

陈梦然,高浩泽,周培培,等. 维生素 E 和谷氨酰胺对兔精液获能的影响及获能相关基因的表达[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):306-308.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.089

维生素 E 和谷氨酰胺对兔精液获能的影响 及获能相关基因的表达

陈梦然,高浩泽,周培培,刘俊,李拥军

(扬州大学动物科学与技术学院/江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室,江苏扬州 225009)

摘要:为了探讨不同质量浓度维生素 E 和谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 对精子获能的影响,以及与获能有关的关键基因在获能后相对表达量的差异,在获能液中加入不同质量浓度的维生素 E (0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL) 或 Gln (0、5、10、15、20 mg/mL),并分别将其与精子悬液一同培养,以孕酮诱导顶体反应,通过涂片染色镜检得到顶体发生率;采用实时荧光定量 PCR 得到获能相关基因蛋白激酶 A 催化亚单位 β (PRKACB) 和 ACP6 (acid phosphatase 6, lysophosphatidic) 在获能后的表达。结果表明,添加质量浓度为 1.0 mg/mL 的维生素 E 对精子顶体发生率的影响显著高于其他组别 ($P < 0.05$); 添加质量浓度为 15 mg/mL 的 Gln, 精子顶体发生率显著高于其他组别 ($P < 0.05$); 与空白对照组相比, 维生素 E 最佳质量浓度处理组 (1.0 mg/mL) 的 PRKACB 和 ACP6 基因的相对表达量显著性降低 ($P < 0.05$); Gln 最佳质量浓度处理组 (15 mg/mL) 处理后, 基因 PRKACB、ACP6 在获能后的相对表达量高于空白对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)。可见, 获能液中添加维生素 E 和 Gln 对兔精子获能具有一定影响。

关键词: 维生素 E; 谷氨酰胺; 精子获能; 基因表达

中图分类号: S829.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0306-03

随着哺乳动物胚胎生物工程技术的深入研究以及商业性胚胎移植技术的迅猛发展,对卵母细胞和胚胎的需求量日益增加^[1],加强对体外受精技术的研究十分必要。精子获能是精卵结合的重要前提,获能效果的好坏直接影响受精效果。学者以小鼠^[2]、山羊^[3]等为试验材料,对精子获能机理、获能方法等进行了大量研究,从而推动了体外受精技术的发展。

动物精液中含有少量的活性氧 (ROS), 在进行孵育的过程中,精子的呼吸代谢也会产生一定量的 ROS, 正常范围内的 ROS 有助于精子获能, 但高浓度的 ROS 会对精子获能过程造成阻碍。生产中常通过添加抗氧化剂来减少和消除 ROS 对精子的不利影响^[4]。维生素 E 的主要功能是非特异性的断链抗氧化, 因此维生素 E 能保证细胞膜结构和功能的完整性, 也可缓解氧自由基造成的应激^[5]。谷氨酰胺是一种重要的氨基酸, 参与合成谷胱甘肽。谷胱甘肽对维持生物体内适宜的氧化还原环境具有至关重要的作用。在动物机体体内, 谷胱甘肽参与对异物和亲电代谢物的去毒, 是有效的自由基清除剂, 保护细胞免受活性氧复合物的损伤^[6]。本试验探讨维生素 E 和谷氨酰胺对兔精子获能的影响, 为进一步提高兔的人工授精效率提供理论及实践依据。

研究表明, 蛋白酪氨酸磷酸化 (PTP) 有利于精子获能, 精子中可能存在 4 种 PTP 信号传导途径, 其中最为重要的是可溶性 AC/cAMP/PKA 途径。该信号传递路径为: Ca^{2+} 、 HCO_3^-

等信号离子→可溶性腺苷酸环化 (adenylatecyclase, AC) 被激活→环磷酸腺苷 (cAMP) 含量增加→PKA 被活化→PKA 底物磷酸化→蛋白酪氨酸磷酸化→精子获能^[7]。PKA 是可溶性 AC/cAMP/PKA 信号途径中最为重要的关键信号节点, 由 2 个具有调节功能的亚基单位 (R) 和 2 个具有催化功能的亚基单位 (C) 组成, 在 cAMP 的作用下调节亚基并催化亚基分离, 使 PKA 激活, 诱发 PKA 底物磷酸化以及最终的蛋白酪氨酸磷酸化, 进而诱导精子发生获能变化。目前已有 5 个不同的人类 C 亚单位基因被鉴定, 即 PRKACA、PRKACB、PRKACG、PRKX、PRKY。PRKACA、PRKACB、PRKX 人类 C 亚单位基因被转录和翻译为功能性蛋白激酶, 分别被称为 PKA Ca、PKA Cb、PRKX^[8]。随着获能进程的推进, 精子 AC、顶体酶、神经氨酸苷酶等相继被激活。胆固醇流失引起的 Ca^{2+} 、 HCO_3^- 内流激活了 AC^[9], 最终胞浆内 Ca^{2+} 缓慢降低, 顶体酶原逐渐活化变为顶体酶, 激活的顶体酶作用于膜上和膜内相关成分, 触发了后续的一系列获能相关反应^[10]。其中, 酸性磷酸酶 (acid phosphatase, ACP) 是精子获能过程中变化最为剧烈的一种顶体酶类^[11], 磷酸酶的激活提高了膜脂代谢率, 产生大量溶血磷脂, 这些溶血磷脂代谢产生的甘油二酯可激活蛋白激酶, 通过调控 PTP 影响精子获能^[12]。溶血磷脂酸性磷酸酶 6 型 (lysophosphatidic acid phosphatase type 6) 是一种由基因 ACP6 (acid phosphatase 6, lysophosphatidic) 编码在人类基因中的酸性磷酸酶, 该基因的表达与溶血磷脂酸性磷酸酶及酸性磷酸酶的活性相关^[13]。本试验通过对 PRKACB 和 ACP6 相对表达量的测定, 从而分析维生素 E 和 Gln 对精子获能的影响。

收稿日期: 2016-02-29

作者简介: 陈梦然 (1995—), 女, 江苏连云港人。Tel: (0514) 87990481; E-mail: 925942965@qq.com。

通信作者: 李拥军, 博士, 教授, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。
E-mail: lijy@yzu.edu.cn。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

选用体况相近的新西兰大白兔公兔(购自江苏省南京市金陵种兔场)进行笼养,饲喂颗粒饲料,自由饮水,定期补充适量青绿饲料。

1.2 主要试剂

维生素 E(纯度 $\geq 50\%$)购自上海源叶生物科技有限公司,*L*-谷氨酸钠(含量 $\geq 98.0\%$)购自北京索莱宝科技有限公司,Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。FastQuant RT Kit(cDNA 第一条链合成试剂盒)、SuperReal PreMix Plus 均购自天根生化科技(北京)有限公司。氯化钠、氯化钾、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、氯化钙、葡萄糖、0.2% 酚红、青霉素、链霉素、碳酸氢钠、丙酮酸钠、肝素、BSA、孕酮、考马斯亮蓝染色液(CBB)、 $10 \times \text{PBS}$ 。

1.3 精液的采集及顶体反应的诱导

选用体况相近的新西兰大白兔公兔,采用假阴道法进行精液采集。先将采集到的精液进行镜检,保证精子活力在 0.6 以上;将精液与获能液按 1:(2~3) 比例混匀,离心去上清液后在下层精子沉淀中加入 1 mL 获能液,于 CO_2 培养箱

中培养 20~30 min;吸取上清液离心后去上清,分别加入含不同质量浓度维生素 E(0、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL)、Gln(0、5、10、15、20 mg/mL)的获能液稀释 2~5 倍,继续培养 2~3 h;向培养后的精液中加入孕酮,使其在培养液中的质量浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$,并继续培养 30 min。

1.4 考马斯亮蓝法判断顶体反应

精子完成顶体反应后,精子悬液以 $1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min,沉淀以固定液固定 10 min,离心去上清,用 $10 \times \text{PBS}$ 洗涤 2 遍。采用适量 $10 \times \text{PBS}$ 悬浮沉淀,将 CBB 染色液滴于玻片上染色 30 min,采用 CBB 脱色液冲洗玻片并晾干。采用普通光学显微镜进行观察,随机观察不同视野中的 200 个精子,并计算其顶体反应率。

1.5 qRT-PCR

采用 Trizol 试剂分别提取未添加试剂的获能后精液、添加了最适质量浓度维生素 E 和 Gln 获能液处理后精液的总 RNA,采用 FastQuant RT Kit 将 RNA 反转录为 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 qRT-PCR,所用引物序列见表 1。使用的仪器为 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪,试剂为 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)。qRT-PCR 的反应条件为:95 $^\circ\text{C}$ 15 min;95 $^\circ\text{C}$ 10 s,58 $^\circ\text{C}$ 32 s,40 个循环。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

引物名称	序列(5'→3')	产物大小
<i>actin</i>	AGCAGTCGTTGGAGCGAG;ACATGGCATCTCAGATATTTGG	125
<i>Acp6</i>	CAGTCATGATGTGACCCTC;ATTCTGTGCTGCTAGACT	111
<i>Prkab</i>	CGATCCCATCCACTTCAG;GTTCTGTATCTCCAGAGC	213

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)对数据进行分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 兔顶体反应诱导与维生素 E 的关系

由图 1 可知,随着维生素 E 质量浓度的上升,精子的顶体发生率呈先上升后下降的趋势,当维生素 E 的质量浓度为 1.0 mg/mL 时,精子的顶体发生率最高,与其他组相比具有显著性差异($P < 0.05$)。质量浓度为 0.5、1.5 mg/mL 的处理组与空白组相比,精子的顶体发生率均有所提高,但差异不显著($P > 0.05$)。质量浓度为 2.0 mg/mL 的处理组与空白组相比,精子的顶体发生率有所下降,但差异不显著($P > 0.05$),

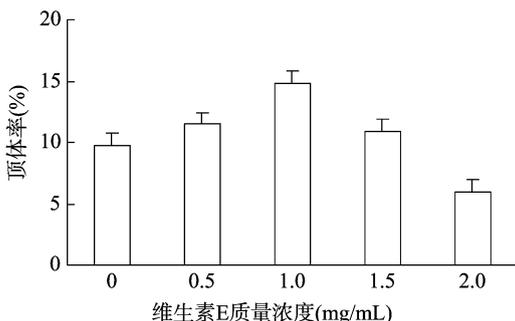


图 1 不同质量浓度的维生素 E 对精子获能的影响

而与其他试验组相比差异性显著($P < 0.05$),可能是由于质量浓度过高的维生素 E 不利于精子的获能反应。

由图 1 得出最佳质量浓度为 1.0 mg/mL,该质量浓度的处理组与空白组相比,精子获能后 *PRKACB* 和 *ACP6* 基因的相对表达量均有所下降,且差异性显著($P < 0.05$)。*PRKACB* 与 *ACP6* 基因的相对表达量相比较,二者之间不具有显著性差异($P > 0.05$)(图 2)。

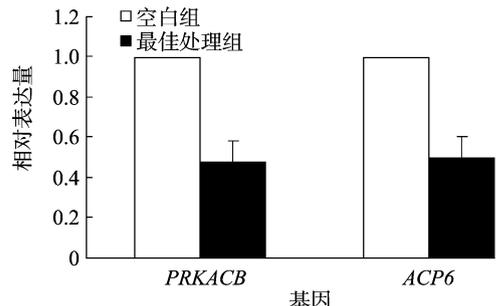


图 2 最佳维生素 E 处理组 *PRKACB* 与 *ACP6* 基因的相对表达量

2.2 谷氨酰胺对兔精子获能和顶体反应的影响

由图 3 可知,随着 Gln 质量浓度的上升,精子的顶体发生率呈先上升后下降的趋势,当 Gln 质量浓度为 15 mg/mL 时,精子的顶体发生率最高,与其他组相比具有显著性差异($P < 0.05$)。质量浓度为 5、10、20 mg/mL 的处理组与空白组相比,精子的顶体发生率差异性均不显著($P > 0.05$)。可见,15 mg/mL 为最佳处理浓度。

由图 3 得出最佳质量浓度为 15 mg/mL,该质量浓度的处

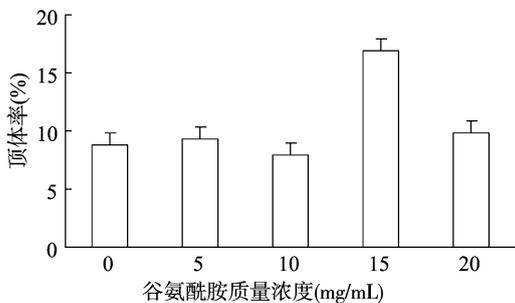


图3 不同质量浓度的谷氨酰胺对精子获能的影响

理组与空白组相比,精子获能后 *PRKACB* 和 *ACP6* 基因的相对表达量均有所上升,但差异性不显著 ($P > 0.05$)。 *PRKACB* 与 *ACP6* 基因的相对表达量相比较,二者之间不具有显著性差异 ($P > 0.05$) (图4)。

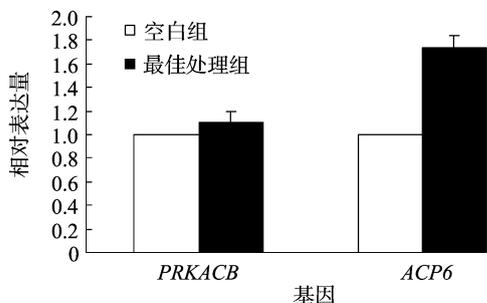


图4 最佳谷氨酰胺处理组 *PRKACB* 与 *ACP6* 基因的相对表达量

3 结论与讨论

本试验采用考马斯亮蓝染色法研究添加不同质量浓度的维生素 E、Gln 对精子获能的影响,结果表明,获能液中维生素 E 添加量为 0.5、1.5 mg/mL 时,精子顶体发生率有所提高,但差异不显著 ($P > 0.05$);当添加量为 1.0 mg/mL 时,顶体发生率显著提高 ($P < 0.05$);当添加量为 2.0 mg/mL 时,顶体发生率下降。顶体发生率整体呈先上升后下降的趋势,表明维生素 E 的质量浓度在一定范围内对精子的顶体发生率具有正向调控作用;当维生素 E 的质量浓度达到一定量时,精子的顶体发生率会受到一定程度的抑制。试验过程中还发现,高质量浓度维生素 E 处理后的精子死亡率明显高于其他处理组,表明高质量浓度维生素 E 对精子具有一定伤害作用。添加 Gln 的试验结果相似,总体呈先上升后下降的趋势。获能液中 Gln 添加量为 5 mg/mL 时,精子顶体率有所提高,但差异不显著 ($P > 0.05$);当添加量为 15 mg/mL 时,顶体反应率显著提高 ($P < 0.05$)。可见,添加一定质量浓度的维生素 E 或谷氨酰胺可有效清除获能过程中过多产生的 ROS,防止精子细胞膜损伤、脂质过氧化、蛋白质磷酸化,从而影响获能,这与 Shiva 等的研究结论^[14]一致。

本试验还采用实时荧光定量 PCR 得到获能相关基因 *PRKACB* 和 *ACP6* 的相对表达量,结果表明,与空白对照组相

比,维生素 E 最佳质量浓度处理组 (1.0 mg/mL) *PRKACB* 和 *ACP6* 基因的相对表达量显著性降低 ($P < 0.05$)。可见,虽然宏观上最佳处理质量浓度对于精子的顶体发生率具有显著提高作用,但由于机体内部存在反馈机制,过多的基因表达开启了负反馈机制,从而导致相应基因的表达量下调。与维生素 E 相比,Gln 最佳质量浓度处理组 *PRKACB* 和 *ACP6* 基因在获能后的相对表达量高于空白对照组,但差异不显著 ($P > 0.05$)。可见,Gln 在精子获能过程中可促进蛋白激酶 A 和磷酸激酶的活性,与宏观上 Gln 最佳质量浓度促进精子的顶体发生率相一致。在获能液中添加 1.0 mg/mL 维生素 E 或 15 mg/mL 谷氨酰胺,对兔精子获能具有显著性影响。

参考文献:

- [1] 蒋涛,高庆华,何良军,等. 兔体外受精的研究[J]. 中国草食动物,2005,25(6):3-7.
- [2] Cisneros M A, Sánchez H D P. cGMP and cyclic nucleotide-gated channels participate in mouse sperm capacitation[J]. FEBS Letters, 2012,586(2):149-153.
- [3] 周佳勃,吴延光,刘丽清,等. 肝素处理山羊精子体外获能的研究[J]. 生物工程学报,2004,20(2):252-256.
- [4] 张明,鲜红,朱庆,等. 外源性物质提高精子受精能力研究进展[J]. 动物学杂志,2006,41(4):122-127.
- [5] 周筱丹,董晓芳,佟建明. 维生素 E 的生物学功能和安全性评价研究进展[J]. 动物营养学报,2010,22(4):817-822.
- [6] 宋增廷,姜宁,张爱忠,等. 谷胱甘肽生物学功能的研究进展[J]. 饲料研究,2008,09(9):25-27.
- [7] 周思畅,倪崖,石其贤. 获能期间精子蛋白的酪氨酸磷酸化[J]. 生命科学,2006,18(3):285-289.
- [8] Soberg K, Jahnsen T, Rognes T, et al. Evolutionary paths of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) catalytic subunits[J]. PLoS One,2013,8(4):e60935.
- [9] Breitbart H. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction[J]. Cellular and Molecular Biology,2003,49(3):321-327.
- [10] 石其贤. 精子获能(I)[J]. 浙江省医学科学院学报,1980,3(1):61-65.
- [11] Fernandes A P, Curi G, Franca F G, et al. Nuclear changes and acrosome formation during spermiogenesis in *Euchistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)[J]. Tissue & Cell,2001,33(3):286-293.
- [12] 郑行,朱化彬. 高级动物生殖生理[M]. 北京:中国农业科学院,2009:59-60.
- [13] Ando T, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al. Expression of *ACP6* is an independent prognostic factor for poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncology Reports,2006,15(6):1551-1555.
- [14] Shiva M, Gautam A K, Verma Y, et al. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity[J]. Clinical Biochemistry,2011,44(4):319-324.