

精液蛋白质质谱的研究进展

赵 奇(综述), 王晓平(审校)

基金项目: 广西医疗卫生适宜技术与开发课题(编号:S201313-06)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院泌尿外科

作者简介: 赵 奇(1988-), 男, 在读研究生, 研究方向: 少弱畸精子蛋白质质谱变化的相关研究。E-mail: 357314561@qq.com

通讯作者: 王晓平(1955-), 男, 大学本科, 医学学士, 主任医师, 研究方向: 泌尿男性疾病的相关研究。E-mail: wwxiaoping@163.com

【摘要】 蛋白质组学是一种复杂生命作用机理的阐述工具, 其中蛋白质质谱技术可以揭示参与生命活动蛋白质的类别和性质。蛋白质组学应用于精液蛋白质质谱的研究, 可以发现不育等疾病的特异性蛋白质标志物, 探索其发病机制并得出治疗途径, 对生育调控和不育的治疗均有重要意义。该文就精液蛋白质质谱的研究进展进行综述。

【关键词】 精液; 蛋白质; 质谱分析

【中图分类号】 R 69 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2014)12-1170-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.12.27

Research progress of sperm protein mass spectrometry ZHAO Qi, WANG Xiao-ping. Department of Urology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

【Abstract】 Proteomics is a tool of expounding complex mechanism of life, and the protein mass spectrometry reveals the categories and characters of the proteins involved in life activities. Applying proteomics to studying sperm protein mass spectrum can find the specific protein markers of disease such as infertility etc, explore the pathogenesis, get the treatment methods, and has important significance for fertility regulation and sterility treatment. This paper reviewed the research progress on sperm protein mass spectrometry.

【Key words】 Semen; Protein; Mass spectrometry

蛋白质组学是研究细胞内全部蛋白质的存在与行为方式的一门科学, 它是后基因组研究中最主要的部分, 是从整体上对体系内的蛋白质进行研究, 随着分子生物学的发展, 近年来蛋白质组学技术已广泛应用于生殖男科领域^[1]。蛋白质组学技术的核心包括双向凝胶电泳、质谱鉴定和生物信息学分析三大部分, 其中蛋白质质谱鉴定技术是蛋白质组学研究的一个极重要的方面, 它对于此类研究起到一个核心作用^[2]。蛋白质质谱鉴定技术有较好的灵敏度和准确度, 它能准确测定蛋白质的种类。质谱机器由进样器、离子源、质量分析器、离子检测器、控制电脑及数据分析系统等组成, 传统的质谱仅用于小分子挥发物质的分析, 但随着新的离子化技术, 如基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer, MALDI-TOF-MS) 和电喷雾电离质谱(elec-

tropray ionization mass spectrometry, ESI-MS) 等, 各种质谱技术的出现为蛋白质分析提供了一种新的且准确快速的途径。目前, 酶解、液相色谱分离、串联质谱及计算机算法的联合应用已成为鉴定蛋白质的发展趋势。蛋白质质谱主要测定蛋白质一级结构包括分子量、肽链氨基酸排序及多肽或二硫键数目和位置, 在对蛋白质结构分析的研究中占据了重要的地位。其基本原理是通过电离源将蛋白质分子转化为离子, 然后利用质谱分析仪的电场、磁场将具有特定质量与电荷比值(M/Z)的蛋白质离子分离开来, 经过离子检测器收集分离的离子, 确定离子的 M/Z 值, 分析鉴定未知蛋白^[3]。精液由精子和精浆构成, 精液中精子占 5% 左右, 其中精子分为头颈体尾四个部位, 精浆中含有大量水、蛋白质、多肽、果糖、多种其他糖类(如葡萄糖)、酶类(如前列腺素)、无机盐和有机小分子, 精浆主要是前列腺和精囊腺的

分泌物。精液蛋白质含量丰富,种类繁多,与精子的生理功能息息相关^[4]。精液蛋白的研究是从蛋白质水平揭示了精子不同生理与病理条件下的蛋白质表达谱的变化规律,了解精子受精过程中的生理与病理的机制,对生育调控和不育的治疗均有重要意义。蛋白质质谱技术应用在精液蛋白质方面已有较多文献报道,现总结如下。

1 精子表面蛋白质质谱研究

国内学者 Wang 等^[5]采集 10 名正常人精子膜蛋白进行分析,运用双向蛋白电泳、图像分析软件及质谱分析技术共得到了 800 多个蛋白点,它们大多数蛋白的相对分子质量为 20 000 ~ 100 000,等电点为 3.0 ~ 7.0,建立了一个健康人精子膜蛋白谱。2004 年 Tan 等^[6]研究了精子及精子头部蛋白质,使用双向电泳技术对精子表面蛋白质进行分离,获得了 428 个蛋白点的精子表面图谱。他们发现精子表面蛋白与精子的获能及顶体反应有密切联系,为发现不育的机制打下基础。Stein 等^[7]在成熟精子的精卵结合位点上发现有 100 种以上的蛋白质表达,初步推测它们可能介导精子的受精过程。Rajeev 等^[8]在对不育患者精子膜蛋白的研究中得到了一个蛋白,其位于精子头部,分子质量为 57 kDa,它在不育患者蛋白图谱上缺失或低表达,该蛋白主要位于未发生顶体反应的精子顶体上,当精子发生顶体反应后,该蛋白会转移到精子的赤道部,推测其可能为精子与卵母细胞的介导反应有关,其是两者识别和结合的重要介质,应用免疫印迹技术可以得出这种蛋白,可以提出一个检测精子质量的新指标。Wolkowicz 等^[9]通过 WB 免疫印迹技术及蛋白质谱分析技术发现精子表面一种分子质量为 54 kDa 的蛋白 h-tekBl 并定位于精子鞭毛,该蛋白可能与精子运动有关。Bohring 等^[10]运用分离技术对精子膜蛋白进行钝化分离,运用最新的 WB 技术及质谱分析技术,得到了 18 种表面抗原及 6 种与抗体亲和率更高的蛋白抗原,它们都是抗精子抗体,其中包含惰性半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶、热休克蛋白 70 等,并发现一些抗原能被大部分抗精子抗体所结合识别,说明这些精子表面膜蛋白作为抗原与男性精子免疫性不育有着很大的关系。Aivado 等^[11]运用双向电泳及质谱分析法对 218 名正常人进行了精子蛋白质研究,发现了一种能够鉴别骨髓增生异常综合征(MDS)的蛋白,其可作为对 MDS 诊断的标志物。国内葛少钦等^[12]在对不育与基因及蛋白的研究中发现由于基因变异导致 Pygo2 蛋白空间结构破坏及相关疾病的产生,它由

rs141722381 单个氨基酸改变引起,得出了 Pygo2 基因蛋白质编码序列区 SNPs 可能是特发性少精子症和无精子症的诱发因素之一,从而最终导致男性不育症的发生。国内张纪云^[13]运用双向电泳及 WB 技术对腮腺炎与不育进行研究,发现不育症患者精浆中抗流行性腮腺炎病毒抗体免疫球蛋白 IgG 及 IgM 显著升高,提示不育与此类抗体有关。精子免疫方面的研究对不育的疾病诊断及诊断起着重要作用,越来越多的诊断依靠蛋白质抗原抗体的发现来确定。

2 精浆蛋白质质谱研究

国外学者 Edwards 等^[14]和 Pilch 等^[15]都以正常人精浆蛋白作为研究对象,应用 2D 电泳、图像分析软件及蛋白质质谱技术分别获得了 200 多个蛋白点及 923 种蛋白质。国内魏小斌等^[16]对精浆蛋白电泳分析的研究中分析了 20 例能够生育的患者与 140 例不育患者,应用琼脂糖区带电泳法对精浆进行蛋白分离,建立其精浆蛋白质的特征电泳图谱。Bai 等^[17]在应用双向电泳及质谱分析正常男性精浆蛋白的研究中鉴定出 331 种蛋白质,相对分子质量范围 8 000 ~ 572 068,等电点范围 4.36 ~ 11.05;这些蛋白质按功能分类为 51 个运输蛋白质,11 个细胞运动蛋白,63 个信号转导蛋白质,147 个蛋白酶及 38 个酶调节蛋白质,21 个细胞凋亡蛋白,12 个结构和支撑蛋白质,还有 59 个分子功能未知蛋白质。这些精浆中的蛋白可能与信号转导密切相关,它们在维持精子活力和代谢方面有协同作用。李杰等^[18]运用双向电泳及质谱分析技术分析了精索静脉曲张不育患者精浆蛋白质的表达差异,得到分辨率和重复性均较好的精索静脉曲张患者与正常精浆蛋白的双向凝胶电泳图谱,发现他们之间在表达上有明显差异,差异表达蛋白质点数为 38 个,提出了精浆中某些蛋白质的表达和修饰改变与精索静脉曲张有关,对这些差异蛋白质点的进一步分析有助于揭示精索静脉曲张导致男性不育的分子机制。

3 差异蛋白质质谱研究

国内学者申树林等^[19]在运用双向电泳及质谱分析技术寻找人类精子差异表达蛋白,发现正常组和弱精子症组分别检出共有蛋白质点为 738 个和 698 个,按照 5 倍的表达量计算,发现有差异表达的蛋白质点 7 个,2 个点在弱精子症精子中高表达,而在正常精子中低表达;相反在正常精子中高表达的 5 个点,则在弱精子症精子中低表达。其初步建立了正常精子和弱精子症患者精子的双向电泳图谱,并发

现两者之间存在一些差异表达蛋白,为我们对特发性弱精子症精子差异表达蛋白的分离及鉴定的进一步研究打下了良好基础。孙玲^[20]用蛋白质芯片结合质谱技术,分别对精液液化延迟组与正常组、非阻塞性无精症组与正常组、严重少精症组与正常组进行比较蛋白质组学研究,发现正常组与液化延迟组之间有 19 个蛋白表达存在差异,其中锌指蛋白、谷胱甘肽转移酶同功酶、动力蛋白轻链、细胞色素氧化酶多肽可能与精液液化延迟相关;正常组与无精组则有 28 个蛋白表达存在差异,据此推测丝氨酸蛋白酶抑制因子的表达异常可能是导致无精症的因素之一。Wang 等^[21]对弱精症患者精浆进行差异蛋白质组学研究,通过 SDS 凝胶电泳结合 LC-MS/MS 技术,分离到蛋白质 741 种,其中蛋白质的表达 3 倍上调有 45 种,蛋白质表达 3 倍下调有 56 种,其中在弱精症患者的精浆中表达下调的蛋白质 DJ-1 参与控制氧自由基应激,揭示了前列腺和附睾的功能异常对弱精症的形成具有重要作用。白洁等^[22]对人精浆中弱精子症相关蛋白质的研究中得出正常生育男性和弱精子症男性精浆中共得到 172 种差异蛋白质,通过分析差异蛋白质的功能,有 10 种蛋白质尤其重要,可能与弱精子症相关,这 10 种蛋白质是膜联蛋白 VI 同工型 2、白介素 6 受体 β 亚单位同工型 1 前体、相对分子质量为 400 000 的蛋白质、胞质动力蛋白重链、 α -辅肌动蛋白 4、受体型酪氨酸蛋白磷酸酶 η 前体、维生素 D 结合蛋白前体、蛋白 S100-A11、蛋白 S100-A9 和膜联蛋白 A4。Hosseinfar 等^[23]在应用 2D 电泳研究弱精症患者差异蛋白中得出 3 个差异蛋白点,包括热休克蛋白 A5 (HSPA5)、超氧化物歧化酶 (SOD1)、ATP 合成酶亚基 δ (Atp5d),并提出这些蛋白可能与 DNA 完整率和精子的运动能力有关。

4 精子蛋白质质谱研究

Naaby-Hansen^[24]结合银染、同位素标记、生物素标记和计算机扫描分析技术得到了 1 397 个蛋白点,初步建立了全精子蛋白质图谱。范立青^[25]运用 2-DE 技术率先在国内建立了 700 多个点的人精子蛋白质图谱;Johnston 等^[26]用 LC-MS/MS 质谱分析技术应用不同溶剂对正常人精子进行全蛋白组分析,成功鉴定出 1 760 个蛋白质点。Sun 等^[27]运用 2-DE 技术得到含有 (905 $\pm$ 57) 个蛋白点的人正常精子蛋白图谱,结合 MALDI-TOF-MS 质谱分析对 10 名健康供精者不同时间取得的 30 份精子分析,建立了具有 1 352 个蛋白点的人精子蛋白质图谱。上述

研究对完善人类全精子蛋白组学打下了坚实的基础,随着硬件和软件的发展,相信在未来我们能获得人类全精子蛋白图谱,这样将会对男性不育方面的研究提供宝贵的资料。

5 蛋白芯片技术

蛋白质芯片技术是一种高通量的蛋白功能分析技术,可用于蛋白质表达谱分析,研究蛋白质与蛋白质的相互作用,甚至 DNA-蛋白质、RNA-蛋白质的相互作用,筛选药物作用的蛋白靶点等。国内白洁等^[28]应用蛋白芯片技术对无精症及正常生育男性的精浆蛋白质进行研究,结果无精症组与正常组之间有 28 种表达差异蛋白,差异蛋白中发现有 24 种含量低于正常组,其中 4 个 M/Z 在 7 196.058、7 630.573、7 547.610 和 7 709.833 的蛋白质差异极显著 ($P < 0.01$)。刘池波等^[29]用表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱 (SELDI-TOF-MS) 分析少精子症患者和正常对照组精浆蛋白质指纹图谱的变化,结果显示在相对分子质量 2 000 ~ 20 000 范围内,共检测到 185 种有差异的蛋白峰,其中 23 种有统计学意义 ($P < 0.05$),初步建立了由 3 种差异蛋白质组成的少精子症诊断模型。蛋白质表达谱分析能够分析出蛋白类型,对研究精液蛋白质有很大的帮助。它具有快速、简便等优点,可以直接用粗生物样品进行分析,但是建立廉价、高通量的蛋白质表达和纯化方法是今后研究的重点。

6 结语

综上所述,蛋白质质谱分析技术的飞速发展在生命科学研究中起到举足轻重的作用,其中它运用于精液研究对于我们寻找差异蛋白和生殖不育疾病的诊断及治疗提供了强有力的支持,随着我们不断深入的研究,必将对此类疾病有更全面深刻的认识,为生殖不育患者带来福音。

参考文献

- 1 Armon L, Ben-Ami I, Ron-El R, et al. Human oocyte-derived sperm chemoattractant is a hydrophobic molecule associated with a carrier protein[J]. *Fertil Steril*, 2014, 102(3): 885-890.
- 2 Pruneau L, Moumène A, Meyer DF, et al. Understanding Anaplasmataceae pathogenesis using "Omics" approaches[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, 4(86): 1-7.
- 3 Saeed F, Pisitkun T, Knepper MA, et al. An efficient algorithm for clustering of large-scale mass spectrometry data[J]. *Proceedings (IEEE Int Conf Bioinformatics Biomed)*, 2012, 4: 1-4.
- 4 Barazani Y, Agarwal A, Sabanegh ES Jr, et al. Functional sperm testing and the role of proteomics in the evaluation of male infertility[J]. *Urology*, 2014, 84(2): 255-261.

- 5 Wang HF, Xiang ZQ, Wang YX. Experimental research on human spermatozoa membrane proteins by two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Nat J Androl*, 2003, 9(7):504-507.
- 6 Tan YM, Fan LQ, Luo KL, et al. Establishment of the two-dimensional gel electrophoretic protein map of the human sperm head[J]. *Nat J Androl*, 2004, 10(12):886-889.
- 7 Stein KK, Go IC, Lane WS, et al. Proteomic analysis of sperm regions that mediate sperm-egg interactions [J]. *Proteomics*, 2006, 6(12):3533-3543.
- 8 Rajeev SK, Reddy KV. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen[J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(2):234-242.
- 9 Wolkowicz MJ, Naaby-Hansen S, Gamble AR, et al. Tektin B1 demonstrates flagellar localization in human sperm[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(1):241-250.
- 10 Bohring C, Krause W. The characterization of human spermatozoa membrane proteins-surface antigens and immunological infertility [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(45):971-976.
- 11 Aivado M, Spentzos D, Gerding U, et al. Serum proteome profiling detects myelodysplastic syndromes and identifies CXC chemokine ligands 4 and 7 as markers for advanced disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(4):1307-1312.
- 12 葛少钦, Jeanine Griffin, 刘丽华, 等. 特发性少精子症和无精子症与 Pygo2 基因蛋白编码区 SNPs 的相关性[J]. *遗传*, 2013, 35(5):616-622.
- 13 张纪云. 不育男性精浆抗流行性腮腺炎病毒抗体分析[J]. *中华男科学杂志*, 2007, 13(2):175-176.
- 14 Edwards JJ, Tollaksen SL, Anderson NG. Proteins of human semen Two-dimensional mapping of human seminal fluid[J]. *Clin Chem*, 1981, 27(8):1355-1340.
- 15 Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma[J]. *Genome Biology*, 2006, (5):40.
- 16 魏小斌, 白志明, 陈 扬, 等. 精浆蛋白电泳分析的临床意义[J]. *中国男科学杂志*, 2007, 21(12):44-46.
- 17 Bai J, Zhou BX, Li LH, et al. The formation mechanism of titania nanotube arrays in hydrofluoric acid electrolyte[J]. *Journal of Materials Science*, 2008, 43(6):1880-1884.
- 18 李 杰, 唐 伟, 唐亚雄, 等. 双向电泳分析精索静脉曲张不育患者精浆蛋白质的表达差异[J]. *重庆医科大学学报*, 2009, 34(4):442-446.
- 19 申树林, 罗 勇, 宁 亮, 等. 特发性弱精子症精子与正常精子蛋白质双向电泳图谱分析[J]. *中华男科学杂志*, 2007, 13(1):50-52.
- 20 孙 玲. 蛋白质芯片技术对男性不育精浆相关蛋白质群的分析[D]. 广州:第一军医大学, 2007.
- 21 Wang J, Zhang HR, Shi HJ, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteomic that affect oxidative stress responses and semen quality[J]. *Asian J Androl*, 2009, 11(4):484-491.
- 22 白 洁, 傅淑宏, 蔡力力, 等. 利用 shotgun 蛋白组学策略鉴定健康生育男性精浆蛋白质[J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(4):297-309.
- 23 Hosseinfar H, Sabbaghian M, Nasrabadi D, et al. Study of the effect of varicocele on sperm proteins expression in patients with varicocele and poor sperm quality by using two-dimensional gel electrophoresis[J]. *Assist Reprod Genet*, 2014, 31(6):725-729.
- 24 Naaby-Hansen S, Flickinger CJ, Herr JC, et al. Two-dimensional gel electrophoretic analysis of vectorially labeled surface proteins of human spermatozoa[J]. *Biol Reprod*, 1997, 56(3):771-787.
- 25 范立青. 人类精子蛋白质组分析的双向蛋白电泳技术研究[J]. *湖南医科大学学报*, 2001, 11(2):58-64.
- 26 Johnston DS, Wooters J, Kopf GS, et al. Analysis of the human sperm proteome[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1061:190-202.
- 27 Sun BL, Fan LQ, Li LW, et al. Establishment of the 2-D synthetic map of total protein of normal human spermatozoa enriched with low abundance protein[J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2006, 12(4):295-299.
- 28 白 洁, 孙 玲, 陈士岭, 等. 无精子症患者与生育男性精浆蛋白质群的比较分析[J]. *中华男科学杂志*, 2007, 13(7):579-583.
- 29 刘池波, 梁 勇, 潘春琴, 等. 应用 SELDI-TOF-MS 技术分析少精子症患者精浆中的差异表达蛋白[J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(3):232-236.

[收稿日期 2014-08-21][本文编辑 谭 毅 黄晓红]

《中国临床新医学》杂志编辑部启事

为了加强与市、县医疗单位的交流与合作,提高广大业务技术人员医学论文的写作水平,《中国临床新医学》杂志编辑部的有关专家将分期分批赴各市、县医疗卫生单位进行“医学论文写作”、“医学文献检索”和“医学统计学应用”等有关方面的学术讲课。各医疗卫生单位如有这方面的需求,敬请与编辑部联系。联系电话:0771-2186013。

· 本刊编辑部 ·