

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.11.006

文章编号: 1005-8982 (2020) 11-0026-06

线粒体及其自噬与不同程度弱精子症的关系 *

刘俊¹, 张友旺², 潘龙瑞², 谭艳²

(1. 锦州医科大学 湖北医药学院研究生培养基地, 湖北 十堰 442000 ;

2. 湖北医药学院基础医学院, 湖北 十堰 442000)

摘要: 目的 观察弱精子症患者的射精精子中是否存在自噬及线粒体自噬现象, 并探讨线粒体及其自噬对精子活动力的影响。**方法** 收集湖北医药学院附属人民医院男科及生殖中心就诊的精液样本, 并依照计算机辅助精液分析系统(CASA)检测结果, 分为正常对照组和轻、中、重度弱精子症组, 每组30例。采用电镜观察各组精子线粒体形态及自噬小体分布; Western blotting检测精子线粒体膜蛋白及自噬标志蛋白TOM20、LC3等的表达水平; 共聚焦显微镜检测精子中的LC3及线粒体荧光斑点, 以了解精子中发生的自噬是否属于特异性线粒体自噬。**结果** 不同程度弱精子症患者的精子中, 线粒体分布及自噬发生程度均有不同的表现, 两者存在共定位的特点, 并且与弱精子症程度呈负相关($P < 0.05$)。**结论** 线粒体自噬是人类精子的活性过程, 自噬的活化在人类精子生理活动中起积极作用, 保持并调节精子活动力。

关键词: 弱精子症; 线粒体自噬; 精子活动力; 自噬

中图分类号: R697

文献标识码: A

Correlation between mitochondria and mitophagy in different degrees of Asthenospermia*

Jun Liu¹, You-wang Zhang², Long-rui Pan², Yan Tan²

(1. Postgraduate Training Base of Hubei University of Medicine, Jinzhou Medical University, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To observe the phenomenon of autophagy and mitophagy of ejaculated sperm in the male patients with asthenospermia (AZS), and to determine the role of mitochondria and their autophagy among patients with different level of AZS in China. **Methods** According to the WHO manual (the 5th edition), published in 2010, semen samples were collected from the Andrology clinics in the People's hospital which were affiliated to Hubei University of Medicine, and were divided into 4 group, the normal control group, mild group, moderate group and severe group (30 cases in each group). Electron microscope detection was performed to analyze the number and morphology of mitochondria and the distribution of autophagosomes in the sperm of each group. Western blotting method was used to judge the expression of TOM20, LC3 and other proteins related to mitochondrial autophagy. LC3 and mitochondrial fluorescence spots in sperm were detected by confocal laser microscopy to exam if autophagy in sperm is the idiopathic mitochondrial autophagy. **Results** In different degree of asthenospermia, the distribution of mitochondria and the degree of autophagy were different, they had the characteristics of CO location, and they were negatively correlated with the degree of asthenospermia ($P < 0.05$). **Conclusions** Mitochondrial autophagy is an active process in human sperm. The activation of autophagy plays an active role in human sperm physiological

收稿日期: 2019-12-11

* 基金项目: 湖北省教育厅科研基金项目 (No: B2016134)

[通信作者] 谭艳, E-mail: 2659754897@qq.com; Tel: 0719-8891131

activities, maintaining and regulating sperm motility.

Keywords: asthenospermia; mitophagy; sperm motility; autophagy

精子活动力是决定男性生育能力的关键因素,由于精子活动力下降导致的弱精子症是男性不育的常见病因之一^[1]。精子活动力来源于细胞内线粒体的氧化磷酸化和线粒体外的糖酵解途径^[2]。目前的研究表明,线粒体及其自噬在维持生精细胞的稳态及在成熟过程中发挥着重要作用^[3-5],但是线粒体及其自噬在维持人类精子活动力方面的作用及调节自噬后对人类尤其是中国男性射精精子活动力影响的研究较少见。故本研究通过观察精子形态、检测自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3), 以及线粒体外膜转位酶(translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOM20)的表达水平,探索线粒体及其自噬对精子活动力的影响,以期对男性不育症的诊断、治疗及预后提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集 2017 年 12 月—2018 年 12 月在湖北医药学院附属人民医院男科及生殖中心就诊的男性精液样本。纳入标准:①精液浓度 $\geq 15 \times 10^6$ 个/ml;②年龄 >22 岁;③排除有泌尿生殖系统疾病家族遗传史及有手术外伤史等可能会影响精子质量的患者。通过手淫取精于无菌取精杯内,置 37℃恒温培养箱内液化 30 min。待精液完全液化后,按照 WHO《人类精液检查与处理实验室手册》第 5 版检验标准对所有的实验对象进行精液常规检查^[6],按照精子前向运动速率(progressive motility, PR)将其区分为 4 组:正常对照组(PR $\geq 32\%$),轻度弱精子症组(20% $\leq$ PR $<32\%$),中度弱精子症组(10% $\leq$ PR $<20\%$),重度弱精子症组(0% $<$ PR $<10\%$)。每组 30 例,合计 120 例。本研究经医院医学伦理委员会同意,患者家属签署知情同意书。

1.2 试剂及仪器

Percoll 液购自美国 Pharmacia 公司, BWB 精子培养液(由 Biggers-Whitten-Whittingham 研究小组在 1971 年发表,又称为获能培养液)购自生工生物工程(上海)股份有限公司,电镜固定液购自武汉谷歌生物科技有限公司, Mitotracker Deep Red(MTDR)荧光染料购自北京中杉金桥生物科技有限公司,内参 GAPDH、

兔抗 LC3、TOM20 一抗、HRP- 山羊抗兔 IgG 二抗及 FITC 标记山羊抗兔 IgG 均购自上海碧云天生物技术有限公司。制冰机、超净工作台、4℃冰箱、-20℃冰箱及 37℃恒温箱均购自青岛海尔集团,移液器及振荡器购自北京 Dragon-Lab 实验仪器公司,计算机辅助精液分析系统(computer-aided sperm analysis, CASA)购自北京自然基因科技有限公司,高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司,激光共聚焦免疫荧光成像系统购自荷兰 Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 精子的电镜检测 取 500 μ l 精液标本,加入约 10 倍体积的电镜固定液室温固定 2 h,再转移至 4℃预冷 1 h 后,恒温 4℃冰袋运输至武汉谷歌生物科技有限公司,由该公司对标本进行处理后采集图像,根据图像分析各组精子中线粒体数量、形态、分布等。

1.3.2 Percoll 法分离精液 为避免精液中的生精细胞及精浆中的白细胞对结果产生影响,采用非连续梯度离心的方法对精子进行分离。具体操作如下:将 40% Percoll 液 2 ml+80% Percoll 液 2 ml+ 精液 2 ml 缓慢分层加入离心管中,1 200 r/min 离心 15 min,弃上清,底层沉淀即为分离出的精子。底层精子加入 2 ml PBS,然后 1 200 r/min 离心 15 min,洗涤 3 次。镜下确认纯化效果并计数,纯化后的精子可用于后续实验。

1.3.3 Western blotting 检测 LC3 及 TOM20 的相对表达量 将纯化精子重悬于细胞溶解液 RIPA,同时按 1:100 的比例加入蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(100 mg/ml),超声裂解 10 s $\times$ 5 次,全程置于冰上操作。4℃、15 000 r/min 离心 15 min,上清即为精子总蛋白。用上海碧云天生物技术有限公司的 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,加入 5 $\times$ SDS Loading buffer, 100℃煮 5 min。配置 12% SDS-PAGE 胶,每孔上样 30 μ g 蛋白,常规电泳和转膜,用含 5% 脱脂牛奶的 PBST 室温封闭 2 h,兔抗 LC3、TOM20 一抗 4℃孵育过夜。次日, PBST 洗膜 8 min $\times$ 3 次。然后用 HRP- 羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 2 h, PBST 洗膜 8 min $\times$ 3 次,用化学发光法(ECL)显影。采用 Image Lab 图像分析软件测定每条带的灰度值,用样本与相对应内参 GAPDH 的灰度值比值作为该样本蛋白的相对表达量。

1.3.4 免疫荧光检测 LC3 及线粒体数量 将纯化的

精子重悬于 BWB 精子培养液中,调整浓度为 30×10^6 个/ml,按照 1 : 100 的比例加入兔抗 LC3 一抗 4℃ 孵育过夜,1 200 r/min 离心 15 min,弃上清,PBS 1 200 r/min 离心 15 min,洗涤 3 次,加入 BWB 精子培养液在显微镜下调整浓度为 30×10^6 个/ml,按照 1 : 100 的比例加入 FITC 标记山羊抗兔 IgG 及 MTDR 荧光染料,避光孵育 60 min,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 1 200 r/min 离心 5 min,洗涤 3 次,加入抗荧光淬灭封片剂重悬浮精子,取 5 μ l 混悬液置于载玻片上,使用盖玻片推片,激光共聚焦显微镜观察拍照。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;不服从正态分布的计量资料,经转化处理后服从正态分布,多组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同活动力精子电镜检测结果

电镜结果显示,所有精液样本中的精子头部及鞭毛完整,未见畸形精子,但线粒体的形态、数量及分

布存在差异。具体表现为:正常对照组可见线粒体位于精子尾部颈部至中段,线粒体与精子尾轴呈平行规则排列,以规则的圆形及卵圆形多见;线粒体数次 50 ~ 70 个不等,线粒体长径与横径比约为 2 : 1,相邻的线粒体分界清晰;线粒体双层膜结构清晰,嵴膜和嵴间隙结构较完整,内有或无颗粒。轻度弱精子组可见精子线粒体数量较正常组减少,形态不规则,趋于圆形;双层膜结构尚存在,内部可出现空泡化,线粒体旁可见自噬小泡形成。中度弱精子组可见精子线粒体数量较前进一步减少,分布不均匀,主要集中在头颈部,可出现双重或 3 层重叠线粒体围绕于轴丝,部分脱鞘,形态明显不规则,线粒体嵴消失,肿胀明显,伴有内部明显空泡化,可形成微囊状结构;肿胀的线粒体周围可见大量自噬小泡形成。重度弱精子组可见线粒体排列紊乱、分布极不均匀,可沿尾部分散排列,伴有数量减少,体积缩小,膜间隙消失,局部可见形似凋亡小体的不规则高密度结晶状物聚集。见图 1。

2.2 各组线粒体数量及 LC3 的表达

激光共聚焦显微镜可见,在正常对照组中,线粒体主要位于精子头部及尾部中段,被 MTDR 染色后呈

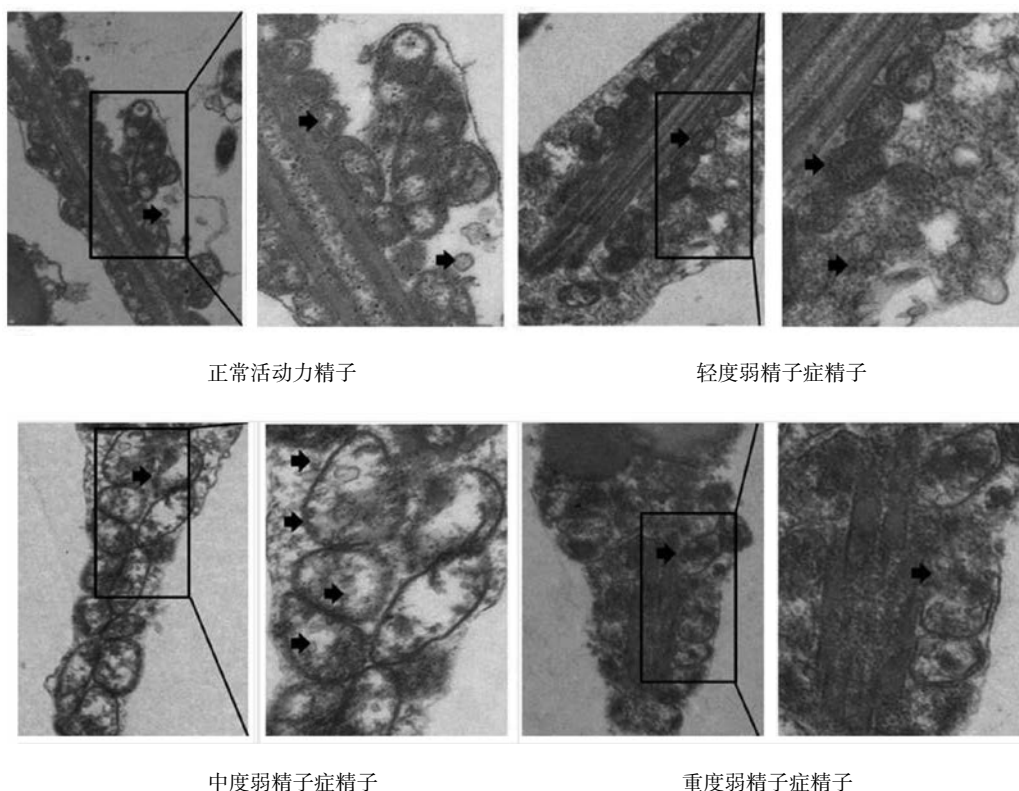


图 1 不同弱精子症患者精子的线粒体结构 (电镜 $\times 10\ 000$)

红色，而 FITC 标记的 LC3 荧光颗粒也同时位于此处，在荧光显微镜下呈绿色，红绿两者共定位，故呈黄色。随着弱精子症程度的加重，线粒体分布逐渐由头部及尾部中段向整个尾部移动，包括 FITC 标记的 LC3 荧光颗粒也随之向远处移动，并伴有分布不均匀及数量减少。在不同组的精子中，线粒体的分布以及自噬发生的程度均有不同的表现，两者存在共定位的现象。

见图 2。

2.3 各组 TOM20 与 LC3 的表达

结果显示，各组 TOM20 与 LC3 的表达量比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在不同程度弱精子症组中 LC3 和 TOM20 表达随着精子活动力下降，呈现逐渐递减趋势 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 3、4。

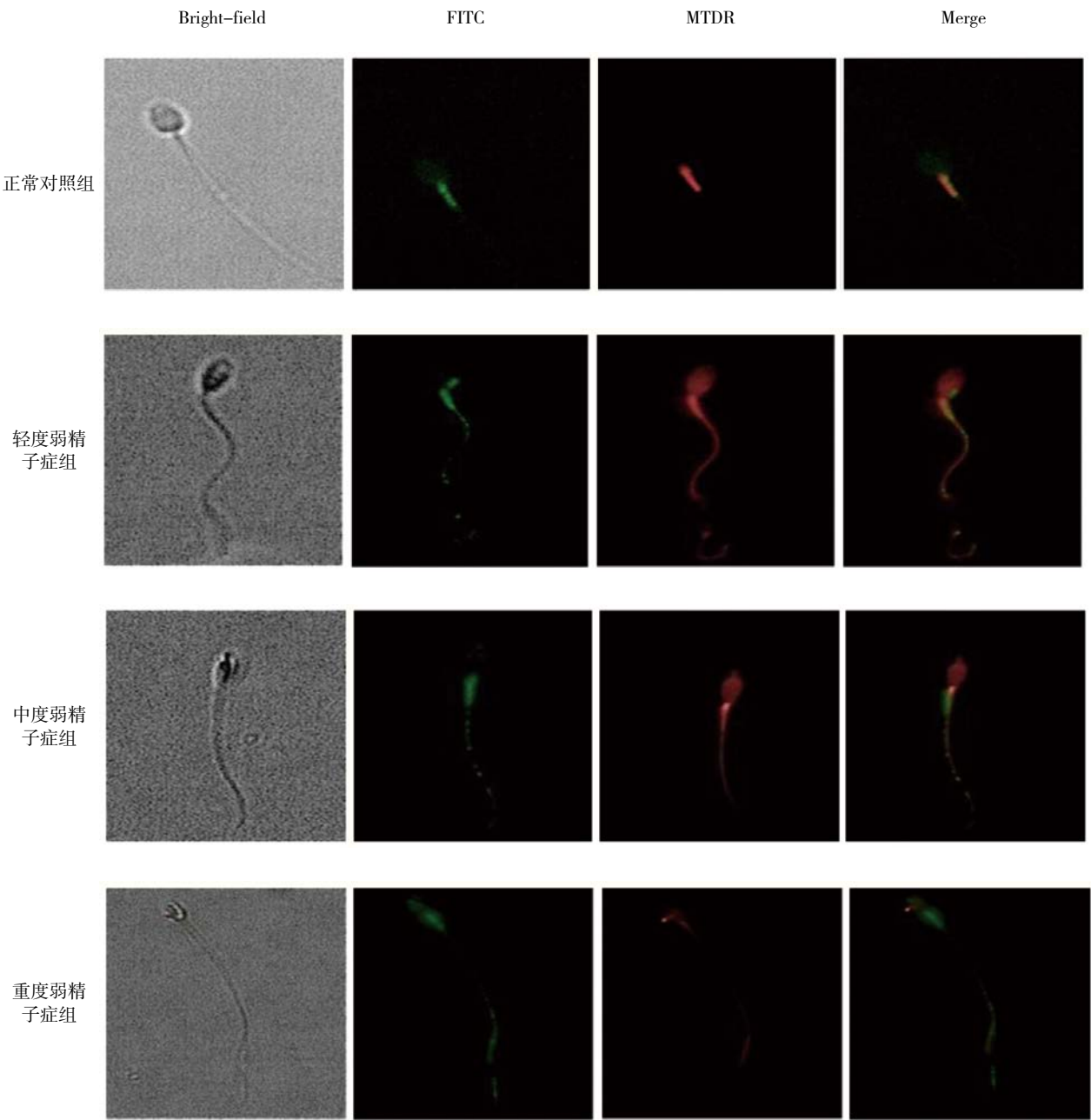


图 2 不同程度弱精子症患者精子中线粒体及自噬颗粒分布情况 （激光共聚焦显微镜 × 63）

表 1 4 组 LC3 及 TOM20 蛋白表达水平比较

(n=30, $\bar{x} \pm s$)

组别	LC3- II /LC3- I	TOM20
正常对照组	3.51 ± 0.52	1.33 ± 0.31
轻度弱精子症组	6.52 ± 0.31 ^①	1.10 ± 0.13 ^①
中度弱精子症组	2.52 ± 0.21 ^{①②}	0.54 ± 0.20 ^{①②}
重度弱精子症组	0.98 ± 0.12 ^{①②③}	0.21 ± 0.07 ^{①②③}
F 值	49.647	59.021
P 值	0.000	0.000

注: ①与正常对照组比较, $P < 0.05$; ②与轻度弱精子症组比较, $P < 0.05$; ③与中度弱精子症组比较, $P < 0.05$ 。

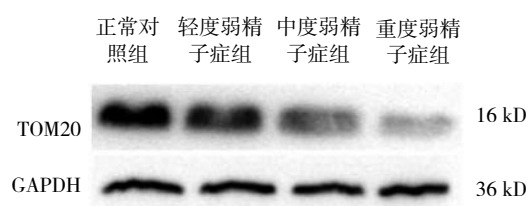


图 3 各组 TOM20 蛋白的表达

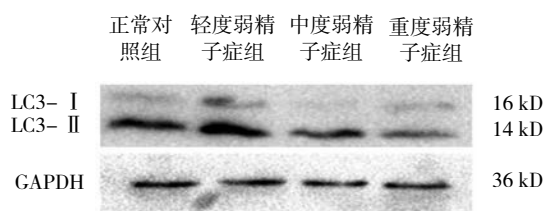


图 4 各组 LC3 蛋白的表达

3 讨论

良好的精子质量是成功受精和后代存活的重要因素,通常可由多个质量指标进行评估^[7]。精子活动力是男性生育能力的关键因素。对人类而言,发育成熟的精子只有获得运动能力后才能穿透宫颈黏液,抵达输卵管壶腹部与卵子结合形成受精卵^[8-9]。而外界环境污染、不良生活习惯、免疫因素或理化因素等均可导致人类精子活动力降低^[10-12]。早在 1955 年已经证实,精子活动力的能量来源是三磷酸腺苷(ATP)^[13-14]。而精子内 ATP 的来源也与大多数真核生物一样来源于 2 条通路:细胞内的氧化磷酸化和糖酵解,但是关于能量代谢通路的主导作用一直备受争议^[15]。

目前多数研究认为,由于糖酵解相关酶系存在于细胞质中,反应速度快,涉及的环节少,相对于复杂的三羧酸循环更加适用于精子的能量供应;同时由于精子尾部轴丝的“9+2”微管结构相互滑动过程导致精子活动的过程中所需的 ATP 数量巨大,需要 ATP

的快速供应,这时由于线粒体位于精子尾部中段,距离轴丝尾部较远,所产生的 ATP 无法快速转运至轴丝尾部,所以此时糖酵解反应的快速性就成为轴丝尾部运动所需 ATP 的主要“供给者”。结合国内外的研究,糖酵解可提供精子尾部运动所需能量的 80% ~ 90%,而线粒体仅提供约 10% ~ 20%^[16-17]。线粒体作为成熟精子唯一保留的细胞器,在维持精子正常功能过程中尤其是精子的发育成熟过程中发挥重要的作用^[18-19]。研究证实,精子线粒体与受精卵中父系线粒体 DNA 的清除有重要关联^[20]。线粒体在发挥活性功能的同时产生的诸如活性氧类(reactive oxygen species, ROS)等代谢物需要特定的通路进行代谢。正常情况下,睾丸内 ROS 的产生及清除处于一种相对平衡的状态。生理浓度的 ROS 不仅对精子无害,而且还可以诱导其顶体反应,促进精子的获能;但是当 ROS 的浓度超过一定程度,男性生殖系统内的抗氧化系统难以将其清除时,ROS 可对精子的生存及活动力产生危害,称之为氧化应激^[21]。而线粒体在此过程中正是通过自噬发挥一定的清道夫功能。本研究中,通过透射电镜发现,随着弱精子症程度的加重,线粒体形态逐渐发生水肿空泡化,同时伴有自噬小泡数量逐渐增多,但是随着弱精子症程度的进一步加重至重度弱精子症时,自噬减弱甚至消失,主要因为线粒体的大量破坏,使其无法发挥正常功能。

精子活动力与精子线粒体的损伤程度息息相关,随着弱精子症程度的加重,线粒体的形态、分布、功能等均发生改变,正常线粒体的数量逐渐减少,在此过程中线粒体自噬可能对精子活动力起到一个正向调节作用,但是当损伤线粒体达到一定程度和数量后,线粒体无法发挥正常功能,自噬减弱或消失从而导致精子活动力呈现塌方式下降。本研究仅仅通过对弱精子症分度后进行研究,发现线粒体膜蛋白及自噬标记蛋白表达呈现出一定趋势,尚未通过对线粒体功能及自噬过程的干扰观察到精子活动力改变,需要后期研究深入探讨。

综上所述,虽然目前尚未明确射精精子活动力调节就是线粒体自噬在发挥作用,但是线粒体自噬在精子活动力的调节中起到很大的作用,随着精子活动力的减弱,线粒体数量及自噬相关蛋白的表达均发生一定程度的改变,并且不同程度弱精子中线粒体的功能对于精子活动力有一定的调节作用。当然本研究未考虑到精浆中的成分对精子活动力的影响。因此,可以通过调节射精精子线粒体自噬的强度来调节精子的活

动力,从而为弱精子症的治疗提供一个新的治疗靶点。

参 考 文 献:

- [1] CHEN H, RUAN Y C, XU W M, et al. Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility[J]. Hum Reprod Update, 2012, 18(6): 703-713.
- [2] GUO H B, GONG Y B, HE B, et al. Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility[J]. Theriogenology, 2017(87): 276-283.
- [3] YIN J, NI B, TIAN Z Q, et al. Regulatory effects of autophagy on spermatogenesis[J]. Biol Reprod, 2017, 96(3): 525-530.
- [4] ZHANG J, MA W G, HE Y, et al. Potential contributions of miR-200a/-200b and their target gene-leptin to the sexual size dimorphism in yellow catfish[J]. Front Physiol, 2017(8): 970.
- [5] BUI A D, SHARMA R, HENKEL R, et al. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility[J]. Andrologia, 2018, 50(8): e13012.
- [6] 谷翊群,等.译.世界卫生组织.世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2011:16-20.
- [7] MINUTOLI L, ARENA S, ANTONUCCIO P, et al. Role of inhibitors of apoptosis proteins in testicular function and male fertility: effects of polydeoxyribonucleotide administration in experimental varicocele[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 248976.
- [8] HAO M J, ZHU S H, HU L, et al. Myocardial ischemic postconditioning promotes autophagy against ischemia reperfusion injury via the activation of the nNOS/AMPK/mTOR Pathway[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): 18030614.
- [9] BISHT S, DADA R. Oxidative stress: major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies[J]. Front Biosci (Schol Ed), 2017(9): 420-447.
- [10] GUO J Y, TENG X, LADDHA S V, et al. Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells[J]. Genes Dev, 2016, 30(15): 1704-1717.
- [11] APARICIO I M, ESPINO J, BEJARANO I, et al. Autophagy-related proteins are functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility[J]. Sci Rep, 2016(6): 33647.
- [12] ANTONUCCI L, FAGMAN J B, KIM J Y, et al. Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(45): E6166-E6174.
- [13] CODINA M, ESTANYOL J M, FIDALGO M J, et al. Advances in sperm proteomics: best-practise methodology and clinical potential[J]. Expert Rev Proteomics, 2015, 12(3): 255-277.
- [14] LIU C, WANG H N, SHANG Y L, et al. Autophagy is required for ectoplasmic specialization assembly in sertoli cells[J]. Autophagy, 2016, 12(5): 814-832.
- [15] BORODKINA A, SHATROVA A, ABUSHIK P, et al. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells[J]. Aging (Albany NY), 2014, 6(6): 481-495.
- [16] ZHANG M Q, JIANG M, BI Y, et al. Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41412.
- [17] GALLARDO B J, MIRO M A, BALAO da S C, et al. Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30688.
- [18] SHANG Y L, WANG H N, JIA P F, et al. Autophagy regulates spermatid differentiation via degradation of PDLIM1[J]. Autophagy, 2016, 12(9): 1575-1592.
- [19] ZHANG J, ZHANG X M, LIU Y J, et al. Leucine mediates autophagosome-lysosome fusion and improves sperm motility by activating the PI3K/Akt pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(67): 111807-111818.
- [20] ESTEVES S C, AGARWAL A, CHO C L, et al. A strengths-weaknesses-opportunities-threats (SWOT) analysis on the clinical utility of sperm DNA fragmentation testing in specific male infertility scenarios[J]. Transl Androl Urol, 2017, 6(Suppl 4): S734-S760.
- [21] LIU S J, HUANG L X, GENG Y Q, et al. Rapamycin inhibits spermatogenesis by changing the autophagy status through suppressing mechanistic target of rapamycin-p70S6 kinase in male rats[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 4029-4037.

(王荣兵 编辑)

本文引用格式: 刘俊,张友旺,潘龙瑞,等.线粒体及其自噬与不同程度弱精子症的关系[J].中国现代医学杂志,2020,30(11):26-31.