

不同植冰温度下冷冻液的结晶变化 及其对小鼠胚胎冷冻的效果*

安志兴, 李向臣, 王 超, 张 涌*

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 采用程序化冷冻方法, 对不同植冰温度下几种冷冻液的结晶变化进行了分析, 并比较了其对小鼠胚胎的冷冻效果。结果表明, - 5 0 ℃ 植冰时, 3种冷冻液 PEF、PGF 和 PEGF 只有部分结晶; 当植冰温度为 - 5 5 ℃ 时, PEF 和 PEGF 完全结晶时间为 10 min, PGF 在 15 min 尚未完全结晶; - 6 0 ℃ 植冰时, 3种冷冻液完全结晶时间分别为 8、10 和 10 min; - 6 5 ℃ 植冰后完全结晶时间分别为 5、8 和 5 min。将小鼠胚胎载入上述 3种冷冻液, - 5 5 ℃ 植冰冷冻解冻后, 囊胚孵化发育率分别为 81.7%、68.5% 和 87.5%, - 6 0 ℃ 植冰时发育率分别为 80%、76.5% 和 90.9%, - 6 5 ℃ 植冰后的发育率分别为 10%、13.3% 和 38.4%。据此得出, 在 - 5 5 或 - 6 0 ℃ 时植冰, 以 PEGF 作为冷冻保护液冷冻保存小鼠胚胎效果较好。

[关键词] 植冰温度; 结晶; 胚胎冷冻; 小鼠

[中图分类号] Q 954.4; S814.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0011-04

Whittingham 于 1972 年首次获得小鼠胚胎冷冻成功后^[1], 胚胎冷冻技术被广泛应用于多种动物的研究中, 其优点主要表现为能极大提高胚胎移植的效率, 可以对物种资源进行保存, 以及为低温生物学研究开辟新的途径^[2]。胚胎冷冻效果包括以下几方面影响因素, 物种间差异、冷冻保护剂种类及浓度、植冰温度、冷冻速率、解冻过程等^[3]。近期研究较多的为玻璃化冷冻方法, 但结果不稳定, 目前应用最广泛的是较稳定的程序化冷冻^[4,5]。在胚胎冷冻过程中, 植冰后冷冻剂发生的一系列物理性状变化对胚胎影响较大。为此, 本研究采用程序冷冻, 观察不同植冰温度下冷冻剂的结晶变化以及不同冷冻方法对小鼠胚胎的冷冻保存效果, 为其他物种的胚胎冷冻方法提供依据。

1 材料和方法

1.1 冷冻液结晶变化试验分组

根据植冰温度不同, 试验设计共分 4 组, 分别为 - 5 0、- 5 5、- 6 0 和 - 6 5 ℃。以添加 100 mL/L FBS 的 PBS 为基础液, 然后分别添加 100 mL/L 乙二醇(PBS+EG, PEF), 100 mL/L 甘油(PBS+GL,

PGF)或 50 mL/L 乙二醇+ 50 mL/L 甘油(PBS+EG+GL, PEGF)作为 3 种冷冻液, 并以基础液作为对照。0.25 mL 细管采用三段法装管, 气泡间隔长度为 0.3 cm, 细管末端加热封口。程序冷冻仪为澳大利亚产 CL-5500 型冷冻仪。将细管一步置入降温至植冰温度的冷冻室内^[6], 停留 2 min 后进行植冰, 植冰段计为上段, 依次为中段、下段。分别于植冰后 2、5、8、10 和 15 min 观察细管内冷冻液上、中、下段的结晶变化, 分别以上段、中段和下段完全结晶时计时。

1.2 试验动物的超排处理

昆明白小鼠, 购自第四军医大学试验动物中心, 按试验动物饲养标准管理。试验用小鼠于 18:00 腹腔注射 PM SG 5 IU, 48 h 后腹腔注射 hCG 5 IU, 同时与公鼠同笼, 比例为 2:1。次日早晨检查阴道栓, 见栓者认为交配成功, 见栓当天计为第 0 天, 并分开饲养。

1.3 小鼠胚胎的收集及冷冻方法

见栓后第 3 天 14:00 左右, 脱颈法处死小鼠, 常规手术无菌采取小鼠子宫, 用基础液清洗数次后, 回收桑椹胚及早期囊胚, 分组用于冷冻保存。首先将胚

* [收稿日期] 2002-06-10

[基金项目] 国家“863”高技术项目(2001AA 213081)

[作者简介] 安志兴(1973-), 男, 内蒙古乌盟人, 在读博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究。E-mail: zhangyl@public.xa.sn.cn

胎直接放入冷冻液中,平衡 5 min 后,将胚胎装入 0.25 mL 细管中段,依照方法 1.1 进行植冰冷冻,植冰温度分别为 -5.5 、 -6.0 和 -6.5 。在植冰温度下保持 15 min 后开始降温,降温速率为 0.3 / min,降温至 -35 时将细管直接投入液氮保存。

1.4 小鼠胚胎的解冻和体外培养

从液氮中取出装有胚胎的细管,在空气中停留数秒,分别投入 25 或 35 的水浴中解冻,停留 $1\sim 2$ min 后将胚胎直接置于含 0.2 mol/L 蔗糖的 PBS 中平衡 5 min,然后移入 PBS 中,清洗 3 次,观察解冻后胚胎的形态,并进一步体外培养。胚胎体外培养液为 mCR1aa,培养条件是 37.5 、 50 mL/L CO_2 饱和湿度,于培养 $24\sim 48$ h 后观察胚胎的发育情况,以胚胎扩张并孵化出透明带判定为冷冻解冻

后胚胎存活并能发育。

所有试验重复 3 次,试验数据用 χ^2 进行差异显著性分析。

2 结 果

2.1 不同植冰温度下冷冻液的结晶变化

在 4 种植冰温度下,以 PBS 作为对照,观察 PEF、PGF 和 PEGF 在不同时间的结晶变化,结果见图 1。图 1 表明,对照 PBS 在低温下,诱发结晶后很快完全形成冰晶,无论是在 -5.0 还是在 -6.5 ,各组都在 2 min 内完全结晶。图 1 结果还表明,单独添加甘油组比单独添加乙二醇组具较低的结晶速率,并且当植冰温度高于 -6.0 时,PGF 植冰后未完全结晶。

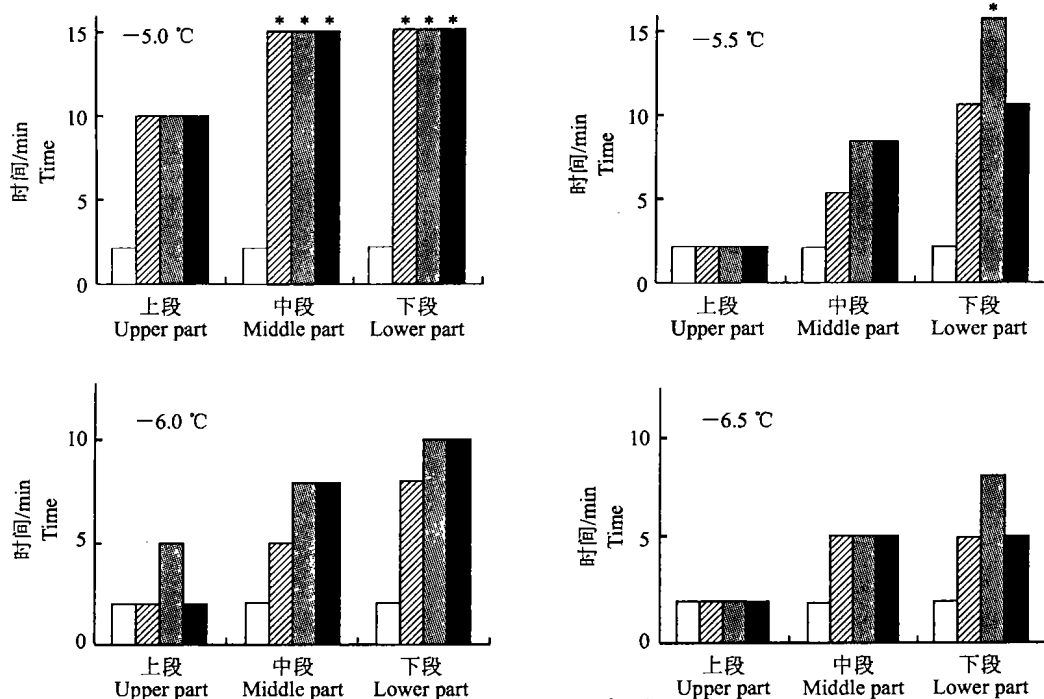


图 1 不同温度植冰时不同冷冻液的结晶变化

□.PBS; ▨.PEF; ■.PGF; ▩.PEGF; * 未完全结晶

Fig. 1 Ice formation of various cryoprotectant seeded at different temperature

□.PBS; ▨.PEF; ■.PGF; ▩.PEGF; * No ice formation completely

2.2 不同冷冻方法对小鼠胚胎的冷冻效果

不同植冰温度下使用 3 种冷冻液对小鼠胚胎进行程序化冷冻,结果见表 1。表 1 表明,在 -5.5 植冰时胚胎解冻后体外囊胚孵化率分别为 81.7% 、 68.5% 和 87.5% ; -6.0 植冰时胚胎解冻后体外发育率分别为 80% 、 76.5% 和 90.9% ; 当在 -6.5 植冰时发育率分别只有 10% 、 13.3% 和 38.4% 。 -5.5 和 -6.0 组的发育率极显著高于 -6.5

植冰时的发育率($P < 0.001$)。并且在 -5.5 和 -6.0 植冰温度下,不同冷冻液对小鼠胚胎冷冻效果不同,PEF 与 PEGF 在 -5.5 时尽管差异不显著($P > 0.05$),但以 PEGF 的冷冻效果较好,并且二者的囊胚孵化率高于 PGF 组($P < 0.01$); 植冰温度为 -6.0 时,PEGF 明显好于 PEF 和 PGF 组($P < 0.01$); -6.5 植冰时,PEF 和 PGF 结果相近,PEGF 冷冻效果较好($P < 0.05$)。从本试验可以

看出, 小鼠胚胎冷冻保存在- 5 5 或- 6 0 时植冰, 并以 PEGF 为冷冻液冷冻效果较好。

表 1 不同植冰温度下冷冻液对小鼠胚胎冷冻解冻后发育的影响

Table 1 Effect of different cryoprotectant and seeding temperature on the development of mice embryos after cryopreservation-thawing

植冰温度/ Seeding temperature	冷冻液种类 Cryoprotectant	胚胎总数 No. of embryos	孵化胚胎数 Hatching embryos	孵化发育率/% Percentage of hatching
- 5 5	PEF	60	49	81.7 a
	PGF	54	37	68.5 b
	PEGF	64	56	87.5 a
- 6 0	PEF	90	72	80 a
	PGF	81	62	76.5 b
	PEGF	99	90	90.9 a
- 6 5	PEF	30	3	10 c
	PGF	30	4	13.3 c
	PEGF	26	10	38.4 d

3 讨 论

在冷冻液中通常添加不同的冷冻保护剂, 使溶液的凝固点降低, 避免冰晶的形成。本试验采用常用的冷冻保护剂——乙二醇和甘油, 添加浓度采用常用浓度即 100 mL/L, 与其他报道使用剂量相近^[7]。乙二醇和甘油可以降低溶液的凝固点, 冷冻过程中对膜起修饰保护作用, 不但能很好地使细胞脱水, 防止冰晶形成, 还可以较快地使细胞内外的渗透压达到平衡。研究表明, 随着冷冻剂浓度的增加, 对胚胎的毒性增加, 当乙二醇和甘油浓度为 50 mL/L 时, 胚胎冷冻解冻后无一发育^[8], 并且在高浓度下暴露时间延长, 毒性也加大^[9]。为了避免冷冻过程中对胚胎的形态及细胞胞质内细胞器结构的破坏, 细胞还必须保持适当的电解质平衡^[10], 如果完全脱水, 电解质失衡, pH 值发生改变, 同样引起细胞的死亡^[11]。因此, 为达到最大程度地提高胚胎的存活力, 冷冻过程要综合考虑以下几点: 减少对细胞的毒性, 防止冰晶的产生与损伤, 保持渗透压和电解质的平衡。这些影响因素在很大程度上取决于细胞的脱水程度, 细胞的脱水过程主要发生在细胞进入冷冻液平衡的时间内, 但因为在胚胎冷冻过程降温开始(特别是植冰)后, 细胞外的液体首先形成冰晶, 溶液浓度增加, 冰晶形成的快慢直接影响细胞的脱水程度, 慢的结晶速度使细胞有足够的时间脱水, 同时增加胚胎在冷冻液中的暴露时间; 结晶快, 细胞来不及充

分脱水, 容易导致细胞内冰晶的产生。本试验在- 5 0 时植冰, 即使停留 15 min, 也只有部分液体结晶, 而在- 6 5 植冰时, 5 min 左右整段液体完全结晶。对小鼠胚胎的冷冻结果反映出冷冻液结晶速度的变化对胚胎的损伤和后继发育影响显著。试验中还对在植冰温度下的冷冻液不进行植冰时的变化进行观察, 在- 5 0 停留 15 min 内不发生结晶, 但在- 6 5 时冷冻液自动有结晶的出现。本试验对冷冻液植冰后的变化进行分析, 在实际应用中具有一定的参考价值。

不同冷冻剂对胚胎所处时期具有不同保护作用, 乙二醇对山羊桑葚胚冷冻效果好, 甘油对囊胚期的冷冻效果好^[12], 本试验未对胚胎发育时期进行分组, 结果表明乙二醇的冷冻解冻发育率比甘油好, 但二者在- 5 5 植冰温度下差异显著, - 6 0 时差异不显著。乙二醇和甘油混合冷冻小鼠胚胎, 其发育率明显高于单独添加甘油组, 同时冷冻效果好于单独添加乙二醇组。另外研究指出, 在冷冻液中添加蔗糖或海藻糖, 它们可能保护膜结构, 并具有抗毒性作用, 使细胞收缩, 减少细胞内冷冻剂的含量, 在玻璃化冷冻中效果明显^[7]。由于不同动物胚胎间存在差异, 在选取不同保护剂种类及浓度和冷冻程序时, 要特别考虑胚胎表面积与体积比、冷冻液的植冰温度等。使用本试验方案首先比较冷冻液结晶变化, 选取合适的植冰温度和冷冻剂, 对其他动物胚胎冷冻保存效果如何, 有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Whittingham D G, Leibo S P, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to - 196 degrees and - 269 degrees C[J]. Science, 1972, 178 (59): 411- 414

[2] Leibo S P. Preservation of ova and embryos by freezing[M]. New York: Academic Press, 1981. 127- 139

- [3] 史洪才. 家畜胚胎冷冻保存的研究进展[J]. 草食家畜, 1999, (1): 31- 34
- [4] Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals[J]. Anim Reprod Sci, 2000, 61: 357- 364
- [5] Booth P J, Vajta G, Hoj A. Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress[J]. Theriogenology, 1999, 51(5): 999- 1006
- [6] Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H. Cryopreservation of bovine pre-morula-stage *in vitro* matured/*in vitro* fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer[J]. Biol Reprod, 1999, 60: 534- 539
- [7] Vajta G, Booth P J, Kuwayama M, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos[J]. Mol Reprod Dev, 1998, 51: 53- 58
- [8] Kasai M, Komihara H, Takakama A, et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability[J]. J Reprod Fert, 1990, 89: 91- 97
- [9] Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs[J]. Theriogenology, 1991, 35: 109- 124
- [10] Rall W F, Reid D S, Polge C. Analysis of slow warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods[J]. Cryobiology, 1984, 21: 106- 121
- [11] Damien M, Luciano A A, Peluso J J. Propanediol alters intracellular pH and developmental potential of mouse zygotes independently of volume change[J]. Hum Reprod, 1990, (5): 212- 216
- [12] Le Gai F, Baril G, Vallet J C, et al. *In vivo* and *in vitro* survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol[J]. Theriogenology, 1993, 40: 771- 777.

Effects of crystallization of cryoprotectants at different seeding temperature on the developmental ability of mouse embryos

AN Zhixing, LI Xiang-chen, WANG Chao, ZHANG Yong*

(College of Animal Sciences and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Crystallization changes of various cryoprotectants sections were analyzed at different seeding temperature using programmed freezing procedure. When seeded at -50°C , PBS was frozen completely within 2 min, PBS+ ethylene glycol (PEF), PBS+ glycerol (PGF) and PBS+ ethylene glycol+ glycerol (PEGF) were not crystallized entirely although the process lasted for 15 min; When seeding temperature was -55°C , PEF and PEGF were crystallized entirely in 10 min, but PGF was not in 15 min; While seeding temperature reduced at -60°C and -65°C , the three kinds of cryoprotectants were solidified in 8 min, 10 min and 10 min vs 5 min, 8 min and 5 min respectively. Mouse embryos were exposed to the three cryopreservative compounds and seeded at -55°C and -60°C followed launching into liquid nitrogen at -35°C , after thawing and *in vitro* culture, percentage of hatching embryos were 81.7%, 68.5% and 87.5% vs 80%, 76.5% and 90.9%, they both had higher developmental abilities than that seeded at -65°C (10%, 13.3% and 38.4%). Compared with PEF and PGF, PEGF had better effect on the freezing of mice embryos.

Key words: seeding temperature; crystallization; embryo cryopreservation; mouse