

二甲亚砜对几种淡水鱼 精子渗透压及成活率影响的研究*

章龙珍 刘宪亭 陈松林 鲁大椿 郭 峰

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

提 要

本文研究了淡水鱼类精子在低温冷冻保存时,其渗透压在抗冻剂 DMSO 作用下的变化规律。冷冻前精子的渗透压在 DMSO 作用下最高可达 1538mOsm/L 与 4.5%NaCl 溶液相等渗,是自然条件下的 5 倍。解冻后最高仍保持在 1367mOsm/L 与 4.0%NaCl 溶液相等渗,是自然条件下的 4.5 倍。渗透压变化(Y)与二甲亚砜浓度(X)的关系式为 $Y=0.148X+1.245$, $r=0.898$ (冻前)和 $Y=0.136X+0.641$, $r=0.968$ (冻后)。当冷冻前精子渗透压为 1025—1367mOsm/L 时进行冷冻保存,解冻后精子成活率最高。

关键词 二甲亚砜,淡水鱼精子,渗透压,成活率

二甲亚砜(Dimethylsulfoxide,缩写 DMSO)是一种无色的极性溶剂,分子量为 78.13。由于它具有渗透力强,能很快通过细胞膜降低原生质冰点等特性^[1],所以在生物材料低温冷冻保存时常作为抗冻剂添加到稀释液中以便取得好的保存效果。在进行淡水鱼精子超低温(-196℃)冷冻保存时,稀释液的成分及抗冻剂的含量对精子成活有影响,甚至可改变精子的生理特性^[2]。用 DMSO 作为抗冻剂保存几种家鱼、虹鳟、大鳞大马哈鱼等精液时获得了好的结果^[3-5]。但多数学者只研究了冻精的受精率和 DMSO 对精子的毒性作用,而有关 DMSO 对精子渗透压的影响及抗冻保护机理却报道很少。

淡水鱼类精子在等渗液里是不运动的,只有当精子接触到水或所处环境渗透压低于精子时,精子即被激活运动^[6]。作者曾在 1983 年进行几种家鱼的精液冷冻保存研究时,就几种家鱼精子对 NaCl 单因子的耐受量进行了实验,证明当 NaCl 浓度分别达到 0.8—1.0%时,草鱼、鲢、团头鲂和鲤的精子完全被抑制不动,精子渗透压与 0.8—1.0%NaCl 溶液渗透压相等(273—341mOsm/L)^[4]。随后的研究发现精子在含有 DMSO 的保存液中对 NaCl 耐受量增高,说明精子渗透压改变了,即 DMSO 对精子渗透压有调节作用。本文的目的在于找出 DMSO 对精子渗透压的调节规律,尤其是精子在 DMSO

* 本文为国家“七·五”科技攻关75-06-01-09-02课题的部分研究内容。

①傅朝君等,1985年,家鱼精液超低温保存的研究。长江水产研究所鉴定材料。

1991年10月11日收到。

作用下渗透压改变的最高限值、解冻后精子渗透压的变化情况以及冷冻前渗透压变化对冷冻保存精子成活率的影响,进一步完善淡水鱼类精子超低温保存技术,提高精子冷冻保存的成活率。

1 材料和方法

实验于 1987—1990 年在长江水产研究所试验场家鱼人工繁殖期间进行。材料为鲤 (*Cyprinus carpio* Linnaeus)、团头鲂 (*Megalobrama amblycephala* Yih)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idella* Cuvier et valenciennes)等精液。雄性亲鱼经人工催情后用注射器采取精液,然后取样镜检,选用精子活率达 90%以上者。用 D-15 稀释液添加 14% 的 DMSO 保存鲤鱼精子,样品先在冻箱中 3—4℃ 下作 1—10h 平衡处理,然后进行超低温冷冻保存。用含 4—24%DMSO 的稀释液保存团头鲂精子,同时进行超低温保存。在室温 (22—23℃) 和 0℃ 条件下用含有 8%DMSO 的稀释液保存的草鱼精子,作 3、5、6h 平衡处理。精子经过不同平衡时间、不同 DMSO 浓度、不同温度以及冷冻保存解冻处理后,取样在倒置显微镜下分别滴加不同浓度 NaCl 溶液激活精子,观察精子活率,记录存活时间。渗透压值以 NaCl 浓度按 2000mmol/L 计算^[3]。

2 结果

2.1 DMSO 平衡时间对冷冻前和解冻后鲤鱼精子渗透压及活率的影响

2.1.1 冷冻前的影响 鲤精子在 14%DMSO 的保存液中经不同时间处理后,精子渗透压随时间延长而提高, (图 1A), 5—7h 精子渗透压达到最高 1538mOsm/L, 与

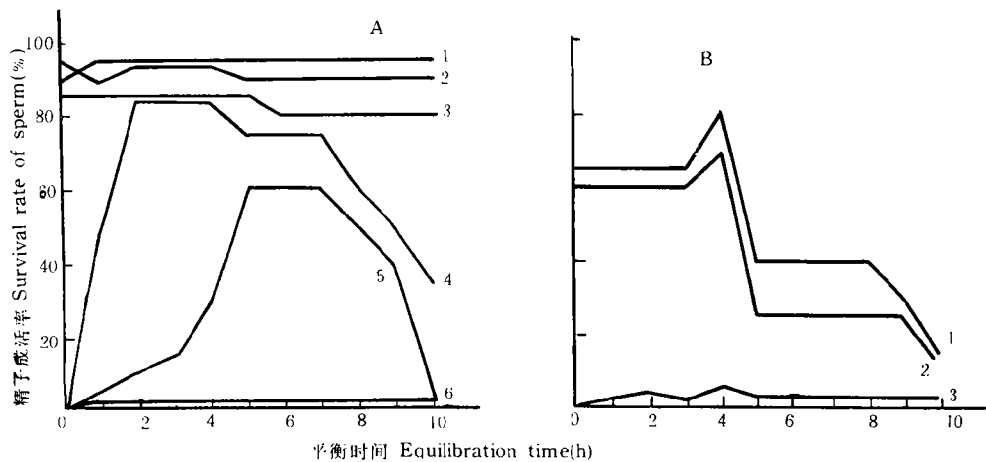


图 1 DUSO 平衡时间对冷冻前和解冻后鲤精子渗透压及活率的影响

Fig.1 Effect of DMSO equilibration time on the osmotic pressure and survival rate of the common carp sperm before freezing and after thawing

图注 1—6 分别表示 1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5% 的 NaCl 浓度; A 为冷冻前; B 为解冻后

4.5%NaCl 溶液的渗透压相等。7h 以后精子渗透压不再提高。4h 以前精子活率最高,用 3.5%以下 NaCl 溶液激活精子,精子活率在 85%以上。精子寿命最长达 143s。用 0.5%NaCl 溶液激活存活时间是用水激活的 3 倍,而用 1.0%NaCl 激活是用水激活的 1.4 倍。

2.1.2 解冻后的影响 解冻后鲤精子的渗透压为 1025mOsm / L,与 3.0%NaCl 相等,比冻前降低 513mOsm / L,随着时间的改变精子渗透压变化不大。在 4h 以前精子活率最高,(图 1B)。解冻后精子寿命最长为 22s。用 1.0%NaCl 溶液激活存活时间是用水激活的 3 倍,用 0.5%NaCl 激活是用水激活的 1.5 倍。解冻以后的结果与冻前的最佳平衡时间是相吻合的。

2.2 DMSO 浓度对冷冻前和解冻后团头鲂精子渗透压及活率的影响

2.2.1 冷冻前 稀释液中加入不同浓度 DMSO 后,团头鲂精子的渗透压发生变化也不同。从图 2A 中可以看到,低浓度 4.0%DMSO 作用精子后,精子渗透压最高只能达到 689mOsm / L,用 2.0%NaCl 溶液不能激活精子。随着 DMSO 浓度增加,精子渗透压相应提高。当 DMSO 浓度达 22%时,精子渗透压最高能到 1538mOsm / L,用 4.5%的 NaCl 基本不能激活精子,精子的渗透压与 4.5%NaCl 的渗透压相等。其渗透压是自然条件下平均渗透压 307mOsm / L 的 5 倍。

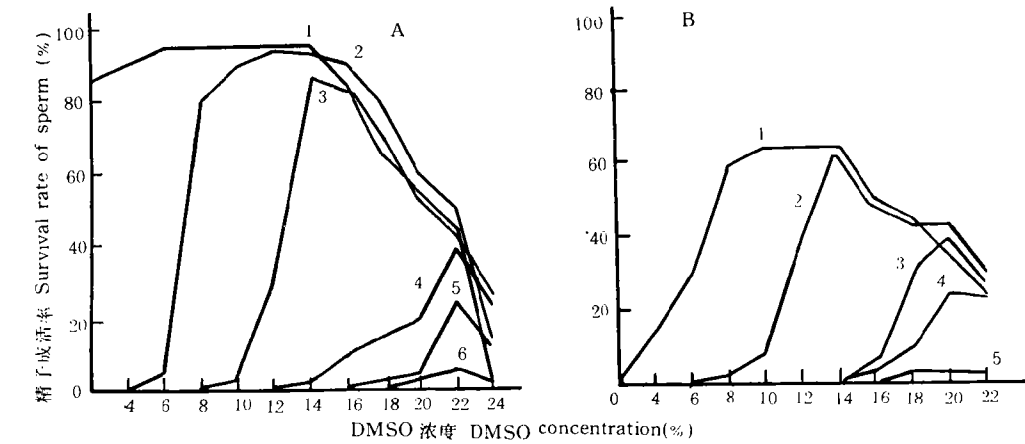


图 2 DUSO 浓度对冷冻前和解冻后团头鲂精子渗透压及活率的影响

Fig.2 Effect of DMSO concentration on the osmotic pressure and survival rate of the blunt-snout bream sperm before freezing and after thawing

图注 1—6 分别表示 1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5%的 NaCl 浓度;A 为冷冻前;B 为解冻后

2.2.2 解冻后 团头鲂精子渗透压与冷冻前变化相似,随着 DMSO 浓度增加渗透压提高(图 2B),用 10%以下 DMSO 冷冻保存精子,精子渗透压在 1025mOsm / L 以下,当它解冻后,用 2.0%NaCl 溶液不能激活精子,只有当 DMSO 浓度达 10%以上冷冻保存的精子才被 2.0%NaCl 激活运动。精子渗透压最高仍保持在 1367mOsm / L 与 4.0%NaCl 相等,是自然条件下的 4.5 倍,比冷冻前降低 171mOsm / L。当 DMSO 浓度增加,到 16%以后精子活率开始下降,直到 DMSO 增加到 22%时,精子活率下降到 25%以下。

结果表明, 冷冻前用 10—14%DMSO 保存精子, 在 3—4℃ 下平衡 4h, 当精子渗透压上升到 1025—1367mOsm / L 时进行液氮保存。解冻后用 2.0%以下 NaCl 溶液激活精子, 精子成活率达到最高。

冷冻前和解冻后精子渗透压与 DMSO 浓度的增长呈正相关。相关方程分别为: 冷冻前, $Y=0.148X+1.245$, $r=0.898$ 和解冻后, $Y=0.136X+0.641$, $r=0.968$, (图 3)。

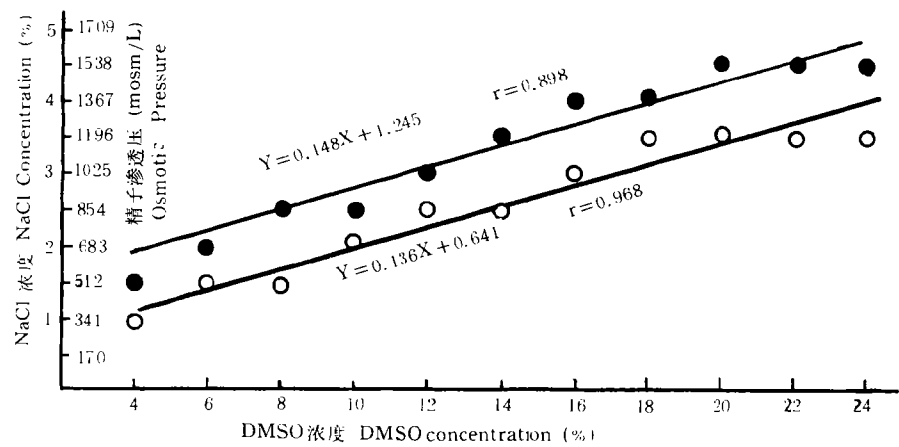


图 3 DMSO 浓度与团头鲂精子渗透压的关系

Fig.3 Relationships between DMSO concentration and osmotic pressure of the blunt-snout bream sperm

冻前 Before freezing; o 解冻后 After thawing

2.3 不同温度下 DMSO 对草鱼精子渗透压及活率的影响

室温下, 草鱼精子经 8%DMSO 处理 3h 后, 仅有 5%精子的渗透压超过 854mOsm / L, 能用 2.5%NaCl 激活。用 1.0%NaCl 激活时, 精子活率最高为 75%。处理 6h 后, 无论用 NaCl 或水激活, 精子活率为零(表 1)。

表 1 不同温度下 8%DMSO 作用时间对草鱼精子渗透压及活率的影响

Tab.1 Effect of 8% DMSO treatment time on the survival and osmotic pressure of grass carp sperm at different temperatures

处理温度 (℃) Treatment temperature	处理时间 (h) Treatment time	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0*	激活精子的 NaCl 浓度(%) NaCl concentration for sperm activation
		1196	1025	854	683	512	341		
22—23	0	0	0	0	30	40	85	90	精子成活率(%) Survival rate
	3	0	0	5	15	70	75	60	
	5	0	0	0	3	3	5	5	
	6	0	0	0	0	0	0	0	
0	0	0	3	85	90	90	95	90	* O—水(Water)
	3	0	0	65	90	90	95	90	
	5	0	0	45	85	90	95	90	
	6	0	0	40	85	90	95	90	

在 0℃ 条件下, 精子渗透压最高可达 1025mOsm / L, 相当于 3%NaCl 溶液的渗透

压。用 2.5%NaCl 激活精子,精子活率达 85%,平衡 6h 时仍有 40%精子被激活,用 2.0%以下的 NaCl 或水激活,精子活率在 85%以上。

3 讨论

3.1 DMSO 的抗冻保护机理

DMSO 对淡水鱼类精子的抗冻保护作用是由于 DMSO 能渗透到精子里面提高精子渗透压,而这种渗透作用在精子接触到 DMSO 瞬间就已发生。用 DMSO 处理后渗透压很快升高,这与精子体积小($5.05\mu\text{m}$)和 DMSO 渗透性强有关^[7]。精子渗透压随 DMSO 平衡时间和 DMSO 浓度增加而提高,20%浓度 DMSO 使精子的渗透压比原来升高了 1060mOsm/L ,冰点下降到 -10°C ,因提高渗透压而降低冰点使精子在结冰前得以快速通过($0\text{--}60^{\circ}\text{C}$)危险温区^[8],从而使精子冷冻保存获得良好效果。

3.2 精子渗透压的变化与成活率的关系

精子冷冻前随着用 DMSO 处理时间和 DMSO 浓度的改变,精子渗透压由 307mOsm/L 上升到 1538mOsm/L ,但冻前精子渗透压达最高值时精子活率并不是最高,也不是存活时间最长和保存效果最好之时。我们认为:①精子冷冻前所用 DMSO 的最佳浓度是 10—14%,在平衡 3—4h 时,渗透压可达到最好保存效果。如超过最佳范围时,由于一部分精子本身对环境的适应,渗透压提高不大,当用较高浓度的 NaCl 溶液激活时,对这部分精子来说是处于高渗而不能激活。②冷冻前高浓度 DMSO 对精子的毒性作用使一部分精子死亡,这与 Kurokura 等人研究结果一致。③冻前精子渗透压达到最高值,在冷冻保存过程中,由于结冰精子脱水造成“溶质损伤”,解冻后精子活率降低。

3.3 关于解冻后精子渗透压比冷冻前低的问题

我们认为,在精子冰冻过程中,由于结冰精子进一步脱水使渗透压达到最高,解冻时保护液先融化,融化的保护液对精子来说是处于低渗,它稀释和降低了精子的渗透压,所以解冻后的精子大部分都被激活作摆动运动,少数可以游动。因此解冻后精子的渗透压比冻前低。但它的渗透压仍比自然条件下高 3—4.5 倍。在进行冻精授精时,不能用水直接激活精子,因为用水激活会造成精子内外渗透压差过大,大部分精子立刻吸水膨胀死亡,其存活率极低,存活时间极短。如用 1.0—2.0%NaCl 溶液激活,精子活率最高,存活时间长,授精效果好。

精子冷冻前用 NaCl 溶液作为间接测定精子渗透压的一种手段,是简单可行的,而且很适用。因为精子本身体积很小,不可能进行渗透压测定,只能测定精液的渗透压,也就是精子所处环境的渗透压。根据 NaCl 不同浓度对精子抑制-激活作用,能很快地测知精子的渗透压。由于 DMSO 对不同种类鱼的精子的渗透性不同,渗透调节作用也有所区别,但只需在冷冻前用不同浓度的 NaCl 溶液作为激活剂使精子激活,以测其渗透压。根据精子渗透压变化规律就能很快地确定冷冻前保存精子所需条件,使冷冻保存精子获得较高的成活率。

参 考 文 献

- [1] 白乃庆. 血液保存. 上海: 上海科学技术出版社, 1984: 167—168.
- [2] 陈松林等. 抗冻剂二甲亚砜对家鱼精子生理特性影响的初步研究. 淡水渔业, 1987, (5): 17.
- [3] 卢敏德. 家鱼精液冷冻技术续报. 新疆农业科学, 1981, (4): 46.
- [4] Hisashi Kurokura. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 1984, 7: 267.
- [5] Legendre M. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. *Aquaculture*, 1980, 20: 1959.
- [6] 勃朗, M.E 编著, (费鸿年译). 鱼类生理学. 北京: 科学技术出版社, 1962: 310—312.
- [7] 鱼大椿等. 我国主要淡水鱼类精液的生物学特性. 淡水渔业, 1987, (2): 34.
- [8] 华泽钊. 生物材料的低温保存. 科学, 1978: 39.

EFFECT OF DIMETHYLSULFOXIDE ON OSMOTIC PRESSURE AND SURVIVAL RATE OF THE SPERM OF SEVERAL FRESHWATER FISH SPECIES

Zhang Longzhen, Liu Xianting, Chen Songlin, Lu Dachun and Guo Feng

(Yangtze River Fisheries Reserach Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences Shashi 434000)

Abstract

The mechanism of cryoprotection of fish sperm by dimethylsulfoxide (DMSO) lie is its fast penetration into the sperm and increase of the osmotic pressure of the sperm. Results of this study showed that the osmotic pressure of the sperm increased in direct proportion to the treatment time and concentration of DMSO. Before cryopreservation, when the sperm was treated with 14% DMSO for 5—7 h, its osmotic pressure rose to a peak level of 1538 mOsm / L, which was five times higher the level under natural conditions. After thawing, the osmotic pressure of the sperm was still maintained at 1025 mOsm / L, or three times the level under natural conditions. When the DMSO concentration increased to 22% prior to cryopreservation, sperm osmotic pressure rose to 1538 mOsm / L immediately, and was maintained at 1367 mOsm / L after thawing.

After thawing, the sperm osmotic pressure was 171—513 mOsm / L lower than before thawing. The survival rate after thawing was highest when the osmotic pressure of the sperm prior to cryopreservation was 1025—1367 mOsm / L. As the sperm osmotic pressure after thawing was 3—4.5 times higher than that under natural conditions, it was necessary to activate the sperm with 1.0—2.0% NaCl to achieve higher survival rate.

The relationship between sperm osmotic pressure (Y) and DMSO concentration (X) was: $Y = 0.148X + 1.245$, $r = 0.898$ (Osmotic pressure before thawing) and $Y = 0.136X + 0.641$, $r = 0.968$ (Osmotic pressure after thawing)

Key words Dimethylsulfoxide (DMSO), Freshwater fish sperm, Osmotic pressure, Survival rate