

## 精子顶体反应及其临床应用价值的研究进展

郭小桥 余波澜 刘见桥 孙筱放

哺乳动物的顶体是一个膜包裹的溶酶体样细胞器,位于精子核膜与质膜之间,是一个膜结合的帽状结构,其内含多种酶。顶体反应(acrosome reaction, AR)是精子与卵透明带(zona pellucida, ZP)结合之后,精子的顶体破裂,释放一系列的顶体酶的过程。受精是精子与卵子融合,精子将所携带的单倍体遗传物质与卵子的单倍体遗传物质相融合形成双倍体合子的过程<sup>[1]</sup>。这是一个非常复杂和严格有序的生理过程,不同种类动物,其受精方式及过程有所不同。人类受精过程包括:(1)精子获能;(2)精子与卵丘细胞之间的相互作用;(3)精子活动力的改变如超活化;(4)精子与透明带结合、透明带诱发精子顶体反应;(5)精子顶体酶激活;(6)精子穿入透明带;(7)精卵质膜融合;(8)卵子激活;(9)精子染色质解凝;(10)精卵核融合<sup>[2]</sup>。AR发生的主要部位是卵丘颗粒细胞间隙及透明带,顶体反应通常是在卵丘细胞团的间隙中启动,在精子穿入ZP时,AR发生的程度更大,速度更快,能使卵子受精的精子,很可能是在卵丘细胞间隙就发生AR的精子<sup>[3]</sup>。

顶体酶的释放使精子得以穿过ZP与卵子结合,是受精的前提。目前主要根据WHO标准评估精子的质量,这是一种描述性的方法,强调射出精子的总数,活动力及形态。按照这个标准,男性生育力是由大于一定数量的活动精子及正常形态精子决定。但是临床上存在不少不育患者精液分析提示正常,但不能使正常育龄女性受孕的情况。这些患者的精子功能可能存在异常。目前精子的功能检测包括检测精子DNA碎片、活性氧检测、精子与透明带相互作用、顶体反应、精子染色体非整倍性的检测<sup>[4]</sup>。这些功能检测可用于预测人类精子在体内外的受精能力。通过检测在体外诱发精子顶体反应率的情况可预测体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)结局,为临床男性因素不孕的夫妇选择合适的辅助生殖治疗提供帮助。

### 一、顶体反应的原理和机制

精子顶体是高尔基体衍生而来的帽状细胞器,覆盖在精子核的前2/3区。顶体反应涉及精子质膜与顶体外膜的融合,导致顶体内容物的释放,精子前头部顶体内膜的暴露。在体内,诱发顶体反应的生理性物质有透明带糖蛋白、黄体酮、卵泡液、透明质酸酶等。在体外可用药理学物质诱发顶体反应,这些物质诱发顶体反应所涉及的作用位点及作用机制见表1<sup>[5]</sup>。

尽管可以诱发精子顶体反应的物质很多,但是研究比较多的是透明带糖蛋白、黄体酮、卵泡液、 $\gamma$ -氨基丁胺、钙离子载体A23187。

#### 1. 透明带糖蛋白诱发人类精子顶体反应:哺乳动物受精时,

分子	作用位点	作用机制
A23187	质膜	钙离子载体
PAF	质膜	
GABA	GABA <sub>A</sub> R	GABA <sub>A</sub> 受体激动剂
甘露糖化胎牛血清	质膜	精子受体激动剂?
双丁酰环磷酸腺苷(cAMP类似物)	PKA	PKA刺激因子
福司柯林	AC	AC刺激因子
己酮可可碱	PDE	PDE抑制因子
1-oleoyl-2-acetyl-glycerol(DAG类似物)	PKC	PKC刺激因子
佛波醇二酯(PMA, TPA)	PKC	PKC刺激因子
毒胡萝卜素内酯	质膜	Ca <sup>2+</sup> -ATP酶-泵阻滞剂

注:A23187是一种钙离子载体;PAF:血小板活化因子;AC:腺苷酸环化酶;PKC:蛋白激酶c;PDE:磷酸二酯酶;PMA:血小板活化因子;TPA:12-十四酰佛波醇-13-乙酸;cAMP:环磷酸腺苷;GABA: $\gamma$ -氨基丁胺;DAG:甘油二酯

透明带环绕卵母细胞,负责将精子结合到卵母细胞上并诱发结合在透明带上的精子发生顶体反应。顶体反应对精子穿过透明带至关重要。在人类,ZP由4种糖蛋白组成,分别是ZP1、ZP2、ZP3、ZP4,其中只有ZP1、ZP3、ZP4参与诱发顶体反应<sup>[6]</sup>。ZP3被认为是最主要的受体,ZP3诱发的顶体反应涉及G蛋白,但是ZP1/4诱发的顶体反应则不涉及G蛋白,但ZP2不能诱发顶体反应,主要与发生了顶体反应的精子结合,可能作为第二受体<sup>[7]</sup>。

精子质膜上存在2种不同受体介导的信号通路负责ZP诱导的顶体反应。一个是G<sub>i</sub>蛋白偶联受体,激活磷脂酶C(PLC) $\beta$ 1介导的信号通路;另一个是酪氨酸激酶(TK)受体,与PLC $\gamma$ 偶联。ZP结合G<sub>i</sub>蛋白偶联受体可调节腺苷酸环化酶(AC),导致cAMP的升高和PKA的激活,PKA使特定蛋白磷酸化及激活下游作用蛋白通路。受体与配体结合同时也激活精子质膜上的L型及T型钙离子通道及钠/氢交换体,导致胞质内钙离子呈级联放大效应。PLC $\beta$ 1和PLC $\gamma$ 的激活,水解PIP<sub>2</sub>,产生DAG和IP<sub>3</sub>,DAG可能导致PKC迁移到精子质膜及其激活,IP<sub>3</sub>使细胞内钙储存的Ca<sup>2+</sup>释放。细胞储存的钙离子的消耗激活质膜上电压依赖的钙离子通道,释放大量的钙离子,诱发精子顶体外膜与质膜融合及顶体内容物的释放,即顶体反应<sup>[8]</sup>。

2. 黄体酮诱发顶体反应:黄体酮被认为是精子顶体反应的另外一个天然诱发剂,主要由卵丘颗粒细胞分泌,存在于卵泡液及女性生殖道输卵管液中,能诱导获能的人类精子发生生理性顶体反应。在受精过程中,卵丘颗粒细胞分泌的黄体酮对精子有趋化作用,使精子向卵子方向游动,且能使提供精子活动力及诱发精子顶体反应率<sup>[9]</sup>。黄体酮诱发的顶体反应有时间依赖性及其剂量依赖性的特点。低浓度的黄体酮可快速激活钙离子内流,激活激酶活性剂酪氨酸磷酸化,改变精子尾部的摆动方式,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.12.037

基金项目:国家自然科学基金(31171229);NSFC-广东联合基金(U1132005)

作者单位:510150 广州医学院第三附属医院广东省普通高校生殖与遗传重点实验室

通讯作者:孙筱放,Email:xiaofangsun@hotmail.com

向颗粒细胞方向趋向运动,提高精子活动力,但不能诱发精子顶体反应<sup>[10-11]</sup>。只有高浓度的黄体酮才能使精子活动力超活化及诱发精子顶体反应,当黄体酮浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,与精子样本一起孵育 60 min 时,其诱发的顶体反应率可达到最大值<sup>[12]</sup>。最近研究提示人精子对于黄体酮的作用十分敏感,纳摩尔浓度水平的黄体酮就可通过激活 CatSper 钙离子通道来增加细胞内钙离子浓度<sup>[13-14]</sup>。

高、低浓度的黄体酮都通过激活 T 型电压门控的钙离子通路及 CatSper 通道,使精子细胞内钙离子浓度迅速增加,通过下游通路诱发顶体反应,这是黄体酮介导精子功能的主要机制<sup>[15]</sup>。目前研究比较多的是黄体酮诱发 AR 时激活精子特异的 CatSper  $\text{Ca}^{2+}$  通道,导致一种短暂的快速钙离子电流及随后的缓慢的持续的钙离子电流的双极信号,其通路下游可能涉及 cAMP、cGMP、PKA、PKG,细胞内储存的钙离子的释放,最终发生顶体反应<sup>[14]</sup>。

3. 钙离子载体 A23187 诱发顶体反应:钙离子载体 A23187 与钙离子形成脂溶性复合物,导致钙离子快速通过精子质膜而内流,钙离子内流可导致精子质膜与顶体外膜的融合,发生顶体反应<sup>[16]</sup>。钙离子载体诱发 AR 的能力可能不代表精子发生生理性 AR 的能力,钙离子载体 A23187 诱发 AR 主要涉及钙离子内流的化学作用,而生理性 AR (用 ZP 诱发) 与用其他诱发剂包括钙离子载体,甚至黄体酮诱发的 AR 的机制明显不同。钙离子载体诱发 AR 实验可以检测钙离子内流缺陷的患者,但不能检测 ZP 诱发 AR 异常的患者。

4. 卵泡液对顶体反应的作用:人输卵管中的卵泡液(主要有效成分是黄体酮)能促使获能的精子细胞外的钙离子内流,诱发顶体反应。卵泡液刺激精子顶体反应呈剂量依赖性:当卵泡液浓度为 30% 时,其诱发精子顶体反应率达峰值,且其机制涉及 GABA 受体通路<sup>[17]</sup>。部分免疫性不孕患者中其卵泡液中所含的抗精子抗体能使精子发生顶体反应,但是同时也抑制精子结合 ZP 的能力,这个作用可能是通过直接结合 ZP 受体实现的<sup>[18]</sup>。有报道人输卵管中的卵泡液可降低含  $\alpha$ -D-甘露醇受体的精子数,从而降低精子结合 ZP 的能力,从而降低多精受精的机会<sup>[19]</sup>。

5.  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)对顶体反应的作用:GABA 是中枢神经系统及外周神经系统的重要神经递质。在中枢神经中,GABA 作为抑制性信号的主要调节物。目前主要发现 2 个 GABA 受体,分别为 A、B 受体。但 GABA 不仅仅存在于神经系统。Arthur Aanesen 等学者用放射性同位素标记法证明精子表面存在特异性 GABA 结合位点,由此可推测可能存在 GABA 转导蛋白。GABA 可通过激活精子质膜表面受体使人精子细胞外的钙离子内流而诱发顶体反应,GABA 诱发人精子顶体反应有剂量依赖性,且呈双向性,当 GABA 浓度在 0 到 1.25 ~ 2.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  之间时随着 GABA 剂量增加,AR 率增加,达峰值后再增加 GABA 的量时,AR 率反而下降,这可能是由于其受体饱和所致<sup>[20]</sup>。

## 二、获能

获能是精子识别 ZP,发生顶体反应,使卵子受精的前提条件,包括多种生理及生化的改变。获能及 AR 是受精的重要过程,是精子结合及穿透 ZP 及随后与卵子质膜融合所必需的。在哺乳动物受精过程中,获能的精子穿入卵丘细胞,与 ZP 结合,ZP 诱发精子顶体反应,精子穿入 ZP 与卵子质膜结合<sup>[21]</sup>。获能后精子活动力的改变,即超活化,使精子可以从输卵管上皮细胞向前移动,为精子穿透 ZP 提供动力。

获能时精子质膜的胆固醇外流,质膜上的  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  转运体和 CatSper 钙离子通道开放, $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{Ca}^{2+}$  迅速进入细胞内,激活非典型的腺苷环化酶 SACY,激活 PKA,使得其下游底物磷酸化;快速过程使精子开始运动;慢速过程激活了蛋白酪氨酸酶、精子超活化,同时也为精子发生顶体反应做准备<sup>[22-24]</sup>。质膜中的胆固醇外流启动了获能,增加精子质膜的渗透性及流动性,引起钙离子内流及级联反应,精子获能,获能的精子与 ZP 结合后,精子细胞内的钙离子进一步升高,质膜及顶体外膜的钙离子通道开始新的级联反应,精子发生顶体反应<sup>[25]</sup>。

## 三、顶体反应与精子的功能

目前临床采用精液分析检测评估男性生育力的潜能,常规精液分析检查提示精液正常的样本并不能反映精子的功能也正常,且精液分析检测提示精子质量差的男性仍可以使女方受孕<sup>[26]</sup>。一些研究提出决定受精的因素并不全在于精子的数量、形态,更重要的因素是精子的功能<sup>[27]</sup>。因此,精子功能的检测对于评估男性生育力备受关注。

受精过程是来自父母双方的原核融合形成新的个体的过程,包括以下几个步骤:(1)精子穿入卵丘;(2)精子与透明带相互作用;(3)精子-卵子膜融合;(4)卵子激活;(5)精子细胞核染色体的解凝及原核形成;(6)母源性和父源性原核发育及转移到卵母细胞中心;(7)在第一次有丝分裂的纺锤体轴线上发生双原核融合<sup>[28]</sup>。在受精过程中,精子必须完成顶体反应,释放顶体细胞溶解酶,使得精子在穿入透明带过程中产生一条轨道,协助精子穿入透明带与卵子结合<sup>[3]</sup>。因此,顶体反应是精子的重要功能之一。若精子在与透明带结合前发生自发性顶体反应,精子就失去了受精能力,自发性顶体反应率大于 10% 提示精子质量差<sup>[29]</sup>。

## 四、顶体反应率在预测体外受精结局的临床应用研究

顶体反应是精子的重要功能之一,在精子穿过透明带与卵膜结合过程中发挥重要作用,但是目前研究对精子顶体反应率的临床应用价值尚存在争议。早期研究提出钙离子载体诱发 AR 与受精率明显相关,但是在正常形态 > 15% 亚组中,这种相关是弱的,而在正常形态 < 15% (平均 9.1%,范围 0 ~ 14%) 亚组,相关性更显著<sup>[16]</sup>。日本学者 Katsuki 等<sup>[30]</sup> 提出钙离子载体诱发精子顶体反应是不同于精液分析的另一种可为不孕不育患者选择适当 ART 方案的一种指引方法,预测体外受精中完全不受精、体外受精妊娠率的 AR 阈值分别是 21% 和 26%。香港学者 Makkar 等<sup>[31]</sup> 提出钙离子载体诱发的顶体反应率比传统的精子参数及精子速度更能预测控制性超排卵及宫腔内注射人工授精的妊娠结局。

Esterhuizen 等<sup>[32]</sup> 用 ZP 在体外诱发精子顶体反应,发现精子顶体反应率与体外受精受精率呈明显正相关, $r = 0.95$ , $P < 0.01$ ,行 ROC 曲线得出 ZP 诱发的顶体反应率 > 15% 是预测体外受精受精率的阈值,当顶体反应率 > 15% 时,体外受精受精率为 79%,敏感度及特异度分别为 93%,100%。ZP 在体外诱发的顶体反应异常的患者其体外受精受精率低,甚至出现不受精,但改用卵子胞浆内单精子注射治疗,其受精率高,建议这些患者选用卵子胞浆内单精子注射治疗<sup>[33]</sup>。

## 五、前景与展望

精子与卵子透明带结合,穿过透明带与卵膜结合,发生受精前必须先进行顶体反应,只有发生了顶体反应的高活动力精子才能成功使卵子受精。因此评估精子顶体反应能力可能可以预测体外受精的结局,对于顶体反应率明显低下的患者可选择卵

子胞浆内单精子注射的辅助生殖技术,因这一技术可以绕过精子与卵子相互作用的许多过程,直接将精子注入卵子胞质内,受精率高,特别为常规精液分析正常但顶体反应明显低下的反复体内受精失败的患者提供了指导。此外,研究精子顶体反应也为发展男性避孕药物提供了方向。

### 参 考 文 献

- [1] 李媛. 人类辅助生殖技术. 北京: 科学出版社, 2008.
- [2] Abu DA, Franken DR, Hoffman B, et al. Sequential analysis of sperm functional aspects involved in fertilisation; a pilot study. *Andrologia*, 2012, 44:175-181.
- [3] Bedford JM. Site of the mammalian sperm physiological acrosome reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108:4703-4704.
- [4] Lamb DJ. Semen analysis in 21st century medicine: the need for sperm function testing. *Asian J Androl*, 2010, 12:64-70.
- [5] Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell*, 2000, 92:255-266.
- [6] Bhandari B, Bansal P, Talwar P, et al. Delineation of downstream signalling components during acrosome reaction mediated by heat solubilized human zona pellucida. *Reprod Biol Endocrinol*, 2010, 8:7.
- [7] Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, et al. Mammalian zona pellucida glycoproteins; structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res*, 2012, 349:665-678.
- [8] Gupta SK, Bhandari B. Acrosome reaction: relevance of zonapellucida glycoproteins. *Asian J Androl*, 2011, 13:97-105.
- [9] Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky A, et al. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum Reprod*, 2008, 23:2339-2345.
- [10] Teves ME, Guidobaldi HA, Uñates DR, et al. Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One*, 2009, 4:e8211.
- [11] Blengini CS, Teves ME, Uñates DR, et al. Human sperm pattern of movement during chemotactic re-orientation towards a progesterone source. *Asian J Androl*, 2011, 13:769-773.
- [12] Sagare-Patil V, Galvankar M, Satiya M, et al. Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Int J Androl*, 2012, 35:633-644.
- [13] Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y. Progesterone activates the principal  $Ca^{2+}$  channel of human sperm. *Nature*, 2011, 471:387-391.
- [14] Strünker T, Goodwin N, Brenker C, et al. The CatSper channel mediates progesterone-induced  $Ca^{2+}$  influx in human sperm. *Nature*, 2011, 471:382-386.
- [15] Publicover SJ, Goyalas LC, Teves ME, et al.  $Ca^{2+}$  signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front Biosci*, 2008, 13:5623-5637.
- [16] Liu DY, Baker HW. Calcium ionophore-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen. *Hum Reprod*, 1998, 13:905-910.
- [17] Burrello N, Vicari E, D'Amico L, et al. Human follicular fluid stimulates the sperm acrosome reaction by interacting with the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors. *Fertil Steril*, 2004, 82:1086-1090.
- [18] Marín-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Gonzalez-Echeverría F, et al. Effect of Antisperm Antibodies Present in Human Follicular Fluid upon the Acrosome Reaction and Sperm-Zonapellucida Interaction. *Am J Reprod Immunol*, 2003, 50:209-219.
- [19] Munuce MJ, Caille AM, Botti G, et al. Modulation of human sperm function by follicular fluid. *Andrologia*, 2004, 36:395-401.
- [20] Shi QX, Yuan YY, Roldan ER.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3:677-683.
- [21] Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, et al. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol*, 2008, 52:463-472.
- [22] Signorelli J, Diaz ES, Morales P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res*, 2012, 349:765-782.
- [23] Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol*, 2008, 52:503-510.
- [24] Visconti PE. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106:667-668.
- [25] Abou-haila A, Tulsiani DR. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 485:72-81.
- [26] Agarwal A, Bragais FM, Sabanegh E. Assessing sperm function. *Urol Clin North Am*, 2008, 35:157-171.
- [27] Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl*, 2006, 29:69-75.
- [28] Nixon B, Aitken RJ, McLaughlin EA. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64:1805-1823.
- [29] Wisner A, Sachar S, Ghetler Y, et al. Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: Preliminary results. *Andrologia*, 2013 Jan 28.
- [30] Katsuki T, Hara T, Ueda K, et al. Prediction of outcomes of assisted reproduction treatment using the calcium ionophore-induced acrosome reaction. *Hum Reprod*, 2005, 20:469-475.
- [31] Makkar G, Ng EH, Yeung WS, et al. The significance of the ionophore-challenged acrosome reaction in the prediction of successful outcome of controlled ovarian stimulation and intrauterine insemination. *Hum Reprod*, 2003, 18:534-539.
- [32] Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JG, et al. Clinical importance of zona pellucida-induced acrosome reaction and its predictive value for IVF. *Hum Reprod*, 2001, 16:138-144.
- [33] Liu DY, Baker HW. Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertil Steril*, 2003, 79:74-80.

(收稿日期:2013-02-26)

(本文编辑: 戚红丹)