

牛精子和卵母细胞低温保存研究进展

周正 张绍志* 陈光明

(浙江大学制冷与低温研究所, 杭州 310027)

摘要 牛的精子和卵母细胞的低温保存对于畜牧业的发展有重要价值。该文综述了近年来牛精子和卵母细胞低温保存的研究进展, 包括保存方法、与低温保存有关的细胞特性、存在的问题和改进的方法等内容。

关键词 低温保存; 牛; 精子; 卵母细胞

畜禽既是一种珍贵的自然资源, 又是畜牧业发展的基础和保证。建立牛品种资源保护体系, 对牛品种资源进行有效的选育、开发、利用和推广, 是我国畜牧业向高效、优质、可持续发展转变的重要途径^[1]。

目前, 牛的人工授精技术在我国已经得到了广泛的应用, 而利用液氮将精液长期冷冻保存是人工授精技术的一项重大革新, 其重要性不言而喻。自1958年我国首次成功地进行了家畜的精液冷冻保存研究以来, 经过半个多世纪的发展, 家畜中奶牛现已基本全部实现人工授精; 在肉牛生产方面, 人工授精技术也得到较好的推广和应用。此外, 牛卵母细胞的低温保存也取得了一定程度的进展。这些对我国畜牧业的发展均有着重大的意义, 不仅提高了母牛的受胎率, 使得优良品种得到保留, 还能预防疾病的传染, 免除了良种牛群之间配种的地域限制, 保护了遗传资源^[2]。

本文将主要介绍近年来国内外牛生殖细胞低温保存的研究进展, 包括具体保存方案、细胞与低温保存有关的特性的测量、存在的问题和改进的方法等内容。

1 牛精子细胞的低温保存

低温保存技术是一种有效的细胞保存手段, 其原理是通过降低或者抑制细胞的新陈代谢强度, 从而达到延长细胞寿命的目的^[3]。20世纪50年代初, 英国学者Smith和Polge首次成功地进行了牛精液的冷冻保存, 这一技术创新对人工授精技术的发展产生了重要的影响。进入到20世纪70年代后期, 牛冷冻精液保存技术得到了快速的发展, 许多国家早已普

及牛的冷冻精液保存技术; 欧美一些发达国家还成立了精液供应公司, 开展国际精液贸易业务^[4]。

目前, 我国牛精液的冷冻保存技术已形成一套规范化的工艺流程, 并且已经制订和实施了牛冷冻精液生产的国家标准。在盛装容器方面, 我国在90年代后已全面实现由颗粒型冻精向细管型冻精生产的转变^[5]。在冷冻方法方面, 目前采用较多的是气氮熏蒸法, 即将冻精放在液氮液面上方。对于安瓿、细管装精液, 国内采用较多的设备是大口径液氮罐, 冷冻槽因冷冻效果差, 液氮耗量大, 已基本被淘汰; 喷液氮式的程控降温仪因价格昂贵、液氮消耗量也较大, 也不常采用。邓福金等^[6]报道过一种细管冻精新方法即密集浸入法, 该法可极大地提高每批次的冻精数量, 减少液氮消耗量, 同时保证了质量, 从而优化了冻精生产工艺。除了上述传统的低温冷冻保存方法, 近年来将冷冻干燥技术应用于哺乳动物细胞保存是生物材料保存领域的研究热点之一, 其中就包括具有显著经济价值的牛精子。与低温保存方法相比, 冻干保存具有成本低廉、操作方便、占地面积少、便于运输和存储等优点^[7]。

传统上, 甘油、二甲基亚砜是最为常见的低温冷冻保护剂(cryoprotective agent, CPA), 可以减少精子在冷冻和解冻时受到的损伤, 提高精子的存活率。Rasul等^[8]对含有由这两种成分构成的CPA进行了研究, 研究对象为水牛的精子细胞。结果发现在37 °C时加入6%的甘油作为CPA, 精子细胞的存活率、细

收稿日期: 2011-07-18 接受日期: 2011-08-29

浙江省自然科学基金(No. Y1090409)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-87952464, Fax: 0571-8795246, E-mail:

enezsz@zju.edu.cn

胞膜完整性、流动性等均好于4 °C时加入CPA; 另外该研究还发现, 随着CPA中二甲基亚砷含量的增多, 保存后水牛精子细胞的完整性等活性指标会逐渐下降。近年来, 更多学者对CPA的成分进行了一些改进。Moussa等^[9]实验研究发现, 添加浓度为8%的卵黄低密度脂蛋白(low density lipoproteins, LDL)可达到良好的保护效果, 最高可以达到67%存活率。Bucak等^[10]研究发现, 蛋氨酸、纤维醇和肉毒碱等抗氧化剂能有效地保护牛精子细胞DNA的完整性, 从而提高保存后精子细胞的存活率, 如用2.5 mmol/L的肉毒碱处理过的牛精子细胞可以达到93.18%的妊娠率。Sarıözkan等^[11]研究发现, 2 mmol/L的半胱氨酸可以使冻存后公牛精子的流动性提高10%, 变形率减小7%。Uysal等^[12]研究表明, 以5 mmol/L的氧化谷胱甘肽(GSSG)、20 mg/mL的牛血清白蛋白(BSA)、10 mmol/L的半胱氨酸和800 µg/L的番茄红素联合作为牛精子细胞的CPA, 可以达到最佳的保护效果, 细胞的存活率可以达到70.5%以上。

细胞从冷冻到使用的过程中, 需要经历降温冷冻、低温保存和升温复苏三个步骤, 在降温和复温过程中, 被保存的细胞极易受溶液冻结、融化及溶液渗透压力变化等因素的作用而受到各种损伤^[13]。低温保存方案的制定和优化与所保存细胞的细胞膜渗透特性直接相关。一般来说, 细胞膜对水的渗透性越差, 细胞体积越大, 最佳冷却速率越低。在牛精子细胞渗透特性研究方面, Chaveiro等^[14]于2004年使用停流法测量了牛精子在22 °C对水和常见的四种CPA (甘油、二甲基亚砷、丙二醇和乙二醇)的渗透特性, 得到了相应的渗透特性参数, 并利用这些数据模拟了CPA加入或取出时牛精子细胞的体积变化。2006年, Chaveiro等^[15]测量了来自不同个体的牛精子细胞在三个温度位对甘油的渗透性, 发现个体间差异较大, 这表明保存方案的最佳只能是相对的, 是在不同个体间的折中。牛精子细胞渗透性数据参见表1。

目前, 针对冷冻干燥保存的研究开展的较少,

表1 22 °C下牛精子细胞的渗透参数^[14]

Table 1 Bull sperm permeability characteristics at 22 °C^[14]

低温保护剂	水力传导率(µm/(min·atm))	渗透系数(×10 ⁻³ cm/min)	相互作用系数
CPA	L _p (µm/(min·atm))	P _s (×10 ⁻³ cm/min)	σ
二甲亚砷(DMSO)	0.91	1.72	0.93
甘油(Glycerol)	0.29	1.75	0.80
丙二醇(PG)	0.42	2.47	0.83
乙二醇(EG)	0.39	1.49	0.91
无低温保护剂(Without CPA)	0.69		

主要是外国学者对冷冻干燥保护剂配方的一些基础性研究。Martins等^[16]研究了牛精子细胞的冷冻干燥保护剂, 发现若保护剂配方中加入0.2 mol/L的EGTA和0.2 mol/L的海藻糖, 则可以显著提高保存的效果, 细胞的受精率从10.2%提高到了19.4%, 细胞膜完整的比例从15%提高到了45%。Sitaula等^[17]研究发现, 在冻干保护剂中加入海藻糖、蔗糖或去铁胺都有助于提高牛精子细胞对干燥过程的抵抗力, 尤其是细胞膜的完整性得到了较好的保持。Sitaula等^[18]还研究了山梨醇的保护作用, 结果发现, 它可以显著提高牛精子细胞对渗透压损伤的抵抗力, 从而加强牛精子细胞对于干燥过程的耐受力。

虽然目前牛精子细胞的保存已经取得了巨大的进步, 但是仍然存在不少亟待解决的问题。例如,

牛精子细胞低温保存方案的制定依然没有一个明确的标准, 水牛品种的冻精保存效果依然不好, 牛精子细胞的冻干研究刚起步、效果欠佳等。今后的努力可以从以下一些方面着手: (1) 准确测量牛精子细胞与低温保存有关的特性参数, 为制定科学的保存方案打下基础; (2) 开展牛精子细胞冻干的基础性研究, 如研究如何将海藻糖更好地载入到精子内部。

2 牛卵母细胞的低温保存

与精子细胞相比, 卵母细胞体积巨大, 并且个数较少, 这使得卵母细胞的低温保存更加困难^[19]。总体上看, 家畜的卵母细胞冷冻保存研究进展较慢, 经历低温保存后的卵母细胞的受精率、卵裂率和囊胚率都显著低于未冷冻对照组, 其中冷冻牛卵母细

胞发育到囊胚的比例大多数低于50%^[20,22]。

近些年来, 研究发现玻璃化方法更适合于牛卵母细胞的低温保存, 因为玻璃化保存可以最大限度的避免细胞内冰晶的形成, 从而降低冰晶对细胞产生的损伤^[21]。但是, 玻璃化保存需要很高的冷却速率或者加入较高浓度的CPA, 前者对设备有较高的要求, 后者会带来保护剂毒性和渗透性等问题。关于玻璃化溶液的配方, 研究人员已进行了不少的研究。Yamada等^[22]详细地研究了常用的三种CPA对未成熟牛卵母细胞的保存效果, 结果发现25%的乙二醇+25%二甲基亚砷作为CPA的保存效果要好于其它组合, 保存后的卵母细胞发育率可以达到29.2%。Dhali等^[23]研究发现, 以3.5 mol/L的乙二醇或4.5 mol/L二甲基亚砷作为CPA, 可以达到最佳的保护效果, 发育率最高达到33%。Wani等^[24]研究表明, 就玻璃化溶液的保护效果而言, 由好到坏存在以下次序: 乙二醇>乙二醇+甘油>甘油。许卫华等^[25]研究发现, 对未成熟的牛卵母细胞, 无论是采用程控冷冻法还是玻璃化法, 乙二醇都比甘油具有更高的复苏后体外成熟率; 并且添加0.1 mol/L蔗糖比添加0.3 mol/L的蔗

糖, 体外成熟率更高。此外, Otoi等^[26]研究发现, 在慢速冷冻中添加蔗糖有利于未成熟卵冷冻后的发育潜能, 而成熟牛卵母细胞则有相反结果。除了常见的小分子量CPA, 大分子聚合物经常用作细胞外保护剂在低温保存中对细胞进行保护。尽管大分子并不能穿透细胞膜, 但是可以降低达到玻璃化所需的细胞内保护剂浓度, 从而减轻加入CPA带来的毒性问题。Checura等^[27]研究了胎牛血清(FCS)、牛血清白蛋白(BSA)、聚蔗糖(Ficoll)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯醇(PVA)等聚合物的影响, 结果发现18% Ficoll+1% BSA和6% PVP+1% BSA的保护效果最好, 均能达到最高23.0%的发育率, 加入过多(大于6%)或过少(小于0.3%) BSA, 或者加入0.3%的PVA均会显著降低发育率。

与其它细胞相比, 卵母细胞还存在因发育阶段的不同而导致的细胞低温保存特性的差异^[28]。Agca等^[29]对未成熟和体外成熟的牛卵母细胞进行了渗透性的测试, 结果发现胚泡期(GV期)的细胞对水和保护剂的渗透性显著低于处于减数分裂二期(MII期)细胞的相应值。具体数值见表2。此外, 他们还比较

表2 22 °C下牛卵母细胞的渗透参数^[29]

Table 2 Bovine oocyte permeability characteristics at 22 °C^[29]

时期	低温保护剂	水力传导率($\mu\text{m}/(\text{min}\cdot\text{atm})$)	渗透系数($\times 10^{-3}\text{cm}/\text{min}$)	相互作用系数
Stage	CPA	L_p ($\mu\text{m}/(\text{min}\cdot\text{atm})$)	P_s ($\times 10^{-3}\text{cm}/\text{min}$)	σ
GV	DMSO	0.70	0.36	0.86
MI		1.14	0.48	0.90
GV	EG	0.50	0.22	0.94
MI		0.83	0.37	0.76

了乙二醇和二甲基亚砷对细胞的毒性, 结果发现后者对牛卵母细胞的毒性要更大。Vanessa等^[30]研究发现, 处于GV期的未成熟牛卵母细胞比MI期细胞更能承受较高浓度的乙二醇溶液, 但是GV期的细胞总体而言较MI期细胞更难保存, 保存后的受精率不如MI期细胞, 而且会伴有纺锤体受损、染色体分散、皮质颗粒外排等问题。谭秀文等^[31]以10%二甲基亚砷+10%乙二醇为CPA, 玻璃化冷冻保存MI期卵母细胞, 形态正常率达到98%, 囊胚发育率在10%左右, 这可能是由于试验中的卵母细胞取自于性成熟前的小母牛(<1.5岁), 而已有文献报导称性成熟前的小牛卵母细胞的囊胚发育率要低于成熟母牛^[32]。

目前, 牛卵母细胞的低温保存面临的问题主要

有: (1) 牛卵母细胞存在一个“低温敏感区”, 需要使其快速通过这个温度危险区; (2) 与牛精子细胞低温保存一样, 卵母细胞CPA的保存配方大多是经验的, 缺乏相应的理论支持; (3) 其它细节问题, 如卵丘细胞的存在与否、处于减数分裂的不同阶段对保存效果的影响存在不确定性。可能的改进方向包括: (1) 测定牛卵母细胞与低温保存过程有关的特性参数, 如渗透率、细胞体积、不可渗透体积等, 为制定保存方案提供基础数据, 如Wang等^[33]详细地研究了GV期和MI期牛卵母细胞的渗透性, 在此基础上设计出四步法加入与两步法去除保护剂, 实验证实对细胞具有更好的保护效果; (2) 针对不同的影响因素设计不同的实验进行验证, 例如Zhou等^[34]研究发现

有卵丘细胞包裹的GV期卵母细胞能更好的进行玻璃化保存,但是对MII期细胞的保护结果并不明显。

3 结语

虽然牛生殖细胞的低温保存研究相对比较成功,应用也比较广泛,但仍有较大的进步空间。以冷冻干燥方法保存牛精子细胞作为最新尝试,与传统的低温保存方式相比具有很多优势,值得关注。针对牛精子细胞的低温保存,国内研究人员需要加强学科间合作,在测量细胞有关特性参数的基础上制定实验方案,减少盲目性。牛卵母细胞的低温保存目前面临的问题较多,没有通行的保存方法,距离广泛应用仍有一段距离,玻璃化保存成功希望很大,但需要注意不同发育阶段细胞耐受保护剂毒性的差别,以及细胞膜对水和保护剂渗透性的差别。希望本文的介绍能给国内研究和生产人员带来帮助,促进牛类生殖细胞冷冻保存技术的进步。

参考文献 (References)

- 肖 剑, 牛 辉, 王居强, 王新庄. 中国黄牛的现代保种方法. 安徽农业科学 2007; 35(27): 8505-6, 8570.
- 李晓强, 陈兴平, 贾永红, 胡建宏. 牛精液冷冻技术应用研究进展. 中国牛业科学 2006; 32(5): 59-62, 66.
- Song Y, Randy S, Lu FH, Hassan M. The future potential of cryopreservation for assisted reproduction. Cryobiology 2010; 60(3): 60-5.
- 桑润滋. 动物繁殖生物技术. 北京: 中国农业出版社, 2002; 6.
- 刘瑞鑫, 吴柱月, 黄光云, 李 铭. 牛和猪精液冷冻保存. 黑龙江动物繁殖 2008; 16(6): 29-31.
- 邓福金, 王化青, 祁茂彬, 李 波. 细管精液冷冻设备工艺改进的研究. 黑龙江畜牧兽医 2006; 1: 44-6.
- 华泽钊. 冷冻干燥新技术. 北京: 科学出版社, 2006; 1-2.
- Rasul Z, Ahmed N, Anzar M. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. Theriogenology 2007; 68(5): 813-9.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. Theriogenology 2002; 57(6): 1695-706.
- Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Başpınar N, Taşpınar M, Cayan K, *et al.* Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology 2010; 61(3): 248-53.
- Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. Cryobiology 2009; 58(2): 134-8.
- Uysal O, Bucak MN. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. ACTA VET. BRNO 2007; 76:383-90.
- 刘 静. 低温生物医学工程学原理. 北京: 科学出版社, 2007; 15-6.
- Chaveiro A, Liu J, Mullen S, Woelders H, Critser JK. Determination of bull sperm membrane permeability to water and cryoprotectants using a concentration-dependent self-quenching fluorophore. Cryobiology 2004; 48(1): 72-80.
- Chaveiro A, Liu J, Engel B, Critser JK, Woelders H. Significant variability among bulls in the sperm membrane permeability for water and glycerol: Possible implications for semen freezing protocols for individual males. Cryobiology 2006; 53(3): 349-59.
- Martins CF, Bão SN, Dode MN, Correa GA, Rumpf R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. Theriogenology 2007; 67(8): 1307-15.
- Sitaula R, Elmoazzen H, Toner M, Bhowmick S. Desiccation tolerance in bovine sperm: A study of the effect of intracellular sugars and the supplemental roles of an antioxidant and a chelator. Cryobiology 2009; 58(3): 322-30.
- Sitaula R, Fowler A, Toner M, Bhowmick S. A study of the effect of sorbitol on osmotic tolerance during partial desiccation of bovine sperm. Cryobiology 2010; 60(3): 331-6.
- Checura CM, Seidel GE Jr. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. Theriogenology 2007; 67(5): 919-30.
- Lj X, Su L, Li Y, Ji W, Dinnyés A. Vitrification of Yunnan Yellow Cattle oocytes: Work in progress. Theriogenology 2002; 58(7): 1253-60.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol Reprod 1996; 54(5): 1059-69.
- Yamada C, Caetano HV, Simões R, Nicacio AC, Feitosa WB, Assumpção ME, *et al.* Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. Anim Reprod Sci 2007; 99(3): 384-8.
- Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Post-vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: Effect of ethylene glycol concentration and exposure time. Anim Reprod Sci 2000; 63(3): 159-65.
- Wani NA, Maurya SN, Misra AK, Saxena VB, Lakhchaura BD. Effect of cryoprotectants and their concentration on *in vitro* development of vitrified-warmed immature oocytes in buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 2004; 61(5): 831-42.
- 许卫华, 王子玉, 王 锋, 偶 健, 周冬仁. 卵母卵泡细胞的体外成熟和冷冻保存. 中国兽医学报 2007; 27(2): 264-9.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Suzuki T. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. Cryobiology 1995; 32(5): 455-60.

- 27 Checura CM, Seidel GE Jr. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology* 2007; 67(5): 919-30.
- 28 Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TA. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2006; 73(5): 627-37.
- 29 Agca Y, Liu J, Peter AT, Critser ES, Critser JK. Cryoprotectant and water permeability of immature and *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology* 1997; 47(1): 340.
- 30 Magnusson V, Feitosa WB, Goissis MD, Yamada C, Tavares LM, D'Avila Assumpção ME, *et al.* Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. *Anim Reprod Sci* 2008; 106(3): 265-73.
- 31 谭秀文, 刘晓牧, 游伟, 黄金明, 万发春. 牛卵母细胞玻璃化冷冻保存影响因素的研究. *生物学杂志* 2008; 25(4): 15-9.
- 32 Albarracín JL, Morató R, Rojas C, Mogas T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 2005; 63(3): 890-901.
- 33 Wang X, Al Naib A, Sun DW, Lonergan P. Membrane permeability characteristics of bovine oocytes and development of a step-wise cryoprotectant adding and diluting protocol. *Cryobiology* 2010; 61(1): 58-65.
- 34 Zhou XL, Al Naib A, Sun DW, Lonergan P. Bovine oocyte vitrification using the cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology* 2010; 61(1): 66-72.

Advances in Cryopreservation of Bovine Spermatozoa and Oocytes

Zhou Zheng, Zhang Shaozhi*, Chen Guangming

(*Institute of Refrigeration and Cryogenics, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*)

Abstract The ability to cryopreserve bovine spermatozoa and oocyte cells successfully has important practical values in animal production. In this paper, the recent advances in cryopreservation of bovine spermatozoa and oocytes are reviewed. The methods of preservation, characteristics of spermatozoa and oocytes related to cryopreservation, the existing problems and the future development of cryopreservation of bovine spermatozoa and oocytes are analyzed.

Key words cryopreservation; bovine; spermatozoa; oocyte

Received: July 18, 2011 Accepted: August 29, 2011

This work was supported by National Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (No.Y1090409)

*Corresponding author. Tel: 86-571-87952464, Fax: 86-571-8795246, E-mail: enezsz@zju.edu.cn