



姚静婷, 苏胜齐, 徐红艳. 鱼类卵巢组织及卵母细胞的冷冻保存研究进展 [J]. 水产学报, 2026, 50(5): 059105.

Yao J T, Su S Q, Xu H Y. Recent advances in the studies on cryopreservation of ovarian tissues and oocytes in fish species [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2026, 50(5): 059105 (in Chinese).

· 综述 ·

鱼类卵巢组织及卵母细胞的冷冻保存研究进展

姚静婷, 苏胜齐*, 徐红艳*

(西南大学水产学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室,
水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆 402460)

摘要: 卵巢组织与卵母细胞的冷冻保存是保护野生鱼类遗传资源和经济鱼类种质资源的重要技术。近年来, 各种功能性冷冻保护剂 (CPAs) 和新型冷冻技术不断涌现, 但卵巢细胞的冷冻损伤仍无法完全避免。冷冻保存过程中, 样品自身的低温敏感性、CPAs 的选用、脱水降温及解冻复水等过程均会对细胞造成损伤, 如冰晶形成、脂质相变及氧化应激等, 导致细胞结构和功能受损, 进而影响卵巢细胞的存活率和发育潜力。本综述系统介绍了鱼类卵巢组织及卵母细胞冷冻保存技术的发展现状; 阐述了冷冻保存过程中细胞所受的各类损伤及其发生机制, 主要包括机械损伤、氧化应激、代谢异常及遗传物质变异等; 并概述了目前鱼类卵巢组织及卵母细胞冷冻保存的优化策略与先进技术。最后, 本文就鱼类母系种质库的构建技术研究提出展望, 旨在进一步揭示卵母细胞冷冻损伤的分子机制以制定针对性优化策略, 从而建立高效且标准化的鱼类卵巢组织及卵母细胞冷冻保存技术, 助力水产养殖业的可持续发展与濒危水生动物遗传资源的保护。

关键词: 鱼类; 卵巢组织冻存; 卵母细胞冻存; 冷冻损伤机制; 优化策略

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

近年来, 在过度捕捞与生境变化的双重压力下, 全球鱼类资源正面临严峻威胁, 部分物种已濒临灭绝。目前全球濒危鱼类超过 4 046 种, 较 2023 年增加 268 种 (世界自然保护联盟, IUCN, 2025)。因此, 为实现濒危鱼类的资源保护和水产养殖业的可持续高质量发展, 其种质资源保存工作显得愈发重要^[1]。鱼类种质冷冻保存技术主要通过超低温环境对雌性生殖细胞、雄性生殖细胞及胚胎进行长期保存, 可为濒危物种遗传信息的

保存提供有效途径, 避免因自然灾害或生态破坏等因素所造成的遗传资源丢失, 同时还能通过保存优质种质资源, 提高水产养殖品种的遗传多样性与渔业产值, 为水产养殖业的可持续发展提供关键技术和资源支撑。

为建立具备生存、繁殖和种群恢复能力的种质资源群体, 需要以生殖细胞的形式保存其单倍体基因组。目前, 鱼类的精子冷冻保存技术已较为成熟, 冷冻保存后的成熟精子与精原细胞已在

收稿日期: 2025-10-20 修回日期: 2026-01-09

资助项目: 国家重点研发计划 (2022YFD2400902)

第一作者: 姚静婷, 从事鱼类种质资源保存研究, E-mail: 13262973352@163.com

通信作者: 苏胜齐, 从事渔业资源与环境研究, E-mail: sushengqi@swu.edu.cn;

徐红艳, 从事鱼类遗传育种研究, E-mail: xuhzyqh@163.com



鲑科 (Salmonidae)、鲤科 (Cyprinidae) 和鲮科 (Cypriodontidae) 等多种野生与养殖鱼类繁殖生产中得到了成功应用^[2]。然而, 精子仅能保存父系基因组, 为完整保存种质资源, 对母系遗传信息(如卵母细胞中的线粒体 DNA) 的保存同样不可或缺。鱼类卵母细胞(尤其是成熟期卵母细胞) 的冷冻保存至今仍面临技术瓶颈, 由于其高度特化的细胞结构与细胞器组成, 使得成熟期卵母细胞对低温损伤极为敏感。与体细胞相比, 鱼类卵母细胞在冷冻保存方面存在以下困难: ① III 期及以后的鱼类卵母细胞体积巨大 (> 200 μm), 且细胞质中富含卵黄颗粒, 导致胞质黏度极高, 这将严重阻碍冷冻过程中水分和冷冻保护剂的跨膜渗透与均匀扩散, 引发细胞内冰晶形成和溶液效应损伤; ② 卵母细胞膜脂质相变温度高, 低温环境下将更早发生脂质相变, 改变其流动性和通透性, 致使细胞功能异常; ③ 低温或渗透压波动极易触发皮层颗粒提前胞吐, 致使卵膜硬化并引发非正常激活, 使得卵母细胞丧失发育潜能; ④ 减数分裂期, 纺

锤体对低温极度敏感, 低温会导致其解聚, 复苏后即便重组也常出现染色体排列错误与分离异常, 从而引发细胞的染色体组非整倍化等遗传缺陷^[3]。

近年来, 卵巢组织冷冻保存成为鱼类母系遗传信息保存研究的新方向。卵巢组织中富含卵原细胞和未成熟卵母细胞, 与成熟卵子相比, 这些细胞体积小、结构简单、对温度变化的敏感性相对较低, 具有较强的抗冻能力^[3]。鱼类卵巢组织及卵母细胞的冷冻保存与复苏通常包括以下步骤: ① 配制冷冻保存液; ② 将完整卵巢、卵巢组织块或分离获得的卵母细胞浸入冷冻保存液中脱水平衡; ③ 样品冻存前处理: 以 0.3~50.0 °C/min 的速率进行程序性降温至-80°C, 或利用液氮及蒸汽快速降温以使样品玻璃化; ④ 将冻存管中的样品浸入液氮进行冷冻保存; ⑤ 在液氮中保存一定时间后, 水浴解冻以复苏样品; ⑥ 在培养基或含有冷冻保护剂 (CPAs) 的溶液中进行复水以尽量去除样品组织及细胞内的渗透性 CPAs。复水后的组织或细胞即可进行后续实验 (图 1, 表 1), 如细胞的存

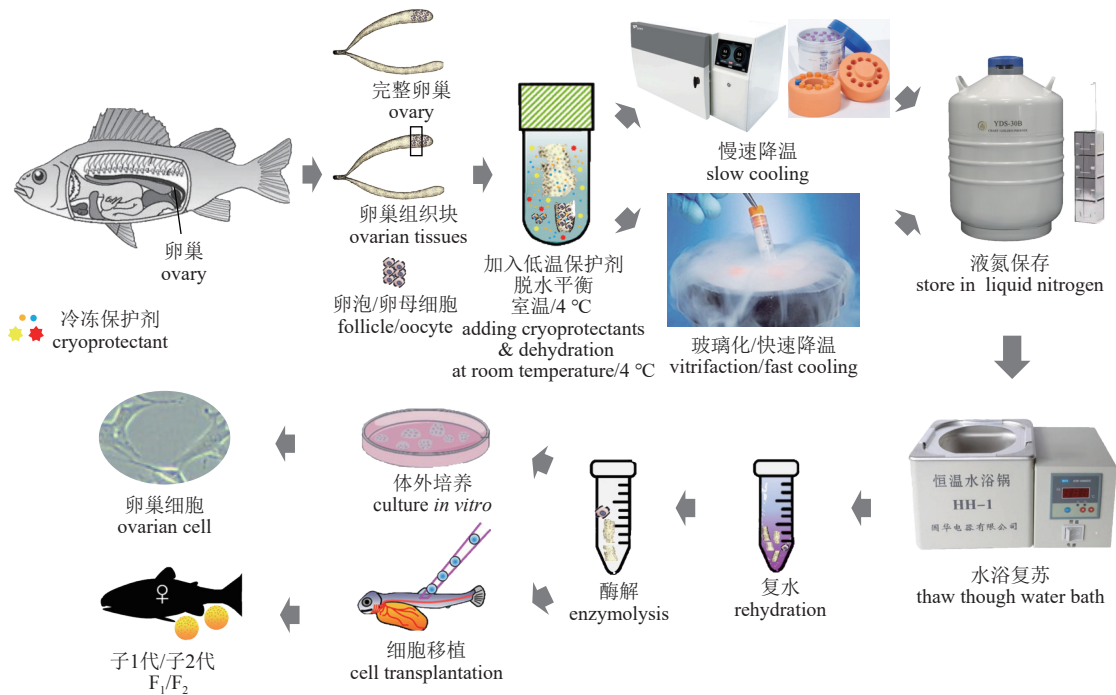


图 1 鱼类卵巢组织及卵母细胞超低温保存、复苏及应用

Fig. 1 Cryopreservation, thawing processes, and applications of ovaries and/or oocytes in fish

活率检测、体外培养及移植等。

本文基于 Web of Science、PubMed 和知网数据库, 以“冷冻保存”、“卵母细胞”与“卵巢”为核心关键词, 系统检索了近 20 年来以鱼类为主的水

生动物相关研究文献。通过归纳与综述, 旨在梳理鱼类卵巢组织与卵母细胞冷冻保存的研究现状, 总结关键技术步骤、损伤机制及前沿进展, 以期为鱼类母系种质资源冷冻保存技术研究以及相关

表 1 已报道的鱼类卵巢组织及卵母细胞冷冻保存技术的主要研究进展
Tab. 1 Studies on cryopreservation of ovarian tissues and/or cells in fish species

物种 species	组织/细胞 tissues/cell	存活率% viability	扩展剂 extender	冷冻保护剂 cryoprotectant	脱水及降温过程 dehydration and cooling	复水及解冻过程 rehydration and thawing	冻存时长 cryopreservation time	文献 reference
鲫 <i>Carassius auratus</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 51.7% II 期卵泡:	PBS	冻存液 I: 10% DMSO + 3% 蔗糖 + 3% BSA; 冻存液 II: 10% DMSO + 6% 蔗糖 + 6% BSA	冻存液 I 4 °C 平衡 30 min; 冻存液 I + II 4 °C 平衡 10 min; -1 °C/min 降温至 -80 °C; 转移入液氮	28 °C 水浴; 0.75 mol/L 蔗糖孵育 15 min; 0.375 mol/L 蔗糖孵育 15 min; 0.125 mol/L 蔗糖孵育 15 min; L-15 孵育	7 d	[4]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	卵巢组织	I 期卵泡: 76.8% II 期卵泡: 43.1% III 期卵泡: 8.7% IV 期卵泡: 1.3%	L-15	平衡液: 1.5 mol/L 甲醇 + 0.5 mol/L 蔗糖 15 min; 玻璃化液: 1.5 mol/L 甲醇 + 4.5 mol/L 丙二醇 90 s	平衡液 4 °C 平衡 15 min; 玻璃化液 4 °C, 90 s; 直接浸入液氮	28 °C 水浴; 1 mol/L 蔗糖孵育 1 min; 0.5 mol/L 蔗糖孵育 3 min; 0.25 mol/L 蔗糖孵育 5 min; L-15 孵育	2-7 d	[3]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	早期卵泡	I 期卵泡: 49.3% II 期卵泡: 69.4%	无钠 KCl 缓冲液	4 mol/L 甲醇 + 0.2 mol/L 葡萄糖	室温平衡 30 min; 2 °C 降温至 -12 °C, 2 °C/min; -12 °C 降温至 -40 °C, 0.3 °C/min; -40 °C 降温至 -80 °C, 10 °C/min; -80 °C 降温至 -160 °C, 50 °C/min; 转移入液氮	28 °C 水浴; 2 mol/L 甲醇孵育 10 min; 1 mol/L 甲醇孵育 10 min; 0.5 mol/L 甲醇孵育 10 min; L-15 孵育	10 min	[5]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	卵巢组织	I 期卵母细胞: 54.6% II 期卵母细胞: 23.7% 卵黄期卵母细胞: 12.6%	L-15	平衡液: 1.5 mol/L 甲醇 + 2.75 mol/L DMSO 7 min; 玻璃化液: 1.5 mol/L 甲醇 + 5.5 mol/L DMSO + 0.5 mol/L 蔗糖 90 s	平衡液 4 °C 平衡 7 min; 玻璃化液 4 °C, 90 s; 直接浸入液氮	28 °C 水浴; 1 mol/L 蔗糖孵育 1 min; 0.5 mol/L 蔗糖孵育 3 min; 0.25 mol/L 蔗糖孵育 5 min; L-15 孵育	7 d	[6]
澳洲彩虹鱼 <i>Melanotaenia fluviatilis</i>	卵巢组织	卵原细胞: 76.1%	EMEM	2.0 mol/L DMSO + 0.1 mol/L 海藻糖 + 1.5% BSA	4 °C 平衡 1 h; 4 °C 降温至 -80 °C, 1 °C/min; 转移入液氮	30 °C 水浴; EMEM + 5% FBS 孵育 3 次, 每次 20 min	24 h	[7]
俄罗斯鲟 <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	卵巢组织	卵原细胞: 55.7%	L-15	平衡液: 1.5 mol/L PG + 1.5 mol/L DMSO; 玻璃化液: 1.5 mol/L 丙二醇 + 5.5 mol/L DMSO	平衡液 22 °C 平衡 5 min; 玻璃化液 22 °C, 30 s; 直接放入液氮	10% FBS + 0.3 mol/L 海藻糖 5 min; 10% FBS + 0.1 mol/L 海藻糖 5 min; 10% FBS	24 h	[8]
美洲白鲟 <i>Acipenser transmontanus</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 15.0%	PBS	1.5 mol/L DMSO + 0.5% BSA + 50 mmol/L 葡萄糖	冰上平衡 10 min; 0 °C 降温至 -80 °C, 1 °C/min; 转移入液氮	10 °C 水浴; L-15 孵育 3 次, 每次 5 min	60 d	[9]
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	卵巢组织	生殖细胞: 72.9%	L-15	1 mol/L DMSO + 10% 蛋黄 + 1.5% BSA + 1.5% FBS + 0.1 mol/L 海藻糖	4 °C 平衡 60 min; 4 °C 降温至 -80 °C, 1 °C/min; 转移入液氮	10 °C 水浴	24 h	[10]

· 续表 1 ·

物种 species	组织/细胞 tissues/cell	存活率% viability	扩展剂 extender	冷冻保护剂 cryoprotectant	脱水及降温过程 dehydration and cooling	复水及解冻过程 rehydration and thawing	冻存时长 cryopreservation time	文献 reference
黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 90.0%	L-15	15% 丙二醇 + 0.2 mol/L 海藻糖 + 15% FBS	冰上平衡 60 min; -80 °C 降温 1 h; 转移入液氮	10 °C 水浴; L-15 孵育 10 min	7 d	[11]
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 65.0%	PBS	1.5 mol/L DMSO + 1.5% BSA + 0.1/ mol/L 葡萄糖	4 °C 平衡 60 min; 4 °C 降温至 -80 °C, 1 °C/min; 转移入液氮	26 °C 水浴; L-15 孵育 3 次, 每次 5 min	4 h	[12]
欧洲鳗鲡 <i>Anguilla anguilla</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 84.9%	L-15	平衡液: 1.5 mol/L 丙二醇和 1.5 mol/L DMSO; 玻璃化液: 3 mol/L 丙二醇和 3 mol/L DMSO	平衡液 4 °C 平衡 5 min; 玻璃化液 4 °C, 30 s; 转移入液氮	10 °C 水浴; 10% FBS + 0.3 mol/L 海藻糖 5 min; 10% FBS + 0.1 mol/L 海藻糖 5 min; 10% FBS	24 h	[13]
匙吻鲟 <i>Polyodon spathula</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 75.0%	L-15	1.3 mol/L DMSO + 10% FBS + 0.1 mol/L 海藻糖	4 °C 平衡 60 min; -80 °C 降温 1 h; 转移入液氮	25 °C 水浴; L-15 孵育 3 次, 每次 5 min	3 d	[14]
西伯利亚鲟 <i>Acipenser baerii</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 55.5%	PBS	1.5 mol/L 乙二醇 + 1.5% FBS + 0.5 mol/L 葡萄糖	4 °C 平衡 60 min; -80 °C 降温 1 h; 转移入液氮	38 °C 水浴	30 d	[15]
斜带髯鲷 <i>Haplogenys nitens</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 90.0%	L-15	15% 丙二醇 + 0.2 mol/L 海藻糖 + 15% FBS	冰上平衡 60 min 直接储存在 -80 °C	10 °C 水浴; L-15 孵育 10 min	7 d	[16]
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 73.8%	PBS	冻存液 I: 10% DMSO + 3% 蔗糖 + 3% BSA + 0.2% 茶多酚; 冻存液 II: 10% DMSO + 6% 蔗糖 + 6% BSA + 0.2% 茶多酚	冻存液 I 4 °C 平衡 30 min; 冻存液 I + II 4 °C 平衡 10 min; 4 °C 降温至 -80 °C, 1 °C/min; 转移入液氮	28 °C 水浴; 0.75 mol/L 蔗糖 15 min; 0.375 mol/L 蔗糖 15 min; 0.125 mol/L 蔗糖 15 min; L-15 孵育	7 d	[4]
褐鲟 <i>Salmo trutta</i>	卵巢组织	卵巢细胞: 40.3%	L-15	平衡液: 1.5 mol/L 甲醇 + 1.5 mol/L DMSO; 玻璃化液: 3 mol/L 丙二醇 + 3 mol/L DMSO	平衡液 23 °C 平衡 15 min; 玻璃化液 23 °C, 90 s; 直接浸入液氮	23 °C 水浴; L-15 + 10% FBS + 0.3 mol/L 海藻糖 1 min; L-15 + 10% FBS + 0.1 mol/L 海藻糖 3 min; L-15 + 10% FBS 5 min	2 d	[17]

资源库的建立提供理论参考。

1 影响卵巢组织及卵母细胞冷冻保存效果的主要因素

1.1 生物样品

不同发育阶段的卵母细胞及卵泡的冷冻保存效率存在显著性差异。早期卵母细胞/卵泡一般比晚期卵母细胞/卵泡更耐低温, 因其尚未形成阻碍 CPAs 渗透的卵黄结构, 且拥有较大的比表面积, 有利于 CPAs 的渗透与细胞脱水, 从而有效抑制细胞内冰晶形成 (IIF), 降低冷冻损伤^[18]。同时, 进入减数分裂期的卵母细胞, 因其活跃的 DNA 复制、细胞骨架重排及细胞器增殖与分配等生命活动, 对低温及 CPAs 的毒性更为敏感, 这也使得其较之早期卵母细胞更易受到冷冻损伤^[19]。以甲醇、丙二醇和蔗糖配置冻存液, 对斑马鱼不同时期的卵泡进行为期 7 d 的玻璃化冷冻保存, 复苏后 I 期、II 期、III 期及 IV 期卵泡的存活率分别为 76.8%、43.1%、8.9% 及 1.3%, 也进一步证实了对晚期卵母细胞/卵泡进行有效冷冻保存的挑战性^[3]。

鱼类卵巢组织块的冷冻保存能够高效保存大量且种类丰富的卵巢细胞 (包括不同时期的卵母细胞及体细胞); 同时, 在冻存后组织细胞的移植潜力与应用前景方面, 组织块冻存也显著优于消解分散的卵母细胞。Pšenička 等^[15] 将西伯利亚鲟卵巢组织分割为 0.1 g 的组织块, 分别对组织块及其中酶解消化获得的分散卵巢细胞进行冷冻保存。结果显示, 虽然复苏后卵巢组织块酶解获得的活细胞数量与分散解离细胞组无显著性差异 (约 50%), 但死亡细胞数量较低。这表明复苏后的酶解过程去除了卵巢组织中大量的死细胞 (主要为在冷冻过程中受损的细胞), 同时, 分散解离的细胞中过高的死细胞量导致样品过于黏稠, 使得后续的细胞移植工作无法进行, 这也体现了卵巢组织块冷冻保存的优势^[20]。

卵巢组织块的体积大小是影响冷冻保存效率的关键因素。样品体积过大会阻碍 CPAs 的渗透和细胞脱水, 导致内部细胞遭受严重冷冻损伤; 而样品体积过小则不利于后续移植或体外培养, 影响其细胞分泌功能活性和发育潜能^[21]。在鱼类研究中, 卵巢组织通常仅被简单剪碎, 组织块大小并无严格标准。尽管有研究尝试对整个卵巢进行冷冻保存, 但其卵泡存活率较低。对斑马鱼卵

巢组织块与完整卵巢分别进行玻璃化保存, 复苏并体外培养 24 h 后, 卵巢组织块中卵泡存活率 (31.0%±11.5%) 显著高于完整卵巢 (12.0%±2.6%)^[3]。由于体积较大的样品需要在冷冻保存液中平衡更长时间以充分脱水, 因此, 在优化样品大小的同时, 增加冷冻保护液的细胞渗透性, 是提高卵巢组织与细胞冷冻保存效率的关键。

不同鱼类对同一冷冻策略也存在不同的响应结果, 其卵母细胞的结构与胞质成分, 以及卵巢组织细胞是否存在发育异质性是造成这一差异的重要原因。相较于斑马鱼、青鳉 (*Oryzias latipes*) 等小型热带鱼, 鲑鳟等大型鱼类的卵母细胞体积大, 卵黄含量高, 冷冻过程中更易形成胞内冰晶。同时, 海水及冷水性鱼类组织及细胞的冷冻效率较高, 前者卵母细胞的胞内渗透压较高, 更易耐受 CPAs 及脱水造成的高渗环境^[22]; 而后者体液和细胞中常含有抗冻蛋白或抗冻糖蛋白, 可以降低冰点并抑制冰晶形成, 为卵母细胞提供了天然的抗冻保护^[23]。卵母细胞的细胞膜成分也会显著影响冻存效率, 该因素通常与物种及其食物结构有关。一般认为细胞膜中较高的胆固醇和饱和脂肪酸的比例可以增强其在低温下的流动性, 减少细胞体积变化从而降低损伤^[24]。此外, 同步产卵鱼类的卵巢内卵母细胞发育期高度一致, 更容易寻找一个通用的冷冻策略。而多次产卵鱼类中, 卵巢内含有处于不同发育期的多种卵母细胞, 不同发育期的卵母细胞对低温敏感性的差异及对冷冻保存液渗透性的差异等都可能会显著影响相关细胞的冻存效率。

1.2 冷冻保存液成分

冷冻保存过程中, 向等渗或高渗扩展剂中加入适量 CPAs 能够有效改变生物样品变温时的理化环境, 提高系统中溶质浓度以减轻或避免冰晶对细胞的损伤。常用的 CPAs 可分为渗透性保护剂、非渗透性保护剂及具有特殊功能 (抗冻、抗氧化、抗凋亡等) 的微量添加剂。

扩展剂是用于配制冷冻保存液的基础溶液。在鱼类卵巢组织及卵母细胞的冷冻保存中, 除磷酸缓冲液 (PBS, 0.1 mol/L, pH 7.4) 外, L-15 及 M199 培养基也是常见的扩展剂 (表 1), 主要负责为组织和细胞提供营养, 并创造相近或略高于体内环境的渗透压条件 (265~325 mOSM)。其中, 0.1 mol/L PBS 是生物化学研究中使用最为广泛的

一种缓冲液, 能够提供良好的盐平衡; L-15 与 M199 培养基渗透压相近 (275~320 mOSM), 且已经广泛应用于鱼类卵泡培养。然而, L-15 培养基中钠盐水平较高, 在温度变化过程中会导致斑马鱼卵泡内钠离子积累, 干扰细胞正常功能并降低卵泡存活率^[25]。因此, 扩展剂的选用需要结合具体物种的渗透压需求。

二甲基亚砜 (DMSO)、甲醇、乙二醇和丙二醇是鱼类卵巢组织及卵母细胞冷冻保存中常用的渗透性冷冻保护剂。这类非电解质小分子能够穿透细胞膜, 促进细胞脱水以抑制胞内冰晶形成, 并有效防止解冻过程中的重结晶。不同 CPAs 在渗透速率、细胞毒性及保护机制方面存在较大差异。虹鳟卵细胞中, 甲醇的渗透速率高于 DMSO 和甘油, 可以加速细胞脱水^[26], 然而其对斑马鱼 III 期卵母细胞的毒性远超 DMSO^[27]。DMSO 可与磷脂的极性基团相互作用, 从而增强细胞膜的稳定性; 同时还能减少-40℃ 环境下的膜构象紊乱, 延缓蛋白质在冷冻过程中的变性, 从而维持细胞膜结构与功能^[28]。然而常温条件下, 浓度为 0.1% (体积比) 的 DMSO 即可改变蛋白质的二级结构, 也能降低膜脂中的胆固醇酯水平并引发氧化应激^[29]。这种变化会改变跨膜钙通量, 导致胞质钙离子 (Ca^{2+}) 浓度上升, 激活相关降解酶, 从而导致 DNA 分解和细胞凋亡^[30]。上述机制在一定程度上解释了为何不同物种或同一物种不同发育阶段的卵巢组织及卵母细胞, 对 CPAs 的种类与浓度存在差异化的响应。

非渗透性冷冻保护剂通常为小分子聚合物, 能够提高细胞外渗透压, 在平衡和降温阶段加速细胞脱水并抑制冰晶形成; 在解冻和复水阶段则减缓水分子内流, 从而避免渗透性休克和重结晶^[31]。糖类是最常见的非渗透性冷冻保护剂, 可与脂质双分子层中的极性基团相互作用, 稳定膜结构并防止细胞内蛋白质聚集; 同时, 还可以为组织及细胞提供能量以应对降温引发的应激反应^[32]。在冻存液中添加 0.2 mol/L 乳糖可以将长鳍真鲷 (*Ictalurus furcatus*) 卵原细胞的存活率由 29.7% 提高至 67.7%^[33]; 0.2 mol/L 海藻糖也将玻璃化的斜带髯鲷卵原细胞的存活率由不足 40% 提高至约 80%^[16]。此外, 多种蛋白质也被证实可作为高效的非渗透性冷冻保护剂, 如胎牛血清 (FBS) 和牛血清白蛋白 (BSA) 等, 它们能够与细胞膜磷脂紧密结合, 从而增强细胞在冻融过程中膜的完整

性^[34]。BSA 可以通过减少活性氧 (ROS) 引起的脂质过氧化来缓解鲤精子冷冻过程中的细胞膜损伤和 DNA 片段化^[35]。FBS 则富含生长因子、黏附因子与激素等多种生物活性成分, 在细胞冷冻保存中常以 10%~15% (体积比) 的浓度添加, 能够显著促进复苏后细胞的增殖。鸡蛋黄也是一种常见的非渗透性保护剂, 在冷冻液中添加 10% (质量体积比) 的蛋黄可显著提高虹鳟卵巢组织的冷冻保存效率, 且效果优于 1.5% BSA^[10]。鸡蛋黄中的低密度脂蛋白能够在冷却过程中对细胞膜提供支持, 从而保护卵母细胞结构; 而其中的卵磷脂则可以结合或黏附在细胞膜上形成保护膜, 补充冷冻保存过程中细胞膜表面丢失的磷脂, 从而为细胞提供冷冻保护^[36]。非渗透性冷冻保护剂依赖渗透压平衡, 因此需要较长的平衡时间促使细胞脱水; 而渗透性保护剂因其细胞毒性, 又需尽量缩短脱水时间。因此, 冷冻保护剂的组成与脱水平衡时间及降温速率密切相关。

1.3 脱水及降温过程

降温前的平衡过程直接影响样品的脱水程度及 CPAs 的渗透效率, 是决定冷冻保存效率的重要因素。根据样品类型与保存方案的不同, 鱼类卵巢组织或细胞的平衡时间通常为 15~60 min。考虑到玻璃化所使用的高浓度 CPAs 具有较高毒性, 其平衡时间一般短于慢速降温法 (表 1)。

1 °C/min 是鱼类卵巢组织或卵母细胞慢速冻存中较为常用的降温速率, 但这并不代表该速率就适用于所有水生动物。九孔鲍 (*Haliotis diversicolor*) 卵细胞的冷冻保存研究中, 比较了 45、25、15、12、7、3 和 1.5 °C/min 等多种降温速率。结果显示, 在 2.0 或 2.5 mol/L DMSO 中, 1.5 °C/min 的降温速率可避免 IIF; 3.0 mol/L DMSO 中, 3 °C/min 以上的降温速率会导致 IIF; 而 4.0 mol/L DMSO 中, 7 °C/min 以上的降温速率才会导致 IIF^[37]。因此, 降温速率应依据 CPAs 浓度进行优化, CPAs 浓度越高, 样品脱水速率越快, 降温速率也应相应提高, 以平衡 CPAs 毒性、脱水效率与冰晶抑制之间的关系。

玻璃化冷冻保存是通过快速降温 (1 000~5 000 °C/min) 使组织及细胞在冷却过程中避免冰晶形成, 以更好地维持样品的形态完整性^[38]。玻璃化的褐鳟卵巢组织复苏后, 约有 88.3% 的卵泡保持结构正常, 然而这些细胞是否具备正常的发育与受精能力仍需进一步验证^[17]。此外, 玻璃化所需的高

浓度 CPAs 可能带来较强的毒性作用, 这也会对卵母细胞产生不可预知的影响。因此, 冷冻后组织及细胞复苏、复水并快速去除 CPAs 的过程也是影响冻存效率的重要环节。

1.4 复苏及复水过程

复苏过程中, 生物样品会经历复水、重结晶以及冰晶溶解等步骤。理想的升温速率需避免温度过高以防止水分过快进入细胞造成损伤, 又要迅速越过容易发生重结晶的危险温度区间。实际操作中则通常追求快速解冻, 且温度多选择接近或略高于细胞正常生存的温度范围。例如, 人类、小鼠等哺乳动物的卵巢组织或卵母细胞解冻温度通常为 37 或 38.5 °C, 而水生动物则多为 10~38 °C (表 1)。

复苏过程中水分快速进入细胞, 引起胞内渗透压剧烈变化。因此, 减小渗透冲击对维持细胞活力至关重要。将冻存的斑马鱼卵泡分别使用一步法和四步法进行复苏, 一步法直接将复苏后卵泡置于无保护剂的 KCl 缓冲液中 10 min; 四步法则依次使用含 2.0、1.0、0.5 mol/L 甲醇的 KCl 缓冲液各处理 10 min, 最后转移至无 CPA 缓冲液^[39]。结果表明, 复苏 1 h 后, 使用四步法的 II 期卵泡的存活率为 69.4%, 显著高于一步法 (约 50%), 这是因为四步法中渗透压逐渐降低, 减轻了复水过程中的渗透应激^[39]。在冻存的紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 卵母细胞复水过程中, 添加 1 mol/L 蔗糖可以显著提高复苏后的存活率^[40], 这也是因为非渗透性保护剂蔗糖缓解了水分子进入细胞的速度, 从而避免了渗透冲击。

冷冻保存过程中, 一系列的脱水、降温及复水步骤导致的 CPAs、温度和渗透压的剧烈变化使得卵巢组织细胞产生复杂的应激反应, 进而导致各种细胞结构和亚细胞器的损伤。因此, 深入探究细胞在冷冻保存过程中的生理生化响应及结构变化, 有助于针对性地优化冷冻保存策略, 进而改善鱼类卵巢组织及卵母细胞的冷冻保存效果。

2 冷冻保存对卵巢组织及卵母细胞的主要损伤及相关机制

2.1 机械损伤

细胞在冷冻及复苏过程中承受的机械应力主要源于胞内冰晶及贴附于细胞表面的胞外冰晶所

产生的直接机械剪切力, 以及由细胞外溶液溶质浓度升高引起的渗透压变化导致细胞过度收缩或膨胀。这两类机械损伤与降温、升温速率以及样品在冷冻保存液中平衡的时间密切相关, 且一定程度上存在拮抗关系。卵母细胞慢速冷冻保存过程中, 细胞内结冰概率和冰晶体积随冷却速率的提高而增加; 而复苏过程中, 升温速率越高, 细胞内冰晶体积越小, 造成的机械损伤也随之减弱^[41]。

除冰晶导致的机械损伤外, 冷却损伤也是冷冻保存中常见的膜损伤类型, 主要发生于细胞从液态转变为凝胶态的过程中^[42]。冷却过程中热能散失导致脂质分子运动减缓, 相邻脂质间相互作用增强, 进而降低膜流动性并损害其功能, 该临界温度称为膜脂质 (LPT) 的相变温度 (T_m), 相变温度越低, 细胞在冷却过程中越晚发生相变, 抗冷能力更强。细胞膜的胆固醇、脂肪酸及磷脂组成是影响 T_m 的主要因素。胆固醇可以降低 T_m 并增强抗冻能力, 高不饱和脂肪酸则可以提高细胞膜流动性从而抵抗冷应激^[43]。研究发现, 疣状杯形珊瑚 (*Pocillopora verrucosa*) 幼虫的脂质, 尤其是固醇酯水平, 显著高于浅杯排孔珊瑚 (*Seriato-pora caliendrum*) 幼虫, 将两种珊瑚幼虫在 5 °C 条件下用 0.5 mol/L DMSO 孵育 4 h 后, 疣状杯形珊瑚幼虫存活率约为 22.0%, 而浅杯排孔珊瑚幼虫全部死亡, 表明了胆固醇的抗低温性能^[43]。白芦茎珊瑚 (*Junceela fragilis*) 卵母细胞的 T_m 约为 23.0 °C, 高于红芦茎珊瑚 (*J. juncea*, 18.3 °C) 及红鞭珊瑚 (*Ellisella robusta*, 20.3 °C), 其不饱和脂肪酸含量则呈现相反的趋势, 这也证明了不饱和脂肪酸成分对卵母细胞冷冻保存效率的重要性^[44]。

卵巢组织在冷冻保存过程中, 还存在一类特殊的组织结构损伤, 即因温度剧烈变化引起的热胀冷缩导致卵泡从基底膜上脱离^[45]。基底膜是一种高度特化的细胞外基质 (ECM), 具有促进类固醇分泌及参与卵母细胞发育等多种功能。因此, 卵泡与基底膜脱离也是卵巢组织复苏或移植后卵泡死亡或发育能力受损的重要因素。

2.2 氧化应激

由外界环境引入的 ROS, 以及生物样本内部由于 CPAs 毒性、低温胁迫和渗透压变化引发的氧化应激反应 (图 2) 是卵巢组织及细胞在冻存过程中受到的主要生化损伤, 会引发线粒体功能活性降低, 导致能量代谢异常, 并攻击染色质, 从而引发遗传物质改变。

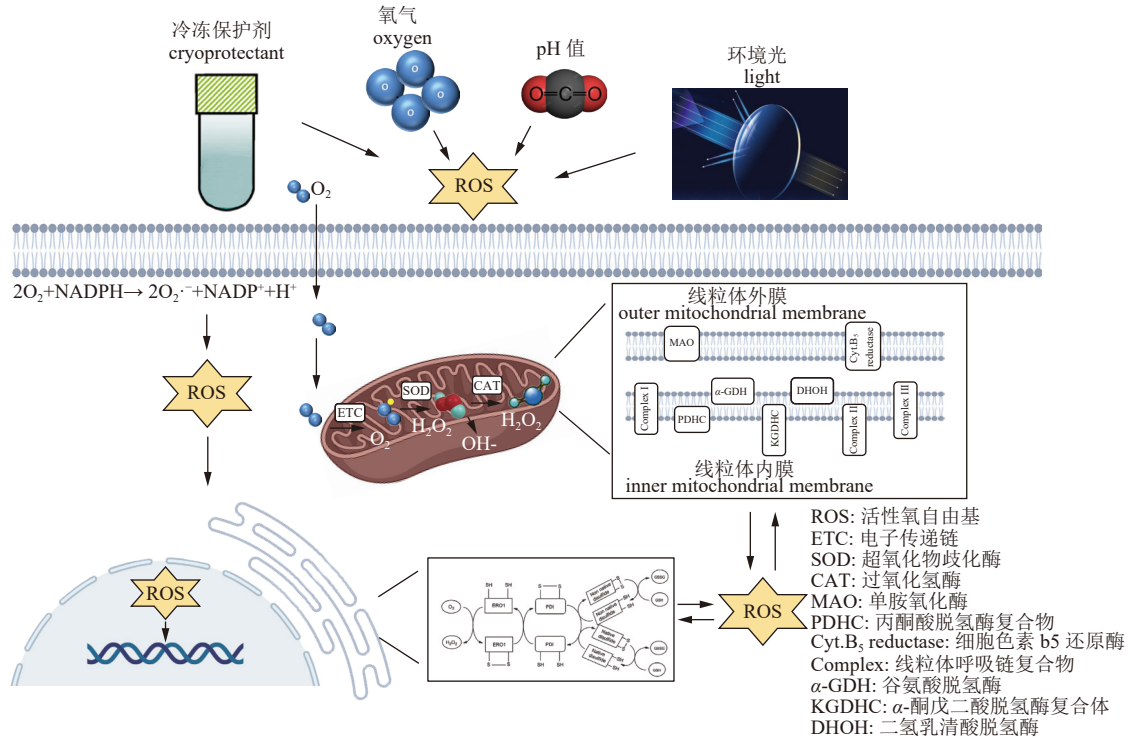


图 2 卵母细胞超低温保存过程中活性氧的产生及其对细胞活性的影响

卵母细胞低温保存过程中产生的外源 ROS 主要是由环境因子和相关实验试剂引起的。线粒体是内源性 ROS 产生的主要细胞器，从复合物 I、II 和 III 中逸出的电子会迅速与氧 (O₂) 反应产生超氧阴离子 (·O₂⁻)。线粒体呼吸链中产生的·O₂⁻大量释放，会加剧蛋白质错误折叠，引发内质网应激，致使内质网产生大量 ROS。

Fig. 2 The induction of ROS in oocyte cryopreservation and its effects on oocytes

The exogenous ROS during oocyte cryopreservation is mainly caused by the environment factors and the reagents used in the experimental procedures. The mitochondria are a major organelle generating ROS since electrons escape from complexes I, II, and III, and will quickly react with oxygen (O₂) to produce superoxide anion (·O₂⁻). The ROS generated in the respiratory chain are released in large quantities, thus cause protein misfolding and trigger ER stress. Meanwhile, a large amount of ROS can also be generated in the ER.

细胞的外源 ROS 主要是由冷冻保护剂、环境光、氧气及 pH 值变化等因素导致的。丙二醇及 DMSO 等渗透性保护剂会促使 Ca²⁺从内质网进入细胞质，引起线粒体内 Ca²⁺浓度的急剧升高，导致线粒体通透性转换孔 (mPTP) 异常开放，致使 ATP 逸散及 ROS 水平升高，促使细胞凋亡因子释放并激活细胞凋亡通路^[46]。同时，由于组织及细胞的冷冻保存需要在体外进行，环境中的氧气及某些光，如蓝光及紫外线，会诱导 DNA 碱基氧化和 DNA 链断裂，损伤呼吸链中的酶活性并促进 H₂O₂ 产生，同样会导致线粒体功能受损和 ROS 水平异常^[47]。

粒体 DNA 编码的呼吸链蛋白复合物也会受到影响。电子传递链受损情况下，ATP 产量降低，H₂O₂ 持续产生 OH⁻，导致 ROS 大量产生^[49-50]。ATP 和线粒体膜电位 (MMP) 的增加是卵母细胞的发育与成熟的重要条件之一。然而，冷冻保存后的绿唇贻贝 (*Perna canaliculus*) 卵母细胞出现 MMP 降低，氧化应激水平升高等情况，最终导致卵母细胞存活率及成熟率下降^[51]。这些 ROS 泄漏至胞质后会触发一系列级联反应，包括氧化应激及其介导的 DNA、蛋白质和脂类等重要生物分子损伤、细胞膜结构破坏以及脂质信号异常等^[52]。

细胞内的 ROS 主要源自氧化代谢过程中呼吸链中线粒体复合物 I 和 III 的副产物。低温胁迫及部分 CPAs 会改变线粒体膜结构，导致呼吸链电子传递效率降低^[48]；同时，由于缺乏组蛋白保护，线粒体 DNA 比核 DNA 更容易受到氧化损伤，线

胞质内的 ROS 可进入细胞核攻击 DNA 分子，造成碱基氧化、DNA 甲基化状态异常、DNA-蛋白质交联受损，甚至直接导致 DNA 双链断裂^[53]。尽管细胞具备碱基切除修复、同源重组修复等多种机制以应对 ROS 引起的 DNA 损伤，但 ROS 过量并超出系统修复能力时，DNA 的损伤将持续累

积, 最终导致基因突变、染色体不稳定及细胞凋亡^[53]。冷冻保存后, 斑马鱼卵巢组织 ROS 水平显著上升, 抗氧化能力降低, 同时伴随着显著的线粒体活性降低和 DNA 损伤^[36]。类似的氧化应激情况也出现在多种鱼类精子的冷冻研究中^[54]。这些损伤不仅影响细胞的短期基因表达调控, 还可能对遗传信息的稳定性和后代健康产生长远影响。

线粒体、内质网以及细胞膜是细胞中重要的膜结构细胞器, 但 ROS 会攻击膜结构中的脂质, 如磷脂和脂肪酸等, 引发氢原子夺取反应, 生成脂质过氧化物, 导致膜脂双分子层交联、断裂, 膜通透性增加甚至破裂^[55]。同时, ROS 还会导致内质网脂双层膜受损, 使得错误折叠的蛋白质持续积累, 从而诱导内质网应激。应激情况下, 内质网会通过氧化酶(如 NADPH 氧化酶 4)进一步产生大量 ROS^[56]。细胞外基质同样容易受到 ROS 的损伤。细胞外基质是由胶原蛋白、多糖和水分子构成的蛋白网络, 为细胞增殖与存活、类固醇合成、细胞聚集及形态维持提供微环境, 基质中的金属蛋白酶(MMPs)受到氧化应激后, 会导致胶原结构降解与基质稳定性丧失从而影响复苏后卵母细胞的发育潜力^[57]。

2.3 代谢异常

线粒体是细胞中的能量工厂, 同时还参与钙离子稳态调控、细胞凋亡与坏死等过程。在卵母细胞成熟、受精和早期胚胎发育中, 线粒体需要为纺锤体组装、极体排出、染色体分离、受精和胚胎发育等过程提供大量 ATP。人类卵母细胞过程中, 线粒体 DNA 拷贝数从早期卵母细胞的约 500 个增加到成熟卵母细胞的 150 000~700 000 个^[58]。低温和 CPAs 引发的线粒体内 Ca^{2+} 和 ROS 水平上升诱使 mPTP 开放, 致使线粒体膜电位的快速下降, 并引起 ATP 合成酶复合体构象改变和电子传递链功能异常, 从而导致线粒体功能丧失^[54, 59]。同时, 在添加/移除 CPAs 和冷冻/解冻过程中, 细胞内外渗透压的剧变会导致细胞及线粒体快速肿胀或收缩, 导致外膜破裂或内膜通透性改变。此外, 复苏后, 细胞需要大量 ATP 来修复损伤, 如修复膜结构、清除错误折叠蛋白、恢复离子稳态等, 若大量线粒体功能受损或 ATP 储备耗尽, 细胞存活率将进一步降低^[60]。例如, 卵母细胞中 ATP 的严重耗竭会破坏细胞骨架中的微丝结构, 并导致许多合成及分解代谢的关键生理过程中断,

最终严重影响其复苏后的功能恢复^[61]。玻璃化冷冻保存过程中, 斑马鱼 III 期卵母细胞 ATP 含量下降至新鲜卵母细胞的 15.1%, 且线粒体结构受损^[62]。而在斑马鱼 III 期卵母细胞慢速冷冻保存的过程中, 经 CPAs 平衡 30 min 后, ATP 含量下降 42.6%; 冷冻并复苏后 ATP 水平进一步降至 1.7%; 复苏后 2 h, ATP 几乎完全耗竭(0.4%), 且所有卵母细胞呈现半透明状态^[60]。这些结果表明, 应对低温胁迫, 细胞内 ATP 储备被大量消耗, 能量代谢系统(如线粒体及其相关酶系)也会遭到不可逆的损伤^[60]。

线粒体自噬可以选择性地去除受损的线粒体, 一定程度上减轻线粒体损伤引发的级联反应。线粒体膜电位降低会诱导 PTEN 诱导激酶 1(PINK1)在线粒体外膜中积累, 促进 Parkin 连接酶进入受损线粒体, 将自噬特征底物 P62 聚集到线粒体中以诱导线粒体自噬。受损的线粒体会被自噬囊泡选择性地吞噬, 与溶酶体融合并被水解酶降解^[63]。然而, 线粒体自噬对冷冻保存的卵母细胞的修复作用较为有限, 过度的线粒体自噬也会导致卵母细胞体外发育潜力下降^[64]。因此仍需进一步开发冷冻保存过程中针对线粒体的保护措施, 或优化复苏后的线粒体更新方法以提高复苏后卵巢组织及卵母细胞的质量。

2.4 遗传物质改变

冷冻保存过程会对细胞核的结构与功能造成多方面损伤, 不仅会直接引发 DNA 断裂, 还会扰乱染色质的三维结构及折叠状态, 进而导致染色质压缩异常。这些损伤将进一步危及卵母细胞的存活率、发育潜力及后代健康^[65]。除 ROS 过量积累导致 DNA 损伤外, 高浓度的渗透性冷冻保护剂还可以通过核孔进入细胞核, 引起染色质异常凝聚或核基质肿胀, 进而破坏 DNA 空间结构^[66]。对处于减数分裂期的卵母细胞进行冷冻保存时, 低温环境和乙二醇等 CPAs 会显著降低微管蛋白亚基的聚合动力学, 诱导纺锤体微管解聚, 导致染色体排列异常或分离错误。染色体异常则会引发非整倍体等严重遗传缺陷, 最终造成卵母细胞发育停滞或凋亡。值得注意的是, 这一损伤过程并非完全可逆^[19]。将 M II 期小鼠卵母细胞冷却至 4 °C 会导致纺锤体逐渐解体和染色体分散, 且损伤程度随温度降低和暴露时间延长而加剧, 37 °C 孵育后, 少数卵母细胞无法恢复纺锤体结构和染色体排列^[67]。

冷冻保存还会引发生殖细胞表观遗传谱异常,包括 DNA 甲基化和组蛋白翻译后修饰等^[68-69]。斑马鱼原始生殖细胞冷冻保存过程中, *vasa* 和 *cxcr4b* 等基因的启动子中, DNA 甲基化水平显著升高^[68]。玻璃化的小鼠卵母细胞中, H4K12 蛋白乙酰化模式异常, 进而影响染色质组装和卵母细胞的发育^[69]。部分研究认为, 冷冻保存导致的生殖细胞表观遗传改变是可逆的^[70]。然而, 考虑到生殖细胞质量对后代的影响, 其表观遗传谱的变化及安全性评估还需进一步研究阐明。

2.5 生长、发育及受精潜能的损伤

卵泡的正常发育和分化依赖于卵母细胞与周围体细胞之间精密的双向通信, 这一过程涉及多种旁分泌、自分泌因子以及细胞间连接结构, 如跨带投射 (TZPs) 和缝隙连接等。TZPs 对 CPAs 的毒性、温度和绝对应力的变化非常敏感^[71], 缝隙连接通道也会在低温等应激条件下异常开放, 损伤细胞功能甚至引发死亡。玻璃化的小鼠卵巢组织中, 缝隙连接蛋白 Cx43 和 Cx37 表达水平显著下降, 但将复苏后的卵巢组织移植到受体小鼠体内后可成功实现生育力的恢复^[72]。这表明冷冻保存会严重损伤细胞间通信, 但这种损伤并不一定是永久性的, 一段时间后卵泡仍可能重建细胞间通信并恢复部分功能。

鱼类卵母细胞中, 冷冻保存还会改变卵黄结构从而影响后续发育与受精。斑马鱼卵泡在成熟过程中会在生发囊破裂阶段自然呈现半透明状态, 这与 IV 期卵母细胞中卵黄的蛋白质水解有关。而玻璃化的斑马鱼 III 期卵泡解冻并在室温下孵育 30 min 后, 大部分卵泡变为半透明并出现轻微肿胀, 表明卵黄结构发生了变化^[62]。这可能是卵母细胞在玻璃化过程中释放蛋白酶或影响离子运输机制, 最终改变了卵黄蛋白质的物理结构从而影响复苏后卵母细胞的发育情况。

针对上述主要冷冻损伤, 目前已对冷冻保存技术提出了多种针对性优化策略, 并建立了新的冷冻技术, 显著改善了卵巢组织与卵母细胞冷冻保存效果。

3 卵巢组织及卵母细胞冷冻保存技术的优化策略

3.1 细胞膜修饰

调节脂肪酸和胆固醇水平 脂质修饰是

提高卵母细胞冷冻保存效率的有效策略。提高细胞膜中的胆固醇和多不饱和脂肪酸水平可增强其在低温下的流动性, 从而减轻冷却损伤^[73], 同时还可以有效降低 T_m 从而增强细胞抗冷性^[74]。该方案主要通过营养管理和环境暴露达成。为长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 饲喂含高比例多不饱和脂肪酸的微藻, 冷冻保存后其卵母细胞受精率显著高于普通饲料组^[75]。不饱和脂肪酸可以通过体外孵育将外源脂肪酸掺入细胞膜磷脂疏水尾部^[76]。这表明高不饱和脂肪酸的即时补充可能在缓解冷冻损伤方面具有潜在价值。在珊瑚幼虫的玻璃化液中添加 400 $\mu\text{g/mL}$ 芥酸也表现出类似的保护效果^[77]。

过表达水通道蛋白 细胞膜的渗透压调节能力是影响冷冻保存效率的关键因素。水通道蛋白 (AQPs) 是一类位于细胞膜上的跨膜蛋白, 可促进水分子和一些小分子冷冻保护剂沿渗透梯度快速穿过细胞膜。目前已鉴定出 4 种水甘油通道蛋白的 AQP 亚型 (AQP3、AQP7、AQP9 和 AQP10), 可以运输水、甘油及其他小的非电解质^[78]。斑马鱼卵母细胞中 AQP3 的过表达可以显著增强细胞膜对水、甘油、丙二醇和乙二醇的通透性^[79]。而青鳞卵母细胞中过表达 AQP3 在未增加其对冷冻保护剂毒性的敏感性的同时, 有效抑制了降温过程中冰晶的形成^[80]。然而, 考虑到不同冷冻保护剂进入细胞的方式不同, 并非完全依赖 APQ, AQP 过表达的效率也可能与 CPAs 种类以及实验物种差异密切相关。

3.2 线粒体修饰

静默线粒体 降温前抑制线粒体功能可以有效降低冷冻保存造成的线粒体损伤。作为细胞的能量中心, 线粒体产生 ATP 的同时也释放热量。二甲双胍能够通过抑制线粒体复合物 I 活性, 减缓其呼吸并减少 ATP 的产生。这一机制能够减轻蛋白酶体抑制引发的线粒体功能障碍; 同时还可以通过抑制线粒体代谢活性以减少冷冻保存过程造成的氧化损伤^[81]。用 400 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍对猪卵母细胞进行孵育处理可以降低线粒体温度, 显著提高玻璃化后细胞的存活率并减少异常线粒体数量^[81]。鱼类中, 在饲料中添加 0.12% 的二甲双胍也被证实能够减轻团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 中高糖饮食引起的抗氧化能力异常、炎症和线粒体功能障碍^[82]。

抑制细胞内 Ca^{2+} 的过度积累 线粒体钙

摄取蛋白 1(MICU1)是线粒体钙单向转运蛋白(MCU)的重要调节亚基,可以感知并调节细胞质内 Ca^{2+} 浓度。降低MICU1活性可以阻止线粒体在冷冻时过量积累 Ca^{2+} ,从而缓解细胞的氧化损伤和凋亡。玻璃化前,用 $8\ \mu\text{mol/L}$ MICU1抑制剂预处理小鼠卵母细胞,可显著降低其MICU1蛋白的表达水平,减少线粒体对 Ca^{2+} 的摄取,并降低卵母细胞的氧化应激水平^[83]。一些冷水性鱼类体内也天然存在这种机制,南极地区鱼类体内存在4种防冻蛋白,其中I型和II型防冻蛋白可以以剂量依赖的方式抑制钙离子的过量摄取,抑制冰晶形成的同时也减少卵母细胞内的冷冻损伤^[84-85]。

补充健康线粒体 上述两种方法通常难以完全逆转冷冻保存造成的线粒体损伤。因此,补充健康的外源线粒体已成为恢复细胞活力的新型策略。将源于自体脂肪干细胞的线粒体通过显微注射的方法,移植至冷冻复苏后的小鼠卵母细胞中,可以有效恢复其质量并将发育到囊胚期的细胞比例由38.2%提高至56.8%^[86]。线粒体移植能够调节卵母细胞的线粒体功能、恢复线粒体膜电位,改善卵母细胞质量及增殖发育能力,甚至抑制细胞坏死和凋亡。在鱼类中,功能性线粒体的补充同样有望作为一种潜在策略,用以缓解冷冻复苏后细胞能量代谢危机,从而提高存活率。

3.3 减少氧化应激

补充内源性抗氧化剂 在冷冻保存中,通过添加内源性抗氧化剂减轻氧化损伤是保护细胞功能的重要手段,主要分为酶促抗氧化剂(如SOD、CAT、GPX)和非酶促抗氧化剂(如GSH、CYS)两类。例如,在冷冻保存液中添加 $5\ \mu\text{mol/L}$ 重组MnSOD蛋白,可将复苏后的葡萄牙牡蛎(*C. angulata*)卵母细胞的受精率由20.0%提高至82.5%^[87]。同样,在鳊(*Siniperca chuatsi*)精子冻存过程中补充 $2\ \text{mmol/L}$ GSH可以通过调节细胞的硫-氧还原状态降低脂质过氧化水平,将精子的存活率由64.6%提高至82.0%^[88]。

补充外源性抗氧化剂 相较于内源性抗氧化剂,外源性抗氧化剂的补充在卵母细胞冷冻保存中更为常见且种类也更为多样,如褪黑素^[89]和维生素E^[90]等。这些外源性抗氧化剂可以有效缓解冷冻保存期间细胞的氧化损伤,从而在一定程度上提升其复苏后的发育和成熟潜能。此外,线粒体靶向抗氧化剂,如米托蒽醌甲磺酸盐(MitoQ),

不但能清除ROS,还可以减轻冷冻保存过程中的线粒体损伤,通过稳定线粒体膜电位、减少内源性ROS的生成,从而提供更精准的保护^[91]。

然而,抗氧化剂对组织及细胞的冷冻保护作用,根据物种不同和卵母细胞发育阶段的差异呈现出不同效果。过高浓度的抗氧化剂会干扰细胞自身的抗氧化机制,将氧化应激转化为还原应激,从而破坏细胞内部稳态并造成损伤^[92]。因此,如何针对性地筛选和优化抗氧化剂方案,仍是亟待通过实验解决的重要问题。

3.4 抑制冰晶形成

红外激光脉冲加速降温 卵母细胞的冷冻保存效率主要取决于降温之前的脱水程度以及复苏时的升温速率。一般而言,细胞含水量越高,所需解冻速率也需越快,以抑制复苏过程中的重结晶。小鼠卵母细胞玻璃化冷冻后,利用红外激光脉冲以 $10^7\ \text{°C/min}$ 的超高速率进行解冻,可获得90%以上的存活率^[93]。激光纳米加热法在冻存的斑马鱼胚胎中也进行了尝试,复苏后获得了3%的孵化率,且其中有2尾幼鱼成功发育为成鱼并产生后代^[94]。该方法适用于较小的组织和细胞,组织或细胞越大,不同区域的升温速率差异越大。因此,目前红外激光脉冲并不适用于完整卵巢组织的复苏。

添加聚合物冷冻保护剂 天然抗冻蛋白的螺旋结构可以覆盖冰晶表面以抑制复苏过程中的重结晶。近年来,模仿抗冻蛋白冰晶抑制特性的合成聚合物,如聚乙烯醇,已逐渐应用于组织及细胞冷冻保存^[95]。聚合物冷冻保护剂的分子量较高,无法穿透细胞膜,从而避免了胞内损伤。同时,其高浓度溶液呈黏稠或玻璃态,能有效调控冷冻与复苏过程中水分的扩散速率^[96]。然而该技术尚未在鱼类组织细胞冷冻保存中得到验证。

3.5 装置及载体改良

优化装置 冷冻保存容器的选择直接影响导热效率,进而影响卵巢组织与卵母细胞的玻璃化效果。玻璃化过程中使用的装置按照形状大致可分为管状、环网状、针状和无设备。目前鱼类卵巢及卵母细胞玻璃化常见的装置为CryoTube小管^[13, 17, 36]。Marques等^[3]将塑料CryoTube小管进行改良,开发了一种不锈钢的金属封闭系统,用于斑马鱼卵巢组织的玻璃化。该系统既能避免组织样品与液氮直接接触,同时还能实现更快地变温,

成功保存了 76.8% 的 I 期卵泡。此外, 针浸法也被应用于鱼类卵巢组织玻璃化, 在减少 CPAs 体积、浓度和毒性的同时最大限度地提高降温速率, 该方法成功保存了 40.3% 的褐鳟卵原细胞和 84.9% 的欧洲鳗鲡卵巢细胞^[13, 17]。然而, 由于组织样品直接与液氮接触, 增加了污染的风险, 因此操作需要更加谨慎。相较之下, 哺乳动物卵巢组织玻璃化研究中使用的装置则更为多样, 包括开拉式吸管、麦管、石英毛细管、空纤维管、冷冻环、铜网、三角尼龙网和多层丝素蛋白片等^[97]。这些装置在鱼类卵巢组织及细胞冷冻保存中的适用性, 仍有待进一步验证。

优化封装系统 使用物理凝胶, 如海藻酸钠、明胶和透明质酸对组织或细胞进行封装, 可以在不影响玻璃化结果的情况下, 减少高浓度 CPAs 的使用, 从而降低细胞毒性^[98]。海藻酸钠通过与钙离子交联形成水凝胶, 该凝胶无毒且具有良好的生物降解性、生物相容性、吸水性及抗氧化特性, 可以为封装其内的细胞和组织创造一个类似于胞外基质的环境, 改善孔隙率、增加机械强度并促进细胞增殖^[99]。该方法在鱼类中的研究非常有限, 用海藻酸钠水凝胶封装斑马鱼卵巢组织并进行玻璃化冻存, 复苏后未观察到存活率的提高, 但有助于维持细胞膜的完整性, 防止卵母细胞从基底膜上脱离, 并且可以大幅降低 CPA 的使用浓度从而降低毒性^[6]。然而, 海藻酸钠尚无法完全替代 CPA, 且海藻酸盐不是卵泡天然 ECM 的一部分, 可能会对细胞发育造成不可预知的影响。透明质酸是天然 ECM 的主要成分之一, 由颗粒细胞产生, 有助于卵泡的发育和成熟。作为一种天然无毒 CPA, 仅用 5% 低分子量透明质酸 (LMW-HA) 冷冻保存的小鼠 C2C12 成肌细胞和 D1 间充质干细胞, 在复苏后呈现出与 10% DMSO 冷冻保存组相似的代谢活性和细胞活力^[100]。这显示出 LMW-HA 作为低毒 CPA 的潜力, 未来或可在鱼类卵母细胞冷冻保存中替代 DMSO。

微流控技术 微流控芯片, 也称为器官芯片, 为生物样品脱水、降温、升温过程以及复苏后的孵育提供了一个高度集成的平台。传统冷冻保存流程严重依赖人工操作, 不仅耗时且易造成批次差异。而微流控技术仅需恒压驱动, 即可实现自动化、高通量的高性能卵母细胞冷冻保存, 大幅提升效率。目前该技术已在人类和小鼠卵母

细胞冷冻保存中实现应用, 复苏后卵母细胞存活率可达 80% 以上^[101]。相较于哺乳动物, 水生动物通常具有更大的卵母细胞贮备需求, 因此这种低成本、高性能、半自动且易于操作的冷冻保存技术, 有望为水生动物卵巢组织细胞的冷冻保存提供极大的便利。

4 鱼类卵巢组织细胞库构建的研究和应用前景

尽管当前鱼类卵巢组织与卵母细胞的冷冻保存仍面临诸多技术挑战, 其在种质资源长期保存方面的潜力已日益凸显。随着多学科方法与新兴技术的不断融合, 动物卵巢组织及细胞冻存领域的研究正逐渐从基础机制探索走向系统优化与规模化应用, 因此, 该领域未来的研究方向可重点关注以下几个方面:

首先, 应进一步解析卵巢组织及细胞的低温损伤机制, 为建立更具针对性的高效冷冻保护策略提供理论依据。尽管现有研究已在细胞膜、线粒体、细胞核和细胞连接等方面部分揭示了低温损伤机理, 但仍需在亚细胞结构与分子水平进一步探究鱼类卵母细胞特有的冷冻应答机制。例如卵母细胞中卵黄颗粒的低温相变行为、脂质代谢对冷冻胁迫的响应机制等关键问题, 尚需依托高分辨率显微成像、多组学分析与计算建模等手段进行系统解析。在此基础上, 结合抗氧化剂、离子调节剂与抗凋亡因子等多组分保护策略, 构建物种特异性的冷冻保存液体系, 从而更有效地缓解冷冻保存造成的损伤。

第二, 建立鱼类卵巢组织和卵母细胞的长期冷冻保存技术。目前, 鱼类卵巢组织冷冻保存的时间较短, 研究多局限于几个小时至几天, 最长的保存时间一般不超过 3 年。然而, 实际的生产应用中, 种质资源需要保存数年甚至数十年。因此, 未来需要突破现有保存时限, 系统开展长期保存与复苏能力的深入研究。重点研究超低温条件下组织与细胞结构、功能和遗传完整性的维持机制, 探索适用于长期保存的冷冻保护剂组合、降温程序与储存方案。通过建立可稳定保存十年以上的可靠技术体系, 为实现鱼类种质资源的永久性保存与可持续利用奠定基础。

第三, 推动技术标准化与跨物种应用。目前, 鱼类卵巢组织及细胞的冷冻保存方案缺乏统一的

操作标准, 物种及组织发育期不同造成的细胞异质性阻碍了相关共性技术体系的建立。未来需开展跨物种比较研究, 系统筛选和明确共性与特异性参数, 进而制定适用于不同类型及发育期组织细胞的标准化操作, 以提高该技术的普适性与可重复性。

最后, 建立鱼类卵巢组织和卵母细胞高效的体外培养与移植技术体系至关重要。当前, 鱼类卵母细胞体外成熟技术尚不完善, 严重限制了组织细胞冷冻复苏后种质资源的开发利用。为此, 亟需针对早期卵泡及卵母细胞的体外培养条件进行优化, 通过模拟体内微环境以支持卵母细胞的减数分裂、卵黄合成和细胞间通讯的正常进行。此外, 应加强生殖细胞移植研究, 包括其在异种或同种受体中的迁移、定植、分化及生殖发育分化功能的重建。同时, 结合基因编辑、类器官培养等前沿技术, 有望全面提升鱼类优良种质的开发利用率及其对物种后代的遗传贡献, 最终实现珍稀优良种质从冷冻组织细胞到可育个体的完整生殖力恢复。

综上所述, 鱼类卵巢组织及卵母细胞冷冻保存技术研究虽仍处于发展阶段, 但凭借不断创新的技术手段与跨学科协同发展, 有望成为未来遗传资源保护与利用的核心支柱之一。鱼类卵巢冷冻保存技术不仅可以促进水产养殖种业与物种资源保护研究的发展, 也能为脊椎动物生殖发育生物学研究提供宝贵的技术平台与理论基础。

(作者声明本文无利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Holt W V, Comizzoli P. Opportunities and limitations for reproductive science in species conservation[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2022, 10: 491-511.
- [2] Higaki S, Shimada M, Kawamoto K, et al. *In vitro* differentiation of fertile sperm from cryopreserved spermatogonia of the endangered endemic cyprinid honmoroko (*Gnathopogon caeruleus*)[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42852.
- [3] Marques L S, Bos-Mikich A, Godoy L C, et al. Viability of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles after vitrification in a metal container[J]. *Cryobiology*, 2015, 71(3): 367-373.
- [4] Yao J T, Zeng L H, Zhu Z, et al. Studies on ovarian tissues' cryopreservation in the cyprinid species[J]. *Cryobiology*, 2025, 119: 105251.
- [5] Tsai S. Development of cryopreservation techniques for early stages zebrafish (*Danio rerio*) oocytes[D]. Luton: University of Bedfordshire, 2009.
- [6] de Freitas T R, Galuppo A G, Marques L S, et al. Hydrogel encapsulation as a handling and vitrification tool for zebrafish ovarian tissue[J]. *Theriogenology*, 2023, 198: 153-163.
- [7] Rivers N, Daly J, Jones R, et al. Cryopreservation and flow cytometric analysis of ovarian tissue in murray river rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis*[J]. *Animals*, 2022, 12(6): 794.
- [8] Lujic J, Franek R, Marinovic Z, et al. Vitrification of the ovarian tissue in sturgeons[J]. *Theriogenology*, 2023, 196: 18-24.
- [9] Romney A L T, Myers D M, Martin F R, et al. Germ cell recovery, cryopreservation and transplantation in the California white sturgeon, *Acipenser transmontanus*[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 16905.
- [10] Lee S, Katayama N, Yoshizaki G. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 478(3): 1478-1483.
- [11] Zhou L, Li F Y, Sun Z H, et al. Cryopreservation of ovarian tissue at the stage of vitellogenesis from yellow drum (*Nibea albiflora*) and its effects on cell viability and germ cell-specific gene expression[J]. *Fishes*, 2025, 10(6): 288.
- [12] Franek R, Tichopád T, Steinbach C, et al. Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation[J]. *Cryobiology*, 2019, 87: 78-85.
- [13] Ščekić I, Marinović Z, Lujic J, et al. A novel strategy for conservation of European eel (*Anguilla anguilla*) genetic resources: cryopreservation of ovarian stem cells[J]. *Cryobiology*, 2020, 95: 151-156.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Zhou L, Li F Y, Han K H, et al. Successful cryopreservation of matured testis and ovary for the short barbeled velvetfin (*Haploxygnathys nitens*)[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2025, 12: 1597747.
- [17] Lujic J, Marinović Z, Bajec S S, et al. First successful vitrification

- ation of salmonid ovarian tissue[J]. *Cryobiology*, 2017, 76: 154-157.
- [18] Zhang T T, Isayeva A, Adams S L, *et al.* Studies on membrane permeability of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes in the presence of different cryoprotectants[J]. *Cryobiology*, 2005, 50(3): 285-293.
- [19] Magnusson V, Feitosa W B, Goissis M D, *et al.* Bovine oocyte vitrification: effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages[J]. *Animal Reproduction Science*, 2008, 106(3-4): 265-273.
- [20] 王宏艳, 李文雅, 苗亮, 等. 光唇鱼 (*Acrossocheilus fasciatus*) 卵原干细胞提取、冻存及移植研究 [J]. *海洋与湖沼*, 2025, 56(2): 442-449.
- Wang H Y, Li W Y, Miao L, *et al.* Study on extraction, cryopreservation and transplantation of ovogonial stem cells from *Acrossocheilus fasciatus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2025, 56(2): 442-449 (in Chinese).
- [21] Kolbe T, Walter I, Rülcke T. Influence of graft size, histocompatibility, and cryopreservation on reproductive outcome following ovary transplantation in mice[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2019, 36(12): 2583-2591.
- [22] Christensen E A F, Grosell M, Steffensen J F. Maximum salinity tolerance and osmoregulatory capabilities of European perch *Perca fluviatilis* populations originating from different salinity habitats[J]. *Conservation Physiology*, 2019, 7(1): coz004.
- [23] Yamazaki A, Nishimiya Y, Tsuda S, *et al.* Freeze tolerance in sculpins (Pisces; Cottoidea) inhabiting north pacific and arctic oceans: antifreeze activity and gene sequences of the antifreeze protein[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(4): 139.
- [24] Villalobos E F, Pereira W A, Pérez-Atehortúa M, *et al.* Influence of dietary fatty acids on fish sperm tolerance to cryopreservation[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2025, 17(1): e12968.
- [25] Guan M, Rawson D M, Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes by vitrification[J]. *CryoLetters*, 2010, 31(3): 230-238.
- [26] Harvey B, Ashwood-Smith M J. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes[J]. *Cryobiology*, 1982, 19(1): 29-40.
- [27] Plachinta M, Zhang T, Rawson D M. Studies on cryoprotectant toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) oocytes[J]. *CryoLetters*, 2004, 25(6): 415-424.
- [28] Spindler R, Wolkers W F, Glasmacher B. Effect of Me₂SO on membrane phase behavior and protein denaturation of human pulmonary endothelial cells studied by in situ FTIR spectroscopy[J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2009, 131(7): 074517.
- [29] Tunçer S, Gurbanov R, Sheraj I, *et al.* Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 14828.
- [30] Galvao J, Davis B, Tilley M, *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO[J]. *The FASEB Journal*, 2014, 28(3): 1317-1330.
- [31] Matsumura K, Hayashi F, Nagashima T, *et al.* Molecular mechanisms of cell cryopreservation with polyampholytes studied by solid-state NMR[J]. *Communications Materials*, 2021, 2(1): 15.
- [32] Nynca J, Judycka S, Liszewska E, *et al.* Utility of different sugar extenders for cryopreservation and post-thaw storage of sperm from Salmonidae species[J]. *Aquaculture*, 2016, 464: 340-348.
- [33] Abualreesh M, Myers J N, Gurbatow J, *et al.* Development of an effective cryopreservation protocol for blue catfish oogenesis[J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2021, 83(4): 336-345.
- [34] Cheng S, Sheng Z, Zhu J Q, *et al.* Effects of trehalose, bovine serum albumin, and sucrose, on the integrity of the plasma membrane of *Pseudosciaena crocea* semen after cryopreservation[J]. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2015, 67: 1-12.
- [35] Shaliutina-Loginova A, Loginov D S. Oxidative stress and DNA fragmentation in frozen/thawed common carp *Cyprinus carpio* sperm with and without supplemental proteins[J]. *Animal Reproduction Science*, 2023, 251: 107213.
- [36] Marques L S, Fossati A A N, Rodrigues R B, *et al.* Slow freezing versus vitrification for the cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) ovarian tissue[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 15353.
- [37] Yang C Y, Yeh Y H F, Lee P T, *et al.* Effect of cooling rate and cryoprotectant concentration on intracellular ice formation of small abalone (*Haliotis diversicolor*) eggs[J]. *Cryobiology*, 2013, 67(1): 7-16.
- [38] Matrosov A, Soloviev A, Ponomareva E, *et al.* Finite element modeling of crystallization with temperature jump to improve cryopreservation of fish germ cells[J]. *Processes*, 2024, 12(2): 413.
- [39] 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.
- [40] Liu Y B, Li X X. Successful oocyte cryopreservation in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Aquaculture*, 2015, 438: 55-58.
- [41] Yuan P S, Dong X Q, Wang H C, *et al.* Modeling and typical cases analyze at the cell-scale of transmembrane transport and intracellular crystallization and recrystallization during the freeze-thaw process[J]. *Cryobiology*, 2025, 118: 105210.
- [42] Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, *et al.* The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes[J]. *Human Reproduction*, 2005, 20(12): 3385-3389.
- [43] Cirino L, Tsai S, Wen Z H, *et al.* Lipid profiling in chilled coral larvae[J]. *Cryobiology*, 2021, 102: 56-67.
- [44] Lin C, Kuo F W, Chavanich S, *et al.* Membrane lipid phase transition behavior of oocytes from three gorgonian corals in relation to chilling injury[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92812.
- [45] Ramos L, Galbinski S, Nacul A, *et al.* Detailed morphological analysis of cryoinjury in human ovarian tissue following vitrification or slow freezing[J]. *Reproductive Sciences*, 2022, 29(8): 2374-2381.
- [46] Larman M G, Katz-Jaffe M G, Sheehan C B, *et al.* 1, 2-propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology[J]. *Human Reproduction*, 2007, 22(1): 250-259.
- [47] Ottosen L D M, Hindkjær J, Ingerslev J. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2007, 24(2-3): 99-103.
- [48] Sazhina E A, Okotrub K A, Amstislavsky S Y, *et al.* Effect of low temperatures on cytochrome photoresponse in mouse embryos[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019, 669: 32-38.
- [49] Figueroa E, Lee-Estevéz M, Valdebenito I, *et al.* Effects of cryopreservation on mitochondrial function and sperm quality in fish[J]. *Aquaculture*, 2019, 511: 634190.
- [50] Larsen S, Wright-Paradis C, Gnaiger E, *et al.* Cryopreservation of human skeletal muscle impairs mitochondrial function[J]. *CryoLetters*, 2012, 33(3): 169-175.
- [51] Gale S L, Buritt D J, Tervit H R, *et al.* Can additives ameliorate oxidative stress and improve development of Greenshell™ mussel (*Perna Canaliculus*) oocytes during cryopreservation? [J] *CryoLetters*, 2015, 36(1): 37-44.
- [52] Mostek A, Słowińska M, Judycka S, *et al.* Identification of oxidatively modified proteins due to cryopreservation of carp semen[J]. *Journal of Animal Science*, 2018, 96(4): 1453-1465.
- [53] Hong Y H, Boiti A, Vallone D, *et al.* Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: transcriptional regulation and evolution[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(3): 312.
- [54] Sreebun S, Booncherd K, Thongchaitriwat S, *et al.* Cryopreservation of the whole testes of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and its effects on apoptosis, germ cell-specific gene expression, germ cell transplantability, and DNA methylation[J]. *Theriogenology*, 2024, 229: 178-190.
- [55] Greene L E, Lincoln R, Cosa G. Spatio-temporal monitoring of lipid peroxy radicals in live cell studies combining fluorogenic antioxidants and fluorescence microscopy methods[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018, 128: 124-136.
- [56] Yu W M, Li S Q, Wu H X, *et al.* Endothelial Nox4 dysfunction aggravates atherosclerosis by inducing endoplasmic reticulum stress and soluble epoxide hydrolase[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2021, 164: 44-57.
- [57] Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31(S1): 177-183.
- [58] Wai T, Ao A, Zhang X Y, *et al.* The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility[J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 83(1): 52-62.
- [59] 陈张帆, 丁兰清, 程鹏, 等. 施氏鲟精子超低温冷冻前后的蛋白组学分析 [J]. *水产学报*, 2025, 49(1): 019602.
- Chen Z F, Ding L Q, Cheng P, *et al.* Proteomic analysis between fresh and freeze-thawing semen in *Acipenser schrenckii*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2025, 49(1): 019602 (in Chinese).
- [60] Guan M, Rawson D M, Zhang T. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes using improved controlled slow cooling protocols[J]. *Cryobiology*, 2008, 56(3): 204-208.
- [61] Liu G Y, Li J Y, Wu C Y. Reciprocal regulation of actin filaments and cellular metabolism[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2022, 101(4): 151281.
- [62] Godoy L C, Streit D P Jr, Zampolla T, *et al.* A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles[J]. *Cryobiology*, 2013, 67(3): 347-354.
- [63] Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters J J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007, 462(2): 245-253.
- [64] Lee G K, Shin H, Lim H J. Rapamycin influences the efficiency of *in vitro* fertilization and development in the mouse: a role for autophagic activation[J]. *Asian-Australasian Journal*

- of *Animal Sciences*, 2016, 29(8): 1102-1110.
- [65] Lin C, Tsai S. The effect of cryopreservation on DNA damage, gene expression and protein abundance in vertebrate[J]. *Italian Journal of Animal Science*, 2012, 11(1): e21.
- [66] Murray K A, Gibson M I. Chemical approaches to cryopreservation[J]. *Nature Reviews Chemistry*, 2022, 6(8): 579-593.
- [67] Pickering S J, Johnson M H. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte[J]. *Human Reproduction*, 1987, 2(3): 207-216.
- [68] Riesco M F, Robles V. Cryopreservation causes genetic and epigenetic changes in zebrafish genital ridges[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67614.
- [69] Suo L, Meng Q G, Pei Y, *et al.* Effect of cryopreservation on acetylation patterns of lysine 12 of histone H4 (acH4K12) in mouse oocytes and zygotes[J]. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2010, 27(12): 735-741.
- [70] Trapphoff T, Dieterle S. Cryopreservation of ovarian and testicular tissue and the influence on epigenetic pattern[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13): 11061.
- [71] Appeltant R, Somfai T, Santos E C S, *et al.* Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation[J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2017, 29(12): 2419-2429.
- [72] da Silva A M S, Bruno J B, de Lima L F, *et al.* Connexin 37 and 43 gene and protein expression and developmental competence of isolated ovine secondary follicles cultured *in vitro* after vitrification of ovarian tissue[J]. *Theriogenology*, 2016, 85(8): 1457-1467.
- [73] Buschiazzo J, Ríos G L, Canizo J R, *et al.* Free cholesterol and cholesterol esters in bovine oocytes: implications in survival and membrane raft organization after cryopreservation[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180451.
- [74] Zaręba D, Ziarno M. Tween 80™-induced changes in fatty acid profile of selected mesophilic lactobacilli[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2024, 71: 13014.
- [75] Adams S L, Salinas-Flores L, Lim M H. Diet conditioning of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, broodstock to improve oocyte cryopreservation success[J]. *Journal of Shellfish Research*, 2013, 32(2): 391-399.
- [76] Pelech S L, Pritchard P H, Brindley D N, *et al.* Fatty acids promote translocation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase to the endoplasmic reticulum and stimulate rat hepatic phosphatidylcholine synthesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(11): 6782-6788.
- [77] Cirino L, Tsai S, Wang L H, *et al.* Supplementation of exogenous lipids via liposomes improves coral larvae settlement post-cryopreservation and nano-laser warming[J]. *Cryobiology*, 2021, 98: 80-86.
- [78] Huang H F, He R H, Sun C C, *et al.* Function of aquaporins in female and male reproductive systems[J]. *Human Reproduction Update*, 2006, 12(6): 785-795.
- [79] Seki S, Kouya T, Hara T, *et al.* Exogenous expression of rat aquaporin-3 enhances permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2007, 53(3): 597-604.
- [80] Valdez D M Jr, Tsuchiya R, Seki S, *et al.* A trial to cryopreserve immature medaka (*Oryzias latipes*) oocytes after enhancing their permeability by exogenous expression of aquaporin 3[J]. *Journal of Reproduction and Development*, 2013, 59(2): 205-213.
- [81] Zhou D, Liu H Y, Zheng L, *et al.* Metformin alleviates cryoinjuries in porcine oocytes by reducing membrane fluidity through the suppression of mitochondrial activity[J]. *Communications Biology*, 2024, 7(1): 925.
- [82] Adjoumani J J Y, Abasubong K P, Zhang L, *et al.* Metformin attenuates high-carbohydrate diet-induced redox imbalance, inflammation, and mitochondrial dysfunction in *Megalobrama amblycephala*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2024, 50(6): 2237-2253.
- [83] Lan T Y, Zhang K, Lin F F, *et al.* Effects of MICU1-mediated mitochondrial calcium uptake on energy metabolism and quality of vitrified-thawed mouse metaphase II oocytes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): 8629.
- [84] Weng C F, Gong H Y, Wu J L, *et al.* Antagonizing effects of type I antifreeze protein on Ca⁺⁺ uptake in fish TO-2 cells[J]. *Zoological Studies*, 2000, 39(2): 144-150.
- [85] Chakraborty S, Jana B. Calcium ion implicitly modulates the adsorption ability of ion-dependent type II antifreeze proteins on an ice/water interface: a structural insight[J]. *Metallomics*, 2019, 11(8): 1387-1400.
- [86] Gamage U S K, Hashimoto S, Miyamoto Y, *et al.* Mitochondria transfer from adipose stem cells improves the developmental potential of cryopreserved oocytes[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(7): 1008.
- [87] Cheng C M, Nagarajan D, You W J, *et al.* Manganese superoxide dismutase-cell-penetrating peptide fusion protein supplementation as a novel strategy for the effective cryopres-

- vation of Portuguese oyster *Crassostrea angulata* oocytes[J]. *Aquaculture*, 2025, 606: 742585.
- [88] Yang S, Xu W J, Hua Y L, *et al.* Incorporation of reduced glutathione to the extender improves frozen-thawed sperm function and fertility potential in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2025, 40: 102590.
- [89] Yang S, Zeng Z L, Chen X H, *et al.* Melatonin supplementation to the freezing medium enhances post-thaw sperm quality and fertility of giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*)[J]. *Aquaculture Reports*, 2023, 31: 101662.
- [90] Zhu X C, Miller-Ezzy P, Gluis M, *et al.* Effects of phosphatidylcholine and tocopherol during larval cryopreservation of Pacific oysters (*Magallana gigas*)[J]. *Aquaculture*, 2023, 574: 739650.
- [91] Plotnikov E Y, Zorov D B. Pros and cons of use of mitochondria-targeted antioxidants[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(8): 316.
- [92] Bisht S, Dada R. Oxidative stress: major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies[J]. *Frontiers in Bioscience, Scholar*, 2017, 9(3): 420-447.
- [93] Jin B, Mazur P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9271.
- [94] Khosla K, Kangas J, Liu Y L, *et al.* Cryopreservation and laser nanowarming of zebrafish embryos followed by hatching and spawning[J]. *Advanced Biosystems*, 2020, 4(11): 2000138.
- [95] Graham B, Bailey T L, Healey J R J, *et al.* Polyproline as a minimal antifreeze protein mimic that enhances the cryopreservation of cell monolayers[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(50): 15941-15944.
- [96] Sasaki K, Matsui Y, Miyara M, *et al.* Glass transition and dynamics of the polymer and water in the poly(vinylpyrrolidone)-water mixtures studied by dielectric relaxation spectroscopy[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2016, 120(27): 6882-6889.
- [97] Hoshi S. Cryodevices developed for minimum volume cooling vitrification of bovine oocytes[J]. *Animal Science Journal*, 2022, 93(1): e13683.
- [98] Nagao M, Sengupta J, Diaz-Dussan D, *et al.* Synthesis of highly biocompatible and temperature-responsive physical gels for cryopreservation and 3D cell culture[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2018, 1(2): 356-366.
- [99] Muangsri R, Chuysinuan P, Thanyacharoen T, *et al.* Utilization of freeze thaw process for polyvinyl alcohol/sodium alginate (PVA/SA) hydrogel composite[J]. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 2022, 32(2): 34-41.
- [100] Gurruchaga H, Saenz del Burgo L, Orive G, *et al.* Cell microencapsulation and cryopreservation with low molecular weight hyaluronan and dimethyl sulfoxide[J]. *Bio-protocol*, 2019, 9(4): e3164.
- [101] Wang S S, Chen L, Fang J S, *et al.* A compact, high-throughput semi-automated embryo vitrification system based on hydrogel[J]. *Reproductive BioMedicine Online*, 2024, 48(5): 103769.

Recent advances in the studies on cryopreservation of ovarian tissues and oocytes in fish species

YAO Jingting , SU Shengqi * , XU Hongyan *

(Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education,
Key Laboratory of Aquatic Sciences of Chongqing, College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 402460, China)

Abstract: Fish germplasm conservation is crucial for sustainable aquaculture and biodiversity preservation. In contrast to the well-established technique of sperm cryopreservation, the cryopreservation of oocytes remains a major challenge due to their large size, high yolk content, and complex cellular structure. This review systematically synthesizes the current status, persistent challenges, and recent advances in the cryopreservation of fish ovarian tissues and oocytes, with the ultimate aim to provide a theoretical foundation for establishing efficient and standardized cryopreservation protocols. Cryopreservation efficiency for fish ovarian tissues and oocytes is mainly determined by biological characteristics and technical variables. Biologically, the oocyte developmental stage, tissue sample size, and species-specific physiology are crucial. Technically, the composition, concentration, and toxicity of cryoprotectants (CPAs), the choice of cryopreservation protocol, along with the cooling and warming rates, also have significant influence on cellular dehydration, ice crystal formation, survival rate and developmental capacity. The freeze-thaw process and CPAs can induce various cryoinjuries on ovarian cells. These include mechanical damage from ice crystals and membrane lipid phase transition, profound oxidative stress resulting from metabolic disruption and CPA toxicity, as well as a range of cellular and subcellular damage such as disruption of membrane integrity, mitochondrial dysfunction, DNA damage, and chromatin disorganization. To address these challenges, a variety of optimization strategies has been developed. These mainly encompass cellular preconditioning (e.g., membrane lipid modulation, antioxidant application) and targeted mitochondrial protection (e.g., via metabolic inhibition or exogenous supplementation). Concurrently, technological advances focus on ice-crystal control through novel CPAs or ultra-rapid warming, the use of biomaterial-based carriers for enhanced stability, and the adoption of automated platforms like microfluidics to improve standardization and scalability. In conclusion, considerable progress has been made in elucidating cryodamage mechanisms and devising protective strategies for fish ovarian materials. In order to establish a comprehensive fish maternal germplasm biobank, several proposals were advanced, including prioritizing study of subcellular cryo-response mechanisms, extending preservation limits, standardizing protocols, and improving *in vitro* culture systems. Thus, this work would provide the basis for the sustainable development of aquaculture and the conservation of genetic resources in endangered aquatic animals.

Key words: fish species; ovarian tissue cryopreservation; oocyte cryopreservation; cryoinjury mechanism; advanced techniques

Corresponding authors: SU Shengqi. E-mail: sushengqi@swu.edu.cn;

XU Hongyan. E-mail: xuhyzqh@163.com

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2022YFD2400902)