

两种冷冻保护剂对小鼠 2 细胞胚冷冻效果的比较*

雷晓华^{1,2} 曹宇静¹ 宁立娜¹ 马保华^{1,2**}

1. 中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101

2. 西北农林科技大学动物医学院, 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100

摘要 乙二醇 (ETG) 和 1, 2-丙二醇 (PROH) 具有高细胞渗透性和低毒性特点, 常被用于人及多种哺乳动物早期胚胎冷冻保存。为了比较 ETG 和 PROH 对小鼠 2-细胞胚的冷冻保护效果, 本试验分别采用这两种冷冻保护剂, 对小鼠 2-细胞胚进行冷冻保存, 并采用冻后体外培养和囊胚移植进行冷冻效果检测。结果表明, PROH 组胚胎解冻后胚胎存活率与 ETG 组无显著差异, 但 PROH 组 4 细胞胚发育率和囊胚发育率显著高于 ETG 组 (82.7% vs. 64.6%, 61.2% vs. 29.1%, $P < 0.01$)。囊胚移植结果表明, 2-细胞胚胎冻存后能够发育为正常的后代, PROH 组和 ETG 组的囊胚移植后妊娠产仔率无统计学差异 ($P > 0.05$), 但均显著低于对照组 ($P < 0.05$)。为了分析两组胚胎冻存后损伤情况, 对解冻后的胚胎细胞微丝进行检测, 结果显示 ETG 组微丝受损的胚胎数高于 PROH 组。本研究结果证明采用 PROH 作为冷冻保护剂冷冻保存小鼠 2-细胞胚的冻存效果优于 ETG [动物学报 54 (6): 1098– 1105, 2008]。

关键词 冷冻保护剂 冷冻 2-细胞胚胎 小鼠

Effects of 1, 2-propanediol and ethylene glycol on the development of cryopreserved 2-cell mouse embryos in uterus*

LEI Xiao-Hua^{1,2}, CAO Yu-Jing¹, NING Li-Na¹, MA Bao-Hua^{1,2**}

1. State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2. Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Agriculture Ministry of China, College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract Ethylene glycol (ETG) and 1, 2-propanediol (PROH) have been largely used in the cryopreservation of human and other mammalian early stage embryos due to their low toxicity and high permeability to embryos. In this study, we investigated the cryoprotective activity of ETG and PROH on the development of 2-cell embryos. Two-cell embryos were cryopreserved with PROH and ETG using conventional cryopreservation procedures. After thawing, the survival rates of 2-cell embryos were assessed, and their development to 4-cell embryos, blastocysts, hatched blastocysts and offspring were compared with nonfrozen embryos. The total number of cells in a blastocyst in each group was examined. To further compare the integrity of frozen embryos between PROH and ETG, the level of cytoskeleton disruption of mouse embryos was detected. Results show that the percentage of damaged blastomeres in 2-cell mouse embryos frozen with PROH and ETG respectively showed no difference. Embryos frozen with PROH had significantly higher rates of development to 4-cell stage and expanded blastocyst stage than those frozen with ETG (82.7% vs. 64.6% and 61.2% vs. 29.1%, respectively, $P < 0.01$). However, there was no statistical difference in hatched blastocyst rate and birth rate between PROH and ETG (32.4% vs. 32.2% and 26.9% vs. 23.5%, $P > 0.05$). In addition, higher cytoskeleton disruption rate of embryos was observed in ETG group than in PROH group. Therefore, our results indicated that PROH does appear to be a considerable alternative to the ETG in 2-cell embryo cryopreservation in mice [Acta Zoologica Sinica 54 (6): 1098– 1105, 2008].

Key words 1, 2-propanediol, Ethylene glycol, Cryopreservation, 2-cell embryo, Mouse

2008-04-13 收稿, 2008-06-19 接受

* 中科院重大项目“育种卫星留轨舱微重力平台”(KACX2-SW-02-07), 中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室客座资金 [This work was supported by the grants of CAS Knowledge Innovation Program (KACX2-SW-02-07) and the Visiting Fellowship grant of State Key Lab of Reproductive Biology, Institute of Zoology, CAS]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: mabh@nwsuaf.edu.cn

© 2008 动物学报 Acta Zoologica Sinica

随着空间生物技术和空间生物学的发展,有关太空环境对人与哺乳动物植入前胚胎的发育及对生殖内分泌方面的研究已变得十分重要。研究空间环境与哺乳动物胚胎发育的关系,其目的是为人类探索太空生存条件提供科学依据和技术手段(Furusawa et al., 2001)。小鼠是常用的实验动物模型,其胚胎的收集与操作简便,常被用作空间发育生物学研究的试验材料(Cao et al., 2007)。

研究空间环境对小鼠早期胚胎发育的影响,需要大量发育阶段一致、质量优良的早期胚胎,而在空间试验实践中,受时间和空间的限制难以在短时间内采集到足够数量、质量均一的新鲜胚胎用于研究,采用冷冻胚胎来代替新鲜胚胎将会是一个很好的选择。因此,早期卵裂阶段胚胎的冷冻保存及其冻后体外发育技术体系的建立就成为空间胚胎发育学研究的必要内容。在过去的几十年里胚胎冷冻保存技术被广泛应用于动物繁殖学(Van et al., 1997)、生殖医学(Magli et al., 1999)等领域。但多数胚胎冷冻研究集中于 8-细胞至囊胚期(Chen et al., 2005; Cremades et al., 2004; Mukaida et al., 1998),对早期卵裂阶段胚胎冷冻保存的研究仍然不足。在前期的研究工作中,我们比较了 1, 2-丙二醇(1, 2-propanediol, PROH)、乙二醇(Ethylene glycol, ETG)、二甲基亚砷(Dimethylsulfoxide, DMSO)和甘油(Glycerol)等 4 种冷冻保护剂对小鼠 2-细胞胚的渗透性和毒性,结果显示 ETG 和 PROH 渗透性好,细胞毒性低,是小鼠 2-细胞胚胎冷冻保存的理想候选冷冻保护剂(雷晓华等, 2008)。由于 PROH 和 ETG 在化学结构和某些化学特性非常地相似,但是关于它们对早期胚胎冷冻效果比较的研究报道还比较少。前期研究多数主要集中在发育晚期的胚胎(8-细胞至囊胚期)。在人类辅助性生殖方面的研究中,PROH 常常被采用作为人卵母细胞和受精卵冷冻保存的首选冷冻保护剂(Boldt et al., 2003)。Chen et al. (2005) 采用 PROH 作为冷冻保护剂对人卵母细胞进行慢速冷冻保存取得较好的效果。虽然 ETG 具有低毒性和高渗透性的特点,但有研究报道,ETG 并不适合于原核期胚胎的冷冻保存,将其用于 4 细胞及之后的各个时期胚胎冻存效果却很好(Shaw et al., 1995)。

为了研究 ETG 和 PROH 对小鼠 2-细胞胚的冷冻效果及胚胎冻后的发育情况。本试验采用冻前二步平衡、常规冷冻降温及解冻后分步脱除保护剂冷冻解冻方法,冷冻保存小鼠 2-细胞胚胎,比较 ETG

和 PROH 对小鼠 2-细胞胚冻存后存活率及体外发育能力的影响;分析小鼠 2-细胞胚冻后的微丝分布与完整性,为改善小鼠 2-细胞胚胎冷冻及体外发育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂、胚胎冷冻保护液、解冻液和培养液

试验中所用试剂除特别说明外均为 Sigma 公司产品。胚胎冲洗液为含 10% 胎牛血清(Fetal calf serum, FCS)的改良杜氏磷酸盐缓冲液(Modified Dulbecco' phosphate buffered, mDPBS); ETG 冷冻保护液为 1.5 mol/L ETG (含 1.5 mol/L ETG+ 15% FCS 的 mDPBS), 1.5 mol/L ETG+ 0.1 mol/L 蔗糖(含 1.5 mol/L PROH+ 0.1 mol/L 蔗糖+ 15% FCS 的 mDPBS); PROH 冷冻保护液为 1.5 mol/L PROH (含 1.5 mol/L PROH+ 15% FCS 的 mDPBS), 1.5 mol/L PROH+ 0.1 mol/L 蔗糖(含 1.5 mol/L PROH+ 15% FCS+ 0.1 mol/L 蔗糖的 mDPBS); 分步解冻液分别为含有 1.0 mol/L PROH/ETG+ 0.25 mol/L 蔗糖, 0.5 mol/L PROH/ETG+ 0.25 mol/L 蔗糖和 0.25 mol/L 蔗糖的 mDPBS; 胚胎培养液为 KSOM-AA (Chemicon, MR-106-D)。

1.2 小鼠 2-细胞胚胎的收集

昆明系雌性小鼠(购自中国科学院遗传发育研究所), 22-25 g, 光控条件下饲养(12 h 光照, 12 h 黑暗)。超排鼠于下午 4:00 腹腔注射 10 IU 孕马血清促性腺激素(Pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG)(宁波第二激素厂), 48 h 后腹腔注射 10 IU 人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotrophin, hCG)(宁波第二激素厂), 随即与雄鼠合笼, 次日晨检查雌鼠阴栓, 见栓鼠在注射 hCG 后 44 h 收集输卵管 2-细胞胚胎。选取形态正常的 2-细胞胚胎, 随机分成 ETG 冷冻组、PROH 冷冻组和对照组。

1.3 胚胎冷冻与解冻

将胚胎移入 1.5 mol/L ETG/PROH 冷冻保护液中平衡 5 min, 再移入 1.5 mol/L ETG/PROH+ 0.1 mol/L 蔗糖冷冻保护液中平衡 5 min, 然后吸入 0.25 ml 塑料冷冻细管中, 放入程序冷冻仪(Cryologic Australia, CL-8000)的冷冻槽内进行冷冻降温。降温程序为: 起始温度 22℃, 以 2℃/min 的降温速度降至 -7℃, 在 -7℃ 停留 2 min 开始人工植冰, 植冰后再停留 10 min, 然后以 0.3℃/min 的速度降至 -32℃, 投入液氮保存。

胚胎解冻时, 将冻胚细管从液氮中取出, 在室温 (25℃) 空气中停留 15 s, 然后放入 35℃ 水浴解冻 10 s; 剪开细管封口, 将胚胎小心移入 1.0 mol/L PROH/ETG+ 0.25 mol/L 蔗糖解冻液中平衡 10 min; 再将胚胎移入 0.5 mol/L PROH/ETG+ 0.25 mol/L 蔗糖解冻液中平衡 10 min, 之后移入 0.25 mol/L 蔗糖液中平衡 10 min。最后将胚胎移入含 10% FCS 的 mDPBS 中洗 3 遍, 镜检。根据卵裂球完整程度将卵裂球形态正常的胚胎为存活组 (Intact embryos, IEs), 卵裂球结构部分损伤的胚胎为部分存活组 (Partial embryos, PEs), 卵裂球结构完全损伤为死亡组 (Damaged embryos, DEs), 分别统计各组胚胎数量。

1.4 胚胎体外培养及囊胚细胞计数

2-细胞胚胎解冻后, 只将形态完整的胚胎 (IEs) 移入预先平衡好的 KSOM-AA 培养液中于 CO₂ 培养箱中培养 72 h, 统计胚胎的囊胚发育率及孵化胚发育率, 并对各组扩张囊胚进行细胞计数, 作为判定囊胚质量的一个指标。囊胚计数按照 Papaioannou et al. (1988) 介绍的方法稍加修改, 将体外发育的各组囊胚分别移入 4% 多聚甲醛的无 Ca²⁺, 无 Mg²⁺ 的 PBS [PBS (-)] 液中室温固定 30 min, 然后用 PBS (-) 洗 3 次; 移入 0.5% Triton X100 (Ameresco) 的 PBS (-) 中室温穿透 15 min, 之后用 PBS (-) 洗 3 遍; 再移入 2 μg/ml 的 Hoechst 33342 中 37℃ 孵育 15 min, PBS (-) 洗 3 次后将胚胎移入载玻片上的防淬灭剂液滴中, 封片。在倒置荧光显微镜 (Olympus, IX77; CCD: diagnostic, RT Colors SPOT 2.2.1) 下观察, 计数。各组统计的囊胚数为 22–24 枚。对照组为不经冷冻的新鲜 2-细胞体外培养的囊胚。

1.5 胚胎移植

2-细胞胚胎体外培养 72 h 后, 随机选取各组囊胚移植到假孕 D4 的受体母鼠子宫角内, 每侧子宫角移植 4–8 枚胚胎。受体妊娠到期产仔时, 记录产仔率。

1.6 细胞骨架检测

2-细胞胚胎解冻后, 体外培养 1 h, 1 h 后用 4% 的多聚甲醛对各组形态完整的部分胚胎室温下固定 30 min, 然后用洗涤 3 遍, 再将胚胎移入 0.5% 的 TritonX-100 (Ameresco) 中穿透 20 min, PBS (-) 洗 3 遍后移入 5% 的 BSA 封闭 1 h, 移入 2 μg/ml 的 FITC 标记的鬼笔环肽于 4℃ 孵育过夜, 用 PBS (-) 充分洗涤 3–4 遍, 将胚胎移到 1 μg/ml 的

Hoechst33342 进行核染色, 室温下 10–15 min, 洗涤后将胚胎移入载玻片上, 封片。最后在共聚焦显微镜 (Zeiss Meta 510, USA) 下观察胚胎细胞微丝的定位及完整性。

1.7 统计分析

卵裂球完整率和囊胚细胞数以 Mean ± SE 表示。PROH 组, ETG 组和对照组的 2-细胞胚胎体外培养囊胚发育率和孵化率依据 SPSS11.5 软件 One-way ANOVA 分析, 组间差异采用 LSD 检验, *df* 表示组内自由度, 试验重复 3 次; 胚胎妊娠产仔率进行 χ^2 独立性检验。P < 0.05 表示差异显著; P < 0.01 表示差异极显著。

2 结 果

2.1 2-细胞胚胎冷冻-解冻后卵裂球完整性

对解冻后 2-细胞胚胎的形态进行划分和统计, 结果显示 PROH 组 IEs、PEs 和 DEs 所占比例分别为 59.8% ± 2.6%、21% ± 1.9%、19.2% ± 4.2%, 与 ETG 组 (51% ± 4.7%、23% ± 2.4%、26% ± 5%) 比较, 两组 IE 比例差异显著 (P < 0.05), PEs 和 DEs 差异不显著 (*t*-test, *df* = 4, P > 0.05); 但两组胚胎存活率 (IEs + PEs) 分别为 81.8% 和 74.5%, 两者比较无统计学差异 (图 1)。

2.2 2-细胞胚胎解冻后囊胚发育率和孵化率

各组胚胎解冻后只将 IEs 进行体外培养, 比较胚胎体外培养 72 h 后囊胚发育率及孵化率, 结果见图 2。结果显示采用 PROH 作为冷冻保护剂解冻后的 2-细胞胚胎发育至 4 细胞的比率 (82.7%) 和囊胚发育率 (61.2%) 要极显著地高于 ETG 组 (64.6% 和 29.1%; *df* = 8, P < 0.01), 但各组胚胎孵化率无统计差异 (One-way ANOVA, LSD 检验, P > 0.05)。

2.3 囊胚细胞计数结果

胚胎体外培养 72 h 后, 对各组囊胚进行细胞计数, 结果如图 3 所示。数据统计结果显示 PROH 组和 ETG 组囊胚细胞数目与对照组差异无统计意义 (47.6 ± 9.6、45.9 ± 9.3 vs 48.5 ± 11.5), 结果表明胚胎冷冻不会影响囊胚期的细胞数, 只要胚胎能发育至囊胚无论采用 PROH 作为冷冻保护剂还是采用 ETG, 囊胚细胞数目与对照组比较均没有显著的差异 (One-way ANOVA, LSD 检测, F = 0.261, *df* (组内) = 65, *df* (组间) = 2; P > 0.05)。

2.4 胚胎移植的效果

将试验组和对照组体外发育 72 h 的囊胚移植

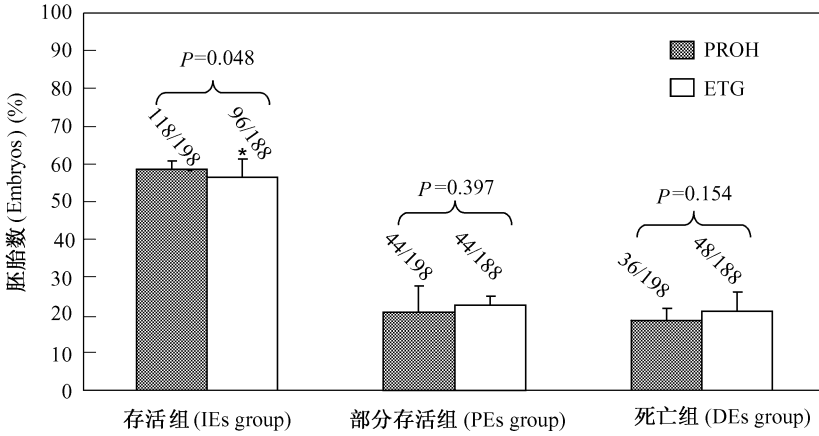


图 1 小鼠 2-细胞冷冻胚胎解冻后卵裂球完整率 (t 检验)

Fig 1 Percentage of damaged blastomeres in 2-cell stage mouse embryos frozen with PROH and ETG (t-test)

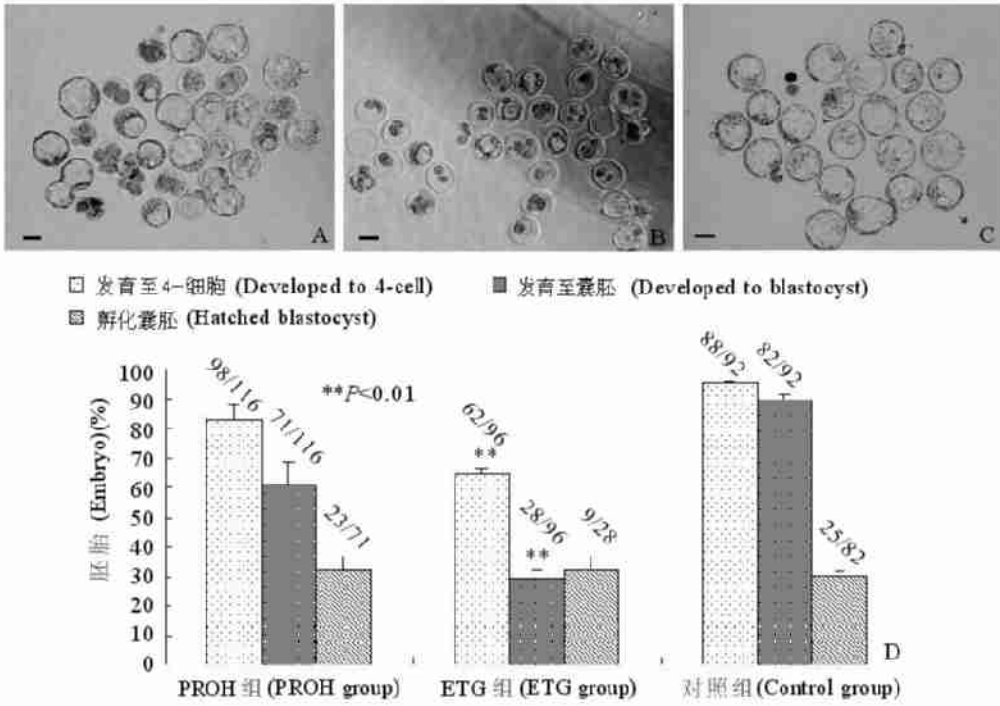


图 2 2-细胞期胚胎 PROH 冷冻组, ETG 冷冻组和对照组胚胎体外发育 72 h 后胚胎形态和发育率

A. PROH 组胚胎体外培养 72 h 后胚胎. B. ETG 组胚胎体外培养 72 h 后胚胎. C. 对照组胚胎体外培养 72 h 后胚胎. D. 各组胚胎体外培养 4 细胞发育率 (点状直方图)、囊胚发育率 (灰色直方图) 和孵化率 (斜线直方图). 标尺= 50 μm.

** 表示 ETG 组胚胎 4 细胞发育率和囊胚率与 PROH 和对照组比较差异有统计意义 (LSD 检验, P < 0.01).

Fig 2 The morphology and developmental rate of thawed two-cell embryos in PROH group, ETG group and control group after 72h culture in vitro

A. PROH group embryos after 72 culture in vitro. B. ETG group embryos after 72 h culture in vitro. C. Control group embryos after 72 h culture in vitro. D. Histogram of dot, histogram of gray and histogram of oblique showing the rate of 4 cell, blastocyst and hatched blastocyst respectively. Bar= 50 μm.

** Represent significant difference of ETG group compared to PROH group and control group (LSD test of One-way ANOVA, P < 0.01).

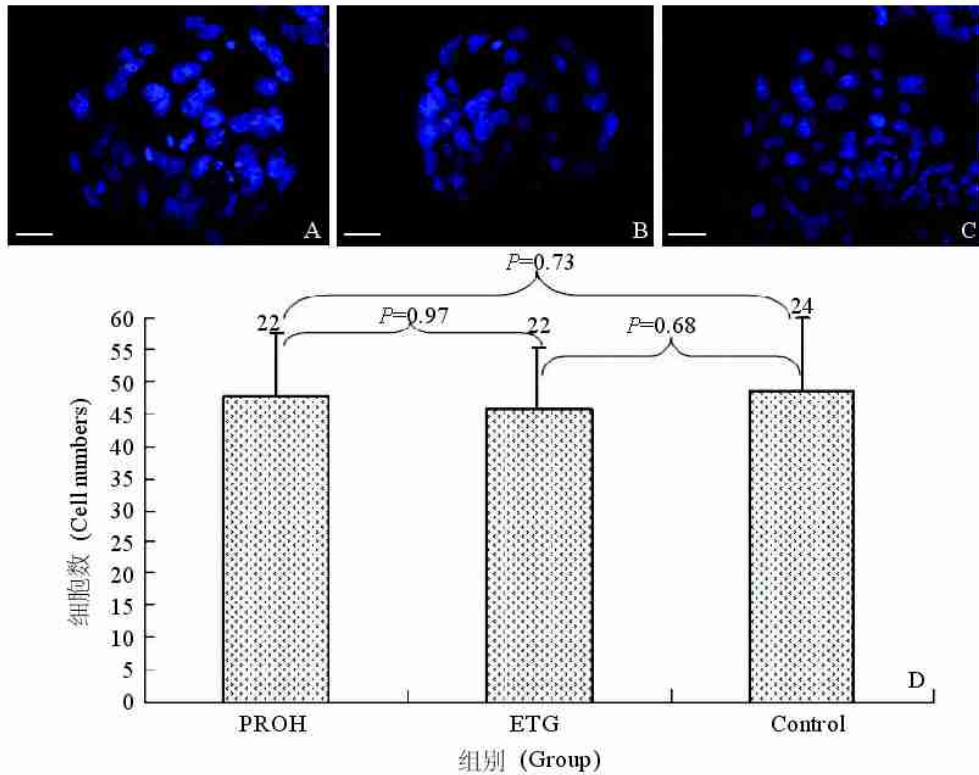


图3 PROH 冷冻组, ETG 冷冻组和对照组胚胎体外培养 72 h 后囊胚的细胞总数 (Mean±SD)

三组之间比较差异无统计学意义 (LSD 检验, $P > 0.05$)。A. PROH 组囊胚。B. ETG 组囊胚。C. 对照组囊胚。D. 三组囊胚细胞数的统计图。标尺= 20 μm。

Fig 3 The number of cells in a blastocyst after 72 h culture in PROH, ETG and control group (Mean±SD)

No significant difference was observed among different groups (LSD-test, $P > 0.05$). A. A blastocyst of PROH group. B. A blastocyst of ETG group. C. A blastocyst of Control group. D. Histograms showing the number of cells of blastocysts in each group. Bar= 20 μm.

到假孕母鼠子宫角内。PROH 组移植胚胎数为 36 枚, 受体鼠为 3 只, 2 只妊娠, 产仔 7 只; ETG 组移植胚胎数为 17 枚, 2 只受体鼠都妊娠, 产仔 4 只; 两试验组妊娠产仔率比较差异不显著 (χ^2 -test, $df = 2$, $P = 0.585$), 但显著地低于对照组妊娠产仔率 (χ^2 -test, $df = 4$, $P < 0.05$), 结果见表 1。

表 1 2-细胞胚胎冻后体外培养 72 h 的囊胚移植结果

Table 1 Developmental competence of blastocysts derived from two-cell embryos after 72 h culture *in vitro* proceeded by cryopreservation and thawing

组别 Group	受体 Number of recipient	移植胚胎 Number of transferred embryo	妊娠受体数 Number of pregnancy recipient	妊娠受体移植胚胎数 Number of transferred embryo of pregnancy recipient	胚胎成仔率 Rate of embryo developed to term
PROH	3	36	2	26	26.9% (7/26) ^a
ETG	2	17	2	17	23.5% (4/17) ^a
Control	3	34	3	34	32.4% (11/34) ^b

同一栏内不同的上标字母表示差异显著 (χ^2 -检验, $P < 0.05$)。

Different superscripts in the same column denote significant difference (χ^2 -test, $P < 0.05$).

2.5 2-细胞胚胎冻后细胞骨架完整性检测结果

2-细胞胚胎解冻后, 对其微丝蛋白在卵裂球内的分布进行免疫荧光定位检测 (图 4)。

在图 4.A 中, 共聚焦显微镜扫描结果显示细胞骨架完整的胚胎微丝均匀地分布于细胞的皮质区, 在两个卵裂球连接处微丝蛋白的分布丰富; 而

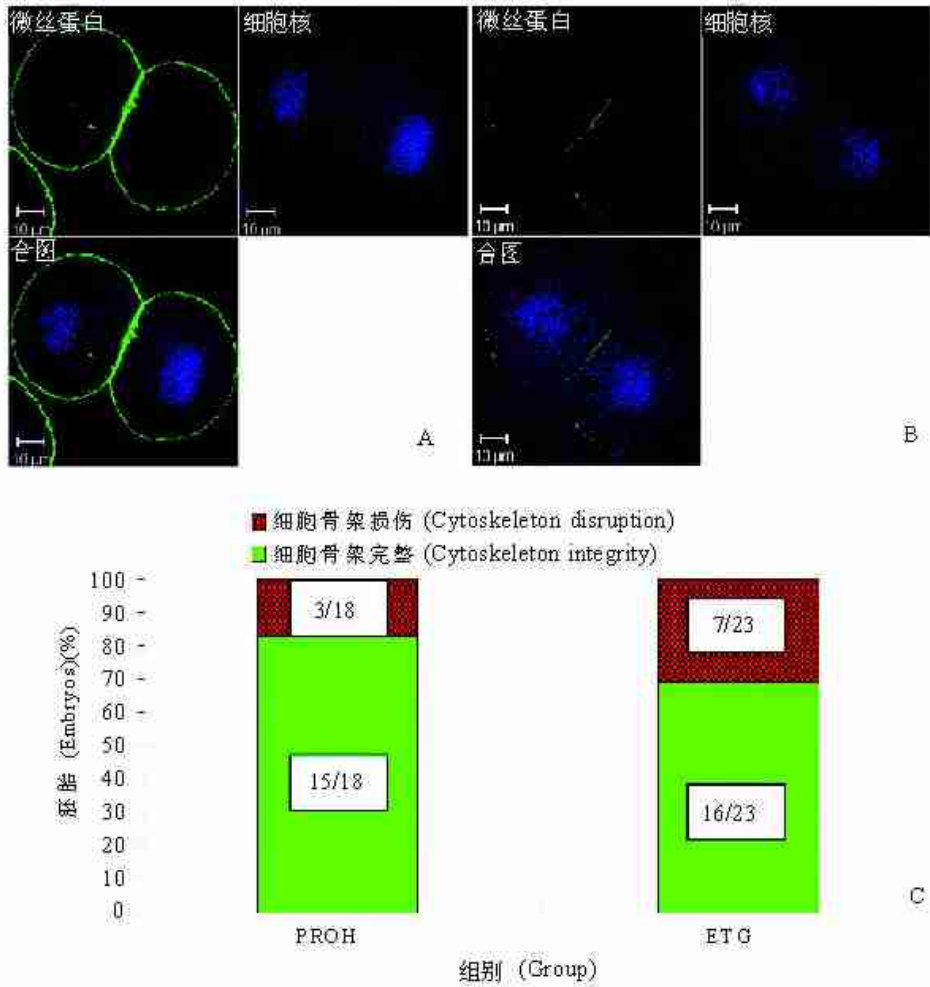


图 4 比较 PROH 组和 ETG 组 2-细胞胚胎解冻后细胞骨架完整性

所有图像均在同一个参数下进行扫描。A. 细胞骨架完整的胚胎。B. 细胞骨架受损的胚胎。C. 细胞骨架完整与不完整胚胎所占比例。标尺= 10 μm。

Fig 4 Effect of freezing on the cytoskeleton distribution of mouse embryos

Confocal images were made at the same optical parameter. A. an embryo of cytoskeleton integrity. B. an embryo of cytoskeleton disruption. C. the percentage of embryos between cytoskeleton integrity or not. Bar= 10 μm.

细胞骨架遭受破坏的胚胎微丝蛋白着色不均匀, 蛋白表达也非常弱 (图 4B)。图 4C 显示的是 PROH 组和 ETG 组细胞骨架完整和不完整胚胎所占的比例。结果显示 ETG 组细胞骨架受损的胚胎数要高于 PROH 组。

3 讨论

PROH 和 ETG 在化学结构和某些化学特性相似, 针对它们同属于醇类且分子量和化学性质 (细胞高渗透性和低毒性) 相似的特点, 本试验比较了这两种保护剂对小鼠 2-细胞胚胎冷冻效果。结果表明采用 PROH 作为冷冻保护剂对小鼠 2-细胞胚胎冷冻保存时, 解冻后 2-细胞胚胎发育为 4 细胞胚胎的

比率和囊胚发育率要显著地高于 ETG 组, 结果与 Emiliani et al. (2000) 对小鼠合子冷冻的结果基本一致。但从解冻后卵裂球完整性统计中可以发现 PROH 组胚胎解冻后存活率与 ETG 组存活率并无显著的差异, 与 Bafrani et al. (2003) 研究小鼠受精卵冷冻时的结果不一致。有趣的是虽然两试验组胚胎解冻后存活率无显著差异, 但 PROH 组 4 细胞胚胎发育率和囊胚率却极显著地高于 ETG 组。这一结果提示解冻后两试验组胚胎虽然在细胞形态上和存活率上无差别, 但可能是由于胚胎细胞内一些器官发生了致命的损伤, 从而引起 ETG 组多数胚胎停滞发育。

胚胎冻存后不可避免地会对细胞造成一定的伤

害,而影响胚胎冷冻后不发育的原因很多,即冷冻保存对胚胎的损伤是全方位的。冷冻可能引起胚胎透明带(ZP)收缩(Garrisi et al., 1992),破坏细胞骨架结构(Dobrinisky, 2001),损伤细胞膜和细胞内部结构的完整性(Yildiz et al., 2007),线粒体代谢失活(Coticchio et al., 2005),染色体异常等(Khalifa et al., 2008)。其中细胞骨架损伤是冷冻保存最常见的,而细胞骨架对于维持细胞的形态结构及内部结构的有序性起着关键作用,在细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递和细胞分化等方面也发挥了重要的功能(Grain, 1986)。有研究表明低温冷冻保存会引起细胞骨架的形态发生改变(Vincent and Johnson, 1992),胚胎解冻后1 h后微管和微丝的形态虽基本能恢复正常,但是仍有部分胚胎细胞骨架严重受损,影响其后胚胎的分裂及进一步的发育(Dobrinisky et al., 2000)。Tharasanit et al. (2005) 研究发现低温冷存后会严重影响马囊胚细胞微丝骨架的完整性。尽管前期的多数研究都表明冷冻保存会造成细胞微丝骨架蛋白受损,但并不是所有的胚胎都有微丝的损伤。本试验对解冻后的胚胎进行微丝免疫荧光定位检测,并统计PROH组和ETG组胚胎微丝骨架的损伤比例,结果显示两个试验组胚胎都存在细胞骨架的损伤,但数据统计可知ETG组细胞骨架受损的胚胎数要显著地高于PROH组。因此,细胞骨架分析结果表明本试验ETG对2-细胞胚胎冷冻保存效果显著低于PROH其主要原因在于胚胎细胞骨架损伤的情况要显著地高。

评价某种冷冻解冻程序及冷冻保护剂是否成功的标准是解冻后的胚胎能否发育为一个完整的个体。为了进一步比较两种冷冻保护剂对小鼠2-细胞胚胎的冷冻效果,本试验将体外发育72 h后的囊胚进行子宫移植,结果显示冷冻胚胎能够在受体母鼠子宫中发育,并能形成正常的个体。尽管PROH冷冻组胚胎囊胚发育率要显著地高于ETG,但两种冷冻保护剂胚胎移植后妊娠产仔率无统计上的差异。结果表明冻存胚只要能发育到囊胚,不管采用PROH还是ETG作为冷冻剂,两组胚胎移植后产仔率无显著差异。本研究结果表明采用PROH作为冷冻保护剂对小鼠2-细胞胚胎冷冻保存效果要显著优于ETG。

参考文献 (References)

Bafrani HH, Salsabil N, Pasbakhsh P, Hassani H, Movahedin M, Aftarihi

T, Akbari F, Keshavarz M, 2003. Comparison of 1, 2-propanediol and ethylene glycol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes and their subsequent development. *J. Assist. Reprod. Genet.* 20 (6): 234–240.

Boldt J, Cline D, McLaughlin D, 2003. Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Hum. Reprod.* 18 (6): 1250–1255.

Cao YJ, Fan XJ, Shen Z, Ma BH, Duan EK, 2007. Nitric oxide affects preimplantation embryonic development in a rotating wall vessel bioreactor simulating microgravity. *Cell Biol. Int.* 31 (1): 24–29.

Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, Tsai YY, Yang YS, 2005. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1, 2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Hum. Reprod.* 20 (7): 1975–1980.

Coticchio G, Boni MA, Bianchi V, Flamigni C, Borini A, 2005. Criteria to assess human oocyte quality after cryopreservation. *Reprod. Biomed. Online* 11 (4): 421–427.

Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira SJ, Barros A, 2004. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Hum. Reprod.* 19 (2): 300–305.

Dobrinisky JR, 2001. Cryopreservation of pig embryos: adaptation of vitrification technology for embryo transfer. *Reprod. Suppl.* 58: 325–333.

Dobrinisky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA, 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 62 (3): 564–570.

Emiliani S, Van BM, Vanrin AS, Biramane J, Englert Y, 2000. Comparison of ethylene glycol, 1, 2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum. Reprod.* 15 (4): 905–910.

Furusawa T, Kotani E, Ihida M, Sugimura Y, Yamanaka H, Takahashi S, Fukui M, Kogure K, Sakaguchi B, Fujii H, Ikenaga M, Watanabe T, 2001. Embryonic development in the eggs of the silkworm *Bombyx mori* exposed to the space environment. *Biol. Sci. Space* 15 (Suppl.): 177–182.

Garrisi GJ, Talansky BE, Sapira V, Gordon JW, Navot D, 1992. An intact zona pellucida is not necessary for successful mouse embryo cryopreservation. *Fertil. Steril.* 57 (3): 677–681.

Grain J, 1986. The cytoskeleton in protoists: nature, structure, and functions. *Int. Rev. Cytol.* 104: 153–249.

Khalifa TA, Rekkas CA, Lymberopoulos AG, Sioga A, Dimitriadis I, Papanikolaou T, 2008. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 104 (2–4): 143–163.

Lei XH, Cao YJ, Duan EK, Ma BH, 2008. Permeability and toxicity of four cryoprotectants on 2-cell embryo in the mouse. *Acta Zoologica Sinica* 54 (4): 725–732 (In Chinese).

Magli MC, Gianaroli L, Fortini D, Ferraretti AP, Munne S, 1999. Impact of blastomere biopsy and cryopreservation techniques on human embryo viability. *Hum. Reprod.* 14 (3): 770–773.

Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M, 1998. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum. Reprod.* 13 (10): 2874–2879.

Papaioannou VE, Ebert KM, 1988. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. *Development* 102 (4): 793–803.

Shaw JM, Ward C, Trounson AO, 1995. Evaluation of propanediol, ethylene

- glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. *Hum. Reprod.* 10 (2): 396-402.
- Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TA, 2005. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. *Reproduction* 129 (6): 789-798.
- Van WL, den DJ, Rall WF, 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology* 48 (7): 1071-1084.
- Vincent C, Johnson MH, 1992. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 14: 73-100.
- Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L, McKelvie C, 2007. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, *in vitro* fertilization, and *in vitro* embryo development in the mouse. *Reproduction* 133 (3): 585-595.
- 雷晓华, 曹宇静, 段恩奎, 马保华, 2008. 四种冷冻保护剂对小鼠 2-细胞渗透性和毒性作用的比较. *动物学报* 54 (4): 725-732.