

## 海风藤酮对兔胚胎发育及 PAF 效应的影响<sup>①</sup>

郑 行<sup>②</sup> 马从容

(中国农业大学生物学院)

**摘 要** 海风藤酮为血小板激活因子 PAF 的特异性受体拮抗剂。用含  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  海风藤酮的培养液培养兔 2 细胞胚胎 144 h,发育到等于或小于 16 细胞的胚胎比例为 66.9%,对照组为 13.5% ( $P < 0.025$ )。发育到囊胚和孵化囊胚的比例,对照组为 39.9%,而试验组发育到囊胚的比例为 2.7% ( $P < 0.001$ ),没有胚胎发育到孵化囊胚阶段。试验表明海风藤酮对胚胎的体外发育有阻滞作用。试验还表明,兔胚胎可以释放 PAF,海风藤酮能明显抑制兔胚胎培养液所引起的去脾鼠血小板数量下降的 PAF 效应。

**关键词** 兔胚胎;海风藤酮;血小板激活因子(PAF)

**分类号** Q492.6

## Influence of Kadsurenone on Rabbit Embryo Development and the PAF Effect

Zheng Xing Ma Congrong

(College of Biology, CAU)

**Abstract** Kadsurenone is a competitive antagonist of PAF receptor. Rabbit 2-cell embryos were cultured in the culture medium containing  $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  kadsurenone for 144 h. 66.9% embryos developed to 16-cell or smaller than 16-cell stage. It was 13.5% ( $P < 0.025$ ) in control group. 39.9% embryos developed to blastocyst and hatched blastocyst stage in control group. but only 2.7% ( $P < 0.001$ ) embryos developed to blastocyst stage in test group, none of them developed to hatched blastocyst stage. It showed that kadsurenone had an inhibitory effect on embryo development *in vitro*. The result also showed that rabbit embryo could release PAF and kadsurenone could distinctly inhibit the PAF effect of splenectomized mice platelet number decrease caused by rabbit embryo cultured medium.

**Key words** rabbit embryo; kadsurenone; platelet activating factor(PAF)

血小板激活因子近年来被发现在受精、着床等生殖过程中有着相当重要的作用<sup>[1~3]</sup>。已有实验证实外源 PAF 能提高胚胎氧化代谢的作用<sup>[4~6]</sup>,而且 PAF 还能显著提高扩张期胚胎的平均细胞数量<sup>[7,8]</sup>,因而认为胚胎释放的 PAF 是胚胎分泌的代谢生长因子。另一方面,妊娠早期的母兔、母鼠的外周血小板数量的减少与胚胎有关<sup>[1,2,9,10]</sup>,而且鼠 8~16 细胞胚胎培养 24 h 的培养液也能引起去脾鼠外周血小板数量的下降<sup>[1,2]</sup>。

海风藤酮是一种竞争性的 PAF 受体拮抗剂<sup>[8]</sup>,它抑制 PAF 诱导的血小板聚集。海风藤酮

收稿日期: 1997-01-24

①国家自然科学基金资助项目 39270516

②郑行,北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区),100094

用于生殖调控的研究见于国内外海风藤酮对小鼠胚卵着床影响的报道<sup>[8,11]</sup>,说明海风藤酮有抗胚胎着床的作用。本试验试图进一步研究海风藤酮对兔胚胎发育的影响,以及它对兔胚胎培养液能够引起外周血小板减少这种 PAF 效应的拮抗作用,从而反证 PAF 对兔胚胎发育的促进作用及兔胚胎能够释放 PAF,并为海风藤酮的抗生育作用提供试验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物

昆明系小白鼠健康成年未孕,体重 30 g 左右,做去脾手术。成年雌性大耳白兔,健康未孕,6 月龄以上,2.5 kg 以上。

### 1.2 超数排卵

早晚 8 点在母兔颈部皮下注射猪 FSH(中国科学院动物所),连续处理 3 d,FSH 总用量为  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{只}^{-1}$ 。于第 4 天上午静脉注射 10 IU 猪 LH(中国科学院动物所),并立即人工输入兔精液。

### 1.3 胚胎培养

人工授精后 24 h 采用外科手术方式从兔输卵管冲出胚胎,选择正常胚胎用 M199(GIBCO USA)洗涤 2 次,在 24 孔培养板(corning USA)每小孔内放入 1 mL 含 3 mg 牛白蛋白·V(华美生物工程公司)的 M199 培养液和 30 枚兔 2 细胞胚胎,培养板放入 5%CO<sub>2</sub>,95%空气和 38℃饱和湿度的二氧化碳培养箱中。

### 1.4 培养液收集

2 细胞胚胎培养 24 h 后,收集培养液,将胚胎(即 8~16 细胞胚)继续培养 24 h,再收集一次培养液。空白对照培养液内没有放入胚胎。

### 1.5 血小板计数

将 400  $\mu\text{L}$  培养液注射到去脾鼠腹腔内,在注射前[0]及注射后 5,10,15,20,30,45,60,90 和 120 min 时以断尾方式采血 10  $\mu\text{L}$ ,经 2.5%NaCl 溶液稀释后,用血球计算板在显微镜( $\times 160$ )下计数血小板。

### 1.6 数据处理

比较无脾鼠注射兔胚胎培养液前后的血小板数量,注射后减少的百分率即为下降率(%),并用统计学 t 检验方法检查差异显著性。

## 2 试验结果

### 2.1 海风藤酮对兔胚胎体外发育的影响

在含  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 海风藤酮(北京医科大学药学院)的培养液(试验组)及不含海风藤酮的培养液(对照组)中培养兔 2 细胞胚胎,144 h 的胚胎发育状况(表 1)说明,对照组等于或小于 16 细胞的胚胎数量为 20 枚,占总数的 13.5%;而试验组为 101 枚,占总数的 66.9%,2 组比较差异显著( $P < 0.025$ )。从形成囊胚和孵化囊胚的数量看,对照组为 59 枚,占总数的 39.9%;而试验组只有 4 枚胚胎发育到囊胚阶段,占总数的 2.7%,没有胚胎发育到孵化囊胚阶段,2 组间差异也极显著( $P < 0.001$ )。

### 2.2 海风藤酮对胚胎培养液降低去脾鼠外周血小板数量效应的影响

试验分 3 组做不同处理: I 组,在培养液中加入  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 海风藤酮,经培养胚胎 24 h 后

收集培养液; I 组, 将胚胎培养 24 h 后所收集的培养液, 在向无脾鼠注射之前, 再加入  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  海风藤酮; II 组, 对照组, 为不含海风藤酮经培养 24 h 的兔胚胎培养液。

表 1 兔胚胎在含海风藤酮的培养液中培养 144 h 时的各阶段胚胎数量

单位: 枚

组 别	总 数	$\leq 16$ 细胞期	32~64 细胞期	桑椹胚	囊胚	孵化囊胚
对照组 <sup>①</sup>	148	20	46	23	45	14
试验组 <sup>②</sup>	151	101	44	2	4	0

①对照组为含  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  牛白蛋白 5 片段的 M199 培养液。

②试验组为含  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  海风藤酮及  $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  牛白蛋白 5 片段 M199 培养液。

上述 3 组 2 细胞期胚胎培养液, 分别注射到去脾鼠体内, 所测得的外周血小板数量, 见表 2。

表 2 注射含海风藤酮的兔 2 细胞胚胎培养液后的去脾鼠外周血小板数量的变化

$\times 10^4 \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-3}$

组 别	注射前		注射后测定时间 $t/\text{min}$								
	0	5	10	15	20	30	45	60	90	120	
I *	平均数 $n=4$	99±10.3	101±8.0	102±9.8	98±11.7	99±11.6	101±11.9	98±9.1	100±10.5	101±12.5	100±11.6
	平均下降率%	—	—	—	2.0	1.0	—	2.0	—	—	—
II	平均数 $n=4$	101±10.5	96±9.6	96±8.9	100±11.4	99±10.5	97±10.5	95±9.1	101±9.0	100±8.5	97±8.6
	平均下降率%	—	4.0	4.0	1.0	2.0	3.0	5.9	0	1.0	3.0
III	平均数 $n=4$	89±8.1	69±9.1	66±11.0	58±13.4	52±10.2	58±5.6	61±6.9	75±7.5	79±5.7	85±9.9
	平均下降率%	—	22.5	25.8	34.8	41.6*	34.8*	31.5	15.7	12.4	4.5

注: I 组注射含海风藤酮的兔胚胎培养 24 h 的培养液; II 组临注射兔胚胎培养液前加海风藤酮; III 组注射不含海风藤酮的兔胚胎培养液; “—”表示血小板数量比注射前有上升; \* 为差异显著(与注射前相比较)。

从表 2 可以看出, 注射培养液后的去脾鼠外周血小板数量, I 和 II 组在注射 120 min 内均没有明显的下降变化, 最大下降率分别为 2.0% 和 5.9% ( $P > 0.5$ )。而 III 组在注射后 5 min 时, 外周血小板数量就开始下降, 在注射后 20 min 时下降率最大为 41.6% ( $P < 0.05$ )。I, II 组与 III 组比较差异极显著 ( $P < 0.001, P < 0.005$ ), 在到 120 min 时外周血小板数量也未恢复到注射前的水平。

将上述 3 种处理的 8~16 细胞期胚胎培养液分别注射到去脾鼠体内, 所测得外周血中血小板数量变化同上述 2 细胞期胚胎培养液结果相似(表 3)。

表3 注射含海风藤酮的兔8~16细胞胚胎培养液后的  
去脾鼠外周血小板数量的变化

$\times 10^4$  个 $\cdot$ mm $^{-3}$

组别	注射前		注射后测定时间 t/min								
	0	5	10	15	20	30	45	60	90	120	
I	平均数 n=4	88±4.7	95±5.7	93±3.8	89±6.0	89±5.2	88±5.7	84±4.9	89±3.8	87±4.6	92±7.0
	平均下降率%		—	—	—	—	0	4.5	—	1.1	—
II	平均数 n=4	115±11.1	113±12.7	115±15.0	120±16.7	110±10.5	101±9.1	109±8.2	110±10.7	116±9.2	114±11.9
	平均下降率%		1.7	0	—	4.3	5.2	5.2	4.3	—	0.9
III	平均数 n=4	118±13.7	94±11.5	90±11.1	77±13.3	69±10.3	67±16.4	71±9.2	79±18.7	81±18.3	84±22.7
	平均下降率%		20.3	23.7	34.7	41.5*	43.2	39.8*	33.1	31.4	28.8

注: I组注射含海风藤酮的兔胚胎培养24h的培养液; II组注射兔胚胎培养24h的培养液前加海风藤酮; III组注射不含海风藤酮的兔胚胎培养液; “—”表示血小板数比注射前有上升; \*为差异显著(与注射前相比较)。

### 3 讨论

试验结果1表明,浓度为 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的海风藤酮对兔胚胎体外发育的形态及细胞内胚胎的形态无明显影响,但对胚胎的发育阶段有明显的阻滞作用。这可能是由于PAF特异拮抗剂海风藤酮抑制了胚胎所释放的PAF对胚胎发育的促进作用;或者是抑制了胚胎的PAF的释放,从而阻滞了胚胎的发育。这说明,早期胚胎的生长发育过程中需要PAF的作用,也反证了PAF是胚胎自分泌的代谢生长因子这一观点。

试验结果2表明,无论是在胚胎培养时或注射前向培养液中加入海风藤酮,都能显著抑制去脾鼠因注射胚胎培养液所引起的外周血小板数量的下降。由此可以推测,兔2细胞期和8~16细胞期胚胎的培养液中存在有来自于胚胎的PAF样活性物质,甚至就是胚源性的PAF,该物质能引起去脾鼠外周血小板数量的减少。

本试验选用去脾小鼠作为实验动物模型,是因为脾脏有贮血功能,约有30%的血小板贮存于脾脏中,并与血流中的血小板保持平衡。当机体处于应激状态时,脾脏收缩,其中的血小板就会进入外周血液循环中。因而研究血小板数量变化的试验,使用去脾动物是适宜的。

兔胚胎培养液引起去脾鼠外周血小板数量减少的原因,是由于胚胎释放的PAF与血小板膜上的PAF受体结合,导致血小板聚集而使血小板数量减少。海风藤酮与PAF竞争血小板膜上的受体,阻止了PAF与其受体结合,从而抑制了血小板的聚集。对于胚胎在含海风藤酮的培养液中培养后胚胎培养液并不能引起去脾鼠外周血小板数量减少的另一原因可能是海风藤酮直接抑制了胚胎PAF的释放,从而不能引起血小板的聚集。

从本试验结果看出,国产海风藤酮具有一定的抗生育作用,与国内外有关报道海风藤酮抗胚胎着床的抗生育作用一致。海风藤酮影响胚胎发育的作用机理及其抑制血小板聚集的作用

机制仍需进一步探讨。

### 参 考 文 献

- 1 O'Neill C. Thrombocytopenia is an initial maternal response to fertilization in mice. *J Reprod Fertil*, 1985a,73:567~577
- 2 O'Neill C. Examination of the cause of early pregnancy associated thrombocytopenia in mice. *J Reprod Fertil*, 1985b,73:578~585
- 3 O'Neill C. Partial characterization of the embryo-derived platelet-activating factor in mice. *J Reprod Fertil*, 1985c,75:375~380
- 4 O'Neill C. Supplementation of in vitro fertilising culture medium with platelet activating factor. *Lancet* ii, 1989,769~772
- 5 Ryan J P, et al. Platelet activating factor (PAF) enhance mitosis in preimplantation mouse embryos. *Reprod Fertil Dev S*, 1989,271~279
- 6 Ryan J P. Oxidative metabolism of energy substrates by preimplantation mouse embryos in the presence of plateletactivating factor. *J Reprod Fertil*, 1990a,89:301~307
- 7 Ryan J P. Activity of the pentose phosphate pathway of mouse embryos in the presence of platelet-activating factor. *Proc AUS Soc Reprod Biol*, 1990b,22:112
- 8 Spinks N R, et al. Antagonists of embryo-derived plateletactivating factor act by inhibiting the ability of the mouse embryo to implant. *J Reprod Fertil*, 1990, 88:241~248
- 9 黄夺先. 兔受精卵着床前母体的妊娠识别. *江苏农业学报*, 1986(2):33~36
- 10 郑行, 满光明, 叶剑雄. 无脾兔输卵管移入胚胎后外周血小板数量的变化. 见: 畜禽优质高产生物调控研讨会论文摘要汇编. 河北昌黎中国畜牧兽医学学会动物生理生化分会, 1994, 58~59
- 11 肖君刚, 李穗, 刘斌. 海风藤酮对小鼠胚胎着床的影响. *北京医科大学学报*, 1994, 26(1):42

(上接第 14 页)

目前,可拓工程的研究主要有以下几个方面:

①可拓方法在决策中的应用; ②可拓方法在新产品构思中的应用; ③可拓方法在搜索中的应用; ④可拓方法在诊断中的应用; ⑤可拓方法在设计中的应用; ⑥可拓方法在营销策略策划中的应用; ⑦可拓方法在控制领域中的应用; ⑧可拓方法在识别与评判中的应用。

虽然可拓工程的研究刚刚开始,但它的应用前景是十分广阔的。本文介绍这个应用方法,目的是希望联合农业各学科的有志之士,共同开创可拓工程在农业领域的应用和研究,在多学科交叉互补、新方法和多手段解决农业生产实际问题方面做些尝试,为农业生产和人类社会的可持续发展起到推动作用。