维普资讯 http://www.cqvip.com

134-137

9

文章编号：0253-3626(2000)02-0134-04

R321.3

小鼠囊胚在人羊膜上着床行为的实验研究

谭　毅[1]，顾美礼[1]，艾　玲[2]，白　晋[2]，王智彪[2]

（1. 重庆医科大学第二临床学院妇产科 400010；2. 重庆医科大学医学超声工程研究所 400010）

摘　要　**目的**：探索用人羊膜作为胚胎着床模型支持材料的可行性。**方法**：将妊娠第四天的小鼠囊胚培养在人羊膜的基膜面，并作病理观察。**结果**：小鼠囊胚能在羊膜上正常脱带、贴附和扩展，其脱带率和贴附率与在培养板中的结果没有差异，但扩展率显著低于在培养板中的值；滋养层细胞对羊膜的基膜有侵入，二者在结构上有交错。**结论**：人羊膜可用作胚胎体外着床模型的建立，是一种有特殊应用价值的生物膜。

关键词　囊胚；人羊膜；着床

小鼠　胚胎着床

中国图书分类法分类号：R321.3　　**文献标识码**：A　　**收稿日期**：1999-11-29

Studies of mouse blastocysts implantation on human amniotic basement membrane

TAN Yi, et al

Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital

Abstract　**Objective**: To develop a new embryo implantation model with human amnion. **Methods**: Culture the mouse blastocysts on day 4 of pregnancy on human amniotic basement membrane and observe microscopically. **Results**: Mice blastcysts developed normally experiencing shedding zona pellucida,attachment and outgrowth.There was no difference between the percentage of blastocysts shedding zona pellucida and attachment cultured on the membrane and in the 96-well plates while the percentage of outgrowing blastocycts on the membrane was significantly lower than that in the plates.However,light microscopic examination indicated that trophoblasts invaded the basement membrane while it was impossible to do so on the plastic or glass surfaces. **Conclusion**: Human amnion could be used as substratum of in vitro model for peri-implantation development of mouse blastocysts.

Key Words　Blastocyst; Human amnion; Implantation

哺乳动物胚胎着床时，胚胎首先与子宫内膜贴附，随后滋养细胞增生分化，侵蚀子宫上皮，逐渐埋入子宫基质。在此过程中，子宫基质细胞分化为蜕膜细胞，并在周围沉积膜样细胞外基质（extracellular matrix，ECM），其主要成分是层粘连蛋白(laminin，LN)、纤粘连蛋白(fibrinectin，FN)、Ⅳ型胶原(Ⅳ collagen)、Vireonectin、Entactin等[1]。从生物学角度来讲，着床的核心过程在于滋养细胞与子宫内膜之间细胞与细胞(cell-cell，C-C)、细胞与细胞外基质(C-ECM)的相互作用。将单一的ECM成分涂于培养基或培养皿/孔，让胚胎或滋养细胞在其上生长，结果表明，LN、FN可以促进滋养细胞的粘附、扩展和迁移[2,3,4]。人足月孕羊膜含有Ⅳ型胶原、LN等ECM，可以作为一种天然基膜，将胚胎培养在羊膜上，不仅可以观察胚胎在ECM的生长行为，而且可制作切片，进行病理或超微结构的观察。已有学者通过将肿瘤细胞和分离的人胎盘滋养细胞在人羊膜上培养来观察它们的侵蚀行为[5,6]，迄今未见有囊胚在人羊膜上着床行为的研究报道。

1　材料和方法

1.1　实验动物

一级NIH小鼠，由重庆医科大学实验动物中心提供，合格证号：24301042。雌鼠体重20～35g，雌雄按3:1合笼，自然交配，次日晨发现有阴栓者为妊娠第1天(D_1)。

1.2　主要设备和试剂

1.2.1　主要设备　超净工作台(SW-CG-IC标准型，苏州安泰空气净化有限公司)、二氧化碳孵化箱(Shel-Lab TC2323,美国)、倒置显微镜(XSZ-D2型，重庆光学仪器厂)、Olympus高级倒置显微镜(IX70，日本)、解剖镜(Motic,日本)、Olympus

作者介绍：谭　毅（1966-09出生），男，副教授，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

光学显微镜(BH2)。

1.2.2 器材：96孔细胞培养板(GIBCO，美国)、Φ5.0cm玻璃表面皿(重庆玻璃仪器公司)、Φ3.0cm×高0.8cm玻璃小培养皿(重庆玻璃仪器公司)、Φ1.5cm×高0.7cm玻璃圈(自制)。

1.2.3 试剂：Ham's F_{12}和DMEM培养基(Sigma产品)、胎牛血清(GIBCO产品)、1.0%氨水(重庆化学试剂总厂，过滤除菌)、无菌生理盐水。

1.3 方法

1.3.1 人羊膜的处理：取健康、足月、剖腹产的人胎膜，在超净工作台上先用无菌生理盐水漂洗干净血迹，然后钝性剥离羊膜与绒毛膜，与绒毛膜接触面为羊膜的基质面，另一面为羊膜的上皮面。将羊膜在1.0%的氨水中洗涤2.0 h，再用生理盐水漂洗6次，此时大部分羊膜上皮崩解、脱落，羊膜呈透明状，残留的上皮细胞呈白点或白斑，清晰可见，可用干燥棉签轻轻擦去。

1.3.2 羊膜培养圈的制作：用丝线将羊膜上皮面朝内固定于玻璃圈的一侧端口，剪去多余羊膜，翻转后移入玻璃小培养皿中，这样，上面开口、底面是羊膜上皮面的培养圈就做成了。备用时，培养圈里加入0.2ml培养液以防羊膜干燥，加盖后保存于普通冰箱的冷藏室。

1.3.3 囊胚的获得与种植：取妊娠4 d小鼠于下午3:00~4:00脱颈处死，剪取双侧子宫角，吸取F_{12}：DMEM(1:1)培养液用4号针头从输卵管端冲洗子宫腔。在解剖镜下挑选发育良好的囊胚，移入已加培养液的羊膜培养圈中进行培养，8~12个囊胚/羊膜圈；培养板中8~10个囊胚/孔。

1.3.4 培养条件：F_{12}：DMEM(1:1)，另加20%胎牛血清，pH值7.4，5%CO_2，37℃,相对湿度70%~90%。

1.3.5 观察拍照：间隔12h观察一次，以水平晃动培养碟，不移动位置者记为贴附囊胚；在已贴附囊胚的周围扩展出滋养层细胞者记为扩展囊胚。记录囊胚脱带、贴附、扩展情况，并在Olympus高级倒置显微镜下拍照。

1.3.6 组织切片：培养48 h后，剪断羊膜圈上固定羊膜的丝线，将羊膜平铺于直径8.0cm的培养皿中。在解剖镜下，确定胚胎的生长位置，将周边多余的羊膜剪去，移入Bouin氏液固定24h，酒精梯度脱水，石蜡切片，HE染色，Olympus光学显微镜下观察拍照。

1.3.7 统计学处理：χ^2检验。

2 结 果

2.1 小鼠囊胚在人羊膜上培养的一般情况

妊娠第四天的小鼠囊胚在羊膜上培养24h后，可见部分囊胚已脱去透明带，脱带胚胎的形状和大小与在培养板中的情形一致，偶见正在脱带的胚胎(见图1)。少数脱带胚胎已贴附于羊膜表面。培养48小时后，可见少数胚胎的初生滋养层多核巨细胞呈放射状大范围扩展(见图2)或者镜下呈亮点散布在胚胎的四周(见图3)。

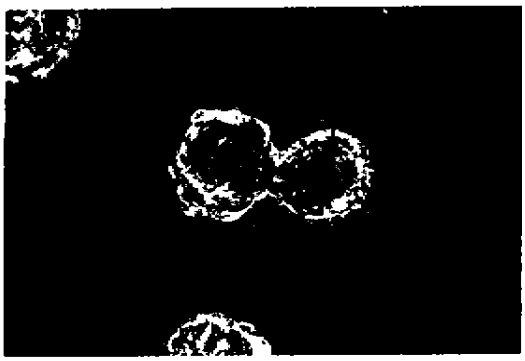


图1 在羊膜上培养24h后，正在脱透明带的囊胚，×200

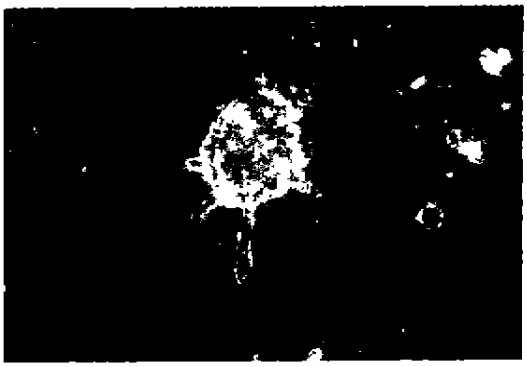


图2 在羊膜上培养48h后，滋养层细胞呈放射状扩展生长，×200



图3 在羊膜上培养48h后，已扩展的滋养细胞呈亮点分布在胚胎周围，×200

2.2 小鼠囊胚在人羊膜上与培养板中生长发育的比较研究

小鼠囊胚在人羊膜上培养24h后，其脱带率、贴附率、扩展率分别为29.2%、12.5%、2.1%，与在培养板中的对应值31.6%、9.6%、0相比，均没有显著性差异($P>0.05$)。培养48h后，两组胚胎累计脱带率分别为60.4%和59.7%、贴附率分别为54.2%和46.5%，仍没有显著差异($P>0.05$)，但是扩展率在羊膜上只有18.4%，而在培养板中高达39.6%，二者差异非常显著($P<0.01$)。仔细分析附表可知，在羊膜

维普资讯 http://www.cqvip.com

表　小鼠囊胚在人羊膜上和培养板中48h时的实际脱带率、贴附率、扩展率

	培养板		人羊膜		P
	48h(n=96)	比例(n=58)	48h(n=114)	比例(n=68)	
脱带率	6.3%(6)	10.3%(6)	13.2%(15)	22.1%(15)*	<0.01
贴附率	14.6%(14)	24.1%(14)	28.1%(32)	47.1%(32)*	<0.01
扩展率	39.6%(38)	65.5%(38)	18.4%(21)	30.9%(21)*	<0.01

上，只有30.9%的已脱带囊胚扩展生长，而47.1%的大部分囊胚尚停留于贴附阶段，另有22.0%的囊胚刚脱带；在培养板中，绝大部分已脱带囊胚都已扩展(65.5%)，处在贴附阶段和刚脱带的胚胎只分别占24.1%和10.4%。结果表明，羊膜对囊胚的脱带和贴附没有影响，但对滋养层细胞的扩展似乎有抑制作用。

2.3　小鼠囊胚在人羊膜上着床行为的病理观察

选择已经贴附和扩展的胚胎作成切片后观察发现，贴附胚胎与羊膜表面的关系并不是简单的机械粘着，而是有滋养层细胞和(或)内细胞团细胞对羊膜的侵蚀，二者结构在接触面上有交错，胚胎边缘与羊膜表面分界清楚，大约成直角关系(见图4)。滋养层细胞已扩展的胚胎与羊膜在接触面上同样有结构的交叉，但其边缘向四周铺展，已与羊膜表面形成连续关系(见图5)。在图4和图5中，可见许多低分化、多核的胚胎细胞，但是囊胚腔不明显。



图4 培养48h的胚胎紧贴在羊膜的基膜面，显示胚胎对膜表面有侵入，×400



图5 培养48h的胚胎在羊膜已扩展生长，×200

3　讨　论

胚胎在体外培养时，顺序出现脱带、贴附和扩展，所谓扩展就是当胚胎培养在塑料或玻璃制造的培养板(皿)中，滋养层细胞沿培养板(皿)的表面向胚胎四周生长迁移。在此过程中，滋养层细胞分化为多核、不规则的巨细胞，胚胎由立体结构转变为扁平结构，囊胚腔消失，内细胞团基本上位于中央位置。当滋养层巨细胞扩展到一定的面积范围时就不再继续向外扩展，此时，内细胞团的细胞重组排列，出现一定的结构，可能正在分化。但是，无论人类还是小鼠，囊胚的滋养层细胞在体内并无扩展生长的现象。滋养层细胞一经贴附就开始增生、分化，并分泌蛋白酶溶解子宫上皮，进而穿过基膜，使胚胎逐渐埋入子宫内膜之中[7]。

羊膜既不同于柔软疏松的子宫内膜，也不同于非生物材料的培养板(皿)，它有一定的厚度，因此胚胎在其上可能首先会有一个侵入的过程。倒置镜下，扩展的滋养层细胞与羊膜上表面不在同一水平面(焦点)上，图2中，滋养层细胞侵入的位置较浅，可见放射状扩展的细胞形态，图3中，滋养层细胞之所以表现为亮点分布在内细胞团的周围和底面，是因为滋养层细胞已侵入羊膜之中，细胞质及细胞间界限不明显，细胞核因密度高、折射光线而表现为亮点状。病理切片和超微结构观察(另文发表)证实了此点分析和观察。据此，实验结果中，脱带囊胚在羊膜上的扩展率低于在培养板的数值并不能说明羊膜对胚胎的扩展生长有抑制作用，因为部分已贴附的胚胎已经或者正在侵入羊膜的基膜，但尚未表现出镜下可识别的扩展特征。

羊膜基膜中的ECM能促进包括滋养层细胞、肿

维普资讯 http://www.cqvip.com

瘤细胞在内的细胞的粘附和迁移。本实验中，小鼠囊胚在羊膜上的贴附率并不显著高于在培养板中的观察结果，其原因可能是处理羊膜的氨水浓度偏高。其他学者[8,9]一般使用0.1%的浓度，而本实验采用的是1.0%，因为这个浓度除去上皮细胞的效果更好。是否1.0%的氨水使ECM蛋白发生了变性还有待于进一步的研究。

正常人羊膜厚约0.02mm～0.05mm,自内而外分为上皮细胞层、基膜、致密层、成纤维细胞层与海绵层，其中羊膜上皮细胞由单层无纤毛立方细胞组成。基膜是位于上皮细胞之下的一层网状组织，由粗纤维和粗胶原纤维组成。致密层、成纤维细胞层与海绵层来自胚外中胚层，其中成纤维细胞层含有成纤维细胞及霍夫包细胞，海绵层的疏松网状结缔组织使得羊膜与绒毛膜之间有相对的活动性，便于剥离。迄今在羊膜各层中尚未发现微血管、淋巴管和神经[10]。通过机械、化学方法[11,12]处理后的羊膜主要是基膜成分，其在生命科学研究中有着重要的应用价值。早期，羊膜曾用于肿瘤细胞侵蚀过程的观察和机理探讨[13,14]以及用来研究滋养层细胞的侵蚀和雌孕激素、蛋白酶、细胞因子等活性物质在此过程中的调节作用[5,6]。组织工程中，羊膜可作为成纤维细胞或雪旺氏细胞培养生长的载体，用于修复、连接断裂的肌腱或神经纤维[8]。此外，新鲜羊膜或保存在特殊培养系统中的羊膜临床上还用于大面积皮肤烧伤的治疗[15]。

人羊膜的来源十分丰富，作为一种天然的生物膜结构，其在胚胎着床机理的研究中具有可利用的重要价值，因为它有培养板(皿)不具备的三个优点：含有LN、FN等ECM；胚胎在其上有侵入行为发生；可制成切片进行显微或超微结构的观察。因此，胚胎在人羊膜上着床模型的建立无疑为胚胎着床机理的研究提供了一个强有力的工具。

参 考 文 献

[1] Armant DR, Kameda S. Mouse trophoblast cell invasion of extracellular matrix purified from endometrial tissue: A model for periimplantation development[J]. J Exp Zool.1994;269(2): 146~156

[2] Armant DR, Kaplan HA, Lennarz WJ. Fibronectin and laminin promote in vitro attachment and outgrowth of mouse blastocysts[J]. Dev Biol, 1986;116(2):519~523

[3] Wordinger RJ, Brun-Zinkernagel AM. An ultrastructural study of in vitro interaction of guinea pig and mouse blastocysts with extracellular matrices[J]. J Reprod Feritl, 1991;93(2):585~597

[4] 曹宇静，曾国庆. 层粘连蛋白及其肽段对小鼠胚泡粘附和扩展的作用[J]. 动物学报，1997；43(1)：85~89

[5]Yagel S, Parhar RS, Jeffery JJ, et al. Normal nonmetastatic humnan trophoblast cells share in vitro invasive properties of malignant cells[J]. J Cell Physiol, 1988;136(3): 455~462

[6]Graham CH, Lala PK. Mechanism of control of trophoblast invasion in situ[J]. J Cell Physiol, 1991;148(2):228~234

[7] 刘 斌，高英茂，主编. 人体胚胎学[M]. 北京：人民卫生出版社，1996;648~649

[8] Davis GE, Blaker SN. Human amnion membrane serves as a substratum for growing axons in vitro and vivo[J]. Science, 1987;263(4805):1106~1109

[9] Meller D, Tseng SC. Conjunctival epithelial cell differentiation on amnniotic membrane[J]. Invest Opthalmol Vis Sci,1999;40(5):878~886

[10] 陈忠年，等，主编. 妇产科病理学[M]. 上海:上海医科大学出版社，1996;307~308

[11] Erickson CA.Behavior of neural crest cell on embryonic basal laminae[J].Rev Biol,1987;120(1):38~49

[12] Liotta LA, Lee W and Morakis DJ. New method for preparing large surfaces of intact human basement membrane for tumor invasion studies[J].Cancer Lett,1980;11(2):141~152

[13] Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB. Tumor invasion through the human amnniotic membrane:requirement for a proteinase cascade[J]. Cell,1986;47(4):487~498

[14] 刘子君，文建明，张 荫。肿瘤细胞对人羊膜浸润的观察[J]. 中华病理学杂志，1988；17(3)：219~221

[15] Burgos H, Faulk WP. The maintaince of human amnniotic membranes in culture[J]. Bri J Obstet Gynaecol, 1981;88(3):294~300