

红鳍东方鲀精子超低温保存前后的超微结构观察

于海涛¹, 张秀梅¹, 陈超², 李辉³

(1. 中国海洋大学 生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 山东华新海大海洋生物股份有限公司, 山东 威海 264200)

摘要: 应用透射电镜技术, 研究超低温保存前后红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) 精子的超微结构。观察发现, 受冷冻损伤精子的被膜膨胀、破裂、脱落; 线粒体内嵴变形, 结构模糊, 甚至消失; 鞭毛在基部或主段、末段断裂, 或被膜膨胀脱落。结果表明, 经超低温保存后, 部分红鳍东方鲀精子由于膜结构及鞭毛轴丝损伤导致精子活力下降。

关键词: 红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*); 精子; 超低温保存; 超微结构

中图分类号: S961 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)02-0017-03

超低温保存是指生物细胞、组织器官或配子等在超低温状态下代谢完全停止, 生命以静止的形式可以在这种状态下得以长期保存。此项技术可应用于生物精子的批量运输、杂交育种、遗传研究, 以及保存稀有物种种质等方面。自从 Ploge 1949 年开创动物配子低温保存以来, 鱼类精子冷冻保存技术日趋成熟, 迄今国内外已建立了 40 余种淡、海水鱼类精子冷冻保存方法^[1,2], 而关于红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) 精子超低温保存研究却甚少, 尤其是红鳍东方鲀精子超低温保存后的超微结构观察更是鲜有报道。作者利用透射电镜对红鳍东方鲀精子在超低温保存前后精子形态和超微结构的变化作了观察, 了解超低温保存和解冻对其造成的结构损伤, 以期减少冷冻损伤, 建立完善的液精子超低温保存程序提供参考。

1 材料与方法

1.1 精液采集

实验用鱼为山东华新海大海洋生物股份有限公司培育的性腺成熟亲鱼, 手挤法采集精液, 弃掉刚挤出的 2 mL 精液, 然后再用干净烧杯挤取, 实验精液要求无血、无尿、无脏, 颜色乳白, 有光泽, 镜检活力大于 90%。

1.2 冻精制备

用含有 10% DMSO 的稀释液与精液按 3:1 混合均匀, 分段冷冻法冷冻, 液氮保存 24 h。

1.3 精子固定

取同一批精液 5 mL, 迅速滴入经干燥消毒过的离心管中, 3 500~4 000 r/min 常温离心 10~15 min 后, 弃去上清液, 然后沿离心管内壁缓慢、小心滴加 2

~3 倍体积的 2.5% 戊二醛(pH7.5)进行固定, 在 4℃ 下, 约 0.5 h 后, 更换一次固定液, 置 4℃ 冰箱保存备用。将经超低温保存 24 h 后的精子取出, 40℃ 流水解冻再行固定, 固定方法同上。

1.4 电镜样品制备

48 h 后, 取部分样品, 分别标记, 用 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液(PBS)漂洗, 1% 戊二醛后固定, 梯度酒精脱水, Epon 812 树脂包埋, 作 70 nm 超薄切片, 经醋酸铀和柠檬酸铅染色后, 置于日立牌 H-700TEM 型透射电镜进行观察。

2 结果

经透射电镜观察, 红鳍东方鲀精子隶属于鞭毛型类, 分头和尾两部分, 头部呈炮弹状, 头部细胞核的前方无顶体, 核内高度浓缩的染色质中有形态和位置不定的个别小空隙, 空隙中有或无少量的电子致密物质分布(图 1-1)。核后端正中方有向前凹陷核内的植入窝, 呈井状; 窝内是中心粒复合体, 由近端中心粒、中心粒间体和基体 3 部分组成。近端中心粒伸入植入窝的深处, 无论纵切或横切, 皆无清晰的 9 组三联微管(图 1-1)。袖套接在细胞核的后端, 呈圆筒状, 其中央腔为袖套腔, 袖套外膜位于袖套的外侧, 由核

收稿日期: 2004-02-17; 修回日期: 2004-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070593); 山东省自然科学基金资助项目(Y2002D10)

作者简介: 于海涛(1978), 山东青岛人, 硕士, 电话: 0532-82031352, E-mail: seamanyu@hotmail.com; 张秀梅, 通讯作者, 电话: 0532-82032076, E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

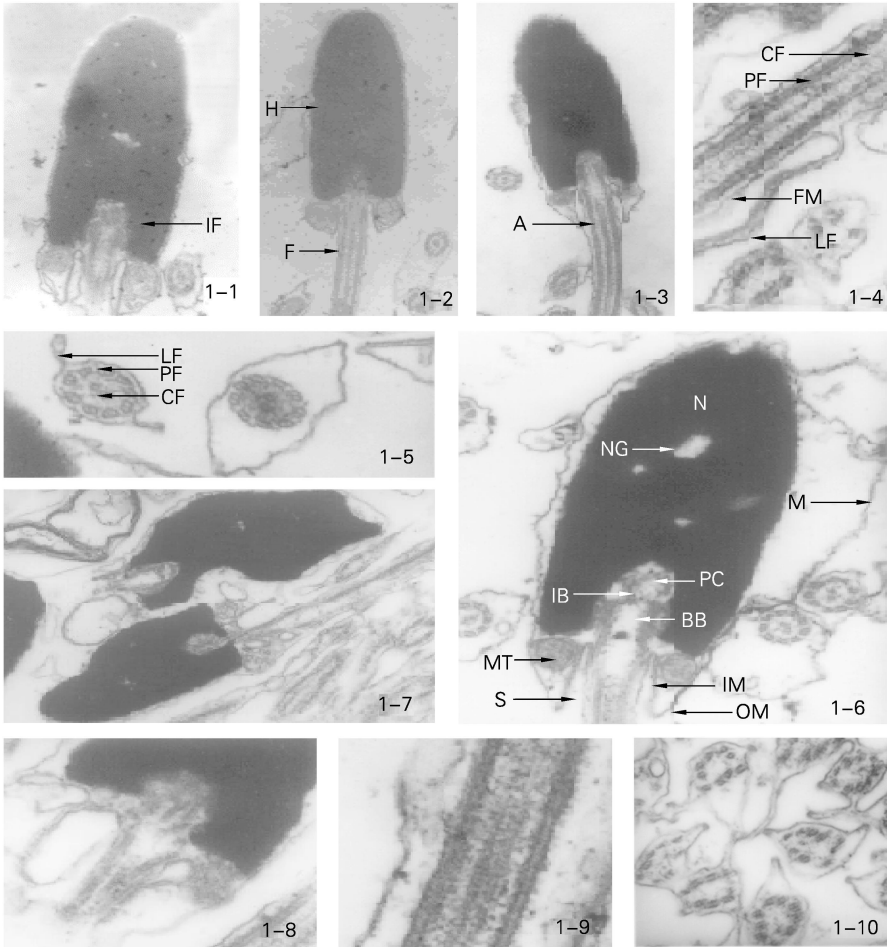


图 1 鲜精和冻精的超微结构

Fig. 1 The ultrastructure of fresh sperm and cryopreserved thawed sperm

1-1. 鲜精头部纵切×20 000; 1-2. 保存良好冻精头部纵切×15 000; 1-3. 鲜精头部纵切×15 000; 1-4. 鲜精鞭毛纵切, 示鞭毛被膜和侧鳍×40 000; 1-5. 冻精鞭毛横切, 示鞭毛侧鳍解体×40 000; 1-6. 保存较差冻精头部纵切, 示头部被膜膨胀×30 000; 1-7. 冻精头部纵切, 示精子头部畸形×15 000; 1-8. 冻精头部纵切, 示线粒体缺失×40 000; 1-9. 冻精鞭毛纵切, 示鞭毛被膜膨胀和侧鳍解体×60 000; 1-10. 冻精鞭毛横切, 示鞭毛轴丝解体×40 000; A: 轴丝; BB: 基体; CF: 中央纤维; H: 头部; IB: 中心粒间体; IF: 植入窝; IM: 袖套内膜; F: 鞭毛; FM: 鞭毛被膜; LF: 侧鳍; M: 细胞膜; MT: 线粒体; N: 细胞核; NG: 核中空隙; OM: 袖套外膜; PC: 近端中心粒; PF: 外周纤维; S: 袖套腔

1-1. Longitudinal section of the fresh sperm head×20 000; 1-2. Longitudinal section of the well frozen sperm head×15 000; 1-3. Longitudinal section of the fresh sperm head×15 000; 1-4. Longitudinal section of flagellum, showing the membrane and lateral fin of flagellum×40 000; 1-5. Cross section of flagellum, showing the disintegration lateral fin×40 000; 1-6. Longitudinal section of the bad frozen sperm head, showing the membrane of frozen sperm head swelled×30 000; 1-7. Longitudinal section of the frozen sperm head, showing the abnormality of the sperm head×15 000; 1-8. Longitudinal section of the frozen sperm head, showing the loss of mitochondria×40 000; 1-9. Longitudinal section of flagellum, showing the swelled membrane and the disintegration lateral fin×60 000; 1-10. Cross section of flagellum, showing the disintegration of the axoneme×40 000; A: axoneme; BB: basal body; CF: central fibril; H: head; IB: intercentriolar body; IF: implantation fossa; IM: inner membrane of the sleeve; F: flagellum; FM: membrane of flagellum; LF: lateral fin of the flagellum; M: membrane; MT: mitochondrion; N: nucleus; NG: gap within the nucleus; OM: outer membrane of the sleeve; PC: proximal centriole; PF: peripheral fibril; S: central space of the sleeve

后端的质膜和核膜分离后行,延伸而成;袖套内膜位于袖套的内侧,其内、外膜于袖套后下缘相连续。近袖套内膜的细胞质中可见一层膜(图 1-2),与袖套内膜平行;袖套纵切仅有 2 个圆形的线粒体(图 1-2, 1-3)。鞭毛从核后端正中中部向后伸出,起始端位于袖套腔中,细长尾部穿过袖套腔向后外伸出。鞭毛中央结构是轴丝,轴丝具有“9+2”结构;鞭毛上长有 2 排侧鳍,从鞭毛的横切面上看,侧鳍和轴丝与 2 条中央微管同在坐标的 Y 轴上,侧鳍边缘呈不规则波浪状,鳍基没有液泡(图 1-4, 1-5)。

经 10% DMSO 处理,液氮冷冻保存 24 h,并经 40℃流水解冻的精子,其超微结构经透射电镜观察发现:保存良好的精子结构没有太大变化,只是质膜稍显肿胀(图 1-2);经受冷冻损伤的精子,头部有的仍呈炮弹状,但被膜残缺或膨胀或消失(图 1-6);有的头部畸形,出现凹陷(图 1-7);线粒体内嵴破损,精子无鞭毛,或鞭毛在中段断裂(图 1-6, 1-7);袖套破裂,袖套内外膜膨胀破裂,线粒体缺失(图 1-7, 1-8);鞭毛被膜膨胀,呈波浪状,“9+2”结构不明显,中央维管束缺失,外围维管束畸形(图 1-5, 1-9, 1-10)。

3 讨论

精子经过超低温保存,一般认为会受到两种损伤,一种是降温过快,导致细胞内水分少量渗出,因而形成胞内冰,造成组织损伤;另一种是降温过慢,导致细胞内水分全部渗出细胞,使细胞极度脱水而损伤。当胞内水分渗出速度和渗出量比较适宜,形成一种匀质的“玻璃化”时,可以减少细胞损伤,冷冻细胞才能存活。

冷冻和解冻过程中,线粒体膨胀或者由于脱水过度导致对线粒体的紧缚,可能导致线粒体功能缺失,减少向精子鞭毛的能量输送,因而降低精子活力^[3],本研究发现,用本实验方法冷冻保存的精子出现线粒体破损或缺失,这直接导致能量的损失,从而降低了精子的运动能力。Gwo 等^[4]研究保存大西洋鳕(*Micropogonias undulatus*)以及 Lahnsteiner 等^[5]保存河鳟(*Thymallus thymallus*)精子也发现类似变化。对家畜的研究表明,谷草转氨酶(GOT)为精子线粒体上的一种重要酶类,当精子膜和线粒体受损时,该酶即向精浆中逸失,从而使细胞呼吸链的酶系统失调,能量来源断绝,导致精子死亡^[6]。Yoo 等^[7]在大西洋鲑(*Salmo salar*)上也发现类似的冷冻损伤效应。

另一方面,经透射电镜研究发现,精子被膜膨胀,尤其是鞭毛质膜膨胀,可能导致鞭毛运动受阻,且消耗能量增大,从而降低了精子活力。Zhang 等^[8]研究褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)精子的超低温保存时也认为是这种原因导致受精率较低。从理论上说,

解冻精子的复苏率与受精能力应是正相关,但这种逻辑的推论在实际资料中远不能得到证实^[9]。本研究发现,部分冻精头部质膜膨胀破损,而尾部保存较好,或是头部保存较好,而尾部断裂,这种情况下精子鞭毛仍能摆动,即能“复苏”,但活力却下降很大,从而导致受精能力显著降低。当然,不同的保存方法也可能导致冻精活力差异很大,如果只是以活力或者受精率来作为指标,这其中可能有假象。据 Ritar 等^[10]对条纹婢鳞(*Laris lineata*)进行短期保存和超低温保存研究发现,麦管法和颗粒法获得的冻精活力相近,但是,麦管法冷冻获得的受精率显著高于用颗粒法冷冻获得的受精率,这可能与因保存方法的不同而导致冷冻与解冻损伤的部位、机制和程度有差异,而这种差异只是在胚胎发育过程中才显现出来。

目前,人们对造成精子冷冻损伤机制的本质尚未了解透彻,精子的低温损伤机制的研究需要更深入的工作,而电子显微镜在精子超低温保存技术中的应用,会推动此项工作的开展。

参考文献:

- [1] 陈松林. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展和前景展望[J]. 水产学报, 2002, 26(2): 161-168.
- [2] 丁福红. 真鲷精子胚胎冷冻保存研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2004.
- [3] Yao Z, Crim L W, Richardson G F, et al. Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus*) sperm after cryopreservation [J]. *Aquaculture*, 2000, 181: 361-375.
- [4] Gwo J C, Arnold C R. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes [J]. *J Exp Zool*, 1992, 264: 444-453.
- [5] Lahnsteiner F, Weismann T, Patzner R A. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces: Teleostei) during routine cryopreservation [J]. *Aquaculture*, 1992, 103: 73-84.
- [6] 吕兆启. 家畜精子的酶及其生理功能[J]. 国外畜牧科技, 1983, 6: 44-47.
- [7] Yoo B Y. Loss of protein from spermatozoa of Atlantic salmon because of cryopreservation [J]. *Can J Zool*, 1987, 65: 9-13.
- [8] Zhang Y Z, Zhang S C, Liu X Z, et al. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology [J]. *Theriogenology*, 2003, 60(5): 989-996.
- [9] 潘英焘. 鱼类冷冻精子结构变异的电子显微镜研究[J]. 淡水渔业, 1981, 4: 4-8.
- [10] Ritar A J, Campet M. Sperm survival during short term storage and after cryopreservation of sperm from striped trumpeter (*Laris lineata*) [J]. *Theriogenology*, 2000, 54: 467-480.

(下转第 26 页)

Changes in ultrastructures of *Takifugu rubripes* spermatozoa before and after cryopreservation

YU Hai tao¹, ZHANG Xiur mei¹, CHEN Chao², LI Hui³

(1. Fishery College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Shandong Huaxinhaida Halobios Company Limited, Weihai 264200, China)

Received: Feb. , 17, 2004

Key words: *Takifugu rubripes*; spermatozoon; cryopreservation; ultrastructure

Abstract: The ultrastructures of *Takifugu rubripes* spermatozoa before and after cryopreservation were studied by means of ultrathin section transmission electron microscopy technique. The results indicate that cryodamage may cause the membrane of sperm head swelling or disintegrating, the abnormality of the head, the transmutation of mitochondria, the loss of mitochondria. The cryodamages of membrane and axoneme of flagellum may cause the falling of sperm activity.

(本文编辑: 刘珊珊)