

人类精子糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白研究进展

刘 新 综述, 李建远 审校(山东省烟台毓璜顶医院中心实验室 264000)

【关键词】 糖基化磷脂酰肌醇; 人类精子; 预测软件

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.02.040 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)02-0203-03

在大多数真核生物中,糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚作为一种翻译后修饰定位蛋白质的 C 端而定位于细胞膜的外叶。GPI 锚的结构上主要由三部分组成:磷酸乙醇胺连接部分、聚糖部分和磷脂尾部分。因 GPI 锚定蛋白结构和功能的多样性而在众多生物学过程中起到重要作用^[1]。在人精子膜同样存在 GPI 锚定蛋白,这些蛋白在精子成熟、精子储存、精子免疫防御、精卵识别和精卵融合等多方面具有重要意义。本文概述了近来人类精子 GPI 锚定蛋白研究进展和 GPI 锚定蛋白批量化在线预测软件,以期对男性节育、避孕以及生殖药物研发提供新的靶点和思路。

1 GPI 锚定蛋白的结构

1976 年一种能够切割磷脂酰肌醇的磷脂酶从蜡芽孢杆菌中获得,被命名为磷脂酰肌醇特异性的磷脂酶 C(PI-PLC),随后在金黄色葡萄球菌和诺氏梭菌中相继发现 PI-PLC。PI-PLC 具有从组织细胞表明释放碱性磷酸酶、5'核苷酸酶和红细胞乙酰胆碱酯酶的特性,而这些蛋白被推迟是通过磷脂酰肌醇以共价结合的方式锚定于细胞磷脂双层膜上^[2]。1985 年,两个细胞表面蛋白(布氏锥虫的表面变化糖蛋白和哺乳动物胸腺及脑组织的胸腺抗原 1)的 C 端结构才被确认:(1)通过乙醇胺的氨基连接到蛋白的 C 端;(2)多聚糖部分包含甘露糖,葡萄糖胺和半乳糖等;(3)结合到质膜的磷脂键可被 PI-PLC 切断,至此 GPI 锚的基本结构被确定^[3]。随着研究的深入,GPI 锚的结构被进一步确认。GPI 锚定蛋白通过磷酸乙醇胺连接到高度保守核心多糖:甘露糖(1-2 连接)甘露糖(1-6 连接)甘露糖(1-4 连接)葡萄糖胺(1-6 连接)肌醇。一个磷脂尾锚定于细胞膜。在高等真核生物中,磷酸乙醇胺连接到第 2 个还是第 3 个甘露糖是可变的。第 1 个甘露糖仍可连接另外一个甘露糖;含 N 连接的乙酰化半乳糖胺的多糖可结合到多糖核心的第 3 个甘露糖;核心多糖中的葡萄糖胺很少被修饰;磷酸肌醇连接到二酰基甘油(烷基化的甘油酯或者是神经酰胺);脂质中碳原子数变化范围为 14~28;肌醇环可被棕榈酸修饰,但修饰后的肌醇磷酸不在被 PI-PLC 识别和切割^[4-5]。

2 人精子中 GPI 锚定蛋白

人精子中的 GPI 锚定蛋白主要来源主要有两种:一是在睾丸精子发生过程中合成,然后转运到精子膜;二是精子在男性生殖道转运过程中通过与生殖道管腔液相互作用,以附睾小体或者前列腺小体方式转运到精子表面。但到目前为止,人精子膜 GPI 锚定蛋白研究相当少,但这些蛋白对于维持精子功能、发挥精子生理作用具有重要意义。

2.1 CD52 CD52 是人精子 GPI 锚定蛋白中研究最为深入的一种蛋白,由 12 个氨基酸组成核心肽段,氨基端第 3 个氨基酸——天冬酰胺发生 N 连接的糖基化,该糖基化位点的糖链具有高度异质性,羧基端通过 GPI 锚与精子质膜连接,CD52 复杂的翻译后修饰形成了多种不同的抗原表位,因而有多种抗体可识别 CD52。097 识别 GPI 锚远端 4 个氨基酸;CAM-PATH-1G 识别羧基端和部分 GPI 锚结构;CF1D12 识别 N-连

接的糖链;2E5 识别 N-连接糖链的唾液酸。Yeung 等^[6]研究表明,人精子在获能过程中 CD52 的糖链更倾向展开以便更容易接触到唾液酸、核心肽段和 GPI 锚。人精子在睾丸中生成,但是并不具备运动和受精的能力,经附睾转运后才能达到精子成熟的要求。CD52 由附睾上皮细胞分泌,通过 GPI 锚附着于在附睾中转运的精子表面。CD52 功能主要使精子免受补体依赖的免疫反应发生并防止精子之间相互凝聚^[7]。研究发现不育女性外周血 B 淋巴细胞产生一种针对精子表面蛋白 CD52 的单克隆抗体(Mab H6-3C4),直接造成精子制动并引发精子凝集,影响精子受精能力^[8]。因此 CD52 极有可能成为免疫避孕的精子表面靶蛋白,通过与 CD52 的单克隆抗体结合,干扰精子正常受精过程^[9]。

2.2 NYD-SP8 Yin 等^[10]报道了一种新的人精子 GPI 锚定蛋白:NYD-SP8(南医大精子蛋白 8)。在精卵相互作用过程中被释放,释放的 NYD-SP8 与卵丘结合促进了精卵相互作用并导致钙离子依赖的黄体酮释放,最终引发顶体反应。精子与 NYD-SP8 相应抗体结合后造成小鼠受孕率降低。精子很有可能在到达透明带之前已经将 NYD-SP8 释放,用于与卵丘细胞结合触发顶体反应,很有可能在精卵受精中发挥重要作用。

2.3 CD55 CD55 也是一种人精子 GPI 锚定蛋白,曾命名为衰退加速因子(DAF),属于补体调节类蛋白,免受补体攻击^[11]。CD55 同时定位于人精子质膜和顶体内膜。Cummer-son 等^[12]通过荧光双重标记的方法证实了 CD55 不仅定位于精子质膜同时在顶体内膜也有定位,但是后者荧光强度明显高于前者。磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C 处理顶体反应后的精子顶体内膜可以释放 CD55,从而证明了 CD55 是以 GPI 锚定的方式存在于顶体内膜上的可能性。

2.4 CD59 CD59 属于补体调节蛋白,是补体系统的膜攻击复合物的抑制分子,通过 GPI 锚定于人精子膜。Rooney 等^[13]报道在人精浆中存在大量的 CD59 分子,浓度不低于 20 mg/mL。通过高速离心、高效液相色谱分离和电子显微镜联用策略发现精浆中 CD59 与小囊泡(前列腺小体)有关联,进而推测精子膜上的 CD59 分子来自于前列腺小体。Cummerson 等^[12]研究发现 CD59 在精子定位情况与 CD55 类似,即在精子质膜和顶体内膜均有定位,顶体反应后的精子经糖基化磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C 处理后,CD59 可从顶体内膜脱落。

2.5 CD46 CD46 在人精子和移植入子宫前胚胎中均有表达,使其免受补体介导的免疫攻击,但 CD46 作为一个补体结合蛋白在生殖过程中可能还有其他作用^[14]。CD46 作为一个 GPI 锚定精子膜蛋白,定位不同于 CD55 和 CD59,其仅定位于精子顶体内膜。顶体反应发生后,CD46 才能暴露出来,参与受精过程^[12]。

2.6 CD73 CD73 也属于补体调节蛋白,是补体系统的膜攻击复合物的抑制分子,使精子在男性和女性生殖道中免受免疫攻击^[15]。CD73 通过 GPI 锚定位于精子顶体区的外质膜。CD73 具有 5''核苷酸酶活性,产生腺苷。CD73 很可能与精子

运动和男性不育密切相关^[16]。

2.7 类胚蛋白(Doppel) Doppel 是第一个报道的胚蛋白同源蛋白,两者在氨基酸序列以及蛋白质的三维结构中相似性高,但它们的生理功能有待于进一步研究。Doppel 存在于人睾丸、附睾和成熟精子中,以 GPI 锚定的方式定位于精子膜。由于 Doppel 在人睾丸支持细胞和人成熟精子中有表达,推测该蛋白很可能与精子发生以及精卵相互作用有关^[17]。Cereghetti 等^[18]通过电子顺磁共振光谱技术发现了 Doppel 蛋白有两个 Cu^{2+} 结合位点,因此 Cu^{2+} 可能对于 Doppel 发挥正常生理活性具有重要意义。

2.8 磷脂酰乙醇胺结合蛋白 1(PEBP1) PEBP1 也被称为去获能因子受体,是精子膜另外一个 GPI 锚定蛋白。Gibbons 等^[19]发现 PEBP1 定位于人精子顶体帽,顶体后区以及鞭毛。用磷脂酶处理后可以切掉 GPI 锚定状态,从而证明了 PEBP1 在精子膜上是以 GPI 锚定形式存在。在精子获能过程中可能引起头部和尾部质膜的改变。

2.9 精子顶体膜相关蛋白 14(SAMP14) SAMP14 是尿激酶型纤溶酶原激活物受体,属于尿激酶纤溶酶原激活物受体超家族成员。SAMP14 以 GPI 锚定方式定位于人精子顶体内膜和精子质膜。精子诱发顶体反应后,通过 GPI 锚钩结合到精子顶体的外膜和内膜。在未洗涤体外射出精子,SAMP14 定位于整个精子,暗示了 SAMP14 在精子质膜的定位。在发生顶体反应后,精子顶体内膜 SPAM14 才能暴露出结合部位,进一步经 PIPLC 处理后,SAMP14 从顶体反应后的精子顶体内膜脱落。SAMP14 与特异抗体结合后抑制了与仓鼠卵的结合,暗示 SAMP14 在精卵融合过程中起到关键作用^[20]。上述的 NYD-SP8 与 SAMP14 有 30% 的同源性,可能涉及不同转录后剪切^[10]。

2.10 精子黏附分子 1(SPAM1) SPAM1 通过 GPI 锚定于人精子质膜和顶体内膜。SPAM1 具有透明质酸酶的活性,在睾丸、附睾和精子中均有表达。在精子膜蛋白中,SPAM1 是一个广泛存在的保守的精子抗原。人的 SPAM 家族中有 6 个成员,仅 SPAM1 具有透明质酸酶活性。由于在睾丸和附睾中均有表达,SPAM1 很可能与精子发生以及精子成熟、储存有关^[21]。SPAM1 作为一个单链的 GPI 锚定蛋白,其蛋白 N 端具有透明质酸酶活性,该活性能够帮助精子穿越卵周围的卵丘细胞层;由于 SPAM1 在顶体内膜也有定位,顶体反应后的精子质膜(顶体内膜)上的 SPAM1 能够第二次与透明带结合,参与精卵融合过程^[22]。有关精子表面 SPAM1 来源,Griffiths 等^[23]报道人精子在附睾转运过程中,丛生蛋白作为载体将附睾液中的 SPAM1 转移到精子膜表面,附睾液中加入抗丛生蛋白抗体会导致转移效率降低,但是高浓度的丛生蛋白并没有增加转移效率,相反较低浓度的丛生蛋白反而增加了 SPAM1 的转移。至于精子顶体内膜的 SPAM1 是在精子发生过程中已经存在,还是在附睾转运过程中插入有待于进一步研究。

3 GPI 预测软件

GPI 锚定蛋白作为一类重要蛋白,在人精子成熟和受精中发挥重要作用。从以上综述不难看出在人精子中研究比较多的仅为上述 10 种蛋白,此外还有多少 GPI 蛋白可能存在于精子膜上。有研究学者对于不同物种全基因组进行 GPI 锚定蛋白进行预测,软件架构主要基于隐马尔可夫模型和神经网络模型对 GPI 蛋白特异性的信号肽 ω 位点进行预测,不同之处在于参数的设置,结果显示大多数物种 GPI 锚定蛋白数量不超过 3%^[24]。人精子蛋白质组领域研究较多两个研究小组分别鉴定到 1 760 个和 1 056 个蛋白质^[25],按照 3% 计算,精子 GPI

锚定蛋白数量在 50 个左右,但这个数量会随着蛋白质组学技术的提高而有所增加。目前通过网络可以在线计算的 GPI 蛋白预测软件主要有 4 种:神经自组织 GPI 锚定信号在线预测(GPI-SOM)^[24];GPI 锚定蛋白在线预测系统(PredGPI)^[26];GPI 修饰位点在线预测(BIG-PI)^[27];GPI 锚定蛋白预测串联系统(FragAnchor)^[28]。预测软件为蛋白可能存在的 GPI 锚定位点提供了参考,但预测的准确性仍有待于生物学实验的验证。

4 展 望

GPI 锚定蛋白从 1985 年基本结构确定至今,对这类 GPI 锚定蛋白的认识还处于起步阶段。GPI 锚的功能一般认为参与膜蛋白横向运动;介导蛋白定位;调节细胞内吞;信号转导。GPI 锚丰富的侧链可变基团与其功能的发挥还有待于研究。

人类精子膜上的 GPI 锚定蛋白从鉴定的数量和功能的挖掘上都是不足的。但从已发现的人类精子 GPI 锚定蛋白已经显示其在精子成熟、精子免疫防御、精卵识别和精卵融合过程中作用,而有些 GPI 锚定蛋白的缺失导致男性不育。人类精子的 GPI 锚定蛋白必将成为男性生殖生物学研究领域的焦点,为男性节育避孕和生殖药物开发提供靶点并为男性生殖健康奠定理论基础。

参考文献

- [1] Nosjean O, Briolay A, Roux B. Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1331(2): 153-186.
- [2] Low MG. The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989, 988(3): 427-454.
- [3] Ferguson MA. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research[J]. *J Cell Sci*, 1999, 112(Pt 17): 2799-2809.
- [4] Paulick MG, Bertozzi CR. The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins[J]. *Biochemistry*, 2008, 47(27): 6991-7000.
- [5] McConville MJ, Ferguson MA. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes[J]. *Biochem J*, 1993, 294(2): 305-324.
- [6] Yeung CH, Pérez-Sánchez F, Schröter S, et al. Changes of the major sperm maturation-associated epididymal protein HE5 (CD52) on human ejaculated spermatozoa during incubation[J]. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(7): 617-624.
- [7] Koyama K, Ito K, Hasegawa A. Role of male reproductive tract CD52 (mrt-CD52) in reproduction[J]. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007, 63: 103-110.
- [8] Koyama K, Hasegawa A, Komori S. Functional aspects of CD52 in reproduction[J]. *J Reprod Immunol*, 2009, 83(1): 56-59.
- [9] Domagala A, Kurpisz M. CD52 antigen—a review[J]. *Med Sci Monit*, 2001, 7(2): 325-331.
- [10] Yin L, Chung CM, Huo R, et al. A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(5): 900-908.
- [11] Taylor CT, Johnson PM. Complement-binding proteins are

- strongly expressed by human preimplantation blastocysts and cumulus cells as well as gametes[J]. Mol Hum Reprod, 1996,2(1):52-59.
- [12] Cummerson JA, Flanagan BF, Spiller DG, et al. The complement regulatory proteins CD55 (decay accelerating factor) and CD59 are expressed on the inner acrosomal membrane of human spermatozoa as well as CD46 (membrane cofactor protein)[J]. Immunology, 2006,118(3):333-342.
- [13] Rooney IA, Atkinson JP, Krul ES, et al. Physiologic relevance of the membrane attack complex inhibitory protein CD59 in human seminal plasma: CD59 is present on extracellular organelles (prostasomes), binds cell membranes, and inhibits complement-mediated lysis[J]. J Exp Med, 1993,177(5):1409-1420.
- [14] Taylor CT, Johnson PM. Complement-binding proteins are strongly expressed by human preimplantation blastocysts and cumulus cells as well as gametes[J]. Mol Hum Reprod, 1996,2(1):52-59.
- [15] Kirchhoff C, Hale G. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation[J]. Mol Hum Reprod, 1996,2(3):177-184.
- [16] Takayama T, Matsubara S, Shibahara H, et al. Ultracytochemical localization of 5'-nucleotidase activity in human ejaculated spermatozoa[J]. Int J Androl, 2000, 23(2):106-108.
- [17] Peoc'h K, Serres C, Frobert Y, et al. The human "prion-like" protein Doppel is expressed in both Sertoli cells and spermatozoa[J]. J Biol Chem, 2002, 277(45):43071-43078.
- [18] Cereghetti GM, Negro A, Vinck E, et al. S. Copper(II) binding to the human Doppel protein may mark its functional diversity from the prion protein[J]. J Biol Chem, 2004,279(35):36497-36503.
- [19] Gibbons R, Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR. A mouse sperm decapacitation factor receptor is phosphatidylethanolamine-binding protein 1[J]. Reproduction, 2005, 130(4):497-508.
- [20] Shetty J, Wolkowicz MJ, Digilio LC, et al. SAMP14, a novel, acrosomal membrane-associated, glycosylphosphatidylinositol-anchored member of the Ly-6/urokinase-type plasminogen activator receptor superfamily with a role in sperm-egg interaction[J]. J Biol Chem, 2003, 278(33):30506-30515.
- [21] Martin-DeLeon PA. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function[J]. Mol Cell Endocrinol, 2006, 250(1):114-121.
- [22] Myles DG, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg[J]. Biol Reprod, 1997, 56(2):320-327.
- [23] Griffiths GS, Galileo DS, Aravindan RG, et al. Clusterin facilitates exchange of glycosyl phosphatidylinositol-linked SPAM1 between reproductive luminal fluids and mouse and human sperm membranes[J]. Biol Reprod, 2009,81(3):562-570.
- [24] Fankhauser N, Mäser P. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map[J]. Bioinformatics, 2005,21(9):1846-1852.
- [25] du Plessis SS, Kashou AH, Benjamin DJ, et al. Proteomics: a subcellular look at spermatozoa[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011,9:36-40.
- [26] Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R. PredGPI: a GPI-anchor predictor[J]. BMC Bioinformatics, 2008,9:392-396.
- [27] Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F. Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences[J]. J Mol Biol, 1999,292(3):741-758.
- [28] Poisson G, Chauve C, Chen X, et al. Frag anchor: a large-scale predictor of glycosylphosphatidylinositol anchors in eukaryote protein sequences by qualitative scoring[J]. Genomics Proteomics Bioinform, 2007,5(2):121-130.

(收稿日期:2011-07-15)

肝胆外科的胆管造影检查

姜 飞¹综述, 龚建平², 何 堃²审校(1. 重庆市九龙坡区第五人民医院外科 401329; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010)

【关键词】 肝胆外科; 胆管造影; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.02.041 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)02-0205-03

肝胆外科的胆管造影(cholangiography)是经一定方法和渠道使造影剂进入胆道,使胆道造影部位的轮廓及病变图像能在X线片上清楚显示出来,从而更有助于肝胆疾病的诊断。胆管造影的方法很多,一般分为排泄性胆道造影和直接胆道造影两大类。

1 排泄性胆管造影

排泄性胆道造影是运用口服或静脉注射造影剂(利用造影剂为肝细胞摄取并排入胆道的原理)进行胆道造影摄片。这种造影方法适宜于其他脏器功能正常且无并发症的患者使用。

常用的方法有经口胆囊造影方法、经静脉胆道造影法(普通静脉造影和滴注静脉造影)、经口和静脉联合造影法。有明显肝功能异常(黄疸指数30单位以上,磺溴酞钠30%以上)和阻塞性黄疸时上述3种排泄法胆道造影均不能使用。排泄性胆管造影目前已很少采用。

2 直接胆道造影

直接胆道造影法是通过各种途径把造影剂直接注入胆道,进行摄影,临床上常采用的方法有内窥镜下逆行胰胆管造影法、经皮肝穿刺胆道造影、手术胆道造影法(术中造影)和术后