

附睾小体及其相关蛋白研究进展

李 宁 李建远

附睾小体及相关蛋白与通过附睾管的精子相互作用,使精子发生一系列生化改变,从而获得运动和受精的能力。附睾小体以顶质分泌/顶浆分泌的方式由附睾上皮细胞分泌出来。对附睾小体相关蛋白及与精子相互作用的研究,不但有助于人们进一步了解附睾内精子成熟及调节附睾小体与精子相互作用的分子机制,同时又将为临床上因附睾问题造成的男性不育的诊断与治疗开辟新的途径。本文就近年来附睾小体,附睾小体相关蛋白及其与精子的相互作用的研究进展做一综述。

附睾是哺乳动物重要的生殖器官,主要负责精子的转输、浓缩、贮存以及成熟。研究显示,精子离开睾丸后并不具有运动和受精的能力,还需要经历一系列生化改变以获得成熟^[1]。这些改变主要包括精子膜表面磷脂组成的改变,胆固醇/磷脂比例的改变,二硫键及表面负电荷的增加,表面抗原的重定位,表面蛋白的修饰、消失以及增加^[2]。精子通过与附睾上皮区域性分泌的蛋白质间相互作用而成为功能完全的配子,因此精子成熟过程中黏附在精子表面的蛋白的功能引起广泛的关注^[3]。这些蛋白通常被认为是外衣蛋白,它们通过静电力结合在精子表面,可以通过高离子强度的溶液从精子表面洗涤下来。但有趣的是,当精子经历不同的生化处理的时候,许多附睾蛋白更像是精子膜蛋白^[4]。研究表明,一些与精子表面相关的蛋白都为 GPI-锚定蛋白,比如 HE5/CD52,小鼠 SPAM1^[5,6];仓鼠 P26h 及牛 P25b^[7,8]。GPI 锚定蛋白通常都是通过旁分泌途径分泌并锚定到细胞膜上的。根据基本的分泌途径,细胞外来蛋白不可能成为细胞表面的 GPI 锚定蛋白。因此,附睾起源的通过 GPI 锚定到精子膜表面的蛋白可能通过特殊的方式分泌^[9]。此外,最新的研究显示分泌的附睾蛋白能够结合到精子细胞的胞内亚区^[10]。这些结果显示,附睾分泌蛋白通过特殊的机制转移到精子上^[11]。

一、附睾小体

由附睾上皮细胞局浆分泌的附睾蛋白被认为是管腔液中的可溶蛋白。这些蛋白的编码序列中含有信号肽,能指导它们运输到内质网上。但是附睾内腔液中的一些蛋白如果高速离心的话会发生沉淀。这些蛋白与直径 50 ~ 500nm 的膜状小囊泡相关^[12]。Yanagimachi^[13]首次用电镜下发现了存在于附睾管腔液并与仓鼠精子表面相互作用膜状小囊泡。众所周知,精子在经过附睾管腔时质膜经历了一系列的修饰,研究人员推测这些囊泡可能参与了精子质膜胆固醇的运输。这些小囊泡被称为附睾小体(epididymosomes)。目前附睾小体已在很多物种如仓鼠、牛、小鼠、大鼠的附睾中发现^[13~16]。

附睾小体含磷脂(主要为鞘磷脂)非常丰富,并且胆固醇/磷脂比例很高,Saez^[11]等研究发现比值可高达 2.0^[15]。由于附睾小体相关蛋白缺乏信号肽,它们不能被运输到内质网并由内质网上的核糖体合成,因此这些蛋白通过附睾小体以顶浆方式分泌(apocrine secretion),这与通过局部分泌方式进入附睾腔的可溶性附睾分泌蛋白不同。附睾小体的形成主要包括以下几个过程^[17]:①在附睾上皮主细胞顶部形成细胞质突起;②突起以出芽方式生长,从微绒毛之间穿出形成小泡,小泡中含有少量内质网,游离核糖体及附睾小体。核糖体的存在表明新合成的没有信号肽的蛋白通过这些顶体小泡分泌到管腔;③顶体小泡与细胞脱离并进入附睾腔,之后破裂,释放出能与精子结合的附睾小体。

二维凝胶电泳发现,附睾不同区域的附睾小体相关蛋白具有很大的不同^[14]。从附睾尾获得的附睾小体与从射出精子中纯化得到的类似囊泡也有很大的不同^[18]。这表明,附睾小体对存在于射出精子上的囊泡的种类并未起到重要作用。用 0.1% 的 Triton 处理这些附睾小体并不能分离这些蛋白,表明它们与附睾小体的结合是非常强的,这可能与膜质囊泡胆固醇/磷脂比例高有关^[18]。目前,研究人员已鉴定了一些附睾小体相关蛋白,并预测了其在精子成熟中的功

能。

二、附睾小体相关蛋白及其功能

1. 与精卵结合的蛋白:目前已鉴定出来的附睾小体相关蛋白非常少,这也是附睾小体功能仍未明确的主要原因。P26h 是在仓鼠中发现的参与精子-透明带相互作用的一个精子蛋白。P26h 在精子穿过附睾时转移到精子顶体区,影响精卵结合。在抗 P26h 或重组 P26h 分子免疫接种作用下,仓鼠体内受精可以被阻断^[19]。P26h 有望成为避孕疫苗研制开发的新的候选分子。此外,P26h 的同源蛋白还在牛和人的附睾内发现,命名为 P25b 和 P34h。与 P26h 相似,P25b 和 P34h 同样是附睾小体相关蛋白,通过 GPI 锚定到附睾小体表面,在精子通过附睾时转移到精子顶体区,影响精子与透明带结合^[20]。

精子黏附因子 1 (SPAM1),又称 PH20,是 GPI 锚定的单链糖蛋白,在小鼠、大鼠、恒河猴、牛等动物的附睾内发现,主要由附睾上皮主细胞表达^[21]。它也是一种利用附睾小体转移到精子上的蛋白。研究发现在附睾头段此蛋白可在整个精子头部检测到,而在附睾尾段却定位于顶体下区,研究证实 SPAM1 在精子顶体下区的聚集可能与附睾小体相关蛋白向精子的转移有关^[22,23]。SPAM1 主要的生物功能包括在透明质酸酶活性作用下协助精子穿过放射冠、顶体反应后与透明带的次级结合^[22]。

2. 与精子运动相关蛋白:巨噬细胞转移抑制因子 MIF 以前认为是一个 T 细胞因子,后发现 MIF 组织分布广泛。根据其组织分布和细胞表达类型的不同,MIF 可以发挥不同的生物学功能^[24]。MIF 首先是一个重要的致炎细胞因子,在脓毒症、感染性休克、糖尿病病的发病过程中起重要作用,此外它是一个左旋多巴铬异构酶活性,具有异构酶活性,能将红色的左旋多巴铬甲酯溶液催化成无色吡啉衍生物溶液。最近的研究发现,MIF 对生殖也有着重要的影响,尤其是可以影响精子成熟和精子活力。睾丸间质细胞分泌的 MIF 能调节睾丸支持细胞合成的抑制素的功能。此外,MIF 在大鼠、人、牛的附睾上皮细胞具有高表达特性,它通过顶浆分泌进入附睾管腔^[25,26]。在附睾管腔内,这些附睾小体与精子质膜相互作用从而使 MIF 转移到精子成为鞭毛外致密纤维。MIF 如何从附睾小体转移定位成为精子鞭毛内部组成成分还不甚明了。有人推测,在精子经过附睾时,MIF 自由巯基螯和的锌与外层致密纤维相互作用,从而形成鞭毛内部结构蛋白之间的二硫键^[26]。这可能是精子在附

睾转运过程中调控精子运动的机制。

醛糖还原酶和山梨糖脱氢酶是附睾小体另外的两种组成蛋白,这些酶参与了多元醇代谢途径。这个糖通路可能是与附睾小体相关的另外一种调控精子运动的机制^[27]。多元醇途径的第 1 步包括醛糖还原酶把葡萄糖还原成山梨醇,并以 NADPH 作为电子供体。第 2 步山梨糖脱氢酶以 NAD⁺ 作为电子受体来产生果糖^[28]。在牛中,这两种酶都与附睾精子和附睾小体相关。醛糖还原酶的活性除了在附睾尾部远端及输精管处较低以外整个附睾中都很高。附睾醛糖还原酶活性的最适 pH 值为 6.0~6.5,该值正好是附睾液的 pH 值。山梨糖脱氢酶活性最高的部位位于尾部及输精管。因此,山梨糖产物在除了附睾尾部及输精管部位以外的附睾中比较多,该部位高活性的山梨糖脱氢酶可将山梨糖氧化成果糖。我们推测,山梨糖在整个附睾管腔内都比较丰富。与葡萄糖和果糖不同,山梨糖为线性醇,因此,精子质膜不利于山梨糖渗透。高活性的醛糖还原酶剥夺了精子细胞内能量的组成部分。在附睾尾部,山梨糖脱氢酶能产生果糖,果糖能为准备射出体外的精子提供能量^[29]。有人推测,附睾管腔内的山梨糖作为精子细胞体积调控所需的渗透物起作用。因此,附睾小体通过 MIF 和多元醇代谢途径中的酶调节附睾中精子运动能力。

3. 与不育调节有关的蛋白:HE5 是人附睾组织特异表达基因的产物。序列显示该蛋白为 CD52,是人淋巴细胞的表面蛋白。该蛋白是在精子成熟过程中通过 GPI 锚定到精子表面。推测该蛋白可能与附睾小体相关,而且这些囊泡参与了 HE5/CD52 向精子质膜的转移,HE5/CD52 被认为与免疫不孕有关。

4. 与抗氧化及清除缺陷精子相关的蛋白:5 型谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX5) 是另外一种由头部附睾上皮细胞分泌的附睾小体相关蛋白。GPX5 缺乏 GPXs 家族所特有的硒代半胱氨酸残基,属于非特异性谷胱甘肽过氧化物酶。GPXS 家族蛋白在附睾精子的抗氧化损伤过程中起关键作用,避免未成熟精子在 ROS 作用下过早获能,因而还具有维持精子处于静止期的功能^[22]。研究发现,GPX5 定位于精子的顶体下区,具有保护精子免受氧化损伤的功能。谷胱甘肽-S-转移酶是另外一种有附睾上皮主细胞分泌的附睾小体相关蛋白,该蛋白也与保护精子抗氧化损伤有关。

泛素是另外一种牛附睾小体相关蛋白。像其他蛋白一样,泛素在精子经过附睾的过程中转移到精子上,并且可能在缺陷精子的清除中起作用。

三、精子与附睾小体相互作用

Yanagimachi 等认为附睾小体可能与精子膜胆固醇外流有关,但仅有间接证据表明附睾小体与精子之间发生脂类交换。相比之下,附睾小体与精子之间存在蛋白转移已经得到广泛认可。研究发现,牛附睾尾部的附睾小体与头部的精子体外培养时,附睾相关蛋白选择性地转移到精子上^[14],还有文献报道,当附睾头或者尾部的附睾小体与附睾头部的精子体外培养时附睾小体相关蛋白向精子的转移具有一定的特异性,也就是说附睾不同区域的附睾小体与精子之间的作用是不相同的,其相关蛋白向精子的转移在附睾不同区域具有一定的特异性。

脂筏作为精子及附睾小体上特殊的微小区域,也影响附睾小体与精子相互作用。有报道称一些脂修饰蛋白、脂质化信号转导分子及 GPI 锚定蛋白被隔离在这一微小区域,比如牛 P25b 蛋白和 MIF 就结合在这一特殊部位。脂筏通过调控特异性附睾相关蛋白向精子的转移,在精子成熟过程中起着重要作用。

附睾小体参与了附睾分泌蛋白向精子不同亚组成部位转移的过程,这些蛋白参与透明带结合能力的获得(P26h/P25b),附睾内精子运动能力的调节,免疫不育的调节,抗氧化及清除缺陷精子等过程,在附睾内精子成熟过程中扮演重要的角色。对附睾小体相关蛋白及与精子相互作用的研究,不但有助于人们进一步了解附睾内精子成熟及调节附睾小体与精子相互作用的分子机制,同时又将为临床上附睾问题造成的男性不育的诊断与治疗开辟新的途径,因此,有望成为男性不育研究的重要方向。

参考文献

- Penttinen J, Pujiato DA, Sipila P, *et al.* Discovery in silico and characterization in vitro of novel genes exclusively expressed in the mouse epididymis. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(11): 2138 – 2151
- Oh JS, Han C, Cho C. ADAM7 is associated with epididymosomes and integrated into sperm plasma membrane. *Mol Cells*, 2009, 28(5): 441 – 446
- Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, *et al.* The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol Reprod*, 2005, 73(3): 404 – 413
- Girouard J, Frenette G, Sullivan R. Compartmentalization of proteins in epididymosomes coordinates the association of epididymal proteins with the different functional structures of bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, 2009, 80(5): 965 – 972
- Yeung CH, Perez – Sanchez F, Schroter S, *et al.* Changes of the major sperm maturation – associated epididymal protein HE5 (CD52) on human ejaculated spermatozoa during incubation. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(7): 617 – 624
- Zhang H, Martin – Deleon PA. Mouse epididymal Spam1 (pH – 20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl*, 2003, 24(1): 51 – 58
- Nagdas SK, Winfrey VP, Olson GE. Identification of a hamster sperm 26 – kilodalton dehydrogenase/reductase that is exclusively localized to the mitochondria of the flagellum. *Biol Reprod*, 2006, 75(2): 197 – 202
- Frenette G, Sullivan R. Prostate – like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol Reprod Dev*, 2001, 59(1): 115 – 121
- Hermo L, Jacks D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol Reprod Dev*, 2002, 63(3): 394 – 410
- Frenette G, Legare C, Saez F, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(18): 575 – 582
- Saez F, Frenette G, Sullivan R. Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. *J Androl*, 2003, 24(2): 149 – 154
- Thimon V, Frenette G, Saez F, *et al.* Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum Reprod*, 2008, 23(8): 1698 – 1707
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl*, 2007, 9(4): 483 – 491
- Frenette G, Lessard C, Sullivan R. Selected proteins of "prostate – like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod*, 2002, 67(1): 308 – 313
- Rejzaji H, Sion B, Prensier G, *et al.* Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol Reprod*, 2006, 74(6): 1104 – 1113
- Eickhoff R, Wilhelm B, Renneberg H, *et al.* Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med*, 2001, 7(1): 27 – 35
- Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl*, 2007, 9(4): 483 – 491
- Frenette G, Girouard J, Sullivan R. Comparison between epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine caput and cauda epididymidis. *Biol Reprod*, 2006, 75(6): 885 – 890
- Dube E, Legare C, Gaudreault C, *et al.* Contraceptive responses of female hamsters immunized with recombinant sperm protein P26h. *Contraception*, 2005, 72(6): 459 – 467
- St – Cyr A, Legare C, Frenette G, *et al.* P26h and dicarbonyl/L – xylulose reductase are two distinct proteins present in the hamster epididymis. *Mol Reprod Dev*, 2004, 69(2): 137 – 145

(下转第 19 页)