

DOI: 10.12264/JFSC2024-0111

解冻温度和冷冻保护剂对中华鲟精原干细胞超低温冷冻保存效果的影响

舒雪密^{1,2}, 叶欢¹, 仲嘉¹, 张鸣^{1,3}, 罗江¹, 刘源¹, 杜浩^{1,2}

1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 湖北 武汉 430223;

2. 中国农业科学院, 北京 100010;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 中华鲟(*Acipenser sinensis*)是我国一级重点保护水生动物, 其精原干细胞等种质资源冷冻保护技术尚不完善。本研究在前期建立的匙吻鲟(*Polyodon spathula*)精原干细胞冷冻保存液配方基础上, 研究解冻温度、抗氧化剂和抗冻蛋白对中华鲟精原干细胞冷冻保存效果的影响, 以期建立高效的中华鲟精原干细胞超低温冷冻保存方法。研究表明, 实验设置的解冻温度(20、25、30 和 40 °C)中 25 °C 组冷冻保存效果最佳: 解冻后细胞数目为 $(3.86 \pm 0.51) \times 10^5$, 细胞存活率可达 $(96.36 \pm 0.53)\%$; 比较不同浓度组(500、1000 和 1500 mg/L)的谷胱甘肽、抗坏血酸和 α -生育酚等 3 种抗氧化剂对中华鲟精原干细胞冷冻保存效果的影响, 结果显示, 冷冻保存液中添加 1000 mg/L α -生育酚的实验组, 解冻后得到的细胞数目最多 $(7.64 \pm 0.34) \times 10^5$, 显著高于其他抗氧化剂添加组, 细胞存活率可达 $(92.82 \pm 0.72)\%$; 通过比较不同浓度(0.1、1.0 和 10 $\mu\text{g/mL}$)的两种类型抗冻蛋白(AFPI 和 AFPIII)对中华鲟精原干细胞的冷冻保存效果, 发现添加了 1.0 $\mu\text{g/mL}$ AFPI 的实验组解冻效果最好, 解冻后得到的细胞数目为 $(6.85 \pm 0.19) \times 10^5$, 显著高于其他实验组, 细胞存活率为 $(86.89 \pm 0.73)\%$ 。综上所述, 中华鲟精原干细胞冷冻保存的最佳解冻温度为 25 °C, 1000 mg/L α -生育酚作为抗氧化剂, 和 1.0 $\mu\text{g/mL}$ AFPI 作为抗冻蛋白对其冷冻保存效果最佳。

关键词: 中华鲟; 精原干细胞; 超低温冷冻保存; 解冻温度; 抗氧化剂; 抗冻蛋白

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)07-0745-09

水产种质资源保存的方式主要有活体保存、标本保存、细胞保存和基因保存, 其中细胞保存一般分为细胞系保存、配子保存和胚胎保存^[1]。在鱼类配子和胚胎保存方面, 一方面由于卵母细胞和胚胎细胞体积大和卵黄含量高等原因, 导致其冷冻保存技术尚未突破, 目前仍停留在探索阶段^[2-4]; 另一方面, 体外条件下将鱼类早期卵母细胞培养为成熟卵子的技术也未突破^[5]。因此, 目前鱼类配子保存方式主要以精子保存为主。但精子只含有单亲遗传信息, 在濒危鱼类的种质资源保存方面存在一定的局限性。鱼类细胞系保存为鱼

类资源的保护利用和遗传改良提供了重要工具, 目前建立的细胞系已达三百多株, 其中绝大部分为成纤维细胞系, 少数为类胚胎干细胞系^[6], 但由于鱼类诱导成纤维细胞和类胚胎干细胞成为生殖干细胞的技术尚未成熟, 因此冷冻保存的细胞系虽然携带双亲遗传信息却无法将遗传信息传递给后代。与传统的种质资源保存方式相比, 生殖干细胞冷冻保存具有诸多优势: 首先, 生殖干细胞不仅携带双亲遗传信息, 还具有分化为两性配子的潜能^[7-8]; 其次, 由于其体积较小且脂质及卵黄含量低, 这些细胞更易于在超低温环境下进行

收稿日期: 2024-05-15; 修订日期: 2024-06-13.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD120030107); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2023TD08).

作者简介: 舒雪密(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生动物种质资源保护. E-mail: 1150907298@qq.com

通信作者: 杜浩, 研究员, 主要从事濒危水生动物保护生物学研究. E-mail: duhao@yfi.ac.cn

冷冻保存, 建立高效的冷冻保存技术^[9]。

中华鲟为国家一级保护水生动物^[10], 受人类活动影响目前其资源已极度濒危^[11], 监测表明每年洄游到葛洲坝下的中华鲟已不足 20 尾, 且自 2017 年以来已经连续 7 年没有自然繁殖活动发生^[12], 物种极度濒危, 将中华鲟的生殖干细胞进行保存是物种拯救的有效手段。生殖干细胞的冷冻保存主要有直接冷冻性腺组织和冷冻解离细胞两种方式, 生殖干细胞存在于性腺组织中, 因此直接冷冻保存精巢或卵巢组织也可以获得高质量的生殖干细胞。在西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)的生殖干细胞冷冻保存中发现直接冷冻性腺组织所得到的生殖干细胞中细胞存活率更高^[13], 因此鲟的生殖干细胞冷冻保存方式主要为直接冷冻性腺组织。目前国际上已在多种鱼类中建立了性腺组织的冷冻保存方法, 如细鳞鱼(*Brachymystax lenok*)^[14]、丁鲷(*Tinca tinca*)^[15]、青鳉(*Oryzias latipes*)^[16]、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)^[17]、斑马鱼(*Danio rerio*)^[18]、鲤(*Cyprinus carpio*)^[19-20]、鲫鲮(*Rhodeus ocellatus ocellatus*)^[21]、匙吻鲟(*Polyodon spathula*)^[22]等。

研究表明, 不同解冻温度、不同浓度和类型的抗冻蛋白、抗氧化剂添加对精原干细胞保存效果有显著影响, 最优的解冻温度可使细胞快速越过危险温度区并获得最佳活力^[23], 抗氧化剂(antioxidant)有利于减缓甚至逆转细胞在冷冻保存期间承受的氧化应激损伤^[24]; 抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)可以使鱼类细胞适应零度以下的气温, 并且在不宜生存的条件中存活^[25-26]。本研究在前期建立的匙吻鲟生殖干细胞超低温冷冻保存配方^[22]的基础上, 进一步比较解冻温度(20 ℃、25 ℃、30 ℃和 40 ℃)、抗氧化剂(谷胱甘肽、抗坏血酸和 α -生育酚)和抗冻蛋白(AFPI 和 AFPIII)对中华鲟精原干细胞冷冻保存的效果, 从而建立高效的中华鲟精原干细胞冷冻保存方法, 为中华鲟的种质资源保存提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

本实验所用中华鲟来自中国水产科学研究院

长江水产研究所太湖试验场(湖北荆州), 选用 3 龄雄性子二代中华鲟, 体长为(95.30±5.58) cm, 体重为(5.76±0.68) kg。实验鱼的使用得到中国水产科学研究院长江水产研究所实验动物福利伦理委员会的批准, 取样过程遵守实验动物福利和相关制度。

1.2 石蜡切片

将精巢组织保存于 Bouin's 溶液(Phygene, 中国), 按组织大小固定 2~6 h, 转移至 70%乙醇溶液长期保存。石蜡切片样品需经过 Bouin's 固定、乙醇梯度脱水、二甲苯透化、石蜡浸蜡、包埋等步骤处理。对石蜡样品连续切片, 切片厚度为 4.5 μ m, 苏木精-伊红(HE)染色(Biosharp, 中国), 中性树脂(Biosharp, 中国)封片, 正置显微镜(Leica, 德国)下观察精巢组织形态结构并拍照。

1.3 中华鲟精巢组织采集

将雄性中华鲟用 MS-222 (Sigma-Aldrich, E10521)麻醉, 鱼体全身消毒后, 带入无菌间, 迅速摘取无菌双侧精巢组织, 置于盛有适量磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS, BI)的培养皿中清洗血块, 加适量添加青霉素-链霉素双抗(Penicillin-Streptomycin, PS, Sigma)的 L-15 (Gibco)培养基于培养皿中, 并将培养皿置于冰盒(4 ℃)上去除精巢组织上的腹膜和脂肪。

1.4 中华鲟精原干细胞冻存与解冻复苏

1.4.1 解冻温度筛选 称取 0.15 g 精巢组织, 将精巢组织剪碎至 1 mm³ 小块后, 用约 3 倍体积的 L-15 培养基清洗组织块, 4 ℃ 200 g 离心 5 min, 重复清洗 3 次。最后一次离心完毕, 去上清后加入 1 mL 配置好的冷冻保存液: 1.3 mol/L 二甲基亚砜(DMSO, Amresco)、10%胎牛血清(FBS, Gibco)和 0.1 mol/L 海藻糖(Wako), 溶于 L-15 培养基中, 于 0.2 μ m 滤器无菌过滤, 现用现配, 混匀后转移至冻存管, 将冻存管和程序降温盒置于冰盒(4 ℃) 1 h, 把冻存管转移到程序降温盒, 于-80 ℃保存 90 min 后转移到液氮。每组实验保存 4 管样品, 重复 3 次, 用于实验的雄性中华鲟 3 尾。

冷冻保存 2 d 后, 从液氮中取出冻存管, 并迅速把冻存管分别置于已设置不同解冻温度(20 ℃、25 ℃、30 ℃和 40 ℃)的水浴锅中解冻复苏, 完

全解冻后用移液枪将解冻后的精巢组织分别转移到 15 mL 离心管, 加入 5 mL L-15 培养基, 4 °C 200 g 离心 5 min, 清洗 3 次。

1.4.2 抗氧化剂和抗冻蛋白筛选 实验方法同 1.4.1, 但在冷冻保存液中添加不同浓度的抗氧化剂: 谷胱甘肽(GSH, Merck)、抗坏血酸(VC, Merck)和 α -生育酚(VE, Merck), 或抗冻蛋白: AFPI (A/F Protein Inc., USA)和 AFPIII (A/F Protein Inc., USA)。3 种抗氧化剂浓度设置为 500、1000 和 1500 mg/L, 两种抗冻蛋白浓度设置为 0.1、1.0 和 10 μ g/mL, 共设置 15 种保存方法。每组实验样本保存 3 管, 实验重复 3 次, 用于实验的雄性中华鲟 15 尾。

冷冻保存 2 d 后, 将冻存管置于 25 °C 水浴锅中进行解冻复苏, 完全解冻后将精巢组织分别转移到 15 mL 离心管, 加入 5 mL L-15 培养基, 4 °C 200 g 离心 5 min, 清洗 3 次。

1.5 精原干细胞分离

解冻后的精巢组织经离心清洗后, 以精巢组织: 消化液=15: 100 (W/V)的比例在精巢组织中加入消化酶溶液(Dispase II, Roche) 50 μ L; 胎牛血清(FBS, Gibco) 50 μ L; 40 mg/mL 胶原酶(Roche) 100 μ L; 1% DNaseI (Roche) 50 μ L; L-15 培养基 750 μ L, 制成 1 mL 消化液, 于 0.2 μ m 滤器无菌过滤(现用现配)并将其移至六孔板内, 置于 25 °C 培养箱消化, 每隔 20 min 用移液枪轻轻吹打混匀。消化 4 h 后加入 10% FBS 终止消化, 并依次用 150 μ m 和 50 μ m 滤器过滤消化液到 15 mL 离心管中, 4 °C 200 g 离心 5 min, 弃掉上清液加入 2 mL L-15 培养基 4 °C 200 g 离心 5 min, 弃掉上清液加入 500 μ L L-15 培养基重悬细胞并在显微镜下拍照计数; 用台盼蓝(Sigma)染色法检测细胞活性, 重复计数 3 次。同时, 以新鲜精巢组织制备的细胞作为对照组, 与冷冻保存精巢相比较, 用于实验的雄性中华鲟 3 尾。

1.6 细胞存活率检测

取少量细胞悬液和台盼蓝溶液 1: 1 (V/V)混合后, 显微镜下(Leica, Germany)用血球计数板(Meilunbio)计细胞总数以及细胞存活率, 统计 3

个视野下的细胞数目, 取平均值。

1.7 数据分析

数据采用统计软件 SPSS 29.0 (IBM, 美国)单因素 ANOVA 方差分析, $P<0.05$ 表示差异显著, $P>0.05$ 表示差异不显著数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm SD$)表示, 用 GraphPad prism 10 软件作图。

2 结果与分析

2.1 中华鲟精原干细胞鉴别特征

通过石蜡切片分析 3 龄中华鲟精巢的组织学特征, 发现 3 龄未成熟的中华鲟精巢组织含有较多的精原干细胞, 在精巢单个分散分布, 精原干细胞的细胞核呈圆形或椭圆形, 细胞较大且核仁明显(图 1)。

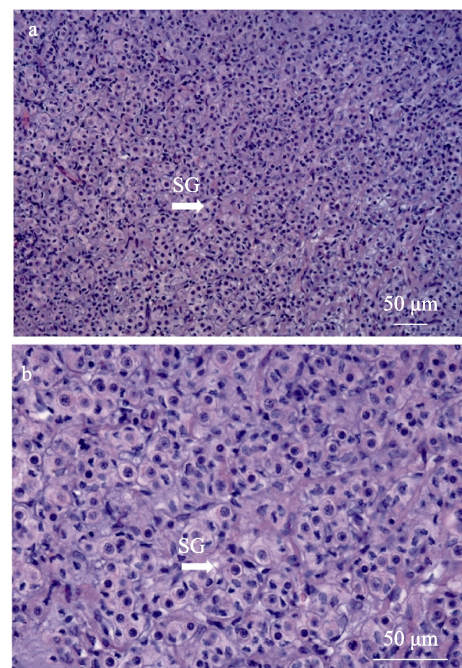


图 1 中华鲟精巢组织学特征

a. 10 $\times$; b. 40 $\times$. SG: 精原干细胞.

Fig. 1 Histological characteristics of *Acipenser sinensis* testes a. 10 $\times$; b. 40 $\times$. SG: spermatogonial stem cell.

2.2 不同解冻温度对中华鲟精原干细胞的超低温冷冻保存效果

在相同的冷冻程序下, 将中华鲟精巢组织冷冻保存 2 d 后在不同温度(20 °C、25 °C、30 °C 和 40 °C)解冻精巢组织, 结果显示, 解冻温度为 25 °C 时, 解冻复苏后制备得到的细胞数目为

$(3.86 \pm 0.51) \times 10^5$, 高于其他解冻温度的细胞数目且具有显著性差异($P < 0.05$); 解冻温度为 20 °C、30 °C 和 40 °C 时, 解冻制备得到的细胞数目无显著性差异($P > 0.05$) (图 2a)。

当解冻温度为 25 °C 时, 解冻复苏后的细胞存活率最高, 细胞存活率为 $(96.36 \pm 0.53)\%$, 与解冻

温度为 40 °C 时的细胞存活率差异显著($P < 0.05$)。20 °C 和 30 °C 两组解冻温度的细胞存活率无显著性差异($P > 0.05$) (图 2b)。因此, 解冻温度为 25 °C 时, 解冻复苏后的细胞数目和细胞存活率均优于其他解冻温度, 故将 25 °C 作为中华鲟精原干细胞冷冻保存的解冻温度。

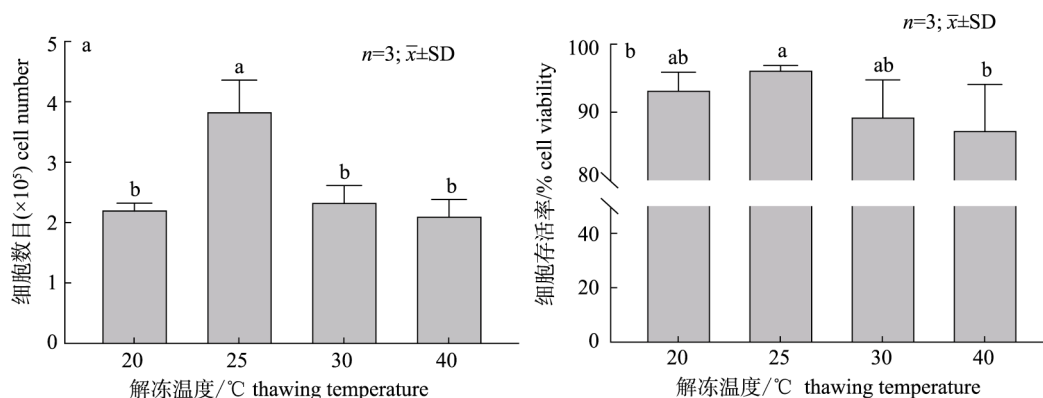


图 2 不同解冻温度对中华鲟精原干细胞细胞数目(a)和细胞存活率(b)的影响

不同字母代表组间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 2 The effect of different thawing temperatures on cell number (a) and cell viability (b) of *Acipenser sinensis*. Different letter indicates significant difference between groups ($P < 0.05$).

2.3 不同抗氧化剂对中华鲟精原干细胞的超低温冷冻保存效果

与新鲜精巢组织相比, 冻存后制备得到的细胞数目显著降低($P < 0.05$)。冷冻保存液中添加 1000 mg/L α -生育酚(VE)实验组得到的细胞数目显著高于其他抗氧化剂实验组($P < 0.05$)。同时, 随

着谷胱甘肽(GSH)和抗坏血酸(VC)浓度的增加, 其细胞数目呈下降的趋势(图 3a)。

在细胞存活率方面, 冻存精巢组织的细胞存活率均显著低于新鲜精巢($P < 0.05$)。在 9 组抗氧化剂实验组中, 添加 500 mg/L 谷胱甘肽解冻复苏后的细胞存活率最高, 存活率为 $(94.53 \pm 0.67)\%$ 。添加

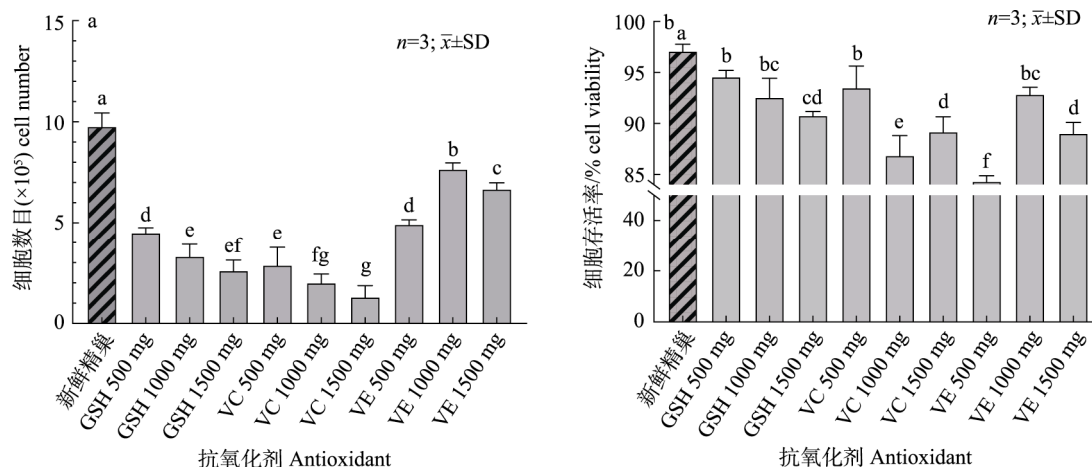


图 3 不同抗氧化剂对中华鲟精原干细胞细胞数目 (a) 和细胞存活率 (b) 的影响

不同字母代表组间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 The effect of different antioxidants on the cell number (a) and cell viability (b) of *Acipenser sinensis*. Different letter indicates significant difference between groups ($P < 0.05$).

1000 mg/L α -生育酚的细胞存活率为(92.82±0.72)%, 仅次于 500 mg/L 谷胱甘肽和 500 mg/L 抗坏血酸的实验组, 且无显著性差异($P>0.05$)(图 3b)。

总体而言, 抗冻剂中添加了 1000 mg/L α -生育酚后制备得到的细胞数目显著高于 500 mg/L 谷胱甘肽($P<0.05$), 而 1000 mg/L α -生育酚的细胞存活率与 500 mg/L 谷胱甘肽无显著性差异($P>0.05$), 因此, 中华鲟精原干细胞冷冻保存液中添加 1000 mg/L α -生育酚能有效提高制备得到的细胞数目, 同时细胞具有较高的活性。

2.4 不同抗冻蛋白对中华鲟精原干细胞的超低温冷冻保存效果

与新鲜精巢组织相比, 冻存后制备的细胞数目显著降低($P<0.05$)。冷冻保存液中添加 1.0 μ g/mL

AFPI 的实验组制备得到的细胞数目最多, 为(6.85±0.19)×10⁵, 显著高于其他抗冻蛋白添加组($P<0.05$)。同时也发现, 随着冷冻保存液中抗冻蛋白浓度增加, 解冻复苏后细胞数目均呈现先上升后下降的趋势(图 4a)。

冷冻保存液中添加了抗冻蛋白的实验组精巢组织解冻复苏后其细胞存活率均显著低于新鲜精巢组织($P<0.05$)。结果显示, 随着抗冻蛋白浓度增加(从 0.1 μ g/mL 增加到 10 μ g/mL), 解冻复苏后细胞存活率均呈现先上升后下降的趋势; 其中添加了 1.0 μ g/mL AFPIII 的实验组细胞存活率最高, 为(88.44±1.64)%; 添加 1.0 μ g/mL AFPI 实验组的细胞存活率为(86.89±0.73)%, 仅次于 1.0 μ g/mL AFPIII 且无显著性差异($P>0.05$)(图 4b)。

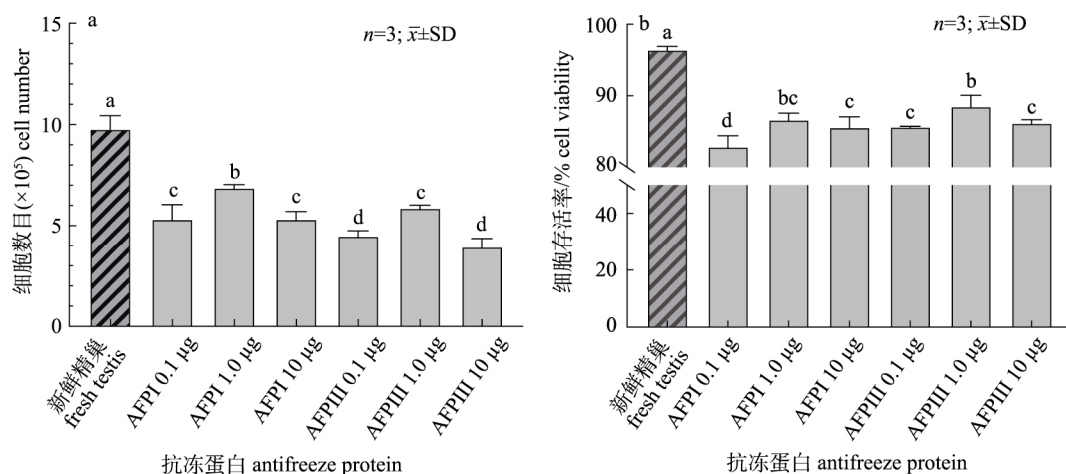


图 4 不同抗冻蛋白对中华鲟精原干细胞细胞数目 (a) 和细胞存活率 (b) 的影响
不同字母代表组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 The effect of different antifreeze proteins on the cell number (a) and cell viability (b) of *Acipenser sinensis*
Different letter indicates significant difference between groups ($P<0.05$).

1.0 μ g/mL AFPI 实验组的细胞数目显著高于 1.0 μ g/mL AFPIII ($P<0.05$), 其细胞存活率虽然低于 1.0 μ g/mL AFPIII 实验组, 但没有显著性差异($P>0.05$), 因此, 综合细胞数目和细胞存活率, 当中华鲟精原干细胞冷冻保存液中添加抗冻蛋白时, 加入 1.0 μ g/mL AFPI 的冷冻保护效果最好。

3 讨论

3.1 解冻温度对中华鲟精原干细胞冷冻保存效果的影响

解冻与冷冻过程同等重要, 解冻温度也是影

响超低温保存效果的重要因素。在冷冻细胞的升温过程中, 会发生重结晶、细胞水化和细胞内的去玻璃化, 最佳的解冻温度可以防止细胞受到上述因素的损害^[27]。冷冻解冻方法主要有低温慢速解冻(5 $^{\circ}$ C)、常温解冻(15~40 $^{\circ}$ C)和高温快速解冻(50 $^{\circ}$ C以上), 目前最常用的解冻方法是常温解冻和高温快速解冻。在鱼类精原干细胞超低温冷冻保存的研究中, 更倾向于采用常温解冻的方式。细鳞鲑(*Brachymystax lenok*)的精原干细胞分别在 10 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 和 40 $^{\circ}$ C 的水浴中解冻, 解冻温度为 30 $^{\circ}$ C 时获得最高的细胞存活率(81.0±

1.3)%^[28]; 而虹鳟^[29]、澳洲彩虹鱼(*Melanotaenia maccullochi*)^[30]和西伯利亚鲟^[17]的精原干细胞最佳解冻温度分别为 10℃、30℃和 38℃。有研究发现,解冻温度与不同物种细胞膜对解冻时温度骤变的敏感性有关^[31],因此,参考其他鱼类的解冻温度,并根据中华鲟的生活环境温度^[32],笔者设置了 20℃、25℃、30℃和 40℃ 4 种不同解冻温度,发现解冻温度为 25℃时对中华鲟精原干细胞的冷冻保存效果最好,易雨君等^[32]研究发现中华鲟的生长适宜温度为 18~25℃,超过 28℃会导致摄食量减少,生长速度减慢,因此该结果可能与中华鲟的生长适宜水温等有关。在鸡精液冷冻保存的研究中发现,快速冷冻后的精子存活率、复苏率等都要高于慢速冷冻,且快速解冻有利于细胞迅速通过冰晶形成区,从而避免细胞结构的再次损伤^[33],但是快速解冻在鱼类的相关研究中并不适用,本研究结果表明,随着解冻温度升高,其细胞数目和细胞活力均呈现下降趋势,这可能是与中华鲟精原干细胞对突然升高的温度生理上不适应有关。

3.2 抗氧化剂浓度和种类对中华鲟精原干细胞冷冻保存效果的影响

在多种抗冻保护剂中,抗氧化剂对陆生哺乳动物及部分水生生物细胞具有较强的保护作用,可有效降低细胞内损伤^[26,34]。研究发现,谷胱甘肽、褪黑激素、过氧化氢酶、抗坏血酸等抗氧化剂抑制冷冻损伤的功效取决于超低温保存前的细胞类型和细胞完整性^[34-35],目前已对 α -生育酚、抗坏血酸、牛磺酸和谷胱甘肽等抗氧化剂进行了研究,并作为鱼类精子冷冻介质的潜在冷冻保护剂使用^[35-36]。抗氧化剂对冷冻保存效果的影响存在物种差异性,例如,抗坏血酸和 α -生育酚可以降低金头鲷(*Sparus aurata*)精子的 DNA 损伤,但相反的是,这两种抗氧化剂却加重了欧洲舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)精子的 DNA 损伤^[35]。在小鼠的精原干细胞冷冻保存中,将 α -生育酚添加到抗冻保护剂中,与不添加该抗氧化剂的对照组相比,精原干细胞的存活率显著提高^[37-38]。本研究中,添加 α -生育酚后发现其能够显著提高冷冻保存后的细胞数目,并具有较高的细胞存活率,说明 α -生

育酚作为中华鲟的抗冻保护剂是有效的,细胞数目的提升可能与 α -生育酚的亲脂性有关,该特性可使细胞减少脂质过氧化和 DNA 损伤^[37]。有研究表明,谷胱甘肽可以提高河鲈(*Perca fluviatilis*)的精子活率和运动速度,但其对鱼类精子质膜完整性和精子活力模式并无显著影响^[39]。本研究中,添加谷胱甘肽后,精原干细胞数目虽然有所提高,但是其细胞存活率相较添加 α -生育酚有所降低,因此谷胱甘肽虽然能够在细胞内活性氧浓度较低时通过氧化还原过程减少其对细胞的损伤^[40],但是由于低温保存过程中会产生大量的活性氧导致蛋白质、脂质和核酸的氧化,对细胞造成不可逆的损伤,甚至导致细胞凋亡^[34,41],这可能导致细胞存活率有所下降。长鳍叉尾鲷(*Ictalurus furcatus*)在基础冷冻配方中添加过氧化氢酶、亚牛磺酸和抗坏血酸后精原干细胞的细胞数目和细胞活力都较低^[42]。本研究中使用抗坏血酸的结果与其相似,其对中华鲟精原干细胞的冷冻保存效果最差,说明抗氧化剂的添加并不一定会对冻存效果产生积极影响。因此不建议将抗坏血酸应用到中华鲟精原干细胞冷冻保存, α -生育酚较其他两种抗氧化剂对中华鲟精原干细胞的冻存效果更好,这可能与物种的差异性有关,说明可将 α -生育酚作为中华鲟精原干细胞冷冻保存的备用冷冻保护剂。

3.3 抗冻蛋白浓度和种类对中华鲟精原干细胞冷冻保存效果的影响

抗冻蛋白可使物种在低温环境下具有高度适应性,并且能让鱼类在不适宜生存的环境中存活下来^[25-26],它们在分子水平发挥作用,并与细胞膜相互作用^[25],能够在深度冷冻期间抑制冰晶的产生^[43-45]。已知的抗冻蛋白有许多类型,但常用于鱼类研究的抗冻蛋白有 AFPI、AFPII 和 AFPIII^[26]。在鲤(*Cyprinus carpio*)^[46]、金头鲷^[47]、波斯鲟(*Acipenser persicus*)^[48]等的研究中,抗冻蛋白对精子冷冻保存效果产生了积极影响。而在长鳍叉尾鲷的精原干细胞冷冻保存研究中发现,AFPI 和 AFPIII 添加到冷冻保存液中反而降低了细胞数目和存活率^[42]。与长鳍叉尾鲷相比,本研究中添加 1.0 $\mu\text{g/mL}$ AFPI 的实验组能显著提高得到的细胞数目并获得较高的细胞存活率,说明抗冻蛋白作

为抗冻保护剂是否能够发挥保护作用可能取决于其浓度以及抗冻蛋白是否与该物种的细胞保护机制相适应。有研究发现, 当某些特定的抗氧化剂和抗冻蛋白结合使用时, 对长鳍叉尾鲟精原干细胞的冷冻保存效果会有所改善^[42], 后续研究也可以探讨特定的抗氧化剂和抗冻蛋白组合对中华鲟精原干细胞冷冻保存效果的影响。

4 结论

本研究通过探讨解冻温度、抗氧化剂和抗冻蛋白对中华鲟精原干细胞超低温冷冻保存效果的影响, 得出以下结论: 发现解冻温度为 25 °C 时, 解冻后得到的细胞数目最多, 且细胞存活率最高; 当在冻存液中添加 1000 mg/L α -生育酚时, 可以显著提高得到的细胞数目, 同时具有较高的细胞活性; 添加 1.0 μ g/mL AFPI 实验组制备得到的细胞数目最多, 且细胞活性也较高。本研究可为建立高效的中华鲟精原干细胞冷冻保存方法提供基础数据, 为中华鲟种质资源冷冻保存及复原利用提供技术支撑。

参考文献:

- [1] Wang X G, Luo J, Yin S W, et al. Advancement in fish germplasm preservation[J]. Marine Fisheries, 2012, 34(2): 222-230. [王小刚, 骆剑, 尹绍武, 等. 鱼类种质保存研究进展[J]. 海洋渔业, 2012, 34(2): 222-230.]
- [2] Hagedorn M, Kleinhans F W, Freitas R, et al. Water distribution and permeability of zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*[J]. Journal of Experimental Zoology, 1997, 278(6): 356-371.
- [3] Tsai S, Rawson D M, Zhang T. Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling[J]. Theriogenology, 2009, 71(8): 1226-1233.
- [4] Zhang T T, Rawson D M. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol[J]. Cryobiology, 1998, 37(1): 13-21.
- [5] Tsai S, Rawson D M, Zhang T T. Development of *in vitro* culture method for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles for use in cryopreservation studies[J]. Theriogenology, 2010, 74(2): 290-303.
- [6] Bairoch A. The cellosaurus, a cell-line knowledge resource [J]. Journal of Biomolecular Techniques, 2018, 29(2): 25-38.
- [7] Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, et al. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(8): 2725-2729.
- [8] Yoshizaki G, Ichikawa M, Hayashi M, et al. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout[J]. Development, 2010, 137(8): 1227-1230.
- [9] Yoshizaki G, Lee S. Production of live fish derived from frozen germ cells via germ cell transplantation[J]. Stem Cell Research, 2018, 29: 103-110.
- [10] Wei Q W, Ke F E, Zhang J M, et al. Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China[J]. Environmental Biology of Fishes, 1997, 48(1): 241-255.
- [11] Wei Q W. Conservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) based on its life history: Dilemma and breakthrough [J]. Journal of Lake Sciences, 2020, 32(5): 1297-1319. [危起伟. 从中华鲟(*Acipenser sinensis*)生活史剖析其物种保护: 困境与突围[J]. 湖泊科学, 2020, 32(5): 1297-1319.]
- [12] Wu J M, Wang C Y, Zhang S H, et al. From continuous to occasional: small-scale natural reproduction of Chinese sturgeon occurred in the Gezhouba spawning ground, Yichang, China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(3): 425-431. [吴金明, 王成友, 张书环, 等. 从连续到偶发: 中华鲟在葛洲坝下发生小规模自然繁殖[J]. 中国水产科学, 2017, 24(3): 425-431.]
- [13] Pšenička M, Saito T, Rodina M, et al. Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells[J]. Cryobiology, 2016, 72(2): 119-122.
- [14] Lee S, Yoshizaki G. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*)[J]. Cryobiology, 2016, 72(2): 165-168.
- [15] Marinović Z, Lujčić J, Kása E, et al. Cryosurvival of isolated testicular cells and testicular tissue of tench *Tinca tinca* and goldfish *Carassius auratus* following slow-rate freezing[J]. General and Comparative Endocrinology, 2017, 245: 77-83.
- [16] Seki S, Kusano K, Lee S, et al. Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 43185.
- [17] Yoshikawa H, Ino Y, Shigenaga K, et al. Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* from cryopreserved testicular germ cells using surrogate broodstock technology[J]. Aquaculture, 2018, 493: 302-313.
- [18] Marinović Z, Li Q, Lujčić J, et al. Preservation of zebrafish genetic resources through testis cryopreservation and spermatogonia transplantation[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 13861.
- [19] Franěk R, Marinović Z, Lujčić J, et al. Cryopreservation and

- transplantation of common carp spermatogonia[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0205481.
- [20] Franěk R, Tichopád T, Steinbach C, et al. Preservation of female genetic resources of common carp through oögonial stem cell manipulation[J]. Cryobiology, 2019, 87: 78-85.
- [21] Octavera A, Yoshizaki G. Production of Chinese rosy bitterling offspring derived from frozen and vitrified whole testis by spermatogonial transplantation[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2020, 46(4): 1431-1442.
- [22] Ye H, Zhou C L, Yue H M, et al. Cryopreservation of germline stem cells in American paddlefish (*Polyodon spathula*)[J]. Animal Reproduction Science, 2021, 224: 106667.
- [23] He B B. Effect of freeze-thaw temperature and melatonin effect on cryopreservation of chicken semen[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019. [何贝贝. 冷冻解冻温度和褪黑素对鸡精液冷冻保存效果的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.]
- [24] Mylonas C C, Duncan N J, Asturiano J F. Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality[J]. Aquaculture, 2017, 472: 21-44.
- [25] Hassoun A, Emir Çoban Ö. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products [J]. Trends in Food Science & Technology, 2017, 68: 26-36.
- [26] Robles V, Valcarce D G, Riesco M F. The use of antifreeze proteins in the cryopreservation of gametes and embryos[J]. Biomolecules, 2019, 9(5): Article No.181.
- [27] Karlsson J O M. A theoretical model of intracellular devitrification[J]. Cryobiology, 2001, 42(3): 154-169.
- [28] Lee S, Yoshizaki G. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*)[J]. Cryobiology, 2016, 72(2): 165-168.
- [29] Lee S, Iwasaki Y, Shikina S, et al. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(5): 1640-1645.
- [30] Rivers N, Daly J, Jones R, et al. Cryopreservation of testicular tissue from Murray River rainbowfish, *Melanotaenia fluvialis*[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): Article No.19355.
- [31] Lewis P D, Morris T R. Poultry lighting: the theory and practice[M]. UK: Northcot Hampshire, 2006.
- [32] Yi Y J, Wang Z Y, Lu Y J. Habitat suitability index model for Chinese Sturgeon in the Yangtze River[J]. Advances in Water Science, 2007, 18(4): 538-543. [易雨君, 王兆印, 陆永军. 长江中华鲟栖息地适合度模型研究[J]. 水科学进展, 2007, 18(4): 538-543.]
- [33] Gao X L, Zhang Z W, Du Q C, et al. The effect of the different cryoprotectant, start freezing and thawing temperature on the cryopreservation of chicken semen[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2018, 53(4): 15-21, 28. [高小莉, 张兆旺, 杜秋晨, 等. 不同抗冻剂及初冻和解冻温度对鸡精液冷冻保存的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, 53(4): 15-21, 28.]
- [34] Len J S, Koh W S D, Tan S X. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation[J]. Bioscience Reports, 2019, 39(8): BSR20191601.
- [35] Cabrita E, Ma S, Diogo P, et al. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation[J]. Animal Reproduction Science, 2011, 125(1-4): 189-195.
- [36] Martínez-Páramo S, Diogo P, Dinis M T, et al. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm[J]. Theriogenology, 2012, 77(6): 1129-1136.
- [37] Ahmadi S, Bashiri R, Ghadiri-Anari A, et al. Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review[J]. International Journal of Reproductive Biomedicine, 2016, 14(12): 729-736.
- [38] Ha S J, Kim B G, Lee Y A, et al. Effect of antioxidants and apoptosis inhibitors on cryopreservation of murine germ cells enriched for spermatogonial stem cells[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0161372.
- [39] Lahnsteiner F, Mansour N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques[J]. Aquaculture, 2010, 307(1-2): 130-140.
- [40] Evangelista-Vargas S, Santiani A. Detection of intracellular reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide) and lipid peroxidation during cryopreservation of alpaca spermatozoa[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2017, 52(5): 819-824.
- [41] Chen W Y, Li D L. Reactive oxygen species (ROS)-responsive nanomedicine for solving ischemia-reperfusion injury[J]. Frontiers in Chemistry, 2020, 8: 732.
- [42] Abualreesh M, Myers J N, Gurbatow J, et al. Effects of antioxidants and antifreeze proteins on cryopreservation of blue catfish (*Ictalurus furcatus*) spermatogonia[J]. Aquaculture, 2021, 531: 735966.
- [43] Fuller B J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state[J]. Cryo Letters, 2004, 25(6): 375-388.
- [44] Harding M M, Anderberg P I, Haymet A D J. 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(7): 1381-1392.
- [45] Irshad M, Ali Subhani M, Ali S, et al. Biological importance of essential oils[M]//El-Shemy H. Essential Oils-Oils of Nature.

- London: IntechOpen, 2020: 37-40.
- [46] Karanova M V, Pronina N D, Tsvetkova L I. The effect of antifreeze glycoproteins on survival and quality of fish spermatozoa under the conditions of long-term storage at +4 degree C[J]. *Izvestiia Akademii Nauk Seriya Biologicheskaya*, 2002(1): 88-92.
- [47] Beirão J, Zilli L, Vilella S, et al. Fatty acid composition of the head membrane and flagella affects *Sparus aurata* sperm quality[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2012, 28(6): 1017-1019.
- [48] Abed-Elmdoust A, Farahmand H, Mojazi-Amiri B, et al. Metabolic changes in droplet vitrified semen of wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1997)[J]. *Cryobiology*, 2017, 76: 111-118.

Effects of thawing temperature and cryoprotectant on the ultra-low temperature cryopreservation of spermatogonial stem cells of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)

SHU Xuemi^{1,2}, YE Huan², ZHONG Jia², ZHANG Ming^{1,3}, LUO Jiang², LIU Yuan², DU Hao^{1,2}

1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Areas; Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;
2. Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100010, China;
3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) is one of the key aquatic animals under first-degree protection in China, but its germplasm resources, such as spermatogonial stem cells, are not well protected by cryoprotection technology. In this study, we investigated the effects of thawing temperature, antioxidants, and antifreeze proteins on the cryopreservation of spermatogonial stem cells of Chinese sturgeon based on the formulation of the spermatogonial stem cell cryopreservation solution used for the American paddlefish (*Polyodon spathula*). The aim was to establish a highly efficient method for ultra-low-temperature cryopreservation of spermatogonial stem cells of Chinese sturgeon. The best cryopreservation effect was achieved at a thawing temperature of 25 °C among the temperatures tested (20, 25, 30, and 40 °C). The number of cells after thawing was $(3.86 \pm 0.51) \times 10^5$, and the cell viability reached $(96.36 \pm 0.53)\%$. The effects of different concentrations (500 mg/L, 1000 mg/L, and 1500 mg/L) of glutathione, ascorbic acid, and α -tocopherol on the cryopreservation of spermatogonial stem cells of Chinese sturgeon were examined. The results showed that the experimental group with the addition of 1000 mg/L α -tocopherol to the cryopreservation solution had the highest number of cells $(7.64 \pm 0.34) \times 10^5$ after thawing, which was significantly higher than that of the other groups with antioxidants added, and the cell viability reached $(92.82 \pm 0.72)\%$. The effects of different concentrations (0.1, 1.0, and 10 $\mu\text{g/mL}$) of two types of antifreeze proteins (AFPI and AFPIII) on the cryopreservation of spermatogonial stem cells of Chinese sturgeon were examined. The experimental group with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ AFPI had the best defrosting effect, and the number of cells obtained after defrosting was $(6.85 \pm 0.19) \times 10^5$, which was significantly higher than the number in the other experimental groups, and the cell viability was $(86.89 \pm 0.73)\%$. In summary, in the present study, we obtained the optimal thawing temperature for the cryopreservation of spermatogonial stem cells of Chinese sturgeon, evaluated the effects of three types of antioxidants and antifreeze proteins on the effect of cryopreservation, and established a highly efficient cryopreservation technology for spermatogonial stem cells of Chinese sturgeon. These data provide technical support for the cryopreservation and restoration of the Chinese sturgeon's germplasm resources.

Key words: *Acipenser sinensis*; spermatogonial stem cell; ultra-low temperature cryopreservation; thawing temperature; antioxidant; antifreeze protein

Corresponding author: DU Hao. E-mail: duhao@yfi.ac.cn