

玻璃化冷冻对猪体外成熟卵母细胞染色体与纺锤体的影响

项智锋* 张金洲 李陪庆 张德福¹ 张似青¹

(河南科技学院动物科学院细胞胚胎工程实验室, 新乡 453003; ¹上海农业科学院畜牧研究所, 上海 201106)

摘要 以冷冻环为载体, 探讨玻璃化冷冻对猪体外成熟卵母细胞染色体与纺锤体影响。单用 40% 乙二醇(ethylene glycol, EG)或 20%EG 与 20% 二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO)联合作冷冻保护剂, 用直投液氮或使用玻璃化冷冻仪制冷冷冻猪体外成熟卵母细胞; 解冻 2 h 后固定并免疫荧光法染色纺锤体及染色体; 挑选各试验组形态正常卵母细胞进行体外受精实验。结果表明, 与单用 EG 以及 EG 和 DMSO 联合直投液氮方案比较, EG 和 DMSO 联合应用并采用玻璃化冷冻仪制冷方案卵母细胞染色体正常率为 30.1%, 纺锤体正常率为 37.2%, 可明显降低卵母细胞染色体及纺锤体结构损伤($P<0.05$), 并明显提高卵母细胞的激活效果($P<0.05$)。采用联合冷冻保护剂及玻璃化冷冻仪高速冷冻可较好维持猪卵母细胞染色体与纺锤体形态, 但玻璃化冷冻明显影响猪卵母细胞体外受精后的发育能力。

关键词 玻璃化冷冻; 卵母细胞; 纺锤体; 染色体; 猪

哺乳动物卵母细胞冷冻保存不仅成为保护品种资源和拯救濒危动物不可缺少的技术保障, 而且也是人类辅助生育技术(ART)的重要研究内容。玻璃化保存方法具有许多优点, 其操作简单, 耗时少、更安全有效^[1], 所以在卵母细胞低温保存的胚胎生物技术研究已成为不可缺少的技术手段。利用玻璃化方法冷冻胚胎^[2]和卵母细胞^[3]在多种哺乳动物中获得成功。家畜卵母细胞的冷冻保存主要集中在牛上, 目前已经获得来自冷冻-解冻的牛体外成熟和未成熟卵母细胞的牛犊, 而猪卵母细胞冷冻保存的研究进展缓慢, 尚未建立起成熟的保存方法, 目前仍处于实验室探索阶段, 且解冻后卵母细胞的存活率、受精率及胚胎发育率仍然很低^[4]。要提高卵母细胞的冷冻效果, 就必须清楚低温保存前后猪卵母细胞超微结构的变化以及冷冻过程引起卵母细胞发育潜力下降的原因。本研究从保存体外培养成熟的猪 MII 卵母细胞入手, 探讨不同低温冷冻保护剂和降温速率对卵母细胞形态、纺锤体微管和染色体形态结构影响及其与体外受精后续发育能力的关系, 为研究和提高猪冷冻后卵母细胞体外生产效率打下基础。

1 材料与方

1.1 材料

除特别说明外, 本实验所用化学药品与试剂均购自 Sigma 公司。

体外成熟培养液: TCM199(Gibco, 12340-030)+10% 卵泡液(PFF)+0.57 mmol/L 半胱氨酸+10 IU/ml PMSG+10 IU/ml hCG+10 mg/ml EGF+200 IU/ml 青霉素+10% 胎牛血清(NCS)。

受精卵培养液: NCSU-23 液+0.4%BSA(fraction V, A-9647)+5 μ g/ml 胰岛素+50 μ mol β - 基乙醇。

精子洗涤液: BTS 液+3 mg/ml BSA+0.85 mg/L 亚牛磺酸。

精子受精液: TALP 液+2 mmol/L 咖啡因+3 mg/ml BSA+0.85 mg/L 亚牛磺酸+1 mg/ml 乙烯乙醇+0.17 mmol/L 卡那霉素+20 mg/L 肝素。

玻璃化平衡液与冷冻液: 依照冷冻保护剂及降温速度不同有所差异。EG40 组[单用乙二醇(ethylene glycol, EG)组]的冷冻平衡液为 20%EG+TCM199+20%NCS, 冷冻液为 40%EG+10 g/L ficoll+0.65 mol/L 海藻糖; ED20(-)组[EG 和二甲基亚砷(dimethyl

收稿日期: 2006-03-20 接受日期: 2006-09-01

河南科技学院青年基金项目资助(No.040106)

* 通讯作者。Tel: 0373-3040833, Fax: 0373-3040718, E-mail: zhifeng7809@yahoo.com.cn

suiphonide, DMSO)联合组]的平衡液为10%EG+10%DMSO+TCM199+20%NCS, 冷冻液为20%EG+20%DMSO+10 g/L ficoll+0.65 mol/L 海藻糖; ED20(+)组(EG和DMSO联合并高速制冷组)的平衡液与冷冻液均与ED20(-)组相同。EG40组及ED20(-)组卵母细胞在平衡液中平衡2 min后采用一步法直投液氮制冷, ED20(+)组采用玻璃化冷冻仪(VTT MASTER 0200-1)制冷。

解冻液: 解冻液1~4分别为0.5, 0.3, 0.1, 0 mol/L 海藻糖+TCM199+20%NCS

1.2 猪卵巢的收集与体外成熟

从屠宰场收集新鲜卵巢(均来自青年母猪), 于2 h内带回实验室, 采集卵巢表面直径2~6 mm 卵泡中的卵丘-卵母细胞复合体(COCs), 挑选有3层以上完整卵丘细胞且胞质均匀的COCs经体外成熟液微滴培养。在5% CO₂、38.5 °C、饱和湿度CO₂培养箱(Forma, USA)中成熟培养40 h至MII期。

1.3 玻璃化冷冻与解冻

以冷冻环为载体进行卵母细胞玻璃化冷冻和解冻过程^[5]。将新鲜配置的冷冻液和平衡液在37 °C温箱中平衡约20 min。全部的冷冻及解冻过程均在37 °C恒温板(TOKAI HIT ThermoPlate)中进行。先将卵母细胞移入平衡液中平衡2 min, 然后移入冷冻液中, 将冷冻环迅速浸入冷冻液, 由于液体表面张力, 在环上形成一层薄的液膜, 用吸管将3~5枚卵母细胞轻放入液膜, 直接投入液氮, 整个过程控制在25~35 s之间。玻璃化冷冻仪使用: 使用前, 将液氮倒入玻化仪瓶胆内, 旋好盖子, 打开机器, 负压抽吸至液氮温度从-196 °C逐渐降至-208 °C(约2~3 min), 此时液态氮转为半固态。打开盖子, 将带有卵母细胞冷冻环投入半固态氮中, 在其中将冷冻环旋入冷冻管, 转入液氮罐中保存, 时间控制仍为25~35 s之间。ED20(+)组使用玻璃化冷冻仪。解冻: 在液氮中将冷冻环从冷冻管上旋下, 立即移入37 °C解冻液1中, 5 min后移入解冻液2中, 随后移入解冻液3、4中, 间隔均为5 min, 最后转入培养液中。在37.5 °C、5%CO₂培养箱内温育2 h, 供免疫荧光染色及体外受精实验用。

1.4 免疫荧光染色

参照Ju等^[6]方法加以改进, 以Hoechst33342染色染色体, 利用免疫法FITC标记的山羊抗鼠IgG来标定纺锤体微管。用3.7%多聚甲醛于室温下将卵母细胞固定30 min, 在0.3%Triton X-100、1 μmol/L

taxol及3%BSA的PBS中于4 °C过夜。然后在含有100 mmol/L甘氨酸和3%BSA的PBS中封闭40 min。卵母细胞在1:250稀释的小鼠抗α微管蛋白的一抗中37 °C温育40 min, 0.01%Triton X-100的PBS液漂洗3遍。然后在1:80稀释的FITC标记的山羊抗鼠IgG中37 °C避光温育40 min, 再用封闭液漂洗3遍。接着在10 μg/ml Hoechst33342中染色5 min。最后将卵母细胞移到载玻片上, 用指甲油封闭盖玻片后放入暗盒于4 °C保存, 待荧光显微镜观察和显微照像。凡染色体与纺锤体保持MII期基本形态特征的卵母细胞记为正常。

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, 温育15 min使其获能。同时将外部形态正常(胞质均匀、无透明带缺损)的未冷冻卵母细胞(对照组)或冷冻解冻后卵母细胞(试验组)于37.5 °C玻璃化平衡液中温育3 h后以受精液洗涤3遍, 放入50 μl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 μl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, 二者共温育8 h。将受精卵转移至含有输卵管单层上皮的受精卵培养液中, 48 h后观察卵裂并吸弃未分裂的单细胞, 每24 h更换一半容积的新鲜受精卵培养液。

1.6 实验设计

实验一: COCs经微滴成熟培养后, 以0.1%透明质酸酶去除卵丘细胞, 挑选第一极体排出且胞质均匀的成熟卵母细胞, 依照冷冻保护剂及制冷程序随机分为对照组(不作冷冻处理)、EG40组、ED20(-)组及ED20(+)组进行冷冻、解冻及染色试验(详见1.3~1.4)。试验重复3次。

实验二: 随机抽取以上4组解冻后卵母细胞进行体外受精发育试验(详见1.5), 检测胚胎发育情况。试验重复3次。

实验数据汇总后以SAS卡方分析法(Chi-square analysis)测定显著性。

2 结果

2.1 猪体外成熟卵母细胞玻璃化保存染色体及纺锤体形态观察

对照组MII期卵母细胞(图1a, 图1a')染色体均匀排列在赤道板中央(→所示), 纺锤体形态整齐,

呈典型椭圆椎形结构; EG40 组(图 1b, 图 1b')染色体崩解松散, 细胞质中可见游离染色体碎片, 纺锤体严重扭曲变成扫帚样结构(→所示); ED20(-)组(图 1c, 图 1c')染色体完全崩解, 染色体碎片遍布细胞质中, 纺锤体微管解聚, 胞质内可见清晰解离微管(→所示); ED(+)组(图 1d, 图 1d')染色体重新恢复至 MII 期形态, 纺锤体微管轮廓大体完整, 但周边仍有松散游离的丝状微管结构(→所示)。

2.2 不同保存方案维持染色体与纺锤体形态结构正常比较

根据表 1 所示, EG40 组与 ED20(-)组染色体正常率及纺锤体正常率相似, 无明显差异。ED20(+)组染色体正常率为 30.1%, 与 EG40 组比较无明显差异, 但显著高于 ED20(-)组($P<0.05$); 而纺锤体正常率为 37.2%, 均高于 EG40 组及 ED20(-)组, 差异显著($P<0.05$)。与对照组比较, ED20(+)组染色体正常比例及纺锤体正常率显著降低($P<0.05$)。

2.3 猪体外成熟卵母细胞玻璃化保存后对外受

精发育的影响

体外受精试验表明, ED20(+)组精子入卵率(29.4%)与试验组 EG40(26.1%)及 ED20(-)组(25.7%)无显著差异, 但卵母细胞激活率为 54.5%, 与 EG40(36.2%)及 ED20(-)(30.1%)组差异显著($P<0.05$), 但卵母细胞激活后胚胎卵裂率与 EG40 及 ED20(-)组无明显差异。与对照组比较, 三冷冻试验组在精子入卵率、单精子入卵率、卵母细胞激活率及胚胎卵裂率上均存在显著差异($P<0.05$)。各试验组均存在明显的多精入卵现象, 进入卵母细胞的平均精子数在 2.3 个及其以上(表 2)。

3 讨论

目前玻璃化保存法所使用的低温保护剂属于高浓度溶液(约 7 mol/L), 在超低温环境下凝固, 形成无规则的玻璃化固体, 这种固态物质能保持液态时的正常分子与离子分布, 因而在细胞内发生玻璃化起到保护作用。但过高浓度的保护剂常温下对细

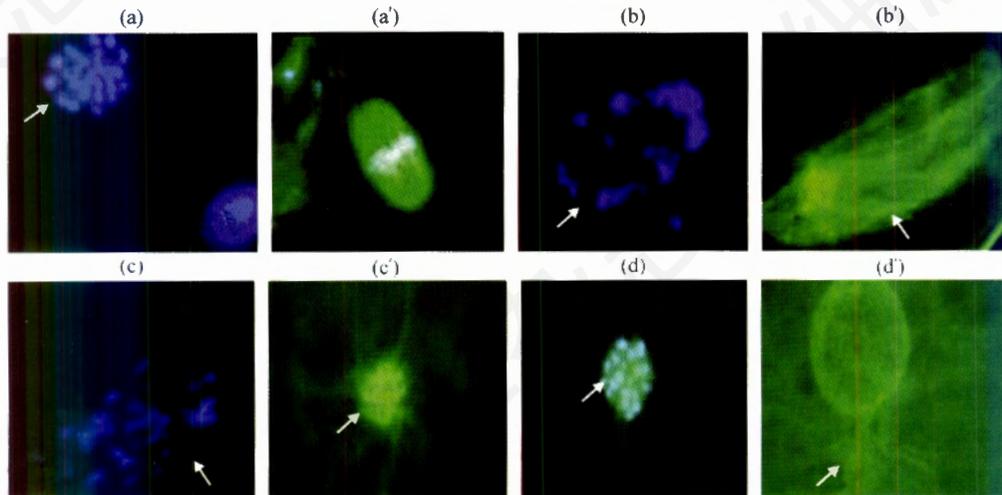


Fig.1 Immunofluorescent micrographs of porcine oocytes matured *in vitro*

The chromosomes (blue) are stained with Hoechst 33342 in group a, b, c and d. The spindle microtubules (green) are labeled with anti α or β tubulin antibodies and FITC-conjugated secondary antibody in group a', b', c' and d'. a: a normal MII oocyte prior to vitrification (control group) had a polar body (pb) and chromosome alignment at equatorial plane of the spindle; a': A normal spindle morphology (control group); b: chromosomes disperse (group EG40); b': spindle structures severely distort (group EG40); c: chromosomes completely disperse in the cytoplasm [group ED20(-)]; c': microtubules of spindle become dissembled in the cytoplasm [group ED20(-)]; d: chromosomes return to MII phase[group ED20(+)]; d': spindle morphology basically maintain, while microtubules disperse at the top of the structures.

Table 1 Normal rate of spindle organization and chromosomes morphology of porcine oocytes after vitrification

Groups	Total No. of oocytes	Normal chromosomes, % (n)	Normal spindle organization, % (n)
Control	111	82.9(92) ^a	84.7(94) ^a
EG40	93	19.4(18) ^{bc}	20.4(19) ^b
ED20(-)	101	14.9(15) ^b	17.8(18) ^b
ED20(+)	113	30.1(34) ^c	37.2(42) ^c

Values with different superscripts a, b, c within each column are significantly different at 0.05 level respectively.

Table 2 Influence of vitrification porcine oocytes on development after fertilized *in vitro*

Groups	n	No. of oocyte penetrated by sperm (%)		Sperm No. into oocyte	No. of activated oocyte (%)	=2cell (%)	to>2cell (%)
		Total	Monospermy				
Control	340	249(75.5 ± 6.5) ^a	87(24.6 ± 2.2) ^a	2.4 ± 0.3 ^b	249(100) ^a	38(15.0 ± 0.9) ^a	162(63.1 ± 3.0)
EG40	75	19(25.7 ± 2.9) ^b	7(9.4 ± 1.1) ^{bc}	3.5 ± 0.6 ^a	7(36.2 ± 2.9) ^b	1(5.3 ± 0.9) ^b	0(0)
ED20(-)	38	10(26.1 ± 1.7) ^b	2(5.3 ± 1.0) ^c	2.3 ± 0.1 ^b	3(30.1 ± 1.7) ^b	0(0)	0(0)
ED20(+)	113	33(29.4 ± 2.1) ^b	9(8.1 ± 1.5) ^b	2.8 ± 0.3 ^{ab}	18(54.5 ± 3.1) ^c	2(6.0 ± 0.8) ^b	0(0)

Values with different superscripts a, b, c within each column are significantly different at 0.05 level respectively.

胞毒性较大, 所以需要尽量降低玻璃化溶液的毒性。自 Kasai 等^[8]报道以 40%EG 玻璃化溶液超快速冷冻小鼠胚胎, 可以有效降低玻璃化溶液的毒性, 并获得了较高的存活率(98%)以来, 许多研究者采用 40% 浓度保护剂以保存卵母细胞和胚胎^[3,4,7]。EG 是目前玻璃化保存的主要细胞内保护剂, 因为细胞对 EG 耐受能力好, EG 渗透速度明显快于丙二醇、DMSO 以及甘油, 而在低温下如果冷冻保护剂渗透性低, 至冷冻前细胞内部可能仍没能达到玻璃化所需浓度, 很可能形成冰晶致细胞死亡。但 EG 的玻璃化形成作用较差, 所以有的玻璃化保存方案将 EG 与其它细胞内保护剂联合应用, 以结合 EG 的快速渗透作用和其他保护剂易于形成玻璃化的特点。DMSO 在卵母细胞冷冻研究初期曾被单独用作冷冻保护剂, 有研究^[9]表明会对卵母细胞纺锤体微丝和微管成分构成破坏, 增加卵母细胞激活后的染色体非倍性比率, 但也有人^[10]认为在 0 °C 加入 DMSO 并没有增加非整倍性, 甚至延长 1 h, 也没有增加的非倍体率。在本研究中 EG40 组与 ED20(-)组染色体正常率分别为 19.4% 与 14.9%, 纺锤体正常率分别为 20.4% 与 17.8%, 均无明显差异, 表明采用 40%EG 单独或 20%EG 与 20%DMSO 联合使用作为冷冻保护剂对猪卵母细胞染色体及纺锤体冷冻损伤影响并不明显。

卵母细胞染色体与纺锤体的损伤还涉及到玻璃化保存过程中的另一关键因素即降温速度。Pickering 等^[11]研究表明, 温度降低导致纺锤体形态改变, 若温度下降后再恢复到正常温度, 仅有部分卵子纺锤体能恢复到原有状态。人类 MII 期卵子体外培养时, 当温度由正常培养温度(37 °C)下降至室温(25 °C), 纺锤体会在 5 min 内完全崩解, 若随即将温度回升至 37 °C, 则纺锤体可恢复至原来形态, 若温度由 37 °C 下降至 33 °C、28 °C 或 25 °C, 经 10 min 后再恢复至 37 °C, 此时卵子纺锤体恢复至正常形态比例分别为 5/5、2/5、0/5^[12], 表示纺锤体受温度影响后, 再恢复正常形态的能力与下降

温度及处于低温所维持的时间相关。

相同地, 当卵母细胞处于超低温玻璃化冷冻的情形与此类似。玻璃化溶液形成玻璃化的温度大约在 -110~-130 °C 之间, 常规冷冻法若快速通过此温度区时易造成卵母细胞破裂。而玻璃化保存方法中因为保护剂摩尔浓度较高, 在降温及升温过程中玻璃化转相温度通过比较缓和, 可降低卵母细胞的损伤破裂。而提高玻璃化冷冻速率是降低玻璃化过程中纺锤体损伤的有效方法之一。有研究表明^[13]卵母细胞玻璃化冷冻存在危险温区(如 15~-5 °C), 在该温区内由于玻璃化处在起始形成阶段容易诱发冰晶形成对纺锤体造成损伤, 提高玻璃化冷冻速率可使卵母细胞更迅速地通过冷冻危险区, 还可以降低形成玻璃化所需的冷冻保护剂浓度, 减轻玻璃化冷冻溶液对卵母细胞的毒害作用。在本研究中, 当采用玻璃化冷冻仪高速降温时, ED20(+)组染色体及纺锤体正常率分别为 30.7% 与 37.2%, 均显著高于 ED20(-)及 EG40 两直投液氮组。原因可能是当卵母细胞投入液氮时, 瞬时降温速率约为 2 100 °C/min, 此时尽管液氮蒸气只维持 1 s 时间, 在卵母细胞还是容易形成冰晶, 从而可能对纺锤体造成损伤, 而纺锤体的作用是在分裂细胞中牵引染色体到达分裂极, 导致染色体结构损伤。玻璃化冷冻仪通过真空抽吸装置负压, 引起液氮固化而无液氮蒸气产生, 且导热速率急剧增加, 瞬时降温速率约为 135 000 °C/min, 避免了冰晶形成, 从而使卵母细胞染色体和纺锤体结构得到很好保护。

卵母细胞的激活过程与精子与卵母细胞透明带(ZP)精子受体蛋白结合及相关蛋白激活过程相关, 卵母细胞玻璃化保存容易造成卵母细胞透明带破裂或硬化^[14]。对冷冻-解冻后卵母细胞的体外受精实验结果显示, ED20(+)组精子入卵率与 EG40 组、ED20(-)组无显著性差异, 但卵母激活率明显高于该两组, 提示冷冻保护剂 EG 与 DMSO 联合应用并高速制冷方案可能对卵母细胞透明带结构及透明带上精子受体蛋白的数量或活性有一定的维持保护作用

用。

冷冻各组受精卵发育能力均显著低于试验组,并滞留在2~4细胞发育阶段,且明显低于现阶段所研究的其他哺乳动物卵母细胞玻璃化冷冻后受精率(牛8%~40%,小鼠35%~80%),进一步说明低温对各哺乳动物卵母细胞刺激损伤具有种属特异性^[15]。此外,猪卵母细胞多精入卵率高(表2)、猪卵母细胞富含脂质成分^[16]及猪种属特异的“4cell embryo-arresting”^[4]现象可能是影响其冷冻效果及后续发育能力低下的原因之一。

综上所述,采用冷冻保护剂EG及DMSO联合应用作为玻璃化冷冻液并提高制冷速率方案可较好地保持猪卵母细胞染色体及纺锤体结构。但染色体及纺锤体损伤仍比较严重,解冻后卵母细胞受精能力仍很低下,说明猪卵母细胞冷冻保存中所使用的抗冻保护剂目前为止还难以达到理想的冷冻效果,为此冷冻方法与冷冻损伤机制的研究还有待进一步。

感谢本实验室的苏建民和王春梅同学在实验室工作中给予的帮助。

参考文献(References)

- [1] Shaw JM *et al.* *Theriogenolog*, 2000, **53**: 59
- [2] Ben-Yosef D *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1995, **42**: 122
- [3] Nakagata N. *J Reprod Fertil*, 1989, **87**: 479
- [4] Isachenko V *et al.* *Cryobiology*, 1998, **36**: 250
- [5] Lane M *et al.* *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 1234
- [6] Ju JC *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1999, **53**: 336
- [7] Vajta G *et al.* *Theriogenology*, 1996, **45**: 683
- [8] Kasai M *et al.* *J Reprod Fertil*, 1990, **89**: 91
- [9] Pickering SJ *et al.* *Hum Reprod*, 1991, **6**: 142
- [10] Magistrini M *et al.* *Eur J Cell Biol*, 1980, **22**: 699
- [11] Pickering SJ *et al.* *Fertil Steril*, 1990, **54**: 102
- [12] Wang WH *et al.* *Hum Reprod*, 2001, **16**: 2374
- [13] Aman RR *et al.* *Biol Reprod*, 1994, **50**: 103
- [14] Vincent C *et al.* *J Reprod Fertil*, 1990, **89**: 253
- [15] Didion BA *et al.* *J Anim Sci*, 1990, **68**: 2803
- [16] Nagashima H *et al.* *Theriogenology*, 1996, **45**: 180

Influence of Vitrification on the Chromosomes and Spindles of Porcine Oocytes Matured *in Vitro*

Zhi-Feng Xiang*, Jin-Zhou Zhang, Pei-Qing Li, De-Fu Zhang¹, Shi-Qing Zhang¹

(Department of Animal Science, Henan Sci-tech College, Xinxiang 453003, China; ¹Animal Husbandry and Veterinary Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract To investigate the influence of vitrification freezing on the chromosomes and spindles of porcine oocyte matured *in vitro* by using nylon cryoloop. Porcine oocytes were verified with ethylene glycol (EG) singly or EG combined with dimethyl sulphoxide (DMSO) as cryoprotectants, and cooled by taking oocytes directly into liquid nitrogen or by vitrification machine. After frozen porcine oocytes thawed, the microtubulin of the spindles and chromosomes were fixation and stained by immunofluorescent method. Normal morphological oocytes in every groups were used to fertilize *in vitro*. Comparatively, in protocol of EG combined with DMSO and at ultra-rapid cooling rate, the normal configuration of spindle and chromosomes rate of thawed porcine oocytes was remarkably higher than that of the two protocol of single EG used and EG combined with DMSO, As the same in the rate of oocytes activated. The protocol of EG combined with DMSO as cryoprotectants and with extremely high cooling rate can produce better effect on conservation of chromosomes and spindle configuration in vitrification of porcine oocytes, while the development ability of thawed oocytes are severely affected.

Key words vitrification; oocyte; spindle; chromosome; porcine

Received: March 20, 2006 Accepted: September 1, 2006

This work was supported by the Youth Fund of Henan Sci-tech College (No.040106)

*Corresponding author. Tel: 86-373-3040833, Fax: 86-373-3040718, E-mail: zhifeng7809@yahoo.com.cn