

辅助生殖技术对小鼠表型影响的研究进展

胡永艳, 孔申申*

(北京大学第一医院实验动物中心, 北京 100034)

【摘要】 通过辅助生殖技术产生的后代同自然受精后代在遗传物质上几乎无差异,但是研究发现两者在某些表型上存在不同程度的差异。本文通过总结辅助生殖技术对小鼠在性别、生长发育、行为学、寿命、器官和组织代谢以及分子表型等的影响,以期对辅助生殖技术在基因修饰小鼠制作、快速繁殖、净化、保种等一系列应用中可能出现的问题提供一定的指导。

【关键词】 辅助生殖技术;表型;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 03-0114-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.03.022

Research progress on the effects of assisted reproductive technology on phenotypes of mice

HU Yongyan, KONG Shenshen*

(Laboratory Animal Center, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

【Abstract】 The offspring generated by assisted reproductive technology (ART) are considered genetically identical with those generated by natural fertilization. However, studies have found that there are differences between them in some phenotypes to varying extents. In this review, we have summarized the effects of ART on the sex ratio, growth and development, behavior, life expectancy, metabolism of organs and tissues, and molecular phenotypes of mice, providing some guidance to the problems that may arise during the application of ART in the production of genetically modified mice, rapid propagation, purification, embryo cryopreservation, and so on.

【Key words】 assisted reproductive technology; ART; phenotypes; mice

辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)已广泛应用于人类不育治疗及家畜优良种质资源高效利用。体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)是一种关键的辅助生殖技术。在实验动物科学研究中,IVF技术常用于基因修饰小鼠的制作、冷冻保种、生物净化以及快速扩大繁殖等操作,通过使用IVF技术能够大大提高基因修饰小鼠的繁殖效率和品系保存质量,保持遗传背景的稳定性。IVF后代

同正常受精后代小鼠在遗传物质上几乎无差异,但目前动物实验相关证据表明,IVF后代同正常受精鼠后代在生长发育、器官组织生理特性、代谢等不同层面存在差异。本文通过分析综述IVF对性别、生长发育、行为学、寿命、器官和组织代谢以及分子表型等的影响,以期对IVF技术在基因修饰小鼠快速繁殖、净化、保种等应用中可能出现的问题提供一定的指导意义。

[作者简介] 胡永艳(1986—),女,助理研究员,研究方向:遗传学。E-mail: huyyg@163.com

[通信作者] 孔申申(1958—),女,教授,研究方向:实验动物管理。E-mail: shen_shenk@hotmail.com

1 性别比研究

IVF 小鼠同自然繁育后代小鼠相比,从植入前到产前阶段有显著的性别差异,IVF 小鼠雄性增多。在植入前阶段,雌性 IVF 胚胎似乎更容易受到 IVF 诱导的影响,包括凋亡百分比显著增加,经典的性别相关基因的表达异常(*Xist*、*Hprt*、*Pgk1* 和 *Hsp70*)。在妊娠中期,胚胎第 13.5 天(E13.5) IVF 雄性胎儿的生存率高于 IVF 雌性胎儿(雄:雌 = 1.33:1),伴有雌性偏倚的妊娠丢失。妊娠晚期,E19.5 IVF 雄性胎鼠性别比高(雄:雌 = 1.48:1)。出生后,IVF 雄性鼠的生长速度比其体内胚胎雄性对照鼠高,而 IVF 雌性与体内胚胎雌性呈现相似的生长模式^[1]。

性别比是生殖健康的一个重要指标,其性别失衡反映了胚胎发育的缺陷。IVF 引发的表观修饰错误可能是造成性别失衡的主要原因。小鼠 IVF 后代的性别比例失衡是由于围植入期雌性胚胎倾向性的发育异常所致。有研究发现雌性 IVF 附植前胚胎存在 *Xist* 表达抑制和印迹 X 染色体失活(imprinted X-chromosome inactivation, iXCI) 异常的表观修饰错误,并发现在胚胎体外培养液中适时添加适量的视黄酸可以校正 IVF 引发的 iXCI 不足问题,并有效地校正出生性别比例^[2]。

2 生长发育影响

胚胎发育早期的环境应激能够影响出生后表型,这些生理表型可能出现于成年后。小鼠受精卵在营养不充足的培养基中发育 10 h 即可改变出生体重和出生后的生长^[3]。Le 等^[4]以小鼠为研究对象,应用常规的 IVF 技术建立小鼠模型。实验结果显示,IVF 组出生率明显低于对照组;IVF 组出生体重明显高于对照组,而在第 2 周及第 3 周时,出现了相反的结果,IVF 组体重明显低于对照组,第 4 周后直到性成熟期(8~10 周)两组之间又表现为差异无显著性,表明 IVF 技术对小鼠的早期生长发育具有一定的影响,而随着生长发育这些影响逐渐减少,应加强对 IVF 子代早期生长发育的监督及评估。另一项研究同样发现 IVF 小鼠出生体重增加^[5],而对胎鼠的体重研究发现^[6],ART 小鼠在 E18.5 导致胎儿重量减少和胎盘过度生长。ART 鼠胎盘在 E18.5 表现出胎盘层分离和糖原细胞迁移缺陷的组织形态学改变,ART 操作导致大部分胎盘营养转运蛋白的下调和胎盘效率的降低。ART 胎盘改变与 H19、

KvDMR1 的印迹控制区的甲基化水平升高相关,并且破坏了 E18.5 对于胎盘发育和功能重要的绝大多数印记基因的表达。小鼠模型的结果显示了 ART 操作可以通过破坏胎盘发育和功能来影响胎儿生长的第一个证据,表明由胚胎操作引起的基因组印记的改变可能导致这些问题出现。

体重是生长发育的重要指标,文献分析发现由于 ART 操作导致胎盘效率降低,IVF 组在 E18.5 胎鼠重量减少,而 IVF 小鼠出生体重增加有表观遗传调控的参与,自胚胎末期至出生体重结果的变异目前分析可能是由于不同的研究体外培养条件有差异,具体原因有待进一步研究。

IVF 是否会影响小鼠寿命方面的研究存在争议,有研究发现正常饮食的小鼠寿命没有差异^[7],也有研究发现,与对照组相比,饲喂高脂饮食的 ART 小鼠的寿命缩短约 25%,且表观遗传改变导致了这些问题的出现^[8]。

3 行为影响

多个研究发现 IVF 操作与小鼠的行为和焦虑水平相关^[9-10]。研究人员起初发现 IVF 操作会引起后代的行为学异常^[9,11],这些研究表明 IVF 出生的小鼠分窝前行为学表型较少改变,但是成年后在焦虑、自主运动、空间和内隐记忆等方面改变明显。例如,IVF 小鼠在高架十字迷宫的开放臂中停留更多的时间,表明其焦虑水平降低,这一行为差异在雄性小鼠中尤为明显,并伴随在焦虑相关的皮质和皮质下结构以及小脑中的单胺氧化酶 A 基因、促皮质素释放因子和 γ -丁胺酸表达改变^[10],这三个基因已被证明是焦虑和恐惧行为的调控因子^[12],它们与其相关受体和转运蛋白的改变与焦虑水平的变化相关^[13]。

4 器官与组织代谢

4.1 肝脏

ART 小鼠老年时期的肝脏重量显著增加,且添加了胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的培养液体外培养过的雌鼠肝脏脂肪变性,雄性和对照很少出现脂肪变性^[9]。研究发现了胆汁酸代谢、蛋白质泛素化、线粒体功能障碍和氧化磷酸化的变化转录证据,以及可能反映细胞对治疗反应差异的基因错误表达^[14]。代谢组学数据展示了改变蛋白水解作用和蛋白质泛素化证据——二肽浓度显著增加,活化

蛋白激酶的变化,三磷酸腺苷和三磷酸鸟苷-需能反应(增加嘌呤代谢物如腺苷酸、鸟苷酸和鸟苷)和减少胆汁酸储量。损害胆汁酸的合成以致胆汁酸储量减少,最终明显减少能量消耗,导致肥胖和糖尿病的发生^[9, 15]。此外,研究还发现 IVF 鼠的肝脏中葡萄糖代谢物的含量降低,而糖原中间体的含量增加,谷氨酰胺减少,长链脂肪酸减少,这反映出线粒体功能的改变。在另一项研究中,IVF_{KAA}(使用具有氨基酸和 5% O₂ 的 KSOM 优化培养基)和自然怀孕胎鼠肝脏的脂类组学分析显示增加了几个与葡萄糖代谢及血管功能异常相关的磷脂,包括溶血磷脂酰胆碱、磷脂酸和溶血磷脂酰乙醇胺,它们可能导致 IVF 小鼠出生后某些可能的代谢异常^[16]。

4.2 脂肪组织

IVF 普遍导致胎盘脂质代谢及其代谢调控网络基因表达异常,IVF 所致的与脂质代谢相关的印记基因印记紊乱以及印记维持关键基因表达水平异常可追溯到植入前胚胎。植入前期是重新编码的时期,可能容易受到破坏。有研究发现 IVF 出生的小鼠早期生理表型正常,但是成年后会出现脂肪组织显著增加。研究表明 IVF_{KAA} 雌鼠成年后更容易脂肪沉积^[15]。转录发生变化的基因多与脂类代谢、能量生成(如糖异生、三羧酸循环)以及胰岛素受体信号通路、白介素-1 信号通路和类视黄醇 X 受体/肝 X 受体和类视黄醇 X 受体/法尼酯 X 受体的异二聚体的激活相关。雄性和雌性性腺脂肪的代谢组学研究发现与脂肪生成有关的促炎性和活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)代谢产物雌性特异地增加^[17-19]。

脂肪是代谢异常的主要驱动,所以 IVF 小鼠脂肪组织性别差异可能导致性别特异的代谢表型。两种性别的 IVF_{KAA} 小鼠皆保有脂肪特有的存在,与其他成年组织相比,IVF 囊胚中的转录变化,包括糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)和硫氧环蛋白相互作用蛋白增加^[20]。这些数据提示脂肪组织可能是 IVF 小鼠性别和组织特异性变化的作用场所。

4.3 胰岛

IVF 小鼠成年期通常有较高的空腹血糖并伴有葡萄糖不耐受^[14],IVF_{KAA} 动物表现出低胰岛素生成指数(葡萄糖耐量试验中前 30 min 的血浆胰岛素水平变化除以葡萄糖水平变化)^[21],表明由于 β 细胞对葡萄糖不敏感,IVF 小鼠应对葡萄糖分泌胰岛素

的能力降低^[5]。进一步的研究表明,与对照组相比,IVF 雌鼠在 29 周的时间内体重标准化的胰腺重量较低。与其他胰岛素敏感组织相比,胰岛的芯片分析在基因表达上的变化更少,最显著的变化是甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)表达的显著下调,GAPDH 的减少、ROS 的增加是糖尿病周围组织和 β 细胞引起细胞损伤的关键通路^[22]。 β 细胞功能障碍随年龄的增加而增加,有研究表明 12 周龄的 IVF 雌鼠在葡萄糖刺激下胰岛素分泌正常,但是 29 周时,IVF 小鼠胰岛表现出基础胰岛素分泌增加,并且应对高糖刺激引起的胰岛素分泌增加不明显^[21]。ART 小鼠出生后葡萄糖体内平衡可能具有性别二态性^[22]。有研究对断奶后 IVF 小鼠高脂喂养 8 周,发现它们空腹血糖水平升高,葡萄糖耐量受损以及胰岛素刺激引起的 Akt 磷酸化减少^[23]。

4.4 血管组织

Rexhaj 等发现 IVF 出生的 FVB 雄鼠脉管系统的内皮功能紊乱、硬度增加,伴随雄性隔代遗传的动脉高血压^[8]。血管表型能够跨代遗传显示表观遗传在其中发挥作用,但有待进一步证实。研究者进行了定向分析,并发现动脉中内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因启动子甲基化改变,及血管中 eNOS 表达和一氧化氮(nitric oxide, NO)合成降低。另一个关于血压的评估同样发现 IVF 出生的 CF1 $\times$ B6D2F1 雄鼠收缩压降低、舒张压与自然生产对照鼠一样^[5]。但是,另一个研究结果表明胚胎培养后收缩压升高^[24]。结果差异的复杂性与小鼠品系、血压测量方法和实验设计(例如在 Rexhaj 等^[8]的研究中没有对每窝的产仔数进行控制)相关。研究发现由 ART 产生的小鼠的脉管系统显示内皮功能障碍和血管硬度增加,其在体内转化为动脉高血压。雄性 ART 小鼠的后代也显示血管功能障碍,这表明 ART 鼠的遗传物质受到了表观遗传修饰。给予 ART 小鼠脱乙酰酶抑制剂后血管基因甲基化和功能恢复正常,以致子代小鼠没有血管功能障碍。ART 相关血管和表观遗传改变的诱因似乎与胚胎环境有关,这些改变可能通过伴随 ART 的激素刺激排卵来促进^[8]。

小鼠在妊娠期间营养不良可通过表观遗传机制引起后代的肺血管功能障碍,而 IVF 即可能会造成小鼠胚胎早期的营养不良。在大鼠中,怀孕期间的限制性饮食(restrictive diet during pregnancy, RDP)增加了胎盘中的氧化应激。氧化物诱导表观

遗传改变,并且可能穿过胎盘屏障,所以一项研究检测了缺氧 2 周后 RDP 和对照小鼠后代的肺血管功能和肺 DNA 甲基化,发现体外内皮依赖性肺动脉血管舒张受损,体内低氧诱导的肺动脉高压和右心室肥大在 RDP 后代中更加显著。给予组蛋白脱乙酰酶抑制剂丁酸盐和曲古抑菌素 A 后 RDP 后代的肺 DNA 甲基化和血管功能恢复正常。最后,在 RDP 期间向孕鼠施用氮氧化物 tempol 可防止后代的血管功能障碍和异位甲基化^[25]。

4.5 心脏

与对照组相比,封闭群 IVF_{WM} 雄鼠的血压偏低,但是超声心动图结果显示它们心脏收缩末期和舒张末期的体积增大^[24]。超声心动图分析还发现 IVF 和胞质内精子注射的幼鼠左心室肥大^[26]。另一个研究表明培养条件的差异能够显著影响出生后心脏重量,体外培养时加入 FCS 的小鼠在 20 月龄时心脏重量显著增加^[9]。尽管大部分心脏几何形态参数在各个研究组中是可以比较的,IVF 后代在校正了年龄、性别、体表面积和心率后,其左心室相对壁厚、左心室质量指数和左室重构指数显著升高。

5 分子表型

许多研究小组报告了一系列与 IVF 和胚胎培养有关的出生后代代谢和分子表型。但是考虑到小鼠品系和体外培养条件的差异,很难将多个研究联系到一个全面的解释,即植入前的体外暴露如何影响成年表型。有研究组采用多组学方法,因为仅芯片并不总能捕获所有的基因转录本或组织/胚胎言行,代谢组学提供了细胞过程和转录改变潜在结果的实时概览。芯片分析发现 1361 个基因错误表达,但是只有 16 个基因的表达差异在两倍以上,其中包括 *Ccl7*、*Ccl19*、*Chd7*、*Cnnm2*、*Il17ra*、*Il1rb*、*Gfpt2* 和 *Ngf*,主要集中在炎症反应信号通路、细胞组装和组织、癌症、细胞间的信号传递、相互作用和运动等^[27]。值得注意的是,相似的结果在自然出生和 ART 出生的儿童的心脏功能分析中有报道^[28]。芯片研究结果显示超过 35 个错误表达基因反映了 GR 信号上调,这是值得注意的,因为不适当的糖皮质激素信号可以影响生长、对慢性疾病的易感性,以及诱导应激反应。糖皮质激素的升高也与心血管疾病和糖尿病的易感有关^[29]。IVF 转录信号丰富的其他信号通路包括细胞间通信和运动,也包括

NO 和 ROS 的产生^[28]。

比较 E3.5、E7.5 和 E10.5 三个重要发育阶段的体内胚胎和 IVF 胚胎的 microRNA-seq 数据,发现失调的 microRNAs 主要参与调控与癌症发生、遗传信息加工、葡萄糖代谢、细胞骨架组成及神经发生等过程相关的基因,进一步发现 IVF 组胚胎中仅有 miR-199 a-5p 从 E3.5 到 E10.5 持续低表达。通过功能性缺失与补偿性实验,证实 IVF 引发的 miR-199 a-5p 低表达是造成 IVF 胚胎糖酵解率高、发育潜能降低、附植后胚胎存活率低的主要原因^[2]。

综上所述,ART 小鼠可能在性别比例、生长发育、行为、某些器官与组织代谢以及分子等表型方面存在某些异常,对于这些异常,尤其是性别比例和生长发育相关的异常,研究结果存在一些多样性,仍然需要更多的研究来验证它们,以排除不同研究者观察的 IVF 小鼠样本量的大小、动物健康及饲养管理水平等非 IVF 因素等带来的干扰。而且这些异常大部分出现在进行了胚胎体外操作出生的那一代小鼠,针对 IVF 后代可能出现的一些健康问题,仍需要大量研究探索,进而根据具体情况合理使用该技术,或者提出针对性的解决方案,最终实现 ART 更加安全有效的应用。尽管有一些瑕疵,但是 ART 技术现在并且以后仍然会在基因修饰小鼠制作、冷冻保种、生物净化等方面对生命科学的发展发挥非常重要的作用。

参考文献:

- [1] Tan K, Wang Z, Zhang Z, et al. IVF affects embryonic development in a sex-biased manner in mice [J]. *Reproduction*, 2016, 151(4): 443–453.
- [2] Tan K, An L, Miao K, et al. Impaired imprinted X chromosome inactivation is responsible for the skewed sex ratio following *in vitro* fertilization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(12): 3197–3202.
- [3] Banrezes B, Sainte-Beuve T, Canon E, et al. Adult body weight is programmed by a redox-regulated and energy-dependent process during the pronuclear stage in mouse [J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29388.
- [4] Le F, Wang LY, Wang N, et al. *In vitro* fertilization alters growth and expression of Igf2/H19 and their epigenetic mechanisms in the liver and skeletal muscle of newborn and elder mice [J]. *Biol Reprod*, 2013, 88(3): 75.
- [5] Donjacour A, Liu X, Lin W, et al. *In vitro* fertilization affects growth and glucose metabolism in a sex-specific manner in an outbred mouse model [J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(4): 80.
- [6] Chen S, Sun FZ, Huang X, et al. Corrigendum: Assisted reproduction causes placental maldevelopment and dysfunction

- linked to reduced fetal weight in mice [J]. *Sci Rep*, 2016, 6; 29150.
- [7] Sommovilla J, Bilker WB, Abel T, et al. Embryo culture does not affect the longevity of offspring in mice [J]. *Reproduction*, 2005, 130(5): 599–601.
- [8] Rexhaj E, Paoloni-Giacobino A, Rimoldi SF, et al. Mice generated by *in vitro* fertilization exhibit vascular dysfunction and shortened life span [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(12): 5052–5060.
- [9] Fernández-Gonzalez R, Moreira P, Bilbao A, et al. Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(16): 5880–5885.
- [10] Strata F, Giritharan G, Sebastiano FD, et al. Behavior and brain gene expression changes in mice exposed to preimplantation and prenatal stress [J]. *Reprod Sci*, 2015, 22(1): 23–30.
- [11] Ecker DJ, Stein P, Xu Z, et al. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(6): 1595–1600.
- [12] Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states [J]. *Prog Neurobiol*, 2003, 70(2): 83–244.
- [13] van Ameringen M, Mancini C, Farvolden P, et al. Drugs in development for social anxiety disorder: more to social anxiety than meets the SSRI [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2000, 9(10): 2215–2231.
- [14] Feuer SK, Liu X, Donjacour A, et al. Use of a mouse *in vitro* fertilization model to understand the developmental origins of health and disease hypothesis [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(5): 1956–1969.
- [15] Watanabe M, Horai Y, Houten SM, et al. Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(30): 26913–26920.
- [16] Li B, Xiao X, Chen S, et al. Changes of phospholipids in fetal liver of mice conceived by *in vitro* fertilization [J]. *Biol Reprod*, 2016, 94(5): 105.
- [17] Feuer SK, Donjacour A, Simbulan RK, et al. Sexually dimorphic effect of *in vitro* fertilization (IVF) on adult mouse fat and liver metabolomes [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(11): 4554–4567.
- [18] Imhoff BR, Hansen JM. Differential redox potential profiles during adipogenesis and osteogenesis [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2011, 16(1): 149–161.
- [19] Vigilanza P, Aquilano K, Baldelli S, et al. Modulation of intracellular glutathione affects adipogenesis in 3T3-L1 cells [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(8): 2016–2024.
- [20] Simbulan RK, Liu X, Feuer SK, et al. Adult male mice conceived by *in vitro* fertilization exhibit increased glucocorticoid receptor expression in fat tissue [J]. *J Dev Orig Health Dis*, 2016, 7(1): 73–82.
- [21] Sone H, Kagawa Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(1): 58–67.
- [22] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism [J]. *Diabetes*, 2005, 54(6): 1615–1625.
- [23] Chen M, Wu L, Zhao J, et al. Altered glucose metabolism in mouse and humans conceived by IVF [J]. *Diabetes*, 2014, 63(10): 3189–3198.
- [24] Watkins AJ, Platt D, Papenbrock T, et al. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(13): 5449–5454.
- [25] Rexhaj E, Bloch J, Jayet PY, et al. Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: role of epigenetic mechanisms [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(1): H247–H252.
- [26] Valenzuela-Alcaraz B, Crispi F, Bijmens B, et al. Assisted reproductive technologies are associated with cardiovascular remodeling in utero that persists postnatally [J]. *Circulation*, 2013, 128(13): 1442–1450.
- [27] Feuer S, Liu X, Donjacour A, et al. Common and specific transcriptional signatures in mouse embryos and adult tissues induced by *in vitro* procedures [J]. *Reproduction*, 2017, 153: 107–122.
- [28] Zhou J, Liu H, Gu HT, et al. Association of cardiac development with assisted reproductive technology in childhood: a prospective single-blind pilot study [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3): 988–1000.
- [29] Jaddoe VW, Witteman JC. Hypotheses on the fetal origins of adult diseases: contributions of epidemiological studies [J]. *Eur J Epidemiol*, 2006, 21(2): 91–102.

〔收稿日期〕2017–11–03