

文章编号: 0529-6579 (2000) 04-0085-05

# 渗透压和 pH 对日本鳗鲡精子活力的影响<sup>\*</sup>

邓岳松, 林浩然

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘 要:** 日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 的精子在低于或等于精浆渗透压 ( $\leq 766.1$  kPa) 的溶液中不运动, 在一定渗透压范围内 ( $1\,021.4 \sim 3\,830.4$  kPa), 超过精浆渗透压的溶液可激活精子。鳗鲡精子在偏碱性的溶液 (pH 7.0~8.9) 中活力较强, 酸性 (pH < 7.0) 或碱性较强 (pH > 8.9) 的溶液, 都将降低精子活力。被激活后运动一段时间静止下来的精子, 在人工精浆中孵育后, 可被重新激活。

**关键词:** 鳗鲡 (*Anguilla japonica*); 精子活力; 渗透压; pH

**中图分类号:** Q45 **文献标识码:** A

鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 是降海回游, 在海水中繁殖的鱼类, 受精效果不仅与精、卵的质量有关, 也与受精时的环境条件密切相关。对精子来说, pH 值、渗透压、各种离子和有机物都可能不同程度的影响精子的活力。研究各种因素对鳗鲡精子活力的影响, 不仅有助于鳗鲡精液保存液和人工繁殖时精液稀释液的配制, 也有助于深入了解鱼类精子生物学特性。谢刚等<sup>[1]</sup>研究了盐度和温度等环境因子对鳗鲡精子活力的影响, Ohta 等<sup>[2]</sup>报道了  $K^+$  和  $HCO_3^-$  对鳗鲡精子活力的影响。但渗透压和 pH 对鳗鲡精子活力的影响在现有文献中尚无明确记载, 本文初步观察了这 2 种因素对日本鳗鲡精子活力的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 雄鳗的处理及精液采集

鳗鲡于 1998 年 12 月购自广州, 共 60 尾。体质量平均为 394 g, 范围 250~420 g; 平均体长 61.2 cm, 范围 56.5~71 cm。鱼购回后蓄养于  $1\text{ m} \times 0.6\text{ m} \times 0.5\text{ m}$  的循环水族箱中, 用 4 d 时间逐步适应盐度 28‰~32‰的人工海水 (广州市海马盐业公司的海水素配制)。鱼在实验期间不投喂, 自然水温 ( $20 \sim 25^\circ\text{C}$ ) 和光照。通过埋植雄烯二酮来催熟鳗鲡<sup>[3]</sup>。待鳗鲡达性成熟后 20 d, (此时精液质量较好<sup>[3]</sup>), 用挤压法采集精液: 用去离子水洗净生殖孔, 再用干毛巾擦去生殖孔周围及体表的水分, 轻压鳗鲡腹部, 用干净吸管将精液移入冰浴的 1.5 mL 离心管, 要求无尿、粪便、血液的污染。

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770101)

收稿日期: 1999-07-05; 作者简介: 邓岳松 (1967~), 男, 博士生; 通讯关系人: 林浩然。

1.2 精子活力的测定

将 2  $\mu$ L 精液与 1 mL 稀释液（ $\times 501$ ）混匀后，取 50  $\mu$ L 转移到载玻片上并立即在显微镜（ $\times 400$ ）下观察。精子活力的计算参照 Wang 的方法稍加修改<sup>[4]</sup>，以精子激活比例表示，即任意记数 100 个以上的精子，根据活动精子占精子总数的比例将精子活力分为 6 个等级：0 级，活动精子比例 $< 1\%$ ；1 级，活动精子比例为  $1\% \sim 20\%$ ；2 级，活动精子比例为  $21\% \sim 40\%$ ；3 级，活动精子比例为  $41\% \sim 60\%$ ；4 级，活动精子比例为  $61\% \sim 80\%$ ；5 级，活动精子比例为  $81\% \sim 100\%$ 。每次实验取 5~7 尾鳗鲡的精液，每个精液样品重复观察 3 次，取平均值。所有试剂均为分析纯，用去离子水配制成不同渗透压或不同 pH 值的稀释液。观察渗透压对精子活力影响时用 0.1 mol/L 的 NaOH 调溶液的 pH 值至 8.0，观察 pH 值对精子活力影响时用 0.1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 将 2 298.2 kPa 的 NaCl 或葡萄糖调到所需的 pH 值。观察时温度为  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.3 精浆和血浆的渗透压及 pH 值测定

精浆：将精液 5 000 r/min 离心 10 min，取上清液。血浆：从鳗鲡尾动脉抽血，4  $^\circ\text{C}$  放置 4 h，10 000 r/min 离心 5 min，取上清液。测 pH 值用精密 pH 试纸，测定前用 pH 计校正。渗透压用渗透压计测定（日本 Nikkiso 公司的 OSA-21 型渗透压计）。

2 结果与分析

2.1 精浆和血浆的渗透压、pH 值

从表 1 可看出，鳗鲡精浆渗透压与血浆渗透压都在 766.1 kPa 左右。而鳗鲡生活环境（人工海水）的渗透压较高，达 2 298.2 kPa，与相同盐度的天然海水（2 298.2~2 553.6 kPa）相近。精浆、血浆和人工海水的 pH 值都偏碱性，其中精浆和人工海水 pH 值较高。

表 1 精浆、血浆和人工海水的渗透压及 pH 值

Tah 1 Osmolality and pH value of seminal plasma, blood plasma and artificial sea-water

| 样品        | 样品数目 | 渗透压/ kPa          | pH            |
|-----------|------|-------------------|---------------|
| 精浆        | 8    | 766.1 $\pm$ 29.6  | 8.2 $\pm$ 0.2 |
| 血浆        | 8    | 754.7 $\pm$ 8.2   | 7.5 $\pm$ 0.2 |
| 人工海水（32‰） | 6    | 2332.2 $\pm$ 13.8 | 8.0 $\pm$ 0.2 |

2.2 精液稀释倍数对精子活力的影响

取 50  $\mu$ L 不稀释的精液在显微镜下直接观察，发现精子都处于静止状态，活力为 0 级。然后分别用低于精浆渗透压（383 kPa）等于精浆渗透压（766.1 kPa），高于精浆渗透压（2 298.2 kPa）的葡萄糖或 NaCl 溶液以不同的倍数稀释精液。从表 2 可看出，精子在低渗液和等渗液中即使稀释 1 000 倍，精子仍不能激活；在高渗液中当稀释倍数达到 50 倍以上时，精子活力达到最高。

表 2 精液稀释倍数对精子活力的影响

Tah 2 Effects of dilution on the sperm motility class of *Anguilla japonica*

| 稀释比例 |            | 5 | 10 | 50 | 100 | 200 | 400 | 800 | 1000 |
|------|------------|---|----|----|-----|-----|-----|-----|------|
| 葡萄糖  | 383 kPa    | 0 | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    |
|      | 766.1 kPa  | 0 | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    |
|      | 2298.2 kPa | 3 | 4  | 5  | 5   | 5   | 5   | 5   | 5    |
| 氯化钠  | 383 kPa    | 0 | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    |
|      | 766.1 kPa  | 0 | 0  | 0  | 0   | 0   | 0   | 0   | 0    |
|      | 2298.2 kPa | 3 | 4  | 5  | 5   | 5   | 5   | 5   | 5    |

2.3 不同渗透压的 KCl、NaCl 和葡萄糖对鳗鲡精子活力的影响

表 3 说明用不同渗透压的电解质和非电解质对精子活力的影响, 精子在低于和等于精浆渗透压 ( $\leq 766.1$  kPa) 的溶液中活力为 0 级; 在 1 021.4 kPa 的溶液中活力为 1 级; 在 1 021.4~1 787.5 kPa 之间, 精子活力随渗透压的升高而升高; 当渗透压达到 1 787.5 kPa 或 2 042.9 kPa 时, 精子活力达到最高; 但渗透压超过 2 553.6 kPa 时, 精子活力开始下降, 到 3 830.4 kPa 精子活力为 0 级. 不同的激活液结果稍有不同, 如用 KCl 作激活液, 1 787.5 kPa 时精子活力为 4 级; 而 NaCl 和葡萄糖都为 5 级; 用葡萄糖作激活液, 3 064.3 kPa 时精子活力为 1 级, 而 KCl、NaCl 为 3 级.

表 3 渗透压对精子活力的影响  
Tab.3 Effect of osmolality on the sperm motility class of *A. japonica*

| 渗透压/kPa | 510.7 | 766.1 | 1021.4 | 1276.8 | 1532.2 | 1787.5 | 2042.9 | 2298.2 | 2553.6 | 3064.3 | 3830.4 |
|---------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| KCl     | 0     | 0     | 1      | 2      | 4      | 4      | 5      | 5      | 5      | 3      | 0      |
| NaCl    | 0     | 0     | 1      | 2      | 4      | 5      | 5      | 5      | 5      | 3      | 0      |
| 葡萄糖     | 0     | 0     | 1      | 2      | 4      | 5      | 5      | 5      | 5      | 1      | 0      |

图 1 表明交替使用高于精浆渗透压的溶液和低于精浆渗透压的溶液, 精子活力的变化. 精子在比精浆渗透压低的 NaCl 溶液 (638.4 kPa) 中呈静止状态, 活力为 0 级; 加入适当体积的 5 mol/L NaCl 溶液 (25 536 kPa), 使渗透压达到 2 298.2 kPa, 精子在 4 s 内开始运动; 1 min 后, 加入适当体积的 pH 8.2 的 Hepes-NaOH 缓冲液 (102.1 kPa), 使溶液渗透压下降到 638.4 kPa, 所有精子在 10 s 内停止运动. 如此反复 4 次都可使精子激活或静止. 用葡萄糖作激活液, 结果一样.

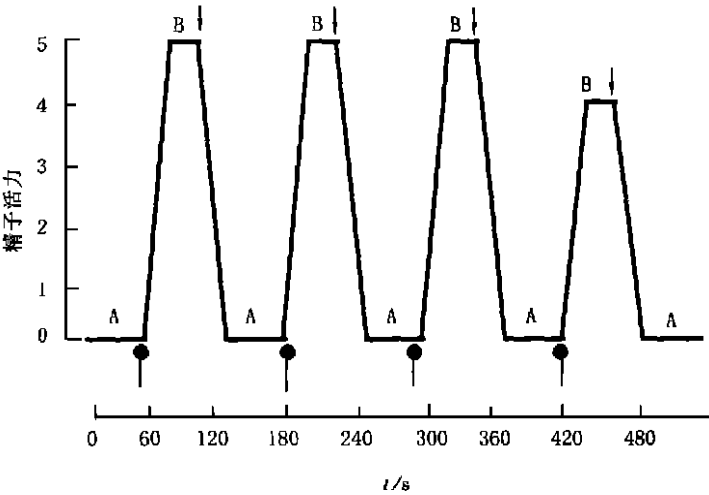


图 1 反复改变环境渗透压对鳗鲡精子活力的影响

Fig.1 Repetition of sperm motility in Japanese eel by changing external osmolality

A 代表精子处于 638.4 kPa 的溶液中; B 代表精子处于 2 298.2 kPa 的溶液中;  
●代表加入适当体积的 25 536 kPa 的溶液; →代表加入适当体积的 102.1 kPa 的 Hepes-NaOH 缓冲液

表 3 和图 1 说明精子激活或抑制受渗透压调节, 与激活液是否是电解质无关.

#### 2.4 pH 值对精子活力的影响

精子在 pH 5.4, 5.8, 6.4, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 8.9, 9.4, 10, 11, 12 时, 平均活力分别为 2, 3, 4, 5, 5, 5, 5, 4, 2, 1, 0. 精子在中性和偏碱的溶液中 (pH 7.0 ~ 8.9) 活力较强, 在酸性溶液中活力较低. 但 pH 12 时, 精子活动被完全被抑制. 实验中还发现, 在 pH 12 的稀释液中加入适量 pH 7.0 的 NaCl, 使激活液 pH 值下降, 精子又可被激活. 说明 pH 对鳗鲡精子的抑制是可逆的.

#### 2.5 精子的重新激活

将取自同一条的鱼的精液等分为 A、B、C 三部分, 用 50 倍体积的 2 298.2 kPa 的 KCl 或葡萄糖稀释, 立即观察活力 (活力都为 5 级) 后室温放置 25 ~ 30 min, 待所有精子都停止运动后 (活力都为 0 级), 轻轻震荡激活液, 使静止的精子均匀分散在激活液中. A 部分立即置 4 °C 冰箱中; B 部分和 C 部分在 5 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 去上清液后, 将 B 部分和 C 部分沉淀下来的精子分别悬浮于 10 倍体积的高渗液 (成分为 427 mmol/L NaCl + 60 mmol/L KCl + 3.3 mmol/L CaCl<sub>2</sub> + 5.4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 渗透压为 2 298.2 kPa) 和人工精浆中 (140.8 mmol/L NaCl + 18.4 mmol/L KCl + 1.1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> + 1.8 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 渗透压为 835.3 kPa, 与精浆相同, 离子组成比例与高渗液相同), 4 °C 孵育 4 ~ 8 h 后 (活力仍然都为 0 级), 再用 50 倍体积的 2 298.2 kPa 的 KCl 或葡萄糖稀释, 然后在显微镜下观察 A、B、C 部分的精子活力, 结果见表明 C 部分的精子可重新激活, 但活力由第一次激活后的 5 级降为 3 级; 而 A、B 部分的精子因一直处于高渗透压的环境中, 活力均为 0 级. 一共取了 5 尾鱼的精液, 结果相同.

### 3 讨 论

鱼类精子活力受渗透压、pH、无机离子、有机物等多种因子的调节, 不同的鱼有不同的调节方式<sup>[9]</sup>. 本实验结果表明, 鳗鲡精子在低于或等于精浆渗透压的溶液中不运动, 只有当环境渗透压超过精浆渗透压时, 精子才被激活 (表 3); 改变环境渗透压可反复激活或抑制精子运动 (图 1), 因此鳗鲡精子活力主要受渗透压调节, 与鳕、黄盖鲽等海产硬骨鱼相似<sup>[9]</sup>. 表 3 还显示, 鳗鲡精子在渗透压为 2 298.2 kPa 左右 (1 787.5 ~ 2 553.6 kPa) 的溶液中, 活力最高, 这可能是鳗鲡精子生理特性与环境相适应的结果: 鳗鲡的繁殖在较高渗透压的环境中 (人工海水或天然海水的渗透压都在 2 298.2 kPa 左右) 进行, 其精子排出体外后, 直接被高渗的海水稀释, 从而被激活, 以便与卵子受精.

鳗鲡精子在偏碱性的溶液中活力较高, 可能也是其生理特性与环境相适应的结果. 因为鳗鲡繁殖时所处的水环境 pH 值较高 (人工海水 pH 值为 7.8 ~ 8.2, 天然海水的 pH 值为 7.5 ~ 9.0).

有学者认为<sup>[1]</sup>, 鱼类精子激活后停止运动便死亡了, 从本实验的结果来看与此不一致的. 精子活动需 ATP 水解<sup>[9]</sup>. 鳗鲡被激活的精子停止运动后, 在与精浆等渗的人工精浆中孵育一段时间又可被激活, 而在与人工精浆离子组成相同的高渗透压的溶液中孵育则不能被重新激活, 这可能是低渗透压环境可抑制鞭毛动力蛋白 ATP 酶活性, 使线粒体产生的 ATP 有所恢复, 而高渗透压不能抑制鞭毛动力蛋白 ATP 酶活性. 因此精子停止运动可能是其 ATP 被大量消耗引起的, 精子并没有死亡. 当精子停止运动是其结构被破坏引起

的, 则是“真正”死亡了<sup>[8]</sup>。

以上结果提示, 在配制鳗鲡精液保存液时, 保存液的渗透压宜在 766.1 kPa 左右, 或稍低; 而配制人工受精的精子激活液时, 激活液的渗透压宜在 2 298.2 kPa 左右, 激活液体积要超过精液体积的 50 倍。保存液和激活液宜偏碱性 (pH 8.2 左右)。

#### 参考文献:

- [1] 谢刚, 叶星, 苏植蓬, 等. 鳗鲡精子的主要生物学特性 [J]. 上海水产大学学报, 1999, 8 (1): 81~84.
- [2] OHTA H, IKEDA K, IZAWA T. Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility *in vitro* by Japanese eel spermatozoa [J]. J Exp Zool, 1997, 277: 171~180.
- [3] 邓岳松, 林浩然. 埋植雄烯二酮一次诱导雄性日本鳗鲡性腺发育成熟的研究 [J]. 海洋科学, 2000 (4): 43~45.
- [4] WANG Z, CRIM L W. Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus* [J]. Fish Physiol Biochem, 1997, 16 (1): 77~83.
- [5] 邓岳松, 林浩然. 鱼类精子活力研究进展 [J]. 生命科学研究, 2000 (1): 1~8.
- [6] MORISAWA M, SUZUKI K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts [J]. Science, 1980, 210: 1145~1146.
- [7] TAKAI H, MORISAWA M. Change in intracellular  $K^+$  concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts [J]. J Cell Sci, 1995, 108: 1175~1181.
- [8] MORISAWA M, SUZUKI K, SHIMIZU H, et al. Effects of osmolality and potassium on sperm motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes [J]. J Exp Biol, 1983, 107: 95~103.

## Effects of Osmolality and pH on Sperm motility of Japanese eel (*Anguilla japonica*)

DENG Yue-song<sup>\*</sup>, LIN Hao-ran

**Abstract:** Sperm of *Anguilla japonica* remained immotile when the semen was diluted in NaCl, KCl or glucose solution which isotonic or hypotonic to the seminal plasma. The sperm became motile in media containing NaCl, KCl or glucose if the osmolality was higher than that of the seminal plasma. Sperm acquisition of high motility at pH 7.0 to pH 8.9. Buffers below pH 7.0 or high than pH 8.9 would inhibit sperm motility. The sperm which lost their motility would reactivate motility if incubated with artificial-seminal-plasma for 4~8 hours.

**Keywords:** *Anguilla japonica*; sperm motility; osmolality; pH

<sup>\*</sup> School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China