

激光辐射对绵羊精子细胞内外酶活性的影响

朱九明

(上海市农业科学院畜牧兽医研究所)

Effects of laser irradiation on intra- and extra-cellular enzyme activity from ram sperms

Zhu Jiuming

(Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai)

Abstract: Salisike rams' semen were irradiated with He-Ne laser light. The results show that laser is capable of activating GOT both in the seminal plasm and the sperm mitochondria, but exhibiting hyaluronidase in the sperm acrosome. This indicates that there exists a mechanism throughout which laser stimulates sperm motility.

Ilina 用氦氖激光照射公猪精液^[1], Sato 等用氦激光照射人精液^[2], 发现激光能提高精子活率, [2] 还证明激光对精子游速无明显影响。本研究用氦氖激光照射绵羊的离体精液, 根据激光照射后精子细胞内外酶活性的变化, 试从分子水平上来研究激光对精子细胞的辐射效应, 以探讨激光刺激动物生殖细胞的机理, 为激光诱变育种提供理论依据。

一、材料和方法

1.1 材料

实验选用纯种萨里斯克成年公羊(简称萨羊)。在绵羊配种季节, 每隔一日上午七点用人工假阴道采精一次, 经外观鉴定合格后, 按 1:4 分别进行等温稀释, 采用[3]中的稀释液配方, 但以硫酸链霉素取代其中的磺胺粉。然后经 1 小时缓慢降温至室温后, 再分装于内径为 15mm 的圆柱形聚酯塑料瓶中, 每瓶 1.1 ml。激光照射后的样品置于 14°C 恒温下存放, 分别于激光照射后 4 和 12 小时测定。

用 He-Ne 激光照射。激光束经反射镜 90° 后垂直向下, 通过扩束镜, 直接投射到样品瓶中。调整扩束镜高度, 使光斑直径等于瓶口内径(图 1)。实验设 1 个对照组和 4 个处理组, 各处理组的照射时间分别为 1'、2.5'、8' 和 30', 能量密度分别为 0.89、2.22、7.09 和 26.60 J/cm²。

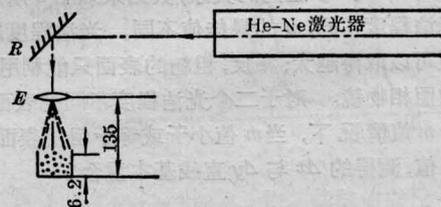


图 1 激光辐射示意图

R—反射镜; E—扩束镜

1.2 测定方法

试验样品存放 4 小时后, 按 1:1 进行第二次稀释, 然后移入 800 型离心机以 1500 转/分离心 10 分钟, 取其上清液测定精清中的酶活性, 剩余部分再按 1:4 进行第三次稀释, 然后将高倍稀释的样品置于冰浴中, 参照[4]所用的处理剂量, 用 CSS-200 型超声波粉碎机, 作细胞破碎性处理 2 分钟(分两次进行, 每次 1 分钟, 间隔 15 分钟)。通过 Giemsa 染色法镜检表明, 顶体破损率达 99% 以上。破碎处理后的样品, 再移入 800 型离心机, 以 4000 转/分离心 15 分钟, 再取其上清液测定样品中总酶。

推算精子内的酶含量, 除扣除精清中的酶活性而外, 沉淀部分按每微升含 2×10^7 个精子的近似值^[5]估算。

用 Linker 氏比色法^[6]测定透明质酸酶(Hyase),

缓冲液 pH 4.0 改为最适 pH 4.3^[7]。酶活性以美国国家药典标准单位列出。

用 Reitman 氏比色法^[8]测定谷草转氨酶 (GOT) 酶活性测定值按 [9] 所介绍的公式换算为毫国际单位。

实验结果用单因子方差分析进行显著性检验, 组间多重比较用 Duncan 氏新复极差检验法, 并对某些项目进行了相关分析。

二、结果与讨论

在相同分析条件下, 对透明质酸酶和谷草转氨酶, 分别重复测定 24 头次和 20 头次, 结果如图 2 和图 3。

谷草转氨酶 (GOT) 是评定精子活率的一个生化指标, 它存在于精子尾部的线粒体内^[10]。在激光照射后 4 小时, 30' 组精液中酶活性极显著地高于 1' 组和

2.5' 组 ($P < 0.01$), 显著地高于对照组 ($P < 0.05$); 线粒体内的 GOT 活性各组之间差异不显著, 但此时精液中与线粒体内的 GOT 活性存在正相关 ($r = 0.934, P < 0.05$)。到 12 小时, 2.5' 组酶活性升为最高, 极显著地高于对照组和 1' 组 ($P < 0.01$), 尽管线粒体内 GOT 的活性在各组之间差异仍不显著, 但 1' 组、2.5' 组和 8' 组精液中 GOT 的总活性升高了, 这充分说明激光对 GOT 有激活作用。

实验中测定的另一种酶——透明质酸酶, 是精子顶体内的一种特异性水解酶, 具有降解卵子周围胶样基质放射冠的功能, 为精子接触卵子打开道路^[11]。在激光照射后 4 小时, 1' 组 ($P < 0.05$) 和 2.5' 组 ($P < 0.01$) 顶体内酶活性明显低于对照组。导致小剂量 ($0.89 \sim 2.22 \text{ J/cm}^2$) 激光处理的酶活性低于对照组的原因可能有两个: 一是由于激光增强了细胞膜的通透性而使顶体内酶逸入精液中所致; 其次是激光可能使酶变性失活; 再一种可能是激光对酶有暂时性抑制作用。

因为在 1' 组和 2.5' 组顶体内透明质酸酶下降的同时, 这两组精液中的酶活性并没有呈反比例升高, 顶体内分别下降 210 和 233 $\text{U}/10^9$ 精子, 而对照组顶体内下降 735 $\text{U}/10^9$ 精子, 相对下降率是前两组的三倍多, 而这三组精液中的酶活性升高的幅度都差不多。这个事实足以排除上述第一种可能性。为了充分说明这一点, 再分别以处理组精液中透明质酸酶和 GOT 活性在精液中所占比例, 与对照组相应的比例进行比较, 结果表明, 各处理组与对照组之间差异均不显著。另外, 在 4 小时, 虽然只有精液中 GOT 活性与线粒体内酶活性成正相关, 但各组精液中透明质酸酶活性与顶体内酶活性没有出现明显的交叉现象。这些都进一步说明了细胞内的酶没有通过质膜而明显逸入精液中。

样品存放 12 小时后, 顶体内透明质酸酶活性由于各组下降的幅度不等, 而使其差异缩小到不显著, 其中对照组降低 735 $\text{U}/10^9$ 精子, 相对下降率为 2.66%, 而 1' 组和 2.5' 组分别降低 210 和 233 $\text{U}/10^9$ 精子, 相对下降率分别为 0.80% 和 0.89%, 如果照后 4 小时 1' 组和 2.5' 组顶体内的透明质酸酶的降低, 是由于部分酶被破坏失活所引起的话, 那么再经过 8 小时的存放, 这两组顶体内透明质酸酶活性下降的幅度就应该高于对照组, 但情况并非如此, 于是又排除了上述第二种可能, 从而肯定了上述第三种可能。另外还应看到, 从激光照射后 4 小时到 12 小时, 2.5' 组精液中的 GOT 活性由倒数第二上升为最高, 而线粒体内该酶活性并没有明显降低, 这

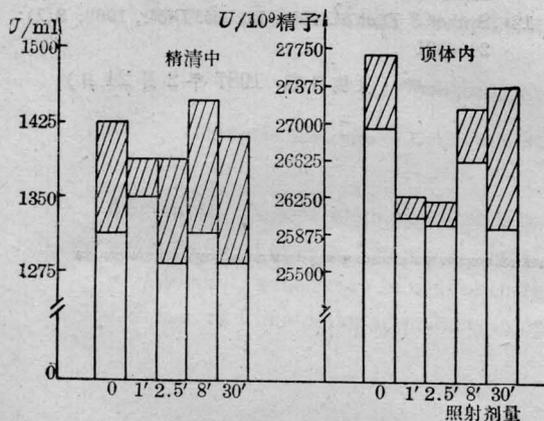


图 2 萨羊精子细胞内外透明质酸酶活性变化

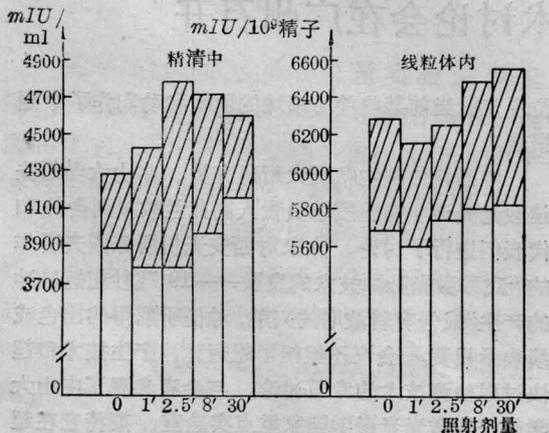


图 3 萨羊精子细胞内外 GOT 活性变化
(影条部分表示 4~12 小时内精液中的活性增加部分以及顶体或线粒体内减少的部分)

也说明小剂量激光对酶具有暂时性抑制作用。

大量的研究证明,由于酶分子结构上的差异,光对某些酶有激活作用,但也能使另一些酶发生钝化,钝化可通过两种机制发生:一种是直接的,即破坏酶的活性部位的氨基酸残基;一种是间接的,即破坏酶的活性构象所必需的那些残基。一般说来,蛋白质的二硫键和肽键不会因光氧化而断裂,其化学变化涉及五种敏感氨基酸的侧链。如果其中某一氨基酸暴露在酶分子三维结构的表面,那就有可能被氧化而使酶钝化。如果这些氨基酸都埋藏于酶分子三维结构的内部,那就受到一定程度的保护^[12]。由于透明质酸酶和 GOT 的分子结构不同,又各自存在于精子细胞内的不同部位,那么两者对激光辐射效应的不同,就丝毫不足为怪了。

GOT 在精子氨基酸代谢过程中必不可少,这种酶活性的提高,使得精子代谢加强,产生更多的 ATP,为精子游动提供更多的能量来源,从而使精子活率提高。激光对顶体内透明质酸酶的轻度抑制作用,是否影响精子受精能力,尚待进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 Il'isna T A. *Animal Breeding Abst.* 1977; **48**(5): 277
- 2 朱九明译,国外激光,1986; (5): 36
- 3 内蒙古自治区牧业学校主编,家畜遗传繁育学,农业出版社,北京,1979
- 4 Forman D P *et al.* *J. Reprod. Fert.*; 1984; **70**(1): 301
- 5 谢成侠编著,家畜繁殖原理,南京:江苏科学技术出版社,1983; 115
- 6 Bergmeyer H U. *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1984, 256~262
- 7 Yang C H *et al.* *J. Reprod Fert.*, 1974; **37**(1): 17
- 8 《生物化学及生物化学检验技术》编写组编,生物化学及生物化学检验技术,南京:江苏科学技术出版社,1980: 246~251
- 9 沈任,李健斋,中华医学检验杂志,1984; **5**(1): 11~15
- 10 吕兆启. 国外畜牧科技,1983; (6): 44.
- 11 Hunter R H F. *Reproduction of Farm Animals*, Longman, Lond. -NY, 1982; 36~57.
- 12 Spikes J D *et al.* *Adv. Radiat. Biol.*, 1969; **3**(1): 29~121

(收稿日期: 1987年2月24日)

简 讯

第一届全国超快现象学术讨论会在广州召开

超快现象研究是近十多年来新开拓的学术领域。为了推动我国超快现象领域研究工作的发展,中国光学学会基础光学专业委员会于1988年1月19日至21日在广州召开了第一届全国超快现象学术讨论会。

会议筹备组共收到全国各地科研工作者的论文130篇。评审后录取论文106篇,其中有关超短脉冲产生技术41篇;超短光信号探测技术16篇;超短激光脉冲与物质非线性相互作用方面24篇;时间分辨光谱学25篇。71篇作为宣读论文,35篇作为张贴论文。为使与会者对国内外超快现象研究有更充分的了解,大会邀请了余振新、王清月、刘颂豪等十二

位专家就当前某些前沿领域的现状和动向作了专题报告。

中国科协副主席王大珩研究员、中山大学超快速激光光谱学实验室总负责人高兆兰教授到会并和代表们进行了讨论。大家对西安光机所陈国夫所作的“飞秒激光脉冲技术的发展——19飞秒超短脉冲的产生”报告有着浓厚的兴趣,对他所取得的出色成绩表示祝贺。会议还组织了超短脉冲产生技术和超快过程检测技术的专题讨论。与会者参观了中山大学超快速激光光谱学国家重点实验室,期待它在超快现象的研究中充分发挥作用。

(赵梅村)