

# 牛卵泡卵母细胞冷冻保存的研究\*

于永生<sup>1,3</sup>, 常万存<sup>1</sup>, 李鹏<sup>2</sup>, 严娟<sup>2</sup>, 刘艳<sup>1</sup>, 马世援<sup>1</sup>, 李青旺<sup>3</sup>

(1 山东省农科院高新技术中心, 山东 济南 250100; 2 山东中大胚胎中心, 山东 曹县 274400;

3 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 研究了用3种不同方法(A法:程序冷冻;B法:超快速冷冻;C法:玻璃化冷冻)冷冻保存的牛GV期卵母细胞的发育潜力。结果表明,解冻后,C组卵母细胞形态正常率显著高于A、B组;3种方法冷冻的卵母细胞成熟培养后,平均卵丘扩展率为65%,其中C组最高(69%);3组冷冻卵母细胞的体外成熟率、体外受精率和卵裂率分别为14.3%,17.1%,21.6%;11.1%,12.6%,15.1%和5.6%,9.1%,11.1%。结果还表明:玻璃化冷冻的卵母细胞损伤较轻。

[关键词] 牛;卵泡卵母细胞;冷冻保存;体外受精

[中图分类号] S823.3<sup>+</sup>4 [文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)02-0051-04

自Whittingham<sup>[1]</sup>首次报道来自冷冻解冻的小鼠卵母细胞的活仔以来,研究者对人及家畜的卵母细胞冷冻保存也进行了探索,已获得来自冷冻解冻的人卵母细胞婴儿<sup>[2]</sup>。家畜主要集中在牛上进行了研究,并获得了为数很少的来自冷冻的牛体外成熟<sup>[3]</sup>和未成熟<sup>[4]</sup>卵母细胞的牛犊。卵母细胞的冷冻方法借鉴了胚胎的冷冻方法,但其效果远不如胚胎冷冻。目前,只有小鼠成熟卵母细胞的冷冻取得了较为理想的效果,牛、羊等其他动物冷冻卵母细胞的受精率、卵裂率和发育率与未冷冻卵泡卵母细胞相比都很低。本试验研究了用3种不同方法冷冻保存的牛卵泡卵母细胞的发育潜力,旨在探索简单、高效的卵母细胞保存技术,提高冷冻效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 卵泡卵母细胞的收集

从屠宰厂获取牛卵巢,置于30~35℃生理盐水(添加青霉素和链霉素)中,3h内运至实验室。用带12号针头的20mL注射器从卵巢表面2~6mm的卵泡中抽取卵泡液,注入灭菌平皿中沉淀5min后,在实体显微镜下检出包被2层以上卵丘细胞、透明带完整、胞质均匀的卵丘-卵母细胞复合体(COC),用PBS+体积分数5%的新生牛血清(NCS)和M199+体积分数10%的NCS各洗2遍,进行冷冻。

### 1.2 卵母细胞的冷冻

用下述3种方法进行冷冻。A法:把COC置于PBS+体积分数20%NCS+体积分数5%甘油和PBS+体积分数20%NCS+体积分数10%甘油中各平衡10min,温度保持在30℃,然后每50个COC装入1支0.25mL的冷冻细管中,用CL-863程序冷冻仪进行冷冻。首先以5.0℃/min的速度降至20℃,保持5min,再以2.0℃/min的速度降至0℃,保持10min,再以8.0℃/min的速度降至-5℃,保持30min,最后以0.30℃/min的速度降至-40℃,保持10min,投入液氮。B法:将卵母细胞置于含体积分数10%乙二醇的PBS中平衡5min,再转入PBS+体积分数25%乙二醇中,立即装管,在液氮面平衡3min后,投入液氮。C法:配制含质量分数30%聚蔗糖,0.5mol/L蔗糖的PBS液(FS),用FS将乙二醇稀释成体积分数20%和体积分数40%,即EFS20和EFS40液。卵母细胞先移入PBS+体积分数10%乙二醇或EFS20中预处理3min,再移入EFS40中,立即装管,经2min液氮熏蒸后投入液氮。

### 1.3 卵母细胞的解冻

保存1月后,从液氮中取出冷冻细管,置空气中3~5s后,在37℃水浴中解冻。A法:将COC依次放入PBS+0.5mol/L蔗糖+0.67mol/L甘油、PBS+0.5mol/L蔗糖+0.33mol/L甘油、PBS+

\* [收稿日期] 2001-10-31

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(Q99D06)

[作者简介] 于永生(1976-),男,山东夏津人,在读硕士,主要从事动物生殖生理与调控技术的研究。

0.5 mol/L 蔗糖中,三步脱去甘油,每步 5~7 min。B 法和 C 法用 PBS+ 0.5 mol/L 蔗糖一步脱除冷冻保护剂,脱除保护剂的 COC 用成熟培养液(M199+ 体积分数 10% 发情牛血清)洗 2 次,在实体显微镜下检查形态是否正常。卵丘细胞未脱落,透明带完整,胞质均匀的卵母细胞,判为形态正常。

#### 1.4 卵母细胞的成熟培养

将形态正常的 COC 移入 M199+ 体积分数 10% 的发情牛血清(ECS)中,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 22~24 h,培养条件为 39 ℃,体积分数 5% CO<sub>2</sub>,饱和湿度。

#### 1.5 卵母细胞的体外受精

由新鲜精液利用上游法<sup>[5]</sup>获取高活率精子,离心洗涤 2 次,用受精液(Tyrode's+ 6 mg/mL BSA+ 30 μg/mL 肝素)将精子稀释为(1×10<sup>7</sup>) mL<sup>-1</sup>。将卵丘细胞发生扩展的大部分 COC 用受精液清洗 2~3 次后,转移到受精液中,加入精子,使其密度为(1.5×10<sup>6</sup>) mL<sup>-1</sup>。受精 20 h 后转移至 M199+ 体积分数 10% ECS 培养液中。

#### 1.6 卵母细胞成熟及受精检查

COC 培养 22~24 h 后,脱去卵丘细胞,如发现第一极体,判为成熟,将受精后 20 h 的 COC 脱去卵丘细胞,如发现第二极体,判为受精。观察受精后 50 h 的卵母细胞,看是否卵裂。

#### 1.7 统计分析

用 *t* 检验分析比较 3 种方法(各设 3 个重复)冷冻的卵母细胞的回收率、形态正常率、培养后卵丘扩展率、成熟率、受精率及卵裂率。

## 2 结果与分析

本研究共收集 76 头牛的卵巢,获卵母细胞 1 102 枚,平均每头 14.5 枚,其中形态正常的卵母细胞 915 枚,占 83.0%,平均每头 12.0 枚。

3 种不同冷冻方法冷冻卵母细胞解冻后的回收率、形态正常率如表 1。由表 1 可见,所有冷冻的卵母细胞解冻后的回收率接近 92%,C 组卵母细胞的形态正常率明显高于 A、B 组。少量的卵母细胞胞质变暗,也有的卵丘与卵母细胞分离,形成裸卵。

表 1 牛冷冻卵母细胞解冻后回收率和形态正常率

Table 1 Recovery rate and survival rate of cryopreserved bovine oocytes

方法 Method	冷冻数 No. of cryopreserved oocyte	回收率 Recovery rate	形态正常率 Survival rate
A	337	291/337(86.3%) a	217/291(74.6%) a
B	283	263/283(92.9%) b	190/263(71.2%) a
C	295	283/295(95.9%) b	255/283(90.1%) b

注: a 与 b 间差异极显著( $P < 0.01$ )。Note: Significantly different within a and b ( $P < 0.01$ )。

冷冻后的卵母细胞培养成熟情况见表 2。由表 2 可见,在体外培养的 COC 中,近 65% 的卵丘能正常扩展,呈粘稠的棉絮状。3 种方法冷冻的卵母细胞培

养后卵丘细胞扩展率及卵母细胞成熟率均较低,但 C 法显著高于 A 法和 B 法。在所检查的卵母细胞中,仅有 17.8% 出现第一极体。

表 2 牛冷冻卵母细胞的体外成熟率

Table 2 *In vitro* cultural rate of cryopreserved bovine oocytes

方法 Method	培养数 No. of cultured oocyte	卵丘扩展率 Cumulus expansion rate	体外成熟率 <i>In vitro</i> cultural rate
A	217	134/217(61.3%) a	5/35(14.3%) a
B	190	122/190(64.2%) a	6/35(17.1%) b
C	255	176/255(69.0%) b	8/37(21.6%) c

注: a 与 b、b 与 c 间差异显著( $P < 0.05$ ), a 与 c 间差异极显著( $P < 0.01$ )。表 3 同表 2。

Note: Significantly different within a and b, b and c ( $P < 0.05$ ), Significantly different within a and c ( $P < 0.01$ ). Table 3 is the same as table 2

冷冻保存的卵母细胞体外受精及其后的发育能力如表 3。由表 3 可见,进行体外受精的卵母细胞仅有 13.2% 排出第二极体,3 种方法冷冻的卵母细胞

受精率均低于 20%,A、B 两种方法无显著差异,但均显著低于 C 法。发生卵裂的仅有 8.8%,也以 C 法为最高。

表 3 牛冷冻卵母细胞体外受精及发育

Table 3 *In vitro* fertilization and development of cryopreserved bovine oocytes

方法 Method	授精数 Inseminated number	受精率 Fertilization rate	卵裂率 Cleavage rate
A	99	11/99(11.1%) a	3/54(5.6%) a
B	87	11/87(12.6%) b	5/55(9.1%) b
C	139	21/139(15.1%) c	8/72(11.1%) c

## 3 讨论

### 3.1 玻璃化冷冻法和程序冷冻法比较

在卵母细胞冷冻方法中,超快速冷冻和玻璃化冷冻是较简单经济的两种方法。Schellander等<sup>[6]</sup>证实,二甲基亚砜对牛GV期卵母细胞的毒性最大,甘油、乙二醇优于DM SO,而Lim等<sup>[7]</sup>认为,从解冻的形态正常率、卵裂率来看,乙二醇优于甘油。因此,本研究用体积分数10%甘油和体积分数25%乙二醇、体积分数40%乙二醇3种保护剂和程序冷冻法,超快速冷冻法、玻璃化冷冻法3种冷冻方法保存牛卵泡卵母细胞。结果表明,玻璃化冷冻法效果最佳,程序冷冻法效果最差。

### 3.2 冷冻保存对卵母细胞发育潜能的影响

Niemann<sup>[8]</sup>报道,牛GV期卵母细胞冷冻后很少(6%)能体外成熟。Furu等<sup>[9]</sup>揭示,冷冻牛GV期卵母细胞体外成熟后的受精率仅为7.7%~9.1%,仅有0.8%受精后卵裂。Schellander等<sup>[6]</sup>利用3种冷冻保护剂(甘油、丙二醇和二甲基亚砜)冷冻牛GV期卵母细胞,卵裂率分别达到10.7%、12.7%、5.1%。Lim等<sup>[7]</sup>提出,牛未成熟卵母细胞冷冻后的成熟及发育潜力比正在成熟及已经成熟的卵母细胞差,但其研究结果好于上述报道,卵裂率达5.5%~12.5%。国内范必勤等<sup>[9]</sup>慢速冷冻牛GV期卵母细胞,快速解冻后卵母细胞存活率为86%,成熟率为15.1%;孙青原<sup>[10]</sup>用程序冷冻法冷冻牛GV期卵母细胞,解冻后的存活率达75%,但体外培养仅14.4%出现第一极体。本研究中,冷冻后牛GV期卵母细胞体外培养后,近65%卵丘可发生扩展。但体外成熟及体外受精率仅为17.8%和13.2%。卵丘扩展是卵母细胞成熟所必需的,卵丘扩散的卵母细胞大多可发生“生发泡破裂”,成熟率和受精率较低,说明卵母细胞不能进行正常的分裂。Wu等<sup>[12]</sup>报道了冷冻牛GV期卵母细胞,微管和纺锤体的形成均受到影响,无法进行正常的减数分裂。Hochi等<sup>[13]</sup>对马的未成熟卵母细胞玻璃化冷冻后的超微结构进行了观察,发现在卵质周围有大的空泡存在,线粒体电子致密度降低、肿胀。也有人认为,冷冻破坏了卵丘细胞与卵母细胞之间的联系,使细胞信号无法传递,而这些信号是卵母细胞成熟所必需的<sup>[14]</sup>。总之,冷冻解冻过程中,卵母细胞要经历温度和渗透压的变化,这些变化都可能造成卵母细胞的损伤,对以后的发育产生影响。

### 3.3 超快速冷冻法与程序冷冻法的比较

用超快速冷冻法冷冻小鼠和牛的成熟卵母细胞已取得成功。Hao等<sup>[14]</sup>用该法冷冻小鼠卵泡卵母细胞,解冻后形态正常率达58.1%,形态正常的卵母细胞体外成熟率为22.7%。Van der Elst等<sup>[16]</sup>用该法冷冻小鼠成熟卵母细胞的存活率、受精率分别为80%~90%和56%,46%的受精卵体外发育为胚胎。Martino等<sup>[17]</sup>利用电子显微镜铜纱网作为牛成熟卵母细胞冷冻载体,进行了超快速冷冻,结果卵裂率可达30%。在本试验中,超快速冷冻后的GV期COC,其体外成熟率和卵裂率均高于程序冷冻法,达到17.1%和9.1%。Azam uja<sup>[18]</sup>和Wu<sup>[12]</sup>均证实,牛的卵母细胞对低温是非常敏感的。而程序冷冻法要在0℃经过一段时间,造成对卵母细胞的低温打击,从而影响其发育潜力。而超快速冷冻法可很快经过致死温区,在0℃停留的很短。但超快速冷冻法利用高浓度的冷冻保护剂(甘油、乙二醇等),由于其膜渗透性低,会引起对细胞膜的严重渗透性损伤<sup>[19]</sup>,这也是为什么超快速冷冻法保存的卵母细胞不如玻璃化冷冻保存的卵母细胞发育潜力高的原因。

### 3.4 玻璃化冷冻法的原理与优点

玻璃化冷冻是根据物理学原理,将高浓度的低温保护剂(约7 mol/L)在超低温环境下凝固,形成无规则的玻璃化样固体,这种固态物质能保持液态时的正常分子与离子分布,因而在细胞内发生玻璃化时能起到保护作用。COC在该冷冻液中脱水到一定程度后,可引起内源性大分子如蛋白质及已渗透到胞内的冷冻保护剂浓缩,从而使细胞在急剧降温过程中得到保护。本试验的玻璃化冷冻液采用分子量低、渗透性强、化学毒性低的乙二醇作为细胞内液抗冻剂;高分子量的聚蔗糖和蔗糖不能渗透到细胞内部,为细胞外液抗冻剂。聚蔗糖的溶解度高,速冻后易形成玻璃化状态,减少了由于冰晶形成而造成透明带及胞质的损伤。蔗糖具有冷冻前脱水、调整胚胎内外渗透压和解冻后细胞内乙二醇脱出的作用。由于玻璃化冷冻具有以上优点,使得在本试验中解冻后的卵母细胞卵裂率、成熟率均显著高于其他两种方法,但卵母细胞的发育潜力仍受到很大损伤,因此,有必要继续深入研究玻璃化冷冻液的组成,以期更好地保护卵母细胞,减轻受损程度。

本研究表明,牛GV期卵母细胞冷冻解冻后能体外成熟、体外受精及卵裂。但对于卵母细胞的低温生物学特征仍需进行深入研究。通过随时随地提供具有发育能力的卵母细胞,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极大的 样性提供有效的技术支撑<sup>[20]</sup>。  
灵活性,还可为珍稀濒危动物的保种和保持物种多

### [参考文献]

- [1] Whittingham D G. Fertilization in vitro and developments to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at - 196 [J]. J Reprod Fertil, 1977, 49: 89- 94
- [2] Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation[J]. Lancet, 1986, 2: 884- 886
- [3] Vajta G, Holm P, Kuwayama M, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryo [J]. Mol Reprod Dev, 1998, 51: 53- 58
- [4] Suzuki T, Nishikata Y. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one-step dilution method in vitro[J]. Theriogenology, 1992, 37: 306
- [5] 马云. 牛卵泡卵母细胞体外成熟、体外受精及受精卵体外培养的研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2001.
- [6] Schellander K, Peli J, Schmolz F, et al. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes[J]. Theriogenology, 1994, 42: 909- 915
- [7] Lin J M, Fukui Y, Ono H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization[J]. Theriogenology, 1992, 37: 351- 361.
- [8] Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs[J]. Theriogenology, 1991, 35(1): 109- 124
- [9] Fuku E, Xia L, Downey B R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification[J]. Cryobiology, 1995, 32: 139- 156
- [10] 范必勤, Ridha M T, Dukelow W R. 牛卵泡卵母细胞的超低温冷冻和解冻后的体外培养成熟[J]. 江苏农业学报, 1985, (1): 27- 32
- [11] 孙青原, 刘国艺, 冯怀亮, 等. 牛卵泡卵母细胞冷冻保存后发育潜力的研究[J]. 中国兽医学报, 1994, 14(4): 341- 345
- [12] Wu B, Tong J, Leibo S P. Effect of chilling bovine germinal vesicle-stage oocytes on formation of microtubules and the meiotic spindle [J]. Theriogenology, 1998, 49(1): 177.
- [13] Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T. In vitro maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocyte after vitrification[J]. Cryobiology, 1996, 33: 300- 310
- [14] Ledda S, Leoni G, Boylston L, et al. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking[J]. Theriogenology, 2001, 55(6): 1359- 1369
- [15] Hao Z. Ultrarapid freezing of follicular oocytes in mice[J]. Theriogenology, 1990, 33: 365
- [16] Van der Elst. Development capacity of mouse oocytes after ultrarapid freezing[J]. Cryobiology, 1991, 28: 514
- [17] Martino A, Songasen N, Leibo S P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling[J]. Biol Reprod, 1996, 54: 1059- 1069
- [18] Azambuja R M, Kraemer D C, Westhusin M E. Effect of low temperature on in vitro matured bovine oocytes[J]. Theriogenology, 1998, 49: 1155- 1164
- [19] 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
- [20] 刘海军, 张美佳, 侯蓉, 等. OPS 玻璃化冷冻对山羊卵母细胞超微结构的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版). 2001, 29(3): 9- 12

## Research on cryopreservation of bovine follicular oocytes

YU Yong-sheng<sup>1,3</sup>, CHANG Wan-cun<sup>1</sup>, LI Peng<sup>2</sup>, YAN Juan<sup>2</sup>, Liu Yan<sup>1</sup>, MA Shi-yuan<sup>1</sup>, LI Qing-wang<sup>3</sup>

(1 High-Tech Research Centre of Shandong Academy of Agriculture Sciences, Jinan, Shandong 250100, China;

2 Research Centre of embryo technology, Zhongda Group, Caoxian, Shandong 274400, China;

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

**Abstract:** The developmental competences of bovine GV-Stage oocytes cryopreserved by three methods (Method A: Conventional freezing procedures; Method B: ultrarapid freezing; Method C: Vitrification) were studied. After thawing, the morphological normal rate of Group C was significantly higher than those of group A and B. The average cumulus expansion rate of all the cultured oocytes was 65% and that of group C was the highest (69%). The in vitro maturation rates were 14.3%, 17.1% and 21.6%, and the fertilization rates were 11.1%, 12.5% and 15.0%, and the oocyte cleavage rates were 5.6%, 9.1% and 11.1% in group A, B, C oocytes cryopreserved respectively. The results showed that the injuries of vitrified oocytes were less severe.

**Key words:** bovine; follicular oocytes; cryopreservation; *in vitro* fertilization