

• 基础实验研究论著 •

探讨鼠胚实验中两种精子处理方法对实验结果影响

冼英杰, 周秀琴, 颜秋霞, 陈彩蓉

(暨南大学第五附属医院/清远市人民医院生殖中心, 广东清远 511518)

摘要:目的 通过观察和比较两种精子的处理方法对昆明小鼠鼠胚实验结果的影响, 探讨并建立适合鼠胚实验的精子处理方法。**方法** 手术获取昆明小鼠卵子与精子进行常规体外受精, 实验精子处理分别采用常规处理法或单密度梯度离心法。常规体外受精后培养至第 5 天, 观察其受精率、卵裂率、囊胚形成率。**结果** 采用单密度梯度离心法处理后的受精率、卵裂率及囊胚形成率, 分别为 96.2%、97.7%、86.8%, 常规处理法为 55.1%、84.5%、56.8%, 两种方法比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 昆明小鼠鼠胚实验采用单密度梯度离心法处理后行常规体外受精, 能明显提高受精率、卵裂率及囊胚形成率。

关键词: 昆明小鼠; 常规体外受精; 单密度梯度离心法; 常规处理法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)07-0803-02

Exploration on the effect of experimental results in mouse embryos cultured by two sperm treatment methods

Xian Yingjie, Zhou Xiuqin, Yan Qiuxia, Chen Cairong

(Reproductive Medicine Center, the Fifth Affiliated Hospital of Jinan University/
Qingyuan People's Hospital, Qingyuan, Guangdong 511518, China)

Abstract: **Objective** To develop an improved in vitro fertilization by comparing the effect of two treatment methods for spermatozoa of Kunming mice. **Methods** Surgeries were performed for gametes of Kunming mice, which were cultured in vitro fertilization to the 5th day. The experiments applied routine method or single density gradient centrifugation for handling spermatozoa. Then the fertilization rate, cleavage rate and blastocyst formation rate of oocytes were observed. **Results** The fertility rate (96.2% vs. 55.1%), the cleavage rate (97.7% vs. 84.5%) and the blastocyst formation rate (86.8% vs. 56.8%) of single density gradient centrifugation were significantly higher than that of routine method ($P < 0.05$). **Conclusion** It is indicated that the single density gradient centrifugation is more appropriate for in vitro fertilization of Kunming mice, and obviously raise the fertility rate, the cleavage rate and the blastocyst formation rate.

Key words: Kunming mice; in vitro fertilization; single density gradient centrifugation; routine method

小鼠精子采集, 是生殖工程和受精机制研究方面最基本的重要技术, 其优劣直接影响到受精率或其他与精子相关的研究。例如质量控制实验——鼠胚实验(mouse embryo assay, MEA)是目前最常用于生殖中心实验室培养液、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的常规体外受精(IVF)实验室质量控制^[1]。国内有报道, 采用常规处理法进行鼠胚实验, 其受精率、卵裂率及囊胚形成率比国外其他中心报道的要低^[2]。因此, 本研究分别采用常规处理法^[3-9]和单密度梯度离心法^[3-9]进行处理, 并通过观察和比较两种方法对实验结果的影响, 探讨建立适合鼠胚实验的精子处理方法。

1 材料与与方法

1.1 实验材料 实验动物 SPF 级昆明小白鼠购自广东省医学实验动物中心[合格证号: SCXK(粤)2008-0002]。雌鼠 6~8 周, 体质量 25~30 g; 雄鼠 6~8 周, 体质量 30~40 g。小鼠促排卵药物注射用尿促性素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)购于宁波第二激素厂。主要培养液采用瑞典 Vitrolife G5 Series 序贯培养液: 卵-胚胎处理液、受精-培养液、卵裂胚培养液、囊胚培养液、超纯培养油等。除取卵-胚胎处理液使用前 1 d 置 37℃ 培养箱孵育外, 其他培养液均于使用前 1 d 配制好置 37℃、6%CO₂ 培养箱平衡过夜。主要耗材及设备: 培养皿、

试管、移液管等均为美国 Falcon 公司产品, CO₂ 气体纯度为 99.999%, 德国 Labotect C200 二氧化碳培养箱, 美国 Thermo 3111 二氧化碳培养箱。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠超排卵^[10]和鼠卵采集 晚上 20:00 点每只雌鼠腹腔内注射 PMSG 10 IU, 48 h 后腹腔内再注射 HCG 10 IU, 第 2 天早上 9:00 点(注射 HCG 后 13 h)以颈椎脱臼法处死雌鼠, 无菌条件下取出输卵管, 放入盛有卵-胚胎处理液的培养皿中, 用眼科镊刺破输卵管膨大部, 将卵丘团收集到 250 μL 受精-培养液内, 每滴一团卵子, 置 37℃、6%CO₂ 培养箱孵育。

1.2.2 精子处理

1.2.2.1 常规处理法 以颈椎脱臼法处死雄鼠, 取附睾尾和输精管放入 1 mL 受精-培养液中, 用注射器把附睾尾划开几个小口, 用钟表镊挤出精子, 置 37℃、6%CO₂ 培养箱孵育 60 min。

1.2.2.2 单密度梯度离心法 加入 1 mL 80%密度梯度离心液在锥形离心管的底部, 在其液面上小心加入 1 mL 的精子标本, 150×g 离心 20 min; 去上清, 加入 1 mL 受精-培养液, 混匀, 300×g 离心 8 min; 去上清, 加入适量受精-培养液混匀, 调整浓度至约 40×10⁶/mL, 置 37℃、6%CO₂ 培养箱孵育

45 min。

1.2.3 体外受精 在显微镜下观察其活力及浓度,吸取精子悬液到含有卵子的培养液滴中,使终浓度为 $(1\sim 2.5)\times 10^6/\text{mL}^{[1]}$,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $6\%\text{CO}_2$ 培养箱中孵育,6 h后将卵子“捞起”。在卵裂胚培养液中吹洗3次,转至新的已平衡好的卵裂胚培养液内,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $6\%\text{CO}_2$ 培养箱继续培养。

1.2.4 原核及卵裂期胚胎的观察与培养 D0:卵子受精6 h后“捞起”并剥除颗粒细胞,观察是否有原核或双极体,并将其转入已平衡好的卵裂胚培养液中继续培养;D1:2细胞期鼠胚观察;D2:4细胞期鼠胚观察;D3:桑葚期鼠胚观察,并转入已平衡好的囊胚培养液中继续培养;D4~5:囊胚期鼠胚的观察。

1.3 统计学处理 采用SPSS13.0软件进行统计学分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法处理后的受精率比较 采用单密度梯度离心法处理的精子与小鼠卵母细胞IVF后获得的受精率为96.2%,常规处理法为55.1%,二者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 两种方法处理后的卵裂率比较 采用单密度梯度离心法处理的精子与小鼠卵母细胞IVF后获得的卵裂率为97.7%,常规处理法为84.5%,二者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3 两种方法处理后的囊胚形成率比较 采用单密度梯度离心法处理的精子与小鼠卵母细胞IVF后获得胚胎继续进行培养的囊胚形成率为86.8%,常规处理法为56.8%,二者比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨 论

在小鼠IVF的影响因素中,精子的浓度、活力对实验结果影响很大^[11]。本研究采用两种精子处理方法处理小鼠精子,行IVF时的精子终浓度均在 $(1\sim 2.5)\times 10^6/\text{mL}^{[10]}$ 。但实验数据显示,采用单密度梯度离心法处理的受精率明显高于常规处理法,极有可能是因为单密度梯度处理后的精子存活率高,活力好,同时去除了大部分的细胞碎片和死亡精子等杂质,精子质量大为提高。本实验结果和Bath^[12]的观点一致,即去除不动精子、附睾精子碎片和聚集成团的精子,能提高小鼠体外受精率。

本研究中两种方法处理后的精子与鼠卵共孵育时间均采用6 h^[10,13],且因胚胎在不同发育时期对营养物质的需求和代谢不同^[14],所以胚胎培养均采用序贯培养法进行。但实验数据显示,采用单密度梯度离心法处理精子的卵裂率、囊胚形成率明显高于常规处理法。原因可能是采用常规处理法处理的精子含有大量的死精子、细胞碎片及杂质,常规IVF过程中长时间精卵共孵育会产生大量的活性氧,使卵细胞处于一个不良的培养环境中,所形成的受精卵发育潜能差,导致卵裂率和囊胚形成率明显低于单密度梯度离心法。本研究数据提示,采用

单密度梯度离心法处理后的精子活力高、杂质少,形成的胚胎具有较好的发育潜能,卵裂率和囊胚形成率显著提高。

综上所述,昆明小鼠鼠胚实验采用单密度梯度离心法处理后行常规体外受精,受精率、卵裂率及囊胚形成率比采用常规处理法高,其中囊胚形成率达到国内相关标准^[15-17]。因此该精子处理方法适用于鼠胚实验中。

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] 王巍,邱卓琳,马海兰,等.小鼠体外受精胚胎培养在新建IVF实验室质量控制中的作用[J].2011,24(6):649-652.
- [3] 马征兵,李智勇.密度梯度离心法收集逆行射精患者尿液中精子用于人工授精[J].中国性科学,2011,20(6):25-27.
- [4] 汤慧.治疗不孕症精子体外处理上清法和Percoll梯度离心法比较[J].淮海医药,2009,27(4):324.
- [5] 朱为筑,邓小林.Percoll密度梯度离心法对精子分选效果观察[J].贵阳医学院学报,1999,24(2):175-176.
- [6] 陈元明,黄美玉.分离X精子的Percoll密度梯度离心法[J].国外畜牧学:草食家畜,1990(2):19-24.
- [7] 张建湘,杜延龄.Percoll梯度离心法分离牛X精子及配种试验[J].湖南医科大学学报,1995,20(1):28-30.
- [8] 肖清明.上清法及PureSperm密度梯度离心法优选精子的效果比较[J].山东医药,2007,47(24):48-49.
- [9] 黄娟华,刘炜培,张四友,等.PureceptionTM密度梯度离心法优选精子在IVF、ICSI中的应用[J].中国现代医学杂志,2005,15(20):3183-3185.
- [10] 李培旭,李尚为,彭芝兰,等.超排卵对小鼠卵母细胞和胚胎发育潜能的影响[J].四川大学学报,2007,38(4):725-727.
- [11] 华月琴,陈瑞华,吴志南,等.精子孵育时间及培养液成分对小鼠体外受精和胚胎发育的影响[J].苏州大学学报,2009,29(4):647-649.
- [12] Bath ML. Simple and efficient in vitro fertilization with cryopreserved C57BL/6J mouse sperm[J]. Biol Reprod,2003,68(1):19-23.
- [13] 孙新明,魏泓,赵永聚,等.昆明小鼠成熟卵母细胞体外受精及受精卵体外培养的研究[J].中国比较医学杂志,2005,15(3):129-132.
- [14] 贾青,高娟,杨博,等.小鼠体外受精及其胚胎体外培养的比较研究[J].实验动物与比较医学,2008,28(5):304-307.
- [15] 中华医学会.临床诊疗指南-辅助生殖技术与精子库分册[M].北京:人民卫生出版社,2009:143-144.
- [16] 庄广伦.现代辅助生育技术[M].北京:人民卫生出版社,2005:215.
- [17] 赵杰,陈秀娟,范文斌.鼠胚在人类辅助生殖培养环境质量控制的作用研究[J].内蒙古医学院学报,2009,31(1):49-51.

(收稿日期:2013-11-01)