

超低温冷冻保存对七带石斑鱼胚胎酶活性的影响

姜静^{1,2} 田永胜^{1*} 翟介明³ 陈松林¹

1 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071; 2 上海海洋大学, 水产与生命学院, 上海 201306; 3 山东莱州明波水产有限公司, 莱州 261418

* 通讯作者, tianys@ysfri.ac.cn

摘要 七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)是一种生长速度快、低温下耐受性强具有较高经济价值的海水鱼类,在自然环境中种群数量较少,对其种质资源进行长期保存迫在眉睫。本研究以七带石斑鱼胚胎为实验材料进行种质冷冻保存,探讨超低温冷冻(-196 °C)对七带石斑鱼胚胎内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、 N_a^+/K^+ -ATPase、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性的影响,以检测抗冻剂在冷冻保存中对胚胎的影响。本研究分别测定了经过PM(24% 1,2-丙二醇(PG)+16%甲醇(MeOH))、PMG(15.75% 1,2-丙二醇+8.75%甲醇(MeOH)+8.75%甘油(Gly))和PMGT(15.75% 1,2-丙二醇+8.75%甲醇(MeOH)+8.75%甘油(Gly)+5%海藻糖(trehalose))3种玻璃化液处理冷冻前后七带石斑鱼胚胎内6种酶活性的变化。结果表明,胚胎分别经过以上3种玻璃化液处理后,6种酶活性均发生显著性变化,与冷冻前相比,冷冻后胚胎内MDA酶活性显著升高($P<0.05$);与之相反,冷冻后胚胎内的SOD、CK、 N_a^+/K^+ -ATPase、LDH和GSH-Px酶活性与冷冻前相比,均显著下降,且差异显著($P<0.05$)。而在PM玻璃化液处理后的未冷冻胚胎中 N_a^+/K^+ -ATPase的表达量与对照组无显著性差异($P>0.05$)。冷冻使MDA酶活性显著升高,而使其他5种酶的表达量水平降低。PM玻璃化液对CK和 N_a^+/K^+ -ATPase的活性影响较小,说明对胚胎具有一定的保护作用。本研究为七带石斑鱼胚胎超低温冷冻保存提供理论依据。

关键词 七带石斑鱼,超低温冷冻保存,胚胎,酶活性

Effects of Cryopreservation on Enzyme Activity in Seven-band Grouper *Epinephelus septemfasciatus* Embryos

JIANG Jing^{1,2} TIAN Yong-Sheng^{1*} ZHAI Jie-Ming³ CHEN Song-Lin¹

1 Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2 College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3 Ming Bo Aquatic Co. Ltd., Laizhou 261418, China

* Corresponding author, tianys@ysfri.ac.cn

Abstract Seven-band grouper (*Epinephelus septemfasciatus*) is a seawater fish with high economic values that grow fast and tolerate strong with low temperature. Population quantity is less in the natural environment, and the germplasm resources for long-term preservation are imminent. Therefore, based on the cryopreservation of seven-band grouper embryos, the effects of cryopreservation (-196 °C) on the enzyme activity (superoxide dismutase (SOD), creatine kinase (CK), N_a^+/K^+ -ATPase, lactate dehydrogenase (LDH),

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)(No. 2012AA10A402 和 No. 2012AA10A408)、国家自然科学基金项目(No. 31372510) 和山东省泰山学者建设工程专项

收稿日期: 2013-10-30 接受日期: 2013-11-27

malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px)) in *Epinephelus septemfasciatus* embryos were studied. In the present study, the changes of enzyme activity in embryos were analyzed by kits to clarify damage mechanism of embryos. The results indicated that the MDA enzyme activity of embryos after cryopreservation treated with the vitrifications solution of PM(24% 1,2-propylene glycol(PG) + 16% methanol(MeOH)), PMG(15.75% polyene glycol(PG) + 8.75% methanol(MeOH) + 8.75% glycerol(Gly)) 和 PMGT(15.75% polyene glycol(PG) + 8.75% methanol(MeOH) + 8.75% glycerol(Gly) + 5% Trehalose) significantly increased compared with no cryopreservation groups. However, the activity of some other enzymes descended significantly before and after cryopreservation compared with control group ($P < 0.05$), and the latter was significantly lower than the former. However, there was no significant difference between Na^+/K^+ -ATPase enzyme activity of no-frozen embryos treated with PM vitrification group and the control group. From various enzymes activity change from seven-band grouper before and after cryopreservation, cryopreservation and cryoprotectants have significant effect on the enzymes activity of seven-band grouper. Therefore, through the detection and analysis of the concentration of enzymes activity change from frozen embryos, freeze made MDA enzymes activity increase, other 5 enzymes activity decreased. PM vitrification solution had less effect on CK and Na^+/K^+ -ATPase, which showed it had certain protective function. Therefore, the research results provide a theoretical basis for cryopreservation of seven-band grouper embryos.

Keywords *Epinephelus septemfasciatus*, Cryopreservation, Embryos, Enzyme activity

0 引言

目前,鱼类胚胎冷冻保存研究尚处于初步探索阶段,冷冻胚胎成活率低阻碍了相关研究的进展。为了探讨鱼类胚胎冷冻损伤机理,从生理生化角度分析冷冻对胚胎损伤机理成为研究热点。

鱼类在正常生活状态下机体内会产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)。自由基是由ROS及其他组成部分构成的,但是生物体对自由基的需求量是很少的(张克烽等, 2007)。由于自由基性质极其活泼,如果机体不能及时清除多余部分,则会导致机体氧化胁迫(Sun et al., 2007)而引起一系列氧化损伤,如生物膜损伤、DNA损伤、蛋白变性、酶失活、脂质过氧化等,从而导致生物体产生各种生理病变(Li et al., 2001)。然而,随着自然环境的演变,生物体对外界环境的适应性也随之改变和不断的进化,生物体逐渐构建了一套完整的自我防御体系,即抗氧化体系,以此来转换消除体内过多的ROS(张克烽等, 2007; Wai-sun et al., 2006)。酶类抗氧化剂作为抗氧化体系的一个组成部分,主要抗氧化酶有超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)以及过氧化氢酶(catalase, CAT)等。而这些抗氧化剂能将多余的自由基通过

氧化还原反应,将其转化成对机体无害的物质(如水和分子氧等),从而及时地清除自由基对机体的攻击,使机体免受氧化损伤(张克烽等, 2007; 唐学玺, 张培玉, 2000)。当机体受到环境的氧化胁迫时,机体的氧化还原速率必然会加剧,对能量的需求也必然增加。生物体内重要的能量代谢酶如乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、 Na^+/K^+ -ATPase以及肌酸激酶(creatine kinase, CK)的变化水平也就间接的反映了机体的损伤程度。

目前,哺乳动物胚胎冷冻保存研究已处于较成熟阶段,在牛(*Bos taurus*)(朱士恩等, 1996)和小鼠(*Mus musculus*)(Rall, Fahy, 1985)等哺乳动物均已获得成功。然而,鱼类的卵和胚胎体积较大,导致相对表面积小,从而降低了抗冻剂的渗入和水的渗出速率(章龙珍等, 2002);同时,鱼类低渗透性的卵膜,也降低了水、抗冻剂两者与细胞内溶液间的渗透能力(陈松林, 2002)。此外,鱼类的卵和胚胎的高冷冻敏感性,同样也是容易造成冷冻损伤的主要原因之一(Wallace, Selman, 1990)。超低温对酶活性的影响是探索冷冻损伤机理的一个研究热点,国内外对俄罗斯鲟鱼(*Acipenser gueldenstaedti*)(章龙珍等, 2009)、大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)(黄晓荣等, 2012)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、红鲫(*Carassius auratus*)

和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)(张轩杰, 1996)、长鳍篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)(黄晓荣等, 2009)以及黄鳝(*Monopterus albus*)(闫秀明, 张小雪, 2011)等进行过超低温冷冻对精子酶活性影响的研究; 但研究冷冻对胚胎酶活性影响的不多, 有斑尾刺虾虎鱼(*Acanthogobius ommaturus*)(黄晓荣等, 2010a)等。目前, 在七带石斑鱼在种质资源冷冻保存方面, Koh等(2010)和Tian等(2013)对七带石斑鱼精子进行了冷冻保存研究, 此外, 关于七带石斑鱼神经坏死病毒和人工繁殖方面上也获得了一定的研究成果。Tanaka等(2003, 2004)从基因学和组织病理学上对七带石斑鱼神经坏死病进行了研究; Tokinori等(2004)利用重排列(reassortants)方法对七带石斑鱼神经坏死病毒中的宿主专一性决定因素进行了鉴定等方面的研究; Nilar等(2004)对七带石斑鱼卵巢发育和成熟进行了研究, 为七带石斑鱼的人工繁殖提供了理论基础, 但尚未有七带石斑鱼胚胎冷冻保存的相关研究报道。因此, 本研究以七带石斑鱼胚胎为材料, 通过测定冷冻前后七带石斑鱼胚胎内SOD、CK、 Na^+/K^+ -ATPase、LDH、MDA和GSH-Px 6种酶活性的变化, 探讨超低温冷冻保存对七带石斑鱼胚胎酶活性的影响, 探索鱼类胚胎冷冻损伤机理为七带石斑鱼胚胎超低温冷冻保存提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验样品采集与制备

2013年6月, 以山东省莱州市明波水产有限公司养殖的七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus*)为材料, 将采集的七带石斑鱼精卵利用人工授精方法进行授精。授精10 min后, 质量差的卵会自然沉到底部, 优质的受精卵会悬浮在上部。取上部悬浮的受精卵置于孵化箱(22℃)内进行人工孵化和培育。培养17 h(胚体形成后)后从孵化箱内采集适量上浮的卵置于22℃恒温培养箱内进行培育。不同鱼类的不同时期胚胎对玻璃化液及冷冻的适应性不同, 不同浓度和不同种类的玻璃化液对胚胎的影响也不同。金鱼(*Carassius auratus*)(柳凌等, 1997)和斑马鱼(*Brachydanio rerio*)(Zhang et al., 1993)胚胎冷冻保存的最佳时期为心跳期, 牙鲆(*Paralichthys oliuaceus*)(田永胜等, 2005)在肌节期和尾芽期时胚胎对玻璃化液的耐受能力较高, 大菱

鲆(*Scophthalmus maximus*)(田永胜等, 2004)肌节期和神经期胚胎较其他时期胚胎对玻璃化液的耐受能力强。因此, 本研究以待孵化培养至肌节期(受精30 h后)胚胎作为实验材料。同时, 将所取胚胎分为3份, 分别用于对照组、未冷冻组和冷冻组。其中, 对照组是不经任何处理的胚胎, 直接制成10%组织浆液; 未冷冻组是经过玻璃化液处理的而不经过冷冻的胚胎, 直接制成10%组织浆液; 冷冻组是经过玻璃化液处理后并进行冷冻处理的胚胎, 直接制成10%组织浆液。

对照组: 取0.1 g肌节期受精卵加入900 μL 0.1×PBS(pH 7.4), 1 300 ×g离心10 min, 取上清, 再以上清:PBS(1:9)加入0.1×PBS制成10%组织匀浆液置于-20℃冰箱中保存备用。

冷冻组: 取部分肌节期受精卵用于胚胎的玻璃化冷冻保存。利用PM(24% 1,2-丙二醇(1,2-propylene glycol, PG) + 16% 甲醇(methanol, MeOH))、PMG(15.75% 1,2-丙二醇 + 8.75% 甲醇(methanol, MeOH) + 8.75% 甘油(glycerol, Gly))和PMGT(15.75% 1,2-丙二醇 + 8.75% 甲醇(methanol, MeOH) + 8.75% 甘油(glycerol, Gly) + 5% 海藻糖(Trehalose))作为玻璃化液, 再将其分别配制成1/4、1/3、1/2、2/3和1倍的梯度溶液, 然后将100~150粒胚胎依次置于1/4、1/3、1/2、2/3和1倍玻璃化液下分别平衡6 min, 通过这5个浓度梯度处理后, 将含有胚胎的玻璃化液吸入麦管, 每管吸入250 μL (约有5~10粒受精卵), 麦管封口, 直接投入到液氮中, 冷冻时间不低于30 min。利用38℃水浴快速解冻, 用4 mL蔗糖(0.25 mol/L)洗脱液洗脱10 min, 之后用海水小心冲洗3次, 尽量去掉残留的抗冻剂和蔗糖洗脱液, 而后称取0.1 g胚胎制备成10%的组织匀浆液, 方法同对照组。将制备好的10%组织浆液置于-20℃内保存备用。

未冷冻组: 取部分肌节期受精卵利用以上3种玻璃化液分别进行处理, 处理方法同冷冻组, 即经过梯度玻璃化液处理, 然后洗脱冲洗, 但不经过冷冻。称取处理后的受精卵0.1 g制备成10%组织浆液, 方法同上。最后, 将制备好组织匀浆液置于-20℃内保存备用。

1.2 酶活性检测

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、肌酸激酶(creatine jbase, CK)、 Na^+/K^+ -ATPase、乳酸

脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛 ((malondialdehyde, MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)测定试剂盒和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

SOD采用黄嘌呤氧化酶法,1个SOD活力单位(U)即为每毫克组织蛋白在1 mL反应液中,SOD抑制率达50%时所对应的SOD量(陈亚坤,2010)。

CK采用钼酸铵法,活性根据标准曲线计算所得(黄晓荣等,2009)。

N_5^+/K^+ -ATPase采用比色法,1个 N_5^+/K^+ -ATPase活力单位(U)即为每小时每毫克组织蛋白中ATP酶分解ATP产生1 μmol 无机磷的量(赵峰等,2006)。

LDH采用比色法,1个LDH活力单位(U)即为每毫克组织蛋白37 $^{\circ}\text{C}$ 与基质作用15 min,在反应体系中产生的1 μmol 丙酮酸的量(陈亚坤,2010)。

MDA采用硫代巴比妥酸(TBA)法,根据相应公式计算:组织中MDA含量(U/mg protein)=(测定管吸光度-测定空白管吸光度)/(标准管吸光度-标准空白管吸光度) \times 标准品浓度 \times 样本测试前稀释倍数(黄晓荣等,2010a)。

GSH-PX采用比色法,1个GSH-Px活力单位(U)即为每毫克蛋白质,每分钟扣除非酶反应的作用,使反应体系GSH浓度降低1 $\mu\text{mol/L}$ 时的量(黄晓荣等,2009)。

1.3 数据分析

采用SPSS13.0统计软件对数据进行单因素方差分析,并利用Student-newman-keuls对冷冻前后胚胎所有酶活性差异进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 超低温冷冻对SOD活性的影响

七带石斑鱼对照组胚胎中SOD的平均活性为(5.34 \pm 0.26) U/mg protein;利用PM、PMG和PMGT 3种玻璃化液处理的未经冷冻胚胎中SOD的平均活性分别为(0.71 \pm 0.04)、(1.44 \pm 0.03)和(3.29 \pm 0.42) U/mg protein,冷冻后的SOD的平均活性分别为(0.34 \pm 0.01)、(0.65 \pm 0.01)和(0.38 \pm 0.22) U/mg protein。与对照组相比,3种玻璃化液的未冷冻组均显著低于对照组($P<0.05$),并且3种玻璃化液冷

冻组的SOD活性与未冷冻组相比同样都有下降趋势;除PM组未冷冻与冷冻组无显著性差异($P>0.05$)外,其他两组玻璃化液的未冷冻组和冷冻组间均存在显著性差异($P<0.05$),且冷冻后SOD活性显著下降($P<0.05$)(图1)。3种玻璃化液相比较,PMGT对SOD的影响较小。

2.2 超低温冷冻对CK活性的影响

七带石斑鱼对照组胚胎中CK的平均活性为(6.19 \pm 1.19) U/mg protein;利用PM、PMG和PMGT 3种玻璃化液处理的未经冷冻胚胎中CK的平均活性分别为(4.49 \pm 0.28)、(2.56 \pm 0.48)和(5.08 \pm 0.77) U/mg protein,冷冻组CK的平均活性分别为(0.31 \pm 0.01)、(0.69 \pm 0.43)和(0.89 \pm 0.07) U/mg protein。结果显示,与对照组相比,3种玻璃化液的未冷冻组和冷冻组均显著低于对照组($P<0.05$);与未冷冻组相比,冷冻组胚胎中CK酶活性均显著低于未冷冻组($P<0.05$)(图2)。3种玻璃化液相比较,PM和PMGT对CK的表达影响小于PMG。

2.3 超低温冷冻对 N_5^+/K^+ -ATP活性的影响

七带石斑鱼对照组的胚胎中 N_5^+/K^+ -ATP的平均活性为(19.22 \pm 4.26) U/mg protein;利用PM、PMG和PMGT 3种玻璃化液处理的未冷冻组胚胎中 N_5^+

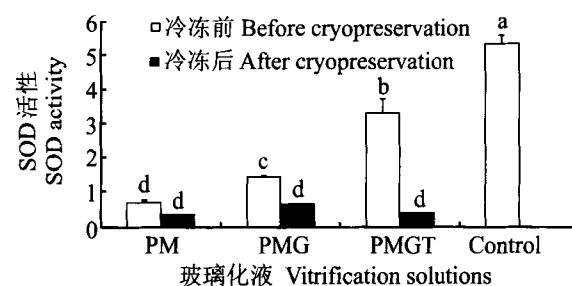


图1 超低温冷冻对SOD活性的影响

Figure 1 Effects of cryopreservation on SOD activity

PM: 24% 1,2-丙二醇(PG)+16%甲醇(MeOH); PMG: 15.75% 1,2-丙二醇+8.75%甲醇(MeOH)+8.75%甘油(Gly); PMGT: 15.75% 1,2-丙二醇+8.75%甲醇(MeOH)+8.75%甘油(Gly)+5%海藻糖(trehalose)。不同小写字母表示存在显著性差异($P<0.05$),下同

PM: 24% 1,2-propylene glycol(PG) + 16% methanol (MeOH); PMG: 15.75% pylene glycol(PG) + 8.75% methanol (MeOH) + 8.75% glycerol(Gly); PMGT: 15.75% pylene glycol (PG) + 8.75% methanol(MeOH) + 8.75% glycerol, (Gly) + 5% Trehalose. Different small letters stand for significant difference ($P<0.05$), the same below

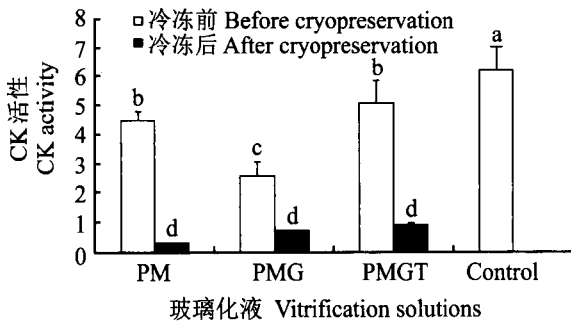


图2 超低温冷冻对CK活性的影响

Figure 2 Effects of cryopreservation on CK activity

K^+ -ATP的平均活性分别为 (19.76 ± 5.75) 、 (10.16 ± 0.64) 和 (3.46 ± 0.73) U/mg protein, 冷冻组 N_a^+/K^+ -ATP平均活性分别为 (5.31 ± 3.22) 、 (7.96 ± 0.57) 和 (3.41 ± 0.19) U/mg protein。结果显示, 与对照组相比, 除了未冷冻组PM外, 其他2种玻璃化液未冷冻组和冷冻组胚胎中 N_a^+/K^+ -ATPase活性均显著低于对照组($P < 0.05$); 利用3种玻璃化液冷冻保存的胚胎, 冷冻组 N_a^+/K^+ -ATP活性与未冷冻组相比有下降趋势, 而在PM组中, 未冷冻组 N_a^+/K^+ -ATP活性显著高于冷冻组($P < 0.05$), 其他两组的胚胎 N_a^+/K^+ -ATPase活性未冷冻组与冷冻组间无显著性差异($P > 0.05$) (图3)。

2.4 超低温冷冻对LDH活性的影响

七带石斑鱼对照组胚胎中LDH的平均活性为 (2297.85 ± 140.01) U/g protein; 利用PM、PMG和PMGT 3种玻璃化液处理的未冷冻组胚胎中LDH的平均活性分别为 (697.65 ± 153.78) 、 (672.92 ± 186.68) 和 (403.21 ± 206.54) U/g protein, 冷冻组中LDH的平均活性为 (240.09 ± 152.11) 、 (302.59 ± 128.77) 和 (88.32 ± 24.28) U/g protein。结果显示, 与对照组相

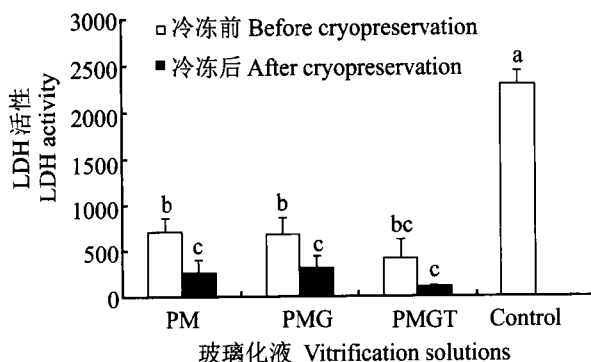
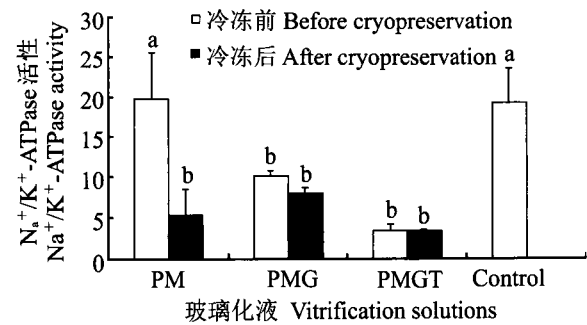


图4 超低温冷冻对LDH活性的影响

Figure 4 Effects of cryopreservation on LDH activity

图3 超低温冷冻对 N_a^+/K^+ -ATP活性的影响Figure 3 Effects of cryopreservation on N_a^+/K^+ -ATP activity

比, 3种玻璃化液的未冷冻组和冷冻组胚胎中LDH酶活性均显著低于对照组($P < 0.05$); 冷冻组和未冷冻组相比, 除了PMGT组未冷冻组和冷冻组间无显著性差异($P > 0.05$)外, 其他2种玻璃化液未冷冻组中的LDH活性均显著高于冷冻组($P < 0.05$) (图4)。

2.5 超低温冷冻对MDA活性的影响

七带石斑鱼对照组胚胎中MDA的平均活性为 (209.10 ± 36.54) U/mg protein; 利用PM、PMG和PMGT 3种玻璃化液处理的未冷冻组胚胎MDA的平均活性分别为 (77.82 ± 8.94) 、 (259.75 ± 158.48) 和 (44.32 ± 2.12) U/mg protein, 冷冻组MDA的平均活性分别为 (120.85 ± 56.84) 、 (268.60 ± 106.46) 和 (432.71 ± 59.18) U/mg protein。结果显示, 与对照组相比, 未冷冻组中MDA酶活性与对照组无显著差异($P > 0.05$), 冷冻组中除PM外, PMG和PMGT组中MDA酶活性均高于对照组; 在PMGT组中, 冷冻组中MDA活性显著高于未冷冻组($P < 0.05$), 同时, 显著高于对照组($P < 0.05$); 其他各组中冷冻组中MDA活性均高于未冷冻组, 但差异不显著($P > 0.05$) (图5)。

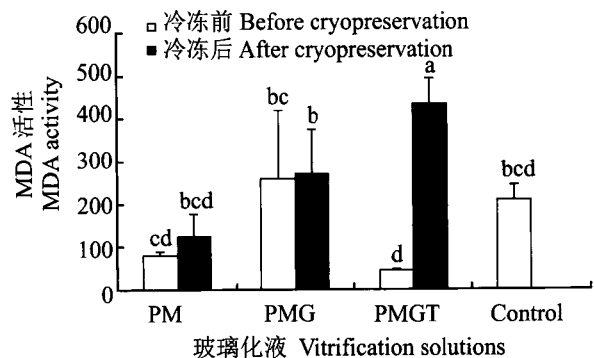


图5 超低温冷冻对MDA活性的影响

Figure 5 Effects of cryopreservation on MDA activity

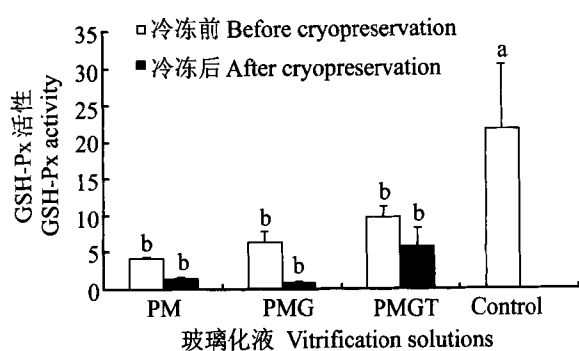


图6 超低温冷冻对GSH-Px活性的影响

Figure 6 Effects of cryopreservation on GSH-Px activity

2.6 超低温冷冻对GSH-Px活性的影响

七带石斑鱼对照组胚胎中GSH-Px的平均活性为(21.65±8.57) U/mg protein; 利用PM、PMG和PMGT 3种玻璃化液处理的未冷冻组胚胎的GSH-Px的平均活性分别为(4.05±0.26)、(6.22±1.51)和(9.68±1.30) U/mg protein, 冷冻组中GSH-Px平均活性分别为(1.26±0.18)、(0.64±0.30)和(5.66±2.41) U/mg protein。结果显示, 与对照组相比, 3种玻璃化液的未冷冻组和冷冻组中GSH-Px酶活性均显著低于对照组($P<0.05$); 冷冻组与未冷冻组相比, 3种玻璃化液的冷冻组中GSH-Px酶活性均下降, 但差异不显著($P>0.05$)(图6)。

3 讨论

3.1 超低温冷冻对能量代谢酶活性的影响

LDH、 Na^+/K^+ -ATPase 和 CK 都属于能量代谢酶。其中, LDH 是参与生物体内糖酵解过程的一种重要的能量代谢酶, 且在生物机体各组织内普遍存在(黄晓荣等, 2010b); Na^+/K^+ -ATPase(又称 N^+/K^+ 泵)由 α 和 β 2 个亚基组成, 是跨膜多次的跨膜载体蛋白, 主要功能是维持细胞胞质膜的离子通透性, 保持细胞内环境中各种离子浓度的相对稳定以及细胞内环境与体外环境的渗透压平衡(赵峰等, 2006); 当 Na^+/K^+ -ATPase 活性表达发生异常时, 尤其是 Na^+/K^+ -ATPase 被抑制而活性下降时, 会伴随有细胞肿胀、细胞器溶剂等特征, 而调节 Na^+/K^+ -ATPase 活性的诸多因素中包含有氧化应激-自由基(徐瑞成, 张敏, 2004)。CK 普遍存在于动物的心脏、肌肉以及脑等组织的细胞浆和线粒体中, 作为一种重要激酶, 主要参与细胞内能量转运、肌肉收缩以及 ATP 再生等反应(Seraydarian, Abbot,

1976)。林金杏等(2007)在冷冻保存对野牦牛精子酶活性的影响研究中发现, 冷冻的野牦牛(*Bos mutus*)精子内 LDH 酶活性降低。陈田飞等(2004)在研究冷冻保存对家蚕(*Bombyx mori*)精液乳酸脱氢酶活性的影响中发现, 冷冻后家蚕精子中 LDH 活性下降。徐滨等(2013)发现经超低温冷冻保存后俄罗斯鲟鱼精子内 LDH 和 CK 的活性显著低于鲜精($P<0.05$); 与添加抗冻剂组酶活性相比, 未添加抗冻剂组酶活性显著降低($P<0.05$)。浦蕴惠等(2013)发现脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)精子经超低温冷冻后, Na^+/K^+ -ATPase 活性显著下降。 Na^+/K^+ -ATPase 是 ATP 酶的一种, 参与生物体的能量代谢、物质运输以及氧化磷酸化等重要生化过程(浦蕴惠等, 2013)。Babiak 等(2001)在研究超低温冷冻对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)精子受精率和酶活性影响中发现, 冷冻精子中 ATP 酶活性显著低于鲜精。闫秀明和张小雪(2011)在研究中发现, 黄鳢精子经冷冻保存后, 冷冻精子中 ATP 酶活性显著下降。黄晓荣等(2012)研究结果表明, 经过冷冻保存后大黄鱼精子内 CK 酶活性显著低于鲜精($P<0.05$)。在研究罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergi*)胚胎超低温冷冻保存中发现, 冷冻胚胎中 LDH、ATP 酶和 CK 三种能量代谢酶活性均显著下降(黄晓荣等, 2010b)。本研究中, 经过超低温冷冻保存后, 未冷冻组和冷冻组中 LDH、 Na^+/K^+ -ATP 和 CK 3 种能量代谢酶活性均显著低于对照组($P<0.05$); 同样, 与未冷冻组相比, 冷冻组中 LDH、 Na^+/K^+ -ATP 和 CK 3 种酶活性均有所下降。分析原因可能是自然状态下, 胚胎内的酶活性足以能够保证胚胎的正常发育, 经过冷冻后, 胚胎机体的内部结构如细胞膜收缩或膨胀, 一旦细胞膜破碎, 膜内的组织结构会受到不同程度的破坏和损伤, 从而这些结构的损伤导致胚胎中酶活性下降。同时, 同样与对照组相比, 未冷冻组 LDH、 Na^+/K^+ -ATP 和 CK 3 种酶活性相比冷冻组下降的幅度较小, 原因可能是: 与冷冻损伤相比, 抗冻剂对胚胎的损伤要相对较小, 冷冻对胚胎的损伤要远大于抗冻剂。本研究中配制的 3 种玻璃化液对胚胎中 6 种酶的影响不同, 发现 PMGT 对 SOD 的影响较小, PM 和 PMGT 对 CK 的表达影响小于 PMG。PM 对 Na^+/K^+ -ATPase 的影响要小于其他两种玻璃化液, 综合来看 PM 对胚胎的保护作用要比其他两种玻璃化液好。

3.2 超低温冷冻对抗氧化酶活性的影响

由超氧化物歧化酶SOD、谷胱甘肽过氧化物酶GSH-Px等抗氧化酶组成的抗氧化体系,是防御脂质过氧化损伤的一种保护机制,在精子中能够维持精子活力和受精率(Aitken, Baker, 2004; Alvarez, Storey, 1989; Sikka, 2004; Bilofeu et al., 2001)。

SOD作为抗氧化体系中重要的抗氧化酶,主要作用是清除生物体内过多的氧自由基,降低氧化损伤程度,SOD酶活性水平是判断外界环境胁迫或氧化损伤的重要参数(Lynch et al., 2011; Sun et al., 1988)。GSH-Px是一种催化过氧化氢分解的重要的抗氧化酶,能够将过氧化氢还原为水和分子氧,降低过氧化氢对生物体的损伤,起到保护细胞膜结构和功能完整的双重作用;同时,具有清除脂质过氧化物的能力(黄晓荣等, 2009, 2010b)。MDA作为膜脂过氧化指标,体现了细胞膜脂过氧化程度,同时,间接地反映了细胞受活性氧(ROS)攻击的强弱(黄晓荣等, 2010a)。

研究表明,在哺乳动物精子冷冻保存研究中,精子在冷冻和解冻过程中,会导致抗氧化酶水平降低(Bilodeau et al., 2000; Ball et al., 2000)。在适宜的寒冷状态下,大鼠(*Rattus norvegicus*)组织中GSH-Px酶活性显著提高;同样,将野鼠(*Microtus agrestis*)从22℃转移至8℃生长时,GSH-Px酶活性上升43%,这一现象的主要原因是低温下ROS大量产生时发生了变化,促进了ROS的清除,与抗冻是有一定相关性(Selman et al., 2000)。Zhang等(2013)研究发现,大鼠冷冻颗粒细胞中SOD酶活性显著低于新鲜颗粒细胞,同时该研究还表明,颗粒细胞的氧化损伤是由冷冻诱导产生的。冷冻对鱼类酶活性的影响与哺乳动物是相一致的。长鳍篮子鱼精子和大黄鱼精子经过超低温冷冻保存后,其精子内SOD酶的活性均显著低于鲜精(黄晓荣等, 2012, 2009)。真鲷(*Pagrus major*)精子经过冷冻保存48个月,精子中SOD酶活性显著下降,冷冻保存26个月,MDA酶活性显著升高,且冷冻保存73个月时MDA酶活性达到最高(Chen et al., 2010)。章龙珍等(2009)研究表明冷冻后俄罗斯鲟鱼精子中的GSH-Px活性较鲜精中的显著下降。任俊玲等(2013)研究发现解冻后猪(*Sus scrofa*)精子中MDA酶活性极显著高于鲜精。Partyka等(2012)研究发现,经冷冻保存后,鸡精浆和精子中MDA酶活性均

显著性升高。此外,Thuwanut等(2010)在猫精子冷冻保存研究中发现,体外补充SOD、GSH-Px等抗氧化酶在一定程度上能提高精子活力、质膜完整性和DNA完整性,该研究从反面证明了冷冻导致精子内抗氧化酶活性的降低。

在本研究中,经超低温冷冻保存后,未冷冻组和冷冻组中SOD和GSH-Px酶活性均显著低于对照组($P<0.05$),原因可能是在冷冻过程中,冷冻对胚胎细胞组织造成的损伤,破坏了机体的抗氧化体系,抗氧化酶活性降低而不能及时清除在冷冻中形成的过多的ROS,导致胚胎氧化损伤而不能恢复正常的发育能力。本研究中,冷冻组中MDA酶活性均高于对照组($P<0.05$),原因可能是冷冻使得抗氧化酶活性降低,不能及时清除胚胎细胞内过多的自由基,与脂质发生氧化反应,导致MDA酶活性增加。

4 结论

本研究通过对3组胚胎内6种能量代谢酶和抗氧化酶活性的检测,从生理生化角度分析了冷冻和抗冻剂对胚胎的损伤,从酶活性检测结果可以看出,超低温冷冻破坏了机体内的抗氧化体系,使胚胎细胞内的能量代谢酶、一些抗氧化酶减少以及脂质过氧化的损伤,导致胚胎不能恢复正常发育。本研究发现,玻璃化液PM对CK和 N_5^+/K^+ -ATPase活性的影响较小,说明对胚胎具有一定的保护作用。在以后的胚胎冷冻保存中,适当的寻求一种抗氧化剂,将其添加到胚胎的玻璃化液中,会对冷冻对胚胎的氧化损伤有所降低。

参考文献

- 陈松林. 2002. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望[J]. 水产学报, 26(2): 161-168. (Chen S L. 2002. Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos[J]. Journal of Fisheries of China, 26(2): 161-168.)
- 陈田飞, 吴大洋, 李春峰. 2004. 冷冻保存对家蚕精液乳酸脱氢酶活性的影响[J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 26(6): 764-768. (Chen T F, Wu D Y, Li C F. 2004. Effects of cryopreservation on the activity of lactate dehydrogenase in silkworm sperm[J]. Journal of Southwest Agricultural University (Natural science), 26(6): 764-768.)

- 陈亚坤. 2005. 超低温保存对真鲷精子质量的影响[D]. 中国科学院研究生院(海洋研究所). 硕士学位论文, 导师: 李军, pp. 32-39. (Chen Y K. 2005. The effect of cryopreservation on sperm quality of red sea bream (*Pagrosomus major*) [D]. Thesis for M.S., Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Supervisor: Li J, pp. 32-39.)
- 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 2009. 超低温冷冻对长鳍篮子鱼精子中几种酶活性的影响[J]. 海洋科学, 33(7): 16-22. (Huang X R, Zhang L Z, Zhuang P, et al. 2009. Effects of cryopreservation on enzyme activity of *Siganus canaliculatus* spermatozoa[J]. Marine Sciences, 33(7): 16-22.)
- 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 2010a. 超低温冷冻对斑尾刺虾虎鱼卵中酶活性的影响[J]. 海洋渔业, 32(1): 48-53. (Huang X R, Zhang L Z, Zhuang P, et al. 2010. Effects of cryopreservation on enzyme activity in *Acanthogobius ommaturus* ovum[J]. Marine Fisheries, 32(1): 48-53.)
- 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 2010b. 超低温保存对罗氏沼虾胚胎中几种酶活性的影响[J]. 海洋渔业, 32(2): 166-171. (Huang X R, Zhang L Z, Zhuang P, et al. 2010. Effects of cryopreservation on enzyme activity in embryo of *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Marine Fisheries, 32(2): 166-171.)
- 黄晓荣, 章龙珍, 庄平, 等. 2012. 超低温冷冻保存对大黄鱼精子酶活性的影响[J]. 海洋渔业, 34(4): 438-443. (Huang X R, Zhang L Z, Zhuang P, et al. 2012. Effects of cryopreservation on enzyme activity of spermatozoa in *Pseudosciaena crocea*[J]. Marine Fisheries, 34(4): 438-443.)
- 林金杏, 阎萍, 郭宪, 等. 2007. 冷冻保存对野牦牛精子酶活性的影响[J]. 中国草食动物, 27(2): 10-12. (Lin J X, Yan P, Guo X, et al. 2007. Effects of cryopreservation on enzyme activities of wild yak sperm[J]. China Herbivores, 27(2): 10-12.)
- 柳凌, 刘宪亭, 章龙珍, 等. 1997. 鱼类、水生生物配子及胚胎低温冷冻保存研究进展[J]. 淡水渔业, 27(3): 13-17. (Liu L, Liu X Z, Zhang L Z, et al. 1997. Progress of cryopreservation of fish gametes and embryos[J]. Freshwater Fisheries, 27(3): 13-17.)
- 浦蕴惠, 许星鸿, 高焕, 等. 2013. 超低温冷冻对脊尾白虾精子几种酶活性的影响[J]. 水产学报, 37(1): 101-108. (Pu Y H, Xu X H, Gao H, et al. 2013. Effects of cryopreservation on enzyme activity of *Exopalaemon carinicauda* spermatozoa[J]. Journal of Fisheries China, 37(1): 101-108.)
- 任俊玲, 马恒东, 李和平. 2013. 猪精液冷冻过程中的脂质过氧化损伤[J]. 繁殖生理, 49(3): 31-33. (Ren J L, Ma H D, Li H P. 2013. The lipid peroxidation damage of boar sperm in the process of cryopreservation[J]. Reproduction and Physiology, 49(3): 31-33.)
- 唐学玺, 张培玉. 2000. 葱对黑鲷超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 24(3): 217-220. (Tang X X, Zhang P Y. 2000. Effects of anthracene on activity of superoxide dismutase in *Sebastes fuscescens*[J]. Journal of Fisheries of China, 24(3): 217-220.)
- 田永胜, 陈松林, 严安生. 2004. 大菱鲆胚胎玻璃化方法研究[J]. 中国水产科学, 11(2): 166-169. (Tian Y S, Chen S L, Yan A S. 2004. Study on vitrification method of turbot, *Scophthalmus maximus*, embryos[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 11(2): 166-169.)
- 田永胜, 陈松林, 严安生. 2005. 牙鲆胚胎玻璃化冷冻技术研究[J]. 高技术通讯, 15(3): 105-110. (Tian Y S, Chen S L, Yan A S. 2005. Study on vitrification technique of Japanese flounder (*Paralichys olivaceus*) embryos[J]. High Technology Letters, 15(3): 105-110.)
- 徐滨, 江琪, 庄平, 等. 2013. 超低温冷冻对俄罗斯鲑鱼精浆和精子酶活性的影响[J]. 淡水渔业, 43(1): 9-13. (Xu B, Jiang Q, Zhuang P, et al. 2013. Effects of cryopreservation on the activities of enzyme activities of seminal plasma semen in *Acipenser gueldenstaedti*[J]. Freshwater Fisheries, 43(1): 9-13.)
- 徐瑞成, 张敏. 2004. Na^+/K^+ -ATP酶抑制引起的细胞凋亡和杂交性细胞凋亡[J]. 细胞生物学杂志, 26: 467-470. (Xu R C, Zhang M. 2004. The apoptosis and hybrid cell death induced by the Na^+/K^+ -ATPase blocking[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 26: 467-470.)
- 闫秀明, 张小雪. 2011. 超低温冷冻对黄鳍精子中几种酶活性的影响[J]. 水生生物学报, 35(5): 882-886. (Yan X M, Zhang X X. 2011. Effects of cryopreservation on enzyme activity of *Monopterus albus* spermatozoa[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 35(5): 882-886.)
- 张克烽, 张子平, 陈云, 等. 2007. 动物抗氧化体系中主要抗氧化酶基因的研究进展[J]. 动物学杂志, 42(2): 153-160. (Zhang K F, Zhang Z P, Chen Y, et al. 2007. Antioxidant defense system in animals[J]. Chinese Journal of Zoology, 42(2): 153-160.)
- 张轩杰. 1996. 冷冻保存对鱼类胚胎DNA、LDH和G6PD的影响[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 19(2): 77-81. (Zhang X J. 1996. Cryopreservation effects on DNA, LDH and G6PD isoenzyme of embryo in fishes[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University,

- 19(2): 77-81.)
- 章龙珍, 江琪, 庄平, 等. 2009. 超低温对俄罗斯鲟鱼精子抗氧化酶活性的影响[J]. 大连水产学院学报, 24(6): 504-508. (Zhang L Z, Jiang Q, Zhuang P, et al. 2009. Effects of cryopreservation on antioxidant activities of semen enzymes in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedii*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 24(6): 504-508.)
- 章龙珍, 鲁大椿, 柳凌, 等. 2002. 泥鳅胚胎玻璃化液超低温冷冻保存研究[J]. 水产学报, 26(3): 213-218. (Zhang L Z, Lu D C, Liu L, et al. 2002. Cryopreservation of loach, *Misgurnus anguillicandatus* embryos by vitrification[J]. Journal of Fisheries of China, 26(3): 213-218.)
- 赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 2006. 盐度驯化对史氏鲟鳃 Na^+/K^+ -ATP酶活性、血清渗透压及离子浓度的影响[J]. 水产学报, 30(4): 444-449. (Zhao F, Zhuang P, Zhang L Z, et al. 2006. The influence of salinity acclimation on activity of Na^+/K^+ -ATPase in branchial epithelium, concentration of ions and osmolarity in serum of *Acipenser schrenckii*[J]. Journal of Fisheries of China, 30(4): 444-449.)
- 朱士恩, 张忠诚. 1996. 牛体外受精扩张囊胚的玻璃化超低温冷冻保存及移植技术的研究[J]. 中国奶牛, 4: 17-19. (Zhu S E, Zhang Z C. 1996. Vitrification cryopreservation and transplantation techniques of expanded blastocysts of cow in vitro fertilization[J]. China Dairy Cattle, 4: 17-19.)
- Aitken R J, Baker M A. 2004. Oxidative stress and male reproductive biology[J]. Reproduction, Fertility and Development, 16(5): 581-588.
- Alvarez J G, Storey B T. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation[J]. Gamete Research, 23 (1) 77-90.
- Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, et al. 2001. Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa[J]. Theriogenology, 56 (1): 177-192.
- Ball B A, Gravance C G, Medina V, et al. 2000. Catalase activity in equine semen[J]. American Journal of Veterinary Research, 61(9): 1026-1030.
- Bilodeau J F, Blanchette S, Gagnon I C, et al. 2001. Thiols prevent H_2O_2 -mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen[J]. Theriogenology, 56(2): 275-286.
- Bilodeau J F, Chatterjee S, Sirard M A, et al. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing[J]. Molecular Reproduction Development, 55(3): 282-288.
- Chen Y K, Liu Q H, Li J, et al. 2010. Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm[J]. Cryobiology, 61: 189-193.
- Koh I C C, Yokoi K, Tsuji M, et al. 2010. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper *Epinephelus septemfasciatus*[J]. Cryobiology, 61(3): 263-267.
- Li H J, Jae H B, Won S E, et al. 2001. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells [J]. Free Radical Biology and Medicine, 31(11): 1509-1519.
- Lynch P T, Siddika A, Johnston J W, et al. 2011. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos [J]. Plant Science, 181: 47-56.
- Nilar S, Hisashi C, Toshihisa A, et al. 2004. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*[J]. Fisheries Science, 70(3): 360-365.
- Partyka A, Lukaszewicz E, Niz 'an'ski W. 2012. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen[J]. Theriogenology, 77: 1497-1504.
- Rall W F, Fahy G M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at $-196\text{ }^\circ\text{C}$ by vitrification[J]. Nature, 313: 573-575.
- Selman C, McLaren J S, Himanka M J, et al. 2000. Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammal[J]. Free Radical Biology and Medicine, 28(8): 1279-1285.
- Seraydarian M W, Abbot B C. 1976. The role of the creatine phosphokinase system in muscle [J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 8(10): 741-746.
- Sikka S C. 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology[J]. Journal of Andrology, 25(1): 5-18.
- Sun Y Y, Yin Y, Zhang J F, et al. 2007. Bioaccumulation and ROS generation in liver of freshwater fish, goldfish *Carassius auratus* under HC Orange No.1 exposure[J]. Environmental Toxicology, 22(3): 256-263.

- Sun Y, Oberley L W, Li Y. 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase[J]. *Clinical Chemistry*, 34: 497-500.
- Tanaka S, Kuriyama I, Nakai T, et al. 2003. Susceptibility of cultured juveniles of several marine fish to the *Sevenband grouper nervous necrosis virus*[J]. *Journal of Fish Disease*, 26(2): 109-115.
- Tanaka S, Takagi M, Miyazaki T. 2004. Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* thunberg, at the grow-out stage[J]. *Journal of Fish Diseases*, 27(7): 385-399.
- Thuwanut P, Chatdarong K, Johannisson A, et al. 2010. Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa effects of *in vitro* antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction[J]. *Theriogenology*, 73: 1076-1087.
- Tian Y S, Qi W S, Jiang J, et al. 2013. Sperm cryopreservation of sex-reversed seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*[J]. *Animal Reproduction Science*, 137(3-4): 230-236.
- Tokinori I, Yasushi O, Kazuyuki M, et al. 2004. Identification of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between *Striped jack nervous necrosis virus* and *Sevenband grouper nervous necrosis virus*[J]. *Journal of Virology*, 78(3): 1256-1262.
- Wai-sum O, Chen H, Chow P H. 2006. Male genital antioxidant enzymes- their ability to preserve sperm DNA integrity[J]. *Molecular Cellular Endocrinology*, 250(1-2): 80-83.
- Wallace R A, Selman K. 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians[J]. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 16(3): 175-201.
- Zhang J M, Wang H C, Wang H X, et al. 2013. Oxidative and activities of caspase- 8, - 9, and - 3 are involved in cryopreservation-induced apoptosis in granulosa cells [J]. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 166: 52-55.
- Zhang T, Rawson D M, John Morris G. 1993. Cryopreservation of pre-hatch embryos of zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Aquatic Living Resources*, 6: 145-153.

(责任编辑 靳晓霞)

更正启事

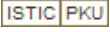
《农业生物技术学报》2014年第22卷第3期第392、393、394页文章的图1、图2和图3有误,在此向作者和读者致歉!更正如下:

图1、图2和图3中 *Hind* II 更正为 *Hind* III; 图2中 *Neo* I 更正为 *Nco* I。

超低温冷冻保存对七带石斑鱼胚胎酶活性的影响

作者: [姜静](#), [田永胜](#), [翟介明](#), [陈松林](#), [JIANG Jing](#), [TIAN Yong-Sheng](#), [ZHAI Jie-Ming](#), [CHEN Song-Lin](#)

作者单位: [姜静, JIANG Jing\(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛266071; 上海海洋大学, 水产与生命学院, 上海201306\)](#), [田永胜, 陈松林, TIAN Yong-Sheng, CHEN Song-Lin\(农业部海洋渔业可持续发展重点实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛266071\)](#), [翟介明, ZHAI Jie-Ming\(山东莱州明波水产有限公司, 莱州, 261418\)](#)

刊名: [农业生物技术学报](#) 

英文刊名: [Journal of Agricultural Biotechnology](#)

年, 卷(期): 2014, 22(4)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_nyswjsxb201404011.aspx