

小鼠扩张囊胚细胞膜对不同抗冻保护剂 通透性的测定^①

朱士恩^②
(动物科技学院)

摘 要 胚胎玻璃化冷冻保存最重要的条件是胚胎细胞膜对抗冻保护剂的通透速度,即细胞内外液保护剂达到平衡的时间。温度及抗冻剂的种类不同,其通透速度各异。本试验将玻璃化抗冻液中常用的几种抗冻保护剂,如乙二醇、丙三醇、二甲基亚砷、乙酰胺及丙二醇的通透性进行比较。

关键词 通透性; 抗冻保护剂; 玻璃化; 扩张囊胚; 鼠

中图分类号 S814.6

Permeability Measurement of Expanded Mouse Blastocysts to Various Cryoprotectants

Zhu Shien

(College of Animal Science and Technology)

Abstract The speed of a cryoprotectant permeates through the embryonic cells, i. e. the time needed by the concentration of a cryoprotectant in intra-and extra-cellular fluid reaching to equilibration, is the most important requirement condition which affect the cryoprotection of embryos by vitrification. Cryoprotectants are differed the permeability, and the permeability is also different under various temperature conditions. In the experiment, the comparison of permeability of expanded mouse blastocysts to various cryoprotectants used in vitrification commonly, such as ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), dimethyl sulfoxide (DMSO), acetamide (AA) and glycerol (GL) were determined.

Key words permeability; cryoprotectant; vitrification; expanded blastocyst; mouse

首先发明的胚胎冷冻保存法称之为传统方法^[1],也叫作慢速冷冻法。尔后又发明了玻璃化冷冻法^[2],是对胚胎冷冻的一次革命。但他们采用的主体抗冻保护剂为DMSO,由于它的化学毒性大,冷冻后的胚胎发育率受到很大的影响。以后Kasai等^[3]和Zhu等^[4]用乙二醇和丙三醇为主体溶液对小鼠桑椹胚和扩张囊胚的玻璃化冷冻保存获得成功。并获得了很高的胚胎发育率。关键是筛选的通透性抗冻保护液的浓度高,且化学毒性低。冷冻后胚胎内部不能形成冰晶。综上所述,冷冻效果与细胞膜对抗冻保护剂的通透性有很大关系。为此掌握细胞膜对抗冻保护剂的通透速度是冷冻成功的关键。

1980年,有人曾以丙三醇为主体的玻璃化溶液对小鼠的未受精卵膜的通透性进行了调查^[5]。最近又曾对小鼠未受精卵和桑椹胚的通透性做了测定^[6]。可是胚胎的发育阶段不同膜的通透性有很大的差异^[7]。对扩张囊胚的通透性的测定至今未见报道。本试验采用小鼠扩张囊胚体积的变化来对几种抗冻保护剂进行测定,从而对不同抗冻保护剂的通透性进行比较,进而为胚胎的冷冻提供可靠依据。

收稿日期: 1996-12-03

①中国博士后科学基金资助项目

②朱士恩,北京海淀区圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

1 材料和方法

1.1 扩张囊胚

5~8周龄ICR系统小鼠,用PMSG及hCG各5IU隔日腹腔注射后与公鼠交配,hCG注射后76~78h,用PBS液冲洗子宫,收集桑椹胚-早期囊胚,在mKRB^[1]培养液中培养,发育至扩张囊胚时供试验使用。

1.2 抗冻保护剂溶液

用PBS溶液稀释成体积分数为10%的乙二醇(EG),丙三醇(GL),二甲基亚砜(DMSO),丙二醇(propylene glycol; PG)和 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙酰胺(acetamide; AA)溶液。

1.3 胚胎的形态变化记录装置

利用日本产显微操作仪(MMS-20, Shimadzu),并配置显像、录像和视频打印系统(EW-820, SONY)。

将毛细管(micro-cops, Drummont)用拉针仪拉成直径为80~120 μm 的固定用吸管。再用断烧器(MPF-1, Shimadzu)将吸管头部烧圆,以吸附固定胚胎。再拉一根大于固定吸管直径1.5~2倍的套管,将固定吸管套住,目的是防止胚胎移入抗冻保护液途中丢失。将抗冻保护液每滴200 μL 配置于塑料培养皿盖($\varnothing 90 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$)中,当中为PBS液滴,周围各抗冻液滴之间的距离为1.5cm。为防止混合和蒸发,液滴上面盖上液体石蜡油,将温度测试器浸入液体石蜡中以测定并调整温度。使抗冻液周围的温度分别为15, 20, 25及30 $^{\circ}\text{C}$ 。先将胚胎导入中央

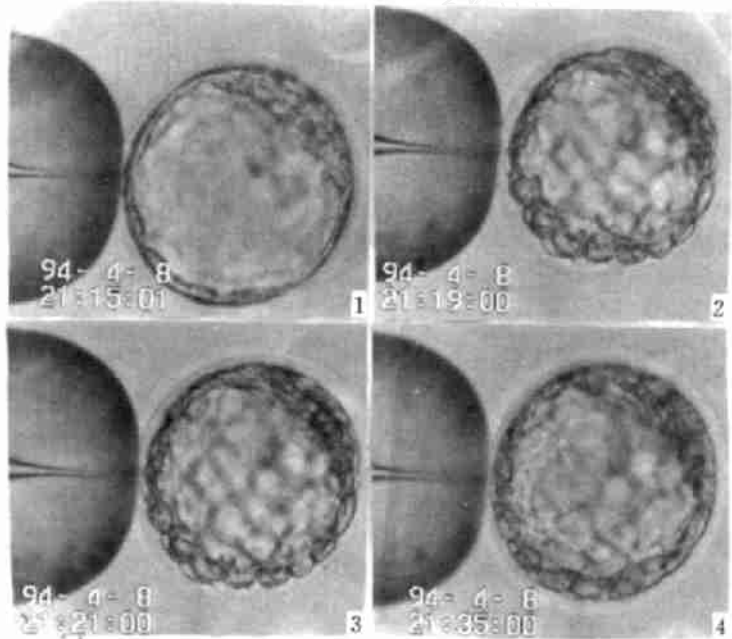


图1 25 $^{\circ}\text{C}$ 温度下,10%DMSO溶液中平衡后小鼠扩张囊胚的体积变化

1 PBS溶液(CK),1min; 2~4 10%DMSO溶液,平衡时间分别为3,5,20min。

的PBS液滴中,在此液中用吸管吸附固定的胚胎,以0.5s的速度录制1min内几张画面($\times 400$)细胞质重量的平均值为对照组(图1-1);然后套上套管将胚胎移入抗冻保护液中,拔出套管后将胚胎暴露在抗冻保护液中开始录制至25min画面并成像(图1-2,3,4)。每换一种抗冻保护液前,要将吸管及套管在新鲜PBS液中充分洗净。

1.4 胚胎体积变化的计算

胚胎移入PBS液中录制1min(对照组)及在抗冻保护液中,录制第5,10,20,30,45s及1,2,3,4,5,6,8,10,20,25min的胚胎画面,通过录像机和成像系统(UP-860, SONY)和显

像专用系统(UPP-110HD, SONY)复制像片。然后沿着外围轮廓剪下收缩后的细胞质部分,分别称重。根据 Jackowski 等(1980)重量比等于面积比,以 PBS 液中胚胎的面积(S)为对照组,设其相对体积为 1,则试验组胚胎相对体积为 $V_c = 4/3(S/\pi)^{3/2}$ 进行计算。对照组和各种抗冻保护剂溶液中测定的胚胎数分别为 3 枚以上的平均值。

2 结论

①等渗 PBS 液稀释后的各种抗冻保护剂的渗透压,AA,PG,DMSO 及 GL 都在约 $2 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$,而 EG 达 $2.54 \text{ mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 高于其他保护剂(表 1)。

②PBS 液中平衡后的胚胎体积几乎无变化。

③不同温度下(15,25,25,及 30 C)的各种抗冻保护剂中平衡 25 min 的体积变化如图 2 所示,15 C 情况下,EG, GL, PG, DMSO 溶液中,约 2 min 以内到最小体积,EG 中收缩度最小(86%),约 15 min 后恢复到原样的体积。GL 和 PG 中的胚胎体积收缩度为 71%和 63%,5 min 后慢慢恢复,至 25 min 没能恢复到原样体积。另外, DMSO 液中的胚胎收缩到 64%的体积后,几乎没有恢复。可是 AA 液中的变化呈一直收缩状态,始终没能恢复。

④温度升高,在 EG, GL, DMSO 液中的胚胎,短时间内达到最小体积,体积恢复很快。如 25 C 1 min 以内收缩到最小体积,25 min 以内体积膨胀,可超过原样的体积。但以 GL 液中的胚胎恢复最快(约 3.5 min),由此可见较高温度下 GL 保护剂的透过性较高。可是在 PG 液中的胚胎,1 min 后达到最小体积,至 10 min 后呈恢复趋势,但随时间的延长又再次收缩。AA 液中的胚胎在不同温度下皆呈现收缩状态,特别是较高温度下细胞质的化学伤害更严重。

表 1 几种抗冻保护剂溶液的渗透压

抗冻保护剂	稀释液	渗透压 / $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$
1.5 mol·L ⁻¹ Acetamide	PBS	1.95
10% Ethylene glycol		2.45
10% Propylene glycol		2.03
10% Dimethyl sulfoxide		2.11
10% Glycerol		2.01

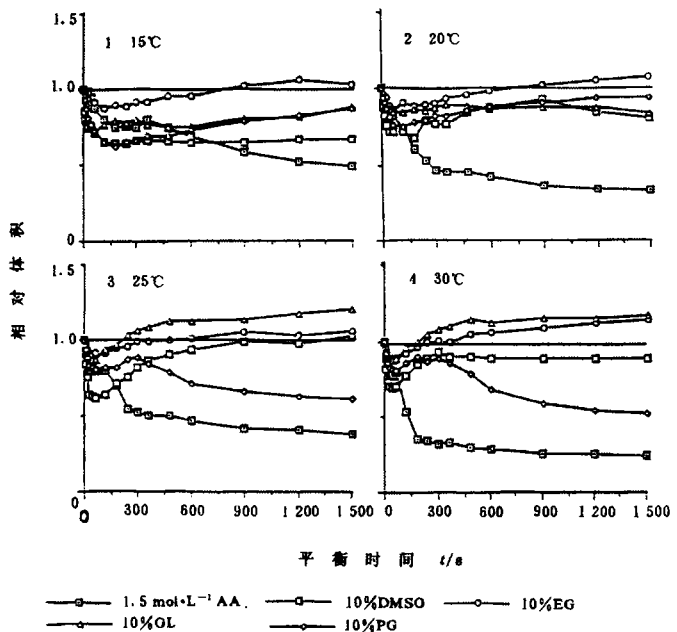


图 2 不同温度下,各种抗冻保护液中平衡后小鼠扩张囊胚的体积变化

3 讨论

水对细胞膜的通透性要比抗冻保护剂快得多。但是胚胎细胞从等渗液到高渗液中,为了维持细胞内外渗透压平衡,水分

由细胞内向外渗出,细胞开始收缩,达到平衡时脱水停止。由于细胞内外浓度发生变化,抗冻剂开始向细胞内渗透。为了调整渗透压平衡,水分再次渗入细胞,当细胞内外渗透压达到平衡时,抗冻剂和水的渗透终止,所以本试验由细胞体积变化的大小来分析抗冻剂对膜透过性强弱。但渗透速度与动物的品种和胚胎的发育阶段,处理温度,抗冻保护剂的种类有很大关系^[5,7,9]。

胚胎移入抗冻保护液中,首先上浮后下降至液体底部,这段时间无法测定,所以本试验根据横山等^[6]用吸管固定法进行抗冻保护剂通透性的胚胎显像测定。胚胎从PBS液中移入抗冻保护液中,当套管脱离后,由于胚胎周围PBS液量很少,并且很快上浮,对测定胚胎可视为无影响。

EG以外的抗冻保护剂,特别是在较高温度的溶液中的胚胎,恢复的中途有再收缩现象产生,可能是抗冻剂的毒性造成细胞膜受损,机能不全而致。这种现象在小鼠桑椹胚没被发现^[10],说明扩张囊胚与桑椹胚相比对抗冻剂的毒性的抵抗力弱。

5种抗冻保护剂,从分子量大小分析,推测其透过速度为AA,EG,PG,DMSO,GL的顺序。从渗透压结果分析,EG液中胚胎收缩大,应该恢复慢。其结果与预想相反。即EG收缩最小,且恢复最快。另外GL分子量大并不影响通透性,特别是在较高的温度下(25~30℃),GL液中的胚胎恢复最快。从图2-1~2-4中可以说明,对于扩张囊胚GL与EG的通透性没有差异。这一点在牛的扩张囊胚的通透性测定时,5种抗冻剂中EG透过性最高,其次GL的结果基本相一致^[11]。

参 考 文 献

- 1 Whittingham D G, Leibo S P, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, 1972, 178: 411~414
- 2 Rall W F, Fahy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 1985, 313: 573~575
- 3 Kasai M, Komi J H, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil*, 1990, 89: 91~97
- 4 Zhu S E, Sakurai T, Edashige K, Machida T, Kasai M. Optimization of the procedures for the vitrification of expanded mouse blastocysts in glycerol-based solutions. *J Reprod Dev*, 1994, 40: 293~300
- 5 Jackowski S, Leibo S P, Mazur P. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. *J Exp Zool*, 1980, 212: 329~341
- 6 横山荣治, 吉田直子, 枝重圭裕, 櫻井孝志, 町田隆彦, 葛西孙三郎. 小鼠未受精卵的各种抗冻剂的透过性. *哺乳卵研志*[日], 1994, 11: 114~115
- 7 Mazur P, Rigopoulos N, Jackowski S C, Leibo S P. Preliminary estimates of the permeability of mouse ova and early embryos to glycerol. *Biophys J*, 1976, 16: 232a (Abstract)
- 8 Toyoda Y, Chang M C. Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transer. *J Reprod Fertil*, 1974, 36: 9~22
- 9 Széll A, Shelton J N, Széll K. Osmotic characteristics of sheep and cattle embryos. *Cryobiology*, 1989, 26: 297~301
- 10 Kasai M, Yokoyama E, Edashige K, Sakurai T, Machida T. Permeability of mouse morulae to various cryoprotectants and the survival of the embryos after vitrification. *International Symposium on Animal Biotechnology*, 1994, 56 (Summary)
- 11 幡丸由美. 牛早期胚胎细胞膜抗冻保护剂通透性的测定[学位论文]. 日本高知大学[日], 1994