

鱼类精子冷冻保存的研究进展

THE CRYOPRESERVATION OF FISH SPERMATOZOA

汪小锋 樊廷俊*

(中国海洋大学海洋生命学院海洋生物系 青岛 266003)

中图分类号 Q68 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)07-0028-04

1 研究意义及应用前景

鱼类精子长期冷冻保存的研究和探索,不仅对进一步理解基本的生命进程具有重要意义,而且对鱼类新品种培育和鱼类养殖业也将产生巨大的深远影响。众所周知,由于低温能抑制生物体内的生化反应,因而在长期保存时不发生变异,而且不需要复杂的温度和湿度调节。鱼类精子超低温冷冻保存的研究,对于鱼类种质资源,尤其是对于那些濒危、珍稀鱼类的种质资源能起到有效的保护作用,同时也可使生物多样性得到保护。

鱼类精子长期冻存的实现对鱼类种质保存和优良品种的培育具有决定性的影响。首先,鱼类精子的长期冻存可被广泛应用于优良鱼类种质资源的保存。目前,许多国家的学者正在对一些重要经济鱼类和濒临灭绝鱼类的精子进行冷冻保存研究^[1],以求建立这些鱼类的精子库,达到保护和保存这些鱼类资源的目的。其次,鱼类精子的长期冻存可以解决鱼类育种过程中的诸多实际问题,如满足不同地区对不同鱼类品系精子量的需求、克服杂交育种中不能自然交配的困难、解决人工繁殖过程中所遇到的雌雄亲鱼成熟时间差的问题、扩大杂交组合的选择范围等。

2 鱼类精子的冷冻技术研究现状

自1953年Blaxter率先对大西洋鲑鱼精子进行冻存研究以来,各国学者也相继开展了鱼类精子冻存的研究工作。但由于诸多实验条件的限制,这方面的研究进展较为缓慢。自20世纪80年代以来,由于热物理学、物理学、化学、工程学和生物学等学科的快速发展和其相互交叉和渗透,低温工程理论及实用设计原理的不断更新及其应用,使鱼类精子的冻存研究出现了蓬勃的发展势头。1987年,Hogan^[2]等人曾报道已成功地将澳洲肺鱼(barramundi)的精子冷冻保存了1周

之久。而Stoss等和Leung等^[3]的研究则使鱼类精子的冷冻保存逐渐有了一套比较成熟的研究思路和技术路线。目前,鱼类精子冷冻保存一般主要采用安瓿冷冻法、小丸颗粒冷冻法和麦细管冷冻方法。但涉及到具体鱼类的精子冻存,究竟应该选用何种方法应以实验材料和条件的具体情况而定。其中,鱼类精子冷冻保存的关键主要是冷冻保护剂的选择与优化,其次便是冷冻前平衡时间的优化、最适冷冻温度的确定、最佳降温速率以及解冻方式的选择等。

2.1 冷冻保护剂的选择

在细胞冻融过程中,胞内及胞间极易产生冰晶,能损伤各种膜结构,引起细胞膜破裂和线粒体丢失,进而导致细胞功能的丧失。但通过添加冷冻保护剂或其它添加剂,可以达到抑制冰晶形成和成功冷冻保存的目的。对于不同动物品系,冷冻保护剂的选择也不相同,具有物种特异性。另外,由于有些冷冻保护剂本身对细胞有毒,因此这类冷冻保护剂的浓度对冻存精子的抗冻效果与精子的活力之间存在着一种相互制约的关系。如何在二者之间找到一个最佳搭配,便是选择冷冻保护剂最适使用浓度的关键。目前,常用的冷冻保护剂主要有二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、甲醇、乙二醇和甘油等。一般来讲,在上述冷冻保护剂中添加适量的蔗糖或葡萄糖能明显提高精子的冷冻保存效果;而在上述冷冻保护剂中添加蛋清或低密度脂蛋白(LDL)^[4],还可以有效地保护细胞膜在冷冻过程中不受损伤。为了保护精子的体外活力,人们模拟其体液配制了各种各样的冷冻保存液^[5,6]。在冷

第一作者:汪小锋,出生于1978年,硕士研究生。

* 通讯作者: E-mail: tjfan@ouqd.edu.cn

收稿日期: 2001-07-16; 修回日期: 2002-05-22

冻前的预处理中,常用冷冻保存液来稀释冷冻保护剂,以达到所需的抗冻液浓度。保存液一般可分为电解质平衡盐溶液(如 Ringer's 液、海洋硬骨鱼 Ringer's 液和 Hank's 液等)、高渗溶液和营养液(Tc199, RBMI 1640 和 Earles 等培养液)3种。

2.2 其它冷冻条件的优化

鱼类精子在冷冻保存前一般不需要平衡,但在某些品系中(如虹鳟鱼)仍需要短时间的平衡(30 min)^[4],可能与不同鱼类的物种特异性有关。在降温速率方面,各位学者意见不一。目前的观点主要有两种,第一:“玻璃化学说”,即快速降温和快速解冻,通过迅速跨越危险温度区(0~ -60℃),最大限度地防止冰晶的发生。第二种观点是“微晶学说”,即慢速降温(加入冷冻保护剂)、分段降温的方法,也在一些鱼类中获得了成功^[7]。对于某一种具体的鱼类精子而言,存在着其特异性的最佳冷却速率,过快或过慢的冷却速率均会导致细胞损伤,降低精子的存活率。在很多鱼类精子冷冻保存的报道中,目前均采用 -10℃/min 的下降速率,在到达某一低温后(-76℃, -150℃等)或直接浸入液氮中,或平衡一段时间后

再浸入液氮中。在精子复苏时,一般由 -196℃ 在 4~5 s 内达到 38℃ 左右,迅速通过危险温度区,保持精子的活力。

2.3 鱼类精子冷冻保存的研究进展

70年代,国外对于鲑鳟鱼类的精子冻存就取得了较大的成功^[8],而同期关于其他淡水鱼类的研究报道则很少。80年代以来,随着冷冻技术的逐渐完善,无论是淡水鱼类还是海水鱼类,精子冷冻保存成功的研究报道逐渐增多^[9,10]。根据国外近几年的研究报道(表1),国外在鱼类精子冷冻保存技术方面已日趋成熟,基本达到在液氮温区进行保存的水平。目前国外关于鱼类精子冷冻保存的研究热点则主要趋向于两个方向:一是通过实验确定各地不同品系鱼类精子的最适冻存条件,即冷冻保护剂的选择和其他冷冻条件的优化^[11]。二是研究冷冻过程中精子损伤的具体过程以及不同部位损伤所引起的具体后果。例如: Taddei 将冻融过程分为三个关键阶段——起始阶段、冻前阶段和复苏后阶段,并且发现不同阶段对细胞所造成的损伤是不同的^[12]。Labbe 等发现,冷冻保护剂对虹鳟鱼 DNA 的稳定性改变甚微,也不损害其后代的存活

表1 几种鱼类精子冷冻保存的结果及其对比

精子种类	平衡时间 (min)	稀释 比例	最佳冷冻 保护剂	降温速率 (℃/min)	保存 时间	保存温度 (℃)	受精率(%)		文献
							实验组	对照组	
白鲑 (<i>Coregonus muksum</i>)	0	1:1	20%甘油	-	1 a	-196	87.7	98.5	[18]
虹鳟 (<i>Salmo gairdneri</i>)	15	1:1	10% DMSO, 5% 蛋黄	80	1 a	-196	67.3	-	[19]
尖吻鲈 (<i>Lates calcarifer</i>)	0	1:4	5% DMSO	10	90 d	-196	84.1	80.7	[20]
隆颈愈额鲷 (<i>Sparus aurata</i>)	0	1:6	5% DMSO	10	-	-196	-	-	[21]
红鲈 (<i>Epinephelus malakarcus</i>)	10	1:1	10% DMSO	-	3 min	-100	40	-	[22]
红点鲑 (<i>Salvelinus alpinus</i>)	0	1:3	20% 甘油, 0.3 mol/L 葡萄糖	-	-	-196	75	85	[23]
台湾大麻哈鱼 (<i>Oncorhynchus masou</i>)	0	1:5	10% DMSO, 0.3 mol/L 蔗糖	-	5 d	-196	88	97.9	[24]
狗鱼 (<i>Esox lucius</i>)	0	1:6	15% DMSO, 0.6 mol/L 蔗糖	-	14 d	-196	77.3	74.1	[25]
鲤鱼 (<i>Cyprinus carpio</i>)	0	-	DMSO	11	-	-196	56	68	[11]

率及质量^[13]。鉴于精子游动性正相关于其受精率,最近,许多学者已开始利用计算机手段来辅助分析鱼类精子的质量^[14],以便更准确地研究精子损伤的发生阶段、具体的损伤过程和抗冻的精确机理。与国外相比,国内在这方面的研究尚有较大差距,但在淡水鱼类精子的冷冻保存方面却取得了相当大的研究进展,已探索出一些常见品系如鲢鱼、鲤鱼、草鱼、鲈鱼等淡水鱼类精子冻存的最适冻存条件,并对其具体的损伤机理进行了研究^[15-17]。

3 鱼类精子冷冻保存的低温生物学原理

鱼类精子一般可分为头部、中部和尾部三部分。冷冻所造成的损伤主要表现为线粒体(形状改变、位置迁移、嵴的大部分丧失)、细胞质膜(肿胀、破裂)及鞭毛“9+2”结构的破坏,造成精子活力的大大降低,受精率大幅度下降^[4,26,27]。最近的研究还发现,由于质膜的破裂,还能导致一些酶类和蛋白质的逸出^[28,29],这同样是造成细胞活力降低的原因之一。

1972年, Mazar 等^[30]在中国仓鼠组织培养细胞的低温保存实验中,首先提出冷冻损伤的两因素假说,认为造成冷冻损伤有两个独立的因素:一是胞内冰晶的形成,因过快冷却而产生。冷却速率越快,损伤越大;二是溶质损伤,由于过慢冷却所产生。溶质损伤是细胞长时间暴露于高浓度溶液中所造成的,冷却速率越慢,此损伤就会越大。

对于鱼类精子而言,鱼类精子冷冻保存时所受的损伤主要在于冷冻和复苏两个步骤,而冰晶则是冷冻过程中的最大危害因素。因温度下降的快慢直接决定了所形成冰晶的大小,因此降温速率过快,将会导致大量冰晶的形成,使细胞受到不可逆损伤。降温速率慢,细胞外水分逐渐结冰,可引起胞内水分向外渗透,减少胞内冰晶的形成,降低细胞的损伤;但慢速降温会使细胞承受高渗的胁迫,如果降温速率过慢又会给细胞带来溶质损伤。在鱼类精子的冷冻和复苏过程中,为了抑制冰晶的形成和减少细胞损伤,通常采用慢降快升的方法。Fabbrocini 等人^[21]对下降速率作了对比实验。他们将海鲷(seabream)的精子用冷冻保护剂稀释后,分别以 10℃/min 和 15℃/min 速率分别下降,到达 -150℃ 时,快速置于液氮。经过一段时间冻存,复苏后检查其游动性,发现 10℃/min 的下降速率在维持精子游动性方面要好于 15℃/min 的下降速率。从而也说明慢速降温有利于减少对鱼类精子的损伤。同样,复苏过程也能造成鱼类精子的损伤。由于复苏严格而言是关于冷冻速率的函数,所以应根据不同的冷冻过程采取不同的复苏方法。一般而言,如果冷却过程的速率较快,那么相应的复温速率也要快

些,这样可获得较好的效果。假如方法选择不当,也易造成精子的损伤。

除了冷冻和复苏过程,还有许多因素会造成细胞的损伤。例如冷冻保护剂的种类、浓度及其加入的方式,以及不当的储存温度等。

在鱼类精子的冷冻保存中必须加入冷冻保护剂,才能有效地保护精子,达到长期冷冻保存的目的。目前经常使用的冷冻保护剂大多属于渗透型冷冻保护剂。此类冷冻保护剂在溶液中易结合水分子,发生水合作用,使溶液的粘性增加,从而弱化了水的结晶作用,减少了冰晶的形成,达到保护冻存精子的目的。但对于不同的冷冻保护剂,其使用浓度、对细胞膜的渗透能力、对水分子的水合作用等各不相同,如甘油适于慢速冷却用,而 DMSO 的渗透性强,易渗进细胞内,但对细胞却具有毒性。事实上,任何一种冷冻保护剂均各有优缺点,单一使用均不能完全满足精子冷冻保存的多方面要求。因此,在实际的冷冻操作中,往往同时使用两种甚至多种冷冻保护剂,并按一定比例进行混合,以达到最佳的冷冻保护效果。

4 结语

国外在鱼类精子的冷冻保存方面已取得了可喜的研究进展,初步形成了一套较为完整的技术体系的冷冻技术工艺。但仍存在着影响和制约鱼类精子冻存研究的诸多问题,如精子冻融损伤的发生阶段、时期,不同冻存温度对细胞活力的影响机理,不同冻存时间对细胞活力有无影响,以及抗冻的精确机理等。另外,由于在复苏过程中对温度升高的控制能力要远远低于冷冻过程中对温度下降的控制,因而使得在升温控制方面的研究显得非常单薄。目前,复苏对细胞的影响程度和影响机理,也已成为研究的重点之一。综上所述,由于冷冻过程造成的高渗压力以及复苏过程中对这些压力的释放,均能引起细胞损伤,影响精子的活力,因此,如何减少这些因素对冷冻细胞的影响,也是一个亟需解决的问题。但应该相信,随着研究手段的不断进步和研究的不断深入,这些问题终将逐步得到解决,而鱼类精子冻存技术的日臻完善,也必将为鱼类精子的冷冻保存理论以及鱼类种质保存与优良种质培育的生产实践带来深远影响。

参考文献

- 1 Viveiros A T, So N, Komen J. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. *Theriogenology*, 2000, 54(9):1 395-1 408
- 2 Hogan A E, Barlow C G, Palmer P J. Short-term storage of barramundi sperm. *Aust Fish*, 1987, 46(7):18-19

- 3 Leung L L P, Jamieson B G M. Live preservation of fish gametes. In: Fish Evolution and Systematics: evidence from Spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 245-269
- 4 Cabrita E, Alvarez R, Anel L, et al. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology*, 1998, 37:245-253
- 5 Chao N H, Chao W C, Liu K C, et al. The biological properties of black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*) sperm and its cryopreservation. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 1986, 10(2):145-149
- 6 Ritar AJ, Campet M. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Lateolabrax lineatus*). *Theriogenology*, 2000, 54(3):467-480
- 7 徐大康. 细胞超低温生物学的基本问题. 西北民族学院学报, 1996, 17(2):89-90
- 8 David A E, Graham E F. Cryopreservation of salmonid spermatozoa. *Cryobiology*, 1978, 15:362-364
- 9 Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, et al. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology*, 2000, 54(9): 1 477-1 498
- 10 Legendre M, Billard R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Reprod Nutr Dev*, 1980, 20(6): 1 859-1 868
- 11 Linhart O, Rodina M, Cosson J. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology*, 2000, 41(3):241-250
- 12 Taddei A R, Barbato F, Abelli L, et al. Is cryopreservation a homogeneous process? Ultrastructure and motility of untreated, prefreezing, and postthawed spermatozoa of *Diplodus puntazzo* (Cetti). *Cryobiology*, 2001, 42(4): 244-255
- 13 Labbe C, Martoriati A, Devaux A, et al. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(3): 397-404
- 14 Rurangwa E, Volckaert F A, Huyskens G, et al. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology*, 2001, 55(3):751-769
- 15 陈松林, 刘宪亭. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究. *动物学报*, 1992, 38(4):413-424
- 16 洪万树, 张其永, 周东晨. 黑鲷和大弹涂鱼精液短期冷冻保存. *海洋科学*, 1997, 4:6-8
- 17 洪万树, 张其永. 花鲈精子生理特性及其精液超低温冷冻保存. *海洋学报*, 1996, 18(2):97-104
- 18 Piironen J. Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of whitefish (*Coregonus muksun* Pallas). *Aquaculture*, 1987, 66:347-357
- 19 Baynes S M, Scott A P. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. *Aquaculture*, 1987, 66:53-67
- 20 Palmer P J, Blackshaw A W, Garrett R N. Successful fertility experiments with cryopreserved spermatozoa of Barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using dimethylsulfoxide and glycerol as cryoprotectants. *Reprod Fertil Dev*, 1993, 5:285-293
- 21 Fabbrocini A, Lubrano L S, Rispoli S, et al. Cryopreservation of Seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*, 2000, 40:46-53
- 22 Chao N H, Tsai H P, Liao I C. Short- and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper *Epinethelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fish Sci*, 1992, 5:103-116
- 23 Piironen J. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmon truttam lacustris* L.) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture*, 1993, 116:275-285
- 24 Gwo J C, Ohta H, Okuzawa K, et al. Cryopreservation of sperm from the endangered Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology*, 1999, 51:569-582
- 25 Babiak I, Glogowski J, Luczynski M J, et al. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa. *Theriogenology*, 1999, 52: 473-479
- 26 Gwo J C, Connie R A. Cryopreservation of Atlantic Croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes. *The Journal of Experimental Zoology*, 1992, 264:444-453
- 27 Segovia M, Jenkins J A, Paniagua-Chavez C, et al. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*, 2000, 53(7):1 489-1 499
- 28 Glogowski J, Babiak I, Goryczko K, et al. Activity of aspartate aminotransferase and acid phosphatase in cryopreserved trout sperm. *Reprod Fertil Dev*, 1996, 8(8): 1 179-1 184
- 29 Ogier de Baulny B, Labbe C, Maise G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology*, 1999, 39(2):177-184
- 30 Whittingham D G, Lyon M F, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science*, 1972, 178:411-414

(本文编辑:刘珊珊)