

丝氨酸蛋白酶与生殖

尚璇 沈春玲 王铸钢*

(上海交通大学医学院附属瑞金医院实验医学研究中心, 上海 200025)

摘要 丝氨酸蛋白酶是一类以丝氨酸为活性中心的蛋白水解酶, 在哺乳动物的生命活动过程中扮演着重要的角色, 在消化、凝血、凋亡和免疫系统中的作用早已被人们所熟知。近年来, 随着对该蛋白酶家族研究的深入, 发现丝氨酸蛋白酶在不明原因的不育患者和 $ACR^{-/-}$ (acrosin)、 $PCSK4^{-/-}$ (proprotein convertase subtilisin/kexin type 4)、 $PRSS21^{-/-}$ (protease, serine, 21)、 $PRSS37^{-/-}$ (protease, serine, 37)、 $PCI^{-/-}$ (protein C inhibitor)、 $SPINKL3^{-/-}$ (serine protease inhibitor Kazal-type)等敲除小鼠模型中具有很高的出现频率。因此, 该文简要介绍了丝氨酸蛋白酶家族特点, 并在此基础上, 着重阐述了其在生殖过程中的作用。

关键词 丝氨酸蛋白酶; 受精; 精子发生; 精卵结合; 不育

Serine Proteases and Reproduction

Shang Xuan, Shen Chunling, Wang Zhugang*

(Research Center for Experimental Medicine, Shanghai Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract Serine proteases are enzymes that cleave peptide bonds in proteins, in which serine serves as the nucleophilic amino acid at the enzyme's active site. They are responsible for vital processes in mammals such as digestion, blood coagulation, apoptosis and immunity. In recent years, new developments from the function investigation of a number of serine protease have found that they have a high frequency of occurrence in unexplained infertile patients and gene-disrupted mice ($ACR^{-/-}$, $PCSK4^{-/-}$, $PRSS21^{-/-}$, $PRSS37^{-/-}$, $PCI^{-/-}$, $SPINKL3^{-/-}$). Therefore, on the basis of a brief overview of the characteristics of serine protease, we pay more attention to its role in reproduction in this review.

Keywords serine protease; fertilization; spermatogenesis; sperm-egg binding; infertility

丝氨酸蛋白酶是一类以丝氨酸为活性中心的蛋白酶家族, 根据催化活性的不同可以分为三类: 即胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶^[1-2]。在长期进化过程中, 这些蛋白酶的序列出现较大的差异, 但都保持着由N-端结构域和C-端结构域构成的相对稳定的核心催化结构, 因此催化机制相同。它们的活性部位都含有Ser、His和Asp三种残基, 其中Asp和His位于N-端结构域, 确保催化中心三联体的结构稳

定和功能活性; 而Ser位于C-端结构域, 主要行使丝氨酸蛋白酶的催化功能^[3-4]。

随着时间的推移, 丝氨酸蛋白酶衍生出了多种多样的生物学功能。从功能进化角度看, 丝氨酸蛋白酶的功能越来越特异。原核生物的丝氨酸蛋白酶主要执行降解功能或食物消化功能, 这些功能大多是直接完成的。真核生物丝氨酸蛋白酶的生理功能是通过一系列的酶或蛋白质激活而

收稿日期: 2016-05-13 接受日期: 2016-07-29

国家自然科学基金(批准号: 81430028)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54656097, E-mail: zhugangw@shsmu.edu.cn

Received: May 13, 2016 Accepted: July 29, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81430028)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54656097, E-mail: zhugangw@shsmu.edu.cn

网络出版时间: 2016-09-19 11:04:15 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160919.1104.008.html>

完成。丝氨酸蛋白酶为适应这些新的功能而产生分化,在分化过程中,主要依靠与其他已有的功能结构域融合形成新的蛋白质,从而发展出新的功能^[4]。丝氨酸蛋白酶约占已知蛋白酶的三分之一,在哺乳类动物生长发育的许多方面发挥重要而广泛的生理作用,包括胚胎发育、组织重建、细胞分化与凋亡、血管生成等^[5]。近年来,越来越多的丝氨酸蛋白酶及其抑制剂被定位在精子质膜、顶体膜和雄性生殖器官内,其在生殖方面的重要性也逐渐被人们认识和了解(表1和表2)。本文对目前已经发现并确定在生殖过程中具有一定作用的丝氨酸蛋白酶进行了简要的归纳和总结。

1 丝氨酸蛋白酶在精子发生过程中的作用

精子发生过程可以分为三个阶段:首先是经过无数次有丝分裂的精原细胞,一部分增殖分化为精母细胞;之后这些精母细胞进行一次减数分裂产生

单倍体圆形精子细胞,在精子发生过程中,减数分裂是一个非常关键的过程,主要特点是,细胞仅进行一次DNA复制,连续进行两次成熟分裂,染色体数目减少一半;最后是精子的变态阶段,经过显著的形态结构变化,最终成为蝌蚪状的精子^[7-8]。

精子发生作为一个集有丝分裂、减数分裂、形态改变于一体的过程,有许多蛋白酶及其抑制剂参与其中,一旦两者间的平衡被打破,就可能导致精子形成异常。蛋白酶C抑制剂基因(*protein C inhibitor, PCI*)是一个广泛表达的基因,其表达产物在人体的许多器官和组织液中都能检测到,而在精浆中的表达水平最高。经比对发现,小鼠*PCI*表达产物的氨基酸序列与人该基因的表达产物高度同源,尤其是重要的功能结构域。与人体不同的是,小鼠*PCI*转录产物仅在雌性小鼠卵巢和雄性小鼠的生殖道内检测到。作为丝氨酸蛋白酶抑制剂,*PCI*可以调节包括顶体酶在内的多种蛋白酶活性^[9-10]。近年来,随着

表1 哺乳动物精子中丝氨酸蛋白酶(根据参考文献[6]修改)

Table 1 Serine proteases in mammalian sperm (modified from reference [6])

名称 Name	方法 Method	定位 Localization	精子发生时期 Spermatogenesis stage
ACR	IC, proteomics	Acrosome, OAM, secreted	Round spermatids to mature sperm
PCSK4	IC, IEM	Acrosome	Spermatocytes, round spermatids
TESP1	IC, WB, proteomics	Acrosome Membrane	Mature sperm
TESP2	IC, WB, proteomics	Acrosome Membrane	Mature sperm
TESP4	IC, WB	Acrosome	Mature sperm
PRSS21	IC, WB	Plasma membrane	Cauda epididymal sperm
PRSS37	IC	Nd	Elongating spermatids
PA	ACT	Plasma membrane	Acquired from genital tract
BSP66	IC, WB	Acrosome-plasma membrane	Mature sperm, round spermatids
26S Proteasome	IC, ACT	Acrosome OAM	Mature sperm
PRSS41	WB	Membrane	Spermatogonia, spermatocytes, spermatids
PRSS42	WB	Membrane, cytoplasm	Secondary spermatocytes, spermatids
PRSS43	WB	Membrane	Spermatocytes, spermatids
PRSS44	Proteomics	Cytoplasm	Spermatocytes, spermatids
HTRA2	Proteomics	Nd	Cauda epididymal spermatozoa

IC: 免疫组化; WB: 免疫印迹; ACT: 活性; IEM: 免疫电镜; OAM: 顶体外膜; Nd: 尚未确定; PCSK4: subtilisin/kexin type前蛋白转化酶4; TESP1: 睾丸丝氨酸蛋白酶1; PRSS21: 丝氨酸蛋白酶家族成员21; PA: 纤溶酶原激活剂。

IC: immunocytochemistry; WB: Western blot; ACT: activity; IEM: immune electron microscopy; OAM: outer acrosomal membrane; Nd: not determined. ACR: acrosin; PCSK4: proprotein convertase subtilisin/kexin type 4; TESP1: testicular serine proteases 1; PRSS21: protease, serine, 21; PA: plasminogen activator; BSP66: bovine sperm protease, 66 kDa; HTRA2: high temperature requirement A2.

表2 哺乳动物精子膜上和雄性生殖道内丝氨酸蛋白酶抑制剂(根据参考文献[6]修改)
Table 2 Serine protease inhibitors on the surface of sperm or in male reproductive tract fluids (modified from reference [6])

名称 Name	方法 Method	定位 Localization
Acrosin trypsin-inhibitor, Kazal type	cDNA cloning purification, RT-PCR	Sperm bound seminal plasma, epididymis, seminal vesicles, prostate, Cowper's glands
BSP66 inhibitor	ACT	Seminal plasma
PCI, SERPIN5	IC, WB	Seminal vesicle, testis, acrosome of mature sperm
SERPINE2	IC, WB	Seminal vesicle, epididymis, testis, coagulating gland, vas deferens, prostate
SPINKL	IC, WB	Seminal vesicles
Caltrin I	IC, WB	Prostate, sperm bound
SPI, SPI3	IC, library screen, WB, ISH, RT-PCR	Embryo tissues, testis, germ cells
Nexin	KO	Flagellum
RKIP	IC, NB	Testis, epididymis
SPINK2	IC	Testicular spermatogenic cells, testicular sperm, mature sperm
SPINK8, 10, 11, 12	ISH	Epididymis
SPINK13	IC, WB	Epididymis
WFDC10	ISH	Epididymis
HONGRES1	NB	Epididymis
Eppin	Proteomics, WB	Epididymis
Alpha-1-antitrypsin	Purification	Epididymal fluid

NB: 诺瑟杂交; ISH: 原位杂交; KO: 敲除; PCI: 蛋白C抑制剂; SERPIN5: 丝氨酸蛋白酶抑制剂5; Caltrin I: 钙转运抑制剂; SPI: 丝氨酸蛋白酶抑制剂。

NB: Northern blot; ISH: *in situ* hybridization; KO: knock-out. PCI: protein C inhibitor; SERPIN5: serine protease inhibitor 5; SPINKL: serine protease inhibitor Kazal-type like protein; Caltrin I: calcium transport inhibitor I; SPI: serine protease inhibitor; RKIP: raf kinase inhibitor protein; SPINK2: serine protease inhibitor Kazal-type 2; WFDC10: WAP four-disulfide core domain protein; HONGRES1: epididymis-specific serine protein inhibitor.

技术的进步, 该基因的小鼠敲除模型逐渐建立起来, *PCI*^{-/-}雌性敲除小鼠生育正常, 而雄性敲除小鼠则表现出不育的症状。进一步研究发现, 雄性小鼠性行为正常, 但是体外培养液中游离出来的精子与野生型相比尾巴缺失、头部变形、活力下降。有文献报道, 睾丸的PCI可以精确定位到精子的顶体内膜上, 它可以与多种丝氨酸蛋白酶结合形成二聚体^[11], 调节这些酶的活性状态^[12]。故研究者推测, 雄性敲除小鼠体内PCI缺失会导致睾丸内的一些蛋白酶异常活跃, 它们破坏支持细胞完整性和血睾屏障, 最终引发精子发生异常。*SPINK2*(serine protease inhibitor Kazal-type 2)的表达产物也是一种蛋白酶抑制剂, 主要存在于睾丸、附睾和生精小管中。临床数据显示, 无精症男性患者睾丸内*SPINK2*的表达水平与正常男性相比降低了4倍。这提示我们, *SPINK2*可能与男性生殖健康有关^[13]。小鼠的*SPINK2*基因仅在睾丸的生殖细胞内特异性表达。为了研究该基因在生物体内的功

能, 研究人员构建了敲除小鼠。与野生型相比, 敲除小鼠的体重和生长速度正常, 但雄性敲除小鼠的生育力显著下降。解剖发现, 敲除小鼠的睾丸与体重比明显低于野生型小鼠, 这说明敲除小鼠睾丸发育障碍。免疫组织化学结果显示, 精子数量减少、形态异常、凋亡增加、睾丸内蛋白酶活性升高^[14]。这与*PCI*^{-/-}敲除小鼠的表型一样。这些由于蛋白酶抑制剂缺失而引起的形态异常的精子不能穿过透明带与卵子结合, 最终表现为雄性敲除小鼠不育^[9]。

精子异常包括两个方面: 形态异常和数量异常。精子发生速率高但效率低, 为了保证精子发生的正常进行, 避免过多的精子产生, 防止异常的精子发生, 凋亡过程在精子发生中发挥了巨大的作用。据文献报道, 许多丝氨酸蛋白酶参与了精子的凋亡过程。*HtrA2*(high temperature requirement A2)是核基因编码的线粒体丝氨酸蛋白酶, 具有强烈促凋亡功能, 在凋亡信号诱导下由线粒体释放到胞

质, 转化成具有促凋亡功能的成熟分子形式。临床数据显示, 多名慢性前列腺炎患者的精子中检测到HtrA2的mRNA和蛋白质水平增高^[15]。HtrA2的表达以及从线粒体到胞质的释放是受胞外凋亡信号调控的。IL-1 β (interleukin-1 β)和TNF- α (tumor necrosis factor- α)是参与多种急性和慢性炎症反应的炎症因子家族成员, 它们直接引发了HtrA2参与的细胞凋亡反应。释放到胞质中的HtrA2通过两种方式诱导细胞凋亡, 包括胱冬肽酶(caspase)依赖和不依赖途径。前者是通过HtrA2取代IAP(inhibitor of apoptosis protein)与胱冬肽酶结合, 从而解除IAP对胱冬肽酶的抑制作用实现的; 后者则是依赖HtrA2自身的丝氨酸蛋白酶活性实现的。正常的凋亡反应是保证精子质量、维持精子数量所必需的, 但过度凋亡会导致精子数量下降, 从而影响生育^[16]。该现象在动物实验中也得到了验证。

小鼠睾丸中存在四种特异性表达的丝氨酸蛋白酶——PRSS41(protease, serine, 41)/TESSP1(testis-specific serine protease 1)、PRSS42/TESSP2、PRSS43/TESSP3和PRSS44/TESSP4。其中, 编码PRSS41/TESSP1的基因位于17号染色体上, 该基因的表达产物以GPI锚定式(glycosylphosphatidylinositol-anchored)结合在生殖细胞和睾丸支持细胞的内侧以及精母细胞和精子细胞的高尔基体上。为了研究PRSS41/TESSP1在精子发生中的作用, 在体外睾丸组织培养体系中加入其抗体, 结果发现, 一部分生精小管内生殖细胞数目减少。为了确定是哪种细胞的变化引起的, 作者检测了精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞标记基因的表达情况。精原细胞数目与正常相比增多了1.7倍, 而后期的生殖细胞数目都有减少趋势。这说明生精小管的生殖细胞存在减数分裂受阻的现象, 且该阻滞发生在精原细胞时期。有文献报道, 精原细胞在减数分裂期的长时间逗留可以导致生殖细胞凋亡。TUNEL实验进一步验证了这些滞留生殖细胞的最终归宿, 即凋亡^[17]。

编码PRSS42/TESSP2、PRSS43/TESSP3和PRSS44/TESSP4这三种蛋白酶的基因都位于小鼠9号染色体。2013年的一篇生殖医学文献对这三个基因进行了研究, 它们的表达产物在生殖细胞中的表达时间不同, 定位也不同^[17]。考虑到PRSS41/TESSP1与这三个基因的表达产物属于同一家族, 我们用相同的方法对它们在精子发生过程中的功能进行了研究,

即在小鼠睾丸体外培养条件下加入这三种蛋白酶的抗体。与PRSS41/TESSP1抗体一样, PRSS42/TESSP2和PRSS43/TESSP3抗体也会引起精原细胞的减数分裂受阻。加入PRSS42/TESSP2抗体后精子发生会滞留在次级精母细胞阶段; 加入PRSS43/TESSP3抗体后, 精子发生则滞留在初级精母细胞阶段。睾丸组织切片显示, 加入抗体后生精小管内精子数量大幅度下降, 凋亡细胞数目急剧增加。由此可见, 丝氨酸蛋白酶在调节精子凋亡维持精子正常数量上扮演着重要的角色。遗憾的是, 由于抗体自身的限制性: 一方面是PRSS44/TESSP4的抗体不能做免疫组化, 另一方面是PRSS44/TESSP4位于细胞质, 抗体不能透过细胞膜与之结合。因此, 该实验没能揭示PRSS44/TESSP4在精子发生过程中的作用^[18]。

2 丝氨酸蛋白酶在精子获能迁移中的作用

精子成熟后储存在附睾中, 在交配时, 大量的精子被射到雌性生殖道内。这些精子在迁移过程中需要经过三个关卡的筛选: 对于大部分阴道射精的哺乳动物来说, 第一道障碍是宫颈, 在此处, 约70%的形态异常和动力低下的精子会被宫颈黏液黏附而被过滤掉; 第二道障碍是由幽长而狭窄的管道组成的宫管连接部(uterotubal junction, UTJ); 第三道障碍是输卵管本身, 它只允许活化精子结合到上皮细胞并帮助其完成受精使命^[19]。而精子获能后, 才具备由子宫向输卵管迁移的动力。在附睾内运行成熟的精子表面覆盖了一层叫做去能因子的糖肽或糖蛋白, 如丝氨酸蛋白酶抑制剂E2(serine protease inhibitor E2, SERPINE2)^[20]和SPINKL(serine protease inhibitor Kazal-type like protein)^[21]。它们可以掩盖精卵识别和融合位点, 避免精子在到达雌性生殖道前过早暴露。而精子获能的本质就是暴露其表面特异性抗原, 使之与卵子发生特异性结合, 故精子获能的第一步就是在精子进入雌性生殖道后去除这些去能因子。尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator, u-PA)是一种丝氨酸蛋白酶, 主要在输精管和生精小管的上皮细胞中合成。当精子从雄性生殖道射出时, 通过与精子膜上的特异性受体相互作用结合到精子的头部^[22], u-PA可以触发精子细胞膜上的蛋白级联水解反应, 使精子膜结构发生改变。而这种膜结构变化是获能的重要步骤, 也是顶体反应和精卵识别的前奏^[23-24]。

精子获能在子宫和输卵管内进行,是多步骤、多时相的有序过程,许多酶参与其中。通过对相关文献的搜索和整理,我们研究了丝氨酸蛋白酶活性改变在生物体内外对精子获能的影响。*PCSK4*(proprotein convertase subtilisin/kexin type 4)是睾丸生精细胞合成的一种丝氨酸蛋白酶,定位在睾丸上皮细胞和精子中。为了了解其在生物体内的功能,作者对*PCSK4*^{-/-}敲除小鼠进行了研究,发现雄性敲除小鼠的精子表现出获能加快、顶体反应发生提前、与透明带结合能力下降、生育力显著下降的表型。其中的分子机制尚不清楚,但多篇文献提到生精细胞产生的信号分子前体需要PCSKs的剪接加工才能行使功能,这提示PCSK4可能是通过改变精子细胞中的信号通路而引发这些表型的^[25-26]。抑制剂的使用是体外条件下研究酶活性最常用和最有效的方法。在精子游离液中加入丝氨酸蛋白酶抑制剂后,显微镜下观察发现,游离出来的精子运动速率显著下降,即精子获能异常^[6]。奇怪的是,虽然有些精子获能正常,但仍不能穿过雌性生殖道。*PRSS37*是在塑形期精子中出现而在成熟精子中消失的一种功能未知的丝氨酸蛋白酶,*PRSS37*^{-/-}敲除小鼠在体内生殖实验中表现出精子由子宫向输卵管迁移障碍和雄性小鼠不育的表型。但免疫组化结果显示,精子发生、形态、获能均正常。这说明,*PRSS37*可能在精子获能后期的某一阶段发挥作用^[27-28]。由此可见,不同的丝氨酸蛋白酶在精子获能的不同阶段行使功能,但对于精子穿过雌性生殖道到达输卵管都至关重要。

3 丝氨酸蛋白酶在精卵识别融合过程中的作用

射入阴道穹窿的精子,在子宫内获能后经过长途跋涉,到达输卵管时只剩少量精子,这部分精子与卵子在壶腹部相遇。卵子表面包裹着一层糖蛋白——透明带(zona pellucida, ZP)。对于大多数哺乳动物而言,透明带由三种组分组成:ZP1、ZP2和ZP3。ZP3介导精子与透明带的初级识别,诱发顶体反应。ZP2介导精子与透明带的次级识别与结合,并阻止多精受精。ZP1将ZP2与ZP3连接起来,构成透明带的三维结构。透明带表面的精子结合受体ZP3,与精子表面的卵子结合蛋白结合后诱发顶体反应。过早的顶体反应不利于精子穿过透明带,只有发生

顶体反应的精子才有可能穿过透明带。虽然近年来有文献报道,已经发生顶体反应的精子仍可与卵子融合^[29-30]。但是,与正常精子相比,这些精子的低受精率表明顶体反应发生时间的重要性^[30]。*SPINK13*是大鼠附睾特异性表达基因,其表达产物是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,结合在精子的顶体部位,防止精子提前发生顶体反应。该基因敲除后,雄性小鼠出现精子顶体反应发生率在获能后期显著提高和生育力下降的表型^[31]。

顶体反应使精子顶体内所含的顶体酶都释放出来,包括ACR、PRSS21等,它们大部分属于丝氨酸蛋白酶,通过水解透明带来促进精卵融合^[32]。考虑到穿过透明带是精卵结合的先决条件,普遍认为这些蛋白水解酶是决定受精成功的关键。体外条件下,丝氨酸蛋白酶和顶体酶的抗体能明显抑制精子穿过透明带^[33-34],这在一定程度上验证了我们的猜测。而*ACR*^{-/-}^[35-36]、*PRSS21*^{-/-}^[37]单敲除小鼠模型和*ACR*^{-/-}/*PRSS21*^{-/-}双敲除小鼠模型的构建^[38-39],彻底揭开了这个谜团,结果与预期有一定差距,这些蛋白酶并没有我们想象的那么重要。*ACR*^{-/-}敲除小鼠的生育力正常,仅在体外生殖实验中表现出精子穿过ZP和受精时间延长^[36]。*PRSS21*^{-/-}敲除小鼠的生育力也是正常的,但其精子在体外实验中表现出卵细胞透明带上顶体反应发生率下降、透明带穿过率下降以及精卵融合率下降等严重的功能障碍^[37]。*ACR*^{-/-}/*PRSS21*^{-/-}敲除小鼠的精子在体外生殖实验中表现出与*PRSS21*^{-/-}精子相同的功能缺陷,与其不同的是,双敲除小鼠生育力下降。考虑到ACR和PRSS21的底物特异性和抑制剂特异性存在一定的相似性,而且在体外实验中,ACR可以显著加速PRSS21的活化^[40],故推测这两种酶在生物体内外可能存在功能上的补偿现象。作为顶体内参与透明带水解的主要酶,ACR和PRSS21的同时缺失导致*ACR*^{-/-}/*PRSS21*^{-/-}双敲除小鼠出现了生育力下降的表型。可见,顶体内的丝氨酸蛋白酶在精卵识别融合过程中发挥着重要作用。值得注意的是,在体外生殖实验中,将*PRSS21*^{-/-}或*ACR*^{-/-}/*PRSS21*^{-/-}的精子直接注射到雌性小鼠的子宫内或将精子与子宫液共孵育都可以显著提高敲除小鼠精子与卵细胞的结合率,这说明雌性生殖道内可能存在某些物质,在一定程度上弥补了精子功能的缺陷^[38]。

精子穿过透明带后与卵子发生特异性的识别

与融合。精子膜上的受精素与卵子膜上的整合素和CD9(cluster of differentiation 9)参与了精子膜和卵子膜的融合。在CD9存在的情况下,精子膜上的受精素与卵子膜上的整合素受体结合后,受精素的融合肽区诱导相邻的精子膜与卵子膜融合。受精素是由受精素 α 和受精素 β 组成的异二聚体,作为ADAM(a disintegrin and metalloprotease gene family)家族中的一员,定位在哺乳动物精子的质膜上。在生精细胞中,这两个亚基是以前体的形式存在,在精子发生过程中,需要经过多种丝氨酸蛋白酶的切割才能变成有活性的受精素并准确地定位到成熟精子的头部。当这些蛋白酶受到抑制或缺失时,受精素形成异常^[41]。受精素除了参与精卵融合外,在精子与透明带的结合、精子在雌性生殖道内由子宫向输卵管的迁移等许多方面发挥重要作用。一旦缺失,会导致雄性小鼠生育力大大下降甚至不育。这一点,在敲除小鼠模型*Fertilin β* ^{-/-}上也得到了验证^[42-43]。可见,丝氨酸蛋白酶在精卵识别与融合过程中也发挥了巨大的作用。

4 丝氨酸蛋白酶在单精受精中的作用

正常情况下,只有一个精子可与卵子结合形成受精卵,即单精受精。能达到受精地点的精子数不多可能是一个因素,但主要是由于卵子皮质颗粒的释放。哺乳动物的皮质颗粒中含多种蛋白酶和糖蛋白,精卵结合后,卵细胞胞质内的皮质颗粒边移边以胞吐方式释放。水解酶可以改变透明带的结构,使其他精子不能穿过,从而保证单精受精。近年来,人们逐渐认识到多精受精可能会造成胚胎异常和夭折,同时也意识到单精受精的重要性,因此对于该过程进行了更为深入的研究。

在不影响精子识别并穿过ZP和精卵融合的前提下,体外用一定的电刺激(150 V、1.0 msec)诱导仓鼠卵的颗粒细胞内容物释放。将释放物和普通培养液分别与新鲜仓鼠或小鼠的卵细胞共孵育120 min后加入获能精子,与对照相比,该组精子与ZP结合率和穿过率均为0。可见,颗粒细胞内容物中的某种水解酶可能改变了卵细胞ZP的结构,并且这种改变不分物种,没有种族特异性。之前有文献报道,已获能的仓鼠精子通过受体与ZP结合,而这个受体对胰蛋白酶很敏感,易被其降解^[44]。因此推测,颗粒细胞释放物中发挥作用的蛋白酶可能是胰蛋白酶。为了证明这一假设,在上述的共培养体系中加入胰蛋白酶抑制

剂,显微镜下观察到穿过透明带的精子数目显著增加。这说明,参与ZP结构改变的颗粒细胞分泌物确实是丝氨酸蛋白酶家族的胰蛋白酶^[45]。棘皮动物的蛋白酶抑制剂实验进一步证实了丝氨酸蛋白酶家族成员在改变透明带结构和避免多精受精机制中发挥了重要作用^[46]。

纤溶酶(plasmin)是一种丝氨酸蛋白酶,在静息状态下以酶原的形式存在于输卵管、透明带和卵膜上,在体外生殖实验中可以显著降低精子穿过透明带的数目,对遏制多精受精有重要作用。由于分子机制尚不明确,研究人员对该酶发挥作用的途径提出了三种假说。第一种假说认为纤溶酶原(plasminogen)从皮质颗粒释放出来,被ZP和卵膜上的激动剂活化。有活性的纤溶酶通过改变ZP的结构,使其对其他蛋白酶不敏感并不被其他精子穿过,亦称透明带反应。这种透明带反应可以很好地解释仓鼠和小鼠的单精受精,但对有蹄类动物而言,它们的透明带反应发生在精卵融合之前,故用这个理论来解释哺乳动物的单精受精显然是不科学的。第二种假说的观点是纤溶酶原或纤溶酶对精子功能有决定性的影响,可以降低它们穿过透明带的能力。然而,在实验的浓度范围内,精子的功能并没有受到影响。相反,低浓度的纤溶酶还可以增强精子活力。可见,结合到卵细胞上精子数目的减少不是由于纤溶酶原或纤溶酶引发的精子功能障碍造成的。第三种假说认为纤溶酶降低与ZP结合的精子数目可能通过以下两种方式:利用空间位阻取代精子在ZP上的位置和分离已经结合在ZP上的精子。体外条件下,提前30 min和与精子同时加入到卵细胞培养液的纤溶酶几乎可以等量地减少与ZP结合的精子数量,这说明纤溶酶不是通过空间位阻取代来减少与ZP结合的精子数目的^[47]。虽然三种假说在解释丝氨酸蛋白酶遏制多精受精作用机制上存在瑕疵和漏洞,但都肯定了其在该过程中的重要作用。

5 展望

丝氨酸蛋白酶作为激动剂或抑制剂参与许多特异和非特异蛋白质降解的生理过程,这些蛋白质常是信号通路上的关键点^[6]。为了确定它们在健康和疾病状态下的时空性表达,我们对多样性的蛋白质水解活动进行了研究和分类。目前对丝氨酸蛋白酶的研究主要包括结构和功能两个方面,根据其催

化活性的不同可以将其分为胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶。其中,最具功能多样性的胰蛋白酶在许多重要生命活动过程中扮演着重要角色,例如,消化、凝血、纤溶、发育、细胞凋亡、免疫力和生殖^[1-5]。从1975年开始,人们就已经发现,睾丸生精上皮细胞和生殖细胞表达的丝氨酸蛋白酶参与了受精过程,随着技术的进步和研究的深入,其在生殖过程中的重要性逐渐突显出来。通过丝氨酸蛋白酶抑制剂的使用和基因敲除小鼠模型的构建,我们发现,丝氨酸蛋白酶几乎参与了哺乳动物生殖的每一个环节,从睾丸内精子发生到子宫内获能,从在雌性生殖道内迁移到与卵细胞表面透明带识别与结合,从顶体反应到精卵识别与融合。参与这些过程的丝氨酸蛋白酶的表达具有严格的时空特异性,而它们的失活绝大多数是通过各自的抑制剂实现的^[1]。随着研究对象范围的扩大,人们逐渐发现,一些在哺乳动物精子中发现的丝氨酸蛋白酶,在体外受精物种的精子中也存在。可见,丝氨酸蛋白酶在进化上具有一定的保守性。考虑到丝氨酸蛋白酶属于限制性蛋白酶,其对底物具有高度专一性。所以不同种属的生物参与生殖的丝氨酸蛋白酶应该具有种属特异性,因此我们推测,这可能是不同生物间存在生殖隔离的一个因素。遗憾的是,我们对丝氨酸蛋白酶在种属间的特异性一无所知^[41]。哺乳动物受精是一个有序的过程,多种蛋白酶相互协调以确保其正常进行。由于技术方法有限,目前还未找到每种酶的特异性底物,确定其发挥作用的时空,而且丝氨酸蛋白酶催化功能具有多样性,因此不能将一种酶与一个具体的生殖环节对应起来^[1]。虽然还有好多问题没有解答、好多疑团没有解开,但通过对已有数据的分析,可以确信丝氨酸蛋白酶参与了生殖全程,并且具有十分重要的作用,任何一个环节的缺失或异常,都会引发生殖障碍。这使我们对丝氨酸蛋白酶的功能有了更加全面的认识,也为今后寻找不孕不育病因和研发避孕药提供了实验基础。

参考文献 (References)

- 1 Page MJ, Di Cera E. Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(7/8): 1220-36.
- 2 汪世华, 王文勇, 黄益洲, 林琳, 沙莉. 丝氨酸蛋白酶研究进展. *福建农业学报*(Wang Shihua, Wang Wenyong, Huang Yizhou, Lin Lin, Sha Li. On serine protease. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*) 2007; 22(4): 453-6.
- 3 Hedstrom L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* 2002; 102(12): 4501-24.
- 4 Kraut J. Serine proteases: Structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem* 1977; 46: 331-58.
- 5 Di Cera E. Serine proteases. *IUBMB Life* 2009; 61: 510-5.
- 6 Cesari A, Monclus Mde L, Tejon GP, Clementi M, Fornes MW. Regulated serine proteinase lytic system on mammalian sperm surface: There must be a role. *Theriogenology* 2010; 74(5): 699-711.
- 7 Okabe M. Mechanism of fertilization: A modern view. *Exp Anim* 2014; 63(4): 357-65.
- 8 Marcello MR, Singaravelu G, Singson A. Fertilization. *Adv Exp Med Biol* 2013; 757: 321-50.
- 9 Uhrin P, Dewerchin M, Hilpert M, Chrenek P, Schofer C, Zechmeister-Machhart M, *et al.* Disruption of the protein C inhibitor gene results in impaired spermatogenesis and male infertility. *J Clin Invest* 2000; 106(12): 1531-9.
- 10 Zheng X, Zechmeister-Machhart M, Uhrin P, Hufnagl P, Geiger M, Binder BR. Effect of protein C inhibitor (PCI) on *in vitro* fertilization. *Immunopharmacology* 1996; 33(1/2/3): 140-2.
- 11 He S, Lin YL, Liu YX. Functionally inactive protein C inhibitor in seminal plasma may be associated with infertility. *Mol Hum Reprod* 1999; 5(6): 513-9.
- 12 Zheng X, Geiger M, Ecke S, Bielek E, Donner P, Eberspacher U, *et al.* Inhibition of acrosin by protein C inhibitor and localization of protein C inhibitor to spermatozoa. *Am J Physiol* 1994; 267(2 Pt 1): C466-72.
- 13 Rockett JC, Patrizio P, Schmid JE, Hecht NB, Dix DJ. Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. *Mutat Res* 2004; 549(1/2): 225-40.
- 14 Lee B, Park I, Jin S, Choi H, Kwon JT, Kim J, *et al.* Impaired spermatogenesis and fertility in mice carrying a mutation in the Spink2 gene expressed predominantly in testes. *J Biol Chem* 2011; 286(33): 29108-17.
- 15 李儒楷. 丝氨酸蛋白酶差异表达及基因多态性与男性不育的相关性研究(硕士论文). 吉林大学(Li Rukai. Study on relations between differential gene expression and polymorphism of HtrA2 and male infertility. Jilin University) 2009.
- 16 Hu XY, Xu YM, Qiao Y, Wu DL, Sa YL, Fu Q, *et al.* Reduced semen quality in chronic prostatitis patients that induce the release of apoptotic protein Omi/HtrA2 from spermatozoa. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007; 10(1): 104-8.
- 17 Yoneda R, Kimura AP. A testis-specific serine protease, Prss41/Tessp-1, is necessary for the progression of meiosis during murine *in vitro* spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441(1): 120-5.
- 18 Yoneda R, Takahashi T, Matsui H, Takano N, Hasebe Y, Ogiwara K, *et al.* Three testis-specific paralogous serine proteases play different roles in murine spermatogenesis and are involved in germ cell survival during meiosis. *Biol Reprod* 2013; 88(5): 118.
- 19 Kolle S. Transport, distribution and elimination of mammalian sperm following natural mating and insemination. *Reprod Domest Anim* 2015; 50 Suppl 3: 2-6.
- 20 Lu CH, Lee RK, Hwu YM, Chu SL, Chen YJ, Chang WC, *et al.* SERPINE2, a serine protease inhibitor extensively expressed in adult male mouse reproductive tissues, may serve as a murine sperm decapacitation factor. *Biol Reprod* 2011; 84(3): 514-25.

- 21 Lin MH, Lee RK, Hwu YM, Lu CH, Chu SL, Chen YJ, *et al.* SPINKL, a Kazal-type serine protease inhibitor-like protein purified from mouse seminal vesicle fluid, is able to inhibit sperm capacitation. *Reproduction* 2008; 136(5): 559-71.
- 22 Huarte J, Belin D, Bosco D, Sappino AP, Vassalli JD. Plasminogen activator and mouse spermatozoa: Urokinase synthesis in the male genital tract and binding of the enzyme to the sperm cell surface. *J Cell Biol* 1987; 104(5): 1281-9.
- 23 Talbot P, Chacon R. Detection of modifications in the tail of capacitated guinea pig sperm using lectins. *J Exp Zool* 1981; 216(3): 435-44.
- 24 Talbot P, Franklin LE. Trypsinization increases lectin-induced agglutinability of uncapacitated guinea pig sperm. *J Exp Zool* 1978; 204(2): 291-7.
- 25 Gyamera-Acheampong C, Tantibhedhyangkul J, Weerachayanukul W, Tadros H, Xu H, van de Loo JW, *et al.* Sperm from mice genetically deficient for the PCSK4 proteinase exhibit accelerated capacitation, precocious acrosome reaction, reduced binding to egg zona pellucida, and impaired fertilizing ability. *Biol Reprod* 2006; 74(4): 666-73.
- 26 Gyamera-Acheampong C, Mbikay M. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4 in mammalian fertility: A review. *Hum Reprod Update* 2009; 15(2): 237-47.
- 27 Shen C, Kuang Y, Liu J, Feng J, Chen X, Wu W, *et al.* Prss37 is required for male fertility in the mouse. *Biol Reprod* 2013; 88(5): 123.
- 28 Shen C, Wang J, Zhuang H, Liu J, Wang X, Chen X, *et al.* Establishment, characterization, and application of pAcr-SP-NTP-EGFP transgenic mice in visualizing the oviduct-migrating ability of sperm from Prss37-null mice. *Acta Biochim Biochys Sin* 2015; 47(6): 466-73.
- 29 Jin M, Fujiwara E, Kakiuchi Y, Okabe M, Satouh Y, Baba SA, *et al.* Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during *in vitro* fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(12): 4892-6.
- 30 Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M, Yanagimachi R. Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(50): 20008-11.
- 31 Ma L, Yu H, Ni Z, Hu S, Ma W, Chu C, *et al.* Spink13, an epididymis-specific gene of the Kazal-type serine protease inhibitor (SPINK) family, is essential for the acrosomal integrity and male fertility. *J Biol Chem* 2013; 288(14): 10154-65.
- 32 Saldivar-Hernandez A, Gonzalez-Gonzalez ME, Sanchez-Tusie A, Maldonado-Rosas I, Lopez P, Trevino CL, *et al.* Human sperm degradation of zona pellucida proteins contributes to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13: 99.
- 33 Veaute C, Furlong LI, Cameo M, Harris JD, Vazquez-Levin MH. Antiacrosin antibodies and infertility. II. Gene immunization with human proacrosin to assess the effect of immunity toward proacrosin/acrosin upon protein activities and animal fertility. *Fertil Steril* 2009; 91(4): 1256-68.
- 34 Cesari A, Sanchez JJ, Biancotti JC, Vazquez-Levin MH, Kaiser G, Palma GA, *et al.* Immunolocalization of bovine sperm protease BSp120 by light and electron microscopy during capacitation and the acrosome reaction: Its role in *in vitro* fertilization. *Mol Reprod Dev* 2004; 69(4): 411-8.
- 35 Baba T, Azuma S, Kashiwabara S, Toyoda Y. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem* 1994; 269(50): 31845-9.
- 36 Adham IM, Nayernia K, Engel W. Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod Dev* 1997; 46(3): 370-6.
- 37 Yamashita M, Honda A, Ogura A, Kashiwabara S, Fukami K, Baba T. Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes Cells* 2008; 13(10): 1001-13.
- 38 Kawano N, Kang W, Yamashita M, Koga Y, Yamazaki T, Hata T, *et al.* Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile *in vitro*. *Biol Reprod* 2010; 83(3): 359-69.
- 39 Zhou C, Kang W, Baba T. Functional characterization of double-knockout mouse sperm lacking SPAM1 and ACR or SPAM1 and PRSS21 in fertilization. *J Reprod Dev* 2012; 58(3): 330-7.
- 40 Yamagata K, Murayama K, Kohno N, Kashiwabara S, Baba T. p-Aminobenzamidine-sensitive acrosomal protease(s) other than acrosin serve the sperm penetration of the egg zona pellucida in mouse. *Zygote* 1998; 6(4): 311-9.
- 41 Lum L, Blobel CP. Evidence for distinct serine protease activities with a potential role in processing the sperm protein fertilin. *Dev Biol* 1997; 191(1): 131-45.
- 42 Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, *et al.* Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 1998; 281(5384): 1857-9.
- 43 Nishimura H, Cho C, Branciforte DR, Myles DG, Primakoff P. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. *Dev Biol* 2001; 233(1): 204-13.
- 44 Hartmann JF, Gwatkin RB. Alteration of sites on the mammalian sperm surface following capacitation. *Nature* 1971; 234(5330): 479-81.
- 45 Peng Q, Yang H, Xue S, Shi L, Yu Q, Kuang Y. Secretome profile of mouse oocytes after activation using mass spectrum. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(8): 765-71.
- 46 Oulhen N, Xu D, Wessel GM. Conservation of sequence and function in fertilization of the cortical granule serine protease in echinoderms. *Biochem Biochys Res Commun* 2014; 450(3): 1135-41.
- 47 Grullon LA, Gadea J, Mondejar I, Matas C, Romar R, Coy P. How is plasminogen/plasmin system contributing to regulate sperm entry into the oocyte? *Reprod Sci* 2013; 20(9): 1075-82.