

doi:10.3969/j.issn.1008-9632.2009.06.005

# 牙鲆胚胎冷冻损伤的观察

王春花<sup>1</sup>, 田永胜<sup>2</sup>

(1. 淮南师范学院 生命科学系, 安徽淮南 232001;

2. 青岛黄海水产研究所 重点开放实验室, 山东青岛 266071)

**摘要:**为了观察牙鲆胚胎在冷冻保存过程中的形态受损情况, 将其浸入 20% PM (20% 丙二醇和 20% 甲醇 1:1 的混合液) 中平衡, 并用程序化法和玻璃化法对其冷冻保存 2h 后解冻, 用摄影显微镜记录其在抗冻剂里平衡时和冷冻保存后的形态。结果显示在平衡过程中胚胎卵膜出现凹陷 (称为溶液损伤), 但可以恢复; 在冷冻过程出现胞内冰损伤, 是致命的; 用程序化法冷冻保存的尾芽期胚胎卵膜和卵黄完好, 胚体边缘受伤; 用玻璃化法保存的尾芽期胚胎, 卵膜和卵黄损伤较重, 胚体损伤较轻; 因此将玻璃化法和程序化法结合可以达到扬长避短的效果。

**关键词:**牙鲆; 胚胎; 溶液损伤; 胞内冰损伤

中图分类号: Q 954.4

文献标识码: A

文章编号: 1008-9632(2009)06-0005-03

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 隶属于鲽形目, 鲆科, 牙鲆属。牙鲆肉质细嫩鲜美, 一直深受消费者喜爱。牙鲆主要分布于中国以及朝鲜、日本、俄罗斯远东沿海海区, 是当前重要的海水养殖鱼类。牙鲆仔鱼、幼鱼生长的最适水温为 17~20℃, 成鱼的最适水温为 16~21℃。牙鲆为广盐性鱼类, 对盐度变化的适应能力很强。近年来, 由于过度捕捞和近亲繁殖, 其种群数量也在逐渐减少, 生长速度减慢、优良性状也在逐渐退化<sup>[1]</sup>。因此, 对牙鲆等重要海水养殖鱼类野生种或优良品种进行长期保存, 以保护我国的鱼类种质资源已非常有必要。

常用冷冻保存方法有两种, 一种是程序化冷冻保存法, 它是利用程序降温仪, 按照预先设计的降温程序将种质细胞所处的环境降至一定温度, 然后将其投入液氮中保存的冷冻方法。程序冷冻法采用较低浓度的抗冻保护剂, 对胚胎造成的毒性损害较小, 并且方法可靠, 适用于大量冷冻<sup>[2]</sup>。另一种是玻璃化法, 即液体在冷冻过程中借助粘度的提高而形成玻璃状非结晶的固体。这种方法主要借助于极快速降温和较高的抗冻剂浓度, 使细胞内外的液体越过结冰过程, 而直接形成玻璃状固体, 从而可以避免细胞内形成冰晶<sup>[3]</sup>。超低温冻存实际上由 3 个技术手段组成: 一是细胞预冻; 二是细胞在 -196℃ 下长期贮存; 三是细胞冻融。细胞在 -196℃ 下贮存是安全、有效的。如果说细胞超低温冻存后出现致死损伤的话, 那肯定是发生在预冻和冻融期间, 而这种由预冻和冻融引起的细胞变化或损伤是可以通过完善和改进技术程序尽量避免的。所以讨论

细胞超低温冻存的致死损伤问题并不意味着是否否定超低温冻存技术的实用性。实验以牙鲆胚胎为材料, 用程序化法和玻璃化法分别对胚胎进行冷冻, 对其出现的冷冻损伤进行观察, 以期对牙鲆胚胎的冷冻保存技术的优化提供一定的实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 牙鲆尾芽期胚胎浸入到 20% PM [20% 丙二醇 (propylene glycol) 和 20% 甲醇 (methanol) 的 1:1 的混合液] 溶液中, 并每隔 10min 进行观察, 用摄影显微镜记录胚胎在平衡过程中形态。

1.2 用程序化方法和玻璃化方法冷冻保存牙鲆胚胎, 并用摄影显微镜记录死亡胚胎的形态。程序化方法: 用 20% PM 平衡牙鲆胚胎 50min, 把胚胎装入麦管, 以 -2℃/min 降温至 -12℃, 植冰, 维持 2min, 继续以 -10℃/min 降温至 -40℃, 维持 2min, 快速投入液氮中, 保存 2h 解冻。玻璃化方法: 45% PM32 平衡胚胎 30min, 把胚胎装入麦管, 快速投入液氮中, 保存 2h 解冻。

## 2 结果

2.1 尾芽期胚胎卵膜在 20% PM 中平衡过程中出现了凹陷 (在低温生物学中称为溶液损伤), 当平衡结束时凹陷又重新鼓起。如图 1 中箭头所标示。在平衡过程中, 胚胎卵膜内陷 (b, c, d); 当平衡结束时胚胎 e 的凹陷又重新鼓起, 同时体积比对照 a 略小; 洗脱后的胚胎 f 与对照胚胎 a 无明显差异。

2.2 经过超低温冷冻的牙鲆胚胎, 由于胞内冰的形成, 出现不同程度的损伤, 如图 2 中箭头所示: 原肠中

收稿日期: 2008-07-31; 修回日期: 2008-08-08

作者简介: 王春花, 女, 理学硕士, 助教, 研究方向: 生物技术与种质资源保护, E-mail: ch\_wang03@yahoo.com.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30570259); 安徽省高校青年教师资助计划项目 (2008jq1134)

期(b,c)卵黄基本上没有损伤,但是细胞损伤严重;用程序化法冷冻保存的尾芽期胚胎卵膜完好,卵黄出现轻微损伤,胚体边缘损伤严重,特别是头部(e,f);用玻璃化法保存的尾芽期胚胎,卵膜和卵黄损伤严重(h)。

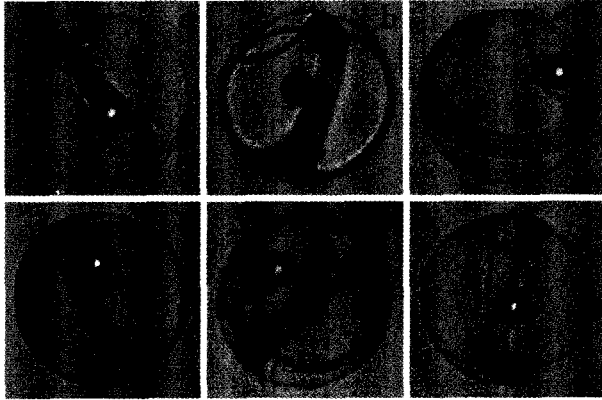


图1 尾芽期(25~30对肌节)胚胎用20%PM平衡过程中的显微观察

Fig 1 The microscopic observation in equilibrating process

a: 未经任何处理的牙鲆尾芽期胚胎×60; b: 处理10min的牙鲆尾芽期胚胎×60; c: 处理20min的牙鲆尾芽期胚胎×60; d: 处理30min的牙鲆尾芽期胚胎×60; e: 处理40min的牙鲆尾芽期胚胎×60; f: 完全洗脱后的牙鲆尾芽期胚胎(25~30对肌节)×60

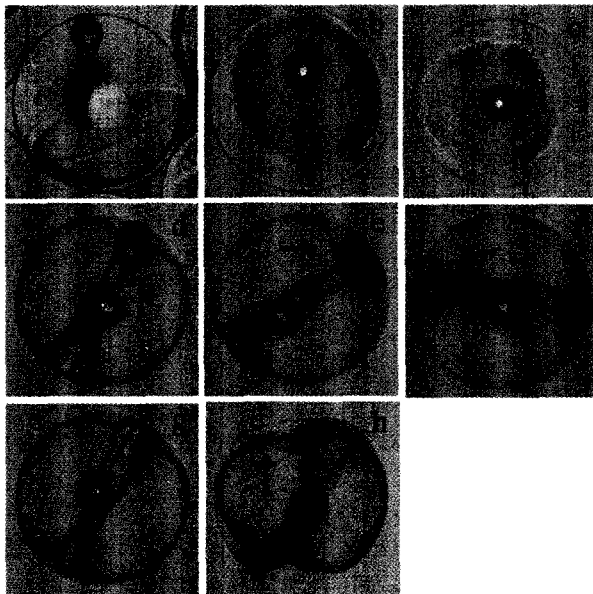


图2 经过超低温冷冻的牙鲆胚胎

Fig 2 Embryos cryopreserved in LN<sub>2</sub>

a: 原肠中期正常胚胎×60; b,c: 经过冷冻的原肠中期胚胎×60; d,g: 尾芽期正常胚胎×60; e,f: 用程序化法保存的尾芽期胚胎×60; h: 用玻璃化法保存的尾芽期胚胎×60

### 3 讨论

从1949年英国生物学家C. Polge和A. U. Smith偶然发现加了甘油的精子可以经历低温而不死亡开始,人们一直在探索细胞组织冷冻损伤的机理。最近几十年来,许多学者根据取得的研究成果,提出了多种假

说。Lovelock认为,过慢的冷却过程造成电解质浓度的增高,导致细胞膜脂蛋白复合体的破坏和膜的分解<sup>[4]</sup>。Meryman认为,当细胞膜脱水收缩达到临界最小体积时,会使细胞膜的渗透率产生了不可逆的致命的增加,原先不能透过膜的溶液也变成可渗透的,造成细胞死亡<sup>[5]</sup>。1972年,Mazur等首先从中国仓鼠组织培养细胞的低温保存实验数据分析中,提出冷冻损伤的两因素假说。这个假说认为造成冷冻损伤有两个独立的因素:一是胞内冰的形成(intracellular ice damage),这是过快冷却所产生的,冷却速率越快,此损伤越大;另一是“溶液损伤”(solution damage),这是由过慢冷却所产生的,它使细胞在高浓度的溶液中暴露的时间过长而遭损伤,冷却速率越慢,此损伤越大<sup>[6]</sup>。Morris认为,其中生物物理作用比生物化学作用更重要,慢速冷冻细胞脱水收缩引起的细胞内原生质和细胞器的变化是造成损伤的主因,而且在渗透收缩过程中压力增加也造成损伤<sup>[7]</sup>。在国内鱼类胚胎冷冻保存研究起步相对较晚,关于冷冻损伤机理的研究比较少。赵维信等利用扫描电镜对鲤科鱼类精子和胚胎的冷冻损伤进行研究,表明胚胎胞内失水引起胚胎表皮细胞皱缩,细胞间相互分离,使胚胎致死<sup>[8]</sup>。对泥鳅的胚胎冷冻前后的显微和亚显微结构进行观察,发现体色素,胚胎冻后表面破裂,胚体收缩,冻后卵黄颗粒破裂,未见结成均质的板块,胚胎内出现网络状的冰腔,体节内有矛状的冰晶沿肌纤维纵向伸展,肌原纤维不可分辨,部分线粒体解体<sup>[9]</sup>。DMSO对草鱼胚胎的毒性,主要是使胚胎脊索受损,发生畸变,泄殖孔后脊椎骨数比正常平均少6节<sup>[10]</sup>。

实质上,胚胎损伤可归为“溶液损伤”和“胞内冰造成的机械损伤”两种因素。“溶液损伤”是胚胎细胞脱水,严重的导致出现表皮细胞皱缩、胚体收缩、细胞间隙连接受损、使胚胎细胞相互分离,对胚胎造成了致命的损伤。“胞内冰造成的损伤”是由于降温速率过快,胚胎细胞内还存有大量的水分,导致大量冰晶的产生,冰晶主要是对细胞膜系统造成机械损伤,它直接损伤膜结构,从而使细胞的生理、代谢功能无法正常发挥。

图1中显示牙鲆尾芽期胚胎在20%PM中平衡时,胚胎出现凹陷现象,原因可能是胚胎在高渗溶液中脱水引起,后来在平衡了一段时间后胚胎的凹陷部位又重新鼓起,原因可能是渗透性抗冻剂(密度比水小)渗入到胚胎引起。这个结果表明在抗冻剂平衡过程中对尾芽期牙鲆胚胎所造成的溶液损伤,不足以致命,是可以恢复的。图2所示结果表明对时期较早的胚胎进行冷冻,发生损伤部位是细胞部分,而卵黄和卵膜完好,不易发生损伤;程序化冷冻保存对卵黄和卵膜就有

良好的保护作用, 胚体较易受损; 相对玻璃化法对胚体细胞保护作用较程序化法略好, 但是对卵黄和卵膜的保护作用较差。因此可以推断: (1) 用玻璃化法保存早期胚胎, 可以避免其缺点, 但是要克服早期胚胎对冷的敏感性; (2) 程序化法, 胚体易受伤, 可能是抗冻液渗透不够, 或是浓度太低, 不足以保护到胚体, 可以通过延长平衡时间和抗冻液浓度来减小对胚体的损伤; (3) 将玻璃化法和程序化法结合可以达到扬长避短的效果。

参考文献:

- [1] 姚善成, 丛娇日. 海水鱼类养殖技术[M]. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1998, 58-75.
- [2] 王春花, 陈松林, 田永胜, 等. 牙鲆胚胎程序化冷冻保存研究[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(3): 81-87.
- [3] 陈松林主编. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007, 39-41.
- [4] Lovelock J E. The denaturation of lipidprotein complexes as a cause of damage by freezing[J]. Proc R Soc Lond B Boi Sci, 1957, 147: 427-433.
- [5] Meryman H T. Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes[J]. Nature, 1968, 218: 333-336.
- [6] Mazur P, Leibo S P, Chu E H. A two factor hypothesis of freezing injury-evidence from Chinese hamster tissue culture cells[J]. Exp Cell Res, 1972, 71: 345-355.
- [7] Morris G J. Liposome as a model system for investigating freezing injury[A]. In: Effects of low temperatures on biological membranes [C]. Academic Press, NY, 1981, 241-262.
- [8] 赵维信, 姜任良, 刘修英, 等. 几种鲤科鱼类精子和胚胎冷冻保存的扫描电镜研究[J]. 淡水渔业, 1992, 5: 3-5.
- [9] 曾志强, 张轩杰. 泥鳅胚胎冷冻前后生物学性状变化研究[J]. 湖南师范大学学报(自然科学版). 1995, 18(4): 40-44.
- [10] 章龙珍, 刘宪亭, 鲁大椿, 等. 二甲亚砜(DMSO)对草鱼胚胎毒性作用初报[J]. 淡水渔业, 1989, 4: 24-26.

## Observation of injury flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos during cryopreservation

WANG Chun-hua<sup>1</sup>, TIAN Yong-sheng<sup>2</sup>

- (1. Department of biology, Huainan Normal University, Huainan 232001;  
2. Yeallow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** In order to observe the change of injury flounder embryos during cryopreservation, flounder embryos were immersed in 20% PM (the mixed solution of 20% propylene glycol and 20% methanol with ratio of 1:1) firstly, and cryopreserved in LN<sub>2</sub> (liquid nitrogen) for two hours with programmed method and vitrification respectively, then thawed, and taken photos with micro-camera. Normally embryos were injured for the osmosis (named solution damage) and the intracellular ice (named intracellular ice damage), when immersed in 20% PM, this injury can be cured. When the embryos were cryopreserved by a programmed method, the chorion and yolk of embryos were in good condition, and the cell part was damaged. Correspondingly, when cryopreserved by vitrification, the chorion and yolk was damaged, and the cell part was better. So combining the two methods would remedy the cryopreservation.

**Keywords:** *Paralichthys olivaceus*; embryos; solution damage; intracellular ice damage

(上接 14 页)

## Floristic of seed plants in Bayueshan-Xiwenquan scenic and historic interest area

DING Bo, LI Chun-yan, SHI Sheng, TANG Li, DENG Hong-ping, CHEN Feng  
(School of Life Science, Southwest China University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** The seed plants were collected and classified in Bayueshan-Xiwenquan scenic and historic interest area of Chongqing. The flora distribution types at the level of family and genera were studied. The results showed that the flora were considerably rich, including 1043 species, which belonged to 136 families and 573 genera. There are 11 distribution types of family and 15 distribution types of genera. The dominant family and genera are obvious. Large number of single family, single genera and ancient multicarpels indicated the ancient flora origin. The characteristics of distribution types of seed plants took on obvious tropical nature, however, owned temperate nature to some extent. Many subtypes and interrupt distribution types showed obvious transitional character. There are some endangered and rare plants, protection plants, and sino-special plants in the reserve area, so it owned highly value and should be paid more attention to protect them.

**Keywords:** the Bayueshan-Xiwenquan; scenic and historic interest area; seed plants; floristic characteristic