

# 胚胎体外共培养:影响因素及作用机理

谭秀文 谭景和\*

(山东农业大学动物科学技术学院,泰安 271018)

**摘 要** 综述了近年来关于哺乳动物早期胚胎与体细胞共培养的研究进展。重点讨论了早期胚胎与不同类型体细胞共培养,血清、发情周期和体细胞传代次数对胚胎共培养效果的影响,以及胚胎体外共培养的作用机理。体细胞共培养体系可以改善早期胚胎体外培养的条件,促进胚胎发育,提高着床率和妊娠率,在发育生殖研究领域有着广泛的应用前景。然而,对其影响因素和作用机理尚欠系统深入研究,许多问题还亟待解决。

**关键词** 胚胎,体细胞,共培养

中图分类号 Q813.7 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2003)04-0502-04

在离体培养哺乳类(包括人)受精卵时人们发现,在一些化学成分确定的培养基中,受精卵往往不能发育到囊胚,而是停顿在某个特定的发育时期。这种现象被称作“发育阻断”。发育阻滞的时期随物种不同而异,例如,大鼠和小鼠的发育阻滞发生在 2-细胞期,人发生在 4-8 细胞期,牛、羊等发生在 8-16 细胞期,兔发生在桑葚胚期<sup>[1]</sup>。这种发育阻滞的时间与胚胎发育中基因表达由母型向合子型过渡的时间基本吻合<sup>[2]</sup>。为了克服胚胎体外发育阻断,人们采用胚胎与体细胞共同培养(Co-culture)的方法来促进胚胎体外的早期发育。共培养体系是指把胚胎放在输卵管上皮细胞或其他类型的辅助细胞上培养。实践证明,共培养技术可以改善胚胎的体外培养效果,克服体外发育阻断,增加发育到囊胚期的胚胎数和囊胚的细胞数<sup>[3]</sup>。尽管近年来用成份明确的培养基已经能够使几种动物(如小鼠和牛)胚胎克服体外阻断而发育到囊胚,但许多动物的胚胎在体外还必须依靠共培养才能发育到囊胚期。另外,探讨共培养系统的作用机制对于了解生殖道对胚胎发育的作用,也十分重要。

## 1 同种体细胞共培养

Eyestone 等(1989)将牛卵母细胞体外成熟体外受精(IVM-IVF)胚胎与输卵管细胞在 M199 液中共培养,共培养与对照组的 2-细胞胚胎数没有差别,但培养 5d 后,共培养组中大于 16 细胞的胚胎数(35%对 7%)和发育到桑葚胚和囊胚的胚胎数(22%对 3%)都明显高于对照组。共培养胚胎移植后,55%的受体牛怀孕并产下牛犊<sup>[3]</sup>。关于体细胞类型对胚胎发育的影响也有研究。Goto 等(1992)将牛 IVM-IVF 胚胎分别与颗粒细胞、输卵管细胞和子宫细胞在 M199 液中共培养,囊胚率分别为 26.9、37.5 和 39.2,差异不显著<sup>[4]</sup>。说明体

细胞的类型对牛早期胚胎发育影响不大。但 Prichard 等(1992)将山羊自然交配后 2-4 细胞胚胎分别与输卵管上皮细胞和子宫上皮细胞在 M199 液中共培养,发现与输卵管上皮细胞共培养比与子宫上皮细胞共培养囊胚率和孵出囊胚率明显提高<sup>[5]</sup>。因此,不同动物的早期胚胎对共培养细胞的要求可能是不一样的。

Ellington 等(1990)发现,牛 IVF 胚胎与新鲜的输卵管上皮细胞共培养比与冻融的输卵管上皮细胞共培养的囊胚细胞数明显增加<sup>[6]</sup>。可能由于新鲜的输卵管上皮细胞代谢活性强,分泌的生长因子和其他活性物质较多的缘故。因此,共培养细胞最好选用新鲜的细胞单层。共培养所用的培养液对胚胎发育也有影响。Carney 等(1990)将兔的体内 1-细胞胚胎分别用 Ham's F10、M199 和 CZB 培养液与输卵管上皮细胞共培养发现,在 M199 培养液中培养的囊胚率和细胞数比在其他培养液中更高<sup>[7]</sup>。

但也有关于共培养效果不明显的报道。Wetzels 等(1998)将人 IVF 胚胎与成纤维细胞共培养 2d,第 3 天进行胚胎移植。发现共培养与对照组相比,妊娠率、细胞数目和胚胎质量上没有差别<sup>[8]</sup>。Carney 等(1990)将兔体内 2-细胞胚胎分别与兔输卵管上皮细胞、肾上皮样细胞系(RK13)、表皮上皮样细胞系(SF1)和皮肤成纤维样细胞系(RAB9)在合成培养液 II 中共培养。结果与体细胞共培养,77%~93%的胚胎发育到囊胚,60%~76%的胚胎从透明带中孵出;但对照组中也有 90%的胚胎发育到囊胚,83%的胚胎孵出。统计表明两组差异不明显<sup>[9]</sup>。

## 2 异种体细胞共培养

鉴于发育阻滞在哺乳类中属普遍现象,各种动物的体细

收稿日期 2003-01-16,修回日期 2003-04-24。

基金项目 国家重点基础研究发展规划(973)项目资助(No. G200016107)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-538-8249616; Fax: 86-538-8249616; E-mail: taoh@sdau.edu.cn

©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

胞可能都有克服发育阻滞的作用。若能用异种体细胞进行胚胎共培养,无疑会大大方便胚胎培养工作。为此,人们探讨了异种体细胞共培养的问题。Zeng 等(1998)利用人输卵管上皮细胞与小鼠的体内 2-细胞胚胎在无血清的 DMEM/F12 液中共培养,结果 82% 的胚胎发育到桑葚胚,77% 的发育到囊胚,63% 的囊胚孵出;而对照组中,45% 的胚胎发育到桑葚胚,13% 的胚胎发育到囊胚,无囊胚孵出;共培养胚胎卵裂速度明显高于对照组,细胞碎裂也少<sup>[10]</sup>。表明人输卵管上皮细胞能支持小鼠的早期胚胎发育。我们将小鼠的体内 1-细胞胚胎与山羊的输卵管上皮细胞在 M16 液中共培养,发育到囊胚的比率为 70%,而单纯用 M16 培养的对照组中,无一例胚胎发育到桑葚胚。说明山羊的输卵管上皮细胞能支持小鼠早期胚胎的体外发育(谭秀文等,待发表)。Pegoraro 等(1998)将牛 IVM-IVF 胚胎分别与牛输卵管上皮细胞和绿猴肾细胞(Vero)在 B2 液中共培养 7~8d 发现,与 Vero 细胞共培养的胚胎比输卵管上皮细胞共培养的胚胎细胞数目明显增多<sup>[11]</sup>。说明牛早期胚胎与 Vero 细胞共培养效果更好。Goto 等(1992)将牛 IVF 胚胎分别与牛颗粒细胞、10 日龄鸡胚皮肤细胞、10 日龄小鼠胚胎的睾丸细胞和 10 日龄鸡胚的肝细胞在 M199 液中共培养,发育到囊胚的比率分别为 53.3、42.9、49.3 和 44.3,差异不显著<sup>[4]</sup>。因此,同种体细胞或异种体细胞对牛胚胎发育的影响差别不大。Ouhibi 等(1990)将小鼠的体内 1-细胞胚胎分别与牛肾细胞(MDBK)和 Vero 细胞共培养发现,胚胎与 MDBK 细胞共培养获得的囊胚率高(67%),而与 Vero 细胞共培养的胚胎,不能通过 2-细胞发育阻断<sup>[12]</sup>。表明 Vero 细胞不能支持小鼠早期胚胎发育。

上述结果说明(1)同一种细胞系对不同动物的胚胎发育影响可能不同。(2)不同动物的早期胚胎对共培养体细胞的种类和种属特异性要求可能不同,牛胚胎与同种和异种动物不同类型体细胞共培养效果都很好,而兔早期胚胎与多种体细胞共培养发育效果都不明显。

### 3 血清与共培养效果

目前研究的共培养体系大都含有血清。市面上比较常见的有胎牛血清(FCS)、犊牛血清(BCS)和发情牛血清(OCS)。血清一方面维持共培养细胞的生长代谢,另一方面也维持胚胎的营养需要。培养液中血清浓度低会使生长因子含量降低,影响共培养细胞和胚胎的发育。

关于血清对共培养体系影响的研究,Rief 等(2002)利用在输卵管合成液(SOF)中添加不同类型和浓度的血清(OCS、FCS 和 DCC-FCS)进行牛输卵管上皮细胞与牛 IVF 胚胎的共培养。DCC-FCS 为右旋糖苷包被木炭处理去除雌二醇、内源性维生素 A 和生长因子的 FCS。在含 OCS 的 SOF 液中培养的牛输卵管上皮细胞具有体内细胞典型的大高尔基器和大量的微绒毛,标志着细胞的代谢活性高。2% 和 5% 的 OCS 对储存在膨胀粗面内质网中蛋白质的合成作用没有明显差别。在调节胚胎营养方面,5% 的 OCS 比 10% 的 OCS 更能促进胚胎葡萄糖转运蛋白-1(Glut-1)的表达。牛输卵管上皮细胞特异性糖蛋白(GP 85-97)是牛输卵管上皮细胞功能的标

志。2% 或 5% 的 FCS 比 10% 的 FCS 明显提高 GP 85-97 基因表达。这可能由于细胞有丝分裂活动降低,利于分化生长的结果。但 OCS 浓度对 GP 85-97 mRNA 的量影响不大。OCS 代替 FCS 时,基因表达升高,可能由于 OCS 中雌二醇的含量较高的缘故。因此,共培养系统中,适当浓度的 OCS 或 FCS 可通过促进细胞分泌胚胎营养因子而支持细胞生长和胚胎发育。DCC-FCS 中的促有丝分裂物质含量降低,能有效地支持牛输卵管上皮细胞的分化生长,保持高比例的有纤毛细胞。不加血清共培养囊胚的 Glut-1 的 mRNA 转录较高,但囊胚发育比例较低,特别是孵出能力降低。这可能由于缺乏特异的血清因子(它们通常阻止所谓的“透明带硬化”)及生长因子(如 EGF)含量降低所致<sup>[13]</sup>。

然而,血清成分的不确定性和可变性使实验向着血清减少或完全无血清的明确培养基发展。另外,血清可能含有病原体或其他污染物,对共培养体系产生毒害作用。

### 4 输卵管上皮细胞的发情周期与共培养效果

Verhage 等(1997)报道,在卵泡期雌二醇水平升高,狒狒输卵管上皮细胞分化成高柱状上皮,分泌细胞的顶端充满膜结合分泌颗粒。黄体时期,孕酮水平升高,上皮退化,去纤毛<sup>[14]</sup>。说明处于不同发情周期的输卵管上皮细胞的形态发生变化,那么,分泌物可能也有变化,对共培养胚胎发育的影响可能也不一样。但目前的研究结果表明,输卵管上皮细胞的发情周期与共培养效果并无联系。Rexroad 等(1988)将绵羊的体内 1-细胞胚胎分别与发情后 2d 的输卵管上皮细胞和黄体期的输卵管上皮细胞在 M199 液中共培养,发现这两种类型的细胞都支持胚胎发育,发育到大于 16-细胞的胚胎数为 37%~42%。这可能由于培养液中添加 FCS 使两种类型的细胞具有相同的类固醇环境,细胞在共培养中产生的分泌物相差不大<sup>[15]</sup>。因此,体外培养的输卵管上皮细胞可能掩盖发情周期对共培养胚胎的影响。

### 5 细胞传代次数与共培养效果

制备共培养细胞的传代次数很重要,传代次数过多可使细胞的某些生物学特征丢失,细胞原有的功能降低,影响共培养胚胎的发育。细胞免疫化学检测显示,原代培养的输卵管上皮细胞绝大多数呈角蛋白染色阳性,波形蛋白阳性细胞不足 2%。传至 4 代以内,角蛋白染色阳性仍占 90% 以上,但传至第 5~6 代时,细胞形态变为长梭形,波形蛋白阳性细胞明显增加<sup>[16]</sup>。说明随着传代次数的增多,培养细胞的形态和功能发生改变。我们将小鼠的体内 1-细胞胚胎分别与原代、第 3 代和第 5 代山羊输卵管上皮细胞共培养,发育到囊胚的比率分别为 71%、69% 和 43%,与第 5 代山羊输卵管上皮细胞共培养,囊胚的发育率显著( $P < 0.05$ )降低。说明随着体细胞传代次数的增多,支持胚胎发育的能力逐渐减弱(谭秀文等,待发表)。因此,在进行共培养研究时,应严格控制细胞的传代次数。

### 6 共培养的作用机理

目前,关于共培养支持胚胎体外发育,克服发育阻滞的

原理并不清楚。可能的作用机制有如下 3 种:第一,共培养细胞可分泌一些对早期胚胎有利的物质,目前研究最多的是生长因子和糖蛋白。生长因子对胚胎发育的促进作用已有报道。转化生长因子(TGF- $\alpha$ 和 TGF- $\beta$ )和表皮生长因子(EGF)能显著提高牛早期胚胎发育到囊胚的比率<sup>[17]</sup>,EGF 还能促进小鼠囊胚滋养层的蛋白合成<sup>[18]</sup>。胰岛素和类胰岛素生长因子(IGF-I)能提高胚胎致密化和囊胚形成比例,促进蛋白质合成<sup>[19]</sup>。IGF-II 是小鼠胚胎正常发育所必需的<sup>[20]</sup>。Larson 等(1990)在简单培养基中添加 TGF- $\beta$ 和牛成纤维细胞生长因子(bFGF),能使 39%的牛早期胚胎通过 8-细胞阻断,而对照组胚胎无一例通过阻断<sup>[21]</sup>。

Desal 等(1998)检测了人 IVF 胚胎与 Vero 细胞共培养时 Vero 细胞释放的生长因子/细胞因子,包括血小板生长因子(PDGF)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、白血病抑制因子(LIF)和表皮生长因子(EGF)。于 Vero 细胞接种后的第 2、3、4、5 和 6 天,分别收集培养瓶中的上清液,用抗生长因子/细胞因子的酶联免疫反应进行检测。所有样品的条件培养基都含有 IL-6、PDGF 和 LIF。IL-6 的浓度从接种后第 2 天的 294pg/孔上升到接种后第 6 天的 1600pg/孔。共培养孔中的 PDGF 也快速增多,从培养早期的 19~40pg/孔升高到接种后第 6 天的 500pg/孔。这些结果表明在共培养中,胚胎处于生长因子和细胞因子浓度升高的动力学环境中<sup>[22]</sup>。我们将小鼠的体内 1-细胞胚胎分别与 50%贴满、贴满后第 1 天、贴满第 3 天及贴满第 5 天的山羊输卵管上皮细胞共培养,发育到囊胚的比率分别为 0、71%、43%和 22.5%。说明胚胎与贴满第 1 天的体细胞共培养效果最好。实验中观察到,接种后第 5 天时体细胞刚好贴满培养孔,可能正处在生长因子和细胞因子的分泌高峰。由此可见,体细胞大量分泌生长因子和细胞因子的时候,共培养胚胎的发育能力最高(谭秀文等,待发表)。Watson 等(1992)用反转录 DNA 扩增法证明,在牛和绵羊上皮细胞中有 IGF-I、IGF-II、TGF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 和 FGF 的 mRNA 转录<sup>[23]</sup>。由此可见,共培养细胞能分泌大量的生长因子。李逸平等(1993)利用兔输卵管上皮细胞分泌蛋白的电泳图谱,确定糖蛋白的分子量范围介于 44~68kD,其中以 68kD 区带最为明显。提示体外培养的输卵管上皮细胞分泌糖蛋白。他们用<sup>125</sup>I 标记示踪技术分析不同发育时间大鼠早期胚胎透明带中的分泌性糖蛋白的情况发现,与兔输卵管上皮细胞共培养的大鼠胚胎,其透明带上都结合有 68kD 的蛋白质,而对照中未发现这条特征蛋白区带<sup>[24]</sup>。说明输卵管上皮细胞分泌的糖蛋白对胚胎发育有作用。

第二,共培养体系可以代谢降解胚胎发育过程中产生的有毒物质,如铵、次黄嘌呤和氧自由基等。Joo 等(2001)将小鼠的体内 1-细胞胚胎与人输卵管细胞共培养发现,与对照组相比,共培养组的氧自由基浓度明显降低<sup>[25]</sup>。说明共培养细胞可以消除氧自由基对胚胎的不利作用。铵和次黄嘌呤也是胚胎发育过程中产生的物质。共培养细胞可能通过降解培养液中的铵和次黄嘌呤,削弱二者对胚胎的不利影响<sup>[26]</sup>。

第三,共培养细胞可能通过胚胎与细胞接触促进胚胎发

育。Joo 等(2001)将小鼠的体内 1-细胞胚胎与人输卵管上皮细胞共培养,在胚胎与细胞之间放一插入物,使胚胎与细胞不接触,发现无一例胚胎发育到囊胚,而共培养中有 45%的胚胎发育到囊胚<sup>[25]</sup>。这说明,在胚胎与体细胞不接触的共培养体系,体细胞对胚胎的有利作用消失。但目前有关体细胞条件化培养基的研究证明,体细胞与胚胎不接触也能促进胚胎发育。Rehman 等(1994)用大鼠肝细胞(BRLC)条件化培养基培养牛 IVM-IVF 胚胎,发现胚胎在条件化 48h 的培养基中发育到囊胚的比例为 56.3%,共培养中囊胚的比例为 59.6%,对照组中囊胚的比例为 27.8%<sup>[27]</sup>。说明条件化培养基支持牛早期胚胎发育,效果与共培养相差不明显。

## 7 前景展望

与体内胚胎相比,体外受精、体外培养胚胎的桑葚胚和囊胚发育率、胚胎质量以及移植到受体后的妊娠和发育产仔率都大大降低。体细胞核移植克隆胚胎移植后的妊娠率更低,而且多出现胎儿和胎盘巨大症、心肺功能不健全和妊娠后期及围产期死亡。这些都严重影响着体外受精和动物克隆技术的实际应用。造成这些问题的原因,除了卵母细胞体外成熟、受精和细胞核移植等过程存在缺欠外,早期胚胎体外培养系统也需要进一步完善。如前所述,采用体细胞共培养,可以改善早期胚胎的体外培养环境,促进体外受精和克隆胚胎的发育,提高胚胎着床率和产仔率。我们目前正在致力于优化小鼠、山羊和牛胚胎的体细胞共培养体系,以提高克隆胚胎的体外培养效果。总之,体细胞共培养体系可以改善早期胚胎的体外发育条件,在发育和生殖研究领域有着广泛的应用前景。相信随着对其影响因素和作用机理更深入系统的研究,共培养一定会对体外受精和动物克隆等胚胎生物技术的发展作出重要贡献。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Telford N A, Watson A J, Schultz G A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*, 1990, **26**: 90-100
- [2] Caird E R. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 1989, **21**: 105-109
- [3] Eyestone W H, First N L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J Reprod Fertil*, 1989, **85**: 715-720
- [4] Goto K, Iwai N, Takuma Y, Nakanishi Y. Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *Anim Sci*, 1992, **70**: 1449-1453
- [5] Prichard J F, Thibodeaux J K, Pool S H *et al.* *In vitro* co-culture of early stage caprine embryos with oviduct and uterine epithelial cells. *Hum Reprod*, 1992, **7**: 553-557
- [6] Ellington J E, Carney E W, Farrell P B *et al.* Bovine 1-2 cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell co-culture systems. *Biol Reprod*, 1990, **43**: 97-104
- [7] Carney E W, Tobback C, Foote R H. Co-culture of rabbit one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, **26**: 629-635
- [8] Wetzels A M, Bastiaans B A, Hendriks J C *et al.* The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development *in vitro* and implantation. *Hum Reprod*, 1998, **13**: 1325-1330

- cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells and other somatic cells. *Mol Reprod Dev*, 1990, **27**: 209 – 215
- [ 10 ] Zeng W, Feng Z. Improvement of mouse early embryo development in vitro by co-culture with human oviductal epithelial cells in serum-free medium. *Zhonghua Fuchanke Zazhi*( 中华妇产科杂志 ), 1998, **33**: 604 – 606
- [ 11 ] Pegoraro L M, Thuard J M, Delalleau N *et al.* Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with Vero cells. *Theriogenology*, 1998, **49**: 1579 – 1590
- [ 12 ] Ouhibi N, Hamidi J, Guillaud J *et al.* Co-culture of 1-cell mouse embryos on different cell supports. *Hum Reprod*, 1990 **5**: 737 – 743
- [ 13 ] Rief S, Sinowatz F, Stojkovic M *et al.* Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction*, 2002, **124**: 543 – 556
- [ 14 ] Verhage H G, Fazleabas A T, Mavrogianis P A *et al.* The baboon oviduct: characteristics of an oestradiol-dependent oviduct-specific glycoprotein. *Hum Reprod*, 1997, **3**: 541 – 552
- [ 15 ] Rexroad C E, Powell J R, Powell A M. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. *J Anim Sci*, 1988, **66**: 947 – 953
- [ 16 ] ZHONG Y( 钟瑜 ), PAN S H( 潘善培 ), ZHANG C X( 张春雪 ) *et al.* Influences of primary and subcultured human oviductal epithelial cells on development of mouse one-cell embryos. *Chinese Journal of Jinan University Transaction*( 暨南大学学报 ), 1996, **5**: 162 – 165
- [ 17 ] Paria B C, Dey S K. Preimplantation embryo development *in vitro*: co-operative interactions among embryos and role of growth factors. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, **87**: 4756 – 4760
- [ 18 ] Wood S A, Kaye P L. Effects of epidermal growth factor on preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fertil*, 1989, **85**: 575 – 582
- [ 19 ] Gardner H G, Kaye P L. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse preimplantation embryos *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, 1991, **3**: 79 – 91
- [ 20 ] DeChiara T M, Efstratiadis A, Robertson E J. A growth deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990, **345**: 78 – 80
- [ 21 ] Larson R C, Ignatz G G, Currie W B. Defined medium containing TGF- $\beta$  and  $\beta$ FGF permits development of bovine embryos beyond the “8-cell block”. *J Reprod Fert Abstr*, 1990, **5**: 16
- [ 22 ] Desai N, Goldfarb J. Co-culture human embryos may be subjected to widely different microenvironments: pattern of growth factor/cytokine release by Vero cells during the co-culture interval. *Hum Reprod*, 1998, **13**: 1600 – 1605
- [ 23 ] Watson A J, Hogan A, Hahnel A *et al.* Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Mol Reprod Dev*, 1992, **31**: 87 – 95
- [ 24 ] LI Y P( 李逸平 ), CHENG G X( 成国祥 ), GU Z( 顾正 ), ZUO J K( 左嘉客 ). Co-culture of rat one-cell embryos with rabbit oviduct epithelial cells. *Chinese Journal of Acta Biologicae Experimentalis Sinica*( 实验生物学报 ), 1993, **26**: 339 – 340
- [ 25 ] Joo B S, Kim M K, Na Y J *et al.* The mechanism of action of co-culture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil Steril*, 2001, **75**: 193 – 199
- [ 26 ] Gardner D K, Lane M, Spitzer A *et al.* Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod*, 1994, **50**: 390 – 400
- [ 27 ] Rehman N, Collins A R, Suh T K *et al.* Development of IVM-IVF produced 8-cell bovine embryos in simple, serum-free media after conditioning or co-culture with buffalo rat liver cells. *Mol Reprod Dev*, 1994, **38**: 251 – 255

## Co-culture of Embryos : Influencing Factors and Mechanisms of Action

TAN Xiu-Wen TAN Jing-He\*

( College of Animal Science and Veterinary Medicine , Shandong Agricultural University , Taian 271018 , China )

**Abstract** In comparison with their *in vivo* counterparts, the *in vitro* produced mammalian embryos had markedly lower rates of morula/blastocyst development and pregnancy after transfer to the recipients. Things became even worse in the cloned embryos. This necessitates improvement of the embryo culture system. Co-culture of embryos with different types of somatic cells was found beneficial for embryo development *in vitro* and many studies have been conducted in this area in recent years. In this paper, recent developments and the authors' own work in studies of co-culture of early mammalian embryos with somatic cells were reviewed, with emphasis on the effects of cell type, stage of estrous cycle and number of passages of somatic cells and supplement of serum on embryo development, and the mechanisms by which co-culture promote embryo development. The recent developments are summarized as follows: 1. Somatic cells of both homogeneous and heterogeneous origins can be used for co-culture of mammalian embryos, with similar developmental rates. 2. Supplementation of animal serum at appropriate concentrations improved the somatic cell growth and consequently the development of embryos in co-culture. 3. The estrous cycle stages of oviduct epithelial cells used for co-culture had no effect on the development of embryos. 4. Over-passaging of somatic cells reduced their efficiency in promoting development of the co-cultured embryos. In conclusion, studies have shown that co-culture overcame the block of embryo development *in vitro* and improved embryo quality with increased rates of implantation and pregnancy, but many problems remain to be solved on its influencing factors and mechanisms of action.

**Key words** embryo, somatic cells, co-culture