

- gen scaffolds promote recovery in injured rat spinal cord [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(5): 618-630.
- [6] Lee SH, Chung YN, Kim YH, et al. Effects of human neural stem cell transplantation in canine spinal cord hemisection[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(9): 996-1002.
- [7] Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, et al. Human neural stem cell differentiation following transplantation into spinal cord injured mice; association with recovery of locomotor function[J]. *Neurol Res*, 2006, 28(5): 474-481.
- [8] Nakamura M, Toyama Y, Okano H. Transplantation of neural stem cells for spinal cord injury [J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2005, 45(11): 874-876.
- [9] Yan J, Xu L, Welsh AM, et al. Extensive neuronal differentiation of human neural stem cell grafts in adult rat spinal cord[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(2): e39.
- [10] Sung JH, Yang HM, Park JB, et al. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(8): 2649-2654.
- [11] Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injury spinal cord tissue[J]. *Spine*, 2004, 29(18): 1971-1979.
- [12] Khalatbary AR, Tiraihi T. Localization of bone marrow stromal cells in injured spinal cord treated by intravenous route depends on the hemorrhagic lesions in traumatized spinal tissues[J]. *Neurol Res*, 2007, 29(1): 21-26.
- [13] Seo MS, Jeong YH, Park JR, et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Vet Sci*, 2009, 10(3): 181-187.
- [14] Dasari VR, Veeravalli KK, Tsung AJ, et al. Neuronal apoptosis is inhibited by cord blood stem cells after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(11): 2057-2069.
- [15] 尹文化, 金大地, 鲁凯伍, 等. 人脐血干细胞移植修复大鼠脊髓损伤的功能评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(43): 8418-8421.
- [16] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [17] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5856-5861.
- [18] Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(12): 1995-1999.
- [19] Schaal SM, Kitay BM, Cho KS, et al. Schwann cell transplantation improves reticulospinal axon growth and forelimb strength after severe cervical spinal cord contusion [J]. *Cell Transplant*, 2007, 16(3): 207-228.
- [20] Papastefanaki F, Chen J, Lavdas AA, et al. Grafts of schwann cells engineered to express PSA-NCAM promote functional recovery after spinal cord injury [J]. *Brain*, 2007, 130(Pt 8): 2159-2174.
- [21] Radtke C, Sasaki M, Lankford KL, et al. Potential of olfactory ensheathing cells for cell-based therapy in spinal cord injury[J]. *J Rehabil Res Dev*, 2008, 45(1): 141-151.
- [22] Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rats corticospinal tract transplants of olfactory ensheathing cells[J]. *Science*, 1997, 277(5334): 2000-2002.
- [23] Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, et al. Long distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord in promoted by olfactory ensheathing glia transplant[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(10): 3803-3815.
- [24] Au E, Richter MW, Vincent AJ, et al. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(27): 7208-7221.
- [25] Blakemore WF, Gilson JM, Crang AJ. Transplanted glial cells migrate over a greater distance and remyelinate demyelinated lesions more rapidly than endogenous remyelinating cells[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(3): 288-294.

(收稿日期: 2010-03-29 修回日期: 2010-09-22)

· 综 述 ·

附睾蛋白酶抑制蛋白及其在免疫避孕中应用的研究进展*

陈正琼^{1,2}综述, 梁志清¹审校

(1. 第三军医大学西南医院妇产科, 重庆 400038; 2. 第三军医大学新桥医院妇产科, 重庆 400037)

关键词: 避孕, 免疫学; 蛋白酶抑制蛋白质类, 分泌; 疫苗

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.037

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)07-0707-03

针对精子特异性抗原的免疫避孕, 为控制生育展示了诱人的前景。Eppin 是其中的研究热点。Eppin 的基因和结构特点决定了其对精子功能的重要作用, 也是其作为免疫避孕有效靶点的基础。本文就 Eppin 的基因与蛋白结构特点及其对应的

功能、Eppin 作为免疫避孕靶点的研究进展作一综述。

1 Eppin 基因

Eppin 基因 2001 年首先在人类发现, 人类基因组中只含有一个 Eppin 基因拷贝。Eppin 含 Kunitz 和 WAP 型基因结

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(30901607)。

构域,具有丝氨酸蛋白激酶抑制剂样结构特点^[1]。人类 Eppin 基因通过可变剪切产生 3 种 mRNA,最终编码两种蛋白亚型,分别命名为 Eppin 1 和 Eppin 2。Eppin 1 是主要类型,它是一种分泌型蛋白,由 133 个氨基酸残基组成,相对分子质量(Mr)为 15 284 kD,1-21 为信号肽,22~133 为成熟蛋白。蛋白序列分析表明小鼠的 Eppin 与兔有 51%、与猴有 60%、与人有 62% 的同源性。对人^[1]、小鼠^[2]和大鼠^[3]的研究均发现,Eppin 只存在于附睾和睾丸中。Eppin 主要在小鼠精子的顶体头部、Sertoli 细胞、Leydig 细胞、获能前后的精细胞以及附睾尾表皮等重要细胞中表达^[2]。

2 Eppin 蛋白结构特点

分泌型 Eppin 理论上的相对分子质量是 15 283.72 kD,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析 Eppin 发现其单体形式相对分子质量为 16~18 kD,二聚体为 33~36 kD^[4]。Eppin 蛋白含有 14 个半胱氨酸残基,可以组成 7 对二硫键(33~61、40~65、48~60、54~69、77~127、86~110、102~123);含有两个保守的结构域,其中 26~73 氨基酸残基为乳清酸蛋白(whey acidic protein, WAP)结构域,77~127 为牛胰蛋白酶抑制蛋白(bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI)结构域,又称 Kunitz 抑制蛋白结构域。Eppin 蛋白所有的半胱氨酸残基和 WAP、Kunitz 结构域在不同物种之间高度保守,提示其对 Eppin 蛋白具有重要意义。Eppin 具有抗菌活性^[5],其抗菌活性依赖于完整的二硫键。McCrudden 等^[6]发现 Kunitz 结构域是该分子发挥弹性蛋白酶抑制活性的结构,并能独立发挥作用。相反,尽管 WAP 和 Kunitz 两个结构域都表现出一定程度的针对革兰阴性菌的抗菌活性,但完全的抗菌活性需要二者共同参与。

3 Eppin 蛋白的功能

3.1 Eppin 对精子的保护作用 含有 WAP 结构域的蛋白往往具有抗菌作用,WAP 结构域可能是抗菌蛋白的一个重要特征^[7]。Eppin 含有 WAP 结构域。Yenugu 等^[5]研究证实 Eppin 存在抗菌作用,抗菌能力与半胱氨酸数目和状态相关,推测二硫键对于这类蛋白质的抗菌功能发挥重要作用。新近研究表明,Eppin 具有针对革兰阴性菌的抗菌活性^[6]。将 Eppin 和其 WAP、Kunitz 结构域分别用大肠埃希菌表达,通过菌落形成单位分析其杀菌能力,发现这两个结构域分别都具有一定程度的针对大肠埃希菌的抗菌活性,但是不能达到 Eppin 完整蛋白或两个结构域一起使用的强度。其杀菌的作用可能通过渗透细菌内膜,导致呼吸电子链解耦联,瓦解质子动力势实现。Wang 等^[8]从人精液中分离获得了 Eppin 蛋白复合物(EPC),包含乳铁蛋白(LTF)、丛生蛋白(CLU)和精液凝固蛋白(SEMGI),并提出 LTF、CLU 和(或)Eppin 受体可能作为精子质膜受体与 EPC 结合,该复合物在精子表面蛋白间相互作用中起着核心作用,可能发挥抗菌作用保护精子。此外,Kunitz 能抑制弹性蛋白酶。推测 Eppin 的这些作用可保护精子不受细菌和蛋白酶的破坏保持其活性。

3.2 Eppin 与精液液化 精子表面存在 Eppin 受体,人类射出的精子头和尾部都被覆着 Eppin^[1-4],而这些 Eppin 可能来自睾丸和附睾。当精子进入射精管时,精子表面的 Eppin 被从精囊来的精囊凝固蛋白 Semenogelin(Sg)饱和性结合。Sg 是精液的主要组成成分^[9]。Sg 与 Eppin 结合使得精子紧密凝集在精液中从而增强抗菌能力^[10]。前列腺特异性抗原(PSA)是一种丝氨酸蛋白激酶,PSA 能水解去除 Sg,使精液液化,释放出具有活力和受精能力的精子。

Eppin 对 PSA 清除 Sg 具有重要调节作用^[11]。无 Eppin 存在时,用 PSA 消化重组 Sg 得到许多低相对分子质量的片段;而当 Eppin 与 Sg 结合后,PSA 对 Sg 的消化则不完全,出现一个 15 kD 的片段。加入抗 Eppin C 端的抗体可抑制重组 Eppin(rEppin)对 PSA 消化重组 Sg(rSg)的调节作用;抗体结合到 rEppin 的 N 端则不影响 rSg 的消化。可见,Eppin 以其 C 端(75~133 氨基酸)结合到精子表面的 Sg 上,并且 Eppin 能保护 rSg 中一个 15 kD 的片段不受 PSA 的水解。进一步分析该保护性片段,发现其包含 Cys-239。Cys-239 甲基化将阻断 rEppin 和 rSg 的结合,说明 Cys-239 是 rEppin 和 rSg 结合的所必须的半胱氨酸^[4,12],rEppin 可能通过 239 位的半胱氨酸和 rSg 形成二硫键而特异性结合。

3.3 Eppin 与精子顶体反应 新近研究表明,Eppin 在精子受精过程中也存在重要作用。Eppin 位于精子顶体和尾部,而当顶体反应发生后,Eppin 位于精子赤道部和尾部。将人精子与抗 Eppin 抗体共孵育,发现抗 Eppin 抗体能显著抑制 A23817 诱导的顶体反应,这种抑制作用呈现剂量依赖关系。抗 Eppin 抗体能抑制 A23817 诱导的精子细胞内钙离子增加。Eppin 可能通过调节细胞内钙离子浓度,进而影响钙离子载体 A23817 诱导的顶体反应^[13]。

4 Eppin 在免疫避孕中的应用

Eppin 对精子功能的正常发挥很重要,Eppin 的功能被抗体阻断后会对生育力产生怎样的影响? O'Rand 等^[14]用重组 Eppin 对成年雄猴进行免疫后,随着精液中抗 Eppin 抗体滴度的增加,射精后精子的前向运动能力逐渐减弱。此外,随着抗体滴度的增加,精液的黏稠度下降。生育力实验发现,被免疫 9 只雄猴中的 7 只(78%)产生了针对 Eppin 的高滴度抗体,所有产生高滴度抗体的雄猴发生不育。停止免疫后,7 只中的 5 只(71%)恢复了生育力。这项研究中持续几个月的高血清抗体滴度维持了有效的避孕状态。这个研究表明在灵长类动物实现男性的有效而可逆的免疫避孕是可行的目标。

进一步研究发现,来自不育雄猴的抗 Eppin 抗体能显著抑制人精子的前向活动力,使其总运行距离、直线距离以及速度均下降^[15]。用抗 Eppin 抗体处理后的精子环腺苷酸(cAMP)含量显著增加,说明精子利用 cAMP 存在障碍。另一方面,加入重组人 Sg 对精子的前向运动也具有浓度依赖的抑制作用。说明抗 Eppin 抗体与 Eppin 结合能阻断 Sg 与 Eppin 的结合。加入针对 Eppin C 端表位的亲和纯化抗体对精子的前向运动力有显著抑制作用。提示人精子表面 Eppin-Sg 结合位点是男性非激素避孕的理想靶点。

出于安全考虑,全长蛋白不适于用作疫苗,找出真正抑制生育的关键性表位并增强其免疫原性和避孕效果是关键。Chen 等^[16]用计算机表位预测结合蛋白初免-表位肽加强免疫策略来筛选 Eppin 蛋白优势中和 B 细胞表位,发现 Eppin 蛋白的第 103~115 区段是 Eppin 优势中和 B 细胞表位区域。此后,Sun 等^[17]将 Eppin 的第 89~133 氨基酸合成 8 条十肽(相邻肽段间具有 5 个重叠氨基酸),分别免疫小鼠,所得抗血清能显著抑制精卵结合率,且 105~114 肽段免疫小鼠生育力显著下降,可能是 Eppin 蛋白的免疫优势表位所在区域。但如何提高免疫原性和避孕效率尚待深入研究。

5 展望

自从研究者利用重组 Eppin 蛋白免疫雄猴避孕取得成功^[14],给男性避孕疫苗的成功开发带来了希望^[18-20]。但是被实验的猴子数量太少,尚无法对有效性和安全性作出结论。对

精子的功能及受精过程认识的局限性限制了对避孕疫苗开发的进程。Eppin 蛋白发挥免疫避孕作用的机制还有待深入认识,在此基础上,探索其增强有效性和安全性的策略,势必有望迎来男性免疫避孕的曙光。

参考文献:

- [1] Richardson RT, Sivashanmugam P, Hall SH et al. Cloning and sequencing of human Eppin; a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis [J]. *Gene*, 2001, 270(1/2): 93-102.
- [2] Sivashanmugam P, Hall SH, Hamil KG, et al. Characterization of mouse Eppin and a gene cluster of similar protease inhibitors on mouse chromosome 2 [J]. *Gene*, 2003 (312): 125-134.
- [3] Bian ZH, Zhang J, Ding XL, et al. Localization of epididymal protease inhibitor in adult rat and its transcription profile in testis during postnatal development [J]. *Asian J Androl*, 2009, 11(6): 731-739.
- [4] Wang Z, Widgren EE, Sivashanmugam P, et al. Association of eppin with semenogelin on human spermatozoa [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(5): 1064-1070.
- [5] Yenugu S, Richardson RT, Sivashanmugam P, et al. Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(5): 1484-1490.
- [6] McCrudden MT, Dafforn TR, Houston DF, et al. Functional domains of the human epididymal protease inhibitor, eppin [J]. *FEBS J*, 2008, 275(8): 1742-1750.
- [7] Hagiwara K, Kikuchi T, Endo Y, et al. Mouse SWAM1 and SWAM2 are antibacterial proteins composed of a single whey acidic protein motif [J]. *J Immunol*, 2003, 170(4): 1973-1979.
- [8] Wang Z, Widgren EE, Richardson RT, et al. Characterization of an eppin protein complex from human semen and spermatozoa [J]. *Biol Reprod*, 2007, 77(3): 476-484.
- [9] Jarow JP. Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process [J]. *J Urol*, 2002, 168(5): 2309-2310.
- [10] de Lamirande E, Yoshida K, Yoshiike TM, et al. Semenogelin, the main protein of semen coagulum, inhibits human sperm capacitation by interfering with the superoxide anion generated during this process [J]. *J Androl*, 2001, 22(4): 672-679.
- [11] Wang ZJ, Zhang W, Feng NH, et al. Molecular mechanism of epididymal protease inhibitor modulating the liquefaction of human semen [J]. *Asian J Androl*, 2008, 10(5): 770-775.
- [12] Wang ZJ, Wu HF, Qian LX, et al. Correlation of epididymal protease inhibitor Eppin and Semenogelin on human ejaculated spermatozoa [J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2006, 12(5): 428-431, 434.
- [13] Zhang J, Ding X, Bian Z, et al. The effect of anti-eppin antibodies on ionophore A23187-induced calcium influx and acrosome reaction of human spermatozoa [J]. *Hum Reprod*, 2011, 25(1): 29-36.
- [14] O'Rand M G, Widgren EE, Sivashanmugam P, et al. Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with eppin [J]. *Science*, 2004, 306(5699): 1189-1190.
- [15] O'Rand MG, Widgren EE, Beyler S, et al. Inhibition of human sperm motility by contraceptive anti-eppin antibodies from infertile male monkeys: effect on cyclic adenosine monophosphate [J]. *Biol Reprod*, 2009, 80(2): 279-285.
- [16] Chen Z, He W, Liang Z, et al. Protein prime-peptide boost as a new strategy induced an Eppin dominant B-cell epitope specific immune response and suppressed fertility [J]. *Vaccine*, 2009, 27(5): 733-740.
- [17] Sun LL, Li JT, Wu YZ, et al. Screening and identification of dominant functional fragments of human epididymal protease inhibitor [J]. *Vaccine*, 2010, 28(7): 1847-1853.
- [18] Karande A. Eppin: a candidate male contraceptive vaccine? [J]. *J Biosci*, 2004, 29(7): 373-374.
- [19] O'Rand MG, Widgren EE, Wang Z, et al. Eppin: an epididymal protease inhibitor and a target for male contraception [J]. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007(63): 445-453.
- [20] Wang Z, Widgren EE, Richardson RT, et al. Eppin: a molecular strategy for male contraception [J]. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007(65): 535-542.

(收稿日期: 2010-10-12 修回日期: 2010-11-04)

· 综 述 ·

NO 和维生素 B₆ 抑制血小板活化和聚集的研究进展

谭 芳 综述, 李代渝 审校

(泸州医学院附属医院输血科, 四川泸州 646000)

关键词: 血小板源性一氧化氮; 维生素 B₆; 生物合成途径

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.038

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)07-0709-04

血小板具有黏附、聚集、分泌、收缩血块等活动, 在止血和凝血过程中起重要作用, 当血管破损时, 它在血栓形成和溶解

两方面都起作用, 还参与血管内皮细胞的修复, 保持血管壁的完整。因此, 血小板的输注在临床输血中占了很大比例, 但是