

Major Role of Human KLK14 in Seminal Clot Liquefaction

Received for publication, February 13, 2008, and in revised form, May 13, 2008 Published, JBC Papers in Press, May 15, 2008, DOI 10.1074/jbc.M801194200

Nashmil Emami^{‡§}, David Deperthes[¶], Johan Malm^{_}, and Eleftherios P. Diamandis^{‡§1}

From the [‡]Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, Ontario M5G 1L5, Canada, the [§]Department of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario M5G 1X5, Canada, [¶]Med Discovery S.A., Biopôle, Chemin des Criosettes 22, CH-1066 Epalinges, Switzerland, and the ^{_}Department of Laboratory Medicine, Section for Clinical Chemistry, Lund University, Malmö University Hospital, Malmö SE-205 02, Sweden

Journal of Biological Chemistry, 2008, July 11, Volume 283, Number 28, page 19561–19569

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Table 1 and Fig. 1.

To whom correspondence should be addressed: FRCPC, Dept. of Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital, 600 University Ave., Toronto M5G 1X5, Ontario, Canada. Tel.: 416-586-8443; Fax: 416-619-5521;

E-mail: ediamandis@mtsina.on.ca

The abbreviations used are: KLK, human kallikrein-related peptidase; ACT, antichymotrypsin; AMC,

7-amino-4-methylcoumarin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; pNA, para-nitroanilide; Sg, semenogelin;

TBS, Tris-buffered saline; Suc, succinyl; BisTris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol.

中文翻译全文

人类精液凝胶块在液化过程中 KLK14 所起的作用研究

摘要

KLKs 称为 Kallikrein 的相关肽的缩写, 精液凝胶块的液化过程与其中蛋白的降解以及活精子释放出的物质有关。KLKs 是一个有若干个成员的家族群, 它们在精液凝胶块的液化过程中均参与了作用, 发挥其功能作用关键在于极大地调节了蛋白质水解降解的连锁放大效应。在上述的 KLKs 家族成员中, KLK3 (即前列腺专一抗原) 是一个具有主要的实质性作用的酶, 负责处理精液凝胶块的原发成分 (即精液凝胶素 I 和 II, 即 SgI 和 SgII) 的生物物质。我们近来已经鉴别出 KLK14 属于 KLK3 和其他的 KLKs 的潜在的上游激活剂。本研究在于阐明 (ex vivo, 即利用在体外的活体实验方法) KLK14 是如何起中介上述蛋白质水解连锁放大效应的。在临床上, 精液凝胶块液化延缓患者的 KLK14 表达极低者 ($p=0.025$), 同时精子活力不足者的 KLK14 也明显地低 ($p=0.0478$)。由人工合成的 ACT_{G9} 是具有专一抑制 KLK14 的活力, 它能够产生明显的精液凝胶块液化的延缓效应。“原先前”射精后, “类似于胰凝乳蛋白酶效应”和 KLK1 活力的 30 分钟延缓的, 会致使再进一步“延晚”至射精后 90 分钟才液化的“类似于胰凝乳蛋白酶效应”。相反地如果加入 KLK14 就使得精液凝胶块的液化容易得多, 其根源在于增大了早期的“类似于胰凝乳蛋白酶效应”, 并且降低了后期的“类似于胰凝乳蛋白酶效应”。由于观察到的“类似于胰凝乳蛋白酶效应”的活力应该几乎完全地归属于 KLK3 的作用所致, 因此 KLK3 应该是一个具有双相调节作用的。因此高水平的 KLK3 裂出, 可以在 KLK14 诱导的凝胶块中观察到, 因此这一结果建议失活机制来源于内部断裂。最后, 精液凝胶素 I 和 II 的分裂是由于 KLK14 起作用的。在锌离子的存在下, 精液凝胶素可以逆转 KLK14 的抑制作用, 由此提出了一个新的 KLK14 活力的调节机制。我们的实验结果展示了, KLK14 起到一个明显的、具有剂量效果的精液凝胶块液化

过程关键作用。

序言

精子的发生过程，也可以说就是睾丸干细胞分化为成熟精子的过程。它是由睾丸生精管开始，先产出尚未成熟的精子（1~3），然后在付睾过渡中变成为成熟的精子，因为就是在付睾环境中使没有成熟的精子变成为具有活动能力和具有受精生育能力的精子的（4、5）。在受精时精子的活动能力特别地重要，因为此时精子必需非常容易地穿越过卵细胞的透明区，达到与卵细胞的融合而实现受精生育结局（1、2、6）。

精子的活力不足，可以认为是精子在活动能力上有损害，它是男性低生育能力、或不能生育的主要原因。当然也可以由于男性精液不完全液化、液化缓慢、不能液化的状况的原因有关（7~9）。正常的情况之下，男性的精液凝块被储存于睾丸后部鞘膜腔内的（10~12）。男性射精以后，精液仅仅在 5~20 分钟内就相继液化（10、13），如此的过程就让精液凝块所包含的精子群体可以逐步地释放和游动出来，去实现受精作用。如上所谓的液化过程，实际上是精液凝胶蛋白水解裂解的步骤，将精液凝胶块的精液胶 I 和 II（简称为：SgI 和 SgII）裂解为可溶性强的蛋白质分子，继之又被裂解为更小的肽片，最后又将此类肽片分解为所组成氨基酸的残基（14~18）。

在生命系统中精液凝块与液化过程的管理是及其严密有序的。例如，男性射精之前和遭受结构改造之前，Sg 蛋白质能螯合了非常多的锌离子，诱导其聚集为巨大分子的复合物（19~23）。Sg 蛋白质的降解主要受 KLK3（全称为：kallikrein-related peptidase 3,中文即为“血管舒张缓素相关肽酶 3”）的激活而调控着。这一物质也叫做前列腺专一抗原（22、24、25）。KLK3 的酶活力紧密地受到一系列的内源性抑制物和调节反馈环所调控的（26），如与 Sg 蛋白质一起的有丝氨酸酶抑制剂、蛋白质 C 抑制剂等（这些物质是由精细胞囊泡内腔面所分泌的）。近来的研究指出蛋白质 C 抑制剂与 Sg 蛋白质的复合物能够阻止由激活的 KLK3 引起其早熟性水解（27）。在前列腺的分泌过程中，KLK3 的活力可以进一步由于游离的锌离子被抑制（25、28）。Sg 蛋白质与游离锌离子的螯合，即刻产生了可以利用的锌离子水平的下降，由此而导致了 KLK3 的激活。相反地，当 Sg 蛋白质被切成为碎片时，锌离子就缓缓地释放了出来。锌离子水平的增加起到负反馈环的作用，又阻止过多蛋白质的水解，否则会导致精子自身天然的健康性（29）。

近来证明 Sg 蛋白质的水解调节过程中更具有复杂性。例如，体外试管实验证明，其他的蛋白酶也直接与间接地参与 Sg 蛋白质降解的处理过程（30~32），特别是 KLK 相关的其他家族成员（如 KLK2 和 KLK5）。此外，最新报导认为，精液液化的蛋白质酶学水解机制的调节是属于一系列正、负反馈环所控制的。例如，KLK5 属于自动激活，继之激活 KLK3（33）。虽然也有相反的报导，认为 KLK2 激活 KLK3 原（34~36）。最后论及我们的工作，我们认为，KLK14 是 KLK3 原和其他几个精液 KLKs 原（如 KLK1 原与 KLK11 原）的潜在上游激活剂（37）。对于经典的蛋白质水解体系的特点，我们以前提到过 KLK3 的双相调节机制，在此说法中，由 KLK14 中介的激活之后，就有激活的 KLK3 在 145 位的赖氨酸残基位置内部断裂的失活行为存在（37）。

KLK14 是一个类似于胰乳蛋白酶的 KLK 成员，优先攻击精氨酸部位（37）。锌离子具有强烈地抑制 KLK14 的酶活力（38），在精液液化过程中，还具有蛋白质的潜在内力的加固作用。本文对于精液中企图描述 KLK13 可能功能，本研究阐明，在精液液化过程中 KLK14 酶与其他的潜在的存在于蛋白质水解整个体系中所涉及的其他成分之间的关系。

实验方法

试剂有：

合成基质 Suc-Arg-Pro-TyrpNA_HCl (RPY-pNA) 和 Pro-Phe-Arg-AMC (PFR-AMC)/
Gln-Ala-Arg-AMC (QAR-AMC) 分别购自BACHEM (King of Prussia, PA) 公司 和 Pharmacia
Hepar-Chromogenix (Franklin, OH) 公司
重构自大肠杆菌的pro-KLK3赠自于Spectral Diagnostic Inc. (Toronto, Canada) 公司
小鼠抗KLK3单克隆抗体购自 Medix MAB (Kauniainen, Finland). 公司
重构 KLK1, -4, -5, -11, -12, -14; 和KLK14-专一化单克隆 (clone 2E9) 和兔抗KLK14/KLK3
多克隆抗血清由本实验室根据文献所述 (38) 自制
重构KLK2赠自Hybritech Inc. (San Diego, CA) 公司
Western blot用的共轭山羊抗兔抗体和化学发光荧光基质分别购自Jackson ImmunoResearch
Laboratories 公司和 Diagnostic Products Corp公司
N-Hydroxysuccinimide-activated Sepharose 4 快流玻璃珠购自 GE Healthcare公司
认识KLK1的HUK-IgG抗体和纯化的Sg 蛋白分别赠自Prof. J. Chao (Medical University
of South Carolina) 和Dr. J. Malm (Malmo University Hospital, Sweden)
ACTG9、 KLK14专一重构变株抑制剂与Dr. D. Deperthes (Med-Discovery) 合作应用文献
(40) 所述方法自制。

材料有:

凝固的精液: 具有正常液化速度的精液在常温下采集, 一个样本分为3份, 立即储存于-80
摄氏度的冰箱中, 直至使用。液化的精液来自于95位个体。其中分为两组: 正常液化组
与迟缓液化组。

液化的精液: 这些个体均经过 the Institutional Review Boards of Mount Sinai Hospital
and the University Health Network会珍确认, 如果需要, 则人工收集起来, 进行乳化,
加以凝乳蛋白酶37摄氏度保温1小时后使用。

ELISA分析

KLK14蛋白表达水平的是用Sandwich型号的ELISA仪器进行测定, 应用小鼠单克隆/兔多克隆
构型, 如前报导所述操作 (38、41), 主要做法为, 每井500ng抗KLK14的单克隆抗体 (clone
2E9), 稀释于覆盖缓冲液中 (50 mmol/liter Tris, 0.05% sodium azide (pH7.8)), 被固定
于96井白色聚苯乙烯平板上室温过夜。平板然后用缓冲液 (50 mmol/liter Tris, 150
mmol/liter NaCl, 0.05% Tween 20 (pH 7.8)) 洗2次。精液浆以1: 10比例稀释于缓冲液中
(50 mmol/liter Tris, 6% bovine serum albumin, 10% goat IgG, 2% mouse IgG, 1%
bovine IgG, 0.5 mol/liter KCl, 0.05% sodium azide, pH 7.8), 被下载, 在室温中温
育2小时。继之平板洗6次。100 μ l 兔抗KLK14多克隆血清稀释于100倍的缓冲液中保温1小
时。继之平板洗6次, 与已经与山羊抗兔IgG (3000倍稀释) 的碱性磷酸酶温育45分钟。最
后用缓冲液 (diflunisal phosphate, 100 μ l of a 1 mM solution) 溶于基质缓冲液中 (0.1
mol/liter Tris, pH 9.1, 0.1 mol/liter NaCl, and 1 mmol/liter MgCl₂), 每井加入保
温10分钟, 接着每井加入发展颜色的溶液 (100 μ l, containing 1 mol/liter Tris base, 0.4
mol/liter NaOH, 2 mmol/liter TbCl₃, and 3 mmol/liter EDTA) 保温1分钟。所产生的荧
光用时间分辨荧光计读出。同样地KLK1、KLK2、KLK4、KLK5、KLK11、KLK12 均可以用上述
类似方法读出 (41)。

精液临床参数测定

液化速度: 用Pasteur吸管, 全部液体进入吸管内为完全液化。此外用相差显微镜观察, 全
部胶状结构的消失作为完全液化指标。

总体精子活动率: $[(a+b)/(a+b+c)]100\%$, a、b、c分别示精子具有运动方向的数目、随机运动的数目、无运动的数目。小于或等于35%者被认为无能精液患者。

Sgi和SgII蛋白质的降解

分别为500 ng 纯Sgi和SgII蛋白质与56ng的KLK14 (溶于30 μ l的该蛋白的分析液中, 分析液为: 100 mM phosphate buffer, 0.01% Tween 20, pH 8.0), 摄氏37保温至各个时间点。到时中断方法为放入液氮中冷冻中断反应, 在还原条件下跑SDS凝胶电泳, 跑完电泳用银染色显示电泳蛋白分布片段。

Sg蛋白中介锌离子的可逆抑制

用12nM的KLK14与0和120nM锌离子(醋酸锌)温育, 最终体积100 μ l, 37摄氏度, 10分钟。之后荧光基质QAR-AMC加入(最终浓度1mM), 释放荧光的测量通过仪器读出(Wallac Victor fluorometer, PerkinElmer Life Sciences), 激发光为 355 nm, 发射光为460nm, 测20分钟, 5分钟起开始读。如上所述每井中加入0.05 μ M 的SgI、SgII或0.01M EDTA, 测量如上所述。粗读数需要减去本地为真值, 每个样本实验3次。

酶活力分析

精液浆样本中“胰凝乳蛋白酶样”活力, 稀释10倍动态测定, 用0.8mM比色基质RPY-pNA总体积为100 μ l的 KLK3缓冲液中(0.1 mM Tris, 3 mM NaCl, 0.01% Tween 20, pH 7.5), 用Wallac Victor Fluorometer仪器在405 nm. 进行吸收光谱测量, 粗测定值应该减去本底值。样品用重构KLK14或ACTG9分别处理。每个样本做3次。

KLK1专一活性测量, 采用荧光法(如文献37所述)。200ng的KLK1专一多克隆抗体

(HUKIgG)固定在96孔白色聚苯乙烯平板上过夜。平板洗2次, 然后加入反应液。KLK1的活力的测定, 为温育2小时后测定PRF-AMC基质荧光的增量, 反应的速度是通过每份荧光单位与时间作图的斜率。

精液浆中KLK3的剔除

1 mg的抗KLK3的单克隆抗体固定于1 ml的 50% N-Hydroxysuccinimide激活的Sephacrose Fast Flow玻璃珠上, 用冰冷2 ml的1 mM HCl溶液平衡3次。玻璃珠与1mg的单克隆抗前列腺专一抗原抗体在常温下保温1个小时, 并彻底地摇动混合。继之用2ml缓冲液A(50 mM Tris_HCl, 1 M NaCl, pH 8.0)和缓冲液B(0.1 M acetate, 0.5 M NaCl, pH 4.0), 清洗3次将玻璃珠上残留的活性基团被阻断。玻璃珠继续用缓冲液A清洗2次, 常温下保温15分钟。保温后的玻璃珠在用缓冲液B、A、B分别清洗3次, 达到进一步阻断。玻璃珠在TBS中(50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5)与蛋白质结合平衡。20 μ l的精液浆稀释于总体积为1ml的TBS缓冲液中, 并常温保温1小时, 进行彻底混合。流出的液体即为剔除KLK3的精液浆, 收集起来供动力学分析之用。玻璃珠用缓冲液(TBS with 2 M urea, pH 7.5)清洗5次, 用1ml缓冲液(0.1 M glycine with 2 M urea, pH 3.0)洗流出来。与此同时一个对照的剔除KLK3精液浆的样品同时进行做好。收集流出样品剔除KLK3的百分率, 用KLK3专一的ELISA分析获得。流出液用浓缩膜浓缩10倍, 浓缩膜可分离去的分子量为5000, 5 μ l浓缩膜加95 μ l分析液(合计100 μ l)进行分析。对于三肽RPY-pNA基质酶活力按照如上所述进行测定。

为了保证排除KLK3剔除之外的酶活力的下降, 2个平行实验, 即用20 μ l免疫剔除与对照实验同时进行还原状态下跑SDS-PAGE电泳。用银染色显示抗KLK3抗体的痕迹(下有述说)。

Western Blot显示精液浆中KLK3片段

为了检测KLK14中介KLK3的降解作用，将精液胶与不同量的重构KLK14作用，进行Western Blot显示。同样KLK14中介KLK3原也用Western Blot显示。将两者混合温育不同的时间取出做Western Blot显示。蛋白质做SDS-PAGE电泳（NuPAGE Bis-Tris, with 4 - 12% gradient polyacrylamide gels），200V，45分钟。然后转移至再做电泳（Hybond-C Extra nitrocellulose membrane, GE Healthcare），30V，1小时。基质进行膜的阻断一个小时（用5% milk/TBS-Tween 0.1 mol/liter Tris-HCl 内含 0.15 mol/liter NaCl and 0.1% Tween 20, 4 ° C），所用探针为兔抗KLK3多克隆血清，常温下保温1小时。膜用TBS-Tween清洗3次，继续用碱性磷酸酶连接的山羊抗兔抗体常温保温45分钟。膜按照如上清洗后，在X光片上用化学发光基质显示荧光，进行检测。

结果

精液液化速率与KLK14表达与临床表现的关系：总共有95个标本，其中35个属于正常，零61个属于精液液化延缓者。KLK14的浓度为0.2~181.2 μg/L, 平均值为13.2 μg/L，中值为6.8 μg/L。

KLK14在液化延缓组（61例）和液化正常组（35例）

(p=0.0252)	液化延缓组（61例）	液化正常组（35例）
中值	5.2 μg/L	11.5 μg/L
平均值	12.38 μg/L	12.99 μg/L

(p=0.0478)	精子活动障碍组（70例）	精子活动正常组（35例）
中值	7.9 μg/L	13.4 μg/L
平均值	9.8 μg/L	22.5 μg/L

KLK14具有精液液化蛋白酶的作用

为了进一步研究KLK14的蛋白降解酶的作用，分别将重组的KLK14和ACT₆₉加入正常的精液样品中，同时另一份以蒸馏水加入作为对照。三个样本分别在相差显微镜下观察，结果为与对照样品相比，KLK14与ACT₆₉具有相反作用，KLK14加速液化而ACT₆₉ 阻害液化。图2为相同时间拍下的显微镜照片，可以充分看出三套照片所显示的结果是明显地不同，与对照样品相比加ACT₆₉ ACT₆₉ 的样品明显液化滞后，而加重构的KLK14样品加快液化。说明ACT₆₉ 抑制液化，而重构KLK14促进液化加快。

KLK14对Sg蛋白的降解作用

KLK14具有明显的精液液化效应，我们测定构成功能的精液凝胶块的原发组成是否属于KLK14的即刻下游靶目标。为此我们测定了KLK14的断裂纯化的SgI和SgII的能力。SgI和SgII分别与重构的KLK14温育后，通过电泳展示只需12分钟KLK14几乎将全部SgI和SgII打靶很快地裂解 (Fig. 3)，其中新断裂片出现于早在2分钟的温育。

由SgI和SgII引起的锌离子抑制的可逆性研究

认为锌离子具有针对于KLK14的正离子蛋白酶抑制剂的功能(38)。如前所述，SgI和SgII能够间接通过锌离子结合至分子上去的方式，进行调节一系列的KLKs的活力，以致这些分子不能够抑制KLK的活力。为了检测是否Sg蛋白具有这种类似的效应（中介抑制KLK14），我们将KLK14与超10倍锌离子克分子比例进行温育。我们进行了如上所述的KLK14酶活力的动

态检测。反应开始之后5分钟加入SgII的加入，即很快地逆转锌离子的抑制作用 (Fig. 4)，因此展示了具有共同的调节机制（即有好几个KLKs涉及进去），但是我们的资料不显示SgI具有这种效应。

KLK14与“胰凝乳蛋白酶样作用活力”相关性的研究

通过体外实验证明，KLK3原被认为是接受KLK14下游控制的功能靶区（37），不幸的是现行在该复杂的精液浆生物样品中，尚没有可利用的工具专门定量KLK3的酶活力，然而因为KLK3显示攻击具有酪氨酸、脯氨酸、精氨酸的基质底物，因此可以认定在精液中和它的优先与基质底物认识上，KLK3是属于“胰凝乳蛋白酶样作用活力”的酶系统性质，为此我们有理由认为KLK3的活力，可以通过应用PRY-pNA基质，测量胰凝乳蛋白酶的活力进行精确地实现之。为了证明如上的假设，我们做了一系列的复杂的KLK3的剔除实验。实验结果展示约95%以上的KLK3已经被剔除了，当与对照样本相比时，对RPY的三肽基质显示出零活力 (supplemental Fig. 1A)。此外，以上洗出液和对照样品液均用银染色和针对KLK3的Western Blot 实验所证实 (supplemental Fig. 1B)，在所有的洗出液中进行蛋白鉴定，均属于全长的KLK3或属于它的片段。

在确定KLK3的活力可以用测定胰凝乳蛋白酶活力，以三肽RPY-pNA的手段加以正确评估（我们简易地称之为“胰凝乳蛋白酶样活力测定”），如此KLK14中介KLK3的调节也就可以随之测定而出了。精液中胰凝乳蛋白酶的活力与KLK14密切相关，因为经过重构的KLK14处理的精液样品在早阶段（射精后的30分钟以内），与用KLK14的抑制剂相比时，显示约78%胰凝乳蛋白酶样活力的高出 (Fig. 5A)。先前我们认为，测定道德增加属于快速性和过渡性的，继之而来的是相反，即以凝乳蛋白酶样的活力下降了。经过较长时间的保温以后（射精后的90分钟），产生了逆向的调节方向，与未处理的对照相比是下降了 (Fig. 5B)。经ACTG9处理的却增加了约10%，而经过加入重构的KLK14处理的却下降了78% (Fig. 5B)。

精液KLK3被KLK14切割的实验结果

我们以前体外研究表明，KLK3的失活属于其活性蛋白内部的裂解所致。为了肯定这一点，我们比较了KLK3的片段，非常地与KLK14的片段十分相似 (Fig. 6B)。我们所用的实验方法，属于Western Blot技术，应用兔抗KLK3多克隆血清，应用银染色技术（37），所用血清是自己实验室生产的 (Fig. 6A)。如我们所希望地，被切割的碎片与KLK14的活力密切相关。更有兴趣的是，经KLK14诱导出来的明显电泳带条可以被独特的KLK14降解下来的片段加以确定，KLK3断裂的条带是在肽链的Lys145-Lys146处（37）。

KLK14如何激活精液中的KLK1

体外实验结果表明KLK1属于KLK14的下游靶标之一（37）。为了评价精液中KLK1的KLK14中介激活作用机制，我们考察了用ACTG9处理过的样品中的KLK1专一活力，进行与未经处理的同时同样射精的样本的一部分作为对照。结果为对照样本与ACTG9处理的相比，KLK1专一活力只减弱KLK1专一活力约20%（图7A）。此结果展示出KLK14能够激活精液中的KLK1原，在KLK1的胰蛋白酶样活力高度丰富具有交叉基质底物专业性条件下，关键在于KLK1抗体具有缩穴专一性。为了排除其他的KLKs也具有的可能性，我们对于KLK1、2、4、5、11、12、14均用本实验室建立的ELISAs方法测了（补充资料表1）。抗KLK1 HUK IgG 的缩穴专一性的评估是用重构的KLK1、2、4、5、11、12、14以它们的原精液浆中存在的当量进行的（图7B）。虽然这些KLKs在溶解的情况下是高度的活跃，但是在KLK抗体缩穴以后，几乎没有酶的活力可以看到。基于如上所述，一个新奇的KLK14精液块液化功能的连锁放大通路已经被展示了出来（图8）。

讨论

人类精液射出后,在正常生理条件下,5~20分钟就液化(11),虽然其机制并不完全清楚,但是其由凝固至液化的过程认为是属于一系列蛋白酶和抑制因子在起作用(14、15)。近来报导认为血液凝固和纤维蛋白溶解系统,诸如蛋白C抑制剂、组织和尿激酶类型的血浆素原活化剂、组织因子、组织因子通路抑制剂、血液凝固因子X等,与精液液化与男性生殖有关(42-46)。整个精液的调节组成与血液凝固总体来看,所有证据可以认为纤维蛋白溶解与精液液化有类似,均具有高度、有序的蛋白质水解连锁放大程序(7, 10, 31, 47, 48)。经典的蛋白水解连锁放大系统,有三个阶段组成:启动、扩展、执行(49)。一个蛋白质降解连锁反应,通常开始于某一个外部的“刺激”,它如同一个激发器启动了蛋白酶,或内部进行自我激发启动了“开始端”;接着活性的“开始端”转变为下游的“展开机”蛋白酶变成为具有活性,并开始降解;紧接着由活性“展开机”激活“执行器”,进行迅速降解。而且激活的酶通常又激活更多的酶,形成了正反馈机制,产生更为迅速的蛋白质降解的放大效应。为了阻止不必要的蛋白质降解,典型的蛋白质降解连锁反应系统中还具有多个调节点,如同抑制剂、自动降解、内断裂机制等。积累以往的证据,可以认为KLK家族有多个成员参与精液凝块蛋白质的降解连锁反应过程中(31)。本实验室的研究资料认为,KLK14是以上反应的非常重要的成员,调节着多个KLKs的成员,包括KLK1, KLK3, 和 KLK11 (37, 50)。此外KLK14的活力可以被锌离子所抑制(38),如此加强了精液和前列腺组织中所论及的酶的功能。在本文我们首次报导KLK14精液凝块液化过程的中介作用,是起到“胰蛋白酶”样的关键作用的。

“胰蛋白酶”样的作用具有非同寻常,具有KLKs其他成员的激活剂,而且其不会自身激活的(32)。其中的KLK3就是如此的一个例子,它具有“胰蛋白酶”样的作用,不会自身激活。以往它已经作为精液浆液化过程中的一个蛋白质降解的执行者被广泛地研究过(22, 28)。然而惊人的是KLK3的表达在正常与延缓液化的案例中无差别(51),认为这是属于在蛋白质调节水平上激活不充分有畸变。以前我们报导KLK14是KLK3原的激活剂,更为有趣的是, KLK14表达过低与精液延缓液化和精子无能的病例相符合。保持凝固状态的物理条件影响着精子的运动能力,我们发现约有70%的精液液化延缓者的精子是缺乏活动能力的。这是否观察到的KLK14水平的下降属于在前列腺或精液浆中被测物质取消了表达的缘故。在本文中我们应用KLK14靶目标抑制技术和过分激活外推方法证明KLK14是精液凝胶块完全液化关键物质。

我们应用突变抑制剂ACT₆₉来进行研究,这一物质高度地选择KLK14进行抑制(40)。它在反应活性中心环夹上含有抗以凝乳蛋白酶的专门结构,对于噬菌体显示选择作用在KLK14的基质G9位置上(40)。这一抑制剂专一于KLK14,而对于其他的KLK家族如KLK2、KLK3、KLK4、KLK5、和KLK12均无抑制作用(40)。

虽然此抑制剂大大阻断了精液的液化,然而并没有完全阻断全过程。这就使我们想到除此以外,在精液液化过程中还有其他的多余其他激活剂供KLK14备用,如KLK5和KLK2等有待进一步研究。如前所述,精液的精胶素蛋白质(Sgs)也是一个影响精液液化连锁反应的因素。我们的研究资料表明KLK14能够高效率地裂解Sgs。我们以前资料也显示KLK14也参与纤连蛋白的降解作用,而后者也是精液凝胶的成分之一(22)。

而且Sg蛋白质是通过从活化的执行因子退出来的锌离子,起到结构上的支撑作用,老调节蛋白质的降解活力(29),这种可逆的效应也是由KLK家族中几个成员来实现的,如KLK3 和 KLK5 (28, 31)。我们的结果展示KLK14的生理学上调节机制是10倍克分子于SgII的浓度而发挥作用的。我们以前报道过,在体外实验中显示KLK14能够调节KLK3。更为惊奇的是在精液中KLK3具有最丰富的以凝乳蛋白酶样的10mg/mlde 表达水平(41, 52)。然而,大多数具有活力的KLK3是与精液的抑制剂构成复合物,如蛋白C和 α_2 巨球蛋白(27, 53, 54),如此一来就使它失活。尽管一些应用色层与免疫学分析报导,认为可以用来测定具有活力的KLK3(55-57),然而其低回收率限制了其在

生物学中的微量应用。由于技术上的限制，所给定的KLK3的基质底物是RPY三肽，我们以“以凝乳蛋白活力”测定了精液浆的KLK3的活力。为了保证观察到基质底物中酶活力绝大多数的KLK3的活力，我们使用了对照物是首先把KLK3剔除的样本作为对照物。我们的实验结果展示，对照物中，95%KLK3已经剔除掉，其他的酶活力也几乎不存在。剔除掉的仅仅是KLK3或其碎片。

KLK14中介KLK3活力具有双相性，因为我们观察到长温育过程中“胰凝乳蛋白酶样”的可逆关系。当男性精液射出后，KLK3被激活的动作，如同一个开始液化的触发器一样，启动了整个液化的过程，即Sg蛋白质被“胰凝乳蛋白酶消化蛋白质一样”，把Sg蛋白质切得碎碎片片，致使精液变成水样。但是也不能够老是如此切割下去，岂不是走上歪倒，也会把精子自身的蛋白也且切割了而妨害怀孕，因此在后期这种酶的切割就被阻止掉。这个结果与我们的体外试验相符合，KLK14juyou后期的致使KLK3的时或作用(37)。我们以前报道过KLK3的激活通过内切割(37)。我们现在认为属于外源性KLK14的参与，因为我们的体外试验结果认为KLK14与KLK3具有剂量效应。因此是KLK14激活了KLK3。同样地KLK14也以此方式激活了KLK1。同样地KLK2也被认为是KLK1原的激活剂(50)，由此支持了KLK1与整个精液中KLKs放大连锁系统的关系。虽然并不完全肯定，但是临床上已经初步确定KLK1具有增强精子活力功能，对于治疗精子活力不足是有改善的治疗(58, 59)。根据如上所述，男性射精以后精液的液化是生殖科学具有重大意义，是决定精子活力重要依据。至于KLK1的功能是否通过调节精液凝固/液化，尚待进一步研究。

总而言之，本文研究提供了强有力的证据，KLK14是一个生殖科学中的重要作用，中介了人类精液凝胶块的聚集与液化的功能（图8）。此一连锁时间非常相似于射精时的一触即发的结果：精液中的不同成分做了一个重新混合，是精液素Sg和锌离子也做了重新分布，在这个连锁反应系统中，KLKde家族成员或其他蛋白酶类，一下子参与了进来，启动了这一连锁反应。当然还有不少复杂的关系和调节细节有待进一步阐明。了解KLK中介精液凝胶块所起的蛋白质降解事件，已经展示出的光芒，不仅对于阐明酶家族的生理学作用，而且对于异常精子的因由也有了阐明。同样地，从治疗的角度来看，研究精液的蛋白质降解在生殖事件的价值，几乎是没有什么应用前景。但是相反地，对于生殖连锁事件中的靶标抑制对象的研究，在潜在药物避孕策略上具有良好的应用前景的。

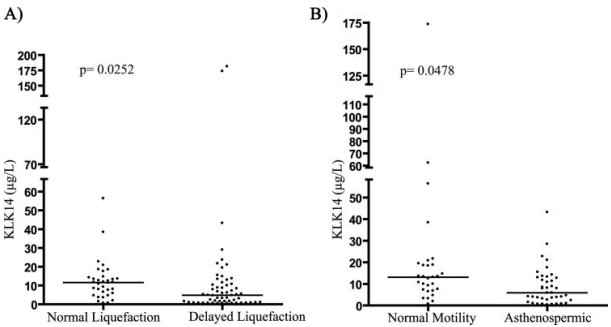


图1 临床上精液液化速度迟缓者（A）与精子活力障碍者（B）的KLK14表达的关系

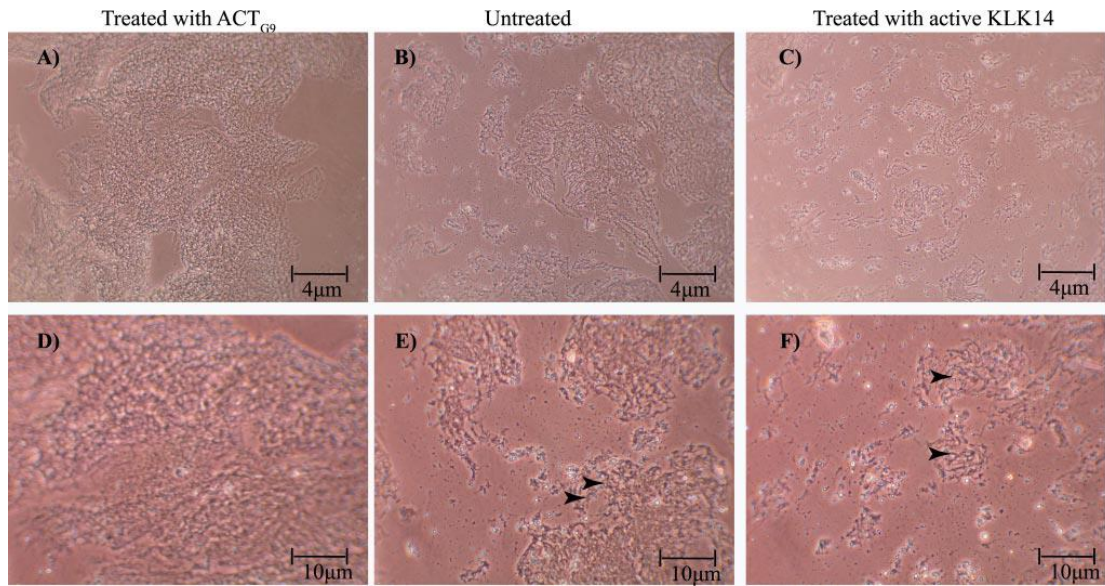


图 2 精液凝块液化水平的相差光学显微镜观察。在相差显微镜下可以观察精液凝块，箭头指示精子在空腔中扑获情形。射出精液分为三个样品，A 与 D 用 KLK14 的抑制剂处理 ($0.8 \mu\text{M}$ ACTG9)，B 和 E 为加入同样体积蒸馏水作为对照，C 和 F 为重构 KLK14 处理 ($0.8 \mu\text{M}$ KLK14)。液化块的消失通过相差显微镜的观察实现。注意在常温下 10 分钟后凝胶块强度慢慢减弱。显微镜下照片尺度：A、B、C 为 $4 \mu\text{m}$ ，D、E、F 为 $10 \mu\text{m}$ 。

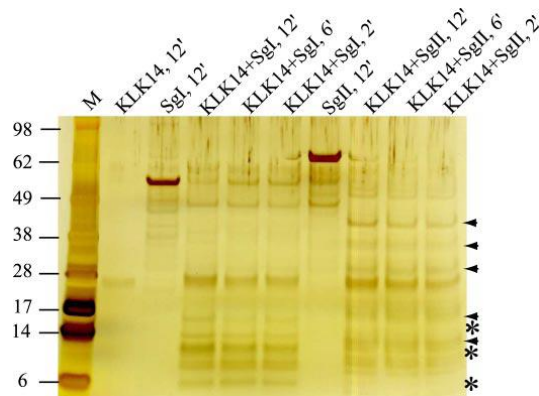


图 3 KLK14 中介精液蛋白 SgI 和 SgII 的降解：将 56ng 的 KLK14 与 500ng 的纯化的 SgI 和 SgII 分别温育，不同时间段取出样品，跑 SDS-PAGE 电泳，银染色，主要成分在邮编用箭头和星号标出，最左侧电泳条为标准分子量样品，数字为相应的 kDa。

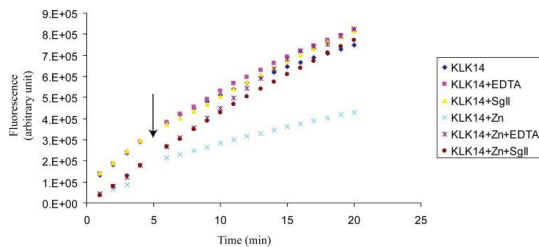


图 4 SgII 对锌离子的可逆抑制：含有 12nM 的 KLK14 的 6 个样品分别加对照缓冲液、 0.01MEDTA 、 $0.05 \mu\text{M}$ SgII， 120nM 锌离子、 120nM 锌离子 + 0.01MEDTA 、 120nM 锌离子 + $0.05 \mu\text{M}$ SgII，向下箭头指示加入 SgII 或 EDTA 的时间，注意锌离子抑制 KLK14 的残存活力几乎留在加入 SgII 后的基线上

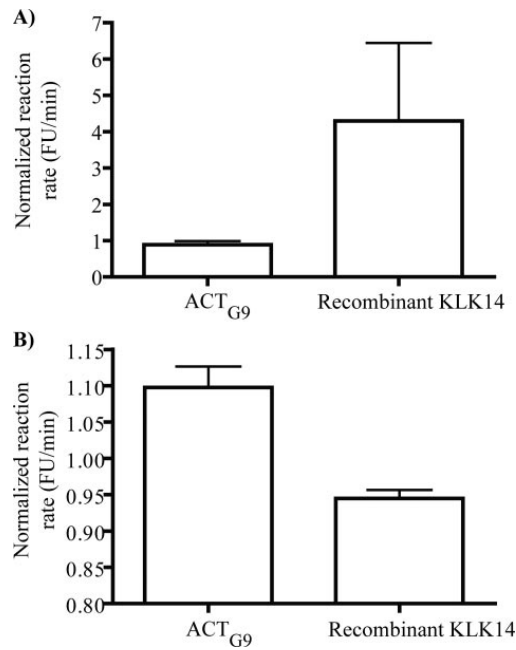


图5 KLK14 调节胰凝乳蛋白酶样活力: A 示前 30 分钟, B 示后 90 分钟。精液分为两份, 一份用 KLK14 处理, 另一份用 ACYG9 处理, 测定总胰凝乳蛋白酶样活力用 RPY-pNA 基质底物($0.8 \mu\text{M}$)。处理组的残基反应速率分别标准化为扣除未处理对照组的本底为准。注意前 30 分钟 KLK14 促进增加, 而后 90 分钟略有促进下降。

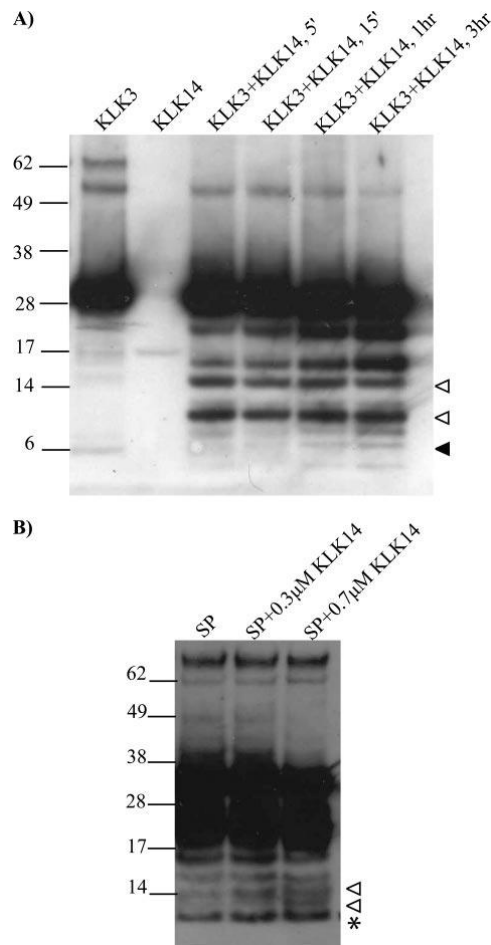


图6 KLK14中介重构KLK3 (A) 和原精液KLK3 (B) 的内裂解。(A) 重建的KLK3: KLK3原与

KLK14以1: 10的比例进行温育于37摄氏度中，不同时间取出做电泳；（B）原精液KLK3： 2 μ 精液内含约22 nM KLK3稀释15倍与磷酸缓冲液中，以 0.3 μ M (1:70克分子比例)或0.7 μ M (1:30克分子比例)的KLK14的混合物常温温育1小时，降解的KLK3碎片用免疫学方法进行检
测，运用兔多克隆KLK3抗体（1: 1000）进行。有实心箭头处为重建KLK3碎片发生处（但是B
中检测不出），空心箭头示A、B均有，*示剂量在光强度和KLK3碎片含量的依赖性增加。SP
示精液浆。

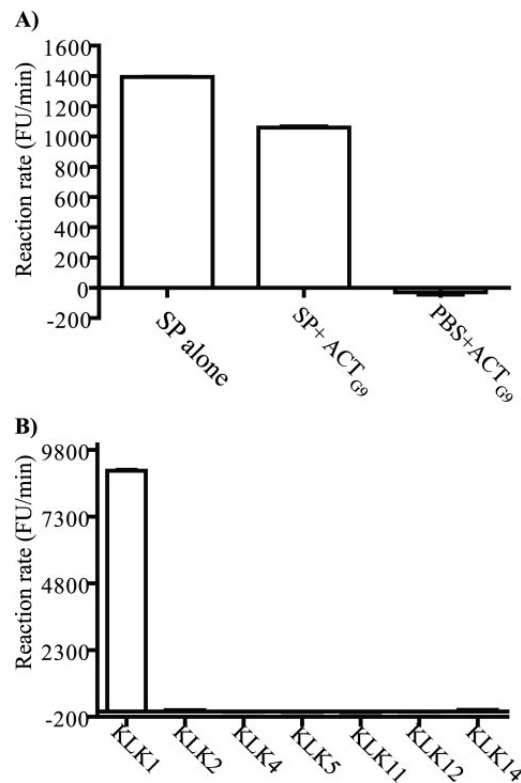


图7 KLK14中介激活精液KLK1。A. ex vivo激活：精液分别与0.8 μ M ACTG9的0.8 μ M ACTG9或单独本身，37摄氏度温育10分钟。KLK1放入96孔平板上，预先覆盖上抗KLK1抗体，200ng的抗体固定过夜100 μ l经处理或未处理样本加入进去，每个孔样做3个重复，室温温育2小时，酶活力用0.5 mM PFR-AMC基质底物的裂解测定之。B. KLK1专一化的sandwich pull-down分析：重构具有活力的KLK1, 2, 4, 5, 11, 12, 和14加到KLK1抗体覆盖孔中，测定的活力测定如A所述，除KLK1外，其余均为零。

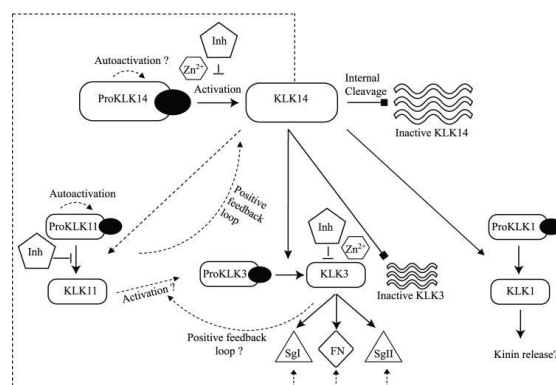


图 8 精液凝块液化蛋白质水解连锁放大效应中 KLK 作用示意图 KLK14 激活 KLK3 原、KLK11 原、KLK1 原 (38)。激活的 KLK3 是一个主要精液蛋白酶执行者, 其结果达到了精液凝块的液化, 其机制通过精液中蛋白如 SgI、SgII、FN (纤维粘连蛋白) 的水解分裂为断片。激活的 KLK11 可激活 KLK3 (50), 其功能在于扩大反应规模。激活的 KLK14 又能直接分裂精液胶块蛋白质 (如 SgI、SgII、FN)。信号放大效应是通过正、反馈环。整个连锁放大效应是通过内源性系列抑制剂和锌离子, 以及具活力的 KLKs 内源性裂解来实现。实线为体外活体实验所肯定, 而虚线为试管实验结果, 即全长组合蛋白实验所证实 (38、50)。“?”处通过试管实验指出可能的作用, 实验中应用融合组合蛋白盒 (含有每一个具有活力的成分)。

REFERENCES

1. Hinrichsen-Kohane, A. C., Hinrichsen, M. J., and Schill, W. B. (1984) *Andrologia* 16, 321–341
2. De Jonge, C. J. (1998) *Semin. Reprod. Endocrinol.* 16, 209–217
3. Goossens, E., and Tournaye, H. (2006) *Semin. Reprod. Med.* 24, 370–378
4. Cosentino, M. J., and Cockett, A. T. (1986) *Urol. Res.* 14, 229–240
5. Hoskins, D. D., Brandt, H., and Acott, T. S. (1978) *Fed. Proc.* 37, 2534–2542
6. Bhattacharyya, A. K., and Kanjilal, S. (2003) *Mol. Cell Biochem.* 253, 255–261
7. Mikhailichenko, V. V., and Esipov, A. S. (2005) *Fertil. Steril.* 84, 256–259
8. Wilson, V. B., and Bunge, R. G. (1975) *J. Urol.* 113, 509–510
9. Mandal, A., and Bhattacharyya, A. K. (1988) *Arch. Androl.* 20, 141–145
10. Lwaleed, B. A., Goyal, A., Delves, G. H., and Cooper, A. J. (2007) *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 3–12
11. Tauber, P. F., and Zaneveld, L. J. (1981) in *Biochemical Andrology* (Hafez, E. S. E., ed) pp. 153–166, Mosby, St. Louis
12. Amelar, R. D. (1962) *J. Urol.* 87, 187–190
13. Daunter, B., Hill, R., Hennessey, J., and Mackay, E. V. (1981) *Andrologia* 13, 131–141
14. Koren, E., and Lukac, J. (1979) *J. Reprod. Fertil.* 56, 493–499
15. Lukac, J., and Koren, E. (1979) *J. Reprod. Fertil.* 56, 501–506
16. Lilja, H., and Laurell, C. B. (1984) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 44, 447–452
17. Lilja, H., and Laurell, C. B. (1985) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 45, 635–641
18. Lilja, H., Abrahamsson, P. A., and Lundwall, A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 1894–1900
19. Polak, B., and Daunter, B. (1990) *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 35, 223–234
20. de Lamirande, E. (2007) *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 60–68
21. Polak, B., and Daunter, B. (1989) *Int. J. Androl.* 12, 187–194
22. Lilja, H., Oldbring, J., Rannevik, G., and Laurell, C. B. (1987) *J. Clin. Invest.* 80, 281–285
23. Lynch, M. J., Masters, J., Pryor, J. P., Lindon, J. C., Spraul, M., Foxall, P. J., and Nicholson, J. K. (1994) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12, 5–19
24. Lilja, H. (1985) *J. Clin. Invest.* 76, 1899–1903
25. Robert, M., Gibbs, B. F., Jacobson, E., and Gagnon, C. (1997) *Biochemistry* 36, 3811–3819
26. Kise, H., Nishioka, J., Kawamura, J., and Suzuki, K. (1996) *Eur. J. Biochem.* 238, 88–96
27. Suzuki, K., Kise, H., Nishioka, J., and Hayashi, T. (2007) *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 46–52
28. Jonsson, M., Linse, S., Frohm, B., Lundwall, A., and Malm, J. (2005) *Biochem. J.* 387, 447–453
29. Robert, M., and Gagnon, C. (1999) *Cell Mol. Life Sci.* 55, 944–960
30. Deperthes, D., Frenette, G., Brillard-Bourdet, M., Bourgeois, L., Gauthier, F., Tremblay, R. R., and Dube, J. Y. (1996) *J. Androl.* 17, 659–665

31. Michael, I. P., Pampalakis, G., Mikolajczyk, S. D., Malm, J., Sotiropoulou, G., and Diamandis, E. P. (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 12743–12750
32. Emami, N., and Diamandis, E. P. (2007) *Mol. Oncol.* 1, 269–287
33. Michael, I. P., Sotiropoulou, G., Pampalakis, G., Magklara, A., Ghosh, M., Wasney, G., and Diamandis, E. P. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 14628–14635
34. Kumar, A., Mikolajczyk, S. D., Goel, A. S., Millar, L. S., and Saedi, M. S. (1997) *Cancer Res.* 57, 3111–3114
35. Vaisanen, V., Lovgren, J., Hellman, J., Piironen, T., Lilja, H., and Pettersson, K. (1999) *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2, 91–97
36. Denmeade, S. R., Lovgren, J., Khan, S. R., Lilja, H., and Isaacs, J. T. (2001) *Prostate* 48, 122–126
37. Emami, N., and Diamandis, E. P. (2008) *J. Biol. Chem.* 283, 3031–3041
38. Borgono, C. A., Michael, I. P., Shaw, J. L., Luo, L. Y., Ghosh, M. C., Soosapillai, A., Grass, L., Katsaros, D., and Diamandis, E. P. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 2405–2422
39. Felber, L. M., Borgono, C. A., Cloutier, S. M., Kundig, C., Kishi, T., Ribeiro, C. J., Jichlinski, P., Gygi, C. M., Leisinger, H. J., Diamandis, E. P., and Deperthes, D. (2005) *Biol. Chem.* 386, 291–298
40. Felber, L. M., Kundig, C., Borgono, C. A., Chagas, J. R., Tasinato, A., Jichlinski, P., Gygi, C. M., Leisinger, H. J., Diamandis, E. P., Deperthes, D., and Cloutier, S. M. (2006) *FEBS J.* 273, 2505–2514
41. Shaw, J. L., and Diamandis, E. P. (2007) *Clin. Chem.* 53, 1423–1432
42. Espana, F., Navarro, S., Medina, P., Zorio, E., and Estelles, A. (2007) *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 41–45
43. Van Dreden, P., Audrey, C., and Aurelie, R. (2007) *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 21–28
44. Lwaleed, B. A., Greenfield, R. S., Birch, B. R., and Cooper, A. J. (2005) *Thromb. Haemost.* 93, 847–852
45. Thyzel, E., Siegling, S., Gotting, C., Tinneberg, H. R., Brinkmann, T., and Kleesiek, K. (2003) *Thromb. Res.* 109, 329–332
46. Matsuda, Y., Shimokawa, K., Katayama, M., Shimizu, H., Umeda, T., Oshio, S., and Chiba, R. (2002) *Arch. Androl.* 48, 295–300
47. Fernandez, J. A., and Heeb, M. J. (2007) *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 13–20
48. Lwaleed, B. A., Greenfield, R., Stewart, A., Birch, B., and Cooper, A. J. (2004) *Thromb. Haemost.* 92, 752–766
49. Amour, A., Bird, M., Chaudry, L., Deadman, J., Hayes, D., and Kay, C. (2004) *Biochem. Soc. Trans.* 32, 15–16
50. Yoon, H., Laxmikanthan, G., Lee, J., Blaber, S. I., Rodriguez, A., Kogot, J. M., Scarisbrick, I. A., and Blaber, M. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 31852–31864
51. Dube, J. Y., Gaudreault, D., and Tremblay, R. R. (1989) *Andrologia* 21, 136–139
52. Balk, S. P., Ko, Y. J., and Bubley, G. J. (2003) *J. Clin. Oncol.* 21, 383–391
53. Leinonen, J., Zhang, W. M., and Stenman, U. H. (1996) *J. Urol.* 155, 1099–1103
54. Christensson, A., and Lilja, H. (1994) *Eur. J. Biochem.* 220, 45–53
55. Zhang, W. M., Leinonen, J., Kalkkinen, N., Dowell, B., and Stenman, U. H. (1995) *Clin. Chem.* 41, 1567–1573
56. Wu, P., Stenman, U. H., Pakkala, M., Narvanen, A., and Leinonen, J. (2004) *Prostate* 58, 345–353
57. Michel, S., Collomb-Clerc, E., Geourjon, C., Charrier, J. P., Passagot, J., Courty, Y., Deleage, G., and Jolivet-Reynaud, C. (2005) *J. Mol. Recognit.* 18, 225–235
58. Siems, W. E., Maul, B., Wiesner, B., Becker, M., Walther, T., Rothe, L., and Winkler, A. (2003) *Andrologia* 35, 44–54
59. Schill, W. B., and Miska, W. (1992) *Andrologia* 24, 69–75