

磷脂酶A₂亚型及其与男性生殖相关性研究

谢海锋^{2,1} 李坤¹ 倪崖^{1,2*}

(¹浙江省医学科学院生殖生理实验室, 杭州 310013; ²温州医学院检验医学院、生命科学学院, 温州 325035)

摘要 磷脂酶A₂(phospholipase A₂, PLA₂)是参与细胞代谢活动、信号转导等过程的重要酶类之一, 广泛分布于哺乳动物机体内。随着对磷脂酶A₂研究的深入, 目前已有30余种磷脂酶A₂亚型被逐一鉴定, 磷脂酶A₂亚型与男性生殖相关性研究也有了新的发现。该文通过对磷脂酶A₂的最新亚型分类及其特征、磷脂酶A₂在男性生殖系统中的分布、磷脂酶A₂参与精子顶体反应及其信号转导通路以及与男性生殖相关的磷脂酶A₂亚型等内容进行分析, 研究磷脂酶A₂在男性生殖系统中发挥的作用及其机制, 为男性不育的诊断和治疗提供理论依据和思路策略。

关键词 磷脂酶A₂; 亚型; 男性生殖; 顶体反应; 信号转导

PLA₂ Subtypes and Their Relationships with Male Reproduction

Xie Haifeng^{2,1}, Li Kun², Ni Ya^{1,2*}

(¹Unit of Reproductive Physiology, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

²School of Medical Lab Science, School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract Phospholipase A₂ (PLA₂), which exists widely in the mammalian, is one of the most crucial enzymes that play important roles in cell metabolism, signal transduction and so forth. With the further research of phospholipase A₂, more than 30 enzymes that possess phospholipase A₂ or related activity have been identified in mammals and it helps to lead a new advance in revealing the male reproduction relevant phospholipase A₂ isozymes. This review focuses on the current understanding of the classification and characterization of phospholipase A₂ family members, the localizations of phospholipase A₂s in male reproductive system, the roles of phospholipase A₂ and its signal transduction pathways in the acrosome reaction, phospholipase A₂ subtypes relevant to the male reproduction, etc. This article is a study on the roles and the mechanisms of phospholipase A₂s in male reproductive system which may provide a theoretical basis and thinking for a strategy in the male infertility diagnosis and treatment.

Key words phospholipase A₂; subtype; male reproduction; acrosome reaction; signal transduction

磷脂酶A₂(phospholipase A₂, PLA₂)参与男性生殖过程已被证明多年, 其与精子获能、顶体反应以及精卵融合等过程密切相关, 对研究男性生殖生理和男性避孕药均有重要意义。随着科研技术的发展

和相关研究的不断深入, 新的PLA₂亚型逐步被发现和鉴定, 同时关于不同PLA₂亚型参与生殖过程的研究时有报道, 近年取得了一些重要的研究进展。因此, 本文将着重就PLA₂的亚型分类及其特征、PLA₂

收稿日期: 2012-07-24 接受日期: 2012-09-24

国家自然科学基金(批准号: 81000244、81170554)、浙江省自然科学基金(批准号: Y2100058、Y2090236)和浙江省重点科技创新团队(批准号: 2010R50048-07)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88215476, Fax: 0571-88075447, E-mail: niya99@126.com

Received: July 24, 2012 Accepted: September 24, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81000244, No.81170554), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.Y2100058, No.Y2090236) and the Key Science and Technology Innovation Team of Zhejiang Province (Grant No.2010R50048-07)

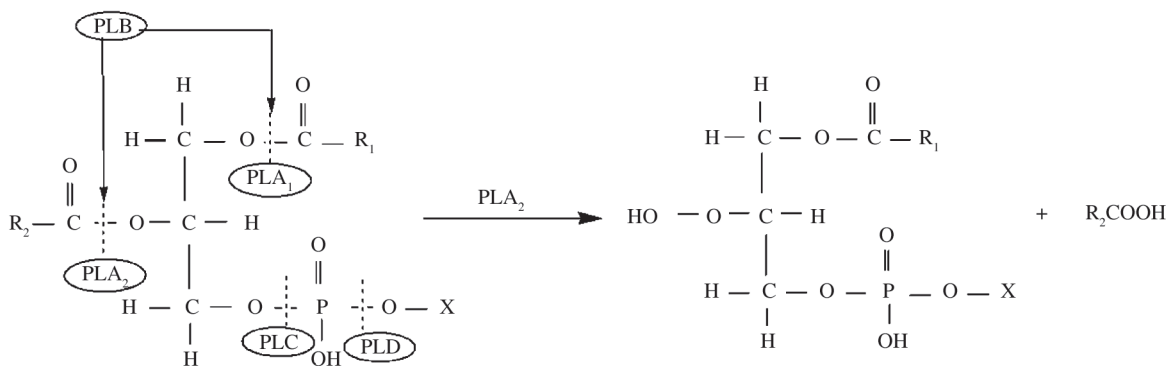
*Corresponding author. Tel: +86-571-88215476, Fax: +86-571-88075447, E-mail: niya99@126.com

与男性生殖的相关性研究等作一概述。

1 PLA₂概述

磷脂酶(phospholipases, PLAs)是指催化水解磷脂酰、溶血磷脂酰化合物中的羧酸酯键、磷酸酯键和磷酸与胆碱之间酯键的一类脂酶。根据磷脂酶水解的部位不同,它们被分为磷脂酶A₁(PLA₁)、磷脂酶A₂(PLA₂)、磷脂酶B(PLB)、磷脂酶C(PLC)和磷脂酶D(PLD)。PLA₂在生物界分布广泛,在哺乳动物体内尤为丰富,包括心、脑、肝、肺、脾、胰等脏器,血管平滑肌、巨噬细胞、红细胞、血小板、胰液、炎性渗出液等细胞和体液^[1]。PLA₂可催化水

解细胞膜甘油磷脂类的sn-2位酯键从而生成脂肪酸和溶血磷脂(图1),花生四烯酸是其中重要的一种。花生四烯酸可被环加氧酶氧化而生成一类被称作类花生酸的生物活性物质,如前列腺素类物质、白三烯、血小板活化因子等,介导体内一系列病理生理过程,如机体的抗菌抗病毒过程、关节炎、动脉粥样硬化、哮喘、鼻炎、血栓形成等^[2]。近期研究还发现,PLA₂与巴特综合征、神经轴突营养障碍、新生儿坏死性小肠结肠炎等疾病均具有密切关系^[2]。由此可见,PLA₂在控制体内磷脂类物质平衡、调节动物新陈代谢、参与疾病的病理进程等方面发挥着极其重要的作用。



R₁, R₂: 长链脂肪酸; X: 极性头端基团。

R₁, R₂: fatty acid chain; X: any of a number of polar head groups.

图1 不同磷脂酶催化甘油磷脂位点及磷脂酶A₂催化反应

Fig.1 Hydrolysis positions of glycerophospholipids catalyzed by different phospholipases and phospholipase A₂ catalytic reaction

2 PLA₂亚型分类及其特征

根据PLA₂的分子结构、催化机制、胞内定位和氨基酸顺序同源性等特征,PLA₂可分为四大类,分别为分泌型PLA₂家族(secreted PLA₂ family, sPLA₂s)、胞质型PLA₂家族(cytosolic PLA₂ family, cPLA₂s)、钙离子非依赖型PLA₂家族(Ca²⁺-independent PLA₂ family, iPLA₂s)又称含patatin磷脂酶结构域脂酶(patatin-like phospholipase domain-containing lipases, PNPLAs)^[3]以及血小板激活因子酰基水解酶家族(platelet-activating factor acetylhydrolase family, PAF-AHs)。此外,近年来还发现两种新的PLA₂家族,即溶酶体PLA₂家族(lysosomal PLA₂s, LPLA₂s)和脂肪特异性磷脂酶(adipose-specific PLA, AdPLA)^[4-5]。

2.1 sPLA₂s

sPLA₂s包括sPLA₂-IB、IIA、IIC、IID、IIE、IIF、

III、V、X、XIIA、XIIIB十一个亚型。sPLA₂-I/II/V/X为传统型sPLA₂(conventional sPLA₂),分子量为14~19 kDa,具有高度保守的钙离子结合环和组氨酸-天冬氨酸二联体构成的催化位点以及六个完全保守的二硫键和两个非保守二硫键构成的高度稳定结构。sPLA₂-III和sPLA₂-XII为非典型性sPLA₂(atypical sPLA₂),除钙离子结合环和催化位点外其结构与传统型sPLA₂均不同^[6]。

sPLA₂对磷脂的sn-2位无选择性,各亚型在体内主要功能各不相同。目前,已知sPLA₂-IB主要由胰腺分泌,参与食源性磷脂的消化;sPLA₂-IIA主要存在于血清和渗出液中并与炎症相关,促炎介质的刺激可显著诱导其表达;sPLA₂-V和sPLA₂-X与哮喘的发病相关;sPLA₂-IID主要表达于淋巴器官(如脾脏和淋巴结),并可能具有免疫抑制功能^[6]。

2.2 cPLA₂s和iPLA₂s

cPLA₂s包括cPLA₂-IVA-IVF六个亚型,除cPLA₂-IVC外,均有一N末端C2结构域连接催化结构域。iPLA₂s包括iPLA₂-VIA(又称PNPLA9)、VIB(又称PNPLA8)、PNPLA1-7九个亚型,其因有一似马铃薯块茎特异性蛋白patatin的蛋白结构域而又称含patatin磷脂酶结构域脂酶^[3]。iPLA₂s分两类,一类为有一典型长N末端结构域的磷脂酶型(PLA type),包括PNPLA6-9;另一类为余下缺乏上述特征性结构域的脂肪酶型(lipase type)。cPLA₂s和iPLA₂s的催化结构域都为 $\alpha/\beta/\gamma$ 三层构型联合一个保守丝氨酸/天冬氨酸催化二联体^[7],在不同程度上具有PLA₁、PLA₂、溶血磷脂酶、脂肪酶多重催化活性,表明两个家族可能进化自同一祖先基因。

cPLA₂在胞内信号传递中占有重要地位,在细胞反应急性期和慢性期均发挥作用,是体内产生脂类介质的主要PLA₂。cPLA₂各亚型的功能研究主要集中于cPLA₂-IVA,并已发现与哮喘、肺纤维化、急性呼吸窘迫综合征、阿尔兹海默病、肠道溃疡等多种疾病相关。此外,还参与细胞从高尔基体转运膜结合蛋白至胞膜^[6,8]。PNPLA9与精子发生和二型糖尿病有关,PNPLA8的缺乏可致线粒体功能失调,PNPLA6基因敲除的雌性小鼠可发生胎盘缺陷而致胚胎死亡^[6]。

2.3 PAF-AHs

PAF-AHs包括PAF-AH-VIIA、VIIB、VIIIA/VII-IB,结构中含有催化性丝氨酸可催化PAF的sn-2位酯键,释放出乙酸盐。PAF-AH-VIIA为分泌蛋白,又称血清型PAF-AH(plasma-type PAF-AH)或脂蛋白相关PLA₂(lipoprotein-associated PLA₂)^[9],它能避免机体产生PAF介导的病理变化,如水肿、哮喘,且与动脉粥样硬化的发生和进展有关^[10]。PAF-AH-VIIB为胞内单体蛋白,又称II型胞内PAF-AH(intracellular PAF-AH type II, PAF-AH-II),41%的蛋白序列与PAF-AH-VIIA相同,含脂肪酶共有基序GXS²³⁶XG^[11]。PAF-AH-VIIB有助于机体抵抗氧化应激,通过降解细胞膜上的氧化磷脂而保护细胞免受氧化损伤^[12]。PAF-AH-VIIIA/VIIIB又称I型胞内PAF-AH(intracellular PAF-AH type I, PAF-AH-I),是由两个30 kDa同源或者异源催化亚单位($\alpha 1$ 和 $\alpha 2$)和一个45 kDa调控亚单位构成的异源三聚体,或仅为上述两种催化亚单位构成的同源或者异源二聚体^[13],其功能可能与睾丸

生精相关。

2.4 LPLA₂s

LPLA₂s包括酸性钙离子非依赖性PLA₂(acidic Ca²⁺-independent PLA₂, aiPLA₂)和溶酶体PLA₂(lysosomal PLA₂, LPLA₂)^[5]。两者结构迥异,但均存在于溶酶体中且适宜在酸性环境下发挥催化作用^[6]。aiPLA₂为过氧化还原酶6(peroxiresoxin 6, Prdx₆),既有PLA₂活性又有谷胱甘肽过氧化物酶活性,aiPLA₂/Prdx₆缺陷的小鼠对氧化应激敏感性增加^[14]。aiPLA₂/Prdx₆位于肺泡II型细胞溶酶体中,与肺泡表面活性物质二棕榈酰磷脂酰胆碱(dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC)的降解有关^[15]。LPLA₂存在于巨噬细胞溶酶体并被分泌入血^[16]。它在pH4的条件下可不依赖钙离子而水解磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)和磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)^[17]。在LPLA₂相关基因缺陷小鼠中,其肺泡和腹膜巨噬细胞以及脾脏细胞可出现PE和PC蓄积^[18],最终表现为肺泡和腹膜巨噬细胞泡沫细胞样变、脾肿大、肺泡表面活性物质脂质蓄积,出现磷脂病。

2.5 AdPLA

AdPLA,或称PLA₂-XVI,大量存在于白色脂肪组织,因其在脂肪细胞分化成脂肪细胞时被诱导表达^[4]而得名。钙离子可激活AdPLA,但非必需因素。它能催化水解卵磷脂的sn-2位酯键生成游离脂肪酸和溶血磷脂^[4],但也有报道称其在不同的实验条件下还能水解sn-1位酯键,并且PLA₁活性高于PLA₂活性^[19]。AdPLA是脂肪细胞发生脂解作用的主要调控因子,对肥胖的发生起决定性作用^[20]。目前,就其具体的致肥胖机制,尚无统一论。对于AdPLA归类为PLA₂家族是否恰当,也存在争议^[6,19]。

3 PLA₂存在于雄性生殖系统并与生育相关

PLA₂存在于不同种属的雄性生殖系统内,如存在于羊、牛以及人的精浆中,仓鼠精子的顶体中。人精浆中PLA₂主要由前列腺上皮细胞分泌^[21],同时附睾、精囊等也能参与精液中PLA₂的分泌,并且各个性腺所分泌的PLA₂亚型种类不完全相同^[22]。由此可推测,除精子本身表达PLA₂外,各附属性腺器官分泌入精浆的PLA₂可能与精子头部结合,在顶体反应过程中被激活,溶解精子膜磷脂产生溶血磷脂和游离脂肪酸,参与精卵融合。通过不育男性和正常生育男性的精浆和精子头部PLA₂含量检测发现,精

浆PLA₂含量和精子密度呈负相关, 而正常生育男性精子头部PLA₂含量高于不育男性^[23], 这表明精浆中PLA₂与男性生育相关, 精子头部PLA₂含量缺乏可能是引起男性不育的原因之一。

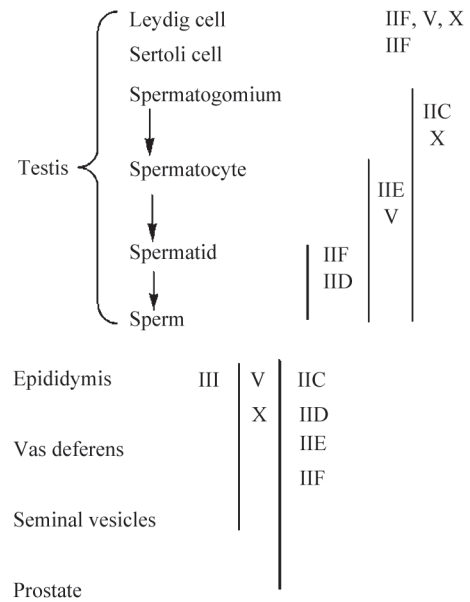
通过sPLA₂在雄性小鼠和男性生殖系统中的免疫组化定位^[22]发现, sPLA₂-IIE、V、X主要存在于精母细胞和圆形或处于尾部形成期的精子细胞中, sPLA₂-IIC、IID、IIF、V、X存在于成熟的精子细胞上。睾丸间质细胞表达sPLA₂-IIF、V、X, 表明这些酶可能参与性激素的合成。附睾上皮细胞和输精管中表达的sPLA₂s有sPLA₂-IIC、IID、IIE、IIF、V、X、III。小鼠的精囊上皮细胞表达sPLA₂-IIC、IID、IIE、IIF、V、X, 而人的精囊上皮细胞主要表达sPLA₂-IID和sPLA₂-V, sPLA₂-IIF和sPLA₂-X表达甚微。人前列腺上皮细胞高表达sPLA₂-IIA, 是精浆中sPLA₂-IIA的主要分泌腺体, 此外, 还表达sPLA₂-IID和sPLA₂-X, 而小鼠前列腺上皮细胞则表达sPLA₂-IIC、IID、IIE、IIF。小鼠sPLA₂-III由附睾近端上皮细胞表达并分泌入附睾腔, 而精子本身并不表达^[24]。PAF-AH、iPLA₂-VIA在小鼠附睾和精子中均能检测到活性^[25-26], 但它们具体出现在精子发生过程中的哪个阶段尚无报导(雄性小鼠睾丸及附性器官sPLA₂定位总结见图2)。有些sPLA₂亚型同时存在于多个附属性腺器官中, 如sPLA₂-IID在附睾上皮细胞、输精管、精囊和前列腺上皮细胞中均有表达, 而前列腺上皮细胞或精囊上皮细胞中的sPLA₂-IID是由其自身表达的还是吸收自其上游性腺器官(如附睾上皮细胞)分泌的sPLA₂-IID, 仍待进一步研究确认。

4 PLA₂参与精子顶体反应及其激活调控机制

顶体反应(acrosome reaction, AR)是受精的前提, 它是指精子质膜与顶体外膜多点融合, 释放出酶和其他蛋白质的反应, 有助于精子穿过卵细胞的外围结构和精核入卵。正常情况下, 精子穿过卵丘细胞及其胞外基质, 与透明带(zona pellucida, ZP)结合并诱发AR, 促使精子释放各种酶类和脂类, 促进精子穿过ZP和卵膜融合。PLA₂对调控这一正常生理过程具有重要作用。

4.1 PLA₂参与顶体反应

研究者通过使用PLA₂抑制剂(mepacrine或者pBPB)对不同种属哺乳动物的精子进行处理, 发现



竖线长度所包括的器官/细胞均表达竖线右侧的sPLA₂类别。

The sPLA₂s listed on the right side of the vertical lines are the ones that expressed in the reproductive organs/cells covered by the vertical lines

图2 雄性小鼠睾丸及附性器官sPLA₂s定位

Fig.2 The localizations of PLA₂s present in male mouse testis and accessory genital organs

其可阻碍精子顶体反应的发生, 而添加外源性PLA₂代谢产物(如溶血磷脂类物质或脂肪酸类物质)可使正常精子加速发生顶体反应, 间接表明PLA₂与精子的顶体反应相关^[27]。后来, Roldan等^[28]通过两种不同的放射性同位素标记精子磷脂, 用钙离子载体A23187刺激钙离子内流, 发现花生四烯酸和溶血卵磷脂浓度随时间而增加; 加入PLA₂阻滞剂Ro-4493可抑制花生四烯酸的释放和顶体反应, 如加入花生四烯酸或者溶血卵磷脂后则可逆转上述抑制作用。这些结果表明, PLA₂参与精子溶血磷脂和游离脂肪酸的释放以及顶体反应的发生。通过对人精子进行sPLA₂免疫荧光染色及共聚焦激光扫描显微镜检测, 发现sPLA₂存在于完整精子顶体的头部和尾部, 头部的sPLA₂与精子顶体功能相关, 即随着顶体反应的发生, 精子顶体sPLA₂逐渐释放而减少, sPLA₂的分布方式可作为精子与卵细胞受精能力的指标^[29-30]。

PLA₂催化精子膜磷脂产生溶血磷脂(lysophospholipids)和脂肪酸。这两种代谢物可作为PKC协同激活因子, 但它们的主要作用可能为参与精卵融合时的细胞膜流动^[31]。

溶血磷脂如溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, lysoPC)可能与顶体反应有关。早期研究发

现, 豚鼠精子用lysoPC预处理可缩短精子获能时间, 迅速激发精子顶体反应^[32]。lysoPC可增强钙离子载体A23187诱发的精子顶体反应, 并呈浓度依赖性关系^[28]。用相关精子PLA₂抑制剂如花生四烯酸抑制剂(ATA)或百日咳毒素(PTX)可抑制精子活性, 加入外源性lysoPC可重新诱发精子的顶体反应^[33]。但并非所有的溶血磷脂对顶体反应都有影响, 磷脂酰胆碱和磷脂酰肌醇被认为有助于顶体反应的发生, 而磷脂酰丝氨酸则对该生理作用无影响^[34]。

相对于溶血磷脂, 脂肪酸则更倾向于在细胞膜流动中发挥作用。早期研究发现, 某些脂肪酸可刺激预获能金黄仓鼠精子发生顶体反应^[35]。后来研究表明, 花生四烯酸可以增强绵羊精子对钙离子载体A23187的反应^[28]。有人认为, 一部分脂肪酸可在体内进一步代谢, 并通过它们的代谢衍生物对机体进行调节, 因为通过实验发现花生四烯酸代谢衍生物能刺激顶体反应的发生, 而用环氧合酶或脂氧合酶途径抑制剂, 可部分或完全阻止自发性顶体反应的发生^[27,36-37]。然而这些实验没有检测花生四烯酸或是通过上述两种氧合酶途径产生代谢产物的浓度, 因而不具有直接证明作用。脂肪酸代谢产物参与顶体反应的具体机制尚待进一步验证。

4.2 PLA₂在顶体反应过程中的信号转导通路

精子PLA₂活性的激活及其调控机制受G蛋白受体介导^[38]。ZP通过G蛋白介导刺激PLA₂激活而使精子发生AR, 加入G蛋白敏感抑制剂百日咳毒素可抑制该AR发生。但是G蛋白受体是直接激活PLA₂, 还是通过激活钙离子内流通道等其他信号通路而间接激活PLA₂尚不清楚。另一条PLA₂调节通路为DAG-PKC-MAPK途径^[39], 即DAG在刺激PKC后导致MAPK磷酸化进而激活PLA₂。DAG也可直接激活PLA₂。内源性DAG在DAG激酶抑制剂R59002作用时增加, 同时用ZP和GABA刺激豚鼠精子可以导致PLA₂活性与AR率的增加^[38]。也有人推测, PLA₂可直接被PKC激活, 因为PKC抑制剂staurosporine和chelerythrine chloride能抑制ZP、孕酮或GABA刺激精子的AA释放^[40], 但是体内实验尚未证明这一点。另一方面, PKA抑制剂14-22amide和H-89可抑制豚鼠精子在ZP、孕酮或GABA引起AA释放和AR增加, MAPK也可以通过cAMP-PKA通路而被磷酸化, 这也可能是调控精子PLA₂的另一机制^[40]。不同激活剂对PLA₂的激活由不同受体介导。孕酮诱导PLA₂激

活由类GABA_A受体介导, 而透明带诱导PLA₂激活为Gi蛋白介导^[40]。尽管有关PLA₂的信号转导通路研究取得了一定进展, 但不同的亚型是否具有相同的通路还需进一步证明。

5 雄性生殖过程中不同亚型的PLA₂

由于磷脂酶在机体中种类多而复杂, 在过去一段时间里研究进展并不多。一些PLA₂新亚型的发现和鉴定, 也为探索精浆中PLA₂与男性生殖的相关性提出了新的疑问。附性器官是否分泌不同亚型的PLA₂? 不同亚型的PLA₂对精子发生、成熟、获能等一系列生理过程如何发挥作用? 为此, 下文就目前已发现的与男性生殖相关的PLA₂亚型作一简述。

5.1 PAF-AH

PAF-AH为带负电荷、酸不稳定的蛋白质, 可使PAF失活, 成为溶血性血小板活化因子(Lyso-PAF)。PAF-AH各亚型中, 以PAF-AH-I(又称PAF-AH-VIII/VIIIB)与生殖系统最具相关性。通过基因敲除小鼠研究发现, PAF-AH-I的 $\alpha 1$ 亚基基因缺陷可致小鼠睾丸体积缩小, $\alpha 2$ 亚单位基因缺陷可致小鼠生精障碍^[41-42]。

以往有文献称, PAF不仅仅是炎症和过敏症的介质, 而且还与生殖相关。它能增进人类精子运动能力, 促进获能和顶体反应的发生^[43]。Zhu等^[44]发现, 精液中PAF-AH浓度和精子活力呈负相关, 表现为去获能作用。有人认为, PAF-AH由男性生殖道分泌, 在精液中抑制精子获能。当精液进入女性生殖道后, 由于酸性环境PAF-AH活性下降, 从而促进精子获能。然而, PAF-AH的活性下降是否会导致由精子产生的PAF浓度增加, 尚无报道。

5.2 iPLA₂-VIA

iPLA₂-VIA的编码基因为*Pla2g6*, 催化时无需钙离子参与, 其活性可以被溴烯醇内酯抑制。通过对*Pla2g6*基因敲除小鼠的研究表明, 缺乏iPLA₂-VIA的小鼠精子活力降低, 体内外受精能力受损, 但iPLA₂-VIA缺乏的母鼠生育能力正常^[26]。iPLA₂-VIA基因敲除小鼠精子运动状态与正常精子加入PLA₂阻断剂溴烯醇内酯后表现的运动状态基本相同, 精子活力与所加药物剂量和时间呈负相关。因此, iPLA₂-VIA可能成为新型男性避孕药物的作用靶点。

5.3 sPLA₂-III

sPLA₂-III分子量为18 kDa, 相应的编码基因为

Pla2g3。该基因在雄性C57BL/6小鼠睾丸组织中呈高表达,其次为大脑,两者远远高于其他器官组织的表达水平^[24]。这表明,sPLA₂-III与雄性小鼠精子发生发展必定具有重要的联系。

精子从附睾头部到尾部的运输过程中,需经历一个重要的形态学改变和生物化学修饰,即成熟过程,从而获得前向运动和识别卵细胞并受精的能力。近年发现,小鼠sPLA₂-III由附睾近端上皮细胞表达并分泌入附睾腔,而精子本身并不表达^[24]。通过对雄性小鼠*Pla2g3*基因敲除发现,缺乏sPLA₂-III不影响小鼠精子发生,但会导致成熟精子运动能力减弱,究其原因因为精子尾部鞭毛轴丝和顶体结构异常,同时精子产生ATP减少,导致与精子获能相关的酪氨酸磷酸化水平降低。

5.4 sPLA₂-X

精子在获能期间,有一部分精子(30%~40%)将提前发生顶体反应,称之为自发性顶体反应(spontaneous AR)。研究发现,小鼠sPLA₂-X(mouse group X sPLA₂, mGX sPLA₂)表达于晚期生精细胞及成熟精子的顶体中,在获能期间通过自发性顶体反应以活性酶形式释放,缺乏该酶可使小鼠精子自发性顶体反应率下降^[45]。mGX sPLA₂可以激发次优精子(sub-optimal sperm)发生自发性顶体反应,有助于受精精子的优选。同时,mGX sPLA₂缺乏的雄鼠和雌鼠交配,可致其所产仔鼠数量减少,但其对小鼠生育力的调控主要作用在精子而与卵细胞无关^[46]。

去年,Escoffier等^[47]在后续研究中发现,mGX sPLA₂可使小鼠精子活力和运动参数降低,包括获能和非获能精子的运动曲线速率(VCL)和精子头侧摆幅度(ALH)。同时,研究表明mGX sPLA₂对精子活力的抑制效能与精子的运动速率呈反比,即对高速运动精子的抑制作用明显低于对低速运动精子的抑制作用。mGX sPLA₂对精子活力的这一调控作用,展现了一条全新的精子筛选的生理学途径。

5.5 sPLA₂-IID

目前,sPLA₂-IID与精子功能的相关性研究并不多。本实验室在阐述了GABA、孕酮、透明带于精子顶体反应时激活PLA₂及其相关机制^[38-40]的基础上,又对人精子sPLA₂-IID进行了研究^[48]。采用正常生育男子标本进行处理后,通过多聚甲醛固定并用兔抗sPLA₂-IID和Alexa Fluor 488标记羊抗兔IgG进行间接免疫荧光染色观察,发现sPLA₂-IID位于人精

子头部顶体后区和尾部中段。将标本进行蛋白提取和SDS-PAGE电泳,用兔抗sPLA₂-IID和过氧化物酶标记羊抗兔IgG进行蛋白定位,证实sPLA₂-IID分子质量为16 kDa。sPLA₂-IID抗体可阻断精子超激活运动,影响其曲线速率(VCL)、精子头侧摆幅度(ALH),但不影响活动精子比例。通过台盼蓝染色计数显示,加入sPLA₂-IID抗体后精子对孕酮激发的顶体反应率明显下降,同时经GC-MS检测表明其花生四烯酸水平明显较正常发生顶体反应的精子低,表明sPLA₂-IID亚型可能参与了精子顶体反应。

6 展望

精子PLA₂是一种重要的磷脂酶类,不仅参与体内炎症、过敏反应等病理过程,还与精子发生、成熟及受精密切相关。PLA₂不同亚型分别影响着精子获能、顶体反应以及精子活力。对各种PLA₂与精子功能相关机制的研究,有助于发现新的药物作用靶点,为男性不育研究及男用避孕药物的研发指明方向。尽管对PLA₂的研究在不断深入,但是由于其复杂性,尤其是人们对其与男性生殖的相关性上的认识还非常有限,尚有许多问题亟待解决。

目前,对PLA₂亚型的研究中,大部分研究是用酸性提取液来提取哺乳动物精子中的PLA₂,这可能使得一部分大分子质量的PLA₂亚型在提取过程中受到破坏。在当前已经被鉴定的PLA₂亚型中,有一部分亚型对哺乳动物机体的生理作用尚未阐明,如sPLA₂-IIC-IIF、cPLA₂-IVB-IVF、PNPLA1、PNPLA4、PNPLA5等,不能否定其中可能有部分与雄性哺乳动物生殖相关。精子头部的PLA₂是否有部分是由精浆中的PLA₂结合,如果是则通过何种机制与之结合并且激活,尚未见报道。PLA₂亚型多达数十种,可能尚有未被发现但表达于生殖系统各组织器官的相关亚型。若干PLA₂亚型已被发现表达于睾丸、附睾、前列腺、输精管等不同解剖部位,但其具体功能尚未了解,如sPLA₂-IIA、IIC、IIE、IIF、V。在上述已发现与精子功能相关的PLA₂亚型中,其具体影响精子功能的分子生物学机制也有待进一步阐明。

PLA₂与男性生育功能相关性的深入研究,有助于人们进一步认识受精生理机制、男性不育的病理机制,并协助提高体外受精和试管婴儿的成功率,为男性不育症诊断和治疗及避孕药物设计拓宽思路,具有重大的理论与实践意义。

参考文献 (References)

- 1 Conde R, Zamudio FZ, Becerril B, Possani LD. Phospholipin, a novel heterodimeric phospholipase A₂ from *Pandinus imperator* scorpion venom. *FEBS Lett* 1999; 460(3): 447-50.
- 2 Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A₂ enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 2011; 111(10): 6130-85.
- 3 Kienesberger PC, Oberer M, Lass A, Zechner R. Mammalian patatin domain containing proteins: A family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl: S63-8.
- 4 Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Jaworski K, Ahmadian M, Sul HS. Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A₂ (AdPLA). *J Biol Chem* 2008; 283(37): 25428-36.
- 5 Kitsioulis E, Nakos G, Lekka ME. Phospholipase A₂ subclasses in acute respiratory distress syndrome. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1792(10): 941-53.
- 6 Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A research: From cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* 2011; 50(2): 152-92.
- 7 Ghosh M, Loper R, Ghomashchi F, Tucker DE, Bonventre JV, Gelb MH, *et al.* Function, activity, and membrane targeting of cytosolic phospholipase A₂ zeta in mouse lung fibroblasts. *J Biol Chem* 2007; 282(16): 11676-86.
- 8 San Pietro E, Capestrano M, Polishchuk EV, DiPentima A, Trucco A, Zizza P, *et al.* Group IV phospholipase A₂ alpha controls the formation of inter-cisternal continuities involved in intra-Golgi transport. *PLoS Biol* 2009; 7(9): e1000194.
- 9 Khakpour H, Frishman WH. Lipoprotein-associated phospholipase A₂: An independent predictor of cardiovascular risk and a novel target for immunomodulation therapy. *Cardiol Rev* 2009; 17(5): 222-9.
- 10 Tsimikas S, Tsironis LD, Tselepis AD. New insights into the role of lipoprotein(a)-associated lipoprotein-associated phospholipase A₂ in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(10): 2094-9.
- 11 Hattori K, Adachi H, Matsuzawa A, Yamamoto K, Tsujimoto M, Aoki J, *et al.* cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase. *J Biol Chem* 1996; 271(51): 33032-8.
- 12 Kono N, Inoue T, Yoshida Y, Sato H, Matsusue T, Itabe H, *et al.* Protection against oxidative stress-induced hepatic injury by intracellular type II platelet-activating factor acetylhydrolase by metabolism of oxidized phospholipids *in vivo*. *J Biol Chem* 2008; 283(3): 1628-36.
- 13 Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* 1994; 370(6486): 216-8.
- 14 Wang X, Phelan SA, Forsman-Semb K, Taylor EF, Petros C, Brown A, *et al.* Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem* 2003; 278(27): 25179-90.
- 15 Fisher AB, Dodia C. Role of phospholipase A₂ enzymes in degradation of dipalmitoylphosphatidylcholine by granular pneumocytes. *J Lipid Res* 1996; 37(5): 1057-64.
- 16 Abe A, Kelly R, Shayman JA. The measurement of lysosomal phospholipase A₂ activity in plasma. *J Lipid Res* 2010; 51(8): 2464-70.
- 17 Hiraoka M, Abe A, Shayman JA. Cloning and characterization of a lysosomal phospholipase A₂, 1-O-acylceramide synthase. *J Biol Chem* 2002; 277(12): 10090-9.
- 18 Hiraoka M, Abe A, Lu Y, Yang K, Han X, Gross RW, *et al.* Lysosomal phospholipase A₂ and phospholipidosis. *Mol Cell Biol* 2006; 26(16): 6139-48.
- 19 Uyama T, Morishita J, Jin XH, Okamoto Y, Tsuboi K, Ueda N. The tumor suppressor gene H-Rev107 functions as a novel Ca²⁺-independent cytosolic phospholipase A_{1/2} of the thiol hydrolase type. *J Lipid Res* 2009; 50(4): 685-93.
- 20 Jaworski K, Ahmadian M, Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Varady KA, Hellerstein MK, *et al.* AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med* 2009; 15(2): 159-68.
- 21 Kallajoki M, Alanen KA, Nevalainen M, Nevalainen TJ. Group II phospholipase A₂ in human male reproductive organs and genital tumors. *Prostate* 1998; 35(4): 263-72.
- 22 Masuda S, Murakami M, Matsumoto S, Eguchi N, Urade Y, Lambeau G, *et al.* Localization of various secretory phospholipase A₂ enzymes in male reproductive organs. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1686(1/2): 61-76.
- 23 Wang SK, Huang YF, Li BT, Xia XY, Wang ZZ. Detection and clinical significance of phospholipase A₂ in semen of male infertile patients. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2003; 9(2): 90-3.
- 24 Sato H, Taketomi Y, Isogai Y, Miki Y, Yamamoto K, Masuda S, *et al.* Group III secreted phospholipase A₂ regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *J Clin Invest* 2010; 120(5): 1400-14.
- 25 Muguruma K, Johnston JM. Metabolism of platelet-activating factor in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1997; 56(2): 529-36.
- 26 Bao S, Miller DJ, Ma Z, Wohltmann M, Eng G, Ramanadham S, *et al.* Male mice that do not express group VIA phospholipase A₂ produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J Biol Chem* 2004; 279(37): 38194-200.
- 27 Meizel S, Turner KO. The effects of products and inhibitors of arachidonic acid metabolism on the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool* 1984; 231(2): 283-8.
- 28 Roldan ER, Fragio C. Phospholipase A₂ activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J Biol Chem* 1993; 268(19): 13962-70.
- 29 Lessig J, Reibetanz U, Armhold J, Glander HJ. Destabilization of acrosome and elastase influence mediate the release of secretory phospholipase A₂ from human spermatozoa. *Asian J Androl* 2008; 10(6): 829-36.
- 30 Lessig J, Glander HJ, Schiller J, Petkovic M, Paasch U, Armhold J. Destabilization of the acrosome results in release of phospholipase A₂ from human spermatozoa and subsequent formation of lysophospholipids. *Andrologia* 2006; 38(2): 69-75.
- 31 Roldan ER, Shi QX. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 2007; 12: 89-104.
- 32 Fleming AD, Yanagimachi R. Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig sperma-

- tozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. *Gamete Res* 1981; 4(4): 253-73.
- 33 Garde J, Roldan ER. Stimulation of Ca^{2+} -dependent exocytosis of the sperm acrosome by cAMP acting downstream of phospholipase A_2 . *J Reprod Fertil* 2000; 118(1): 57-68.
- 34 Llanos MN, Morales P, Riffo MS. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction *in vitro*. *J Exp Zool* 1993; 267(2): 209-16.
- 35 Meizel S, Turner KO. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 1983; 161(2): 315-8.
- 36 Joyce CL, Nuzzo NA, Wilson L Jr, Zaneveld LJ. Evidence for a role of cyclooxygenase (prostaglandin synthetase) and prostaglandins in the sperm acrosome reaction and fertilization. *J Androl* 1987; 8(2): 74-82.
- 37 Lax Y, Grossman S, Rubinstein S, Magid N, Breitbart H. Role of lipoxigenase in the mechanism of acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1043(1): 12-8.
- 38 Yuan YY, Chen WY, Shi QX, Mao LZ, Yu SQ, Fang X, *et al*. Zona pellucida induces activation of phospholipase A_2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod* 2003; 68(3): 904-13.
- 39 Chen WY, Ni Y, Pan YM, Shi QX, Yuan YY, Chen AJ, *et al*. GABA, progesterone and zona pellucida activation of PLA_2 and regulation by MEK-ERK1/2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *FEBS Lett* 2005; 579(21): 4692-700.
- 40 Shi QX, Chen WY, Yuan YY, Mao LZ, Yu SQ, Chen AJ, *et al*. Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A_2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *J Cell Physiol* 2005; 205(3): 344-54.
- 41 Yan W, Assadi AH, Wynshaw-Boris A, Eichele G, Matzuk MM, Clark GD. Previously uncharacterized roles of platelet-activating factor acetylhydrolase 1b complex in mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(12): 7189-94.
- 42 Koizumi H, Yamaguchi N, Hattori M, Ishikawa TO, Aoki J, Taketo MM, *et al*. Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. *J Biol Chem* 2003; 278(14): 12489-94.
- 43 Krausz C, Gervasi G, Forti G, Baldi E. Effect of platelet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. *Hum Reprod* 1994; 9(3): 471-6.
- 44 Zhu J, Massey JB, Mitchell-Leef D, Elsner CW, Kort HI, Roubesh WE. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity affects sperm motility and serves as a decapacitation factor. *Fertil Steril* 2006; 85(2): 391-4.
- 45 Escoffier J, Jemel I, Tanemoto A, Taketomi Y, Payre C, Coatrieux C, *et al*. Group X phospholipase A_2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest* 2010; 120(5): 1415-28.
- 46 Sato H, Isogai Y, Masuda S, Taketomi Y, Miki Y, Kamei D, *et al*. Physiological roles of group X-secreted phospholipase A_2 in reproduction, gastrointestinal phospholipid digestion, and neuronal function. *J Biol Chem* 2011; 286(13): 11632-48.
- 47 Escoffier J, Pierre VJ, Jemel I, Munch L, Boudhraa Z, Ray PF, *et al*. Group X secreted phospholipase A_2 specifically decreases sperm motility in mice. *J Cell Physiol* 2011; 226(10): 2601-9.
- 48 Li K, Jin JY, Chen WY, Shi QX, Ni Y, Roldan ER. Secretory phospholipase A_2 group IID is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis of human spermatozoa. *J Androl* 2012; 33(5): 975-83.