

小鼠卵泡卵母细胞的一步冷冻研究

郝志明 钱菊汾 王建辰

(家畜生殖内分泌研究室)

摘要 通过对冷冻液和平衡时间的筛选,研究了裸露小鼠卵泡卵母细胞的一步冷冻。结果表明:当冷冻液含25%的1,2-丙二醇和0.25 mol/L的蔗糖,平衡时间为10 min时,冷冻效果最为有效,解冻后存活率和形态正常率分别达66.2%和58.1%。解冻后形态正常的卵泡卵母细胞可以发育成熟,成熟率为22.7%。

关键词 一步冷冻, 卵泡卵母细胞, 小鼠

中国分类号 S865.130.3

卵泡卵母细胞的冷冻保存是一项很有意义但较为困难的工作。自从Whittingham首次研究以来^[1],成功的报道寥寥无几。范必勤等和南桥·昭等曾分别用DMSO和甘油对卵泡卵母细胞的冷冻进行了研究^[2,3],但都仅局限于缓慢冷冻。

在整个非结晶状态时,1,2-丙二醇有较大的稳定性和较小的冰晶形成可能性;而且1,2-丙二醇在室温下的毒性较低^[4]。Trounson等曾将1,2-丙二醇和蔗糖结合起来组成冷冻液,对小鼠2细胞胚胎进行了一步冷冻,获得较为满意的结果^[5]。本研究旨在选择出合适的1,2-丙二醇和蔗糖浓度,使一步冷冻法适用于卵泡卵母细胞,并期望解冻后卵母细胞的体外成熟率有所提高。

1 材料和方法

1.1 试验动物

4~6周龄的健康雌性昆明小鼠60只,体重20~30 g,由第四军医大学实验动物中心提供。

1.2 仪器与试剂

①YDS-30液氮罐 成都液氮容器厂产品。

②0.25 mL细管和聚乙烯醇粉末 美国产。

③WJ-6D CO₂培养箱 日本平沢制作所制造。

④新生犊牛血清(NCS) 自制。

⑤冲卵液 加有5%~10% NCS的改良杜氏磷酸缓冲液(mD-PBS)。

⑥冷冻液用50% 1,2-丙二醇(PROH)、2.0 mol/L蔗糖和20% NCS的mD-PBS按不同比例混合形成不同冷冻液:25% PROH-1.0 mol/L蔗糖,20% PROH-1.0 mol/L蔗糖,15% PROH-1.0 mol/L蔗糖,25% PROH-0.75 mol/L蔗糖,25% PROH-

文稿收到日期:1990-05-23。

• 国家教委博士点基金资助项目。

0.5 mol/L 蔗糖, 25% PROH-0.25 mol/L 蔗糖和25% PROH。

⑦0.8% 台盼兰染色液 临用时取4份1%台盼兰加入1份4.25%氯化钠水溶液混合而成。

⑧培养液 加有20%NCS的mD-PBS。

1.3 冷冻方法

①采卵 断颈处死阴门红肿小鼠, 取卵巢置解剖镜下, 用5号针头刺破卵泡, 挤出卵母细胞。检出的卵用冲卵液洗2次, 选择无卵丘细胞或仅粘附少量卵丘细胞的完全或大部分裸露的卵母细胞(图1-1)进行冷冻。

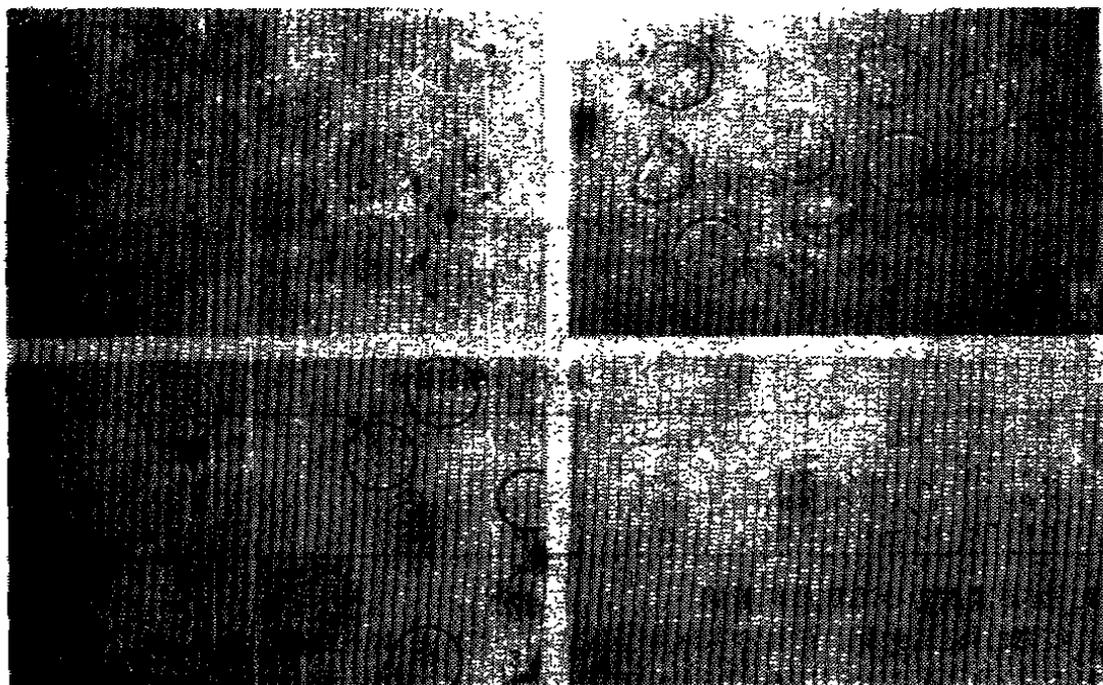


图1. 裸露小鼠卵泡卵母细胞的形态(150×)

1.冻前; 2.冷冻液中; 3.除去防冻剂后; 4.成熟后

②平衡 将裸露卵泡卵母细胞移入冷冻液中平衡5, 10, 15min(图1-2)。

③装管 见图2。

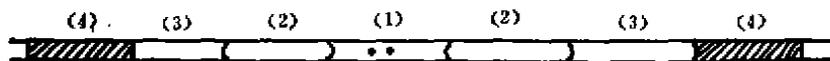


图2 卵母细胞装管示意图

(1)含卵的冷冻液; (2)气泡; (3)冷冻液; (4)聚乙烯醇

④冷冻 将细管垂直放入预冷的钢筒内, 在平衡的最后25~30s, 将钢筒缓慢投入液氮中。

⑤解冻和除去防冻剂 将细管直接放在20℃的水中解冻。解冻后剪去细管封口, 将

卵母细胞直接回收于含有相应浓度的蔗糖溶液中(如冷冻液为25% PROH-0.25 mol/L蔗糖时, 则用0.25 mol/L的蔗糖溶液)。10 min后, 将卵母细胞移入含20% NCS的mD-PBS中。10 min后洗2次, 进行效果评价。

⑥冷冻效果评价 将卵母细胞置于0.8%台盼兰中2 min, 检查卵母细胞着色与否。不着色者定为存活卵。在存活卵母细胞中, 凡圆形、胞浆均匀及反光者定为形态正常卵(图1-3)。

⑦卵母细胞培养 将解冻后存活的形态正常的卵母细胞放在培养液中培养, 15~16h后检查极体的有无(图1-4)。

1.4 统计分析

试验结果用卡平方测验进行统计处理。

2 结果

2.1 PROH浓度对冷冻效果的影响

冷冻液中蔗糖浓度保持不变, 改变PROH浓度进行试验。结果3组的卵母细胞存活率($\chi^2 = 7.4$, $P < 0.05$)和形态正常率($\chi^2 = 2.6$, $P > 0.05$)都随PROH浓度的下降而降低(表1)

表1 PROH对冷冻效果的影响

%

冷冻液	回收率	存活率	形态正常率
25% PROH-1.0 mol/L蔗糖	96.5	15.9	2.4
20% PROH-1.0 mol/L蔗糖	90.5	12.3	0
15% PROH-1.0 mol/L蔗糖	82.7	0	0

2.2 蔗糖浓度对冷冻效果的影响

根据2.1试验结果, 保持冷冻液中25%的PROH不变, 将蔗糖浓度改变为1.0 mol/L, 0.75 mol/L, 0.5 mol/L和0.25 mol/L(表2)。表2表明, 解冻后卵母细胞的存活率($\chi^2 = 77.4$, $P < 0.01$)和形态正常率($\chi^2 = 88.1$, $P < 0.01$)随蔗糖浓度的降低而显著增加。当蔗糖浓度为0.25 mol/L时, 解冻后卵母细胞的存活率和形态正常率最高, 分别为66.2%和58.1%。

表2 蔗糖对冷冻效果的影响

%

冷冻液	回收率	存活率	形态正常率
25% PROH-1.0 mol/L蔗糖	96.5	15.9	2.4
25% PROH-0.75 mol/L蔗糖	93.3	25.7	21.4
25% PROH-0.5 mol/L蔗糖	88.4	47.4	43.4
25% PROH-0.25 mol/L蔗糖	91.4	66.2	58.1
25% PROH	86.1	2.0	2.0

2.3 平衡时间对冷冻效果的影响

以25% PROH-0.25 mol/L蔗糖作冷冻液, 将小鼠卵母细胞分别平衡5, 10和15min

后再行冷冻(表3)。表3表明,平衡时间以10 min最好,延长或缩短5 min均显著降低卵母细胞的存活率($\chi^2 = 4.6, P < 0.05$; $\chi^2 = 16.3, P < 0.01$)和形态正常率($\chi^2 = 31.9, P < 0.01$; $\chi^2 = 13.4, P < 0.01$)。

表3 平衡时间对冷冻效果的影响

平衡时间 (min)	%		
	回收率	存活率	形态正常率
0	92.9	28.3	24.5
10	91.4	66.2	58.1
15	92.5	44.9	6.1

2.4 解冻卵母细胞的体外培养

22枚解冻后形态正常的卵母细胞在培养液中进行培养,培养后的成熟卵母细胞及成活卵母细胞分别占5枚和4枚,成熟率为22.7% (5/22)。

3 讨论

3.1 冷冻方法及效果

卵泡卵母细胞极为幼嫩脆弱,抵抗力非常弱。至今,其冷冻仍停留在繁琐的慢冻阶段。解冻后的存活率为31.1% (10%甘油作为冷冻液)或92.5% (1.5 mol/L的DMSO作为冷冻液)^[3,21]。本试验以Trounson等对2细胞胚胎的冷冻方法为基础^[6],通过对冷冻液中PROH和蔗糖浓度以及平衡时间的筛选,首次实现了卵泡卵母细胞的一步冷冻,冷冻效果与Trounson等的相似^[6]。解冻后卵母细胞的存活率和形态正常率达66.2%和58.1%。

经过冷冻的卵泡卵母细胞,解冻后再完成体外成熟是较为困难的。Whittingham发现,小鼠卵泡卵母细胞冷冻后的体外成熟率不超过10.0%^[11]。范必勤等则将解冻后的牛卵泡卵母细胞的成熟率提高到25.0%^[3]。本研究也只取得与范必勤等的结果相似的解冻后卵母细胞的成熟率。但据作者的资料(待发表),试验用培养液不是小鼠卵泡卵母细胞体外成熟的最佳培养基,如果选用适合小鼠卵母细胞体外成熟的WM培养基,解冻后卵泡卵母细胞的成熟率将可能会有较大的提高。

3.2 冷冻液对冷冻效果的影响

卵母细胞冷冻所用的防冻剂有DMSO、甘油和PROH。卵母细胞冷冻选用何种防冻剂效果较好,目前还难以确定。几年前,范必勤等和南桥.昭等分别选用1.5 mol/L DMSO和10%甘油对牛卵泡卵母细胞进行慢冻,得到92.5%和31.1%的存活率^[2,3],似乎DMSO效果比甘油好。从Critser等的冷冻试验可以看出,即使DMSO,也对卵母细胞有毒性,他们发现1.5 mol/L的DMSO虽不影响解冻后的形态正常率,但已显著干扰了受精;就是VS₁液,随着DMSO浓度的升高也会影响卵母细胞形态正常率和受精率^[6]。对于PROH,虽然到现在还未见到其对卵母细胞有无毒性及毒性强弱的报道,但就兔胚而言,其毒性要比DMSO弱^[4]。作者曾将小鼠裸露卵泡卵母细胞置于25% PROH-0.5 mol/L蔗糖和25%甘油-0.5 mol/L蔗糖的溶液中,平衡5 min后除去防冻剂,存活率分别为100% (12/12)和9.1% (1/11),PROH呈现出很大的优越性。冷冻结果表

明, 本试验的结果优于Surrey和Quinn用DMSO和蔗糖作为防冻剂的结果^[7]。因此, PROH是较为适合卵母细胞冷冻的一种防冻剂, PROH和蔗糖组成的冷冻液是较为有效的一步冷冻保护剂。

参 考 文 献

- 1 Whittingham D G. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocyte previously stored at -196°C . *J Reprod Fert*, 1977, 49: 89
- 2 南桥·昭, 山本裕介, 芦野正城等. 牛卵泡卵子的冻结保存. *Japn J Anim Reprod*, 1985, 33 (4): 85
- 3 范必勤, Ridha M T, Dekelow W R. 牛卵泡卵母细胞超低温冷冻和解冻后的体外培养成熟. *江苏农业学报*, 1985, 1 (2): 27~32
- 4 Renard J P, Nguyen B X, Garnier V. Two-step freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J Reprod Fert*, 1984, 56: 573~580
- 5 Trounson A, Peure A, Kirby C. Ultrarapid freezing, a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fert Steril*, 1987, 48(5): 843~850
- 6 Critser J K, Arneson B W, Aaker D V et al. Cryopreservation of hamster oocytes, effects of vitrification or freezing on human sperm penetration of zona-free hamster oocytes. *Fert Steril*, 1986, 46: 277
- 7 Surrey E, Quinn P. Ultrarapid freezing (UF) of unfertilized oocytes. *Fert Steril*, 1988, suppl, 118

One-step Freezing of Follicular Oocytes in Mouse

Hao Zhiming Qian Jufen Wang Jianchen

(Laboratory of Reproductive Endocrine in Domestic Animals, Northwestern Agricultural University)

Abstract One-step freezing on denuded follicular oocytes in mouse was studied by selecting freezing solution and equilibration time. The results indicated that when the oocytes were placed in modified Dulbeccos phosphate buffered saline containing 25% 1,2-propanediol and 0.25 mol/L sucrose for 10 minutes, freezing was the most efficient, and after unfreezing, the survival and normal morphological rate reached 66.2% and 58.1%. However, the normal morphological oocytes after unfreezing were cultured in vitro, the maturation rate was 22.7%.

Key words one-step freezing, follicular oocyte, mouse