

文章编号: 1000-0615(2003)04-0386-05

• 研究简报 •

离子浓度和一氧化氮供体对 池塘养殖鳗鲡精子活力的影响

谢 骏^{1,2}, 王广军², 潘德博², 余德光², 杨小静²

(1. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

关键词: 日本鳗鲡; 精子活力; 一氧化氮; 离子浓度

中图分类号: S917 文献标识码: A

The effect of environmental concentration of ions and nitric oxide on *Anguilla japonica* sperm motility

XIE Jun^{1,2}, WANG Guang-jun², PAN De-bo², YU De-guang², YANG Xiao-jing²

(1. Institute of Aquatic Economic Animal & Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animal,

Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The effect were examined *in vitro* of the ionic composition of the incubation medium on the acquisition and loss of the potential for motility were examined by the spermatozoa of the Japanese eel (*Anguilla japonica*). Milt was obtained from male eels that had been artificially matured by repeated injections of HCG. The percent motility increased with increasing concentrations of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} ions ($0-400\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and decreased with concentrations of those ions ($500-1000\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), eel sperm was collected and then incubated with nitric oxide donor-sodium nitroprusside in different doses. Eel sperm motility was accelerated or maintained at low dose of sodium nitroprusside (SNP) ($10^{-10}-10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), while marked inhibition effects were found at high dose (SNP $> 10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Nitric oxide affects the motility of eel sperm in dose-dependent manner. The eel sperm of maturation by SPN and HCG was used for fertilizing three batches of eggs and hatchability is higher than the sperm of maturation by HCG.

Key words: *Anguilla japonica*; sperm motility; nitric oxide; concentration of ions

鳗鲡是世界性的优质养殖鱼类, 20 世纪 80 年代以来养鳗业迅速发展, 已成为水产产业化程度最高的养殖品种之一, 但养殖所需的苗种完全靠天然捕捞。早在 1934 年 Boucher 等^[1]就用孕妇尿促使雄性欧洲鳗(*A. anguilla*)精巢成熟, Yamamoto 和 Yamauch 于 1974 年对日本鳗鲡进行人工催熟获得精子^[2], 但多年来鳗鲡精子质量和数量一直在波动(数量

收稿日期: 2003-03-27

资助项目: 国家十五科技攻关项目(2000BA50B0516); 国家海洋 863 项目资助(2001AA 622050)

作者简介: 谢 骏(1965-), 男, 湖南湘潭人, 副研究员, 博士研究生, 主要从事鱼类育种和健康养殖。Tel: 020-81616178, E-mail:

xj007@163.net

为 0.1~ 0.4g, 运动精子为 20%~ 50%)^[3,4], 因此, 如何稳定和提高精子的质量和数量的研究是非常必要的。

绝大多数鱼类的受精过程是在体外条件下进行的, 受精效果不仅受到精、卵质量的影响, 而且也与外界环境密切相关。通过对日本鳊鱼精子在不同浓度的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等溶液中的运动能力的比较试验, 探讨各种生态环境因子对鳊鱼精子活力的影响, 找出精子的抑制-激活反应主要限制因素, 为精子提供最佳的活动环境, 从而获得理想的受精率。

一氧化氮(NO)是新发现的细胞信使因子, 在免疫、心血管系统和神经信息传导中发挥重要作用, 关于其对人类精子的影响研究较多^[5,6], 但对鱼类精子运动的影响未见报道。我们在体外孵育精子中加入 NO 供体硝普钠(SNP), 观察 NO 对精子运动的影响, 并应用于雄性鳊鱼的催熟过程。因此, 研究精子活力与金属离子、NO 等因子的关系, 既有助深入了解鱼类精子的生态生理特性, 又有助于鳊鱼精液保存和人工繁殖时精液稀释液的配制。

1 材料和方法

1.1 鳊鱼精子的获得

120尾雄性日本鳊鱼(体重 200.0±25.5g)采自顺德市陈村镇鳊鱼养殖场, 运至深圳海水养殖基地, 经 7d 盐度适应过渡到盐度为 32~ 35 的海水池中。每尾鳊鱼用液氮标记, 常规组用 HCG 人工注射 6 次, 试验组用 HCG+ SNP(硝普钠)注射, 全程不投喂饲料。每周定时采样(周六上午 9:00), 采集精液前先用淡水清洗鳊鱼, 再用干毛巾擦去生殖孔周围及体表的水分, 用挤压法采集精液, 轻压鳊鱼腹部, 用一次性注射器将精液移入冰浴的 1.5mL 离心管, 要求无尿、粪便、海水的污染。

1.2 精子活力的测定

将精液用鳊鱼精子稀释液^[3]按 1:500~ 1:1000 稀释混匀后, 取 50 μ L 转移到载玻片上并立即在显微镜($\times 400$)下观察。精子活力的计算使用标准血细胞计数器, 记数灭活后总精子数及灭活前不活动的精子数, 二者之差作为活动精子数, 以百分数表示。每次实验取 5~ 7 尾鳊鱼的精液, 每个精液样品重复观察 3 次, 取平均值。观察时温度为 19±1℃。KCl、NaCl、CaCl₂、MgCl₂ 等均为分析纯, 采用去离子水配成所需浓度。

1.3 鳊鱼精子孵育液

鳊鱼精子孵育液为无血清孵育液, 参照邓岳松等配方并适当加以修改^[7]。其组成为 L-15(GIBCO BRL) 1 包/L, 1.7 mmol·L⁻¹脯氨酸(上海试剂三厂), 0.15 mmol·L⁻¹门冬氨酸(上海试剂三厂), 0.15 mmol·L⁻¹谷氨酸(上海试剂三厂), 0.5% 牛血清白蛋白因子, 50 μ g·L⁻¹维生素 A(Sigma), 1mg·L⁻¹牛胰岛素(GIBCO BRL), 青霉素 100 000IU, 链霉素 100 000IU, 两性霉素 B 5mg·L⁻¹, 10 mmol·L⁻¹Hepes。配制时将药品溶于双蒸水, 用 1mol·L⁻¹的 NaOH 调 pH 至 8.1, 用 Nalgene 细菌过滤器、0.22 μ m 细菌滤膜过滤除菌。加入终浓度为 10⁻⁹ mol·L⁻¹、10⁻⁸ mol·L⁻¹、10⁻⁷ mol·L⁻¹、10⁻⁶ mol·L⁻¹、10⁻⁵ mol·L⁻¹、10⁻⁴ mol·L⁻¹、10⁻³ mol·L⁻¹ 的硝普钠(Sigma), 二氧化碳孵育箱中 6 h 后观察精子运动情况。

1.4 鳊鱼卵子采样

80尾雌性日本鳊鱼(体重 500~ 1000g)采自顺德陈村鳊鱼养殖场, 经 7d 的盐度适应过渡到盐度为 32~ 35 的海水池中, 进行催熟。选择成熟鳊鱼(催熟 12 次后)进行催产, 注射催产剂后 12h 从 5 尾成熟雌性鳊鱼取卵进行人工授精实验。

1.5 实验设计

SNP 孵育精子实验: 在鳊鱼精子孵育液中加入终浓度为 10⁻¹⁰ mol·L⁻¹、10⁻⁹ mol·L⁻¹、10⁻⁸ mol·L⁻¹、10⁻⁷ mol·L⁻¹、10⁻⁶ mol·L⁻¹、10⁻⁵ mol·L⁻¹、10⁻⁴ mol·L⁻¹ 的硝普钠, 二氧化碳孵育箱中 28℃ 孵育 6h 后观察精子运动变化, 每个浓度 3 个平行样。对照组精液 8 份, 上游法获得优质精子, 放入不加 SNP 的孵育液。选择高剂量(10⁻¹⁰ mol·L⁻¹)和低剂量(10⁻⁴ mol·L⁻¹)的 SNP 分别测定 2、4、6h 的精子活力。

人工授精实验:用常规催熟(对照组)方法和添加硝普钠(实验组)的精子进行人工授精效果比较实验,分别用3批卵进行人工授精实验。

1.6 统计方法

各组数值以 $M \pm S.D$ 表示,以 t 检验, Student-Newman-Keuls 法检验各组之间的差异。* 表示差异显著, ** 表示差异极显著。

2 结果

2.1 精子活力与几种离子的关系

由图1可知,4种离子(Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+})对鳗鲡精子影响的趋势基本一致,鳗鲡精子在 $400 \sim 500 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 溶液中都具有较理想的活动能力。同浓度的氯化钠与氯化钾溶液相比较,用氯化钠激活时的精子活动时间较长,用氯化钾激活时的精子活动时间较短。氯化钙与氯化镁对精子的影响接近,在同浓度下的氯化钙与氯化镁中的精子活力较氯化钠中的低。

2.2 精子活力与硝普钠的关系

硝普钠对精子活率的影响具有剂量依赖效应(图2),在 $10^{-10} \sim 10^{-9} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 时,可以明显促进精子的运动($P < 0.05$);在 $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 时,对精子运动影响不大($P > 0.05$);在浓度大于 $10^{-5} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 时,精子活率明显下降($P < 0.01$)。

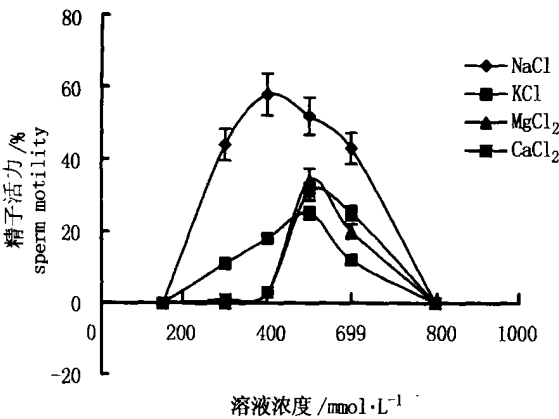


图1 鳗鲡精子在各溶液的活性

Fig.1 Eel sperm motility in four solution

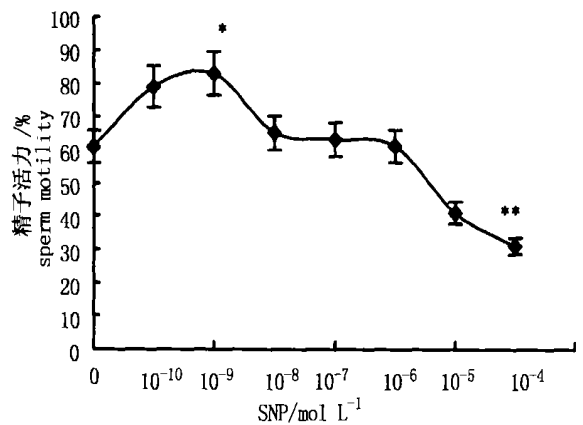


图2 鳗鲡精子活力与 SNP 关系

Fig.2 The relationship the SNP and eel sperm motility

2.3 精子活力与硝普钠的时间依存关系

在高浓度下 $10^{-4} \text{ mol} \cdot L^{-1}$,随时间延长,精子活率呈进行性下降趋势($P < 0.01$)(图3);在低浓度下 $10^{-10} \text{ mol} \cdot L^{-1}$,随时间延长,精子活率呈进行性上升趋势($P < 0.01$)(图4)。

2.4 两种精子人工受精的卵孵化率比较

应用了3批卵进行人工受精实验,对照组(只用HCG组)的孵化率分别为 $18.4\% \pm 2.6\%$ 、 $19.7\% \pm 3.0\%$ 和 $35.6\% \pm 3.2\%$ ($n = 5$);而实验组(SNP+ HCG)的孵化率分别为 $19.9\% \pm 3.2\%$ 、 $23.5\% \pm 2.8\%$ 和 $40.6\% \pm 2.4\%$ ($n = 5$)。在第2批和第3批实验组与对照组(t 检验, $P < 0.001$)的差异显著。也就是说,低剂量的一氧化氮供体硝普钠产生NO提高了精子受精能力。

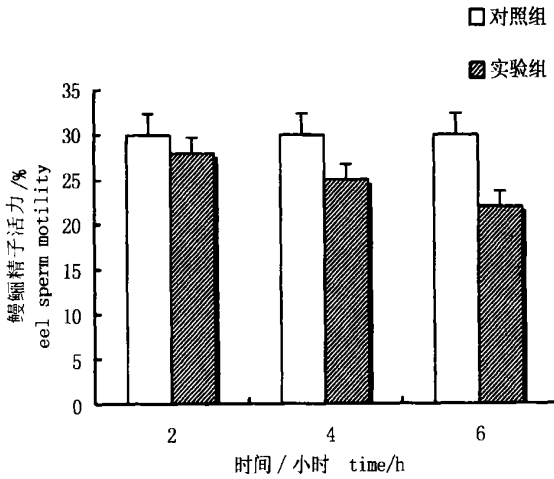


图3 高浓度下 SNP($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 不同时间对精子的影响

Fig. 3 The eel sperm motility level in different time at high SNP

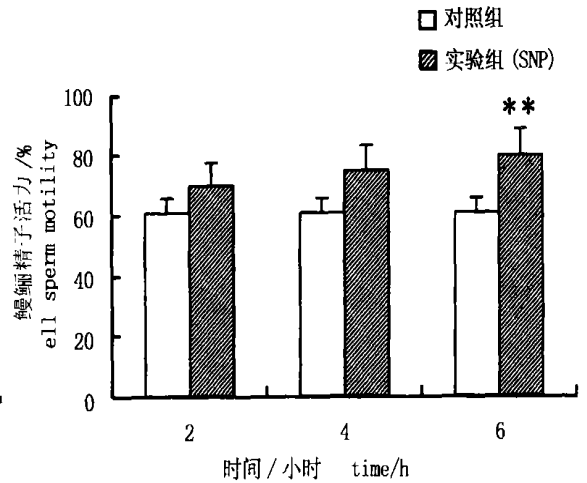


图4 相同浓度下 SNP($10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 不同时间对精子的影响

Fig. 4 The eel sperm motility change in different time at same SNP

3 讨论

3.1 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对鳗鲡精子的影响

Na^+ 、 K^+ 是鱼类精浆的重要组成成分,是形成精浆渗透压的主要离子^[7],在鲑科鱼类中,高浓度的 K^+ 溶液抑制精子活动。Morisawa^[8]发现 $0 \sim 150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Na^+ 液对虹鳟、大马哈鱼精子运动没影响,而 $0.25 \sim 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 K^+ 溶液则抑制其精子的运动。本研究发现适宜浓度的 K^+ 与 Na^+ 相比,有延长精子活动时间的的作用,这表明 Na^+ 、 K^+ 的对精子活动的影响因鱼的种类不同而有所差异。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 与 Na^+ 、 K^+ 一样是鱼类精浆的重要组成成分,也是形成精浆渗透压的主要离子^[8]。Morisawa^[9]发现 $0 \sim 16 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 溶液不影响氯化钠溶液中大马哈鱼精子的运动时间,低浓度 ($1 \sim 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 Ca^{2+} 对 K^+ 的抑制效应有一种梯度的对抗作用。本试验没有发现精子头部朝内,头对头,尾向外的聚集成群的现象^[10]。

3.2 一氧化氮对鳗鲡精子活力的影响

一氧化氮可以影响多种细胞的功能,在生理剂量下通过 $\text{NO} \cdot \text{cGMP}$ 途径发挥生理学效应。Hellstrom 等^[11]应用硝普钠处理冻融精子时证实,硝普钠可以保护精子免于冻融过程中的损伤。

我们采用自低到高的系列浓度观察了硝普钠对精子运动的影响效应,发现硝普钠对精子运动的影响存在剂量依赖效应,在低浓度下可以促进精子的运动,人工授精的实验表明 SNP 显著提高了鳗鲡的受精率,表明 SNP 整体提高了精子的授精能力。

参考文献:

- [1] Boucher S, Boucher M, Fontaine M. Sur la maturation provoquée des organes génitaux de l'anguille[J]. CR Soc Biol Paris, 1934, 116: 1284-1286.
- [2] Yamamoto K, Yamauchi K. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium[J]. Nature, 1974, 251: 220-222.
- [3] Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, et al. Milt production in the Japanese eel *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin [J]. Fisheries Science, 1996, 62: 44-49.
- [4] Ohta H, Kagawa H, Tanaka H, et al. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1997, 17: 163-169.
- [5] Rosselli M, Dubey R K, Imthum B, et al. Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity [J]. Hum Reprod, 1995, 10: 1786-1790.

- [6] Zheng R L. Regulation of reactive oxygen species and scavengers on human sperm function[J]. J Lanzhou University, 1999, 35(3): 134- 140. [郑荣梁. 自由基对人精子功能的调控[J]. 兰州大学学报, 1999, 35(3): 134- 140.]
- [7] Deng Y S, Lin H R. Effects of osmolality and pH on sperm motility Japanese eel (*Anguilla japonica*) [J]. Acta Universitatis Sunyanseni, 2000, 39(4): 87- 89. [邓岳松, 林浩然. 渗透压和 pH 对日本鳗鲡精子活力的影响[J]. 中山大学学报, 2000, 39(4): 87- 89.]
- [8] Morisawa M. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid[J]. Fish J Exp Biol, 1983, 107: 95- 103.
- [9] Morisawa M. Effects potassium of and osmolality on spermatozoa motility of salmonid[J]. Fish J Exp Biol, 1983, 107: 105- 113.
- [10] Jiang S G, Li J E, Ou Y J, et al. Relationships between conditions for activating spermatozoa of four sparidae fishes and the fishes' ecological habits [J]. Acta Ecologica Sinica, 2000, 20(3): 468- 473. [江世贵, 李加儿, 区又君, 等. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性关系[J]. 生态学报, 2000, 20(3): 18- 26.]
- [11] Hellstrom W J, Bell M, Wang R, et al. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability and lipid peroxidation [J]. Fertil Steril, 1994, 61: 1117- 1122.

欢迎订阅 2004 年《现代渔业信息》

《现代渔业信息》杂志系农业部主管、中国水产科学研究院东海水产研究所主办和农业部东海区渔政渔港监督管理局、农业部黄海区渔政渔港监督管理局、江苏省海洋与渔业局等四十九个单位协办的一本供全国农、林、水系统各级领导、高等院校教师、科技人员以及生产单位工作者参阅的渔业科技综合性信息刊物(月刊)。

本刊报道的主要内容侧重于国外渔业生产、水产科学技术的新动态、新工艺、新材料和新方法等信息;同时报道国内渔业生产、科技及教育等方面进展动态。21 世纪是信息时代,对您单位或个人及时了解国内外渔业发展动向,掌握国内外水产科学发展趋势,特别是对各级领导正确决策、科研人员开阔思路、院校教师更新教材以及生产单位技术改造、引入竞争机制等均有重要参考价值。

国际大 16 开,每期 4.00 元,全年 12 期,共计 48 元。欲订阅者,请到当地邮局办理订阅。若当地邮局订阅不便,仍可与《现代渔业信息》杂志编辑部发行部联系办理订阅。帐号为东海水产研究所上海市杨树浦桥分理处 1001222309026400731。

地址:上海市军工路 300 号,电话:021- 55530500, 传真:021- 65683926, 邮编:200090

国内发行:上海市邮政局报刊发行,广告、发行部联系人:徐吟梅