

精卵细胞融合分子机制

郭晓强* 杨彩卿¹(解放军白求恩医学院生物化学教研室, 石家庄 050081; ¹ 保定师范专科学校定州分校, 定州 073000)

摘要 精卵融合是有性生殖中最为关键的事件之一, 因此对该过程分子机制的理解具有十分重要意义。已经发现多种蛋白质涉及到这个重要的过程, 主要包括卵子表面的 CD9、GPI 锚定蛋白和整合素等, 精子表面的附睾蛋白 DE、Izumo 和 ADAM 家族成员等, 它们通过特异性的识别和结合而辅助完成了精卵融合。这些进展对开发新的用于生殖调节或不育诊断和治疗技术、药物提供了保证。

关键词 精子; 卵子; 融合

受精是一个非常复杂的过程, 精子需要穿过卵丘细胞和透明带, 最后再通过与卵子表面特异性的分子识别后才完成融合过程并形成受精卵^[1,2], 该过程的研究一直是生殖科学的主要内容之一, 但对于这个重要且神秘问题的理解一直较少, 特别是分子具体机制上则更少。随着分子生物学新技术方面的一系列突破, 借助遗传学、生物物理学和生物化学的多种方法使精卵融合分子机制的研究获得了巨大的进展, 已经在精子和卵子表面鉴定了多种与两者特异性识别密切相关的蛋白质, 并且对其作用机制也有了较为深入的研究, 使人们对精卵识别并最终融合的分子机制在分子水平上有了一个深入全面的认识。本文就精卵识别过程中涉及到的蛋白质及融合机制方面的最新进展进行综述。

1 卵子表面精卵融合相关蛋白

精卵融合的前提是两者的有效识别, 因此其细胞表面的特异性蛋白对有效识别具有关键性的作用, 目前已经在精子和卵子表面鉴定了许多与细胞识别及随后的融合相关蛋白, 其中最为主要的有以下几种。

1.1 CD9 和 CD81

CD9 是一种普遍存在于细胞膜表面属于四跨膜超蛋白家族的蛋白质, 这个蛋白质家族的许多成员都参与了质膜的融合过程, 因此认为 CD9 也涉及到细胞的融合过程^[3], 而一系列实验发现 CD9 确实在精卵融合过程中发挥着特定的功能。

用 CD9 抗体温育小鼠的卵子可以显著减少和精子的融合数量^[3,4], 而当用蛋白酶处理卵子使受精率下降的一个重要原因也是减少了卵细胞表面的 CD9 含

量^[5], 这些初步结果说明 CD9 应该是精卵融合过程所必需的一类蛋白质。

最为重要的时, 2000 年 3 个不同研究小组通过同源重组获得了 CD9 缺陷小鼠^[6-8], 对这些 CD9 缺陷小鼠的表型观察发现, 它们的身体健康并发育正常, 且雌性小鼠性成熟后可有效排卵并且卵子在形态上也是正常, 但雌性小鼠却出现不育的后果。对其机制研究发现不育的原因是由于卵子失去了与精子有效融合的能力, 当体外将精子注入 CD9 缺陷的卵细胞内后可形成正常的受精卵。研究还发现当将 CD9 的 mRNA 注射到雌性 CD9 缺陷小鼠卵子内部后, 卵子重新获得了与精子融合的能力, 则雌性小鼠又恢复了生殖能力^[9,10]。这一系列结果说明卵子表面的 CD9 不影响卵细胞的正常发育, 只在精卵融合过程中发挥重要作用。

随后的研究还发现了 CD9 发挥精卵融合作用的结构域——大胞外结构域(large extracellular domain, LED)^[11], 当使用高浓度可溶的 LED 与卵子共同和精子混合后, 精卵融合的几率下降, 这是由于 LED 的竞争性作用减少了卵子表面 CD9 与精子表面特异蛋白结合的能力。此外点突变还发现 CD9 第二个胞外环的 173~175 位氨基酸残基 SFQ 也对精卵融合发挥重要作用, 因为当这 3 个氨基酸发生突变后, 精卵融合的几率明显的减少^[9]。特别是研究还发现在卵子发育和与精子融合过程中, CD9 的蛋白质表达存在着一个动态的变化^[12], 暗示着它们与该过程有密切关系。

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-12-28

* 通讯作者。Tel: 0311-87977344, E-mail: xiaoqiangguo123@163.com

这些结果说明小鼠表面的CD9在精卵融合过程的重要作用,而且不同物种的卵子表面均存在保守性较高的CD9^[13],因此可以初步认为CD9介导的精卵融合应该具有一定的普遍性。在人类方面研究表明CD9控制了一些卵子表面膜蛋白的重分布,如整合素 $\alpha_6\beta_1$ 的成簇过程等,从而也参与了配子的融合过程^[14]。

精卵融合除了需要CD9之外,还有另外一个四跨膜蛋白CD81^[15]。CD81的基因剔除导致40%的雌性不孕,体外实验表明是由于精卵融合缺陷,更为重要的是当CD9和CD81两个双突变将导致雌性小鼠全部不孕,说明两者共同组成了精卵融合的必需元件^[16]。

1.2 GPI 锚定蛋白

糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定蛋白是另一种存在于卵细胞表面并且参与精卵融合过程的重要蛋白质。通过基因剔除的方法获得了GPI锚定蛋白缺陷小鼠,其成熟雌性小鼠同样表现出不育特征,对卵子体外实验表明其无法与正常精子完成有效融合。当使用针对磷脂酰肌醇的特异性磷脂酶C(PLC)处理卵子破坏GPI锚定蛋白的结构后,卵子与精子的结合力明显降低^[17],这一系列结果说明卵子表面的GPI锚定蛋白在精卵融合过程也发挥着必要的作用。

1.3 整合素

除了上述两类已经确定的必需分子外,卵细胞表面的其他蛋白质也可能在精卵融合过程发挥了重要的辅助作用,其中最重要的一类就是整合素。卵子表面常见的整合素如 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 等^[18],虽然一系列实验表明,这些蛋白质并不是完全必需的^[19],但考虑到本身整合素在细胞识别和融合过程中的重要作用,且精子表面存在与其对应的特定分子^[20],因此这些整合素必然参与了精卵的融合过程^[21],由于卵子表面整合素本身种类的多样性,因此推测应该是辅助性的作用,具体的机制还待详细研究。

2 精子表面精卵融合相关蛋白

由于精卵融合过程是一个相互的作用,因此和卵子表面特异性分子相对应,精子表面也存在与融合过程相关的一系列重要蛋白质,已经鉴定的主要有以下几种。

2.1 DE

附睾蛋白DE又称为富含半胱氨酸分泌蛋白(cysteine-rich secretory protein 1, CRISP1),这种蛋白

质的典型特征是含有大量保守的半胱氨酸(大约16个)。DE最早在大鼠附睾中检测得到,是一个转录本两种不同的拼接形式,随后发现存在于大鼠精子表面并与精卵结合相关,在其他哺乳动物中也发现了DE的同源序列,而且存在较高保守性,如小鼠中的AEG-1与大鼠DE有70%同源,人的ARP有40%同源^[2]。实验发现,DE抗体处理后一方面可以有效减少精子的穿透能力(获能降低),另一方面也阻止了与卵子的最终融合,说明DE对于最终的精卵融合发挥重要功能^[22]。随后的实验发现在卵子表面存在可以识别并结合DE的特异性蛋白位点,当使用游离的DE和精子共同于卵子混合,可有效减少精卵融合的比率^[23,24],这说明精子表面的DE与卵子表面的特异位点的结合是精卵融合发生的一个必要条件^[25,26],最新研究发现CRISP N端两个非常保守的模体对于精子和卵子的有效结合发挥着重要的作用^[27]。

2.2 ADAM 家族

ADAM家族是一种含有保守的去整合素结构域和金属蛋白酶结构域(a disintegrin and a metalloprotease domain)的蛋白质家族,目前在精子表面鉴定与精卵融合相关的ADAM主要有3个成员,分别称为ADAM1(又名受精素 α),ADAM2(受精素 β)和ADAM3(cyritestin),它们被认为是卵子表面整合素的受体^[28],通过和整合素的相互作用而参与了精卵融合过程。研究发现受精素 α 和 β 可以形成异源二聚体来识别整合素^[29],在形成二聚体的过程中还需要一种蛋白质calmegin的参与,因为calmegin缺陷也可以导致雄鼠出现不育^[30]。Cyritestin本身可以形成一个同源二聚体而参与与整合素的识别过程,但该过程依赖于另外两种ADAM的参与^[31],具体的细节问题还需进一步阐明。

2.3 Izumo

Izumo是最近才从小鼠精子表面鉴定的一种跨膜蛋白^[32],属于免疫球蛋白超家族的成员。使用Izumo抗体可有效阻断精卵融合过程,当使用基因剔除获得Izumo缺陷小鼠后,小鼠的发育正常,身体健康却丧失生殖能力。对这些小鼠的精子观察发现,它们外形正常且可以顺利穿过透明带,但不能与卵子有效融合,因此无法形成受精卵。在人类方面也已经鉴定了Izumo,初步实验表明在参与精卵融合过程时具有与小鼠类似的功能。

2.4 其他蛋白质

除了上面提及的一些比较明确的蛋白质外,还有

其他许多精子表面蛋白也可能参与了精卵融合过程, 其中钙离子通道 TRP-3 就是其中重要的一种。TRP-3 在正常情况下存在于细胞囊泡中, 在精子激活过程中被运输到膜表面, 随后还伴随着钙离子流动的增强, 它的缺陷也可以导致精卵融合的失败^[33], 这说明 TRP-3 介导的钙离子流动在受精卵形成过程中也发挥着重要的作用, 这个结果与钙离子参与了许多重要的细胞融合过程相一致^[34]。

3 精卵融合基本过程

哺乳动物受精是一个多步骤的复杂过程, 而精卵融合是其中最为关键的一步。大量的实验已经鉴定了许多与精卵融合相关的细胞膜蛋白, 它们在精卵识别和结合过程中发挥着重要的作用。根据细胞特异性融合的 SNARE 假说, 细胞表面分子的特异性识别是细胞融合的必要前提^[34], 当然精卵融合也不例外, 因此精子和卵子表面与融合相关的蛋白质应该具有一定的特异性互补。从目前的证据来看精子表面的 ADAM 和卵子的整合素应该相对应(由它们的结构互补性所确定), 至少体外实验已经证明该过程可以发生^[35], 而精子的 Izumo 可能和卵子表面的 CD9 结合, 通过实验已经表明另外一种免疫球蛋白超家族成员 PSG17 可以有效和 CD9 结合^[36], 而根据结构保守性推测 Izumo 和 CD9 的结合也符合这个原则, 但现在的的问题是两者是否可以真正结合还需要用进一步的实验证实。至于其他相关分子的互补性还待证实。

根据已有的资料, Schultz 等^[37]初步提出了受精的基本机制: 精子首先通过由卵丘细胞分泌的含有透明质酸的基质, 然后与卵细胞外层的透明带相互作用促使顶体内含物释放, 通过一种现在未完全理解的相互作用^[38]而穿过透明带进入到卵黄周隙与卵细胞表面结合并融合。此时缺乏了顶体的精细胞表面的 DE、ADAM 家族、Izumo 以及一些未鉴定的分子与卵细胞表面的 CD9 及 CD81、GPI 锚定蛋白、整合素等之间实现特异性识别并结合, 在 TRP-3 钙离子通道释放的 Ca^{2+} 协助下实现两层细胞膜的融合, 从而使精卵细胞融为一体形成受精卵。在精卵细胞从结合到融合的具体过程在分子水平上现在还未完全阐明, 而通过借助一系列新的实验手段和方法通过在体外模拟该过程而真正理解这种神秘的生命现象^[39]。

4 展望

精卵细胞膜融合形成受精卵可以说是生物界最

神秘的现象之一, 是进行有性生殖的高等生物繁衍的基础, 它的准确、特异性识别并融合一方面保证了新个体的形成, 另一方面又避免外源物种基因的污染, 保证遗传物质的相对稳定性, 因此对这个基本生物学过程的研究一直是生命科学的主要内容之一, 当前借助生命科学的多种方法和技术已经在该领域取得了一系列重大结果, 从而使许多问题得到很好的解决, 但由于该问题的复杂性因此距离完全阐明该问题还有很长一段距离要走。

对精卵融合的研究有着极为重要的理论和临床意义, 除了使人们对这个基本的生物学问题有更深入的理解外, 还将大大革新当前的生殖学临床治疗, 如可以对困扰当前许多夫妇不孕不育问题的解决将有重大帮助, 也可以在新型免疫避孕药物的开发方面取得新突破。

参考文献(References)

- [1] Primakoff P *et al.* *Science*, 2002, **296**: 2183
- [2] Hoodbhoy T *et al.* *Reproduction*, 2004, **127**: 417
- [3] Kaji K *et al.* *Reproduction*, 2004, **127**: 423
- [4] Miller BJ *et al.* *J Cell Biol*, 2000, **149**: 1289
- [5] Komorowski S *et al.* *Int J Dev Biol*, 2003, **47**: 65
- [6] Le Naour F *et al.* *Science*, 2000, **287**: 319
- [7] Miyado K *et al.* *Science*, 2000, **287**: 321
- [8] Kaji K *et al.* *Nat Genet*, 2000, **24**: 279
- [9] Zhu GZ *et al.* *Development*, 2002, **129**: 1995
- [10] Kaji K *et al.* *Dev Biol*, 2002, **247**: 327
- [11] Higginbottom A *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **311**: 208
- [12] Komorowski S *et al.* *Zygotes*, 2006, **14**: 119
- [13] Li YH *et al.* *Reproduction*, 2004, **127**: 151
- [14] Ziyat A *et al.* *J Cell Sci*, 2006, **119**: 416
- [15] Rubinstein E *et al.* *Semin Cell Dev Biol*, 2006, **17**: 254
- [16] Rubinstein E *et al.* *Dev Biol*, 2006, **290**: 351
- [17] Alfieri JA *et al.* *J Cell Sci*, 2003, **116**: 2149
- [18] He ZY *et al.* *Dev Biol*, 2003, **254**: 226
- [19] Sengoku K *et al.* *Hum Reprod*, 2004, **19**: 639
- [20] Tomczuk M *et al.* *Exp Cell Res*, 2003, **290**: 68
- [21] Talbot P *et al.* *Biol Reprod*, 2003, **68**: 1
- [22] Cohen DJ *et al.* *Biol Reprod*, 2001, **65**: 1000
- [23] Cohen DJ *et al.* *Biol Reprod*, 2000, **63**: 462
- [24] Ellerman DA *et al.* *Biol Reprod*, 2002, **67**: 1225
- [25] Da Ros VG *et al.* *Biol Reprod*, 2004, **70**: 1325
- [26] Roberts KP *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 2006, **250**: 122
- [27] Ellerman DA *et al.* *Dev Biol*, 2006, **297**: 228
- [28] Cuasnicu PS *et al.* *Arch Med Res*, 2001, **32**: 614
- [29] Evans JP. *Hum Reprod Update*, 2002, **8**: 297
- [30] Yamagata K *et al.* *Dev Biol*, 2002, **250**: 348
- [31] Nishimura H *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 34957
- [32] Inoue N *et al.* *Nature*, 2005, **434**: 234
- [33] Xu XZ *et al.* *Cell*, 2003, **114**: 285

- [34] 郭晓强. *生物学通报*, 2005, **40**: 6
[35] Stein KK et al. *J Cell Sci*, 2004, **117**: 6269
[36] Ellerman DA et al. *Mol Biol Cell*, 2003, **14**: 5098
[37] Schultz R et al. *Nature*, 2005, **434**: 152
[38] Clark GF et al. *J Biol Chem*, 2006, **281**: 13853
[39] Wortzman GB et al. *Methods Mol Biol*, 2006, **341**: 89

Molecules Mechanism of Sperm-oocyte Fusion

Xiao-Qiang Guo*, Cai-Qing Yang¹

(Department of Biochemistry, Bethune Military Medical College, Shijiazhuang 050081, China;

¹Department of Dingzhou, Baoding Normal College, Dingzhou 073000, China)

Abstract Sperm-oocyte fusion is one of the most key events in sexual reproduction, so it has an important significance to understand its molecular mechanism. There are several molecules that involved in sperm-oocyte fusion, such as CD9, glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and integrins on oocytes, and epididymal protein DE, Izumo and ADAMs on sperm. These molecules assist to complete sperm-egg fusion by special recognition and binding. These progress has vital application in developing new methods for both fertility regulation and diagnosis and treatment of human infertility.

Key words sperm; oocyte; fusion

Received: May 8, 2006

Accepted: December 28, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-311-87977344, E-mail: xiaoqiangguo123@163.com