

氰戊菊酯对小鼠精子顶体反应影响及作用机理

张习春, 肖 杭*, 张 莉, 王心如

(南京医科大学公共卫生学院应用毒理学研究所, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 观察氰戊菊酯对小鼠精子顶体反应的影响并探讨其作用机理。方法 采用顶体反应诱导试验结合细胞染毒, 以考马斯亮蓝染色法判定精子顶体反应。结果 孕酮或 A23187 诱导的小鼠精子顶体反应, 可被 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 和 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mn^{2+} 相应地完全抑制; $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰戊菊酯则有明显抑制作用。实验还发现氰戊菊酯在精子获能前或后加入, 对孕酮诱发顶体反应的抑制率不同, 获能前抑制率低, 二者存在显著性差异。结论 氰戊菊酯对小鼠精子顶体反应有抑制作用, 对小鼠精子获能可能有一定的促进作用。

关键词: 氰戊菊酯; 精子; 顶体; 获能

中图分类号: R994.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)01-0021-04

近年来, 在人体和野生动物发现的许多异常现象, 如男性精子活力降低或数量减少、动物生殖机能障碍等, 均被认为与可扰乱内分泌系统的环境污染物有关。其中, 令人们关注的是被称为环境雌激素的一些环境污染物, 是当今威胁人类生殖及后代繁衍的重要因素之一。氰戊菊酯已被美国环保局列入环境雌激素的名单中。本实验观察氰戊菊酯对小鼠精子顶体反应的影响, 并对作用机理作初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

ICR 小鼠, ♂, 12~16 周, 体重 30~35 g, 南京医

收稿日期: 2001-05-08 接受日期: 2001-07-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30170811)

作者简介: 张习春(1975-), 男, 辽宁大连市人, 医学硕士, 主要研究方向氰戊菊酯对精子细胞钙信号途径的作用。

* 联系作者 Tel: (025)6662956, Fax: (025)6527613

E-mail: neutoxi@njmu.edu.cn

科大学实验动物中心提供。Tyrode 液, 参照文献^[1]配制; 孕酮(progesterone), Ca^{2+} 载体 A23187, 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购于 Sigma 公司; 氰戊菊酯标准参照物, 纯度 > 98.60%, 购于上海中西药业股份有限公司; 考马斯亮蓝 G250 为 Fluka 进口分装; 依地酸二钠(disodium ethylenediamine tetraacetate, EDTA- Na_2)和 MnCl_2 为分析纯, 购于上海试剂厂; 孕酮, A23187, 氰戊菊酯均溶于 DMSO, 反应体系 DMSO 的浓度不超过 1%, 其对小鼠精子活率和顶体反应均无影响。

1.2 小鼠精子获取

12~16 周的小鼠, ♂, 颈椎脱臼处死, 迅速剪取双侧附睾尾和输精管, 放入 Tyrodes 液剪成小段, 于 37°C CO_2 孵箱 10 min, 使精子游离出来。以上游富集法收集运动良好的精子, 调节精子浓度至每毫升 $(3\sim6) \times 10^6$, 活动率 $\geq 90\%$ 。

1.3 小鼠精子顶体反应的诱导和染毒

精子悬液分装于 1 mL 容量的 Eppendorf 管, 每管 0.2 mL, Parafilm 密封, 37°C 培养 2 h, 使精子获能。获能后的精子悬液加入溶于 DMSO 的孕酮或 Ca^{2+} 载体 A23187, 终浓度分别为 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Parafilm 密封, 37°C 继续培养 15 min 以诱导顶体反应。氰戊菊酯于获能完成, 加入孕酮或 A23187 前 5 min 加入。实验中为了观察氰戊菊酯对小鼠精子获能和顶体反应两个不同过程的影响, 一组于精子获能前, 即精子悬液在 37°C CO_2 孵箱平衡 15 min 后加入氰戊菊酯; 另一组于精子获能完成时加入, 其他同前。

1.4 考马斯亮蓝染色法判定顶体反应

参照文献^[2], 精子完成顶体反应后, $500 \times g$ 离心 10 min, 沉淀以 5% 甲醛-磷酸盐缓冲液(PBS)固定 10 min, 离心去上清, PBS 洗涤 2 遍; 适量 PBS 悬浮沉淀, 吸取 $50 \mu\text{L}$ 精子悬液于载玻片涂片晾干; 精子涂片用 0.22% 考马斯亮蓝染液滴玻片浸染 2 min, 双蒸水冲洗, 晾干。普通光学显微镜观察, 每张涂片计数 200 个精子, 以百分数表示精子顶体反应率。

1.5 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异的比较用 t 检验。

2 结果

2.1 小鼠精子顶体反应诱导和与 Ca^{2+} 关系

小鼠精子自发顶体反应率为 $(17 \pm 3)\%$ ，加入 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 孕酮或 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} 载体 A23187 顶体反应率显著增加，分别为 $(42 \pm 7)\%$ ， $(54 \pm 11)\%$ ，与自发顶体反应率相比均有非常显著性差异，而当反应体系中存在 $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 或 $1.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mn^{2+} 时，二者的诱导作用相应地被完全抑制(图 1)，提示 Ca^{2+} 在生理性诱导剂孕酮诱发顶体反应中也起重要作用。

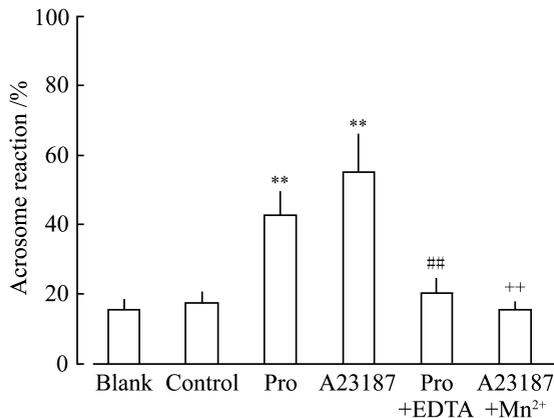


Fig 1. Effect of ethylenediamine tetraacetate and Mn^{2+} on the acrosome reaction of mouse sperm induced by progesterone(Pro) or A23187. Pro: $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, A23187: $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, EDTA: $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Mn^{2+} : $1.8 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Data were expressed as percentages of sperm with reacted acrosomes as determined by coomassie brilliant blue (CBB) staining. Two hundred cells were counted per treatment per trial. Spermatozoa that received no treatment were blank. Spermatozoa that treated with DMSO were control. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. ** $P < 0.01$, compared with control; ## $P < 0.01$, compared with progesterone; ++ $P < 0.01$, compared with A23187.

2.2 氰戊菊酯对小鼠精子获能和顶体反应的影响

以 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰戊菊酯处理获能精子，而后加入孕酮或 Ca^{2+} 载体 A23187，顶体反应率分别由未加氰戊菊酯时的 $(38 \pm 4)\%$ ， $(62 \pm 10)\%$ 降为 $(22 \pm 4)\%$ ， $(35 \pm 7)\%$ ，前后比较均有显著性差异(图 2)。另在顶体反应诱导实验中，一组于精子获能前加入

氰戊菊酯，另一组于获能后加入，可见 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氰戊菊酯对两组顶体反应也存在明显抑制作用(图 3)，但两组抑制率有显著性差异($P < 0.01$ ，非配对 t 检验，图上未显示)，获能前组抑制率低。这些提示氰戊菊酯对精子顶体反应和获能两个阶段均有作用，但其作用不同。

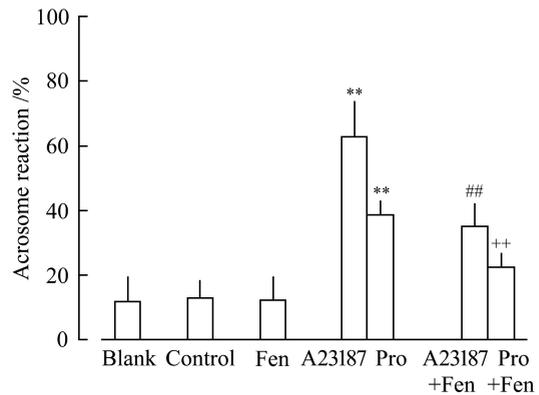


Fig 2. Effect of fenvalerate on acrosome reaction of mouse sperm induced by A23187 or progesterone. Pro: $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, A23187: $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Fen: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The data expression, the number of cells counted, the blank and the control are the same as described in Fig 1. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$ (A23187), 14 (Pro). ** $P < 0.01$, compared with control; ## $P < 0.01$, compared with A23187; ++ $P < 0.01$, compared with progesterone.

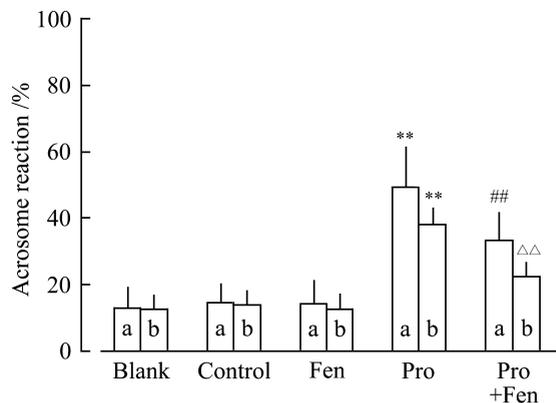


Fig 3. The difference of percentages of acrosome reaction of mouse sperm as treated with fenvalerate before (a) or after (b) capacitation. Pro: $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Fen: $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The data expression, the number of cells counted, the blank and the control are the same as described in Fig 1. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$ (a), 14 (b). ** $P < 0.01$, compared with control; ## $P < 0.01$, compared with progesterone (a); △△ $P < 0.01$, compared with progesterone (b).

3 讨论

研究 Ca^{2+} 在小鼠精子顶体反应中的作用时发现, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 和 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Mn^{2+} 相应地完全抑制孕酮和 A23187 诱导的顶体反应。EDTA 对 Ca^{2+} 的特异亲和性, 使得正常培养基中游离 Ca^{2+} 被结合; A23187 为 Ca^{2+} 载体, 但其对 Mn^{2+} 的亲合性强于 Ca^{2+} , 若溶液中同时存在 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} , 则优先转运 Mn^{2+} , 使 Ca^{2+} 不能进入胞内, 而 Mn^{2+} 对精子顶体反应无作用^[3], 因而不能诱发顶体反应。这些结果表明 Ca^{2+} 入胞在小鼠精子顶体反应中起重要作用, 而且提示在孕酮诱发精子顶体反应中, Ca^{2+} 内流也是重要的一环, 这支持孕酮开放一依赖于胞外 Cl^{-} 的 Ca^{2+} 通道^[4]。值得一提的是, 在得到相似顶体反应率时, 本次实验所用孕酮浓度约是文献报道的 10 倍, 考虑是种属间差异造成的。

文献报道氰戊菊酯可致小鼠精子畸形率增加^[5], 本实验则研究氰戊菊酯对小鼠精子顶体反应的影响。作者观察到氰戊菊酯对孕酮和 A23187 诱发的顶体反应均显著性抑制。A23187 为亲脂性 Ca^{2+} 载体, 不通过 Ca^{2+} 通道直接运载胞外 Ca^{2+} 入胞, 进而引起精子顶体反应; 在孕酮诱发的顶体反应中胞内 Ca^{2+} 升高也是关键环节。氰戊菊酯的作用, 提示 Ca^{2+} 转运或 Ca^{2+} 信号途径的抑制。已知钙调神经磷酸酶在精子顶体反应起始起重要作用, 钙调神经磷酸酶的激活依赖于 Ca^{2+} 或钙调蛋白, A23187 可促使其活化, 氰戊菊酯则抑制其活化^[6,7], 使精子膜蛋白酪氨酸处于磷酸化状态, 影响顶体反应发生。本实验再次提示氰戊菊酯作用途径之一可能是抑制钙调神经磷酸酶。另在孕酮诱导顶体反应中, 已知其可开放一 GABA_A 样受体复合物的 Cl^{-} 通道, Cl^{-} 内流引起膜的超极化, 转而激活 Ca^{2+} 通道。 GABA_A 样受体复合物存在氰戊菊酯作用靶点^[8], 而且氰戊菊酯对 Cl^{-} 通道也有抑制作用^[9], 那么氰戊菊酯对孕酮诱导顶体反应的抑制是否也有这些途径参与? 尚需证明。

实验结果提示氰戊菊酯对小鼠精子获能可能有一定促进作用。已有实验表明氰戊菊酯可增加神经细胞膜流动性^[10], 而在小鼠精子获能时一重要的变化则是膜流动性的增加, 那么氰戊菊酯是否通过增加精子膜流动性促进获能? 这是需要我们进一步阐明的。

总之, 氰戊菊酯对小鼠精子顶体反应有明显抑

制作用, 影响精子受精能力。尽管已知这与 Ca^{2+} 信号途径有关, 但仍有许多问题尚未解决, 如它除了抑制 Ca^{2+} 或钙调神经磷酸酶的活性是否还作用于其他 Ca^{2+} 信号途径? 对获能影响机理如何? 这些都还有待深入研究。

致谢: 实验中浙江医学科学院药物研究所石其贤教授给予了无私的帮助, 在此表示感谢。

4 参考文献:

- [1] Shi QX, Roldan ER. Bicarbonate/ CO_2 is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation [J]. *Biol Reprod*, 1995, **52**(3):540-546.
- [2] Boettger-Tong H, Aarons D, Biegler B, Lee T, Poirier GR. Competition between zonae pellucidae and a proteinase inhibitor for sperm binding [J]. *Biol Reprod*, 1992, **47**(5):716-722.
- [3] Lee MA, Storey BT. Endpoint of first stage of zona pellucida-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa characterized by acrosomal H^{+} and Ca^{2+} permeability: population and single cell kinetics [J]. *Gamete Res*, 1989, **24**(3):303-326.
- [4] Shi QX, Roldan ER. Evidence that a GABA_A -like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa [J]. *Biol Reprod*, 1995, **52**(2):373-381.
- [5] Pati PC, Bhunya SP. Cytogenetic effects of fenvalerate in mammalian *in vivo* test system [J]. *Mutat Res*, 1989, **222**(3):149-154.
- [6] Enan E, Matsumura F. Specific inhibition of calcineurin by type II synthetic pyrethroid insecticides [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, **43**(8):1777-1784.
- [7] Carrera A, Moos JR, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, *et al.* Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of a kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation [J]. *Dev Biol*, 1996, **180**(1):284-296.
- [8] Lawrence LG, Casida JE. Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the gamma-aminobutyric acid receptor-ionophore complex [J]. *Science*, 1983, **221**(4618):1399-1401.
- [9] Forshaw PJ, Lister T, Ray DE. The role of voltage-gated chloride channel in type II pyrethroid insecticide poisoning [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **163**(1):1-8.

- [10] Sarkar SN, Balasubramanian SV, Sikdar SK. Effect of fenvalerate, a pyrethroid insecticide on membrane fluidity[J].

Biochim Biophys Acta, 1993, **1147**(1):137 - 142.

Effect of fenvalerate on sperm acrosome reaction in mice and its mechanism

ZHANG Xi-Chun, XIAO Hang, ZHANG Li, WANG Xin-Ru

(*Department of Neurotoxicology, Institute of Applied Toxicology, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China*)

Abstract: **AIM** To observe the effect of fenvalerate, a pyrethroid insecticide on sperm acrosome reaction in mice, and to study the mechanism of its action. **METHODS** The sperms treated directly with fenvalerate were stimulated by progesterone or Ca^{2+} ionophore A23187, an inducer of acrosome reaction (AR). The acrosomal status was determined by light microscopy combined with Coomassie brilliant blue staining. The rate of AR of sperm was calculated. **RESULTS** The rise of intracellular Ca^{2+} was essential in the sperm AR induced by progesterone or A23187, but the rate of AR was obviously lower when the

system existed $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ fenvalerate ($P < 0.01$). Furthermore, the study showed that the inhibition rate of AR as adding fenvalerate before capacitation was significantly lower than that after capacitation ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Fenvalerate inhibits sperm AR and may promote sperm capacitation.

Key words: fenvalerate; spermatozoa; acrosome; capacitation

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(30170811)

(本文编辑 石 涛)