



哺乳动物胚胎体外培养研究进展

于坤元^{1,2,3}, 刘子琛^{1,2,3}, 翟晶磊^{1,3*}

1. 中国科学院动物研究所器官再生与智造重点实验室, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 北京干细胞与再生医学研究院, 北京 100101

* 联系人, E-mail: zhajinglei@ioz.ac.cn

收稿日期: 2024-05-20; 接受日期: 2024-07-23; 网络版发表日期: 2025-01-20

国家重点研发计划(批准号: 2021YFA0805701)和国家自然科学基金优秀青年科学基金(批准号: 82322026)资助

摘要 早期胚胎发育关乎人口健康。异常胚胎发育过程可引发妊娠相关疾病、出生缺陷和发育源性疾病等。因此, 解析人类早期胚胎发育过程和调控机理对于了解人类生命起源、探究病理性胚胎发生机制、提高相关疾病的诊疗效率至关重要。然而, 由于伦理和技术限制, 人类体内发育的正常胚胎难以直接用于科学研究, 因此胚胎体外培养(*in vitro* culture, IVC)成为研究胚胎早期发育的重要技术。目前, IVC技术已被应用于小鼠、大鼠、兔、猪、猴和人等多种哺乳动物胚胎的发育过程研究。这项技术对发育生物学、遗传学、毒理学、再生医学等领域研究至关重要。本文对胚胎体外培养技术的发展进行回顾, 总结不同IVC体系的关键技术以及影响因素, 并探讨IVC技术面临的挑战和未来发展方向。

关键词 早期胚胎发育, 胚胎体外培养, 原肠运动, 早期器官发育, 再生医学与器官制造

正常的早期胚胎发育过程是健康个体形成的基石。人的胚胎发育始于精子和卵子结合形成的受精卵。受精卵经过多次卵裂, 于受精卵形成后的第5天(胚胎期第5天, embryonic day 5, E5)形成囊胚(图1A)^[1-10]。囊胚由内细胞团(inner cell mass, ICM)和滋养外胚层(trophoblast, TE)组成。ICM会分化为上胚层(epiblast, EPI)和原始内胚层(primitive endoderm, PE)。EPI主要发育为未来的胚胎, PE将主要发育成卵黄囊, TE主要发育为胎盘。人囊胚于E7~8与母体子宫接触并发生着床, 主要由极滋养层(polar trophoblast, pTE)直接参与。胚胎在着床之后E9~10阶段, EPI的多能性逐渐退出并发生极性转化, EPI形成中间包裹羊膜腔的

“花环”结构^[11]。在E11~12阶段, 羊膜腔逐渐扩大, 羊膜腔背侧细胞会特化成鳞状羊膜细胞, 羊膜细胞前侧会分化出原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)^[4]。羊膜腔腹侧细胞会特化成杯状上皮细胞, 这些杯状EPI细胞排列成胚盘, 未来主要发育为胎儿组织。在E13~14阶段, EPI的尾侧细胞开始表达Branchury基因, 发生上皮-间质转化, 并向腹侧迁移, 形成原条原基, 胚胎自此开启原肠运动(gastrulation)^[4]。原肠运动是胚胎发育过程中的里程碑事件。人胚胎原肠运动大约历经一周的发育历程(E14~21)。随着原肠运动进行, 前部的EPI细胞分化为外胚层(ectoderm), 后部的原条原基逐渐延长形成原条。原条细胞进一步从背侧向腹侧迁移

引用格式: 于坤元, 刘子琛, 翟晶磊. 哺乳动物胚胎体外培养研究进展. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1319–1331

Yu K Y, Liu Z C, Zhai J L. Research progress on *in vitro* culture of mammalian embryos (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1319–1331, doi: 10.1360/SSV-2024-0159

分化, 一部分形成定型内胚层(definitive endoderm, DE), 还有一些形成中胚层(mesoderm)^[12]. 具有三胚层结构的胚胎被称为原肠胚(gastrula). 在原肠运动中晚期(约E18~21), 外胚层特化为位于胚盘中央的神经板(neural plate)和两侧对称的表皮区(epidermis). 中胚层与内胚层协同发育, 为多器官原基的形成奠定基础. 原肠运动结束时, 胚胎前侧神经板结构向腹侧弯折, 背侧形成1~3对体节, 体节处神经管已闭合, 尾侧原条结构消失. 随后, 胚胎进入早期器官发育阶段, 外胚层

主要发育为神经系统和表皮; 中胚层主要参与心脏、骨骼、骨骼肌、肾脏、生殖器等器官的形成; 内胚层主要参与消化道、肺脏、胰腺、肝脏等多种器官的形成.

小鼠胚胎由于与人胚胎在发育过程上的相似性, 且具有发育周期短、易获取等优势, 成为研究人类早期胚胎发育过程的良好模型. 小鼠受精卵经过多次卵裂后于E3.5形成囊胚(图1B)^[13~20]. 囊胚由ICM和TE构成, ICM进一步分化为EPI和PE. 三个着床前细胞类型

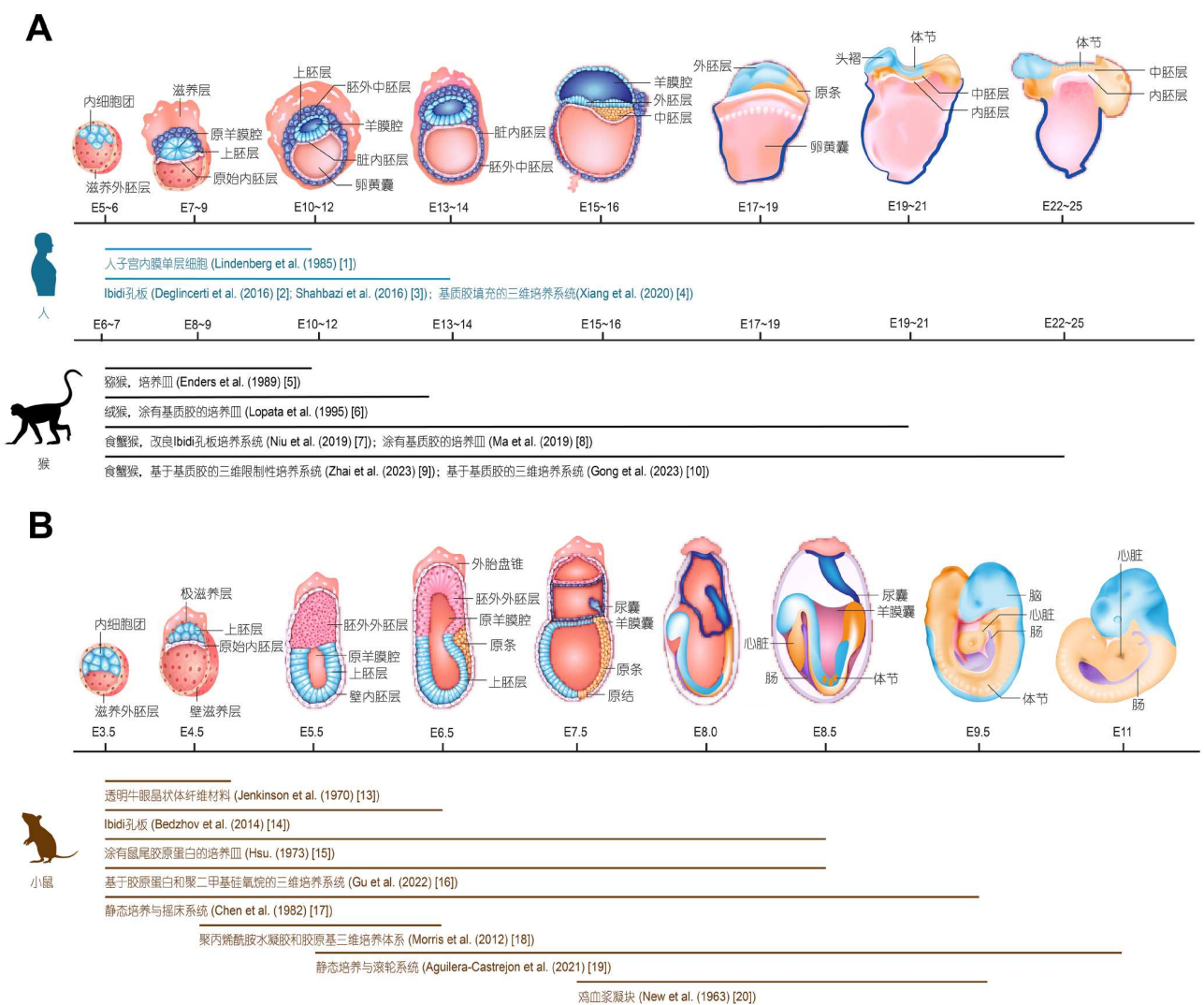


图 1 哺乳动物胚胎发育过程和体外培养技术总结. A: 人和猴胚胎发育过程与代表性体外培养技术总结; B: 小鼠胚胎发育过程与代表性体外培养技术总结

Figure 1 Summary of mammalian embryo development process and *in vitro* culture techniques. A: Summary of human and monkey embryo development process and representative *in vitro* culture techniques; B: summary of mouse embryo development process and representative *in vitro* culture techniques

分离后, 囊胚进入子宫并从透明带中孵化出来, 开始着床准备. 小鼠囊胚着床过程主要由壁滋养层细胞(mural trophoctoderm, mTE)直接参与^[21], 着床之后ICM会首先形成由上胚层EPI包裹的“花环”结构^[11]. “花环”结构中间的原羊膜腔(primitive amniotic cavity, PAC)逐渐扩大, 其壁侧包裹顶壁内胚层(parietal endoderm, ParE), 并向壁滋养层侧伸展, 极侧覆盖pTE, 为胚外外胚层(extraembryonic ectoderm, EXE)和外胎盘锥(ectoplacental cone, EPC)的发育做准备^[21]. E5.5期, 原羊膜腔逐渐扩大并伴随EPI的增殖, 由PE演化而来的脏内胚层(visceral endoderm, VE)包裹EPI向壁滋养层侧延伸. E6.0期, 胚体的原羊膜腔进一步扩大, 形成由EPI和VE包裹的中空杯状结构^[22]. 小鼠胚胎原肠运动启动于E6.5, 此时杯状结构尾部EPI有部分细胞表达*Branchury*基因, 并具有上皮-间质转化的特征, 这些细胞由向腹侧迁移, 形成原条(primitive streak, PS)^[23,24]. 头部的EPI进一步分化为外胚层. 尾部PS会进一步分化中胚层和内胚层. 此时, 胚胎形成具有外中内三胚层结构的原肠胚. 小鼠胚胎原肠运动经历E6.5~8.5的发育. 随后, 胚胎进入早期器官发育阶段.

由于哺乳动物胚胎在母体子宫内生长, 因此胚胎的形态发生、细胞分化和分子调控过程很难直接研究. 哺乳动物胚胎体外培养(*in vitro* culture, IVC)是在体外支持哺乳动物胚胎发育, 进而还原体内正常发育过程的技术. 该技术现已用于小鼠、大鼠、兔、猪、猴和人等多种哺乳动物早期胚胎的发育过程可视化研究, 极大地丰富研究者对早期胚胎发育过程的理解. 通过IVC技术不仅可以在体外观察哺乳动物胚胎的发育过程, 了解细胞分裂、分化和组织形成的具体机制, 还可以对IVC胚胎进行详细的基因表达分析, 追踪不同发育阶段的基因表达变化, 揭示调控发育的关键基因和信号通路. 这对于理解正常或异常胚胎发育机理具有重要意义. 本文将回顾哺乳动物胚胎IVC技术的发展历史, 总结培养方法, 并探讨IVC技术面临的挑战和未来发展方向.

1 小鼠胚胎的体外培养为哺乳动物胚胎体外研究奠定技术基础

小鼠胚胎的IVC技术可以追溯到1949年, Hammond^[25]利用蛋黄和蛋白的缓冲液首次将小鼠2-细胞

胚胎培养至囊胚阶段. 此后, 着床前胚胎的体外培养体系逐渐成熟, 并很快商品化^[26]. 对于着床后的胚胎培养, 科学家们仍努力优化培养条件, 包括培养基成分、气体成分、动静态条件和其他因素等, 旨在开发更高效的IVC体系, 以支持胚胎在体外的高效、长时程、高保真发育.

1.1 培养基的发展

随着培养技术的发展, 用于培养小鼠胚胎的培养基被不断改良优化(表1)^[27-38]. 1963年, New和Stein^[20]使用鸡胚提取物和鸡血清的混合培养基, 将E8.0的小鼠胚胎体外培养48小时, 达到类E9.0形态, 胚胎能够发育出心脏和卵黄囊循环网络. 1972年, Hsu使用含15%胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的Eagle's基础培养基(Eagle's minimal essential medium)^[39], 将E3.5小鼠胚胎培养到类E8.0阶段^[28]. 1973年, Hsu^[15]优化不同发育阶段的培养基, 从囊胚阶段开始培养胚胎, 在IVC第2天, 将培养基更换为含有10%胎牛血清的培养基; 第3天和第4天将胎牛血清浓度提高到20%; 在第5~6天, 培养基更换为含有10%胎牛血清和10%人脐带血清(human cord serum, HCS)的混合物; 从第7天起, 培养基改为含有20%人脐带血清的培养基. 借助每天培养基的更换, 最终将小鼠囊胚培养至类E8.5. 之后, Libbus和Hsu^[32]再次优化该体系, 将基础培养基改为CMRL1066, 在E3.5胚胎培养的前三天使用20%胎牛血清, 之后持续使用人脐带血清, 将50%~70%的囊胚培养到类E8.5早期体节阶段. 1979年, Sadler^[31]将大鼠血清添加到E9.0胚胎培养基中, 经过48小时的培养, 胚胎可形成16~19个体节、闭合的神经褶和心跳. 1982年, Chen和Hsu^[17]借助胎牛血清、人脐带血清和大鼠血清改良不同发育阶段的培养基, 在IVC前5天内使用10%~40%的胎牛血清和人脐带血清, 在IVC第6天加入大鼠血清, 并在IVC第7~9天内使用100%大鼠血清进行培养, 最终将E3.5小鼠囊胚体外培养至可以观察到各主要器官原基以及血液循环形成的类E9.5阶段. 2003年, Miura等人^[38]同样利用大鼠血清, 将E5.5小鼠胚胎培养至类E7.5原肠运动阶段, 胚胎可发育出中胚层并建立前后体轴. 由此证明, 大鼠血清的使用可以从E5.5开始. 2014年, Bedzhov等人^[14,40]使用DMEM/F12培养基, 同时在培养基中进一步补充L-谷氨酰胺、青霉素和链霉素, 加入孕酮和 β -雌二醇, 并加入胰岛素-转铁蛋白-

表 1 小鼠胚胎体外培养系统

Table 1 *In vitro* culture system for mouse embryos

时间	培养阶段/时长/效率	培养基成分	培养条件
1963 ^[20]	E7.5~8.5/2天/27%	台式液/鸡血浆凝块/葡萄糖	静置培养
1970 ^[13]	E3.5~5.5/2天/-	Earle平衡盐溶液(EBSS)/胎牛血清	玻璃牛眼晶状体纤维/静置培养
1971 ^[27]	E3.5~接近7.0/10~14天/5%~20%	MEM培养基/胎牛血清	50 mm培养皿/胶原蛋白/静置培养
1972 ^[28]	E3.5~接近7.0/6天/15%~20%	MEM培养基/胎牛血清	50 mm培养皿/胶原蛋白/静置培养
1973 ^[15]	E3.5~接近E8.5/9天/-	MEM培养基/胎牛血清和人脐带血清	35 mm培养皿/胶原蛋白/静置培养
1974 ^[29]	2-细胞阶段~8.5/12天/1%~3%	MEM培养基/胎牛血清和人脐带血清丙酮酸盐和抗生素	35 mm培养皿/胶原蛋白/静置培养
1979 ^[30]	E3.5~8.5/8天/62%	CMRL-1066培养基/胎牛血清和人脐带血清/丙酮酸钠和谷氨酰胺	35 mm培养皿/静置培养
1979 ^[31]	E8.0~10.5/2天/-	Waymouth培养基/胎牛血清和大鼠血清	玻璃瓶/滚轮培养
1980 ^[32]	E3.5~8.5/8天/40%~50%	CMRL-1066培养基/胎牛血清和人脐带血清	35 mm培养皿/静置培养
1981 ^[33]	E7.5~9.5/2天/80%	DMEM培养基, Waymouth培养基/大鼠血清和胎牛血清/链霉素	玻璃瓶/滚轮培养
1982 ^[17]	E3.5~9.5/10天/10%	CMRL-1066培养基/胎牛血清, 人脐带血清和大鼠血清/丙酮酸钠、谷氨酰胺、青霉素和链霉素	35 mm培养皿/静置培养和震荡
1988 ^[34]	E8.0~11.0/3天/75%~85%	台式液/小鼠血清和大鼠血清	玻璃瓶/滚轮培养
1995 ^[35]	E8.5~9.5/2天/73%	小鼠血清, 人血清和大鼠血清	玻璃瓶/滚轮培养
1997 ^[36]	E3.5~8.5/8天/23.5%	CMRL-1066培养基/胎牛血清和人脐带血清/青霉素和链霉素	35 mm培养皿/静置培养
2003 ^[37]	E10.5~11.5/1天/-	DMEM培养基/敲除血清替代物/N2, 白蛋白, 青霉素和链霉素	玻璃瓶/滚轮培养
2003 ^[38]	E5.5~6.5/2天/80%	DMEM培养基/大鼠血清	4孔板/静置培养
2012 ^[18]	E4.5~6.5/5天/38%	CMRL-1066培养基/胎牛血清和人脐带血清L-谷氨酰胺, 丙酮酸钠, 青霉素和链霉素	24孔板/聚丙烯酰胺基质/静置培养
2014 ^[14]	E4.5~6.5/5天/40%~45%	改良DMEM/F12培养基/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β -雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	Ibidi孔板/静置培养
2021 ^[19]	E5.5~11/6天/20%	DMEM培养基/胎牛血清和大鼠血清/丙酮酸、GlutaMAX、D-葡萄糖、青霉素、链霉素和HEPES	Ibidi孔板和玻璃瓶/静置培养和旋转培养
2022 ^[16]	E3.5~接近8.5/10天/-	CMRL-1066培养基/胎牛血清, 敲除血清替代物和大鼠血清/GlutaMAX、NEAA、葡萄糖、青霉素-链霉素、N2和B27	4孔板/PDMS和胶原蛋白/静置培养

硒-乙醇胺(ITS-X)和血清替代品(knockout serum replacement, KSR, 含有营养物质包括氨基酸、糖类、维生素、无机盐、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、去甲肾上腺素、肾上腺素、雌激素、胰岛素等; <https://www.thermofisher.cn/>), 以支持小鼠E3.5的胚胎在体外培养5天后达到类E6.5阶段。

综合这些研究结果, 多个研究团队都证实, 不同发育阶段的胚胎需要搭配不同培养基组分。例如10%

~20%的胎牛血清适合用于培养小鼠胚胎E3.5~6.5阶段的胚胎^[14], 30%的KSR可以培养E5.5~6.5阶段胚胎, 人脐带血清和大鼠血清更能促进胚胎E5.5或E6.5之后的发育。血清浓度随着胚胎发育阶段的梯度增加, 可进一步满足胚胎体外发育所需营养。同时添加合适的激素、生长因子等, 对于胚胎体外发育必不可少。然而, 不同培养基成分对胚胎发育的作用机理仍未被探究清楚。这可能是未来优化培养基成分的一个突破口。此外, 也有研究认为, 胚胎对营养物质的吸收远少于培养基中所提供的营养^[41]。因此未来对培养基的优化还应综合考虑营养成分的种类、不同成分的最佳浓度、胚胎的受体等更加细节的因素。

1.2 气体条件的优化

胚胎体外培养技术的优化不仅依赖于培养基的改良, 还需要对气体成分进行精确控制. 1979年, Sadler等人^[31]用5%的二氧化碳(CO₂)、5%的氧气(O₂)和90%的氮气(N₂)搭配的低氧条件培养小鼠E9胚胎24小时, 之后在第二个24小时调整气体条件为20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂, 小鼠胚胎可在体外发育出卵黄囊循环. 因此, 低氧条件或不利于器官发育阶段的胚胎体外发育. 1988年, Hunter等人^[34]发现将气体组成由初始的5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂调整为20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂, 有助于将E6的小鼠胚胎发育到肢芽阶段, 证明原肠运动至早期器官发育的胚胎可以用常氧条件培养. 2017年, Kikkawa等人^[42]发现, E8~8.5的小鼠胚胎仅可在5% O₂的气体条件下存活12~24小时, E9.5的小鼠胚胎可在20%~60%的O₂的条件下存活36小时, 而发育阶段更靠后的胚胎则在95%的O₂中最久可存活36小时. 因此, 高氧条件更适合早期器官发育阶段的胚胎培养.

综上所述, 低氧或常氧的气体条件似乎更适合原肠运动之前的胚胎培养. E8.5早期器官形成之前胚胎的体外培养需要常氧条件支持. 高氧条件更适合器官发育阶段胚胎的培养. 在E8.5之后胚胎的培养过程中, 氧气浓度的需求随着培养时程逐渐提高.

1.3 动静态培养条件的转变

小鼠胚胎从E3.5开始着床(图1B). 为营造稳定的着床环境, 对于E3.5胚胎的体外培养多采用静置培养. 因此Matrigel、胶原蛋白、水凝胶、子宫内细胞等, 以及这些成分的组合, 在静置培养的体系中被引入, 以支持囊胚更好地体外发育(表1). 例如, Jenkinson和Wilson^[13]将小鼠囊胚注射到透明的牛眼晶状体中, 囊胚可发育到类E4.75. Hsu^[15]将小鼠囊胚放入涂有重组鼠尾胶原蛋白的塑料板上, 胚胎可以发育到类E8.5. 胚胎与小鼠子宫细胞共培养模型也可部分重现植入过程^[43]. 为更精确地模拟子宫微环境, Gu等人^[16]测量小鼠子宫的弹性模量和孔隙率, 并用胶原蛋白和聚二甲基硅氧烷(PDMS)构建三维(3D)人造子宫培养体系, 可以支持囊胚发育至类E8.5心跳形成. 静态的培养体系可以支持小鼠胚胎从着床期到原肠运动阶段的体外发育过程. 动态的培养体系可以为胚胎发育提供剪切力, 并促进物质交换效率, 因此被应

用于早期器官发育阶段的胚胎培养中. 1981年, Sadler等人^[33]使用滚轮培养系统将E8.5的小鼠胚胎在体外培养48小时, 胚胎可完成翻转, 神经管闭合, 维持心跳, 并且达到与体内同期发育阶段胚胎相似的大小、蛋白含量和器官发生特征. 因此, 滚轮培养系统被广泛应用于培养. 1982年Chen和Hsu^[17]尝试将小鼠囊胚进行体外培养, 在第1天至第6天用静置培养、第7天(类E8.5心跳形成阶段)至第10天将胚胎置于摇床上震荡培养, 成功将小鼠胚胎从囊胚阶段体外培养到肢芽阶段. 2021年, Aguilera-Castrejon等人^[19]同样利用滚轮培养成功实现小鼠胚胎从E5.5到E11期间的连续发育. 在培养过程中, 他们发现E8.5之前的胚胎更适合静息培养, E8.5之后的胚胎依赖于动态培养, 早于或晚于E8.5阶段将胚胎转移至动态培养体系中均会造成胚胎无法进一步发育, 这与Chen和Hsu^[17]的研究结果不谋而合.

综上所述, 静态培养系统更适合从植入期到原肠运动阶段的小鼠胚胎体外培养, 然而动态培养系统更适合于原肠运动之后器官发育阶段的胚胎在体外的发育.

1.4 综合条件的优化

培养基成分、气体条件和动静态培养的整合应用是目前胚胎培养的主要优化方向. 其中, 最为经典的案例为1982年Chen和Hsu^[17]发表在*Science*上的研究. 他们整合大鼠血清、人脐带血清、动态的氧浓度条件、震荡和滚轮培养体系, 支持小鼠E3.5胚胎持续体外发育至类E9.5阶段. 该研究是目前着床前胚胎体外发育的最长记录. 2021年Aguilera-Castrejon等人^[19]发表在*Nature*上的研究同样具有代表意义. 在研究中, 他们整合上述多种条件, 支持小鼠E5.5胚胎持续体外发育至E11. 这是目前小鼠着床后胚胎体外发育达到的最长记录. 整合的培养体系甚至可以培养基于干细胞构建的小鼠类胚胎体外发育至类E8.5阶段^[44-46].

除培养基成分、气体条件和动静态培养条件的影响外, 体外培养小鼠胚胎的发育状态还会受到小鼠品系、胚胎密度、胚胎解剖方式等因素的影响. Aguilera-Castrejon等人^[19]发现, 129品系和ICR(129/C57BL6)品系的小鼠胚胎培养效率高于C57BL6:BDF1杂交品系和BDF1:BDF1品系. Kang等人^[36]的研究指出, 胚胎在体外培养中的群体密度对发育成功率有显

著影响。随着培养皿中胚胎数量的增加,特别是在E5.5~9.5阶段,胚胎的成功发育率会降低。Bedzhov等人^[14]发现,将小鼠E4.5壁滋养层(mural TE)切除,仅培养极滋养层(polar TE)和内细胞团,同样可以发育至类E6.5阶段,而且切掉polar TE的方法可以加快小鼠类E6.5结构的形成。

总的来说,IVC技术的成功率因多种因素而异,包括胚胎质量、培养条件、操作规范等。目前,小鼠胚胎从植入期到原肠运动阶段的培养成功率最高可达到62%^[30],从原肠运动至早期器官发育阶段的成功率最高可达55%^[19]。小鼠胚胎体外培养的相关研究推动哺乳动物胚胎体外研究技术的发展,也为研究者对其他哺乳动物,尤其是灵长类胚胎的体外培养研究提供重要参考。

2 大鼠、兔等物种胚胎的体外培养探究

除小鼠外,大鼠和兔也是经典的应用于发育生物学的模式动物。大鼠和兔胚胎体外培养研究虽不如小鼠胚胎体外研究丰富,但可作为培养条件优化的论证和补充^[47~53]。例如,1973年,New等人^[47]首次用滚轮培养方法培养大鼠E9.5胚胎60~70小时,达到早期肢芽期形成阶段,胚胎可发育出26至28个体节。将E11.5(22~28个体节)胚胎在体外培养40~50小时,胚胎可维持其血液循环约30小时,形成40~42个体节。这一研究是胚胎动态培养条件的先驱探究之一,为之后小鼠胚胎的长时程培养奠定基础。由于大鼠胚胎体积较大,且不同品系大鼠之间的差异较大,胚胎营养和代谢需求更难在体外完全满足,因此大鼠胚胎体外培养的成活率仍较低^[54]。

对于兔胚胎体外培养的研究可以追溯到1929年。Lewis和Gregory^[51]首次成功利用鸡血浆培养兔受精卵和桑椹胚。他们观察到在血浆中,兔受精卵可持续生长约2天,最终发育到8-细胞期,而桑椹胚则能在血浆中存活长达8天,形成囊胚。之后,兔胚胎的体外研究多集中于卵裂期至囊胚阶段^[55,56]。对于兔着床后胚胎的培养,Ozolins^[50]报道使用含有50%兔血清的培养基,实现对E9~11阶段的兔胚胎的体外培养,胚胎可实现神经管、心脏、体节、早期肢芽等的发育。与小鼠或大鼠胚胎相比,兔的胚胎体积更大,因此其发育所需的营养条件更难在体外满足。兔胚胎还拥有复杂且变化

的胚外覆盖物^[57],更加多样的胚胎子宫互作的机制,涉及更多的细胞相互作用和信号传递。这些原因都导致兔胚胎的体外发育很难在体外维持。

此外,猪^[58]、羊^[59]、牛^[60]、马^[61]等大型哺乳动物的囊胚前培养也有初步研究,并已被应用于畜牧生产。例如Long等人^[58]通过使用改良的NCSU-23培养基,成功将猪胚胎从受精卵阶段培养至囊胚阶段;Olson等人^[62]使用化学成分明确的培养基,结合低氧培养,将体外受精的牛受精卵培养至囊胚阶段,成功率可以达到28%。但针对囊胚后胚胎的培养,领域内仍有巨大空白。2022年,Ramos-Ibeas等人^[63]首次将绵羊的囊胚在低氧条件下体外培养至原肠运动阶段,羊胚胎的原肠运动发生于着床之前,且其原肠胚拥有与灵长类动物类似的盘状结构,该研究揭示羊胚胎原肠运动细胞迁移、胚外组织发育特性、中胚层发育过程等事件。对于大型哺乳动物的胚胎体外培养研究不仅有助于提高畜牧生产,也有助于人们从毒理学、进化生物学、干细胞与再生医学等多角度进一步了解胚胎发育。

3 人类胚胎体外培养是灵长类早期胚胎发育研究的重要内容

人类胚胎的体外研究已有近60年的发展历史。自20世纪70年代初开始,已有系列研究成功将人类卵母细胞在体外受精并培养至8-细胞或16-细胞阶段^[64],从此揭开人类胚胎体外研究的热潮。1978年,基于卵子体外受精和植入前胚胎体外培养技术的发展,人类第一名试管婴儿诞生^[65],为人类辅助生殖技术开创先河。1979年美国卫生教育和福利部伦理咨询委员会提出“14天准则”,要求胚胎的体外培养时间不得超过E14或原肠运动发生。1984年英国《沃诺克报告》吸纳该准则,并建议通过立法来监管胚胎相关研究及应用。随后,该准则及相关建议深远地影响包括中国在内的多国立法政策。目前人类胚胎的体外培养技术能够支持胚胎体外发育至E14(表2)。

2016年,Shahbazi等人报道使用商品化Ibidi孔板将人类胚胎体外培养至E13的研究,这是一种2D的培养体系。借助该培养体系,他们研究人类胚胎着床后的发育过程,包括EPI的多能性退出、TE的早期发育、原羊膜腔形成、原羊膜腔向羊膜腔的转化、原始生殖细胞分化、卵黄囊形成等过程,以及不同细胞谱系的

表 2 人类胚胎体外培养系统
Table 2 *In vitro* culture system for human embryos

时间	培养阶段/时长/效率	培养基成分	培养条件
1985 ^[1]	E0~10/10天/—	Ham's F-10培养基/胎牛血清/谷氨酰胺, BSA, 氢化可的松和D-缬氨酸	子宫上皮细胞/静置培养
2016 ^[3]	E0~13/13天/—	改良DMEM/F12/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β-雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	Ibidi孔板/静置培养
2016 ^[2]	E0~13/13天/—	改良DMEM/F12/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β-雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	Ibidi孔板/静置培养
2019 ^[66]	E0~14/13天/—	改良DMEM/F12/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β-雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	Ibidi孔板/静置培养
2019 ^[67]	E0~12/12天/—	改良DMEM/F12/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β-雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	Ibidi孔板/无菌纤维连接蛋白/静置培养
2019 ^[68]	E0~10/10天/—	改良DMEM/F12/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β-雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	Ibidi孔板/子宫内膜细胞/静置培养
2020 ^[4]	E6~14/7天/25%	改良DMEM/F12/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β-雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	U形底部96孔板/基质胶 (Matrigel)/静置培养
2022 ^[69]	E0~13/13天/—	改良DMEM/F12/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 丙酮酸盐, 孕酮, β-雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	Ibidi孔板/静置培养

典型基因表达特征^[2,3]。2019年, Zhou等人^[66]再次利用该培养技术, 将人类胚胎培养至E14, 并结合单细胞多组学技术系统分析人类植入后胚胎细胞的分化路径和甲基化特征, 发现雌性胚胎在植入过程中出现X染色体随机失活, 启动X染色体连锁基因的等位基因特异性表达。借助类似的培养方法, 2019年Lv等人^[68]利用体外培养的人胚胎研究着床前后滋养层细胞命运分化的调控机制, 发现T-box转录因子3 (TBX3)是细胞滋养层(cytotrophoblast, CTB)向合体滋养层(syncytiotrophoblast, STB)分化的关键调控因子。2022年, Wang等人^[69]同样借助该培养体系研究体外培养的人胚胎滋养层细胞分化和形态发生过程, 建立人滋养层细胞从原始细胞滋养层细胞(primitive cytotrophoblast, pCTB)、原始合体滋养层细胞(primitive syncytiotrophoblast, pSTB)到迁移滋养层细胞(migration trophoblast, MTB)的连续发育数据模型, 发现滋养层发育过程中的细胞骨架转变、不规则细胞核形变、细胞周期停滞和细胞老化等现象。此外, 2020年, Xiang等人^[4]报道基于Matrigel的3D低黏附96孔板培养系统(M-3D), 将人类囊胚培养至E14, 至原条原基(primitive streak anlage, PSA)形成阶段。结合单细胞转录组分析, 描述上、下胚层和滋养外胚层的谱系分化和基因调控网络。2023年, Ai等人^[70]在该3D体系的基础上, 收集24枚体外培养的E10~14阶段胚胎, 利用10×单细胞转录组技术捕获一万余个细胞, 更新人胚胎着床后单细胞图谱, 解析细胞谱系发展及信号调控机制, 揭示WNT,

BMP和Nodal等信号通路在谱系分化中的协同作用。在人胚胎培养相关研究中, 70%以上的体外培养胚胎会在着床至原肠运动阶段发育阻滞^[4,7,9]。对这一阶段的胚胎正常或异常发育研究或有望揭示临床反复种植失败患者的发病机理, 进而筛选可促进胚胎着床的药物, 未来或可应用于此类患者的预防和治疗。

综上所述, 体外培养人类胚胎的研究为研究者理解胚胎着床后至原肠运动前的发育过程提供重要依据。然而, 人类胚胎的体外研究已达到伦理限制。随着胚胎培养技术的发展, “14天准则”在当前科学环境下的适用性正面临着前所未有的挑战^[71]。“14天准则”是否要放开? 放开到什么时间点? 这些问题已成为近年来伦理学界的热议问题。国际干细胞协会(International Society for Stem Cell Research, ISSCR)在2021年发布的最新指南中呼吁, 在符合当地的政策和法规并获得广泛公众支持, 且经过严格的伦理审查程序以证明其必要性的情况下, 人胚胎的体外培养界限可以适当放宽并超过14天限制, 同时需确保只使用最低数量的胚胎来实现研究目标。但目前暂无将人类胚胎培养至E14之后的研究。

4 非人灵长类胚胎体外培养是灵长类胚胎体外研究的重要组成部分

非人灵长类与人类在进化上相近, 发育生物学特征相似, 其胚胎发育过程与人类胚胎在形态结构、发

育节点等多方面高度相似, 因此是探究人类胚胎发育过程的理想替代模型之一. 对于非人灵长类胚胎的体外研究(表3), 1989年, Enders等人^[5]首次尝试将6枚恒河猴受精卵体外培养10~13天. 6枚胚胎均可以成功发育至囊胚, 其中5枚自行从透明带中孵出, 但仅1枚成功贴附于孔板上. 这枚胚胎可发育出合胞体滋养层, 但内细胞团未能成功发育出胚盘结构. 1995年, Lopata等人^[6]将狨猴8-细胞胚胎培养至囊胚, 之后将囊胚转移到Matrigel上, 用含有10%胎牛血清、胰岛素和转铁蛋白的MEM培养基培养4~6天. 在培养的第4天可见合胞体滋养层, 在第6天可见ICM发育出羊膜腔. 这一研究为进一步理解植入过程提供重要线索. 2019年, Niu等人^[7]和Ma等人^[8]分别搭建不同的2D培养体系, 成功将食蟹猴囊胚体外培养至E20原肠胚阶段. 结合胚胎在体外发育不同阶段的形态、细胞特异性标志物的染色、单细胞转录组测序等技术, 他们证明体外培养的食蟹猴胚胎可重现胚胎在体内着床后的多个关键事件, 包括上下胚层细胞的分化、羊膜细胞的分化、卵黄囊腔的形成、胚盘结构的形成、原始生殖细胞的迁移、原肠运动细胞的分化和上皮-间质转化过程、原条的形成以及早期类神经结构的形成^[72].

基于此研究, Zhai等人^[9]深入比较几种2D和3D胚胎培养体系, 证实3D培养条件可以更好地维持食蟹猴胚胎胚盘结构的发育. 通过优化生物材料和培养基成分, 她们进一步构建3D长时程培养体系(*prolonged in vitro culture*, pIVC), 该体系可支持33.7%的食蟹猴囊胚发育至E25阶段. pIVC培养的胚胎可重现原肠运动中晚期三胚层特化过程, 分化出定型内胚层、初始中胚层和神经外胚层, 并可以分化出原始生殖细胞、表

皮外胚层等细胞类型. 发育至E25的胚胎神经外胚层可进一步发生折叠和闭合, 形成神经管. 闭合的神经管可形成沿背腹轴模式化发育的神经祖细胞和早期运动神经元. 同年, Gong等人^[10]开发一种三明治样的3D培养系统, 该体系同样可支持食蟹猴胚胎体外发育至E25, 发育效率在20%以上. 形态学、组织学和单细胞转录组测序分析表明, 体外培养的食蟹猴胚胎可重现神经外胚层分化、侧板中胚层分化、卵黄囊造血、原肠运动和原始生殖细胞发育等事件. 这两项研究为目前国际上首次将灵长类胚胎体外培养至早期器官发育阶段, 填补灵长类早期神经胚发育和卵黄囊造血发育研究的空白^[73]. 然而, 由于体外培养的食蟹猴胚胎在E25之后停滞发育, 胚胎出现发育延迟或退化、胚外组织无法正常完整发育, 因此更长时程的胚胎体外培养仍需更多的技术探索.

综上所述, 由于非人灵长类胚胎与人类胚胎相似的自然优势, 其相关体外研究是人类胚胎体外研究的重要补充, 尤其是E14之后胚胎的体外发育, 有助于研究者推演人类原肠运动和早期器官发育过程, 类比分调控机理. 基于非人灵长类胚胎体外培养开展的理化条件筛查、基因编辑或谱系示踪等研究推演的人类正常或异常胚胎发育过程, 同样比基于小鼠等其他物种的研究更加可信的.

5 总结与展望

胚胎体外培养技术与其他胚胎体外发育模拟技术共同被*Nature Methods*选为2023年度方法^[74,75]. 由此可见, 包括胚胎体外培养在内的多种胚胎发育体外研究

表 3 猴子胚胎体外培养系统

Table 3 *In vitro* culture system for monkey embryos

时间	培养阶段/时长/效率	培养基成分	培养条件
1995 ^[6]	E0~11/11天/—	MEM培养基/胎牛血清/胰岛素、转铁蛋白和HEPES	4孔板/基质胶/静置培养
2019 ^[7]	E7~20/13天/21.74%	DMEM/F12培养基/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β -雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	Ibidi孔板/静置培养
2019 ^[8]	E7~20/13天/—	CMRL-1066培养基/胎牛血清, 敲除血清替代物和大鼠血清/丙酮酸钠, GlutaMAX, 青霉素, 链霉素, N2, B27和葡萄糖	4孔板/基质胶静置培养
2023 ^[10]	E0~25/25天/20.61%	DMEM/F12培养基/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β -雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 葡萄糖, 青霉素和链霉素	Ibidi孔板/10% (v/v) Geltrex夹在未稀释的基质胶(底部)和4% (v/v, 顶部) 基质胶之间/静置培养
2023 ^[9]	E0~25/25天/—	改良DMEM/F12培养基/胎牛血清和敲除血清替代物/ITS-X, L-谷氨酰胺, 孕酮, β -雌二醇, N-乙酰-L-半胱氨酸, 青霉素和链霉素	U形底96孔板/基质胶/静置培养

技术将迎来更加广泛的关注和更加严峻的挑战。目前, 早期胚胎的体外培养技术已遇到技术瓶颈。

首先, 现有培养条件有很多局限性。尽管现有IVC系统可支持多物种的胚胎从受精卵到原肠运动甚至早期器官的发育, 但由于IVC系统本身涉及培养基、气体、剪切力和其他生物因素等综合条件的协同作用, 这些因素相互之间最佳的搭配模式和对不同阶段胚胎发育的作用机制尚未被探究清楚。同时, 这些因素在多大程度上能模拟胚胎在子宫内发育的正常环境仍未被解答, 不同的气液条件对不同物种发育的影响差异也缺乏系统的比较研究。因此, 相关的横向研究亟待深入开展。

其次, 胚外组织的发育缺失性。基于现有IVC系统, 无论从早期的任何阶段开始培养胚胎, 它们都无法形成正常的功能性胎盘。因此胚胎在发育过程中无法获得正常的胚外组织信号, 发育至早期器官形成阶段之后更无法通过有效的物质交换体系获取营养, 进而限制胚胎自身的发育, 导致体外胚胎比正常体内发育的胚胎体积小, 细胞数量少, 胚层或结构缺失, 更长时程的体外发育受阻等。此外, 胎盘的发育依赖于子宫的支撑。因此, 在生物、物理、化学等多角度探究子宫-胎盘界面在妊娠不同阶段的特性, 将有助于搭建更适合不同阶段胚胎发育的环境, 从而提高胚胎体外发育效率和发育质量。

最后, 不同物种培养条件的差异性。这可能与不同物种的胚胎大小、形貌结构、关键发育节点、宫内环境等特征密切相关。例如, Zhai等人^[9]发现, 利用含有基于10% Matrigel构建的人胚胎培养条件培养猴胚胎, 培养结局或不相同。这可能由于人和猴胚胎在着床后的发育环境不同密切相关。人胚胎在着床后完全被子宫蜕膜包裹, 因此需要更加丰富的胞外基质供给支撑和机械压力^[76], 而猴胚胎在着床后并不能完全被子宫蜕膜包裹, 而是大部游离于子宫腔内, 因此不需要叠加的胞外基质作用^[77,78]。由此可见, 针对不同物种需研发物种特异的培养体系。哺乳动物胚胎的发育是高度保守的, 而其胎盘的发育在物种间具有显著差异。因此, 对不同物种胚胎培养体系的搭建应更多考虑其胚外组织特性。例如, 兔早期胚胎拥有复杂且变化的胚外覆盖物, 这些覆盖物并不能像小鼠透明带那样利用台式液或链蛋白酶即可去除^[57,79,80]。而覆盖物的保留对胚胎体外发育的影响暂未被探究清楚。因此在针对兔胚胎的体外研究中, 需将这一特征

考虑在内。羊的胚胎已被培养至原肠运动阶段, 但与羊胚胎特征相似的猪、牛、马等胚胎体外研究仍未见突破性进展。

对以上瓶颈问题的解决, 是胚胎体外培养技术在未来短期发展中亟待解决的问题。换言之, 胚胎体外培养的技术发展将更加具象化、精细化和多样化。同时, 培养技术在短期的发展过程中, 有望与生物材料、基因编辑、干细胞嵌合、实时成像、组学测序^[81,82]等技术紧密结合, 深度被应用于发育生物学和生殖医学研究, 以探究宫内无法直接研究的发育事件, 追踪特殊干细胞类群的分化轨迹, 揭示特定基因在胚胎发育过程中的功能, 评估各理化因素对胚胎发育的影响, 为研究者进一步了解胚胎发育本身提供技术平台和理论依据。

胚胎体外培养技术在长期发展过程中, 更有望实现物种特异性、发育阶段特异性, 甚至谱系分化特异性。首先, 不同物种胚胎的体外培养可以使人们更全面地从进化的角度理解胚胎发育过程。现有的大多数胚胎体外培养研究集中在小鼠、人类、猴上, 对于其他物种的研究仍有待深入探索。其次, 针对不同发育阶段的胚胎需要搭建不同的培养体系。前文中详细回顾适用于早期胚胎发育的培养体系。针对晚期胎儿发育的研究同样已有先驱。例如2017年, 美国费城儿童医院的团队将相当于人类22~24周胎儿的胎羊放入“生物袋”, 超过80%小羊经过4周“生物袋”的“孕育”顺利出生存活, 并且该团队表示, 希望能在3~5年内开展临床试验^[83,84]。然而, 适用于早期和晚期胚胎发育的体外培养体系的应用衔接, 仍需要攻克一系列技术壁垒。近年来, 基于干细胞构建的人工胚胎是发育生物学领域研究热点。将人工胚胎与胚胎体外培养技术结合, 尤其是基于非人灵长类胚胎体外培养技术的结合, 将推动人工胚胎体外发育至多器官或特定器官形成, 未来将有望应用于组织工程和再生医学, 成为获取可移植功能器官的重要来源。

综上所述, 哺乳动物胚胎体外培养技术已有将近100年的发展历史, 近年来更成为发育生物学和再生医学领域的研究热点。通过不断搭建和优化新型胚胎培养技术, 探索相关技术在发育生物学、生殖生物学、组织工程和器官再生等多方面的应用前景, 将为治疗不良妊娠结局, 多种重大疾病和损伤提供新的参考和治疗策略, 从而促进人类健康和医学进步。

参考文献

- 1 Lindenberg S, Nielsen M H, Lenz S. *In vitro* studies of human blastocyst implantation. [Ann New York Acad Sci](#), 1985, 442: 368–374
- 2 Deglincerti A, Croft G F, Pietila L N, et al. Self-organization of the *in vitro* attached human embryo. [Nature](#), 2016, 533: 251–254
- 3 Shahbazi M N, Jedrusik A, Vuoristo S, et al. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. [Nat Cell Biol](#), 2016, 18: 700–708
- 4 Xiang L, Yin Y, Zheng Y, et al. A developmental landscape of 3D-cultured human pre-gastrulation embryos. [Nature](#), 2020, 577: 537–542
- 5 Enders A C, Boatman D, Morgan P, et al. Differentiation of blastocysts derived from *in vitro*-fertilized rhesus monkey ova. [Biol Reprod](#), 1989, 41: 715–727
- 6 Lopata A, Kohlman D J, Bowes L G, et al. Culture of marmoset blastocysts on matrigel: a model of differentiation during the implantation period. [Anat Rec](#), 1995, 241: 469–486
- 7 Niu Y, Sun N, Li C, et al. Dissecting primate early post-implantation development using long-term *in vitro* embryo culture. [Science](#), 2019, 366: eaaw5754
- 8 Ma H X, Zhai J L, Wan H, et al. *In vitro* culture of cynomolgus monkey embryos beyond early gastrulation. [Science](#), 2019, 366: eaax7890
- 9 Zhai J, Xu Y, Wan H, et al. Neurulation of the cynomolgus monkey embryo achieved from 3D blastocyst culture. [Cell](#), 2023, 186: 2078–2091.e18
- 10 Gong Y, Bai B, Sun N, et al. *Ex utero* monkey embryogenesis from blastocyst to early organogenesis. [Cell](#), 2023, 186: 2092–2110.e23
- 11 Christodoulou N, Kyprianou C, Weberling A, et al. Sequential formation and resolution of multiple rosettes drive embryo remodelling after implantation. [Nat Cell Biol](#), 2018, 20: 1278–1289
- 12 Zorn A M, Wells J M. Vertebrate endoderm development and organ formation. [Annu Rev Cell Dev Biol](#), 2009, 25: 221–251
- 13 Jenkinson E J, Wilson I B. *In vitro* support system for the study of blastocyst differentiation in the mouse. [Nature](#), 1970, 228: 776–778
- 14 Bedzhov I, Leung C Y, Bialecka M, et al. *In vitro* culture of mouse blastocysts beyond the implantation stages. [Nat Protoc](#), 2014, 9: 2732–2739
- 15 Hsu Y C. Differentiation *in vitro* of mouse embryos to the stage of early somite. [Dev Biol](#), 1973, 33: 403–411
- 16 Gu Z, Guo J, Zhai J, et al. A uterus-inspired niche drives blastocyst development to the early organogenesis. [Adv Sci](#), 2022, 9: 2202282
- 17 Chen L T, Hsu Y C. Development of mouse embryos *in vitro*: preimplantation to the limb bud stage. [Science](#), 1982, 218: 66–68
- 18 Morris S A, Grewal S, Barrios F, et al. Dynamics of anterior-posterior axis formation in the developing mouse embryo. [Nat Commun](#), 2012, 3: 673
- 19 Aguilera-Castrejon A, Oldak B, Shani T, et al. *Ex utero* mouse embryogenesis from pre-gastrulation to late organogenesis. [Nature](#), 2021, 593: 119–124
- 20 New D A T, Stein K F. Cultivation of mouse embryos *in vitro*. [Nature](#), 1963, 199: 297–299
- 21 Christodoulou N, Weberling A, Strathdee D, et al. Morphogenesis of extra-embryonic tissues directs the remodelling of the mouse embryo at implantation. [Nat Commun](#), 2019, 10: 3557
- 22 Saykali B, Mathiah N, Nahaboo W, et al. Distinct mesoderm migration phenotypes in extra-embryonic and embryonic regions of the early mouse embryo. [eLife](#), 2019, 8: e42434
- 23 Tam P P L, Loebel D A F. Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. [Nat Rev Genet](#), 2007, 8: 368–381
- 24 Wilkinson D G, Bhatt S, Herrmann B G. Expression pattern of the mouse *T gene* and its role in mesoderm formation. [Nature](#), 1990, 343: 657–659
- 25 Hammond J. Recovery and culture of tubal mouse ova. [Nature](#), 1949, 163: 28–29
- 26 Kidder B L. *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of mouse oocytes and preimplantation embryo culture. [Methods Mol Biol](#), 2014, 1150: 191–199
- 27 Hsu Y C. Post-blastocyst differentiation *in vitro*. [Nature](#), 1971, 231: 100–102
- 28 Hsu Y C. Differentiation *in vitro* of mouse embryos beyond the implantation stage. [Nature](#), 1972, 239: 200–202
- 29 Hsu Y C, Baskar J, Stevens L C, et al. Development *in vitro* of mouse embryos from 2-cell egg stage to early somite stage. [J Embryol Exp Morphol](#), 1974, 31: 235–245
- 30 Hsu Y C. *In vitro* development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage. [Dev Biol](#), 1979, 68: 453–461
- 31 Sadler T W. Culture of early somite mouse embryos during organogenesis. [J Embryol Exp Morphol](#), 1979, 49: 17–25
- 32 Libbus B L, Hsu Y C. Sequential development and tissue organization in whole mouse embryos cultured from blastocyst to early somite stage. [Anat Rec](#), 1980, 197: 317–329

- 33 Sadler T W, New D A T. Culture of mouse embryos during neurulation. *J Embryol Exp Morphol*, 1981, 66: 109–116
- 34 Hunter E S, Balkan W, Sadler T W. Improved growth and development of presomite mouse embryos in whole embryo culture. *J Exp Zool*, 1988, 245: 264–269
- 35 Van Maele-fabry G, Gofflot F, Picard J J. Whole embryo culture of presomitic mouse embryos. *Toxicol in Vitro*, 1995, 9: 671–675
- 36 Kang B M, Kim C H, Chang Y S, et al. Effect of population density on the early post-implantation mouse embryo growth *in vitro*. *J Obstet Gynaecol*, 1997, 23: 119–124
- 37 Moore-Scott B A, Gordon J, Blackburn C C, et al. New serum-free *in vitro* culture technique for midgestation mouse embryos. *Genesis*, 2003, 35: 164–168
- 38 Miura S, Mishina Y. Whole-embryo culture of E5.5 mouse embryos: development to the gastrulation stage. *genesis*, 2003, 37: 38–43
- 39 Eagle H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 1959, 130: 432–437
- 40 Bedzhov I, Zernicka-Goetz M. Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. *Cell*, 2014, 156: 1032–1044
- 41 Ermisch A F, Herrick J R, Pasquariello R, et al. A novel culture medium with reduced nutrient concentrations supports the development and viability of mouse embryos. *Sci Rep*, 2020, 10: 9263
- 42 Kikkawa T, Takahashi M, Osumi N. Electroporation in the rodent embryonic brain using whole embryo culture system. *Curr Protoc Neurosci*, 2017, 78: 3.30.1–6
- 43 Salomon D S, Sherman M I. Implantation and invasiveness of mouse blastocysts on uterine monolayers. *Exp Cell Res*, 1975, 90: 261–268
- 44 Tarazi S, Aguilera-Castrejon A, Joubran C, et al. Post-gastrulation synthetic embryos generated *ex utero* from mouse naive ESCs. *Cell*, 2022, 185: 3290–3306.e25
- 45 Amadei G, Handford C E, Qiu C, et al. Embryo model completes gastrulation to neurulation and organogenesis. *Nature*, 2022, 610: 143–153
- 46 Lau K Y C, Rubinstein H, Gantner C W, et al. Mouse embryo model derived exclusively from embryonic stem cells undergoes neurulation and heart development. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 1445–1458.e8
- 47 New D A T, Coppola P T, Terry S. Culture of explanted rat embryos in rotating tubes. *Reproduction*, 1973, 35: 135–138
- 48 Tiwari R, Mehrotra P K, Srivastava A. Implantation *in vitro*: co-culture of rat blastocyst and epithelial cell vesicles. *Cell Tissue Res*, 2004, 315: 271–277
- 49 Harris C. Rat whole embryo culture. *Methods Mol Biol*, 2019, 1965: 195–217
- 50 Ozolins T R S. Rabbit Whole embryo culture. *Methods Mol Biol*, 2019, 1965: 219–233
- 51 Lewis W H, Gregory P W. Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science*, 1929, 69: 226–229
- 52 Carney E W, Tornesi B, Markham D A, et al. Species-specificity of ethylene glycol-induced developmental toxicity: toxicokinetic and whole embryo culture studies in the rabbit. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2008, 83: 573–581
- 53 Marshall V A, Carney E W. Rabbit whole embryo culture. *Methods Mol Biol*, 2012, 889: 239–252
- 54 Agca Y. *In vitro* culture of rat preimplantation embryos. *Methods Mol Biol*, 2019, 2006: 33–43
- 55 Biehl J P, Vilter R W. Effect of isoniazid on vitamin B6 metabolism; its possible significance in producing isoniazid neuritis. *Nutr Rev*, 1982, 40: 183–186
- 56 Carney E W, Foote R H. Improved development of rabbit one-cell embryos to the hatching blastocyst stage by culture in a defined, protein-free culture medium. *Reproduction*, 1991, 91: 113–123
- 57 Fischer B, Mootz U, Denker H W, et al. The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. *Anat Embryol*, 1991, 183: 17–27
- 58 Long C R, Dobrinsky J R, Johnson L A. *In vitro* production of pig embryos: comparisons of culture media and boars. *Theriogenology*, 1999, 51: 1375–1390
- 59 Zhu J, Moawad A R, Wang C Y, et al. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *Int J Vet Sci Med*, 2018, 6: S15–S26
- 60 Ferre L B, Kjelland M E, Strøbech L B, et al. Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, 2020, 14: 991–1004
- 61 Brom-de-Luna J G, Salgado R M, Felix M R, et al. Culture protocols for horse embryos after ICSI: effect of myo-inositol and time of media change. *Anim Reprod Sci*, 2021, 233: 106819
- 62 Olson S E, Seidel G E. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. *J Anim Sci*, 2000, 78: 152–157

- 63 Ramos-Ibeas P, González-Brusi L, Usud M T, et al. *In vitro* culture of ovine embryos up to early gastrulating stages. [Development](#), 2022, 149: dev199743
- 64 Edwards R G, Steptoe P C, Purdy J M. Fertilization and cleavage *in vitro* of preovulator human oocytes. [Nature](#), 1970, 227: 1307–1309
- 65 Steptoe P C, Edwards R G. Birth after the reimplantation of a human embryo. [Lancet](#), 1978, 312: 366
- 66 Zhou F, Wang R, Yuan P, et al. Reconstituting the transcriptome and DNA methylome landscapes of human implantation. [Nature](#), 2019, 572: 660–664
- 67 West R C, Ming H, Logsdon D M, et al. Dynamics of trophoblast differentiation in peri-implantation-stage human embryos. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2019, 116: 22635–22644
- 68 Lv B, An Q, Zeng Q, et al. Single-cell RNA sequencing reveals regulatory mechanism for trophoblast cell-fate divergence in human peri-implantation conceptuses. [PLoS Biol](#), 2019, 17: e3000187
- 69 Wang Y, Jiang X, Jia L, et al. A single-cell characterization of human post-implantation embryos cultured *in vitro* delineates morphogenesis in primary syncytialization. [Front Cell Dev Biol](#), 2022, 10: 835445
- 70 Ai Z, Niu B, Yin Y, et al. Dissecting peri-implantation development using cultured human embryos and embryo-like assembloids. [Cell Res](#), 2023, 33: 661–678
- 71 Hurlbut J B, Hyun I, Levine A D, et al. Revisiting the Warnock rule. [Nat Biotechnol](#), 2017, 35: 1029–1042
- 72 Nakamura T, Okamoto I, Sasaki K, et al. A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans. [Nature](#), 2016, 537: 57–62
- 73 Li Z, Zhou F. Prolonged 3D culture unlocks black box of primate embryogenesis. [Cell Stem Cell](#), 2023, 30: 911–912
- 74 Wu X, Zhai J, Li Q, et al. The *in vitro* culture of mammalian embryos. [Nat Methods](#), 2023, 20: 1855–1858
- 75 Method of the Year 2023: methods for modeling development. [Nat Methods](#), 2023, 20: 1831–1832
- 76 Turco M Y, Moffett A. Development of the human placenta. [Development](#), 2019, 146: dev163428
- 77 Jiang X, Zhai J, Xiao Z, et al. Identifying a dynamic transcriptomic landscape of the cynomolgus macaque placenta during pregnancy at single-cell resolution. [Dev Cell](#), 2023, 58: 806–821.e7
- 78 Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. [Nat Rev Immunol](#), 2006, 6: 584–594
- 79 Denker H W, Gerdes H J. The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. [Anat Embryol](#), 1979, 157: 15–34
- 80 Leiser R, Denker H W. The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. [Anat Embryol](#), 1988, 179: 129–134
- 81 Bai D D, Yan Z H, Liu S Y, et al. Research progress of histone methylation modification in early embryonic development and related diseases (in Chinese). [Sci Sin Vitae](#), 2023, 53: 1564–1574 [柏丹丹, 燕子回, 刘善尧, 等. 组蛋白甲基化修饰与早期胚胎发育及相关疾病的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1564–1574]
- 82 Wu Y Q, Zhu S, Wang Q. Metabolic control of oocyte development. [Sci Sin Vitae](#), 2024, 54: 16–33 [吴奕秋, 祝帅, 王强. 卵母细胞发育的代谢调控. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 16–33]
- 83 Partridge E A, Davey M G, Hornick M A, et al. An extra-uterine system to physiologically support the extreme premature lamb. [Nat Commun](#), 2017, 8: 15112
- 84 Kozlov M. Human trials of artificial wombs could start soon. Here's what you need to know. [Nature](#), 2023, 621: 458–460

Research progress on *in vitro* culture of mammalian embryos

YU KunYuan^{1,2,3}, LIU ZiChen^{1,2,3} & ZHAI JingLei^{1,3*}

¹ State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Key Laboratory of Organ Regeneration and Intelligent Manufacturing, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

³ Beijing Institute of Stem Cell and Regenerative Medicine, Beijing 100101, China

* Corresponding author, E-mail: zhaijinglei@ioz.ac.cn

Early embryonic development is crucial for population health. Abnormal embryonic development can lead to pregnancy-related diseases, birth defects, and development-originated diseases. Therefore, deciphering the processes and regulatory mechanisms of early human embryonic development is crucial for understanding the origin of human life, exploring the mechanisms of pathological embryogenesis, and improving the diagnostic and therapeutic efficacy of related diseases. However, due to ethical and technical limitations, human embryos that are developed within the uterus are difficult to be directly used for scientific research. Therefore, embryo *in vitro* culture (IVC) has become an important technique for studying the early embryonic development. Currently, embryo IVC technologies have been applied to reveal the features of embryonic development in various mammals, including mice, rats, rabbits, pigs, monkeys, and humans. These technologies are vital to the fields of developmental biology, genetics, toxicology, and regenerative medicine. This article reviews the development of embryo IVC technologies, summarizes the methods and factors of different culture systems, and discusses the challenges and future directions.

early embryonic development, *in vitro* culture of embryos, gastrulation, early organogenesis, regenerative medicine and organ manufacturing

doi: [10.1360/SSV-2024-0159](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0159)



翟晶磊, 中国科学院动物研究所副研究员, 北京干细胞与再生医学研究院“致一研究员”, 国家自然科学基金优秀青年科学基金获得者(2023年). 2020年于中国科学院动物研究所获得基础医学博士学位, 同年入动物研究所博士后工作站, 2023年出站并留所任职. 长期从事哺乳动物早期胚胎发育研究, 主要方向为: 利用生物材料构建啮齿类和灵长类胚胎体外长时程培养体系, 利用胚胎培养体系研究灵长类动物原肠运动与早期器官发育核心事件等. 以第一作者或共同第一作者在*Science*, *Nature*, *Cell*, *Developmental Cell*, *Advanced Science*等期刊发表多篇论文. 曾于研究生在读期间获得国家奖学金、中国科学院优秀毕业生、北京市优秀毕业生. 2020年获得中国科学院院长特别奖.