

# 小鼠卵母细胞和胚胎不同冷冻方法的比较研究

虞 莲<sup>1</sup>, 卓玛拉姆<sup>2</sup>, 邓增卓玛<sup>2</sup>, 李建强<sup>2</sup>, 雷安民<sup>1,\*</sup>

(1. 西北农林科技大学动物医学院陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100;

2. 西藏昌都津垦牧业科技有限责任公司)

**摘要:**探讨程序化冷冻与玻璃化冷冻对小鼠 GV 期卵母细胞及二细胞期胚胎的复苏率及其发育潜能的影响。通过小鼠的卵母细胞与早期胚胎的不同冷冻方法的比较,为后续阿旺绵羊的胚胎冷冻保存提供参考。采用程序化冷冻与玻璃化冷冻技术,分别冷冻小鼠 GV 期卵母细胞及二细胞期胚胎,复苏后培养,比较不同冷冻处理后的复苏率、成熟率与囊胚率。小鼠 GV 期卵母细胞程序化冷冻复苏率(48.00%±5.29%)显著低于玻璃化冷冻复苏率(65.00%±5.00%),有统计学差异( $P=0.0147<0.05$ );而程序化冷冻后复苏卵母细胞的发育成熟率略高于玻璃化冷冻组,但无统计学意义。小鼠二细胞期胚胎程序化冷冻组复苏率(76.00%±2.00%)显著高于玻璃化冷冻组复苏率(70.00%±2.00%),有统计学差异( $P=0.0213<0.05$ );冷冻后复苏胚胎发育的囊胚率程序化冷冻略低于玻璃化冷冻及对照组,但无统计学意义。

**关键词:**卵母细胞;二细胞期胚胎;程序化冷冻;玻璃化冷冻

[中图分类号] S814.1 [文献标识码] A [文章编号] 1004-6704(2023)02-0005-04

## Comparative Study on Different Freezing Methods of Mouse Oocytes and Embryos

YU Lian<sup>1</sup>, ZHUO MA La-mu<sup>2</sup>, DENG ZENG Zhuo-ma<sup>2</sup>, LI Jian-qiang<sup>2</sup>, LEI An-min<sup>1,\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University/Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center Northwest A&F University Yangling Shaanxi 712100, China; 2. Tibet Changdu Jinken Animal Husbandry Technology Co., Ltd.)

**Abstract:** This paper explores the effects of programmed freezing and vitrification on the recovery rate and developmental potential of mouse GV stage oocytes and two-cell stage embryos. We compared different cryopreservation methods of mouse oocytes and early embryos to provide a reference for subsequent Avang sheep embryo cryopreservation. In this study, programmed freezing and vitrification techniques were used to freeze mouse GV stage oocytes and two-cell stage embryos respectively, and culture them after recovery. The recovery rate, maturity rate and blastocyst rate after different freezing treatments were compared. The programmed freezing recovery rate (48.00% ± 5.29%) of mouse GV stage oocytes was significantly lower than the vitrification recovery rate (65.00% ± 5.00%), with statistical difference ( $P = 0.0147 < 0.05$ ). The development and maturation rate of revived oocytes after programmed freezing was slightly higher than that of vitrification group, but there was no statistical significance. The recovery rate (76.00% ± 2.00%) of the mouse two-cell stage embryo programmed freezing group was significantly higher than that of the vitrification group (70.00% ± 2.00%), with statistical difference ( $P = 0.0213 < 0.05$ ). The rate of blastocyst blastocysts in thawed embryos developed by programmed freezing was slightly lower than that of vitrification and control group, but there was no statistical significance.

**Key words:** oocyte; two-cell embryo; programmed freezing; vitrification

1972 年 Whittingham 等成功低温慢速冷冻保

存小鼠胚胎。1985 年 Rall 等率先用玻璃化冷冻方式冷藏保存老鼠胚胎。此后,玻璃化冷冻保护技术在试验大小鼠上得到了不断改进,两种冷冻胚胎的方式也广泛应用于多种家畜的实际生产中。目前在生殖医学领域,玻璃化冷冻应用最为广泛,应用于卵母细胞、卵裂期胚胎、囊胚期胚胎,甚至是精子冷冻等。但程序化冷冻作为早期胚胎冷冻研究中最常用

[收稿日期] 2022-11-29

[基金项目] 西藏昌都市横向课题:西藏昌都地区阿旺绵羊的胚胎冷冻研究与应用示范(K4040121029)

[作者简介] 虞莲(1996-),女,四川自贡人,硕士,主要从事动物胚胎工程研究工作。E-mail: yuyulian2021@163.com。

\*[通讯作者] 雷安民(1970-),男,河南灵定人,博士,研究员,主要从事动物胚胎工程研究工作。E-mail: anmin-leiryan@nwsauf.edu.cn。

的方法,也在不断改进优化。本试验比较了小鼠卵母细胞、二细胞期胚胎采用程序化冷冻及玻璃化冷冻的冷冻效率和解冻后发育潜力,为阿旺绵羊胚胎冷冻技术的改进提供参考。

### 1.1 试验材料

1.1.1 实验动物 小鼠为6~8周龄昆明白,购自成都达硕实验动物有限公司,自由采食和饮水。

1.1.2 试验试剂及耗材 (1)超数排卵相关试剂:孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG),均购于宁波三生药业有限公司。小鼠卵母细胞、胚胎采集及培养相关试剂:MEM培养基、碳酸氢钠、氯化钠、3%透明质酸、HEPES、M2培养基、KSOM、矿物油等,均购置于美国Sigma公司。玻璃化冷冻试剂:Cryotech玻璃化快速冷冻试剂组及冷冻载杆购置于广州尊博医疗器械有限公司。程序化冷冻仪CL-8800i及冷冻试剂:程序化冷冻仪CL-8800i由澳大利亚CRYOLOGIC公司设计制造,程序化慢速冷冻试剂购置于天津云牧生物科技有限公司。(2)试验相关耗材:90 mm培养皿、35 mm培养皿、1 mL注射器、手套、口罩、自制吸胚针及拨卵针等。

1.1.3 试验仪器 37℃恒温加热台、体式显微镜、

表1 程序化与玻璃化冷冻复苏和卵子成熟情况

分组	细胞数(n)	复苏数(n)	复苏率(%)	成熟数(n)	成熟率(%)
对照组	50	—	—	36.70±1.52	73.00±3.00 <sup>a</sup>
程序化冷冻	50	26.00±5.57	48.00±5.29 <sup>a</sup>	18.67±1.15	78.21±6.95 <sup>a</sup>
玻璃化冷冻	50	33.00±3.46	65.00±5.00 <sup>b</sup>	23.00±1.73	71.12±0.27 <sup>a</sup>

注:表中每列数值比较,相同小写字母表示差异不显著( $P>0.05$ ),不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。(下同)

1.2.3 玻璃化冷冻及复苏 (1)冷冻步骤:将卵或胚胎放入平衡液ES中10 min,然后转移至冷冻液VS混合几次,将卵或胚胎放置载杆末端,投入液氮,此步骤要求在60~90 s内完成。整个过程可在室温下进行,每次最多操作10枚GV期卵母细胞和2-cell期胚胎,以上液体均提前至少1 h放置于室温环境中。(2)复苏步骤:将卵或胚胎取出,置入复苏液TS停留1 min,转移至复苏液TS和稀释液DS 1:1的混合液,停留3 min;之后将卵或胚胎依次放入稀释液DS、清洗液WS1、清洗液WS2,各自停留2 min;将WS2中恢复形态的卵或胚胎转移至提前孵育的培养液中。

1.2.4 程序化冷冻及复苏 (1)冷冻步骤:选择内置程序4,运行程序至-7℃时,放入胚胎管,停留时间在1分钟后诱导植冰;三孔板添加Holding培养液,另外两孔均为10%甘油冷冻保存液。整个冷冻操作过程中的室温要求维持在23℃以上。(2)复苏

CO<sub>2</sub>培养箱、荧光相差倒置显微镜、普通倒置显微镜等。

### 1.2 方法

1.2.1 GV期卵母细胞采集 在自然光照条件下25℃饲养的6~8周龄雌性小鼠,注射PMSG 10 IU/只,48 h后颈部处死,采集卵巢并收集卵母细胞。将COCs转移到含有0.3%透明质酸酶的M2培养液中,在37℃下培养3~5 min,去除卵母细胞中的颗粒细胞,收集形态正常、完整、细胞质均匀、含有生发泡的卵母细胞。将卵母细胞在预热的M2小碗中清洗3次,并置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中。

1.2.2 二细胞期胚胎采集 观察阴道,选择处于前情期的雌鼠20只,注射PMSG 10 IU/只,48 h后注射hCG 10 IU/只,挑选体型合适的雄鼠合笼,以合笼当晚12点记为受精0 h,次日9点左右捡栓。受精后34~38 h处死小鼠,打开腹腔,采集卵巢及输卵管置于预热的MEM培养液中,用1 mL注射器针头划破输卵管,使胚胎从输卵管释放游离出,直至输卵管无管状结构。检出2-cell期小鼠胚胎,置于提前预热的KSOM滴中清洗3遍,放入37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中备用。

步骤:冻胚细管取出后,空气停留10~15 s,将细管浸入37℃水浴锅中,停留15~20 s左右。剪掉细管塞子,将GV期卵母细胞和2-cell期胚胎依次放入6%甘油+0.3 mol/L蔗糖、3%甘油+0.3 mol/L蔗糖和0.3 mol/L蔗糖冲洗,每次停留5 min,再移入Holding培养液内停留30 min。观察卵母细胞或胚胎的胞质结构是否完整、能否继续发育的情况,选择良好的卵母细胞或胚胎进行培养。解冻操作过程中的室温要求维持在23℃以上。

## 2 结果

### 2.1 小鼠GV期卵母细胞程序化慢速冷冻与玻璃化冷冻的比较

小鼠GV期卵母细胞程序化冷冻组复苏率(48.00%±5.29%),显著低于玻璃化冷冻组复苏率(65.00%±5.00%),有统计学差异( $P=0.0147<0.05$ )。冷冻后复苏卵母细胞发育成熟率程序化冷冻

为  $78.21\% \pm 6.95\%$ , 略高于玻璃化冷冻  $71.12\% \pm 0.27\%$  及对照组  $73.00\% \pm 3.00\%$ , 但无统计学意义。

## 2.2 小鼠 2-cell 胚胎程序化慢速冷冻与玻璃化冷冻

小鼠 2-cell 期胚胎程序化冷冻组复苏率 ( $76.00\% \pm 2.00\%$ ), 显著高于玻璃化冷冻组复苏率

( $70.00\% \pm 2.00\%$ ), 有统计学差异 ( $P = 0.0213 < 0.05$ )。冷冻后复苏胚胎发育的囊胚率程序化冷冻为  $67.49\% \pm 2.31\%$ , 略低于玻璃化冷冻  $69.23\% \pm 3.08\%$  及对照组  $72.00\% \pm 2.00\%$ , 但无统计学意义。

表 2 程序化与玻璃化冷冻复苏和胚胎发育情况

分组	细胞数(n)	复苏数(n)	复苏率(%)	囊胚数(n)	囊胚率(%)
对照组	50	—	—	$36.00 \pm 1.00$	$72.00 \pm 2.00^a$
程序化冷冻	50	$38.00 \pm 1.00$	$76.00 \pm 2.00^a$	$25.67 \pm 1.53$	$67.49 \pm 2.31^a$
玻璃化冷冻	50	$35.00 \pm 1.00$	$70.00 \pm 2.00^b$	$24.00 \pm 1.00$	$69.23 \pm 3.08^a$

## 2.3 小鼠囊胚 hoecchst33342 染色情况

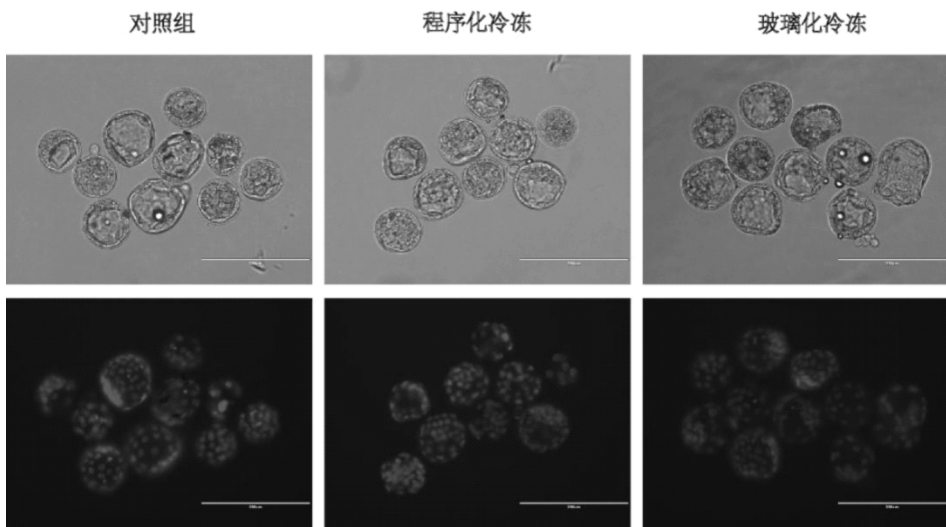


图 1 小鼠囊胚 hoecchst33342 染色

## 3 统计学方法

每组试验均各使用 50 枚卵母细胞或胚胎, 重复三次所得结果进行差异性统计学分析。

## 4 结果分析

本试验结果, GV 期小鼠卵母细胞程序化冷冻复苏率 ( $48.00\% \pm 5.29\%$ ) 显著低于玻璃化冷冻复苏率 ( $65.00\% \pm 5.00\%$ ) ( $P = 0.0147 < 0.05$ )。其原因可能是采用传统的程序化冷冻, 需要一个可编程程序的冷冻仪, 它可以充分控制最佳冷冻速度。在冷却过程中, 温度逐渐降低到结冰的冰点以下。冰的形成发生在细胞外和细胞内区域, 而细胞内过多的冰形成, 会破坏细胞结构和功能, 从而导致细胞凋亡或细胞死亡。与缓程序化冷冻相比, 玻璃化冷冻允许从液相快速转变为玻璃状阶段或水固化, 进而使细胞受到了保护。但冷冻后复苏卵母细胞发育成熟率程序化冷冻 ( $78.21\% \pm 6.95\%$ ) 略高于玻璃

化冷冻 ( $71.12\% \pm 0.27\%$ ), 其原因可能是卵母细胞经过高渗溶液的冷冻前平衡以及解冻恢复后可以暂时存活, 但由于复苏渗透压的急剧变化, 对 GV 期卵母细胞进一步发育成熟的能力是有影响的。2-cell 期胚胎程序化冷冻组复苏率显 ( $76.00\% \pm 2.00\%$ ) 著高于玻璃化冷冻组复苏率 ( $70.00\% \pm 2.00\%$ ) ( $P = 0.0213 < 0.05$ ), 玻璃化冷冻虽然减少了细胞内冰晶损伤, 但由于冷冻保护剂 (CPA) 浓度较高, 增加了其毒性和渗透性休克对胚胎的影响。

## 5 讨论

卵母细胞及胚胎冷冻技术已在畜牧学、繁殖学、医学等领域广泛应用。在哺乳动物胚胎工程的研究中, 小鼠是研究哺乳动物胚胎发育的特别强大的模型, 一是其卵母细胞及胚胎获取方便快捷, 二是其胚胎发育所需条件较严格, 小鼠卵母细胞和胚胎的体积小使操作难度相对更大。无论是常规程序化冷冻方法或玻璃化冷冻方法, 对于卵母细胞和胚胎冷冻

技术都需要不断更新,以适应不同的环境和地域。刘文静等对小鼠不同阶段胚胎玻璃化冷冻的研究中,小鼠 2-cell 期胚胎冷冻复苏率(89.4%)显著低于 8 细胞期胚胎(97.2%)、桑葚胚(98.3%)及囊胚(98.8%),结果差异显著( $P < 0.05$ )。本试验玻璃化冷冻小鼠 2-cell 胚胎复苏存活率(70%)略低于刘文静等(2020 年)冷冻小鼠 2-cell 胚胎复苏率(89.4%)。这一结果可能是由于在 8 细胞胚胎和晚期胚胎,细胞体积变小,胚胎质膜的表面积比小鼠卵母细胞及 2-cell 期胚胎更大,渗透性更强,在玻璃化溶液中能更快达到平衡。因此,本试验选择小鼠卵母细胞及 2-cell 期胚胎进行玻璃化冷冻,更能提升胚胎冷冻效果,为后期在绵羊胚胎玻璃化冷冻应用上做铺垫。

研究表明,羊(绵羊)胚胎的冷冻保存相对容易,主要是因为胚胎冷冻的发育阶段不会影响解冻后的成功率;处于 1 细胞、2 细胞和囊胚阶段的胚胎在低至 0 °C 的温度下冷却后都可以存活。然而,研究结果表明,相比之下,乙二醇慢速冷冻仍然比玻璃化更成功。为了开发羊卵母细胞的玻璃化冷冻技术,Mullen 和 Fahy 解决了一些问题,包括信使 RNA 水平的变化和细胞骨架的损伤细胞。虽然这些都是重要的问题,但一些科学家已经成功地获得了至少 10% 的胚泡发育率并且最近已经证明使用开放式吸管进行羊胚胎玻璃化冷冻的成功率更高。此外,在 2013 年第一次成功玻璃化冷冻(使用 cryoloop)羊卵母细胞的胚泡阶段。从此,绵羊卵母细胞玻璃化技术不断发展。与哺乳动物卵母细胞冷冻保存有关的一项特殊挑战与其他细胞类型相比,它们的细胞体积非常高;这使得它们极其敏感,并且由于较低的表面体积比,在冷冻保存过程中更容易形成细胞内结冰。使卵母细胞冷冻保存更具挑战性的其他因素包括透明带的存在和卵母细胞质膜的通透性降低,这两者都会阻碍水和冷冻保护剂进出卵母细胞的运动。然而,受精会改变其中的许多参数,因此胚胎冷冻保存的难度通常较小。目前,所用的绵羊胚胎冷冻方法是慢速冷冻,需要诱发结冰,并按一定的速率降温。由于需要自动控制温度的胚胎冷冻仪,这种方法具有较长(约 3 h)的平衡和降温时间,复杂的操作步骤,因此,在生产过程中会受到一定程度的限制。通过本试验对小鼠卵母细胞和胚胎进行程序化及玻璃化冷冻效果的比较,为后期在阿旺绵羊胚胎的冷冻后发育效果的影响作参考,最终目的是探索出适合阿旺绵羊胚胎冷冻保存的稳定可靠的方法,提高冷冻保存效率。

#### 参考文献:

- [1] WHITTINGHAM, D, S. P. LEIBOP. M. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C[J]. Science, 1972,178(4059): 411-414.
- [2] W F R, G M F. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification[J]. Nature, 1985,313(6003).
- [3] KASAI, M., J. H. K, A. TAKAKAMO, et al. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability[J]. J Reprod Fertil, 1990,89(1): 91-97.
- [4] 王珂. 奶牛卵母细胞玻璃化冷冻方法及胚胎程序化冷冻研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2008.
- [5] 王月春. 小鼠卵母细胞程序化和 OPS 玻璃化冷冻效果的比较[D]. 大连: 大连医科大学, 2007.
- [6] LIEBERMANN J, DIETL J, VANDERZ WALMEN P, et al. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now [J]. Reproductive BioMedicine Online, 2003, 7(6): 623-633.
- [7] SAITO H, ISHIDA G M, KANEKO T, et al. Application of vitrification to human embryo freezing [J]. Gynecologic and Obstetric Investigation, 2000, 49(3): 145-149.
- [8] HORTA F, ALZOBI H, JITANANTAWITTAYA S, et al. Minimal volume vitrification of epididymal spermatozoa results in successful in vitro fertilization and embryo development in mice [J]. Asian Journal of Andrology, 2017, 19(1): 107-112.
- [9] VAJTA, G., Z. P. NAGY, A. COBO, et al. Vitrification in assisted reproduction: myths, mistakes, disbeliefs and confusion[J]. Reprod Biomed Online, 2009, 19(3): 1-7.
- [10] POLGE, C., A. U. SMITHA. S. PARKES. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures [J]. Nature, 1949, 164(4172): 666.
- [11] T. MUKAIDA, S. WADA, K. TAKAHASHI, P. B. PEDRO. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos[J]. Hum Reprod, 1998, 13: 2874-2879.
- [12] 刘文静, 李月梅, 张荣玲, 等. 玻璃化冷冻不同阶段小鼠胚胎的比较研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2020, 28(10), 1273-1274, 1290.
- [13] C. POLGE, S. M. WILLADSEN. Freezing eggs and embryos of farm animals[J]. Cryobiology, 1978, 15: 370-373.