

大熊猫精清血小板激活因子乙酰水解酶 (PAF-AH) 活性影响因素的初步探讨

鲜红¹, 侯蓉², 郑鸿培¹

(1. 四川农业大学动物科技学院, 四川雅安 625014; 2. 成都大熊猫繁育研究基地)

摘要: 在 2004 年度 2~5 月大熊猫繁殖季节, 对 5 只不同年龄雄性大熊猫的精液使用酶免法检测精清中的 PAF-AH 含量, 并初步探讨了其含量高低的影响因素。结果在所有受检样品中均检测到 PAF-AH 活性的存在, 浓度最低仅 12.96 mmol/min·mL, 最高达 275.42 mmol/min·mL, 大熊猫年龄不同、采精时间不同, 精清 PAF-AH 含量存在一定差异; 同时 PAF-AH 的含量表现出与精子活力呈极显著负相关 ($R = -0.73, P < 0.001$), 与精子运动状态呈显著负相关 ($R = -0.58, P < 0.05$); 与精子形态完整性也有一定相关性但差异不显著 ($R = -0.42, P > 0.05$)。结果表明, 大熊猫精清中含有 PAF-AH, 其含量高低与大熊猫年龄、采精季节及精液质量有关。

关键词: 大熊猫; 精清; PAF-AH; 年龄; 季节; 精液质量

中图分类号: Q959.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083 (2006) 01-0055-04

Some Factors Influencing Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH) Activity in Giant Panda Seminal Plasma

XIAN Hong¹, HOU Rong², ZHENG Hong-pe¹

(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Yaan, Sichuan 625015;

2. Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding)

Abstract: The objective of this study is to determine the activity of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) in giant panda seminal plasma through EIA and to determine the relationship among PAF-AH content and age, season or sperm quality. Results: Seminal PAF-AH content ranged from 12.96 mmol/min·mL to 275.42 mmol/min·mL, the PAF-AH content varied in different giant panda and month. Linear regression analysis revealed significant ($P < 0.001, P < 0.05$) relationship between PAF-AH content in semen and sperm motility and sperm moving character. The data confirms the presence of PAF-AH in giant panda semen and its content levels are age-dependent and seasonal changed, also related to sperm quality.

Key words: giant panda; seminal plasma; PAF-AH; age; season; sperm quality

血小板活化因子 (platelet-activating factor, PAF) 是一种具有广泛生物学活性的乙酰化的甘油磷脂, 自 20 世纪 70 年代被发现以来, 已被证明与哺乳动物的多种生殖过程有关, 其中包括排卵、受精、附植前胚胎的发育、植入乃至分娩等, 在雄性则主要影响精子功能, 包括对精子活力、顶体反应、获能和受精等多方面的作用^[3,4,7~9,12]。PAF-AH 是 PAF 在体内代谢失活的主要限速酶^[1], 其可以通过调节 PAF 水平进而调节精子的功能。有资料显示, PAF-AH 有助于维持精子质膜的稳定性, 射精后, 精浆中的 PAF-AH 可转移至精子表面, 使 PAF 维持一定的水平, 以保护精子, 避免

精子的活力受到损害, 也避免精子在成熟时受到触发而过早地发生顶体反应, 被认为是与精子获能有关的去获能因子^[12]。目前, 该酶已被发现存在于牛、猪、马、兔、鼠等多种动物和人类精清当中^[2,4,10], 表现出与雄性生殖功能的相关性^[8,11,13]。本研究旨在对大熊猫精清中是否存在 PAF-AH 进行检测, 并初步探讨影响其含量水平的相关因素, 包括年龄、季节以及精液质量等, 以期对 PAF-AH 与大熊猫繁育能力的关系作一定的探索, 并为大熊猫生殖生理的研究提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 受试大熊猫

受试大熊猫为成都大熊猫繁育研究基地的 5 只成年雄性大熊猫，其基本情况见表 1。

表 1 受试大熊猫基本情况

大熊猫编号	出生日期	体重 (kg)	健康状况
1	1984 年 9 月	100.5	良好
2	1992 年 7 月	123.0	良好
3	1997 年 9 月	120.3	良好
4	1998 年 9 月	120.2	良好
5	1987 年 9 月	104.3	良好

1.2 大熊猫精液的采集与精清的制备

在 2004 年 2~5 月大熊猫的发情繁殖季节，通过电刺激直肠采精法采集大熊猫精液。将采集的精液稀释后离心分离精清，将所得的精清再 3000

rpm 离心 10 分钟，取上清液分装后置 -20℃ 保存待用。同时作大熊猫的常规精液品质分析，检测其密度、活力、运动状态、形态等指标。

1.3 精清中 PAF-AH 的测定

精清中 PAF-AH 的测定采用 ELISA 方法进行，所使用的 PAH-AH 酶免检测试剂盒为 Cayman 产品 (Lot. No. 98835)，测定步骤参照试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 大熊猫精清样品中 PAF-AH 浓度的检测

对 5 只大熊猫共成功采得精液 19 次，取得精清样品 19 份，各样品中 PAF-AH 的浓度检测结果见表 2。

表 2 不同个体大熊猫精清 PAF-AH 浓度检测结果

大熊猫编号	PAF-AH 浓度 (mmol/min·mL)			
	2 月	3 月	4 月	5 月
1	104.92 ± 15.69	25.19 ± 15.83	35.43 ± 0.54	102.79 ± 7.81
2	35.85 ± 3.84	97.12 ± 20.62	41.66 ± 4.11	275.42 ± 17.24
3	26.1 ± 6.62	15.12 ± 0.30	12.96 ± 0.98	19.53 ± 1.29
4	49.35 ± 5.18	14.84 ± 1.09	32.32 ± 1.29	28.20 ± 3.66
5	-	78.22 ± 10.33	-	-

PAF-AH 对磷脂具有很高的选择性，能够识别位于磷脂 SN-2 位置很短的酰基，并且和脂蛋白相联。本检测使用了 2-thio PAF，它能够作为所有 PAF-AH 作用的底物。PAF-AH 使位于 SN-2 位置的乙酰基硫脂水解，水解下来的自由的硫醇通过使用 DTNB (Ellman's reagent) 探测。而 25℃ 下 1 单位酶每分钟能够水解 1umol 2-thio PAF。所以，PAF-AH 的浓度可以用 umol/min·mL 来表示。从以上检测结果可以看出，从所有获取的大熊猫精清样品中，均检测到了 PAF-AH 的活性变化，浓度最低仅 12.96 mmol/min·mL，最高达 275.42 mmol/min·mL，其平均含量为 56.76 ± 60.86 mmol/min·mL。

2.2 年龄及采精时间对精清 PAF-AH 浓度的影响

不同个体大熊猫及不同月份精清 PAF-AH 浓度变化结果见图表 1 和图表 2。

从图表中可以看出，精清 PAF-AH 的含量高低在个体上和精液采集时间上是有一定程度差异的 (图 1)。年龄较小的 3 号和 4 号熊猫个体 (<10 岁) 精清 PAF-AH 含量较低，10~20 岁的熊猫个

体精清 PAF-AH 含量较高，大于 20 岁的熊猫个体 PAH-AH 活性较 10~20 岁的熊猫个体 PAF-AH 活性有所下降，但差异不显著。从时间来看 (图 1、2)，在大熊猫发情旺盛季节 (2、3、4 月份) 精清 PAF-AH 浓度相对较低，伴随繁殖季节的结束，精清中 PAF-AH 浓度开始上升，这与其后 PAF-AH 浓度与精液质量关系分析中表现出的负相关具有一致性。但由于受试验动物样本数量的限制，该结果尚需进一步的验证。

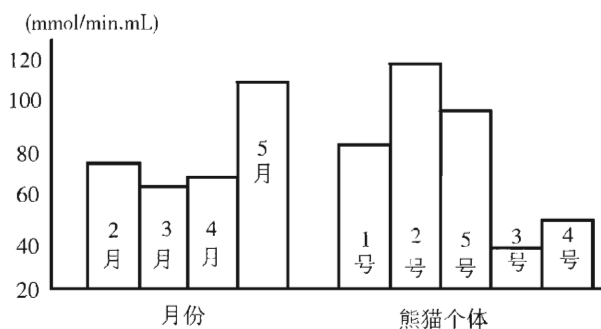


图 1 不同年龄大熊猫不同月份精清 PAF-AH 浓度差异

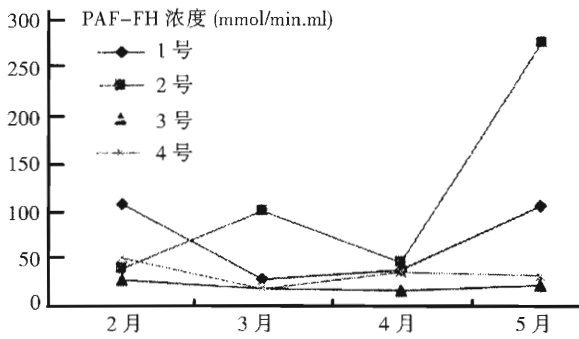


图 2 不同年龄大熊猫繁殖季节精清 PAF-AH 变化图

2.3 精清中 PAF-AH 含量与大熊猫精液质量指标的相关性分析

将成功采集的 19 次大熊猫精液在进行冷冻保存以前进行精液质量的常规检测，检测指标包括：精子密度、活力、运动状态和精子形态，同时分离精清检测 PAF-AH 浓度。所得数据进行线性相关分析，结果见表 3。

表 3 PAF-AH 含量与大熊猫精液各质量指标的相关分析

	精子密度	精子活力	精子运动状态	精子形态
PAF-AH 浓度 (mmol/min·mL)	0.14	-0.73**	-0.58*	-0.42

从上表分析得到的相关系数结果来看，精清中 PAF-AH 的含量高低与精子活力存在极显著的负相关 ($R = -0.73, P < 0.001$)，即精清中 PAF-AH 的浓度越高，精子活力越差；同时精清 PAF-AH 浓度也呈现出与精子运动状态的显著负相关 ($R = -0.58, P < 0.05$)，与精子密度和精子形态有一定的相关性，但差异不显著。

3 讨论与分析

精液由精子和精清组成。精清是精液的无形成分，由睾丸液、附睾液和几种副性腺的分泌物混合而成。精清内含有的各种成分是射精后精子生存的微环境，对调节精子的生成、成熟以及为精子提供能量和营养物质具有重要意义。由生殖小泡腺和前列腺分泌的 PAF-AH^[6]是存在于精清中的一类水解酶类，其含量高低与动物年龄、季节及精液质量等有关。Kordan 等 (2003) 发现猪在 37 周龄以前随年龄的增长精清 PAF-AH 活性变化不大，在 31~36 周龄时出现一个峰值，在 37~42 周龄后活性开始下降，并认为这种变化可能与动物的性成熟有关。从季节上看，夏季是猪精清 PAF-AH 表现较

高活性的时期，而此时动物精液的质量也较差。此后，Roudebush 等 (2003) 和 Zhu 等 (2004) 对精液中 PAF-AH 含量与精子活力的关系进行了研究，结果都发现，精液中 PAF-AH 的含量与精子活力呈现显著的负相关 ($P < 0.001$)，即精清中 PAF-AH 的活性越低，精子活力越高，但他们对这一现象的作用机制未能作进一步的研究。在本次试验当中，精清 PAF-AH 活性也表现出与大熊猫年龄、采精时间以及精液质量的相关性，特别是其与精子活力等质量指标的显著负相关说明，PAF-AH 这一存在于大熊猫精清中的水解酶类，有可能在大熊猫的生殖过程中扮演了一定的角色，但它对于精子活力的影响作用及其机制以及它在雄性生殖过程中的具体功能还需要我们更进一步的研究。

4 参考文献

- [1] Hiroyuki A. Platelet - activating factor acetylhydrolase [J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators, 2002, 68-69: 83 ~ 94.
- [2] Hough SH, Parks JE. Platelet-activity factor acetylhydrolase activity in seminal plasma from the bull, stallion, rabbit, and rooster [J]. Biology of Reproduction, 1994, 50: 912~916
- [3] Huo LJ, Yang ZM. Effects of platelet activating factor on capacitation and acrosome reaction in mouse spermatozoa [J]. Molecular Reproduction and Development, 2000, 56: 436~440.
- [4] Kordan W, Strzezek J. Effect of platelet-activity factor (PAF) on motility parameters and plasmalemma integrity of boar spermatozoa [J]. Animal Science Papers and Reports, 2002, 20 (1): 37 ~ 45.
- [5] Kordan W, Strzezek J, et al. Age-dependent and seasonal changes in the activity of platelet-activity factor acetylhydrolase (PAH-AH) of boar seminal plasma in relation to the content of calcium ions [J]. Animal Science Papers and Reports, 2003, 21 (1): 5 ~ 13
- [6] Kordan W. Properties of platelet-activity factor acetylhydrolase (PAF-AH) from boar seminal plasma [J]. Dissertations and Monographs, 2001, 44: 1~53.
- [7] Luconi M, Bonaccorsi L, et al. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa [J]. Molecular and Cell Endocrinology, 1995, 108: 35~42.
- [8] Muguruma K, Johnston J. Metabolism of platelet-activating factor in rat epididymal spermatozoa [J]. Biology of Reproduction, 1997, 56: 529~536.
- [9] Odeh AI, Dascanio JJ, et al. Effect of platelet- activating factor (PAF) on stallion sperm motility, capacitation and the acrosome reaction [J]. Reproduction, 2003, 126 (5): 605~613.
- [10] Sebastien S, Isabelle T, et al. Bovine seminal platelet-activating factor acetylhydrolase: association properties in seminal plasma and

猪白细胞介素 4、6 融合基因对小鼠免疫的影响

李化, 谢翌, 高荣*, 武梅, 孟民杰, 章欢, 程驰,
杨毅, 刘狄广, 王泽洲, 王秀英, 沈翼, 王红宁

(生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 目的: 研究猪白细胞介素 IL4、IL6 融合基因 (PIL46) 对小鼠免疫应答的反应。方法: 以壳聚糖纳米颗粒包裹融合基因 (PIL46) 的真核表达质粒 (VPIL46) 接种昆明小鼠, 免疫后 28 日以口服攻毒实验小鼠, 观察其体液和细胞免疫水平指标的变化和病变情况。实验结果发现: CNP 包裹 VPIL46 接种小鼠体液免疫和细胞免疫指标不同程度地增多, 均显著高于对照组 ($P < 0.05$); 与 CNP 包裹 VPIL4+6 免疫效果相近。免疫后 28 日以口服攻毒实验小鼠, 检测结果发现: CNP 包裹 VPIL46 组和 CNP 包裹 VPIL4+6 组小鼠的上述免疫指标除中性粒细胞外均显著多于对照小鼠, 免疫小鼠无症状和病变, 健康存活; 而对照小鼠均发病, 消化道组织器官呈现明显出血病变。结论: PIL46 基因具有显著增强小鼠体液和细胞免疫功能、提高对大肠杆菌感染抵抗力的免疫调节效应, 可作为有效的抗感染免疫调节剂。

关键词: 猪 IL4 和 IL6; 融合基因; 壳聚糖纳米颗粒; 免疫; 小鼠

中图分类号: Q34 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083 (2006) 01-0058-06

Effect of Fusion Gene of Porcine Interleukin 6 and 4 on the Immunity of Mice

LI Hua, XIE Zhao, GAO Rong*, WU Mei, MENG Min-jie, ZHANG Huan, CHEN Chi, YANG Yi,
LIU Di-guang, WANG Ze-zhou, WANG Xiu-ying, SHEN Yi, WANG Hong-ning

(Key Lab for Biological Resource and Ecological Environment of Education Ministry, College of Life Sciences,
Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: Objective To research the immunopotential of a novel fusion gene of porcine interleukin-6 and -4 on immunity of mice. **Methods** The eukaryotic expression plasmid of fusion gene of porcine interleukin-6 and -4 was entrapped with chitosan-nanoparticle (CNP) prepared by the method of ionic cross linkage to immunize Kunming mice at the age of 21 days, and then the experimental mice were orally challenged with virulent *E. coli* bacteria 28 days post-inoculation. The peripheral blood were weekly collected from the tail vein of inoculated mice to detect the content of IgG, IgA, IgM and specific antibody against *E. coli* as well as the levels of interleukin 2 (IL2), IL4 and IL6 by the SABC-ELISA. The number of lymphocytes, monocytes, granulocytes and white blood cells were also counted out as the routine method. **Results** The humoral and cellular immune values were respectively elevated to different extent in the mice vaccinated with VPIL46 or VPIL4+6. The immunized mice all survived without symptoms and lesions after challenge, while the control mice appeared evident symptoms and hemorrhagic lesions mainly in digestive tissues and organs. **Conclusion** The PIL46 fusion gene could significantly promote the humoral and cellular immunity and resistance of mouse against *E. coli* infection, and would be utilized as an effective adjuvant to improve the immunity and resistance of animals against infectious diseases.

Key words: porcine IL6 and IL4; fusion gene; chitosan-nanoparticle (CNP); immunity; mouse

收稿日期: 2005-12-26 基金项目: 四川省青年科技基金资助项目

作者简介: 李化 (1978~), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生态工程, E-mail: muzirenqi@163.com

*通讯作者, gaorong96@163.com

with lipoproteins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1392: 176~184.

[11] William E, Roudebush, *et al.* Sperm motility is related to platelet-activating factor-acetylhydrolase content in semen [J]. *Reproductive Biology Assoc*, 2003, 80 (3): 256.

[12] Wu C, Tomas S, *et al.* Evidence for the autocrine of induction of

capacitation of mammalian spermatozoa [J]. *J Biological Chemistry*, 2001, 276 (29): 26962~26968.

[13] Zhu J, Brackett NL, Aballa T, *et al.* Elevated semen platelet-activating factor-acetylhydrolase content is correlated with low sperm motility in men with spinal cord injury [J]. *Fertility and Sterility*, 2004, 82 (2): 87.