

张帆,安学芳,赵赫,等. I型干扰素受体缺失小鼠体外受精实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 351-357.

Zhang F, An XF, Zhao H, et al. In vitro fertilization using type I interferon receptor-deficient mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 351-357.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.009

I型干扰素受体缺失小鼠体外受精实验研究

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 探索两种I型干扰素受体缺失对于小鼠体外受精的影响并对体外受精条件进行优化。**方法** 对两种I型干扰素受体缺失小鼠(IFN- α R^{-/-}、IFN- α/β R^{-/-})及背景野生型小鼠(C57BL/6)分别进行体外受精及胚胎移植,每组超排5只小鼠,3次重复,记录相关数据,分析干扰素受体缺失是否对小鼠体外受精存在影响。分别将两种I型干扰素受体缺失小鼠配子与C57BL/6小鼠配子进行体外受精杂交试验,每组5只小鼠,3次重复,探讨I型干扰素受体缺失对雌雄配子体外受精的影响。同时,优化体外受精条件,探索提高受精率技术方法,每组5只小鼠,三次重复。**结果** 两种I型干扰素受体缺失小鼠平均体外受精率低于背景品系C57BL/6小鼠,组间差异具有显著性($P < 0.05$)。干扰素 α 受体缺失小鼠体外受精率高于干扰素 α 、 β 受体双缺失小鼠体外受精率,组间差异具有显著性($P < 0.05$)。两种I型干扰素受体缺失小鼠的精子与C57BL/6小鼠卵细胞体外受精率均高于其卵细胞与C57BL/6小鼠精子的体外受精率,组间差异具有显著性($P < 0.05$)。通过延长精子获能时间至1h或在获能液及受精液中加入1 mmol/L还原型谷胱甘肽(GSH)能够提高体外受精率,相应组间差异具有显著性($P < 0.05$)。**结论** I型干扰素受体缺失可能导致相应品系小鼠体外受精率降低,而且对卵细胞的影响较精子的影响更为显著,通过适当延长精子获能时间或改变获能及受精液成分,能够提高体外受精率。

【关键词】 I型干扰素受体;小鼠;体外受精

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)03-0351-07

In vitro fertilization using type I interferon receptor-deficient 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 To explore the effects of two types of type I interferon (IFN-I) receptor deletions upon the reproductive performance of mice. **Methods** *In vitro* fertilization (IVF) was performed using two types of IFN-I receptor-deficient mice (deficient in IFN- α and IFN- α/β receptor signaling) and wild-type background (C57BL/6) mice. Each group contained 5 superovulated mice and the assay was repeated in triplicate. The female and male gametes of two the types of IFN receptor-deficient mice and the wild-type mice were examined using IVF. The IVF conditions were optimized and method to increase the fertilization rate were explored. **Results** The average IVF rates (number of 2-cell embryos as a percentage of oocytes) for the two types of IFN receptor-deficient mice were significantly lower ($P < 0.05$) than that of wild-type mice. The IVF rate of mice with IFN- α receptor deficiency was higher ($P < 0.05$) than that of mice with IFN- α/β receptor deficiency. The IVF rates using receptor-deficient sperm and C57BL/6 oocytes were significantly higher ($P < 0.05$) than those using receptor-deficient oocytes and C57BL/6 sperm. The IVF rates were significantly increased (P

[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,研究方向:实验动物技术与管理。Email:zhangf@wh.iov.cn

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

< 0.05) by extending the sperm capacitation time from 30 min to 1 h or adding glutathione to the capacitation and fertilization solutions from 0 mmol/L to 1 mmol/L. **Conclusions** Deletion of the IFN-I receptor may reduce the fertility of mice, and the effect on oocytes appears more significant than that upon sperm. Extending the sperm capacitation time or changing the capacitation and fertilization fluid composition improved the fertilization rate.

【Keywords】 type I interferon receptor; mice; *in vitro* fertilization

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

干扰素是一类在同种细胞上具有广谱抗病毒功能的活性蛋白,其活性的发挥受细胞基因的调节和控制^[1],分为 I 型干扰素和 II 型干扰素两大类。I 型干扰素包括 IFN- α 和 IFN- β , II 型干扰素又称 IFN- γ 。IFN- α 、IFN- β 和 IFN- γ 在体内分别由白细胞、成纤维细胞和淋巴细胞分泌,作用于干扰素受体,通过信号途径的激活,产生抗病毒蛋白,抑制病毒复制^[2]。

I 型干扰素受体缺失小鼠是 C57BL/6 背景小鼠通过 ES 细胞基因打靶获得,该小鼠在被病毒感染后靶组织器官内病毒滴度远高于野生型小鼠,同时,病毒感染致死量远低于野生型小鼠^[3],是理想的病毒易感动物模型,广泛应用于感染性小鼠模型的制备、病毒致病机制的研究、抗病毒药物及疫苗的筛选与评价等方面^[4-8]。

实际饲养繁育过程中发现,干扰素受体缺失小鼠妊娠期 21 d 左右,哺乳期为 21 d 左右,出生后 42 ~ 56 d 可达性成熟,以上繁殖性能与背景野生型小鼠无明显差异。但在产仔数量上,干扰素受体缺失小鼠普遍不佳,每胎产仔 3 ~ 6 只,显著低于背景野生型小鼠每胎产仔数 8 ~ 12 只。干扰素受体缺失是否对小鼠体外受精造成影响,目前鲜有报道,本实验使用体外受精-胚胎移植 (IVF-ET) 技术,通过配子杂交试验,探讨 I 型干扰素受体缺失对小鼠精子和卵细胞在体外受精中的影响。同时,通过优化体外受精参数,探索提高体外受精率的方法,为后续相应机理研究以及快速扩繁策略制定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

150 只 4 周龄雌性 IFN- α R^{-/-} 小鼠,体重约 14 g;33 只 12 周龄雄性,体重约 25 g)、IFN α/β R^{-/-} 小鼠(150 只 4 周龄雌性,体重约 14 g;33 只 12 周龄雄性,体重约 25 g),ICR 小鼠(9 只 8 周龄雌性,体重 22 ~ 25 g),由中国科学院武汉病毒研究所实验动

物中心保存【SYXK(鄂)2019-0034】。C57BL/6 野生型小鼠(45 只 4 周龄雌性,体重约 14 g;9 只 12 周龄雄性,体重约 25 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。所有动物均满足 SPF 级,饲养于屏障环境 IVC 笼盒【SYXK(鄂)2019-0034】。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(IACUC 审批号:WIVA30201901)。

1.1.2 主要试剂与仪器

PMSG(宁波三生生物科技股份有限公司, B181205)、HCG(宁波三生生物科技股份有限公司, S180801), HTF(Cosmobio, CSR-R-B070), KSOM(Cosmobio, CSR-R-B074), 2,2,2-三溴乙醇(Sigma, T48402), 叔戊醇(Sigma, 152463), M2 培养基(Sigma, M7167), 矿物油(Sigma, M5310)。

体视显微镜(Motic, 中国)、倒置显微镜(Leica, 德国)、二氧化碳培养箱(Thermo, 德国)、体温维持仪(瑞沃德, 中国)、超净工作台(苏净安泰, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

两种 I 型干扰素受体缺失小鼠(IFN- α R^{-/-}、IFN- α/β R^{-/-})及背景野生型小鼠(C57BL/6)分别进行体外受精及胚胎移植,每组超排 5 只雌鼠,3 次重复,记录相关数据。同时,分别将两种 I 型干扰素受体小鼠配子与同背景品系小鼠配子进行体外受精,每组 5 只小鼠,3 次重复,记录相关数据。体外受精条件优化实验每种因素超排 5 只小鼠,3 次重复,记录相关数据。

1.2.2 麻醉剂的配置与使用

称取 5 g 2,2,2-三溴乙醇,加入 3.1 mL 叔戊醇充分溶解,取 500 μ L 溶液加入 39.5 mL 生理盐水中混匀过滤,小鼠麻醉按照 20 μ L/g 腹腔注射使用,所有实验操作均在动物麻醉状态下进行。

1.2.3 雌鼠超排及取卵

超排雌鼠腹腔注射 10 IU PMSG,48 h 后腹腔注射 10 IU HCG。注射 HCG 15 h 后将动物安乐死,收集卵子并放入二氧化碳培养箱暂存。

1.2.4 雄鼠精子采集与质量测定

将具有成功交配经验且 1 周内未与雌鼠合笼的可育雄鼠安乐死后,取出附睾,迅速将精子取出至 HTF 获能液中,获能 30 min 后对精子进行计数观察并统计精子活力,精子活力计算公式为:(总精子数-非前进运动精子数)/总精子数。

1.2.5 体外受精

延获能滴边缘吸取适量精子悬浊液,注射入受精滴中,放入二氧化碳培养箱中培养 6 h 后,将受精卵移入 KSOM 液滴中继续培养。

1.2.6 受体准备

将 ICR 结扎雄鼠与受体雌鼠 1:1 合笼,第 2 天验栓,如发现阴道栓则可作为胚胎移植的受体。移植前应确定受体动物输卵管出现膨大部,如无膨大部,则不能作为受体动物。

1.2.7 早期胚胎形态学观察与统计

体外受精 24 ~ 28 h 后,镜检受精情况,统计 2 细胞胚胎数、未受精卵数、异常卵数。各类细胞形态特点见参考文献^[9]。

1.2.8 胚胎移植

将镜检状态良好的 2 细胞胚胎移入提前平衡好的 M2 培养基中,漂洗 3 次后可用于移植。受体小鼠麻醉后将 40 枚胚胎采用输卵管移植方法移入双侧输卵管中。移植完成后注意保温及术后照料,具体移植方法见参考文献^[9]。

1.2.9 体外受精条件的优化

影响小鼠体外受精因素很多,本实验主要对以下影响因素进行优化:A:不同采卵时间对体外受精效果的影响。B:不同精子密度对体外受精效果的影响。C:不同精子获能时间对体外受精效果的影响。D:在获能液及受精液加入还原型谷胱甘肽对体外受精的影响。探索提高 I 型干扰素受体缺失小鼠体外受精方法。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,对所得数据进行单因素方差分析,定量数据以平均值±标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示。组间比较采用 *t* 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两种 I 型干扰素受体缺失雄鼠精子参数分析

由表 1 可见,两种 I 型干扰素受体缺失小鼠与背景品系雄鼠精子数量差异无显著性($P > 0.05$),

而两种 I 型干扰素受体缺失小鼠精子活力低于背景品系雄鼠,差异具有显著性($P < 0.05$)。两种 I 型干扰素受体缺失小鼠间,精子活力差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 两种 I 型干扰素受体缺失小鼠体外受精率分析

由表 2 可见,IFN- α R^{-/-}和 IFN- α/β R^{-/-}小鼠体外平均受精率分别为(43.37 ± 1.90)%和(34.41 ± 3.18)%,背景品系 C57BL/6 小鼠体外平均受精率为(77.09 ± 0.67)%,两种 I 型干扰素受体缺失小鼠与背景品系小鼠平均体外受精率差异具有显著性($P < 0.05$)。同时,干扰素 α 受体缺失小鼠体外受精率高于干扰素 α 、 β 受体双缺失小鼠体外受精率,两者差异具有显著性($P < 0.05$)。

2.3 移植产仔率分析

将 2 细胞胚胎定数移植受体小鼠双侧输卵管,对小鼠产仔数、平均产仔率、离乳数及平均成活率进行统计。由表 3 可见,IFN- α R^{-/-}、IFN- α/β R^{-/-}及 C57BL/6 小鼠的平均产仔率分别为(20.83 ± 1.44)%、(19.17 ± 1.44)%及(20.83 ± 1.44)%,不同品系小鼠组间平均产仔率差异无显著性($P > 0.05$)。IFN- α R^{-/-}组和 IFN- α/β R^{-/-}组出生的仔鼠在离乳前均死亡 1 只,C57BL/6 组仔鼠全部成活,均顺利离乳。不同实验组间平均成活率差异无显著性($P > 0.05$)。

2.4 配子杂交实验分析

将两种干扰素受体缺失小鼠雌雄配子分别与背景野生型小鼠雄雌配子进行体外受精,对卵母细胞数、2 细胞胚胎数、未受精卵数及异常卵数进行记录并计算平均受精率。由表 4 可见,IFN- α R^{-/-}雌性小鼠卵细胞与背景野生型 C57BL/6 雄性小鼠精子体外受精,平均受精率为(41.20 ± 1.18)%,IFN- α R^{-/-}雄性小鼠精子与背景野生型 C57BL/6 雌性小鼠卵细胞体外受精,平均受精率为(50.30 ± 1.08)%,两者差异具有显著性($P < 0.05$)。IFN- α/β R^{-/-}雌性小鼠卵细胞与背景野生型 C57BL/6 雄性小鼠精子体外受精,平均受精率为(33.29 ± 2.44)%,IFN- α/β R^{-/-}雄性小鼠精子与背景野生型 C57BL/6 雌性小鼠卵细胞体外受精,平均受精率为(42.82 ± 0.35)%,两者差异具有显著性($P < 0.05$)。

2.5 体外受精条件优化结果分析

2.5.1 不同采卵时间对体外受精效果的影响

雌性小鼠注射 HCG 后,不同时间点收集卵子,

由表 5 可见, IFN- α R^{-/-} 小鼠注射 HCG 后 15 h 收集卵细胞体外受精, 受精效果最好, 受精率显著高于其他时间点取卵的受精率 ($P < 0.05$)。由表 6 可见, IFN- α/β R^{-/-} 小鼠注射 HCG 后 13 h 和 15 h 收集卵细胞体外受精, 受精率差异不显著 ($P > 0.05$), 受精率显著高于 11 h 和 17 h 取卵的受精率 ($P < 0.05$)。

2.5.2 不同精子密度对体外受精效果的影响

将不同密度小鼠精子体外受精, 由表 7 及表 8 可见, 两种 I 型干扰素受体缺失小鼠体外受精中, 精子浓度为 $0.5 \sim 1 \times 10^6/\text{mL}$ 受精效果最好, 显著高于其余两个精子浓度组 ($P < 0.05$), 精子浓度过低或过高均不利于体外受精。

表 1 两种 I 型干扰素受体缺失小鼠精子参数 ($n=3$)

Table 1 Sperm parameters of two type I interferon receptor-deficient mice ($n=3$)

品系 Strain	平均精子数 Average sperm count ($\times 10^7$)	向前运动精子数 Forward movement sperm ($\times 10^7$)	非向前运动精子数 Non-forward movement sperm ($\times 10^7$)	精子活力 (%) Sperm activity rate (%)
IFN- α R ^{-/-}	(2.67 $\pm$ 0.31)	(1.34 $\pm$ 0.12)	(1.33 $\pm$ 0.23)	(47.40 $\pm$ 6.12) ^b
IFN- α/β R ^{-/-}	(2.53 $\pm$ 0.31)	(1.13 $\pm$ 0.12)	(1.40 $\pm$ 0.20)	(44.82 $\pm$ 1.74) ^b
C57BL/6	(2.80 $\pm$ 0.35)	(1.80 $\pm$ 0.31)	(1.00 $\pm$ 0.12)	(64.42 $\pm$ 4.19) ^a

注: 同一列中数字后字母不同者差异具有显著性 ($P < 0.05$)。(下表同)

Note. Pairwise comparison, the differences are significant ($P < 0.05$). (The same in the following Tables)

表 2 两种 I 型干扰素受体缺失小鼠体外受精情况 ($n=15$)

Table 2 IVF results of two types I interferon receptor-deficient mice ($n=15$)

品系 Strain	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 (%)
IFN- α R ^{-/-}	514	223	210	81	(43.37 $\pm$ 1.90) ^b
IFN- α/β R ^{-/-}	452	155	203	94	(34.41 $\pm$ 3.18) ^c
C57BL/6	506	390	64	52	(77.09 $\pm$ 0.67) ^a

表 3 移植产仔率与成活率情况 ($n=3$)

Table 3 Transplant birth rate and survival rate ($n=3$)

品系 Strain	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 (%)
IFN- α R ^{-/-}	120	24	(20.83 $\pm$ 1.44) ^{ns}	23	(96.30 $\pm$ 6.41) ^{ns}
IFN- α/β R ^{-/-}	120	23	(19.17 $\pm$ 1.44) ^{ns}	22	(95.83 $\pm$ 7.22) ^{ns}
C57BL/6	120	25	(20.83 $\pm$ 1.44) ^{ns}	25	(100.00 $\pm$ 0.00) ^{ns}

注: 同一列中数字上标“ns”者差异无显著性。

Note: There is no significant difference between the numbers with the superscript “ns” in the same column.

表 4 两种 I 型干扰素受体缺失小鼠与背景野生型小鼠配子杂交实验情况

Table 4 Hybridization test of two types I interferon receptor-deficient mice and background wild-type mice

品系 Strain	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 (%)
IFN- α R ^{-/-} (♀) $\times$ C57BL/6 (♂)	459	189	180	90	(41.20 $\pm$ 1.18) [*]
IFN- α R ^{-/-} (♂) $\times$ C57BL/6 (♀)	505	254	160	91	(50.30 $\pm$ 1.08) [*]
IFN- α/β R ^{-/-} (♀) $\times$ C57BL/6 (♂)	448	149	196	103	(33.29 $\pm$ 2.44) ^{Δ}
IFN- α/β R ^{-/-} (♂) $\times$ C57BL/6 (♀)	502	215	188	99	(42.82 $\pm$ 0.35) ^{Δ}

注: 同一列中数字上标相同者差异具有显著性 ($P < 0.05$)

Note. Pairwise comparison, the differences are significant ($P < 0.05$)

2.5.3 不同获能时间对体外受精效果的影响

将不同获能时间的精子与卵细胞体外受精, 由表 9 及表 10 可见, 两种 I 型干扰素受体缺失小鼠精子获能 1 h 平均受精率最高, 显著高于其他获能时间组 ($P < 0.05$), 获能时间延长至 2 h 时, 受精率明显降低。

2.5.4 获能液及受精液中加入还原型谷胱甘肽对体外受精的影响

将精子获能液及受精液中添加 1 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 由表 11 及表 12 可见, 两种 I 型干扰素受体缺失小鼠平均体外受精率与不添加还原型谷胱甘肽比较, 均获得显著提高 ($P < 0.05$)。

表 5 不同采卵时间对 IFN- α R^{-/-} 小鼠体外受精的影响Table 5 Effects of different oocyte collection time on *in vitro* fertilization of IFN- α R^{-/-} mice

采卵时间(h) Oocyte collection time(h)	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	平均受精率(%) Average fertilization rate(%)
11	500	194	(38.82 ± 0.68) ^c
13	499	208	(41.66 ± 1.19) ^b
15	514	223	(43.37 ± 1.90) ^a
17	519	207	(39.87 ± 0.73) ^c

表 6 不同采卵时间对 IFN- α / β R^{-/-} 小鼠体外受精的影响Table 6 Effects of different oocyte collection time on *in vitro* fertilization of IFN- α / β R^{-/-} mice

采卵时间(h) Oocyte collection time(h)	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	平均受精率(%) Average fertilization rate(%)
11	451	136	(30.19 ± 1.12) ^b
13	441	151	(34.29 ± 2.07) ^a
15	452	155	(34.41 ± 3.18) ^a
17	447	133	(29.77 ± 1.45) ^b

表 7 不同精子浓度对 IFN- α R^{-/-} 小鼠体外受精的影响Table 7 Effects of different sperm concentrations on *in vitro* fertilization of IFN- α R^{-/-} mice

精子浓度(/mL) Sperm concentration (/mL)	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	平均受精率(%) Average fertilization rate(%)
1 ~ 3 × 10 ⁵	544	121	(22.22 ± 1.63) ^c
0.5 ~ 1 × 10 ⁶	514	223	(43.37 ± 1.90) ^a
1 ~ 3 × 10 ⁶	532	171	(32.20 ± 1.87) ^b

表 8 不同精子浓度对 IFN- α / β R^{-/-} 小鼠体外受精的影响Table 8 Effects of different sperm concentrations on *in vitro* fertilization of IFN- α / β R^{-/-} mice

精子浓度(/mL) Sperm concentration (/mL)	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	平均受精率(%) Average fertilization rate(%)
1 ~ 3 × 10 ⁵	467	66	(14.13 ± 1.36) ^c
0.5 ~ 1 × 10 ⁶	452	155	(34.41 ± 3.18) ^a
1 ~ 3 × 10 ⁶	487	140	(28.77 ± 2.34) ^b

表 9 不同获能时间对 IFN- α R^{-/-} 小鼠体外受精的影响Table 9 Effects of different capacitation time on *in vitro* fertilization of IFN- α R^{-/-} mice

获能时间(h) Capacitation time(h)	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	平均受精率(%) Average fertilization rate(%)
0.5	514	223	(43.37 ± 1.90) ^b
1	534	296	(55.40 ± 2.48) ^a
2	537	207	(38.56 ± 1.25) ^c

表 10 不同获能时间对 IFN- α / β R^{-/-} 小鼠体外受精的影响Table 10 Effects of different capacitation time on *in vitro* fertilization of IFN- α / β R^{-/-} mice

获能时间(h) Capacitation time(h)	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	平均受精率(%) Average fertilization rate(%)
0.5	452	155	(34.41 ± 3.18) ^b
1	472	217	(45.93 ± 1.16) ^a
2	471	161	(34.18 ± 1.46) ^b

表 11 添加还原型谷胱甘肽对 IFN- α R^{-/-} 小鼠体外受精的影响Table 11 Effects of adding GSH on *in vitro* fertilization of IFN- α R^{-/-} mice

是否添加还原型 GSH Add reduced GSH	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	平均受精率 (%) Average fertilization rate (%)
是 Yes	529	339	(64.11 ± 1.19) ^a
否 No	514	223	(43.37 ± 1.90) ^b

表 12 添加还原型谷胱甘肽对 IFN- α/β R^{-/-} 小鼠体外受精的影响Table 12 Effects of adding GSH on *in vitro* fertilization of IFN- α/β R^{-/-} mice

是否添加还原型 GSH Add reduced GSH	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	平均受精率 (%) Average fertilization rate (%)
是 Yes	491	231	(47.05 ± 1.13) ^a
否 No	452	155	(34.41 ± 3.18) ^b

3 讨论

I 型干扰素受体缺失小鼠作为一种免疫缺陷动物,通过血液学分析,4 ~ 12 周龄的 I 型干扰素受体缺失小鼠与正常背景野生型小鼠唯一的异常是末梢血中成熟型单核细胞及嗜中性细胞增加 2 ~ 3 倍,细胞表面 IgM 稍有减弱^[10],是多种病毒的易感模式动物,目前对其的研究主要集中在通过感染病毒后的机体各项指标的测定,从而确定感染性动物模型的构建是否成功,为后续病毒致病机理、抗病毒药物筛选等研究提供动物模型支持。由于 I 型干扰素受体缺失小鼠产仔数量偏低,为探索原因,笔者通过体外受精-胚胎移植及配子杂交试验初步探索干扰素受体缺失对体外受精造成的影响,并通过单一变量法对体外受精条件进行优化,为后续深入研究提供数据支持。

对两种 I 型干扰素受体缺失小鼠 IFN- α R^{-/-} 和 IFN- α/β R^{-/-} 及背景野生型小鼠 C57BL/6 精子参数比较发现,两种 I 型干扰素受体缺失小鼠在精子数量上与背景品系小鼠并无显著性差异 ($P > 0.05$),但精子活力显著低于背景品系小鼠 ($P < 0.05$)。体外受精-胚胎移植发现,两种 I 型干扰素受体缺失小鼠平均体外受精率与背景野生型小鼠比较有显著差异 ($P < 0.05$);同时,干扰素 α 受体单缺失小鼠平均体外受精率高于干扰素 α/β 受体双缺失小鼠,两者比较有显著差异 ($P < 0.05$) (见表 2)。由此初步推断, I 型干扰素受体缺失导致小鼠体外受精能力明显降低,并且降低程度随受体缺失数量增加而增加。将体外受精获得的 2 细胞胚胎定数移植入受体输卵管,均得到了较理想的产仔量, I 型干扰素受体缺失小鼠与背景野生型小鼠无明显差异 (见表 3)。

为研究 I 型干扰素受体缺失小鼠的卵细胞和精子分别对体外受精的影响,笔者设计了配子杂交试

验,将 IFN- α R^{-/-} 及 IFN- α/β R^{-/-} 小鼠卵细胞和精子分别与背景野生型小鼠精子和卵细胞进行杂交体外受精,记录卵母细胞数、2 细胞胚胎数、未受精卵数及异常卵数,并计算平均受精率。分析可知,两种 I 型干扰素受体缺失小鼠精子与背景野生型小鼠卵细胞体外受精平均受精率 (50.30 ± 1.08)% 和 (42.82 ± 0.35)% 和相应品系小鼠卵细胞与背景野生型小鼠精子体外平均受精率 (41.20 ± 1.18)% 和 (33.29 ± 2.44)% 均低于背景野生型体外受精率 (77.09 ± 0.67)%,推断 I 型干扰素受体缺失对小鼠精子和卵细胞均产生了影响,导致受精率降低。同时,两种 I 型干扰素受体缺失小鼠精子与背景野生型小鼠卵细胞体外受精率均高于相应品系小鼠卵细胞与背景野生型小鼠体外受精率,说明 I 型干扰素受体缺失对卵细胞在体外受精中的影响更为明显。当 I 型干扰素与受体结合后,将引发级联性的信号放大过程,信号传递到细胞核,对一系列干扰素刺激基因的表达进行调控,主要涉及的信号通路包括 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 通路^[11]。研究发现在动物繁殖的不同阶段均有 MAPK 信号通路的参与,对动物生产实践中的繁殖调控具有一定作用,主要体现在对于精子的发生、睾丸的发育及卵母细胞的发育产生影响^[12]。推测 I 型干扰素受体缺失,使细胞内 MAPK 通路受阻,从而导致小鼠生殖功能障碍,相关具体机制仍需进一步研究。同时, I 型干扰素受体缺失将直接影响动物免疫功能,是否能够间接导致其繁殖性能下降亦需要后续探索。

影响小鼠体外受精因素很多,本试验通过改变影响体外受精的因素,如注射 HCG 后的取卵时间、精子浓度、精子获能时间及改变精子获能液和受精液成分,探索提高体外受精效率的方法。通过改变注射 HCG 后取卵时间或调整体外受精精子浓度,并

未使两种 I 型干扰素受体缺失小鼠体外受精率获得提升。适当调整精子获能时间,当延长获能时间为 1 h 时,发现两种 I 型干扰素受体缺失小鼠体外受精率与常规方法相比,具有显著提高($P < 0.05$)。本试验以本实验以 Takeo 等^[13]前期研究为依据,将常规精子获能液及受精液中加入 1 mmol/L 还原型 GSH,结果发现,加入 GSH 后,两种 I 型干扰素受体缺失小鼠体外受精率与常规获能液及受精液比较均获得显著提高($P < 0.05$)。

本研究显示 I 型干扰素受体缺失可导致该两种品系小鼠体外受精率降低,同时,对卵细胞的影响较精子更为显著,通过延长精子获能时间或在精子获能液及受精液中加入 GSH,能够显著提高体外受精效果。笔者后续将对 I 型干扰素受体缺失对小鼠体外受精造成的影响以及繁殖策略进行深入研究,并对相应影响机制进行进一步探索。

参 考 文 献(References)

- [1] 孙亚萍,王英明,乔守怡. 干扰素及其最新研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2006, 22(7): 676-679
Sun YP, Wang YM, Qiao SY. The latest research progress of interferon [J]. Chin J Immunol, 2006, 22(7): 676-679
- [2] 吴文煜,韩梅芳. 干扰素信号通路对病毒性肝炎抗病毒疗效的影响 [J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(3): 261-263.
Wu WY, Han MF. Impact of interferon signal tunnel on antiviral efficacy of patients with viral hepatitis [J]. J Prac Hepatol, 2016, 19(3): 261-263
- [3] Muller U, Steinhoff U, Reis L, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense [J]. Science, 1994, 264(5167): 1918-1921.
- [4] Dowall SD, Graham VA, Emma R, et al. Lineage-dependent differences in the disease progression of Zika virus infection in type-I interferon receptor knockout (A129) mic [J]. PLoS Neglect Trop D, 2017, 11(7): e0005704.
- [5] Dowall SD, Graham VA, Rayner E, et al. Protective effects of a Modified Vaccinia Ankara-based vaccine candidate against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever virus require both cellular and humoral responses [J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0156637.
- [6] Li XF, Deng YQ, Zhao H, et al. Noninvasive bioluminescence imaging of dengue virus infection in the brain of A129 mice [J]. Appl Microbiol Biot, 2013, 97(10): 4589-4596.
- [7] Zhao FF, Xu YF, Lavillette D, et al. Negligible contribution of M2634V substitution to ZIKV pathogenesis in AG6 mice revealed by a bacterial promoter activity reduced infectious clone [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10491.
- [8] Liu J, Liu Y, Nie K, et al. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes [J]. Nat Microbiol, 2016, 1(9): 16087-16087.
- [9] 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 Sini, 2020, 28(1): 96-99.
- [10] 李晓敏. 干扰素受体在抗病毒感染中的意义 [J]. 国际免疫学杂志, 1996, 19(2): 100-102.
Li XM. Significance of interferon receptors in antiviral infection [J]. Int J Immunol, 1996, 19(2): 100-102.
- [11] 李军,曾芸. 病毒诱导 I 型干扰素产生的机制 [J]. 生命的化学, 2006, 26(5): 395-398.
Li J, Zeng Y. Mechanism of virus induced interferon type I production [J]. Chem Life, 2006, 26(5): 395-398.
- [12] 郭永娟,郑亚琳,张彩霞,等. MAPK 信号通路在动物繁殖中的研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(5): 1268-1273.
Guo YJ, Zheng YL, Zhang CX, et al. Research progress of MAPK signal pathway in animal reproduction [J]. Chin Anim Husband Vet Med, 2015, 42(5): 1268-1273.
- [13] 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.

[收稿日期] 2019-10-12