

林秋敏, 赖宝色, 钟佩云, 等. 杜洛克公猪精液 NAGase 对调控精子功能蛋白质组学的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 14-21.

LIN Q M, LAI B S, ZHONG P Y, et al. Research on proteomics of NAGase in regulating the function of spermatozoa in Duroc boar semen [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 14-21.

杜洛克公猪精液 NAGase 对调控精子功能蛋白质组学的研究

林秋敏^{1,2}, 赖宝色^{1*}, 钟佩云¹, 林祚贵¹, 徐磊¹, 黄小红²

(1. 福建农业职业技术学院动物科技学院, 福建 福州 350007;

2. 福建农林大学中西兽医结合与动物保健福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 旨在以杜洛克公猪精液为研究对象, 通过 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 抑制剂体外处理精液, 经 12.5% SDS-PAGE 对处理好的精子样品进行双向电泳分离, 筛选 NAGase 作用互作点蛋白表达差异; 表达丰度差异的蛋白经酶消化后进行质谱分析。结果: 银染筛选获得 57 个差异表达蛋白点在凝胶中, 蛋白点主要分布在 pH 值 3~10 和相对分子质量 14.4~116 kDa 的范围内; 经 NCBI 和 Mascot 数据库进行差异表达蛋白匹配搜索, 成功鉴定与精子功能相关的上调差异表达蛋白 8 个, 分别是磷脂酰乙醇胺结合蛋白 4 (PEBP4)、精卵融合蛋白 4 (IZUMO4)、精浆糖蛋白 1 (PSP-1)、猪精子黏附蛋白 (AWN)、糖结合蛋白 (SPMI)、细胞色素 c 氧化酶 VIα 亚基多肽 1 (COX6A1)、二氢硫辛酸脱氢酶蛋白 (DLD) 和伴侣蛋白 1 (TCP1); 8 个上调差异表达蛋白主要涉及精子成熟、精子运动、精卵识别等生理功能。通过 STRING 工具分析蛋白质互作关系表明 IZUMO 蛋白可能是 NAGase 调节精子功能的一个重要靶点并形成了可能的蛋白质调控网络。研究结果为提高公猪生产性能研究奠定了基础。

关键词: 杜洛克公猪; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 精子功能; 蛋白质组学

中图分类号: S828 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)02-0014-08

Research on proteomics of NAGase in regulating the function of spermatozoa in Duroc boar semen

LIN Qiumin^{1,2}, LAI Baose^{1*}, ZHONG Peiyun¹, LIN Zuogui¹, XU Lei¹, HUANG Xiaohong²

(1. College of Animal Science and Technology, Fujian Vocational College of Agricultural, Fuzhou 350007, China;

2. Fujian Province Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Veterinary Medicine and Animal Health Care, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the semen of Duroc boars, specifically by treating the semen with an N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase) inhibitor *in vitro*. Following this treatment, the processed sperm samples were subjected to two-dimensional electrophoresis separation using 12.5% SDS-PAGE to screen for differences in NAGase-interacting proteins. Finally, proteins exhibiting abundance differences were digested with enzymes and were analyzed by mass spectrometry. The results were as follows: A total of 57 differentially expressed protein spots were detected in the gel after silver staining, with the protein spots primarily distributed within a pH range of 3 to 10 and a relative molecular mass range of 14.4 to 116 kDa. Differential protein matching searches conducted using NCBI and Mascot databases successfully identified eight upregulated differential proteins related to sperm function, namely phosphatidylethanolamine-binding protein 4 (PEBP4), IZUMO sperm-egg fusion protein 4 (IZUMO4), glycoprotein in seminal plasma 1 (PSP-1), porcine sperm adhesion protein (AWN), sugar-binding protein (SPMI), cytochrome C oxidase VI A subunit polypeptide 1 (COX6A1), dihydrolipoyl dehydrogenase protein (DLD), and chaperonin protein 1 (TCP1). These eight upregulated differentially expressed proteins were primarily involved in physiological functions such as sperm maturation, sperm motility, and sperm-egg recognition. Analysis of protein-protein interactions using the STRING tool indicated that the IZUMO protein might be an important target for NAGase in regulating sperm function, forming a potential protein regulatory network. The findings of this study provided a basis for animal reproduction and production and laid the groundwork for further

收稿日期: 2024-04-08; 修回日期: 2024-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31572484); 福建农业职业技术学院博士科研启动课题 (2022JS002); 2023 年福建农业职业技术学院科技研究项目 (2023JS002)

第一作者: 林秋敏, 男, 副教授

* 通信作者: 赖宝色, 副教授, 研究方向为动物病理与药理, E-mail: 651568625@qq.com。

research on improving animal production performance.

Keywords: Duroc boar; N-acetyl- β -D-glucosaminidase; sperm function; proteomics

N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 是一种广泛分布在微生物、动物、植物体内不同组织中的水解酶^[1-3]。NAGase 已经被证实参与多糖、糖蛋白、糖脂的修饰、分解代谢, 并且这些生理活动都与受精过程密切相关^[4-5]。猪精液中含有大量的 NAGase, 其比活力远高于其他动物, 如河田鸡、山麻鸭、牛等^[6]。相关研究显示 NAGase 在猪睾丸和精子中大量表达, 且抑制 NAGase 的活性能够导致精子顶体的完整性、线粒体活性以及运动性能受到不同程度的影响^[1,7]。精子的顶体完整性是精子发生顶体反应的前提和基础, 而且线粒体活性是保证精子的前向运动获得能力的基础^[8-9]。基于此, 为了解抑制 NAGase 活性调节精子顶体完整性和线粒体活性的靶点, 为更好地研究精子的生理功能, 本研究通过 NAGase 活性抑制剂体外处理公猪精液, 分析精子细胞中蛋白表达的变化, 筛选差异表达蛋白, 以期识别关键蛋白并构建蛋白质调控网络, 为进一步研究 NAGase 对精子生理功能调节作用奠定基础, 为公猪繁殖和生产提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

尿素、二硫苏糖醇 (DTT)、硫脲、碘乙酰胺 (IAA)、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 (CHAPS) 和 IPG 干胶条 (24 cm, pH = 3 ~ 10), 购自于 GE 公司 (美国); 丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠 (SDS)、三羧基氨基甲烷 (Tris)、甘氨酸、低熔点琼脂糖、三氯乙酸 (TCA)、过硫酸铵 (APS)、碳酸钠、N, N, N', N'-四甲基二乙胺 (TEMED), 购自于 Amresco 公司 (美国); 蛋白质分子量标签、蛋白酶抑制剂 (PMSF)、胰蛋白酶, 购自于 Sigma 公司 (德国); 蛋白测定试剂盒、蔗糖、甲酸、乙腈、丙酮、甲醇、磷酸、正丁醇、乙醇、冰醋酸、硫酸铵、琼脂糖, 购自于厦门速致生物公司 (中国); TRIzol 试剂、RNA 酶抑制剂、荧光酶、反转录酶 (M-MLV)、随机引物和 dNTP, 购自于 Promega 公司 (美国)。

MALDI - TOF 串联质谱仪 (ABI, 美国), PDquest 分析软件 (Bio - Rad, 美国), Bio - Rad MyiQ™ Real - time PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国), 自动凝胶图像分析仪 (上海培清科技有限公司, 中国)。

1.2 主要溶液配制

双向电泳方法参照文献 [10] 并作调整。含量

为 100 μ g 的样品与水化上样缓冲液 (尿素 8 mol/L, 2% CHAPS, 0.5% IPG 缓冲液, DTT 18 mmol/L 并加 0.001% 溴酚蓝) 充分混合。使用 pH = 3 ~ 10 非线性胶条进行电泳。电泳条件: 30 V 12 h, 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 8 000 V 8 h, 500 V 4 h)。

1.3 精子细胞差异表达蛋白筛选

1.3.1 精液样品处理和蛋白样品准备

100 mL 杜洛克公猪精子悬液分装于干净灭菌的离心管内, 45°置于 37 °C 水浴内回温 30 min, 随后每管吸取一半的精子悬液, 加入等体积的精子稀释液。取 4 mL 的精子 (精子计数为 1.8×10^7 个/mL) 分装于高温灭菌、37 °C 预热的玻璃试管内。在上述精子悬液中加入乙酰胺 (1 mol/L) 溶液, 乙酰胺终浓度为 200 mmol/L^[11-12], 进行 3 次重复, 对照样品由与贝尔茨维尔解冻液 (BTS) 混合的精子组成, 无添加乙酰胺。随后, 水浴锅中 37 °C 孵育 25 min (期间每隔 5 min 取出轻缓上下颠倒混匀)。随后取出置于 4 °C、5 000 r/min 离心机离心 5 min, 去上清液保留沉淀, PBS 洗涤 1 次, 离心, 沉淀用 4 mL PBS 混匀。

蛋白样品准备具体步骤为: 在精液中加入 5 倍体积的丙酮溶液, -20 °C 沉淀 1 h。取出于 4 °C 离心机 10 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀。沉淀用水化液 (7 mol/L 脲, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 0.5% CA, 75 mmol/L DTT) 和 1 mmol/L PMSF 的混合物混合。30 °C 恒温水浴充分溶解蛋白。室温下 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液采用 Bradford 法进行总蛋白测定后于 -80 °C 储存备用。

1.3.2 等电聚焦

取 200 μ g 蛋白样品与水化液进行充分混合均匀, 样品总体积为 450 μ L。等电聚焦的试验过程参考文献 [12], 双向凝胶电泳等电聚焦参数见表 1。

表 1 双向凝胶电泳等电聚焦参数 (24 cm, pH = 3.0 ~ 10.0)

步骤	电压/V	持续时间/h	信号	功能
再水化	50	8	被动水化	水化
1	100	1	慢性	除盐
2	200	1	慢性	除盐
3	500	1	慢性	除盐
4	1 000	1	线性	除盐
5	1 000 ~ 10 000	1	线性	升压
6	1 000	10.5	快速	聚焦
7	500	12	快速	保持

1.3.3 凝胶图像扫描及分析

聚焦完成后胶条平衡及 12.5% SDS-PAGE 过程参考文献 [13] 进行, 结束后胶条进行染色。凝胶采用银染进行染色, 参考文献 [14] 进行。使用 ImageScanner 扫描仪对染色后的凝胶进行灰度模式扫描。扫描图采用 PDQuest 8.0 软件进行图像灰度分析, 主要步骤包括图像背景扣除、蛋白点灰度值标准化、蛋白点检测、不同凝胶间蛋白点匹配, 而后根据匹配结果计算差异表达倍数。

1.3.4 差异表达蛋白筛选及标注

分别将处理和对照的双向电泳图片进行比较, 进行后续差异表达蛋白筛选。将蛋白点进行酶消化, 并于 MALDI-TOF 串联质谱仪上进行质谱分析。采用正离子、反射模式进行分析。蛋白点的数据用在线 MASCOT 程序以及检索 NCBI 蛋白质数据库。根据检索蛋白的蛋白序列覆盖率、蛋白等电点以及分子量 3 个因素确定蛋白信息, 并根据京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 在线软件和文献资料对差异表达蛋白进行分类和标注。

对 3 次重复数据进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 的蛋白认为差异显著, 其中倍数变化 (FC) > 2 , $P < 0.05$ 作为差异表达蛋白选择标准。FC > 2 最终确定是差异表达蛋白, 用不同颜色标注。

1.4 精子细胞中差异表达蛋白生物信息学分析

根据筛选的差异表达蛋白标注结果, 对差异表达蛋白之间的互作 (PPI) 关系进行预测分析, 进一步了解筛选的差异表达蛋白功能的关联性。蛋白质互作基于蛋白-蛋白之间的靶向或调控关系分析是基于不同生物体在 NCBI 的 Viridiplantae 数据库中列出的确定的蛋白质功能进行, 通过 STRING 9.0 在线数据库对猪属已注释的蛋白质进行关联度分析, 制作蛋白质 PPI 的作用示意图^[15]。

1.5 数据统计与分析

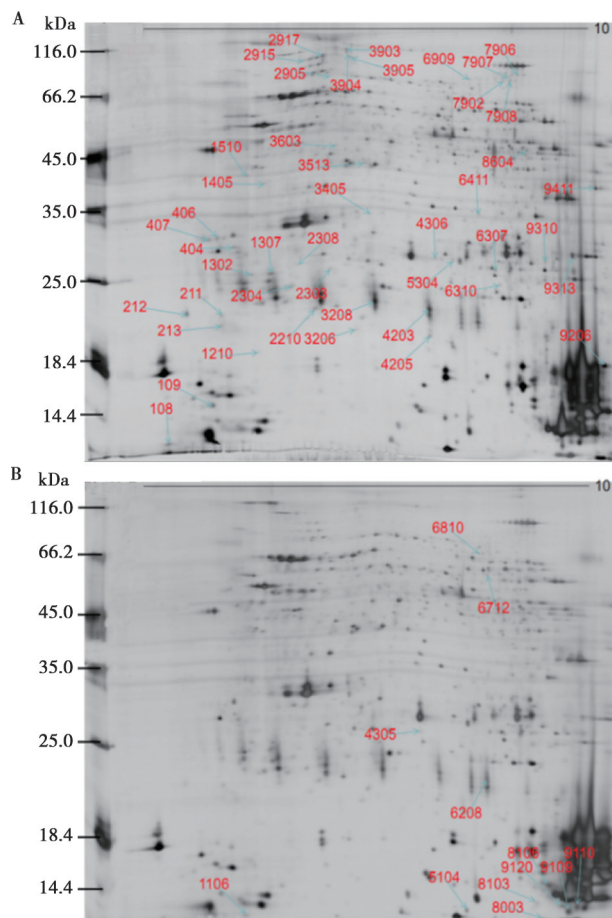
蛋白质组学结果比对统计采用 PDQuest 8.0 (Bio-Rad) 软件分析, 蛋白表达丰度差异利用 ANOVA 方法分析。采用 SPSS 28.0 软件对差异性试验数据进行 ANOVA 分析, 结果以“平均值 \pm 标准误”表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 NAGase 作用互作蛋白筛选差异比较

使用 24 cm, pH=3~10 的胶条通过 12.5% SDS-PAGE 对处理好的精子样品进行双向电泳分离。通过银染筛选, 检测到 57 个差异表达的蛋白点在凝胶中。这些蛋白点主要分布在 pH=3~10 和相对分子质量

14.4~116 kDa 的范围内。结果发现以下蛋白表达水平发生了显著变化: 磷脂酰乙醇胺结合蛋白 4 (PEBP4) 上调了 2.08 倍, 细胞色素 c 氧化酶 VI α 亚基多肽 1 (COX6A1) 上调了 3.33 倍, 精卵融合蛋白 4 (IZUMO4) 上调了 2.49 倍, 二氢硫辛酸脱氢酶 (DLD) 上调了 5.39 倍, 伴侣蛋白 1 (TCP1) 上调了 2.29 倍, 精浆糖蛋白 1 (PSP-1) 上调了 6.81 倍, 猪精子黏附蛋白 (AWN) 上调了 9.86 倍, 糖结合蛋白 (SPMI) 上调了 3.03 倍。这些上调的蛋白可能并非全部直接由 NAGase 水解活性所调节, 部分变化可能是精子功能受影响后的间接结果。为了验证这些蛋白是否为 NAGase 的直接底物, 进行了额外的文献搜索和试验分析。试验重复 3 次, 选择具有代表性的图谱进行标注, 筛选出差异表达蛋白, 将不同比较组中表达量上调的蛋白点标注到对应的 2-DE 图谱上 (图 1)。扫描图上蛋白点的匹配采用 PDQuest 8.0 软件进行分析, 经手工逐点校准进行质量检查后, 平均匹配率为 83.1% 以上。比较试验组和对照组分离图, 差异表达蛋白被筛选和选择, 试验组有 12 个差异表达蛋白上调。



A. 对照组; B. 试验组。图上数字为样品编号。

图 1 精子细胞中差异表达蛋白点双向凝胶电泳示意

2.2 差异表达蛋白点分析

筛选出的表达丰度差异表达蛋白进行蛋白点酶消化，而后经质谱仪进行蛋白鉴定。经 NCBI 和 Mascot 数据库进行差异表达蛋白匹配搜索，成功鉴定与精子功能相关的典型差异表达蛋白 9 个，其中 2 个相同蛋白（表 2）。筛选的差异表达蛋白相对分子质量（Mrs）和等电点（pIs）与理论值较为接近。由表 2 可知，其中匹配到的 8 个蛋白中与精子成熟、精子运动、精卵识别等生理功能相关的蛋白，分别是 PEBP4、IZUMO4、PSP-1、AWN、SPMI、COX6A1、DLD 以及 TCP1。

表 2 NAGase 抑制剂乙酰胺处理精子差异表达蛋白的鉴定

样品编号	鉴定蛋白名称	变化程度
4305	PEBP4	2.08*
5104	COX6A1	3.33*
6208	IZUMO4	2.49*
6712	DLD	5.39*
6810	TCP1	2.29*
8003	PSP-1	6.81*
8103	AWN	9.86*
9109	AWN	3.57*
9110	SPMI	3.03*

注：与对照组相比，* 表示 $P < 0.05$ 。

2.3 差异表达蛋白的功能分类

从图 2 可知，NAGase 抑制剂乙酰胺处理显著增加了精子生理机能相关蛋白的表达。根据 KEGG 数据库鉴定差异表达蛋白参与的生理调控进程大致分为 5 类，包括精子发生（12%）、单精受精（38%）、线粒体功能（12%）、精卵识别（13%）和线粒体能量供应（25%）。这些分类的蛋白参与的过程与精子生理功能均密切相关，尤其是精子的能量来源涉及的精子线粒体功能占比。另外，本结果中鉴定出的差异表达蛋白 IZUMO4，涉及蛋白主要是核孔复合体蛋白包括核孔复合体蛋白 93、核孔复合体蛋白 214、核孔复合体蛋白 85 和核孔复合体蛋白 210。基于以上分析，推测精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后，IZUMO 等精卵识别和受精相关蛋白上调可能与 NAGase 和 IZUMO 相互作用有关。

2.4 差异表达蛋白互作关系预测

为了明确精卵识别过程中 NAGase 与 IZUMO4 蛋白相互作用机制，对蛋白互作效应进行了预测。通过 STRING 工具分析蛋白质互作关系，结果如图 3 所示。精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后，精子细胞中差异表达蛋白相互作用以 IZUMO4 蛋白为核心蛋白

的代谢网络，涉及精卵识别和精子获能等过程。

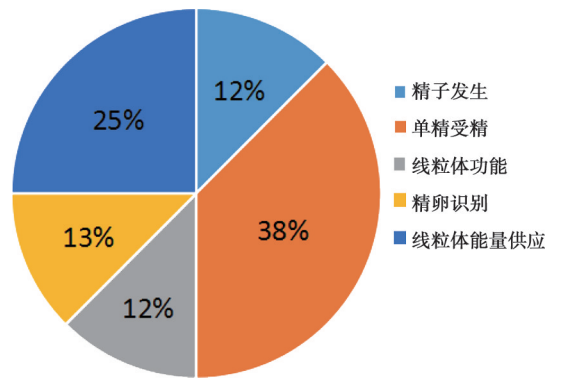
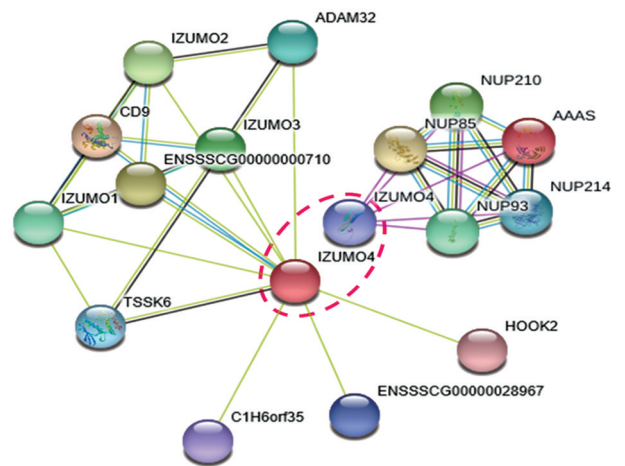


图 2 NAGase 抑制剂乙酰胺处理筛选的差异表达蛋白功能分类



不同颜色表示来源不同的关联度，绿色表示邻近，蓝色表示基因组共呈现，黑色表示共表达，红色表示基因融合，紫色表示试验获得，浅蓝色表示来源基础数据库，黄色表示来源于 PubMed 摘要。下同。

图 3 涉及 IZUMO4 蛋白的蛋白质互作功能预测分析

如图 4 所示精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后，精子细胞中差异表达蛋白 PSP-1 被显著上调表达，分析以 PSP-1 蛋白为核心蛋白的代谢网络，涉及受精过程中精子与卵母细胞的相互作用的透明带结合蛋白（ZBPB），精子获能相关的顶体反应结合蛋白（ACRBP），附睾精子结合蛋白（ELSPBP1），维持精子形态完整的肌动蛋白结合蛋白 β 亚基（CAPZB），外密纤维蛋白（ODFP），谷胱甘肽过氧化物酶 5（GPX5）等。

精液中 NAGase 被抑制可显著降低线粒体的活性，对涉及线粒体功能的差异表达蛋白进行蛋白质互作预测分析，其结果如图 5 所示。精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后，精子细胞中差异表达蛋白线粒体终止蛋白 PEBP4 被显著上调表达，可能通过调节线

粒体核糖体蛋白 (MRP) -L4、L17、L44 和死亡联合蛋白 (DAP) -3 的表达和功能发挥作用。

OGDH 样蛋白 (OGDHL), 丙酮酸脱氢酶 E1 α 亚基 (PDHA1) 等。

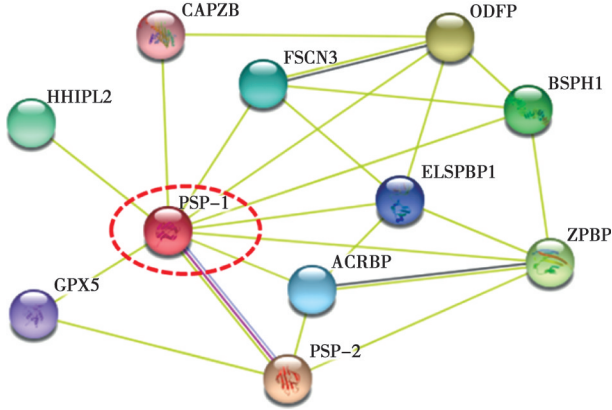


图 4 涉及 PSP-1 蛋白的蛋白质相互作用功能预测分析

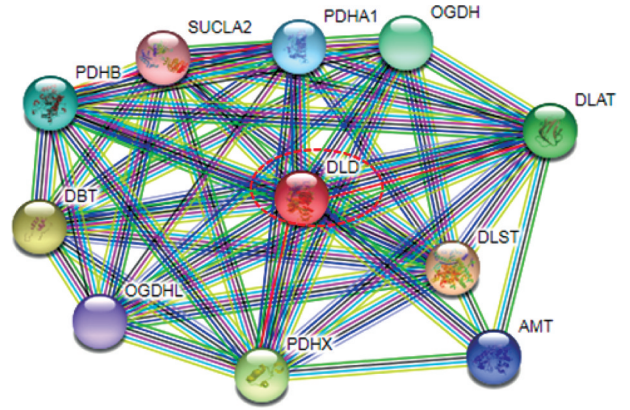


图 7 涉及 DLD 蛋白的蛋白质相互作用功能预测分析

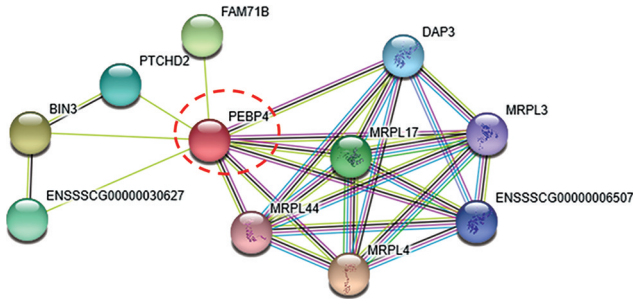


图 5 涉及 PEBP4 蛋白的蛋白质相互作用功能预测分析

如图 8 所示, 精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后, 精子细胞中差异表达蛋白 TCP1 被显著上调表达, 分析以 TCP1 蛋白为核心蛋白的代谢网络, 涉及精子的发生相关的 CCT 家族蛋白, 巴德-毕德氏综合征 10 蛋白 (BBS10), 麦库西克-卡恩斯综合征蛋白 (MKKS) 等。

如图 6 所示, 精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后, 精子细胞中差异表达蛋白 COX6A1 被显著上调表达, 分析以 COX6A1 蛋白为核心蛋白的代谢网络, 涉及线粒体呼吸链生理过程的泛醌-细胞色素 c 还原酶 (UQCR) 铁硫蛋白 1 (UQCRFS1), UQCR 10 kDa 蛋白 (UQCR10), UQCR 核心蛋白 Q (UQCRQ) 等。

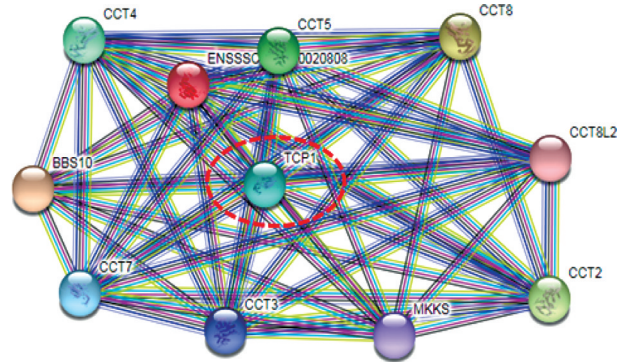


图 8 涉及 TCP1 蛋白的蛋白质相互作用功能预测分析

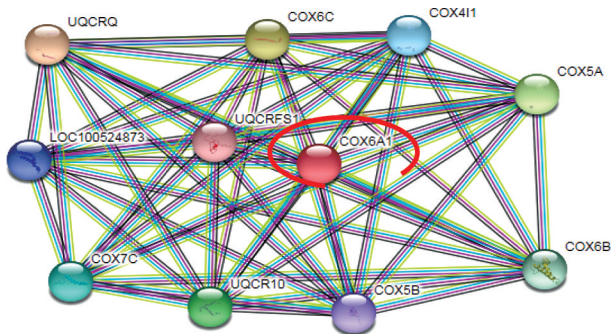


图 6 涉及 COX6A1 蛋白的蛋白质相互作用功能预测分析

如图 9 所示, 精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后, 精子细胞中差异表达蛋白 AWN 被显著上调表达, 分析以 AWN 蛋白为核心蛋白的代谢网络, 涉及维持精子的形态和受精过程中精子与卵母细胞的相互作用的 ZPBP, 精子细胞发育过程中顶体的形成过程相关的双 Y 结构域包含蛋白 (DYDC1), 精子的运动相关的 Ropporin1 蛋白 (ROPN1) 等。

如图 7 所示, 精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后, 精子细胞中差异表达蛋白 DLD 被显著上调表达, 分析以 DLD 蛋白为核心蛋白的代谢网络, 涉及线粒体的能量供应相关的 2-氧戊二酸脱氢酶 (OGDH),

如图 10 所示, 精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后, 精子细胞中差异表达蛋白 SPMI 被显著上调表达, 分析以 SPMI 蛋白为核心蛋白的代谢网络, 涉及维持精子的形态和受精过程中精子与卵母细胞的相互作用的 ZPBP、ZPBP2, 与精子获能及单精受精等生理过程相关的核旁斑点结构蛋白 1 (PSPC1), 精子

的运动相关的 ODFP 等。

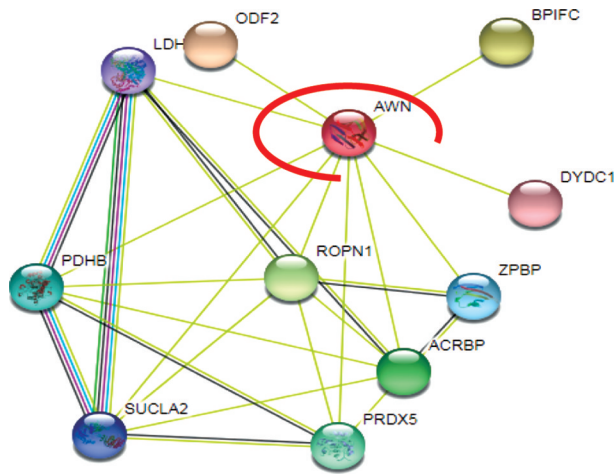


图9 涉及 AWN 蛋白的蛋白质互作功能预测分析

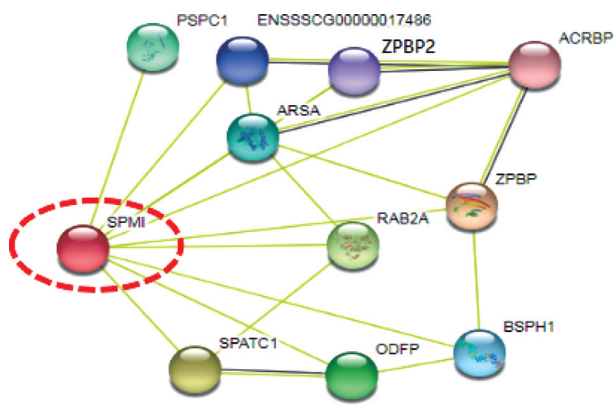


图10 涉及 SPMI 蛋白的蛋白质互作功能预测分析

3 讨论

3.1 NAGase 在精子功能调节中的作用及其潜在机制

NAGase 主要存在于脏器、睾丸组织中，具有特殊的生理功能，其不仅是生物体糖类物质分解代谢的水解酶，还是糖蛋白、糖脂生物合成中寡糖链的修饰酶，参与了糖基化过程和生殖细胞识别等。关于 NAGase 对生殖细胞的影响研究已经有一些报道，但是 NAGase 如何调节糖蛋白识别并参与受精进程调控仍不清晰。试验结果显示，NAGase 抑制剂乙酰胺处理显著改变了精子细胞中蛋白的表达。在相同试验条件下，双向电泳结果经 PDQuest 8.0 软件和 MALDI-TOF 质谱分析发现在乙酰胺处理下精子细胞中出现 12 个表达丰度差异大于 2.0 倍或小于 0.5 倍的蛋白点，成功鉴定 8 个差异表达蛋白。这些差异表达蛋白的功能主要是：PEBP4 主要涉及线粒体的翻译终止进程，涉及线粒体 MRP-L4、L17、L44 和 DAP-

3^[15]，对于精子细胞而言，该蛋白表达上调会降低精子线粒体提供的 ATP，进而减低精子运动活性。COX6A1 主要涉及质子跨膜转运和线粒体 ATP 代谢^[16]。IZUMO4 蛋白主要参与的是精卵识别和受精的过程，核心在于精子与卵子的质膜融合参与单次受精^[17]，涉及蛋白主要包括 IZUMO-1、2 和 3，睾丸特异性丝氨酸激酶 6 (TSSK6)；NAGase 被抑制后，可能影响了 NAGase 与 IZUMO 蛋白的相互作用^[18]；此外，IZUMO 蛋白还与核孔复合蛋白关系密切。DLD 蛋白主要参与线粒体能量代谢中的三羧酸循环^[19]。TCP1 主要参与输卵管细胞外囊泡与精子的相互作用^[20]。PSP-1 主要是参与精子获能、单精受精等生理过程^[21]，与 ACRBP 和 ZPBP 相互作用防止多精入卵。AWN 属于精子黏附蛋白家族，与 PSP-2 作用密切，参与精子获能，单精受精等生理过程^[22]。SPMI 也属于精子黏附蛋白家族，与 PSP-2 作用密切^[23]，参与精子获能、单精受精等生理过程，并且该蛋白具有具结合磷酸化胆碱的活性，参与受精过程的信号传递。差异表达蛋白筛选结果表明精子细胞中涉及精子线粒体功能和线粒体活性、精卵识别和精子活力的蛋白上调。通过蛋白互作预测分析显示精液中 NAGase 活性被乙酰胺抑制后，精子细胞中差异表达蛋白相互作用以 IZUMO 蛋白为核心蛋白的代谢网络，涉及精卵识别和精子获能等过程。尽管本试验观察到了这些蛋白表达的显著变化，但目前还不能确定它们是否都是 NAGase 的直接底物。考虑到 NAGase 在精子功能中的多方面作用，这些蛋白的变化可能部分是由于 NAGase 活性抑制后对精子功能的间接影响^[24-25]。例如，PEBP4 的上调可能影响了精子线粒体功能的调节，进而影响了精子的运动能力^[26]。此外，IZUMO 精卵融合蛋白的上调可能与精子与卵子融合过程中的膜相互作用有关^[27]。

3.2 IZUMO 蛋白在精卵识别与融合中的作用及其与 NAGase 活性的关联

IZUMO 蛋白被证明是精子的表面关键蛋白，并且参与精卵结合^[28]。在有性生殖过程中，雌雄个体产生形态学上完全不同细胞的相遇与结合形成新的个体，此过程中雌雄个体生殖细胞的结合具有特定互作效应，是细胞膜识别与融合的过程^[29]。研究指出，精子在卵细胞透明带表面的结合并不足以诱导精子发生顶体反应，精卵的识别取决于透明带蛋白的分裂状态，尤其是透明带蛋白中 ZPBP2 的分裂状态^[30]。精子表面配体蛋白在精子发生顶体反应前处于隐藏状态，参与精卵识别过程，能够促进精卵的融合^[31]。相关研究表明精子发生顶体反应以及精卵识别过程需要 CD9 蛋白和 IZUMO 蛋白参与^[32-33]。仓鼠受精试验

结果显示人 IZUMO 抗体使用可以抑制精子和卵子融合^[34]。基因敲除 IZUMO1 后雌性小鼠尽管具有正常生育能力,可完成交配行为,但精卵识别及膜融合受到抑制而不能产生子代^[35]。这也进一步说明精子缺少 IZUMO 蛋白就不能正常受精。本研究结果显示抑制 NAGase 后精子中 IZUMO4 蛋白显著上调,这也说明 IZUMO4 蛋白在精子发挥生理功能中与 NAGase 活性密切相关。根据大鼠和人的 IZUMO4 蛋白功能推测,虽然 IZUMO4 蛋白并不是跨膜蛋白,但很可能参与精卵融合的环节涉及精卵识别、顶体反应、穿越透明带等^[35-36]。

3.3 NAGase 抑制对精子蛋白表达的影响及其在精卵融合中的作用

过去的研究中指出参与精卵质膜融合蛋白或关键分子很多,如富含半胱氨酸的分泌蛋白 2 (CRISP2)、精子赤道段蛋白 1 (SPESP1)、TSSK6 等。基因敲除结果显示精卵融合中涉及 IZUMO1 蛋白的结构与疟原虫孢子阶段表达的入侵蛋白质含血小板反应蛋白 (TSP) 重复序列的匿名蛋白和对细胞穿越至关重要的孢子体微线蛋白 1 (MCRS1) 的结构相似^[37]。精卵融合蛋白的形成中类似于病毒融合的方式招募^[38]。相关研究人员在对融合蛋白形成的研究表明卵细胞膜和精子膜可经历膜识别中形成融合孔,从而导致膜融合触发精卵融合^[39-40]。研究结果显示抑制 NAGase 后, TCP1 亚基 3、PSP-1 和 AWN 等蛋白被显著上调。TCP1 亚基 3 是一种环状的低聚异复合体,参与精子发生中的蛋白结构构建,与 PSP-1 和 AWN 一起调节精子的活性。此外,上调表达的还包括线粒体 DLD 和 TCP1。研究指出 DLD 是在好氧性糖分解时,作为从丙酮酸形成乙酰辅酶 A 阶段极其重要的蛋白。抑制 NAGase 活性后精子的运动性能降低,通过上调或异常激活 DLD 从而促进精子的继续运动。NAGase 作为一种水解酶在高等真核生物中移除多余糖基成分是维系高等真核生物生命活动的重要保证^[41]。在合适环境条件下,NAGase 作为一种外切糖苷酶从非还原末端专一性地逐步切下复合型 N-寡糖,以精子质膜糖蛋白的形式在精子穿透卵子细胞的过程中发挥作用^[42]。另外,IZUMO 家族蛋白是一种免疫球蛋白,IZUMO1 蛋白是其家族蛋白成员中重要的一种蛋白,也是一种膜蛋白,IZUMO1 蛋白有一个含接近 150 个氨基酸的“IZUMO 蛋白结构域”和 8 个半胱氨酸残基“IZUMO 蛋白结构域”,这些结构决定 IZUMO1 蛋白的生物活性^[43]。然而 IZUMO1 蛋白有着胞外区的免疫球蛋白样结构域是保护 IZUMO1 不被降解的保守的 N-聚糖^[43]。CRISPR/Cas9 编辑研究结果也显示 IZUMO1 蛋白的表达变化不影响精卵融

合,这也推测 IZUMO1 蛋白不参与融合过程^[44]。无论顶体反应后是单次跨膜或是经短胞质尾区的变化,均具有 IZUMO1 蛋白的表达^[44],这可能与相对保守的 N-聚糖有关。

NAGase 参与精卵的识别过程,主要涉及蛋白质的修饰。IZUMO4、SPMI、PSP-1 等显著上调说明抑制 NAGase 后这些蛋白参与精卵识别、穿越透明带并引起顶体反应的能力下降。

4 结论

通过蛋白质组学分析揭示了 NAGase 在精子生理功能中的调节作用。NAGase 抑制剂乙酰胺处理精子后,影响了多个与生殖生理机能相关的蛋白表达,这些蛋白参与精子发生、单精受精、线粒体功能、精卵识别和能量供应等关键过程。特别是,IZUMO4 蛋白作为 NAGase 的一个潜在靶点,其上调表达可能与精子功能的调节密切相关。通过蛋白质互作网络分析,观察到 NAGase 抑制对精子线粒体供能和精卵识别过程的直接影响,这可能对受精率产生重要影响。尽管 IZUMO 蛋白的确切作用机制尚未完全阐明,但其在线粒体功能和精卵识别中的作用不容忽视。NAGase 在精子功能调节中的潜在作用及其通过 IZUMO 蛋白等关键蛋白形成的调控网络,为理解精子生理学提供了新的视角,并为改善动物繁殖效率提供了可能的分子靶点。

参考文献:

- [1] NGUYEN H A, NGUYEN T H, KREN V, et al. Heterologous expression and characterization of an N-acetyl- β -D-hexosaminidase from *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 [J]. *J Agr Food Chem*, 2012, 60 (12): 3275-3281.
- [2] CATTANEO F, OGISO M, HOSHI M, et al. Purification and characterization of the plasma membrane glycosidases of *Drosophila melanogaster* spermatozoa [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, 32 (8): 929-941.
- [3] 林建城, 吴建洪, 林娟娟. 二甲亚砜对中国鳖 NAGase 的抑制作用 [J]. *水产科学*, 2023, 42 (4): 719-725.
- [4] 章文, 林心宇, 黄小红, 等. 单糖对猪精液碱性 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的影响 [J]. *福建农林大学学报 (自然科学版)*, 2012, 41 (3): 271-275.
- [5] 林建城, 胡建辉, 吴钦端. 日本鳗鲡肠道 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的分纯化及酶学性质 [J]. *水生生物学报*, 2022, 46 (9): 1301-1309.
- [6] 赖育河, 林心宇, 黄小红. 莆田黑猪精液中 NAGase 酶学特性研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41 (11): 160-164.
- [7] 周秀芬, 姜宏. 线粒体功能与精子活力 [J]. *国际生殖健康*, 2009, 28 (6): 355-357.
- [8] 商学军, 黄宇烽, 叶章群, 等. 褪黑素在活性氧致精子线粒体

- 功能损伤中的保护作用 [J]. 中华男科学杂志, 2004, 10 (8): 604-607.
- [9] 黄小红, 罗忠宝, 李明伟, 等. 猪精液碱性 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶的纯化与酶学性质研究 [J]. 中国农业科学, 2008, 41 (9): 2843-2849.
- [10] LEE S Y, PARK J Y, CHOI Y J, et al. Comparative proteomic analysis associated with term placental insufficiency in cloned pig [J]. Proteomics, 2007, 7 (8): 1303-1315.
- [11] 林秋敏, 谢正露, 林心宇, 等. 乙酰胺对杜洛克公猪精子顶体完整性及线粒体活性的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2021 (8): 53-56.
- [12] QIU N, LIU W, MA M, et al. Differences between fertilized and unfertilized chicken egg white proteins revealed by 2-dimensional gel electrophoresis-based proteomic analysis [J]. Poult Sci, 2013, 92 (3): 782-786.
- [13] ZHENG N Z, ZHU Z M, XIN Q W. Differential protein profiles in duck meat during the early postmortem storage period [J]. Anim Sci J, 2019, 90 (6): 757-768.
- [14] SHEVCHENK O, ANDRE J, WIL M, et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels [J]. Anal Chem, 1996, 68 (5): 850-858.
- [15] ZADRAZNIK T, HOLLUNG K, EGGE-JACOBSEN W, et al. Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. J Proteomics, 2013, 78 (1): 254-272.
- [16] 安丽萍, 杜瑞丽, 徐广宇, 等. 猪精浆液中磷脂酰乙醇胺结合蛋白 4 的纯化及其一级结构分析 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2010, 36 (6): 1196-1200.
- [17] 周子晔. 克唑替尼代谢抑制引起 COX6A1 下调致肝脏毒性的机制研究 [D]. 温州: 温州医科大学, 2022.
- [18] 沈睿. 牛 JUNO 与精子 IZUMO1 蛋白结合的关键氨基酸位点研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023.
- [19] 来兄. TSSK6 与 IZUMO1 和 IZUMO4 在绵羊精子上的共定位 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.
- [20] 柴瑞兰. 超低温保存对猪精子 DLD 和 SDHB 蛋白功能的影响 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
- [21] 杨娜, 邢蒙恩, 丁莹莹, 等. 弓形虫假定的 TgTCP-1 伴侣蛋白与宿主细胞唾液酸受体结合的研究 [C]. 中国畜牧兽医学分会兽医寄生虫学分会第一届青年科学家学术论坛, 沈阳, 2019.
- [22] 滕尚辉, 宋成义. 猪 PSP-1/PSP-II 的生物学特性研究 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007 (5): 54-55.
- [23] 胡安琪. 不同条件下猪精液质量及精子黏附蛋白基因家族表达的差异 [D]. 南宁: 广西大学, 2017.
- [24] 杜海波, 黄生强, 马乐. 猪脂多糖结合蛋白家族及其基因的研究进展 [J]. 国外畜牧学 (猪与禽), 2010, 30 (3): 89-90.
- [25] DOE J. Indirect effects of NAGase inhibition on sperm function: a proteomic perspective [J]. Fertil Res Pract, 2020, 6 (1): 1-10.
- [26] ROE A. Direct and indirect substrates of NAGase in the context of sperm capacitation [J]. Mol Reprod Dev, 2021, 88 (4): 425-435.
- [27] SMITH J A, LEE D D, BROWN P. The role of NAGase in sperm function and its potential as a therapeutic target [J]. Reprod Biol, 2021, 45 (3): 567-578.
- [28] JOHNSON L, WANG Z. Proteomic analysis of sperm proteins: implications for fertility and assisted reproduction [J]. Reprod Sci, 2022, 29 (2): 203-213.
- [29] INOUE N, IKAMA M, ISOTANI A, et al. The immunoglobulin superfamily protein Izomo is required for sperm to fuse with eggs [J]. Nature, 2005, 434 (7030): 234-238.
- [30] STEIN K K, PRIMAKOFF P, MYLES D. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane [J]. J Cell Sci, 2004, 117 (26): 6269-6274.
- [31] GAHLAY G, GAUTHIER L. Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg zona pellucid protein [J]. Science, 2010, 329 (5988): 216-219.
- [32] OKABE M. The cell biology of mammalian fertilization [J]. Development, 2013, 140 (22): 4471-4479.
- [33] 林秋敏, 赖宝色, 林心宇, 等. 斑马鱼 IZUMO1 蛋白对体外受精作用的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2023, 29 (1): 64-69.
- [34] NAOUR F, RUBINSTEIN E, PRENANT M, et al. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice [J]. Science, 2000, 287 (5451): 319-321.
- [35] ELLERMAN D A, PEI J, GUPTA S, et al. IZUMO is part of a multiprotein family whose members form large complexes on mammalian sperm [J]. Mol Reprod Dev, 2009, 76 (12): 1188-1199.
- [36] WANG P, HUO H L, WANG S Y, et al. Cloning, sequence characterization, and expression patterns of members of the porcine TSSK family [J]. Genet Mol Res, 2015, 14 (4): 14908-14919.
- [37] SINGARAVELU G, RAHIMI S, KRAUCHUNAS A, et al. Forward genetics identifies a requirement for the IZUMO-like immunoglobulin superfamily spe-45 gene in caenorhabditis elegans fertilization [J]. Curr Biol, 2015, 25 (24): 3220-3224.
- [38] INOUE N, IKAMA M, OKABE M. Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377 (3): 910-914.
- [39] YOUNG S A, MIYATA H, SATO Y, et al. CRISPR/Cas9 mediated mutation revealed cytoplasmic tail is dispensable for IZUMO1 function and male fertility [J]. Reproduction, 2016, 152 (6): 665-672.
- [40] PETIT F M, SERRES C, BOURGEON F, et al. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding [J]. Hum Reprod, 2013, 28 (4): 852-865.
- [41] PANG P C, CHIU P C, LEE C L, et al. Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis^x oligosaccharide on the zona pellucida [J]. Science, 2011, 333 (6050): 1761-1764.
- [42] SLAWSON C, HOUSLEY M P, HART G W. O-GlcNAc cycling: how a single sugar post-translational modification is changing the way we think about signaling networks [J]. J Cell Biochem, 2006, 97 (1): 71-83.
- [43] INOUE N, HAMADA D, KAMIKUBO H, et al. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion [J]. Development, 2013, 140 (15): 3221-3229.
- [44] SATO Y, INOUE N, IKAWA M, et al. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1 [J]. J Cell Sci, 2012, 125 (Pt 21): 4985-4990.