

丙烯酰胺对离体人成熟精子功能的影响

邹乾兴¹ 陈雯² 翁诗琦¹ 罗韬^{1*}

(¹南昌大学生命科学研究院, 南昌 330031; ²南昌大学高等研究院, 南昌 330031)

摘要 该文研究了丙烯酰胺在体外对人成熟精子功能的影响。不同浓度(0, 2, 10, 50, 250, 1 000 $\mu\text{mol/L}$)的丙烯酰胺溶液在体外处理人成熟精子, 利用伊红苯胺黑染色、计算机辅助精子分析系统、金霉素染色、精子单细胞钙成像等方法检测精子活力、运动、获能、顶体反应和胞内钙动员等生理功能。结果显示, 不同浓度的丙烯酰胺溶液对人成熟精子活率、运动、获能、顶体反应以及胞内钙动员等生理功能均未有显著影响。推测丙烯酰胺体外急性染毒在短时间内并不抑制人成熟精子功能。

关键词 丙烯酰胺; 人成熟精子; 运动; 顶体反应; 胞内钙动员

In Vitro Effect of Acrylamide on Human Spermatozoa Functions

Zou Qianxing¹, Chen Wen², Weng Shiqi¹, Luo Tao^{1*}

(¹*Institute of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China;*

²*Institute for Advanced Study, Nanchang University, Nanchang 330031, China)*

Abstract The aim of this study is to explore the *in vitro* effect of acrylamide on the function of human spermatozoa. Different concentrations (0, 2, 10, 50, 250, 1 000 $\mu\text{mol/L}$) of acrylamide were exposed to human ejaculated spermatozoa *in vitro*. The viability, motility, capacitation, acrosome reaction (AR) and intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of acrylamide-treated spermatozoa were assessed by eosin-nigrosin staining, computer-aided sperm analysis, chlortetracycline staining and single sperm calcium imaging. The results indicated that all the concentrations of acrylamide used in this study had no significant effect on the viability, motility, capacitation, AR and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of human spermatozoa. These results implied that *in vitro* exposure to acrylamide did not inhibit the function of human spermatozoa in a short time.

Key words acrylamide; human spermatozoa; motility; acrosome reaction; intracellular calcium concentration

丙烯酰胺(acrylamide, CAS登记号为79-06-1)作为一种重要的化工原料, 从上世纪七十年代以来广泛用于污水净化、造纸、采矿业及科研等领域。丙烯酰胺可经消化道、呼吸道、皮肤黏膜等途径进入体内, 是一种重要的职业接触化合物^[1]。此外, 淀粉

类食品在高温(>120 °C)烹调下容易产生丙烯酰胺, 被摄入体内^[2-3]。人体还通过吸烟和饮水等途径接触和吸收丙烯酰胺^[4]。大量的毒理学实验表明, 丙烯酰胺具有神经、遗传和致癌等毒性, 被定为中等毒性的二级致癌物, 因此被广泛关注^[4-7]。

收稿日期: 2014-06-16 接受日期: 2014-7-16

国家自然科学基金(批准号: 31400996)、江西省科技厅青年科学基金(批准号: 0142BAB215050)和江西省教育厅青年科学基金(批准号: GJJ13021)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0791-83827083, E-mail: luotao@ncu.edu.cn

Received: June 16, 2014 Accepted: July 16, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31400996), the Scientific Foundation for Young Scientists of Jiangxi Provincial Science and Technology Department (Grant No.20142BAB215050) and the Scientific Foundation for Young Scientists of Jiangxi Provincial Education Department (Grant No.GJJ13021)

*Corresponding author. Tel: +86-791-83827083, E-mail: luotao@ncu.edu.cn

网络出版时间: 2014-10-24 09:18 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0205.html>

丙烯酰胺对哺乳动物雄性生殖系统具有毒害作用, 主要表现为其不仅降低雄性动物睾丸组织的大小和重量, 损伤睾丸组织细胞中的DNA, 造成生殖细胞遗传毒性, 而且影响精子发生, 导致精子畸形和活力下降等病变。丙烯酰胺的雄性生殖毒害作用机制主要是通过改变睾丸中与生精相关基因的表达以及诱发雄性生殖细胞染色体异常, 导致精子数目减少、活力下降、形态改变最终影响生育能力^[8-12]。目前, 国内外的研究对丙烯酰胺的在体雄性生殖毒性进行了阐明, 但是其对雄(男)性离体精子功能的影响尚未有报道。雄(男)性成熟精子在进入雌(女)性生殖道后, 由于理化环境的改变诱发精子发生一系列生理和功能上的改变。精子生理上的改变主要表现为胞内钙浓度的增加^[13-16], 功能上的改变包括运动、获能、顶体反应等一系列的过程^[17-19]。对于整个受精过程而言, 正常精子所经历的这些生理和功能上的改变是极其重要的。因此, 研究丙烯酰胺对离体人成熟精子生理功能的影响是对丙烯酰胺的雄(男)性生殖毒害作用及其机制进行的重要补充和完善。

本研究依据丙烯酰胺体外细胞毒性浓度(小于2 $\mu\text{mol/L}$ 无毒性; 2~1 000 $\mu\text{mol/L}$ 影响细胞生长和增殖; 大于1 000 $\mu\text{mol/L}$ 细胞致死)^[20], 用不同浓度(0, 2, 10, 50, 250, 1 000 $\mu\text{mol/L}$)丙烯酰胺处理离体人成熟精子, 探讨其对离体人精子运动、获能、顶体反应以及胞内钙动员等生理功能的影响, 其结果将为进一步系统地阐明丙烯酰胺的生殖毒害作用及其机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

丙烯酰胺和盐酸金霉素等分析纯化学试剂均购自Sigma公司, percoll分层液购自GE公司, human tubal fluid (HTF)培养基购自Millipore公司, 钙离子荧光指示剂Fluo4和去垢剂Pluronic F-127均购自Invitrogen公司, 细胞黏附剂CellTak购自BD公司, 精子活力伊红苯胺黑染色试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。

1.2 精液标本采集

按照WHO标准从南昌大学第二附属医院门诊就诊的男性中筛选活力正常(总活力 $\geq 50\%$, 前向运动a级 $\geq 25\%$ 或a+b级 $\geq 50\%$ 的样本)的精液标本, 标本提供者年龄25~40岁, 无心、肝、肾疾病, 禁欲3~5 d,

取样前48 h禁酒和咖啡等对精子有影响的食物或药物, 手淫取精。

1.3 精子活力和运动能力检测

10例正常人精液样本, 每例分成6组(90 μL /组), 移入6个1.5 mL离心管中, 分别加入10 μL 含有不同浓度丙烯酰胺的HTF培养基, 使得丙烯酰胺的终浓度分别为0, 2, 10, 50, 250, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 。混匀后于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中孵育, 分别于1, 12, 24 h三个时间点取各管精子进行活力和运动能力检测。精子活力通过精子活力伊红苯胺黑染色试剂盒检测, 头部未着色的精子为活精子, 精子活率=未着色精子数/总检测精子数 $\times 100\%$ 。精子运动能力通过北京伟力WLJY9000型计算机辅助精液分析仪(CASA)检测(包括运动精子比例、前向运动比例和平均直线速率), 每次检测至少计数200个精子。

1.4 精子获能和顶体反应检测

正常人精液样本经percoll密度梯度离心纯化后, 用HTF培养基重悬。纯化后的精子样本分成2组, 即自发顶体反应组和诱发顶体反应组; 每组分别取6个1.5 mL离心管, 分别加入48 μL 纯化精子样本和1 μL 含有不同浓度丙烯酰胺的HTF培养基至丙烯酰胺终浓度分别为0, 2, 10, 50, 250, 1 000 $\mu\text{mol/L}$, 混匀后于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中获能3.5 h后, 分别在自发顶体反应组各管中加入1 μL HTF和在诱发顶体反应组各管中加入1 μL 含有50 $\mu\text{mol/L}$ 钙载体A23187的HTF培养基, 混匀后继续孵育0.5 h。精子获能和顶体反应通过金霉素(chlortetracycline, CTC)染色后, 用徕卡DM2500正置荧光显微镜观察和拍照。其中, 精子不同染色类型分别为: “F”: 整个头部着色为未获能; “B”: 除赤道后区外头部均着色为获能未发生顶体反应; “AR”: 头部未着色为发生顶体反应。3次实验总共检测9个不同人样本, 每个样本至少检测200个精子。

1.5 精子胞内钙浓度检测

正常人精液样本经percoll密度梯度离心纯化后, 用98 μL HTF培养基重悬, 再与1 μL 5% Pluronic F-127和1 μL 1 mmol/L Fluo-4混合, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中孵育0.5 h。Fluo-4染色后精子经离心, 去上清, HTF培养基重悬, 再黏附到一个底部用Cell-Tak处理的共聚焦培养皿(Nest Biotechnology)上。精子胞内钙浓度通过钙成像系统检测: 精子通过奥林巴斯IX-71倒置显微镜观察, 结

合钙离子Fluo-4荧光用488 nm单色仪(Polychrome V, TILL Photonics GmbH)激发, 发散光通过滤光片HQ540/50(Chroma)后通过高速CCD摄像机采集(CoolSNAP HQ, Roper Scientific)。总共检测9个不同人样本, 每个样本取10个精子分析。胞内钙浓度变化用 $\Delta F/F_0$ 表示, $\Delta F = F(\text{精子头部荧光强度}) - F_0(\text{加药前精子头部荧光强度})$ 。

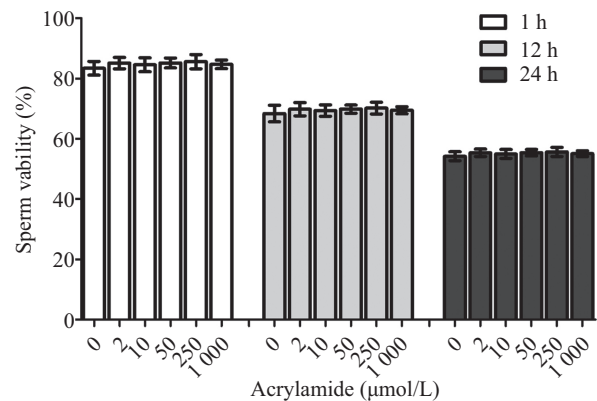
1.6 数据统计

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示, 显著性差异分析用SPSS 11.5软件, 采用不成对双侧 t 检验进行数据分析。

2 结果

2.1 丙烯酰胺在体外对人成熟精子不具有细胞毒性

为了研究丙烯酰胺在体外对人成熟精子功能的影响, 本研究首先检测丙烯酰胺在体外对人成熟精子是否具有细胞毒性。结果表明, 与对照组($0 \mu\text{mol/L}$)相比, 不同浓度($2, 10, 50, 250, 1\ 000 \mu\text{mol/L}$)丙烯酰胺

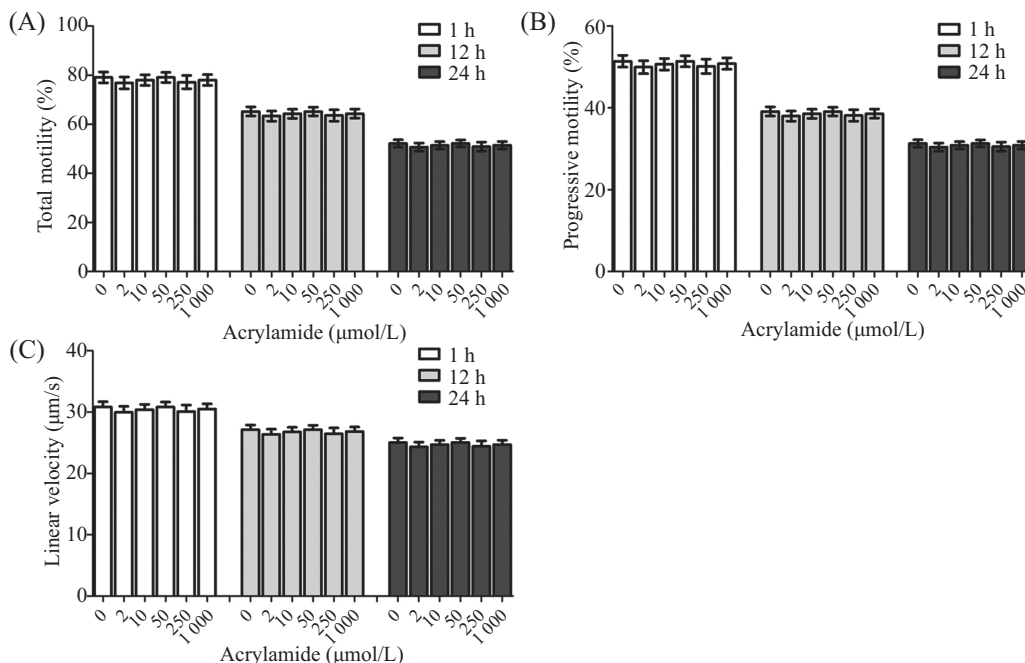


正常人精液样本经 $0, 2, 10, 50, 250, 1\ 000 \mu\text{mol/L}$ 的丙烯酰胺处理 $1, 12, 24$ h后, 分别用精子活力伊红苯胺黑染色试剂盒检测活力。 $n=10$ 。

Different concentrations ($0, 2, 10, 50, 250, 1\ 000 \mu\text{mol/L}$) of acrylamide were exposed to human ejaculated sperm *in vitro* for $1, 12, 24$ h, respectively. Then, the viability were assessed by eosin-nigrosin staining. $n=10$.

图1 丙烯酰胺对人成熟精子活力的体外影响

Fig.1 *In vitro* effect of acrylamide on viability of human ejaculated sperm

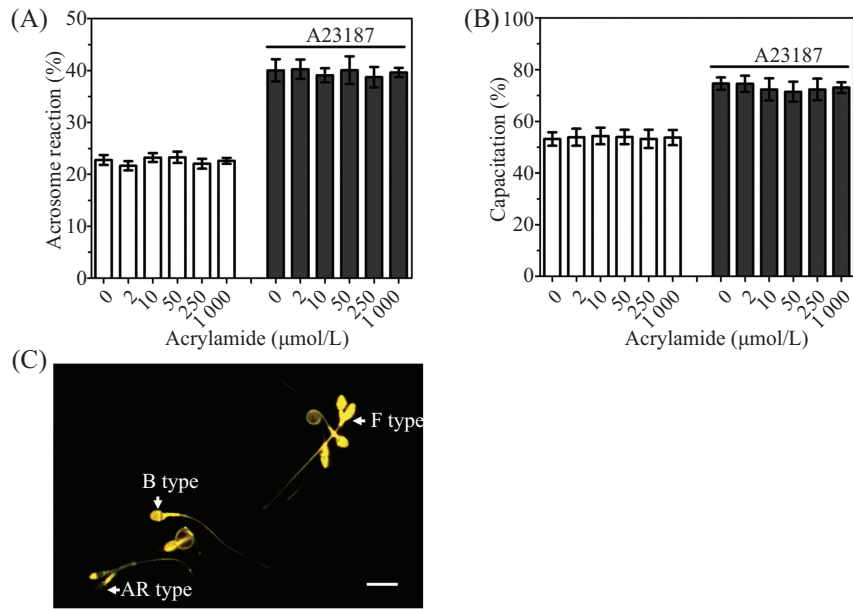


正常人精液样本经 $0, 2, 10, 50, 250, 1\ 000 \mu\text{mol/L}$ 的丙烯酰胺处理 $1, 12, 24$ h后, 分别用计算机辅助精液分析系统检测总活力(A)、前向运动(B)和平均直线速率(C)。 $n=10$ 。

Different concentrations ($0, 2, 10, 50, 250, 1\ 000 \mu\text{mol/L}$) of acrylamide were exposed to human ejaculated sperm *in vitro* for $1, 12, 24$ h, respectively. Then, the total motility (A), progressive motility (B) and linear velocity (C) were examined by computer-aided sperm analysis system. $n=10$.

图2 计算机辅助精液分析系统测定丙烯酰胺处理的人成熟精子运动参数

Fig.2 The motile parameters of acrylamide-treated human ejaculated sperm were examined by computer-aided sperm analysis system

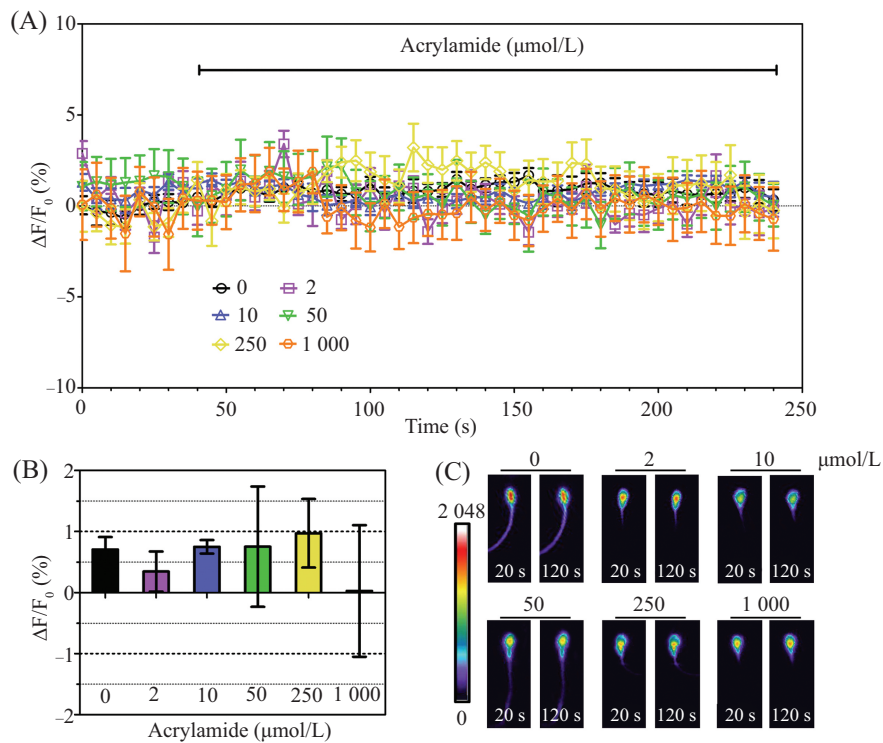


丙烯酰胺对人成熟精子顶体反应(A)和获能(B)的影响; C: 金霉素染色不同类型, 标尺=5 μm。

The effects of acrylamide on acrosome reaction (A) and capacitation (B) of human sperm; C: different pattern of CTC staining, scale bar=5 μm.

图3 丙烯酰胺体外作用人成熟精子后获能和顶体反应的变化

Fig.3 *In vitro* effects of acrylamide on capacitation and acrosome reaction of human sperm



A: 精子胞内钙浓度实时变化; B: 胞内钙浓度变化平均值; C: 不同时间点精子荧光图像, n=9。

A: real-time changes of sperm $[Ca^{2+}]_i$; B: mean changes of $[Ca^{2+}]_i$; C: examples of single sperm in different time frames, n=9.

图4 丙烯酰胺对人成熟精子胞内钙浓度的作用

Fig.4 Effects of acrylamide on the $[Ca^{2+}]_i$ of human ejaculated sperm

作用精子1、12和24 h后, 精子存活率(Sperm viability) 均未有显著差异(图1)。这说明在短时间内(24 h)丙烯酰胺在体外对人成熟精子不具有细胞毒性。

2.2 丙烯酰胺在体外对人成熟精子运动没有显著影响

成熟精子的运动是精子功能的直观表现, 同时

也是研究许多药物药理特性的潜在指标^[18]。本实验的结果表明,与对照组精子相比,2, 10, 50, 250, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯酰胺作用的精子,其三个时间点的运动参数(运动精子比例、前向运动比例和平均直线速率)均无显著变化(图2)。这说明在短时间(24 h)内丙烯酰胺在体外并不会引起成熟精子运动的改变。

2.3 丙烯酰胺在体外未显著改变人成熟精子获能和顶体反应

人精子进入雌性生殖道后,需要经历获能和顶体反应来完成正常受精。获能和顶体反应是反映精子正常功能的重要指标^[19-20]。本实验的结果显示,2, 10, 50, 250, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯酰胺孵育的精子,无论是自发还是钙载体A23187诱发的获能(图3A)和顶体反应(图3B),与对照组精子相比均未有显著差别。

2.4 丙烯酰胺在体外不引起人成熟精子胞内钙浓度的变化

钙离子作为重要的信号分子,其在精子中调控运动、获能和顶体反应等多种生理功能,对精子受精能力起到关键作用^[14-15]。本研究利用精子单细胞钙成像技术检测丙烯酰胺对精子胞内钙信号的影响。结果表明,2~1000 $\mu\text{mol/L}$ 丙烯酰胺在短时间内(3.5 min)并不改变离体人精子胞内钙浓度(图4A和图4B)。为进一步显示不同浓度丙烯酰胺对离体人精子的影响,我们截取了加药前(20 s)和加药后(120 s)精子实时荧光图像,结果显示,荧光主要分布精子头部,且丙烯酰胺并不改变精子头部和尾部荧光(图4C)。综上所述,丙烯酰胺并不会引起人成熟精子胞内钙浓度的变化。

3 讨论

本研究首次探讨丙烯酰胺对离体人成熟精子生理功能的影响,旨在补充和完善丙烯酰胺对男性生殖的毒害作用及机制。结果显示,2, 10, 50, 250, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的丙烯酰胺溶液在体外对人成熟精子活率、运动、获能、顶体反应以及胞内钙浓度等生理功能均未有显著影响。虽然前人报道丙烯酰胺具有体内雌性生殖毒性,本研究结果却表明,丙烯酰胺在短时间内并不影响离体人成熟精子功能,探究其原因有以下几方面:

首先,丙烯酰胺在体内转化为环氧丙酰胺发挥毒性,而对于离体人成熟精子主要以丙烯酰胺单

体形式起作用。丙烯酰胺进入人体内后,仅少量以原型经尿液排出。大部分在细胞色素P4502E1的作用下,生成活性环氧丙酰胺等代谢产物。环氧丙酰胺与DNA上的鸟嘌呤结合形成加合物,导致遗传物质损伤^[21]。研究显示,经口一次给予雄性大鼠54 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 丙烯酰胺后,在睾丸组织中检出了环氧丙酰胺-鸟嘌呤加合物,但未见丙烯酰胺-鸟嘌呤加合物^[22]。此外,病理切片提示,高剂量丙烯酰胺[100 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]腹腔注射连续染毒5 d可减少雄性小鼠睾丸曲细精管中生精细胞数量,并且增加早期生精细胞微核率以及初级精母细胞染色体畸变率^[9]。这些结果表明,丙烯酰胺经体内代谢后,所形成的环氧丙酰胺通过与DNA中鸟嘌呤形成加合物,造成早期生精细胞和初级精母细胞染色体畸变,引起生殖细胞遗传毒性。然而,离体人成熟精子不能将丙烯酰胺代谢为环氧丙酰胺,且丙烯酰胺自身不结合DNA,因此其对离体人成熟精子不造成遗传生殖毒性。

其次,在体内丙烯酰胺通过改变睾丸相关基因的表达来其作用,而成熟精子功能改变主要通过翻译后修饰等非基因组途径来实现。前人的研究表明,经口连续5 d给予雄性SD大鼠60 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 丙烯酰胺,可显著改变染毒大鼠睾丸中与生精相关的基因、睾丸功能相关基因以及逆境相关基因的表达从而影响生育^[11]。然而,成熟精子是转录沉默的特殊细胞,其核基因几乎不进行转录和翻译,成熟精子功能改变主要通过翻译后修饰等非基因组途径来实现^[23]。其中,精子胞内钙离子作为重要的信号分子,在调控哺乳动物成熟精子运动、获能和顶体反应等功能中起到关键作用^[13-14]。据报道,扰乱精子胞内钙信号将影响生育^[24]。本研究的结果表明,丙烯酰胺在体外并不影响人成熟精子胞内钙信号,从而并不改变离体人成熟精子运动、获能和顶体反应等功能。但是,丙烯酰胺是否会影响人成熟精子中其他信号通路还有待进一步研究。

最后,本研究中所用丙烯酰胺剂量与前人体内实验中所用剂量不同。前人在体内实验中所用丙烯酰胺浓度为5~100 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 。但是,丙烯酰胺进入体内后绝大部分转化为环氧丙酰胺等代谢产物,剩余的部分经尿液排除体外,体内几乎没有丙烯酰胺单体存在,因此丙烯酰胺的体内毒性主要是检测其代谢产物环氧丙酰胺。然而,成熟精子并不能将丙烯酰胺转化为环氧丙酰胺,因此,本研究所有的体

外浓度不是参考前人所用的体内剂量, 而是依据丙烯酰胺体外细胞毒性浓度^[20], 选用0, 2, 10, 50, 250, 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 作为实验浓度, 检测丙烯酰胺本身对离体人成熟精子功能的影响。

综上所述, 结合前人的研究和本实验结果推测, 丙烯酰胺对雄(男)性生殖的毒害机制为: 在体内, 丙烯酰胺转化为环氧丙酰胺, 结合生殖细胞中的DNA, 导致染色体异常, 并且改变睾丸中与生精相关的基因表达, 导致精子数目减少、活力下降、形态改变; 在体外, 丙烯酰胺对人成熟精子没有细胞毒性, 不影响人成熟精子胞内钙信号, 因而对人成熟精子运动、获能和顶体反应等功能没有显著抑制效果。

参考文献 (References)

- 1 张寿林, 何凤生, 王玉萍, 邓海, 杨师, 吴益群, 等. 41例丙烯酰胺作业工人临床分析. 中国工业医学杂志(Zhang Shoulin, He Fengsheng, Wang Yuping, Deng Hai, Yang Shi, Wu Yiqun, *et al.* Health risks evaluation of acrylamide exposed workers. Chinese Journal of Industrial Medicine) 1992; 5(4): 193-6.
- 2 Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Food chemistry: Acrylamide is formed in the maillard reaction. Nature 2002; 419(6906): 448-9.
- 3 Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, *et al.* Acrylamide from maillard reaction products. Nature 2002; 419(6906): 449-50.
- 4 Pingot D, Pyrzanowski K, Michalowicz J, Bukowska B. Toxicity of acrylamide and its metabolite-glycidamide. Medycyna Pracy 2013; 64(2): 259-71.
- 5 LoPachin RM. The changing view of acrylamide neurotoxicity. Neurotoxicology 2004; 25(4): 617-30.
- 6 Tsuda H, Shimizu CS, Taketomi MK, Hasegawa MM, Hamada A, Kawata KM, *et al.* Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations. Mutagenesis 1993; 8(1): 23-9.
- 7 Virk-Baker MK, Nagy TR, Barnes S, Groopman J. Dietary acrylamide and human cancer: A systematic review of literature. Nutr Cancer 2014; 29: 1-17.
- 8 Tyla RW, Friedman MA, Losco PE, Fisher LC, Johnson KA, Strother DE, *et al.* Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water. Reprod Toxicol 2000; 14(5): 385-401.
- 9 Holland N, Ahlborn T, Turteltaub K, Markee C, Moore ID, Wyrobek AJ, *et al.* Acrylamide causes preimplantation abnormalities in embryos and induces chromatin-adducts in male germ cells of mice. Reprod Toxicol 1999; 13(3): 167-78.
- 10 Yang HJ, Lee SH, Jin Y. Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. J Vet Sci 2005; 6(2):103-9
- 11 Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han DU, Chae C, *et al.* Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. Reprod Toxicol 2005; 19(4): 527-34.
- 12 Wang H, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, *et al.* Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. Reprod Toxicol 2010; 29(2): 225-30.
- 13 Publicover S, Harper CV, Barratt C. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signalling in sperm-making the most of what you've got. Nat Cell Biol 2007; 9(3): 235-42.
- 14 Publicover SJ, Giojalas LC, Teves ME, Oliveira G, Garcia AAM, Barratt CLR, *et al.* Ca^{2+} signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. Front Biosci 2008; 13: 5623-37.
- 15 Zeng XH, Yang C, Kim ST, Lingle CJ, Xia XM. Deletion of the Slo3 gene abolishes alkalization-activated K^+ current in mouse spermatozoa. Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(14): 5879-84.
- 16 Brenker C, Zhou Y, Müller A, Echeverry FA, Trötschel C, Pötsch A, *et al.* The Ca^{2+} -activated K^+ current of human sperm is mediated by Slo3. Elife 2014; 3: e01438.
- 17 Turner RM. Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation. Reprod Fertil Dev 2006; 18(1/2): 25-38.
- 18 de Jonge C. Biological basis for human capacitation. Hum Reprod Update 2005; 11(3): 205-14.
- 19 Yanagimachi R. Mammalian sperm acrosome reaction: Where does it begin before fertilization? Biol Reprod 2011; 85(1): 4-5.
- 20 Borenfreund E, Babich H. *In vitro* cytotoxicity of heavy metals, acrylamide, and organotin salts to neural cells and fibroblasts. Cell Biol Toxicol 1987; 3(1): 63-73.
- 21 Boettcher MI, Schettgen T, Kutting B, Pischetsrieder M, Angerer J. Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. Mutat Res 2005; 580(1/2): 167-76.
- 22 Maniere I, Godard T, Doerge DR, Churchwell MI, Guffroy M, Laurentie M, *et al.* DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. Mutat Res 2005; 580(1/2): 119-29.
- 23 Abou-haila A, Tulsiani DRP. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. Arch Biochem Biophys 2009; 485(1): 72-81.
- 24 Espino J, Mediero M, Lozano GM, Bejarano I, Ortiz A, Garcia JF, *et al.* Reduced levels of intracellular calcium releasing in spermatozoa from asthenozoospermic patients. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7: 11.