

冻存对自发性高血压大鼠精子顶体功能的影响

陈荪红*, 王如瑶, 陆欣, 秦石晓, 李建国, 吴明章

(上海第二医科大学组织胚胎学教研室, 上海 200025)

摘要:应用金霉素(CTC)荧光检测、精子穿卵试验和顶体酶 β -D-半乳糖苷酶活力测定等方法检测冻存对大鼠精子顶体的影响。CTC荧光反应显示,与未冻存精子比较,冻存后精子顶体反应的类型发生改变,AR型(发生了顶体反应)精子比例明显下降,冻存前为68.6%,冻存后为13.4%,但是获能精子的比例未发生明显变化(92.6%对90.8%)。与未冻存的精子相比,冻存组精子的穿卵试验的受精指数下降(23.4 ± 7.02 对 10.2 ± 3.95),而且冻存后精子顶体酶—— β -D-半乳糖苷酶活力明显下降(9.39 ± 1.98 对 4.50 ± 1.40)。结果表明冻存后精子的顶体功能受到较明显的破坏。实验结果为今后针对性地改进大鼠精子的冻存方法,改善大鼠精子的冻存保护剂提供实验和机制上的依据。

关键词:精子冻存;顶体反应;自发性高血压大鼠(SHR)

中图分类号: R318.52, R321.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)021-181-04

当温度剧烈变化时,细胞会产生一系列的形态、生理、生化上的变化。当温度从37℃体温降至0℃以下时,会发生细胞内冰晶,这些细胞内冰晶对细胞是致死的。同时从深低温恢复到体温的过程中,细胞也会发生许多物理和生物学上的变化。因此冻存细胞时必须要选择合适的冻存方法和冻存保护剂,以维持细胞活力。精子作为一种特殊的细胞,其形态和结构与体细胞存在很大的差异,这给精子冷冻技术的突破带来了极大的障碍。1949年Polge等^[1]才发现甘油能够部分保护哺乳动物精子免遭冷冻引起的创伤。直至20世纪90年代下半叶才开始有小鼠精子冻存成功的报道^[2],以后有报道采用各种冻存保护剂冻存小鼠精子,但重复性不强。至于大鼠精子的冻存,至今尚无大鼠精子成功冻存的报道。因此了解冻存后大鼠精子结构和功能的变化可以为选择最佳冻存方法和冻存保护剂提供理论依据。

自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rat, SHR)是人类高血压病的模型动物,得到全世界的认同,即所有高血压病的遗传机制等及药品研究的动物指标均须以SHR为准,其他动物资料不能认同。SHR价格昂贵,国外每只SPF级售价为5000法郎。而且随着SHR代系的增加,其高血压特性会发生改变,甚至消失,因此必须采取有效措施,使优良

SHR品系得到维系。而配子和胚胎的冻存是一个既有效又经济的方法。迄今为止,只有一例有关SHR 2-细胞胚胎玻璃化冻存的文献报道^[3],尚没有配子冻存的报道。

我们已研究了大鼠精子经冻存和复苏后细胞膜、细胞核和线粒体鞘的变化(另做描述),本篇报道旨在描述冻存对精子顶体功能的影响。哺乳动物精子顶体覆盖在精子核的前面,它是一个膜包裹的溶酶体样细胞器,位于精子核膜和质膜之间,其中含有很多酶。只有经过顶体反应的精子才能与卵子结合。目前,有关冻存与精子顶体反应之间的关系在人、牛、羊、猪、狗和猴等动物中有研究,发现冻存对这些精子顶体功能的影响主要是对膜结构造成影响,并引起顶体渗漏。有关冻存对大鼠顶体功能的影响未见报道,因此研究冻存对精子顶体的影响对大鼠精子冻存技术的提高有很大的意义。

1 材料与方法

1.1 样本准备

1.1.1 动物的准备 三月龄以上SHR雄鼠20只,由上海第二医科大学动物科学部和中国科学院上海

收稿日期:2003-07-18;修回日期:2004-02-18

上海市科学技术基金资助,基金号为984119041

*通讯作者, E-mail: zpcshong@shsmu.edu.cn

实验动物中心提供。

1.1.2 精子收集 断颈处死大鼠, 室温下取附睾尾部在 PBS 中简单漂洗二次, 去除血细胞, 把附睾尾部放在 1ml 冻存保护液(21.07mmol/L Tes, 9.49mmol/L Tris, 2.22mmol/L 葡萄糖, 25% 卵黄, 0.1% SDS, 5% 甘油)^[4]。37℃ 预热的 35 mm 平皿中, 剪 3 刀, 5% CO₂, 37℃ 中孵育 10min, 使精游出。精子装入麦管, 准备冻存。

1.2 冻存和复苏

1.2.1 精子冻存 利用程序降温仪(Planer 公司 KRYO10)进行程序冷冻, 程序如下: (1) 起始温度为 20℃; (2) 以 1℃/min 速率降至 4℃, 平衡 3min; (3) 以 1℃/min 速率降至 -20℃; (4) 以 10℃/min 速率降至 -80℃; (5) 以 20℃/min 速率降至 -196℃, 平衡 10min; (6) 投入液氮。

1.2.2 精子的复苏 从液氮中取出麦管, 室温中停留 10s, 马上放入 37℃ 水浴, 快速复温, 离心去除冻存保护剂, 然后精子在 PBS(pH7.4, 37℃) 孵育 10~30min, 再进行后续实验。

1.3 精子顶体反应(acrosomal reaction, AR)的测定

1.3.1 顶体反应金霉素检测法^[5] 1.5mmol/L CTC (chlortetracycline, CTC, Sigma C4881)溶液用 CTC 染色缓冲液(130 mmol/L NaCl, 5mmol/L L-cysteine, 20mmol/L Tris, pH7.8)新鲜配制, 低温避光保存。

获能液 T6(含 4mg/ml BSA)在 37℃, 5% CO₂ 中孵育至少 30min, 取新鲜或冻存后复苏大鼠附睾精子在预孵育的获能液中孵育 1h 后, 精子移至获能液 T6(含 16mg/ml BSA)中培养 2h, 调整精子密度至 10⁶~2×10⁶ 个/ml, 备用。

获能的精子用钙离子载体 20μmol/L inomycin (Sigma, I0634)处理 1h 后, 取 50μl 的精子悬液和等体积的 CTC 染色液混合, 30s 后加入 8μl 12.5%(W/V)多聚甲醛[用 PBS(pH7.4)配制], 温和混合。将精子悬液滴到已预热的载玻片上, 涂片, UV 镜检。根据 CTC 染色后精子所发荧光, 精子顶体的反应类型分为三种类型: “F 型”——头部均匀荧光(顶体完整且未获能精子的特征); “B”——顶体后面部分有一无荧光的条带(顶体完整的已获能精子的特征); “AR”——头部无荧光(发生顶体反应精子的特征)。每个样品计数大于 250 个精子, 计算三种反应类型的比例。实验重复 3 次以上。

1.3.2 精子穿卵试验(sperm penetration of zona-free egg assay, SPA) (1) 精子获能同 1.3.1; (2) 对雌

性金黄地鼠进行超数排卵处理。每只金黄地鼠腹腔注射 10IU 的孕马血清(PMSG)48h 后注射 20IU 的绒毛促性腺激素(HCG)。从输卵管中壶腹部获取卵母细胞。将卵母细胞移入透明质酸(300IU/ml, Sigma, H3506)中, 37℃, 5% CO₂, 孵育 10min, 待大部分卵丘细胞散脱后, 卵母细胞经 M₂ 培养液漂洗后移入胰蛋白酶(0.25%)液中消化, 37℃, 5% CO₂, 5 分钟, 去除透明带; (3) 去除透明带的卵移入已获能的精子悬液中, 用石蜡油(Sigma, M8410)覆盖精子悬液。37℃, 5% CO₂ 孵育 2~3h, 观察结果; (4) 吸出卵母细胞, 用 M₂ 培养液洗 3 次, 以除去吸着于卵母细胞表面的精子。将受精卵用 2% 多聚甲醛(含 0.04% Triton X-100)固定 37℃ 1h, 10μg/ml Hoechst33258(Sigma, B2883)染色, 放在载玻片上, 用激光扫描共聚焦显微镜(ZEISS, 德国)观察。卵母细胞浆内出现具有蓝色荧光的精子头部, 提示卵子已被精子穿透(图 1); (5) SPA 结果可用卵子受精率及受精指数表示:

卵子受精率 = 受精卵子数 / 卵子总数

受精指数(fertilization index, FI) = 穿入卵子的精子总数 / 卵子总数

1.3.3 大鼠精子顶体酶 β-D- 半乳糖苷酶活性测定^[6]

(1) 抽提: 精子(1×10⁷ 个/ml)悬浮于含 25 mmol/L 盐酸苯甲脒(生工 0616)的 PBS(pH7.4)中, 600g 离心 10min。去上清, 沉淀重悬在抽提缓冲液中, 含 0.1mmol/L Tris-HCl(pH8.5), 1% TritonX-100(生工 0694), 0.3mmol/L NaCl 和 25 mmol/L 盐酸苯甲脒, 然后用 5mm 探头超声破碎 3 次, 每次 10s。120000g 离心 20min, 取沉淀。上述步骤重复两次。离心后的抽提物透析过夜。透析液含 10mmol/L Tris (pH7.5), 0.15mmol/L NaCl 和 25 mmol/L 盐酸苯甲脒。所有步骤在冰浴中进行。(2) 测定: 把 5 mmol/L p- 硝基苯酚-β-D- 半乳糖苷底物(Sigma, N1252)加入 10 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH3.5)(含 0.2% Triton X-100)中, 加入抽提样品(50μl), 总体积为 0.5 ml。37℃ 中孵育 4h 后, 用 1 ml 碳酸钠(0.1mol/L)终止反应。10min 后 410nm 分光光度计测定活性。精子分别来自 6 只 SHR 大鼠。

1.4 数据统计

采用 SASS 统计软件包分析(配对 t 检验)。

2 结果

2.1 CTC 荧光检测精子顶体反应

表1 冻存精子和未冻存精子顶体反应类型比较

	未冻存精子	冻存精子
F(%)	7.2±3.63	9.2±4.087
B(%)	24.0±9.72	77.4±6.348
AR(%)	68.6±11.928	13.4±3.36

“F”:头部均匀荧光(顶体完整且未获能精子的特征)。“B”:顶体后面部分有一无荧光的条带(顶体完整的已获能精子的特征)。“AR”:头部无荧光(发生顶体反应精子的特征)。

表2 冻存前后精子穿卵试验比较

	未冻存精子	冻存精子
卵子受精数(%)	100	100
受精指数(精子数)	23.4±7.02	10.2±3.95

$P=0.023$ 。

表3 精子 β -D-半乳糖苷酶活力比较

	冻存前	冻存后
SHR	9.39±1.98	4.50±1.40

$P < 0.01$ 。

从表1可知,经过CTC染色后,冻存前的精子的顶体反应类型,主要是AR型,占68.6%,但是冻存后精子顶体反应的类型明显下降,降至13.4%,B型却激增至77.4%,说明冻存对顶体反应的类型是有影响的,但是对获能却影响不大(所有B型和AR型精子均为已获能的精子,所以冻存后仍然有90.8%的精子获能),与未冻存精子的获能率94.6%相差不大。

2.2 精子穿卵试验

激光扫描共聚焦显微镜下扫描观察未冻存精子和冻存精子的穿卵情况(见图1A, B)。从表2中可知,尽管冷冻后精子的卵子受精率仍然是100%,但是冻存前后的受精指数分别为 23.4 ± 7.02 和 10.2 ± 3.95 , $P=0.0233$ 。 $0.01 < P < 0.05$,冻存前后差值有统计学意义,说明冻存后受精指数下降。

2.3 大鼠精子 β -D-半乳糖苷酶活力测定

采用分光光度法测定冻存对SHR精子的顶体酶 β -D-半乳糖苷酶活力的影响,结果显示冻存后该酶活力有明显下降(表3)。

3 讨论

哺乳动物精子的顶体是位于精子头部的一种大型分泌颗粒状细胞器,覆盖在精子质膜的内。精子只有经过获能、顶体反应,才能穿入卵母细胞透明带与其融合,完成受精。获能的精子穿过卵丘细胞外基质时被激活引发顶体反应,将顶体内的多种蛋白质水解酶和磷酸酯酶释放出来,溶解放射冠及透

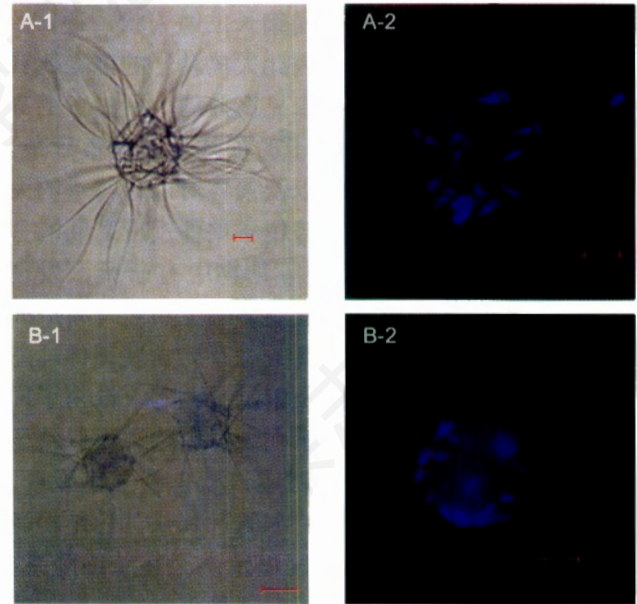


图1 精子穿卵试验

(A)未冻存SHR精子穿透去透明带卵母细胞试验(A-1,白光;A-2, Hoechst 紫色荧光显示精子头部)。(B)冻存后SHR精子穿透去透明带卵母细胞试验(B-1,白光;B-2, Hoechst 紫色荧光显示精子头部)。Bar, 20 μ m。

明带。因此,检测精子是否发生顶体反应,有助于预示精子的受精能力。本研究中,我们通过比较精子冻存前后的顶体反应类型、穿卵能力以及顶体酶活力的变化说明冻存对大鼠精子顶体的影响。

CTC是一种抗菌素。可根据精子不同的获能和AR阶段或精子表面差异进行染色。因而可客观而定量地评价哺乳动物获能和顶体反应。CTC可与精子质膜上带阴离子多肽相结合。顶体反应发生后,该阴离子多肽消失,精子即丧失与CTC的结合能力。在我们的实验中,冻存后发生顶体反应的精子数目明显下降,但是冻存对获能的精子数目影响不大,说明冷冻对精子质膜上的多肽没有影响。

精子穿卵试验首先由Yanagamashi等人于1976年报道,它是测定精子获能、顶体反应精子卵膜融合能力以及精子核解聚能力的经典方法,冻存后受精指数下降也说明精子的顶体反应能力下降。

β -D-半乳糖苷酶(EC3.2.1.23)是顶体内的一种水解酶类,它能够从糖蛋白和糖脂中分解半乳糖。Nizolajczyk等人^[7]报道兔子精子的顶体中存在 β -D-半乳糖苷酶,并在精子和透明带的结合中起作用。Skudlarek等人^[8]证实在大鼠精子顶体中存在 β -D-半乳糖苷酶。我们比较了未冻存大鼠精子和冷冻后大鼠精子的 β -D-半乳糖苷酶活力,发现冷冻对顶体酶有破坏作用。

由于大鼠精子的头部呈细长的镰刀状,顶体狭窄细小,而且鞭毛很长,因此大鼠精子的冻存比其他啮齿动物更困难,至今未见高效的大鼠精子的冻存方法和冻存保护剂。精子的顶体反应非常复杂,它涉及到顶体膜、顶体酶以及顶体对能量需求的突然变化。目前,有关冻存与精子顶体反应之间的关系在人、牛、猪、狗和猴等动物中有研究,发现冻存对它们的精子顶体功能的影响主要是对膜造成影响,并引起顶体渗漏。有关冻存对大鼠顶体功能的影响未见报道,我们的实验结果证实大鼠精子顶体功能对冻存很敏感,提示在选择和改善大鼠精子的冻存步骤和冻存保护剂时应该考虑到上述因素。由于精子是一种高度特化的细胞,其头部的结构排列紧凑致密,在极小的空间里依次存在着细胞膜、顶体外膜、顶体内膜和核膜,各种膜之间的缝隙非常狭窄,因此,在冻存精子的过程中,精子要经历两次大幅度的体积变化和快速恢复的过程,导致因冻存引起的不同生物膜之间的各种程度的融合,从而造成精子顶体的结构、成分和功能上的变化。因此我们设想在冻存过程中维持生物膜流动性(比如在冻存保护剂中加入胆固醇类物质)的同时避免细胞体积的剧烈变化(改善冻存程序,在保证细胞

活力的同时,降低降温速率),将有助于对精子顶体的保护。

参考文献

- [1] POLGE C, SMITH A U, PARKES A S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature [J]. *Nature*, 1949, **164**: 666 — 668.
- [2] SONGSASEN N, LEIBO S P. Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology*, 1997, **35**: 240 — 254.
- [3] SATO M, YOKOKAWA K, KASAI K, *et al.* Successful vitrification of stroke-prone spontaneously hypertensive and normal Wistar rat 2-cell embryos. *Lab Anim*, 1996, **30**: 132 — 137.
- [4] PENFOLD L M, MOORE H D. A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1993, **99**: 131 — 134.
- [5] FRASER L R, HEROD J E. Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate. *J Reprod Fertil*, 1990, **89**: 611 — 621.
- [6] SKUDLAREK M D, ABOU-HAILA A, TULSIANI D R. Rat spermatogenic cell β -D-galactosidase: characterization, biosynthesis, and immunolocalization. *Exp Cell Res*, 2000, **261**: 139 — 149.
- [7] NIKOLAJCZYK B S, O'RAND M G. Characterization of rabbit testis β -D-galactosidase and arylsulfatase A: purification and localization in spermatozoa during the acrosome reaction. *Biol Reprod*, 1992, **46**: 366 — 378.

The Effect of Cryopreservation on the Acrosome of the Spermatozoas from SHR

CHEN Sun Hong*, WANG Ru Yao, LU Xin, QIN Shi Xiao, LI Jian Guo, WU Ming Zhang

(Department of Histology and Embryology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

Abstract: With the best cryopreservation protocol and the cryoprotectant for rat spermatozoas we could found, the effect of cryopreservation on the acrosome of the spermatozoas from SHR were studied. The effect of cryopreservation on the acrosomal reaction of SHR spermatozoa is determined by the ways such as chlortetracycline (CTC) staining, sperm penetration of zona-free egg assay, and β -D-galactosidase activity analysis. The acrosomal reaction rate of frozen rat spermatozoas (13.4%) was significantly lower than that of unfrozen (68.6%). Compared to the spermatozoas unfrozen, the fertility index of frozen spermatozoas was significantly reduced (23.4 ± 7.02 and 10.2 ± 3.95 , respectively); as well as that of β -D-galactosidase activity (9.39 ± 1.98 and 4.50 ± 1.40 , respectively). The present results indicated that cryopreservation impaired the acrosome of rat spermatozoas.

Key words: spermatozoa cryopreservation; acrosomal reaction; spontaneous hypertension rat (SHR)

The research was supported by Shanghai Scientific and Technological Fund (No. 984119041)

*Corresponding author, E-mail: zpcshong@shsmu.edu.cn