

用氦-氖激光研究绵羊精子的代谢效应

岳文斌 敖秀珠

(山西农业大学, 太谷, 030800) (内蒙古农牧学院, 呼和浩特, 010018)

Effects of He-Ne laser irradiation on metabolism of ram spermatozoa

Yue Wenbin

(Shanxi Agricultural University, Taigu)

Ao Xiuzhu

(Inner Mongolia Agricultural and Graziety College, Huhehaote)

Abstract: Low doses of He-Ne laser irradiation is able to increase the fructolysis, respiration superweak luminescence and ^{32}P uptake of spermatozoa, whereas high doses of laser irradiation shows no significant effect on the respiration. Laser irradiation causes change of Ca^{++} and Zn^{++} concentration in seminal plasma.

Key words: laser, ram spermatozoa

一、引言

近年来,激光已应用于细胞生理学、胚胎学的研究,以及医学临床实践,并且提出激光能影响生殖力。激光辐射精液方面,1977年 Il'im 用氦氖激光($\lambda = 632.8 \text{ nm}$)辐射公猪精液,继后 Sato 等用氦激光辐射人精液,均发现激光可以提高精子的活力,但对代谢方面未做进一步的研究,本试验用氦氖激光辐射绵羊精液,测定精子的果糖利用、呼吸、超弱发光、无机磷的摄入和精液中钙、锌浓度的变化,来探讨激光对精子的生物学效应和作用机理,为激光应用于畜牧实践提供科学依据。

二、材料和方法

1. 精液的采集和处理

用假阴道法采得精液,经肉眼鉴定后混匀,计算活力和密度。密度根据等温稀释为每毫升含有 10^9 精子。实验设一个对照组和四个处理组,各处理组的辐射时间分别为 1、2、8 和 16 min,能量密度分别为 0.9、1.8、7.2 和 14.4 J/cm^2 。辐射后的精子均在 37°C 下恒温孵育保存。

2. 果糖分解测定

采用 Seliwanoff 方法^[1],测定激光辐射后 0 和 2 小时精清中的果糖含量,计算果糖利用率: $F_1 = \text{mg/h}/10^9$ 精子。

3. 呼吸的测定

用瓦式呼吸计测定精子呼吸。将处理完毕的精液取 1.0 ml 移至呼吸仪反应主杯, 37°C 下孵育 5 小时, 气箱内为空气。计算精子的呼吸强度: $ZO_2 = \mu l O_2 / h / 10^9$ 精子。

4. 超弱发光的测定

用液体闪烁计数仪测定精子的超弱发光。从处理完毕的样品中取 1.0 ml 移至闪烁杯中, 再加入 7 ml 稀释液, 然后在暗室 37°C 下孵育, 分别在处理后 2 和 6 小时测定精子的发光。每处设一平行管, 其发光值取二管测定的平均值, 并减去本底值, 以光子数/min/ 10^9 精子表示。

5. 无机磷摄入的测定

将处理完毕的精液分别在未经孵育(0 小时)和 2 小时加入 ^{32}P i 标记的 NaH_2PO_4 10 μ l (0.7 μ oi/ml), 置于 37°C 下孵育 20 min, 取出后立即加入 2 滴 5% 三氯醋酸, 杀死精子, 1000 转离心 10 分钟, 弃上清, 重复洗涤三次, 将沉淀的精子细胞置于水为基质的闪烁杯中, 置于液体闪烁仪内, 测定放射性。结果以 CPM/ 10^9 精子表示^[2](CPM 为每分钟磷的放射强度)。

6. 精清中钙和锌离子浓度的测定

采用原子吸收分光光度法。将处理完毕的样品分别在辐射后 0 和 2 小时, 以 2000 转/min 离心 15 分钟, 放入冰箱保存。精清稀释 41 倍, 测定了 Ca^{++} 和 Zn^{++} , 全部样品一次完成。结果以 mg/100 ml 精清表示。

三、结果与讨论

激光辐射组精子的果糖分解、呼吸、超弱发光、无机磷的摄入和精清中钙、锌的浓度, 与对照组相比较, 均有一定的差异, 试验结果见表 1。

表 1 激光对精子代谢的效应

测定指标	测 定 时 间	样 本 数	单 位	辐射剂量(J/cm ²)				
				0	0.9	1.8	7.2	14.4
果糖利用	0~2 h	8	mg/h/ 10^9 精子	1.78±0.21	2.43±0.44**	2.47±0.27**	2.21±0.31**	2.12±0.28*
	0~2 h	8	μ lO ₂ /h/ 10^9 精子	34.4±4.1	37.2±5.2	42.3±6.5**	37.2±3.4	35.5±4.9
呼 吸	3~5 h	8	μ lO ₂ /h/ 10^9 精子	32.7±3.1	34.9±2.7	41.7±8.4**	36.6±5.1	34.3±4.1
	2 h	8	光子数/min/ 10^9 精子	3428±415	3822±313	4343±627**	3837±335	3663±372
超弱发光	6 h	8	光子数/min/ 10^9 精子	2395±401	2987±588**	3160±379**	2910±287*	2642±406
	20 min	8	CPM/ 10^9 精子	4528±137	4475±281	5238±646**	5189±267**	4718±700
³² Pi 摄入	2h 20 min	8	CPM/ 10^9 精子	4065±189	4369±315	4748±418**	4517±481	4330±313
	0 h	8	mg/100 ml 精清	16.01±2.27	13.09±1.65**	13.41±1.87*	13.77±1.76*	13.70±2.00*
钙	2 h	8	mg/100 ml 精清	15.48±2.37	14.06±1.63	13.86±2.28	14.37±2.32	14.00±2.00
	0 h	8	mg/100 ml 精清	0.22±0.03	0.26±0.04*	0.27±0.04**	0.25±0.03	0.24±0.04
锌	2 h	8	mg/100 ml 精清	0.26±0.05	0.29±0.04	0.30±0.02	0.29±0.03	0.27±0.02

采用 SSR 法多重比较, ** 为 $P < 0.01$, * 为 $P < 0.05$

1. 激光辐照对精子果糖分解的效应

本试验结果表明 $0.9\sim 7.2\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组精子的果糖利用率极显著地高于对照组 ($P<0.01$), $14.4\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组显著地高于对照组 ($P<0.05$), $1.8\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组还显著地高于 $14.4\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组 ($P<0.05$).

许多哺乳动物精清中含有大量的果糖, 在精子中酶和辅酶的作用下, 果糖就渗入细胞之内, 参与代谢活动。激光辐射后可显著提高精子的果糖利用, 可能是改变了精子线粒体中 NADH 的反应活性, 促进了果糖分解中间产物的转化。已有资料表明, 激光可影响线粒体中 NADH 及与之相连的反应活性, 从而增加线粒体的能量转化功能^[8]。另外细胞内 cAMP 的活性也影响精子的果糖分解, 如在 10mM 浓度的 cAMP 作用下, 孵育牛附睾中得到的精子, 果糖分解提高 $3\sim 5$ 倍, 表明激光辐照可能提高了细胞内的 cAMP 水平, 从而使果糖利用率得到提高。

2. 激光辐照对精子呼吸的影响

本试验结果表明, $1.8\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组可以显著提高精子的呼吸强度。 $0\sim 2\text{h}$, $1.8\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组极显著地高于对照组 ($P<0.01$), 还显著地高于 $14.4\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组 ($P<0.05$); $3\sim 5\text{h}$, $1.8\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组极显著地高于对照组和 $14.4\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组 ($P<0.01$), 还显著地高于 $0.9\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组 ($P<0.05$), 其它各处理组比对照组虽有提高, 但差异不显著。

精子的呼吸取决于细胞色素的水解活性, 如果对这一系统的功能发生影响, 则可显著影响精子的呼吸, 如精子经过洗涤, 造成细胞色素的逸出, 其呼吸强度就会下降, 然而将洗涤的精子短时间暴露于一般的可见光, 则可显著地提高精子的呼吸。显然, 光照提高了细胞色素系统的活性, 并已有研究表明, 激光可以改变细胞线粒体中细胞色素系统的活性^[9]。从本试验结果看, 激光提高了精子的呼吸, 这与激光对线粒体内细胞色素系统的作用有关, 表明激光促进了细胞色素的催化作用, 从而提高了精子的呼吸强度。

3. 激光辐照对精子超弱发光的影响

生命系统中, 如细胞、组织和体液中, 普遍存在着一种与新陈代谢相关联的发光现象, 它与荧光可见光不同, 只发射 $360\sim 800\text{nm}$ 的极微弱光, 光通量极低, 称为超弱发光^[4]。本试验结果表明, 孵育 6h , $0.9\sim 1.8\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组极显著地高于对照组 ($P<0.01$), $7.2\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组显著地高于对照组 ($P<0.05$), 而 $14.4\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组虽高于对照组, 但不存在统计学的差异。

超弱发光在很大程度上反映了各种酶类特别是氧化酶类的活动情况, 细胞内的过氧化物酶和细胞色素氧化酶活性高时, 发光也较强。因此, 超弱发光的增强反映了细胞内这两种酶活性在升高, 同时这两种酶与精子的呼吸作用密切相关, 它们的活性升高会引起呼吸的显著增强。由此看来, 激光所引起的超弱发光强度的增强和呼吸的增强有内在联系。可以认为, 激光作用于精子后, 使其过氧化物酶和细胞色素氧化酶激活, 从而促进精子的呼吸, 增强了代谢基质的氧化过程, 产生大量的过氧化自由基, 当它们复合时, 便释放出光子, 从而以超弱发光的增强为特征, 反映了精子代谢机能增强的信息。

4. 激光辐照对精子 ^{32}Pi 摄入量的影响

结果表明, 无论处理后 20min 还是 $2\text{h}20\text{min}$, $1.8\sim 7.2\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组均极显著地高于对照组 ($P<0.01$), 0.9 和 $14.4\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组比对照组有所提高, 但差异不显著。

哺乳动物细胞膜,包括精子膜均可摄入无机磷。Babcock 等人(1975年)曾观察到牛精子膜中存在转运磷酸盐载体,在有氧情况下摄取的 $^{32}\text{P}_i$ 约有一半掺入到核苷酸中。Huacuja 等人(1977)报道,人精子摄入的 $^{32}\text{P}_i$ 一部分经磷酸化作用与质膜中专一性蛋白质相结合。本文表明绵羊精子质膜上同样存在磷酸盐转运系统,激光能促进绵羊精子摄入较多的 $^{32}\text{P}_i$,进入细胞内的无机磷,可能一部分掺入 ATP,另一部份通过 ATP 形成磷酸肌酸,也可能有一部份与专一性蛋白质相结合激活腺苷酸环化酶,产生 cAMP 调节精子的糖分解或其它生物学功能。

5. 激光辐照对精液中离子浓度的影响

在本试验中,未经激光孵育的与激光处理组精液中的钙均比对照组低,表明激光促进了钙内流的转运系统,内流的钙可能与钙调素(一种蛋白质)结合,使钙调素-钙复合物与多种酶相结合,从而激活了酶,触发生化反应,产生能量,供精子运动所需。

本试验观察到未经激光孵育的与 0.9 和 $1.8\text{J}/\text{cm}^2$ 激光组比对照组的精子释放较多的锌。与前人的报道相类似,伴随着锌的释放,精子的活力增强。Westmoral 等人(1967)报道精液在冷冻过程中,从精液中吸收大量的锌,当在精子中加入膜损伤因素,如菲律宾菌素或毛地黄皂苷,也能引起对锌的吸收加快,认为膜损伤造成了质膜上锌的结合位点暴露,这样使精子从精液中锌的吸收增强。因此,从本试验的结果可以看出, $0.9\sim 14.4\text{J}/\text{cm}^2$ 激光仅改变精细胞质膜的通透性,对膜无明显的损害。

本工作承蒙内蒙古农牧学院刘震乙教授、白宝宽教授、税世荣教授、李翠环讲师的指导,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 北京大学生物系生物化学教研室编,生物化学实验指导(高等教育出版社,北京,1979), 11
- 2 方天祺 *et al.*, 内蒙古大学学报(自然科学版), **18**(4), 837(1987)
- 3 Passarella S. *et al.*, *FEBS*, **175**(1), 95(1984)
- 4 胡天寿,生物化学与生物物理进展, **15**(1), 18(1988)

(收稿日期: 1988年12月19日)

~~~~~

明年扩版 容量更大

欢迎订阅《中国激光》

经上级批准,本刊自 1991 年第 1 期起,版面由原来的 64 面增扩至 80 面,定价每期 4.50 元,全年 54.00 元,全国各邮电局均可订阅。本刊邮发代号: 4-201,您一定记住了吧,谢谢!