

## Zn 缺乏对人精子 VDAC mRNA 的影响

赵 丹<sup>1</sup>, 吴 炜<sup>2</sup>, 章 轶<sup>1</sup>, 王增军<sup>1\*</sup>, 王心如<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院泌尿外科, 生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京医科大学卫生毒理学系, 现代毒理学教育部重点实验室, 生殖医学国家重点实验室, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 探讨 Zn 离子缺乏对成熟精子活动能力和电压依赖性离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC) 的 mRNA 丰度的影响。方法: 从 3 个正常生育者捐献所得的精液经非连续 Percoll 梯度离心获得精子样本, 并将其分 3 组连续培养 24 h: 对照组; 加入 Zn 离子螯合剂的 TPEN 组 (2  $\mu\text{mol/L}$ ); 同时加入 Zn 离子螯合剂 N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) Ethylenediamine (TPEN) 和 Zn 离子 (5  $\mu\text{mol/L}$ ) 组。行 CASA 和荧光定量 PCR (qPCR) 分别分析不同时间的精子活动能力和 24 h 后各 VDAC 亚型 mRNA 丰度。结果: CASA 显示: 培养 3 h, TPEN 组与对照组比较, 精子活力明显下降 ( $P < 0.05$ )。qPCR 结果显示: 培养 24 h 后, TPEN 组 VDAC3 mRNA 丰度明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )。而同时加入 TPEN 和 Zn 离子组与对照组比较, 差异无统计学意义。结论: Zn 离子缺乏使 VDAC3 mRNA 丰度降低, 可能影响到精子的正常功能。

**[关键词]** Zn; 精子; VDAC; 男性不育; Zn 缺乏

**[中图分类号]** R711.6

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)04-443-06

## Effects of intracellular zinc depletion on the abundance of VDAC mRNA in cultured human spermatozoa

ZHAO Dan<sup>1</sup>, WU Wei<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, WANG Zeng-jun<sup>1\*</sup>, WANG Xin-ru<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, the State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Toxicology, Key Laboratory of Modern Toxicology of Education Ministry, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether intracellular zinc depletion can actually change spermatozoa motility and the abundance of voltage-dependent anion channel (VDAC) mRNA in cultured human spermatozoa. **Methods:** Spermatozoa were separated from ejaculates of three donors using a discontinuous Percoll gradient centrifugation. Each spermatozoa specimen were divided into 3 groups, one was exposed to a cell membrane-permeable zinc chelator N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) Ethylenediamine (TPEN) (2  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours, one was to TPEN plus zinc sulfate (5  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours, and one was as control. CASA and quantitative real-time PCR (qPCR) were performed to detect sperm motility characteristics, mRNA abundance and difference of the three VDAC subtypes between three different treatment groups respectively. **Results:** The results of CASA demonstrated that exposure of spermatozoa to TPEN for three hours significantly decreased sperm motility compared with the control group ( $P = 0.049$ ). qPCR demonstrated that VDAC3 mRNA level of TPEN group were significantly lower than that of control group, while no significant difference was found between TPEN plus zinc sulfate treatment group and control group. Co-addition of zinc partly reversed TPEN-induced alterations of sperm motility and VDAC3 mRNA abundance. **Conclusion:** The results of the present study implicate that zinc depletion may induce VDAC3 mRNA abundance decreasing and affect the normal function of spermatozoa.

**[Key words]** Zn; sperm; VDAC; male infertility; zinc depletion

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(4): 443-448]

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目 (30872575, 30973199)

\*通讯作者, E-mail: zengjunwang@njmu.edu.cn

微量元素 Zn 是人类生长发育、性成熟和生殖所必须的<sup>[1]</sup>。在男性生殖方面也起着重要的作用<sup>[2]</sup>。血清中 Zn 浓度对于精子的生理活动是不可缺少

的,如缺乏可能会造成睾丸功能的紊乱以及睾丸和精道发育的异常<sup>[3]</sup>。而精浆中 Zn 主要由前列腺分泌。Zn 离子的缺乏可能会降低其对精子染色体的保护作用,从而导致精子 DNA 易受到有害物质的破坏,而精子 DNA 的碎片化则也被认为是与男性不育相关精子质量的重要指标<sup>[4]</sup>。精浆中的 Zn 还通过与 Sg 和 PSA 的相互作用参与精液的液化机制<sup>[5]</sup>,同时 Zn 还存在于多种酶中或与之相互作用,在男性生殖机制中发挥着重要的作用。

电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel,VDAC)是一种最早在 1976 年于双核草履虫线粒体外膜上发现的孔道样蛋白<sup>[6]</sup>。之后,发现其在所有的真核生物的线粒体外膜上都存在<sup>[5]</sup>。在哺乳动物中存在 3 种不同的 VDAC 基因(VDAC1,VDAC2 和 VDAC3),它们之间的同源性达 75%~94%,其编码 3 种不同的 VDAC 蛋白亚型均具有通道样结构特点<sup>[7]</sup>。在体外试验中,VDAC 蛋白通道展现出电压依赖性门控通道的特性。通过这种特性,VDAC 可以调节线粒体膜对离子(如 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup> 和 Cl<sup>-</sup>)和小分子(如 ATP、琥珀酸盐和琥珀酸盐)的通透性。通过这种特性,VDAC 还参与到很多生理和病理机制,包括能量代谢<sup>[8]</sup>和细胞凋亡<sup>[9]</sup>。进一步研究表明 VDAC 不仅存在于线粒体的外膜上,还存在于人类淋巴细胞和内皮细胞的质膜上<sup>[10]</sup>。不仅如此,还发现在不同的生殖细胞和组织中分布着不同的 VDAC 亚型。VDAC1 分布于支持细胞,VDAC2 分布在精母细胞和精子细胞,VDAC3 分布广泛,但在间质细胞上分布尤其丰富<sup>[11]</sup>。另外,在成熟的牛精子鞭毛的外层致密纤维(ODF)中也发现了 VDAC2 和 VDAC3,这是首次报道在非膜组织中分布 VDAC<sup>[12]</sup>,提示 VDAC 可能与精子鞭毛运动有关。而且 VDAC2 还分布在顶体区域的顶体膜/质膜上<sup>[13]</sup>,进一步提示 VDAC 可能影响精子的顶体反应或精卵融合。

根据 VDAC 的电压依赖离子通道的特性和在生殖组织和细胞中的分布特点,可以推测 VDAC 可能在精子功能和男性生育中起着重要的作用。敲除 VDAC3 基因的雄性小鼠表现出明显的精子活力和生育能力下降<sup>[11]</sup>,进一步证实了 VDAC 和男性生育的关系。有趣的是,既往有报道在新生 Wistar 大鼠的海马神经细胞中,细胞内的 Zn 离子缺乏可以导致 VDAC 的 mRNA 表达下调并因此导致神经细胞损伤<sup>[14]</sup>。为了进一步证实 Zn 对 VDAC 的影响,本研究探讨 Zn 离子缺乏对人成熟精子活力以及 VDAC 的 mRNA 丰度的影响及其相互关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

2011 年 6 月~2011 年 10 月在南京医科大学第一附属医院人类精子库收集到 3 份新鲜精液,所有精液均为捐献者在禁欲 3~7 d 后通过手淫法获取并达到以下指标:液化时间< 60 min;精液量≥2 ml;精子浓度≥20 × 10<sup>6</sup> 个/ml;活率≥70%;活力≥50%;白细胞< 1 × 10<sup>6</sup> 个/ml;pH 7.2~7.8。3 个捐献者年龄为(24.7 ± 3.1)岁,并在 2 年内未采用过人工辅助生育。本研究经过南京医科大学伦理委员会批准。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 精子的培养

所收集的精液在完全液化后通过不连续 Percoll (GE Healthcare 公司,美国)梯度离心(80%,40%)去除圆细胞(不成熟生殖细胞和白细胞),离心条件为室温,400 g,18 min,收集离心管底部沉淀,用精子培养液洗涤 2 次(400 g,5 min),在最后 1 次离心前显微镜观察确保精子质量。最后加入精子培养液分装 3 份:①阴性对照;②加入特异性的细胞内 Zn 离子螯合剂 TPEN(2 μmol/L;Sigma 公司,美国);③加入 TPEN(2 μmol/L)和 ZnCl<sub>2</sub>(5 μmol/L)。TPEN 用二甲亚砜(DMSO)溶解。置于 37°C,95%空气和 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 24 h。

#### 1.2.2 精子活力的评估

根据 WHO 指南(World Health Organization, 1999),所培养精子参数用计算机辅助精液分析系统分析(WLJY-9000;Weili New Century Science and Tech Dev,北京)。分别获取培养时间为 1、3、6、24 h 所培养精子的运动参数,包括 a 级精子、活力(a + b 级精子,%)、活率(a + b + c 级精子,%)、曲线速度(VCL,μm/s)、直线速度(VSL,μm/s)和平均速度(VAP,μm/s)。

#### 1.2.3 RNA 提取

培养 24 h 后的精子通过离心收集沉淀并置于 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司,美国),-80°C 保存备用。精子总 RNA 的提取步骤简述如下:加 TRIzol 的精子室温沉淀静置 5 min,再加氯仿后 4°C 离心(12 000 g,5 min),吸取上层澄清相,并在其中加异丙醇,-20°C 放置 60 min,然后 4°C 离心 10 min,倒掉液体,加 75%乙醇(DEPC 水处理)洗涤后进行 4°C 离心(12 000 g,5 min),然后倒掉乙醇,晾干,加 DEPC 水溶解后-80°C 保存备用。总 RNA 样品质量测

定采用分光光度计定量 DU800 (Beckman 公司,美国)。

#### 1.2.4 逆转录

使用逆转录 cDNA 合成试剂盒 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche 公司,德国)。配置 20  $\mu\text{l}$  逆转录体系如下:总 RNA 1  $\mu\text{g}$ , 锚定 oligo(dt)18 引物 1  $\mu\text{l}$ , 加上 PCR 级水至 13  $\mu\text{l}$ , 5 $\times$  RT Buffer 4  $\mu\text{l}$ , Primer Mix 2  $\mu\text{l}$ , RT Enzyme Mix, 0.5  $\mu\text{l}$ , Protector RNase Inhibitor 0.5  $\mu\text{l}$ , 反应条件为 55 $^{\circ}\text{C}$ , 30 min, 然后 85 $^{\circ}\text{C}$  失活 5 min 终止反应。逆转录所得到的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$  储存备用。

#### 1.2.5 聚合酶链反应(PCR)

为了确保样本没有受到圆细胞的污染,我们把逆转录所得到的 cDNA 样本进行 PCR 以排除 c-kit (不成熟的生殖细胞标记)和 CD45 (白细胞标记)。GAPDH 用于内参。各引物以及反应条件均为前期研究所报道<sup>[15]</sup>。总反应体系为 20  $\mu\text{l}$ , 含 14  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 2.0  $\mu\text{l}$  10 $\times$  PCR Buffer, 1.6  $\mu\text{l}$  MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 0.4  $\mu\text{l}$  正向引物和反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ), 0.2  $\mu\text{l}$  DNA polymerase, 1  $\mu\text{l}$  cDNA 模板。使用未经梯度离心处理精子的 cDNA 作为阳性对照, ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照。PCR 后的产物通过 2% 琼脂糖胶电泳在紫外分析仪下观察结果。

#### 1.2.6 实时定量 PCR(qPCR)

各样本中 VDAC1、VDAC2 和 VDAC3 的 mRNA 表达通过 7900 HT Fast Real-Time PCR (Applied

Biosystems 公司,美国)系统进行分析。 $\beta$ -actin 作为内参,各引物均为先前文献所报道<sup>[15]</sup>。cDNA 样本在 qPCR 前稀释 5 倍。10  $\mu\text{l}$  反应体系含:6.4  $\mu\text{l}$  dd H<sub>2</sub>O, 10  $\mu\text{l}$  SYBR<sup>®</sup> Green Real-Time PCR Master Mix (Roche 公司,德国), 8 pmol 正向引物和反向引物, 2  $\mu\text{l}$  cDNA。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$  60 s, 然后 40 个循环 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 最后 60 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  45 s 结束。扩增曲线的循环阈值用 C<sub>T</sub> 表示, 每一样本做 3 次 RT-PCR 以得到样本的平均 C<sub>T</sub> 值, 用  $\beta$ -actin 作为内参校正后的数值  $2^{-\Delta C_T}$  代表实际 VDAC 的 mRNA 的相对表达量,  $\Delta C_T = (C_{T(\text{VDAC})} - C_{T(\beta\text{-actin})})$ 。各处理组 VDAC 的 mRNA 丰度的平均相对差异性用  $2^{-\Delta C_T}$  比较。

#### 1.3 统计学方法

所有数据用 Stata 9.2 统计软件进行分析, 如未做特别说明, 数据均采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。各组变量值间的差异性通过方差齐性检验, 方差齐采用 *t* 检验, 方差不齐采用秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

所收集的 3 份精液样本通过不连续 Percoll 梯度离心收集筛选出高活力和低活力的精子, 经高倍显微镜检查确定没有混杂圆细胞。每份筛选的精子分 3 组(对照组、TPEN 组和 TPEN+Zn 组)培养后, 获得不同时间点的 CASA 分析数据以观察活力改变情况(表 1)。可以看到在培养 3 h 精子活力(A 级+B

表 1 对照组、TPEN 组和 TPEN+Zn 组在不同培养时间精子活动能力参数分析

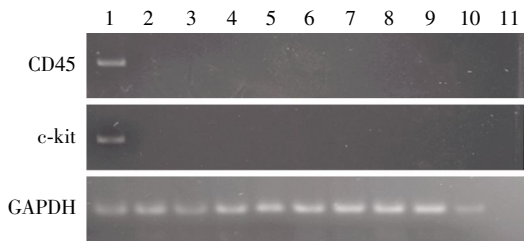
Table 1 The sperm motility characteristics of the control group, TPEN group and TPEN plus zinc group cultured for different time analyzed by CASA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

	a 级 (%)	活力 (%)	活率 (%)	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )
1 h						
对照组	80.33 $\pm$ 4.04	82.33 $\pm$ 3.06	97.33 $\pm$ 1.53	75.07 $\pm$ 10.96	62.10 $\pm$ 4.18	119.80 $\pm$ 37.00
TPEN 组	75.00 $\pm$ 7.55	76.00 $\pm$ 7.55	90.00 $\pm$ 5.29	70.60 $\pm$ 14.80	53.03 $\pm$ 8.80	143.70 $\pm$ 24.70
TPEN+Zn 组	75.67 $\pm$ 9.07	77.67 $\pm$ 8.33	93.33 $\pm$ 5.51	72.50 $\pm$ 5.80	59.53 $\pm$ 2.48	128.40 $\pm$ 31.06
3 h						
对照组	57.00 $\pm$ 3.61	59.33 $\pm$ 3.22	82.67 $\pm$ 2.52	73.87 $\pm$ 5.24	66.50 $\pm$ 4.06	132.40 $\pm$ 15.17
TPEN 组	45.00 $\pm$ 7.00	47.00 $\pm$ 6.93*	73.67 $\pm$ 6.69	76.53 $\pm$ 10.89	65.00 $\pm$ 9.00	129.40 $\pm$ 24.97
TPEN+Zn 组	55.67 $\pm$ 7.64	58.00 $\pm$ 7.21	78.00 $\pm$ 7.81	81.67 $\pm$ 4.62	68.43 $\pm$ 6.62	140.30 $\pm$ 11.04
6 h						
对照组	24.67 $\pm$ 4.73	29.00 $\pm$ 5.20	68.67 $\pm$ 4.93	49.63 $\pm$ 11.02	40.97 $\pm$ 13.38	87.07 $\pm$ 10.39
TPEN 组	28.00 $\pm$ 6.23	30.67 $\pm$ 6.66	64.00 $\pm$ 14.73	59.63 $\pm$ 15.30	48.57 $\pm$ 14.92	109.60 $\pm$ 19.56
TPEN+Zn 组	25.00 $\pm$ 6.25	27.67 $\pm$ 7.64	56.33 $\pm$ 12.42	58.20 $\pm$ 4.16	49.40 $\pm$ 4.97	104.30 $\pm$ 3.83
24 h						
对照组	14.67 $\pm$ 8.02	19.33 $\pm$ 7.51	56.67 $\pm$ 13.58	38.40 $\pm$ 5.85	31.20 $\pm$ 4.76	69.77 $\pm$ 14.63
TPEN 组	14.00 $\pm$ 6.928	19.67 $\pm$ 7.02	65.33 $\pm$ 12.66	43.07 $\pm$ 7.65	36.80 $\pm$ 6.70	76.43 $\pm$ 3.30
TPEN+Zn 组	9.33 $\pm$ 2.31	13.67 $\pm$ 2.08	52.33 $\pm$ 8.08	36.93 $\pm$ 3.19	30.47 $\pm$ 3.65	66.60 $\pm$ 2.17

VAP: 平均速度; VSL: 直线速度; VCL: 曲线速度; 培养 3 h TPEN 组与对照组比较, \*P < 0.05。

级)TPEN 组低于对照组并具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 而 TPEN+Zn 组与对照组间比较则无统计学差异。除此以外, 在其他的时间点的精子活力各项参数与对照组比较均没有发现统计学差异。

从 24 h 培养后的精子中提取总 RNA 并逆转录为 cDNA, 行 PCR 没有扩增出 c-kit 和 CD45, 可以证实筛选的精子的纯度, 排除了圆细胞 RNA 的污染(图 1)。通过行 qPCR 分析不同培养条件组精子的 VDAC 各亚型 mRNA 的表达量。在排出体外的人成熟精子中 3 种 VDAC 亚型 mRNA 均可检测到, 这和以前的研究结果是一致的 [15]。其中, TPEN 组的 VDAC3 的 mRNA 丰度与对照组比较显著降低 ( $P = 0.0495$ ), 而 TPEN+Zn 组与对照组比较则无统计学差异。VDAC1 和 VDAC2 各组与对照组 mRNA 的丰度没有统计学差异(表 2)。为了更直观的理解各处理组之间的倍数关系, 在图 2 中可以看到用 TPEN 耗竭精子细胞内 Zn 离子后, VDAC1 和 VDAC2 的 mRNA 丰度与对照组比较分别下降了约 1 倍和 2 倍, 但是统计分析发现差异没有统计学意义, 而 TPEN 组 VDAC3 的 mRNA 丰度与对照组比较下降了约 2 倍并且有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。同时, 加入 Zn 离子后, 由于 TPEN 细胞内 Zn 离子所导致的 VDAC3 mRNA 丰度的下降被逆转。这个结果可以说明由 TPEN 螯合精子细胞内 Zn 离子可以导致 VDAC3 的 mRNA 丰度水平下调。



1: 未经 percoll 筛选分离的精子样本作为阳性对照; 2~10: 经 percoll 筛选分离的精子样本; 11: 未加提取的 RNA 作为阴性对照。

图 1 用提取的精子总 RNA 行 RT-PCR 扩增 c-kit, CD45 和 GAPDH 并经 2% 凝胶电泳分析

Figure 1 RT-PCR products of c-kit, CD45 and GAPDH amplified from human sperm total RNA extracts and showed by agarose gel electrophoresis

### 3 讨论

微量元素 Zn 在人类生长发育, 性成熟和生殖中起着重要作用 [1]。精浆中的 Zn 离子主要由前列腺分泌并且浓度高于人体其他组织 [16]。前期的研究从睾丸文库中通过 PCR 扩增可得到 3 种 VDAC 基因

表 2 Real-Time PCR 在阴性对照、TPEN、TPEN+Zn 各处理组精子 VDAC 亚型 mRNA 丰度

Table 2 The mRNA abundance of three VDAC subtypes in ejaculated spermatozoa of the control group, TPEN group and TPEN plus zinc group analyzed by Real-Time PCR ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

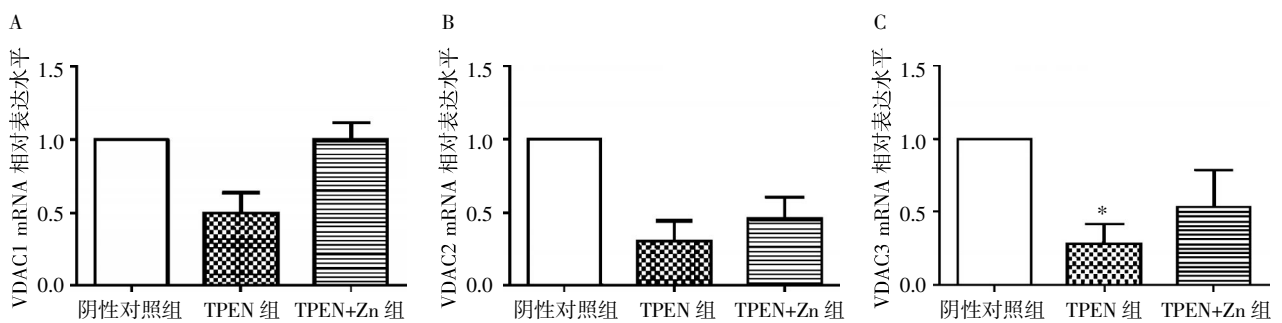
样本	$\Delta CT$	$2^{-\Delta CT}$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
VDAC1			
阴性对照	1.70 ± 0.29	0.31 ± 0.06	1.00(0.82~1.22)
TPEN	2.83 ± 0.98	0.16 ± 0.11	0.46(0.90~0.23)
TPEN+Zn	1.73 ± 0.39	0.31 ± 0.09	0.98(0.75~1.28)
VDAC2			
阴性对照	1.55 ± 1.54	0.47 ± 0.37	1.00(0.34~2.90)
TPEN	3.53 ± 0.49	0.09 ± 0.03	0.25(0.18~0.36)
TPEN+Zn	2.85 ± 1.03	0.17 ± 0.13	0.41(0.20~0.83)
VDAC3			
阴性对照	1.26 ± 0.93	0.47 ± 0.24	1.00(0.52~1.91)
TPEN	3.40 ± 0.18	0.10 ± 0.01*	0.23(0.20~0.26)
TPEN+Zn	2.51 ± 0.42	0.18 ± 0.05	0.42(0.31~0.56)

在 VDAC3 中 TPEN 组与对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

序列, 并且证实精子膜表面存在 VDAC2 和 VDAC3 蛋白质序列 [17]。在这个体外试验中, 人精子与 2  $\mu\text{mol/L}$  的 TPEN 孵育后, 精子活力下降, 并且 VDAC3 的 mRNA 水平下调。

对不同处理方式的精子在不同时间点行 CASA 分析, 发现在孵育 3 h, Zn 离子减少可以导致精子活动性受到影响。以前的体内研究结果证实精浆中的 Zn 离子降低与精子的活动性下降有密切关系 [18], 而另一些研究则没有发现精浆中 Zn 离子浓度与精子活动力相关 [19]。本实验与以前的部分研究结果一致。Zn 离子是否对精子的活力有影响尚需进一步体内外和大样本的研究。

在含 Zn 离子螯合剂 TPEN 的环境中孵育 24 h 后, 精子 VDAC3 的 mRNA 丰度水平下调, 而这种下调的趋势可以被加入的 Zn 离子所逆转, 这与 Lu 等 [14] 在体细胞实验中的研究结果基本一致。Zn 离子缺乏下调 VDAC3 的 mRNA 水平的机制目前尚不清楚, 可能与 Zn 离子缺乏时自由基或其他有害物质增多有关 [20]。在精子生成的过程中, 精子细胞核中的组蛋白逐渐被鱼精蛋白所代替, 这使精子染色体高度稳定从而使精子的基因组转录处于静止状态 [21], 也可以说明在该体外试验中, 精子的 mRNA 量的变化不大可能是由于转录水平受影响而引起的。传统的观点认为成熟精子 mRNA 是在精子生成的过程中残留下来的, 因此体外成熟精子 mRNA 表达的变化可以反映精子生成过程中 mRNA 的表达变化, 体



VDAC1、VDAC2、VDAC3 和  $\beta$ -actin 各自引物行 RT-PCR 做半定量分析。从阴性对照组, TPEN 组和 TPEN+Zn 组的精子提取总 RNA 所逆转的 cDNA 作为模板, 各组的 mRNA 丰度均用  $\beta$ -actin 的 mRNA 量做校正, 使用与对照组比较的相对值做为比较值。对照组的 mRNA 相对丰度设为 1。TPEN 减少细胞内 Zn 离子可以下调 VDAC3 的 mRNA 丰度。而加入 Zn 离子则可逆转这种影响。与对照组比较有统计学差异,  $*P < 0.05$  ( $n = 3$ )。

图 2 用 TPEN 螯合细胞内 Zn 离子对于培养 24 h 后的精子各 VDAC mRNA 亚型的影响

Figure 2 The effect of zinc depletion by TPEN on the abundance of VDAC mRNA in cultured spermatozoa

外实验证实 Zn 离子缺乏能下调精子 mRNA 表达, 可以推测 Zn 同样可以对精子生成过程 mRNA 的表达产生影响。

VDAC 通过电压依赖离子通道的特性调节线粒体膜内外离子、小分子的转运、参与能量代谢和细胞凋亡。除此以外, 在成熟的牛精子鞭毛的外层致密纤维(ODF)发现了 VDAC2 和 VDAC3, Hinsch 等<sup>[12]</sup>推测可能与精子鞭毛的 ATP 传递有关并且因此调节精子的活动能力。本实验室前期的研究也证实了在弱精症患者精子中 VDAC2 的 mRNA 表达水平与正常生育组比较是显著升高的<sup>[15]</sup>。在敲除 VDAC3 基因的雄性小鼠表现出明显的精子活力和生育能力的下降<sup>[11]</sup>。这些都提示 VDAC 可能与精子活动能力存在着密切的关系。本研究表明 Zn 离子缺乏能下调精子 VDAC3 的 mRNA 丰度。可以推测在精子的生成过程中 Zn 离子缺乏同样可能会影响 VDAC 的 mRNA 表达水平, 从而影响精子的活动能力。另外, 传统的观点认为在人成熟的精子是转录静默的, 不存在 mRNA, 然而, 一些近期的研究表明在人成熟的精子中存在着各种 mRNA, 并且这些 mRNA 对精子的活动能力、获能、顶体反应以及授精能力起着重要的作用<sup>[22]</sup>。因此, 在本实验中, 由于 Zn 离子缺乏导致的 VDAC3 的 mRNA 丰度下降可能是精子活力下降的原因。在 CASA 分析结果中, 精子的活动参数是精液质量的重要指标, 可以用以提供对男性生育能力的评估。因此 Zn 离子缺乏所导致的 VDAC3 的 mRNA 丰度下调与男性的生育能力也可能密切相关。

VDAC 除了可能与精子的活动能力有关以外, 还可能参与精子的其他生理机制。之前的研究表明

敲除了 VDAC3 基因的雄性小鼠除了表现出精子活动能力下降以外, 还表现出异常的精子结构, 精子鞭毛的中段轴丝 9+2 的微管出现缺失<sup>[11]</sup>。另外抗 VDAC 抗体可以影响到精子顶体的完整性, 可能是由于 VDAC 调节精子顶体区域膜内外  $Ca^{2+}$  和  $Cl^{-}$  离子的浓度, 从而维持膜内外正常的离子渗透压所致<sup>[23]</sup>。VDAC 精子获能时酪氨酸磷酸化, 而酪氨酸磷酸化与精子的获能、顶体反应、透明带结合以及精卵结合相关<sup>[24]</sup>。因此由 Zn 离子缺乏引起的 VDAC3 的 mRNA 水平变化也可能会影响到上述精子的复杂功能, 从而影响男性的生育能力。另外, Zn 在精液中抑制 PSA 酶或其他蛋白酶活性<sup>[25]</sup>, Zn 存在可能使得精子 VDAC 的 mRNA 分解减弱, 对维持精子生存、延长精子的寿命可能也有作用。Zn 离子可能通过影响 VDAC 的 mRNA 途径从而影响精子的获能、顶体反应、透明带结合以及精卵结合等功能的机制需要进一步研究。

总之, 本研究表明在体外试验中 Zn 离子缺乏时可以导致精子的活动能力受到影响并且下调了 VDAC3 的 mRNA 丰度, 而加入 Zn 离子后则可以逆转上述影响。这个研究结果可以为 Zn 是否在体内影响精子 VDAC 的 mRNA 表达水平, 从而影响到精子的正常功能提供线索。同时还能帮助进一步理解精子运动以及男性生育的分子机制, 为 Zn 制剂预防和治疗由于 Zn 缺乏导致的男性不育提供理论依据。

(致谢: 感谢南京医科大学现代毒理学教育部重点实验室给予的技术支持。)

## [参考文献]

- [1] Mohan H, Verma J, Singh I, et al. Inter-relationship of zinc levels in serum and semen in oligospermic infertile patients and fertile males [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 1997, 40(4): 451-455
- [2] Chia SE, Ong CN, Chua LH, et al. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men [J]. *J Androl*, 2000, 21(1): 53-57
- [3] Bedwal RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction [J]. *Experientia*, 1994, 50(7): 626-40
- [4] 孙超, 徐志鹏, 石亮, 等. 不育症患者精子 DNA 碎片化指数与精子常规参数关系的研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, (4): 565-567
- [5] Young MJ, Bay DC, Hausner G, et al. The evolutionary history of mitochondrial porins [J]. *BMC Evol Biol*, 2007, 7: 31
- [6] Schein SJ, Colombini M, Finkelstein A. Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria [J]. *J Membr Biol*, 1976, 30(2): 99-120
- [7] Colombini M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 256-257(1-2): 107-115
- [8] Blachly-Dyson E, Forte M. VDAC channels [J]. *IUBMB Life*, 2001, 52(3-5): 113-118
- [9] Tsujimoto Y, Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis [J]. *Biochimie*, 2002, 84(2-3): 187-193
- [10] Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson CE, et al. The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29): 27312-27318
- [11] Sampson MJ, Decker WK, Beaudet AL, et al. Immobile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage-dependent anion channel type 3 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 39206-39212
- [12] Hinsch KD, De Pinto V, Aires VA, et al. Voltage-dependent anion-selective channels VDAC2 and VDAC3 are abundant proteins in bovine outer dense fibers, a cytoskeletal component of the sperm flagellum [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15): 15281-15288
- [13] Triphan X, Menzel VA, Petrunina AM, et al. Localisation and function of voltage-dependent anion channels (VDAC) in bovine spermatozoa [J]. *Pflugers Arch*, 2008, 455(4): 677-686
- [14] Lu H, Pang W, Hu YD, et al. Effects of intracellular zinc depletion on the expression of VDAC in cultured hippocampal neurons [J]. *Nutr Neurosci*, 2011, 14(2): 80-87
- [15] Liu B, Wang P, Wang Z, et al. Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2010, 27(12): 719-724
- [16] Fuse H, Kazama T, Ohta S, et al. Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters [J]. *Int Urol Nephrol*, 1999, 31(3): 401-408
- [17] 王增军, 张炜, 吴宏飞, 等. 人精子膜表面电压依赖性阴离子通道的初步研究 [J]. *中华男科学杂志*, 2007, 13(6): 498-501
- [18] Zhao RP, Xiong CL. Zinc content analysis in serum, seminal plasma and spermatozoa of asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic patients [J]. *中华男科学杂志*, 2005, 11(9): 680-682
- [19] Wong WY, Flik G, Groenen PM, et al. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men [J]. *Reprod Toxicol*, 2001, 15(2): 131-136
- [20] Caldamone AA, Freytag MK, Cockett AT. Seminal zinc and male infertility [J]. *Urology*, 1979, 13(3): 280-281
- [21] Grootegoed JA, Siep M, Baarends WM. Molecular and cellular mechanisms in spermatogenesis [J]. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2000, 14(3): 331-343
- [22] Wang H, Zhou Z, Xu M, et al. A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2004, 82(5): 317-324
- [23] Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, et al. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(18): 2249-2270
- [24] Urner F, Sakkas D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa [J]. *Reproduction*, 2003, 125(1): 17-26
- [25] de Lamirande, E Semenogelin. The main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33(1): 60-68

[收稿日期] 2011-12-09