

附睾精子结合蛋白 1 在男性生殖中的研究进展

李世佳¹, 石 慧², 李建远² 综述, 魏 军³ 审校 (1. 宁夏医科大学检验学院, 银川 750004;
2. 青岛大学附属烟台毓璜顶医院中心实验室, 山东烟台 264001; 3. 宁夏医科大学
总医院医学实验中心, 银川 750004)

【关键词】 附睾; 精子; 附睾精子结合蛋白 1

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.19.042 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)19-2476-03

附睾是哺乳动物精子成熟、获得受精及运动能力、贮存和保护精子的场所。睾丸中完成形态分化的精子从染色质角度看已基本成熟, 但只有在通过附睾的过程中, 与管腔微环境中特异表达的蛋白质不断地相互作用, 才能最终获得前向运动能力、透明带结合能力及受精能力。

附睾精子结合蛋白 1 (epididymal sperm binding protein 1, ELSPBP1) 属于附睾起源的精子膜蛋白家族, 在附睾中高度表达, 其编码的蛋白质与牛精浆蛋白 (bovine seminal plasma proteins, BSP) 在结构上具有一定的相似性, 预测该蛋白是与 BSP 功能相关的结合蛋白, 参与精子胞膜的脂类代谢, 调节精子获能及顶体反应^[1]。本文现对 ELSPBP1 的分子生物学特征及其与男性生殖的关系作一阐述。

1 ELSPBP1 的结构、组织表达及定位

1.1 ELSPBP1 的结构 ELSPBP1 是德国 Saalman 等^[2]于 2001 年通过差异 cDNA 文库筛选、Northern 印迹杂交和组织原位杂交等方法在人附睾上皮内发现验证的新基因, 又名附睾分泌蛋白 12 (epididymal secretory protein 12, E12), 该基因位于染色体 19q13.33, cDNA 全长 1 025 bp, 编码的蛋白氨基酸序列中含有 4 个纤维连接蛋白 2 型 (fibronectin type II, Fn2) 结构域^[3]。其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 编码 223 个氨基酸, 相对分子质量约为 26.1×10^3 。序列同源性分析发现, 与之序列最相近的是 BSP 蛋白家族, 包括 BSP-A1/A2、BSP-A3 和 BSP-30 $\times 10^3$ 蛋白质, 其中 ELSPBP1 的第 26~113 位氨基酸与 BSP-A3 的 28~115 位氨基酸约有 51% 的残基相同^[4]。

1.2 ELSPBP1 的组织表达及定位 Saalman 等^[2]用 Northern 印迹方法证明了人 ELSPBP1 的表达具有附睾特异性, 在附睾头、体部高表达, 尾部弱表达, 在脑垂体、甲状腺、前列腺、睾丸、肾脏及精腺囊等组织未见表达。但罗阳等^[5]曾在睾丸组织发现并克隆了一个精子结合蛋白的 cDNA 序列, 命名为 TSBP (testis sperm binding protein), 其 GenBank 注册号为 AF279147, 与 ELSPBP1 的基因序列、相对分子质量、注册号等信息完全一致, 现认为两者为同一基因。采用 RT-PCR 方法研究发现, 人 TSBP 除在附睾组织有丰富表达外, 在睾丸、肠、肝、肾脏、脾脏、胰腺、胃、心肌及骨骼肌等 10 种组织中均有阳性表达, 肺、脑组织中未见明显的扩增带, 即提示该基因没有组织特异性。2003 年 Schafer 等^[6]用 Western 印迹技术发现, 人 ELSPBP1 蛋白在附睾体、尾部及精子中有表达。2006 年 Harayama 等^[7]及 2007 年 Ekhlasi-Hundrieser 等^[8]通过免疫荧光结果显示 ELSPBP1 蛋白定位在人精子尾部的中段、主段

及赤道部, 其中精子尾部中段高表达, 赤道部弱表达。2010 年 Li 等^[9-10]等通过蛋白质组学及免疫荧光技术研究发现人 ELSPBP1 蛋白在附睾中高表达并定位在精子赤道部。亚细胞定位实验证明, ELSPBP1 存在于细胞膜附近。该基因属于一个高度保守的蛋白家族, 在灵长类、有蹄类及哺乳类动物中表达, 但在啮齿类动物中未见表达^[2]。

2 ELSPBP1 的功能研究

2.1 ELSPBP1 结构和功能的关系 ELSPBP1 蛋白结构含有 4 个串联的 Fn2, 每个 Fn2 包含两个含有 40 个氨基酸的二硫化物结构域, 故又属于纤维连接蛋白家族。纤维连接蛋白是一种与细胞表面结合的浆蛋白, 可与胶原、肝素、DNA、肌动蛋白等结合, 作为一种不溶的细胞基质以二聚体形式在细胞内存在, 亚基间以 C 末端的二硫键相连。II 型是指在多肽中半胱氨酸残基按顺序以 1-3 和 2-4 形成的二硫键从而构成的胱氨酸多肽结构^[8]。Fn2 可形成多聚体结构与精子表面磷脂结合促进由肝素、HDL 等诱导的精子获能^[1]; 还可促进精子胞膜上的胆固醇外移。有报道认为精子胞膜上高浓度的胆固醇是妨碍其获能的一个原因^[11]。研究表明 ELSPBP1 蛋白在精子胞膜的脂类代谢、精子获能及顶体反应等方面发挥重要作用。

2.2 ELSPBP1 在生殖系统中的功能 精子跨膜细胞信号转导与精子的活力密切相关, 不同的细胞信号通过细胞信号转导通道引起精子鞭毛蛋白的磷酸化或去磷酸化来调节精子活力。(1) 蛋白质酪氨酸磷酸化增加是精子获能的一个重要表现, 在人精子中, 蛋白质酪氨酸磷酸化的增加是受 cAMP/PKA 信号途径调节的, 因此精子获能极有可能与蛋白激酶 A (PKA) 途径有关。ELSPBP1 可以激活 PKA 活性^[12]; PKA 可通过调节精子尾部肌动蛋白的亚基磷酸化进而影响精子活力、促进精子获能^[13-14]。PKA 在精子顶体外膜刺激电压依赖性 Ca^{2+} 通道, 使得精子顶体内部向胞质释放 Ca^{2+} , 增加 Ca^{2+} 水解磷脂酰肌醇二磷酸酯, 可使得磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 激活, 从而导致蛋白激酶 C (PKC) 在质膜上打开电压依赖性 Ca^{2+} 通道, 使得 Ca^{2+} 浓度第 2 次升高, 最终导致顶体反应的发生和精子鞭毛运动的增强^[8]。(2) 适宜浓度的 ELSPBP1 蛋白可以使精子 PKC 含量上调, 人精子 PKC 亚型免疫化学分析证明 α 、 β_{II} 亚型存在于赤道部, 可能参与顶体反应的调节^[15]; β_I 、 ϵ 亚型存在于精子尾部的中段和主段, 与精子的活动力有关; γ 亚型不存在于人精子中^[16]。有研究证实人精子有高度特异的细胞骨架蛋白, 如肌动蛋白、肌球蛋白、微管蛋白等^[17], 精子活动力与这些蛋白磷酸化/去磷酸化相关, 而这些蛋白均是 PKC 的潜在底物^[18]。PKC 可通过酰佛波乙酸酯 (phorbol myristate

acetate, PMA)/PKC ϵ /细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated protein kinase, ERK)等途径调节精子活动力^[19]。2011 年丁玉芹等^[20]研究证实, PKC 可使 ERK 磷酸化水平升高, ERK 通路是丝裂原活化蛋白激酶(mitogenactivated protein kinase, MAPK)信号传导通路中重要一环。表明 PKC 在 ERK 信号传导通路中起着非常重要的作用, 激活 ERK 信号传导通路可增加精子的活动力^[17]。因此, PKC 的活性及含量与精子的活动力密切相关。(3)宿文辉等^[21-22]利用人重组睾丸精子结合蛋白 TSBP 体外培养精子, 结果表明: 特定浓度的 ELSPBP1 蛋白可与精子细胞膜融合, 精子前向运动百分率、人精子经孕酮诱导的顶体反应率及低渗肿胀率均有明显提高并使膜功能得到改善, 提高人精子的受精能力。在低渗肿胀试验中, 人精子尾呈不同程度的膨胀、卷曲。现普遍认为精子尾部的形变代表质膜的完整性, 并有证据表明尾部的形变率与受精能力呈高度正相关。

3 结论与展望

现有研究结果表明人 ELSPBP1 蛋白在受精过程中发挥了重要作用, 既能激活 PKA 活性刺激 Ca^{2+} 释放进而使得顶体反应在 PKC 作用下易于发生, 又可以激活 cAMP/PKA 和 ERK 信号通路影响精子运动、获能及顶体反应。体外蛋白孵育实验也表明, ELSPBP1 浓度的高低对精子运动能力有显著影响。然而, 对于该基因与其他基因的相互作用关系, 以及是否可作为临床诊断男性不育的靶基因还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Therien I, Bleau G, Manjunath P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin[J]. Biol Reprod, 1995, 52(6): 1372-1379.
- [2] Saalman A, Münz S, Ellerbrock K, et al. Novel sperm-binding proteins of epididymal origin contain four fibronectin type II-modules[J]. Mol Reprod Dev, 2001, 58(1): 88-100.
- [3] Sahin E, Petrunkina AM, Ekhlasi-Hundrieser M, et al. Fibronectin type II-module proteins in the bovine genital tract and their putative role in cell volume control during sperm maturation[J]. Reprod Fertil Dev, 2009, 21(3): 479-488.
- [4] Salois D, Ménard M, Paquette Y, et al. Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa; phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma[J]. Biol Reprod, 1999, 61(1): 288-297.
- [5] 罗阳, 张学, 刘莹, 等. 人牛精浆蛋白相关新基因的 cDNA 克隆、定位和表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(2): 191-196.
- [6] Schafer B, von Horsten HH, Dacheux JL, et al. Cloning and characterization of boar epididymal secretory proteins by homology to the human[J]. Reprod Domest Anim, 2003, 38(2): 111-118.
- [7] Harayama H, Miyake M. A cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase C activation is involved in the hyperactivation of boar spermatozoa[J]. Mol Reprod Dev, 2006, 73(9): 1169-1178.
- [8] Ekhlasi-Hundrieser M, Schäfer B, Philipp U, et al. Sperm-binding fibronectin type II-module proteins are genetically linked and functionally related[J]. Gene, 2007, 392(1-2): 253-265.
- [9] Li J, Liu F, Wang H, et al. Systematic mapping and functional analysis of a family of human epididymal secretory sperm-located proteins[J]. Mol Cell Proteomics, 2010, 9(11): 2517-2528.
- [10] Li J, Liu F, Liu X, et al. Mapping of the human testicular proteome and its relationship with that of the epididymis and spermatozoa[J]. Mol Cell Proteomics, 2011, 10(3): M110.004630.
- [11] Therien I, Moreau R, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm[J]. Biol Reprod, 1998, 59(4): 768-776.
- [12] 宿文辉, 张哲, 张杰, 等. 重组人睾丸精子结合蛋白对蛋白激酶 A 活性的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2007, 24(6): 1334-1337.
- [13] Schlingmann K, Michaut MA, McElwee JL, et al. Calmodulin and CaMKII in the sperm principal piece: evidence for a motility-related calcium/calmodulin pathway[J]. J Androl, 2007, 28(5): 706-716.
- [14] Itoh A, Inaba K, Ohtake H, et al. Characterization of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from rainbow trout spermatozoa[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(4): 855-861.
- [15] Rotem R, Paz GF, Homonnai ZT, et al. Ca^{2+} -independent induction of acrosome reaction by protein kinase C in human sperm[J]. Endocrinology, 1992, 131(5): 2235-2243.
- [16] Rotem R, Paz GF, Homonnai ZT, et al. Protein kinase C is present in human sperm; possible role in flagellar motility[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(18): 7305-7308.
- [17] Peknicova J, Pexidrova M, Kubatova A, et al. Expression of beta-tubulin epitope in human sperm with pathological spermiogram[J]. Fertil Steril, 2007, 88(4 Suppl): 1120-1128.
- [18] Kalina M, Socher R, Rotem R, et al. Ultrastructural localization of protein kinase C in human sperm[J]. J Histochem Cytochem, 1995, 43(4): 439-445.
- [19] Almog T, Lazar S, Reiss N, et al. Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality[J]. J Biol Chem, 2008, 283(21): 14479-14489.
- [20] 丁玉芹, 姜宏, 汪存利. 蛋白激酶 C(PKC)对人精子活动力的影响及其作用机制[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(4): 422-425.
- [21] 宿文辉, 刘欣春, 冯晨, 等. 重组人睾丸精子结合蛋白对人

精子运动参数的影响[J]. 中华男科学, 2009, 15(9): 783-787.

[22] 宿文辉, 崔城, 张哲, 等. 重组人睾丸精子结合蛋白对人精子获能及膜功能的影响[J]. 生殖与避孕, 2007, 5(27):

(收稿日期: 2012-02-27)

老年股骨颈骨折的手术治疗进展

吴市春 综述, 严康宁, 林文祥 审校(福建医科大学附属漳州市医院骨科, 福建漳州 363100)

【关键词】 股骨颈骨折; 骨折内固定; 老年人; 人工关节置换

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 19. 043 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)19-2478-02

老年股骨颈骨折发生率较高, 约占老年股骨近端骨折的 53%^[1], 占全身骨折的 3. 58%^[2]。随着社会人口老龄化的进展, 老年股骨颈骨折的发病率有明显的上升趋势。老年人股骨颈骨折后, 其生活质量明显下降, 伤后并发症及病死率较高。老年股骨颈骨折如采用保守治疗, 需长期卧床(8 周左右), 则容易发生肺炎、深静脉血栓形成、褥疮等并发症, 甚至危及生命, 因此要尽量积极手术治疗, 争取早期下床活动, 尽可能避免上述并发症。然而老年股骨颈骨折的手术方式较多, 其手术方式的选择争议较大, 且不同手术方式的疗效也存在差异。本文结合文献报道, 就近年来老年股骨颈骨折的手术治疗予以综述。

1 临床分型

股骨颈骨折有许多种的分型方法, 如 Garden 分型、AO 分型、按 Pauwells 角分型等。目前国际上常用的是 Garden 分型。因股骨颈骨折的 Garden 分型可提示骨折的稳定性, 而且可评估股骨头血供的大致情况, 对于手术方式的选择及预后的判断有较大帮助。故国内主要也采用 Garden 分型^[3-4], 其分型如下: I 型为不完全性骨折, 多伴嵌插; II 型为完全骨折, 股骨头无明显移位; III 型为完全骨折, 伴有骨折块明显的移位, 股骨头外展移位; IV 型骨折块完全移位, 而股骨头可回复到正常位置, 即其骨小梁与髁臼骨小梁重新对线。

2 手术治疗

老年人股骨颈骨折的手术方式较多, 临床疗效不一。关于骨折的初次手术治疗, 采用内固定还是人工关节置换存在较大争议。Browner^[5]报道对 Garden I、II 型老年患者应用 AO 空心加压螺钉内固定治疗是最佳的治疗方案。王振威等^[6]报道对 Garden III、IV 型老年患者应行人工关节置换术。而 Probe^[7]认为, 对 60~80 岁的 Garden I、II 型老年患者也可行人工关节置换术, 但应根据患者骨折的稳定性、身体状况等综合考虑, 选择手术方式。其中内固定方式包括空心加压螺钉、DHS 内固定等, 而人工髋关节置换术包括人工股骨头置换术和全髋关节置换术。

2.1 内固定治疗 相对于人工关节置换术, 该手术时间较短, 创伤较小, 操作较简单, 出血较少。常见的内固定方式为空心加压螺钉内固定。空心加压螺钉内固定手术由于可经皮操作, 创伤小, 对股骨头的血供损害小, 术后疼痛程度轻, 目前已经成为治疗 Garden I、II 型老年股骨颈骨折最常用的一种手术方式, 成功率达 86%~96%。张昆等^[8]报道应用空心加压螺钉治疗老年股骨颈骨折 91 例, 结果优良率达 88. 6%。马永江等^[9]应用空心加压螺钉治疗老年股骨颈骨折 38 例, 结果优

良率 89. 47%。尽管空心加压螺钉内固定手术具有上述优点, 但是对于部分不稳定型的股骨颈骨折, 如内收型的股骨颈骨折, 由于骨折线之间的剪切力大, 此时应用空心加压螺钉内固定手术效果常不理想, 如果采用动力髋螺钉(DHS)固定则可达到较稳定的效果。对于股骨颈骨折患者, 其股骨头缺血性坏死的发生率与患者年龄呈反比, 年龄越大其发生率越低。因此对于老年股骨颈骨折患者, 尽管内固定手术存在一定的失败率, 但因其具有创伤小、操作简单等优点, 如果内固定材料的选择得当、手术技术正确、术后积极的康复训练, 患者仍可以得到比较满意的治疗效果。

尽管内固定手术具有上述优点, 但是其仍存在一定的缺点, 其较大的缺点是骨折不愈合和股骨头缺血坏死问题。根据文献统计, 老年股骨颈骨折内固定治疗后, 骨折不愈合的发生率为 15%, 股骨头缺血坏死的发生率为 20%~30%^[10], 需二期行人工关节置换术。股骨头的血供是决定骨折不愈合和股骨头缺血坏死是否发生的最关键因素, 而改善股骨头血供的关键因素是良好的骨折复位。因此行内固定手术时, 应该使骨折具有良好的复位。行内固定手术, 应有严格的手术指征, 对于 Garden I、II 型老年患者, 初次手术行内固定手术治疗是一种理想的手术方法; 而对于明显移位的股骨颈骨折, 如 Garden III、IV 型老年患者, 估计术中骨折复位困难, 术后发生骨折不愈合和股骨头缺血坏死的可能性较大, 则选择行人工髋关节置换术可避免上述并发症, 达到较好的临床效果^[11]。

2.2 人工关节置换术 相对于内固定手术, 人工髋关节置换没有骨折不愈合和股骨头缺血坏死发生的缺点, 术后可早期下床活动、进行髋关节功能锻炼等优点, 目前已成为治疗老年股骨颈骨折的一种理想的手术方法。陈戎波等^[12]报道应用人工髋关节置换治疗老年股骨颈骨折患者 126 例, 结果优良率达 92. 1%。但其主要缺点为: 假体的使用寿命有限(一般 15~20 年), 随着髋臼磨损等并发症的出现, 患者的髋关节功能将明显下降, 需二次行翻修手术, 而该手术的难度较大、手术时间长, 术中出现神经、血管损伤, 术后出现感染等并发症较内固定手术明显升高。因此, 人工关节置换治疗老年股骨颈骨折应严格掌握手术指征。

老年股骨颈骨折的人工髋关节置换包括全髋关节置换和人工股骨头置换, 对于选用何种手术方法, 目前也有争议。人工股骨头置换具有操作较简单、手术的创伤较小、手术时间较短等优点, 但其有一定的局限性。由于人工股骨头(陶瓷头或金属头)直接对髋臼造成磨损, 容易导致创伤性关节炎、股骨头中心性脱位等并发症, 最终需二期行全髋关节翻修手术。据文