

线粒体呼吸功能与精子活力、核DNA损伤的相关性分析

郑九嘉^{1,2} 楼哲丰¹ 郑蔚虹³ 金建远² 倪吴花² 李平¹ 金龙金^{1*}

(¹温州医学院检验医学院、生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; ²温州医学院附属第一医院生殖医学中心, 温州 325000; ³温州大学生命与环境科学学院, 温州 325027)

摘要 为探讨线粒体呼吸功能与精子活力、核DNA损伤程度之间的相关性, 按WHO标准收集34例不同活力的精液标本, 采用蔗糖差速离心法或密度梯度离心法提取精子线粒体, 通过铂氧电极-溶氧仪测定线粒体呼吸耗氧率并计算状态III呼吸、状态IV呼吸、呼吸控制率(RCR)、磷氧比(P/O)及氧化磷酸化效率(OPR); 应用精子染色质扩散(sperm chromatin dispersion, SCD)实验检测精子DNA损伤情况。结果表明: 不同活力精子线粒体状态III呼吸耗氧量之间具有显著差异($P<0.01$); 弱精子症组RCR和OPR与正常对照组比较, 分别降低了17.03%($P<0.05$)和40.74%($P<0.01$); 精子DNA损伤程度与精子活力、状态III呼吸及OPR均呈极显著负相关(r 值分别是-0.812、-0.788和-0.696)。以上结果提示: 精子线粒体呼吸耗氧和氧化磷酸化功能与精子活力之间存在着密切的联系; 精子DNA(包括mtDNA)损伤可能影响精子的正常功能。

关键词 精子活力; 线粒体; 氧化磷酸化; DNA损伤

目前, 全球约有15%已婚夫妇受到不孕不育的困扰, 而在男性不育中弱精子症约占19%, 已成为影响男性生育力的常见病因^[1-2]。精子运动所需能量主要来自线粒体呼吸链的氧化磷酸化, 如果氧化磷酸化功能异常, 酶活性或表达量改变及mtDNA的变异等均可能导致线粒体能量合成障碍, 降低精子活力。1955年, Hoffman-Berling最早证明ATP是精子尾部运动的能量来源, 所以线粒体的结构和功能状态是评价精子质量的重要指标之一。近年来线粒体结构和功能异常与精子活力低下的相关性已引起关注, 有关精子线粒体基因变异影响精子活力低下的研究已见一些报道。本实验室已往的研究中也陆续发现 $mtATPase6$ 基因变异^[3]、 $mtND2$ 、 $mtND3$ 和 $mtND4L$ 基因突变^[4-5]与精子活力低下可能有相关性。但迄今为止, 有关线粒体呼吸状态与精子活力之间的相关性研究, 国内外还鲜有报道。

近年来, 精子DNA损伤被认为是一个新的评价精液质量和预测生育能力的指标^[6], 因此, DNA损伤程度对精子功能的正常与否有着重要的意义。本研究首次采用氧电极测定精子线粒体的呼吸功能并应用精子染色质扩散(sperm chromatin dispersion,

SCD)方法检测精子DNA损伤, 分析精子活力、线粒体呼吸状态和DNA损伤程度三者之间的相关性, 为进一步研究线粒体功能与弱精子症提供基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象

弱精子症和正常对照精液标本来自温州医学院附属第一医院生殖医学中心, 参照世界卫生组织(WHO)的标准, 经计算机辅助精液分析系统(CASA)分析后, 选取不同活力的精液标本34例, 所有精液标本在采集前禁欲3~5天, 手淫法收集精液标本, 在37℃ 20~30 min完全液化后进行分析。

1.2 主要试剂

牛血清蛋白、琥珀酸钠、ADP等均购自Sigma公司; 考马斯亮兰(G250)为Amresco公司产品; Janus Green B染料购自Fluka公司; 线粒体裂解液和线粒体保存液均购自上海碧云天生物技术有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2011-04-21 接受日期: 2011-09-27

浙江省自然科学基金(No.Y206582)和温州市科技合作项目(No.H20090063)资助项目

*通讯作者。Tel: 0577-86689780, E-mail: jil20050101@yahoo.com.cn

1.3 方法

1.3.1 精液的预处理 新鲜精液标本一份用磷酸盐缓冲液(pH6.8)调密度至 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 用于DNA损伤检测; 另一份用PBS(pH8.0)将密度调至 $5 \times 10^7/\text{mL}$ 左右, 于4℃条件下, 10 000 r/min离心10 min, 弃去精浆, PBS洗涤细胞, 再10 000 r/min离心10 min, 重复两次, 弃去上清, 进行超声破碎精子细胞(超声时间6 s, 间隔时间6 s, 功率600 W, 16~20次, 超声次数以显微镜下观察精子破碎情况而定)。

1.3.2 精子线粒体的提取 参照Tang等^[7]介绍的方法加以改进, 采用蔗糖差速离心或密度梯度离心法, 向处理后的标本中加入约6倍体积的线粒体提取液(250 mmol/L Sucrose, 5 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mmol/L EDTA, 调pH至7.4, 同时每份标本加入0.5 mg牛血清蛋白)于3 200 r/min离心8 min, 取上清于10 000 r/min离心10 min, 弃上清, 沉淀以3~4 mL分离介质悬浮, 再以10 000 r/min离心10 min, 沉淀以0.25~0.30 mL线粒体保存液充分混匀溶解, 以上操作均需在0~4℃、1~1.5小时内完成。

1.3.3 线粒体活性鉴定 在载玻片上加一滴线粒体悬液, 滴加0.2% Janus Green B染色液, 使线粒体悬液与Janus Green B染色液1:1混合, 室温染色10 min, 于200倍显微镜下观察。

1.3.4 线粒体总蛋白浓度测定 线粒体沉淀中加入60 μL 线粒体裂解液, 剧烈振荡15 s, 以牛血清蛋白作为标准, 采用Bradford法测定精子线粒体蛋白浓度, 并制备成每份标本约含6 mg/mL蛋白含量的线粒体悬浮液, 用于呼吸测定。

1.3.5 线粒体呼吸功能的测定 参照柳劲松等^[8]采用的实验改进方法, 采用铂氧电极-溶氧仪(英国Hansatech, DW-1)测定线粒体呼吸功能。反应温度为30℃, 反应杯总体积为2 mL, 加入0.18 mL基质液(225 mmol/L Sucrose, 50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L KH_2PO_4 , 调pH至7.4)和0.20 mL线粒体悬液(含蛋白浓度为6 mg/mL左右), 以琥珀酸作为底物(终浓度为5 mmol/L)启动状态IV呼吸, 等呼吸曲线斜率稳定后(约需2~6 min不等), 加入50 mmol/L的ADP约8 μL 启动状态III呼吸, 待ADP完全消耗后又转入状态IV呼吸。状态III与状态IV呼吸, 即线粒体呼吸活性, 以单位时间内每毫克线粒体蛋白消耗多少摩尔氧的量表示((nmol- O_2)/(min·mg·protein)), 根据状态III与状态IV呼吸, 计算:

呼吸控制率(respiratory control rate, RCR): ADP供给充分时线粒体氧耗速率和缺乏ADP时氧耗速率之比; 磷氧比(P/O): 反应体系中加入的ADP的摩尔数与因此而消耗氧量的摩尔原子数之比; 氧化磷酸化效率(oxidative phosphorylation rate, OPR): 单位时间内每毫克线粒体蛋白合成的ATP量((nmol)/(min·mg))。

1.3.6 精子染色质扩散(SCD)实验检测精子DNA损伤 采用精子Halosperm试剂盒(Halotech DNA, Spain)说明书介绍的方法进行SCD检测, 步骤简述如下: 新鲜精液用PBS稀释至精子密度 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 取出60 μL 加入溶解的低熔点琼脂糖凝胶60 μL 中, 37℃下混匀, 加20 μL 精子凝胶混合液于预处理载玻片上, 盖上22 cm×22 cm盖玻片, 4℃冰箱水平放置5 min。移去盖玻片, 放入酸性DNA变性液中, 室温避光孵育7 min。取出玻片浸泡于裂解液中, 避光孵育23 min。在蒸馏水中静置5 min洗去残余裂解液。玻片依次放入70%、90%和100%乙醇中各2 min脱水。晾干后玻片用染色液(Wright's染色剂和磷酸盐缓冲液等比例混合)覆盖于样本表面, 曝光10~15 min。用自来水冲洗掉染液, 烘干。200倍光镜下观察, 比较精子核和核周围晕轮大小, 计算精子DNA碎片指数(DNA fragmentation index, DFI)。

1.4 数据分析

定量数据以平均数±标准差(means±SEM)表示, 各组均数比较用单因素方差分析或t检验(或近似t检验); 多重比较采用LSD法检验, 方差不齐时用Dunnert法, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义, 应用SPSS13.0软件进行统计分析。

2 结果

2.1 精子线粒体活性鉴定

Janus Green B是专一针对线粒体的活细胞染料, 能跨过细胞膜, 有染色能力带正电的基团结合在负电性的线粒体内膜上, 内膜上的细胞色素氧化酶使染料保持氧化状态, 呈蓝色或蓝绿色的网状结构, 而在胞质内染料被还原成无色, 有活性的线粒体被染成蓝色或蓝绿色。结果显示: 视野中有大量呈蓝绿色的网状结构, 提示提取的线粒体有较好的活性(图1)。

2.2 精子活力与线粒体呼吸状态、线粒体蛋白含量的相关性

随着精子活力的提高, 线粒体状态III、IV呼吸

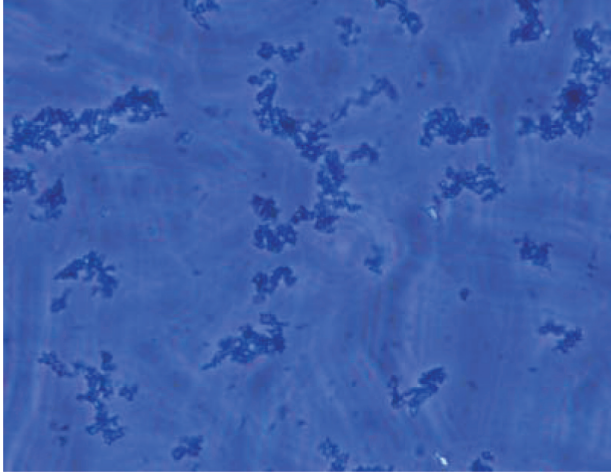


图1 Janus Green B活体线粒体染色(200×)

Fig.1 Appraisalment by Janus Green B(200×)

耗氧量均不断增大,不同活力之间状态III呼吸具显著性差异($P<0.05$),尤其是与(10%~30%)组之间的差异极显著($P<0.01$),而(31%~60%)与(61%~80%)活力组间的状态IV呼吸无显著性差异($P>0.05$),但这两组间的蛋白浓度的差异具有统计学意义($P<0.05$)(表1)。

以a+b级活力50%为标准将标本分为活力正常组($a+b\geq 50\%$,平均活力为 66.47 ± 9.143)和弱精子症组($a+b<50\%$,平均活力为 31.24 ± 12.28)。比较活力正常组和弱精子症组之间呼吸控制率(RCR)、磷氧比(P/O)和氧化磷酸化效率(OPR)的差异,比较结果如下:弱精子症组线粒体RCR与正常组比较,降低了17.03%,具有显著性差异($P<0.05$)(图2A);弱精子症组P/O与正常组相比,差异无显著性($P>0.05$)(图2B)。正

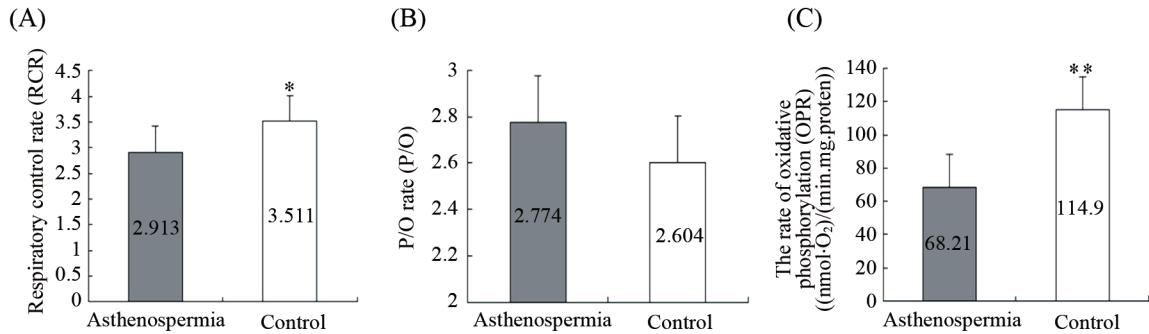
表1 不同活力精子线粒体氧化呼吸功能变化(means $\pm$ SEM)

Table 1 Mitochondria respiratory function of different sperm motility(means $\pm$ SEM)

精子活动力	例数	精子平均活力	线粒体总蛋白浓度(mg/mL)	线粒体状态III呼吸耗氧量((nmol·O ₂)/(min·mg·protein))	线粒体状态IV呼吸耗氧量((nmol·O ₂)/(min·mg·protein))
Motility of sperm	<i>n</i>	Average motility of sperm	Mitochondrial protein contents(mg/mL)	Mitochondrial state III respiration((nmol·O ₂)/(min·mg·protein))	Mitochondrial state IV respiration((nmol·O ₂)/(min·mg·protein))
10%~30%	8	18.88 $\pm$ 3.498	8.143 $\pm$ 2.085	19.32 $\pm$ 3.066 $\triangle\triangle\triangle$	6.614 $\pm$ 1.045 $\triangle\triangle\triangle$
31%~60%	14	45.31 $\pm$ 8.412	7.918 $\pm$ 1.722 $\blacktriangle$	34.63 $\pm$ 10.01 $\blacktriangle\blacktriangle$	11.96 $\pm$ 3.058 $\blacktriangle\blacktriangle$
61%~80%	10	67.53 $\pm$ 4.920	9.694 $\pm$ 2.310 $\triangle$	41.73 $\pm$ 9.177 $\blacktriangle\blacktriangle$	13.41 $\pm$ 3.286 $\blacktriangle\blacktriangle$

与10%~30%组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与30%~60%组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$; 与60%~80%组比较, $\blacktriangle P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ 。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with 10%~30% group; $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ compared with 30%~60% group; $\blacktriangle P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ compared with 60%~80% group.



A: 精子活力与线粒体呼吸控制率(RCR)的比较; B: 精子活力与磷氧比(P/O)的比较; C: 精子活力与氧化磷酸化效率(OPR)的比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: comparison of sperm motility and RCR; B: comparison of sperm motility and P/O; C: comparison of sperm motility and OPR, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图2 弱精子症组和对照组线粒体呼吸功能的比较

Fig.2 Comparison of mitochondria respiratory function in the asthenospermia and controls

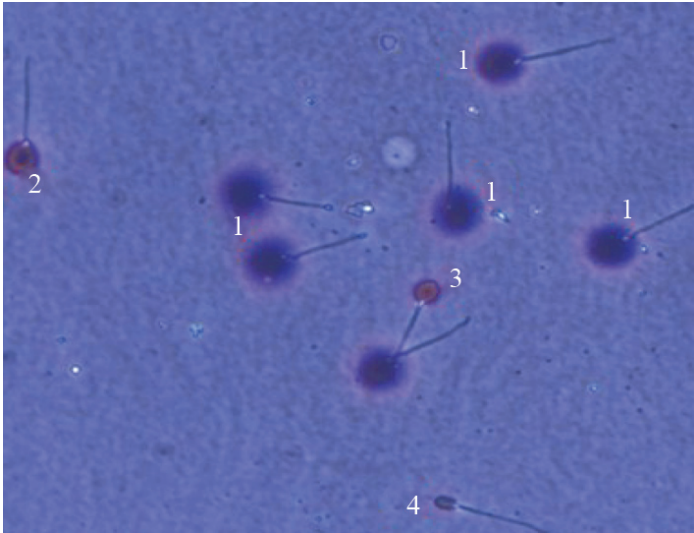
常组的OPR比弱精子症组明显增大(图2C),其单位耗氧量增加了40.74%,经统计分析两者间存在极显著差异($P<0.01$)。

2.3 精子DNA损伤与精子活力、线粒体呼吸状态的相关性

SCD实验分析精子DNA损伤,根据光晕与精子

头部横径的比例,分为大、中、小和无光晕4个等级,大和中光晕表示精子DNA完整无损伤,小和无光晕表示精子DNA有一定程度损伤(图3)。小光晕以精子头直径 $\leq 1/4$ 为判断标准,中光晕精子头直径在 $>1/4$ 和 $\leq 2/3$ 之间,大光晕精子头直径 $>2/3$ 。

根据SCD实验结果,分析精子活力、线粒体呼吸状态与精子DNA损伤程度的相关性,显示精子DNA损伤与精子活力、线粒体状态III呼吸、氧化磷酸化效率(OPR)均呈极显著负相关($P<0.01$),而与蛋白浓度和呼吸控制率(RCR)均无显著相关性($P>0.05$)(表2)。



1: 大晕轮精子; 2: 中晕轮精子; 3: 小晕轮精子; 4: 无晕轮精子; 1~2: 精子核DNA完整; 3~4: 精子核DNA发生断裂。
1: large-sized dispersion halos; 2: medium-sized dispersion halos; 3: small-sized dispersion halos, 4: none dispersion halos. 1~2: sperm nuclei with integrity DNA; 3~4: nuclei with DNA fragmentation.

图3 精子染色质扩散实验(200×)
Fig. 3 Sperm chromatin dispersion experiment(200×)

表2 精子DNA损伤与精子活力、线粒体呼吸状态的相关性分析

Table 2 Sperm DNA fragmentation index(DFI) associated with motility of sperm, mitochondria respiratory function			
实验项目	例数	r值	P值
Item	n	r value	P value
The percents of grade a (a%)	24	- 0.796**	0.000
The percents of grade (a+b)(a+b%)	24	- 0.812**	0.000
Mitochondrial protein contents(mg/mL)	24	- 0.104	0.629
ST III ((nmol·O ₂)/(min·mg·protein))	24	0.788**	0.000
RCR	24	- 0.029	0.892
OPR ((nmol·O ₂)/(min·mg·protein))	24	- 0.696**	0.000

精子DNA碎片与精子活力和线粒体呼吸功能的相关性, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
DFI correlation to motility of sperm and mitochondria respiratory function, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

3 讨论

线粒体是细胞进行有氧氧化的主要细胞器, 细胞的各项生命活动几乎都是由线粒体氧化磷酸化提供能量, 而精子的运动需要大量的能量供应, 因此精子线粒体呼吸链的氧化磷酸化功能对维持精子正常活力具有至关重要的作用, 若其功能异常可能直接影响能量的产生与传递, 导致精子运动障碍。近年来, 人们虽然逐渐发现了精子线粒体基因的缺失、

突变以及表达改变都与精子活力存在一定的联系, 如Kao等^[9-10], Thangaraj等^[11]和郁金红等^[12]研究发现线粒体基因的变异、长片段缺失与精子活力低下可能相关。但是与精子能量来源直接相关的线粒体呼吸功能和呼吸链的能量代谢与精子活力之间是否具有一定的相关性呢? 迄今为止这方面的研究在国内还未见报道, 而在国外也很少有相关的报道。

目前, 国内外对线粒体呼吸功能和呼吸链能量

代谢的研究主要集中在一些高耗氧、能量需求大的组织器官,如肝脏组织、脑组织、心肌组织等,这些高耗氧组织线粒体能量代谢障碍会引起膜电位下降,ATP生成大大减少,影响组织器官的功能^[13-14]。而维持精子正常运动需要大量的能量供给,因此对精子线粒体呼吸功能和呼吸链能量代谢的研究就具有重要的意义。本研究主要创新点就在于将线粒体氧化磷酸化产生ATP的功能直接与精子活动能力相联系,能够从分子生理水平探索精子活力低下的致病机理,同时通过检测精子DNA的损伤情况与精子线粒体的呼吸代谢状态,为弱精子症的临床诊断提供依据。我们研究发现精子活力与线粒体呼吸、氧化磷酸化功能以及精子DNA损伤程度之间有着紧密的联系。通过测定不同活力精子线粒体状态III和状态IV呼吸耗氧发现,随着精子活力的下降其相应的线粒体状态III呼吸耗氧也逐渐降低,且在不同活力精子之间表现为显著性差异($P<0.05$)。随后我们检测弱精子症和正常活力精子线粒体的呼吸控制率(RCR)和氧化磷酸化效率(OPR)等指标,结果显示弱精子症精子线粒体RCR和OPR与正常活力精子比较均具有显著性差异($P<0.01$)。与此同时,我们通过SCD实验分析精子DNA损伤程度,发现精子DNA损伤与精子活力、线粒体状态III呼吸耗氧、OPR均呈极显著负相关($P<0.01$)。根据我们的实验结果可推测,活力差的精子线粒体结构可能不完整,特别是内膜系统受到破坏,质子从膜间隙跑到介质中,使质子梯度破坏,ATP合成和电子传递解耦联,使得线粒体内ATP生成受到很大的影响,导致精子能量代谢异常,表现为运动障碍。另一方面,由于线粒体能量代谢的正常运行需要线粒体与细胞核的信息交流及两套基因组的协同表达,因此,精子DNA损伤程度越高,就意味着精子遗传物质受到的破坏越严重,从而影响氧化磷酸化过程中起主要作用的蛋白质,最终表现为精子能量代谢异常、运动障碍。

同时,国内外诸多研究发现,许多能量需求大、高耗氧的组织器官的线粒体一旦发生了能量代谢障碍、呼吸功能异常,就直接会影响到该组织器官的正常功能。在一般的细胞中如果线粒体呼吸功能发生异常很容易造成线粒体膜电位下降,使活性氧(ROS)生成增加,产生氧应激,破坏呼吸链的正常运转,导致能量障碍^[15-16]。在能量需求较大、线粒体含量丰富的肝脏细胞中,如果线粒体RCR越低,能量

代谢障碍越严重,肝细胞的功能障碍就越严重,主要表现为对脂肪的处理、转运能力大大降低,同时肝脏脂肪的沉积也随之增多^[17];倪海霞^[18]用银杏叶提取物治疗糖尿病心肌异常大鼠,使其线粒体状态III呼吸、RCR和OPR增高,改善了心肌线粒体代谢微环境后,大鼠的心肌功能得到了明显的改善。在精子遗传物质研究方面近几年有大量的研究均表明精子DNA的损伤是造成男性不育的一个极为重要的致病因素^[19]。而线粒体功能相关的遗传物质研究自1995年Bourgeron等^[20]首次报道了核基因异常导致线粒体复合体II缺陷引起氧化呼吸链功能障碍以来,现已陆续发现精子核基因缺陷、核DNA损伤可引起严重的线粒体氧化呼吸链功能障碍,主要包括编码氧化呼吸链酶复合体亚基的核基因变异和编码氧化呼吸链酶复合体组装蛋白的核基因变异^[21-23]。因此,本研究通过探讨精子DNA损伤和精子线粒体呼吸代谢功能的相关性,对男性不育的诊断和辅助生殖的治疗具有一定的理论和临床意义。虽然迄今为止对精子线粒体呼吸的研究很少有类似报道,但是众多的高耗氧组织线粒体呼吸研究的结果、论点和我们得出的实验结果都支持精子活力与线粒体呼吸状态、氧化磷酸化功能以及精子DNA损伤存在密切的联系。精子DNA损伤程度越高,就意味着核基因和线粒体基因缺陷、变异越严重,就越有可能引起严重的线粒体氧化呼吸链功能障碍。

我们在对精子线粒体呼吸功能和精子DNA损伤研究的基础上,将继续通过增加病例数量,进一步分析精子线粒体的膜电位变化、ATP生成能力和呼吸链复合体等功能指标检测其与精子活力的相关性,同时对可能引起线粒体氧化呼吸链功能障碍的基因缺陷进行研究,探索精子遗传物质的损伤与能量代谢障碍的相关性,从而帮助我们逐步了解精子线粒体在弱精子症男性不育中的作用机理,对指导临床诊断、治疗和辅助生殖中胚胎植入前遗传学诊断(PGD)具有重要意义。

致谢

感谢温州大学生命与环境科学学院柳劲松教授提供实验仪器和试剂,特此致谢!

参考文献 (References)

- 1 Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M,

- Thomas AJ, *et al.* Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril* 2002; 77(5): 873-82.
- 2 Curi SM, Ariagno JJ, Chenlo PH, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi Segovia LM, *et al.* Asthenozoospermia: Analysis of a large population. *Arch Androl* 2003; 49(5): 343-9.
- 3 金龙金, 李传连, 费前进, 张春玲, 黄学锋, 楼哲丰, 等. mtAT-Pase6基因变异与弱精子症的相关分析. *细胞生物学杂志* 2008; 30(5): 660-6.
- 4 李传连, 楼哲丰, 黄学锋, 吴永根, 张李雅, 吕建新, 等. 线粒体基因ND3、ND4L核苷酸变异与弱精子症相关分析. *中国病理生理杂志* 2010; 26(2): 362-7.
- 5 郑九嘉, 黄学锋, 杨宗, 杨旭, 张李雅, 吕建新, 等. mtND2基因多态性与弱精子症的相关性分析. *中国细胞生物学学报* 2010; 32(4): 546-54.
- 6 Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006; 12(1): 19-25.
- 7 Tang Z, Iqbal M, Cawthon D, Bottje WG. Heart and breast muscle mitochondrial dysfunction in pulmonary hypertension syndrome in broilers (*Gallus domesticus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002; 132(3): 527-40.
- 8 柳劲松, 李铭, 邵淑丽. 树麻雀肝脏和肌肉产热特征的季节性变化. *动物学报* 2008; 54(5): 777-84.
- 9 Kao SH, Chao HT, Wei YH. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol Reprod* 1995; 52(4): 729-36.
- 10 Kao SH, Chao HT, Wei YH. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(7): 657-66.
- 11 Thangaraj K, Joshi MB, Reddy AG, Rasalkar AA, Singh L. Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility. *J Androl* 2003; 24(3): 388-92.
- 12 郁金红, 崔英霞. 精子获能前后运动轨迹变化与MTATP8、MTCYB基因缺失. *男科学报* 1999; 5(4): 208-12.
- 13 Hill MM, Adrain C, Martin SJ. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv* 2003; 3(1): 19-26.
- 14 Saprunova VB, Bakeeva LE, Iaguzhinskiĭ LS. Ultrastructure of mitochondria apparatus of cardiomyocytes in apoptosis induced by longterm anoxia in rats. *Tsitologiia* 2003; 45(11): 1073.
- 15 Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, *et al.* Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59(5): 1037-46.
- 16 Choksi KB, Boylston WH, Rabek JP, Widger WR, Papaconstantinou J. Oxidatively damaged proteins of heart mitochondrial electron transport complexes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1688(2): 95-101.
- 17 Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, *et al.* Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: Effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001; 33(4): 808-15.
- 18 倪海霞. 银杏叶提取物对糖尿病大鼠心肌线粒体呼吸控制率的影响. *中国现代医药杂志* 2007; 12(9): 52-4.
- 19 Ryan T, Dana A, Gary D, Smith. Sperm DNA damage in male infertility: Etiologies, assays, and outcomes. *Assist Reprod Genet* 2010; 27(1): 3-12.
- 20 Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, *et al.* Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995; 11(2): 144-9.
- 21 Loeffen J, Smeitink J, Triepels R, Smeets R, Schuelke M, Sengers R, *et al.* The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome. *Am J Hum Genet* 1998; 63(6): 1598-608.
- 22 Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, Gorbatyuk M, Tzagoloff A, Taanman JW, *et al.* A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 2001; 29(1): 57-60.
- 23 Zeviani M. The expanding spectrum of nuclear gene mutations in mitochondrial disorders. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12(6): 407-16.

Analysis of Mitochondria Respiratory Function Associated with Motility of Sperm and Nucleus DNA Damage

Zheng Jiujia^{1,2}, Lou Zhefeng¹, Zheng Weihong³, Jin Jianyuan², Ni Wuhua², Li Ping¹, Jin Longjin^{1*}

(¹Zhejiang Provincial Key Laboratory for Medical Genetics, School of Life Sciences, School of Laboratory Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; ²Reproductive Medicine Center, First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325001, China; ³School of Life and Environment Science, Wenzhou University, Wenzhou 325027, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the correlation between mitochondrial respiratory function and sperm motility and nuclear DNA damage. Thirty-four semen samples were collected according to the WHO motility criteria. The mitochondria of sperm were extracted by differential centrifugation or density gradient centrifugation. Oxygen electrode units were used to measure the respiration rate of sperm mitochondria, and calculate mitochondrial state III respiration(ST III), mitochondrial state IV respiration(ST IV), P/O ratio, respiratory control rate(RCR) and the rate of oxidative phosphorylation(OPR). Sperm DNA damage was assessed by sperm chromatin dispersion(SCD). Our results showed that mitochondrial state III respiration significantly different among groups with different motility sperm($P<0.01$), the RCR and OPR in asthenospermia(AST) group were significantly lower than that of control group, decreased by 17.03%($P<0.05$) and 40.74%($P<0.001$), respectively. Linear regression analysis indicated sperm DNA damage negative correlation to motility of sperm, STIII, OPR($r=-0.812$, -0.788 and -0.696 , respectively). In conclusion, mitochondria respiratory and oxidative phosphorylation might have close correlation with sperm motility; sperm function might be impaired when DNA was damaged.

Key words motility of sperm; mitochondria; oxidative phosphorylation; DNA damage

Received: April 21, 2011 Accepted: September 27, 2011

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y206582) and Wenzhou Science & Technology Cooperation Program (No.H20090063)

*Corresponding author. Tel: 86-577-86689780, E-mail: jl20050101@yahoo.com.cn