

# 膜片钳技术应用于精子离子通道研究的进展

张伟伟 张 晗 樊国达 曹 芳 康现江\*

(河北大学生命科学学院, 保定 071000)

**摘要** 精子发生是个复杂的细胞事件, 为了使这一事件有序的进行, 生精细胞分裂和分化必须在信号调控下精确地进行。精子的离子通道在调节其离子平衡和重要的生理过程(精子能动性、顶体反应、对卵子的趋向性等)中都起了关键性的作用。离子通道表达水平或功能的改变都直接影响人类及其他动物的雄性生育能力。对离子通道的研究最直接的方法是膜片钳技术, 但由于精子直径小, 又是末端分化细胞, 关于其电生理学的研究报道较少。该文介绍了精子离子通道的重要生理功能和电生理特征, 同时分析了膜片钳技术在精子离子通道研究中的重要价值。

**关键词** 精子; 离子通道; 膜片钳技术

## Advances in Ion Channels of Sperm with Patch Clamp Technical

Zhang Weiwei, Zhang Han, Fan Guoda, Cao Fang, Kang Xianjiang\*

(College of Life Science, Hebei University, Baoding 071000, China)

**Abstract** Spermatogenesis is a complex cellular event. Sperm ion channels play a central role in the regulation of spermatozoa homeostasis and vital cellular processes such as motility, chemotaxis toward the egg and the acrosome reaction. Changes on the expression or function of some ion channels in spermatozoa directly affect male fertility of human and other animals. The most direct method for the study of ion channels is patch clamp technique, which appeared extremely difficult because of the size of spermatozoa and its motility. This review summarizes the function and electrophysiological character of sperm ion channels. We also discuss the pivotal usage of patch clamp technique in the study of sperm ion channel.

**Keywords** sperm; ion channels; patch clamp technical

受精过程对于有性生殖的物种来说是必不可少的, 也是产生新个体不可或缺的。当精子进入生殖环境或者通过射精进入雌性生殖道内, 随之而来的就是精子一系列细胞生理过程, 比如精子能动性的获得、对卵子的趋向运动、顶体反应等。细胞内外离子浓度的变化均会对这些生理过程产生影响, 因此离子通道在控制精子发生以及使精子具有受精能力等方面起了非常重要的作用。例如体内受精物种(爬行动物、鸟类和哺乳动物)的精子通过附睾时,

离子浓度的变化均会使精子获得能动性<sup>[1]</sup>。精子可以在短时间内完成各种构型变化, 使得这个小细胞成为细胞生理学最有吸引力的模型<sup>[2]</sup>。目前研究表明, 许多物种精子中, 顶体位于精子头部, 是介于质膜和细胞核之间的囊状细胞器, 发生顶体反应时会将精子的顶体膜暴露出来, 侵入卵子表面, 随后与卵子的细胞膜进行融合<sup>[3]</sup>。而体外受精的物种, 例如中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)精子顶体反应需要依赖海水中的Ca<sup>2+</sup><sup>[4]</sup>。这种外部离子的组成对精子能动

收稿日期: 2016-06-17 接受日期: 2016-10-14

国家自然科学基金(批准号: 31572269)、河北省高等学校科学技术研究项目(批准号: Z2014063)和生物学河北省国家重点学科培育项目资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0312-5079362, E-mail: xjkang218@126.com

Received: June 17, 2016 Accepted: October 14, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31572269), Colleges and Universities in Hebei Province Science and Technology Research Project (Grant No.Z2014063) and Hebei Province Project for Cultivating National Key Disciplines in Biology

\*Corresponding author. Tel: +86-312-5079362, E-mail: xjkang218@126.com

网络出版时间: 2016-12-28 16:27:26 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161228.1627.012.html>

性和顶体反应的影响,使人们认识到精子膜的离子通道积极参与精子的这些基本生理过程。

在过去的十几年中,对离子通道机制的研究主要采用电压和离子敏感的荧光染料技术、双分子层调整技术、DNA重组技术、免疫细胞化学技术等。这对精子离子通道及其相关机制的研究提供了重要的理论依据<sup>[5]</sup>。但是,这些方法缺乏对离子通道和精子质膜转运蛋白的直接研究,阻碍了对调节精子活动和雄性生育能力分子机制的理解。1976年,德国马普生物物理化学研究所Hamill等<sup>[6]</sup>通过研究青蛙肌细胞创建了膜片钳技术(patch clamp techniques)。随后,这项技术广泛应用于心肌、骨骼肌、神经系统、内分泌等各类细胞中<sup>[7]</sup>。这使得人们对于相关疾病及药代动力学的发生机制有了进一步的认识。目前,膜片钳技术研究对象主要为可兴奋性细胞,对非兴奋性细胞研究报道较少,但对非兴奋性细胞的离子通道(如精子离子通道)的研究同样具有非常重要的意义。本文主要介绍了精子离子通道的特征与功能,以及膜片钳技术应用于生殖细胞方面的研究进展。

## 1 精子的离子通道组成

精子形成是一个复杂的细胞事件,在形态上经历了增殖、分裂、变形等一系列过程。为使这一过程井然有序,曲细精管内外信号需对这些步骤进行严格精确的调控,使精子具有受精能力,因此,生殖细胞膜电位的变化可能是其信号机制的重要组成部分。精子获得受精能力,也需要经历多种生理上的变化,例如精子膜蛋白的变化、精子活性的转变、[pH]<sub>i</sub>的改变、膜电位(Em)和膜结构的改变等<sup>[2,8]</sup>。精子的这些生理反应是通过多种因素进行调节的,而其中离子通道起了非常关键的作用。

Lee等<sup>[9]</sup>研究表明,特定离子通道阻断剂和离子条件的改变会抑制精子的成熟、精子能动性的获得和顶体反应。精子离子通道在调节其离子平衡和受精过程(精子能动性、趋化性和顶体反应)等方面也起了关键性的作用。目前发现,离子通道的改变或缺乏都直接影响人类或小鼠的雄性生育能力<sup>[10-12]</sup>。在精子发生的不同阶段,把存在的各种离子通道和细胞分布与其功能状态联系起来进行研究,将有助于更好地理解它们参与精子分化和生理功能的分子机制。在精子细胞膜上,已鉴定出多种离子通道,其中Ca<sup>2+</sup>、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>和一些阴离子通道广泛分布于头

部和鞭毛上,在调节精子的生理功能方面具有非常重要的作用。

### 1.1 精子的Ca<sup>2+</sup>通道

受精过程是一个复杂的、高度协调的过程。这一成熟的生理过程主要是通过信号级联反应和作为细胞内第二信使的钙离子进行调节。大量研究表明,提高精子内钙离子浓度或者增加钙的内流均可调节精子的能动性、超活化、趋向性顶体反应,促进精子与卵子结合并完成受精<sup>[12]</sup>。因此,了解精子钙离子通道的结构与分类是研究生物受精过程的关键。

Ca<sup>2+</sup>进入精子主要通过钙通道,这类通道主要包括电压依赖性钙通道(voltage-dependent calcium channel, VDCC)、瞬时感受器电位通道(transient receptor potential, TRP)、Ca<sup>2+</sup>释放通道、环核苷酸门控通道(cyclic nucleotide-gated, CNG)以及精子阳离子通道(cation channel of sperm, CatSper)<sup>[13]</sup>。表1为精子含有的部分钙通道。

1.1.1 VDCC VDCC的主要功能为通过膜电位的改变调节钙通道的开放与关闭。它是由4个结构域组成的蛋白质复合体,分别为 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2\delta$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 。其中, $\alpha 1$ 是钙离子通过的孔道,由4个重复结构域(I~IV)形成亲水性通道,每个重复结构域都是由6个跨膜螺旋结构组成, $\alpha 1$ 的N-端和C-端都位于细胞内侧,而且C-端含有很多重要的调节区域,其他4个为辅助型亚基,对通道的电压感受、电生理变化及细胞的定位起着重要作用<sup>[14]</sup>。VDCC主要有两种类型,一种是高电压激活(high voltage-activated, HVA)钙通道,这类通道在高电位的去极化刺激下,会被缓慢激活,HVA通道根据生理特性进一步细分,可以分为L-型钙通道、N-型钙通道、P/Q-型钙通道和R-型钙通道<sup>[13]</sup>;另一种为低电压激活(low voltage-activated, LVA)钙通道。这种通道在较低电位的去极化刺激下,会被瞬时激活且快速失活,命名为T-型钙通道。 $\alpha 1$ 亚基是由10个基因家族编码,所以可分为3个亚族:Ca<sub>v</sub>1有4个成员,Ca<sub>v</sub>1.1~Ca<sub>v</sub>1.4,均属于L-型钙通道;Ca<sub>v</sub>2有3个成员,Ca<sub>v</sub>2.1属于P/Q-型钙通道,Ca<sub>v</sub>2.2属于N-型钙通道,Ca<sub>v</sub>2.3属于R-型钙通道。Cohen等<sup>[15]</sup>在小鼠精子中发现了Ca<sub>v</sub>2.3通道的激活机制,在精子将要发生顶体反应时,需要Ca<sup>2+</sup>进一步内流,促进顶体外排,此时,Ca<sub>v</sub>2.3起主要作用,而该通道的激活与精子膜上固醇类物质的去除以及外环境中的G<sub>M1</sub>糖脂的局部浓缩密切相关。Ca<sub>v</sub>3有3个成员,Ca<sub>v</sub>3.1~Ca<sub>v</sub>3.3,

均属于T-型钙通道。T-型钙通道相关的mRNAs和蛋白质在精子发生到成熟精子中都被检测到, 但该通道的电流只在睾丸的精子中被记录, 在附睾中的精子尚未记录到该通道电流<sup>[16]</sup>。记录VDCC通道电流主要采用单通道记录的方法。这些通道位于精子的不同部位, 分别起着不同的作用<sup>[10]</sup>。有研究发现, 在精子发生和类固醇生成中, VDCC具有重要的生理功能, 其活性可以通过蛋白质酪氨酸磷酸化<sup>[17-18]</sup>或细胞内的[pH]<sup>[19]</sup>值进行调整。在支持细胞和睾丸间质细胞<sup>[20]</sup>内, 影响睾丸发育的刺激激素主要是促卵泡激素(follicle stimulating hormone, FSH)或促黄体激素(luteinizing hormone, LH), 这一过程可能涉及通过VDCC的Ca<sup>2+</sup>内流。

在不育男性精子中经常会发现异常Ca<sup>2+</sup>电流通过构象异常的二氢吡啶敏感的钙通道, 但在可育的男性精子中并未发现, 这主要归因于不育男性精子缺少钙通道。使用膜片钳技术研究精子VDCC电生理特性发现, 细胞外基质的高钾或高[pH]<sub>o</sub>会引起Ca<sup>2+</sup>通过VDCC流入成熟精子内<sup>[21]</sup>, 这进一步证实了VDCC是精子钙通道的重要组成部分。在人类精

子中使用L-型钙通道阻断剂会引起可逆转的男性不育<sup>[22]</sup>。这表明, 钙通道在生殖系统内部具有重要的生理功能。

**1.1.2 TRP** TRP通道蛋白由6个跨膜区域(S1~S6)组成, S5和S6形成亲水性通道, 负责运输离子。N-端包含4个重复锚蛋白结构(ankyrin repeats, AnkR)和一个螺旋结构域(coiled-coil, CC)<sup>[16]</sup>。C-端含有CIRB(calmodulin IP3 receptor binding)、PDZ(postsynaptic density zone)及TRP盒(transient receptor potential box)区域。其中, CIRB是钙调蛋白和IP<sub>3</sub>R的结合区域, PDZ则是与其他蛋白质结合的区域; TRP有7个亚群, 目前在小鼠和人类的精子内只发现了其中1个亚群TRPC(transient receptor potential canonical)。研究表明, 这些通道可能参与精子与卵子的成功结合, 另外, 精子TRPC2通过与卵子透明带的ZP3结合后激活, 可能参与精卵成功识别, 但将该通道敲除后, 精卵仍能成功识别并结合, 说明在识别过程中其他TRPC通道会形成补偿机制<sup>[23]</sup>。

**1.1.3 Ca<sup>2+</sup>释放通道** 第三种类型的通道为钙离子

表1 与精子有关的钙通道(根据参考文献[13]修改)

Table 1 Calcium channels associated with sperm (modified from reference [13])

电流类型 Current type	通道名称 Channel name	物种 Species	分布 Distribution	功能 Function
VDCC	Ca <sub>v</sub> 1.2 (L type)	Human, mouse, rat	Head, flagellum	
	Ca <sub>v</sub> 2.1 (P/Q type)	Human, mouse	Head, flagellum	Ca <sup>2+</sup> influx
	Ca <sub>v</sub> 2.2 (N type)	Human, mouse, rat	Head, flagellum	Ca <sup>2+</sup> influx
	Ca <sub>v</sub> 2.3 (R type)	Human, mouse, rat	Head, flagellum	Motility
	Ca <sub>v</sub> 3.1 (T type)	Human, mouse	Head, flagellum	Acrosome reaction
	Ca <sub>v</sub> 3.2 (T type)	Human, mouse	Head, flagellum	Acrosome reaction
	Ca <sub>v</sub> 3.3 (T type)	Human, mouse	Flagellum	
	TRPC1	Human, mouse	Midpiece	
TRPC	TRPC2	Bull, mouse	Head	Acrosome reaction
	TRPC3	Human, mouse	Principal piece	
	TRPC4	Human, mouse	Head, flagellum	
	TRPC5	Mouse	Head, flagellum	
	TRPC6	Human, mouse	Midpiece	
	TRPC7	Human, mouse	Flagellum	
	Ca <sup>2+</sup> release channel	RyR3	Mouse	Head, flagellum
IP3R1		Bull, human, mouse	Head, midpiece	
CNG channel		Bull	Principal piece	
	CatSper1	Human, mouse	Principal piece	
CatSper	CatSper2	Human, mouse	Principal piece	
	CatSper3	Mouse	Principal piece	Motility
	CatSper4	Mouse	Head	Motility



释放通道, 目前发现2种钙离子释放通道: Ryanodine受体(ryanodine receptor, RyR)通道和三磷酸肌醇受体(inositol 1,4,5-triphosphate receptor, IP<sub>3</sub>R)通道。内质网是细胞质的“钙库”, 可以将内部的钙离子释放到细胞质中, 从而导致细胞内钙离子浓度瞬时增加, 在RyR通道中, 负责将钙离子释放到胞质中的受体为Ryanodine受体(RyR)。哺乳动物体内有3种RyRs的亚型表达: RyR1、RyR2和RyR3。免疫细胞化学研究表明, 目前只有RyR3在成熟的精子内有表达。RyR通道由四个亚基构成, C-端构成了孔道, 而N-端大部分位于细胞质一侧, 主要是配体结合区域。RyR通道是阳离子选择通道, 对于单价和二价阳离子具有高电导率。RyRs通道通过钙离子结合位点将钙离子从内质网中释放到细胞质内<sup>[17]</sup>。ER的膜上不仅有RyR通道, 而且具有IP<sub>3</sub>R受体。目前, 在海胆及哺乳动物精子的顶体膜上发现IP<sub>3</sub>R通道, 这一通道由4个亚基组成, 每个亚基均有一个IP<sub>3</sub>结合位点, 控制Ca<sup>2+</sup>的流出。

**1.1.4 CNG** CNG是从小鼠睾丸内克隆出的第一个精子离子通道, CNG通道是非选择性阳离子通道, 从蛋白质序列来看, 它们与电压门控通道类似, 也是由6个跨膜区域构成, C-端具有1个环核苷酸结合位点。有研究表明, 在牛和小鼠的精子膜上, CNG通道可以诱导钙离子的内流<sup>[24]</sup>。目前发现, 此通道在海胆精子的趋化性方面有一定的作用, 不仅如此, 它在感觉传导过程(视觉和嗅觉)中的作用也得到了证实<sup>[18]</sup>, CNG通道的开放依赖于与cAMP或cGMP的结合, 具有较低的离子选择性和较弱的电压敏感性, CNG通道与其他通道不同, 它们不会失活或者脱敏<sup>[19]</sup>。

**1.1.5 CatSper** CatSper是一种弱电压依赖性、钙离子选择性以及pH敏感的精子特有的离子通道。这类通道调控钙离子进出, 对于精子的超活化和受精能力有非常重要的影响<sup>[25]</sup>。CatSper由4个不同孔道亚基(CatSper1~4)和至少3个辅基组成(CatSper $\beta$ 、CatSper $\gamma$ 和CatSper $\delta$ ), 这是CatSper通道重要的组成部分<sup>[26]</sup>。CatSper1~4的结构相似, 都具有6个跨膜区域, 结构与电压依赖性钙通道相似。

CatSper通道基因家族中, *CatSper1*是第一个被鉴定出来的, 在相关的基因敲除实验中, *CatSper1*和*CatSper2*基因突变型会导致不育, *CatSper3*和*CatSper4*的作用还未鉴定。*CatSper1*基因与电压依赖性钙通道具有较高的同源性, 包含6个赖氨酸和精

氨酸组成的带电氨基酸残基, 调节*CatSper1*表达的转录调控机制中, 临近的启动子区域有4个转录起始点和3个Sox结合位点已被鉴定, 其中转录因子Sox5和Sox9能显著提高CatSper1启动子的转录活性。这些结果为研究控制CatSper通道表达的分子机制提供了新的方向<sup>[26]</sup>。

CatSper主要的作用是提升细胞内钙离子的浓度, 控制精子超活化, 并且参与精子其他钙离子依赖性的生理活动, 如趋化运动和顶体反应<sup>[27]</sup>。CatSper的激活是依靠精子内部的碱化作用(小鼠和人类)和黄体酮(人类), 若小鼠和人类缺乏CatSper通道则表现为不育<sup>[28]</sup>。在人类精子中, 纳摩尔级的黄体酮足以激活CatSper通道。最近, Miller等<sup>[29]</sup>发现, 黄体酮对CatSper的激活是间接的, 通过与精子鞭毛区的脂质水解酶(abhydrolase domain-containing protein 2, ABHD2)结合, 促使ABHD2水解精子膜上CatSper通道内部的阻断物内源性大麻素2-花生四烯酸甘油(2-arachidonoylglycero, 2AG), 从而进一步促进CatSper的开放。该发现不仅有助于研究人员对黄体酮信号通路进行深入研究, 而且有助于对不孕不育的研究。

## 1.2 精子的K<sup>+</sup>通道

K<sup>+</sup>通道是一种跨膜蛋白质, 允许K<sup>+</sup>顺电化学梯度进行被动扩散。最初在生理条件下, 采用膜片钳技术, 从精子上直接记录到的pH依赖性钾离子电流被命名KSper。目前研究表明, 不同的钾通道在不同类型的生殖细胞内均有表达, 在精子发生过程中扮演不同的角色。K<sup>+</sup>通道共同特点是, 由Slo(slowpoke)基因家族编码, 成员有Slo1、Slo2以及Slo3, 这些通道由4个相同的亚基组成电压敏感性通道核心, 每个亚基均有7个跨膜螺旋区域S0~S6。S4为电压敏感区域, 与电压敏感性有关。S5与S6为孔道形成区, C-末端为配体结合区域, 参与功能的调控, 这是一种典型的电压门控钾通道<sup>[30]</sup>。目前, 在哺乳动物精子内已经发现了Slo1和Slo3通道, 而未见Slo2通道的报道。此外, 在睾丸中还发现了许多其他钾通道, 诸如内向整流K<sup>+</sup>通道、环腺苷酸门控通道和pH敏感K<sup>+</sup>通道, 这些通道在精子发生和生殖过程中均起着非常重要的作用。

Slo1通道由*kcnma1*基因编码, 该通道的C-端有2个K<sup>+</sup>电导的调节区域, 具有Ca<sup>2+</sup>高亲和结合位点<sup>[31]</sup>。这些结构使得Slo1通道能够感受到胞内电

压和 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的变化。有研究发现, Slo1通道是人类精子的主要钾通道。由于Slo1具有较大的单通道电导(60~270 pS), 因此, Slo1通道也被称为大电导钙激活钾通道(large-conductance calcium-activated potassium channels, BK)<sup>[32]</sup>。对于人类精子K<sub>Sper</sub>, 主要由Slo1通道介导, Slo1通道由2个亚基组成, 分别是成孔结构亚基和调节亚基, 成孔亚基由*kcnma1*基因编码, 调节亚基由*kcnmb1*和*kcnmb3*基因编码。这2种基因缺乏保守性, 不同物种会形成不同的基因转录变体。

对于小鼠精子K<sub>Sper</sub>, 主要由Slo3通道介导。该通道是由*kcnul1*基因编码, 该通道仅在睾丸中表达, 与Slo1通道同属于Slo家族, 不同物种间Slo1氨基酸序列具有较高的保守性。而在不同物种间Slo3氨基酸序列缺乏保守性, 比如小鼠的Slo3通道具有胞内碱化和电压依赖性, 将小鼠Slo3的cRNA注射至非洲爪蟾卵母细胞, 使其在爪蟾卵母细胞中表达, 通过全细胞膜片钳技术对其电生理特性进行验证, 发现该通道对胞内碱化具有依赖性<sup>[33]</sup>。

人类Slo3通道结构与Slo1非常相似, 具有非常保守的氨基酸序列, C-末端对膜内的pH比较敏感。在小鼠精子膜上, Slo3通道受pH和膜电压调节, 精子内碱性环境会激活小鼠Slo3通道。而在人类精子膜上, Slo3则由 $\text{Ca}^{2+}$ 介导, 而非碱性环境。人类精子的Slo3通道具有钙离子和电压依赖性。对于人类Slo3通道的研究, 采用真核细胞转染技术, 将人类*Slo3*基因与*LRRC52*(leucine rich repeat containing 52)基因共转染至中国仓鼠卵巢细胞(chinese hamster ovary cell, CHO)中, 并在CHO膜上表达, 通过膜片钳技术检测该通道的电生理特性<sup>[34]</sup>。Slo3对精子顶体反应的作用机制目前尚不清楚, 有一种推测是, Slo3的激活使精子膜呈现超极化状态, 从而激活电压依赖性的 $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交换体, 进一步促进精子内部pH的升高, 激活CatSper,  $\text{Ca}^{2+}$ 内流, 精子膜去极化, 发生顶体反应<sup>[35]</sup>。最近, Zeng等<sup>[36]</sup>在小鼠精子研究中发现, Slo3通道的开放与一个潜在的辅基LRRC52密切相关, *LRRC52*敲除的小鼠表现出较低的受精率, 在对其电生理研究中发现, 若缺乏LRRC52时, K<sub>Sper</sub>的激活需要更高的电位刺激和更高的pH激活, 这些都说明LRRC52对维持Slo3通道的正常生理功能至关重要。最近, 在小鼠精子中发现了LRRC52亚基与Slo3共同表达, 通过基因敲除LRRC52基因, 会影响小鼠精子Slo3的

活性水平, 说明该基因对小鼠精子的生理活动具有重要作用。

### 1.3 精子的 $\text{Na}^+$ 通道

在精子内有大量 $\text{Na}^+$ 通道表达,  $\text{Na}^+$ 的跨膜梯度在精子膜电位的调节中具有关键作用。伴随精子获能的一个重要事件就是通过升高精子内 $[\text{pH}]_i$ 值使精子质膜膜电位转变为超极化状态。这种超级化与细胞膜 $\text{K}^+$ 通透性增加和 $\text{Na}^+$ 通透性降低有关。

以前人们从未在精子膜上检测到 $\text{Na}^+$ 通道, 传统认为, 这些通道只存在于神经细胞、骨骼肌细胞以及心肌细胞内, 因此对其他组织和细胞的 $\text{Na}^+$ 通道的功能研究很少, 尤其是生殖系统内<sup>[37]</sup>。目前发现, 所有编码 $\text{Na}^+$ 通道亚基的mRNAs中有3个亚基是在精细胞内表达的。当精子发生开始有转录活性时, 从这些细胞里分离的mRNAs可以反映出基因的表达过程, 这一过程发生于精子发生的早期, 在人类睾丸的精子膜上, 所有的电压门控 $\text{Na}^+$ 通道(voltage-gated sodium channel, VGSC)的mRNA均有表达。但其功能目前还不清楚。最近研究发现, 通过改变鳗鲡精子外环境的 $\text{Na}^+$ 浓度, 会影响精子的能动性, 在精子获能前后, 精子内部的 $\text{Na}^+$ 会明显升高, 从静息状态的96.72 mmol/L上升到获能后的152.21 mmol/L。随后, 通过添加 $\text{Na}^+$ 通道阻断剂氨氯吡啶(2 mmol/L), 发现精子内的 $\text{Na}^+$ 浓度会发生下降, 说明在鳗鲡精子上存在 $\text{Na}^+$ 通道, 但还无对该通道电生理特性的研究<sup>[38]</sup>。

### 1.4 精子的其他离子通道

睾丸内的精子没有或仅有较弱的运动能力, 在射精前, 成熟哺乳动物的精子外液的pH变化根据物种的不同在5.5~6.8之间<sup>[11]</sup>, 明显低于正常体细胞内的pH值, 这种环境有助于精子在射精前处于静止状态和积存能量, 可存活数月<sup>[7]</sup>。在射精瞬间, 精子与精液暴露于更高的细胞外的pH值( $[\text{pH}]_o$ , 平均 $[\text{pH}]_o \approx 7.0$ 或者更高), 使精子内的 $[\text{pH}]_i$ 也提升至6.5( $[\text{H}^+] \approx 0.3$  mmol/L), 这使得精子初步获能<sup>[11]</sup>。而雌性生殖道中的 $[\text{pH}]_o$ 为7.4左右, 这会使精子内部的 $[\text{pH}]_i$ 继续升高, 并伴随精子的超活化运动。这是受精必要的过程。这一过程可提供给精子能量, 使其有能力穿过输卵管, 穿透卵子外的透明带<sup>[11]</sup>。这说明,  $\text{H}^+$ 通道在精子获得受精能力的过程中具有至关重要的作用。有研究表明, 人类的精子质膜上有大量的电压依赖性 $\text{H}^+$ 通道(H<sub>Sper</sub>), 在人类精子膜上主要的H<sub>Sper</sub>通道是H<sub>v1</sub>, 该通道似乎是可以使精子内部快速碱性化的离子通

道,这个通道可以通过膜去极化、减少细胞外的锌离子以及被大麻素所激活。有趣的是,HSper电流在小鼠的精子中未检测到,表明在小鼠体内精子的碱化可能有不同的机制<sup>[28]</sup>。

研究发现,小鼠的精子膜上有ATP门控电流( $I_{ATP}$ ),它由P2X2(purinergic receptor P2X 2)嘌呤受体通道介导,该通道是一种非选择性阳离子ATP依赖性P2X2通道,这一通道仅限于精子中段<sup>[39]</sup>。Navarro等<sup>[39]</sup>认为,P2X2受体在精子膜上的表达可以促进 $Ca^{2+}$ 内流,并可以促使线粒体ATP合成增加,这样就会提高精子的健康度,为精子提供选择优势。

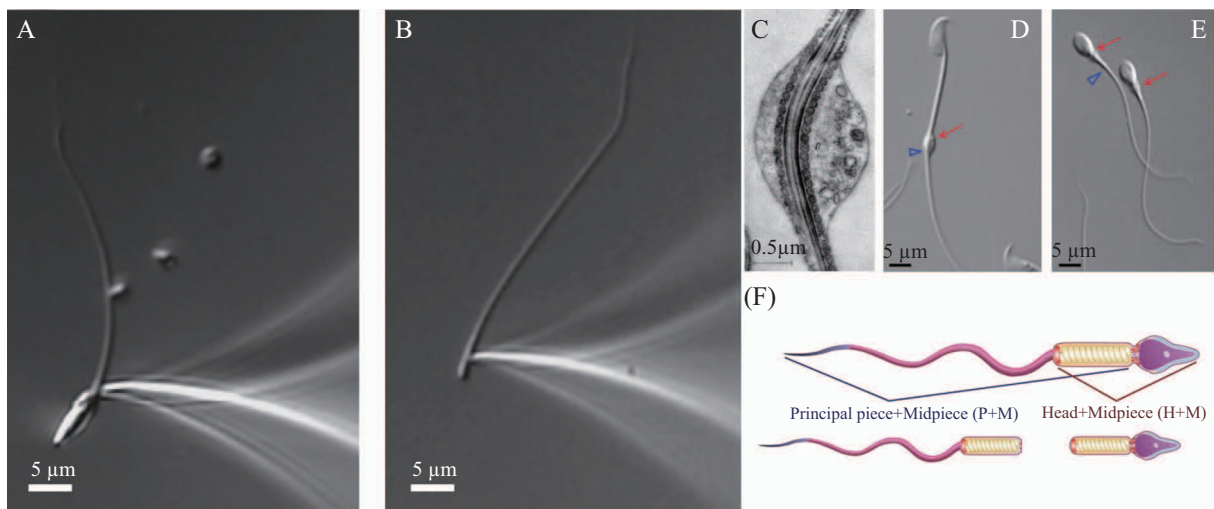
目前研究表明,当精子在缺乏Cl<sup>-</sup>的培养基内进行培养,大部分与获能有关过程均被阻断<sup>[40]</sup>。尤其是在无Cl<sup>-</sup>的培养基内,发现精子无酪氨酸磷酸化现象,没有超极化现象的产生,不会经历顶体反应,甚至在体外也不会与进入第二次减数分裂中期的卵子结合。有趣的是,尽管没有Cl<sup>-</sup>,cAMP激动剂仍会诱导磷酸化作用,但是cAMP途径的激活不足以让精子体外受精。使用Cl<sup>-</sup>指示剂MQAE[N-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium bromide]发现,在精子获能期间细胞内的Cl<sup>-</sup>浓度([Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>)会增加<sup>[40]</sup>。这一结果表明,精子内Cl<sup>-</sup>平衡的调节可使精子获能,而且精子内存在一个或多个Cl<sup>-</sup>

运输系统。虽然已知Cl<sup>-</sup>在精子获能和顶体反应中具有重要作用,但相关通道的分子机制还不清楚。直到后来,Orta等<sup>[41]</sup>在成熟人类精子的头部,通过全细胞膜片钳技术才记录到一种钙依赖性Cl<sup>-</sup>通道电流,并且该电流可以被Cl<sup>-</sup>通道阻断剂NFA(niflumic acid, 35 μmol/L)和DIDIS(4,4-diisothiocyano-2,2-stilbene disulphonic acid, 20 μmol/L)阻断,进一步验证了该通道在精子质膜上的存在。

## 2 膜片钳技术在精子离子通道研究的应用

### 2.1 膜片钳实验中精子的选择

哺乳动物精子膜片钳实验研究过程中,电极多钳制于精子细胞质滴(cytoplasmic droplet, CD)部位(图1)。CD是精子质膜与内部结构结合较松散的唯一区域,它是精子头部和尾部发展过程的过渡部分。在功能上,研究人员认为,在射精时,CD可能帮助精子适应细胞外渗透压的变化。射精后,CD的脱落通常不影响精子质膜的完整性。除此之外,CD的存在可能还与精子的不孕症有关,至少在小鼠、公牛和野猪中具有这种现象<sup>[42]</sup>。人类射出的新鲜精子由于具有完整的形态学特征,且功能上已经成熟,所以是符合膜片钳实验的最佳材料<sup>[43]</sup>。一些灵长类动物的精子在射精期间,CD不会从精子上脱落下来<sup>[42]</sup>,所以



A: 人类精子CD与电极形成的高阻封接; B: 人类精子鞭毛与电极形成的高阻封接; C: 羊附睾尾精子CD; D: 小鼠附睾体精子, 红箭头标注为CD, 蓝色三角为鞭毛中段与主段的连接处; E: 人类射出的精子, 红箭头标注为CD, 蓝色三角为鞭毛中段与主段的连接处; F: 精子分段的模式图。

A: a tight gigohm seal is formed with the CD of the human spermatozoon. B: seal formation is formed with human sperm flagellum. C: a ram spermatozoon isolated from cauda epididymis. D: mouse spermatozoon isolated from corpus epididymis. CD is indicated with the red arrow. Annulus (connection between the principal piece and the midpiece) is indicated with the blue arrow. E: ejaculated human spermatozoa. The indication of red and blue arrows is as same as D. F: graph demonstrating fractionation of the spermatozoon.

图1 精子膜片钳记录的唯一途径——细胞质滴(根据参考文献[10]修改)

Fig.1 The only gateway for sperm patch clamp-cytoplasmic droplet (modified from reference [10])



膜片钳技术可以应用于完整的成熟的射出精子<sup>[28]</sup>。其他的物种,例如小鼠、兔、狗,它们的CD一般在射精的时候就已经脱落。人类的精子在女性生殖系统内也保存着CD,这并不会影响整个受精过程<sup>[40]</sup>。人类射出的精子也可以在体外获能,膜片钳技术同样能够应用于获能或未获能的射出精子。但是,获能的精子游动非常剧烈,能黏附在盖玻片上的获能精子比较少,对其进行膜片钳实验较困难。

收集小鼠射出的精子非常困难<sup>[43]</sup>,精子CD在射精过程中经常会脱落<sup>[30]</sup>。因此,为了了解成熟小鼠精子离子通道的生理学性质,膜片钳实验需要从附睾体或附睾尾分离出精子<sup>[28]</sup>。附睾尾精子的CD易被破坏,这使得膜片钳对精子的记录尤为困难。而从小鼠附睾体内分离出精子的CD具有韧性,不易脱落,比较容易进行膜片钳实验。可是,从附睾体取出的精子,并不是完全成熟的,大部分的精子不能与卵子受精<sup>[37]</sup>,使用其作为模型来理解精子获能会有一些的难度。然而对于膜片钳实验,小鼠附睾体和附睾尾的精子之间没有发现任何离子通道的显著差异,所以在进行膜片钳实验时,根据情况选择附睾体或者附睾尾部的精子均可。

传统的膜片钳记录主要是以可兴奋性细胞为主,例如神经细胞、肌细胞等。对于生精细胞和精子的研究较少,这主要是因为精子质膜与细胞内结构紧密连接,这使得应用于可兴奋性细胞的膜片钳技术应用于精子被认为是很难实现的。因为膜片钳实验过程中需要对细胞进行高阻封接,需要穿透高度黏性环境,还需要质膜没有变形或损坏。精子的这一特殊结构增加了精子膜片钳实验的困难。最近,这一技术难题在小鼠精子上解决了,随着实验方法的发展,允许从精子质膜上进行可重复的膜片钳记录。现在,相似的方法已成功应用于人类精子细胞,这为研究雄性可育性的分子机制提供了新的机会,尤其是对人类的男性可育性的研究<sup>[28]</sup>。

## 2.2 精子的膜片钳记录

膜片钳记录电极一般使用硼硅酸盐玻璃拉制,电极进入细胞外液之前,给电极施加正压,确保电极进入细胞外液后,保持尖端清洁,不带任何碎屑。电极内外液根据记录离子通道不同会有所改变,但是电极内液的渗透压要比细胞外液的渗透压高出10%,这是因为电极内液较高的渗透压可以帮助保持在精子膜片钳记录时尽可能低的电阻。将提取的精子

悬液静置在含有盖玻片的培养皿内。实验前,将多聚赖氨酸铺在盖玻片上,以固定精子。目前主要是通过全细胞膜片钳技术对精子进行记录。膜片钳全细胞模式的先决条件是电极尖端和质膜之间形成紧密封接<sup>[6]</sup>。为了提高封接稳定性,精子经常要进行低渗溶液处理,细胞膜会发生膨胀,鞭毛的轴丝陷入内部,与质膜松散的接触,这时候就很容易自发地形成GΩ封接。此外,低渗处理也有利于破膜进入膨胀的精子内,形成全细胞模式,记录全细胞电流。但在低渗溶液内,膨胀的精子会释放水解酶,引起膜蛋白的降解,而且破坏质膜和内部结构的连接会改变精子离子通道的性质。解决这一问题的关键就是对精子的CD进行封接。CD质膜并没有像其他部分质膜紧贴在细胞内结构上,因此比较容易形成高阻封接。虽然精子CD的生理功能还不清楚,但其现实意义是显而易见的。目前它是精子电生理实验中唯一的突破口,可以通过这部分连接膜片钳放大器。

当电极尖端接触到CD,迅速给电极负压,使CD与电极尖端形成高阻封接。这一技术需要非常精细的操作。许多电生理学家处理更大的细胞时,通过延长吸附时间,从而建立封接的形成。这可能是由于这些细胞的膜面积较大,但它不适合人类精子,因为人类精子CD和电极高阻封接的形成,是一个快速的过程。而小鼠CD的封接,要比人类精子CD的封接要大一些,因此需要长时间或者延长吸附时间会更有利。在这种情况下,在刚接触时,电极的负压可以保持1 min,逐渐的形成封接。形成高阻封接后,转化成全细胞模式,成功破膜后,精子的全细胞实验开始以与其他细胞类型完全相同的方式进行。如果破膜不成功,或者引起非特异性漏流,就要选择另一个合适的精子,再次尝试形成全细胞模式。全细胞模式成功后根据不同的研究目的进行不同的电生理实验。

目前,许多生殖细胞电生理实验的研究主要集中在生精细胞或精子的尾部。研究生精细胞的原因是由于生精细胞还未经过变形期,尤其是精原细胞还会有大量蛋白质的合成,这样离子通道的作用就会显得尤为重要。从膜片钳技术层面讲,生精细胞比成熟精子体积大,这样就会降低膜片钳实验的难度,其次生精细胞的膜质比大,这样容易形成高阻封接。目前还有一部分电生理实验主要集中在研究精子的尾部<sup>[11]</sup>。这种现象并不会令人感到惊奇,因为

精子尾部的质膜占整个精子的70%~75%。此外,不论是小鼠的精子还是人类的精子,都可以将尾部(主要的阶段和中段)从头部除去。记录时只记录全部鞭毛质膜的电流<sup>[1]</sup>。因此,精子的膜片钳技术可以用于研究鞭毛的离子通道和调节通道活性的机制,这种技术可以使人们对鞭毛结构上膜的相关信号转导有深刻的认识。

### 3 小结

在生殖系统内,精子质膜离子通道的改变对于精子生理状态以及受精过程有非常重要的作用。事实上,精子的离子通道可以调节精子的能动性。一些物种离子通道动态可以调控精子向卵子运动的趋向性,而且还可以触发精子的顶体反应。直到最近,人们才通过膜片钳实验初步了解了精子离子通道的分子机制,而且可以直接通过膜片钳记录离子通道的活动,膜片钳技术打开了许多先前未知的精子生理功能的分子机制。

精子离子通道的正常表达和受精过程密切相关,因此精子离子通道也可作为精子质量新的评价指标,可为精子质量分析提供参考依据。以前的实验技术缺乏对离子通道和精子质膜转运蛋白的直接研究,阻碍了人们对调节精子活动和雄性生育能力分子机制的理解。而膜片钳技术可以直观的去观察细胞膜离子通道变化,将这一技术用于研究生殖细胞质膜或精子鞭毛的离子通道以及调节通道活性的机制,使人们对相关的信号转导有深刻的认识。生殖细胞电生理的研究应用将开启人们对生殖系统质量评价方面的研究方向,对其人工授精和良种选育提供基础理论资料,具有一定的实践意义。

### 参考文献 (References)

- Darszon A, Labarca P, Nishigaki T, Espinosa F. Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* 1999; 79(2): 481-510.
- Darszon A, Liévano A, Beltrán C. Ion channels: Key elements in gamete signaling. *Curr Top Dev Biol* 1996; 34: 117-67.
- Beltrán C, Treviño CL, Mata-Martínez E, Chávez JC, Sánchez-Cárdenas C, Baker M, *et al*. Role of ion channels in the sperm acrosome reaction. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2016; 220: 35-69.
- Wang YL, Sun WJ, He L, Li Q, Wang Q. Morphological alterations of all stages of spermatogenesis and acrosome reaction in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Cell Tissue Res* 2015; 360(2): 401-12.
- Jiménez-González MC, Gu Y, Kirkman-Brown J, Barratt CL, Publicover S. Patch-clamp 'mapping' of ion channel activity in human sperm reveals regionalisation and co-localisation into mixed clusters. *J Cell Physiol* 2007; 213(3): 801-8.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv* 1981; 391(2): 85-100.
- Korneich BG. The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *J Vet Cardio* 2007; 9(1): 25-37.
- Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Treviño CL, *et al*. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 2006; 131(6): 977-88.
- Lee JH, Ahn HJ, Lee SJ, Gye MC, Min CK. Effects of L- and T-type Ca<sup>2+</sup> channel blockers on spermatogenesis and steroidogenesis in the prepubertal mouse testis. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28(1): 23-30.
- Kirichok Y, Lishko PV. Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod* 2011; 17(8): 478-99.
- Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 2006; 12(1): 23-37.
- Lishko PV, Kirichok Y, Ren D, Navarro B, Chung JJ, Clapham DE. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annu Rev Physiol* 2012; 74: 453-75.
- Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño CL, Felix R, Beltrán C. Calcium channels and Ca<sup>2+</sup> fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* 2005; 243: 79-172.
- Wu J, Yan Z, Li Z, Yan C, Lu S, Dong M, *et al*. Structure of the voltage-gated calcium channel CaV1.1 complex. *Science* 2015; 350(6267): 388-90.
- Cohen R, Buttke DE, Asano A, Mukai C, Nelson JL, Ren D, *et al*. Lipid modulation of calcium flux through CaV2.3 regulates acrosome exocytosis and fertilization. *Dev Cell* 2014; 28(3): 310-21.
- Darszon A, Hernández-Cruz A. T-type Ca<sup>2+</sup> channels in spermatogenic cells and sperm. *Pflugers Arch* 2014; 466(4): 819-31.
- Michelangeli F, Ogunbayo OA, Wootton LL. A plethora of interacting organellar Ca<sup>2+</sup> stores. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(2): 135-40.
- Mazzolini M, Marchesi A, Giorgetti A, Torre V. Gating in CNGA1 channels. *Pflugers Arch* 2010; 459(4): 547-55.
- Brown RL, Strassmaier T, Brady JD, Karpen JW. The pharmacology of cyclic nucleotide-gated channels: Emerging from the darkness. *Curr Pharm Des* 2006; 12(28): 3597-613.
- Manna PR, Pakarinen P, El-Hefnawy T, Huhtaniemi IT. Functional assessment of the calcium messenger system in cultured mouse leydig tumor cells: Regulation of human chorionic gonadotropin-induced expression of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 1999; 140(4): 1739-51.
- Wennemuth G, Westenbroek RE, Xu T, Hille B, Babcock DF. CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca<sup>2+</sup> channels in depolarization-evoked entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm. *J Biol Chem* 2000; 275(28): 21210-7.
- Katsoff D, Check JH. A challenge to the concept that the use of calcium channel blockers causes reversible male infertility. *Hum Reprod* 1997; 12(7): 1480-2.



- 23 Darszon A, Sánchez-Cárdenas C, Orta G, Sánchez-Tusie AA, Beltrán C, López-González I, *et al.* Are TRP channels involved in sperm development and function? *Cell Tissue Res* 2012; 349(3): 749-64.
- 24 Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: A multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002; 32: 235-49.
- 25 Singh AP, Rajender S. CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online* 2015; 30(1): 28-38.
- 26 Mata-Rocha M, Hernández-Sánchez J, Guarneros G, de la Chesnaye E, Sánchez-Tusie AA, Treviño CL, *et al.* The transcription factors Sox5 and Sox9 regulate Catsper1 gene expression. *FEBS Lett* 2014; 588(18): 3352-60.
- 27 Suarez SS. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 2008; 14(6): 647-57.
- 28 Lishko PV, Kirichok Y. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation. *J Physiol* 2010; 588(23): 4667-72.
- 29 Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, *et al.* Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via sex hormone progesterone. *Science* 2016; 352(6285): 555-9.
- 30 Schreiber M, Wei A, Yuan A, Gaut J, Saito M, Salkoff L. Slo3, a novel pH-sensitive K<sup>+</sup> channel from mammalian spermatocytes. *J Biol Chem* 1998; 273(6): 3509-16.
- 31 Yuan P, Leonetti MD, Pico AR, Hsiung Y, MacKinnon R. Structure of the human BK channel Ca<sup>2+</sup>-activation apparatus at 3.0 Å resolution. *Science* 2010; 329(5988): 182-6.
- 32 Mannowetz N, Naidoo NM, Choo SA, Smith JF, Lishko PV. Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *Elife* 2013; 2: 1-19.
- 33 Martínez-López P, Santi CM, Treviño CL, Ocampo-Gutiérrez AY, Acevedo JJ, Alisio A, *et al.* Mouse sperm K<sup>+</sup> currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381(2): 204-9.
- 34 Brenker C1, Zhou Y, Müller A, Echeverry FA, Trötschel C, Poetsch A. The Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife* 2014; 3: e01438.
- 35 Chávez JC, Ferreira JJ, Butler A, De La Vega Beltrán JL, Treviño CL, Darszon A, *et al.* SLO3 K<sup>+</sup> channels control calcium entry through CATSPER channels in sperm. *J Biol Chem* 2014; 289(46): 32266-75.
- 36 Zeng XH, Yang C, Xia XM, Liu M, Lingle CJ. SLO3 auxiliary subunit LRRC52 controls gating of sperm KSPER currents and is critical for normal fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(8): 2599-604.
- 37 Seda M, Pinto FM, Wray S, Cintado CG, Noheda P, Buschmann H, *et al.* Functional and molecular characterization of voltage-gated sodium channels in uteri from nonpregnant rats. *Biol Reprod* 2007; 77(5): 855-63.
- 38 Vílchez MC, Morini M, Peñaranda DS, Gallego V, Asturiano JF, Pérez L. Sodium affects the sperm motility in the European eel. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2016; 198: 51-8.
- 39 Navarro B, Miki K, Clapham DE. ATP-activated P2X2 current in mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(34): 14342-7.
- 40 Hernandez-Gonzalez EO, Trevino CL, Castellano LE, de la Vega-Beltran JL, Ocampo AY, Wertheimer E, *et al.* Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *J Biol Chem* 2007; 282(33): 24397-406.
- 41 Orta G, Ferreira G, José O, Treviño CL, Beltrán C, Darszon A. Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. *J Physiol* 2012; 590(11): 2659-75.
- 42 Cooper TG. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J Androl* 2011; 13(1): 130-8.
- 43 Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009; 15(2): 213-27.