

- [5] Loborg, H. and Rundquist, I., 1997, *Cytometry*, **28**: 212-219.
- [6] Ohsumi, K. et al., 1993, *Science*, **262**: 2033-2035.
- [7] Gerdes, M. G. et al., 1994, *J. Cell Biol.*, **2**: 289-304.
- [8] Rattner, J. B., 1992, *Chromosoma*, **101**: 259-264.
- [9] Yan, Y. L., 1993, *La Kromosomo*, **1-70**: 2395-2406.
- [10] 罗艺, 刘凌云, 1996, *遗传学报*, **23**: 351-356.
- [11] 阎蕴力等, 1997, *实验生物学报*, **30**: 213-219.
- [12] Saitoh, N. et al., 1995, *BioEssays*, **17**: 759-766.
- [13] Roberge, M. et al., 1990, *J. Cell Biol.*, **111**: 1753-1762.
- [14] Bickmore, W. A. and Oghene, K., 1996, *Cell*, **84**: 95-104.
- [15] Cook, P. R., 1994, *BioEssays*, **16**: 425-430.
- [16] Warburton, P. E. and Earnshaw, W. C., 1997, *BioEssays*, **19**: 97-99.
- [17] Saitoh, Y. and Laemmli, U. K., 1994, *Cell*, **76**: 609-622.
- [18] Andreassen, P. R. et al., 1997, *J. Cell Biol.*, **13**: 29-43.
- [19] Strissel, P. L. et al., 1996, *Chromosoma*, **105**: 122-133.
- [20] Bickmore, W. A. and Oghene, K., 1996, *Cell*, **84**: 95-104.
- [21] Von Kries, J. P. et al., 1992, *Cell*, **64**: 123-135.
- [22] Vega-Salas, D. E. and Salas, P. J. I., 1996, *Chromosoma*, **105**: 321-331.
- [23] Pluta, A. et al., 1990, *Trends Biochem. Sci.*, **15**: 181-185.
- [24] Hirano, T. and Mitchison, T. J., 1994, *Cell*, **79**: 449-458.
- [25] Hirano, T. et al., 1997, *Cell*, **89**: 511-521.
- [26] Shi, L. et al., 1994, *Science*, **263**: 1143-1145.
- [27] Oberhammer, F. A. et al., 1994, *J. Cell Biol.*, **126**: 827-837.
- [28] Martin, S. J. et al., 1995, *Science*, **269**: 106-107.
- [29] Abend, M. et al., 1996, *Cell Prolif.*, **29**: 101-113.
- [30] 阎蕴力等, 1996, *癌变、畸变、突变*, **8**: 161-164.
- [31] 阎蕴力等, 1998, *癌变、畸变、突变*, **10**: 155-159.
- [32] Sit, K. H. et al., 1996, *Anat. Rec.*, **245**: 1-8.
- [33] Jacobson, M. D. et al., 1994, *EMBO J.*, **13**: 1899-1910.
- [34] Kass, G. E. N. et al., 1996, *Biochem. J.*, **318**: 749-752.
- [35] Cohen, G. M. et al., 1994, *J. Immunol.*, **153**: 507-512.
- [36] Franziska, A. et al., 1994, *J. Cell Biol.*, **126**: 827-837.
- [37] 小高加千子, 1997, *临床免疫*, **29**: 67-75.
- [38] Bassnett, S. and Mataic, D., 1997, *J. Cell Biol.*, **137**: 37-49.
- [39] Ferlini, C. et al., 1996, *Cell Prolif.*, **29**: 427-436.
- [40] Ferlini, C. et al., 1997, *J. Immunol. Methods*, **205**: 95-101.

## 受精 $\text{Ca}^{2+}$ 波动信号

邓满齐

(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)

迄今为止研究的所有动物卵子在受精时都有一个共同的现象,即胞质游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,从静息状态的 40-100nmol/L 升高至 600-1000nmol/L 水平,并以波的形式从精卵结合点向卵子的其他部位扩展<sup>[1]</sup>。在哺乳类受精诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化表现为有规律的跃升,即

$\text{Ca}^{2+}$  波动或振荡<sup>[2]</sup>。受精诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  波动可持续达数小时之久,直至原核形成时才消失<sup>[3]</sup>。小鼠卵受精诱导  $\text{Ca}^{2+}$  波动的特点是:第 1 峰高而宽,峰值达  $617.7 \pm 143.5$  nmol/L,峰宽  $220.1 \pm 43.3$  sec。将第 1 峰放大后可观察到许多锯齿状小峰(图 1)。第 1 峰之后  $\text{Ca}^{2+}$  波动的

峰高和峰宽均低于第1峰而且各峰较为一致,峰高和峰宽分别为  $360.7 \pm 21.5 \text{ nmol/L}$  和  $96.6 \pm 16.1 \text{ sec}^{[3]}$ 。研究表明,  $\text{Ca}^{2+}$  波动作为受精的信号诱导休止于第二次成熟分裂中期(M I)的卵母细胞恢复分裂并启动胚胎早期发育<sup>[2,4]</sup>。目前已知许多种类的细胞包括非兴奋细胞,如内分泌细胞、肝细胞、神经细胞、卵细胞等

均有  $\text{Ca}^{2+}$  波动现象<sup>[4]</sup>,并证明这类  $\text{Ca}^{2+}$  波动的发生依赖于细胞膜与 G 蛋白耦联的受体的激活<sup>[5]</sup>。由于受精的特殊性和复杂性,关于受精诱导卵子  $\text{Ca}^{2+}$  波动的发生机制一直是科学家们期待解决的问题。本文就该领域目前的进展,结合作者的研究结果对受精  $\text{Ca}^{2+}$  信号的发生机制、生物学作用作一概述。

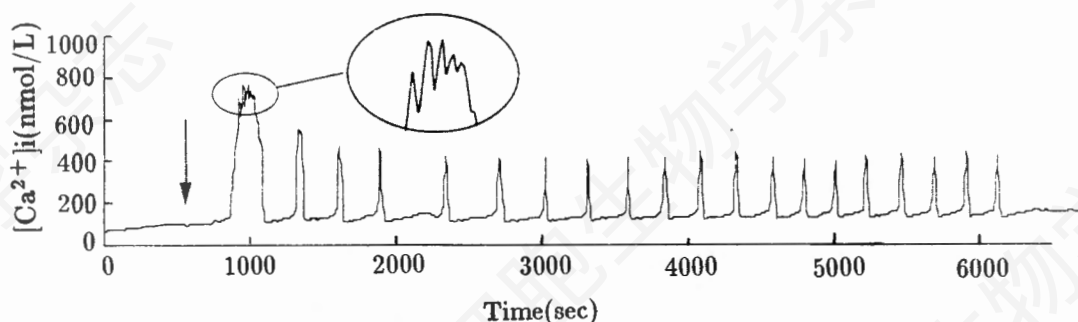


图1 小鼠卵受精诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  波动(箭头示授精时间)

## 一、受精 $\text{Ca}^{2+}$ 信号的发生机制

### 1. 膜受体-G 蛋白-磷酸肌醇信号传导途径

许多人认为受精诱导卵子  $\text{Ca}^{2+}$  波动的发生机制与体细胞相同,遵循经典的信号跨膜传导途径,即精子与卵子受精时首先激活与 G 蛋白耦联的细胞膜受体,尔后沿 G 蛋白信号传导途径激活磷脂酶 C (PLC),使二磷酸磷脂酰肌醇 ( $\text{PIP}_2$ ) 水解形成三磷酸肌醇 ( $\text{IP}_3$ ),作为第二信使  $\text{IP}_3$  与细胞内钙库受体结合诱导  $\text{Ca}^{2+}$  释放,即“ $\text{IP}_3$  诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  释放 ( $\text{IP}_3$  - induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, IICR)”,  $\text{Ca}^{2+}$  自身又可作用于 ryanodine 受体,进一步诱导  $\text{Ca}^{2+}$  释放即“ $\text{Ca}^{2+}$  诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  释放 ( $\text{Ca}^{2+}$  - induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, CICR)”(图2)。支持 G 蛋白介导受精  $\text{Ca}^{2+}$  信号实验证据有以下几点:1. GTP- $\gamma$ -S 可以诱导与受精类似的  $\text{Ca}^{2+}$  升高, GDP- $\beta$ -S 则可抑制  $\text{Ca}^{2+}$  升高<sup>[6,7]</sup>。2. 将编码(与 G 蛋白耦联的)5-羟色胺 (5-HT) 受体的 mRNA 注入爪蟾卵子

后,用 5-HT 处理在质膜表达 5-HT 受体的卵子可诱导与受精相似的  $\text{Ca}^{2+}$  反应<sup>[8]</sup>。与此相同的乙酰胆碱实验亦得到相似的结果<sup>[9]</sup>。3. 卵内注射  $\text{IP}_3$  可诱导与受精类似的  $\text{Ca}^{2+}$  反应<sup>[6,8,10,11]</sup>。4. 用  $\text{IP}_3$  受体抗体 (mAB)18A10 不仅抑制了仓鼠卵受精诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  波动而且阻断了  $\text{Ca}^{2+}$  波在胞质的传递<sup>[12]</sup>以及卵激活的一系列反应<sup>[13]</sup>。这些实验有力地证明了激活 G 蛋白-磷脂酰肌醇信号转导途径能够诱导与受精类似的  $\text{Ca}^{2+}$  反应,仿佛受精诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  波动即是激活该信号转导途径的结果。但是正常受精过程的生理反应是否真正如此尚不能下定论。“膜受体-G 蛋白-磷脂酰肌醇信号学说”的最大不足是迄今尚没有在卵子质膜上找到相应的精子受体。而且在海胆的实验表明,  $\text{IP}_3$  受体拮抗剂-肝素并不能阻止受精引起的  $\text{Ca}^{2+}$  波动以及  $\text{Ca}^{2+}$  波的传递<sup>[13,14]</sup>。肝素也不能完全抑制小鼠卵受精诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  波动<sup>[16,17]</sup>。因此认为精子象激素一样充当配体通过激活膜受体-G 蛋白- $\text{IP}_3$  途径诱导卵子产生  $\text{Ca}^{2+}$  波动的理论受到下面学说的有力挑战。

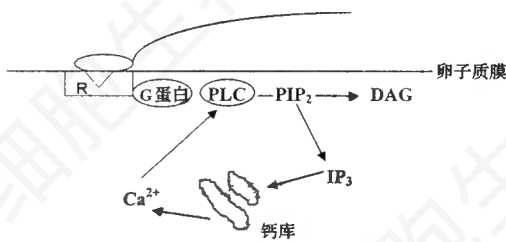


图2 受精时精子与卵子膜表面受体(R)结合,通过激活G蛋白-磷脂酰肌醇信号转导途径诱导胞质游离Ca<sup>2+</sup>波动

## 2. 精子蛋白因子诱导Ca<sup>2+</sup>波动学说

早在80年代初就有人提出,受精时可能是精子带入的某种胞质因子诱导卵子Ca<sup>2+</sup>升高<sup>[1]</sup>。1985年Dale等首先发现,将海胆精子抽提物直接注入海胆卵子能够诱导与受精反应相似的皮质颗粒释放<sup>[18]</sup>,尔后Swann和Stice等进一步发现,将仓鼠和兔精子可溶性蛋白抽提物注入卵子胞质能够诱导受精样Ca<sup>2+</sup>波动<sup>[19,20]</sup>。这些实验表明,精子蛋白可以越过卵子质膜受体-G蛋白的经典信号转导途径而直接作用于卵子胞质,诱导Ca<sup>2+</sup>波动。这一学说认为在精子中存在某种蛋白质因子,受精时由于精卵质膜融合而被“注入”卵子,并直接作用于钙库诱导Ca<sup>2+</sup>释放而导致Ca<sup>2+</sup>波动(图3)。为了证实诱导Ca<sup>2+</sup>波动的因子是蛋白质而不是由精子带入的Ca<sup>2+</sup>、IP<sub>3</sub>、cGMP、cADPr等其他能够诱导Ca<sup>2+</sup>释放的因子,科学家曾做了大量的实验和论证<sup>[22]</sup>。可以肯定的是,在精子中的确存在某种蛋白因子能够诱导卵子Ca<sup>2+</sup>波动。但是这种蛋白因子究竟是什么?从精子中分离纯化这种因子的工作十分艰难。国外最近报道从仓鼠精子中分离出一种能诱导卵子Ca<sup>2+</sup>波动的蛋白组分——P33(分子量33Kd),被命名为“波动蛋白(oscillin)”,并克隆了波动蛋白的基因<sup>[23]</sup>。波动蛋白存在于精子赤道部位<sup>[23]</sup>,精卵质膜融合时被带入卵子。但是精子波动蛋白是否是导致受精Ca<sup>2+</sup>波动的唯一因子尚不能肯定。“精子蛋白学说”目前还缺少两个有力的证据,即1:波动蛋白基因表达的产物

要能够模拟受精诱导的Ca<sup>2+</sup>波动反应。2:波动蛋白的拮抗剂如单克隆抗体应能够功能性阻断受精诱导Ca<sup>2+</sup>波动。只有满足了上述两个条件,“精子蛋白学说”才真正成为完善的理论。目前这一工作正在进行之中。遗憾的是最近的实验结果表明,波动蛋白——P33并不能诱导卵子Ca<sup>2+</sup>波动(私人通讯)。看来,寻觅精子波动蛋白的工作仍然任重道远。

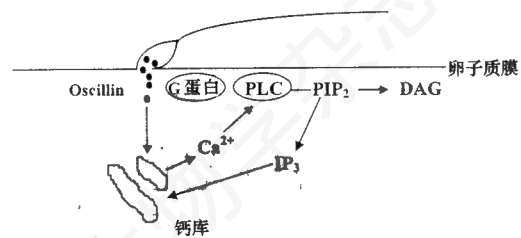


图3 受精时精子将波动蛋白因子——Oscillin(●)注入卵子,诱导胞质游离Ca<sup>2+</sup>波动

由上可见,上述两个学说均有各自的实验依据和不足之处,试图全盘肯定一个而否定另一个学说是十分困难的。有人将这两个学说形象地比喻为人进门的方式。彬彬有礼的进门方式是先敲门或掀门铃,等待主人来开门或允许后再进门,较为鲁莽的进门方式是未征得主人许可便“破门而入”。无论哪种方式最终都达到了进门的目的。目前的困难是从精卵结合、质膜融合到出现Ca<sup>2+</sup>波动的时间非常短,很难将精子与膜表面受体结合与质膜融合这两个事件截然分开。正常受精时,精子和卵子在质膜水平的相互作用包括多级反应,即精卵相互识别(初级结合)、精子激活(顶体反应)、精子表面抗原的暴露及其与卵子的二级结合以及结合蛋白、fertilin和integrin等介导的质膜融合<sup>[24,25]</sup>、精子内部抗原的进一步暴露及其与卵子的相互作用等。现在的问题是上述生理反应在诱导受精Ca<sup>2+</sup>波动及卵子激活中究竟起什么作用?这些生理反应仅仅是将精子“波动蛋白”送入卵细胞?抑或受精Ca<sup>2+</sup>波动是精卵质膜相互作用和精子“波动蛋白”的协同作用?最近有人报道,仅

将精子核注入卵子即可激活卵子<sup>[26]</sup>。这表明激活卵子的信号分子可能不仅存在于精子胞质,而且也存在于核。最近还有人报道,在精子中段和原生质残滴(cytoplasmic residue droplet)中存在一种称之为“Tr-Kit”的蛋白,将 Tr-Kit 蛋白或其 mRNA 注射到卵子均可以诱导卵子激活的一系列反应,如皮质颗粒释放、第二极体排出、原核形成及卵裂发育等<sup>[27]</sup>。但遗憾的是上述作者均没有测定卵子的  $\text{Ca}^{2+}$  变化。因此目前尚不知道 Tr-Kit 和精子核是否象正常受精那样通过诱导胞质  $\text{Ca}^{2+}$  波动来激活卵子。

## 二、卵子 $\text{Ca}^{2+}$ 波动的 $\text{Ca}^{2+}$

### 来源及 $\text{Ca}^{2+}$ 波动的维持

早期的研究已表明,受精诱导  $\text{Ca}^{2+}$  波动的  $\text{Ca}^{2+}$  来源主要为胞内钙库  $\text{Ca}^{2+}$  释放<sup>[1,28]</sup>,但胞外  $\text{Ca}^{2+}$  对于  $\text{Ca}^{2+}$  波动的维持至关重要<sup>[4,28]</sup>。在无胞外  $\text{Ca}^{2+}$  条件下,受精仍可诱导卵子  $\text{Ca}^{2+}$  波动数次,但很快停止,恢复胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度后卵子可恢复  $\text{Ca}^{2+}$  波动<sup>[16,28]</sup>。有实验表明,升高胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度可使  $\text{Ca}^{2+}$  波动频率加快;而降低胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度则降低  $\text{Ca}^{2+}$  波动频率<sup>[16,28]</sup>。钙库敏感性的变化和其对自身  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的反馈性调节对于  $\text{Ca}^{2+}$  波动的形成起重要作用。如前所述,受精首先引起  $\text{IP}_3$  升高诱导  $\text{IP}_3$  敏感钙库  $\text{Ca}^{2+}$  释放,局部释放的  $\text{Ca}^{2+}$  又作用于附近的 Ryanodine 敏感钙库引起  $\text{Ca}^{2+}$  释放(即 CICR)并沿钙库排列方向向胞质其他部位传递,形成所谓的  $\text{Ca}^{2+}$  波<sup>[29]</sup>。钙库排空后对  $\text{IP}_3$  和 Ryanodine 的敏感性立即降低,使排空的钙库对外来的连续刺激产生一个不应期。与此同时钙库排空后会使得细胞产生一种信号分子,开启质膜上的  $\text{Ca}^{2+}$  通道使胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流。这种信号分子被称之为“ $\text{Ca}^{2+}$  内流因子”(Calcium influx factor, CIF)<sup>[30]</sup>。胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流后使排空的钙库再次充盈并恢复对  $\text{IP}_3$  和 Ryanodine 的敏感性,从而引起第二次  $\text{Ca}^{2+}$  释放。这种周而复始的过程导致胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度有规律地波动。需要指出的是对于胞质  $\text{Ca}^{2+}$  波动的机制目前仍处于假

说阶段,有许多问题还没有解决。

## 三、受精诱导卵子 $\text{Ca}^{2+}$

### 波动的生物学意义

#### 1. $\text{Ca}^{2+}$ 升高与卵子激活

尽管对于受精诱导卵子  $\text{Ca}^{2+}$  波动的发生机制目前尚不十分清楚,但对于受精过程中  $\text{Ca}^{2+}$  升高在卵激活中的作用已经明确。大量的实验表明:胞质游离  $\text{Ca}^{2+}$  升高可介导卵子皮质颗粒释放<sup>[2]</sup>。卵子皮质颗粒释放后对卵膜(透明带)进行修饰,使之硬化(Hardening),这对于防止多精入卵有重要意义。 $\text{Ca}^{2+}$  升高的另一个作用是通过降低促成成熟因子(Maturation Promoting Factor, MPF)水平,启动细胞周期,使休止于第二次成熟分裂中期(MII)的卵母细胞恢复分裂并启动胚胎早期发育程序<sup>[2,31,32]</sup>。但是研究发现,胞质  $\text{Ca}^{2+}$  仅升高 1 次即足以诱导皮质颗粒释放并激活卵子<sup>[2,32,33]</sup>。如通常使用乙醇、钙离子载体(ionophore)及电刺激等处理卵子均可诱导卵子孤雌激活(这些刺激一般仅诱导胞质  $\text{Ca}^{2+}$  升高 1 次)。令人费解的是既然胞质  $\text{Ca}^{2+}$  升高 1 次即可激活卵子,那么受精诱导的长达数小时之久的  $\text{Ca}^{2+}$  波动的生物学意义究竟何在?

#### 2. $\text{Ca}^{2+}$ 波动对胚胎早期发育的影响

仔细分析会发现,孤雌激活的效果取决于卵龄。卵龄越大越容易激活<sup>[34]</sup>。上述诱导卵子孤雌激活的理化刺激对于刚排出不久的卵子(正常受精卵龄)往往无效。有人用多次电刺激诱导卵子  $\text{Ca}^{2+}$  多次升高,模拟受精诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  波动型式发现,多次  $\text{Ca}^{2+}$  升高诱导的卵子激活率及激活后发育至囊胚的比例远远高于 1 次  $\text{Ca}^{2+}$  升高<sup>[35,36]</sup>。这提示: $\text{Ca}^{2+}$  波动可能对胚胎发育有重要意义。另外有实验表明胞质  $\text{Ca}^{2+}$  多次升高对充分降解 MPF 有积极作用<sup>[37]</sup>。年轻卵子之所以不易被 1 次  $\text{Ca}^{2+}$  升高激活是由于 1 次  $\text{Ca}^{2+}$  升高只能降解胞质中已存在的 MPF,不能阻止卵子新产生的 MPF。由于老化卵子合成新 MPF 的能力降低,人工诱导 1 次  $\text{Ca}^{2+}$  升

高即可激活卵子。由此可见,受精诱导的  $Ca^{2+}$  波动对充分激活卵子,保证激活后胚胎早期发育有重要意义。有众多类型的细胞在生理过程中出现胞质  $Ca^{2+}$  波动的现象表明:胞质游离  $Ca^{2+}$  波动可能是细胞内信号传导和功能调节的一种普遍方式。

### 参 考 文 献

- [1] Jaffe, L. F. 1983, *Dev. Biol.*, **99**: 265-276.
- [2] Kline, D., Kline, J. T. 1992, *Dev. Biol.*, **149**: 80-89.
- [3] 邓满齐, 辛俭, 黄秀英, 孙方臻, 1997, 科学通报, **42**(3): 317-320.
- [4] Miyazaki, S. 1993, *Japanese J. Physiol.*, **43**: 409-434.
- [5] Berridge, M. J. 1988, *FASEB J*, **2**: 3074-3082.
- [6] Miyazaki, S. 1988, *J. Cell Biol.*, **106**: 345-353.
- [7] Moore, G. D. et al., 1993, *Dev. Biol.*, **159**: 669-678.
- [8] Kline, D. et al., 1988, *Science*, **241**: 464-467.
- [9] Williams, C. J. et al., 1992, *Dev. Biol.*, **151**: 288-296.
- [10] Fujiwara, T. et al., 1993, *Dev. Biol.*, **156**: 69-79.
- [11] Kline, J. T., Kline, D. 1994, *Biol. Reprod.*, **50**: 193-203.
- [12] Miyazaki, S. et al., 1992, *Science*, **257**: 251-255.
- [13] Xu, Z. et al., 1994, *Development*, **120**: 1851-1859.
- [14] Crossley, I. et al., 1991, *Cell Regulation*, **2**: 121-133.
- [15] Rakow, T. L., Shen, S. S. 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 9285-9286.
- [16] Deng, M. Q. et al., 1997, *Biol. Reprod.*, (in press).
- [17] Deng, M. Q. et al., 1996, *Acta Pharmacologica Sinica*, **17**(4): 357-360.
- [18] Dale, B. et al., 1985, *Experientia*, **41**: 1068-1070.
- [19] Swann, K. 1990, *Development*, **110**: 1295-1302.
- [20] Stice, S. T., Robl, J. M. 1990, *Molecular Reproduction and Development*, **25**: 272-280.
- [21] Swann, K., Whitaker, M. J. 1990, *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. **42**: 141-153.
- [22] Whitaker, M., Swann, K. 1993, *Development*, **117**: 1-12.
- [23] Parrington, J. et al., 1996, *Nature*, **379**: 364-368.
- [24] Foltz, K. R., Lennarz, W. J. 1992, *J. Cell Biology*, **116**: 647-658.
- [25] Blobel, C. P., et al., *Nature*, **356**: 248-252.
- [26] Kuretake, S. et al., 1996, *Biol. Reprod.*, **55**: 789-795.
- [27] Sttler, C., et al. 1997, *Development*, **124**: 2267-2274.
- [28] Igusa, Y., Miyazaki, S. 1983, *J. Physiol.*, **340**: 611-632.
- [29] Miyazaki, S. 1990, *J. Reprod. Fert.*, Suppl. **42**: 163-175.
- [30] Randrlamampita, C., Tsien, R. Y. 1993, *Nature*, **364**: 809-814.
- [31] Steinhardt, R. A., et al., 1974, *Nature*, **252**: 272-280.
- [32] Whitaker, M., Patel, R. 1990, *Development*, **108**: 525-542.
- [33] Whikater, M., Swann, K. 1993, In: *Advances in Developmental Biochemistry*, JAI Press, pp201-221.
- [34] Kaufman, M. H. 1983, In: *Early Mammalian Development, Parthenogenetic Studies*. Cambridge University Press.
- [35] Ozil, J. P. 1990, *Development*, **109**: 117-127.
- [36] Vitullo, A. D., Ozil, J. P. 1992, *Dev. Biol.*, **151**: 128-136.
- [37] Collas, P. et al., 1995, *Molecular Reproduction and Development*, **40**(2): 235-258.

## 视黄素受体结构及其一些生物学特性

吴 乔 苏文金

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 厦门 361005)

近年来,视黄素(retinoid)对癌细胞生长的抑制作用,以及临床上治疗癌症的效果引起人们的极大关注。视黄素的作用主要由其受体:视

黄酸受体(retinoic acid receptor, RAR)和视黄素 X 受体(retinoid X receptor, RXR)介导<sup>[1]</sup>, 这些受体作为配体激活的转录因子,通过结合