

不同冷冻保护剂对早期卵裂期小鼠胚胎 冷冻后成活率和发育的影响

刘伟信^{1,2*}, 黄萍², 王丽², 岳利民¹, 何亚平¹, 张金虎¹, 王颖佳², 郑煜¹

(¹ 四川大学华西医学中心生理教研室, 成都 610041; ² 成都市计划生育技术指导所, 成都 610031)

摘要: 为了评价利用不同冷冻保护剂冷冻早期卵裂期胚胎的效果, 用小鼠为实验动物, 采用慢速冷冻、快速融解的冷冻技术, 比较丙二醇、二甲基亚砷和甘油作冷冻保护剂对小鼠 2-细胞、4-细胞、8-细胞胚胎冷冻后胚胎存活率和囊胚形成率的影响。发现以丙二醇和蔗糖为冷冻保护剂冷冻 4-细胞、8-细胞胚胎, 解冻后胚胎成活率和囊胚形成率显著高于以二甲基亚砷或甘油为冷冻保护剂。结果表明, 丙二醇是一种冷冻早期卵裂期小鼠胚胎有效的冷冻保护剂。

关键词: 冷冻保护剂; 小鼠胚胎; 胚胎成活率; 囊胚形成率

中图分类号: R318.52 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-317-04

自 1972 年 Whittingham 首次报道植入冷冻小鼠胚胎获得正常后代以来^[1], 冷冻胚胎移植已经在十多种哺乳动物中取得成功。在胚胎冷冻过程中, 常常需要加入小分子化合物如: 丙二醇、二甲基亚砷和甘油等渗透性保护剂和非渗透性保护剂来避免胚胎细胞内冰晶的形成, 减少胚胎冷冻时的损伤, 从而提高冷冻胚胎的成活率。近几十年来, 丙二醇、二甲基亚砷和甘油结合蔗糖已经广泛应用在哺乳动物及人类胚胎冷冻保存中^[2-4], 但它们对胚胎冷冻效果的影响尚有争议。本文利用小鼠为动物模型比较丙二醇、二甲基亚砷和甘油对 2-细胞、4-细胞、8-细胞胚胎的冷冻效果, 为临床胚胎冷冻保存过程中冷冻保护剂的选择提供有益的信息。

1 材料与方 法

1.1 小鼠胚胎的获取

四川大学华西医学中心实验动物中心提供的昆明系小白鼠, 5~8 周龄成熟雌鼠, 经腹腔注射孕马血清促性腺激素(PMSG)(天津生物制品研究所)7 IU, 46~48h 后注射人绒毛膜促性腺激素(hCG)(上海生物制品研究所)10 IU, 当晚与 8 周龄以上成熟雄鼠合笼过夜, 次晨检查雌鼠阴栓, 有阴栓者定为交配成功, 38~40h 后断颈处死雌鼠, 剖腹取出输卵管, 置入含 HEPES 的人输卵管液(HEPES-HTF)(Irvine Scientific, USA)中, 在解剖镜下挑出已经分裂的 2-

细胞胚胎, 用 HEPES-HTF 液洗涤数次, 移入盛有含 10% 血清替代品(SSS)(Irvine Scientific)HTF 液的四孔培养皿中, 加盖矿物油(Sigma, USA), 于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。将所获得的 2-细胞胚胎随机分成 3 组: A 组, 2-细胞胚胎冷冻, B 组, 培养到 4-细胞胚胎冷冻, C 组, 培养到 8-细胞胚胎冷冻, D 组, 对照组, 未冷冻的 2-细胞胚胎在体外培养到囊胚。根据 Steer 报道^[5]的胚胎评分标准进行胚胎评分, 只有 I-II 级胚胎才用于冷冻。

1.2 胚胎冷冻和解冻过程

在 A、B、C 三组中, 每组分别采用丙二醇(Sigma)、二甲基亚砷(Sigma)和甘油(Sigma)结合蔗糖(Sigma)作为冷冻保护剂对胚胎进行冷冻保存。采用慢速冷冻的方法进行胚胎冷冻^[6]。将胚胎放入磷酸盐缓冲液(PBS)(Sigma)冲洗数次; 移入含 1.5M 丙二醇、二甲基亚砷、甘油的 PBS 液, 平衡 10min; 转入含 1.5M 丙二醇、二甲基亚砷、甘油, 0.1M 蔗糖 PBS 液, 并将胚胎装入麦管中, 每一麦管中装 20~30 个胚胎, 放入程序冷冻仪(CL3000, Cryologic, Australia)中进行冷冻。从 24 °C 以 -1 °C/min 降温到 -6 °C; 浸润 1 min, 植冰, 再保温 9 min; 以 -0.3 °C/min 降温到 -32 °C; -0.2 °C/min 降温到 -36 °C; -1 °C/min 到 -75 °C; 将麦管直接

收稿日期: 2003-08-26; 修回日期: 2004-01-05

* 通讯作者, E-mail: liuweixind@163.com

放入液氮中冷冻保存。

解冻时,麦管在室温下停留40s,然后放入30℃水浴40s。随后,胚胎依次放入下列解冻液各5min,1.0M丙二醇、二甲基亚砷、甘油,0.2M蔗糖的PBS液;0.5M丙二醇、二甲基亚砷、甘油,0.2M蔗糖的PBS液;0.2M蔗糖的PBS液;PBS液。胚胎用预先在37℃、5%CO₂平衡好的HTF液洗涤数次。所有胚胎的冷冻和解冻试剂均含有20%SSS。

在倒置显微镜下观察冷冻胚胎的成活率,根据Mohr等^[7]、Testart等^[8]报道的结果,解冻后胚胎中有50%以上细胞形态完整的胚胎可认为是成活的胚胎。将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℃、5%CO₂培养箱中继续培养,观察其囊胚的形成率。

1.3 数据统计

采用SPSS软件对数据进行处理,进行t检验和 χ^2 检验,P值<0.05表示差异显著。

2 结果

实验共获得小鼠2-细胞胚胎877个,分成4组,A组,247个进行冷冻;B组,273个2-细胞胚胎体外培养,255个发育到4-细胞胚胎进行冷冻;C组,270个2-细胞胚胎体外培养,248个发育到8-细胞胚胎进行冷冻;对照组,87个2-细胞胚胎进行体外培养,发育到4-细胞胚胎83个,8-细胞胚胎80个,囊胚62个。

2.1 不同冷冻保护剂对2-细胞胚胎冷冻效果的影响

从表1中可见,3种冷冻保护剂冷冻2-细胞胚胎,解冻后胚胎成活率及囊胚形成率没有显著性差异。3种冷冻保护剂进行冷冻保存后解冻后胚胎的囊胚形成率显著低于体外培养2-细胞胚胎的囊胚形成率。

2.2 不同冷冻保护剂对4-细胞胚胎冷冻效果的影响

从表2中可见,以丙二醇作冷冻保护剂冷冻4-细胞胚胎,解冻后胚胎成活率(75.0%)和囊胚形成率(54.0%)显著高于以二甲基亚砷、甘油作冷冻保护剂的结果。而以二甲基亚砷和甘油作冷冻保护剂冷冻4-细胞胚胎,解冻后胚胎成活率及囊胚形成率没有显著性差异。3种冷冻保护剂进行冷冻保存后解冻胚胎的囊胚形成率显著低于体外培养4-细胞胚胎的囊胚形成率。

2.3 不同冷冻保护剂对8-细胞胚胎冷冻效果的影响

表1 不同冷冻保护剂对2-细胞胚胎冷冻效果的影响

	冷冻胚胎数	解冻后胚胎成活率(%)	囊胚形成率(%)
对照组	87*		71.3 (62/87) ^a
丙二醇	82	62.2 (51/82) ^a	39.2 (21/51) ^b
二甲基亚砷	85	50.6 (43/85) ^a	32.6 (14/43) ^b
甘油	80	51.3 (41/80) ^a	31.7 (13/41) ^b

*指体外培养的胚胎数;同列相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著,下同。

表2 不同冷冻保护剂对4-细胞胚胎冷冻效果的影响

	冷冻胚胎数	解冻后胚胎成活率(%)	囊胚形成率(%)
对照组	83*		74.7 (62/83) ^a
丙二醇	84	75.0 (63/84) ^a	54.0 (27/50) ^b
二甲基亚砷	87	47.1 (41/87) ^b	31.7 (13/41) ^c
甘油	84	46.4 (39/84) ^b	30.8 (12/39) ^c

表3 不同冷冻保护剂对8-细胞胚胎冷冻效果的影响

	冷冻胚胎数	解冻后胚胎成活率(%)	囊胚形成率(%)
对照组	80*		77.5 (62/80) ^a
丙二醇	80	73.8 (59/80) ^a	55.9 (33/59) ^b
二甲基亚砷	85	47.1 (40/85) ^b	35.0 (14/40) ^c
甘油	83	50.6 (42/83) ^b	31.0 (13/42) ^c

从表3中可见,以丙二醇作冷冻保护剂冷冻8-细胞胚胎,解冻后胚胎成活率(73.8%)和囊胚形成率(55.9%)显著高于以二甲基亚砷、甘油作冷冻保护剂的结果。而以二甲基亚砷和甘油作冷冻保护剂冷冻8-细胞胚胎,解冻后胚胎成活率及囊胚形成率没有显著性差异。3种冷冻保护剂进行冷冻保存后解冻胚胎的囊胚形成率显著低于体外培养8-细胞胚胎的囊胚形成率。

3 讨论

冷冻保护剂主要有渗透性冷冻保护剂和非渗透性冷冻保护剂。非渗透性冷冻保护剂是大分子聚合物,可增加细胞外渗透压而使细胞脱水,包括各种单糖、双糖和三糖。蔗糖是最常用的非渗透性保护剂。渗透性冷冻保护剂主要有甘油、二甲基亚砷、丙二醇等小分子化学物质,可迅速渗透入细胞内,降低细胞内冰晶形成的可能性,同时还可与水分子结合,降低细胞内盐及其他溶质的浓度,减小对细胞的损害。甘油的保护作用早在1949年Polge就用于冻存精子。现已经广泛应用于哺乳动物细胞的冷冻保存,包括人类的胚胎和卵细胞。二甲基亚砷是一种低分子量的非电解质,世界首例人类冷冻胚胎成功妊娠就是应用二甲基亚砷为冷冻保护剂。丙二醇属于甘醇,其水溶液在0℃以下为无晶体状态,

可避免复温时冰晶的形成,而且丙二醇对冷冻后胚胎体外发育的毒性小。

对不同冷冻保护剂冷冻胚胎的效果,研究者的报道还存在一定差异。Lee等用丙二醇和二甲基亚砷冷冻小鼠4-细胞胚胎,解冻后胚胎的囊胚形成率以丙二醇作冷冻保护剂(64.0%)显著高于和以二甲基亚砷作冷冻保护剂(41.5%)^[9]。Liu等比较了丙二醇和二甲基亚砷做冷冻保护剂冷冻4-细胞小鼠胚胎,植入率分别为60%和54%^[10]。Emiliani等报道,用丙二醇和甘油作冷冻保护剂,冷冻4-细胞小鼠胚胎,结果解冻后胚胎成活率和扩张期囊胚形成率没有显著性差异^[11]。Avery报道,不同冷冻保护剂冷冻不同发育阶段胚胎,其效果不一样,甘油冷冻早期卵裂期胚胎效果较差,主要用于冷冻精子和囊胚;二甲基亚砷可用于冷冻4~8细胞胚胎;丙二醇用于冷冻原核期胚胎及早期卵裂期胚胎均取得较好效果^[12]。本实验结果表明,以丙二醇作冷冻保护剂冷冻小鼠4~8细胞胚胎,其胚胎成活率和囊胚形成率显著高于以二甲基亚砷和甘油作冷冻保护剂(表2,3)。可能是因为三种冷冻保护剂中,丙二醇的渗透性强于甘油和二甲基亚砷,且丙二醇的毒性比二甲基亚砷和甘油低,有利于冷冻胚胎的成活和进一步发育;另外,三种冷冻保护剂只有丙二醇在0℃以下为无晶体状态,在胚胎解冻过程中,能够较快的扩散到细胞外,从而减少了由于水分渗入引起细胞膨胀所导致的渗透性休克的发生,减少了胚胎解冻过程中的损害。

实验结果表明,对小鼠2-细胞胚胎冷冻,用丙二醇作胚胎冷冻保护剂解冻后胚胎成活率和囊胚形成率高于以甘油和二甲基亚砷作冷冻保护剂,但差异没有显著性(表1)。而丙二醇作冷冻保护剂冷冻小鼠4~8-细胞胚胎,其胚胎成活率和囊胚形成率显著高于以二甲基亚砷和甘油作冷冻保护剂,可能是2-细胞胚胎与4-细胞、8-细胞胚胎相比,细胞数较少,胚胎细胞体表面积与容积的比较小,可能减少了不同冷冻保护剂间的渗透性差异对胚胎冷冻结果的影响。其影响机制还有待于进一步研究。

在人类辅助生育技术中,在体外受精-胚胎移植时常将胚胎培养到2~8-细胞再进行胚胎移植。而小鼠的胚胎常常被用于作为人类胚胎冷冻生物学理论的主要材料,还未见同时用丙二醇、甘油和二甲基亚砷三种冷冻保护剂冷冻小鼠2~8-细胞胚胎的研究报道。为此,实验分析了以丙二醇、甘油

和二甲基亚砷作为冷冻保护剂冷冻小鼠2~8-细胞胚胎的效果,结果表明,丙二醇作冷冻保护剂冷冻小鼠4-细胞、8-细胞胚胎,其冷冻结果优于甘油和二甲基亚砷作冷冻保护剂,因此在临床中可以选择丙二醇作为4细胞、8细胞胚胎冷冻的冷冻保护剂。

参 考 文 献

- [1] WHITTINGHAM D G, LEIBO S P, MAZUR P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C [J]. *Science*, 1972, **178**(27): 411 - 414.
- [2] ISACHENKO V V, ISACHENKO E F, OSTASHKO F I, et al. Ultrarapid freezing of rat embryos with rapid dilution of permeable cryoprotectant [J]. *Cryobiology*, 1997, **34**: 157 - 164.
- [3] COCER M J, DIAZ DE L A, ESPINA S M, et al. Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants [J]. *Biol Reprod*, 2002, **66** (5): 1244 - 1258.
- [4] MUKAIDA T, WADA S, TAKAHASHI K, et al. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos [J]. *Hum Reprod*, 1998, **13**(10): 2874 - 2879.
- [5] STEER C V, MILLS C L, TAN S L, et al. The cumulative embryo score a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme [J]. *Hum Reprod*, 1992, **7**(1): 117 - 119.
- [6] SENN A, VOZZI C, CHANSON A, et al. Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage [J]. *Fertil and Steril*, 2000, **74**(5): 946 - 952.
- [7] MOHR L R, TROUNSON A, FREEMANN L. Deep-freezing and transfer of human embryos [J]. *J In Vitro Fertil Embryo Trans*, 1985, **2**(1): 1 - 3.
- [8] TESTART J, LASSELLE B, RELAISCH-ALLART J, et al. Human embryo viability related to freezing and thawing procedures [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1987, **157**(1): 168 - 171.
- [9] LEE J D, CHANG M Y, CHEN F P, et al. The survival and development rates in mouse embryo cryopreservation [J]. *Changcheng Yi Xue Za Zhi*, 1991, **14**(4): 216 - 221.
- [10] LIU J, VAN DEN ABBEEL E, VAN STEIRTEGHEM A C. Assessment of ultrarapid and slow freezing procedures for 1-cell and 4-cell mouse embryos [J]. *Hum Reprod*, 1993, **8**(7): 1115 - 1119.
- [11] EMILIANI S, VAN DEN BERGH M, VANNIN A S, et al. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts [J]. *Hum Reprod*, 2000, **15**(4): 905 - 910.
- [12] AVERY S M. Embryo cryopreservation [M]. Brinsden PR. A Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction, 2nd ed. USA: The Parthenon Publishing group Inc, 1999: 211 - 217.

Effect of Different Cryoprotectants on Post-thaw Survival and Development of Early Cleavage Stage Mouse Embryos

LIU Wei Xin^{1,2*}, HUANG Ping², WANG Li², YUE Li Min¹, HE Ya Ping¹,
ZHANG Jin Hu¹, WANG Ying Jia², ZHENG Yu¹

(¹Department of Physiology, Medical College, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

²Chengdu Institute of Family Planning, Chengdu 610031, China)

Abstract: To evaluate the effects of different cryoprotectants on cryopreservation of the early cleavage embryos, three cryoprotectants 1, 2-propanediol (PROH), dimethyl-sulphoxide (DMSO) and glycerol, combined with sucrose were employed; and the post-thaw survival rate, as well as the cleavage rate of development to the blastocyst of 2-cell, 4-cell and 8-cell mouse embryos, were studied using the slowing-freezing and fast-thawing protocol. The survival rate and the cleavage rate with PROH as cryoprotectant were significantly higher than those of DMSO and glycerol. The results showed that PROH was the most effective cryoprotectant for the cryopreservation of early cleavage mouse embryos.

Key words: cryoprotectant; mouse embryo; survival rate of embryo; the rate of cleavage to blastocyst

*Corresponding author, E-mail: liuweixind@163.com