温度、时间及葡萄糖加载对深低温(-15℃附近)冻存蚂蚁复活的影响

张素清,周一欣,闫井夫,杨 阳,刘 静

中国科学院理化技术研究所,北京 100080

[摘要] 微小生命个体的冷冻复活研究,可以为今后实现极具挑战性的动物个体乃至人体的冷冻复活提供实验依据。对黑背蚂蚁进行了冷冻(-15℃左右)复活研究,试验探讨了蚂蚁复活率与冷冻速率、时间、温度水平的关系,以及喂饲葡萄糖对蚂蚁复活率的干预作用。结果显示:蚂蚁冷冻后的复活率可能与降温速度呈正比,至少快速降温不会降低蚂蚁的复活率;冷冻时间越长,温度越低,蚂蚁复活率越低;喂饲葡萄糖则可以增加蚂蚁的抗冷冻损伤能力。

[关键词] 活体保存;低温生物;冷冻复活;蚂蚁冻存;抗冻剂活体加载;温度测试

[中图分类号] Q811.213,R318.52,TB61 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-7857(2007)05-0034-04

Effects of Freezing Temperature, Time and *in vivo* Feeding of Glucose to the Revival Ratio of Ants Subject to Cryopreservation Around -15℃

ZHANG Suqing, ZHOU Yixin, YAN Jingfu, YANG Yang, LIU Jing

Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

Abstract: Tests on the freezing revival of a micro biological body may provide experimental evidences to support future scientific efforts in freezing and surviving an animal or even a human being. In this study, revival experiments of ants subject to cooling around -15℃ were performed. Correlations between the ant revival ratio and the freezing rate, the time and temperature levels were investigated. Particularly, the influence of *in vivo* feeding with glucose on the ant revival ratio was also tested. It is found that the revival ratio of the ants under freezing around -15℃ is directly proportional to the freezing rate, at least, a rapid freezing will not lower the revival ratio. The longer freezing time and the lower freezing temperature, the lower revival ratio will be. If feeding with glucose, the capability for the ant to withstand the freezing injury may be improved.

Key Words: preservation of biological body; cryobiology; freezing revival; ant cryopreservation; *in vivo* loading of anti freeze agent; temperature measurement

CLC Numbers: Q811.213, R318.52, TB61 **Document Code:** A **Article ID:** 1000-7857(2007)05-0034-04

0 引言

自 1949 年英国生物学家偶然发现添加甘油的精子可以低温保存而不死亡以后,低温生物学取得了长足进展[1],人类分别在 20 世纪 60 年代实现了血液保存,70 年代实现了牛、羊胚胎保存,80 年代实现了胰岛细胞保存。体积由小到大,结构由简单到复杂,保存的时间也越来越长。目前,生物材料的低温保存在医学上的应用已有突破性的进展,主要体现在自体移植和异体移植类材料的保存上,相关对象涉及人的血液及其某些成分,如精子、胚胎、骨髓细胞、皮肤、胰腺组织、甲状腺,以及制药用的高品位菌种等。然而,由于各种生物细胞的降温和复温率千差万别,对所使用的抗冻剂的要求

收稿日期:2007-01-18

基金项目:国家自然科学基金项目(50325622,50436030)

作者简介:张素清,女,北京中关村中国科学院理化技术研究所,博士后,主要研究方向为低温生物学;

E-mail: zhangsqing2002@yahoo.com.cn

刘 静(通讯作者),男,北京中关村中国科学院理化技术研究所,研究员,主要从事生物热物理研究;E-mail:jliu@cl.cryo.ac.cn

也各不相同;特别是由于生物器官体积通常较大,在降温过程中很难达到内外温度一致和浓度一致。所以直到目前为止,能实现低温保存的生物材料大多仍仅限于结构相对简单的细胞,少数是组织,如皮肤、角膜等,几乎没有器官,更不用说动物或人的整体了。追溯起来[1],1971 年曾有研究报道,采用液氮长时间保存舌蝇和白蛉并获得成功,但此后的案例十分少见。显然,对微小生命个体的冷冻复活研究,可以为今后实现大动物个体乃至人体的冷冻复活提供实验参考依据。为此,本文通过引入新的试验方案,对黑背蚂蚁进行了冷冻(-10℃以下)复活研究,探讨了蚂蚁复活率与冷冻速度、时间、温度的关系,以及喂饲天然的抗冻剂葡萄糖对蚂蚁复活率的干预效果。

1 材料与方法

1.1 材料

昆虫:以黑背蚂蚁为试验对象;试剂:葡萄糖为北京化学试剂公司提供,分析纯;主要仪器:Rongsheng BCD-182/HC 型冰箱,Agilent 34902A 数据采集系统。

1.2 方法

将蚂蚁分为对照和实验两组。对照组为野外捕捉的蚂蚁,立即进行冷冻-复活实验;实验组为野外捕捉的蚂蚁,分别被饲养 7 d 和 14 d 后,再进行冷冻-复活实验。食物为葡萄糖。捕捉到的蚂蚁放于 500 ml 的广口瓶中,广口瓶放在冰箱的-20℃冷冻室中,热电偶检测瓶内温度。从瓶内温度降到-0.5℃左右开始记时,30 min,5 h,48 h 后从冰箱中取出广口瓶,记录蚂蚁复活所需时间,以及取出广口瓶 30 min,1 h,2 h 后蚂蚁复活的只数。

2 结果

2.1 冷冻时间对存活率的影响

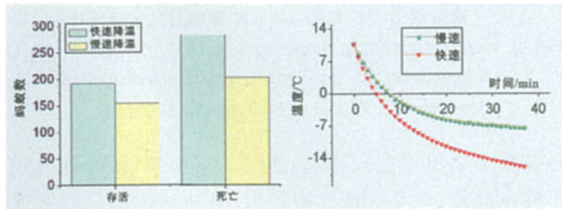
本实验依据冷冻的时间共分为 3 个组,即 30 min,5 h,48 h 组。结果显示:30 min 组,蚂蚁复活率为 55.29%;5 h 组,蚂蚁复活率为 15.67%;48 h 组,蚂蚁复活率为 1.31%。可见,30 min 组的蚂蚁复活率明显高于 5 h 组和 48 h 组,具有高度统计学意义($p<0.01$),详见表 1。从表 1 可以看出,3 个组所达到的最低温度不同,但其降温速率没有明显的差异。这一结果表明,冷冻时间与蚂蚁复活率呈负相关,冷冻时间越长,蚂蚁复活率越低。另外,到达的最低温度可能对蚂蚁的复活率也有影响。

表 1　冷冻时间对蚂蚁复活率的影响

Table 1　Effects of freezing time on revival ratio of ants

组别	降温速度 /℃·min⁻¹	样本数/只	最低温度/℃	复活数/只	死亡数/只	复活率/%
30 min	0.012 453	539	-12℃	298	241	55.29
5 h	0.013 516	600	-15℃	94	506	15.67**
48 h	0.013 246	534	-18℃	7	527	1.31**

注:** 为 $p<0.01$。



(a)　　(b)

图 1　不同降温速率对蚂蚁复活率的影响(a)及快、慢降温速度的比较(b)

Fig. 1　Impact of freezing rate on revival ratio of ants (a), comparison of and temperatures between the slow and fast freezing (b)

2.2 降温速度对存活率的影响

从图 1(a)中可以看出,快速降温组蚂蚁复活率高于慢速降温组,不过没有统计学意义($p>0.05$)。从图 1(b)可以看出,快速降温组的降温速率明显高于慢速降温组,而且达到的最低温度明显低于慢速降温组。从图 1(b)中还可以看出,两组的冷冻时间基本一致。这些结果显示,提高降温速度不会降低蚂蚁的复活率。

2.3 最低温度对存活率的影响

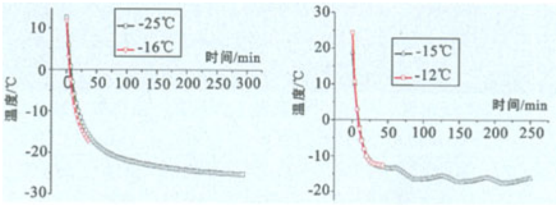
从表 2 中可以看出,在快速降温组之间比较,最低温度为-16℃组的蚂蚁复活率明显高于最低温度为-25℃组($p<0.01$);而在慢速降温组之间比较,则最低温度为-12℃组的蚂蚁复活率明显高于最低温度为-16℃组的情况($p<0.01$)。从图 2 还可以看出,快速降温组和

表 2　最低温度对蚂蚁存活率的影响

Table 2　Effects of the lowest temperature on the revival ratio of ants

组别	样本数/只	复活数/只	死亡数/只	复活率/%
快速冷冻至-25℃	825	0	825	0
快速冷冻至-16℃	952	384	568	40.34**
慢速冷冻至-15℃	535	122	413	22.80
慢速冷冻至-12℃	539	298	241	55.29**

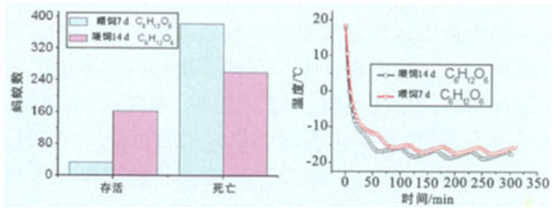
注:** 为 $p<0.01$



(a) (b)

图 2 最低温为-25 ℃及-16 ℃的快冻组温度响应(a)及最低温为-16 ℃及-12 ℃的慢冻组温度响应(b)

Fig. 2 Fast temperature dropping down to -25 ℃ and -16 ℃, respectively (a), and slow temperature dropping down to -16 ℃ and -12 ℃, respectively (b)



(a) (b)

图 3 喂糖 7 d 与喂糖 14 d 蚂蚁复活率的比较(a)和二者降温速度的比较(b)

Fig. 3 Ant revival ratios for groups of feeding glucose 7d and 14 d, respectively (a), and temperature dropping rate for groups of feeding glucose 7 d and 14 d, respectively (b)

慢速降温组组内比较,降温速度基本相同,而冷冻时间不同。此外,表 2 和图 2 中还显示,快速降温最低温度为-25℃组与慢速降温组最低温度为-15℃组比较,冷冻时间基本相同,但蚂蚁复活率有明显的统计学意义($p<0.01$)。说明下降的温度越低,蚂蚁复活率越低。

2.4 喂饲葡萄糖对蚂蚁存活率的影响

从表 3 中可以看出,喂饲葡萄糖组的蚂蚁冷冻 0.5 h 的复活率为 85.54%,而对照(不喂饲葡萄糖)组的蚂蚁复活率为 55.29%。两组比较,具有高度的统计学意义($p<0.01$)。冷冻 5 h, 喂饲葡萄糖组的蚂蚁复活率为 7.05%,而对照组的蚂蚁复活率为 13.82%,对照组明显高于喂饲葡萄糖组($p<0.01$)。冷冻 48 h,喂饲葡萄糖组的蚂蚁复活率为 0.55%, 对照组的蚂蚁复活率为 0.92%,对照组高于喂饲葡萄糖组,但两组比较无统计学意义($p>0.05$)。

表 3 喂饲葡萄糖对蚂蚁存活率的影响

Table 3 Effects of feeding glucose on the revival ratio of ants

组别	样本数/只	存活数/只	死亡数/只	存活率/%
对照组(0.5 h)	539	298	241	55.29
喂饲葡萄糖组(0.5 h)	664	568	96	85.54**
对照组(5 h)	861	119	742	13.82**
喂饲葡萄糖组(5 h)	809	57	752	7.05
对照组(48 h)	757	7	750	0.92
喂饲葡萄糖组 (48 h)	904	5	899	0.55

注: ** 为 $p<0.01$

2.5 喂饲葡萄糖 7 d 与喂饲 14 d 蚂蚁存活率的比较

图 3(a)显示,喂饲葡萄糖 14 d 组,蚂蚁复活率明显高于喂饲葡萄糖 7 d 组,具有高度的统计学意义($p<0.01$)。图 3(b)显示,两组的冷冻时间、降温速率基本相同,而且在相同时间点,喂饲葡萄糖 14 d 组的温度还略低于喂饲葡萄糖 7 d 组。本实验结果说明,喂饲葡萄糖时间延长,蚂蚁的抗冻能力增加。

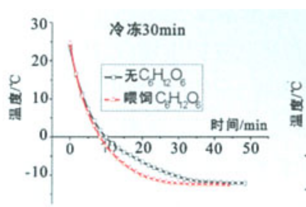
3 讨论

低温环境可使活组织的代谢活动能力显著降低,当外界温度低至一定程度时,肌体细胞既不会衰老,也不会退化,处于"生命机会停顿"状态,因而使生命得以永恒封存。从理论上来说,一个生物若能在 4℃的环境下存活 2 h,那么,在-40℃下就能保存数日,在-80℃下可保存数月,而在-196℃下则可望保存几个世纪[1]。一些细胞能在-196℃低温下长期保存,这在实践中已日益广泛地被加以应用,但对动物个体甚至是微小的生命个体的规范的冷冻复活试验研究,至今却很少见诸学术杂志。本文工作是一个有益的尝试。

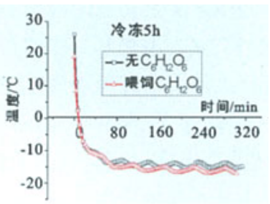
实际上,某些动物自身的耐寒性能使其安全度过冬季,而其器官和组织并不被低温损伤。对于大多数物种来说,其体内允许的最大结冰容量是固定的,它们通过降低达到这一最大结冰容量所对应的温度来实现低温下存活。一旦温度下降至此允许温度之下,或者低温暴露时间过长,超过了允许的最大结冰容量,生物体将遭受不可逆转的低温损伤[2]。有作者[3]总结了耐受结冰性动物成功存活必须满足的 4 个条件: ① 冰晶必须只局限于细胞外部,且冰晶引起的损伤应尽量达到最小; ② 冷冻速率必须足够慢, 以维持细胞渗透压在一定范围之内, 保证有足够的时间进行细胞内外离子和溶质的重新分布,并允许细胞膜在一定范围内收缩;③ 细胞的容积缩小和脱水程度不能超过最大的损伤范围;④ 细胞必须能够在长时间被胞外冰晶包围所引起的局部缺血的环境中生存。因此,动物的耐寒性与低温程度、低温暴露时间及降温速度有关。笔者所做实验结果显

示，蚂蚁冷冻后的复活率与低温程度、低温暴露时间呈反比，即温度越低，低温暴露时间越长，蚂蚁的复活率越低。从图 1(b)可以看出，快速降温与慢速降温的冷冻时间相同，快速降温的最低温度明显低于慢速降温；表 2 显示，冷冻温度越低，蚂蚁的复活率越低；而图 1(a)却显示，两组蚂蚁的复活率没有明显的差异($p>0.05$)，说明降温速度越快，蚂蚁的损伤越小。此结果与细胞、组织的低温冷冻报道一致[4]，而与从活体动物中得到的一些结论[3]相反。

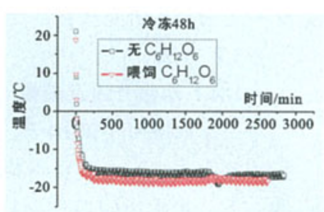
耐受结冰的动物适应胞外结冰的机制包括 [5-9]：① 成功地运用冰核蛋白诱导和控制胞外结冰，产生抗冻蛋白，避免复温中的再结晶；② 调节细胞容积，控制细胞内溶质组分，以对抗由于胞外结冰引起的渗透压变化，相应方法包括产生小分子抗冻物质，如葡萄糖、甘油、海藻糖等，以此控制细胞容积及产生大分子的抗冻蛋白，还包括增加细胞内不冻结水的含量的方法；③ 改变细胞的代谢机制来适应冷冻状态下的代谢需求，如改变细胞膜的组分和酶的种类，使其能适应低温环境。本实验探讨了葡萄糖活体长时加载对蚂蚁存活率的影响，结果显示：喂饲葡萄糖 7 d，冷冻 30 min，蚂蚁复活率明显高于对照组（不喂饲葡萄糖组）；而冷冻 5 h 和 48 h 组，复活率无改变。从图 4 可以看出，冷冻 30 min，两组的最低温度基本相同，而冷冻 5 h 和 48 h，喂饲葡萄糖组的温度明显低于对照组，原因可能是低温损伤



(a) 冷冻 30 min



(b) 冷冻 5 h



(c) 冷冻 48 h

图 4 冷冻 30 min，5 h，48 h 喂饲葡萄糖组与对照组降温速度的比较

Fig. 4 Temperature response for freezing of 30 min, 5 h, and 48 h, respectively for either the feeding glucose group or the control groups

代偿了葡萄糖的损伤作用。喂饲葡萄糖 14 d，冷冻 5 h，蚂蚁的复活率明显高于喂饲葡萄糖 7 d 者，见图 3(a)，因此，葡萄糖活体加载增加了蚂蚁的抗冻能力。

4 小结

对完整生命个体的冷冻保存，历来是具有重大科学意义和实际应用前景的课题，目前尚存在着巨大的鸿沟有待跨越。本文以黑背蚂蚁为试验研究对象，尝试通过引入活体加载无毒性绿色抗冻剂即葡萄糖的新颖方法，从多个试验角度考察了黑背蚂蚁复活率与冷冻速率、时间、温度水平乃至喂饲葡萄糖的关系，获得了一些富有启发性的数据。尽管目前的结果离成功冻存蚂蚁还存在很大距离，但这些努力为今后此领域内的探索工作提供了重要的参考信息。

参考文献(References)

[1] 华泽钊，任禾盛. 低温生物医学技术 [M]. 北京：科学出版社，1994.
HUA Zezhao, REN Hesheng. Low temperature biomedical technology[M]. Beijing: Science Press, 1994.

[2] MURPHY D J. The relationship between the lethal freezing temperatures and the amounts of ice formation the foot muscle of marine snails [J]. Cryobiology, 1979, 16: 292–300.

[3] STOREY K B, STOREY J M. Freeze tolerance in animals [J]. Physiol Rev, 1988, 68: 42–58.

[4] 刘金刚，刘作斌. 低温医学[M]. 北京：人民卫生出版社，1993.
LIU Jingang, LIU Zuobin. Cryomedicine[M]. Beijing: People′s Health Press, 1993.

[5] KLOK C J, CHOWN S L. Critical thermal limits, temperature tolerance and water balance of a sub-antarctic kelp fly, paractora dreuxi (Diptera: Helcomyzidae)[J]. J Insect Physiol, 2001, 47: 95–109.

[6] WHARTON D A, GOODALL G, MARSHALL C J. Freezing rate affects the survival of a short -term freezing stress in panagrolaimus davidi, an antarctic nematode that survives intra cellular freezing [J]. Cryoletters, 2002, 23: 5–10.

[7] RUBINSKY B. Microscale heat transfer in biological systems at low temperatures [J]. Exp Heat Trans, 1997, 10: 1–29.

[8] STOREY K B, BIOSCHOF J, RUBINSKY B. Cryomicroscopic analysis of freezing in liver and freeze-tolerant wood frog[J]. Am J Physiol, 1992, 263: 185–194.

[9] GREEN C. Mammalian hibernation: lessons for organ preservation?[J]. Cryoletters, 2000, 21: 91–98.

(责任编辑 李慧政)