

张帆,安学芳,赵赫,等. 还原型谷胱甘肽在 AG129 小鼠生物净化及快速繁殖中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 96-99.
Zhang F, An XF, Zhao H, et al. Application of reduced glutathione in biological purification and rapid propagation of AG129 mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 96-99.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.014

还原型谷胱甘肽在 AG129 小鼠生物净化及快速繁殖中的应用

张帆,安学芳*,赵赫,李丽,肖宇宙

(中国科学院武汉病毒研究所,武汉 430071)

【摘要】 目的 AG129 小鼠自然产仔困难,采用常规体外受精试剂无法获得足够数量用于移植的胚胎。使用还原型谷胱甘肽(GSH)调节小鼠体外受精液成分,完成对 AG129 小鼠体外受精,为体外受精困难品系的基因工程小鼠生物净化及快速扩繁提供思路。**方法** 设计3个含不同浓度 GSH 的精子获能及受精液的实验组,浓度分别 0.5、1、2 mmol/L,1个不含 GSH 的精子获能液及受精液的对照组,每组超排5只小鼠,重复3次。**结果** 不同 GSH 实验组及对照组间平均受精率差异具有显著性($P < 0.05$),在精子获能及受精液中 GSH 浓度为 1 mmol/L 时,AG129 小鼠体外受精效果最佳,平均受精率为 $(43.35 \pm 1.76)\%$,胚胎状态良好。将获得胚胎移植受体小鼠,受体动物均妊娠并顺利产仔。**结论** 体外受精液中的 GSH 浓度为 1 mmol/L 时,能够显著提高 AG129 小鼠体外受精效率,为类似体外受精困难品系的小鼠生物净化及快速繁殖提供解决方案。

【关键词】 AG129 小鼠;谷胱甘肽;生物净化;快速繁殖

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0096-04

Application of reduced glutathione in biological purification and rapid propagation of AG129 mice

ZHANG Fan, AN Xuefang*, ZHAO He, LI Li, XIAO Yuzhou

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Corresponding author: AN Xuefang. E-mail: anxf@wh.iov.cn

【Abstract】 Objective AG129 mice have difficulty giving birth naturally, and conventional in vitro fertilization (IVF) reagents do not yield a sufficient number of embryos for transplantation. Reduced glutathione (GSH) was used to regulate a component of the IVF reagent and complete the IVF process in AG129 mice, presenting a potential method for biological purification and rapid reproduction of genetically engineered mouse strains with IVF difficulties. **Methods** Four experimental groups were designed using 0 mmol/L (control group), 0.5 mmol/L, 1 mmol/L and 2 mmol/L of GSH for sperm capacitation and fertilization. Each group contained 5 superovulated mice, and the assay was repeated three times. **Results** The average fertilization rate differed between the GSH experimental groups and the control group ($P < 0.05$). The 1 mmol/L GSH concentration had the best IVF effect on the AG129 mice. The average fertilization rate was $(43.35 \pm 1.76)\%$, and the embryo status was good. All recipient mice became pregnant and gave birth successfully after the embryos were transferred. **Conclusions** A GSH concentration of 1 mmol/L significantly improves the IVF efficiency of AG129 mice. This provides a potential solution for the biological purification and rapid propagation of mice with IVF difficulties.

【Keywords】 AG129 mice; glutathione; biological purification; rapid propagation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】湖北省科技支撑计划项目(2017BEC016)。

Funded by Science and Technology of Hubei (2017BEC016).

【作者简介】张帆(1985—),男,实验师,硕士。Email:zhangf@wh.iov.cn

【通信作者】安学芳(1965—),女,高级工程师,主要从事实验动物质量控制与管理工作。Email:anxf@wh.iov.cn

还原型谷胱甘肽 (GSH) 是一种具有重要生理功能的三肽硫醇,在哺乳动物细胞中发挥十分重要的生物活性作用^[1]。这种化合物是许多酶反应的辅基,是机体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂,保护细胞膜中含巯基的蛋白质和含巯基酶不被破坏^[2]。目前普遍认为,雄性动物的精清中的氧自由基过多会导致不育,削弱精子谷胱甘肽转移酶活性,可直接导致精子质膜损伤,使精子运动能力、顶体反应及受精能力降低甚至消失^[3]。

研究表明,在小鼠卵母细胞玻璃化冷冻过程中,在培养液中加入一定量的 GSH,可以一定程度改善卵母细胞活性^[4],同时,在精子复苏液中加入一定量 GSH 可以明显提高牛、羊等家畜冻存精子的活力、形态及遗传物质的完整性^[5]。

AG129 小鼠是 I 型和 II 型干扰素受体缺失基因敲除动物品系,对寨卡病毒、登革病毒、肠道病毒等多种病毒易感^[6-8],是较为理想的病毒易感动物模型。但是,该品系小鼠在饲养过程中,表现出较明显的繁殖障碍,每胎产仔数量低,无法快速获得足够数量动物,成为相关科学研究的瓶颈。在体外受精实验中,使用常规试剂获得可移植的两细胞胚胎效率极低。笔者通过在精子获能液和受精液中加入 GSH,并探索调整 GSH 的最佳浓度,成功对 AG129 小鼠完成体外受精并胚胎移植,为相关体外受精困难品系小鼠的生物净化、快速扩繁提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 AG129 小鼠(雌性 4 周龄 80 只、雄性 12 周龄 12 只)由中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心保存,品系引自中国科学院上海药物研究所【SCXK(沪)2015-0004】,SPF 级 ICR 小鼠(雌性 8 周龄 9 只)购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。所有动物均饲养在 SPF 级屏障环境 IVC 笼盒中【SYXK(鄂)2019-0034】,所有动物自由采食和饮水。所有操作均符合中国科学院武汉病毒研究所动物实验伦理要求,满足 3R 原则(IACUC 审批号:WIVA30201902)。

1.1.2 主要试剂与仪器

PMSG、HCG 购自宁波三生生物科技有限公司;HTF (Cosmobio CSR-R-B070)、KSOM (Cosmobio CSR-R-B074)购自日本 Cosmo Bio 公司;2,2,2-三溴乙醇 (Sigma T48402)、叔戊醇 (Sigma 152463)、GSH (Sigma BD8612)、M2 培养基 (Sigma M7167)、

矿物油 (Sigma M5310) 购自西格玛奥德里奇贸易有限公司。

体视显微镜 (Motic)、二氧化碳培养箱 (Thermo)、小动物体温维持仪 (瑞沃德)、超净工作台 (苏净安泰)。

1.2 方法

1.2.1 麻醉剂的配置与使用

在超净工作台中将 5 g 2,2,2-三溴乙醇用 3.1 mL 叔戊醇溶解,待充分溶解后取 0.5 mL 溶液加入 39.5 mL 生理盐水中,充分混合后过滤待用,配置完成的麻醉剂需避光保存,小鼠麻醉时按照 20 μ L/g 腹腔注射使用,实验中所有对活体小鼠的手术操作均在动物麻醉状态下开展。

1.2.2 GSH 溶液的配制

在超净工作台中使用 HTF 将 GSH 粉末溶解,分别配置终浓度为 0、0.5、1、2 mmol/L 的 GSH 溶液。

1.2.3 雌鼠超排及取卵

将每只 AG129 雌鼠腹腔注射 PMSG 10IU,48 h 后腹腔注射 HCG 10 IU,每个 GSH 浓度组超排 5 只 AG129 小鼠,3 次平行。注射 HCG 15 h 后处死超排小鼠,手术取雌鼠输卵管,将输卵管在无菌滤纸上短暂放置去除表面血液后,放入提前在 37℃ 5% CO₂ 中平衡好的 HTF 受精滴油相中。用显微镊固定输卵管,用解剖针将输卵管膨大部刺破后,被卵丘细胞包裹的卵细胞溢出,用显微镊将其拖入 HTF 培养液中,放入二氧化碳培养箱内。

1.2.4 雄鼠精子采集

将 AG129 雄鼠处死后,手术取附睾尾,将附睾尾在无菌滤纸上短暂放置去除表面血液,用显微镊将附着的脂肪组织去除后,放入提前在 37℃ 5% CO₂ 中平衡好的 HTF 获能滴油相中。用显微镊固定附睾尾,用显微剪切开头部中央的附睾管,显微镊轻压附睾尾,使精子从切口处流出。迅速用显微镊将流出的精子拖入 HTF 获能滴中,放入二氧化碳培养箱培养 30 min,使精子获能。

1.2.5 体外受精

在体视显微镜下观察精子浓度,使用移液器轻柔沿边缘吸取 4 ~ 6 μ L 精子悬液注射入含有卵子的 HTF 受精滴中进行受精,将受精滴放入二氧化碳培养箱中进行培养。受精 6 h 后,将卵子移入提前在 37℃ 5% CO₂ 中平衡好的 KSOM 液滴中继续培养。

1.2.6 移植受体准备

将受体 ICR 雌鼠与 ICR 结扎雄鼠 1:1 合笼,第 2 日检查阴道栓,有阴道栓的可作为胚胎移植的受体动物。

1.2.7 早期胚胎形态学观察及统计

受精 24 ~ 28 h 后,对受精卵进行镜检,对 2 细胞胚胎、未受精卵、异常卵进行统计。

1.2.8 2 细胞胚胎收集

使用移卵针将形态完好的 2 细胞胚胎移入提前准备好的 M2 培养基中,反复清洗 3 次后放入二氧化碳培养箱内待移植。

1.2.9 胚胎移植

将受体 ICR 小鼠麻醉后剃除背部左右两侧被毛,并用 75%酒精消毒。在卵巢脂肪垫部位皮肤纵向剪开一切口,分离皮肤与肌肉,再将相应部位肌肉剪开,拉出脂肪垫,卵巢、输卵管及子宫可一并牵引出。用脂肪夹夹住脂肪垫,在体视显微镜下调整输卵管位置,找到输卵管膨大部,用滤纸在待移植部位做好标记。用维纳斯剪刀在输卵管伞口与膨大部间剪一小口,将移植针沿开口朝膨大部方向插入,小心将 15 枚每胎移入输卵管内,以输卵管中可见指示气泡作为移植成功标志。移植后将脂肪垫、卵巢及输卵管小心还纳回腹腔,缝合肌肉层和皮肤层,完成单侧移植操作,使用相同方法将 15 枚胚胎移入另外一侧输卵管中。移植完成小鼠放在小动物体温维持仪上 30 min,待苏

醒后转入 IVC 笼盒内单独饲养。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,对所得实验数据进行单因素方差统计分析,定量数据以平均值±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示。组间比较采用 *t* 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 AG129 小鼠体外受精添加 GSH 试验结果

由表 1 可见,不同 GSH 浓度组平均受精率差异具有显著性($P < 0.05$)。在精子获能及受精过程中,HTF 中不添加 GSH 时,AG129 小鼠体外受精率为(2.30 ± 0.73)%。添加 0.5 mmol/L GSH 时,两细胞胚胎数量有所增加,受精率为(20.44 ± 0.15)%。添加 1 mmol/L GSH 时,两细胞数量进一步增加,受精率达到(43.35 ± 1.76)%。添加 2 mmol/L GSH 时,两细胞数量有所下降,受精率为(31.77 ± 1.42)%,同时,异常卵数明显增加,主要表现为多个精子头部钻入卵细胞透明带,胚胎呈“毛球”状(见图 1),使卵细胞无法正常完成受精,最终发育为未受精卵、畸形卵或者死亡(见图 2)。

表 1 AG129 小鼠体外受精结果

Table 1 *In vitro* fertilization results of AG129 mice

GSH 浓度 (mmol/L) GSH concentration (mmol/L)	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	未受精卵数 Number of unfertilized oocytes	异常卵数 Number of abnormal oocytes	平均受精率 (%) Average fertilization rate (%)
0	216	5	198	13	2.30 ± 0.73^d
0.5	225	46	163	16	20.44 ± 0.15^c
1	224	97	110	12	43.35 ± 1.76^a
2	211	67	81	63	31.77 ± 1.42^b

注:同一列中数字后字母不同者,差异具有显著性。
Note. Pairwise comparison, the differences are significant.

2.2 移植产仔率分析

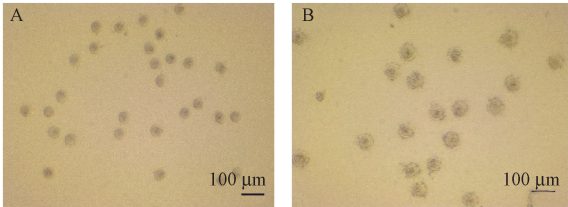
由表 2 可见,将相同数量的胚胎移植受体,均获得了较理想的产仔量,不同 GSH 浓度组间平均产仔率差异无显著性($P > 0.05$),1 mmol/L 组略高。0.5 mmol/L 组与和 1 mmol/L 组出生的仔鼠均离乳成活,2 mmol/L 组仔鼠离乳前死亡 1 只,平均成活率为(96.30 ± 6.41)%,不同 GSH 浓度组间平均成活率差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

目前,AG129 小鼠作为干扰素受体缺失最严重动物,是病毒感染性动物模型的建立、病毒致病机制研究及抗病毒疫苗与药物研究等方面科研工作中重要的实验材料。干扰素受体缺失,可能是导致该品系小鼠繁殖能力下降的原因,采用常规雌雄同

笼交配方式,很难快速获得周龄、性别均一足量的动物,成为限制相关科研活动顺利开展瓶颈。使用激素对 AG129 小鼠进行超排,采用常规体外受精方法很难获得足够数量的胚胎进行后续移植。

精子质膜中含有大量不饱和脂肪酸,为精子与卵子结合提供必要的条件。活性氧(ROS)能够使精子质膜过氧化,从而使精子质膜不可逆的丧失流动性,造成精子损伤,失去受精能力^[9]。GSH 作为清除氧自由基的清道夫,在细胞抗氧化系统中发挥着重要的作用^[10]。在体外受精试剂中加入一定浓度的 GSH,有利于体外受精的完成。GSH 固体较稳定,但在溶液中极易受外界环境中的温度、光照等条件影响而被氧化为不具生理活性的氧化型谷胱甘肽^[11]。因此,为防止含 GSH 的精子获能液氧化,必须在使用前现用现配,不可使用前期配置或使用剩余的试剂。

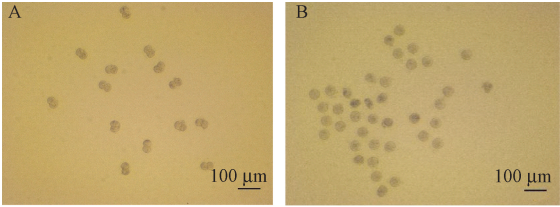


注:A: 正常体外受精 6 h 后胚胎。B: 异常体外受精 6 h 后“毛球”状胚胎。

图 1 AG129 小鼠体外受精 6 h 后胚胎

Note. A, Normal embryos after 6 h of ivf. B, Abnormal “hairball” embryos after 6 hours of ivf.

Figure 1 Embryos after 6 h of ivf of AG129 mice



注:A:正常体外受精 24 h 后胚胎。B: 异常体外受精 24 h 后发育情况。

图 2 AG129 小鼠体外受精 24 h 后胚胎

Note. A, Normal embryos after 24 h of ivf. B, Growth of abnormal embryos after 24 h of ivf.

Figure 2 Embryos after 24 h of ivf of AG129 mice

表 2 移植产仔率与成活率情况

Table 2 Transplant birth rate and survival rate

GSH 浓度 (mmol/L) GSH concentration (mmol/L)	移植胚胎数量 Number of embryos transferred	产仔数 Litter size	平均产仔率 (%) Average litter rate (%)	离乳数 Number of weaning	平均成活率 (%) Average survival rate (%)
0.5	90	22	24.44 ± 1.93	22	100.00 ± 0.00
1	90	25	27.78 ± 1.92	25	100.00 ± 0.00
2	90	24	26.67 ± 3.34	23	96.30 ± 6.41

本实验以 Toru 等^[12]前期研究为依据,设计了 3 个含不同浓度 GSH 的精子获能及受精液的实验组,1 个不含 GSH 的精子获能液及受精液的对照组,通过实验发现精子获能液及受精液中加入 GSH 能够显著提高体外受精率,当 GSH 浓度为 0.5 mmol/L 时,受精率有所提高,当 GSH 浓度为 2 mmol/L 时,由于精子活力过强,导致异常受精卵数量明显增多,平均受精率下降,当 GSH 浓度为 1 mmol/L 时,受精率最高,受精效果最好。将不同 GSH 浓度组获得的 2 细胞胚胎分别移植受体动物,均获得了数量较为稳定的仔鼠。

因此,使用还原型谷胱甘肽(GSH)调节小鼠体外受精液成分,显著提高了 AG129 小鼠体外受精率,良好的完成对 AG129 小鼠体外受精,为该品系小鼠生物净化及快速繁殖提供了可靠的技术保障,并为后续类似问题的顺利解决提供了技术思路。

参 考 文 献(References)

[1] Pastore A, Federici G, Bertini E, et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification [J]. Clin Chim Acta, 2003, 333(1):19-39.

[2] 袁平戈, 张大志. 还原型谷胱甘肽的作用机制及临床应用 [J]. 药品评价, 2006, 3(5):385-390.

Yuan PG, Zhang DZ. Mechanism and clinical application of reduced glutathione [J]. Drug Eval, 2006, 3(5):385-390.

[3] Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, et al. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development [J]. Theriogenology, 2003, 60(5):943-952.

[4] 付敏, 钱卫平, 林冬霞等. 谷胱甘肽在小鼠卵母细胞玻璃化冷冻

中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(28): 5422-5425.

Fu M, Qian WP, Lin DX, et al. The effect of GSH treatment on vitrication mouse oocytes [J]. Prog Mod Biomed, 2013, 13 (28): 5422-5425.

[5] Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SM, et al. Glutathione-supplemented tris-citric acid extender improves the post-thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa [J]. Reprod Biol, 2012, 12(3):271-276.

[6] Aliota MT, Caine EA, Walker EC, et al. Characterization of lethal zika virus infection in AG129 mice[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(4): e0004682.

[7] Tan GK, Ng JKW, Trasti SL, et al. A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(4): e672.

[8] Too IH, Yeo H, Sessions OM, et al. Enterovirus 71 infection of motor neuron-like NSC - 34 cells undergoes a non-lytic exit pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6:36983.

[9] Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa [J]. Mol Hum Reprod, 1997, 3(3):203-213.

[10] Tam ús Somfai, Ozawa M, Noguchi J, et al. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage [J]. Cryobiology, 2007, 55(2):0-126.

[11] 朱义福. 还原型谷胱甘肽的稳定性研究 [J]. 现代食品科技, 2011, 27(8):919-923.

Zhu YF. Stability of reduced Glutathione under different conditions[J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(8):919-923.

[12] Takeo T, Nakagata N. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin [J]. Biol Reprod, 2011, 85(5): 1066-1072.