

精子膜表面蛋白的研究进展*

程立均 康现江** 赵晓瑜

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘要: 动物的精子是一类结构和功能都十分特化的细胞,其膜表面存在多种糖蛋白或糖复合物,它们与精卵识别、结合以及质膜融合等受精活动密切相关,同时,作为精子膜抗原,在免疫避孕和免疫不育的治疗中具有广阔的应用前景。本文扼要概述了精子膜蛋白的研究进展。

关键词: 精子;膜表面蛋白

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)06-125-04

The Research Progress of Sperm Membrane Surface Proteins

CHENG Li-Jun KANG Xian-Jiang ZHAO Xiao-Yu

(The College of Life Science, Hebei University, Buoding 071002, China)

Abstract: Animal spermatozoa are a group of cells specialized in structure and function. There are a number of glycoproteins or glycoconjugates located on the sperm membrane surface. They are closely correlated with fertilization activities such as sperm-egg recognition, binding and plasma membrane fusion. As sperm membrane antigens, they have great potential of application in immunocontraception and the treatment of immunological infertility. Some important sperm membrane proteins are summarized in this paper.

Key words: Sperm; Membrane surface proteins

精子的膜表面蛋白在受精过程中起着重要的作用。在组成和结构域组织上,精子膜表面蛋白(以下简称膜蛋白)的概念从精子发生期间就开始定义了,随着精子内部发育以及生殖道的各种因素的影响,膜蛋白不断发生着变化,一直持续到精卵融合时为止。

1 精子发生、成熟以及获能过程中的膜蛋白

精子发生、成熟过程中,与卵识别、结合、融合相关的膜蛋白的合成修饰及分布不断发生着变化。精子发生后,在通过附睾管时,精子表面有些糖蛋白可能丢失,而附睾管分泌物中的一些糖蛋白被整合到精子膜表面特异的区域上,成为精子膜的一部分。人类精子膜蛋白 hSMP-1 是一种在精细胞分化过程中产生的睾丸特异性蛋白,存在于人类睾丸精子发生的各个阶段。使用 HSD-1(编码 hSMP-1 的基因)作探针对 16 种人类不同组织中的 mRNA 进行 Northern 杂交分析,只有睾丸

mRNA 出现阳性反应,说明 hSMP-1 的基因表达是睾丸特异性的。蛋白定位显示, hSMP-1 位于小鼠精子的头部、尾部以及睾丸内的后期精细胞和精子中,这说明 HSD-1 是在精子发生过程中表达的^[1]。George^[2]从牛精子上提取出一种精子外周蛋白,这是一种盐藻糖结合蛋白,是从附睾液或附属腺体的液体中产生的,其分子量为 16.5 ku,等电点为 5.8,具有抑制精子与输卵管外植体(oviductal explants)结合的作用。Belmonte^[3]从小鼠精子膜中纯化出 45 ku、55 ku 两种蛋白,它们可能是附睾液配体的高亲和力结合位点,与识别小鼠附睾液配体的不同受体相一致,或者与相同受体的不同形式相一致。现在人们已普遍认为精子获能是在分子水平上

* 河北省科技攻关项目(No. 99547016D)资助;

** 通讯作者, E-mail: xjk169@hotmail.com;

第一作者介绍 程立均,男,25,硕士研究生;主要研究方向:生殖生物学。

收稿日期:2002-12-29,修回日期:2003-07-01

发生了膜变化,膜蛋白重新进行修饰、分布或丢失,特别是精子顶体区膜表面的糖蛋白,在获能前后发生明显的变化,说明精子膜糖蛋白是参与获能的重要因素。总之,膜蛋白在精子膜上的分布是不均一的,在精子发生、成熟、获能以及顶体反应过程中不断发生着变化,为受精过程中精卵识别、结合和融合等步骤做了相应的准备。

2 与卵透明带相互作用的膜蛋白

透明带(zona pellucida, ZP)是一层包被在卵外的糖蛋白“外衣”。它构成了卵子受精前精子必须穿越的一道屏障^[4]。哺乳动物在受精前首先要经历一个精卵识别的过程,此过程就发生在卵 ZP 表面,存在种的特异性,而种特异性是由精子膜上与卵 ZP 相互作用的膜蛋白所决定的。在目前研究的几种动物中,已提出多种精子膜蛋白在与卵 ZP 糖蛋白结合过程中起受体作用(表 1)。

表 1 与 ZP 作用的主要膜蛋白

精子蛋白	分子量(ku)	动物种类
半乳糖苷转移酶	54	小鼠
PH-20	64(顶体反应前);41+27(顶体反应后,分裂为两个片段)	豚鼠、猴、人体
SP56	56	小鼠
SP17	17~26	兔
ZRK(p95)	95	小鼠、人
精子黏合素	12~16	猪、狗、马

2.1 与 ZP 初级结合的相关膜蛋白 精子与 ZP 的识别、结合构成了受精过程中最重要的事件。ZP 一般由 ZP₁、ZP₂ 和 ZP₃ 三种硫酸化的糖蛋白组成。对小鼠的研究表明,ZP₃ 是 ZP 的精子结合蛋白(又称精子受体),它要和至少三种精子质膜上的 ZP 结合蛋白相结合,以完成精子和 ZP 的初级结合。其中第一种 ZP 结合蛋白是与 ZP₃ 的半乳糖残基特异性结合的 sp56 蛋白,它位于顶体完整的精子头部。最初 sp56 被认为是一种精子表面蛋白,但 Kye^[5] 的研究表明,sp56 是精子顶体内的一种组分。小鼠精子膜上另两种 ZP 结合蛋白是 β 1,4-半乳糖苷转移酶(60 ku)和透明带受体激酶(ZRK,又称 p95)。以上三种 ZP 结合蛋白存在于顶体完整的精子表面,特异性地识别 ZP₃。Catherine^[6] 通过对小鼠精子膜上识别 ZP₃ 的膜蛋白进行鉴定,结果发现,精子质膜上含有可以与 ZP₃ 单独作用的成分,此外,还含有与 ZP₁ 或 ZP₂ 联合起来与 ZP₃ 作用的成分。说明至少有两类膜蛋白介导了小鼠精子与 ZP 糖蛋白的相互作用。一

部分作为基本的 ZP 结合蛋白,因为它们直接与 ZP₃ 作用,而另一些在这之后与 ZP 发生作用,初步认为是在顶体胞吐过程中为了保持精子与 ZP 联系的过渡相互作用。

2.2 与 ZP 次级结合的相关膜蛋白 在大多数哺乳动物的精子中,和 ZP 的次级结合是由位于顶体内膜的顶体蛋白/顶体蛋白介导的。但是,在豚鼠的精子中,和 ZP 的次级结合是由 PH-20 介导的^[7]。PH-20 是一种单链蛋白,通过一个糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定在精子质膜中。PH-20 具有双重功能:1)其 N-末端区域具有透明质酸酶的活性,这对于精子穿过围绕卵子的卵丘细胞层是必需的;2)在顶体反应后的精子中,介导精子和 ZP 的次级结合^[8]。通过注射 PH-20 可导致豚鼠不育,不育豚鼠体内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 ZP 的结合。Gavin^[9] 对小鼠的研究结果表明,小鼠精子表面的 2B1 抗原(豚鼠精子 PH-20 的同源物)是一种精子质膜结合糖蛋白。2B1 通过一个 GPI 锚定物附着在质膜上,这是它在精子获能时具有从尾部迁移至顶体区域能力的重要因素之一。2B1 在通过附睾时,以及在随后精子获能中从精子尾部迁移至顶体区域时,被内切蛋白酶水解,这使其透明质酸酶活性在受精前即已达到最大,促进精子穿过卵丘。与 PH-20 不同的是,2B1 对磷酸肌醇酯酶 C 不敏感。Sabour^[10] 通过对狗 PH-20 的研究,发现 PH-20 位于精子头区域,存在于狗的精子和圆形精子细胞的膜上。蛋白印迹显示 PH-20 主要在 50 ku 区域,并且在 pH 4.0 时蛋白带比 pH 7.0 时更明显,说明在酸性条件下 PH-20 的透明质酸酶活性更高。在牛精子头顶体后区的质膜表面有一种 80 ku 的膜蛋白,它很可能是 PH-20 的同源蛋白。与 PH-20 类似,80 ku 蛋白也具有透明质酸酶活性,与 PH-20 不同的是,80 ku 蛋白是通过未知的机理松散地附着在精子表面上的^[11]。

精子与 ZP 之间的作用非常复杂。到目前为止,ZP 寡聚糖末端单糖组分与精子细胞表面相应受体之间相互识别的分子机制,尚未完全阐明。精卵识别可能涉及到多种精子膜蛋白参与,很多精子膜蛋白都可与 ZP 作用,但对于某一种动物而言,哪一种膜蛋白是受精所必需的,还有待进一步研究。

3 参与精卵质膜相互作用的膜蛋白

精子通过与 ZP 相互作用,诱发顶体反应。随后精子穿过透明带,与卵质膜相遇,两者发生融合。精子质膜上有一些具粘附作用的蛋白参与融合的过程(表 2)。如哺乳类精子质膜上的受精素(fertilin)和 cyritestin 等。

表 2 参与精卵质膜相互作用的主要膜蛋白

动物种类	精子蛋白
豚鼠	fertilin、34 ku 蛋白
小鼠	ADAM 和 Crisp 基因家族,被 M29、M37 和 OBF13 等单抗所识别的新抗原
大鼠	DE/AEG 蛋白
人	fertilin、DE(Crisp-1、ARP)、FA-1、纤连蛋白和补体成分 C _{1q} 、MH61、FLB1、SOB2
仓鼠	M1(分子量 37 ku)
海胆	bindin
鲍鱼	lysin

fertilin 是可能参与精卵质膜间相互作用最有特征性的候选分子,从属于 ADAM (adisinintegrin and metalloprotease) 或者 MDC (metalloprotease/disintegrin/cysteine-rich) 分子家族。除 fertilin 外,其它的 ADAMs 也存在于精子的质膜上,与 fertilin 一起参与精卵融合。首批被报道的 ADAMs 家族成员除豚鼠的 α -fertilin 和 β -fertilin 外,还有以下几种:(1)EAP-1,其表达依赖于雄性激素并分布在附睾上皮细胞顶表;(2)MDC,一种乳腺癌肿瘤的阻遏因子。目前,在多种组织和生物体内(从果蝇到人),已经发现了多种 ADAMs 成员,它们在发育和成体当中发挥着多种功能。cyritestin(ADAM3, tMDC1)是 ADAMs 家族的另一重要成员。cyritestin 的整联蛋白配体区参与精卵之间的反应,用对应于 cyritestin 整联蛋白配体区的合成肽片段可以有效地抑制精卵之间的反应和减少受精事件的发生,用针对 cyritestin 整联蛋白配体区的抗体处理精子,可以减少精卵结合与融合。

fertilin(原称 PH-30)是一种精子膜固有蛋白。fertilin 由 α 、 β 两个亚基构成,是一种粘附分子,在精卵质膜融合过程中发挥着重要的作用,有类似于金属蛋白、胰岛素样生长因子及去整合素样的作用。fertilin 的抗体在体外能抑制精卵之间的融合,用 fertilin 来免疫雄豚鼠可造成不育。 α -fertilin(ADAM1)、 β -fertilin(ADAM2)是高度同源的跨膜蛋白,分子量分别为 60 ku 和 44 ku,它们都参与精卵质膜的相互作用。通过对哺乳动物 α -fertilin 和 β -fertilin 结构和功能的分析,已经鉴定出它们功能上关键的结构域。Evans^[12,13]实验室对小鼠的研究结果表明, α -fertilin 和 β -fertilin 使用不同的功能域来介导精卵质膜间的相互作用。去整合区的一个三肽序列 EDC (Glu-Cys-Aps) 可能是小鼠 β -fertilin 的功能尾(business end)。 β -fertilin 中的 ECD 序列与蛇的去整合素中介导这些分子与特异整合素受体相互作用的三肽 RGD(Arg-Gly-Asp)类似。ECD 的末端 Asp 残基对于 ECD 的功能来说,是至关重要的,这个发现是在该区域点突

变研究的基础上得来的。与 β -fertilin 相比,小鼠 α -fertilin 更加复杂。它在与卵表面的相互作用中,既使用去整合素区,又使用 cys 富集区。对 α -fertilin 的去整合素区进一步分析,鉴定出一段短的氨基酸序列 DLEECDGC,它和 β -fertilin 中含 ECD 部分的区域是不同的(例如,距 N 末端 50 个氨基酸以外)。人的 ADAM20 与 α -fertilin 有几个相同的特点,如两者都具有相同的金属蛋白酶活性激活位点和一个推测的融合肽,这暗示着 ADAM2 可代替 α -fertilin 的功能。以上这些表明,ADAMs 蛋白可能具有介导细胞之间相互作用的多个功能结构域(例如,cys 富集区和去整合素区的不同部分)。

另外,在不同动物中,还存在着其它参与精卵质膜相互作用的精子膜蛋白。例如,果蝇精子质膜中有两种具有糖苷酶活性的膜内在蛋白。Cattaneo^[14]纯化并鉴定了这些糖苷酶:两个 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的异构体(HEX1 和 HEX2)和一个 α -甘露糖苷酶,天然的 β -氨基己糖苷酶分子量是 158 ku,HEX1 和 HEX2 分别类似于哺乳动物的异构酶 A 和异构酶 B,而 α -甘露糖苷酶分子量为 317 ku,含有三个不同分子量的亚基。这些酶最终都被糖基化。

4 膜蛋白与生殖免疫

精子膜蛋白与受精和胚胎的早期发育有密切关系。在精子获能、顶体反应、穿过卵 ZP、精卵融合以及受精卵分裂的过程中起着重要的作用。其中部分膜蛋白能引起机体产生相应的抗体,导致免疫性不育,另外,基于膜蛋白(任何蛋白都是潜在的抗原)开发避孕疫苗是一项很有前途的避孕方法。因此,对膜蛋白的研究有助于为免疫避孕及免疫不育的治疗开辟新的道路。如今,我们已经对部分生育相关的膜蛋白有了较深入的认识。

精子与卵 ZP 的识别和结合是受精过程中最重要的事件,因此,这一过程中涉及的膜蛋白是免疫避孕疫苗的重要候选者。广泛的研究显示有 4 种主要的膜蛋白与人的 ZP₃ 结合。分子量分别为 95、63、51 ku 和 14~18 ku,它们在睾丸中特异性表达,其 cDNAs 已经被克隆并测序,这些膜蛋白的重组蛋白在人类免疫避孕及不育症的诊治方面具有广阔的应用前景。其中,51 ku 蛋白为 FA-1 抗原,是一种精子特异性糖蛋白,具有识别和结合卵 ZP 的受体活性,并且在精子获能和顶体反应中起作用。FA-1 与人类免疫不育有关,具有高度组织特异性和各种重组或合成精子抗原表位的疫苗,重组(r)FA-1 抗原是制备避孕疫苗的良好候选者。Naz^[15]鉴定出一种新膜抗原,称作 YLP(12)。分子量约为 725 ku,它

是睾丸特异性的,与人精子-ZP的识别、结合有关。YLP(12)和它的抗体特异性地显著抑制人类精子与ZP的结合。FA-1和YLP(12)在男性不育的特异性诊断治疗以及避孕疫苗的开发方面都是理想的目标抗原^[16]。乳酸脱氢酶(LDH-C₄)特异地存在于鸟类和哺乳动物的成熟睾丸和精子中,为精子的运动和存活提供能量。它是一种自身抗原,其天然抗体不与体细胞LDH同工酶发生交叉反应,用LDH-C₄免疫小鼠或兔等能够诱导免疫应答,导致生育率的降低。因此,LDH-C₄在人类避孕和鼠害控制方面将有广阔的应用前景^[17]。人类精子表面抗原中,SP-10颇具特色,该蛋白曾被世界卫生组织避孕疫苗特别工作组定为“一号种子疫苗”。用SP-10抗体处理,可抑制精卵顶体反应,阻止受精。

使用同种动物的免疫血清研究精子膜特异性抗原是可行的。用同种精子膜蛋白免疫雌猪,在双向凝胶电泳中,至少有12种膜蛋白(其中包括4种碱性蛋白)可以与免疫血清发生结合。另外,目前的研究已经基本上肯定了精子膜抗原的种间交叉反应性,这就为免疫避孕的研究提供了另一种可能,即以容易获得的动物精子膜蛋白制备免疫避孕疫苗。膜蛋白标记后的双向凝胶电泳技术为免疫不育的诊断和治疗开辟了一条新的途径。

综上所述,精子膜表面蛋白是精卵相互作用中十分重要的因素。目前对参与精卵相互作用的精子膜表面蛋白虽然已经有了一定的认识,但是,对于受精的分子机制以及各种膜蛋白在受精中的作用,仍有待于深入的研究和探索。另外,就目前主要研究的哺乳动物来说,虽然同目异种之间膜蛋白在结构、功能上具有显著的保守性,但不同目的各种之间,膜蛋白的分子结构和功能差异较大,因此,不同种间膜蛋白的区别仍有待于进一步研究^[18]。相信随着研究方法的不断改进,精子膜表面蛋白在受精中的重要作用将会更加明确,在生殖免疫中的应用也将进一步得到发展。

参 考 文 献

- [1] Zhang X D. Human sperm membrane protein [hSMP-1]: developmental testis-specific component during germ cell differentiation. *Arch Androl*, 2000, **45**(3): 239 ~ 246.
- [2] George G I, Margaret C L, et al. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, 2001, **64**: 1 806 ~ 1 811.
- [3] Belmonte S, Sartor T, Bertini F. Purification of proteins from rat sperm membranes that interact with ligands other than posphomannosyl residues. *Andrologia*, 2000, **32**(2): 115 ~ 118.
- [4] 陈大元主编. 受精生物学. 北京: 科学出版社, 2000. 113 ~ 115.
- [5] Kye S K, Moon C C, George L G. Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biology of Reproduction*, 2001, **64**: 36 ~ 43.
- [6] Catherine D T, Richard A C. Distinct membrane fractions from mouse sperm bind different zona pellucida glycoproteins. *Biology of Reproduction*, 2002, **66**: 65 ~ 69.
- [7] 鹿培源, 翟玉梅, 宋淑燕. 哺乳动物受精过程中精子和透明带的初级及次级结合. *动物学杂志*, 2000, **35**(1): 52 ~ 55.
- [8] Myles D G, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biology of Reproduction*, 1997, **56**: 320 ~ 327.
- [9] Gavin J S, Len H. Rat sperm 2B1 glycoprotein (PH-20) contains a C-terminal sequence motif for attachment of a glycosyl phosphatidylinositol anchor. effects of endoproteolytic cleavage on hyaluronidase activity. *Biology of Reproduction*, 2000, **62**: 1 667 ~ 1 676.
- [10] Sabeur K, Foristall K, Ball B A. Characterization of PH-20 in canine spermatozoa and testis. *Theriogenology*, 2002, **57**(2): 977 ~ 987.
- [11] Claudia L. Characterization of an 80-kilodalton bull sperm protein identified as PH-20. *Biology of Reproduction*, 2001, **65**: 628 ~ 636.
- [12] Evans J P. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization. *Bioessays*, 2001, **23**(7): 628 ~ 639.
- [13] Evans J P. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod Update*, 2002, **8**(4): 297 ~ 311.
- [14] Cattaneo F. Purification and characterization of the plasma membrane glycosidases of *Drosophila melanogaster* spermatozoa. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, **32**(8): 929 ~ 941.
- [15] Naz R K. Fertilization-related sperm antigens and their immunocontraceptive potentials. *Am J Reprod Immunol*, 2000, **44**(1): 41 ~ 46.
- [16] Naz R K. Molecular and immunological characteristics of sperm antigens involved in egg binding. *J Reprod Immunol*, 2002, **53**(1-2): 13 ~ 23.
- [17] 常建军, 彭景梗. 精子特异性乳酸脱氢酶的免疫学特性及其应用. *动物学杂志*, 2002, **37**(2): 85 ~ 88.
- [18] Ward E, Berger T. Binding of porcine sperm plasma membrane proteins to sheep, hamster and mouse oocyte plasma membrane. *Zygote*, 2000, **8**(2): 181 ~ 187.