

# 细胞松弛素 B 和解冻方法对玻璃化冷冻小鼠卵母细胞的影响

张 波, 冯贵雪, 方伟芬, 周 红, 周 莉, 甘贤优, 刘 茵

(广西壮族自治区妇幼保健院生殖中心, 广西南宁 530003)

**摘要:** 【目的】探讨细胞松弛素 B 和解冻程序对玻璃微细管法(GMP)玻璃化冷冻小鼠卵母细胞的影响。【方法】以小鼠 MII 期卵母细胞为模型, 研究冷冻前细胞松弛素 B 预处理、不同解冻程序对小鼠卵母细胞冷冻效果的影响; 随后对经 GMP 玻璃化冷冻的卵母细胞直接进行培养以检测冷冻是否诱发孤雌发育。【结果】与对照组相比, 细胞松弛素 B 预处理的卵母细胞存活率、受精率、卵裂率及囊胚率没有显著差异 (89.3% vs 91.3%, 44.0% vs 40.4%, 30.0% vs 27.7%, 4.0% vs 6.4%;  $P > 0.05$ ); 采用连续浓度梯度递减解冻法的受精率明显高于间断浓度梯度递减解冻法 (57.4% vs 40.4%;  $P < 0.05$ ), 且前者的卵裂率和囊胚发育率也相对较高 (40.2% vs 27.7%, 14.5% vs 6.4%;  $P > 0.05$ )。冷冻复苏后卵母细胞的孤雌发育率稍高于未经冷冻的卵母细胞 (17.1% vs 3.2%;  $P > 0.05$ )。【结论】细胞松弛素 B 预处理对 MII 期小鼠卵母细胞的 GMP 玻璃化冷冻保存效果没有影响; 采用连续浓度梯度递减解冻法能明显提高复苏后卵母细胞的体外发育能力。

关键词: 卵母细胞; 玻璃化冷冻; 小鼠; 细胞松弛素 B

中图分类号: R318.52

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0645-04

## Effects of Cytochalasin B and Thawing Program on Vitrification of Mouse Mature Oocytes

ZHANG Bo, FENG Gui-xue, FANG Wei-fen, ZHOU Hong, ZHOU Li, GAN Xian-you, LIU Yin

(Reproductive Medicine Center, Maternal and Child Health Hospital of Guangxi, Nanning 530003, China)

**Abstract:** 【Objective】Effects of cytochalasin B and thawing program on glass micropipette (GMP) vitrification of mouse mature oocytes were investigated. 【Methods】The effects of cytochalasin B pre-treatment and thawing program on viability and in vitro development of matured mouse oocytes were investigated in the present study. The thawing oocytes were directly cultured to explore whether vitrification caused parthenogenetical development.

【Results】Compared to the controlled group, The survival rate, fertilization rate, cleavage rate, and blastocyst rate of cytochalasin B pre-treatment were not significantly different (89.3% vs 91.3%, 44.0% vs 40.4%, 30.0% vs 27.7%, 4.0% vs 6.4%;  $P > 0.05$ ); But the fertilization rate using the thawing program of consecutive-decrease concentration were significantly higher than using the discontinuous-decrease concentration (57.4% vs 40.4%;  $P < 0.05$ ), the cleavage rate and blastocyst rate were also higher (40.2% vs 27.7%, 14.5% vs 6.4%), but were not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Vitrification were easy to induce thawing mouse oocytes producing parthenogenetical development, but not significantly different when compared to the no-vitrification group (17.1% vs 3.2%;  $P > 0.05$ ).

【Conclusions】The effects of GMP vitrification of mouse mature oocytes were not improved if pre-vitrification treatment with cytochalasin B, but the thawing program of consecutive-decrease concentration method were helpful to improve the in vitro developmental ability of mouse oocytes.

Key words: oocytes; vitrification; mouse; cytochalasin B

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):645-648]

卵母细胞冷冻保存是人类辅助生殖领域中研究的热点和难点问题。自 1986 年 Chen 首次报道人成熟卵母细胞冻融后成功分娩以来, 许多研究

者虽然对卵母细胞冷冻进行了大量的研究, 但进展缓慢。近年来, 玻璃化冷冻技术由于其简单、方便、不需要昂贵冷冻仪器等优点已逐渐进入到人

收稿日期: 2007-06-25

基金项目: 广西自然科学基金(桂科自 0542058); 广西卫生厅科研基金(Z2004024)

作者简介: 张 波(1960-), 女, 山东莱阳人, 副主任医师, 主要从事生殖医学工作, E-mail: cestbon269@sina.com

类生殖领域<sup>[1-3]</sup>,在人卵母细胞冷冻保存方面表现出独特的优势并产下健康的婴儿<sup>[4-6]</sup>,尽管如此,该技术仍有待进一步成熟,许多基础问题有待深入研究。本实验拟采用本中心所建立的玻璃微细管(glass micropipette, GMP)玻璃化冷冻方法<sup>[7,8]</sup>,以小鼠 MII 期卵母细胞为模型,研究细胞松弛素 B 解冻程序和冷冻对卵母细胞发育的影响,以期为人类探索一种简易、高效的卵母细胞冷冻保存方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物来源

5~6 周龄的雌性小鼠(广西医科大学实验动物中心提供)。

### 1.2 方案设计

1.2.1 细胞松弛素 B 对小鼠卵母细胞冻融效果的影响 试验分为两组:对照组采用 GMP 法对小鼠 MII 期的卵母细胞直接进行玻璃化冷冻;处理组在冷冻前用细胞松弛素 B(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 预处理 5 min 后再进行玻璃化冷冻保存。两组均用间断浓度梯度递减解冻法进行复苏。复苏后通过卵母细胞的存活率、受精率、卵裂率及囊胚率来评定细胞松弛素 B 对卵母细胞冻融效果的影响。

#### 1.2.2 复苏方法对小鼠卵母细胞冻融效果的影响

试验分为两组:一组是“间断浓度梯度递减解冻法”(对照组),即将卵母细胞由高浓度向低浓度逐步转移的方法。另一组是“连续浓度梯度递减解冻法”(试验组),即复苏时将两种不同浓度的解冻液连接在一起,由于浓度差的存在,高浓度的解冻液向低浓度渗透从而形成了液流,卵母细胞随着此液流由高浓度一侧漂向低浓度一侧的方法。复苏后通过卵母细胞的存活率、受精率、卵裂率及囊胚率来评定复苏方法对卵母细胞冻融效果的影响。

1.2.3 玻璃化冷冻诱发卵母细胞孤雌发育的观察 试验分为两组:对照组将卵母细胞直接置于培养液中,观察是否出现单原核或/和卵裂;试验组将经过 GMP 玻璃化冻融后的卵母细胞置于培养液中,观察是否出现单原核或/和卵裂。

### 1.3 卵母细胞的采集

对雌性小鼠进行超排处理[间隔 48 h 分别每只注射 10 IU 的孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)],注射

hCG 后 15 h 颈椎脱臼处死小鼠,剖腹取出输卵管,在实体镜下用眼科镊将输卵管膨大部撕破,卵丘卵母细胞复合体自动排出。将其移入含 75 IU/mL 透明质酸酶的培养液中处理 40~50 s,用稍大于卵母细胞的吸管反复吹打以去除卵母细胞周围的卵丘细胞,然而用基础液清洗 5~6 遍,收集形态正常、有第一极体的卵母细胞移入培养液以供实验使用。本试验按照此方法共处理 14 只小鼠,获卵 396 枚,经过筛选后用于本试验的共 351 枚。

### 1.4 卵母细胞的玻璃化冻融

卵母细胞首先在玻璃化 1 液(200 mL/L 人血清蛋白的基础液, V1) 中洗涤 2 次,移入玻璃化 2 液(75 mL 乙二醇和 75 mL 二甲亚砷, V2) 中平衡 60~90 s,再转入玻璃化 3 液(165 mL 乙二醇和 165 mL 二甲亚砷 +0.6 mol/L 蔗糖, V3) 中 30 s。用自制的 GMP 虹吸入卵母细胞后直接投入液氮保存。解冻时将 GMP 由液氮中取出后直接浸入 30~32 含 0.75 mol/L 蔗糖的解冻液中 1 min,然后分别在 0.6, 0.45, 0.3, 0.15, 0 mol/L 蔗糖 2.5 min,移入含 200 mL/L 人血清蛋白的基础液中 10 min,同时将温度调至 37 $^{\circ}\text{C}$ ,再转入含 50 mL/L 人血清蛋白的基础液液中室内 20 min,移进卵裂培养液后放入培养箱培养 2~3 h 后观察卵母细胞的存活情况。

### 1.5 体外受精

1.5.1 精子采集与获能 雄性鼠颈椎脱臼处死,剖腹分离出附睾,用灭菌的吸水纱布去除黏附于附睾上的脂肪和血液,用显微剪剪破附睾,将精子挤到 200  $\mu\text{L}$  受精液中,  $\text{CO}_2$  培养箱中(体积分数 5%  $\text{CO}_2$ , 37 $^{\circ}\text{C}$ ) 获能 1 h 后,检查精子的活力和数量后制作受精滴, 100  $\mu\text{L}/\text{滴}$ , 密度约为  $5 \times 10^6/\text{mL}$ 。

1.5.2 受精 卵母细胞用基础液清洗 2 次后移入培养液中。用吸管将卵母细胞加入获能后的受精滴中(30 个/滴)放入  $\text{CO}_2$  培养箱中授精 4~7 h 后将卵子吸出,在培养液中清洗 3 次洗去卵母细胞表面的精子,然后移入培养液中(每滴培养液 25  $\mu\text{L}$ , 用石蜡油覆盖,充分平衡后移入 20~30 枚卵子),培养 3~5 h 后,显微镜下镜检,见第二极体和双原核的卵母细胞判为已受精。

### 1.6 复苏后卵母细胞存活和体外发育能力的评定

冻融后的卵母细胞在培养液中培养 1 h 进行观察。如透明带破裂、脱落、细胞质碎裂、细胞死亡均视为异常;如有完整透明带和细胞膜,且胞质折光性好,则判定为存活。

存活率=存活的卵母细胞数/冷冻卵母细胞数×100%;受精率=受精卵母细胞数/存活卵母细胞数×100%;卵裂率=卵裂胚胎数/存活卵母细胞数×100%;囊胚率=囊胚数/存活卵母细胞数×100%。

### 1.7 统计与分析

采用卡方( $\chi^2$ )进行差异性检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 细胞松弛素B预处理对小鼠卵母细胞冻融效果的影响

如表1所示,与对照组相比,细胞松弛素B预处理组的卵母细胞存活率、受精率、卵裂率及囊胚率没有显著差异( $P>0.05$ ),提示细胞松弛素B预处理对小鼠卵母细胞冻融效果没有影响(表1)。

表1 细胞松弛素B预处理对小鼠卵母细胞冻融效果的影响  
Table 1 Effects of cytochalasin B on GMP vitrification of mouse mature oocytes

Treatment	Oocytes	Survival (%)	Fertilization(%)	Cleavage(%)	Blastocyst (%)
Control	103	94(91.3)	38(40.4)	26(27.7)	6(6.4)
Cytochalasin B	56	50(89.3)	22(44.0)	15(30.0)	2(4.0)
$\chi^2$ (Chi-Square)	-	0.166	1.72	0.088	0.045
P(Asymp. Sg.)	-	0.684	0.679	0.767	0.832

### 2.2 复苏方法对小鼠卵母细胞冻融效果的影响

如表2所示,两种复苏方法对小鼠卵母细胞存活率影响的差异无显著意义( $P>0.05$ ),但连续浓度梯度递减解冻法的受精率明显高于间断浓度梯度递减解冻法( $P<0.05$ );且前者的卵裂率和囊胚发育率也相对较高,但差异无显著意义( $P>0.05$ ),提示连续浓度梯度递减解冻法有利于卵母细胞复苏后的后继发育(表2)。

表2 复苏方法对小鼠卵母细胞冻融效果的影响

Table 2 Effects of thawing program on GMP vitrification of mouse mature oocytes

Methods	Oocytes	Survival (%)	Fertilization(%)	Cleavage(%)	Blastocyst (%)
A	103	94 (91.3)	38 (40.4)	26 (27.7)	6 (6.4)
B	126	117(92.9)	67 (57.3)	47 (40.2)	17(14.5)
$\chi^2$ (Chi-Square)	-	0.199	5.912	3.606	3.562
P(Asymp. Sg.)	-	0.655	0.015	0.058	0.059

A: Thawing program of discontinuous-decrease concentration (control); B: Thawing program of consecutive-decrease concentration

### 2.3 玻璃化冷冻对小鼠卵母细胞孤雌发育的影响

与直接培养组相比,冻融后培养组的卵裂率相对较高,但差异无统计学意义( $\chi^2=2.051$ ,  $P>0.05$ ,表3)。

表3 GMP玻璃化冷冻对卵母细胞孤雌发育的影响

Table 3 Effects of GMP vitrification on parthenogenetical development of mouse mature oocytes

Methods	Oocytes	Cleavage(%)	Blastocyst (%)
Directly Culture	31	1 (3.2)	0
Culture after vitrification	35	6 (17.1)	0
$\chi^2$ (Chi-Square)	-	2.051	-
P(Asymp. Sg.)	-	0.152	-

## 3 讨论

### 3.1 细胞松弛素B对GMP玻璃化冻融效果的影响

由于冷冻过程中渗透压的变化可以改变细胞骨架成分的理化特性和完整性,导致减数分裂进程的异常和胚胎发育的延迟<sup>[9,10]</sup>。因此稳定细胞骨架系统可能有利于提高冻融后卵母细胞的存活率和随后的胚胎发育率<sup>[11]</sup>。细胞松弛素B是胞质分裂抑制剂,可增加细胞骨架的弹性,可以降低卵母细胞和胚胎在冻融过程中由于细胞骨架变硬而引起的细胞骨架变形和损伤<sup>[9,11]</sup>。然而相反的结果也有报道<sup>[12,13]</sup>,这一结论与Somfai等<sup>[14]</sup>和Silvestre等<sup>[13]</sup>分别在猪和绵羊上的研究结果一致。正因为存在这些不同的报道,所以尚需进一步研究。本试验结果表明细胞松弛素B预处理并没有提高玻璃化冻融后卵母细胞的存活率、受精率和卵裂率。

### 3.2 复苏方法对GMP玻璃化冻融效果的影响

复苏后卵母细胞内抗冻保护剂的脱出方法是影响卵母细胞存活率及体外发育能力的重要因素。当卵母细胞置于比细胞内抗冻保护剂浓度低的溶液中,细胞外水分的进入速度大于细胞内抗冻保护剂的脱出速度,从而导致细胞膨胀甚至破裂。有研究发现,卵母细胞复苏后利用蔗糖脱去细胞内的抗冻保护剂,合适的蔗糖浓度及作用时间能有效降低细胞内外的渗透压波动,控制细胞外的水分进入细胞内,从而达到更好的复苏效果。因此,为达到这一目的,通常采用浓度梯度递减解冻法脱出细胞内冷冻保护剂。这种方法由于不同浓

度间是间断、不连续的,在高浓度向低浓度转移时,浓度差的突然改变可能会对卵母细胞的存活及发育造成不利影响。为了克服这种常用方法的不足之处,我们在卵母细胞复苏时,将两种不同浓度的解冻液连接在一起,由于浓度差的存在,高浓度的解冻液向低浓度一侧渗透从而形成了液流,卵母细胞随着此液流也由高浓度一侧漂流向低浓度一侧,从而避免了浓度的突然改变对卵母细胞所生产的不良作用,这种解冻方法称为“连续浓度梯度递减解冻法”。结果发现,两种复苏方法对小鼠卵母细胞的存活率没有影响(92.9% vs 91.3%;  $P > 0.05$ ),但连续浓度梯度递减解冻法的受精率明显高于间断浓度梯度递减解冻法的受精率(57.3% vs 40.4%;  $P < 0.05$ );且前者的卵裂率和囊胚发育也相对较高,提示连续浓度梯度递减解冻法有利于卵母细胞复苏后的后继发育。

### 3.3 玻璃化冷冻与孤雌发育

我们将 GMP 玻璃化冻融后的卵母细胞直接置于培养液中,发现有 17.1% 的卵母细胞未经受精或激活处理而出现分裂现象,表明冻融后的卵母细胞发生了孤雌发育。然而,未经冻融的卵母细胞也有 3.2% 发生孤雌发育。本试验中,冻融后卵母细胞的孤雌发育率相对高于未经冻融的卵母细胞,但没有显著差异。这可能是研究的样本数量较少,该结论有待大样本的数据进一步研究。但有一点不可忽视:玻璃化冷冻可能是引发卵母细胞孤雌发育的诱因之一。由于孤雌发育的卵母细胞已排出皮质颗粒,透明带变硬而不能正常受精,所以孤雌不能正常发育。这种现象与卵母细胞冷冻保存的目的相悖。因此,对此问题我们应该高度重视。

本实验利用 GMP 玻璃化法对小鼠卵母细胞进行冷冻保存,冻融后获得了较高的存活率,并通过体外受精手段证明冻融后的卵母细胞有继续发育的潜力,在冷冻液中添加细胞骨架稳定剂-细胞松弛素 B 可能并不能提高小鼠卵母细胞的冻融效果,但冻融后卵母细胞的孤雌发育问题不容忽视。

#### 参考文献:

- [1] LIEBERMANN J, TUCKER M J. Vitrifying and warming of human oocytes, embryos, and blastocysts: vitrification procedures as an alternative to conventional cryopreservation [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 254: 345-364.
- [2] LI YU-BIN, ZHOU CAN-QUAN, YANG GUO-FEN, et al. Modified vitrification method for cryopreservation of human ovarian tissues [J]. *Chin Med J*, 2007, 120 (2): 110-114.
- [3] 李宇彬,周灿权,杨国奋,等.人卵巢组织两种超低温冻存方法的研究[J].*中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(6):704-708.
- [4] 彭艳,于丛一,李予,等.慢速冷冻和玻璃化冷冻对人类卵巢组织中卵泡形态的影响[J].*中山大学学报:医学科学版*, 2007, 28(1):70-74.
- [5] ANTINORI M, LICATA E, DANI G, et al. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries [J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 14 (5): 72-79.
- [6] 陈子江,李媛,胡京美,等.人卵母细胞玻璃化冷冻的临床应用及成功分娩[J].*中华医学杂志*, 2006, 80 (29): 2037-2040.
- [7] 方伟芬,冯贵雪,张波,等.GMP玻璃化法冻存人早期胚胎的临床应用[J].*中国优生与遗传杂志*, 2007, 15 (5):101.
- [8] 冯贵雪,方伟芬,张波,等.GMP法玻璃化冷冻人胚胎的效果观察[J].*中国优生与遗传杂志*, 2006, 14 (11): 108-109.
- [9] DOBRINSKY J R, PURSEL V G, LONG C R, et al. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62 (3): 564-570.
- [10] ROJAS C, PALOMO M J, ALBARRACIN J L, et al. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments [J]. *Cryobiology*, 2004, 49 (3): 211-220.
- [11] ISACHENKO V, SOLER C, ISACHENKO E, et al. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant [J]. *Cryobiology*, 1998, 36 (3): 250-253.
- [12] FUJIIHARA T, KISHIDA R, FUKUI Y. Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants [J]. *Cryobiology*, 2004, 49 (3): 286-290.
- [13] SILVESTRE M A, YANIZ J, SALVADOR I, et al. Vitrification of pre-pubertal ovine cumulus-oocyte complexes: effect of cytochalasin B pre-treatment [J]. *Anim Reprod Sci*, 2006, 93 (1-2):176-182.
- [14] SOMFAI T, DINNYES A, SAGE D, et al. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after solidsurface vitrification (SSV) [J]. *Theriogenology*, 2006, 66 (2): 415-422.