

鼠胚实验在新建胚胎培养实验室 质量控制中的作用

李小平,郝朝亮,高庭,付晨星

(南华大学附属第一医院生殖医学中心,湖南 衡阳 421001)

摘要: **目的** 采用鼠胚实验(mouse embryo assay, MEA)检测新建的胚胎培养实验室的培养体系是否符合人类胚胎体外培养的要求。**方法** 采用配子体外授精法和收集 2 细胞胚胎培养法进行实验。在胚胎体外培养的过程中定时对胚胎的发育状况进行观察并拍照记录。**结果** 配子体外受精法的囊胚形成率为 $90.84\% \pm 7.09\%$ 。收集 2 细胞胚胎培养法的囊胚形成率为 $91.17\% \pm 6.97\%$ 。两种方法的囊胚形成率之间差异无显著性。**结论** 配子体外授精法和收集 2 细胞胚胎培养法均可作为新建胚胎培养实验室的质量控制方法。

关键词: 鼠胚实验; 体外受精; 质量控制

中图分类号: R321 **文献标识码:** A

The Role of Mouse Embryo Assay in the Quality Control of the Newly Established Embryonic Laboratory

LI Xiaoping, HAO Chaoliang, GAO Ting, et al

(Center for Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital, University of South China,
Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To detect whether embryo culture system of the newly established embryonic laboratory is reliable for the human embryo culture by using mouse embryo assay. **Methods** The mouse's gamete IVF and 2cell embryo collection was employed in the study. The embryo development status was observed and picture record was taken at regular time. **Results** In in-vitro fertilization (IVF) study, the blastocyst formation rate was $90.84\% \pm 7.09\%$. The blastocyst formation rate was $91.17\% \pm 6.97\%$ in 2 cells embryos collection study. The blastocyst formation rate of the two methods was not statistically different. **Conclusion** The study results show that the in-vitro fertilization (IVF) method of mouse's gamete and the 2 cells embryos collection method can be used in newly established embryonic laboratory quality control.

Key words: mouse embryo assay; in vitro fertilization; quality control

对于新建的胚胎培养实验室,胚胎培养实验室的环境温度和湿度,仪器设备的温度和性能,试剂耗材的质量等是否能达到配子及胚胎体外操作和生长发育的要求至关重要。因此在进行人类胚胎的体外操作和培养之前,要检测胚胎培养实验室的整个培养体系能否胜任体外胚胎培养的重任,就必须对实验室的整个培养体系进行质量控制。

鼠胚实验(mouse embryo assay, MEA)是对胚胎实验室的培养体系进行质量控制的方法之一。已有的研究报道鼠胚实验的可靠性受到较多因素的影响,对于是否采用鼠胚实验作为胚胎实验室质量控制方法的观点并不一致^[1-2]。因此对新建的胚胎培养实验室采用鼠胚实验进行质量控制的有效性值得探讨。

本生殖中心胚胎培养实验室在装修完成及所有的仪器设备安装调试好后,并经湖南省疾病预防控制中心对实验室的环境检测合格后,本文作者在胚胎培养实验室内进行了鼠胚实验。现将实验结果报道如下。

收稿日期:2012-09-11

基金项目:湖南省卫生厅资助项目(B2011-046)。

作者简介:李小平,医学遗传学博士,助理研究员,研究方向:生殖与遗传, E-mail: xiaopingli18@163.com.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 昆明小白鼠 64 只, 雌性 40 只, 雄性 24 只, 由南华大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要药品和试剂 孕马血清促性腺激素 (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG) 购自杭州动物药品厂, 批号: 010521; 人绒毛膜促性腺激素 (Human Chorionic Gonadotropin, HCG) 购于丽珠制药厂, 批号 110106; 人类输卵管液 (Human Tube Fluid, HTF)、HEPES 缓冲液、卵裂液、囊胚液、血清蛋白替代品 (Serum protein substitutes, SPS) 均购于 Coopersurpical 公司。

1.1.3 实验耗材 巴斯德管 (ORIGIO), 5 mL 圆底小试管 (BD), 10 mL 圆底小试管 (BD), 1 mL 注射器 (BD), 35 mm 培养皿 (BD)。

1.2 实验方法

1.2.1 配子体外授精法 实验动物的选择与处理: (1) 体外授精 (in-vitro fertilization, IVF) 雌鼠的选择与处理: 选择 7 周龄以上且体重大于 20 g 的健康雌鼠, 每只雌鼠腹腔注射 10 IU PMSG, 48 h 后再注射 10 IU HCG, 于 13~16 h 后取卵子。取卵子复合体: 将处理后的小鼠采取颈椎脱臼法处死, 打开腹腔, 取出输卵管, 在体式显微镜下于输卵管壶腹部用 1 mL 注射器针头做一切口, 从切口的一端轻轻挤出卵子复合体。卵子复合体用 HTF 洗涤两遍后, 按每个受精皿放 15 个卵子放入受精皿等待受精。(2) 体外授精雄鼠的选择与处理: 选择 8 周龄以上且体重大于 25 g 的雄性特征明显的雄鼠。取小鼠精子: 将选择好的小鼠采用颈椎脱臼法处死, 打开小鼠腹腔, 取出附睾及输精管, 在体式显微镜下于 HTF 受精液中在附睾和输卵管上打孔使精子游出, 放于培养箱中放置 30 min。离心处理, 计数精子浓度, 放于培养箱中。体外受精与胚胎培养: 根据精子浓度, 每个受精皿加入精子的终浓度为 $(1.5 \sim 2) \times 10^5/\text{mL}$ 。受精 6 h 后用拉制好的巴斯德管祛除颗粒细胞, 把受精卵转入胚胎培养皿, 进行受精卵的观察后放入二氧化碳浓度为 6% 的培养箱继续培养。

1.2.2 收集 2 细胞胚胎培养法 实验动物的选择与处理: (1) 雄鼠的选择: 选择 8 周龄以上且体重大于 25 g 的雄性特征明显并曾进行过交配的雄鼠。(2) 雌鼠的选择与处理: 选择 7 周龄以上且体重大于 20 g 的健康雌鼠, 每只雌鼠于下午 5:30 腹腔注

射 10 IU PMSG, 48 h 后再注射 10 IU HCG, 注射 10 IU HCG 后与选择好的雄鼠合笼, 于第 2 天清晨检查雌鼠阴道口是否有阴栓, 发现阴栓为成功交配的雌鼠。(3) 2 细胞胚胎的收集与培养: 将成功交配的雌鼠, 于交配后 22 h 左右采用颈椎脱臼法处死, 按无菌操作的要求打开小鼠腹腔, 取出输卵管, 在体式显微镜下用注射器冲出 2 细胞胚胎, 或用注射器拆掉输卵管释放出 2 细胞胚胎, 用 HTF 洗涤两遍后, 将 2 细胞胚胎转入卵裂液进行培养。在胚胎体外培养的第 3 天将胚胎转入囊胚液继续进行培养。

1.3 统计方法

采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行均数分析, 并对两种方法的囊胚形成率进行卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 配子体外授精法囊胚结果

采用配子体外授精法共进行了 5 批次实验, 共获得 2 细胞胚胎 213 枚, 经体外培养发育成囊胚的胚胎共 190 枚, 平均囊胚率为 $90.84\% \pm 7.09\%$, 每批次的囊胚率大于 80% (表 1)。

表 1 配子体外授精法囊胚结果

实验批次	2 细胞胚胎数 (枚)	囊胚数 (枚)	囊胚率 (%)
1 批	45	41	91.11
2 批	21	20	95.24
3 批	32	32	100.00
4 批	80	68	85.00
5 批	35	29	82.86

2.2 2 细胞胚胎培养法实验囊胚结果

采用收集 2 细胞胚胎培养法进行了 7 批次实验, 共获得 2 细胞胚胎 326 枚, 经体外培养发育成囊胚的胚胎共 301 枚, 平均囊胚率为 $91.17\% \pm 6.97\%$, 每批次的囊胚率大于 80% (表 2)。

表 2 2 细胞胚胎培养法囊胚结果

实验批次	2 细胞胚胎数 (枚)	囊胚数 (枚)	囊胚率
1 批	15	14	93.33
2 批	43	37	86.05
3 批	60	53	88.33
4 批	60	53	88.33
5 批	34	34	100.00
6 批	65	64	98.46
7 批	49	46	93.88

2.3 两种方法的囊胚形成率的比较

配子体外授精法的囊胚形成率(90.84% ± 7.09%)与收集 2 细胞胚胎培养法的囊胚形成率(91.17% ± 6.97%)比较,差异无显著性($\chi^2 = 1.56$, $P = 0.21$, $P > 0.05$)。

3 讨 论

在胚胎培养实验室的质量控制中,鼠胚实验结果的可靠性至关重要,而已有的研究表明鼠胚实验的结果受到较多因素的影响。质量控制的结果受到鼠品系、鼠胚质量、胚胎实验室的物理环境(包括整个实验室的温度、湿度,培养箱的温度湿度和 CO₂ 浓度及操作台面温度等因素)、试剂、耗材、实验室工作人员的操作技能等因素的影响^[3-5]。对于新建的胚胎实验室,必须尽量减少可控因素变化的影响,以利于实验者查找导致囊胚率不达要求的原因。

本实验的结果显示采用两种方法的鼠胚囊胚率均大于 80%,研究报道囊胚形成率达到 80% 即可以做为胚胎实验室培养体系符合要求的标准,且本研究结果显示采用两种方法的质量控制结果没有差异,因此以上两种方法均可以用于胚胎实验室的质量控制。但笔者认为体外授精囊胚培养法更适宜用于新建实验室的质量控制。其原因在于:(1)已有的研究结果显示 1 细胞鼠胚胎比 2 细胞鼠胚胎对胚胎发育的影响因素更为敏感,更有利于检测出不利因素对胚胎发育的影响^[6-7]。(2)配子体外授精法是对体外授精的全过程进行的质量控制,更有利于发现体外培养体系中存在的问题。(3)行小鼠配子体外授精是对实验操作者技术能力的检验,并可以培训和提高实验室技术人员的技术能力。

尽管胚胎实验室质量控制的方法还有人精子存活实验等方法,其中精子存活实验用于检测试剂、耗材的内毒素比较适宜,但对于检测新建的胚胎培养室的培养体系而言具有局限性,将精子存活实验作为胚胎培养实验室正常运行后的试剂和耗材的常规质量控制方法是目前普遍的做法^[8]。对于新建的胚胎培养实验室的质量控制采用鼠胚实验中的体外授精法能更好的检测整个培养体系,这也是目前国内同行所公认的新建胚胎培养实验室的质量控制方法^[9-10]。此外,在进行鼠胚实验的同时对所用试剂、耗材进行精子存活实验更有利于整个培养体系

的检测。

总之,收集 2 细胞胚胎培养法和配子体外授精法均可以用于新建胚胎培养室的质量控制,但配子体外授精法更有利于对整个胚胎培养体系进行质量控制。因很多因素会影响到胚胎的质量和囊胚率,故只有尽可能控制那些影响胚胎生长发育的胚胎培养体系中的可控因素,胚胎培养实验室的整个培养体系才能为胚胎的生长发育提供相对适宜的条件,才可能培养出生长发育潜能好的胚胎。

参考文献:

- [1] Scott LF, Sundaram SG, Smith S. The relevance and use of mouse embryo bioassays for quality control in an assisted reproductive technology program[J]. Fertil Steril, 1993, 60(3):559-568.
- [2] Zarmakoupis-Zavos PN, Zavos PM. Factors that may influence the mouse embryo bioassay[J]. Tohoku J Exp Med, 1996, 179(3):141-149.
- [3] Cutting R, Pritchard J, Clarke H, et al. Establishing quality control in the new IVF laboratory[J]. Hum Fertil (Camb), 2004, 7(2):119-125.
- [4] Morbeck DE. Importance of supply integrity for in vitro fertilization and embryo culture[J]. Semin Reprod Med, 2012, 30(3):182-190.
- [5] 张宁,王喜良,李侠. 鼠胚生物学分析在 IVF 实验室质量控制中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(7):123-124.
- [6] Fleetham JA, Pattinson HA, Mortimer D. The mouse embryo culture system:improving the sensitivity for use as a quality control assay for human in vitro fertilization[J]. Fertil Steril, 1993, 59(1):192-196.
- [7] Hughes PM, Morbeck DE, Hudson SB, et al. Coddington CC: Peroxides in mineral oil used for in vitro fertilization: defining limits of standard quality control assays[J]. J Assist Reprod Genet 2010, 27(2-3):87-92.
- [8] Claassens OE, Wehr JB, Harrison KL. Optimizing sensitivity of the human sperm motility assay for embryo toxicity testing[J]. Hum Reprod, 2000, 15(7):1586-1591.
- [9] Gardner DK, Reed L, Linck D, et al. Quality control in human in vitro fertilization[J]. Semin Reprod Med, 2005, 23(4):319-324.
- [10] 刘东云,韩伟,黄国宁. 如何进行 IVF 实验室的质控[J]. 广东医学, 2010, 31(19):2481-2483.

(此文编辑:蒋湘莲)