

鱼类冷冻胚胎结构变异的研究

张轩杰

(湖南省生物研究所, 长沙 410081)

摘要 本文以草鱼胚胎为材料, 研究了鱼类胚胎冷冻保存前后的结构变异。观察结果表明, 草鱼胚胎冷冻到 -196°C 后, 外部形态和内部结构都有不同程度的损伤。其主要表现在: 1) 冷冻后的受精卵, 卵表收缩开裂, 表面的膜褶结构被破坏, 卵膜上出现大量的絮状物; 2) 卵黄颗粒破裂, 成为均质的团块结构; 3) 发育后期的胚胎冷冻后, 胚体严重收缩变形, 卵黄囊疏松, 体表组织脱落; 4) 胚体内部结冰, 结冰可分为细胞内部结冰和细胞间结冰等类型。这些损伤的存在, 导致了鱼类胚胎在冷冻保存后的死亡。

关键词 草鱼, 胚胎, 冷冻保存, 亚显微结构变化

鱼类胚胎的冷冻保存是近年来刚刚起步的研究课题。日本学者(张厚贤译, 1981)^[1]曾研究过虹鳟胚胎的冷冻保存; 张新生等(1987)^[2]研究过鲤鱼胚胎的冷冻保存; 赵维信等(1991)^[3]对鲤、团、青、鲢等鱼的胚胎进行过冷冻保存试验, 作者(1992)^[4]也曾对红鲫、泥鳅胚胎进行过冷冻保存研究, 这些工作大都是初步性的, 冷冻保存的最低温度都在 -20°C 以上, 且复苏率不高, 张新生等(1987)报道曾获得过经液氮(-196°C)保存后存活的鲤鱼胚胎, 但这一实验结果始终难以重复。由此可见, 鱼类胚胎的冷冻保存尚处于探索阶段, 离达到液氮条件下长期保存的目标甚远。

作者于1991年至1993年, 以草鱼胚胎为材料, 对鱼类胚胎冷冻前后的结构变化进行了比较研究, 以期鱼类胚胎冷冻保存技术的提高提供一些低温生物学的依据。

材 料 与 方 法

(一) 材料 在家鱼繁殖季节, 取人工授精的草鱼受精卵置瓷盆中静水孵化, 定期取材进行冷冻试验。

(二) 胚胎冷冻处理方法 将所取胚胎用自配的防冻保护液在低温(4°C)处理10-15min, 然后以 $0.1^{\circ}\text{C}-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的冷冻速率降温至 -80°C , 再转入液氮中保存备用。

(三) 观察方法 将液氮保存的草鱼胚胎升温解冻。透射电镜材料采用戊二醛-锇酸双重固定, 丙酮脱水, Epon812包埋, 超薄切片。日本产H-600电镜观察, 扫描材料经丙酮脱水后, 临界点干燥, 喷金, 日本产S-570电镜观察。

观 察 结 果

(一) 草鱼受精卵冷冻前后的形态变化 正常草鱼受精卵外观呈园球形(图版 I: 1), 直径 1.1mm 左右, 卵子表面有膜褶隆起, 形成较为规则的多边形框架, 这可能有维持卵子球体稳定性的作用。高倍镜下观察, 可见卵膜平整, 膜上有均匀分布、直径约为 $0.5\mu\text{m}$ 的小孔(图版 I: 3), 这可作为胚胎发育过程中卵子吸水气体及其它代谢产物交换的通道。冷冻后的受精卵形态有明显的变化: 1) 卵表多边形的膜褶隆起变粗, 数目减少; 2) 卵子表面出现冻裂口(图版 I: 2); 3) 高倍镜下观察, 平整的卵膜变得粗糙, 并出现大量的絮状物(图版 I: 4)。这种絮状物的存在遮盖了卵膜表面的部分微孔, 其结果可能影响受精卵内外物质的正常交换功能。

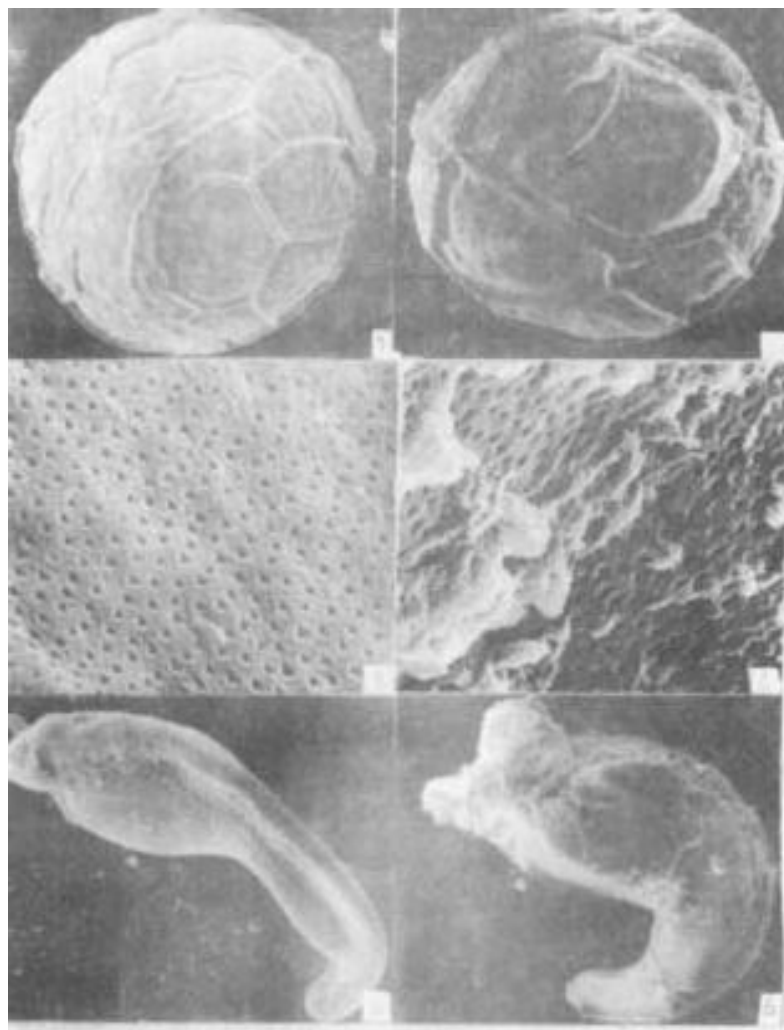
(二) 发育后期胚胎冷冻后的形态变化 正常胚胎发育到神经胚后, 胚体逐步伸长。从受精卵的园球形, 逐渐演变为椭圆形, 最后形成流线形, 胚体表面光滑。肌肉效应期后的胚胎, 胚体两侧可见到排列整齐的体节, 腹部的卵黄囊随着胚胎的发育进程不断缩小(图版 I: 5, II: 3)。脱膜后胚体进一步伸长, 卵黄囊完全消失(图版 II: 1)。最后成为能自由游动的鱼苗。冷冻后的胚胎, 胚体严重收缩、弯曲, 体表粗糙, 出现大量皱褶, 甚至出现裂隙(图版 I: 6, II: 2), 头部等产生不正常的突起, 表皮细胞脱落, 体节肌纤维外露(图版 II: 4)。

(三) 冷冻后胚体内部结构的损伤 胚胎经冷冻处理后, 内部结构都有不同程度的损伤。主要表现为: 1) 卵黄颗粒破裂, 卵黄物质由颗粒状粘结成团块状; 2) 组织细胞间出现大量的裂隙, 这些裂隙纵横交错, 显然是冷冻时结冰所形成的; 3) 冷冻后胚胎表面的细胞损伤较深层的严重, 细胞膜大都破裂, 细胞结构不完整。深层细胞大都形态正常, 细胞膜、核膜清晰, 细胞结构完整。但也有部分细胞受到冷冻损伤, 细胞内或细胞间出现大小不等, 形状不规则的冰腔, 这是冷冻过程中细胞内外结冰所致。细胞结冰的情况大致可分为三种类型: a) 细胞质内结冰(图版 III: 2); b) 核周结冰(图版 III: 4); c) 细胞外结冰(图版 III: 3)。冰晶的形状有园球形(或椭圆形), 不规则的分枝形及板块状等。细胞外结冰引起细胞脱水, 导致细胞严重收缩, 细胞器、细胞核相互挤压。细胞内结冰会直接造成细胞结构的机械损伤, 如细胞器被破坏, 核收缩变形等。在一个胚体内, 往往几种结冰类型同时存在。

讨 论

1. 冷冻损伤的机理探讨 生物样品经冷冻保存后, 其外部形态和内部结构都有一定程度的损伤。现已发现, 冷冻损伤可以发生在所有的生物细胞中。朱裕鼎等(1984)^[5]冷冻花白奶牛胚胎时, 发现部分胚胎透明带出现明显的缺口, 严重者半个胚胎脱落, 甚至呈离散黑色碎块; 赵维信等(1987)观察到结冰死亡的鱼类胚胎表皮细胞严重蜷缩, 乃至细胞间相互分离。作者的实验结果表明, 经冷冻后的草鱼胚胎, 其外部形态和内部结构都

图版 I



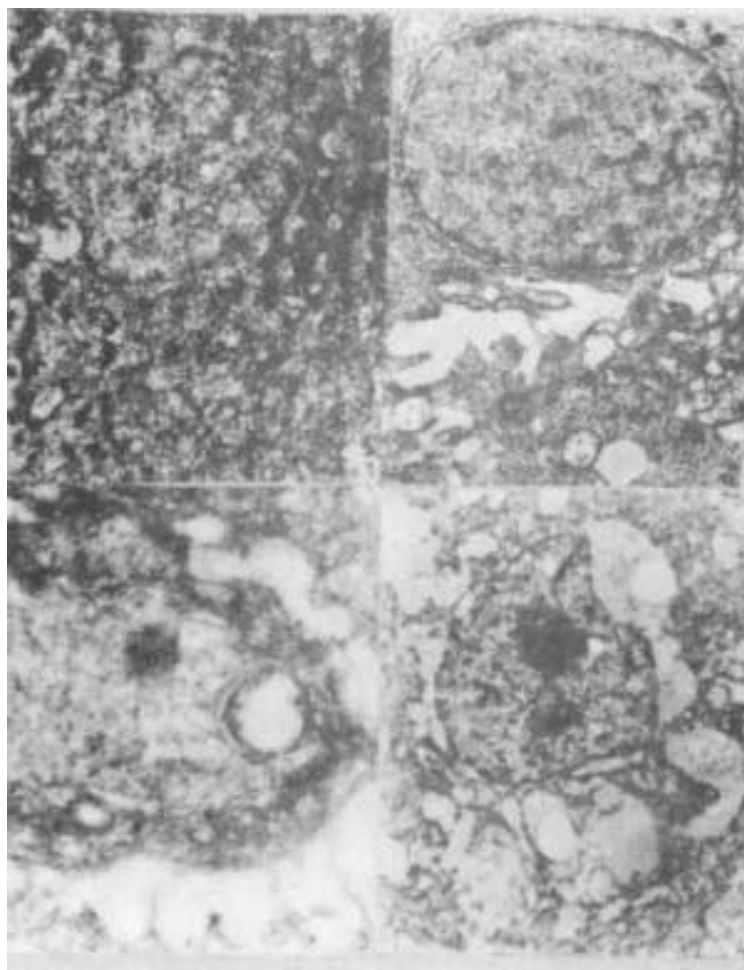
1. 草鱼受精卵的正常形成。×75
2. 冷冻后的受精卵形态, 示卵表裂口。×75
3. 受精卵表面放大。×6000
4. 冷冻后受精卵表面放大, 示絮状物。×6000
5. 肌肉收缩期胚胎形态。×40
6. 冷冻后的肌肉收缩期胚胎, 胚体收缩、弯曲, 头部有不正常突起。×40
1. Normal form of fertilized egg, *C. idellus*. ×75.
2. The form of frozen fertilized egg, show crack on chorion. ×75.
3. Normal fertilized egg chorion. ×6000.
4. Frozen fertilized egg chorion, show the wadding matter on the chorion. ×6000.
5. Muscular contraction stage embryo. ×40.
6. Frozen muscular contraction stage, show the body wrinkled and shrinked. ×40.

图版 II



1. 草鱼脱膜后的胚胎形态。×20
2. 冷冻后的脱膜胚胎，胚体弯曲，体表出现大量皱褶。×30
3. 脱膜胚体侧面观。×400
4. 冷冻后的脱膜胚，体表层组织破裂脱落，肌纤维外露。×400
1. Decidual embryo of *C. idellus*. ×20.
2. Frozen decidual embryo, show the body wrinkled and crooked, ×30.
3. Flank of decidual embryo, ×400.
4. Frozen decidual embryo, show the surface layer broken and dropped and the muscular fiber revealed, ×400.

图版 III



1. 草鱼脱膜胚的正常细胞结构。X8000
2. 冷冻脱膜胚的细胞，示胞内冰腔。×8000
3. 冷冻脱膜胚的细胞，示胞外冰腔及胞体收缩。×8000
4. 冷冻脱膜胚的细胞，示核周冰腔及胞核收缩。×8000
1. Cellular structure of normal embryo, ×8000.
2. Frozen embryo cell, show the ice holes in the cell, ×8000.
3. Frozen embryo cell, show the ice holes between cells and shrank cell. ×8000.
4. Frozen embryo cell, show the ice holes around the nucleus, ×8000.

有明显的损伤。

现代冷冻损伤理论认为,细胞的冷冻损伤主要是由于冰晶的生成和细胞的脱水造成的,动物细胞含有大量的水份,可以说原生质是含有一定内容物的水合体。在冷冻过程中,当温度降低到溶液的冰点以下时,就会发生结冰现象。根据前人的研究。 $0^{\circ}\text{C} \sim -60^{\circ}\text{C}$ 是冰晶形成的温度区。当温度降低到溶液冰点以下时,溶液中的水首先结冰,即初级结晶。随着温度的进一步降低,溶质和水一起结冰,即次级结晶;解冻时,当温度上升到 $0^{\circ}\text{C} \sim -60^{\circ}\text{C}$ 温度区时,又会发生结冰现象,即重结晶^[6],从草鱼胚胎冷冻损伤的结果来看,组织间、细胞间及细胞内都存在结冰后所成的冰腔,这些冰晶的形成必然会对细胞造成严重的机械损伤。另一方面,保护溶液水份结冰时,溶质浓度增大,胞内水在相应的蒸汽压下流出胞外,以达到细胞内外水份的平衡,这必然导致细胞脱水,引起细胞,乃至整个胚体的收缩变形,以及胞内物质的挤压和交链。草鱼胚胎的冷冻损伤可以说是结冰和脱水双重作用的结果。

2. 提高冰冷技术水平,减少或避免鱼类胚胎冷冻损伤的可能性 细胞内大而稳定的冰晶形成和溶质的浓缩是导致生物样品在冷冻中死亡的两个主要原因。细胞内冰晶形成的大小、数量与冷冻速度、生物样品的体积及细胞对水的透性等均有密切关系。一般认为,较高的冷冻速度,增大了胞内结冰的可能性,会形成多而小的冰晶;较缓慢的冷冻速度增加了细胞脱水的可能性,倾向于形成大而稳定的胞外结晶。但是,“快速”与慢速并没有严格的界限,它与生物样品的体积大小和生物学特性有关,不同的细胞类型和生物个体对冷冻速度的要求是不同的,例如,用 $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 的冷冻速度冷冻海胆卵所形成的胞内冰晶比 $5000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 冷冻人的红细胞所形成的冰晶更大、更稳定^[7]。作者在过去的实验中看到,用 $30^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 的速度冷冻鱼类精子,没有发现冰晶形成的现象,而用 $0.1-0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 的速度冷冻草鱼胚胎,却有相当数量的胞内冰晶存在。目前较普遍的看法是,对含水量低,体积小的生物样品可采用较高的速度冷冻,而对于含水多体积大的生物样品宜采用缓慢的速度冷冻。鱼类胚胎体积大,卵黄多,卵周腔又有大量的水份,这无疑增大了冷冻保存的难度。要取得鱼类胚胎冷冻保存的成功,必须找到一个既能避免胞内大而稳定冰晶的形成,又能防止细胞严重脱水的“适宜冷冻速度”。

参 考 文 献

- [1] 张厚贤译, 1981。虹鳟胚胎的冷冻保存试验。淡水渔业译文, 57-60。
- [2] 张新生等, 1987。鲤鱼胚胎冷却至 -196°C 的试验。上海机械学院学报, 9 (2): 83-89。
- [3] 赵维信等, 1991。淡水养殖鱼类胚胎低温保存的初步研究。水产科技情况, 18 (3): 68-72。
- [4] 张轩杰, 1992。红鲫、泥鳅胚胎冷冻保存的初步研究。内陆水产, 5: 10-12。
- [5] 朱裕鼎等, 1984。牛胚胎两步冷冻。畜牧兽医学报, 15 (9): 145-148。
- [6] 朱仁华, 1984。海洋低温生物学, 5-94。海洋出版社。
- [7] Tokio Ne 1981。Cryobiology 18: 229-237。

A STUDY ON CHANGES OF FISH EMBRYO AFTER FROZEN

Zhang Xuanjie

(Hunan Biology Institute, Changsha 410081)

ABSTRACT This paper describes the structural destroy of fish embryo (*C. idellus*) after frozen. a) chorion of fertilized egg becomes wrinkled and cracked and its hexagonal frames are completely disrupted; a much precipitate is on the surface of egg; b) yolk globules are broken and stuck to blocks with equal character; c) lately stage embryo is wrinkled and twisted, and its yolk sac is loosed and swollen, its surface cells are removed after frozen. Different type ice exists in intracellular and extracellular. The changes described above are the main deadly factors of frozen-thawed embryo

KEYWORDS Ultrastructural change, Cryopreservation, Embryo, Fish