

泌尿系疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002339

线粒体活性对人类精子活动力的影响

张友旺¹, 潘龙瑞¹, 刘俊², 马开槐³, 张特⁴, 谭艳⁵

(1. 湖北医药学院基础医学院机能实验室, 十堰 442000; 2. 武汉大学附属同仁医院血管、小儿及胃肠(Ⅱ)外科, 武汉 430073; 3. 湖北医药学院基础医学院, 十堰 442000; 4. 湖北医药学院生物医药研究院, 十堰 442000; 5. 湖北医药学院附属人民医院男科, 十堰 442000)

【摘要】目的:分析线粒体活性对人类精子活动力的影响。**方法:**以线粒体特异性荧光染料——mitotracker deep red 633(MTDR)对不同活力的精子进行染色,然后用流式细胞术测定精子线粒体活性(即 MTDR 荧光强度值)。用雷帕霉素(rapamycin, RP)和羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)调控精子活性水平,测定精子活动力的变化。**结果:**MTDR 荧光强度值与前向运动速率(progressive motility, PR)不相关($r=0.182, P=0.268$)。5 nmol/L 和 100 nmol/L 的 RP 均可明显降低线粒体活性,50 $\mu\text{mol/L}$ HCQ 可明显提高线粒体活性($P<0.05$),但它们对精子活动力影响都不明显($P>0.05$)。**结论:**线粒体活性对人类精子活力影响不明显。

【关键词】mitotracker deep red 633; 线粒体; 精子; 活动力

【中图分类号】R698^{+.2}

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-05-03

Effects of mitochondrial activity on human spermatozoa motility

Zhang Youwang¹, Pan Longrui¹, Liu Jun², Ma Kaihuai³, Zhang Te⁴, Tan Yan⁵

(1. Lab of Medical Functions, School of Basic Medical Science, Hubei University of Medicine;
2. Blood vessels, Pediatric and Gastrointestinal(Ⅱ) Surgery, Tongren Hospital of Wuhan University;
3. School of Basic Medical Science, Hubei University of Medicine;
4. Biomedical Research Institute of Hubei University of Medicine;
5. Department of Andrology, Renmin Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine)

【Abstract】Objective: To analyze effects of mitochondrial activity on human spermatozoa motility. **Methods:** Mitochondrial specific fluorescent dye, mitotracker deep red 633(MTDR), was used to stain sperms with different motility. And the flow cytometry was used to determine the activity of sperm mitochondria(that is, value of MTDR fluorescence intensity). Rapamycin(RP) and hydroxychloroquine(HCQ) were used to regulate the mitochondrial activity, and then measure the change of sperm motility. **Results:** MTDR fluorescence intensity value was not correlated with spermatozoa progressive motility (PR) rate ($r=0.182, P=0.268$). RP of 5 nmol/L or 100 nmol/L was able to significantly decrease the mitochondrial activity, and HCQ of 50 $\mu\text{mol/L}$ was able to significantly increase the mitochondrial activity ($P<0.05$). However, those above concentrations had no obvious effect on sperm motility ($P>0.05$). **Conclusion:** There is no obvious effect of mitochondrial activity on human sperm motility.

【Key words】mitotracker deep red 633; mitochondria; spermatozoa; motility

弱精子症是引起男性不育症的重要因素。精子活动需要三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)提供能量。通常认为,线粒体的主要功能是为精子运

动提供 ATP,线粒体中丰富的脂肪和磷脂可维持膜的稳定性,还可作为能量来源。线粒体数量减少或呼吸酶链缺陷均可导致精子活力下降^[1]。

然而,精子运动所需的 ATP 主要来源于线粒体的氧化磷酸化还是精子尾部细胞质中的糖酵解,目前争议较大^[2]。Mitotracker deep red 633(MTDR)是一种细胞渗透型的远红外红色荧光探针,包含标记线粒体的弱巯基反应性氯甲基官能团,只需简单孵

作者介绍:张友旺, Email: zyw19870604@126.com,

研究方向:男性不育相关研究。

通信作者:谭艳, Email: 2659754897@qq.com。

基金项目:湖北医药学院人才启动金资助项目(编号:2017QDJZR21)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20191104.1709.004.html>

(2019-11-05)

育细胞,即可被动运输穿过细胞膜并聚集于活性线粒体^[3]。MTDR 荧光强度值可反映线粒体数量及线粒体膜电势^[3],与线粒体活性相关^[4]。因而 MTDR 已被用于线粒体活性的检测^[4-6]。本研究通过分析人类精子线粒体活性与其活动力的关系,以期对弱精子症的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 精液样本

本研究的人类精液样本取自十堰市人民医院,纳入标准:年龄 25~40 岁;医学史和临床检查确定其身体状况良好。本研究经湖北医药学院附属人民医院伦理委员会同意。手淫法收集样本到无菌塑料罐中,于 37 °C 孵育 1 h 后,根据 WHO《人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版进行精液常规分析。按照精子前向运动速率(progressive motility, PR)百分比将其分为 4 个等级:正常组($PR \geq 32\%$)、轻度弱精子组($20\% \leq PR < 32\%$)、中度弱精子组($10\% \leq PR < 20\%$)和重度弱精子组($PR < 10\%$)。

1.2 试剂

线粒体特异性染料 MTDR (美国 Invitrogen 公司, M-22426), BWB 精子培养液(上海生工生物科技公司),羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ, Selleck 公司),雷帕霉素(rapamycin, RP, 上海爱必信生物科技有限公司)。

1.3 线粒体活性测定

1.3.1 MTDR 储备液的配制 用细胞培养级无水二甲基亚砜将 MTDR 溶解至终浓度 1 mmol/L。

1.3.2 MTDR 工作液的配制 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, 0.01 mol/L, pH7.4)将 MTDR 储存液稀释成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的工作液。

1.3.3 染色及检测 精液标本液化后(37 °C, 1 h),用 37 °C 的 PBS 洗涤 2 次,离心(1 200 g, 5 min)去除精浆。用 37 °C 预热的 MTDR 工作液轻轻重悬细胞,并调整精子密度为 2.5×10^6 个/mL,置于 37 °C 温箱中避光孵育 20 min。染色结束后离心(1200 g, 5 min)去除 MTDR 工作液,用 PBS 洗涤细胞 1 次,然后用 PBS 重悬, CytoFlex 流式细胞仪测定 MTDR 荧光强度值。每份精子悬液标本获取 20 000 个有效细胞。

1.4 精子线粒体活性调控

精液标本液化后(37 °C, 1 h)摇匀,从中取 12 小份加入 EP 管中,每管加 200 μL 。实验分组如下:对照组(CK),向其中 3 份 EP 管中分别加入等量 BWB 培养基,混匀;低浓度 RP 组(RP-5 nmol/L),向其中 3 份 EP 管中加入等量含 10 nmol/L RP 的 BWB 培养基,混匀;高浓度 RP 组(RP-100 nmol/L),向其中 3 份 EP 管中加入等量含 200 nmol/L RP 的 BWB 培养基,混匀;HCQ 组(HCQ-50 $\mu\text{mol/L}$),向其中 3 份 EP 管中

加入等量含 100 $\mu\text{mol/L}$ HCQ 的 BWB 培养基,混匀。37 °C 温箱孵育 2 h 后进行线粒体活性及精子活力测定。

1.5 精子活力测定

取 2 μL 精液至精子计数池中,用 SCA 计算机辅助精子分析系统分析精子运动参数:快速前向运动(a 级)、慢速前向运动(b 级)、非前向运动(c 级)和极慢或不动(d 级)精子的百分比。

1.6 统计学处理

CytExpert 软件获取和分析 MTDR 荧光强度值。数据采用 Microsoft Excel 2010 进行处理和制图。采用 SPSS 19.0 软件进行相关性和明显性分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用独立样本 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。精子 PR 百分比=快速前向运动(a 级)+慢速前向运动(b 级)^[7]。

2 结果

2.1 线粒体自噬水平的测定

本实验采取 39 例人类精液样本,测定其线粒体活性(MTDR 荧光强度)和精子活动力(表 1)。分析表明,正常组、轻度弱精组、中度弱精组和重度弱精组的 PR 百分比分别为 $(39.9 \pm 5.8)\%$ 、 $(26.8 \pm 2.5)\%$ 、 $(14.3 \pm 2.9)\%$ 和 $(4.0 \pm 3.6)\%$,其 MTDR 平均值分别为:12 860.72 $\pm$ 4 024.82、10 791.20 $\pm$ 3 123.25、11 548.50 $\pm$ 3 866.80 和 9 722.42 $\pm$ 4 866.66,各组内 MTDR 值标准差较大,组间差异不明显($F=0.997$, $P=0.405$)。此外,相关分析表明,MTDR 荧光强度值与 PR 不相关($r=0.182$, $P=0.268$)。

2.2 RP 和 HCQ 对精子线粒体活性的调节

2.2.1 RP 对线粒体活性的调节 本实验中取 2 例精液样本(分别为样本 1 和样本 2),其 PR 百分比分别为 17%和 15%。与 CK 相比,RP-5 nmol/L 和 RP-100 nmol/L 均导致 MTDR 荧光曲线左移(图 1A、B)。统计表明,在样本 1 中,与 CK 相比,RP-5 nmol/L 和 RP-100 nmol/L 均明显降低 MTDR 值($t=6.832$, $P=0.002$; $t=4.115$, $P=0.015$);在样本 2 中,与 CK 相比,RP-5 nmol/L 和 RP-100 nmol/L 均明显降低 MTDR 值($t=4.579$, $P=0.010$; $t=7.031$, $P=0.002$)(图 1C)。因此,5 nmol/L 和 100 nmol/L 的 RP 均可明显降低精子线粒体活性。

2.2.2 HCQ 对线粒体活性的调节 本实验中取 2 例精液样本(分别为样本 1 和样本 2),其 PR 速率分别为 39%和 25%。50 $\mu\text{mol/L}$ 的 HCQ 导致曲线右移(图 2A、B)。分析表明,HCQ 组荧光强度值明显高于对照组($t=-16.977$, $P=0.000$; $t=-4.800$, $P=0.009$)(图 2C),HCQ 明显提高了精子线粒体活性。

2.2.3 线粒体活性改变后,精子活力的变化 由表 2 可知,与 CK 相比,RP-5 nmol/L、RP-100 nmol/L 及 HCQ-50 $\mu\text{mol/L}$ 对精子 PR 百分比的影响差异不具有统计学意义($P>0.05$)。

表 1 样本的 MTDR 荧光强度值

样本号	精子活动力 (%)					MTDR
	a 级	b 级	c 级	d 级	PR	荧光强度值
正常组						
正常 1	14	39	9	38	53	18 199.23 ± 1 007.66
正常 2	17	30	11	42	47	8 438.57 ± 420.68
正常 3	16	30	12	42	46	12 402.37 ± 87.44
正常 4	15	27	12	46	42	18 686.27 ± 1 014.70
正常 5	14	27	12	47	41	7 526.53 ± 724.61
正常 6	13	28	11	48	41	14 816.03 ± 493.24
正常 7	10	24	14	52	34	16 310.27 ± 784.75
正常 8	11	22	7	60	33	10 032.50 ± 132.27
正常 9	7	37	9	47	44	8 600.23 ± 331.89
正常 10	10	28	12	50	38	6 535.90 ± 164.51
正常 11	9	24	10	57	33	17 413.87 ± 319.59
正常 12	12	23	10	55	35	15 273.50 ± 196.34
正常 13	12	25	11	52	37	10 945.40 ± 128.29
正常 14	9	26	7	58	35	14 869.40 ± 330.70
轻度弱精组						
轻度 1	8	23	16	53	31	11 133.03 ± 252.81
轻度 2	7	22	15	56	29	7 190.77 ± 54.00
轻度 3	4	24	12	60	28	15 007.13 ± 185.17
轻度 4	11	17	11	61	28	9 493.63 ± 988.02
轻度 5	7	20	12	61	27	11 573.20 ± 109.56
轻度 6	8	17	10	65	25	7 652.50 ± 586.23
轻度 7	9	14	9	68	23	15 054.63 ± 183.24
轻度 8	6	17	12	65	23	13 570.77 ± 525.56
轻度 9	0	27	11	62	27	6 445.10 ± 411.11
中度弱精组						
中度 1	4	15	11	70	19	6 562.80 ± 269.52
中度 2	3	15	10	72	18	11 195.03 ± 548.12
中度 3	4	13	8	75	17	8 799.17 ± 68.38
中度 4	4	10	4	82	14	8 915.13 ± 107.42
中度 5	0	14	14	72	14	14 040.10 ± 221.00
中度 6	4	9	7	80	13	20 938.50 ± 711.95
中度 7	3	9	18	70	12	11 086.17 ± 33.15
中度 8	0	12	6	82	12	11 557.83 ± 156.37
中度 9	0	10	5	85	10	10 841.73 ± 238.55
重度弱精组						
重度 1	0	7	7	86	7	11 897.07 ± 477.54
重度 2	0	0	0	100	0	10 163.00 ± 269.47
重度 3	0	0	6	94	0	19 824.33 ± 636.23
重度 4	0	0	10	90	0	4 668.50 ± 79.29
重度 5	0	8	0	92	8	4 942.40 ± 89.88
重度 6	0	8	8	84	8	10 051.67 ± 266.72
重度 7	0	5	11	84	5	6 510.00 ± 190.62

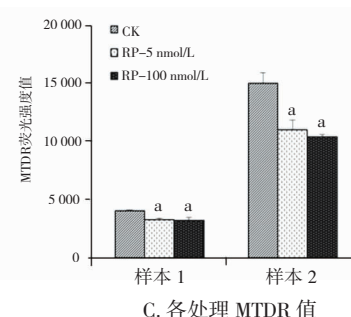
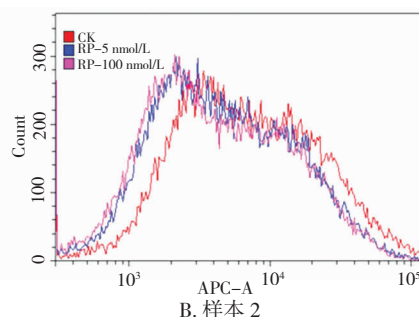
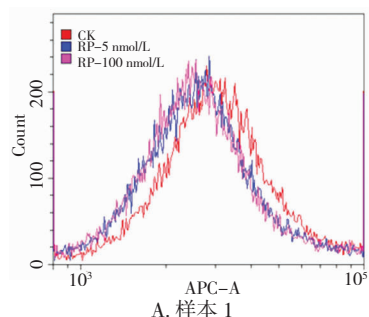
注: a, 与 CK 相比, $P < 0.05$

图 1 RP 对精子线粒体活性的影响

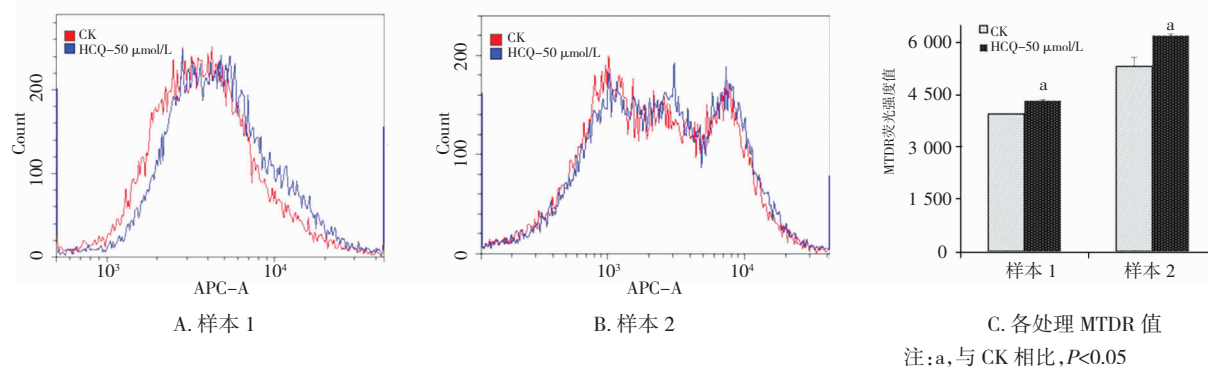


图2 HCQ对精子线粒体活性的影响

表2 RP和HCQ对精子PR的影响(%)

样本号	CK	RP-5 nmol/L	RP-100 nmol/L	HCQ-50 μ mol/L
1	10.43 $\pm$ 1.85	11.17 $\pm$ 1.34	12.13 $\pm$ 0.80	10.27 $\pm$ 1.04
2	13.80 $\pm$ 1.44	14.83 $\pm$ 1.89	12.67 $\pm$ 1.03	14.03 $\pm$ 1.05
3	11.13 $\pm$ 0.57	12.63 $\pm$ 1.16	11.00 $\pm$ 0.17	9.70 $\pm$ 2.29
4	12.90 $\pm$ 1.31	14.93 $\pm$ 1.00	14.67 $\pm$ 2.11	11.40 $\pm$ 0.61

3 讨论

精子活动力直接关系到人类生殖,只有正常作前向运动的精子才能抵达输卵管壶腹部,与卵子结合。精子尾部运动需要ATP供能。研究发现,弱精症患者精子中ATP含量为 (69.5 ± 21.3) pmol/ 10^6 个精子,明显低于正常组的 (136.7 ± 72.8) pmol/ 10^6 个精子^[1]。精子ATP的合成途径有2条:线粒体中的氧化磷酸化和细胞质中的糖酵解。精子线粒体结构的改变可伴有能量代谢酶(如乳酸脱氢酶同工酶、琥珀酸脱氢酶及细胞色素氧化酶)含量的改变,影响精子的供能^[8]。

然而,本研究发现MTDR荧光强度值与PR不相关($r=0.182, P=0.268$),表明线粒体活性对人类精子活力的影响不明显。这与Nascimento等^[9]的研究结果相似:家犬及人类精子的活力参数——游动力和曲线速度跟精子线粒体膜电位之间不相关,表明精子活力与线粒体呼吸无关。此外,Ortiz-Rodriguez等^[10]通过MTDR实验发现,正常生育力和低生育力种马的活性线粒体精子百分比差异不明显($P>0.05$)。

为了进一步验证此结论,本研究用RP和HCQ来调控精子线粒体活性,然后观察精子活动力的变化。大部分线粒体膜上的酶及蛋白质为核基因的产物^[10],在细胞质中核糖体内合成后运送至线粒体内

部进行更新和组装^[11]。而精子形成完成时,精子细胞中多余的胞质已被除去,留下的胞质中不含核糖体,胞质蛋白质的合成停止了^[1]。线粒体可被特异性地包裹进自噬体中,与溶酶体融合而被降解^[12]。由此推定,自噬诱导剂RP增强了线粒体自噬,而人类精子不能合成线粒体蛋白以进行补充,导致精子线粒体数量减少,MTDR荧光强度降低,精子线粒体整体活性降低。自噬抑制剂HCQ则与之相反。本研究证实,5 nmol/L及100 nmol/L的RP可明显降低精子MTDR荧光强度值,即RP降低了精子线粒体活性,而50 μ mol/L的HCQ能明显提高线粒体活性。既往研究发现,线粒体自噬诱导剂——羧基氰化物间氯苯胺诱导人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)线粒体自噬而导致MTDR荧光强度值下降,线粒体活性降低,而HCQ则反之^[3]。本研究还发现,RP和HCQ改变线粒体活性后,精子活力变化不明显($P>0.05$)。这进一步证实线粒体活性跟精子活力之间的关系不明显。

线粒体活性跟人类精子活力不相关,可能是人类精子活动力对线粒体功能(氧化磷酸产生的ATP)依赖较弱所致。首先,虽然1 mol/L的葡萄糖经糖酵解只生成2 mol/L的ATP,而经氧化磷酸化却可产生36 mol/L或38 mol/L的ATP,但研究表明线粒体产生的ATP对精子活力的影响较小^[13],人类精子ATP主要依赖于糖酵解供应^[9,14]。其次,精子特异性糖酵

解酶——甘油醛-3-磷酸-脱氢酶-S 产生的 ATP 占总量的 90%, 与纤维鞘结合紧密, 在维持鞭毛运动上起着重要作用^[15]。此外, 线粒体位于精子中段, 其合成的 ATP 就需要扩散到达精子尾部, 这显然不能满足高速运动的鞭毛对大量 ATP 的需求^[16-17]。而人类精子的糖酵解相关酶类及 ADP/ATP 载体蛋白都位于其尾部, 这也提示糖酵解功能在精子运动中的重要作用^[18]。

研究发现精子鞭毛结构蛋白表达异常^[19]、多种离子通道蛋白表达不足^[20-21]、信号转导异常^[22]及精浆蛋白含量的变化^[23]等, 都与弱精子症发病存在明显的相关性。因此弱精症的发生可能是多因素导致, 而不仅仅是线粒体功能障碍。

综上所述, 线粒体的氧化磷酸化途径并非人类精子活动所需的 ATP 主要来源, 线粒体活性对人类精子活力的影响不明显。解决特发性弱精症难题, 可能还需要从糖酵解或其他代谢功能障碍方面着手。

参 考 文 献

- [1] 熊承良, 商学军, 刘继红. 人类精子学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [2] du Plessis SS, Agarwal A, Mohanty G, et al. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?[J]. Asian J Androl, 2015, 17(2): 230-235.
- [3] Mauro-Lizcano M, Esteban-Martínez L, Seco E, et al. New method to assess mitophagy flux by flow cytometry[J]. Autophagy, 2015, 11(5): 833-843.
- [4] Ortiz-Rodríguez JM, Anel-Lopez L, Martín-Muñoz P, et al. Pulse Doppler ultrasound as a tool for the diagnosis of chronic testicular dysfunction in stallions[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0175878.
- [5] Hallap T, Nagy S, Jaakma U, et al. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633[J]. Theriogenology, 2005, 63(8): 2311-2322.
- [6] Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, et al. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants[J]. Anim Reprod Sci, 2016, 167: 103-108.
- [7] 曹兴午, 林 凯, 李翠英, 等. 评《WHO 人类精液检查与处理实验室手册》[J]. 5 版. 中华男科学杂志, 2011, 17(12): 1059-1063.
- [8] Pelliccione F, Micillo A, Cordeschi G, et al. Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia[J]. Fertil Steril, 2011, 95(2): 641-646.
- [9] Nascimento JM, Shi LZ, Tam J, et al. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping[J]. J Cell Physiol, 2008, 217(3): 745-751.
- [10] 韩雨梅, 张 勇. 耐力训练诱导增龄大鼠骨骼肌线粒体生物合成的分子机制[M]. 北京: 北京体育大学出版社, 2012.
- [11] 汪堃仁, 薛绍白, 柳惠图. 细胞生物学[M]. 3 版. 北京: 北京师范大学出版社, 2017.
- [12] 秦正红. 自噬: 生物学与疾病·基础卷[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2015.
- [13] Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellarmovement[J]. Biol Reprod, 2004, 71(2): 540-547.
- [14] Hereng TH, Elgstoen KBP, Cedervik FH, et al. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa[J]. Hum Reprod, 2011, 26(12): 3249-3263.
- [15] Miki K, Qu W, Goulding EH, et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(47): 16501-16506.
- [16] Turner RM. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?[J]. J Androl, 2003, 24(6): 790-803.
- [17] Ford WC. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round?[J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(3): 269-274.
- [18] Kim YH, Haidl G, Schaefer M, et al. Compartmentalization of a unique ADP/ATP carrier protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the human sperm flagellar principal piece[J]. Dev Biol, 2007, 302(2): 463-476.
- [19] Kuo YC, Lin YH, Chen HI, et al. SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus[J]. Hum Mutat, 2012, 33(4): 710-719.
- [20] Bhilawadikar R, Zaveri K, Mukadam L, et al. Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in normozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its association with motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate[J]. J Assist Reprod Genet, 2013, 30(4): 513-523.
- [21] Dirami T, Rode B, Jollivet M, et al. Missense mutations in SLC26A8, encoding a sperm-specific activator of CFTR, are associated with human asthenozoospermia[J]. Am J Hum Genet, 2013, 92(5): 760-766.
- [22] Kang MG, Campbell KP. Gamma subunit of voltage-activated calcium channels[J]. J Biol Chem, 2003, 278(24): 21315-21318.
- [23] Chiu WW, Chamley LW. Human seminal plasma antibody-binding protein[J]. Am J Reprod Immunol, 2003, 50(3): 196-201.

(责任编辑: 张辉洁)