

· 实验研究 ·

冷冻环玻璃化法冷冻小鼠卵母细胞的效果评价

王增艳, 何方方*, 孙正怡, 陈颖

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 北京协和医院妇产科, 北京 100730)

【摘要】 目的 评价 ED15 (15% ethylene glycol, EG + 15% dimethylsulphoxide, DMSO) 冷冻环玻璃化法冻存小鼠成熟卵母细胞的效果, 以及对其纺锤体形态、染色体分布和发育潜能的影响。方法 分别以小鼠新鲜成熟卵母细胞为对照组, 玻璃化冷冻复苏卵母细胞为冷冻组。玻璃化冷冻以冷冻环为载体, 以乙二醇 (EG) 及二甲亚砜 (DMSO) 联合作为冷冻保护剂。解冻后观察细胞存活情况并对解冻后培养 0、1、2 h 的卵母细胞行纺锤体及染色体免疫荧光染色, 激光共聚焦扫描显微镜观察; 其余卵母细胞行体外受精培养, 计算受精率、囊胚形成率。结果 冷冻组成熟卵母细胞存活率为 98.2%, 复苏后卵母细胞培养 0、1、2 h 的纺锤体形态正常率及染色体分布正常率与对照组比较无显著性差异 (分别为 87.0%、90.9%、90.3% vs 95%, $P > 0.05$; 91.3%、95.4%、93.5% vs 90%, $P > 0.05$); 冷冻组受精率及囊胚形成率与对照组比较均无显著性差异 (81.3% vs 85.2%, $P > 0.05$; 76.1% vs 75.4%, $P > 0.05$)。结论 ED15 冷冻环玻璃化法冻存小鼠成熟卵母细胞复苏存活率高, 对其纺锤体形态、染色体分布及发育潜能无明显影响。

【关键词】 卵母细胞; 玻璃化; 冷冻环; 纺锤体; 小鼠

【中图分类号】R711.6 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1004-3845(2008)01-0038-05

Assessment of a new cryoloop vitrification protocol in the cryopreservation of mouse mature oocytes

WANG Zeng-yan, HE Fang-fang, SUN Zheng-yi, CHEN Ying

Department of Obstetrics & Gynecology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730

【Abstract】

Objective : To assess the outcome of a new cryoloop vitrification protocol in the cryopreservation of mouse MII oocytes.

Methods : Frozen-thawed oocytes were investigated against the fresh mouse MII oocyte as control. With the cryoloop carrier, mouse MII oocytes were vitrified in vitrification solution consisting of 15% ethylene glycol (EG), 15% dimethylsulphoxide (DMSO), 5.8 mg/ml Ficoll 400 and 0.58 mol/L sucrose (ED 15 protocol). After thawing, the survival rates were recorded. Some thawed oocytes and fresh oocytes were fixed, and the microtubules of the spindles and chromosomes were then stained by immunofluorescent method. Confocal microscopy was used to reveal the configurations of the spindles and chromosomes. Most of the other survived oocytes were inseminated in vitro, then the fertilization rates and blastocyst formation rates were compared with those of the control group.

Results : The oocytes vitrified by this protocol survived very well. The number of thawed oocytes with normal spindles and chromosomes was similar to that of the fresh ones. The fertilization rates and blastocyst formation rates of the thawed oocytes were also high, similar to those of the control group.

Conclusion : The ED15 vitrification protocol has little deleterious affect on the MII mouse oocytes' survival rate, spindles and chromosomes.

Key words : Oocytes; Vitrification; Cryoloop; Spindle; Mouse

(J Reprod Med 2008;17(1):38-42)

【收稿日期】 2007-06-12; **【修回日期】** 2007-08-13

【作者简介】 王增艳(1982~),女,山西运城人,硕士生,生殖医学专业。(*通讯作者)



卵母细胞冻存是辅助生育领域的研究热点之一,冷冻技术主要有慢速冷冻及快速冷冻(玻璃化)法。尽管慢速冷冻目前有很多改良方案,也获得了较高的复苏率及妊娠率^[1],但该方法费时费力,而且需要昂贵的程序冷冻仪。玻璃化冷冻技术在动物实验及临床应用中都获得了较满意的结果,而且该方法省时省力,所需设备简单。但不同学者报道的玻璃化冷冻方案的过程及结果都存在较大差别,目前尚无统一的可推广应用的冷冻方案。本实验采用冷冻环玻璃化法冻存小鼠成熟卵母细胞,从卵母细胞的纺锤体损伤及受精发育情况等方面对一种新的玻璃化冷冻方案进行评价,为寻求一种能推广应用于临床的玻璃化冷冻方案提供实验依据。

材料与方 法

一、培养液

卵巢及输卵管转运液为 HEPES 缓冲的含 5 mg/ml 人血清白蛋白(HSA, Quinn's, 美国)的拟人输卵管液(HTF, Quinn's, 美国);处理精液及授精所用培养液为碳酸盐缓冲的授精用 HTF;胚胎培养为碳酸盐缓冲的卵裂培养液或囊胚培养液。所有碳酸盐缓冲的培养液均不含蛋白,使用前一天配置,配置时添加 10% 血清蛋白替代品(SPS, Quinn's, 美国),在 5% CO₂ 培养箱中平衡过夜。

二、卵母细胞的采集及分 组

对 4~5 周龄雌性昆明(KM)小鼠进行超促排卵,隔日腹腔注射孕马血清促性腺激素(PMSG,宁波市激素制品厂)与人绒毛膜促性腺激素(hCG,宁波市激素制品厂)各 10 IU,并于 hCG 注射后 13~16 h 处死小鼠,剪下卵巢及输卵管,在体视镜下使用 25 G 注射器针头刺破输卵管壶腹部膨大处,获得卵丘复合体移入 80 IU/ml 透明质酸酶溶液,37℃ 恒温台上处理 1 min 左右,收集形态正常、有第一极体的卵母细胞,移至授精培养皿中,置于 5% CO₂ 培养箱中培养供后续使用。

将获得的卵母细胞随机分为两组:(1)对照组:直接固定行纺锤体及染色体免疫荧光染色或体外受精培养;(2)冷冻组:玻璃化冷冻复苏后,部分细胞固定行纺锤体及染色体免疫荧光染色,部分行体外受精培养;据文献^[2]报道冷冻液中添加胎牛血清(FBS, Gibco, 美国)有提高冻存卵母细胞受精率的作用,将冷冻组按照冷冻液中所含蛋白质种类不同分为 HSA 组及 FBS 组。

三、卵母细胞冷冻复苏

1. 冷冻:卵母细胞玻璃化冷冻液的配制均以 HEPES 缓冲的含 5 mg/ml HSA 或 10% FBS 的 HTF 为基础液,预平衡液中含有 7.5% (v/v) 二甲亚砜(DMSO) + 7.5% (v/v) 乙二醇(EG),玻璃化液中含有 15% (v/v) EG + 15% (v/v) DMSO + 5.8 mg/ml Ficoll 400 (Sigma, 美国) + 0.58 mol/L 蔗糖(Sigma, 美国)。将准备冷冻的卵母细胞先于预平衡液中平衡 2 min,然后将卵母细胞移入玻璃化液中,充分洗涤平衡后在冷冻环上由玻璃化液形成的液膜上;最后将冷冻环直接投入液氮。在卵母细胞进入玻璃化液至投入液氮的时间严格控制在 30~45 s 之间。

2. 复苏:卵母细胞冻存 1~10 d 后复苏。在室温下将含有卵母细胞的冷冻环自液氮中取出,在空气中停留 5~10 s 后,投入含 0.28 mol/L 蔗糖的复苏液 1,充分洗涤,平衡 2 min;然后移入含 0.17 mol/L 蔗糖的复苏液 2,充分洗涤,平衡 3 min;最后移入不含蔗糖的复苏液 3,平衡 5 min 后,移入添加了 10% SPS 碳酸盐缓冲的 HTF 中,放入 5% CO₂ 培养箱中培养。

四、复苏后卵母细胞存活率统计

将卵母细胞复苏,1 h 后观察存活情况,计算存活率。如果透明带和胞膜无损伤,卵周隙清楚,无胞质外漏或卵细胞萎缩,大小正常,胞浆均质折光好,则定为存活。若卵膜破裂,卵周隙消失,或胞浆呈颗粒状变性,折光消失,则定为死亡。存活的卵母细胞进行体外受精培养,或固定后行共聚焦显微镜观察及电镜观察。

五、共聚焦显微镜标本制备及纺锤体与染色体观察

将复苏存活卵母细胞随机分为 0、1、2 h 3 组:将对照组及各实验组各取 20~30 枚卵母细胞进行固定,荧光染色。具体过程:3.6% 多聚甲醛中 30 min,0.5% Triton X-100-PBS 液中在 37℃ 下 20 h,115 mol/L 甘氨酸 + 1% Triton X-100-PBS 中 30 min,PBS 洗 15 min,异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC, Sigma, 美国)染色 90 min,PBS 洗 2 次,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, Sigma, 美国)染色 10 min,PBS 洗 2 次,防衰减剂(碧云天,中国)封片,4℃ 保存。FITC 标记纺锤丝的微管成分呈绿色荧光,采集 FITC 荧光时,激发光波长为 488 nm,发

射光波长为 515 ~ 535 nm。DAPI 标记染色质成分使染色体成像呈蓝色荧光,采集 DAPI 荧光时,激发光波长为 543 nm,发射光波长为 590 ~ 630 nm。

六、获取精液及体外受精培养

在受精当日,选用 10 ~ 12 周龄成年雄性 KM 小鼠,处死后,刺破附睾尾部,获得精液置培养液中培养 1 ~ 2 h 获能后,以 $1 \sim 2 \times 10^6$ / ml 的终浓度进行授精。第 2 天检查受精情况,将受精胚胎移入卵裂培养液培养,发育至 8 细胞或桑椹胚时将胚胎移入囊胚培养液中培养,第 5 天观察囊胚发育情况。

七、统计学方法

采用 SPSS12.0 统计学软件进行统计分析,计数资料采用 χ^2 检验及 Fisher 精确概率法检验。

结 果

一、冷冻组卵母细胞复苏情况及复苏后培养不同时间的纺锤体形态、染色体分布

冻存小鼠成熟卵母细胞 612 个,复苏后存活 601 个,复苏率为 98.2%。正常纺锤体呈中间隆起两端渐尖的纺锤形,损伤的纺锤体可见断裂或纺锤丝扭曲。正常染色体规则排列在纺锤体正中隆起处的赤道板上,若染色体脱离纺锤体赤道板离散分布则为异常。本实验异常卵母细胞均为纺锤丝轻度断裂或染色体轻度离散,未发现纺锤体严重损伤或染色体极度离散现象(图 1)。玻璃化冷冻各组卵母细

胞复苏后培养不同时间,纺锤体形态及染色体分布正常率与对照组比较均无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 各组纺锤体及染色体分布情况

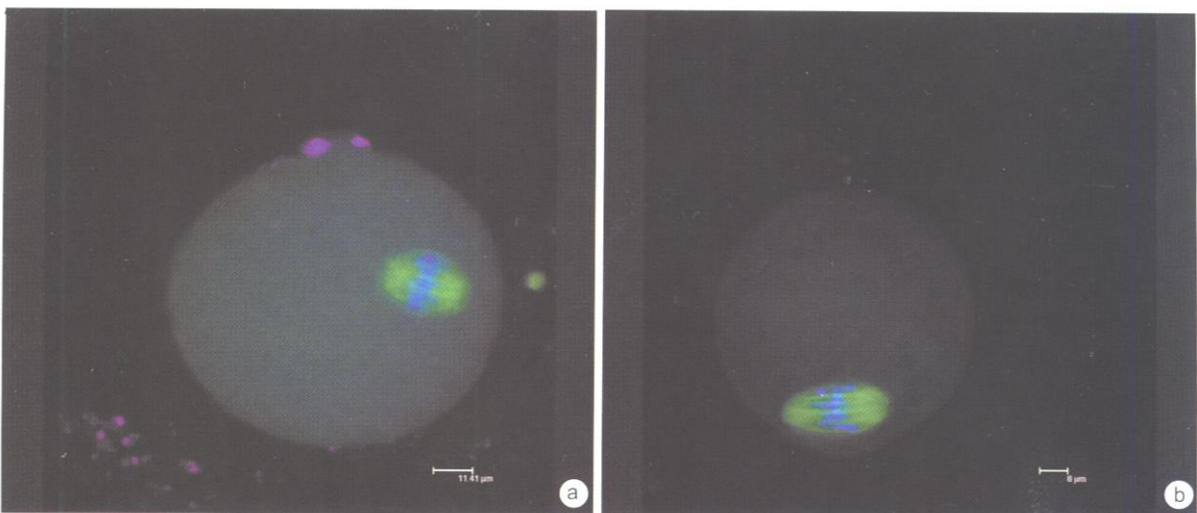
组 别	观察卵数 (n)	纺锤体形态正常卵 n (%)	染色体分布正常卵 n (%)
对照组	20	18 (95.0)	19 (90.0)
冷冻组			
0 h	23	21 (87.0) ^a	20 (91.3) ^a
1 h	22	21 (90.9) ^a	20 (95.4) ^a
2 h	31	29 (90.3) ^a	28 (93.5) ^a

注:a:与对照组比较均为 $P > 0.05$

二、卵母细胞体外受精发育情况

共 432 个复苏存活卵母细胞行体外受精,第 2 天 351 个卵母细胞受精分裂为 2 细胞,受精率 81.3%,第 5 天有 267 个囊胚形成,囊胚形成率为 76.1%。冷冻组受精率及囊胚形成率与对照组比较均无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

冷冻组中 HSA 组 239 个卵母细胞受精 189 个,受精率 79.1%;FBS 组 193 个中受精 162 个,受精率为 83.9%,与对照组 (85.2%) 比较均无显著性差异 ($P > 0.05$),两组比较亦无显著性差异 ($P > 0.05$)。



a:有正常纺锤体形态及染色体分布的成熟卵母细胞,在 12 点位置可见极体;b:极少数卵母细胞纺锤体不完整,纺锤丝轻度断裂,染色体轻度离散。未见纺锤体严重损伤或染色体极度离散现象。荧光染色 $\times 400$

图 1 ED15 冷冻复苏后卵母细胞纺锤体形态及染色体分布

表 2 各组受精率及囊胚形成率

组别	受精卵数	受精率 n (%)	囊胚形成率 n (%)
对照组	243	207 (85.2)	156 (75.4)
冷冻组	432	351 (81.3)	267 (76.1)

注:与对照组相比, $P > 0.05$

讨 论

自 1986 年首例冻存人类卵母细胞获成功妊娠以来,报道通过卵母细胞冻存技术出生的婴儿不足 200 个,通过玻璃化冷冻方案出生的更少^[1]。卵母细胞玻璃化冷冻技术的关键除了选择恰当的细胞发育时期外,根据卵母细胞质膜的特性选择合适的抗冻保护剂及其浓度、作用时间,既要保证抗冻保护剂的充分渗透和细胞内部水分的脱出,又不能使卵母细胞在冷冻液中处理时间过长,以防止抗冻保护剂对卵母细胞产生化学毒性。而不同的冷冻保护剂毒性不同,玻璃化能力及渗透性也不同。为了达到满意的玻璃化冷冻效果,改进冷冻载体,加快降温速度,寻求玻璃化液中冷冻保护剂的最佳浓度组合。但是目前大家报道的玻璃化冷冻方案种类较多,结果差别也较大,目前该技术还不成熟。本实验联合 EG 与 DMSO,均采用 15% 的浓度(ED15),低于文献^[3]所用的 20% 浓度,而且玻璃化液中含有 Ficoll 400 及蔗糖;使用冷冻环作载体操作简单易掌握。

由微管形成的纺锤体是一个动态变化的结构,在有丝或减数分裂时帮助染色体分离。在其功能正常时,可保证染色体准确分离,避免非整倍体^[4]。而纺锤体的损伤会导致胚胎的非整倍体现象^[5]。最近研究显示损伤的纺锤体结构会自然恢复^[4]。通过使用纺锤体观测仪,使用非侵入性手段观察活细胞的纺锤体。Rienzi 等^[6]报道慢速冷冻复苏后卵母细胞的纺锤体存在复苏后重聚。Cook 等^[7]报道,卵母细胞冷冻不会增加其核型异常及染色体离散。本实验通过 ED15 + Ficoll + 蔗糖的玻璃化冷冻方案冷冻小鼠卵母细胞,复苏后进行固定并对纺锤体及染色体进行荧光染色观察,发现冷冻复苏后不同时间的纺锤体损伤、染色体离散情况均与对照组无显著性差异。这与文献报道不符,说明通过改善玻璃化冷冻方案可以减少冷冻对纺锤体的损伤。而不恰当的冷冻方法,如在玻璃化冷冻液中暴露时间过长(超过 50 s)或冷冻保护剂浓度不合适均会对纺锤体造成

损伤(数据待总结)。

玻璃化冷冻小鼠卵母细胞复苏率最高达 99.3%^[8],是用 ED 16 + 10 mg/ml Ficoll + 0.65 mol/L 蔗糖作冷冻保护剂。本实验以 ED 15 + 5.8 mg/ml Ficoll 400 + 0.58 mol/L 蔗糖作冷冻保护剂的玻璃化冷冻方法冷冻小鼠卵母细胞,获得了 98.2% 的复苏率。很多研究都证实了卵母细胞冷冻会引起皮质颗粒释放而导致透明带变硬,受精失败^[9]。有学者采用透明带打孔等技术来解决该问题。还有人向冷冻液中添加 BSA(牛血清白蛋白,胎牛血清中的主要成分)取代蛋白质作为大分子物质可明显改善冻存卵母细胞的受精率^[2],但是卵母细胞或胚胎的培养液中添加血清不符合生理现象,而且在人类卵母细胞中应用受到限制。直至卵胞浆内单精子注射(ICSI)技术出现后,冻存人类卵母细胞受精问题才解决。关于冷冻引起卵母细胞皮质颗粒释放的机制目前认为还是冷冻保护剂毒性所致^[10]。本实验按冷冻液中含有蛋白 HSA 或 FBS 的不同分为两组,研究冷冻复苏后卵母细胞的透明带变硬问题,复苏后两组卵母细胞的透明带均未行任何处理,采用常规体外受精。两组受精率分别为 79.1% 与 83.9%,与对照组的 85.2% 均无显著差异,两组间差异亦无显著性。证实了通过改善玻璃化方案,改善玻璃化冷冻保护剂的组合可以降低甚至消除冷冻保护剂的毒性,克服冷冻所致的透明带硬化问题。

总之,本实验采用冷冻环 ED15 + Ficoll + 蔗糖逐步平衡玻璃化法冷冻小鼠 MII 期卵母细胞。发现该方法冻存卵母细胞复苏率高,对复苏后卵母细胞进行纺锤体、染色体等形态学观察,发现损伤较小,而且复苏后卵母细胞体外受精后也获得了满意的受精发育情况,认为该方案有进一步研究并探讨其临床应用的价值。

【参 考 文 献】

- [1] Jain J K, Paulson RJ. Oocyte cryopreservation[J]. Fertil Steril, 2006, 86[Suppl 3]:1037-1046.
- [2] Carroll J, Wood MJ, Whittingham DG. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules[J]. Biol Reprod, 1993, 48(3):606-612.
- [3] Cai XY, Chen GA, Lian Y, et al. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes[J]. Hum Reprod, 2005, 20(7):1969-1974.
- [4] Stachecki JJ, Munne S, Cohen J. Spindle organization after cryopreservation of mouse, human, and bovine oocytes[J].

Reprod Biomed Online, 2004, 8(6):664-677.

[5] Almeida PA, Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte[J]. Zygote, 1995, 3(4):357-365.

[6] Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, et al. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures [J]. Hum Reprod, 2004, 19(3):655-659.

[7] Gook DA, Osborn SM, Bourne H, et al. Fertilization of human oocytes following cryopreservation: normal karyotypes and absence of stray chromosomes[J]. Hum Reprod, 1994, 9(4):684-691.

[8] Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a Nylon Loop[J]. Mol Reprod Dev, 2001, 58(3):342-347.

[9] Ghetler Y, Skutelsky E, Ben Nun I, et al. Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules[J]. Fertil Steril, 2006, 86(1):210-216.

[10] Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes[J]. Reproduction, 2006, 131(1):53-61.

关于书写作者单位名称的说明

自本刊实行论著文稿同时附中、英文摘要以来,特别是目前全国部分医学院校与综合性大学合并调整后,不少作者在投稿时,对所在单位的中文、英文名称书写不规范,单位开具推荐信(介绍信)使用的公章与文稿中所书写的不一致。单位名称书写不规范,将影响读者与作者之间的联系,以及文稿发表后文献计量学的统计等工作。为此,本刊就作者单位名称的书写要求如下:(1)作者在投稿时,应列出单位名称的全称,如已归属于综合性大学的单位,应先列出大学名称,之后列出医学院或医院、科室名称。(2)单位的英文名称应根据所在单位统一的英文名称书写。(3)作者在投稿时,单位科研部门开具文稿推荐信的公章内容,需与文稿中所书写的单位名称一致。这一点,特别提请目前已完成院校合并、调整的单位注意。(4)由不同单位共同撰写的文稿,各个单位的名称均需分别列出,由第一作者所在单位开具文稿推荐信。(5)如文稿作者为集体作者,英文摘要的作者项中,应列出本文稿第一整理者(第一执笔者)的姓名及工作单位。(6)如文稿第一作者在投稿后工作单位有变动,英文摘要的作者项中,应同时列出第一作者的原单位及现在单位。

本刊有关录用论文版权转让的声明

随着因特网的不断发展,网络出版已经成为推进期刊成果传播应用、提升期刊质量水平的有效方式之一。为了规范网络环境下的期刊出版和传播行为,尊重作者的信息网络传播权益,保护期刊出版单位的著作权,维护正常的期刊网络出版传播的正常秩序,国际上著名期刊如:Science、Nature 以及 Elsevier 所属期刊社都与作者签署相关的论文版权转让协议;国内的一些期刊出版单位如:中国科学杂志社、北京大学学报(自然科学版)编辑部、软件学报编辑部等也都与作者签署相关的著作权转让书,中国高校自然科学学报研究会还在会员单位内推广这一工作,建议作者将论文的汇编权、复制权、发行权、信息网络传播权、翻译权等在全世界范围内转让给期刊社(编辑部)和相关数据库。

事实证明,顺应网络环境下期刊出版的新要求,在著作权法的框架内,期刊出版单位与作者签署论文版权转让合同,是新形势下推进期刊网络出版传播,正确处理作者、期刊编辑部和网络数据库出版单位之间关系的行之有效的方式。因此,凡本刊所录用论文,则需将该论文的复制权、发行权、信息网络传播权、翻译权、汇编权等权利在全世界范围内转让给本刊。本刊已加入万方数据数字化期刊群,被中国核心期刊(遴选)数据库收录。凡被本刊录用的稿件将同时通过因特网进行网络出版或提供信息服务,稿件一经刊用,将一次性支付作者著作权使用报酬(即包括印刷版、光盘版和网络版各种使用方式的报酬)。凡有不同意见者,请另投它刊。特此声明。

本刊编辑部