中国科学 (C 辑)
第 26 卷 第 4 期 SCIENCE IN CHINA (Series C) 1996 年 8 月

豚鼠精子信号通路的研究*

李明文 焦 日** 孙青原 胡国俊 段崇文
刘 辉 宋祥芬 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)

摘要 钙调素(CaM)拮抗剂三氟拉嗪(TFP)在 10～100 μmol/L 浓度范围内对豚鼠精子获能和顶体反应具有极显著的促进作用, 且不依赖于外源 Ca^{2+} 的存在. Forskolin, dbcAMP 和咖啡因对非同步培养系统获能早期豚鼠精子的顶体反应有显著的促进作用, 但对同步培养系统获能早期精子的顶体反应无显著影响. 若在同步培养系统获能培养较长时间(15 h)使精子获能, 则这 3 种药物对顶体反应均具有显著的促进作用, 且不依赖外源 Ca^{2+} 的存在. 蛋白激酶 C(PKC)激活剂 PMA 和 PDB 对获能前期豚鼠精子的顶体反应无显著影响, 但对获能精子的顶体反应有显著的促进作用, 且这种促进作用也不依赖于外源 Ca^{2+} 的存在. 相反, PKC 抑制剂 staurosporine 对顶体反应有显著的抑制作用.

关键词 豚鼠 精子 顶体反应 钙调素 cAMP 蛋白激酶 C

精子细胞信号通路的研究对揭示卵激活精子及获能和顶体反应的机理具有重要意义. 目前认为精子细胞和体细胞一样, 主要具有 3 条信号通路, 即 Ca^{2+}/钙调素信号通路、cAMP 信号通路和肌醇酯信号通路. 这 3 条细胞信号通路相互配合. 对精子获能和顶体反应具有极为重要的作用. 精子细胞信号通路的研究始于 60 年代, 特别是对 Ca^{2+} 和 cAMP 信号通路在精子获能和顶体反应中的作用的研究起步较早, 但直到现在还有一些问题有待研究或尚未研究清楚, 例如钙调素(CaM)与精子获能和顶体反应的关系, cAMP 信号通路与 Ca^{2+} 的关系, 蛋白激酶 C(PKC)在获能和顶体反应过程中的作用及其与 Ca^{2+} 的关系等. 本文以豚鼠精子为材料, 较系统地研究了 CaM 拮抗剂三氟拉嗪(TFP)、腺苷酸环化酶(ACase)激活剂 forskolin, cAMP 类似物 dbcAMP, cAMP 磷酸二酯酶(PDE)抑制剂咖啡因、PKC 激活剂 PMA 和 PDB 等对顶体反应的影响及其与 Ca^{2+} 的关系.

1 材料和方法

1.1 药品

所用药物钙调素(CaM)、三氟拉嗪(TFP)、forskolin, dbcAMP、咖啡因、phorbol 12-myristate

1995-08-23 收稿, 1996-01-25 收修改稿
* 中国科学院"八五"重点基金资助项目
** 现在解放军农牧大学基础部
*** 联系人

13-acetate (PMA), phorbol 12, 13-dibutyrate (PDB)和 PKC 抑制剂 staurosporine 均为 Sigma 公司产品, CaM, TFP, dbcAPM 和咖啡因母液由 0.9% NaCl 配制, forskolin, PMA, PDB 和 staurosporine 先用 DMSO 溶解, 用前以 0.9%NaCl 稀释. DMSO 最终浓度<0.05%.

1.2 精子培养

用在培养箱中预孵育的改良 Tyrode 培养液[1]逆向冲灌输精管获得附睾尾精子后, 用相同培养液稀释至精子密度为$(3\sim5)\times10^7$/mL. 然后分管培养, 每管含精子悬液 200 μL. 培养条件 37℃, 5% CO_2 和石蜡油覆盖.

培养系统分为同步和非同步培养系统. 同步培养系统即精子先在无 Ca^{2+} 液中培养至一定时间, 然后加入影响因子母液 10 μL, 10 min 后加入 $CaCl_2$ 母液 10 μL, 使 Ca^{2+} 浓度为 1.8 mmol/L, 继续培养 30 min, 加入少量含 1.4%蔗糖的 3%戊二醛终止培养. 非同步培养系统即培养液内 Ca^{2+} 浓度始终为 1.8 mmol/L, 影响因子在获能培养前加入, 培养至一定时间终止培养. 具体程序见实验结果部分.

1.3 顶体反应百分率统计

终止培养的精子混匀后吸取少量装片, 400 倍光镜下鉴别顶体反应精子(顶体帽全部或部分脱落)和未顶体反应精子(顶体帽完整). 每个样品计数 150 个以上精子, 每个实验重复 3 次, 做显著性 t 检验.

2 结果

2.1 TFP 对精子顶体反应的影响

由图 1, 2 可以看出, 无论是对非同步培养系统获能培养前期(5 h)的精子, 还是对同步培养系统中已获能的精子(培养 15 h), TFP 对顶体反应均有极显著的促进作用, 并且呈剂量依赖关系, 在 10～100 μmol/L 范围内, 浓度越高, 促进作用越明显, 在 100 μmol/L 时可 100%地促使精子发生顶体反应. 在无外 Ca^{2+} 条件下 TFP 也可显著促进顶体反应, 因此 TFP 对精子

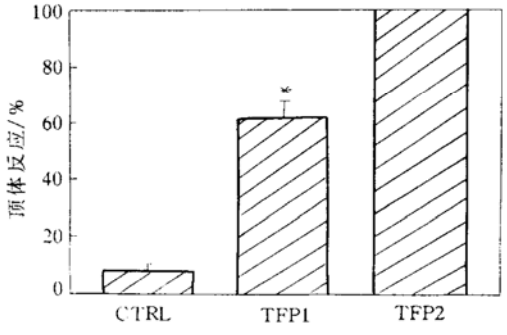


图 1

非同步培养系统中培养 5 h, 培养前加 TFP, TFP1 和 TFP2 分别为 50 和 100 μmol/L. $M\pm SD$, $n=3$.
$*P<0.001$

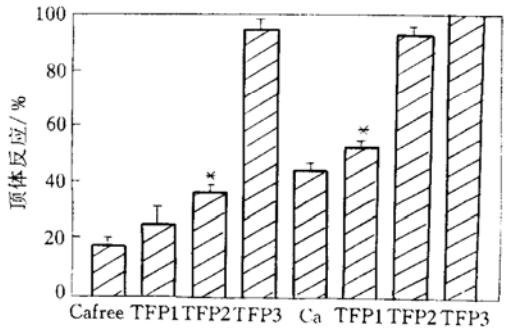


图 2

同步培养系统中培养 15 h 时加入 TFP, 10 min 后加入 Ca(后 4 组)或不加 Ca(后 4 组). TFP1, TFP2 和 TFP3 分别为 10, 50 和 100 μmol/L. $M\pm SD$, $n=3$.
$*P<0.01$

顶体反应的促进作用是 Ca^{2+} 非依赖性的.

2.2 Forskolin, dbcAMP 和咖啡因对获能早期精子顶体反应的影响

由图 3 可以看出, forskolin, dbcAMP 和咖啡因在始终含 1.8 mmol/4 Ca^{2+} 的条件下(非同步培养系统)均可显著促进获能早期(<5 h)豚鼠精子的顶体反应, 并且促进作用呈剂量依赖性关系. 但在同步培养系统于获能培养早期(<5 h)这 3 种药物对顶体反应无显著促进作用(图 4). 这说明 Ca^{2+} 在精子获能早期对上述药物的促进作用是必需的.

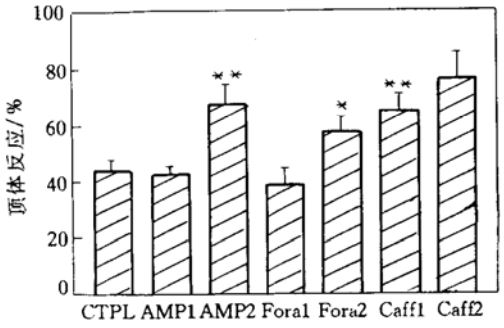


图 3

非同步培养系统中培养 5>h, 培养前加 dbcAMP (AMP)、forskolin(Fors)或咖啡因(Caff). AMP1 和 Caff1 为 0.5 mmol/L; AMP2 和 Caff2 为 1.0 mmol/L; Fors1 和 Fors2 分别为 5 和 10 μmol/L. $M \pm SD$, $n = 3$. * $P<0.05$; * * $P<0.01$

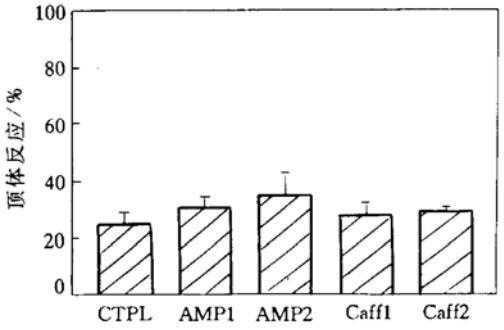


图 4

同步培养系统中培养 5 h 时加 dbcAMP(AMP)或咖啡因(Caff). AMP1 和 Caff1 为 0.5 mmol/L; AMP2 和 Caff2 为 1.0 mmol/L. $M \pm SD$, $n = 3$

2.3 Forskolin, dbcAMP 和咖啡因对获能精子顶体反应的影响

由图 5 可以看出, 精子在无 Ca^{2+} 的同步培养液中获能培养 15 h 加入 forskolin 或咖啡因, 则无论加 Ca^{2+} 与否, 均对精子顶体反应具有极显著的促进作用.

2.4 PMA, PDB 和 staurosporine 对获能早期精子顶体反应的影响

由图 6 可以看出, PKC 激活剂 PMA, PDB(10～50) ng/mL 和 PKC 抑制剂 staurosporine(50～100) ng/mL 对非同步和同步培养系统获能早期(<5 h)的豚鼠精子顶体反应均无显著影响.

2.5 PMA, PDB 和 staurosporine 对获能精子顶体反应的影响

若将培养时间延长至 11 h(非同步培养系统)或 15 h(同步培养系统), 则 PKC 激活剂 PMA 和 PDB 对顶体反应有显著的促进作用, 且这种促进

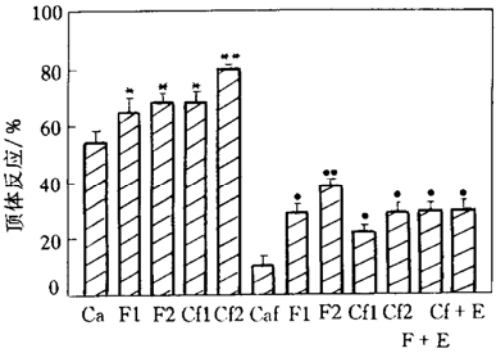


图 5

同步培养系统中培养 15 h 时加入 forskolin(F)或咖啡因(Cf). E 表示在培养液内同时加入 EGTA 40 μmol/L. 前 5 组于加药后加入 Ca, 后 7 组始终不加 Ca, 其中 Ca 和 Caf 分别为加 Ca 和不加 Ca 的对照组. F1 和 F2 分别为 10 和 20 μmol/L, F = F2; Cf1 和 Cf2 分别为 0.5 和 1.0 mml/L, Cf = Cf2; $M \pm SD$, $n = 3$. * $P<0.05$; * * $P<0.01$; · $P<0.01$ · · $P<0.001$

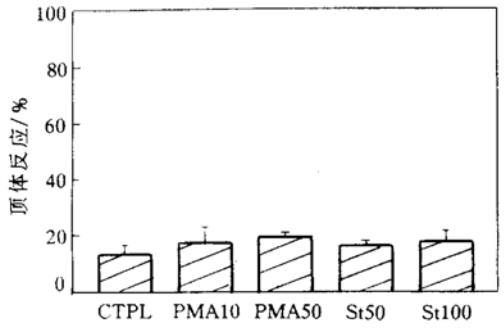


图 6

非同步培养系统中培养 5 h, 培养前加 PMA 或 staurosporine(St). PMA10 表示 PMA 浓度为 10 ng/mL, 其它类推. $M \pm SD$, $n = 3$

作用不需要培养液中 Ca^{2+} 的存在. 而 PKC 抑制剂 staurosporine 对顶体反应有显著的抑制作用, 且 staurosporine 可抑制 PMA 和 PDB 对顶体反应的促进作用(图 7, 8).

3 讨论

生化测定和免疫电镜研究已经证明哺乳动物精子内具有大量的钙调素(CaM), 分布于精子各个部位[2], 因此 CaM 在精子的获能和顶体反应过程中可能具有重要作用. 但直到目前对精子 CaM 功能的研究资料极少, 只是在猪精子发现 CaM 拮抗剂三氟拉嗪(TFP)和 calmidazolium 可促进 Ca^{2+} 内流[3]. 我们以豚鼠为材料, 发现 TFP 可极显著促进精子的顶体反应, 并且这种促进作用不依赖于外源的 Ca^{2+} 的存在. TFP 除了对顶体反应有促进作用外, 对获能过程也有促进作用, 因为在获能早期 TFP 即可极显著地促进顶体反应.

TFP 对获能和顶体反应具有促进作用, 说明 CaM 对精子获能和顶体反应具有显著的抑制作用. 可能精子内不同部位分布的 CaM 具有不同的作用, 有些与 Ca^{2+} 结合后通过激活 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶而促进获能和顶体反应, 而另一些则起相反的作用, 即对获能和顶体反应有抑制作用. CaM 的这种抑制作用可能与环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)有关. 在体细胞的研究结果指出, CaM 对 PDE 有激活作用, PDE 的激活作用将导致 cAMP 的水解和 cAMP 水平的下降, 这不利于精子获能和顶体反应. CaM 拮抗剂 TFP 能显著阻止 CaM 与其受体酶的相互作用, 可以使活化状态的 PDE 几乎完全抑制[4], 从而使细胞内 cAMP 水平升高和促进精子获能和顶体反应.

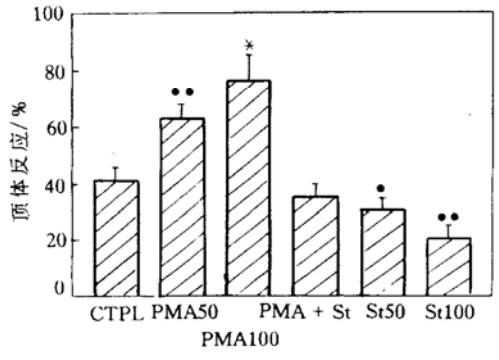


图 7

非同步培养系统中培养 11 h, 培养前加 PMA 或 staurosporine(St). PMA50 表示 PMA 浓度为 50 ng/mL, 其它类推. PMA + St 为 PMA 1 000 ng/mL + St100 ng/mL. $M \pm SD$, $n = 3$. * $P < 0.05$; ·· $P < 0.01$; * $P < 0.001$

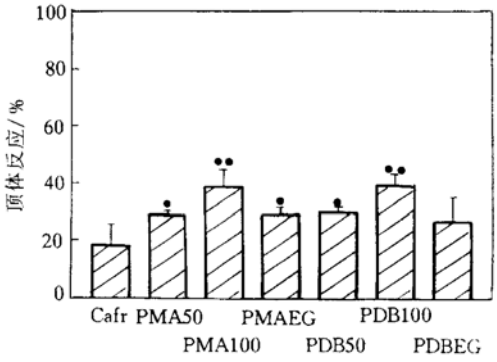


图 8

同步培养系统中培养 15 h 时加入 PMA 或 PDB. PMAEG 或 PDBEG 表示在加 PMA 或 PDB 100 ng/mL 的同时加入 EGTA 40 μmol/L. 各组始终不加 Ca, 其中 Cafr 为对照组. $M \pm SD$, $n = 3$. · $P < 0.05$; ·· $P < 0.01$

关于 cAMP 信号通路与精子获能和顶体反应的关系，在兔、地鼠、大鼠的研究证明 cAMP 类似物和 PDE 抑制剂可以促进精子的获能和顶体反应过程[5]. De Jone 等[6]对人精子 cAMP 信号通路的研究较为全面，发现腺苷酸环化酶激活剂 forskolin，cAMP 类似物 dbcAMP 和 PDE 抑制剂 IBMX 等均可显著促进获能的人精子的顶体反应，并且环腺苷酸依赖性蛋白激酶 A (PKA)的抑制剂 H-8 等可抑制 dbcAMP 对人精子顶体反应的促进作用. 该研究还证明 dbcAMP 对人精子顶体反应的促进作用不依赖于外源 Ca^{2+} 的存在. 但 Hyne 等对豚鼠精子的研究却指出 cAMP 类似物 8-bromo-cAMP 对精子顶体反应的促进作用依赖于外源 Ca^{2+} 的存在[7]. 本研究首次发现 forskolin，dbcAMP 和咖啡因等 cAMP 信号通路相关药物对豚鼠精子获能和顶体反应的促进作用在精子获能早期依赖于外源 Ca^{2+} 的存在，但对已获能的精子顶体反应的促进作用不依赖于外源 Ca^{2+} 的存在. 本发现可以解释过去报道的 cAMP 类似物对顶体反应的促进作用依赖或不依赖于外源 Ca^{2+} 的矛盾的实验结果.

cAMP 信号通路相关药物在精子获能早期对顶体反应的促进作用依赖于细胞外 Ca^{2+} 的存在，而对已获能精子其促进作用不依赖于外源 Ca^{2+}，可能说明精子的获能过程是一个很复杂的生理生化过程，涉及除了 cAMP 信号通路以外的其它 Ca^{2+} 依赖性机制. 一旦这些 Ca^{2+} 依赖性生理生化过程结束，即获能过程完成，则 cAMP 信号通路相关药物对顶体反应的促进作用即不依赖于外源 Ca^{2+} 的存在.

肌醇酯信号通路是体细胞信息传递的重要通讯途径之一. 在哺乳动物精子发现了磷酯酶 C(PLC)和磷酯酰肌醇(PIP2)的存在，并且 Ca^{2+} 的内流可迅速导致 IP3 和 DAG 的产生[8]，这说明肌醇酯信号通路存在于哺乳动物精子细胞. 然而直到目前对该信号通路在精子获能和顶体反应过程中的作用还不清楚，并且在不同的动物种类得到的实验结果很不相同. 例如 PKC 激活剂 PMA 和 OAG 对地鼠精子的顶体反应没有影响[9]，对小鼠精子的顶体反应有抑制作用[10]，甚至有人认为羊精子不具有 PKC，因为 PKC 激活剂对羊精子的顶体反应和蛋白质的磷酸化没有影响，在羊精子也未检测到 PKC 激活剂 PMA 的结合位点[11]. 然而新近的研究结果却指出 PKC 激活剂 PMA 和 DAG 类似物可显著地促进人和牛精子的顶体反应，而 PKC 抑制剂可阻断 PKC 激活剂对顶体反应的促进作用，并且用光镜免疫细胞化学方法证明人和牛精子具有 PKC[12~14]. 关于 Ca^{2+} 与 PKC 激活剂对顶体反应的促进作用的关系，Roiem 等报道 PKC 对人精子顶体反应的促进作用不依赖于细胞外 Ca^{2+}[13]，但 De Jone 等报道这种促进作用依赖于外源 Ca^{2+} 的存在[12]. 由于蛋白激酶 C(PKC)激活剂 PMA、PDB 和 PKC 抑制剂 staurosporine 不论是对含 Ca^{2+} 的非同步培养系统，还是对无 Ca^{2+} 同步培养系统中获能早期(<5 h)的豚鼠精子的顶体反应均无显著的影响，而对在上述两个培养系统中培养较长时间(11 h 和 15 h)的精子的顶体反应有显著的促进作用(PMA 和 PDB)或显著的抑制作用(staurosporine)，因此认为存在于豚鼠精子的 PKC 可能对获能过程(至少是获能早期)不起重要作用，但对顶体反应过程具有重要的功能. 在人和牛精子的研究结果也指出 PKC 激活剂对顶体反应的促进作用随获能时间的延长而增强[13,14].

PKC 激活剂 PMA 和 PDB 对在无 Ca^{2+} 液中获能培养 15 h 的精子的顶体反应不论在顶体反应阶段是否加入 Ca^{2+} 使 Ca^{2+} 浓度升高至 1.8 mmol/L，均具有显著的促进作用. 而在正常情况下豚鼠精子的顶体反应是必须有每升毫摩尔水平的外源 Ca^{2+} 的存在，因此可以认为正常情况下 Ca^{2+} 内流发生于 PKC 激活之前，并且可能正是由于内流的 Ca^{2+} 激活了 PKC. 豚鼠精

子PKC的功能和cAMP信号通路的功能相似点是均可促进顶体反应的进行,但PKC对获能过程(至少对获能早期)没有影响,而在Ca^{2+}存在下cAMP信号通路的激活可缩短获能时间.

参 考 文 献

1 Leibfried M L, Bavister B D. Fertilizability of in vitro matured oocytes from golden hamster. J Exp Zool, 1983, 226:481～485

2 Camatini M, Anelli G, Casale A. Immunocytochemical localization of calmodulin in intact and acrosome-reacted boar sperm. Eur J Cell Biol, 1986, 41:89～96

3 Peterson R N, Ashart M, Russell L D. Effects of calmodulin antagonists on Ca^{2+} uptake by boar spermatozoa. Biochem Biophys Res Commun, 1983, 114:28～33

4 张 云, 薛绍白. 钙与细胞功能. 细胞生物学进展, 1991, 2:160～210

5 Mrsny R J, Meizel S. Evidence suggesting a role for cyclic nucleotide in acrosome reaction of hamster sperm in vitro. J Exp Zool, 1980, 211:153～157

6 De Jonge C J, Han H L, Lawrie H *et al*. Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. J Exp Zool, 1991, 258:113～125

7 Hyne R V, Garbers D L. Calcium-dependent elevation of adnosine 3′,5′-monophosphate and induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. Proc Natl Acad Sci, USA, 1979, 76:5 699～5 703

8 Roldan E R S, Harrison R A P. Polyphosphoinositide breakdown and subsquent exocytosis in the Ca^{2+}/ionophore-induced acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Biochem J, 1989, 259:397～406

9 Visconti P E, Tezon J G. Phrbol esters stimulate cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate accumulation in hamster spermatozoa during in vitro capacitation. Biol Reprod, 1989, 40:223～231

10 Lee M A, Kopf G S, Storey B T. Effects of phorbol esters and diacylglycerol on the mouse sperm acrosome reaction induced by the zona pellucida. Biol Reprod, 1987, 36:617～627

11 Roldan E R S, Harrison R A P. Absence of active protein kinase C in the ram spermatozoa. Biochem Biophys Res Comm, 1988, 155:901～906

12 De Joneg C J, Han H L, Mack S R *et al*. Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. J Androl, 1991, 12:62～70

13 Breitbart H, Lax J, Rotem R *et al*. Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Biochem J, 1992, 281:473～476

14 Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature, 1984, 308:693～698