DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.036
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0833-03

论著

精子膜蛋白 Cyritestin 单抗对鼠精卵结合和融合的抑制作用及其意义

李彦锋[1],靳凤烁[1],何 畏[2],江 军[1],王洛夫[1],靳文生[1] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042;[2]附属西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 通过观察精子膜蛋白 Cyritestin 单抗对体外鼠精-卵结合和融合作用的影响,探讨该蛋白在受精过程中的作用。方法 应用鼠 Cyritestin 单抗,通过体外受精试验观察该单抗预孵育不同浓度精子后,对精-卵结合和融合功能的影响;应用免疫细胞化学方法确定 Cyritestin 在精子表面的特异性定位。结果 不同精子浓度下,Cyritestin 单抗均可显著降低体外精-卵的结合和融合能力;可使精-卵结合指数降低 37.18%~79.00%,平均 60.33%;使精-卵融合的受精指数降低 51.66%~77.01%,平均 66.90%;受精率下降 32.28%~76.15%,平均 57.41%。在精子顶体反应前后,Cyritestin 在精子表面均特异性定位于精子头部赤道区域和顶体内膜区域。结论 Cyritestin 在精-卵的结合和融合中均发挥重要生理作用。该蛋白作为精子靶抗原开发避孕疫苗的可能性值得深入研究。

关键词:精子蛋白;受精;避孕疫苗
中图法分类号:R329.25;R339.2;R392.11 文献标识码:A

Inhibitory effects and significance of monoclonal antibody against sperm surface protein cyritestin on the mouse sperm-egg binding and fusion

LI Yan-feng, JIN Feng-shuo, HE Wei, JIANG Jun, WANG Luo-fu, JIN Wen-sheng (Department of Urology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the role of the sperm surface protein cyritestin in fertilization by observing the effects of anti-cyritestin mAb on the mouse sperm-egg binding and fusion *in vitro*. Methods The effects of anti-cyritestin mAb on the mouse sperm-egg binding and fusion *in vitro* fertilization with different concentrations of sperm were observed. The specific location of the cyritestin on the sperm surface was detected with immunocytochemical staining. Results The mAb against mouse cyritestin significantly decreased the sperm-egg binding and fusion. The binding index reduced from 37.18% to 79.00% (mean 60.33%) and fusion index from 51.66% to 77.01% (mean 66.90%). The fertilization rate reduced was reduced by 32.28% to 76.15% (mean 57.41%) in different sperm concentrations. Cyritestin was localized in the equatorial region and inner acrosomal membrane region of the sperm membrane before and after acrosomal reaction. Conclusion The cyritestin plays a crucial role in the sperm-egg binding and fusion and the possibility of using cyritestin as a sperm target antigen for the development of contraception vaccine may be further studied.

Key words: sperm protein; fertilization; contraception vaccine

哺乳动物受精过程是一个复杂的生理过程,其详细机制尚未完全明确。目前研究表明精-卵相互作用包括:①精子穿透卵丘颗粒细胞层;② 穿入透明带;③精子与卵膜的结合和融合[1]。上述生理过程通常需要多种精卵表面的粘附分子的参与。尽管精-卵质膜相互作用的分子机制尚知之甚少,但初步研究结果显示 ADAM(A disintegrin and a metalloprotease)家族的部分成员与精卵的结合和融合关系密切。ADAM 家族具有多种保守性结构域,包括前区、金属蛋白酶、去整合素、富含半胱氨酸结构域、EGF 样结构域、跨膜区和胞浆区。其中约 80~90 个氨基酸残基的去整合素结构域与所发现的蛇毒液金属蛋白酶(SVMP'S)去整合素结构域具有同源性[2,3],由于 SVMP'S 去整合素结构域可与血小板的整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 结合,从而阻止纤维蛋白原与血小板的结合和凝血,因此推测精子上含有去整合素结构域的蛋白能与卵细胞整合素结合,介导精卵结合和融合。目前发现的 ADAM 家族成员超过 29 种,其中至少受精素β和 Cyritestin 蛋白是睾丸特异性表达[4]。为深入探讨 Cyritestin 在精-卵相互作用过程中的详细机制,本研究在体外受精情况下,应用 Cyritestin 单抗观察了其对精-卵结合和融合的影响,并应用免疫细胞化学方法,观察了 Cyritestin 在精子表面的特异性定位。

1 材料与方法

1.1 材料

8 周龄以上昆明小鼠 100 只,雌雄各半;HRP 标记羊抗小鼠 IgG、DAB 显色试剂盒(北京中山公司);抗-Cyritestin 单抗(美国 Chemicon 公司);小牛血清白蛋白(BSA)(华美公司);考马斯亮蓝 R-250、透明质酸酶、α-糜蛋白酶、钙离子诱导剂 Ionophore A23187、DAPI 荧光染料(美国 Sigma 公司);尿促性激素(HMG)、绒毛膜促性腺激素(HCG)(丽珠集团)。

1.2 方法

1.2.1 卵细胞的分离 取昆明种雌鼠,于腹腔内注入尿促性激素(HMG)10 U,48~72 h 后再于腹腔内注入 HCG 10 U,12~14 h 后取超排卵雌鼠,剖腹取小鼠输卵管内所有卵细胞。一次超排卵通常可获得 30~70 个卵细胞。卵细胞周围颗粒细胞层及透明带的去除参照文献[5]进行。接着将无透明带卵细胞移入 1 滴 100 μl 含 3%BSA 的 BWW 培养液中,上面应用矿物油覆盖,置 37 ℃,5%CO_2 孵箱中孵育 1 h,备用。

1.2.2 精子的分离和顶体反应的诱导 取雄鼠附睾尾部精子置于含 3%BSA 的 BWW 培养液中,37 ℃,5%CO_2 孵箱中孵育

作者简介:李彦锋(1968-),男,山西省长子县人,博士,主治医师,讲师,主要从事避孕疫苗、前列腺增生研究,发表论文 11 篇。电话:(023)68757344

收稿日期:2001-02-10;修回日期:2001-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3~4 h，加入钙离子诱导剂 A23187 溶液使终浓度为 10 μmol/L，继续孵育 30 min；吸取少量培养液涂于玻片上，固定后加入 0.2%考马斯亮蓝染色液染色 15~20 min，观察精子顶体反应发生情况[6]。待超过 70%的精子发生顶体反应后，取微量培养液进行精子计数，调整精子浓度为所需浓度，备用。

1.2.3 精-卵体外结合和融合分析 应用 Cyritestin 单抗 10 μg 加入含不同浓度精子的 1 滴(50 μl)含 3%BSA 的 BWW 培养液中，上层覆盖矿物油，置孵箱中预孵育 60 min；接着于该培养液滴内加入 10~15 个无透明带卵细胞，进行精-卵共同孵育；90 min 后，小心吸取液滴内卵细胞依次加入 3 滴预热的高渗 BWW 培养液中进行洗涤，去除松散地附着于卵细胞的精子。然后将卵细胞移至载玻片上，显微镜下观察精子与卵细胞结合情况，统计每个卵细胞结合的精子数(Binding Index，BI)。精-卵的融合通过 DAPI 染色[5]后荧光和激光共聚焦显微镜下观察。精-卵融合的统计方法：①受精指数(Fertilization Index，FI)，与每个卵细胞融合的精子平均数；②受精率(Fertilization Rate，FR)，与至少一个精子融合的卵细胞的百分数。

1.2.4 Cyritestin 蛋白在精子表面的免疫定位 采用间接免疫酶标法进行。

1.2.5 统计学分析 应用统计分析软件 SPSS 进行。对结合指数和受精指数进行方差分析，对受精率进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 精子浓度对精-卵结合和融合的影响

首先应用 6 种不同浓度精子与卵细胞进行了结合和融合分析，以确定精子最适浓度，较客观地反映干预因素对精卵作用影响的细微差别并进行观察和统计，结果见表 1。发现随着精子浓度的不断升高，精一卵结合和融合的结合指数、受精指数和受精率均明显增加。当精子浓度过高时，每个卵细胞结合的精子数极多，且多精受精的比例大大增加，计数时则较为困难；而当精子浓度过低时，由于受精指数、受精率及结合指数均过低，无法进行干预试验观察，故结合文献报道，本实验选用 5×10^4/ml、1×10^5/ml、5×10^5/ml 3 种精子浓度进行下一步试验。

表 1 不同精子浓度下精-卵结合和融合情况

Tab 1 Sperm-egg binding and fusion in different concentration of sperm

Sperm concentration (ml^{-1})	Numbers of the ovum	Binding Index (BI)	Fertilization Index (FI)	Fertilization Rate (FR)(%)
5×10^3	40	0.73±0.45	0.43±0.50	42.50
1×10^4	46	1.52±0.66	0.54±0.50	54.35
5×10^4	41	8.61±1.93	0.88±0.46	82.93
1×10^5	45	11.16±2.46	1.07±0.50	91.11
5×10^5	45	25.96±4.72	1.47±0.63	95.56
1×10^6	45	34.09±7.27	2.07±1.03	95.56

2.2 抗 Cyritestin 单抗对精-卵结合和融合的影响

应用抗 Cyritestin 单抗预处理 5×10^4、1×10^5、5×10^5/ml 浓度精子后，精-卵的结合与对照组相比分别显著降低了 37.18%~79.00%，平均 60.33%；受精指数下降了 51.66%~77.01%，平均 66.90%；受精率下降 32.28%~76.15%，平均 57.41%，见表 2。同时通过对不同精子浓度下，Cyritestin 单抗对精卵结合和融合的抑制率分析，发现随着精子浓度的增加，Cyritestin 单抗对精-卵的结合和融合的抑制作用呈逐渐减弱趋势。

表 2 不同精子浓度下 Cyritestin 单抗对精-卵结合和融合的影响

Tab 2 Effects of anti-cyritestin McAb on sperm-egg binding and fusion in different concentration of sperm

Sperm concentration (ml^{-1})	Control				Anti-cyritestin McAb group			
	Numbers of the ovum	BI	FI	FR(%)	Numbers of the ovum	BI	FI	FR(%)
5×10^4	45	8.76±1.61	0.87±0.46	82..22	51	1.84±0.78*	0.20±0.40*	19.61*
1×10^5	45	12.53±2.86	1.18±0.68	86.67	51	4.41±1.19*	0.33±0.52*	31.37*
5×10^5	45	26.84±4.95	1.51±0.84	95.56	51	16.86±3.83*	0.73±0.60*	64.71*

*: $P<0.01$ *vs* control

2.3 Cyritestin 蛋白在精子表面的免疫定位

顶体反应前的精子免疫细胞化学染色显示：Cyritestin 阳性染色主要限于精子头部的赤道区域和顶体内膜区域，见图 1A。鉴于在精-卵相互作用过程中，仅有顶体反应后精子能够与卵细胞质膜融合，所以对顶体反应后精子亦同时进行了免疫染色，发现在精子发生顶体反应后，该抗原在精子表面的定位模式无明显改变，均大部份为赤道区域和顶体内膜区域的同时染色，见图 1B。而应用 PBS 取代一抗所进行的阴性对照组染色均为阴性。

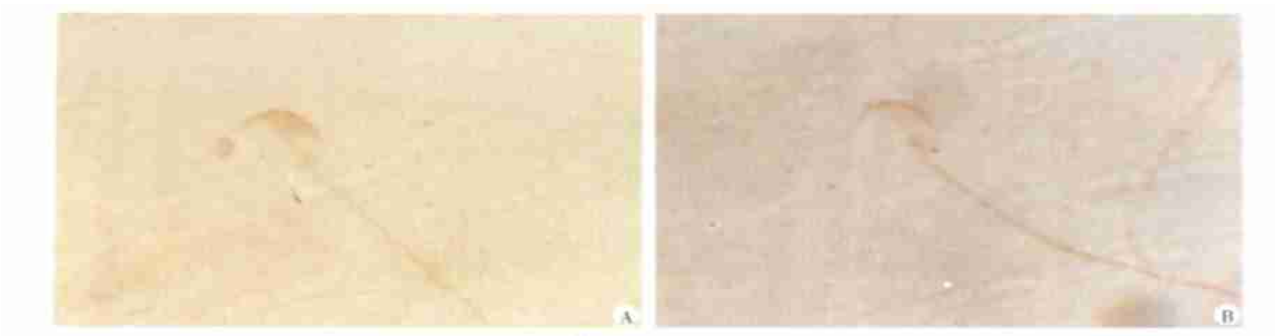


图 1 Cyritestin 蛋白在小鼠精子表面的免疫定位 (ABC×400)

A：顶体反应前；B：顶体反应后

Fig 1 The immunological localization of the cyritestin on the mouse sperm surface (ABC×400)

A: Before acrosomal reaction; B: After acrosomal reaction

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

ADAM 家族蛋白具有共同的结构域和相似的功能。本研究所选择的 Cyritestin 蛋白已有研究表明系睾丸内特异性表达, 与受精素 β 一起参与了精-卵的结合和融合。Cyritestin 最初的鉴定是通过 PCR 克隆策略鉴定 ADAM 家族成员时在猴体内被发现的。该蛋白的命名参考其分子组成和表达形式(富含半胱氨酸、睾丸特异性)。Cyritestin 在睾丸精子中以 110×10^3 的前体形式表达, 当睾丸内精子被释放入输精管腔时, 该蛋白水解为 55×10^3 的成熟形式, 接着转运至附睾。有证据显示 Cyritestin 的去整合素结构域参与了精卵相互作用, Cyritestin 去整合素环的合成多肽如 12 肽 RK-SKDQCDFPEF 或 8 肽 SKDQCDFP, 在抑制精卵相互作用和降低受精的发生率方面均有显著效果[7,8]。荧光标记的 PKSKDQCDFPEF 多肽可与无透明带小鼠卵细胞结合[8]。来源于 5 个不同 ADAM/MDC 家族成员的合成多肽的比较研究显示, Cyritestin 多肽在抑制精卵结合方面非常有效[7]。Cyritestin 基因进行缺失突变后, 丧失 Cyritestin 基因的纯合子雄鼠则丧失生育能力[9]。为深入了解 Cyritestin 蛋白在精-卵结合和融合中的地位和作用, 本研究应用 Cyritestin 单抗对体外受精情况下精-卵结合、融合作用的影响进行了研究。

在体外受精分析研究中, 精子浓度的选择对于实验结果的影响是极为明显的[5,10]。选择适当的精子浓度进行实验方可较客观地反映干预因素对精-卵作用的影响。本实验发现当精子浓度低于 1×10^4/ml 时, 精-卵结合和融合的比率均极低, 不利于在应用抗体干预试验后的观察和比较, 而当精子浓度高于 5×10^5/ml 时, 多精受精的比例大大增加, 而且每个卵细胞结合的精子数量较多, 在镜下准确计数极为困难。故本研究选用了在 5×10^4、1×10^5、5×10^5/ml 精子浓度下进行精卵结合和融合研究。

实验结果表明, Cyritestin 单抗在不同精子浓度下不但可显著抑制精-卵的结合, 而且可显著抑制精卵的融合, 从而降低受精率。这与应用 Cyritestin 活性位点多肽在体外精-卵结合和融合试验中对受精的抑制作用相一致[7]。由于在精卵的相互作用分析中, 结合和融合是一个连续的过程, 且与每个卵细胞结合的精子数可直接影响精卵的融合数量和受精率, 因而, 分辨 Cyritestin 单抗是否仅对精卵的结合具有直接影响还是对结合和融合均有直接作用较为困难。精-卵融合能力的降低原因可能有二: 一是 Cyritestin 单抗本身可直接对精-卵的融合产生影响, 即 Cyritestin 蛋白在精-卵的结合和融合中均发挥直接作用, 那么其抗体与之的结合, 将不但影响精-卵的结合, 而且影响精-卵的融合, 二是 Cyritestin 单抗对精-卵的结合产生明显的抑制效应后, 由于与每个卵细胞结合的精子数量的减少, 使精-卵融合的比例自然减少, 这种效应是抗体对精-卵结合产生抑制作用后的间接下游效应。所以, Cyritestin 单抗是否直接影响精-卵的融合尚需进一步实验证实。

精卵的结合和融合均发生于其特定的细胞表面区域, 如精-卵膜的结合最初发生于精子顶体内膜, 随后是赤道和头后区域, 精卵的融合开始于精子头部质膜, 但仅有赤道和头后区域与卵膜融合, 而顶体内膜区域通过吞噬样作用与卵细胞胞浆溶为一体[11]。精子特异性表面区域结构与其功能密切相关, 同时参与精卵结合和融合的精子表面蛋白的定位也是与其功能相一致的[7]。因而明确 Cyritestin 蛋白的精子表面特异性定位, 有利于确认该蛋白在精-卵相互作用中的重要功能, 本实验证实在精子顶体反应发生前后, Cyritestin 蛋白均主要定位于精子头部表面赤道区域和顶体内膜区域, 该区域正是精卵结合和融合的特定区域, 这进一步表明该蛋白极可能参与了精-卵的结合和/或融合过程, 是重要的精子表面功能性蛋白之一。结合有关文献报道, 本结果支持进一步深入研究以探讨将该蛋白作为精子靶抗原用于免疫性避孕疫苗开发的可能性。

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 in Biosci, 1999, 15(4): 114—131.

[2] Bjarnason J B, Fox J W. Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins [J]. Methods Enzymol, 1995, 248(1): 345—367.

[3] Gould R J, Polokoff M A, Friedman P A, *et al*. Disintegrins: A family of integrin inhibitory proteins from viper venoms[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1990, 195(2): 168—171.

[4] Wolfsberg T G, Straight P D, Gerena R L, *et al*. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain[J]. Dev Biol, 1995, 169(1): 378—383.

[5] Evans J P, Schultz R M, Kopf G S. Mouse sperm-egg plasma membrane interaction: analysis of roles of egg integrins and the mouse sperm homologue of PH-30(fertilin)β[J]. J Cell Sci, 1995, 108(pt10): 3 267—3 278.

[6] Moller C C, Bleil J D, Kinloch R A, *et al*. Structural and functional relationships between mouse and hamster zona pellucida glycoproteins[J]. Dev Biol, 1990, 137(2): 276—286.

[7] Yuan R, Primakoff P, Myles D G. A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion[J]. J Cell Biol, 1997, 137(1): 105—112.

[8] Linder B, Heinlein U A O. Decreased *in vitro* fertilization efficiencies in the presence of specific cyritestin peptides[J]. Dev Growth Diff, 1997, 39(2): 243—247.

[9] Shamsadin R, Adham I M, Nayernia K, *et al*. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile[J]. Biol Reprod, 1999, 61(6): 1 445—1 451.

[10] Evans J P, Kopf G S, Schultz R M. Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin beta subunit to mouse eggs: Evidence for adhesive activity via an egg beta-1 integrin-mediated interaction[J]. Dev Biol, 1997, 187(1): 79—93.

[11] Yanagimachi R. Mammalian fertilization[A]. In: Knobil E, Neill J D. The Physiology of Reproduction[M]. New York: Raven Press Ltd, 1994. 189—317.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net