

· 基础医学 ·

## 一种高效的成年小鼠同步诱导多细胞胚胎及受精卵的双排卵实验方案

赖娅娜<sup>1</sup>, 曾文滔<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京医科大学医药实验动物中心, <sup>2</sup>南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] **目的:**探讨二次超排方案对提高成年小鼠超排效果和胚胎发育潜能的可行性。**方法:**首先比较常规双排卵方案与自然排卵、随机超排实验方案所获总卵数的差异,然后在初步研究外源孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)对自然受孕一次胚胎发育影响的基础上,进一步对常规双排卵实验方案进行优化。**结果:**优化后的双排卵实验组单只鼠平均总卵数高达61.7枚,与自然排卵组、随机超排组和常规双排卵组差异显著,提升了成年小鼠的超排卵效果。**结论:**优化后的超数双排卵方案为同步大量获得小鼠多细胞胚胎及受精卵提供了一种新的、高效的技术方法。

[关键词] 小鼠受精卵供体;生殖激素;超数排卵

[中图分类号] R321.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)02-213-05

doi:10.7655/NYDXBNS20230209

## An efficient double ovulation protocol for simultaneous induction of multicellular embryos and fertilized eggs in adult mice

LAI Yana<sup>1</sup>, ZENG Wentao<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Animal Core Facility of Nanjing Medical University, <sup>2</sup>State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the feasibility of secondary superovulation scheme in improving the superovulation effect and embryonic development potential of adult mice. **Methods:** Firstly, the difference of total egg number among the conventional double ovulation scheme, the natural ovulation and random superovulation experimental schemes was compared, and then the conventional double ovulation experimental scheme was further optimized on the basis of the preliminary study of the effect of exogenous pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on the development of naturally conceived embryos. **Results:** The average total number of eggs in the optimized double ovulation experimental group was 61.7, which was significantly different from the natural ovulation group, the random superovulation group and the conventional double ovulation group, and improved the superovulation effect of adult mice. **Conclusion:** The optimized double superovulation scheme provides a new and efficient technical method for obtaining a large number of mouse multi-cell embryos and fertilized eggs.

[Key words] mouse zygote donors; reproductive hormone; superovulation

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(02):213-217]

小鼠作为一种重要的实验动物,广泛运用于探索生命奥秘、研究疾病机制及防治等生命科学各领域。以超数排卵技术为基础的辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)对获得足够

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BE2019730)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wentaozeng@njmu.edu.cn

数量受精卵和可用胚胎,充分利用有限的动物资源,缩短世代间隔,提高胚胎工程技术在生物领域中的应用效率具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。国内外针对小鼠超数排卵研究较多,经典的小鼠超排方案是注射孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)促卵泡发育48 h后注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG)促排卵<sup>[4-5]</sup>。

幼鼠因超排效果稳定、卵子数量多,被广泛用于早期胚胎的研究以及基因工程编辑模型鼠的建立<sup>[6-7]</sup>。相对而言,成年鼠超排受内源性激素的影响较大,相关研究资料报道较少,但对于卵细胞质量要求比较高的科学研究和在拯救濒危品系时操作的对象为成年小鼠<sup>[8]</sup>。成年雌鼠交配后10~12 h阴道口有白色的阴道栓,交配后小鼠的黄体变为功能性黄体,小鼠的发情周期停止。有研究报道,雌鼠在发情周期的不同阶段注射PMSG均可以诱导超数排卵<sup>[9]</sup>,长期从事生物净化的过程中发现妊娠期小鼠也可通过超排获得受精卵。ICR小鼠是用Swiss小鼠群以多产为目标进行选育的小鼠品系,经美国癌症研究所分送各国饲养实验。本研究以ICR野生型雌鼠为实验对象,在其自然受孕当日再进行超排操作,探讨同时获得卵细胞和多细胞胚胎(一次自然受孕的受精卵在超排期间继续发育的胚胎)的可行性,然后对二次募集成熟卵细胞的超排方案进行优化,深挖成年小鼠超排效果和胚胎发育的潜能,为充分利用小鼠资源从超排卵中获得最大收益提供了高效、可行的实验方案。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

ICR雌鼠为10~15周,ICR雄鼠为10~20周有生育能力且停配至少1周,均来源于上海斯莱克实验动物有限公司,按照SFP级标准饲养于南京医科大学医药实验动物中心屏障系统,符合南京医科大学实验动物伦理管理规范(伦理号:IACUC-2205051)。自由饮水,室温(22±1)℃,光照12 h/d,(7:00~19:00)。

超净工作台(苏州苏净公司),CO<sub>2</sub>恒温培养箱(Thermo公司,美国),体视显微镜(SZX10-3151,Olympus公司,日本)、35 mm及60 mm培养皿(Corning公司,美国);注射用PMSG、注射用HCG(北京启维益成科技有限公司),石蜡油(货号M8410,Sigma公司,美国),M2培养液(货号M7167,Sigma公司,美国),透明质酸酶(货号H4272,Sigma公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试验分组和激素注射剂量

10~15周龄的C57BL/6J雌鼠种群内随机挑选,按照采取的超排方案分为4个试验组。自然排卵对照组、随机超排对照组、常规双排卵实验组、优化双排卵实验组。所有超排组小鼠按照每只7.5 U PMSG促卵泡发育,7.5 U HCG促排卵。实验组小鼠入组条件:适

龄发情鼠与有交配经验并停配1周的雄鼠合笼,次日8:00检阴道栓,见交配栓的小鼠入选实验组。

#### 1.2.2 小鼠超排方案

自然排卵对照组:自然受孕,不进行激素超排。在16:00挑选发情鼠,16:30与有交配经验并停配1周的雄鼠1:1合笼,次日检栓。

随机超排对照组:第1天16:00注射PMSG,第3天16:00(间隔48 h)注射HCG促排卵,16:30与有交配经验并停配1周的雄鼠1:1合笼,次日检栓。

常规双排卵实验组:见栓当天(第1天)16:00注射PMSG,第3天16:00(间隔48 h)注射HCG,第4天9:00取胚胎(图1A)。

优化双排卵实验组:见栓当天(第1天)9:00注射PMSG,第2天17:00(间隔32 h)注射HCG后再次与停配1周的雄鼠1:1合笼,第3天8:00检栓,见栓鼠和未见栓鼠分开取卵(图1C)。

#### 1.2.3 卵母细胞和早期胚胎的收集

用颈椎脱臼法处死小鼠,剖宫依次取输卵管和子宫,将输卵管置于覆盖石蜡油的M2培养液(提前置于37℃,5% CO<sub>2</sub>培养箱预温)内,用眼科镊撕破壶腹部释放卵细胞团,经0.1%透明质酸酶消化颗粒细胞,洗涤3次后统计所有多细胞的胚胎以及受精、未受精、死亡和异常卵母细胞的数量。采用1 mL注射器抽取37℃预热的M2冲洗子宫,检查输卵管内是否存留正常发育的胚胎,记录囊胚数、退化卵数和取到囊胚的小鼠只数。受精率=见栓鼠受精卵数/见栓鼠排卵总数×100%。

#### 1.2.4 外源PMSG对自然受孕一次胚胎发育影响的观察

自然交配见栓鼠于9:00注射PMSG,分别在8、24、32、48 h后对输卵管胚胎数量进行观察,记录各时间点自然排卵胚胎数量的变化(图1B),并于见栓24、48、80 h分别对2细胞、8细胞及囊胚期不同阶段胚胎发育进行观察记录。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS 25.0进行数据的统计学分析,各实验组间排卵计数资料均采用单因素方差分析进行检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各实验组排卵数量的比较

自然排卵对照组、随机超排对照组、常规双排卵实验组共入组22只小鼠,各组小鼠排卵的情况详见表1。自然排卵对照组和随机超排对照组的平均

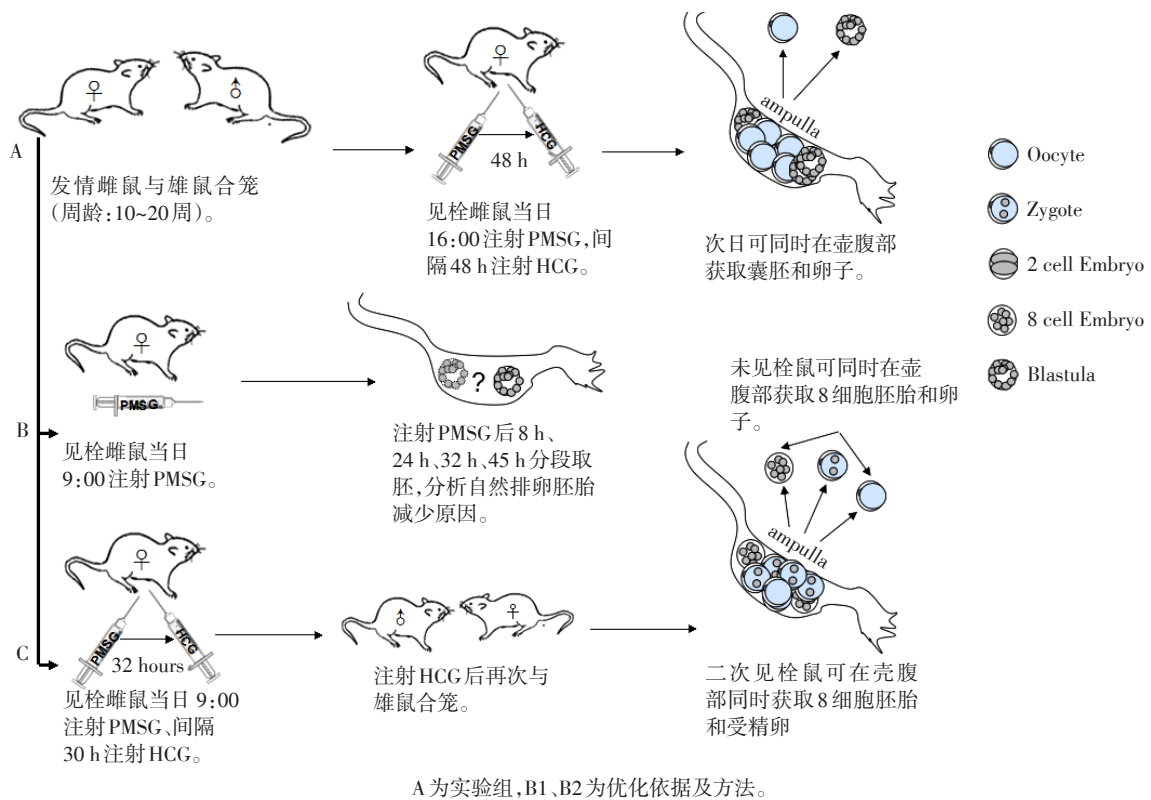


图1 双排卵实验流程图

Figure 1 Flow chart of double ovulation experiment

排卵数分别是 15.1 和 16.6 枚, 两者没有统计学差异。常规双排卵实验组 8 只小鼠共获得二次排卵 205 枚, 平均 25.6 枚/只, 相对其他两个对照组 16.6 枚/只和 15.1 枚/只差异显著 ( $P < 0.01$ )。双排卵实验组的 8 只鼠中有 4 只取出自然发育的囊胚期胚胎 16 枚, 所有胚胎均在壶腹部, 子宫及近子宫输卵管无任何形态卵子或胚胎。

## 2.2 外源 PMSG 对自然受孕一次胚胎发育的影响

自然交配见栓的小鼠在注射 PMSG 后于各时间节点观察自然排卵胚胎的发育情况。自然排卵胚胎在小鼠注射 PMSG 后的 8、24、34 h 依然存在于壶腹部中。在 48 h 随着壶腹部消失, 仅部分小鼠在原壶腹部位置可以检测到少量胚胎, 而对输卵管和子宫冲洗未发现胚胎存在(图 2)。

对照组(没有进行外源 PMSG 注射)与 PMSG 处

理组在 2 细胞至 8 细胞期发育时期一致, 囊胚期发育形态差距较大。在 80 h 对照组处于 3 级扩张期晚期, 部分囊胚达到 4 级孵化期, 囊胚形态扁长, 实验组处于 3 级扩张期, 形态圆润立体, 透明带外无孵化点(图 3)。

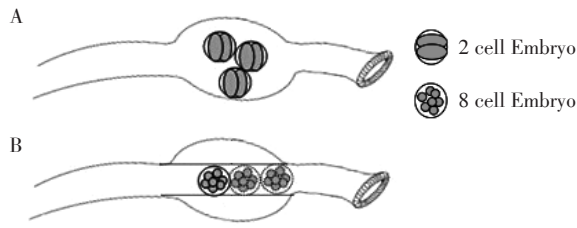
## 2.3 双排卵实验方案的优化

优化双排卵实验组 18 只鼠入组, 其中 16 只鼠取到 187 枚由一次排卵发育而来的 8 细胞胚胎, 平均每只鼠收集到一次排卵胚胎 11.7 枚。所有优化双排实验组小鼠均成功诱导二次排卵, 共获得 M II 期卵子及受精卵 838 枚、退化胚 85 枚, 两次排卵总共获得 1 110 枚卵子和多细胞胚胎, 平均每只 61.7 枚, 显著高于常规双排卵实验组(31.8 枚),  $P < 0.01$  (表 2)。异常胚为萎缩、碎裂和溶解 3 种状态, 具体归为未受精、死亡或异常卵母细胞未做分类和评

表 1 超排方案对小鼠排卵效果的影响

Table 1 Effect of superovulation scheme on ovulation in mice

组别	入组小鼠总数	总卵数(一次卵+二次卵+异常胚)	均只排卵数	自然见栓一次排卵			异常胚总数/均只数	超排二次排卵		
				一次胚检出小鼠只数	一次胚胎/排卵数	均只见胚/排卵数		二次排卵检出只数	二次排卵总数	均只排卵数
常规双排卵实验组	8	254	31.8	4	16	4.0	33/4.1	8	205	25.6
随机超排对照组	7	116	16.6	7	116	16.6	—	—	—	—
自然排卵对照组	7	106	15.1	7	106	15.1	—	—	—	—



A:注射PMSG 8~32 h胚胎依然在壶腹部中部,并没有靠近子宫端;B:32~48 h壶腹部消失,PMSG使输卵管的运动方向依然由子宫像壶腹部运送精子的状态。少量胚胎停留在原壶腹部位置,近子宫端输卵管和子宫内均无胚胎。

图2 注射PMSG后胚胎发育情况

Figure 2 Embryo development after PMSG injection

价。优化双排卵实验组总共检出异常胚85枚(无法区分畸形碎裂胚实际来源于第一次排卵还是第二次排卵,故仅统计异常胚总数),平均每只小鼠检测到4.7枚,与实验组无统计学差异。优化双排卵实验组在注射HCG后与雄鼠二次合笼,其中15只(15/18)二次见栓,清洗输卵管共收集735枚卵母细胞和受精卵母细胞,其中受精卵509枚,受精率为69.2%。值得一提的是,有3只鼠二次排卵数超过80枚,排卵最多的1只雌鼠取胚数更是高达109枚(含二次卵母细胞93枚、一次胚胎16枚)且壶腹部

异常膨大(图4)。

### 3 讨论

超排卵技术有助于基因工程小鼠的产生及减少动物的使用量,在基因工程小鼠构建、生物净化、大量扩繁、濒危动物品系保存等领域发挥重要的作用。小鼠诱导超排技术流程相对成熟,成年小鼠自然排卵仅8~15枚,而常规超排卵技术也仅能得到15~40枚卵子,因此提高雌鼠超排效果和胚胎发育潜能一直是辅助生殖技术所追求的目标。尽管幼年小鼠供体受激素刺激会产生更多的卵母细胞,但对于卵细胞质量要求比较高的科学研究以及在拯救濒危珍贵小鼠模型时使用更多的是成年小鼠。本研究以成年小鼠为研究对象进行受精后激素诱导超排,在见栓和激素诱导后,平均每只鼠可二次排卵25.6枚,相对于对照组小鼠差异显著( $P < 0.01$ )。结果说明,双排卵实验方案能够显著提高成年雌鼠的超排效果。

自然受孕的小鼠受精卵在适宜的条件下,会继续发育成为多细胞胚胎。但8只常规双排卵实验组小鼠体内仅有4只收集到总数16枚正常发育的多细胞

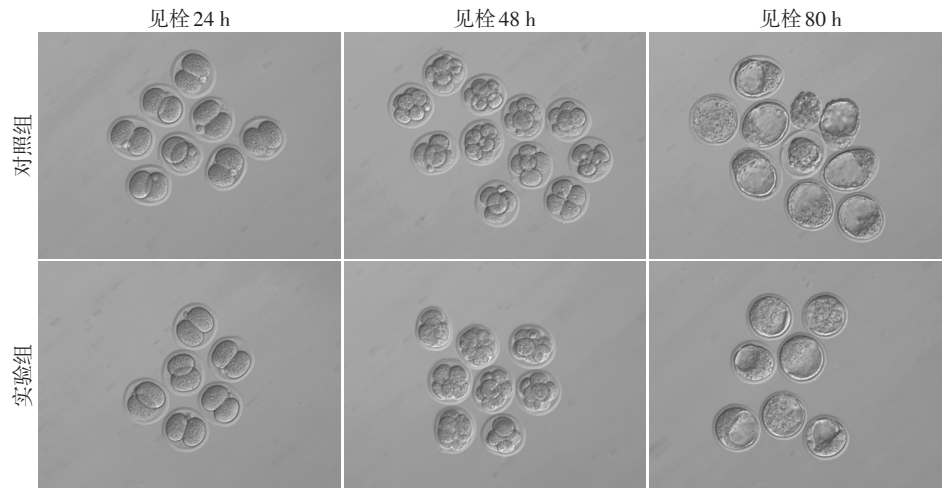


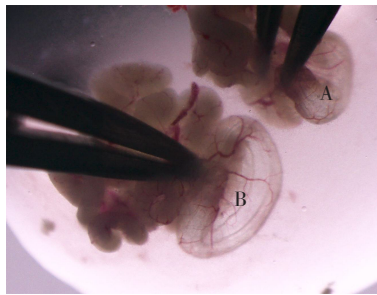
图3 不同时期对照组与实验组胚胎发育比较(x25)

Figure 3 Comparison of embryonic development between control group and experimental group at different stages (x25)

表2 双排卵优化实验方案与常规双排卵实验方案排卵数据对比

Table 2 Data comparison between the optimized double ovulation experimental scheme and the conventional double ovulation experimental scheme (n)

组别	入组小鼠总数	总卵数(一次+异常胚)	均只排卵数	自然见栓一次排卵		异常胚总数	超排二次排卵		二次排卵受精率					
				一次检出胚胎数	均只排卵数		超排二次排均只卵总数	二次排均只卵总数	二次见栓数	排卵数	受精率(%)			
优化双排卵实验组	18	1110	61.7	187	16	11.7	85	18	838	46.6	15	735	509	69.2%
常规双排卵实验组	8	254	31.8	16	4	4.0	33	8	205	25.6	—	—	—	—



A:正常超排输卵管壶腹部;B:双排卵第二次排卵的壶腹部明显大于正常超排壶腹部。

图4 正常超排和双排卵第二次排卵的壶腹部对比

Figure 4 Comparison of ampulla between conventional superovulation and second double ovulation

胚胎(平均2枚),说明在雌鼠接受外源激素注射后,小鼠体内自然受孕产生的受精卵在胚胎发育过程中受到严重的抑制。为了更大程度上提高雌鼠超排效果,明确一次胚胎(自然产生的受精卵)减少的原因,本研究小组观察了自然交配见栓鼠在注射PMSG不同时间节点输卵管内胚胎数量的变化。结果发现,在PMSG注射后伴随32~48 h壶腹部消失,仅极少量胚胎停留在原壶腹部位置,近子宫端输卵管和子宫内均无胚胎。本项研究表明,HCG的注射时间与壶腹部的状态对自然受孕一次胚胎的发育有密切关系。

通过改良的二次超排方案,将超排时间改为见栓当日9:00注射PMSG,并将HCG的注射时间提前到次日16:00注射(与PMSG注射间隔缩短至31 h)。调整后,优化双排实验组平均每只鼠收集到自然排卵发育而来的8细胞胚胎11.7枚,显著多于常规双排卵实验组(2枚)。第二次超排18只鼠均有排卵,共收集到卵子838枚,平均每只鼠产生46.6枚卵子。18只鼠前后两次排卵合计收集到1110枚卵子和胚胎(平均每只高达61.7枚),数量分别较自然排卵组(平均15.1枚)、随机超排组(平均16.6枚)和常规双排卵组(平均31.8枚)提高了307.23%、272.12%和94.23%。其中有1只鼠二次排卵总数高达109枚,是同龄雌鼠自然排卵的7~13倍。在不同时期对胚胎观察发现,对照组与实验组一次排卵胚胎在8细胞前发育同步(图3),在囊胚期实验组处于3级扩张期要晚于对照组,实验组胚胎受PMSG的影响一直停留在输卵管,发育差距可能是受到不同微环境的影响。为了评价二次超排募集到的卵子是否具有受精能力,本研究对优化后的实验组采用自然交配

来获得受精卵,有15只二次见栓鼠共收集到卵子735枚中有509枚为受精卵,69.2%的受精率与Luo等<sup>[10]</sup>的正常小鼠超排受精率结果相近,说明二次超排卵子为正常可受精的卵子。本研究提供的优化双排卵实验方案增加了小鼠排卵的数量,在很大程度上减少了使用的小鼠数量,对动物福利和科研成本节约具有深远意义。

#### [参考文献]

- [1] MOCHIDA K. Development of assisted reproductive technologies in small animal species for their efficient preservation and production [J]. *J Reprod Dev*, 2020, 66(4): 299-306
- [2] HANSEN P J. Implications of assisted reproductive technologies for pregnancy outcomes in mammals [J]. *Annu Rev Anim Biosci*, 2020, 8:395-413
- [3] HEYKANTS M, SCHERB H, MICHEL G, et al. Influence of polygamous versus monogamous mating on embryo production in four different strains of mice after superovulatory treatment [J]. *Theriogenology*, 2018, 114:85-94
- [4] 白雪,刘露,胡月,等. Zfp212基因敲除小鼠模型的建立和雌性生殖表型研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2022, 42(3):309-316
- [5] 尚彦星,周蒙,鄂裘恺,等. 神经损伤诱导蛋白2在卵巢发育中的作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(4):477-482
- [6] LI R, LI E, KAMILI G, et al. Effect of resveratrol on superovulation in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 146: 112565
- [7] TAKEO T, MUKUNOKI A, NAKAGATA N. Ovulation of juvenile, mature, and aged female C57BL/6 mice following coadministration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin [J]. *Theriogenology*, 2019, 135:1-6
- [8] LUCIANO A M, FRANCIOSI F, BARROS R G, et al. The variable success of in vitro maturation: can we do better? [J]. *Anim Reprod*, 2018, 15(Suppl 1):727-736
- [9] AVERINA O A, VYSOKIKH M Y, PERMYAKOV O A, et al. Simple recommendations for improving efficiency in generating genome-edited mice [J]. *Acta Naturae*, 2020, 12(1):42-50
- [10] LUO C, ZUÑIGA J, EDISON E, et al. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2011, 50(4):471-478

[收稿日期] 2022-10-29

(本文编辑:唐震)