

形成了梯度,使得有四个胞质通道的两个细胞中浓度最高,首先进入减数分裂,有三个胞质通道的次之,稍后也进入减数分裂。然而减数分裂的继续还需要另外的稳定因子,这种因子可能在 Bic-D 和 orb 等的作用下特异定位于预卵母细胞,使预卵母细胞的减数分裂能继续下去;其他所有的细胞没有得到这种因子,即使进入减数分裂也在不久后退出。上述因子的定位可能依赖极性微管系统,破坏微管骨架会使预卵母细胞不能决定为卵母细胞,而进入营养细胞的发育途径。

4. 物质运输与卵母细胞的决定

在预卵母细胞-营养细胞的极性建立起来以后,卵决定有关因子以一种未知机制沿微管骨架从营养细胞运输到预卵母细胞并在其中特异定位,使其分化进一步进行,最后卵母细胞中减数分裂能够稳定地继续下去。

5. 卵母细胞内基因表达调控与卵母细胞的决定

尽管传统上认为卵细胞中没有转录活动,但是现在已有迹象表明并非如此。可能正是卵母细胞中的基因表达调控因子(卵母细胞决定因子?)最终决定了自身的命运(资料待集)。

综上所述,卵母细胞的决定过程相当复杂,但是现有资料基本上支持运输定位模型。为便于理解,整个决定过程可以分为两个阶段,第一阶段,通过不均等分裂, fusome 的形成等过程,建立了极性,这一阶段是卵母细胞决定的前提;第二阶段包括卵母细胞决定有关因子的定位以及减数分裂因子梯度的建立。这两个阶段中预卵母细胞和营养细胞一步一步地分别走向两条截然不同的发育途径。整个卵母细胞决定过程是一个有多个因子参与的,多步骤的过程。寻找

这些因子,搞清楚每一个过程,将是下一阶段工作的重点。

参 考 文 献

- [1] Lynn Cooley, 1995, *Developmental Genetics*, 16:1-5.
- [2] Paul. F. Lasko, 1994, "Molecular Genetics of Drosophila Oogenesis", R. G. Landes Company, Austin.
- [3] William E. Theurkauf et al., 1993, *Development*, 118:1169-1180.
- [4] Wayne R. steinhauer and Laura J. Kalfayan, 1992, *Genes & Development*, 6: 233-243.
- [5] Dennis Mckearin and Allan Spradling, 1990, *Genes Dev.*, 4:2242-2251.
- [6] Dennis Mckearin and Lori Christerson, 1994, *Syba Foudation Symposium*, 182:210-222.
- [7] Dennis Mckearin and B. Ohlstein, 1995, *Development*, 121:2937-2947.
- [8] Valerie Lantz, Linda A. and Paul S., 1992, *Development*, 115:75-88.
- [9] Valerie Lantz, J. S. Chang, et al., 1994, *Genes Dev.*, 8:598-613.
- [10] William E. Theurkauf et al., 1992, *Development*, 115:923-936.
- [11] Brenda A. Knowles and Lynn Cooley, 1994, *TIG.*, 10(7):235-241.
- [12] Wayne R. Steinhauer and Laura J. Kalfayan, 1991, *Genes Dev.*, 6:233-243.
- [13] Pamela K. Mulligan, Ana R. Campos, and J. Roger Jacobs, 1996, *Developmental Genetics*, 18:316-326.
- [14] Robinson D. Cant K, Cooley L., 1994, *Development*, 120:2015-2025.
- [15] Xue F, Cooley L., 1993, *Cell*, 72:681-693.
- [16] Beat Suter and Ruth Steward, 1991, *Cell*, 67:917-926.
- [17] Bing Ran, Rita Bopp and Beat Suter, 1994, *Development*, 120:1233-1242.
- [18] Adelaide T. C. Carpenter, 1994, *Ciba Foundation Symposium.*, (182)223-254.
- [19] Lin H, Spradling A., 1995, *Dev. Genetics.*, 16:6-12.

精子头后部质膜融合蛋白 fertilin 的研究进展

苟克勉 邓继先

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

陈永福

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

哺乳类睾丸精子经过附睾成熟时的膜蛋白

加工和迁移过程后,成为自由运动的具有受精

能力的成熟精子。受精时,成熟精子首先在雌性生殖道或体外获能,与卵母细胞-卵丘复合体相遇时,精子借助头后部(顶体后区)质膜蛋白PH-20的透明质酸酶活性^[1]穿过卵母细胞外卵丘细胞层,到达透明带后,精子通过头前部(顶体区)质膜表面的透明带结合蛋白(如 sp56, p95, PH-20, FA-1, β -1, 4-GT 等)与卵母细胞透明带发生识别和结合过程,同时,卵母细胞透明带 ZP3 糖蛋白诱导精子发生顶体反应;依靠顶体酶类作用和尾部的运动,发生顶体反应的精子穿过透明带,到达卵周隙,紧接着,精子头后部质膜糖蛋白 fertilin 与卵母细胞质膜发生识别和结合过程^[2-4],并且,启动精子和卵母细胞的质膜融合系统^[2-3],最终实现受精过程,完成父系遗传物质的传递。

依据物种的不同,顶体反应后精子表面与卵母细胞质膜开始融合的部位有所区别,分别有顶体内膜^[5],赤道区^[6-8]和头后部^[2,4]质膜,其中,哺乳类精子常通过赤道区或头后部质膜发动精卵质膜的融合过程。精子与卵母细胞质膜的结合(binding)和融合(fusion)是两个独立的过程^[4],具体表现为:1. 成熟精子只有完成顶体反应,才具有融合能力^[5],结合过程与顶体反应没有密切关系。顶体反应过程中,精子表面的融蛋白结构发生变化,暴露出融合位点^[9],同时,顶体内容物中的金属蛋白酶类对融合分子具有水解加工作用^[10]。2. 融合过程必须二价阳离子的参与^[4-6],结合过程对离子条件的要求不甚严格,没有二价阳离子(Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+})存在时,结合能力只是下降,但并没有消失^[7-8]。如果将具有完整顶体的精子显微注射至透明带内,没有 Ca^{2+} 参与的话,精卵质膜也能发生结合,却无法实现融合过程^[4];3. 结合过程没有明显的特异性和生化反应过程,而融合过程特异性极强,并且需启动卵母细胞的信号转导系统^[1-4];4. 结合过程可能存在两种或两种以上的结合方式^[6-8,11],而融合过程相对专一,可能只有一种方式^[1-4]。目前,还难以确认所有的哺乳类是否具有相同的融合蛋白和相同的融合机

制,人们以抗精子膜蛋白的单克隆抗体^[2]为研究手段,发现了候选的融合蛋白是 ADAMs 基因家族^[12-13]的 fertilin 糖蛋白(前称 pH-30)^[2-3,13],本综述主要介绍 fertilin 糖蛋白的研究概况。

一、Fertilin 糖蛋白的结构特征

Primakoff(1987)等人最早发现,豚鼠精子头后部膜蛋白 fertilin 的单克隆抗体只抑制豚鼠体外受精时的精卵质膜结合和融合过程,而对精子的活力和卵母细胞均无其它影响,即 fertilin 蛋白参与豚鼠精子的体外受精过程^[2];同样,小鼠精子表面存在的 fertilin 蛋白也只参与受精时的精卵质膜融合过程^[6-8]。免疫组化和免疫电镜定位发现,fertilin 抗原位于顶体完整和顶体反应后豚鼠精子的头后部^[2]和小鼠精子的赤道板区域^[6-8,11],正好是这两种动物精子与其卵母细胞进行结合和融合的部位^[4-5]。Northern 杂交显示,fertilin 蛋白基因只在成年动物的睾丸组织中表达^[12],对豚鼠的原位杂交也证实,fertilin 蛋白最早出现在豚鼠精子细胞(spermatid)的头部和原生质滴(cytoplasmic lobe)上^[14],睾丸精子进入附睾前,fertilin 蛋白位于精子的整个头部^[2,14],在附睾中,头前部的 fertilin 蛋白向头后部迁移,最终严格地限定于头后部质膜上^[14-15]。利用单克隆抗体亲和层析和免疫印迹发现,fertilin 蛋白由 α (60kDa)和 β 两个亚基(44kDa)构成异二体结构,两个亚基本身各自具有二硫键,但在亚基间没有二硫键存在^[2];通过对其 cDNA 文库的分析发现两个亚基的共同特点是:都具有跨膜结构,属于内在型蛋白,大部分氨基酸序列扩展于膜外,胞质内只是羧基端的一个肽尾;两个亚基都连接有寡糖链,糖基化位点和二硫键位点分布在膜外的氨基端。其中成熟型 α 亚基的主肽链由 289 个氨基酸残基构成,约 29.7kDa,经过翻译时加工 N-端寡糖链和在 Golgi 体中加工 O-端寡糖链后为 60kDa;成熟型 β 亚基的主肽链有 353 个氨基酸残基,约 39kDa,经过两个位点的

N-端糖基化后分子量为 44kDa^[3]。进一步用 PCR 和 RACE 技术分析发现, α 和 β 前体的一级结构相近, 从氨基端起, 依次包括: 信号肽 (signal sequence)、前体区 (prodomain)、金属蛋白酶区 (metalloprotease domain)、整联蛋白配体区 (disintegrin domain)、半胱氨酸富含区 (cysteine-rich domain)、表皮生长因子样重复区 (epidermal growth factor-like repeat)、跨膜区 (transmembrane domain) 和胞内肽尾区 (cytoplasmic tail), 其中信号肽在分泌前被切除^[3,12]。由前体到成熟型亚基的加工过程中, 蛋白水解酶从金属蛋白酶区和整联蛋白配体区连接处进行酶切, 得到氨基端为 Disintegrin 区域的成熟型亚基^[16-17], 其中, α 亚基的成熟加工过程在睾丸组织中完成, 而且在分泌前进行酶切, 即在高尔基体中水解, 属于胞内加工^[16]; β 亚基在附睾中成熟, 其水解过程伴随着 fertilin 蛋白在精子头部的迁移过程^[15], 最近发现, β 亚基在附睾加工所需的丝氨酸蛋白酶来自睾丸分泌液, 而非附睾内皮细胞分泌物^[16]。由亚基前体一级结构间的同源性可以看出, fertilin 蛋白的 α 和 β 亚基可能源于同一原始蛋白^[3,12-13]。与 Genbank 已有的资料比较发现, 两个亚基与多种蛇毒蛋白 (snake venom proteins) 间具有很高的同源率^[12-13,18], 这一结果暗示 fertilin 蛋白不仅与蛇毒蛋白的起源相同, 而且可能具有相似的作用机理。

由于 fertilin 蛋白的两个亚基前体和蛇毒蛋白可能源于同一原始蛋白, 并且都具有金属蛋白酶区和整联蛋白配体区, 因此, Wolfsberg (1995) 等人将含有这一结构域的跨膜蛋白归于一类, 统称 ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease domains) 族蛋白^[13]。PCR 技术证实, ADAM 基因广泛地存在于哺乳类^[13]及低等动物^[19]的体组织^[13,19]和生殖系统^[13,20]中, 而且, 同一物种不同的 ADAMs 成员位于不同的染色体上^[20-21]。ADAMs 基因编码的 disintegrin 肽段为整联蛋白 (integrin) 的配体, 而整联蛋白广泛存在于真核生物界, 是真核细胞与细

胞、细胞与胞外基质层发生联系的一种公共受体, 参与细胞间的粘附和信号传导过程^[22]。因此, ADAMs 基因在不同细胞中的表达, 与细胞的发育和联系等基本的生物学现象密切相关。除了在精子形成和受精过程中的特殊功能外, 已知的体组织中表达的其它 ADAMs 成员还参与神经^[23]和骨骼肌^[24]的发育。

二、Fertilin 糖蛋白的主要功能

(一) β 亚基在精卵质膜结合中的作用

对蛇毒蛋白作用机理的研究发现, ADAMs 蛋白的 disintegrin 肽段有一个通过半胱氨酸间二硫键形成的发夹结构, 发夹结构含有 13 或 14 个氨基酸残基, 其顶端的三肽结构是 ADAMs 结构域与整联蛋白结合的功能单位^[18,22], 而且, ADAMs 发夹结构的氨基酸序列呈现多样性, 决定了 disintegrin 与整联蛋白结合的特异性, 如蛇毒蛋白的三肽为 RGD^[22], 豚鼠和小鼠 fertilin β 亚基分别为 TDE^[25] 和 QDE^[6,26], 它们可能连同后面相邻的一个半胱氨酸残基共同组成功能单位^[25]。受精过程中, β 亚基的 disintegrin 结构区扮演精卵质膜结合的主要证据有: 1. 成熟型 β 亚基的前 90 个氨基酸残基与蛇毒蛋白的 disintegrin 高度同源^[12], 在豚鼠的体外受精实验中, 采用人工合成的三肽结构类似物发现, 含有 TDE 结构的合成寡肽竞争性地与卵母细胞质膜结合后, 抑制了随后进行的精卵质膜融合过程, 证明 TDE 结构是精子与卵母细胞结合必需的, 而且, 其作用机理类似蛇毒蛋白的 RGD 三肽结构域与整联蛋白的结合方式^[25]; 2. 哺乳类卵母细胞^[26]和早期受精卵^[27]表面确实存在整联蛋白, 进一步用 PCR 技术和单抗实验证实, 卵母细胞表面存在的整联蛋白为 β -1 型^[7,26]; 3. 荧光标记的重组 β 亚基与卵母细胞发生结合的位置正好是精卵结合的位置^[7]。

(二) α 亚基在精卵质膜融合中的潜在作用

精子借助 fertilin 蛋白 β 亚基的 disinte-

grin 肽段与卵母细胞质膜结合后, fertilin 蛋白本身结构发生变化, 暴露出成熟型 α 亚基上可能具有融合功能的肽段(90-111aa)^[3], 并进一步促成融合过程^[1,4]。目前, 还难以用实验手段证实 α 亚基在融合中的作用, 人们只是在对 fertilin 蛋白的两个亚基进行结构分析时发现, 与 β 亚基相反, α 亚基的 90-111 残基间的肽段位于膜外氨基端, 疏水性强, 并且, 疏水性残基(Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val)在外侧形成侧面型 α -螺旋结构(sided α -helix)^[3], 这一结构正好与已知的病毒融合蛋白具有结构上的相似性^[18]。当病毒感染宿主细胞时, 膜表面构象首先发生变化, 暴露出疏水性的融合肽段, 然后融合肽段插入宿主细胞质膜, 形成融合孔(fusion pore), 融合孔的扩大导致膜的融合过程^[1,18]。这一机理启发人们, 受精时, α 亚基的 90-111 肽段可能在精卵质膜融合时具有融合作用。间接证明发现, 人工合成的 α 亚基 90-111 肽段确实可以结合并引发脂质体的融合过程, 但是, 这种人工肽段促进脂质体融合的作用机制与病毒的融合机理完全不同^[28-29]。进一步的研究发现, 牛^[17]和猴^[30] fertilin 糖蛋白的 α 亚基该区段无疏水性, 也不形成螺旋结构, 也就是说, 牛和猴的该区段不具备潜在的融合肽段需要的结构特征, 因此, 对于 α 亚基在融合中的作用, 有必要做深入地研究。

(三) α 亚基的其他可能功能

以前认为, fertilin 蛋白在成熟加工时, α 亚基的大部分 disintegrin 肽段被水解除去, 也就是说, α 亚基失去了与卵母细胞结合的可能性; 近期的研究发现, α 和 β 亚基水解加工发生在金属蛋白酶区和 disintegrin 区连接处, 即 α 前体的 disintegrin 肽段水解后成为成熟型 α 亚基的氨基端肽链^[16-17], 因此, 不能排除 α 亚基也具有与卵母细胞质膜的结合能力, 有证据表明重组 α 亚基确实可以与卵母细胞发生结合过程^[8]。

尽管所有的 ADAMs 蛋白都具有金属蛋白酶区, 但是, 比较发现, 只有 α 亚基前体的金

属蛋白酶区存在一个共有序列(consensus sequence), 其中有一个酶激活位点, 而且 α 前体 gene 主要在睾丸组织中表达^[13], 暗示 α 亚基前体 N-端肽链的金属蛋白酶区在睾丸水解前后具有特殊的功能, 可能参与精子的发生、精子细胞释放至输精管的生理过程、精子在输精管发生波中的迁移, 或者参与自身或其他 ADAMs 蛋白的水解加工过程^[13]。

三、结 语

目前发现, ADAMs gene 在多种组织中广泛存在和表达, 睾丸组织中, 就有 10 余种 ADAMs 基因表达^[1], 因此, 不能排除其他 ADAMs 蛋白在精卵结合和融合过程中的潜在作用。已经发现小鼠精子表面的 cyritestin 和 β 亚基就共同参与精卵质膜的结合过程^[11]。已经清楚的是, 发生顶体反应的精子首先利用 fertilin 蛋白的 β 亚基的 disintegrin 区与卵母细胞质膜上的整联蛋白结合, 然后, fertilin 蛋白结构发生变化, 露出 α 亚基, 并可能通过 α 亚基的融合肽段与卵膜开始融合过程; 对于卵母细胞来说, 发生结合的整联蛋白可能激活 TKs 信号转导系统, 开始融合信号的传递过程, 同时, 整联蛋白本身发生自体酪氨酸磷酸化过程^[22], 降低了卵母细胞与其他精子 fertilin 蛋白上 disintegrin 肽段的结合, 防止了异常的多精子入卵发生, 保证了受精过程的顺利完成。融合完成后, 精子的顶体内膜通过胞吞作用进入受精卵的细胞质, 可能参与组成高尔基体等内膜系统, 精子的其他质膜系统(包括尾膜)掺入卵子质膜, 共同组成受精卵的质膜系统^[5]。同时, 精子头后部的质膜蛋白也成为受精卵的质膜蛋白, 但对其在胚胎发育时的作用和去向还不清楚。我们发现, 用抗精子头后部 sp18 蛋白的单克隆抗体预处理小鼠精子后, 体外受精得到的受精卵, 其早期发育被阻断在 2-细胞期, 即掺入卵子质膜的精子膜蛋白可能与胚胎的早期发育密切相关。对于 fertilin 糖蛋白来说, 还需进行深入研究的内容包括: α 亚基在精卵融

合时的具体作用和卵母细胞的激活机理, fertilin 在顶体反应时是否具有结构上的变化以及 α 和 β 亚基的糖基在受精时是否具有作用等。

摘 要

精子头后部(或赤道区)表面 fertilin 糖蛋白由相关的两个跨膜亚基 α 和 β 构成异二体形式。这两个亚基前体均含有金属蛋白酶区(metalloprotease domain)和整联蛋白配体区(disintegrin domain),属于 ADAMs gene 家族。 α 和 β 前体分别在睾丸和附睾中从上述两区域连接处水解后,得到成熟型亚基。受精时,穿过透明带的顶体反应后精子借助 β 亚基的 disintegrin 肽段与卵母细胞表面的整联蛋白结合,同时 fertilin 结构发生变化,暴露出 α 亚基上潜在的融合肽段(90-111aa),并介导精子与卵母细胞发生质膜融合,最终完成受精过程。

参 考 文 献

- [1] Myles DG & P Primakoff. 1997. *Biol Reprod.* **56**:320-327.
- [2] Primakoff P. et al., 1987, *J Cell Biol.* **104**:141-149.
- [3] Blobel CP. et al., 1992, *Nature.* **356**:248-252.
- [4] Myles DG. 1993, *Dev. Biol.* **158**:35-45.
- [5] Yanagimachi R. 1994, In *Physiology of Reproduction*. Ed. By Knobil E. & JD Neill. pp. 189-317. Raven Press. New York.
- [6] Evans JP et al., 1995, *J Cell Biol.* **108**: 3267-3278.
- [7] Evans JP et al., 1997, *Dev. Biol.*, **187**:79-93.
- [8] Evans JP et al., 1997, *Dev. Biol.* **187**:94-106.
- [9] Arts EGJM et al., 1997, *Biochem J.* **325**: 191-198.
- [10] Diza-Perez E & S Meizel. 1992, *Mol Reprod Dev.* **31**:122-130.
- [11] Yuan RY et al., 1997, *J Cell Biol.* **137**:105-112.
- [12] Wolfsberg TG et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:10783-10787.
- [13] Wolfsberg TG et al., 1995, *Dev. Biol.* **169**:378-383.
- [14] Cowan AE & DG Myles. 1993, *Dev. Biol.* **155**:124-133.
- [15] Hunnicutt GR. et al., 1997, *Dev. Biol.* **191**:146-159.
- [16] Lum L & Blobel CP 1997, *Dev. Biol.* **191**: 131-145.
- [17] Waters SI & JM White. 1997, *Biol Reprod.* **56**:1245-1254.
- [18] White JM et al., 1992, *Science.* **258**:917-924.
- [19] Rooke J et al., 1996, *Science* **273**:1227-1231.
- [20] Perry AC et al., 1994, *Biochem Biophys Acta.* **1207**:134-137.
- [21] Cho C et al., 1996, *Genomics.* **34**: 413-417.
- [22] Hynes RO et al., 1992, *Cell.* **69**:11-25.
- [23] Wolfsberg TG et al., 1995, *J Cell Biol.* **131**:(2)275-278.
- [24] Takako Yagami-Hiromasa et al. 1995, *Nature*, **377**:652-656.
- [25] Myles DG. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:4195-4198.
- [26] Almeida ECA. et al., 1995, *Cell.* **81**:1095-1104.
- [27] Sutherland AE et al., 1993, *Development.* **119**:1175-1186.
- [28] Muga A et al., 1996, *Biochemistry.* **33**: 4444-4448.
- [29] Martin I & JM Ruyschaert. 1997, *FEBS Lett.* **405**:351-355.
- [30] Perry ACF et al., 1996, *Biochem.* **307**:843-850.

用示踪技术研究视神经再生细胞学的新进展

王子仁

(兰州大学生物系 兰州 730000)

鱼类和两栖类成年动物的视神经,作为中枢神经的一部分(来源于胚胎的神经管),已被

电生理学和解剖学的实验证明具有再生的能力^[1,2]。当其视神经被损伤后,经过 3 至 6 个