

原 著

用顆粒細胞和小白鼠受精卵或兩細胞期早期胚胎
行共同培養可增進其發育

何信頤* 曾啓瑞 張淑如 簡立維 陳庵君

摘 要

我們取下小白鼠輸卵管內的兩細胞期胚胎和小白鼠顆粒細胞進行共同培養，發現胚胎形成囊胚的比例(75%)明顯較沒有進行共同培養的(58%)高，顯示顆粒細胞的共同培養對早期胚胎的生長發育有益。

在小白鼠體外受精的實驗方面，我們發現在3%BSA溶液中的受精率(52%)比在15%FCS溶液中的受精率(22%)為高，這可能是血清中含有較多不利精卵體外受精的物質。更進一步發現，使用 microdrop in oil 處理 BSA 溶液，受精率可顯著提高(70%)。但體外受精所形成的早期胚胎，則不像取自受精於輸卵管的早期胚胎般可在體外發展至桑葚胚及囊胚。

由本實驗我們可以歸納出幾點結論：顆粒細胞的共同培養系統確可在體外協助早期胚胎的發展。另外，在進行體外受精時，使用無血清培養液比使用含血清培養液有較高的受精率。而 microdrop in oil 可提供比一般培養皿好的體外受精環境，使受精率更為提高。但這些體外受精所形成的受精卵，其胚胎品質比在輸卵管內受精的早期胚胎為差。

關鍵字：顆粒細胞，共同培養，小白鼠胚胎，體外受精。

自從1978年英國成功地誕生全世界第一名體外受精的試管嬰兒，十幾年來人工生殖科技突飛猛進地發展。這些日新月異的生殖科技為不孕夫婦膝下無子的痛苦帶來一道曙光。然而，如何提高體外受精的成功率便成為當前急待克服的課題。由於體外受精--胚胎植入(In vitro fertilization-Embryo transfer)和自然受孕之最大不同便在於其受精及著床前發育都是在體外的人工環境內進行，而很多研究也顯

示在胚胎受精起至進入子宮著床這段時間，輸卵管內的環境因素對胚胎發展有決定性的影響。因此，如何在體外能營造一個類似體內的生物環境便成為我們研究的重點。在我們的實驗中，我們將小白鼠的顆粒細胞和小白鼠著床前胚胎共同培養(coculture of granulosa cell and pre-implantation embryos)，以了解共同培養對早期胚胎發育成囊胚的影響。並將以小白鼠為實驗模型，嘗試進行小白鼠體外受

*臺北醫學院醫學系五年級

臺北醫學院附設醫院 婦產科家計科

民國八十二年二月十二日受理

精，以實地了解試管嬰兒進行時所需面對的問題。

器材與方法

培養液的準備

1. DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline (Gibco).

2. BSA :以 HTF (human tubal fluid) 為溶劑，沖泡成含 bovine serum albumin (Sigma) 3% 的溶液，經 $0.2\ \mu\text{m}$ filter (Minisart, Sartorius) 過濾後保存。

3. FCS: 以 HTF 為溶劑，沖泡含 fetal calf serum (Sigma) 10% 和 15% 的溶液，並以 $0.2\ \mu\text{m}$ filter 過濾保存。

以上各培養液的使用期限皆不超過一星期。

母鼠的誘導排卵

取 6-8 週大的 ICR 母鼠(臺大動物實驗中心)，以腹腔內注射(Intraperitoneal injection)的方式打入 0.1 cc ,10 IU 的 PMSG (pregnant mare serum gonadotropin, Serono)，4 8 小時後再注射 0.1 cc ,10 IU 的 HCG (human chorionic gonadotropin, Serono)。

兩細胞期胚胎的取法

1. 每隻母鼠在注射過 HCG 後，配以兩隻 8-10 週大的 ICR 公鼠(臺大動物實驗中心)共處一籠過夜，第二天則可見母鼠的陰部有所謂的 vaginal plug，代表完成交配。

2. 將成功交配的母鼠於注射 HCG 36 小時後，以頸椎脫臼法(cervical dislocation)殺死，取下其兩側輸卵管，在解剖顯微鏡下用針戳破並尋找成功分裂至兩細胞期的受精卵，以玻璃滴管(事先在酒精燈燄上拉長以縮小其管徑)收集兩細胞期胚胎並分別置入實驗組及對照組的培養皿中，放在 37°C , 5% CO_2 的培養箱內培養，每 24 小時觀察一次並記錄。

體外受精的步驟

1. 母鼠在注射過 HCG 12 小時後，以頸椎脫臼法殺死並取下其兩側輸卵管，在解剖顯微鏡下以針戳破，再以玻璃滴管收集其 cumulus mass 置入培養液中。

2. 將 8-10 週大的公鼠殺死，取下其兩側副睪及輸精管，在培養皿中擠壓使精蟲能被擠入培養液內。

3. 將含有精蟲的培養液滴入含有 cumulus mass 的培養皿中(organ dish 或 microdrop in oil, 詳見下)，置於 37°C , 5% CO_2 的培養箱內 6 小時以進行受精反應，cumulus mass 將被精蟲衝散為游離的卵和顆粒細胞。

4. 以拉長的玻璃滴管收集培養皿中的卵，分別放入實驗組及對照組的培養皿中，置入 37°C , 5% CO_2 的培養箱培養，每 24 小時觀察一次並記錄。

5. 吸走卵後，原先進行受精反應的培養皿內還存有大量游離的顆粒細胞，甚至部分已經附著在培養皿的底部。將此培養皿放在 37°C , 5% CO_2 中培養 24 小時，使更多顆粒細胞能附著在培養皿底部，再以 DPBS 清洗數次以移除未附著的顆粒細胞及死去的精子。加入適當培養液培養附著的顆粒細胞以供實驗組進行共同培養之用。在共同培養實驗進行前 24 小時換上新鮮培養液。

Microdrop in oil 的處理

在 4-well 的培養皿(Felcon)中各滴入一滴 BSA 或 FCS 溶液，再滴入石蠟油(paraffin oil)將其覆蓋。使用時分別以玻璃滴管將 cumulus mass 及含有精蟲的培養液移入油面下的培養液液滴中，放在 37°C , 5% CO_2 下進行 6 小時的受精反應，並和純粹在 organ dish 內進行受精反應的結果相比較。

Table 1. Development of early embryos from oviducts and granulosa cells in coculture

	2-Cell No	Morula No.	Blastocysts No.
3% BSA	100	78 (78.0%)	65 (65.0%)
10% FCS	236	184 (78.0%)	137 (58.1%)
10% FCS + granulosa	142	115 (81.0%)	106 (74.9%)*

*p < 0.005

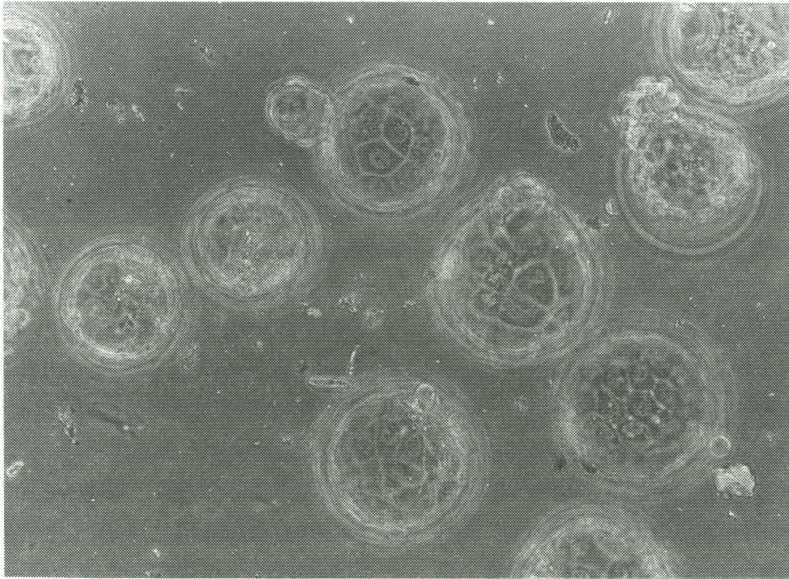


Fig. 1 Blastocysts developed from 2-cell stage embryos. Some of them are hatching out of the zona pellucida.

結果

早期胚胎與顆粒細胞的共同培養

取出 478 個已在輸卵管內發育成兩細胞期的胚胎，分別放入 3%BSA, 10%FCS, 及含有顆粒細胞和 10% FCS 三組培養皿中，所得結果如表一和圖一。

在培養液的選擇方面，3%BSA 及 10% FCS 二者對兩細胞期的胚胎發育成桑葚胚及囊胚的影響，在統計學上不具意義。

但若兩細胞期的胚胎在 10%FCS 內和顆粒細胞共同培養，和單純以 10%FCS 培養的

胚胎比較，雖在形成桑葚胚上的比例沒有顯著差別，可是形成囊胚的比例卻明顯大於沒有共同培養的對照組 (p < 0.005)，意即在與顆粒細胞進行共同培養下，兩細胞期的胚胎確實比較容易發育成囊胚。

小白鼠體外受精的培養環境

使精子和 cumulus mass 在以各種培養環境中進行受精反應 6 小時(見圖二)，以形成兩細胞期的胚胎證明細胞分裂來定義完成受精⁽⁹⁾，結果如表二。

不論是在 organ dish 中，或是以 micro-drop in oil 的方式處理，使用 3%BSA 溶液都

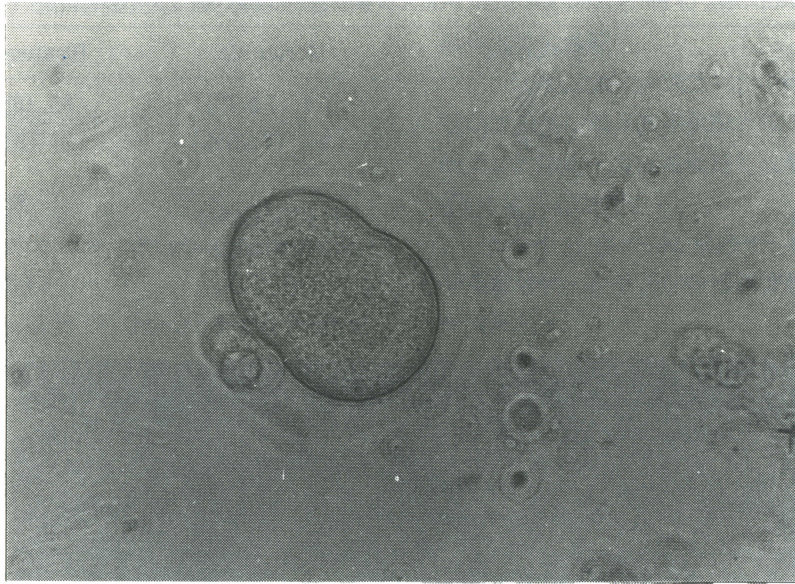


Fig. 2 Fertilized egg in mouse IVF. There are two secondary polar bodies beside the dividing nucleus.

Table 2. Fertilization environment in mouse IVF

	Egg No.	2-Cell No.
3% BSA	220	116 (52.7%)
15% FCS	302	67 (22.2%) ^a .
15% FCS + 1% L-Glu	126	47 (37.3%) ^c .
3% BSA microdrop	63	44 (69.8%) ^d .
15% FCS microdrop	156	36 (23.1%) ^b .

- a. $p < 0.001$ compared with 3% BSA.
- b. $p < 0.001$ compared with 3% BSA in microdrop.
- c. $p < 0.001$ compared with 15% FCS.
- d. $p < 0.025$ compared with 3% BSA.

明顯比使用 15%FCS 有較高的受精率(二者皆 $p < 0.001$)。

15% FCS 可在溶液內多加 1% L-glutamate 而提高受精率($p < 0.001$)。

同樣使用 3% BSA 溶液, 在 microdrop 內進行受精反應, 其受精率(69.8%)比在 organ dish 中的受精率(52.7%)好($p < 0.$

025)。

由此表可知, 在 microdrop 中的 3% BSA 溶液內進行體外受精反應, 可得最好的受精率。

討論

自從 Dr. Robert Edward 在 1978 年成功地發明試管嬰兒體外受精，為人工生殖科技開創了一個新的紀元。為求能使體外受精達到更好的成功率，共同培養的觀念由焉而生⁽¹⁻⁴⁾。由於體外受精和自然受孕的最大差別在於受精及著床前的環境不同，營造一個和自然受孕類似的生物環境便成為共同培養的主要目的。在這方面許多細胞的共同培養都已證明對胚胎發育有良好影響，諸如 Vero cells, fibroblasts 等。但我們認為，女性生殖系統的細胞的共同培養應該較其他器官的細胞有更好的效果。因為自然狀態下所產生的胚胎本來就在母親的生殖系統內發育，理論上最可能提供最適合的生長環境。受精卵在著床前的大部份時間都是在母親輸卵管內度過，因此輸卵管上皮細胞應是最好的共同培養的材料，很多研究也顯示輸卵管上皮細胞的共同培養確能大幅提升胚胎發育成果^(5,6)。但此類細胞來源不易，培養困難，在臨床應用上難具經濟效益。而顆粒細胞則可補救此缺憾，因為顆粒細胞可在每次進行體外受精時收集，無論在實驗上或臨床上，都很簡便而經濟。而其對早期胚胎的影響，在本次實驗中也確實提高了兩細胞期胚胎形成囊胚的比例，證明在顆粒細胞的共同培養下，早期胚胎可得到較好的發育^(7,8)。

至於共同培養的理論機制，一般認為最主要有二：第一，分泌特殊分子，進行 paracrine 的作用，例如生長因子 (growth factor)，細胞激素 (cytokine) 等胚胎營養物質 (embryotrophic substance)；第二，移除有毒物質，包括移去胚胎毒性物質 (embryotoxic substance) 及降低氧張力 (oxygen tension；很多研究顯示，高氧張力對早期胚胎發育有不良的影響，參考 9,10,11)。這兩個優點是人工培養液所難以比擬的。由於顆粒細胞的共同培養確對早期胚胎有良好的影響，且又符合臨床上經濟方便

的要求，對將來體外受精成功率的改善，具有相當大的潛力⁽²⁾。

另外，在本實驗內，使用 BSA 或 FCS 為培養液，對早期胚胎本身的發育沒有差別，這是早期胚胎培養和一般細胞培養最大的不同。早期胚胎未經分化，且本身在卵內便貯存有大量養分，對外界營養需求不高（這在卵生動物尤為明顯，卵生動物所含養分足夠該卵發育至孵化的），需要的反而是能啟動其核內一連串基因生化反應的生長因子 (growth factor)，或能助其排除毒性物質的解毒功能，這也便是細胞共同培養比單純培養液更能有效助其生長的原因。但像顆粒細胞等一般體細胞，由於高度分化，又沒有自貯養分，特殊培養液的選擇便很重要。在本實驗中，我們以 FCS 培養顆粒細胞，因為它比 BSA 含有更高的營養成份。

在體外受精方面，我們以小白鼠為模型，進行試管嬰兒的實際操作，將母鼠的 cumulus mass 和公鼠的精蟲混在一起，使其進行受精反應。在這方面，首先要突破的是受精率的問題。由於小白鼠的 pronucleus 觀察不易，我們參照 Dr. Pabon 的定義⁽⁹⁾，以形成兩細胞期胚胎的有無來計算受精率。在培養液的選擇方面，我們以 FCS 和 BSA 兩溶液分別代表含血清的有無。其中 BSA 溶液只在 HTF 中加入白蛋白以供緩衝 (buffer) 之用，為無血清培養液 (serum-free medium)，而 FCS 則為含血清培養液 (serum-supplemented medium)。一般認為，FCS 的營養成份明顯較 BSA 好，用在細胞培養上應有較好的效果。但我們發現，不論在 organ dish 或在 microdrop 中進行體外受精，使用 BSA 的受精率都明顯優於使用 FCS，這在 Dr. Holst 和 Dr. Fukui 的報告中也有類似的觀點^(11,12)。這是因為受精反應的進行不同於一般的細胞培養，必須考慮以下三方面因素：第一，精子和卵子本身都貯有足夠的能量，因此培養液的營養與否對其受精反應的影響不大，這和表一中 BSA 和 FCS 對兩細胞期胚胎的發育也無顯著差別的道理相同。第二，

血清中所含有的很多物質，諸如抗體、補體及其他發炎介質 (inflammatory mediators)，雖然十分微量，對一般細胞培養影響很小，但對極為脆弱的精子、卵子或受精卵而言，可能已具有很大的傷害。第三，由於受精反應進行時，卵子為大量的顆粒細胞所包圍，血清的供給帶給顆粒細胞較好的營養和較多的生長因子使其活性大增。一些研究也顯示顆粒細胞在不同培養環境下分泌能力也隨之改變^(7,8)。而高度活化的顆粒細胞則易使未受精的卵子黃體化 (luteinization)，影響其受精率^(12,13)。基於這些考慮，在進行體外受精時，使用無血清培養液，反而比含血清培養液更具價值。

至於 FCS 溶液對體外受精的不良影響，可因加入 1% L-glutamic acid 而獲得些許改善。這可能是因為一般培養液中的 L-glutamic acid 極易自空氣中氧化消失，而 L-glutamic acid 又為 glutathion 等分子的重要成分，對細胞的抗氧化作用有很大的影響。但這一點改善仍遠不如使用 BSA 溶液的受精率。

然而最重要的是，BSA 溶液在 microdrop 的處理下，其受精率近乎七成，明顯大於使用 organ dish 的 BSA 溶液，顯示 microdrop 確對體外受精率有重大影響。microdrop 應用在胚胎培養上有三大意義：第一，在油滴覆蓋下，BSA 液滴內形成一個封閉環境，諸如 pH，氧張力等因素都不易受到外界影響而變動；第二，小型的液滴環境，有利於其 autocrine 和 paracrine 的進行。很多研究顯示在早期胚胎發展過程中，由 autocrine 和 paracrine 而來的生長因子對胚胎的發育佔很重要的角色⁽¹⁴⁾，而 microdrop 使這些作用更容易進行⁽¹⁵⁾。第三，在小型的液滴中，可維持很高的精蟲濃度，對受精率有直接的正面影響，可用較少的精子達到受精的目的。由於 microdrop 有如上的好處，操作又簡便，已經成為部分國外不孕症中心施行體外受精及胚胎培養的方法，在臨床上一尤其是對精蟲較少的男性病患一應有很大的應用價值。我們將體外受精成功的受精卵在

不同條件下繼續培養，發現大部分胚胎都在兩細胞期便無法繼續分裂下去 (即所謂的 2-cell block)，且沒有一個受精卵能成功發育至桑葚胚以上，大部份胚胎都碎裂 (fragmentation) 而死，顯示胚胎的品質極差。這和在輸卵管內受精而形成的兩細胞期胚胎，有六成以上都能長成囊胚的情況相比，真有天壤之別，可見受精時的生物環境，對受精反應的進行及早期胚胎的發育，確有極深遠的影響。

實驗的最終目的，是希望將成果推展至臨床的實際應用。我們的結論是：不論是配子的受精或早期胚胎的生長與發育，母體所提供的特殊環境有著決定性的影響。在進行不孕夫婦的試管嬰兒體外受精時，如何在體外妥善處理並培養精子、卵子、以及早期胚胎便成為當前突破 IVF 成功率的焦點所在。這包括了穩定培養環境，使 autocrine 和 paracrine 順利進行，提供 embryotrophic effect，除去胚胎毒性物質及降低氧張力等等。microdrop 的處理，乃至於目前最熱門的共同培養系統，都是藉由模擬一個類似人體內的生物環境以改善這些問題，也成為國內外很多不孕症中心期以提高成功率的方法⁽⁴⁾。我們希望這個共同培養的觀念，能進一步突破人類 IVF 的成功率，以期造福更多的不孕夫婦。

誌謝

感謝國科會提供全部研究經費 (計畫編號：NSC 82-0115-C-038-010-007 b, NSC 82-0412-B-038-010)。並感謝臺北醫學院生藥學科在飼養小白鼠方面所提供的協助。

參考文獻

1. Bongso A, Ng SC, Fong CY, et al.: Coculture - a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 56(2):179-89, 1991.

2. Thibodeaux JK, Godke RA: In vitro enhancement of early stage embryos with coculture. *Arch Pathol Lab Med* 116, 364-72, 1992.
3. Ouhibi N, Hamidi J, Guilaud J, et al.: Coculture of I-cell mouse embryos on different cell supports. *Hum Repro.* 5: 737-743, 1990.
4. Bonso A, Ng SC, Fong CY, et al.: Coculture in human assisted reproduction. Support of embryos in vitro and their specificity. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 626:438-44, 1991.
5. Goldberg JM, Khalifa E, Friedman CI, et al.: Improvement of in vitro fertilization and early embryo development in mice by coculture with human fallopian tube epithelium. *Am J Obstet Gynecol* 165:1802-5, 1991.
6. Takeuchi K, Magata Y, Sandow BA, et al.: Primary culture of human fallopian tube epithelial cells and coculture of early mouse pre-embryos. *Molecular Reproduction and Development* 32:236-242, 1992.
7. Richardson MC, Davis DW, Watson RH, et al.: Cultured human granulosa cells as a model for corpus luteum function: relative roles of gonadotrophin and low density lipoprotein studied under defined culture conditions. *Hum Repro.* 7(1):12-18, 1992.
8. Kobayashi K, Takagi Y, Satoh T, et al.: Development of early bovine embryos to the blastocyst stage in serum-free conditioned medium from bovine granulosa cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 28 A(4):255-9, 1992.
9. Pabon JE, Findley WE, Gibbon WE: The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 51(5), 896-900, 1989.
10. Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, et al.: Protection from oxidative stress by thiorodoxin and superoxide dismutase of mouse embryo fertilization in vitro. *Hum Repro.* 6(9):1305-10, 1991.
11. Kishi J, Noda Y, Narimoto K, et al.: Block to development in cultured rat I-cell embryos is overcome using medium HECM-1. *Hum Repro.* 6(10):1445-8, 1991.
12. Holst N, Bertheussen K: Serum-free culture media in IVF: Clinical results and granulosa cell function. *ARTA* 3; 239-48, 1992.
13. Holst N, Bertheussen K, Burhol PG, et al.: Medium-associated luteinization expressed as progesterone release in granulosa-luteal cells isolated from patients undergoing in-vitro fertilization. *Hum Repro.* 6(10):1343-8, 1991.
14. Paria BC, Dey Sk: Preimplantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and role of growth factor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 87(12):4756-60, 1990.
15. Baltz JM, Biggers JD: Oxygen transport to embryos in microdrop cultures. *Molecular Reproduction and Development*, 28(4): 351-5, 1991.
16. Fukui Y, McGowan LT, James RW, et al.: Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 92(1):125-31, 1991.
17. Cohen J, Talansky B, Alikani M: Laboratory techniques for handling gametes and embryos. *British Medical Bulletin* 46(3); 643-53, 1989.

Enhancement of the Development of Fertilized Mouse Eggs and 2-cell Stage Early Embryos by Use of Granulosa Cells in a Coculture System

Hsin-Yee Ho *, Chii-Ruey Tzeng, Li-Wei Chien,
Shew-Ru Chang and An-Chiun Chen

ABSTRACT

In the experiment of coculture system with early embryo, a total of 478 2-cell stage embryos from oviduct of female mice were collected and cultured in BSA, FCS media or cocultured with murine granulosa cells. The rate of 2-cell mouse embryos reaching blastocysts was 65%, 58%, and 75% respectively and it was significant higher in the coculture group ($p < 0.005$).

In the experiment of mouse in vitro fertilization (IVF), the fertilization rate in BSA (53%) is much higher than in FCS (22%), but the best fertilization rate (70%) was observed when BSA medium was treated as microdrop in oil, compared with the control (53%). However, further embryos growth derived from IVF could not develop as well as those fertilized in oviducts, and most of the fertilized eggs were arrested at the 2-cell stage. The supplementation of granulosa cells in coculture system also did not improve the embryos' growth and development.

In conclusion : 1) coculture with granulosa cells may facilitate the development of mouse pre-implantation embryos; 2) microdrop in oil may provide a better environment for fertilization in vitro; 3) embryo quality is better if fertilized in oviducts rather than in vitro.

Key words: granulosa cell, coculture, mouse embryo, IVF.

* Department of Medicine, fifth grade student, Taipei Medical College
Division of Family Planning, Department of Obstetrics and Gynecology, Taipei Medical College Hospital, Taipei, Taiwan, ROC

Received for Publication: February 12, 1993.