设施设备

非人灵长类动物体外受精-胚胎移植(IVF-ET)手术室建设及使用探讨

江勤芳[1],高家红[1],曾 桥[2],唐东红[1],和占龙[1],马开利[1]

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所药物安全性评价研究中心,昆明 650118;
2. 同济大学转化医学中心,上海 200039)

【摘要】 非人灵长类动物已广泛应用于与人类相关的生殖模型研究,而生殖和转基因操作相关手术室的硬件和软件建设是保证研究顺利开展的前提条件。因此,本文结合我中心的实际建设情况,就非人灵长类动物体外受精-胚胎移植相关手术室的合理建设及可能存在的问题等进行了探讨,为相关科研工作人员提供参考。

【关键词】 非人灵长类动物; 体外受精-胚胎移植; 手术室
【中图分类号】R332 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2014) 05-0072-04
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2014.005.015

The construction and use of the operating room for in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) in non-human primates

JIANG Qin-fang[1], GAO Jia-hong[1], ZENG Qiao[2], TANG Dong-hong[1], HE Zhan-long[1], MA Kai-li[1]
(1. Center for drug safety evaluation and research, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China; 2. Center for translational medicine, Tongji University, Shanghai 200039, China)

【Abstract】 The non-human primates have been profoundly being used to study the human reproductive models. It is the prerequisites to set up the operating rooms including hardware and software on reproductive experiments and transgenic manipulation. Thus, Combined with the practice of our center, both the construction and the associated problems about the IVF-ET operating rooms were discussed in this paper. It will provide some help for the related researches.

【Key words】 Non-human primates; In vitro fertilization and embryo transfer; Operating room

非人灵长类动物在生物进化、生殖生理等方面与人类极为相似,拥有与人类相似的单子宫,盘状血绒毛型胎盘,尤其是雌性恒河猴,它们具有与人相似的月经周期,是研究人类生育调控机制、体外受精及胚胎移植的理想动物[1-2]。非人灵长类动物(包括恒河猴、食蟹猴等其它非人灵长类动物)体外受精及胚胎移植研究的开展将为人类生殖及转基因动物模型的建立提供更为广阔的应用前景。而合理化及标准化手术室的建设,是确保研究顺利开展的前提条件。非人灵长类动物体外受精-胚胎

[基金项目] 国家自然科学基金(81301073);高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题(20121106120056);云南省应用基础项目(2013FZ132,2011FZ211);协和青年基金—中央高校基本科研业务费专项资金(3332013083);生物所所级一般项目(IMB2013YB01)。
[作者简介] 江勤芳(1974-),女,主管技师,研究方向:实验动物学。E-mail: jqf@imbcams.com.cn。
[通讯作者] 马开利(1981-),男,博士,Email:mklpumc@gmail.com。

移植手术室既具有“实验动物设施”的特点,又具有人类医疗手术室的某些特征;既要满足人员在洁净室内操作的要求,又要满足实验动物的需要[3]。因此我们综合考虑了人员、动物以非人灵长类动物体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization and embryo transfer,IVF-ET)研究的需要,并结合本中心实际情况建立了手术室。目前已经顺利开展了 15 只实验猴的取卵及胚胎移植工作,现将相关工作进行总结及探讨。以下将从硬件建设、软件建设及使用几个方面分别进行探讨。

1 硬件

(IVF-ET)实验人员必须依赖和利用相应的仪器设备,才能进行各种精细的操作,并为卵子受精和胚胎发育提供一个稳定、可靠的环境。

1.1 房间布局

手术室设置在配有空调净化系统的屏障系统内,通过空调系统对空气进行初效、中效和高效三级过滤,严格控制进入室内空气中的微粒数量,确保整个手术室空气质量及房间内温度达到相应要求。屏障系统需通过相关管理机构的认证,取得《实验动物设施使用许可证》后方可开展非人灵长类动物的实验研究。实验人员通过更衣室(一更、二更)、使用自动净手器洗手消毒后进入屏障环境内,同时还要对进入室内的器具、实验耗材等进行消毒灭菌。

1.2 全数字超声诊断系统

非人灵长类动物体外受精-胚胎移植手术室可选用兽用超声诊断仪。B 超仪是必不可缺的有效工具,在此实验中贯穿整个过程。非人灵长类动物尚未注射促排卵药物之前,首先需要用 B 超确认动物是否处于非受孕状态,确认处于非怀孕期的动物即可观察子宫情况,包括子宫大小及子宫内膜周期性变化。在使用促排卵药物之后,可用 B 超观察卵泡的生长发育情况[4],卵泡成熟后可在 B 超下看到清晰的网状结构,从而能够根据 B 超的结果分析和评估药物促排卵效果,最终确定动物取卵的时间点。在施行外科手术之前,为便于对卵巢的手术操作,需要 B 超仔细观察动物腹腔内状况。胚胎移植后,需用 B 超观察动物是否受孕。因此,B 超诊断系统应配置不同分辨率的腹部凸阵探头、线阵探头,同时具有前沿的成像技术、完善的数据管理才能确保实验的顺利进行。

1.3 电刺激采精仪全套

电刺激采精是非人灵长类人工受精、体外受精和精子生物学研究过程中获得精子的基本手段。在有关非人灵长类电刺激采精的报道中,阴茎和直肠电刺激采精是较常用的方法[5]。动物电刺激采精仪是利用低电压小电流交流电刺激动物输精管壶腹部附近的感觉神经末梢,然后传导到射精中枢,产生兴奋而排精的人工采精方法。本中心在开展实验前购置了电刺激采精仪,选用直肠刺激的方法进行精液的采集。电刺激采精仪应配备与非人灵长类动物适合的刺激电击棒,电击棒粗细的直径约为 1.5 cm,长度为 30 cm 左右即可。具有电压、电流的选择按钮,刺激过程中可方便电流或电压调谐。同时具备电源手动和自动切换开关,便于实验人员控制连续刺激或间隙刺激时间。刺激电击棒在使用时,在前端要涂抹少量凡士林,以润滑电极棒。实验中可根据不同的个体及动物临床表现选择电流的大小或刺激时间的长短。

1.4 显微操作注射系统

包括倒置显微镜、精确定位的显微注射操作器及成像系统(图 1)。倒置显微镜应具备霍夫曼调制相差(Hoffman Modulationcontrast)及微分干涉相差(differential interference phase contrast microscope, DIC)功能,以便能够形成高对比度的图像,从而可以较好地使用塑料培养皿来观察卵细胞,便于显微操作。显微镜及显微操作需通过同一系统进行控制,从而实现将单一精子注射入卵子内使其受精的操作过程。显微操作注射系统应具有较高分辨率、对比度以及人性化的操作系统,以便有效提高单精子卵胞浆显微注射的成功率。

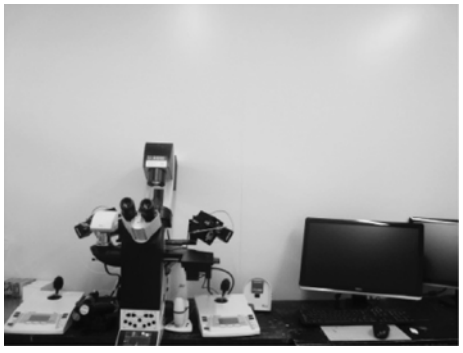

图 1 显微操作注射系统

Fig. 1 Micromanipulation injection system

1.5 其它必需设备

(1)显微镜及显微恒温热台。选用工作距离

大、聚焦深度大的解剖显微镜,其物镜放大倍数为 ×0.7 ~ ×11.5,目镜 ×10,可方便选卵、观察胚胎。体外胚胎对温度的变化非常敏感,显微恒温热台是必备的辅助设备,其温控性能需稳定可靠,使温度能长时间稳定在所需要的数值上。(2)三气培养箱。实验中研究对象均来自于非人灵长类动物机体,细胞的体外培养要求非常严格,不仅要有适合的温度、湿度,且要有洁净的气流循环。三气培养箱是指可供有氮气、二氧化碳和氧气三种气体的培养箱,三种气体的比例通常是氮气 90%、二氧化碳 5%、氧气 5%。可为胚胎提供相对稳定的体外生长环境,如恒定的酸碱度(pH:7.2 ~ 7.4)、稳定的温度(37℃)、较高的相对湿度(95%)、稳定的 CO_2 水平,使胚胎完成体外发育,配子离体后几乎所有的时间都在培养箱内完成其体外发育,因此培养箱的精确性非常重要[7]。培养箱箱内采用微风循环方式,使空气循环接近自然界空气对流,缩短温度、湿度、O_2 浓度和 CO_2 浓度的恢复时间,确保温度、湿度、O_2 浓度和 CO_2 浓度的均衡性。其应具有清晰的操作控制界面,该界面一方面显示箱体内的实时温度、湿度、气体浓度,又要方便操作者进行数值的设定或校正。其次,应具备数值异常报警装置,便于对其环境的监控。(3)超净工作台。超净工作台是应用于手术室的局部净化单元,目的是保证工作区内的风速始终处于理想状态,其环境条件满足所需培养基、试剂的配制要求,同时方便开展实验用具制作等方面的工作,例如移卵玻璃毛细管拉制等。

1.6 (IVF-ET)外科手术所需配置

(1)动物手术床。动物手术床应便于操作,具有温度控制器,满足动物麻醉后在手术过程中的保温需求。同时,手术床应具有调节升降的功能,增加动物在手术中的舒适度并便于实验人员操作。在手术中通常将温度调节到 30℃ 左右[6]。当动物处于深麻醉状态需使用较高的台面温度时,在手术过程中需适时轻轻移动动物,以免动物局部不适。(2)无影灯。在对动物进行手术过程中,无影灯可以有效照射手术部位,避开血管并便于对卵巢及输卵管的观察,在手术中应方便使用,操作简单,可通过移动进行光源远近式调节,以及通过旋钮对灯头高度和角度进行调节。(3)心电监护仪。为提高对手术中非人灵长类动物的关怀,采用心电监护仪监护主要的生命指标:心率、心电图、呼吸、脉搏等。在手术过程中,可根据手术时间长短及动物麻醉状况决定是否启用心电监护仪。(4)手术器械全套。在实验开始前,购置适合非人灵长类动物的全套手术器械。包括组织钳、止血钳、卵圆钳、手术剪、手术刀、拉钩、缝合针及缝合线,准备无菌纱布及棉花等器械及耗材,在实验前一天打包进行高压灭菌处理、烤干后备用。

2 软件

非人灵长类动物体外受精-胚胎移植(IVF-ET)手术室的建设,硬件和软件缺一不可。

2.1 创建一个团结和良好合作的团队

由于非人灵长类动物(IVF-ET)还在起步探索阶段,可与有丰富经验的人类辅助生殖中心联合开展实验,以便在关键实验技术方面得到积极和有效的指导。

2.2 具有熟练掌握显微注射、卵细胞培养、精子冷冻及复苏、胚胎培养等胚胎移植相关实验技术的人员。

2.3 配备熟练掌握操作 B 超仪的技术人员,以便能对 B 超图像进行熟练采集并作出科学正确的判断,并能在 B 超图像的引导下,快速及准确对动物进行外科手术。

2.4 对动物精心护理的饲养人员及兽医师

在实验中能及时发现非人灵长类动物的月经及其它异常情况,给予准确合理的处理方案。同时规范麻醉药的用量及完成动物手术中生命体征的监护,确保动物在手术前及手术后能得到精心和细致的护理。

3 手术室的使用

目前,本中心手术室已开展 15 例非人灵长类动物的 IVF-ET 研究。B 超过程中,选用分辨率为 6.5 MHz 的探头可清楚观察到卵巢,但因人类的阴道探头外形直径较大而不适用于非人灵长类动物阴道探测,因此首先选用此探头直接在腹部观察实验猴经促排卵药物处理后卵泡的生长发育情况(图 2),然后再通过腹部手术切口,暴露卵巢后用注射器直接抽取卵泡的的方式获取卵子。今后在开展实验的过程中可与 B 超机生产厂家联系,争取开发或选购到直径大小适宜非人灵长类动物阴道探测的探头,从而对超声引导下经阴道穿刺取卵术进行积极的探索和尝试。超声引导下经阴道穿刺取卵具有简便、快捷,痛苦小、创伤小,不用全身麻醉和并发

症少等优点[8],在今后非人灵长类动物的 IVF-ET 中,有必要对阴道穿刺取卵术开展一些有效的探索。

图 2 促排卵后,月经周期第 12 天卵巢 B 超图

Fig. 2 The B ultrasound figure of ovariumin the twelfth days menstrual cycle after ovarian hyperstimulationtreatment

在本中心开展的实验研究中,由于对三气培养箱密集使用,氮气消耗比较快,而频繁的更换氮气瓶,也对手术室环境带来了潜在的污染风险。在今后改进及完善过程中,可使用氮气发生器,从而减少更换氮气瓶对环境的潜在污染。研究实验中为下一步转基因动物的开发进行探索,没有采用精子和卵混合培养方式完成体外受精,而是借助单精子卵母细胞内注射受精技术(intracytoplasmic sperm injection,ICSI)实现精卵结合完成受精过程。ICSI 受精的胚胎有与自然受精形成的胚胎相似的发育潜力,其具有受精率高、精子浓度形态对受精无影响的特点[7],对开展的实验研究起到积极的促进作用。缺点是设备精密而昂贵、操作技术需要长时间反复的练习,在练习过程难免会发生把针弄断的情况。在有条件的手术室,可配置拉针器、磨针器和锻针器,更好便于初学者对显微操作技术的练习。

4 讨论

非人灵长类动物(IVF-ET)手术室的建立,将使非人灵长类动物在生殖医学领域的研究向更深层次拓展,并将更充分发挥其在研究人类生殖疾病方面的作用。建立非人灵长类动物体外受精-胚胎移植手术室是一个系统工程。除上述以外,一些实验仪器也是必需的,例如用于存放需冷冻及冷藏试剂的冰箱;用于胚胎冷冻保存的液氮罐;电子天平、纯水仪等。手术室建立后,需建立可行的手术室管理规章制度及操作规程;在手术前、后需对环境进行合理有效消毒,使环境及实验体系处于有效地质量控制之下,才能确保手术室得到规范化使用。同时,实验人员应珍惜和善待动物,采取动物福利的相关措施,给予动物人性化关怀。本中心的手术室工作距离短,便于实验人员操作,可进行快速取卵和取精。但由于手术室是在土建施工完成后因地制宜而建立,所以也存在不完善的地方。例如手术室面积不够大,实验设备配置多。为保障多人在手术室内的有序操作,需要建立相应的规章制度及操作规程并严格执行。与人类的辅助生殖相比,非人灵长类动物的(IVF-ET)尚在探索和起步阶段,不论从硬件和软件上,还有一定差距,今后在扩建非人灵长类动物手术室过程中可尝试参照人类的改进和进一步完善。

参考文献:

[1] Wolf D, Mitalipov S, Byrne J. Primate Models for the Assisted Reproductive Technologies and Embryonic Stem Cell Biology[J]. Sourcebook of Models for Biomedical Research, 2008, V (B):397.

[2] Davison BB, Cogeswell FB, Baskin GB, *et al.* Plasmodium coatneyi in the rhesus monkey (Macacamulatta) as a model of malariain pregnancy[J]. Am J Trop Med Hyg, 1998, 59(2):189-201.

[3] 徐桓,唐强根. 长海医院动物手术室设计及施工的经验体会[J]. 实验动物科学与管理,2000,17(2):45-49.

[4] Morgan PM, HutzRJ, Kraus EM, *et al.* Evalution of ultrasonography for mornitoringfollcular growth in rhesus monkey[J]. Theriogenology, 1987, 27:769-780.

[5] 杨上川, 季维智, 陈建春, 等. 一种改进的阴茎电刺激采精法和猕猴藏酋猴及熊猴的采精及其精液特征的初步研究[J]. 动物学研究, 1994, 15 (1): 77-83.

[6] 蔡文训,董振明,康荣田,等. 低温对麻醉犬血液动力学及流变学的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2000,20:286-289.

[7] 黄国宁,孙海翔,主编. 体外受精-胚胎移植实验室技术[M]. 人民卫生出版社,2012,9:175.

[8] 李美芝,主编. 妇科内分泌学[M]. 人民军医出版社,2001:375.

〔修回日期〕2014-01-16