

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.04.003

Cu²⁺ 对泥鳅精子运动的影响

陈玉明, 胡家会*, 陈杰, 王曰文

(聊城大学生命科学学院, 山东聊城 252059)

摘要:以泥鳅精子为受试材料,应用计算机辅助精子分析(CASA),研究不同浓度 Cu²⁺ 暴露对运动型精子和静止型精子的毒性。结果显示,运动型精子和静止型精子暴露在 10 μM 的 Cu²⁺ 中,两者运动能力均受到明显抑制;在 30 μM 及以下浓度中运动型精子受影响程度较静止型精子大,而在更高浓度中出现相反结果。表明泥鳅精子对 Cu²⁺ 毒性较敏感,不同能量代谢状态时其敏感性不同;Cu²⁺ 对泥鳅精子运动能力有较大影响,对淡水鱼具有潜在生殖毒性。

关键词: Cu²⁺; 泥鳅; 精子运动; 毒性

中图分类号: Q959.4; R994.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)04-0556-04

Effects of Cu²⁺ to Sperm Motility of the Loach

CHEN Yu-ming, HU Jia-hui*, CHEN Jie, WANG Yue-wen

(Department of Life Sciences, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong Province 252059, China)

Abstract: To understand the sensitivity of sperm from freshwater fishes to Cu²⁺ on different moving conditions, the motility of the moving sperm and the resting sperm of the loach *Misgurnus anguillicaudatus* were examined by a computer-assisted semen analyzer (CASA). The percentage, the duration and the relative velocity of sperm movement were determined at post-activation respectively, after the sperm had been incubated in solutions containing Cu²⁺ (10 μM, 30 μM, 60 μM and 100 μM) for 0 h or 2 h, basing on the preliminary experiment. The results showed that the motility of both the moving sperm and the resting sperm were reduced significantly. However, the motility of the moving sperm was much more strongly affected at low concentrations of Cu²⁺ (10 μM, 30 μM). So did the motility of the resting sperm at high concentrations (60 μM, 100 μM). These results suggested that the loach sperm was sensitive to Cu²⁺, and the sensitivity of the moving sperm was different from that of the resting sperm. And Cu²⁺ was harmful for the loach sperm, which might adverse to reproduction of freshwater fishes.

Key words: Cu²⁺; loach; sperm motility; toxicity

铜(Cu)是生物体内一种必需微量元素,对造血、细胞增殖、酶活性及内分泌功能有重要作用(Soucek *et al.*, 2001)。然而,农业中广泛使用含铜杀菌剂、杀虫剂和肥料等,使水环境铜污染加剧(Quzounidou & Ilias, 2005)。近年来,以卵细胞、胚胎和幼体为对象进行了 Cu²⁺ 对鱼生殖毒性的系列研究(何斌等, 2006);同时, Cu²⁺ 对成体鱼急性毒性研究也受到重视(刘福军等, 2003)。但关于 Cu²⁺ 对淡水鱼精子毒性的报道较少。鱼精子表面缺少类似卵膜的保护层,排到体外更易受水中毒物影响。精子质量对受精、孵化、胚胎发育和个体发育有重要影响,精子损伤会对子代产生不可逆影响(Kime & McAllister, 2003)。因此,开展 Cu²⁺ 对鱼精子毒理研究,对水产养殖和水生动物保护有重要意义。

计算机辅助精子分析(Computer-Assisted Semen Analyzer, CASA)最初用于人类和哺乳类精子质量检测 and 体外受精,后被引入毒理学领域。CASA 能客观、准确、快速评价污染物生物毒性,在环境检测中有重要应用价值。泥鳅 *Misgurnus anguillicaudatus* 生活在湖泊、河流及池塘水层底部,有时钻进泥底。相对其他鱼,泥鳅生存环境恶劣,易接触水和沉积物中的毒物。利用 CASA 对多种毒物进行了检测(Bellas *et al.*, 2001; Grzyb *et al.*, 2003; Dietrich *et al.*, 2010),但未见 Cu²⁺ 对泥鳅精子毒性检测的报道。淡水鱼精子在精巢中静止,排到体外被激活。在体内外,鱼精子运动状态不同,不同运动状态代表细胞不同能量代谢水平。本实验应用 CASA 检测不同 Cu²⁺ 浓度处理对泥鳅精子的毒性,并对不同代谢水平的精子受 Cu²⁺ 影

收稿日期:2010-10-25 接受日期:2010-12-29 基金项目:山东省自然科学基金课题(ZR2010CM048)

作者简介:陈玉明(1980~),硕士研究生,研究方向:生殖毒理学, E-mail: ymchen08@yahoo.cn

* 通讯作者 Corresponding author, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向:发育生物学和生殖毒理学, E-mail: hujiahui@lcu.edu.cn

响程度进行比较,为 Cu^{2+} 对雄性淡水鱼生殖毒性研究补充基础资料,并为精子毒理学在环境污染物检测中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 实验用泥鳅购自山东省聊城市交运大市场,平均体重为 (8.62 ± 0.54) g,平均体长为 (12.88 ± 0.44) cm,运回实验室后,先在 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 KMnO_4 溶液中浸泡 10 min 杀菌消毒,在玻璃缸 ($60 \text{ cm} \times 35 \text{ cm} \times 25 \text{ cm}$) 内饲养,每缸 40 尾,共 3 缸,两周后用于实验。实验用水为曝气 3 天以上的自来水,连续充气,每天换水约 1/5 体积。

1.1.2 实验试剂 实验用氯化铜 (CuCl_2)、氯化钾 (KCl) 和氯化钠 (NaCl) 等化学试剂均为分析纯,购自南京南奥科技有限公司。

参照 Múrrían 等(1997)的方法并加以改进,用双蒸水配制精子保存液和激活液。精子保存液含 135 mM NaCl、10 mM KCl、1 mM CaCl_2 和 10 mM Tris-HCl (pH6.5),渗透压为 $300 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。精子激活液含 60 mM NaCl、10 mM KCl、1 mM CaCl_2 和 10 mM Tris-HCl (pH6.5),渗透压为 $150 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。为保持渗透压不变并得到所需浓度的含 Cu^{2+} 溶液,配置 0.1 M 的 CuCl_2 母液 1(渗透压为 $300 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和 0.05 M 的 CuCl_2 母液 2(渗透压为 $150 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1}$),根据需要将母液 2 和激活液、母液 1 和保存液按比例混合。各种溶液均保存在 4°C 冰箱内,24 h 内完成实验。

1.2 实验方法

1.2.1 精子的收集 随机从玻璃缸中取健康、性成熟泥鳅,在清水中冲洗,吸去体表的水,称重、测体长,解剖取精巢。按 1:10 (W:V) 将精巢放在保存液中,用眼科剪剪碎,让精子游出,离心 ($200 \text{ 转}/\text{min}$, 1 min),弃去组织碎块加入少量保存液,计数,制成精子悬液(密度约为 1×10^8 个/mL)。根据精巢大小每次解剖 2~3 尾鱼为 1 组,用于不同代谢水平的精子毒理实验。

1.2.2 预备实验 在精浆、等渗或高渗溶液中,泥鳅精子是静止的,细胞代谢活动较低;本实验保存液中不运动精子为静止型精子。精子细胞暴露在低渗环境中,运动被激活,细胞代谢活跃;本实验中被激活液激活的精子为运动型精子。

为检测 Cu^{2+} 对运动型精子(高代谢)的毒性,提

前将母液 2 和激活液按比例混合。在对泥鳅精子运动产生影响的浓度两侧,按等差方式配制终浓度为 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 和 $100 \mu\text{M}$ 的含 Cu^{2+} 激活液;为保持所测精子密度一致,将精子悬液用保存液稀释 10 倍。取 $5 \mu\text{L}$ 置于载玻片上,迅速用 $45 \mu\text{L}$ 含 Cu^{2+} 激活液混合 10 s(精子充分激活),在相差显微镜 (Olympus IX81, Japan) 下观察、拍摄 (Olympus DP70, Japan),用精子运动自动分析软件 (Image-ProPlus5.1) 处理,目标精子头部运动轨迹呈现在计算机显示屏上,数据以 Excel 文件输出,测定精子运动率、运动时间和运动速度等参数。

为检测 Cu^{2+} 短时间暴露对静止型精子(低代谢)的毒性,提前将母液 1 和保持液按比例混合,配制终浓度为 0、10、20、30、40、50、60、70、80、90 和 $100 \mu\text{M}$ 的含 Cu^{2+} 保存液,将精子悬液和 Cu^{2+} 保存液按体积比 (1:9) 混匀,在 4°C 条件下保存,2 h 后离心 (1000 转 , 2 min),弃去上清液加入等量保存液,混匀,然后以相同方法检测运动参数。

预实验每个浓度组进行 3 次,确定具有代表性的 Cu^{2+} 终浓度为 0、10、30、60 和 $100 \mu\text{M}$ 。其中,不含 Cu^{2+} 的溶液为对照。

1.2.3 正式实验 按预备实验中介绍的方法检测 Cu^{2+} 对运动型精子的毒性和 Cu^{2+} 短时间暴露对静止型精子的毒性。 Cu^{2+} 终浓度为 0、10、30、60 和 $100 \mu\text{M}$,每个样本分析 200 个精子,每个浓度重复 6 次。

1.2.4 数据分析 所得数据以平均值 ($n=6$) 表示,精子运动参数标准参考 Rodina 等 (2008) 描述的方法,并如表 1 定义。

表 1 本研究有关精子运动参数的定义
Table 1 The definition of sperm motility parameters in this study

运动参数 Movement parameter	定义 Definition
不运动精子	运动速度等于或小于 $5 \mu\text{m}/\text{s}$
运动精子	运动速度大于 $5 \mu\text{m}/\text{s}$
运动率 (%)	具有运动能力精子的百分率
运动时间 (s)	从激活开始,到精子运动停止时所用的时间
运动速度 (m/s)	根据精子运动痕迹计算出的实际运动速度
相对速度 (%)	Cu^{2+} 处理的精子运动速度与对照速度的百分比

精子激活后每分钟拍摄 1 次,记录运动率和运动时间。在对照组中,运动率低于 90% 的精子悬液样本不作记录。用 CASA 和 SPSS13.0 统计软件进行分析,采用 t 检验进行差异显著性检验,差异显著水平为 $P < 0.05$,差异极显著水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 不同 Cu²⁺ 浓度对泥鳅运动型精子的毒性

泥鳅精子被含 Cu²⁺ 的溶液激活后,随 Cu²⁺ 浓度的升高,精子运动率逐渐降低,运动时间不断缩短,运动速度越来越慢(表 2)。且在 30 μM 的 Cu²⁺ 溶液中,精子运动率和运动时间显著受到影响($P < 0.05$);而相对速度在 10 μM 的 Cu²⁺ 溶液中明显受到影响($P < 0.05$)。在 60 μM 的 Cu²⁺ 溶液中,泥鳅精子运动能力极显著下降($P < 0.01$)。

表 2 Cu²⁺ 对泥鳅运动型精子的毒性

Table 2 Toxicity of Cu²⁺ to loach sperm in moving

运动参数 Movement parameter	浓度 Concentration (μM)				
	0	10	30	60	100
运动率(%)	94	90	73*	56**	21**
运动时间(s)	435	405*	413*	240**	45**
相对速度(%)	100	88*	76**	45**	16**

数据为平均值(n=6);*表示差异显著($P < 0.05$);**表示差异极显著($P < 0.01$);下表同

Date was mean(n=6);*: difference was significant at the 0.05 level; **: difference was significant at the 0.01 level; The same below

2.2 不同 Cu²⁺ 浓度对泥鳅静止型精子的毒性

泥鳅精子在不含 Cu²⁺ 溶液中激活后,同对照组

相比,精子运动能力出现不同程度的减弱。与对运动型精子毒性效应相似,随 Cu²⁺ 浓度的升高,精子运动率逐渐降低,运动时间不断缩短,运动速度越来越慢(表 3)。但是,在 10 μM 的 Cu²⁺ 溶液中,精子运动时间和相对速度均显著受到影响($P < 0.05$)。

表 3 Cu²⁺ 对泥鳅静止型精子的毒性

Table 3 Toxicity of Cu²⁺ to loach sperm in resting

运动参数 Movement parameter	浓度 Concentration (μM)				
	0	10	30	60	100
运动率(%)	93	92	86*	45**	15**
运动时间(s)	425	410*	420*	155**	40**
相对速度(%)	100	73*	56**	33**	5**

2.3 不同 Cu²⁺ 浓度对泥鳅运动型和静止型精子毒性的比较

Cu²⁺ 对不同泥鳅精子运动状态毒性效应是不同的,在 30 μM 及以下浓度,静止型精子的运动率高于运动型精子,两者具相似的运动时间;在更高浓度组中,运动型精子的运动率和运动时间都优于静止型精子。但是,在所有 Cu²⁺ 处理组中,运动型精子的相对速度明显高于静止型精子(图)。可见,低浓度 Cu²⁺ 对运动型精子毒性较大,而高浓度 Cu²⁺ 对短期暴露的静止型精子表现出更大毒性。

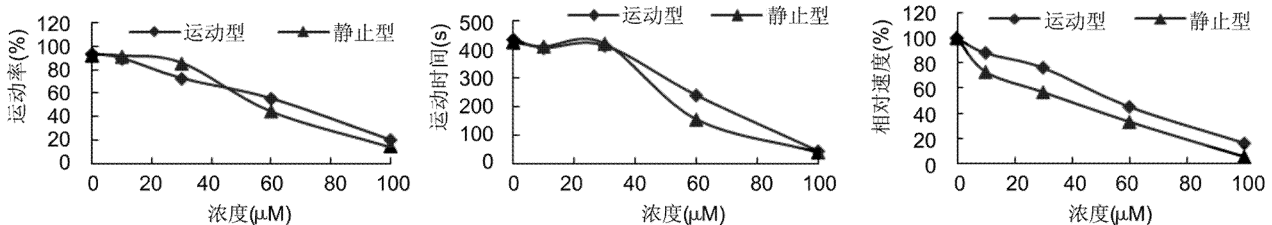


图 Cu²⁺ 对泥鳅运动型和静止型精子毒性的比较

Fig. Comparison toxicity of Cu²⁺ to loach moving sperm and resting sperm

3 讨论

精子运动能力反映精子能量状况,直接影响受精率,是评价精子质量的重要指标。本实验选用精子运动率、运动时间和相对速度等参数,应用 CASA 评价 Cu²⁺ 对泥鳅精子的毒性,发现 10 μM 的 Cu²⁺ 明显降低精子运动能力。可见,低浓度 Cu²⁺ 对泥鳅精子有明显毒性,威胁其生殖正常进行,并对其他淡水鱼有潜在生殖毒性。

重金属毒性主要通过诱导细胞脂质过氧化产生。在过氧化中产生的自由基,攻击蛋白质、脂质和 DNA 等生物大分子(Yousef *et al.*, 2007; Kasperczyk *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 2009)。也有研究表明,

Cu²⁺ 经渗透或被动、主动吸收进入生物体,与多种酶类及活性因子如巯基、胺基(-NH₂)、亚胺基(-NH)等结合生成不溶水硫醇盐,使之失活,破坏酶系统,阻断生化反应和新陈代谢,使生物体死亡(谢炎福,祖恩普,2005)。本实验体外模拟 Cu²⁺ 对静止型精子短时间暴露产生的毒性,检测 Cu²⁺ 对运动型精子的毒性,发现 Cu²⁺ 对泥鳅精子的毒性效应较复杂。目前,未发现不同运动状态下有关精子毒理的报道。本研究推测,泥鳅精子细胞膜上可能存在某些离子通道,精子静止时这些通道呈关闭状态,精子运动激活时,离子通道开启;低浓度 Cu²⁺ 对细胞膜直接损伤较小,但部分 Cu²⁺ 在离子通道开启时进入细胞内,使细胞损伤加剧;高浓度 Cu²⁺ 对精子细胞膜有

较强破坏力,其破坏程度随着作用时间的延长而加剧。因此,关闭状态的细胞膜可有效减轻低浓度污染物对静止精子的毒害;但污染物浓度过高时,保护作用随暴露时间增加而降低。上述推测可解释本实验在低浓度 Cu^{2+} 中暴露 2 h 的静止型精子损伤低于运动型精子,而在高浓度 Cu^{2+} 暴露中静止型精子损伤更严重的现象。尽管已发现一些细胞膜离子通道,但离子通道开闭的机理与精子运动启动的关系尚需进一步研究。

早期,水体污染物急性毒性通过鱼成体半数致死浓度 (LC_{50}) 获得;而后,用组织培养鱼体细胞检测污染物潜在毒性。前者灵敏度较低,不能真实反映环境污染物的生物毒性;后者检测结果是纯细胞水平的,仅代表污染物对某种细胞存活率和代谢活动的影响。最近几年,建立了用鱼类精子检测水体污染物急性毒性的体外方法 (Ciereszko & Dabrowsko, 2000)。精子是一种极特化细胞,既有体细胞一般特征,又有体细胞不具有的特性,其检测结果能较好反映污染物生物毒性;且其在体内是唯一的,检查结果具有较好重复性。CASA 能在体外快速检测污染物对精子的毒性,在环境监测中具有较大应用前景。本文选用的 3 个运动指标,简单、准确、明了,可应用于体外快速检测重金属生物毒性。

4 参考文献

- 何斌,何利君,杜军,等. 2006. 14 种重金属离子对淡水石斑胚胎及仔鱼急性毒性的研究[J]. 水利渔业, 26(4): 94~96.
- 刘福军,张饮江,王明学. 2003. 铜对鱼类慢性中毒研究进展[J]. 水生生物学报, 27(3): 302~307.
- 谢炎福,祖恩普. 2005. 硫酸铜引起鱼类中毒原因的分析及对策[J]. 水利渔业, 25(6): 98~99.
- Bellas J, Vázquez Z, Beiras R. 2001. Toxicity of Hg, Cu, Cd, and Cr on early developmental stages of *Ciona intestinalis* (Chordeata, Ascidacea) with potential application in marine water quality assessment[J]. Water Research, 35(12): 2905~2912.
- Ciereszko A, Dabrowsko K. 2000. In vitro effect of gossypol acetate on yellow perch (*Perca flavescens*) spermatozoa[J]. Aquatic Toxicology, 49: 181~187.
- Dietrich GJ, Dietrich M, Kowalski RK, et al. 2010. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success[J]. Aquatic Toxicology, 97(4): 277~284.
- Grzyb K, Bieghevska A, Skorkowski EF, et al. 2003. Quantitative determination of creatine kinase release from herring (*Clupea harengus*) spermatozoa induced by tributyltin[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 134(2): 207~213.
- Guzmán BP, Gutiérrez MS, Marchetti F, et al. 2009. Methyl-parathion decreases sperm function and fertilization capacity targeting spermatozoa and maturing spermatozoa[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 238: 141~149.
- Kasperczyk A, Kasperczyk S, Horak S, et al. 2008. Assessment of semen function and lipid peroxidation among lead exposed men[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 228: 378~384.
- Kime DE, McAllister BG. 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Aquatic Toxicology, 65(3): 309~316.
- Márián T, Krasznai Z, Balkay L, et al. 1997. Role of extracellular and intracellular pH in carp sperm motility and modifications by hyperosmotic regulation of the Na^+/H^+ exchanger[J]. Cytometry, 27: 374~382.
- Quzounidou G, Ilias I. 2005. Hormone-induced protection of sunflower photosynthetic apparatus against copper toxicity[J]. Biologia Plantarum, 49(2): 223~228.
- Rodina M, Policar T, Linhart D, et al. 2008. Sperm motility and fertilizing ability of frozen spermatozoa of males (XY) and neomales (XX) of perch (*Perca fluviatilis*) [J]. Journal of Applied Ichthyology, 24: 438~442.
- Soucek DJ, Cherry DS, Zipper CE. 2001. Aluminum-dominated acute toxicity to the cladoceran *Ceriodaphnia dubia* in neutral waters downstream of an acid mine drainage discharge [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 58(12): 2396~2404.
- Yousef MI, Kamel KI, Guendi MIE, et al. 2007. An *in vitro* study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm; The protective role of some antioxidants[J]. Toxicology, 239: 213~223.