

小鼠桑椹胚玻璃化冷冻前后生物频谱处理对体外发育的影响^①

朱士恩^② 王海彦 曾申明 王永胜 张忠诚 周林 陈昆
(中国农业大学动物科技学院) (北京周林频谱公司)

摘要 本试验利用周林频谱仪(WS-302)照射玻璃化冷冻前后小鼠桑椹胚,研究对其体外发育的影响,结果表明:胚胎在10%EG溶液中处理5 min后移入EFS30中处理1 min的二步法冷冻组,解冻后经照射5~20 min后的胚胎发育率(95%~100%)与对照组(94%)比较无显著性差异($P>0.05$)。当在EFS40中处理1 min的一步法冷冻组的胚胎,照射后发育率由对照组的54%提高到97%差异极显著($P<0.01$)。改用GFS40一步法冷冻的胚胎照射后的发育率也明显高于对照组($P<0.05$)。另外,对冷冻前胚胎进行照射,其解冻后发育率(87%)也得到了显著提高($P<0.01$)。

关键词 生物谱;玻璃化;冷冻;桑椹胚;小鼠

分类号 S814.6

Effect of Bio-Frequency Spectrum on Development of Mouse Vitrified Morulae *in vitro*

Zhu Shi'en Wang Haiyan Zeng Shenming Wang Yongsheng Zhang Zhongcheng
(College of Animal Science & Technology, CAU)

Zhou Lin Chen Kun
(Beijing Zhoulin Bio-Frequency Company)

Abstract This experiment was to study the developmental ability of mouse morulae which were irradiated by Zhoulin Bio-Frequency Spectrum Generator (WS-302) before or after being frozen. Mouse morulae were pretreated in 10% EG for 5 min, then pipetted into EFS40 for another 1 min treatment and plunged into LN₂ (two-step) for storage. After thawing the embryos were irradiated by WS-302 for 5~20 min. The rate of development was 95%~100% *in vitro* culture, which was not differ from the control (94%) group ($P>0.05$). However, mouse morulae were frozen only in EFS40 for 1 min (one-step), the rate of development was 97% after the thawed embryos were irradiated by WS-302 and the control was 54%, the difference was greatly significant ($P<0.01$). When the morulae were vitrified in GFS40, the developmental rate was significantly higher than the control ($P<0.05$) after the thawed embryos were irradiated by WS-302. The developmental rate was also significantly higher than the control when mouse morulae were irradiated by WS-302 before freezing ($P<0.01$).

Key words bio-frequency spectrum; vitrification; frozen; morulae; mouse

收稿日期: 1997-09-01

①本试验为周林频谱公司资助项目

②朱士恩,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

生物谱(bio-frequency spectrum)是生物自身物理信息的电磁波表征,实验证明生物体自身是一个天然的能向周围空间发射多种信号的生物辐射源^[1]。根据物理学原理,在一定条件下当2种物理信号相同或相近时能引起谐振,产生最大的吸收。传统的电磁波理疗仪器大都只是机体向外辐射特性的较窄或单一谱段,周林生物频谱仪所产生的辐射波具有宽频带特性,峰值在3.6~6 μm之间,主能量分布在峰值波长附近,且延续呈远红外、亚毫米波以及毫米波^[2]。由它所发射的信号可引起机体产生内热效应,并导致细胞通透性,胶体状态,生物电,酸碱度和酶系统的改变,形成生物活性物质组织胺和乙酰胆碱等,可使新陈代谢旺盛,生物组织营养改善,组织再生能力加强,功能恢复加快^[1,3]。

目前用频谱辐射哺乳动物胚胎,缓解和修复冻伤的试验尚属首次,类似试验在国内外未见报道。为此,本试验用乙二醇和丙三醇为主体抗冻保护剂配制各种玻璃化溶液,分别对冷冻解冻后小鼠桑椹胚进行照射,探讨生物谱对哺乳动物玻璃化冷冻后胚胎的冻伤恢复效果,同时也对玻璃化冷冻方法作进一步探讨和完善。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物为5~6周龄的昆明白系小鼠(中国科学院动物遗传研究所)。周林生物频谱仪为WS-302型便携式频谱仪(深圳周林频谱有限公司)。冲卵液为mPBS溶液^[4]。预处理液用10%乙二醇(Ethylene glycol,EG)溶液。将30%聚蔗糖和0.5 mol·L⁻¹蔗糖用PBS液溶解混合后,制成FS溶液。FS溶液再与乙二醇(Ethylene glycol)溶液或丙三醇(Glycerol)按一定比例配制成EFS30,EFS40及GFS40玻璃化溶液(表1)。胚胎培养液为mKRB溶液^[5]。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠超数排卵 5~6周龄昆明白系雌性小鼠,自然光照,自由采食,经适应饲养7 d后,分别用10 IU的孕马血清促性腺激素(PMSG;天津实验动物中心)和人绒毛膜促性腺激素(hCG;宁波市激素制品厂),经隔日腹腔

表1 玻璃化冷冻液配制

玻璃化溶液	抗冻保护剂	稀释液	体积比例
EFS30	乙二醇(ethylene glycol)	FS液*	3:7
EFS40	乙二醇(ethylene glycol)	FS液*	4:6
GFS40	丙三醇(glycerol)	FS液	4:6

* FS液:将含量为30%聚蔗糖与0.5 mol·L⁻¹蔗糖溶于PBS溶液中。

内注射后与同系性成熟公鼠交配,交配后有阴道栓小鼠于hCG注射后78~80 h将子宫摘出,用mPBS液冲洗子宫内容物,于实体显微镜下回收致密桑椹胚。

1.2.2 胚胎玻璃化冷冻 一步法冷冻保存。将室温调至20~25℃,而后用吸管将胚胎直接移入事先装好玻璃化溶液的0.25 mL塑料细管内,1~2 min处理后封口,即投入液氮中一步法冷冻保存。

二步法冷冻保存。胚胎移入细管前,首先在10%EG预处理溶液中平衡5 min(预先处理)。以后同一步法。

1.2.3 解冻 冷冻细管由液氮中取出后直接投入20~25℃水中解冻,用0.5 mol·L⁻¹蔗糖溶液0.8 mL冲洗细管内容物于表面皿中,在实体显微镜下收集胚胎。收集的胚胎移入新鲜的0.5 mol·L⁻¹蔗糖滴中脱出抗冻剂,再用mPBS液洗净后移入mKRB液中待照射。

1.2.4 周林生物频谱照射 在培养皿中作成400 μL的mKRB液滴,液滴周围稍加液体石

蜡固定。将冷冻前和解冻后的胚胎分别导入 mKRB 滴中,将一直径为 60~90 mm 的玻璃平皿内添加适量的水,然后放置于 38℃ 的恒温水浴箱中的试管架上,再将含有胚胎的培养皿置于玻璃平皿中,注意不要淹没培养皿。而后用预热后的周林频谱仪(强档,功率 12 W;频率 50~60 Hz)照射。照射高度为 15 cm,照射时间为 0,5,10,15 及 20 min。

1.2.5 胚胎的体外发育性观察 胚胎对照组及实验组用培养液洗净,移入于 CO₂ 培养箱中经平衡 12 h 后的 mKRB 培养液中(100 μL·滴⁻¹,培养 10 枚胚胎),置于 5%CO₂,95%空气和 100%相对湿度,温度为 38℃ 培养箱中培养。每小时镜下观察胚胎发育情况。凡发育至囊胚阶段的胚胎视为发育性胚胎。

1.2.6 统计分析 胚胎发育率的比较采用卡方(χ^2)检验。

2 结果

2.1 玻璃化冷冻前的胚胎经周林生物频谱照射后的发育率

冷冻前对新鲜胚胎进行频谱照射,照射高度为 15 cm,照射时间分别为 5,10,15 min,冷冻解冻后的发育率分别为 87%,83%和 53%(表 2);与不加照射的对照组(54%)相比,5~10 min 组的囊胚发育率得到了显著提高($P<0.01$)。

表 2 周林频谱照射^①对用 EFS(或 GFS)一步法玻璃化冷冻前、后小鼠桑椹胚发育率的影响

照射处理	冷冻温度 $\theta/^\circ\text{C}$	冷冻液	冷冻时间 t/min	照射时间 t/min	发育胚数/照射胚数(%)
冷冻前	20	EFS40	1	0	19/35(54)
				5	27/31(87) * *
				10	29/35(83) *
				15	19/36(53)
冷冻后	20	EFS40	1	0	19/35(54)
				5	29/30(97) * *
				10	52/65(80) *
				15	50/64(78) *
				15	20/39(51)
		GFS40	2	0	53/94(56)
				5	28/40(70)
				10	20/39(51)
				15	30/34(88) *
				5	38/42(90) *
GFS40	20	GFS40	1	0	19/33(58)
				5	32/37(86) *
				0	22/34(70)
				5	38/42(90) *
				5	38/42(90) *

①照射高度为 15 cm,功率为 12 W. 表 3 同;②对照组(不加照射). 表 3 同.

* 与对照组比较差异显著($P<0.05$); ** 与对照组比较差异极显著($P<0.01$).

2.2 一步法玻璃化冷冻胚胎经周林生物频谱照射后的发育率

①20℃ 室温条件下,EFS40 中经 1~2 min 处理后冷冻保存的胚胎,解冻后进行照射,照射

高度为 15 cm,照射时间为 5,10,15 min。结果 1 min 冷冻组的囊胚发育率为 97($P<0.01$), 80%($P<0.05$)及 78%($P<0.05$)(表 2)。与对照组的囊胚发育率(54%)相比均有显著性差异。而 2 min 冷冻组,只有照射 15 min 后经培养的囊胚发育率显著提高(88%),与对照组(56%)相比差异极显著($P<0.01$)。

②20℃条件下,用 GFS40 处理 1~2 min 后冷冻组的胚胎,解冻后照射高度不变,照射时间为 5 min,2 组胚胎的囊胚发育率为 86%和 90%(表 2)。与对照组的 58%和 70%相比差异显著($P<0.05$)。

2.3 二步法玻璃化冷冻胚胎经周林生物频谱照射后的发育率

二步法冷冻即 25℃室温下,用 10%EG 平衡 5 min 后,移入 EFS30 玻璃化溶液中处理 1 min 投入液氮中冷冻保存。解冻后的胚胎在照射高度 15 cm;照射时间为 5,10,20 min,培养后的囊胚发育率分别为 98%,100%及 95%(表 3)。与不加照射的对照组的囊胚发育率(94%)相比无显著性差异($P>0.05$)。

而 20℃室温下,用 EFS40 二步法冷冻保存的胚胎,解冻后经照射结果,与对照组也无显著性差异(89%和 94%)($P>0.05$)。

表 3 周林生物频谱照射对用 EFS 二步法玻璃化冷冻小鼠桑椹胚发育率的影响

冷冻温度 $\theta/^\circ\text{C}$	第一步		第二步		照射时间 t/min	发育胚数/ 照射胚数(%) ^①
	预处理液	t/min	冷冻液	t/min		
25	10%EG	5	EFS30	1	0	45/48(94)
					5	48/49(98)
					10	41/41(100)
20	38/40(95)					
20	10%EG	5	EFS40	1	0	39/44(89)
					5	34/38(89)

①试验组与对照组比较无显著性差异($P>0.05$)。

3 讨论

①本试验按照 Kasai 等^[6]和 Zhu 等^[7]的胚胎玻璃化冷冻方法对小鼠致密桑椹胚进行冷冻。特别是二步法冷冻保存的胚胎,其囊胚发育率较高(89%~94%),与前作者^[7]的结果相一致。但一步法冷冻的胚胎解冻后的发育率明显低于前作者^[6]。小鼠的品种不同其胚胎冷冻后的发育率也不尽相同^[8]。本试验使用的小鼠为昆明白系,而 Kasai 等使用的是 ICR 系小鼠。可能是品系的不同,造成胚胎的抗冻效果不同。

②周林频谱对冷冻前小鼠桑椹胚进行照射后再冷冻,其解冻后的发育率与不加照射的对照组相比,照射 5~10 min 明显高于对照组(87%, 83% : 54%)($P<0.01, P<0.05$)(表 2)。证明频谱照射完整无损的新鲜胚,可增加其抗冻效果。

③20℃室温下,用 EFS40 一步法冷冻保存的胚胎,解冻后囊胚发育率在 54%~56%之间,这可能是冷冻时受高浓度的抗冻保护剂化学毒性作用和急速降温及解冻时的快速升温,使透

明带或胚胎部分细胞受损,容易产生不可逆的恢复^[10,11]。基于这种情况,本试验利用周林生物频谱仪(WS-302),对解冻后的胚胎进行照射。照射高度规定为15 cm是根据王永胜等^[3]摸索出的最佳高度,经5,10,15 min照射后培养,使囊胚发育率由对照组的54%提高到97%,差异极显著($P < 0.01$)(表2)。这种效果的产生,可能来源于生物频谱照射后,胚胎新陈代谢加强,营养得到改善,增进了组织恢复和再生功能^[12]。

④用丙三醇代替乙二醇配制成的GFS40玻璃化溶液,在20℃的室温下,对胚胎一步法冷冻保存,解冻后只照射5 min,囊胚发育率也显著高于对照组($P < 0.05$)(表2)。更进一步证实了生物频谱对玻璃化冷冻胚胎受损后的代偿和恢复有促进作用。

⑤20℃或25℃室温下,二步法玻璃化冷冻保存的胚胎,解冻后胚胎不加照射,培养后的囊胚发育率高达94%^[9],生物频谱照射后虽有一些提高(89%~100%),但是无显著差异($P > 0.05$)(表3)。

⑥周林频谱对冷冻前小鼠桑椹胚进行照射,解冻后囊胚发育率比对照组得到了明显的提高。而冷冻解冻后的胚胎经照射后,囊胚发育率高于冻前照射组。说明周林频谱照射用于冻伤胚胎的恢复其效果更明显。

参 考 文 献

- 1 陈锐. 模拟人体频谱特性及作用探讨. 第二届全国生物频谱研讨会论文集,1992,1~5
- 2 周林. 生物频谱概述. 第二届全国生物频谱研讨会论文集,1992, I ~ IV
- 3 王永胜,左琴,朱士恩,张忠诚,陈锐. 周林生物频谱对家兔胚胎发育影响的初步研究. 中国畜牧杂志,1997,34: 6~8
- 4 Whittingham D G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. London Nature, 1971,233:125~126
- 5 Toyoda Y, Chang M C. Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. J Reprod Fert,1974,36:9~12
- 6 Kasai M, Komi J H, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J Reprod Fert,1990,89:91~97
- 7 Zhu S E, Kasai M, Otoge H, Sakurai T, Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. J Reprod Fert,1993,98:139~145
- 8 Yokoyama M. Freeze Preservation of Mouse Embryos; with Reference to Strain Differences. J Mamm Ova Res,1989,6:19~22
- 9 朱士恩,张忠诚,李玉欣,曾申明. 小鼠桑椹胚简易玻璃化冷冻技术再探讨. 中国畜牧杂志,1997,33:14~17
- 10 Dobrinsky J R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. Theriogenology, 1996,45:17~26
- 11 Kasai M, Zhu S E, Pedro P B, et al. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. Cryobiology,1996,33:459~464
- 12 俞婉芳. 频谱治疗仪治疗冻疮42例. 第三届全国生物频谱研讨会论文集,1995,117~118