

LDH-C :睾丸重要的特异表达基因

李 宁 李建远

(山东省烟台毓璜顶医院中心实验室 山东 烟台 264000)

摘要 :乳酸脱氢酶 C(LDHC)是目前已知的最早在男性生精细胞中发现的睾丸特异同功酶。LDHC 最早通过凝胶电泳技术在人精子及睾丸生精细胞中被发现。免疫组化结果显示 LDHC 最早出现在早期的粗线期初级精母细胞中 ,其数量随着减数分裂逐渐增加。成熟精子中 LDHC 主要定位在精子尾部的主段区域。研究显示 ,乳酸脱氢酶家族的同功酶在哺乳动物细胞中无所不在 ,他们受到发育的调控 ,具有组织细胞的特异性 ,且功能多样。本文就 LDHC 的发展史及他们在帮助精子完成受精过程中的作用作一综述。

关键词 精子特异乳酸脱氢酶 ;LDH-C ;睾丸 ;精子

中图分类号 :Q75 R322.64 R335.5 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)20-3975-03

LDHC :The most important testis specific gene

LI Ning, LI Jian-yuan

(Central Laboratory, Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China)

ABSTRACT: Lactate dehydrogenase (LDHC) was the first testis specific isozyme discovered in male germ cells. LDHC was detected initially in human spermatozoa and spermatogenic cells of the testes by gel electrophoresis. Immunohistochemistry showed that LDHC was first existed in early pachytene primary spermatocytes with an apparent increase in quantity following meiosis, and it located in and on the principle piece of the sperm tail. Studies showed that the lactate dehydrogenase isozymes are ubiquitous in vertebrates, developmentally regulated, tissue and cell specific and multi-functional. Here we review the history of LDHC and the function of LDHC required for sperm to accomplish their ultimate goal, fertilization.

Key words: Sperm-specific lactate dehydrogenase; LDHC; Testis; Sperm

Chinese Library Classification(CLC): Q75 R322.64 R335.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2010)20-3975-03

精子特异性乳酸脱氢酶 (sperm-specific lactate dehydrogenase, LDHC) 是 Goldberg[1]于 1963 年在多种哺乳动物、鸟类睾丸组织和精子中发现的。它特异地存在于哺乳动物及鸟类的睾丸和精子中,与体细胞乳酸脱氢酶 A4 (LDH-A4) 和 B4 (LDH-B4) 同属于乳酸脱氢酶家族,它们都以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)为辅酶催化丙酮酸和乳酸的转化,在能量代谢中发挥重要作用。但是由于在分布上的特异性,LDH-C4 具有和其他同工酶不同的独特的理化性质,与精子的生成、代谢、获能和受精有密切关系,为精子能量代谢的一个关键酶。本文就 LDHC 发展历史及其在受精过程中的功能作一综述。

1 乳酸脱氢酶家族成员及进化关系

乳酸脱氢酶家族成员在体内通常以四聚体形式存在。体细胞内 LDH 通常由 A 亚基和 B 亚基形成同源或异源四聚体(LDHB4、LDHB3A、LDHB2A2、LDHBA3、LDHA4)。C 亚基通常不与 A 或 B 结合,仅形成单一的同源四聚体 LDH-C4 特异地存在于睾丸及精子细胞中^[2]。最近报道表明 LDH-C4 也可在卵子中表达^[3]。A、B、C 亚基分别由 3 个不同的基因 Ldha、Ldhb、Ldhc 编码。在人和小鼠中 Ldha 和 Ldhc 分别位于 11 号和 7 号染色体上,Ldhb 基因位于人的 12 号染色体和小鼠的 6 号染色

体上。根据基因进化理论研究人员认为在哺乳动物的进化过程中,原始的 Ldh 基因经复制后产生了 Ldha 和 Ldhb 基因。Ldhc 基因起源于第二次的基因复制,在鱼类和鸟类中,Ldhc 起源于 Ldhb 的基因复制,而在哺乳动物的进化过程中 Ldhc 起源于 Ldha 的复制^[4]。

2 LDHC 的结构及酶活性

早期的活性试验显示乳酸脱氢酶家族各同工酶的催化动力有所不同。对 LDH-C4 结构和基因序列的研究显示虽然 LDHC 与 LDHA 亚基和 LDHB 亚基同源(在小鼠和人中分别与 LDHA 有 72.5%和 75.3%的同源性,与 LDHB 有 64.5%和 69.8%的同源性),但是 LDH-C4 在氨基酸序列及三维结构中发生了改变,使得 LDH-C4 具有一些独特的理化化学性质。LDH-C4 具有很高的耐热性^[5],60℃水浴 30 分钟基本灭活 LDH1-LDH5,但 LDH-C4 的活性大部分保留。在乳酸脱氢酶同工酶谱分析中,LDH-C4 电泳活性区带位于 LDH3 和 LDH4 之间,其活性在正常精子细胞中占 LDH 总活性的 46.3%左右。此外 LDH-C4 的底物范围比 LDH 的其他同工酶广泛的多,且 LDH-C4 的催化能力更强,这可能对精子生理功能的一种适应,因为在生殖细胞中产生的乳酸不可能通过血液循环运输到肝脏部位进行转化,大量乳酸的产生将抑制精子的运动,影响精子正常生理功能^[6]。

3 LDHC 的组织定位

作者简介 李宁(1980-),女,硕士,技师,主要研究方向:男性生殖,

电话:0535-6691999-81533 E-mail:ningning305@126.com

(收稿日期:2010-12-18 接受日期:2011-02-10)

早期的电泳及免疫组化结果证实了 LDHC 蛋白在睾丸中的存在。对分离得到的青春期或成年小鼠的生精细胞检测发现 LDH-C4 的合成起始于前细线期精母细胞,并且在精子细胞和精子中含量丰富^[7]。尽管 LDHA 被认为是主要存在于体细胞的乳酸脱氢酶,但是研究发现 LDHA 也存在于粗线期精母细胞中。但生精细胞中的 LDH 的活性主要来源于 LDHC4,且 C 亚基与 A 亚基在人及小鼠的睾丸中并未发现形成异源四聚体^[8]。最初研究人员认为 LDHC 是存在于精子中的唯一的乳酸脱氢酶,但是最近的研究发现 LDHA 同样存在于精子中,只是 LDHC4 的活性占小鼠精子乳酸脱氢酶总活性的 80%^[8,9]。

最新的免疫组化研究发现,LDHC 除了在生精细胞中特异表达以外,还在生发泡阶段的卵子及受精卵中有表达,并且一直持续至着床前的囊胚^[3]。但是并未在卵子中检测到 LDH-C4 的酶活性,这可能是由于 LDHC 表达水平过低引起的。睾丸中 ldhc 的转录水平是卵子中 LDHC 转录水平的 27 倍。LDH-C4 在卵子发生、卵母细胞的成熟、及早期发育中的作用还不是很清楚^[3]。目前发现 Ldhc 基因缺失的雌性小鼠其生育能力并未受到影响^[8]。

4 LDHC 亚细胞定位

蛋白的亚细胞定位能帮助发现一些可能影响蛋白功能的特异微环境。免疫组化研究发现 LDHC 存在于精母和精子细胞的胞质中,并且位于成熟精子的主段区域。在成熟精子的主段区域 LDHA 能紧密地结合在纤维鞘中,而 LDHC 与纤维鞘的结合不紧密^[9]。LDHA 与 LDHC 的不同细胞内定位能够很好的解释为什么体内缺失 A-C 亚基形成的异源四聚体,而在体外可以存在。LDHC 相应的疏水性结构域显示 LDHC 可能位于质膜上。LDHC 发现存在于卵子和植入前囊胚的皮层区域^[3]。通过对兔精子不同亚细胞成分分离发现 10% 的 LDHC 存在于精子质膜部分^[10]。Beyler 等人的研究也发现 LDHC 在于精子的表面^[11]。

此外,一些研究证实 LDHC 可能存在于精子线粒体的基质中,但是大部分所用的都是间接鉴定的方法,而且精子内亚细胞组分的交叉污染很容易发生,因此结果并不十分可信。通过利用针对 LDHC 肽段设计的特异 MC5-15 和 MC211-220 抗体进行的免疫荧光结果显示,在精子主段区域能检测到强的荧光信号,而在线粒体区域仅检测到弱的荧光信号^[8,12]。然而该微弱的荧光同样在 Ldhc 缺失的小鼠精子中发现表明该信号可能仅为背景信号。当然,存在于精子线粒体的 LDHC 可能在透明或者精子涂片的过程丢失,以致于并未检测到荧光信号。通过使用金标记的高分辨率定位试验,特异性的抗体以及利用 Ldhc 缺失小鼠的精子作为阴性对照对于解决这个问题将会十分有效。然而值得一提的是 JC-1 染色及氧消耗试验(培养基中仅用乳酸作为底物)测出的线粒体活性与 Ldhc 缺失精子中的线粒体活性一致^[4]。因此,即便是有少量的 LDHC 存在于线粒体基质中,LDHC 在呼吸过程中所起的作用仍不能确定。

5 Ldhc 的基因表达模式及转录调控

Ldhc 的表达具有严格的时空调控。Ldhc 转录本仅在产后第 11 天精母细胞出现后才出现并且随着精子细胞的出现而进

一步增加^[13]。早期的验证表明 Ldhc 基因转录和翻译只在青春期哺乳动物初级精母细胞粗线中期被启动,持续至精子形成期。随着生精细胞的逐渐成熟分化,mRNA 的水平急剧下降,而 LDH-C4 的含量却逐渐上升。用分离得到的青春期或成年小鼠的生精细胞检测,结果表明 LDH-C4 的合成起始于前细线期和细线期/偶线期,在粗线期精母细胞,圆形精子和浓缩过程中的精子细胞中比较显著,在精子中则有所下降^[7]。说明在 A 型精原细胞分化成为 B 型精原细胞参与精子发生周期时,Ldhc 基因就开始活化和表达。

LDH-C4 在睾丸组织的特异性表达表明了 Ldhc 基因在生殖细胞中被激活而在体细胞中受抑制的机制。LDH 的 3 种亚基分别由不同基因表达,Ldhc 基因仅在精子(包括成熟生精细胞)中表达,而 Ldha、Ldhb 基因则在体细胞中表达活跃。如果将 Ldhc 启动子区域转基因至 Ldha cDNA,结果在转基因小鼠睾丸匀浆中可发现 LDH-A4、LDH-C4 这两种四聚体,提示人类 Ldhc 启动子包含特异的调节序列,用以在精子生成中作为转基因特殊表达 LDH-A4,同时并不影响其生育能力^[14,15]。此外对 Ldhc 启动子区域的研究显示,在转录启动子区域包含一小段 CpG 岛序列,此序列在体细胞成高度甲基化状态,而在睾丸组织呈去甲基化状态,Kroft^[16]等发现不只一个睾丸特异基因的表达与这一现象相关,小鼠 Ldhc(mLdhc)CpG 岛序列位于包含一个 GC 盒及 1 个串连的转录激活因子(ATF)/CRE 结合位点的启动子区域,其在睾丸组织中呈去甲基化而在体细胞中呈高度甲基化状态,ATF/CRE 结合位点的甲基化状态改变了蛋白质的结合方式,这种改变在小鼠肝脏,睾丸细胞核抽提物的电泳分析中已得到证实,说明启动子区域的高度甲基化状态对抑制 Ldhc 在体细胞的转录起重要作用。

6 LDH-C4 在精子受精中的作用

通常评价精子 LDHC 功能的方法是使用 LDH 抑制剂。研究人员发现对牛精子进行草氨酸钠盐(LDH 的一种抑制剂)处理后,精子的获能受到抑制。小鼠中也发现同样的现象^[12]。然而 LDH 抑制剂能特异性的抑制蛋白提取物中的 LDH 活性,但不能抑制完整精子中的 LDH 活性。Ldhc 基因缺失雄性小鼠的成功构建为进一步研究 LDHC 在精子受精过程中的作用提供了基础。研究发现 Ldhc 缺失雄性小鼠的精子发生正常,睾丸形态未受到影响,每日的精子产量及附睾尾部的精子数量也未发生改变。但是 Ldhc 缺失的雄性小鼠的生育能力明显降低。进一步的研究证实这种低生育率是精子功能缺陷引起的。Ldhc 缺陷精子的运动能力受损且向前运动的能力逐渐减弱,以致于 Ldhc 缺陷的精子不能有效地穿过女性生殖道。此外,即使 Ldhc 缺陷精子能达到卵子,IVF 试验显示它们也不能使卵受精。Ldhc 缺陷小鼠不能经历获能所需的蛋白磷酸化并发展成为超激活运动,而这些是精子受精所必需的过程。卵子去除透明带后,Ldhc 缺陷小鼠的受精率仅为 29%,该受精率远远低于杂合性小鼠精子的受精率。这些结果显示,Ldhc 缺陷精子除了不能有效穿透透明带以外,在精卵融合过程中也不能发挥功能^[8]。

目前对于 Ldhc 缺陷精子引起不育的原因还不甚清楚。一直以来,ATP 被认为是精子长时间运动过程中维持运动能力的必要条件,也是诱导精子获能和超激活的必要条件。研究人

员推测 LDHC 缺失可能引起由于糖酵解受抑制而产生的 ATP 生成缺陷。研究人员发现 Ldhc 缺陷小鼠精子与野生型小鼠精子相比其向前运动的能力及 ATP 水平均明显降低,而且与野生精子不同的是 Ldhc 精子不能消耗葡萄糖。但是,有趣的是 Ldhc 缺陷小鼠精子能像野生型小鼠精子一样以相同的动力学速率把丙酮酸盐转化成乳酸。这可能是存在于纤维鞘的 LDHA 为 Ldhc 缺陷的小鼠精子提供部分或大部分的乳酸脱氢酶活性的结果^[8]。值得一提的是 Ldhc 突变的杂合型小鼠是可育的,但是睾丸中 Ldhc 的转录本水平降低了 40% 整个的 LDH 酶活性在睾丸中降低了 19.1%,在精子中降低了 24.7%。这些结果显示 精子中实际含有多于受精所需的大量的 LDH-C4 蛋白。

7 结论

Ldhc 缺陷小鼠精子功能的缺陷进一步证实了 LHDC 的重要性,它可能在精子受精过程中起重要作用,但是既然精子中的 LDHA 能完成糖酵解过程为什么精子还需要大量的特异 LDHC 仍需要进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Goldberg E. Lactic and malic dehydrogenase in human spermatozoa [J]. Since, 1963, 139: 602-603
- [2] Gupta GS. LDH-C4: a unique target of mammalian spermatozoa[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2002, 34(6):361-385
- [3] Coonrod S, Vitale A, Duan C, et al. Testis-specific lactate dehydrogenase (LDH-C4; Ldh3) in murine oocytes and preimplantation embryos[J]. J Androl, 2006, 27(4):502-509
- [4] Goldberg E, Eddy EM, Duan C, et al. LDHC the ultimate testis specific gene[J]. J Androl, 2010, 31(1):86-94
- [5] LeVan KM, Goldberg E. Properties of human testis-specific lactate dehydrogenase expressed from Escherchia coli [J]. Biochem J, 2001, 273(Pt3):587-592
- [6] Gupta GS, Kang BP. LDH-C4-substrate binary complexes studied by intrinsic fluorescence method[J]. Indian J Biochem Biophys, 2004, 34 (3): 307-312
- [7] Li SS, O'Brien DA, Hou EW, et al. Differential activity and synthesis of lactate dehydrogenase isozymes A (muscle), B (heart), and C (testis) in mouse spermatogenic cells [J]. Biol Reprod, 2001, 4 (1): 173-180
- [8] Obet F, Duan C, Willis WD, et al. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (Ldhc) is required for male fertility [J]. Biol Reprod, 2008, 79(1):26-34
- [9] Krisfalusi M, Miki K, Grootegoed A, et al. Multiple glycoytic enzymes are tightly bound to the fibrous sheath of mouse spermatozoa [J]. Biol Reprod, 2006, 75(2):270-280
- [10] Alvarez JG, and Storey BT. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa[J]. Biol Reprod, 1984, 30(2):323-331
- [11] Beyler SA, Wheat TE, and Goldberg E. Binding of antibodies against antigenic domains of murine lactate dehydrogenase-C4 to human and mouse spermatozoa[J]. Biol Reprod, 1985, 32(5):1201-1210
- [12] Duan C, and Goldberg E. Inhibition of lactate dehydrogenase C4 (LDH-C4) blocks capacitation of mouse sperm in vitro [J]. Cytogenet Genome Res, 2003, 103(3-4):352-359
- [13] Shima JE, Mclean DJ, McCarrey JR, and Griswold MD. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis[J]. Biol Reprod, 2004, 71(): 319-330
- [14] Markert CL, Amet TM, Goldberg E. Human testis-specific lactate dehydrogenase-C promoter drives overexpression of mouse lactate dehydrogenase-1 cDNA in testes of transgenic mice [J]. J Exp Zool, 2005, 282(1/2):171-178
- [15] Tang H, Kung A, and Goldberg E. Regulation of murine lactate dehydrogenase C (Ldhc) gene expression [J]. Biol Reprod, 2008, 78: 455-461
- [16] Kroft TL, Jethanandani P, McLean DJ, et al. Methylation of CpG dinucleotides alters binding and silences testis-specific transcription directed by the mouse lactate dehydrogenase C promoter [J]. Biol Reprod, 2001, 65(5):1522-1527
- [16] Walker DK, Gilliland SE. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus[J]. J Dairy Sci, 1993, 76: 956-96
- [17] 吴丽红, 贺稚非. 发酵香肠中的微生物发酵剂的研究发展[J]. 四川食品与发酵, 2005, 1: 31-36
- WU Li-hong, HE Zhi-fei. Research Progress of Microbial Culture Starters of Fermented Sausages[J]. Sichuan Food and Fermentation, 2005, 1: 31-36
- [18] Hugas M, Monfort JM. Bacterial starter cultures for meat fermentation [J]. Food Chemistry, 1997, 59(4): 547-554