科学通报
第40卷 第15期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1995年 8月

小鼠精子顶体反应中腺苷酸环化酶和环核苷酸磷酸二酯酶调节作用的研究*

段崇文 胡国俊 陈大元

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室,北京 100080)

关键词 顶体反应 腺苷酸化酶 环核苷酸磷酸二酯酶 调节作用

自从 Austin 和 Chang 提出获能以来,已有很多学者对哺乳动物精子获能的形态及生化变化进行了研究,并逐渐进入到分子机理的研究. Cascien 等(1976)报道了牛精子获能之初的腺苷酸变化,Fraser(1979)报道了咖啡因加速小鼠精子体外穿卵过程,Chan 等(1981)报道了精子获能及顶体反应过程中有环核苷酸参与,紧接着 Fraser(1981)发现 dbcAMP 能缩短获能时间[1]及与 cAMP 相关的 Ca^{2+} 浓度变化[2],指出获能必须有 Ca^{2+} 参加,其后 Monks(1987)又报道小鼠精子中具有腺苷酸环化酶和环核苷酸磷酸二酯酶活性[3], 由此可见,精子获能过程中存在着 Ca^{2+}, cAMP 及两种酶的调节系统. 为探讨上述各因素之间的关系,我们采用几种影响和调节上述因素的外源因子,观察其对小鼠精子体外获能的影响,并以精子获能为指标,探讨上述因素之间的关系及其对精子获能及精子顶体反应的影响,以便进一步讨论精子获能的分子机制.

1 材料与方法

1.1 精子体外获能

昆明系雄性小鼠,12 周龄,控光(D:N=14:10)饲养. 动物颈椎脱臼处死,迅速取下附睾尾及输精管,放入盛有 3 mL 培养液的 30 mm 塑料培养皿中,并稍剪碎. 然后培养皿置 37 ℃, 5%CO_2 培养箱中孵育 5 min, 使活精子游出之后,取上层培养液,2 000 r/min 离心使精子沉降,沉淀加入 3 mL 新鲜培养液并转入 30 mm 培养皿,再次放入上述 37 ℃, 5%CO_2 培养箱中培养 1 h, 相差显微镜观察,以确定精子获能效果.

1.2 培养液

实验所用培养液为购自 Sigma 的 Tyrode's 液(T2145). 溶液以 $NaHCO_3$ 调 pH 为 7.4, 再加入 BSA 至终浓度为 4 mg/mL. 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌. 实验设计下列 7 组培养系统:

(1) 对照组: 精子正常培养液组, (2)EDTA 组:精子正常培养液加 2 mmol/L EDTA 组, (3) Quer 组: 精子正常培养液加 50 μmol/L 槲皮素(Quercetin)组, (4)Fosk 组: 精子正常培养液加 5 μmol/L Foskolin 组, (5)EDTA+Fosk 组: 精子正常培养液加 2 mmol/L EDTA 及 5 μmol/L

1994-10-24 收稿, 1995-02-26 收修改稿
* 中国科学院"八五"攻关重点资助项目

Foskolin 组，(6) EDTA+cAMP 组：精子正常培养液加 2mmol/L EDTA 及 15 μmol/L dbcAMP 组，(7) Endo 组：精子正常培养液加 0.1 μmol/L β- 内啡肽(β-Endophin)组．7 组实验均同时重复进行 3 次．

1.3 材料固定及电镜样品制备

各组精子体外获能 1 h 后，经 2 000 r/min 离心收集沉淀，3% 戊二醛，0.5% 多聚甲醛，0.1 mol/L CaCo 混合固定液固定 2 h，4℃，然后用 0.1 mol/L CaCo 缓冲液漂洗过夜．次日材料经 1% 锇酸，0.1 mol/L CaCo 固定液后固定 1 h 后，系列酒精脱水，Spurr 包埋．薄切片经铀、铅染色后 JEM-2000EX 电镜观察．

2 结果与讨论

薄切片在电镜上观察，以顶体膨胀为精子获能、顶体反应初始的指标，统计每一组材料的任意 300 个精子中，经过了顶体膨胀时期的精子个数所占 300 个精子中的比例，以此衡量不同因子对精子顶体反应的影响，从而推测 Ca^{2+}，cAMP 与腺苷酸环化酶及环核苷酸磷酸二酯酶之间的关系及对精子获能的影响．

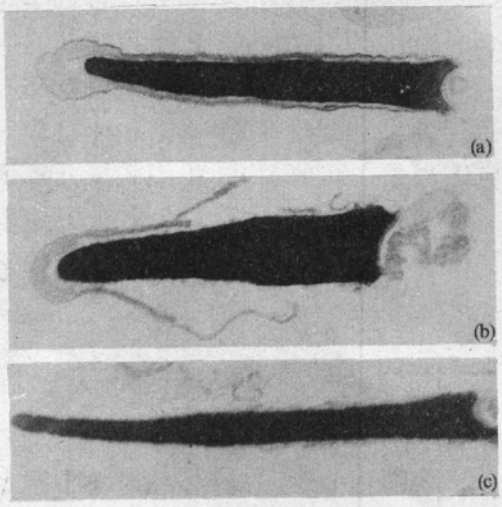


图 1 电镜下判断不同时期精子的形态标准 (a)顶体完整为未获能精子，(b)顶体膨胀为获能和顶体反应初始精子，(c)顶体脱落为顶体反应完毕精子

对各种精子鉴定的形态标准由图 1 示，未获能精子(图 1(a))、顶体膨胀精子(图 1(b))、顶体脱落精子(图 1(c))．

对照组：3 次实验经过了顶体膨胀时期的精子数分别为 51，63，61 个，各占总数 300 个精子的 17%，21%，20.3%，并且绝大多数为顶体膨胀，偶见有顶体脱落者．

EDTA 组：加入 2 mmol/L EDTA，使得正常培养中 Ca^{2+} 被结合，失去游离 Ca^{2+}，此时电镜观察发现，3 组实验各 300 个精子中分别有 4，5，5 个精子顶体膨胀，各占总数的 1.3%，1.7%，1.7%．精子获得能所需的最大和最小 Ca^{2+} 浓度，Fraser (1987) 已有证明[4]，本实验再次证明没有 Ca^{2+} 精子不能获能．

Quer 组：加入槲皮素，是 Ca^{2+}-ATPase 的专一性抑制剂，抑制 Ca^{2+}-ATPase 对 Ca^{2+} 的主动运输，30～100 μmol/L 即可抑制肌浆网摄取 Ca^{2+}．这一组中，3 次实验各 300 个精子中分别有 65，85，81 个精子经过了顶体膨胀期，各占 21.7%，28.3%，27%，略高于对照组，但其中已见有顶体帽脱落者，说明槲皮素对精子获能有促进作用，Bradley 和 Forrester(1982) 曾报道羊精子表面 Ca^{2+}-ATPase 引起 Ca^{2+} 外流[5]，Fraser (1984) 又报道小鼠精子表面有 Ca^{2+}-ATPase 将精子内 Ca^{2+} 泵出[6]．本实验证明，小鼠精子表面的 Ca^{2+}-ATPase 能主动将 Ca^{2+} 转运到精子外，抑制 Ca^{2+}-ATPase 对 Ca^{2+} 的外运，能提高精子内 Ca^{2+} 浓度，有利于精子获能．

Fosk 组：Foskolin 是腺苷酸环化酶的促进剂，在此培养液中，3 次实验各 300 个精子分别有 82，98，102 个精子经历了顶体膨胀，其中各有 11，10，15 个已经顶体脱落，获能精子数明

显高于对照组，本实验证明了腺苷酸环化酶的促进剂能促进精子获能，缩短精子获能时间，同时说明腺苷酸环化酶在精子获能和顶体反应过程中起正调节作用.

EDTA+Fosk 组：同时加入 EDTA 和 Foskolin，统计精子获能情况表明，3 次实验分别仅有 7, 7, 5 精子获能，占统计总数 300 个精子的 2.3%, 2.3%, 1.7%，并且获能精子中没有顶体帽脱落者，该结果与第二组实验相似. 实验表明，Foskolin 对腺苷酸环化酶的促进作用，必须有 Ca^{2+} 存在，如果没有 Ca^{2+}，Foskolin 不能刺激腺苷酸环化酶合成 cAMP，同时我们推测小鼠精子中的腺苷酸环化酶是 Ca^{2+} 依赖型的，没有 Ca^{2+} 则酶没有活性.

EDTA+cAMP 组：同时加入 dbcAMP 和 EDTA，观察统计表明，3 次实验各 300 个精子中已分别有 48, 66, 69 个精子经过了顶体膨胀期，其中 12, 19, 17 个已经顶体脱落，精子获能率分别为 16%, 22%, 23%，从获能精子比例看与对照组相似，但从顶体反应率看，比对照明显增加，说明 cAMP 能直接引起精子获能和顶体反应. 从本实验我们认为精子获能实际上是精子内部cAMP 聚集的过程，当cAMP 达到一定浓度时，诱发精子顶体反应. 外源加入 cAMP，此时虽然无 Ca^{2+}，二种酶均无活性，但由于 cAMP 是膜通透性的，培养液中的 cAMP 能进入精子内，使得精子内已有了获能的产物，精子同样能发生顶体反应.

Endo 组：加入 β-Endo，观察统计表明，3 次实验各 300 个精子中已分别有 127, 153, 147 个精子经过顶体膨胀期，并且有 58, 76, 75 个已经顶体反应，顶体脱落. 获能精子分别占统计总数的 42.5%, 51%, 49%，顶体反应占全部获能精子的 45.7%, 49.7%, 51%，实验表明 β-Endo 能有效地刺激精子获能，精子的反应，胜过上述几种因子. β-Endo 的作用是专一性抑制 CaM 对环核苷酸磷酸二酯酶的激活作用，从而证明，精子内环核苷酸磷酸二酯酸是受 CaM 激活. 由于β-Endo 抑制作用，使得环核苷酸磷酸二酯酶失活，从而导致 cAMP 的降解被抑制，cAMP 聚集加快，诱发了精子顶体反应.

7 组实验结果如图 2.

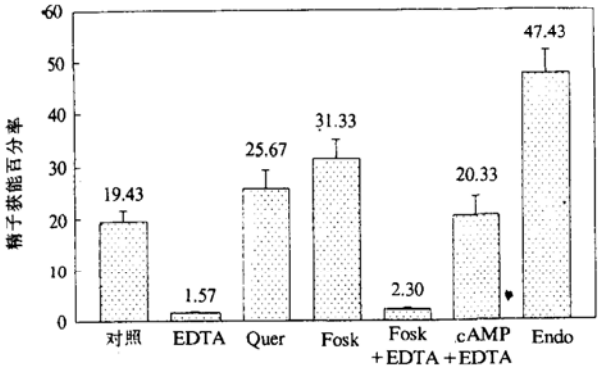


图 2　各组实验精子获能的百分率

现有的研究表明，细胞内腺苷酸环化酶和环核苷酸磷酸二酯酶都由 CaM 激活，结合我们的实验，我们认为，精子获能过程时，首先是精子内 Ca^{2+} 浓度上升，激活 CaM，由 CaM 激活腺苷酸环化酶和环核苷酸磷酸二酯酶. 此二酶调节着 cAMP 浓度缓慢上升，其详细机制有待进一步研究其酶动力等. 当精子内 cAMP 上升到一临界点便诱发精子顶体反应，而获能过程则是 cAMP 聚集的过程. 提高腺苷酸环化酶活性，抑制环核苷酸磷酸二酯酶活性，增加 cAMP，都能缩短精子获能时间，促进精了顶体反应.

全部结果简示于图 3.

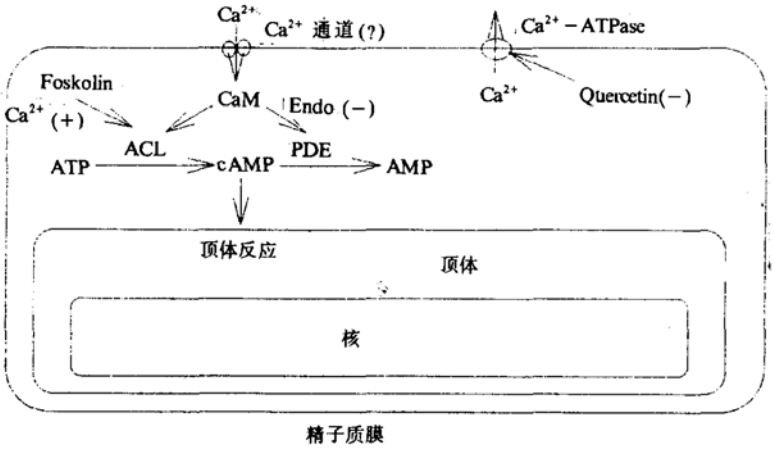


图 3 几种因子在精子获能中的作用

CaM为钙调蛋白，ACL为腺苷酸环化酶，PDE为环核苷酸磷酸二酯酶

致谢 本室电镜室齐跃敏同志在本实验电镜观察中给予帮助，在此表示感谢.

参 考 文 献

1 Fraser L R. Dibutyl cyclic AMP decrease capacitation time in vitro in mouse spermatozoa. J Reprod Fertil, 1981, 62: 63～72

2 Fraser L R. Ca^{2+} is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. J Androl, 1982, 3: 412～418

3 Monks N J, fraser L R. Phosphodiesterase activity of mouse sperm incubated under conditions that modulate fertilization potential in vitro. Gamete Res, 1987, 18: 85～96

4 Fraser L Y. Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirement during sperm capacitation and fertilization in vitro. J Reprod Fertil, 1987, 81: 77～89

5 Bradley M P, Forrester I T. Human and ram seminal plasma both contain a calcium-dependent regulator protein calsemin. J Androl, 1982, 3: 289～296

6 Fraser L Y, Ahuja K K. Metabolic and surface events in fertilization. Gamete Res, 1988, 20: 491～519