

生殖細胞冷凍保存技術的現況

朱惠真、陳力豪、胡艷方、蔡惠萍、張錦宜

水產試驗所水產養殖組

冷凍保存技術發展至今雖然已逾 60 餘年，但相關領域之研究隨著科技的進步，仍持續不斷的精進，為包括人類在內的動物之生殖生理研究提供新的契機。冷凍保存的範疇包括生殖細胞（精子與卵子）、胚胎細胞、卵裂細胞（blastomeres）以及生殖組織（卵巢及精巢），其中以精子的冷凍保存技術發展的歷史最悠久及完整。以下便就精子及卵子在冷凍過程中所需注意的事項加以說明。

影響冷凍過程中細胞 DNA 完整性的因素

DNA 在活體細胞中容易因為各種化學物質及物理因素而改變穩定度，有些化學及物理因子在冷凍保存的過程中就會產生影響 DNA 結構穩定度的物質。舉例而言，冷凍保存的過程中，因為抗凍劑及稀釋液的添加而造成滲透壓的改變，造成染色體的結構改變而提高細胞內姊妹染色體單體交換（sister chromatid exchange, SCE）的機率。高滲透壓的情況下，很容易造成 DNA 的損壞或者是抑制 DNA 的修復，進而造成 DNA 的畸變（chromosomal aberrations）。在冷凍的過程中，有 2 種情況會造成 DNA 的雙股斷裂

（double-strand breaks, DSBs），其一是因為滲透壓的提高而導致細胞的皺縮，在核仁內的巨大分子產生推擠和扭曲，造成染色體的過度堆疊與 DNA 的過度緊繃，而使得此處的 DNA 非常容易斷裂。另一種情形則是因為滲透壓的提高，導致細胞內的自由基產生，使 DNA 的雙股結構易被破壞。這些破壞皆會影響冷凍保存細胞的生理活性。

影響卵細胞冷凍保存的因素

卵細胞不僅提供遺傳訊息給胚胎，同時也供應胚胎能量、營養鹽以及粒線體基因等。卵細胞的營養成分來自於卵黃，卵黃含有高量的脂質、蛋白質及多醣體，高量的脂質是冷凍保存成功的條件因素之一（Zhou and Li, 2013）。以下的因素會影響卵的冷凍保存，其一是紡錘絲的完整性（spindle integrity），根據目前的研究可知，形成紡錘絲的微管對於溫度的改變具有敏感性，並且很容易解聚化（depolymerize），在經過一段時間的常溫誘導後，紡錘絲雖然會再度回復聚集（repolymerize），但細胞分裂的正確性卻已經受到影響（Bromfield et al., 2009），因此玻璃化冷凍法（vitrification）的卵細胞存

活度會優於慢速結凍的卵細胞 (slow-freezing oocyte)。其二是非整倍體的染色體形成。細胞在進行減數分裂的過程中，紡錘絲能將染色體對等的排列，如果有染色體不正常的分離或是不分離，就會形成非整倍體的染色體。目前的研究發現，冷凍保存的卵細胞經過解凍，然後進行人工授精的過程中，會產生多精子受精的現象，同時造成非整倍體的染色體形成 (BosMikich and Whittingham, 1995)。其三是姊妹染色體單體交換 (SCE)，SCE 是細胞突變明顯的指標，在老鼠的胚胎研究上顯示，卵細胞在冷凍保存及活化的過程中皆會產生 SCE。此外，卵子冷凍的過程中若加入含 DMSO 的抗凍劑，不可於室溫下放置過久，否則會增加 SCE 的形成 (Kopeika et al., 2015)。

影響精子冷凍保存的因素

回顧精子低溫生物學及冷凍保存技術的發展，可追溯至 16 世紀中，其最主要的研究是起始於 1950 至 1960 年代，因為乳品製造業需要一種能夠長期儲存公牛精子的方法而開啟，更因為相關技術有需要持續改進之動力推動下，促使精子冷凍保存漸漸演變成一門重要的學科。各種精液冷凍保存方法，皆是希望能暫時抑制精子的活動，降低代謝、減緩能量的浪費，一般的方法有兩種，其一是降低保存的溫度使精子的代謝下降，另外則是控制稀釋液的 pH 值，使精子處於弱酸的狀態下減緩其活力。現行的精液保存方法按保存的溫度可以分為常溫 (15–25℃)、低溫 (0–5℃) 以及冷凍 (-79℃ 或 -196℃) 保

存等 3 種。常溫保存是利用稀釋液創造弱酸環境，抑制精子的代謝及活動力，並添加外源性的營養鹽及抗菌物質以抑制細菌的孳生，目前主要應用在豬、羊及牛的精液保存，其他生物則多採用冷凍保存。

一般精子冷凍保存的效果會受到精子本身的優劣以及 DNA 完整性的影響。精子在冷凍過程中，冷凍損傷會造成精子頭部和尾部的外膜破裂，而造成精子死亡，使冷凍精子內的異檸檬酸脫氫酶 (isocitrate dehydrogenase, NAD⁺) 及蘋果酸脫氫酶 (malate dehydrogenase) 的濃度明顯低於新鮮精子，進而影響其活力與質量 (王等, 2012)。其次是由於精子的數目較卵細胞多，在受精過程中，精子最重要的功能是在提供遺傳物質，因此在精液冷凍保存的過程中，最需要注意的便是確立其 DNA 的完整性。目前已知測定精子 DNA 是否完整的方法有 TUNEL、AO assay、SCSA、SCD 等。TUNEL 的檢測原理是當細胞發生凋亡時，會激活細胞中的內切酶，進而切斷基因體 DNA，造成 180–200 bp 的 DNA ladder，利用含有異硫氰酸螢光素 (fluorescein isothiocyanate hydrochloride, FITC) 標記的 dUTP 標記，可從顯微鏡檢測精子細胞是否有細胞凋亡的現象。AO assay (acridine orange, AO) 是 AO 結合雙股 DNA 時，若以單體方式結合，經 470–490 nm 波長之能量激發後，會散出綠色螢光；若以聚合體方式結合，則會散出紅色螢光，藉此來判斷 DNA 的完整性。SCSA 法是以精子染色質結構分析 (sperm chromatin structure assay) 為主，利用流量式細胞儀以雷射激發，測量精子 DNA 的斷裂值。SCD

法則是依據 DNA 完整的精子會產生出擴大的光量，損傷的精子則是不產生光量或是光量很小的原理，藉由測量精子染色質的消散率 (sperm chromatin dispersion)，評估 DNA 的完整性 (Kopeika et al., 2015)。

目前主要的魚類精子抗凍液種類

冷凍過程中，細胞外首先容易形成冰晶，使精子因過度脫水，對細胞膜及細胞內的結構造成損傷。為減少冰晶形成所造成的損傷及滲透壓的改變，目前精子冷凍保存液主要是使用甘油、DMSO、甲醇、乙醇、丙二醇等作為抗凍保護劑。鉀離子和鈉離子是魚類精漿中重要的組成成分，對維持滲透壓有重要的作用，研究發現，鉀離子可抑制精子的活動，鈉離子可促進精子的活動，鈉離子和鉀離子須維持一定的比例才不至在冷凍的過程傷害精子 (齊等，2014)。甘油主要使用於海水魚類的精子冷凍保存，除了可以保護精子頂體之外，還可以濃縮胞內的水分，降低溶液中的鹽濃度和冷凍液的滲透壓，而葡萄糖和乳糖在高濃度時可以抵銷甘油的部分負面作用 (陳等，2008)。另外，海藻糖能夠在細胞脫水的環境下，在細胞膜外形成一層保護膜，抑制鈣離子的作用以減緩滲透壓的瞬間變化，保護細胞的結構 (陳等，2008)。在淡水魚類的精子冷凍保存應用較廣泛的是甲醇。丙二醇則為一種滲透性的小分子物質，有作為抗凍劑必須具備的滲透速度快、毒性較小的特點，主要經過滲入精子的細胞內與水分子結合，增加抗凍液的黏性，弱化結晶的過程，減少精子再結凍過程的損

傷 (韓等，2014)。DMSO 因其具備有高滲透性和與精子膜上磷脂層作用而廣泛的應用在多種精液保存的抗凍劑中 (王等，2012)。

冷凍保存在養殖上的重要性

冷凍保存是水產種原庫保種育種不可或缺的項目，目前國內的水產種原保存以活體蓄養為主，冷凍保存只研究了少部分的魚貝類精液，卵細胞的冷凍保存部分仍尚未成功，細胞培養成功的種類亦不多。大致上水產種原庫可分成兩大部分，即儲存所 (repository) 以及資料庫 (database)，前者是整合協調遺傳資源之供應、保存及利用，後者為建立完善種原或遺傳資訊之整理、儲存、交換及擷取的系統機制。隨著全球環境變遷，平均溫度逐年上升，不僅我們可以利用的環境資源日趨減少，在地球上的生物也會因為環境的改變造成物種的多樣性越來越少。因此，我們必須要在有限的時間內，減緩物種消失的壓力，成立水產種原庫是勢在必行的趨勢，發展冷凍保存技術更是選項之一。

環境的變遷會對水產養殖造成莫大的影響，透過建立重要經濟魚種或瀕臨滅絕魚類的精子、細胞、卵子或胚胎的冷凍保存技術，將魚類配子以不同的方式長期保存起來，這樣就可以避免因為過度撈捕或因為環境的自然淘汰而造成的生物滅絕，也可以維持長期人工繁養殖水產生物的基因多樣性，同時亦可提供魚類遺傳育種材料，加速魚蝦貝類遺傳育種研究 (郭，2014)，其對於保種或是育種而言皆是不可或缺的重要技術。