

玻璃化冷冻保存牛卵母细胞技术研究^{*}

李青旺¹, 于永生¹, 江中良¹, 王立强¹, 胡建宏¹, 常万存²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100; 2 山东农科院 高新技术中心, 山东 济南 250100)

[摘要] 采用一步法和二步法研究玻璃化冷冻保存的牛生发泡(GV)期和体外成熟(IVM)卵母细胞的发育潜力。结果表明, 冷冻基础液 PBS 和 TCM 199 在玻璃化冷冻中的效果差异不显著($P > 0.05$); 冷冻程序和卵母细胞发育阶段对冷冻效果有明显影响, 二步法冷冻效果显著优于一步法($P < 0.05$), IVM 卵母细胞冷冻效果显著优于 GV 期($P < 0.05$)。

[关键词] 牛; 卵母细胞; 玻璃化冷冻

[中图分类号] S823.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0109-04

自 Wittingham^[1]首次报道冷冻-解冻的小鼠卵母细胞活仔以来, 许多研究者对人及家畜的卵母细胞冷冻保存技术进行了探索, 目前已获得来自冷冻-解冻的人卵母细胞的婴儿^[2]及牛体外成熟和未成熟卵母细胞的牛犊^[3,4]。家畜的卵母细胞冷冻保存研究主要集中在牛上, 卵母细胞的冷冻方法借鉴了胚胎的冷冻方法, 但其效果远不及胚胎冷冻。目前只有小鼠成熟卵母细胞的冷冻取得了较为理想的结果^[5], 而牛等其他动物卵母细胞的受精率、卵裂率和发育率, 与未冷冻卵母细胞相比都很低^[6], 还亟待进一步研究。本试验采用一步法和二步法, 通过对牛卵母细胞玻璃化冷冻保存方法的研究, 试图探索一种简单、高效的冷冻-解冻保存体系, 为进一步提高牛卵母细胞冷冻保护效果提供理论基础和技术途径。

1 材料与方法

1.1 操作液

体外成熟培养液基础液 TCM 199 + 10 mmol/L Hepes + 0.055 g/L 丙酮酸钠 + 2.2 g/L 碳酸氢钠 + 0.031 g/L 青霉素钠。

成熟培养液 基础液 + 体积分数 10% 发情牛血清 (ECS)。

受精卵培养液 基础液 + 体积分数 5% ECS + 体积分数 5% 新生犊牛血清 (NCS)。

精子洗涤液 Tyrode's 液 + 6 g/L BSA + 1 mg/L 亚牛磺酸。

精子获能液和受精液 Tyrode's + 6 g/L BSA

+ 30 mg/L 肝素 + 1 mg/L 亚牛磺酸。

玻璃化基础液 (FS, Ficoll and Sucrose) A 为 PBS + 300 g/kg 聚蔗糖 + 0.5 mol/L 蔗糖 + 体积分数 20% NCS; B 为 TCM 199 + 300 g/kg 聚蔗糖 + 0.5 mol/L 蔗糖 + 体积分数 20% NCS。

玻璃化冷冻液 将 FS 液用乙二醇分别稀释成体积分数为 20%, 30% 和 40% 的液体, 即冷冻液 EFS20, EFS30 和 EFS40; 解冻液为 TCM 199 + 体积分数 20% NCS + 0.5 mol/L 蔗糖。

1.2 卵母细胞的获取

将牛屠宰后, 立即剖腹, 无菌法采集卵巢, 然后投入温度为 37℃ 左右, 并且加有适量青霉素钠和链霉素钾的灭菌生理盐水的保温瓶中, 4 h 内送到实验室后, 先用灭菌生理盐水洗涤 3 次, 再用装有 16 号针头的 5 mL 注射器抽吸卵巢表面直径为 2~6 mm 卵泡内的卵母细胞。在实体显微镜下选择含有 2 层以上致密卵丘细胞, 形态正常的卵丘卵母细胞复合体, 此时该复合体处于生发泡期 (GV 期), GV 期卵母细胞经成熟培养液清洗 2~3 次后, 进行成熟培养或冷冻保存。

1.3 卵母细胞的玻璃化冷冻与解冻

将获取的 GV 期卵母细胞, 或体外成熟 (IVM) 的卵母细胞先移入 EFS20 或 PBS/TCM 199 + 体积分数 10% 乙二醇中预处理 3 min, 再移入 EFS40 中, 或卵母细胞直接移入 EFS40 中后, 立即装入细管, 用聚乙烯醇粉末封口, 然后立即投入液氮中。解冻时, 从液氮中取出细管, 在空气中停留 10 s 后, 投

^{*} [收稿日期] 2002-11-04

[基金项目] 98 留学回国启动基金 (4130107); 山东省自然科学基金资助项目 (Q99D06)

[作者简介] 李青旺 (1956-), 男, 陕西西脂人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理与调控技术的研究。

入 37℃温水中轻轻振动 10 s 后,将内容物用装有解冻液的注射器向外冲入到培养皿中,接着在实体显微镜下检出卵母细胞,并放入解冻液中,平衡 5 min 后,一步脱除冷冻保护剂,用体外成熟培养液清洗 3 遍,每遍 5 min。

1.4 卵母细胞的成熟培养

将获取的 GV 期卵母细胞,或冷冻保存的 GV 期卵母细胞解冻后,用成熟培养液清洗 2 遍,放入加有预先平衡 2 h 成熟培养液的四孔培养板(400 μ L/孔)中,培养 22~24 h(卵母细胞 50~60 个/孔),培养条件为体积分数 5% CO₂, 38.5℃,饱和湿度(以下均同)。

1.5 卵母细胞体外受精及胚胎早期培养

利用上浮法获取新鲜精液中高活率的精子^[7],经离心处理后,用受精液悬浮精子,并调整精子浓度为 $2 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个/mL,孵育 15 min,使其获能。同时将体外成熟培养的卵母细胞(包括新鲜和冷冻的)或解冻后的成熟卵母细胞用受精液洗涤 3 遍后,放入 50 μ L 预孵 2 h 的受精液微滴中,每微滴 10~20 枚卵母细胞,每微滴受精液中加入 50 μ L 获能后的精子悬液,使精子的最终浓度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$

个/mL,二者共孵育 8 h。将受精卵转移至含有输卵管小片段的受精卵培养液中,受精后 20 h 观察第二极体,受精后 48 h 观察卵裂并吸弃未分裂的单细胞,并且每 24 h 更换一半受精卵培养液。

1.6 冷冻效果评定

解冻后卵丘细胞未脱落、透明带完整、胞质均匀的卵母细胞判为形态正常。GV 期卵母细胞解冻后进行 NM,随机抽取一部分判定成熟率(以排出第一极体判为成熟),体外受精后随机抽取一部分判定受精率(以排出第二极体判为受精),以卵母细胞受精后分裂为 2~4 个细胞判为卵裂。

2 结果与分析

2.1 冷冻基础液对 GV 期卵母细胞发育的影响

PBS 和 TCM 199 作为玻璃化冷冻的基础液,对 GV 期卵母细胞形态正常率、成熟率、受精率、卵裂率的影响见表 1。 t 检验和方差分析(以下均同)表明,以 PBS 和 TCM 199 作为玻璃化冷冻的基础液,解冻后 GV 期卵母细胞各项指标差异均不显著($P > 0.05$),说明本试验所用基础液类型并不影响 GV 期卵母细胞的发育。

表 1 冷冻基础液对 GV 期卵母细胞发育的影响

Table 1 Effect of holding medium s on the development competences of bovine GV oocytes

冷冻基础液 Holding medium	卵母细胞数 No. of oocytes	形态正常率/% Rate of natural oocytes	成熟率/% Maturation rate	受精率/% Fertiliza- tion rate	卵裂率/% Cleavage rate
PBS	452	83.2(376/452) a	17.0(16/94) a	11.8(10/85) a	7.1(14/197) a
TCM 199	508	83.9(426/508) a	17.8(18/101) a	12.5(12/97) a	9.2(21/229) a

注:同一列中标注不同字母者表示差异显著($P < 0.05$),下表同。

Note: Figures with different letters in the same column show significant difference, $P < 0.05$. The following tables are just the same.

2.2 冷冻程序对 GV 期卵母细胞发育的影响

采用一步法(不预先处理,直接移入冷冻液)和二步法(预先处理后再移入冷冻液),分别对 GV 期卵母细胞进行冷冻,2 种方法对其形态正常率、成熟率、受精率和卵裂率的影响结果见表 2。表 2 结果表

表 2 冷冻程序对 GV 期卵母细胞发育的影响

Table 2 Effect of steps of cryopreservation on the development competences of bovine GV oocytes

冷冻程序 Freezing procedure	卵母细胞数 No. of oocytes	形态正常率/% Rate of natural oocytes	成熟率/% Maturation rate	受精率/% Fertiliza- tion rate	卵裂率/% Cleavage rate
一步法 One-step method	467	77.3(361/467) a	13.0(13/100) a	9.4(9/96) a	4.9(8/165) a
二步法 Two-step method	493	89.5(441/493) b	22.1(21/95) b	15.3(13/85) b	10.3(27/261) b

2.3 冷冻基础液对 NM 卵母细胞发育的影响

PBS 和 TCM 199 作为玻璃化冷冻的基础液,对 NM 卵母细胞形态正常率、成熟率、受精率和卵裂率的影响见表 3。结果(表 3)表明,以 PBS 和

明,以二步法和一步法玻璃化冷冻保存 GV 期卵母细胞,解冻后的各项指标前者显著优于后者($P < 0.05$),说明冷冻程序对 GV 期卵母细胞的发育有显著影响。

TCM 199 作为玻璃化冷冻的基础液,解冻后的各项指标差异均不显著($P > 0.05$),表明本试验所用基础液类型并不影响 NM 卵母细胞的发育。

表 3 冷冻基础液对 NM 卵母细胞发育的影响

Table 3 Effect of holding medium s on the development competences of bovine NM oocytes

冷冻基础液 Holding medium	卵母细胞数 No. of oocytes	形态正常率/% Rate of natural oocytes	受精率/% Fertiliz- ation rate	卵裂率/% Cleavage rate
PBS	517	85.7(443/517) a	30.1(25/83) a	23.9(86/360) a
TCM 199	502	85.9(431/502) a	31.2(29/93) a	24.6(83/338) a

2.4 冷冻程序对 NM 期卵母细胞发育的影响

一步法(不预先处理,直接移入冷冻液)和二步法(预先处理后再移入冷冻液)对 NM 卵母细胞形态正常率、成熟率、受精率、卵裂率的影响结果见表

4。表 4 结果表明,以二步法和一步法玻璃化冷冻保存 NM 卵母细胞,解冻后的各项指标前者显著优于后者($P < 0.05$),说明冷冻程序对 NM 卵母细胞的发育有显著影响。

表 4 冷冻程序对 NM 期卵母细胞发育的影响

Table 4 Effect of steps of cryopreservation on the development competences of bovine NM oocytes

冷冻程序 Freezing procedure	卵母细胞数 No. of oocytes	形态正常率/% Rate of natural oocytes	受精率/% Fertiliz- ation rate	卵裂率/% Cleavage rate
一步法 One-step method	472	79.9(377/472) a	25.0(23/92) a	17.9(51/285) a
二步法 Two-step method	547	90.9(497/547) b	36.9(31/84) b	28.6(118/413) b

3 讨 论

3.1 玻璃化冷冻的优点及冷冻程序对冷冻的影响

玻璃化冷冻是根据物理学原理,将高浓度的冷冻保护剂在超低温环境下凝固,形成不规则的玻璃化样固体,保持了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。卵母细胞在这种冷冻液中脱水到一定程度后,可引起内源性胞质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^[8]。本研究的玻璃化冷冻液采用分子质量低、渗透性强、化学毒性低的乙二醇作为细胞内液抗冻剂,高分子质量的聚蔗糖和蔗糖不能渗透到细胞内部,作为细胞外液抗冻剂。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对膜性结构和胞质造成的损伤。而且,蔗糖具有冷冻前脱水,调整细胞内外渗透压和解冻后细胞内乙二醇脱出的作用。在本试验中二步法冷冻效果显著优于一步法,其原因可能是在一步法中,乙二醇不能充分渗透到细胞内部,冷冻时卵母细胞内部出现冰晶,导致卵母细胞损伤。

3.2 冷冻基础液对牛卵母细胞的冷冻效果

PBS 是一种平衡盐溶液,主要由无机盐和葡萄糖配制而成,而 TCM 199 是一种成分复杂的合成培养基,除无机盐外,还含有氨基酸、维生素等成分,营养更为丰富。刘海军^[9]用 TCM 199 和 PBS 作冷冻基础液,玻璃化冷冻 GV 期山羊卵母细胞,解冻后的形态正常率、成熟率、受精率分别为 84.2%、27.1%、

6.8%和 83.6%,24.6%,6.6%,各指标差异均不显著。本研究以 TCM 199 和 PBS 作为冷冻基础液,冷冻牛 GV 期和 NM 卵母细胞,结果表明,二者冷冻效果无显著差异,表明基础液种类并不影响玻璃化冷冻牛卵母细胞的发育效果。

3.3 发育阶段对牛卵母细胞的冷冻效果

卵母细胞发育阶段不同,冷冻对其造成的损伤是不同的。Lim 等^[10]用 1.0 mol/L 甘油作保护剂,采用程序冷冻法,对处于不同成熟阶段的牛卵母细胞进行了冷冻。分别在体外成熟培养的 0,6,12,18,24 h 冷冻,解冻后再相应培养 24,18,12,6,0 h,结果表明,解冻后不同发育阶段卵母细胞的成熟率分别为 27.7%,33.3%,48.0%,52.9%,50.0%;受精率分别为 20.0%,22.7%,35.4%,31.0%,34.5%,各组差异不显著;而解冻后的卵裂率为 5.5%,19.2%,24.5%,25.0%和 52.9%,GV 期卵母细胞显著低于其他期。Hochi 等^[11]冷冻牛成熟 0,6,12,24 h 的卵母细胞,发现卵母细胞成熟 12 h 时,是冷冻的最佳阶段,但在各减数分裂阶段,特别是第二次减数分裂中期抗冻性最强,发育囊胚的百分率最高。以上结果说明,未成熟的卵母细胞比正在成熟和已经成熟的卵母细胞受到的冷冻影响更为严重。本研究表明,采用玻璃化冷冻法,无论是用 TCM 199 还是 PBS 作为冷冻基础液,无论是用一步法还是二步法,解冻后受精率、卵裂率均是 NM 卵母细胞显著高于 GV 期卵母细胞。其原因可能是 GV 期卵母细胞外周有数层致密的卵丘细胞,二者通过紧密的胞间连接结构相连接,该连接在卵母细胞成熟中起重

要作用^[12]。当卵丘卵母细胞复合体进入渗透压梯度较大的高渗溶液时,卵母细胞和卵丘细胞都大幅度收缩,造成二者的牵拉、损伤,破坏了胞间连接,这可能是GV期卵母细胞冷冻效果不佳的原因之一。而卵母细胞发育成熟后,卵丘细胞与卵母细胞的缝隙连接数量急剧下降,并且因粘液化和卵丘细胞扩张,卵母细胞和周围的卵丘细胞不再偶联,卵丘细胞的

突起自卵母细胞表面收回^[13],这可能是NM卵母细胞较GV期卵母细胞耐冻的原因之一。

玻璃化冷冻法既不需要昂贵的冷冻仪,又省去了费时的降温过程,技术简单,成本低,冷冻效果又好,因此具有良好的应用前景,值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Whittingham D G. Fertilization *in vitro* and developments to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C [J]. J Reprod Fertil, 1977, 49: 89- 94
- [2] Chen C. pregnancy after human oocyte cryopreservation [J]. Lancet, 1986, 19: 884- 886
- [3] Vijta G, Holm P, Kuwayama M, et al Open pulled straw (ops) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine and embryos [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] Carroll J, Wood M J, Whittingham D G. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules [J]. Biol Reprod, 1993, 48: 606- 612
- [6] Schellander K, Peli J, Scholl F, et al Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and immature bovine oocytes [J]. Theriogenology, 1994, 42: 909- 915
- [7] 马云. 牛卵母细胞体外成熟、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.
- [8] 季维智, 陈建春, 商恩缘, 等. 小鼠卵慢速和快速降温及玻璃化冻存的比较研究 [J]. 动物学研究, 1996, 17(1): 68- 74
- [9] 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
- [10] 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
- [11] Hochi S, Kanamori A, Kimura K, et al *In vitro* fertilizing ability of bovine oocytes frozen-thawed at immature, maturing, and mature stages [J]. J Mamm Ova Res, 1997, 14: 61- 65
- [12] 陈大元. 受精生物学——受精机制与生殖工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2000. 324
- [13] Im K S, Kang J K, Kim H S. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes [J]. Theriogenology, 1997, 47: 881- 891

Vitrified cryopreservation of bovine oocytes

LI Qing-wang¹, YU Yong-sheng¹, JIANG Zhong-liang¹,
WANG Li-qiang¹, HU Jian-hong¹, CHANG Wan-cun²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 High-Tech Research Centre of Shandong Academy of Agriculture Science, Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: The developmental competences of bovine NM and GV-stage oocytes cryopreserved by vitrification were studied. The results showed that there was no significant differences between TCM 199 and PBS in vitrification as the holding medium ($P > 0.05$), whereas the step of cryopreservation and development stage had significant effects on the development capacity of frozen-thawed bovine oocytes, the development capacity with two-step vitrification was better than that with one-step vitrification after thawing. The fertilization rates and the cleavage rates of GV oocytes were significantly lower than that of the NM oocytes ($P < 0.05$).

Key words: bovine; oocyte; vitrification