

长期超低温保存后真鲷精子的质量变化

陈亚坤^{1,2}, 刘清华¹, 赵春彦¹, 肖志忠¹, 徐世宏¹, 马道远¹, 李军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛, 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要: 通过对精子运动率、受精率和超微结构的观察, 研究了 2003~2009 年分 5 批冷冻保存的真鲷 (*Pagrus major*) 精子经 1~73 个月保存后质量变化情况。冷冻精子在 40 °C 水浴中解冻, 大约 100~110 s 转化为液态后取出, 用海水激活后观察精子运动率, 人工受精 6~8 h 后观察受精率, 同时精子用 2.5% 戊二醛前固定, 经处理后用扫描电镜和透射电镜观察精子超微结构。结果表明, 冷冻精子的最高运动率(87.67% ± 2.52%)和受精率(71.33% ± 8.84%)都是 2009 年保存 1 个月的精子, 保存 1, 13, 26 个月的精子运动率和受精率差异不显著($P < 0.05$), 保存 48 个月后的精子运动率和受精率显著低于保存 1 个月的精子($P < 0.05$), 2003 年保存的精子(73 个月)运动率(50.67% ± 5.31%)和受精率最低(39.56% ± 0.69%)。精子的超微结构损伤主要包括精子头部损伤, 线粒体损伤以及精子质膜的损伤。

关键词: 低温保存; 真鲷 (*Pagrus major*); 精子; 运动率; 受精率

中图分类号: Q331

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)06-0050-05

超低温保存技术是种质细胞长期保存的重要方法。鱼类精子超低温保存技术以及精子库的建立, 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。自从 1953 年 Blaxter^[1]成功冷冻保存大西洋鲱鱼 (*Clupea harengus*) 精巢以来, 鱼类种质细胞的低温保存研究迅速开展。在过去的 50 多年中, 世界许多国家的科研工作者围绕超低温保存技术、冷冻损伤机理及冻精质量检测等方面开展了大量研究工作, 现已建立 200 多种鱼精液的超低温保存技术, 有些鱼种精液已应用于商业生产和科学研究^[2]。

目前, 理论上普遍认为精子新陈代谢在低温状态下极其缓慢, 在液氮中甚至基本是停止的, 保存时间不会影响精子的运动率, 精子的生育力在液氮中能保存 200~32 000 a^[3]。以前的精子超低温保存研究主要集中在短期保存, 样品大多数在液氮中冷冻保存几小时到几周, 最长一般不超过 2 a, 并且认为精子在长期保存过程中质量不会有所变化^[4~6]。然而, 随着超低温保存技术和精子质量检测手段的不断发展完善, 长期冷冻保存后精子质量发生变化的现象也出现零星报道。鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 精子的受精率在超低温保存 342 d 后显著低于保存 14 d 的受精率^[7]; 鲶鱼 (*Clarias gariepinus*) 精子超低温保存 14 d 后孵化率为 51%, 16 个月后下降为 41%^[8], 类似现象在对虾和人类精子超低温保存中也有报道^[9~11]。

本实验室在真鲷 (*Pagrus major*) 精液超低温保存

过程中发现, 保存时间对冻精质量变化情况存在一定的影响, 并且 15%~18% 的二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, 简称 DMSO) 对真鲷精子的保存效果较好^[12]。因此, 本实验对 2003~2009 年用 15% DMSO 作为抗冻剂保存 1~73 个月的真鲷精子进行检测, 通过对运动率和受精率的观察, 研究了真鲷精子经过不同超低温保存时间后质量的变化情况, 并通过超微结构观察检测了精子的损伤情况。

1 材料和方法

1.1 亲鱼培养及配子采集

亲鱼(4 雌, 6 雄; 3~4 kg, 每年 10 尾, 9~10 龄)暂养于青岛中国科学院海洋研究所水族楼的方形水泥池中(长×宽×高: 3 m×2.5 m×2 m), 养殖水体温度为 16~18 °C。每年 3 月中旬至 5 月下旬, 处于真鲷生殖盛期, 采用人工挤压腹部的方法采集精液。操作前首先将雄鱼置于 0.003% 的丁香酚溶液中 3~5 min 至完全麻醉, 将鱼体洗净擦干, 轻轻挤压腹部采集精液于器皿中, 操作过程中尽量避免海水、粪便、尿液等的污染。在 2003、2005、2007、2008 和 2009 年

收稿日期: 2010-03-22; 修回日期: 2010-04-10

基金项目: 中国科学院海洋研究所知识创新领域前沿项目 (Y02507101Q)

作者简介: 陈亚坤(1982-), 女, 吉林德惠人, 硕士研究生, 主要从事低温生物学研究, E-mail: yakunchen@163.com; 李军, 通信作者, 电话: 0532-82898716, E-mail: junli@qdio.ac.cn

分别采集 5 批精子进行超低温冷冻保存。为避免不同批次精子的差异,仅运动率高于 90%的精子用于实验。精子的运动率是用自然海水以 1 : 1000 的比例进行稀释激活精子,在 100 倍显微镜下观察精子的运动情况,计数 100 个精子中运动精子的个数,运动精子个数与总计数精子个数的比例为精子的运动率。人工受精实验所用卵子取自一条雌鱼(质量好的卵占总卵比例高于 95%的卵子用于实验)。质量好的卵呈规则圆形,颜色为半透明的微黄色。

1.2 药品及仪器

DMSO 购自 SIGMA 公司,其他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(8 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.14 g/L CaCl₂, 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.1 g/L MgCl₂·6H₂O, 0.06 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0.06 g/L KH₂PO₄, 1g/L 葡萄糖, 0.35 g/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 真鲷精子的冷冻保存

精液与 15%DMSO 按 1 : 3 的体积比均匀混合,将混合液(共 1.6 mL)置于 2 mL 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 5 min,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。每一管样品为一个平行样,每次实验至少 3 个平行样,实验重复 3 次。

1.4 真鲷精子长期超低温保存后运动率观察和受精实验

对 2003~2009 年分 5 批保存 1~73 个月的精子进行水浴解冻,水浴温度为 40℃。冷冻样品在水浴中大约 100~110 s,转化为液态后取出。解冻的精子用自然海水以 1 : 250 的比例进行稀释激活,然后显微镜下观察精子的运动率。受精实验参考文献[12],精子与卵的个数比例按 500 : 1 真鲷标准化精卵比进行人工受精实验,对解冻精子进行人工受精,受精后 6~8 h,胚胎发育到囊胚期时计算受精率,受精率为发育到囊胚期的胚胎数占最初卵总数的百分比(受精率 = 囊胚期胚胎数/卵总数)。实验重复 3 次。

1.5 真鲷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(0.2 mol/L, pH=7.4,磷酸缓冲液配制)进行前固定。

扫描电镜(scanning electron microscope, 简称 SEM)样品,经磷酸缓冲液(0.2 mol/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, 简称 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 16.0 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 冷冻精子的运动率和受精率

2003~2009 年分 5 批冷冻保存的精子,经过不同时间的超低温冷冻保存后其运动率和受精率参见表 1。

表 1 冷冻精子的运动率和受精率

年份(保存时间)	运动率(%)	受精率(%)
2009 年 (1 个月)	87.67±2.52 ^a	71.33±8.84 ^a
2008 年(13 个月)	86.67±2.08 ^a	69.22±1.02 ^a
2007 年 (26 个月)	87.33±2.08 ^a	60.33±2.33 ^a
2005 年 (48 个月)	75.33±1.53 ^b	47.22±3.89 ^b
2003 年 (73 个月)	50.67±5.31 ^c	39.56±0.69 ^c

注: 其中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)

经过长期超低温冷冻保存后,冷冻精子的运动率和受精率随保存时间的不同而存在显著变化。冷冻精子的最高运动率和受精率都是 2009 年保存 1 个月的精子,保存 1, 13, 26 个月的精子运动率和受精率差异不显著($P > 0.05$),保存 48 个月后的精子运动率和受精率显著低于保存 1, 13, 26 个月的精子($P < 0.05$),2003 年保存的精子(73 个月)运动率和受精率最低。

2.2 真鲷精子超低温保存后超微结构变化情况

鲜精和经超低温保存后冷冻精子的超微结构如图 1 和图 2。

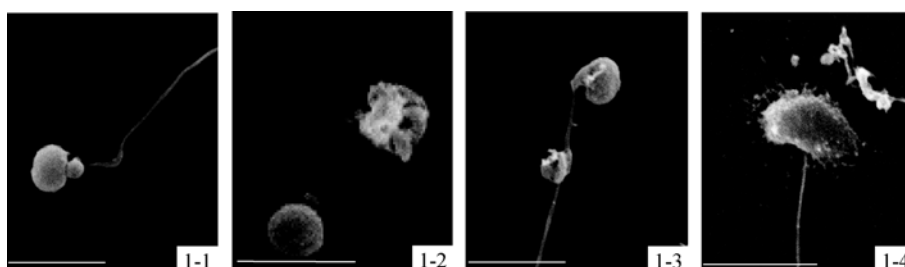


图 1 鲜精和冷冻精子扫描电镜照片(标尺为 5 μ m)

Fig. 1 The SEM photos of fresh and post-thaw sperm

1-1. 鲜精; 1-2. 头部破裂的精子; 1-3. 线粒体脱落的精子; 1-4. 膜损伤精子

1-1. fresh sperm; 1-2. sperm with broken head; 1-3. sperm with mitochondria flaking off; 1-4. sperm with membrane damage

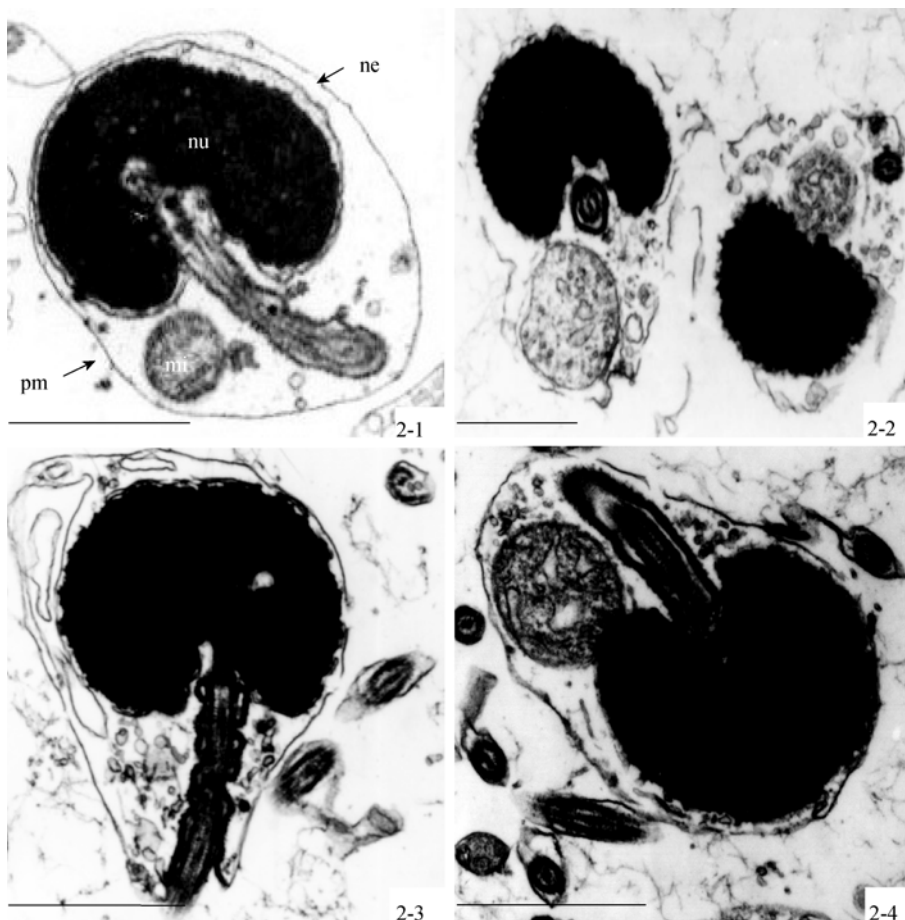


图 2 鲜精和冷冻精子透射电镜照片(标尺为 1 μ m)

Fig. 2 TEM photographs of fresh and post-thaw sperm

2-1 . 鲜精, nu: 细胞核; ne: 核膜; mi: 线粒体; pm: 质膜; 2-2. 精子核膜, 质膜消失, 线粒体正在溶解; 2-3. 线粒体消失的精子; 2-4. 精子核膜消失, 质膜断裂

2-1. fresh sperm, nu: nucleus; ne: nuclear envelope; mi: mitochondrion; pm: plasmalemma; 2-2. sperm with nuclear envelope and plasmalemma loss and mitochondria in the process of dissolving; 2-3. sperm with mitochondrial loss; 2-4. sperm with disappeared nuclear envelope and broken plasmalemma

正常真鲷精子呈近似圆球形, 直径为 1.3~1.4 μ m, 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 1-1 和图 2-1)。经过长期超低温保存后的精子遭受不同程度的损伤, 主要有: 精子头部

损伤(图 1-2), 精子线粒体损伤(图 1-3 和图 2-2,2-3), 以及精子质膜的损伤(图 1-4 和图 2-2,2-4)。

3 讨论

一般认为在液氮(-196 °C)超低温条件下, 精子处于休眠状态, 代谢活动基本停止, 长时间冷冻保存对精液的质量没有显著影响。在鱼类精子超低温保存研究中, Suquet 等^[4]报道大菱鲂(*Psetta maxima*)精液保存 9 个月后, 冻精的受精率、存活率都与鲜精差异不显著。冷冻保存 1a 的大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)精液受精率、孵化率与鲜精相近^[5]。保存 1 周和 1a 的大马哈鱼(*Siniperca chuatsi*)的冷冻精子, 在受精率和孵化率方面与鲜精无显著差别^[6]。然而, 本实验对 2003~2009 年保存的精子进行检测, 结果表明保存时间会明显影响真鲷精液超低温保存的效果, 尽管保存 1, 13, 26 个月后精子运动率和受精率没有显著差别, 但保存 43 个月后精子的运动率和受精率显著低于保存 1, 13, 26 个月的精子。对于其他鱼种的研究, Kerby 等^[13]发现液氮中保存的条纹鲈鱼(*Morone saxatilis*)精子的受精能力随着保存时间的延长而降低。在鲤鱼精液超低温保存中也发现, 保存 342 d 的精子受精率显著地低于保存 14d 的精子受精率^[7]。同样保存 16 个月的鲈鱼精子孵化率显著低于保存 14 d 的精子孵化率^[8]。在人类精子超低温冷冻保存研究中, Smith 等^[5]对冻贮的精液作了较长时间的观察, 结果发现在液氮中冻贮超过 36 个月后, 精子运动率显著降低。从人工受精和临床实践角度看, 尹志康等^[11]认为人类精液超低温保存以不超过 3a 为最适冻贮时间。类似的结果在斑节对虾(*Penaeus monodon*)精子的超低温保存中也有报道^[9], 研究者检测了超低温保存 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 d 的精子质量, 保存 60 d 的冻精活力与鲜精无差异, 但是保存 90~120 d 的冻精活力显著降低。

迄今, 这种经长期冷冻保存后精子质量下降的现象在动物种质超低温保存研究中还没有合理的解释, 对于植物低温保存的研究, Walters 等^[14]提出, 低温并不能完全阻止种子的衰退, 并把种子的退化归因于活性氧(reactive oxygen species, 简称 ROS)的产生和累积。在动物精子的超低温保存过程中 ROS 过量产生也有报道^[15]。过量 ROS 会攻击细胞膜, 导致膜发生脂质过氧化, 造成膜的损伤^[15~17]。本实验中通过超微结构观察检测到精子的损伤包括头部破

裂, 线粒体和膜损伤, 但膜的损伤是否与 ROS 过量产生有关以及在长期保存过程中 ROS 是否存在累积, 在鱼类精子超低温保存研究中未见报道。

本实验表明, 长期超低温保存并不能维持真鲷精子质量不变, 经过长期冷冻保存后, 精子的运动率和受精率随时间的延长会显著下降, 因此在建立精子库进行种质保存时, 应该考虑到精子保存的最佳年限问题, 对精子进行定期更新, 并且真鲷精子在长期保存过程中质量下降的机理及其是否与 ROS 有关有待深入探讨研究。

参考文献:

- [1] Blaxter J H S. Sperm storage and cross—fertilization of Spring and Autumn spawning herring[J]. *Nature*, 1953, 172: 1 189-1 190.
- [2] Gwo J C. Cryopreservation of sperm of some marine fishes[A]. Tiersch T R, Mazik P M. Cryopreservation in aquatic species[C]. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 2000. 138-160.
- [3] Ashwood-Smith M J. Low temperature preservation of cells, tissues and organs[A]. Ashwood-Smith M J, Farrant J. Low temperature preservation in medicine and biology[C]. Turnbridge Well: Pitman Medical Ltd, 1980. 19-44.
- [4] Suquet M, Dranno C, Petton B, et al. Long-term effect of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa [J]. *Aquatic Living Resources*, 1998, 11: 45-48.
- [5] 林丹军, 尤永隆. 大黄鱼精子生理特性及其冷冻保存[J]. *热带海洋学报*, 2002, 21: 69-75.
- [6] Ding S Y, Ge J C, Hao C, et al. Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*[J]. *Animal Reproduction Science*, 2009, 113: 229-235.
- [7] Hisahi K, Reijiro H, Masakatsu T, et al. Cryopreservation of carp sperm [J]. *Aquaculture*, 1984, 37: 267-273.
- [8] Steyn G J, Van Vuren J H J. The fertilizing capacity of cryopreserved sharp-tooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm[J]. *Aquaculture*, 1987, 63: 187-193.
- [9] Vuthiphandchai V, Nimrat S, Kotcharat S, et al. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatozoa[J]. *Theriogenology*, 2007, 68: 1 192-1 199.
- [10] Smith K D, Stultz D R, Steinberger E. Survival of

- spermatozoa in a human sperm bank. Effects of long-term storage in liquid nitrogen[J]. **Journal of the American Medical Association**, 1973, 223: 774.
- [11] 尹志康, 陈在贤. 冻贮人类精液的最适条件[J]. *生殖与避孕*, 2001, 21: 138-142.
- [12] Liu Q H, Li J, Zhang S C, *et al.* An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2-mL Cryovials[J]. **The World Aquaculture Society**, 2006, 37: 289-297.
- [13] Kerby J H. Cryogenic preservation of sperm from striped bass[J]. **Transactions of the American Fisheries Society**, 1983, 112: 86-94.
- [14] Walters C, Wheeler L, Stanwood P C. Longevity of cryogenically stored seeds[J]. **Cryobiology**, 2004, 48: 229-244.
- [15] Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen[J]. **Animal Reproduction Science**, 2009, 114: 125-134.
- [16] Numan-Bucak M, Atessahin A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process[J]. **Small Ruminant Research**, 2008, 75: 128-134.
- [17] Numan-Bucak M, Sarıözkan S, Barbaros-Tuncera P, *et al.* Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation[J]. **Small Ruminant Research**, 2009, 81: 90-95.

Quality change of *Pagrus major* sperm after long-term cryopreservation

CHEN Ya-kun^{1,2}, LIU Qing-hua¹, ZHAO Chun-yan¹, XIAO Zhi-zhong¹, XU Shi-hong¹, Ma Dao-yuan¹, LI Jun¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Received: Mar., 22, 2010

Key words: cryopreservation; *Pagrus major*; sperm; motility; fertilization rate

Abstract: After cryopreservation (1-73 months), the quality of *Pagrus major* sperm, which was cryopreserved from 2003 to 2009 in 5 batches, was examined by observing motility, fertilization rate and ultrastructures. The cryopreserved sperm were thawed in 40 °C water bath for 100~110 s. After activation with seawater, the motility of the sperm was estimated; 6-8 h after artificial fertilization, fertilization rate was examined; and after being fixed with by 2.5% glutaraldehyde, the ultrastructure of sperm was studied with scanning electron microscope and transmission electron microscope. The highest motility (87.67%±2.52%) and fertilization rate (71.33%± 8.84%) were obtained in sperm after a 1-month cryopreservation, even though they were not significantly different from those of the sperm after a 13-month or and 26-month cryopreservation ($P>0.05$). After a 48-month cryopreservation, the motility and fertilization rate decreased significantly in comparison with those of sperm after a 1-month cryopreservation ($P<0.05$). The lowest motility (50.67%± 5.31%) and fertilization rate (39.56%± 0.69%) were obtained in sperm cryopreserved for 73 months; main ultrastructural damage was observed in the head, mitochondria and membranes of sperm.

(本文编辑: 谭雪静)