

# PMSG 和 hCG 诱导长爪沙鼠超数排卵方案的优化

唐 旺, 李长龙, 杜小燕, 陈振文

(首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

**【摘要】** 目的 优化 PMSG 和 hCG 诱导长爪沙鼠超数排卵方案。方法 通过对动物周龄、激素剂量和间隔时间等系统研究, 优化出用于长爪沙鼠超数排卵的最佳动物周龄、激素组合剂量和间隔时间。结果 对 6 周龄长爪沙鼠使用 10 单位激素计量及间隔 70 h 可以获得最佳超数排卵效果。在合笼 16 h 后 80% 的动物得以排卵, 获卵数为  $32.6 \pm 3.0$  枚/只, 其中  $24.8 \pm 5.4$  枚/只可以发育至二细胞胚胎。结论 本研究获得了利用 PMSG 和 hCG 诱导长爪沙鼠超数排卵的优化方案, 为长爪沙鼠胚胎生物技术研究奠定了基础。

**【关键词】** 长爪沙鼠; 超数排卵; 孕马血清促性腺激素; 人绒毛膜促性腺激素

**【中图分类号】** **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0059-05

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856.2015.007.012

## The optimization scheme of Mongolian gerbils superovulation induced by PMSG and hCG

TANG Wang, LI Chang-long, DU Xiao-yan, CHEN Zhen-wen

(School of Basic Medical Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**【Abstract】 Objective** To optimize the scheme of Mongolian gerbil superovulation. **Methods** Based on the analysis of the animal-week-old, the dose and time interval of hormone, we got the best animal-week-old, dose and time interval of hormone for Mongolian gerbil superovulation. **Results** The 6 week old female Mongolian gerbils which injected of 10 IU PMSG and followed by 10 IU hCG in 70 hours later could get the best superovulation. We collected eggs at 16 hour after mate with male gerbils. The ovum pick-up rate reached 80%, the number of oocytes were  $32.6 \pm 3.0$ , the number of the fertilized egg developed to 2-cell are  $24.8 \pm 5.4$ . **Conclusions** This study summarizes the optimization scheme of Mongolian gerbil superovulation induced by PMSG and hCG and it supported the foundation for Mongolian gerbils embryo biotechnology.

**【Key words】** Mongolian gerbil; Superovulation; PMSG; hCG

长爪沙鼠是源自中国的实验动物, 随着对长爪沙鼠实验动物化研究的不断深入, 长爪沙鼠的应用领域不断扩大, 培育的长爪沙鼠模型品种也逐渐增多<sup>[1-9]</sup>。为了保存这些珍贵的动物资源, 人们除了加强活体保种外, 为了确保种子安全, 还要开展动物胚胎冷冻保存<sup>[10]</sup>。这就需要更多的长爪沙鼠胚

胎来源, 超速排卵为解决胚胎来源提供了最有效途径<sup>[11]</sup>。近年来随着应用长爪沙鼠开展更为深入的研究, 制作转基因和基因敲除动物已成为迫切需求, 应用长爪沙鼠开展特殊生物学特性的发育生物学研究也备受重视。但这些研究无不以长爪沙鼠胚胎为实验材料, 因此超数排卵就成了关键技

**【基金项目】** 国家科技支撑计划项目(2015BAI09B01; 2011BAI15B01-32); 北京市自然科学基金重点课题(7141002)。

**【作者简介】** 唐旺(1989-), 男, 硕士生, 研究方向: 实验动物遗传学, E-mail: 522636161@qq.com。

**【通讯作者】** 陈振文(1959-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 实验动物遗传育种, E-mail: czwenteam@163.com。

术。虽然超数排卵在小鼠、金黄地鼠、大鼠等多种实验动物已成为成熟技术,但在长爪沙鼠尚存在许多疑虑,国内外对长爪沙鼠超数排卵方案研究中鲜有较为稳定高效的报道,在使用动物的周龄、激素剂量及间隔时间等也存在较大差异<sup>[12-14]</sup>,极大地阻碍了应用长爪沙鼠开展科学研究的进程和保种规划的实施。本研究拟利用首都医科大学饲养的长爪沙鼠通过对动物周龄、激素剂量及间隔时间的对比研究,优化出高效稳定的长爪沙鼠超数排卵方案。通过本研究不但可为长爪沙鼠资源冷冻保存奠定基础,而且将加速应用长爪沙鼠开展科学研究的进展,扩大其在生命科学研究及生物医药产业中的应用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

雌性普通级长爪沙鼠 200 只,10 周龄以下,体重 30~60 g;雄性普通级长爪沙鼠 50 只,10~12 周龄,体重 60~80 g。所有长爪沙鼠均来自首都医科大学实验动物部,饲养于控制湿度的普通环境中【SYXK(京)2013-0005】。

### 1.2 试剂和仪器

孕马血清促性腺激素(PMSG)购自宁波第二激素厂(批号:140324),人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波第二激素厂(批号:140322),M2 培养基(M7167, Sigma),M16 培养液(M7292, Sigma),透明质酸酶(H1136, Sigma),生理盐水,75%酒精等。35 mm 无菌塑料培养皿,体视显微镜,倒置显微镜,CO<sub>2</sub> 培养箱,超净工作台,灭菌手术器械(眼科剪、眼科镊、显微剪和显微镊等)。

### 1.3 实验设计

#### 1.3.1 动物周龄的优化

随机挑选 5、6、7、8、9、10 周龄的长爪沙鼠,每组 20 只,注射剂量为 10 IU PMSG/hCG。激素注射间隔时间 50 h,激素注射方式为腹腔注射,注射 hCG 后合笼,次日检查阴道栓并取卵。

#### 1.3.2 激素剂量的优化

随机将 12 只 6 周龄雌性沙鼠分为 4 组,每组 3 只,剂量分别为 5、10、20、30 IU 的 PMSG/hCG。激素注射间隔时间 50 h,激素注射方式为腹腔注射,注射 hCG 后合笼,次日检查阴道栓并取卵。

#### 1.3.3 激素间隔时间的优化

随机将 60 只 6 周龄雌性沙鼠分为 3 组,每组 20

只,剂量为 10 IU 的 PMSG/hCG。激素注射间隔时间分别为 50 h、70 h 和 90 h,激素注射方式为腹腔注射,注射 hCG 后合笼,次日检查阴道栓并取卵。

### 1.4 取卵步骤

注射 hCG 后并与雄鼠合笼 16~17 h 后,在漏底饲养笼下托盘上检查阴道栓脱落情况,并将超数排卵使用的雌性长爪沙鼠脱颈处死,俯卧喷洒 75% 酒精,打开背侧腹腔,分别取出两侧输卵管和卵巢置于盛有 M2 培养液液滴的培养皿中,在体视显微镜下,用显微镊撕开输卵管膨大的壶腹部,释出卵母细胞-卵丘细胞复合体,重复检查确保将所有卵母细胞取出。将卵母细胞-卵丘细胞复合体收集到含有 0.1% 透明质酸酶的 M2 液滴中,处理 3~5 min,移入 M2 液滴中,洗涤 3 次,在体视显微镜和倒置显微镜下观察,计算卵母细胞数;移入 M16 液滴中,放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中,37℃ 培养,次日统计二细胞胚胎数。

### 1.5 统计学分析

对于不同激素剂量、不同周龄以及不同激素间隔时间各组间的比较,采用单因素方差分析方法进行统计学分析, $P < 0.05$  的值在统计学上具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 动物周龄对超数排卵的影响

通过注射 10 IU 激素剂量,激素间隔时间为 50 h,对不同周龄(10 周龄及以下)长爪沙鼠进行超排,结果显示:5 及以下周龄长爪沙鼠没有检查到阴道栓,取卵数为 0;9~10 周龄动物获得平均 7.1~7.6 枚卵;6~8 周龄鼠的动物平均每只获得 14.6~17.5 枚卵。统计结果表明,6~8 周龄动物超数排卵数量显著高于与 9~10 周龄动物( $P < 0.05$ );6 周龄超数排卵率为 80%,明显高于其他周龄组(表 1)。

### 2.2 激素剂量对超数排卵的影响

激素剂量是超数排卵的重要影响因素。通过腹腔注射激素,激素间隔时间 50 h,对 6 周龄长爪沙鼠激素剂量优化,结果如表 2 所示,5 IU 激素剂量不能促进长爪沙鼠排卵,取卵数为 0;10~30 IU 激素剂量均能产生超数排卵效应,其中 10 IU 剂量组获得 55 枚卵,每只平均取卵数为 27.5 枚。5 IU 激素剂量组未检测到阴道栓,在输卵管也未发现排卵现象。10 IU 以上剂量组均有排卵现象,排卵数随着激素剂量的升高而降低。

**表 1** 不同周龄长爪沙鼠注射 10IU PMSG 和 hCG 间隔 50 h 超数排卵效果比较

**Tab. 1** Comparison of effects of different weeks old of Mongolian gerbils injected 10 IU PMSG and hCG at 50 hours intervals to superovulation

组别 Group	周龄(周) Weeks	使用鼠(只) Number of gerbils used	获胚胎鼠(只) Number of gerbils collected eggs	超数排卵率(%) Ovum pick-up rate	平均排卵数(枚) Average ovulation
1	10	20	9	45	7.6 ± 3.6 <sup>a</sup>
2	9	20	9	45	7.1 ± 3.7 <sup>a</sup>
3	8	20	10	50	14.6 ± 5.9 <sup>b</sup>
4	7	20	12	60	16.2 ± 6.3 <sup>b</sup>
5	6	20	16	80	17.5 ± 4.8 <sup>b</sup>
6	5	20	-	-	-

注: a、b 字母相同表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Values with same superscript letters show insignificant difference ( $P > 0.05$ ), those with different superscript letters show significant difference ( $P < 0.05$ ).

**表 2** 不同剂量 PMSG 和 hCG 注射间隔时间 50 h 6 周龄长爪沙鼠超数排卵效果比较

**Tab. 2** Comparison of effects of different dosages of PMSG and hCG injected at 50 hours intervals to superovulation in 6-weeks-old Mongolian gerbils

组别 Group	激素量(IU) Dosages	使用鼠(只) Number of gerbils used	获胚胎鼠(只) Number of gerbils collected eggs	平均排卵数(枚) Average ovulation
1	5	3	-	-
2	10	3	2	27.5 ± 2.8
3	20	3	2	22.5 ± 2.1
4	30	3	2	10.0 ± 7.1

**表 3** 不同间隔时间 10 IU PMSG 和 hCG 注射 6 周龄长爪沙鼠超数排卵情况比较

**Tab. 3** Comparison of effects of different time interval of 10 IU PMSG and hCG injected to superovulation in 6-week-old Mongolian gerbils

组别 Group	激素间隔 时间(小时) Time interval of hormone	使用鼠(只) Gerbils used	获胚胎鼠(只) Gerbils collected eggs	平均排 卵数(枚) Average ovulation	2-细胞(枚) 2-cell eggs	发育率(%) Developmental rate
1	50	20	16	17.5 ± 4.8	7.5 ± 1.7	43
2	70	20	16	32.6 ± 3.0*	24.8 ± 5.4*	76
3	90	20	8	3.0 ± 1.6	-	-

注: \* 表示 70 h 组与 50 h 组比较, 有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: \* Values with the groups of 50 hours and 70 hours show significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 激素给予间隔时间对超数排卵的影响

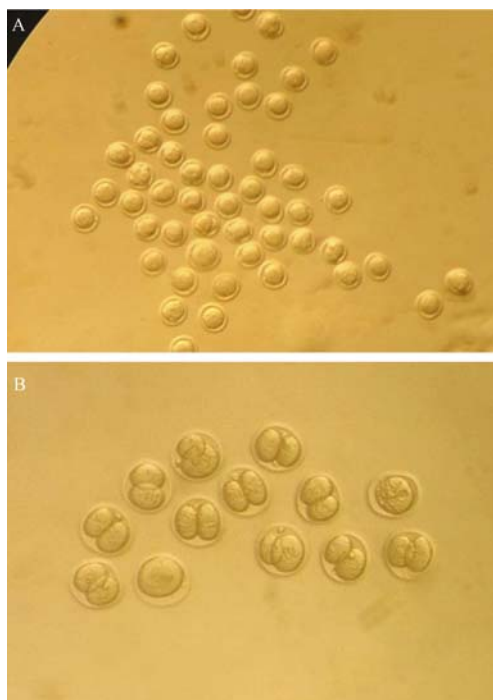
两种激素给予间隔时间对超数排卵有很大的影响。通过 10 IU 激素剂量, 对 6 周龄长爪沙鼠给予 2 种激素的间隔时间 50 h、70 h 和 90 h 观察超数排卵效果, 结果如表 3 所示, 90 h 未能达到超数排卵效果, 平均取卵数仅为 3 枚; 70 h 获得最佳的超数排卵效果, 平均取卵数为 32 枚(图 1 A), 发育至 2-细胞(图 1 B)也更多, 卵发育率由 43% 提高到 76%, 显著优于 50 h 和 70 h 组 ( $P < 0.05$ ), 图 1 显示取得的卵及其发育的 2-细胞。

### 3 讨论

排卵是由一系列极其复杂的生理过程累积而产生的结果, 影响因素诸多, 包括动物遗传特性、体

况、营养状态、年龄、发情周期、卵巢功能、季节、温度以及激素等<sup>[15]</sup>。野生和实验室培育的长爪沙鼠均为“一雌一雄”长期同居的繁殖方式, 一只死亡后另一只很难形成繁殖单元, 强行合笼繁殖则导致严重争斗致死<sup>[16-17]</sup>。长爪沙鼠的这种习性为后期配对增加了难点。为了克服这一问题, 我们将离乳(4 周)幼鼠雌雄分笼饲养, 并且雄鼠(8 周龄)单笼饲养, 待实验时, 挑选合适周龄, 并在注射激素后合笼, 该方法可有效减少长爪沙鼠之间争斗行为。

腹腔注射 PMSG/hCG 是一种有效地诱导长爪沙鼠超数排卵的方法。由于选择动物随机性, 固定的发情周期对激素的作用会产生一定影响。年轻动物发情周期正在建立, 机体自身分泌激素量少, 容易受外界激素影响, 此时注射激素可以降低动物



注:A:消化后的卵( $\times 6$ );B:受精卵发育至2-细胞( $\times 11.5$ )。

图1 采集的卵及发育的2-细胞胚胎

Note: A: The digested eggs( $\times 6$ );

B: The fertilized eggs developed to 2-cell embryos( $\times 11.5$ ).

Fig. 1 The collected eggs and the developed 2-cell embryos

自身激素对研究结果的影响。10 周龄以上的长爪沙鼠在诱导超数排卵时,由于体内激素影响,不仅排卵数目少(少于 10 枚),并且超数排卵极不稳定,超数排卵率也低于 40%,在增加激素量后也未见较好效果,故未统计在实验数据中。超排长爪沙鼠 9~10 周龄接近性成熟,发情周期趋于稳定,超数排卵受本身激素影响较大;5 周龄及以下的雌鼠其卵巢发育未成熟,卵巢不具备排卵的能力,而 6~8 周龄雌鼠具备较好的超数排卵条件<sup>[12, 18-19]</sup>,实验结果也表明该年龄段可获得良好的超数排卵效果,尤其在 6 周段,雌鼠超数排卵不仅排卵数目较高,而且超数排卵成功率(80%)极高。

超数排卵对 PMSG/hCG 的注射剂量有一定要求,已有的报道中长爪沙鼠超数排卵使用的激素剂量范围较大(10~40 IU)<sup>[12-14]</sup>,参考价值较低。一般认为激素剂量过低,不能引起机体对激素的反应,或者不能抵御自身发情周期所分泌的激素影响;而激素剂量过高,机体对激素负反馈调节效应增强,抑制机体对激素产生效应;10~20 IU 激素剂量能较好地克服自身发情周期影响,且不引起强烈的激素负反馈调节效应,能高效地诱导长爪沙鼠

超数排卵效果<sup>[12-14, 18-19]</sup>。本研究中优化了激素剂量,发现 10 IU PMSG/hCG 可以有效诱导 6~8 周龄长爪沙鼠超数排卵。如果实验过程中使用年龄和体重较大的动物,可适当增加激素剂量,以提高超数排卵效率<sup>[12, 14]</sup>。

激素给予间隔时间也是超数排卵的重要影响因素。长爪沙鼠发情周期为 4~6 d, PMSG/hCG 的注射间隔时间需要探讨。激素间隔时间过短, PMSG 促进卵泡发育尚未达到最高效应,超数排卵后收集的卵较少;激素注射时间过长, PMSG 效应减退,不能起到超数排卵效果<sup>[12-13]</sup>。本实验结果发现, PMSG/hCG 的最佳间隔时间为 70 h,同时胚胎发育率也提高至 76%。

本研究得到的长爪沙鼠高效稳定的超数排卵方案为:6 周龄雌鼠, PMSG/hCG 的剂量为 10IU,间隔时间为 70 h,注射激素后立即与雄鼠合笼,在 16~17 h 后取卵。本实验中,最多单只雌鼠能取得 57 枚卵,其中 56 枚见明显原核(即受精卵),发育至 2-细胞数占 90%。本研究的优化方案大大的提高了长爪沙鼠超数排卵效率,为长爪沙鼠资源保存和胚胎生物技术研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 聶嘉伍, 王国良, 任运智, 等. 长爪沙鼠生物净化的研究[J]. 中国比较医学杂志. 1993, 3(3, 4): 135-138.
- [2] 聂金荣, 刘金明, 叶亚玉. 长爪沙鼠的饲养管理与繁殖[J]. 上海实验动物与科学. 1989, 9(1): 20-22.
- [3] 黄继荣, 王炎, 李联涛. 长爪沙鼠生物学特性调查研究[J]. 宁夏农林科技. 2006, 6: 36-37.
- [4] 刘锋华, 郭红刚, 楼琦. 链脲佐菌素诱导长爪沙鼠 I 型糖尿病模型的实验研究[J]. 中国实验动物学报; 2010, 18(6): 489-494.
- [5] Honda S, Fujioka T, Tokieda M, et al. Cancer Res. Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils [J]. 1998, 58(19): 4255-9.
- [6] Du XY, Zhu XD, Dong G, et al. Characteristics of circle of Willis variations in the mongolian gerbil and a newly established ischemia-prone gerbil group[J]. ILAR J. 2011, 52(1): E1-7.
- [7] 李长龙, 郭红刚, 石巧娟, 等. 长爪沙鼠高胆固醇血症模型的建立与辛伐他汀的作用[J]. 中国比较医学杂志; 2010, 20(8): 44-49.
- [8] Cheal ML. The gerbil: unique model for research on aging [J]. Exp Aging Res. 1986, 1: 3-21.
- [9] 姚莘莘, 徐芳, 朱函坪, 等. 肾综合征出血热的 4 周龄长爪沙鼠模型[J]. 中国人兽共患病杂志. 2005, 1: 60-61.
- [10] 刘雅琳, 张益鸣. 动物胚胎冷冻保存技术研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯; 2006, (5): 12-13.

- [11] 章志国, 章孝荣. 动物超数排卵的影响因素及发展现状[J]. 安徽农业科学. 2003, 31(1): 41-43.
- [12] 郭红刚, 卢领群, 周生来, 等. 乙二醇玻璃化冷冻液二步法对长爪沙鼠 2-细胞胚胎的冷冻保存[J]. 实验动物科学. 2014, 31(4): 28-31.
- [13] 路静, 朱祥宇, 王超, 等. 周龄和激素水平对长爪沙鼠超数排卵效果的影响[J]. 中国比较医学杂志. 2012, 22(8): 15-17.
- [14] Kameyama Y, K Arai, Ishijima Y. Interval between PMSG Priming and hCG Injection in Superovulation of the Mongolian Gerbil[J]. J Mamm Ova Res. 2004, 21: 105-109.
- [15] 刘维俊, 高珊, 唐菲, 等. 小鼠超数排卵相关问题的探讨[J]. 黑龙江动物繁殖. 2011, 19(1): 1-9.
- [16] 朱景丽, 王靖宇, 李慧玲. 长爪沙鼠的生理及行为研究初探[J]. 辽东学院学报(自然科学版). 2007, 2: 73-76.
- [17] 聂金荣, 聂朝晖. 长爪沙鼠行为观察[J]. 上海实验动物科学. 1995, 3: 154-156.
- [18] 卢静, 乔欣, 石淑静, 等. 长爪沙鼠生长繁殖性能的研究[J]. 中国实验动物学报. 2004, 12(2): 123-126.
- [19] 刘寒英, 文端成, 戴丽军, 等. 长爪沙鼠生长与繁殖性能的主要指标测定[J]. 动物科学与动物医学. 2004, 21(12): 35-36.

〔修回日期〕2015-06-25