

OPS 玻璃化冷冻对山羊卵母细胞超微结构的影响

刘海军², 张美佳¹, 侯 蓉¹, 张志和¹, 王基山¹, 兰景超¹, 钱菊汾³, 张安居¹

(1 成都野生濒危动物繁殖与遗传开放实验室, 成都 610081; 2 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112;

3 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 对山羊不同发育阶段卵母细胞 OPS 玻璃化冷冻的超微结构损伤进行了电镜观察。结果表明, 卵丘细胞除内质网扩张外, 未见其他明显的结构损伤; 卵母细胞的质膜损伤以 GV 期最为严重, 其次为培养 9 h 的, IVM 的最轻; GV 期卵几乎看不到微绒毛, 而培养 9 h 和 IVM 卵微绒毛保存较好; GV 期卵母细胞线粒体有的发生了损伤, 主要表现在嵴不清或扩张, 培养 9 h 和 IVM 卵母细胞的线粒体基本上保持了正常的结构; 培养 9 h 卵母细胞的内质网发生了扩张, IVM 卵母细胞内质网结构正常。

[关键词] 卵母细胞; OPS 玻璃化; 超微结构; 山羊

[中图分类号] S827.36

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)03-009-04

通过随时随地提供具有发育能力的卵母细胞, 山羊卵母细胞冷冻保存将赋予体外受精、核移植、转基因等相关技术应用的极大灵活性, 还可为珍稀濒危动物的保种提供技术参考。关于山羊卵母细胞冷冻保存研究的报道很少, 已有的报道表明, 与未冷冻卵母细胞相比, 冷冻卵母细胞的成熟率、受精率、卵裂率都很低^[1~3]。冷冻卵母细胞发育能力降低, 是因为冷冻过程造成了卵母细胞结构损伤。未见有冷冻对山羊卵母细胞超微结构影响的报道。本研究对 OPS 玻璃化冷冻山羊不同发育阶段, 卵母细胞超微结构的损伤进行了电镜观察, 旨在为改进冷冻方法, 提高冷冻效果提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 卵母细胞采集

山羊卵巢取自成都市郊个体屠宰厂, 山羊品种为成都麻羊。用双面刀片切割卵巢表面 2~6 mm 卵泡, 选择含一层以上致密卵丘细胞、形态正常的卵母细胞, 用于冷冻或成熟培养。

1.2 卵母细胞成熟培养

卵母细胞成熟培养液为 TCM199+25 mmol/L Hepes+2.2 g/L NaHCO₃+0.11 g/L 丙酮酸钠+体积分数 10% NCS+0.06 g/L 青霉素+0.1 g/L 链霉素+10 μg/mL FSH+20 μg/mL LH+1 μg/mL 17β-E₂, 卵母细胞在 CO₂ 培养箱中培养 9 h

或 24~26 h (38.5 °C、体积分数 5% CO₂、饱和湿度)。

1.3 OPS 玻璃化冷冻和解冻

将普通细管(0.25 mL)拉至管壁和直径均为原来的一半, 中间割断, 制成 OPS 管。基础液为 TCM199+体积分数 20% NCS。冷冻液 I: 基础液+体积分数 10% EG+体积分数 10% DMSO; 冷冻液 II: 基础液+体积分数 20% EG+体积分数 20% DMSO。解冻液 I: 基础液+0.25 mol/L 蔗糖; 解冻液 II: 基础液+0.15 mol/L 蔗糖。卵母细胞分 GV 期(培养 0 h)、培养 9 h 和 IVM(培养 24~26 h)3 组进行冷冻。卵母细胞先在冷冻液 I 中平衡 30~45 s, 然后用 OPS 管尖端接触包含有冷冻液 II 的微滴(1~2 μL), 卵子随即被吸入, 迅速浸入液氮。从放入冷冻液 II 至浸入液氮, 时间不超过 25 s。解冻时将 OPS 管从液氮中取出, OPS 管尖端直接插入解冻液 I 中, 卵子借助重力从管端流出, 进入解冻液 I, 停留 1 min 后, 转移至解冻液 II 中, 停留 5 min, 最后在基础液中洗 2 次, 每次 5 min。

1.4 电镜样本制作

取冷冻的 GV 期、培养 9 h 和 IVM 卵母细胞各 5 枚, 用体积分数 2.5% 戊二醛(4 °C)和质量浓度 10 g/L 的锇酸双重固定后, 丙酮脱水, Epon812 包埋, 聚合, 制作超薄切片, 用醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色, 透射电镜(JEM-100CX II)观察。

[收稿日期] 2001-01-02

[基金项目] 成都大熊猫繁育研究基金(9820); 国家计划与发展委员会资助项目(1996-2277)

[作者简介] 刘海军(1967—), 男(蒙古族), 内蒙古赤峰人, 助理研究员, 博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

2 结果与分析

2.1 GV 期卵母细胞

卵丘细胞质膜和核膜完整,可见线粒体嵴及双层膜(图 1),粗面内质网扩张(图 2)。卵母细胞质膜很不清楚,损伤明显,几乎看不到微绒毛(图 3);线粒体电子致密度高,颜色深,典型的带帽线粒体少,线粒体膜完整,嵴清楚(图 4),有的线粒体看不到嵴或嵴扩张(图 5);胞质的空泡多,大小不一致,大空泡较少(图 4)。

2.2 培养 9 h 卵母细胞

卵丘细胞与 GV 期的卵丘细胞相似,除可见内质网扩张外,核膜、质膜清楚,线粒体膜清楚,可见嵴(图 6)。卵母细胞质膜有损伤,可见有断裂现象,有些部位其损伤比 GV 期的轻,卵周隙内可见倒伏的微绒毛(图 7);带帽线粒体多,膜嵴结构清晰,内质网包在线粒体外,有扩张现象(图 8);空泡数量多,大小不一(图 7)。

2.3 IVM 卵母细胞

卵质膜较清楚,且较完整,其冷冻损伤比培养 9 h 的卵更轻,卵周隙内有竖起的微绒毛断面(图 9);线粒体主要为带帽线粒体,膜、嵴清楚,有些内质网包在线粒体外,内质网结构完整;空泡数量较多,大小不一(图 10)。

以上的观察结果可见,GV 期和培养 9 h 的卵丘细胞,除内质网扩张外,未见其他明显的结构损伤。卵母细胞的质膜损伤以 GV 期最为严重,其次为培养 9 h 的,IVM 的最轻;GV 期卵几乎看不到微绒毛,而培养 9 h 和 IVM 卵微绒毛保存较好;GV 期卵母细胞线粒体有的发生了损伤,主要表现在嵴不清楚或扩张,培养 9 h 和 IVM 卵母细胞的线粒体基本上保持正常结构;培养 9 h 卵母细胞的内质网发生了扩张,IVM 卵母细胞内质网结构正常。

3 讨论

冷冻对卵丘细胞造成的损伤是轻微的,只表现在内质网扩张。孙青原^[4]报道,冷冻的牛 GV 期卵丘细胞,扩张的内质网经体外培养后可恢复正常。Le Gal^[2]在生化上证明,冷冻和未冷冻的山羊 GV 期卵丘细胞,表现出相似的蛋白合成。由于卵丘细胞对卵母细胞的成熟具有重要作用,因此可认为冷冻卵母细胞的成熟率下降,主要是由于冷冻对卵母细胞本身造成的损伤引起的。从总体上讲,GV 期→培养 9 h→IVM 卵母细胞的冷冻损伤逐渐减小,主

要表现在质膜的损伤,以 GV 期卵最重,培养 9 h 卵次之,IVM 卵最轻。GV 期卵未见微绒毛,线粒体有损伤,培养 9 h 和 IVM 卵微绒毛保存较好,线粒体结构完整,培养 9 h 卵母细胞内质网有扩张现象,IVM 卵母细胞的内质网结构正常。据此推论,从 GV 期到 MⅡ期卵母细胞对冷冻的抵抗能力逐步提高,是一个渐进性的过程,随着培养时间延长而增加。孙青原^[4]认为,与牛 GV 期卵母细胞相比,体外成熟的卵母细胞冷冻损伤较轻,主要表现为细胞膜完整、微绒毛保存或减少不多、囊泡不发生融合或较少发生融合;Fuku 等^[5]也发现,玻璃化冷冻的牛未成熟卵母细胞微绒毛、线粒体、囊泡受到破坏,GV 期卵母细胞对玻璃化冷冻的敏感性比 IVM 卵母细胞更高。GV 期卵母细胞冷冻解冻后,质膜和绒毛膜的破坏主要是由于溶液效应(渗透作用)引起的细胞收缩、膨胀造成的。未成熟卵母细胞膜表面有微绒毛伸入透明带中,与透明带联系较紧密,卵母细胞收缩时,容易造成膜和微绒毛破坏。而 IVM 卵母细胞由于微绒毛已从透明带中撤出,卵母细胞收缩时,没有透明带对微绒毛的牵拉作用,因而对质膜和微绒毛的破坏小。

在冷冻解冻过程中,质膜和微绒毛的破坏是主要的损伤。质膜在细胞生活中起着重要作用,因为细胞与环境发生的一切联系和反应,都必须通过质膜来实现^[6],卵母细胞膜还参与受精时精卵质膜的融合,因此,卵母细胞膜的损伤,对其发育是致命的。在程序冷冻时,平衡过程中由于渗透压的差异,水及冷冻保护剂快速通过质膜、冷冻解冻过程中细胞内冻晶的形成、稀释过程中细胞过度膨胀以及冷冻保护剂与细胞膜直接相互作用(如离子泵崩解)等都可引起细胞膜的破坏^[7,8]。玻璃化溶液的化学毒性也可引起质膜的超微结构破坏^[9]。微绒毛的破坏可能会影响到受精过程,因为正常受精时,精子质膜不与缺乏微绒毛区域的卵质膜融合。

冷冻后的卵母细胞的细胞器如线粒体、内质网受到不同程度的损伤。本研究观察到线粒体损伤的主要特征是嵴不清或扩张,内质网的损伤表现在发生了扩张,这可能是由于渗透作用引起的,即冷冻解冻过程中水分快速进出细胞造成的。

由此看来,冷冻卵母细胞的发育潜力下降,是与其超微结构的损伤密切相关的。

4 结论

本研究首次对山羊卵母细胞的 OPS 玻璃化冷

冻损伤进行了超微结构观察,发现卵母细胞受损伤严重的结构是质膜和微绒毛;IVM 卵母细胞,其冷

冻损伤较GV 期和9 h 的卵轻;GV 期和培养9 h 卵母细胞的卵丘细胞结构保存较好。

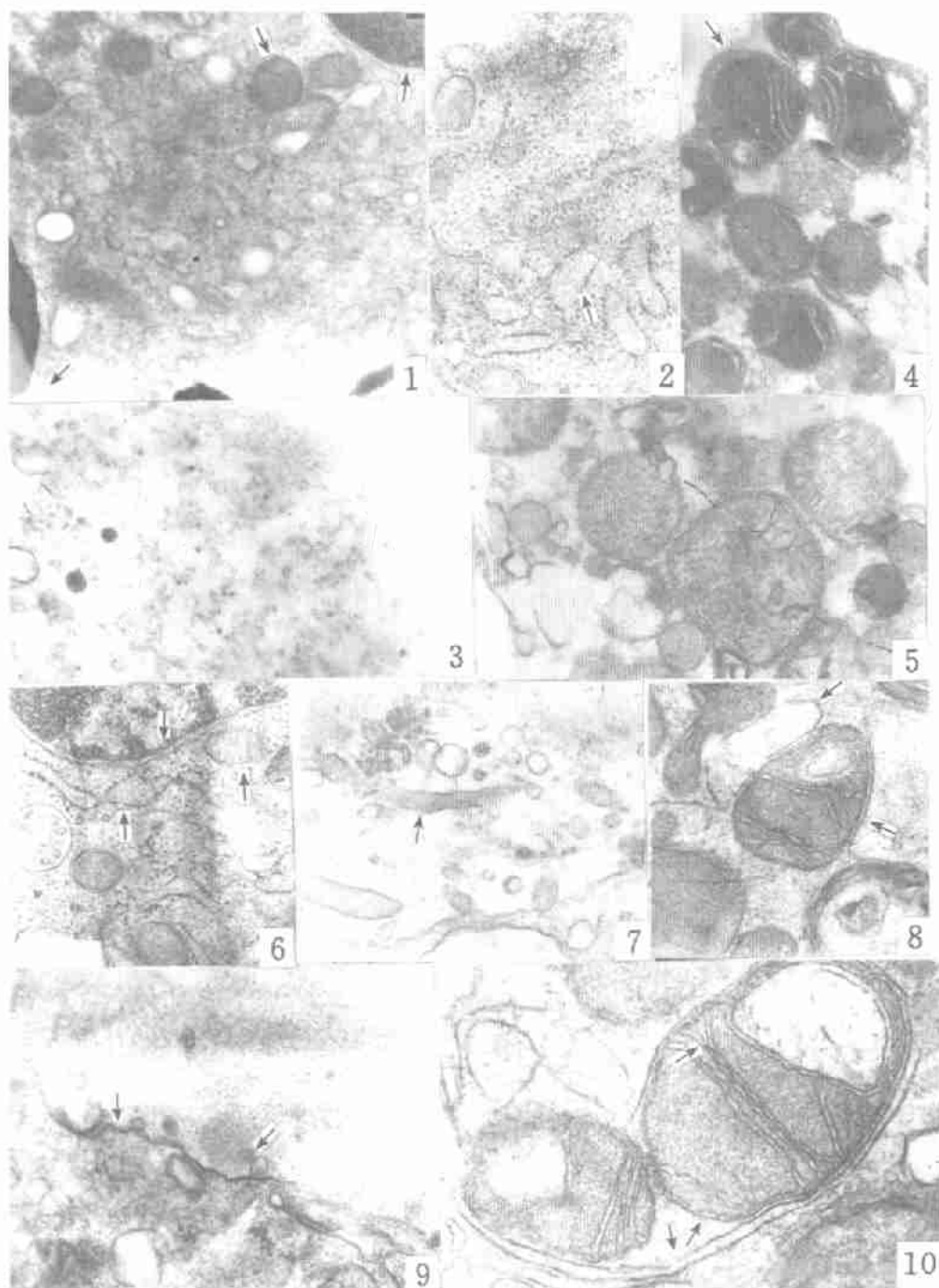


图1~10 OPS玻璃化冷冻对山羊卵母细胞超微结构的影响

1~5. 冷冻的GV期卵母细胞。1. 卵丘细胞质膜、核膜、线粒体正常, $\times 29\,000$; 2. 卵丘细胞内质网扩张, $\times 29\,000$; 3. 卵母细胞质膜模糊、微绒毛消失, $\times 29\,000$; 4. 卵母细胞线粒体保存较好, $\times 29\,000$; 5. 卵母细胞线粒体峰不清晰或扩张, $\times 29\,000$ 。6~8. 冷冻的培养9 h 的卵母细胞。6. 卵丘细胞核膜、线粒体正常, 内质网有扩张现象, $\times 29\,000$; 7. 卵母细胞质膜有损伤, 微绒毛保存较好, $\times 29\,000$; 8. 卵母细胞线粒体保存较好, 内质网有扩张现象, $\times 36\,000$ 。9~10. 冷冻的IVM 卵母细胞。9. 卵母细胞质膜较完整, 微绒毛保存较好, $\times 36\,000$; 10. 卵母细胞线粒体、内质网结构正常, $\times 48\,000$ 。

Figs. 1~10 Ultrastructural changes in goat oocytes cryopreserved by OPS vitrification

Figs. 1~5. Ultrastructural changes of vitrified goat GV oocytes. Fig. 1. Oolemma, nuclear envelope and mitochondria of cumulus cell kept normal structure, $\times 29\,000$; Fig. 2. Endoplasmic reticulum (ER) of cumulus cell swelled, $\times 29\,000$; Fig. 3. Oolemma of oocytes was not clear and

microvilli was absent, $\times 29\ 000$; Fig. 4. Mitochondria of oocytes was basically well-preserved, $\times 29\ 000$; Fig. 5. Mitochondrial cristae of oocytes was not cleared or swelled, $\times 29\ 000$. Figs. 6~8. Ultrastructural changes of vitrified goat oocytes cultured for maturation of 9 h. Fig. 6. Nuclear envelope and mitochondria of cumulus cell kept normal structure, and endoplasmic reticulum (ER) swelled, $\times 29\ 000$; Fig. 7. Oolemma of oocytes was partly damaged, and microvilli was basically well-preserved, $\times 29\ 000$; Fig. 8. Mitochondria of oocytes was basically well-preserved, and endoplasmic reticulum (ER) swelled, $\times 36\ 000$. Figs. 9~10. Ultrastructural changes of vitrified goat IVM oocytes. Fig. 9. Oolemma and microvilli was basically well-preserved, $\times 36\ 000$; Fig. 10. Mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) of oocytes kept normal structure, $\times 48\ 000$.

[参考文献]

- [1] 郝志明, 张 涌, 钱菊汾. 山羊卵泡母细胞低温冷冻保存研究[J]. 西北农业大学学报, 1992, 20(增刊): 121—124.
- [2] Le Gal F. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage[J]. Theriogenology, 1996, (45): 1177—1185.
- [3] 刘海军. 山羊卵母细胞冷冻保存研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2000.
- [4] 孙育原. 牛卵母细胞体外成熟、冷冻及受精的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 1994.
- [5] Fuku E, Xia L, Downey B R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification[J]. Cryobiology, 1995, (32): 139—156.
- [6] 汪莹仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学[M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1990. 81.
- [7] Shaw P W, Fuller B J, Bernard A, et al. Vitrification of mouse oocytes improved rates of survival, fertilisation and development to blastocysts[J]. Mol Reprod Dev, 1991, (20): 373—378.
- [8] Arakawa T. The basis for toxicity of certain cryoprotectants; A hypothesis [J]. Cryobiology, 1990, (27): 401—415.
- [9] Fujikawa S. Ultrastructural studies of mouse embryos cryopreserved by one-step vitrification procedure[J]. Cryobiology, 1992, 29: 275.

Ultrastructural changes in goat oocytes cryopreserved by OPS vitrification

LIU Hai-jun², ZHANG Mei-jia¹, HOU Rong¹, ZHANG Zhi-he¹,

WANG Ji-Shan¹, LAN Jing-Chao¹, QIAN Ju-fen³, ZHANG An-ju¹

(1 Chengdu Open Laboratory on Reproduction and Genetics of Endangered Wildlife, Chengdu 610081, China;

2 Tianjin Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Tianjin 300112, China;

3 College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Ultrastructural damage of goat oocytes at different maturation stage was investigated after OPS vitrification procedure using transmission electron microscopy (TEM). Cumulus cells keep normal structure except the swelling of endoplasmic reticulum (ER). The oolemma was most seriously damaged in GV oocytes, the second in 9 h, the third in IVM. Microvilli in GV oocytes was often absent, but in 9 h and IVM oocytes, microvilli was well-preserved. Swelling of mitochondrial cristae was seen in GV oocytes. Mitochondria in 9 h and IVM oocytes was basically well-preserved. Swelling of ER was seen in 9 h oocytes, ER was well-preserved in IVM oocytes.

Key words: oocytes; OPS vitrification; ultrastructure; goat