

卵透明带 ZP3 的研究及其应用*

徐丽 彭景樾**

(中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘要: 卵透明带蛋白围绕在卵母细胞外,在受精过程中起着重要作用。ZP3 蛋白是卵透明带蛋白家族中的重要成员,在功能上,ZP3 作为初级精子受体,起始精卵结合和顶体反应。由于 ZP3 在受精中的重要作用,它成为免疫避孕的有效靶点。ZP3 蛋白疫苗和 DNA 疫苗可以诱导机体产生较强的免疫反应,导致生育降低,同时带来一定程度的副作用。本文重点介绍了 ZP3 的免疫特性及其应用。

关键词: 卵透明带;免疫避孕;DNA 疫苗

中图分类号: 789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)01-122-05

Studies and Applications of Zona Pellucida 3

XU Li PENG Jing-Pian

(The State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Science, Beijing 100080, China)

Abstract: Zona pellucida protein surrounding to oocyte is important in the process of fertilization. ZP3 protein is one of the ZP family. It acts as the primary receptor for sperm, initiating the binding of sperm and egg and acrosome reaction as well. Because of its key role in fertilization, it is regarded as the target of immunocontraception. Both ZP3 protein vaccine and DNA vaccine can elicit immune responses and result in subsequent infertility, but at the same time cause some structural abnormality. Here we introduce the immunological property and application of the ZP3.

Key words: Zona pellucida; Immunocontraception; DNA vaccine

卵透明带(zona pellucida, ZP),是围绕在卵外周的细胞外糖蛋白基质。ZP 具有卵巢组织特异性,在受精过程中起着十分重要的作用。它可作为精卵结合的精子受体——精子必须首先与 ZP 结合才能进入卵子;ZP 可以保护卵母细胞免受免疫细胞的攻击;还可以阻止多精受精,保护着床前的处于早期发育阶段的胚胎。ZP3 是 ZP 家族的成员之一,实验表明,ZP3 是初级精子受体,精子与卵的结合首先要结合在 ZP3 上。基因剔除实验表明^[1],缺少 ZP3 基因的小鼠卵母细胞外不能形成 ZP。因此,ZP3 对于 ZP 结构的完整性和功能是十分重要的。鉴于 ZP3 的重要作用,人们对其结构和功能进行了广泛的研究,并将 ZP3 作为免疫避孕的有效靶点,构建疫苗作为控制有害动物数量及为人类未来免疫避孕的应用提供新途径。本文对近几年的研究进展做一综述。

1 ZP3 的结构

人们对 ZP 的合成与分泌位置一直存在争论。有

人认为,小鼠的 ZP 糖蛋白是由卵母细胞而不是颗粒细胞合成与分泌的。EI-mestrah 等^[2]利用连接蛋白质 A 金颗粒的抗小鼠 ZP 的多克隆抗体,显示了在小鼠卵母细胞的高尔基体、分泌泡等结构中存在的 ZP,而在邻近的颗粒细胞中没有此抗体标记的存在,提示小鼠的 ZP 糖蛋白是由卵母细胞合成分泌的;同时也有人认为^[3],在有些哺乳动物中,如人、牛等,ZP 基因在颗粒细胞中也有表达。但是更多的资料则依据细胞中存在的 mRNA 和蛋白认定 ZP 是由卵母细胞与颗粒细胞共同合成分泌的^[4]。

绝大多数哺乳动物的 ZP 是由三种糖蛋白组成的。

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-SW-201);

** 通讯作者, E-mail: pengjp@panda.ioz.ac.cn;

第一作者介绍 徐丽,女,30,硕士;研究方向:分子免疫学。

收稿日期:2003-04-25, 修回日期:2003-09-11

以小鼠为例,可分为 ZP1、ZP2 和 ZP3,其分子量分别是 200、120 和 83 ku。成熟 ZP 的厚度因物种不同从 5 到 20 μm 不等^[3]。ZP3 的编码基因比起 ZP1 和 ZP2 要短。小鼠和人类的 ZP3 氨基酸均是 424 个,氨基酸序列同源率为 67%,并且半胱氨酸的位点是保守的。在小鼠(mouse)、仓鼠(hamster)、黑家鼠(*Rattus rattus*)和人四者之间,ZP3 mRNA 同源性可达 80%。可见,ZP3 蛋白的编码基因在不同物种之间具有一定的保守性(表 1)^[5]。

表 1 不同动物 ZP3 蛋白的结构特点和关系^[5]

种类	氨基酸同源性 (与人类)(%)	氨基酸 残基数目	分子量 (ku)	N-糖基化 数目
小鼠	67	424	46	6
兔	69	419	43	5
猪	74	421	44	4
人	-	424	47	4
Bonnet	94	424	47	4

在 ZP3 的蛋白骨架上,分布着许多糖链。这些糖链有的是单体,有的相互聚合成二体、三体和四体分支状的寡糖。这种糖基化是 ZP3 蛋白翻译后的修饰加工造成的。这些糖基链共价结合在 ASN 的氨基端(N-连接)或 Thr、Ser 的羟基氧上(O-连接)。N-连接的寡糖中,与 ASN 相连的多为 β -GlcNAc。这种寡糖常有 GlcNAc 核和甘露糖分支。O-连接的寡糖多为 Gal- β (1,3)-GalNAc,还有半乳糖、甘露糖或木糖。Barber 等^[6]的实验表明,利用凝集素研究狗、猫和大象的 ZP 糖基组成,发现三者都有 β (1,4)-半乳糖、Gal- β (1,3)-GalNAc 和岩藻糖。三者不同的是唾液酸(sialic acid):猫具有 α -2,6-连接型唾液酸,狗的是 α -2,3-连接,而大象两者都有。在猪中,存在着数量相当的半乳糖和 N-乙酰葡糖胺、甘露糖、岩藻糖、唾液酸和 N-乙酰半乳糖胺等^[5]。其中硫酸化常发生在 N-乙酰葡糖胺的 C₆ 位置。

在其它方面,ZP3 与 ZP1、ZP2 一样,三种糖蛋白都有 N 末端的信号肽,C 末端的跨膜区和高度保守的 ZP 基序。ZP 蛋白在分泌之前都要经过一个水解加工的过程,其水解位点位于 C 末端跨膜区上游,水解酶属于 furin 转换酶家族^[7];在有袋类,水解过程要更多,因而有袋类动物的 ZP 比起其它真兽亚纲的动物要薄^[11]。从分布量来看,ZP3 与 ZP2 的量相当,而 ZP1 较少。

2 ZP3 的功能

实验表明,ZP3 最主要的作用是在受精过程中作为初级精子受体并诱发顶体反应。Catherine 等利用超声破碎后的 4 组小鼠精子片段与¹²⁵I 标记的 ZP 亲和实验表明,具有精子轴丝和中间片段的第 4 组不能与 ZP 结

合,而其它包含头部及头部后区片段的三组可与¹²⁵I-ZP 结合,提示精子头部及后区存在着 ZP 的结合位点;若进一步利用可与 ZP 结合的 3 组精子片段再分别与 ZP3 丰富区和无 ZP3 区结合,发现其中二组可与 ZP3 富含区结合而另一组则不能,提示精子与 ZP 的结合至少分两步:精子首先与 ZP3 结合,然后与 ZP1/ZP2 结合^[8]。当精子与 ZP3 结合并发生顶体反应后,卵母细胞皮层释放 N-乙酰葡糖胺酶,水解 ZP3 上参与精子结合的半乳糖基转移酶受体,从而阻止多精受精。顶体反应发生后,顶体外膜水解,暴露了顶体内膜。内膜上的一些蛋白质分子如顶体素等与 ZP2 结合;反之,如果顶体完整,则精子不能与 ZP2 结合。因而,人们仍然确信 ZP3 为初级精子受体,ZP2 是次级精子受体的假说。但是,转基因实验表明,重组小鼠 ZP(由小鼠 ZP1、小鼠 ZP2 和人 ZP3 组成)可以与鼠精子结合,但是不能与人精子结合,提示人类精子与 ZP 的初级结合除 ZP3 外还需其它 ZP 糖蛋白的参与。在结合部位上,小鼠动物模型中,ZP3 与 ZP2 分别结合于精子头部的不同区域:大约 20% 的 ZP3 结合于顶体帽,其余的 ZP3 结合于顶体后区;而 ZP2 只结合于顶体反应后的内膜后区^[9]。

ZP3 上的寡糖链对于 ZP3 结合精子活性是至关重要的。人们对 ZP3 上的精子结合位点进行分析发现,ZP3 的初级精子受体活性可能与 ZP3 上的寡糖链有关。在小鼠中,ZP3 上的 O-连接寡糖链与精子结合。参与 ZP3、精子结合的糖基有:ZP3 末端的半乳糖、N-乙酰葡糖胺。在猪中,参与精子、ZP3 结合的是 N-连接的寡糖。在人类,利用 SPR(表面胞质团共振)研究人类受精过程,表明参与 ZP3 与精子结合的糖基是甘露糖^[10]。同时,精子上还分布着 ZP3 受体。在小鼠中, β -1,4-半乳糖基转移酶(Gal-1)与 ZP3 寡糖链上的 N-乙酰葡糖胺结合。Gal-1 是一种己糖基转移酶,催化半乳糖基的转移。Gal-1 除了与 ZP3 结合外,还与精子膜上的 G 蛋白形成复合物。当 Gal-1 与 ZP3 结合后,可以激活 G 蛋白,经过一系列信号转导途径,使精子膜上的钙离子通道开放,精子外膜内的钙离子增多,进而诱发顶体反应。因此,Gal-1 起信号传递的作用。若 Gal-1 过表达,则 G 蛋白的活化,精子与 ZP3 的结合和顶体反应都明显增多^[11];反之,如果精子上缺乏 Gal-1,则不能发生顶体反应,更不能穿过透明带,但并不影响精子与 ZP3 结合的起始。表明精子与 ZP3 结合的起始可能不依赖于 Gal-1。在人类,具有生物活性的重组人 ZP3 可与人精子上的神经元甘氨酸受体(GlyR)结合而诱发顶体反应^[12];同时,重组人 ZP3 诱发人精子发生顶体反应还可能由烟酸乙酰胆碱型受体的参与^[12]。可见精子与 ZP3

的结合关系是复杂的,并非简单的单一对应结合。

除了作为初级精子受体诱发顶体反应外,ZP3 对于卵透明带的形成和功能也是十分重要的。基因剔除实验表明,缺少 ZP1 基因的小鼠 ZP 形态异常,生育力低下,所产幼仔较小;缺少 ZP2 基因的小鼠 ZP 较薄,形成的卵子较小^[13];而缺少 ZP3 基因的小鼠最为严重,其卵母细胞外周不能形成 ZP,这种小鼠没有生育力^[1]。

3 ZP3 的免疫学特性及其应用

在受精过程中,如果 ZP3 上的精子结合位点结合其它分子,精子就不能与之结合。实验表明,抗 ZP3 抗体与 ZP3 结合后,一方面,抗体阻碍了 ZP3 上的精子结合位点,使精子不能与 ZP3 结合和发生顶体反应,更无法穿过 ZP 到达卵子,从而导致受精的失败。另一方面,抗原(ZP3)-抗体复合物还阻断了卵母细胞与其周围颗粒细胞之间的信号联系,导致初级卵泡的闭锁、退化。当用同源或异源 ZP3 蛋白免疫动物后,可以激起被免疫动物高滴度的抗体反应,产生的抗体可以与自身 ZP3 结合。被免疫动物体内产生的血清抗体主要是 IgG。当抗 ZP3 抗体水平增多时,动物不孕;若抗体水平下降到基础状态,动物的生育力也恢复。抗 ZP3 抗体主要结合于卵泡发育的后期 ZP3 糖基上,因为用去糖基的猪 ZP3 免疫兔后,兔产生抗体比用天然猪 ZP3 少 63%。此外,ZP3 是卵巢特异性的,免疫反应只发生于机体局部。有实验表明,用猪 ZP 免疫兔后在兔体内产生的抗体与马和狗的 14 种非卵巢体细胞(如脑、肝等)没有交叉反应^[6]。因此,人们希望以 ZP3 作为免疫避孕的高效靶点,构建 ZP3 疫苗免疫动物,达到“受精前避孕”的目的。这样既不影响机体的激素水平,又能避孕,正是人们一直所追求的目标。由此控制有害动物的数量,进而在人类生殖避孕研究中进行新探索。

在 ZP3 免疫避孕的早期研究中,人们用天然 ZP 蛋白直接免疫动物观察效果。在此期间,天然猪 ZP(pZP)被广泛用作抗原。有人用天然 pZP 对灵长类动物进行免疫避孕实验,结果表明,主动免疫后猴体内产生了高滴度的抗体反应,产生的抗 pZP 抗体与猴自身 ZP 结合,被免疫猴在一段时间内可以保持不孕。在体外人类精卵结合实验中,抗 pZP 抗体也能抑制人类精卵的结合。同时,他们还对比了天然的去糖基的 pZP,发现无论在体内还是体外反应,去糖基 pZP 引起的反应都不如天然的好,提示 ZP3 的糖基和它的蛋白骨架对于 ZP3 的免疫原性都是很重要的。此外,pZP 还被应用于兔、马、狗、鹿等动物的避孕研究中。

在用天然 ZP 蛋白直接免疫达到避孕目的的同时,

被免疫动物出现了较为严重的卵巢炎。表现为卵巢功能紊乱,原始卵泡衰竭。产生这种副作用的原因可能是当用同源性较大的 ZP3 免疫时,在免疫原上存在着一些表位,被抗原提呈细胞提呈后,引起了针对动物体自身的 T 细胞反应而发生了自身免疫性疾病。近年来,为了在利用 ZP3 蛋白作为免疫原时不引起自身免疫性疾病,学者们设想,可以寻找和保留免疫原(ZP3)上的 B 细胞表位,除去引起不良反应的 T 细胞表位,这样就可以避免副作用的发生。但是,为了激起抗体反应,T 细胞表位又是必需的。所以,人们把挑选出来的含有 B 细胞表位的 ZP3 多肽与其它亲缘关系较远的含 T 细胞表位的蛋白相连,构建成嵌合多肽免疫动物,达到了降低生育力和减少副作用的目的。实验发现,小鼠 ZP3 上的 B 细胞表位存在于氨基酸顺序 335 ~ 342;Chen^[14]等认为小鼠 ZP3 氨基酸顺序 332 和 334 位点的两个丝氨酸对其结合精子特性十分重要,这可能是因为丝氨酸上连接的寡糖链可以起始精子与 ZP3 的结合。在 Bonnet monkey 中,ZP3 的有效 B 细胞表位存在于氨基酸顺序 334 ~ 342;在 Paterson 等人的研究中,Marmoset monkey 的 ZP3 有效 B 细胞表位存在于其氨基酸顺序 301 ~ 320^[15]。常用的含 T 细胞表位的外源载体蛋白有疟原虫孢子蛋白(CSP)、破伤风毒素蛋白(TT)、白喉毒素(DT)、笠贝血蓝蛋白(KLH)等。其中,mstZP3[301 ~ 320]与破伤风毒素蛋白嵌合多肽^[15]在体外实验中可以抑制人类精卵结合,阻抑率可达 60%,而且在 20 个月免疫后卵巢功能未见异常。然而,在体内实验中,这个嵌合多肽疫苗对猴的生育力却没有什麼影响。因而,关于 ZP3 蛋白 B 细胞表位图谱和免疫避孕机理有待深入研究。

在方法上学,研究早期人们是用 ZP 蛋白粗提物或纯化后的天然蛋白免疫动物。近年来,人们在了解 ZP3 氨基酸顺序的基础上,利用多肽合成仪合成特定的包有效 B 细胞表位的多肽,如 bmZP3[334 ~ 342];或者用基因工程的方法,将编码特定 ZP3 多肽的基因重组到质粒载体中,再转染表达体系,如 *E. coli*、CHO、COS 细胞系等等。这些表达体系表达重组蛋白,经纯化后再免疫动物。合成多肽和重组多肽都有正确的氨基酸顺序,但是二者相比,合成多肽较短,可能包含最小的抗原表位;重组多肽经过了翻译后加工过程,蛋白质被糖基化。但是由于表达体系的局限,重组蛋白与天然蛋白在结构上仍有所不同。除此之外,人们还利用噬菌体表面呈现技术研究 ZP 蛋白的功能域结构,利用单克隆抗体研究 ZP 表面的糖基结构^[16];利用杂交瘤产生的抗 ZP 的单抗研究受精的分子机制^[17];利用转基因及

基因剔除技术研究特定 ZP 蛋白的功能等等^[1]。

20 世纪 90 年代 DNA 疫苗问世,ZP3 DNA 疫苗的研究很快成为热点。DNA 疫苗是把一段外源编码基因插入质粒或病毒的合适位点,然后把重组质粒或病毒注入机体,使插入的外源基因能够在机体内表达,从而同时诱发机体的体液免疫和细胞免疫反应。由于重组质粒在机体内利用宿主的酶系进行转录和翻译,因此所产生的蛋白与自然条件下的蛋白在构型和翻译后修饰、加工等方面最为接近。如 Jackson 等^[18]构建的 ECTV-ZP3 重组病毒。这种重组病毒选取的是小鼠 ZP3 cDNA(30~1 294)克隆到 Ectromelia 病毒中。后者是一种能在小鼠体内致瘤的病毒。二者重组构建成的重组病毒感染雌性 BalB/C 小鼠后,可以激起小鼠体内高滴度的抗体反应,产生的抗体与小鼠卵巢 ZP3 结合,使小鼠生育力下降。但同时出现了卵巢功能的损害。作者实验室近年来对 ZP DNA 疫苗进行了较为系统的研究,1998 年与澳大利亚合作构建了兔 ZPB(RC 55)DNA 疫苗。虽然该疫苗能够诱导被免疫动物产生一定滴度的抗体,但避孕效果较差。2000 年又选取兔 ZP3 编码氨基酸 263~415 的 cDNA 为免疫原,以质粒 pCMV4 为载体构建了 pCMV4-rZPC' DNA 疫苗。实验表明,该疫苗免疫雌性 BalB/C 小鼠后避孕率达到 60%,而且小鼠卵巢切片病理检测结果说明,pCMV4-rZPC' DNA 疫苗对被免疫动物的卵巢没有明显的影响,取得了较好的避孕效果^[19,20]。作者目前正选取布氏田鼠(*Microtus brandii*)卵透明带蛋白 ZP3 cDNA 部分片段,构建 br ZPC' DNA 疫苗,以对其免疫避孕机理进行深入研究。

ZP3 作为非激素类的抗生育阻断位点,越来越受到人们的关注。寻找一个既能产生抗生育作用,又不影响机体正常的激素水平,对卵巢结构和功能也不产生毒副作用的抗原表位,一直是生殖生物学研究领域的难点之一。用 ZP3 特异抗原决定簇构建疫苗是一个新的探索。随着分子生物学的发展,相信免疫避孕的研究一定会有突破性的进展。

参 考 文 献

- [1] Liu C, Litscher E S, Mortillo S, *et al.* Targeted disruption of the mZP3 gene results in production of eggs lacking a zona pellucida and infertility in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 5 431 ~ 5 436.
- [2] Majid El-Mestrah, Philip E C, Girum B, *et al.* Subcellular distribution of ZP1, ZP2 and ZP3 glycoproteins during folliculogenesis and demonstration of their topographical disposition within the zona matrix of mouse ovarian oocytes. *Biol Reprod*, 2002, **66**: 866 ~ 876.
- [3] Sinowatz F, Köle S, Töpfer-Petersen E. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs*, 2001, **168**: 24 ~ 35.
- [4] Prasad S V, Skinner S M, Carinoc C, *et al.* Structure and function of the proteins of the mammalian zona pellucida. *Cells Tissues Organs*, 2000, **166**: 148 ~ 164.
- [5] Dunbar B S, Therese M T, Sheri M S, *et al.* Molecular analysis of a carbohydrate antigen involved in the structure and function of zona pellucida glycoproteins. *Biol Reprod*, 2001, **65**:951 ~ 960.
- [6] Barber M R, Fayrer-Hosken R A. Possible mechanisms of mammalian immunocontraception. *J Reprod Immunol*, 2002, **46**:103 ~ 124.
- [7] Susan Mcleskey Kiefer, Patricia Saling. Proteolytic processing of human zona pellucida protein. *Biol Reprod*, 2002, **66**:407 ~ 414.
- [8] Catherine D T, Richard A C. Distinct membrane fractions from mouse sperm bind different zona pellucida glycoproteins. *Biol Reprod*, 2002, **66**:65 ~ 69.
- [9] Candace L K, William F H, Joel H S, *et al.* Characterization of zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3) and ZP2 binding sites on acrosome-intact mouse sperm. *Biol Reprod*, 2002, **66**:1 583 ~ 1 595.
- [10] Masahiko Maegawa, Masahara Kamada, Satoshi Yamamoto, *et al.* Involvement of carbohydrate molecules on zona pellucida in human fertilization. *J Reprod Immunol*, 2002, **53**: 79 ~ 89.
- [11] Miller D J, Shi X, Burkin H. Molecular basis of mammalian gamete binding. *Recent Prog Horm Res*, 2002, **57**:37 ~ 73.
- [12] Christopher Bray, Jung-Ho Son, Stanley Meizel. A nicotinic acetylcholine receptor is involved in the acrosome reaction of human sperm initiated by recombinant human ZP3. *Biol Reprod*, 2002, **67**: 782 ~ 788.
- [13] Rankin, T L, O' Brien M, Lee E, *et al.* Defective zona pellucida in ZP2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, 2001, **128**:1 119 ~ 1 126.
- [14] Chen J, Litscher E S, Wassarman P M. Inactivation of the mouse sperm receptor, by site-directed mutagenesis of individual serine residues located at the combining site for sperm. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, **95**:6 193 ~ 6 197.
- [15] Margaret P, Zoe A J, Martin R W, *et al.* The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. *J Reprod Immunol*, 2002, **53**:99 ~ 107.
- [16] Bonnie S D, Therese M T, Sheri M S, *et al.* Molecular analysis of a carbohydrate antigen involved in the structure and function of zona pellucida glycoprotein. *Biol Reprod*, 2001, **65**:951 ~ 960.
- [17] Tsuneatsu Mori, Mao Wu Guo, Eimei Sato, *et al.* Molecular

- and immunological approaches to mammalian fertilization. *J Reprod Immunol*, 2000, **47**: 139 ~ 158.
- [18] Ronald J J, Deborah J M, Lyn A H, *et al*. Infertility in mice induced by a recombinant ectromelia virus expressing mouse zona pellucida glycoprotein 3. *Biol Reprod*, 1998, **58**: 152 ~ 159.
- [19] 周飞, 杨颖, 彭景榭. 重组真核质粒 pCMV-rZP3' 的构建及在小鼠体内的表达. *动物学杂志*, 2001, **36**(4): 22 ~ 27.
- [20] Xiang R L, Zhou F, Yang Y, *et al*. Construction of the plasmid pCMV-rZPC' DNA vaccine and analysis of its contraceptive potential. *Biol Reprod*, 2003, **68** (5): 1 518 ~ 1 524.