

pCXN2 - mIZUMO 对 C57BL/6 小鼠 生育能力的影响

Effect of pCXN2-mIZUMO on the Fertility of C57BL/6 Mice

AN Gang, HUANG Tian-hua*, XIE Qing-dong, WANG De-gang.
(Research Center for Reproductive Medicine, Shantou University
Medical College, Shantou 515041, China)

安 刚/黄天华*/谢庆东/王德刚

(汕头大学医学院生殖医学研究中心, 广东
汕头 515041)

【摘要】背景与目的: 精卵融合是发生在受精过程中的重要生物学事件, Izumo 是位于顶体内膜上的 I 型免疫球蛋白, 是一种具有精子特异性的膜蛋白, 在精卵融合中起关键作用。我们研究 pCXN2-mIZUMO 在小鼠 C57BL/6 肌肉中的表达及其对生育能力的影响, 为进一步研究免疫避孕手段提供实验依据。材料与方法: 用重组质粒 pCXN2-mIZUMO 分别免疫雌和雄性 C57BL/6 小鼠。ELISA 测定小鼠体内的抗 Izumo 抗体水平, 检测小鼠抗血清在体外受精中对受精率的影响, 被免疫的雌性、雄鼠分别与正常的雄、雌鼠交配, 雌雄合笼比例为 2:1, 分娩完成后统计其产仔数。结果: pCXN2-mIZUMO 可以在小鼠体内诱发抗 Izumo 特异性免疫应答。被 pCXN2-mIZUMO 免疫后的小鼠抗血清在体外能够降低其受精率; 各组产仔数分别为: 实验雌鼠组 2.9 ± 0.66 ; 对照雌鼠组 5.4 ± 0.82 ; 实验雄鼠组 5.1 ± 0.99 ; 对照雄鼠组 6.0 ± 1.34 。实验雌鼠组的生育能力比对照雌鼠组明显降低 ($P < 0.05$)。结论: 重组质粒 pCXN2-mIZUMO 免疫雌性小鼠具有降低生育能力的作用。

【关键词】 Izumo 基因; 免疫避孕; 基因免疫

中图分类号: R169.41

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2007)04-0316-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: Sperm-egg fusion is a vital step in the process of fertilization. Izumo protein, only found on the inner acrosomal membrane, is a testis (sperm)-specific protein and belongs to the immunoglobulin superfamily. It is the key molecule which impacts on the sperm-egg fusion in the process of fertilization. In this study, we investigated the expression of pCXN2-mIZUMO in the muscle and its effect on the fertility of C57BL/6 mouse by means of gene immunization. The results could provide useful experimental data for the immunocontraceptive research. MATERIALS AND METHODS: Female and male C57BL/6 mice were inoculated with pCXN2-mIZUMO respectively. Sera titers of antibodies against Izumo were measured using ELISA assay and fertilization *in vitro* test was exerted to confirm the effect of antiserum. All the animals were introduced to mate with normal mice at a female/male ratio of 2:1. The litter size were analyzed after delivery. RESULTS: The immune system was induced specific response to Izumo antigen. The rate of the fertilization *in vitro* was decreased in the presence of antiserum values. The numbers of newborns were as follows: experiment female 2.9 ± 0.66 ; control female 5.4 ± 0.82 ; experiment male 5.1 ± 0.99 ; control male 6.0 ± 1.34 . The fertility of female mice inoculated with pCXN2-mIZUMO plasmid was impaired. CONCLUSION: compared with the control female groups, low fertility was induced after vaccination with the recombinant plasmid of pCXN2-mIZUMO.

【KEY WORDS】 Izumo; immunocontraception; gene immunization

基因免疫是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新的免疫技术^[1], 该技术是将抗原基因重组到真核表达载体上, 经过转染到动物机体细胞内, 表达的抗原经过抗原提呈激活机体免疫系统, 从而诱导产生特异性的体液免

收稿日期: 2007-03-05; 修订日期: 2007-05-11

作者简介: 安 刚(1978-), 男, 河北省安国人, 硕士研究生, 研究方向: 生殖遗传学。

* Correspondence to: HUANG Tian-hua, Tel: 0754-8900845, E-mail: thuang@stu.edu.cn

疫和(或)细胞免疫应答^[2-3]。Izumo 蛋白是一种精子特异性膜蛋白,研究已证实它在精卵融合中起关键作用,被敲除 Izumo 蛋白的精子由于丧失了与卵子质膜融合的能力而使小鼠失去了生育的能力^[4]。我们通过观察 Izumo 基因在小鼠 C57BL/6 肌肉中的表达及其对生育能力的影响,为进一步研究免疫避孕候选疫苗提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 重组质粒 pCXN2-mIZUMO 由日本大阪大学 Naokazu Inoue 博士惠赠。实验中所需限制性内切酶均购自大连 TaKaRa 公司。Trizol 试剂、SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum Taq 试剂盒均购自 Invitrogen 公司。96 孔酶标板购自丹麦 NUNC 公司。HRP 偶联山羊抗小鼠 IgG 抗体购自美国 Sigma 公司;质粒 DNA 提取试剂盒购于 Tiangen 生物公司。

1.2 实验动物与分组 雄性与雌性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,18~23 g。购自中国医学科学院实验动物研究所。将雌、雄小鼠各随机分为 2 组,用重组质粒 pCXN2-mIZUMO 分别免疫雌性、雄性小鼠作为实验组;用对照质粒 pCXN2 分别免疫雌性、雄性小鼠为对照组。

1.3 质粒 DNA 的制备 用 EcoR I 将真核表达质粒 pCXN2-mIZUMO 中的 Izumo 基因 cDNA 切除,用 T4 DNA 连接酶连接对照质粒 pCXN2。然后按 Tiangen 公司质粒提取试剂盒说明书提纯 pCXN2-mIZUMO 和 pCXN2 质粒 DNA,用分光光度计测定核酸样品的纯度和浓度。贮存于 -30 ℃ 备用,注射前用双蒸水调整浓度至 1.0 μg/μl。

1.4 RT-PCR 检测 根据 Izumo 基因设计引物,上游引物:5'-CTTAC CTGAATGACCACCTG-3';下游引物:5'-TGTTCTCCCA AACCCCTGT-3',由华大基因-上海鼎安生物科技有限公司合成。取小鼠注射质粒部位的肌肉组织,用 Trizol 抽提总 RNA 进行 RT-PCR 反应。反应条件为:50 ℃、30 min 逆转录合成 cDNA,94 ℃、15 s,50 ℃、30 s,72 ℃、1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。对 RT-PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖电泳和碱基序列测序。

1.5 免疫血清的制备 小鼠每次免疫前用 0.25% 盐酸布比卡因多点注射左后腿胫前肌,提高 DNA 的摄取效率。3 d 后在同一部位进行 DNA 免疫,每隔 2 周免疫 1 次,共 3 次。免疫剂量为每次每只 100 μg^[5]。并于每次免疫前 1 天,从小鼠尾静脉取血约 150 μl,室温静置 4~5 h,1 500 g 离心 10 min^[6] 取上层血清分装。贮存在 -30 ℃ 冰箱备用。

1.6 ELISA 检测抗体水平 将重组蛋白 Izumo 包被于 96 孔酶标反应板(100 ng/孔),4 ℃ 过夜后 PBS 洗涤 3 次;以含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭,37 ℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次;加入按 1:100 稀释血清样本,37 ℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次;加入按 1:5 000 稀释 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG,37 ℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次;可溶性单组分四甲基联苯胺(TMB)显色 10~30 min,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,测 OD₄₅₀ 值。以 OD₄₅₀ 读数反映被检测抗体的水平,以 P/N > 2 为阳性。其 P/N 按下列公式计算^[7]:

$$P/N = (\text{待测血清 OD}_{450} \text{ 值} - \text{稀释液 OD}_{450} \text{ 值}) / (\text{正常血清 OD}_{450} \text{ 值} - \text{稀释液 OD}_{450} \text{ 值})。$$

1.7 体外受精 (IVF) 实验 雌鼠注射人绒毛膜促性腺激素(HCG) 12~13 h 后处死雄鼠,剪下小鼠的附睾用无菌滤纸擦去黏附在表面的黏液,用针头穿破附睾远端挤出精子团,将精子团转移到盛有获能培养基的试管中,置于 5% CO₂ 37 ℃ 培养,使精子充分上游获能。另用 6~8 周的雌性小鼠,每只腹腔注射孕马血清促性腺激素(PMSG) 5 U,48 h 后注射 HCG 5 U,14 h 后处死雌鼠解剖并剪下输卵管,在盛有 Hepes-mKSOM 培养基的表皿中撕开膨大的输卵管壶腹部挤压出包裹有卵母细胞的卵丘,用透明质酸酶去除卵丘细胞后,将卵母细胞转移到受精液滴中,将受精液滴分成 2 组,分别在每个受精液滴中加入实验组血清或对照组血清各 10 μl,孵育 30 min 后再加入经获能处理、终浓度为 2 × 10⁶/ml 的精子,置于 5% CO₂ 37 ℃ 培养,1 h 后制片镜检。观察到肿大的精子头或带尾巴的原核视为受精^[8-10]。

1.8 产仔数的观察 3 次免疫完成后 2 周,将实验组与对照组的雌鼠分别与正常雄鼠交配;将实验组与对照组的雄鼠分别与正常雌鼠交配;雌雄交配比例为 2:1。合笼次日以观察到阴道栓视为成功交配的标志。3~4 周后比较两组小鼠的产仔数。

1.9 统计学方法 应用 SPSS 10.0 for windows 软件包对实验数据进行统计分析,显著性检验采用 χ^2 检验和 *t* 检验进行数据分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 质粒的构建和鉴定 如图 1 所示,对重组质粒 pCXN2-mIZUMO 和构建的对照质粒 pCXN2 分别进行酶切鉴定,均得到相应的特异性片段。说明对照质粒构建成功,重组质粒正确无误。

2.2 RT-PCR 结果 如图 2 所示,在小鼠肌肉组织总 RNA 中反转录扩增出长度为 468 bp 的特异性片段。产物由华大基因-上海鼎安生物科技有限公司进行



碱基序列测定, 测序结果经 BLAST 比对分析后证实为 C57BL/6 小鼠 *Izumo* 的 mRNA 碱基序列。从而证实 *Izumo* 基因 mRNA 能在小鼠肌肉内成功表达。

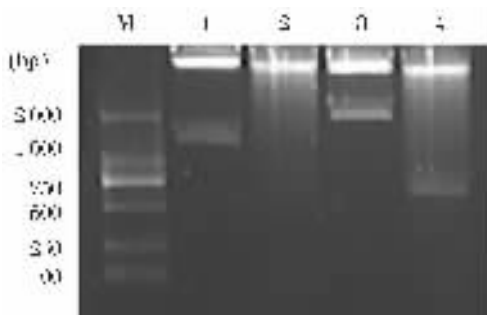


图 1 质粒 pCXN2-mIZUMO 和 pCXN2 酶切电泳结果

Figure 1 Restriction endonuclease patterns of pCXN2-mIZUMO and pCXN2 recombinant plasmids. Lane M: Marker; Lane 1: pCXN2-mIZUMO plasmid, cut by EcoR I; Lane 2: pCXN2 plasmid, cut by EcoR I; Lane 3: pCXN2-mIZUMO plasmid, cut by Hind III and Xba I; Lane 4: pCXN2, cut by Hind III and Xba I.

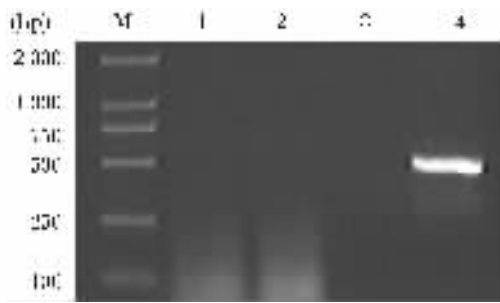


图 2 RT-PCR 产物电泳结果

Figure 2 Electrophoresis of RT-PCR products. Lane M: Marker; Lane 1: minus template control (-T); Lane 2: minus reverse transcriptase control (-RT); Lane 3: pCXN2 group; Lane 4: pCXN2-mIZUMO group.

2.3 ELISA 检测结果 如图 3 所显示, 重组质粒 pCXN2-mIZUMO 第 1 次免疫小鼠 2 周后即可检测到抗 *Izumo* 特异性抗体, 经过 2 次加强免疫后抗体水平从 0~6 周持续升高并维持在较高的水平。提示 pCXN2-mIZUMO 基因免疫在小鼠体内诱发了抗 *Izumo* 特异性免疫应答。

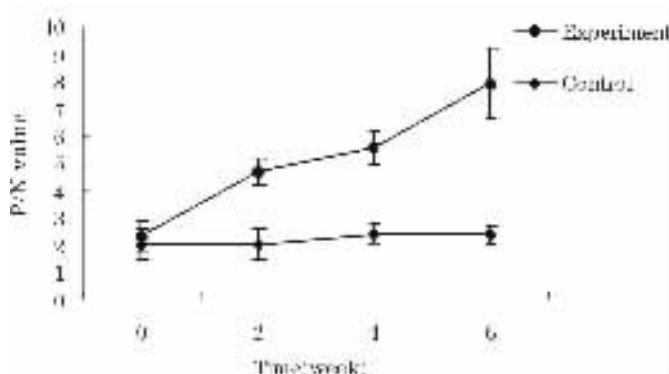


图 3 ELISA 检测抗体水平

Figure 3 The antibody against *Izumo* detected by ELISA.

2.4 体外受精实验 由表 1 可见, 经重组质粒 pCXN2-mIZUMO 免疫后小鼠的抗血清在体外可以降低其受精率。

表 1 免疫 pCXN2-mIZUMO 和 pCXN2 后对小鼠生育能力的影响 ($\bar{x} \pm S_E$)
Table 1 Effect of mice immunized pCXN2-mIZUMO and pCXN2 vaccine ($\bar{x} \pm S_E$)

Group	Number of fertilization	Number of non-fertilization	Total
Experiment	14 [▲]	107	121
Control	31	92	123
Total	45	199	244

Compared with Control, [▲] $P < 0.05$.

2.5 抗生育能力分析 结果见表 2, 免疫雌鼠的实验组与对照组两组间产仔数的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 而免疫雄鼠与正常雌鼠交配的实验组与对照组间, 产仔数在两组间差异无统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 两组小鼠体外受精 (IVF) 情况

Table 2 the occurrence of in vitro fertilization

Group	n	Rate of reproduction	Number of newborns
Female experiment	16	68.75%	2.9 ± 0.66 [▲]
Control	16	81.25%	5.4 ± 0.82
Male experiment	8	87.5%	5.1 ± 0.99
Control	8	75%	6.0 ± 1.34

Compared with control, [▲] $P < 0.05$.

3 讨论

人口过剩, 有害动物过量繁殖为社会和环境带来了巨大压力, 如何控制日益膨胀的人口和那些具有高生育能力的有害物种已经成为人们关注的焦点^[11]。近年来, 随着生物学和免疫学的不断发展, 免疫避孕的可行性日渐被人们所认识。避孕疫苗的免疫抗生育作用主要依赖于产生足够量的抗体, 以中和生殖过程中起重要作用的关键分子的生物学功能^[12]。免疫避孕疫苗的研究已经从直接将完整病原体在无毒或减毒情况下接种人体, 产生特异免疫反应的第一代疫苗, 发展到以重组蛋白方式, 生产的抗原作为疫苗的第二代疫苗, 以及以基因免疫为主的第三代疫苗^[13]。

人们如何从精子、卵细胞和生殖激素中筛选出最适合的靶抗原用于免疫避孕疫苗成为研究的关键。以精子抗原为基础的免疫疫苗的应用成为一种具有广泛前景的避孕途径, 精子抗原在避孕疫苗开发上的应用取决于其精子(睾丸)特异性, 以及这种抗原在精子发生和受精过程中所扮演的何种生物学角色^[14]。*Izumo* 蛋白是一种具有精子特异性, 位于精子顶体内膜上的 I 型免疫球蛋白。Naokazu Inoue 等建立的 *Izumo*^{-/-} 小鼠动物模型证实了 *Izumo* 蛋白是在精卵融合中起关键的作用, 被敲除 *Izumo* 蛋白的精子由于丧失了与卵子质膜融合的能力而

使小鼠完全失去了生育能力^[4]。

本研究通过应用基因免疫的原理和方法,证实了重组质粒 pCXN2-mIZUMO 能够在 C57BL/6 小鼠的肌肉中表达并诱发机体的免疫应答反应,从而产生特异的抗 Izumo 抗体。体外受精试验进一步表明含有抗 Izumo 抗体的血清在体外亦可以降低精卵结合的能力。实验中被免疫雌鼠组的产仔数显著低于对照雌鼠组,说明被免疫雌鼠的生育能力较对照雌鼠降低。

尽管 ELISA 检测到 pCXN2-mIZUMO 免疫完成后的 2 组实验动物体内抗 Izumo 抗体滴度均维持在较高的水平,但雄鼠组生育能力却无明显变化,其原因可能是:①在被免疫的雄鼠体内抗 Izumo 抗体无法与定位于顶体内膜上 Izumo 蛋白相结合,不能起到中和 Izumo 蛋白生物学功能的作用;②交配过后射入小鼠阴道的精子在经过液化、获能、长距离迁移等一系列生物学活动后,到达输卵管壶腹部受精部位时,精子表面附着的抗 Izumo 特异性抗体已经丢失殆尽,无法与发生顶体反应后暴露出的 Izumo 蛋白结合,失去了抗精卵结合的作用。

本研究虽然证实了通过 pCXN2-mIZUMO 免疫的雌鼠其生育能力下降,而雄鼠组的产仔数却无明显变化,表明 Izumo 蛋白虽然可以作为免疫避孕研究的精子靶抗原,但对其避孕效果、作用时间和是否具有可逆性等其他生物学功能仍需进一步深入研究。

(致谢:由衷的感谢日本大阪大学 Naokazu Inoue 博士惠赠重组质粒 pCXN2-mIZUMO)

参考文献:

- [1] 姜勋平,熊远著,杨利国. 基因免疫的原理和方法 [M]. 北京:科学出版社,2004:
- [2] Adam DC, Jean DB, David BW. Modulating the immune response to genetic immunization [J]. *The FASEB Journal*, 1998, 12 (15):1611-1626.

- [3] Lucia K. DNA/Genetic Vaccination[J]. *Immunology*, 1998,11 (2):55-63.
- [4] Naokazu I, Masahito I, Ayako I, et al. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs [J]. *nature*,2005 434(7030) :234-238.
- [5] Ruo-Lan Xiang, Fei Zhou, Ying Yang, et al. Construction of the plasmid pCMV4-rZPC DNA vaccine and analysis of its contraceptive potential[J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68(5) :1518-1524.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁,黎孟枫,候云德,等译. 北京:科学出版社,1992: 857-858.
- [7] Jing Ni, Yi Ni, Xiaohua Wang, et al. Application of a gene vaccine targeting HER-2/ Neu in immunocontraception [J]. *DNA and Cell Biology*,2004, 23 (12) : 807-814.
- [8] 陈大元. 受精生物学 [M]. 北京:科学出版社,2000: 335-346.
- [9] Mahi CA, Yanagimachi R. Prevention of *in vitro* fertilization of canine oocytes by anti-ovary antisera: a potential approach to fertility control in the bitch[J]. *J Exp Zool*,1979,210(1): 129-135.
- [10] Tateno H, Kamiguchi Y. *In vitro* fertilization of Chinese hamster oocytes by spermatozoa that have undergone ionophore A23187-induced acrosome reaction, and their subsequent development into blastocysts. [J] *Zygote*,1996,4(2):93-99.
- [11] Peter JD, Torben L, Ivan MR. Antifertility vaccines[J]. *Trends in Immunol*,2002,23(4):213-219.
- [12] Rajeshk N. Effect of sperm DNA vaccine on fertility of female mice[J]. *Molecular reproduction and development*, 2006, 73(7): 918-928.
- [13] 王丽莉,王振海. 免疫避孕疫苗研究进展 [J]. 国外医学计划生育分册,2000,19(3) :139-141.
- [14] Naz RK, Vanek CM. Testis-specific proteins and their role in contraceptive vaccine development [J]. *Front-Biosci*, 1998, 30(3) :e39-48.

