

PP1 γ 2 对昆明小鼠精子成熟和运动性的调控作用*

刘芳[#], 杨明华[#], 朱方方, 李亚辉^{**}
(云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】PP1 γ 2 是一种特异表达于动物睾丸和精子的蛋白磷酸酶, 为精子发生、运动性获得与调控所必需的关键酶, 本文对 PP1 γ 2 与昆明小鼠精子成熟和运动性调控进行研究。【方法】通过 Western-blot 技术, 分析昆明小鼠不同条件下附睾头和附睾尾精子中磷酸化和非磷酸化 PP1 γ 2 的蛋白质表达量, 探讨磷酸酶抑制剂 okadaic acid (OA) 和 cyliculin A (CA) 对附睾头和附睾尾精子运动度的影响。【结果】附睾尾精子中磷酸化 PP1 γ 2 的蛋白水平远远高于附睾头精子的 ($P<0.05$); db-cAMP、IBMX 和 Ca^{2+} 不改变磷酸化 PP1 γ 2 的蛋白水平; OA 和 CA 能显著提高附睾头和附睾尾磷酸化 PP1 γ 2 的表达水平, 且能显著提高精子 (尤其是附睾头的精子) 运动度。【结论】PP1 γ 2 通过磷酸化和去磷酸化作用, 其酶活性发生变化, 从而对昆明小鼠附睾精子成熟和运动性进行调控, 即在附睾头精子中 PP1 γ 2 酶活性较高, 精子运动度较低; 在附睾尾精子中 PP1 γ 2 酶活性较低, 精子运动度得到显著提高。

关键词: PP1 γ 2; 精子成熟; 运动性; 昆明小鼠; 附睾

中图分类号: Q 555.4

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2018) 06-1054-06

Sperm Maturation and Motility in Kunming Mice Regulated by Protein Phosphatase PP1 γ 2

LIU Fang, YANG Minghua, ZHU Fangfang, LI Yahui

(College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] PP1 γ 2 is a testis- and sperm-specific type of protein phosphatase and it is a key enzyme essential for maturation, initiation and regulation of sperm motility. The regulation of PP1 γ 2 on sperm maturation and motility in Kunming mice was studied. [Method] In the present study, the levels of phosphorylated and dephosphorylated PP1 γ 2 in caput and caudal epididymal spermatozoa under various conditions were examined *via* Western-blot, and the effects of two phosphatase inhibitors, i.e., okadaic acid (OA) and cyliculin A (CA) on motility in caput and caudal epididymal spermatozoa were also investigated. [Result] The level of phosphorylated PP1 γ 2 was significantly higher ($P<0.05$) in caudal epididymal spermatozoa than that of caput spermatozoa. The level of phosphorylated PP1 γ 2 remained unchanged under the treatments of db-cAMP, IBMX or Ca^{2+} . OA or CA significantly increased not only the level of phosphorylated PP1 γ 2 in caput and caudal epididymal

收稿日期: 2017-04-19

修回日期: 2018-11-06

网络出版时间: 2018-11-15

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460308); 云南中科灵长类生物医学重点实验室开放基金[云中科学 (2016) 008 号]。

作者简介: [#]对本文贡献等同, 为并列第一作者。刘芳 (1994—), 女, 河北邯郸人, 在读硕士研究生, 主要从事动物生殖生物学研究。E-mail: lingfang1107098670@outlook.com; 杨明华 (1967—), 女, 云南陇川人, 硕士, 高级实验师, 主要从事动物分子营养与代谢调控研究。E-mail: yangmh85@hotmail.com

^{**}通信作者 Corresponding author: 李亚辉 (1967—), 男, 云南武定人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖与发育生物学研究。E-mail: kmliyh@163.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201704031](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201704031)

spermatozoa but also the sperm motility (especially in caput epididymal spermatozoa). [**Conclusion**] The enzyme activity of PP1 γ 2 changes with the phosphorylation and dephosphorylation of PP1 γ 2, thus, PP1 γ 2 exerts its roles on the regulation of sperm maturation and motility in the epididymis in Kunming mice. To be specific, the high activity of enzyme PP1 γ 2 in caput epididymal spermatozoa results in lower sperm motility whereas the low activity of enzyme PP1 γ 2 in caudal epididymal spermatozoa enhances motility significantly.

Keywords: PP1 γ 2; sperm maturation; sperm motility; Kunming mice; epididymis

哺乳动物的精子刚从睾丸产生时并没有完全成熟,需进入附睾,在其中发生一系列形态、生理和生化方面的变化,完成成熟过程,形成具有活力的精子^[1]。由于精子是高度分化的特异细胞,其染色质高度浓缩,既不进行基因转录也不能进行蛋白质的翻译合成,细胞活动的调控几乎都是通过翻译后蛋白质修饰的方式进行。蛋白质的磷酸化和去磷酸化是翻译后蛋白质修饰及其活性与功能调节的重要方式之一。目前,研究人员已在人、牛、大鼠、仓鼠等许多哺乳动物精子中发现蛋白质的磷酸化作用,而且这种作用与精子的运动能力、获能或顶体反应密切相关^[2-4]。细胞内蛋白质的磷酸化水平由蛋白激酶和蛋白磷酸酶的调控作用来维持,已有的研究更多关注的是蛋白激酶对精子功能的调控,对磷酸酶与精子功能关系的研究报道较少。从理论上来说,作为蛋白质磷酸化调节的一分子,磷酸酶在精子功能调控中也应发挥作用,而且越来越多的证据表明精子中有丝/苏氨酸磷酸酶的存在,并参与精子重要功能的调节^[5-7]。

蛋白磷酸酶分为丝/苏氨酸磷酸酶和酪氨酸磷酸酶两大类^[8],它们的催化亚基具有很高的同源性,但其 N-端和 C-端结构域差异极大^[8-10]。目前至少发现 4 类丝/苏氨酸磷酸酶,即 PP1、PP2A、PP2B 和 PP2C^[10-12]。磷酸酶 PP1 包括 PP1 α 、PP1 β 、PP1 γ 1 和 PP1 γ 2^[12-14]等 4 个成员,其中,前 3 种磷酸酶几乎在所有组织中均有表达,PP1 γ 2 则主要表达于睾丸中且是 PP1 在精子中的唯一表达形式。这些磷酸酶与精子功能关系的研究表明:PP1 γ 2 与牛、灵长类附睾精子成熟、运动能力获得及雄性生育力以及小鼠超激活运动的调节有关^[7, 15-18]。PP2A 与人及灵长类动物精子运动性获得有关^[15],此外,它还参与小鼠、仓鼠精子的超激活运动和蛋白酪氨酸磷酸化的调节^[18-19]。研究

人员在人、山羊、牛、猪、犬等动物精子中检测到磷酸酶 PP2B^[20],进一步研究发现 PP2B 与人、猪、犬、家禽等动物精子运动性、顶体反应的调控有关^[20-23]。最近的研究显示人精子获能与丝/苏氨酸磷酸酶的活动有关^[20, 24]。关于磷酸酶 PP1 γ 2 与昆明小鼠精子功能关系的研究目前未见报道。为此,本研究探索了 PP1 γ 2 对昆明小鼠精子在附睾中成熟和运动性变化的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

8~10 周雄性性成熟的昆明小鼠购自昆明市艾尼莫实验动物养殖中心。NaCl、KCl、KH₂PO₄、MgSO₄、Glucose、pyruvic acid、CaCl₂、Hepes、okadaic acid (OA)、calyculin A (CA) 等试剂从 Sigma 公司购买;洗精液参考文献^[25]的方法配制。

1.2 精子蛋白的提取

将小鼠脱颈处死,取出附睾头和附睾尾,将其分别放入 2 个离心管中,于 37℃ 水浴孵育 10 min,使精子自由游出。加适量洗精液混匀后取少许检测精子活力及精子总数,加入适量洗精液稀释精子至 $5 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ mL⁻¹。5 000 r/min,弃上清。用 VISCONTI 等^[26]所述方法提取精子蛋白后于 -80℃ 保存备用。

1.3 Western-blot 分析

具体操作详见 VISCONTI 等^[26]描述。

1.4 OA 和 CA 作用的最适浓度及最佳时间的确定

将小鼠精子悬液分为 5 管,加入不同浓度的 OA (0、1、5、10、25 μ mol/L),于 37℃ 水浴中孵育 10 min,在显微镜下统计精子运动度,确定 OA 作用于精子的最佳浓度;用最佳浓度的 OA 与附睾尾精子共同孵育不同时间 (0、10、20、30 min),统计精子运动度,确定 OA 作用于

精子的最佳时间。

将小鼠精子悬液分为 6 管，加入不同浓度的 CA (0、5、10、30、50、70 nmol/L)，于 37 ℃ 水浴中孵育 10 min，在显微镜下统计精子运动度，确定 CA 作用于精子的最佳浓度；用最佳浓度的 CA 与附睾尾精子共同孵育不同时间 (0、10、20、30 min)，统计精子运动度，确定 CA 作用于精子的最佳时间。

对照试验 (Ctrl) 为：将附睾尾精子洗涤后置于洗精液中，室温放置 40 min，分别用不同浓度的 OA (0、1、5、10、25 μmol/L) 和 CA (0、5、10、30、50、70 nmol/L) 于 37 ℃ 孵育 10 min，统计精子运动度。

1.5 db-cAMP、IBMX、Ca²⁺、OA、CA 对小鼠附睾头和附睾尾精子 PP1γ2 磷酸化变化的影响

将附睾头和附睾尾精子悬液分别转入 2 mL 离心管，分别加入 DMSO (DMSO 是溶解 A23187 的溶剂，50%DMSO 是溶解 OA 的溶剂，1%DMSO 是溶解 CA 的溶剂)、db-cAMP、IBMX、10 μmol/L A23187、Ca²⁺ (0.2、0.5、1.0、2.0 mmol/L)、5 μmol/L OA 和 50 nmol/L CA，在 37 ℃ 中孵育之后，提取精子蛋白，进行 Western-blot 分析。

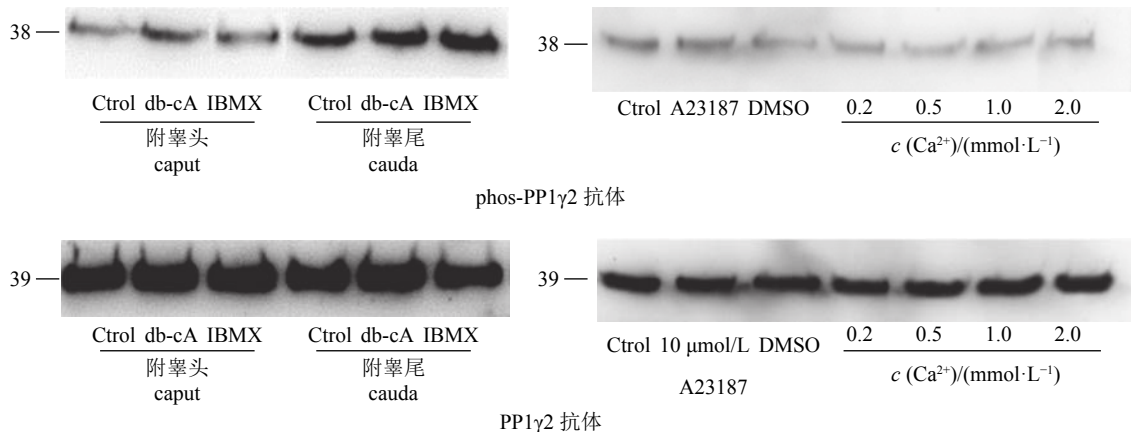


图 2 db-cAMP、IBMX 和 Ca²⁺对 PP1γ2 磷酸化的影响

Fig. 2 Effects of db-cAMP, IBMX and Ca²⁺ on the phosphorylation of PP1γ2

2.3 OA 和 CA 对附睾头和附睾尾精子 PP1γ2 磷酸化的影响

由图 3 可知：在小鼠附睾头和附睾尾精子悬液中分别加入蛋白磷酸酶抑制剂 OA 或 CA，附睾头和附睾尾精子的 PP1γ2 磷酸化程度显著增加。

2.4 OA 和 CA 对小鼠精子运动性的作用

由图 4a 可知：在相同的培养时间下，在 0~5 μmol/L 范围内，随着 OA 浓度的升高，小鼠精子运

2 结果与分析

2.1 PP1γ2 在小鼠附睾头和附睾尾精子中的存在形式

由图 1 可知：通过 Western-blot 分析表明在小鼠附睾头和附睾尾精子中存在 PP1γ2，提取等量的小鼠附睾头和附睾尾精子蛋白，可以看到 PP1γ2 在小鼠附睾尾精子的磷酸化程度远高于小鼠附睾头精子。

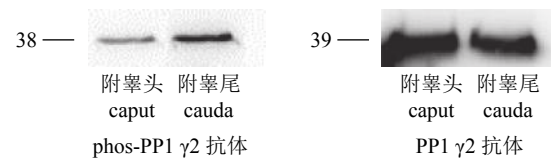


图 1 PP1γ2 在昆明小鼠附睾头和附睾尾精子的存在形式

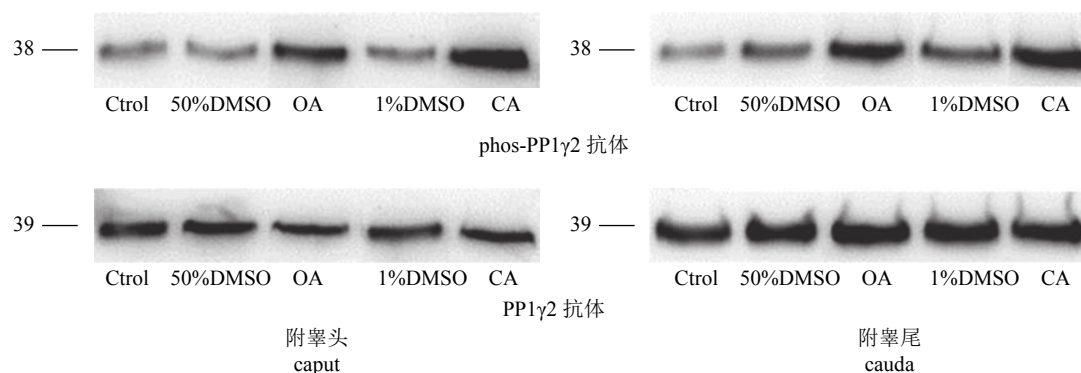
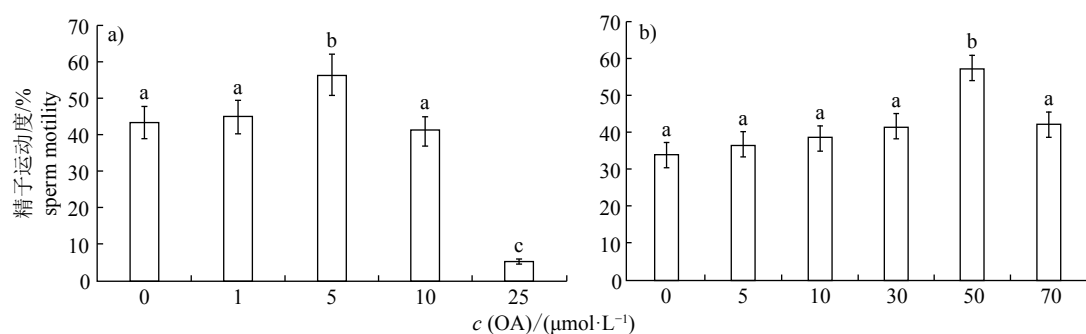
Fig. 1 The present form of PP1γ2 in caput and caudal epididymal spermatozoa in Kunming mice

2.2 db-cAMP、IBMX 和 Ca²⁺对 PP1γ2 磷酸化的影响

由图 2 可知：在小鼠附睾头和附睾尾精子悬液中加入 db-cAMP、IBMX 或 Ca²⁺，不会改变 PP1γ2 的磷酸化水平。

动度逐渐升高；继续增加 OA 浓度 (10~25 μmol/L) 后，小鼠精子运动度逐渐降低。在 5 μmol/L 时，小鼠精子运动度显著高于其他各组。

由图 4b 可知：在相同的培养相同下，在 0~50 nmol/L 中，随着 CA 浓度的升高，小鼠精子运动度呈现上升趋势；当 CA 浓度增至 70 nmol/L 时，小鼠精子运动度逐渐降低。在 50 nmol/L 时，小鼠精子运动度显著高于其他各组。

图3 OA和CA对附睾头和附睾尾精子PP1 γ 2磷酸化的影响Fig. 3 Effects of OA and CA on the phosphorylation of PP1 γ 2

注: 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同。

Note: Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$); the same as below.

图4 不同浓度的OA和CA对小鼠精子运动性的作用

Fig. 4 Effects of OA and CA concentration on the sperm motility

2.5 OA和CA对小鼠精子运动性的作用时间

由图5可知: 向小鼠精子悬液中分别加入5 $\mu\text{mol/L}$ OA和50 nmol/L CA, 分别孵育0、10、20、30 min, 发现小鼠精子运动度有不同程度升高, 孵育10 min的运动度均显著高于其他各组。

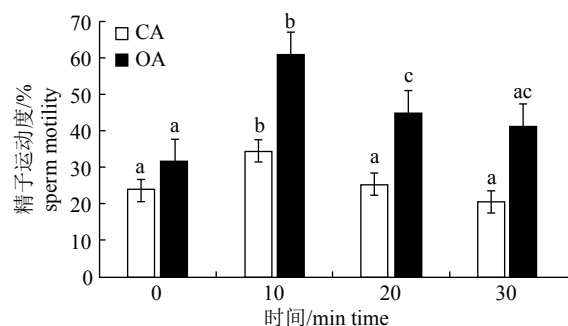


图5 最佳浓度的OA和CA对小鼠精子运动性的作用时间

Fig. 5 The effect of incubation time of OA and CA on the sperm motility

2.6 OA和CA对小鼠附睾头和附睾尾精子运动性的影响

由图6可知: 不同浓度的OA和CA对小鼠

附睾头和小鼠附睾尾精子运动度的趋势相似。0~5 $\mu\text{mol/L}$, 随着OA浓度升高, 小鼠精子运动度呈上升状态; 5~25 $\mu\text{mol/L}$, 其运动度逐渐降低; OA浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 小鼠附睾头的运动度显著高于其他浓度组(图6a)。0~50 nmol/L, 随着CA浓度的升高, 小鼠附睾头和附睾尾精子运动度呈上升趋势; 当CA浓度增至50 nmol/L后, 其运动度逐渐降低, 且当CA的浓度为50 nmol/L时, 小鼠附睾尾精子运动度高于其他浓度组(图6b)。

3 讨论

本研究中, 在附睾头和附睾尾精子中加入磷酸酶抑制剂OA或CA, 均能使磷酸化的PP1 γ 2蛋白水平增加, 由于CA是PP1或PP2A的高效抑制剂, 说明PP1(PP1 γ 2自身)或PP2A可对PP1 γ 2做出调节, 即使得磷酸化的PP1 γ 2去磷酸化。

本研究发现: 附睾尾精子磷酸化的PP1 γ 2远远高于附睾头精子的, 在运动度较低的附睾头精子中加入磷酸酶抑制剂OA或CA, 能显著提高精子运动度, 且能增加磷酸化PP1 γ 2的蛋白表达

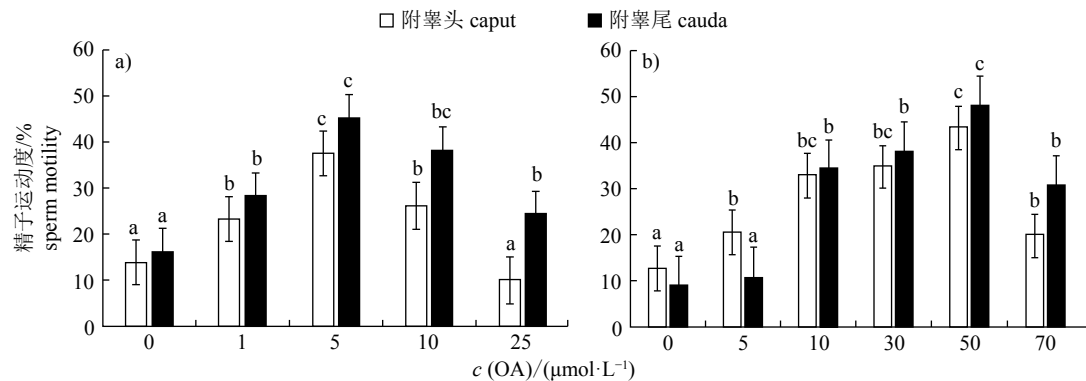


图 6 OA 和 CA 对小鼠附睾头和附睾尾精子运动性的影响

Fig. 6 Effects of OA and CA on the motility of caput and caudal sperm

水平,表明小鼠精子在从附睾头转移至附睾尾的过程中,通过蛋白磷酸酶 PP1 γ 2 的调控而成熟,精子运动性也受 PP1 γ 2 的调控,此调控作用通过 PP1 γ 2 磷酸化/去磷酸化影响其酶活性变化而实现,PP1 γ 2 的这种磷酸化/去磷酸化变化及其对精子功能的调控模式与前人在人、猕猴、牛精子中的情形一致^[7,16],说明这是精子成熟及运动性调控的一种通用机制。尽管这些研究阐明了 PP1 γ 2 在附睾精子成熟和运动性获得中的重要性及其基本调控模式,但 PP1 γ 2 进一步的作用机制仍不清楚。已有研究表明:精子运动的起始依赖于细胞内 cAMP、Ca²⁺等调控因子^[27]。因此,本研究在附睾头和附睾尾精子中加入 cAMP 类似物 db-cAMP、磷酸二酯酶抑制剂 IBMX (能增加胞内 cAMP 浓度)以及 Ca²⁺,以探索 PP1 γ 2 磷酸化状态的变化,研究结果显示:PP1 γ 2 的磷酸化状态没有改变,说明它们可能以不同路径对精子成熟和运动性进行调控。

此外, HUANG 等^[16]认为:PP1 γ 2 可能通过与其他蛋白分子的相互作用而在附睾头和附睾尾中表现出不同的活性。磷酸化的 PP1 γ 2 是该酶在附睾尾精子中唯一具催化作用的活性形式(尽管磷酸化的 PP1 γ 2 也结合有其他蛋白分子,即 protein 14-3-3),附睾尾精子中其他两种形式的 PP1 γ 2 则没有催化活性,它们分别是与 sds22 蛋白(为酵母 PP1 结合蛋白 sds22 蛋白的同源物)和 hsp90 蛋白相结合的 PP1 γ 2。有意思的是,在附睾头精子中,大量非磷酸化的 PP1 γ 2 并不像在附睾尾精子那样与 sds22 蛋白结合在一起,它们或与 1 种 17kDa 蛋白质相结合,或单独存在^[28],因此,这种自由的 PP1 γ 2 分子具有催化活性,其他二种形式的 PP1 γ 2 与附睾尾精子中的一样。精子成熟过

程中 PP1 γ 2 酶活性的降低是由非磷酸化的 PP1 γ 2 与其蛋白调节分子相结合的变化所引起,据推测这些变化远远大于有催化活性的磷酸化的 PP1 γ 2。他们推测磷酸化的 PP1 γ 2 可能是在精子中维持 PP1 γ 2 催化活性的一种生化机制。由于本研究中 PP1 γ 2 在昆明小鼠附睾头和附睾尾的存在形式及对精子功能的作用方式与 HUANG 等^[16]研究的结果相同,故推测其调控机制也与其基本一致。需要指出的是,除 PP1 γ 2 外,我们还检测到另外 2 种磷酸酶(PP2A 和 PP2B)也存在于昆明小鼠精子中,其具体作用及是否与 PP1 γ 2 有关则是下一步的重点研究内容。

4 结论

PP1 γ 2 通过磷酸化和去磷酸化作用,其酶活性发生变化,从而对昆明小鼠附睾精子成熟和运动性进行调控,酶 PP1 γ 2 通过失活或降低活性的方式而促使附睾精子成熟及提高精子运动度。

[参考文献]

- [1] 杨增明,孙青原,夏国良.生殖生物学[M].北京:科学出版社,2005.
- [2] DEVI K U, JHA K, SHIVAJI S. Plasma membrane-associated protein tyrosine phosphatase activity in hamster spermatozoa[J]. Molecular Reproduction and Development, 1999, 53(1): 42. DOI: [10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199905\)53:1<42::AID-MRD5>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<42::AID-MRD5>3.0.CO;2-5).
- [3] VISCOMTI P E, WESTBROOK V A, CHERTIHIN O, et al. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity[J]. Journal of Reproductive Immunology, 2002, 53(1/2): 133. DOI: [10.1016/S0165-0378\(01\)00103-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(01)00103-6).
- [4] SALICION A M, PLATT M, WERTHEIMER E V, et al. Signalling pathways involved in sperm capacitation[J]. Society of Reproduction and Fertility Supplement, 2007,

- 65: 245.
- [5] TANG F Y, HOSKINS D D. Phosphoprotein phosphatase of bovine epididymal spermatozoa[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1975, 62(2): 328. DOI: [10.1016/S0006-291X\(75\)80142-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(75)80142-2).
- [6] AHMAD K, BRACHO G E, WOLF D P, et al. Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases[J]. Archives of Andrology, 1995, 35(3): 187. DOI: [10.3109/01485019508987871](https://doi.org/10.3109/01485019508987871).
- [7] SMITH G D, WOLF D P, TRAUTMAN K C, et al. Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility[J]. Biology of Reproduction, 1996, 54(3): 719. DOI: [10.1095/biolreprod54.3.719](https://doi.org/10.1095/biolreprod54.3.719).
- [8] BARFORD D, DAS A K, EGLOFF M P. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation[J]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1998, 27(1): 133. DOI: [10.1146/annurev.biophys.27.1.133](https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.133).
- [9] COHEN P T W. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1997, 22(7): 245. DOI: [10.1016/S0968-0004\(97\)01060-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01060-8).
- [10] HONKANEN R E, GOLDEN T. Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era?[J]. Current Medicinal Chemistry, 2002, 9(22): 2055. DOI: [10.2174/0929867023368836](https://doi.org/10.2174/0929867023368836).
- [11] MUMBY M C, WALTER G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth[J]. Physiological Reviews, 1993, 73(4): 673. DOI: [10.1152/physrev.1993.73.4.673](https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.4.673).
- [12] WERA S, HEMMINGS B A. Serine/threonine protein phosphatases[J]. Biochemical Journal, 1995, 311(1): 17. DOI: [10.1042/bj3110017](https://doi.org/10.1042/bj3110017).
- [13] SASALI K, SHIMA H, KITAGAWA Y, et al. Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 α gene in rat hepatocellular carcinomas[J]. Cancer Science, 2010, 81(12): 1272. DOI: [10.1111/j.1349-7006.1990.tb02690.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1990.tb02690.x).
- [14] KITAGAWA Y, SASAKI K, SHIMA H, et al. Protein phosphatases possibly involved in rat spermatogenesis [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1990, 171(1): 230. DOI: [10.1016/0006-291X\(90\)91381-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)91381-2).
- [15] VIJAYARAGHAVAN S, STEPHENS D T, TRAUTMAN K, et al. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity[J]. Biology of Reproduction, 1996, 54(3): 709. DOI: [10.1095/biolreprod54.3.709](https://doi.org/10.1095/biolreprod54.3.709).
- [16] HUANG Z H, VIJAYARAGHAVAN S. Increased phosphorylation of a distinct subcellular pool of protein phosphatase, PP1 γ 2, during epididymal sperm maturation[J]. Biology of Reproduction, 2004, 70(2): 439. DOI: [10.1095/biolreprod.103.020024](https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.020024).
- [17] GOTO N, HARAYAMA H. Calyculin A-sensitive protein phosphatases are involved in maintenance of progressive movement in mouse spermatozoa *in vitro* by suppression of autophosphorylation of protein kinase A[J]. Journal of Reproduction and Development, 2009, 55(3): 327. DOI: [10.1262/jrd.20170](https://doi.org/10.1262/jrd.20170).
- [18] SI Y, OKUNO M. Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation[J]. Biology of Reproduction, 1999, 61(1): 240. DOI: [10.1095/biolreprod61.1.240](https://doi.org/10.1095/biolreprod61.1.240).
- [19] SIGNORELLI J R, DIAZ E S, FARA K, et al. Protein phosphatases decrease their activity during capacitation: a new requirement for this event[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81286. DOI: [10.1371/journal.pone.0081286](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081286).
- [20] TASH J S, BRACHO G E. Regulation of sperm motility: emerging evidence for a major role for protein phosphatases[J]. Journal of Andrology, 1994, 15(6): 505.
- [21] TASH J S, KRINKS M, PATEL J, et al. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm[J]. Journal of Cell Biology, 1988, 106(5): 1625. DOI: [10.1083/jcb.106.5.1625](https://doi.org/10.1083/jcb.106.5.1625).
- [22] ASHIZAWA K, WISHART G J, RANASINGHE A R A H, et al. Protein phosphatase-type 2B is involved in the regulation of the acrosome reaction but not in the temperature-dependent flagellar movement of fowl spermatozoa[J]. Reproduction, 2004, 128(6): 783. DOI: [10.1530/rep.1.00327](https://doi.org/10.1530/rep.1.00327).
- [23] CASTILLO B J, ROGGERO C M, MANCIFESTA F E, et al. Calcineurin-mediated dephosphorylation of synaptotagmin VI is necessary for acrosomal exocytosis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(34): 26269. DOI: [10.1074/jbc.M109.095752](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.095752).
- [24] BATTISTONE M A, ROSV G D, SALICIONI A M, et al. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases[J]. Molecular Human Reproduction, 2013, 19(9): 570. DOI: [10.1093/molehr/gat033](https://doi.org/10.1093/molehr/gat033).
- [25] TATENO H, KAMIGUCHI Y. Evaluation of chromosomal risk following intracytoplasmic sperm injection in the mouse[J]. Biology of Reproduction, 2007, 77(2): 336. DOI: [10.1095/biolreprod.106.057778](https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057778).
- [26] VISCONTI P E, BAILEY J L, MOORE G D, et al. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation[J]. Development, 1995, 121(4): 1129.
- [27] COOPER T G. The epididymis, sperm maturation and fertilisation[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 1986.
- [28] MISHRA S, SOMANATH P R, HUANG Z H, et al. Binding and inactivation of the germ cell-specific protein phosphatase PP1 γ 2 by sds22 during epididymal sperm maturation[J]. Biology of Reproduction, 2003, 69(5): 1572. DOI: [10.1095/biolreprod.103.018739](https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018739).

责任编辑: 何馨成