

超低温保存后大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) 精子的生理活性及其超微结构研究*

张雪雷^{1,2} 王文琪¹ 肖志忠² 徐长安³ 蒋日进⁴ 徐世宏²
马道远² 肖永双² 武宁宁⁵ 刘清华² 李 军²

(1. 青岛农业大学海洋科学与工程学院 青岛 266109; 2. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071;
3. 国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005; 4. 浙江海洋学院海洋与渔业研究所 舟山 316100;
5. 青岛市渔业技术推广站 青岛 266071)

提要 采用计算机辅助分析和电子显微镜方法, 对大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)精子生理活性(运动率、运动速度和寿命)和超微结构进行观察, 研究其精子经超低温保存后质量变化情况, 得到了新鲜精子的路径速度 $[(101.91 \pm 9.30) \mu\text{m/s}]$ 、运动率 $(88.30\% \pm 2.62\%)$ 和寿命 $[(368.00 \pm 111.50)\text{h}]$, 以及冷冻精子的路径速度 $[(76.78 \pm 8.49) \mu\text{m/s}]$ 、运动率 $(65.60\% \pm 4.76\%)$ 和寿命 $[(120.00 \pm 12.00)\text{h}]$ 。结果表明, 新鲜精子的生理特性好于冷冻精子。同时通过电镜去进行超微结构分析, 发现大菱鲂精子经过超低温保存后, 40%—60%的精子基本保持正常的形态结构, 其余精子遭受不同程度的机械损伤。其中膜损伤为主要损伤, 损伤精子中 60%—70%带有膜损伤。推测大菱鲂精子在冷冻解冻过程中遭受到的机械损伤可能是导致冻精生理活性显著下降的主要原因。

关键词 超低温保存; 大菱鲂; 精子; 超微结构; 机械损伤

中图分类号 Q954

精子冷冻保存技术在防止鱼类物种灭绝和种质退化等方面有巨大的应用潜力, 对于鱼类种质资源保护、遗传改良以及水产养殖业可持续发展有着重要应用价值和理论意义。

目前, 经济鱼类精子的超低温冻存及质量检测的研究已见在黑鲷(*Sparus macrocephalus*)、真鲷(*Pagrus major*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、褐鳟(*Salmo trutta*)、七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)及条纹狼鲈(*Dicentrarchus labrax*) (叶霆等, 2009; Liu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Perez-Cerezales *et al.*, 2010; Martinez-Paramo *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2010; Zilli *et al.*, 2003)等种类中研

究报道。

现阶段对于大菱鲂精子的低温冷冻保存方面的研究较少。大菱鲂的雌雄性腺发育不同步, 大菱鲂雄鱼精子产量少、质量差, 精液产量跟不上育苗需要量。所以, 本文对大菱鲂精子冷冻保存技术研究, 在建立大菱鲂精子高效冷冻保存方法、检测冻精质量、为规模化生产储存材料、养殖品种的改良方面都具有重要意义。用客观地检测精子的质量在一些鱼类生物学及相关研究中已有报道, 如利用计算机辅助分析系统检测真鲷新鲜精子和冷冻精子的运动率和运动速度(刘清华等, 2006)。本文通过计算机辅助分析(CASA)和电子显微镜对大菱鲂新鲜精子和冷冻精子的生理活性和超微结构进行了比较研究, 从而掌握

* 现代农业产业技术体系建设专项资金, nycytx-50号; 国家自然科学基金项目, 31072212号, 41076100号; 海洋渔业科学与技术浙江省重中之重学科开放课题, 2012.01—2012.12; 山东省发改委“两区”建设专项资金, 2011.06—2013.12。张雪雷, 硕士研究生, E-mail: zhang-xuelei@163.com; 同等贡献第一作者: 王文琪, 教授, E-mail: wenqiwang@qau.edu.cn

通讯作者: 刘清华, E-mail: qinghualiu@qdio.ac.cn; 李军, E-mail: junli@qdio.ac.cn

收稿日期: 2012-06-29, 收修改稿日期: 2012-08-27

低温冷冻对精子的损伤情况,探讨冷冻对精子的损伤机制,以期为精子超低温保存技术改进提供理论依据和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 精子的采集

实验用大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)亲鱼为采集于烟台东方海洋公司的繁殖用鱼。采用人工挤压腹部的方法采集精液,操作过程中尽量避免海水、粪便、尿液等的污染。将运动率高于 80%的精子用于实验,采集到的精子置于 4℃冰箱中保存。精子的运动率是用自然海水以 1:300 的比例进行稀释激活精子,在 20 倍显微镜下观察精子的运动情况,以精子、微生物动(静)态图像检测系统(清华同方公司)对精子进行计数,每个样本计数的精子数目为至少 200 个,运动精子个数与总计数精子个数的比例为精子的运动率。

1.2 药品及仪器

二甲基亚砜(DMSO)购自 SIGMA 公司,其它药品均来自国药集团化学试剂有限公司。抗冻剂稀释液由 Hanks 缓冲液配制(8g/L NaCl, 0.4g/L KCl, 0.14g/L CaCl₂, 0.1g/L MgSO₄·7H₂O, 0.1g/L MgCl₂·6H₂O, 0.06g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0.06g/L KH₂PO₄, 1g/L 葡萄糖, 0.35g/L NaHCO₃)。程序降温仪型号 Kryo-360-1.7, 光学显微镜型号 Nikon-YS-100; 液氮罐型号 YDS-30B-80。

1.3 大菱鲂精子的冷冻保存

精液分别与 15%丙二醇(PG)和 15% DMSO 按 1:3 的体积比均匀混合,将混合液(共 1.6mL)置于 2mL 的冷存管后转入程序降温仪,按照预设程序进行冷冻处理。冷冻程序为:0℃平衡 5min,然后以 20℃/min 的速度从 0℃降到-150℃,快速从程序降温仪腔体内取出样品投入到盛有液氮的液氮罐中保存。每次实验至少 3 个平行样,实验重复 3 次。

1.4 大菱鲂新鲜精子和精子超低温保存后对平均路径运动速率、运动率和寿命的观察

对冷冻保存的精子进行水浴解冻,水浴温度为 35℃。冷冻样品在水浴中大约 100—110s,转化为液态后取出。解冻的精子用自然海水以 1:100 的比例进行激活,然后显微镜下观察精子的运动情况。新鲜精子和解冻的精子放于 4℃冰箱中保存,每隔 12h 取少量精子进行激活,记录的精子平均路径运动速率、运动率和寿命。

1.5 大菱鲂精子超低温保存后超微结构变化

鲜精和 15% DMSO 冷冻保存的冻精用 2.5%戊二

醛(0.2mol/L, pH=7.4, 磷酸缓冲液配制)进行前固定。扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)样品,经磷酸缓冲液(0.2mol/L, pH=7.4)漂洗后,用 1% 锇酸后固定,然后经酒精系列脱水、醋酸异戊脂置换、离子镀膜等步骤后,扫描电镜(KYKY-1000B)下观察、拍照。透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)样品,按常规步骤进行预包装、切块后,用 1% 锇酸固定,梯度酒精脱水,然后 Epon812 渗透包埋,超薄切片,经铀铅双重染色后,透射电镜(日立 H-7000)下观察、拍照。

1.6 统计分析

本实验数据均用 SPSS 19.0 软件进行分析(SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA)。实验数据以平均数±SD 表示,均数的比较采用 One-Way ANOVA 分析法,差异显著性分析采用 SNK(Student-Newman-Keuls'test)法。

2 结果

2.1 大菱鲂新鲜精子和冷冻精子平均路径运动速率、运动率和寿命

精子的寿命是指从精子的运动率下降到低于 10%的这段时间。精子激活后的路径速度和运动率如图 1 和图 2 所示。

大菱鲂新鲜精子的平均路径运动速率、运动率和寿命都要高于冷冻精子(图 1 和图 2),差异显著($P<0.05$)。用 PG 做抗冻剂的冷冻精子的平均路径运动速率、运动率和寿命都要高于用 DMSO 做抗冻剂的冷冻精子,但是差异不显著($P>0.05$)。

2.2 大菱鲂新鲜精超微结构和精子超低温保存后超微结构变化

大菱鲂的鲜精和经过超低温保存后的冻精的超微结构如图 3 和图 4 所示。

正常大菱鲂精子包括头部、中段和尾部 3 部分结构,其中头部和中段紧密相接(图 3a, 图 4a),精子的鞭毛长(53.186 ± 2.67) μm ,精子的质膜和核膜紧贴(图 4a),植入窝陷入精子中很深(图 3a, 图 3b),核呈肾形(图 4a)。大菱鲂鲜精的线粒体 13 个左右,分布于不同的水平上。

大菱鲂精子经过超低温保存后,40%—60%的精子基本保持正常的形态结构,其余精子遭受不同程度的损伤,主要有:精子头部损伤和精子线粒体损伤(图 3c, 图 3d),以及精子质膜、核膜的损伤(图 4c, 图 4d),还有精子形状的改变(图 3c, 图 4c),其中膜损伤为主要损伤,损伤精子中 60%—70%带有膜损伤。

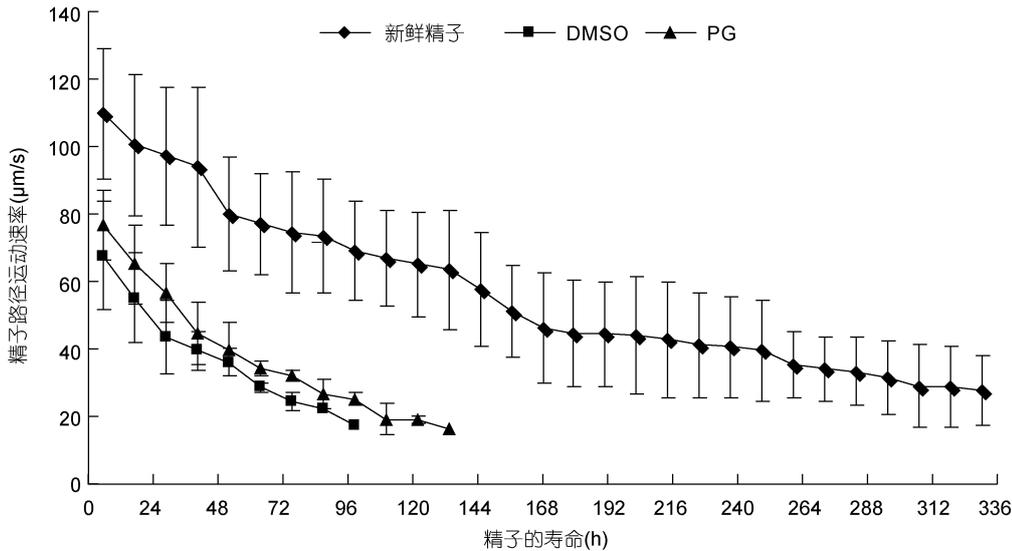


图1 大菱鲂精子激活后的路径运动速率
Fig.1 VAP of *S. maximus* sperm after activation

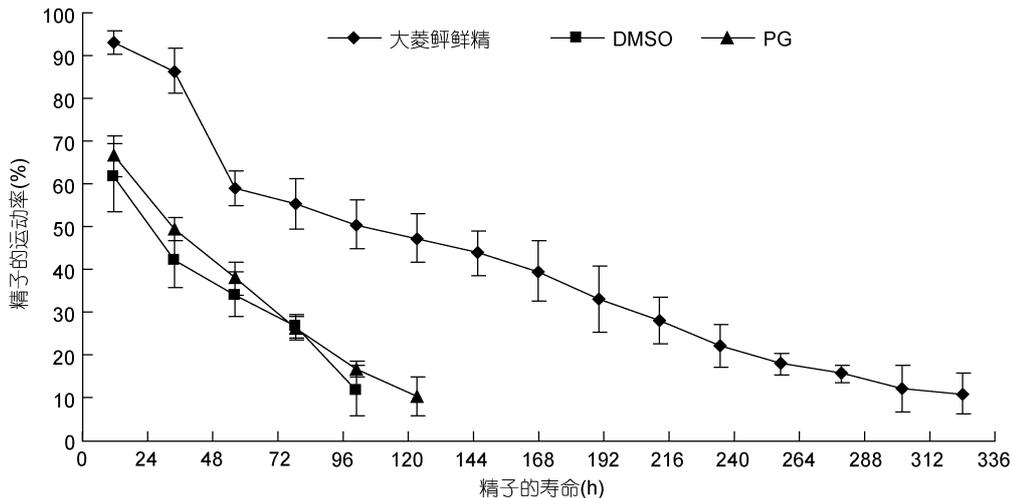


图2 大菱鲂精子4°C下的运动率
Fig.2 Motility of *S. maximus* sperm preserved at 4°C

3 讨论

3.1 大菱鲂精子的运动速率和运动率

运动速率和运动率是检测精子质量的一个重要的指标,尤其是运动率,在理论上与精子的受精率存在一定的相关性(Cosson *et al*, 1999)。超低温保存后的精子通常通过检测其运动率来评价保存的质量状况(刘清华等, 2006)。超低温保存对大菱鲂精子运动率以及运动速度的影响见图1、图2。

现阶段的研究展示了利用 CASA 采集精子数据的重要性,例如本文中采集大菱鲂精子的数据。本文利用 CASA 检测精子的运动速率和显微镜,获得了大

菱鲂新鲜精子和分别应用两种不同抗冻剂的冷冻精子的运动速率和运动率。从结果中可以看出,超低温保存对于大菱鲂精子的运动率以及运动精子的运动速度影响显著($P<0.05$),快速直线路径运动仍然是冻精的主要运动方式。大菱鲂新鲜精子的运动速率和运动率要高于冷冻精子,差异显著($P<0.05$)。

细胞冻融过程中,胞内及胞间极易产生冰晶,能损伤线粒体、质膜和核膜还有各种其它的细胞器,尤其是线粒体。因为线粒体是供给精子运动和其它功能能量的重要细胞器,但是精子经过超低温保存后有的精子的线粒体会破裂甚至脱落(陈亚坤等, 2010)。一些精子的质膜和核膜也会在解冻后与精子发生分离和断裂(陈亚坤等, 2010)。Saragusty 等(2009)也使用牛精子研究了机械损伤对与精子冷冻损伤的关系,证明机械损伤是精子冷冻

损伤的主要原因。因此,推测精子在解冻过程中的机械损伤是导致大菱鲂鲜精的生理活性好于冻精生理活性的主要原因。

本实验所使用的抗冻液 DMSO 和 PG 是一种渗透性抗冻剂,抗冻剂的浓度为 15%,而且使用 Hanks 缓冲液作为抗冻液的缓冲液,可有效防止精子由于渗透压的变化而产生的质膜的损伤。研究显示有各种可以使用的抗冻剂包括 DMSO、甘油、乙二醇、PG、丁二醇等,但是这些抗冻剂都有毒性,对精子的毒性大小不同并且抗冻效果各异(Wegener *et al*, 2012)。在精子的快速冷冻过程中高渗抗冻液能够保护精子免

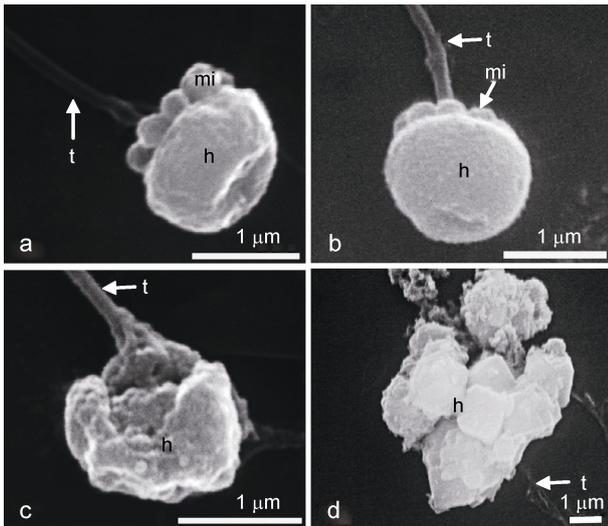


图3 大菱鲆精子扫描电镜观察

Fig.3 SEM image showing ultrastructure of spermatozoa of *S. maximus*

注: a. 鲜精; b. 结构比较完整的冻精; c. 轻微损伤的冻精; d. 严重损伤的冻精。h. 头; t. 尾; mi. 线粒体

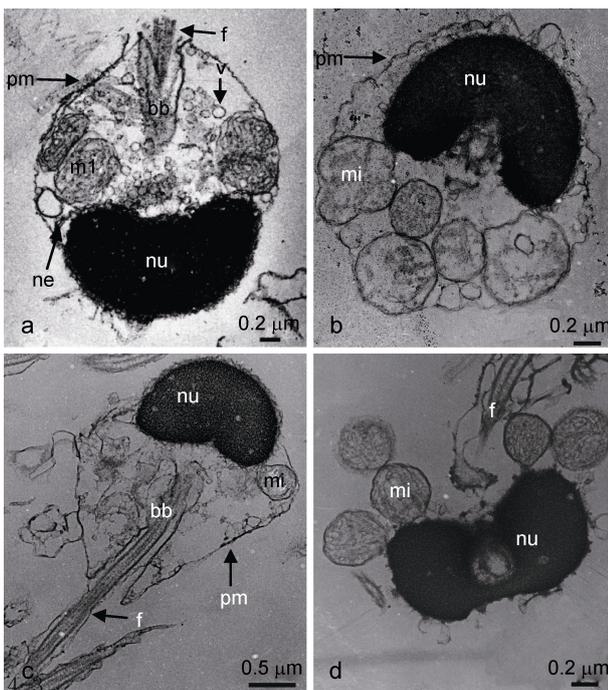


图4 大菱鲆精子透射电镜观察

Fig.4 TEM image showing ultrastructure of spermatozoa of *S. maximus*

注: a. 鲜精; b. 结构比较完整的冻精; c. 形状改变, 线粒体正在溶解的冷冻精子; d. 质膜、核膜消失的冷冻精子。nu. 核; ne. 核膜; bb. 基体; mi. 线粒体; pm. 质膜; f. 鞭毛; v. 液泡

受冰晶损伤,但在解冻后由于精液中含有的DMSO和PG又可能对精子的活力和受精力产生毒性。PG的毒性要比DMSO要小,在本实验中也证明了采用

PG作为抗冻液的精子的运动率和运动速率要比使用DMSO作为抗冻液的精子要高(图1和图2)。DMSO和PG毒性和抗冻效果的差异可能是导致分别使用PG和DMSO作为抗冻剂的冷冻精子的运动率和运动速率产生差异性的原因。因此,可以使用PG做抗冻液来减小抗冻液在解冻后的毒性对精子造成的损害。

3.2 大菱鲆精子超微结构的变化

大菱鲆精子有鞭毛,无顶体,这与大多数硬骨鱼类相似(Hara *et al.*, 1998; Grier, 1973; 尹洪滨等, 2000; 尤永隆等, 1996, 1997)。大菱鲆鲜精的线粒体为13个左右,分布于不同的水平上,在精子的超微结构的观察中发现很多精子的线粒体很容易在超低温冷冻中发生脱落并且精子尾部的轴丝断裂和脱落,而精子的运动能量来源于线粒体并且精子尾部的轴丝的剧烈摆动是精子在激活后运动的动力,因此冷冻精子的运动速度低于新鲜精子的(图1)。Gwo(1995)观察运动后的精子发现其线粒体体积变小,数量也会减少,直至消失。

有研究显示超低温冷冻会使一些精子的外部形态结构发生变化(陈亚坤等, 2010),这种损伤主要发生在精子冷冻的超低温贮藏过程中。对解冻后的精子的超微结构观察表明冷冻精子的损伤的比率上升。最常见的异常是精子质膜的变化,如质膜膨胀或破损;其次是核的变化,如核膜破裂、丢失,染色质解体等;细胞器主要是线粒体和轴丝的损伤,如线粒体嵴消失,轴丝断裂成许多段等。这些精子在超低温保存中出现的损伤也出现在其它一些鱼类中。

陈亚坤等(2010)在观察了真鲷新鲜精子和冷冻精子的超微结构后指出,精子超微结构在超低温冷冻后发生异常并且精子质膜与核膜的损伤是普遍的。有学者通过对精子的染色和超微结构的观察,发现超低温冷冻后精子的死亡率上升,精子的质膜损伤率大于新鲜精子(Liu *et al.*, 2007)。Cabrita等(2001)认为精子超低温冷冻后受精能力下降与质膜损伤有关。有许多因素会造成精子质膜的损伤,例如降温、解冻过程中精子内外冰晶的生成引起膜的机械损伤,还有加入抗冻液后导致的渗透压的改变引起的精子质膜的损伤。

参 考 文 献

- 尤永隆,林丹军,1996. 鲤鱼精子超微结构的研究. 动物学研究, 24(04): 377—383
 尤永隆,林丹军,1997. 大黄鱼精子的超微结构. 动物学报,

- 43(02): 119—126
- 尹洪滨, 孙中武, 刘玉堂等, 2000. 索氏六须鲈精子的超微结构. 水产学报, 355—357
- 叶 霆, 竺俊全, 杨万喜等, 2009. 黑鲷精子的超低温冻存及 DNS 损伤的 SCGE 检测. 动物学研究, 30(2): 151—157
- 刘清华, 李 军, 丁福红等, 2006. 运用计算机辅助分析检测超低温保存的真鲷(*Pagrus major*)精子的质量. 自然科学进展, 16(9): 1181—1185
- 陈亚坤, 刘清华, 赵春彦等, 2010. 长期超低温保存后真鲷精子的质量变化. 海洋科学, 34(6): 50—54
- Cabrita E, Anel L, Herraez M P, 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 56(4): 623—635
- Chen S L, Ji X S, Yu G C *et al*, 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*, 236(1—4): 547—556
- Cosson J, Billard R, Cibert C *et al*, 1999. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. *Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. Paris: Cache River Press, 161—186
- Grier H J, 1973. Ultrastructure of the testis in the teleost *Poecilia latipinna*. *J Ultrastruct Res*, 45: 82—92
- Gwo J C, 1995. Ultrastructure-study of osmolality effect on spermatozoa of 3 marine teleosts. *Tissue Cell*, 27(5): 491—497
- Hara M, Okiyama M, 1998. An ultrastructural review of the spermatozoa of Japanese fishes. *Bull Ocean Res Inst Univ Tokyo*, 33: 120—131
- Koh I C C, Yokoi K, Tsuji M *et al*, 2010. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology*, 61(3): 263—267
- Liu Q H, Li J, Zhang S C *et al*, 2007. Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology*, 67: 1168—1174
- Martinez-Paramo S, Perez-Cerezales S, Gomez-Romano F *et al*, 2009. Cryobanking as tool for conservation of biodiversity: Effect of brown trout sperm cryopreservation on the male genetic potential. *Theriogenology*, 71(4): 594—604
- Perez-Cerezales S, Martinez-Paramo S, Beirao J *et al*, 2010. Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology*, 74(2): 282—289
- Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I *et al*, 2009. Do physical forces contribute to cryodamage. *Biotechnol Bioeng*, 104(4): 712—728
- Wegener J, Bienefeld K, 2012. Toxicity of cryoprotectants to honey bee semen and queens. *Theriogenology*, 77(3): 600—607
- Zhang S C, Zhang Y Z, Liu X Z *et al*, 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology*, 60(5): 989—996
- Zilli L, Schiavone R, Zonno V *et al*, 2003. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology*, 47(3): 227—235

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND ULTRASTRUCTURE OF POST-THAW SPERM IN TURBOT *SCOPHTHALMUS MAXIMUS*

ZHANG Xue-Lei^{1,2}, WANG Wen-Qi¹, XIAO Zhi-Zhong², XU Chang-An³,
JIANG Ri-Jin⁴, XU Shi-Hong², MA Dao-Yuan², XIAO Yong-Shuang²,
WU Ning-Ning⁵, LIU Qing-Hua², LI Jun²

(1. College of Marine Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao, 266109; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 3. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, 361005; 4. Marine and Fishery Research Institute, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316100; 5. Qingdao Fishery Technique Promotion Station, Qingdao, 266071)

Abstract This study examined the quality of turbot *Scophthalmus maximus* sperm by observing VAP, motility, longevity and ultrastructures after cryopreservation. The VAP [(101.91±9.30)μm/s], motility (88.30%±2.62%) and longevity [(368.00±111.50)h] of the fresh sperm and the VAP [(76.78±8.49)μm/s], motility (65.60%±4.76%) and longevity [(120.00±12.00)h] of the post-thaw sperm were obtained by using the computer assisted sperm analysis (CASA). The results show the physiological quality of the fresh sperm were better than those of the post-thaw sperm. The ultrastructure analysis showed 40%—60% of the post-thaw sperm could keep the normal morphology. 60%—70% of the mechanical damage occurred in the nuclear envelope and plasmalemma. We speculated that the mechanical damage occurred in the post-thaw process might be the main reason for physiological activity decline.

Key words cryopreservation; turbot *Scophthalmus maximus*; sperm; ultrastructure; mechanical damage