

哺乳动物受精过程中精子和透明带的初级及次级结合

鹿培源 翟玉梅 宋淑燕*

(山东大学生命科学学院 济南 250100)

关键词 哺乳动物 精子 透明带 结合

中图分类号 [Q955] 文献标识码 :A 文章编号 0250-326X(2000)01-52-04

在哺乳动物的受精过程中,获能的精子穿过卵丘细胞层到达卵子透明带后,精子头部便结合在透明带的表面上。精子和透明带的结合可以分为初级结合和次级结合两个阶段,初级结合是指二者在顶体反应之前的结合,次级结合是指二者在顶体反应之后的结合。精子和透明带的结合是精子顶体反应和精子入卵的先决条件,是哺乳动物受精过程中非常重要的环节,涉及到精子以及透明带的多种蛋白质分子之间的相互作用。这方面的研究工作主要是以小鼠为实验对象进行的,在其他哺乳动物中也有很多报道。本文将主要以小鼠为例,概述哺乳动物受精过程中精子和透明带结合的分子机制,并兼述在二者的结合过程中透明带糖蛋白 ZP3 对精子顶体反应的诱导作用。

1 精子和透明带的初级结合

1.1 透明带的精子结合蛋白 小鼠的透明带是由生长着的卵母细胞合成和分泌的,由 ZP1、ZP2 和 ZP3 三种硫酸化的糖蛋白组成。ZP2 和 ZP3 的异二聚体互相连接,形成很多条蛋白质细丝,ZP1 把这些细丝交联在一起,构成了一个网状结构,包围着完全成熟的卵子^[1]。透明带在受精过程中有两个重要作用:一是结合精子,二是在精子结合以后诱导精子的顶体反应。

Bleil 和 Wassarman 等^[2,3]证明,把精子和透明带糖蛋白预先培养可以抑制小鼠精子和透

明带的结合,并且在透明带的三种糖蛋白成分中,83kD(千道尔顿)的 ZP3 是这个抑制试验的竞争物,其他两种糖蛋白 ZP1 和 ZP2 不能竞争与精子结合。此外,Bleil 和 Wassarman 还证明放射性同位素标记的 ZP3 可与带有完整顶体的小鼠精子的头部结合^[4]。可确定 ZP3 就是小鼠透明带的精子结合蛋白(又称精子受体)。

ZP3 糖蛋白起结合精子作用的部位是它的寡糖链。Florman 和 Wassarman 等^[3,5]证明 ZP3 上的寡糖链对于 ZP3 和小鼠精子的结合是非常重要的,除去这些与苏氨酸或丝氨酸连接的寡糖链,就消除了 ZP3 的精子受体的作用,而这些去掉的寡糖在体外仍然具有精子受体的特征,从其它各种糖蛋白(包括 ZP1 和 ZP2)衍生的寡糖在体外却不能和精子结合。

1.2 精子的透明带结合蛋白 小鼠的精子 and 透明带结合以后,并不立即钻入透明带,而是被能动地拴在透明带的表面上^[6]。透明带要留住这些扭动的精子,需要由 ZP3 和至少三种精子质膜上的透明带结合蛋白(又称 ZP3 受体)相结合,如果用实验的方法使这三种 ZP3 受体的任何一种失活,精子便不能和透明带结合。

小鼠精子的第一种透明带结合蛋白是和

* 工作单位:青岛市第二卫生学校,青岛 266000;

第一作者简介:鹿培源,男,29岁,硕士;

收稿日期:1998-05-05,修回日期:1999-09-24

ZP3 的半乳糖残基特异性结合的一种蛋白质。Bleil 和 Wassarman^[5]证明 ZP3 糖蛋白的一个末端半乳糖残基对于其精子受体的作用是非常重要的,如果这个末端半乳糖残基被除去或被化学修饰,ZP3 结合精子的能力就丧失。后来,他们以 ZP3 作配基,用亲和层析的方法从小鼠精子质膜内分离出一种 56kD 的蛋白质,这种蛋白质暴露在精子质膜外,能够和 ZP3 的半乳糖残基特异性地结合^[7]。

小鼠精子的第二种透明带结合蛋白是精子质膜的一种糖基转移酶。Shur 和 Miller 等^[8-10]证明这种透明带结合蛋白是一种识别 ZP3 上的 N-乙酰葡萄糖胺的酶——N-乙酰葡萄糖胺:半乳糖基转移酶。这种酶镶嵌在精子的质膜里,正好位于顶体的上方,活性部位指向外面,分子量为 60kD。这种酶的功能是催化把一个半乳糖残基(来自 UDP-半乳糖)加到以 N-乙酰葡萄糖胺为终端的糖链上。因为在哺乳动物的雌性生殖道内不存在 UDP-半乳糖,所以这种酶虽然能够和 ZP3 的 N-乙酰葡萄糖胺残基结合,但不能催化糖基转移反应的发生。因此,这种酶就和 ZP3 保持结合状态。支持这种观点的实验证据如下:(1)Shur 和 Lopez 等^[9,11]发现精卵结合可用以下四种方式阻断:①加入 UDP-半乳糖;②从 ZP3 上除去 N-乙酰葡萄糖胺残基;③加入抑制这种糖基转移酶的活性的抗体;④在介质中加入过量的这种糖基转移酶(过量的酶会和透明带结合从而抑制精子和透明带的结合)。(2)Miller 等^[10]证明精子的这种糖基转移酶能够把 UDP-半乳糖的半乳糖残基特异性地转移到 ZP3 的 N-乙酰葡萄糖胺残基上。这些证据表明这种糖基转移酶是小鼠精子的一种重要的 ZP3 受体。

小鼠精子的第三种透明带结合蛋白是一种具有两个功能部位的 95kD 的蛋白质,一个功能部位可以特异性地和 ZP3 结合,另一个功能部位具有酪氨酸激酶活性。这种蛋白质同时也是酪氨酸激酶的底物,它具有自身磷酸化作用,可使它自己的酪氨酸残基磷酸化。当这种蛋白质结合 ZP3 时,它的酪氨酸残基发生自身磷酸

化,其酪氨酸激酶活性也就被激活^[12-13]。

2 ZP3 对精子顶体反应的诱导作用

哺乳动物精子的顶体反应是由 ZP3 糖蛋白诱导的,因为修饰 ZP3 的肽链能够消除精子的顶体反应,所以精子和 ZP3 的结合可以不受影响^[14]。Leyton 和 Macek 等^[15-16]认为 ZP3 通过使精子质膜上的 ZP3 受体群集在一起来诱导顶体反应,如果这些受体被人工交联(用可溶性的 ZP3 蛋白或者用半乳糖基转移酶的抗体)精子就会发生顶体反应。95kD 的 ZP3 受体的酪氨酸激酶活性也是非常重要的,当它的活性被抑制时,精子和透明带结合以后顶体反应不能发生^[13]。

3 精子和透明带的次级结合

在顶体反应的过程中,精子质膜的前端部分被从精子上排出去,这正是 ZP3 受体所处的位置,然而精子必须仍然保持和透明带结合以便溶解出穿过它的通道,这就依赖于二者的次级结合。

3.1 介导次级结合的透明带糖蛋白 在小鼠中,精子和透明带的次级结合是通过 ZP2 糖蛋白和顶体内膜的蛋白质的特异性结合进行的。ZP2 可以和顶体反应后的精子结合,并且抗 ZP2 的抗体可以阻止顶体反应后的精子和透明带的结合。顶体反应后的精子把它们的结合部位从 ZP3 转移到相邻的 ZP2 分子上^[17]。大多数哺乳动物的情况和小鼠相同,但在猪中,和精子的次级结合是由透明带糖蛋白 ZP4 介导的(这种糖蛋白在小鼠透明带中不存在)^[18]。

3.2 介导次级结合的精子蛋白 在大多数哺乳动物的精子中,和透明带的次级结合是由位于顶体内膜的顶体蛋白原/顶体蛋白(proacrosin/acrosin)介导的。顶体蛋白原可以自身激活成具有丝氨酸蛋白酶活性的顶体蛋白,这种酶长期以来被认为与消化透明带有关。同时,顶体蛋白原/顶体蛋白也可以高亲和力和透明带糖蛋白上的多硫酸基团结合,从而维持顶体反应后的精子和透明带的结合^[19]。这

方面的工作主要是在猪中进行的,现在已经在猪顶体蛋白原分子上定位了和透明带糖蛋白结合的重要氨基酸,猪顶体蛋白原的位于93位甘氨酸和275位丙氨酸之间的精氨酸、赖氨酸和组氨酸残基以及47位组氨酸和50位精氨酸对于它对透明带糖蛋白的多硫酸基团的最高结合活性是必需的。此外,这个中间肽段的二级和三级结构,对于保证重要的氨基酸残基和透明带糖蛋白上互补硫酸基团的正确结合也是非常重要的^[20]。

在豚鼠的精子中和透明带的次级结合不是由顶体蛋白原/顶体蛋白介导的,而是由顶体内膜的蛋白质pH-20介导的。如果把这种蛋白质注射到雄性或雌性豚鼠体内,它们就会百分之百地持续几个月不育,并且其血清中含有高浓度的抗pH-20的抗体。通过注射pH-20导致不育豚鼠的抗血清不但能特异地和pH-20结合,而且在体外还能阻断精子和透明带的结合^[21]。pH-20是一种具有双重功能的蛋白质,在顶体完整的精子中,pH-20具有透明质酸酶活性,这对于精子穿过围绕卵子的卵丘细胞层是必需的,在顶体反应后的精子中,pH-20介导精子和透明带的次级结果^[22]。

综上所述,在哺乳动物的受精过程中,精子和透明带的初级结合,是通过透明带的ZP3糖蛋白和至少三种精子质膜上蛋白质的结合进行的,精子和透明带的次级结合在大多数哺乳动物中是由透明带的ZP2糖蛋白和精子顶体内膜的顶体蛋白原/顶体蛋白介导的,但在个别动物中有一些例外情况。与哺乳动物的精子和透明带结合有关的其他蛋白质的确定、分离以及其更深一层的机理仍有待进一步解决。这方面的研究对于人类应用免疫学原理进行避孕将具有非常重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Wassarman, P. M. Fertilization in mammals. *Sci. Am.*, 1989, **256**(6):78~84.
- [2] Bleil, J. D., P. M. Wassarman. Mammalian sperm and egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zona pellucida possessing receptor activity for sperm. *Cell*, 1980, **20**(3):873~882.
- [3] Florman, H. M., P. M. Wassarman. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 accounts for its sperm receptor activity. *Cell*, 1985, **41**(1):313~324.
- [4] Bleil, J. D., P. M. Wassarman. Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J. Cell Biol.*, 1986, **102**(4):1363~1371.
- [5] Bleil, J. D., P. M. Wassarman. Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**(18):6778~6782.
- [6] Baltz, J. M., D. F. Katz, R. A. Cone. The mechanics of sperm-egg interaction at the zona pellucida. *Biophys. J.*, 1988, **54**(4):643~654.
- [7] Bleil, J. D., P. M. Wassarman. Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, **87**(14):5563~5567.
- [8] Shur, B. D., N. G. Hall. A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding for the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.*, 1982, **95**(2):574~579.
- [9] Lopez, L. C., E. M. Bayna, D. Litoff *et al.* Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. *J. Cell Biol.*, 1985, **101**(4):1501~1510.
- [10] Miler, D. J., M. B. Macek, B. D. Shur *et al.* Complementarity between sperm surface β -1, 4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature*, 1992, **357**(6379):589~593.
- [11] Shur, B. D., C. A. Neely. Plasma membrane association, purification and partial characterization of mouse sperm β -1, 4-galactosyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**(33):17706~17714.
- [12] Leyton, L., P. Saling. 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell*, 1989, **57**(7):1123~1130.
- [13] Leyton, L., P. Leguen, D. Bunch *et al.* Regulation of mouse gametic interaction by a sperm tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, **89**(24):11692~11695.
- [14] Endo, Y. G., P. Mattei, G. S. Kopf *et al.* Effects of phorbol ester on mouse eggs: Dissociation of sperm receptor activity from acrosome reaction-inducing activity of the mouse zona pellucida protein, ZP3. *Dev. Biol.*, 1987, **123**(2):574~577.
- [15] Leyton, L., P. Saling. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reac-

- tion. *J. Cell Biol.* , 1989 , **108**(6) 2163~2168.
- [16] Macek , M. B. , L. C. Lopez , B. D. Shur. Aggregation of β -1, 4-galactosyltransferase on mouse sperm induces the acrosome reaction. *Dev. Biol.* , 1991 , **147**(2) : 440 ~ 444.
- [17] Bleil , J. D. , J. M. Greve , P. M. Wassarman. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida : Role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev. Biol.* , 1988 , **128**(2) : 376 ~ 385.
- [18] Koyama , K. , A. Hasegawa , M. Inoue et al. Studies on the epitope of pig zona pellucida recognized by a fertilization-blocking monoclonal antibody. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* , 1996 , **50** : 135~142.
- [19] Williams , R. M. , R. Jones. Specificity of binding of zona pellucida glycoproteins to sperm proacrosin and related proteins. *J. Exp. Zool.* , 1993 , **226**(1) : 65~73.
- [20] Jansen , S. , M. Quigley , W. Reik et al. Analysis of polysulfate-binding domains in porcine proacrosin , a putative zona adhesion protein from mammalian spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* , 1995 , **39**(3) : 501~510.
- [21] Primakoff , P. , W. Lathrop , L. Woolman et al. Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein pH-20. *Nature* , 1988 , **335**(6189/6190) : 543~546.
- [22] Hunnicutt , R. Gary , P. Primaleoff et al. Sperm surface protein pH-20 is bifunctional : One activity is a hyaluronidase and a second , distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol. Reprod.* , 1996 , **55**(1) : 80~86.