

环境因子对牙鲆精子运动能力的影响*

王宏田 张培军

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

摘要 于1997年5—6月,在山东荣成市石岛养殖场采用挤压法收集牙鲆亲鱼的精子,利用显微镜观察精子的活力,研究外界环境因子的变化对牙鲆精子运动能力的影响。结果表明,将蔗糖、NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂等溶解于去离子水中,制成不同浓度即具有不同渗透压的溶液,不同渗透压的溶液对精子运动的诱导结果不同。EDTANa₂溶液不能诱导精子运动。在人工海水中加入一定量的EDTANa₂后,可使原先运动的精子静止;在该溶液中加入新的Ca²⁺后,将不再诱导原来受到EDTANa₂抑制的精子;如用MgSO₄代替溶液中的CaCl₂,可诱导精子运动;而当用MgCl₂代替溶液中的CaCl₂,以及用CaCl₂或NaCl代替MgSO₄时,溶液即失去诱导精子运动的能力。在pH=4.0—9.5的海水中,牙鲆精子均可正常运动。

关键词 牙鲆 精子 运动 渗透压 离子 pH值

学科分类号 Q28

影响硬骨鱼类精子运动能力的因素有渗透压、金属离子、pH值等(Morisawa *et al.*, 1980),对这一问题,目前仍未彻底了解其分子机制。在不同的实验过程中,环境因子对鱼类精子产生不完全相同、甚至是相反的结果,学者们依据不同的实验数据,对其分子机制提出了不同的假设(Boitano *et al.*, 1991; Tanimoto *et al.*, 1988)。本文报告环境因子对牙鲆精子运动能力的影响的研究结果,以期探讨其内部分子机制提供充分的依据,同时也为牙鲆的人工育苗提供资料。

1 材料与方 法

实验所用的牙鲆 [*Paralichthys olivaceus* (T. et S.)] 精子,于1997年5—6月在山东荣成市石岛养殖场采用人工挤压的方法取自牙鲆亲鱼。在挤压过程中注意防止尿液以及体表水分的污染。采集后的精子置于干净的小烧杯中,在冰浴中保存。实验方法参照Morisawa等(1984),略作改动。观察不同条件下精子的活动情况时,先将精液与不同的溶液按照1:1000的比例混合、摇匀,然后用干净的吸管将含有精子的溶液滴加在载玻片上,在100倍显微镜下观察并记录。精子运动能力以活动精子占全部精子的百分数表示。实验所用的蔗糖、NaCl、KCl、EDTANa₂、CaCl₂、MgCl₂、MgSO₄等均为分析纯。采用去离子水配置溶液。

2 结 果

2.1 不同浓度的各种溶液对牙鲆精子运动能力的影响

* 国家攀登计划B资助项目,PD B-6-1-2号。王宏田,男,出生于1970年3月,博士,E-mail: whouston3@yahoo.com

收稿日期: 1998-03-26, 收修改稿日期: 1998-08-18

不同浓度的蔗糖、NaCl、KCl、EDTANa₂溶液对牙鲆精子运动能力的影响见表1。

表1 不同浓度(mmol/L)的各种溶液对牙鲆精子运动能力(%)的影响

Tab.1 Effects of different solutions on motility of sperm of *P. olivaceus* (T. et S.)

蔗糖浓度	100	250	330	400	500	670	750	1 000	1 200
精子运动能力	0	0	5	80	90	90	80	0	0
NaCl浓度	50	100	150	300	500	600	800	1 000	
精子运动能力	0	0	0	20	60	20	0	0	
KCl浓度	50	100	150	300	500	600	800	1 000	
精子运动能力	0	0	0	30	60	20	0	0	
EDTANa ₂ 浓度	50	100	150	300	330	400	500		
精子运动能力	0	0	0	0	0	0	0		

2.2 Ca²⁺、Mg²⁺对牙鲆精子运动能力的影响

按 Morisawa 等(1984)的配方配置人工海水,每 1 000ml人工海水含: 30gNaCl; 0.8g KCl; 1.3gCaCl₂; 6.6gMgSO₄; 0.18gNaHCO₃。将牙鲆精子与人工海水混合,经测定,精子的运动能力接近 100%。

在混合液中逐渐加入 EDTANa₂(2mol / L)溶液,至其终浓度为 10mmol / L时,精子的运动能力为 20%;至混合液中 EDTANa₂终浓度为 40mmol / L时,精子的运动能力降至 0。此时再向混合液中逐渐加入 CaCl₂溶液(2mol / L),至其终浓度为 20mmol / L、40mmol / L 和 80mmol / L 时,精子的运动能力没有恢复。

用相同摩尔数的 MgCl₂和 MgSO₄代替人工海水中的 CaCl₂,使人工海水中不含 Ca²⁺,经测定,牙鲆精子的运动能力分别为 0 和 50%。

用相同摩尔数的 NaCl、CaCl₂以及 37mmol / L 的 CaCl₂代替人工海水中的 MgSO₄,然后分别与精液混合,经测定,精子的运动能力均为 0。

2.3 不同 pH 值对牙鲆精子运动能力的影响

用浓度为 1mol / L 的 HCl 和 NaOH 调节过滤海水,使其具有不同的 pH 值。然后将精液与各种不同 pH 值的海水混匀,进行观察,结果见表 2。

表2 不同pH值的海水对牙鲆精子运动能力(%)的影响

Tab.2 Effects of seawater with different pH on motility of sperm of *P. olivaceus* (T. et S.)

pH值	3.0	4.0	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	9.0	9.5
精子运动能力	0	30	50	60	70	90	90	90	90	50	40

3 讨论与结论

本实验着重研究了渗透压以及离子等外界环境因子对牙鲆精子运动能力的影响。根据已有的文献报道(Morisawa *et al.*, 1984)和作者进行的预实验结果,本实验在将牙鲆精液与溶液混合时采用 1:1 000的比例,这一比例可以消除精液中原有离子产生的误差影响。

3.1 渗透压的影响

利用不同的溶质形成一定的外界环境渗透压时,能够使精子运动。由以前的实验观

察结果可知,当牙鲆精子置于蒸馏水中的时候,精子膜发生破裂。当渗透压过高或过低时,精子皆处于静止状态,可能也是由于精子已受到损伤的缘故。

不同溶质对牙鲆精子运动能力的作用不同。牙鲆精子在浓度为 330mmol / L 的蔗糖溶液中的运动能力为 5%,而在相同渗透压的 NaCl 和 KCl 溶液中处于静止状态;在浓度为 600mmol / L 的 NaCl 和 KCl 溶液中的运动能力为 20%,而在 1 000mmol / L 的蔗糖溶液中全部处于静止状态。在实验中还观察到,精子在蔗糖溶液中活动速度快,持续时间长。

上述差别可能与各种溶质在溶液中的不同存在形式有关。NaCl、KCl 等在水溶液中以离子的形式存在,它们形成的渗透压对精子运动能力的影响,可能与电离后的离子对精子的作用有关(Takai *et al*, 1995)。而蔗糖是二聚糖分子,在水溶液中基本不电离,本身又不能直接被精子直接吸收,因此,蔗糖溶液影响牙鲆精子运动能力的机理可能与甘露糖相同,即通过改变精子的体积而使其内部的离子浓度发生改变,从而引起精子运动能力的变化(Oda *et al*, 1993)。

CaCl₂和 MgCl₂对牙鲆精子运动能力的影响与 KCl 和 NaCl 相似(实验记录)。EDTANa₂是 Ca²⁺和 Mg²⁺的络合剂,它对牙鲆精子的抑制作用可能由其络合作用所引起,尚需实验确证。因此认为,环境溶液的渗透压在一定的范围内,能够引起牙鲆精子的运动,这种运动是体内多种因素共同参与的复杂过程。

3.2 K⁺的影响

鲑鱼精子启动过程中伴随有 K⁺外流的现象(Tanimoto *et al*, 1994)。当溶液中 K⁺浓度较高时,鲑鱼精子处于静止状态;当溶液被稀释后,鲑鱼精子能够运动,同时伴有精子内部 cAMP 浓度升高的现象发生(Morisawa *et al*, 1982)。但这一现象在有些硬骨鱼类中并不存在(Takai *et al*, 1995)。本实验没有测定牙鲆精子运动时其内部的 K⁺浓度是否降低,但从表 1 可知,外界溶液中 K⁺浓度升高到一定值时,反而会诱导牙鲆精子产生运动。

3.3 Ca²⁺的影响

由表 1 可知,溶液环境中 Ca²⁺的存在并不是牙鲆精子运动的必要条件。EDTANa₂对牙鲆精子运动的抑制作用见表 1 和结果 2.2,有可能通过改变精子体内的 Ca²⁺浓度而实现(Tanimoto *et al*, 1994)。本实验结果表明,正在运动的精子一旦受到抑制,即使再增加 Ca²⁺的浓度,也难以使其恢复运动,这一结果与 Morisawa 等(1984)的报道不尽一致。这种差异可能是由于鱼的种类不同或是其它原因引起,有待进一步确证。

3.4 其它离子的影响

由 2.2 可知,当溶液中几种离子对牙鲆精子的运动能力共同产生作用时,SO₄²⁻似乎有其特殊作用,这在以前的文献中未见报道,其原理尚不清楚。实验还发现,在配制人工海水时,如果不添加 NaHCO₃,精子的运动能力会减弱甚至丧失(实验记录),这与 Ohta 等(1997)对日本鳗鲡精子的研究结果相同,其机理有待进一步研究。

3.5 pH 值的作用

由 2.3 可知,牙鲆精子对 pH 值具有较强的适应性。在另一对照实验中发现,不同 pH 值的去离子水并不能使精子运动,这说明单纯的 pH 值变化并不足以使牙鲆精子的运动能力发生改变。本实验研究了牙鲆精子的运动能力,主要以运动精子占全部精子的百分数作为指标。实验过程中还观察到,不同条件下精子的运动速度及运动持续时间并不相同,

其详细机理有待进一步研究。

参 考 文 献

- Boitano S, Charlte K, Omoto S, 1991. Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. *J Cell Sci*, 98: 343—349
- Morisawa M, Suzuki K, 1980. Osmolality and potassium ion: Their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 210: 1145—1147
- Morisawa M, Okuno M, 1982. Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. *Nature*, 295: 703—704
- Morisawa M, Sachiko Morisawa, Rosaria De Santis, 1984. Initiation of sperm motility in *Ciona intestinalis* by calcium and cyclic AMP. *Zool Sci*, 1: 237—244
- Oda S, Morisawa M, 1993. Rises of intracellular Ca^{2+} and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motil Cytoskel*, 25: 171—178
- Ohta Hiromi, Kazuo Ikeda, Toshio Izawa, 1997. Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility *in vitro* by Japanese eel spermatozoa. *J Exp Zoo*, 277: 171—180
- Takai H, Morisawa M, 1995. Change in intracellular K^+ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *J Cell Sci*, 108: 1175—1181
- Tanimoto S, Morisawa M, 1988. Roles for potassium and calcium channels in the initiation of sperm motility in rainbow trout. *Dev Growth Differ*, 30(2): 117—124
- Tanimoto S, Yoshihisa Kudo, Tohru Nakazawa *et al*, 1994. Implication that potassium flux and increase in intracellular calcium are necessary for the initiation of sperm motility in salmonid fishes. *Mol Repro Devel*, 39: 409—414

EFFECTS OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON SPERM MOTILITY IN FLOUNDER, *PARALICHTHYS OLIVACEUS* (T. ET S.)

WANG Hong-tian, ZHANG Pei-jun

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Abstract Between May and June in 1997, experiments were conducted to determine the effects of external factors on the sperm motility in flounder, *Paralichthys olivaceus* (T. et S.). The different solutes, which included sugar, NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, EDTANa₂, were dissolved in double distilled water to produce solutions with different concentrations. The sperm could be initiated by increasing the external osmolality. With different solutes, the osmolality levels that could initiate or terminate the sperm motility were different. EDTANa₂ had no induction effect. When EDTANa₂ was added to the artificial seawater, the sperm could not be initiated and the original active sperm was inhibited. When Ca²⁺ was dissolved in such solution, the sperms that were inhibited could not motile again. When MgSO₄ was dissolved in the solution to replace CaCl₂, the sperm could be initiated. But when CaCl₂ was replaced by MgCl₂, or MgSO₄ was replaced by CaCl₂ or NaCl, the sperm kept inactive. The sperm could be induced by the seawater with different pH-value ranging between 4.0 and 9.5.

Key words *Paralichthys olivaceus* (T. et S.) Sperm Motility Osmolality Ions pH

Subject classification number Q28