

小鼠体外受精及其胚胎体外培养的比较研究

贾青^{1,2}, 高娟^{1,2}, 杨博^{2,3}, 刘丽均², 郁丽丽², 徐平², 芮荣¹

(1. 南京农业大学 动物医学院, 南京 210095; 2. 中国科学院上海实验动物中心, 上海 201615; 3. 西北农林科技大学 动物医学院, 杨凌 712100)

[摘要] 目的 通过比较不同品系小鼠体外受精情况以及不同培养液对C57BL/6J小鼠胚胎体外培养效果的实验, 进一步完善小鼠体外受精和早期胚胎体外培养体系。方法 对C57BL/6J、DBA/2、FVB/NJ、BALB/c、KM、ICR及BARR 小鼠进行超排和体外受精, 并对C57BL/6J小鼠体外受精后的2-细胞胚胎用HTF、CZB、KSOM、M16、HECM五种培养液在相同条件下进行体外培养到囊胚, 计算4-细胞~囊胚的发育率。结果 各品系小鼠平均排卵数为13.0~38.7个($P<0.01$), 体外受精率为70.2%~92.8%($P<0.05$)。不同培养液至4-细胞的发育率为60.3%~95.8%, 其中KSOM的4-细胞发育率为95.8%, 最适合2-细胞向4-细胞的发育。8-细胞发育率为52.8%~91.1%, 桑椹胚发育率为40.6%~87.5%, 囊胚发育率为5.1%~75.4%, 各阶段胚胎发育率均差异显著。其中适合于金黄仓鼠桑椹胚、囊胚发育的HECM-2并不支持C57BL/6J囊胚的发育, 其囊胚发育率只有5.1%, CZB最适合其囊胚的发育。结论 遗传背景是影响小鼠超排及体外受精效果的主要因素之一。葡萄糖的存在不利于克服2-细胞发育阻断, 胚胎在8-细胞期以前, 主要能源物质不是葡萄糖, 直到桑椹胚后期, 葡萄糖才是主要的能量物质。磷酸盐可引起胚胎发育阻断。氨基酸和EDTA有利于克服胚胎发育阻滞。

[关键词] 小鼠; 体外受精; 胚胎体外发育

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1004-8448(2008)05-0304-05

自从1968年Whittingham最先报道了小鼠体外受精获得后代以来, 许多研究者进行了大量的研究。目前小鼠体外受精技术已日臻完善, 但某些品系小鼠依然存在体外受精率不高, 结果不稳定等现象。小鼠胚胎体外培养技术虽已得到长足发展, 但依然存在发育受阻、囊胚发育率不高等问题。本实验试图通过对不同遗传背景的小鼠进行超排和体外受精, 为进一步完善小鼠体外受精技术积累数据, 同时通过对几种培养液体外培养效果的比较分

析, 试图找出对不同阶段胚胎发育最适合的培养液, 为提高小鼠胚胎体外发育率提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级C57BL/6J、DBA/2、FVB、BALB/c四个近交系小鼠; KM和ICR两个封闭群及BARR 1个基因敲除小鼠由中科院上海实验动物中心提供[SCXK(沪)2007-0005]。

1.2 主要试剂

PMSG和hCG(宁波第二激素厂), 石蜡油(SIGMA), HTF按Quinn等^[1]的方法配制, KSOM按Lawitts等^[2]的方法配制, HECM-1, HECM-2按Polani等^[3]的方法配制, CZB和M16按《小鼠胚胎操作实验手册》^[4]中的方法配制。

1.3 精子的收集和获能

3月龄以上雄鼠颈椎脱臼处死, 取出附睾尾放在

[收稿日期] 2008-04-21

[基金项目] 国家十一五科技支撑项目(2006BAI23B04)

[作者简介] 贾青(1982-), 女, 硕士, 研究方向: 动物生殖调控及生殖疾病控制, E-mail: jiaqing204@163.com

[通讯作者] 徐平(1964-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物低温生物学和实验动物遗传性疾病,

E-mail: xuping@slaccas.com,

芮荣, 男, 博士生导师, 研究方向: 动物生殖调控及生殖疾病控制, E-mail: rrui@njau.edu.cn

滤纸上去除血迹,手指挤压附睾尾,用维纳斯剪将其顶端剪一小口,用解剖针将精子挑出放入120 μ l HTF 液滴中获能,将其置于 37 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 饱和湿度条件下培养 1 h 以上。

8 周左右的 C57BL/6J、DBA/2、FVB、BALB/c、KM、ICR、BARR 雌鼠,每品系 12 只/次。下午 15:00 左右按 7.5 IU/只腹腔注射 PMSG,48 h 后注射 HCG7.5 IU/只,注射 hCG 15 h 以后颈椎脱臼处死,取出输卵管放入盛有 HTF 的培养皿中,用眼科镊刺破输卵管膨大部将卵团引入 100 μ l HTF 受精液滴中,每个液滴放 3 个小鼠的卵团。

1.5 体外受精

精子获能 1 h 后在显微镜下观察活力和浓度,取 10 μ l 精子在 Makler 板上计算精子浓度,用 10 μ l 移液器向放有卵团的 HTF 受精液滴中加入 8~15 μ l 精子(视精子浓度而定)媒精。体外受精 6 h 后,将受精卵用 HTF 清洗 3 次后转至新的 HTF 液滴中培养 16 h。

1.6 小鼠胚胎的体外培养

C57BL/6J 小鼠雌雄配子体外受精获得 2-细胞胚胎。使用 100 μ l 培养液滴置于 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 饱和湿度培养箱内培养,所用培养液为 HTF、CZB、M16、KSOM、HECM-1,HECM-2,其中 HECM-1 用于 2~8-细胞的培养,8-细胞以后使用 HECM-2 培养。

1.7 统计学方法

不同培养液各阶段胚胎发育率的比较,7 个品系小鼠超排卵数、异常卵率及体外受精率的比较均采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),使用 SPSS13.0,对数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 不同品系小鼠超排卵数、异常卵数、体外受精率

七个品系小鼠平均超排数为 11.8~38.7 个 ($P < 0.01$),异常卵率为 2.3%~26.7% ($P < 0.01$),体外受精率为 70.2%~92.8% ($P < 0.05$)。近交系平均超排数、异常卵率及体外受精率均差异显著 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.2 不同培养液对 C57BL/6J 小鼠早期胚胎培养的结果

各培养液中的胚胎发育率是三次实验的平均值,2-细胞数是三次实验的 2-细胞数的总和。不同培养液 4-细胞发育率、8-细胞发育率、桑椹胚率、及囊胚率均差异显著 ($P < 0.05$)。从表 2 可知在 KSOM 培养液中 4~8-细胞发育率最高显著高于其它各组 ($P < 0.05$),而 CZB 的桑椹胚和囊胚发育率最高。HECM-1 支持 4~8-细胞的发育,而 HECM-2 却基本不支持胚胎发育。

表 1 不同品系小鼠体外受精结果的比较
Table 1 Results of IVF in various mouse strains

品系分类 Strains class	品系 Strains	平均超排卵数 / 个 Average No. of superovulation	异常卵裂率 / % Abnormal rate / %	受精率 / % Fertility rate / %
近交系 Inbred	C57BL/6J	36.3 ^c	3.4% ^a	90.4% ^c
	DBA/2	24.0 ^b	5.6% ^a	92.7% ^{cd}
	FVB	23.7 ^b	28.1% ^d	94.6% ^d
	BALB/c	12.0 ^a	5.8% ^b	71.2% ^a
封闭群 Closed colony	KM	39.7 ^c	7.9% ^c	85.0% ^b
	ICR	20.3 ^b	3.5% ^a	91.0% ^c
基因敲除 Knock out	BARR II	14.7 ^a	5.8% ^b	94.4% ^{cd}

注: 同列具相邻小写字母标注者, 差异显著, $P < 0.05$; 同列具相间小写字母标注者, 差异极显著, $P < 0.01$, 下表同。

① 平均超排数 = 取卵总数 / 12 (每品系 12 只雌鼠); ② 异常卵比率 = (异常卵数 / 卵总数) \times 100%; ③ 体外受精率 = [2-细胞数 / (2-细胞数 + 未受精卵数)] \times 100%;

Note: Values in the same column with neighbouring lowercase letters indicating significant difference, $P < 0.05$; Values in the same column with unneighbouring lowercase letters indicating significant difference, $P < 0.01$, the same in the following table.

① The average number of superovulation = the total number of oocytes / 12; ② The abnormal rate = (the number of abnormal oocytes / the total number of oocytes) \times 100%; ③ The rate of fertility *in vitro* = [the number of 2-cell / (the number of 2-cell + the number of unfertilized ovum)] \times 100%;

表 2 不同培养液中 C57BL/6J 小鼠胚胎发育率的比较

Table 2 The embryo development of C57BL/6J mice *in vitro* in different media

培养液 Media	2- 细胞胚胎数 number of 2-cell embryos	4- 细胞率 4-cell embryo rate/%	8- 细胞率 8-cell embryo rate/%	桑椹胚率 morula rate /%	囊胚率 blastcyst rate /%
HTF	139	60.3% ^a	52.8% ^a	41.9% ^a	26.7% ^b
HECM	154	91.4% ^c	83.9% ^b	42.1% ^a	5.1% ^a
CZB	191	92.3% ^c	90.6% ^{bc}	88.6% ^b	78.6% ^d
M16	168	79.8% ^b	69.7% ^a	50.2% ^a	36.2% ^c
KSOM	193	95.8% ^d	91.1% ^c	82.1% ^b	71.6% ^d

注: 各期胚胎发育率=(各期胚胎数/原 2- 细胞数)× 100%

Note: The development rate of embryo =(the number of embryos/the number of 2-cell) × 100%

3 讨论

目前小鼠体外受精技术已经相对成熟,关于小鼠体外受精的研究报道也很多,但是由于各研究者的实验方法和实验环境存在很大差异,导致对于同一品系的小鼠的体外受精率的报道存在不同的结果。本实验结果表明,不同品系小鼠超排效果差异显著,体外受精结果差异显著,这与赵丹凤等^[5]报道的结果一致。证明遗传背景是影响小鼠超排效果及体外受精效果的主要因素之一。

Chatot 等^[6]采用 CZB 培养不同品系小鼠 1- 细胞期胚胎试验证明,不同品系小鼠胚胎在同一培养液中胚胎发育率差异很大。本实验选择 C57BL/6J 一个品系小鼠的胚胎,避免了小鼠基因型不同而导致的胚胎代谢类型的差异。通过比较不同培养液早期胚胎的发育率发现,小鼠早期胚胎培养的关键在于如何克服 2- 细胞阻滞,而克服小鼠胚胎发育阻滞的培养液需要添加的成分很多,如必需和非必需氨基酸、牛磺酸等。本实验结果显示,HTF 的 4- 细胞发育率最低(60.3%),M16 次之(79.8%)。分析 HTF 和 M16 配方发现,HTF 和 M16 与 KSOM 相比不含有必需、非必需氨基酸及 EDTA,与 CZB 相比不含有 EDTA。氨基酸是蛋白质合成前体,同时参与胚胎能量代谢,许多研究表明氨基酸是兔(Kane,1989)、仓鼠(Carney and Bavister,1987)、人(Winkle,2001)等胚胎发育到囊胚所必需的。有研究表明在体外培养液中加入氨基酸有利于克服早期体外受精胚胎的发育阻滞并能促进胚胎的早期发育和增强胚胎植入后的发育能力。必需氨基酸(EA)在胚胎致密化前没有作用,甚至对胚胎发育有副作用,但对后期胚胎发育有促进作用。非必需氨基酸(NEAA)能促进胚胎向囊胚发育,并增加滋养层细

胞的数量和囊胚的孵化能力。EDTA 可以螯合培养液中对胚胎发育有害的金属离子,以增强克服胚胎体外发育阻滞能力。

本实验结果显示,HECM 可以支持 4-8 细胞的发育,却不支持发育到囊胚,KSOM 的 4- 细胞发育率显著高于 CZB,但是桑椹胚率和囊胚率却低于 CZB。通过比较 HECM 的配方,作者发现 HECM 中不含葡萄糖。由此推断,胚胎在 8- 细胞期以前,主要能源物质并不是葡萄糖,直到桑椹胚后期葡萄糖才是主要的能量物质。因此 HECM 不支持小鼠胚胎发育到囊胚。这与 Iyengar 等^[7]研究结果一致。比较 KSOM 和 CZB 两种培养液的配方,作者发现 KSOM 中葡萄糖含量仅为 3.6 mg/100ml,而 CZB 中葡萄糖含量却高达 100 mg/ml,由此推断在小鼠胚胎发育的最初 48 h 葡萄糖抑制胚胎的发育,葡萄糖的存在不利于克服 2- 细胞阻滞,这与 Chatot 等^[6]的研究结果相同。王敏康等^[8]也认为葡萄糖是小鼠胚胎体外发育阻断的主要原因。也有人报道葡萄糖不会导致 2- 细胞阻滞,目前,葡萄糖是否抑制早期胚胎的体外发育究竟胚胎发育的哪一阶段需要葡萄糖报道不一。Gardner & Leese 和丁芳等报道了 KSOM 中葡萄糖为 3.0 mmol/L 可能是 ICR 小鼠胚胎体外发育的最佳浓度^[9]。由此推测小鼠体外发育的最适浓度可能与体内输卵管的浓度接近。研究表明如果小鼠缺乏磷酸果糖激酶活性从而抑制了糖酵解的作用,在 1~2 细胞期时糖原含量增加 4 倍,糖原的异常积累无法分解引起卵裂球膨胀裂解导致发育受阻(Bavister 等)。Ozias 等从能量角度解释认为,胚胎在糖原合成过程中消耗大量能量,抑制早期胚胎卵裂。Barnett 等^[10]从细胞结构水平研究葡萄糖对胚胎毒害作用时发现,葡萄糖可以引起体外培养正常胚胎线粒体重新分布,从而引起胚胎体外发育阻

断。同时高浓度的葡萄糖在代谢过程中容易产生氧自由基,破坏核酸蛋白质等使细胞功能丧失。因此在胚胎体外培养过程中适时适量的加入葡萄糖对胚胎发育是有利的。

KSOM 和 CZB 相比, KH_2PO_4 含量低很多。Schini 等^[11]认为磷酸盐是引起胚胎发育阻断的原因。Aoki 等(1990)报道 mKRB 培养液中 KH_2PO_4 对 2- 细胞期以后胚胎发育有害。由此推测 CZB 的 4- 细胞率低于 KSOM 也有可能是因为 KH_2PO_4 含量太高的缘故。

胚胎发育是一个动态过程, 在不同发育时期对营养物质的需求和代谢不同。因此, 要针对不同发育阶段胚胎设计不同的培养基, 这样才能促进胚胎在体外的正常发育。

[参考文献]

- [1] Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of medium based on the composition of human tubal fluid[J]. *Fertil.Steril*, 1985, 44: 493-498.
- [2] Lawitts JA, Biggers JD. Culture of preimplantation embryos [J]. *Methods Enzymol*, 1993, 225: 153-164.
- [3] Seshagiri PB, Bavister BD. Relative Developmental Abilities of Hamster 2-and 8-Cell Embryos Cultured in Hamster Embryo Culture Medium-1 and -2 [J]. *J Exp Zool*, 1991, 257: 51-57.
- [4] A. 纳吉, M. 格斯滕斯坦, K. 文特斯滕, 等. 小鼠胚胎操作实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2004.565-579.
- [5] 赵丹凤, 刘丽均, 赵立虎, 等. 不同遗传背景小鼠的超排与体外受精率的比较研究[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2006, 24(5): 466-470.
- [6] Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, et al. An improved culture medium supports development of randombred 12 cell mouse embryos in vitro[J]. *J Reprod Fertil*, 1989, 86: 679.
- [7] Iyengar MR, Iyengar CW, Chen HY. Expression of creation kinase isoenzyme during oogenesis and embryo genesis in mouse [J]. *Dev Biol*, 1983, 96(1): 263-268.
- [8] 王敏康, 张田, 王晓燕. 几种克服昆明小鼠 2- 细胞胚胎发育阻滞的培养液研究[J]. *动物学报*, 2000, 46(1): 81-87.
- [9] 丁芳, 周红林, 刘洋, 等. 葡萄糖对 ICR 小鼠胚胎体外发育的影响[J]. *动物学研究*, 2007, 28(5): 501-506.
- [10] Barnett DK, Claytoo MK, Kimare Barnett DK, et al. Glucose and phosphate toxicity in hamster preimplantation embryos involves disruption of cellular organization, including distribution of active mitochondria[J]. *Mol .Reprod Dev*, 1997, 48: 227-237.
- [11] Schini SA, Bavister BD. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose [J]. *Biol Reprod*, 1988, 39: 1183-1192.
- [12] 刘淑娟, 华进年, 葛秀国, 等. 几种培养液对昆白系小鼠早期胚胎体外发育的影响[J]. *西北农业学报*, 2007, 16(3): 19-22, 36.
- [13] Dawson KM, Baltz JM. Organic osmolytes and embryos: substrates of the Gly and beta transport systems protect mouse zygotes against the effects of raised osmolarity[J]. *Biol Reprod*, 1997, 86:1550-1558.
- [14] Lalorapa M, GP Kumar, and MM Laloraya. Histochemical study of superoxide dismutase in the ovary of the rat during the oestrous cycle [J]. *Reprod Fert*, 1989, 86: 583-587.
- [15] Devreker. F and K Harey. Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos *in vitro* [J]. *Biol reprod*, 1997, 57: 921-928.
- [16] Martin KL, Leese H J. Role of glucose in mouse pre 2imp lantation embryo development [J]. *Mol Rep rod Dev*, 1995, 40 (4): 436-443.
- [17] 徐平, 山村绫子, 唐一岷, 等. 不同品系小鼠的体外受精、胚胎冷冻及移植的比较研究[J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(3): 147-151.
- [18] Michael C , Lynda K, Joel A, et al. IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids [J]. *HumanReproduction*, 2000, 15(8): 1791-1801.

The Comparative Studies on *in vitro* Fertilization and Development of Embryos in Mice

JIA Qing^{1,2}, GAO Juan^{1,2}, YANG Bo^{2,3}, LIU Li-jun², YU Li-li², XU Ping², RUI Rong¹

(1. College of Veterinary, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Shanghai Laboratory Animal Center, CAS, Shanghai 201615, China;

3. College of Veterinary, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

[Abstract] Objective To compare the fertilization *in vitro* in various mouse strains and the effects of different culture medium for development of embryos in C57BL/6J mice *in vitro*.

Methods Females from 7 strains of mice were superovulated and operated by IVF, and the average number of superovulation and the fertility rate were observed. HTF、CZB、KSOM、M16、HECM were used as the culture medium to culture the 2-cell of C57BL/6J mice in the same condition and the development rate from 4-cell to blastocyst were observed respectively. **Results** there is a significant difference ($P<0.01$) in the average number of superovulation markedly among 13.0~38.7, and the rate of fertility of individual mouse with a range of 70.2% to 92.8% ($P<0.05$). The development rate of 4-cell, 8-cell, morula and blastocyst in the 5 culture mediums with a range of 60.3%~95.8%、52.8~91.1%、40.6~87.5% and 5.1%~75.4%. **Conclusion** the genetic background is a primary factor for the effect of superovulation and fertilization *in vitro* in mice. Glucose can result in 2-cell interdiction of the embryo development; it is not primary energy substance before 8-cell. Phosphate can result in retardance of the embryo development. Amino and EDTA are beneficial for overcoming the block of the embryo development.

[Key words] Mouse; *in vitro* fertilization; Embryo development

· 信 息 ·

《人类疾病动物模型复制方法学》已经出版

由周光兴、高 诚、徐 平、姚 明、谢家骏、胡建华等主编的《人类疾病动物模型复制方法学》一书，已经由上海科技文献出版社出版。此书根据人类各系统疾病的特点，通过疾病动物模型的复制方法、模型特点及比较医学三个方面，着重介绍近千种人类疾病动物模型的复制方法，全书共分为 16 个章节 400 余页，近 150 万字，定价 128 元。介绍的人类疾病动物模型以诱发性动物模型为主，仅收录有少量的自发性动物模型；内容除生物医学领域公认的经典性疾病动物模型以外，尚收录了大量非经典性疾病动物模型。全书内容丰富，资料翔实，文字简练，通俗易懂，实用性强，是生物医学、药物研发、食品化工、畜牧兽医、轻工业、环境保护、航天医学、军事医学、进出口检疫、生物工程等研究和应用领域具有重要参考价值的一本工具书。

如有读者和作者需要购买此书，本编辑部可以代购，需购书者可汇款至上海市浦东金科路 3577 号，邮编 201203，上海市实验动物资源中心内，《实验动物与比较医学》编辑部，书款加挂号邮费合计 135 元，款到寄书和发票。