

研究工作

人体精子 LDH 酶谱中一条新酶带的发现和探讨

刘道鸣

(南京中医学院生化教研室 南京)

提 要

用 paragon 电泳技术在人精子 LDH 酶谱中发现一条新的酶带, 暂称 γ 酶带。该 γ 酶带的位置在 LDH-4 和 LDH-5 之间, 含量为 LDH 的 $1.57\% \pm 0.82\%$, 与 LDH-4 比较其相对迁移率 (RF 值) 为 1.25—1.35。

试验证明 γ 酶带的存在与否与精子密度和 LDH、CPK 总活力有明显相关性。

乳酸脱氢酶 (LDH) 及其同工酶广泛存在于一切有糖酵解作用的细胞中, 人体精浆与精子中也有存在。在男性生育调节机理中, 对其研究越来越引起重视。LDH 由 A、B 两个亚基根据不同的排列, 组合可构成不同形式的五种同工酶: LDH-1(B_4); LDH-2(B_3A); LDH-3(B_2A_2); LDH-4(BA_3); LDH-5(A_4)^[1]。

1963 年 Blanco 和 Goldlberg^[2] 等首次在人精子和睾丸中发现另一种 LDH 同工酶, 称为 LDH-x, 有人认为这是由同源单体亚基 C 组成的四聚体 (C_4)。据目前文献报道^[3]在人体精子中用电泳法可以检测出 LDH-3; LDH-x; LDH-4; LDH-5 等四条同工酶带。

我们在人体精子标本中利用 paragon 电泳技术进行 LDH 酶谱研究时, 除观察到上述几条同工酶区带外, 还发现在 LDH-4 和 LDH-5 之间存在着一条新的未知带。暂称为 γ 酶带。

材 料 与 方 法

一、标本采集

我们先后共采集 68 例精液标本, 标本提供者半月内不服用任何药物 (包括西药, 中药, 针灸。只一例在收取标本前两天服用过感冒药。);

停止同房一星期。门诊手淫法采集精液标本。

二、方法

1. 标本收取后立即进行分离精浆、精子。
2. 以 0.15 mol/L NaCl 溶液清洗精子三次, 每次 5 毫升, 离心, 留取沉淀。
3. 加入 0.15 mol/L NaCl 溶液 0.5 毫升于沉淀中, 混匀, 匀浆器冰水浴中粉碎, 镜检下精子破碎为度。
4. 离心, 取上清液为精子提取液。
5. 以精子提取液进行 paragon 电泳, 显色, BECKMAN CDS-200 型光密度计 550 nm 波长扫描。

结 果

一、paragon 电泳进行精浆和精子 LDH 酶谱分析, 在 68 例标本中发现 31 例精子中出现 γ 酶带; 精浆中均未发现 γ 酶带。

经扫描, γ 酶带含量为 LDH 总活力的 $1.57 \pm 0.82\%$; 以 LDH-4 的相对移动距离 (距原点) 为 1, γ 酶带的相对迁移率 (RF) 为 1.25—1.35 图 1。

二、鉴别试验

1. 无底物基质对照试验^[4,5]图 2。

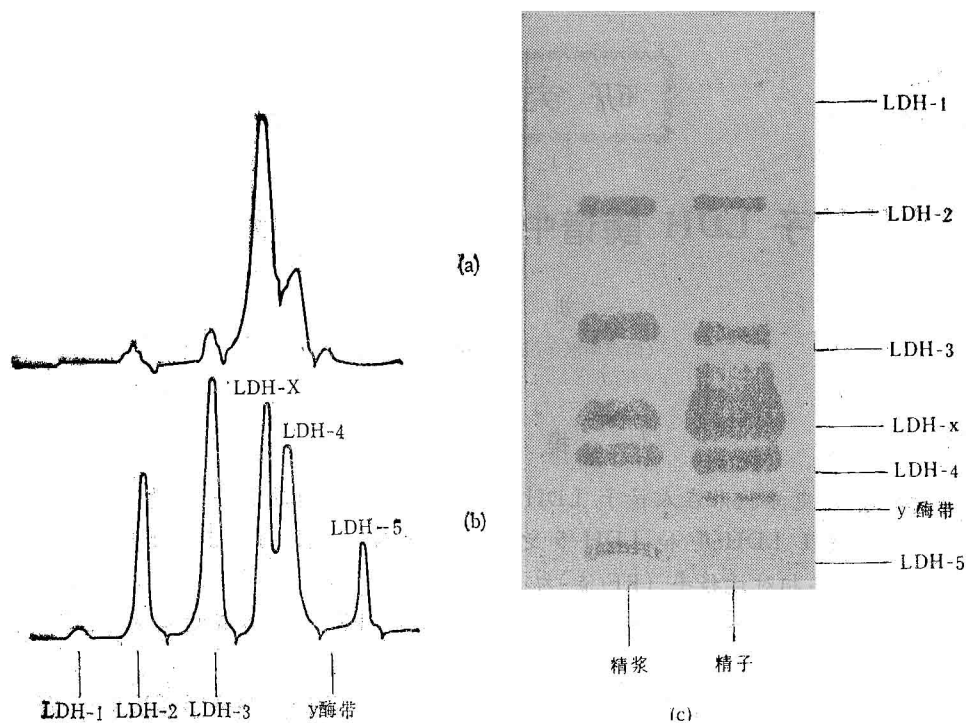


图1 精浆、精子 LDH 电泳及光密度扫描图谱

(a) 精子 LDH 电泳光密度扫描图谱。(b) 精浆 LDH 电泳光密度扫描图谱。(c) 精浆、精子 LDH 电泳图谱。精浆中无 γ 酶带。精子中出现 γ 酶带。

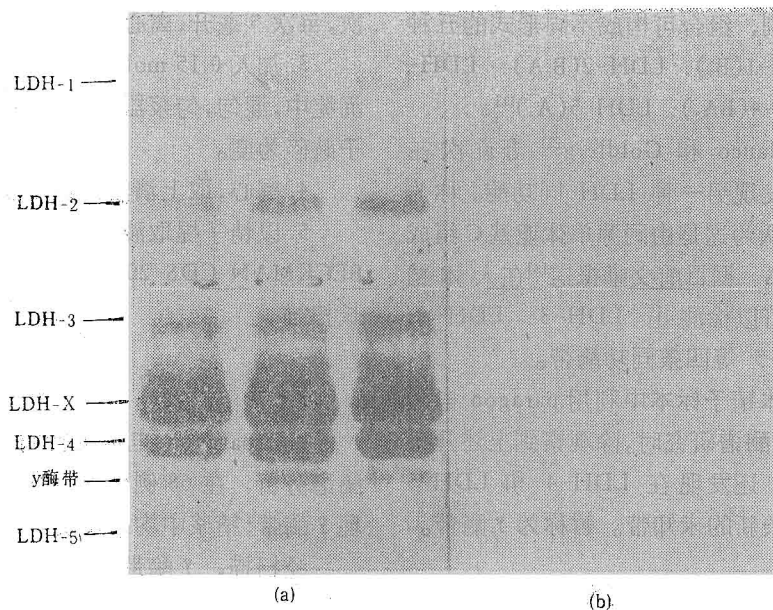


图2 无底物基质对照试验

(a) 基质中有底物: γ 酶带及其它几条酶带均清晰存在。(b) 基质中无底物: γ 酶带及其它几条酶带均不出现。

取上述含有 γ 酶带的标本 A, B, C 三份, 每份标本再分 1、2 两组, 即 A_1, B_1, C_1 为第 1 组; A_2, B_2, C_2 为第 2 组, 以同样条件, 同时进行电泳, 电泳完毕, 第一组用有底物的基质(含有乳

酸钠)温育显色;第二组用无底物基质(不含乳酸钠,其它成份皆保留。)温育显色。完成后第1组电泳谱带中 γ 酶带明显存在;第2组中 γ 酶带以及其它LDH同功酶带均消失。

2. H_2O_2 对照试验^[4]

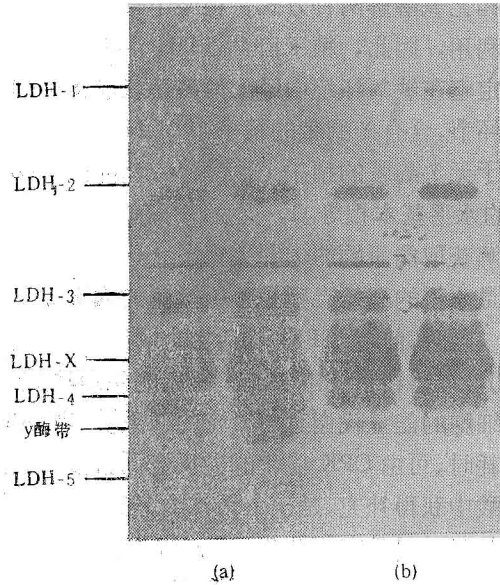


图3 双氧水对照试验

(a) 标本中未加 H_2O_2 , γ 酶带清晰存在。(b) 标本中加有 H_2O_2 , γ 酶带清晰存在。

取含有 γ 酶带的标本0.5 ml加10% H_2O_2 一滴,混匀,静置10分钟后进行电泳,温育显色,与未加 H_2O_2 的同样标本对照,该 γ 酶带依然存在。

3. 乙醇试验

取含 γ 酶带之标本进行电泳,电泳完毕,加以无水乙醇替代乳酸钠的基质温育显色, γ 酶带及LDH同功酶其它酶带均不出现。

4. 稳定性试验

标本收取后2小时及24小时分别进行电

泳检测其相对活力, γ 酶带与其它同功酶带一样,活力无明显改变,稳定性良好。

三、 γ 酶带与精子密度和某些生化指标的相关性见表1,2:

表2 γ 酶带与精子、精浆中LDH,CPK总活力及LDH-x含量的关系

组 别		LDH (IU/dl)	CPK (IU/L)	LDH-x (%)
精子	含有 γ 酶带组	592.91 $\pm$ 89.70	21 $\pm$ 14.4	71.45 $\pm$ 5.92
	无 γ 酶带组	260.20 $\pm$ 159.78	9.8 $\pm$ 6.7	71.72 $\pm$ 28.82
	P 值	P<0.001	P<0.05	P>0.05
精浆	其相应精子有 γ 酶带组	552.76 $\pm$ 173.35	1377 $\pm$ 235	30.2 $\pm$ 12.47
	其相应精子无 γ 酶带组	546.30 $\pm$ 153.34	1428 $\pm$ 234	18.39 $\pm$ 12.62
	P 值	P>0.05	P>0.05	P<0.001

($\bar{x}\pm S$)

讨 论

一、据 podlasek 等^[6]建议的LDH同功酶异常区带的规则及分类法^[7]

第一类: 巨分子LDH,即各种真正的LDH与Ig的复合物。

第二类: 真正的LDH的化学变种,包括:

1. 基因变种,(由A,B亚基等位基因产生的真正的LDH。)
2. 不同基因位点产生的LDH分子(如精液中LDH-x)
3. 可能形成低聚的LDH分子或其它组织来源的LDH。

第三类: 乳酸不依赖性脱氢酶(具有LDH活性的乙醇脱氢酶)

此外尚有由于某些还原性物质所产生的“非酶效应”^{[4][8]}

对于第三类及“非酶效应”的最重要的鉴别方法即为“无底物基质对照试验”,其次为“ H_2O_2 试验”,“乙醇试验”“稳定性试验。”,我们发现的这条 γ 酶带经上述一系列试验对照可以确定它不属于第三类和“非酶效应”,故可以排除乳酸不依赖性脱氢酶和其它还原性物质的可能性。

对于第一类——巨分子LDH,该 γ 酶带也可以排除,理由如下:

表1 γ 酶带与精子密度的关系

组别	精子数 (亿/毫升)	精子总数(亿)	精子活率(%)
精子中含 γ 酶带组	0.858 $\pm$ 0.504	2.862 $\pm$ 1.463	45.32 $\pm$ 20.45
精子中无 γ 酶带组	0.51 $\pm$ 0.445	1.361 $\pm$ 1.130	39.38 $\pm$ 41.2
P值	P<0.01	P<0.001	P>0.05

($\bar{x}\pm S$)

(1) 曲细精管内的生精细胞与血循环中的抗体是由血辜屏障隔离,从而避免发生免疫反应。血辜屏障由基底膜,管壁和足细胞(Sertoli 细胞)构成。精子与血循环中的抗体隔离是避免免疫反应的关键^[1],即使在某些特殊情况下,此屏障被打破而产生免疫反应,也仅仅发生在精子膜的表面,而不在内部,所以精子内的 LDH 是不可能与 Ig 结合而产生“巨分子 LDH”。

(2) 抽查部份含 γ 酶带之精子标本作 ASAB (抗精子抗体)检查,结果为阴性。事实上,在我们的标本提供者中,精子中含有 γ 酶带的已有受孕得子者。

(3) 可以设想,如果此条 γ 酶带是由 LDH 与 Ig 的复合物,则这条酶带应该首先在精浆中出现,但是,在精浆中未发现此 γ 酶带,只在部份精子中才发现它此 γ 酶带。

由此可以肯定此 γ 酶带不属于第一类——巨分子 LDH。该 γ 酶带只能属于第二类:即真正的 LDH 的化学变种。

二、 γ 酶带与精子密度的关系

精子密度为男性不育症临床诊断的重要指标之一,从表 1 可以看出,精子中有无 γ 酶带与精液中精子密度呈正相关。有 γ 酶带组的精子密度,无论每毫升精液所含精子数或一次排出精子总数其均值都在正常数限以上,而无 γ 酶带组则在正常数限以下。两者显著差异。

精子活动率方面尚看不出明显差异。

三、从表 2 中可以看到

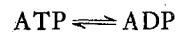
(1) 有 γ 酶带与无 γ 酶带的精子组比较,前者的 LDH, CPK 总活力明显大于后者,而二组所含的 LDH-x 相对含量基本相同,说明精子中 LDH, CPK 总活力之大小与是否含有 γ 酶带有关,而与 LDH-x 酶带含量无关。

(2) 精子中有 γ 酶带与无 γ 酶带二组的相应的精浆比较,它们在 LDH, CPK 总活力方面几乎相等,无明显差异,说明精子中 γ 酶带的存在只与精子内的 LDH, CPK 总活力有关,与精浆无关。但是在这二组精浆中 LDH-x 含量却有明显差异,精子中含有 γ 酶带的精浆组,其中 LDH-x 含量也高,提示精子中 γ 酶带的

有无与精浆中 LDH-x 含量有关。

生育是个很复杂的过程,精子从产生到与卵结合要经过复杂多变的环境,只有具备相当能量的精子才能完成此过程。精子运动所需要的能量主要是通过糖代谢获得——包括有氧化和无氧酵解两种方式,精浆中有大量的糖可供利用,因此,精子自身 LDH 活力的强弱是决定它在缺氧环境中经无氧酵解获能多少的重要环节,含有 γ 酶带的精子中 LDH 总活力明显高于无 γ 酶带的精子(尽管这二者含有 LDH-x 的水平基本相等。),这反映了前者通过无氧酵解获取能量的能力要大得多。这对精子本身能量水平的高低无疑是个极重要的因素。

同时,前者 CPK 总活力也明显大于后者。CPK 与运转系统中 ATP 再生的生理功能以及细胞的能量代谢有着紧密的联系。当 ATP 消耗时,可由 CPK 催化的逆反应而直接从磷酸肌酸中获得补充,是一个天然的“能量缓冲器”,而且通过肌酸在氧化磷酸化方面,利用



的转化来调节细胞呼吸。因此,CPK 活力的增加也显示出这一部份精子对 ATP 的转化、利用方面的能力增加。

可以看出,精子中是否含有 γ 酶带与精子的质量有密切关系,尤其是它与精子本身 LDH, CPK 二个重要的酶的关系十分明显,就这点而言,它比 LDH-x 更加明显。

由于电泳技术及其仪器设备的迅速发展,不同方法和条件所得到的结果也不尽相同。

据报道,南斯拉夫同行也曾人在精子的 LDH-2 和 LDH-3 间以及 LDH-3 和 LDH-x 间发现过电泳区带,而且他们在用人血 LDH 和精液标本进行离体杂交重组试验时曾在 LDH-4 和 LDH-5 间出现过电泳区带,认为这可能是 A 亚基另一种组分形式^[10],但可惜他们未能在人活体标本中找到过。

我们在 31 例人活体精子标本中发现 γ 酶带,并反复证实了它的存在。至于此条 γ 酶带与南斯拉夫同行们人工重组形成的电泳区带有何不同,它的生物学、生化学性质以及与生育的

超氧化物歧化酶化学修饰的初步研究

区耀华 吕冬 周昕

(清华大学生物科学与技术系 北京)

提 要

本文以三聚氰氯为活化剂,采用聚乙二醇法对超氧化物歧化酶进行化学修饰,得到了均一的聚乙二醇-SOD 加合物。修饰酶活力为天然酶的 75%,表明酶活性中心结构基本保持。

对修饰酶残留氨基的测定表明,近 80% 可滴定氨基参加了反应,且 SOD 骨架结构在修饰前后变化不大,可以推测聚乙二醇是连结在蛋白质表面上的。

引 言

近年来的研究表明,氧自由基与人类的健康和疾病密切相关^[1]。氧自由基可以破坏机体细胞,活化致癌物而导致肿瘤发生,引起炎症和自身免疫性疾病,并可促使机体衰老。超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的氧自由基清除剂,因而它在临床治疗及机体保护方面都有着重要的意义。

要把 SOD 应用于实际,存在着较多问题。首先是 SOD 在体内存留时间短,另外还有异体蛋白免疫原性问题。当前解决问题的方法主要是依靠:(1)脂质体包裹。(2)高分子对蛋白质表面化学修饰。在第二种方法中,所用的

高分子是多种多样的^[2,3]。目前看来,修饰效果以聚乙二醇较为理想^[4]。

蛋白质化学修饰的聚乙二醇法有如下特点:首先是反应条件温和,且酶活性保持较好。其次,聚乙二醇-蛋白加合物水溶性好。此外,聚乙二醇无毒无免疫原性,且具有较好的生物相容性。因此,这是一种较有前途的修饰方法。

本文以三聚氰氯为活化剂,采用聚乙二醇法对 SOD 进行化学修饰,并对修饰后得到的加合物进行了初步研究。

实 验 方 法

一、材料及仪器

牛超氧化物歧化酶、2, 4, 6-三硝基苯磺

关系等问题,还有待进一步深入探讨,但是,我们认为这条 γ 酶带的发现对男性生育机理的深入研究有重要的意义。

此项研究曾得到申冬珠、冯群先,华一珊三位副教授的关心帮助,专此致谢。

参加此项工作的还有中医系在校研究生 翟亚春,一并致意。

参 考 文 献

- [1] 须藤加代子:《临床病理》特集第 60 号,1984, 68.
- [2] Bianco, A, et al.: *Science*, 1963, **139**, 601.

- [3] 吴持平:《国外医学计划生育分册》,1987, **1**, 21.
- [4] 吴果诚等:《中华医学检验杂志》,1983, **6**, 202.
- [5] 赵树铭:《国外医学临床生化与检验学分册》,1986, **6**, 19.
- [6] Podlasek, S.J. et al.: *clin. chem.* 1984, **30**, 1270.
- [7] Podlasek, S.J. et al.: *clin. chem.* 1985, **31**, 527.
- [8] 杨振华:《同功酶测定》,南通医学院出版,江苏南通, 1979.
- [9] 梁志国:《生殖与避孕》,1985, 5 卷 3 期, 3.
- [10] Mirjana Gavell et al.: *Cellular and Molecular BIOLOGY*, 1984, **30**(1), 85.
- [11] 王梦玖,滕春英:《生殖免疫学》,中国展望出版社,北京 1986 276—311.

[本文于 1988 年 4 月 27 日收到]