

·基础研究·

前列腺精子结合蛋白的二维凝胶电泳及质谱分析

骆建民¹, 谢江新², 王 俐³

(1. 汕头大学医学院神经修复研究室, 广东 汕头 515031; 2. 香港大学巴斯德研究所, 香港; 3. 汕头大学医学院附属第一医院皮肤科, 广东 汕头 515041)

摘要: 【目的】应用精子膜蛋白亲和层析柱分离金黄地鼠前列腺精子结合蛋白, 并用二维电泳和质谱对金黄地鼠前列腺精子膜结合蛋白进行初步分析。【方法】应用附睾精子膜亲和层析柱纯化前列腺精子结合蛋白, 采用二维凝胶电泳对纯化的前列腺精子膜结合蛋白进行蛋白分离和图像分析, 并结合基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析及数据库搜索从而鉴定部分蛋白质斑点; RT-PCR 检测已鉴定蛋白在前列腺及未受精卵子中的 mRNA 的表达。【结果】附睾精子膜蛋白亲和层析柱可纯化出前列腺结合蛋白, 前列腺附睾精子膜蛋白结合蛋白的二维凝胶电泳蛋白图谱。分离的蛋白质斑点为 30 个, 质谱鉴定出 2 个蛋白点, 一为热休克蛋白 105, 另一羧基还原酶(NADPH)-3。前列腺和未受精卵中均表达热休克蛋白 105 和羧基还原酶-3 的 mRNA。【结论】自前列腺分泌物中分离出精子膜结合蛋白, 金黄地鼠前列腺中精子结合蛋白经双向电泳及飞行质谱分析鉴定出蛋白热休克蛋白和羧基还原酶。

关键词: 前列腺分泌蛋白; 附睾精子膜蛋白; 二维凝胶电泳; 质谱

中图分类号: R697.35

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0601-06

Analysis of Ventral Prostate Secretory Sperm Binding Proteins by 2D-Electrophoresis and MOTIF

LUO Jian-min¹, XIE Jiang-xin², WANG Li³

(1. The Lab of Neural Repair, Shantou University Medical College, Shantou 515031, Guangdong, China; 2. Pasteur Research Center, The University of Hong Kong, Hong Kong; 3. The First Affiliated Hospital, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China)

Abstract: 【Objective】The aims of this study was to identify and purify the ventral prostate secretory sperm binding proteins and analyze the ventral prostate sperm binding proteins by 2D - electrophoresis and MOTIF. 【Methods】The ventral prostate secretory sperm binding proteins were identified and purified by epididymal sperm membrane affinity chromatography. The protein spots excised from 2D gels were digested with trypsin and then the resulting peptides were identified by using peptide mass fingerprinting feature by database searching. The mRNA of heat shock protein-105 and carbonyl reductase(NADPH)-3 were detected in ventral prostate gland and unfertilized oocyte by RT-PCR. 【Results】It was purified sperm membrane proteins from ventral prostate secretory proteins. About 30 spots were separated by 2D-electrophoresis. Heat shock protein-105 and carbonyl reductase-3 are identified by MOTIF from ventral prostate sperm binding proteins. Both mRNA of heat shock protein-105 and carbonyl reductase (NADPH)-3 were expressed in ventral prostate glands and unfertilized oocyte. 【Conclusions】About 30 of ventral prostate secretory proteins bind to sperm. Heat shock protein-105 and carbonyl reductase (NADPH)-3 are identified from the ventral prostate secretory sperm binding proteins.

Key words: ventral prostate secretory protein; epididymal sperm membrane protein; 2D-electrophoresis; mass spectrometry

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):601-606]

收稿日期: 2007-06-15

基金项目: 广东省医学科研基金(A20030503)

作者简介: 骆建民(1962-), 男, 福建惠安人, 博士, 讲师, 通讯作者, 骆建民, E-mail: jml@stu.edu.cn

前列腺为雄性附属性腺之一,而精浆主要由雄性附属性腺分泌。精浆对精子生殖力的影响有许多矛盾报道;体外获得的牛附睾尾部的精子的生殖力低于射出的精子的生殖力,但在猪猫和大鼠则相反^[1]。更多的证据表明精浆蛋白与生殖力相关。高生殖力的牛精浆中存在 M_r 为 26 k 的 pI6.2 和 M_r 为 55 k 的 pI4.5 蛋白,但低生殖力的牛精浆中存在另两种蛋白^[2]。马、人精浆中也发现与生殖力相关蛋白^[3]。雄性附属性腺对生殖力的影响目前主要来自啮齿类动物实验,去除雄性附属性腺,特别是前列腺和精囊腺可导致小鼠、大鼠的生殖力下降,去除全部附属性腺或壶腹腺或前列腺可引起胚胎早期死亡^[4]。体外实验显示前列腺或壶腹腺可影响修饰精子的膜蛋白和膜糖蛋白^[5]。交配后精浆停留于子宫内,其中的大分子不能通过子宫进入输卵管内。鉴于精子仅在射精时与附属性腺分泌物接触,就此笔者认为雄性附属性腺蛋白可能与精子表面特异结合进而影响生殖力。精子表面存在附属性腺抗原和精浆来源物已有报道^[6],但缺乏对附属性腺每一腺体成员影响精子生殖力、精子膜的了解。既往研究证实腹前列腺和壶腹腺对生殖力有调节作用,进一步的研究表明仅腹前列腺起作用^[4]。认识前列腺的影响生殖力的作用,首先应分离与精子作用的蛋白。本研究应用附睾精子膜蛋白亲和层析分离前列腺蛋白,应用二维电泳电泳和质谱对金黄地鼠前列腺精子膜结合蛋白进行初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料及设备

1.1.1 研究对象 金黄地鼠前列腺分泌物及附睾精子。

1.1.2 试剂及设备 除非特别提及,所有化学试剂均为分析纯并购自美国 Sigma (USA) 公司。胰酶(typsin)购自美国 Promega 公司。等电聚焦所用的固定 pH 梯度胶条 (immobilized pH gradient strip, IPG strip)、再水化液、覆盖液、2-D Clean-Up 试剂盒均为英国 Amerchan 公司产品。双向电泳在 Ettan IPGphor IEF System 和 Ettan DALT twelve Large Vertical system (英国 Amerchan 公司)的装置上进行。飞行质谱分析采用 Voyager-DE™ STR (PE Biosystems, USA)质谱仪分析。

1.1.3 附睾精子膜蛋白制备 附睾精子收集,4 只健康 14~20 周龄雄鼠用致死量的 4%戊巴比妥钠麻醉后,切开腹腔,暴露并游离附睾;用含 5 mmol/L HEPES/0.264 mmol/L 蔗糖缓冲液 [pH 7.4, 含 2 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 和 10 mmol/L 碘乙酰胺]的注射器 21 号磨平针头,经输精管逆行冲出精子。冲出精子经 PBS (pH 7.4,含 2 mmol/L PMSF 和 10 mmol/L 碘乙酰胺)洗 3 次(每次在 4 条件下 600 ×g 离心 5 min)。重悬于 0.5% NP-40 蔗糖缓冲液中,调整精子浓度为 2×10^6 /mL,置于冰上 20 min。然后在 0, 10 000 ×g 下离心 15 min,收集上清即为膜蛋白,经超滤膜浓缩后(Centricon-3, 美国 Amicon 公司)定量蛋白。

1.1.4 前列腺分泌物的收集 将 6 只 14 周龄金黄地鼠的前列腺 (VPG) 分离。腺体表面切几个口,置自制不锈钢滤网上,离心收集分泌物于离心管内。收集的腺体分泌物置 -20 °C 冰箱待用。

1.2 鉴定和纯化前列腺分泌物中精子结合蛋白

1.2.1 精子膜蛋白基质亲和层析柱纯化前列腺结合蛋白 附睾精子膜蛋白亲和柱的制备步骤略述如下,收集的附睾精子膜蛋白溶于磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)上 DEAE-柱,经含 1 mol/L NaCl 的磷酸缓冲液 (PB, 0.02 mol/L, pH 5.8)洗脱。收集的洗脱组分经饱和硫酸铵沉淀、过滤后用双蒸水透析后冻干即为金黄地鼠附睾精子膜蛋白 (EPI)。2 g 活化 CNBr-Sephrose4B 凝胶经溶胀后,经 400 mL 10^{-3} mol/L HCl 淋洗 15 min。30 mg 的 EPI 溶于 10 mL 交联溶液内并在室温下与凝胶混匀 2 h。凝胶中未结合的蛋白经 600 ×g 离心 10 min 去除。剩余的活化基团用 1 mol/L 甘氨酸封闭。将制备好的 EPI-CNBr-Sephrose4B 凝胶装柱。柱洗 3 遍去除非特异吸收蛋白,每 1 遍顺序用含 1 mol/L NaCl (0.1 mol/L 乙酸盐缓冲液 pH 4) 和含 1 mol/L NaCl (0.1 mol/L 硼酸盐 pH 8.0) 缓冲液洗, EPI-Sephrose-4B 亲和柱已制备待用。前列腺分泌物在 2 000 ×g 离心 30 min,收集上清用 0.05 mol/L PB, pH 7.4 调整蛋白为 3 mg/mL。前列腺蛋白上 EPI-Sephrose4B 柱,含 3 mol/L KSCN PB 缓冲液洗脱特异结合蛋白。洗脱的组分收集、透析、冻干、储存于 -20 °C。

1.2.2 结合蛋白电泳分析 结合蛋白的非变性和变性 SDS-PAGE 电泳。8 μg 的前列腺精子结合蛋白上样于 10%非变性凝胶 (凝胶和缓冲液中无

SDS) 和 10% SDS-PAGE 中电泳分析。考马斯亮蓝染色。二维凝胶电泳分析。前列腺分泌物溶于裂解液(8 mol/L, Urea 40 g/L, CHAPS 40 mmol/L Tris)中, 经 4 低温超速离心 12 000 ×g 30 min 后收集上清, 35 μg 样本上样电泳, 2-D 标准品(Bio-Rad 公司, USA)同时在另一凝胶上电泳。凝胶经银染显色。所有实验至少重复 3 次。凝胶斑点经扫描仪 Image Scanner (Amersham, 英国)扫描, 图像贮存分析, 对应的斑点的等电点和分子量参照 2-D 标准品确定。双向电泳分离的结合蛋白的胶上消化。参照 SDS-PAGE 电泳对应的分子量的结果在 2D 凝胶上的选取 13 个斑点。手工将斑点切除置 1.5 mL 离心管内, 将 3 块凝胶的斑点置同一管内, 加入高纯度的胰酶消化并抽提蛋白。

飞行质谱分析。应用 Voyager-DE™ STR 质谱仪在 20 kV 加速电压和 70%栅极电压下进行质谱分析, 肉桂酸 [CHCA (alpha cyano- 4-hydroxy cinnamic acid)]作为基质。新鲜配制 10 mg/mL 肉桂酸于乙腈溶剂(含 0.1%三氟乙酸)中。抽提的消化蛋白(或多肽)按 1:4 比例与基质充分混合。将制备好的样本滴于不锈钢的样本台上, 空气干燥。质谱数据的校准收集和数据库搜索。依照标准肽质谱值进行样本本质谱值校准。各质谱峰值导入 MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>) 计数数据库进行匹配搜索。

1.2.3 RT-PCR 验证相应鉴定蛋白 mRNA 的表达 雄性金黄地鼠过量麻醉处死, 游离 14~20 周龄的前列腺, 在雌鼠发情期分离卵巢和输卵管, 冲出未受精卵, 用于 mRNA 的抽提取。RNA 的提取与 cDNA 合成: 分别取约 50 mg 干重前列腺组织或未受精卵用 Trizol (Invitrogen, 美国) 试剂盒提取总 RNA。cDNA 合成根据逆转录酶 (Qiagen, 德国) 说明书操作。PCR 扩增: 含 10×缓冲液 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL, dNTP(1 μL), 上下游引物(12.5 pmol/L) 各 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.3 μL (1 U), cDNA 1.5 μL, 补足 ddH₂O 至总体积为 25 μL。在 DNA 循环合成仪(德国, Eppendorf)内扩增。采用热启动法, 反应条件为: 94 预变性 5 min, 94 1 min 变性, 53 1 min 退火, 72 1.5 min 延伸, 共进行 35 个循环, 72 7 min 延伸。以 β 肌动蛋白作为内参照, 引物序列从 Genbank 获褐家鼠热休克蛋白 105 (NP001011901) 和羧基还原酶 (LOC688320) 序列, 获金黄地鼠 β 肌动蛋白 (CAC38394), 应用 Primer primer5 软件设计引物,

具体如下。β 肌动蛋白, 上游: 5 - GCTGTCCCTGTA TGCCTCT - 3, 下游: 5 - CTCGTTGCCAAT GGTGAT - 3, 扩增产物 343 bp。热休克蛋白, 上游: 5 - TATCCAGCAAGACAACAGT - 3, 下游: 5 - TCAGAAGGTCCCTCCCTA - 3, 扩增产物 245 bp; 羧基还原酶, 上游: 5 - TATCAATGTAGGCAAAG AAGC - 3, 下游: 5 - CTGTAGGTGGTCAAGTT AGGA - 3, 扩增产物 483 bp; 扩增产物经 1%琼脂糖电泳, 溴化乙锭染色, 凝胶成像系统(美国, UVP) 摄取图象并分析条带的光密度值, 以 β 肌动蛋白的条带作为内参, 获得相对光密度值。

2 结果

2.1 EPI-sepharose 4B 亲和柱分离前列腺分泌蛋白

前列腺分泌蛋白结合洗脱组分紫外光吸收谱见图 1, 峰 为前列腺蛋白不与基质结合蛋白。峰 经含 0.5 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L PB, pH 7.4 洗脱峰, 提示为非特异性与精子膜结合蛋白。峰 用含 3 mol/L KSCN 的 0.01 mol/L PB, pH 7.4 缓冲液洗脱的峰, 这一组分为特异性与精子膜结合蛋白。

2.2 前列腺精子结合蛋白的电泳分析

2.2.1 前列腺精子结合蛋白非变性电泳及 SDS-

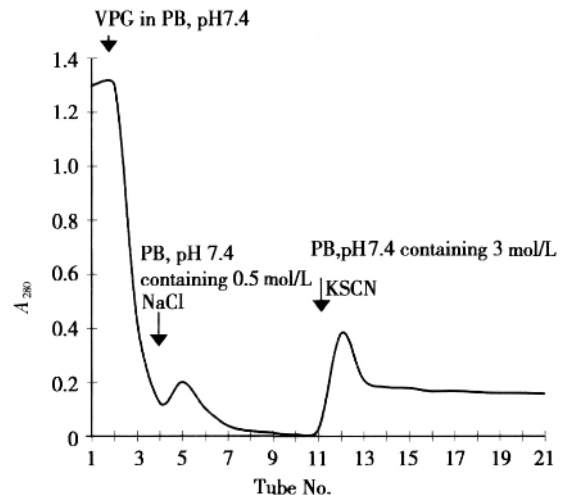


图 1 附睾精子膜蛋白亲和层析柱分离前列腺分泌蛋白洗脱组分紫外光吸收谱

Fig.1 Elution profile of VPG secretions from an EPI-affinity column.

VPG secretions were applied to an EPI-Sepharose 4B column, washed with PB containing 0.5 mol/L NaCl and then eluted with PB containing 3 mol/L KSCN.

PAGE电泳分析 分离的前列腺精子膜结合组分的非变性电泳,可见 2 条主带(图 2,泳道 2)。而 10% SDS-PAGE 电泳分析结果示,9 条蛋白电泳带,分子量分别为 75 ku, 53 ku, 44 ku, 30.5 ku, 27 ku, 24 ku, 17 ku 和 16.5 ku, 还有一分子量小于 14.4 ku 带(图 3)。其中 75 ku, 53 ku 组分为主带。27 ku 带在前列腺分泌物中为次要带,但经精子膜蛋白亲和柱层析后则成结合蛋白中的主带。



图 2 前列腺分泌物及附睾精子膜结合蛋白非变性电泳分析结果

Fig.2 10% Native gel electrophoresis of VPG secretory proteins

Lane 1: crude VPG secretions (30 μg); Lane 2: VPG secretions purified by epididymal sperm membrane affinity chromatography (8 μg).

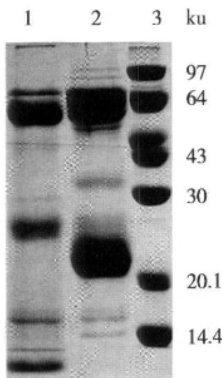


图 3 前列腺分泌物及附睾精子膜结合蛋白 SDS-PAGE 电泳分析结果

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis of VPG secretory proteins

Lane 1: VPG secretory proteins isolated by epididymal sperm membrane matrix affinity chromatography (8 μg); Lane 2: crude VPG secretions (30 μg); Lane 3: MW marker.

2.2.2 2D- 电泳分析前列腺精子膜结合蛋白 2-D-PAGE 电泳标准蛋白作为标注测定同时分离蛋白的分子量和等电点值。图 4 示 2-D PAGE 电泳前列腺精子结合蛋白。大约可分辨 30 斑点,参

照单向电泳结果,自凝胶切下斑点胰酶消化进一步进行 MS-TOF 分析。

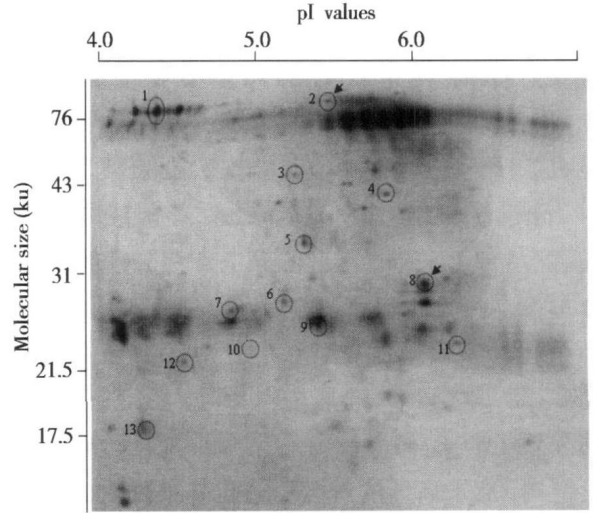


图 4 前列腺附睾精子膜结合蛋白的二维电泳

Fig.4 2D-electrophoresis of ventral prostate secretory sperm binding proteins

The numbered and encircled spots indicate proteins which were cut from gel to analyzes. The two proteins indicated by an arrow were identified using matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry (MALDI-MS) and peptide matching.

2.2.3 选取斑点进行 MALDI-TOF 选取了 13 个斑点胰酶消化 MS-TOF 分析,11 个斑点的肽质量指纹图谱与数据库无匹配结果。斑点 2 (MW 90 ku, pI 5.4)飞行质谱图(图 5),质谱峰值 1637.4、2095.26、2836.26、2980.35 和 3365.05。空白凝胶经胰酶消化后作为对照。搜索匹配结果见表 1,最高匹配值蛋白是热休克蛋白 105 ku,由此初步得出斑点 2 为热休克蛋白 105 ku。

图 6 为斑点 8(MW 30.5 kD, pI 5.9)的质谱图,峰值 645.48, 1083.99, 1099.93, 1811.21 和 2167.42 进行质谱肽库检索。检索结果见表 1。匹配值最高者为羧基还原酶[NADPH]-3。实验分子量与等电点与理论分子量与等电点的值一致。斑点 8 鉴定为羧基还原酶 (NADPH)-3。

2.2.4 RT-PCR 分析热休克蛋白和羧基还原酶在前列腺和未受精卵中的表达 RT-PCR 扩增热休克蛋白、羧基还原酶和 β-肌动蛋白基因,扩增产物电泳显示,前列腺和未受精卵呈现特异性中热休克蛋白、羧基还原酶基因条带(图 7),表明前列腺和未受精卵均表达热休克蛋白、羧基还原酶的 mRNA。

热休克蛋白分为两类,一类为分子伴侣参与蛋白折叠组装,另一类损伤蛋白的稳定因子,在细胞受到打击时蛋白质有机会修复或降解。近来认识到热休克蛋白具保护细胞抑制细胞凋亡作用。在炎热季节,牛精子中 HSP70 显著减少。尽管机制不清,仍有证据提示热休克蛋白在受精与胚胎早期发育中起重要作用。发育的胚胎呈现 HSP70 可抵抗应激引起的凋亡^[9]。胚胎基因组激活,细胞分裂时需要应激保护因子,然而牛卵子和 2- 个细胞期胚胎自身含热休克蛋白,并且 2- 细胞期胚胎热休克蛋白的合成增加^[10]。本实验金黄地鼠未受精卵也表达热休克蛋白 mRNA。前列腺所提供的热休克蛋白有何作用,特别是对胚胎发育的影响我们仍不清楚。自主性 HSP70 合成出现于小鼠胚胎基因组的激活至桑葚期达最适水平, HSP70 的表达在培养的小鼠胚胎中增加 5~15 倍。热休克蛋白合成的增加可能为胚胎发育提供适当的条件。

睾丸和精子内的热休克蛋白 105 ku 属 HSP70 家族,热休克蛋白 105 ku 在生殖系统和胚胎发育过程中起与 HSP70 类似的作用,既往观察前列腺对胚胎发育的效应与 HSP70 作用类似。本研究中分离的精子结合蛋白与热休克蛋白 105 有 60% 同源性,但其双向电泳的分子量为 90 ku。此前分泌的 HSP90 蛋白可能是 HSP105 家族的新成员。

目前为止前列腺蛋白影响胚胎发育的确切机制仍然不清。本研究提示前列腺热休克蛋白与精子结合。精子膜本身富含热休克蛋白, HSP70 在精子膜上的功能可能不参与应激反应,因为染色质是高度浓缩的不同于体细胞的应激反应。据 HSP 90 ku 与热休克蛋白 105 ku 同源性可推测前列腺所提供的蛋白可能参与受精后或胚胎发育。

羧基还原酶 (secondary - alcohol: NADP (+) oxidoreductase, EC 1.1. 1.184) 属短链脱氢酶/还原酶 (SDR) 家族。羧基还原酶 (CBRs) 活性依赖于 NADPH, 多数单体,胞浆酶对内源性 & 外源性的羧基化合物具广泛底物特异性。它们既催化还原内源性前列腺素、类固醇和其他脂肪族醛和酮,也还原多环芳香碳水化合物衍生物苯醌或醌^[11]。金黄地鼠精子蛋白 26 kDa (P26h) 与小鼠肺羧基还原酶 (MLCR) 高度同源,并且在睾丸及附睾总蛋白抽提液中表达^[12]。P26h 主要以 4 聚体形式存在于睾丸细胞的线粒体内,控制细胞内雄激素的浓度,

在生精过程中,这一蛋白进入精子线粒体^[12]。蛋白 P26h 的底物谱广为多种羧基化合物,由于线粒体内 NAD⁺ /NADH 比率较胞浆低, P26h 作为还原酶还原睾丸或附睾线粒体内脂过氧化反应的衍生羧基化合物。另外 P26h 通过与配体相互作用而发挥作用,抗 P26h 抗体可抑制精子与透明带结合^[13]。羧基还原酶抑制剂可阻断精子与透明带的结合,精子的 P26h 可能在受精过程中起作用^[14]。有报道在未成熟精子细胞上存在胞浆形式的 P26h,附睾腔液中具可溶性的 P26h。精子在经过附睾时最终获得 P26h 并以磷脂酰肌醇 GPI- 锚定在精子顶体膜蛋白上^[15]。本研究 RT- PCR 证实前列腺和未受精卵中有羧基还原酶 mRNA 的表达。本研究首次提示前列腺中含羧基还原酶此酶与精子结合。我们既往研究提示前列腺不影响受精,前列腺中此酶功能仍然不清。

肽质量指纹图谱鉴定蛋白质需要多种数据结合,因数据库资料的限制、存在物种差异、蛋白质的修饰变化等,所鉴定的蛋白质实际值和数据库理论值不一定完全符合。本研究自前列腺中分离出精子膜结合蛋白,经双向电泳和飞行质谱鉴定出两种热休克蛋白- 90 ku 和羧基还原酶,前列腺影响胚胎的早期发育可能与热休克蛋白相关。其影响胚胎早期发育的作用有待进一步证实。

参考文献:

- [1] ARANGASAMY A, SINGH L P, AHMED N, et al. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa [J]. Anim Reprod Sci, 2005, 90(3- 4):243- 254.
- [2] MOURA A A, KOC H, CHAPMAN D A, et al. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach [J]. J Androl, 2006, 27(2): 201- 211.
- [3] JOBIM M I, BUSTAMANTE FILHO I C, TREIN C, et al. Equine seminal plasma proteins related with fertility [J]. Anim Reprod Sci, 2005, 89(1- 4):305- 308.
- [4] JIANG H Y, O W S, LEE K H, et al. Ablation of paternal accessory sex glands is detrimental to embryo development during implantation [J]. Ant Embryol (Berl), 2001, 203(4): 255- 263.

- correlation with age, gender and severity of cataract[J]. *Curr Eye Res*, 2003, 27(1):45- 53.
- [2] ORLOWSKI M, WILK S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complexes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 383(1):1- 16.
- [3] JENNER P. Oxidative stress in Parkinson s diseases[J]. *Ann Neurol*, 2003, 53 (Suppl 3):S26- 38.
- [4] REINHECKEL T, SITTE N, ULLRICH O, et al. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress [J]. *Biochem J*, 1998, 335 (Pt 3): 637- 642.
- [5] HOSLER M R, WANG-SU S T, WAGNER B J. Targeted disruption of specific steps of the ubiquitin- proteasome pathway by oxidation in lens epithelial cells [J]. *Int J Biochem Cell Bid*, 2003, 35(5):685- 697.
- [6] NANDI D, TAHILIANI P, KUMAR A, et al. The ubiquitin- proteasome system [J]. *J Biosci*, 2006, 31(1): 137- 155.
- [7] LIU Q, SHANG F, GUO W, et al. Regulation of the ubiquitin proteasome pathway in human lens epithelial cells during the cell cycle [J]. *Exp Eye Res*, 2004, 78 (2):197- 205.
- [8] QURESHI N, VOGEL S N, VAN WAY C 3rd, et al. The proteasome: a central regulator of inflammation and macrophage function[J]. *Immunol Res*, 2005, 31 (3): 243- 260.
- [9] 杨艳艳, 牛朝诗. 泛素蛋白酶体系统与帕金森病 [J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5(9): 962- 965.
- [10] PEREIRA P, SHANG F, HOBBS M, et al. Lens fibers have a fully functional ubiquitin- proteasome pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76(5):623- 631.
- [11] VITERI G, CARRARD G, BIRLOUEZ- ARAGON I, et al. Age- dependent protein modifications and declining proteasome activity in the human lens [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 427(2):197- 203.
- [12] ANDERSSON M, SJOSTRAND J, KADSSON J O. Differential inhibition of three peptidase activities of the proteasome in human lens epithelium by heat and oxidation [J]. *Exp Eye Res*, 1999, 69(1):129- 138.

(编辑 刘清海)

(上接第 606 页 from page 606)

- [5] CHENG L Y L, YUEN A C Y, CHOW P H. Electrophoretic study of modification of sperm plasma membrane by ventral prostate secretion in golden hamsters [J]. 1995, 35(1): 13- 20.
- [6] AUMULLER G, RENNEBERG H, SCHIEMANN P J, et al. The role of apocrine released proteins in the post- testicular regulation of human sperm function [J]. *Adv Exp Med Bid*, 1997, 424:193- 219.
- [7] YING Y, CHOW P H, O W S. Effects of male accessory sex glands on deoxyribonucleic acid synthesis in the first cell cycle of golden hamster embryos [J]. *Bid Reprod*, 1998, 58(3): 659- 663.
- [8] 彭蔚, 余敏斌, 吴开力, 等. 正常人眼小梁组织的二维凝胶电泳及质谱分析. [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27(6):672- 676.
- [9] NEUER A, SPANDORFER S D, GIRALDO P, et al. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis [J]. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 1999, 7(1- 2): 10- 16.
- [10] EDWARDS J L, HANSEN P J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two- cell embryos and compromises function of maturing oocytes [J]. *Bid Reprod*, 1996, 55(2):341- 346
- [11] FORREST G L, GONZALEZ B. Carbonyl reductase [J]. *Chem Biol Interact*, 2000, 129(1- 2): 21- 40.
- [12] ISHIKURA S, USAMI N, KITAHARA K, et al. Enzymatic characteristics and subcellular distribution of a short- chain dehydrogenase/reductase family protein, P26h, in hamster testis and epididymis [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(1):214- 224.
- [13] MONTFORT L, FRENETTE G, SULLIVAN R. Sperm- zona pellucida interaction involves a carbonyl reductase activity in hamster [J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61(1): 113- 119.
- [14] BERUBE B, SULLIVAN R. Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26- kDa sperm glycoprotein [J]. *Bid Reprod*, 1994, 51(6):1255- 1263.
- [15] LEGARE C, BERUBE B, LEFIEVRE L, et al. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol- anchored protein [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 52(2):225- 233.

(编辑 徐杰)