研究鼠胚实验在评价新建IVF-ET实验室中的意义

王燕，钱耀先，韦斌，韦玲珊，甘永安

兴义市人民医院，贵州 兴义 562400

【摘要】目的：通过鼠胚实验，判断新建IVF-ET实验室及相关培养体系是否满足人类胚胎体外培养的要求，为我院开展IVF-ET技术奠定基础。**方法：**选择6-10周龄的昆明系小鼠，对小鼠进行超排卵，然后鼠卵采集及鼠精采集，收集获能后的精子进行体外受精及体内受精。统计受精率、卵裂率、囊胚率。**结果：**体内受精18个周期，取卵355枚，受精率81%，卵裂率96.0%，囊胚率90%；体外受精44周期，取卵1118枚，受精率62%，卵裂率95.0%，囊胚率86%。**结论：**通过鼠胚实验结果，新建IVF-ET实验室及相关培养体系符合人类辅助生殖实验室的标准要求，为后期实验室开展人类胚胎培养技术奠定强有力的基础。

【关键词】鼠胚实验；体内受精；体外受精；囊胚率

【基金项目】黔西南州社会发展攻关基金资助项目（2019-1-41）

To Study the Significance of Mouse Embryo Test in the Evaluation of New IVF-ET Laboratory

WANG Yan, QIAN Yao-xian, WEI Bin, WEI Ling-san, GAN Yong-an
Xingyi People's Hospital, Xingyi Guizhou 562400, China

【Abstract】Objective: To determine whether the new IVF-ET laboratory and related culture system can meet the requirements of h uman embryo culture in vitro through mouse embryo experiment, and to lay the foundation for IVF-ET technology in our hospital. **Methods:** Kunming mice aged 6 to 10 weeks were selected for superovulation, and the sperm and eggs were collected. The sperm were collected for in vitro fertilization and in vivo fertilization. The fertilization rate, cleavage rate and blastocyst rate were counted. **Results:** After 18 cycles of in vivo fertilization, 355 eggs were collected. The fertilization rate was 81%, cleavage rate was 96.0%, and blastocyst rate was 90%. In 44 cycles of in vitro fertilization, 1118 eggs were collected. The fertilization rate was 62%, the cleavage rate was 95.0%, and the blastocyst rate was 86%. **Conclusion:** According to the mouse embryo experiment results, the new IVF-ET laboratory and related culture system in our hospital meet the standard requirements of human assisted reproduction laboratory, which lays a strong foundation for the development of human embryo culture technology in later laboratory.

【Key words】rat embryo experiment; internal fertilization; In vitro fertilization; blastocyst rate

体外受精－胚胎移植(IVF-ET)及其卵泡浆内单精子注射(ICSI)技术是目前治疗不孕不育的一项重要人类辅助生殖技术(ART)[1]。而胚胎实验室是人类ART实施的重要支撑点，是保证ART成功的重要核心条件，所以高效稳定的胚胎培养环境对于胚胎培养的生长发育及体外受精的成功率都有着很大影响。实验室在开展人类体外受精－胚胎移植辅助生殖技术之前，必须检测新建实验室及其培养体系是否适合胚胎的培养，而小鼠胚胎实验(简称鼠胚实验)能够有效地检测整个培养体系，且有较好的敏感性，因为单从基因方面看，人类和小鼠各有3万多个基因，其中约80%的人类基因与小鼠基因完全相同，99%的人类基因与小鼠基因非常相似[2]，因此，研究鼠胚实验在评价新建IVF-ET实验室中的意义重大，同时，依据人类体外辅助生殖技术医疗器械－鼠胚实验行业标准，鼠胚实验囊胚率≥80%[3]，预示着鼠胚实验成功，说明新建IVF实验室及其相关培养体系达到要求，这为后期实验室开展人类胚胎培养技术奠定强有力的基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

6-8周龄的健康昆明系小白鼠，均购斯贝福(北京)生物技术有限公司；小鼠饲料均购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司；购回后在本生殖中心饲养适应环境2-3周后方用于实验；饲养环境：温度23-25℃、光照、黑暗各12h、湿度30%-60%；自由摄食，雄鼠单笼饲养，雌鼠集中饲养。

1.2 主要药品、试剂及设备

1.2.1 主要药品、试剂　孕马血清促性腺激素(PMSG)和绒毛膜促性腺激素(HCG)购自南京易之核科技发展有限公司；胚胎处理液G—MOPS、洗精受精液G—IVF、卵裂胚培养液G1、囊胚培养液G2均为瑞典Vitrolife公司产品。

1.2.2 主要设备　丹麦K-S艺术特色IVF(L1)恒温百级工作站；德国Labotect高级二氧化碳培养箱(C200)；体视显微镜(日本Nikon，SNIZI270)；倒置

显微镜(日本NIKON，TiU)，相差生物显微镜(日本Nikon，E200)。

1.3 方法

1.3.1 小鼠超排卵和鼠卵的采集　于下午17时对每只雌鼠腹腔内注射PMSG 10IU，48h后腹腔内注射HCG10IU，次日上午8: 00采用颈椎脱白法处死雌鼠。无菌工作台内取出小鼠卵巢及输卵管，于卵子－胚胎缓冲液(G−MOPS plus)中洗涤2遍，体视显微镜下用1ml注射器轻轻划破膨大的输卵管壶腹部，让卵子团自动逸出，收集卵子团于受精皿中，放置于37℃，6%的CO2培养箱中孵育。

1.3.2 鼠精的采集和处理　采用颈椎脱白法处死雄鼠，无菌工作台内取出小鼠附睾及部分输精管，于卵子－胚胎缓冲液(G−MOPS plus)中洗涤2遍，体视显微镜下用1ml注射器从附睾尾部向前轻轻挤出输精管中的精子(若精子数量不足，可用注射器刺破附睾获取精子)，用巴氏吸管快速吸出精子悬液，将精子悬液缓慢加入装有受精处理液的离心管底部，置于37℃，6%CO2培养箱中获能30 min。

1.3.3 体外受精　收集获能后的上层精子，相差显微镜下观察精子活力及浓度，使用精子计数板对精子计数。从培养箱中取出含有卵子的受精皿(1mLG−IVFPLUS，加油覆盖)，将精子悬液加入到放有卵子团的受精液滴中并调整精子浓度约为(1～2)×106mL，并放置于培养箱中，4～6h后观察受精情况。然后将受精卵从G−IVFplus中转移到G1−plus微滴中培养。

1.3.4 体内受精　于下午17时将注射HCG后的雌鼠与雄鼠(1: 1)合笼，次日早晨观察雌鼠阴道栓形成情况。将形成阴道栓的雌鼠颈椎脱臼处死，无菌工作台内取出小鼠卵巢及输卵管，在体视显微镜下取出合子团(方法同鼠卵采集)。将合子团在G−MOPSPLUS中洗涤2遍，后再透明质酸酶作用30s脱掉颗粒细胞，分别在G−MOPSPLUS和G1−PLUS微滴中洗涤后转移到新的G1−PLUS微滴中，放置于培养箱中培养。

1.3.5 原核胚的发育观察　在体外受精中，精卵孵育4～6小时后观察2PN的形成情况，统计受精率；对于体内受精，将收集的合子团置于透明质酸酶液滴(10倍稀释后)中，轻轻吹打10～20s以脱去卵丘颗粒细胞，观察原核胚的形成情况，统计受精率。

1.3.6 卵裂期胚胎和囊胚的培养　将收集的原核胚洗涤后转入卵裂胚胎培养液滴中，培养液滴体积为50ul，放入5～10(胚胎过多会导致胚胎营养不足)枚胚胎；第3天将胚胎转入囊胚培养液滴中继续培养，相差显微镜下观察D1、D2、D3、D4、D5的胚胎，记录各期胚胎发育情况，统计卵裂率和囊胚率。

2 结果

2.1 体外受精实验结果

共进行了15个批次，44个周期，总获卵1118个，其中原核受精胚共688个，受精率62.0%，卵裂率95.0%，囊胚率86%，见表1。

表1　体外受精胚胎培养实验结果

批次	周期	获卵数	受精卵数	受精率	2细胞数	卵裂率	囊胚数	囊胚率
1	5	115	69	60%	68	99%	61	90%
2	3	62	34	55%	31	91%	27	87%
3	3	78	47	60%	47	100%	39	83%
4	3	79	58	73%	53	91%	45	85%
5	3	108	85	79%	78	92%	62	79%
6	3	69	28	41%	27	96%	25	93%
7	3	65	40	62%	40	100%	33	83%
8	3	92	47	51%	45	96%	45	100%
9	2	48	29	60%	25	86%	22	88%
10	3	72	44	61%	43	98%	32	74%
11	3	65	42	65%	37	88%	32	86%
12	3	74	45	61%	44	98%	36	82%
13	3	82	36	44%	35	97%	28	80%
14	2	61	45	74%	43	96%	37	86%
15	2	48	39	81%	38	97%	35	92%
合计	44	1118	688	62%	654	95%	559	86%

2.2 体内受精实验结果

共进行了7个批次，18个周期，总获卵355个，其中原核受精胚共280个，受精率81.0%，卵裂率96.0%，囊胚率90.0%，见表2。

表2　体内受精胚胎培养实验结果

批次	周期	获卵数	受精卵数	受精率	2细胞数	卵裂率	囊胚数	囊胚率
1	3	65	53	82%	53	100%	45	85%
2	3	62	47	76%	47	100%	43	91%
3	3	78	52	67%	50	96%	44	88%
4	2	45	40	89%	38	95%	33	87%
5	2	30	28	93%	25	89%	22	88%
6	2	33	27	82%	25	93%	23	92%
7	3	42	33	79%	33	100%	32	97%
合计	18	355	280	81%	271	96%	242	90%

3讨论

体外受精－胚胎移植(IVF−ET)及其卵泡浆内单精子注射(ICSI)技术是目前治疗不孕不育的一项重要人类辅助生殖技术(ART)[4-5]。体外受精实验室是这一技术能够有效开展的极为重要的部分，高效稳定的实验室环境及其相关培养体系对于胚胎的生长发育及IVF的成功率都起着至关重要的作用[6]，鼠胚实验(mouseembryoassay，MEA)是目前最常用于IVF实验室、耗材、培养基和设备等质量控制的生物学方法，适用于新建或新启动周期的IVF实验室的质量控制[2]。

本实验研究显示，体外受精进行15个批次，44个周期的体外受精实验，总获卵1118个，其中原核受精胚共688个，受精率62.0%，卵裂率95.0%，囊胚率86.0%，见表1。体内受精进行7个批次，18个周期，总获卵355个，其中原核受精胚共280个，受精率81.0%，卵裂率96.0%，囊胚率90.0%，见表2。通过以上体内受精及体外受精结果显示，体外及体内受精最终囊胚率都大于80%，达到国家人类体外辅助生殖技术医疗器械－鼠胚实验行业标准[3]。在本实验中，鼠胚体外受精培养受精率较低，是因为小鼠促排过程并未像人一样实时监测激素，取卵时机很难把握，存在退化、坏死、未成熟卵子较多，所以受精率相对较低。而鼠胚体内培养受精率相对体外培养受精率高，是由于促排过程部分退化、未成熟卵在体内受精过程已经在小鼠体内吸收掉或未能全部收集，所以受精率相对较高，因此，最终也是体内受精培养受精率、卵裂率、囊胚率均高于体外受精培养的一个原因。

总之，通过鼠胚实验结果，证明新建IVF实验室及其相关培养体系达到要求，这在评价新建IVF−ET实验室中产生巨大的作用，造福于当地不孕不育妇女同胞的同时，也给本院带来一定的社会及经济价值。

参考文献

[1] 黄国宁 , 孙海翔主编 . 体外受精一胚胎移植实验室技术 [M]. 北京 : 人民卫生出版社 , 2012: 15−37.

[2] 刘平 , 乔杰 . 生殖医学实验室技术鼠胚实验 [M]. 北京 : 北京大学医学出版社 , 2013.

[3] 中国食品药品检定研究院 . YY/T 1434−2016 人类体外辅助生殖技术医疗器械 − 鼠胚实验行业标准 [S]. 国家食品药品监督管理总局 .

[4] MorbeckDE. Importanceofsupplyintegrityforinvitroferti−lizationandembryoculture[J]. SeminReprodMed, 2012, 30(3): 182−190.

[5] 黄国宁 . 辅助生殖实验室技术 [M]. 北京 : 人民卫生出版社 , 2016.

[6] 柳岚 , 吴兵平 , 李志敏 , 等 . 新建辅助生殖实验室的鼠胚培养质控及鼠卵显微注射分析 [J]. 生殖医学杂 , 2020, 29(1): 98−102.

收稿日期：2021年2月12日

出刊日期：2021年3月10日

引用本文：王燕, 钱耀先, 韦斌, 等. 研究鼠胚实验在评价新建IVF−ET实验室中的意义[J]. 当代介入医学, 2021, 1(05): 5−7. DOI: 10.12208/j.jcim.2021.05.003

Copyright: © 2021 by author(s) and Open Access Journal Research Center.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).http: //creativecommons.org/licenses/by/4.0/

OPEN ACCESS