

抗冻剂、CB 和离心极化对猪 GV 期卵母细胞 冷冻效率的影响

刘跃男,金 一,方南洙,韩明铭
(延边大学 农学院,吉林 龙井 133400)

【摘 要】 【目的】评价 2 种冷冻保护剂(EDS 和 EPS)、细胞松弛素 B(CB)和离心极化处理对猪 GV 期卵母细胞冷冻效果的影响。【方法】分别应用 EDS 和 EPS 2 种冷冻保护剂、CB(设 5.0、7.5 和 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 3 个水平)和离心极化处理,对猪卵母细胞进行玻璃化冷冻保存,解冻后用台盼蓝染色法和 Hoechst33342 染色法分析猪卵母细胞存活率及随后的成熟率。【结果】EPS 组和 EDS 组冻融后的猪卵母细胞存活率和成熟率均无显著差异。以 EPS 作冷冻保护剂时,冻融后裸卵组的存活率显著高于 COCs 组($P<0.05$)。7.5 $\mu\text{g/mL}$ CB 处理组的裸卵存活率显著高于对照组($P<0.05$);7.5 $\mu\text{g/mL}$ CB+离心极化处理组裸卵存活率与成熟率均显著高于 CB 单处理组和对照组($P<0.05$)。【结论】同等条件下,猪 GV 期裸卵的冷冻效果好于 COCs;CB 或 CB+离心极化均能改善 GV 期猪卵母细胞冷冻效果。

【关键词】 猪;卵母细胞;冷冻保护剂;细胞松弛素 B;离心极化;玻璃化冷冻

【中图分类号】 S814.8;S828 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2009)01-0029-05

Effects of centrifugal polarization,CB and cryoprotectants on freezing efficiency of oocytes at GV stage in pigs

LIU Yue-nan,JIN Yi,FANG Nan-zhu,HAN Ming-ming
(College of Agriculture,Yanbian University,Longjing,Jilin 133400,China)

Abstract: 【Objective】 The study evaluated the effect of cryoprotectives,crytochalasin B(CB)and centrifugal polatrization on the survival and development of the frozen-thawed oocytes at GV stage in pigs. 【Method】 Using cryoprotectants,CB and centrifugal polarization treatment was carried out to improve the freezing efficiency of oocytes. 【Result】 The survival and development rate of frozen-thawed oocytes were not significantly different between EPS and EDS groups;the survival rate of denuded oocytes was significantly higher than that of COCs ($P<0.05$); the survival rate of the 7.5 $\mu\text{g/mL}$ CB treatment group was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$);the survival and maturation rate of the 7.5 $\mu\text{g/mL}$ CB and centrifugation treatment group was significantly higher than those of the 7.5 $\mu\text{g/mL}$ CB treatment group and the control group. 【Conclusion】 The freezing efficiency of denuded oocytes was better than that of COCs;CB and centrifugal polarization treatment can improve the freezing efficiency of pig GV stage oocytes.

Key words: pig;oocyte;cryoprotectant;CB;centrifugal polarization;vitrification

卵母细胞冷冻保存技术在动物繁殖育种中具有重要的意义,但猪 GV 期卵母细胞冷冻保存的研究进展较慢,解冻后 GV 期卵母细胞的存活率、受精率及胚胎发育率仍很低。这与猪 GV 期卵母细胞玻璃

* [收稿日期] 2008-01-23
[基金项目] 吉教科合字[2007]第 20 号
[作者简介] 刘跃男(1981—),女,吉林长春人,在读硕士,主要从事动物繁殖生物技术研究。
[通信作者] 金 一(1967—),男,吉林延边人,副教授,硕士生导师,主要从事动物繁殖生物技术研究。

化冷冻效果影响因素众多有关,如脂滴的存在使猪 GV 期卵母细胞对低温敏感,冷冻过程中造成超微结构不可逆损伤;使用的冷冻保护剂同时也产生了毒性作用等。针对猪 GV 期卵母细胞冷冻保存的特点,其冷冻中的一些问题,亟待解决。

Wilmut^[1]首次论证了猪卵母细胞对低温敏感性最强,并具有种属特异性。猪 GV 期卵母细胞内富含脂滴,易在低温作用下变成具有透明条纹的球状物^[2],而牛 GV 期卵母细胞内仅存在一种均匀脂滴,这种脂滴含量与分布的差异导致了截然不同的冷冻效果。甘油是猪 GV 期卵母细胞冷冻常用保护剂,但冷冻效果一直不佳。Huang 等^[3]研究了甘油、二甲亚砜(DMSO)、乙二醇(EG)、1,2-丙二醇(1,2-PROH)等 4 种常用冷冻保护剂对猪 GV 期卵母细胞冷冻效率的影响,结果表明,4 种冷冻保护剂的冷效率没有显著差异。但是,关于以上几种冷冻保护剂混合使用效果如何,目前尚未见报道。

超低温破坏了 GV 期卵母细胞膜和微丝的有序结构,使这些微丝系统重构,形成新的细胞骨架系统,支撑整个细胞,导致冻融后 GV 期卵母细胞受精率下降^[4]。细胞松弛素 B(CB)能提高冻融后卵母细胞的体外成熟率^[5],可作为细胞骨架松弛剂以减弱细胞骨架基础的坚固性^[6],从而减轻冻融对卵母细胞骨架的破坏作用。近来的研究结果显示,离心处理能有效提高冻融后猪 GV 期卵母细胞的存活率,但影响后期的发育率。目前,有关离心和 CB 处理对猪 GV 期卵母细胞冷冻效率影响的研究报道甚少。为此,本研究比较了组合抗冷冻剂(EDS 和 EPS)、CB 处理、CB+离心极化处理对猪 GV 期卵母细胞冷冻效果的影响,以期筛选出有效的猪 GV 期卵母细胞冷冻程序,提高其冷冻保存效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪卵巢 猪卵巢采自龙井市屠宰场,在屠宰的猪腹腔被打开后,立即采集卵巢,置于 37 ℃生理盐水(含双抗)中,2 h 内送到实验室。

1.1.2 试剂 主要有 TCM199、乙二醇(EG)、二甲基亚砜(DMSO)、1,2-丙二醇(1,2-PROH)、蔗糖、细胞松弛素 B、胰蛋白酶和台盼蓝染剂等,均购于 Sigma 公司。

1.1.3 冷冻液和解冻液 ED 液(预处理液):将 0.75 mL 的 EG 和 0.75 mL 的 DMSO 加入到 8.5 mL 的 TCM199(含 1.7 mL 胎牛血清)中,充分混

匀,即得 ED 液。

EDS 液(冷冻液):将 1.5 mL 的 EG 和 1.5 mL 的 DMSO 加入到 7.0 mL 的 TCM199(含 1.4 mL 胎牛血清)中,再加入 0.17 g 的蔗糖,充分混匀,即得 EDS 液。

EP 液(预处理液):将 0.75 mL 的 EG 和 0.75 mL 的 1,2-PROH 加入到 8.5 mL 的 TCM199(含 1.7 mL 胎牛血清)中,充分混匀,即得 EP 液。

EPS 液(冷冻液):将 1.5 mL 的 EG 和 1.5 mL 的 1,2-PROH 加入到 7.0 mL 的 TCM199(含 1.4 mL 胎牛血清)中,再加入 0.17 g 的蔗糖,充分混匀,即得 EPS 液。

解冻液 I:将 0.17 g 蔗糖溶于 10 mL TCM199(含 2 mL 胎牛血清)中,即得解冻液 I;

解冻液 II:将 0.085 g 蔗糖溶于 10 mL TCM199(含 2 mL 胎牛血清)中,即得解冻液 II。

以上各液配制完成后均用孔径 0.22 μm 的微孔滤膜过滤消毒,4 ℃保存备用。

1.1.4 细胞松弛素 B 将 CB 溶于 DMSO 中,配成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液,-20 ℃保存备用。试验时再配成质量浓度分别为 5.0,7.5 和 10.0 μg/mL 的溶液。

1.1.5 台盼蓝染色液 将台盼蓝溶于含体积分数 15%胎牛血清的 TCM199 中,使其浓度为体积分数 0.3%,用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后,4 ℃保存备用。

1.2 猪 GV 期卵丘-卵母细胞复合体(COCs)的制备

将猪卵巢组织用灭菌的生理盐水清洗 3 次,除尽周围的脂肪和系膜,用灭菌的医用纱布吸干后,用装有 18 号针头的无菌注射器抽取卵巢表面直径为 3~6 mm 的卵泡,放入 5 mL 的离心管中,在水浴中静止沉淀 10 min。在实体显微镜下捡有 3 层或以上卵丘颗粒细胞、包裹致密、卵母细胞胞质黑色均一的 GV 期 COCs,用 TCM199 液洗 2~3 次后备用。

1.3 猪 GV 期裸卵的制备

将 COCs 置于胰蛋白酶消化液中,并用旋涡震荡仪震荡 5 min 去掉周围的颗粒细胞,使其成为裸卵。

1.4 猪 GV 期裸卵的离心极化处理

将猪 GV 期裸卵分别置于含 0(对照组),5.0,7.5 和 10.0 μg/mL CB 的 TCM199 溶液中,据其形态正常率、存活率及成熟率,筛选 CB 的最佳质量浓度。将猪 GV 期裸卵在最佳 CB 质量浓度下培养 20

min后,转入2 mL离心管中,以12 000 r/min离心10 min,使卵母细胞内脂滴偏于细胞的一极。

1.5 冷冻液对猪GV期COCs和裸卵冷冻效果的影响

采用两步法冷冻猪GV期COCs和裸卵,将猪GV期COCs和裸卵用TCM199清洗后,分别转移到ED和EP预处理液中,平衡5 min,再转移到相应的冷冻液中,迅速装管。装管时依次吸入1 cm 0.5 mol/L蔗糖,0.5 cm空气,2 cm预处理液,0.5 cm空气,3 cm含卵母细胞的冷冻液,0.5 cm空气,2 cm预处理液,0.5 cm空气,最后吸入0.5 mol/L蔗糖。猪GV期裸卵、CB处理的猪GV期裸卵和CB+离心极化处理的猪GV期裸卵依同法进行处理。将装好的管直接投入液氮内保存,GV期COCs投入液氮前在冷冻液中停留的时间控制在30 s左右。

从液氮中取出冷冻管,直接投入到37℃水浴中,晃动10 s,立即取出拭去水珠,将内容物吹出置于表面皿中的解冻液Ⅰ中,然后转入到新鲜的解冻液Ⅰ中平衡5 min,再转入到解冻液Ⅱ中平衡5 min,最后在TCM199中平衡10 min,以充分洗去冷冻保护剂。

1.6 猪卵母细胞冷冻效果的评定

1.6.1 形态学评价 将解冻后的卵母细胞置于倒置显微镜下观察,进行形态学鉴定。凡能恢复到冻前正常状态,卵母细胞胞质饱满、均一,透明带完整,COCs卵丘细胞未发生脱落或仅有少量脱落者,判为形态正常;不能恢复到冻前大小,COCs卵丘细胞脱落,细胞质松散,判为形态不正常,计算正常率。正常率=解冻后形态正常的卵母细胞数/解冻的卵

母细胞总数×100%。
1.6.2 台盼蓝染色法 将解冻后的卵母细胞放入体积分数0.3%的台盼蓝溶液中,37℃染色3 min,再用TCM199清洗3次,在倒置显微镜下观察细胞存活情况(存活卵母细胞不着色,死亡卵母细胞则蓝染),计算存活率。存活率=A/(A+B)×100%。式中:A为不着色的卵母细胞数;B为蓝染的卵母细胞数。

1.6.3 体外成熟 将猪GV期卵母细胞冷冻-解冻后,在TCM199中洗数次,再放入预平衡的TCM199成熟培养液中培养44~48 h,显微镜下观察,排除第一极体的卵母细胞视为体外成熟的卵母细胞,计算卵母细胞成熟率。卵母细胞成熟率=排除第一极体的卵母细胞数/体外培养的卵母细胞总数×100%。

1.7 数据统计分析

所得数据用SPSS 14.0软件分析,差异显著标准为P<0.05。

2 结果与分析

2.1 EDS和EPS对猪GV期COCs和裸卵冷冻效果的影响

由表1可知,EDS和EPS处理组猪GV期COCs的存活率分别为28.7%和30.7%,两组间差异不显著;体外成熟率分别为14.6%和15.1%,差异也不显著。EDS和EPS处理组猪GV期裸卵的存活率分别为29.1%和30.9%,两组间差异不显著;体外成熟率分别为14.9%和15.6%,差异也不显著。表明,EPS和EDS对猪GV期COCs和裸卵的冷冻效果没有显著差异。

表1 不同冷冻保护剂对猪GV期COCs冻融后发育潜力的影响(n=7)

组别 Item	抗冻剂 Cryoprotective	冻卵数 Frozen oocyte	形态正常率/% Normal shape	存活率/% Survival rate	成熟率/% Mturation rate
COCs	EDS	403	66.8±6.4 a	28.7±3.5 a	14.6±1.8 a
	EPS	388	68.4±6.4 a	30.7±2.9 a	15.1±2.0 a
裸卵 Denuded ocytes	EDS	397	68.1±6.6 a	29.1±3.7 a	14.9±1.1 a
	EPS	381	71.3±5.7 a	30.9±2.6 a	15.6±1.8 a

注:同列数据标不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。
Note: Values in the same column with different superscripts are significantly different (P<0.05). The same goes with the following tables.

2.2 不同质量浓度CB对猪GV期裸卵冷冻效果的影响

由表2可知,7.5 μg/mL处理组的存活率(33.1%)显著高于对照组(P<0.05),但与5.0 μg/mL(31.7%)和10.0 μg/mL处理组(32.1%)无

显著差异;4个试验组间裸卵的成熟率没有显著差异。表明7.5 μg/mL CB处理组的效果最佳,10.0 μg/mL处理组次之,5.0 μg/mL处理组较差。分析其原因,可能是超低温冷冻保存扰乱了卵母细胞膜和微丝的有序结构,使这些微丝系统重构,形成新的

骨架系统,支撑整个细胞,添加 CB 能改善卵母细胞的内部结构,在一定程度上降低了卵母细胞骨架对

冷冻损伤的敏感性,从而提高猪卵母细胞的冷冻效率。

表 2 不同质量浓度 CB 对猪 GV 期裸卵解冻后发育潜力的影响($n=6$)

Table 2 Effect of CB on development competence of frozen-thawed denuding oocytes at GV stage in pigs($n=6$)				
CB 质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ CB content	冻卵数 Frozen oocyte	形态正常率/% Normal shape	存活率/% Survival rate	成熟率/% Mturation rate
0(CK)	225	69.7 $\pm$ 11.8 a	30.0 $\pm$ 0.9 b	15.8 $\pm$ 3.9 a
5.0	225	71.1 $\pm$ 10.9 a	31.7 $\pm$ 2.2 ab	18.1 $\pm$ 3.1 a
7.5	225	72.2 $\pm$ 10.7 a	33.1 $\pm$ 2.1 a	18.9 $\pm$ 3.8 a
10.0	225	70.9 $\pm$ 11.3 a	32.1 $\pm$ 1.8 ab	18.6 $\pm$ 3.2 a

2.3 EPS 对猪 GV 期 COCs 和裸卵冷冻效果的影响

母细胞的冷冻效果有一定的影响,导致卵母细胞的体外成熟率低。分析其原因,可能是由于 COCs 在冷冻过程中,卵母细胞和卵丘细胞均大幅度收缩,导致二者的牵拉、损伤,破坏了胞间连接,造成细胞骨架损伤,导致 COCs 的成活率和成熟率均下降。

由表 3 可知,裸卵组的存活率(31.1%)显著高于 COCs 组(27.6%);裸卵组的体外成熟率(15.4%)与 COCs 组(14.5%)差异不显著。可见,裸卵的冷冻效果要好于 COCs,表明颗粒细胞对卵

表 3 EPS 对猪 GV 期 COCs 和裸卵冻融后质量及发育潜力的影响($n=6$)

Table 3 Comparison between development competence of frozen-thawed COCs and denuded oocytes at GV stage in pigs($n=6$)				
组别 Item	冻卵数 Frozen oocyte	形态正常率/% Normal shape	存活率/% Survival rate	成熟率/% Mturation rate
COCs	334	68.7 $\pm$ 5.5 a	27.6 $\pm$ 1.0 b	14.5 $\pm$ 1.2 a
裸卵 Denuded oocyte	339	70.6 $\pm$ 4.2 a	31.1 $\pm$ 1.2 a	15.4 $\pm$ 1.4 a

2.4 CB 和离心极化处理对猪 GV 期裸卵冷冻效果的影响

率(36.2%)和成熟率(21.4%)均显著高于其他 2 组($P<0.05$)。可见,CB+离心极化处理卵母细胞的冷冻效果最好。

由表 4 可知,CB+离心极化处理组裸卵的存活

表 4 离心极化处理对猪 GV 期裸卵冻融后发育潜力的影响($n=6$)

Table 4 Effect of centrifugation treatment on development competence of frozen-thawed denuding oocytes at GV stage in pigs($n=6$)				
组别 Group	回收卵数 Recovery oocyte	冻后形态正常率/% Normal shape	存活率/% Survival rate	成熟率/% Mturation rate
对照 Control	230	70.0 $\pm$ 4.7 a	30.1 $\pm$ 0.8 c	16.3 $\pm$ 2.0 b
CB	225	72.8 $\pm$ 4.1 a	32.8 $\pm$ 1.8 b	18.2 $\pm$ 2.4 b
CB+离心极化 CB+centrifugal polatrization	222	74.7 $\pm$ 3.0 a	36.2 $\pm$ 3.1 a	21.4 $\pm$ 2.8 a

由图 1 可知,CB+离心极化处理的猪 COCs(图 1A)比未进行 CB+离心极化处理的 COCs(图 1B)脂滴集中均一,冷冻效果更佳。CB+离心极化处理的成熟卵母细胞(图 1C)比未进行 CB+离心极化处理的成熟卵母细胞(图 1D)脂滴集中均一,冷冻效果更佳。

3 讨 论

目前,在动物卵母细胞冷冻方面,玻璃化冷冻法颇受青睐,发展十分迅速。在卵母细胞冷冻时大多

采用 EG 作为主体抗冷冻剂^[4],但 EG 形成玻璃化的能力较差,因此有的玻璃化冷冻方案将 EG 与其他细胞内保护剂联合应用,以发挥 EG 的快速渗透作用和其他保护剂易于形成玻璃化的优点。人、牛和山羊卵母细胞的冷冻试验表明,4 种常见的冷冻保护剂的冷冻效果依次为 EG、1,2-PROH、DMSO、甘油^[7-9]。本研究结果表明,DMSO 与 1,2-PROH 的冷冻效果没有差异,这与 Huang 等^[3]试验结果相近,说明对精卵母细胞而言,4 种常见的冷冻保护剂的冷冻效果没有显著差异。

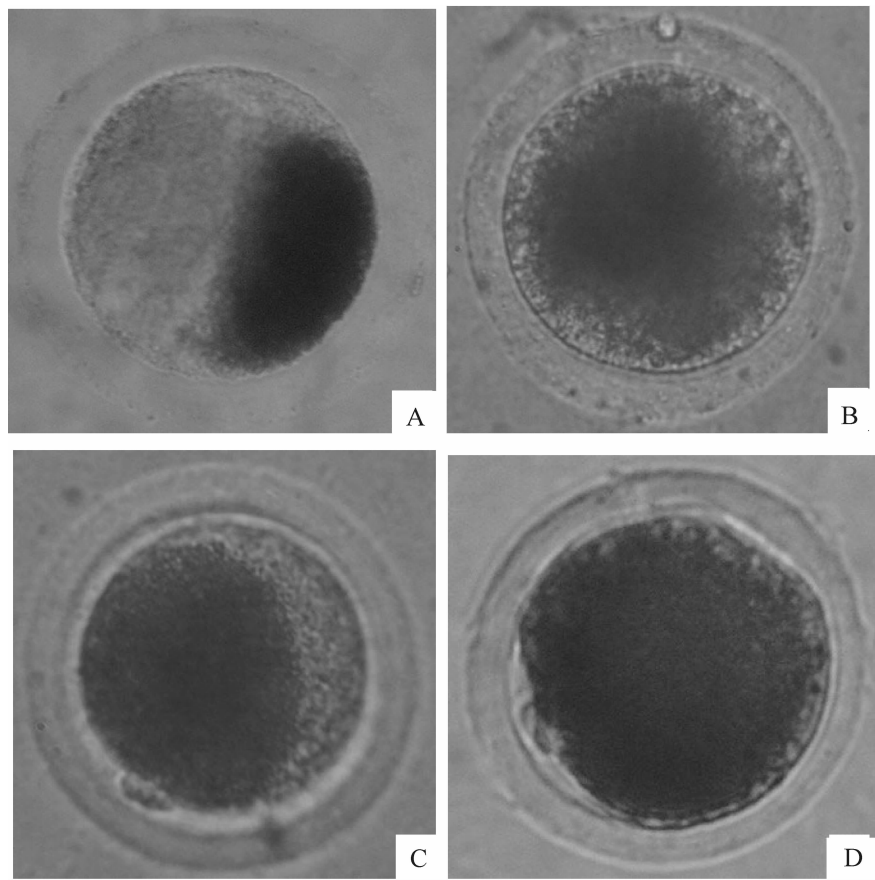


图 1 CB 和离心极化处理后的猪卵母细胞

A. CB+离心极化处理的卵母细胞;B. 未处理卵母细胞;C. CB+离心极化处理的成熟卵母细胞;D. 未处理的成熟卵母细胞

Fig. 1 Porcine oocytes after CB and centrifugal polarization treatments

A. Oocyte treated with CB and centrifugation;B. Oocyte treated without CB and centrifugation

C. Maturation oocyte treated with CB and centrifugation;D. Maturation oocyte treated without CB and centrifugation

冷冻不仅会造成细胞骨架损伤,也会消弱、甚至完全破坏卵丘细胞与卵母细胞之间的联系,并使细胞器受损^[10]。在卵母细胞冷冻研究中发现,当卵丘-卵母细胞复合体进入渗透压梯度较大的高渗溶液中时,卵母细胞和卵丘细胞均大幅度收缩,卵丘-卵母细胞间的连接被破坏,造成细胞骨架损伤,导致COCs的成活率和成熟率均下降。

武彩红等^[11]研究表明,猪GV期卵母细胞经玻璃化冷冻保存后会造成纺锤体、染色体和微丝不可逆的损伤,这可能是影响卵母细胞成熟、受精与发育的重要原因。

细胞松弛素B是细胞骨架稳定剂,可增加细胞骨架弹性,降低玻璃化冷冻对卵母细胞的损伤^[12]。CB能提高未成熟卵母细胞冻融后的存活率和发育潜力^[13-14],这与本研究的结论是一致的。

有研究表明,未成熟猪卵母细胞经体外成熟后,甘油三酯含量降低^[15],说明脂质是卵母细胞代谢的

能量来源,可见卵母细胞内脂质在细胞结构和功能,特别是在调节生物膜理化特性和能量代谢方面,具有重要作用。因此,去除卵母细胞胞质内脂粒可能对卵母细胞生存不利。本研究用CB处理卵母细胞后,再经离心使胞质内脂质偏于细胞一极,而不去除脂质,这既保证脂质仍可发挥其能量来源的作用,又可减少脂质去除对细胞骨架的影响。

4 结 论

混合冷冻保护剂EPS和EDS对冻融后的猪GV期卵母细胞均有不同程度的损伤,EPS和EDS的冷冻效果无显著差异;在TCM199中添加7.5 μg/mL的CB可提高猪GV期卵母细胞冻融后的存活和发育能力;EPS处理裸卵的冷冻效果要好于COCs;经7.5 μg/mL CB+离心极化处理的裸卵的冷冻效果要好于单纯CB处理的裸卵。

(下转第 38 页)