

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)14-1249-04

小鼠品系影响胚胎移植成功率的比较研究

张庆玲¹, 贺莉¹, 杨玉芳², 李祖国¹, 丁彦青¹(¹ 南方医科大学基础医学院病理学教研室 广东 广州 510515, ² 广州军区空军医院眼科 广东 广州 510515)

Effect of mouse strain on implantation rate of embryo transfer : A comparative study

ZHANG Qing-Ling¹, HE Li¹, YANG Yu-Fang², LI Zu-Guo¹, DING Yan-Qing¹¹Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, ²Department of Ophthalmology, Air Force Hospital, Guangzhou Military Area Command, Guangzhou 510515, China

【 Abstract 】 AIM : To explore the relations of the strains of embryo and pseudopregnant recipient to live birth rate of embryo transfer and the feasibility of mixed transfer of different embryo strains. **METHODS** : A total of 362 embryos collected from 24 B6CF1 mice (F1 generation of Balb/c male and C57BL/6 female mice) and 14 kunming (KM) mice were transferred into 24 mice of the 2 strains (8 B6CF1 mice and 16 KM mice) respectively for comparing the live birth rate. **RESULTS** : The birth rate of B6CF1 embryos transferred into the pseudopregnant mice of same strain were much higher (32.0%) than that of KM mice homogeneous embryos (4.0%); the birth rate of mixed transferring of the 2 embryo strains were 25.0% of B6CF1 and 15.0% of KM mice. Except for homogenous embryo transfer, cross-strain embryo transfer was also performed in B6CF1 and KM mice. Among them, the total birth rate in embryo-transferred B6CF1 pseudopregnant mice (29.0%) was obviously higher than that in KM pseudopregnant mice (7.0%). As for embryo strain, the birth rate of B6CF1 strain embryo transferring (16.0%) was higher than that of KM embryo transferring (11.0%). **CONCLUSION** : The live birth rate of embryo transfer could be elevated by selecting mouse strain cautiously. Both cross-strain and mixed-strain embryo transfer are feasible, but homogenous embryo transfer is a priority. B6CF1 mouse is a better embryo transfer candidate than KM mouse.

【 Keywords 】 embryo transfer; animals, genetically modified; mouse strains

收稿日期 2005-12-27; 接受日期 2006-03-27

基金项目: 国家高科技研究发展计划(863 计划) 项目 (2003AA2160101)

通讯作者: 丁彦青. Tel: (020) 62742148 Email: dyq@fimmu.com

作者简介: 张庆玲, 博士生(导师丁彦青), 讲师. Tel: (020) 62789100

Email: zqllc8@fimmu.com

【 摘要 】目的: 探讨不同受体鼠和供体鼠品系对胚胎移植成功率的影响以及不同品系胚胎混合移植的可行性. 方法: 以 Balb/c 雄鼠和 C57BL/6 雌鼠杂交 F1 代(B6CF1) 小鼠 24 只和昆明鼠(KM 鼠) 14 只作为供体鼠, 共取状态良好的受精卵 362 颗, 分别或混合回种于 8 只 B6CF1 和 16 只 KM 受体鼠输卵管内, 比较两种品系鼠的产仔率. 结果: 除同品系回种可产仔外, KM 鼠和 B6CF1 杂交鼠受精卵交叉回种 B6CF1 或 KM 受体鼠以及两品系受精卵混合回种均可产仔. 其中 B6CF1 受体鼠产仔率(29.0%) 明显高于 KM 受体鼠(7.0%), B6CF1 供体鼠产仔率(16.0%) 也略高于 KM 供体鼠(11.0%); 杂交 B6CF1 受精卵同品系回种产仔率最高(32.0%), KM 鼠受精卵同品系回种产仔率仅 4.0%, 而 B6CF1 和 KM 鼠作为受体鼠混合回种两品系受精卵的产仔率分别为 25.0% 和 15.0%. 结论: 不同品系小鼠胚胎可交叉或混合回种, 小鼠胚胎移植技术不受品系限制, 但同品系胚胎移植成功率更高, B6CF1 作为胚胎移植实验动物明显优于 KM 鼠.

【 关键词 】 胚胎移植 动物 基因修饰 小鼠品系**【 中图分类号 】** R3 S85 **【 文献标识码 】** A

0 引言

胚胎移植技术是制备转基因动物及其他显微操作工作的关键技术. 胚胎移植实验动物的选择直接影响移植效率和成功率. 小鼠是胚胎移植研究的主要实验动物之一. 不同品系小鼠对基因改造的反应区别非常明显^[1]. C57BL/6 和 Balb/c 小鼠是国际通用的近交系小鼠实验动物^[2]. 昆明鼠(KM 鼠) 是我国自行培育的远交系小鼠, 也是目前国内转基因实验研究对象之一. 国外有报道动物种系对转基因整合效率有一定影响^[3]. 目前关于 C57BL/6-Balb/c 杂交小鼠与 KM 鼠之间转基因和胚胎移植效率的比较研究及作为供体和受体鼠异同还较少报道. 为丰富 KM 鼠相关研究资料, 探讨 C57BL/6 雌鼠和 Balb/c 雄鼠杂交 F1 代(B6CF1) 和 KM 鼠作为供体鼠和受体鼠的异同, 我们以此两种品系成年鼠为对象, 分别进行了一系列相关比较分析.

1 材料和方法

1.1 材料 健康、清洁级和远交系 KM 小鼠 34 只, 6~10 wk 龄, 体质量 16~22 g; 健康、清洁级和近交

系 C57BL/6 和 Balb/c 小鼠各 10 只 6~8 wk 龄, 体重 16~22 g 杂交培育 B6CF1 小鼠 36 只(灰色)(南方医科大学实验动物中心)。孕马血清促性腺激素(PMSG, G-4877, Sigma 公司); 人绒毛膜促性腺激素(HCG, C-1063, Sigma 公司); 透明质酸酶(Sigma 公司)。显微操纵仪(Nikon 公司), 体视显微镜、拉针仪和毛细玻璃管(Narishige 公司), CO₂ 培养箱等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养基的配制 根据文献[4]自配 HEPES-CZB 培养基和 CZB 培养基, 于配制好当日取 20 颗状态良好的受精卵置于培养基内培养过夜, 以超过 80% 卵发育成二细胞期为培养基合格标准, 每次配制的培养基使用时间不超过 40 d。所有培养基在使用时均以矿物油覆盖。

1.2.2 超数排卵 将 8 wk 龄 B6CF1 雌鼠或 6~8 wk 龄 KM 雌鼠作为供体鼠, PMSG 和 HCG 间隔 46~48 h 注射, 然后分别与 B6CF1 雄鼠或 KM 雄鼠同种交配, 次日晨检查阴栓。将有阴栓的雌鼠处死, 收集超排卵, 并于 HEPES-CZB 培养基内轻柔洗涤 5~7 次, 完全去除颗粒细胞, 然后将卵置于 CZB 培养基内, 于 CO₂ 孵箱内短暂培养 30 min 左右。

1.2.3 受体鼠选择和制备 在供体鼠交配日同时选择发情期 KM 雌鼠或 B6CF1 雌鼠, 分别与同系的结扎雄鼠交配, 次日晨选择有明显阴栓的雌鼠作为受体鼠用于受精卵的回种。

1.2.4 胚胎移植 分别选取短暂培养的状态好的超排受精卵, 麻醉受体鼠, 并于腰背部、肋骨和髂骨之间切开皮肤和肌肉, 暴露并拉出卵巢和输卵管, 体视显微镜下找到输卵管伞部, 将受精卵通过输卵管伞部回种入受体鼠输卵管。根据供体鼠和受体鼠的品系将回种组合分为 3 组。① 同品系卵回种: KM 鼠卵回种于 KM 受体鼠, B6CF1 鼠卵回种于 B6CF1 受体鼠; ② 异品系卵回种: KM 鼠卵回种于 B6CF1 受体鼠, B6CF1 鼠卵回种于 KM 受体鼠; ③ 混合卵回种: 杂交鼠卵和 KM 鼠卵混合回种于 KM 受体鼠或 B6CF1 受体鼠。另外, 还根据回种卵的发育时期进行比较, 包括单细胞期受精卵回种、单细胞期和二细胞期受精卵混合回种以及二细胞期受精卵回种。

2 结果

2.1 不同品系的受精卵回种 不同品系的受精卵均可在回种 19~21 d 后产仔(图 1~4), 总产仔率为 25/169(17.0%), 单细胞期受精卵回种、单细胞期和二细胞期受精卵混合回种以及二细胞期受精卵回种情况下都可以成功产仔, 单细胞期和二细胞期的受精

卵同时回种于同一受体鼠, 可于回种后第 20 日和第 21 日分别产下一仔。



图1 B6CF1 母鼠回种 B6CF1 鼠卵(产 2 白 3 黑共 5 只 B6CF1 鼠仔)



图2 B6CF1 母鼠回种 KM 鼠卵(产 5 只白色 KM 小鼠)



图3 KM 母鼠回种 B6CF1 鼠卵(产 3 只 B6CF1 鼠仔)

2.2 受体鼠品系对回种成功率的影响 分别以两种品系受体鼠和受精卵交叉回种, 以及两品系卵混合回种于同一假孕母鼠后, B6CF1 受体鼠接受回种后产仔成功率明显高于 KM 受体鼠, 回种入 B6CF1 受体鼠的受精卵发育成小鼠的比例也明显高于 KM 受体鼠(表 1)。



图4 KM 母鼠回种同种 KM 鼠卵(产 2 只 KM 鼠仔)

表1 两种受体鼠品系回种成功率和产仔率比较 [n(%)]

受体鼠品系	受体鼠	产仔受体鼠	回种卵	产仔
F1	8	8(100.0)	132	38(29.0)
KM	16	6(38.0)	230	16(7.0)
合计	24	14(41.0)	362	54(17.0)

2.3 供体鼠品系对回种成功率影响 B6CF1 受精卵回种后产仔率比 KM 鼠稍高,两种品系卵混合回种产仔率略高于两种品系卵分别回种(表2)。

表2 两种品系供体鼠的回种成功率比较 [n(%)]

供体鼠品系	供体鼠	取卵	回种卵	产仔
F1	24	364	152	24(16.0)
KM	14	264	130	14(11.0)
混合	8	186	80	16(20.0)
合计	46	814	362	54(17.0)

2.4 不同供体鼠和受体鼠品系配对情况下对回种成功率影响 B6CF1 的受精卵回种后产仔率明显高于 KM 鼠卵的回种产仔率。其中,供体鼠和受体鼠均为 B6CF1 时,产仔率高于 KM 卵回种入 B6CF1 受体鼠和两种卵混合回种入 B6CF1 受体鼠,而不管供体鼠品系是 B6CF1 还是 KM 鼠或两种卵混合,KM 受体鼠的产仔率都较低(表3)。

表3 两种品系小鼠分别作为供体鼠和受体鼠进行配对回种成功率比较 [n(%)]

受体鼠品系	回种 F1 供体鼠卵		回种 KM 供体鼠卵		混合回种 F1 和 KM	
	回种卵	产仔	回种卵	产仔	回种卵	产仔
F1	56	18(32.0)	36	10(29.0)	40	10(25.0)
KM	96	6(6.0)	94	4(4.0)	40	6(15.0)

3 讨论

转基因研究动物品系的选择受多方法和多因素影响,其中最重要的条件是动物的产仔率。一般来说,远交系和杂交系产仔率比近交系卵移植产仔率更高。而且有研究表明动物品系对转基因成功率和基因表达水平有明显影响^[5-6]。杂交鼠呈现一种“杂交优势”,与近交系小鼠相比异常卵比例低,生育能力有所增强,产仔数多。KM 小鼠起源于远交系 SWISS 小鼠,于 1946 年由 Haffine 研究所引入云南昆明,经过半个多世纪的饲养繁殖,已成为我国目前使用最为广泛的小鼠,是我国独有的远交群实验动物^[7]。目前普遍认为 KM 远交系小鼠和杂交系小鼠均比近交系小鼠生殖能力好,产仔数多^[8]。已有的研究报道认为动物种系对转基因整合效率有一定影响,目前国内有报道 C57BL/6 和 KM 鼠的杂交 F1 代在转基因实验的基因整合方面优于 KM 鼠后代^[9-10],但是尚少见关于 B6CF1 小鼠与 KM 鼠之间胚胎移植成功率的比较研究。而 KM 鼠具有价格相对低廉的优点,如果与国际通用实验动物比较,KM 鼠胚胎移植效率没有差别,那么 KM 鼠将是很好的胚胎移植实验动物,至少可以作为一种很好的受体鼠,从而达到节约实验成本的目的,同时也可进一步丰富 KM 鼠作为供体鼠和受体鼠在胚胎移植方面的作用特点等相关实验资料。

本研究表明,KM 鼠超排卵数量和质量比 B6CF1 鼠高,而 B6CF1 小鼠作为受体鼠和供体鼠产仔率优于 KM 鼠。因此杂交 B6CF1 代作为转基因对象强过 KM 鼠;在受体鼠品系不限的情况下,B6CF1 鼠作为供体鼠其超排卵回种后发育成小鼠的比例高于 KM 鼠。说明受体鼠品系对胚胎移植成功率的影响比供体鼠品系更大。KM 鼠的卵同品种回种产仔率低于 B6CF1 代的卵和 KM 鼠卵混合回种入 KM 受体鼠,说明两种品系卵混合移植对移植产仔率也有一定影响,可能从另一个侧面提示卵本身品系对移植产仔率具有影响。我们还尝试了不同发育时期(单细胞期和二细胞期)的受精卵同时回种于同一受体鼠,结果该受体鼠于回种后第 20 日和第 21 日分别产下一仔。因此,我们认为小鼠胚胎移植不受品系和发育时期限制,但是品系对胚胎移植有显著影响,其中受体鼠品系对胚胎移植成功率的影响比供体鼠品系更大。B6CF1 小鼠作为供体鼠和受体鼠的胚胎移植成功产仔率明显高于 KM 鼠,是比较好的转基因实验候选动物。

【参考文献】

- [1] Fleming RE, CC Holden, Tomatsu S, et al. Mouse strain differences determine severity of iron accumulation in Hfe knockout model of he-

reditary hemochromatosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA , 2001 , 98(5) 2707 - 2711 .

[2] Zhang GL , Srinivasan KN , Veeramani A , et al. PREDBALB/c : A system for the prediction of peptide binding to H2d molecules , a haplotype of the Balb/c mouse[J]. Nucleic Acids Res , 2005 , 33(Web Server issue) : 180 - 183 .

[3] Brinster RL , Chen HY , Trumbauer ME , et al. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs[J]. Proc Natl Acad Sci USA , 1985 82(13) 4438 - 4442 .

[4] Chatot CL , Ziomek CA , Bavister BD , et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro[J]. J Reprod Fertil , 1989 86(2) 679 - 688 .

[5] Rose-Hellekant TA , Gilchrist K , Sandgren EP. Strain background alters mammary gland lesion phenotype in transforming growth factor-

alpha transgenic mice [J]. Am J Pathol , 2002 , 161 (4) : 1439 - 1447 .

[6] Popova E , Bader M , Krivokharchenko A. Production of transgenic models in hypertension[J]. Methods Mol Med , 2004 108 33 - 50 .

[7] 章根木 , 姚甘火. 中国昆明小鼠(KM 鼠) 遗传背景资料调查 [J]. 中国实验动物学杂志 , 1997 4 246 - 251 .

[8] 胡秀兰 , 胡柏林 , 韩世亮 , 等. 武汉所昆明小鼠生产性能试验研究 [J]. 中国实验动物学杂志 , 2002 12(1) 11 - 13 .

[9] 陈占昆 , 吕厚山 , 艾京 , 等. 人 $\beta 2m$ 转基因小鼠的制备、筛选及鉴定 [J]. 北京大学学报 医学版 , 2001 33(4) 366 - 369 .

[10] 陈占昆 , 吕厚山 , 王东 , 等. 人类白细胞抗原 B2704 基因在转基因小鼠中的整合与表达 [J]. 中华风湿病学杂志 , 2005 , 9(6) 321 - 324 .

编辑 王睿

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)14-1252-01

卤米松乳膏联用补骨脂素治疗白癜风疗效观察

廖卫东 (吉安市中心医院皮肤科 江西 吉安 343000)

【关键词】 卤米松 β -甲氧补骨脂素 白癜风
【中图分类号】 R758.41 【文献标识码】 B

0 引言 白癜风是一种获得性进行性皮肤色素障碍性疾病 , 治疗时间长 疗效不理想。我科 2004-09/2005-10 外用卤米松加 β -甲氧补骨脂素(8-MOP) 治疗白癜风 收到满意疗效。

1 临床资料 我院门诊白癜风患者 85(男 53 , 女 32) 例 , 年龄 4 ~ 57(平均 32.3) 岁 , 病程 3 mo ~ 21 a , 其中局限型 35 例 , 散发型 27 例 , 泛发型 8 例 , 肢端型 5 例 , 节段型 10 例 , 静止期 59 例 , 发展期 26 例。有 7 例分布于头皮且伴有白发 , 其他皮损多分布于面颈部、手足、躯干、外阴等部位。所有患者均无应用糖皮质激素和补骨脂素禁忌症 3 mo 内均未系统或局部使用治疗白癜风的藥物。

采用多中心随机法将患者(按年龄、病期、部位、面积等) 分为 3 组 , 即 8-MOP(浓度为 2 mL/L 本院自制) 加卤米松(商品名澳能 , 香港澳美制药有限公司 , 浓度为 0.5 g/L) 组 35 例 , 8-MOP 组 26 例 β -MOP 加丁酸氢化可的松软膏(商品名 尤卓尔) 24 例。所有患者每月门诊复诊 1 次 , 观察疗效及不良反应 , 总疗程 6 mo β -MOP 加卤米松组晨间外用 8-MOP 1 次 , 每日早、晚各用卤米松 1 次 β -MOP 组每日晨间用 8-MOP 1 次 ; 8-MOP + 尤卓尔组晨间用 8-MOP 1 次 , 每日早、晚各用尤卓尔 1 次。

用药 6 mo 后判定疗效 , 按全国中西医结合皮肤性病学会色素病学组制定的白癜风疗效标准^[1]。有效率 = ([痊愈数 + 显效数] / 治疗数) \times 100%。结果见表 1。8-MOP + 卤米松组有效率明显高于 8-MOP 组及 8-MOP + 尤卓尔组 ($P < 0.01$) ; 而 8-MOP + 尤卓尔组有效率高于 8-MOP 组 , 但经统计学检验差异无显著性 ($P > 0.05$)。8-MOP + 卤米松组有 2 例发生毛囊性丘疹 , 另两组未见这一不良反应 3 组均无皮肤萎缩或毛

细血管扩张 3 组分别有 1 , 7 , 5 例发生不同程度的红斑、水肿、水疱 , 减少用药量或暂停治疗 , 给予对症处理后症状消失。

表 1 3 组药物治疗白癜风的疗效比较 (n)

组别	n	痊愈	显效	有效	无效	有效(%)
8-MOP + 卤米松	35	17	12	5	1	82.9 ^b
8-MOP	26	7	5	12	2	46.2
8-MOP + 尤卓尔	24	8	5	10	1	54.2

^b $P < 0.01$ vs 8-MOP 和 8-MOP + 尤卓尔。

2 讨论 8-MOP 是一种光敏性化合物 , 能增加黑素细胞的密度 , 增加黑素细胞中酪氨酸的活性 , 从而促使黑素的生化合成、转运及扩散 , 促使肤色恢复正常。单独使用常引起一些不良反应 , 严重者需中断治疗。

卤米松是一种超强效糖皮质激素 , 外用于皮损局部可抑制引起黑素细胞破坏的局部免疫反应而终止白癜风的发展 , 并促进黑素细胞的恢复 , 且机体耐受性好^[2] , 还可能直接作用于黑素细胞本身 , 刺激黑素合成而诱导皮肤恢复正常色^[3]。Goldstein 等^[4]认为 , 外用糖皮质激素治疗白癜风与其强度有关。我科用超强效糖皮质激素 0.5g/L 卤米松乳膏联合外用 8-MOP 治疗白癜风的有效率明显高于单用 8-MOP 组或 8-MOP 联合中效糖皮质激素丁酸氢化可的松软膏组 , 且经统计学检验处理差异有显著性 , 虽然 8-MOP 组和 8-MOP + 尤卓尔组经统计学检验差异无显著性 , 但后者高于前者。外用卤米松乳膏还可以减轻 8-MOP 光敏性反应及其它不良反应 , 且经皮吸收极低 , 此种治疗方法病程短 , 疗效满意 , 经济实用 , 在临床工作中值得推广应用。

【参考文献】

[1] 中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会色素病学组. 白癜风临床分型及疗效标准(2003 年修订稿) [J]. 中华皮肤科杂志 , 2004 37(7) 440 .

[2] 吴纪园. 两种卤米松乳膏治疗局限性白癜风临床疗效对比 [J]. 临床皮肤科杂志 2005 34(2) 97 .

[3] Kim DG , Kim HY , Kim MY. Lincomycin abrogates dexamethasone-enhanced melanogenesis in B16 melanoma cells [J]. Pigment Cell Res , 1998 11(3) 143 - 150 .

[4] Goldstein E , Haberman HF , Menon IA , et al. Non-psoralen treatment of vitiligo. Part II. Less commonly used and experimental therapies [J]. Int J Dermatol , 1992 31(5) 314 - 319 .

编辑 袁天峰

收稿日期 2006-05-15 ; 接受日期 2006-06-20
作者简介 廖卫东 , 学士 , 主治医师。Tel : (0796) 8216163 Email : liaoweidong2005@126.com