

海胆受精机制的研究

陈 裕 明

(北京中医学院生物学教研室)

对海胆受精的研究,近年来逐步深入,引起细胞学家、胚胎学家、生理学家以及生物化学家等广泛的兴趣。用电镜研究精子和卵受精时,发生的形态和微细结构的变化。还用凝胶层析,离子交换层析等方法研究海胆受精时的化学变化、化学物质的成分与性质。用海胆精卵结合起来研究细胞表面的大分子调节以及细胞间的识别,也是一种理想的模型系统。因为海胆的生殖季节长,大约3—8个月。能产生大量的精子或卵,雄性海胆在整个生殖季节可排出一千亿精子;雌性海胆可排出四亿卵。研究者比较容易地从海胆中取出精子或卵,在玻璃器皿中使精卵结合,用显微镜观察受精时精子和卵所发生的一系列变化。

一、海胆卵的皮质结构

早期的研究着重于形态方面。电镜研究海胆卵的卵膜为两层,外层为厚约30埃的卵黄膜;内层为厚约60埃的质膜,双层膜总厚度包括间隙为150—200埃。这是恩达(Y. Endo 1961)研究日本榧海胆(*Clypeaster japonicus*)的未受精卵情况。但罗森查

尔德(Rothchild)研究刺海胆(*Echinus esculentus*)卵的双层膜,可能由于固定液不同,外层较内层厚。未受精的海胆卵的卵膜外,围一层糖蛋白凝胶被膜,称为胶质膜(Jelly coat)。

质膜的里面,有许多小泡样的颗粒,由50埃的膜围着,直径1微米。这些特殊的细胞器——皮质颗粒排列为单层,约15000个(图1)。许多动物的卵都存在皮质颗粒,如鱼卵、爪蟾卵、小鼠卵等都有。

阿弗泽利阿斯(A. Afzelius 1956)对五种海胆的皮质颗粒进行研究,发现它们存在着轮

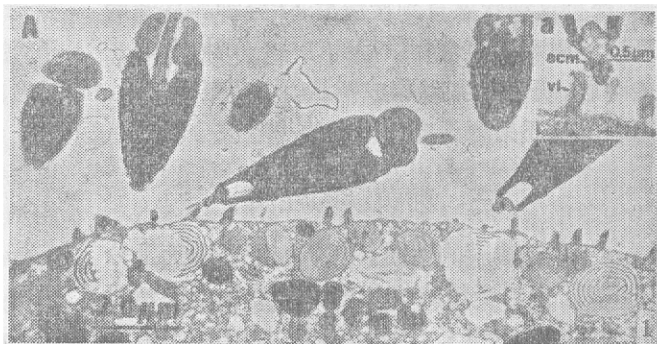


图1 紫球海胆卵的皮质颗粒,卵黄膜上的微绒毛及起反应的精子。×10,000

a, 高倍放大,精子的顶体突起(acm)附着于卵黄膜的微绒毛(vl.)的顶端。×20,000

廓清楚的种间特异性。恩达研究的皮质颗粒，有呈网状，有呈旋涡状或两者混合。分暗的和亮的部分。经过染色，显示皮质颗粒的内含物有酶类、结构蛋白和称为硫酸粘多糖的胶体物质。

二、受精时海胆卵的皮质反应

海胆卵受精之后，最引人注目的变化是皮质反应。光学显微镜下也能看到。受精时，皮质颗粒先膨胀，精子顶体突起穿入卵黄膜后约 25—35 秒钟，皮质颗粒的膜与质膜合并，卵黄膜升起，皮质颗粒的内含物释放到质膜和卵黄膜之间的空隙——卵周隙内，沉积于卵黄膜上。卵黄膜与质膜分离先于皮质颗粒的裂开。皮质颗粒释放其内含物的过程，称胞吐作用。查恩乐和霍瑟 (E. Chandler and J. Heuser 1979) 用迅速冷冻和蚀刻的方法，研究海胆卵皮质颗粒的胞吐作用。皮质颗粒释放出内含物以后，它的大部分膜融合到质膜中，形成新的质膜，所以有人认为皮质颗粒是质膜的小囊袋。

皮质反应从精卵接触点开始，以波浪的形式，约 20 秒钟波及整个卵的表面。卵黄膜与皮质颗粒内含物融合，形成受精膜，最初无结构，后来变成两层的膜。进一步阻滞多精受精(早期阻滞多精入卵，是在精子附着卵上约 1 秒钟，有一股钠离子流入细胞，使膜电位改变)。大约配子合并后 3 分钟，受精膜包被整个的卵，变得较厚，保持这种状态直到授精后 12 分钟。从开始释放皮质颗粒内含物以后约 7—8 分钟，形成一透明层，开始为细丝构成网状，晚期变得较厚，透明层物质来源于皮质颗粒的一些成分。

三、卵黄膜的性质

了解卵黄膜的性质，对研究配子表面上分子识别，探究受精的机制有着重要意义。特哥尼尔和埃波尔 (J. Tegner and D. Épél 1976) 用扫描电镜研究海胆的卵黄膜。它是一种表面粗糙有绒毛的被膜，由酸性粘多糖复合物组成。可用“卵黄膜去层酶”(delaminase) 处理未受精

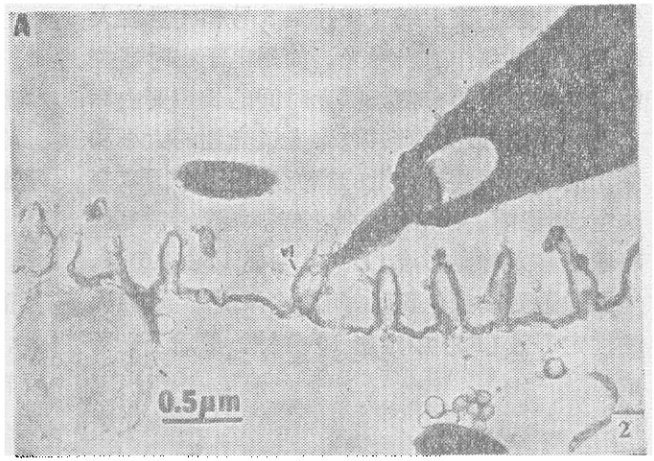


图 2 紫球海胆精子与卵黄膜的微绒毛紧密附着。×35,000

卵而得到卵黄膜，也可用二硫苏糖醇 (DTT) 和胰酶除去卵黄膜，暴露其下面的质膜。卵黄膜最明显的形态特征是有的一系列致密的突起(微绒毛)(图 1、2)，由于质膜之微绒毛所致。受精后，这些微绒毛迅速伸长(大约增加 3—4 倍)，并高度分枝。格拉比和瓦克奎厄 (G. Glabe and D. Vacquier 1977) 分离海胆的卵黄膜，研究它的特性。经过最后洗涤，分离出的卵黄膜在相差显微镜下观察，是一薄层厚度一致的被膜。用电镜观察卵黄膜的切片，发现一面是扁平的(内表面，和质膜相接触的表面)，另一面有短绒毛状球形突出物(外表面)。把精子与卵黄膜相混，用扫描电镜观察，精子仅仅结合于外表面。外表面为 22,730 平方微米 (μm^2) 的随机切片观察中，发现 108 个结合精子；而在 4810 平方微米内表面的类似观察中，仅发现一个结合精子，说明卵黄膜外表面上，有识别精子并能与之结合的大分子(图 1、2)。

特哥尼尔和埃波尔用扫描电镜最突出地发现连接精子头和尾到卵上的细丝。这些细丝可能是卵的产物，紫球海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 卵受精时能重复地被看到。其他 4 种海胆 (*S. franciscanus*、*Alloccentrotus fragilis*、*Echinometra mathaei*、*Encope californicas*) 也曾观察到。若用二硫苏糖醇 (DTT) 处理，除去卵黄膜，精子再结合到这种卵上时，看不到细丝。推测细丝可能来自卵黄膜。不是每一个卵或一

个卵的每个精子上都能观察到细丝，可能因为种种处理而被破坏。这些细丝在受精中的机能还不清楚，一种可能是诱捕精子，使之受精；另一说法，使一个精子固定以减少多精受精，细丝似乎是卵对受精作用的应答。

四、精子的顶体反应

用电镜研究确认，受精时，精子的顶体反应对配子膜的融合是一个先决条件。如果把完整的精子显微注射到卵细胞质内，则不会导致细胞分裂和发育。精子和卵接触之后，精子必然经历顶体反应。海胆卵的胶质膜能诱导精子的顶体反应，早由戴恩 (Dan, 1952、1954、1956) 描述过。但由胶质膜的哪些成分诱导的，最近塞盖尔和莱纳兹 (K. Segall and J. Lennarz 1979) 进行研究，他们对 *Arbacia punctulata*、*Strongylocentrotus purpuratus*、*S. drobachiensis*、*Lytechinus variegatus* 这四种海胆卵胶质膜的研究，发现其化学成分非常类似。用凝胶层析分离纯化以后，胶质膜物质是由岩藻糖、硫酸盐、唾液酸和蛋白质组成，分子量非常大 (大于 10^6 道尔顿)。进一步纯化，离子交换层析分离一种涎蛋白 (Sialoprotein) 和一种多糖，这种多糖是由硫酸岩藻糖组成。比较 4 种海胆的硫酸岩藻糖多糖，含 41—53% 的岩藻糖和 38—49% 的硫酸。不同种类的涎蛋白含 41—72% 的唾液酸和 19—48% 的蛋白质。

用凝胶层析纯化的胶质膜物质诱导顶体反应，*A. punctulata* 精子的顶体反应有种间特异性，*S. drobachiensis* 精子仅仅与它们同源的胶质膜起反应，紫球海胆精子不能用 *A. punctulata* 的胶质膜诱导顶体反应，但能用 *L. variegatus* 的胶质膜诱导。而 *L. variegatus* 精子的顶体反应，对试验所用的胶质膜都没有特异性。看起来不同种类有不同的特异性。

诱导顶体反应的能力只存在于硫酸岩藻糖多糖，并决定种的特异性。涎蛋白则没有这种活性。用唾液酸苷酶 (neuraminidase) 处理胶质膜，释放 95% 以上的唾液酸，但对顶体反应的诱导能力没有抑制的影响。若将涎蛋白加到硫

酸岩藻糖多糖中，不改变种的特异性。若用高碘酸处理胶质膜，引起 35% 的岩藻糖破坏，导致制备物不能诱导顶体反应。

还有哪些因素影响精子的顶体反应呢？德克尔等 (L. Decker et al. 1976) 对 *A. punctulata* 精子的顶体反应进行研究发现，*A. punctulata* 精子在没有卵或卵的碎片，没有卵胶质的情况下，在人工海水中 pH 为 9.75，0—4°C 孵化 1 分钟，大部分精子发生顶体反应。pH 值低于 9.3 时，仅少数精子有顶体反应。pH 9.6 时，有 75% 以上的精子起反应，pH 8.0—8.3 时，孵化以后没有找到发生顶体反应的精子。如果加入卵胶质，pH 值可显著变低，pH 8.6 时，60% 以上的精子发生顶体反应。如果是异源的卵胶质，比如用紫球海胆分离的卵胶质处理 *A. punctulata* 的精子，和同源的卵胶质一样，pH 为 8.6 以上时才有顶体反应。pH 8.1 时则看不到反应。提高精子的百分数 pH 8.6—8.8 时即起反应，如果 pH 8.7，起反应的精子百分数与孵胶质的浓度成比例。但这个特殊的实验中，起反应的精子最大百分数不超过 50%，偶尔得到其中 20—30% 的精子是不能动的，说明出现精子生活力降低比卵膜质激起的反应更明显。

海胆卵受精需要 Ca^{++} 离子。这在六十多年前前就已经知道 [洛伯 (Loeb) 1915]。戴恩发现诱导精子顶体反应需要 Ca^{++} 。塔卡哈什和苏姬娅玛 (Takahashi and Sugiyama 1973) 提出，细胞外 Ca^{++} 在精卵膜融合的全部过程中都是需要的，可能它独自参与顶体反应。戴恩提及顶体反应中关键的一步是顶体膜与质膜的融合，和其他过程中膜融合一样， Ca^{++} 是一个共同的基本必要条件。用离子载体 A_{23187} 在正常生理 pH 值时，无卵胶质情况下诱导顶体反应，离子载体 A_{23187} 能促进细胞融合。德克尔等发现，离子载体诱导顶体反应是和细胞外 Ca^{++} 浓度直接相关，可能引起细胞外 Ca^{++} 库的重新分配，离子载体使细胞外 Ca^{++} 进入细胞。

五、精—卵识别

受精作用可能包含两个水平上的识别，用

胶质膜诱导顶体反应,可能是第一水平的识别;随着顶反应而发生的精卵结合,将作为第二级识别,其机制在研究中。

萨默斯和海兰德尔 (Summers and Hylander 1975) 曾提出,诱导顶体反应和精卵结合是两个独立的过程。施迈尔 (Schmell) 及其同事们 (1977) 用 *A. punctulata* 的卵实验证明,卵表面上有一种对胰酶敏感的精子受体。用胰酶处理的卵受精能力消失。刀豆球蛋白 A (con A) 亦抑制海胆卵受精,因为刀豆球蛋白 A 结合于卵上,推测卵表面有一种能粘着刀豆球蛋白 A 的成分,可能是精子受体。事实上,所有研究都是利用去胶质膜的卵进行的,因此,属于这个研究的受体不是在胶质膜上。而精卵结合正是发生于精子的顶体突起和卵的卵黄膜上。

瓦克奎厄和牟 (W. Moy 1977) 在精子顶体反应期间,从伸长的顶体突起上分离出一种结合素 (bindin),是顶体小泡中含有较多的成分,在海水中,以不可溶的颗粒存在。这种物质的聚丙烯酰胺凝胶电泳证明,它是单一的成分,分子量为 30500 的一种简单蛋白质。用这种颗粒诱导卵,使之发生有种的特异性的凝集作用。瓦克奎厄等提出结合素是粘着性分子,受精期间使精子特异地结合到卵上,即顶体突起产生胞吐作用,使顶体小泡的内含物释放出,以种的特异性识别卵黄膜上的糖蛋白受体。这对受精问题上较老文献中强调的受精种的特异性,由于胶质膜中的特殊“受精素”的假设,提出了怀疑。增加可溶性的卵胶质,不影响结合素的凝集作用,所以精子对海胆卵的种的特异性结合,建立在精子结合素和卵黄膜的相互关系上。格拉比和瓦克奎厄 (1978) 已经证明,存在于卵黄膜上的糖蛋白对结合素有特异性的吸引力 (即受体活性),受体的基本结构单位分子量为 32,500,是对胰酶敏感的糖蛋白。

种间授精时 (G. Glabe and D. Vacquier 1977) 一种海胆精子不能结合到异种的卵黄膜上,不发生受精,虽然存在异种卵时精子也发生顶体反应。配子结合的这种失败,大概是精子顶体突起上的结合素,不能和异种的卵黄膜上

的糖蛋白受体结合所致。

1) *S. purpuratus* 卵 + *S. purpuratus* 结合素 = 凝集

2) *S. purpuratus* 卵 + *S. franciscanus* 结合素 = 不凝集

3) *S. franciscanus* 卵 + *S. franciscanus* 结合素 = 凝集

4) *S. franciscanus* 卵 + *S. purpuratus* 结合素 = 不凝集

最近格拉比和莱纳兹 (1979) 对结合素凝集卵的作用进行定量研究。他们发现来源于两个种的结合素,优先与它来源相同种的卵起凝集作用,虽然也观察到适当的异源凝集作用。他们发现分离出的 *S. purpuratus* 结合素以一种分散的颗粒存在;而 *A. punctulata* 的结合素为含有蛋白质和磷脂的环层小泡。他们发展了以结合素诱导卵凝集作用的定量显微试验,同样发现以结合素调节的 *S. purpuratus* 和 *S. franciscanus* 的卵凝集作用有种的特异性,但不是绝对的。并确认用异种的结合素所形成的凝集大小,比用同种的结合素形成的凝集要小得多,这在肉眼可见的观察中可能被忽略。初步的资料已提出,结合素对最后的半乳糖残基是特异的。对结合素与卵的相互关系提出解释,象其他例子的外源凝集素与糖蛋白“受体”的相互关系。他们也观察到利用细胞表面的糖蛋白阻止由结合素调节的卵凝集作用。但这种抑制没有种的特异性,可能这种糖蛋白不是从卵表面得到;也可能糖蛋白在卵裂时丧失受体的特异性。格拉比和瓦克奎厄报道一种 ^{125}I ——标记的卵表面成分附着到结合素的颗粒上,这种附着有种的特异性。以结合素调节卵凝集作用,在缺乏二价阳离子和 pH 7 时发生,这个过程不被刀豆球蛋白 A 抑制。胰酶处理卵引起结合素丧失对卵的凝集能力。

这种精卵识别,在哺乳动物卵的透明带上,同样有种的特异性。可能是哺乳动物精子结合素和透明带上的受体之间类似的识别。如果从哺乳动物的精子中分离出结合素,那么可能是一种极好的抗原,以诱导哺乳动物免疫不育性。

用分离出的结合素凝集未受精卵的这种试验, 将促进在试管中重建并分析配子结合的分子机制。

参 考 文 献

- [1] L. Decker et al. (1976). A Study of Factors Involved in Induction of the Acrosomal Reaction in Sperm of the Sea Urchin, *Arbacia punctulata*. *Dev. Biol.* 53: 115—125.
- [2] G. Glabe and J. Lennarz. (1979). Species-Specific Sperm Adhesion in Sea Urchins. A Quantitative Investigation of Bindin-mediated Egg Agglutination *J. Cell Biol.* 83: 595—604.
- [3] G. Glabe and D. Vacquier (1977). Species Specific Agglutination of Eggs by Bindin Isolated from Sea Urchin Sperm. *Nature.* 267: 836—837.
- [4] G. Glabe and D. Vacquier (1977). Isolation and Characterization of the Vitelline layer of Sea urchin Eggs. *J. Cell Biol.* 75: 410—421.
- [5] E. Schmell et al. (1977). Identification of a Sperm Receptor on the Surface of the Eggs of the Sea Urchin *Arbacia punctulata*. *J. Cell Biol.* 72: 35—46.
- [6] K. SeGall and J. Lennarz (1979). Chemical Characterization of the Component of the Jelly Coat from Sea Urchin Eggs Responsible for Induction of the Acrosome Reaction. *Dev. Biol.* 71: 33—48.
- [7] J. Tegner and D. Epel (1976). Scanning Electron Microscope Studies of Sea Urchin Fertilization. 1. Eggs with Vitelline layers. *J. Exp. Zool.* 197: 31—58.
- [8] D. Vacquier and W. Moy (1977). Isolation of Bindin: The Protein responsible for Adhesion of Sperm to Sea Urchin Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 2456—2460.