基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.011

细胞松弛素 B 预处理对小鼠卵母细胞玻璃化冻融后发育潜能的影响

唐宇铃，丘　彦，幸贵邦，孟江萍

（重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心，重庆　400016）

【摘　要】目的：观察细胞松弛素 B(Cytochalasin B,CB)预处理对小鼠卵母细胞玻璃化冻融后发育潜能的影响。方法：用浓度为 0（对照）、5、10、20、40 μg/ml 的 CB 分别预处理小鼠成熟卵母细胞后玻璃化冷冻，解冻后进行体外受精，观察卵母细胞的复苏率、受精率、6~8 cell 胚胎形成率。结果：CB 20、40 μg/ml 预处理组复苏率高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$），20 μg/ml 组与 40 μg/ml 组组间比较差异无统计学意义（88.7% vs 87.6%，$P=0.767$）；各组受精率、6~8 cell 胚胎形成率差异无统计学意义（$P>0.05$）。结论：浓度为 20、40 μg/ml 的 CB 对小鼠成熟卵母细胞冻融复苏率有改善作用。

【关键词】细胞松弛素 B；成熟卵母细胞；玻璃化冷冻

【中国图书分类法分类号】R321.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-04-24

The effects of vitrification pretreated with cytochalasin B on the potency of thawed mouse oocytes

TANG Yu-ling, QIU Yan, XING Gui-bang, MENG Jiang-ping

(*Department of Assistant Reproductive Centre, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of vitrification pretreated with cytochalasin B on the potency of thawed mouse oocytes. *Methods*: Mouse mature oocytes were cultured with cytochalasin B of different concentrations of 0 (control), 5, 10, 20, 40 μg/ml, respectively, and then vitrificated. After the oocytes were thawed, we observed the oocyte recovery rate, fertilization rate, and embryo formation rate of 6~8 cell. *Results*: CB groups of 20, 40 μg/ml had higher recovery rate than the control groups, with significant difference ($P<0.01$); the CB group of 20 μg/ml was of no significant difference with the 40 μg/ml group (88.7% vs 87.6%, $P=0.767$). The fertilization rate and embryo formation rate of 6~8 cell in any group was of no significant difference ($P>0.05$). *Conclusion*: The concentrations of 20, 40 μg/ml can be used to improve the recovery rate of mouse mature oocytes.

【Key words】cytochalasin B; mature oocyte; vitrification

自 1999 年 Kuleshova 等[1]首先报道，应用玻璃化冷冻人第二次减数分裂中期（Second metaphase, M Ⅱ）卵母细胞获得成功妊娠和分娩以来，卵母细胞玻璃化冷冻已成为近年来研究的热点和难点。冷冻过程中卵母细胞的微绒毛和质膜被破坏，细胞骨架及纺锤体受损，解冻后透明带变硬[2-4]，可降低卵母细胞解冻后的复苏率及受精率，使该技术在临床的应用受限。

细胞松弛素 B(Cytochalasin B,CB)是从真菌代谢产物中分离得到的生物碱，可通过中断微丝之间的联系降低微管在冷冻过程中的损伤[5]。CB 作为细胞骨架保护剂已经在很多哺乳动物卵母细胞冷冻的研究中应用，但结论尚不统一。本研究将小鼠成熟卵母细胞通过不同浓度的 CB 预处理后玻璃化冷冻复苏，了解 CB 能否降低其冷冻损伤，提高卵母细胞的复苏率、受精率及后期发育潜能。

1　材料与方法

1.1　实验动物

清洁级昆明雌性小白鼠 40 只，6~8 周，体重 25~35 g，用于获取成熟卵母细胞；清洁级昆明雄性小白鼠 15 只，8~12 周，体重 35~45 g，用于获取精子，均购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2　主要仪器和试剂

CO_2 培养箱（Li Shen，中国），解剖显微镜（Leica，德国），

作者介绍：唐宇铃（1980-），女，住院医师，硕士，研究方向：生殖内分泌与辅助生殖技术。

通信作者：丘　彦，女，教授，Email：cqartq@163.com。

基金项目：重庆自然科学基金资助项目（编号：2007BB5300）。

倒置显微镜(XDS-1,中国),SAGE 玻璃化冷冻和解冻试剂盒(深圳市金协和医疗器械有限公司),体外受精(In vitro fertilization,IVF)液(瑞典 Vitrolife 公司),CB(美国 Sigma 公司)。

1.3　成熟卵母细胞的获取

雌性小白鼠腹腔注射 10 IU 尿促性素,48 h 后注射 10 IU 绒促性素,注射绒促性素后 13~14 h 颈椎脱臼处死小鼠,剖腹取出输卵管,在显微镜下,收集形态正常、有第一极体排出的卵母细胞移入 IVF 培养液,放入 CO_2 培养箱备用。共收集到成熟卵母细胞 828 个。

1.4　CB 对小鼠成熟卵母细胞冻融效果的影响

本实验依据不同浓度 CB 预处理卵母细胞分为 5 组:第 1 组为对照组,卵母细胞数量为 160 个,未经 CB 预处理直接进行玻璃化冷冻;第 2、3、4、5 组卵母细胞数量为 168、162、168、170 个,分别经过 CB 浓度为 5、10、20、40 μg/ml 预处理 20 min 后再进行玻璃化冷冻。

1.5　卵母细胞玻璃化冷冻和解冻

将卵母细胞放入 20 μl 平衡液(Equilibration solution,ES)进行预平衡 10 min,然后依次转入玻璃化冷冻液(Vitrification solution,VS) VS1 5 s,VS2 5 s,VS3 10 s,最后转入 VS4 液滴,并在 90 s 内装入麦管投入液氮。

解冻时将麦管浸入 1 mol 解冻溶液(Warming solution,WS),卵母细胞逸出后停留1 min,然后依次移入0.5 mol WS1、0.5 mol WS2、0.25 mol WS3 液滴,各停留 2 min,再将卵母细胞依次经过 3-(N-吗啡啉)乙磺酸缓冲溶液 1、缓冲溶液 2、缓冲溶液 3处理,各停留 3 min,最后移入 IVF 培养液并放入 CO_2 培养箱培养 2 h 后观察卵母细胞存活情况,然后加入受精滴进行 IVF。

1.6　复苏后卵母细胞存活的评定

透明带完整,质膜无破裂,胞质无外流,折光性好,第一极体完整且呈圆形,卵周间歇存在并且均匀。

1.7　IVF

雄性小白鼠分离附睾尾和输精管后,从输精管中挤出精子,放入 CO_2 培养箱中获能 1 h。制作受精滴,密度约为 2×10^6 个/ml,将受精培养皿放入培养箱中静置 4~6 h 后观察有无双原核形成及第二极体释放[6]。受精后 24~48 h 观察 2~4 cell 胚胎数量,48~72 h 观察 6~8 cell 胚胎数量。

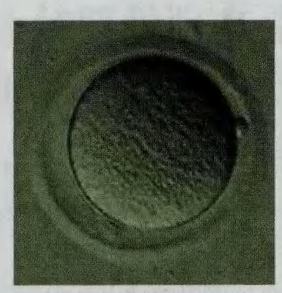
1.8　统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行卡方(χ^2)检验,与对照组相比 $P<0.012\ 5$ 表明差异有统计学意义,组间比较 $P<0.005$ 表明差异有统计学意义。

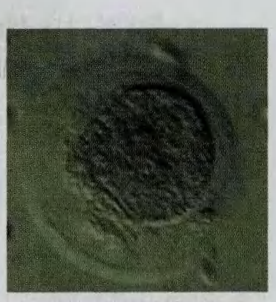
2　结　果

2.1　CB 对解冻后卵母细胞复苏率的影响

CB 浓度为 20、40 μg/ml 组复苏率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),20 μg/ml 组与 40 μg/ml 组组间比较差异无统计学意义(88.7% vs 87.6%,$P=0.767$);5、10 μg/ml 组复苏率高于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$)(见图 1、表1)。



复苏后的卵母细胞形态（×400 倍）



受损的卵母细胞形态（×400 倍）

图 1　卵母细胞形态



受精卵（×400 倍）

图 2　受精卵形态



8 cell（×400 倍）

图 3　胚胎的 8 cell 形态

表 1　CB 对小鼠成熟卵母细胞冻融的影响

CB浓度（μg/ml）	取卵数（MⅡ期）	复苏卵子数率(%)	受精卵数率(%)	6~8 cell 胚胎数率(%)
0	160	122(76.2)	36(29.5)	18(50.0)
5	168	132(78.6)	42(31.8)	22(52.4)
10	162	129(79.6)	40(31.0)	22(55.0)
20	168	149(88.7)[a]	55(36.9)	32(58.2)
40	170	149(87.6)[a]	53(35.6)	31(58.5)

注:a,$P<0.01$,与对照组比较

2.2　CB 对卵母细胞受精率的影响

CB浓度为 5、10、20、40 μg/ml 组受精率高于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),各实验组组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)(见图 2、表 1)。

2.3　CB 对卵母细胞 6~8cell 胚胎形成率的影响

CB 浓度为 5、10、20、40 μg/ml 组 6~8 cell 胚胎形成率高于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$),各实验组组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)(见图 3、表 1)。

3　讨　论

胚胎冷冻技术是常规辅助生殖技术之一,已广泛应用于临床。有报道[7-9]囊胚、早期胚胎、原核期胚胎经玻璃化冷冻后复苏率可达 80%、妊娠率可达 42%,而卵子冷冻复苏后妊娠率仅 20%左右[10],使得该技术在临床应用受限。

目前卵母细胞冷冻面临的主要问题是低温冷冻对其细胞骨架等超微结构的损伤。细胞骨架是由微管、微丝和中间纤维组成，分布于整个细胞质中。微管组成的纺锤体装置是一个功能性组织，促进染色体在分裂过程中分离及第一、第二极体的排出，确保正常的染色体分离避免产生非整倍体[11]。成熟卵母细胞的染色体附着于第二次减数分裂纺锤体易变的微管上，纺锤体对低温敏感，冷冻过程易导致微管解聚、染色体弥散，使冻融后卵母细胞复苏率、受精率和后期发育潜能降低[2]。因此，提高纺锤体等细胞骨架在玻璃化冷冻过程中的稳定性，将有可能提高卵母细胞冷冻的复苏率、受精率以及发育潜能，减少冷冻损伤。

CB是一种细胞骨架保护剂，从真菌代谢产物中分离得到的生物碱，在细胞内与微丝的正端结合，并引起 F-肌动蛋白解聚，阻断亚基的进一步聚合，可通过中断微丝之间的联系降低微管在冷冻过程中的损伤[5]。动物实验中的显微操作采用 CB 进行预处理的研究多数显示有效，但也有不同的研究结论存在[12-14]。有学者[15]曾在核移植过程中采用了 0、5、10、20、40 μg/ml CB 浓度处理 MⅡ期小鼠卵母细胞，通过激光共聚焦扫描显微镜观察纺锤体结构正常，但也有发现浓度过高（如 20 μg/ml 以上）会使卵母细胞的破溃率升高的情况[16,17]。因此本实验采用了 0~40 μg/ml 成倍递增的浓度梯度来处理卵母细胞，观察其在冷冻中作用。研究发现 CB 浓度为 20、40 μg/ml 组对小鼠成熟卵母细胞冻融复苏率高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$），提示 20、40 μg/ml 的 CB 可以减轻冻融对小鼠卵母细胞的损伤，提高卵母细胞复苏率。

本研究中小鼠成熟卵母细胞经冷冻复苏后受精率为 29.5%~36.9%，低于李莉[18]等采用卵母细胞内单精子显微注射（Intracytoplasmic sperm injection，ICSI）技术得到的受精率 38.3%~68.8%，这主要是由于本实验采用 IVF 方式受精。在后期的实验中我们可以选择复苏的 20、40 μg/ml 组卵母细胞进行 ICSI 受精，进一步观察 CB 对冻融后卵母细胞的受精率的影响。

参 考 文 献

[1] Kuleshova K, Gianaroli L, Magli C, et al. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report[J]. Hum Reprod, 1999, 14(12): 3077-3079.

[2] Boiso I, Marti M, Santalo J, et al. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase Ⅱ stage[J]. Hum Reprod, 2002, 7(17): 1885-1891.

[3] Moreira da Silva F, Metelo R. Relation between physical properties of the zone pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification[J]. Reprod Domest Anim, 2005, 40(3): 205-209.

[4] Fujikawa S. Ultrastructural studies of mouse embryos cryopreserved by one-step vitrification procedure[J]. Cryobiology, 1992, 2(29): 275.

[5] 周伯成，王志刚，刘丑生，等. 细胞松弛素 B 对绵羊 GV 期卵母细胞玻璃化冷冻效果影响[J]. 中国畜牧兽医，2007，34(3)：47-49.

[6] 孙青原，陈大元，主译. 小鼠胚胎操作实验手册[M]. 北京：化学工业出版社，2006.422.

[7] Vajta G, Nagy Z P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification[J]. Reprod Biomed Online, 2006, 12(6): 779-796.

[8] Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method[J]. Theriogenology, 2007, 67(1): 73-80.

[9] 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)：101-110.

[10] 赵 丽，章志国，邢 琼，等. 玻璃化冷冻人成熟卵母细胞的临床应用[J]. 安徽医科大学学报，2010，45(5)：224-226.

[11] Bianchi V, Coticchil G, Fava L, et al. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentriation[J]. Hum Reprod, 2005, 20(4): 1078-1803.

[12] Fujihira 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] 张 波，冯 雪，方伟芬，等. 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[J]. 中山大学学报·医学科学版，2007，28(6)：645-648.

[14] 张家新，陈少轻，孟昭霞，等. 卵丘细胞和细胞骨架稳定剂对绵羊成熟卵母细胞玻璃化冷冻的影响[J]. 安徽农业科学，2008，36(5)：1879-1881.

[15] 崔龙波，周雪莹，崔志峰，等. 不同因素对小鼠 MⅡ期卵母细胞纺锤体的影响[J]. 安徽农业科学，2008，36(33)：14555-14557.

[16] 朱德生，谢松涛，杨贵忠. 细胞松弛素 B 浓度对小鼠卵母细胞去核效果的影响[J]. 中国兽医学报，2004，24(2)：195-196.

[17] 刘 军，王勇胜，刘凤军，等. 小鼠卵母细胞去核方案的优化[J]. 农业生物技术学报，2007，15(2)：212-216.

[18] 李 莉，丛 林，曹云霞，等. 冻融后小鼠卵母细胞培养时间对 ICSI 结果的影响及受精失败辅助激活的结果[J]. 现代妇产科进展，2008，17(6)：448-451.

（责任编辑：关蕴良）