

文章编号: 1000-0615(2003)05-0398-05

# 黄鳝精子活力检测和精子入卵早期过程观察

周定刚, 温安祥

(四川农业大学动物科技学院, 四川 雅安 625014)

**摘要:** 采用 Olympus 3×51 相差系统显微镜和 SQUAS-1000 彩色精液质量图文分析系统检测黄鳝精子活力。结果表明, 在 NaCl 溶液浓度为 0~0.3% 时, 黄鳝精子激活比例随溶液浓度升高而极显著增加 ( $P < 0.01$ ); 当 NaCl 浓度达到 0.7% 时, 精子激活比例、直线运动速度和鞭毛摆动频率均显著 ( $P < 0.05$ ) 或极显著 ( $P < 0.01$ ) 降低。扫描电镜观察显示: 黄鳝成熟卵壳膜上的精孔区呈漏斗状凹陷, 其底部中央可见一精孔管外孔, 口径约  $4.22 \pm 0.66 \mu\text{m}$ ; 黄鳝精子入卵速度缓慢, 受精过程较长, 从精子附着于卵球表面到精孔管完全堵塞, 约 30s~5min。

**关键词:** 黄鳝; 精子活力; 精子入卵; 扫描电镜术; 相差显微镜术

中图分类号: Q132.1; S917 文献标识码: A

## The sperm motility and initial stages of penetration of sperm into eggs in *Monopterus albus*

ZHOU Ding-gang, WEN An-xiang

(Animal Science and Technology College, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** The sperm motilities were determined by using phase contrast microscope and analytical system of computer. The results show the sperm activity rate significantly increases ( $P < 0.01$ ) with the concentration of NaCl when that of NaCl ranges from 0 to 0.3% in *Monopterus albus*, but the sperm activity rate, linear velocity of the spermatozoal motion and the frequency of flagellar beat of spermatozoa significantly reduce ( $P < 0.05$ ) when the concentration of NaCl exceeds 0.7%. The micropylar region of the mature egg is like a funnel cave in *M. albus* under scanning electron microscopy. A micropylar canal is located at the central section of the bottom of the cave, about  $4.22 \pm 0.66 \mu\text{m}$  in diameter. The penetration of sperm into the eggs is slow and the process of the fertilization is long. The sperm originally arrives at the surface of the chorion of *M. albus* 30s after insemination. The micropylar canal is blocked by the fertilized plug within 5 minutes after insemination.

**Key words:** *Monopterus albus*; sperm motility; penetration of sperm into egg; scanning electron-microscopy; phase contrast microscopy

精子活力通常是指正常活动精子的质量, 广义而言则泛指精子群体的运动状况。精子活力是研究精液保存和人工授精等的基础, 其激活与抑制机制的研究具有较高的理论与实用价值。有关鱼类精子活力, 国内外学者曾作过大量有价值的工作, 但国内这方面的试验<sup>[1-5]</sup>绝大多数都是借助普通光镜观察, 不仅研究条件受到限制, 而且难免存在人为误差。受精作用是极为重要的生物学过程, 历来受到广

收稿日期: 2002-08-13

作者简介: 周定刚(1939-), 男, 重庆市人, 教授, 从事鱼类生殖内分泌生理研究。Tel: 0835-2882078, E-mail: zhougd@sicau.edu.cn

大学者的关注。自上世纪 70 年代以来,人们对鱼类卵子壳膜结构和精子入卵过程已进行过许多研究<sup>[6,7]</sup>,但黄鳝(*Monopterus albus*)精子入卵过程未见报道。本文采用相差显微镜和电脑分析系统检测黄鳝精子活力,并对精子入卵早期过程进行扫描电镜观察,旨在为鱼类受精生物学积累资料,并为黄鳝人工授精技术提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

试验用黄鳝于 2002 年 6 月购自四川省雅安市农贸市场。选择部分雄性亲鳝解剖,摘取精巢、挤出精液镜检。将精子活动正常而未污染的精液用于测定精子活力和人工授精。另一部分雌性亲鳝经 HCG 诱导排卵后,营干法人工授精,其卵样用于观察精子入卵过程。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 精子活力检测

淡水鱼类体液的渗透浓度为 265~325 毫渗摩尔(mOsm)<sup>[8]</sup>,约与 0.75%~0.95% NaCl 溶液的渗透浓度相等。本试验用低渗溶液激活精子,研究不同浓度梯度的 NaCl 溶液对黄鳝精子活力的影响,将实验分为 A~F 6 组。每次用微量移液器分别吸取蒸馏水以及 0.1%、0.3%、0.5%、0.7% 和 0.9% 的 NaCl 溶液 50  $\mu$ L 至洁净的载玻片上,再以实验用玻棒蘸取少许精液与载玻片上的溶液混匀,加盖玻片置于 Olympus 3 $\times$ 51 相差显微镜下观察。用 SQIS-1000 彩色精液质量图文分析系统自动检测黄鳝精子活力。室温 28.5  $^{\circ}$ C。选择以下指标评价精子群体运动状况。

精子活率(%) (精子激活比例): 已激活的活动精子占检测精子总数的百分比。

精子活力(正常活动精子质量): 按世界卫生组织(WHO)推荐的方法,将其定为 4 级: A 级,呈快速直线前向运动的精子; B 级,呈慢速或非直线前向运动的精子; C 级,原地颤动或旋转的非前向运动的精子; D 级,无活力的不动精子(非死亡精子)。

精子寿命(精子运动时间): 从精子激活开始至运动停止所经历的时间。

精子运动速度( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )和鞭毛摆动频率(Hz): 用 *F* 检验、*q* 检验(*LSR*)和  $\mu$  检验比较各组间的差异程度。

#### 1.2.2 精子入卵过程观察

将催产后获得的成熟鳝卵分别于授精前 10s、30s、1min、2min、3min、4min 及授精后 5min,用 2.5% 戊二醛于 4  $^{\circ}$ C 固定 3h 以上,然后用磷酸缓冲液(pH7.2)冲洗 3 次,每次 10min。梯度酒精脱水,最后用乙酸异戊酯取代,临界点干燥,真空喷涂仪喷金, KYKY-1000B 型扫描电镜观察,摄影。加速电压 25 kV。

## 2 结果

### 2.1 黄鳝精子活力

不同浓度 NaCl 溶液对黄鳝精子活力的影响(表 1)。

精子激活比例: 在 NaCl 浓度为 0~0.3% 范围内,黄鳝精子激活比例随溶液浓度升高而极显著增加( $P < 0.01$ ); 当 NaCl 浓度达到 0.7% 时,精子激活比例开始极显著降低( $P < 0.01$ )。

精子直线运动速度: 0.1%~0.3% 的 NaCl 溶液使精子直线运动速度显著( $P < 0.05$ )或极显著加快( $P < 0.01$ ); 当 NaCl 浓度升高至 0.5% 以后,精子直线运动速度则显著减慢( $P < 0.05$ )。

精子鞭毛摆动频率: 蒸馏水和 0.1%~0.3% NaCl 溶液能极显著刺激黄鳝精子鞭毛摆动( $P < 0.01$ ); 而 0.5%~0.9% NaCl 溶液,则使精子鞭毛摆动频率受到显著抑制( $P < 0.05$ )。

精子运动时间: 在 0.1%~0.3% NaCl 溶液中,呈快速直线前向运动的精子较多,精子运动时间较

长; 0.9% NaCl 溶液使精子活力受到抑制, 具有明显延长精子寿命的作用。

表 1 NaCl 溶液对黄鳝精子活力的影响

Tab. 1 The effect of NaCl concentration on sperm motility of *Monopterus albus*

组别 group	NaCl 浓度 (%) NaCl concentration	平均精子 活率 (%) average sperm activity rate	精子活力 (%) sperm motility				平均直线运速度 ( $\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) average linear velocity of spermatozoa motion	平均鞭毛摆动频率(Hz) average frequency of flagellar beat of spermatozoa	精子寿命 (min) life span of spermatozoa
			A	B	C	D			
A	0	21.58	0.70	0	29.90	78.40	$3.33 \pm 0.92$	$6.82 \pm 1.42$	4
B	0.1	40.64	8.60	4.30	27.80	59.40	$8.37 \pm 1.02$	$6.30 \pm 0.18$	58
C	0.3	70.37	3.70	7.30	59.30	29.60	$3.89 \pm 1.97$	$6.73 \pm 0.73$	74
D	0.5	79.36	0	0	79.40	20.60	$1.47 \pm 0.54$	$4.47 \pm 2.46$	76
E	0.7	13.59	0	0	13.60	86.40	$1.23 \pm 0.09$	$2.56 \pm 0.35$	90
F	0.9	9.56	0	0	9.50	90.50	$0.66 \pm 0.29$	$2.43 \pm 1.16$	243

## 2.2 精孔区形态结构

黄鳝成熟未受精卵的动物极壳膜上, 有一呈漏斗状凹陷的精孔区, 其外口与壳膜相延续, 直径 15.52~21.43  $\mu\text{m}$ 。精孔区内壁平滑、无明显沟嵴、底部中央可见一圆形精孔管外孔, 口径 4.22±0.66  $\mu\text{m}$ , (图版- 1)。

## 2.3 黄鳝精子入卵早期过程

黄鳝精子入卵速度缓慢, 授精后 30s 才观察到有精子附着于卵球表面(图版- 2)。授精后 3min, 精子聚集于精孔区周围。授精后 4min, 有的精子已进入精孔区内(图版- 3)。授精后 5min, 精孔管被塞状物堵塞, 遗留在其外的精子尾部互相缠绕, 类似畸形精子(图版- 4), 卵膜表面的其它精子已失去活力, 全部解体(图版- 5)。此外, 授精后 3min 时, 在去掉壳膜的卵子皮质中可观察到皮层小泡内的分泌颗粒(图版- 6)。授精后 4min, 有的皮层小泡已完全破裂而呈蜂窝状空泡, 其内已观察不到分泌颗粒(图版- 7), 即皮层反应约发生于授精后 3~4min。

## 3 讨论

位于卵膜表面的受精孔, 是无顶体鱼类精子入卵的唯一通道。不同鱼类的精孔区结构和精孔管大小不尽相同。玫瑰无须魮(*Barbus conchoniis*)、大银鱼(*Protosalanx hydrocaranius*)的卵膜孔区(即精孔区)具有放射状沟和嵴的特异结构<sup>[9, 10]</sup>。泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)精孔区侧壁呈左涡旋状<sup>[11]</sup>, 尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)的精孔区则略呈螺旋状排列<sup>[12]</sup>。据观察, 黄鳝卵壳膜上的精孔区与三角鲂(*Megalobrama terminalis* Richardson)<sup>[13]</sup>、鲤(*Cyprinus carpio*)<sup>[7]</sup>等类似, 其侧壁无放射状沟嵴和涡旋状纹路, 只呈现平滑漏斗状凹陷(图版- 1)。宋慧春等<sup>[10]</sup>认为, 精孔区的沟嵴结构与螺旋状结构一样, 为精子云集和导入精孔管提供了有利的条件, 精子入卵除化学因素外, 还存在着不容忽视的机械动力因素。精子入卵机制较为复杂, 以上推论是否适合黄鳝等其它鱼类, 还有待更多观察结果支持和论证。

众所周知, 多数硬骨鱼类的精孔管都只允许一个精子通过, 属单精入卵单精受精。但据我们观察, 黄鳝精子头部直径为 2.08±0.33  $\mu\text{m}$ , 而精孔管外孔口径约 4.22±0.66  $\mu\text{m}$ , 超过精子头部 2 倍。Kudo 等<sup>[14]</sup>也观察到鲤精孔管内径比其精子头部大一倍多的现象。他们认为, 当鲤第 1 个精子和精子穿入部接触后, 穿入部即迅速形成巨大的受精锥阻塞精孔管, 以阻止第 2 个精子进入, 从而保证鲤仍为单精受精。试验中在黄鳝的精孔管未发现由微绒毛所构成的精子穿入部, 但观察到精孔管堵塞前存在皮层反应(图版- 6, 7)。据 Kobayashi 和 Yamamoto<sup>[15]</sup>报道, 鱼类皮层反应所释放的物质分布于卵周隙和精孔管内。黄鳝精孔管外的堵塞物是否由皮层小泡释放而来, 皮层反应与单精受精有何关系, 黄鳝是否存在多精入卵单精受精机制, 值得深入研究。

据观察, 黄鳝精子入卵的速度比其它某些硬骨鱼类缓慢。多数鲤科鱼类如三角鲂<sup>[13]</sup>、鲤<sup>[7]</sup>等, 授精

后 2~ 5s 精子已开始进入精孔管,授精 30s 后精孔管即完全被絮状物堵塞。而黄鳍授精后 30s 才在其卵壳膜上观察到精子,精孔管堵塞则是发生于授精后 5min(图版-4)。黄鳍精子入卵缓慢,受精过程较长,可能与其精子活力相对较差有关。黄鳍精子在 28.5℃ 被 0.1% NaCl 激活时,其平均直线运动速度为  $8.37 \pm 1.02 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ,精子鞭毛摆动频率为  $6.30 \pm 0.18\text{Hz}$ (表 1)。而鲤精子在 20℃ 被激活时,精子运动平均速度达  $103 \pm 11 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ,精子鞭毛摆动频率为 50~ 60Hz<sup>[16]</sup>,分别为黄鳍的 16.35 倍及 7.91~ 9.52 倍。

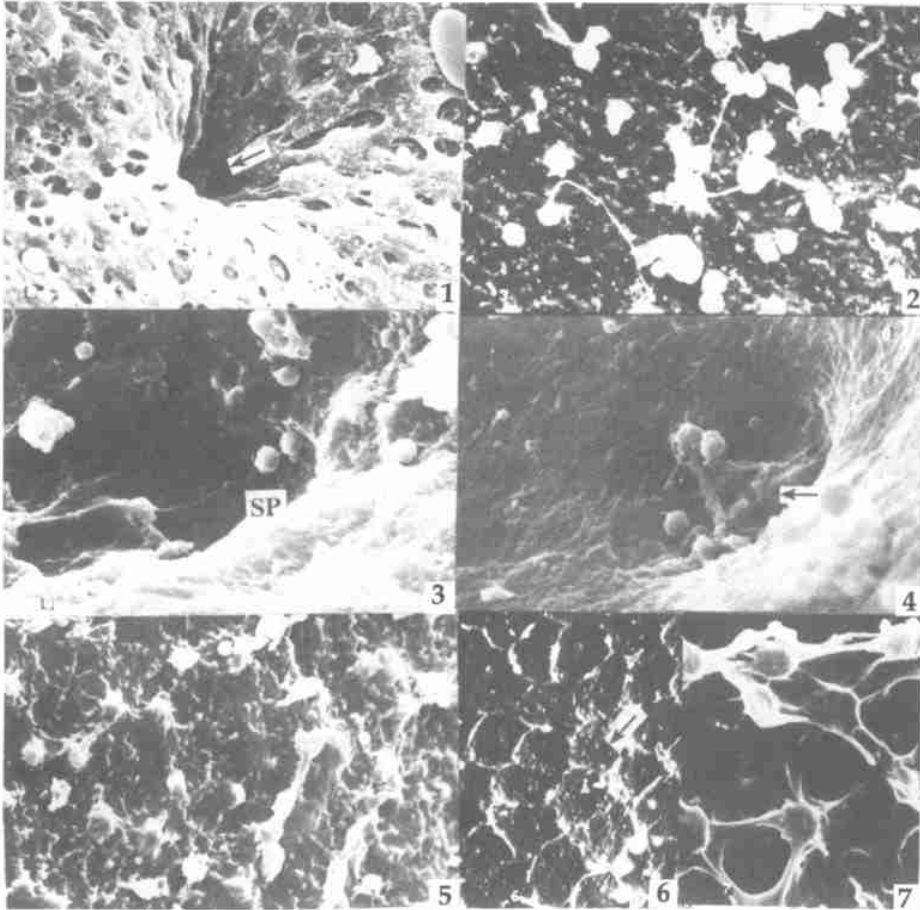
在 NaCl 浓度为 0~ 0.3% 范围内(表 1),黄鳍的精子激活比例随溶液浓度升高而极显著增加( $P < 0.01$ );当 NaCl 浓度达到 0.7% 时,精子激活比例、直线运动速度和鞭毛摆动频率均显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ )降低。以上结果显示,NaCl 特别是  $\text{Na}^+$  (维持细胞兴奋性和渗透压的主要阳离子)在一定范围内具有提高精子活率和加快精子运动速度的作用。精子鞭毛每对双联管中的亚管 A 含有动力蛋白(dynein),其动力蛋白臂(dynein arm)具有 ATP 酶活性,起着与横纹肌肌球蛋白横桥类似的机能作用<sup>[17]</sup>。即当细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,激活动力蛋白臂 ATP 酶活性时,由 ATP 分解产生的能量促使并列或相邻的双联管滑行,从而使鞭毛产生摆动。可见  $\text{Ca}^{2+}$  是调节鞭毛摆动的重要离子。通常细胞膜去极化可使  $\text{Ca}^{2+}$  电导增加,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,但大多数细胞膜的去极化主要取决于  $\text{Na}^+$ ,而不是  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[18]</sup>。这提示  $\text{Na}^+$  可以通过诱发细胞膜去极化产生动作电位,进而引起细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化,起到间接激活精子运动的作用。但是,细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的逆浓度梯度外运是与  $\text{Na}^+$  的顺浓度梯度内流相耦联的(生物细胞普遍存在的  $\text{Ca}^{2+} - \text{Na}^+$  交换机制);当细胞外介质中  $\text{Na}^+$  浓度过高时,反会使细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度降低。可能这就是环境中高  $\text{Na}^+$  抑制精子活力的原因之一。 $\text{Na}^+$  不仅与  $\text{Ca}^{2+}$  存在  $\text{Ca}^{2+} - \text{Na}^+$  交换机制,还与  $\text{K}^+$  存在  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  交换机制。因此, $\text{Na}^+$  似可通过离子间的互作及对渗透压等多方面的影响,起到直接、间接激活或抑制精子运动的作用。精子寿命是反映精子活力的又一指标。鱼类精子寿命受多种因素影响,除存在个体差异外,受环境温度影响较大。例如,在 0.5% NaCl 介质中,28.5℃ 时黄鳍精子寿命为 76min(表 1);31℃ 时为 23min;42℃ 时仅为 2min(后者为倒置显微镜观察,Microarm plate MDF-10HF-O 微加热板测定结果)。这可能与高温使介质渗透压升高,精子严重脱水、代谢增强及 ATP 迅速耗尽等有关。

## 参考文献:

- [1] Li B, Tang Z P, Jie Y H. The observation of sperm motility and inquiry of inseminating method in *Protosalix hyalocaranius* [J]. Water Conservancy and Fishery, 1997, (5): 31- 32. [李勃,康作鹏,解玉浩.大银鱼精子活力观察与人工授精方法的探讨[J].水利渔业,1997,(5):31- 32.]
- [2] Luo F, He X F. Impact of the sodium chloride concentration on spermatid vitality of *Aerossichilus manticola* (Günther) [J]. Sichuan Journal of Zoology, 1999, 18(2): 70- 72. [罗芬,何学福.氯化钠浓度对宽口光唇鱼精子活力的影响[J].四川动物,1999,18(2):70- 72.]
- [3] Huang B F, Luo J B. The effect of sodium chloride concentration on sperm vitality of *Cyprinus carpio* red variety [J]. Journal of Hubei Agricultural College, 2000, 20(1): 62- 64. [黄辨非,罗静波.氯化钠溶液对兴国红鲤精子活力的影响[J].湖北农学院学报,2000,20(1):62- 64.]
- [4] Wei K J, Wang H P, Lin J J, et al. A preliminary study of the effect of sodium chloride concentration on sperm vitality in *Tenulosa reevesi* Richardson [J]. Freshwater Fisheries, 1996, 26(4): 9- 10. [魏开金,王汉平,林加敬,等.氯化钠浓度对鲢鱼精子活力影响的初步观察[J].淡水渔业,1996,26(4):9- 10.]
- [5] Xie E Y, He X F, Yang Q F. The habits and characteristics of reproduction and vitality and life span of spermatozoa in *Tra (Folfer) brajifilis brajifilis* (Peters) [J]. Chinese Journal of Zoology, 1999, 34(2): 5- 8. [谢恩义,何学福,阳清发.瓣结鱼的繁殖习性以及精子的活力与寿命[J].动物学杂志,1999,34(2):5- 8.]
- [6] Zhang T Y, Feng S M, Pan Z Z. Scanning electron microscopic observations on the sperm entry into the eggs of goldfish *Carassius auratus* [J]. Zoological Research, 1993, 14(2): 166- 170. [张天荫,封树芒,潘忠宗.金鱼精子入卵过程的扫描电镜观察[J].动物学研究,1993,14(2):166- 170.]
- [7] Pan G B, Zou S P, Zou G W. Scanning electron microscopic observation of penetration of sperm into the eggs of gynogenesis-matured *Cyprinus carpio* [J]. J Fish Sci China, 1999, 6(3): 28- 31. [潘光碧,邹世平,邹桂伟.诱导鲤雌核发育时精子入卵的扫描电镜观察[J].中国水产科学,1999,6(3):28- 31.]
- [8] Tong S L. The physiology of fishes [M]. Beijing: Science Press, 1988. 176. [童裳亮.鱼类生理学[M].北京:科学出版社,1988.176.]
- [9] Amange D, Iyengar A. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization [J]. Development, 1990, 109(2): 495- 500.
- [10] Song H C, Wu K M, Shen O Z, et al. Electron microscopic observation on the micropyle structure of *Protosalix hyalocaranius* [J]. Acta Zool Sin, 1999, 45(1): 8- 14. [宋慧春,吴坤明,沈其璋,等.大银鱼卵膜孔结构的电镜观察[J].动物学报,1999,45(1):8- 14.]
- [11] Wu K M, Shen Q Z, Liu G H. Study of the vortical structure of the micropyle on the matured egg in *Misgurnis anguillicaudatus* [J]. Science Bulletin, 1991, (5): 1175- 1178. [吴坤明,沈其璋,刘根洪.泥鳅成熟卵受精孔涡旋状结构的研究[J].科学通报,1991,(5):1175- 1178.]

1178.]

- [ 12 ] Huang Y S. Ultrastructure of the mature egg and initial stages of sperm penetration in *Tilapia nilotica* [J]. Acta Zoologica Sinica, 1990, 36(3): 227- 230. [ 黄永松. 尼罗罗非鱼成熟卵结构及精子入卵的早期电镜观察[J]. 动物学报, 1990, 36(3): 227- 230. ]
- [ 13 ] Wang R X, Zhang Y R, Fu C H, et al. The observation on the initial fertilization of freshwater bream by electronic scanning microscope [J]. Journal of Fisheries of China, 1982, 6(4): 314- 320. [ 王瑞霞, 张毓人, 傅仓生, 等. 鲢鱼受精早期精子入卵的扫描电子显微镜观察 [J]. 水产学报, 1982, 6(4): 314- 320. ]
- [ 14 ] Kudo S, Sato A. Fertilization cone of carp eggs as revealed by scanning electron microscopy [J]. Dev Growth Diff, 1985, 27(2): 121- 128.
- [ 15 ] Kobayashi W, Yamamoto T S. Light and electron microscopic observations of sperm entry in the chum salmon egg [J]. J Exp Zool, 1987, 243 (2): 311- 322.
- [ 16 ] Perchee G, Jeulin C, Andre F, et al. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa [J]. J Cell Sci, 1995, 108: 747 - 753.
- [ 17 ] Roger E. Animal physiology ( Third edition) [M]. New York: W•H• Freeman and Company, 1988. 376- 377.
- [ 18 ] Gao T L. Cell physiology [M]. Beijing: Science Press, 1984. 533- 534. [ 高天礼(译). 细胞生理学 [M]. 北京: 科学出版社, 1984. 533- 534. ]



### 图版说明 Explanation of Plate

1. 成熟未受精卵的精孔区形态。示精孔管外孔(箭头),  $\times 2\ 000$ ; 2. 授精后 30s, 示卵壳膜上的精子,  $\times 3\ 500$ ; 3. 授精后 4min 后, 示已进入精孔区内的精子(SP),  $\times 4\ 000$ ; 4. 授精后 5min, 示精孔管外的堵塞物(箭头)和异常精子,  $\times 4\ 000$ ; 5. 授精后 5min, 示已完全解体的精子,  $\times 3\ 000$ ; 6. 授精后 3min, 示皮层小泡内尚未释放的皮层颗粒(箭头),  $\times 1\ 600$ ; 7. 授精后 4min, 示发生皮层反应后, 皮层小泡呈蜂窝状结构,  $\times 2\ 000$

1. Morphology of the micropylar region on the matured unfertilized egg, showing the outer opening (arrow) of the micropyle canal,  $\times 2\ 000$ ; 2. SEM of an egg 30 seconds after insemination, showing spermatozoa on the surface of chorion of *Monopterus albus*,  $\times 3\ 500$ ; 3. SEM of an egg 4 minutes after insemination, showing sperm (sp) to enter into the micropylar region,  $\times 4\ 000$ ; 4. SEM of an egg 5 minutes after insemination, showing the fertilization plug (arrow) and abnormal sperm outside the micropylar canal,  $\times 4\ 000$ ; 5. Showing the degenerating spermatozoa 5 minutes after insemination,  $\times 3\ 000$ ; 6. SEM of an egg 3 minutes after insemination, showing the unreleased cortical granule in the cortical alveoli,  $\times 1\ 600$ ; 7. The cortical alveoli shows honeycomb-like structure after the cortical reaction 4 minutes after insemination,  $\times 2\ 000$