

周龄对非肥胖型糖尿病背景小鼠体外受精效果的影响

阎涛, 胡萍, 徐晨, 王琪, 史丹丹, 赵静, 王宏宇*

(南京大学-南京生物医药研究院, 南京 211800)

【摘要】 目的 提高非肥胖型糖尿病(non-obese diabetic, NOD)背景小鼠体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)效果。**方法** 使用不同周龄的NOD背景雌鼠进行实验, 实验分为四组, 分别为4、6、8和10周龄雌鼠, 与3~6月龄NOD雄鼠进行体外受精, 第二天统计每只雌鼠可用胚胎数量, 重复两次实验。收集2016—2018年NOD小鼠移植生仔数据进行比较。**结果** 第一次实验4、6、8和10周龄四组每只雌鼠体外受精后可用二细胞胚胎数以平均数±标准差表示, 分别为(13.4±2.5)枚、(22.7±2.9)枚、(22.0±7.0)枚、(30.5±10.9)枚。第二次实验4、6、8和10周龄四组每只雌鼠可用二细胞胚胎数以平均数±标准差表示, 分别为(7.8±2.6)枚、(16.5±4.5)枚、(14.2±6.5)枚、(24.5±5.9)枚。4、8、10周龄雌鼠体外受精后胚胎移植平均生仔率±标准差分别为(35.32±9.9)%、(36.19±6.2)%、(43.15±6.9)%。**结论** 10周龄的NOD背景雌鼠进行体外受精效果最好, 建议使用10周龄雌鼠进行体外受精。

【关键词】 体外受精; NOD小鼠; 胚胎

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 09-0066-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.09.011

Effects of age on efficacy of *in vitro* fertilization in non-obese diabetic mice

Yan Tao, Hu Ping, Xu Chen, Wang Qi, Shi Dandan, Zhao Jing, Wang Hongyu*

(Nanjing Biomedical Research Institute of Nanjing University, Nanjing 211800, China)

【Abstract】 Objective To improve the results of *in vitro* fertilization (IVF) for non-obese diabetic (NOD) mice. **Methods** NOD female mice were divided into four age groups: 4, 6, 8, and 10 weeks old. Sperm from 3–6-month-old male NOD mice were used for *in vitro* fertilization. The next day, the number of usable embryos per female mouse was counted and the experiment was repeated twice. NOD mouse embryo transfer data collected from 2016–2018 were used for the comparison of pup rates. **Results** Twenty-four hours after the first experiment, the means ±SD of the number of two-cell-stage embryos per group were 13.4 ± 2.5, 22.7 ± 2.9, 22 ± 7.0, and 30.5 ± 10.9, respectively. Twenty-four hours after the second experiment, the numbers of two-cell-stage embryos per group were 7.8 ± 2.6, 16.5 ± 4.5, 14.2 ± 6.5, and 24.5 ± 5.9, respectively. The mean ±SD rates of pups born from transferred embryos after *in vitro* fertilization in 4, 8, and 10 weeks were (35.32 ± 9.9)%, (36.19 ± 6.2)%, and (43.15 ± 6.9)%, respectively. **Conclusions** Ten-week-old NOD mice respond better to IVF than 4-, 6-, or 8-week-old ones. Therefore, we suggest the selection of 10-week-old NOD female mice for *in vitro* fertilization.

【Keywords】 *in vitro* fertilization(IVF); NOD mouse; embryo

[作者简介] 阎涛(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 小鼠生殖技术。E-mail: yantao@nbri-nju.com

[通信作者] 王宏宇, 女, 教授, 研究方向: 脂质代谢调控以及代谢综合症。E-mail: wanghy@nbri-nju.com

非肥胖型糖尿病(non-obese diabetic, NOD)小鼠是 Makino 及其同事繁育出的一种小鼠品系^[1-2],在自身免疫性 I 型糖尿病研究中具有重要作用。分析目前已有的实验结果,发现 NOD 背景小鼠体外受精效率低,每只雌鼠平均可用的二细胞数量少,而且有资料显示 NOD 背景小鼠在体外受精过程中存在发育迟缓的现象^[3],因此本课题组对现有的实验操作进行改进,通过对不同周龄鼠体外受精效率的比较以及增加一次二细胞期受精率的统计,发现 10 周龄的 NOD 背景雌鼠进行体外受精效率明显高于其他周龄鼠,这一发现对 NOD 背景小鼠体外受精操作具有重要的指导作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

体外受精实验:4 周龄(15~18 g),6 周龄、8 周龄、10 周龄(20~25 g)的 NOD 背景雌鼠(数量见表 1、表 2);3~6 月龄(30~35 g)NOD 背景雄鼠,每次实验 2 只共 4 只。胚胎移植生存率统计:受体全部采用 3 月龄(体重为 25~35 g)的 ICR 雌鼠,4 周龄、8 周龄、10 周龄实验组分别移植 55 只、40 只、30 只,共 125 只。实验动物(SPF 级)全部由南京大学-南京生物医药研究院提供[SCXK(苏)2015-0001]。饲养于南京大学-南京生物医药研究院屏障环境动物房(SPF 级)[SYXK(苏)2015-0001]。所有实验动物的操作程序均在南京大学-南京生物医药研究院实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准下进行(AP 号: NRCMM05)。所有实验动物操作均符合实验动物的福利伦理,并给予实验动物人道主义关怀,符合实验动物使用的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

PMSG(孕马血清雌激素,宁波三生公司);hCG(人绒毛膜促性腺激素,宁波三生公司);M16 培养液(Sigma 公司)用来胚胎培养;HTF 培养液用以精子获能和精卵结合[配制 100 mL 需要 0.5938 g NaCl,0.0350 g KCl,0.0049 g MgSO₄·7H₂O,0.0054 g KH₂PO₄,0.0755 g CaCl₂,0.210 g NaHCO₃,0.050 g 葡萄糖,0.34 mL 乳酸钠,0.0037 g 丙酮酸钠,0.0075 g 青霉素,0.0050 g 链霉素,0.40 g BSA,0.04 mL 酚红(0.5%)]。解剖剪;显微镊子;Motic 体式显微镜;热台(DB-B1,国华)。

1.3 实验方法

1.3.1 超排

下午 5:30 雌鼠经腹腔注射 PMSG,4 周龄雌鼠每只注射 5 IU,6 周龄雌鼠注射 7.5 IU,8、10 周龄雌鼠均注射 10 IU,48 h 后雌鼠经腹腔注射 hCG,hCG 注射剂量同 PMSG。

1.3.2 精子获能

雄鼠脱颈处死,打开腹腔,取出睾丸,分离剪取附睾尾部,用 1 mL 注射器扎破附睾使精液溢出,将精子转移到预平衡过的 HTF 获能滴中获能 1 h。

1.3.3 取卵

注射 hCG 14 h 后将雌鼠脱颈处死,分离取出输卵管,体视显微镜在覆盖矿物油的 HTF 受精滴中撕开膨大部,使卵团流出,将流出的卵团转移到受精滴中。

1.3.4 受精

用移液器吸取 5~10 μ L 精子加入含有卵团的受精滴中受精培养,放入培养箱培养过夜。

1.3.5 统计受精率

24 h 后统计一细胞、二细胞和异形胚胎数量,48 h 后再统计一次。

1.3.6 移植生存率

选取本单位日常生产项目中 2016—2018 年的 NOD 品系移植生存数据进行比较,观察不同周龄 NOD 雌鼠获得胚胎后移植到 ICR 雌鼠受体中的生存率。ICR 受体为假孕 0.5 d,移植方式为输卵管移植。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 软件以 one-way ANOVA 分析法进行检验分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 不同周龄 NOD 雌鼠获得的体外受精二细胞胚胎数量

两次实验,分别统计了 24 h 和 48 h 后的实验结果,结果显示随着周龄增加每只小鼠获得的二细胞胚胎数量呈递增趋势,8 周龄每只雌鼠获得二细胞胚胎数高于 4 周龄($P < 0.05$),但是略低于 6 周龄($P > 0.05$)。受精后 48 h 与 24 h 相比,二细胞胚胎数量增多,具体数据见表 1、表 2。

2.2 2016—2018 年的 NOD 品系移植生存数据

不同周龄 NOD 雌鼠进行体外受精,将得到的胚

胎进行移植,4 周龄雌鼠获得的胚胎移植生存率最低,8 周龄雌鼠胚胎移植生存率高于 4 周龄,10 周龄最高。具体胚胎移植生存数据见表 3。

3 讨论

由实验数据可以看出 NOD 背景的小鼠,在 4 周龄到 10 周龄范围内随着雌鼠周龄的增大,每只小鼠获得的二细胞胚胎数量先增多,8 周龄雌鼠出现降低,10 周龄左右的雌鼠进行体外受精(IVF)效果最好。国内有研究使用 4、8、16 周雌鼠进行体外受精实验,发现 8 周龄雌鼠超排效果最差^[4]。国外的类似研究也发现 8 周龄左右的雌鼠超排量会降低^[5]。可能的原因是 NOD 雌鼠相比其他品系雌鼠性成熟周龄大,7~8 周龄才性成熟,性成熟后生殖器官发育完全,对于超排激素的耐受性增强,由于机体抵抗外源物质的作用使得排卵量不如 6 周龄,但是 8 周龄雌鼠由于自身器官机能不如 10 周龄雌鼠,所以排卵量要低于 10 周龄雌鼠。

统计历史移植生存数据,结果显示随着雌鼠周龄增加体外受精生产的胚胎移植生存率升高。移植生存率是一项波动较大的数据,后续还需要继续积累不同周龄雌鼠生产的胚胎移植生存数据,以便通过大数据的积累,提供更为有力的证据。在利用显微注射方法生产转基因小鼠时也发现使用 4 周龄雌鼠进行体外受精实验产生的可用胚胎数量也要少于 6~10 周龄的雌鼠^[6]。

受精后 48 h 再次统计数据的时候可用胚胎数量增加,但是该观察结果是否具有研究价值还需要进一步研究,因为 48 h 的数据相比于 24 h 增加的胚胎数量不明显,在实际生产中推广的意义也不大。对于实际生产,每只雌鼠可用的二细胞胚胎数量比受精率更有实际意义,所以本文中并未体现受精率的数据。目前并未进行 48 h 后转化为二细胞胚胎的移植实验,今后需要增加该种胚胎移植生存效果实验,该实验还可以为是否有必要将胚胎培养至受精后 48 h 提供重要参考价值。

表 1 第一次实验受精效果数据
Table 1 In vitro fertilization results of the first experiment

NOD 雌鼠周龄(周) Age of female NOD mice (weeks)	NOD 雌鼠只数 Number of female NOD mice	24 h 后二细胞胚胎总数 Total number of two-cell embryos after 24 h	24 h 后每只雌鼠获得的二细胞胚胎数量 Number of two-cell embryos obtained after 24 h per female mouse	48 h 后每只雌鼠获得的二细胞胚胎数量 Number of two-cell embryos obtained after 48 h per female mouse
4	10	135	13.4 ± 2.5 ^a	15.1 ± 3.4 ^a
6	7	159	22.7 ± 2.9 ^b	24.0 ± 3.0 ^b
8	10	220	22.0 ± 7.0 ^b	23.2 ± 7.8 ^b
10	10	299	30.5 ± 10.9 ^c	31.2 ± 9.4 ^c

注:4 组组间比较;4 周龄组和其他三组比较, $P < 0.05$;10 周龄组和其他三组比较, $P < 0.05$;6 周龄组和 8 周龄组相比, $P > 0.05$ 。表 2 同。
Note. Comparison among four groups; 4-week-old compared with the other three groups, $P < 0.05$; 10-week-old compared with the other three groups, $P < 0.05$; and 6-week-old group compared with the 8-week-old group, $P > 0.05$. The same as in Figure 2.

表 2 第二次实验受精效果数据
Table 2 In vitro fertilization results of the second experiment

NOD 雌鼠周龄(周) Age of female NOD mice (weeks)	NOD 雌鼠只数 Number of female NOD mice	24 h 后二细胞胚胎总数 Total number of two-cell embryos after 24 h	24 h 后每只雌鼠获得的二细胞胚胎数量 Number of two-cell embryos obtained after 24 h per female mouse	48 h 后每只雌鼠获得的二细胞胚胎数量 Number of two-cell embryos obtained after 48 h per female mouse
4	10	78	7.8 ± 2.6 ^a	9.9 ± 3.1 ^a
6	11	181	16.5 ± 4.5 ^b	17.2 ± 5.0 ^b
8	10	152	14.2 ± 6.5 ^b	13.7 ± 6.4 ^b
10	6	147	24.5 ± 5.9 ^c	25.1 ± 9.2 ^c

表 3 2016—2018 年的 NOD 品系移植生存数据
Table 3 Pup birth rate of in vitro-fertilized embryos of NOD mice after transferred into ICR female mice as recipients during 2016–2018

NOD 雌鼠周龄(周) Age of female NOD mice (weeks)	移植枚数 Number of embryos transferred	ICR 雌鼠受体数 Number of ICR female mice as recipients	生存率(%) Pup birth rate	实验次数 Number of experiments
4	1043	55	35.32 ± 9.9	8
8	800	40	36.19 ± 6.2	3
10	592	30	43.15 ± 6.9	4