



冻融后小鼠休眠胚胎超微结构的变化

顾美超, 卢天罡, 刘云海, 倪和民, 张劭侯, 翟椿东, 邢书涵, 郭勇

(北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206)

【摘要】 目的 从亚细胞超微结构的角度揭示其抗冻能力优于正常孵化胚胎的原因。方法 利用透射电子显微镜观察小鼠休眠胚胎与正常孵化期胚胎在细胞连接和各细胞器形态与分布上的差异, 以及冻融培养后的变化, 并进行相关比较分析。结果 通过亚细胞结构对比分析发现: 冷冻前小鼠休眠胚胎为紧缩状, 处于能量代谢较低的“基态”, 通过冻融后培养, 细胞器结构恢复与正常孵化胚胎冷冻前相似; 而正常孵化胚胎经过冻融后, 线粒体数量减少, 细胞核松散, 异染色质增多。结论 小鼠休眠胚胎与正常孵化胚胎冻融后相比, 其细胞状态更有利于物质储存及能量代谢, 表明小鼠休眠胚胎从亚细胞超微结构的角度比其正常孵化胚胎更具抗冻性。

【关键词】 小鼠; 休眠胚胎; 超微结构; 冻融

【中图分类号】 Q95-33, Q492 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 03-0053-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.011

Ultrastructural observation of dormant mouse embryos cultured *in vitro* after freezing-thawing

GU Mei-chao, LU Tian-gang, LIU Yun-hai, NI He-min, ZHANG Shao-yu,
ZHAI Chun-dong, XING Shu-han, GUO Yong*

(College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study was to investigate the differences of the cell ultrastructure of normal mouse hatched blastocysts and their dormant ones cultured *in vitro* after freezing-thawing, and to explore whether the dormant embryos have a better anti-freezing shock property than the normal hatched mouse embryos. **Methods** By transmission electron microscopy, the ultrastructure of these two types of mouse embryos was observed and analyzed. **Results** By comparative analysis of their ultrastructure, the results showed that the dormant embryos before freezing are being austerly and with lower energy metabolism at a ‘ground state’. After freezing-thawing and culture, their cellular structure seemed to be similar to that of the normal embryos cultured *in vitro* before freezing. However, after freezing-thawing and culture, the number of mitochondria decreased, the nuclei were loose, and their heterochromatin also increased. **Conclusions** From the ultrastructural observation, compared with the normal mouse hatched embryos, the cellular state of dormant mouse embryos after freezing-thawing is more favorable for material storage and energy metabolism, thus, indicating that they have a better anti-freezing property than normal hatched embryos.

【Key words】 Mouse; Dormant embryo; Ultrastructure; Freezing-thawing

动物的胚胎休眠又称为胚胎滞育或胚胎的不连续发育, 在哺乳动物上称为延迟植入, 它是一种进化方式, 以此来保证野生动物在极端环境条件下的繁

殖成功率。一旦休眠终止, 囊胚恢复新陈代谢活性, 细胞又开始增殖, 囊胚着床并继续发育。胚胎滞育现象可以最大限度的提高哺乳动物繁殖成功率, 并

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(项目批准号: 31272526); 2013年度北京市教委北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展计划项目(项目批准号: PXM2013_014207_000067)。

【作者简介】 顾美超(1988年-), 女, 硕士生。E-mail: gumeichao@163.com。

【通讯作者】 郭勇, 男, 教授。E-mail: y63guo@126.com。

尽量使后代在气候适宜且食物充足时出生^[1]。因此针对哺乳动物的休眠胚胎进行较广泛的相关生物学研究具有一定的理论意义和潜在应用价值^[2,3]。虽然目前国际上对小鼠等哺乳动物休眠胚胎的相关研究取得了巨大进展,但针对此类特殊胚胎进行冷冻及解冻复苏后形态及其亚细胞结构上的研究尚未见报道。2008 年,卢天罡等^[4]首次发现:小鼠休眠胚胎冷冻-解冻后经体外培养的复苏率显著高于正常孵化胚胎。有鉴于此,本研究对小鼠休眠胚胎经程序化冷冻-解冻后与正常孵化胚胎进行亚细胞超微结构上的差异进行比较,为进一步深入研究哺乳动物休眠胚胎冻融后细胞结构变化及抗冻剂研制,尤其是为动物低温生物学方面的研究提供新的参考途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 ICR 雌、雄小鼠各 40 只,8~12 周龄,体重为 26~28 g,购自北京维通利华实验动物科技有限公司【SCXK(京)2012-0001】。实验在北京农学院屏障动物实验设施进行【SYXK(京)2010-0003】。

1.2 实验试剂与器材

胚胎冷冻保护剂,购自 ICPbio Reproduction,货号:101129,新西兰;戊二醛,购自 Sigma,货号:CAS:111-30-8;丙酮,购自 Sigma,货号:CAS:67-64-1;锇酸,购自 Sigma, CAS:20816-12-0,均为美国;普通光学显微镜:Nikon,YS2-H,日本;胚胎冷冻仪:Cryobath;超薄切片机 Leica Uc6i,德国;透射电镜 JEM-1230,日本。

1.3 实验方法

1.3.1 超排处理

选择阴门淡粉色的雌性鼠,腹腔注射 PMSG 10 IU/只,48 h 后注射 hCG 10 IU/只,之后立即与成年雄鼠 1:1 合笼过夜交配,次日早 8 点检查交配情况,见阴道栓者即可用于实验。

1.3.2 休眠胚胎的获取

于见栓的第 4 天上午 9:00 摘除小鼠的双侧卵巢,之后连续 3d 在其颈部皮下注射 0.2 mg/mL 的孕酮 0.1 mL,术后第 4 天即可从其子宫中回收休眠胚胎。

1.3.3 胚胎的程序化冷冻、冷冻后胚胎的收集及解冻方法

将获得胚胎用 PBS 清洗两遍,以确保囊胚表面清洁无粘连细胞。然后用三步法脱去 PBS 至冷冻液中,浓度依次变化,清洗两遍,然后装管。把装好的麦管放入冷冻仪中,以 1°C/min 的速度降到 -5°C 之后,平衡 10 min。再用预冷的镊子在麦管上端进行植冰,之后以 0.3°C/min 的速度降到 -35°C。解冻时需把麦管取出于室温下轻轻晃动 8~10 s,并立即投入到 35°C 左右的温水中。剪掉麦管两端的栓部,将麦管里的胚胎置于含有 1.0 mol/L 蔗糖溶液的培养皿中,按三步法脱去冷冻液。详见文献^[4]。

1.3.4 小鼠胚胎固定、包埋和超薄切片的制备

前固定:将胚胎移至培养皿中,加入 0.5% 甲醛工作液及 3% 戊二醛混合一起加到培养皿中固定 1 h 后,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液做成 100 μL 小滴反复清洗 3 次,每次 5 min。后固定:用 1% 锇酸继续固定 1 h 后,再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液做成小滴反复清洗 2 次,每次 5 min,清洗干净。预包装:该实验采用的 3%~4% 琼脂进行预包装,等待琼脂固化之后,将含有小鼠囊胚的琼脂切成 1 mm³ 的小块,分别放到青霉素瓶中。切片观察:分别经一系列酒精脱水、环氧丙烷过渡等脱水处理小鼠囊胚,之后环氧树脂 Epon812 浸透、包埋、聚合和 LKB-型超薄切片机切片。最后,醋酸双氧铀和柠檬酸铅的染料进行染色,干燥后,透过透射电子显微镜进行观察。

2 结果

2.1 正常孵化期胚胎

2.1.1 滋养层细胞连接

通过电镜观察小鼠正常囊胚滋养层细胞及内细胞团周围的滋养层细胞的形状呈圆形或者近似的正立方体型,且形状均一。并且在滋养层细胞之间有分布均匀的紧密连接结构。偶尔指状结构可见在其中,但是并无相嵌的并指状结构。

2.1.2 细胞核

小鼠正常囊胚的滋养层细胞,细胞核及内细胞团细胞核形态大致相似,大部分为圆形,边缘较平缓,但有很小的起伏和凹凸。细胞核被两层核膜包裹,可见一个或者两个高密度的核仁,整个细胞核布满常染色质,异染色质的分布较少,一般聚集于核膜周围(见图 1A,彩插 9)。

2.1.3 细胞器

电镜下可见大量圆形或椭圆形的线粒体分布在正常囊胚的胞质及滋养层核内细胞团胞质中。同时

在成熟的线粒体中,可见线粒体嵴密集且清晰。丰富的核糖体颗粒分布在胞质中。发现有粗面内质网与线粒体相互连接的结构。呈弓形或半球形的高尔基体堆积在一起。大量的脂滴及空泡分布在正常孵化期囊胚的滋养层细胞中。并且脂滴大小不一,在 $0.5 \sim 2 \mu\text{m}$ 之间(见图 1B)(图 1 见彩插 9)。

2.2 休眠胚胎

2.2.1 滋养层细胞连接

休眠囊胚滋养层细胞和覆盖在内细胞团上的滋养层细胞在形态上都被拉长,呈长条状。指状结构变的钝圆连接在细胞间,并有像微绒毛样的手指样结构伸向临近的细胞,这种手指样结构相互嵌合起来形成并指样结构,与紧密连接黏合斑和桥粒共同组成休眠胚胎滋养层细胞的细胞连接。

2.2.2 细胞核

休眠胚胎滋养层细胞核边缘不平整,有较多凹陷,且凹陷较深。大量的异染色团块分布在核膜周围,颜色较深,容易辨认。细胞核核仁明显,未发现有二个或两个以上核仁的情况(见图 2B,图 2 见彩插 10)。

2.2.3 细胞器

在休眠胚胎中可见有直径达到 $6 \mu\text{m}$ 的大型脂滴(见图 2A)。内细胞团细胞和滋养层细胞质中核糖体数量较少,偶然可以发现核糖体聚集成多聚核糖体(见图 2C)。(图 2 见彩插 10)。

2.3 正常孵化胚胎冻融后培养 24 h 后

2.3.1 滋养层细胞连接

正常孵化期胚胎与冷冻前相比,其滋养层细胞形态变化不大,内细胞团细胞间结构较冷冻前松散,细胞间连接有较大的缝隙(见图 2C)。冻融后滋养层细胞的胞质中有大量的空泡。有些细胞的胞质中几乎是空泡。滋养层细胞之间连接可见到模糊的紧密连接结构,与冷冻前相比变化不大。细胞表面的微绒毛变长,数量增加,但仍呈不规则形态。经过 48 h 的体外培养,滋养层细胞连接方式与培养前无变化。

2.3.2 细胞核

电镜下正常胚胎细胞核与冷冻前相比,其核形态排列不规整,尤其是内细胞团细胞核,有多道较深的凹陷出现。48h 后孵化胚胎细胞开始出现凋亡现象(见图 1E)。

2.3.3 细胞器

冻融培养后的正常孵化期胚胎,发现线粒体虽

然数量较冷冻前无明显变化,但大部分线粒体嵴不清晰,数量较少,有的线粒体嵴消失,观察中发现有部分线粒体中存在空泡和高密度物质,部分线粒体膜发生破损且内容物流出。粗面内质网上附着核糖体颗粒,细胞质中核糖体分布不均匀,有的区域有很多核糖体分布,而有的则较少或者没有,可发现多核糖体(见图 2D)。

2.4 休眠胚胎冻融后培养 24 h 后

2.4.1 滋养层细胞连接

休眠胚胎经过冻融培养后滋养层细胞变厚,由冷冻前的长条状变成立方体状或近似的圆形,且只有在内细胞团周围的滋养层细胞仍然呈长条状。冷冻后滋养层细胞间的并指状结构消失(见图 2D),指状结构收缩在连接部位且不再伸展,可见到紧密连接斑。细胞间连接较冷冻前紧密,内细胞团连接紧密,无较大缝隙。经过 48 h 培养后,与冻融培养 24 h 后结果相似。

2.4.2 细胞核

休眠胚胎与冷冻前相比,其细胞凹陷消失,凹凸较平缓,核周隙不明显。培养 48 h 之后,细胞核边缘的较深凹陷消失,变的平坦。

2.4.3 细胞器

休眠胚胎与冷冻前相比,细胞内线粒体数目显著增加,线粒体比较清晰。偶发现空泡状线粒体的存在。粗面内质网数量与冷冻前相比明显增加。高尔基体数量较冷冻前也有增加。细胞质中核糖体分布广泛,多核糖体广泛分布。脂滴的数量和体积较冷冻前都明显减少(见图 2E)。培养 48 h 后,大型脂滴消失且数量减少。

3 讨论

胚胎休眠现象广泛存在于各种动物,但现在已知最好的动物模型是啮齿类动物,啮齿类动物的子宫环境可在孕激素和生长因子的协同作用下维持胚胎一直处于休眠状态^[5]。早先 Spindler 等^[6]对正常孵化胚胎与休眠胚胎在碳氧化物方面进行比较。发现休眠囊胚代谢较低。Give 等^[7]检测了小鼠见栓第 4 天卵巢摘除后不同时间胚胎细胞的 DNA 合成,发现在卵巢摘除手术 18h 后胚胎细胞 DNA 合成仍然保持高水平,随后在 96 h 后下降,并在随后一直保持低水平。在 2000 年,Renfree 等^[1]发现休眠胚胎是母体子宫源和胚胎源的信号因子共同调控的结果。同时在哺乳动物植入时窗口期信号白细胞抑制

因子等信号之间的相互调节^[8,9]。在我实验室早期对小鼠正常孵化及休眠囊胚在抗冻方面的比较,休眠囊胚的抗冻性显著高于休眠囊胚,由此推断休眠囊胚的特殊亚细胞结构可能对于其抗冻能力有影响。

在该试验中,休眠胚胎与正常孵化胚胎滋养层细胞的连接形式有很大不同,虽然两种胚胎中都存在手指状结构,但是休眠胚胎中的相嵌样的并指状结构,及与紧密连接斑一起构成牢固的细胞间连接。正常孵化胚胎的指状结构并不是突出地伸向相邻细胞,而是平顺的贴在细胞外侧,没有相嵌状结构。我们又发现不经过冻融,只在体外培养 24 h 后休眠胚胎的超微结构,发现滋养层细胞间的并指状细胞连接消失。依据这些证据,我们提出一个假设,那就是休眠胚胎经过冻融或培养后被激活了,考虑这种细胞间坚固的连接结构是前期冷冻试验中休眠囊胚抗冻能力较孵化胚胎好的一个必不可少的原因。休眠囊胚由于在结实而紧密的细胞连接及其碳氧化物的代谢率较低,细胞释放能量很少。每个细胞形成一种维持自己较低的最佳“稳态”。由此对外界各种刺激作用抵抗能力比在释放能量高的孵化胚胎强。

在动物界中,肉食动物的卵母细胞、胚胎滋养层细胞和内细胞团细胞中都会含有大量且丰富的脂滴^[10]。Enders 等^[11]发现大小不一的脂滴是水貂在自然环境下维持延迟着床时胚胎能量代谢的典型中间物质。Allen 等^[12]在西部斑点臭鼬的休眠胚胎上也发现大量体积较大的脂滴,这些脂滴呈深色或黑色。本研究发现,休眠胚胎和正常活化胚胎上都可见到大小不等的脂滴,直径一般都在 1~2 μm 之间,而休眠胚胎上体积达到 6 μm 的大型脂滴,这可能是由于休眠胚胎自身代谢水平较低,脂类消耗较慢,使得脂类物质堆积而成。这也说明休眠胚胎的脂类物质储备要多于孵化胚胎(见图 2A)。在休眠胚胎解冻复苏后 48 h 后,休眠胚胎中的大型脂滴消失,脂滴的数量减少。由此脂类在小鼠休眠胚胎上也是一种物质储备,经过冷冻复苏后的胚胎开始活化,动员每个细胞中可利用的能量物质,使得囊胚的新陈代谢增加。脂类消耗增加。脂滴的数量减少。有文献记载,小鼠休眠胚胎与激活胚胎的差异比较中,激活囊胚通过注射一定量的雌二醇使正在处于休眠状态的胚胎进行了激活^[13]。我们可能怀疑在休眠囊胚冻融后的状态与其后期注射雌激素使其状态激活的效果相似,但此想法还未被证实。

研究中发现,休眠胚胎细胞核边缘不平整,有较

多凹陷,分布在核膜周围。而孵化胚胎细胞核边缘较平滑,没有凹陷。这和 Allen 等^[12]研究结果相类似,他们发现在西部斑点臭鼬的休眠胚胎细胞核有两至三个裂缝,并且含有高密度的异染色质。同时有研究发现在小鼠植入前胚胎上普遍游离核糖体增加的过程^[14,15]。Wu 等^[16]发现被雌激素刺激诱导激活的休眠胚胎普遍有游离核糖体数量的增加现象。在冻融试验中,休眠胚胎细胞核的恢复能力明显比孵化胚胎强。这表明休眠胚胎在冷冻后其状态优于正常孵化胚胎。但在冻融后的分子机制调节仍不清楚。经过冻融,培养后休眠胚胎胞质中核糖体数量有明显增加。线粒体提供细胞生命活动所需能量的 80% 以上的能量,而嵴的存在大大增加了线粒体内膜的表面积和相应的反应效率^[18]。经过解冻复苏,休眠胚胎及正常孵化胚胎都发现了嵴普遍消失和横断,以及膜破损,空泡和高密度物质形成的现象。但是休眠胚胎的线粒体嵴多为横断,横断后嵴呈颗粒状。有文献记载在病理状况下,线粒体的数目减少^[18]。由此可以说明,休眠胚胎在这个阶段线粒体供给能量的功能要优于孵化胚胎,虽然冻融对于两种胚胎的线粒体都有所损伤,但是休眠胚胎的线粒体要比正常孵化胚胎受到的损伤小,或者是在冻融后培养过程中,恢复能力较好。

综上所述,通过冻融后亚细胞结构分析小鼠的休眠胚胎与正常孵化胚胎,在冷冻前休眠胚胎为皱缩状,处于能量代谢较低的“基态”,通过冻融后培养,细胞代谢增加。而正常孵化胚胎冷冻后,线粒体数量减少,细胞核结构松散。这些结果表明,休眠胚胎可能通过冷冻复苏或体外培养的形式等被激活了,不排除可能是培养液中血清物质或者其他添加物质的刺激,这个推论还需进一步的实验证明。但可以肯定的是,休眠胚胎的特殊结构和代谢基态,使其处于抵抗外界损伤较佳状态。

(本文图 1,2 见彩插 9,10)。

参 考 文 献

- [1] Renfree MB, G. Shaw G. Diapause [J]. *Annu Rev Physiol*, 2000, 62:353-375.
- [2] Ptak GE, Tacconi E, Czernik M, et al. Embryonic diapause is conserved across mammals [J]. *PLoS One*. 2012, 7(3): e33027.
- [3] Hondo E, Stewart CL. Profiling gene expression in growth-arrested mouse embryos in diapause [J]. 2005, 6(1): 202.

(下转第 61 页)

