

消旋普萘洛尔抑制豚鼠精子体外获能、顶体反应和精卵融合^{1,2}

钟翠玲、葛仁山、石其贤 (浙江省医学科学院计划生育研究所, 杭州 310013, 中国)

Inhibition of guinea pig sperm capacitation, the acrosome reaction and sperm-egg fusion by *dl*-propranolol *in vitro*^{1,2}

ZHONG Cui-Ling, GE Ren-Shan, SHI Qi-Xian

(Family Planning Research Institute, Zhejiang Academy of Medicine, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT *dl*-Propranolol (Pro), known to have spermicidal effect, was evaluated for its ability to influence capacitation, the acrosome reaction (AR) and fertilization of guinea pig spermatozoa at non-spermicidal dose levels. A concentration-dependent decrease in AR and the whiplashed motility occurred in Pro as low as 0.05 mmol/L. Pro 1.0 mmol/L completely abolished AR, followed by the loss of sperm capacity to penetrate into zona-free hamster egg. Pro exerted its inhibitory effect of AR primarily by restraining the capacitation stage of sperm but at Pro 0.5 mmol/L by blocking both capacitation and AR stages.

% of AR of sperm preincubated with ionophore A-23187 0.2 μ mol/L was significantly higher than that of the control, but markedly lower at Pro \geq 0.05 mmol/L, implying that Pro prevented sperm Ca^{2+} influx. Prenylamine was also found to inhibit AR potentially and enhance the action of Pro against ionophore A-23187. Furthermore, Pro inhibition of the fertilizing ability of preincubated spermatozoa was antagonized by cAMP. Pro 0.5 mmol/L even caused the egg vesiculation. The reversibility of the action depends on the dose and time of sperm exposure to Pro.

Received 1989 Apr 12 Accepted 1989 Sep 4

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No 3861213) and the Rockefeller Foundation (No 85049-22).

² Presented at the 8th Annual Meeting of the Society for the Advancement of Contraception, 1988 May 23-6, Tokyo,

These findings suggest that the inhibitory effects of Pro on guinea pig sperm capacitation, the acrosome reaction and fertilization may be the mechanisms for its antifertility action.

KEY WORDS propranolol; spermatozoa; sperm capacitation; acrosome; fertilization *in vitro*

摘要 消旋普萘洛尔(Pro)抑制豚鼠精子体外获能的初始浓度为 0.05 mmol/L, 1.0 mmol/L 时获能完全抑制。此作用与 Pro 的膜稳定作用以及 Ca^{2+} 通透性减少有关。Pro (>0.25 mmol/L) 亦可抑制已获能精子顶体反应和精卵融合能力, 后者受 cAMP 拮抗。Pro 对精子获能抑制的可逆性与其浓度、作用时间相关。本研究为 Pro 作为避孕药使用提供依据。

关键词 普萘洛尔, 精子, 精子获能, 顶体, 体外精卵融合

消旋普萘洛尔 (*dl*-propranolol, Pro) 能有效地抑制人精子活力⁽¹⁾。国内外学者已评价了 Pro 作为阴道避孕药的可能性, 认为 Pro 不仅具有杀精活性, 还具有明显的抗着床作用^(2,3)。但是有关 Pro 对精子受精诸环节的直接作用尚未见报道。

哺乳动物精子在受精前必须完成获能和顶体反应。在获能期间, 精子膜发生一系列急剧的生理生化特性改变。而精子 Ca^{2+} 摄取是早期顶体反应的步骤之一^(4,5)。本文以豚鼠精子为模型研究了非杀精浓度 Pro 对精子获能、顶体反应(acrosome reaction)和精卵融合(受精)的作用及其可能的作用方式。

MATERIALS

普尼拉明(prenylamine, 原名心可定)为苏州第一制药厂生产, 丙酮酸钠、乳酸钠、牛血清白蛋白(BSA)、*N*-2-羧乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸(HEPES)、钙离子载体 Ionophore A-23187

及 Pro 均为 Sigma 产品。二甲亚砜 (DMSO) 等系国产 AR 试剂。A-23187 用 DMSO 溶解, 临用前稀释至所需浓度。

精子获能培养基采用改良的无 Ca^{2+} 最小获能培养基 (CaF-MCM)⁽⁶⁾, 增加 HEPES 20 mmol/L 使 pH 稳定。此培养基只有加入 Ca^{2+} , 才能诱发精子顶体反应。仓鼠卵培养基 (BWW)⁽⁷⁾。临用前均用微孔滤膜过滤 (Nalgene, 0.2 μm)。

精子取自 8 只豚鼠 (体重 $690 \pm 45 \text{ g}$) 附睾尾和输精管, 记录活力并调数至 $1 \times 10^7 - 3 \times 10^7$ 精子/ml。仓鼠卵子按本实验室建立的超排卵法⁽⁸⁾获得。

METHODS AND RESULTS

对豚鼠精子获能和顶体反应的影响 按同步顶体反应法⁽⁴⁾进行。精子在含 Pro 0.05-1.0 mmol/L 的 CaF-MCM 中 37°C 培养 6 h, 然后加入 CaCl_2 2.0 mmol/L, 15 min 后观察精子顶体反应率 (AR), 以 AR 为指标评价精子是否完成获能。结果见 Fig 1。Pro 抑制精子获能的最低浓度为 0.05 mmol/L, 随着浓度增加抑制率加大, 1.0 mmol/L 时 AR 下降为零, 说明此时精子获能已完全阻断。若将精子进一步作穿卵试验, 可见受精率平行下降 (待发表资料)。

为了研究 Pro 对顶体反应阶段有何影响, 取已获能的正常豚鼠精子, 加入 Pro 0.05-0.5

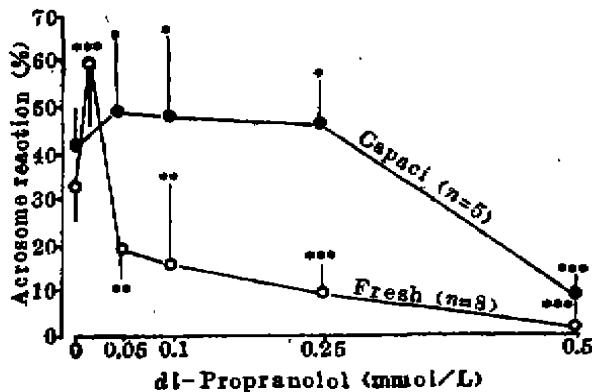


Fig 1. Effects of dl-propranolol on guinea pig sperm acrosome reaction *in vitro*. $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

mmol/L 后平衡 10 min, 以 CaCl_2 2.0 mmol/L 诱发顶体反应, 观察 AR 在 Pro 处理组与对照组之间的差别。Fig 1 结果显示高浓度 Pro ($\geq 0.5 \text{ mmol/L}$) 可直接抑制顶体反应, 而低浓度则通过抑制获能使 AR 下降。

作用的可逆性 精子与 Pro 接触 0.5, 1, 2, 3 和 4 h 后, 离心 ($500 \times g, 10 \text{ min}$) 两次, 收集下沉精子, 重新悬于新鲜 CaF-MCM 中培养 6 h, 记录 AR。结果见 Fig 2。Pro 0.25 mmol/L 与精子培养 2 h 顶体反应能够部分恢复, 随着时间延长, 顶体反应呈不可逆下降趋势。精子与 Pro 0.5 mmol/L 即使接触 5 min, 顶体反应也不能恢复 (未发表资料)。

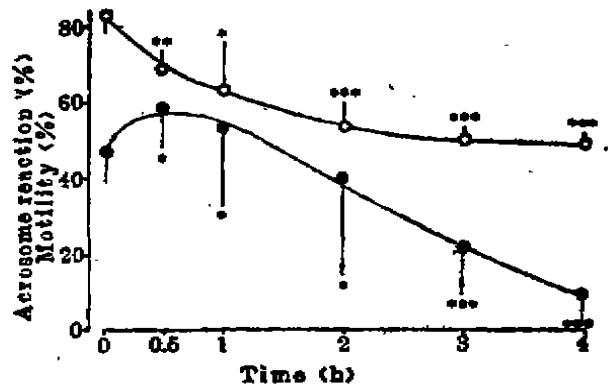


Fig 2. Reversibility of the action of dl-propranolol on guinea pig sperm motility (○) and the acrosome reaction (●) *in vitro*. $n = 4$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

作用的可能途径 精子顶体反应需要 Ca^{2+} 参与⁽¹⁰⁾。已知 Ca^{2+} 离子载体 A-23187 在细胞外 Ca^{2+} 存在下, 能有效地提高细胞内 Ca^{2+} 浓度, 加速精子获能, 促进顶体反应的发生⁽⁹⁾。不同浓度 Pro 与 A-23187 同时加入含有精子的 Ca-MCM 中, 15 min 后观察到 Pro 具有明显抑制 A-23187 诱发顶体反应的作用, 抑制强度呈 Pro 浓度正相关。A-23187 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 对照组 AR 高达 85%, 而在 Pro 0.25 mmol/L 与 A-23187 合并组只有 15%。此外, 对照组精子获能后呈现超激活运动 (hyperactivated motility), 经 Pro 0.1 mmol/L 处理后亦明显减少。如果将精子预先与 Pro 作用 6 h, A-

23187 诱发顶体反应的作用几乎丧失。普尼拉明的作用与 Pro 类似,但拮抗 A-23187 的强度似较 Pro 小,两者合用具有协同抑制顶体反应的作用。见 Fig 3 所示。值得注意的是,Pro 0.25 mmol/L 和普尼拉明 0.8 mmol/L 处理组,AR 几乎下降到零。

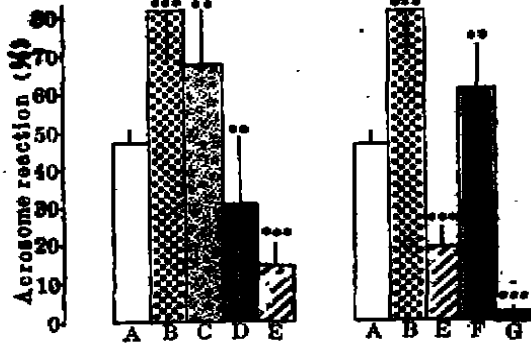


Fig 3. Effects of *dl*-propranolol and prenylamine on ionophore calcimycin (A-23187 0.2 μ mol/L)-induced stimulation of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa after incubation for 15 min in Ca^{2+} -minimal capacitation medium (MCM) *in vitro*. A) Control; B) A-23187 only; (C,D,E) *dl*-propranolol 0.05, 0.10, 0.25 mmol/L, $n=6$; F) Prenylamine 0.8 mmol/L; G) *dl*-propranolol 0.25 mmol/L with prenylamine 0.8 mmol/L. $n=4$, $\bar{x} \pm SD$. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

对精卵融合的影响 精子在 Ca-MCM 中预先完成获能和顶体反应, 然后与 Pro (0.1-1.0 mmol/L) 平衡 10 min, 加入去透明带仓鼠卵, 受精培养 2 h。结果表明 Pro 对精卵融合

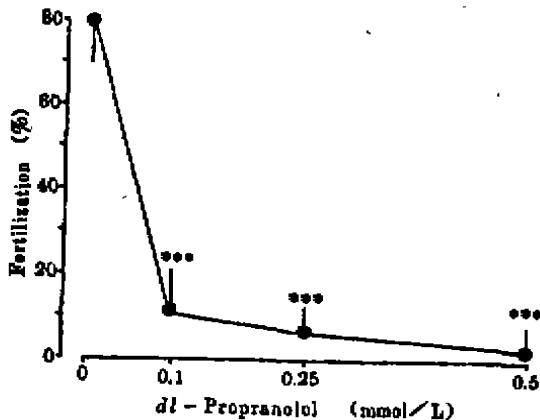


Fig 4. Effects of *dl*-propranolol on capacitated guinea pig sperm fertilization *in vitro*. $n=5$, $\bar{x} \pm SD$. *** $P < 0.01$.

亦有抑制作用。0.1 mmol/L 时, 受精率为 $13 \pm 5\%$, 与对照组 ($78 \pm 6\%$) 比较差异显著 ($P < 0.01$) 见 Fig 4。Pro 高浓度 (≥ 0.5 mmol/L) 还可引起卵的变性。

cAMP 拮抗 Pro 0.1 mmol/L 引起的精卵融合抑制作用 在上述受精培养的开始阶段, 加入 cAMP 0.1-1.0 mmol/L, 培养 2 h 后, 精子受精率随 cAMP 浓度增加而提高, 0.3 mmol/L 时, 可使精子受精率恢复至对照水平 (47%), 见 Fig 5。

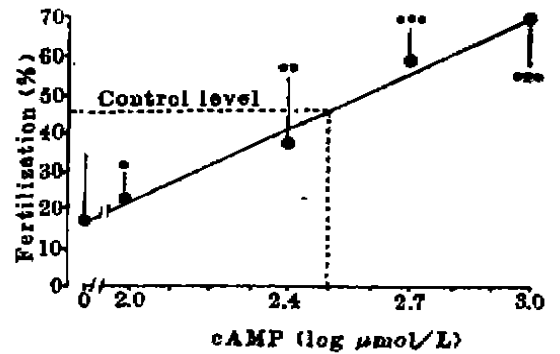


Fig 5. Antagonism by cAMP on *dl*-propranolol (0.1 mmol/L)-inhibited guinea pig sperm fertilization *in vitro*. $n=4$, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs *dl*-propranolol 0.1 mmol/L only.

DISCUSSION

本文从体外实验结果提示, 非杀精浓度 Pro 0.05-1.0 mmol/L 具有抑制豚鼠精子体外获能、顶体反应和精卵融合(受精)的作用, 抑制强度和抑制的可逆性与浓度、作用时间呈正相关。豚鼠精子受精诸环节对 Pro 的敏感性依次为: 受精 > 获能 > 顶体反应。

Hong 等^(10,11) 根据 Pro 和 *d*-Pro 抑制人精子活力的强度相当这一事实, 提出 Pro 抑制精子活力是由于它的膜稳定活性。豚鼠精子获能后呈现超激活运动。本研究表明 Pro 0.1 mmol/L 可完全抑制上述超激活运动。Pro 结构中含有的非极性基团和芳香环, 有助于离子化的氨基进入膜脂质层, 影响一些定位于膜的代谢酶, 直接干扰糖酵解。因此, Pro 抑制精子获能以

及对卵膜的损害作用与其膜稳定作用密切相关。

Ca^{2+} 内流与顶体反应、顶体酶释放的关系前人已作过研究^(4,6)。 Ca^{2+} 进入精子后, 激活磷脂酶, 后者将磷脂分解成溶血卵磷脂和自由脂肪酸, 促进顶体反应的完成, Noack 等曾报道 Pro 可影响肌质网 Ca^{2+} 转运⁽¹²⁾。本文利用 A-23187 证明 Pro 具有抑制精子 Ca^{2+} 内流的作用, 它与普尼拉明协同拮抗 A-23187, 使 AR 和受精率明显下降。目前还没有证据表明 Ca^{2+} 通过精子钙调蛋白发挥作用。

Pro 抑制已完成顶体反应精子与去透明带仓鼠卵子的融合能力, 表现为 σ 原核形成受阻, 卵胞浆内未见有膨大的精子头部, 但对精子与卵子的附着过程无明显影响。精卵融合(受精)伴随着精子内 cAMP 水平升高, Ca^{2+} 参与这个过程^(13,14)。本文结果揭示 cAMP 能有效地拮抗 Pro 对精子穿卵能力的抑制作用, 推测也与其阻断 Ca^{2+} 内流有关。

极低浓度 Pro (<0.05 mmol/L) 能激活顶体反应, 这个效应是否存在着种族特异性尚有待证明。

REFERENCES

- Peterson RN, Freund M. The inhibition of the motility of human spermatozoa by various pharmacologic agents. *Biol Reprod* 1975; 13 : 552
- Zipper J, Wheeler RG, Potts DM, Rivera M. Propranolol as a novel, effective spermicide: Preliminary findings. *Br Med J* 1983; 287 : 1245
- Lu RK, Cheng QY, Liu Y, Chen KY. Study of the spermicidal effect of propranolol on human sperm *in vitro*. *Reprod Contracep (Chin)* 1987; 7(4) : 34
- Yanagimachi R. The acrosome reaction: Analysis of its mechanism using guinea pig spermatozoa. In: Mohri H, ed. *New horizons in sperm cell research* Tokyo: Jpn Sci Soc Press, 1987 : 19-29
- Yanagimachi R, Usui N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of the guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 1974; 89 : 161
- Barros C. Capacitation of mammalian spermatozoa. In: Coutinho EM, Fuchs FF, eds. *Physiology and genetics of reproduction; Part B*. NY : Plenum, 1974 : 3-24
- Rogers BJ. The sperm penetration assay: its usefulness reevaluated. *Fertil Steril* 1985; 43 : 821
- Shi QX, Ye Z, Zhong CL, Liu LC. Spermine — an inhibitor of hamster sperm capacitation and fertilization *in vitro*. *Kexue Tongbao* 1989; 34 : 383
- Talbot P, Summers RG, Hylander BL, Keough EM, Franklin LE. The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A-23187. *J Exp Zool* 1978; 198 : 383
- Peterson RN, Freund M. Effects of (H^+), (Na^+), (K^+) and certain membrane active drugs on glycolysis, motility and ATP synthesis by human spermatozoa. *Ibid* 1973; 8 : 350
- Hong CY, Chaput de Staintonge DM, Turner P. The inhibitory action of procaine, (+)-propranolol and (\pm)-propranolol on human sperm motility: antagonism by caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 1981; 12 : 751
- Noack B, Kurzmack M, Verjovski-Almeida S, Inesi G. The effect of propranolol and its analogs on Ca^{2+} transport by sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 206 : 281
- Roldan ERS, Wramsby H, Yanagimachi R. Verapamil, a Ca^{2+} channel antagonist, accelerates the *in vitro* penetration of zona-free hamster eggs by human spermatozoa. *Clin Reprod Fert* 1987; 5(1/2) : 1
- Rogers BJ, Garcia L. Effect of cAMP on acrosome reaction and fertilization. *Biol Reprod* 1979; 21 : 365