

内毒素和大肠杆菌繁殖对小鼠胚胎体外发育的影响

冯 颖,徐维海,周文静,沈蓉蓉,王慧红,费小阳

(杭州市妇产科医院生殖医学中心,杭州 310000)

【摘要】目的:通过了解内毒素和大肠杆菌繁殖对小鼠胚胎发育的影响,探讨污染胚胎对内毒素的耐受性及胚胎污染的解决办法。**方法:**将 150 枚小鼠 2-细胞胚胎随机分成 5 组,A 组作为对照,B、C 组分别加入细菌内毒素 0.25 EU/ml、0.5 EU/ml,D、E 组均加入大肠杆菌,中途对 E 组换液,终止细菌污染。在第 2 天和第 4 天观察各组胚胎发育情况,对胚胎质量进行评估。**结果:**(1)对照组存活率和囊胚形成率均 100%,内毒素 B、C 2 组存活率和囊胚形成率均为 100%,囊胚形态学观察与对照组无差别。(2)D、E 组第 2 天存活无统计学差异($P>0.05$),第 4 天 E 组囊胚形成率明显高于 D 组($P<0.01$),但囊胚质量较差。**结论:**菌体繁殖代谢对胚胎的影响大于单纯的内毒素,及时终止污染可部分缓解细菌污染对胚胎发育的影响。

【关键词】内毒素;大肠杆菌;胚胎发育

【中图分类号】R927.12

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-08-18

Effect of endotoxin and *escherichia coli* reproduction on the development of mouse embryos *in vitro*

Feng Ying, Xu Weihai, Zhou Wenjing, Sheng Rongrong, Wang Huihong, Fei Xiaoyang

(Department of Obstetrics and Gynecology Hospital of Hangzhou Reproductive Medicine Center)

【Abstract】Objective: To explore the embryo tolerance of endotoxin and the solution to embryo contamination by discussing the effect of endotoxin and *escherichia coli* reproduction on the development of mouse embryos *in vitro*. **Methods:** Totally 150 mouse 2-cell embryos were randomly assigned into five groups, named groups A to E. A was control group; endotoxin was added to microdroplet of groups B and C at 0.25 EU/ml, 0.5 EU/ml; groups D and E were polluted by *escherichia coli* while culture media of group E was replaced after 24 h. To evaluate the quality of embryos, the development of embryos on the first day (D2) and the third day (D4) in different groups was observed. **Results:** The development rate and blastocyst rate were 100% in control group as well as in groups B and C without significant differences. On D2, the survival rates were not significantly different between groups D and E ($P>0.05$), but on D4, the blastocyst rate in group E was significantly higher than that in group D. **Conclusion:** Bacteria breeding exerts greater toxic effect on embryo development than endotoxin. Stopping contamination in time can improve the result of embryo development. Low dose of endotoxin has no effect on mouse embryos *in vitro*.

【Key words】endotoxin; *escherichia coli*; embryo development

目前,人类体外受精实验室普遍使用商品化培养基,研究证实商品性培养液中含有内毒素^[1]。培养基、液氮、空气污染均有可能成为内毒素的来源。IVF 中,细菌污染主要来自带菌的精液,其中大肠埃希菌是引起胚胎污染的最常见革兰氏阴性菌^[2]。细菌

在生长繁殖中,可产生大量的内毒素,对体外培养的精子、卵子、合子和胚胎存在多种有害毒性效应^[3],从而导致胚胎污染。本文通过细菌内毒素和耐药大肠埃希菌菌株分别污染小鼠卵裂期胚胎,观察内毒素和细菌污染对其发育的影响,并对部分大肠埃希菌污染胚胎采取清洗并更换含其他抗生素培养液的补救措施终止污染,观察补救措施的效果,从而探讨胚胎对内毒素的耐受性及胚胎发生细菌污染的处理方法。

作者介绍:冯 颖,Email:fengying0203@126.com,

研究方向:生殖医学。

通信作者:费小阳,Email:feixy1962@163.com。

基金项目:浙江省人口和计划生育科技资助项目(编号:JSW2013-A036)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150310.2154.011.html>

(2015-03-10)

1 材料与方法

1.1 试剂制备

细菌内毒素干粉(国产,1000 EU/支),用 G-1 培养液(瑞典,Vitro life)倍比稀释制成 5 EU/ml 的内毒素悬液备用;大肠杆菌菌液制备大肠杆菌为庆大霉素耐药(MIC 12 $\mu\text{g/ml}$),阿米卡星敏感(MIC ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$)菌株,用 G-1 培养液比浊和倍比稀释配制 100 cfu/ml 的菌悬液备用;用含 10% 血清代用品 SSS(Irvine,美国)的 G-1 培养液制成 50 μl 的微滴(G1 培养液成分中已含有庆大霉素),矿物油覆盖,所有胚胎于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、6%CO₂ 培养箱中培养。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠胚胎获取 12 只 4 周龄 C57BL/6J 雌鼠,腹腔注射孕马血清(PMSG)10 IU/只,48 h 后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(HCG)10 IU/只,hCG 注射后当晚,雌鼠与同系性成熟雄鼠按比例 1:1 合笼,第 2 天上午观察阴道栓,第 3 天上午将见栓雌鼠颈椎脱臼处死取胚,挑取 150 枚形态完好的 2-细胞胚胎备用,剩余胚胎冷冻保存。

1.2.2 小鼠胚胎分组及培养 将 150 枚胚胎随机分成 5 组,每组 30 枚胚胎:A 组为对照组,B 组内毒素浓度为 0.25 EU/ml,C 组内毒素浓度为 0.5 EU/ml,D 组为细菌污染后未处理组,E 组为细菌污染 1 d 后更换含不同抗生素的培养液组。按组别在预热后的微滴中各加入 10 枚鼠胚,每组 3 个微滴。B 组加入 2.5 μl 内毒素悬液,微滴中内毒素终浓度为 0.25 EU/ml;C 组加入 5 μl 内毒素悬液,微滴中内毒素终浓度为 0.5 EU/ml;D 和 E 组各加入大肠杆菌悬液 20 μl (每微滴含 2 条大肠杆菌),培养 24 h 后(D2)观察各组胚胎发育和细菌生长情况,并将 E 组胚胎清洗后转入新配制的含阿米卡星的 G-1 培养液中继续培养,72 h 后(D4)再观察每组胚胎发育和细菌生长情况并记录。

1.3 胚胎形态学观察

镜下观察各组胚胎发育、囊胚形成、细菌生长和胚胎死亡情况。将卵裂球退化、崩解的胚胎判定为死亡;根据 David Gardner 囊胚评分标准^[4]对囊胚进行分期和质量评价。对微滴

中培养液进行细菌培养,判定细菌生长情况。依据培养液的细菌培养结果判定细菌的生长情况。

1.4 统计学分析

相关数据采用 SPSS 11.0 进行分析,采用卡方检验进行统计分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 D1 观察结果

A 组培养液清亮,胚胎全部存活;B、C 组培养液清亮,胚胎全部存活;D、E 组培养液浑浊,存活率均明显低于 A 组($P<0.05$),观察 D、E 2 组的存活胚胎卵裂球数和细胞间致密程度明显低于 A 组胚胎,呈现发育迟滞的现象,见表 1。

表 1 5 组胚胎发育情况 (n,%)

Tab.1 Development of embryos in five groups (n,%)

组别	D2		D4		囊胚
	存活 (n,%)	死亡 (n,%)	存活 (n,%)	死亡 (n,%)	
A 组	30(100)	0(0)	30(100)	0(0)	30(100)
B 组	30(100)	0(0)	30(100)	0(0)	30(100)
C 组	30(100)	0(0)	0(100)	0(0)	30(100)
D 组	21(70) ^a	9(30)	0(0)	30(100)	0(0) ^b
E 组	22(73) ^c	8(27)	18(60)	12(40)	6(20) ^d

注:a:与 A 组相比, $\chi^2=10.588$, $P=0.002$;b:与 A 组相比, $\chi^2=60.000$, $P=0.000$;c:与 A 组相比, $\chi^2=9.231$, $P=0.002$;d:与 A 组相比, $\chi^2=40.000$, $P=0.000$;与 D 组相比, $\chi^2=6.667$, $P=0.024$

2.2 D4 观察结果

A 组培养液清亮,胚胎全部形成囊胚,B、C 组培养液较清亮,胚胎全部存活;D 组培养液浑浊,胚胎全部死亡;E 组培养液清澈,囊胚形成率明显高于 D 组($P<0.05$),而明显低于 A 组($P<0.05$);A、B、C 3 组囊胚均以 IV 期和 V 期囊胚为主,囊胚腔均已较好的扩张,囊胚的内细胞和滋养细胞数量较多,优质囊胚较多,E 组囊胚腔较小,部分为囊胚腔未完全扩张的 II 期囊胚,内细胞和滋养细胞数均较少,无优质囊胚。见表 2。

表 2 4 组囊胚质量评价

Tab.2 Quality evaluation on blastocysts in four groups

组别		I 期	II 期	III 期	IV 期	V 期	VI 期	合计
A 组	囊胚	0	0	2	13	15	0	30
	优质囊胚	0	0	2	12	15	0	29
B 组	囊胚	0	0	4	11	15	0	30
	优质囊胚	0	0	2	11	15	0	28
C 组	囊胚	0	1	6	10	13	0	30
	优质囊胚	0	0	2	9	13	0	24
E 组	囊胚	0	2	1	1	2	0	6
	优质囊胚	0	0	0	0	0	0	0

3 讨论

人类胚胎体外培养体系随时可能发生内毒素和细菌污染,这对胚胎的生长和发育造成严重影响。虽有对人类污染胚胎经过处理后移植,并成功分娩的报道^[5],但对污染胚胎的处理仍是一个有争议的问题。能确定病原体的种类和来源,对胚胎进行质量评估,针对不同的污染来源采取相应对策,对于辅助生殖来说尤为重要。

本文添加不同浓度内毒素的鼠胚,形态学观察发育均正常,均能形成囊胚;而采用大肠杆菌污染的小鼠 2-细胞胚胎发育受到了明显的影响,胚胎受到细菌污染第 1 天即出现胚胎发育迟缓、碎片比例高、卵裂球均一度差,继续培养至第 3 天则全部死亡。当培养液中内毒素浓度达 0.5 EU/ml 时,胚胎的存活率和囊胚形成率都未受到显著影响,小鼠 2-细胞胚胎对该浓度内毒素敏感度较低。虽然小鼠 1-细胞胚胎较之 2-细胞胚胎对内毒素敏感,但从 1-细胞胚胎体外培养至囊胚过程中,小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞效应难以控制,对实验结果造成影响。而去除卵透明带的小鼠胚胎对内毒素或培养液毒性物质的敏感性比卵透明带完整的 1-细胞或 2-细胞胚胎要高^[6],也可用于体外培养的质量控制。须注意的是,内毒素对小鼠胚胎发育的抑制效应剂量显著高于人类胚胎^[7],即小鼠胚胎对内毒素的抗性比人类胚胎强。为了建立有效的检测体系,要不断完善和改进鼠胚检测内毒素的方法,对体外培养系统进行严格质量控制。

细菌试验中,通过换培养液处理,可有效改善污染胚胎的发育环境,使部分胚胎继续发育成囊胚,但囊胚质量较差。有报道称,由卵裂期质量较差胚胎发育而来的囊胚,非整倍体概率增加,种植率和妊娠率均降低^[8]。因为胚胎体外培养需要合适的营养和环境条件,而细菌的快速生长繁殖消耗了培养液中胚胎发育所需的营养,释放大量的对胚胎具有毒性代谢物,影响胚胎的生长发育,大肠杆菌在繁殖或死亡时还释放内毒素,对胚胎具有多种细胞毒作用^[9],甚至导致胚胎死亡。因此受污染胚胎虽然发育形成囊胚,但其超微结构和分子水平是否受到损伤尚不清楚。由于没有相关文献报道细菌污染胚胎的最低浓度,本文每个微滴加入大肠杆菌数约为 2 条,模拟大肠杆菌感染的最低浓度。

通过本文研究,单纯性低剂量内毒素和大肠杆

菌分别污染胚胎,对胚胎发育的影响程度不同。小鼠 2-细胞胚胎对内毒素具有一定的抵抗作用,低浓度的内毒素对其发育到囊胚的进程影响不明显;而细菌污染造成的胚胎损伤很严重,可能是内毒素和细菌的综合作用所致。实验表明,单纯性的低剂量内毒素对小鼠 2-细胞胚胎影响不大,应尽量避免精液的细菌污染。在实际工作中,嘱咐患者取精前多饮水,排空膀胱,减少细菌的负荷量,并做好外阴和手的消毒及清洁工作^[10];对于患者精液或卵泡液中携带病原体,可使用敏感抗生素取卵或取精前预防用药;如果细菌来源是精液的病例用药无效,可改行 ICSI 方式受精,避免精液中细菌接触到卵子和培养体系,从而杜绝污染的可能性。同时,工作人员要有很强的无菌意识,杜绝操作过程中胚胎污染。另外,胚胎实验室人员要对实验室进行严格的耗材质控,并对环境中可能存在的内毒素污染因素进行有效的控制。总之,辅助生殖工作中,必须做好污染的预防和控制,尽量避免胚胎的污染,提高辅助生殖的成功率。

参考文献

- [1] Nagata Y, Shirakawa K. Setting standards for the levels of endotoxin in the embryo culture media of human in vitro fertilization and embryo transfer[J]. Fertil Steril, 1996, 65(3): 614-619.
- [2] Snyman E, Van der Merwe JV. Endotoxin-polluted medium in a human in vitro fertilization program[J]. Fertil Steril, 1986, 46(2): 273-276.
- [3] 朱伟杰, 李 菁. 辅助生育体外培养系统的内毒素控制[J]. 生殖与避孕, 2003, 23(3): 158-163.
- [4] Gardner DK, Phil D, Lane M, et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer[J]. Fertil Steril, 2000, 73(4): 1155-1158.
- [5] 李俐琳, 李穗萍, 林雯青, 等. 人类胚胎体外培养细菌污染 12 例分析[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(9): 1106-1107.
- [6] Montoro L, Subias E, Young P, et al. Detection of endotoxin in human in vitro fertilization by the zona-free mouse embryo assay[J]. Fertil Steril, 1990, 54(1): 109-112.
- [7] Randall GW, Gantt PA. Preimplantation murine embryos are more resistant than human embryos to bacterial endotoxins[J]. Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 1990, 7(5): 280-282.
- [8] 鲁振宇, 张云山, 糜若然. 胚胎发育对囊胚形成的影响[J]. 天津医药, 2010, 38(4): 257-259.
- [9] Kastrop PM, Graaf MLA, Gutknecht DR, et al. Microbial contamination of embryo cultures in an ART laboratory: sources and management[J]. Hum Reprod, 2007, 22(8): 2243-2248.
- [10] 马文敏, 张静雯, 宋春林, 等. 体外受精胚胎感染后的补救方法[J]. 中国妇幼保健, 2009, 21(2): 244-246.

(责任编辑: 冉明会)