

海洋酸化对泥蚶精子运动的影响及作用机理初探

施巍 韩毓 闫茂仓 黄贤克 胡利华 柴雪良 刘广绪

OCEAN ACIDIFICATION INHIBITS THE SPERM MOTILITY OF *TEGILLARCA GRANOSA* VIA DISURBING ATP SYNTHESIS AND INTRACELLULAR Ca^{2+} ACTIVITY

SHI Wei, HAN Yu, YAN Mao-Cang, HUANG Xian-Ke, HU Li-Hua, CHAI Xue-Liang, LIU Guang-Xu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2020.070>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

海洋酸化对蟹类影响的研究进展

EFFECTS OF OCEAN ACIDIFICATION ON CRABS

水生生物学报. 2020, (): – <https://doi.org/10.7541/2020.070>

泥蚶G2代快速生长家系遗传结构的微卫星分析及其与生长性状的关联

MICROSATELLITE ANALYSIS OF GENETIC VARIATION IN THE FAST GROWTH FAMILIES OF THE 2nd GENERATION OF *TEGILLARCA GRANOSA* AND CORRELATION WITH GROWTH TRAITS

水生生物学报. 2018, 42(4): 681–689 <https://doi.org/10.7541/2018.084>

光强调控三角褐指藻对海洋酸化的生理学响应

LIGHT-MODULATED PHYSIOLOGICAL RESPONSE TO OCEAN ACIDIFICATION IN *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*

水生生物学报. 2019, 43(1): 189–195 <https://doi.org/10.7541/2019.023>

PFOS对中华倒刺幼鱼爆发游泳及运动后代谢恢复的影响

EFFECTS OF PFOS ON BURST SWIMMING PERFORMANCE AND METABOLIC RECOVERY IN JUVENILE *SPINIBARBUS SINENSIS*

水生生物学报. 2019, 43(2): 356–361 <https://doi.org/10.7541/2019.044>

铜和镉胁迫对海洋青摄食行为的影响

EFFECTS OF Cu^{2+} AND Cd^{2+} ON THE FEEDING BEHAVIOR OF *ORYZIAS MELASTIGMA*

水生生物学报. 2020, 44(3): 554–561 <https://doi.org/10.7541/2020.068>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2020.070

海洋酸化对泥蚶精子运动的影响及作用机理初探

施巍¹ 韩毓¹ 闫茂仓² 黄贤克² 胡利华² 柴雪良² 刘广绪¹

(1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058; 2. 浙江省海洋水产养殖研究所, 温州 325005)

摘要: 研究分析了未来海洋酸化情景(pH7.8和pH7.4)对典型滩涂贝类泥蚶(*Tegillarca granosa*)精子运动活力的影响, 并从精子运动供能角度探究了其作用机理。研究表明, 海洋酸化可以显著削弱泥蚶的精子运动速度。由于精子的三磷酸腺苷(ATP)水平与其活力呈显著的正相关, 研究检测了不同酸化条件下泥蚶精子的ATP含量及其合成关键酶酶活, 实验结果显示精子的ATP含量以及磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶活力在酸化条件下均显著下降。此外, 精子内的 Ca^{2+} -ATP酶(Ca^{2+} -ATPase)调节了精子的运动能力, 因此实验也探究了海洋酸化对泥蚶精子 Ca^{2+} -ATPase酶活的影响, 结果证实该酶活力在海水pH为7.4时被显著抑制。综合本研究结果可以得出, 海洋酸化很可能会通过干扰精子细胞内ATP的合成及 Ca^{2+} 的调控进而削弱精子的运动速度。

关键词: 海洋酸化; 泥蚶; 精子运动; ATP; Ca^{2+}

中图分类号: S917.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2020)03-0570-07

自工业革命以来, 人类大量使用化石燃料以及森林的砍伐等活动导致大气中二氧化碳(CO_2)浓度不断上升。据统计, 大气中的 CO_2 浓度已从工业革命前的280 ppm(标准大气压比)增长了约40%, 目前已达到了近400 ppm^[1, 2]。由于海洋与大气间存在着持续不断的气体交换, 大气中的 CO_2 会不断溶入海洋, 进而造成海水变酸, 即“海洋酸化”现象^[3]。根据联合国政府间气候变化专门委员会(Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC)预测, 如果不能大幅度减少 CO_2 的排放速度, 全球表层海水的pH会在本世纪末降至7.8, 而这一数值将在2300年继续降到7.4^[3]。由于栖息于更易受空气 CO_2 浓度变化影响的近岸环境, 海洋贝类尤其是潮间带双壳贝类被认为是最先和最容易受到海洋酸化影响的物种之一, 因此这些物种对海洋酸化的响应引起了国内外学者的广泛关注^[4-6]。目前的相关研究表明, 未来海洋酸化情景能对海洋贝类的受精、胚胎发育、生物钙化和生理代谢等诸多生命过程产生不利影响, 进而对海洋贝类及其所处的生态系统构成严重威胁^[7-9]。

大多数海洋双壳贝类通过广播式体外受精进

行繁殖, 其直接将配子排放到开放的水体中, 受精率主要依赖于配子在水体中的相互作用^[10]。根据海洋无脊椎动物受精动力学模型, 贝类精子的游动速度越快也就意味着单位时间内其与水体中卵子相遇的概率越大, 受精的几率更高^[11, 12]。虽然之前的研究表明, 海洋酸化显著抑制海洋贝类精子的运动能力, 但迄今为止该影响的细胞与分子作用机理仍知之甚少^[7, 13]。

众所周知, 精子运动主要依靠ATP供能, 而精子细胞内绝大部分ATP是由线粒体通过三羧酸循环经无氧糖酵解途径产生的^[14]。糖酵解效率由每一步反应对应的催化酶调控, 而这些酶的活性和催化能力大多都与细胞内的pH密切相关。此外, 精子尾部存在大量 Ca^{2+} -ATP酶(Ca^{2+} -ATPase), 该酶调节了精子内 Ca^{2+} 水平和精子生理功能^[15, 16]。之前的研究表明, Ca^{2+} -ATPase的缺失或活力降低都将导致精子运动能力的衰减^[15, 16]。尽管海洋酸化已被证实会影响到海洋生物细胞内的pH和离子平衡^[8], 但海洋酸化是否通过影响海洋贝类精子ATP合成及 Ca^{2+} -ATPase酶活, 进而导致精子活力降低, 还有待进一步研究证明。

收稿日期: 2019-05-24; 修订日期: 2020-01-15

基金项目: 国家自然科学基金(31672634和31372503)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31672634, 31372503)]

作者简介: 施巍(1992—), 男, 博士; 研究方向为海洋生态学。E-mail: shiwei1992@zju.edu.cn

通信作者: 刘广绪, 教授; E-mail: guangxu_liu@zju.edu.cn

泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus), 俗称“血蚶”, 属软体动物门(Mollusca), 瓣鳃纲(Lamellibranchia), 列齿目(Taxodonta), 蚶科(Arcidae), 广泛分布于印度洋与西太平洋近岸海域, 是我国重要的经济养殖贝类物种之一^[17-19]。针对海洋酸化影响精子运动的细胞与分子机理尚不明确的现状, 本研究以泥蚶为研究对象, 根据IPCC所预测的2100年和2300年海洋酸化情景, 分析了未来海洋酸化条件(pH7.8和7.4)对泥蚶精子运动的影响, 并通过对比不同海洋酸化条件下泥蚶精子ATP合成中关键酶及Ca²⁺-ATPase酶活力等指标, 探讨了其影响精子运动的作用机理。

1 材料与方法

1.1 泥蚶的采集与暂养

实验所用的性成熟泥蚶[壳长(35.6±4.33) mm]于2014年6月取自浙江省温州市乐清湾(东经121°, 北纬28°), 随后被转移至浙江省海洋水产养殖研究所(清江试验站)。经海水小心冲洗除去壳表污物后, 将泥蚶于室内2000 L大桶中流水暂养一周[海水pH为8.07±0.07, 盐度为(21.2±0.1)‰, 温度为(26±3)℃]。在暂养过程中, 桶内海水保持连续充气, 每日早中晚定时投喂活体扁藻(*Platymonas subcordiformis*, 密度为2×10⁴个/mL)三次, 以保证泥蚶处于适宜的性成熟状态。

1.2 海洋酸化模拟与参数测定

实验设置三个pH海水处理组, 其中对照组使用正常海水(pH8.1), 另根据IPCC的预测设置两个海洋酸化模拟实验组(pH分别为7.8和7.4)。对照组充入除湿后的空气, 而酸化海水则通过加富CO₂的方式制备^[9,20]。在实验过程中, 海水的pH通过Sartorius PB-10型pH计监测, 温度和盐度使用WTW Multi 3410型多参数水质分析仪测得。同时实验期间每半小时使用电位滴定法测定一次实验海水的总碱度^[21]。利用实验测得的海水pH、盐度、总碱度和温度, 结合部分已知常量, 使用开源软件CO2SYS计算得出实验过程中海水的碳酸盐体系组分和文石(Ω_{ara})与方解石饱和度(Ω_{cal})参数^[22]。各组海水的理化参数如表1所示。

1.3 泥蚶精子的收集与酸化处理

根据之前报道的催产方法, 泥蚶精子通过阴干和温度刺激法获得^[9,23]。在实验前一晚, 将大小均一的泥蚶从暂养桶内捞出, 冲刷干净后置于23℃的空调房阴干过夜。次日将每个泥蚶个体单独置于装有500 mL过滤海水的烧杯中进行催产, 期间烧杯中保持持续充气。待泥蚶开始排放配子后停止充气, 待大约45min后收集精子悬浮液, 在显微镜(Nikon, Eclipse E600)下检查精子质量, 并用血球计数板测量精子浓度。每份精子样品均至少测定三次以减少取样误差^[24]。为确保结果的准确性, 实验中舍弃活力低下和浓度过低的精子样品。

为避免泥蚶个体差异带来误差, 实验中将来自同一个泥蚶个体的精子样品均分为三份, 然后分别施以对照或酸化处理。酸化处理1h后, 取各组精子样品用于后续对比分析。

1.4 精子运动速度分析

相应实验处理1h后, 取100 μL 精子悬液置于单凹载玻片上, 并盖上载玻片以减少器壁效应(Wall-effect)对实验结果的影响^[25]。随后样品置于装有录像系统(DXM1200F, Nikon)的显微镜(Eclipse E600, Nikon)下以200×放大倍数进行观察并对精子运动情况进行录像(至少30s)。使用开源软件ImageJ(版本1.46r)中的计算机辅助精子分析(Computer Aided Sperm Analysis, CASA)插件, 对录像数据进行分析。通过测定精子在不同时间点的位置坐标, 构建运动轨迹, 进而计算得到各组精子运动的曲线运动速度(V_{CL})、平均路径速度(V_{AP})和直线速度(V_{SL})^[10,12]。本研究共检测了来自15个泥蚶个体的精子样品在不同处理后的运动情况(共计45份精子样品)。

1.5 泥蚶精子ATP含量测定

经酸化处理1h后, 每个处理组取90 mL精子样品置于离心管中, 于离心机(5810R, Eppendorf)中以3000 r/min离心2min, 弃上清获得精子用于ATP含量测定。首先采用Bradford蛋白浓度测定试剂盒(P0006, 碧云天), 按照试剂盒提供的方法对泥蚶精子蛋白浓度进行定量。随后使用ATP含量测定试剂盒(A095-1, 南京建成), 利用分光光度计(UV-2100, 上海菁华)测量样品在636 nm波长处0.5 cm光

表1 对照组与酸化实验组的海水理化参数值(均值±标准误)

Tab. 1 Chemical parameters of seawater in the control and experiment groups (Mean±SE)

pH	温度T (°C)	盐度Sal (‰)	pH _{NBS}	总碱度TA ($\mu\text{mol/kg}$)	CO ₂ 分压pCO ₂ (μatm)	总无机碳浓度DIC ($\mu\text{mol/kg}$)	文石饱和度 Ω_{ara}	方解石饱和度 Ω_{cal}
8.1	26.28±0.05	21.19±0.08	8.07±0.07	2057.63±11.25	596.37±3.25	1954.68±6.87	2.04±0.02	3.26±0.03
7.8	26.19±0.10	21.22±0.09	7.79±0.10	2062.97±11.28	1175.25±20.52	2004.80±8.41	1.16±0.02	1.85±0.02
7.4	26.22±0.11	21.18±0.12	7.41±0.05	2067.78±11.58	3095.58±43.7	2135.43±7.76	0.48±0.01	0.77±0.01

径的吸光度值, 并按照以下公式计算得到各样品的ATP浓度值($\mu\text{mol/g prot}$)。

$$\text{ATP 浓度} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} \times \text{稀释倍数} \div \text{蛋白浓度}$$

1.6 精子丙酮酸激酶(PK)和磷酸果糖激酶(PFK)酶活测定

本研究使用丙酮酸激酶测定试剂盒(A076-1, 南京建成)对不同处理组泥蚶精子的丙酮酸激酶(PK)活力进行测定。根据试剂盒的操作要求加样并混匀后, 在340 nm波长0.5 cm光径处测定样品在30s时初始吸光值(A_1)。随后加入反应液, 37℃水浴15min, 测定反应后样品的吸光值(A_2)。按照以下公式计算PK酶活力。

$$\text{丙酮酸激酶活力} = \frac{A_1 - A_2}{\text{毫摩尔消光系数}(3.22)} \div$$

$$\text{反应时间} \div \text{比色光径} \times \frac{\text{反应液体积}}{\text{取样量}} \div \text{蛋白浓度}$$

将37℃下每克组织蛋白每分钟将1 μmol 的磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)转变成丙酮酸定义为一个酶活力单位(U_{PK})。

与之类似, 利用磷酸果糖激酶测试盒(A129, 南京建成)对样品的磷酸果糖激酶(PFK)活力进行测定。按照试剂盒说明书操作要求加入试剂于1 mL比色皿后, 记录样品在340 nm波长下20s时的初始吸光值(A_1)和10min 20s时的吸光值(A_2)。随后按照以下公式计算PFK酶活力。

$$\text{果糖磷酸激酶活力} = 450 \times (A_1 - A_2) \div \text{蛋白浓度}$$

1.7 泥蚶精子 Ca^{2+} -ATPase酶活测定

本研究使用超微量 Ca^{2+} -ATPase酶测定试剂盒(A070-4, 南京建成)对不同处理后的泥蚶精子 Ca^{2+} -ATPase活性进行测定。按照试剂盒所述的操作步骤, 加样完毕后, 利用分光光度计测定对照与样品在636 nm波长处0.5 cm光径的吸光值, 并通过以下公式计算得到 Ca^{2+} -ATPase酶活值。

$$\text{ATPase活力} = \frac{\text{测定OD值} - \text{对照OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度} \times 6 \times 2.8 \div \text{蛋白浓度}$$

将每小时每毫克细胞蛋白的细胞中ATP酶分解ATP产生1 μmol 无机磷的量定义为一个ATP酶活力单位, 即 $\mu\text{mol磷/g (prot} \cdot \text{h)} \text{U}_{\text{ATPase}}$ 。

1.8 数据统计与分析

利用Levene检验和Shapiro-Wilk检验来分别判

断数据是否符合方差齐性和正态性分布, 对不符合的数据进行平方根反正弦变换以满足相关统计分析要求。通过单因素方差分析(One-way ANOVA)检测泥蚶精子的运动速度、ATP含量及PK、PFK和 Ca^{2+} -ATPase酶活力在各实验组间的差异。并通过Tukey检验(Post-hoc Tukey tests)进行多重比对, 明确组间的显著性差异。所有统计分析均在R统计分析软件(R development Core Team, 2012)中进行, 以 $P < 0.05$ 作为显著性检验标准。

2 结果

2.1 海洋酸化对泥蚶精子运动速度的影响

与对照相比, 海洋酸化处理导致泥蚶精子运动速度显著降低($P < 0.05$), 且该影响随着酸化程度的提高而显著增强。经过pH7.8的酸化海水处理后, 泥蚶精子的VCL、VAP和VSL分别降至对照组的82.5%、62.8%和76.2%。随着海水pH的进一步下降(pH7.4), 泥蚶精子 V_{CL} 、 V_{AP} 和 V_{SL} 分别进一步降至仅为对照组的66.9%、53.3%和54.7%(表2)。

2.2 海洋酸化对泥蚶精子ATP含量的影响

单因素方差分析结果显示, 海洋酸化导致泥蚶精子ATP含量显著下降($P < 0.05$)。如图1所示, 经海洋酸化处理1h后, 泥蚶精子ATP含量在pH7.8和7.4处理组中分别下降至对照组的62.9%和35.6%, 说明泥蚶精子供能在海洋酸化的条件下被显著抑制。

2.3 海洋酸化对磷酸果糖激酶(PFK)和丙酮酸激酶(PK)酶活的影响

统计结果表明, 海洋酸化显著抑制了泥蚶精子PFK和PK的酶活力($P < 0.05$)。ANOVA与Tukey检验显示pH7.8和7.4酸化实验组的泥蚶精子PFK活力显著低于对照组, 分别只有对照组的76.9%和45.8%(图2)。与之类似, 在经pH7.8和7.4的海水酸化处理1h后, 泥蚶精子的PK酶活力也分别相较于对照组显著下降了33.1%和50.0%(图3)。

表2 海洋酸化对泥蚶精子运动速度的影响(均值 $\pm$ 标准误)

Tab. 2 Effects of ocean acidification on the sperm motility of *T. granosa* (Mean $\pm$ SE)

pH	V_{CL} ($\mu\text{m/s}$)	V_{AP} ($\mu\text{m/s}$)	V_{SL} ($\mu\text{m/s}$)
8.1	123.63 $\pm$ 2.06 ^a	136.30 $\pm$ 3.23 ^a	105.65 $\pm$ 5.39 ^a
7.8	101.95 $\pm$ 7.97 ^b	85.66 $\pm$ 3.20 ^b	80.51 $\pm$ 2.19 ^b
7.4	82.73 $\pm$ 3.87 ^b	72.64 $\pm$ 3.20 ^c	57.75 $\pm$ 4.31 ^c

注: V_{CL} 为曲线运动速度, V_{AP} 为平均路径速度, V_{SL} 为直线速度; 同一行中, 不同上标字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: V_{CL} means velocity curvilinear, V_{AP} means velocity average path, V_{SL} means velocity straight line; Values with different superscripts letters in the same column mean significant differences ($P < 0.05$)

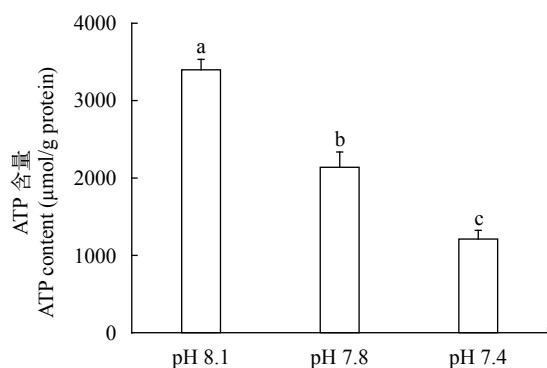


图1 海洋酸化对泥蚶精子ATP含量的影响(均值±标准误)

Fig. 1 Effects of ocean acidification on the ATP content in *T. granosa* sperm (Mean±SE)

图中上标字母不同表示差异显著($P < 0.05$); 下同

Values with different superscripts represent significant difference ($P < 0.05$); the same applies below

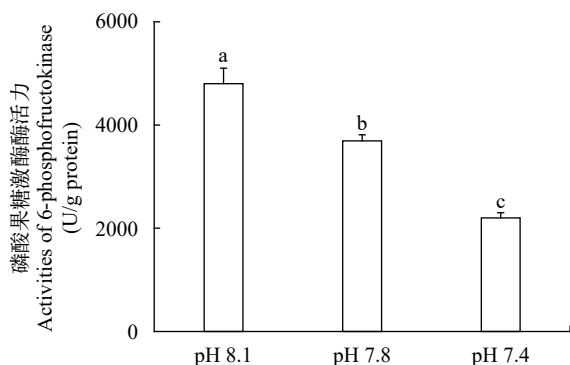


图2 海洋酸化对泥蚶精子磷酸果糖激酶(PFK)酶活力的影响(均值±标准误)

Fig. 2 Effects of ocean acidification on the on the activities of 6-phosphofructokinase (PFK) in *T. granosa* sperm (Mean±SE)

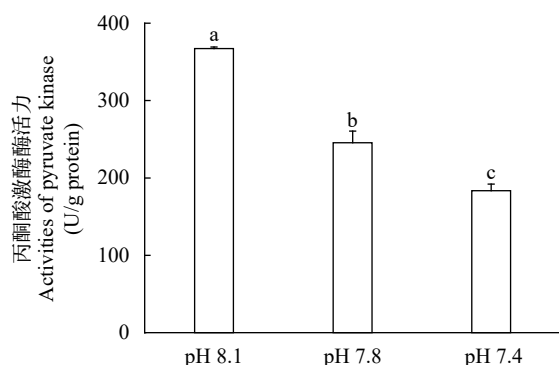


图3 海洋酸化对泥蚶精子丙酮酸激酶(PK)酶活力的影响(均值±标准误)

Fig. 3 Effects of ocean acidification on the activities of pyruvate kinase (PK) in *T. granosa* sperm (Mean±SE)

2.4 海洋酸化对泥蚶精子 Ca^{2+} -ATP酶活的影响

单因素方差分析显示, 海洋酸化处理显著抑制

了泥蚶精子 Ca^{2+} -ATPase活力($P < 0.05$)。虽然与对照相比, 泥蚶精子 Ca^{2+} -ATPase活力在经pH7.8的酸化海水处理后并未发生显著性变化($P > 0.05$), 但pH7.4的海水酸化处理后导致泥蚶精子 Ca^{2+} -ATPase活力显著下降了60.2%($P < 0.05$, 图4)。

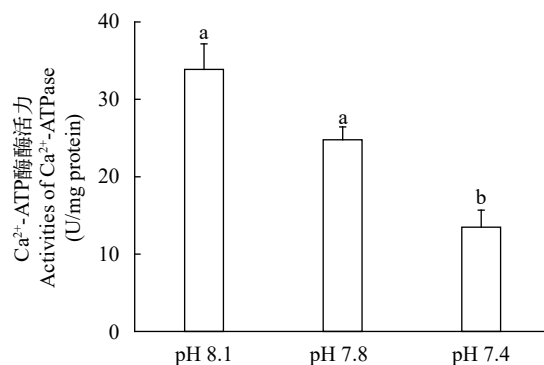


图4 海洋酸化对泥蚶精子 Ca^{2+} -ATPase酶活影响(均值±标准误)

Fig. 4 Effects of ocean acidification on the activities of Ca^{2+} -ATPase in *T. granosa* sperm (Mean±SE)

3 讨论

无论是在哺乳动物或者海洋无脊椎动物中, 精子运动速度都是衡量雄性生育能力的一个重要指标^[11, 26]。本研究发现, 未来海洋酸化情景能显著削弱泥蚶精子的运动速度(包括 V_{CL} 、 V_{SL} 和 V_{AP})。根据受精动力学模型, 泥蚶精子运动速度的降低意味着其与散布在三维水体内的卵子相遇几率的下降, 这无疑会导致其受精率的降低^[10, 12]。尽管类似的结果在太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、紫海胆(*Heliocidaris erythrogramma*)和指形鹿角珊瑚(*Acropora digitifera*)等物种中已有报道^[27, 28, 39], 但海洋酸化影响海洋无脊椎动物精子运动能力的作用机理一直没有定论。根据本研究所得到的结果, 海洋酸化影响泥蚶精子运动能力的原因可以从以下几个方面进行初步解释。

首先, 海洋酸化可能通过阻碍泥蚶精子的激活来损害其运动能力。体外受精的鱼类、贝类的精子在精巢或精浆内一般处于静止状态, 只有当释放到适宜的水体环境中才被激活^[30, 31]。因此, 水体环境盐度、温度和pH等理化条件的变化有可能造成精子激活失败和运动能力减弱^[32, 33]。已有研究证实, 泥蚶精子的激活同样受到外界海水pH的调节和影响。例如, 当环境水体的pH由8下降到7.5时, 泥蚶精子的激活率、总运动时间和激烈运动时间都会明显降低^[34]。鉴于此, 海洋酸化很可能会干扰泥蚶精子的正常激活, 从而导致其运动能力的下降。

其次, 海洋酸化能影响精子供能系统, 阻碍精

子尾部的摆动,最终削弱精子的游动能力。众所周知,精子的运动时主要是由其细胞内的线粒体产生ATP以供给能量,因此精子线粒体ATP的合成效率对保障其活力至关重要。之前有研究报道,海胆(*Centrostephanus rodgersii*)精子的线粒体膜电位(Mitochondrial membrane potential, MMP)在海洋酸化的条件下会显著降低,这将导致精子的ATP合成酶在酸化条件下无法利用质子梯度的势能偶联合成ATP^[35]。本研究也发现,经酸化处理后的泥蚶精子ATP含量较对照组有显著下降。同时,由于PFK和PK是糖酵解的关键酶,对糖酵解合成ATP速率的控制和调节起着关键的作用^[36,37],因此本研究中发现的酸化导致PFK和PK活力显著降低,将无疑会抑制精子ATP的合成并进而影响精子的运动。

此外,海洋酸化还可能干扰了精子的胞内Ca²⁺调控,从而影响了其运动能力。大量研究证实,Ca²⁺通过介导精子质膜表面的Ca²⁺通道对精子运动进行调控,随后通过改变动力蛋白臂的滑动,使精子鞭毛不停摆动并调节其运动的对称性^[16,38-40]。根据报道,胞外pH水平能影响Ca²⁺的内流及其胞内浓度^[8,41]。例如,当外界的pH由7.5降至6.5时,小鼠突触小体中Ca²⁺的内流会被显著抑制^[41]。同样的,在海洋酸化的条件下,泥蚶血淋巴内的Ca²⁺浓度也会随着海水pH的下降而明显降低^[8]。因此,海洋酸化也很可能导致精子胞内Ca²⁺紊乱,从而削弱其运动能力^[41]。另一方面,Ca²⁺-ATPase在海洋无脊椎动物的精子中维持着胞内Ca²⁺浓度的稳定,并在精子的运动及受精过程中发挥着重要的作用^[42]。例如,用Ca²⁺-ATPase抑制剂5(6)-carboxyeosin处理海胆精子会导致精子胞内Ca²⁺浓度变化并造成鞭毛运动能力丧失^[42]。在本研究中,海洋酸化处理后的泥蚶精子的Ca²⁺-ATPase活力显著下降,这意味着海洋酸化很有可能会因此打破精子胞内Ca²⁺稳态,干扰其对本已有限的ATP能量的利用,从而导致其运动能力的显著下降。

综上所述,本研究表明海洋酸化可能通过阻碍精子供能以及干扰精子运动调控,进而抑制泥蚶精子的运动能力,继而降低泥蚶精卵碰撞的概率,最终影响泥蚶的受精过程及其种群繁衍。

参考文献:

- [1] Caldeira K, Wickett M E. Oceanography: anthropogenic carbon and ocean pH [J]. *Nature*, 2003, **425**(6956): 365-365.
- [2] Climate Change 2014: Synthesis Report [C]//Pachauri R K, Meyer L A (Eds.), Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Switzerland: IPCC, 2014: 60-70.
- [3] Orr J C, Fabry V J, Aumont O, et al. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms [J]. *Nature*, 2005, **437**(7059): 681-686.
- [4] Bibby R, Widdicombe S, Parry H, et al. Effects of ocean acidification on the immune response of the blue mussel *Mytilus edulis* [J]. *Aquatic Biology*, 2008, **2**(1): 67-74.
- [5] Shi W, Zhao X, Han Y, et al. Ocean acidification increases cadmium accumulation in marine bivalves: a potential threat to food safety [J]. *Scientific Reports*, 2016, (6): 20197.
- [6] Huang X, Lin D, Ning K, et al. Hemocyte responses of the thick shell mussel *Mytilus coruscus* exposed to nano-TiO₂ and seawater acidification [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, (180): 1-10.
- [7] Zhao X G, Liu G. Advances in the effects of ocean acidification on marine invertebrates [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, **35**(7): 2388-2398. [赵信国, 刘广绪. 海洋酸化对海洋无脊椎动物的影响研究进展 [J]. *生态学报*, 2015, **35**(7): 2388-2398.]
- [8] Zhao X, Shi W, Han Y, et al. Ocean acidification adversely influences metabolism, extracellular pH and calcification of an economically important marine bivalve, *Tegillarca granosa* [J]. *Marine Environmental Research*, 2017, (125): 82-89.
- [9] Shi W, Han Y, Guo C, et al. Ocean acidification hampers sperm-egg collisions, gamete fusion, and generation of Ca²⁺ oscillations of a broadcast spawning bivalve, *Tegillarca granosa* [J]. *Marine Environmental Research*, 2017, (130): 106-112.
- [10] Liu G X. Review of fertilization kinetics model in marine invertebrates: investigating methodology and application [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(5): 938-944. [刘广绪. 海洋无脊椎生物受精动力学模型: 研究方法与应用 [J]. *水生生物学报*, 2013, **37**(5): 938-944.]
- [11] Vogel H, Czihak G, Chang P, et al. Fertilization kinetics of sea-urchin eggs [J]. *Mathematical Biosciences*, 1982, **58**(2): 189-216.
- [12] Shi W, Zhao X, Han Y, et al. Effects of reduced pH and elevated pCO₂ on sperm motility and fertilisation success in blood clam, *Tegillarca granosa* [J]. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 2017, **51**(4): 543-554.
- [13] Parker L M, Ross P M, O'Connor W A. The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850) [J]. *Global Change Biology*, 2009, **15**(9): 2123-2136.
- [14] Cross N L, Hanks S E. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes [J]. *Human Reproduction*, 1991, **6**(9): 1279-1283.

- [15] Okunade G W, Miller M L, Pyne G J, *et al.* Targeted ablation of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for PMCA1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for PMCA4 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(32): 33742-33750.
- [16] Schuh K, Cartwright E J, Jankevics E, *et al.* Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(27): 28220-28226.
- [17] Shao Y, Chai X, Xiao G, *et al.* Population genetic structure of the blood clam, *Tegillarca granosa*, along the pacific coast of Asia: isolation by distance in the sea [J]. *Malacologia*, 2016, **59**(2): 303-312.
- [18] Chen X Y, Jiang G P, Chai X L, *et al.* full-length cDNA cloning and expression analysis of glutathione peroxidase from blood clam *Tegillarca granosa* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2016, **40**(6): 1144-1151. [程雪艳, 蒋国萍, 柴雪良, 等. 泥蚶谷胱甘肽过氧化物酶基因的全长克隆与表达分析 [J]. 水生生物学报, 2016, **40**(6): 1144-1151.]
- [19] Teng S S, Fang J, Shao Y Q, *et al.* Microsatellite analysis of genetic variation in the fast growth families of the 2nd generation of *Tegillarca granosa* and correlation with growth traits [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(4): 681-689. [滕爽爽, 方军, 邵艳卿, 等. 泥蚶G2代快速生长家系遗传结构的微卫星分析及其与生长性状的关联 [J]. 水生生物学报, 2018, **42**(4): 681-689.]
- [20] Shi W, Han Y, Guo C, *et al.* Ocean acidification increases the accumulation of titanium dioxide nanoparticles (nTiO_2) in edible bivalve mollusks and poses a potential threat to seafood safety [J]. *Scientific Reports*, 2019, **9**(1): 3516.
- [21] Zhao X G, Guo C, Han Y, *et al.* Ocean acidification decreases mussel byssal attachment strength and induces molecular byssal responses [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2017, (565): 67-77.
- [22] Liu S, Shi W, Guo C, *et al.* Ocean acidification weakens the immune response of blood clam through hampering the NF-kappa β and toll-like receptor pathways [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, (54): 322-327.
- [23] Han Y, Shi W, Guo C, *et al.* Characteristics of chitin synthase (CHS) gene and its function in polyspermy blocking in the blood clam *Tegillarca granosa* [J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2016, **82**(4): 550-557.
- [24] Babcock R, Keesing J. Fertilization biology of the abalone *Haliotis laevis*: laboratory and field studies [J]. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 1999, **56**(9): 1668-1678.
- [25] Havenhand J N, Buttler F R, Thorndyke M C, *et al.* Near-future levels of ocean acidification reduce fertilization success in a sea urchin [J]. *Current Biology*, 2008, **18**(15): R651-R652.
- [26] Wallach E E, Liu D Y, Baker H G. Tests of human sperm function and fertilization in vitro [J]. *Fertility & Sterility*, 1992, **58**(3): 465-483.
- [27] Barros P, Sobral P, Range P, *et al.* Effects of sea-water acidification on fertilization and larval development of the oyster *Crassostrea gigas* [J]. *Journal of Experimental Marine Biology & Ecology*, 2013, (440): 200-206.
- [28] Byrne M, Soars N, Selvakumaraswamy P, *et al.* Sea urchin fertilization in a warm, acidified and high pCO_2 ocean across a range of sperm densities [J]. *Marine Environmental Research*, 2010, **69**(4): 234-239.
- [29] Nakamura M, Morita M. Sperm motility of the scleractinian coral *Acropora digitifera* under preindustrial, current, and predicted ocean acidification regimes [J]. *Aquatic Biology*, 2012, **15**(3): 299-302.
- [30] Li J E, Ou Y J, Jiang S G. Effects of environment change of the vitality of spermatozoa in *Rhabdorsargus sarba* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1996, **31**(3): 6-9. [李加儿, 区又君, 江世贵. 环境因子变化对平鲷精子活力的影响 [J]. 动物学杂志, 1996, **31**(3): 6-9.]
- [31] Jiang S G, Li J E, Ou Y J, *et al.* Relationships between conditions for activating spermatozoa of four sparidae fishes and the fishes' ecological habits [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 1999, **20**(3): 468-473. [汪世贵, 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, 1999, **20**(3): 468-473.]
- [32] Johnson C H, Epel D. Intracellular pH of sea urchin eggs measured by the dimethylloxazolidinedione (DMO) method [J]. *Journal of Cell Biology*, 1981, **89**(2): 284-291.
- [33] Zhong A H. The influence of physical-chemical factors upon *Mytilus coruscus* sperm motility [J]. *The Journal of Marine Sciences*, 2010, **28**(4): 89-94. [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.]
- [34] 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. [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.]
- [35] Schlegel P, Binet M T, Havenhand J N, *et al.* Ocean acidification impacts on sperm mitochondrial membrane potential bring sperm swimming behaviour near its tipping point [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2015, **218**(7): 1084-1090.
- [36] Peng C, Zhao X, Liu S, *et al.* Effects of anthropogenic sound on digging behavior, metabolism, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity, and metabolism-related gene expression of the bivalve *Sinonovacula constricta* [J]. *Scientific Reports*, 2016, (6): 24266.
- [37] Wang L Y, Zhang M, Zhao X L, *et al.* Effects of different training methods on the activity of isocitrate dehydrogenase and phosphofructokinase-1 in rats skeletal muscle [J]. *Journal of Tianjin Medical University*, 2011,

- 17(2): 170-172. [王丽艳, 张敏, 赵晓丽, 等. 不同运动方式对大鼠异柠檬酸脱氢酶和磷酸果糖激酶-1的影响[J]. 天津医科大学学报, 2011, 17(2): 170-172.]
- [38] Zhang H G, Duan X G, Liu R Z. Ca^{2+} and sperm function [J]. *National Journal of Andrology*, 2006, 12(10): 933-935. [张红国, 段晓刚, 刘睿智. 钙离子与精子功能[J]. 中华男科学杂志, 2006, 12(10): 933-935.]
- [39] Sampson M J, Decker W K, Beaudet A L, *et al.* Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001(276): 39206-39212.
- [40] Ren D, Navarro B, Perez G, *et al.* A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility [J]. *Nature*, 2001(413): 603-609.
- [41] Saadoun S, Lluch M, Rodríguez-Álvarez J, *et al.* Extracellular acidification modifies Ca^{2+} fluxes in rat brain synaptosomes [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1998, 242(1): 123-128.
- [42] Gunaratne H J, Neill A T, Vacquier V D. Plasma membrane calcium ATPase is concentrated in the head of sea urchin spermatozoa [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2010(207): 413-419.

OCEAN ACIDIFICATION INHIBITS THE SPERM MOTILITY OF *TEGILLARCA GRANOSA* VIA DISURTRBING ATP SYNTHESIS AND INTRACELLULAR Ca^{2+} ACTIVITY

SHI Wei¹, HAN Yu¹, YAN Mao-Cang², HUANG Xian-Ke², HU Li-Hua², CHAI Xue-Liang² and LIU Guang-Xu¹

(1. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Mariculture Research Institute of Zhejiang Province, Wenzhou 325005, China)

Abstract: Since the industrial revolution, massive amount of anthropogenic carbon dioxide (CO_2) have been generated to elevate the atmospheric CO_2 concentration. Some anthropogenic CO_2 have been absorbed by the ocean to cause “ocean acidification” (OA). Although the negative impacts of OA on sperm motility are increasingly found in various marine invertebrate species, the cellular and molecular mechanisms for these effects are still poorly understood. This study investigated the effect of OA (pH7.8 and 7.4) on sperm motility and energy supplying pathway in blood clam *Tegillarca granosa*. The results showed that the sperm swimming speed reduced significantly in acidified seawater. Since the adenosine triphosphate (ATP) level of sperm is closely related to its motility, we analyzed the sperm ATP content and activities of key enzymes during ATP synthesis under different OA scenarios. OA treatments significantly reduced ATP content as well as activities of 6-phosphofructokinase and pyruvate kinase in the sperm of *T. granosa*. The sperm Ca^{2+} -ATPase of various animals has been reported to regulate sperm motility. Therefore, we explored the Ca^{2+} -ATPase activity of *T. granosa* sperm under OA treatment. The results found that Ca^{2+} -ATPase activities in the sperm of *T. granosa* were significantly declined under OA scenarios. In conclusion, these results suggested that OA could constrain sperm motility through inhibiting ATP synthesis and disturbing intracellular Ca^{2+} regulation.

Key words: Ocean acidification; *Tegillarca granosa*; Sperm motility; ATP; Ca^{2+}