

文章编号: 1004-7271(2004)04-0343-05

·综述·

鱼类精子活力及其超低温保存研究综述

A review of research of motility and cryopreservation of fishes sperm

苏天凤, 艾红

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

SU Tian-feng, AI Hong

(South China Sea Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

关键词 鱼类 精子 活力 超低温保存

Key words fishes; sperm; motility; cryopreservation

中图分类号 S917 文献标识码: A

鱼类精子是一类分化程度很高的细胞,在精巢中不活动,一旦与其生存水环境接触,精子便立即被激活而开始运动。近年来鱼类精子的这一特性在杂交育种、良种选育、种质保护及种质改良等方面得到了进一步的研究和应用,本文主要就鱼类精液生理特性、精子活力及精子超低温保存方面的研究作一个综述。

1 鱼类精液一般生理特性及精子运动器官

鱼类精液外观乳白色,大多数呈弱碱性,pH 值在 7.3~8.5 之间,其浓度和密度随季节而变化。精液中金属元素组成主要为钾、钠、钙、镁、锌等。其中钾和钠两种元素占总金属元素含量的比例高达 99.7%~99.8%,主要起稳定渗透压的作用,对精子的激活和抑制起着非常重要的作用。

在透射电子显微镜下可以清楚地观察到鱼类的精子可分为头、颈和尾 3 部分。尾部又称鞭毛,是精子的运动器官。如果将鞭毛横切,从横切面可以看到“9+2”的结构(鳗鲡等为 9+0),即外周由 9 条二联管(A 管和 B 管)环绕着中央 2 条间管微管组成。A 管内含有 ATP 水解酶,通过水解 ATP 引起双微管之间的滑动,使鞭毛产生摆动来获得活力。外界因子对鱼类精子活力的影响,是通过影响 cAMP-ATP-Mg²⁺ 系统来影响鞭毛的活动而实现^[1]。

2 鱼类精子活力

2.1 精子活力的评价

精子活力是指精子群体运动状态与寿命长短,是反映精子质量的重要指标。精子活力的评价是研究精子生理特性、精子受精、精子保存等的基础,目前并没有一个统一标准。一般通过显微镜观察精子运动的激烈程度、精子激活比例及精子运动时间等几方面来确定。近年来通过一些新技术如显微电视、计算机辅助细胞活力分析仪和一些新方法如相差显微多次曝光法、激光-光散射分光光度法等用来观察精

子的活力。这些方法更为直接、清楚和准确,特别是计算机辅助细胞活力分析仪,其结果已有专门的分析系统²¹。目前国内大多数研究机构还是运用传统的显微镜来观察。

显微镜下观察精子活力,常用凹载片悬滴法。将精液以一定的比例稀释,迅速与激活液混合后立即在显微镜下观察。根据精子群体在激活液中的运动状况,不同的研究者将其分为不同的阶段。吴景贵等³将鲤精子运动分为快速运动、中速运动、慢速运动、死亡;四川省长江水产资源调查组⁴将鲟鱼类精子运动分为激烈运动、缓慢运动、微弱摆动;谢刚等⁵将鳗鲡精子运动分为激烈运动、半数运动、个别运动、死亡;鲁大椿等⁶将淡水鱼类精子分为激烈运动、快速运动、慢速运动、摇摆运动、死亡;唐天德等⁷则笼统地将梭鱼精子运动分为涡动(包括激烈运动和快速运动)与总运动等。生产实践和试验证明,精子在激烈运动和快速运动阶段授精能力最强,慢速运动的精子授精能力明显降低,摇摆运动的精子无授精能力。从这个意义上讲,将精子运动状态简单分为激烈运动和总运动较为科学,既体现了精子活力最强的时间,又反映了精子的寿命。精子活力与受精率呈正相关,活力越高精子受精能力越强^{8,9}。

2.2 精子的抑制-激活机制

鱼类精子在一定条件下(如在精巢中)会受到抑制,而一旦抑制条件被解除(如释放到水中)则会激烈运动起来,激烈运动的精子如果再放到抑制环境中,其活动又会受到抑制,条件适合时又会被重新激活,可以如此反复直至死亡。

激活精子并影响精子活力的因素很多,水环境中的各种理化因子,如渗透压(主要由盐度调节)、无机离子、酸碱度、水温甚至一些有机物也会影响到精子的激活。对鱼类精子而言,渗透压的影响至关重要¹⁰。精子的一部分能量就是消耗在渗透压的调节上。Morisawa等¹¹用不同渗透压的NaCl、KCl和甘露醇溶液作精子激活试验,发现一些淡水硬骨鱼类,如鲫(*Carassius auratus*)、褐三齿雅罗鱼(*Tribolodon hakonensis*)的精子在高渗透压溶液中,精子不活动,呈抑制状态,若加1滴去离子水,精子立刻被激活而运动,而用低渗透压溶液去稀释精子,同样能诱发精子从抑制到激活状态。一些海水硬骨鱼类,如鳕(*Gadus morrhua macrocephalus*)、黄盖鲷(*Pseudopleuronectes yokohamae*)的精子,可被高于精液渗透压的溶液激活。Chauvaud等¹²也赞同此观点。国内的一些学者关于淡水鱼类和海水鱼类精子激活的研究结果也与此一致。王祖昆等¹³的研究表明当精子处于渗透压偏高的溶液(大于270mOsm/L)中时,精子基本不活动,即高渗溶液抑制精子,低渗溶液激活精子。当溶液渗透压超过500mOsm/L时,精子的激活将受到影响;当溶液渗透压低于200mOsm/L时,精子的抑制-激活反应将逐步消失,在淡水中,激活后精子将一直运动至死。海水鱼类精液的平均渗透压相当于盐度7.6的水渗透压,海水鱼类精子以及处于最强活动时的环境盐度都远高于其本身的渗透压。黑鲷(*Sparus macrocephalus*)在溶液盐度为10时才被激活,在盐度25~30之间的涡动时间最长^{14,15}。广盐性的咸淡水鱼精子抑制-激活机制又有其特点。如中华乌塘鳢(*Bostrichthys sinensis*)精子既可被盐度35以下的海水激活,也能被淡水激活,在淡水中寿命极短,基本无快速运动¹⁶。

渗透压与离子对精子活力的影响是相互联系的。 Na^+ 、 K^+ 是精浆的重要组成成分及形成精浆渗透压的主要离子。Morisawa等¹⁷发现 K^+ 在鲑鳟鱼类如虹鳟(*Salmo gairdneri*)、马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus masou*)、亮斑红点鲑(*Salvelinus leucomaenis*)的精液中含量很高,可高出血浆 K^+ 含量5~10倍。用渗透压为0~679.5kPa的NaCl或甘露醇溶液来稀释精液,精子都能被激活。而渗透压为0.57~1.13kPa的KCl便能抑制精子运动,但有 Na^+ 存在时, K^+ 对精子激活的抑制浓度随 Na^+ 浓度的提高而增加,在含339.7kPa的 Na^+ 的溶液中需13.5~14.7kPa的 K^+ 离子才能抑制精子活动。因此 K^+ 能抑制鲑鳟鱼类精子的活动, Na^+ 则能降低这种抑制作用。除 Na^+ 外, Ca^{2+} 、 H^+ 、 Mg^{2+} 也能部分降低 K^+ 的这种抑制作用¹⁸。然而鲤科鱼类,虽然精浆中 K^+ 含量较高(52~82mmol/L),较血浆中高18~29倍,不但不能阻止精子运动,反而能提高精子运动速度,延长精子运动时间¹⁹。江世贵等¹⁶通过对咸淡水鱼中华乌塘鳢精子激活的研究,认为 K^+ 的存在在一定程度上对中华乌塘鳢精子的活动有抑制作用,这点与鲑鳟鱼类相同。

Ca^{2+} 是调节鱼类精子活力的重要因子,外界环境的 Ca^{2+} 通过对 Ca^{2+} 通道进入精子细胞使精子细胞

的 Ca^{2+} 增加,是精子激活所必需的^[20]。

另外, pH 值也是精子抑制及激活的调节因子之一,鲑鳟鱼类其生殖管道中精子的活力是 pH 值上升的结果。当溶液 pH 值低于 7.5 时虹鳟精子运动受抑制^[21]。淡水硬骨鱼类精子活动的最适 pH 值略有不同,约在 7.0~8.5 之间,海水鱼精子活力高峰的 pH 值为 7.8~8.2。鳗鲡精子耐受酸碱的范围较宽,在 pH5~10 都有激烈活动,最适为 7~8^[5]。中华乌塘鳢也能耐受较强的酸碱环境,在 pH5.5~9.5 均具有活力,最适为 6.0^[16]。王祖昆等^[13]认为 pH 值对精子活力有明显影响,在 pH 值最适范围内,强烈运动时间长,精子寿命也较长。温度对精子的作用主要通过低温使精子消耗的 ATP 减少而延长精子运动时间^[22]。

3 精子保存

3.1 精子保存的原理及意义

精子的寿命随其能量的消耗殆尽而终结。其能量的消耗主要在两个方面:一是运动;二是调节细胞内外渗透压平衡。因此减缓精子能量的消耗,就可延长其寿命。

精子保存可分常温保存、低温保存及超低温保存。常温保存的原理是根据精子的生理特性配制一定浓度稀释液,减少精子用来调节渗透压平衡的能量消耗而延长精子的寿命,可将精子寿命延长几分钟至几小时。淡水鱼类在人工授精过程中采用生理盐水代替淡水可提高受精率。低温保存的原理是根据低温能降低精子代谢活动,可将精子寿命延长几天至十几天。超低温保存则是让精子在超低温(-196℃)条件下,其运动和代谢完全停止,精子处于假死状态,生命以静止状态保存下来。精子可以无限期的保存,解冻后会“复活”。精子超低温保存的主要意义在于(1)在育种上可避免近亲交配,增加遗传优势,解决雌、雄鱼不同步成熟的问题。(2)可建立优良鱼种和濒危鱼种的原种库。(3)可与国内外育种单位进行合作,具有超越时空的价值。(4)可与其它生物技术如诱发雌核生殖、诱发全雄性子代等配合使用。

3.2 鱼类精子超低温保存的工艺与应用

鱼类精子超低温保存的工艺流程为精液采集→精液稀释(加入精液保护剂及抗冻剂)→降温平衡→液氮保存→解冻→活力检验。其中关键步骤为稀释液的配制、冷冻保存、解冻。稀释液由基础溶液和抗冻剂组成。基础溶液的成份和浓度因种类不同而不同,其原则是必须使精子不受损害地以静止状态进入冻结状态。已经应用的精液冷冻保存基础溶液种类很多,主要有盐类(NaCl、 NaHCO_3 、KCl)、糖类(葡萄糖)、脂类(磷脂)、蛋白质以及微量添加剂(维生素、抗生素)等。有的学者^[23]认为,海水鱼类用由葡萄糖和柠檬酸钠组成的稀释液就能获得良好的冷冻效果。江世贵等^[15]用氯化钠、柠檬酸钠、葡萄糖组成的稀释液对黑鲟精子成功地进行了超低温保存。淡水鱼类稀释液则应以氯化钠和氯化钾为主,加入少量氯化钙、氯化镁、碳酸氢钠和葡萄糖^[24,25]。James 和 Satterfield^[26]报道,添加血清能大大延长大眼梭鲈(*Stizostedion vitreum vitreum*)精子的保存期限。抗冻剂主要有甘油和二甲基亚砜(DMSO)。甘油较广泛应用于海水鱼类的冷冻保存,在白鲑(*Coregonus muksun*)^[27]、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)^[28]的精子冷冻保存中也被证明是一种有效的抗冻剂。而在鲤科鱼类^[24,25,29]、鲷科鱼类^[30-33]、中华乌塘鳢^[16]的精子保存中 DMSO 也取得了良好的效果。姜仁良等^[34]发现了一种新的抗冻剂——N,N-二甲酰胺(DMF),他们认为 DMF 对淡水鱼类冷冻保存具有明显效果,冻精授精效果优于 DMSO。DMSO 与 DMF 对家鱼精子抗冻保护的机理均是通过渗入精细胞内,提高精子渗透压,降低其冰点而起保护作用^[34,35]。

降温平衡是否需要,因不同种类而异。Magrary 等^[29]用分段降温平衡的方法进行鲤鱼精子保存,取得很好的效果,鲷科鱼类则完全不需平衡。降温分为快速降温和慢速降温两种。若用快速降温,细胞内的水分还未渗出或渗出甚少,冻结形成的冰晶会损伤细胞膜,导致精子死亡。慢速降温,可使精子充分脱水,与周围高渗溶液保持渗透压平衡,如果降温速率太慢,精子就会长时间处于高渗溶液中,导致细胞收缩,出现溶质损伤。因此,筛选最佳的降温速率对提高冷冻保存效果至关重要。目前多采用分段降温

法。复温解冻是降温冻结的逆过程,亦是精子升温溶解复苏的过程。降温出现的胞内冰晶虽然有害,若复温适当,细胞尚能存活,但复温过程中胞内的重结晶却是致命的。有室温自然解冻和快速解冻两类方法,比较常用的是在 30~40℃的水浴中快速解冻。

另外,环境的溶氧量也影响精子保存的效果,Tsvetkova 等^[36]报道,在缺氧和高氧的条件下饲养的鲤鱼低温保存的精子活力比在正常条件下饲养的鲤鱼的精子活力低 30%~50%。

鱼类精子的超低温保存国外的研究前期主要集中在虹鳟鱼类和某些海水鱼类上,最近几年也开展了淡水鱼精子超低温的冷冻研究,有的受精率高达 90% 以上,说明鱼类精子冷冻保存技术已日趋成熟。有的成果已经在种质资源保护上发挥了作用,如 Thorhaard^[37]对哥伦比亚河某些濒危的鲑鱼、鲟鱼进行精子的冷冻保存,建立了基因库。我国对青、草、鲢、鳙、鲤等十余种淡水养殖鱼类建立了精子保存技术的操作规程,对精液进行批量冷冻保存,建立了精子库。鲟科鱼类的精子保存技术也逐渐形成了体系,并在杂交育种中得到应用。

4 结语与展望

精子活力研究是包括精子超低温保存在内的一切以精子为材料研究的基础。目前精子活力的研究虽然取得了较大进展,但仍存在一些不足:其一,研究种类较少,大多数研究集中在鲤科鱼类、鲑鳟鱼类、鲟科鱼类和某些咸淡水鱼类,其它种类鱼精子活力影响因子尚未明了;其二,精子抑制-激活机制研究得不够充分和透彻,如精子的膜结构是否有离子通道?渗透压及各种环境因子是通过何种方式来作用精子的?其激活原理的分子机制究竟如何等等。这些还有待进一步的研究和证实。

尽管鱼类精子的超低温保存取得较大成功,但冻精的受精率很难达到鲜精的水平,也即经过超低温保存后,冻精的活力总是比鲜精要差,总有部分精子在冷冻过程中受到损伤。因此,鱼类精子超低温保存研究还有待进一步深入和完善,筛选更适宜的稀释液配方以及寻找更为有效的降温速率和解冻速率方案是有效保护精子的遗传物质及解决冻精受精能力下降的重要措施,同时也是今后进一步研究的重点。

参考文献:

- [1] Hoar W S, Randall D J, Donaldson E M. Fish physiology[M]. New York: Academic Press, 1978. 31-53.
- [2] Perchec G, Jeulin C, Ander F, et al. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa[J]. J Cell Sci, 1995, 108(2): 747-753.
- [3] 吴景贵. 鲤鱼精子的寿命观察报告[J]. 动物学杂志, 1959, 10: 462-465.
- [4] 四川省长江水产资源调查组. 长江鲟鱼类生物学及人工繁殖研究[M]. 成都: 四川科学出版社, 1988.
- [5] 谢刚, 叶星, 苏植蓬, 等. 鳙鱼精子的主要生物学特性[J]. 上海水产大学学报, 1999, 18(1): 81-84.
- [6] 鲁大椿, 傅朝君, 刘宪亭, 等. 我国主要淡水养殖鱼类精液的生物学特性[J]. 淡水渔业, 1989, 19(2): 34-37.
- [7] 唐天德, 许兴基, 李文杰, 等. 几个环境因子对梭鱼精子活力影响的初步研究[J]. 热带海洋, 1985, 4(2): 91-97.
- [8] Cosson M P, Billard R, Gatti J L, et al. Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy[J]. Aquac, 1985, 46: 71-75.
- [9] Ohta H, Shinriki Y. Changes in osmotic pressure that trigger the initiation of sperm motility in river sculpin *Cottus hangiangensis* [J]. Fish Physiol Biochem, 1998, 18: 29-35.
- [10] Mark C, Bates K, William R. Effect of osmotic pressure on the activation and storage of channel catfish sperm[J]. American Fisheries Society, 1996, 125: 798-802.
- [11] Morisawa M, Suzuki K. Osmolality and potassium: their roles in initiation of sperm motility in teleosts[J]. Science, 1980, 210: 1145-1146.
- [12] Chauvaud L, Cosson J, Suquet M. Sperm motility in turbot, *Scophthalmus maximus*: initiation of movement and changes with time of swimming characteristics[J]. Environ Biol Fish, 1995, 43(4): 341-349.
- [13] 王祖昆, 邱麟翔, 陈魁候, 等. 我国南方主要淡水养殖鱼类精子特性研究[J]. 淡水渔业, 1985, 15(1): 18-21.
- [14] 区又君, 李加儿. 黑鲟 *Sparus macrocephalus* (Basilewsky) 精子在不同环境中的活力[J]. 中国水产科学研究院学报, 1991, 1(1): 18-26.
- [15] 江世贵, 区又君, 李加儿. 黑鲟 *Sparus macrocephalus* (Basilewsky) 精子超低温保存研究[J]. 南海水产研究, 1994, 9: 18-23.
- [16] 江世贵, 苏天凤, 喻达辉, 等. 中华乌塘鳢精子的生物学特性及其超低温保存[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 119-122.

- [17] Morisawa M , Suzuki K , Morisawa S . Effect of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes [J] . J Exp Biol , 1983 , 107 : 105 - 113 .
- [18] Tanimoto S , Morisawa M . Roles for potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in rainbow trout [J] . Dev Growth Differ , 1988 , 30 : 117 - 124 .
- [19] Morisawa M , Suzuki K , Shimizu H , et al . Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes [J] . J Histochem Cytochem , 1993 , 41 : 291 - 297 .
- [20] Detweiler C , Thomas P . Role of ions and ion channels in the regulation of Atlantic croaker sperm motility [J] . J Exp Zool , 1998 , 281 : 139 - 148 .
- [21] Baynes S M , Scott A P , Dawson A P . Rainbow trout , *Salmo gairdnerii* Richardson , spermatozoa : effects of cations and pH on motility [J] . J Fish Biol , 1981 , 19 : 259 - 267 .
- [22] Billard R , Cosson M P . Some problem related to the assessment of sperm of sperm motility in freshwater fish [J] . J Exp Zool , 1992 , 261 : 122 - 131 .
- [23] Hisashi K . Cryopreservation of rainbow trout Sperm [J] . Bull Soci Sci Fish , 1980 , 46 : 1493 - 1495 .
- [24] 陈松林 , 刘宪亭 , 鲁大椿 , 等 . 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究 [J] . 动物学报 , 1992 , 38 (4) : 413 - 424 .
- [25] 鲁大椿 , 刘宪亭 , 章龙珍 . 鱼类精液冷冻保存技术操作规程 [J] . 淡水渔业 , 1997 , 27 (4) : 13 - 17 .
- [26] James R , Satterfield J . Factor influencing storage potential of preserved walleye sperm [J] . The Progressive Fish-Culturist , 1995 , 57 : 175 - 181 .
- [27] Piironen J . Factors affecting fertilization rate with cryopreserved sperm of whitefish [*Coregonus muksun* Pallas] [J] . Aquac , 1987 , 66 : 347 - 357 .
- [28] Kebby J H . Cryogenic preservation of sperm from striped bass [J] . Trans Amer Fish Soci , 1983 , 112 : 86 - 94 .
- [29] Magyary I , Urbanyi B , Horvath L . Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L .) sperm : optimal conditions for fertilization [J] . J Appl Ichthyol / z Angew Ichthyol , 1996 , 12 (2) : 117 - 119 .
- [30] 江世贵 , 区又君 , 李加儿 , 等 . 鲷科鱼类精子超低温保存技术 [J] . 水产科技 , 1996 (3) : 22 - 25 .
- [31] 江世贵 , 李加儿 , 区又君 . 平鲷♀与真鲷♂的杂交研究 [J] . 海洋科学 , 1997 (5) : 33 - 38 .
- [32] 区又君 , 李加儿 , 江世贵 . 保存和激活对真鲷精子生理特性的影响 [J] . 热带海洋 , 1998 , 17 (3) : 65 - 74 .
- [33] 洪万树 , 张其永 , 吴鼎勋 . 真鲷精液和精巢超低温冷冻保存 [J] . 厦门大学学报 (自然科学版) , 1996 , 35 (5) : 790 - 794 .
- [34] 姜仁良 , 赵维信 , 张饮江 . 一种新抗冻剂 DMF 在淡水鱼类精液超低温保存上的应用 [J] . 上海水产大学学报 , 1992 , 1 (1) : 27 - 30 .
- [35] 章龙珍 , 刘宪亭 , 陈松林 , 等 . 二甲亚砜对几种淡水鱼精子渗透压及成活率影响的研究 [J] . 水生生物学报 , 1994 , 18 (4) : 297 - 302 .
- [36] Tsvetkova L I , Pronina N D , Kochetov A , et al . On certain factors affecting sperm cryopreservation of carp , *Cyprinus carpio* . [J] . Ichthyo , 1995 , 35 (9) : 305 - 314 .
- [37] Thorgaard G H , Wheeler P A , Cloud J G , et al . Gene banking efforts for endangered fishes in the United States [A] . Action before extinction , An international conference on conservation of fish genetic diversity [C] . World Fisheries Trust , 1998 , 181 - 185 .