

# 小鼠超数排卵与早期胚胎体外培养效果研究

林峰, 陈玉霞\*, 孙克宁, 杨婷, 田晓军

(河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

**摘要:**为探讨冲胚方法对小鼠超数排卵效果的影响,分别采用子宫切碎法与子宫冲胚法对超排小鼠进行了冲胚。结果表明:子宫冲胚法的平均采卵数和平均获胚数极显著高于子宫切碎法( $P < 0.01$ ),而平均可用胚数显著高于子宫切碎法( $P < 0.05$ ),两种方法的平均未受精卵数则差异不显著( $P > 0.05$ ),说明冲胚方法对小鼠超数排卵效果的影响显著,且子宫冲胚法明显优于子宫切碎法。小鼠早期胚胎发育观察结果表明:超排处理后,在公母鼠合笼后76~79.5 h采胚,胚胎大多处于桑椹胚期,而在公母鼠合笼后88~91.5 h采胚,胚胎大多处于致密桑椹胚期与囊胚期;采用TCM199+15%胎牛血清培养液对小鼠胚胎进行体外培养是可行的。

**关键词:**小鼠;超数排卵;早期胚胎;体外培养;冲胚方法

**中图分类号:** Q132.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-8581(2010)12-0144-03

## Study on Effect of Superovulation and *in vitro* Culture of Early Embryo in Mouse

LIN Feng CHEN Yu-xia\*, SUN Ke-ning YANG Ting TIAN Xiao-jun

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine Henan Agricultural University Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In this paper, the effect of different methods of collecting embryos on the superovulation of mice was studied and the embryos in the superovulated mice were collected by using the uterus-mincing method and uterus-collecting method respectively. The results showed that the average number of eggs and embryos obtained by the uterus-collecting method were extremely significantly higher ( $P < 0.01$ ) than those obtained by the uterus-mincing method and the average number of usable embryos obtained by the uterus-collecting method was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that did by the uterus-mincing method. The average number of unfertilized eggs obtained by these two methods was not significantly different ( $P > 0.05$ ). So the superovulation effect of mice was significantly influenced by the method of collecting embryos. The observation results of early embryos development indicated that most of the embryos collected 76~79.5 hours after combining cages were at morula stage while most of the embryos collected 88~91.5 hours after combining cages were at compacted morula stage and blastocyst stage. It was feasible that the embryos of mice were cultivated *in vitro* by using the mixed solution of TCM199 and 15% FCS.

**Key words:** Mouse Superovulation Early embryo *In vitro* culture Method of collecting embryos

雌性哺乳动物一生所产的卵子总数早在其胚胎发育形成卵巢的过程中已被确定,成熟卵子在成年后的发情周期中分别排出,但是单纯依靠动物的自然排卵,一方面所得到的卵母细胞数或胚胎数较少,另一方面又消耗大量的时间和浪费较多的动物,因此为了获取大量的胚胎,多采用超数排卵的方法,即利用外源性促性腺激素诱发多个卵泡同时发育并排出具有正常受精能力的卵子<sup>[1~3]</sup>。该技术大幅度地开发利用了卵巢上的卵母细胞资源,为胚胎工程和转基因动物等相关领域的研究提供了大量的研究素材。小鼠具有个体小、生长快、繁殖力强等特点,是畜牧兽医科学研究领域应用最为广泛的实验动物,研究小鼠超数排卵对动物胚胎工程等研究具有重要意义。

近年来,随着遗传工程小鼠的大量开发,人们对小鼠卵母细胞和胚胎的需求量日趋增多,因而完善的超数排卵技术是遗传工程小鼠研究获得成功的重要前提条

件。到目前为止,能够获得大量胚胎来源的技术仍为超数排卵。超数排卵反应是一个极其复杂的生理过程,研究资料表明,小鼠超排效果受激素的种类、剂量以及动物的生理状态等多种因素影响,这些因素错综复杂,使超数排卵效果很不稳定<sup>[1,4]</sup>。为了进一步研究冲胚方法对超数排卵的影响及小鼠冲胚的有效方法,本试验在控制以上因素一致的前提下,采用两种不同的冲胚方法来进行对比,以期今后的小鼠超数排卵研究提供一定的参考依据,为胚胎生物技术研究提供借鉴。

### 1 材料与方法

**1.1 试验地点和时间** 本试验于2009年10月16日至2010年5月27日在河南农业大学牧医工程学院胚胎生物技术研究室进行。

#### 1.2 试验动物

**1.2.1 试验动物的条件** 试验用昆明小白鼠购于河南省实验动物中心,雌性小鼠(未经产)为17周龄、体重30

收稿日期: 2010-09-10

基金项目: 河南省重点科技攻关计划项目(82102130005);河南省重大科技攻关计划项目(0422011200)。

作者简介: 林峰(1972-),男,山东栖霞人,副教授,博士,主要从事动物胚胎生物技术研究。\* 通讯作者: 陈玉霞。

~40 g 雄性小鼠为 17 周龄, 体重 35~45 g 采用标准颗粒料(购于河南省实验动物中心)按常规饲养。

1.2.2 试验动物的分组 试验选择 271 只小鼠, 随机分为 A、B 两组, A 组 140 只, B 组 131 只, 全部采用 10 IU PMSG+10 IU HCG 腹腔注射。A 组采用子宫切碎法回收胚胎, B 组采用子宫冲胚法回收胚胎。

### 1.3 试验药品

1.3.1 小鼠超数排卵药品 孕马血清促性腺激素(PMSG), 杭州动物药品厂生产, 1000 IU/支; 人绒毛膜促性腺激素(HCG), 杭州动物药品厂生产, 1000 IU/支。

1.3.2 小鼠冲胚与早期胚胎体外培养的主要试剂 PBS 溶液: GIBCO 公司。PBS 冲胚液: 在 PBS 溶液中加入 15% 的胎牛血清, 再加入青霉素、链霉素各 500 IU/mL。TCM199 培养液: GIBCO 公司; 胎牛血清: 杭州四季青。

### 1.4 小鼠超数排卵处理方法

1.4.1 试验方案 A、B 两组均按表 1 方案进行超数排卵, 注射 HCG 后公母鼠按照 1:1 合笼。A、B 两组均于合笼后 76~91.5 h 采集胚胎, 观察超数排卵效果并记录胚胎发育情况。

表 1 小鼠超数排卵方案

激素	第 1d 16:00	第 3d 15:00	第 6d 19:00	第 7d 7:00
PMSG	10 IU	/	/	/
HCG	/	10 IU	冲胚	冲胚

1.4.2 试验分组和给药 A、B 两组小鼠均按表 1 方案腹腔注射给药, 注射 HCG 后公母鼠按 1:1 合笼。

### 1.5 冲胚

#### 1.5.1 子宫切碎法

1.5.1.1 取出子宫、输卵管和卵巢 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 将子宫连同输卵管和卵巢一并剪下, 放入加有少许 PBS 冲胚液的平皿中。

1.5.1.2 剥离子宫并切碎 在低倍体视显微镜下, 用手术刀片将子宫、输卵管和卵巢周围的脂肪组织尽量剥离干净, 切掉卵巢并从子宫角与输卵管相连处剪断子宫, 将带有少许输卵管的小鼠子宫置于加有少许 PBS 冲胚液的检胚皿中, 用手术刀片将其切碎。

表 2 小鼠超数排卵结果

组别	处理小鼠数(只)	采卵总数(枚)	平均采卵数(枚/只)	获胚胎总数(枚)	平均获胚数(枚/只)	可用胚总数(枚)	平均可用胚数(枚/只)	未受精卵总数(枚)	平均未受精卵数(枚/只)
A 组	140	1785	12.75±9.67 A	1500	10.71±7.53 A	1298	9.27±5.56 a	285	2.04±2.39
B 组	131	2830	21.60±10.25 B	2415	18.43±8.75 B	1494	11.40±5.37 b	415	3.12±2.77

注: 同列不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

2.2 小鼠胚胎发育观察 从表 3 可以看出, 在公母鼠合笼后 76~79.5 h 冲胚, 所获胚胎大多处于桑椹胚期; 而在公母鼠合笼后 88~91.5 h 冲胚, 所获胚胎大多处于致密桑椹胚期与囊胚期, 因此, 在公母鼠合笼后 76~91.5 h 冲胚时, 若胚胎仍处于 1~16 细胞期阶段, 应为发育延迟的胚胎, 不能作为可用胚胎进行移植或进行下一步操作。

1.5.1.3 检胚 将上述得到的装有子宫碎片的检胚皿(静置 5~10 min)置于体视显微镜下观察, 用移胚管将观察到的胚胎吸出放入集卵皿中, 并详细记录不同发育时期的胚胎数量。

#### 1.5.2 子宫冲胚法

1.5.2.1 取出子宫、输卵管和卵巢 方法同 1.5.1.1。

1.5.2.2 剥离子宫并冲胚 在低倍体视显微镜下, 用手术刀片将子宫、输卵管和卵巢周围的脂肪组织尽量剥离干净, 切掉卵巢, 但宫管连接部要保持完整, 并在靠近子宫颈的位置剪断子宫, 将子宫放入检胚皿中, 用 1 mL 注射器(带有 12 号针头)吸取 PBS 冲胚液 0.2 mL, 针头插入子宫, 并用镊子夹紧, 缓慢推注射器, 观察子宫的充盈状态, 同时防止有冲胚液从子宫后端流出。子宫充盈后用手术刀片在子宫和输卵管连接处纵向切开, 缓慢地将冲胚液推出, 冲入检胚皿中。

1.5.2.3 检胚 冲胚后将检胚皿(静置 5~10 min)置于体视显微镜下观察, 用移胚管将观察到的胚胎收集到集卵皿中, 并详细记录不同发育时期的胚胎数量。

1.6 小鼠胚胎鉴定与发育观察 小鼠胚胎鉴定采用形态学鉴定法<sup>[5]</sup>。对采用子宫冲胚法所获得的胚胎进行了胚胎发育观察, 记录胚胎所处时期与形态。

1.7 小鼠早期胚胎体外培养的方法 将 70 枚桑椹胚置于 TCM199+15% 胎牛血清培养液中进行开放式培养。每 2 mL 培养液放入胚胎 10~20 枚。把培养皿放在二氧化碳培养箱内(5% CO<sub>2</sub> 和 95% 空气的气相环境, 38.5℃ 恒温)培养 12 h 观察并记录各个时期胚胎的发育状况。

1.8 数据处理 详细记录 A、B 两组小鼠采集的胚胎数量及形态, 并对各试验组结果采用  $\chi^2$  检验进行统计分析。

## 2 结果与分析

2.1 不同冲胚方法对小鼠超数排卵的效果 由表 2 可知, 采用两种不同冲胚方法对超排处理小鼠冲胚后, B 组的平均采卵数与平均获胚数极显著 ( $P < 0.01$ ) 高于 A 组, 而平均可用胚数则显著 ( $P < 0.05$ ) 高于 A 组, A、B 两组间的平均未受精卵数则差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 说明 B 组的冲胚方法明显优于 A 组。

发育各个时期的小鼠胚胎见图 1 与图 2。

2.3 小鼠胚胎体外培养效果 从表 4 可以看出, 70 枚桑椹胚培养 12 h 后, 35 枚发育至囊胚, 25 枚发育至致密桑椹胚, 发育率达到 85.71%。说明使用 TCM199+15% 胎牛血清培养液对小鼠胚胎进行体外培养是完全可行的。

表 3 小鼠胚胎发育观察结果

采胚时间	处理小鼠数 (只)	获胚胎总数 (枚)	退化胚胎数 (枚)	1~16细胞期胚胎数 (枚)	桑椹胚数 (枚)	致密桑椹胚数 (枚)	囊胚数 (枚)
合笼后 76~79.5 h	60	1030	297	197	500	21	15
合笼后 88~91.5 h	71	1385	344	83	96	420	442
合计	131	2415	641	280	596	441	457



图 1 小鼠 1 细胞期胚胎至桑椹胚



图 2 小鼠囊胚

表 4 小鼠胚胎体外培养结果

培养前胚胎 所处时期	培养的胚胎 个数(枚)	培养 12 h 胚胎所处 时期及个数	发育率 (%)
桑椹胚	30	35 枚囊胚, 25 枚致密 桑椹胚, 10 枚桑椹胚	85.71

### 3 讨论

超数排卵反应是一个由一系列极其复杂的生理过程累积而产生的结果,影响因素较多,包括动物遗传特性、体况、营养状态、年龄、发情周期阶段、卵巢功能状态、季节、温度以及激素剂量等。而胚胎生物技术研究需要通过超数排卵处理提供足够数量的卵母细胞和胚胎,所以有关超数排卵的研究对动物胚胎生物技术研究地开展具有重要意义<sup>[6~8]</sup>。

关于小鼠的超数排卵,国内多采用 PMSG 与 HCG 各 5 IU 或各 10 IU 剂量,国外多采用 PMSG 与 HCG 各 5 IU 或各 7.5 IU 剂量的方法。李聚学等<sup>[9]</sup>通过 3 种不同激素剂量组合对小鼠进行超排处理的研究结果表明:激素剂量以 10 IU 为最佳。动物超数排卵常用的促性腺激素是孕马血清促性腺激素(PMSG),因为 PMSG 的半衰期较长只需注射一次,虽然超数排卵效果不太稳定但方法简便,由于以上原因本试验采用 10 IU PMSG 的剂量进行腹腔注射。杨春荣等<sup>[10]</sup>采用 PMSG 对小鼠超排的最佳结果是平均获胚 32.00 枚。戴丽军等<sup>[11]</sup>的研究表明:10 IU PMSG 可对小鼠产生稳定的超排效果,平均获卵 5.60~9.80 枚,最高组平均获卵 13.00 枚。从平均获胚数量上来看,本试验结果:子宫冲胚法平均获卵 21.60 枚,平

均获胚 18.43 枚,稍低于杨春荣等的试验结果,但明显高于戴丽军等的结果。

超数排卵效果是否理想,与冲胚方法等有很大关系。小鼠作为一类常用实验动物,现有资料中对小鼠的冲胚方法很少有详细的叙述,本研究分别采用两种不同冲胚方法对超排处理小鼠进行冲胚,从试验结果可以看出:冲胚方法对超数排卵的结果影响显著。子宫切碎法由于切碎子宫时产生大量组织碎片不易清除,增加了检胚、移胚的困难,而造成胚胎的丢失;而采用子宫冲胚法进行检胚、移胚简单易行,可行性很好,可为小型实验动物冲胚方法的改进提供参考依据。

### 4 结论

子宫冲胚法可以获得更多的可用胚胎,明显优于子宫切碎法。

在公母鼠合笼后 76~79.5 h 胚胎多数处于桑椹胚阶段,公母鼠合笼后 88~91.5 h 胚胎多数处于致密桑椹胚和囊胚期。若胚胎仍处于 1~16 细胞期,为发育延迟胚胎,不可用于小鼠胚胎移植或进行下一步操作。

采用 TCM199+15%胎牛血清培养液对小鼠胚胎进行体外培养,取得了较好的效果。

### 参考文献:

- [1] 廉颖,李劲松,朱子玉,等.影响兔超数排卵因素的研究[J].中国畜牧兽医科技,2001,31(4):14~16
- [2] 章志国,章孝荣.动物超数排卵的影响因素及发展现状[J].安徽农业科学,2003,31(1):41~43
- [3] 王炜,李跃民,孙新民.超排方法及兔龄对家兔超排效果的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2003(3):51~52
- [4] 高建明,侯文元,焦占海.小鼠超数排卵效果分析[J].北京农学院学报,2000,15(1):25~28
- [5] 张忠诚.家畜繁殖学(第四版)[M].北京:中国农业出版社,2005:219~220
- [6] 李青旺.动物细胞工程与实践[M].北京:化学工业出版社,2005:126~132
- [7] 李厚达.实验动物学[M].北京:中国农业出版社,2002:100~115
- [8] 孙玉成,张建芳,孟令君,等.影响小鼠超数排卵效果的因素[J].北京农学院学报,2005,20(4):17~19
- [9] 李聚学,魏雁,魏庆信,等.影响小鼠超数排卵的若干因素[J].湖北农业科学,2004(4):120~122
- [10] 杨春荣,马雷飞,李吉霞,等.PMSG 不同剂量对小鼠超排效果的影响[J].畜牧兽医杂志,2001,6(1):18~19
- [11] 戴丽军,叶炳飞,黄月玲.小鼠超排的比较试验[J].上海实验动物科学,2003,23(2):108~109