

文章编号: 1000-0615(2017)10-1571-07

DOI: 10.11964/jfc. 20160610447

急性铅染毒对河南华溪蟹副性腺诱导精子顶体反应的影响

李娜^{1,2}, 许鹏¹, 王兰^{1*}

(1. 山西大学生命科学学院, 山西太原 030006;

2. 山西农业大学文理学院, 山西太谷 030801)

摘要: 为探究河南华溪蟹副性腺的功能以及铅对副性腺功能的影响和毒性机理, 首先采用钙离子载体A23187诱导法对河南华溪蟹进行精子顶体反应诱导实验, 结果显示副性腺匀浆+A23187组合下的顶体反应诱导率最高, 可达78%, 这提示河南华溪蟹副性腺具有调节精子顶体反应的作用。在此基础上采用急性铅染毒的方法, 设1个对照组和5个铅处理组(3.675、7.35、14.70、29.40和58.80 mg/L), 染毒时间分别为3、5和7 d, 检测了铅染毒后的副性腺对精子顶体反应诱导率的影响, 以及染毒后副性腺中活性氧(ROS)含量、蛋白质羰基化(PCO)含量、DNA-蛋白质交联率(DPC)的变化。结果显示, 随着铅染毒剂量的增加和染毒时间的延长, 精子顶体反应诱导率明显下降, 副性腺中ROS含量和PCO含量升高, 但DPC无明显变化。研究表明, 铅对河南华溪蟹副性腺有明显的生殖毒性, 可降低其在精子顶体反应诱导过程中的作用, 主要原因是铅诱导产生的ROS使副性腺中蛋白质发生了氧化损伤。

关键词: 河南华溪蟹; 副性腺; 顶体反应; 蛋白质羰基化; DNA-蛋白质交联率; 铅

中图分类号: S 917.4; X 171.5

文献标志码: A

近年来, 冶炼、铅制品等工矿企业快速发展的同时, 非正常污染物排放使得铅污染问题变得日益严重^[1]。空气中的铅最终会通过灰尘降落和雨水冲刷等方式进入水体, 造成对水生生物的毒害^[2]。铅可诱导机体产生过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 高度活跃的ROS会攻击细胞内生物大分子, 导致蛋白修饰和脂质过氧化, 甚至造成细胞内DNA链断裂, 从而对细胞、器官组织产生毒害。铅的生殖毒性已引起人们的关注, 但这方面的研究主要集中在哺乳动物^[3-8], 对水生无脊椎动物的生殖毒性鲜有报道。

副性腺是雄性生殖系统的一部分, 但国内外对其的研究大多集中在昆虫类^[9-10]。针对十足类甲壳动物副性腺的功能研究在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)中提及较多。中华绒螯蟹副性腺的主

要功能: ①给精子提供一定能量和营养^[11]; ②副性腺的分泌物有可能随精荚一起进入雌体, 除可以有效消化精荚壁使精子从精荚中游离出来外, 对雌体的排卵及受精也起到一定的调节作用^[12]; ③副性腺中的某些蛋白质作为获能因子对精子的获能及顶体反应起重要调节功能^[13-15]。

副性腺也是河南华溪蟹雄性生殖系统的重要组成部分^[16], 但对其功能的研究目前仍属空白。本研究就副性腺在河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)精子顶体反应过程中的作用进行相关的研究, 并在此基础上研究铅对副性腺功能的影响及其毒性机理。以期探讨副性腺在精子获能、顶体反应等方面的作用, 同时深入了解铅对甲壳动物雄性生殖毒性机理, 为保护生态环境和水产品健康养殖提供科学依据。

收稿日期: 2016-06-15 修回日期: 2017-01-04

资助项目: 国家自然科学基金(31672293, 30970361); 山西省应用基础研究项目(2016021141)

通信作者: 王兰, E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 实验对象

河南华溪蟹(简称溪蟹)购于太原五龙口水产批发市场,在实验室条件下[温度(20±2)℃],曝气自来水饲养,水体溶解氧8.0~8.3 mg/L,暂养2周后,挑选大小均匀[体质量(20.12±1.78)g]的健康成年雄蟹进行实验。

1.2 主要试剂

钙离子载体A23187购自美国Sigma公司,使用前用DMSO溶解配成2 mg/mL溶液,-20℃保存备用。蛋白酶K、荧光染料Hoechst 33258、Tris也购于美国Sigma公司。ROS检测试剂盒购于南京建成生物公司。硝酸铅[Pb(NO₃)₂]、盐酸胍、EDTA、2,4-二硝基苯肼(DNPH)均为国产分析纯。

1.3 不同诱导条件下精子顶体反应诱导率的比较

活体解剖雄蟹,迅速取出贮精囊和副性腺,轻轻划破贮精囊,使精荚破裂,精子释放于2 mL磷酸缓冲液(PBS, pH=7.4),搅匀,3000 r/min离心10 min,弃上清液,得精子沉淀。取出的副性腺于1.5 mL EP管中称重,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例加入PBS,磁珠匀浆法制成10%的副性腺匀浆液。同时活体解剖雌蟹,迅速取出卵,同副性腺匀浆液制备方法制成10%的卵水。

取5份精子沉淀,其中3份分别加入1 mL PBS、副性腺匀浆液和卵水后,再分别加入15 μL的离子载体A23187工作液,混匀后用NaOH调pH=8,37℃水浴箱中避光10 min,取出,终止反应。另外2份精子沉淀,分别加入1 mL副性腺匀浆液和卵水,不加A23187,其他步骤同上。显微镜下观察,随机计数200个精子,计算平均顶体反应诱导率。

1.4 染毒实验与样品制备

将健康成熟雄蟹暴露于2 L曝气水(pH=6.8)的容器(45 cm×30 cm×30 cm)中进行急性攻毒试验,分别设5个处理组和1个对照组,处理组Pb²⁺浓度分别为3.675、7.35、14.70、29.40和58.80 mg/L(根据96 h LC₅₀^[17]的1/80、1/40、1/20、1/10和1/5设定),分别暴露3、5和7 d。染毒期间不喂食,不换水,每天检查溪蟹的健康状况。

染毒结束后,分别从各组随机选取5只溪蟹活体解剖,迅速取出副性腺,置于-80℃冰箱保存。

1.5 顶体反应诱导试验

从-80℃冰箱中取出副性腺组织,用“不同诱导条件下精子顶体反应诱导率的比较”的方法制成10%的副性腺匀浆液,加入到正常精子沉淀中得精子悬浮液,并进行精子顶体反应诱导试验。

1.6 副性腺ROS含量的检测

按照1:1000用PBS稀释DCFH-DA,使其浓度为10 μmol/L。190 μL副性腺匀浆液与10 μL稀释好的DCFH-DA混匀,37℃孵育20 min,每隔3~5分钟颠倒混匀一次。用多功能酶标仪进行检测(激发波长:488 nm,发射波长:525 nm)。

1.7 副性腺PCO含量和DPC检测

从-80℃冰箱中取出副性腺组织,按重量(g):体积(mL)=1:1的比例加入预冷的PBS,电动匀浆器匀浆制备得50%的匀浆液,4000 r/min 4℃离心10 min,取上清液,参照文献[18]进行PCO含量和DPC测定。实验结果用平均值±标准差(mean±SD)表示。

1.8 数据处理

用SPSS 17.0统计分析软件对实验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),并应用Dunnett法将处理组与相应对照组进行比较(*P<0.05为差异显著,**P<0.01为差异极显著)。实验结果用平均值±标准差(mean±SD)表示。

2 结果

2.1 不同诱导条件下精子顶体反应率的比较

未进行顶体诱导的溪蟹精子在显微镜下观察呈圆形,发生了顶体反应的精子形态发生了变化,呈现顶体外翻(图1)。

用5种不同的诱导方式对溪蟹的精子进行顶体反应诱导实验,副性腺匀浆制成的精子悬浮液用A23187诱导时顶体反应率最高,顶体诱导率可达78%,其他诱导方式效果不明显(表1)。

2.2 铅作用后的副性腺对精子顶体反应诱导率的影响

用铅染毒后的溪蟹副性腺对精子进行顶体反应诱导,染毒5 d,Pb²⁺浓度为58.80 mg/L时,

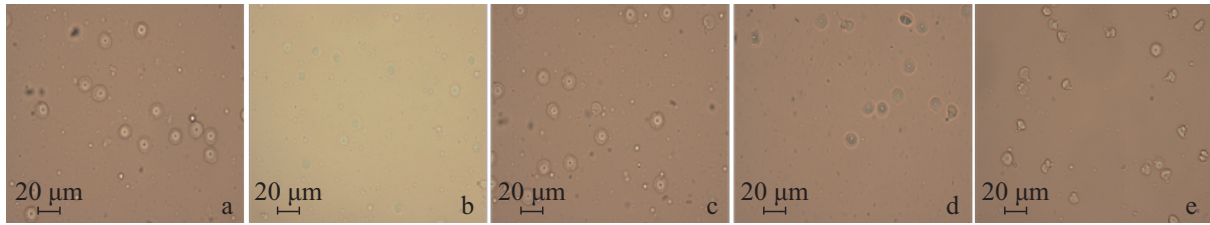


图 1 显微镜下观察的河南华溪蟹精子

(a)未进行顶体诱导的精子; (b)副性腺匀浆液诱导后的精子; (c)A23187诱导后的精子; (d)卵水+A23187诱导后的精子; (e)副性腺匀浆液+A23187诱导后的精子

Fig. 1 Sperm of *S. henanense* observed by microscopy

(a) sperms not for acrosome reaction induced; (b) sperms induced by accessory gland homogenate; (c) sperms induced by A23187; (d) sperms induced by

表 1 不同诱导方式下河南华溪蟹精子的顶体反应率

诱导方式 induction condition	顶体诱导率 acrosome reaction induction rate
卵水 ovum homogenate	0
副性腺匀浆 accessory gland homogenate	0
钙离子载体A23187 calcium ionophore A23187	4.5±0.3
卵水+A23187 ovum homogenate +A23187	6.0±0.5
副性腺匀浆+A23187 accessory gland homogenate +A23187	78±3.4

顶体反应诱导率显著下降; 染毒7 d, Pb^{2+} 浓度为29.40、58.80 mg/L时顶体反应诱导率和对照组相比有显著性差异(图2)。

2.3 铅对河南华溪蟹精子ROS含量的影响

当染毒5 d, Pb^{2+} 高浓度组(Pb^{2+} 浓度 ≥ 14.7 mg/L)副性腺中ROS含量与对照组相比均显著性升高($P < 0.05$)。染毒7 d时, ROS含量也随染毒浓度增大而增高, 除3.675 mg/L浓度组外, 其他各染毒组与对照组相比均有显著性差异(图3)。

2.4 铅对副性腺PCO含量的影响

在染毒5 d, Pb^{2+} 浓度为58.80 mg/L时, PCO含量升高, 与对照组相比出现极显著性差异($P < 0.01$)。在染毒7 d时, 除 Pb^{2+} 浓度为3.675 mg/L染毒组外, 其他处理组的PCO含量都比对照有显著升高, 在 Pb^{2+} 为58.80 mg/L时达到最大值(图4)。

2.5 铅对副性腺DPC水平的影响

在所有的染毒天数下, 所有处理组DPC水平与对照组相比无显著性差异(图5)。

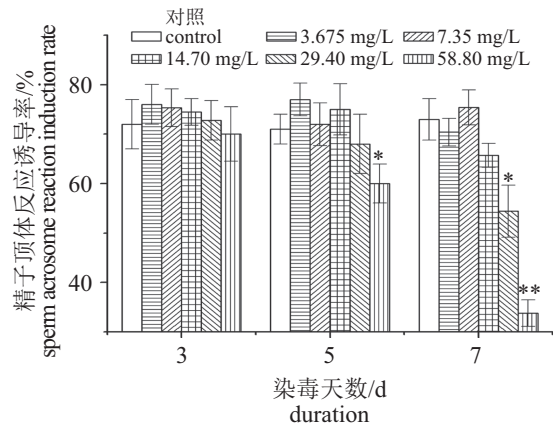


图 2 铅作用后的副性腺对精子顶体反应诱导率的影响

Fig. 2 Effects of accessory gland treated by Pb on sperm acrosome reaction induction rate

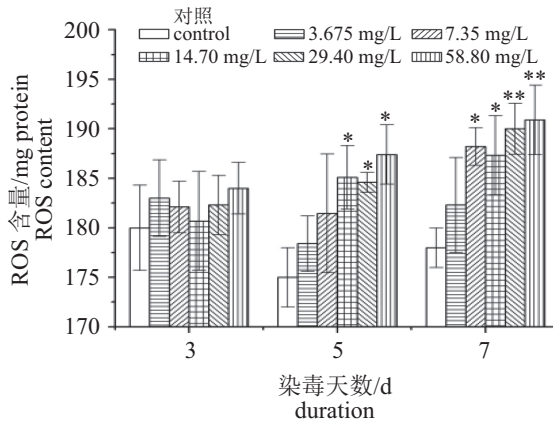


图 3 铅对河南华溪蟹副性腺ROS含量的影响

Fig. 3 Effects of Pb on ROS content in accessory gland of *S. henanense*

3 讨论

精子顶体反应是保证精子完成受精的重要生理过程, 包括精子将顶体内的酶释放出来溶

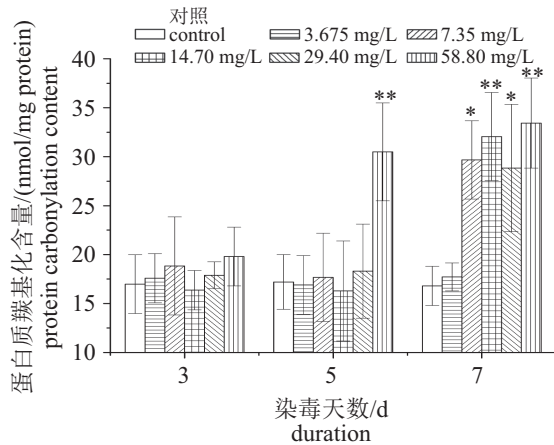


图 4 铅对河南华溪蟹副性腺 PCO 含量的影响

Fig. 4 Effects of Pb on PCO content in accessory gland of *S. henanense*

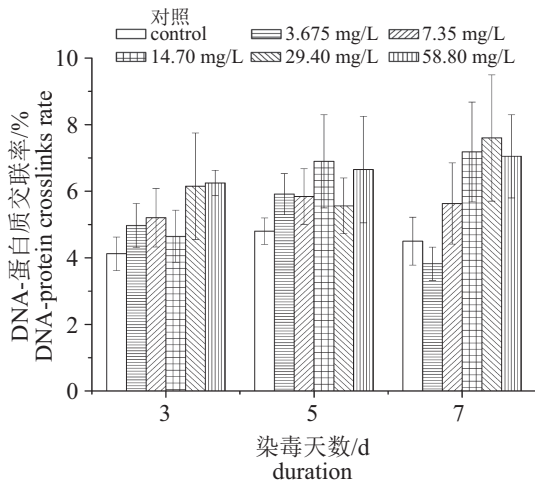


图 5 铅对河南华溪蟹副性腺DPC水平的影响

Fig. 5 Effects of Pb on DPC level in accessory gland of *S. henanense*

解卵放射冠和透明带、精子穿过卵细胞透明带、精卵融合、完成受精这4个过程^[19]。精子顶体反应率是衡量精液质量的重要指标。顶体反应是由钙离子内流启动的，细胞外钙离子通过钙离子通道进入细胞内是诱导精子顶体反应不可缺少的条件^[20-21]。钙离子载体A23187可以帮助打开精子膜的通道促进Ca²⁺进入精子^[22]，所以无论是脊椎动物还是甲壳类无脊椎动物的精子顶体反应都用A23187进行诱导。本实验解剖取出溪蟹的贮精囊划破精荚得到精子，分别用单独卵水、单独副性腺匀浆液、单独A23187、卵水+A23187以及副性腺匀浆液+A23187等5种诱导条件人工诱导溪蟹精子的顶体反应，结果显示

副性腺匀浆液+A23187组合条件下河南华溪蟹精子的顶体反应诱导率最高，而其他处理条件下几乎诱导不出精子顶体反应，提示河南华溪蟹副性腺中的某些蛋白质参与精子顶体反应的调节，对于精子顶体反应的发生必不可少，而且精子顶体反应过程同时需要A23187的诱导，证实河南华溪蟹精子的顶体反应也依赖Ca²⁺。目前，卵水诱导精子的顶体反应效果无定论，本实验中不论单独卵水还是卵水+A23187都未能成功诱导，王艺磊等^[23]用卵水处理锯缘青蟹(*Scylla serrata*)也未诱导出顶体反应，而堵南山等^[24]用卵水诱导的中华绒螯蟹的精子顶体反应诱导率高达93%，这可能与卵子的成熟程度有关。同时，在对河南华溪蟹的精子进行顶体反应诱导过程中，发现河南华溪蟹顶体反应的最适pH为8，偏碱性，这与日本蛭(*Charybdis japonica*)和锯缘青蟹类似^[23, 25]，而中华绒螯蟹的最适pH为偏酸性，这可能与物种差异以及对生存环境的适应性有关。

为进一步研究铅对副性腺诱导精子顶体反应的影响，用铅染毒处理后溪蟹的副性腺匀浆液+A23187法对正常溪蟹精子进行顶体反应诱导实验，结果发现，用较高浓度和较长时间铅处理后的溪蟹副性腺诱导精子顶体反应时，其顶体反应诱导率较对照组明显降低，提示铅染毒会干扰副性腺功能的正常实行，从而对溪蟹的雄性生殖造成影响。

本实验中，在染毒5和7 d的高浓度铅处理组，ROS的量较对照组明显升高，这提示铅诱导机体生成了过量的ROS。过量的ROS可攻击细胞内的大分子物质，包括脂质、蛋白质及DNA^[26]，继而引起细胞的氧化损伤，导致精子正常功能的缺失。前期实验进行了铅对副性腺脂质的损伤研究^[27]，本研究进一步检测了铅对副性腺蛋白质和DNA的氧化损伤情况。

蛋白质分子被ROS氧化修饰的一个重要标记是产生蛋白质羰基^[28]，因此，本实验中通过测定精子中蛋白质羰基化水平来反映精子蛋白质的氧化损伤情况。结果显示，染毒5 d时的最高铅浓度组，以及染毒7 d时除染毒最低浓度组外的其他处理组，副性腺中蛋白质羰基化含量显著上升，这主要是ROS攻击蛋白质修饰其氨基酸残基后的结果^[29]，表明其蛋白质结构和功能受到损伤，由此推断副性腺的功能可能会受到影响。

DNA也是ROS攻击的目标,ROS作用下,蛋白质会与DNA结合形成DNA-蛋白质交联物从而影响DNA的结构,并进一步影响其正常功能的发挥,如复制、修复、重组、转录以及染色质重组^[30]等。实验结果显示,在不同的染毒时间下,所有染毒处理组副性腺中蛋白质-DNA交联率较对照组无明显变化,推测铅作用下未造成副性腺中DNA的损伤。也可能是由于副性腺的上皮细胞分泌物主要含有蛋白质和糖类^[31],而DNA含量较少未被检测到。

综上所述,急性铅染毒会影响河南华溪蟹副性腺调节精子顶体反应的功能,其主要原因是铅诱导产生的ROS导致副性腺中大分子物质蛋白质的氧化损伤。

参考文献:

- [1] Yin D X, Wang X, Chen C, *et al.* Varying effect of biochar on Cd, Pb and As mobility in a multi-metal contaminated paddy soil[J]. *Chemosphere*, 2016, 152: 196-206.
- [2] Zhang Z Y, Juying L, Mamat Z, *et al.* Sources identification and pollution evaluation of heavy metals in the surface sediments of Bortala River, Northwest China[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 126: 94-101.
- [3] Sainath S B, Meena R, Supriya C, *et al.* Protective role of *Centella asiatica* on lead-induced oxidative stress and suppressed reproductive health in male rats[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2011, 32(2): 146-154.
- [4] Priya P H, Reddy P S. Effect of restraint stress on lead-induced male reproductive toxicity in rats[J]. *Journal of Experimental Zoology-Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 2012, 317(7): 455-465.
- [5] Hernández-Ochoa I, García-Vargas G, López-Carrillo L, *et al.* Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico[J]. *Reproductive Toxicology*, 2005, 20(2): 221-228.
- [6] Awadalla N J, El-Helaly M, Gouida M, *et al.* Sperm chromatin structure, semen quality and lead in blood and seminal fluid of infertile men[J]. *The International Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2011, 2(1): 27-36.
- [7] Benoff S, Centola G M, Millan C, *et al.* Increased seminal plasma lead levels adversely affect the fertility potential of sperm in IVF[J]. *Human Reproduction*, 2003, 18(2): 374-383.
- [8] Oliveira H, Spanò M, Santos C, *et al.* Lead chloride affects sperm motility and acrosome reaction in mice: lead affects mice sperm motility and acrosome reaction[J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2009, 25(4): 341-353.
- [9] Lung O, Kuo L, Wolfner M F. *Drosophila* males transfer antibacterial proteins from their accessory gland and ejaculatory duct to their mates[J]. *Journal of Insect Physiology*, 2001, 47(6): 617-622.
- [10] Baldini F, Gabrieli P, Rogers D W, *et al.* Function and composition of male accessory gland secretions in *Anopheles gambiae*: a comparison with other insect vectors of infectious diseases[J]. *Pathogens and Global Health*, 2012, 106(2): 82-93.
- [11] 孙菊香. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)副性腺的结构和功能研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- Sun J X. Study on the structure and function of male accessory gland of *Eriocheir sinensis*[D]. Shanghai: East China Normal University, 2007 (in Chinese).
- [12] 毛倩. 中华绒螯蟹副性腺蛋白功能的初步研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2009.
- Mao Q. Studies on the function of the accessory sex gland protein in *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai: East China Normal University, 2009 (in Chinese).
- [13] Hou X L, Mao Q, He L, *et al.* Accessory sex gland proteins affect spermatophore digestion rate and spermatozoa acrosin activity in *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2010, 30(3): 435-440.
- [14] 侯雪丽. 中华绒螯蟹副性腺差减cDNA文库的构建及内容物功能的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2009.
- Hou X L. Studies on the differentially expressed genes in accessory sex gland and function of *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai: East China Normal University, 2009 (in Chinese).
- [15] 孙文娟. ERK在体外诱导中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)精子顶体反应中的调节作用[D]. 上海: 华东师范大学, 2015.
- Sun W J. ERK is involved in the process of acrosome reaction in vitro of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai: East China Normal University,

- 2015 (in Chinese).
- [16] 王兰, 堵南山, 赖伟. 长江华溪蟹输精管的超微结构与精荚形成的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(4): 374-379.
Wang L, Du N S, Lai W. Ultrastructure of vas deferens and formation of spermatophore of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense* (Crustacea, Decapoda)[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1996, 27(4): 374-379(in Chinese).
- [17] 刘娜. 铅镉对长江华溪蟹抗氧化系统的影响[D]. 太原: 山西大学, 2008.
Liu N. The effects of lead and cadmium on antioxidant system of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiens* [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2008 (in Chinese).
- [18] Li R J, Zhou Y Y, Ji J F, *et al.* Oxidative damages by cadmium and the protective effects of low-molecular-weight chitosan in the freshwater crab (*Sinopotamon yangtsekiense* Bott 1967)[J]. Aquaculture Research, 2011, 42(4): 506-515.
- [19] Tosti E. Sperm activation in species with external fertilization[J]. Zygote, 1994, 2(4): 359-361.
- [20] Rahman M S, Kwon W S, Pang M G. Calcium influx and male fertility in the context of the sperm proteome: an update[J]. Biomed Research International, 2014, (2): 175-185.
- [21] Schackmann R W, Shapiro B M. A partial sequence of ionic changes associated with the acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus*[J]. Developmental Biology, 1981, 81(1): 145-154.
- [22] Bhavanishankar S, Subramoniam T. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forsk.)[J]. Journal of Experimental Zoology, 1997, 277(4): 326-336.
- [23] 王艺磊, 张子平, 谢芳靖, 等. 锯缘青蟹精子顶体反应的研究[J]. 动物学报, 2001, 47(3): 310-316.
Wang Y L, Zhang Z P, Xie F J, *et al.* Acrosome reaction in sperm from mud crab (*Scylla serrata*)[J]. Acta Zoologica Sinica, 2001, 47(3): 310-316(in Chinese).
- [24] 堵南山, 赖伟, 薛鲁征. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)精子顶体反应的研究[J]. 动物学报, 1987, 33(1): 8-13.
Du N S, Lai W, Xue L Z. Acrosome reaction of the sperm in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda)[J]. Acta Zoologica Sinica, 1987, 33(1): 8-13(in Chinese).
- [25] 许星鸿, 阎斌伦, 徐加涛. 体外诱导日本鲟精子顶体反应的形态变化与诱导条件[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1821-1828.
Xu X H, Yan B L, Xu J T. Morphological changes and induced conditions of acrosome reaction *in vitro* induction of sperm from marine crab (*Charybdis japonica*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(12): 1821-1828(in Chinese).
- [26] Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, *et al.* Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 64(2): 178-189.
- [27] Li N, Hou Y H, Ma D D, *et al.* Oxidative damage and histopathological alteration in testes and accessory glands of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*, induced by acute lead exposure[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 117: 20-27.
- [28] Samuel S, Kathirvel R, Jayavelu T, *et al.* Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL- α -lipoic acid[J]. Toxicology Letters, 2005, 155(1): 27-34.
- [29] 文静, 张春华, 董雨, 等. 蛋白质羰基含量与蛋白质氧化损伤[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 153-157.
Wen J, Zhang C H, Dong Y, *et al.* Review on relationship between protein carbonyl content and protein oxidative injury[J]. Food Science, 2003, 24(10): 153-157(in Chinese).
- [30] Barker S, Weinfeld M, Murray D. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences[J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2005, 589(2): 111-135.
- [31] 王玉凤, 堵南山, 赖伟. 罗氏沼虾雄性生殖系统的组织化学研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(3): 13-16.
Wang Y F, Du N S, Lai W. A histochemical study on the male reproductive system of *Macrobrachium rosenberch*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1997, 4(3): 13-16(in Chinese).

The effect of acute lead on accessory gland of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) in sperm acrosome reaction induction

LI Na^{1,2}, XU Peng¹, WANG Lan^{1*}

(1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. School of Arts and Sciences, Shanxi Agriculture University, Taigu 030801, China)

Abstract: To investigate the toxic effect of lead on male accessory gland function in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*, the function of accessory gland was investigated firstly, acrosome reaction induction rate was high up to 78% under the combination of calcium ionophore A23187 and accessory gland homogenate, it implied that accessory gland could adjust the action of sperm acrosome reaction. Then the effects of Pb on the accessory gland function in sperm acrosome reaction induction and oxidative stress were investigated after 3, 5 and 7 d, exposed to different Pb concentrations (0, 3.675, 7.35, 14.70, 29.40 and 58.80 mg/L). The results showed that the acrosome reaction induction rate was decreased significantly when the accessory gland was taken from crabs which was treated by Pb. Meanwhile, the reactive oxygen species (ROS) content and protein carbonylation (PCO) content were increased in a concentration- and time-dependent manner in accessory gland, however, DNA-protein crosslinks rate (DPC) level had no significant change. Our findings documented that Pb decreased the function of accessory gland in sperm acrosome reaction induction, which was associated with the increasing of ROS leading to protein oxidative damage.

Key words: *Sinopotamon henanense*; accessory gland; acrosome reaction; protein carbonylation; DNA-protein crosslink rate; lead

Corresponding author: WANG Lan. E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

Funding projects: National Nature Science Foundation of China (31672293,30970361); Applied Basic Research Program of Shanxi Province (2016021141)