

臺北醫學大學醫學科學研究所醫學檢驗暨生物技術組碩士論文

Taipei Medical University
Graduate Institute of Medical Science for School of Medical
Laboratory Science and Biotechnology
Master Thesis

骨橋蛋白對精子游動力及受孕力的調節機制

**Identification of OPN-regulated sperm motility and
fertilizing capacity**

研究生：朱永寧(Yung - Ning Chu)

指導教授：高淑慧 博士(Shu - Huei Kao, Ph.D.)

中華民國九十七年七月

July, 2008

致謝

回想起三年前考進研究所到現在，是我人生轉變最大的一個階段。當初去考研究所的動機有一半是因為太太(逸菁)先去唸了研究所，激勵了我也想去唸書來充實自己。在求學的過程中覺得很開心，但由於兩個小孩的出世，心理壓力漸漸沉重，於是第二年離開了學校在白天找了第二份工作，也謝謝高老師的諒解，讓我先去工作。工作與學業的完成曾經讓我猶豫了許久，最後還是先選擇喜歡的學業，完成了我的夢想。在這三年中要感謝的人真的很多，其中要提出來的是高老師和我太太(逸菁)，我常私底下跟學弟妹說：這輩子遇過最偉大的女人，莫過於高老師與我太太了！老師她其實是身兼數職的，要指導這麼多學生、寫計畫、還要顧家庭與小孩，我想應該是累翻了，雖然我的座位離老師最近，非到不得已我才會去請教老師，因為我知道老師很辛苦，印象最深刻的是老師居然在我面前哭了，雖然老師說不完全是因為我，但是我知道老師心理的壓力與辛苦是沉重的；再來要感謝的是我太太，一直鼓勵與幫忙我完成學業。再來就是要感謝曾院長對我論文內容的指導與修改，盧副院長支持本實驗計畫的內容與進行，黃副教授對實驗的建議與傳授相關經驗及趙主任給予實驗的內容與方向的建議，最後還要感謝這群實驗室學弟妹的幫忙與協助，才能順利完成學業與論文。

論文名稱：骨橋蛋白對精子游動力及受孕力的分子調節機制

Identification of OPN-regulated sperm motility and fertilizing capacity

研究所名稱：臺北醫學大學醫學科學研究所醫學檢驗暨生物技術組在職專班

研究生姓名：朱永寧

畢業時間：96 學年度第 2 學期

指導教授：高淑慧博士

摘要內容

精子游動力是目前被認為是受孕能力的重要指標。臨床上如何選擇高游動力或改善精子游動力，藉以提高受孕能力是極為重要的課題。骨橋蛋白 (osteopontin, OPN)，在公牛被認為受孕的指標蛋白。OPN 廣泛存在於壺腹部、副睪、儲精囊及輸卵管中，此外 OPN 是一種磷酸蛋白質，主要調節許多細胞，包括巨噬細胞(macrophages)、蝕骨細胞(osteoclasts)及癌症細胞的發生和轉移有關。本研究主要為探討 OPN 是否具有調節精子細胞的游動能力及受孕力。在 Western blotting 的分析結果中，發現在 25kD 以及 50kD 處有 OPN 的表現，並且其表現量與精子的游動力有相關性，游動力佳的精子 25kD OPN 表現量較多(54.4%±11.6% vs. 81.8%±6.8%， $p < 0.05$)。並且依精子的游動力細分樣本為 Group 1 為 0~30%，Group 2 為 30%~60%，Group 3 為 60%~100%，並以電腦輔助精液分析儀(computer-assisted semen analysis)測定各項游動參數。當我們以添加 0.1μM OPN 與精子作用 30 分鐘前後游動力變化，發現在 Group 1 的精子中，游動力有增加的情形(15.6%±2.1% vs.

39.6%±4.6%， $p < 0.01$)，Group 2 亦有相同的增加情形(51.7%±1.5% vs. 69.5%±6.0%， $p < 0.05$)。在 CASA 的分析結果中，共計 8 個精子的運動參數中，有 4 個參數，包括 VCL、LIN、STR 與 BCF，在游動力較差的 Group 1 有明顯升高的情形，其中 VCL 提高為原始之 175%±18.0%倍、LIN 為 226.5%±25.0%倍、STR 為 241.1%±30.0%倍，以及 BCF 也成為原先的 154.4%±13.0% ($p < 0.05$)，不過在活動力較好的兩組(Group 2 及 Group 3)，OPN 並沒有顯著的提升。進一步分析 OPN 對於精子受孕能力的影響，包括精子移動至卵子能力的測定(*in vitro* migration test)、精子穿透力試驗(sperm penetration assay)、頂體反應試驗(acrosomal reaction)，以及老鼠體外受精試驗等，發現 OPN 可以提高精子移動到卵子的能力(1.5%±0.2% vs. 6.3%±1.5%， $p < 0.05$)、穿透卵子的能力(1.4±0.1 個 vs. 2.3%±0.1 個， $p < 0.05$)以及增加體外受精率(62.0%±3.6% vs. 78.0%±2.1%， $p < 0.05$)。不過在精子頂體反應試驗中，結果並沒有發現有增加的情形。最後我們利用螢光染色分析方法，觀察到 OPN 表現於精子的頭部(head)與中節(mid-piece)，並且在加入 OPN 後會造成精子的細胞骨架細胞(cytoskeleton)的改變，在 actin 及 tubulin 有增加的情形，而 spectrin 螢光表現強度並無明顯增加。本研究證實 OPN 具有調控精子游動力及受孕力的能力。

關鍵詞：骨橋蛋白、受孕力、游動力、體外受精率

Abstract

Title of Thesis : Identification of OPN-regulated sperm motility and fertilizing capacity

Authors : Yung-Ning Chu

Thesis advised by : Shu-Huei Kao Ph. D

The motility of the spermatozoa is reported as a critical indicator of fertilizing capacity. In clinical, to enhance the fertilization rate by selecting sperms with high motility or improving the sperm motility is an important issue. Osteopontin (OPN) was proposed as a fertility indexes protein of bulls. OPN is a secreted phosphoprotein, regulates biological functions of diverse cell types, such as macrophages and osteoclasts. It is also involved in onset and metastasis of cancer cells. OPN is expressed in the ampulla, seminal vesicles, epididymis, as well as oviduct. Aim of this study was to address the role of OPN in regulation of sperm motility and fertility potential. A significantly increase of the OPN expression by Western Blotting. A significant increased expression of 25 kD OPN was found in the sperm with good motility ($54.4\% \pm 11.6\%$ vs. $81.8\% \pm 6.8\%$, $p < 0.05$). Then we divided all the sample into three groups, motility from 0% to 30% (Group 1), 30% to 60% (Group 2), and up to 60% (Group 3). Follow the supplementation of

0.1 μ M OPN for 30 minutes, the alteration of sperm motility and moving characteristics were examined by computer-assisted semen analysis (CASA). The sperm motility was significantly increased in Group 1 (51.7% \pm 1.5% vs. 69.5% \pm 6.0%, p <0.05). OPN caused a significant increase in the percentage of VCL (175.0% \pm 18.0%, p <0.05), LIN (226.5% \pm 25%, p <0.05), STR (241.1% \pm 30.0%, p <0.05), and BCF (154.4% \pm 13.0%, p <0.05) in Group 1 but not seen in Group 2 and 3. The effects of OPN on fertilizing capacity were evaluated by *in vitro* migration test, sperm penetration assay, acrosomal reaction, and mouse *in vitro* fertilization test. The result showed that the capability of sperm migration (1.5% \pm 0.2% vs. 6.3% \pm 1.5%, p <0.05), sperm penetration number (1.4% \pm 0.1 spermatozoa vs. 2.3% \pm 0.1 spermatozoa, p <0.05), and *in vitro* fertilization rate (62.0% \pm 3.6% vs. 78.0% \pm 2.1%, p <0.05) was enhanced by OPN. However, there was no difference in terms of acrosomal reaction followed by OPN treatment. In addition, the distribution of actin, tubulin and spectrin was determined by immunofluorescent analysis. Sperm actin and tubulin increased display, but not in spectrin. In conclusion, OPN plays an important role in the regulation of sperm motility and fertilizing capacity.

key words : motility, fertilization ,osteopontin , *in vitro* fertilization.

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
目 錄	5
圖表目次.....	9
縮 寫 表.....	12
第一章 緒論	14
第一節 研究背景	14
一、不孕現況	
二、精子異常之原因	
三、現今提高游動力之方法	
第二節 研究動機	19
第三節 研究目的	20
第二章 文獻探討	21
第一節 精卵受精的機制	22
一、精子的構造	
二、受精的發生	
三、受精的過程	

四、實驗室評估男性精子之檢查項目

五、受精失敗的原因

六、參與精子受精能力之分子標識

第二節 OPN 的生化特性..... 30

一、OPN 的發現

二、OPN 的結構

三、OPN 的生理功能

四、OPN 在生殖系統中之表現

五、OPN 在受精時扮演之角色

六、OPN 對精子的作用

第三章 研究方法..... 36

第一節、實驗設計..... 37

一、研究目的(一)

探討 OPN 於精液中之表現情形

二、研究目的(二)

分析 OPN 於精子中之表現情形

三、研究目的(三)

觀察添加 OPN 後對精子游動力之影響

四、研究目的(四)

探討 OPN 對於精子受孕能力之影響

五、研究目的(五)

探討 OPN 提高精子受孕能力之機制

第二節、實驗方法與材料..... 39

一、精液收集

二、精液分析檢查

三、西方墨點法(Western Blot)分析 OPN 蛋白表現亮

四、以 OPN 處理精子觀察對精子生理活性的影響

1. 精子穿透力試驗

2. 精子移動至卵子能力測定

3. 頂體反應試驗

4. 老鼠體外受精試驗

5. 精子細胞骨架之螢光免液染色

五、統計方法

六、病人權利之保護

第四章 實驗結果..... 46

第五章	討論.....	52
第六章	圖表.....	58
第七章	參考文獻.....	93



表目錄

Table. 1	電腦輔助分析儀之各項精子運動參數定義	59
Table. 2	精液分析結果	60
Table. 3	HTF 之組成成分	61
Table. 4	分析 OPN 添加對精子各項參數的影響	62



圖目錄

Fig. 1	頂體反應	63
Fig. 2	CASA 運動參數分析圖	64
Fig. 3	OPN 的結構	65
Fig. 4	OPN 的功能性結構	66
Fig. 5	實驗設計流程	67
Fig. 6	老鼠精子穿透力試驗(Sperm penetration assay ; SPA)之實驗過程	68
Fig. 7	精子移動能力試驗裝置圖	69
Fig. 8	精子頂體化試驗(acrosomal reaction)	70
Fig. 9	老鼠體外受精試驗(mouse <i>in vitro</i> fertilization assay)	71
Fig. 10	Western Blot 分析 OPN 於精液中之表現情形	72
Fig. 11	以 Western Blot 測定精液中 OPN 之含量	73
Fig. 12	OPN 對精子游動力之影響	74
Fig. 13	OPN 對精子 Progressive motility 之影響	75
Fig. 14	OPN 對精子 VCL(curvilinear velocity)之影響	76
Fig. 15	OPN 對精子 LIN(linearity)之影響	77
Fig. 16	OPN 對精子 STR(straightness)之影響	78
Fig. 17	OPN 對精子 BCF(beat-cross frequency)之影響	79
Fig. 18	OPN 對精子 VAP(velocity average path)之影響	80
Fig. 19	OPN 對精子 ALH(amplitude of lateral head displacement)之影響	81
Fig. 20	OPN 對精子 VSL(velocity straight line)之影響	82
Fig. 21	OPN 對精子 WOB(wobble)之影響	83

Fig. 22	評估 OPN 對精子移行結果並對老鼠精子移動力之影響	84
Fig. 23	老鼠精子穿透力試驗之結果(Sperm penetration assay ; SPA)	85
Fig. 24	OPN 對老鼠精子穿透卵子透明帶之影響	86
Fig. 25	OPN 對老鼠精子頂體反應試驗(Acrosomal reaction assay)之影響	87
Fig. 26	OPN 對老鼠體外授精之影響	88
Fig. 27	於 200 倍顯微鏡下，觀察精子表現 OPN 之位置	89
Fig. 28	以共軛焦顯微鏡，觀察精子細胞 OPN 之位置(localization)	90
Fig. 29	免疫螢光染色-Actin、 α -tubulin 與 spectrin	91
Fig. 30	實驗結果圖	92

縮寫表

AKAPs	A-kinase anchoring proteins
ALH	Lateral head displacement
BCF	Beat cross frequency
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine mono phosphate
CASA	Computer-assisted sperm analysis
ECM	Extracellular matrix
GAG	Glycosoaminoglycan
hCG	Human chorionic gonadotropin
ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
IVF	<i>In vitro</i> fertilization
LIN	Linearity
OPN	Osteopontin
PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin
ROS	Reactive oxygen species
sAC	Soluble adenylate cyclase
SIBLING family	Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein family
SPA	Sperm penetration assay
SPP1	Secreted phosphoprotein I
VAP	Velocity average path
VSL	Velocity straight line

第一章 緒論



第一章 緒論

第一節、研究背景

一、不孕現況

1978年英國劍橋大學實驗室將人類精子與卵子取出體外，受精後再植入子宮中，成功的生下第一例試管嬰兒。Louise 開啟了生命也可於子宮外的環境培育之新紀元。人工生殖發展至今已接近三十年，至少有 1% 的出生來自於人工生殖的治療，而目前全球約有超過一百萬的試管嬰兒(Sutcliffe and Ludwig, 2007)。

近年來不孕人口比率日漸增高，根據世界衛生組織(WHO)估計全球約有百分之八到十的夫妻不孕，而在台灣每 100 對夫妻約有 10-15 對不孕。這些尋求生殖技術協助的不孕夫婦之中，約 90% 的原因可查知，其中女性因素佔 50%，包括排卵障礙、輸卵管阻塞、子宮內膜異位、子宮頸及子宮問題等；而男性因素佔 30%，包括精子的游動力、數量與受精的能力等。共同因素佔 20%，另外還有 10% 原因不明。並有統計指出約有 4-17% 之不孕夫婦會尋求人工生殖技術的協助(Gnoth *et al.*, 2005; Templeton, 2000)，而這之中約有 3-4% 的人最後仍然無法成功如願擁有小孩(Bhasin *et al.*, 1994)。

二、精子異常之原因

在男性不孕症方面，其中因精子異常而造成之男性不孕，約有 15-20%

之男性為無精症(Bhasin *et al.*, 1994), 而有 10%之男性每毫升精子數量少於 1×10^6 隻, 另外有 40-60%之原因不明, 其中大部分為自發性之寡精症(idiopathic oligozoospermia)(Forti and Krausz, 1998)。這些不孕之男性中約有 10-30%患有精索靜脈張(varicoceles), 但其造成的原因至今仍不清楚(Ficarra *et al.*, 2006)。除此之外基因異常也會引起精子生成的障礙, 如先天性睪丸發育不全綜合症(Klinefelter syndrome)以及 Y 染色體長臂微缺失(Y chromosome AZF microdeletions) 約佔 10-20% (Chandley, 1979); 而抗精蟲抗體在不孕男性也較一般正常男性為多, 亦為男性不孕之原因之一(Mazumdar and Levine, 1998)。

三、現今提高精子游動力之方法

除了人工生殖技術中, 單一精蟲顯微注射(Intracytoplasmic Sperm Injection 簡稱 ICSI), 已被廣泛應用在男性不孕症的治療外, 目前也有許多針對各種造成精子異常原因, 而發展出各種提高精子活力之方法。

1. 濾泡液(Follicular fluid)

濾泡液中含有許多可以提高精子效能的物質, 如氨基葡聚醣(glycosoaminoglycan, GAG)、血小板活化因子(platelet activating factor)、血清蛋白(serum albumin)、以及可增加細胞內環單磷酸腺苷(cyclic adenosine mono phosphate (cyclic AMP)含量之磷酸二酯酶抑

制劑(phosphodiesterase inhibitors)等物質。因此濾泡液可以增加精子的游動力(motility)、活能化(capacitation)與頂體反應(acrosomal reaction)之能力，對於精子穿透力與受精率也有提升(Meizel, 1985; Ravnik *et al.*, 1990; Yee and Cummings, 1988; Yudin *et al.*, 1988)。另外有學者證實濾泡液可以促使精子的過動化現象(hyperactivation)，研究中發現加入濾泡液之精子其過動化現象較原先提高了三倍(Mbizvo *et al.*, 1990)。

2. 黃體素(Progesterone)

精子在極短時間的黃體素刺激下，可提高細胞內鈣離子(cytosolic Ca^{2+})的含量並誘發精子的頂體化反應(Minhas *et al.*, 1996)。由於黃體素可與活能化後的精子尾巴上的細胞膜上的接受器結合，使細胞膜內外的電位差改變，造成細胞外鈣離子流入細胞內，造成精子尾巴軸絲上的肌動蛋白(dynein)收縮，而引起強烈的鞭毛運動(Blackmore *et al.*, 1990)。黃體素所引發的精子過動現象使精子得以掙開輸卵管峽部細胞(Blackmore *et al.*, 1990)的束縛和穿過圍繞卵子的卵丘細胞間質進入卵子透明帶完成受精。

3. 血小板活化因子(Platelet Activating Factor)

血小板活化因子為精子內生性之組成因子(Kumar *et al.*, 1988;

Kuzan et al., 1990; Minhas *et al.*, 1991; Parks *et al.*, 1990), 其可增加精子移動能力與活能化能力, 使得精子穿透子宮頸黏液之能力以及穿透卵子能力提高(Minhas, 1993; Sengoku *et al.*, 1993), 並有研究指出精子在黃體素(1mg/ml)的刺激下, 15 分鐘後會使得血小板活化因子增加, 而提高受精能力(Minhas *et al.*, 1993)。

4. 細胞激素(Cytokines)

身體的免疫細胞對外來的刺激, 會分泌一些像內分泌素一樣的物质, 我們稱為細胞素細胞激素。在男性生殖器包括睪丸、副睪丸、輸精管、精囊及攝護腺都有免疫細胞存在, 這些器官受到外物入侵像細菌感染時其內的免疫細胞會分泌一些細胞素像「阿發腫瘤壞死因子」(TNF- α), 及干擾素來殺死細菌病毒, 但這些細胞素也會直接或間接影響精子的游動力, 以及穿透卵子的能力(Anderson and Hill, 1988)。另外一種細胞素叫介白素-6 (Interleukin-6) 會刺激中性白血球產生活性氧化物, 間接促使精子游動力下降(Naz and Kaplan, 1994; Yamamoto and Miyake, 1994), 不過也有研究在體外培養精子加入 IL-6 可誘導精子頂體酶及超氧化物歧化酶(SOD)的活性, 促進精子頂體反應(Naz and Kumar, 1991)。

5. 己酮可可鹼(Pentoxifylline)

Pentoxifylline 為甲基黃嘌呤鹼類 (methylxanthine) 之衍生物，可抑制 cAMP 的代謝，增加精子的游動力(Sikka and Hellstrom, 1991)。因此在精子中加入了 Pentoxifylline(1mg/ml)可提高精子活能化與頂體化的能力。



第二節、研究動機

現今不孕症已經成為一個世界性難題。據 WHO 世界衛生組織估計，目前世界上大約有 800 多萬對不孕夫婦，而引起的原因，其中男性、女性的因素大約各占一半。傳統中用以診斷男性不孕因素，通常以精子數量和游動力作依據，但仍有許多不明的原因。這些不明原因目前常以下列各種檢測來探討可能的因素，包括精子穿透卵子能力(penetration)、精子的活能化與頂體化反應，以及較少被提出探討的精子移動至卵子的能力(chemotaxis)。精子必須要有能力與卵子相遇，兩者才能展開一連串的相互作用，而達到受精的目的。精子進入女性生殖道後，中間經過曲折迂迴的路徑與卵子相遇，一般而言精子平均身長約為 60 μm ，而子宮腔之總長度長達 70-80 mm，並且在進入輸卵管後還須經過 50-80 mm 的路程才能遇見卵子，這相對於精子的大小，是一段很長的路。因此最後精子順利到達輸卵管之數量僅占射精時總量的 0.004%，即 25,000 隻約只有一隻精子可以順利到達輸卵管與卵子會合(Eisenbach and Tur-Kaspa, 1999)，進行受精。因此關於男性不孕因素，包括精子數量、游動力與生命力外，頂體反應，精子穿透卵子的能力，以及精子移動的潛力都是必須要深入探討的部份。

骨橋蛋白 Osteopontin(簡稱 OPN)，為一酸性之細胞外間質蛋白，屬

於 small integrin binding ligand N-linked glycoprotein 家族(SIBLING family)(Johnson *et al.*, 2003)。有研究分析在受精後的第三天 OPN 存在於輸卵管壺腹部並分泌至輸卵管中，同時發現 OPN 也會由許多男性生殖道細胞所分泌(Cancel *et al.*, 1999; Siiteri *et al.*, 1995)。另外 OPN 在公牛的生殖道中製造，免疫螢光染色下觀察到於睪丸副睪與精子中皆有存在(Cancel *et al.*, 1999)。2006 年 Hao 等人發現同樣的在公豬之生殖道中也會製造 OPN，並且在輸卵管中也有存在，輸卵管為精子與卵子受精之地點，因此深入探討 OPN 與受精能力之關係。研究結果提出了 OPN 之含量與精卵膜融合的能力有關，並且再加入特定濃度的 OPN 於精子中，確實有幫助提高受精的作用(Hao *et al.*, 2006)。

第三節、研究目的

本研究針對 OPN 對人類精子在受精能力上之影響，探討其可能作用的機制。進一步的研究是否可以利用培養液的添加，提高精子與卵子的受精能力，解決更多因男性因素引起的不孕問題，此為本篇之研究目標。



第二章 文獻探討

第二章 文獻探討

第一節、精卵受精的機制

一、精子的構造

人類精子在射精之後自陰道經由子宮頸口進入子宮中，於子宮與輸卵管交接處與卵子相遇，就此時發生了奧妙的精卵結合。

精子與卵子的結合非常奧妙，精子是由位於睪丸的精母細胞分化並經過兩次減數分裂而成。精子是人體中最小的細胞，構造主要包括頭部、中段與尾巴三部分。依 1999 年世界衛生組織(WHO)定義之標準，精子的頭部長度約 4.0 至 5.5 μm ，寬為 2.5 至 3.5 μm ；中段部分約為 7.5 至 9 μm ；尾部則有 45 μm 長。精子的頭部由含有 DNA 的細胞核及少量的細胞質所組成，在頭部前端有一帽狀的頂體區(acrosome) 正常約佔頭部 40~70%，內含多種溶解酶，可協助精子穿入卵子的外壁(Lindemann *et al.*, 1992; Mayorga *et al.*, 2007)。精子的尾部含有排列整齊的微管(microtubules)可以造成彎曲而產生類似鞭毛的運動促使精子游動至輸卵管與卵子相遇。在受精時所需要的能量是由中節(mid-piece)的粒線體供應，中節為精子的頭部與尾巴間有一段很短的部分，功能上屬精子尾巴的一部分，內有微管(microtubules)，此段的微管為整條尾巴軸絲的起始部，外有粒線體包圍。粒線體是精子能量的來源，可製造出腺苷三磷

酸(ATP)，ATP 能量傳遞至整條軸絲可引起精子尾巴的擺動(Lindemann *et al.*, 1992)。

二、受精的發生

包圍在精子外面的細胞膜，在精卵受精過程中扮演很重要的角色。細胞膜又稱原生質膜，是包圍在細胞細胞質外的脂質雙層液狀結構，其上面含有一些醣類和蛋白質，這些醣類和蛋白質附在細胞的表面或嵌在其中，稱為接受器(receptor)。位於精子頭部頂體前方的細胞膜上的蛋白質和精子認識卵子及引發頂體反應有關，此處的細胞膜我們稱前頂點體區細胞膜，覆蓋在頭部非頂體區的細胞膜我們稱為後頂體區細胞膜。在前頂體區細胞膜和後頂體區細胞膜間的細胞膜稱為赤道區細胞膜，赤道區細胞膜上有與卵膜融合的融合蛋白(Kaji and Kudo, 2004)。

當獲能之精子與卵子相遇時，精子頂體的前膜即與表面的細胞膜融合，並且形成許多小孔，將頂體內含的酶（acrosine）逐漸釋放出來，而這種變化為頂體反應(acrosomal reaction) (Fig. 1)。釋放的頂體酶先解離卵子周圍旁之放射冠的卵丘細胞，繼而分解透明帶(zona pellucida)，形成一個精子穿過的通道，精子則與卵子直接接觸，此為受精的開始(Kaji and Kudo, 2004)。

三、受精的過程

1. 活能化作用(Capacitation)

在副睪中成熟的精子雖然會游動，但仍無受精能力。當精子到達輸卵管峽部時會進行「活能化」作用，此時由於接近排卵時期，輸卵管峽部管腔上皮細胞會分泌含鉀離子高的分泌物，由於其液體黏稠，再加上鉀離子會降低精子的游動速度，如此環境下使得精子暫時停留於此處，並進行活能化作用(Mbizvo *et al.*, 1990; Yee and Cummings, 1988)。此時精子細胞膜上的保護物質如膽固醇等含量將減少，促使細胞膜上的接受器暴露出來，如此精子經過這一過程後才會具有受精能力。

2. 過動化現象(Hyperactivation)

過動化現象為已經完成活能化的精子，當卵巢排卵時，成熟濾泡破裂，釋放出卵子及濾泡液，其中濾泡液含有黃體素等物質，會促使這些精子做激烈的抽鞭式擺動，使精子掙脫輸卵管峽部的束縛游向壺部，並穿透卵子周圍的卵丘細胞，此時稱為精子的過動現象(Mbizvo *et al.*, 1990)。1969年 Yanagimachi 博士首先發現倉鼠的精子在卵泡液培養一段時間之後，精子的尾巴會發生狂暴式，抽鞭式的三度空間擺動，而精子的頭部左右擺動的幅度也會增大，此時精子由直線前進的方式改成8字型的前進方式，因此稱這種運動方式為過動現象(Mbizvo *et al.*, 1990)。過去有研究發現人類的精子也有過動現象，當濾泡液中的黃體

素與精子尾部細胞膜上的接受器結合後，造成細胞膜內外電位差改變，使鈣離子進入膜內，此時造成精子尾巴軸絲的肌動蛋白(dynein)收縮，而引起強烈的鞭毛運動(Jouannet and Serres, 1998; Kulin *et al.*, 1994)。

3. 頂體反應(Acrosomal reaction)

頂體(acrosome)位於精子的頭部，被膜包住的構造，裡面含有許多水解酶(hydrolyzing enzyme)主要為 hyaluronidase 和 acrosin。當精子穿透卵子周圍的細胞後，接觸卵子的透明帶時，精子頭部之外頂體膜(outer acrosomal membrane)和細胞膜多點癒合，而造成膜破裂，繼而釋放出頂體酶，這過程稱為頂體反應(acrosome reaction)。當頂體囊會崩解釋出裡面的酵素，加上精子強烈的抽鞭式擺動，使精子終於能穿過透明帶完成受精(Primakoff and Myles, 2002)。

4. 精子通過女性生殖道之能力

除了精子必須發生的活能化及頂體反應為受精的重要過程，精子移動到輸卵管的能力以及遇到卵子是否仍保有受精能力也是關鍵因素(Suarez and Pacey, 2006)。在自然受精的過程，自陰道或子宮頸進入之精子須經過長途跋涉才能到達輸卵管與卵子相遇，而完成受精之使命。精子移動的力量主要來自精子尾部的擺動，以及藉由生殖道內膜的蠕動將精子推向輸卵管兩種方式(Fukuda and Fukuda, 1994)。一般而言精子

平均游動速率約 5mm/min，因此估計精子通過子宮約需時 10 分鐘。過去有學者探討射精後精子於子宮中之游動情形，發現在正常情況下將精子植入子宮後，5 分鐘後於輸卵管之壺腹部可發現精子，並且於 10 分鐘後精子將充滿整條輸卵管(Settlage *et al.*, 1973)。

四、實驗室評估男性精子之檢查項目

許多臨床醫師與研究學者不斷在嘗試找尋精液與精子品質之標準值，以定義“可生育之族群”，目前歐洲與美國之學會已提出實驗室中用以評估男性生育能力之檢查項目。

1. 初步評估

精液的特性之檢查，包括精液的容積、酸鹼值、黏稠度(viscosity)、以及是否有凝集現象(agglutination)。而精子的數量、游動力、型態、與其他血球細胞之數量(包括紅血球、白血球或其他細胞)與抗精蟲抗體(antisperm antibodies)的檢測等都為基本之檢測項目；除此之外仍可以精子的染色(vital dyes)或滲透壓試驗(hypo-osmotic swelling test)皆可用來評估精子的活力(Oehninger, 2001)。

2. 進階評估

精子功能性的評估，包括精子穿透力試驗(sperm-zona pellucida binding tests)、頂體反應試驗(acrosome reaction)，以及利用電腦輔助分

析系統(computer-assisted sperm analysis, CASA)(Vizcarra and Ford, 2006)性、各種酵素之含量，以及利用精子染色質結構分析(SCSA)評估精子DNA的完整性等(Parvinen *et al.*, 1997)。

3. 電腦輔助精子分析系統(Computer-assisted sperm analysis, CASA)

CASA 分析儀首先使用於 1980 年，使精液分析的檢查更趨於簡單便利，可惜當時 CASA 計算出之結果並不精準(Mortimer and Mortimer, 1988)。為了使 CASA 成為一個可信賴之分析精液的工具，歐洲生殖醫學會(ESHRE)中之男性學學者，制訂了一套標準值，從此 CASA 成為一個具公信力之精液評估方法。不僅利用電腦快速計算精子的活動速度，並且具有大量儲存空間以記錄精子活動之影像，同時利用 CASA 之分析，可以減少利用顯微鏡目測評估之出錯率。CASA 是利用於單位時間大量紀錄精子細胞游動軌跡，約一秒鐘紀錄 20 個位移紀錄。當分析精子的速率，CASA 分析了三種精子運動的特性，包括 velocity average path (VAP), velocity straight line (VSL)與 curvilinear velocity (VCL)。VCL 測量精子頭部移動之行徑路程，此為三個參數值中最大的；VSL 移動之直線距離，為三個數值中最小的，另外還有 VAP，則是計算同方向之行徑路程。另一個有用的測量值為 beat cross frequency (BCF)，計算過程中精子頭部擺

動與 average path 交叉的次數。藉由 BCF 的數值可計算精子尾巴改變拍打方式的次數。Lateral head displacement(ALH)為精子頭部擺動的振幅；Linearity (LIN) 則是分別計算 VSL 與 VCL 後，再將 VSL 除以 VCL，成為直線前進之比率(Table 1)(Fig. 2)。

過去有許多研究利用 CASA 之方法分析各種物種精子之游動力，包括老鼠(Moore and Akhondi, 1996)、公牛(Hoflack *et al.*, 2007)、公豬(Holt *et al.*, 1997)、兔子(Farrell *et al.*, 1993)、火雞(Bakst and Cecil, 1992)，以及人類(Barlow *et al.*, 1991; Holt *et al.*, 1985; Macleod and Irvine, 1995)。在老鼠中，發現 VSL 與精子卵子之體外授精之能力有關(Moore and Akhondi, 1996)；在公牛中也發現，VSL 與懷孕子代數目有關(Holt *et al.*, 1997)。而在人類精子中，研究發現 VSL 數值與男性生孕能力相關(Garton and Reid, 1993; Liu *et al.*, 1991; Wainer *et al.*, 1996)。在新鮮的公牛(Vizcarra and Ford, 2006)與火雞(King *et al.*, 2000)精液中，發現 CASA 結果中之 VAP、VCL、VSL、以及 BCF 數值與精子之運動性有關，代表了這些參數足以做為代表高運動性之精子游動速度較低運動性精子快之指標。此外，文獻指出 BCF 與 sperm 穿透卵細胞的能力有關，亦為精子穿透力的指標(Larsen *et al.*, 2000)。

4. 基因診斷

檢測精子基因之染色體型(Karyotype)、Y 染色體是之微小片段缺失(microdeletions of Y chromosome)，以及囊性纖維症(cystic fibrosis mutations)(Van Steirteghem *et al.*, 1999)。

五、受精失敗的原因

一般而言，受精失敗的原因可能為精子或卵子的缺陷或品質不佳，或培養環境的原因導致。有研究指出，在受精失敗的情況下，若改以捐贈之正常精子再行授精，大部分皆可以獲得改善，因此受精失敗仍以精子為主要原因(Liu and Baker, 2000)。因此受精失敗的原因與精液的參數值較有關係，包括精子游動力、型態、精子與卵子之結合力、以及頂體化反應，而與女性之卵子數目與女性年紀較無相關。

在進行人工生殖技術下，多數出現精子與卵子之結合失敗，其中包括了精子與卵子的結合問題與精子穿透卵子兩方面。若做精子結合力試驗(sperm-zona pellucid binding assay)，當結合力小於 25%，其受精率約為 20%，若大於 50%，則可正常受精(Liu *et al.*, 1989)。精子與卵子的結合會引發頂體反應，但在正常精液分析與正常結合力的精子中，也可能出現未進行頂體反應。據統計進行頂體反應之精子若佔全部精子之 16% 以上，則受精率可高於 60%，否則受精率將低於 30%(Liu *et al.*, 2001)。

六、參與精子受精能力之分子標識

依照 WHO 的標準卻很難做為評估精子受精能力的依據，因此許多研究提出可做為評估精子受精能力之分子標誌(Barlow et al., 1991)。在精子之受孕能力中，如精子的活能化作用，其參與的分子包括鈣離子與酪胺酸之磷酸化(tyrosine phosphorylation)；精子游動力，與粒線體氧化磷酸化(mitochondrial oxidative phosphorylation)與 soluble adenylate cyclase，(sAC)activity 之分子參與；而在精子過動化，則是與 sAC activity、A-kinase anchoring proteins (AKAPs) tyrosine phosphorylation 等分子相關。另外在精子與卵子的交互關係過程中，精子對卵子的趨化性，是與 chemokine receptors 之分子有關；精子與卵子的融合作用，最近有研究提出與 Izumo、CRISPs 相關；精子之頂體化作用參與之分子有 calcium 及 acrosine。除此之外，如 DNA fragmentation、Sperm ubiquitination、M540 bodies、Oxidative stress、PS exposure 等分子，亦是與精子受孕相關之分子標誌(Muratori *et al.*, 2008)。

第二節、OPN 的生化特性

一、OPN 的發現

Osteopontin 骨橋蛋白，簡稱 OPN (Fig. 3)。1987 年首先發現，其源

自於骨中的酸性醣蛋白且分布於許多組織中(Cancel *et al.*, 1999)，最初發現於骨頭、牙齒與軟骨(Franzen and Heinegard, 1985)以及上皮細胞，並於腸胃道、腎臟、腦、血管、骨髓中之腺體細胞、內耳神經細胞、滋養細胞、絨毛膜細胞、子宮蛻膜細胞中亦有發現。另外在唾腺、汗腺、膽囊與胰管之上皮細胞，以及巨噬細胞、淋巴球都有 OPN 之存在(Ashkar *et al.*, 2000; Hotte *et al.*, 2002; Malyankar *et al.*, 2000)。除此之外，OPN 也會分泌至身體各處體液中，包括血液、乳汁、尿液、精液等，而當惡性腫瘤細胞存在時，也會使得巨噬細胞及淋巴球細胞分泌 OPN，因此 OPN 同時具有生理性與病理性之意義(Senger *et al.*, 1989)。

二、OPN 的結構

目前研究已找出小鼠、大鼠、豬、牛、雞和人的 OPN cDNA 和基因(Denhardt and Guo, 1993)。而人類和大鼠的 OPN 氨基酸序列有 65% 的同源性，而大鼠和小鼠的 OPN 氨基酸序列有 86% 的同源性。OPN 是一個單體 (monomer) 從氨基酸 264 到 301 的長度，但由於 RNA 的轉譯後修飾 (post-translational modification) 之磷酸化、醣化作用 (glycosylation) 以及硫酸化 (Sulfation) 之蛋白水解程度的不同而以多種形式存在(Sodek *et al.*, 2000)。

OPN 為分泌型之磷酸化蛋白，因此亦被稱為 secreted phosphoprotein

I (SPP1) 蛋白。其結構中之一端為聚天氫氨酸片段(polyaspartic acid sequences)，為高親水性的分子，以及 Ser/Thr 磷酸化之另一端與鈣質相結合。並含有 arginine - glycine - aspartate (GRGDS 或 RGD)之結構。OPN 屬於細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 分子，經由 thrombin 切割後，可釋放出兩個與 integrin 結合的部位分別為 RGD 序列及 RSK 序列 (Fig. 4)。

OPN 在人類是位於第 4 對染色體 4q13 處，包含 7 個 exons，全長 11.1kbp；不僅在人類，在其他的物種上，包括老鼠之 OPN 位在第 5 對染色體上；而豬則是位在第 8 對染色體(Sodek *et al.*, 2000)。最初合成的 OPN 是一個以 34kD 片段基因重複組成的蛋白，長約 264 至 301 個胺基酸，經由各種轉譯後之修飾作用，包括磷酸化、糖化及酵素的切割形成具有功能的蛋白，形成各種不同大小之蛋白，主要界於 25kD 至 75kD 分子量之間，並且於各種不同的組織中具有不同的功能(Prince *et al.*, 1987)。

三、OPN 的生理功能

雖然現今 OPN 的真正功能仍未明確，但依照其具有的分子結構特性，如 RGD 片段區，凝血裂解酶位置、聚天氫氨酸片段、以及 serine/threonine 磷酸化位置，來推測其具有之功能。

1. 調節磷酸鈣(calcium phosphate)及草酸結晶質(oxalate crystals)之生成

依照 OPN 之表現位置與礦物結晶的形成得知 OPN 在骨頭礦化作用(mineralization)過程中扮演重要角色(Kohri *et al.*, 1993; Shiraga *et al.*, 1992)。

2. 經由與細胞內之 integrin 接受器與細胞產生黏附作用

OPN 之所以有黏附的作用，因其具有一重要保留區(conserved motifs) RGD 片段，富含 aspartic、glutamic acid 及 serine，利用此片段可與 integrin 相接合，做為細胞黏合與訊息傳遞的功能。當它與細胞膜上的 $\alpha V\beta 3$ 接合後，會引起細胞內的 Ca^{2+} 增加使得細胞增生、細胞骨架重組，以及使細胞移動(Denhardt and Guo, 1993; Denhardt and Noda, 1998)。

3. 參與細胞內訊息傳遞作用

OPN 可於內皮細胞中活化 NF κ B，並經由 Bcl-x 抑制 pro-caspase 之活性，進而維持細胞的完整性，計而抑制細胞凋零作用 (Stromblad *et al.*, 1996)。

4. 促進免疫細胞、骨母細胞、腫瘤細胞之轉移

除了 integrin 外 OPN 亦可與細胞內之 CD44 之接受器接合，CD44 存在於免疫細胞之表面，包括骨髓細胞、淋巴細胞、以及巨噬細胞。

然而 CD44 同時也表現在骨母細胞、纖維母細胞、平滑肌細胞、以及上皮細胞與內皮細胞上(Weber and Cantor, 1996)，而 CD44 以可經由 integrin β 1 的作用下促使細胞的移動以及趨化作用，因此 OPN 具有調節細胞移行能力以及影響腫瘤的轉移(Katagiri *et al.*, 1999)。

5. 減少受傷組織產生氧化自由基及一氧化氮，以降低細胞之死亡

OPN 的表現會抑制巨噬細胞產生氧化自由基(reactive oxygen species, ROS)(Weber and Cantor, 1996)，以及抑制誘導型之一氧化氮產生(Rollo *et al.*, 1996)因而降低細胞毒性產生，減少細胞死亡。

四、OPN 在生殖系統中之表現

1992 年 Brown 提出 OPN 存在於人類許多部位之管腔上皮細胞，包括腸道、膽囊、胰臟、尿道、肺臟、氣管、唾腺與汗腺，除此之外，生殖道中也具有 OPN 之表現，並扮演重要角色(Cancel *et al.*, 1999)。

OPN 起初被發現存在於人類的前列腺以及睪丸的上皮細胞中(Cancel *et al.*, 1999)，在兔子中，除了睪丸與副睪的組織中也有 OPN 的表現，在副睪的體液中與副睪中分離出的精子均有 OPN 之蛋白表現。更進一步做螢光免疫分析出 OPN 於精子的尾部表現，屬於細胞表面分子(Siiteri *et al.*, 1995)。1999 年 Aida 等人研究 OPN 在公牛的生殖道中之表現情形，意外在 Western blotting 的結果中發現 OPN 於睪丸、副睪

組織、輸精管，與前列腺中並無表現，而存在於精漿中。推測其原因可能為物種的不同使得 OPN 之表現位置不同，也有可能因其所偵測的 OPN 抗體分子量不同而造成結果的不同。OPN 會經由後轉譯之修飾作用，產生不同大小的分子片段，因此會使的不同的物種有不同大小的分子片段(Cancel *et al.*, 1999)。

五、OPN 在受精時扮演之角色

OPN 同時存在於女性與男性之生殖道中，加上具有細胞黏附的功能，因此在 2008 年 Carlos 等人(Souza *et al.*, 2008)探討 OPN 與受精作用之關係。精卵的受精開始於精子與卵子的接合(sperm-oocyte binding)、頂體反應，最後為精子與卵的融合，以完成受精過程。在牛的精子中，OPN 主要存在於頂體帽區(acrosome cap)，若是與輸卵管峽部液(isthmic oviducal fluid)作培養，結果發現在 4 小時後，OPN 轉至後赤道區(post-equatorial segment)表現。OPN 會藉由與 integrin 與 CD44 結合，當精子剛射出時，OPN 表現在於精子頭部，這會促使著精子與卵子的靠近與接合，接合後當精子受到輸卵管液的刺激，會使得 OPN 由精子的頭部移至後赤道區表現，如此，利用與 integrin 或 CD44 的接合，使精子融合進入卵子中。另外將 OPN 的抗體加入培養液中，會使得精子與卵子的受精率降低，如此證明了 OPN 確實與精卵的受精有關(Souza *et al.*, 2008)。

六、OPN 對精子的作用

OPN 不僅在受精時扮演重要功能，對於精子受孕能力也具有相當的影響。有研究提出在豬的精子中，加入特定濃度的 OPN 於精子中，確實有幫助提高受精的作用(Hao et al., 2006; Souza et al., 2008)。而本研究將探討 OPN 對精子的調控與影響，我們將針對精子游動力、精子的穿透實驗、頂體反應等試驗.對於最後的受精作用有何變化。



第三章 研究方法



第三章 研究方法

第一節、實驗設計(Fig. 5)

一、 研究目的(一)：探討 OPN 於精液中之表現情形

實驗設計：利用西方墨點法(Western blot)分析精液中 OPN 蛋白之表現情形。

二、 研究目的(二)：分析 OPN 於精子中之表現情形。

實驗設計：

1. 利用西方墨點法(Western blot)分析精子中 OPN 蛋白之表現量。
2. 分別探討各等級游動力之精子其 OPN 之表現情形。
3. 利用免疫螢光分析法，觀察 OPN 於精子中表現之位置。

三、 研究目的(三)：觀察添加 OPN 後，對於精子游動力之影響

實驗設計：利用電腦輔助精子分析儀(CASA)分析加入 0.1 μ M OPN 後對於各等級游動力之精子游動力及各項運動參數之影響。

四、 研究目的(四)：探討 OPN 對於精子受孕能力之影響

實驗設計：評估精子受孕能力試驗

1. 精子移動至卵子之能力測定(*In vitro* migration patterns assay)
2. 精子穿透卵子試驗(Sperm penetration assay ; SPA)
3. 精子之頂體反應(Acrosome reaction assay)
4. 體外受精試驗(*In vitro* fertilization assay)

五、 研究目的(五)：探討 OPN 提高精子受孕能力之機制

實驗設計： 精子細胞骨架蛋白(cytoskeleton)之免疫螢光染色，包括 actin、 spectrin 與 α -tubulin。

第二節、實驗方法與材料

一、精液收集

本研究之男性精子來源為醫學中心門診病人，檢體依照游動力 Grade3 與 Grade4 總和所佔之比率，將檢體區分為低(0-30%)、中(31-60%)、高游動力之精子。Grade3 與 Grade4 之精子佔全部之 30% 以下列為低游動力組，稱為 Group 1；介於 31-60%則為中游動力組，稱為 Group 2；而高於 60%則屬游動力佳之高游動力組，稱為 Group 3(Table.2)。

二、精液分析檢查

收集禁慾 3-5 天之新鮮精液，靜置 20 分鐘後，待其完全液化。取 5 μ l 之精液置於 Makler chamber 上，並在 37°C 之加熱平台，以輔助精子分析儀 (CASA ; IVOS 10.7s, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA)。影像之擷取於 20 倍顯微鏡下，隨機抽選四個視野下做分析；CASA 之分析於每一個視野下連續擷取 64 張影像，並且至少分析 100 之精子。

CASA 對精子運動參數進行分析。包括精子游動力與各項運動參數，如曲線速度 VCL(μ m/sec)、直線速率 VSL(μ m/sec)、平均路徑速率 VAP(μ m/sec)、直線前進 LIN(%)、前向性 STR(%)、頭部擺

動振幅 ALH(μm)、搏動頻率 BCF(%)以及擺動性 WOB(%)。其中 VSL、VAP 代表精子前進指標，而 VCL 則代表精子活力指標。

三、西方墨點法(Western Blot)分析 OPN 蛋白表現量

收集病人之精液，分析其精子濃度與游動力，包括 Grade 3、Grade 4 與 progressive motility 所佔的比率。並將精子以 600 x g，10 min 離心分離。並將收集到的精子以 PBS 清洗 2 次。利用 Western blot 分析各檢體中精液與精子中所含之 OPN 量。

Western blot 利用 SDS-PAGE 於室溫中將蛋白分離，利用 Milliblot semi-dry transfer system (Millipore, Bedford, MA) 於 25 V 下 30 分鐘轉漬至 nitrocellulose paper (Trans-Blot Transfer Medium; Bio-Rad)上。再利用 Ponceau S (0.5% Ponceau S, 1% acetic acid)染色後以 PBS solution containing 0.1% Tween 20 及 5% BSA 於 4°C 隔夜。隔日加入 primary antibody (以 1:1000 的 PBS 稀釋，加入 0.1% Tween 20 及 1% BSA) 於 PBS-Tween 20 含 1%羊血清中(goat serum)清洗 30 分鐘。之後加入 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10000 以 PBS 稀釋，含 0.1% Tween 20，1% BSA)作用 2 小時，於 PBS-0.1% Tween 20 清洗三次，每次 15 分鐘；最後置於 PBS 中 5 分鐘。並且另外一組以 rabbit preimmune serum 加入 primary

antibody 作為 negative control 。Blots 於 1:1 dilution 稀釋的 ECL 試劑中反應，纖維膜於 Fuji medical x-ray film (Fuji, Tokyo, Japan) 中曝光 3~15 秒。底片利用 Bio-Rad densitometer scanner (Model GS-670)(Bio-Rad, City, State) 顯像，並利用 manufacturer's recommendations (Molecular Analyst; Bio-Rad Image Analysis Software, City, State) 分析結果。

四、以 OPN 處理精子觀察對精子的受孕能力的影響

1. 精子穿透力試驗(Sperm penetration assay ; SPA)

精子液化後，於實驗組加入含 0.1 μ M 之 OPN，室溫中培養 30 分鐘後以 Human tubal fluid (HTF, Irvine Scientific, Santa Ana, CA)(Table.3)調至 1×10^6 /ml 的濃度準備與 Hamster 的卵子進行穿透力試驗(Fig. 6)。Hamster 的卵子利用 0.5% pronase (Sigma, St. Louis, MO) 除去透明帶，並置於含 0.2ml 之處理後的精子作用 3-3.5 小時後觀察受精。實驗總計為 100 顆卵子，最後觀察精子與卵子的原核 (pronucleus) 以及極體 (polar body) 形成。

2. 精子移動至卵子能力測定(*In vitro* migration patterns assay)

利用 horizontal column (Fig.7)來測試精子移動的能力(Hossain *et al.*, 1999)。取一 100mm 之 Petri dish，實驗組含 10 μ g/ml OPN 之 HTF

培養液，製作 column，做為精子游動之路徑。Column 共有 7 段轉折(segment1-7)，每段長 5 公分寬 1.3-2.4 公分，並於 column 的頭尾部分做一個圓滴當作精子儲存池，並於上方覆蓋礦物油(mineral oil)。將精子濃度調至 $20 \times 10^6/\text{ml}$ ，至於 37°C ， $5\%\text{CO}_2$ 培養，於 4 小時記錄其於最後一段(S7)所含精子量。記錄以 65°C 使精子不再移動各段 column 精子細胞數。

3. 頂體反應試驗(Acrosome reaction assay)

觀察精子頂體反應之情形，利用 Spermac kit (Stain Enterprises, Onderstepoort, South Africa) 染色；包括 Fixative I、Stain solution A、Stain solution B、以及 Stain solution C 四步驟染劑，實驗方法依照 Spermac kit manufacturer's guidelines 所述步驟(Fig. 8)。待精液液化後，將精子抹片於玻片上，於玻片完全風乾前加入 Fixative I，室溫靜置 5 分鐘。

I. 將玻片清洗後，加入 Stain solution A，靜置 2 分鐘。

II. 清洗後，加入 Stain solution B，靜置 1 分鐘。

III. 清洗後，最後加入 Stain solution C，靜置 1 分鐘。

IV. 待玻片風乾後以 1000 倍於光學顯微鏡下觀察。

4. 老鼠體外受精試驗(mouse *in vitro* fertilization assay)

為觀察 OPN 對於精子與卵子之受精是否有影響，因此利用老鼠體外受精實驗(Fig. 9)。將老鼠進行超排卵刺激(superovulation)，自國家動物中心購買 4-5 週大的 ICR 老鼠，飼養於台北醫學院大學動物中心，且經過動物實驗管理小組(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)核准。動物室光照週期條件為 12 小時光照，12 小時黑暗週期，在水、飼料充分供給的飼養環境至 8-10 週大，以腹腔注射方式施打 10IU 妊娠馬血清性腺刺激激素注射液(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) (Sigma, St. Louis, MO)進行超排卵(superovulation)刺激。48 小時後，再於腹腔中注射 10IU 人類絨毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG) (Profasi, Serono, Aubonne, Switzerland)於腹腔中。隔日自輸卵管中取出卵子與公鼠輸精管取出之精子進行體外受精，於 16-18 小時後，計算細胞內產生 2 個原核(2 pronucleus)之胚胎數目。

5. 精子細胞骨架之螢光免疫染色

為了觀察精子之骨架蛋白(cytoskeletal protein)之表現，我們利用 actin、spectrin 與 α -tubulin 抗體來測定其變化。精子固定於玻片上並以 PBS 清洗清洗之後置於 3% bovine serum albumin (BSA) 之

PBS 中 1 小時。加入一級抗體，包括 actin、spectrin、 α -tubulin，37 °C 中培養一小時。培養過後加入二級抗體，FITC conjugate sheep anti-mouse IgG 或是 goat anti-rabbit IgG。Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes Inc., Plano, TX) 用以偵測 spectrin 於 spectrinactin 中之位置。在數次以 PBS 的清洗後，玻片以含 propidium iodide (Vector Laboratories, Prague, Czech Republic) 封片。最後以螢光顯微鏡觀察，並以 confocal microscope (Leica TCS 4D, Heidelberg, Germany) 457~675nm laser 擷取影像。

五、統計方法

每項實驗皆是重複三次以上所得，數據以平均值±標準差呈現。並且使用 Student's *t*-test 統計法分析實驗組與對照組間的差異性。若 *p* value < 0.05 為兩組間具有顯著意義。

六、病人權利之保護

本研究計劃經由醫院人體試驗委員會審查通過。

第四章 實驗結果



第四章 實驗結果

I. 實驗一：探討 OPN 於精液中之表現情形

在 Western blot 的結果中，位於 66、58、50、25kD 處有 band 出現(Fig.10)。並且在 line 1-5，其檢測之精液樣本依據 WHO 定義游動力正常的精子中，OPN 表現量較多。而相對的第 6-8 組精子游動力為較差之精子其精液中 OPN 表現量也相對較少。因此在初步的結果中我們認為，游動力較差的精子其精液中之 OPN 表現量較游動力好的低。

II. 實驗二：分析 OPN 於精子中之表現情形

在 Western blot 分析精子本身 OPN 表現情形(n=44)的結果中，主要測得 25kD 與 50kD 的 OPN。在經過定量分析後，發現 Group3(G3+G4 \geq 60%)的精子其 Western blot 結果於 25kD 處之 OPN 表現量較 Group1(G3+G4 $<$ 30%) 為多 ($81.8\% \pm 6.8\%$ vs $54.4\% \pm 11.6\%$, $p < 0.05$)。而在 50kD 之 OPN 含量，Group1 表現量卻較 Group3 多 ($63.4\% \pm 3.2\%$ vs. $29.4\% \pm 4.1\%$, $p < 0.05$) (Fig.11)。

III. 實驗三：觀察加入 0.1 μ M 濃度之 OPN 後，對於精子游動力的影響

將精子加入 0.1 μ M OPN 培養 30 分鐘後，發現於 Group1 的精子，其游動力有顯著的提升($15.6\% \pm 2.1\%$ vs. $39.6\% \pm 4.6\%$, $p < 0.01$)；

同樣的在 Group2 的精子中，OPN 亦可提升其游動能力 ($51.7\% \pm 1.5\%$ vs. $69.5\% \pm 6.0\%$, $p < 0.05$)，但在 Group3 之組別中，OPN 並無顯著提高精子之游動力。統計在加入 OPN 後，精子游動力提升的比率，Group1 其上升比率相較於 Group3 高 ($253.1\% \pm 25.01\%$ vs. $110.9\% \pm 18.0\%$, $p < 0.05$) (Fig.12)。針對 progressive motility 之改變做分析，發現在 Group1 中，經過 OPN 的作用後，progressive motility 的比率增加 ($4.3\% \pm 1.0\%$ vs. $11.1\% \pm 2.8\%$, $p < 0.05$) 增加倍數為 $260.7\% \pm 21.0\%$ ；但在 Group3 的精子，加入 OPN 作用之後，progressive motility 之比率反而下降 ($12.3\% \pm 3.2\%$ vs. $4.7\% \pm 1.8\%$, $p < 0.05$) 減少為加 OPN 之前 $38.0\% \pm 9.0\%$ (Fig.13)。

除了分析 OPN 對游動力之影響外，在 CASA 分析精子運動參數中，總共分析了八項指數。在 Group1 的組別中，共計有四項參數為有意義之提升，包括 VCL、LIN、STR 與 BCF。VCL 在加入 OPN 後，為原先之 $175\% \pm 18$ ($28.6\% \pm 4.3\%$ vs. $50.0\% \pm 2.8\%$, $p < 0.05$) (Fig.14)，LIN 增加至加入 OPN 前之 $226.5\% \pm 25.0\%$ ($17.8\% \pm 5.1\%$ vs. $40.2\% \pm 4.3$, $p < 0.05$) (Fig.15)，在 STR 亦提升至 OPN 處理前之 $241.1\% \pm 30.0\%$ ($23.9\% \pm 5.6\%$ vs. $55.21\% \pm 3.9\%$, $p < 0.05$) (Fig.16)，另外 BCF 也提高為原始之 $153.4\% \pm 13$ ($5.9\% \pm 0.5\%$ vs. $9.0\% \pm 0.4\%$,

$p < 0.05$) (Fig.17)。

而在 Group2 與 Group3 中，OPN 對於精子之運動參數並無顯著之影響，其中 VAP(Fig.18)、ALH(Fig.19)，與 BCF 數值上升但無顯著意義，而在 VSL(Fig.20)、LIN、STR，以及 WOB(Fig.21)之指數則較原先有下降之情形。(Table.4)

IV. 實驗四：OPN 對精子受孕能力的影響

1. 精子移動至卵子能力測定(*In vitro* migration patterns assay)

總共收集 6 為男性精子，於 200 倍顯微鏡下，計算在每個轉折中每個視野之精子數目。實驗結果發現在 OPN 之組別中，精子游到最終段(S7)之比率較控制組多($6.3\% \pm 1.5\%$ vs. $1.5\% \pm 0.2\%$)，並且在第四個區間(S4)之 OPN 組別游到之精子數目明顯較控制組為多(69.3 ± 4.6 精子細胞 vs. 165.5 ± 4.3 精子細胞， $p < 0.05$) (Fig.22)。

2. 精子穿透力試驗(Sperm penetration assay；SPA)

將 6 位男性精子加入 $0.1\mu\text{M}$ OPN 培養 30 分鐘後，放入去除卵殼之 Hamster 的卵子進行精子穿透力試驗(Fig.23)。經過 3 至 3.5 小時後，在 OPN 刺激之組別其精子穿透數目較未處理的組別多(1.4 ± 0.1 細胞 vs. $2.3\% \pm 0.1$ 細胞， $p < 0.05$)(Fig.24)。

3. 頂體反應試驗(Acrosomal reaction assay)

精子經過 OPN 作用 30 分鐘後，隨即抹片並固定於玻片上進行染色。全部收集 6 位男性之精子，每個檢體隨機取 3-4 個視野觀察，總共計算 100 隻精子，並將結果分類為頂體反應(acrosome-reacted)與未頂體反應兩類之精子，其中未發生頂體反應之精子包含 acrosome-intact 以及 acrosome-defective(Fig.25)。實驗結果在 6 個檢體中，OPN 與控制組皆無顯差异性。

4. 體外受精試驗

在老鼠的體外受精實驗中，於十六個小時後觀察受精胚胎原核的產生第二級體的出現，發現加入 OPN 之組別中有較高的受精率($62.0\% \pm 3.6\%$ vs. $78\% \pm 2.1\%$, $p < 0.05$) (Fig.26)

V. 實驗五：觀察精子中 OPN 之表現位置。

經過免疫螢光染色後，觀察到精子之頭部(head)與中節(mid piece)有 OPN 之螢光表現(Fig.27)。並且其螢光之強度與精子游動力有關，在 Group3 之精子其螢光強度較 Group1 強(Fig.28)。

VI. 實驗六：探討 OPN 對於精子骨架細胞之影響。

在 cytoskeleton 的染色結果，發現 actin 主要存在於精子尾部(tail)、中節(mid-piece)，而有少部分精子同時出現於頭部(head)；

α -tubulin 主要以精子尾部、中節為主，至於 spectrin 亦分布在尾巴、中節。分析 OPN 組與控制組的表現，比較 actin、tubulin 與 spectrin 尾巴上螢光分布的比例，發現 Actin 在中節(mid-piece)亮度有明顯增加， α -tubulin 在尾巴(tail) 亮度有明顯增加；spectrin 並無明顯改變。

(Fig.29)



第五章 討 論



第五章 討論

OPN 存在於身體許多地方，是一個多功能的分泌型蛋白，由於其具有 proliferation 以及與 integrin 結合的特性，而在當 OPN 與 integrin 結合後，會引起細胞內鈣離子的升高(Goncalves *et al.*, 2007)，進而使 focal adhesion kinase 磷酸化，促使細胞增生以及維持細胞骨架與細胞移動的能力(Denhardt and Guo, 1993)，因此許多研究朝向 OPN 在探討腫瘤與著床方面所扮演的角色。回顧過去文獻中，從受精到著床，不論自精子或卵子方面都有研究與 OPN 相關(Cancel *et al.*, 1999; Sodek *et al.*, 2000)，在人類中已證實懷孕之蛻膜細胞具有 OPN 之表現，並且可以受到 progesterone 的調控而增加表現(Omigbodun *et al.*, 1997)。不過在精子的 OPN 研究中，研究仍以動物為主，包括公牛、公豬、兔子與老鼠為主，研究中證實了 OPN 與精子的游動力以及受孕能力相關，因此，OPN 是否同樣的對於人類精子也是具有提升精子的游動能力及受孕力的作用成為本研究感興趣之處。

實驗的開始於探討 OPN 是否在精子游動力不好之病人有異常的表現，在 Western Blot 的結果得到了兩個結果，首先我們確認在人類精子細胞上確實可檢測到 OPN 蛋白，並且 OPN 的含量也確實與游動力相關(Fig.10)。加上免疫螢光染色結果中，我們看到了 OPN 之存在的位置，大部分存在於精子的頭部(head)與中節(mid-piece)處(Fig.28)。由於精子尾部的功能足以影響

其游動力的表現，合併在免疫螢光染色結果發現，游動力較差的精子螢光染色強度相較於游動力好的精子表現弱，因此更證實了 OPN 與精子的游動力相關。

在公豬的精子中，有研究發現加入特定量的 OPN 可以使精子的受精率提高(Hao *et al.*, 2006)，因此我們嘗試同樣的在人類精子也加入 OPN 看其對游動力的影響。將所有精子分為三個游動力等級，細分看其對不同游動力的精子的影響，實驗結果 OPN 僅對游動力最差(Group1)的病人有提升其游動力(Fig.12)與 progressive motility 的比例(Fig.13)，不過在 Group 2 及 3 的族群中，反而使其 progressive motility 的比例降低，甚至在游動力最佳的 Group3 中，progressive motility 比例明顯的減少(Fig.13)。探究其原因，OPN 可以促使游動力不好的精子增加能量提高游動力，但在原本游動力好的精子中，OPN 對其游動力的影響則無特別意義，不過在分析精子運動性方面，許多原先直線前進的精子，經由 OPN 的激發下，開始呈現 helical 的運動方向，最後成為 circular 的型態，因此 progressive motility 的比例會減少。我們知道當精子出現 helical 與 circular 的運動方式，即發生所謂的 hyperactivation，此時 VCL 與 ALH 會增加，而 LIN 與 STR 則會下降(Shivaji *et al.*, 1995)，這符合了我們 CASA 的實驗結果。因此實驗結果可以推論當精子的游動力較差時，OPN 可以提高其細胞內鈣離子的流量，增加精子的游動能力；若是

OPN 作用在游動力較好的精子中，可以促使精子進行 hyperactivation 的作用，如此精子才具有足夠之能力穿透卵子達成受精使命。

在證實游動力會因 OPN 的刺激而增加之後，接下來則探討是否會經由游動力的提高，而使得精子能有較強的移動能力，由於 CASA 的參數值僅侷限於一個玻片大小空間，並不能完全代表精子長程的游動力。因此藉由一自製的 column，模擬體內精子自子宮頸口游動至輸卵管中與卵子相遇的情形，以評斷精子的能力。結果發現再經由 OPN 刺激下，精子的移動能力確實有提升。由於整個實驗測量約為 4 小時，因此我們也同時瞭解了 OPN 對於精子的影響可長達四小時以上，這對於未來應用在生殖技術中也有很大的助益。

頂體反應染色中，我們使用的是 Spermac kit，過去傳統許多方法，會因為 acrosome cap 的太小而難以在顯微鏡下觀察到。此染劑的優點為操作方便，並且易於判讀，不必如傳統的在螢光顯微鏡下觀察，並且染色的片子可以長時間保存。最大的優點則是可以區別 acrosome 區域的消失是確實的 acrosome reaction 還是 acrosome 其他原因的消失，如此更可以確認實驗的真實性。

當我們了解了 OPN 對於精子受精能力的影響後，如何造成精子受精能力提高的機制是我們所要進一步釐清的。既然 OPN 對於細胞骨架有

organization 的作用，因此我們做螢光染色，看 OPN 對於細胞內 cytoskeleton 的影響。選擇三個主要的細胞骨架蛋白觀察，包括 actin、 α -tubulin 與 spectrin，這三個骨架蛋白與精子的活能化、頂體化以及運動之游動力皆相關。由於主要分析精子的游動力，而精子的游動力與尾部較相關，基於此理由定義了評估標準。將精子尾部之螢光染色量化為螢光分佈百分比，比較加入 OPN 後，尾部所帶螢光之比例是否增加。結果發現 α -tubulin 的螢光強度表現最強，經過 OPN 的刺激後，幾乎精子的整條尾巴皆帶有螢光，相較於未經處理的精子，強度較弱，且有時出現斷斷續續的螢光表現(Fig.29)。另外在 actin 方面則是某些會出現於頭部，其可能與 acrosome reaction 有關，不過在 actin 的染色較 α -tubulin 的表現不同。actin 螢光以點狀為主，包括尾巴及頭部都是呈顆粒性螢光，代表了 actin 大部分是以單體存在，而在頭部的 actin 則是主要進行頂體反應的功能(Fig.29)。

實驗最後的結論中，我們確實的發現了 OPN 可以增加精子的游動力，而這游動力的增加我們推論可以讓精子足以長途跋涉到卵子處，其參與的機制為細胞骨架的改變，加入了 OPN 後，使得細胞骨架分布較多較密，增加其運動的能力，進而增加精子穿透卵子的能力，OPN 分布於精子的頭部，同時研究中也提出在卵子的卵殼(zona pellucida)上發現有 OPN 的存在，其來源可能為輸卵管液或是濾泡液中，藉由帶有 OPN 的相似結構，促使精子與

卵子的接觸，隨即發生了頂體反應，此時存在於頭部的 OPN 後移至赤道區處，藉由赤道區上的 OPN 與卵細胞 integrin 結合而與卵細胞進行融合作用，完成受精的步驟(Souza *et al.*, 2008)。

未來，探討 OPN 作用在精子時參與的分子機制成為日後的重點，另外過去研究中。發現在公牛體外受精時。OPN 的濃度與受精率有相關，過高的濃度會使卵子的卵殼變硬，導致精子不易穿入卵子，而使受精率降低。因此，後續我們也將朝 OPN 的濃度對受精能力的影響來探討，觀察在不孕男性以及女性體內的 OPN 濃度是否有意義。亟盼能並進一步運用臨床上，藉由增加經子細胞的游動立及受孕力來提升人工生殖技術的成功率。

第六章 圖 表



Table .1 電腦輔助分析儀之各項精子運動參數定義

Motility parameters	unit	Definition
MOT	%	Grade 3 + Grade 4
PMOT	%	Linearity > 75%
LIN	%	VSL/VCL
STR	%	VSL/VAP
ALH	μm	Amplitude of head displacement
BCF	Hz	Beat cross frequency = number of times the sperm head goes across the average path
VCL	μm/sec	Curvilinear velocity = total distance traveled by the sperm head in 1 sec
VSL	μm/sec	Straight line velocity = straight line distance traveled by sperm head in 1 sec
VAP	μm/sec	Average path velocity = calculated using a 5 point smoothing algorithm
WOB	%	VAP/VCL

Descriptive criteria laid down by the current World Health Organization Manual [World Health Organization, 1992]

Table .2 精液分析結果

Group	n	Motility(Range)	Motility(%)	Con.(10 ⁶ /ml)
1	10	0-30	19.24±3.31	72.37±19.34
2	15	31-60	46.28±2.75	71.05±14.06
3	16	61-90	77.44±1.77	156.71±26.37

Con., Concentration, n, number Data 以 mean±SD (standard deviation)呈現



Table .3 HTF 之組成成分

Component	Concentration (mM)
Sodium Chloride	97.80
Potassium Chloride	4.69
Magnesium Sulfate, Anhydrous	0.20
Potassium Phosphate, Monobasic	0.37
Calcium Chloride, Anhydrous	2.04
Sodium Bicarbonate	25.00
Glucose	2.78
Sodium Pyruvate	0.33
Sodium Lactate	21.40
Gentamicin Sulfate	10 µg/mL
Phenol Red	5 mg/L
Protein Supplementation	None

Table .4 OPN 添加對精子各項游動參數的影響

CASA parameters	Unit	Group 1		Group 2		Group 3	
		-OPN	+OPN	-OPN	+OPN	-OPN	+OPN
Motility	%	15.6±2.1	39.6±4.6	51.7±1.5	69.5±6.0	82.0±3.7	90.9±3.0
Progressive motility	%	4.2±1.0	11.9±2.7	23.7±4.9	19.8±4.9	12.2±4.6	3.2±1.8
VCL	%	28.5±4.3	49.9±2.7	53.6±3.3	68.6±4.2	70.7±5.4	84.4±4.0
LIN	%	17.7±5.1	40.2±4.3	48.4±6.3	39.1±5.5	27.4±6.6	20.9±3.3
STR	%	23.8±5.5	55.2±3.9	70.2±6.6	61.7±6.9	47.3±7.5	39.8±4.7
BCF	Hz	5.8±0.5	8.9±0.3	8.7±0.3	9.7±0.4	9.7±0.7	10.9±0.1
VAP	μm/sec	24.7±8.4	31.7±3.7	36.5±2.1	37.7±1.3	38.2±2.9	44.0±2.3
ALH	μm	1.0±0.3	1.5±0.1	1.5±0.1	1.6±0.1	1.8±0.2	2.2±0.1
VSL	μm/sec	17.6±5.8	25.9±6.0	22.9±2.3	21.9±2.8	18.0±3.1	17.1±1.7
WOB	%	42.4±5.1	63.0±4.2	66.3±2.9	65.5±3.3	55.2±4.0	52.6±2.1

Data 以 Mean±2SD 表示

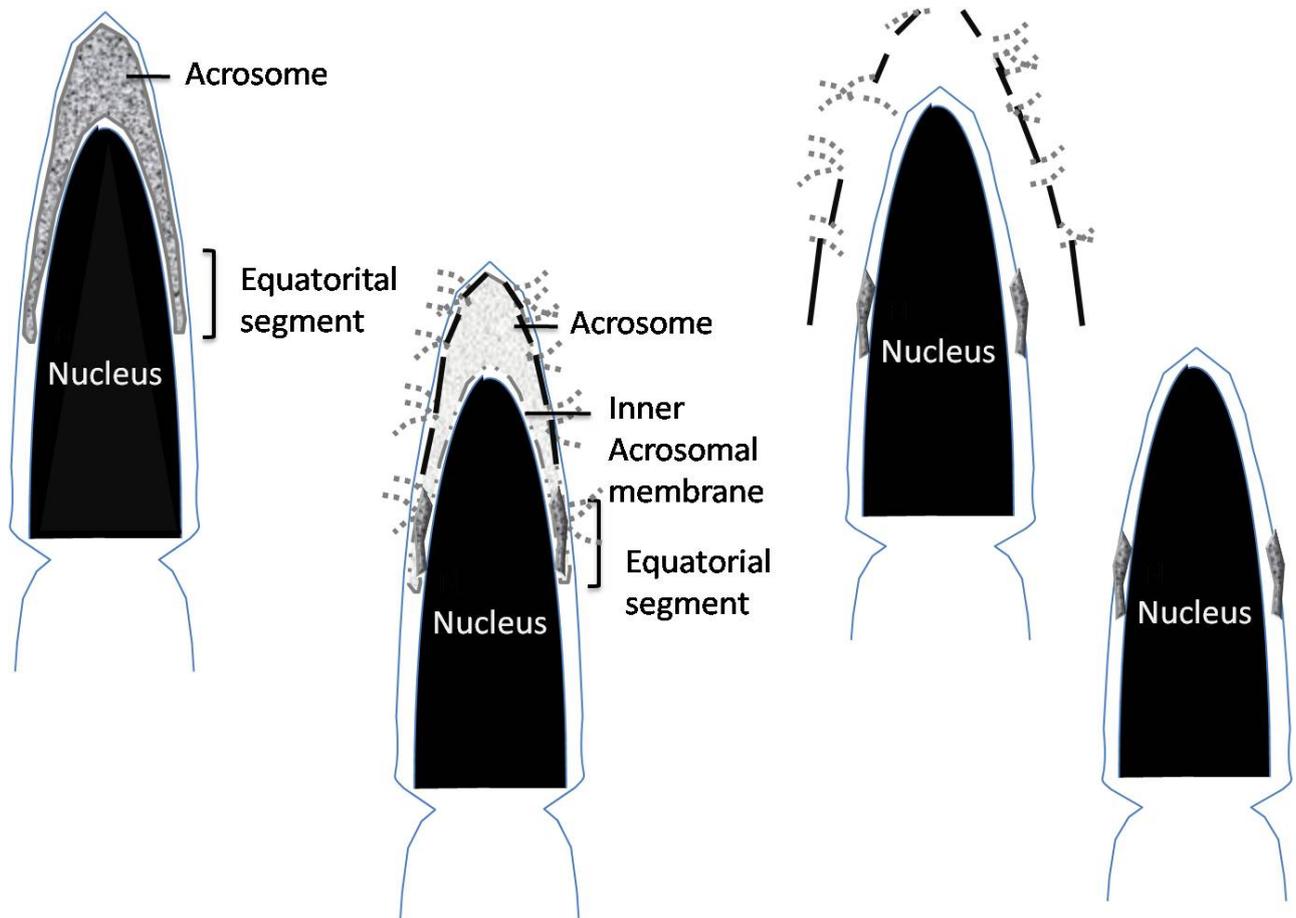


Fig. 1 頂體反應

頂體反應(Acrosomal reaction)的開始於頂體膜的瓦解，頂體素(acrosin)釋放出來，當受精時再經由赤道區與卵子進行融合作用。

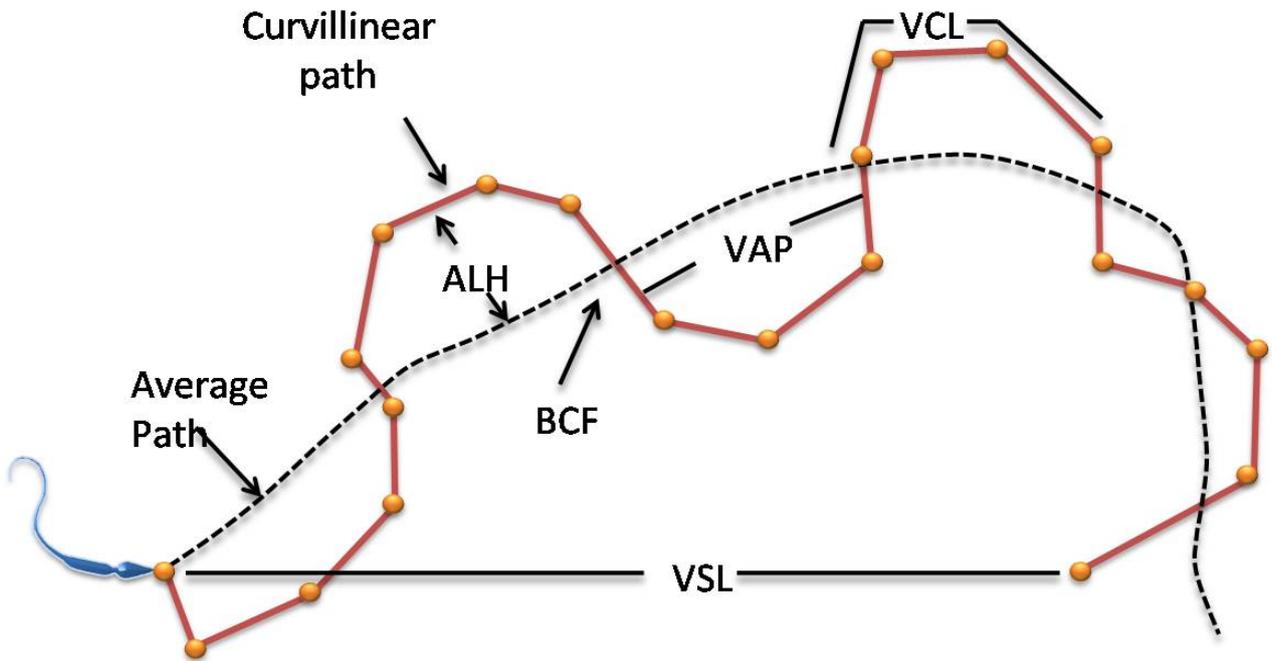
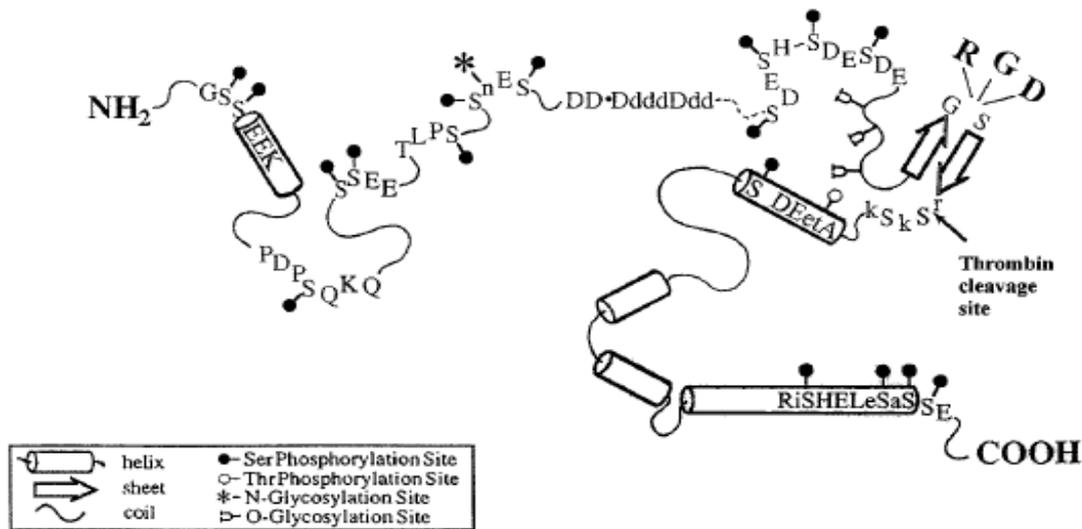


Fig. 2 CASA 運動參數分析圖

以電腦輔助分析儀測定精子細胞各種游動特性及運動參數。VCL, curvilinear velocity($\mu\text{m/s}$) ; VSL, velocity straight line ($\mu\text{m/s}$) ; VAP, velocity average path ($\mu\text{m/s}$) ; ALH, amplitude of lateral head displacement (μm) ; LIN, linearity= VSL/VCL ; STR, straightness= VSL/VAP ; BCF, beat-cross frequency (beat/second)。



Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2001. 41:723-

Fig. 3 OPN 的結構

OPN 為分泌型之磷酸化蛋白，其結構包括 Ser 與 Thr-phosphorylation site、thrombin cleavage site 以及 glycosylation site 所組成，為一酸性之細胞外間質蛋白，屬於 small integrin binding ligand N-linked glycoprotein 家族(SIBLING family)。OPN 之所以有黏附的作用，因其具有一重要保留區(conserved motifs) RGD 區域，富含 aspartic、glutamic acid 及 serine，利用此 RGD 區域可與 integrin 相接合，做為細胞黏合與訊息傳遞的功能。

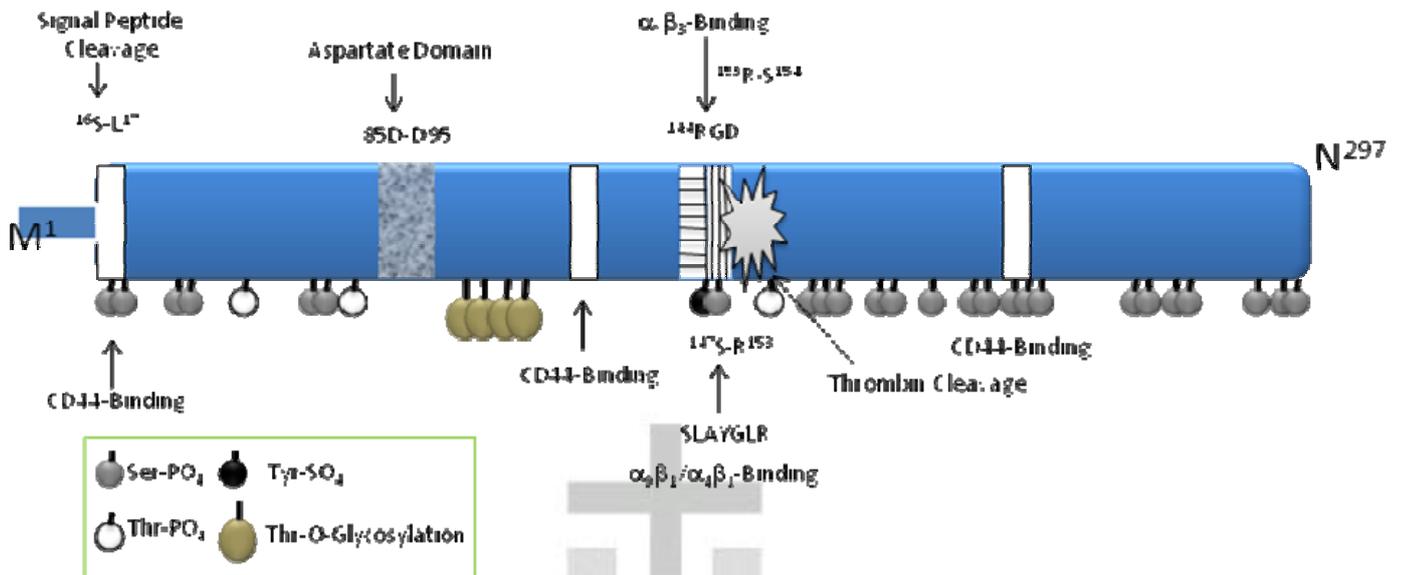


Fig. 4 OPN 的功能性結構

OPN 屬於細胞外基質(extracellular matrix, ECM)分子,經由 thrombin 切割後,可釋放出兩個與 integrin 結合的部位,稱 RGD 與 RSK domain,另外還包括了 CD44-binding domain 與 $\alpha_v\beta_3$ binding domain。

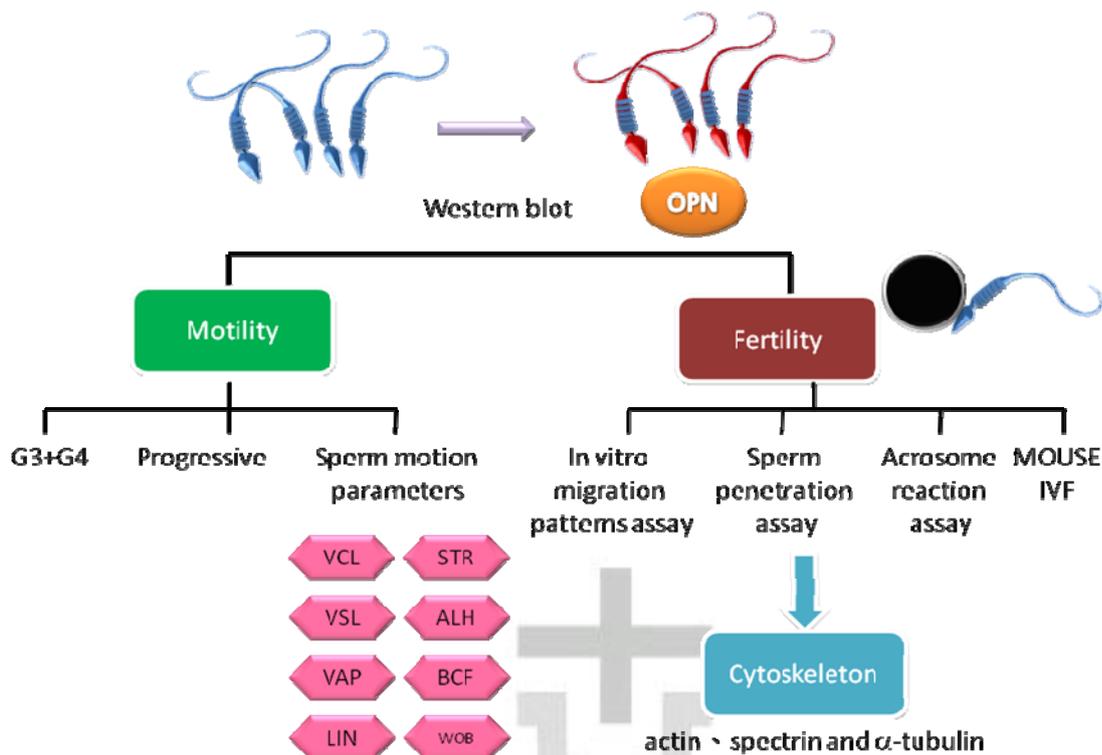


Fig. 5 實驗設計流程:

收集精液樣本，我們首先以 Western Blot 分析精子細胞內 OPN 蛋白含量，並探討 OPN 對於精子之游動力與受孕力之影響。其中游動力之評估包含了游動力屬 G3+G4 的比率、Progressive motiity 的比率，以及精子游動之運動參數(如 VCL、VSL、VAP、LIN、STR、ALH、BCF、WOB 等)。而受孕力則是包括了精子移動至卵子之能力測定、精子穿透卵子試驗、精子之頂體反應以及體外受精試驗。最後在分析其細胞骨架蛋白的改變。G4 即 Grade 4 (rapid motion, VAP > 25 $\mu\text{m}/\text{second}$), G3 為 Grade 3 (slow motion, VAP 5-25 $\mu\text{m}/\text{second}$)。

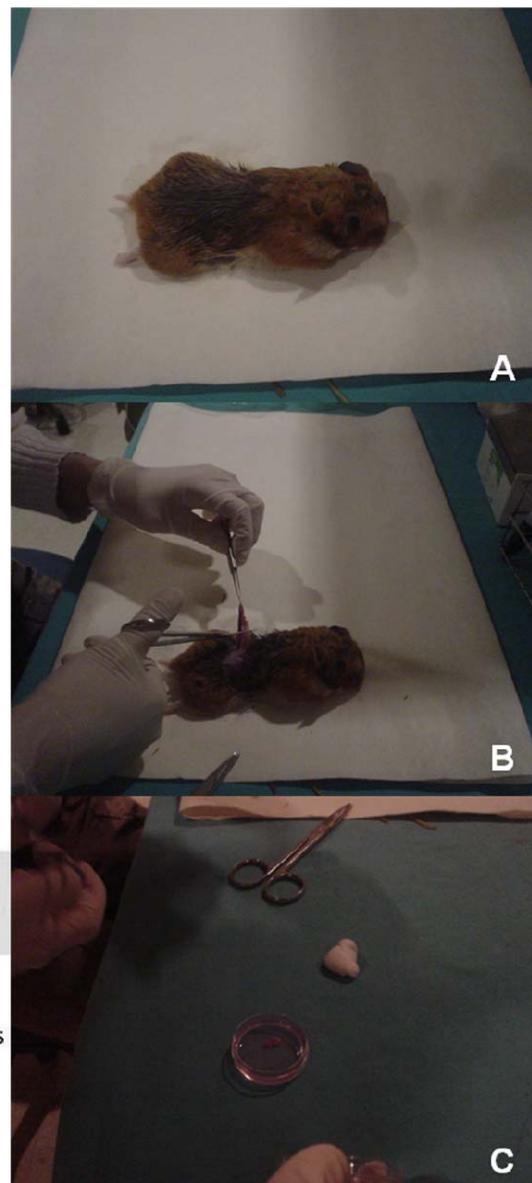
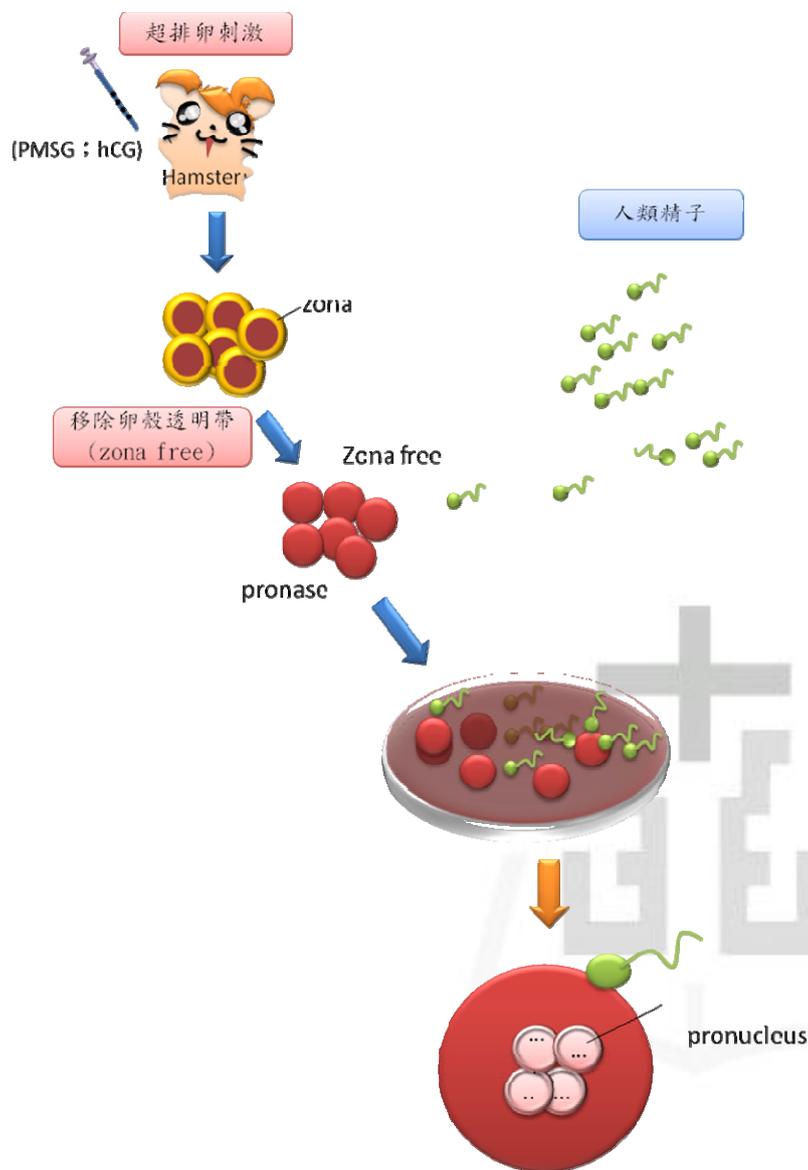


Fig. 6 老鼠精子穿透力試驗 (Sperm penetration assay ; SPA) 之實驗過程
 自國家動物中心購買 4-5 週大的 ICR 老鼠，飼養至 8-10 週大，將老鼠進行超排卵刺激，以腹腔注射方式施打 10IU 妊娠馬血清賀爾蒙注射液 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 進行超排卵刺激 (superovulation)。48 小時後，再注射 10IU 人類絨毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 於腹腔中。將 Hamster 母鼠進行斷頸犧牲(A)；解剖剪下輸卵管(B)；自輸卵管處取出卵子(C)。

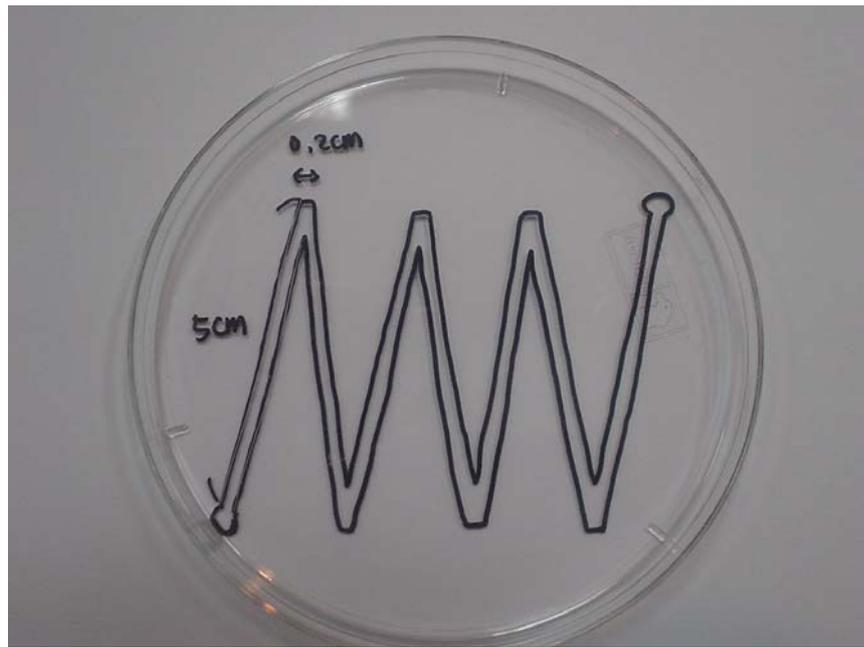


Fig. 7 精子移動能力試驗裝置圖

取 10cm 的 petri dish 製成 7 段轉折，column 共有 7 段轉折 (segment1-7)，並於 column 的頭尾部分做一個圓滴當作精子儲存池，並於上方覆蓋油(mineral oil)。

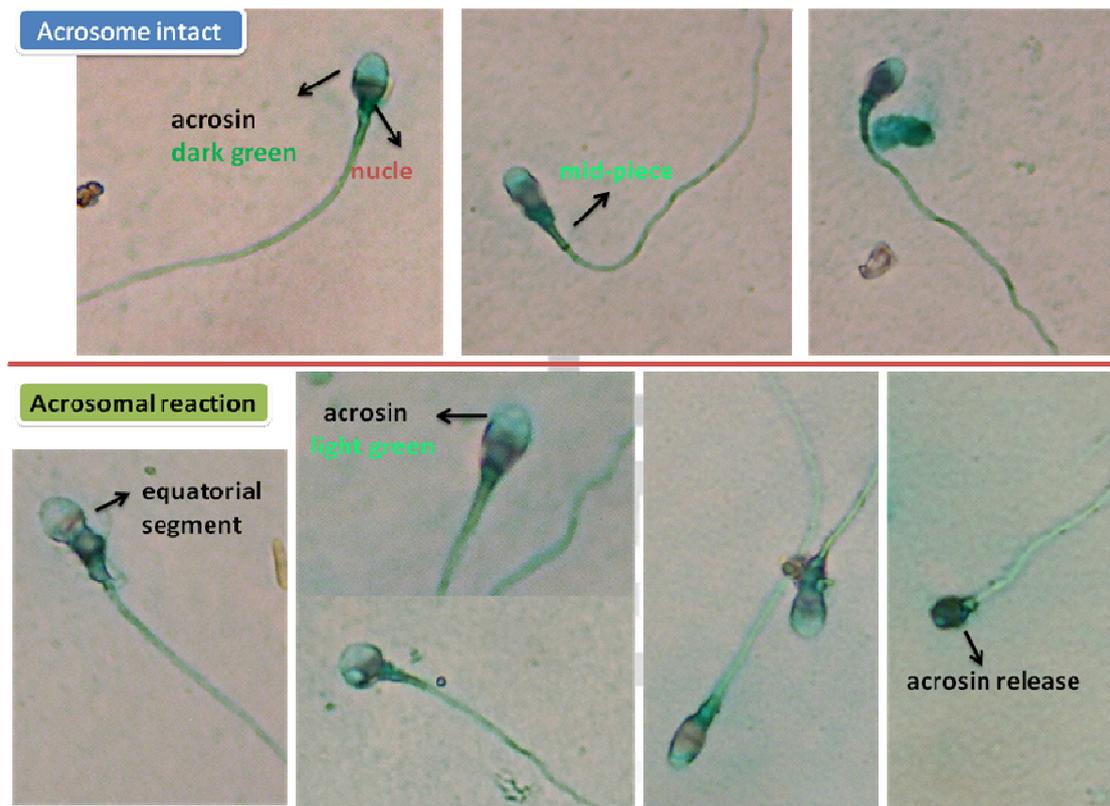


Fig. 8 精子頂體化試驗 (Acrosomal reaction)

利用 Spermmac stain kit 進行精子頂體區之染色。圖中 acrosome 區域為深綠色、nucleus 為紅色、equatorial segment 赤道區呈現淡綠色、而 midpiece 以及 tail 則是綠色。

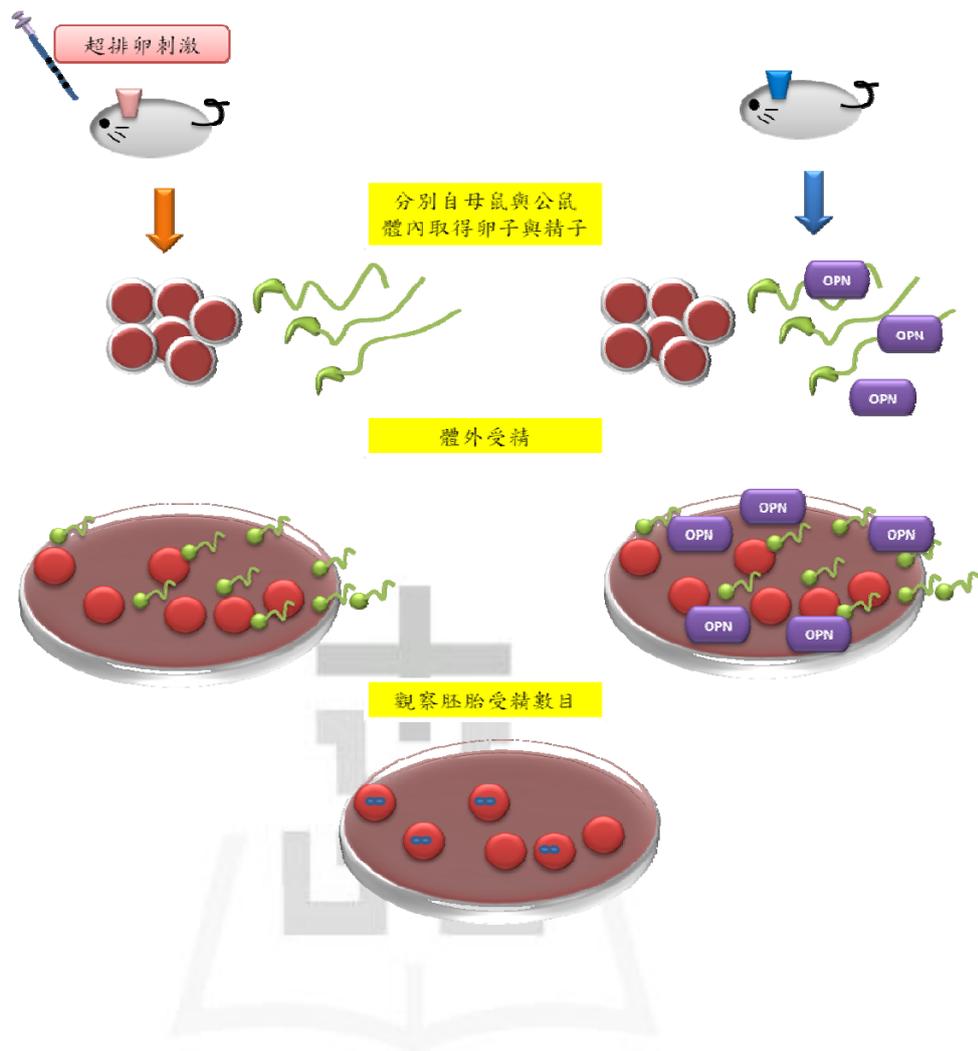
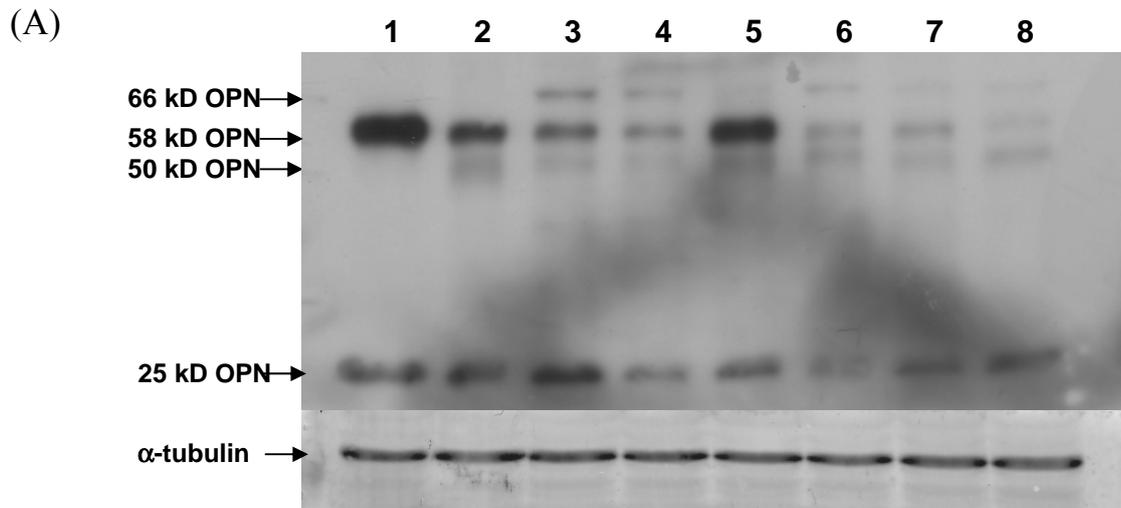


Fig. 9 老鼠體外受精試驗(mouse in vitro fertilization assay)

自國家動物中心購買 4-5 週大的 ICR 老鼠，飼養至 8-10 週大，將老鼠進行超排卵刺激，以腹腔注射方式施打 10IU 妊娠馬血清賀爾蒙注射液(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)進行超排卵刺激(superovulation)。48 小時後，再注射 10IU 人類絨毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)於腹腔中。隔日自輸卵管中取出卵子並由公鼠輸精管取出之精子進行體外受精，於 16-18 小時後，計算產生 2 個原核(2 pronucleus)產生之胚胎數目。



(B)

Line	Group	Con. (1×10^6)	Motility % (G 3+G 4)	Progressive motility
1	N	154.0	78.74	9.45
2	N	52.1	59.09	13.64
3	V/N	207.0	57.04	14.07
4	V/N	165.3	56.60	15.09
5	V/N	11.8	55.56	22.22
6	V/L	8.7	15.79	0.00
7	V/L	43.5	15.58	1.30
8	V/L	21.0	12.00	4.00

Fig. 10 Western Blot 分析 OPN 於精液中之表現情形

以 Western Blot 測定精液中的 OPN 含量，測得有 4 種分子量，分別為 66kD, 58kD, 50kD 及 25kD OPN，並以 α -tubulin 為 internal control(圖 A)。Lane 1-5 為正常游動力之精子；Lane 6-8 為游動力差之精子。(B)表為 A 圖中各精液標本的游動力分析數據 N：normal subject, V/N：Vericocele/Normal motility, V/L：Vericocele/Low motility；Grade 4 (rapid motion, VAP > 25 $\mu\text{m}/\text{second}$), Grade 3 (slow motion, VAP 5-25 $\mu\text{m}/\text{second}$)。

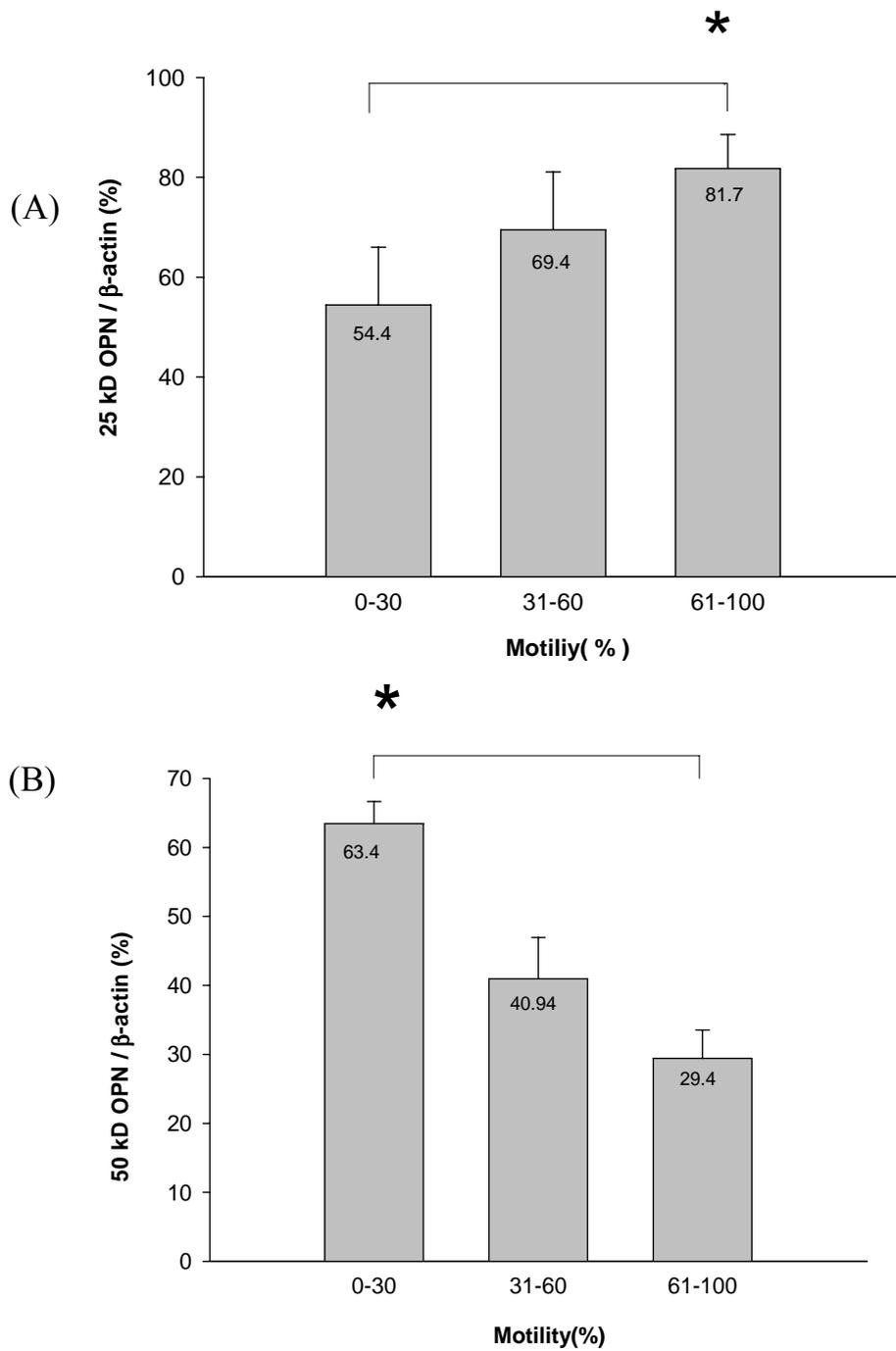


Fig. 11 以 Western Blot 測定精子中 OPN 之含量。

(A) 以 Western Blot 測定精子細胞 OPN 含量，並以 β -actin 為 internal control。定量 25kD OPN 含量，發現精子游動力越高其 25kD 含量越高。*, $p < 0.05$

(B) 以 Western Blot 測定精子細胞 OPN 含量。定量 50kD OPN 含量，發現精子游動力越低其 50kD 含量越高。*, $p < 0.05$

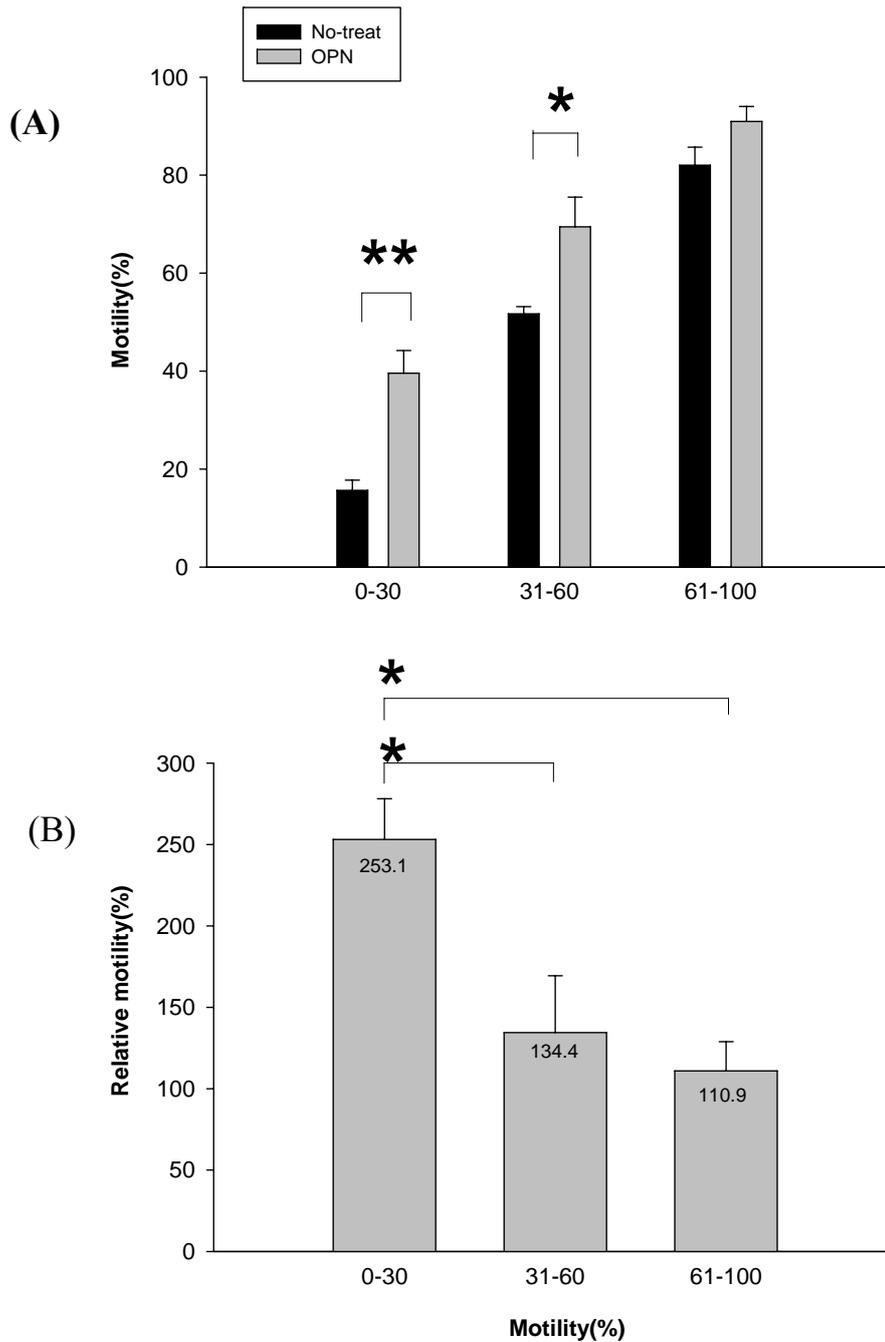


Fig. 12 OPN 對精子游動力之影響。

(A) 精子加入 0.1 μ M OPN 後游動力改變情形，結果發現在 group 1(motility 0-30%)與 group 2(motility 31-60%)游動力都有明顯升高的趨勢；(B) 精子游動力於 0.1 μ M OPN 添加處理改變的相對比例。*, $p < 0.05$ ；**, $p < 0.01$

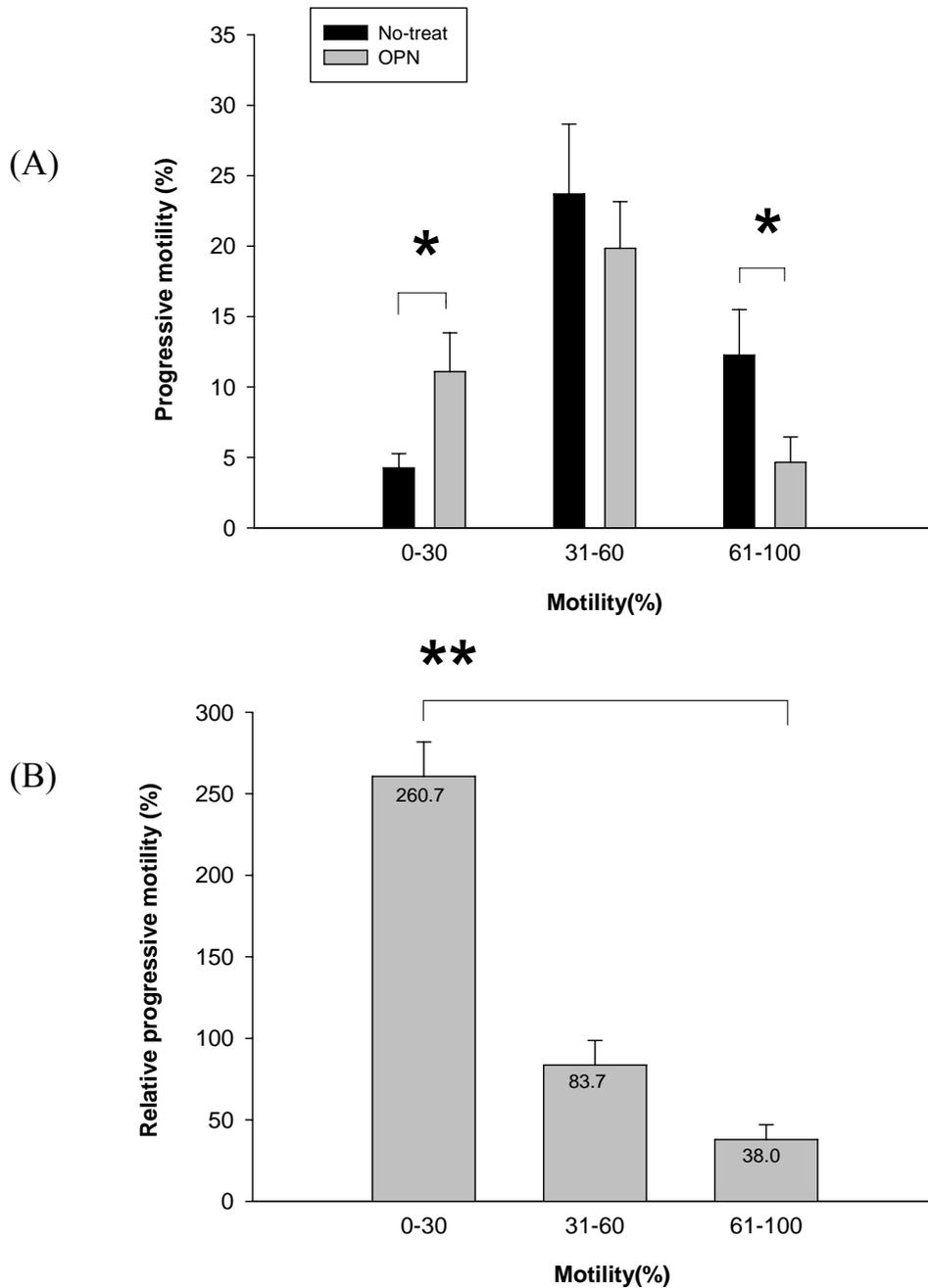


Fig. 13 OPN 對精子 progressive motility 之影響。

(A) 精子加入 $0.1\mu\text{M}$ OPN 後 progressive motility 的改變情形，結果發現在 group 1(motility 0-30%)有明顯升高的趨勢；但是在 group 2(motility 31-60%)與 group 3(motility 31-60%)會下降，特別在 group 3 下降趨勢最明顯；(B)精子添加 $0.1\mu\text{M}$ OPN 作用前後其 progressive motility 改變的相對比例。*， $p < 0.05$ ；**， $p < 0.01$

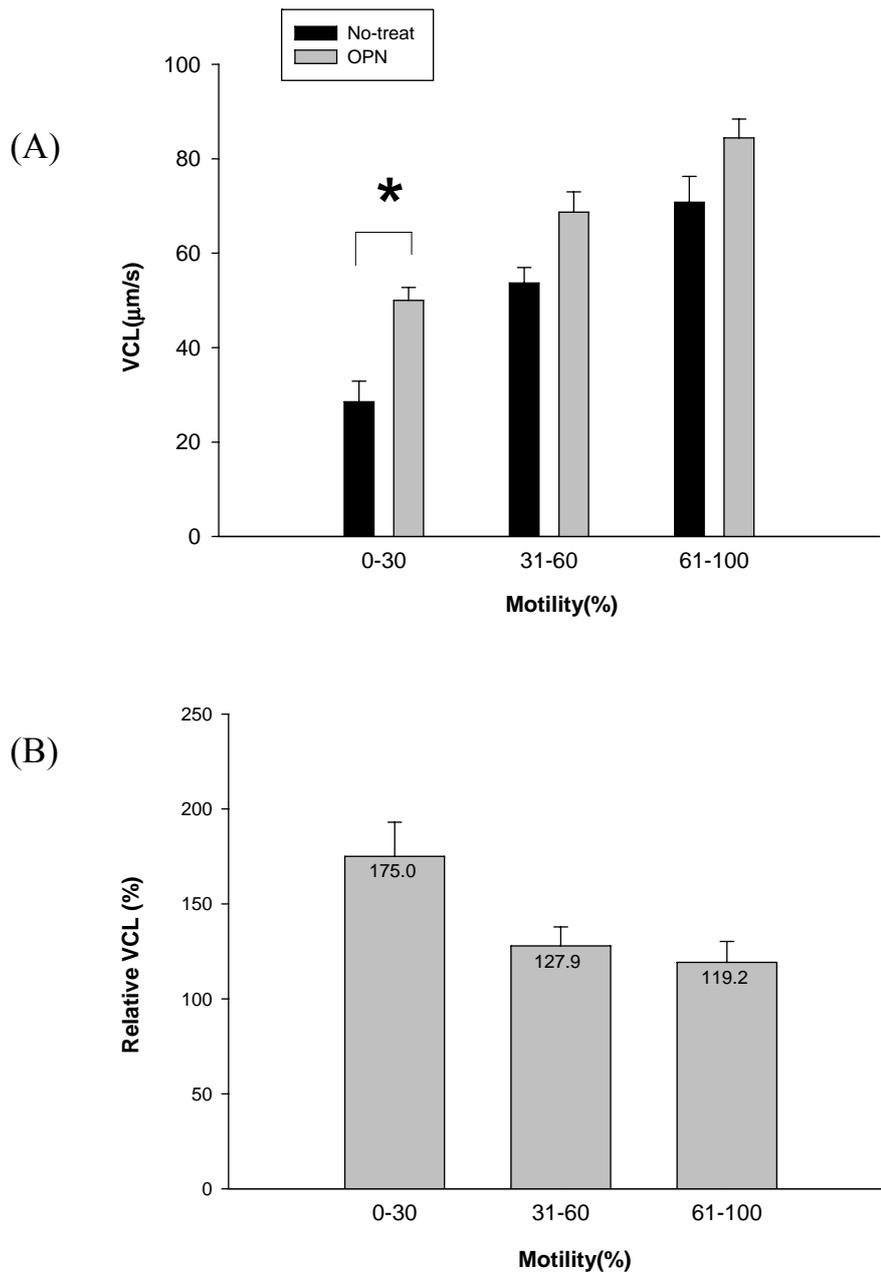


Fig. 14 OPN 對精子 VCL (curvilinear velocity) 之影響。

(A) 精子加入 $0.1\mu\text{M}$ OPN 後 VCL 的改變情形，結果發現在 group 1(motility 0-30%)有明顯升高的趨勢，group 2、3 也略有上升；(B) 精子添加 $0.1\mu\text{M}$ OPN 作用前後其 VCL 改變的相對比例。*, $p < 0.05$

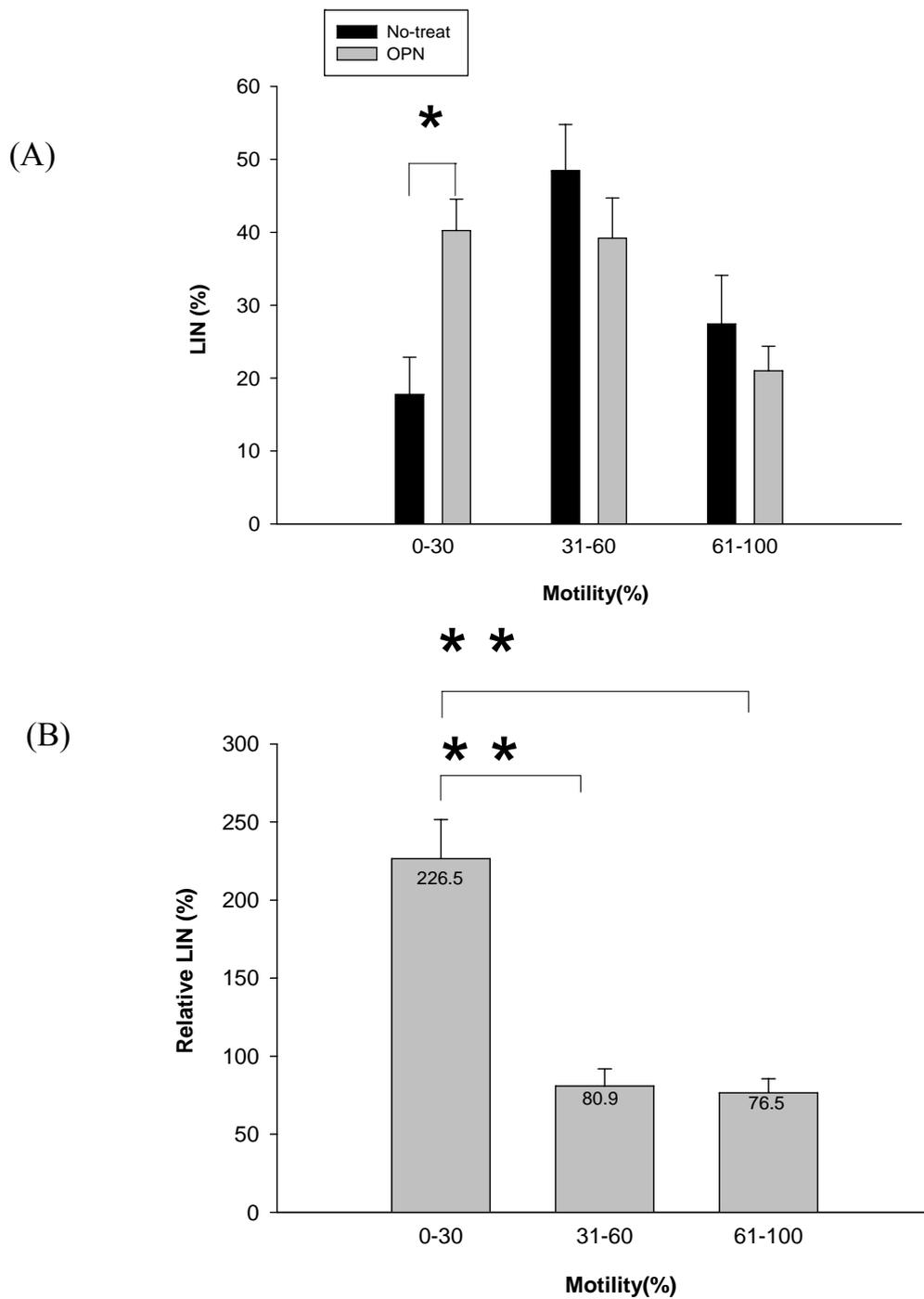


Fig. 15 OPN 對精子 LIN (linearity) 之影響。

(A) 精子加入 $0.1\mu\text{M}$ OPN 後 VCL 的改變情形，結果發現在 group 1 (motility 0-30%) 有明顯升高的趨勢，group 2、3 則是略為下降；

(B) 精子添加 $0.1\mu\text{M}$ OPN 作用前後其 VCL 改變的相對比例。*， $p < 0.05$ ；**， $p < 0.01$

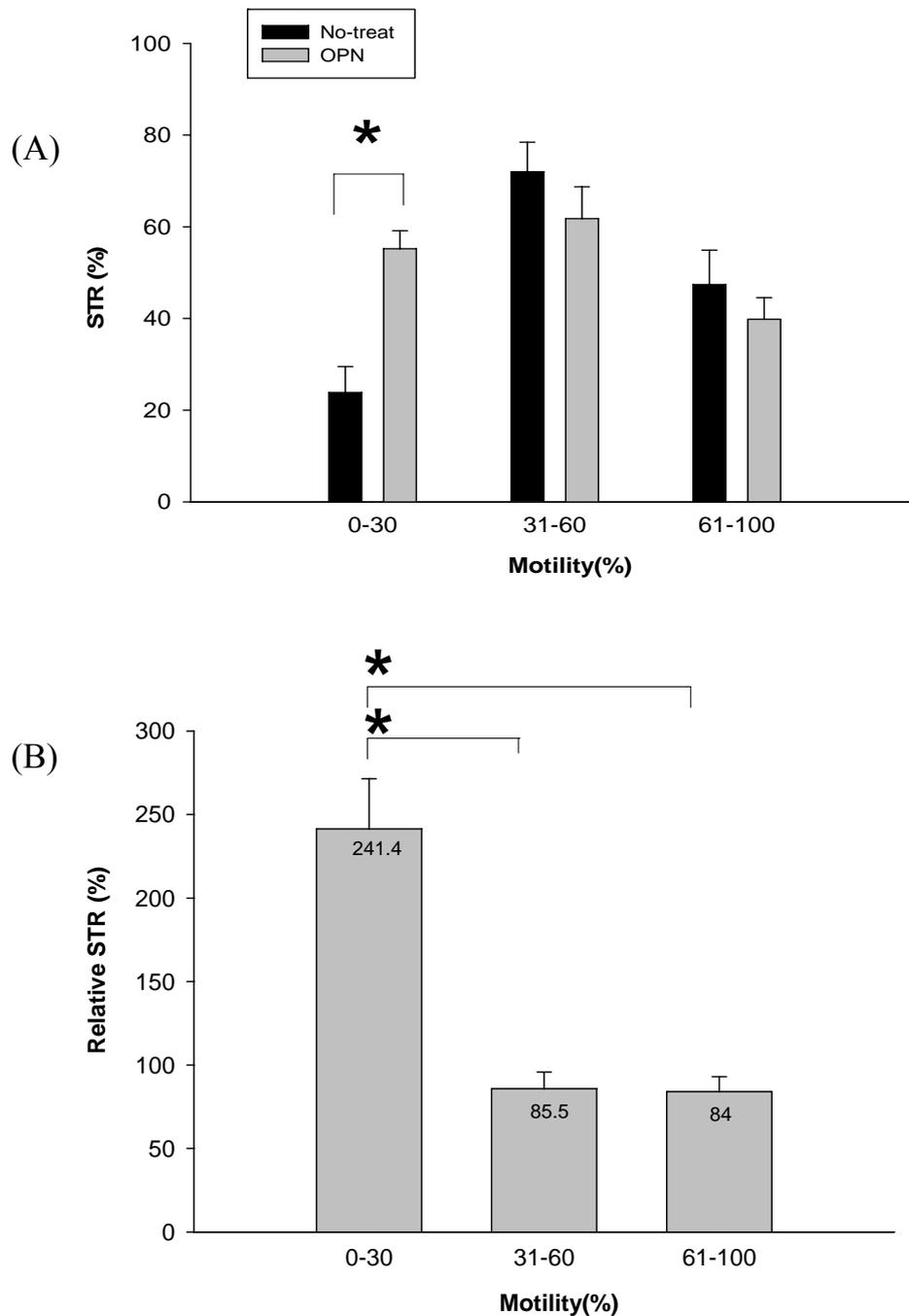


Fig. 16 OPN 對精子 STR (straightness) 之影響。

(A) 精子加入 0.1 μ M OPN 後 STR 的改變情形，結果發現在 group 1(motility 0-30%)有明顯升高的趨勢，group 2、3 則是略為下降；(B) 精子添加 0.1 μ M OPN 作用前後其 STR 改變的相對比例。*， $p < 0.05$ 。

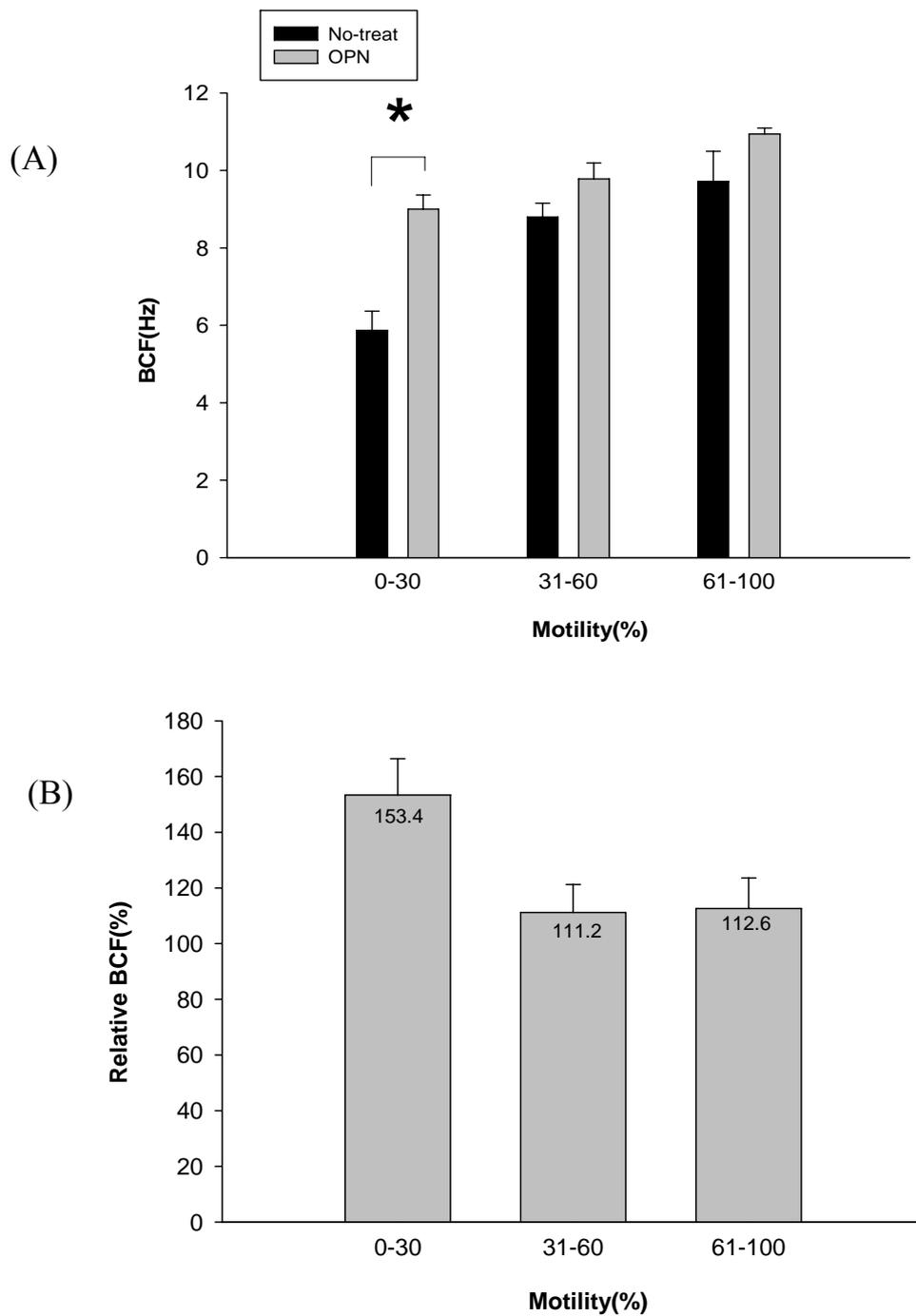


Fig. 17 OPN 對精子 BCF (beat-cross frequency) 之影響。

(A) 精子加入 $0.1\mu\text{M}$ OPN 後 BCF 的改變情形，結果發現在 group 1 (motility 0-30%) 有明顯升高的趨勢，group 2、3 則是略為上升；(B) 精子添加 $0.1\mu\text{M}$ OPN 作用前後其 BCF 改變的相對比例。*, $p < 0.05$ 。

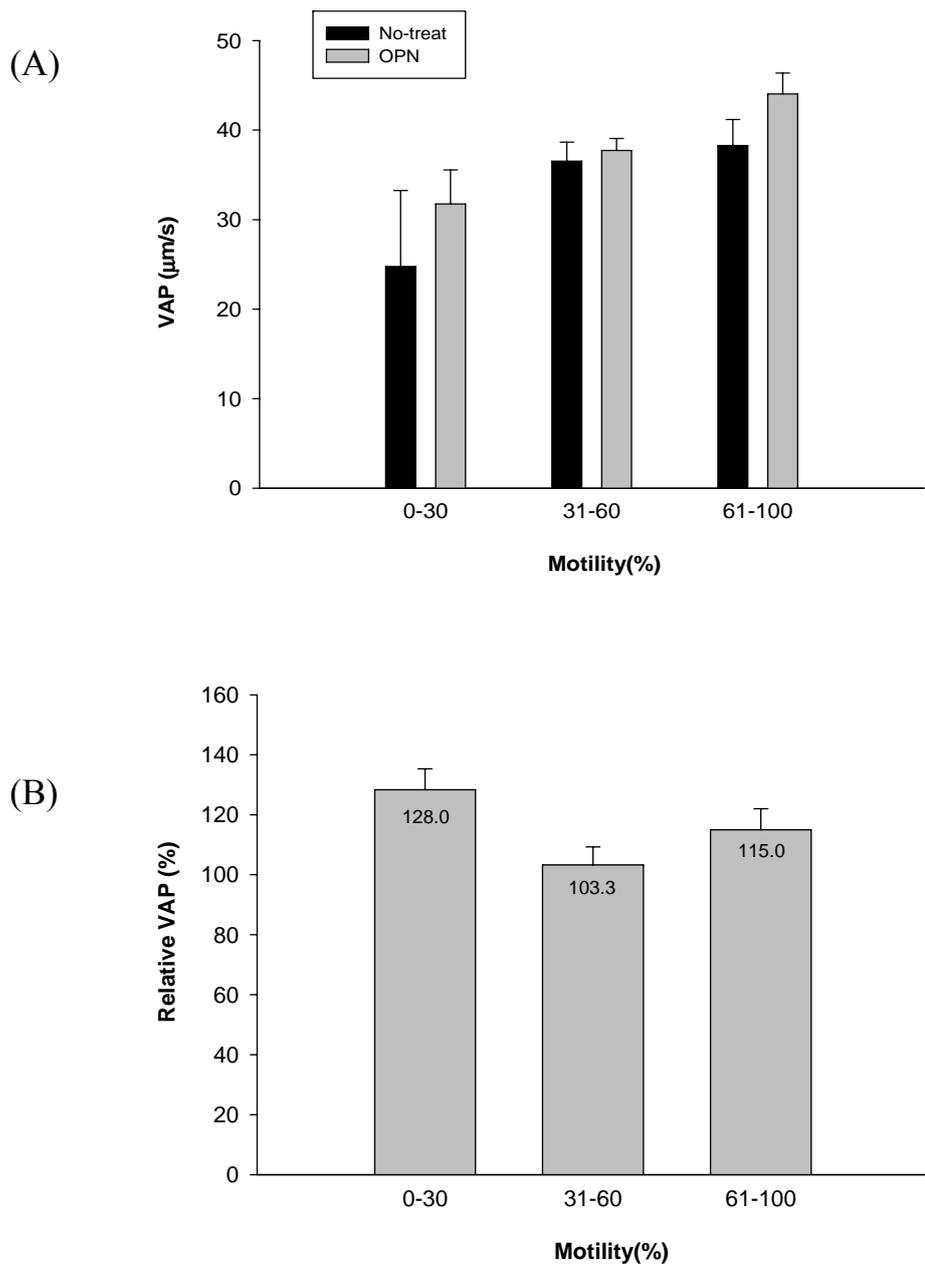


Fig. 18 OPN 對精子 VAP (velocity average path) 之影響。

(A) 精子加入 $0.1\mu\text{M}$ OPN 後 VAP 的改變情形，結果發現在 group 1 可增高 53.0%，.2.3 只有略微上升並無太大的變化；(B) 精子添加 $0.1\mu\text{M}$ OPN 作用前後其 VAP 改變的相對比例。

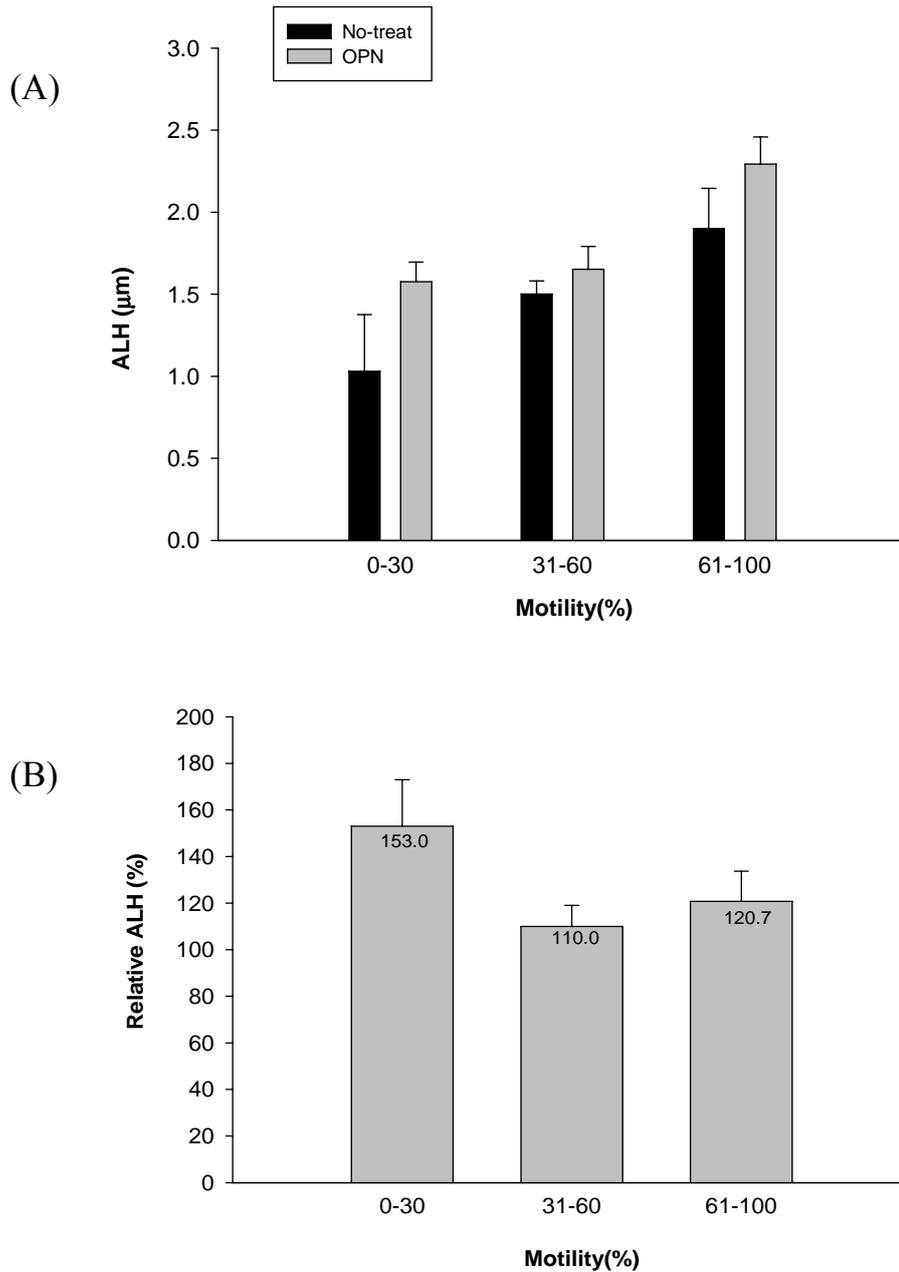


Fig. 19 OPN 對精子 ALH(amplitude of lateral head displacement) 之影響。

(A) 精子加入 0.1 μ M OPN 後 ALH 的改變情形，結果發現在 group 1.2.3 只有略微上升並無太大的變化；(B) 精子添加 0.1 μ M OPN 作用前後其 ALH 改變的相對比例。

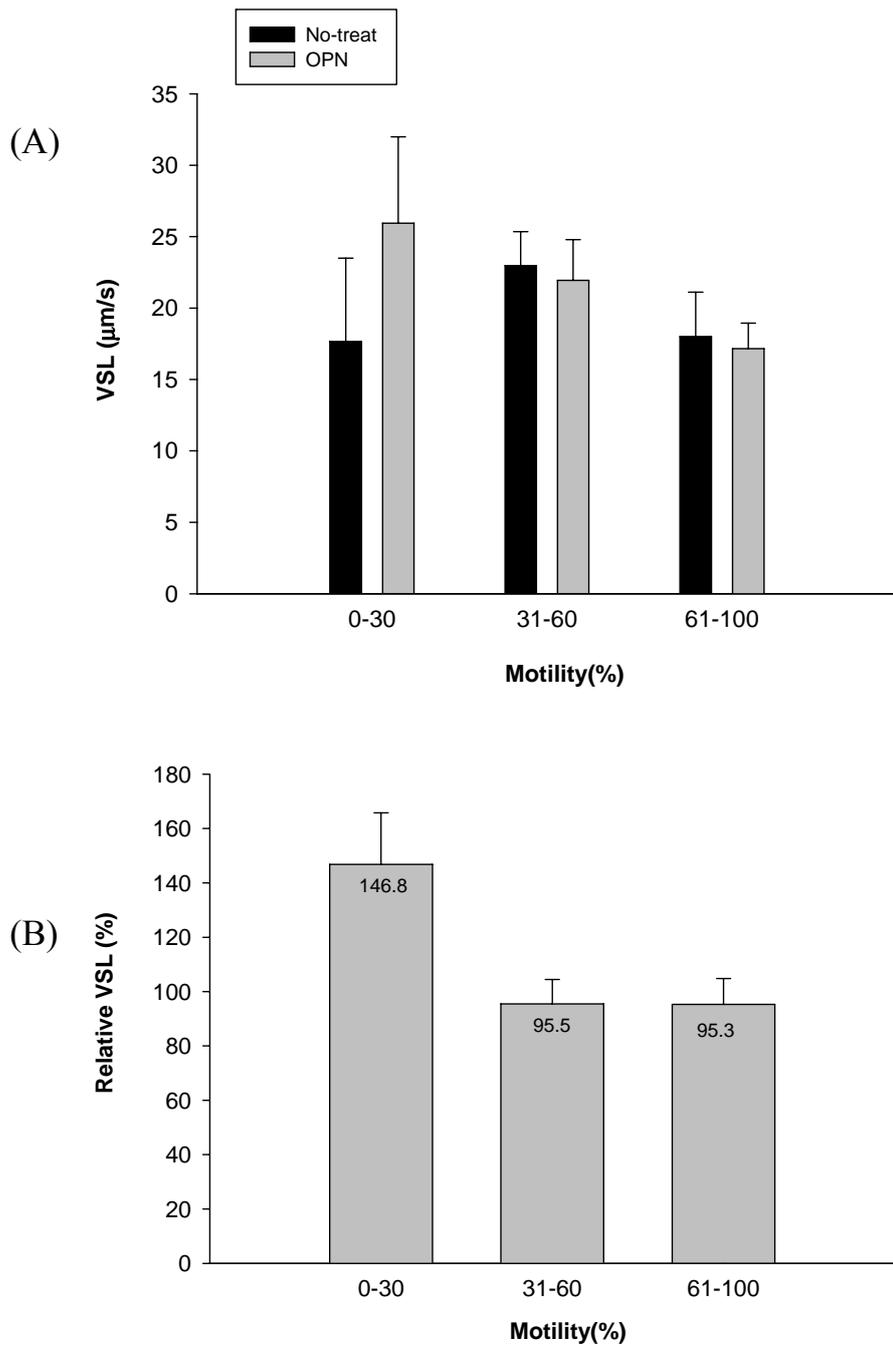


Fig. 20 OPN 對精子 VSL (velocity straight line) 之影響。

(A) 精子加入 $0.1\mu\text{M}$ OPN 後 VSL 的改變情形，結果發現在 group 1 (motility 0-30%) 有升高的趨勢，group 2、3 則是略為下降；(B) 精子添加 $0.1\mu\text{M}$ OPN 作用前後其 VSL 改變的相對比例。

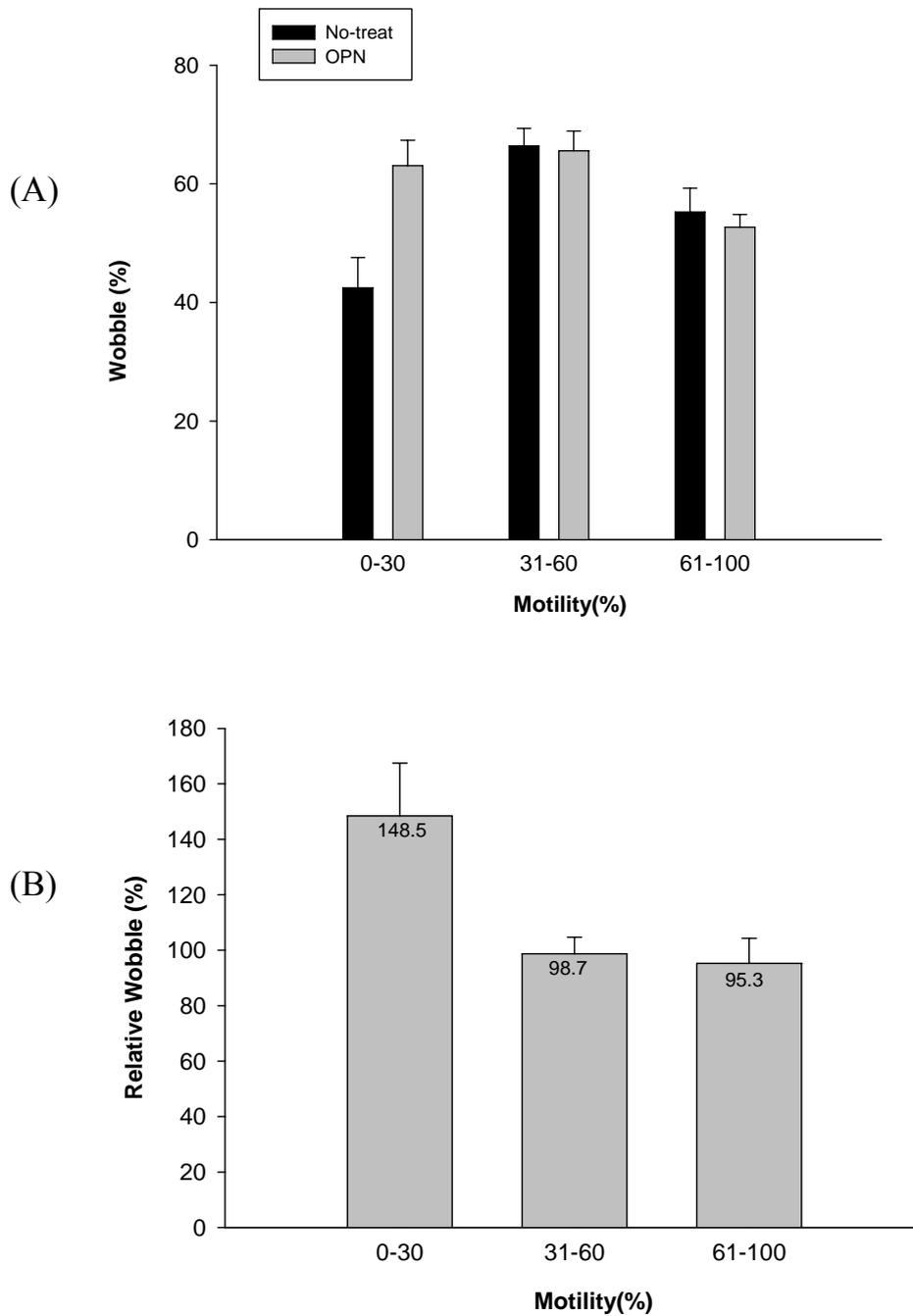


Fig. 21 OPN 對精子 WOB (wobble) 之影響。

(A) 精子加入 $0.1\mu\text{M}$ OPN 後 WOB 的改變情形，結果發現在 group 1(motility 0-30%)升高至 148.5%，group 2、3 則是略為下降；(B) 精子添加 $0.1\mu\text{M}$ OPN 作用前後其 WOB 改變的相對比例。

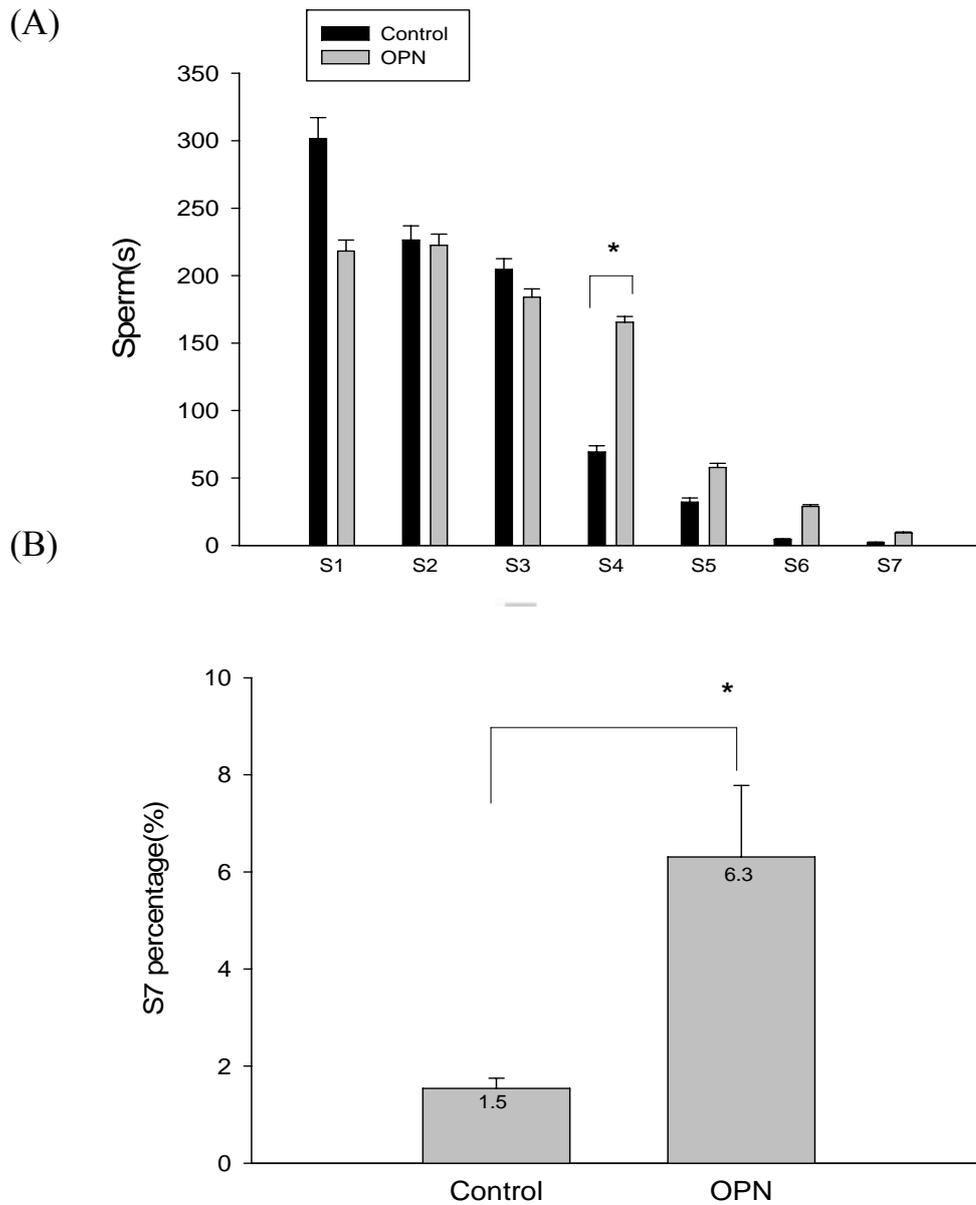


Fig.22 評估 OPN 對精子移行之結果並對精子移動力之影響

(A)分析加入 0.1 μ M OPN 後精子移動至每個 Segment (S1-S7)之數目。(B) 分析 OPN 在精子移行試驗中，游至終點(Segment 7)之精子佔所有精子之比例。* $p < 0.05$

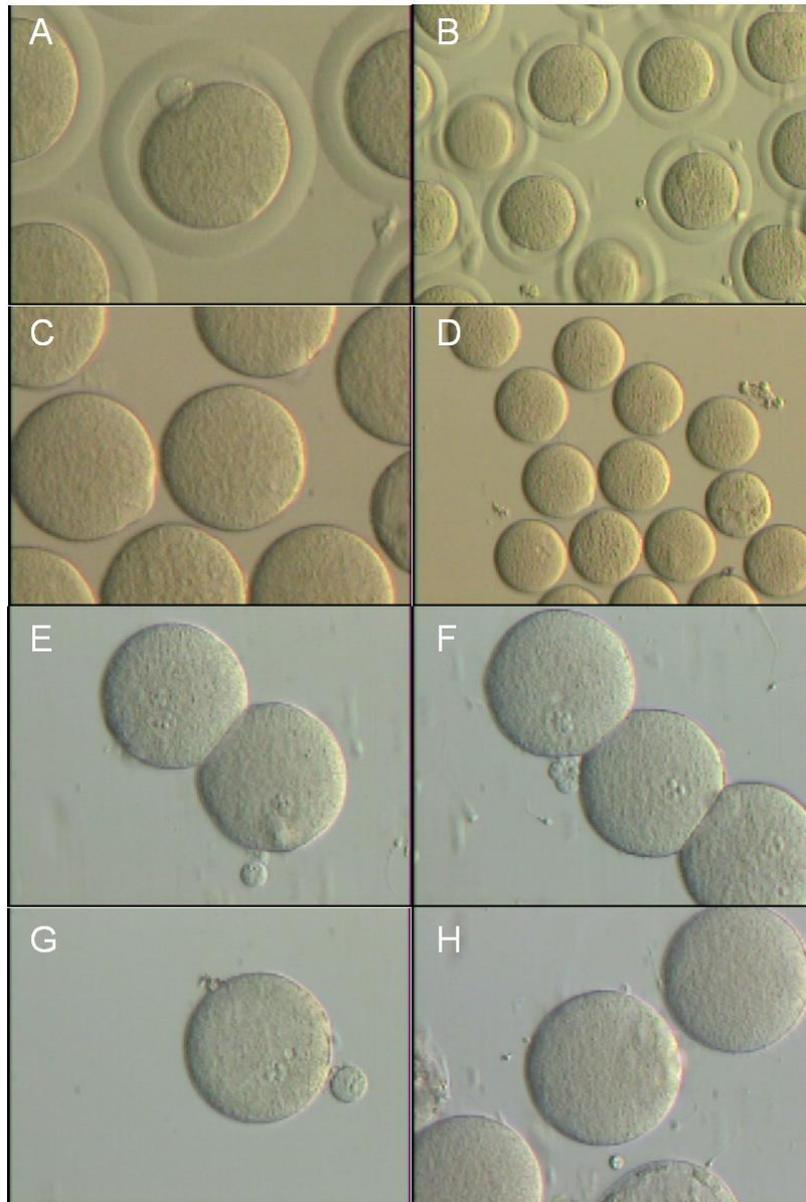


Fig. 23 老鼠精子穿透力試驗之結果(Sperm penetration assay ; SPA)

圖 A 及 B Hamster 之卵子；圖 C 及 D 添加 pronase 移除卵子透明帶(zona pellucida)；圖 E 及 F 加入 OPN 之組別；圖 G 及 H 為控制組。計算 E~H 圖中卵細胞內精子進入形成原核(pronucleus)的數目。A、C、E~H 為 400 倍而 B、D 為 200 倍顯微鏡下觀察。

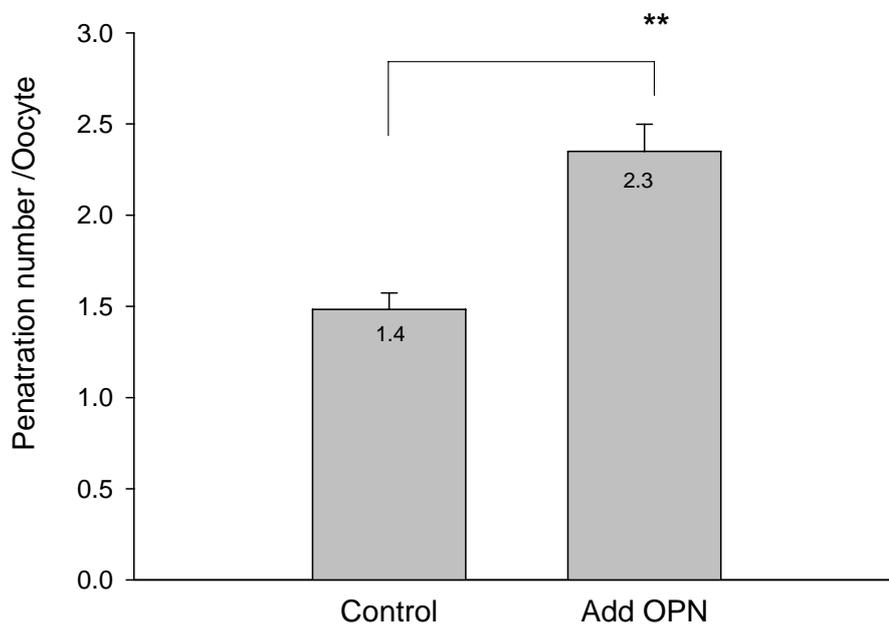


Fig. 24 OPN 對老鼠精子穿透卵子透明帶之影響

分析加入 0.1 μ M OPN 後精子後對穿透卵子能力之比例，結果發現加入 OPN 的 sperm 平均能穿透卵子的數目明顯增加。

**代表比較後有顯著意義 $p < 0.01$ 。

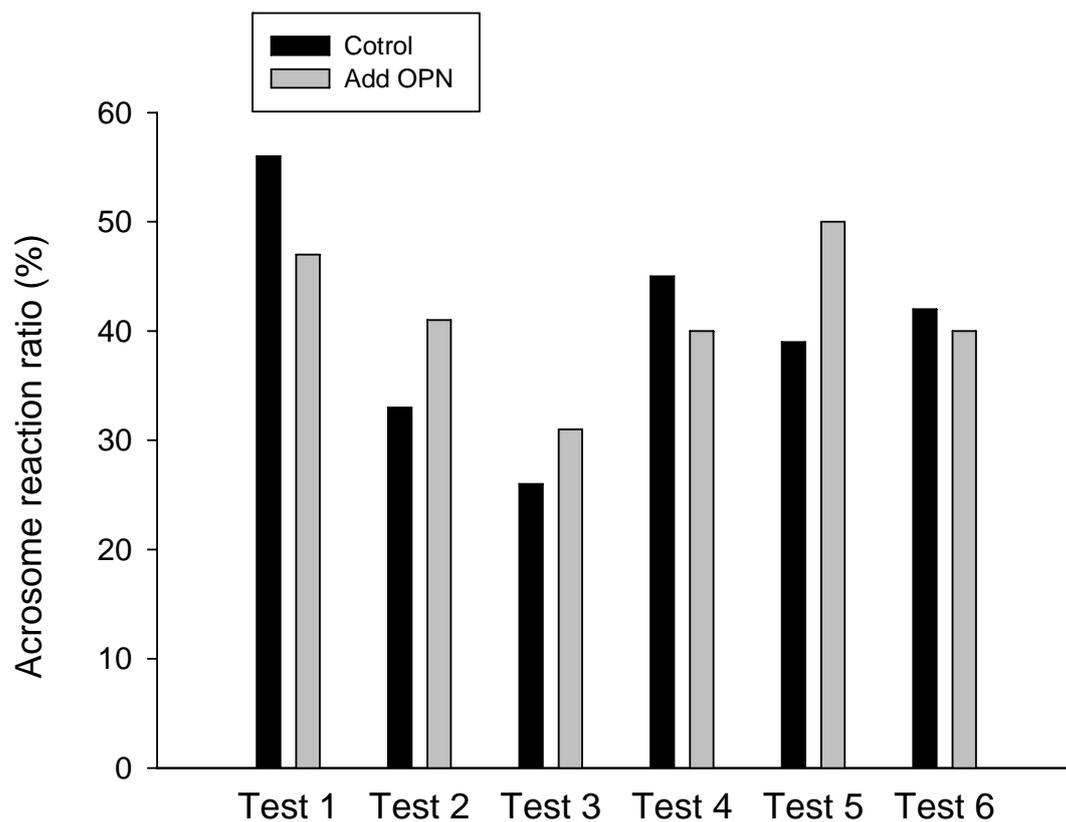


Fig.25 **OPN 對精子頂體反應試驗(Acrosomal reaction assay)之影響**

全部收集 6 位男性之精子，每個檢體隨機取 3-4 個視野觀察，總共計算 100 隻精子，觀察在加入 0.1 μ M OPN 的前後頂體反應的變化情形，結果發現 OPN 與控制組皆無顯差异性。

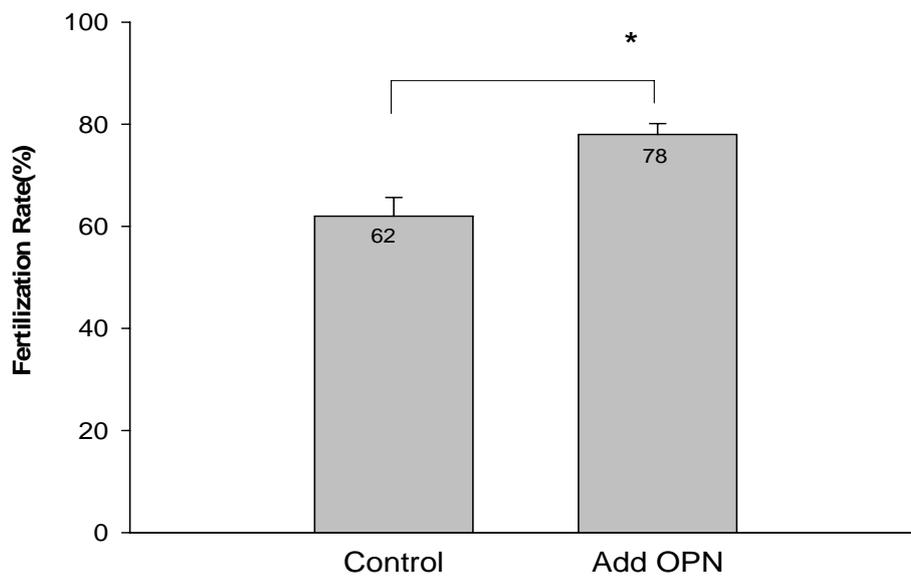


Fig. 26 OPN 對老鼠體外授精率之影響

分析加入 0.1 μ M OPN 精子後老鼠精子與卵子體外受精之比例，結果發現加入 OPN 之後受精率有明顯上升。* 代表比較後有意義 $p < 0.05$ 。

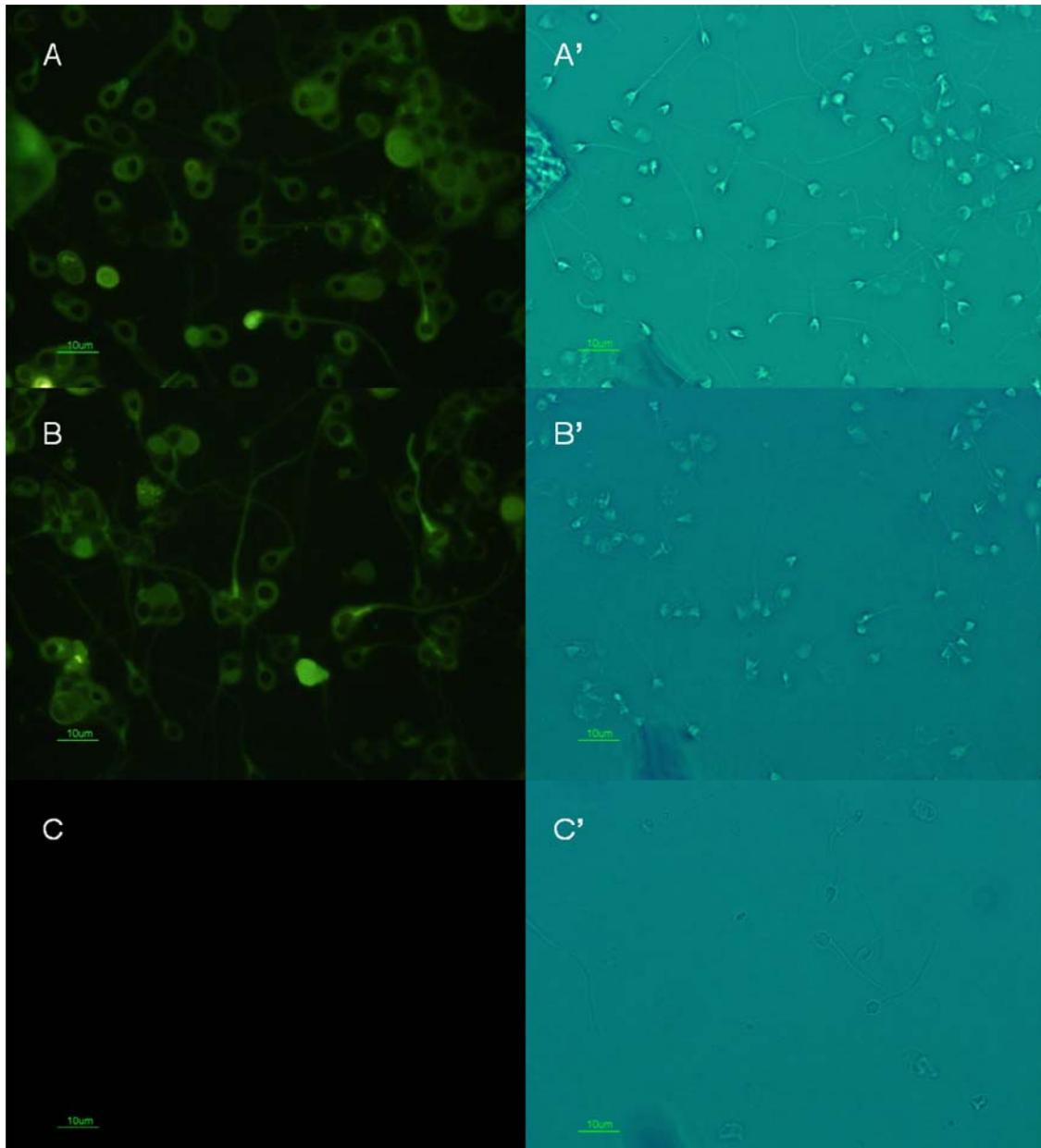


Fig. 27 於 200 倍顯微鏡下，觀察精子表現 OPN 之位置

利用免疫螢光染色方法，觀察精子所帶 OPN 之位置，在精子之頭部 (head)與中節(mid-piece)有 OPN 之螢光表現。其中 A，B 為 OPN 表現之螢光；C 為控制組。而 A'-C' 為一般可見光。

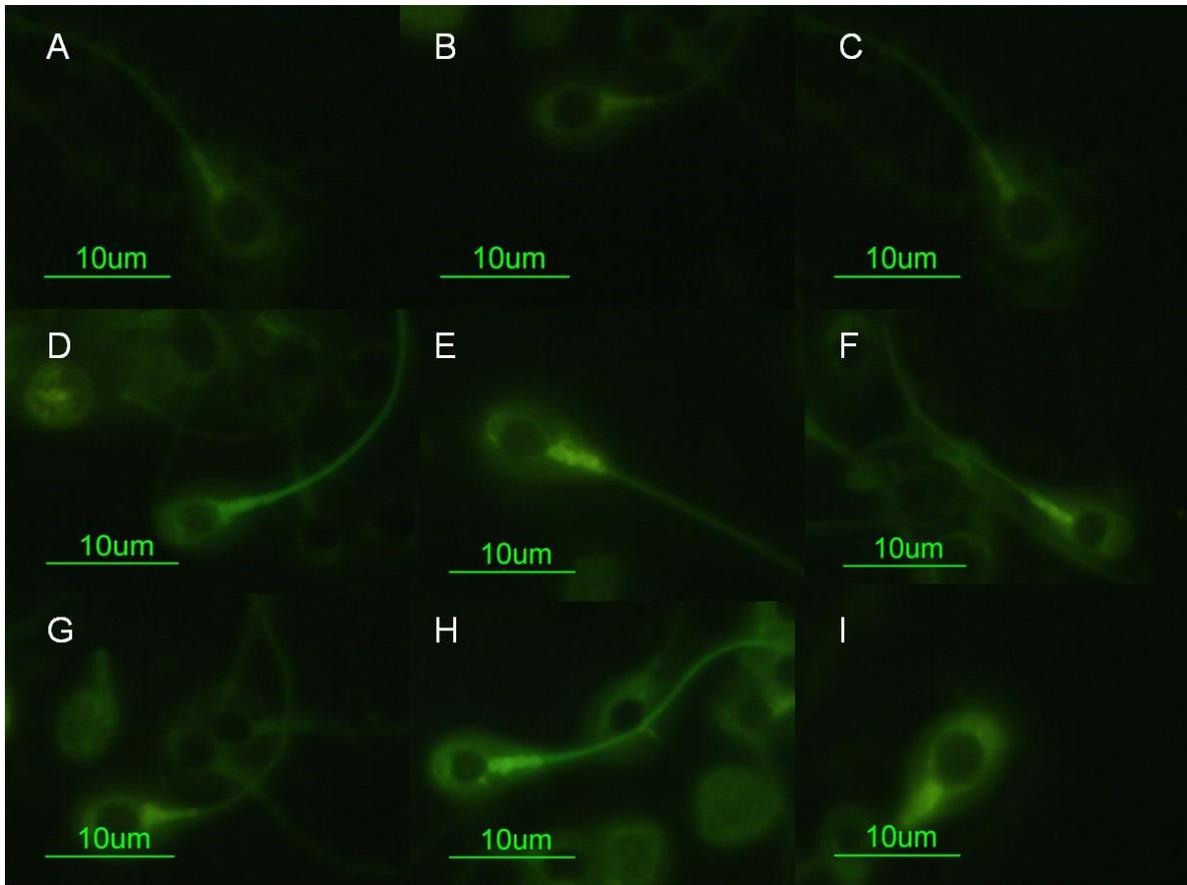


Fig. 28 以共軛焦顯微鏡，觀察精子細胞 OPN 之位置(localization)

在免疫螢光染色方法，觀察精子所帶 OPN 之位置與情形。A~C 為 Group1 之精子、D~F 為 Group2 之精子，以及 G~I 為 Group3 之 OPN 表現之情形，發現在游動力好的螢光強度有較明顯。

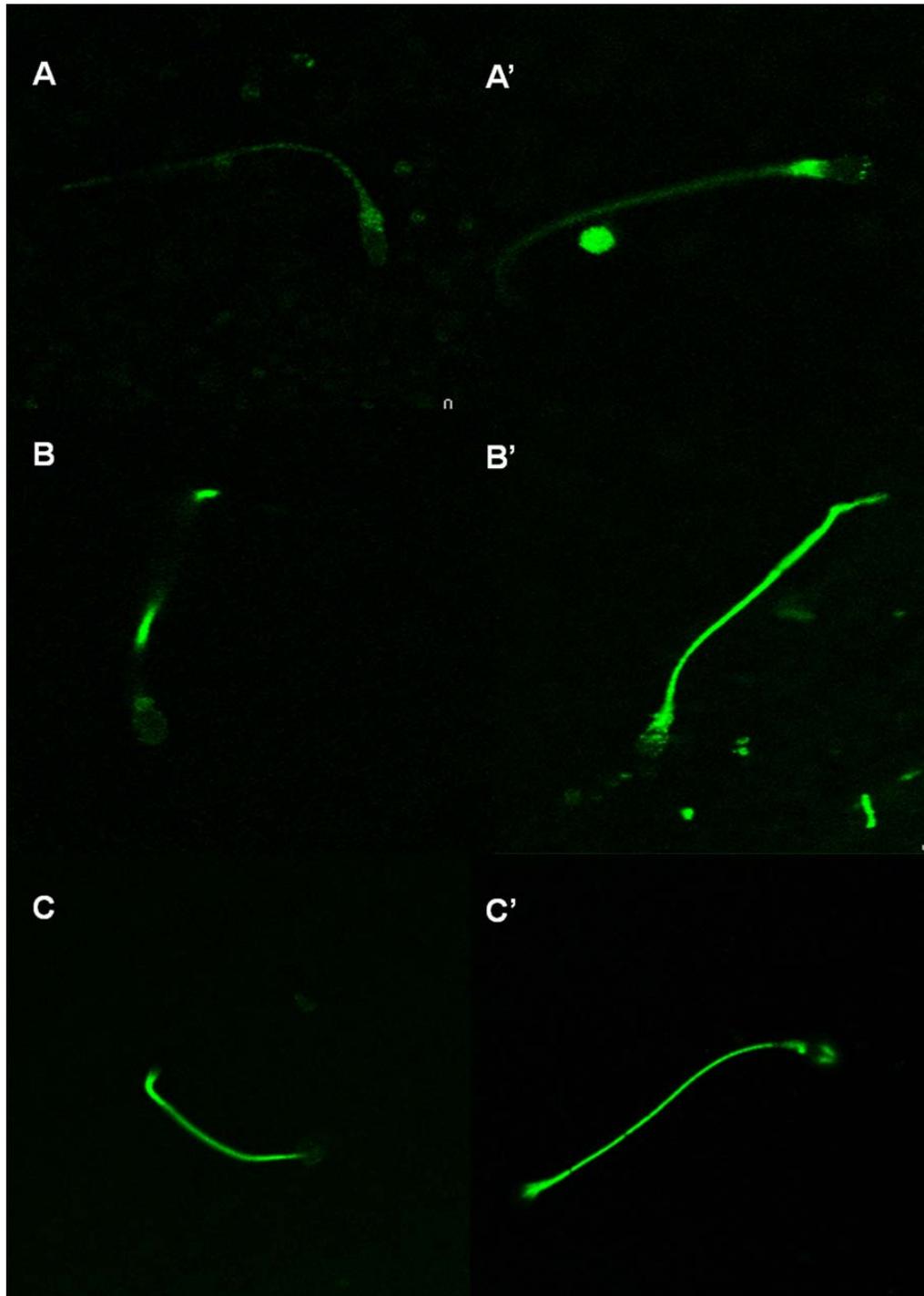


Fig. 29 免疫螢光染色-Actin、 α -tubulin 與 spectrin。
 (A,B,C)分別為未加入 OPN 之 Actin、 α -tubulin 與 spectrin 之 FITC。
 (A',B',C')分別為加入 OPN 之 Actin、 α -tubulin 與 spectrin 之 FITC。
 發現 Actin 在中節(mid-piece)亮度有明顯增加， α -tubulin 在尾巴(tail)
 亮度有明顯增加；spectrin 並無明顯改變。

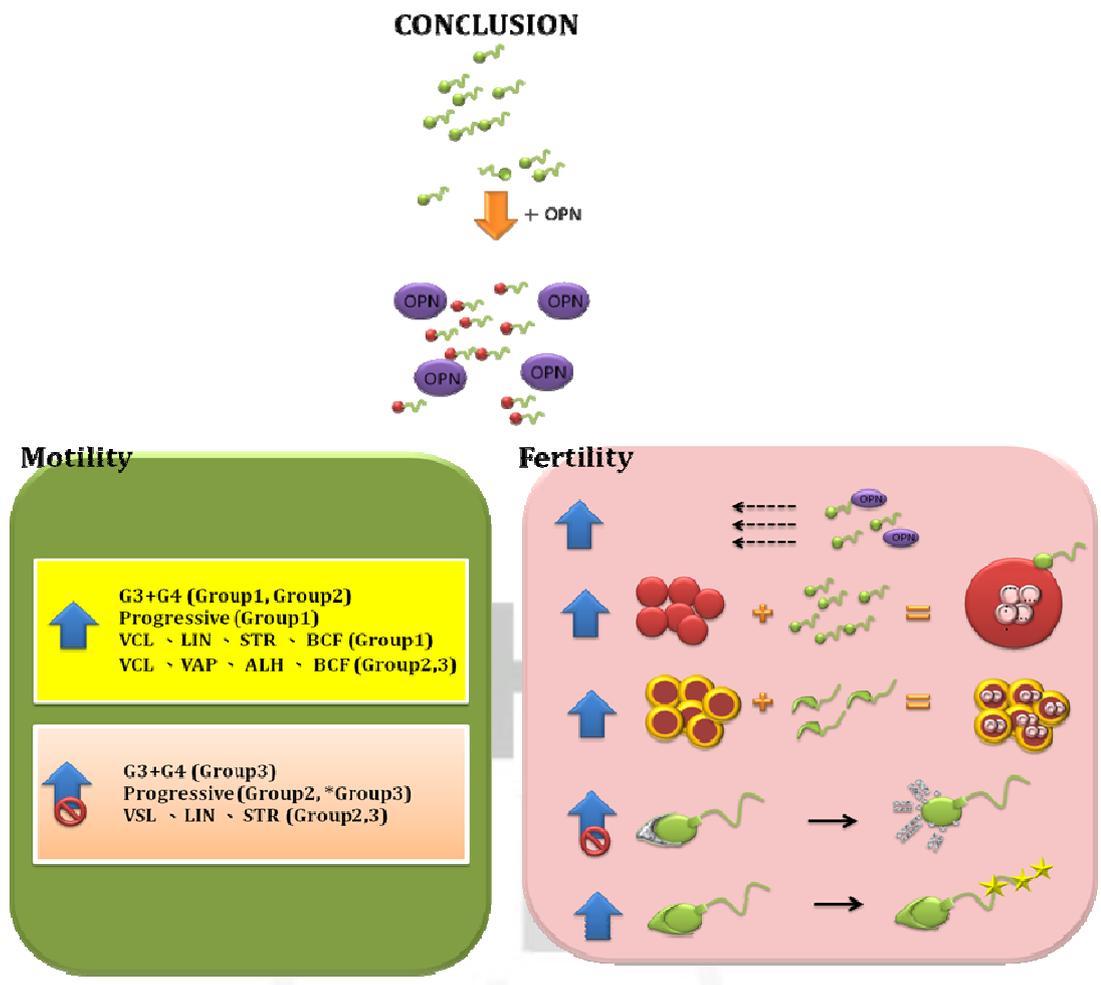


Fig. 30 實驗結果圖

在 Western blot 的分析結果中，發現在 25kD 以及 50kD 處有 OPN 的表現，並且其表現量與精子的游動力有相關性。精子細胞添加 OPN 後以 CASA 的分析，8 個運動參數中，其中 4 個參數，包括 VCL、LIN、STR 與 BCF，在 Group 1 有明顯升高的情形，不過在 Group 2 及 Group 3，OPN 並沒有顯著的提升。進一步分析 OPN 對於精子受孕能力的影響，發現 OPN 可以提高精子移動到卵子的能力、穿透卵子的能力以及增加體外受精率，但在精子頂體反應試驗中，結果並沒有發現有增加的情形。最後利用螢光染色分析方法觀察 OPN 加入後會造成精子的細胞骨架細胞的改變，因此本研究證實 OPN 具有調控精子游動力及受孕力的能力。

第七章 參考文獻



- Anderson, D.J., and Hill, J.A. (1988). Cell-mediated immunity in infertility. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 17, 22-30.
- Bakst, M.R., and Cecil, H.C. (1992). Effect of bovine serum albumin on motility and fecundity of turkey spermatozoa before and after storage. *J Reprod Fertil* 94, 287-293.
- Barlow, P., Delvigne, A., Van Dromme, J., Van Hoeck, J., Vandebosch, K., and Leroy, F. (1991). Predictive value of classical and automated sperm analysis for in-vitro fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)* 6, 1119-1124.
- Bhasin, S., de Kretser, D.M., and Baker, H.W. (1994). Clinical review 64: Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1525-1529.
- Blackmore, P.F., Beebe, S.J., Danforth, D.R., and Alexander, N. (1990). Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* 265, 1376-1380.
- Cancel, A.M., Chapman, D.A., and Killian, G.J. (1999). Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod* 60, 454-460.
- Chandley, A.C. (1979). The chromosomal basis of human infertility. *Br Med Bull* 35, 181-186.
- Denhardt, D.T., and Guo, X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 7, 1475-1482.
- Denhardt, D.T., and Noda, M. (1998). Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl* 30-31, 92-102.
- Eisenbach, M., and Tur-Kaspa, I. (1999). Do human eggs attract spermatozoa? *Bioessays* 21, 203-210.
- Farrell, P.B., Foote, R.H., Simkin, M.E., Clegg, E.D., and Wall, R.J. (1993). Relationship of semen quality, number of sperm inseminated, and fertility in rabbits. *J Androl* 14, 464-471.
- Ficarra, V., Cerruto, M.A., Liguori, G., Mazzoni, G., Minucci, S., Tracia, A., and Gentile, V. (2006). Treatment of varicocele in subfertile men: The Cochrane Review--a contrary opinion. *Eur Urol* 49, 258-263.
- Forti, G., and Krausz, C. (1998). Clinical review 100: Evaluation and treatment of the infertile couple. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 4177-4188.
- Fukuda, M., and Fukuda, K. (1994). Uterine endometrial cavity movement and cervical mucus. *Hum Reprod* 9, 1013-1016.
- Garton, M.J., and Reid, D.M. (1993). Bone mineral density of the hip and of the anteroposterior and lateral dimensions of the spine in men with rheumatoid arthritis. Effects of low-dose corticosteroids. *Arthritis Rheum* 36, 222-228.
- Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J., and Freundl, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human reproduction (Oxford, England)* 20, 1144-1147.
- Goncalves, R.F., Wolinetz, C.D., and Killian, G.J. (2007). Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins (alphaV and alpha5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. *Theriogenology* 67, 468-474.
- Hao, Y., Mathialagan, N., Walters, E., Mao, J., Lai, L., Becker, D., Li, W., Critser, J., and Prather, R.S. (2006). Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. *Biol Reprod* 75, 726-733.
- Hoflack, G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., and Duchateau, L. (2007). Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian blue and Holstein-Friesian bulls. *Reprod Domest Anim* 42, 153-161.
- Holt, C., Holt, W.V., Moore, H.D., Reed, H.C., and Curnock, R.M. (1997). Objectively

measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl* 18, 312-323.

Holt, W.V., Moore, H.D., and Hillier, S.G. (1985). Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays. *Fertil Steril* 44, 112-119.

Hossain, A.M., Barik, S., Rizk, B., Kulkarni, P.M., and Thorneycroft, I.H. (1999). Analysis of in vitro migration patterns of human spermatozoa by a petri dish-based horizontal column. *Biol Reprod* 61, 406-410.

Johnson, G.A., Burghardt, R.C., Bazer, F.W., and Spencer, T.E. (2003). Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biol Reprod* 69, 1458-1471.

Jouannet, P., and Serres, C. (1998). [The movement of the human spermatozoon]. *Bull Acad Natl Med* 182, 1025-1034; discussion 1034-1026.

Kaji, K., and Kudo, A. (2004). The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127, 423-429.

Katagiri, Y.U., Sleeman, J., Fujii, H., Herrlich, P., Hotta, H., Tanaka, K., Chikuma, S., Yagita, H., Okumura, K., Murakami, M., *et al.* (1999). CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 59, 219-226.

King, L.M., Holsberger, D.R., and Donoghue, A.M. (2000). Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in turkeys. *J Androl* 21, 65-71.

Kohri, K., Nomura, S., Kitamura, Y., Nagata, T., Yoshioka, K., Iguchi, M., Yamate, T., Umekawa, T., Suzuki, Y., Sinohara, H., *et al.* (1993). Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *J Biol Chem* 268, 15180-15184.

Kulin, S., Bastiaans, B.A., Hollanders, H.M., Janssen, H.J., and Goverde, H.J. (1994). Human serum and follicular fluid stimulate hyperactivation of human spermatozoa after preincubation. *Fertil Steril* 62, 1234-1237.

Kumar, R., Harper, M.J., and Hanahan, D.J. (1988). Occurrence of platelet-activating factor in rabbit spermatozoa. *Arch Biochem Biophys* 260, 497-502.

Kuzan, F.B., Geissler, F.T., and Henderson, W.R., Jr. (1990). Role of spermatozoal platelet-activating factor in fertilization. *Prostaglandins* 39, 61-74.

Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T.K., Bonde, J.P., Ernst, E., Hjollund, N.H., Zhou, Y., Skakkebaek, N.E., and Giwercman, A. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human reproduction (Oxford, England)* 15, 1562-1567.

Lindemann, C.B., Orlando, A., and Kanous, K.S. (1992). The flagellar beat of rat sperm is organized by the interaction of two functionally distinct populations of dynein bridges with a stable central axonemal partition. *J Cell Sci* 102 (Pt 2), 249-260.

Liu, D.Y., and Baker, H.W. (2000). Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)* 15, 702-708.

Liu, D.Y., Clarke, G.N., and Baker, H.W. (1991). Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl* 12, 231-239.

Liu, D.Y., Clarke, G.N., Lopata, A., Johnston, W.I., and Baker, H.W. (1989). A sperm-zona pellucida binding test and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 52, 281-287.

- Liu, D.Y., Clarke, G.N., Martic, M., Garrett, C., and Baker, H.W. (2001). Frequency of disordered zona pellucida (ZP)-induced acrosome reaction in infertile men with normal semen analysis and normal spermatozoa-ZP binding. *Human reproduction (Oxford, England)* *16*, 1185-1190.
- Macleod, I.C., and Irvine, D.S. (1995). The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme. *Human reproduction (Oxford, England)* *10*, 580-586.
- Mayorga, L.S., Tomes, C.N., and Belmonte, S.A. (2007). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* *59*, 286-292.
- Mazumdar, S., and Levine, A.S. (1998). Antisperm antibodies: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Fertil Steril* *70*, 799-810.
- Mbizvo, M.T., Burkman, L.J., and Alexander, N.J. (1990). Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm. *Fertil Steril* *54*, 708-712.
- Meizel, S. (1985). Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Am J Anat* *174*, 285-302.
- Minhas, B.S. (1993). Platelet-activating factor treatment of human spermatozoa enhances fertilization potential. *Am J Obstet Gynecol* *168*, 1314-1317.
- Minhas, B.S., Kumar, R., Ricker, D.D., Robertson, J.L., and Dodson, M.G. (1991). The presence of platelet-activating factor-like activity in human spermatozoa. *Fertil Steril* *55*, 372-376.
- Minhas, B.S., Ripps, B.A., Zhu, Y.P., Kim, H.N., Burwinkel, T.H., and Gleicher, N. (1996). Platelet activating factor and conception. *Am J Reprod Immunol* *35*, 267-271.
- Minhas, B.S., Zhu, Y.P., Kim, H.N., Ripps, B.A., and Buster, J.E. (1993). Platelet activating factor content and release from rabbit spermatozoa is stimulated by progesterone treatment. Fortieth Annual Meeting, Society for Gynecologic Investigation, Toronto, Canada, *Abstract* 349.
- Moore, H.D., and Akhondi, M.A. (1996). Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those from the distal cauda or vas deferens. *J Androl* *17*, 50-60.
- Mortimer, D., and Mortimer, S.T. (1988). Influence of system parameter settings on human sperm motility analysis using CellSoft. *Human reproduction (Oxford, England)* *3*, 621-625.
- Muratori, M., Luconi, M., Marchiani, S., Forti, G., and Baldi, E. (2008). Molecular markers of human sperm functions. *Int J Androl*.
- Naz, R.K., and Kaplan, P. (1994). Increased levels of interleukin-6 in seminal plasma of infertile men. *J Androl* *15*, 220-227.
- Naz, R.K., and Kumar, R. (1991). Transforming growth factor beta 1 enhances expression of 50 kDa protein related to 2'-5' oligoadenylate synthetase in human sperm cells. *J Cell Physiol* *146*, 156-163.
- Oehninger, S. (2001). Strategies for the infertile man. *Semin Reprod Med* *19*, 231-237.
- Omigbodun, A., Ziolkiewicz, P., Tessler, C., Hoyer, J.R., and Coutifaris, C. (1997). Progesterone regulates osteopontin expression in human trophoblasts: a model of paracrine control in the placenta? *Endocrinology* *138*, 4308-4315.
- Parks, J.E., Hough, S., and Elrod, C. (1990). Platelet activating factor activity in the phospholipids of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* *43*, 806-811.
- Parvinen, M., Salo, J., Toivonen, M., Nevalainen, O., Soini, E., and Pelliniemi, L.J. (1997).

Computer analysis of living cells: movements of the chromatoid body in early spermatids compared with its ultrastructure in snap-frozen preparations. *Histochem Cell Biol* 108, 77-81.

Primakoff, P., and Myles, D.G. (2002). Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science* 296, 2183-2185.

Prince, C.W., Oosawa, T., Butler, W.T., Tomana, M., Bhowan, A.S., Bhowan, M., and Schrohenloher, R.E. (1987). Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem* 262, 2900-2907.

Ravnik, S.E., Zarutskie, P.W., and Muller, C.H. (1990). Lipid transfer activity in human follicular fluid: relation to human sperm capacitation. *J Androl* 11, 216-226.

Rollo, E.E., Laskin, D.L., and Denhardt, D.T. (1996). Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *J Leukoc Biol* 60, 397-404.

Senger, D.R., Perruzzi, C.A., and Papadopoulos, A. (1989). Elevated expression of secreted phosphoprotein I (osteopontin, 2ar) as a consequence of neoplastic transformation. *Anticancer Res* 9, 1291-1299.

Sengoku, K., Tamate, K., Takaoka, Y., and Ishikawa, M. (1993). Effects of platelet activating factor on human sperm function in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)* 8, 1443-1447.

Settlage, D.S., Motoshima, M., and Tredway, D.R. (1973). Sperm transport from the external cervical os to the fallopian tubes in women: a time and quantitation study. *Fertil Steril* 24, 655-661.

Shiraga, H., Min, W., VanDusen, W.J., Clayman, M.D., Miner, D., Terrell, C.H., Sherbotie, J.R., Foreman, J.W., Przysiecki, C., Neilson, E.G., *et al.* (1992). Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 426-430.

Shivaji, S., Peedicayil, J., and Girija Devi, L. (1995). Analysis of the motility parameters of in vitro hyperactivated hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 42, 233-247.

Siiteri, J.E., Ensrud, K.M., Moore, A., and Hamilton, D.W. (1995). Identification of osteopontin (OPN) mRNA and protein in the rat testis and epididymis, and on sperm. *Mol Reprod Dev* 40, 16-28.

Sikka, S.C., and Hellstrom, W.J. (1991). The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. *J Androl* 12, 165-170.

Sodek, J., Ganss, B., and McKee, M.D. (2000). Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 279-303.

Souza, C.E., Moura, A.A., Monaco, E., and Killian, G.J. (2008). Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci* 105, 72-89.

Stromblad, S., Becker, J.C., Yebra, M., Brooks, P.C., and Cheresh, D.A. (1996). Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J Clin Invest* 98, 426-433.

Suarez, S.S., and Pacey, A.A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update* 12, 23-37.

Sutcliffe, A.G., and Ludwig, M. (2007). Outcome of assisted reproduction. *Lancet* 370, 351-359.

Templeton, A. (2000). Infertility and the establishment of pregnancy--overview. *Br Med Bull* 56, 577-587.

Van Steirteghem, A., Liebaers, I., and Camus, M. (1999). [Genetic male infertility]. *Rev Prat*

49, 1309-1313.

Vizcarra, J.A., and Ford, J.J. (2006). Validation of the sperm mobility assay in boars and stallions. *Theriogenology* 66, 1091-1097.

Wainer, R., Merlet, F., Bailly, M., Lombroso, R., Camus, E., and Bisson, J.P. (1996). [Prognostic sperm factors in intra-uterine insemination with partner's sperm]. *Contracept Fertil Sex* 24, 897-903.

Weber, G.F., and Cantor, H. (1996). The immunology of Eta-1/osteopontin. *Cytokine Growth Factor Rev* 7, 241-248.

Yamamoto, M., and Miyake, K. (1994). Successful use of interferon for male infertility. *Lancet* 344, 614.

Yee, B., and Cummings, L.M. (1988). Modification of the sperm penetration assay using human follicular fluid to minimize false negative results. *Fertil Steril* 50, 123-128.

Yudin, A.I., Gottlieb, W., and Meizel, S. (1988). Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Gamete Res* 20, 11-24.

