

· 综 述 ·

酪氨酸磷酸化在精子获能中的作用

樊国彪, 李洲平, 曾海涛*

(中南大学 生物科学与技术学院 分子生物学研究中心, 中国湖南 长沙 410078)

摘 要: 获能是精子发生顶体反应以及与卵子结合之前所必需的生理过程. 研究发现在精子获能过程中伴有蛋白质的磷酸化特别是酪氨酸的磷酸化. 主要对酪氨酸磷酸化蛋白在精子获能过程中的作用及其存在的部位进行归纳总结, 为进一步阐明精子获能分子机制奠定基础.

关键词: 精子; 获能; 酪氨酸磷酸化

中图分类号: Q25

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2008)04-0283-05

The Effect of Tyrosine Phosphorylation in Sperm Capacitation

FAN Guo-biao, LI Zhou-ping, ZENG Hai-tao*

(Molecular Biology Research Center, School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410078 Hunan, China)

Abstract Capacitation is an important physiological pre-requisite that enables sperm undergo acrosome reaction and fertilize the egg. Researches have found that the protein phosphorylation especially at tyrosine residues which is one of the most important events that occur during capacitation. The effect of tyrosine phosphorylation during capacitation and the location where it occurs are reviewed.

Key words : sperm ; capacitation ; tyrosine phosphorylation

(Life Science Research 2008, 12(4) 283~287)

Austin 和 Chang 在 20 世纪 50 年代初期经过对兔精子的研究发现, 精子与卵细胞结合以前必须经历一系列连续的生化反应和生理上的改变才能使其与卵细胞粘着并且融合, 这一现象被称为获能^[1]. 哺乳动物的精子在受精前必须经历获能这个过程, 精子获能后的变化有超激活运动、质膜胆固醇含量减少、膜的离子渗透性增加^[2]、膜的超极化、胞内 pH 升高^[3]、Ca²⁺和 cAMP 含量增加^[4]、超氧阴离子生成量增多^[5]、酪氨酸磷酸化增强、与卵透明带结合^[6]、引发顶体反应(acrosome reaction, AR) 等, 但是获能过程中完整的分子机制和信号通路始终不是很清楚.

蛋白质酪氨酸磷酸化是精子获能后显著的

特征之一. 蛋白质磷酸化是蛋白质翻译后的加工修饰过程, 在真核细胞中蛋白质的磷酸化/去磷酸化是调节蛋白质活性最常见的方式之一, 它能调控细胞内的许多生理活动. 蛋白质磷酸化主要发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上. 早期的研究表明精子既有丝氨酸和苏氨酸磷酸化蛋白质, 也有酪氨酸磷酸化蛋白质. 但大量研究结果表明, 蛋白质酪氨酸磷酸化对于精子获能尤为重要^[7]. 成熟精子是高度分化的特殊细胞, 不能转录翻译合成新的蛋白质, 因此精子的获能、超激活运动的维持、发生顶体反应等都是通过酪氨酸的磷酸化/去磷酸化来调控的, 因此对其的研究报道也是最多的.

收稿日期: 2008-04-28; 修回日期 2008-10-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470892, 30400481); 中南大学米塔尔创新基金资助项目(07MX26)

作者简介: 樊国彪(1983-) 男, 山西文水人, 硕士研究生, 主要从事生殖生物学研究, E-mail: fanguobiao@yahoo.com.cn; * 通讯作者: 曾海涛(1963-) 男, 湖南邵阳人, 中南大学副研究员, 硕士生导师, 主要从事生殖生物学研究, Tel: 0731-4805449, E-mail: htzeng@mail.csu.edu.cn

1 精子中酪氨酸磷酸化蛋白的研究

早在 1989 年, Leyton 和 Saling 就已经证实存在小鼠精子中存在着酪氨酸磷酸化的蛋白质, 他们用酪氨酸磷酸化抗体得到分子质量为 52、75、95 kD 的 3 种蛋白, 并且证实精子获能后 95 kD 的蛋白酪氨酸磷酸化增强^[8]. Naz 等对人、大鼠、兔和小鼠精子蛋白质酪氨酸磷酸化情况进行了研究, 发现人精子中 14 种蛋白质(122、105、95、89、73、62、48、46、40、33、30、28、25 和 22 kD) 具有自磷酸化作用^[9]. 人精子分子质量为 95/94 ± 3 kD、46 ± 3 kD、25 ± 7 kD、12 ± 2 kD 的蛋白质发生了酪氨酸磷酸化, 其中 95 kD 的蛋白与 Leyton 和 Saling 报道的一致. 孔丽娟发现豚鼠精子 80、45、40 kD 的 3 种蛋白发生酪氨酸磷酸化, 其中 40 kD 的蛋白酪氨酸磷酸化水平自精子体外培养后呈递增趋势, 45 kD 的蛋白酪氨酸磷酸化自培养 3 h 后发现并呈递增趋势, 而 80 kD 的蛋白酪氨酸磷酸化水平在精子培养 3 h 时最高, 后呈递减趋势^[10].

1.1 精子酪氨酸磷酸化的部位

为了进一步研究在获能过程中精子不同部位发生磷酸化的情况及发现不同磷酸化蛋白与精子特殊功能之间的关系, 有必要将发生酪氨酸磷酸化的蛋白质在精子中的分布情况研究清楚, 许多实验室应用免疫细胞化学的方法对酪氨酸磷酸化蛋白的定位情况进行了观察. CHOI 比较获能与未获能的猪精子蛋白质二维图谱后, 发现 56 个有差异的蛋白质点, 对其中酪氨酸磷酸化的蛋白通过免疫荧光定位发现其大多分布在精子头部和尾部^[11].

1.1.1 精子尾部蛋白质的酪氨酸磷酸化

精子尾部是蛋白质酪氨酸磷酸化最主要的发生部位, 利用免疫细胞化学技术已经在人、猴子、猪、金仓鼠和小鼠的精子尾部发现有酪氨酸磷酸化的蛋白存在^[11], 精子尾部蛋白的酪氨酸磷酸化与精子的超激活运动有关. 通过药物增加细胞内 cAMP 的水平后发现精子的超激活运动和尾部的酪氨酸磷酸化增加, 人、猴子、大鼠精子中均存在这种现象.

在人精子中存在精子 A 激酶锚定蛋白(A-kinase anchoring proteins, AKAPs), AKAP82 定位在纤维鞘. 钙结合酪氨酸磷酸化调节蛋白(Calcium binding and tyrosine phosphorylation-regulated

protein, CABYR)位于精子尾部的主段^[12], 获能过程中 CABYR 发生磷酸化后才获得与钙离子结合的能力, 表明酪氨酸磷酸化和钙离子有一定的关联并且调节精子的超激活运动.

1.1.2 精子头部蛋白质的酪氨酸磷酸化

在获能过程中小鼠精子头部只有一小部分蛋白发生了酪氨酸磷酸化, 没有获能的精子通常不发生磷酸化, 但是在顶体区约有 5%~10% 的蛋白质发生了酪氨酸磷酸化. 与精子尾部发生酪氨酸磷酸化的蛋白相比顶体区域蛋白的磷酸化程度不随获能时间的增加而变化^[13]. 在没有获能的小鼠精子头部检测到唯一一个发生磷酸化的己糖激酶(hexokinase), 它定位在顶体区而且磷酸化的状态不随获能过程改变.

在获能过程中精子头部蛋白酪氨酸磷酸化作用并不清楚. 分子质量为 95 kD 的精子膜蛋白与小鼠透明带结合以后会发生酪氨酸磷酸化, 它具有受体酪氨酸激酶(Receptor protein tyrosine kinases, RPTK)的活性, 当它与透明带 3(zona pellucida 3)结合以后磷酸化加强, 由于这一性状它被命名为透明带受体激酶(zona receptor kinase, ZRK), 在人精子中也发现了相似的蛋白 Hu9. 受体酪氨酸激酶是一类由胞外结构域和胞内酪氨酸激酶结构域构成的跨膜蛋白, 当胞外配体结合以后, 激酶被激活使 RPTK 上的酪氨酸残基磷酸化, 磷酸肌醇 3 激酶和磷脂酶 C 被聚集到 RPTK 磷酸化后的结构域, RPTK 激活磷酸肌醇 3 激酶和磷脂酶 C. 精子头部也存在非受体蛋白酪氨酸激酶如 c-yes, c-yes 是酪氨酸激酶非受体 Src 家族中的一员, 在人精子头部检测到其存在, c-yes 激酶的活化依赖于 cAMP 的浓度, 说明精子头部酪氨酸磷酸化是 cAMP 和酪氨酸激酶通路共同参与的^[14].

1.1.3 精子酪氨酸磷酸化蛋白的鉴定

精子获能过程中有多种蛋白发生酪氨酸磷酸化. 磷脂过氧化氢物谷胱甘肽过氧化物酶(phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, PHGPx)是精子线粒体的结构蛋白, 分子质量为 19 kD, 仓鼠精子获能过程中 PHGPx 酪氨酸磷酸化, PHGPx 能影响线粒体的功能, 可能在获能信号转导中起重要的作用^[15]. 人精子纤维鞘蛋白 95(fibrous sheath protein of 95 kD, FSP95)在获能期发生酪氨酸磷酸化^[16]. 人 FSP95 与 AKAP11 同源, Vijayaraghavan 报道牛精子的 AKAP110 位于精子顶体和尾部主段^[17] 而 Mandal 报道人 FSP95 位于精

子尾部主段的纤维鞘, FSP95 在两种生物精子中的定位差异值得进一步研究. 获能时, 人精子尾部主段发生酪氨酸磷酸化的蛋白还有 CABYR^[12]. Hsp60 和 erp99 这两种分子伴侣蛋白位于精子头部接近顶体的质膜中. Asquith 推测精子获能前, 透明带受体没有暴露在精子质膜外表面, 获能时胆固醇从质膜释放, 增加膜的流动性, 促进膜蛋白质重新分布. Hsp60 和 erp99 位于质膜内表面, Hsp60 和 erp99 发生酪氨酸磷酸化后, 可能激活透明带受体复合体, 使受体复合体的构象改变, 暴露在细胞表面^[18]. Baker 发现 SRC 的丝氨酸 17 被 PKA 磷酸化后, SRC 的 Y416 发生自磷酸化, 使 SRC 呈现酪氨酸激酶活性. C 端 SRC 激酶 (C terminal SRC kinase, CSK) 也参与调节 SRC 的活性, CSK 可使 SRC 的 Y527 发生磷酸化, 抑制 SRC 的酪氨酸激酶活性. Baker 用二维电泳和质谱分析技术鉴定了小鼠精子 SRC 的作用底物, 底物包括精子尾部外周致密纤维 2 (Outer dense fiber from sperm tail 2), α -微管蛋白, β -微管蛋白, AKAP-3, AKAP-4, HSP-60, HSP90 α , HSP70, 葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated proteins, GRP), 钙网蛋白 (Calreticulin)、内质网素 (Endoplasmic reticulum chaperone, ER chaperone), 谷胱甘肽转移酶, α -烯醇酶, LDH C3. 上述底物中的酪氨酸可被 SRC 磷酸化^[19].

Ficarro 发现人精子获能时酪氨酸磷酸化的蛋白有电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC)、角蛋白、PHGpX、泛醇-细胞色素 C 还原酶、谷氨酰胺合成酶、丙酮酸脱氢酶、纤维型肌动蛋白加帽蛋白 β (F-actin capping protein β)、AKAP3、AKAP4、肿瘤坏死因子 1 型受体相关蛋白 (tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein)、N-酰基-氨酰肽水解酶 (N-Acyl-aminoacylpeptide hydrolase)、含缬氨酸蛋白 (valosin-containing protein, VCP)、HSP70、HSP90 α 、前顶体素结合蛋白、谷胱甘肽转移酶、外周致密纤维 1、 α -微管蛋白^[20].

获能时, 精子中有些酪氨酸磷酸化蛋白的分布会发生变化. 获能前, VCP 位于人精子颈部, 获能后, VCP 移动到精子头部前端. VCP 作为分子伴侣, 将相关的膜融合蛋白聚合在发生顶体反应的部位, VCP 在精子质膜和顶体外膜的融合过程中起作用^[20].

1.2 酪氨酸磷酸化参与的信号转导通路

1.2.1 cAMP 依赖的蛋白激酶 A (PKA) 和 PKA 底物

cAMP 水平升高是精子获能过程中最早发生的胞内改变之一. cAMP 依赖的 PKA 也是精子获能过程中必需的参与者之一. PKA 由两个具有调节功能和两个具有催化功能的亚单位组成, 它的活性与 cAMP 的浓度有关. cAMP 能够与 PKA 的调节亚单位结合来达到其调节活性的作用^[21], PKA 能使含有 (Arg)-X-X-(Ser/Thr) 基团的蛋白质发生丝/苏氨酸磷酸化, 因此含有该基团的蛋白质被称为 PKA 磷酸化的底物^[22].

在精子内 PKA 通过其调节亚基与 AKAPs 连接实现定位, 而 AKAPs 又能将蛋白激酶、磷酸酶和它们的靶蛋白固定在一定的细胞区域内, 以此来实现对蛋白质磷酸化的调节. 精子中已经发现许多不同类型的 AKAPs: AKAP82 定位在精子尾部主段区的纤维鞘^[23], AKAP110 定位在精子顶体区域和精子尾部主段区^[17], S-AKAP84 和 AKAP121 定位在线粒体外膜^[24]而 AKAP220 则与细胞骨架锚定连接^[25]. AKAPs 在精子内几乎所有的区域存在表明它们间接参与了精子头部和尾部酪氨酸磷酸化的调节^[26].

用抗 Arg-X-X-P-(Ser/Thr) 的抗体测定得知精子获能与 PKA 磷酸化底物有关, PKA 底物含量随着时间的增加而增加, 约获能 30 min 后浓度达到最大, 而此时 PKA 的活性也处在最大值^[27]. PKA 底物的磷酸化能够被非受体型酪氨酸蛋白激酶 (PTK) 抑制剂 herbimycin A 和 PP2 所抑制, 而受体型 PTK 抑制剂 tyrphostin A47、PKC 抑制剂 chelerythrine 和 MEK (MAPK kinase) 抑制剂 PD98059 和 U126 却对其没有抑制作用. 此外用 IBMX + dbcAMP 孵育的精子中 herbimycin A 和 PP2 并不能抑制 Arg-X-X-(Ser/Thr) 基序的磷酸化, 这表明部分 PTK 在位于 PKA 活化的上游起作用, 它可能激活 cAMP 的生成. 这些结果提示至少有两种不同的 PTKs 参与了获能: 一种可能在精子获能的前期和 PKA 的激活有关, 另一种可能与纤维鞘蛋白的酪氨酸磷酸化有关.

1.2.2 促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 途径

MAPK 也被称为胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK), 已经被证实与精子的运动、获能以及顶体反应有关^[28]. 精子质膜中有多种 RPTK, 相应的配体与 RPTK 结合后, 多数 RPTK 中的酪氨酸可发生自身磷酸化, 然后发生生物效应. 有些种类的 RPTK 发生

酪氨酸自磷酸化后,通过接头蛋白(adapter protein)与 Ras 结合,Ras 活化后则激活 Raf,活化的 Raf 与 MEK 结合,Raf 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可使 MEK 中的丝氨酸磷酸化而激活 MEK,MEK 是双重特异性激酶,能使 ERK1 和 ERK2 催化域 VIII 亚区的 Thr-Glu-Tyr 序列中的苏氨酸和酪氨酸磷酸化,使 ERK1 和 ERK2 活化,激活的 ERK1 和 ERK2 可使其下游靶蛋白的酪氨酸发生磷酸化^[27]. ERK 信号途径已经在禽类和人类的精子中发现,在禽类精子中它参与轴丝和细胞骨架蛋白的磷酸化并对鞭毛活动进行调节,在人类精子中 ERK2 (p42ERK)可直接被孕酮激活,因此这个激酶可能与精子获能以及顶体反应有直接关系.

MAPK 亚型 ERK2、接头蛋白 Shc 和 Ras 定位在人精子头部,研究表明 ERK 信号通路的所有抑制剂都可以阻断精子获能,通过一种抗磷酸化的抗体在人精子中发现分子质量为 55、94 和 115 kD 的蛋白^[29],这种抗体可以与含丝氨酸磷酸化的短肽结合.研究发现这些蛋白的磷酸化程度在 1 h 内增加,然后会逐渐减弱,尽管通过质谱检测发现这些蛋白结构与 MEK 并不相同,但是它们都可以被 MEK 磷酸化抑制剂所抑制,因此它们属于 MEK 磷酸化相似蛋白.

最近研究发现 MEK 相似蛋白大多含有 Thr-Glu-Tyr^[30]或 Pro-X-X-Ser/Thr-Pro^[31]基序,这类蛋白大多分布在精子尾部,其磷酸化程度在获能后增强,而 PKA 似乎具有调节降低 Thr-Glu-Tyr 磷酸化的作用.当脯氨酸位于+1 或-2 位(Pro-X-X-Ser/Thr-Pro)时 ERK1 和 ERK2 才能使丝/苏氨酸磷酸化,用抗 Ser/Thr-Pro 磷酸化的单克隆抗体研究发现人精子中分子质量为 78 和 80 kD 不溶于 Triton 的蛋白可能为 ERK 相似蛋白的作用底物.

1.2.3 磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)

磷酸肌醇 3 激酶参与了许多信号通路,它最主要的功能是使 PIP₂ 磷酸化. PIP₂ 又是 PIP₃ 依赖激酶 (PDK)、Akt、PLC、PKC、PKA 和 NOS 等酶活化的中间介质.被牛血清白蛋白处理过的精子能被 Akt 抑制剂和渥曼青霉素阻止获能^[32],PI3K 和 Akt 在获能过程中的作用与 Thr-Glu-Tyr-P 基团和酪氨酸的磷酸化有关.但是当精子被牛血清白蛋白诱导获能以后 Akt 抑制剂和渥曼青霉素并不能抑制 PKA 磷酸化底物和 MEK 相似蛋白磷酸化的增加^[33].因此 PI3K/Akt 信号通路可能是独

立于 cAMP/PKA 信号通路作用的.

此外许多文献报道胆固醇、钙离子、碳酸氢根离子、活性氧离子(ROS)、孕酮、 γ -氨基丁酸(GABA)、血管紧张素 II 以及细胞因子等物质也会对酪氨酸磷酸化以及获能产生影响,在此不做详细介绍.

2 小结

卵子受精前精子必须经过一系列生理生化变化,研究证明蛋白质磷酸化已经和精子超激活运动、顶体反应一起成为精子获能的重要特征.长期深入的研究已经证实了许多在精子获能过程中与酪氨酸磷酸化有关的信号通路,但是这些信号通路之间的关系仍待进一步的研究,cAMP/PKA 信号通路调节酪氨酸磷酸化的机制以及在信号通路中一些未知磷酸化蛋白的识别依然是需要解决的问题.因此要完全揭开酪氨酸磷酸化在精子获能过程中的作用及其参与的信号通路仍然是今后的主要研究方向.同时,虽然已经通过细胞免疫化学技术对许多酪氨酸磷酸化蛋白进行了定位研究,但是要进一步确定哪些蛋白在获能过程中起关键作用,以及系统的全面的对精子蛋白进行研究还需要借助如 HPLC、MS、二维电泳等新的技术手段,获得更多精子蛋白质组学的信息.

参考文献 (References):

- [1] KNOBIL E, NEILL J D. Physiology of Reproduction[M]. New York: Raven Press, 1994.189-317.
- [2] FRASER L R. Ionic control of sperm function[J]. Reprod Fertil, 1995, 7(4):905-925.
- [3] VREDENBURGH-WILBERG W L, PARRISH J J. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation[J]. Mol Reprod, 1995, 40(4):490-502.
- [4] BALDI E, CASANO R, FALSETTI C, et al. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa[J]. J Androl, 1991, 12(5): 323-330.
- [5] O'FLAHERTY C, BEORLEGUI N, BECONI M T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm[J]. Int J Androl, 2003, 26(2): 109-114.
- [6] DE JONGE C. Biological basis for human capacitation[J]. Hum Reprod Update, 2005, 11(3): 205-214.
- [7] NAZ R K, RAJESH P B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction[J]. Reprod Biol Endocrinol 2004, 2:75.
- [8] LEYTON L, SALING P. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding [J]. Cell, 1989, 57(7):1123-1130.

- [9] NAZ R K, AHMAD K, KUMAR R. Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function[J]. *J Cell Sci*, 1991, 99 (Pt 1):157-165.
- [10] 孔丽娟, 李忠浩, 黄静燕, 等. 酪氨酸磷酸化蛋白在体外获能豚鼠精子上的分布与表达[J]. *中国生物工程杂志* (KONG L J, LI Z H, HUANG J Y, *et al.* The localization and expression of tyrosine phosphorylated proteins during in vitro capacitation of guinea pig sperm [J]. *China Biotechnology*), 2007, 27 (4) : 89-93.
- [11] CHOI Y J, UHM S J, SONG S J, *et al.* Cytochrome c upregulation during capacitation and spontaneous acrosome reaction determines the fate of pig sperm cells:linking proteome analysis[J]. *J Reprod Dev*, 2008, 54(1):68-83.
- [12] NAABY-HANSEN S, MANDAL A, WOLKOWICZ M J, *et al.* CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation[J]. *Dev Biol*, 2002, 242(2):236-254.
- [13] URNER F, LEPPENS-LUISIER G, SAKKAS D. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose[J]. *Biol Reprod*, 2001, 64 (5):1350-1357.
- [14] LECLERC P, GOUPIL S. Regulation of the human sperm tyrosine kinase c-yes. Activation by cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate and inhibition by Ca²⁺ [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(1):301-307.
- [15] NAGDAS S K, WINFREY V P, OLSON G E. Tyrosine phosphorylation generates multiple isoforms of the mitochondrial capsule protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase(PHGPx), during hamster sperm capacitation[J]. *Biol Reprod*. 2005, 72(1):164-171.
- [16] MANDAL A, NAABY-HANSEN S, WOLKOWICZ M J, *et al.* FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa[J]. *Biol Reprod*, 1999, 61(5):1184-1197.
- [17] VIJAYARAGHAVAN S, LIBERTY G A, MOHAN J, *et al.* Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein[J]. *Mol Endocrinol*. 1999, 13(5):705-717.
- [18] ASQUITH K L, BALEATO R M, MCLAUGHLIN E A, *et al.* Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117 (Pt 16):3645-3657.
- [19] BAKER M A, HETHERINGTON L, AITKEN R J. Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 15):3182-3192.
- [20] FICARRO S, CHERTIHIN O, WESTBROOK V A, *et al.* Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm: evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation[J]. *J Biol Chem* 2003, 278(13):11579-11589.
- [21] COHEN G, RUBINSTEIN S, GUR Y, *et al.* Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation[J]. *Dev Biol*, 2004, 267(1): 230-241.
- [22] BRUCE J I, SHUTTLEWORTH T J, GIOVANNUCCI D R, *et al.* Phosphorylation of inositol 1,4,5-triphosphate receptors in parotid acinar cells[J]. *J Biol Chem* 2002, 277(2):1340-1348.
- [23] JOHNSON L R, FOSTER J A, HAIG-LADEWIG L, *et al.* Assembly of AKAP82, a protein kinase A anchor protein, into the fibrous sheath of mouse sperm[J]. *Dev Biol*, 1997, 192 (2):340-350.
- [24] CARDONE L, DE CRISTOFARO T, AFFAITATI A, *et al.* A-kinase anchor protein 84/121 are targeted to mitochondria and mitotic spindles by overlapping amino-terminal motifs[J]. *J Mol Biol*, 2002, 320(3):663-675.
- [25] REINTON N, COLLAS P, HAUGEN T B, *et al.* Localization of a novel human A-kinase-anchoring protein, hAKAP220, during spermatogenesis[J]. *Dev Biol* 2000, 223(1):194-204.
- [26] 李杨, 刘继红. 精子 A 激酶锚定蛋白的研究进展[J]. *中华男科学杂志* (LI Y, LIU J H. Progress in researches on A-kinase anchor proteins in sperm[J]. *National Journal of Andrology*), 2004, 10(9):692-694.
- [27] LEFIÈVRE L, JHA K N, DE LAMIRANDE E, *et al.* Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction[J]. *J Androl*, 2002, 23 (5):709-716.
- [28] DU PLESSIS S S, PAGE C, FRANKEN D R. The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa involves extracellular signal-regulated kinase activation[J]. *Andrologia*, 2001, 33(6):337-342.
- [29] O'FLAHERTY C, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Reactive oxygen species and protein kinases modulate the level of phospho-MEK-like proteins during human sperm capacitation [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73(1):94-105.
- [30] LIGUORI L, DE LAMIRANDE E, MINELLI A, *et al.* Various protein kinases regulate human sperm acrosome reaction and the associated phosphorylation of Tyr residues and of the Thr-Glu-Thr motif [J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(3):211-221.
- [31] DE LAMIRANDE E, GAGNON C. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by superoxide anion[J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(2):124-135.
- [32] O'FLAHERTY C, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(6):1045-1055.
- [33] O'FLAHERTY C, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events[J]. *Free Radic Biol Med* 2006, 41(4):528-540.