

微滴培养技术的新应用

霍龙¹ 张岩² 吴应积^{1,2}

(¹内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021; ²内蒙古大学哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特 010021)

摘要: 微滴培养技术在卵母细胞培养和胚胎早期发育研究中有广泛的应用。近期研究发现这项技术又有新的应用范围。有科学家发现将该技术应用于胚胎干细胞可以实现高效传代, 在精原干细胞培养和精子发生相关过程的研究方面也可取得很好效果。同时, 对早期人类胚胎干细胞的分离过程的监控和对精原干细胞生长过程的观察也相对容易。这些研究结果显示, 微滴培养技术在这些新领域的研究与常规培养方法相比具有独特的优势。回顾微滴培养技术的主要发展过程, 重点探讨微滴培养技术的最新应用及其优点。

关键词: 微滴培养技术 新应用 体外培养 胚胎干细胞 精原干细胞

The New Applications of Micro-drop Culture Technique

Huo Long¹ Zhang Yan² Wu Yingji^{1,2}

(¹ College of Life Sciences Inner Mongolia University, Hohhot 010021; ² Key Laboratory of China Education Ministry for the Research of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021)

Abstract: Micro-drop culture technique has been used widely in the oocyte culture and the development of early embryos. It has been found this technology has multiple new applications by recent studies. Some scientists have found that this technique used in embryonic stem cells can achieve high efficiency in passage, used in *in vitro* culture of spermatogonial stem cells and related spermatogenesis can be also very desirable, while it's relatively easier to monitor the derivation of the early human embryonic stem cells and observe the process of the growth of spermatogonial stem cells. These results showed that micro-drop culture technique in these new areas of research has multiple special advantages compared with the conventional culture methods. In this review, we describe the development process of the micro-drop culture technique, and focus on the latest applications and advantages of this technique.

Key words: Micro-drop culture New applications *In vitro* culture Embryonic stem cells Spermatogonial stem cells

微滴培养技术是指在覆盖油膜的一定微小体积的培养环境内对少数定量细胞的一种培养方法。这项技术的建立对卵母细胞培养^[1]、体外受精^[2]、胚胎早期发育^[3]以及多种胚胎操作技术^[4]的发展起到了极大的促进作用。近期一些学者的研究发现, 微滴培养技术还拥有更广阔的应用范围, 如该技术可实现胚胎干细胞的高效传代和对其分化过程的监控^[5], 并在精原干细胞培养和观察^[6]以及精子发生相关过程的研究方面^[7]也可取得很好效果。

1 微滴培养技术的主要发展阶段

1963 年, Brinster^[8,9] 为胚胎培养而创立微滴培

养技术, 经过近半个世纪的发展, 微滴培养技术曾用于胚胎内细胞团的培养^[10]及对阿米巴滋养体形态的观察^[11]; 在检测药物敏感性^[12]和对神经元细胞网状系统动力学^[13]进行特性分析时也证明了该方法的可行性。此外, 该技术已成功应用于胚胎、卵子培养、体外受精技术、胚胎干细胞及精原干细胞培养等一些重要领域的研究。

1.1 微滴培养技术在胚胎和卵子发育研究方面的应用

1980 年报道有科学家利用微滴培养技术培养小鼠胚胎, 并且成功证明了小鼠胚胎合成和释放糖

收稿日期: 2011-04-29

基金项目: 国家大学生创新性实验计划(101012610), 高等学校博士学科重点专项科研基金项目(20101501110001)

作者简介: 霍龙, 男, 本科, 研究方向: 精原干细胞; E-mail: howlown@163.com

通讯作者: 吴应积, 男, 教授, 研究方向: 精原干细胞及乳腺生物反应器; E-mail: yingji_wu@yahoo.com.cn

蛋白的原因是由于衣霉素的不敏感性^[14]。Choi 和 Landa 等^[14]分别将微滴培养技术成功应用于小鼠八倍体胚胎的培养和马卵母细胞在体外的成熟作用。1996 年报道的关于在小鼠胚胎培养方面的文章指出,科学家通过对囊胚孵化率的研究说明与其他常规方法比较,微滴培养是一种更优越的培养系统^[3]。同年还有报道指出,在同样时间内未更换培养液的微滴培养系统和常规培养系统相比,牛的胚胎的发育率在前者的内部明显偏高^[15]。2009 年,Sharma 等^[16]阐述了微滴培养技术是一种高效的可对水牛窦前期卵泡的伸展生长提供立体微环境的新方法。一系列的研究试验证明微滴培养技术越来越深入的研究将为胚胎和卵子的体外培养提供更佳培养条件。

1.2 微滴培养技术在体外受精方面的应用

随着体外受精技术的逐渐成熟,许多科学家也将微滴培养法应用于体外受精技术^[17]。早在 1983 年就有文章报道科学家成功将微滴培养技术应用于体外受精,当时使用的是牛卵母细胞和精子^[18]。2004 年的报道中曾经指出微滴培养系统可以提供含有卵、卵泡细胞和卵母细胞成分在内的一个重要的排卵环境,从而为下一步的受精做好准备^[19]。2005 年有文章报道称体外的拟生态微滴受精系统可以减少多精入卵现象,增加潜在的有活力的胚胎数量,而不减少整体数目上生长繁殖的效率^[20]。一直以来,人们认为猪体外受精过程中发生多精入卵现象的主要原因是常规方法中将两种配子进行了共培养,而 Park 等^[21]通过试验证明微滴培养技术可以减少猪的体外受精中多精入卵现象,并会在体外受精过程中获得具有更好特性和染色体核型的胚胎细胞。因此,体外受精技术将会随着微滴培养技术的发展而日趋成熟。

1.3 微滴培养技术在崭新领域的应用

随着微滴培养技术发展,科学家也将其应用到更多领域。2006 年,该项技术被应用于研究人类圆形精子向长形精子的分化过程^[7]。2010 年 4 月,一些学者通过试验证实微滴培养技术在人类胚胎干细胞的培养与分化方面比常规培养技术更为高效,而且更容易监视早期人类胚胎干细胞的分化过程^[5]。在 2010 年 8 月的一篇报道中,Araki 等^[6]将微滴培

养技术应用于精原干细胞的体外培养,并获得成功。这些都是微滴培养技术在细胞领域的崭新应用,而且将对胚胎干细胞和精原干细胞的体外培养作出应有的贡献。

2 微滴培养技术在新领域的应用现状及其优点

2.1 微滴培养技术应用于圆形精子向长形精子体外分化研究

生精细胞体外分化已成为男性辅助生育领域的一大热点,然而,人类生精细胞体外培养分化的技术到目前为止还不成熟,继续探索人类生精细胞体外培养的方法具有十分重要的意义。2006 年有文章报道研究人员通过使用微滴培养技术探讨梗阻性无精子症患者(睾丸正常生精)的生精细胞在体外发生分化的情况^[7],从而探索正常生精细胞向精子分化的条件,为解决体内发育阻滞的生精细胞(生精阻滞患者)在体外重新启动分化的难题提供思路和方法。

研究人员分别以普通 HTF 培养液和 Vero 细胞条件培养液重悬细胞,置于 96 孔板中,用石蜡油覆盖,将此细胞混合物置于 32℃、5% CO₂ 培养箱中培养,期间每 24 h 观察 1 次^[7]。

这种微滴培养技术的优点在于可以实现人睾丸组织的圆形精子细胞在体外化为长形精子细胞这一过程,并在此过程中观察长鞭毛的长形精子细胞及精子、各种圆形细胞(包括圆形精子细胞、精母细胞、精原细胞、Sertoli 细胞及其他体细胞)等的形态。通过对长形精子细胞与圆形细胞的计数,从而求得长形精子细胞比率(长形精子细胞数与长形精子细胞和圆形细胞总数的比值),并发现在添加卵泡刺激素、睾酮的 HTF 培养液中进行睾丸细胞混合培养,24 h 后长形精子细胞比率较培养前显著增加,从而为探索更佳的生精细胞向精子的分化条件提供帮助。

2.2 微滴培养技术应用于人类胚胎干细胞体外培养

人类胚胎干细胞的培养和分化在细胞治疗、器官组织移植等领域具有重要应用。2010 年,有报道称 Aflatoonian 等^[5]将微滴培养技术成功应用于人类胚胎干细胞培养。人类胚胎干细胞培养和分化的常规培养方法是进行内细胞团的共培养,这种共培养使用的滋养层细胞是由内含一些成纤维细胞生长因

子和灭活的鼠或人类胚胎成纤维细胞组成。但在实现人类胚胎干细胞分化的常规操作方法中却存在一些不足。如一些重要的生长因子可能会在培养过程中被稀释乃至消失,进而对细胞培养产生影响。

研究人员试图利用微滴培养技术解决上述问题,在 8 个细胞系的研究试验中,前两个使用常规方法培养的细胞系(每个培养皿中加 10 mL 培养液),另外 6 个细胞系使用微滴培养技术(在每滴 50 μL 培养液的表面覆盖矿物油),通过不同的条件设置对照试验。在建立细胞系的过程中,研究人员对所培养细胞进行冷冻、解冻、染色体的核型分析以及免疫染色等多项操作过程,并发现使用微滴培养法后,干细胞系在每个胚胎内的比例从起初的 4.8% 上升到 16%^[5]。

研究证明,微滴培养法能够更好的维护滋养层细胞并使人类胚胎干细胞实现高效传代。在人类胚胎干细胞的分化方面的应用比常规培养方法更具有优势,也更容易监控早期人类胚胎干细胞的分化过程。

2.3 微滴培养技术应用于精原干细胞体外培养

2010 年 8 月,有文章报道微滴培养技术被成功应用于小鼠精原干细胞的体外增殖培养^[6]。长期以来,精原干细胞的长期体外培养一直受到科学家的关注,因为人们对生精上皮细胞内精原干细胞的形态和生物学特性了解甚少,而它的数目在动物体内含量也较少,如仅占小鼠睾丸细胞的 0.01%,并且如何建立培养技术来获得纯度较高的精原干细胞也一直处于研究状态之中^[21-22]。由于精原干细胞的体外长期培养一直受到条件限制,其体外培养的生长过程也一直未被人们观察到。因而微滴培养技术在精原干细胞培养方面的最新应用为研究人员带来很大惊喜,将微滴培养技术中的优势之处应用于精原干细胞培养会使我们对精原干细胞的研究更为深入。

在相关试验中,研究人员使用小鼠胚胎成纤维细胞作为滋养层细胞,含 10% 胎牛血清的 DMEM 作为培养液,利用显微操作技术转移精原干细胞。通过试验发现,在 5 μL 的微滴培养液体积内,在起初培养生殖干细胞的数目从 3 增加到 40 的过程中,增殖所获得的细胞数量也会随之增加^[6]。当只有少量人体睾丸组织可用来做细胞培养时,如果需要对细胞进行活体检测,常规的富集的方法对此可能并不合适,因为样品中一些重要的成分会在富集过程

中丢失。但应用微滴培养法可以在富集过程中避免丢失问题,通过一些显微操作技术还可以实现对确定数目的细胞进行相关操作^[5]。这种方法可以更容易地从体细胞中挑选出干细胞,并且可以实现细胞的高效增殖^[6]。

研究指出,将微滴培养技术应用于精原干细胞的体外培养过程,人们可更直观地了解精原干细胞的生长过程。由于微滴培养技术是采用一定体积内培养特定细胞数目的培养系统,因此,通过定期地观察和分析,还可以收集定量性的数据^[8]。同时,有试验证明微滴培养系统有利于细胞分选^[23],尤其是在人们对精原干细胞的体外培养过程了解较少的情况下,希望微滴培养技术在精原干细胞培养方面的进一步成熟会使我们更深刻地了解精原干细胞的体外生长机理和自我更生及分化的条件。

虽然微滴培养法与常规培养法使用相同的培养液,但它还具有常规培养法不具备的其他优势。如微滴培养法,可实现在单位体积中培养适当数量的细胞,从而保证细胞的营养需要,防止因培养液过多而导致的一些干细胞发育过程中自身分泌的有效因子的稀释现象,维持培养液滴正常的渗透压。这无疑都将为细胞的体外培养提供更好的环境和条件。

此外,微滴培养技术的优点还来源于覆盖油层,油层避免了污染和培养液蒸发的损失,还起到了稳定温度和 pH 值的作用。研究表明,覆盖油层还可以起到对有毒物质洗涤的作用,同时可以防止外界的污染^[24]。覆盖油滴可以保证培养液内细胞的营养需要,维持培养液滴正常的渗透压,从而实现一个较佳的细胞生长环境。微滴培养法将为细胞体外培养过程的观测和高纯的细胞提取作出应有的贡献。

3 展望

综上所述,微滴培养技术在多领域的研究应用说明该方法相关的培养条件和优势之处将不仅仅适合于胚胎、卵母细胞、圆形精子、胚胎干细胞和精原干细胞,它还可以更广泛地应用于来自其他组织的细胞研究。如有的试验将微滴培养技术成功应用于进行核移植的牛卵母细胞的培养^[25],对克隆动物、转基因动物等研究产生重大影响。因此,这一培养方法将为更多种类的细胞培养提供一个新的技术手段,从而直接应用到生物学与医学的相关研究当

中。我们预期 微滴培养技术将在各类干细胞的挑选、纯化、胚胎操作和精原干细胞操作等研究中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Choi YH , Hochi S , Braun J , et al. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. *Theriogenology* , 1993 , 40(5) : 959-966.
- [2] Park CH , Lee SG , Choi DH , et al. A modified swim-up method reduces polyspermy during *in vitro* fertilization of porcine oocytes. *Animal Reproduction Science* , 2009 , 115(1-4) : 169-181.
- [3] Sherbahn R , Fraser J , Radwanska E , et al. Comparison of mouse embryo development in open and microdrop co-culture systems. *Human Reproduction* , 1996 , 11(10) : 2223-2229.
- [4] Landa V , Teplý O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. *Folia Biological(Praha)* , 1990 , 36(3-4) : 153-158.
- [5] Aflatoonian B , Ruban L , Shamsuddin S , et al. Generation of Sheffield(Shef) human embryonic stem cell lines using a microdrop culture system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal* , 2010 , 46(3-4) : 236-241.
- [6] Araki Y , Sato T , Katagiri K , et al. Proliferation of mouse spermatogonial stem cells in microdrop culture. *Biology of Reproduction* , 2010 , 83(6) : 951-957.
- [7] Cai ZM , Shi M , Long Y , et al. *In vitro* differentiation of human testicular round spermatids to elongating spermatids. *Zhonghua Nan Ke Xue* , 2006 , 12(7) : 587-589 , 593.
- [8] Brinster RL. A Method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Experimental Cell Research* , 1963 , 32: 205-208.
- [9] Brinster RL. Studies on the development of mouse embryo *in vitro*. *Journal of Reproduction & Fertility* , 1965 , 10: 227-240.
- [10] First NL , Sims MM , Park SP , et al. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. *Reproduction , Fertility and Development* , 1994 , 6(5) : 553-562.
- [11] 陈洪友 , 姜庆五 , 李勤学 , 等. 阿米巴活体微培养法. *中国寄生虫学与寄生虫杂志* 2005 23(6) : 453-455.
- [12] Akselband Y , Cabral C , Shapiro DS , et al. Rapid mycobacteria drug susceptibility testing using Gel Microdrop(GMD) Growth Assay and flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* , 2005 , 62(2) : 181-197.
- [13] Macis E , Tedesco M , Massobrio P , et al. An automated micro-drop delivery system for neuronal network patterning on microelectrode arrays. *Journal of Neuroscience Methods* , 2007 , 161(1) : 88-95.
- [14] Fishel SB , Surani MA. Evidence for the synthesis and release of a glycoprotein by mouse blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility* , 1980 , 59(1) : 181-185.
- [15] Fukui Y , Lee ES , Araki N. Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from *in vitro* produced early bovine embryos. *Journal of Animal Science* , 1996 , 74(11) : 2752-2758.
- [16] Sharma GT , Dubey PK , Meur SK. Survival and developmental competence of buffalo preantral follicles using three-dimensional collagen gel culture system. *Animal Reproduction Science* , 2009 , 114(1-3) : 115-124.
- [17] Paria BC , Dey SK. Preimplantation embryo development *in vitro*: cooperative interactions among embryos and role of growth factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 1990 , 87(12) : 4756-4760.
- [18] Bondioli KR , Wright RW Jr. *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacitated *in vitro*. *Journal of Animal Science* , 1983 , 57(4) : 1001-1005.
- [19] Hunter RH , Rodriguez-Martinez H. Capacitation of mammalian spermatozoa *in vivo* , with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Molecular Reproduction and Development* , 2004 , 67(2) : 243-250.
- [20] Clark SG , Haubert K , Beebe DJ , et al. Reduction of polyspermic penetration using biomimetic microfluidic technology during *in vitro* fertilization. *Lab on a Chip* , 2005 , 5(11) : 1229-1232.
- [21] Nagano MC. Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. *Biology of Reproduction* , 2003 , 69(2) : 701-707.
- [22] Tegelenbosch RA , de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research* , 1993 , 290(2) : 193-200.
- [23] Carroll S , Al-Rubeai M. The selection of high-producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opinion on Biological Therapy* , 2004 , 4(11) : 1821-1829.
- [24] Miller KF , Goldberg JM , Collins RL. Covering embryo cultures with mineral oil alters embryo growth by acting as a sink for an embryotoxic substance. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* , 1994 , 11(7) : 342-345.
- [25] Obach B , Wiersema AT , Gaynor P , et al. Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning and Stem Cells* , 2003 , 5(1) : 3-12.

(责任编辑 狄艳红)