

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

類泛素小分子蛋白修飾作用在人工生殖週期中對於精蟲功能及
染色質損壞之角色

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 106-2314-B-040-022-
執行期間：106年08月01日至107年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：李宗賢

計畫參與人員：學士級-專任助理：丁祐任

中華民國 107 年 10 月 28 日

中文摘要：精蟲細胞的細胞質很少，合成蛋白質的功能幾乎停擺，因此蛋白質轉譯後修飾的作用，對於精蟲既有蛋白質的正常功能非常重要，例如精子獲能的過程就依賴著酪氨酸的磷酸化。近來發現類泛素小分子蛋白質修飾作用 (Small Ubiquitin-like Modifier; SUMO)，可以當作精蟲是否有缺陷的指標，而SUMO蛋白程度多寡，又受到氧化壓力的調節。個人最近對於精蟲的研究，發現抗氧化能力的作用，可能在精子生成的階段，而非體外培養的階段。因此我們假設SUMO程度可能代表精蟲生成階段的氧化壓力指標，並且可能與精漿的抗氧化能力及精蟲DNA損壞有相當的關聯。在此一年期的研究計畫成果，我們完成收集70位男性個案的精液樣本檢體，分別進行精液分析、ROS偵測與免疫螢光染色觀察精蟲細胞的SUMO表現程度。結果發現ROS活性較高之精蟲細胞，其活動力比例明顯較低，並初步觀察到在不同活動力的精蟲細胞中，ROS活性與SUMO蛋白表現有不同的相關趨勢。

中文關鍵詞：自由基，類泛素小分子蛋白質，精蟲細胞

英文摘要：Protein synthesis in spermatozoa is almost absent due to scanty cytoplasm. Post-translational modification is essential for the normal function of proteins in spermatozoa. For example, sperm capacitation is closely dependent on tyrosine phosphorylation. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) for protein modification is reported to be a marker of defective spermatozoa. Furthermore, sumoylation is regulated by oxidative stress. Our recent research for spermatozoa suggested that the effect of antioxidants may be related to the stage of spermatogenesis instead of in vitro culture. Taking together, we raised the hypothesis that sperm sumoylation may indicate the oxidative stress during spermatogenesis and the sperm sumoylation may closely correlated with antioxidant capacity of seminal plasma and sperm DNA fragmentation. In this year, there were total 70 semen samples collected, and then semen analysis, ROS detection and immunofluorescence had been done. We found that motile is decreased in sperm cell with high ROS level. And there may be a different correlation between ROS activity and SUMO protein expression in motile and immotile sperm cell.

英文關鍵詞：Reactive Oxygen Species (ROS)，Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)，sperm

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

類泛素小分子蛋白修飾作用 在人工生殖週期中對於精蟲功能及染色質損壞之角色

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 106-2314-B-040-022-

執行期間：106年08月01日至107年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：李宗賢 副教授

計畫參與人員：丁祐任 研究助理

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 份：

- 執行國際合作與移地研究心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 出國參訪及考察心得報告

中華民國 107 年 10 月 27 日

目錄

中英文摘要及關鍵詞	ii
報告內容	
前言	1
研究目的	1
文獻探討	1
研究方法	3
結果與討論	4
參考文獻	9
計畫成果自評	11
科技部補助專題研究計畫成果彙整表	12

(一) 計畫中文摘要。(五百字以內)

關鍵字：自由基，類泛素小分子蛋白質，精蟲細胞

精蟲細胞的細胞質很少，合成蛋白質的功能幾乎停擺，因此蛋白質轉譯後修飾的作用，對於精蟲既有蛋白質的正常功能非常重要，例如精子獲能的過程就依賴著酪氨酸的磷酸化。近來發現類泛素小分子蛋白質修飾作用 (Small Ubiquitin-like Modifier; SUMO)，可以當作精蟲是否有缺陷的指標，而 SUMO 蛋白程度多寡，又受到氧化壓力的調節。個人最近對於精蟲的研究，發現抗氧化能力的作用，可能在精子生成的階段，而非體外培養的階段。因此我們假設 SUMO 程度可能代表精蟲生成階段的氧化壓力指標，並且可能與精漿的抗氧化能力及精蟲 DNA 損壞有相當的關聯。在此一年期的研究計畫成果，我們完成收集 70 位男性個案的精液樣本檢體，分別進行精液分析、ROS 偵測與免疫螢光染色觀察精蟲細胞的 SUMO 表現程度。結果發現 ROS 活性較高之精蟲細胞，其活動力比例明顯較低，並初步觀察到在不同活動力的精蟲細胞中，ROS 活性與 SUMO 蛋白表現有不同的相關趨勢。

(二) 計畫英文摘要。(五百字以內)

Key words：Reactive Oxygen Species (ROS) ， Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) ， sperm

Protein synthesis in spermatozoa is almost absent due to scanty cytoplasm. Post-translational modification is essential for the normal function of proteins in spermatozoa. For example, sperm capacitation is closely dependent on tyrosine phosphorylation. The small ubiquitin-like modifier (SUMO) for protein modification is reported to be a marker of defective spermatozoa. Furthermore, sumoylation is regulated by oxidative stress. Our recent research for spermatozoa suggested that the effect of antioxidants may be related to the stage of spermatogenesis instead of in vitro culture. In addition, we found that the localization of DAXX (a SUMO-target protein) in spermatozoa is similar with that of SUMO2/3 protein. Taking together, we raised the hypothesis that sperm sumoylation may indicate the oxidative stress during spermatogenesis and the sperm sumoylation may closely correlated with antioxidant capacity of seminal plasma and sperm DNA fragmentation. In this year, there were total 70 semen samples collected, and then semen analysis, ROS detection and immunofluorescence had been done. We found that motile is decreased in sperm cell with high ROS level. And there may be a different correlation between ROS activity and SUMO protein expression in motile and immotile sperm cell.

壹、前言

人類自然受孕過程需要染色體為單倍體精蟲與卵子，兩者能順利完成相當複雜的受精(fertilization)動作，進而形成染色體雙倍體的受精卵。而精子或卵子的生成都要經歷相當繁複的成熟過程，反向的從雙倍體的精原細胞或卵母細胞，經過減數分裂生成單倍體的精蟲或卵子。在睪丸製造的精蟲，還要經過在副睪適當的活化，逐漸成熟，才能獲得具有使卵子受精的能力，這個過程稱為精蟲獲能 capacitation(Austin, 1952)。經歷獲能過程之後，精子獲得使卵子受精能力，可以穿過卵子透明層，與卵子細胞膜結合，進入卵子內，以完成受精。而人工生殖療程也是個複雜的療程，原則上都在模擬自然受孕的過程來發展新的技術或是設計流程，所以基本上需要能夠正常發揮功能的優質精蟲與卵子，以達到成功受孕及生殖下一代的目的。

Reactive Oxygen Species (ROS)又稱為自由基，為一群具有未配對電子的高度活性分子，在生物體之中常伴隨氧化還原反應生成。由於 ROS 的高活性，其在生物體內的存在扮演著一定的生理特性。然而一旦 ROS 的生成過多且未存在足夠的抗氧化劑(Antioxidants)與之調節，氧化壓力(oxidative stress)因而產生，並對細胞造成傷害。已有文獻指出雖然精蟲本身具有抗氧化酵素系統及低分子量抗氧化物質，用以處理過多的氧化自由基，但是精蟲本身的一些特質，例如細胞膜上富含不飽和脂肪酸、細胞質的量很少，也就是抗氧化酵素及抗氧化物質的量不多，造成精蟲很容易受到氧化壓力影響，包含精蟲細胞磷脂質的破壞、DNA 損壞甚至誘發精蟲細胞凋亡，繼而影響精蟲的品質，精蟲活動力減弱、精蟲細胞數減少等等，目前認為男性不孕症及部分不明原因不孕症都可能與精蟲受到氧化壓力之後的氧化破壞作用有關聯(Agarwal et al., 2014) 。另一方面，由於精蟲細胞本身缺乏轉錄活性，無法藉由產生新的蛋白質維持生理功能，僅能依賴既有蛋白質轉譯後修飾(Post-translation modification, PTMs)來調節正常生理功能。其中類泛素化(Small-ubiquitination modification, SUMOylation)已經被確認與精蟲生成相關，並且被認為是精蟲發育缺陷的一個指標 (Vigodner et al., 2013)。

貳、 研究目的

為了釐清精蟲細胞 ROS 強度與與細胞中類泛素化程度的相關性，因此本研究蒐集精液樣本進行 ROS 偵測與類泛素化程度分析比對，以驗證兩者之間的相關性。

參、 文獻探討

精蟲細胞因為細胞質的量很少，幾乎沒有製造新蛋白質的功能，因此舊有蛋白質轉譯後修飾的作用，對於正常精蟲細胞的功能就變得格外重要。常見的轉譯後修飾作用包括某些氨基酸的磷酸化、半胱氨酸(cysteine)的雙硫鍵(-S-S-)、乃至於加上醣鏈 (glycosylation)等等。精蟲細胞蛋白質轉譯後修飾作用中，酪氨酸磷酸化(tyrosine phosphorylation)是被研究的最多最透徹的，且酪氨酸磷酸化與精蟲獲能 (capacitation)有密切相關。除此之外，精蟲獲能也與氧化自由基的生理作用有關(De Jonge, 2005)。這個作用與細胞膜蛋白質的酪氨酸磷酸化有關，必須要有一定濃度的氧化自由基才能進行細胞膜蛋白質酪氨酸的磷酸化作用。這裡面的調節作用主要是依賴過氧化氫(hydrogen peroxide)以及細胞膜上面的 receptor tyrosine kinase(RTK)去調節訊息傳遞(O'Flaherty et al., 2006)。我們之前的研究證實，不同種類的合成血清白蛋白 (synthetic serum albumin)對於精蟲獲能的影響與氧化自由基的濃度高低有關。且如果給予還原型的 glutathione 之類的抗氧化劑，則可抑制精子獲能的過程(Shih et al., 2016)。

事實上，精蟲細胞合成蛋白質之後，這些蛋白質還需要在內質網中進行酵素切割、藉由雙硫鍵(-S-S-)進行摺疊、還有加上醣鏈等轉譯後修飾過程。其中蛋白質在內質網的雙硫鍵折疊過程與氧化自

由基有關，當氧化自由基過多時，會造成蛋白質出現錯誤的折疊，這些摺疊錯誤的蛋白質則會誘發unfold protein response (UPR)，藉此可以回收利用蛋白質中的胺基酸。氧化自由基在生物體內或細胞中的作用具有兩面刀的特性，在精蟲生成或是受精的過程中也是。例如精蟲染色質由 histone 轉成 protamine，需要蛋白質進行 sulfoxidation 來完成緻密化的過程，這個過程與蛋白質中半胱胺. (cysteine) 的氧化有關，也是藉由類似雙硫鍵(-S-S-)進行摺疊的過程，這個過程也需要依賴氧化還原狀態來調節。曾經有報告指出，如果精液裡面抗氧化能力過強時，有可能造成雙硫鍵被打開的現象，可能因此造成染色質緻密的過程不足(Menezo et al., 2007)。

除了上述與精蟲獲能相關的酪胺酸磷酸化以及染色質與 histone 硫氫基的氧化作用之外，近來的研究發現，泛素化 (ubiquitination)或類泛素化(small ubiquitin-like modifier, SUMOylation)的蛋白質轉譯後修飾作用在精蟲生成與功能調節方面，也扮演著重要的角色。類泛素化與泛素化作用類似，即 SUMO 蛋白質(SUMOs)會與目標蛋白質上的精氨酸(lysine)進行共價鍵結合改變了目標蛋白質的結構進而調節該蛋白質的功能(Wilkinson., 2010)。目前已知的 SUMO 蛋白分為四種亞型(paralogs)，分別為 SUMO1、2、3 與 4。其中 SUMO2 和 3 由於在胺基酸序列上有 95%的相似度，因此經常以 SUMO2/3 表示；SUMO4 則侷限在腎臟、肝臟與淋巴結才會表現(Xiao et al., 2016)。針對人類精蟲的研究發現，類泛素化蛋白主要被發現在精蟲細胞頸部，目前已有報導指出 SUMO1 與精蟲的前進活動力(Progressive motility)有負相關性，表現位置則以細胞核為主，甚至某些樣本中則出現在精蟲中段(midpiece) (Marchiani et al., 2011)。SUMO2/3 的表現與精蟲細胞的異常型態相關，像是在雙尾的、小頭的精蟲頸部發現該蛋白質表現特別多。另外也有研究報導發現 SUMO1 與 SUMO2/3 蛋白會聚集在精蟲細胞中多餘的細胞核膜(redundant nuclear envelope)位置。因此 SUMO 蛋白表現過多似乎是精蟲缺陷的一個指標 (Vigodner et al., 2013)。

生物細胞中主要的氧化還原反應之一，就是粒腺體當中的氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)反應，這是細胞內產生能量的主要來源，但是反應過程中就會產生相當量的超氧化物 superoxide，進而產生氧化壓力。而氧化還原的調節，某個程度而言，經常牽涉到蛋白質上面半胱氨酸氫硫基(-SH)的氧化修飾及還原反應。部分蛋白質對於氧化還原狀態比較敏感，在氧化壓力的情況下，可能造成蛋白質折疊結構的異常，進而造成內質網的壓力 (endoplasmic reticulum stress)。此外，泛素化蛋白質的作用，特別是經由 PML(promyelocytic leukemia)蛋白的 sumoylation 作用，也是經由氧化壓力調控的(Sahin et al., 2014)。因此，我們合理推測，氧化壓力所調節的類泛素化作用，極有可能與精蟲生成及受精功能有密切的關聯性。

我們之前針對不明原因不孕症夫婦的先生研究，發現全身性或精漿中抗氧化能力強的先生，接受試管嬰兒療程時，受精率及胚胎品質都比較優良；然而血清及精液的氧化自由基含量卻不會影響到受精率及胚胎品質，暗示著抗氧化能力的保護作用似乎作用在射精之前，也就是說主要作用的時間在精子生成的階段。另有研究報告指出，不成熟精蟲的氧化自由基產量較高。而新近的臨床隨機試驗及綜合分析研究報告也指出，口服抗氧化物，的確可以提高男性因素不孕症夫婦的試管嬰兒療程活產率。這些成果都指向抗氧化能力的提高，其受益的關鍵點應該是精蟲生成及成熟的過程，而類泛素化蛋白較多的精蟲又代表精蟲生成過程中有缺陷的狀況。因此我們形成一個假說：精蟲類泛素化的作用與精蟲生成過程中的氧化壓力有關聯，氧化壓力過高時，有可能造成比較多的類泛素化作用。

在此一年期的研究計畫成果中，我們收集 70 位男性個案的精液樣本檢體，分別進行精液分析、分別以化學冷光(Chemiluminescence)的方式偵測精蟲細胞的 ROS，並且利用免疫螢光染色觀察精蟲細胞的 SUMO 表現程度與表現位置。藉以釐清精液中精蟲細胞類泛素化比例是否與其的氧化壓力程度相關，對於精蟲生理與病理機制有更深的一層認識。

肆、 研究方法

● 檢體蒐集與精液常規分析 Sample collection and Semen analysis

本研究蒐集中山醫學大學附設醫院生殖中心所之臨床精液檢體，已通過中山醫學大學附設醫院第二倫理審查委員會之審核，並在充分告知受試者權利義務，取得受試者同意後蒐集檢體，由中山醫學大學附設醫院生殖中心進行精液的常規分析(Semen analysis)之後，並進行接下來檢體精蟲細胞前處理、ROS 偵測、細胞計數與免疫螢光染色。

● 檢體前處理 Sample Preparation

本研究使用 60%PureSperm Density Gradient 的方式分離檢體精蟲細胞，在離心 3000rpm 5 分鐘之後，將具活動力的細胞(motile sperm)與不具活動力的細胞(immotile sperm)分別分離出來，先將中間層的無活動力精蟲細胞以塑膠吸管取出並蒐集至 1.5ml 離心管，去除上清液後再以 PBS (phosphate-buffer solution)回溶底層細胞。接著將所得到的兩種不同活動力的精蟲細胞分別進行 ROS 的偵測、細胞計數以及免疫螢光染色。另外有部分樣本直接以單一相的方式進行離心，未區別兩種活動力的精蟲細胞。

● ROS 偵測 ROS detection

本研究使用 Luminol 作為化學冷光偵測 ROS 的探針。配置 100mM 的備存 luminol(stocking)，保存在室溫，接著以 DMSO(Dimethyl sulfoxide)稀釋為 5mM luminol (Ashok et al., 2008)，並取 10 μ l 加入 96 孔盤與 200 μ l 的樣本反應。待測樣本包括陽性控制組、陰性控制組與精蟲樣本。陽性控制組有兩組，係以 30% H₂O₂ 分別稀釋為 0.15%與 1.5%，稀釋液為 PBS。陰性控制組則使用 200 μ l 之 PBS。精蟲樣本分別為全精液(whole semen)、無活動力精蟲與具有活動力的精蟲 (由 60% PureSperm Density Gradient method 分離)。各組精蟲樣本會分別做不同細胞數的稀釋後再進行偵測，以避免過多 ROS 反應過快降解所造成之偽陰性發生。全精液取 100 μ l 加 100 μ l PBS 得到總體積 200 μ l 的待測樣本。無活動力之精蟲取 10 μ l 與 100 μ l 之細胞液補 PBS 至 200 μ l。有活動力之精蟲細胞則先做 1.25 倍稀釋後分別取 200、100、50、12.5 和 2.5 μ l 加補 PBS 至 200 μ l。配置好待測樣本後，馬上以五合一多功能光譜儀(SpectraMax M5)偵測反應產生的冷光訊號，連續偵測三十分鐘。分析時，我們以其中最高的三個訊號之平均值作為 ROS 多寡之基礎 (ROS level)。樣本 ROS level 若大於或等於 50 RLU 則定義為 ROS 陽性，反之為 ROS 陰性。

● 細胞計數 Cell counting

細胞計數使用細胞計數盤(Neubauer Counting Chamber)，將 10 μ l 以 PBS 稀釋的細胞液加入，在 100 倍的倒立式光學顯微鏡(CKX41 Olympus Life Science)下計算細胞數，並依稀釋倍數回推原液的細胞濃度。

● 免疫螢光 Immunofluorescence

取 5 μ l 的細胞液至載玻片上均勻推開製成抹片，接著進行免疫螢光的實驗。首先將抹片依序浸泡在 2%與 4% Formaldehyde，於室溫分別反應 15 分鐘後浸泡在 PBS 中清洗 3 次，每次 1 分鐘，以此步驟固定細胞。接著將抹片浸泡在 Triton x-100 5%，於室溫中反應 30 分鐘後浸泡在 PBS 中清洗 3 次，每次 1 分鐘。清洗完後以 NET solution 與抹片於室溫下反應 30 分鐘。完成上述抹片處理後接著進行抗體反應。一級抗體(Primary antibody)於 4°C 的溫度下反應，反應時間至少八個小時(overnight)，選用抗體與其宿主和稀釋倍數(以 NET solution 為稀釋液)分別為：SUMO1(mouse, 1:200)、SUMO2/3(rabbit, 1:200)、DAXX(rabbit, 1:100)、Nuclear pore complex (mouse, 1:200)。其中 Nuclear pore complex 是用來定位 RNE 的位置。一級抗體反應完成後，以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘。接著進行二級抗體反應(Secondary antibody)，於室溫下反應 60 分鐘，反應後以 PBS 清洗 3 次，每次 5 分鐘，選用綠光與紅光螢光標記的二級抗體分別為：Alexa Fluor 488 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG 與 Alexa Fluor 594 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG，兩者皆以 NET solution 稀釋 250 倍。完成免疫螢光染色後以 Hoechst33342 進行核染色，反應 5 分鐘後以 PBS 清洗 5 分鐘 1 次。最後待樣本風乾後，加入 Glycerol 覆上蓋玻片，最後以指甲油封片。待封片完成後以正立螢光顯微鏡(Zeiss Axio Image A2)觀察結果。

螢光的結果與分析主要是觀察精蟲各個位置之目標蛋白的表現強度與表現該蛋白之細胞占總細胞數的百分比。位置分別為頭部(head)、核(nucleus)、頸部(neck)、中段(midpiece)與鞭毛(flagella)，一到五分強度紀錄上述各個位置表現目標蛋白的螢光強度與分布，分數越高代表強度越強，分布的百分比越高。表現分布的標準為觀察至少二十顆細胞，計算目標蛋白表現在特定位置的比例為多少。

● 資料分析 Data analysis

每組臨床檢體試驗至少進行二次以上試驗，標示各試驗組的最大值與最小值，並計算各試驗組別的平均值與樣本標準差，最後以 t 檢定計算顯著差異。

伍、 結果與討論

● 精液常規分析 Semen analysis

106 年 10 月 17 日到 107 年 8 月 27 日期間一共蒐集 70 個精液樣本，其中有 12 個以單一相的方式將所有精蟲細胞與精漿分離，之後因為考慮不同個案之間精蟲品質差異甚大，具活動力與無活動力之精蟲細胞比例不盡相同，因此之後的 58 個樣本改以 60% PureSperm density gradient 的方式將具活動力與無活動力之精蟲細胞分離。精液常規分析的結果，70 個檢體樣本的精液檢體體積範圍為 0.5-7ml，精蟲細胞濃度範圍為 7.98-92.88 M/ml，可活動之精蟲細胞濃度範圍為 5.34-88.46 M/ml，正常型態的精蟲佔 1-18 % (其中有兩個樣本未紀錄此數據)。

精蟲常規分析項目	範圍	個案數
體積(ml)	0.5-7	70
濃度(Million/ml)	7.98-92.88	70
活動精蟲數(Million/ml)	5.34-88.46	70
正常型態精蟲比例(%)	1-18	68

Table 1. 本研究收錄個案之精蟲常規分析結果

● ROS 偵測 ROS detection

ROS 的偵測包括三個部分，分別為全精液(Whole semen)、無活動力細胞(Immotile sperm)與有活動力的細胞(Motile sperm)。如前所敘述，70 個精液樣本均有測得位分離細胞之前的全精液 ROS 偵測值，但是有 12 個以單一相方式分離精蟲細胞的樣本，沒有具活動力與無活動力之精蟲細胞的 ROS 偵測，即只有混合型態的偵測結果。另外的 58 個樣本則有具活動力與無活動力之精蟲細胞的 ROS 偵測結果(Table 1)。

如 Figure 1 所示，全精液總計有 68 個實驗結果(2 個樣本未測得)，其中有 2 個樣本的 ROS 偵測值為陽性結果(2/68, 2.94%)，其餘皆為陰性結果，68 個全精液樣本的 ROS 偵測值最高值為 135.47 RLUs，最低值為 10.4 RLUs，中位數為 28.82 RLUs。先前的研究報導示精漿中含有抗氧化物質，因此可以達到拮抗還原精漿細胞中的 ROS，因此全精液的樣本中並沒有明顯的 ROS 存在。

如 Figure 2 所示，12 個以單一相分離之精蟲樣本，其中 3 個樣本為陽性結果(3/12, 25.00%)，偵測得到的 ROS 最高值為 621.82 RLUs，最低值為 17.68 RLUs，中位數 34.61 RLUs。

不過由於這些樣本是混合型態的偵測結果，無法區分具活動力與無活動力之精蟲細胞中所包含有的 ROS 的差異，因此後續的樣本我們將採用 60% PureSperm density gradient 的方式將具活動力與無活動力之精蟲細胞分離，藉以確認 ROS 的強度是否與精蟲細胞的活動力有相關。58 個以梯度方式分離所得之具有活動力之精蟲所測得的 ROS 數值中，最高值為 1246.39 RLUs，最低值為 12.42 RLUs，中位數為 33.84 RLUs，其中有 8 個樣本為陽性結果(8/58, 13.79%)(Figure 3)。

進行梯度分離之樣本總共有 58 個，實際測得 55 個無活動力之精蟲細胞樣本(3 個無活動力的精蟲樣本未測 ROS)，其 ROS 偵測值最高值為 816.60 RLUs，最低值為 8.40 RLUs，中位數為 28.30 RLUs，其中有 10 個樣本 ROS 偵測值為陽性結果(10/55, 18.18%)，其餘 45 個樣本為陰性結果(Figure 4)。

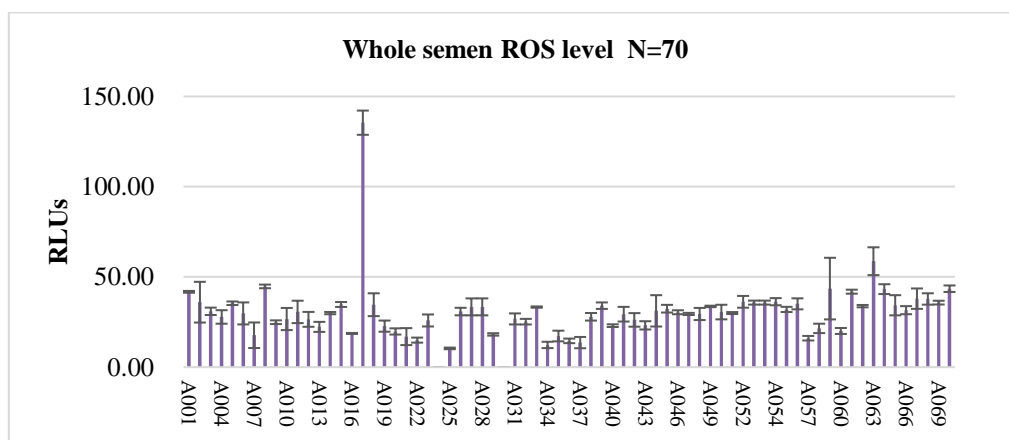


Figure 1. 全精液樣本的 ROS 活性

68 個全精液樣本 ROS 偵測值最高值為 135.47 RLUs，最低值為 10.4 RLUs，中位數為 28.82 RLUs。其中有 2 個樣本為 ROS level 陽性結果(2/68, 2.94%)，其餘皆為陰性結果。

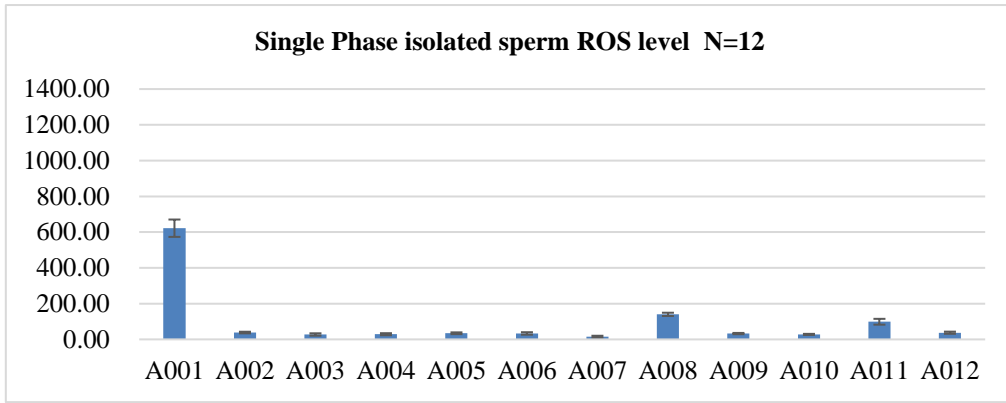


Figure 2. 單一相分離之精蟲樣本的 ROS 活性

12 個以單一相分離之精蟲樣本 ROS 最高值為 621.82 RLU，最低值為 17.68 RLU，中位數 34.61 RLU，其中 3 個樣本為陽性結果(3/12，25.00%)。

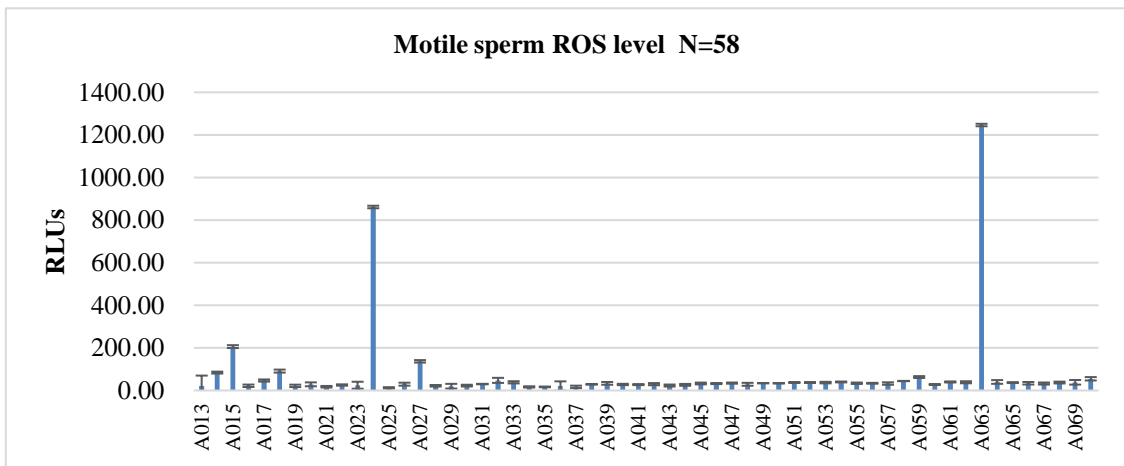


Figure 3. 具有活動力之精蟲的 ROS 活性

58 個以梯度方式分離所得之具有活動力之精蟲所測得的 ROS 數值中，最高值為 1246.39 RLU，最低值為 12.42 RLU，中位數為 33.84 RLU，其中有 8 個樣本為陽性結果(8/58，13.79%)。

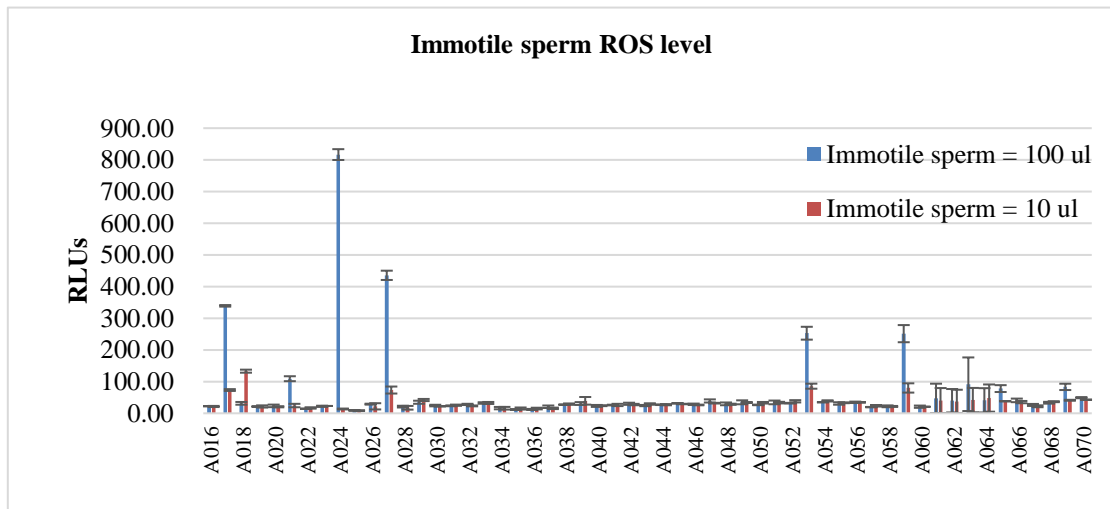


Figure 4. 不具有活動力之精蟲的 ROS 活性

55 個無活動力之精蟲 ROS 偵測值，最高值 816.60 RLUs，最低值 8.40 RLUs，中位數 28.30 RLUs，其中有 10 個樣本 ROS 偵測值為陽性結果(10/55，18.18%)，其餘 45 個為陰性結果。

● ROS 活性與精液常規分析的相關性

目前臨床上常作為評估精蟲品質的指標分別為精液中的精蟲濃度、具有活動力之精蟲佔總精蟲數的比例與正常型態精蟲細胞的比例。我們將精蟲透過梯度離心的方式分別偵測兩種不同活動能力的精蟲所產生的 ROS，以 ROS 偵測值 50RLUs 作為分界，依各樣本的 ROS 偵測值結果將檢體樣本分為陽性與陰性樣本，再與精蟲常規分析精蟲濃度、具活動力之精蟲比例與正常型態精蟲細胞比例的結果檢定分析發現，不論是哪一種分組的精蟲樣本中，ROS 偵測值陽性的精蟲細胞活動比例明顯較低 (P <0.05, Table 2, Table 3)。

另外根據 WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5th ed 定義，若是個案精蟲分析結果中的上述指標包括精蟲濃度、具活動力之精蟲比例與正常型態精蟲細胞比例低於世界衛生組織(World Health Organization)所統計之 5%之群體，例如精蟲濃度少於 15M/ml、具活動力之精蟲比例少於 40%，與正常型態精蟲細胞比例低於 4% (Cooper et al., 2010)，則分別診斷為為寡精症(Oligospermia)、精蟲無力症(Asthenospermia)與異常型態精蟲症(Teratospermia)等異常精蟲 (abnormal)之症狀。本次試驗的 70 個個案中，依據此定義判別有 4 個為寡精症、2 個為精蟲無力症、9 個異常型態精蟲症，其中有 2 個個案同時為寡精症與異常精蟲症，其餘的 57 個個案無上述之情形。為了觀察這些臨床診斷跟 ROS 活性的相關，因此進行以上述三個定義診斷與 ROS 偵測值進行分析檢定，結果發現 57 個定義診斷為正常精蟲之個案，與定義診斷為異常精蟲個案之間的 ROS 活性並無顯著差異。初步推論可能是因為定義診斷的分組標準條件太過嚴苛所致。

Motile Sperm(n=58)	ROS Positive (n=8)	ROS Negative (n=50)	P value
Concentration	45.06(10.60-85.31)	48.1(7.98-90.10)	0.39537
Motile (*10 ⁶ /ml)	27.66(5.34-83.37)	36.55(6.27-88.46)	0.17694
Motile (VAP>25)(%)	41.04(27.06-92.96)	66.27(12.7-94.47)	0.01660**
Local Motile (5<VAP<25)(%)	14.91(4.77-28.48)	14.05(0.98-39.74)	0.48036
Sum (%)	61.15(40.15-97.73)	83.03(32.6-98.18)	0.00389**
Normal spermatozoas (%)	6(1-8)*	6(2-18)	0.28459

Table 2. 具有活動力之精蟲的 ROS 活性與精蟲品質的相關性

在具有活動能力的精蟲細胞中，ROS 偵測值陽性組別的 motile 和 sum 的百分比分別為 41.04% 和 61.15%，明顯低於 ROS 陰性組別的 66.27% 和 83.03% (** P < 0.05)。

VAP：average path velocity，代表精蟲直線方向移動之平均速度，VAP>25 μm/s 者定義為 Motile 的精蟲，VAP 介於 5 到 25μm/s 則為 local motile 之精蟲，Sum 為兩群精蟲之總和，百分比的分母為總精蟲細胞數。

*data missing, n=7 一筆資料不完整，僅收錄比較 7 筆資料。

Immotile Sperm(n=55)	ROS Positive (n=10) **	ROS Negative (n=45)	P value
Concentration	47.87(10.6-73.67)	47.61 (7.98-90.10)	0.32228
Motile (*10 ⁶ /ml)	35.78(5.34-65.10)	36.50 (6.27-88.46)	0.19095
Motile (VAP>25) (%)	56.45(27.06-70.61)	66.61 (22.28-94.47)	0.19095
Local Motile (5<VAP<25) (%)	19.21(10.72-28.48)	13.47 (0.98-39.74)	0.13313
Sum (%)	75.63(40.15-89)	84.40 (42.6-98.18)	0.03571**
Normal spermatozoa (%)	7(1-8) *	6 (2-18)	0.30167

Table 3. 不具有活動力之精蟲的 ROS 活性與精蟲品質的相關性

在不具有活動能力的精蟲細胞中，ROS 偵測值陽性組別的 sum 的百分比為 75.63%，明顯低於 ROS 陰性組別的 84.40% (** P < 0.05)。

VAP：average path velocity，代表精蟲直線方向移動之平均速度，VAP>25 μm/s 者定義為 Motile 的精蟲，VAP 介於 5 到 25μm/s 則為 local motile 之精蟲，Sum 為兩群精蟲之總和，百分比的分母為總精蟲細胞數。

*data missing, n=9 一筆資料不完整，僅收錄比較 9 筆資料。

● 精蟲細胞中 SUMO1、SUMO2/3、以及 NPC 蛋白表現分析

我們利用免疫螢光染色來偵測精蟲細胞中 SUMO1、SUMO2/3、以及 NPC 蛋白的表現位置和表現量，並將結果計分量化之後，再與 ROS 進行相關分析。由於目前僅完成 19 個檢體樣本的免疫螢光染色，在初步的分析結果中，19 個樣本的具活動力的精蟲細胞組與較不具活動力的精蟲細胞組進行分組比較，觀察兩組之間的 SUMO 蛋白表現分數與 ROS 強度的相關性，結果可以初略觀察到兩組細胞的相關係數趨勢明顯不同，不過由於目前尚未完成所有的免疫螢光染色分析樣本，因此會等所有結果完成之後再確認各目標蛋白與 ROS 數值之間的相關性，以釐清精蟲細胞中 ROS 活性與類泛素化程度的相關性，以及可能的調控作用 (Figure 4)。

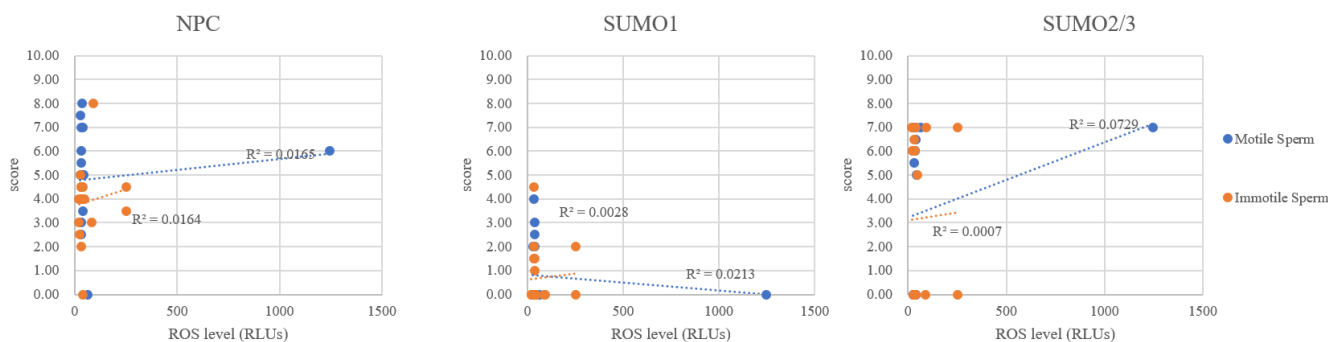


Figure 4. SUMO 相關蛋白與精蟲活動力以及 ROS 活性的相關性

在具活動力的精蟲細胞組與不具活動力的精蟲細胞中，利用免疫螢光染色計分進行分組比較，觀察兩組之間的 SUMO 蛋白表現分數與 ROS 強度的相關性。

● 結論

由目前的研究結果得知，ROS 活性較高之精蟲樣本，其精蟲細胞的活動力比例明顯較低，但與目前的臨床診斷定義比較，尚不足以作為異常精蟲之認定。另一方面，雖然我們初步觀察到在不同活動力的精蟲細胞中，ROS 活性與 SUMO 蛋白表現有不同的相關趨勢，但是由於已完成的樣本數略顯不足，因此未來會再陸續補齊所有樣本的免疫染色計分之後，再進行一次迴歸分析，以釐清確認精蟲細胞 ROS 強度與 SUMO 程度是否具有關聯。

陸、 參考文獻

- Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014;32(1):1-17.
- Aitken, R.J., Baker, M.A., O'Bryan, M. (2004) Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. *J Androl* 25:455-465.
- Ashok Agarwal MC, Hussein Abdelrazik, Sharma aRK. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. In: Lewin IPaG, editor. *Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment*. Trivandrum-695 023, Kerala, India: Transworld Research Network; 2008. p. 195-218.
- Austin, C.R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* 170, 326.
- Cappadocia, L., Mascle, X.H., Bourdeau, V., Tremblay-Belzile, S., Chaker-Margot, M., Lussier-Price, M., Wada, J., Sakaguchi, K., Aubry, M., Ferbeyre, G., *et al.* (2015). Structural and functional characterization of the phosphorylation-dependent interaction between PML and SUMO1. *Structure* 23, 126-138.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, *et al.* World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):231-45.
- De Jonge, C. (2005). Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 11, 205-214.
- Fujii, J., Iuchi, Y., Matsuki, S., and Ishii, T. (2003). Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl* 5, 231-242.
- Holmgren, A., and Lu, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 120-124.
- Huang, C.C., Lin, D.P., Tsao, H.M., Cheng, T.C., Liu, C.H., Lee, M.S. (2005). Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 84:130-140.
- Jang, M.S., Ryu, S.W., and Kim, E. (2002). Modification of Daxx by small ubiquitin-related modifier-1. *Biochem Biophys Res Commun* 295, 495-500.
- Kao, S.H., Chao, H.T., Chen, H.W., Hwang, T.I., Liao, T.L., Wei, Y.H. (2008). Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril* 89:1183-1190.
- Marchiani S, Tamburrino L, Giuliano L, Nosi D, Sarli V, Gandini L, *et al.* Sumo1-ylation of human spermatozoa and its relationship with semen quality. *Int J Androl*. 2011;34(6 Pt 1):581-93.
- Menezo, Y.J., Hazout, A., Panteix, G., Robert, F., Rollet, J., Cohen-Bacrie, P., Chapuis, F., Clement, P., and Benkhalifa, M. (2007). Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 14, 418-421.
- Mukhopadhyay, D., and Matunis, M.J. (2011). SUMO1-mediated Daxx-mediated repression. *Mol Cell* 42, 4-5.

- O'Flaherty, C., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (2006). Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* 40, 1045-1055.
- Rogers, R.S., Inselman, A., Handel, M.A., and Matunis, M.J. (2004). SUMO modified proteins localize to the XY body of pachytene spermatocytes. *Chromosoma* 113, 233-243.
- Sahin, U., de The, H., and Lallemand-Breitenbach, V. (2014). PML nuclear bodies: assembly and oxidative stress-sensitive sumoylation. *Nucleus* 5, 499-507.
- Shih, Y.F., Tzeng, S.L., Chen, W.J., Huang, C.C., Chen, H.H., Lee, T.H., and Lee, M.S. (2016). Effects of Synthetic Serum Supplementation in Sperm Preparation Media on Sperm Capacitation and Function Test Results. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 1027158.
- Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14, 243-258.
- Vigodner, M., Shrivastava, V., Gutstein, L.E., Schneider, J., Nieves, E., Goldstein, M., Feliciano, M., and Callaway, M. (2013). Localization and identification of sumoylated proteins in human sperm: excessive sumoylation is a marker of defective spermatozoa. *Hum Reprod* 28, 210-223.
- Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*. 2010;428(2):133-45.
- Xiao Y, Lucas B, Molcho E, Schiff T, Vigodner M. Inhibition of CDK1 activity by sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;478(2):919-23.

106年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：李宗賢			計畫編號：106-2314-B-040-022-				
計畫名稱：類泛素小分子蛋白修飾作用在人工生殖週期中對於精蟲功能及染色質損壞之角色							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇		
		研討會論文		0			
		專書		0	本		
		專書論文		0	章		
		技術報告		0	篇		
		其他		0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		0	篇	
			研討會論文		0		
			專書		0	本	
專書論文			0	章			
技術報告			0	篇			
其他			0	篇			
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			

	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	1		聘用一位專任助理，並訓練期可以操作免疫螢光法偵測蛋白質表現，可以用冷光偵測儀測量氧化自由基濃度，熟悉精蟲的功能分析。
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

這個研究發現氧化自由基活性較高之精蟲細胞，其活動力比例明顯較低，並初步觀察到在不同活動力的精蟲細胞中，氧化自由基活性與類泛素小分子修飾蛋白表現有不同的相關趨勢。類泛素小分子修飾蛋白比較容易出現在不成熟的精子族群中。這些結果暗示，氧化自由基會影響精子的活動力，而類泛素小分子蛋白則是容易出現在氧化自由基較高的精蟲上面，也就是說氧化自由基也可能干擾精蟲的生成，進一步降低精蟲的功能，影響精蟲的受精能力。後續可以繼續探討提供抗氧化物健康食品，是否可以改善精蟲的功能。提供男性不孕症治療的新方向。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）