

周龄和激素水平对长爪沙鼠超数排卵效果的影响

路静¹, 朱祥宇², 王超¹, 王迎¹, 陈振文¹, 杜小燕¹

(1. 首都医科大学实验动物部, 北京 100069; 2. 北京大学医学部实验动物部, 北京 100191)

【摘要】 目的 探讨不同周龄和激素水平对长爪沙鼠超数排卵效果的影响, 以期确定长爪沙鼠最佳超排周龄和激素使用剂量。方法 腹腔注射 10 IU PMSG/HCG 对 4~18 周龄 8 个年龄段的雌性长爪沙鼠进行超数排卵, 末次注射 16~17 h 内对各组动物卵母细胞计数, 确定最佳超排周龄后, 对该年龄动物以 5、10、15 IU 3 个剂量水平腹腔注射 PMSG/HCG, 观察各组动物的卵母细胞计数差异。结果 与其它周龄组相比, 6 周龄组长爪沙鼠超数排卵后的卵母细胞数最多, 各组间有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 5、10、15 IU 等 3 个剂量组的超排效果也有一定的差异, 10 IU 组数量最高。结论 对长爪沙鼠而言, 采用 10 IU 激素注射和 6 周龄的动物进行超数排卵, 获得的卵母细胞数量最多而且超排效果稳定性。

【关键词】 长爪沙鼠; 周龄; 剂量; 超数排卵

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)08-0015-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.008.003

Effect of Week-Age and Hormonal Level on Superovulation in Mongolian Gerbils

LU Jing¹, ZHU Xiang-yu², WANG Chao¹, WANG Ying¹, CHEN Zhen-wen¹, DU Xiao-yan¹

(1. Department of Laboratory Animals, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Department of Laboratory Animals, Peking University Health Science Center, Beijing 100191)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of different week-age and the hormonal level on superovulation in Mongolian gerbils. **Methods** Eight groups of Mongolian gerbils at different age of 4 - 18 weeks were induced to superovulate by intraperitoneal injection of 10 IU PMSG/HCG, respectively. At 16 - 17 h after the last injection, the amounts of eggs of animals in different groups were counted and analyzed to determine the best week-age of superovulation. Superovulation was induced in the animals of best week-age by intraperitoneal injection of 5, 10, 15 IU PMSG/HCG to analyze the different amounts of eggs. **Results** Compared with other groups, the amount of eggs obtained in gerbils at age of 6 weeks is highest and there were significant differences among all groups ($P < 0.05$). The amounts of eggs obtained in groups of different PMSG/HCG doses were significantly different and that of the 10 IU group was highest. **Conclusion** The age of 6 weeks and the dose of 10 IU PMSG/HCG are the best ages and effective dose to induce superovulation in Mongolian gerbils.

【Key words】 Mongolian gerbil; Week age; Pregnant mare's serum gonadotrophin, PMSG; Human chorionic gonadotropin, HCG; Doses; Superovulation.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (No. 31071988) 和国家“十二五”科技支撑项目 (No. 2011BAI15B01)。

[作者简介] 路静, 助理实验师, 主要从事实验动物技术工作。

[通讯作者] 杜小燕, E-mail: duduyan@ccmu.edu.cn。

长爪沙鼠, 又称蒙古沙鼠 (*Meriones unguiculatus*, Mongolian gerbil), 属于哺乳纲, 啮齿目, 仓鼠科, 沙鼠亚科, 沙鼠属。由于其具有一些独特的解剖学、生理学和行为学特征, 是一种正在开发的, 具有广泛应用前景的“多功能”实验动物, 目前已广泛应用于脑缺血、营养代谢、寄生虫、药理学、胃癌等研究领域, 甚至在听觉、焦虑等研究领域也发挥了重要作用^[1-5]。但遗憾的是, 国内外对其生殖以及胚胎发育的研究均鲜有报道, 这极大地桎梏了长爪沙鼠的开发和利用。为了探讨长爪沙鼠稳定高效的超排方法, 获取数量较多及质量较高的长爪沙鼠的成熟卵母细胞, 本文从影响超数排卵最重要的两种因素年龄和激素剂量入手, 对长爪沙鼠的超数排卵效果进行研究, 为开展相关的胚胎研究提供前期基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级长爪沙鼠 40 只, 雌性, 体重 30~75 g, 来自首都医科大学实验动物部, 生产合格证号 SCXK(京)2000-0012, 饲养于控制温湿度的普通环境中。

1.2 试剂

PMSG(孕马血清促性腺激素), HCG(人绒毛膜促性腺激素)均购西美杰公司; 透明质酸酶购自美国 Sigma 公司, 生理盐水, M2 培养液, 75% 乙醇等。

1.3 器械

35 mm 塑料培养皿, 体视显微镜, 倒置显微镜, CO₂ 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)。

1.4 超数排卵实验过程

以年龄因素为变量的实验, 长爪沙鼠共分为 8 组, 分别为 4、6、8、10、12、14、16、18 周龄, 每组 4 只, 注射剂量为 10 IU PMSG/HCG。以剂量为变量的长爪沙鼠共分为 3 个组, 分别为 5、10 和 15 IU 的 PMSG/HCG。给长爪沙鼠腹腔注射 PMSG 后, 46~48 h 内再腹腔注射 HCG, 此后在 16~17 h 内将长爪沙鼠颈椎脱臼处死, 仰卧喷洒 75% 酒精, 打开腹腔, 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, 在双筒体视显微镜下, 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。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 1~2 次, 在体视显微镜和倒置显微

镜下观察, 计算卵母细胞数。

1.5 统计学分析

对于不同周龄以及不同激素剂量各组间的比较采用方差分析进行统计学分析。

2 结果

2.1 不同周龄的长爪沙鼠超数排卵的效果

在本试验中, 我们对 4、6、8、10、12、14、16、18 周龄的长爪沙鼠分别腹腔注射 10 IU 的 PMSG/HCG 后对其超数排卵的卵母细胞数进行了分析, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 与其他各年龄组相比, 6 周龄组的动物取卵总数最高, 而且动物个体间的超排数量差异较小, 超排效果比较稳定。6 周龄后随着年龄的增加, 取卵数呈下降趋势。

2.2 不同激素剂量水平对长爪沙鼠超数排卵后的效果

鉴于目前对长爪沙鼠超数排卵的激素剂量水平还不十分清楚, 我们分别用 5、10 和 15 IU 的 PMSG/HCG 3 个剂量对其进行了超数排卵实验, 结果发现, 10 IU 组的超数排卵后卵母细胞总数最高, 5 IU 的最低, 15 IU 剂量组的介于二者之间, 经方差分析发现 3 个剂量组之间差异有显著性 ($P < 0.05$) (表 1)。

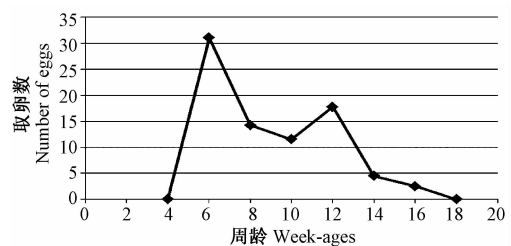


图 1 不同周龄动物超排后的取卵数平均值

Fig. 1 The average number of eggs obtained in gerbils of different weeks-ages after superovulation

表 1 经 3 个不同剂量腹腔注射 PMSG/HCG 于 6 周龄的长爪沙鼠后超数排卵的结果

Tab.1 Results of superovulation after intraperitoneal injection of 5, 10, 15 IU PMSG/HCG in gerbils at the age of 6 weeks

剂量 (IU)	动物数	取卵总数 (个)	平均值 (个) $\pm (\bar{x} \pm s)$
Dose	Animal number	Amount of eggs	Mean value
5	4	41	10.25 \pm 8.75 ^A
10	4	124	31.00 \pm 1.00 ^B
15	4	106	26.50 \pm 8.50 ^B

注: 相同字母表示差异不显著, 不同字母表示差异显著。

Note: The same letter shows non-significant difference, different letter shows significant difference.

3 讨论

对小型啮齿类动物而言,选择适当年龄段的动物超数排卵是非常重要的。年龄太小,发育不成熟,无法完成排卵过程;年龄太大,激素对其发育过程的干预有限,也无法得到数量较多的卵母细胞。因此,有许多文献对小鼠、金黄地鼠、布氏田鼠等实验动物的超数排卵年龄进行了研究^[7-9]。对长爪沙鼠而言,关于其超数排卵的文献只有 Mochida KJ 等^[10]的报道,他们选用 8~18 周龄的动物进行了超数排卵和胚胎冷冻的研究。分析本实验的结果可知,参照封闭群小鼠的经验^[7],我们用 4 周龄刚离乳的沙鼠进行超数排卵,结果取卵数为 0,4 只动物均没有收集到卵母细胞,且观察到其卵巢较小,可能该年龄的动物还不具备产生卵子的能力。而随着年龄的增加,超排数量减少,可见激素对其排卵的干预能力受限,如果要取得较好的超排效果,应该结合阴道涂片的结果和考虑其发情周期来确定超排注射激素的时间。本实验的结果与 Mochida KJ 等的略有差异,其一可能是所用动物种群不同造成的差异,其二基于胚胎冷冻的目的,其文中并未详细说明不同动物周龄收集胚胎数量的差异,但这种差异应该是存在的。

超数排卵的剂量选择一直是该实验成功与否的关键,有多个报道对小鼠、家兔、金黄地鼠、布氏田鼠、猪等等动物实施超数排卵的激素剂量进行了研究^[8,9,11-13]。本文仅仅设定了 5、10 和 15 IU 3 个剂量组对长爪沙鼠进行了超排实验,结果发现,10 IU 组和 15 IU 组收集的卵母细胞数量有一定的差别,但没有统计学差异。因此,在实际工作中可以考虑采用 10 IU PMSG/HCG 对长爪沙鼠进行超数排卵。

参考文献:

[1] Arguello Garcia R, OrtegaPierres MG. *Giardia duodenalis*:

Analysis of humoral immune response in experimentally infected gerbils (*Meriones unguiculatus*) [J]. Arch Med Res, 1997, 28: 171-178.

- [2] Cruz YR, Tamos YM, Cernuda AM, et al. Treatment with nasal neuro-EPO improves the neurological, cognitive, and histological state in a gerbil model of focal ischemia [J]. Sci World J, 2010, 10: 2288-2300.
- [3] Segatelli TM, Franca LR, Pinheiro PF, et al. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. J Androl, 2004, 25(6): 872-880.
- [4] Lee CH, Yoo KY, Choi JH, et al. Cyclin D1 immunoreactivity changes in CA1 pyramidal neurons and dentate granule cells in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia [J]. Neurol Res, 2011, 33(1): 93-100.
- [5] Gleich O, Weiss M, Strutz J. Age-dependent changes in the lateral superior olive of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. Hear Res, 2004, 194(1-2): 47-59.
- [6] Matsubara S, Shibata H, Takahashi M, et al. Cloning of Mongolian gerbil cDNAs encoding inflammatory proteins, and their expression in glandular stomach during *H. pylori* infection [J]. Cancer Sci, 2004, 95(10): 798-802.
- [7] 薛亮亮, 雷小春, 司苏晋, 等. 近交系 C57 小鼠与封闭群昆明小鼠超排卵数的比较 [J]. 山西医科大学学报, 2010, 41(3): 225-226.
- [8] 包华琼 孙岚, 任彬林, 等. 金黄地鼠超数排卵模型的建立 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(7): 52-54.
- [9] 潘思丹, 施海霞, 宋铭晶. SPF 级布氏田鼠的繁殖及生长发育性能测定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(1): 92-94.
- [10] Mochida KJ, Wakayama T, Takano K, et al. Birth of offspring after transfer of Mongolian gerbil (*Meriones Unguiculatus*) embryos cryopreserved by vitrification [J]. Molec Reprod Dev, 2005, 70: 464-470.
- [11] 王田娟, 章志国, 邢琼, 等. 不同超排方法对家兔超数排卵效果的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(4): 355-357.
- [12] 郭亮勇, 况玲, 蒋国英, 等. 激素的不同剂量对小鼠超数排卵的影响 [J]. 新疆农业科学, 2010, 47(7): 1466-1469.
- [13] 邓凯伟, 王峰, 王志刚, 等. 猪超数排卵影响因素的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2011, 4: 39-41.

[修回日期]2012-05-10