

# 人精子顶体反应与孵育时间的关系

凌 玲\*

(中山医科大学孙逸仙纪念医院妇产科,广州,510120)

W. C. L. Ford

(Reproductive Unit Bristol Maternity Hospital)

**提 要** 以人新鲜及冷冻精子在不同孵育时间内及不同 A23187浓度下进行实验。采用低渗溶液处理以观察精子的死活及顶体反应情况,比较不同条件下,精子顶体反应的变化。结果表明:(1)新鲜及冷冻精子均可受 A23187诱发,而出现顶体反应;(2)A23187可使部分精子在极短时间内出现顶体反应;(3)一定范围内延长孵育时间,可提高 A23187的诱发效率;(4)人精子间存在明显不均一性。

**关键词** 精子;顶体反应;A23187;孵育时间;获能

**中图分类号** R321.1

顶体反应(acrosome reaction)是精子受精过程中关键步骤之一。顶体反应使精子细胞膜与顶体外膜融合,形成通道使10多种顶体酶释出,这些酶类作用于卵子透明带,协助精子进入卵细胞。同时,顶体反应可暴露顶体内膜上与卵细胞结合的特异位点。根据其发生原因,顶体反应可分为自发性及诱发性两种。

对于人类精子而言,女性生殖道是一个复杂的外环境,已有许多文献报道输卵管液、卵子透明带,卵丘细胞,某些蛋白溶解酶及某些生物胺类物质均可不同程度地诱发顶体反应<sup>[1]</sup>。因此,生理情况下精子进入女性生殖道后,会受到多种物质诱发,而出现顶体反应。在体外,以钙离子通道激动剂 A23187及 Ionomycin 作为实验性顶体诱发剂为多。

过去曾经认为精子必须经过获能这一关键步骤才具有受精能力,能够在与卵子透明带接触时出现顶体反应。然而,精子获能的实质目前仍在研究探索之中。曾有文章报道人

精子可以超越获能这一步骤,而直接出现顶体反应。<sup>[2]</sup>。为了进一步了解人精子获能与顶体反应的情况,本文研究和比较了冷冻及新鲜精子的自发性顶体反应、即时诱发性顶体反应以及不同孵育时间的诱发顶体反应等3种情况。

## 1. 材料与方 法

### 1.1 实验材料

A23187(游离酸型),购于 Boehringer Mannheim, GMBH, Lewes, U. K; 荧光标记 Pisum Sativum Agglutinin(PSA),购于 Vector Laboratories, 16 Wulfvic Square, Peterborough, U. K; 其它试剂分别购于 Flsons Scientific Apparatus, Loughborough Leics, U. K. 及 BDH Chemicals Ltd. Poole, U. K.

A23187预先溶于二甲基亚砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO),使其终浓度为50mmol/L,以每份5 $\mu$ l分装后置于-20 $^{\circ}$ C保存。使用前

\* 第一作者,33岁,女,讲师,硕士

取一份解冻后立即以 Biggers, Whittem Whittingham (BWW) 液<sup>[3]</sup> 稀释成浓度为  $8\mu\text{mol/L}$  及  $20\mu\text{mol/L}$  两个浓度 A23187 备用。

### 1.2 标本收集及处理

由于低温储存过程可使部分精子受损,影响实验结果,为保证质量,所有冷冻标本在实验前均经过非连续性 Percoll 密度梯度离心法进行处理。为了结果的可比性,对新鲜的精子于实验前也经过了相同处理。

### 1.3 实验方法

对上述处理过的标本进行鉴定精液中活精子数 < 95% 的标本弃去。将选好的标本精子数调整至  $20 \times 10^6/\text{ml}$ , 以每份  $50\mu\text{l}$  分别置3个相同试管内,再加入适量 95% 空气及 5%  $\text{CO}_2$ , 置  $37^\circ\text{C}$  温育箱分别孵育 1h, 2h, 6h 及留一管准备即用。新鲜精子则延长孵育时间至 22h。各管完成孵育后,一份试管只加 BWW 液  $50\mu\text{l}$  作为对照,其余两份则分别加入  $8\mu\text{mol/L}$  及  $20\mu\text{mol/L}$  A23187 液  $50\mu\text{l}$ , 使 A23187 终浓度为  $4\mu\text{mol/L}$  及  $10\mu\text{mol/L}$ , 管内精子数为  $10 \times 10^6/\text{ml}$ 。  $37^\circ\text{C}$  条件下重复孵育 1h 后鉴定结果。

### 1.4 精子的死活及顶体状态的评定

采用 Jeyendran 介绍的低渗溶液法<sup>[4]</sup>与荧光 PSA 相结合的方法基本步骤如下:预先配制果糖-枸橼酸钠低渗溶液(渗透压 = 150mos)备用。使用时将精子加入此低渗溶液作用 30min 后离心 ( $500g \times 20\text{min}$ , 离心后取沉淀按 1:1 比例将沉淀重新悬浮于 95% 乙醇溶液内固定 30min, 取悬浮液 1 滴置干燥玻片上(约  $30\mu\text{l}$ ), 烘干, 加入 0.1% PSA 液  $100\mu\text{l}$  染色 30min, 用 PBS 溶液将多余染料轻轻洗去, 避光干燥后置荧光显微镜下鉴定。为防止荧光染料迅速退色, 观察时加入  $20\mu\text{l}$  CITI Glycerol。每张片随机观察 200 个精子, 将所观察精子分为如下 4 类: ① 已顶体反应的活精子; ② 已顶体反应的死精子; ③ 顶体完整的活精子; ④ 顶体完整的死精子。

## 2 结 果

### 2.1 自发性顶体反应率

在无 A23187 作用下, 冷冻精子经过 1h, 2h, 3h 及 7h BWW 液孵育后, 其存活精子自发性顶体反应率为 28% ~ 34%, 与孵育时间无显著相关 ( $P > 0.05$ )。新鲜精子延长孵育至 23h, 分析结果显示新鲜精子自发性顶体反应率与体外孵育时间呈显著正相关关系。冷冻精子自发性顶体反应率显著大于新鲜精子 ( $P > 0.01$ ) (图 1)。

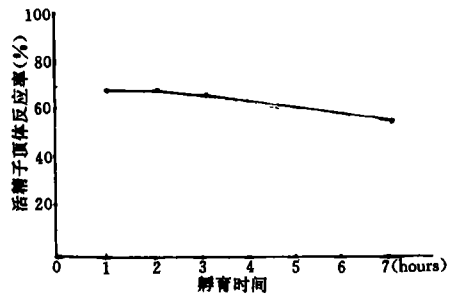


图 1 a 复温后活精子体外孵育时间与顶体反应率的关系顶体反应率 (%)

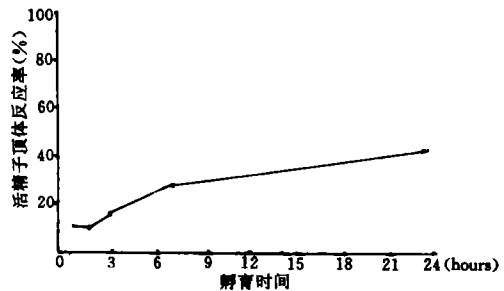


图 1 b 新鲜活精子体外孵育时间与顶体反应率的关系

### 2.2 即时顶体反应诱发率

所用标本经密度梯度离心处理后立即加入 A23187 诱导剂, 作用 1h 后观察表明: 与未加 A23187 组比较, A23187 可显著提高精子顶体反应率 ( $P < 0.01$ )。A23187 诱发顶体反应率与其浓度有关, 这一特性同时反映在冷冻精子与新鲜精子中(图 2)。

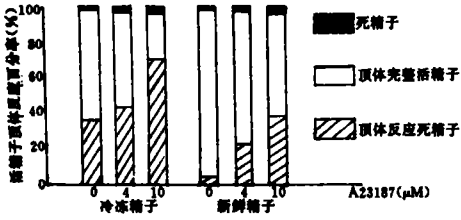


图2 即时精子(冷冻/新鲜)诱发顶体反应率

2.3 时间及 A23187同时对顶体反应的影响

同一份标本分别在不同的孵育时间及不同 A23187浓度下比较其顶体反应率。结果显示:在 A23187浓度低于10μmol/L 范围内,随 A23187浓度及孵育时间的同时增加,活精子顶体反应诱发率显著增加。电脑 Two-way Variance 程序统计学分析结果表明, A23187及体外孵育时间二者可协同提高人精子顶体反应率。(F = 6.31, P < 0.01)。A23187作用后精子死亡率在冷冻标本中较高(7%~20%),而新鲜标本中精子死亡率较低(0%~6%)。(图3,4;附表)。

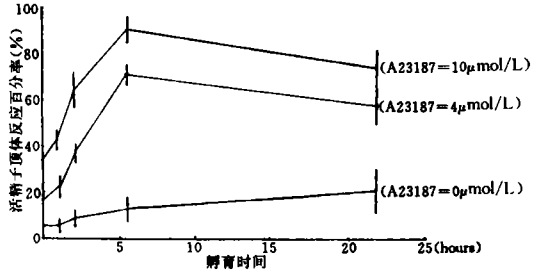


图3 不同条件下新鲜活精子顶体反应百分率比较

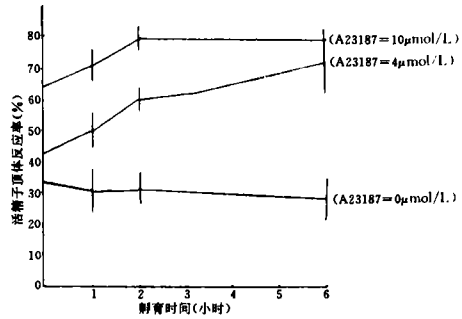


图4 不同条件下冷藏活精子顶体反应百分率变化比较

附表 不同孵育条件下双向差异分析表

资料	DF	SS	MS	F	P
A23187	2	13376	6688	181.74	<0.01
孵育时间	3	857	286	7.76	<0.01
相互作用	6	1393	232	6.31	<0.01
误差	36	1325	37		
总值	47	16951			

\* 表中各数据源于“Two-way Variance”统计学电脑分析软件

3 讨 论

一般认为人精子的自发性顶体反应是完成获能后的继发现象。Mortimer<sup>[5]</sup>曾报道,自发性顶体反应的高低与培养液中的白蛋白含量密切相关,在低量白蛋白培养液中(约0.3%),15h~24h的自发性顶体反应率为10%

~20%,在高量白蛋白培养液中(约3%),17~24h的反应率可达55%~65%。本实验所采用的白蛋白浓度为0.3%,所观察的新鲜精子自发性顶体反应率相似于多数文献结果。然而,同样条件下,冷冻精子的自发性顶体反应率却显著高于新鲜精子。这说明精子的自发性顶体反应的发生除与精子获能条件有关外,还与精子细胞的低温损伤有关。Barthele-

my<sup>[6]</sup>等曾利用电镜观察到冷冻后的精子普遍出现细胞膜超微结构损伤。Crister<sup>[7]</sup>等报道,精子对低温损伤最敏感的部位是顶体膜。不同于其它动物的精子,目前对人精子顶体情况研究的最大障碍是不能在普通光镜下进行观察,电镜研究耗资费时,且缺乏代表性,所要求的技术条件较高。本研究结果提示应用荧光标记法了解精子顶体反应率的高低变化,很可能成为鉴定冷藏精子复温后损伤程度的一种颇具实际意义的指标<sup>[8]</sup>。

无论是观察自发性顶体反应率还是A23187下诱发性顶体反应率的变化,都显示了精子间存在着明显的不均一性:少部份精子可被A23187立即诱发出顶体反应;另有少部份精子自始至终都保持完整的顶体;大部份精子需要较长的孵育时间或/和较高的A23187浓度。对此,许多学者提出人精子获能过程是否能被“超越”的问题。事实上,获能的机制及其概念至今都尚未完全明了。早在1951年Austin<sup>[9]</sup>通过兔的生殖实验证实刚排出体内的兔精子并不具备受精能力,而在雌性生殖道内获取的精子与卵子同置却使该卵子受精,逐而提出了获能这一概念。然而,随着70年代体外受精技术的出现,人们发现精子无须通过女性生殖道的特定环境,而仅仅在体外经过一定时间的培养后,即可使卵子受精。由此推测所谓精子获能最关键的仍是时间问题,而精子细胞膜在这段时间内的结构改变可能是其实质。Fraser<sup>[10]</sup>曾试图给精子获能重新定义:“精子获能是一种涉及细胞内及表面成份变化的复杂现象,是为精子顶体反应作准备的一个过程”。目前有关获能机制的研究表明,钙离子的内流是获能及顶体反应的重要步骤。若有物质能够在短期内改变精子细胞膜上双层脂类中胆固醇与磷脂的比例,使细胞膜的流动性及通透性增加,钙离子内流达到一定阈值,则触发顶体反应。这时则表现出精子获能过程被“超越”。Stock<sup>[12,11]</sup>等用钙离子通道激动剂lonomycin的实验结果以及Ford<sup>[12]</sup>对金黄地鼠卵子穿透试验的

结果观察都支持“超越”获能的现象,本实验中所观察到的即时顶体反应诱发率也证明人类部份精子确实能“超越”获能过程而出现顶体反应。然而,本文结果表明人精子最大顶体反应诱发率出现在体外6h孵育之后(因冷冻精子的死精量增加,故未进行延长孵育)。这一结果与Byrd<sup>[13]</sup>等人的体外实验结果相似,而这一时间恰是人精子从阴道后穹窿向输卵管壶腹部移行过程所需要时间。

精子的不均一性涉及因素较多。众所周知,精液中的精子并非同一时间由曲细精管产生。因此,尽管是同一份精液,精子的成熟度可以相差较大。这种成熟度的不同表现在细胞膜上对钙离子通透性不一,这种通透性可能与精子获能及顶体反应诱发的时间密切相关。至于其生理意义,已知获能后的精子若未被“去获能”(Decapacitation),可以很快因能量耗竭而死亡,精子的不均一性可以保证在一定时间内不断有受精能力的精子与已经排出的卵子相遇,有效地增加了精-卵结合机会,提高人类的生殖能力。相反,当精子自发性顶体反应率过高时,大量精子在与卵子相遇前,即可能因能量耗竭而死亡,故有可能与男性不育症有关<sup>[14,15]</sup>。有关这方面的探索,将是我们下一步的研究内容。

参 考 文 献

- 1 Garbers DL. Molecular basis of fertilization *Ann Rev Biochem.*1989,58:719
- 2 Stock CE and Fraser LR. Divalent cations, capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Reprod Fert.*1989,87:463
- 3 Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG. The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC (ed. ): "Methods in Mammalian Embryology". San Francisco: Freeman and Co., 1971. 86~116
- 4 Jeyendran RS, Vander Ven, Perez-Pelaez M, et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert.*1984,70:219
- 5 Mortimer D, Curtis EF, Camenzind AR, et al. The spontaneous acrosome reaction of human

- spermatozoa incubated in vitro. *Hum Reprod*, 1989,4:57
- 6 Barthelemy C, Royere D, Hammahah S, et al. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch of Andro*, 1990,25:29
  - 7 Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, et al. Cryopreservation of human spermatozoa I. Effects of holding procedure and seeding on motility fertilizability, and acrosome reaction. *Fertil Steril*, 1987,47:656
  - 8 Topfer-Petersen E. The kinetic of acrosome reaction an additional sperm parameter? *Andrologia*, 1985,17:224
  - 9 Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into themammalian egg. *Aust J Sci Res*, 1951,4:581
  - 10 Fraser IR, Ahuja KK. Metabolic and surface events in fertilization. *Gamete Res*, 1988,20:491
  - 11 Stock CE, Fraser LR. The acrosome reaction in human sperm from men of proven fertility. *Hum Reprod*, 1987,2:109
  - 12 Ford WCL, Ress Jm, Mclaughlin EA, et al. The effect of A23187 concentration and exposure time on the outcome of the hamster egg penetration test. *Inter J Andro*, 1991,14:127
  - 13 Byrd W, Tsu J, Wolf DP. Kinetics of spontaneous and induced acrosomal loss in human sperm incubated under capacitating and noncapacitating condition. *Gamete Res*, 1989,22:109
  - 14 Fenichel P, Ress J, Weiaaenberg. Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1990,55:994
  - 15 Schill WB, Topfer-Peterson E, Heissler E. The sperm acrosome functional and clinical aspects. *Hum Reprod*, 1988,3:139  
(1993-03-11收稿 1993-10-04修回)

## THE RELATIONSHIP BETWEEN ACROSOME REACTION OF HUMAN SPERMATOZOA AND INCUBATION TIME

Ling Ling

(Department of Gynaecology and Obstetrics, Sun Yat-Sen Memorial Hospital  
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou; 510120)

W. C. L. Ford

(Reproductive Unit of Bristol Maternity Hospital)

The report shown the results of both fresh and frozen human spermatozoa which were incubated in different concentration of ionophore A23187 for different period of time. The vitality of the spermatozoa were identified by using the hypo-osmotic method, the acrosomal status were identified by using the fluorescent dye Pisum Sativum Agglutinin (PSA). After analysis the proportion of acrosome reaction under several circumstances, the results suggest that: (a) both fresh and frozen human spermatozoa can be successfully induced acrosome reaction by A23187; (b) A23187 can make the human spermatozoa by-passing the process of capacitation; (c) prolonged the incubation time of spermatozoa in a certain period can enhance the effeci-ent of A23187 and increase the proportion of acrosome reaction; (d) there are obvious heterogeneous characteristics among the human spermatozoa.

**Key words** human spermatozoa; acrosome reaction; A23187; incubation time; capacitation