

文章编号: 1000-0615(2018)11-1737-10

DOI: 10.11964/jfc.20180211171

PI/Rh123双染和流式细胞术作用下不同盐度对葡萄牙牡蛎精子质量及受精的影响

杜俊鹏¹, 王昭萍^{1*}, 崔玉婷¹, 李阳春¹,
杨洋¹, 李鹏飞², 柳逸群¹

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 莱州市长渔水产有限公司, 山东 烟台 264003)

摘要: 以葡萄牙牡蛎精子为对象, 采用碘化丙啶(PI)/罗丹明123(Rh123)双染与流式细胞术(FCM), 研究了不同盐度胁迫(10、15、20、25、30、35)对精子质量的影响, 并对受胁迫精子进行授精实验。结果显示, 随着盐度升高, 精子的存活率、运动时间和活力先升高后降低; 葡萄牙牡蛎精子的适宜盐度为20~35, 活力较高的盐度范围为25~35; 通过双染和FCM检测了精子质膜完整性和线粒体活性, 发现盐度胁迫先对精子质膜造成损伤, 后对线粒体活性造成伤害; 低盐胁迫(10、15)对精子损伤严重, 胁迫15 min时质膜受损比例高达67.26%±2.35%。人工授精结果显示, 低盐胁迫下精子受精率和卵裂率显著降低, 且卵裂阶段出现畸形及分裂停止等现象, 表明精子质量不仅严重影响了受精过程, 还对卵裂造成一定影响。本实验不仅探究了PI/Rh123双染和FCM检测牡蛎精子质膜完整性和线粒体活性的可行性, 还结合显微观察全面评价了精子质量, 为牡蛎精子质量的研究提供了理论基础。

关键词: 葡萄牙牡蛎; PI/Rh123双染; 流式细胞术; 精子质量; 质膜完整性; 线粒体活性

中图分类号: S 968.31

文献标志码: A

贝类繁育中, 精子质量影响着受精、卵裂以及孵化, 对贝类育种具有重要意义。精子的质量评价指标主要包括精子的活力和活率、精子形态、质膜的完整性、线粒体活性、顶体状态以及染色质等^[1]。质膜的完整性是精子能够新陈代谢、精卵识别及融合、完成获能和发生顶体反应等一系列生理活动的基础。精子活力通常用精子的运动状态来表示, 包括精子激活与抑制、精子运动激烈程度及运动时间等。线粒体活性与精子的运动能力紧密相关, 线粒体的供能状态对精子活力及受精能力起着重要作用, 所以线粒体活性是衡量精子质量的一个重要指标^[2]。

海洋贝类大多行体外受精, 精子极易受到

温度、盐度、pH等环境因素的影响^[3]。Alavi等^[4]、Billard等^[5]认为低温会抑制精子的运动, 减少ATP的消耗, 延长存活时间; 赵会宏等^[6]发现适度高温可以促进精子运动, 提高精子活力, 温度过高则会影响精子存活; 钟爱华^[7]、竺俊全等^[8]研究发现, 随盐度和pH的升高, 精子激活率和运动时间先升高后降低。刘广绪等^[9]采用计算机辅助精子分析系统(computer-assisted sperm analysis, CASA)研究了重金属对缢蛏(*Sinonovacula constricta*)精子运动能力的毒害作用; Everett等^[10]、孔宁^[11]采用CASA监测精子运动能力、运动路径及精子活率来评价精子活力, 避免了显微观察中主观因素的影响。但以上研究均未涉及精子质膜、细胞核、线粒体等结构的变化, 本实验

收稿日期: 2018-02-03 修回日期: 2018-03-19

资助项目: 国家自然科学基金(31172403)

通信作者: 王昭萍, E-mail: zpwang@ouc.edu.cn

创新性地采用荧光染料双染法和流式细胞术(FCM)检测牡蛎精子内部结构的变化,进而评价精子活力。

常用的荧光染料主要有Hochest 33 258/33 342、碘化丙啶(PI)、SYBR-14、二乙酰荧光素(FDA)、羧基荧光素双醋酸盐(CFDA)及罗丹明123(Rh123)、JC-1、MITO等^[12-14]。PI不可穿透质膜,对质膜受损及死亡精子有很强的特异性,并可释放红色荧光,所以常用来鉴定死、活精子^[15-16]。Rh123是一种阳离子,可以穿透质膜并与线粒体结合,具有跨膜电位的线粒体可以释放绿色荧光,而受损线粒体则不释放荧光^[12],所以Rh123常用来检测线粒体活性^[17-18]。研究中常结合PI/Rh123双染和FCM鉴定活精子、死精子以及运动能力差的精子^[1-2, 19-21]。

关于牡蛎精子质量的研究尚未报道,本实验以葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)精子为材料,开展盐度胁迫实验,观察精子的运动状态及存活时间,并结合PI/Rh123双染和FCM测定精子存活比例、质膜受损比例及线粒体活性,探究盐度对精子质膜和线粒体活性的影响及其损伤情况。此外,利用盐度胁迫后的精子进行授精实验,全面分析盐度对精子质量及受精的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

葡萄牙牡蛎采自青岛南山市场,平均壳高6~7 cm,壳长3~4 cm。解剖、镜检,选取活力好的精子进行实验,海水盐度29~31,水温25~27 ℃。

Rh123和PI均购自Solarbio公司。

1.2 实验设计

将葡萄牙牡蛎暂养1周,解剖镜检,选取精子活力强、卵子质量好的雌雄个体各10只,吸取0.5 mL精液进行混合作为精子原液,500目筛绢洗卵作为授精卵液,严格操作避免精卵污染。

利用灭菌海水、海水晶和充分曝气的淡水,配制盐度为10、15、20、25、30、35的梯度海水,盐度误差控制在 ± 0.2 之内。将精子原液加入梯度海水中,用血球计数板统计精子密度,调整精子浓度为 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL,显微镜下观察精子的运动情况,包括精子的适应时间、快速运动时间、总运动时间等,并记录各组快速运动精子的比例,实验重复3次。

适应时间(adaptation time, AT, min)是指从精子与海水混合时,从基本不动到约50%精子快速运动的时间;快速运动时间(fast time, FT, min)是指从适应期结束至约70%快速运动精子转入缓慢运动的时间;总运动时间(total time, TT, min)是指从精液与梯度海水混合开始,到视野中约95%的精子停止活动的时间;精子活力(sperm motility, %)为快速运动时间FT与总运动时间TT的百分比^[3, 22]。

1.3 PI和Rh123双染

荧光染液配制:将Rh123和PI分别溶于超纯水中,均配成浓度为1 mg/mL的储存液,分别置于-20 ℃和-4 ℃保存。已有研究表明,Rh123和PI的最适浓度均为10 $\mu\text{g/mL}$,最佳染色时间为10 min^[1]。

先将2种储存液稀释至100 $\mu\text{g/mL}$,精子浓度控制在 $10^7 \sim 10^8$ 个/mL,取盐度胁迫15 min、30 min、1 h、2 h、4 h的精子各160 μL ,加入2种染液各20 μL 混合,使待测样品的染液终浓度均为10 $\mu\text{g/mL}$,在室温下避光放置10 min, PBS冲洗2次,流式细胞仪进行检测。不同状态的精子经PI和Rh123染色后,在荧光显微镜下会释放不同颜色的荧光,经FCM会分布在不同的象限。

1.4 授精实验

将上述卵液海水促熟30~60 min,取盐度胁迫15和30 min的精子进行授精实验。授精前进行镜检,以避免污染,授精实验严格按照规范操作,显微镜下观察受精情况,记录受精率、卵裂率。

1.5 数据处理

受精率为排放极体的卵子数占总卵数的百分比,卵裂率为卵裂卵子数占总卵数的百分比。所有数据均以平均值 \pm 标准差表示,利用Excel作图,SPSS 17.0统计软件进行数据分析,不同盐度的实验组间数据的比较采用单因素方差分析,差异显著性为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 盐度对精子活力的影响

盐度25~35组精子的适应时间较短,仅3~4 min,盐度10的适应时间最长,约8 min(表1)。

随盐度升高,精子的运动时间先迅速升高后缓慢下降。盐度10组的快速运动和总运动时间最

表 1 盐度对葡萄牙牡蛎精子活力的影响

Tab. 1 Effect of salinity on sperm motility of *C. angulata*

盐度 salinity	适应时间/min adaptation time	快速运动时间/min fast time	总运动时间/min total time	精子活力/% sperm motility
10	8.00±0.55	5.00±0.40	20.00±1.20	25.00±0.70
15	6.00±0.50	15.00±0.60	50.00±1.52	30.00±1.31
20	6.00±0.50	60.00±1.80	150.00±5.00	40.00±1.51
25	4.00±0.30	125.00±5.00	210.00±6.50	59.52±2.58
30	3.00±0.15	95.00±2.58	150.00±5.25	63.33±3.96
35	3.00±0.20	90.00±2.52	150.00±5.10	60.00±2.10

短, 盐度15次之, 二者的精子活力分别为25.00%±0.70%和30.00%±1.31%, 显著低于其他组($P<0.05$); 盐度25组的快速运动时间和总运动时间最长, 分别为(125.00±5.00) min和(210.00±6.50) min, 显著高于其他组($P<0.05$)。盐度20、30、35的总运动时间基本一致, 而盐度20组的快速运动时间显著低于盐度30、35组($P<0.05$)。

经多重分析, 盐度30组精子活力最大, 为63.33%±3.96%, 盐度35和25组次之, 分别为60.00%±2.10%和59.52%±2.58%, 三者之间无明显差异($P>0.05$), 但均显著高于其他组($P<0.05$)。经多重分析, 葡萄牙牡蛎精子的适宜盐度为20~35, 活力较高的盐度为25~35。

2.2 盐度对精子质膜和线粒体的影响

经PI/Rh123染色和FCM检测的精子分布在不同的象限, 图1-a为PI单染的精子, 质膜破损的精子分布在上半侧, 即R1和R2; 图1-b为Rh123单染, 具有线粒体活性的精子分布在右半侧, 即R2、R4; 图1-c为PI与Rh123双染, R1为Rh123⁻/PI⁺, 表示质膜破裂、线粒体无活性的死精子; R2为Rh123⁺/PI⁺, 表示质膜破裂但线粒体仍具有活性, 也就是即将死亡的精子; R3为Rh123⁻/PI⁻, 表示质膜正常但无线粒体跨膜电位的精子; R4即Rh123⁺/PI⁻, 表示正常的活精子。理论上, 只有质膜和线粒体都正常的精子才能完成受精, 质量不佳的精子即使可以受精, 此后的卵裂及孵化也会受到不同程度的影响。根据FCM检测结果, 可以清晰地区分不同状态的精子并显示其比例, 其中质膜受损情况及线粒体活性比例分别如表2和表3所示。

低盐胁迫下精子质膜受损严重, 盐度10胁迫15 min的精子质膜受损比例高达67.26%±2.35%,

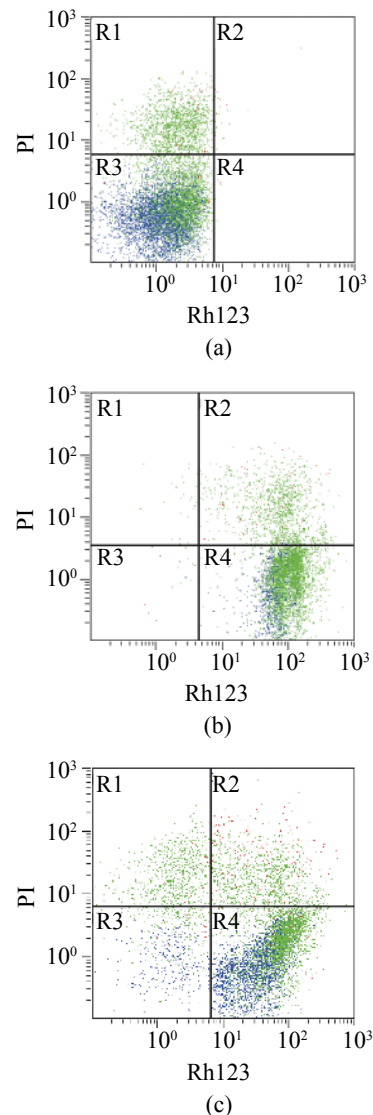


图 1 FCM检测葡萄牙牡蛎精子质量的结果

(a)(b)(c)分别为PI、Rh123和Rh123/PI的染色结果

Fig. 1 Results of FCM tests sperm quality of *C. angulata*

(a) staining result of PI, (b) staining result of Rh123, (c) staining result of Rh123/PI

表2 FCM检测精子质膜受损比例的结果
Tab. 2 Results of FCM tests sperm damaged membrane rate %

盐度 salinity	胁迫时间/min stress time				
	15	30	60	120	240
10	67.26±2.35	67.41±2.37	100	100	100
15	17.80±1.02	22.18±1.16	75.84±2.54	100	100
20	13.35±0.93	12.91±0.93	22.22±1.16	67.26±2.18	100
25	6.21±0.60	6.68±0.66	11.37±0.90	14.00±0.96	38.12±1.43
30	4.31±0.52	6.21±0.61	8.09±0.79	10.09±0.88	22.22±1.15
35	0.76±0.03	0.65±0.02	9.58±0.83	12.66±0.92	27.90±1.21

表3 FCM检测精子线粒体活性比例的结果
Tab. 3 Results of FCM tests sperm mitochondrial activity rate %

盐度 salinity	胁迫时间/min stress time				
	15	30	60	120	240
10	81.71±1.16	0.37±0.11	0	0	0
15	87.75±0.19	84.79±0.18	33.82±2.09	0	0
20	95.75±0.23	94.06±0.20	84.46±0.18	41.88±1.12	0
25	99.17±0.37	99.01±0.36	96.97±0.24	94.79±0.22	87.77±0.19
30	99.33±0.39	99.17±0.38	98.97±0.29	98.29±0.27	84.46±0.18
35	99.45±0.39	98.06±0.29	97.38±0.24	97.44±0.25	79.05±0.15

显著高于其他组($P<0.05$), 60 min内精子质膜全部受损(表2)。随盐度升高, 质膜受损比例逐渐降低, 盐度35时仅有不到1%受损, 显著低于其他组($P<0.05$)。随胁迫时间延长, 受损比例逐渐升高, 盐度15胁迫60 min时受损比例达75.84%±2.54%, 显著高于其他组($P<0.05$); 盐度25、30、35三者精子质膜受损较轻, 240 min时分别仅有38.18%±1.43%、22.22%±1.15%、27.90%±1.21%受损。

随盐度升高, 具线粒体活性的精子比例逐渐升高(表3)。盐度10组具线粒体活性的精子比例最低, 约为81.71%±0.16%; 盐度35时最高, 为99.45%±0.39%, 显著高于前者($P<0.05$)。

随胁迫时间延长, 具线粒体活性的精子比例逐渐降低。胁迫15 min时, 80%以上的精子都有线粒体活性, 胁迫30 min时, 盐度10组仅有不到1%具有线粒体活性, 60 min时, 盐度15组约有34%具有活性, 显著低于其他组($P<0.05$); 盐度10、15、20组的线粒体活性比例下降明显, 盐度25、30、35组下降缓慢, 胁迫240 min时仍有80%左右的精子具有线粒体活性, 且三者无显著

差异($P>0.05$)。

盐度胁迫初期质膜受损严重, 此时绝大部分精子具有线粒体活性, 此后线粒体活性比例逐渐降低, 这说明盐度胁迫先损伤精子质膜, 后对线粒体造成影响。

2.3 盐度对精子存活的影响

随胁迫时间延长, 精子的存活率逐渐下降(表4)。胁迫15 min时, 盐度10组精子的存活率最低, 仅为32.60%±1.20%, 显著低于其他组($P<0.05$); 胁迫60 min后, 盐度15、20组精子的存活率显著下降($P<0.05$), 120 min时, 盐度15组的精子全部死亡, 盐度20组仅有32.64%±1.13%存活; 盐度25、30、35组精子的存活率下降缓慢, 胁迫60 min时约有90%的精子存活, 240 min时仍有50%以上的精子存活。

随盐度升高, 精子的存活率逐渐升高, 盐度35组最高, 达96.67%±1.45%, 盐度30组次之, 二者均显著高于盐度10、15、20组($P<0.05$)。经多重分析, 葡萄牙牡蛎精子的适宜盐度为20~35。

表 4 FCM检测精子存活率的结果
Tab. 4 Results of FCM tests sperm survival rate

盐度 salinity	胁迫时间/min stress time				
	15	30	60	120	240
10	32.60±1.20	0	0	0	0
15	76.31±1.12	71.40±1.07	24.07±1.31	0	0
20	86.38±1.15	83.71±1.11	69.74±1.05	32.64±1.13	0
25	93.39±1.38	92.76±1.34	87.32±1.14	83.83±1.10	53.75±0.88
30	95.28±1.41	93.39±1.40	91.33±1.21	89.07±1.18	69.74±1.03
35	96.67±1.45	95.14±1.38	89.56±1.20	86.17±1.12	63.12±1.01

2.4 盐度对受精及卵裂的影响

随盐度升高, 受精率和卵裂率呈现先上升后下降的趋势(表5)。胁迫15 min时, 盐度10组精子的受精率与卵裂率最低, 仅为19.74%±1.74%和11.93%±1.40%, 盐度25组的受精率和卵裂率最

高, 均达90%以上, 显著高于盐度10、15组($P < 0.05$)。随胁迫时间延长, 受精率和卵裂率呈下降趋势。胁迫30 min, 盐度10组不受精, 盐度15、20、35组的受精率急剧下降, 显著低于胁迫15 min时的受精率($P < 0.05$)。

表 5 盐度胁迫精子15 min与30 min的受精率和卵裂率
Tab. 5 Fertilization rate and cleavage rate after 15 min and 30 min of salinity stress

盐度 salinity	15 min		30 min	
	受精率 fertilization rate	卵裂率 cleavage rate	受精率 fertilization rate	卵裂率 cleavage rate
10	19.74±1.74 ^E	11.93±1.40 ^f	0	0
15	66.96±3.87 ^D	38.39±0.77 ^d	29.43±2.92 ^F	0
20	83.12±2.11 ^A	75.05±3.85 ^c	72.37±1.98 ^{CD}	57.77±5.33 ^c
25	90.24±3.15 ^B	90.16±1.41 ^a	90.59±0.45 ^B	85.52±2.09 ^{ab}
30	88.96±3.45 ^{AB}	88.42±1.59 ^{ab}	93.50±2.18 ^B	90.98±4.44 ^a
35	85.88±2.71 ^{AB}	81.13±2.28 ^b	74.60±0.30 ^C	48.72±2.71 ^E

注: 大写字母表示受精率之间差异显著($P < 0.05$), 小写字母表示卵裂率之间差异显著($P < 0.05$)

Notes: capital letters mean significant difference in fertilization rate($P < 0.05$), small letters mean significant difference in cleavage($P < 0.05$)

盐度10、15组精子的卵裂率显著低于受精率($P < 0.05$), 而盐度25、30组的卵裂率略低于受精率, 差异不显著($P > 0.05$)。胁迫15 min, 盐度10、15的卵裂率显著低于受精率($P < 0.05$), 其余组无显著差异($P > 0.05$); 胁迫30 min, 盐度15组虽受精但不卵裂, 盐度20、35组卵裂率显著低于胁迫15 min时的卵裂率($P < 0.05$), 盐度25、30组之间无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 精子的运动与活力及存活情况

预实验中, 精子运动时间与浓度呈正相

关, 精子活力随精子浓度的增加呈现先升高后逐渐稳定的趋势, 经分析, 精子浓度为 10^8 个/mL时活力较高, 故本实验将精子浓度确定为 10^8 个/mL。研究表明精子浓度越大, 呼吸作用排放的 CO_2 就越多, 使所处环境呈弱酸性, 进而抑制精子运动, 延长存活时间^[23]。

高盐组(35)比低盐组(10、15)精子的适应时间短, 这可能与精子的离子激活机制有关, Na^+ 、 Cl^- 是精子激活中最重要的离子^[24], 而海水的主要成分就是NaCl, 高盐组的离子浓度高于低盐组, 所以能够起到更好的激活作用, Alavi等^[4]也认为精子活力受阳离子浓度影响。

随着盐度升高,精子的运动时间和活力先升高后下降,这与喻达辉等^[25]、王辉等^[26]研究结果一致。低盐胁迫(10、15)下精子的运动时间和活力显著低于高盐组,可能是海洋生物的精子通常在高渗环境中运动,活力最强时的渗透压高于自身渗透压^[26-27];也可以用渗透压平衡和能量收支来解释,低盐胁迫会激活 Na^+/K^+ -ATP酶,向外排出多余的阳离子,消耗大量能量,而高盐胁迫则是通过阳离子通道吸收离子以维持渗透压平衡,此过程不消耗能量^[28-30],这就造成低盐胁迫下能量消耗过多,进而影响精子活力和运动时间。

另外,胁迫产生的活性氧 ROS (reactive oxygen species)也会加快精子的死亡。研究称,胁迫程度越剧烈,越易产生大量的ROS^[31-33],ROS会破坏生物膜、氧化蛋白质、损伤DNA^[31-32],对机体造成严重伤害。实验中,向精子中滴加淡水并立即观察,发现精子瞬间死亡,表明剧烈胁迫对精子伤害巨大,也证明了生产中利用淡水浸泡工具来防止精子污染的可行性。

3.2 精子的质膜与线粒体活性

精子质膜的完整性与精子质量密切相关,线粒体是提供能量的主要场所,对维持精子运动及活力具有至关重要的作用。本实验结合PI/Rh123双染与FCM来检测精子质膜受损情况和线粒体活性,在不损伤精子的情况下,方便快捷地区分各个状态的精子,进而客观准确地评价精子质量。

实验初期,70%左右的精子质膜受损,此时80%以上的精子具有线粒体活性,之后线粒体活性比例逐渐降低,说明盐度胁迫先损伤精子质膜,后对线粒体活性造成影响,这与孙菊香等^[34]、Krogenaes等^[35]、Hammerstedt等^[36]研究一致,认为精子质膜是最易受损的部位。实验中发现大量线粒体功能完好但质膜破损的精子,郑娇等^[1]、刘奕等^[19]认为,此类精子可以运动但无法受精,因为质膜破损会严重影响精卵识别及融合过程。随胁迫时间的延长,线粒体活性逐渐受到影响,一方面原因可能是胁迫致使内膜系统被破坏,质子从膜间隙溢出,造成ATP合成和电子传递解偶联,导致ATP合成受阻,线粒体活性降低^[23];另一方面,ROS对核DNA造成损伤^[31-32],线粒体氧化磷酸化过程中的关键蛋白编码受到

阻碍,造成ATP合成受阻,线粒体失活^[37-39]。Wang等^[40]认为ROS通过损伤线粒体膜阻碍能量供应,降低精子活力,Sikka^[41]、Sharma等^[42]也认为ROS极易对遗传物质造成严重损伤,影响机体功能。

经多重分析,葡萄牙牡蛎精子的适宜盐度为20~35,与显微观察结果基本一致,说明显微观察虽然存在一定的主观性,但整体趋势较为准确。显微观察从精子运动时间、剧烈程度判断精子活力,双染法通过精子质膜的完整性、线粒体活性以及存活比例判断精子受损程度,二者结合可以更加准确地判断精子质量。

3.3 受精与卵裂

质膜的完整性和线粒体活性是精卵识别、发生顶体反应、细胞融合等一系列生理活动的基础,精子质量的好坏直接影响着受精和卵裂,研究认为运动精子所占的比例和持续时间对受精能力有重要作用^[43-45]。

结果显示,低盐组的受精率显著低于高盐组,可能是低盐胁迫对精子损伤太大,实验中观察到低盐组出现受精卵分裂缓慢甚至停止分裂等现象,说明精子质量不仅影响受精过程,还对卵裂造成严重影响,原因可能有两方面,一是线粒体呼吸链功能障碍^[23, 46-47]或耗能过多,造成精子无法提供卵裂所需的能量,导致卵裂率显著低于受精率;二是核DNA受损,受精之后精卵两套基因组未能很好融合,导致卵裂出现异常。郑九嘉等^[23]、Schulte等^[48]认为胁迫程度越剧烈、胁迫时间越长,对精子遗传物质的破坏就越大,将会影响遗传物质的复制和基因组的融合,这也解释了随着盐度胁迫时间的延长,受精率和卵裂率均下降的现象。

4 结论

本实验探究了盐度与对精子质量的影响,通过显微观察和PI/Rh123双染,评价了精子存活时间、存活比例以及运动状态,并对受胁迫精子进行人工授精,全面评价了盐度对精子质量的影响。同时,利用双染和FCM对精子质膜完整性和线粒体活性进行研究,确定了PI/Rh123双染和FCM评估葡萄牙牡蛎精子质量的可行性,葡萄牙牡蛎精子的适宜盐度为20~35,活力较高的盐度范围为25~35,为今后研究牡蛎精子提供

了理论基础。

后续工作将从温度胁迫对精子活力的影响开展, 并从精子核DNA损伤层面对离子激活机制进行研究。

参考文献:

- [1] 郑娇, 王梅芳, 余祥勇. 贝类精子质量检测与评价方法的研究 V: 栉江珧精子线粒体活性的荧光检测[J]. 广东海洋大学学报, 2011, 31(6): 86-90.
Zheng J, Wang M F, Yu X Y. Study of quality detection and evaluation on sperm of mollusc V: detection of sperm mitochondrial activity of *Atrina pectinata* by using fluorescent dye[J]. Journal of Zhanjiang Ocean University, 2011, 31(6): 86-90(in Chinese).
- [2] 霍立军, 杨增明. 哺乳动物精子质量的评价方法[J]. 动物学杂志, 2002, 37(2): 89-93.
Huo L J, Yang Z M. Progresses on the methods for evaluating the mammalian sperm quality[J]. Chinese Journal of Zoology, 2002, 37(2): 89-93(in Chinese).
- [3] 阮国良, 冯家斌, 杨代勤. 渗透压、pH和温度对泥鳅精子活力及受精率的影响[J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(1): 22-25.
Ruan G L, Feng J B, Yang D Q. Effects of osmolality, pH and temperature on sperm motility and fertilization of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)[J]. Journal of Hubei Agricultural College, 2004, 24(1): 22-25(in Chinese).
- [4] Alavi S M H, Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) effects of ions and osmolality: a review[J]. Cell Biology International, 2006, 30(1): 1-14.
- [5] Billard R, Cosson M P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish[J]. Journal of Experimental Zoology, 1992, 261(2): 122-131.
- [6] 赵会宏, 刘晓春, 林浩然, 等. 斜带石斑鱼精子超微结构及盐度、温度、pH对精子活力及寿命的影响[J]. 中国水产科学, 2003, 10(4): 286-292.
Zhao H H, Liu X C, Lin H R, et al. Ultrastructure of spermatozoa and effects of salinity, temperature and pH on spermatozoa motility in *Epiniphelus coioides*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2003, 10(4): 286-292(in Chinese).
- [7] 钟爱华. 几种理化因子对厚壳贻贝精子活力的影响[J]. 海洋学研究, 2010, 28(4): 89-94.
Zhong A H. The influence of physical-chemical factors upon *Mytilus coruscus* sperm motility[J]. Journal of Marine Sciences, 2010, 28(4): 89-94(in Chinese).
- [8] 竺俊全, 丁理法, 焦海峰, 等. 环境因子变化对泥蚶精子活力的影响[J]. 海洋科学, 2006, 30(2): 65-68.
Zhu J Q, Ding L F, Jiao H F, et al. Effects of environmental factors on spermatozoa motility of *Tegillarca granosa*[J]. Marine Sciences, 2006, 30(2): 65-68(in Chinese).
- [9] 刘广绪, 吴洪喜, 柴雪良, 等. 重金属对滩涂贝类缢蛏精子的毒性作用[J]. 水生生物学报, 2011, 35(6): 1043-1048.
Liu G X, Wu H X, Chai X L, et al. Toxic effect of copper, zinc, lead and cadmium on sperm of razor clam (*Sinonovacula constricta canarck*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(6): 1043-1048(in Chinese).
- [10] Everett E M, Williams P J, Gibson G, et al. Mitochondrial DNA polymorphisms and sperm motility in *Mytilus edulis* (Bivalvia: Mytilidae)[J]. Journal of Experimental Zoology-Part A: Comparative Experimental Biology, 2004, 301(11): 906-910.
- [11] 孔宁. 温度、盐度对皱纹盘鲍“97”选群生长发育的影响[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2016.
Kong N. Effects of temperature and salinity on growth and development of “97” selective breeding population of *Haliotis discus hannai* Ino[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, University of Chinese Academy of Sciences, 2016 (in Chinese).
- [12] Garner D L, Thomas C A, Joerg H W, et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa[J]. Biology of Reproduction, 1997, 57(6): 1401-1406.
- [13] Thomas C A, Garner D L, Dejarnette J M, et al. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa[J]. Biology of Reproduction, 1997, 56(4): 991-998.
- [14] 采克俊, 司维, 李亚辉, 等. 流式细胞术在哺乳动物精液质量检测中的应用[J]. 动物学研究, 2003, 24(4): 311-317.
Cai K J, Si W, Li Y H, et al. Evaluation of mammalian semen quality by flow cytometry[J]. Zoological Research, 2003, 24(4): 311-317(in Chinese).
- [15] Garner D L, Johnson L A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide[J]. Biology of Reproduction, 1995, 53(2): 276-284.

- [16] Graham J K, Kunze E, Hammerstedt R H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry[J]. *Biology of Reproduction*, 1990, 43(1): 55-64.
- [17] Aziz D M, Enbergs H. Stimulation of bovine sperm mitochondrial activity by homeopathic dilutions of monensin[J]. *Homeopathy*, 2005, 94(4): 229-232.
- [18] Gillan L, Evans G, Maxwell W M C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential[J]. *Theriogenology*, 2005, 63(2): 445-457.
- [19] 刘奕, 纪锋, 谷伟, 等. 荧光染色法检测虹鳟精子质量[J]. *水产学杂志*, 2010, 23(1): 32-34.
Liu Y, Ji F, Gu W, *et al.* Evaluation of the sperm quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using the fluorescent dye[J]. *Chinese Journal Fisheries*, 2010, 23(1): 32-34(in Chinese).
- [20] 华咏, 钱宪明, 陈炳官, 等. 流式细胞术在精子功能检测中的应用[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(7): 608-611.
Hua Y, Qian X M, Chen B G, *et al.* Application of flow cytometry to the evaluation of semen quality[J]. *National Journal of Andrology*, 2006, 12(7): 608-611(in Chinese).
- [21] 吴永明, 夏欣一, 潘连军, 等. 罗丹明/碘化吡啶双染法检测精子线粒体膜功能的研究[J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(9): 803-806.
Wu Y M, Xia X Y, Pan L J, *et al.* Evaluation of sperm mitochondrial function using Rh123/PI dual fluorescent staining[J]. *National Journal of Andrology*, 2006, 12(9): 803-806(in Chinese).
- [22] 江世贵, 李加儿, 区又君, 等. 四种鲷科鱼类的精子激活条件与其生态习性的关系[J]. *生态学报*, 2000, 20(3): 468-473.
Jiang S G, Li J E, Qu Y J, *et al.* Relationships between conditions for activating spermatozoa of four sparidae fishes and the fishes' ecological habits[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2000, 20(3): 468-473(in Chinese).
- [23] 郑九嘉, 楼哲丰, 郑蔚虹, 等. 线粒体呼吸功能与精子活力、核DNA损伤的相关性分析[J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(1): 34-40.
Zheng J J, Lou Z F, Zheng W H, *et al.* Analysis of mitochondria respiratory function associated with motility of sperm and nucleus DNA damage[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2012, 34(1): 34-40(in Chinese).
- [24] 喻达辉, 江世贵, 陈竞春. 合浦珠母贝精子激活的离子选择性[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(3): 101-103.
Yu D H, Jiang S G, Chen J C. Selectivity of ions for spermatozoa activation of Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1999, 6(3): 101-103(in Chinese).
- [25] 喻达辉, 江世贵, 陈竞春, 等. 合浦珠母贝精子激活机制的初步研究[J]. *热带海洋*, 1999, 18(2): 5-10.
Yu D H, Jiang S G, Chen J C, *et al.* A preliminary study on activation mechanism of spermatozoa of Japanese pearl oyster, *Pinctada Martensii*[J]. *Tropic Oceanology*, 1999, 18(2): 5-10(in Chinese).
- [26] 王辉, 罗明明, 朱晓闻, 等. 温度和盐度对马氏珠母贝精子激活率及活力的影响[J]. *海洋科学*, 2011, 35(10): 57-63.
Wang H, Luo M M, Zhu X W, *et al.* Effect of temperature and salinity on the sperm activation and motility in *Pinctada fucata martensii* (dunker)[J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(10): 57-63(in Chinese).
- [27] Morisawa M, Suzuki K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts[J]. *Science*, 1980, 210(4474): 1145-1147.
- [28] 林听听, 来琦芳, 陆建学, 等. 盐度突变对青蛤(*Cyclina sinensis*)鳃Na⁺/K⁺-ATPase活性的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2012, 32(1): 54-58.
Lin T T, Lai Q F, Lu J X, *et al.* Effects of abrupt variations in salinity on the Na⁺/K⁺-ATPase activity in gills of *Cyclina sinensis*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2012, 32(1): 54-58(in Chinese).
- [29] 沈永龙, 戈贤平, 黄金田, 等. 盐度对瘤背石磺不同部位Na⁺/K⁺-ATP酶活性、围心腔液和腹腔液渗透压及离子含量的影响[J]. *水产学报*, 2013, 37(6): 851-857.
Shen Y L, Ge X P, Huang J T, *et al.* Effects of salinity on Na⁺/K⁺-ATPase activity, the osmolality of pericardial cavity fluid and peritoneal fluid and ion content in *Onchidium struma*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(6): 851-857(in Chinese).
- [30] Lucu Č, Devescovi M. Osmoregulation and branchial Na⁺, K⁺-ATPase in the lobster *Homarus gammarus* acclimated to dilute seawater[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1999, 234(2): 291-304.
- [31] 李子牛, 林听听, 么宗利, 等. 盐度对青蛤抗氧化酶活性及生长的影响[J]. *生态学报*, 2012, 31(10): 2625-2630.
Li Z N, Lin T T, Yao Z L, *et al.* Effects of water salinity

- on the antioxidant enzyme activities and growth of clam *Cyclina sinensis*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(10): 2625-2630(in Chinese).
- [32] Choi C Y, An K W, An M I. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2008, 149(3): 330-337.
- [33] Liu W C, Li M Y, Huang F Y, *et al.* Effects of cadmium stress on xanthine oxidase and antioxidant enzyme activities in *Boleophthalmus pectinirostris* liver[J]. Journal of Applied Ecology, 2006, 17(7): 1310-1314.
- [34] 孙菊香, 范丽君, 贾林芝, 等. 伊红、PI染色法检测中华绒螯蟹活精子率[J]. 水产学报, 2007, 31(S1): 69-73.
- Sun J X, Fan L J, Jia L Z, *et al.* Detection of mortality of *Eriocheir sinensis* sperms stained by eosin and propidium iodide (PI)[J]. Journal of Fisheries of China, 2007, 31(S1): 69-73(in Chinese).
- [35] Krogenaes A, Andersen B K, Hafne A L, *et al.* Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after *in vitro* fertilization[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 1994, 35(1): 17-26.
- [36] Hammerstedt R H, Graham J K, Nolan J P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive[J]. Journal of Andrology, 1990, 11(1): 73-88.
- [37] Zeviani M. The expanding spectrum of nuclear gene mutations in mitochondrial disorders[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2001, 12(6): 407-416.
- [38] Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, *et al.* Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency[J]. Nature Genetics, 1995, 11(2): 144-149.
- [39] de Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, *et al.* A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure[J]. Nature Genetics, 2001, 29(1): 57-60.
- [40] Wang X, Sharma R K, Gupta A, *et al.* Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study[J]. Fertility and Sterility, 2003, 80(S2): 844-850.
- [41] Sikka S C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology[J]. Journal of Andrology, 2004, 25(1): 5-18.
- [42] Sharma R K, Pasqualotto F F, Nelson D R, *et al.* The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility[J]. Human Reproduction, 1999, 14(11): 2801-2807.
- [43] Mansour N, Ramoun A, Lahnsteiner F. Quality of testicular semen of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and its relationship with fertilization and hatching success[J]. Aquaculture Research, 2005, 36(14): 1422-1428.
- [44] Dreanno C, Cosson J, Suquet M, *et al.* Nucleotide content, oxidative phosphorylation, morphology, and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period[J]. Molecular Reproduction and Development, 1999, 53(2): 230-243.
- [45] Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, *et al.* Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1996, 15(2): 167-179.
- [46] Choksi K B, Boylston W H, Rabek J P, *et al.* Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2004, 1688(2): 95-101.
- [47] Aitken R J, Gordon E, Harkiss D, *et al.* Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa[J]. Biology of Reproduction, 1998, 59(5): 1037-1046.
- [48] Schulte R T, Ohl D A, Sigman M, *et al.* Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2010, 27(1): 3-12.

Effects of salinity on *Crassostrea angulata* sperm quality and fertilization using PI/Rh123 dual fluorescent staining and flow cytometry

DU Junpeng¹, WANG Zhaoping^{1*}, CUI Yuting¹, LI Yangchun¹,
YANG Yang¹, LI Pengfei², LIU Yiqun¹

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laizhou Changyu Fisheries Limited Company, Yantai 264003, China)

Abstract: In this experiment, *Crassostrea angulata* sperm was used as the research object to study the effect of salinity stress on sperm quality and fertilization rate using PI/Rh123 dual fluorescent staining and flow cytometry (FCM). The results showed that sperm moving-time, survival rate and sperm activity increased first and then decreased with the increase of salinity. The suitable salinity range of *C. angulata* sperm was 20–35, and the salinity range was 25–35 with higher sperm activity. It was found that salinity stress caused damage to the sperm plasma membrane first and then damaged the mitochondrial activity by PI/Rh123 dual fluorescent staining and FCM. In addition, sperm were severely damaged under low salinity conditions (10, 15) and the damage ratio of sperm plasma membrane was $67.26\% \pm 2.35\%$, which was significantly different from the other groups. The artificial insemination experiment showed that fertilization rate and cleavage rate decreased significantly after low salinity stress (10, 15), and deformity and split stagnation were observed in cleavage stage, which shows that sperm quality not only seriously affects the process of fertilization, but also has a certain effect on cleavage. This experiment explored the feasibility of PI/Rh123 dual fluorescent staining and FCM to detect the function of plasma membrane and mitochondrial activity in oyster sperm, but also evaluated the sperm quality comprehensively, which provided a theoretical basis for the research of oyster sperm quality.

Key words: *Crassostrea angulata*; PI/Rh123 staining; flow cytometry; sperm quality; plasma membrane function; mitochondrial activity

Corresponding author: WANG Zhaoping. E-mail: zpwang@ouc.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31172403)