

维生素 C 提高小鼠体细胞核移植胚胎的发育潜能

史三宝 纪冬梅 陈蓓丽 郝 燕 陈大蔚 周 平 章志国 曹云霞

摘要 探讨不同浓度维生素 C 和培养时间对小鼠体细胞核移植胚胎发育潜能的影响。不同浓度维生素 C (0、50、100 mg/L) 分别处理小鼠核移植重构胚, 50 mg/L 维生素 C 浓度组处理重构胚 18 h, 获得的囊胚率以及胚胎着床率显著高于其他组 ($P < 0.05$), 且在此基础上提高维生素 C 浓度或处理时间不能进一步提高克隆胚的发育潜能 ($P > 0.05$)。小鼠体细胞核移植胚胎培养时, 适当的维生素 C 浓度和培养时间可显著提高小鼠重构胚的发育潜能。

关键词 维生素 C; 体细胞; 核移植; 胚胎; 发育潜能

中图分类号 R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0679-03

体细胞核移植动物不仅可以用于基础医学研究, 还可用于再生医学领域核移植胚胎干细胞替代治疗疾病。虽然体细胞核移植哺乳动物早在上个世纪就被成功报道^[1], 而且近年来已开展了很多关于提高小鼠体细胞核移植克隆效率的相关研究^[2], 但是仍然没有太多的进展^[3-4]。维生素 C 是许多动物的一种必需营养物质, 同时也是有效的抗氧化剂^[5]。最近研究^[6]显示, 维生素 C 可以提高小鼠和人诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPS) 产生效率, 促进部分重新编程 iPS 细胞过渡至完全重编程状态, 并且可能是通过减少细胞内抑癌基因 p53 的完全表达来提高细胞重编程效率。因此, 维生素 C 促进细胞重编程是安全的。该研究旨在探讨维生素 C 也可能改善小鼠体细胞核移植克隆效率。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 F1 (C57BL* CBA) 杂交

2013-12-10 接收

基金项目: 安徽医科大学第一附属医院青年培育基金 (编号: 3101005002061); 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81370691)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院生殖中心, 合肥 230022

作者简介: 史三宝, 男, 硕士研究生;

曹云霞, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: caoyunxia6@126.com;

章志国, 男, 研究员, 责任作者, E-mail: zzg100ster@gmail.com

鼠 68 周龄 20~26 g, 购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.2 试剂与仪器 培养液 G-Gamete、G-1plus、G-2plus 购自瑞典 Vitrolife 公司; 透明质酸酶、氯化锶 (SrCl₂)、矿物油、细胞松弛素 B (cytochalasin B, CB)、无钙 CZB 液、胎牛血清 (BSA) 等均购自美国 Sigma 公司; 7% 聚乙烯吡咯烷酮 (7% PVP) 购自美国 Sage 公司; 孕马血清 (PMSG) 及人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 购自宁波生物工程有限公司。拉针仪 (PN-300 型)、磨针仪 (EG-40 型)、电融合仪 (ECM2001, BTX)、玻璃管及机械针 (G-100) 购自澳大利亚 CryoLogic 公司; 倒置显微镜 (CE-2000, Nikon)、显微操作系统 (IX-71) 购自日本 Olympus 公司。

1.3 卵子促排 6~8 周龄的雌性 F1 (C57BL* CBA) 杂交鼠, 光照 12 h/d, 自由摄食饮水。腹腔注射 7.5 IU PMSG, 46~48 h 后腹腔注射 7.5 IU hCG, 17.5 h 时颈椎脱臼处死, 取出卵丘卵团复合体, 37 °C、0.08 IU/L 透明质酸酶消化 3 min 去除颗粒细胞, 取表明光滑、胞浆质地均匀的卵子置于 G-Gamete 液滴中备用。

1.4 显微操作针

1.4.1 持卵针 将事先制备出的机械针于直径 80~90 μm 处切割并将末端烤成均匀钝圆, 使其外径为 80~90 μm, 内径为 13~15 μm。

1.4.2 去核针 将事先制备出的机械针在 ϕ 10 μm 处切割并将其相对磨针仪 30 度角固定, 加适量无水乙醇, 调整磨针仪转速, 磨针 3 min; 然后垂直于锻针仪电热丝正上方, 缓慢加热电热丝, 匀速调整玻璃针, 烤平去核针内管口, 使内径为 8~10 μm, 外径为 10~12 μm。

1.4.3 注射针 参照去核针, 注射针外径约为 7 μm, 内径约为 5 μm。

1.5 体细胞核移植方法

1.5.1 去核 本实验统一采用透明带打孔法。将事先选好的卵子置于显微操作液滴 A (G-Gamete + 5 μg/ml CB) 里, 用持卵针及去核针调整卵子的位置, 第一极体位于 12 点时持卵针固定, 将原始机械针由卵子 1 点位置刺入, 11 点刺出, 然后持卵针释

放卵子,并用机械针与持卵针反复摩擦,使卵子从机械针上自动脱落。再次调整卵子使核位于3点钟位置固定,去核针负压匀速吸除极体及周围卵核质^[10],见图1A。

1.5.2 注核 将去核后的卵子置于G-1液滴中,37℃、5% CO₂培养箱内培养1h,然后移入显微操作液B(G-Gamete)中注核。同时用注射针于PVP液滴中处理颗粒细胞,将吸有破膜颗粒细胞的注射针由去核路径注入卵黄膜内,见图1B。

1.6 重构卵的激活与培养

1.6.1 激活 将注核后的重构卵移入事先制备的10 mmol/L SrCl₂ + 5 μg/ml CB + 10% BSA 的无钙CZB中激活约5h,并继续在含5 mg/L CB的G-1 Plus中培养3h,当重构卵胞质中出现类原核或分裂为2-细胞且各含1个原核时,确定为激活成功^[11]。

1.6.2 培养 将成功激活的一部分重构卵分3组移入0、50、100 mg/L 维生素C的培养液分别培养小鼠重构胚18h,换液培养观察重构胚的发育情况并记录。在50 mg/L 维生素C基础上将另一部分重构卵再分3组,一组为无维生素C对照,另两组统一在50 mg/L 维生素C培养液分别培养18h和36h后再换液,观察并记录囊胚发育情况。

1.7 重构胚移植 核移植胚胎发育2.5d时制备ICR母鼠为假孕受体,3.5d时将核移植发育得到的囊胚移植至双侧子宫内,移植时小鼠全身麻醉,移植后恢复2~3h,待小鼠清醒后再进食。

1.8 统计学处理 数据采用SPSS 13.0统计软件进行分析,各种率的比较采用χ²检验。

2 结果

2.1 囊胚发育情况 不同维生素C浓度和处理时间组均获得了核移植优质囊胚,见图1C。

2.2 不同维生素C浓度处理组的胚胎发育 50 mg/L 维生素C组的小鼠克隆胚的卵裂及囊胚率显著高于不含维生素C组(P<0.01),但进一步提高维生素C浓度并没有进一步提高重构胚的发育率,见表1。

表1 不同维生素C浓度下重构胚的发育情况[n(%)]

浓度(mg/L)	重构胚数	>2-细胞数	囊胚数
0	98	62(63.3)	8(8.2)
50	112	96(85.7) ^{△△} ■	26(23.2) ^{△△}
100	105	78(74.3)	20(19.0) [△]

与0 mg/L组比较:△P<0.05,△△P<0.01;与100 mg/L组比较:■P<0.05

2.3 不同维生素C处理时间组的胚胎发育 重构胚移入含有浓度为50 mg/L 维生素C培养液中分别培养0、18、36h得出,维生素C中培养18h组小鼠重构胚的卵裂及囊胚率均显著高于0h组(P_{卵裂}<0.01, P_{囊胚}<0.05) 将维生素C处理时间从18h延长至36h并没有进一步提高胚胎发育率。见表2。

表2 50 mg/L 维生素C下不同处理时间重构胚的发育情况[n(%)]

时间(h)	重构胚数	>2-细胞数	囊胚数
0	86	48(55.8)	9(10.5)
18	89	73(82.0) ^{△△}	22(24.7) [△]
36	81	60(74.1) [△]	17(20.9)

与0h组比较:△P<0.05,△△P<0.01

2.4 胚胎移植 本研究用ICR假孕母鼠为受体,共移植小鼠核移植重构胚360枚,其中未处理160枚,移植4只受体,维生素C培养18h组200枚,移植5只受体,平均每只受体移植40枚核移植胚胎,并与移植后第9天处死代孕母鼠,检查子宫内着床情况,最终维生素C组3只着床点(60%),见图1D,未处理组仅1只着床点(25%)。

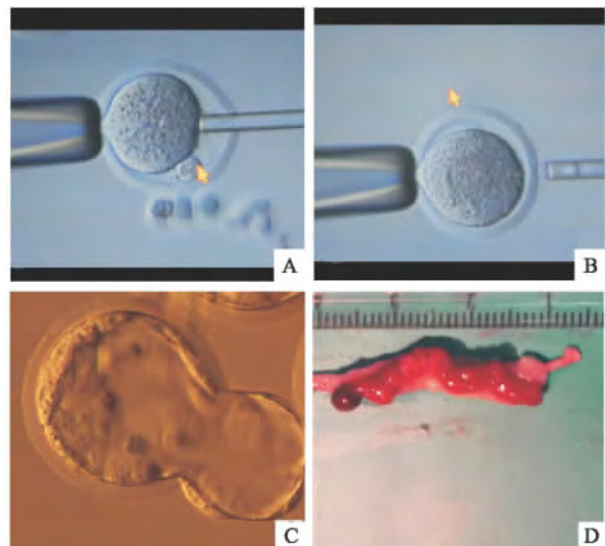


图1 体细胞核移植去核与注核以及重构胚体内外发育情况

A:去核 × 100;B:注核 × 100;C:核移植囊胚 × 200;D:核移植胚胎子宫内着床点

3 讨论

本研究中,小鼠克隆胚胎在维生素C浓度为50 mg/L的培养液中处理18h,囊胚发育率显著高于未处理组。可能是由于维生素C改善了克隆胚培养

液的培养条件。据研究^[5]报道,抗坏血酸在某些培养体系中可以作为有效的抗氧化剂。另一方面,延长维生素 C 处理时间至 36 h 并没有提高囊胚率,这表明维生素 C 处理 18 h 可以提高着床前胚胎的发展潜力。重构胚起始的 18 h 也是被公认的分化细胞细胞核重编程激活的时间窗^[7]。同时也显示出,后期补充维生素 C 不能进一步提高囊胚形成率,虽然囊胚率也高于未处理组。

哺乳动物克隆重构胚的不完全重编程是主要的技术缺陷^[7]。组蛋白乙酰化是核移植中供体细胞和受体胞质中的关键表观遗传标记,而且组蛋白 H4 已经被证明直接诱导核染色质更精确的组装^[8]。本研究用 50 mg/L 维生素 C 处理小鼠体细胞克隆胚胎 18 h,显著提高了重构胚的发育潜能,可能是维生素 C 在一定程度上提高了重构胚内相关因子的表达水平。

虽然胚胎在体外发育至囊胚阶段能力已被用来作为预测体细胞核移植的效率,但是体外培养阶段的胚胎,通常不能预测胚胎的体内妊娠结局^[9]。因此,本研究中也做了胚胎移植,得到的结果是维生素 C 组的着床率(60%)显著高于正常对照组(25%),进一步证实维生素 C 还可以提高小鼠体细胞核移植胚胎的着床率。

维生素 C 可显著提高小鼠体细胞核移植重构胚的囊胚发育率,促进核移植胚胎在子宫内的着床,具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells [J]. *Nature*, 1997, 385(6619):810-3.
- [2] Salehi M, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of melatonin treatment on developmental potential of somatic cell nuclear-transferred mouse oocytes *in vitro* [J]. *Zygote* 2013, 16:1-5.
- [3] Wakayama T. Development of novel intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer techniques for animal reproduction [J]. *Anim Sci J*, 2011, 82(1):8-16.
- [4] Oda M, Shiota K, Tanaka S. Trophoblast cell lineage in cloned mouse embryos [J]. *Dev Growth Differ*, 2010, 52(3):285-91.
- [5] Kere M, Siriboon C, Lo N W, et al. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation [J]. *J Reprod Dev*, 2013, 59(1):78-84.
- [6] Esteban M A, Wang T, Qin B, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1):71-9.
- [7] Han J W, Yoon Y S. Epigenetic landscape of pluripotent stem cells [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(2):205-23.
- [8] Horikoshi N, Kumar P, Sharma G G, et al. Genome-wide distribution of histone H4 Lysine 16 acetylation sites and their relationship to gene expression [J]. *Genome Integr*, 2013, 4(1):3.
- [9] Cong P, Zhu K, Ji Q, et al. Effects of trichostatin A on histone acetylation and methylation characteristics in early porcine embryos after somatic cell nuclear transfer [J]. *Anim Sci J* 2013, 84(9):639-49.

Vitamin C enhanced the potential of mouse somatic cell nuclear transfer embryos

Shi Sanbao, Ji Dongmei, Chen Beili, et al

(Center of Human Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract To investigate the impact of different concentrations and time of vitamin C on mouse somatic cell nuclear transfer embryo development potential. Mice reconstructed embryos were treated with different concentrations (0, 50, 100 mg/L) of vitamin C, the blastocyst and implantation rate was significantly higher than the other groups when this embryos were treated with 50 mg/L concentrations of vitamin C for 18 h ($P < 0.05$), on the basis of this condition, developmental potential of cloned embryos could not be further enhanced either by increasing the concentration of vitamin C or by prolonging the processing time ($P > 0.05$). Appropriate concentrations and incubation time of vitamin C could significantly improve the developmental potential of reconstructed embryos in the process of mouse somatic cell nuclear transfer.

Key words vitamin C; somatic cell; nuclear transfer; embryo; development potential