

DOI: 10.13376/j.cblls/2014054

文章编号: 1004-0374(2014)04-0369-08

## 哺乳动物精子获能过程中信号通路研究进展

赵娜, 甄林青, 胡启蒙, 李新红\*

(上海交通大学农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240)

**摘要:** 哺乳动物精子在雌性生殖道内及体外获能培养过程中伴随着胆固醇外流、质膜重组、离子通道调节及获能相关蛋白磷酸化状态改变等相关生理调节过程, 其中信号通路及相应信号分子对精子获能及功能修饰起到重要调节作用, 成为精子细胞超激活运动及完成受精作用的关键环节。根据近年来的研究报道, 对哺乳动物精子获能过程中已知的信号通路、信号分子及调节因子、离子通道、存在的问题及未来研究主要方向进行综述, 为精子体外培养及辅助生殖等提供理论参考。

**关键词:** 获能; 信号通路; 调节因子; 离子通道; 精子

**中图分类号:** Q959.8; R339.2

**文献标志码:** A

## Research progress of signaling pathways of mammalian sperm capacitation

ZHAO Na, ZHEN Lin-Qing, HU Qi-Meng, LI Xin-Hong\*

(Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology,  
Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** During the process of incubation *in vivo* or *in vitro*, the changes associated with mammalian sperm capacitation include: cholesterol efflux, plasma membrane reorganization, ion channel regulation and changes in the phosphorylation state of many proteins. The effect of signaling pathways and corresponding signal molecules plays an important role during sperm capacitation and modification of functions, and becomes the key links of sperm capacitation to hyperactivation and fertilization completed of sperm cells. Based on some reports published in recent years, this review examines that during the process of mammalian sperm capacitation, the known signal pathways, signal molecules, regulatory factors, ion channels, the existing questions and the main investigating fields in the future to provide theoretical reference for *in vitro* fertilization and assisted reproduction.

**Key words:** capacitation; signaling pathways; regulatory factors; ion channel; sperm

哺乳动物精子是高度分化的特异性生殖细胞, 虽然离开附睾的精子具备完整的形态结构以及活跃的运动能力, 但尚不能完成受精作用。精子必须在雌性生殖道内或者体外培养一定时间, 发生一系列生理和生化变化, 才具备真正的受精能力, 这种现象被称为精子“获能”(capacitation)<sup>[1-2]</sup>。获能过程中精子发生的理化及功能性变化不是单一事件, 而是涉及到一系列连续并行的分子过程, 因此, 获能可以被分成两个信号事件(快速事件和慢速事件)<sup>[3]</sup>。快速事件是在精子离开附睾后就会立即发生, 包括鞭毛强有力和不对称运动的激活; 慢速事件需要在雌性生殖道或体外媒介培养一段时间才会发生,

包括精子质膜重组、离子通道调节、获能相关蛋白磷酸化状态改变及超激活运动等一系列相关理化调节过程<sup>[3-4]</sup>。其中信号通路和相应信号分子对精子获能理化变化及功能修饰起到重要调节作用, 成为精子细胞超激活运动及完成受精作用的关键环节。本文主要以信号通路为主线, 对其信号通路中关键

收稿日期: 2013-07-12; 修回日期: 2013-08-13

基金项目: 农业部公益性行业专项项目(200903056);  
上海市科技兴农攻关项目(沪农科攻字2009、第5-1号)

\*通信作者: E-mail: lixinhong7172@sjtu.edu.cn; Tel:  
021-34205827

结点和调节因子等分子事件作一归纳总结，目的在于阐明近年来有关精子获能过程中的信号通路研究进展，更好地理解精子获能过程的理化变化及主要分子事件，总结该领域存在的主要问题及未来重点研究方向。

哺乳动物精子在雌性生殖道内经过一系列生理生化过程后才真正具备受精能力，获得受精能力的精子先后发生“顶体”脱落、胞吐作用(顶体反应)及“顶体酶”释放，最终使卵细胞放射冠和透明带溶解，使精子进入卵细胞完成受精功能<sup>[5]</sup>。精子获能过程发生的生理变化、复杂的分子事件及相应级联反应伴随整个获能过程，而级联反应的分子事件都被信号通路所调控，因此，把获能过程中发生的信号通路归纳为以下三种：(1) cAMP- 依赖的蛋白激酶 A (cAMP-PKA) 信号通路；(2) 磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K) 信号通路；(3) 促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路。信号通路见图 1。下面主要综述这三种信号通路的特点和作用方式，以及信号通路中涉及的重要调节因子和蛋白激酶等在信号通路中的作用。

## 1 cAMP-依赖的蛋白激酶A (cAMP-PKA)信号通路

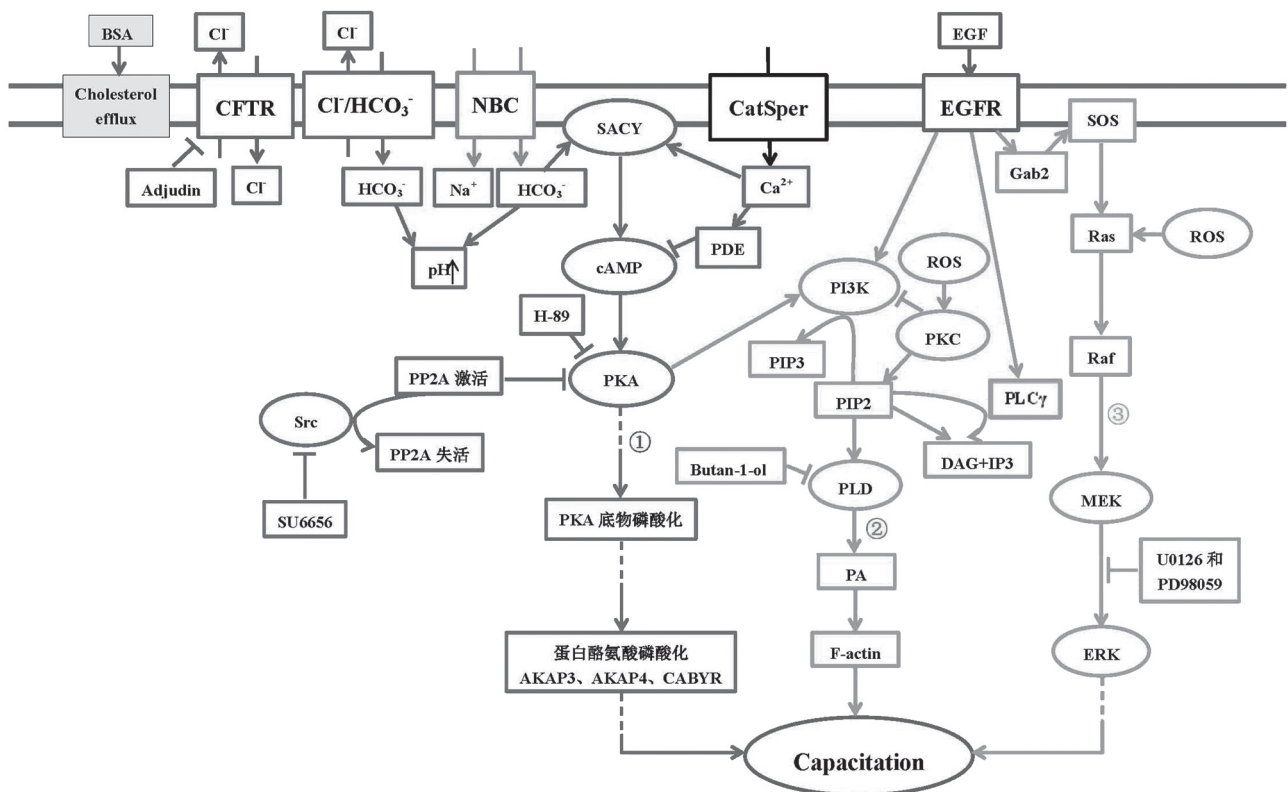
### 1.1 特点及作用方式

获能是一个  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{Ca}^{2+}$  依赖型过程，当细胞  $\text{HCO}_3^-$  和  $\text{Ca}^{2+}$  增加时可以作为信号分子与相应 G 蛋白偶联受体结合后导致受体构象改变，然后激活细胞膜上的 Gs 蛋白，被激活的 Gs 蛋白再激活细胞膜上的腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, AC)，尤其是 AC 的一种类型可溶性腺苷酸环化酶 (SACY)，SACY 可水解 ATP 生成 cAMP，生成的 cAMP 作为第二信使决定蛋白激酶 A (PKA) 的活性。激活的 PKA 将磷酸化许多靶蛋白<sup>[6]</sup>，从而改变这些蛋白的活性，进一步影响相关蛋白的表达；PKA 还可间接激活酪氨酸蛋白激酶，使精子发生蛋白酪氨酸磷酸化、超激活运动、顶体反应及精卵结合等过程<sup>[7]</sup>。

### 1.2 调节因子

#### 1.2.1 血清白蛋白(serum albumin)

质膜中胆固醇外流被认为是精子获能中一个非常重要的起始点。在体外受精研究中，介质中血清



此图是参考精子获能相关研究报道进行归纳总结<sup>[3,8-10]</sup>。实线：进一步就能发生或作用的直接靶标；虚线：过程比较复杂，可能需要几步或更多；标号①②③分别代表3条不同信号通路。

图1 哺乳动物精子获能信号通路

白蛋白(通常使用小牛血清白蛋白,BSA)是非常重要的成分,BSA可以与胆固醇结合,在一定程度上起到诱导胆固醇外流的作用。胆固醇外流可以改变质膜结构,使得质膜通透性和流动性增加,导致质膜中一些转运体(例如NBC( $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ )转运体)和离子通道(例如 $\text{Ca}^{2+}$ 通道CatSper)激活,促使精子获能中需要的信号调节因子进入cAMP-PKA信号通路传递状态,最终参与精子获能<sup>[4]</sup>。从目前的研究报道来看,胆固醇从精子质膜上外流这一信号转导途径是怎样调控的,是如何启动细胞内信号的还不是很清楚。一种可能是,在精子获能前,胆固醇聚集在质膜的特殊微小部位或脂质筏上,它可以把蛋白质聚集在一起,这样质膜上胆固醇外流或增加将会对脂筏的行为产生深远影响<sup>[4]</sup>。在体细胞中,胆固醇外流被认为是破坏了脂筏的结构,因此,激活的信号事件涉及到酪氨酸激酶、G蛋白或其他信号分子,这些信号事件进一步参与获能<sup>[11]</sup>。随着对获能机制的深入研究,2010年,Botto等<sup>[12]</sup>发现 $\beta$ -环状糊精( $\beta$ -CD)能代替BSA引起精子质膜上胆固醇外流,并通过cAMP-PKA信号通路增加蛋白酪氨酸磷酸化,促进精子获能,且效果比BSA好。

### 1.2.2 $\text{HCO}_3^-$ 和 $\text{Ca}^{2+}$

精子质膜结构发生变化,使 $\text{HCO}_3^-$ 主要通过NBC( $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ )转运体被转运进细胞, $\text{Ca}^{2+}$ 主要通过钙通道(CatSper)被运送进细胞<sup>[3]</sup>。 $\text{HCO}_3^-$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 作为信号分子与G蛋白偶联受体结合形成复合体导致受体构象发生改变,激活Gs蛋白,激活的Gs蛋白进一步激活SACY产生cAMP<sup>[13-14]</sup>,cAMP可以激活囊性纤维化跨膜调节因子(CFTR)通道。CFTR是一种cAMP激活的 $\text{Cl}^-$ 通道,精子质膜中 $\text{Cl}^-$ 转运对于细胞膜电位、pH、 $\text{HCO}_3^-$ 流入的调节非常重要<sup>[15]</sup>。2013年,Li等<sup>[16]</sup>研究发现在人类精子中,Adjudin是一种经典的 $\text{Cl}^-$ 通道抑制剂,它明显抑制SACY活性,使得精子细胞中cAMP水平显著降低。Adjudin还可阻止丝/苏氨酸磷酸化,但并不抑制精子蛋白酪氨酸磷酸化。然而,精子获能过程中Adjudin的这种抑制作用需要 $\text{Cl}^-$ 的存在,在 $\text{Cl}^-$ 缺乏时,是没有抑制作用的。

$\text{Cl}^-$ 内流刺激 $\text{HCO}_3^-$ 通过 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 转运体被转运进细胞<sup>[16]</sup>。 $\text{HCO}_3^-$ 影响精子膜电位, $\text{HCO}_3^-$ 增加使鼠精子质膜发生短暂超极化<sup>[17]</sup>。在获能过程中, $\text{HCO}_3^-$ 横跨膜运动和细胞内pH值的增加有关。pH值增加可激活CatSper,使细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 增加,进一步促进获能<sup>[18]</sup>;但是 $\text{Ca}^{2+}$ 或钙调蛋白也可以激活

磷酸二酯酶(PDE)使cAMP发生水解,抑制精子获能<sup>[4,19]</sup>。同时钙调蛋白抑制剂N-(6-氨基己烷基)-5-氯-1-萘-磺胺(W-7)和Calmidazolium(CZ)可以抑制与获能相关的蛋白磷酸化而抑制获能<sup>[20]</sup>。

然而,CatSper通道是如何被激活而转运 $\text{Ca}^{2+}$ 的呢?2013年,Alasmari等<sup>[21]</sup>研究发现CatSper通道是精子鞭毛膜上特异表达的阳离子通道,主要定位在精子鞭毛的主段,该通道至少包括7个编码基因:CatSper1~4、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 。CatSper通道由4个亚通道组成复合体,CatSper通道复合体的破坏或缺失将导致与获能相关的酪氨酸磷酸调节异常,从而阻碍获能,导致雄性不育。CatSper通道就像一个脚手架,它可以管理一些信号分子,它的组成和功能( $\text{Ca}^{2+}$ 进入)对信号通路来说是非常重要的<sup>[21]</sup>,而且CatSper通道的这种组成方式保证了信号转导的准确性和速度<sup>[4,22]</sup>。

## 1.3 蛋白激酶

### 1.3.1 可溶性腺苷酸环化酶(SACY)

SACY是cAMP-PKA信号通路中较为重要的信号因子。在人类精子中, $\text{HCO}_3^-$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 通过激活SACY,促进cAMP合成<sup>[23]</sup>,后者可激活PKA,激活的PKA刺激下游蛋白发生酪氨酸磷酸化,加快精子运动和鞭毛鞭打频率,从而发生超激活运动。功能性SACY缺失会影响PKA的功能,使得与获能相关的酪氨酸磷酸化水平下降或不能发生,最终导致不育<sup>[23-24]</sup>。2005年,Hess等<sup>[23]</sup>研究表明,细胞中有两种类型的腺苷酸环化酶(AC):一种是可溶性腺苷酸环化酶(SACY),另一种是跨膜腺苷酸环化酶(tmAC)。两者在哺乳动物细胞中调节不同的信号转导。SACY被 $\text{HCO}_3^-$ 和 $\text{Ca}^{2+}$ 激活,tmAC被毛喉素(Forskolin)激活。哺乳动物精子中tmAC是否存在还有争议,它在获能过程中的作用还不是很清楚。2011年,O'Brien等<sup>[25]</sup>研究认为tmAC通过PKA激活也可调节脊椎动物精子活力。在低渗透性环境冲击作用下激活渗透敏感型蛋白,触发下游tmAC激活和cAMP增加,后者则会激活cAMP-PKA信号途径,引起蛋白质磷酸化和增加精子活力。

### 1.3.2 蛋白激酶A(PKA)

PKA是cAMP-PKA信号通路最为重要的关键信号节点,尤其是PKA底物磷酸化能够进一步诱导下游蛋白的酪氨酸磷酸化,进而诱导精子发生获能变化。PKA是cAMP的主要下游靶蛋白。cAMP与PKA调节亚基结合,使PKA调节亚基与催化亚基分开,被激活的催化亚基使底物磷酸化<sup>[7]</sup>。PKA



可以磷酸化许多靶蛋白, 这些靶蛋白可以启动多个信号转导途径<sup>[4]</sup>。鼠精子中缺乏 PKA 特定亚基 C2 $\alpha$  时, 精子活力和与获能相关的酪氨酸磷酸化水平降低<sup>[8]</sup>。2009年, Visconti<sup>[3]</sup>通过实验证明, 哺乳动物精子获能过程中无论是快速事件还是慢速事件都会被 cAMP-PKA 信号通路调节, 因此, cAMP-PKA 信号通路在哺乳动物精子获能和蛋白酪氨酸磷酸化中起着非常重要的作用。

A 型激酶锚定蛋白 (A-kinase anchoring proteins, AKAPs) 是 cAMP-PKA 信号传递途径的关键环节<sup>[26]</sup>, 可看作是纹架蛋白家族, 是酪氨酸磷酸化的主要底物。AKAPs 可以募集 PKA 的调节亚基, 协调靶蛋白磷酸化位点, 对信号转导途径进行精确调控<sup>[27]</sup>。St-Ht31 可以使 PKA 和 AKAP 之间的相互作用发生紊乱, 阻断 PKA 底物磷酸化<sup>[28]</sup>。某些蛋白酪氨酸磷酸化底物已被识别<sup>[29]</sup>, 例如 AKAP4、AKAP3 和钙结合酪氨酸磷酸化调节蛋白 (CABYR)。现已报道在人类和仓鼠精子中, AKAP4 的缺失或减弱明显降低精子活力, 具体机制还不很清楚<sup>[29]</sup>。PKA 底物磷酸化可以被 cAMP 类似物或 PKA 激动剂 (db-cAMP) 诱导, 被 PKA 抑制剂 H-89 抑制。2.5  $\mu\text{mol/L}$  的 db-cAMP 可以明显增加精子 PKA 活性, 而 0.5  $\mu\text{mol/L}$  的 H-89 即可明显降低精子 PKA 活性以及与获能相关的酪氨酸磷酸化<sup>[30]</sup>。因此, PKA 在 cAMP-PKA 信号通路中起关键作用, 而且它还通过刺激其他蛋白激酶共同调节精子获能。

### 1.3.3 酪氨酸激酶(Src)

Src 活性可以调节 cAMP-PKA 信号通路, 它主要通过调节 PKA 活性来调节此信号通路。证据表明在 cAMP-PKA 介导的酪氨酸磷酸化增加过程中, Src 起重要的中间媒介作用。采用免疫细胞化学方法已确认人精子中 Src 的存在<sup>[31-32]</sup>。2008年, Mitchell 等<sup>[32]</sup>研究发现, Src 和 PKA 可免疫共沉淀, 在获能的精子中 PKA 和 Src 相互作用, 但在非获能精子中是不能的。

2010年, Krapf 等<sup>[33]</sup>研究发现, 在鼠精子中 Src 不直接参与获能相关的酪氨酸磷酸化水平增加, 而调节丝/苏氨酸磷酸酶活性。2011年, Visconti 等<sup>[4]</sup>研究发现, 有两个并行的途径调节磷酸化导致精子获能, 一个需要 PKA 激活, 另一个需要丝/苏氨酸磷酸酶失活。丝/苏氨酸磷酸酶家族有 PP1 $\gamma$ 、PP2A、PP2B 等, PP1 $\gamma$  对于精子活力调节非常重要, PP2A 和 PP2B 在精子获能中的作用还在进一步研究<sup>[34]</sup>。Src 可以使 PP2A 失活而使 PKA 底物磷酸化<sup>[4]</sup>。鼠

精子孵育过程中存在 Src 激酶抑制剂 SU6656 使 PP2A 保持活性, 抑制 PKA 底物磷酸化, 较有效地降低精子活力, 使与获能相关的酪氨酸磷酸化和随后的超激活水平下降, 但这种抑制作用在丝/苏氨酸磷酸酶抑制剂冈田酸 (OA) 存在时可被阻断<sup>[35]</sup>。Src 抑制剂不能完全抑制酪氨酸磷酸化和超激活运动的表达, 揭示可能同时有其他的信号通路在起作用<sup>[36]</sup>, 但是, 在人和猪精子中 Src 只调节顶体反应, 不影响精子活力<sup>[35]</sup>。因此, 在不同物种中 Src 在精子获能和顶体反应中的作用是有差异的, 有待于进一步研究。

## 2 磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)信号通路

### 2.1 特点及作用方式

肌动蛋白聚合作用发生在精子获能过程中, 解聚作用发生可以实现顶体反应。肌动蛋白聚合和解聚过程中有一个比较重要的信号调控通路, 即磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K) 信号通路<sup>[37]</sup>。此信号通路主要是通过 PI3K 活性来调节, PKA 激活可以促进 PI3K 激活, 抑制蛋白激酶 C (PKC) 激活, 而 PKC 激活抑制 PI3K 激活, 磷酸酶 (PP1 $\gamma$ 2) 激活也可抑制 PI3K。在获能过程中, PKA 直接刺激 PI3K 激活, 间接增强 PKC 和 PP1 $\gamma$ 2 的降解和失活, 进一步促进 PI3K 激活, 其他调节因子或蛋白激酶也可能调节 PI3K 活性和此信号通路<sup>[8,38]</sup>。

### 2.2 蛋白激酶

#### 2.2.1 表皮生长因子受体(EGFR)

激活的 EGFR 可激活 PI3K<sup>[37]</sup>。EGFR 是表皮生长因子 (EGF) 细胞增殖和信号传递的受体, 是相对分子质量为  $1.7 \times 10^5$  的横跨膜酪氨酸激酶。EGFR 位于细胞膜表面, 与配体结合导致受体二聚作用, 从而激活其位于细胞内的激酶通路, 包括 Y992、Y1045、Y1068、Y1148、Y1173 等激活位点, 该自磷酸化引导下游信号激活和溶酶体降解。正因为 EGFR 有多个磷酸化激活位点, 所以它更广泛地参与多种信号途径<sup>[39]</sup>。在 PI3K 信号通路中, EGFR 在甲基- $\beta$ -环糊精 (M $\beta$ CD) 因子作用下可激活 PI3K 来调节信号通路<sup>[40]</sup>。2010年, Daniel 等<sup>[41]</sup>证明, 乌本苷 (Ouabain) 是 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP 酶抑制剂, 它存在于血液和雌性生殖道内。当 EGF 存在时, 生理浓度的 Ouabain 可增加 EGFR Y845 位的磷酸化, 刺激钙离子内流, 诱导顶体反应。EGFR 能被 EGF 直接激活, 间接被 PKA 激活或者被 G-蛋白偶联受体 (GPCRs) 反式激活。GPCR 的激活剂血管紧张素 II 可以激活

EGFR,但是具体的调控机制还不是很清楚<sup>[9]</sup>。

### 2.2.2 磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)和蛋白激酶C(PKC)

PI3K是PI3K信号通路中的关键节点,PKA或EGFR可以调节PI3K活性,后者进一步调节磷脂酰肌醇二磷酸(PIP2)活性,使肌动蛋白发生聚合和解聚作用,以实现获能和顶体反应。PI3K还对磷脂酰肌醇-3-磷酸(PIP3)合成起着基础性作用,它在细胞生长、细胞运动和黏附、蛋白质合成以及细胞骨架重排等生物过程中起着非常重要的作用<sup>[42]</sup>。PI3K活性调节在精子获能过程中非常重要,PKA上调PI3K的活性,PKC下调PI3K的活性<sup>[43]</sup>。在获能开始时,PKC处于激活状态,导致PP1 $\gamma$ 2激活,激活的PP1 $\gamma$ 2引起PI3K抑制。在此基础上,PIP2水平增加导致磷脂酶D(PLD)激活,PLD进一步产生磷脂酸(PA),PA引起肌动蛋白的聚合,进一步促进获能<sup>[44]</sup>。在获能过程中,PKA介导PKC和PP1 $\gamma$ 2降解,导致PI3K激活,激活的EGFR会使PLC $\gamma$ 激活,激活的PLC $\gamma$ 水解PIP2产生IP3(三磷酸肌醇)和DAG(二酰基甘油)。IP3激发Ca<sup>2+</sup>外流,DAG在Ca<sup>2+</sup>协同下激活PKC,进一步激活下游信号途径,使肌动蛋白发生解聚作用,从而产生顶体反应<sup>[8,38,43-44]</sup>。

因此,PI3K的活性变化在精子获能过程中起到非常重要的作用<sup>[37,42]</sup>。然而,据报道,PI3K和PI4K均参与牛精子获能<sup>[43]</sup>。在其获能过程中,10 nmol/L 渥曼青(wortmannin,PI3K抑制剂)即可抑制PI3K的活性,而10  $\mu$ mol/L 渥曼青才可抑制PI4K活性;PI4K激活可以促进牛精子获能过程中F-肌动蛋白水平的增加,而PI3K的激活不能达到相同的效果<sup>[43]</sup>。因此,有关PI3K和PI4K在精子获能和顶体反应中的作用有待于进一步研究。

### 2.2.3 磷脂酶D(PLD)

PLD是PI3K信号通路中较为重要的调节因子,PLD水解卵磷脂成磷脂酸(PA)和胆碱,PA可以改变许多酶和蛋白质的活性,细胞中PA增加引起肌动蛋白聚合作用快速高效增加和接下来的获能反应<sup>[45]</sup>。PLD是哺乳动物细胞中普遍存在的一种酶,在精子细胞中也普遍存在,它调节精子肌动蛋白聚合作用和精子活力。肌动蛋白聚合在获能之前发生,证明获能依赖于肌动蛋白聚合作用。PLD抑制剂正丁醇(Butan-1-ol)可以阻止肌动蛋白聚合和随后的获能,但异丁醇(Butan-2-ol)对此过程无影响<sup>[44,46]</sup>。细胞松弛素D(CD)可阻止肌动蛋白聚合,从而抑制精子活力,因此,CD增加可抑制获能,进一步

支持了在鼠精子和人精子中PLD依赖的肌动蛋白聚合作用是获能所必需的<sup>[44]</sup>。

## 3 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路

### 3.1 特点及作用方式

促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)是一种重要的丝/苏氨酸蛋白激酶,MAPK信号转导通路存在于大多数细胞中,在细胞增殖、变异、分化和细胞凋亡等生理过程中起作用。它将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内起作用,MAPK信号转导是以三级激酶级联的方式进行的,由3类蛋白激酶MAPKKK-MAPKK-MAPK组成,通过依次磷酸化将上游信号传递至下游应答分子。MAPK家族主要包括胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun N末端激酶(JNK)、P38-丝裂原活化蛋白激酶(P38-MAPK)和ERK5等4个亚族<sup>[47]</sup>。MAPK信号通路在调节精子鞭毛活力、超激活运动和顶体反应中起重要作用,尤其是ERK(Ras/Raf/MEK/ERK)信号通路<sup>[48]</sup>。

### 3.2 调节因子活性氧(ROS)

在MAPK信号通路中最经典的通路是ERK信号通路,可以调节精子获能和酪氨酸磷酸化,而活性氧(ROS)对该信号途径起调节作用<sup>[49]</sup>。活性氧(ROS),如超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和一氧化氮(NO),生理浓度时可作为第二信使调节精子获能。目前认为两条途径有助于ROS生成:一是位于精子顶体膜上的过氧化物酶系催化葡萄糖通过磷酸戊糖途径产生的NADPH而生成,一是通过线粒体呼吸链中的电子传递链而生成<sup>[50]</sup>。ROS活动可能通过精子蛋白上的巯基/二硫来介导<sup>[51]</sup>。精子产生大量可控制的ROS,后者通过刺激Ras来调节ERK信号通路<sup>[49]</sup>,同时还有研究认为ROS可激活PKC来调节cAMP-PKA信号通路<sup>[51]</sup>进一步调节精子获能。2012年,Aksamitiene等<sup>[52]</sup>研究证实,PI3K抑制剂渥曼青霉素和Akt抑制剂蛋白激酶B可抑制精子获能和相关蛋白磷酸化水平增加,但不影响通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和NO诱导的PKA底物磷酸化水平的增加和精子获能,因此,ROS可触发ERK信号通路而独立于cAMP-PKA信号通路。但是ROS产生过多会对精子细胞产生毒害作用,阻止精子获能<sup>[51]</sup>。因此,要严格控制活性氧产生,使之更好地保障精子获能。

### 3.3 蛋白激酶

#### 3.3.1 表皮生长因子受体(EGFR)

上述2.2.1中介绍了EGFR的特点及作用,其

可激活 PLC $\gamma$  和 PI3K, 触发 PI3K 信号通路以调节精子获能。2012 年, Luna 等<sup>[10]</sup> 证明 EGFR 还是 MAPK 信号途径的一个经典激活剂。EGFR 激活使 EGFR 下游底物酪氨酸磷酸化增加, 磷酸化的受体酪氨酸激酶可以募集支架蛋白 Gab2, Gab2 与交换因子 (SOS) 结合。SOS 是 Ras 的一个鸟嘌呤核苷酸交换因子, SOS 被定位在质膜上导致 Ras 激活, 从而触发经典的 Ras/Raf/MEK/ERK 途径<sup>[47,52]</sup>。

### 3.3.2 MAPKK (MEK)和MAPK (ERK)

MEK1 和 MEK2 是该通路的主要 MEK, 通过两个残基磷酸化而被激活; ERK 同 MEK 一样, 也主要有 ERK1 (p44MAPK) 和 ERK2 (p42MAPK)。MEK 可以使丝/苏氨酸和酪氨酸发生磷酸化, 最终高度选择性地激活 ERK1 和 ERK2。MEK 抑制剂 U0126 和 PD98059 可以明显抑制 ERK 活性, 阻止 ERK 信号通路, 减少与获能相关分子事件的发生<sup>[40,47]</sup>。有证据表明, 在人精子中, P38 抑制剂 SB203580 和 PD169316 可以增加精子活力, 揭示 P38 是精子活力的一个负调控因子。P38 信号途径的激活可以抑制精子活力和超激活运动, 但可促进顶体反应, 而 ERK 信号途径激活均起到促进作用, 具体调节机制还不是很清楚<sup>[47,53]</sup>, 而且各个信号通路之间的相互联系还不明确, 需要进一步研究。

## 4 问题与展望

近年来, 哺乳动物精子获能过程信号通路研究不仅在技术方法上有了很大改进, 而且为解释动物生殖与发育以及获能过程中关键分子事件的分子机制提供了新的证据; 但从总体来看, 有关精子获能过程中信号通路研究中的分子机制尚未完全定论, 尤其是各个信号通路之间的相互联系还不明确, 主要包括以下几个方面: (1) PKA 底物磷酸化蛋白及信号通路中一些未知蛋白的鉴别; (2) 信号通路中某些酪氨酸激酶、酪氨酸磷酸酶种类及靶蛋白, 尤其在 cAMP-PKA 信号通路中 PKA 作用精子蛋白的酪氨酸磷酸化, 其功能相互关系仍然没有明确; (3) 胆固醇外流对精子获能过程中信号通路作用的分子机制如何, 尤其是重要的蛋白激酶对精子获能信号通路调节还有待进一步研究; (4) 质膜外信号调节因子, 例如 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>、Cl<sup>-</sup>、Ca<sup>2+</sup> 及 BSA 等调节因子如何作用于质膜或者通过精子离子通道, 如何激活信号分子的传递以及诱导 PKA 底物磷酸化及蛋白质酪氨酸磷酸化。上述作用的分子机制还有待进一步研究。鉴于哺乳动物精子的生理功能特点及蛋

白质组学自身的一些特点, 离开睾丸的精子几乎是以内源性蛋白的增加或者是精子固有蛋白的修饰来控制自身的功能, 使得精子获能过程中相应蛋白等信号分子及相应调节因子的分析鉴定成为未来研究的重点方向, 尤其是 PKA 底物磷酸化蛋白、酪氨酸激酶、酪氨酸磷酸酶种类及靶蛋白鉴定, 离子通道作用及信号调节分子机理的深入研究, 对精子获能信号通路及相应分子机理研究起到较大促进作用。同时, 精子蛋白质组学及磷酸化蛋白质组学技术亦将成为精子获能信号通路相关研究的主要分析方法, 相信定量磷酸化蛋白质组学研究技术的不断成熟和发展, 将不断促进获能及受精分子机理研究进程。

### [参 考 文 献]

- [1] Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 1951, 168(4277): 697-8
- [2] Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res*, 1951, 4(4): 581-96
- [3] Visconti PE. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(3): 667-8
- [4] Visconti PE, Krapf D, Vega-Beltra JL, et al. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*, 2011, 13: 395-405
- [5] Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *J Dev Biol*, 2008, 52(5-6): 503-10
- [6] Fraser LR. The role of small molecules in sperm capacitation. *Theriogenology*, 2008, 70(8): 1356-9
- [7] Signorelli J, Diaz ES, Morales P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(3): 765-82
- [8] Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl*, 2012, 14(6): 816-21
- [9] Breitbart H, Etkovitz N. Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Asian J Androl*, 2011, 13(1): 106-10
- [10] Luna C, Colas C, Perez-Pe R, et al. A novel epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated MAP kinase cascade involved in sperm functionality in sheep. *Biol Reprod*, 2012, 87(4): 93
- [11] Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 2010, 327(5961): 46-50
- [12] Botto L, Bernabo N, Palestini P, et al. Bicarbonate induces membrane reorganization and CBR1 and TRPV1 endocannabinoid receptor migration in lipid microdomains in capacitating boar spermatozoa. *J Membr Biol*, 2010, 238(1-3): 33-41
- [13] Darszon A, Beltran C, Felix R, et al. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol*, 2001, 240(1): 1-14



- [14] Bailey JL. Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med*, 2010, 56(5): 334-48
- [15] Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Ion channels in sperm physiology and male fertility and infertility. *J Androl*, 2012, 33(5): 777-88
- [16] Li K, Ni Y, He Y, et al. Inhibition of sperm capacitation and fertilizing capacity by adjudin is mediated by chloride and its channels in humans. *Hum Reprod*, 2013, 28(1): 47-59
- [17] De La Vega-Beltran JL, Sanchez-Cardenas C, Krapf D, et al. Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J Biol Chem*, 2012, 287(53): 44384-93
- [18] Alasmari W, Barratt CL, Publicover SJ, et al. The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum Reprod*, 2013, 28(4): 866-76
- [19] Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, et al. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007, 65: 245-59
- [20] Zeng HT, Tulsiani DR. Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components. *J Cell Sci*, 2003, 116(10): 1981-9
- [21] Alasmari W, Costello S, Correia J, et al.  $Ca^{2+}$  signals generated by CatSper and  $Ca^{2+}$  stores regulate different behaviors in human sperm. *J Biol Chem*, 2013, 288(9): 6248-58
- [22] Wang H, Liu J, Cho KH, et al. A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol Reprod*, 2009, 81(3): 539-44
- [23] Hess KC, Jones BH, Marquez B, et al. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell*, 2005, 9(2): 249-59
- [24] Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, et al. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, 2000, 289(5479): 625-8
- [25] O'Brien ED, Krapf D, Cabada MO, et al. Transmembrane adenylyl cyclase regulates amphibian sperm motility through protein kinase A activation. *Dev Biol*, 2011, 350(1): 80-8
- [26] Langeberg LK, Scott JD. A-kinase-anchoring proteins. *J Cell Sci*, 2005, 118: 3217-20
- [27] 王默进, 王玲, 周总光. A型激酶锚定蛋白及其信号复合物结构与功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24(2): 101-6
- [28] Kaneto M, Krisfalusi M, Eddy EM, et al. Bicarbonate-induced phosphorylation of p270 protein in mouse sperm by cAMP-dependent protein kinase. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(6): 1045-53
- [29] Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, et al. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol*, 2008, 52(5-6): 463-72
- [30] Liu SL, Ni B, Wang XW, et al. FSCB phosphorylation in mouse spermatozoa capacitation. *BMB Rep*, 2011, 44(8): 541-6
- [31] Lawson C, Goupil S, Leclerc P. Increased activity of the human sperm tyrosine kinase SRC by the cAMP-dependent pathway in the presence of calcium. *Biol Reprod*, 2008, 79(4): 657-66
- [32] Mitchell LA, Nixon B, Baker MA, et al. Investigation of the role of SRC in capacitation-associated tyrosine phosphorylation of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(4): 235-43
- [33] Krapf D, Arcelay E, Wertheimer EV. Inhibition of Ser/Thr phosphatases in duces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J Biol Chem*, 2010, 285(11): 7977-85
- [34] Goupil S, La Salle S, Trasler JM, et al. Developmental expression of SRC-related tyrosine kinases in the mouse testis. *J Androl*, 2011, 32(1): 95-110
- [35] Bragado MJ, Gil MC, Martin-Hidalgo D, et al. Src family tyrosine kinase regulates acrosome reaction but not motility in porcine spermatozoa. *Reproduction*, 2012, 144(1): 67-75
- [36] O'Flaherty C, De Lamirande E, Gagnon C. Phosphorylation of the arginine-X-X- (Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(5): 355-63
- [37] Breitbart H, Rotman T, Rubinstein S, et al. Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314(2): 234-8
- [38] Rotman T, Etkovitz N, Spiegel A, et al. Protein kinase A and protein kinase C(alpha)/ PPP1CC2 play opposing roles in the regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activation in bovine sperm. *Reproduction*, 2010, 140(1): 43-56
- [39] Jaldety Y, Glick Y, Orr-Urtreger A, et al. Sperm epidermal growth factor receptor (EGFR) mediates  $\alpha 7$  acetylcholine receptor (AChR) activation to promote fertilization. *J Biol Chem*, 2012, 287(26): 22328-40
- [40] Chen X, Resh MD. Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 49631-7
- [41] Daniel L, Etkovitz N, Weiss SR, et al. Regulation of the sperm EGF receptor by ouabain leads to initiation of the acrosome reaction. *Dev Biol*, 2010, 344(2): 650-7
- [42] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002, 296: 1655-7
- [43] Etkovitz N, Rubinstein S, Daniel L, et al. Role of PI3-kinase and PI4-kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation. *Biol Reprod*, 2007, 77(2): 263-73
- [44] Itach SB, Finklestein M, Etkovitz N, et al. Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization. *Dev Biol*, 2012, 363(2): 154-61
- [45] Kusner, DJ, Barton JA, Wen KK, et al. Regulation of phospholipase D activity by actin. Actin exerts bidirec-

- tional modulation of mammalian phospholipase D activity in a polymerization-dependent, isoform-specific manner. *J Biol Chem*, 2002, 277(52): 50683-92
- [46] Zouwail S, Pettitt TR, Dove SK, et al. Phospholipase D activity is essential for actin localization and actin-based motility in dictyostelium. *J Biol Chem*, 2005, 389(1): 207-14
- [47] Almog T, Naor Z. The role of mitogen activated protein kinase (MAPK) in sperm functions. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314(2): 239-43
- [48] Osaki LH, Gama P. MAPKs and signal transduction in the control of gastrointestinal epithelial cell proliferation and differentiation. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(5): 10143-61
- [49] Yamashita S, Tai P, Charron J, et al. The Leydig cell MEK/ERK pathway is critical for maintaining a functional population of adult Leydig cells and for fertility. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(7): 1211-22
- [50] De Lamirande E, O'Flaherty C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784(1): 106-15
- [51] Chen SJ, Allam JP, Duan YG, et al. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 288(1): 191-9
- [52] Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: A fine balance. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40: 139-46
- [53] Almog T, Lazar S, Reiss N, et al. Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality. *J Biol Chem*, 2008, 283(21): 14479-89