

DMSO 对泥鳅胚胎脱水量及存活率的影响

柳 凌 刘宪亭 章龙珍 鲁大椿

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000)

摘 要 本文通过高效液相色谱技术(HPLC), 测定了 DMSO 渗入泥鳅胚胎的过程中单位时间里胚胎内 DMSO 的含量变化。结果表明, 该过程可分为快速进入和慢速进入 2 个阶段, 二者间的转折点出现时间越早, 胚胎的存活率就越低。计算了胚胎相应的脱水量, 当脱水量达到 25% 时, 胚胎的存活率为 70%~80%。尾芽期胚胎对 DMSO 的耐受力最强, 而心跳期胚胎的耐受力最差。

关键词 二甲亚砜, 高效液相色谱, 泥鳅胚胎, 脱水量, 存活率

二甲亚砜(DMSO)是一种极性很强的有机溶剂, 由于它脱水性好, 渗透能力强, 能很快地通过细胞膜, 将原生质冰点降至 -45°C ^[1], 所以在进行生物材料的低温保存时, 常把它作为抗冻剂添加到保存液中, 以便获得较好的保存效果。虽然 DMSO 在低温下对细胞有保护作用, 但在常温下却对细胞有一定的毒性^[2]。因此, 确定胚胎脱水的程度是鱼类胚胎冷冻保存成功与否的重要环节之一。由于胚胎外的抗冻剂在不断将胚胎内的水份向外吸出的同时, 又在不断向胚胎内渗透, 改变着细胞内原生质的浓度。故只有测得抗冻剂进入胚胎细胞内的量, 才能准确知道胚胎的脱水量。

本文通过高效液相色谱技术, 测定 DMSO 渗入泥鳅胚胎内的单位时间变化情况, 并参照胚胎在 DMSO 中的耐受力, 对胚胎在冻前平衡过程中的脱水效果进行计算和分析, 从定量方面探讨抗冻剂对鱼类胚胎的毒性损伤机理, 为进行鱼类胚胎冷冻损伤机理的深入研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 鱼类胚胎的来源及 DMSO 处理

从市场上购较大个体的泥鳅。在实验室饲养半个月, 再用 LRHA-2 和 HCG 催情, 人工授精, 受精卵在室温下静水孵化。当卵发育到原肠中期后, 选出受精卵作为试验材料。

试验样品选用了 4 种发育阶段的胚胎, 即原肠中期、尾芽期、肌肉效应期和心跳期。

试验用 DMSO 浓度分别为 10%、12%、14%、16% 4 个浓度梯度, 胚胎在 DMSO 中处理

的时间为 30~240 min, 每隔 30 min 取样 1 次, 共 8 个时间段。

1.2 HPLC 样品制备及对照组处理

样品经一定浓度 DMSO 处理 1 段时间后, 取出 2 份样品各 50 粒卵。其中 1 份用蒸馏水快速冲洗, 另 1 份不冲洗, 2 份样品分别用滤纸吸去所残留在胚胎表面的水份和 DMSO 后直接称重, 2 份样品的平均重量为该样品的湿重。然后加入 0.5 ml 10% 丙酮, 匀浆器匀浆, 静置约 5 min, 3 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液, 于 -20℃ 冰箱保存, 待 HPLC 测定。

对照组不经 DMSO 处理, 用上述方法称取湿重, 并在真空干燥器中室温干燥至恒重, 所得重量为样品对照组干重。

取 HPLC 样品的同时, 另取 1 份样品 30 粒卵, 置清水中观察胚胎存活率。

1.3 HPLC 色谱条件及测定

色普柱 YWG-C¹⁸ 柱, 300 mm×3.9 mm i. d.; 粒径 10 μm, 流动相 0.1 mol/L 丙酮溶液, pH 6.25; 流速 0.8 ml/min; 紫外检测波长 254 nm; 灵敏度 0.01 AUFS; 进样量 20 μl。每份样品平行处理 3 次, 取其平均值为测定结果。

2 结果

2.1 平衡过程中 DMSO 在胚胎内的含量变化

图 1 中的 A、B、C、D 图分别显示了 DMSO 在原肠中期、尾芽期、肌肉效应期和心跳期胚胎细胞中的变化情况。4 条曲线分别代表浓度为 10%, 12%, 14%, 16% 的 DMSO。从图 1

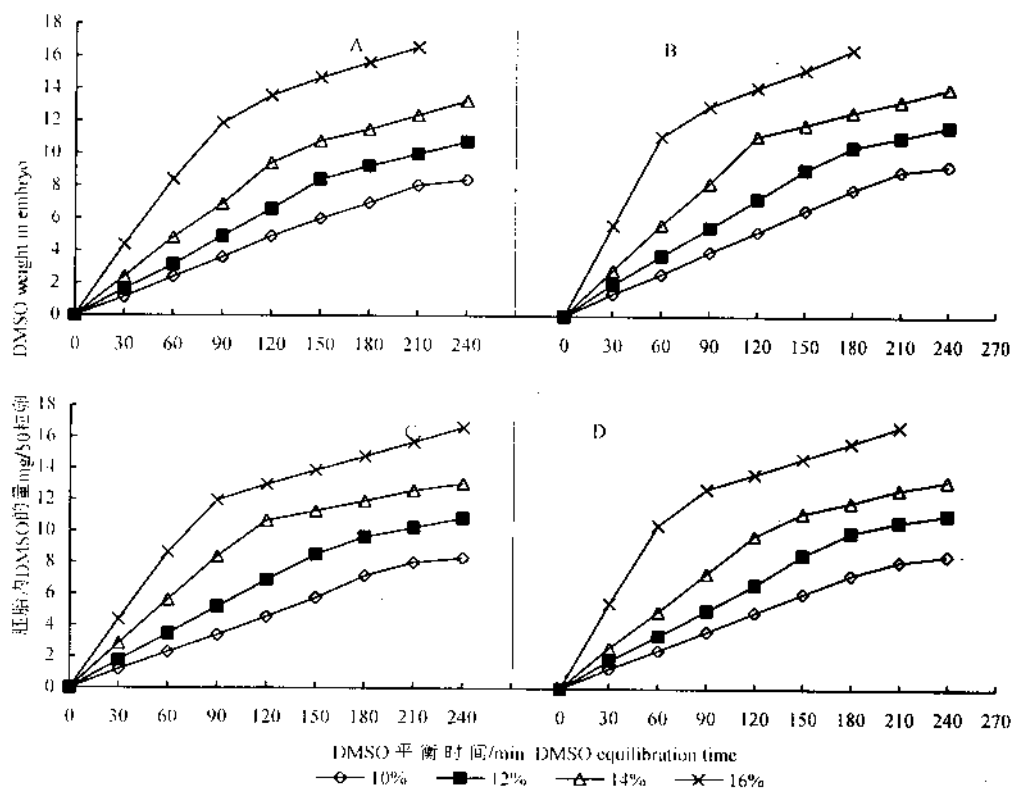


图 1 不同浓度 DMSO 在泥鳅胚胎内的变化

Fig.1 Changes in loach embryo with different concentration of DMSO

可看出,DMSO 进入泥鳅胚胎的量受胚胎发育期的影响不大。以原肠中期与心跳期的结果比较来看,当用 10% 的 DMSO 处理 210 min 后,DMSO 在原肠中期胚胎内的量为 8.06 mg/50 粒卵,而进入心跳期胚胎的量为 8.14 mg/50 粒卵;用 16% 的 DMSO 处理 210 min 后,DMSO 进入原肠中期胚胎的量为 16.57 mg/50 粒卵,而进入心跳期胚胎的量为 16.70 mg/50 粒卵。而且,相同浓度的 DMSO 进入各胚胎发育期的方式也基本相同,即在不同的胚胎发育期都会出现 1 个相同的转折点,该转折点把 DMSO 进入胚胎细胞的过程分为快速进入和慢速进入 2 个阶段。DMSO 首先是以快速方式进入胚胎细胞,紧接着又以 1 种较慢的速度渗入胚胎细胞内。但不同浓度的 DMSO 出现转折点的时间是不同的。10% 的 DMSO 出现转折点的时间为 200~215 min;12% DMSO 达到转折点的时间为 165~175 min;14% DMSO 的为 110~125 min;而 16% 的 DMSO 则为 65~80 min。可见,DMSO 浓度越高,转折点出现的时间也就越早。

2.2 泥鳅胚胎各发育期的脱水量

根据 HPLC 的 DMSO 在各时间段进入胚胎的量及样品的湿重,作者推导出下列关系式,并计算出胚胎各发育期在 DMSO 处理的不同时间段里的脱水量,其结果见表 1。

$$X = \frac{W_{\text{湿}1} - W_{\text{湿}2} + W_D/1.1}{W_{\text{湿}1} - W_{\text{干}}} \times 100\%$$

式中: X 为胚胎的脱水量; $W_{\text{湿}1}$ 为某 1 发育期胚胎对照组的湿重; $W_{\text{干}}$ 为某 1 发育期胚胎对照组的干重; $W_{\text{湿}2}$ 为某 1 样品的湿重; W_D 为某 1 样品胚胎内 DMSO 的含量

表 1 泥鳅胚胎各发育期在不同浓度 DMSO 中的脱水量变化

Table 1 Changes of dehydrated rate of loach embryo at each developmental stage with different concentration of DMSO

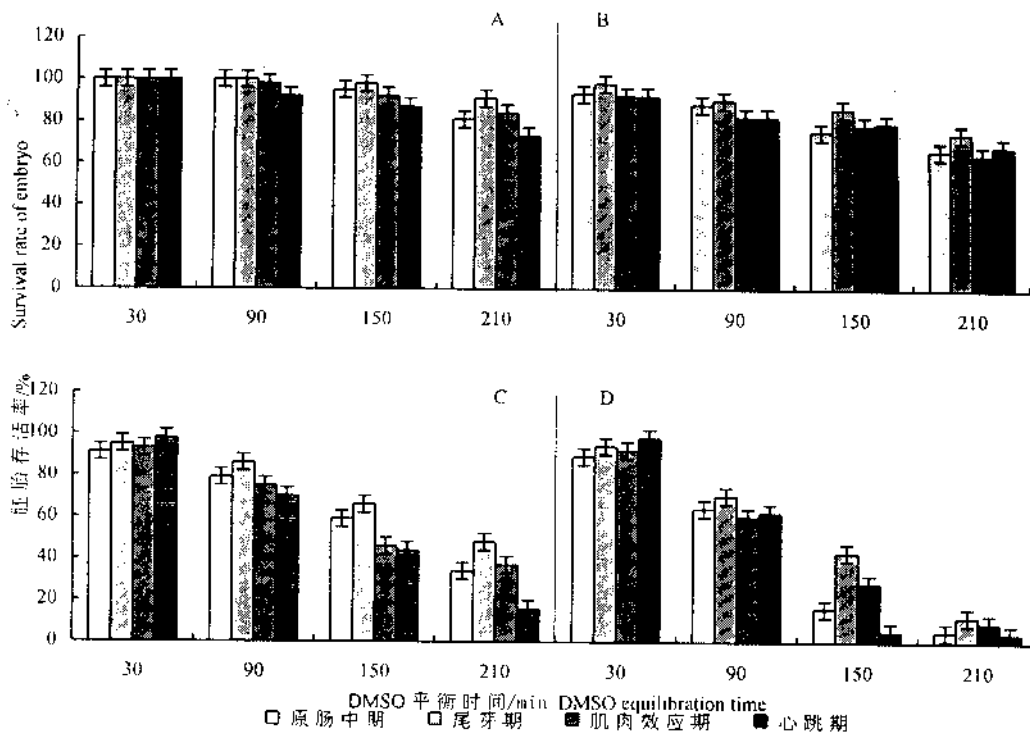
胚胎发育期 developmental stage	DMSO 浓度/% DMSO concentration	脱水量/% dehydrated rate							
		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min
原肠晚期	10	2.8	6.6	10.3	13.6	16.4	19.2	21.9	22.7
	12	4.1	7.8	11.5	15.3	19.1	22.5	25.2	27.6
	14	6.5	12.6	17.1	21.0	24.1	26.6	29.1	31.3
	16	11.5	16.6	23.6	27.3	30.7	33.8	-	-
尾芽期	10	3.6	7.2	10.5	14.1	17.6	20.2	22.8	23.9
	12	4.7	8.6	12.5	16.2	20.0	23.4	26.2	28.7
	14	6.2	11.6	16.6	20.4	26.9	27.3	29.9	31.4
	16	9.8	17.6	23.1	26.9	30.6	33.7	-	-
肌肉效应期	10	3.2	6.1	9.0	12.1	15.3	17.9	19.5	21.1
	12	4.2	8.0	11.7	15.2	18.5	21.4	23.9	26.2
	14	6.6	11.8	16.4	20.5	23.7	26.3	28.5	30.6
	16	10.1	17.7	23.1	26.7	30.2	33.4	-	-
心跳期	10	2.9	6.2	9.3	12.5	15.9	19.0	21.4	22.5
	12	4.2	8.1	11.5	15.6	18.9	24.0	25.3	27.4
	14	6.1	11.9	16.8	20.7	23.8	26.8	29.5	-
	16	11.1	18.7	23.3	27.0	30.3	33.5	-	-

从表 1 可看出,DMSO 浓度越高,胚胎的脱水量也越大;平衡时间越长,胚胎的脱水量也越大。且 DMSO 浓度越高,胚胎的脱水平均速度也越快。以尾芽期胚胎在 DMSO 中处

理到 180 min 时为例, DMSO 浓度 10% 时脱水平均速度为 6.73%/h; 12% 时为 7.80%/h; 14% 时为 9.10%/h; 而 16% 时则为 11.23%/h。

2.3 胚胎在 DMSO 中的存活率

试验结果 DMSO 浓度越低, 胚胎的存活率越高。仍以尾芽期胚胎为例, 当 DMSO 浓度为 10% 时, 210 min 后其存活率可达 93%, 而当 DMSO 的浓度升高到 16% 时, 同样时间, 胚胎存活率只有 15%。泥鳅胚胎在 DMSO 中的存活率不仅受到 DMSO 浓度的影响, 而且还与胚胎的发育期密切相关。尾芽期的耐受力最强, 心跳期的耐受力最差。当胚胎在 16% DMSO 中处理 150 min 后, 尾芽期的胚胎仍有 45% 的存活, 而心跳期的只剩下不到 5%。但有 1 个例外, 即当胚胎受高浓度的 DMSO 短时间处理后, 心跳期胚胎的存活率则略高于尾芽期, 如图 2-C, D 所示。其原因将在 3.1 中进一步讨论。



A~D 分别为 10%, 12%, 14% 和 16% 的 DMSO 结果

图 2 泥鳅胚胎各发育期在 DMSO 中耐受力的变化

Fig. 2 Changes of durability of loach embryo at each developmental stage with DMSO

3 讨论

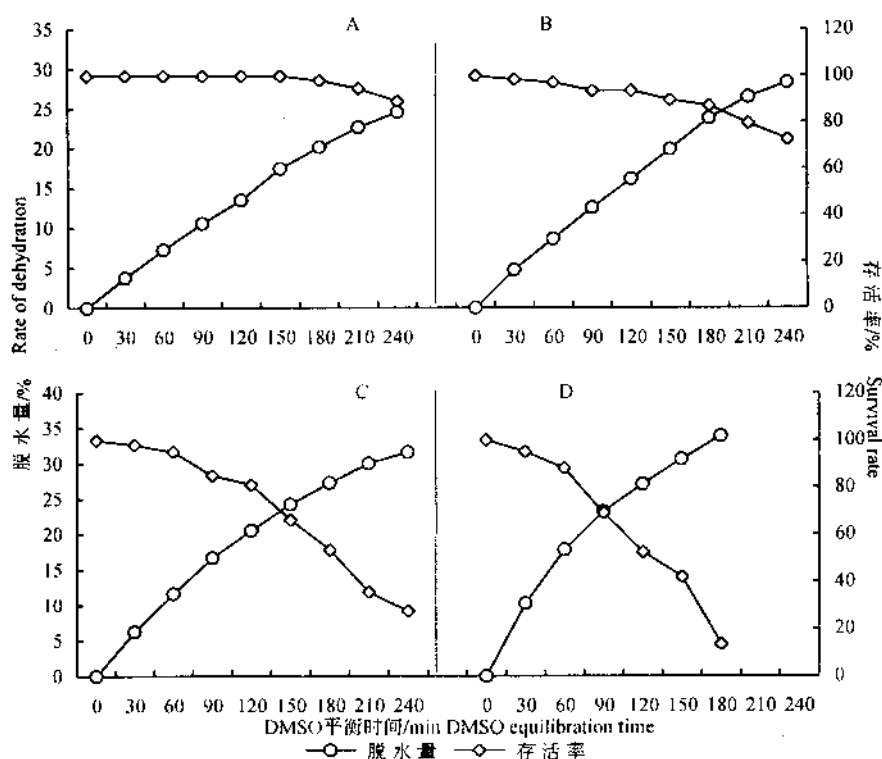
3.1 DMSO 在胚胎内的含量与胚胎存活率的关系

DMSO 进入胚胎细胞的过程分为快速进入和慢速进入 2 个阶段。对胚胎存活率有直接影响的是快速进入阶段, 快速进入的时间越短, 胚胎的存活率就越低。我们认为, 当 DMSO 以很快的速度大量渗入胚胎细胞内时, 可能引起了胚胎细胞膜的某些结构发生了不可逆的改变。Stoss J.^[5]在虹鳉鱼的胚胎冷冻保存试验中, 从另 1 个侧面证实了这一假设。他将虹鳉鱼的胚胎用 2 种方式进行冻前平衡, 1 种是直接将胚胎放入 2 mol/L 的 DMSO 中, 另 1 种是分 4 步将 DMSO 的浓度逐渐加到 2 mol/L, 结果大不相同。一步到位的胚胎存活率只

有 30%, 而分步到位的胚胎存活率可达到 87%^[3]。因此, 提高 DMSO 浓度的前提是延长 DMSO 快速进入胚胎细胞的过程以提高胚胎存活率。但 DMSO 是通过什么方式改变胚胎细胞膜结构的, 以及胚胎细胞膜结构又发生了那些变化, 尚有待进一步研究。

3.2 胚胎脱水量与胚胎存活率的关系

Harvey, B 提出胚胎的脱水量直接影响着胚胎的存活率^[8]。将本试验中发育到尾芽期的泥鳅胚胎在不同浓度 DMSO 中的存活率与脱水量在图 3 中进行比较时, 发现脱水量与存活率之间的确存在着一定的关系, 它表现为无论 DMSO 浓度怎样变化, 当不考虑胚胎在 DMSO 中处理的时间参数时, 一定的脱水量导致了一定的胚胎存活率。图 3 中, 除图 3-A 由于 DMSO 浓度低而没有显示出结果外, 其它 3 个图中脱水量变化曲线与存活率曲线都产生了 1 个交叉点。在这个交叉点上, 当脱水量 25% 左右时, 胚胎的存活率都为 70%~80%。但这个交叉点是否为胚胎脱水的最佳时机尚有待进一步研究。



A~D 分别为 10%, 12%, 14%, 16% 的 DMSO 比较结果

图 3 尾芽期泥鳅胚胎在不同浓度 DMSO 中脱水量与存活率的关系

Fig.3 Relation between dehydrated rate and survival rate of loach embryo during tail-bud stage at different concentration of DMSO

3.3 胚胎的不同发育期与胚胎存活率的关系

Zheng T. 对斑马鱼胚胎进行冷冻保存的研究后得出, 鱼类胚胎进行超低温冷冻保存的最佳发育期应为心跳期^[7]。国内外有许多学者做了同样试验, 也认为心跳期应为最佳时期^[9]。而本试验结果与上述结论存在一定差异。从图 2 的结果看, 尾芽期的胚胎对 DMSO 耐受力比心跳期的胚胎强。产生这种差异的原因可能有 2 方面: ①是不同的鱼胚胎各发育期对 DMSO 的耐受力可能不同; ②是各试验所取的存活率参数不同。以图 2-C, D 为例,

当 DMSO 浓度达 14% 以上时, 而胚胎只在 DMSO 中处理 30 min 时, 心跳期胚胎的存活率就高于尾芽期。这是因为心跳期的胚胎器官发育更完全, 胚胎从整体来讲抵御外界恶劣环境的能力要比早期胚胎强。但胚胎发育过程中各组织器官对 DMSO 的敏感程度不一样, 心跳期胚胎的尾部极易受到损伤。虽然复温后有许多胚胎暂时都能存活, 但绝大多数到后来都发育成畸形胚, 最终在胚后发育阶段还会死亡。因此, 当以复温后的胚胎存活率为标准时, 就可能得出心跳期胚胎的存活率比尾芽期高的结论, 但若进一步观察, 其结果正好相反。

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 毛树坚. 生命科学论文集. 杭州大学出版社, 1992: 140~145
- 3 章龙珍. 玻璃化液对鲢鱼胚胎存活的影响. 淡水渔业, 1996, 5: 7~10
- 4 章龙珍. DMSO 对草鱼胚胎毒性作用初探. 淡水渔业, 1989, 4: 24~26
- 5 Stoss J. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout and coho salmon. Aquaculture, 1983, 31: 51~65
- 6 Arai N. Cryopreservation of medaka embryos during development. Zool Sci, 1989, 4: 813~818
- 7 Zheng T. Cryopreservation of prehatch embryos of zebra fish. Aquat. Living Resour. Vivantes Aquat, 1993, 6: 145~153
- 8 Harvey B. Cooling of embryonic cells, isolated blastoderms and into embryos of the zebra fish to -196°C . Cryobiology, 1983, 20: 440~447
- 9 Harvey B. Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethylsulfoxide. Cryobiology, 1983, 20: 432~439

Effect of dimethylsulfoxide on dehydrated level and survival rate of loach embryo

Liu Ling Liu Xianting Zhang Longzhen Lu Dachun

(Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000)

Abstract This experiment measured the changes of DMSO contents in the loach embryo cells during its permeating process with HPLC technique. The process divides into 2 courses, i. e. rapid and slow permeation. The turning time of the 2 courses has a close relationship with DMSO concentrations. The earlier the turning time emerges, the lower the survival rate of the embryos is. The dehydrated level of the embryo was calculated. The survival rate is 70%~80% while the dehydrated rate of the embryos 25%. The durability at tail-bud stage was stronger than that at heartbeat stage.

Key words dimethylsulfoxide (DMSO), high performance liquid chromatography (HPLC), loach embryo, dehydrated level, survival rate