

# 影响小鼠体外受精关键因素的研究

邱枫 饶金鹏 蔡益婷

**【摘要】** 目的：探讨促排卵方案及小鼠体外受精环节中去除颗粒细胞、精液洗涤、精卵共孵育时间对昆明小鼠体外受精的影响，为人类辅助生殖技术提供理论基础，并为新开展的辅助生殖实验室建立质控提供更直接可靠的方法。方法：(1) 对昆明小鼠促排卵，促排药物孕马血清 (PMSG) + 绒毛膜促性腺激素 (HCG) 分为三个组合，分别为 6 IU+6 IU, 8 IU+8 IU, 10 IU+10 IU, 统计并比较三组获得的卵子数。(2) 分别用卵丘复合体和去除卵丘的卵母细胞与小鼠精子进行体外受精，比较两组受精率。(3) 用上游法和简单洗涤法处理小鼠精子，进行体外受精，比较两组受精率。(4) 精卵共孵育 4 h 和 16 h, 比较两组受精率。结果：(1) 促排药物 PMSG+HCG 为 8 IU+8 IU 时获得卵子数量显著高于其他两组 ( $P<0.05$ )。(2) 卵丘复合体和去除卵丘的卵母细胞相比，受精率显著增高 ( $P<0.05$ )。(3) 简单洗涤法洗涤精子后与卵子受精比上游法处理精子受精率高 ( $P<0.05$ )。(4) 精卵共孵育 4 h 的受精率高于共孵育 16 h 受精率 ( $P<0.05$ )。结论：选择合适的促排卵药物组合 PMSG 8 IU 和 HCG 8 IU 可以获得最多数量的卵子，减少小鼠资源的浪费，体外受精时去除卵丘复合体的卵丘细胞导致受精率显著下降，洗涤法处理精液较上游法明显提高受精率，短时受精能减少氧化应激对受精过程的影响，较隔夜受精受精率高。

**【关键词】** 昆明小鼠 促排卵 体外受精

doi:10.14033/j.cnki.cfmr.2019.32.076

文献标识码 B

文章编号 1674-6805 (2019) 32-0178-03

Study on the Critical Factor in Vitro Fertilization in Mice/QIU Feng, RAO Jinpeng, CAI Yiting. //Chinese and Foreign Medical Research, 2019, 17(32): 178-180

**[Abstract]** Objective: To explore the effects of controlled ovarian hyperstimulation, granulosa cells removal, semen washing and the time of incubation for sperm and egg on the outcome in vitro fertilization of Kunming mice, provide theoretical basis for human assisted reproductive technology and provide a basis for the establishment of the new assisted reproductive laboratory. Method: (1) Different dosage of HMG and HCG were carried out to stimulate Kunming mice ovulation, doses were divided into three groups 6 IU+6 IU, 8 IU+8 IU, 10 IU+10 IU, then the quantity of oocyte in each group were compared to determine the best combination dose. (2) Oocyte-corona-cumulus complexes and M<sub>II</sub> oocytes removed of cumulus cells were respectively used in vitro fertilization, then compared their fertility rates. (3) Mouse sperm were treated by upstream and washing methods, then compared their fertility rates. (4) The time of in vitro fertilization were respectively four hours and sixteen hours, then compared their fertility rates. Result: (1) The biggest amount and the best quality of oocytes when HMG and HCG were 8 IU+8 IU ( $P<0.05$ ). (2) The fertility rate of oocyte-corona-cumulus complex was higher than M<sub>II</sub> oocytes removed of cumulus cells ( $P<0.05$ ). (3) The fertility rate of sperm treated by upstream was higher than washing methods ( $P<0.05$ ). (4) The fertility rate of incubation for four hours was higher than sixteen hours ( $P<0.05$ ). Conclusion: The most oocytes by selecting the appropriate combination of ovulation stimulating drugs (PMSG 8 IU+HCG 8 IU), then the waste of resources in mice can be reduced. The removal of cumulus cells during in vitro fertilization can cause fertility rate significantly decreased, sperm treated by washing method upstream can develop the fertility rate than treated by upstream, short time fertilization can reduce the effects of oxidative stress on fertilization and the fertility rate is higher than overnight fertilization, so the appropriate fertilization methods and conditions should be chosen to improve the in vitro fertilization rate of mice.

**[Key word]** Kunming mice Controlled ovarian hyperstimulation Vitro fertilization

First-author's address: The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, China

鼠胚实验 (mouse embryo assay, MEA) 是目前最常用于实验室培养液、耗材和设备质量控制的生物方法, 适用于新建或

新启动周期常规体外受精 (IVF) 实验室的质量控制<sup>[1]</sup>, 帮助实验室人员熟练掌握胚胎操作技术, 并为人类辅助生殖技术提供理论基础。但由于实验环节较多, 小鼠体外受精实验体系尚

浙江大学医学院附属第二医院 浙江 杭州 310052

使用强度相关性研究 [J]. 中国消毒学杂志, 2019, 36 (3): 186-188.  
[10] 于雅晴, 苗文娟, 林青松. 血液病患者大肠埃希菌耐药率与抗菌药物使用强度的相关性分析 [J]. 天津药学, 2019, 31 (3): 19-22.  
[11] 马晶. 质量管理工具在抗菌药物使用强度管理中的应用价值探讨 [J]. 医药前沿, 2019, 9 (1): 243-244.  
[12] 王睿芳, 熊陈, 李小琴. 应用帕累托图对我院抗菌药物使用强度现状分析 [J]. 中国处方药, 2019, 17 (1): 58-59.

[13] 周丽娟, 蒙光义, 彭评志, 等. 嗜麦芽窄食单胞菌的耐药性变迁调查及与抗菌药物使用强度相关性分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38 (24): 2595-2598.  
[14] 葛学顺, 葛倩倩, 陶晓军, 等. 肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌的耐药性与抗菌药物使用强度的相关性分析 [J]. 实验与检验医学, 2019, 37 (3): 364-367, 406.

(收稿日期: 2019-09-20) (本文编辑: 李盈)

缺乏稳定性。有研究表明,大剂量的PMSG影响卵母细胞的质量<sup>[2]</sup>,不同剂量激素组合促排卵得出的卵子数目和质量也有很大差别<sup>[3]</sup>。另外卵丘细胞的去除、精液的处理方法、受精时间长短等因素对小鼠体外受精均有不同的影响<sup>[4-6]</sup>。虽然已有小鼠促排卵及体外受精技术的报道,但小鼠品系不同,促排卵剂量及体外受精方法亦有差别。因此本研究对昆明系小鼠促排卵方案进行比较,得出最佳促排方案,减少小鼠资源浪费,降低实验成本,对体外受精中卵母细胞的选择、精液的处理方法和受精时间进行研究,提高受精率,得出最适合昆明小鼠的受精方式,为新建实验室的质控提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级昆明小白鼠,雌鼠6周龄,体质量25~30g,雄鼠10周龄,体质量30~35g,购自浙江中医药大学实验动物中心[动物合格证号:SYXK(浙)2013-0184]。

1.1.2 药物与试剂 孕马血清(PMSG)与绒毛膜促性腺激素(HCG)均购自宁波第二激素厂;透明质酸酶(hyaluronidas)、HTF、G-IVF,购自Vitrolife公司;人血清白蛋白(HSA)及石蜡油购自SAGE公司。除透明质酸酶取卵当天配置外,其余培养液均于前1天配置置于37℃,6%CO<sub>2</sub>培养箱培养过夜。

1.1.3 耗材与设备 四孔板购自NUNC公司;1ml注射器购自龙德医用器械有限公司;35mm培养皿、60mm培养皿、移液管及玻璃巴氏德管购自BD Falcon公司。另外设备有丹麦IVFTECH超净工作台,日本OLYMPUS解剖显微镜,美国THEMRO培养箱,德国Eppendorf离心机。

### 1.2 实验方法

1.2.1 小鼠超排卵剂量的选择 雌鼠随机分为3组,每组10只,第一组注射PMSG 6 IU和HCG 6 IU,第二组注射PMSG 8 IU和HCG 8 IU,第三组注射PMSG 10 IU和HCG 10 IU。具体实验方法:第1天下午15:00每只雌鼠腹腔内注射PMSG,50h后腹腔内注射HCG,注射HCG后15h,即第2天早上8:00采用颈椎脱臼法处死雌鼠,在无菌环境下取出输卵管,放入预先平衡好的盛有卵-胚胎缓冲液的培养皿中,在体视显微镜下用1ml注射器刺破输卵管膨大部,收集卵丘复合体,放在配置好的透明质酸酶中消化时间小于1min,洗涤后观察卵子形态及计数M期卵子。

1.2.2 精液处理方法的选择 用颈椎脱臼法处死雄鼠,取雄鼠附睾和输精管置于装有预热平衡过的1ml HTF中,挤出输精管中精子,用针刺破附睾尾(精子活力>50%),收集精子,混匀后平均分配两组,一组用上游法处理,置于37℃,6%CO<sub>2</sub>培养箱中倾斜45°获能培养0.5h,一组用简单洗涤法处理,在试管中加入提前平衡预热的HTF洗液,300g离心10min。雌鼠注射PMSG 8 IU和HCG 8 IU,按1.2.1方法超排卵并取出卵丘复合体,随机分为两组,取以上两组精子分别加入含有卵子的G-IVF培养液中,调精子终密度 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ,置于37℃,6%CO<sub>2</sub>培养箱培养4h,4h后用G-IVF培养基清洗三次后转移到新的平衡过的G-IVF培养基中,继续培养20h后在倒置显微镜下观察两细胞形成情况,计算受精率。

1.2.3 体外受精卵子的选择 注射PMSG 8 IU和HCG 8 IU,按照1.2.1方法超排并取出卵丘复合体,取出后分为两组,一组为不做处理的卵丘复合体,一组用透明质酸酶去除颗粒细胞。按照1.2.2方法用颈椎脱臼法处死雄鼠,密度梯度离心法处理精液,精子加入两组含卵子G-IVF培养基中,调精子终密度 $2 \times 10^6/\text{ml}$ ,置于37℃,6%CO<sub>2</sub>培养箱培养4h,用G-IVF培养基清洗三次后转移到新的平衡过的G-IVF培养基中,继续培养20h后在倒置显微镜下观察两细胞形成情况,计算受精率。

1.2.4 授精时间选择 注射PMSG 8 IU和HCG 8 IU,按1.2.1方法超排卵并取出卵丘复合体,按1.2.2方法用颈椎脱臼法处死雄鼠,密度梯度离心法处理精液后体外受精分为两组,一组置于37℃,6%CO<sub>2</sub>培养箱培养4h,用G-IVF培养基清洗三次后转移到新的平衡过的G-IVF培养基中,继续培养,另一组置于37℃,6%CO<sub>2</sub>培养箱隔夜培养16h,在倒置显微镜下观察两组两细胞形成情况,计算受精率。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件对数据进行统计分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较采用t检验,计数资料以率(%)表示,采用 $\chi^2$ 检验,P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠超排剂量选择结果

注射不同剂量PMSG和HCG得到不同数目的卵子,PMSG 8 IU和HCG 8 IU时M期卵子数目最多,差异有统计学意义(P<0.05),见表1。

表1 超排剂量对小鼠获卵数的影响

剂量组合	小鼠(只)	获卵数(个)
PMSG 6 IU+HCG 6 IU	10	15.1±2.3
PMSG 8 IU+HCG 8 IU	10	22.6±2.1 <sup>#</sup>
PMSG 10 IU+HCG 10 IU	10	18.5±1.2 <sup>*</sup>

\*与PMSG 6 IU+HCG 6 IU比较,P<0.05;#与PMSG 10 IU+HCG 10 IU比较,P<0.05。

### 2.2 精液处理方法选择的结果

小鼠精液用上游法和简单洗涤法处理后,简单洗涤法受精率高于上游法,差异有统计学意义(P<0.05),见表2。

表2 精液洗涤方法对小鼠体外受精的影响

精液洗涤方法	卵子数目(个)	受精卵子数目(个)	受精率(%)
洗涤法	512	399	77.93
上游法	431	241	55.92
P值			<0.05

### 2.3 体外受精卵子的选择结果

用卵丘复合体和去除卵丘细胞的卵子受精,用卵丘复合体受精比拆除卵丘细胞的卵子受精率显著高,差异有统计学意义(P<0.05),见表3。

### 2.4 受精时间选择的结果

精卵共培养4h换取新的培养液和精卵过夜培养16h比较,精卵共培养4h受精率高于受精16h,差异有统计学意义(P<0.05),见表4。

表3 去除卵丘细胞对小鼠体外受精的影响

卵子处理方式	卵子数目 (个)	受精卵子数目 (个)	受精率 (%)
不处理	351	262	74.64
去除卵丘细胞	304	65	21.38
P 值			<0.05

表4 精卵共培育时间对体外受精的影响

受精时间	卵子数目 (个)	受精卵子数目 (个)	受精率 (%)
4 h	305	211	69.18
16 h	282	122	43.26
P 值			<0.05

### 3 讨论

小鼠超排卵是体外受精 - 胚胎移植非常重要的一步, 为小鼠体外受精 - 胚胎移植模型的建立提供了基础。雌鼠超排卵效果受年龄体重、激素剂量、注射时间及小鼠品系的影响。不同品系小鼠使用超排药物的有效剂量不同, 对于大部分品系推荐 5 IU<sup>[6]</sup>, 但有些品系小鼠 2.5 IU 或高达 10 IU 效果可能更好, 昆明系鼠作为我国最常使用的实验动物, 其卵母细胞可为新建辅助生殖实验室质控的重要实验材料, 关于昆明系鼠促排最佳有效剂量虽有报道<sup>[7]</sup>, 但所用激素不同最佳剂量亦有不同, 本实验使用 6 周龄昆明小鼠用 PMSG 和 HCG 进行促排, 选取获卵数最多且卵母细胞质量最好的一组为最佳剂量组合, 通过比较获卵数发现, 随着剂量的升高获卵数升高, 但当 PNSG 和 HCG 达到 10 IU 时, 获卵数呈下降趋势, 且卵母细胞质量有所下降, 部分卵母细胞退化, 有研究发现, 超排卵可使小鼠卵母细胞染色体异常的比例增高<sup>[8]</sup>, 推测 PMSG 和 HCG 10 IU 可能剂量过大, 选取 8 IU 为本组的最佳剂量组合。

影响小鼠体外受精的因素有很多, 雄鼠精子活力为其中很重要的一个因素, 采用上游法和简单洗涤法均能提高体外受精的受精率, 对于人类精子的处理, 有人认为, 洗涤法较上游法得到的精子密度及回收率要明显增高<sup>[9]</sup>, 也有人认为, 上游法较简单洗涤法在妊娠率、流产率、精子密度、精子活力上差异均无显著性意义<sup>[10]</sup>。也有认为, 上游法处理后精子活力 (PR) 及活率 (PR+NP) 均要显著高于简单洗涤法<sup>[11]</sup>。而对于小鼠, 本实验采用 10 周龄雄鼠分别用上游法和简单洗涤法对小鼠精液处理, 结果显示简单洗涤法的精子受精率更高, 提示洗涤法比上游法能更好地去除死精, 筛选出活力好的精子。有研究去除卵丘细胞的小鼠卵母细胞存在受精障碍, 且不同品系的小鼠实验结果不同<sup>[12]</sup>, 本实验分别用卵丘复合体和去除卵丘细胞的卵母细胞体外受精, 卵丘复合体受精率显著高于去除卵丘细胞的卵母细胞, 原因可能是卵母细胞经过透明质酸酶处理后透明带结构发生改变。故为提高小鼠体外受精的受精率, 更快更效率地为新建立实验进行室质控, 笔者选取卵丘复合体进行体外受精。对于人类的体外受精, 短时受精和隔夜受精两种方式文献报道不一<sup>[13]</sup>, 多数文献更倾向于短时受精更有优势, 本实验比较了小鼠短时受精和隔夜受精的受精率, 结果显示短时受精的受精率显著高于隔夜受精, 这一结果提示长时间的共培养导致

更多氧化应激产物的释放及高浓度的精子代谢物对受精及胚胎发育可能都是不利的。

综上所述, 促排剂量过多或过少对促排的卵母细胞数量和质量都有影响, 选取 PMSG 和 HCG 8 IU 为最佳剂量组合, 可以使获卵数达到最大, 减少小鼠资源的浪费。采用洗涤法处理小鼠精液, 卵丘复合体进行体外受精, 受精时间选取 4 h, 提高小鼠受精率, 以到达最高的受精率。

### 参 考 文 献

- [1] 黄国宁, 刘东云, 韩伟. 辅助生殖技术实验室的建设及其质量控制 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26 ( 10 ) : 755-758.
- [2] Karagenc L, Yalcin E, Ulug U, et al. Administration of increasing amounts of gonadotrophin compromises preimplantation development of parthenogenetic mouse embryos [J]. Reprod Bi-omed Online, 2004, 8 ( 6 ) : 628-634.
- [3] 王守芹, 卜丽华, 崔玉凤. 不同促排卵方法对小鼠卵母细胞发育潜能的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2015, 19 ( 11 ) : 1821-1822.
- [4] 洗英杰, 周秀琴, 颜秋霞, 等. 探讨鼠胚实验中两种精子处理方法对实验结果影响 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35 ( 7 ) : 803-804.
- [5] 安铁洙, 谭建华, 高丰, 等. 去掉卵丘细胞或切开卵透明带对小鼠体外受精的影响 [J]. 中国兽医科技, 2001, 31 ( 5 ) : 10-12.
- [6] Martin-Coello J, Gonzalez R, Crespo C, et al. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice ( Mus musculus, Mus spretus and Mus spicilegus ) [J]. Theriogenology, 2008, 70 ( 6 ) : 1004-1013.
- [7] 邱卓琳, 李红, 毛向明, 等. 不同剂量促排卵激素对昆明小鼠卵子及胚胎发育潜能的影响 [J]. 广东医学, 2012, 33 ( 3 ) : 325-327.
- [8] Elbling L, Colot M. Abnormal development and transport and increased sister-chromatid exchange in preimplantation embryos following superovulation in mice [J]. Mutat Res, 1985, 147 ( 4 ) : 189-195.
- [9] 邓俊耀, 张朝晖, 秦英键. 3 种精子优化处理方法处理精液效果评价 [J]. 华夏医学, 2009, 22 ( 5 ) : 832-834.
- [10] 李涛, 郭庆华, 田金徽, 等. 宫腔内人工授精中应用上游法和密度梯度离心法的系统评价 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14 ( 18 ) : 3310-3313.
- [11] Boomsma C M, Heineman M J, Cohlen B J, et al. Semen preparation techniques for intrauterine insemination [J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2007, 3 ( 4 ) : 92.
- [12] 吴红, 孙强, 范士明, 等. 不同品系小鼠体外受精方法的研究 [J]. 扬州大学学报, 2004, 25 ( 1 ) : 18-21.
- [13] 史鸿志, 张楠, 秦妍, 等. 短时受精联合 R-ICSI、half-ICSI、过夜受精在不同不孕情况中的应用 [J]. 生殖医学杂志, 2018, 27 ( 12 ) : 1219-1223.
- [14] 张纯, 张帆, 郑洁, 等. 改良过夜与短时受精对体外受精及临床妊娠结局的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30 ( 24 ) : 4167-4169.

(收稿日期: 2019-09-19) ( 本文编辑: 何玉勤 )