

## 乳酸脱氢酶 C<sub>4</sub> 对生育力的免疫抑制

王 又 明

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

### 提 要

在当前进行的生育调节的研究中, 对精子特异酶的研究已成了一个重要的方面。其中, 睾丸和精子所特有的乳酸脱氢酶 C<sub>4</sub> 引起人们重视, 它很有可能成为一种避孕疫苗。本文对这一方面作一介绍。

在我们过去所进行的电离辐射对哺乳动物生物效应的研究中看到: 电离辐射对生殖腺的影响明显大于体细胞, 动物受照后生育力下降<sup>[1]</sup>。生育力下降是与睾丸及精子中酶含量的减少有关\*。

睾丸所特有的酶有: 磷酸甘油酸激酶 B(Phosphoglycerate Kinase B) 烯醇化酶 S(enolase), 心肌黄酶 (Diaphorase), 碳酸酐酶 (Carbonic Anhydrase), 腺嘌呤环化酶 (Adenyl Cyclase), 细胞色素 Ct(Cytochrome Ct), 磷酸二酯酶 (Phosphodiesterase), 和乳酸脱氢酶 C<sub>4</sub>(Lactate Dehydrogenase C<sub>4</sub>)<sup>[2]</sup>。其中最值得注意的是乳酸脱氢酶 C<sub>4</sub>(LDH-C<sub>4</sub>) [EC1.1.1.27]。

### LDH-C<sub>4</sub> 的生物学特性

LDH-C<sub>4</sub>是由 C 亚基组成的四聚体, 这种 C 亚基是由 Idh C 基因编码的。这个基因位点在初级精母细胞的粗线期被激活, 经过转录和翻译才表现出它的特性。LDH-C 的合成率与有功能的 LDH-C mRNA 的量有关。Idh C 基因一旦被激活后, 它产生的 LDH-C<sub>4</sub> 是稳定的, 在整个生精过程中被累积起来, 一直到精子成熟<sup>[3,4]</sup>, 通过免疫荧光检查也证实了这一点。LDH-C<sub>4</sub> 只存在于精母细胞, 精子细胞和精子之中, 而精原细胞和非生精细胞 (如 Sertoli 细

胞)中则不存在。在雄性个体内, 除睾丸以外的其它器官, 以及雌性个体中都不产生这种酶<sup>[5]</sup>。

LDH-C<sub>4</sub> 的产生及其催化特性都与在体细胞中广泛存在的, 由 A, B 两条亚基组成的五种 LDH 的同功酶不同。如它的底物及辅酶的范围广, 对丙酮酸的抑制作用较为敏感, 而对乳酸的抑制作用则不够敏感。K<sub>m</sub> 测定表明: 对乳酸有较高的亲合性, 转换系数低, 热稳定性较强等<sup>[6]</sup>。LDH-C<sub>4</sub> 的这些特点是适应于生精过程的生理需要的, 因为在睾丸内精子细胞是以乳酸作为能源的, 而精子又必须在乳酸浓度很高的生殖道内保持功能, 所以 LDH-C<sub>4</sub> 是保持精子活力的关键酶。在生精过程中出现病理性失调, 或由于垂体切除后生精上皮退化时, 都能引起 LDH-C<sub>4</sub> 的减少<sup>[3]</sup>。但是关于 LDH-C<sub>4</sub> 合成的机理还不清楚, 不过随着 DNA 重组技术的发展, 以 cDNA 为探针, 进行基因序列分析, 对阐明调控 LDH-C<sub>4</sub> 合成的机理是有利的。

### LDH-C<sub>4</sub> 的结构

对一些哺乳动物的 LDH-C<sub>4</sub> 进行提取、纯化, 并制成了结晶, 这就有可能对它们进行多方面的研究。以小鼠的 LDH-C<sub>4</sub> (MC) 为例, 它是由 C 亚基组成的四聚体, 分子量是  $14 \times 10^4$

\* 作者在 1986 年南京举行的小剂量电离辐射生物效应国际讨论会分会会上宣读的论文。

道尔顿。每个亚基由 330 个氨基酸残基组成，其分子量为  $3.7 \times 10^4$  道尔顿，在 C 亚基的氨基酸组成中，亮氨酸、甘氨酸、苏氨酸和蛋氨酸残基数与 A, B 亚基不同。见表 1<sup>[7]</sup>。

表 1 LDH 同工酶的氨基酸组成

氨基酸残基	LDH-C	LDH-B		LDH-A	
	a	b	c	b	c
Lys	104±7.4	96	98	111	105
His	32±1.2	28	26	25	38
Arg	41±2.9	33	32	41	39
Asp	155±2.4	149	135	127	121
Thr	80	57	51	46	48
Ser	108	102	89	95	88
Glu	108±3.9	111	126	114	119
Pro	48±1.9	45	46	47	44
Gly	144±3.7	92	92	97	103
Ala	83±2.4	81	82	78	82
Val	139±4.3	144	135	141	129
Met	13±6.1	34	33	27	33
Ile	74±2.5	87	88	90	86
Leu	179±7.0	138	136	140	139
Tyr	25±3.1	26	27	28	28
Phe	23±0.0	22	22	28	28

注：表内所列的残基数是根据 LDH-C<sub>1</sub> 分子量为  $14 \times 10^4$  而推算的。a, b, c, 为不同作者的数据。

与 LDH-A, LDH-B 一样, LDH-C<sub>1</sub> 的功能区也可分为: NH<sub>2</sub> 末端区, 环肽区, 辅酶结合区, 底物结合区, 但其结构各异。如 LDH-C<sub>1</sub> 的 NH<sub>2</sub> 末端(残基 1—20)只有在 7, 8, 以及 18 和 19 位上的残基与 A, B 亚基相同, 其余皆异。此外, C 亚基 10 和 15 位上的残基聚在一起形成一个隆起, 这在 A, B 亚基中未曾见到, 这可能与 C 亚基的 13 位上的脯氨酸残基有关。现将几种动物的 A, B, C 亚基的 5—15 位残基序列列于表 2。

再如: 在 A B 亚基中, 环肽(96—117 位残基)是打开的, 与 NAD 结合后, 这个环肽移动 13 Å 盖住辅酶, 而在小鼠的结晶的 LDH-C 中环肽是关闭的, 在溶液中时, LDH-C 环肽的闭环状态和闭环状态呈现动态的平衡, 这使得它与辅酶结合的效能大为减少<sup>[8,9]</sup>。C 亚基的环肽区及辅酶区氨基酸残基的序列与 A, B 亚基也有差别, 见表 3<sup>[10]</sup>。

由以上提出的 LDH-C 在结构上的特点, 反映了它在某些性质上与 A, B 亚基的不同。但是, 由于没有能提出一个准确的模型, 所以对 LDH-C<sub>1</sub> 的催化特性还不能作出完善的解释。

表 2 LDH 不同亚基中 5-15 位残基序列

	序 列				
	5	10	14a	14b	15
MC	Glu-Gln-Leu-Ile-Gln-Asn-Leu-Val-Pro-Glu-Asp-Lys				
DA	Asp-Lys-Leu-Ile-Gly-His-Leu-Ala-Thr-Ser-Gln-Glu				
PA	Asp-Gln-Leu-Ile-His-Asn-Leu-Leu-Lys-Glu-Glu-His				
CA	Asp-His-Leu-Ile-His-Asn-Val-His-Lys-Glu-Glu-His				
PB	Glu-Lys-Leu-Ile-Ala-Pro-Val-Ala-Gln-Gln-Glu-Thr				
CB	Glu-Lys-Leu-Ile-Thr-Pro-Val-Ala-Ala-Gly-Ser-Thr				

注: MC: 小鼠 C 亚基; DA: 狗鱼 A 亚基; PA, PB: 猪 A, B 亚基; CA, CB: 鸡 A, B 亚基。

### LDH-C<sub>1</sub> 的免疫学特性

LDH-C<sub>1</sub> 在生物学及结构上的特性表明, 它是一个有效的抗原。在雄性个体中, 可籍血睾屏障将它们阻挡住, 而不致引起自身免疫反应。但在不能合成 LDH-C<sub>1</sub> 的雌体中, 它们是一个抗原。如雌兔或雄兔用纯化的小鼠 LDH-C<sub>1</sub> 免疫后, 能产生出抗体, 这种抗体与小鼠的 LDH-

C<sub>1</sub> 结合后形成沉淀的抗原-抗体复合物<sup>[11]</sup>。但与由 A, B 亚基组成的 LDH 同工酶结合时则不发生反应<sup>[12]</sup>。实验也表明, 兔抗小鼠 LDH-C<sub>1</sub> 的抗体不仅与小鼠的 LDH-C<sub>1</sub> 发生反应, 也能与其它种类动物的 LDH-C<sub>1</sub> 发生反应。但是, 它对不同种类动物的 LDH-C<sub>1</sub> 的识别功能, 及补体结合功能都有所不同。这可能由于 LDH-C<sub>1</sub> 的氨基酸排列顺序的种属差异之故。

表3 LDH 同工酶中辅酶区环肽区氨基酸成份的比较

	DA	CA	PA	CB	PB	MC	RC	相比较的残基数
辅酶结合区 (21—95 & 118—163)残基								
DA		17	18	19	22	35	33	121
CA	14.1		14	19	19	27	26	98
PA	14.9	14.3		18	21	31	33	121
CB	15.7	19.4	14.9		4	30	29	102
PB	18.2	19.4	17.4	3.9		35	34	121
MC	28.9	27.6	25.6	29.4	28.9		9	121
RC	27.3	26.5	27.3	28.4	28.1	7.4		121
环肽区 (96—117) 残基								
DA		0	0	2	2	9	8	22
CA	0		0	2	2	9	8	22
PA	0	0		2	2	9	8	22
CB	9.1	9.1	9.1		0	11	10	22
PB	9.1	9.1	9.1	0		11	10	22
MC	40.9	40.9	40.9	50.0	50.0		2	22
RC	36.4	36.4	36.4	45.5	45.5	9.1		22

注：表中右上方的数是指所比较的残基中有差异的残基个数。左下方的数是差异残基的百分数。

由于用小鼠的 LDH-C<sub>4</sub> 免疫裸鼠后,没有产生抗体,可以推断,机体被 LDH-C<sub>4</sub> 免疫后,通过 T 细胞的辅助作用才诱发出抗体。但是,关于 LDH-C<sub>4</sub> 的抗体形成机理,结构及特性还不清楚,虽已制出 LDH-C<sub>4</sub> 的单克隆抗体<sup>[13]</sup>,也只不过是一个良好的开端而已。

### LDH-C<sub>4</sub> 的抗生育作用

用结晶的小鼠 LDH-C<sub>4</sub> 免疫雌兔以后,在雌兔体内产生循环抗体,当这种抗体在血清中含量增高时,就能转移到雌性生殖道中,在滤泡液中也有。在受精后,雌性生殖道中的 LDH-C<sub>4</sub> 抗体与精子表面的 LDH-C<sub>4</sub> 相结合,使精子产生了凝集作用,阻止精子前进;也能产生有细胞参与的细胞溶解免疫反应,而使精子溶解<sup>[14]</sup>,从而干扰了受孕。这种妊娠的免疫抑制在雌性小鼠中为 40—60%;兔为 70%;狒狒为 63%<sup>[15]</sup>。也应看到,要达到抑制生育,在雌体内的抗体含

量一定要足够高,否则不能奏效,为此,采用对雌体生殖腺的局部免疫能得到较为满意的效果<sup>[16]</sup>。

### LDH-C<sub>4</sub> 的抗原决定簇

用胰蛋白酶消化小鼠的 LDH-C<sub>4</sub>, 对所得到的肽链进行结构测定及放射免疫分析。结果分离出十二个有抗体结合的肽链,其中有八个已测出了氨基酸残基的序列,见表 4<sup>[17]</sup>。

通过对这几个有活性肽的分析,看出它们的特点是:一,大多数的肽中都含有脯氨酸残基,可能是这个残基对多肽链的构象有作用。二,有活性的肽多位于四聚体分子的表面,这样是便于与抗体结合,其中最明显的是 5—15 位残基片断,它们都处于分子的表面。另外几个肽链也都分别有五至十个不等的残基位于表面;如 58—74 肽链中有 25% 的残基位于表面,而 211—220 的片断中有八个残基位于表面。总

表4 LDH-C<sub>4</sub>的免疫活性肽

5-15	Glu-Gln-Leu-Ile-Gln-Asn-Leu-Val-Pro-Glu-Asp-Lys
41-55	Gly-Leu-Ala-Asp-Glu-Leu-Ala-Leu-Val-Asp-Ala-Asp-Thr-Asp-Lys
58-74	Gly-Glu-Ala-Leu-Asp-Leu-Leu-His-Ser-Leu-Phe-Leu-Ser-Thr-Pro-Lys
176-210	Leu-Gly-Val-Asn-Pro-Thr-Ser-Cys-His-Gly-Trp-Val-Leu-Gly-Glu- His-Gly-Asp-Ser-Ser-Val-Pro-Ile-Trp-Ser-Gly-Val-Asn-Val-Ala- Gly-Val-Thr-Leu-Lys
211-220	Ser-Leu-Asn-Pro-Ala-Gly-Thr-Asp-Lys
231-243	Gln-Gln-Val-Val-Glu-Gly-Gly-Tyr-Glu-Val-Leu-Asp-Met-Lys
283-303	Glu-Glu-Val-Phe-Leu-Ser-Ile-Pro-Cys-Val-Leu-Gly-Glu-Ser-Gly- Ile-Thr-Asp-Phe-Val-Lys
304-315	Val-Asn-Met-Thr-Ala-Glu-Glu-Gly-Leu-Leu-Lys

之,在C亚基表面的127个残基中,有71个表现出免疫活性。但是,与这些活性部位结合的是一个完整的抗体群?还是多重的,相互交错的单个抗体呢?尚不清楚。三,这些有活性的肽链其氨基酸残基的组成,序列,构象与A、B亚基的差别越大,则抗原性越明显。5—15残基片断是最好的例证,可参看表2。

由以上的结果看出,对LDH-C<sub>4</sub>的特性起重要作用的环肽,从整个分子水解下来后,却没有表现出与抗体结合的活性。这是否由于胰酶的水解作用改变了它们的构象,致使失去活性?当然,由于受体氨基酸序列的不同,抗原区域也会有区别。抗原区的数目,位置以及准确的界线是与蛋白质的结构和抗原-宿主的相互作用有关。

通过对小鼠LDH-C<sub>4</sub>抗原决定簇的研究,就使我们能够合成带有这一抗原决定簇的肽链,作为避孕疫苗,以调节生育。

根据小鼠LDH-C<sub>4</sub>的NH<sub>2</sub>末端,环肽区以及个别有活性的肽片断的氨基酸残基序列而合成了三个肽链,即:

MC5-15:Glu-Gln-Leu-Ile-Gln-Asn-Leu-Val-Pro-Glu-Asp-Lys

MC97-110:Arg-Met-Val-Ser-Gly-Gln-Thr-Arg-Leu-Asp-Leu-Leu-Gln-Arg

MC211-220:Ser-Leu-Asn-Pro-Ala-Ile-Gly-Thr-Asp-Lys

将合成的多肽分别用牛血清白蛋白(BSA)和白喉毒素(DT)作为载体,形成多肽-载体的复合物。用这些复合物对兔进行免疫,免疫后能使兔子产生出与小鼠LDH-C<sub>4</sub>有结合反

应的抗体<sup>[18]</sup>,这些抗体还能与人和小鼠的精子产生凝集作用<sup>[19]</sup>。用DT-MC<sub>5-15</sub>免疫狒狒后,其生育率下降71%<sup>[15]</sup>。实验也表明,合成的肽链的免疫效应,由于载体的不同,效果不同,如BSA-MC211-220的免疫效应要强于DT-MC211-220的效应。这一方面反映出不同载体的效应,也反映出由于肽链与不同载体结合后,它们的构象发生改变,从而表现出不同的活性。

从以上的介绍看出,LDH-C<sub>4</sub>对生育的免疫抑制作用是明显的,用它制出一种避孕疫苗是很有可能的。当然,要取代天然的LDH-C<sub>4</sub>而合成出有效的避孕疫苗,就要使用蛋白质化学和免疫化学的技术,包括制备单克隆抗体的技术,绘制出LDH-C<sub>4</sub>抗原决定簇的图谱,测出这个决定簇中氨基酸的序列,再用化学方法合成出这个序列,并检查他们诱发抗体的能力,一旦合成出有效的避孕疫苗就将会使计划生育工作大有裨益。

### 参 考 文 献

- [1] 小剂量电离辐射生物效应协作组:《中国科学》,1980, 23, 1170。
- [2] Goldberg E.: *Exp. Clin. Immunogenet*, 1985, 2, 120.
- [3] Wheat T. E.: *Isozymes; Current Topic in Biological and Medical Res.*, Alan. R. Liss, Inc., New York, 1983, 7, 113—130.
- [4] Wieben E. D.: *J. Cell Biol.*, 1981, 88, 492.
- [5] Marie Hintz: *Dev. Biol.*, 1977, 57, 375.
- [6] Goldberg E.: *Methods in Ezymology*, 1975, 41, 318—323.
- [7] Goldberg E.: *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 2044.
- [8] Steven S.: *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 7017.
- [9] Donald W.: *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 7611.
- [10] Steven S.: *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 7029.

(下转第353页)

可能的解释是大肠杆菌的迴旋酶发生了补偿性突变,或存在其他类的拓扑酶而使拓扑酶 I 缺失得到补偿,因而仍能维持 DNA 超螺旋密度的平衡。但迴旋酶是细菌生长必需的, DNA 复制的启动及复制末期子链 DNA 的分离都必须有迴旋酶的参与。饶有趣味的是迴旋酶的生成是由 DNA 超螺旋密度来调节控制的,降低 DNA 超螺旋密度可刺激迴旋酶基因的表达。

真核细胞拓扑酶的生物学功能尚不清楚,文献[10]已作了讨论。拓扑酶 I 广泛分布于各种真核生物中,并广泛存在于生物的各器官组织中。我们对大鼠肝、脾、肾、脑、肺及再生肝、癌变肝和胚胎组织进行了活力检测,结果表明这些组织均存在拓扑酶 I; 拓扑酶 I 基因在胚胎早期就已开始表达,并且在以后发育、生长、成熟过程,此酶基因均处于开放状态。用拓扑酶 I 抗体作萤光免疫定位表明它倾向于分布在染色质的活性转录部位。痘苗病毒的核心颗粒含有许多与转录有关的酶,其中也可测出拓扑酶 I 活力。不成熟的爪蟾卵的核仁一般测不出 DNA 复制的活性,但转录活性很活跃,此核仁亦可测出拓扑酶 I 活性。rRNA 基因上游有 DNase I 高敏感部位,拓扑酶 I 在 SDS 存在下可使 DNA 断裂,断裂的位置很接近 DNase I 高敏感部位。在体外,拓扑酶 I 能与核小体紧密结合, HMG 蛋白可促进拓扑酶 I 活力。从

这些事实看来,拓扑酶 I 似与基因的表达或表达的调节有关。一些患自身免疫性疾病(如硬皮病)的病人血清存在拓扑酶 I 抗体,其意义有待深入研究。

真核细胞拓扑酶 II 已被鉴定为有丝分裂时染色体的骨架蛋白。在细胞周期的 S 期,拓扑酶 II 活力显著增加,肝细胞再生,淋巴细胞受刀豆球蛋白 A 刺激而增生时,拓扑酶 II 活力均显著增加。这些事实说明真核细胞拓扑酶 II 似与 DNA 的复制关系较密切。近年来的研究表明,拓扑酶 II 是某些抗癌药物的作用目标,这些抗癌药物要通过拓扑酶 II 的参与和中介而使肿瘤细胞的 DNA 破裂,从而获得抗癌效果。

### 参 考 文 献

- [1] Bauer, W. R.: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1978, 7, 287.
- [2] Champoux, J. J.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1978, 47, 447.
- [3] Gellert, M.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1981, 50, 879.
- [4] Bauer, W. R. et al.: *Scientific Amer.*, 1980, 243(1), 100.
- [5] Wang, J. C.: *Scientific Amer.*, 1982, 24(1), 84.
- [6] Kikuchi, A. et al.: *Nature*, 1984, 309, 677.
- [7] Drlica, K.: *Microbiol. Rev.*, 1984, 48(4), 273.
- [8] Wang, J. C.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1985, 54, 665.
- [9] Wasserman, S. A. et al.: *Science*, 1986, 232, 951.
- [10] 曾桂超:《生物化学杂志》, 1986, 2(1), 1.

[本文于 1987 年 8 月 3 日收到]

(上接第 362 页)

- [11] Shelton J. A.: *J. Reproductive Immunology*, 1985, 8, 321.
- [12] Liang Z. G.: *J. Exp. Zoology*, 1986, 240, 377.
- [13] Goldman R. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1983, 80, 3774.
- [14] Shelton J. A.: *Biology of Reproduction*, 1985, 32, 556.
- [15] Goldberg E.: *Immunological Approaches to contraception and Promotion of fertility*, Plenum Publishing Corp. 1986. 219—230.
- [16] Shelton J. A.: *Biology of Reproduction*, 1986, 35, 873.
- [17] Wheat T. E.: *Molecular Immunology*, 1985, 22, 643.
- [18] Wheat T. E.: *Molecular Immunology*, 1985, 22, 1195.
- [19] Beyler S. A.: *Biology of Reproduction*, 1985, 32, 1201.

[本文于 1987 年 6 月 5 日收到]