

配子及胚胎冻融技术的研究与应用

孙志宏 刘燕 周茂林 李延清 (延安大学生命科学学院, 陕西延安 716000)

摘要 [目的] 为了深刻了解细胞冻融技术的研究与应用进展。[方法] 综述细胞冻融技术的原理, 精子冻融、卵子冻融和胚胎冻融技术的研究进展。配子及胚胎的冻融研究已初步成熟, 并得到广泛应用。[结论] 该技术的研究与应用成果值得推广, 但仍需进一步的研究。

关键词 细胞冻融; 精子冻融; 卵子冻融; 胚胎冻融

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)18-05457-02

1 细胞冻融技术的原理

细胞冻融包括细胞的冻结保存和细胞融解过程两个阶段。细胞的冻结和超低温保存为细胞的脱水过程。当温度降低时, 水分由细胞内流向细胞外, 细胞适度脱水, 当温度进一步降低, 细胞内液开始结冰, 快速降温至 -196°C , 未冻液体玻璃化而不形成新的冰晶。细胞融解过程是将冻结的细胞复温, 使其恢复到冻前状态, 由于受活细胞耐热限制, 融化槽温度一般在 $36\sim 42^{\circ}\text{C}$ 。冻融过程中细胞冰晶形成将导致细胞损伤。影响细胞冻融的两个重要因素是冻融速率和保护剂浓度。冷却过快, 细胞内形成大量冰晶, 造成细胞膜性结构破坏; 冷却过慢, 细胞内溶液浓度过高使细胞易遭损伤, 但此时渗透压改变可由保护剂来弥补, 并使细胞内形成少量而微小的冰晶。此外, 保护剂的种类、加入和移除方式以及低温对脂相细胞膜的改变均影响细胞的成活率^[1-2]。

2 精子的冻融

精子的冷冻效果受遗传背景、冷冻保护剂、冷冻方法(冷冻速率、解冻温度等)等因素的影响。人精子在冻融后其超微结构均发生了一定的变化: 精子的质膜变皱、破裂甚至丢失, 核局部出现凹陷, 并有顶体物质漏出; 中段的线粒体肿胀或破坏, 线粒体嵴改变, 有部分线粒体基质密度降低; 尾部结构形态虽无改变, 但没有冷冻前清晰, 有些模糊不清。冻融后的精子, 染色质基本完整。由于细胞内外冰晶形成的影响, 对精子膜产生一定的损伤, 可导致精子质膜和顶体膜的通透性增加和破坏, 引起部分精子顶体内容物的漏失和精子能量代谢降低或停止, 使精子的活动力和穿入卵细胞透明带的能力降低。但有学者指出^[3], 冷冻-复温过程不损伤 DNA, 冷冻贮存 75 周以上的精子 DNA 未发现重要改变。经卵胞浆内单精子显微注射操作证实, 冻融精子并不影响其受精能力, 受精卵内可见双原核, 卵周隙有 2 个极体, 卵裂后同样能形成 4~8 个卵裂等大均质透明无碎片的优质胚胎。认为精子冻融造成的精子细胞膜和顶体的改变并不完全影响精子的受精能力和胚胎形成。冷冻还可以使一些劣质精子被淘汰。精子冷冻储备结合单精子注射技术为男性不育治疗困难患者提供更多的治疗途径^[4]。研究还发现经冷冻复苏后精子的卷尾现象明显增多, 但不活动, 可能是在冻融过程中由于冷冻保护剂的作用引起渗透压的剧烈变化所致。精子卷尾是由于在低渗时水分通过精子膜进入精子, 以重建内外液体间的平衡而使精子尾部产生膨胀, 是细胞膜功能

的正常表现, 是细胞具有完整的功能活动的特征^[5]。

3 卵子的冻融

卵细胞在冻融过程中将经受温度、冰晶、渗透压和高溶质浓度等一系列变化, 细胞极易受损伤。对于不同时期卵母细胞冷冻的研究, 有学者认为 GV 期卵母细胞因细胞膜的稳定性差等原因, 对温度较为敏感, 冷冻时更易受到伤害。此外, 使用玻璃微管冷冻猪卵母细胞与常规细管程序化冷冻比较, 冻后存活率有显著提高^[6]。

卵细胞冻融后可出现多种改变, 如透明带破裂变性、硬化, 卵细胞膜破裂, 胞浆内颗粒改变, 皮质颗粒分布和数量改变, 细胞骨架解聚, 染色体非整倍体和多倍体的发生等。

卵丘细胞对猪卵母细胞冷冻的作用, 证实卵丘细胞的存在有助于提高猪卵母细胞对冷冻液处理的耐受性。事实上, 在影响冷冻效果的诸因素中, 冷冻/解冻速度是主因, 尽量减少卵母细胞周围冷冻液的体积和冷冻载体的厚度, 可以改善冷冻保存效果^[7]。冻存的卵-冠-丘细胞复合物(OCCC)与裸卵冻存相比, 不但可以降低保护剂毒性, 而且有较高的成活率, 但在预冻前保存或至少保存卵丘细胞。冻融可对卵细胞的透明带、染色体、皮质颗粒、纺锤体和细胞骨架等造成不同程度的损伤, 还可导致细胞内各种酶系和分子结构的改变。对未成熟卵细胞以及始基卵泡的冻存可能减少损伤^[8], 但这有赖于良好的体外培养体系的建立及一些冷冻保护剂对其结构和功能的影响, 如通常在慢冻融是 DMSO 和 PROH 的浓度 $< 1.5\text{ mol/L}$, 以降低毒性和避免细胞过度收缩。以此来使其进一步发育成熟, 恢复减数分裂并最终得以受精和妊娠^[9]。

人卵子经冻融后能成功受精发育并妊娠分娩者很少, 迄今为止, 全世界仅 60 余个婴儿出生于玻璃化冷冻的人卵母细胞, 难以应用于临床^[10]。卵子冻融尚处于研究探索阶段。

4 胚胎冻融

胚胎冻融技术包括胚胎冷冻和胚胎复苏两个过程。胚胎冷冻是细胞充分脱水和渗透性保护剂进入细胞的过程; 胚胎复苏是水进入细胞和渗透性保护剂脱出的过程。胚胎冷冻技术在胚胎移植中极为重要, 是动物胚胎移植产业化和人工辅助生殖的重要技术保障。

胚胎冷冻成功的关键在于细胞脱水和保护剂渗透细胞两者之间达到平衡, 若冷冻前的胚胎质量不高, 碎片很多, 会使每个细胞完整度差, 冻存前碎片 $> 20\%$ 的胚胎经冷冻后基本无法存活, 只有那些冻存前碎片 $< 10\%$ 的胚胎, 解冻后能继续分裂, 才有冷冻价值^[11]。

判断胚胎质量标准包括细胞数、碎片量和细胞形态等。

作者简介 孙志宏(1968-), 男, 陕西延安人, 硕士, 副教授, 从事细胞工程教学与研究工作。

收稿日期 2007-03-21

胚胎完整率越高,胚胎质量越好,抵抗冷冻损伤的能力越强。选择解冻后优质胚胎移植是获得临床妊娠的关键因素。研究表明,妊娠组的冻融胚胎细胞完整率显著高于非妊娠组,有力地支持了胚胎质量是影响冻融胚胎移植妊娠结局重要因素的观点^[12],细胞完整率可有效预测冻融胚胎移植后的妊娠结局。影响冻融胚胎移植成功率的重要因素之一是胚胎能否耐受冷冻和解冻的损伤,该损伤是发生在冷冻或解冻的过程中,细胞发生物理和化学的应激,通常是由于细胞内冰晶形成或者由于细胞失水所致的渗透压改变。一般来说胚胎在分裂早期冷冻的效果比晚期好,即冻融分裂期胚胎的结局比桑椹胚或囊胚好。通常认为胚胎的存活率与所含细胞数成反比。国外有学者对胚胎在不同的发育时期进行冷冻是否存在差异进行了研究,结论不统一,甚至相反^[13-15]。不同冷冻时间仅对来源于体外受精的冻融胚胎有影响,却并不影响来源于胞浆内精子注射的冻融胚胎移植成功率^[14]。但还没有确切的证据表明胚胎在某个时期比其他时期冷冻更有优势,可能与胚胎冷冻方法、冷冻和解冻液或冷冻胚胎选择标准不同等原因有关^[15]。

解冻后的胚胎可表现为所有卵裂球完整、部分卵裂球完整和全部卵裂球死亡3种情况。一般认为至少有50%完整的卵裂球的胚胎才有移植价值。许多资料表明,胚胎复苏后卵裂球的完整性对妊娠率有影响^[16],移植所有卵裂球都完整的胚胎,妊娠率、种植率显著提高^[17]。

胚胎冷冻技术是动物胚胎移植产业化和人工辅助生殖的重要技术保障。胚胎冷冻融解方法、胚胎质量、冻融胚胎移植时机等均会影响最终结果,其中尤以胚胎质量最为重要。如何提高冻融胚胎存活率、植入率和妊娠率等是今后要致力研究的问题。

参考文献

[1] HONG SW, CHUNG HM, II MJM, et al. Improved human oocytes development

after vitrification: a comparison of thawing methods [J]. *Fertil Steril*, 1999, 72(1): 142 - 146.

- [2] ISACHENKO E F, NAYUDU P L. Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromosomal normality and cumulus integrity [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14: 400 - 408.
- [3] 卢惠霖, 卢光琇. 人类生殖与生殖工程[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2001: 95.
- [4] 李满, 庄广伦, 张敏芳, 等. 卵母细胞浆内冷冻精子注射治疗不射精不育一例报告[J]. *生殖医学杂志*, 1998(7): 53.
- [5] 黄宇烽. 男性病实验诊断手册[M]. 2版. 南京: 东南大学出版社, 1993: 51 - 52.
- [6] 朱良成, 芮荣, 杨德吉, 等. 用玻璃微管法冷冻猪卵母细胞[J]. *农业生物技术学报*, 2006, 14(5): 697 - 700.
- [7] FUJIHARA T, NAGAI H, FUKU Y. Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of Taxd treatment for vitrification of in vitro matured porcine oocytes [J]. *Gynology*, 2005, 51: 339 - 343.
- [8] WU J, ZHANG L, LIU P. A new source of human oocytes: preliminary report on the identification and maturation of human preantral follicles from follicular aspirates [J]. *Hum Reprod*, 1998, 13(9): 2561 - 2563.
- [9] 潘永苗. 卵细胞冻融及其影响因素[J]. *国外医学: 妇产科学分册*, 2001, 28(1): 3 - 6.
- [10] 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, 86(29): 2037 - 2040.
- [11] 周伟方, 丁亚军, 谢建华, 等. 冻融胚胎移植的临床应用[J]. *现代实用医学*, 2003, 15(2): 85 - 87.
- [12] SCHALKOFF ME, GSKOWITZ SP, POWERS RD. A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo cryopreservation program [J]. *Fertil Steril*, 1993, 59(6): 1070 - 1074.
- [13] SALUMETS A, TUURI T, MÄKINENS, et al. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer [J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(9): 1890 - 1895.
- [14] LAHAV BARATZ S, KOFMAN M, SHILOH H, et al. Analyzing factors affecting the success rate of frozen-thawed embryos [J]. *Assist Reprod Genet*, 2003, 20(11): 444 - 448.
- [15] KOLIBANAKIS EM, ZIKOPOULOS K, DEVROEY P, et al. Implantation potential and clinical impact of cryopreservation—a review [J]. *Facerta*, 2003, 24 (Suppl B): 27 - 33.
- [16] TESTART J, LASSALLE B, FORMAN R, et al. Factors influencing the success rate of human embryo freezing in and in vitro fertilization and embryo transfer program [J]. *Fertil Steril*, 1987, 48(1): 107 - 112.
- [17] EL TOUKHY T, KHALAF Y, AL DARAZI K, et al. Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles [J]. *Ferti Steril*, 2003, 79(5): 1106 - 1111.