

國立台灣大學生命科學院生化科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemical Sciences

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

哺乳類生殖道之 IGF-1 和精子上 IGF-1 受體的

初步研究

Preliminary study on IGF-1 in the mammalian  
reproductive tract and its receptor on the sperm head

謝孟純

Meng-Tsun Hsieh

指導教授：陳義雄 博士

Advisor : Yee-Hsiung Chen, Ph.D.

中華民國 98 年 6 月

June 2009

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

哺乳類生殖道之 IGF-1 和精子上 IGF-1 受體的初步研究  
Preliminary study on IGF-1 in the mammalian reproductive tract and its  
receptor on the sperm head

本論文係謝孟純君 (R96b46019) 在國立臺灣大學生化科學研究所完成  
之碩士學位論文，於民國九十八年七月八日承下列考試委員審查通過及口  
試及格，特此證明

口試委員：

朱善德 (簽名)

(召集人)

羅清維

林朝浩

陳善雄

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
(指導教授)

## 誌謝

碩士班兩年的光陰不知不覺就過了，承蒙師恩 陳義雄教授之教導，研究期間傳授專業知識及技能，使學生受益良多。於撰寫論文期間，感謝老師對學生粗心大意及拙於表達一再諒解，使學生方能完成此論文，師恩浩瀚，特此致謝。

論文初成時，復蒙口試委員羅清維學長、林翰佳學長以及朱善德教授對論文細心審閱，使研究及論文內容更加完善，謹此致上無限謝意。此外要感謝實驗室每一位學長姊們，在我實驗遇到麻煩時給予最佳的建議。阿湯哥學長引領我操作精子生殖相關技術的研究；煥清學長總在我實驗遇到困難時給予適當的建議；貼心嘉珍學姊讓實驗室每一位成員都不怕肚子餓；才富學姊讓實驗室總是活力無限；昱維學長對於實驗的講解總是不厭其煩且熱於分享；宗茂學長對實驗細心及耐心的精神令我佩服；可愛的美珊總是讓實驗室充滿笑聲，在這碩班兩年的光陰裡，有這些學長姊們的陪伴實在太好了。

一本論文的完成需要許多人的幫忙，所以還有一些謝不完的人，在此對於曾經幫過我忙的各位，說聲謝謝。謹此將這論文獻給愛護我支持我的父母，兄弟姐妹，在我低潮時總給我無限的鼓勵，使我能順利畢業。將此論文與我的師長、父母、同學朋友們分享，敬上最深的敬意。

## 中文摘要

成熟的精子必需經過許多的修飾才具備與卵受精的能力，其中最主要的變化為獲能效應 (capacitation)。目前獲能效應的相關機制尚不是完全清楚，因此尋找與獲能效應相關的蛋白質並進一步探討其功能便是目前重要方向之一。已被證實跟獲能效應相關的現象有：精子細胞膜上脂質之改變、精子的超活動力、精子內鈣離子的增加及 tyrosine 磷酸化的增加。

類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 可藉由細胞中各種訊息傳遞路徑調控細胞功能，其中包含 tyrosine phosphorylation pathway，而酪胺酸磷酸化對於精子的獲能效應為一重要因素。因此本研究以小白鼠精子為材料，探討 IGF-1 的功能和精子獲能效應間是否有關聯性。利用間接螢光染色技術 (indirect fluorescence technique) 證實精子頭部含 IGF-IR。也於任何雄性和雌性的生殖腺檢測到 IGF-1 的 mRNA。利用酵素免疫分析法，也證實 IGF-1 蛋白存於貯精囊液。進一步的實驗結果提示 IGF-1 可能促進獲能效應伴隨的精子蛋白酪胺酸磷酸化，加入 AG538 (IGF-1 受體抑制劑)，則此生化反應的程度會下降。另一方面 BSA 引發的獲能效應，就會使得精子上 IGF-IR 的酪胺酸磷酸化，這個生化反應也會被 AG538 抑制。推測獲能效應引發 IGF-IR 的磷酸化而不必經由 IGF-1 的結合就能加強其激酶活性。

## Abstract

Ejaculated spermatozoon of mammals should undergo a series of modification in female to production tract before they acquire the ability to fuse with the oocytes in order to have a successful fertilization. This process is generally termed “capacitation”. The molecular mechanism of capacitation is still far from understanding, despite of the reports about the capacitation-related events, including the rearrangement of plasma membrane lipid, hyperactivated motility, intracellular  $Ca^{2+}$  elevation and protein tyrosine phosphorylation.

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is well known to stimulate the tyrosine kinase of its receptor (IGF-IR) in the regulation of cellular activity. In the seminal vesicle fluid, I could demonstrate IGF-1 by ELISA. Moreover, I could detect IGF-1 mRNA in any sexual glands of adult mice, and examine also IGF-IR on the mouse sperm head by indirect fluorescence technique. These data together prompted me to assess whether IGF-IR is involved in the capacitation-related protein tyrosine phosphorylation. I found the ability of IGF-1 to elicit the capacitation-related protein phosphorylation. The biochemical event could be suppressed by AG538, an inhibitor of IGF-IR. Meanwhile, the sperm capacitation induced by BSA caused the tyrosine phosphorylation of IGF-IR, and the protein tyrosine phosphorylation associated the capacitation could be greatly reduced by AG538. These data suggest ligand-independent IGF-IR on sperm head in the capacitation-related protein phosphorylation.

# 目次

口試委員審定書.....	I
誌謝.....	II
中文摘要.....	III
英文摘要.....	IV
目錄.....	V
縮寫表.....	VII

## 第一章 概論

I-1 生殖學概論.....	1
I-2 哺乳類雄性生殖系統.....	1
I-3 儲精囊發育與功能.....	4
I-4 精子的形成與成熟.....	4
I-5 獲能效應.....	7
I-6 類胰島素生長因子.....	8
I-7 實驗方向.....	9

## 第二章 材料與方法

實驗材料.....	10
實驗方法.....	10
II-1 Total RNA 萃取.....	10
II-2 RNA 品質檢定.....	11
II-3 逆轉錄-聚合酶連鎖反應.....	11
II-4 聚合酶連鎖反應.....	12
II-5 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳.....	14
II-6 西方墨點法.....	16
II-7 Sperm preparation.....	17
II-8 AG538 抑制精子獲能作用及 IGF-IR 磷酸化.....	17
II-9 In vitro fertilization.....	18
II-10 包夾式酵素免疫分析.....	19
II-11 Indirected immunofluorescence.....	20

## 第三章 實驗結果

III-1 IGF-1 在各個生殖系統中之表現.....	21
III-2 儲精囊液中 IGF-1 的表現量.....	21

III-3 Localization of the IGF-1 receptor on mouse sperm.....	22
III-4 IGF-1 對精子獲能效應引發蛋白酪胺酸磷酸化的影響.....	22
III-5 獲能效應誘發精子上 IGF-IR 的激酶活性.....	23

圖次

Fig III-1 IGF-1 在各個生殖系統中之表現.....	24
Fig III-2 以酵素免疫分析法量測 IGF-1 在儲精囊液中的含量.....	26
Fig III-3 利用免疫螢光染色觀察精子上之 IGF-IR.....	28
Fig III-4 利用西方點墨法 (western blot analysis) 觀察精子之 IGF-1 receptor.....	30
Fig III-5 IGF-1 對精子獲能效應所引發蛋白酪胺酸磷酸化的影響.....	32
Fig III-6 IGF-IR 的抑制物 AG538 降低精子獲能效應所引發蛋白酪胺酸磷酸化..	34
Fig III-7. AG538 對精子獲能反應之影響.....	36

第四章 實驗討論.....	38
第五章 參考文獻.....	39



## 縮寫表

cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DEPC	diethyl pyrocarbonate
EtBr	ethidium bromide
GAPDH	glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase
HRP	horseradish peroxidase
PCR	polymerase chain reaction
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
RT-PCR	reverse transcription- polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
TEMED	N,N,N',N' –tetramethyl ethylenediamine
Tris	2-amino-2[hydroxymethyl]-1,3-propanediol
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IGF-IR	insulin-like growth factor 1 receptor



# 第一章 緒論

## I-1 生殖學概論

地球上的生物種類不勝枚舉，其最重要課題之一便是傳宗接代。生殖方式可分成無性生殖 (asexual reproduction) 及有性生殖 (sexual reproduction) 兩種。無性生殖是最為簡單直接的生殖方式，由母體直接複製出子代，不需經過受精，因此母體和子代的遺傳物質完全相同，不會因生殖而造成變異性，而有性生殖則需經過交配與受精，因此子代的基因具有變異性，這種遺傳所造成的差異，使新的子代更能應付環境變化的考驗而存活下來。在二十世紀後期，複製羊桃莉的誕生讓生殖技術有了重大性的突破，配合細胞生物學，分子生物學及蛋白質化學各個不同的領域，讓生殖學研究所需的工具更快速發展。至今研究結果而知，哺乳類動物各種生殖腺，在構造、生理及功能上皆具相同程度的共同性，因此利用鼠類作為模型可進一步探討人類生殖學的奧秘。

## I-2 哺乳類雄性生殖系統

哺乳類雄性生殖系統主要包含三個部分：(1) 睪丸 (testes)；(2) 管狀系統 (ducts system): 包含副睪 (epididymis)、輸精管 (vas deferens)、輸送管 (ejaculatory duct) 和尿道 (urethra)；(3) 附屬性腺 (accessory sex gland): 包含儲精囊 (seminal vesicle)、前列腺 (prostate gland)、尿道球腺 (bulbourethral gland) 及特化的前列腺，也就是凝固腺 (coagulating gland)。這些性腺的構造和功能於表 1-1 簡單說明。

睪丸主要功能為產生精子和分泌男性荷爾蒙。睪丸內具有間質細胞 (Leydig cell) 及石托利細胞 (Sertoli cell)，雄性荷爾蒙 (androgen) 由間質細胞所分泌，以睪固酮為主。於胚胎發育早期睪固酮會刺激由中腎管演化而來的沃耳夫氏管 (Wolffian ducts) 分化成副睪、儲精囊、輸精管等。雄性生殖系統。除此之外在青春時期睪固酮的刺激，會促使男性第二性徵出現並促進附屬性腺的發育。

副睪附著於睪丸的背部，可區分為頭段 (caput)、中段 (corpus) 和尾段 (cauda) 三個部分，外觀類似逗號形狀 (comma-shaped)。分化完全的精子之後會進入副睪 (Courrot, 1981; Vijayaraghvan and Hoskins, 1990)。副睪主要功能為儲存精子、促進精子成熟 (sperm maturation) 與推送精子到輸精管中。輸精管位於副睪尾部末端，是一條長而彎曲的管道，和儲精囊相連形成射精管。

附屬性腺產生分泌液，於射精後成為精漿 (seminal plasma) 的主要成份，與原本儲存在副睪的精子混合，成為精液 (semen)。精漿富含營養成分，為精子代謝提供能量來源，還可提高精子的運動能力。儲精囊分泌液 (seminal vesicle secretion, SVS) 約佔精漿總體積的百分之七十，因此探討 SVS 的成分對受孕的過程的影響，是生殖學上重要的課題。



**表. I-1 男性生殖系統概要**

下表總結了男性生殖系統的各器官：

男性生殖系統的器官		
結構	描述	功能
睪丸	位於腹外的兩個卵形腺體，是男性最基本的性器官	產生精子和睪固酮
陰囊	鬆弛的皮膚囊袋，內含睪丸	支援睪丸並維持適當的溫度
精索	兩條與睪丸相連的條索狀物	連接睪丸和陰囊，輸送精子的管道
副睪	緊密捲曲的小管，位於睪丸的上端	貯藏精子，並促其發育成熟
輸精管	長而彎曲的管道，自副睪尾端上行至腹部	運輸精子
儲精囊	兩個囊袋狀物，位於骨盆腔內膀胱後	產生精液的基本成分，精液用於輸送和營養精子
前列腺	栗子樣腺體，位於尿道之下	產生精液的基本成分，精液用於輸送和提供精子營養
射精管	兩條短管，穿過前列腺下降至尿道	將輸精管和儲精囊會合
尿道	起自膀胱、穿過前列腺、到達陰莖末端的一條管道	精子輸送系統的最後一部分；也將尿液排出體外
尿道球腺	也稱做 Cowper's 腺。兩個豌豆樣的腺體，位於前列腺下	分泌少量精液
陰莖	男性性器官，從腹部向外延伸而成，由勃起組織、血管和竇腔組成	將精子輸送到女性體內，排尿

### I-3 儲精囊發育與功能

儲精囊屬於附屬性腺系統中的器官，由沃耳夫氏管 (wolffian ducts) 分化而來。儲精囊在哺乳類動物中差異性相當大，例如，在人類、歐洲兔、老鼠、倉鼠、和牛等動物中，儲精囊是相當大的器官；相對在狗、貓、熊和水生哺乳動物則完全沒有這個器官 (Williams-Ashman, H.G., 1983)。儲精囊主要功能為分泌精漿 (semina plasma)，精液的三分之二以上的體積來自這種分泌液。儲精囊分泌液組成主要包含蛋白質與一些低分子量的非蛋白化合物，如脂質、有機酸和二價離子等，能提供精子營養，目前已有文獻指出，利用外科手術將老鼠的貯精囊移除，會導致老鼠的生殖力大為降低 60% 以上 (Peitz, 1986)，由此可知儲精囊在生殖上佔有相當的重要性。本實驗室已陸續探討小鼠的儲精囊分泌液中的蛋白成份，其主要由七種蛋白，依分子量分別命名為 SVS I-VII (Chen, 1987)，此外尚有一些含量較少的蛋白，如 p12, SVA，陸續被發現 (Lai et al. 1991)。

### I-4 精子的形成與成熟

精子為特化的細胞，外觀類似小蝌蚪，長約 60 微米，其結構可分成頭部、中段及尾巴三個部份。頭部體積較大，含細胞質及細胞核，在頭部最前端有一特化的胞器，稱為頂體 (acrosome)，內含溶解酶，在精子與卵子受精時會被釋出，使精子能穿透卵外圍的透明帶 (zone pellucid) 和卵子結合，進而完成受精。中段是由粒腺體環繞成的螺旋，以提供精子在泳動時所需的能量，尾巴則為鞭毛結構，以利精子泳動前進。精子結構圖 1-1。

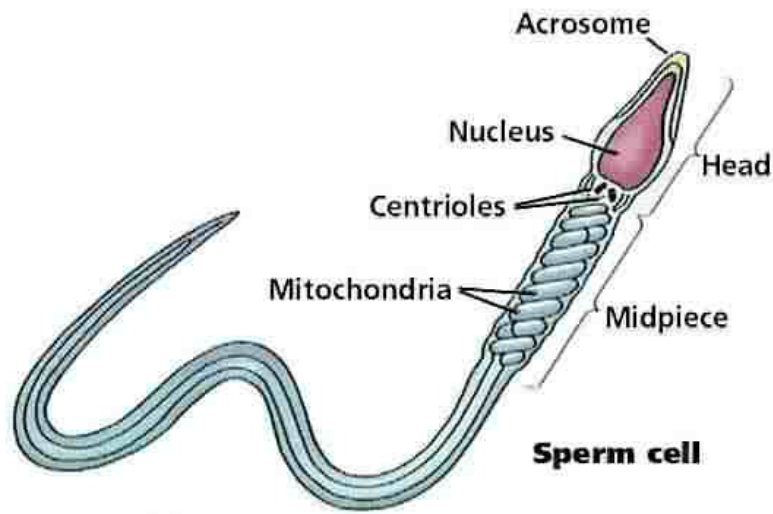


Fig. I-1 精子構造圖

圖 I-1 用來說明精細胞是在睪丸內形成的過程 (spermatogenesis)，青春期後，位於睪丸輸精細管 (seminiferous tubules) 外圍周邊鄰近基底層 (basal lamina) 的精原母細胞 (spermatogonial stem cell) 開始進行分化，經過數次的有絲分裂 (mitosis) 後形成初級精母細胞 (primary spermatocyte)，並開始進行第一次的減數分裂 (meiosis)，形成次級精母細胞 (secondary spermatocyte)，第二次的減數分裂後會形成只含有單套染色體的精細胞 (spermatid)，最後精細胞經由形態的分化 (sperminogenesis) 過程成為精子 (spermatozoon) 進入輸精管管腔。

成形的精子會送到副睪 (epididymis) 儲存，並且經過許多修飾以獲得泳動及與卵子結合的能力 (Vijayaraghvan and Hoskins, 1990)。副睪內的修飾因子可改變精子細胞膜的電荷及穩定度，並修飾膜蛋白的醣基，使其與 lectin 的結合特性改變，另外細胞膜上的磷脂質分佈亦會大幅改變 (Parks and Hammerstedt, 1985)。在經過這些修飾後精子才算真正的成熟，並輸送到副睪末端備用。

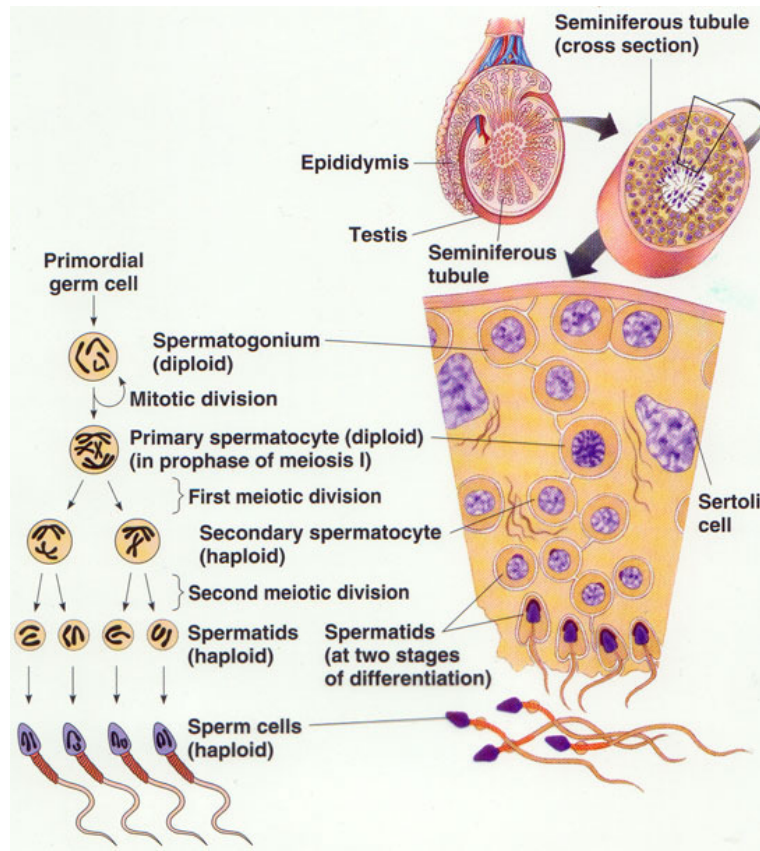


Fig. I-2 精子成形過程 (spermatogenesis)



## I-5 獲能效應 (capacitation)

交配後，精蟲會進入雌性生殖道，但此時的精子無法和卵直接受精，必須再經過一些生理變化後才具受精能力，這個過程通稱為獲能效應 (capacitation)

。獲能效應後的精子活動力會增加，且能進行頂體反應 (acrosome reaction)，使精子能穿透卵外膜進入卵子以進行受精。在獲能效應過程中，精子會有一些變化，包括：

### 一、 細胞膜的流動性提高：

許多結合在膜上的蛋白，例如去獲能因子，會被移除 (Sidhu and Guraya, 1989)。細胞膜上的膽固醇則會受到雌性生殖道內的高密度脂蛋白的吸收或 albumin 的作用而外移，使細胞膜的不穩定和流動性增加，有利於頂體反應發生時，卵膜受體 (ZP receptors) 的聚集 (Leyton and Saling, 1989) 及離子通道。

### 二、 精子內部代謝的變化：

包括耗氧量之增加和 c-AMP 的增加，促使部份蛋白受到 protein kinase A 的磷酸化而活化 (Jha, Kameshwari, and Shivaji, 2003)

### 三、 細胞膜內、外離子濃度的改變：

精液中的鋅離子濃度高於一般的組織，目前也已經證明鋅離子可作為精子獲能效應的抑制劑。已被 BSA 引發的獲能效應會移除精子內的鋅離子。此外細胞膜對鈣離子的通透性會大增，但是在獲能效應期間，進入細胞內的鈣離子量並沒有大量提升，但頂體反應發生時，則鈣離子迅速湧入細胞內 (Breitbart and Naor, 1999)。也許獲能效應進一步改變漿膜的特性，以利於頂體反應時鈣離子的湧入。

### 四、 精子活動力旺盛 (hyperactivating)：

獲能效應後，精子的活動力會增加，泳動的方式會改變，尾巴從擺動會轉變為螺旋狀的活動，使其更能向前泳動，以到達卵子進行受精 (Suarez et al.,

1983)。

#### 五、 Tyrosine 磷酸化增加：

精子在獲能效應所發生的生化反應一直不甚確定，但目前有一已經較為肯定的現象便是 tyrosine phosphorylation 的程度會增加，在發生獲能作用後的精子，其磷酸化的程度會大幅提昇 (Urner and Sakkas, 2003)

### I-6 類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)

IGF 為單一胜肽鏈荷爾蒙，由 70 個胺基酸所組成，內含三個雙硫鍵 (圖 I-3)，於脊椎類動物中皆可發現。二十多年前，在很多生物，例如，人類 (human)，雞 (chicken)，大鼠 (rat)，發現 IGF 具有兩種不同形態，IGF-1 和 IGF-2，可和其結合蛋白 (IGFBPs 1~6) 及 IGFBP 蛋白酶共同調控許多生理功能 (Jansen et al., 1983; Kajimoto and Rotwin, 1991; Shimatsu and Rotwein, 1987)。已有文獻指出，IGF-1 具有調控間質細胞的分化 (Lin T, 1995; Baker J et al., 1996) 及精細胞形成等功能 (Tsuruta JK and O'Brien DO, 1995)。Igf1 突變的小鼠其生殖系統各器官的重量會減少 30%，且睪丸素 (testosterone) 的含量及精子濃度和正常的小鼠比較會下降 18% (Jones J and Clemmons DR, 1995)，因此 IGF-1 在生殖系統中扮演一重要角色。在人類的精漿 (seminal plasma) 中已鑑定出具有 IGF-1, IGFBP-2, IGFBP-3 及 IGFBP-4 (Lee KO et al., 1994., Rosenfeld RG et al., 1993)，且可調控精子的活性及生理功能 (Cohen P et al., 1992)。

IGF-1 可藉由細胞中各種訊息傳遞路徑調控細胞功能，其中包含酪胺酸磷酸化路徑 (tyrosine phosphorylation pathway)。因精子的獲能效應會伴隨精子內蛋白酪胺酸磷酸化，而有前人指出在人類精子表面含 IGF-1 受體 (Naz R.K and Padman P, 1999)，因此 IGF-1 結合其受體有無調控精子活性有待評估。IGF-IR 是否為精子獲能效應中被磷酸化的蛋白質中其中之一，則是瞭解這一課題的先決條件。





## 第二章 材料與方法

### 【實驗材料】

1. 實驗用小白鼠 (ICR strain)：購自台大醫院實驗動物中心，並依照實驗動物準則飼養與使用。動物飼養於 21-22°C、光照控制的環境 (14 小時光照、10 小時黑暗) 並充分供應飲水與 NIH 31 實驗鼠飼料餵食。
2. insulin-like growth factor I (IGF-I) 重組蛋白，購自於 Sigma 公司，配製濃度 50 $\mu$ g/mL (1.31 $\times 10^{-7}$   $\mu$ M) stock 溶液儲存於 -20°C
3. AG538 抑制劑購自於默克公司，溶於 DMSO 中，配製濃度 5mg/mL (1 $\times 10^{-8}$  mM) stock 溶液儲存於 -80°C
4. phosphor-IGF-I receptor  $\beta$ (Tyr1131)/Insulin receptor  $\beta$ (Tyr1146) antibody(#3021)、IGF-I receptor  $\beta$  antibody(#3027)、anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (#7076)、anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (#7074) 購自於 cell signal 公司；IGF-IR  $\alpha$  (n-20): sc-712、p-Tyr (py99): sc-7020，購自於 Santa 公司；Donkey-anti-rabbit IgG, FITC conjugated (#711-096-152) 購自於 Fitzgerald 公司。

### 【實驗方法】

#### ◇ II-1 Total RNA 萃取

#### 【試劑】

1. TRI reagent
2. 100% chloroform (具腐蝕性，以玻璃瓶裝)
3. 100% isopropanol
4. 75% ethanol
5. DEPC

#### 【方法】

##### 1. 前置作業

所有的儀器、瓶罐及離心管都須小心地用 0.1% DEPC 在通風櫥浸泡過夜以破壞 RNase 的活性，然後再 autoclave 使有毒的 DEPC 分解後備用。(DEPC 可以和 RNase 形成共價鍵結而達到抑制 RNase 活性的效果。DEPC 為致癌藥品，須在通風櫥操作並帶口罩)。



## 2. RNA 萃取：

- a. 實驗用小白鼠以乾冰迷昏窒息死亡後，取出組織並迅速以液態氮凍結，以研磨棒在白上磨碎。
- b. 以每 100 mg 組織加入 1mL TRI reagent 溶液的比例均勻混合。
- c. 置於室溫 5 分鐘，讓核蛋白等物質與核酸分離。
- d. 加入 200 $\mu$ l chloroform/1mL TRIzose，vortex 15 秒。
- e. 以 12000g、4 $^{\circ}$ C、離心 15 分鐘，小心取出上清液（水層）至一乾淨的 1.5mL 離心管。（d 和 e 步驟重覆兩次）
- f. 加入 0.5 倍體積的 isopropanol 混合均勻，室溫靜置 5 分鐘後再度離心 8 分鐘，RNA 會呈膠狀或白色沉澱。
- g. 吸去上清液，加入 1mL 的乙醇稍微震盪。
- h. 以 7500g，4 $^{\circ}$ C 離心 5 分鐘。（g 和 h 重覆兩次）
- i. 小心吸去乙醇，插冰上開蓋放置 20min。（RNA 不能完全乾燥，否則會不易回溶）
- j. 以純水回溶（60  $\mu$ L），用 tip 輕輕吸放數次後置於 55~60 $^{\circ}$ C，10~15 分鐘。
- k. 用分光光度計進行 RNA 的分析與定量。

### ◇ II-2 RNA 品質檢定

光譜測定：

測量 RNA 溶液在 OD260/OD280 的吸光值比，理論上應高於 1.8 才表示 RNA 沒有受到蛋白的污染，若比例不好，可用 phenol/chloroform 再萃取並用酒精沈澱後再測。

### ◇ III-3 逆轉錄-聚合酶連鎖反應

#### 【試劑】

採用 invitrogen 公司之 ThermoScript™ RT-PCR System

試劑組：

1. ThermoScript™ RT (15U/ $\mu$ l)
2. 5X cDNA synthesis buffer
3. 0.1M DTT
4. 10mM dNTP mix

5. RNaseOUT™ (40U/μl)
6. Oligo (dT)<sub>20</sub> (50μM)
7. Random Hexamers (50ng/μl)
8. DEPC-treated water
9. E. coli RNase H (2U/μl)

**【儀器】**

Programable Thermal Controller (GeneAmp PCR systems 2400)

**【方法】**

- 1.各試劑依序以下配方加入薄壁離心中

Component	Amount
Primer	1 μl
RNA (10pg-5 μg)	x μl
10mM dNTP mix	2 μl
DEPC-treated water	to 12 μl

- 2.反應 65°C,5min 後置冰上

- 3.加入 8 μl cDNA synthesis mix

cDNA synthesis mix	amount
5x buffer	4 μl
DTT	1 μl
Water	1 μl
RNaseOUT	1 μl
ThermoScript™ RT	1 μl

- 4.50~60°C，反應 30~60 分鐘

- 5.85°C, 5 分鐘

- 6.加入 1 μl RNase H，反應 37°C, 20 分鐘

- 7.得到 cDNA 溶液

◇ II-4 聚合酶連鎖反應

**【儀器】**

Programable Thermal Controller (GeneAmp PCR systems 2400)

### 【試劑】

1. Taq enzyme (Promega ,Madison, WI)
2. 10×Taq reaction buffer with MgCl<sub>2</sub> (Promega ,Madison, WI)  
500 mM KCl  
100 mM Tris-HCl (pH 9.0)  
1% Triton® X-100  
15 mM MgCl<sub>2</sub><sup>註4</sup>
3. dNTP (10 mM) (Promega ,Madison, WI)
4. Mineral oil (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA)

### 【方法】

1. 各試劑依序以下配方加入薄壁離心中

Taq polymerase <sup>註2</sup>	1 μL
Template DNA <sup>註1</sup>	1 μL
Upstream primer (10 μM) <sup>註5 註6</sup>	0.5 μL
Downstream primer (10 μM)	0.5 μL
10 X reaction buffer with MgCl <sub>2</sub>	5 μL
d NTP (10mM)	2 μL
dd H <sub>2</sub> O	40 μL

2. 以下列程序作用

1 cycle	94°C for 2 min
35 cycles	94°C for 15 seconds
	58°C for 15 seconds
	72°C for 1 min <sup>註3</sup>
1 cycle	72°C for 10min
1 cycle	4°C forever

### 【註】

PCR 所需要注意的事項 (Roche Molecular Biochemicals PCR Applications Manual 2<sup>nd</sup> edition) :

#### I. 模板 (Template) :

- a. 模板的純度會影響到 PCR 反應, 如果模板受到污染會影響到 PCR 反應的結果, 例如, 過多的 RNA 會使得鎂離子的濃度降低影響到 PCR 反應進行時的專一性。

- b. 模版的建議濃度：  
 human genomic DNA 最多不要超過 500 ng  
 bacterial DNA 1-10 ng  
 plant 0.1-1 ng。
2. 聚合酶 (Polymerase)：進行 PCR 反應聚合酶濃度應介於 0.5-2.5 units/50 $\mu$ L
  3. 一般聚合酶每四十五秒約可合成一千個核酸，依照 PCR 產物長度的不同調整 extension time。
  4. 鎂離子會與 dNTP 形成複合物 (complex)，此複合物為聚合酶所辨認的受質 (substrate)。因此在 PCR 反應時加入鎂離子 (1.5 mM)，可以增加 PCR 反應時的專一性並且降低背景值。
  5. 引子 (Primer) 設計基本規則：
    - a. 長度介於 18-24 個鹼基。
    - b. 避免引子序列內部有二級結構的形成。
    - c. G/C 比例應介於 40-60 %。
    - d. 注意 Primer 彼此不可互補，形成 Primer dimer。
    - e.  $T_m$  直應介於 55-65 之間。
    - f. 進行 PCR 反應時引子的最後濃度為 0.1-0.6  $\mu$ M。
  6. 設計 Primer 時可以在 5'端加上限制酶切位的序列，藉此序列可以利用剪接的方式，將 PCR 產物接入載體。

#### ◇ II-5 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳

##### 【試劑】

1. 分離電泳膠體 (separating gel) 常備試劑：	
acrylamide mix	30.0 %
(acrylamide : bisacrylamide = 29.2% : 0.8%)	
SDS	10.0 %
Tris · HCl (pH 8.8)	1.5 M
TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine, amresco, No. 0761)	
APS (ammonium peroxodisulfate, Merck, No.1.01201)	

2. 堆積電泳膠體 (stacking gel) 常備試劑	
acrylamide mix	30 %
SDS	10 %
Tris · HCl (pH 6.8)	1 M
TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine, amresco, No. 0761)	
APS (ammonium peroxodisulfate, Merck, No.1.01201)	

3. 電泳緩衝液 (10×tank buffer) 室溫儲存

Tris · HCl	0.25 M
Glycine	1.92 M
SDS	1 %

---

4. 試料緩衝液 (2×sample buffer) 儲存於 4°C

Tris · HCl (pH 6.8)	0.125M
Glycerol	20.0 %
2-mercaptoethanol	10.0 %
bromophenol blue	0.004%

---

\*\* 若蛋白質帶雙硫鍵時以 2-mercaptoethanol 將之還原則可使 SDS 與蛋白質之結合比例更接近理論值。

**【儀器】**

1. 迷你電泳裝置 (Hofer, SE250)
2. 迷你電源供應器 (Hofer, SX250)

**【步驟】**

1. 鑄膠：將鑄造器組合起來，依照附錄 (一) 的配方鑄膠。
2. 蛋白質試料處理：將每一蛋白質試料體積調至相近且以不超過 20μL 為宜，加入等體積之試料緩衝液，於 100°C 反應 5 分鐘。
3. 電泳：將電泳片放置電泳槽中，注入 1×電泳緩衝液並將試料依序注入試料槽中，選用合適之蛋白分子量標記一起進行電泳。
4. 打開電源供應器，先以 80 V 進行電泳，俟試料進入分離膠體後增為 120 V，直到追蹤染料至膠體底部時即停止電泳。

◇ II-6 西方墨點法

**【試劑】**

1. 10X TBS (pH 7.2)

NaCl	80g
KCl	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.5g
dd H <sub>2</sub> O	to 1 L

---

2. 10×TBST (pH 7.2)  
10×TBS (995 ml) 加 Tween-20 (5 mL)
3. 5% Skim milk (DIFCO, 0032-17-3) in 1×PBST
4. PVDF 轉印膜 (MSI, PV4HY00010)
5. ECL reagent 1 and 2 (Perkin Elmer; Branchburg, NJ)

### 【儀器】

溼式擴散轉印槽 (Hoefler)

### 【方法】

1. 剪裁 2 張 9×11 cm 之濾紙及 2 張 7×9 cm 之 PVDF, 將 PVDF 以甲醇浸溼後, 連同濾紙以 1X PBS 浸泡待用。
2. 將電泳完畢之膠片取下, 以 1×PBS 浸泡平衡約 15 分鐘。另外以 PVDF 包於電泳片兩側並截角標記, 再以濾紙包於外側, 最後放入絲瓜布中以轉印夾固定。
3. 將固定好之膠片放入轉印槽中, 於轉印槽中注滿 1×PBS 並以磁攪拌子輕微攪動, 於 4°C 中約 36-48 小時待其以擴散方式轉印至 PVDF 上。
4. 轉印完成後將 PVDF 取下, 浸於 5% skim milk 室溫反應 1 小時以上。
5. 以 1X TBST 清洗 4 次, 第一次 15 分鐘, 而後每次約 5 分鐘。
6. 再浸以 5% skim milk 稀釋之一次抗體 (在本實驗中通常稀釋 5000 倍), 室溫反應 1 小時。
7. 倒去一次抗體溶液, 以 1×TBST 清洗 4 次, 方法如步驟 5。
8. 再浸以 5% skim milk 稀釋之二次抗體, (本實驗而言通常稀釋 5000 倍), 室溫反應 1 小時。
9. 倒去二次抗體溶液, 以 1×TBST 清洗 4 次, 方法如步驟 5。
10. 將 ECL 的 1、2 試劑以等體積混合均勻後將 PVDF 浸入其中避光反應 1 分鐘後, 即可以 x-ray 底片壓片顯影。

### 【備註】

本實驗所使用之 ECL-西方墨點法, 是利用帶 HRP 之二次抗體所產生知過氧化氫將發光胺 (luminol) 氧化而產生冷光 (luminescence), 此種冷之波長約為 428nm, 可使一般 x-ray 底片感光, 其發光原理如圖 (Fig 2-3) 所示。



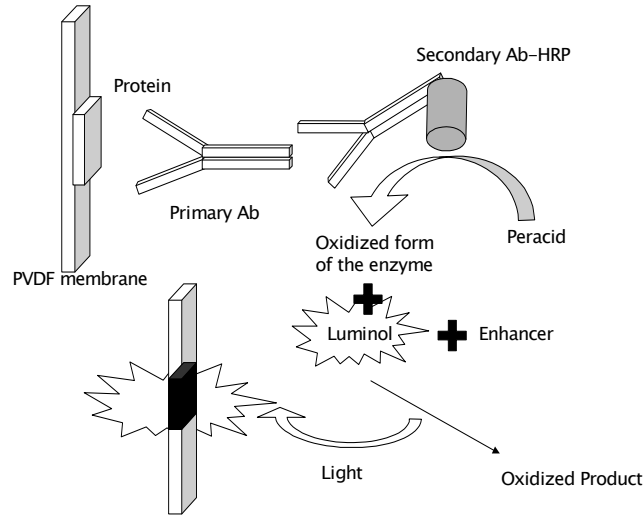


Fig 2-3 ECL 發光原理

#### ◇ II-7 sperm preparation

1. 以乾冰窒息犧牲小白鼠，剪開腹部，取出副睪尾段 (cauda epididymis)。
2. 放入內含 1ml HM buffer 微量離心管後剪成數段使精游出，靜置於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱 20 分鐘。
3. 取出以尼龍網過濾，只留下含有精子之溶液。
4. 以 900g 室溫下離心 10 分鐘，去除上面約 800 μl 的上清液，重覆 3 次。
5. 所得之精子溶液接續做以下實驗。

#### ◇ II-8 AG538 抑制精子獲能作用及 IGF-IR 磷酸化

1. 將處理好之精子以計數器 (Hemocytometer) 確定數目，並分成五組 (總體積 50 μl)。

組別	精子數	DMSO(10%)	AG538	IGF-1	BSA
control	$\frac{6}{10} / 50\mu\text{l}$	5 μl			
IGF-1	$\frac{6}{10} / 50\mu\text{l}$	5 μl		5 μl	
IGF-1+AG538	$\frac{6}{10} / 50\mu\text{l}$		5 μl	5 μl	
BSA	$\frac{6}{10} / 50\mu\text{l}$	5 μl			5 μl
BSA+AG538	$\frac{6}{10} / 50\mu\text{l}$		5 μl		5 μl

2.於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱反應 90 分鐘

3.加入 100 μl wash buffer, 10000rpm 室溫離心 10 分鐘, 重覆 3 次

Wash buffer	
200 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	100 μl
0.5M EDTA	40 μl
10 μg/μl apotinin	30 μl

加水至 10ml

4.離心沉澱的精子以 2X sample buffer 抽取蛋白質, 每 15 μl / 10 μl sample buffer

5.100°C 水浴 10 分鐘

6.4°C 全速離心 10 分鐘

7.取上清液跑電泳, 再分別加入不同的抗體以西方墨點法做偵測

	1 <sup>st</sup> antibody	2 <sup>nd</sup> antibody
抑制精子獲能作用	p-Tyr (py99), 1:5000	anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (#7076), 1:7000
抑制 IGF-IR 磷酸化	phosphor-IGF-I receptor β (Tyr1131) /Insulin receptor β(Tyr1146) antibody, 1:1000	anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (#7074), 1:5000

## ◇ II-9 In vitro capacitation

1.將處理好之精子以計數器 (Hemocytometer) 確定數目, 並分成三組 (總體積 50 μl)。

組別	精子數	IGF-1
control	6 10 /50μl	
IGF-1-a	6 10 /50μl	5 μl
IGF-1-b	6 10 /50μl	5 μl

2.於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養箱反應 90 分鐘

3.加入 100 μl wash buffer, 10000rpm 室溫離心 10 分鐘, 重覆 3 次

Wash buffer	
200 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	100 μl
0.5M EDTA	40 μl
10 μg/μl apotinin	30 μl

加水至 10ml

4.離心沉澱的精子以 2X sample buffer 抽取蛋白質, 每 15 μl / 10 μl sample buffer

5.100°C 水浴 10 分鐘

6.4°C 全速離心 10 分鐘

7.取上清液跑電泳，再以 western 做觀察

8.一抗為 p-Tyr (py99), 比例 1:5000,反應一小時；二抗為 anti-mouse,比例為 1:7000,反應一小時

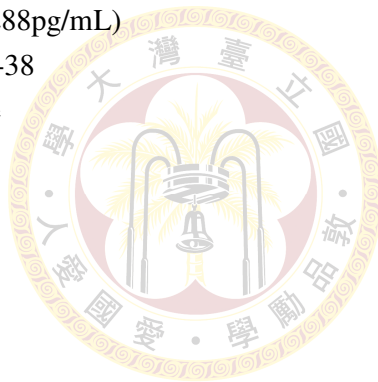
## ◇ II-10 包夾式酵素免疫分析 (sandwich ELISA)

### 【試劑】

採用 R & D systems Quantikine Mouse IGF-1 kit

試劑組:

- 1.mouse IGF-1 Microplate (96 well)
- 2.mouse IGF-1conjugate
- 3.mouse IGF-1standard (4ng/vial)
- 4.mouse IGF-1controls (288pg/mL)
- 5.calibrator diluents RD5-38
- 6.wash buffer concentrate
- 7.color reagent A
- 8.color reagent B
- 9.stop solution



### 【方法】

#### ➤ Standard prepare

- 1.加入 2mL 的 RD5-38，配製成 2 00pg/mL stock solution
- 2.再依續稀釋備用，濃度分別為 2000 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/ mL, 125 pg/ mL, 62.5 pg/ mL, 31.2 pg/ mL

#### ➤ 儲精囊液之製備

取出儲精囊液置於 1.5mL 的離心管中，加入 RD5-38 振盪稀釋後離心，去除不溶的部份。

#### ➤ mouse IGF-1controls prepare

加入 1mL 滅菌過的去離子水，配製濃度為

#### ➤ substrate solution prepare

color reagent A 和 B 以相等體積混勻，需於 15 分鐘內使用完畢

#### ➤ ELISA protocol

- 1.加入 50  $\mu$ l 的 RD5-38 至每個 well 中 (皆三重覆)
- 2.各加入 50  $\mu$ l 的 standard, control, 及儲精囊液，置於 shaker 上室溫培養 2 小時

3. 加入 wash buffer (400  $\mu$ l) wash，重覆 4 次
4. 加入 100  $\mu$ l mouse IGF-1conjugate，置於 shaker 上室溫培養 2 小時
5. 再重覆 3 的步驟
6. 加入 substrate solution 100  $\mu$ l，置於不見光處 30 分鐘
7. 加入 100  $\mu$ l stop solution，輕輕搖晃使溶液均勻混合，於 30 分鐘內以 450nm 及 540 或 570nm 測定其吸光值

#### ◇ II-11 immunofluorescence

1. 將處理好的精子 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) 分成兩組，各取 10  $\mu$ l 滴於載玻片上，以 methanol 固定後，加入含 3% BSA 的 blocking solution 1 小時，而後以 1:20 的比例加入 IGF-IR  $\alpha$  (n-20) 於 4°C 中過夜培養，但控制組不加入 IGF-IR  $\alpha$  (n-20)。
2. 將 sperm 以 1x PBS 稍微清洗後，加入 donkey-anti-rabbit IgG (1:50) 反應一小時，之後以螢光顯微鏡 (AH3-RFCA) 觀察。



## 第三章 實驗結果

### III-1 IGF-1 在各個生殖系統中之表現

已有文獻指出，在 adult rat (W.H. Daughaday and P. Rotwein, 1989) 及 fetal rat 的睪丸中皆有表現 IGF-1 mRNA (V. Rouiller-Fabre et al., 1998, F. Beck et al., 1987)，因此我想進一步檢視 IGF-1 在公鼠及母鼠生殖系統中各器官的表現的情形。

由圖 III-1 可看出，IGF-1 在公鼠及母鼠生殖系統中各器官皆有表現。已有文獻指出，*Igf1* 突變的小鼠其生殖系統各器官的重量會減少 30%，且睪丸素 (testosterone) 的含量及精子濃度和正常的小鼠比較會下降 18% (Jones J and Clemmons DR, 1995)，因此推測 IGF-1 在生殖中扮演著一些角色。

### III-2 儲精囊液中 IGF-1 的表現量

文獻指出：利用外科手術將老鼠的貯精囊移除，會導致老鼠的生殖力大為降低 60% 以上 (Peitz, 1986)，由此可知儲精囊在生殖上佔有相當的重要性。根據前人研究指出，射精時儲精囊分泌液會和副睪中的成熟精子混合，因此儲精囊分泌液中的蛋白質也許會調控精子活性。目前已有數種蛋白質已被發現並進一步探討其功能，例如儲精囊自體免疫蛋白 (seminal vesicle autoantigen, SVA) (Yu et al., 1993) 可以對精子進行去獲能反應 (decapacitation) (Huang et al., 1999, 2000)，防止精子過早活化。SVS VII 蛋白能在不誘發頂體反應之下增加精子的游動力 (Luo et al., 2001)。

於 2007 年有學者研究指出 (Fernando U et al., 2007)，人類儲精囊分泌液中具有 IGF-1，其含量可達 300ng/mL，因此我進一步利用包夾式酵素免疫分析 (sandwich ELISA) 檢查公鼠儲精囊分泌液是否和人類相同具有 IGF-1。由圖 3-2 顯示，在不同週數公鼠的儲精囊分泌液中皆可鑑定出 IGF-1，尤其以 13 週的含

量最高，可達 12.45 ng/mL。

### III-3 Localization of the IGF-1 receptor on mouse sperm

已有研究證實，在人類 (R. K. Naz and P. Padman, 1999)，牛 (Donald M. Henricks et al., 1998) 及兔子 (Minelli et al., 2001) 的精子頭部皆有 IGF-1 receptor。我利用 IGF-1 receptor 的抗體運用間接螢光技術 (indirect fluorescence technique) 觀察小白鼠精細胞是否含有 IGF-1 receptor。其控制組為直接加入 FITC 標定的二級抗體，無任何螢光反應 (圖 III-3a)，而由圖 III-3b 可看出精子頭部具有螢光反應，證實 IGF-1 receptor 位於精子頭部。

IGF-IR receptor 由 2 條  $\alpha$ -subunit (135 KD) 及 2 條  $\beta$ -subunit (90 KD) 所組成，由雙硫鍵共同連接， $\alpha$ -subunit 包含細胞外配位體 (extracellular ligand)，而  $\beta$ -subunit 具有跨膜蛋白 (transmembrane domain) 及酪胺酸蛋白自發性磷酸化位置 (tyrosine autophosphorylation site)。我以 IGF-IR  $\beta$  (cell signal) 及 IGF-IR  $\alpha$  (santa) 抗體，運用西方墨點分析法 (western blot analysis) 檢視由精子抽取的蛋白質物。由圖 III-4 顯示，IGF-IR  $\beta$  抗體可和 72 及 55KDa 的兩條蛋白帶產生免疫反應 (Immuno reaction)，而 IGF-IR  $\alpha$  則可和 135 及 55KDa 的兩條蛋白帶產生免疫反應 (Immuno reaction)，此結果和他以 IGF-IR  $\alpha$ -subunit 抗體去辨認人類精細胞 IGF-IR 所得實驗結果類似 (P. Padman and R. K. Naz, 1999)。

### III-4. IGF-I 對精子獲能效應引發蛋白酪胺酸磷酸化的影響

因為精子獲能效應伴隨精子內一些蛋白的酪胺酸磷酸化，因此評估 IGF-1 引發這一種生化變化的可能性。

IGF-I 濃度為 50  $\mu$ g/ml，各加入 5 $\mu$ l 及 10 $\mu$ l 和精子 ( $10^6/15 \mu$ l) 共同培養 90 分鐘以西方點墨法檢測精子蛋白磷酸化，由圖 III-5 結果顯示，相對於控制組 IGF-I 的加入明顯增加磷酸化的程度，但 IGF-1 劑量增加並沒有顯著增強磷酸化，可能精子頭部 IGF-I 受體只具有一定的數目，且只需要微量的 IGF-I 便可促

進精子獲能作用。

### III-5. 獲能效應誘發精子上 IGF-IR 的激酶活性

Tyrphostins 為 tyrosine kinase 的抑制劑，可抑制受體 IGF-IR 磷酸化反應 (Levitzki A. and Gazit A, 1995)，目前已發展為抗癌藥物。利用 AG538 Tyrphostin 和精子共同培養，進一步檢視精子蛋白酪胺酸磷酸化的程度。由圖 III-6 可得知，在含有 IGF-I 情況下，IGF-IR 會被活化，但若加入 AG538，IGF-IR 磷酸化的程度會下降，利用 BSA 誘發精子獲能作用亦可得到相同的實驗結果。接著觀察整體磷酸化的情形，圖 III-7 顯示，lane 1 為加入 IGF-I 組，lane 2 為 IGF-I+AG538 組，lane 3 為 BSA 組，lane 4 為 BSA+AG538 組，當加入 AG538  $5\mu\text{l}$  後，整體磷酸化程度皆會下降，因此推論獲能效應伴隨 IGF-IR 激酶活化。抑制 IGF-IR 的活性可降低精子蛋白因獲能效應而發生的酪胺酸磷酸化。



### Fig III-1.IGF-1 在各個生殖系統中之表現

取出公鼠及母鼠生殖系統之各器官 total RNA 後，以 reverse transcriptase 轉成 cDNA 後，再以設計好之 IGF-1 forward primer: ACCAGAGACCCTTTGCGGG GCT; reverse primer: AAGTGTACTTCCTTCTGAGTCT 進行 PCR 反應，primer 濃度為 0.1Mm<sup>o</sup>GAPDH PCR 條件為 94<sup>o</sup>C (denaturation 溫度) 15 秒, 23<sup>o</sup>C (annealing 溫度) 15 秒, 72<sup>o</sup>C(DNA synthesis) 15 秒,一共 23 cycle,而 IGF-1 PCR 條件為 94<sup>o</sup>C (denaturation 溫度) 15 秒, 58<sup>o</sup>C (annealing 溫度) 15 秒, 72<sup>o</sup>C(DNA synthesis) 15 秒, 一共 35 cycle, 最終以 2% agarose 電泳鑑定 IGF-1 和 GAPDH (控制組)的 mRNA : lane1; ovary 卵巢; lane2; oviduct 輸卵管; lane3; uterus 子宮; lane4; vagina 陰道; lane5; prostate 前列腺; lane6; coagulating gland 凝固腺; lane7; seminal vesicle 儲精囊; lane8; epididymis 副睪; lane9; testis 睪丸;





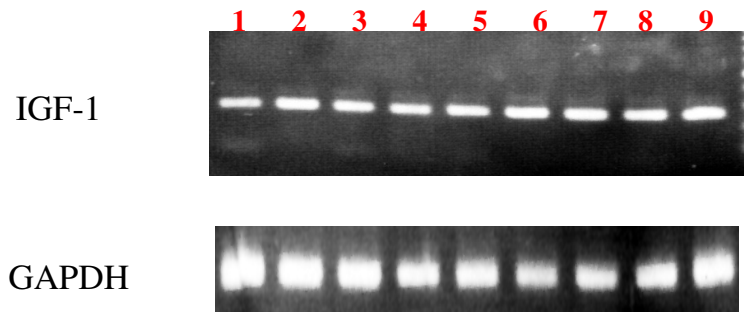


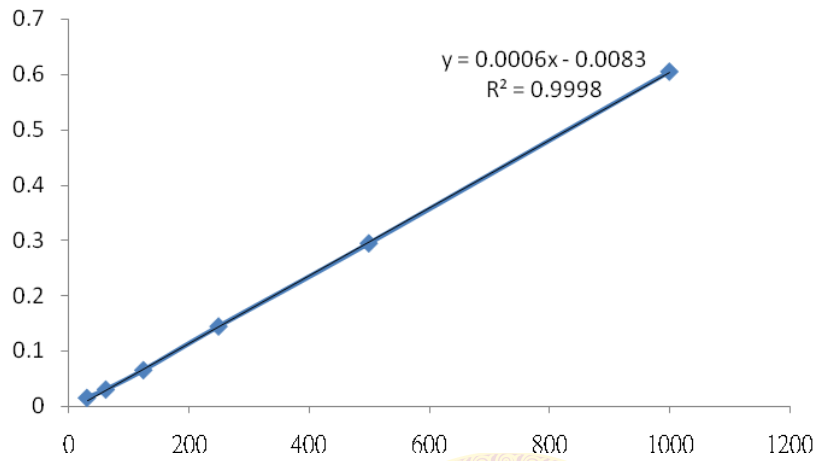
Fig III-2.以酵素免疫分析法量測 IGF-1 在儲精囊液中的含量

(A) 於 microplate 的盤孔 (microplate 盤孔已結合 IGF-1 的 monoclonal antibody, 見材料與方法 II-10) 加入 mouse IGF-1 (288pg/mL) 及不同體積 mouse IGF-1 標準溶液, 在 25°C 培養 2 小時, 清除溶液並以 wash buffer 洗滌 5 次, 最後加入 100  $\mu$ l 的 HRP-conjugation anti-mouse IGF-1 (polyclonal) 溶液於 25°C 培養 2 小時, 清除溶液後再以 wash buffer 洗滌 5 次。於暗處加入 100  $\mu$ l 基質溶液反應 30 分鐘, 最後加入 100  $\mu$ l stop solution 停止反應, 於 450nm 測吸光。由此得 IGF-1 之量和吸光值的線性關係。

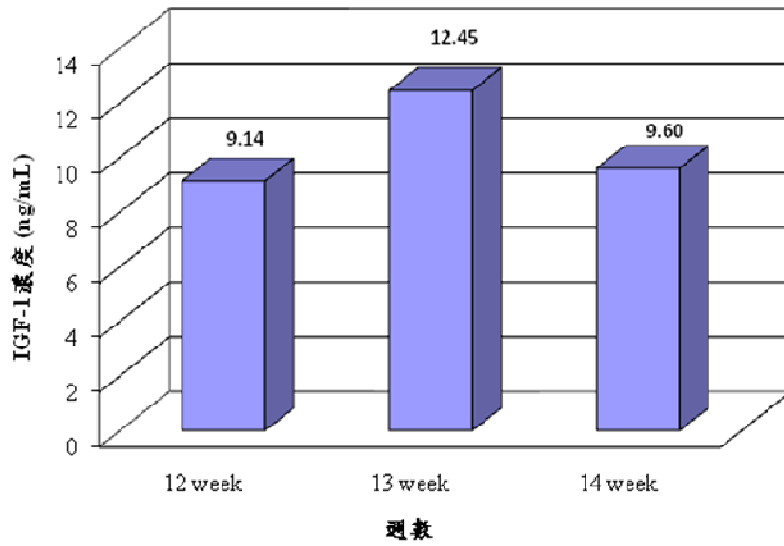
(B) 收集 12, 13, 14 週的小鼠的儲精囊液, 取代(A)之 IGF-1 標準溶液, 依(A)之步驟得 450nm 的吸光值, 對應(A)圖可得儲精囊液 IGF-1 含量。



**Mouse IGF-1 standard curve**



**seminal fluid IGF-1之含量**

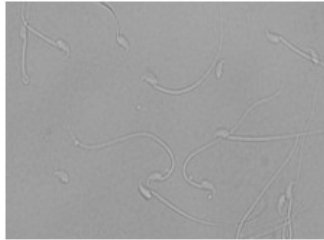


### Fig III-3. 利用間接免疫螢光染色觀察精子上之 IGF-IR

將精子由副睪取出並處理完後，直接塗抹於載玻片上，先以 IGF-1 receptor(1:20) 抗體過夜培養，再以 FITC 結合的二次抗體培養，於螢光顯微鏡下觀察。圖 a 為控制組（只加入二抗）並無任何螢光反應，圖 b 為加了 IGF-1 receptor 抗體後，發現在精子頭部具有螢光反應，代表精子頭部具有 IGF-1 receptor。



**Control**



**IGF-IR**

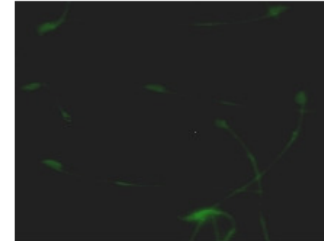
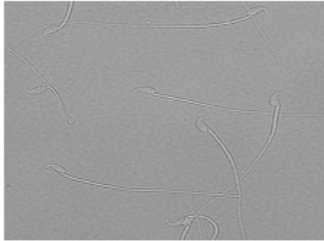
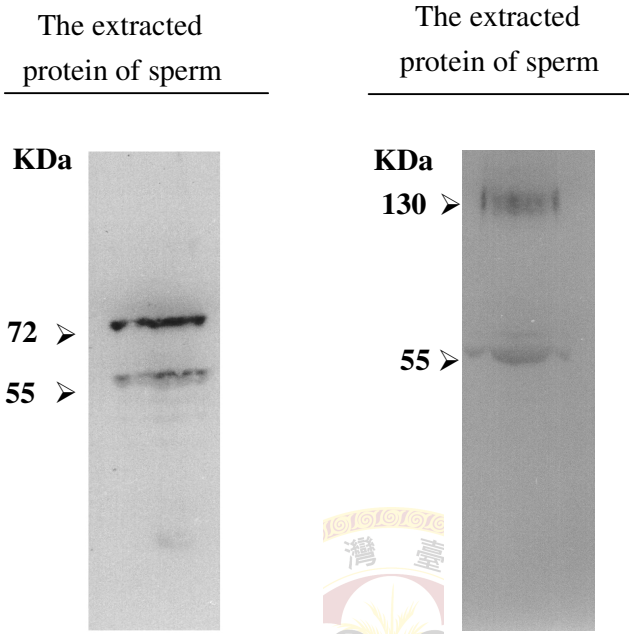


Fig III-4. 利用西方點墨法(western blot analysis) 觀察精子之 IGF-1 receptor

將精子由副睪中取出，處理完成後直接以 SDS-PAGE 所使用的 sample buffer 萃取其蛋白質，經 SDS-PAGE (8% polyacrylamide) 解析後，再利用 IGF-1 receptor  $\alpha$  及  $\beta$  兩種抗體以 1:1000 的比例檢視 gel 內蛋白帶的免疫活性。IGF-1 receptor  $\beta$  可專一性辨認兩條 band，分子量分別為約 72 及 55 KD 的位置，而 IGF-1 receptor  $\alpha$  所辨認位置為 130 及 55KD。





WB: IGF-I receptor  $\beta$

WB: IGF-I receptor  $\alpha$

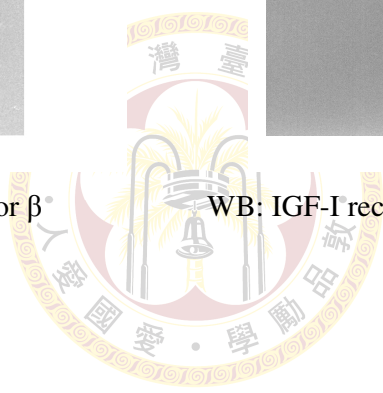


Fig III-5. IGF-I 對精子獲能效應所引發蛋白酪胺酸磷酸化的影響

將精子由副睪中取出後，調整數目為  $10^6/15\mu\text{l}$ ，與 IGF-I 共同培養 90 分鐘，再利用 western analysis 觀察整理磷酸化的情形。Lane 1：控制組，不加入 IGF-I；lane 2 及 lane 3 則各加入  $5\mu\text{l}$  及  $10\mu\text{l}$  的 IGF-I。由圖可看出加入 IGF-I 之後和控制組相比，整體磷酸化程度有提高，代表 IGF-I 可促進蛋白酪胺酸磷酸化。IGF-1 stock 濃度為  $1.31 \times 10^{-7} \mu\text{M}$





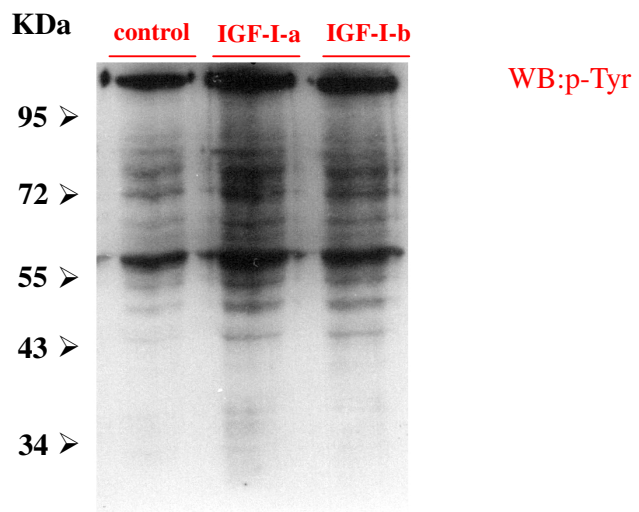
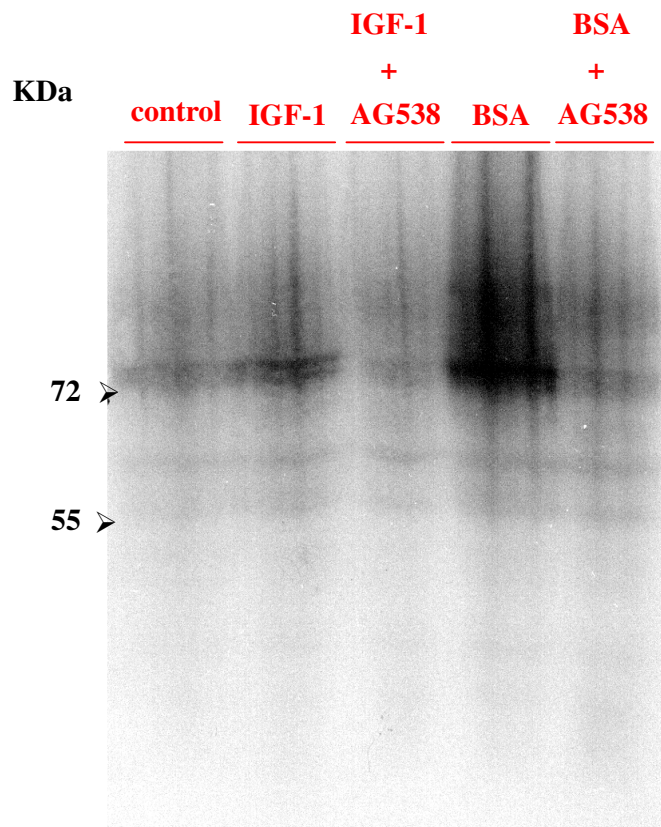


Fig III-6. IGF-IR 的抑制物 AG538 降低精子獲能效應所引發蛋白酪胺酸磷酸化於 AG538 (5mg/mL) 有無存在的培養液中，精子 ( $10^6/15 \mu\text{l}$ ) 與 IGF-1 ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) 或 BSA (3%) 於  $37^\circ\text{C}$  培養 90 分鐘後，再以西方點墨法，利用 phosphor-IGF-I receptor  $\beta$  (cell signal) 抗體檢測 IGF-IR 酪胺酸磷酸化。Lane 1 為控制組，lane 2 為 IGF-I 組，lane 3 為 IGF-I+AG538，lane 4 為 BSA 組，lane 5 為 BSA+AG538，由結果可知，當加入 IGF-I 及 BSA 時，皆會使 IGF-IR 磷酸化，但若加入 AG538  $5 \mu\text{l}$  後，IGF-IR 磷酸化的程度會便下降。

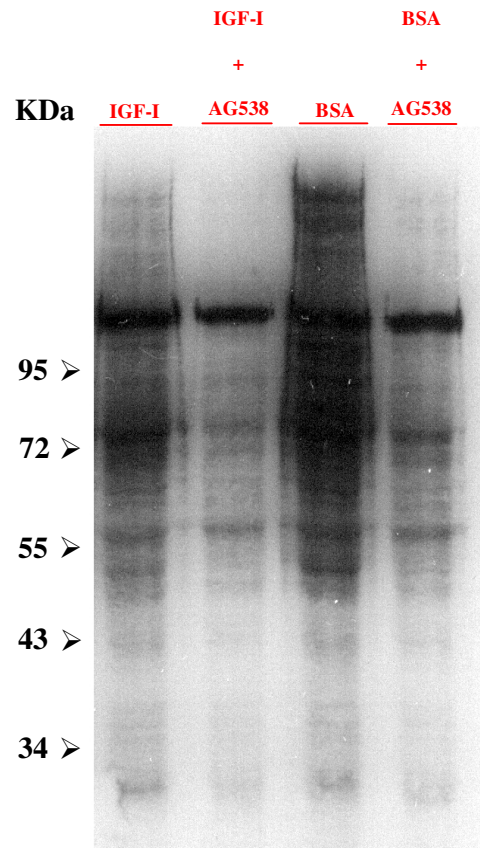




### Fig III-7. AG538 對精子獲能反應之影響

於 AG538 (5mg/mL) 有無存在的培養液中，精子 ( $10^6/15 \mu\text{l}$ ) 與 IGF-1 ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) 或 BSA (3%) 於  $37^\circ\text{C}$  培養 90 分鐘後，再以西方點墨法，利用 p-Tyr (santa) 抗體檢測 IGF-IR 酪胺酸磷酸化。Lane 1 為只加入 IGF-I 與精子共同培養，lane 2 則加入 IGF-I 及 AG538，lane 3 為 BSA 組，lane 4 為 BSA+AG538 組，由圖可看出，不論是 IGF-I 或 BSA 組，在加入 AG538 後，其磷酸化程度皆會下降。





## 第四章 討論

文獻指出，人類 (Naz and Padman, 1999) 和牛 (Henricks et al., 1998) 的精漿中皆有 IGF-I 的存在，並鑑定出人類 (Naz and Padman, 1999)，牛 (Henricks et al., 1998) 及兔子 (Minelli et al., 2001) 的精子頭部皆有 IGF-I 受體，也證實 IGF-I 受體的表現對於精子成形 (spermatogenesis) (Funk et al., 1992, Zhou J and Bondy C, 1993) 和發育 (Ovesen et al., 1996) 是必需的。在人類的精漿中，亦發現其它生長因子，EGF 及 TGF $\alpha$  (Yie et al., 1994)，顯示這些生長因子對於精子生理調控也許有其重要性。在本實驗中，我利用 mouse IGF-1 immunoassay 分析結果顯示，公鼠儲精囊液中含有 IGF-I，且不論公鼠或母鼠的生殖系統皆有 IGF-I mRNA 的表現，另外也發現 IGF-I 受體在精子的頭部。到底生殖道中 IGF-1 有無調控精子頭部 IGF-IR 的活性？由初步結果顯示，IGF-1 會促使精子上的 IGFIR 產生酪胺酸磷酸化。

成熟的精子其特性不同於一般的體細胞，並不具有轉譯 (transcription) 及轉錄 (translation) 的能力，因此許多科學家認為蛋白質磷酸化主要因素改變精子功能。精子中磷酸化的修飾作用主要有兩種，Serine / threonine 及 tyrosine 磷酸化，後者常伴隨獲能效應而發生。目前只有少數幾種產生酪胺酸磷酸化的蛋白於精子內被鑑定。這一種磷酸化和精子獲能效應、泳動性及頂體反應，到底哪一種激酶可以使精子蛋白的酪胺酸磷酸化，則是這一方面的研究必需探討的最基本問題。

由本實驗的初步結果，提示了精子上的 IGFIR 會因 BSA 引發的獲能效應而發生酪胺酸磷酸化(圖 III-6)。因 IGFIR 的酪胺酸磷酸化會引發其激酶活性，可能由此使得一些精子蛋白產生酪胺酸磷酸化。當加入 IGF-IR 的拮抗物，如 AG538，抑制 IGFIR 的激酶活性，精子蛋白酪胺酸磷酸化會受到壓制(圖 III-6)，由此提示精子上的 IGFIR 的活性調控和精子獲能效應伴隨的蛋白酪胺酸磷酸化的正面關係，其因果關係有待將來的研究。IGF-1 能於任何性腺製造，它所引發精子蛋白酪胺酸磷酸化生殖的生理意義，也有待將來釐清。

## 第五章 參考文獻

曾煥清 (2003) 國立台灣大學生化科學研究所碩士論文

葉彥良 (2005) 國立台灣大學生化科學研究所碩士論文

Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Luju F, Bellve AR, Efstratiadis A. 1996. Effects of an Igf I gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol.* 10: 903-916.

Breitbart, H. and Z. Naor. 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod.* 4: 151-9.

Chen, Y.H., B. T., McLachlan, J. A., and Teng, C.T. 1987. The androgen-dependent mouse seminal vesicle secretory protein IV: characterization and complementary deoxyribonucleic acid cloning. *Mol. Endocrinol.* 1: 707-716.

Cohen P, Peehl DM, Stamey TA, Wilson KF, Clemmons DR, Rosenfeld RG. 1993. Elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein2 in the serum of prostate cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 76: 1031-1035.

Courot, M. 1981. Transport and maturation of spermatozoa. *Prog. Reprod. Biol.* 8: 67-79.

Donald M. Henricks, Andrew J, Kouba, Brett R. Lackey William R. Boone, Sandra L. Gray. 1998. Identification of insulin-like growth factor 1 in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. 59: 330-337.

F. Beck, N.J. Samani, J.D.B. Penschow, G.W. Thorley, W.J. Tregear, T. Brammar. 1987. Histochemical localization of IGF-I and IGF-II mRNA in the developing rat embryo. *Development.* 101: 175-184.

Fernando U. Garcia, Katarzyna Urbanska, Lauren Koltowski, Krzysztof Reiss, Christian Sell. 2007. Insulin-like growth factor-1 produced by seminal vesicles: relationship to interaepithelial basal cell hyperplasia in the prostate. *Clin Cancer Res.* 13(11): 3140-46.

Funk B, Kessler U, Eisenmenger W, Hausmann A, Kolb HJ, Hies W. 1992. Expression of insulin like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor in multiple

human tissues during fetal life and early infancy. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 424-431.

Henricks DM, Kouba AJ, Lackey BR, Boone W, Gray SL. 1998. Identification of Insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa. Influence on sperm motility. *Biol Reprod* 59: 330-337.

Huang, Y.H., Chu, S.T., and Chen, Y.H. 2000. A seminal vesicle autoantigen of mouse is able to suppress sperm capacitation-related events stimulated by serum albumin. *Biol. Reprod.* 63: 1562-1566.

Jansen, M., Van Schaik, F.M.A., Ricker, A.T., Bullock, B., Woods, D.E., Gabbay, K.H., Nussbaum, A.L., 1983. Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor-1 precursor. *Nature* 306: 609-611.

Jha, K. N., D. B. Kameshwari, et al. 2003. Role of signaling pathways in regulating the capacitation of mammalian spermatozoa. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 49: 329-40.

Jones J, Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 16: 3-33.

Kajimoto, Y., Rotwein, P., 1991. Structure of the chicken insulin-like growth factor-1 gene reveals conserved promoter. *J. Biol. Chem.* 266: 9724-9731.

Kooijman R. 2006. Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17: 305-323.

Lai, M.L., Chen, S. W., and Chen, Y. H. 1991. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from mouse seminal vesicle secretion. *Arch. Biochem. Biophys.* 290: 265-271.

Leyton, L. and P. Saling. 1989. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol.* 108: 2163-8.

Levitzi, A. and Gazit, A. 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science.* 1782-1788.

Lee KO, Oh Y, Giudice LC, Cohen P, Peehl DM, Rosenfeld RG. 1994. Identification



of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) fragments and IGFBP-5 proteolytic activity in human seminal plasma: a comparison of normal and vasectomized patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 75: 1367-72.

Lin T. 1995. Regulation of Leyding cell function by insulin-like growth factor-I and binding proteins. *J Androl.* 16: 193-196.

Li, S. H., R. K. Lee, et al. 2005. Demonstration of a Glycoprotein Derived from the Ceacam10 Gene in Mouse Seminal Vesicle Secretions. *Biol Reprod.*

Luo, C. W., H. J. Lin, et al. 2001. A novel heat-labile phospholipid-binding protein, SVS VII, in mouse seminal vesicle as a sperm motility enhancer. *J Biol Chem.* 276: 6913-21.

Minelli A, Moroni M, Castellini C. 2001. Isolation and purification of the IGF-1 protein complex from rabbit seminal plasma: effects on sperm motility and viability. *J Exp Zool* 290: 279-290.

Naz RK, Padman P. 1999. Identification of Insulin-like growth factor (IGF)-I receptor in human sperm cell. *Arch Androl* 43: 153-159.

Noyes, R. W. 1953. The fertilizing capacity of spermatozoa. *West J Surg Obsetet Gynecol.* 81: 342-9.

Ovesen P, Ho KY, Orskov H, Jorgensen JO, Ingerslev J, Christiansen JS. 1996. GH treatment of subfertile males. *Fertil Steril* 66: 292-298.

Parks, J. E. and R. H. Hammerstedt. 1985. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biol Reprod.* 32: 653-68.

Peitz, B., and Olds-Clark, P. 1986. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol. Reprod.* 35: 608-617.

Rosenfeld RG, Pham H, Oh Y, Lamson G, Giudice LC. 1990. Identification of insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) and a low molecular weight IGFBP in human seminal plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 70: 551-3.

Shimatsu, A., Rotwein, P., 1987. Mosaic evolution of the insulin-like growth factor:

organization, sequence, and expression of the rat insulin-like growth factor-1 gene. *J. Biol. Chem.* 262: 7894-7900.

Siduh, K. S. and S. S. Guraya. 1989. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol.* 118: 231-80.

Suarez, S. S., D. F. Katz, et al. 1983. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. *Biol Reprod.* 29: 1277-87.

Tsuruta JK, O'Brien DO. 1995. Sertoli cell- spermatogenic cell interactions: insulin-like growth factor II/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mediates changes in spermatogenic cell gene expression in mice. *Biol Reprod.* 53: 1454-1464.

Urner, F. and D. Sakkas. 2003. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction.* 125: 17-26.

Vijayaraghvan, S., and Hoskin, D.D. 1990. Changes in the mitochondrial calcium influx and efflux properties are responsible for the decline in sperm calcium during epididymal maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 186-194.

V. Rouiller-Fabre, L. Lecerf, C. Gautier, J. Saez, R. Habert. 1998. Expression and effect of the insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology.* 139: 2926-2934.

W. H. Daughaday, P. Rotwin. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentration. *Endocr. Rev.* 10: 68-91.

Yie SM, Lobb DK, Clarck DA, Younglai EV. 1994. Identification of a transforming growth factor  $\alpha$ -like molecule in human seminal plasma. *Fertil Steril* 61: 129-135.

Zhou J, Bondy C. 1993. Anatomy of the insulin-like growth factor system in the human testis. *Fertil Steril* 60: 897-904.