

# 巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)对小鼠胚胎体外发育的影响

周娜汝<sup>1,2</sup>, 张宇<sup>1,2</sup>, 吴蓉花<sup>1,2</sup>, 李运生<sup>1,2</sup>, 张运海<sup>1,2\*</sup>

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036)

**摘要:** 以小鼠自然受精与体外受精胚胎为模型, 探索鼠源巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)在小鼠胚胎早期发育过程中的生理功能。分别使用添加不同剂量(对照组: 0 ng·mL<sup>-1</sup>; 试验组: 0.5、2和10 ng·mL<sup>-1</sup>) GM-CSF的化学限定培养基连续培养小鼠自然受精、体外受精原核期与2细胞期胚胎, 检测其胚胎着床前发育效率(卵裂率、囊胚率)及囊胚的质量(囊胚总细胞数、ICM/总细胞数的比率、凋亡指数)。结果发现, 对自然受精胚胎而言, 原核时期添加不同剂量的GM-CSF, 其卵裂率、囊胚总细胞数、ICM/总细胞数的比率在各组之间均差异不显著, 但10 ng·mL<sup>-1</sup>试验组的囊胚率显著低于对照组(61.6±5.1)% ( $P < 0.05$ ); 2细胞时期添加不同剂量的GM-CSF, 其囊胚率、囊胚总细胞数、ICM/总细胞数的比率在各组之间均差异不显著, 但试验组中的囊胚凋亡指数均显著低于对照组( $P < 0.05$ ), 并且试验组中2 ng·mL<sup>-1</sup>的囊胚凋亡指数最低, 显著低于0.5 ng·mL<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ), 其他试验组之间的囊胚凋亡指数没有统计学上的差异性。对体外受精胚胎来说, 原核时期添加GM-CSF, 其卵裂率、囊胚率、囊胚总细胞数、ICM/总细胞数的比率在各组之间均无显著性差异; 在2细胞时期, 10 ng·mL<sup>-1</sup>组的囊胚率显著低于对照组及其他2个试验组( $P < 0.05$ ), 但各组之间的囊胚总细胞数、ICM/总细胞数的比率均无显著性差异。本研究结果表明, 在化学限定培养基中添加一定剂量的GM-CSF有利于改善小鼠自然受精与体外受精囊胚的质量, 但剂量过高可能不利于小鼠受精胚胎的早期发育。

**关键词:** GM-CSF; 化学限定培养基; 小鼠; 早期胚胎; 体外培养

中图分类号: S814.8; S865.13

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2013)01-0083-07

## Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on *in vitro* development of mouse embryos

ZHOU Na-ru<sup>1,2</sup>, ZHANG Yu<sup>1,2</sup>, WU Rong-hua<sup>1,2</sup>, LI Yun-sheng<sup>1,2</sup>, ZHANG Yun-hai<sup>1,2</sup>

(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Provincial Laboratory of Animal Genetic Resources Protection and Breeding, Hefei 230036)

**Abstract:** The aim of this study was to explore the physiological function of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) during early development of mouse embryos derived from *in vivo* natural mating (IVN) or *in vitro* fertilization (IVF). Chemically defined medium (CDM) with different concentrations of GM-CSF (the control group: 0 ng·mL<sup>-1</sup>; the treatment groups: 0.5, 2 and 10 ng·mL<sup>-1</sup>) was used for embryo culture, and the cleavage rate, formation rate and quality of blastocysts (total cell number, inner cell mass (ICM)/total cell number, the index of apoptosis) of the embryos were examined. Regarding to the cleavage rate, the total cell number and the ICM/total cell number, no significant difference was found when GM-CSF added from the pronuclear stage IVN embryos, but the blastocyst rate of 10 ng·mL<sup>-1</sup> group was significantly lower than that of the control group (40.3%±6.7% vs. 61.6%±5.1%;  $P < 0.05$ ). For 2-cell stage IVF embryos, in terms of the blastocyst rate, the total cell number, the ICM/total cell number, no significant difference existed among groups, but the index of apoptosis in blastocyst from three treatment groups was obviously decreased compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Moreover, the index of apoptosis of blastocyst from 2 ng·mL<sup>-1</sup> group was the lowest, even lower than that from 0.5 ng/mL group ( $P < 0.05$ ). Apart from that, other treatment groups had no statistical difference in the blastocyst apoptosis index. As for embryos in the pronuclear stage derived from IVF, no significant difference was

收稿日期: 2012-08-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2011AA100307-04)资助。

作者简介: 周娜汝, 女, 硕士研究生。E-mail: znr2006@126.com

\* 通信作者: 张运海, 男, 博士, 教授。E-mail: yunhaizhang@ahau.edu.cn

observed among groups, regarding the cleavage rate, the blastocyst rate, the total cell number and the ICM /total cell number. When GM-CSF was added just from 2-cell stage IVF embryos, the blastocyst rate in the 10 ng·mL<sup>-1</sup> group was significantly lower than that in the control group and the other two test groups ( $P < 0.05$ ), but the total cell number in blastocysts, the ICM/total cell number in all groups were not significant different. In conclusion, CDM within certain dose of GM-CSF might be helpful to improve the quality of blastocyst derived from either *in vivo* fertilization or *in vitro* fertilization in mouse embryos, but over-high concentration of GM-CSF might be harmful to the early development of mouse embryos.

**Key words:** GM-CSF; chemically defined medium (CDM); mouse; early embryos; *in vitro* culture

小鼠作为一种理想的哺乳动物模型,其胚胎生物学研究已经被广泛应用于人类生殖健康、动物胚胎工程及生理学基础研究领域。然而,到目前为止,小鼠胚胎体外发育效率依然没有体内发育效率理想<sup>[1]</sup>,可能与体外培养环境欠佳有很大的关系。人们为最大程度地、最逼真地模拟小鼠体内发育过程中的生殖道生理环境,不断优化小鼠胚胎的体外培养环境,比如培养气相<sup>[2-3]</sup>、培养密度<sup>[4-5]</sup>、培养基改良<sup>[6-7]</sup>、细胞因子添加<sup>[8]</sup>等,为改善小鼠胚胎的体外发育奠定了坚实的基础。然而,小鼠胚胎体内发育过程接触到的生殖道生理微环境是非常复杂而多样的,尤其是生理条件下的液体成分可能包含大量的细胞因子或其他营养因子使其变得更为神秘,所以阐明某种细胞因子在胚胎发育过程中的生理功能,能够为人类健康生殖与动物胚胎的高效生产提供丰富的理论基础。

研究发现,巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是由雌性生殖道上皮细胞系分泌的一种细胞因子<sup>[9]</sup>,在造血中发挥重要的作用,此外,对哺乳动物胚胎发育也起到一定的调控作用。经研究发现,GM-CSF存在一种异源二聚体受体复合物,这个受体复合物包括低亲和力 $\alpha$ 受体和亲和力 $\beta$ 受体,经检测,低亲和力 $\alpha$ 受体在着床前胚胎有表达,GM-CSF很可能通过此异源二聚体受体复合物发挥其重要的生物学功能<sup>[10]</sup>。关于GM-CSF对小鼠早期胚胎发育的许多研究也陆续报道,发现其不仅能够改善小鼠胚胎卵裂球的存活能力、胎盘发育能力还能够降低胚胎细胞的凋亡率<sup>[11-13]</sup>,所以GM-CSF对早期胚胎发育具有重要的促进作用。尽管GM-CSF在小鼠胚胎的早期发育效率<sup>[14]</sup>、囊胚质量<sup>[11]</sup>均具有正面的促进作用,但这些研究都是以成分不明确的非限定性培养基或半限定性培养基为基础培养基,对探索GM-CSF真实生理功能具有一定的屏蔽作用。众所周知,使用含血清或血清蛋白的非化学限定培养基,其生产批次、化学成分复杂多变,易导致实验重复性低、生理功能不确定。以PVA取代BSA的化学限定培养基(chemically defined me-

dium, CDM),具有成分明确、实验重复性高、易于控制等优点,为研究GM-CSF在小鼠胚胎发育过程中的真实生理功能奠定基础。

一般来说,细胞因子对于胚胎发育的生理作用均具有时间或剂量的依赖性。尽管在没有血清的化学限定培养基中GM-CSF也能够提高小鼠囊胚质量<sup>[15]</sup>,但该研究依然没有能够确定GM-CSF处理的具体时间及剂量。研究表明,GM-CSF在2 ng·mL<sup>-1</sup>处理人受精卵48 h没有提高人胚胎细胞染色体畸变率<sup>[16]</sup>,并且高浓度GM-CSF甚至抑制小鼠胚胎的发育<sup>[17]</sup>。但这些研究均没有综合考虑GM-CSF处理小鼠胚胎的时间及剂量两方面的因素。所以,系统而深入地研究GM-CSF这种细胞因子在小鼠早期胚胎发育过程中的真实生理功能依然具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

ICR品系健康普通级小鼠(*Mus musculus*),购自南京晓庄学院实验动物中心,雌鼠6~8周龄,体重20~25 g,雄鼠9~13周龄,体重30~35 g。小鼠在湿度55%~60%、温度18~22℃控光(7:00~20:00光照,20:00~7:00黑暗)条件下饲养。

### 1.2 试剂

除特别说明外,所有化学试剂均购自Sigma公司(St. Louis, MO, USA);胚胎培养皿为Nunc(Denmark)。化学限定培养基KSOM<sup>PVA</sup><sup>[18]</sup>,这里简称为CDM。体外受精液HTF按<sup>[19]</sup>Quinn等方法配制。

### 1.3 超数排卵

选择处于间情期或发情前期的健康雌性ICR小鼠,腹腔注射10 IU PMSG (pregnant mare serum gonadotropin,宁波第二激素制品厂),48 h后注射10 IU hCG (human chorionic gonadotropin,宁波第二激素制品厂)。

### 1.4 胚胎收集及培养

**1.4.1 自然受精胚胎收集** 注射hCG 22 h后采用颈部脱臼法处死见栓雌鼠,无菌取出两侧输卵管,放入Hepes-KSOM (H-KSOM)操作液<sup>[20-21]</sup>中,用

1 mL 注射器针头刺破输卵管膨大部, 释放出带有卵丘细胞的原核胚团, 移入含有  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  透明质酸酶中, 移液器轻吹几下除去卵丘细胞, 并用 H-KSOM 液清洗 3 次, 于体视显微镜下挑选形态正常的胚胎。根据实验 1, 移入各组中培养 5 d, 观察其胚胎发育情况; 根据实验 2, 先移入 CDM 培养 15~16 h 到 2 细胞阶段, 挑选出形态正常 2 细胞胚胎移入添加不同浓度 GM-CSF 的 CDM 中培养 4 d, 观察其胚胎发育情况。所有胚胎均置于 5%CO<sub>2</sub>、95% 空气、100% 湿度的培养箱中培养。

**1.4.2 体外受精胚胎生产** 颈椎脱臼法处死雄鼠, 无菌取出两侧附睾尾, 放入平衡好的获能液中, 剪破附睾尾, 释放出适量精子, 立即将剩余附睾尾移出, 将获能精子置于 5%CO<sub>2</sub>、95% 空气、100% 湿度的培养箱中获能 30~45 min。注射 hCG 后 15~16 h 采用颈部脱臼法处死见栓雌鼠, 无菌取出两侧输卵管, 放入 H-KSOM 中, 用 1 mL 注射器针头刺破输卵管膨大部, 释放出卵丘卵母细胞, 将卵丘卵母细胞移入平衡好的受精液中, 将平衡好的精子加入受精液中, 精子密度  $1\times 10^6$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ , 精卵共孵育 6 h 后, 挑选出现 2 个原核的受精胚胎备用。根据实验 3, 移入各组中培养 4 d, 观察其胚胎发育情况; 根据实验 2, 先移入 CDM 培养 15~16 h 到 2 细胞阶段, 挑选出形态正常 2 细胞移入添加不同浓度 GM-CSF 的 CDM 中培养 4 d, 观察其胚胎发育情况。所有胚胎均置于 5%CO<sub>2</sub>、95% 空气、100% 湿度的培养箱中培养。

## 1.5 囊胚内细胞与总细胞染色计数

**1.5.1 囊胚内细胞染色并计数** 将囊胚迅速放入 500  $\mu\text{L}$  Solution 1(含有 1% Triton X-100 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PI 的 DPBS)避光室温孵育 10 s 或直到外滋养层变红, 立即移入 500  $\mu\text{L}$  Solution 2(含有 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Hoechst33342 的无水乙醇)中, 避光室温孵育 45~60 s。染色结束后, 将囊胚移到载玻片上甘油液滴中, 尽量少带 Solution 2 液, 以甘油为中心在载玻片四角点少许凡士林, 小心盖上盖玻片并轻压, 使细胞平铺, 最后指甲油封片, 于倒置荧光显微镜下紫外光激发并观察、拍照, 进行内细胞团和总细胞计数。

**1.5.2 总细胞染色并计数** 将囊胚经含 0.05% PVP 的 DBPS(Gibco, 无钙镁)液滴洗 3 次, 每次 3~5 min, 后在含 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Hoechst33342 的 DBPS 液中室温避光孵育 15 min。染色结束后, 将囊胚移到载玻片上甘油液滴中, 尽可能少带液滴, 以甘油为中心在载玻片四角点少许凡士林, 小心盖上盖玻片并轻压,

使细胞平铺, 最后用指甲油封片, 于倒置荧光显微镜下紫外光激发并观察、拍照, 进行总细胞计数。

## 1.6 囊胚细胞凋亡指数

用 TUNEL<sup>[22-23]</sup>来标记囊胚, 取出 2 细胞培养到第 4 天的各组囊胚用 DPBS-PVP ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PVP)液滴洗 3 次, 每次 3~5 min, 后用含 4% 多聚甲醛的 DPBS 室温固定 1 h, 固定之后, 再在 DPBS-PVP ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PVP)液滴洗 3 次, 每次 3~5 min。为提高卵裂球质膜渗透性, 将各组囊胚移入含 0.5% Triton X-100 的渗透液中室温孵育 30 min。阳性对照: 将囊胚移到 Dnase 液中, 37℃ 避光孵育 1 h, 再移入 TUNEL 液, 最后移入 DPBS-PVP ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PVP) 37℃ 避光孵育 1 h; 阴性对照: 将囊胚移到无酶的荧光素中, 37℃ 避光孵育 1 h; 实验组: 将囊胚移到 TUNEL 液, 37℃ 避光孵育 1 h。以上处理后的各组胚胎在避光洗 3 次, 每次 3~5 min, 后在含 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Hoechst 33342 的 DBPS 液中室温避光孵育 15 min, 再用 DPBS-PVP ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  PVP) 避光洗 2 次, 每次 2 min。染色结束后, 将各组囊胚移到载玻片上甘油液滴中, 尽量少带液滴, 以甘油为中心在载玻片四角点少许凡士林, 小心盖上盖玻片并轻压, 使细胞平铺, 最后指甲油封片, 于倒置荧光显微镜紫外光和绿外光激发下观察阴阳对照是否呈现, 阴阳对照成功, 那么再经紫外光和绿外光激发、拍照和记录实验组各囊胚凋亡细胞数和总细胞数。

## 1.7 试验分组

本试验中所用到的生长因子为巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), 在 CDM 中添加 GM-CSF, 使 GM-CSF 的工作浓度分别为 0、0.5、2 和 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 其中 0  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  作为对照组。

## 1.8 试验设计

**试验 1:** 比较培养基中添加不同浓度 GM-CSF 对 ICR 小鼠自然受精原核胚体外早期发育及囊胚质量的影响。试验共分 4 组, 每组重复 7 次。每组以 16~17 枚/50  $\mu\text{L}$  液滴的培养密度将原核期胚胎培养在添加 4 种不同浓度 GM-CSF 的培养基中。

**试验 2:** 比较培养基中添加不同浓度 GM-CSF 对 ICR 小鼠自然受精 2 细胞胚胎体外后期发育及囊胚质量的影响。试验共分 4 组, 每组重复 11 次。每组以 9~10 枚/50  $\mu\text{L}$  液滴的培养密度将 2 细胞胚胎培养在添加 4 种不同浓度 GM-CSF 的培养基中。

**试验 3:** 比较培养基中添加不同浓度 GM-CSF 对 ICR 小鼠体外受精胚胎早期发育及囊胚质量的影

响。试验共分4组,每组重复7次。每组以15枚/50  $\mu\text{L}$  液滴的培养密度将体外受精原核期胚胎培养在添加4种不同浓度GM-CSF的培养基中。

试验4:比较培养基中添加不同浓度GM-CSF对ICR小鼠体外受精发育到2细胞胚胎后期发育及囊胚质量的影响。试验共分4组,每组重复8次。每组以15枚/50  $\mu\text{L}$  液滴的培养密度将2细胞胚胎培养在添加4种不同浓度GM-CSF的培养基中。

### 1.9 统计分析

采用SPSS (17.0版)软件ANOVA法对卵裂率、囊胚率、囊胚总细胞数、内细胞占总细胞数百分比和囊胚细胞凋亡指数进行统计分析,并用LSD检验方法比较各处理间的差异显著性, $P<0.05$ 时表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度GM-CSF对小鼠自然受精胚胎体外发育的影响

在CDM中添加不同浓度的GM-CSF,试验结果显示(表1),小鼠原核胚胎体外培养时,各组卵裂

率、囊胚总细胞数和囊胚内细胞数占总细胞数比例差异不显著,试验组囊胚率均低于对照组,但10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组囊胚率明显低于对照组,其他2个试验组与对照组相比,差异不显著。

### 2.2 2细胞期添加不同浓度GM-CSF对小鼠自然受精胚胎早期发育的影响

将小鼠2细胞移入添加不同浓度的GM-CSF的CDM中,试验结果表明(表2),0.5、2和10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组的凋亡指数明显低于对照组,10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组与0.5、2  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组差异不显著,2  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组凋亡指数显著低于0.5  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组囊胚率有低于对照组和其他2个试验组的趋势,但并没有显著差异。各组囊胚总细胞数和囊胚内细胞数占总细胞数比例差异不显著。

### 2.3 不同浓度GM-CSF对小鼠体外受精胚胎早期发育的影响

在CDM中添加不同浓度的GM-CSF,试验结果显示(表3),小鼠体外受精胚胎体外培养,与对照组相比,试验组并无显著差异,且试验组之间也无显著性差异。

表1 不同浓度GM-CSF对小鼠自然受精原核胚胎体外发育的影响

Table 1 Effect of CDM with different concentrations of GM-CSF on *in vitro* development of mouse embryos at the pronuclear stage

浓度 <sup>1)</sup> / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ Concentration	培养数 No. of presumptive zygotes cultured	卵裂数(卵裂率/%) <sup>2)</sup> No. of embryos cleaved (%, mean $\pm$ S.E.M)	囊胚数(囊胚率/%) <sup>3)</sup> No. of blastocysts (%, mean $\pm$ S.E.M)	囊胚总细胞数 Total cell number of blastocyst (mean $\pm$ S.E.M, $n=10$ )	ICM/总细胞比例/% Ratio of ICM to total cell number (%, mean $\pm$ S.E.M, $n=10$ )
0	118	107(89.7 $\pm$ 6.1)	72(61.6 $\pm$ 5.1) <sup>a</sup>	92 $\pm$ 4	15.8 $\pm$ 1.2
0.5	117	102(85.7 $\pm$ 5.7)	49(43.0 $\pm$ 5.3) <sup>ab</sup>	97 $\pm$ 5	16.2 $\pm$ 1.1
2	117	105(88.4 $\pm$ 7.3)	52(46.5 $\pm$ 8.1) <sup>ab</sup>	95 $\pm$ 3	17.4 $\pm$ 1.2
10	116	99(85.7 $\pm$ 5.5)	44(40.3 $\pm$ 6.7) <sup>b</sup>	89 $\pm$ 5	17.8 $\pm$ 1.6

注: 1)含有0、0.5、2和10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的CDM; 2)卵裂率=卵裂数/培养数; 3)囊胚率=囊胚数/培养数;同一栏内上标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Note: 1) CDM with concentrations of 0, 0.5, 2 and 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  of GM-CSF; 2) Cleavage rate is defined as number of cleaved embryos/number of presumptive zygotes cultured; 3) Blastocyst developmental rate is defined as number of blastocysts / number of presumptive zygotes cultured; values with different superscript letters within a column are significantly different ( $P<0.05$ ).

表2 不同浓度GM-CSF对自然受精小鼠2细胞期胚胎发育的影响

Table 2 Effect of CDM with different concentrations of GM-CSF on *in vitro* development of mouse embryos at 2-cell embryonic stage

浓度 <sup>1)</sup> / $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ Concentration	卵裂数 No. of embryos cleaved	囊胚数(囊胚率/%) <sup>2)</sup> No. of blastocysts (%, mean $\pm$ S.E.M)	囊胚总细胞数 Total cell number of blastocyst (mean $\pm$ S.E.M)	ICM/总细胞比例/% Ratio of ICM to total cell number (%, mean $\pm$ S.E.M)	凋亡指数/% <sup>3)</sup> Apoptotic index (%, mean $\pm$ S.E.M)
0	108	70(64.2 $\pm$ 6.7)	83 $\pm$ 4( $n=17$ )	23.1 $\pm$ 1.1( $n=17$ )	21.8 $\pm$ 2.2( $n=12$ ) <sup>a</sup>
0.5	108	81(75.1 $\pm$ 5.7)	82 $\pm$ 4( $n=15$ )	23.6 $\pm$ 2.4( $n=15$ )	17.0 $\pm$ 1.0( $n=12$ ) <sup>b</sup>
2	108	82(75.0 $\pm$ 5.9)	91 $\pm$ 3( $n=18$ )	23.3 $\pm$ 1.0( $n=18$ )	10.6 $\pm$ 1.4( $n=11$ ) <sup>c</sup>
10	108	70(64.1 $\pm$ 7.0)	80 $\pm$ 4( $n=17$ )	23.5 $\pm$ 2.2( $n=17$ )	12.7 $\pm$ 1.3( $n=12$ ) <sup>bc</sup>

注: 1)含有0、0.5、2和10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的CDM; 2)囊胚率=囊胚数/卵裂数; 3)凋亡指数=凋亡数/囊胚总细胞数;同一栏内上标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

Note: 1) CDM with the concentrations 0, 0.5, 2 and 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  of GM-CSF; 2) Blastocyst developmental rate is defined as number of blastocysts / number of embryos cleaved; 3) Apoptotic index is defined as number of apoptotic cells / number of total cell number of blastocyst; values with different superscript letters within a column are significantly different ( $P<0.05$ ).

## 2.4 2 细胞期添加不同浓度 GM-CSF 对小鼠体外受精胚胎早期发育的影响

试验结果显示(表4), 10 ng·mL<sup>-1</sup>组囊胚率明

显低于对照组、0.5 ng·mL<sup>-1</sup>组和 2 ng·mL<sup>-1</sup>, 其他各组并无显著差异, 在囊胚总细胞数和囊胚内细胞数占总细胞数的比例上并无显著差异。

表 3 不同浓度 GM-CSF 对小鼠体外受精胚胎发育的影响

Table 3 Effect of CDM with different concentrations of GM-CSF on *in vitro* development of mouse embryos *in vitro* fertilization

浓度 <sup>1)</sup> /ng·mL <sup>-1</sup> Concentration	培养数 No. of presumptive zygotes cultured	卵裂数(卵裂率/%) <sup>2)</sup> No. of embryos cleaved (%, mean ± S.E.M)	囊胚数(囊胚率/%) <sup>3)</sup> No. of blastocysts (%, mean ± S.E.M)	囊胚总细胞数 Total cell number of blastocyst (mean ± S.E.M, n=10)	ICM/总细胞比例/% Ratio of ICM to total cell number (%, mean±S.E.M, n=10)
0	105	100(95.2±2.8)	83(79.1±11.2)	70±4	23.4±1.4
0.5	105	105(100.0±0.0)	89(84.8±7.7)	79±5	23.3±1.1
2	105	104(99.1±1.0)	96(91.4±4.3)	75±3	20.6±1.8
10	105	100(95.2±2.4)	89(84.8±5.4)	78±4	19.3±2.1

注: 1)含有 0、0.5、2 和 10 ng·mL<sup>-1</sup> 的 CDM; 2)卵裂率=卵裂数/培养数; 3)囊胚率=囊胚数/培养数; 同一栏内上标不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Note: 1) CDM with the concentrations 0, 0.5, 2 and 10 ng·mL<sup>-1</sup> of GM-CSF; 2) Cleavage rate is defined as number of cleaved embryos/number of presumptive zygotes cultured; 3) Blastocyst developmental rate is defined as number of blastocysts / number of presumptive zygotes cultured; values with different superscript letters within a column are significantly different ( $P<0.05$ ). The same below.

表 4 不同浓度 GM-CSF 对体外受精小鼠 2 细胞期胚胎发育的影响

Table 4 Effect of CDM with different concentrations of GM-CSF on *in vitro* development of mouse IVF-embryos at 2-cell embryonic stage

浓度 <sup>1)</sup> /ng·mL <sup>-1</sup> Concentration	培养数 No. of presumptive zygotes cultured	囊胚数(囊胚率/%) <sup>2)</sup> No. of blastocysts (%, mean ± S.E.M)	囊胚总细胞数 Total cell number of blastocyst (mean ± S.E.M, n=10)	ICM/总细胞 比例(%) Ratio of ICM to total cell number (%, mean ± S.E.M, n=10)
0	120	108(90.0±2.2) <sup>a</sup>	75±4	21.5±1.7
0.5	120	107(89.2±2.8) <sup>a</sup>	71±3	20.0±1.3
2	120	112(93.3±2.5) <sup>a</sup>	79±4	19.5±1.7
10	120	93(77.5±4.5) <sup>b</sup>	76±3	18.6±1.1

## 3 讨论

本研究系统探索了在化学限定培养基(CDM)中添加 GM-CSF 对小鼠体内自然受精、体外受精原核期与 2 细胞期胚胎体外发育的影响。由 GM-CSF 处理的小鼠自然受精和体外受精胚胎结果可知, 各组在卵裂率、囊胚总细胞数和囊胚内细胞数占总细胞数之比上均没有显著性, 而在囊胚率和凋亡指数上有所不同。在自然受精胚胎, 10 ng·mL<sup>-1</sup> 组的囊胚率都有低于对照组的趋势, 而原核期 10 ng·mL<sup>-1</sup> 组囊胚率明显低于对照组, 而 2 细胞 10 ng·mL<sup>-1</sup> 组囊胚率也有低于对照组的趋势, 这可能与二者所使用的基底比值不同所致; 在体外受精胚胎原核期, 10 ng·mL<sup>-1</sup> 组的囊胚率没有低于对照组, 甚至稍高, 但差异不显著, 这可能正是小鼠体外受精和体内受精的差异所在, 小鼠体外受精与自然受精还是存在一定差别的, 体外环境远不能达到小鼠体内的理想环境, 包括气相<sup>[2-3]</sup>、细胞因子<sup>[8]</sup>等, 所以这很有可

能跟小鼠体外受精培养环境欠佳有密切关系; 2 细胞时期, 10 ng·mL<sup>-1</sup> 组的囊胚率显著低于对照组, 也明显低于其他 2 个试验组。总体上说来, 10 ng·mL<sup>-1</sup> 组囊胚率是低于对照组的, 说明 10 ng·mL<sup>-1</sup> GM-CSF 对小鼠囊胚形成具有抑制作用。关于囊胚细胞凋亡在自然受精胚胎 2 细胞时期, 相同条件下, 0.5、2 和 10 ng·mL<sup>-1</sup> 组的凋亡指数明显低于对照组, 说明 GM-CSF 有利于降低小鼠囊胚细胞凋亡, 而 10 ng·mL<sup>-1</sup> 组与 0.5、2 ng·mL<sup>-1</sup> 组差异不显著, 2 ng·mL<sup>-1</sup> 组凋亡指数显著低于 0.5 ng·mL<sup>-1</sup>, 说明 2 ng·mL<sup>-1</sup> 在抑制小鼠囊胚细胞凋亡上, 效果是最佳的, 这可能是该剂量正好与小鼠胚胎着床前期间宫腔液中 GM-CSF 含量相当<sup>[9]</sup>有关, Desai 等用 2 ng·mL<sup>-1</sup> GM-CSF 也得出了相同的结论<sup>[13]</sup>。凋亡也受许多因素影响, 例如小鼠品系、培养体系<sup>[24]</sup>, 当小鼠品系和培养体系不同时, 凋亡指数可能也会有所不同。

本研究发现, 高浓度的 GM-CSF 不仅不能促进小鼠早期胚胎发育的效率, 反而抑制其发育效率。

这与 Behr 等研究者的结果基本一致<sup>[25]</sup>。但在凋亡上, GM-CSF 具有抑制小鼠囊胚细胞凋亡的作用, 可改善小鼠囊胚的质量。

众所周知, 囊胚细胞凋亡指数是判断哺乳动物囊胚质量的一项重要指标。本研究发现, 各处理组均能够降低囊胚细胞凋亡指数, 这与此前文献报道的结果基本一致<sup>[13, 26]</sup>。GM-CSF 降低细胞凋亡率的原因可能是由于细胞表面有 GM-CSF-R  $\alpha$  和 GM-CSF- $\beta$  c 异源二聚体受体复合物, GM-CSF 可通过此二聚体受体复合物发挥作用<sup>[27]</sup>。此外, 在某些肿瘤细胞、胎盘滋养层细胞、爪蟾卵母细胞及人黑色素瘤细胞均发现有 GM-CSF-R  $\alpha$  生物学活性<sup>[28-29]</sup>, 所以 GM-CSF 降低小鼠囊胚细胞凋亡发生可能和此异源二聚体受体复合物有很大关系。

研究发现,  $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  GM-CSF 能够发挥最佳功能的原因可能该剂量正好与小鼠胚胎着床前期间宫腔液中 GM-CSF 含量相当<sup>[9]</sup>。本研究证实  $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  GM-CSF 能够降低小鼠囊胚细胞凋亡指数, 在小鼠胚胎体外发育效率及总细胞数等方面并无显著促进作用。而与此类似研究表明  $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  GM-CSF 可改善冷冻之后小鼠胚胎细胞的存活率、抑制囊胚细胞凋亡但对囊胚总细胞数也没有显著改善<sup>[13]</sup>。与之相反, Levent 等研究者发现  $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  GM-CSF 能够显著提高小鼠自然受精胚胎囊胚总细胞数<sup>[14]</sup>, 这可能与所用小鼠品系、培养基种类不同有关。本试验中所用化学限定培养基 (CDM) 可能更能真实反映出 GM-CSF 在胚胎发育过程中的生理作用。近年来, 以 PVP 替代 BSA, 制备成化学限定培养基 (CDM), 并且以其化学成分明确, 重复性高、可操控性强, 便于研究培养体系具体化学组分的作用机制, 越来越受到研究者的青睐。

同时本试验也证实了一定剂量范围内的 GM-CSF 有利于改善小鼠自然受精与体外受精囊胚的质量, 但剂量过高可能不利于小鼠受精胚胎的早期发育。

GM-CSF 对小鼠胚胎着床后发育及胎儿的健康可能有不可估量的作用, GM-CSF 作为一种新型生长因子, 可能具有不可替代的作用。因此, GM-CSF 对小鼠胎盘结构、生化代谢的影响还需进一步的研究和探讨。

致谢: 感谢张远亮、贾晴在实验耗材及试剂准备方面提供的帮助。

## 参考文献:

- [1] Vajta G, Rienzi L, Cobo A, et al. Embryo culture: can we perform better than nature?[J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(4): 453-469.
- [2] Ali J, Whitten W K, Shelton J N. Effect of culture systems on mouse early embryo development[J]. *Human Reproduction*, 1993, 8(7): 1110-1114.
- [3] Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, et al. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes[J]. *Reprod Biomed Online*, 2004, 9(4): 409-417.
- [4] Vajta G, Peura T T, Holm P, et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system[J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55(3): 256-264.
- [5] Roh S, Choi Y J, Min B M. A novel microtube culture system that enhances the in vitro development of parthenogenetic murine embryos[J]. *Theriogenology*, 2008, 69(2): 262-267.
- [6] Chatot C L, Lewis J L, Torres I, et al. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium[J]. *Biol Reprod*, 1990, 42(3): 432-440.
- [7] Biggers J D, McGinnis L K, Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium[J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(1): 281-293.
- [8] Kurzawa R, Glabowski W, Baczkowski T, et al. Evaluation of mouse preimplantation embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin-like growth factor I and II, epidermal growth factor, insulin, transferrin and selenium[J]. *Reprod Biol*, 2002, 2(2): 143-162.
- [9] Robertson S A, Mayrhofer G, Seamark R F. Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice[J]. *Biol Reprod*, 1992, 46(6): 1069-1079.
- [10] Park L S, Martin U, Sorensen R, et al. Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89(10): 4295-4299.
- [11] Robertson S A, Sjoblom C, Jasper M J, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos[J]. *Biol Reprod*, 2001, 64(4): 1206-1215.
- [12] Sjoblom C, Roberts C T, Wikland M, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor alleviates adverse consequences of embryo culture on fetal growth trajectory and placental morphogenesis[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(5): 2142-2153.
- [13] Desai N, Kattal N, AbdelHafez F F, et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and co-culture can affect post-thaw development and apoptosis in cryopreserved embryos[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2007, 24(6): 215-222.
- [14] Robertson S A, Lavranos T C, Seamark R F. In vitro models of the maternal fetal interface[M]//Wegmann TG, Nisbett-Brown E, Gill TG. The molecular and cellular immunobiology of the maternal-fetal interface. New York: Oxford University Press, 1991: 191-206.
- [15] Karagenc L, Lane M, Gardner D K. Granulocyte-macro-

- phage colony-stimulating factor stimulates mouse blastocyst inner cell mass development only when media lack human serum albumin[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2005, 10(4): 511-518.
- [16] Agerholm I, Loft A, Hald F, et al. Culture of human oocytes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor has no effect on embryonic chromosomal constitution[J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2010, 20(4): 477-484.
- [17] Elaimi A, Gardner K, Kistnareddy K, et al. The effect of GM-CSF on development and aneuploidy in murine blastocysts[J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(6): 1590-1595.
- [18] Biggers J D, Summers M C, McGinnis L K. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos[J]. *Hum Reprod Update*, 1997, 3(2): 125-135.
- [19] Quinn P, Kerin J F, Warnes G M. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid[J]. *Fertil Steril*, 1985, 44(4): 493-498.
- [20] Summers M C, Bhatnagar P R, Lawitts J A, et al. Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM[J]. *Biol Reprod*, 1995, 53(2): 431-437.
- [21] Summers M C, McGinnis L K, Lawitts J A, et al. IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids[J]. *Human Reproduction*, 2000, 15(8): 1791-1801.
- [22] Brison D R, Schultz R M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha[J]. *Biol Reprod*, 1997, 56(5): 1088-1096.
- [23] Brison D R, Schultz R M. Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor alpha-deficient mouse blastocysts[J]. *Biol Reprod*, 1998, 59(1): 136-144.
- [24] Kamjoo M, Brison D R, Kimber S J. Apoptosis in the preimplantation mouse embryo: effect of strain difference and in vitro culture[J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(1): 67-77.
- [25] Behr B, Mooney S, Wen Y, et al. Preliminary experience with low concentration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: A potential regulator in preimplantation mouse embryo development and apoptosis[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2005, 22(1): 25-32.
- [26] Sjoblom C, Wikland M, Robertson S A. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) acts independently of the beta common subunit of the GM-CSF receptor to prevent inner cell mass apoptosis in human embryos[J]. *Biology of Reproduction*, 2002, 67(6): 1817-1823.
- [27] Park L S, Martin U, Sorensen R, et al. Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89: 4295-4299.
- [28] Ding D X, Rivas C I, Heaney M L, et al. The alpha subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation-independent pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 2537-2541.
- [29] Spielholz C, Heaney M L, Morrison M E, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signals for increased glucose uptake in human melanoma cells[J]. *Blood*, 1995, 85(4): 973-980.