综述

文章编号:1000-5404(2005)01-0086-03

哺乳动物受精过程中配子膜相互作用的分子学基础

Molecular basis of gamete membrane interactions in mammalian fertilization

张 军 综述,李彦锋 审校 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

哺乳动物受精过程中精子与卵细胞作用发生在3个不同水平:①卵丘颗粒细胞和透明质酸细胞外基质(放射冠);②卵透明带(zona pellucida, ZP);③卵子质膜。由精子与卵ZP结合诱发的顶体的胞吐作用,即顶体反应是精-卵融合的先决条件。它不仅使精子能够进入发生膜相互作用的卵周隙,还暴露和修饰精子表面首先与卵细胞膜发生作用的顶体内膜区域。配子膜的作用涉及一系列复杂的分子间相互作用,首先是精子附着到卵细胞膜表面,进而细胞间发生紧密的结合,最后导致细胞膜融合[1]。本文主要对配子膜相互作用过程进行了讨论。

1 关于配子膜相互作用的主要研究方法

对配子膜相互作用的早期认识主要来自于显微分析,包括光学显微镜,扫描和透射电子显微镜等。精子首先通过顶体反应后暴露出的顶体内膜与卵细胞膜接触,随后,精子的赤道段和头后部区域与卵细胞膜结合和融合。在人类,顶体反应对于精子附着于卵细胞膜非常重要而且是必须的。对于啮齿类动物,顶体完整的精子能够结合到卵细胞膜上,但只有发生了顶体反应的精子才能与卵细胞膜融合。

体外授精(*in vitro* fertilization, IVF)法是研究精-卵相互作用的细胞和分子机制的主要实验方法,它保证实验在可控条件下进行。从IVF实验所获得的资料通过其它相关的研究得到了充实,包括其它细胞间的相互作用(如通过细胞转染表达相关蛋白)和分子间相互作用(如特殊的蛋白间相互作用的分析)的研究。

现在多数对于配子间相互作用的认识都得自于动物模型。目前已经进行了大量异种动物受精过程的研究。无ZP仓鼠卵细胞常被用于研究配子膜的相互作用,因为它几乎可以与所有试验过的哺乳动物的精子发生融合,仓鼠卵细胞膜的易融合性可能是因为其具有独特的膜环境。在大多数情况下,如果某种介质(如抗体)抑制了人精子与仓鼠卵细胞的作用,那么它也可以抑制人类精-卵细胞的相互作用。

2 介导配子膜相互作用的分子

2.1 精子富含半胱氨酸分泌蛋白-1(CRISP-1)(DE, AEG-1和ARP)

蛋白质DE是在分析大鼠附睾内表达的蛋白时被鉴定的。它是一种蛋白复合体,在变性聚丙烯酰胺凝胶上显示D和E两条蛋白带。研究发现大鼠蛋白DE、小鼠酸性附睾糖蛋白-1(acidic epididymal glycoprotein, AEG-1)和人ARP(AEG-related protein, ARP)蛋白的氨基酸序列具有同源性。随着哺乳动物中其它几种相关蛋白的发现,这一家族逐渐扩大并被命名为CRISP(cysteine-rich secretory protein)家族。家族成员包括附睾内表达的DE样蛋白、主要在睾丸内表达的CRISP-2和分布广泛的CRISP-3。CRISP家族蛋白C末端均富含半胱氨酸,在其家族成员中氨基酸同源性为30%~80%。

目前对大鼠CRISP-1(DE)的研究最为深入。该蛋白在附睾合成,与精子的附睾转运过程相关。与CRISP-1结合的精子主要位于附睾体部远端以及尾部,而且大多数CRISP-1与精子的结合并不牢固,在体外实验的获能过程中或用生化方法处理后可从精子上脱离[2]。免疫荧光检测发现与精子结合的CRISP-1定位于鼠附睾尾部精子的顶体背侧区域;在获能和发生顶体反应的精子上,CRISP-1定位于赤道段;在马、恒河猴以及人射精后离体精子上,该蛋白位于精子尾部主段和中段以及精子头后部区域[3]。

研究显示CRISP-1参与了配子膜的相互作用。IVF试验中,抗DE抗体可抑制大鼠卵细胞的受精。此外,大鼠附睾提取物纯化得到的CRISP-1可与大鼠和小鼠的卵细胞膜结合;IVF条件下,大鼠和小鼠卵细胞经纯化大鼠CRISP-1处理后受精能力下降[4];雄性大鼠经CRISP-1免疫后生育能力降低,并可在附睾液和输精管液中检出抗CRISP-1抗体,雄鼠精子可与无ZP卵细胞结合但不能与之融合[5]。同样,纯化CRISP-1可以抑制大鼠精-卵融合,但对精-卵结合没有明显影响。与大鼠CRISP-1有40%同源性的人附睾蛋白被命名为AEG相关蛋白(即人ARP)。有实验显示ARP的一个亚单位与精子结合紧密,而且通过免疫荧光法检测到人和恒河猴射精后离体精子的头、尾部均存在ARP抗原。经抗人ARP抗体处理后的精子显示与仓鼠卵细胞的受精能力降低;重组人ARP蛋白也可与卵细胞膜结合[6]。这些证据表明人ARP参与了配子膜相互作用,它可能是通过位于卵细胞膜上的特殊结合位点——"基因融合区"与之结合[7]。

2.2 精子ADAMs:受精素β(ADAM2)、受精素α(ADAM1)和cyritestin(ADAM3)

在早期精子表面抗原的研究中,用豚鼠精子膜蛋白免疫小鼠,产生一组可以识别精子表面抗原的单抗,该组抗体中的单抗PH-30能够抑制豚鼠无ZP卵细胞与精子结合,而受精素β就是作为被单抗PH-30识别的抗原而被发现的。随后,受精素α

作者简介:张 军(1975-),男,四川省武胜县人,硕士,医师,从事泌尿外科方面的研究。电话:(023)68757344

收稿日期:2004-05-29;修回日期:2004-10-03

及其性质也被确定，这两种蛋白形成了一个异质二聚体。后来又通过分子克隆技术在小鼠和猴精子上发现了 cyritestin。因为这几种蛋白具有明显的同源性和保守性结构域，最终产生了去整合素和金属蛋白酶结构域（a disintegrin and a metalloprotease domain, ADAM）家族的概念。受精素 α、β 及 cyritestin 分别又被称为 ADAM1、ADAM2、ADAM3。以上蛋白在啮齿类和灵长类动物的表达都得到证实。现在脊椎动物中这个家族已经扩大到了近 30 个成员，在很多组织和细胞中都有表达。ADAMs 蛋白都具有多个保守性结构域：一段信号肽序列、前区、金属蛋白酶结构域、去整合素结构域、富含半胱氨酸结构域、上皮生长因子重复序列、跨膜结构域和胞浆结构域。受精素 α、β 以及 cyritestin 的成熟加工过程是在金属蛋白酶结构域和去整合素结构域之间进行蛋白分解，因而成熟精子表面只有去整合素结构域、富含半胱氨酸结构域和表皮生长因子样重复序列。

蛋白质功能研究表明受精素 α、β 以及 cyritestin 均参与了精-卵粘附过程。在 IVF 试验中，与以上蛋白发生交叉反应的抗体可以与精子结合并抑制受精过程，如抗受精素 β 单抗 PH-30，能够抑制豚鼠卵细胞与精子的结合；重组受精素 α、β 及 cyritestin 均能与小鼠卵细胞膜结合，从而抑制精卵结合，降低受精率；受精素 β 的去整合素环合成肽也可抑制精-卵结合，降低小鼠、豚鼠、猴以及人精子与无 ZP 仓鼠卵细胞或同种卵细胞的受精率[8]。另外在 IVF 研究中，含有去整合素结构域的重组受精素 β(βDCE)能够抑制精-卵的结合，而去除去整合素结构域的受精素 β(βCE)则不能抑制精-卵结合[9]，这显示受精素 β 是利用其去整合素环与卵细胞表面的同源配体相结合的，去整合素结构域是受精素 β 的最主要功能区。对小鼠受精素 α 和 cyritestin 的去整合素环的研究也得出相似的结果。研究表明，小鼠受精素 β 和 cyritestin 去整合素环具有相似的功能性序列：受精素 β 是 ECD 序列，cyritestin 是 QCD 序列[10]。

通过对受精素 β 和 cyritestin 的基因敲除小鼠的研究获得了更进一步的认识。受精素 β 和 cyritestin 基因敲除的小鼠精子均显示与卵细胞膜的结合能力下降约 87%[11,12]，与卵 ZP 的结合能力也严重下降。同时受精素 β 敲除精子显示从子宫向输卵管迁移的能力的缺陷[11]（cyritestin 敲除精子向输卵管迁移的能力是正常的[12]）。这可能意味着受精素 β 和 cyritestin 参与了与 ZP 结合，而且受精素 β 还参与了精子向输卵管的迁移或与输卵管作用的过程。受精素 β 和 cyritestin 基因敲除小鼠精子的蛋白质表达分析表明：①受精素 β 敲除精子缺乏受精素 α，而且 cyritestin 的表达严重降低；②cyritestin 敲除精子表面缺乏受精素 α，而且受精素 β 的表达量仅有野生型的 50%[12]。上述多种分子的缺乏可导致配子膜相互作用以及精子功能的缺陷。

至今在人类还未发现功能性受精素 α 和 cyritestin。已发现的受精素 α 和 cyritestin 基因具有大量点突变，不能产生功能性蛋白质，被认为是无功能的假基因[13]。人类实质上是受精素 α 和 cyritestin 基因敲除（缺乏功能性的受精素 α 和 cyritestin 基因）型，但是却并不像敲除 cyritestin 基因小鼠存在对生育能力的影响。这说明受精素 α 和 cyritestin 可能对人类的配子膜相互作用无关紧要，对正常的蛋白表达也非必需。豚鼠、牛和小鼠精子上受精素 α 和 β 亚单位形成一个异质二聚体发挥作用，而在人类受精素 β 可能是以一个没有受精素 α 的单体（或同源多聚体）单独发挥功能，或者可能是另外某种蛋白（很可能是其它的 ADAM 蛋白，如 ADAM21 和 ADAM20[14]）取代了人类精子中受精素 α 和 cyritestin 的功能。

2.3　卵整合素

对受精素 α、β 和 cyritestin 上的整合素配体样结构——去整合素结构域的鉴定，使人们认识到卵细胞膜上的整合素通过与这些位于精子上的配体结合来介导精-卵结合和融合。整合素家族是一个异质二聚体细胞粘附分子家族，它介导细胞与细胞及细胞与胞外基质间的相互作用。现在共发现和定性了 18 种 α 亚单位和 8 种 β 亚单位，它们可以组合成 24 种不同的整合素，这些整合素又可依据其整合素异质二聚体识别的配体的一般特性和 α 亚单位之间的序列同源性分成 6 个亚家族。研究显示，有 8 种 ADAM 蛋白家族成员可以与其中 3 个整合素亚家族的 6 种整合素发生作用。以下简单介绍参与配子膜相互作用的这 6 种整合素。

$\alpha_4\beta_1$ 和 $\alpha_9\beta_1$ 同属整合素 α_4/α_9 亚家族。这些整合素可识别多种配体，包括血管细胞粘附分子（vascular cell adhesion molecule, VCAM）-1、细胞粘合素-C 和纤维连接蛋白等。上述 8 种 ADAM 家族成员中的 7 种可以与 $\alpha_4\alpha_9$ 亚家族成员发生作用，其中包括受精素 α、β 以及 cyritestin。而表达 $\alpha_9\beta_1$ 的体细胞可与重组受精素 α、β 以及 cyritestin 结合[15]。

已有报道在仓鼠卵细胞上存在 α_4 亚单位，但在人和小鼠卵细胞上可能表达很弱或者缺乏。目前已从小鼠卵细胞 cDNA 文库筛选到 α_9 cDNA，但还没有检测到蛋白表达[16]。$\alpha_v\beta_3$、$\alpha_v\beta_5$ 和 $\alpha_5\beta_1$ 属于 RGD 结合亚家族。该亚家族成员可由卵细胞表达，在 IVF 实验中，RGD 肽可抑制人和仓鼠精子与无 ZP 仓鼠卵细胞和人卵子相互作用，并对受精素 β 与小鼠卵细胞的结合有较强的抑制作用[17]。这些证据表明整合素的 RGD 结合亚家族参与了配子的相互作用。

$\alpha_6\beta_1$ 是层粘连蛋白结合亚家族成员。早期认为 $\alpha_6\beta_1$ 是受精素 β 去整合素结构域在卵细胞上的特异性配体，而且抗 β_1 抗体对小鼠、猪和人的精-卵结合以及重组受精素 β 和小鼠卵细胞的结合有显著的抑制效应；小鼠受精素 β 去整合素结构域合成肽也有相似作用[18]；抗 α_6 的功能阻断性单抗——GoH3 在部分 IVF 试验中可抑制小鼠精-卵相互作用。然而其它一些研究使用相同单抗却未能抑制精-卵相互作用，可能受精素 β 识别了 $\alpha_6\beta_1$ 上的 GoH3 无法阻断的位点，或者 α6 并非受精过程所必需[19]；而小鼠 β_1 基因的敲除并不影响卵细胞的成熟，在体内和体外试验中卵细胞受精功能均正常[20]。近来，人们推测卵细胞上 $\alpha_6\beta_1$ 与 ADAM 发生的结合作用可能不是直接的配体-受体相互作用，而只是作为卵细胞膜上的多分子复合体的一部分参与作用。

2.4　CD9

近来研究表明，卵细胞上还有一种蛋白分子 CD9 与精-卵相互作用相关联，它属于 tetraspanins 蛋白家族（有 4 个保守的跨膜区和 2 个胞外环）[21]。CD9 基因敲除小鼠的无 ZP 卵细胞与精子结合不受影响，但是几乎不能发生融合[22]，这显示卵细胞

上的 CD9 参与了配子膜融合。应用不同抗 CD9 单抗进行的实验结果以及相关的结构-功能分析表明，CD9 的不同表位可能分别参与了精-卵结合和融合[17]，而且研究表明卵细胞上 CD9 可以与 $\alpha_6\beta_1$ 相结合发挥生理功能，因而推测 CD9 很可能是通过与卵细胞表面的其它分子，包括整合素、其它 tetraspanins 和膜蛋白组成一个多分子复合体或网络的形式参与配子膜的相互作用。

2.5 多分子复合体

目前的理论认为，精卵细胞上均存在多分子复合体，各种相关分子作为多分子复合体的组分发挥各自在精-卵相互作用中的功能，其中某个分子的异常可能影响其它分子乃至整个多分子复合体的活性。整合素、CD9 等均是卵细胞上的多分子复合体的重要组分，而对精子上多分子膜蛋白复合体重要性的认识主要来自于对受精素 β 和 cyritestin 基因敲除小鼠精子蛋白表达情况的分析。配子上适当的膜环境和多分子复合体的活性对于配子膜相互作用非常重要，应用抗体和相关基因敲除法可能破坏了配子膜环境和/或多分子复合体而使多分子复合体失活，从而导致精-卵相互作用受到影响。

3 结语

受精过程中配子膜的相互作用不是简单地两个细胞合并为一个合子，该过程极为复杂，涉及精卵膜上多种分子的作用。它对于受精卵的形成，甚至胚胎的早期发育均有重要影响。作为研究哺乳动物受精过程发生的基础，目前对于参与其中的各种分子的功能以及相互间协同作用的认识还远远不够。随着人类生殖生物学知识和技术的不断进步，对受精过程的深入研究将有助于发展新型的避孕措施和促进人类的生殖健康。

关键词：受精；配子；整合素

中图法分类号：R321.2 **文献标识码**：A

参考文献：

[1] Evans J P. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions[J]. Front Biosci, 1999, 4(2): D114 - D131.

[2] Cohen D J, Rochwerger L, Ellerman D A, *et al*. Relationship between the association of rat epididymal protein "DE" with spermatozoa and the behavior and function of the protein[J]. Mol Reprod Dev, 2000, 56(2): 180 - 188.

[3] Sivashanmugam P, Richardson R T, Hall S, *et al*. Cloning and characterization of an androgen-dependent acidic epididymal glycoprotein/CRISP1-like protein from the monkey[J]. J Androl, 1999, 20(3): 384 - 393.

[4] Cohen D J, Ellerman D A, Cuasnicu P S, *et al*. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion[J]. Biol Reprod, 2000, 63(2): 462 - 468.

[5] Ellerman D A, Brantua V S, Martinez S P, *et al*. Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein de inhibits sperm fusion ability[J]. Biol Reprod, 1998, 59(5): 1029 - 1036.

[6] Cohen D J, Ellerman D A, Busso D, *et al*. Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg[J]. Biol Reprod, 2001, 65(4): 1000 - 1005.

[7] Cuasnicu P S, Ellerman D A, Cohen D J, *et al*. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion[J]. Arch Med Res, 2001, 32(6): 614 - 618.

[8] Zhu X, Bansal N P, Evans J P. Identification of key functional amino acids of the mouse fertilinβ(ADAM2) disintegrin loop for cell-cell adhesion during fertilization[J]. J Biol Chem, 2000, 275(11): 7677 - 7683.

[9] Evans J P, Schultz R M, Kopf G S, *et al*. Roles of the disintegrin domains of mouse fertilins α andβin fertilization[J]. Biol Reprod, 1998, 59(1): 145 - 152.

[10] Takahashi Y, Bigler D, Ito Y, *et al*. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of the integrin-associated proteins CD9, CD81 and CD98[J]. Mol Biol Cell, 2001, 12(4): 809 - 820.

[11] Cho C, Bunch D O, Faure J E, *et al*. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin β[J]. Science, 1998, 281(5384): 1857 - 1859.

[12] Nishimura H, Cho C, Branciforte D R, *et al*. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilinβ[J]. Dev Biol, 2001, 233(1): 204 - 213.

[13] Jury J A, Frayne J, Hall L, *et al*. The human fertilin alpha gene is nonfunctional: implications for its proposed role in fertilization[J]. Biochem J, 1997, 321(3): 577 - 581.

[14] Hooft van Huijsduijnen R. ADAM 20 and 21; two novel human testis-specific membrane metalloproteases with similarity to fertilin alpha[J]. Gene, 1998, 206(2): 273 - 282.

[15] Eto K, Huet C, Tarui T, *et al*. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrinα9 β1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions[J]. J Biol Chem, 2002, 277(20): 17804 - 17810.

[16] Stanton J L, Green D P. A set of 840 mouse oocyte genes with well - matched human homologues[J]. Mol Hum Reprod, 2001, 7(6): 521 - 543.

[17] Zhu X, Evans J P. Analysis of the roles of RGD-binding integrins, α_4/α_9 integrins, α_6 integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin β (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane[J]. Biol Reprod, 2002, 66(4): 1193 - 1202.

[18] Evans J P, Kopf G S, Schultz R M, *et al*. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilinβsubunit to mouse eggs: evidence for adhesive activity *via* an egg β_1 integrin-mediated interaction[J]. Dev Biol, 1997, 187(1): 79 - 93.

[19] Miller B J, Georges Labouesse E, Primakoff P, *et al*. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin $\alpha_6\beta_1$ and is CD9-dependent[J]. J Cell Biol, 2000, 149(6): 1289 - 1296.

[20] He Z Y, Brakebusch C, Fassler R, *et al*. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion[J]. Dev Biol, 2003, 254(2): 226 - 237.

[21] Hemler M E. Specific tetraspanin functions[J]. J Cell Biol, 2001, 155(7): 1103 - 1107.

[22] Miyado K, Yamada G, Yamada S, *et al*. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization[J]. Science, 2000, 287(5451): 321 - 324.

（编辑 刘洪娥）