

食蟹猴和恒河猴卵母细胞及早期胚胎玻璃化冻存

黄璋琼¹ 薛志刚² 高家红¹ 江勤芳¹ 吴正存¹ 李聪¹ 罕园园¹ 曾桥^{2*} 马开利^{1*}

¹中国医学科学院医学生物学研究所药物安全性评价研究中心, 昆明 650118;

²同济大学附属同济医院转化医学中心, 上海 200065)

摘要 为了节省经费和使转基因模型动物品种资源得到妥善保存, 该研究利用自制的梯度浓度冷冻液和解冻液结合玻璃化方式分别冷冻和解冻了非人灵长类动物的183个卵母细胞(GV期、MI期和MII期)、114个卵裂期胚胎(2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期)及25个桑椹期胚胎。其中食蟹猴卵母细胞67个, 卵裂期胚胎45个, 桑椹期胚胎11个; 恒河猴卵母细胞116个, 卵裂期胚胎69个, 桑椹期胚胎14个。复苏后存活率分别为56/67(83.58%)、36/45(80.00%)、9/11(81.82%)、102/116(87.93%)、55/69(79.71%)和11/14(78.57%)。结果表明, 快速玻璃化冷冻法简便且胚胎存活率高, 是一种较好的冷冻食蟹猴和恒河猴卵母细胞及胚胎的方法。

关键词 食蟹猴; 恒河猴; 卵母细胞; 胚胎; 玻璃化冻存

Vitrification of Oocytes and Embryos of *Macaca fascicularis* and *Macaca mulatta*

Huang Zhangqiong¹, Xue Zhigang², Gao Jiahong¹, Jiang Qinfang¹, Wu Zhengcun¹,
Li Cong¹, Han Yuanyuan¹, Zeng Qiao^{2*}, Ma Kaili^{1*}

¹Center for Drug Safety Evaluation and Research, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118, China; ²Research Center for Translational Medicine, Shanghai Tongji Hospital, Medical School of Tongji University, Shanghai 200065, China)

Abstract In order to retrench funds and preservation of variety resources of transgenic animal model, this study adopted vitrification method to cryopreserve and thaw 183 oocytes (at the GV, MI and MII stages), 144 embryos in cleavage stage (at the 2- to 8-cell stages) and 25 mulberry of the nonhuman primate with the solution prepared by ourselves. Including 67 oocytes, 45 embryos in cleavage stage and 11 mulberry of cynomolgus monkey; Including 116 oocytes, 69 embryos in cleavage stage and 14 mulberry of rhesus monkey. After thawing, the survival rate was respectively 83.58% (56/67), 80% (36/45), 81.82% (9/11), 87.93% (102/116), 79.71% (55/69) and 78.57% (11/14). The results showed that vitrification cryopreservation, simple and effective, is a good method to cryopreserve the oocytes and embryos of rhesus monkey and cynomolgus monkey.

Key words cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*); rhesus monkey (*Macaca mulatta*); oocyte; embryo; vitrification

收稿日期: 2014-02-12 接受日期: 2014-03-26

国家自然科学基金(批准号: 81301073)、高等学校博士学科点专项科研基金新教师类资助课题(批准号: 20121106120056)、云南省应用基础项目(批准号: 2013FZ132, 2011FZ211)、协和青年基金-中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 3332013083、3332013146)和中国医学科学院医学生物学研究所一般项目(批准号: IMB2013YB01)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-68408567, E-mail: zengqiao@cellpro.com.cn; E-mail: mklpume@gmail.com

Received: February 12, 2014 Accepted: March 26, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81301073), the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Grant No.20121106120056), the Applied Basic Research on the Program Foundation of Yunnan Province (Grant No.2011FZ211, 2013FZ132), the PUMC Youth Fund and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.3332013083, 3332013146) and General Fund of Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences (Grant No.IMB2013YB01)

*Corresponding authors. Tel: +86-871-68408567, E-mail: zengqiao@cellpro.com.cn; E-mail: mklpume@gmail.com

网络出版时间: 2014-07-02 11:10 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0039.html>

随着转基因和基因敲除动物模型的大量建立和广泛使用,其保存和繁育体系的建立愈显重要。其中,胚胎冷冻是体外受精(*In vitro fertilization*, IVF)工作中不可缺少的重要组成部分。非人灵长类动物胚胎的冷冻保存是由于其物种的稀有性和灵长类动物体外受精、胚胎培养和胚胎移植等技术条件的限制。目前,仅在狒狒、狨猴、食蟹猴和猕猴有相关的研究报道^[1-4],其中猕猴胚胎通过卵细胞浆内单精子注射术(*intracytoplasmic sperm injection*, ICSI)获得并经冻融得到了后代。相对于精子和胚胎,非人灵长类动物的卵母细胞冷冻保存研究则更为罕见,目前共有3篇报道,仅限于松鼠猴^[5]、食蟹猴^[6]和猕猴^[7],但都没有提到玻璃化冷冻方式,并且仅有松鼠猴报道了复苏后的存活率为35.4%。而国内关于非人灵长类动物的卵母细胞和胚胎冷冻的研究较少,传统的慢速冷冻法需要严格控制冷冻和解冻过程中形成的冰晶数量,期望在各因素间保持精细的平衡,减少冰晶造成的损伤、渗透压改变造成的损伤、透明带和卵裂球破裂及细胞骨架的改变等,慢冻法比较费时,且需要昂贵的程序化冷冻仪才能完成。近年来应用的玻璃化冷冻技术是使用很高浓度的冷冻保护剂和极高的冷冻速度,使卵母细胞和胚胎在冷冻过程中呈玻璃状固化,与传统冷冻程序相比,玻璃化冷冻可以完全避免冰晶的形成,降低模型动物遗传漂变风险,有望获得更高的胚胎复苏率;具有简便、迅速、经济的优点,操作过程短,减少了卵母细胞在低温环境中的暴露时间;无需昂贵的程序化冷冻设备,并已逐渐成为卵母细胞冷冻保存的研究热点^[8-9]。用玻璃化冻存方法保存卵细胞和胚胎已在一些物种获得成功^[8,10-11],然而这个方法在非人灵长类动物卵母细胞和胚胎的应用几乎没有报道。与普通小鼠和转基因小鼠相比,转基因猴的胚胎显得更加珍贵与脆弱,胚胎数量往往不及前者。为了节省经费和使转基因模型动物品种资源得到妥善保存,以便为后续科研提供充足的资源,本研究对恒河猴、食蟹猴的卵母细胞和经ICSI及特定基因靶向修饰技术获得的不同发育期的早期胚胎进行玻璃化冻存保种及复苏技术进行了探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

食蟹猴6只,恒河猴13只,由中国医学科学院医

学生物学研究所提供,饲养于GLP中心。性成熟(4~6岁)的公猴和母猴单笼饲养,并给予12小时明/暗光控及16~22℃的温控,每天喂食三餐,每天给予一定量的水果。

1.2 试剂与仪器

人输卵管液(HTF)、卵母细胞体外操作液(HTF-HEPES)、代血清(SSS)、胚胎培养液、二甲亚砜(DMSO)购自美国IRVINE公司;TL-HEPES购由LONZA公司提供;庆大霉素、乙二醇及蔗糖购自美国SIGMA公司;玻璃化冷冻、解冻液自己配制;解剖显微镜和倒置显微镜购自日本NIKON公司;显微操作系统购自德国EPPENDORF公司;培养皿、巴斯德吸管购自美国FALCON公司;移液管购自德国EPPENDORF公司;三气培养箱购自美国FORMA公司;达必佳购自德国辉凌制药有限公司;注射用尿促性腺素(hMG)和注射用绒促性素(hCG)购自丽珠制药厂。

1.3 促排卵与卵母细胞采集

对性成熟母猴通过阴道观察月经并记录,月经首日皮下注射达必佳0.1 mg;月经第3 d开始,食蟹猴每天两次连续注射hMG 25 IU 7~8 d,随之注射hCG 1 500 IU;月经第3 d开始,恒河猴每天两次连续注射hMG 30 IU 7~8 d,随之注射hCG 2 000 IU。hCG注射后27~32 h采集卵母细胞。动物经氯胺酮麻醉后固定于手术台上,经下腹中央或两侧做小切口(1.5~2.0 cm),暴露卵巢,采用5 mL注射器负压抽吸卵泡,卵泡液收集到含有10 IU/mL肝素钠的卵子洗涤液中,在解剖镜下收集卵丘复合物。卵丘复合物在体外培养2~4 h后经透明质酸酶消化后去除颗粒细胞,观察卵子成熟情况,成熟卵子(MII期)直接进行ICSI,未成熟卵子则继续培养24~36 h,期间观察卵子成熟情况,若发现成熟卵子则行ICSI。

1.4 精液采集、ICSI及胚胎培养

性成熟公猴经肛门电刺激法采集精液。射出的精液在液化后采用HTF-HEPES溶液洗涤两次。分别将成熟卵子和精子置于10 μL的注射微滴中,活动精子在7%聚乙烯吡咯烷酮(*polyvinylpyrrolidone*, PVP)制动后,持卵针固定成熟卵母细胞,并将第一极体置于12点位置,注射针在3点位置传入卵母细胞,分别穿过透明带和卵膜,负压吸引轻轻破膜后缓缓将精子注入到卵母细胞中,再轻轻退针。卵母细胞经洗涤后培养于37℃、5% CO₂、5% O₂的三气培养箱中。

1.5 胚胎遗传学修饰

培养至1-细胞期, 利用显微程序注射仪注射RNA或DNA 1×10^{-5} μL , 继续培养。

1.6 卵母细胞及胚胎冷冻

分别对不同发育时期的卵母细胞(GV期、MI期、MII期)、经遗传修饰的卵裂期胚胎(2-细胞期、4-细胞期、8-细胞期)和桑椹期胚胎进行冻存, 2~3个月后进行复苏鉴定。

1.6.1 冻存液配制 冻存液配方见表1。

1.6.2 冻存方法 分别用吸管吸出50 μL 的冻存1号液(ES液)、冻存2号液(VS液)于培养皿中。冻存1号液中孵育5~6 min, 冻存2号液中孵育30~60 s, 将胚胎和卵母细胞置于冻存叶片上, 吸取多余液体, 再将叶片置于液氮中, 套好套管后保存于液氮中。室温下操作, 将容器放在显微镜旁边, 方便操作。

1.6.3 解冻方法 解冻液配方见表1。分别用吸管吸取1 000 μL TS液、400 μL DS液和500 μL WS液于培养皿中, 其中TS液需37 $^{\circ}\text{C}$ 预热, 并做好标记。去掉叶片套管后, 分别按顺序将叶片直接置于解冻TS液中孵育1 min, DS液中孵育3~4 min, 解冻3号液(WS液)中孵育8~10 min, 再将胚胎和卵母细胞洗涤后转移至培养微滴内。

1.6.4 解冻效果观察 卵母细胞存活标准, 根据中国人类遗传资源卵母细胞冷冻保存技术规程(GB/T.1.1-2000)^[12]判断: 解剖镜下形态正常, 透明带和胞膜无损伤, 透明带和胞质之间没有空隙, 卵周间隙清楚, 无胞质外漏或卵母细胞萎缩, 大小正常, 则定为存活。

胚胎复苏存活标准: 根据Mohr等^[13]和Testart等^[14]报道的结果, 胚胎存活是指在倒置显微镜下观察, 解冻后有50%以上细胞形态完整(即超过一半以上的卵裂球存活)的胚胎可认为是成活的胚胎。胚胎破损是指有一个或一个以上的卵裂球破损。将部分成

活的胚胎移入盛有含10% SSS的HTF液的四孔培养皿中, 加盖矿物油, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养, 观察其囊胚的形成率, 少量胚胎进行移植。

2 结果

共对322个卵母细胞和胚胎进行了玻璃化冻存研究, 包括183个卵母细胞(GV期、MI期和MII期)、114个卵裂期胚胎(2-细胞期、4-细胞期、8-细胞期)和25个桑椹期胚胎(表2)。

其中, 食蟹猴卵母细胞和胚胎共123个: 卵母细胞67个, GV期、MI期、MII期存活率分别为28/32(87.50%)、18/23(78.26%)和10/12(83.33%), 总体复苏后存活率为56/67(87.93%); 卵裂期胚胎45个, 2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期复苏后存活率分别为14/17(82.35%)、10/13(76.92%)和12/15(80.00%), 总体复苏后存活率为36/45(80.00%), 2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期复苏后破损率分别为3/17(17.65%)、5/13(38.46%)和6/15(40.00%), 总体破损率为14/45(31.11%); 桑椹期胚胎11个, 复苏后存活率为9/11(81.82%), 破损率为5/11(45.46%)(表2)。

其中恒河猴卵母细胞和胚胎共199个: 卵母细胞116个, GV期、MI期、MII期存活率分别为59/66(83.39%)、33/37(89.19%)和10/13(76.92%), 复苏后总体存活率为102/116(87.93%); 卵裂期胚胎69个, 2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期复苏后存活率分别为23/29(79.31%)、19/23(82.60%)和13/17(74.67%), 复苏后总体存活率为55/69(79.71%), 2-细胞期、4-细胞期和8-细胞期复苏后破损率分别为6/29(20.69%)、9/23(39.13%)和7/17(41.18%), 总体破损率为22/69(31.88%); 桑椹期胚胎14个, 复苏后存活率为11/14(78.57%), 破损率为7/14(50.00%)(表2)。

不同时期的卵母细胞(GV期、MI期和MII期)、不同时期的卵裂期胚胎(2-细胞期、4-细胞期、8-细

表1 冻存液及解冻液成分

Table 1 Cryopreservation and thawing solution

	名称 Name	台氏缓冲液 TL-Hepes	庆大霉素 Gentamicin	二甲基亚砷 DMSO	乙二醇 Ethanediol	蔗糖 Sucrose	牛血清蛋白 BSA
Cryopreservation	ES	85%	10 mg/L	7.5%	7.5%	/	12 mg/mL
	VS	70%	10 mg/L	15%	15%	0.5 mol/L	12 mg/mL
Thawing solution	TS	100%	10 mg/L	/	/	1.0 mol/L	12 mg/mL
	DS	100%	10 mg/L	/	/	0.5 mol/L	12 mg/mL
	WS	100%	10 mg/L	/	/	/	12 mg/mL

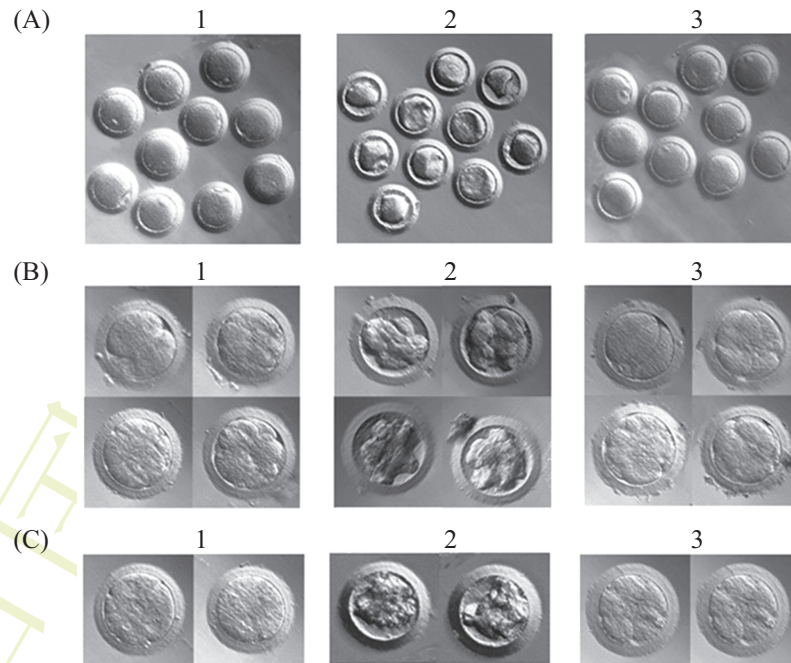
表2 食蟹猴和恒河猴卵母细胞与胚胎玻璃化冻存情况

Table 2 Cryopreservation cases of oocytes and embryos of cynomolgus monkey and rhesus monkey

动物种类 Animal species	发育阶段 Developmental stage	数量 Number	存活率(%) Survival rate (%)	破损率(%) Damage rate (%)
Cynomolgus monkey	GV stage	32	28/32(87.50)	4/32(12.50)
	MI stage	23	18/23(78.26)	5/23(21.74)
	MII stage	12	10/12(83.33)	2/12(16.67)
	2-cell stage	17 [#]	14/17(82.35)	3/17(17.65)
	4-cell stage	13	10/13(76.92)	5/13(38.46)
	8-cell stage	15	12/15(80.00)	6/15(40.00)
	morula stage	11	9/11(81.82)	5/11(45.46)
Rhesus monkey	GV stage	66	59/66(89.39)	7/66(10.61)
	MI stage	37	33/37(89.19)	4/37(10.81)
	MII stage	13	10/13(76.92)	3/13(23.08)
	2-cell stage	29 ^{##}	23/29(79.31)	6/29(20.69)
	4-cell stage	23	19/23(82.60)	9/23(39.13)
	8-cell stage	17	13/17(76.47)	7/17(41.18)
	morula stage	14	11/14(78.57)	7/14(50.00)

[#]: 5个胚胎用于移植; 9个胚胎继续体外培养, 其中3个发育成囊胚, 成囊率3/9(33.33%)。^{##}: 15个胚胎用于移植, 2只受体猴妊娠; 14个胚胎继续体外培养, 其中5个发育成囊胚, 成囊率5/14(35.71%)。

[#]: five embryos were transferred; nine embryos were cultured *In vitro*, three of them developed into blastocysts, and the rate of blastocysts forming was 33.33%. ^{##}: fifteen embryos were transferred, and two recipients pregnancy was determined by ultrasonography after 25 days; fourteen embryos were cultured *in vitro*, five of which developed into blastocysts, and the rate of blastocysts forming was 35.71%.

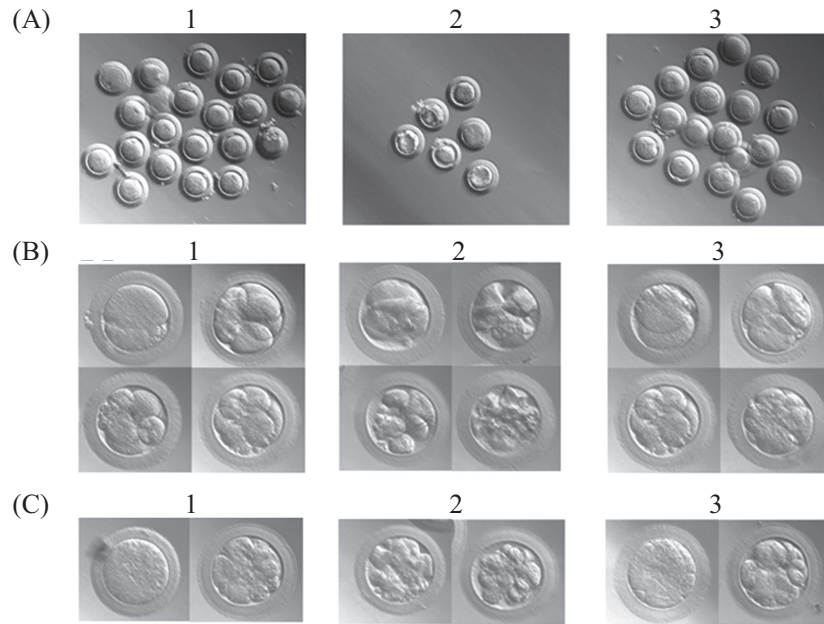


A1: 卵母细胞冻存前形态; A2: 卵母细胞在冻存液中的形态; A3: 卵母细胞解冻后的形态; B1: 卵裂期胚胎冻存前形态; B2: 卵裂期胚胎在冻存液中的形态; B3: 卵裂期胚胎解冻后的形态; C1: 桑椹期胚胎冻存前形态; C2: 桑椹期胚胎在冻存液中的形态; C3: 桑椹期胚胎解冻后的形态。A: 100×; B、C: 200×。

A1: oocytes morphology before freezing; A2: oocytes morphology of freezing stage; A3: oocytes morphology after thawing; B1: cleavage stage embryo morphology before freezing; B2: cleavage stage embryo morphology of freezing stage; B3: cleavage stage embryo morphology after thawing; C1: morula morphology before freezing; C2: morula morphology of freezing stage; C3: morula morphology after thawing. A: 100×; B,C: 200×.

图1 食蟹猴卵母细胞与胚胎玻璃化冻存前、冻存液孵育中与复苏后的形态

Fig.1 Oocytes and early embryos morphology of cynomolgus monkey before freezing, freezing stage and after thawing



A1: 卵母细胞冻存前形态; A2: 卵母细胞在冻存液中的形态; A3: 卵母细胞解冻后的形态; B1: 卵裂期胚胎冻存前形态; B2: 卵裂期胚胎在冻存液中的形态; B3: 卵裂期胚胎解冻后的形态; C1: 桑椹期胚胎冻存前形态; C2: 桑椹期胚胎在冻存液中的形态; C3: 桑椹期胚胎解冻后的形态。A: 100 \times ; B、C: 200 \times 。

A1: oocytes morphology before freezing; A2: oocytes morphology of freezing stage; A3: oocytes morphology after thawing; B1: cleavage stage embryo morphology before freezing; B2: cleavage stage embryo morphology of freezing stage; B3: cleavage stage embryo morphology after thawing; C1: morula morphology before freezing; C2: morula morphology of freezing stage; C3: morula morphology after thawing. A: 100 \times ; B,C: 200 \times .

图2 恒河猴卵母细胞与早期胚胎玻璃化冻存前、冻存液孵育中与复苏后的形态

Fig.2 Oocytes and early embryos morphology of rhesus monkey before freezing, freezing stage and after thawing

胞期)和桑椹期胚胎在冻存过程中,由于冻存液为高渗透压的溶液,当卵母细胞或胚胎置于冻存液中后,胚胎会立即出现皱缩现象(图1和图2中的A2、B2和C2),经过梯度浓度的冻存液处理后,尽可能地将卵母细胞或胚胎卵裂球中的自由水置换出来,以避免在冻存和解冻过程中形成冰晶对细胞造成损害。复苏后的卵母细胞和胚胎经过浓度梯度的解冻液后,形态逐渐恢复如初(图1和图2中的A3、B3和C3)。

3 讨论

玻璃化(vitrification)冷冻法是1985年发展起来的一种快速冷冻胚胎的方法^[15],它的主要特点是使用快的冷冻和解冻速率以及使用高浓度的低温保护剂,在超低温环境下凝固,形成无规则的玻璃化固体,无任何冰晶形成。这种固态物质能保持液态时的正常分子与离子分布,而且在整个复温步骤中维持这种状态,减少了由于细胞内冰晶形成所引起的一系列物理及化学损伤,使存活率提高。其次是操作简单,不需要昂贵的设备。慢速冷冻法使用的冷冻保护剂的浓度虽然较低,但室温状态下冷冻保护

剂与胚胎接触的时间长达2~3 h,而且随着细胞外冷冻保护液的结冰,溶液中保护液的浓度会越来越高。而玻璃化冷冻法使用的冷冻保护液的浓度虽然较高,但冷冻保护液与胚胎接触的时间短。室温条件下本研究严格控制玻璃化冷冻保护液与胚胎接触的总时间在极短的时间内(冻存过程中不超过6 min,解冻过程中不超过15 min),保证了胚胎的安全性。

尽管玻璃化冻存技术始于80年代,但是真正的临床应用是在最近几年才发展起来的,并且被证实玻璃化冻存是使用最小体积保存胚胎及卵母细胞最有效的方法^[8-9]。最初的玻璃化液是由20.5%二甲亚砜(DMSO)、15.5%乙酰胺、10%丙二醇、6%聚乙二醇组成的混合液称玻璃化液(VS),用于冷冻小鼠8-细胞胚胎获得了成功。用这种方法冷冻胚胎不会形成冰晶,但可对胚胎发生毒性和渗透性损伤,为了控制这种有害作用,胚胎必须分别暴露在含不同浓度、温度的玻璃液中平衡。此后,科学家发现了许多冷冻保护剂的混合液如乙二醇与DMSO及乙二醇与聚蔗糖、蔗糖等均被证实是有效的玻璃化液。由于乙二醇的相对分子质量小(浓度为62.07 g/mol),渗透

性好, 进出胚胎的速度快, 冷冻时能在短时间内产生玻璃化, 对胚胎产生的毒性最小, 解冻时容易从胚胎中渗出而不引起一序列渗透损伤。本研究在已有胚胎冷冻和体外受精技术基础上, 改进冷冻液和解冻液的配方比例, 其中DMSO、乙二醇在ES和VS中均是从7.5%升到15%, 蔗糖在这两溶液中从0变化到0.5 mol/L, 而在TS、DS、WS中, 蔗糖浓度呈梯度降低, 分别为1.0, 0.5, 0 mol/L。加入12 mg/mL的血清可促进玻璃化的形成, 并可降低渗性保护液的毒性, 增加细胞膜的稳定性; 同时, 蔗糖作为低分子化合物在冷冻时有助于细胞脱水, 使胚胎发生收缩, 复苏时有助于除去细胞内的冷冻保护液, 防止水分过快进入细胞而引起细胞渗透性休克。对于冷冻液中15%的DMSO浓度, 经我们反复地摸索, 复苏后对胚胎的毒性不大, 因为我们的冻融过程是在室温条件下完成的, 并且操作中严格控制卵母细胞和胚胎在不同浓度的冷冻液中的停留时间和速度, 大大降低了冷冻液对胚胎产生的毒性。2011年, Yamasaki等^[4]也是采用浓度梯度冷冻液和玻璃化冷冻法冻存食蟹猴的经ICSI得到的4-细胞、6-细胞、8-细胞的胚胎和囊胚, 冷冻液的主要成分是组织培养液TCM199, 其中包含乙醇、二甲基亚砷、蔗糖、SSS。从平衡液(ES)到冻存液(VS), 乙醇从7.5%升到15%, 二甲基亚砷从7.5%升到15%, 蔗糖从0升到0.5 mol/L, SSS恒定为20%; 解冻液主要成分也是组织培养液TCM199, 解冻液(TS)、稀释液(DS)、洗涤液(WS)中蔗糖浓度分别为: 1.0 mol/L、0.5 mol/L、0, SSS恒定为20%。其结果表明, 63个4~8-细胞胚胎冻融后有60个存活(95.2%), 其中37个胚胎移植到24个受体, 7个怀孕(29.2%)。本研究证实, 用冻存叶片(cryoleaf)对经过反向遗传修饰技术(CRISPR/Cas9)处理的食蟹猴、恒河猴的不同分裂期的胚胎进行冷冻和复苏取得初步成果(数据另文发表), 并且冷冻、复苏效率高, 缩小冷冻载体的结构, 减小样本体积, 使样本与液氮直接接触, 从而明显提高降温速度。提高降温速度有利于胚胎迅速通过危险温度地带减少损伤, 也有利于采用较低浓度的保护剂, 减少毒性和渗透性损伤。除了严格控制时间和技术娴熟外, 这个方法相对来说是简单快捷的。

卵子与其他发展阶段如卵裂期胚胎和囊胚相比, 细胞膜通透性和稳定性更差, 表面积与体积比更小, 加上透明带、细胞骨架、纺锤体的因素, 因而更

容易受冷冻损伤。本研究用自己配制的冷冻液和解冻液对食蟹猴和恒河猴的GV期、MI期、MII期卵母细胞冻融进行了初步研究, 镜下形态学观察结果表明, 复苏后卵母细胞的皮质颗粒较新鲜卵母细胞没有明显减少, 卵母细胞纺锤体形态和染色体排列没有受到明显影响, 初步证实此方法对食蟹猴和恒河猴的不同发育期卵母细胞冻融有效。由于非人灵长类动物的卵母细胞冷冻保存研究较少, 而人类卵母细胞冷冻保存研究虽然取得一定进展, 但结果并不一致。Mandelbaum等^[16]报道, 冷冻GV期和MII期卵母细胞的存活率并无显著差异; 也有报道表明, GV期卵母细胞的解冻复苏率比体外成熟的MII期卵母细胞的解冻复苏率明显降低^[17]。在本研究中, GV期卵母细胞的解冻复苏率与MII期卵母细胞的解冻复苏率相比无显著差异, 是否与样本量大小有关, 我们正在进一步研究中。另外, 有研究表明, 冻融后的卵母细胞可以应用ICSI技术克服卵母细胞透明带硬化对受精的影响, 冻融后的卵母细胞存活率和受精率可以达到99.4%和92.9%^[18]。非人灵长类动物卵母细胞的冷冻保存研究有如下意义: 供卵者不必行促排卵方案, 减少了费用和简化了供卵过程, 减少了对雌性猴的损伤; 在不影响卵母细胞存活率的条件下, 提高了受精率; 为建立非人灵长类卵子库提供了更为广阔的前景。

总之, 采用玻璃化冻存方式对非人灵长类动物卵母细胞和经ICSI及特定基因靶向修饰技术获得的早期分裂期胚胎的冻存获得成功, 将为我们下一步建立非人灵长类动物特有品系胚胎库和转基因胚胎库奠定坚实基础, 对进一步的医学生物学研究具有重要价值和意义。

参考文献 (References)

- 1 Pope CE, Pope VZ, Beck LR. Cryopreservation and transfer of baboon embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1986; 3(1): 33-9.
- 2 Summers PM, Shephard AM, Taylor CT, Hearn JP. The effects of cryopreservation and transfer on embryonic development in the common marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *J Reprod Fert* 1987; 79(1): 241-50.
- 3 Yeoman RR, Gerami-Naini B, Mitalipov S, Nusser KD, Widmann-Browning AA, Wolf DP. Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod* 2001; 16(9): 1965-9.
- 4 Yamasaki J, Iwatani C, Tsuchiya H, Okahara J, Sankai T, Torii R. Vitrification and transfer of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2011; 76(1): 33-8.

- 5 DeMayo FJ, Rawlins RG, Dukelow WR. Xenogenous and *In vitro* fertilization of frozen/thawed primate oocytes and blastomere separation of embryos. *Fertil Steril* 1985; 43(2): 295-300.
- 6 Younis AI, Toner M, Albertini DF, Biggers JD. Cryobiology of non-human primate oocytes. *Hum Reprod* 1996; 11(1): 156-65.
- 7 Karlsson JO, Younis AI, Chan AW, Gould KG, Eroglu A. Permeability of the rhesus monkey oocyte membrane to water and common cryoprotectants. *Mol Reprod Dev* 2009; 76(4): 321-33.
- 8 Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67(1): 73-80.
- 9 Cobo A, Domingo J, Pérez S, Crespo J, Remohí J, Pellicer A. Vitrification: An effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2008; 10(5): 268-73.
- 10 Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85(1): 108-11.
- 11 Hashimoto S, Yarata Y, Kikkawa M, Sonoda M, Oku H, Murata T, *et al.* Successful delivery after the transfer of twice-vitrified embryos derived from *In vitro* matured oocytes: A case report. *Hum Reprod* 2007; 22(1): 221-3.
- 12 中国人类遗传资源卵母细胞冷冻保存技术规程(Technical Specification for the Refrigeration and Preservation of Megagameteocyte of Chinese Genetic Resources) GB/T.1.1-2000; 7-8.
- 13 Mohr LR, Trounson A, Freemann L. Deep-freezing and transfer of human embryos. *J In Vitro Fertil Embryo Trans* 1985; 2(1): 1-3.
- 14 Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Forman R, Hazout A, Volante M, *et al.* Human embryo viability related to freezing and thawing procedures *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157(1): 168-71.
- 15 Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313(14): 573-5.
- 16 Mandelbaum J, Belaïsch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, *et al.* Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod* 1998; 13(Suppl 3): 161-74; discussion 167-75.
- 17 Gound A, Gound P, Qian C, van der Elst J, van Maele G, Dhont M. Cryopreservation of human germinal vesicle stage and *In vitro* matured MII oocytes: Influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions. *Fertil Steril* 2000; 74(3): 487-94.
- 18 Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high rate and healthy deliveries. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(1): 72-9.