

# 精卵质膜融合过程中卵膜上的候选分子

许媛媛 吴艳红 李秋艳 李云龙\*

(山东师范大学生命科学学院动物抗性实验室, 济南 250014)

**摘要** 受精过程中精卵质膜融合分子机制的研究一直备受关注。随着基因剔除技术的发展及众多新技术的应用, 人们发现这一过程涉及多种分子, 目前对卵膜上的 CD9、糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白和整合素研究较多。现从细胞层次和分子层次上总结三者对精卵质膜融合方面的实验及结论, 分析各个实验结果矛盾之处, 讨论精卵质膜融合研究的前景。

**关键词** 精卵质膜融合; CD9; 糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白; 整合素

受精是精子穿入卵子形成合子的过程, 包括精子与透明带结合、顶体反应、精卵质膜结合与融合、原核形成等步骤, 其中精卵质膜融合是关键一步。过去研究发现精卵融合通常发生在精子质膜的赤道段与卵子质膜有微绒毛的区域, 其上的分子相互作用后质膜融合形成细胞内含物通道, 卵子微绒毛将精子拖入卵内, 但涉及的分子及分子之间的相互作用还不清楚。近年研究发现多种精卵质膜上的分子参与这个过程, 称之为候选分子。卵膜上的候选分子有: 分化簇 CD9(cluster of differentiation 9)、糖基化磷脂酰肌醇锚定蛋白(glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, GPI-APs)、整合素(integrin)等。

## 1 CD9

CD9 是一种膜蛋白, 属于四跨蛋白家族(tetraspanin family), 约 228 个氨基酸残基, 分子量为 24~26 kDa, 基因定位于人染色体 12p13。CD9 结构为 M 型, 氨基端与羧基端均在胞内, 具有 4 个保守的跨膜区域(四跨蛋白名字由此而来), 以及两个大小不等的胞外环: EC1、EC2, 其中 EC2 较大并且氨基酸序列比较保守。CD9 分布广泛, 几乎所有细胞膜表面都有 CD9 表达, 并且可与多种分子如整合素、免疫球蛋白、蛋白聚糖、补体调节蛋白以及生长因子受体等形成蛋白质复合物, 参与细胞黏附、迁移、增殖和分化等过程<sup>[1]</sup>。

最早证明 CD9 参与精卵融合的实验是用抗 CD9 的单克隆抗体 JF9 处理卵子, 该抗体可以抑制精卵结合和融合; 使用其他抗 CD9 的单克隆抗体也可抑

制小鼠、猪等的精卵结合和融合<sup>[2,3]</sup>。CD9 分布在整个卵子表面, 除了不发生精卵融合的无微绒毛区域。

随着基因剔除技术的发展, 科研人员得到了 CD9<sup>-/-</sup>小鼠, 以此为模型研究, 阐明 CD9 在精卵融合中发挥重要作用。CD9<sup>-/-</sup>小鼠无论雌雄均可健康发育到成年, 但雌鼠不孕; 体外实验 CD9<sup>-/-</sup>小鼠的卵子可与精子正常结合, 但不能够融合, 同时也没有标志受精的胞内钙震荡发生, 即使少数可以精卵融合, 其钙震荡的发生也较正常卵迟约 30 min<sup>[4]</sup>。此外, 卵子机能缺陷并非不可逆转, 可以通过注入小鼠或人的 CD9 mRNA(二者有 18 个氨基酸残基差异)而使其恢复与精子融合的能力。以上实验与抗体实验结论基本一致, 但以 CD9<sup>-/-</sup>小鼠为研究对象所得结论更直观、更具说服力, 可以确定 CD9 是精卵融合所必需的。

现在研究热点集中在 CD9 的活性位点上。人们发现 CD9 在精卵融合中发挥功能的区域为 EC2。用谷胱甘肽 S-转移酶(GST)与 EC2 的融合蛋白 GST-EC2 以及组氨酸(HT)与 EC2 的融合蛋白 EC2/HT 分别处理卵子均可抑制精卵融合, 可能原因是它们同卵上内源的 CD9 竞争与其他卵子膜上相关分子形成多分子复合物, 从而阻止内源 CD9 发挥作用; 两种融合蛋白处理卵子有效果而处理精子没有效果则说明 CD9 在精子上没有受体。进一步对 CD9 EC2 氨基酸序列研究表明其上 173~175 位氨基酸残基 SFQ 是精卵融合中发挥作用的活性位点, 174 位苯丙氨

收稿日期: 2005-06-10 接受日期: 2005-07-28

\* 通讯作者。Tel: 0531-86186606, E-mail: li-ly988@163.net

酸(F)突变为丙氨酸(A)的 CD9 EC2 的 mRNA 可以恢复 CD9<sup>-/-</sup> 卵子的受精率到正常卵子的 1/4, 173~175 位丝氨酸-苯丙氨酸-谷氨酰胺(SFQ)突变为丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸(AAA)的 CD9 EC2 的 mRNA 不能恢复卵的受精能力<sup>[5]</sup>。总结这些实验结论, 已知 CD9 发挥功能所必需的活性位点——CD9 EC2 上 173~175 位氨基酸残基 SFQ, 但却不明白该位点何以发挥如此关键的作用。联系 CD9 在其他类型细胞膜上形成蛋白质复合体的研究可推论 SFQ 位点可能为 CD9 在卵膜上形成质膜融合蛋白质复合体的关键位点, 但需要实验证据支持, 尤其是 CD9 与其他分子如 CD81<sup>[6]</sup>等形成的蛋白质复合体的分离及鉴定。

CD9 在精卵融合中发挥重要作用是无庸置疑的, 但是关于 CD9 的功能仍然存在很多疑问, 主要集中在三个方面。第一, CD9 在精卵质膜结合中的作用。抗体实验<sup>[2,3]</sup>证明 CD9 在精卵质膜结合中也发挥作用, 而基因剔除实验发现 CD9 与此无关<sup>[4]</sup>。其原因可能是抗体封闭 CD9 的同时影响了膜上与精卵结合有关的分子发挥作用, 而基因剔除 CD9 的则不影响。人的 CD9 EC2 蛋白可以抑制精卵结合和融合<sup>[7]</sup>, 小鼠的 CD9 EC2 蛋白仅可以抑制精卵融合<sup>[5]</sup>, 两者序列上只有 18 个氨基酸残基的差异, 功能上却有质的差距, 令人费解。第二, CD9 在精卵融合中的作用不是唯一的, 有补偿途径。CD9<sup>-/-</sup> 雌鼠并非绝对不育, 在极个别的情况下可正常受精产下小鼠, 延长 CD9<sup>-/-</sup> 小鼠卵子与正常精子的温育时间可以提高受精率<sup>[8]</sup>; 小鼠 CD81 的 mRNA 可以恢复 CD9<sup>-/-</sup> 小鼠卵子受精率到正常卵子的 50%, CD81 可能是 CD9 的补偿途径<sup>[6]</sup>, 相关机制不明。第三, CD9 在精子上的受体。最新在精子质膜上发现一种名为 Izumo 的免疫球蛋白超家族成员, 基因剔除证明它是精卵融合所必需分子, 人们推测 Izumo 可能为 CD9 在精子上的受体, 相关研究仍在继续<sup>[9]</sup>。总之, 人们对 CD9 的分子结构、各个结构域在精卵质膜结合和融合的功能以及 CD9 与其他膜上分子的联系的研究还不透彻, 许多结论尚处于推测阶段, 需要更多实验辨其真伪, 揭开 CD9 的面纱。

## 2 GPI-APs

GPI-APs 是一种膜锚定蛋白, 由蛋白质、胆胺、甘露糖、葡萄糖胺和肌醇顺序连接而成, 其中胆胺与蛋白质的羧基端相连, 肌醇通过磷酸基团与细胞膜中的磷脂结构相连。GPI-APs 功能广泛,

涉及细胞识别、黏附、生长、分化、程序性死亡和跨膜信息传递等过程。

研究表明, GPI-APs 在精卵融合中发挥重要作用。磷脂酰肌醇磷酸脂酶 C(PI-PLC)可作用于大多数 GPI-APs, 使其水解断裂, 将 GPI-APs 从质膜上完整的解离下来。用 PI-PLC 破坏卵子表面 GPI-APs, 卵子将不能与精子结合和融合, 但卵子的功能并未损坏, 用钙离子载体(calcium ionophore)可以激活卵子。分析 PI-PLC 从卵子表面水解下的 GPI-APs, 小鼠中得到两种: CD55(70 kDa)和分子量为 35~45 kDa 的 GPI-AP<sup>[10]</sup>, 仓鼠中得到是一种 25~40 kDa 的 GPI-AP<sup>[11]</sup>。CD55 是一种衰变加速因子(decay accelerating factor, DAF), 缺失 CD55 的小鼠可以正常受精, 它并非精卵结合和融合所必需分子<sup>[12]</sup>。分子量为 35~45 kDa 和 25~40 kDa 的 GPI-AP 的鉴定及小鼠缺失时的表型仍在研究之中, 这两个蛋白质氨基酸序列、在膜上的三维结构以及同源性的分析将进一步证明 GPI-APs 参与精卵结合和融合。

除去用 PI-PLC 水解卵子表面的 GPI-APs 外, 还可利用条件性基因剔除的方法证明 GPI-APs 在精卵结合和融合中的作用。合成 GPI-APs 的第一步需要 N-乙酰氨基葡萄糖转移酶, 该酶的催化中心为 PIG-A 蛋白(phosphatidylinositol glycan complementation class A), 全部缺陷 PIG-A 蛋白会导致胚胎致死。用 Cre-loxP 重组系统(Cre-loxP recombination system)条件性的剔除基因, 可以获得仅卵子中 *pig-a* 基因剔除的小鼠, 该小鼠卵子中没有 GPI-APs。用这种小鼠实验, 自然交配的情况下未获得任何怀孕的小鼠; 母鼠超数排卵的情况下与正常公鼠交配, 卵子不能正常受精; 观察不能受精的 *pig-a* 基因剔除卵子发现其卵周隙中有大量精子, 精子可以通过透明带, 但却不能与卵子融合。用 *pig-a* 基因剔除的卵子与正常精子体外受精, 卵子与精子可以正常结合却无法融合<sup>[12]</sup>。以上实验虽与 PI-PLC 实验认为 GPI-APs 参与精卵结合的结论有一定的矛盾, 却从另一个角度说明卵膜上的 GPI-APs 肯定参与精卵融合。

总结关于 GPI-APs 的结论, 只知道卵膜上 GPI-APs 这一类蛋白质是精卵融合所必需的, 具体是哪一个或哪几个不知道, 它们之间的联系、与其他分子尤其是精卵融合候选分子的相互作用以及在精子上的受体均不清楚, 这些方面需要继续研究。此外, 有研究发现精子表面的 GPI-APs 也在受精中发挥作用。血管紧张转移酶(ACE)是血压的关键调节

因子, 除具有肽酶活性外, 还具有 GPI-APs 释放活性(GPIase), 可释放精子表面的 GPI-APs: TESP5 和 PH-20。剔除 *ace* 基因的小鼠精子不能与正常卵子结合, 精子表面的 GPI-APs 也是受精所必需的<sup>[13]</sup>。精卵质膜表面都存在 GPI-APs, 它们之间的联系引发人们新的思考。

### 3 整合素

整合素是一类重要的真核细胞黏附因子, 是由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基组成的异源二聚体糖蛋白, 分布广泛, 几乎所有细胞均表达。现已发现的整合素有 24 种, 在卵膜上表达的主要有两类: 含  $\beta_1$  亚基类整合素, 包括  $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$  和  $\alpha_9\beta_1$ ; 含  $\alpha_v$  亚基类整合素, 包括  $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$  和  $\alpha_v\beta_5$ 。

人们一直认为卵子质膜上的整合素和精子质膜上的受精素是配受体关系, 二者结合介导精卵质膜融合, 其中整合素  $\alpha_6\beta_1$  是该过程所必需的实验结论最多。激光共聚焦显微镜观察到卵子膜上的整合素  $\alpha_6\beta_1$  受精时聚集在与精子结合的部位; 提取卵子表面蛋白与精子、卵子共温育后, 精卵不能融合, 检验发现精子上结合了溶解的整合素  $\alpha_6\beta_1$ <sup>[14]</sup>; 抗整合素  $\alpha_6$  亚基的单克隆抗体 GoH3 可抑制精卵结合和融合<sup>[15]</sup>; 这都说明整合素在精卵融合中发挥作用。对整合素在此过程中作用机制的研究表明整合素  $\alpha_6\beta_1$  为精子上受精素  $\beta$  的去整合素结构域的受体, 受精素  $\beta$  为异二聚体, 由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基构成<sup>[16]</sup>。人们在此研究基础上, 结合其他类型细胞融合及病毒侵入宿主细胞的分子机制提出精卵融合的分子模型: 整合素与受精素  $\beta$  结合后, 引起受精素  $\beta$  的构象变化, 使其  $\alpha$  亚基作为融合肽插入卵子质膜, 精卵质膜形成融合孔后精卵融合<sup>[17]</sup>。除整合素  $\alpha_6\beta_1$  外, 卵上的其他整合素, 尤其是  $\beta_1$  类整合素  $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_9\beta_1$  由抗体实验证明是受精素家族成员受精素  $\alpha$ 、*cyrtestin* 的受体, 参与精卵质膜融合<sup>[2]</sup>。

基因剔除实验否定整合素参与精卵质膜融合。剔除整合素  $\alpha_6$ 、 $\beta_3$ 、 $\beta_5$  和  $\alpha_3$  亚基基因后, 卵子均可正常受精; 剔除整合素  $\beta_1$  亚基基因会导致胚胎死亡, 使用条件性基因剔除, 获得仅卵子中缺失  $\beta_1$  基因的小鼠, 小鼠可以正常受精, 体外实验证明小鼠卵子可与精子正常结合和融合。以上基因剔除实验涉及所有卵子表面可能的整合素分子, 其结论否定了整合素作为精卵质膜融合中卵子必需蛋白的可能

性, 证明整合素与精卵质膜融合无关<sup>[18]</sup>。另外, 有人发现 GoH3 不能够抑制受精素  $\beta$  与卵子的结合, 前人实验中的精卵不融合可能原因是实验中去除透明带的试剂影响了卵子表面蛋白的活性<sup>[19]</sup>。这进一步使人们质疑整合素在精卵质膜融合中的作用。

近来人们结合 CD9、受精素等的研究又推测整合素  $\alpha_6\beta_1$  与受精素  $\beta$  的结合只是不在精卵融合中起直接作用, 它们可能与各自质膜上的其他分子形成多分子复合体而参与该过程。众说纷纭, 使整合素的作用令人困惑。抗体封闭实验与基因剔除实验之间到底有什么不同, 它们为什么会造成实验结果如此大的差异, 以及整合素与 CD9 形成的多分子复合体又是何种结构? 这些问题困扰着受精过程中整合素的研究, 亟待解决。

### 4 小结

纵观 CD9、GPI-APs 和整合素的研究, 人们现在可以确定它们在精卵质膜融合中发挥作用, 但其分子结构及功能结构域的研究较少, 各个分子之间的联系、多分子复合体的组成、精卵分子之间的配受体关系以及精卵质膜融合的分子机制仅是推测, 还有大量研究需要继续。精卵质膜融合是一个复杂的过程, 需要多种分子参与, 其候选分子除上文介绍的 CD9、GPI-APs、整合素外, 还有 *uroplakin III*<sup>[20]</sup>、金属蛋白酶<sup>[21]</sup>等。随着研究基因、蛋白质的新技术的诞生和应用, 人们最终会从细胞、亚细胞、分子各个层次上阐明该过程, 并将理论与实践相结合应用于生殖疾病的临床治疗、新型避孕药物的开发等领域。

### 参考文献(References)

- [1] Boucheix C et al. *Cell Mol Life Sci*, 2001, **58**: 1189
- [2] Zhu X et al. *Biol Reprod*, 2002, **66**: 1193
- [3] Li YH et al. *Reproduction*, 2004, **127**: 151
- [4] Kaji K et al. *Nat Genet*, 2000, **24**: 279
- [5] Zhu GZ et al. *Development*, 2002, **129**: 1995
- [6] Kaji K et al. *Dev Biol*, 2002, **247**: 327
- [7] Higginbottom A et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **311**: 208
- [8] Miyado K et al. *Science*, 2000, **287**: 321
- [9] Inoue N et al. *Nature*, 2005, **434**: 234
- [10] Coonrod SA et al. *Dev Biol*, 1999, **207**: 334
- [11] Coonrod S et al. *Mol Hum Reprod*, 1999, **5**: 1027
- [12] Alfieri JA et al. *J Cell Sci*, 2003, **116**: 2149
- [13] Kondoh G et al. *Nat Med*, 2005, **11**: 160
- [14] Takahashi Y et al. *Mol Reprod Dev*, 2000, **56**: 412
- [15] Almeida EA et al. *Cell*, 1995, **81**: 1095

- [16] Chen H *et al. Chem Biol*, 1999, **6**: 1  
[17] Evans JP. *Hum Reprod Update*, 2002, **8**: 297  
[18] He ZY *et al. Dev Biol*, 2003, **254**: 226  
[19] Miller BJ *et al. J Cell Biol*, 2000, **149**: 1289  
[20] Sakakibara K *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 15029  
[21] Correa LM *et al. Dev Biol*, 2000, **225**: 124

## Candidate Molecules Involved in the Sperm-oocyte Plasma Membrane Fusion on Oocyte Surface

Yuan-Yuan Xu, Yan-Hong Wu, Qiu-Yan Li, Yun-Long Li\*

(Key Laboratory of Animal Resistance, College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China)

**Abstract** The molecular mechanism of the sperm-oocyte plasma membrane fusion during fertilization has been investigated in recent years. Development of gene targeting and application of new technologies allow us to identify the molecules involved in fertilization processes. Recent studies are focusing on CD9, Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and integrins on oocyte surface. This paper summarizes the results and the related experiments on these three molecules at cellular and molecular levels.

**Key words** sperm-oocyte plasma membrane fusion; CD9; glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins; integrin

Received: June 10, 2005 Accepted: July 28, 2005

\*Corresponding author. Tel: 86-531-86186606, E-mail: li-ly988@163.net