

小鼠胚胎体外发育培养基中氨基酸含量变化

钱怀剑 丁彪 彭丽婵 杨京霞 刘一飞 李文雍 *

(安徽大学生命科学学院 合肥 230039; 安徽农业大学动物科技学院 合肥 230036;
阜阳师范学院生命科学学院 阜阳 236041)

摘要:通过检测哺乳动物早期胚胎体外发育过程中可以消耗或生成某些氨基酸的含量,可以了解胚胎的发育潜能。利用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)检测KSOM_{aa}培养基中17种氨基酸含量的变化,了解昆明小白鼠(*Mus musculus*)植入前胚胎体外培养过程中氨基酸含量的变化,旨在寻找一种能有效支持昆明小鼠胚胎体外发育的培养基氨基酸组成,优化小鼠胚胎体外培养体系。将180枚原核胚分为9组,体外培养至囊胚,分别于胚胎发育不同时期取样做高效液相色谱分析。这些氨基酸在胚胎发育不同时期的培养基中含量变化可分为5种类型:在2细胞期增加但在4细胞期、8~16细胞期减少,囊胚期又增加的氨基酸(甘氨酸、亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸);在胚胎发育各个时期均下降(谷氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、组氨酸);在胚胎发育各个时期均增加(丝氨酸、赖氨酸、丙氨酸);2细胞期含量减少而在其他时期持续增加(天冬氨酸、脯氨酸、色氨酸);囊胚期减少,其他时期都有增加(异亮氨酸)。

关键词:氨基酸;小鼠;胚胎;体外培养;高效液相色谱

中图分类号:Q492 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2010)01-130-05

Uptake of a Mixture of Amino Acids on Mouse Embryo Development in Vitro

QIAN Huai-Jian DING Biao PENG Li-Chan YANG Jing-Xia
LIU Yi-Fei LI Wen-Yong *

(College of Life Science, Anhui University, Hefei 230039;
College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;
College of Life Science, Fuyang Normal University, Fuyang 236041, China)

Abstract Preimplantation embryos consume and produce amino acids in a manner dependent upon their developmental stages, and detection of embryo metabolism may be predictive of subsequent viability. The consumption and production of amino acids by *in vitro* produced mouse preimplantation embryos were examined to seek for an effective amino acid composition for embryo *in vitro* development and optimize culture system. A total of 480 zygotes were collected from the oviducts of superovulated mice and these zygotes were cultured with KSOM_{aa} containing Eagle's essential amino acids and non-essential amino acids. The content of glycine, leucine, threonine, valine, phenylalanine, and tyrosine in the culture medium increased at 2-cell stage, while decreased at 4-cell or 8 - 16 cell stages, but subsequently increased by blastocyst stage. The content of glutamic

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30570922, 30871415), 安徽高校省级自然科学研究规划项目 (重点) (No. KJ2008A136);

* 通讯作者, E-mail: liwyfyu@yahoo.com.cn;

第一作者介绍 钱怀剑,男,硕士研究生,研究方向:分子发育生物学; E-mail: qhj200650@163.com.

收稿日期:2009-07-10, **修回日期:**2009-11-11

acid, methionine, arginine, and alanine decreased from 2-cell stage to blastocyst stage. The content of serine, lysine and alanine showed continuous increase during embryo development. The content of aspartic acid, proline, and tryptophan decreased at 2-cell stage, but increased in the following stages. The content of isoleucine increased at all stages except for blastocyst stage.

Key words Amino acid; Mouse; Embryo; *In vitro* culture; HPLC

氨基酸是构成生物体蛋白质、DNA和RNA的最基本的物质,是细胞进行正常代谢、维持生命的物质基础,是生物体内不可缺少的营养成分之一。体外培养环境中氨基酸对胚胎的发育具有促进作用^[1-2],胚胎在不含有外源氨基酸的培养液中哪怕只停留5 min也会严重影响其发育潜力^[3]。目前应用于各种动物胚胎体外培养的氨基酸都是Sigma或Gibco公司为培养细胞开发的产品(商品氨基酸),使用添加商品氨基酸的培养液培养胚胎,都得到了较不添加氨基酸更高的囊胚率和囊胚细胞数^[4]。商品非必需氨基酸(nonessential amino acid, NEAA)能促进早期胚胎的前期发育,而商品必需氨基酸(essential amino acid, EAA)对早期胚胎的前期发育不仅没有促进作用,反而会降低胚胎活力,使囊胚率下降^[5]。本实验以昆明小鼠体内受精胚胎(原核胚)为实验材料,以添加氨基酸和不添加氨基酸培养基为对照,通过柱前衍生高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)分析在胚胎发育不同时期培养基中氨基酸含量的变化,旨在寻找能有效支持昆明小鼠体外胚胎发育所需氨基酸浓度的培养基,从而优化小鼠胚胎体外培养体系,减少由于氨基酸浓度差异所带来的胚胎发育异常,为提高哺乳动物胚胎体外培养效率提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验动物为清洁级昆明小白鼠,雌性小鼠为6~8周龄,120只;雄性小鼠为10周龄以上,30只。购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 试剂和药品 孕马血清(pregnant mare

stimulation gonadotropin, PMSG, 宁波第二激素厂);人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG, 宁波第二激素厂);Venusil-AA氨基酸分析试剂盒(北京艾杰尔科技公司);乙腈(acetonitrile, TED A公司);甲醇(TED A公司);正己烷(天津市博迪化工有限公司);醋酸钠(无锡市展望化工试剂有限公司);其他无特别说明的试剂均购自Sigma公司。

1.3 主要仪器 倒置显微镜(Olympus, CKX-31),实体显微镜(Olympus, SZX-10),CO₂培养箱(Shellab, 2424/2-2),高速冷冻离心机(Sigma, 3K30),pH仪(雷磁PH5J-3F,梅特勒-托利多仪器上海有限公司);显微图像管理系统(leika, DML);高效液相色谱仪(日本岛津公司, LC-20AT)。

1.4 主要试剂与培养液配制 小鼠胚胎培养液(KSOMaa)按文献^[6]配方配制,配制完毕后过滤除菌,置于4℃保存。将1000 U的孕马血清(PMSG)促性腺激素溶于10 ml生理盐水中,0.5 ml离心管分装。置于4℃保存。将1000 U的人绒毛膜促性腺激素(HCG)溶于10 ml生理盐水中,0.5 ml离心管分装。置于4℃保存。流动相A:称取15.2 g醋酸钠,加水1850 ml,溶解后用冰醋酸调pH至6.5,然后加乙腈140 ml,混匀,用0.45 μm滤膜过滤。流动相B:80%乙腈。正亮氨酸内标溶液:取正亮氨酸约10 mg,加0.1 mol/L盐酸溶液10 ml使其溶解,混匀。

1.5 色谱条件及洗脱程序 色谱柱为Venusil-AA氨基酸分析柱:4.0 mm ×150 mm;检测波长254 nm,柱温40℃;洗脱程序为二元梯度洗脱,见表1。

表 1 流动相洗脱梯度

Table 1 Condition of gradient separation

时间 Time (min)	12	17	22	27	28	31	31.01	35
流动相乙腈 Acetonitrile (%)	9	15	35	90	100	100	0	stop

1.6 小鼠植入前胚胎获取及体外培养 选择 28~35 日龄,体重大于 25 g 的昆明雌鼠,腹腔注射 PMSG 10 U,48 h 后腹腔注射 HCG 10 U,与雄鼠按照 2 进行合笼,次日清晨检查阴栓。注射 HCG 后 22 h 左右颈椎脱臼法处死见栓雌鼠,取出输卵管,于无菌间内在体视显微镜下获取原核胚,20 枚 /50 μ l 置于 37 \pm 5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养(培养液滴用石蜡油覆盖,培养箱中预热 4 h 以上)。移入时记为 0 h,24 h 观察 2 细胞率,48 h 观察 4 细胞率,72 h 观

察 8~16 细胞率,96 h 观察囊胚率。

1.7 分离测定 取滤液 2 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.8 统计分析 采用 SPSS 和 Excel 软件,使用 LSD、Duncan 分析方法对实验数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 小鼠早期胚胎 小鼠早期胚胎培养结果见图 1。

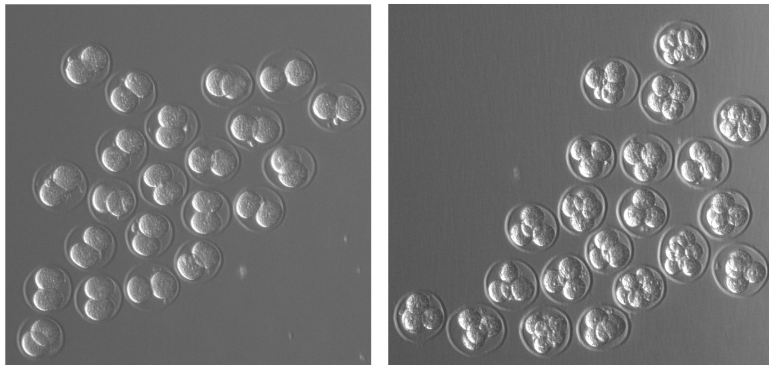


图 1 体外培养条件下不同发育阶段的小鼠胚胎 (\times 100)

Fig 1 In vitro development of mouse zygotes derived from oviduct

左: 2 细胞期胚胎,培养 24 h;右: 4 细胞期胚胎,培养 48 h。

Left: The arrows show the 2-cell embryo, 24 h after IVF; Right: The arrows show the 4-cell embryo, 48 h after IVF.

2.2 胚胎培养基中 17 种氨基酸变化 小鼠植入前胚胎培养基中氨基酸含量的净消耗与净生成是将胚胎发育各个时期的培养基与未添加胚胎的培养基进行比较得出的。本研究检测了植入前胚胎的 4 个不同发育时期,包括 2 细胞期、4 细胞期、8~16 细胞期以及囊胚期,与未加胚胎的空白培养基相比较,得出其含量变化。这些在胚胎发育不同时期培养基中氨基酸含量的变化可分为 5 种情况: 2 细胞期增加而在 4 细胞期以及 8~16 细胞期减少,然后在囊胚期

又增加,属于这一类型的有:甘氨酸、亮氨酸、苏氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸; 胚胎发育各个时期均降低,这一类型的氨基酸有:谷氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、组氨酸; 在胚胎发育各个时期持续增加,这一类型的氨基酸有:丙氨酸、丝氨酸、赖氨酸; 2 细胞期含量减少但在以后的各个时期持续增加,这一类型的氨基酸有:天冬氨酸、脯氨酸、色氨酸; 囊胚期减少,但之前的各个时期都有增加,这类氨基酸只有异亮氨酸(表 2)。

表 2 培养基中氨基酸含量变化表 ($n=9, \text{mmol/L}$)

Table 2 Amino acid net depletion and net increase in vitro culture medium

氨基酸 Amino acids	初始培养基 Content in KSOM	2细胞期 2-cell embryos		4细胞期 4-cell embryos		8~16细胞期 8-16 cell embryos		囊胚 Blastocysts	
		含量	差值	含量	差值	含量	差值	含量	差值
		Content	Difference	Content	Difference	Content	Difference	Content	Difference
天冬氨酸 Aspartate	0.079	0.072	-0.007	0.114	0.035	0.068	-0.010	0.153	0.074
谷氨酸 Glutamate	0.581	0.261	-0.320	0.065	-0.514	0.053	-0.527	0.013	-0.568
丝氨酸 Serine	0.495	0.680	0.185	0.762	0.267	0.418	-0.076	1.025	0.53
甘氨酸 Glycine	0.082	0.097	0.015	0.119	0.037	0.052	-0.029	0.148	0.066
组氨酸 Histidine	0.052	0.018	-0.034	0.016	-0.034	0.015	-0.036	0.030	-0.022
精氨酸 Arginine	0.034	0.035	0.001	0.042	0.008	0.022	-0.011	0.063	0.029
苏氨酸 Threonine	0.066	0.072	0.006	0.086	0.020	0.052	-0.013	0.133	0.067
丙氨酸 Alanine	0.036	0.040	0.004	0.050	0.014	0.031	-0.004	0.069	0.033
脯氨酸 Proline	0.041	0.041	0.000	0.051	0.010	0.027	-0.013	0.075	0.034
苏氨酸 Tyrosine	0.033	0.037	0.004	0.045	0.011	0.025	-0.008	0.067	0.034
缬氨酸 Valine	0.076	0.081	0.005	0.101	0.025	0.056	-0.019	0.143	0.067
蛋氨酸 Methionine	0.036	0.020	-0.016	0.024	-0.012	0.013	-0.023	0.035	-0.001
异亮氨酸 Isoleucine	0.072	0.076	0.004	0.093	0.021	0.052	-0.019	0.066	-0.006
亮氨酸 Leucine	0.073	0.079	0.006	0.100	0.026	0.054	-0.019	0.142	0.069
苯丙氨酸 Phenylalanine	0.140	0.152	0.012	0.216	0.076	0.102	-0.037	0.276	0.136
色氨酸 Tryptophan	0.076	0.081	0.005	0.106	0.030	0.063	-0.012	0.133	0.057
赖氨酸 Lysine	0.106	0.121	0.015	0.153	0.047	0.109	0.003	0.181	0.075

负值表示净减少,正值表示净增加。Negative values mean net depletion and positive values means net increase.

3 讨论

哺乳动物胚胎体外发育受到很多因素的影响,其中氨基酸对其发育具有非常重要的影响。无论是作为能量底物,还是作为活性物质,氨基酸都能促进哺乳动物胚胎体外发育。许多研究者证实了天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸可显著提高囊胚发育率^[7]。甘氨酸和谷氨酰胺可以作为有效的维持胚胎容积的渗透压剂而支持胚胎的体外发育^[8]。郑云胜等^[9]证实牛磺酸对绵羊体外受精胚胎的发育具有促进作用。邓星等^[10]也发现0.5倍浓度氨基酸对8细胞期胚胎的体外发育有促进作用,但含有高浓度氨基酸的培养液培养效果反而有所下降,这可能是由于高浓度的氨基酸影响胚胎的代谢和渗透压的改变,且氨基酸分解及胚胎代谢所产生的氨对胚胎有毒性作用。

本实验主要检测了昆明小鼠植入前胚胎体外发育培养基中17种氨基酸含量变化,不包括谷氨酰胺、天冬酰胺、半胱氨酸。但是谷氨酰胺

在早期胚胎发育中可作为还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)的前体源源不断合成细胞内不断消耗的GSH,在改善和拮抗活性氧 (reactive oxygen species, ROS)的应激作用方面有着非常重要的作用^[11];半胱氨酸和胱氨酸,由于其分子结构中含有能与活性氧强结合的巯基,也能在一定的程度上保护含有巯基的酶类不被活性氧所损伤;天冬酰胺可能对胚胎发育过程中代谢和氨基酸降解产生的氨具有清除作用^[12]。进一步将重点研究谷氨酰胺等在胚胎发育过程中的变化情况。

本研究表明,胚胎培养过程中会释放大量的丙氨酸,推测是胚胎将过量的氨合成丙氨酸并作为清除胚胎内氨的一种方式释放到溶液中^[13-14]。另外持续消耗谷氨酸、精氨酸等;推测谷氨酸和氨在谷氨酰胺合成酶的作用下生成谷氨酰胺,将有毒的氨转化成谷氨酰胺的形式,并在肾分解为谷氨酸和氨,氨随尿液排出体外;精氨酸可能作为尿素循环中的一个很重要的因素,对胚胎代谢和氨基酸降解产生的氨进行清

除^[15]。而其他氨基酸,例如:甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸、天冬氨酸、苏氨酸、异亮氨酸等在胚胎不同发育时期需求不同,这些氨基酸有的是有效维持胚胎容积的渗透压剂,它们在胚胎内的积累能对抗环境中较高的渗透压,保持胚胎容积的大小,支持胚胎继续发育^[14-16]。

无论是净增加还是减少的氨基酸均包括必需氨基酸和非必需氨基酸两类。表明非必需氨基酸和必需氨基酸对哺乳动物早期胚胎的发育具有不同的作用,非必需氨基酸和谷氨酰胺能促进早期胚胎的发育,提高小鼠胚胎2细胞和4细胞的卵裂率,缩短胚胎最初3次卵裂的时间,而必需氨基酸对早期胚胎的前期发育不仅没有促进作用,反而会降低胚胎活力,使囊胚率下降^[17]。这些结果均表明,哺乳动物早期胚胎体外培养的培养基中氨基酸含量变化与以下因素有关:氨基酸种类、胚胎发育时期。由此可以看出,小鼠早期胚胎发育对不同氨基酸需求不同,而同种氨基酸在不同时期的含量变化也不同。这对于研究单个氨基酸或多种氨基酸组合对胚胎体外发育的影响,及胚胎在不同卵裂时期对各种氨基酸量的需求,从而提高早期胚胎体外培养的发育率有重要的意义^[14]。在此基础上,研究胚胎在不同卵裂时期使用不同氨基酸的培养体系,人类定能开发出类似于输卵管和子宫生理条件的培养系统,精确模拟胚胎发育的早期环境,为各种动物体外胚胎的高效生产提供保障。

参 考 文 献

- [1] Hammer M A, Kolajva M, L'éveill'ém, et al Glycine transport by simple human and mouse embryos Hum Reprod, 2000, 15 (2): 419 - 426.
- [2] Cho J, Park S, Chung H, et al Improved development of ICR mouse 2-cell embryos by the addition of amino acids to a serum-, phosphate- and glucose-free medium. J Vet Med Sci, 2002, 64 (9): 797 - 801.
- [3] Jones B N, Gilligan J P. o-Phthalaldehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids J Chromatogr, 1983, 266: 471 - 482.
- [4] Suzuki C, Yoshioka K, Sakatani M, et al Glutamine and hypotaurine improves intracellular oxidative status and *in vitro* development of porcine preimplantation embryos Zygote, 2007, 15 (4): 317 - 324.
- [5] Lane M, Gardner D K Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions J Reprod Fert, 1994, 102: 305 - 312.
- [6] 纳吉 A, 玛丽娜·格特森斯坦, 克里斯蒂娜·文特斯滕, 等: 孙青原, 陈大元主译. 小鼠胚胎操作实验手册 (3版). 北京: 化学工业出版社, 2005, 146 - 148.
- [7] Lee E S, Yutaka F B, Byeong C Promoting effect of amino acids added to a chemically defined medium on blastocyst formation and blastomere proliferation of bovine embryos cultured *in vitro* Anim Reprod Sci, 2004, 84 (3/4): 257 - 267.
- [8] Hadi T, Hammer M A, Algire C, et al Similar effects of osmolarity, glucose, and phosphate on cleavage past the 2-cell stage in mouse embryos from outbred and F1 hybrid females Biol Reprod, 2005, 72 (1): 179 - 187.
- [9] 郑云胜, 张家新, 陈玉琦, 等. 氨基酸和牛磺酸对绵羊体外受精胚胎体外培养的影响. 中国畜牧杂志, 2004, 40 (3): 16 - 18.
- [10] 邓星, 王爽, 黄吴键, 等. 氨基酸浓度对昆明小鼠胚胎体外发育的影响. 第一军医大学学报, 2005, 25 (3): 256 - 261.
- [11] Fumus C C, de Mats D G, Picco S, et al Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes Anim Reprod Sci, 2008, 109 (1/4): 88 - 99.
- [12] 周顺伍. 动物生物化学 (3版). 北京: 中国农业出版社, 2000, 155 - 158.
- [13] Humpherson P G, Leese H J, Stumey R G Amino acid metabolism of the porcine blastocyst Theriogenology, 2005, 64 (8): 1852 - 1866.
- [14] Booth P J, Humpherson P G, Watson T J, et al Amino acid depletion and appearance during porcine preimplantation embryo development *in vitro* Reproduction, 2005, 130 (5): 655 - 668.
- [15] Partridge R J, Leese H J. Consumption of amino acids by bovine pre-implantation embryos Reproduction, Fertility and Development, 1996, 8 (6): 945 - 950.
- [16] Houghton F D, Hawkhead J A, Humpherson P G, et al Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. Hum Reprod, 2002, 17 (4): 999 - 1005.
- [17] Lane M, Gardner D K Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro* J Assist Reprod Genet, 1997, 14 (7): 398 - 403.