

基于体外鼠胚实验评估辅助生殖实验室质量^{*}

特日格勒 爱伦高娃 格格恒 李秦宇琦 韩颖 马成

(赤峰学院附属医院生殖中心, 内蒙古 赤峰 024000)

【摘要】 目的 通过监测体外鼠胚胎培养实验中卵裂率和囊胚率, 评估本院新建的生殖胚胎实验室是否符合人类胚胎体外培养要求。**方法** 采用 SPF 级昆明系小鼠行体内和体外受精实验, 雌鼠通过腹腔注射 PMSG 10 U/只, 48 h 后腹腔注射 hCG 10 U/只进行促排卵, 促排卵后, 体外受精组经手术获得精子和卵子行体外受精培养; 体内受精组在雌鼠促排卵后, 将雌鼠和雄鼠合笼饲养过夜, 第二天清晨处死可见阴栓的雌鼠, 手术获取受精原核胚进行培养, 观察两组胚胎培养过程中的发育情况。**结果** 体外受精实验进行 20 个周期, 共获卵 946 枚, 受精率、囊胚率分别为 $(79.02 \pm 4.05)\%$ 、 $(80.12 \pm 5.27)\%$ 。体内受精实验进行 14 个周期, 共获卵 618 枚, 其受精率、囊胚率分别为 $(80.65 \pm 4.22)\%$ 、 $(81.35 \pm 3.06)\%$, 两组间受精率和囊胚率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 通过监测体外鼠胚胎培养实验中卵裂率和囊胚率评估我院生殖胚胎实验室环境, 结果表明符合各项指标质控标准。

【关键词】 体外鼠胚胎培养; 卵裂率; 囊胚率; 质量控制; 辅助生殖

【中图分类号】 Q813.7 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.09.010

Analysis of the effect of cleavage rate and blastocyst rate on the evaluation of reproductive embryo laboratory quality in vitro mouse embryo culture experiment

Tezegler, Ellen Govar, Gegehen, LI QIN Yuqi, HAN Ying, MA Cheng

(Reproductive Center, The Affiliated Hospital of Chifeng University, Chifeng 024000, Inner Mongolia, China)

【Abstract】 Objective By monitoring the cleavage rate and blastocyst rate in vitro mouse embryo culture experiments, we evaluate whether the new reproductive embryo laboratory of our hospital meets the requirements of in vitro human embryo culture. **Methods** In vitro and in vivo fertilization experiments were performed on SPF Kunming mice. Female mice were intraperitoneally injected with 10 U PMSG per mouse. 48 h later, intraperitoneal injection of hCG 10 U/ mouse was performed for ovulation induction. After ovulation induction, in vitro fertilization group underwent surgery to obtain sperm and egg for in vitro fertilization culture. In the in vivo fertilization group, after ovulation induction in female mice, female mice and male mice were caged together overnight, and the female mice with pubic supposit were killed in the morning of the next day, and the fertilized prokaryotic embryos were obtained by operation for culture, and the development of embryos in the two groups during the culture was observed. **Results** A total of 946 eggs were obtained after 20 cycles of in vitro fertilization. The fertilization rate and blastocyst rate were $(79.02 \pm 4.05)\%$ and $(80.12 \pm 5.27)\%$, respectively. In vivo fertilization experiment was carried out for 14 cycles, and 618 eggs were obtained. The fertilization rate and blastocyst rate of the two groups were $(80.65 \pm 4.22)\%$ and $(81.35 \pm 3.06)\%$. There was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Through monitoring the cleavage rate and blastocyst rate of mouse embryo culture in vitro to evaluate the laboratory environment of reproductive embryos in our hospital, the results show that it meets the quality control standards of all indicators.

【Key words】 In vitro mouse embryo culture; Cleavage rate; Blastocyst rate; The quality control; Assisted reproductive technology

基金项目: 内蒙古自然科学基金(2020LH03017)

引用本文: 特日格勒, 爱伦高娃, 格格恒, 等. 基于体外鼠胚实验评估辅助生殖实验室质量[J]. 西部医学, 2022, 34(9): 1302-1305. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.09.010

体外受精-胚胎移植(In vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET)是一项用于治疗不孕不育的医学前沿技术, 这种人类辅助生殖技术虽然已被广泛应用于不孕症的治疗, 但受孕率仍不尽理想^[1]。IVF

实验室就像一座“加工厂”，直接影响 IVF 结局，胚胎质量是判断辅助生殖技术成功与否的重要因素，体外培养的胚胎失去母体的自身保护，在没有任何保护屏障的情况下，对生存的微环境相当敏感，极有可能影响其生长发育潜能^[2]。因此，在辅助生殖前，需要严格把控 IVF 实验室质量，全方位检测各个环节，建立稳定、可靠的培养体系，以确保为胚胎的生长发育提供相对稳定的场所。目前，鼠胚实验是监测 IVF 实验室各种培养液、实验耗材及实验设备质量的常用生物方法^[3]，本生殖中心于 2019 年初完成胚胎实验室建立，并对其进行为期一个月的“热处理”^[4]，之后进行雌鼠体内外受精和胚胎培养实验评估 IVF 实验室质量，旨在为临床 IVF-ET 提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级健康雌性昆明系小鼠 30 只 6 周龄，体重 20~22 g，SPF 级健康雄性昆明系小鼠 8 只 8 周龄，体重 30~33 g，购自北京北科华夏生物医药科技有限公司，使用许可证号 SYXK(京)2017-0044，室温 20~25℃，相对湿度 40%~60%，12 h 昼夜交替。本研究获得医院动物伦理委员会审核批准。

1.2 试剂和仪器 孕马血清促性腺激素(Pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)和绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin, hCG)购自杭州动物药品厂；卵裂液(CSC)、人输卵管液(Human tubal fluid, HTF)以及 HEPES 缓冲的人输卵管液(modified human tubal fluid, mHTF)购自欧文公司；人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)、洗精受精液、卵裂胚培养液 G1 和囊胚培养液 G2 购自瑞典 Vitrolife 公司；超净工作台购自美国 Thermo 公司；解剖显微镜购自日本 Olympus 公司；CO₂ 恒温培养箱购自美国 Bio-Rad 公司；培养皿、试管等购自美国 Falcon 公司。

1.3 小鼠超排卵^[5] 用生理盐水将 PMSG 和 hCG 配成 100 U/mL 的溶液存于-20℃待用，培养液在使用前一天配制后置于 37℃、6%CO₂ 培养箱中过夜平衡。雌鼠腹腔注射 PMSG 10 U/只，48 h 后腹腔注射 hCG 10 U/只。

1.4 体外受精实验

1.4.1 采集卵母细胞^[6] 14 只雌性小鼠腹腔注射

hCG 16 h 后，颈椎脱臼法处死，无菌环境下取出输卵管，用胚胎处理液和 10% HSA 清洗 3 次，在体视镜下用 1 mL 注射器刺破输卵管膨大部位，使卵子团释放，收集后转移至洗精受精液中，置于 37℃、6% CO₂ 培养箱培养。

1.4.2 采集精子并获能 颈椎脱臼法处死雄鼠，无菌环境下取出附睾尾，用胚胎处理液和 10% HSA 清洗 3 次，用镊子轻轻取出精子，收集后转移至含有洗精受精液的试管中，置于 37℃、6% CO₂ 培养箱中获能 30~60 min。

1.4.3 体外受精 收集获能后的精子于一支新的试管中，取适量精子悬液加入至含有卵子团的洗精受精液中，置于培养箱中培养，4 h 后，将卵子转移到另一新的含有洗精受精液的培养皿中继续培养。

1.5 体内受精实验 剩余的 16 只雌性小鼠腹腔注射 hCG 后，将雌雄小鼠按照 2:1 的比例合笼，第二天清晨将出现阴栓的雌鼠颈椎脱臼法处死，无菌环境下取出输卵管，胚胎处理液和 10% HSA 清洗 3 次，在体视镜下用 1 mL 注射器刺破输卵管膨大部位，使合子释放，收集后转移至洗精受精液中，置于 37℃、6% CO₂ 培养箱培养。

1.6 原核及卵裂期胚胎观察与培养 培养第 0 天下午显微镜下观察原核合子形态；第一天上午观察 2 细胞期胚胎，之后将 2 细胞期胚胎转移至过夜平衡后的卵裂培养液中，置于 37℃、6% CO₂ 培养箱中继续培养；第二天上午观察 4 细胞期胚胎，下午观察 8 细胞期胚胎，并将 8 细胞期胚胎转移至过夜平衡后的囊胚培养液中，置于 37℃、6% CO₂ 培养箱中继续培养；第三天上午观察桑葚期胚胎；第四天观察早期囊胚；第五天上午观察囊胚。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计学软件分析数据，两组间比较采用 χ^2 检验， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体外受精结果 本次实验共进行 20 个体外受精周期实验，共获卵 946 枚，原核受精胚 751 个，受精率 79.39%，2 细胞数 697 枚，卵裂率 92.80%，2 细胞形成囊胚 558 个，囊胚形成率 80.06%，见表 1。

表 1 体外受精结果
Table 1 In vitro fertilization results

周期	获卵数(个)	受精卵数(个)	受精率($\times 10^{-2}$)	2 细胞数(个)	卵裂率($\times 10^{-2}$)	早期囊胚数(个)	2 细胞囊胚形成率($\times 10^{-2}$)
8	422	336	79.62	310	92.26	244	78.71
8	416	333	80.05	312	93.70	253	81.09
4	108	82	75.93	75	91.46	61	81.33

2.2 体内受精结果 共进行了 14 个体内受精周期实验,共获卵 618 枚,原核受精胚 499 个,受精率 80.74%,2 细胞数 453 个,卵裂率 90.78%,2 细胞形成囊胚 368 个,囊胚形成率 81.24%,见表 2。

表 2 体内受精实验结果
Table 2 In vivo fertilization results

周期	获卵数(个)	受精卵数(个)	受精率($\times 10^{-2}$)	2 细胞数(个)	卵裂率($\times 10^{-2}$)	早期囊胚数(个)	2 细胞囊胚形成率($\times 10^{-2}$)
5	266	208	78.20	196	94.23	158	80.61
5	272	229	84.19	202	88.21	165	81.68
4	80	62	77.50	55	88.70	45	81.82

2.3 两组小鼠胚胎体外培养结果 体内受精组和体外受精组相比,受精率、卵裂率和囊胚形成率组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

2.4 小鼠胚胎形态观察 显微镜下观察不同发育阶段的小鼠胚胎,见图 1。

表 3 两组小鼠胚胎体外培养结果比较[$n(\times 10^{-2})$]

Table 3 Comparison of in vitro culture results between the two groups of mouse embryos

组别	受精率	卵裂率	囊胚形成率
体外受精组	751/946(79.39)	697/751(92.81)	558/697(80.06)
体内受精组	499/618(80.74)	453/499(90.78)	368/453(81.24)
χ^2	0.429	1.675	0.243
P	0.512	0.196	0.622

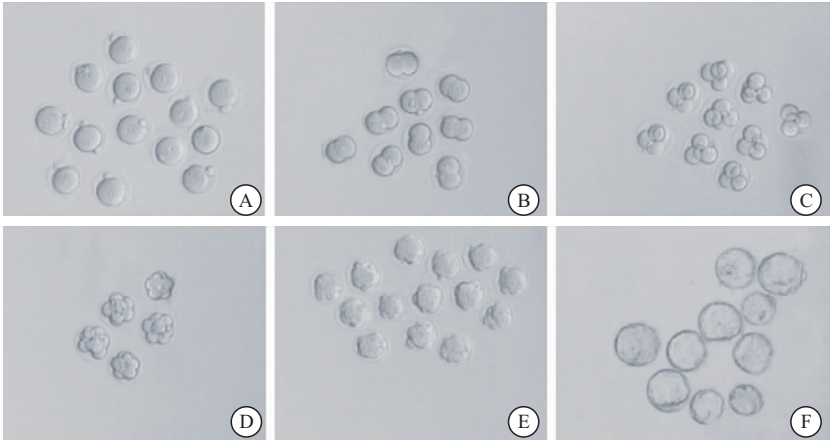


图 1 体外受精后不同发育阶段的小鼠胚胎(10 $\times$)

Figure 1 Mouse embryos at different stages of development after in vitro fertilization

注: A. 合子;B. 2 细胞胚胎;C. 4 细胞胚胎;D. 8 细胞胚胎;E. 桑葚胚;F. 囊胚

3 讨论

人类辅助生殖技术是治疗不孕不育的重要手段,其主要包括卵母细胞体外受精、胚胎早期体外培养和优质胚胎移植等过程^[7]。但在 IVF-ET 过程中多个环节会影响胚胎质量,导致妊娠率降低,例如超促排卵、采卵或采精过程以及配子或胚胎培养过程中所使用的器皿和试剂等因素^[8]。因此,实验室质量是辅助生殖技术成功的重要保障。由于小鼠胚胎的生长发育经历接近于人胚胎,因此鼠胚实验成为检测人早期胚胎体外生长发育环境的最佳模式,不仅能反应胚胎的发育潜能,还能检测实验室质量及实验人员的操作技能^[9-11]。本研究通过检测体外鼠胚胎培养实验中的卵裂率和囊胚率,从而对本院建立的生殖胚胎实验室质量进行评估。

胚胎的生长发育受多种因素的影响,如温度、湿

度、CO₂ 浓度以及离子浓度等都会影响受精卵和早期胚胎生存发育^[12-13]。研究表明,注射 hCG 后随受精时间的延长,优质胚胎率呈增高趋势^[14]。生长激素预处理可明显提高卵巢低反应患者体外受精的结局^[15]。本研究结果表明,体内获得的原核受精胚发育状况良好,体外获得的原核受精胚同样可发育至囊胚阶段,受精率、卵裂率和 2 细胞囊胚形成率两组间比较,差异均无统计学意义。虽然各指标偏低,但均符合人类辅助生殖实验室质控标准。本实验结果说明本院辅助生殖实验室的培养体系和技术员的操作水平已合格。通过对本研究中各周期的受精率和囊胚率分析,仍发现实验中多种因素影响胚胎形成和发育过程。从体内受精实验结果和体外受精实验结果数据分析发现,不同周期受精率、卵裂率和囊胚形成率波动较大,相对不稳定,我们猜测可能是由于实验过程中,频

繁开关培养箱,造成培养箱内温度变化大,且 CO_2 浓度在一定时间段内过低造成。研究表明,温度降低不利于胚胎生存^[16]。另一方面,可能由于技术人员操作技术不娴熟,操作过程中培养皿离开温度稳定、饱和湿度的培养箱时间过长,造成胚胎渗透压改变,而渗透压对维持细胞的稳定生长至关重要^[17]。此外,长时间的观察使胚胎体外曝光时间过长,而研究发现,光照影响胚胎的生长发育^[18],通过不断发现问题,解决问题,同时实验操作人员技术不断提高,受精率、卵裂率和囊胚形成率也在不断升高,但是不同周龄的小鼠或处于不同发情期的小鼠、卵泡液中微生物的存在、体质量等因素都是影响胚胎发育的关键,周龄较长则会造成精子和卵子质量下降,影响实验结果^[19-21]。因此,在实验过程中严格把控实验条件和实验过程中所用到的试剂和仪器设置参数。

4 结论

鼠胚实验中多种因素影响受精率和囊胚形成率,因此不仅要严格控制影响胚胎生长发育的微环境,还要不断提高操作人员的技术水平,在鼠胚实验中任何细节都不容忽视,为建立具有合格的实验室质量控制体系和质量保障系统提供一定的参考价值。但胚胎质量受多种因素影响,如实验小鼠的品系、小鼠质量以及小鼠周龄等,总之,辅助生殖实验室必须建立完整系统的质量控制体系,以确保能够安全稳定运行。

【参考文献】

- [1] YU X, ZHAO Y, HUANG S, *et al.* Correlation of blastocyst quality and pregnancy outcome during freeze-thaw cycle[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2021, 31(3): 278-281.
- [2] ZHANG Q, ZHANG J, ZHOU X, *et al.* Association of number and quality of embryos transferred with early pregnancy loss in infertile women at an advanced age undergoing frozen-thawed embryo transfer[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2021, 41(7): 1050-1055.
- [3] ALJAHDAI A, AIRINA R K R I, VELAZQUEZ M A, *et al.* The duration of embryo culture after mouse IVF differentially affects cardiovascular and metabolic health in male offspring[J]. Hum Reprod, 2020, 35(11): 2497-2514.
- [4] 李媛. 人类辅助生殖实验技术[M]. 科学出版社, 2008, 48-49.
- [5] 赵利, 姚鹏. 鼠胚胎培养在辅助生殖实验室质量控制中的应用研究[J]. 中国医学工程, 2020, 28(1): 8-10.
- [6] 李秋华, 祝晓丽, 魏思达, 等. PM_{2.5}暴露对小鼠体外受精及胚胎发育的影响[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(20): 3372-3375.
- [7] PENG S, SUN H, ZHENG J, *et al.* Risk factors of pregnancy failure in elderly infertility patients undergoing human assisted reproductive technology[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(6): 7306-7311.
- [8] ARIAN S, RUBIN J, CHAKCHOUK I, *et al.* Reproductive outcomes from maternal loss of Nlrp2 are not improved by IVF or embryo transfer consistent with oocyte-specific defect[J]. Reprod Sci, 2021, 28(7): 1850-1865.
- [9] 屈春风, 莫凤明, 蒋军松, 等. 利用鼠胚实验对新建人类辅助生殖实验室进行质量控制分析[J]. 生殖医学杂志, 2018, 27(5): 482-485.
- [10] 柳岚, 吴兵平, 李志敏, 等. 新建辅助生殖实验室的鼠胚培养质控及鼠卵显微注射分析[J]. 生殖医学杂志, 2020, 29(1): 98-102.
- [11] 彭涛, 刘永刚, 李琴. 体外培养鼠胚实验对 IVF 实验室质控的评估[J]. 大理大学学报, 2020, 5(4): 34-38.
- [12] GELO N, KIRINEC G, BALDANI D P, *et al.* Influence of human embryo cultivation in a classic CO_2 incubator with 20% oxygen versus benchtop incubator with 5% oxygen on live births: the randomized prospective trial[J]. Zygote, 2019, 27(3): 131-136.
- [13] CHI H J, PARK J S, YOO C S, *et al.* Effect of evaporation-induced osmotic changes in culture media in a dry-type incubator on clinical outcomes in in vitro fertilization-embryo transfer[J]. Clin Exp Reprod Med, 2020, 47(4): 284-292.
- [14] 蔡慧中, 刁英. 体外受精-胚胎移植中注射人绒毛膜促性腺激素后不同时间受精对早期胚胎发育及临床结局的影响[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2017, 37(5): 399-402.
- [15] 葛小花, 王建业, 张雅梦, 等. 生长激素预处理在卵巢低反应患者体外受精治疗中的应用[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(8): 1291-1295.
- [16] MACKLON N, DELIKARI O, LAMANNA G, *et al.* Embryos are exposed to a significant drop in temperature during the embryo transfer procedure: a pilot[J]. Reprod Biomed Online, 2021, 43(2): 193-195.
- [17] 陈巨星, 孙祥明, 张元兴. 乳酸对海水鱼类细胞系 CHSE 生长和代谢的影响[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2005(3): 290-295.
- [18] FARLAND L V, CORREIA K F B, MISSMER S A, *et al.* Seasonal variation, temperature, day length, and IVF outcomes from fresh cycle [J]. J Assist Reprod Genet, 2020, 37(10): 2427-2433.
- [19] USMAN S F, SHUAIBU I R, DUROJAIYE K, *et al.* The presence of microorganisms in follicular fluid and its effect on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) treatment cycles[J]. PLoS One, 2021, 16(2): e0246644.
- [20] MA M, ZHANG W, ZHANG J, *et al.* Effect of paternal body mass index on neonatal outcomes of singletons after frozen-thawed embryo transfer cycles: analysis of 7, 908 singleton newborns[J]. Fertil Steril, 2020, 113(6): 1215-1223.
- [21] MCPHERSON N O, VINCENT A D, PACELLA-INCE L, *et al.* Comparison of in vitro fertilisation/intracytoplasmic sperm injection on live birth rates in couples with non-male factor infertility and advanced maternal age[J]. J Assist Reprod Genet, 2021, 38(3): 669-678.

(收稿日期: 2021-08-30; 修回日期: 2022-03-29; 编辑: 张翰林)