

鼠胚实验在新建 IVF 实验室中的质控作用

徐薇,付景丽,石云,江飞,胡华[△]

(陆军军医大学第二附属医院妇产科,重庆 400037)

摘要:目的 探讨鼠胚实验对该院新建生殖实验室培养体系进行评估的可行性。方法 选择昆明系小鼠进行体内及体外受精胚胎进行培养,观察常规培养条件下不同受精方式来源的小鼠胚胎及不同培养环境下对小鼠体外受精胚胎的受精率、卵裂率、囊胚率。结果 体内周期数共 35 个,获得受精卵共 844 枚,受精率 95.8%,卵裂率 92.7%,囊胚率 96.2%;体外周期数 42,获得卵母细胞 1 119 枚,受精率 79.2%,卵裂率 94.8%,囊胚率 85.8%;体内受精的受精率和囊胚率与体外受精之间差异显著,且差异有统计学意义。体外受精胚胎在三气培养箱培养卵裂率为 79.3%,受精率为 95.4%,囊胚率为 88.4%;在二气培养箱中卵裂率为 82.7%,受精率为 95.1%、囊胚率为 84.4%;体外受精和体内受精培养在受精率、卵裂率、囊胚率差异不显著。结论 无论是体内受精还是体外受精培养的囊胚率均达到了质控标准,所以本实验室的培养环境适合进行人的体外受精操作;小鼠胚胎对二气或者三气培养箱的环境不具有敏感性,小鼠胚胎具有局限性,可重复性不高。

关键词:小鼠胚胎; 体内受精; 体外受精; 受精率; 囊胚率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.14.011

中图法分类号:R446.9

文章编号:1673-4130(2018)14-1701-04

文献标识码:A

The function of mouse embryo test on the quality control in the new-built IVF laboratory

XU Wei, FU Jingli, SHI Yun, JIANG Fei, HU Hua[△]

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of the culture system of the new laboratory in our hospital by mouse embryo test. **Methods** Kunming mouse were selected and used for in vivo and in vitro fertilized experiments, we have observed the mouse embryos under different culture methods and different cultural conditions in vitro fertilization rate, cleavage rate, and blastocyst rate. **Results** There were 35 cycles and 844 fertilized eggs were collected in vivo fertilization group, the fertilization rate was 95.8%, the cleavage rate was 92.7%, and the blastocyst rate was 96.2%. In vitro fertilization group, we studied 42 cycles, and obtained 1 119 oocytes, fertilization rate was 79.2%, the cleavage rate was 94.8%, and the blastocyst rate was 85.8%. The fertilization rate and blastocyst rate of in vivo fertilization group were significantly higher than those of in vitro fertilization group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The cleavage rate in the three gas culture incubator was 79.3%, the fertilization rate was 95.4%, the blastocyst rate was 88.4%, the cleavage rate was 82.7%, the fertilization rate was 95.1%, and the blastocyst rate was 84.4% in the two gas incubator. In vitro fertilization, the cultural conditions were not significantly different in the fertilization rate, cleavage rate, and blastocyst rate. **Conclusion** Whether in vivo fertilization or in vitro fertilization of blastocysts rate reached the standard of quality control, so the laboratory environment is fitting for human embryos in vitro fertilization.

Key words: mouse embryo; in vivo fertilization; in vitro fertilization; fertilization rate; blastocyst rate

体外受精(IVF)及其衍生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)。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^[1],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。鼠胚实验和精子存活实验是目前最常用于 IVF 实验室耗材、试剂、设备质量控制的生物学方法,适用于新建或者新启动周期的 IVF 实验室的质量

作者简介:徐薇,女,主管技师,主要从事生殖医学研究。 [△] 通信作者, E-mail: huhuaj@aliyun.com。

本文引用格式:徐薇,付景丽,石云,等.鼠胚实验在新建体外受精实验室中的质控作用[J].国际检验医学杂志,2018,39(14):1701-1704.

控制^[2]。陆军军医大学第二附属医院生殖与遗传医学中心 IVF 实验室建成于 2016 年 11 月,经过前期的清洁消毒和热处理后^[3],于 2017 年 4 月到 8 月,在 IVF 实验环境下对昆明小白鼠进行体内受精和体外受精实验 12 批次共 77 周期,对新建 IVF 实验室进行了质量控制检测。

1 材料与方法

1.1 实验动物 无特定病原体的健康昆明小白鼠及小鼠饲料均购自重庆医科大学实验动物中心,许可证号 SYXK(渝)2017-0010,雌雄兼用(6 周龄雌鼠,8~9 周龄成年雄鼠单笼单放饲养),光照、黑暗各 12 h;严格控制温度、湿度,自由摄食。购回后在实验动物中心适应环境 1 周用于实验。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 药品与试剂 孕马血清促性腺激素(PMSG)与人绒毛膜促性腺激素(HCG)均购自于杭州兽药总厂(批号:160721、161205),透明质酸酶(Vitrolife,批号:026582),G-MOPS PLUS(Vitrolife,批号:506523),G-IVF PLUS(Vitrolife,批号:506313),G1-PLUS(Vitrolife,批号:506429),G2-PLUS(Vitrolife,批号:506379),OVOIL(Vitrolife,批号:506142)等。

1.2.2 耗材与设备 3001 皿(Falcon,批号:9246241),3037 皿(Falcon,批号:6297037)5 mL 移液管(Falcon,批号:7543),3 mL 塑料巴氏吸管(Falcon,批号:357575),5.75 英寸巴氏管(Sunlight,批号:S5893),9 英寸巴氏管(Sunlight,批号:S6143),精子计数板(以色列,Sefi-Medcal instruments),其他耗材均购自于 FALCON 公司;氮气纯度 99.99%,CO₂ 纯度 99.99%;丹麦 IVFtech 恒温百级工作台(型号:Sterile180),日本 ASTEC 柜式培养箱(SGA-1651),屉式培养箱(AD3100GC),体视显微镜(日本 Nikon,SMZ1000),倒置显微镜(Olympus,IX53),相差显微镜(德国 Zeiss,Primo star),离心机(美国 Thermofisher,5702)。

1.3 方法

1.3.1 小鼠超排卵和鼠卵采集 挑选发情前期雌鼠于下午 5 点腹腔内注射(PMSG)10 IU/只,注射 PMSG 48 h 后于腹腔内注射 HCG 10 IU/只。次日上午 8 点采用颈椎脱臼处死雌鼠,超净工作台内取出小鼠卵巢及输卵管,于 G-MOPS PLUS 中冲洗两遍,体视显微镜下用 1 mL 的注射器轻轻划破膨大的输卵管壶腹部,让卵子团自行逸出,收集卵子团于受精皿中,放置于 37 °C,6%的 CO₂ 培养箱中孵育。

1.3.2 鼠精的采集和优化 选择发情期雄鼠,颈椎脱臼处死,超净工作台内取出小鼠附睾及部分输精管,于 G-MOPS PLUS 中洗涤 2 遍,剔除多余脂肪组织,体视显微镜用 1 mL 的注射器从附睾尾部刺破输精管,向前轻轻挤出输精管的精子(若精子数量不足,

可用注射器划破附睾获取精子),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 °C,6% CO₂ 培养箱中获能 30 min。

1.3.3 体内受精 注射 HCG 后,当晚将雌、雄鼠(1:1)合笼交配,次晨查阴栓。颈椎脱臼处死小鼠,超净工作台内采集小鼠输卵管及卵巢,在体视显微镜下用注射器剖开输卵管壶腹部,采集合子团。将合子团在 G-MOPS PLUS 中洗涤 2 遍,后再透明质酸酶作用 30 s 脱掉颗粒细胞,分别在 G-MOPS PLUS 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。

1.3.4 体外受精 收集获能的上层精子,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(3037 皿,1 mL G-IVF PLUS,加油覆盖),将精子悬液加入到 3037 皿中,调整精子悬液终浓度(1~2)×10⁶/mL,并放置于培养箱中,4~6 h 后观察受精情况。然后将受精卵从 G-IVF PLUS 中转移到 G1-PLUS 微滴中培养。

1.3.5 原核与卵裂期胚胎的观察与培养 体外受精后,精卵孵育 4~6 h 后观察 2PN 形成情况,统计受精率。体内受精的合子团经透明质酸酶处理后,观察原核胚的形成情况,统计受精率。将收集的原核胚洗涤后转入 G1-PLUS 微滴中培养,微滴体积为 50 μL,可放置 5~10 枚胚胎,D3 天将胚胎转移到 G2-PLUS 微滴中继续培养,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,采集照片,统计受精率、卵裂率和囊胚率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对实验数据进行分析,计数资料以百分率表示,均采用卡方检验进行组间差异性分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体内受精体外培养结果 小鼠体内受精培养共 5 个批次,35 个周期。获卵数为 883 枚,原核受精数 844 枚,受精率为 95.8%;2-细胞胚胎数 782 枚,卵裂率为 92.7%;卵裂后形成囊胚数 752 枚,囊胚率为 96.2%。见表 1。

表 1 小鼠体内受精体外培养结果[n(%)]

批次	周期数	获卵数	合子数 (受精率)	≥2 细胞数 (卵裂率)	囊胚数 (囊胚率)
1	6	164	159(97.0)	137(86.2)	124(90.5)
2	6	152	145(95.4)	131(90.3)	126(96.2)
3	7	175	165(94.3)	154(93.3)	146(94.8)
4	8	172	172(100.0)	165(95.9)	164(99.4)
5	8	220	203(92.3)	195(96.1)	192(98.5)
合计	35	883	844(95.8)	782(92.7)	752(96.2)

2.2 小鼠体外受精培养结果 小鼠体外受精培养共 7 个批次, 42 个周期。获卵数为 1 119 枚, 原核受精胚 886 枚, 受精率为 79.2%; 2-细胞胚胎数 840 枚, 卵裂率为 94.8%; 卵裂后形成囊胚数 721 枚, 囊胚率为 85.8%。见表 2。

2.3 小鼠体内与体外受精胚胎培养情况观察 小鼠体内受精与体外受精胚胎培养, 从 2-细胞胚胎、4~8 细胞胚胎、致密化胚胎到囊胚形成, 见图 1。

2.4 体内与体外受精率与囊胚率比较 体内受精培养获得的受精率为 95.8%, 2-细胞胚胎数或以上为 782 枚; 与体外受精培养获得的受精率为 79.2%, 2-细胞胚胎数或以上为 866 枚, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。囊胚率两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3、4。

表 2 小鼠体外受精培养结果[n(%)]

批次	周期数	获卵数	2PN 数 (受精率)	≥2 细胞数 (卵裂率)	囊胚数 (囊胚率)
1	5	97	59(60.8)	52(88.1)	40(70.5)**
2	5	132	98(74.2)	90(91.8)	75(83.3) ^a
3	6	152	115(81.1)	108(93.9)	94(87.0) ^b
4	7	206	167(81.1)	161(96.4)	142(88.2) ^b
5	8	229	202(88.6)	192(95.0)	159(82.8) ^a
6	6	168	135(80.4)	129(95.6)	116(89.9) ^b
7	5	135	110(81.5)	108(98.2)	95(88.0) ^a
合计	42	1 119	886(79.2)	840(94.8)	721(85.8)

注:^a 表示二气培养条件下(37℃、6%CO₂、饱和湿度);^b 表示三气培养条件下(37℃、6%CO₂、5%O₂、饱和湿度);** 表示二气培养条件下, 未达到质控标准

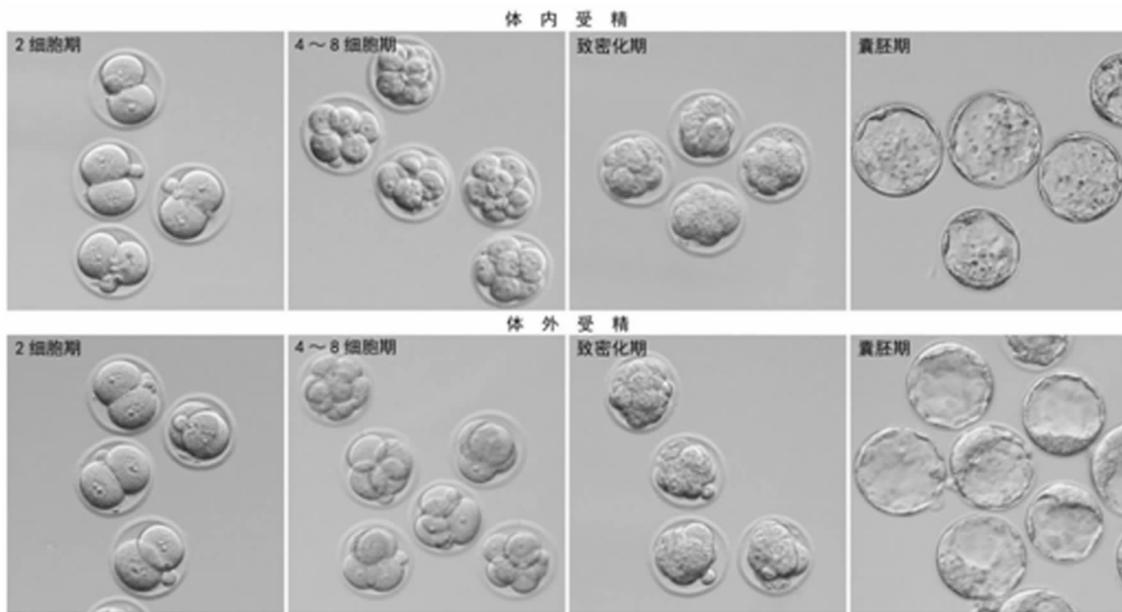


图 1 小鼠体内受精与体外受精各期胚胎

表 3 体内与体外受精率比较

受精方式	受精卵(2-细胞)(n)	未受精卵(n)	卵总数(n)	受精率(%)
体内	782	38	820	95.4
体外	866	253	1 119	79.2 ^a
合计	1 710	274	1 984	

注:与体内受精率比较, $\chi^2 = 113.139$, ^a $P < 0.05$

表 4 体内体外囊胚率比较

受精方式	囊胚(D5)(n)	未成囊胚(n)	2-细胞胚胎(n)	囊胚率(%)
体内	752	30	782	96.2
体外	721	119	840	85.8 ^a
合计	1 473	149	1 622	

注:与体内囊胚率比较, $\chi^2 = 51.806$, ^a $P < 0.05$

体外受精共进行了 18 个周期, 获卵 496 枚, 受精 410 枚。三气培养条件下(37℃、6%CO₂、5%O₂、饱和湿度), 小鼠体外受精共进行了 19 个周期, 获卵 536 枚, 受精 417 枚。三气培养条件下的小鼠胚胎受精率、卵裂率和囊胚率与二气培养条件下差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。其中二气培养条件下的第一批次未达到质控标准, 未纳入统计。见表 5。

表 5 不同培养环境下对小鼠体外受精卵的培养情况比较[% (n/n)]

培养箱	受精率	卵裂率	囊胚率
二气培养箱	82.7(410/496)	95.1(390/410)	84.4(329/390)
三气培养箱	79.3(417/526)	95.4(398/417)	88.4(352/398)
χ^2	1.893	0.048	2.799
P	>0.05	>0.05	>0.05

2.5 不同培养环境下对小鼠体外受精卵培养的影响 二气培养条件下(37℃、6%CO₂、饱和湿度), 小鼠

3 讨 论 胚胎实验室是人类辅助生殖技术实施的重要支

撑点,是保证 ART 成功的重要核心条件。鼠胚实验分析(MEA)适用于新建或新启动周期的 IVF 实验室质控^[1,4]。实验室在开展人类体外受精-胚胎移植辅助生殖技术之前,必须检测其培养体系是否适合胚胎的培养,而小鼠胚胎实验能够有效地检测整个培养体系^[5],且有较好的敏感性^[6-9]。通过动态观察小鼠胚胎发育情况,了解受精率及囊胚形成率等,在反映胚胎发育状况的同时,可监测胚胎实验室的各种因素,包括空气质量、温度、湿度以及各种耗材、培养液、培养箱、CO₂ 气体和技术人员操作水平等^[6]。

实验结果表明,在本胚胎实验室小鼠体内或体外受精获得的原核胚,都能发育至囊胚阶段,而且发育状况良好,各项指标基本达到质控标准^[10-11]。其中,体外受精实验结果第一批次囊胚率未达质控标准,可能原因:(1)技术人员在前期操作中不够熟练,不同人员操作结果也是不同的;(2)最初工作站热台测量温度为 35~36 °C,温度过低会破坏卵子的纺锤体结构,进而影响下一步发育^[3]。通过对工作站热台和显微镜热台的校正,后面批次的囊胚率均达到了质控标准。

本实验结果说明,体外受精培养更能有效地检测整个培养体系。小鼠体外受精胚胎的受精率和囊胚率低于体内受精胚胎的受精率和囊胚率,差异有统计学意义($P < 0.05$)。排除小鼠自身的因素,体外受精受很多因素影响:(1)目前的 IVF 实验室技术不能完全模拟体内输卵管的环境;(2)本中心为新建中心,虽然硬件设施齐全,但是软实力跟一些成熟的中心比较还存在差距,还需不断摸索改善胚胎培养环境;(3)本中心技术人员技术相对薄弱,需要更进一步学习培训。实验结果显示,不同培养环境下体外受精培养的受精率,卵裂率,囊胚率差异无统计学意义($P > 0.05$)。这一结果跟高亚可等^[9]的研究结果不同,这可能与鼠胚实验的重复性很差有关且具有局限性,也可能与实验样本量少有关,还有待进一步研究。

4 结 论

体内受精采集的受精卵培养,该方法虽稳定,但不能很好地评价配子及受精卵对培养试剂与耗材的敏感性,不能对体外受精的过程及实验室操作人员进行全面评价^[12],所以应与体外受精培养相结合来检测整个培养体系。除此之外,小鼠胚胎培养对于一些条

件有限的实验室来说不易实现且存在很多争议,此方法不能作为唯一的质量控制标准,可以采用精子存活实验来进行实验室试剂与耗材的质控作为补充^[13]。

参考文献

- [1] MORBECK D E. Importance of supply integrity for in vitro fertilization and embryo culture[J]. *Semin Reprod Med*, 2012, 30(3): 182-190.
- [2] LIERMAN S, DE SUTTER P, DHONT M, et al. Double-quality control reveals high-level toxicity in gloves used for operator protection in assisted reproductive technology[J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(4 Suppl): 1266-1272.
- [3] 黄国宁. 辅助生殖实验室技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 34-36.
- [4] KRISHER R L, BRAD A M, HERRICK J R, et al. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during in vitro maturation[J]. *Anim Reprod Sci*, 2007, 98(1/2): 72-96.
- [5] 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.
- [6] 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]. *华夏医学*, 2011, 24(6): 649-652.
- [7] 胡卫华, 侯文文, 吴满意, 等. 鼠胚实验在新建 IVF 胚胎培养室中的质控研究[J]. *皖南医学院学报*, 2013, 32(3): 181-183.
- [8] 谭玉梅, 宋革, 祝晓丽, 等. 小鼠胚胎培养在新建辅助生殖实验室质量控制中的作用[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2015, 7(5): 27-29.
- [9] 高亚可, 杜姗姗. 新建辅助生殖实验室的鼠胚实验报告[J]. *广西医学*, 2016, 38(3): 304-307.
- [10] 庄广伦. 现代辅助生育技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 215-216.
- [11] 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.
- [12] PENZIAS A S. Recurrent IVF failure: other factors[J]. *Fertil Steril*, 2012, 97(5): 1033-1038.
- [13] 侯文文, 胡卫华, 吴满意. 新建 IVF 实验室使用前的生物学检测[J]. *安徽医学*, 2013, 34(8): 1062-1065.

(收稿日期: 2017-12-25 修回日期: 2018-02-22)