

大菱鲆卵子排放后在卵巢腔内老化特征初探

宋宗诚¹, 王学颖^{2,3,4}, 薛蕊^{2,3,4}, 肖志忠^{2,3,4}, 马道远^{2,3,4}, 刘清华^{2,3,4},
李军^{2,3,4}

(1. 威海圣航水产有限公司, 山东 威海 264200; 2. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237; 4. 中国科学院 海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 为了探明大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)卵子在卵巢腔内老化的原因及特征, 采用连续跟踪采卵的方式, 通过荧光染色、生理生化指标测定, 对不同采卵时间(0, 3, 6, 9, 12 h)的卵子活性氧和脂质过氧化情况(氧化产物丙二醛 MDA)、抗氧化系统(超氧化物歧化酶 SOD, 还原型谷胱甘肽 GSH)、卵巢液 pH 值及受精率和孵化率进行对比研究。结果表明, 随着卵子在体内老化时间的延长, 其活性氧含量及脂质过氧化程度逐渐升高, 活性氧含量及过氧化程度与排卵后卵子老化呈正相关; SOD 酶活力, GSH 酶活力均显著下降, MDA 含量显著提高; 受精率和孵化率均显著下降。排卵后 6 h, 孵化率降到 2.87%~10.60%, 此时的卵质已经极度恶化, 不能再继续用于后续的生产中。综上, 在卵巢腔中, 卵子排放后, 随着时间的延长, 活性氧含量显著升高, 抗氧化能力逐渐下降, 受精率和孵化率显著降低, 老化逐渐加剧。

关键词: 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); 卵子老化; 活性氧; 受精率; 孵化率

中图分类号: S965.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)07-0106-06

DOI: 10.11759/hyxx20190314002

鱼类的卵质直接关系到胚胎发育以及仔稚幼鱼成活和生长情况, 与养殖效率紧密相关, 对反馈亲鱼培养状况、指导苗种生产等工作都具有重要意义^[1]。鱼类卵子老化现象指发生在鱼体内, 从排放到受精的时间间隔内, 在卵巢腔或者体腔内发生的形态学、组织学、生化、细胞和分子的一系列影响卵质的变化^[2]。大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)属于鲆科(Bothidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*), 自 1999 年春, 雷霖院士率先在国内突破了大菱鲆关键育苗技术, 已经成为我国主要的经济海水养殖品种^[3]。在人工养殖条件下, 大菱鲆不能自然排卵, 生产上采取人工挤卵受精。如果不能及时将排放到卵巢腔的卵收集, 会导致其降解并逐渐被吸收; 如果采集的卵子已经老化过熟, 严重影响胚胎早期发育。采卵时间的控制对于卵子活力尤为重要。卵子老化与卵质息息相关, 该问题越来越引起了人们的重视。近年来, 研究表明氧化应激可能参与了卵子老化过程^[4-6], 但是尚缺少活性氧引起鱼类卵子老化的直接证据。截至目前, 关于大菱鲆体内卵子老化的原因和特征, 在体内储存耐受时间及受精能力的相关研究尚未见报道, 亟需

开展相关研究, 以更好的辅助生产。

1 材料方法

1.1 试验材料

依照亲鱼培养条件控光培育大菱鲆亲鱼, 调控亲鱼进入繁殖期, 养殖池水体体积约为 50 m³ (10 m×5 m×1 m)。养殖水温控制在 15~17℃, 溶解氧≥5 mg/L。光控周期按照 16 L : 8 S, 12 L : 12 S 及 8 L : 16 S 进行。选择三条亲鱼进行产卵跟踪。

1.2 试验设计

实验设置了三个生物学重复, 同一条鱼每隔 3 h 取样 1 次, 设计了 5 个时间点 0, 3, 6, 9 和 12 h。繁

收稿日期: 2019-03-14; 修回日期: 2019-04-26

基金项目: 中国博士后科学基金项目(2016M592259); 现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-47)

[Foundation: the China Postdoctoral Science Foundation (No.2016M592259); Supported by China Agriculture Research System, No.CARS-47]

作者简介: 宋宗诚(1973-), 男, 山东威海人, 高级工程师, 主要从事鲆鲽鱼类苗种繁育相关工作, E-mail: whsh2008@163.com; 刘清华, 通信作者, 研究员, E-mail: qinghualiu@qdio.ac.cn; 李军, 通信作者, 研究员, E-mail: junli@qdio.ac.cn

殖期将雌鱼卵挤净,至下次开始排卵记为0时,每个取样点的样品一分为四:(1)直接进行受精,对受精率和孵化率进行统计;(2)进行pH值测定;(3)通过BODIY、DCF(H₂DCFDA)和DHE (ROS Fluorescent Probe-Dihydroethidium)分别进行脂质过氧化和活性氧染色观察;(4)迅速投入液氮,后期进行抗氧化酶活性和MDA含量的检测。

1.3 不同老化程度卵子的受精率和孵化率统计

每个时间点采集的卵子即不同老化程度的卵子,分别进行人工授精。加入精子后,混匀,加入海水,静置5~10 min后洗卵。在受精后,约500个卵放置在孵化碗中,用于计算受精率和孵化率。2~4细胞期进行受精率的统计,即100颗卵子中正常发育到2~4细胞的百分比;在孵化出膜时进行孵化率的统计,即孵出的幼鱼占上浮卵的百分比,具体参考贾玉东等^[7-8]。

1.4 BODIY, DCF及DHE对不同老化程度的卵子进行染色观察

BODIY, DCF和DHE均为脂质过氧化和活性氧含量测定的常用荧光指示剂。上述三种试剂均购自Life Technologies公司。先配置成母液(BODIY, 2 mmol/L; DCF, 20 mmol/L; DHE, 2 mmol/L),存于-20℃长久保存。待使用时稀释至目标浓度。2 μL BODIY母液加入到1 mL体系中,终浓度是4 μmol/L,染色时间30 min; 0.5 μL DCF母液加入到1 mL体系中,终浓度为10 μmol/L,染色时间30 min; 1 μL DHE母液加入到1 mL体系中,终浓度为2 μmol/L,染色时间30 min。每1 mL体系为约30~50颗卵子,稀释液为海水。孵育时间结束后,用海水清洗3~5次,彻底去除染料。在染料对应的激发波段下进行荧光观察,并拍照。

1.5 不同老化程度卵子的SOD, GSH酶活及MDA含量的测定

SOD酶活试剂盒, GSH酶活试剂盒, MDA含量测定试剂盒和BCA蛋白浓度试剂盒均购自苏州科铭生物技术有限公司。大菱鲆不同老化时间点的样品分别研磨,离心,取上清,进行测定。检测通过96孔板在酶标仪上完成。具体步骤参考相应说明书进行。

1.6 pH测定

不同采样点采集到卵子以后,取出约1 mL,进

行低速(3 000 r/min)离心,离心以后取上清,测定卵巢液的pH值。

1.7 数据分析

本实验数据均采用统计学软件SPSS 16.0进行分析。对不符合正态分布的数据经自然对数转换后再进行下一步分析。使用单因素方差分析ANOVA (Duncan's multiple range tests)进行显著性检验($P < 0.05$),所有数据均以平均值±标准差表示)。

2 实验结果

2.1 不同老化程度卵子的受精率和孵化率统计

随着卵子在体内老化时间的延长,受精率和孵化率整体上呈下降的趋势,下降速率存在个体差异。相较于受精率,孵化率随着老化时间的延长,其下降趋势更为显著。排卵后3 h,受精率由51.34%~65.91%降到48.25%~61.17%,孵化率由18.65%~39.16%下降到17.08%~26.54%。在第一阶段,受精率和孵化率下降均不显著,也就是在排卵后3 h内取卵,影响不大。而第二阶段,从排卵后3 h到排卵后6 h,受精率由48.25%~61.17%下降到39.00%~57.05%,孵化率由17.08%~26.54%下降到2.87%~10.60%,受精率和孵化率均呈下降趋势,且孵化率较受精率更敏感,变化更显著(图1,图2)。排卵后6 h,胚胎的畸形率显著提高,此时的卵质已经极度恶化,不能用于后续生产。受精率和孵化率的统计结果显示,大菱鲆排卵后卵子的采集在0~3 h内最佳,当超过6 h,卵质急剧恶化,不宜继续授精。

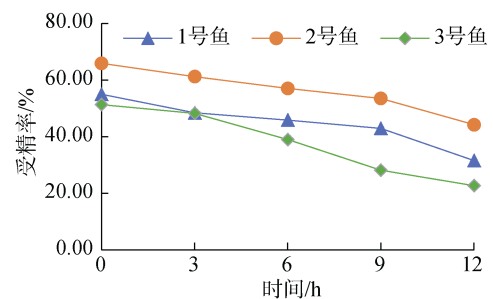


图1 卵子排放后老化不同时间的受精率

Fig. 1 The fertilization rate of post-ovulatory ageing with the extension of time

2.2 BODIY, DCF及DHE对不同老化程度的卵子进行染色观察

为了进一步探明0~6 h内卵子老化的原因,对其

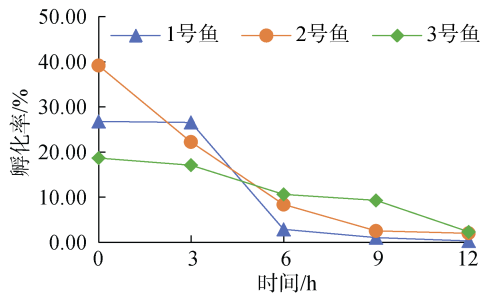


图2 卵子排放后老化不同时间的孵化率

Fig. 2 The hatching rate of post-ovulatory ageing with the extension of time

脂质过氧化和活性氧含量进行检测。通过 BODIY, DCF 及 DHE 对体内不同老化程度的卵子进行染色观察, 结果表明随着大菱鲆卵子排放后在体内停留时间的延长, 其活性氧含量及脂质过氧化程度逐渐升

高。活性氧含量及脂质过氧化程度与卵子排放后老化情况呈正相关(图 3)。

2.3 不同老化程度卵子的 SOD 酶活力, GSH 酶活力及 MDA 含量的测定

为进一步查明大菱鲆卵子老化的特征和原因, 进一步对每尾鱼, 5 个采卵点的抗氧化酶(SOD 和 GSH)活性及 MDA 含量分别进行测定比较。结果表明, 不同鱼之间不同时间点存在个体上的差异, 但是在整体趋势一致。随着老化时间的延长, 抗氧化酶 SOD, 还原性的 GSH 均随着时间的延长而呈降低的趋势, 氧化产物 MDA 呈上升趋势(图 4~图 6)。说明随着卵子排放后在卵巢腔内储存时间的延长, 抗氧化能力下降, 同时发生了脂质过氧化, 进一步验证了活性氧的产生是体内卵子老化的原因, 同时也是卵子老化的特征之一。

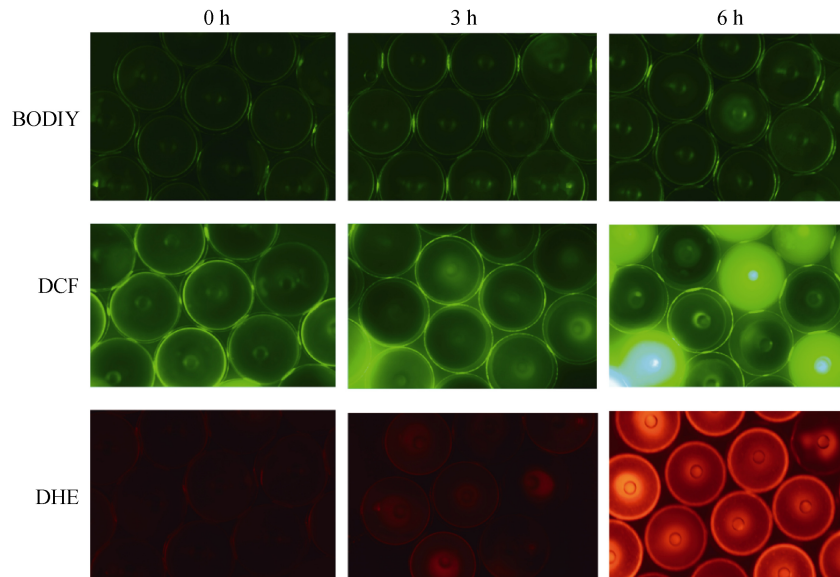


图3 BODIY、DCF 和 DHE 对不同老化程度卵子的染色观察

Fig. 3 BODIY, DCF and DHE of post-ovulatory ageing with the extension of time

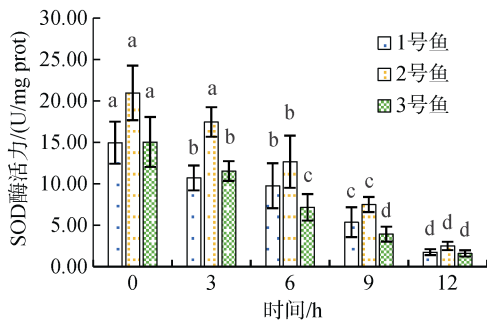


图4 不同老化程度卵子的 SOD 酶活变化

Fig. 4 The superoxide dismutase (SOD) activities of post-ovulation aging with the extension of time

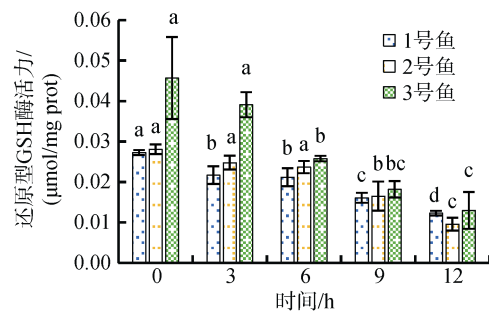


图5 不同老化程度卵子的 GSH 酶活变化

Fig. 5 The glutathione (GSH) activities of post-ovulation aging with the extension of time

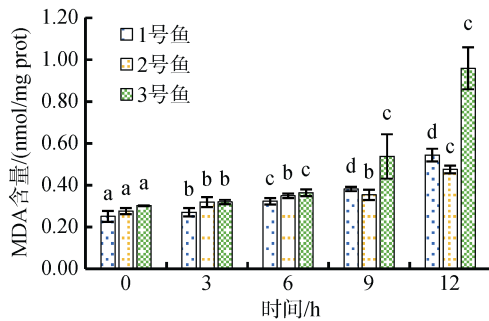


图6 不同老化程度卵子MDA含量变化

Fig. 6 The content of MDA of post-ovulation aging with the extension of time

此外,对每条鱼的每个采卵点收集的卵巢液进行pH检测,结果表明,排卵后0~12 h, pH变化范围在7.4~8.4之间波动,每尾鱼不同采卵点的pH变化区间在0.3~0.5,均为中性偏碱性(图7)。

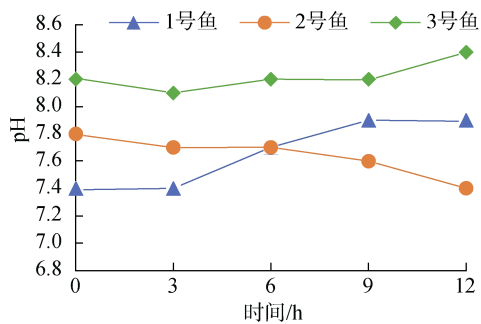


图7 不同老化程度卵子的pH变化

Fig. 7 The pH of post-ovulation aging with the extension of time

综上,受精率、孵化率、荧光染色及抗氧化酶活性分析的结果表明,在卵巢腔中,卵子排放后,随着时间的延长,受精率和孵化率显著下降,卵子老化表现的特征为活性氧含量显著升高,抗氧化能力显著下降。因此,活性氧可能是导致卵子老化的主要原因之一。

3 讨论

亲鱼性腺发育成熟、优质配子的产生是海水鱼类养殖业发展的基础。传统认识重视亲鱼的光照、温度和营养调控而忽视配子产生、获得的最佳时间及质量监测,致使规模化生产中卵子质量往往成为制约受精卵及苗种生产周期长短的决定性因素。卵子排放后储存时间具有物种的差异性和温度依赖性,从几分钟到几周不等。在10℃条件下,白斑狗鱼的最佳挤卵时间为排卵后2~4 d,超过4 d,将导致幼鱼

畸形率增加^[9];在20℃条件下,鲤鱼卵子可以保存的最佳时长为2~4 h,卵子老化影响胚胎的出眼率及孵化率,排卵超过12 h,卵子活力将完全丧失^[10];在18~20℃下,罗非鱼卵子活力可以维持1.5 h^[11];在8~17℃条件下,虹鳟卵子活力可维持5~15 d^[12-15]。本研究中,在13℃条件下,大菱鲆卵子在体内的最佳存活时间是0~3 h,超过6 h卵子质量急剧恶化,所以对人工繁殖条件下不能自然排卵的大菱鲆而言,及时进行人工挤卵和授精对于优良苗种培育非常重要。

近年来的研究表明,氧化应激可能参与了卵子的老化过程。Agarwal^[4]提出氧化应激会对雌性繁殖过程产生影响,ROS通过调节NCX(Na⁺/Ca²⁺ exchanger)活性影响了排卵后的老化过程^[16],导致受精率下降。通过诱导重复排卵,发现氧化应激均对卵巢的结构、卵质及线粒体均产生了不同程度的损害^[6]。褪黑激素通过拮抗氧化应激的方式大大降低了排放后卵的老化^[17]。但是尚缺少鱼类卵子老化原因的直接证据。在大菱鲆我们发现,随着卵子在卵巢腔内储存时间的延长,结合BODIPY、DCF和DHE的荧光染色观察,发现其ROS含量显著升高;ROS的过量积累,可能是引起大菱鲆卵子排放后在卵巢腔内老化的直接原因。

卵子老化在哺乳动物中的研究相对比较深入,在小鼠上的研究表明,卵子老化影响了胚胎的正常的发育及后代的寿命^[18];通过影响纺锤体相关特异蛋白的分布及蛋白激酶B(丝氨酸/苏氨酸激酶)AKT的表达,从而降低卵细胞的存活时间,破坏染色体的正常分离^[19]。在鱼类中,仅针对卵子的老化现象和分子层面进行了初步的探讨。日本鳗鲡和虹鳟卵子老化后自发性多倍化现象增多^[20-22];Rime等^[23]对虹鳟排卵后不同时间点的体腔液组分进行了蛋白质组分析,发现很多蛋白分子在卵子老化过程中发生了显著的变化。Ma Hao等^[24]对虹鳟不同老化程度的卵子进行了miRNA表达谱的测定,发现miRNA的表达与老化程度紧密相关。卵子老化相关特征和潜在原因的揭示为后续老化机制的进一步研究提供基础资料。

4 结论

本研究显示大菱鲆卵子排放后到在卵巢腔内受活性氧诱导发生老化,随着老化时间延长,其抗氧化能力下降,受精率和孵化率显著降低。明确了老化

的检测指标及时间节点,在卵子排放后 0~3 h 内,及时采集,影响不大,但是 6 h 后,卵子质量极度恶化。本研究的结果对于生产中卵子采集时间,培育优质苗种具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 丁福红, 雷霖霖, 刘新富, 等. 鱼类配子质量研究进展与展望[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 129-132.
Ding Fuhong, Lei Jilin, Liu Xinfu, et al. Progress and prospect of quality assessing of fish gametes[J]. Marine Sciences, 2009, 33(12): 129-132.
- [2] Samarin A M, Policar T, Lahnsteiner F. Fish oocyte ageing and its effect on egg quality[J]. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 2015, 23(3): 302-314.
- [3] 雷霖霖. 海水鱼类养殖理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
Lei Jilin. The Theory and Technology of Marine Fish[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005.
- [4] Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar B J, et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2012, 10(49): 1-31.
- [5] Lord T, Martin J H, Aitken R J. Accumulation of electrophilic aldehydes during postovulatory aging of mouse oocytes causes reduced fertility, oxidative stress, and apoptosis[J]. Biology of Reproduction, 2015, 92(2): 1-13.
- [6] Miyamoto K, Sato E F, Kasahara E, et al. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010, 49(4): 674-681.
- [7] Yudong Jia, Zhen Meng, Xinfu Liu, et al. Biochemical composition and quality of turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs throughout the reproductive season[J]. Fish Physiology & Biochemistry, 2014, 40(4): 1093-1104.
- [8] Yudong Jia, Zhen Meng, Xinfu Liu, et al. Molecular components related to egg quality during the reproductive season of turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Aquaculture Research, 2015, 46: 2565-2572.
- [9] Samarin A M, Blecha M, Uzhytchak M, et al. Post-ovulatory and post-stripping oocyte ageing in northern pike, *Esox lucius* (Linnaeus, 1758), and its effect on egg viability rates and the occurrence of larval malformations and ploidy anomalies[J]. Aquaculture, 2016, 450: 431-438.
- [10] Samarin A M, Gela D, Bytyutskyy D, et al. Determination of the best post-ovulatory stripping time for the common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758)[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2015, 31: 51-55.
- [11] Harvey B, Kelley R N. Short-term storage of *Sarotherodon mossambicus* ova[J]. Aquaculture, 1984, 37: 391-395.
- [12] Lahnsteiner F. Morphological, physiological and biochemical parameters characterizing the overripening of rainbow trout eggs[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2000, 23: 107-118.
- [13] Azuma T, Ohta H, Oda S, et al. Changes in fertility of rainbow trout eggs retained in coelom[J]. Fisheries Science, 2003, 69: 131-136.
- [14] Aegerter S, Jalabert B. Effects of post ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 2004, 231: 59-71.
- [15] Samarin A M, Ahmadi M R, Azuma T, et al. Influence of the time to egg stripping on eyeing and hatching rates in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* under cold temperatures[J]. Aquaculture, 2008, 278: 195-198.
- [16] Zhang C X, Cui W, Zhang M, et al. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in modulating postovulatory aging of mouse and rat oocytes[J]. Plos One, 2014, 9(4): e93446.
- [17] Lord T, Nixon B, Jones K T, et al. Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro[J]. Biology of Reproduction, 2013, 88(3): 1-9.
- [18] Tarin J J, Perez-Albala S, Perez-Hoyos S, et al. Post-ovulatory aging of oocytes decreases reproductive fitness and longevity of offspring[J]. Biology of Reproduction, 2002, 66(2): 495-499.
- [19] Cecconi S, Rossi G, Deldar H, et al. Post-ovulatory ageing of mouse oocytes affects the distribution of specific spindle-associated proteins and Akt expression levels[J]. Reproduction Fertility and Development, 2014, 26(4): 562-569.
- [20] Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, et al. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by injection of 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. Aquaculture, 1996, 139: 291-301.
- [21] Aegerter S, Jalabert B. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Aquaculture, 2004, 231: 59-71.
- [22] Nomura K, Takeda Y, Unuma T, et al. Post-ovulatory oocyte aging induces spontaneous occurrence of polyploids and mosaics in artificial fertilization of Japanese eel, *Anguilla japonica*[J]. Aquaculture, 2013, 404: 15-21.
- [23] Rime H, Guitton N, Pineau C, et al. Post-ovulatory ageing and egg quality: A proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2004, 2(26): 1-10.

[24] Ma H, Weber G M, Hostuttler M A, et al. MicroRNA expression profiles from eggs of different qualities as-

sociated with post-ovulatory ageing in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1-9.

Study on characteristics of post-ovulation aging in ovarian cavity of turbot

SONG Zong-cheng¹, WANG Xue-ying^{2, 3, 4}, XUE Rui^{2, 3, 4}, XIAO Zhi-zhong^{2, 3, 4}, MA Dao-yuan^{2, 3, 4}, LIU Qing-hua^{2, 3, 4}, LI Jun^{2, 3, 4}

(1. Weihai Shenghang Aquatic Science and Technology Co., LTD, Weihai 264200, China; 2. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, 7 Nanhai Road, Qingdao, 266071, China)

Received: Mar. 14, 2019

Key words: *Scophthalmus maximus*; postovulatory aging; reactive oxygen; fertilization rate; hatching rate

Abstract: Using fluorescence staining, physiological, and biochemical methods, we investigated the characteristics of postovulatory aging in ovarian cavity of turbot. Lipid peroxidation and antioxidant system (superoxide dismutase (SOD), reducing glutathione (GSH), and oxidation product malondialdehyde (MDA)), ovarian fluid pH, and fertilization and hatching rates were detected. Five time points (0, 3, 6, 9, and 12 h) were set for the artificial collection of eggs and fertilization. The results showed that with delayed fertilization of eggs in ovarian cavity, the ROS content and degree of lipid peroxidation gradually increased. ROS and peroxidation were positively correlated with post-ovulation aging. The concentrations of antioxidant enzyme SOD and GSH decreased, whereas that of MDA significantly increased. Fertilization rate and hatchability significantly declined. At 6 h postovulation, the hatchability dropped to 2.87% to 10.60%, and the eggs cannot be used at this point. In summary, in ovarian cavity, after ovulation, ROS content significantly increases with the extension of time, whereas fertilization rate and hatchability considerably decrease. ROS mainly causes postovulation aging. The present study revealed the basic characteristics of postovulation aging of turbot, determined the optimal time for egg collection, and bears importance in the cultivation of high-quality turbot larva.

(本文编辑: 康亦兼)