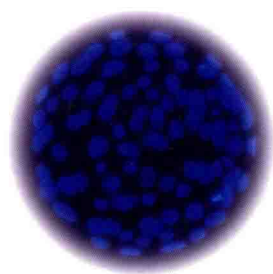




生命科学前沿及应用生物技术



动物配子与胚胎冷冻 保存原理及应用 (第二版)

侯云鹏 周光斌 傅祥伟 主编
朱士恩 主审



科学出版社

生命科学前沿及应用生物技术

动物配子与胚胎冷冻 保存原理及应用

(第二版)

侯云鹏 周光斌 傅祥伟 主编
朱士恩 主审

科学出版社

北京

内 容 简 介

动物配子与胚胎冷冻保存是生命科学领域的重要组成部分,是为开展动物生物技术研究提供充足细胞来源不可或缺的基本保障。本书共分5章,内容包括:动物配子与胚胎冷冻保存原理、胚胎冷冻、生殖细胞(卵母细胞与精子)冷冻、卵巢组织与干细胞(胚胎干细胞、诱导多能性干细胞、精原干细胞和脐带血造血干细胞)冷冻等。书中对近年来超低温冷冻保存原理、技术进展、实验方法及专利等均有较详细的介绍,是一本集动物配子、胚胎、卵巢组织、干细胞冷冻保存原理与应用为一体的系统专著。

本书对从事相关领域的教学和科研工作人员具有理论指导作用和实践参考价值,适合于大专院校和科研院所从事生殖生物学、低温生物学、动物胚胎学、发育生物学、细胞生物学和临床医学等相关研究的师生和科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用/侯云鹏,周光斌,傅祥伟主编. —2版.
—北京:科学出版社,2016.11
ISBN 978-7-03-050203-2

I. ①动… II. ①侯… ②周… ③傅… III. ①动物-配子 ②动物-冷冻胚胎 IV. ①Q954.4 ②S814.8

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第245391号

责任编辑:王海光 李秀伟 / 责任校对:张怡君
责任印制:肖 兴 / 封面设计:刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京通州皇家印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012年2月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2016年11月第 二 版 印张:19 插页:6

2016年11月第二次印刷 字数:425 000

定价:128.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》(第二版)

编委会名单

主 编

侯云鹏 中国农业大学
周光斌 四川农业大学
傅祥伟 中国农业大学

副主编

李俊杰 河北农业大学
吴国权 云南省畜牧兽医科学院
王彦平 北京奶牛中心
史文清 北京市畜牧总站
余文莉 北京安伯胚胎生物技术中心

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 亮	王彦平	田树军	史文清	权国波	任 康
刘 颖	刘 聪	刘 霖	刘爱菊	刘满清	闫长亮
闫荣格	杜 明	李秀伟	李树静	李俊杰	杨中强
杨其恩	吴国权	吴通义	余文莉	张清靖	张瑞娜
阿布力孜·吾斯曼	范志强	岳明星	周光斌	周艳华	
房 义	孟庆刚	侯云鹏	洪琼花	袁佃帅	莫显红
索 伦	贾宝瑜	徐振军	程柯仁	傅祥伟	曾 艳

主 审

朱士恩 中国农业大学

《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》(第一版)

编委会名单

主 编

朱士恩 中国农业大学

副主编

周光斌 四川农业大学

侯云鹏 中国农业大学

李俊杰 河北农业大学

傅祥伟 中国农业大学

史文清 北京市畜牧兽医总站

余文莉 北京安伯胚胎生物技术中心

范志强 中国农业大学

编 委

朱士恩	周光斌	侯云鹏	李俊杰	傅祥伟	史文清
余文莉	范志强	吴国权	王 亮	杜 明	贾宝瑜
吴通义	田树军	李树静	洪琼花	孟庆刚	权国波
索 伦	李秀伟	裴 燕	王彦平	张清靖	杨其恩
赵学明	刘 颖	任 康	阿布力孜·吾斯曼		徐振军
曾 艳	刘 霖	王晓旭	周艳华	杨中强	闫长亮
梁 莹	莫显红	程柯仁	郑天威	袁佃帅	胡麦顺
岳明星	夏 威	房 义	周 崇	谭鸿明	金 方
刘满清	唐国梁	付静涛	胡辛怡	杨宏远	李 松

序

随着低温生物学研究的逐步深入,动物配子与胚胎超低温冷冻不断取得新进展,例如:1985年小鼠胚胎玻璃化冷冻保存技术的发明,推动了以牛为代表的家畜胚胎生物技术的产业化应用,美国和加拿大约有70%的牛胚胎被用来冷冻;我国于2002年获得世界首例来源于玻璃化冷冻卵母细胞的克隆牛;英国PIC公司已攻克猪精液冷冻保存技术,并将其大规模应用于跨区域联合育种;1986年世界上出现第一例人解冻卵子妊娠分娩,目前,全世界靠冻卵技术出生的孩子有2000多例。这些成果展现了该项技术不仅在实验研究和畜牧业生产中发挥了重要作用,而且在人类医学上也具有广阔的应用前景。

本团队20年来一直从事动物配子与胚胎冷冻保存方面的科研与教学工作,不论是理论水平还是实践经验,均能与国际接轨,在国内外相关刊物上发表了多篇有学术价值的科研论文,并取得了丰硕的研究成果。《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》(第二版)一书即是在此基础上编写而成的。综观整体,本书具有如下特色:①系统性强,全书以动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用技术为主线,系统介绍了包括家畜、实验动物、人类和鱼类配子与胚胎冷冻保存原理及基本操作方法。②内容新颖,全书较为全面地阐述了动物配子与胚胎冷冻保存在国内外的最新方法、研究成果及其前景。③图文并茂,全书收录了大量图片,力争简明扼要、生动直观地勾勒出一些基本原理和操作方法。希望本书的问世能为农业和综合性院校及科研院所从事动物繁殖学、低温生物学、生殖生物学、发育生物学、动物胚胎学、细胞生物学及人类临床医学等相关专业的师生及科技人员提供重要理论与技术参考。

第二版与第一版相比,增加了近年来国内外研究的新热点,如牛胚胎玻璃化冷冻管内解冻和直接移植、牛性控精液冷冻、诱导多能性干细胞冷冻和精原干细胞的冷冻、配子与胚胎冷冻在人类辅助生殖中的应用,同时还补充了一些实践中应用广泛的操作程序,这些知识的补充为本书增色不少。

《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》一书的再版将对我国动物繁殖与人类辅助生殖生物技术相关学科的教学和科研发挥重要作用。

朱士恩

中国农业大学教授

2016年8月

第二版前言

本书第一版 2011 年 8 月定稿，2012 年 2 月出版。近几年，动物配子与胚胎超低温冷冻发展较快，应广大读者要求，同时为修订第一版中存在的不足，我们决定将《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》一书修订再版，使之更加完善。

第二版对各个章节的内容都进行了更新和补充，着重更新了胚胎冷冻在人类辅助生殖中的应用，另外增加了性控精液冷冻、诱导多能性干细胞冷冻和精原干细胞的冷冻，以及牛胚胎玻璃化冷冻管内解冻和直接移植。各章编写内容与具体分工如下：绪论（朱士恩）；第一章配子与胚胎冷冻保存原理及方法概论（侯云鹏、李俊杰、朱士恩）；第二章动物早期胚胎冷冻保存（傅祥伟、余文莉、周艳华、莫显红等）；第三章动物卵母细胞冷冻保存（吴国权、田树军、史文清、刘颖等）；第四章动物精液冷冻保存（王彦平、贾宝瑜、杜明、范志强等）；第五章动物卵巢组织与干细胞冷冻保存（周光斌、权国波、索伦、杨其恩等）；国内相关专利（吴通义）；英汉词语对照（吴国权）。

本书成功再版是与广大编委的努力分不开的，是集体智慧的结晶。在此，对在书稿的编写与校对工作中付出辛勤劳动的编者们的表示衷心的感谢！对给予本书出版大力支持的科学出版社表示衷心的感谢！

尽管我们在编写工作中团结协作，兢兢业业，尽了最大努力，但限于编者的知识面和水平，书中仍难免会存在不妥之处，恳请广大读者批评指正，以便在今后的修订中加以改进。

编著者
2016 年 8 月

第一版前言

动物配子与胚胎的冷冻保存技术是现代生物技术的重要组成部分,在畜牧学、生命科学及临床医学等领域发挥着越来越重要的作用。鉴于动物配子与胚胎冷冻保存日益显著的地位,此方面的研究与开发已经成为研究热点与焦点,国内外越来越多的科技工作者开始或正在从事此方面的工作,某些方面已经取得了显著的成果。但是目前国内外关于动物配子与胚胎冷冻保存的书籍甚少,虽然在有些书籍中涉及此方面的内容,但是范围比较窄,阐述得比较浅,难以全面体现动物配子与胚胎冷冻保存技术的知识体系。更重要的是,至今我国还未曾出版动物配子与胚胎冷冻保存相关的专门书籍。鉴于上述原因,在我国急需一部能全面且系统地反映动物配子与胚胎冷冻保存基本原理、技术方法和最新进展的书籍,以供广大的教学和科研工作者参考。因此,为满足上述领域教学、科研和生产的发展需要,特编写了《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》一书献给广大读者。

2009年5月首先由主编朱士恩召集编写人员充分酝酿,在广泛征求意见的基础上,拟定了《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》编写大纲初稿,并于2009年8月1~2日在中国农业大学召开了编委会会议。出席此次会议的有来自全国各地的编委及在校研究生共计30余人,会上编委们围绕着编写大纲展开了热烈讨论,经认真修订,最终完成了《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》编写大纲,确定了编委,对章节内容进行详细分工,并统一了编写要求。在各自完成初稿撰写的基础上,于2010年10月6~7日在中国农业大学召开了《动物配子与胚胎冷冻保存原理及应用》审稿会,对撰写的初稿进行审查,并对写作格式、内容、参考文献等进行规范和统一。2011年5月7~16日再次召开书稿审定会,会上对各部分内容进行了审定、查重和删减,采用分章负责制进行统稿和修订,决定第一章由侯云鹏、李俊杰负责;第二章由傅祥伟、孟庆刚、吴国权、周光斌负责;第三章由吴国权、周光斌和李俊杰负责;第四章由杜明、贾宝瑜负责;第五章由周光斌负责。2011年7月8~25日召开了最终书稿审定会,会上通读书稿,逐句修改,朱士恩主编及主要编委重点对修订后的章节进行讨论,经充分润色、完善,达成一致意见后定稿,并决定交由科学出版社出版。

本书共分五章,各章编写内容与具体分工如下:绪论(朱士恩);第一章配子与胚胎冷冻保存原理与方法概论(侯云鹏、李俊杰、朱士恩);第二章动物早期胚胎冷冻保存(傅祥伟、孟庆刚、吴国权、余文莉、朱士恩等);第三章动物卵母细胞冷冻保存(吴国权、周光斌、李俊杰、王亮、史文清、田树军等);第四章动物精液冷冻保存(杜明、贾宝瑜、范志强等);第五章动物组织材料冷冻保存(周光斌、权国波、索伦);国内外相关专利(吴通义);中英文缩略语对照(吴国权)。

本书的编写在注重系统性的同时,突出了一个“新”字,共查阅了国内外参考文献上千篇(部),综述了国内外的最新研究方法、成果和进展;同时为达到图文并茂的效

果，全书插图 45 幅。

为使读者查阅方便，将动物配子与胚胎冷冻保存主要专业名词的中英文对照和国内外相关专利附于正文后。

本书得以与读者及时见面，是与广大编委的努力分不开的，是集体智慧的结晶。在此，首先对在书稿的编写与校对工作中付出辛勤劳动的编者们表示衷心的感谢！对中国科学院吴常信院士为本书作序表示衷心感谢！对给予本书出版大力支持的科学出版社表示衷心的感谢！

尽管我们在编写工作中团结协作，兢兢业业，尽了最大努力，但由于作者掌握的知识面和水平有限，而本研究领域发展又极为迅速，许多方面跟不上时代的要求，书中仍难免会存在不妥之处，恳请广大读者批评指正，以便再版时加以补充和修订。

编著者

2011 年 8 月

目 录

序	
第二版前言	
第一版前言	
绪论	1
第一章 配子与胚胎冷冻保存原理及方法概论	2
第一节 配子与胚胎冷冻保存的意义与发展概况	2
一、精液冷冻保存的意义与发展概况	2
二、卵母细胞冷冻保存的意义与发展概况	3
三、胚胎冷冻保存的意义与发展概况	5
第二节 配子与胚胎冷冻保存原理	7
一、精液冷冻保存原理	8
二、卵母细胞与胚胎冷冻保存原理	9
第三节 配子与胚胎冷冻保存方法	19
一、冷源及容器	19
二、抗冻保护剂	21
三、精液冷冻保存方法	23
四、卵母细胞与胚胎冷冻保存方法	25
参考文献	37
第二章 动物早期胚胎冷冻保存	46
第一节 家畜	46
一、胚胎生物学特性	46
二、冷冻对胚胎细胞及亚细胞结构的影响	47
三、家畜胚胎冷冻保存研究进展	48
四、实验操作程序	53
第二节 啮齿类实验动物	58
一、胚胎生物学特性	58
二、啮齿类胚胎冷冻保存研究进展	58
三、实验操作程序	61
第三节 灵长类动物	65
一、灵长类动物胚胎冷冻保存研究进展	65
二、灵长类动物胚胎冷冻保存的安全性	68

三、问题与展望	69
四、实验操作程序	69
参考文献	73
第三章 动物卵母细胞冷冻保存	84
第一节 家畜	84
一、卵母细胞生物学特性	84
二、猪卵母细胞冷冻保存研究进展	86
三、牛卵母细胞冷冻保存研究进展	90
四、羊卵母细胞冷冻保存研究进展	94
五、问题与展望	98
六、实验操作程序	98
第二节 啮齿类实验动物	111
一、小鼠卵母细胞生物学特性	111
二、卵母细胞冷冻损伤	112
三、卵母细胞冷冻保存方法改进	119
四、问题与展望	121
五、实验操作程序	122
第三节 灵长类动物	126
一、卵母细胞生物学特性	126
二、灵长类动物卵母细胞冷冻保存研究进展	127
三、实验操作程序	134
参考文献	136
第四章 动物精液冷冻保存	153
第一节 家畜	153
一、精子的生物学特性	153
二、牛精液冷冻保存研究进展	154
三、羊精液冷冻保存研究进展	157
四、猪精液冷冻保存研究进展	160
五、实验操作程序	163
第二节 灵长类动物	169
一、人和猴精子的生物学特性	170
二、人精液冷冻保存研究进展	171
三、猴精液冷冻保存研究进展	174
四、实验操作程序	177
第三节 小鼠	186
一、小鼠精子的生物学特性	186
二、小鼠精液冷冻保存研究进展	187

三、实验操作程序.....	190
第四节 鱼类.....	191
一、鱼类精子生物学特性.....	192
二、鱼类精液冷冻保存研究进展.....	192
三、实验操作程序.....	195
参考文献.....	199
第五章 动物卵巢组织与干细胞冷冻保存.....	213
第一节 哺乳动物卵巢组织.....	213
一、卵巢组织冷冻保存研究.....	213
二、实验操作程序.....	215
第二节 脐带血造血干细胞.....	223
一、脐带血造血干细胞生物学特性.....	223
二、脐带血造血干细胞冷冻保存研究进展.....	224
三、实验操作程序.....	226
第三节 胚胎干细胞和诱导多能性干细胞.....	228
一、胚胎干细胞和诱导多能性干细胞生物学特性.....	228
二、胚胎干细胞和诱导多能性干细胞检测.....	230
三、胚胎干细胞冷冻保存研究进展.....	232
四、实验操作程序.....	234
第四节 精原干细胞.....	240
一、精原干细胞生物学特性.....	240
二、精原干细胞检测.....	241
三、精原干细胞冷冻保存研究进展.....	242
四、实验操作程序.....	242
参考文献.....	247
附录 I 在中国申请的低温保存专利.....	256
附录 II 英汉词语对照.....	284
图版	

绪 论

动物配子与胚胎超低温冷冻是生命科学的重要组成部分,是研究其长期保存不可或缺的生物技术。在超低温条件下,动物配子或胚胎的新陈代谢和分裂暂时停止,一旦恢复到正常温度,又能继续发育。

近年来,受疫病和人类活动及环境破坏的影响,全球物种灭绝的速度已远远超越了新物种的进化速度。有资料表明,全球 6165 个畜禽品种中,有 12%已经灭绝,8.16%濒临灭绝,17.71%已成为濒危动物,因此,各国政府对动物遗传种质资源的保护均给予了高度重视。但活体保种因维持成本高、突发自然灾害(疫病、火灾、洪水、干旱等)等原因,很难实现对全部濒危物种的有效保存。随着生物技术的快速发展,配子与胚胎冷冻保存正逐步成为替代活畜保种的最有效方式,许多国家建立了遗传种质资源库,即“精子库”、“卵子库”、“胚胎库”和“干细胞库”等。据美国农业部统计,冷冻精液人工输精技术的实施对美国奶牛群体遗传改良的贡献率高达 97%;美国胚胎移植学会统计数据表明,2008 年美国有 97%以上的牛胚胎移植均采用冷冻胚胎。人类医学上,配子与胚胎的冷冻保存可以用来保存青年夫妇的生殖潜力,从而避免了因老化或疾病而导致的生育能力下降或丧失。以人卵母细胞为例,自 1986 年以来,全球范围内利用冷冻卵母细胞出生婴儿数逐年增加,全世界靠冻卵技术出生的孩子有 2000 多例。

总之,配子与胚胎冷冻保存技术在畜牧生产和临床医学上发挥了重要作用,应用前景广阔。但是,我们必须充分地认识到,可在畜牧业生产中得到广泛应用和推广的目前只有牛冷冻精液和牛冷冻胚胎,其他动物配子与胚胎的冷冻保存仍存在这样或那样的问题,与实际应用还有一定的距离,需要进一步深入研究。

本书对以上问题进行分析归纳,内容主要包括:慢速冷冻和玻璃化冷冻保存原理;动物配子、胚胎及部分生殖干细胞的超低温冷冻保存的研究进展、实验操作方法及专利。本书共分 5 章。第一章,系统阐述了动物配子与胚胎冷冻保存的意义、原理、发展概况及抗冻保护剂的种类等。第二章,主要讲述了家畜(猪、牛、羊)、啮齿类动物(小鼠)、灵长类动物(猕猴和人)的胚胎生物学特性、超低温冷冻研究进展及实验操作程序。第三章,主要讲述了家畜、啮齿类动物、灵长类动物的卵母细胞生物学特性、超低温冷冻研究进展及实验操作程序。第四章,主要讲述了家畜、啮齿类动物、灵长类动物和低等模式生物(如斑马鱼等)的精子生物学特性、超低温冷冻研究进展及实验操作程序。第五章,主要讲述了动物卵巢组织、脐带血造血干细胞、胚胎干细胞、诱导多能性干细胞和精原干细胞超低温冷冻的研究进展及实验操作程序。

(朱士恩)

第一章 配子与胚胎冷冻保存原理及方法概论

配子和胚胎的冷冻保存，是指将配子（精子和卵子）和胚胎保存于超低温状态下，使细胞新陈代谢和分裂速度减慢或停止，一旦恢复正常生理温度又能继续发育。该技术对于畜牧生产、动物遗传资源保存、配子与胚胎生物技术研究，以及人类辅助生殖技术的开展均具有重要意义。

第一节 配子与胚胎冷冻保存的意义与发展概况

一、精液冷冻保存的意义与发展概况

（一）意义

1. 充分提高优良种公畜的利用率

近年来，随着人工授精技术的推广与普及，精液的长效保存显得尤为必要。一方面，它可以最大限度地提高优良种公畜的利用效率，保证群体母畜的定期配种需要；另一方面，人工授精技术与精液冷冻保存技术相结合，对于加快畜群品种改良步伐，推进育种工作进程具有重要意义。

2. 便于开展国际间种质交流

精液冷冻保存技术使优良种公畜的种质资源在国际间的广泛交流成为可能，避免了活畜引种带来的高额费用和疫病传播。

3. 使发情母畜配种不受时间与地域的限制

由于我国畜牧业规模化程度较低，多为农户散养，很难实现集约化养殖的同期发情和集中配种，而精液冷冻保存技术使优良种公畜在规模化程度低的养殖场的利用成为可能。

4. 建立动物精液基因库

即建立“精子库（sperm bank）”。近年来随着全球生态环境的变化及人类活动的影响，大量珍稀及地方优良畜禽品种处于灭绝或濒临灭绝状态，动物保种刻不容缓，然而目前常用的活体保种因成本高、效率低、疫病高发等原因，很难实现对所有品种的有效保存，而“精子库”的建立为上述品种的长效保存提供了可能。在人类医学领域，“精子库”的建立使那些因患病必须应用某些药物、放射或手术治疗，而产生绝育影响者，或因某种职业（如接触放射物质）而影响生育者，可预先贮藏精液备用。

5. 防止疾病的传播

家畜通过交配传播的疫病很多，在自然交配情况下，家畜因交配被传染上疾病的机会很大，但冷冻精液的应用使公母畜不接触，大大减少了公母畜交互传播疾病的概率。

在人类医学领域,20世纪80年代,人们认识到艾滋病(AIDS)可以通过精液传播的危险性,由于确诊艾滋病的主要依据是化验血中是否存在艾滋病抗体,并且绝大部分人感染艾滋病后,均会在半年内产生抗体,因此,为了保证人工授精的安全性,大多数国家禁止使用新鲜精液,强制使用冻存6个月以上的精子(滕若冰,2010)。

(二) 发展概况

精子低温保存的历史始于18世纪末19世纪初,研究人员偶然发现将人精液埋藏于冰雪中,在0℃以下的严寒环境下保存,用适当方法复温后,竟然某些精子仍然存活,但这一发现当时并未引起人们的重视。1886年,Mouteyazza在-15℃的条件下冻存精子取得成功,并首次提出“精子库”的概念(滕若冰,2010)。但由于当时条件所限,低温冷冻的精子大多死亡,其冻存精子复苏后未能取得理想的效果,难以达到实际应用程度。

1949年精液冷冻技术出现重大突破,Polge等用含甘油(丙三醇)的稀释液在乙醇干冰中冷冻鸡精液,发现可使精子保持原活率,树立了低温生物学发展的里程碑。1951年Stewart报道,用甘油冷冻牛精液且输精后一头犊牛出生了。1954年,Bunge和Sherman首次报道用甘油作保护剂,用干冰(-79℃)为制冷源,将冷冻精液用于临床人工授精,获得世界上第一例冷冻精液人工授精的婴儿。随后以甘油作为抗冻保护剂,成功冷冻保存了大鼠和猪的精液(Wilmot and Polge, 1977)。但是,该项技术在实践中大量应用是在20世纪60年代中期以后,而且仅限于牛。20世纪70年代以来,美国、加拿大、澳大利亚等一些畜牧业发达国家牛冷冻精液利用率已达100%。目前我国奶牛冷冻精液的使用率也已达100%,冷冻精液人工授精总受胎率可达85%~95%。尽管其他畜禽及野生动物冷冻精液的研究进展也很快,但受胎率偏低,目前仍处于试验或中试阶段。此外,冻干法在精子保存方面也得到逐步应用,该方法的优点是贮存和运输过程中不需要液氮或干冰,从而降低了相关费用。但缺点是造成了精子膜的破坏,精子部分甚至完全失去了运动能力和活力,必须借助胞质内单精子显微注射(ICSI)完成授精。目前利用冻干法保存的精子获得了后代(Gil et al., 2014; Hochi et al., 2004)。

近年来,大量研究集中于如何避免冷冻过程中冰晶的形成(Naik et al., 2005; Fuller, 2004; Holt, 2003),研究人员已从适应寒冷环境的真菌、细菌、昆虫和鱼体内发现了抗冻蛋白(Rubinsky et al., 1991)。由于它具有稳定细胞膜和抑制冰晶形成的作用,在绵羊(Payne et al., 1994)、黑猩猩(Younis et al., 1998)、牛(Prathalingam et al., 2006)和兔(Nishijima et al., 2014)精液保存液中添加后,冻融精子存活率均显著提高。

(李俊杰 侯云鹏 朱士恩)

二、卵母细胞冷冻保存的意义与发展概况

(一) 意义

1. 便于珍稀濒危动物和优良地方品种畜禽种质资源的长期保存

利用超低温冷冻保存方法,将珍稀濒危动物和优良地方品种畜禽的卵母细胞保存起来,建立“卵子库”,可以实现动物种质资源的长期保存,同时也为遗传资源在国际和

国内长距离的运输提供了可能。

2. 为胚胎生物技术的研​​究提供充足的卵源

20 世纪 80 年代以来,随着各项胚胎生物技术,如卵母细胞的体外成熟、体外受精、核移植、转基因动物生产、干细胞培养和嵌合体技术的迅速发展,卵母细胞的全年、均衡供应显得尤为重要。但由于受季节、疫病等因素的影响,上述愿望很难实现。随着卵母细胞冷冻保存技术的提高和完善,将为胚胎生物技术的开展解除卵母细胞供应带来的时间和空间上的限制。

3. 为某些因病理或其他原因而推迟生育的妇女提供一个生育的机会

在人类医学领域,卵母细胞的冷冻保存可为某些因手术、放射线治疗、化学治疗失去卵巢功能的患者,或者因工作生活的原因而推迟怀孕的妇女保留生育能力。随着人卵母细胞玻璃化冷冻保存技术的逐步提高,2013 年,美国生殖医学会(ASRM)实践委员会和辅助生殖技术协会(SART)通过的一项准则规定,当妇女因患病采用的治疗方法会对生殖腺产生毒害作用时,成熟卵母细胞玻璃化冷冻可作为女性生殖能力保存的唯一方式。

4. 增加了辅助生殖技术的可操作性和安全性

在人类辅助生殖领域,少数情况下,取卵手术当日取精失败的患者,可同意先进行卵母细胞冷冻保存,待取精成功时再行授精,增加了辅助生殖技术的可操作性。另外,在某些允许卵母细胞捐赠的国家,冷冻保存技术可以保证有充足时间对供卵者进行检疫,以避免供卵者可能存在的传染性疾病对受卵者健康产生影响(Hammarberg et al., 2008)。

(二) 发展概况

Tsunoda 等(1976)开始对卵母细胞的冷冻保存进行研究。1977 年,Whittingham 首次成功地冷冻保存了小鼠的成熟卵母细胞,授精后获得了后代。迄今为止,卵母细胞的冷冻保存以小鼠、牛作为主要对象,其冷冻方法趋于成熟,冷冻后的卵母细胞形态正常率、受精率、胚胎发育率及移植后的产仔率等方面均取得了一定进展。Nakagata(1989)用玻璃化冷冻保存的小鼠卵母细胞,经体外受精后能继续发育,胚胎移植后产仔率高达 45.8%;Vajta 等(1998)采用开放式拉长细管(open pulled straw, OPS)法玻璃化冷冻保存牛成熟卵母细胞,目的是提高降温速度,由细管法的 2000℃/min 提高到约 20 000℃/min,解冻后的卵母细胞经体外受精,获得了 13%的囊胚发育率,且胚胎移植后获得了犊牛。但与成熟卵母细胞相比,未成熟卵母细胞的冷冻相对困难。Candy 等(1994)对小鼠生发泡(GV)期卵母细胞进行了慢速冷冻,解冻后进行体外成熟(IVM)和体外受精(IVF),对获得的 25 枚 2-细胞胚胎进行移植,仅产活仔鼠 13 只。Aono 等(2005)通过对小鼠 GV 期卵母细胞进行玻璃化冷冻,解冻后存活率、成熟率及 IVF 囊胚发育率分别达 98.6%、92.6%和 42.9%,移植后仅获得 10.0%的产仔率。

可见,未成熟卵母细胞对冷冻更敏感。但随着研究的深入、抗冻保护剂的筛选及冷冻载体的改进,未成熟卵母细胞的冷冻保存也取得了显著的进展。Suzuki 等(1996)对

牛冷冻-解冻后的 GV 期卵母细胞进行 IVM 和 IVF, 将获得的 6 枚囊胚移植给 3 头受体母牛, 全部妊娠, 其中 2 头受体产下足月犊牛。Vajta 等 (1998) 改用 OPS 法玻璃化冷冻体外培养 6h 的牛卵母细胞, 结果受精后囊胚发育率高达 25%。国内朱士恩等 (2002) 采用乙二醇和 DMSO 为主体抗冻保护剂, OPS 法冷冻保存牛体外培养 6h 卵母细胞, 解冻后经化学激活, 囊胚发育率达 22%; 而成熟培养 22h 的卵母细胞冷冻-解冻后, 经体外受精, 囊胚发育率达 17%, 胚胎移植后获得 7 头犊牛。可见, 玻璃化冷冻是目前卵母细胞冷冻保存较为理想的方法。在未成熟卵细胞的低温生物学特性方面, Suo 等 (2009) 采用 OPS 法对小鼠 GV 期和生发泡破裂期卵母细胞进行了玻璃化冷冻保存研究, 发现小鼠生发泡破裂 (GVBD) 期卵母细胞冷冻后较 GV 期卵母细胞具有更高的卵丘细胞膜完整性及发育能力, 是比较理想的小鼠未成熟卵母细胞保存阶段。这可能是因为 GVBD 期卵母细胞在体内正常完成了减数分裂的恢复、核质结构的变化, 并激活细胞中与减数分裂和成熟相关蛋白质的合成, 大大降低了体外培养过程对卵母细胞减数分裂及成熟的影响。但也有研究表明, 牛 GVBD 期卵母细胞对冷冻的敏感性较高 (Men et al., 2002), 这可能是由种属差异造成的, 与牛卵母细胞发育相关的转录和翻译大多发生在 GVBD 期卵母细胞 (Men et al., 2003; Ruzicidlo et al., 2001)。

近年来, 在人类辅助生殖领域, 某些年轻女性因患病需进行放射性治疗或化学治疗而面临失去生育能力的风险, 卵母细胞冷冻保存技术为这些患者保留了生育的机会, 因此人类医学领域广泛地开展了相关研究。尽管人类第一例冷冻卵母细胞获得胚胎并成功妊娠的报道来自于慢速冷冻, 但慢速冷冻仍然存在诸多问题。然而, 近来发展起来的玻璃化冷冻具有许多优势, 如降温-复温速率快、不产生有序冰晶等, 在人类卵母细胞冷冻保存领域得到了充分认可并被认为是优于慢速冷冻 (Moragianni et al., 2010; Gook and Edgar, 2007; Oktay et al., 2006), 是女性生殖能力保存的有效方法。

(侯云鹏 李俊杰 朱士恩)

三、胚胎冷冻保存的意义与发展概况

(一) 意义

1. 适应于胚胎移植产业化

超数排卵技术能够获得较多的胚胎, 同时也需要更多的同期发情的母畜进行胚胎移植, 既费时、费力又成本高。若将胚胎冷冻保存起来, 等待发情后适宜的受体进行移植, 不仅可使胚胎移植不受时间和空间的限制, 而且能严格筛选受体, 保证受体的质量, 提高受胎率。将大大地降低成本和促进胚胎移植技术在生产中的应用与推广, 是胚胎移植产业化重要技术保障。

2. 便于胚胎运输

胚胎保存可解决引种和运输种畜的困难, 同时可减少或防止传染病的传播。可广泛地进行国际和国内优良品种的交流, 加速家畜优良品种的扩繁和改良的进程。