泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1171-05

FSCB 蛋白在鼠精子发生过程中的动态表达和迁移研究

李彦锋[1],何 畏[2],张 军[1],张克勤[1],梁培禾[1],孙中义[1],刘顺利[1],靳风烁[1],Charles J. Flickinger[3],John C. Herr[3]

(1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科，重庆 400042;2. 第三军医大学西南医院妇产科，重庆 400038;3. 美国弗吉尼亚大学细胞生物学系避孕和生殖健康研究中心，弗吉尼亚 22908)

【摘 要】目的：探讨一种新的睾丸特异性蛋白 FSCB(Fibrous sheath CABYR binding protein)在精子内的精细动态表达和迁移过程，并研究该蛋白在正常和畸形精子中的形态定位特征。方法：应用过碘酸－希夫氏染色获得鼠睾丸曲精小管上皮中精子发生的时相性背景特征，然后应用间接免疫荧光方法对 FSCB 蛋白在睾丸和精子内的动态表达和迁移过程进行观察。结果：FSCB 最初表达于长精细胞的第 11 步(时相XI)，呈胞浆内弥漫性染色；随之从第 11 步(时相XI)至第 15 步(时相VI)表达逐渐加强；在精子形成的第 15 步(时相IV至时相VI)FSCB 开始向精子鞭毛迁移，最终于第 16 步(时相VIII)FSCB 蛋白整体局限定位于睾丸精子鞭毛上，胞浆内荧光染色消失。进一步研究显示该蛋白在正常精子中定位于鞭毛主段、精子头部、鞭毛颈段、中段和末段均无表达。在畸形精子中，该蛋白表达存在 3 种异常改变：①鞭毛内无阳性表达；②表达节段前移并缩短，提示这类精子缺乏中段；③呈现间断分布的串珠状改变。结论：FSCB 是纤维鞘的重要组成蛋白，在精子纤维鞘形成的后期装配于其表面，可能是纤维鞘生物合成的最后装配步骤。该蛋白在畸形精子中存在明显表达异常，其表达异常与精子运动功能之间的关系有待深入研究。

【关键词】精子；纤维鞘；精子发生；睾丸特异性蛋白

【中国图书分类法分类号】Q492.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-11

The dynamic expression and migration of FSCB in mouse spermatogenesis

LI Yan-feng, et al

(*Department of Urology, Daping Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the dynamic expression and migration of the novel testis- and sperm-specific protein FSCB in mouse spermatogenesis and observe the morphological localization of FSCB on normal and abnormal mouse sperm. *Methods*: For exactly staging of the mouse tubule sections, Periodic acid-Schiff staining was performed at first, and then the dynamic expression of FSCB on mouse testis and sperm by indirect Immunofluorescence was observed. *Results*: FSCB is a post meiotic protein initially expressed at step 11(stage XI)of mouse spermatogenesis in the elongating spermatids, and it's expresson gradully become stronger and stronger from step 11(stage XI) through step 15 (stage VI). It subsequently begin migrate into the flagellar at step 15, and at last totally localize to the sperm flagellar at step 16(stage VIII)accompanied with its disappearing from the cytoplasma of sperm. The exact localization of FSCB on normal sperm is in the flagellar principal piece. Its expression and localization on abnormal sperm was variablely changed: a.No expression on the whole flagellar; b. The expression segment on the flagellar was shift to near the head and become short, suggest this sperm defect middle piece; c. Its distribution on the flagellar showed beads like shape. *Conclusion*: FSCB is an important constituent protein of the fibrous sheath, is assembled at the surface of fibrous sheath core structure and constitutes the final assembly step of fibrous sheath at the later stages of spermiogenesis. The expression of FSCB in abnormal sperm was significantly changed. The relationship between the abnormal expression of FSCB and the sperm motility need to be further studied.

【Key words】Sperm; Fibrous sheath; Spermatogenesis; Testis-specific protein

本文作者发现一种鼠睾丸/精子特异性蛋白 FSCB (Fibrous sheath CABYR binding protein)[1]，该蛋白可与另一种精子鞭毛上具有钙结合功能和在精子获能过程中可被酪氨酸磷酸化的精子特异性 CABYR 蛋白结合，而且其本身也具有钙结合能力，

作者介绍：李彦锋(1967-)，男，副教授，博士，研究方向：男性生殖生理和避孕。

通讯作者：何 畏，女，副教授，E-mail:anyhewei@yahoo.com.cn.。

基金项目：本课题获第三军医大学留学回国人员启动基金资助。

并且在体外可被蛋白激酶 A 磷酸化。FSCB 具有保守的 PXXP 基序，脯氨酸富积区和伸展蛋白样区域（Extensin-like regions）。FSCB 在精子上的超微结构定位研究显示其位于精子鞭毛纤维鞘纵形柱状体和环状肋板表面的中等电子密度皮质层。鉴于该蛋白与某些精子纤维鞘蛋白如 AKAP3，AKAP4，CABYR 等[2-5]具有相似的定位特征，而且具有可被磷酸化及与钙结合的功能特性，推测该蛋白可能是一种参与精子鞭毛的运动，与精子获能和超活化作用有关的重要蛋白。为进一步了解该蛋白在精子发生中表达的启动，迁移和最终的特异性定位改变，以及该蛋白在畸形精子尤其是鞭毛畸形精子中的表达情况，本研究应用过碘酸-希夫氏染色获得鼠睾丸曲精小管上皮中精子发生的时相性背景特征，然后应用免疫荧光方法首次观察了 FSCB 蛋白在精子内的精细动态表达和迁移过程。并取鼠精子进行免疫荧光观察，研究了该蛋白在正常和畸形精子中的形态定位特征。

1 材料和方法

1.1 FSCB 在鼠睾丸曲精小管上的免疫荧光定位

睾丸取自成年雄性 Swiss 小鼠，采取颈脱位法处死，切取睾丸，固定于 Bouin's 液中，常温过夜。组织常规石蜡包埋，取 5 μm 厚度，进行连续切片，置于载玻片，风干。为进行曲精小管的时相性分析，在二甲苯中脱蜡和梯度乙醇中再水化后，取切片按照标准方法，略作修改，进行过碘酸－希夫氏染色（PAS 染色）。具体如下：玻片在 PBS 中洗涤 5 min，置于 0.5% 过碘酸中 10 min，蒸馏水中洗涤 10 min，在希夫氏染色液中暗室内孵育 1 h，玻片置于 1%偏重亚硫酸钾中作用 2 min，蒸馏水中洗涤 10 min，苏木素复染 3 min，自来水淋洗后，置于 1.38%碳酸锂（1.38 g/100 ml 蒸馏水）中作用 3 s；然后在递增梯度乙醇和二甲苯中洗涤后，封片观察。为进行荧光染色，取与前述组织切片相邻的切片，脱蜡和再水化后，置于 2 N HCl 中孵育 20 min，在含有 0.05% Tween-20 的 PBS（PBS-T）中洗涤 3 次×5 min，加入含 10%正常山羊血清的 PBS-T 封闭液孵育 30 min，紧接着应用含有 1% BSA 的 PBS-T（PBS-T-BSA）稀释抗 -FSCB 抗血清（稀释度 1∶400）（本研究组前期研究制备）和免疫前血清（稀释度 1∶400）室温孵育 1 h 或者 4℃下过夜，PBS-T 中洗涤 3 次×5 min，用荧光素异硫氰酸酯标记的山羊抗豚鼠 IgG （PBS-T-BSA 稀释，稀释度 1∶400，Jackson Immuno Research）孵育 1 h，PBS-T 中洗涤 3 次×5 min，封片观察。过碘酸－希夫氏染色切片在光镜下观察，以确定各个曲精小管内上皮生精周期的准确时相，然后通过荧光显微镜研究相邻切片内同一曲精小管，以确定相对应的 FSCB 蛋白荧光染色模式和特征。应用数码相机获得各自绿色荧光图像。

1.2 FSCB 蛋白在鼠正常和畸形精子中的间接免疫荧光定位

收集附睾尾部精子，根据计数板计数将精子浓度稀释为 1×10^6 个 /ml。根据文献方法[6]使精子在 37 ℃下，5% CO_2 中，在含 5 mg/ml BSA 和 10 mmol/L $NaHCO_3$ 获能介质中获能 1.5 h。精子的获能状态通过检测其活动率（>80%）和获能相关的酪氨酸磷酸化作用的提高进行衡量。非获能的精子在没有 BSA 和 $NaHCO_3$ 的同样介质中获得，分别取 20 μl 含 2×10^4 个的获能后和非获能精子，加样于多聚赖氨酸包被的玻片上。玻片于 40℃ 下风干，甲醇固定 10 min，部分玻片不进行甲醇固定，仅简单风干于玻片上。应用 PBS-T 洗涤 3 次×5 min，标本在含 10%正常山羊血清的 PBS-T 中封闭 30 min，豚鼠抗 -FSCB 血清或免疫前血清用 PBS-T-BSA 以 1∶2 000 稀释后，加样，室温下孵育 1 h 或 4℃下过夜，洗涤 3 次×5 min，用异硫氰酸酯荧光素（FITC）标记的羊抗豚鼠 IgG（稀释度 1∶400）孵育 1 h，洗涤 3 次×5 min，封片观察。应用豚鼠抗鼠 CABYR 蛋白的 CR-A 抗血清及其相应免疫前血清（稀释度 1∶400）进行同样免疫染色作为对照。其二抗为 Cy3- 标记的羊抗豚鼠 IgG（稀释度 1∶400，Jackson Immuno Research）。

2 结 果

2.1 精子发生过程中，FSCB 在曲精小管上皮上的定位和动态表达特征

首先取 PAS 染色的睾丸组织切片行精子发生的时相性分析，仔细分辨每一曲精小管内生精上皮的时相性特征，然后取相应荧光染色切片观察与各自时相相对应的曲精小管内 FSCB 表达的染色和分布特征，从而分析获得了该蛋白在精子形成过程中表达和迁移的动态特征。本研究结果显示 FSCB 在精子发生的晚期阶段开始表达，并呈显著的动态和周期性改变，伴随着其在精细胞内的迁移，最终定位于精子鞭毛的主段结构内。在同一组织切片内，由于存在着大量处于不同精子发育时期的曲精小管断面，因此，FSCB 在曲精小管腔面的免疫荧光染色呈现强弱不同，形态各异的花环状特征（图 1）。进一步分别对每一个不同精子发生时期的小管进行观察分析，发现在精子形成的第 9，10 步（精子发生时相 Ⅸ，Ⅹ），曲精小管内圆精细胞，长精细胞或生精上皮的任何精母细胞均未观察到任何 FSCB 蛋白表达的荧光信号。FSCB 的绿色荧光首先出现于长精细胞的第 11 步（时相 Ⅺ），呈现一种胞浆内弥漫性染色；从精子形成的第 11 步（时相 Ⅺ）至第 15 步（时相 Ⅵ），其染色荧光强度呈逐渐加强；在精子形成的第 15 步（时相 Ⅳ 至时相 Ⅵ）FSCB 染色开始出现于精子鞭毛上，从第 15 步到第 16 步其染色强度也呈逐渐增强，最后，FSCB 荧光染色在精子形成的第 16 步（时相 Ⅶ）局限于睾丸内精子的鞭毛上。由于成熟精子鞭毛向管腔内伸展，使曲精小管管腔内呈现放射状均匀分布的线性荧光图像。FSCB 在鞭毛上染色强度的逐渐增强伴随着在曲精小管顶端区域分布的精细胞胞浆内荧光染色的逐渐消失。免疫前

血清未见任何阳性染色。

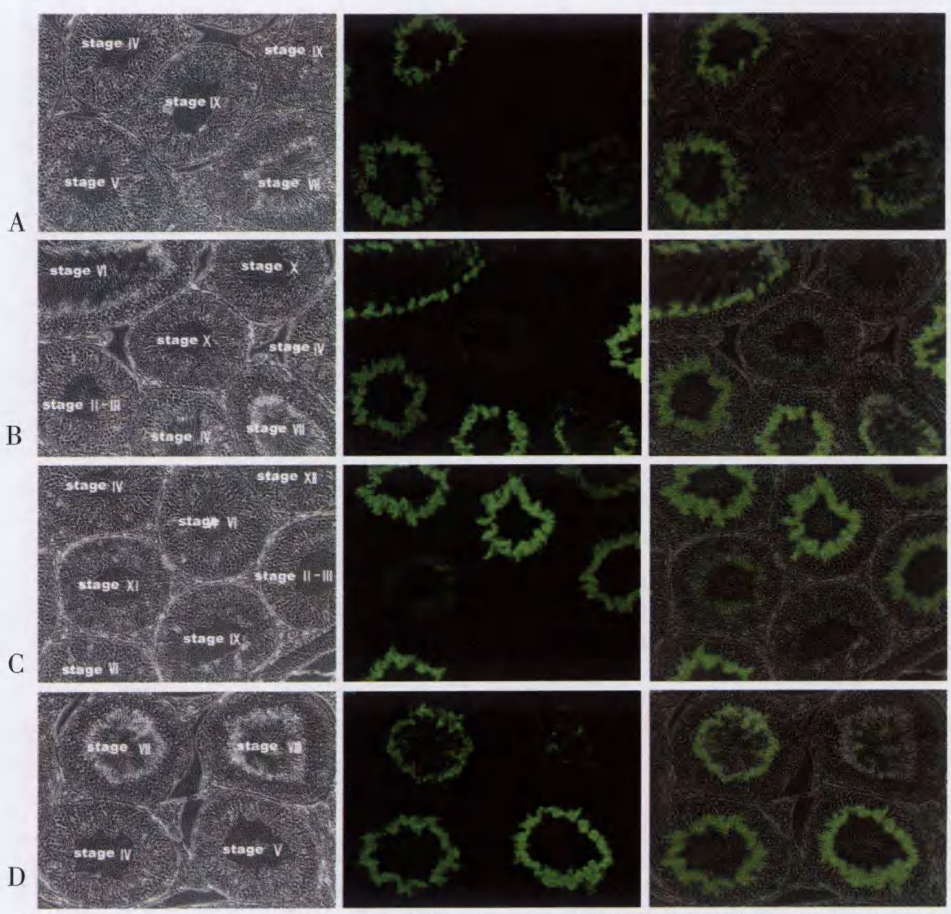
2.2 FSCB 蛋白在正常及异常精子的免疫荧光染色

间接免疫荧光研究显示,在未固定和甲醇固定的非获能及获能后精子中,FSCB 蛋白在精子鞭毛主段的全长均呈现一种强烈致密的荧光信号(图 2A~C)。应用免疫前血清没有检测到任何阳性荧光信号(图 2D)。在精子鞭毛的主段区域,FSCB 的荧光强度从近端向远端区域呈现逐渐减弱的特征。精子头部,颈段,中段和末段均未见荧光信号(图 2A~C)。在未获能和获能后的精子之间未观察到任何荧光染色特征和强度的区别。本研究同时发现少部分精子的 FSCB 荧光染色存在明显不同,提示该类精子的鞭毛存在畸形或异常。遂进一步对该类异常的精子进行了观察和研究,发现在这类异常染色的精子中,存在下列几种不同的特征:①整个鞭毛无 FSCB 蛋白阳性染色(图 2,箭头 1,2,6 所示);②FSCB 染色节段前移并缩短,紧贴鞭毛的颈段后即出现阳性染色,且染色段的长度显著短于正常精子。如果将在正常精子中观察到的 FSCB 蛋白染色仅限于主段区域为依据,那么从这类精子的 FSCB 染色特征上分析,这类畸形精子缺乏明显的中段,而具有显著延长的末段(图 2,箭头 3,4 所示);③某些精子鞭毛在普通光镜下呈全程粗细不均的串珠状改变,FSCB 免疫荧光信号也失去连续性,呈现明显间断的串珠状信号。表明在该类鞭毛畸形精子中,该蛋白的表达,迁移和分布出现显著异常改变。另外,使用活精子进行的免疫荧光研究显示,在活动的精子上,未能观察到荧光染色,该结果提示 FSCB 蛋白的抗原表位可能并未暴露于精子鞭毛的浆膜表面。为深入观察和探讨 FSCB 蛋白在鞭毛上的分布特征,将该蛋白的荧光染色同另一种精子鞭毛特异性蛋白 CABYR 进行了比较观察,发现 FSCB 的定位模式有某些与其相似的特征,同时也有某些独特的表现。CABYR 定位于精子鞭毛的主段,并延伸于末段(图 2E),而 FSCB 仅限于主段;另外,尽管 CABYR 的免疫荧光线状信号随着鞭毛本身从近端向远端的逐渐变细而逐渐变细,但其荧光强度没有明显降低。而 FSCB 的荧光强度从近端向远端区域呈现明显逐渐减弱的特征。

3 讨 论

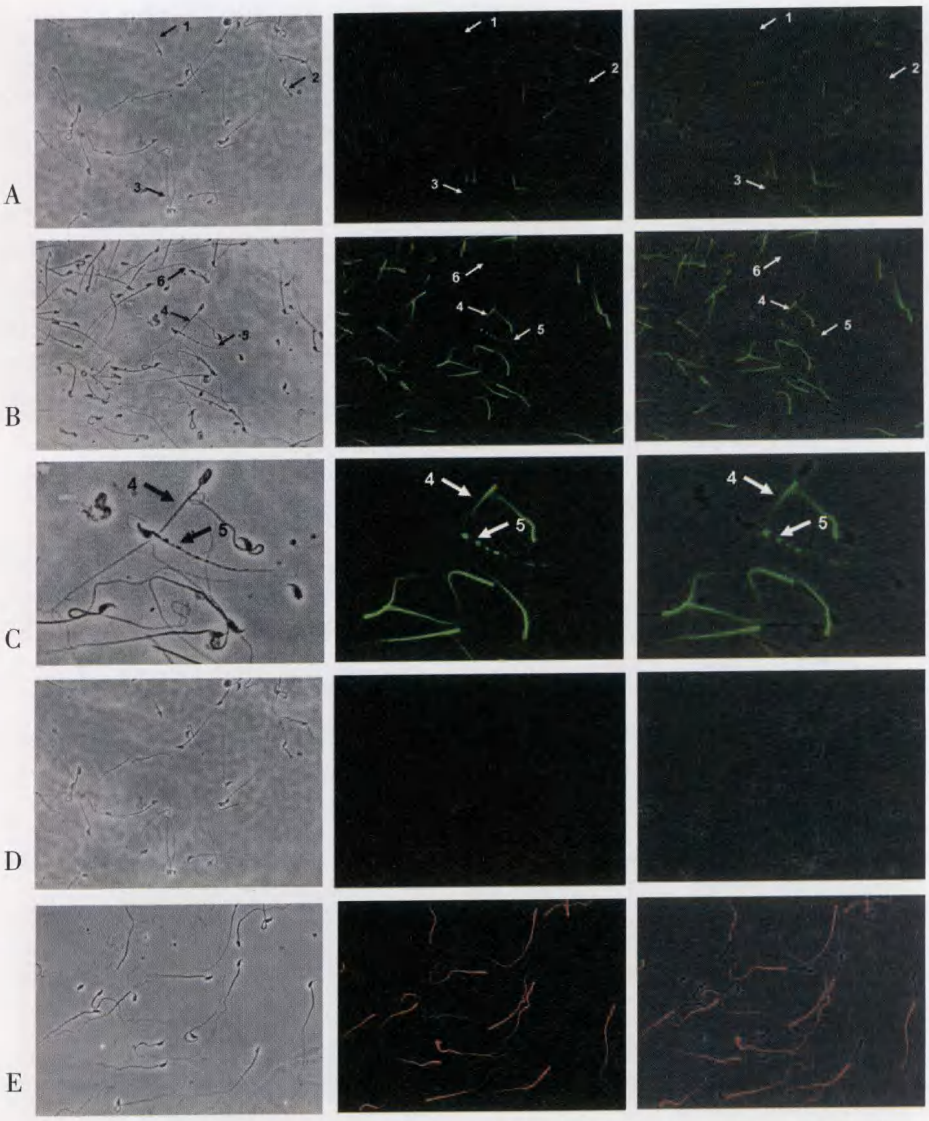
FSCB 是一种作者新发现的睾丸/精子特异性蛋白,Northern blots 和斑点印迹研究已经发现 FSCB 基因的转录仅限于睾丸,多组织的 Western blots 研究显示 FSCB 蛋白的表达限于睾丸和附睾。钙结合分析显示重组截短和全长 FSCB 蛋白均有显著钙结合能力。

既往的研究根据精细胞的细胞核,顶体和精细胞体的大小和形状,将小鼠精子发生过程中生精上皮的特征改变分为 12 个时相(Ⅰ~Ⅻ),精子形成过程分为 16 步。为深入了解该



第 1 列,光镜相差图像,标示每一曲精小管所处的生精时相;第 2 列,对应间接免疫荧光图像;第 3 列,1 和 2 列的重叠合并图像。A, B, C, D: 处于不同生精阶段和上皮时相的曲精小管内 FSCB 在上皮中的表达状态和整体荧光图像。

图 1 FSCB 蛋白在鼠睾丸曲精小管内的动态表达全貌(×100)



第 1 列，光镜相差图像；第 2 列，对应间接免疫荧光图像；第 3 列，1 和 2 列的重叠合并图像。FSCB 的致密免疫荧光染色出现于获能及非获能正常精子鞭毛的主段（A；B；C；图像 C 为图像 B 的局部放大）。FSCB 在精子鞭毛主段的荧光染色强度呈现从近端向远端逐渐减弱的特征，在正常精子中，未见精子头部，颈段，中段或末段的免疫荧光染色。应用免疫前血清的阴性对照未见精子的荧光染色（D）。在异常精子中，FSCB 荧光染色存在下列改变：①整个鞭毛无 FSCB 阳性染色（箭头 1，2，6 所示）；②FSCB 染色节段前移并缩短，紧贴鞭毛的颈段后即出现阳性染色，且染色段的长度显著短于正常精子，提示该类精子缺乏鞭毛中段，而具有显著延长的末段（箭头 3，4 所示）；③ FSCB 免疫荧光呈全程间断的串珠状信号。与 FSCB 相对比，抗 CR-A 抗体识别精子主段的全长和末段，表现为致密的荧光信号，该信号随着精子鞭毛形态的逐渐变细而变细，但没有染色强度的逐渐减弱（E）。

图 2　FSCB 在小鼠正常及异常精子鞭毛上的免疫荧光定位（A、B、D、E：×100；C：×200）

蛋白在精子发生中动态表达和迁移过程以及在正常和异常精子中的表达特征，本研究首先对睾丸组织切片进行 PAS 染色，获得各曲精小管内生精上皮的时相性特征，然后取相邻荧光染色切片观察了各自对应的曲精小管内 FSCB 表达动态过程，从而获得了该蛋白在精子发生和形成过程中整个完整的动态表达和迁移特征。发现 FSCB 首先出现于第 11 步的长精细胞的胞浆内（时相Ⅺ），其表达随精子形成的成熟逐渐加强，并在第 15 步逐渐迁移至精子鞭毛，该蛋白在第 16 步从精子的胞浆内消失，仅出现在精子鞭毛。对正常形态精子的免疫荧光研究进一步表明，FSCB 最终定位于精子鞭毛的主段结构内。

各类细胞骨架成分，外致密纤维和纤维鞘的装配在精子形成过程中均呈现独特的时相性模式[3]。本研究证实 FSCB 蛋白在纤维鞘生物发生的后期阶段嵌入纤维鞘内，根据 FSCB 装配的时相性特征和其亚细胞定位，与至今已经报道的其他纤维鞘蛋白表达模式[2-5]相比较，显示该蛋白更可能是在大量纤维鞘核心蛋白已经装配以后才整合入纤维鞘结构中的。比如 AKAP3 和 AKAP4 是纤维鞘的主要组成成分[7]，AKAP3 的最初表达出现于精子形成的第 4 步圆精细胞胞浆内（时相Ⅳ）和第 9 步长精细胞的鞭毛内（时相Ⅸ）[8]。显然，AKAP3 在精细胞胞浆和精子鞭毛的表达均先于 FSCB 在这两个部位的表达。而且，这一时间上的先后顺序与此前我们

所发现的 FSCB 定位于纤维鞘表面的超微结构相一致。鼠精子完整纤维鞘的形成是在第 14 和 15 步从远端向近端先后发生的[9]。先前的研究显示大鼠精子纤维鞘的纵形柱状体前体首先出现于圆精细胞,而环状肋板前体出现于长精细胞的后期[5,10,11]。由于在人精子中 AKAP3 蛋白定位于环状肋板但不出现纵形柱状体[12],已有学者认为 AKAP3 是在纵形柱状体已经开始形成以后,在环状肋板形成的同时整合进纤维鞘内的,因而,推测 AKAP3 可能参与了环状肋板前体的形成[8]。显然 FSCB 蛋白在精细胞胞浆的表达和向鞭毛的迁移均落后 AKAP3 蛋白。本研究显示 FSCB 的时相性模式其 AKAP4 蛋白既有相似性又有所区别。AKAP4 蛋白占 4 M 处理后纤维鞘不溶成分的 40%[13],既出现于纤维鞘的纵形柱状体也出现于环状肋板[14],该蛋白首先出现于精子形成第 14 步的核致密化精子细胞胞浆和鞭毛内(时相 Ⅱ~Ⅲ),在第 15 步后从核致密化精子细胞胞浆内消失[8]。由于靶向破坏 AKAP4 基因导致纤维鞘形成缺陷,出现缩短的纵形柱状体和更薄的环状肋板并伴随前向运动的丧失[15],因而,认为 AKAP4 被装配入纵形柱状体和环状肋板是完整纤维鞘装配完成的一个主要步骤[8]。FSCB 蛋白在第 11 步的长精细胞胞浆内的时相性表达早于 AKAP4, 而且其在胞浆内存在的时间也较 AKAP4 长,然而该蛋白到达精子鞭毛的时间较 AKAP4 晚。从 FSCB 蛋白的表达,装配并最终在精子亚细胞结构内定位的时相性特征分析,该蛋白为纤维鞘的重要组成蛋白。该蛋白可能装配于已经形成的纤维鞘核心结构的表面,是纤维鞘生物合成的最后装配步骤。

本研究发现在部分异常或畸形精子中 FSCB 蛋白的荧光染色存在明显差异,并且呈现 3 种不同的特征:①整个鞭毛无 FSCB 蛋白阳性染色;②FSCB 染色节段前移并缩短;③FSCB 蛋白的表达在整个鞭毛呈明显间断的串珠状。分析出现上述特征的原因可能为:①精子鞭毛中纤维鞘结构装配缺陷,导致包括 FSCB 蛋白在内的诸多纤维鞘蛋白均没有正常表达;②如果将在正常精子中观察到的 FSCB 蛋白染色仅限于主段区域为依据,那么 FSCB 染色节段前移并缩短,表明这类畸形精子可能由于鞭毛中段(Middle piece)装配障碍或陷缺,导致没有形成正常鞭毛的中段部分,从而使主段部分直接和颈段衔接,并出现显著延长的末段;③精子鞭毛纤维鞘结构形态装配异常,导致 FSCB 蛋白呈全程粗细不均的串珠状分布。由于 FSCB 蛋白在活精子中无法进行免疫检测,因而,目前尚不明确该类 FSCB 蛋白表达异常的精子的运动功能是否显著改变。下一步选择运动功能显著异常的精子进行 FSCB 荧光染色将可能发现该蛋白与精子运动功能之间的关系。

目前的研究已经表明纤维鞘的功能不仅仅是精子鞭毛的一个被动机械性外周细胞骨架成分,而且也是信号级联放大通路组成成分和糖酵解酶的一个支架[7],因而,该类成分的良好装配和定位在调节精子的运动过程中发挥作用。FSCB 蛋白是一种新发现的纤维鞘组成成分,其特异性定位,与钙离子及 CABYR 蛋白结合的能力,可被 PKA 磷酸化及与多种激酶的共同解剖定位强烈提示其在纤维鞘的信号转导中发挥作用。FSCB 蛋白的睾丸特异性以及其减数分裂后的表达模式,在长精细胞和成熟精子的定位提示该蛋白可能作为某种避孕药物的靶点进行深入研究。

参 考 文 献

[1] Li Y F, He W, Jha K N, et al. FSCB, a novel protein kinase a-phosphorylated calcium-binding protein, is a CABYR-binding partner involved in late steps of fibrous sheath biogenesis [J]. J Biol. Chem., 2007, 282(47): 34104-34119.

[2] 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.

[3] Oko R. Occurrence and formation of cytoskeletal proteins in mammalian spermatozoa[J]. Andrologia, 1998, 30(4-5): 193-206.

[4] El-Alfy M, Moshonas D, Morales C R, et al. Molecular cloning and developmental expression of the major fibrous sheath protein(FS 75) of rat sperm[J]. J Androl, 1999, 20(2): 307-318.

[5] Oko R, Clermont Y. Light microscopic immunocytochemical study of fibrous sheath and outer dense fiber formation in the rat spermatid[J]. Anat Rec., 1989, 225(1): 46-55.

[6] Visconti P E, Bailey J L, Moore G D, et al. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation[J]. Development, 1995, 121(4): 1129-1137.

[7] Eddy E M, Toshimori K, O'Brien D A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa[J]. Microsc Res Tech, 2003, 61(1): 103-115.

[8] Brown P R, Miki K, Harper D B, et al. A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum[J]. Biol. Reprod., 2003, 68(6): 2241-2248.

[9] Sakai Y, Koyama Y, Fujimoto H, et al. Immunocytochemical study on fibrous sheath formation in mouse spermiogenesis using a monoclonal antibody[J]. Anat Rec., 1986, 215(2): 119-126.

[10] Irons M J, Clermont Y. Kinetics of fibrous sheath formation in the rat spermatid[J]. Am J Anat., 1982, 165(2): 121-130.

[11] Clermont Y, Oko R, Hermo L. Immunocytochemical localization of proteins utilized in the formation of outer dense fibers and fibrous sheath *in rat spermatids: an electron microscope study*[J]. *Anat Rec.*, 1990, 227(4): 447-457.

[12] 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.

[13] Eddy E M, O'Brien D A, Fenderson B A, et al. Intermediate filament-like proteins in the fibrous sheath of the mouse sperm flagellum[J]. Ann N Y Acad Sci., 1991, 637: 224-239.

[14] 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

[15] Miki K, Willis W D, Brown P R, et al. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility[J]. Dev Biol., 2002, 248(2): 331-342.

(责任编辑:关蕴良)