

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

李 纯 李 军 薛钦昭:

海洋生物种质细胞低温保存与机理*

CRYOPRESERVATION OF GERM CELLS OF MARINE ORGANISMS AND ITS MECHANISM

自从 1949 年 Ploge, Smith 和 Parkes 发现甘油在细胞低温保存中有抗冻作用后, 对生物细胞和组织的低温冷冻保存研究迅速展开, 并形成了一门新兴的学科——低温生物学。低温生物学主要是研究在低温(一般 $0 \sim -196^{\circ}\text{C}$) 条件下生物的形态结构、生理生化等生命现象的变化规律; 以及对细胞、组织、器官乃至整个生物体活性保存的一门边缘学科。发展此项技术的意义在于克服时间和空间的条件限制进行人工繁殖, 并且为品系纯化及遗传基因多样性保护提供技术支持。

目前, 低温保存研究主要以家畜的种质细胞(如精子)为主, 而对海洋生物种质细胞的冷冻保存研究较少。本文就海洋生物种质细胞保存与机理研究予以综述。

1 低温冷冻保存原理和冻伤机

1987 年报道, 细胞低温冷冻保存的原理是通过低温抑制细胞代谢, 使具有生物活性的物质暂时失去活力。细胞由常温下的高耗能, 进行大量代谢状态, 进入一种能量消耗、新陈代谢降至最低点的休眠状态或所谓假死状态。在低温保存过程中, 如果细胞自身发生的变化

是可逆的, 蛋白质、酶以及其他细胞结构没有被破坏, 那么当细胞恢复到常温下时, 才能恢复活力。一般学者认为温度在 $0 \sim -60^{\circ}\text{C}$ 之间细胞内水分子会重新移动按一定次序排列形成冰晶, 损伤细胞使其内部生理、生化条件失去原有的平衡, 造成不可逆变化。当温度低于 -60°C , 细胞内的水分无序排列不再移动, 进入坚硬、均质、团块状的玻璃化状态。玻璃化状态是一种可逆的, 对细胞结构不会造成损伤。因此, 低温保存种质细胞时应以适宜的降温速度越过 $0 \sim -60^{\circ}\text{C}$ 的结晶区进入玻璃化状态, 减少冷冻伤害。

低温保存种质细胞常常会导致一些细胞失去活力、细胞结构(特别是膜系统)不完整甚至破裂, 导致胞内酶系统功能失调。至于低温冷冻保存给细胞带来伤害的具体原因, 并不是十分清楚, 各学者也有不同的观点。(1) 机械损伤学说认为冷冻伤害来自细胞内外的水由于降温结冰而产生的机械损伤。因为随着在冰点温度下时间的延长, 冰晶不断生长。当冰晶生长到足够大时, 会刺穿细胞膜, 使细胞破裂死亡。(2) 盐至变性学说认为, 冰晶的生长会受到细胞内脂蛋白的抑制, 因此冷冻伤害不是来自

冰晶的机械作用, 而是细胞脱水和细胞内外的渗透压改变, 引起电解质的失衡。Karow 等 1965 年报道, 在冷冻过程中蛋白质会失去表面的结合水。Levitt 1962 年、1969 年认为, 在冷冻过程中细胞失水导致蛋白质间距离缩短, 使二硫键和硫氢键的作用加强, 从而给细胞带来不利影响。Lovelock 1953 年认为当细胞外溶液结冰时, 电解质浓度会上升甚至达到致死浓度; 同时细胞外溶液浓度增加, 使细胞内水分渗出以平衡渗透压。这样内外环境的骤然改变会对细胞产生伤害。(3) 细胞容积学说则认为电解质溶液浓度(渗透压) 改变产生的影响并不如细胞体积改变造成的损伤严重。通过实验和计算证实: 冷冻时, 细胞失水发生萎缩体积变小, 如果达到最小临界体积时细胞膜会破裂; 解冻时细胞吸水膨胀超过最大临界体积时也会破裂。而且此学说还认为细胞解冻时吸水膨胀造成的伤害远远超过冷冻时失水带来的损伤。(4) 重结晶学说认为, 冷冻伤害

* 国家自然科学基金资助项目 39770583 号; 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 3761 号。
收稿日期: 1999-08-20;
修回日期: 1999-12-14

不是发生在最初的冷冻阶段,而与解冻升温或在低温中保存时间过长,发生重结晶有关。当溶液在低温中冷冻保存时,冰晶结构会随时间延长发生变化,不断生长;相似变化在升温时也有。这种重结晶现象的发生会加剧渗透压改变或机械作用带来的损伤。

2 低温冷冻保存种质细胞的几种方法

低温冷冻保存研究的早期阶段由于技术手段的限制,多数是零下十几度的低温保存。随着技术的进步,现在的冷冻研究大部分是在干冰(-79°C)或液氮(-196°C)的超低温条件下进行。这样使得保存材料的时间更持久。并且由于保存的最终状态是处于玻璃化状态,所以在储存过程中种质细胞的状态非常稳定,提高了低温保存的成功率。冷冻保存的方法有:(1)低温冰箱冷冻;(2)颗粒冷冻法;(3)安瓿冷冻法;(4)麦管冷冻法。机械冰箱所能达到的最低温度只有零下几十度,只能进行低温保存,并且温度有一定的波动,只适于短时期的低温保存。颗粒冷冻法是将含种质细胞的稀释液滴在干冰上冷冻成颗粒,然后把这些颗粒转移至液氮中保存。安瓿冷冻法和麦管冷冻法是将种质细胞分装在安瓿或麦管中封存,再以一定的降温速率降至液氮中保存。后3种方法是在干冰或液氮中保存,温度能够稳定地保持在 -79°C 和 -196°C 。

3 低温保存中使用抗冻剂

在低温保存过程中种质细胞常常会被破坏,因此人们希望有一

种物质能在冷冻过程中对细胞进行保护,减少冷冻伤害。自从1949年Ploge等发现利用甘油能很好地保护精子后,人们才开始在低温保存中使用抗冻剂。抗冻剂分为渗透性和非渗透性两大类:渗透性抗冻剂可以透过细胞膜进入细胞,与细胞内水分互溶,对提高细胞的抗冻性起主要作用;非渗透性抗冻剂不能进入细胞内部,在细胞外起到辅助作用。

3.1 渗透性抗冻剂

低温保存过程中使用的渗透性抗冻剂主要有二甲基亚砜(DMSO)、甘油、甲醇等。由于DMSO渗透速度快、分布均匀、毒性低、保存效果好,而广泛使用。这些渗透性抗冻剂是许多化合物良好的溶剂,能与水很好地互溶,并能保持水分,增加溶液的粘性。在冷冻过程中这些特性能有效起到防止细胞脱水、冰晶形成的作用。例如水中加入甘油量的不同形成冰晶结构也不同,随着甘油量的增加,液体粘性增强、热传导加快,针形冰晶越来越钝。同时甘油有良好的吸水性并能自由通过细胞膜,有利于保持细胞水分、可溶性盐类,稳定渗透压。虽然抗冻剂能够减少超低温冷冻带来的伤害,但并不能使细胞百分之百复苏。此外,Xue^[3]等1995年认为渗透性抗冻剂本身毒性限制其使用浓度,而浓度过低是起不到对细胞保护作用的。

3.2 非渗透性抗冻剂

在低温保存种质细胞过程中经常加入糖类,但糖的作用并不十分确定。有的学者认为在稀释液中加入糖类(多为蔗糖、海藻糖)可以为精子提供能量。但精子被排出体外后能否利用外界环境中的能量,

尚无结论。更多的学者倾向于把糖类看作是一种作用于细胞外的非渗透性的有抗冻功能的物质。Ancherdoguy等1987年用模拟的细胞膜(双层磷脂分子)做冷冻实验,认为海藻糖和蔗糖的氢键与磷脂分子头部相连形成一个分子层。在降温过程中,这种分子间相互作用能抑制水分结冰,防止双层膜分离、细胞破坏,有一定的抗冻作用。Nai-Hsien Chao^[1]等1997年超低温冷冻保存牡蛎、丽文蛤的胚胎和幼虫时,也认为糖类作为非渗透性的抗冻剂,与渗透性的抗冻剂相互作用能显著提高冷冻效果。

除了糖类有辅助的抗冻作用外,甘氨酸、肌氨酸等氨基酸也有相似的作用。Kobina等1991年保存牡蛎(*Crassostrea tulipa*)精液时分别加入15%DMSO+0.6%甘氨酸和20%DMSO+0.6%甘氨酸,在 -190°C 保存16d后解冻、受精,发育至眼点期幼虫的为23.3%和26.6%,而相应的对照组(不加甘氨酸)只有15.3%和19.5%。

4 冷冻、解冻控制

降温速度对种质细胞的低温冷冻保存能否取得较好的效果非常重要。Ancherdoguy 1987年认为降温速度比较慢时,抗冻剂甘油与细胞膜上的磷脂相互作用是不稳定的,甘油的冷冻保护效果不佳。另外,降温速度过慢会使精子在 $0\sim-60^{\circ}\text{C}$ 温域内停留时间过久。细胞外部环境中水分可能首先结冰使渗透压升高,细胞中的水分会渗出以平衡渗透压。这样细胞内部电解质浓度过高带来不利影响,甚至细胞严重脱水,收缩变形、死亡。当降温速度过快时,细胞内水

分可能来不及渗出细胞外而形成冰晶,对细胞产生机械损伤。许多研究者对最适降温速率做了大量实验,不同的材料其最适冷冻速率大不一样。Chao Nai-Hsien^[1]等 1997 年在超低温冷冻保存牡蛎胚胎和幼虫时,认为选择降温速率应该考虑保存材料的个体大小等因素。只有适宜的降温速率才能使细胞内的水分渗出,适应新的环境,将细胞脱水 and 抗冻剂毒性引起的伤害降低。

解冻时的升温速度也很重要,只有快速升温才能避免重结晶现象发生。用颗粒冷冻法保存的材料一般是直接在激活液中解冻并激活。麦管冷冻法和安瓶冷冻法由于是封闭保存,所以采用在室温解冻或水浴解冻。

5 激活液

Stoss 等 1983 年,陈松林等 1987 年研究表明,由于经过抗冻剂和低温冷冻处理,精子的生理特性(渗透压、运动能力和寿命)都会发生变化。所以选择适宜的激活液对提高解冻后精子的运动能力及受精率非常重要。陈松林等 1992 年认为激活液的 pH 值、渗透压等对冻精的受精率均有一定影响。例如鲢的冻精在渗透压为 171~342 mOsm/L 的 NaCl 溶液中受精率平均在 80% 以上;并且还认为激活液 pH 值偏碱性时,有利于精子激活运动。目前许多实验研究选用激活液都是从调整渗透压、pH 值等方面考虑使精子恢复到常温下活跃状态。对于冻精中含有的抗冻剂如何洗脱置换出来,以减少对精卵的进一步毒害,提高冻精的受精率和孵化率,这方面研究报道不多。

6 海洋生物种质细胞的低温保存

6.1 海洋生物种质细胞保存研究现状

海洋生物种质细胞的低温保存最初是从保存海水鱼类精子开始的。经过几十年的研究发展已经取得了很大的成就,某些种类不仅能够长期低温保存,而且有很高的成功率。目前,冷冻保存研究主要集中在有开发利用价值的经济种类,如:鱼、虾和贝类的精子细胞和胚胎,以及相关的饵料生物——单胞藻和卤虫等。

随着实验技术手段的进步,许多的研究者开始关注低温冷冻保存给种质细胞结构、代谢等带来的变化。Hisashi 等 1990 年处理牡蛎精子时发现解剖取精后有 82.9% 形态结构正常,而经冷冻处理后只有 18.8%~57.0% 精子结构保持完整。用扫描电镜观察精子时发现抗冻剂浓度越高、平衡时间越长,精子顶体的畸形率越高。Lahnsteiner 1992 年用扫描电镜观察茴鱼(*Thymallus thymallus*) 精子时发现,经过冷冻、解冻后有 40%~50% 精子结构完全破坏,30%~40% 精子结构发生了不同程度的改变。1996 年 Lahnsteiner^[2]对虹鳟鱼精子冷冻前后的结构、生理和代谢等方面做了进一步比较研究。结果发现冷冻后只有 16% 的精子与鲜精的结构相似;27% 精子的头部、中段或尾部发生明显的膨胀,其余精子(57%)全部破损。冷冻解冻后精子主要是头部、中段和尾部膨胀破裂而染色体并没有变化。这种现象一方面说明生物膜非常敏感,机械损伤或渗透压的改变破坏了膜的流

动性,引起细胞膜的破裂;同时头部顶体及遗传物质(染色体)保持完整也可能解释为什么解冻后精子运动能力非常低时受精率仍可以很高。另外,冻精授精时大部分做直线运动,而鲜精授精时主要做圆周运动。这很可能是冻精细胞膜对 Ca^{2+} 的通透性发生变化导致。通过对冻精中酶的分析发现异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、乳酸脱氢酶和 ATP 酶等明显降低。磷酸肌酸、ATP 水平明显低于鲜精,而乳酸、丙酮酸、葡萄糖和甘油等则没有明显变化。这些事实从一个方面反映出种质细胞在冷冻保存过程中能量代谢受到抑制,不仅自身不可能产生能量,而且也无法利用外界的能量物质。从显微结构甚至分子水平研究种质细胞在冷冻过程中的变化能很好地揭示低温生物学的机理、验证各种假说,为进一步拓展低温生物学的领域,改进低温保存技术提供有力支持。因此一方面许多学者继续对低温保存技术进行不断的完善,另一方面研究者更多地开始从分子水平关注种质细胞在冷冻和解冻后的结构、代谢等生理和生化上的变化。

6.2 海洋生物种质细胞低温保存活性鉴定方法

关于低温保存海洋生物种质细胞效果的评价,不同的生物材料评价指标不同。对于动物的生殖细胞(精子为主)主要考虑解冻后运动能力、复苏的比例(%)、受精率(%)、相对受精率(%)、受精时精卵比例和正常孵化率(%)等。解冻后冻精的复苏比例和运动能力只能粗略地反映出低温保存对生殖细胞的影响;受精率、相对受精率以及精卵比例等则能较准确地反

映出低温保存给生殖细胞遗传、发育带来的影响。复苏比例和受精率虽然紧密相关,但并不等同。有些种类的冻精虽然运动能力、复苏情况不好,但仍可以有较高的受精率。对于胚胎的低温保存效果主要由解冻后复苏比例(%)和正常发育率(%)确定。而海洋微藻类的保存效果主要是比较解冻后藻的生长率($r = (\ln C_t / \ln C_0) / t$, C_t 为终浓度, C_0 为始浓度, t 为时间)。

6.3 低温保存技术中存在的问题

鱼类通常是人工挤压成熟性腺来获得鲜精。大部分虾的生活史中雌虾接受雄虾的精子后并不是立即精卵结合,而是储存在精英中,第2年才与卵子结合受精。而贝类中存在着雌雄同体、性转换等问题。所以获得虾与贝的成熟精子

细胞比较困难。Tamako 等 1986 年用 12 V 电压刺激龙虾第 5 步足,取下精英,进行低温(4~7℃)保存。岩田仲弘等 1989 年冷冻保存太平洋牡蛎精子是通过挖取性腺组织、挤出精液后离心浓缩获得的。Hisashi 等 1990 年也采用解剖法获取精子。Ronard 1991 年通过提高水温(5~6℃)刺激牡蛎自然排精。解剖取精无法避免未成熟的生殖细胞混入其中,从而影响受精效果和精卵比例。自然排出的精子虽然是成熟生殖细胞,但已经处于活跃受精状态,消耗了一部分能量,对以后的超低温冷冻保存可能会产生不利影响。

抗冻剂作为有毒的化学物质会对海洋动物种质细胞的生长发育产生一定的影响,解冻后如何洗脱残留的抗冻剂还没有人做过研

究。海洋微藻由于有较厚的细胞壁,可以用离心方法洗脱掉抗冻剂。而动物种质细胞没有细胞壁,非常脆弱,因此不适宜离心方法。目前,只是通过增加激活液的使用量,稀释抗冻剂降低其浓度,还没有更有效的解决方法。

参考文献

- 1 Chao Nai-Hsien, *et al.* *Aquaculture*, 1997, 155 : 31~44
- 2 Lahnsteiner, F., *et al.* *Aquaculture*, 1996, 144: 256~274
- 3 Xue Qinzhaoh and Xiang Jianhai. *Chin. J. Oceanol. Limnol.*, 1995, 13 (4): 434~440

(本文编辑:刘珊珊)