

不同培养基对牛体外受精胚发育率及抗冻性的影响

李荣凤 旭日干*

(内蒙古大学实验动物研究中心 呼和浩特 010021)

家畜体外受精(IVF)技术自 80 年代初获得成功以来,发展十分迅速,90 年代即进入试管胚的开发应用阶段。尽管如此,该技术目前还普遍存在着生产效率低的问题,IVF 卵的囊胚发育率偏低,以及 IVF 胚的质量、抗冻性及移植受胎率均不及体内发育胚是导致这一问题的重要因素。

早期的研究通常采用复杂培养基(如 M199)进行牛 IVF 卵的发育培养。近年来,有报道简单的化学合成培养基(如 SOF^[1]、CR₁^[2]等)能显著提高囊胚发育率,如果这些经简单培养基培养的胚胎也能被成功地冷冻,无疑将对 IVF 技术的开发产生巨大的推动作用。

在胚胎冷冻保存研究方面,由于长期以来人们把重点放在了冷冻方法的改进上,致使有关不同培养条件影响胚胎抗冻性的研究开展得不多。1993 年,McGowan 等^[3]报道用 SOF 培养得到的牛 IVF 胚,其抗冻能力明显不及用 M199 培养的胚胎。H. R. Tervit^[4]在绵羊上也得到了相同的结论。1995 年,Kei Imai^[5]的研究表明,经 CR₁ 培养的牛 IVF 胚,冷冻解冻后的存活率也低于 M199。由此看来,在牛 IVF 卵体外发育培养过程中,采用不同的培养系统不但影响胚胎发育率,同时也可能影响到胚胎的抗冻能力。

本研究分别以 M199 和 SOF 为基本培养液,并在 SOF 中添加混合氨基酸,比较这几种条件下的囊胚发育率以及这几种条件下培养得到的牛 IVF 囊胚的抗冻能力,同时检测氨基酸在胚胎发育及抗冻性方面的作用,为牛 IVF 卵体外培养条件的进一步改善和 IVF 胚胎质量的进一步提高提供科学依据。

材料与方 法

1. 卵母细胞的采集、体外成熟及体外受精

本研究中卵母细胞的采集、体外成熟培养和体外受精处理过程均采用旭日干等^[6]的方法并略加改进。主要过程如下:从当地屠宰场回收母牛卵巢,置于 30-35℃ 生理盐水中带回实验室。用手术刀切开卵巢表面 2-6mm 的可见卵泡,再用小药匙刮取卵泡内容物放入装有采卵液 PBS(日本日本制药株式会社,Code 05913) + 3mg/mlBSA(Sigma)的试管中,采卵液保温在 37℃。采卵结束后静置 3-5 分钟,吸去上清液,将带有卵子的培养液倒入平皿内,在光镜下捡卵。

选择 A(带有数层致密卵丘细胞)、B(带有数层较疏松卵丘细胞)级卵母细胞置于 M199(Gibco, Cat. no. 31100-027) + 5% FCS(胎牛血清,本研究中心自制) + 25mmol/L Hepes(日本和光制药株式会社) + 1μg/ml 雌二醇(Sigma) + 0.02Amrum Unit/mlFSH(日本テンカ制药株式会社)的成熟培养液小滴中培养 20-22 小时,每 100μl 小滴内培养 10-20 枚卵母细胞。培养条件为 38.5℃、100%湿度和 5%CO₂、20%O₂、75%N₂的气相。将黑白花奶牛冷冻细管精液在 37℃ 水浴中解冻,用含有 10mmol/L 咖啡因钠(Sigma)的 BO^[7]液离心(2000r/min)洗涤两次,每次 5min。将上浮的活精子通过细胞计数调节浓度至 1×10⁷/ml,用含有 20mg/mlBSA 和 5iu/ml 肝素(日本ノボ・ノルディスク)的 BO 液稀释 1 倍,做成 100μl 的精子悬液小滴,将培养成熟的卵子每 30-40 枚放入一个小滴中共同培养 6h。

2. 体外受精卵的发育培养

将授精处理后的卵子移入到发育培养液中分三个组(M199、SOFaa 和 SOF)进行培养。三个组的培养液分别为: M199 + 25mmol/L Hepes + 5% FCS、SOF^[8] + 5% FCS + BME 氨基酸溶液(Sigma, B6766) + MEM 非必需氨基酸溶液(Sigma, M7415)和 SOF + 5% FCS。以受精日为第一天(D₁),于 D₄ 统计卵裂率和 8 细胞胚发育率, D₈-D₁₁ 统计囊胚发育率和孵化率。

3. 胚胎的冷冻及解冻

选择 D₈ 发育出来的形态正常的囊胚置于含有 1.8mol/L 乙二醇(北京化工厂)和 20% FCS 的 PBS 液中,在室温下(20℃左右)平衡 5min,移入 PBS + 20% FCS + 1.8mol/L 乙二醇 + 0.25mol/L 蔗糖(天津市化学试剂一厂)的冷冻液中,装管并继续在室温下保持至 10min,投入 -7℃ 酒精浴胚胎冷冻仪(ET-1,日本富士平)中进行程序冷冻。冷冻程序为 -7℃ 保持 10min,其间完成植冰过程,然后以 0.3℃/min 降温至 -30℃ 后投入液氮。解冻过程是:从液氮中取出冷冻细管,在空气中停留 5s 左右,放入 37℃ 水浴中,待冰晶全部融化为止。剪开细管,将胚胎迅速移入 PBS + 20% FCS + 0.25mol/L 蔗糖的解冻液中,室温下保持 5min 以去除防冻剂。然后将胚胎放入事先准备好的含有单层贴壁输卵管上皮细胞的发育培养液(M199 + 25mmol/L Hepes + 5% FCS)小滴内培养,分别于 24h 和 72h 统计解冻后的存活率及孵化率。存活标准为重新出现囊胚腔。

本文 2001 年 6 月 25 日收到,11 月 12 日接受。

国家 863 高技术项目“中国北方良种牛 IVF 技术的中试开发研究”资助。

* 课题负责人。

结 果

1. 不同培养基对牛 IVF 卵体外发育的影响

M199、SOFaa 和 SOF 三个处理组的卵裂率分别为 78.9% (105/133)、86.3% (107/124) 和 86.4% (114/132), 三者间无显著差异, 囊胚发育率分别为 22.6% (30/133)、29.0% (36/124) 和 13.6% (18/132), 孵化率分别为 11.3% (15/133)、8.1% (10/124) 和 0, 前两组间的囊胚率及孵化率均无显著差异, 但两者均极显著高于第三组 ($P < 0.01$)。结果表明, M199 的培养效果明显优于 SOF; 在 SOF 中添加氨基酸后能明显提高 IVF 卵的囊胚发育率及孵化率 (见表 1)。

表 1 不同培养基对牛 IVF 卵体外发育的影响

培养液	培养卵数	卵裂卵数 (%)	8 细胞胚数 (%)	囊胚数 (%)	孵化囊胚数 (%)
M199	133	105(78.9)	75(56.4) _a	30(22.6) _a	15(11.3) _a
SOFaa	124	107(86.3)	55(44.4) _{ab}	36(29.0) _a	10(8.1) _a
SOF	132	114(86.4)	50(37.9) _{bc}	18(13.6) _c	0 _c

a>c, $P < 0.01$ 。

2. 不同培养基对牛体外受精胚冷冻解冻后存活率及孵化率的影响

将用 M199、SOFaa 和 SOF 培养得到的囊胚进行冷冻保存, 解冻后 M199 处理组的存活率 (75.8%, 47/62) 及孵化率 (41.9%, 21/62) 均显著高于 SOFaa 处理组 (46.4%, 32/69, $P < 0.01$; 23.2%, 16/69, $P < 0.05$)。SOFaa 处理组又极显著高于 SOF 处理组 (17.3%, 13/75; 0, 0/75, $P < 0.01$)。结果表明, 经复杂培养基 M199 培养得到的胚胎, 其抗冻性明显优于简单的化学合成培养基 SOF 培养得到的胚胎, 在 SOF 中添加氨基酸能明显提高胚胎的抗冻能力 (见表 2)。

表 2 不同培养基对牛体外受精胚冷冻解冻后存活率及孵化率的影响

培养液	冷冻胚数	回收胚数 (%)	存活胚数 (%)	孵化胚数 (%)
M199	62	62(100)	47(75.8) _a	26(41.9) _d
SOFaa	69	69(100)	32(46.4) _b	16(23.2) _b
SOF	75	75(100)	13(17.3) _c	0 _c

a>b, b>c, $P < 0.01$; d>b, $p < 0.05$ 。

讨 论

改善体外培养环境, 进一步提高 IVF 胚的发育率及抗冻能力是解决目前 IVF 技术生产效率低的

重要手段。在牛 IVF 研究中, 采用的培养液通常有两大类, 即复杂培养基和简单的化学成分明确的培养基。多方研究结果表明, 采用简单培养基能获得较高的囊胚发育率^[1,2], 但得到的囊胚的冷冻存活率不及经复杂培养基培养获得的囊胚^[3-5]。简单培养基由几种常规无机盐类并添加能量底物 (如丙酮酸钠和葡萄糖) 组成, 而复杂培养基则含有除这些成分以外的维生素、氨基酸、嘌呤、核苷酸及微量表面活性剂等诸多成分。由此看来, 复杂培养基中存在着简单培养基所没有的一些成分, 这些成分有可能在影响胚胎抗冻性方面起关键作用。

本研究的胚胎发育结果表明, 单纯添加 5% FCS 后, SOF 处理组的囊胚发育率极显著低于 M199, 囊胚扩张后无一枚孵化, 而 M199 组的孵化率可达 11.8%。在添加血清的基础上再添加混合氨基酸, 囊胚率及孵化率均显著提高至与 M199 组无统计学差异的水平, 其中囊胚率还略高于 M199 组。由此可见, 氨基酸在 IVF 胚的体外发育过程中起着非常重要的作用, 这一点在其他哺乳类如绵羊^[9]、猪^[10]和地鼠^[11]上也已经得到证实。这些研究均表明氨基酸能够有效地提高受精卵的囊胚发育率、孵化率及囊胚细胞数。Lane 等^[12]和 Gardner 等^[13]的研究证实氨基酸是早期胚胎细胞功能的主要调节者, 通过调节胚胎能量生产方式促进囊胚腔的形成、滋养层细胞数量的增加及孵化率的提高。牛血清里含有 23 种游离氨基酸, 但浓度低于子宫液^[14], 而本研究在 SOF 处理组仅添加了 5% 的小牛血清, 氨基酸浓度远远不能满足牛 IVF 卵体外发育的营养要求是造成其囊胚率低和胚胎不能孵化的主要原因。

从冷冻结果来看, M199 培养的胚胎经冷冻解冻后的存活率及孵化率显著高于 SOFaa 处理组, 而 SOFaa 培养的胚胎又显著高于 SOF。这一研究结果进一步证实了 McGown 等^[3-5]的结论, 即经简单培养基培养得到的胚胎, 其抗冻能力不及经复杂培养基培养的胚胎。同时还首次证明氨基酸在提高胚胎抗冻性方面具有重要作用。猪胚胎的冷冻保存比牛、羊等其他哺乳类难度大, 原因是含有大量脂滴。1994 年, Nagashima^[15]首次利用高速离心后去除聚集在胚胎一端的脂肪颗粒的方法, 获得了猪胚胎冷冻保存的成功, 较 Wilmut^[16]在牛胚冷冻上的成功晚 20 年。胚胎脂肪颗粒不仅具有种间特异性, 作者研究曾发现^[17], 同种动物的 IVF 胚经不同发育培养系统培养后, 在脂滴特性上也存在差异。经 M199 培养的胚胎, 脂肪颗粒细小均匀, 平均直径

2.5 μm 。而SOF培养的胚胎,脂肪颗粒明显增大,平均直径可达6.3 μm ,且颗粒大小不均。在SOF中添加氨基酸后,大部分胚胎脂肪颗粒减小,呈小脂滴胚,但仍有15%左右的胚胎呈大脂肪颗粒。综合上述研究结果可见,脂滴大小与胚胎抗冻能力具有相关性,脂滴小的胚胎较大脂滴胚具有更强的抗冻能力,而氨基酸则可能通过合成某种特定蛋白(如载脂蛋白)或以其他方式影响脂类的代谢及分布,从而影响脂滴大小,进而影响胚胎的质量及抗冻能力。本研究结果还表明,氨基酸的添加仍不能使SOF胚胎的冷冻存活率提高至M199的水平,可见,胚胎抗冻能力的提高需要多种物质来共同完成,任何成份的缺乏都可能影响到胚胎的发育质量,从而影响胚胎的低温耐受性。

早期的研究通常采用囊胚发育率作为培养系统的评价指标,囊胚发育率越高,则认为培养系统越好^[18]。而本研究结果表明,囊胚发育率高胚胎的抗冻能力并不一定强,如SOFaa处理组的囊胚率略高于M199,而胚胎的冷冻存活率及孵化率却明显不及M119组。由此可见,单从胚胎发育率判断并不能反映培养系统的优劣,还需要进行胚胎冷冻或其他方式的胚胎质量检查,从几个方面对培养系统进行综合评价。

摘 要

采用M199、SOFaa(aa: Amino Acid)和SOF对牛体外受精卵进行发育培养,比较了三种培养条件下的囊胚发育率、孵化率以及这三种条件下培养出来的囊胚的抗冻能力。在M199和SOFaa处理组,囊胚发育率分别为22.6%和29.0%,孵化率分别为

11.3%和8.1%,两者间无显著差异,但均极显著高于SOF处理组(13.6%, $P < 0.01$)。三个处理组的囊胚经冷冻解冻后的存活率分别为78.5%、46.4%和17.3%,孵化率分别为41.9%、23.2%和0,三者间存在极显著差异($P < 0.01$)。结果表明,不同的培养液不但影响胚胎发育率,同时也影响胚胎的抗冻能力,M199的培养效果优于SOF,氨基酸能明显提高胚胎发育率及抗冻能力。

关键词: 牛体外受精 囊胚发育率 胚胎抗冻能力

参 考 文 献

- [1] Rorie R. W. et al., 1994, *Theriogenology*, **42**:385-395.
- [2] Takahashi S. et al., 1994, *Theriogenology*, **41**:311.
- [3] McGowan L. T. et al., 1993, *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, **25**:no.66 abstr.
- [4] Tervit H. R. et al., 1994, *Theriogenology*, **41**:315.
- [5] Kei Imai et al., 1995, *J. Mamm. Ova. Res.*, **12**(1):S3.
- [6] 旭日干等, 1989, 内蒙古大学学报(自然科学版), **20**:407-414.
- [7] Brackett B. G. et al., 1975, *Biol. Reprod.*, **12**:260-274.
- [8] Tervit H. R. et al., 1972, *J. Reprod. Fert.*, **30**:493-497.
- [9] Gardner D. K. et al., 1994, *Biol. Reprod.*, **50**:390-400.
- [10] Rosenkrans Charles F. et al., 1989, *J. Anim. Sci.*, **67**:1503-1508.
- [11] Gardner D. K. et al., 1993, *Biol. Reprod.*, **48**:377-385.
- [12] Lane M. et al., 1997, *J. Reprod. Fert.*, **109**:153-164.
- [13] Gardner D. K. et al., 1998, *Theriogenology*, **49**:83-102.
- [14] Fahning M. L. et al., 1967, *J. Reprod. Fert.*, **13**:229-236.
- [15] Nagashima H. et al., 1994, *Biol. Reprod.*, **51**:618-622.
- [16] Wilmut I. et al., 1973, *Vet. Record*, **92**:686-690.
- [17] R. F. Li. et al., 1996, *AAAP. Anim. Sci. Cong. Proc.*, **2**:82-83.
- [18] Hernandez-ledezma J. J. et al., 1993, *Theriogenology*, **39**:1267-1277.

EFFECT OF DIFFERENT CULTURE MEDIA ON THE DEVELOPMENT RATES AND FREEZING VIABILITIES OF BOVINE IN VITRO FERTILIZED EMBRYOS

LI Rong Feng BOU Shorgan

(The Research Center for Laboratory Animal Science NeiMongol University Hohhot 010021)

ABSTRACT

Bovine IVF embryos were cultured in M199, SOF + Amino Acids(SOFaa) and SOF respectively, their development rates and the freezing viabilities of blastocysts derived from the three culture media were compared. The blastocyst rates in M199 and SOFaa were 22.6% and 29.0%, the hatching rates of blastocysts were 11.3% and 8.1%, respectively. They were significantly higher than that (13.6% and 0) in SOF group ($p < 0.01$). The survival rates of blastocysts derived from M199, SOFaa and SOF after freezing-thawing were 78.5%, 46.4% and 17.3%, the hatching rates were 41.9%, 23.2% and 0. There were significant differences among them ($P < 0.01$). The results indicated that the different culture media affected not only the development rates but also the freezing viabilities of blastocysts. The culture efficiency of IVF embryos in M199 was better than that in SOF. Amino Acids can enhance the development rates and the freezing viabilities of blastocysts.

Key words: Bovine In Vitro Fertilization Development rate of blastocyst Freezing viability of blastocyst