

# 精子膜表面配体依赖性离子通道与精子顶体反应

刘海雄 严缘昌 李逸平\*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**摘要** 配体依赖性离子通道是一类由神经递质调控的跨膜离子通道。研究发现它们在精子的顶体反应中起了重要作用, 顶体反应是精子完成受精的一个关键步骤。至今已发现3种配体依赖性离子通道受体存在于精子头部的质膜上, 它们是乙酰胆碱受体、甘氨酸受体和GABA<sub>A</sub>受体。尽管乙酰胆碱受体和甘氨酸受体已被清楚的证明参与了ZP3诱导的顶体反应, GABA<sub>A</sub>受体的功能则相对复杂, 需进一步研究。这类受体在精子膜电压变化中起的作用和由此导致的膜电位改变对于精子顶体反应的重要性, 为精子顶体反应提供了一个可能的信号传递途径。

**关键词** 顶体反应; 配体依赖性离子通道; 精子; 超极化

顶体是位于精子头前部的巨大分泌性囊泡。顶体反应(acrosome reaction)是精子在顶体反应诱导物作用下, 精子顶体外膜与质膜融合, 导致顶体内容物, 主要是多种水解酶释放的一个特殊的外分泌事件。该事件对于精子穿透卵子外糖蛋白基质(ZP)和精卵膜融合是必需的。根据体内天然诱导物的不同, 顶体反应可分为两种, 即孕酮诱导的顶体反应和ZP3诱导的顶体反应。在结合各自的受体后, 两者最终都触发一类低电压依赖性Ca<sup>2+</sup>通道(low voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel)的开放<sup>[1]</sup>, 导致细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高, 最终引发了精子特有的胞吐事件即顶体反应, 但其间哪些物质参与了各自的信号传递还是十分不明了。最近已有证据表明, 精子膜表面的配体依赖性离子通道, 在顶体反应的信号传递中起着重要作用。

配体依赖性离子通道是一类自身就是离子通道的受体。这种离子通道与受电位控制的离子通道及受化学修饰调控的离子通道不同, 它们的开放或关闭直接受配体的控制, 其配体主要为神经递质。这类受体的共同特点是由多亚基组成受体/离子通道复合物, 其跨膜信号转导无需中间步骤, 反应快, 一般只需几毫秒, 接受神经递质刺激后, 通道开放, 导致离子跨膜流动, 引起膜去极化或超极化, 继而产生生物效应。配体依赖性离子通道常分布于神经细胞和神经肌肉接头处的突触后膜上, 属于此类受体的有阳离子通道烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)和阴离子通道γ-氨基丁酸受体(GABA<sub>R</sub>)、甘氨酸受体等。巧合的是, 在精子膜上也存在相应的各类受体, 有

关各类配体依赖性离子通道在精子顶体反应中的作用机制, 逐渐引起了人们的关注。Arnoult等<sup>[1]</sup>指出获能过程伴随着精子的超极化过程, 而膜的超极化对于卵子透明带蛋白ZP3诱导的顶体反应起着至关重要的作用。在他们的实验中, 57%的精子能被ZP/ZP3诱导发生顶体反应, 这些精子的膜电位在(-78.7 ± 10.2) mV范围之内。相反, 其余不能被诱导的, 它们的膜电位在(-43.2 ± 6.8) mV之间。由此可见, 精子膜电位的超极化与顶体反应密切相关。目前已知的参与膜超极化的膜受体有两类, 一类是γ-氨基丁酸受体, 另一类是甘氨酸受体, 因此它们的作用和功能引起了人们的关注。而乙酰胆碱受体是一类阳离子通道, 它可能参与了膜的去极化, 从而诱导顶体反应。结合本实验室的工作, 本文就精子表面配体依赖性离子通道研究进展作简要的概述。

## 1 乙酰胆碱受体参与ZP3受体诱导的顶体反应

参与膜极化的配体依赖性离子通道有阳离子通道和阴离子通道两类, 目前发现在精子膜上存在的乙酰胆碱受体(ACh receptor)就属于阳离子通道<sup>[2]</sup>, 它是由5个亚基构成的五聚体, 主要选择性的通透Na<sup>+</sup>, 但也能通透Ca<sup>2+</sup>。但是不同亚基类型的乙酰胆碱受体对两种离子的通透性不同。爪蟾卵母细胞

收稿日期: 2005-05-27 接受日期: 2005-07-13

\* 通讯作者。Tel: 021-54921395, E-mail: ypli@stn.sh.cn

表达研究发现 $\alpha 7$ 单类亚基构成的受体的 $\text{Ca}^{2+}$ 的通透性为单价阳离子20倍。有意思的是已知精子头部存在的乙酰胆碱受体至少包含一个 $\alpha 7$ 亚基,该受体可能介导了ZP3诱导的顶体反应。一定浓度的乙酰胆碱能明显提高获能精子的顶体反应率,而在用特异的乙酰胆碱受体抑制剂 $\alpha$ -bungarotoxin,  $\alpha$ -CTX IMI或methyllycaconitine处理后,乙酰胆碱诱发的顶体反应被有效抑制,说明乙酰胆碱作用于乙酰胆碱受体能促进获能精子发生顶体反应。进一步的研究还发现,预先加入乙酰胆碱受体抑制剂后,能明显抑制ZP3诱导的顶体反应,该现象揭示乙酰胆碱受体可能直接参与了ZP3诱导的顶体反应。然而所有乙酰胆碱受体抑制剂都不能抑制孕酮诱导的顶体反应,这一实验结果也支持了在顶体反应中ZP3和孕酮诱导的顶体反应信号通路至少有部分不同的观点。但是乙酰胆碱受体的一个关键亚基 $\alpha 7$ 剔除的小鼠仍有生殖能力,推测ZP3诱导的顶体反应下游可能有一条替代通路使顶体反应能够进行,也有可能该亚基剔除小鼠代偿表达了一个功能与 $\alpha 7$ 相近的亚基,因此需要进一步研究以确立其在顶体反应中的地位。

## 2 甘氨酸受体参与ZP3诱导的顶体反应

对于乙酰胆碱受体的研究揭示了阳离子通道受体介导的去极化在顶体反应中的重要性,但ZP3诱导的顶体反应必需有氯离子参与,实验表明若在培养液中去掉氯离子后,获能的精子不能发生ZP3诱导的顶体反应<sup>[3]</sup>。由于介导氯离子流动的配体依赖性离子通道有两种,甘氨酸受体和GABA<sub>A</sub>受体, Melendrez等<sup>[3]</sup>对哪类氯离子通道参与ZP3诱导的顶体反应进行了药理学实验,在该实验中利用了一种针对甘氨酸受体和GABA<sub>A</sub>受体抑制剂strychnine,它在纳摩尔浓度水平抑制甘氨酸受体,在微摩尔浓度水平抑制GABA<sub>A</sub>受体。在精子的顶体反应中,strychnine在纳摩尔浓度水平抑制ZP3诱导的顶体反应,而在微摩尔浓度只抑制孕酮诱导的顶体反应。他们还用了另一类抑制剂(+)-bicuculline,该抑制剂在高浓度抑制甘氨酸受体,低浓度抑制GABA<sub>A</sub>受体,结果发现相应需用较大浓度的抑制剂才能抑制ZP3诱导的顶体反应,而低浓度同样只抑制孕酮诱导的顶体反应。由此推测是一类甘氨酸受体参与了ZP3诱导的顶体反应,而一类GABA<sub>A</sub>受体参与了孕酮诱导的顶体反应。之后,不少实验室通过分

子生物学手段证实在精子的头部确实存在甘氨酸受体<sup>[4~6]</sup>,并且通过对甘氨酸受体突变精子的研究,进一步证实了该受体对于ZP3诱导的顶体反应的重要性<sup>[7]</sup>。研究发现突变精子获能后几乎不被ZP3和甘氨酸诱导,用抗甘氨酸受体的单克隆抗体可完全阻止正常精子由ZP3诱导的顶体反应。所有实验结果都把甘氨酸受体和ZP3诱导的顶体反应紧紧地联系在一起。

## 3 GABA<sub>A</sub>受体参与孕酮诱导的顶体反应

有意思的是,同为配体依赖性的氯离子通道,甘氨酸受体在ZP3诱导的顶体反应中起了重要作用,而GABA<sub>A</sub>受体则与孕酮诱导的顶体反应密切相关。自从Meizel等<sup>[8]</sup>提出GABA<sub>A</sub>受体可能参与了孕酮诱导的顶体反应后,我们实验室最早通过爪蟾卵母细胞注射大鼠生精细胞mRNA方法,用GABA刺激后检测到了外向电流<sup>[9]</sup>,GABA<sub>A</sub>受体特异性激动剂muscimol可以模仿这种效应,而各种GABA<sub>A</sub>受体抑制剂则可阻断这种外向电流,由此证明在大鼠生精细胞中存在GABA<sub>A</sub>受体mRNA。因此,我们以大鼠为动物模型,通过分子生物学方法克隆到了精子膜上GABA<sub>A</sub>受体的多种亚基,包括 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\gamma 1$ <sup>[10]</sup>。其中除 $\beta 3$ 外, $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 的氨基酸序列在大鼠脑和睾丸都为同一种形式。以上实验为研究精子GABA<sub>A</sub>受体的生理功能打下了基础。通过爪蟾卵母细胞注射实验来判断孕酮是直接作用于GABA<sub>A</sub>受体,还是通过第二信使介导,即GABA<sub>A</sub>受体是否是孕酮直接作用的靶位点。 $\beta 3$ 亚基在睾丸中存在的拼接异构体是为睾丸组织所特有,细胞表达实验发现其不能同神经型的 $\beta 3$ 一样到达细胞质膜<sup>[11]</sup>。原位杂交实验检测到各类亚基均表达在曲精小管圆形精子和变态精子区域,各个亚基表达区域是重合的。通过精子免疫荧光实验发现各种亚基重叠分布于未获能精子顶体周围质膜的多个部分,并在顶体腹侧区相对集中。精子甘氨酸受体分布有三种类型,且随精子获能过程其比例发生改变<sup>[12]</sup>,有关获能对GABA<sub>A</sub>亚基分布的影响仍有待进一步研究。

## 4 GABA<sub>A</sub>受体参与孕酮诱导顶体反应的机制初析

自从Meizel等<sup>[8]</sup>发现BSA标记孕酮也能激活 $\text{Ca}^{2+}$ 内流引发顶体反应,据此推测孕酮可能通过膜上类似GABA<sub>A</sub>的受体而不是经典的核受体途径起作用。

不少细胞中孕酮诱导能产生两种现象，一种是快速即时的导致各种离子通道的开放，根据其时相不可能通过核受体途径产生，另一种是缓慢长期的效果，应该由经典核受体途径产生。有人推测细胞膜上一种未知的孕酮受体介导了快速现象。孕酮诱导的精子顶体反应  $Ca^{2+}$  内流现象与其他细胞中出现的孕酮快速反应现象非常相像，由此推测精子膜上存在一类孕酮膜受体。尽管克隆孕酮膜受体的研究进展缓慢，但可以肯定，孕酮诱导顶体反应不依赖于 GABAa 受体介导的氯离子内流，因为 GABAa 受体抑制剂 picrotoxin 不能有效抑制孕酮诱导的  $Ca^{2+}$  内流，而且在无氯离子的培养液中，孕酮也能有效诱导顶体反应<sup>[13]</sup>。目前尚不能否定 GABAa 受体引发的膜电位改变有协同增强孕酮信号的作用，而且这个假设也被一些实验室所支持。Kuroda 等<sup>[14]</sup>发现孕酮的作用能被 GABA 协同增强，而不是简单相加，该作用可被受体调控  $Ca^{2+}$  通道抑制剂和 GABAa 受体抑制剂 bicuculline 抑制。我们实验室发现 GABA 在低浓度确实能诱导顶体反应，而在高浓度其诱导的作用反被抑制<sup>[15]</sup>。由于在精浆中存在高浓度的 GABA，另外，卵子滤泡液引起的顶体反应可被 GABAa 受体抑制剂所抑制<sup>[16]</sup>，由此推测高浓度的 GABA 使精子不至于过早发生顶体反应，而在雌性生殖道里，滤

泡液有效成分通过作用于精子 GABAa 受体，引发顶体反应。根据以上结果，推断 GABAa 受体在孕酮诱导的顶体反应中起协同促进作用，孕酮可能通过间接和直接两种方式影响 GABAa 受体，而使一类由 GABAa 受体调控的  $Ca^{2+}$  通道开放，引起顶体反应。鉴于生殖系统中高浓度的 GABA 存在，GABAa 受体的生理作用可能不局限于参加孕酮诱导的顶体反应，有研究表明它还参与精子获能和超激活<sup>[17]</sup>。

综上所述，我们将把各类精子质膜表面配体依赖性离子通道与顶体反应诱导物之间的关系归纳成一张示意图(图 1)，图中显示它们在顶体反应中各自精细的分工，这种分工的基础可能与它们在膜上的分布和受到的调控有关。孕酮(P)诱导顶体反应的功能可被 GABAa 受体的超极化协同增强(图 1 中标记 3)。而 ZP3 诱导顶体反应的  $Ca^{2+}$  浓度升高，需要乙酰胆碱受体的参与，ZP3 受体结合 ZP3 后，激活乙酰胆碱受体开放(图 1 中 b)，最后激活  $Ca^{2+}$  通道的开放(图 1 中 d)，而该信号传递需甘氨酸受体诱导的超极化的存在。由于在获能的精子中，膜脂在不断的流动(图 1 中 e)， $Ca^{2+}$  升高迅速导致了顶体外膜和脂膜的融合，最后彻底融合，发生顶体反应。尽管精子质膜表面配体依赖性离子通道的研究目前还缺少电生理实验证据，但似乎可以肯定它们参与了顶体

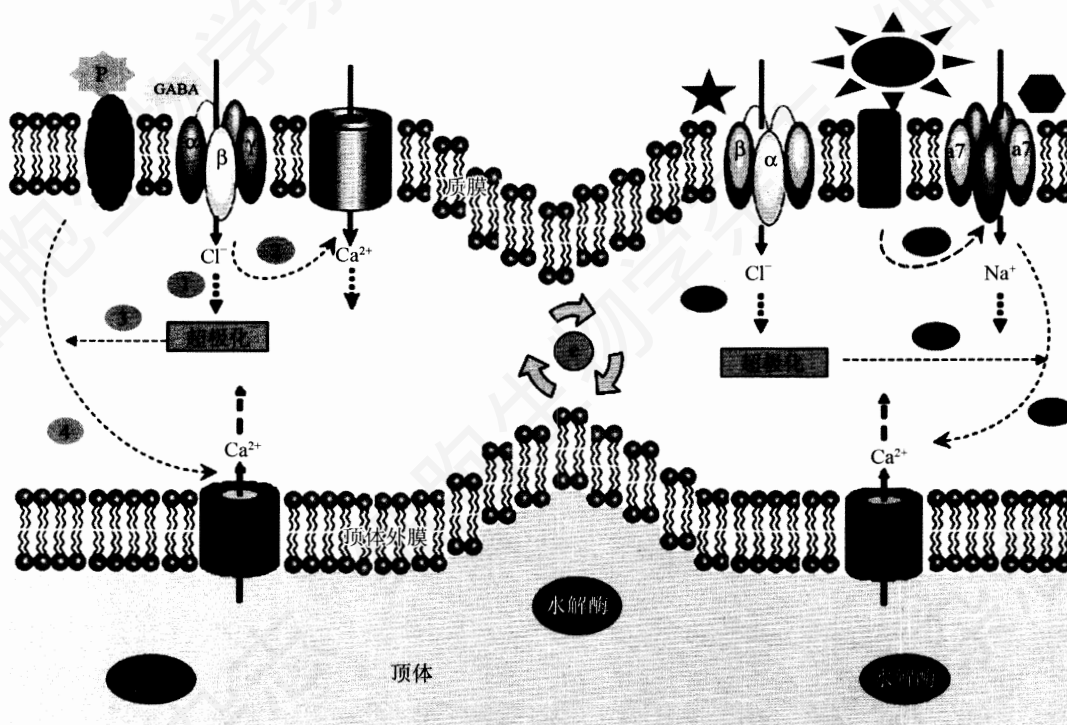


图 1 精子膜表面配体依赖性离子通道与顶体反应的关系图

反应信号传递通路一个关键环节,即膜的去极化。顶体反应诱导物激活各自的膜受体后,诱导了配体依赖性离子通道开放,导致了膜的去极化,进而影响电压依赖性Ca<sup>2+</sup>离子通道的开放,最终导致了顶体反应,但它们与膜电位变化之间的精确关系需进一步研究。虽然精子作为一种极度特化的细胞,限制了电生理实验手段的应用,但现在该技术已能初步应用于小鼠精子膜离子通道的研究<sup>[18]</sup>。由此推测,在不久的将来,膜片钳实验将会给精子膜表面配体依赖性离子通道的研究提供一条重要的途径。

#### 参考文献 (References)

- [1] Arnoult C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 6757  
 [2] Bray C *et al.* *Biol Reprod.* 2002, **67**: 782  
 [3] Melendrez CS *et al.* *Biol Reprod*, 1995, **53**: 676  
 [4] Melendrez CS *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **223**: 675  
 [5] Llanos MN *et al.* *Mol Reprod Dev*, 2001, **58**: 205  
 [6] Sato Y *et al.* *Zygote*, 2002, **10**: 105  
 [7] Sato Y *et al.* *Dev Biol*, 2000, **227**: 211  
 [8] Meizel S *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 1991, **77**: R1  
 [9] Yang SH *et al.* *Reprod. & Contraception*, 1998, **9**: 27  
 [10] Hu JH *et al.* *Neurochem Res*, 2002, **27**: 195  
 [11] Li S F *et al.* *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, **37**: 350  
 [12] Sato Y *et al.* *J Androl*, 2000, **21**: 99  
 [13] Turner KO *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 1994, **101**: 221  
 [14] Kuroda Y *et al.* *Arch Androl*, 1999, **42**: 185  
 [15] Hu JH *et al.* *Arch Androl*, 2002, **48**: 369  
 [16] Burrello N *et al.* *Fertil Steril*, 2004, **82**: 1086  
 [17] Zhang ZH *et al.* *Sheng Li Xue Bao*, 2000, **52**: 179  
 [18] Espinosaa F *et al.* *FEBS Lett*, 1998, **426**: 47

## Function of Sperm Membrane Ligand-gated Ion Channels in Sperm Acrosome Reaction

Hai-Xiong Liu, Yuan-Chang Yan, Yi-Ping Li\*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences,  
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Ligand-gated ion channels are membrane-spanning ion channels gated by neurotransmitters. Researches found out they play an important role in sperm acrosome reaction (AR), a fundamental step needed for mammalian fertilization. So far, three kinds of ligand-gated ion channels were detected in sperm head membrane, they are ACh receptor, glycine receptor, and GABA<sub>A</sub> receptor. Though ACh receptor and glycine receptor are clearly involved in Zona pellucida 3 (ZP3)-induced AR, the function of GABA<sub>A</sub> receptor are much more complicate. This review means to elucidate the different mechanisms of those receptors in changing of sperm membrane potential, and provide a partial view of sperm AR signal transduction passway.

**Key words** acrosome reaction; ligand-gated ion channel; sperm; hyperpolarization

Received: May 27, 2005 Accepted: July 13, 2005

\*Corresponding author. Tel: 86-21-54921395, E-mail: ypli@stn.sh.cn