

精子特异性乳酸脱氢酶的免疫学特性及其应用*

常建军 彭景樵**

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘要: 精子特异性乳酸脱氢酶特异地存在于鸟类和哺乳类动物的成熟睾丸和精子中, 为精子的运动和存活提供能量。它是一种自身抗原, 其天然抗体不与体细胞 LDH 同工酶发生交叉反应。用 LDH-C4 免疫小鼠或兔等能够诱导免疫应答, 导致生育率的降低, 因此在人类避孕和鼠害控制方面将有较好的应用前景。

关键词: LDH-C4; 免疫应答; 免疫不育

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)02-85-04

Immunological Property and Application of Sperm-specific Lactate Dehydrogenase

CHANG Jian-Jun PENG Jing-Pian

(Institute of Zoology, Chinese Academy of Science Beijing 100080, China)

Abstract: LDH-C4 is specific to mature testes and spermatozoa of bird and mammal. It is related to metabolic processes that provide energy for motility and survival of spermatozoa. LDH-C4 is an autoantigen. Antibody against native LDH-C4 is specific to spermatozoa and is not cross-reactive with somatic LDH isozymes. Immunization of mice and rabbits *et al* with LDH-C4 can elicit immune responses and result in reduction in their subsequent fertility. So it is considered as a model of immunocontraception and its application on human contraception and mouse control are prospected.

Key words: LDH-C4; Immunoresponse; Immunocontraception

精子特异性乳酸脱氢酶(sperm-specific lactate dehydrogenase, LDH-C4)特异地存在于鸟类和哺乳类动物的睾丸和精子中, 与体细胞乳酸脱氢酶 A4(LDH-A4)和 B4(LDH-B4)同属于乳酸脱氢酶家族, 它们都以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)为辅酶催化丙酮酸和乳酸的转化, 在能量代谢中发挥重要作用。但 LDH-C4 与体细胞 LDH 相比较又具有一些独特性质。最近 LDH-C4 的生物学功能及其应用的研究引起人们高度关注。本文着重对近年来 LDH-C4 的研究进展及其应用进行综述。

1 LDH-C4 的理化特性

1.1 结构及化学特性 在体内 LDH-C4 是由 4 个 C 亚单位组成的同源四聚体, 分子量为 140 ku, 每个 C 亚单

位由 332 个氨基酸组成, 分子量为 35 ku。它主要存在于生殖细胞内, 在精母细胞、精子细胞及处于分化成熟阶段的精子尾的主段和中段的胞质膜上也有明显分布^[1]。不同物种间 C 亚单位的氨基酸组成有所变化, 如人与小鼠和红狐间只 74% 和 86% 的氨基酸序列同源^[2]。对于同一物种而言, 乳酸脱氢酶同工酶具有的保守活性区域^[3]。说明三者间在结构和功能上又具有一定相关性。

LDH-C4 具有一些独特的化学性质。在 HMB 对酶

* 国家自然科学基金资助项目(No.39870100);

** 通讯作者, E-mail: pengjp@panda.ioz.ac.cn;

第一作者介绍 常建军, 男, 29, 硕士; 研究方向: 分子免疫学。

收稿日期: 2001-12-20, 修回日期: 2002-02-01

的抑制效应上,LDH-C4与体细胞同工酶相比表现出明显的饱和现象,说明其活性中心与体细胞同工酶有所不同。在底物特性上,丙酮酸和乳酸与LDH-C4相互作用时分别出现6 nm和2 nm的红移表明它们间的相互作用可引起结构上的变化,推测这与LDH-C4调控丙酮酸和乳酸的转化有关。LDH-C4的低转换数则可能是对其生理功能的一种适应,因为在生殖细胞中产生的乳酸不可能通过血液循环运输到肝脏部位进行转化,大量乳酸的产生将抑制精子的运动,影响精子正常生理功能^[4,5]。

1.2 表达调控 LDH-C4的表达具有严格的时空调控。Goldberg用Northern blot方法^[6]在初级精母细胞中检测到小鼠LDH-C4的mRNA存在,但在体细胞中没有发现,说明LDH-C4的表达具有组织细胞特异性的特点。在不同物种中LDH-C4的mRNA含量也存在差异,小鼠睾丸中LDH-C4的mRNA含量约是大鼠的九倍并在减数分裂后期仍保持较高水平,而在大鼠其初级精母细胞中含量最高,在精子中有所下降,由于在转录水平上小鼠比大鼠只是略有提高,推测这种mRNA水平的明显差异主要是转录后事件的结果^[7]。LDH-C4的合成及活性也只在精子发生的特定阶段才表现。早期的免疫组化实验表明,小鼠最早在初级精母细胞的粗线期中期表达LDH-C4。用分离得到的青春期或成年小鼠的生精细胞检测,结果表明LDH-C4的合成起始于前细线期和细线期/偶线期,在粗线期精母细胞、圆形精子和浓缩过程中的精子细胞中比较显著,在精子中则有所下降^[8]。说明在由A型精原细胞分化成为B型精原细胞参与精子发生周期时,LDH-C4基因就开始活化和表达。

2 LDH-C4的免疫学特性

2.1 免疫原性 在哺乳动物中,雌性动物不能合成LDH-C4,雄性动物虽然在睾丸部位的生精过程中合成LDH-C4,但在正常情况下血睾屏障使其与免疫系统相隔离。因此对于雌性动物和雄性动物,无论是自身合成的还是外源的LDH-C4都被机体的免疫系统识别为异己成分。当免疫系统与之接触时,LDH-C4作为一种抗原物质可激发机体的免疫系统产生免疫应答反应。用纯化的LDH-C4免疫小鼠的实验结果证明,LDH-C4能够引起特异性免疫应答反应,包括体液免疫和细胞免疫。

2.2 抗原决定簇 通过分离的LDH-C4片段与抗体的结合实验、合成肽段的免疫实验、LDH-C4的衍生物竞争性结合等实验对其抗原结构进行了初步分析。其中的

6个肽段与白喉类毒素连接后免疫兔子,根据免疫效果可对其免疫原性进行排序:5~15,304~316>211~220,274~286>49~58,97~110,这些肽段一般由10~15个氨基酸残基组成(如mC5-15肽段,其氨基酸序列为KEQLIQLNLPVE),代表着四聚体50%的可接触溶剂表面^[9]。兔抗鼠LDH-C4抗体与分离纯化的LDH-C4片段的结合实验结果则表明,小鼠的LDH-C4至少有12个抗原结构域,它们都包含四聚体表面的几个氨基酸残基。当用分离纯化的LDH-C4片段(如Mc152-159)或一些与白喉类毒素(DT)连接的包含免疫原性序列的肽段(如DT-Mc5-15,DT-Mc211-220)免疫鼠或兔时,在鼠或兔的血清中都检测到抗天然LDH-C4的抗体,这些抗体可以特异性地与精子表面的LDH-C4结合,说明部分肽段能引起机体的免疫反应,这些肽段可能是抗原决定簇的组成部分。

2.3 细胞特异性 LDH-C4虽然在氨基酸序列和三维结构上与体细胞LDH有一定的同源性,但它们的免疫学特性截然不同。与体细胞LDH不能明显地诱导产生相应抗体相比,LDH-C4具有性质不同的能够诱导免疫反应的抗原表位以及细胞特异性和剂量依赖性免疫抑制决定簇,能够作为免疫原诱导产生体液性抗体^[10,11]。早期的一些实验结果表明,LDH-C4免疫产生的抗体与不同种属的LDH-C4可以发生交叉反应,而与体细胞的LDH间却没有表现出交叉反应现象。因此LDH-C4免疫动物产生的抗体可以特异性地与表达LDH-C4的精母细胞、精子细胞、精子结合而不会与体细胞相结合,从而表现出极强的细胞特异性。但近期有实验证明抗天然LDH-C4的IgG虽然不能识别体细胞LDH,但经化学修饰的LDH-C4免疫产生的抗血清能与来自体细胞(如肾脏和胎盘)的LDH稳定作用,并且抗化学修饰的LDH-C4的抗血清与天然LDH-C4间的亲和力比抗天然LDH-C4抗体与天然LDH-C4间的亲和力低,因此认为天然LDH-C4之所以是精子特异性抗原,是因为其交叉反应表位被隐藏在结构内部而在免疫化学上表现为精子特异性^[12]。

3 LDH-C4免疫不育的研究

3.1 在受精中的作用及其功能抑制 LDH-C4对丙酮酸水平的代谢调控与精子的腺苷酸环化酶系统有关。将牛附睾精子与丙酮酸和磷酸二酯酶抑制剂孵育后会使其cAMP水平升高,提高呼吸强度,增加运动率。LDH-C4的动力学特征说明在32℃(阴囊温度)时,它与丙酮酸有较高的亲和力而使其降解,从而使附睾精子维持其不动状态和较低呼吸率。相反,受精时精子进入具

有较高温度的雌性生殖道, LDH-C4 对底物的亲和力大幅度下降, 精子进入超激活状态, 呼吸率升高。由此 LDH-C4 通过在不同环境中对丙酮酸水平的调控, 反馈调控 cAMP 水平, 并进一步影响精子的呼吸和运动, 在精子的生理活动中发挥重要作用。如果采用某种方式刺激机体的免疫系统产生抗 LDH-C4 的抗体并分泌到生殖道, 在阴道、子宫、子宫颈、输卵管中与精子膜 LDH-C4 结合, 一方面可影响 LDH-C4 的酶活性, 降低精子的能量代谢水平, 另一方面还可能引起精子的聚集, 两方面的结果都能使精子在生殖道中的运动能力减弱或丧失, 阻断受精。

3.2 蛋白疫苗的研究 LDH-C4 独特的免疫学特性引起了许多科学家的兴趣, 被许多学者当作免疫不育研究的模型, 进行了大量蛋白免疫不育研究。有人用 LDH-C4 或其部分片段免疫注射小鼠、兔等实验都产生针对 LDH-C4 的特异性免疫应答, 动物的生育率降低, 具有一定的免疫不育效果, 但免疫原性较差, 免疫避孕的效果并不理想。后来采取对其残基进行化学修饰、注射弗氏佐剂、将分离或合成的 LDH-C4 部分片段与 DT 相连等方法提高其免疫原性, 抗生育效果虽有所提高, 但抗原的纯化工艺复杂、成本昂贵, 且需多次强化注射等问题使其实际应用受到制约。^[13]

3.3 基因疫苗的研究 分子生物学的发展、粘膜免疫的研究和 DNA 疫苗技术的问世等使得基因免疫抗生育将成为可能, LDH-C4 免疫不育的应用研究随之也进入一个新阶段。

Millan 等最先用鼠 LDH-C4 的特异性单抗和多抗血清在 λ gt11 人睾丸 cDNA 文库中钓取了 LDH-C4 的基因, 随后 Sakai 等又进行了小鼠、大鼠、红狐等 LDH-C4 的基因克隆和测序, 这些基因都包含一个 1 kb 的编码 LDH-C4 亚单位的可读取框。为进一步了解 LDH-C4 表达调控机制, Goldberg 等又对 LDH-C4 的启动子区进行克隆和测序并研究其顺式和反式调控作用, 认为 Sp1 和 NF- κ B 在其细胞特异性表达过程中起着重要作用^[14-17]。

粘膜免疫研究表明粘膜免疫有几个主要特点: 抗原可刺激粘膜免疫系统, 产生相应分泌性抗体; 粘膜免疫系统相联系; 引起粘膜免疫的方式多种多样^[18]。

随着基因重组技术及基因载体传递系统的迅速发展, 90 年代初基因免疫技术问世。技术的核心是将编码抗原的核酸序列组装到含有必要表达调控元件的真核表达载体中构建核酸疫苗, 然后将其导入动物体内, 重组的核酸疫苗可以利用宿主体内的酶系合成外源基因编码的蛋白, 从而诱发宿主对该外源蛋白产生免疫应答, 达到免疫目的。Jay Srinivasan 等将人精子表面蛋

白 Sp10 的基因克隆到表达载体中并感染沙门氏菌, 然后将沙门氏菌喂养小鼠, 利用沙门氏菌作为携带者, 将 Sp10 基因带人体内并进入消化道上皮细胞, 结果在小鼠的生殖道中检测到抗 Sp10 的抗体^[19]; Bird 等将狐的 LDH-C4 基因与载体连接并通过沙门氏菌感染狐后在唾液中也检测到抗 LDH-C4 的抗体, 狐的生育率降低^[20]。

这些研究工作一方面提示将 LDH-C4 基因与载体连接构建的抗生育疫苗可以通过口服途径免疫动物并在机体内合成 LDH-C4, 同时也证实了在体内合成的 LDH-C4 可以刺激机体的粘膜免疫系统, 产生分泌型抗体。通过口服 LDH-C4 基因疫苗使动物不育将成为可能。

4 LDH-C4 在免疫不育上的应用

4.1 在人口控制中的应用 LDH-C4 在控制人口数量、提高人口质量方面表现出较为广阔的应用前景。LDH-C4 作为特异性的精子抗原, 基因序列、结构及生化免疫特性等已经比较清楚; 其免疫不育效果已被动物实验所证实。一些不育病人精浆中 LDH-C4 活性降低或缺失^[21]也提示其异常可能导致人的不育。这表明 LDH-C4 可以应用于人类避孕, 研制开发 LDH-C4 蛋白疫苗和通过口服途径实现免疫避孕的基因疫苗。近期用 LDH-C4 的多肽免疫雄性狒狒的实验结果表明, 没有相关的自身免疫疾病发生, 精子和卵透明带的结合能力却降低^[22], 说明 LDH-C4 有可能应用于男性避孕。

4.2 在鼠害控制中的应用 每年, 鼠及其它小型有害哺乳动物对全球的农林牧业造成严重损失, 传播的出血热、鼠疫等疾病对人类身体健康甚至生命造成严重威胁。灭鼠药剂杀伤力虽强但严重污染环境。既能长期有效地控制鼠害, 又能维持生态平衡, 降低环境污染成为人类在鼠害控制研究过程中追求的目标。

免疫不育技术在控制鼠害方面有独特之处, 一方面可以降低鼠群的生育率, 抑制鼠类种群数量的恢复, 达到长期控制鼠害的目的; 另一方面还可以减轻对环境的污染。正因如此, 近年来免疫不育技术成为国际上鼠害控制领域一个新的研究热点。现在, 除了利用化学不育剂、肽或蛋白类不育疫苗外, 人们正在研究如何将基因免疫不育技术和粘膜免疫研究更好的应用于鼠害的控制。澳大利亚和新西兰等国家已经开展这方面的研究工作^[23], 我国对此也十分重视。目前, 作者已克隆出小鼠和布氏田鼠的 LDH-C4 基因, 构建了 pCR3.1-m LDH-C4 和 pCR3.1-b LDH-C4 重组载体。接下来将要重组载体转入具有极强专一性感染鼠类的菌体, 进行扩增繁殖后野外释放, 通过消化道等感染野生鼠后, 在其体内表达 LDH-C4, LDH-C4 作为抗原刺激鼠

的机体产生抗 LDH-C4 的抗体并分泌到生殖道, 抗体与精子结合阻断受精, 达到控制鼠害的目的。

随着人们对 LDH-C4 免疫特性的逐步认识和了解, LDH-C4 免疫抗生育技术应用于人类避孕和鼠害控制等领域将成为现实。

参 考 文 献

- [1] Burgos C, Maldonado C, Gerez de Burgos N M *et al.* Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C-4 in mice. *Biol Reprod*, 1995, **53**: 84 ~ 92.
- [2] Bradley M P, Geelan A, Leitch V *et al.* Cloning, sequencing, and characterization of Ldh-C4 from a fox testis cDNA library. *Mol Reprod Dev*, 1996, **44**(4): 452 ~ 459.
- [3] Yu Y, Deck J A, Hunsaker L A *et al.* Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4. *Biochem Pharmacol*, 2001, **62**(1): 81 ~ 89.
- [4] Uchijima Y, Yoshida K, Saito H. A further study of human seminal plasma lactate dehydrogenase-C4 (LDH-C4): kinetic properties of LDH-C4. *Hinyokika Kyo*, 1989, **35**(3): 457 ~ 463.
- [5] Gupta G S, Kang B P. LDH-C4-substrate binary complexes studied by intrinsic fluorescence method. *Indian J Biophys*, 1997, **34**(3): 307 ~ 312.
- [6] Goldberg E. The use of molecular biology to study sperm function. In: Dunbar B S, O'Rand M C eds. *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*. New York: Plenum Press, 1991. 423 ~ 436.
- [7] Salehi-Ashtiani K, Goldberg E. Differences in regulation of testis specific lactate dehydrogenase in rat and mouse occur at multiple levels. *Mol Reprod Dev*, 1993, **35**(1): 1 ~ 7.
- [8] Li S S, Da O'brien, Hou E W *et al.* Differential activity and synthesis of lactate dehydrogenase isozymes A (muscle), B (heart), and C (testis) in mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod*, 1989, **40**: 173 ~ 180.
- [9] Hogrefe H H, Kaumaya P T, Goldberg E. Immunogenicity of synthetic peptides corresponding to flexible and antibody-accessible segments of mouse lactate dehydrogenase (LDH)-C4. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 10 513 ~ 10 519.
- [10] Gupta G S, Chaturvedig, Joshi A. Sex dependent immune responses by allogenic LDH isozymes. *Mol Cell Biochem*, 1996, **158**(2): 115 ~ 119.
- [11] Gupta G S, Chaturvedi G. Regulation of immune functions by sperm-specific LDH and its differences with somatic isozyme in primary and secondary lymphocyte cultures. *Am J Reprod Immunol*, 2000, **44**(3): 160 ~ 169.
- [12] Gupta G S, Syal N. Newly exposed immunochemically cross-reactive epitopes in sperm-specific LDH after glucosylation and gossypol interaction. *Am J Reprod Immunol*, 2000, **44**(5): 303 ~ 309.
- [13] O'Hern P A, Bamba C S, Isahakia M *et al.* Reversible contraception in female baboons immunized with a synthetic epitope of sperm-specific lactate dehydrogenase. *Biol Reprod*, 1995, **52**: 331 ~ 339.
- [14] Li S, Zhou W, Doglio I *et al.* Transgenic mice demonstrate a testis-specific promoter for lactate dehydrogenase (LDH). *J Biol Chem*, 1998, **273**: 31 191 ~ 31 194.
- [15] Ambhaikar M, Goldberg E. DNA-protein interactions in the CCAAT box region of the murine lactate dehydrogenase C promoter. *Mol Reprod Dev*, 1999, **52**: 360 ~ 365.
- [16] Bonny C, Cooker L A, Goldberg E. Deoxyribonucleic acid-protein interactions and expression of the human testis-specific lactate dehydrogenase promoter: transcription factor Sp1 plays a major role. *Biol Reprod*, 1998, **58**: 754 ~ 759.
- [17] Poonam Jethanandani, Goldberg E. LDHC expression in non-germ cell nuclei is repressed by NF- κ B binding. *J Biol Chem*, 2001, **276**(38): 35 414 ~ 35 421.
- [18] Jerry R. Mc Ghee, Jiangchun Xu' Amano *et al.* The common mucosal immune system: from basic principles to enteric vaccines with relevance for the female reproductive tract. *Reprod Fertil Dev*, 1994, **6**: 369 ~ 379.
- [19] Jay Srinivasan, Steven Tinge, Richard Wright *et al.* Oral immunization with attenuated Salmonella expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract. *Biol Reprod*, 1995, **53**: 462 ~ 471.
- [20] Bird P, Kayes C, de Jersey J *et al.* Construction and immunological assessment of Salmonella typhimurium expressing fox sperm LDH-C4. *Reprod Fertil Dev*, 1998, **10**: 225 ~ 231.
- [21] Xiao G B, Pan C B, CAI Y Z *et al.* Effect of benzene, toluene, xylene on the semen quality and the function of accessory gonad of exposed workers. *Industrial Health*, 2001, **39**(2): 206 ~ 210.
- [22] Erwin Goldberg, John L, Vandeberg *et al.* Immune response of male baboons to testis-specific LDH-C4. *Contraception*, 2001, **64**: 93 ~ 98.
- [23] Cowan P E, Tyndale-Biscoe C H. Australian and New Zealand mammal species considered to be pests or problems. *Reprod Fertil Dev*, 1997, **9**: 27 ~ 36.