

钠、钾、钙和葡萄糖对白斑狗鱼精子活力的影响^{*}

苏德学^① 严安生^{②**} 田永胜^② 宋全德^③ 胡金波^② 杜劲松^① 陈莉^①

(^①新疆水产科学研究所 乌鲁木齐 830000; ^②华中农业大学水产学院 武汉 430070;

^③新疆阿勒泰市水产办公室 阿勒泰 836500)

摘要: 观察了白斑狗鱼精子在 0 ~ 679.6 kPa NaCl、KCl、葡萄糖溶液和 0 ~ 339.8 kPa CaCl₂ 溶液中的活动情况。在 NaCl、KCl、葡萄糖溶液中, 白斑狗鱼精子快速运动时间和寿命的变化规律基本一致, 精子活动最适渗透压介于 339.8 ~ 453.0 kPa。K⁺ 有延长精子寿命的作用。外源性葡萄糖可被精子利用, 增强精子活力, 延长精子寿命。56.7 kPa CaCl₂ 对精子活动有抑制作用, 并引起精子聚集, 该效应随着 Ca²⁺ 浓度升高而增强。

关键词: 白斑狗鱼; 精子活力; 渗透压; 阳离子; 葡萄糖

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2004)01-16-05

Effects of Na⁺, K⁺, Ca²⁺ and Glucose on Sperm Mobility in Northern Pike, *Esox lucius*

SU De-Xue^① YAN An-Sheng^② TIAN Yong-Sheng^② SONG Quan-De^③ HU Jin-Bo^②
DU Jin-Song^① CHEN Li^①

(^①Xinjiang Fisheries Institute, Urumqi 830000; ^②Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

^③Fisheries Office of Aletai, Xinjiang 836500, China)

Abstract: Sperm motility in 0 - 679.6 kPa NaCl, KCl, and glucose solutions as well as in 0 - 339.8 kPa CaCl₂ solution was investigated in Northern Pike, *Esox lucius*. The results showed that the duration in which sperm kept fast motility and the sperm life span was basically similar in NaCl, KCl and glucose solutions, and the optimum osmolarity spermatozoa motility was 339.8 - 453.0 kPa. K⁺ extended life span of spermatozoa. Extracellular glucose might be used by spermatozoa to increase their motility and to extend their life span. At osmolarity of 56.7 kPa, Ca²⁺ inhibited sperm motility and caused their aggregation, and this effect was enhanced with the increase in Ca²⁺ concentration.

Key words: Northern Pike; Spermatozoal motility; Osmolarity; Cation; Glucose

白斑狗鱼(*Esox lucius*)隶属鲑形目狗鱼科, 是一种较大型的名贵鱼类, 在我国仅分布于新疆的额尔齐斯河水系。因其味鲜美、生长快、易捕捞等特点, 得到消费者的青睐和养殖生产者的关注, 已被列为新疆地区名优水产品重点开发的对象之一。由于白斑狗鱼的天然资源受过度捕捞等因素的影响而呈现衰减趋势, 为保护

该鱼的自然资源和满足人工养殖的需要, 开展

^{*} 国家科技攻关项目“新疆冷水鱼类资源保护和开发利用”(No. 2002EP050013)资助;

^{**} 通讯作者;

第一作者介绍 苏德学, 41岁, 男, 高级工程师; 主要从事渔业资源与鱼类养殖研究。

收稿日期: 2003-06-20, 修回日期: 2003-11-15

该鱼的人工苗种繁育工作是一项十分紧迫的任务。据此,作者结合白斑狗鱼人工繁殖工作,进行了三种阳离子、葡萄糖及其渗透压对该鱼精子活力影响的研究,以丰富我国鱼类精子生态生理特性的内容,也为该鱼精子稀释液和保存液的配制提供科学依据。白斑狗鱼精子活力的研究在国内尚未见报道。

1 材料与方 法

雄性白斑狗鱼均采自额尔齐斯河的北屯至克兰河口河段,体重 430 ~ 1 600 g,体质健壮,无病害,轻压腹部有精液流出。实验鱼暂养于水泥池里,水温 5 ~ 12℃,有微流水。暂养期间未投食。实验鱼均未注射催产药剂。本工作在新疆阿勒泰市水产技术推广站进行。

NaCl、KCl、CaCl₂ 和葡萄糖均为分析纯。NaCl、KCl 和葡萄糖用去离子水配制成 0 ~ 679.6 kPa 7 个渗透压组,CaCl₂ 配制成 0 ~ 339.8 kPa 7 个渗透压组。

采精时,先擦干鱼体表水分,轻挤鱼腹部两侧获取精液。观察用精液应呈乳白色,粘稠,无尿、血、粪、粘液污染。观察时,先于载玻片上加一滴实验液,用洁净牙签尖端挑取少许精液与其混合,即刻移至 10 × 40 倍显微镜下,依次完成对同尾鱼精子在不同渗透压的同种溶液中的活动观测。观察以一个视野为准。每个渗透压组均做两次观测,取其平均值作为观测值。当

精液与实验液相混时即用秒表开始计时。根据精子的活动程度和状态,将其分为:快速运动——精子运动速度很快,看不清其运动路线,只见一些黑点乱窜动;中速运动——能看清精子呈直线或曲线运动,运动速度较慢;慢速运动——精子缓慢地从一处游向另一处,时有停顿现象;颤动——精子只在原地摇动,直至停止摇动(死亡)。当视野中 70% 以上的精子从快速运动转入中速运动,即认为精子快速运动时间结束,当 95% 以上的精子停止颤动,即认为精子寿命终止^[1]。此次观测只计精子快速运动和寿命时间。

采用 STATISTICA 5.5 软件对白斑狗鱼精子在同种溶液不同渗透压条件下的快速运动和寿命进行单因素方差分析,并用 LSD 法比较这两项数值在不同渗透压下的差异显著性。

2 结 果

2.1 不同渗透压 NaCl 对精子活力的影响 从表 1 可知,在 0 ~ 339.8 kPa NaCl 溶液中,精子快速运动时间是随着溶液渗透压的升高而延长,以 339.8 kPa 时最长,为 62.73 s。此后随溶液渗透压增高,精子活动强度减弱,运动时间逐渐缩短,到 679.6 kPa 时仅为 16.60 s,且有相当一部分精子处于不活动状态。数据分析表明,339.8 kPa 中精子快速运动时间与 0、113.3、566.3、679.6 kPa 间存在极显著差异($P < 0.01$)。

表 1 不同渗透压的 NaCl、KCl 和葡萄糖对白斑狗鱼精子快速运动的影响(单位:s)

渗透压 (kPa)	NaCl(n = 11)*		KCl(n = 11)		葡萄糖(n = 10)	
	范围	$\bar{X} \pm SD$	范围	$\bar{X} \pm SD$	范围	$\bar{X} \pm SD$
0	31 ~ 40	31.38 ± 7.15	15 ~ 40	27.73 ± 6.33	31 ~ 40	35.2 ± 3.22
113.3	41 ~ 71	44.40 ± 9.17	25 ~ 53	33.00 ± 14.48	41 ~ 71	51.6 ± 8.78
226.5	50 ~ 80	51.18 ± 15.49	24 ~ 55	44.09 ± 10.68	50 ~ 80	63.5 ± 9.79
339.8	50 ~ 80	62.73 ± 20.75	26 ~ 60	45.91 ± 10.45	50 ~ 80	64.5 ± 10.12
453.0	42 ~ 82	49.70 ± 11.93	24 ~ 66	48.45 ± 14.27	42 ~ 82	56.7 ± 11.11
566.3	19 ~ 70	37.90 ± 12.94	23 ~ 50	36.82 ± 7.91	19 ~ 70	43.6 ± 14.55
679.6	3 ~ 27	16.60 ± 8.78	15 ~ 34	27.82 ± 5.72	3 ~ 27	16.6 ± 8.78

* n 为检测鱼的尾数。下表同。

精子在 0 ~ 453.0 kPa NaCl 溶液中的寿命是随溶液渗透压的升高而延长,以 453.0 kPa 时为最长,达 298.73 s,此后伴随溶液渗透压的升高

而缩短(表 2)。453.0 kPa 时的精子寿命仅与 0 kPa 时的有极显著差异($P < 0.01$),而与 113.3、226.5、679.6 kPa 间存在显著性差异($P <$

0.05)。

表 2 不同渗透压的 NaCl、KCl 和葡萄糖对白斑狗鱼精子寿命的影响(单位:s)

渗透压 (kPa)	NaCl(n=11)		KCl(n=11)		葡萄糖(n=10)	
	范围	$\bar{X} \pm SD$	范围	$\bar{X} \pm SD$	范围	$\bar{X} \pm SD$
0	53~85	68.22 ± 10.86	30~192	121.18 ± 46.13	106~171	135.30 ± 22.22
113.3	72~178	126.10 ± 28.51	40~204	146.73 ± 44.43	111~335	182.22 ± 59.90
226.5	106~163	133.00 ± 20.51	69~534	279.82 ± 136.07	155~1231	668.91 ± 403.09
339.8	109~756	222.45 ± 186.07	239~1871	796.27 ± 504.93	116~1511	1103.70 ± 391.62
453.0	91~819	298.73 ± 233.79	325~2560	1016.27 ± 671.07	226~1293	787.34 ± 342.16
566.3	88~1026	258.00 ± 285.07	170~1185	757.91 ± 314.02	183~990	645.22 ± 310.20
679.6	41~385	101.33 ± 114.7	60~1220	556.36 ± 403.72	29~156	75.57 ± 38.03

2.2 不同渗透压 KCl 对精子活力的影响 在 0~679.6 kPa KCl 溶液中,白斑狗鱼的精子快速运动和寿命是随着溶液渗透压的升高而延长,均在 453.0 kPa 时达最大值,分别为 48.45 s 和 1016.27 s。随着渗透压的继续增高,精子活动受到抑制,快速运动时间和寿命时间缩短(表 1,2)。453.0 kPa 时精子快速运动时间与 0、679.6 kPa 时的有极显著差异($P < 0.01$),与 113.3、566.3 kPa 的存在显著性差异($P < 0.05$)。而 453.0 kPa 时的精子寿命与 0、113.3、226.5、679.6 kPa 的存在极显著性差异($P < 0.01$)。

在相同的 453.0 kPa 时,KCl 溶液中的精子寿命是 NaCl 溶液中的 3.4 倍,表明 K^+ 有延长精子寿命的作用。

2.3 不同渗透压葡萄糖对精子活力的影响

在 0~679.6 kPa 葡萄糖溶液中,白斑狗鱼的精子快速运动和寿命也是随着溶液渗透压的增高而延长,均在 339.8 kPa 时达 64.5 s 和 1103.70 s,为最高值。之后,随着溶液渗透压升高而缩短(表 1,2)。339.8 kPa 时的精子快速运动时间与 0、113.3、566.3、679.6 kPa 之间的差异极显著($P < 0.01$)。339.8 kPa 时的精子寿命与 0、113.3、226.5、566.3、679.6 kPa 间存在极显著性差异($P < 0.01$),与 453.0 kPa 间的差异性显著($P < 0.05$)。

在此次观测中,葡萄糖溶液(339.8 kPa)中的精子寿命最高值要比 KCl 溶液(453.0 kPa)中的长约 100 s,是 NaCl 溶液中的(453.0 kPa)中的 3.7 倍,表明葡萄糖有可能作为细胞外源性能

源被精子所利用,使其精子寿命延长。

2.4 不同渗透压 $CaCl_2$ 对精子活力的影响

与以上三种溶液的情况相反,白斑狗鱼精子在 0~339.8 kPa $CaCl_2$ 溶液中的精子快速运动随溶液渗透压的增高而逐渐缩短(表 3)。56.7 kPa 时已有部分测试鱼精子无快速运动,226.5 kPa 时已有 7 尾测试鱼精子丧失快速运动能力,甚至不经慢速运动就直接呈现原地颤动。此外,精子以头向内,尾向外的聚集(aggregation)程度也是随着溶液渗透压的升高而增强。0 kPa 时的精子快速运动除与 56.7 kPa 时的无显著性差异($P > 0.05$)外,与其余各渗透压组均存在极显著性差异($P < 0.01$),就其精子寿命而言,变幅不大(表 3),0 kPa 组与其它各渗透压组均无显著性显著($P > 0.05$)。很明显,精子在 $CaCl_2$ 溶液中的活动状态与溶液渗透压无关,而是 Ca^{2+} 特殊作用的结果。

表 3 不同渗透压的 $CaCl_2$ 溶液对白斑狗鱼精子快速运动和寿命的影响($n=8$,单位:s)

渗透压 (kPa)	快速运动		寿命	
	范围	$\bar{X} \pm SD$	范围	$\bar{X} \pm SD$
0	24~36	30.63 ± 4.31	56~157	109.13 ± 36.97
56.7	0~37	24.63 ± 11.54	64~160	102.25 ± 34.55
113.3	0~33	16.50 ± 8.94	57~117	87.69 ± 21.43
169.9	0~20	9.62 ± 8.48	53.5~126	86.75 ± 29.11
226.5	0~16	2.38 ± 5.60	35~310.5	127.42 ± 95.14
283.2	0~13	1.63 ± 4.60	51.5~286	126 ± 83.07
339.8	0	0	34~210	114.92 ± 67.04

3 讨论

3.1 影响精子激活的因素 精子在精巢或精

液里是不活动的,却具备很强的潜在运动能力。当精液排入水环境中,精子便瞬间活动起来。这表明存在某种抑制或激活精子活动的因素。Baynes等证实,抑制鲑科鱼类精子活化的因素是钾离子,1 mmol/L的KCl就足以阻止虹鳟精子的激活^[2]。Morisawa等认为精浆(seminal plasma)中比血浆高出多倍的K⁺是抑制鲑科鱼类精子活化的因素,而不是精浆的渗透压^[3]。精液排入淡水,K⁺浓度的降低则激活精子活动^[4,5]。在已经研究过的鲤科鱼类中,抑制和激活精子活动的主要因素是渗透压的高低^[1,3,6,7]。本研究发现,尽管白斑狗鱼是属鲑形目鱼类,但其精子在0~679.6 kPa NaCl、KCl和葡萄糖溶液的活动规律基本与鲤、鲫、欧鲫、两种雅罗鱼、草鱼、鲢、鳙、鲮、团头鲂、花鲢相一致^[1,3,6-8],而不同于鲑鳟鱼类。说明抑制、激活白斑狗鱼精子活动的主要因素是渗透压的高低。

比较白斑狗鱼精子在NaCl、KCl和葡萄糖三种溶液中活动情况,可以认为该鱼精子活动的最适渗透压范围为339.8~453.0 kPa,为该鱼人工授精稀释液的配制和应用提供了科学依据。

3.2 阳离子对精子活力的影响 Na⁺、K⁺是鱼类血浆、精浆的重要组分和构成渗透压的主要离子。Morisawa等检测到虹鳟、马苏大马哈鱼精浆K⁺浓度分别为血浆的10倍和5倍^[3],Na⁺有促进精子活动的作用,K⁺对精子活动则起明显抑制作用^[2,5]。在鲤、鲫,其精浆K⁺浓度是血浆的29倍和18倍^[3]。但K⁺对精子活动的影响与Na⁺是相似的,而且在低于精浆K⁺浓度时,K⁺能增强鲤、欧鲫、两种雅罗鱼、花鲢、鲤、团头鲂精子活力^[1,5,6],延长寿命。从本研究看,白斑狗鱼精子在0~679.6 kPa的NaCl、KCl溶液中的活动变化趋势是很相似的,但在453.0 kPa KCl溶液中的精子寿命则是同渗透压NaCl溶液的3.4倍,这充分地表现出K⁺对延长精子寿命所起的作用,也说明白斑狗鱼精子生理特性类似于鲤科鱼类,而有别于鲑鳟鱼类。

Ca²⁺也是精浆的重要组分之一。在鲫、鲤、

虹鳟、马苏大马哈鱼精浆中,Ca²⁺浓度与血浆相近^[3,5],而且0~16 mmol/L(105.6 kPa)的Ca²⁺不影响100 mmol/L(453.0 kPa)NaCl溶液中大马哈鱼精子的活动时间^[5]。当Ca²⁺浓度高于20 mmol/L(132.0 kPa)则引起虹鳟精子聚集,而使精子激活程度降低^[2]。这表明Ca²⁺对一些鲑鳟鱼类精子活动的促进或抑制作用是有浓度依赖性的。此次研究发现,在相同的0~339.8 kPa范围内,CaCl₂对白斑狗鱼精子活动的影响与NaCl、KCl、葡萄糖的作用完全相反,56.7 kPa(8.3 mmol/L)就能引起精子的聚集,且随Ca²⁺浓度增加,聚集现象更趋强烈,这种现象相似于花鲢、鲤、团头鲂^[1,9]。因此,可以认为白斑狗鱼精子在CaCl₂溶液中活力减弱,产生聚集现象与溶液渗透压无关,而是Ca²⁺作用的结果。产生这种现象的原因有待于更进一步的研究。

3.3 葡萄糖对精子活力的影响 葡萄糖、半乳糖、果糖是精浆中的主要碳水化合物。在鲑、鳟、硬头鳟、白鲑、河鲈和江鳕的精浆中,葡萄糖浓度接近哺乳动物,果糖浓度明显低于哺乳动物^[10]。莫桑比克罗非鱼精浆葡萄糖、半乳糖、果糖含量明显高于鲤鱼^[11]。Gardiner认为,体外受精鱼类精子具有三羧酸循环代谢的能力^[12]。可以通过氧化作用利用细胞外源性碳水化合物,尤其是葡萄糖、半乳糖和果糖^[13]。而且这三种单糖是精子活动存活的可选择和次级的能源^[11]。本研究结果表明,白斑狗鱼精子在葡萄糖溶液中活动规律是与在NaCl、KCl溶液中基本一致的,但在葡萄糖溶液中的快速运动和寿命最大值都比NaCl、KCl溶液中的高,尤其是在寿命时间上差别较大,是NaCl溶液的3.7倍,较KCl溶液的也长100 s。很明显,这种延长精子寿命的作用,除适宜的渗透压环境外,与葡萄糖这个溶质密切相关。表明体外受精鱼类的精子确有利用细胞外源性葡萄糖的能力,来补偿自身活动过程中所消耗的部分能量。

致谢 研究工作得到新疆阿勒泰市水产办公室、市水产技术推广站领导及全体员工的热情支持和帮助,特此致谢!

参 考 文 献

- [1] 严安生, 彭安成, 姚杏珍. 不同浓度的电解质和非电解质溶液对花鲢精子活动的影响. 华中农业大学学报, 1988, 7(4): 375 ~ 378.
- [1] Baynes S M, Scott A P, Dawson A P. Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, spermatozoa: effects of cation and pH on motility. *J Fish Biol*, 1981, 19: 259 ~ 267.
- [3] Morisawa M, Suzuki K, Shimizu H, *et al.* Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *J Exp Biol*, 1983a, 107: 95 ~ 103.
- [4] Morisawa M, Suzuki K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 1980, 210: 1145 ~ 1147.
- [5] Morisawa M, Suzuki K, Morisawa S. Effects of potassium and osmolality on spermatozoa motility of salmonid fishes. *J Exp Biol*, 1983b, 107: 105 ~ 113.
- [6] 严安生, 王其和, 李诗模. 渗透压和钾对鲤鱼、团头鲂精子活力的影响. 淡水渔业, 1993a, 23(3): 19 ~ 21.
- [7] 严安生, 宋贵文, 阎拥军. 鲤和团头鲂精子生理生态特性的研究 III. 单糖和渗透压对精子活力的影响. 淡水渔业, 1995, 25(2): 3 ~ 5.
- [8] 王祖昆, 邱麟翔. 我国南方主要淡水养殖鱼类精子特性研究. 淡水渔业, 1985(1): 18 ~ 21.
- [9] 严安生, 李诗模, 王其和. 鲤和团头鲂精子生理生态特性的研究 II. 钙, 镁对精子活力的影响. 淡水渔业, 1993b, 23(5): 5 ~ 7.
- [10] Phronen J, Hyvarinen H. Composition of the milt of some teleost fishes. *J Fish Biol*, 1983, 22: 351 ~ 361.
- [11] Kruger J C De W, Smit G L, Van Vuren J H J, *et al.* Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). *J Fish Biol*, 1984, 24(3): 263 ~ 272.
- [12] Gardiner D M. Utilisation of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes. *Comp Biochem Physiol*, 1978, 59A: 165 ~ 168.
- [13] Gergory R W. Occurrence of fructose in trout seminal plasma. *Trans Am Fish Soc*, 1968, 97: 203 ~ 204.