

研究工作

棉酚对人精子顶体酶的影响

童建孙 胡延忠 王如 钱绍祯

(江苏省计划生育研究所, 南京)

自从 1930 年 J. Yamane 首先报道精子抽提物能水解卵的被膜以来, 许多学者的研究已经证实, 在精子顶体部分的顶体酶是受精过程中精卵结合必不可少的蛋白水解酶^[1]。有报道口服棉酚能使精子顶体形态发生变化^[2]。我们观察了棉酚直接对精子顶体酶活性的影响。

材料与方 法

一、人精子顶体酶的提取

人精子顶体酶的提取基本上按照 K. L. Polakoski 介绍的方法进行: 用体外按摩法收集健康成人的精液, 待液化后作精子计数, 活力等常规分析后立即以 $1500 \times g$ 离心 15 分钟, 弃去上清液, 使沉淀物悬浮于生理盐水, 再次离心弃去上清液, 如此重复三次。沉淀物置 -20°C 冷冻, 然后室温下融化, 亦重复三次。加入 10% 甘油 ($\text{pH}2.5-3.0$) 于 4°C 过夜。次日 $1500 \times g$ 离心 15 分钟, 上清液即为精子顶体酶抽提液。低温保存, 待测^[3]。

二、顶体酶活性测定

将底物 0.6mM 苯甲酰精氨酸乙酯 (BAEE; Sigma 产品) 配于 50mM Tris 的缓冲液内 (内含 50mM CaCl_2 , $\text{pH}8.0$) 备用。取 2.9ml BAEE 溶液加入比色杯, 然后加入 0.1ml 顶体酶抽提液, 迅速搅拌, 使之均匀, 于波长 253nm 下测其不同时间内光密度^[3]。

三、顶体酶抽提液-棉酚混合液的配制

将顶体酶抽提液与 6mg/ml , 12mg/ml , 25mg/ml 浓度的 PVP-棉酚混合, 37°C 保温 10 分钟, 然后取 0.1ml 混合液, 依上法测顶体酶活

性。

结 果 与 讨 论

一、人精子顶体酶活性测定

顶体酶与苯甲酰精氨酸乙酯迅速起反应, 所释放出羧胺在波长 253nm 附近引起消光变化, 据此可测出顶体酶含量。一般认为每个精子中顶体酶的量近似于 $1 \times 10^{-18}\text{M}$ 。正常人精液中顶体酶活性的测量国内未见报道, 国外报道测得每 10^6 个精子的顶体酶活性的平均值波动较大, 可自 0.75mU 至 5.2mU , (表 1)。我们观察 20 例正常成年人精子顶体酶活性, 平均值为 0.97mU , 与 Tobias^[6] 和 Schill^[7] 的结果相接近。

表 1 人精子顶体酶活性

作 者	顶体酶活性 $\text{mU}/10^6$ 个精子
Bhattacharyya, A. K. ^[8]	5.22
Tobias, P. S. ^[6]	$1.06-2.26$
Schill, W. B. ^[7]	0.75 ± 0.27
本文 ($n=20$)	0.97 ± 0.37

二、PVP-棉酚对人精子顶体酶活性的影响

图 1 表明 PVP-棉酚能抑制精子顶体酶活性, 且存在浓度依赖关系。当 PVP-棉酚浓度为 6mg/ml 时, 顶体酶活性为 0.24mU , 10 分钟后变化不明显。 25mg/ml 时, 顶体酶的活性基本被抑制。

顶体酶是受精过程中必需的蛋白水解酶, 它能消化卵细胞的透明带和增加精子活动力,

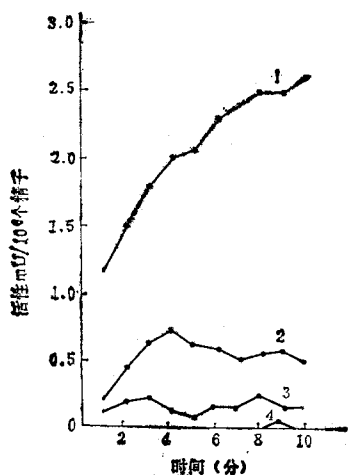


图 1

1. 人精子顶体酶活性 ($n = 10$),
PVP-棉酚混合液中顶体酶活性;
2. 棉酚浓度 6mg/ml 时;
3. 棉酚浓度 12mg/ml 时;
4. 棉酚浓度 25mg/ml 时。

使精子在女性生殖道内活动加强,并迅速与卵细胞融合,当顶体酶的活性被抑制时,受精过程即不可能。现已有不少报道旨在寻找顶体酶抑制剂,以达到控制生育的目的^[4]。

棉酚能迅速使精子制动,已被推荐可作为

一个阴道避孕药。据报道 PVP-棉酚体外使精子制动的有效浓度是 40mg/ml^[5],而本实验表明,PVP-棉酚浓度为 25mg/ml 时,顶体酶活性全部被抑制,因此在试用 PVP-棉酚作为阴道避孕药时,似应参照抑制顶体酶活性的浓度为标准,既可减少用药量,又能保证达到避孕效果。

参 考 文 献

- [1] 周元聪,王守真:《生理科学进展》,13(3),252,1982。
- [2] 薛社普等:《男用节育药棉酚的实验研究》(第一版),人民卫生出版社,北京,p 183,1983。
- [3] Polakaski, K. L. and Zaneveld, L. J. O.: *Human Reproductive Medicine*, Vol. 1: *Techniques of Human Andrology* (the first edition, E. S. E. Hafez ed), Elsevier/North-Holland, Biomedical press, P280, 1977。
- [4] 张燕林等:《生殖与避孕》,4(3),9,1984。
- [5] Waller, D. P. et al.: *Contraception*, 22(2), P183, 1980。
- [6] Tobias, P. S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74, 434, 1977。
- [7] Schill, W. B. et al.: *Fertil. & Steril.*, 25(8), 708, 1974。
- [8] Bhattacharyya, A. K. et al.: *Fertil. & Steril.*, 30(1), 70, 1978。

[本文于 1986 年 2 月 7 日收到]

(上接第76页)

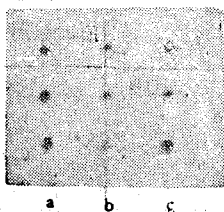


图 3 膜抗原检测图示

- a 膜抗原 (10^6 细胞抽提液), I 抗为病人血清, II 抗为 HRP-IgG。
- b 膜抗原 [10^6 (上端) 和 10^0 (下端) 细胞抽提液] 直接与 HRP-IgG 反应
- c 对照, 以血清为样品直接与 HRP-IgG 反应

有微量的免疫球蛋白,而在 10^6 细胞膜抗原抽提液(下端样点)中则很难测出。但是当把膜抗原经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,再用电泳转移到 NC 纸上按正常印迹程序与 HRP-IgG 反应时,结果并未出现谱带。然而与病人

血清反应后,再与 HRP-IgG 反应时,则可清晰地显出 7—8 条谱带。这表明血清中含有抗膜抗原的多种抗体组份(详见另文)。

参 考 文 献

- [1] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 98: 503—517 1975。
- [2] Towbin, H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 76: 4350—4354, 1979。
- [3] Gershoni, J. M.: *Anal. Biochem.*, 131: 1—15 1983。
- [4] Bradbury, W. C.: *Ibid.*, 137: 129—133 1984。
- [5] Reid, J. H.: *FEMS Microbiology letters.*, 30: 289—293, 1985。
- [6] MyLien Dao: *J. Immunol. Methods.*, 82: 225—231 1985。
- [7] Hancock, K.: *Anal. Biochem.*, 133: 157—162, 1983。

[本文于 1986 年 1 月 31 日收到]