维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2003)05 - 0564 - 04

恶性肿瘤细胞生长液培养早期胚胎的实验研究

杨 竹[1], 赵 颉[2], 胡丽娜[1], 谭 毅[3], 王智彪[2]

(1. 重庆医科大学第二临床学院妇产科, 重庆 400010, 2. 重庆医科大学超声工程研究所, 重庆 400016, 3. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016)

【摘 要】目的:寻找一种体外胚胎培养的良好培养液。方法:小鼠交配后第 4 天取胚胎,分别用肾癌细胞株 GRC - 1 的生长液和基础胚胎培养液(FD + 20% 胎牛血清)进行体外培养,观察胚胎的脱带率、贴壁率和扩展率。结果:肾癌细胞株 GRC - 1 的生长液可使体外培养胚胎的脱带率、贴壁率和扩展率分别达到 89.68%、86.51% 和 84.92%,远远高于对照组的脱带率、贴壁率和扩展率($P<0.01$)。结论:肾癌细胞株 GRC - 1 的生长液对体外胚胎培养具有明显的促进作用。

【关键词】肾癌细胞株 GRC - 1;组织培养;小鼠;胚胎

【中国图书分类法分类号】R73 - 351 【文献标识码】A 【收稿日期】2002 - 10 - 25

Experimental study on embryo culturing medium of malignant tumor growth fluid

YANG Zhu, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To find a good culture medium for embryo development in - vitro. *Methods*: D4 mouse embryo was cultured with carcinoma of kidney GRC - 1 growth fluid and FD + 20% fetal calf serum respectively in - vitro and the rate of zona - hatching, attachment and trophoblast outgrowth were compared respectively. *Results*: The rate of zona - hatching, attachment and trophoblast outgrowth with GRC - 1 were 89.68%, 86.51 % 和 84.92%, respectively. These were significantly higher than those of the control group ($P<0.01$). *Conclusion*: GRC - 1 growth fluid is a kind of good culture medium for growth and development of mouse embryo in - vitro.

【Key words】GRC - 1; Culture; Mouse; Embryo

哺乳动物的繁衍生殖过程非常复杂有趣,围着床期的胚胎生长发育的分子调控机理,一直是科学家研究的重点和难点;由于这一时期体内胚胎的生长影响因素太多,调控机制非常复杂,体内体外研究都具有较高难度;而早期胚胎的生理调节网络机制又十分重要,认识和掌握这一机制,不仅可以帮助我们了解生命起源的奥妙,提高辅助生育技术的成功率;而更重要的是早期胚胎滋养层细胞的分化和浸润与恶性肿瘤细胞向正常组织细胞的浸润非常相似[1],因此,我们将从胚胎生长、滋养层细胞的浸润过程中得到启示,而达到认识肿瘤, 消灭肿瘤的目的。为了便于研究,建立一种体外胚胎的模型,找到一种体外胚胎培养的良好方法就非常重要。而在胚胎体外培养中,良好的培养液尤其重要;目前常用的胚胎培养液种类较多,包括 Ham s - F_{12}、Hams - F_{10}、DMEM、RPMI - 1640、BME、NCTC - 135、CMRL 等;为了改善胚胎的生长情况,还添加谷氨酰胺、乳酸纳、小牛血清、胎牛血清、牛血清白蛋白、雌激素、孕激素、生长因子等。近年来,还建立起胚胎体外共培养体系[2,3],目的都在于提高体外胚胎的培养成功率;但胚胎的生长情况依然不够理想,我们的实验目的在于寻找一种良好的体外胚胎培养液,为进一步的研究提供基础。

作者介绍:杨 竹(1964 -),女,主治医师,博士生,主要研究方向:生殖与胚胎。

基金资助:国家自然科学基金资助项目(30000064)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

一级 NIH 小白鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供,

维普资讯 http://www.cqvip.com

合格证号:24301042。雌雄小鼠 50～60 天龄,雌鼠体重 25～35g,雌雄按 1:2 配种,自然交配,次日晨有阴栓者为妊娠第 1 天。

1.2 主要设备

二氧化碳孵箱(Shel－Lab TC2323,美国)、Olympus 高级倒置显微镜(1×70,日本)、OlympusPM－C35 照相机(日本)。

1.3 主要试剂

Ham's－F12 和 DMEM 培养基(Sigma)、胎牛血清(GIBCO),购于美国 sigmaCo;1640 购于北方同正公司;人肾癌细胞株 GRC－1 由我校王德林博士惠赠(美国 ATCC 提供),属颗粒细胞类型。

1.4 基础培养液的制备

将 Ham's－F12 和 DMEM 按 1:1 溶解于蒸馏水中,常规加入青霉素、链霉素、谷氨酰胺、碳酸氢纳;加入 20% 胎牛血清,过滤。

1.5 条件培养液的制备

先用 1640 加 10% 小牛血清培养肾癌细胞 2～3 天,然后去掉培养液,改用基础胚胎培养液(FD 加 20% 的胎牛血清)再培养 8h,收集上清液过滤备用。

1.6 小鼠胚胎的准备

有阴栓的雌鼠于第 4 天下午 3 点脱颈处死,用常规方法解剖小鼠,获得子宫,用生理盐水从输卵管端冲洗子宫腔,显微镜下吸出胚胎,放入 96 孔板培养。

1.7 研究方法

采用随机对照研究方法,将获得的胚胎随机分入实验组和对照组。

1.7.1 实验组胚胎培养方法 第 1 天全部用肾癌细胞产生的条件培养液,第 2 天换用 FD 加 20% 的基础胚胎培养液,以后每天换液,加入条件和基础培养液各 50μl。每天显微镜下观察胚胎生长情况,并对脱带、贴壁和扩展的细胞记数并照相。

1.7.2 对照组胚胎培养方法 培养液是基础胚胎培养液(FD＋20% 胎牛血清)＋雌激素(7.14nmol/L)＋孕激素(63.5nmoL/l)＋胰岛素(100ng/ml)。每日更换培养液并观察显微镜下胚胎的生长情况。

1.8 培养条件

5% 的 CO_2＋95% 的空气,37℃,相对湿度 70%,pH 值 7.4。

1.9 比较两组胚胎光镜下的脱带率、贴壁率和扩展率。

1.10 全部操作固定由 1 人完成。

1.11 统计学分析 χ^2 检验。

2 结 果

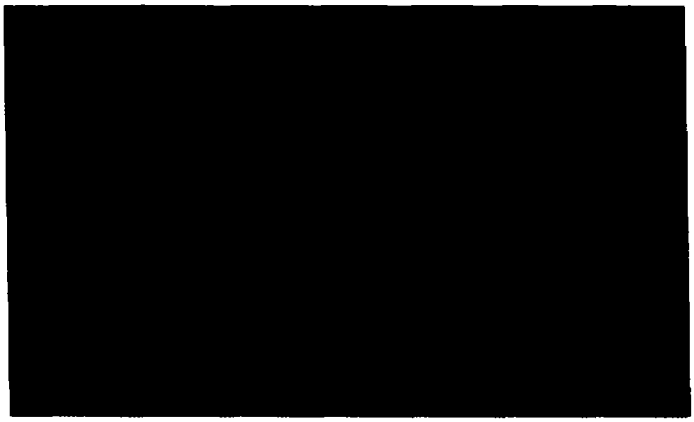


图 1 实验组胚胎培养 48h 光镜下的脱带情况放大倍数:10×3.3×10×1.5



图 2 实验组胚胎培养 48h 光镜下的贴壁情况放大倍数:10×3.3×10×1.5

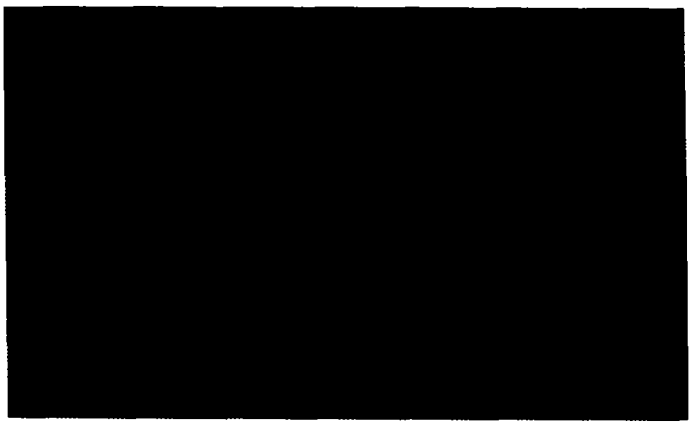


图 3 实验组胚胎培养 72h 光镜下的扩展情况放大倍数:10×3.3×10×1.5

对照组胚胎培养 24h 后没有进入脱带期的,培养 48h 后,共有 28 个胚胎进入脱带期;培养 72h 后,有 22 个进入贴壁期,培养 96h 后,有 18 个胚胎进入扩展期。实验组胚胎培养 24h 后有 28 个进入脱带期(见图 1),到 48h 后共有 113 个进入脱带期;48h

维普资讯 http://www.cqvip.com

到 72h 共有 109 个胚胎进入贴壁期（见图 2）；培养 72h 后，可见大量清晰的扩展现象，到 96h 共有 107 个胚胎进入扩展期：此时见分化的滋养细胞形成多型巨细胞，向四周伸展，扩张，内细胞团位于中央（见图 3）。实验组的扩展细胞可培养到 8～9 天，一般 5 天后扩展细胞处于静止状态，不再发展；以后逐渐出现多型细胞的空化、死亡。两组胚胎的脱带率、贴壁率、扩展率比较见表。两组间明显的差异，具有统计学意义（$P<0.01$）。

表 1 两组胚胎的脱带率、贴壁率和扩展率

组别	对照组（$n=156$）			研究组（$n=126$）			P		
培养时间	脱带（%）	贴壁（%）	扩展（%）	脱带（%）	贴壁（%）	扩展（%）	脱带	贴壁	扩展
≤24h	0	0	0	22.22	0	0	**		
24～48h	17.9	0	0	67.46	22.22	0	**	**	
48～72h	0	14.1	0	0	64.29	21.43		**	**
72～96h	0	0	11.5	0	0	63.49			**

3 讨 论

哺乳动物的胚胎在体内从受精卵历经卵裂到囊胚期，脱离透明带，贴附并植入子宫内膜，完成着床。着床是几乎全部的哺乳动物完成生殖繁衍的基础和关键之一；着床机制出现紊乱或异常，易造成流产、不孕；而滋养层细胞分化和向子宫内膜的浸润与着床密切相关，其侵蚀行为与肿瘤细胞相似；因此，长期以来，着床前胚胎细胞的增殖、分化以及这些变化的调控机制，都是医学界关注的热点问题。胚胎在体外培养时，会出现脱带、贴壁和扩展。扩展过程中，滋养层的细胞分化为多核、不规则的巨细胞，胚胎从立体结构转化为扁平结构，囊胚腔消失，而内细胞团基本上位于中央区。无论是体内还是体外，胚胎的生长和发育，除了依赖丰富的营养物质如氨基酸、无机盐、有机盐等，还需要雌激素孕激素和大量局部的旁分泌、自分泌和并分泌调控因子，如原癌基因和癌基因、细胞因子、生长因子、黏附分子、同源基因产物、蛋白水解酶、细胞外基质、前列腺素[4,5]等；而其调控机制更为复杂，目前人们对此知之甚少。人们正试图从体外胚胎培养模型中，了解胚胎发育过程中的变化，但目前体外胚胎培养的脱带率、贴壁率和扩展率都较低，这不仅给进一步的研究带来困难，且需要的实验动物量大，因此，寻找一种好的胚胎培养液，提高胚胎的脱带率、贴壁率和扩展率就非常重要。目前常用的培养液有 Ham s－F_{12}、Ham s－F_{10}、DMEM、RPMI－1640、BME、NCTC－135、CMRL 等；使用不同的培养液，所得到的胚胎的脱带率、贴壁率和扩展率不尽相同。李真等用 Ham s－F_{12}培养的小鼠胚胎，其脱带率、贴壁率和扩展率分别是 22.60%、18.07%和 19.10%[6]；为了改善胚胎的生长情况，有研究者还在这些培养液中添加雌激素、孕激素、各种生长因子如 LIF、EGF、AR、TGF－α、HB－EGF 等[7～9]，但由于胚胎生长微环境的复杂性，在体外只有单因素改变时，不能完全反映胚胎的生长发育情况，因此研究结果也。只能部分说明这些因素的作用和功能。Bo Sun Joo[3]等用人类的输卵管细胞与小鼠胚胎进行共培养，结果共培养中胚胎的脱带率为 32%，而对照组仅 0。但这些结果都明显低于我们实验组的结果。我们的实验研究发现，人肾癌细胞生长液使得小鼠胚胎在体外培养的脱带率、贴壁率和扩展率分别达到了 89.68%、86.51%和 84.92%，远远高于对照组的结果（$P<0.01$）这不仅表明肾癌细胞生长液对体外胚胎的发育、透明带的孵化、滋养层细胞的扩展具有良好的促进作用，而且提示在恶性肿瘤细胞生长液中可能含有大量的物质，这些物质较雌激素、孕激素和胰岛素对胚胎的促进作用更明显。如果恶性肿瘤生长液对胚胎无其它不良作用，无疑，它将是一种很好的体外胚胎的培养液，可提高胚胎培养的成功率。

肾癌细胞生长液促进胚胎体外发育可能的原因分析：目前对哺乳动物的早期胚胎的信号转导研究认为，雌激素和孕激素需要通过诱导局部子宫内膜分泌各种细胞因子、生长因子、黏附分子等等发挥促进早期胚胎生长发育的作用[10]，在这些因子中，EGF 及其受体家族是研究比较多和肯定的，许多学者都证明 EGF 可显著提高胚胎在体外的增殖、分化、贴附和扩展[11]。最新的研究发现 EGF 主要通过诱导囊胚的 u－PA 和 MMP－9 的表达而直接参与了滋养层细胞的分化和启动早期着床[12]。HB－EGF 也是一个与早期胚胎发育密切相关的因子，它促进囊胚的生长、透明带的孵化和扩展[13]。另一方

维普资讯 http://www.cqvip.com

面表皮生长因子家族及其受体家族在胰腺癌、肺癌、外阴癌[14,15]等人类的绝大多数恶性肿瘤中都表现为超表达，且与肿瘤的浸润、转移、预后有密切关系。因此，我们认为恶性肿瘤细胞生长液表现出的促进胚胎细胞生长发育的能力可能与其分泌产生的生长因子有关。其次在恶性肿瘤中，大量的原癌基因和癌基因都被激活并过度表达，这些过度表达的基因产物与肿瘤的发生和侵袭转移密切相关；而令人惊讶的是正是这些过度表达的基因产物同时与胚胎细胞早期发育和胚胎着床等正常生理过程的信号转导密切相关。Tetents F 等用 RT－PCR。发现在妊娠 13～14 天小牛胚胎中，原癌基因 c－fos、c－jun、c－ha－ras、c－myc 等有表达；当在体外胚胎培养中加入 TGFα 和 EGF 后，可以诱导出 c－fos 的 mRNA 和 c－myc 的蛋白表达[16]；p21ras 在肝癌细胞中成高表达，它参与了蛋白酪氨酸激酶生长因子受体信号转导；而在 4－细胞期到囊胚期的小鼠胚胎细胞中也有 p21ras 的表达，V－H－ras 单可隆抗体能显著抑制体外培养胚胎桑葚胚至晚期囊胚的发育。此外恶性肿瘤细胞旺盛的增殖生长，减少了对胚胎有损害作用的活性氧(ROS)并激活低氧信号转导通路，消耗了一些代谢产物和自由基等，亦可促进胚胎的发育[17]。当然，这些可能的原因需要进一步的实验去验证。

参 考 文 献

[1] Smith SK. Angiogenesis and implantation[J]. Hum Reprod, 2000; 15 (s6): 59－66.

[2] Xu JS, Cheung TM, Chan ST, et al. Temporal effect of hmnan oviductal cell and its derived embryotrophic factors on mouse embryo development[J]. Biol Reprod, 2001; 65(5): 1481－1488.

[3] Joo BS, Kim MK, Na YJ, et al. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo－to－cell contact and the removal of deleterious components[J]. Fertii Sterii, 2001; 75(1): 193－199.

[4] Song H, Lim H, Das SK, et al. Dysregulation of EGF family of growth factors and COX－2 in the uterus during the preattachment and attachment reactions of the blastocyst with the luminal epithelium correlates with implantation failure in LIF－deficient mice[J]. Mol Endocrinol, 2000; 14(8): 11147－11161.

[5] Das C, Kumar VS, Gupta S, et al. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells[J]. J Reprod Immunoi, 2002; 53(1－2): 257－268.

[6] 李 真，顾美礼，王智彪，等. 小鼠胚胎分泌生长因子的量与胚胎质量的关系[J]. 第三军医大学学报，2000; 22(7): 673－675.

[7] Merviei P, Evam－Brion D, Challier JC, et al. The molecular basis of embryo implantation in humans[J]. Zentralbl Gynakol, 2001; 123(6): 328－339.

[8] Tamada H, Higashiyama C, Takano H, et al. The effects of heparm－binding epidermal growth factor－like growth factor on preimplanation－embryo development and implantation in the rat[J]. Life Sci, 1999; 64(22): 1967－1973.

[9] De La Fueme R, O'Brien MJ, Eppig JJ. Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes[J]. Hum Reprod, 1999; 14(12): 3060－3068.

[10] Paria BC, Song H, Dey SK. Implantation: molecular basis of embryo－uterine dialogue[J]. Int J Dev Biol 2001; 45(3 SpecNo): 597－605.

[11] Wang J, Mayemik L, Schuttz JF, et at. Acceleration of trophoblast differentiation by heparin－binding EGF－like growth factor is dependent on the stage－specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts[J]. Development, 2000; 127(1): 33－44.

[12] Afonso S, Tovar C, Romagnano L, et at. Control and expression of cystatm C by mouse decidual cultures[J]. Mol Reprod Dev, 2002; 61(2): 155－163.

[13] Seshagiri PB, Mishra A, Ramesh G, et al. Regulation of pen－attachment embryo development in the golden hamster: role of growth factors[J]. J Reprod Immunol, 2002; 53(1－2): 203－213.

[14] Wagner M, Weber CK, Bressau E et al Transgenic overexpression of amphiregulin induces a mitogemc response selectively m pancreatic duct cells[J]. Gastroenterology, 2002; 122(7): 1898－1912.

[15] Wu X, Xin Y, Yao J, et al. Expression of epithelial growth factor receptor and its two ligands, transforming growth factor－alpha and epithelial growth factor, in normal and neoplastic squamous cells in the vulva: an immunohistochemical study[J]. Med Electron Microsc, 2001; 34(3): 179－184.

[16] Paria BC, Ma W, Tan J, et al. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001; 98(3): 1047－1052.

[17] Avraham Ben－Chetrit, M. D. Andrea Jurisicova, M, Sc. Robert F. Casper, MD. Coculture with ovarian cancer cell enhances human blastocyst formation in vitro[J]. Fertility and Sterility 1996; 65(3): 664－666.