

哺乳动物卵母细胞和胚胎的低温保存*

李光鹏 张心田

(东北农学院生物工程系, 哈尔滨 150030)

超排技术的应用,可以得到几倍于正常排卵的卵母细胞或胚胎,为体外卵母细胞或胚胎的操作提供了丰富的材料。淘汰母畜或屠宰母畜的卵巢更是卵母细胞的一个重要研究资源。然而,如果供大于求,则需要一种较为满意的短期保存过剩卵母细胞或胚胎的方法。超低温(-196℃)冷冻固然是长期保存胚胎的良好方法,但对于只需短期(几个小时到几天)保存的胚胎而言,冷冻过程是烦琐的,且设备昂贵。胚胎的低温(0-37℃)保存却为此开辟了一条良好的途径^[17]。

基因的显微注射和核移植,需要胚胎在体外维持数小时。在收集液中仅停留20分钟的仓鼠2-细胞胚胎,移入受体子宫后,其发育率就大大低于直接移植组^[10]。而把作为供体的4-细胞和8-细胞小鼠胚胎在4℃,保存4-10小时,将其核移入去核的2-细胞胚胎中,不仅在体外发育为囊胚的比率很高(分别为72%和35%),而且移植后产仔率也很高(分别为22%和8%)^[26],同Robl等未经冷处理的结果相似^[21]。低温保存一段时间,可使供体胚胎迟缓发育,得到供体核与受体胞质同步化的最佳时机,提高核移植的成功率。业已证明,哺乳动物胚胎的短期保存,对于获得适当的同步受体,保证供体胚胎发育和受体子宫内膜高度同步化具有重要意义^[17]。

自Chang(1947,1948)报道兔胚胎在0-10℃保存96小时移入受体母兔产仔后,有关哺乳动物胚胎和卵母细胞的低温保存研究越来越多。下面综合介绍几十年来哺乳动物胚胎和卵母细胞在0-37℃间保存的研究状况。

(一)卵母细胞 Chang(1952)将兔卵母细胞在0和10℃保存24小时后进行受精,受

精率分别为40%和78%。在10℃保存96小时后,仍有6%受精。高于或低于10℃保存72小时后,均不受精。在磷酸缓冲液(PBS)缓冲的林格-戴尔氏(Ringer-Dale)液和兔血清(1:1)中,0-10℃保存31小时的兔卵母细胞,受精移植后,有3-11%的胚胎发育为幼兔。

小鼠卵母细胞在失去受精能力之前,只可耐受6小时的低温处理。由于6小时为小鼠卵子在体内的受精期限,所以这种方法用处不大^[17]。原核期小鼠卵于22-23℃,120-180分钟要比保存于35-36℃有高的成活率。在4℃,羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)缓冲的培养液中保存24和48小时的仓鼠卵母细胞,人精子穿入率分别为95%和75%,与新鲜卵子无明显差异^[3]。经4℃保存的仓鼠卵子,仍保持良好膜的完整性。李运星等^[1]也证实,4℃保存15-20分钟的仓鼠卵的人精子穿透率为81%。

Miyamoto等^[18]报道,猪卵母细胞对温度变化极其敏感。在30,20,10和0℃保存60分钟后,卵子成熟至中期I的百分率分别为41,1,0和0。牛的胚泡期(Gv)卵在4℃保存一段时间后,仍有62%成熟至中期I。但温度的轻微变化,显著影响牛卵的体外成熟和受精。在33,35和37-39℃时,牛卵成熟至中期I的比率分别为2.8,56.1和73%^[14],也使卵母细胞的超微结构发生变化^[20](见表1)。

(二)胚胎

1. 兔 Chang(1947)采用兔血清于10℃保存2-细胞胚胎,24,72,120和144小时后,在37℃中培养24小时分别有82,58,36.5和

* 本文经我系秦鹏春教授审阅,谨致谢意。

23.6%的胚胎出现正常卵裂。在他的另一研究(1948)中,于10℃保存96小时的2-细胞和桑椹期胚胎移入受体母兔后,产仔率分别为15%和46%。为了探讨兔胚胎的最适保存液,延长保存时间,Hafez进行了一系列试验(见表2)。证实,5%和7%的明胶、2%的甘油、卵泡液、尿囊液和卵黄对保存兔胚胎均有良好效果^[7]。经6-12℃保存8天的兔桑椹胚,移入受体后,产仔率达25%(Kardymowicz 1962)。Hu-

ghes和Anderson利用改进的杜氏磷酸缓冲液(Dulbecco's PBS)加10%胎核血清(FCS)作为保存液,将4℃保存7天的桑椹期胚胎移植后,产仔率达53%,保存15天的桑椹胚在37℃培养时仍有28%继续发育^[10]。最近,熊慧卿等^[2]在4℃对2-细胞、4-细胞、8-16-细胞和桑椹胚作保存试验,将保存3天的桑椹胚移植后,产仔率为33.5%。

表1 哺乳动物卵母细胞的低温保存

动物	保存液	保存温度(℃)	保存时间(小时)	存后发育
兔	BRS*+兔血清	24	12	37%受精
兔	BRS+兔血清	0	24	40%受精
兔	BRS+兔血清	10	24	78%受精
兔	BRS+兔血清	0-10	31	移植后产仔率为3-11%
小鼠	卵黄、枸橼酸钠+LS**	0-5	6	移植产仔
小鼠	球蛋白、枸橼酸钠+LS	2-3	3	移植产仔
仓鼠	卵培养液	4	15-20分钟	81%受精
仓鼠	HEPES缓冲的培养液+	4	24	95%受精
仓鼠	HEPES缓冲的培养液	4	48	75%受精
猪	杜氏PBS(Dulbecco's PBS)‡	30	1	41%成熟至中期I
猪	杜氏PBS	20	1	1%成熟至中期I
牛	杜氏PBS	4	1	62%成熟至中期I

*BRS—缓冲的林格氏液; **LS—洛克氏液

+HEPES—羟乙基咪唑乙硫磺酸; ‡Dulbecco's PBS—杜氏磷酸缓冲液

2. 小鼠、大鼠 8-12-细胞的小鼠胚胎,在克雷布斯-林格氏碳酸氢盐溶液(Krebs-Ringer's bicarbonate Solution KRB)加以1mg/ml牛血清蛋白(BSA)的保存液中,经10℃24小时保存后移入受体,产仔率为39%(Klissing 1963)在改进的Dulbecco's PBS中将2-细胞胚胎保存24小时后,活力(Viability)大大降低,保存48小时后,只有7%的胚胎能发育到囊胚。然而,5℃保存24小时的2-细胞小鼠胚胎移入受体后,产仔率为23%(Whittingham and Wales 1969)Kasai等^[12]利用含0.75mol/L蔗糖的PBS作为保存液,在0℃保存小鼠桑椹胚,48、72和96小时后,经37℃培养,分别有72、62和41%的胚胎发育为囊胚。而保存

120小时后,最高囊胚发育率(28%)则得自含0.5mol/L蔗糖的PBS中。蔗糖对0℃保存小鼠胚胎有保护作用^[13]。同时,Kasai等^[12]还研究了0℃保存大鼠桑椹胚的情况,保存24小时后,有50%-68%的胚胎在37℃培养时发育到囊胚。120小时后,囊胚发育率下降为15%-20%。将保存3天和4天的大鼠胚胎,移入受体后均有幼仔产下。

不同发育时期的胚胎的低温保存效果不同,Herr和Wright^[9]研究了不同发育时期的小鼠胚胎的4℃保存。1-细胞胚胎保存效果最差,保存1天后只有3%经培养能发育为扩展囊胚(expanded blastoblasts)。8-细胞以后的各期胚胎显著优于8-细胞以前各期胚胎。改变

惠滕氏(Whitten's)液中碳酸氢盐(HCO_3^-)的浓度,对桑椹胚和囊胚的保存无影响。但如果去掉 HCO_3^- ,可使8-细胞和其以前的各期胚胎低温保存后的成活率显著降低。 HCO_3^- 对1-细胞

2-细胞和4-细胞细胞小鼠胚胎的保存是必需的^[9]。5%的甘油或二甲亚砜(DMSO)对小鼠胚胎的5℃保存无益^[17](见表3)。

表2 兔胚胎的低温保存

胚胎时期	保存液	保存温度(℃)	保存时间(天)	存后发育
2-细胞-囊胚	兔血清	0-10℃	4	移植产仔
囊胚	盐液+兔血清	10	1	移植产仔
8-32-细胞	盐液、血清+明胶	10	6	移植产仔
8-32-细胞	盐液、血清+2%甘油	10	7	移植产仔
8-32-细胞	盐液+胚泡液	10	7	移植产仔
8-32-细胞	盐液+尿囊液	10	7	移植产仔
8-32-细胞	卵黄+枸橼酸钠	10	7	移植产仔
8-32-细胞	盐液、血清+明胶	10	14	移植产仔
桑椹胚	LS+兔血清	6-12	8	移植产仔
桑椹胚	杜氏PBS	4	7	移植产仔
桑椹胚	杜氏PBS	4	14	44%发育至囊胚
桑椹胚	杜氏PBS	4	15	28%发育至囊胚
桑椹胚	台氏液	4	3	移植产仔
桑椹胚	199培养液	4	3	移植产仔
2-细胞	盐液+明胶 或促红细胞生成素	10	4	移植产仔

3. 羊 在家畜胚胎的低温保存中,以羊胚胎的保存最成功(见表4)。所用保存液通常为灭活羊血清或者由羊血清与洛克氏(Lock's)液组成。Dulbecco's PBS加20%羊血清适合1-细胞至4-细胞胚胎和桑椹胚的保存和培养^[18]。保存5天的8-细胞胚胎移入受体后,产仔率为18.2%(Kardymowicz)^[11]。最近,Drancourt等^[5]将绵羊桑椹胚在4℃保存24小时后移入受体,受体怀孕率达93%,保存胚胎总存活率为48%。4-16-细胞的山羊胚胎在10℃保存22-27小时后移入受体,产仔率为37%。保存时间超过27小时,不能产生活的幼仔(Otsuki et al)^[25]。

4. 牛、马 1-12-细胞的牛胚胎,在10℃保存24-72小时后再行培养,仍有卵裂发生(Pincus 1951)。Trounson等^[24]对体外培养得到

的牛囊胚进行低温保存,在0℃保存48小时后,经37℃培养有38.4%继续发育。保存48小时的胚胎移入发情6.5-8天的牝牛后,产仔率为40%(20个囊胚产下8个正常牛犊)。BonDurant等^[4]将4℃保存48小时的牛囊胚移入受体母牛,产仔率为34%,与鲜胚直接移植产仔率(48%)无统计学差异。Lindner等^[15]证实,8天的牛胚要比2,4和6天的牛胚保存48小时后的存活率高。最近,Looney等^[16]也证实,5天的牛胚胎在≤4℃环境中不能存活,而在7-20℃保存24小时后,扩展囊胚形成率为50%-67%。发育7天的马胚胎在4℃24小时保存后移入受体,受体怀孕率为16%^[22](见表5)。

表3 小鼠、大鼠胚胎的低温保存

动物	胚胎时期	保存液	保存温度(°C)	保存时间(天)	存后发育
小鼠	2-细胞	杜氏 PBS	5	1	移植产仔
小鼠	8-12-细胞	KRB*	10	2	移植产仔
小鼠	2-细胞	杜氏 PBS	5	2	7%达囊胚
小鼠	桑椹胚	PBS+0.75mol/L蔗糖	0	3	62%达囊胚
小鼠	桑椹胚	PBS+0.75mol/L蔗糖	0	4	41%达囊胚
小鼠	桑椹胚	PBS+0.5mol/L蔗糖	0	5	28%达囊胚
小鼠	1-细胞	Whitten's**	4	1	3%达囊胚
小鼠	2-细胞	Whitten's	4	2	69%达囊胚
小鼠	8-细胞	Whitten's	4	3	85%达囊胚
小鼠	桑椹胚、囊胚	Whitten's	4	6	75%以上达扩展囊胚
大鼠	桑椹胚	PBS+0.5mol/L蔗糖	0	4	25%达囊胚
大鼠	桑椹胚	PBS+0.5 mol/L蔗糖	0	5	15%达囊胚
大鼠	桑椹胚	PBS+0.5mol/L蔗糖	0	3.4	移植产仔

* KRB——克雷布斯-林格氏碳酸氢盐培养液 ** Whitten's-惠滕氏液

表4 羊胚胎的低温保存

动物	胚胎时间	保存液	保存温度(°C)	保存时间(天)	存后发育
羊	2-4-细胞	羊血清	4.5-8	3	移植产仔
羊	8-细胞	羊血清	0-8	1	移植产仔
羊	8-细胞	羊血清+洛克氏液	10	5	移植产仔
羊	6-12-细胞	羊血清+洛克氏液	8-11	3	移植产仔
羊	6-12-细胞	羊血清+洛克氏液	8-12	4	移植产仔
羊	6-12-细胞	羊血清	20-21	2	移植产仔
羊	桑椹胚	PBS+20%羊血清	5	2	移植产仔
绵羊	桑椹胚	PBS+10%胎囊血清	4	1	移植产仔
山羊	4-16-细胞	任格氏液+卵黄 枸橼酸钠	7-10	22-27 小时	移植产仔

表5 牛、马胚胎的低温保存

动物	胚胎时期	保存液	保存温度(°C)	保存时间(天)	存后发育
牛	1-12-细胞	牛血清	10	3	仍能卵裂
牛	囊胚	杜氏 PBS	0	2	移植产仔
牛	囊胚	杜氏 PBS	4	3	移植产仔
牛	囊胚	杜氏 PBS	7	1	50%达扩展囊胚
牛	囊胚	杜氏 PBS	10	1	53%达扩展囊胚
牛	囊胚	杜氏 PBS	13	1	54%达扩展囊胚
牛	囊胚	杜氏 PBS	15	1	67%达扩展囊胚
牛	囊胚	杜氏 PBS	20	1	67%达扩展囊胚
马	囊胚	杜氏 PBS	4	1	移植产仔

综上所述,有关哺乳动物胚胎的低温保存国际上已取得很大进展,已经应用于商业性胚胎移植和胚胎工程等方面。但在国内报道极少^[2]。因此,我们很有必要开展这方面的工作。

参 考 文 献

- 1 李运星等 1989 冷处理金黄仓鼠卵和四种不同培养液对人精子染色体制备的影响 细胞生物学杂志 11(3):128—130。
- 2 熊慧卿等 1988 兔胚胎4℃保存后的体内和体外发育 江苏农业学报 4(3):43—47。
- 3 Barros C. et al. 1986 Hamster oocytes fertilizability after 4℃ storage. *Gamete Res.* 14:149—157.
- 4 BonDurant R. H. et al. 1982 Preliminary studies on bovine embryo survival following short-term storage at 4℃. *Theriogenology* 17:223—228.
- 5 Driancourt M. A. et al. 1988 Survival of ovine embryos stored at 4℃ for 24 hours. *Theriogenology* 30(3):441—446.
- 6 Farrel P. S. and B. D. Bavister 1984 Short-term exposure to twocell hamster embryos to collection media is detrimental to viability. *Biol. Reprod.* 31:109—114.
- 7 Hafez E. S. E. 1965 Storage media for rabbit ova. *J. Appl. Physiol.* 20:731—736.
- 8 Herr C. M. and R. M. Wright 1988 Cold storage of mouse embryos of different stages of development. *Theriogenology* 29(3):765—770.
- 9 ——— 1988 Cold-culture of different stage mouse embryos in bicarbonated and bicarbonate-free media. *Theriogenology* 30(1):159—168.
- 10 Hughes M. A. and G. B. Anderson 1982 Short-term storage of rabbit embryos at 4℃. *Theriogenology* 18:275—282.
- 11 Kardymowicz M. et al. 1966 Successful in vitro storage of sheep ova for 5 days. *Acta. Biol. Cracov. Ser. Zool.* 9:117—119.
- 12 Kasai M. et al. 1983 Protective effect of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0℃. *J. Reprod. Fert.* 68:377—380.
- 13 ——— 1981 Effect of various cryoprotective agents on the survival of frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.* 63:175—180.
- 14 Katska L. and Z. Somorag 1985 The influence of culture temperature on in vitro maturation of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 9:205—212.
- 15 Lindner G. M. et al. 1983 Survival of bovine embryos stored at 4℃. *Theriogenology* 20(3):311—319.
- 16 Looney C. R. et al. 1989 Effect of cooling temperature on precompacted bovine embryos. *Theriogenology* 31(1):218.
- 17 Maurer R. R. 1976 Storage of mammalian oocytes and embryos, A review. *Can. J. Anim. Sci.* 56:131—145.
- 18 Miyamoto H. et al. 1988 Attempts to cool pig oocytes. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 59(4):329—334.
- 19 Moore N. W. and R. J. Bilton 1973 The storage of fertilized sheep ova at 5℃. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:1421—1427.
- 20 Morstin J. and L. Katska 1986 Effect of temperature on ultra-structure of bovine oocytes in culture. *Anim. Reprod. Sci.* 12:13—19.
- 21 Robl J. M. et al. 1986 Nuclear transplantation in mouse embryos; Assessment of recipient cell stage. *Biol. Reprod.* 34:733—739.
- 22 Sertich P. L. et al. 1987 Cooled storage of equine embryos in a commercial semen transport system. *Theriogenology* 27:275.
- 23 Otsuki K. et al. 1960 The collection of fertilized ova by flushing of oviduct from tubouterine junction to fimbria and the transplantation of fertilized ova in the goat. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 6:31—40.
- 24 Trounson A. O. et al. 1976 The influence of in vitro culture and cooling on the survival and development of cow embryos. *J. Reprod. Fert.* 47:367—370.
- 25 Tsunoda Y. et al. 1987 Full-term development of mouse blastomere nuclei transplanted into enucleated two-cell embryos. *J. Exp. Zool.* 242:147—151.