

受精的生物学及化学

Paul M. Wassarman

(美国)

一个多世纪以来科学家们一直对“受精”给予极大的关注。近年来由于扩大了对哺乳动物受精的生物学及化学的认识，因而对受精及节制生育的医学及伦理学方面均有影响。本文将叙述哺乳动物受精的细胞和分子特征，以及从精子与卵的最初相遇到形成受精卵的过程。尽管大多数论述是从体外小鼠配子实验中得出的，但是也适用于大多数哺乳动物（包括人类）体内受精过程。

受精的时间顺序

小鼠卵受精的过程是由一些按一定顺序出现的步骤所组成（图1）。

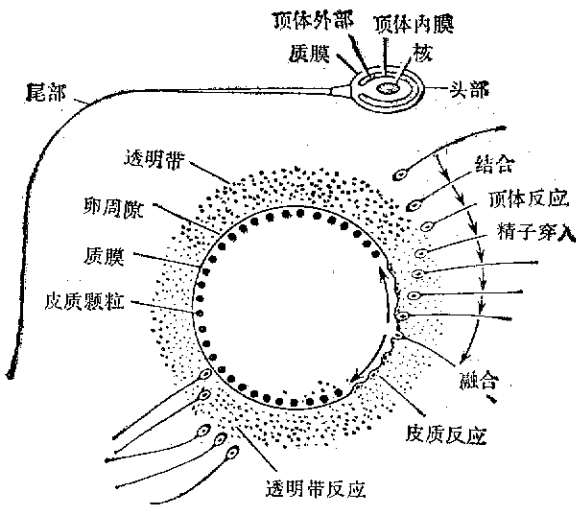


图1 小鼠配子及受精过程。其顺序为附着、精子与卵结合、顶体反应完成、精子穿入、精卵融合、皮质反应以及透明带反应

1. 精子首先与排出的卵在卵透明带的表面呈比较疏松、非特异的结合，称为附着（attachment）。附着的精子随后能和卵形成具有相对

粘着力的、种特异性的结合，称为结合(binding)。附着期配子的共同定向可能会影响精-卵相互作用是否能进行到结合期。精子通过前方的质膜与透明带结合。透明带内的精子受体以及与精子质膜互补的卵结合蛋白调节着这种结合作用。

2. 结合的精子随后完成顶体反应。顶体反应包括顶体外膜与精子质膜多位点融合及其囊泡化，从而导致顶体内含物的释放以及顶体内膜及其所结合的酶暴露出来。

3. 经过顶体反应的精子以每分钟1微米(μm)的速度穿过透明带，前进着的精子后面留下一条极窄的痕迹，其直径约为精子头部大小。

4. 已经到达卵周隙的精子与卵融合，即为受精。精子与卵融合后，卵质膜迅速出现瞬间的去极化作用，对多精入卵形成了一个迅速地、暂时性的阻断。这种现象在海胆卵中较小鼠卵更为明显。

5. 受精诱导卵皮质反应及透明带反应。皮质反应包括卵皮质颗粒膜与卵质膜融合，并引起皮质颗粒内含物（包括各种酶）释入卵周隙，进而诱导透明带反应，表现为透明带外层硬化及其与精子结合能力的丧失。这些改变构成对多精入卵的一种缓慢的阻断。

本文对小鼠与海胆的受精过程进行了比较。尽管从体外受精到体内受精的进化，估计已超过一亿年左右，但两种动物受精过程所涉及的许多细胞及分子机制仍然是相似的。

精子受体

长期以来，已知在哺乳动物中卵透明带在限制种间受精方面起着重要作用（图2）。例如，

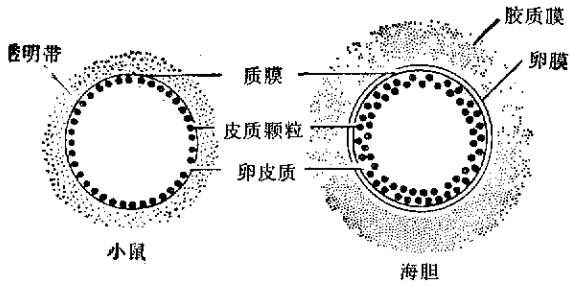


图2 小鼠及海胆卵

在体外，卵可与同种精子受精而很少出现与异种精子受精。上述观察表明，精子与卵的结合是受透明带中的种特异性精子受体的调节。因此，精子不能与受精卵的透明带结合，可能是由于受精后导致这些精子受体的失活所致。这种情况和海胆类似，其精子与卵的种特异性结合可归因于卵细胞外被——卵膜 (vitelline envelope) 中的精子受体。受精之后，皮质颗粒内含物使卵膜转变为受精膜，精子就不能再和受精膜结合

最近已鉴定、分离并阐明了小鼠的精子受体的特征。这种受体称为 ZP_1 (分子量为 83,000)，是组成卵透明带的三种不同糖蛋白之一。 ZP_1 是由 44,000 道尔顿多肽链所组成，在其上共价附着有几种天冬酰胺连接的 (N-连接) 寡糖和丝氨酸-苏氨酸连接的 O-寡糖。生长着的卵母细胞的透明带含有近 10 亿个 ZP_1 复本，它们是与透明带中其它两种糖蛋白一起合成与分泌的。三种糖蛋白装配为一条长的互相连接的细丝，构成相对地具渗透性的透明带 (约 7 微米厚)，包围着完全成熟的卵母细胞。当排卵时，完全成熟的卵母细胞转变成未受精卵，并排放至输卵管内等待受精。胚胎发育到胚泡期 (约 100 个细胞) 从透明带中孵化出来，植入子宫内。

受精开始时，具有完整顶体的小鼠精子，在卵透明带的外缘和几万个 ZP_1 复本结合。为此，精子必须识别具有种特异性的 ZP_1 的某些分子特征。在这种情况下， ZP_1 能起精子受体的作用并不是由于其多肽链，而是分子量为 3900 的 O-寡糖。用化学方法从 ZP_1 中除去这些寡糖，

即完全破坏了精子受体的作用，这些去掉的寡糖还保留着很多精子受体的特征。例如体外实验使精子和仅为毫微克浓度的这些寡糖相接触，就可阻止精子与排出的卵结合和受精。从各种糖蛋白衍生的其它寡糖，包括透明带糖蛋白 ZP_1 及 ZP_2 ，在体外不影响精子和排出的卵结合及受精。上述发现可以说明为什么各种凝集素、单糖以及糖结合物可以阻止精子和哺乳动物卵的结合。还可解释为什么在体外 ZP_1 可继续起着精子受体的作用，甚至在和去垢剂、变性剂接触后或在高温条件下仍起作用。

ZP_1 表明碳水化合物在精子与卵的种特异性结合的这种作用，在海胆中也已充分证实。究竟是 ZP_1 还是 ZP_2 的 O-寡糖具有显示种的特异性，尚未确定。已知多种寡糖结构是与哺乳动物精子受体种特异性的形成相一致。寡糖结构的组成、顺序、分支图型、构象以及其它特征的多样性，提供了多得惊人的组合的可能性。比较上述 ZP_1 寡糖和其它哺乳动物卵中分离出来的、功能上类似的寡糖结构是很有意义的。

卵结合蛋白

海胆的糖蛋白精子受体存在于卵膜中，其分子量大于 1 千万。这些受体可被精子顶体的主要蛋白质成分——结合蛋白 (bindin) 识别。结合蛋白是 30,500 道尔顿疏水蛋白质，由于它能识别并结合糖残基的特殊顺序，故可把它当作一种凝集素。因此，在海胆精子与卵的种特异性结合中，精子受体寡糖起主要作用。结合蛋白位于顶体内并和顶体内膜紧密结合。因此，它只有在顶体反应完成后才能与卵膜内的精子受体相互作用。这种相互作用的方式体现了小鼠和海胆的受精过程的明显不同，在小鼠只是具有完整顶体的精子才能与卵结合。对小鼠来说，有几种不同的卵结合蛋白。这些蛋白质包括凝集素、糖基转移酶、蛋白酶以及糖苷酶。在各种情况下，蛋白质是与精子头部的质膜结合。例如糖基转移酶，它是精子与卵结合的有力介质，可把尿苷 5'-二磷酸半乳糖中的半乳糖转变为终末 N-乙酰葡糖胺残基以形成 N-乙酰乳糖胺。这种酶识别并结合 ZP_1 上特异的 N-乙酰

葡糖胺残基,可能是与前述的精卵相互作用中 ZP₃ O-寡糖作用一致。象在半乳糖基转移酶实例中,识别及结合要通过酶-底物复合物的形式来完成,在这些过程中 ZP₃ 起底物作用。不管卵结合蛋白的准确性质是什么,在演变过程中卵结合蛋白的结构一定要发生变化,以便与精子受体所发生的变化相一致,从而保证精子与卵的种特异性的结合。有关小鼠精-卵相互作用的更为详尽的了解,尚有待于对卵结合蛋白进行分离和鉴定。

顶体反应

顶体是由膜包围的溶酶体样的细胞器。它位于精子头部前端核的上方和质膜下方。从精细胞转变为精子的过程中,顶体首先形成。它含有各种酶,如蛋白酶、糖苷酶、磷酸酶、芳香基硫酸脂酶以及磷脂酶。其中一些酶可能是顶体内膜成分。

精子在穿过透明带并与卵膜融合之前,它首先必须完成顶体反应(图3)。这种反应是一

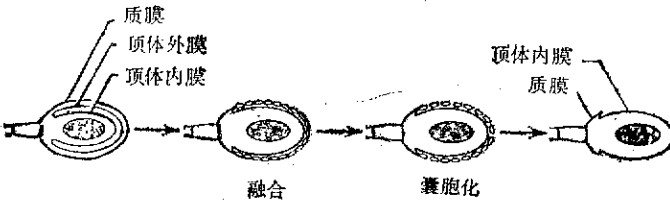


图3 小鼠精子的顶体反应

种胞吐现象,类似体细胞分泌颗粒排放内含物的全过程。顶体反应的特征是通过头部质膜所进行的 Na⁺ 和 Ca⁺⁺ 流入及 H⁺ 流出;后一过程涉及到三磷酸腺苷依赖的 H⁺ 泵,导致细胞内 pH 升高。顶体反应必须要有细胞外 Ca⁺⁺ 和调钙蛋白的参与;此外,离子载体 A23187、磷脂酶及溶血磷脂在小鼠和海胆精子顶体反应中均起重要作用。

小鼠精子是在结合到透明带之后才完成顶体反应,因而可以认为透明带成分能诱导顶体反应。事实上,在体外小鼠精子与可溶性卵透明带接触后或海胆精子与可溶性卵胶膜接触后均可发生顶体反应。这种卵胶膜是由唾液蛋白和岩藻糖硫酸多糖组成。岩藻糖硫酸多糖可诱

导海胆精子的顶体反应。业已证明存在于可溶性卵透明带内的顶体反应诱导剂是 ZP₃。提纯的 ZP₃ 在体外,即使毫微克浓度也象离子载体 A23187 一样,能有效地诱导精子进行顶体反应。这种发现提示,具有完整顶体的精子通过精子头部质膜与 ZP₃ 的结合,足以改变接触部分质膜(可能影响质膜的离子通透性)以使它能和顶体外膜融合。ZP₃ 起精子受体的作用是依靠它的寡糖,而起顶体反应诱导剂的作用是依赖于它的多肽链。因此,从 ZP₃ 来的小糖肽及 O-寡糖能与完整顶体的精子头部相结合,并使这些精子不再和未受精卵结合,但不论是糖肽还是 O-寡糖均不能诱导精子进行顶体反应。对于被诱导的顶体反应来说,这些寡糖必须被多肽链所连接。多肽链本身是否起着促融合剂的作用,尚有待测定。

最近的实验提示,另一种透明带糖蛋白 ZP₂ (分子量为 120,000),在 ZP₃ 诱导顶体反应后,对结合的精子起次级受体作用。如果 ZP₂ 能起这种作用,为什么经过顶体反应的、自由游泳的精子不能和透明带结合。答案并不十分明确,可能 ZP₂ 与顶体反应过的精子之间的这种强度不足以结合自由游泳的精子,但足以保持与透明带有联系的精子的结合状态。因为结合的、顶体反应过的精子必然要穿过透明带,顶体反应过的精子与透明带间比较弱的相互作用将有助于精子穿过透明带。

总之,这些观察提示,ZP₃ 使位于海胆卵胶膜内的多糖(顶体反应诱导剂)以及位于卵膜内的糖蛋白(种特异性精子受体)的功能释放出来。ZP₃ 的双重功能(精子受体及顶体反应的诱导者)是存在于哺乳类卵的一种细胞外被中。

精子穿入

顶体反应后的海胆精子伸出一条长的膜状突起(顶体突起),它穿过卵胶膜并借结合蛋白粘附在卵膜上;而小鼠精子则不伸出这种突起,但必须穿过透明带以到达卵膜并与之融合。显然,这是借其前方透明带的有限的蛋白水解来完成。一种胰蛋白酶样的蛋白酶-顶体素参与

这一过程。无酶活性的顶体素酶原经特异的蛋白水解形成顶体素。它可能与顶体内膜密切相关。由于精子产生的真正推动力，对精子穿过期间是否需要蛋白水解已提出疑问。当然，单靠这种力量能否使精子穿过透明带，仍有争论。

精卵融合

精子一旦穿过透明带，就能和卵接触、粘着并与之融合，即为受精。精卵融合不具特殊的种特异性。小鼠是在精子头的后部区域与卵质膜融合，这显然和海胆的情况不同，后者是精子顶体突起顶端区域的顶体内膜与卵质膜融合(图4)。由此可见，在体外只有完成顶体反应的小鼠精子才能和已去掉透明带的卵融合，而顶体完整的精子绝不会和卵融合。

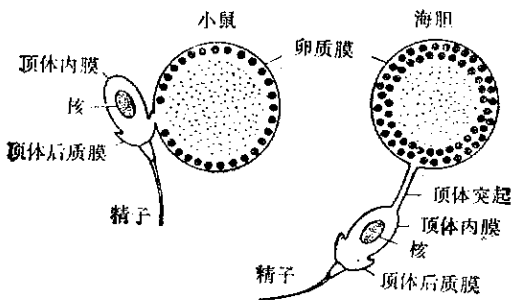


图4 小鼠及海胆的精-卵融合

一旦精子和卵膜融合，精子是如何进入卵内？小鼠及海胆卵表面具有许多微绒毛。海胆的有关实验资料提出，膜融合后，有一组伸长的微绒毛丛紧紧地围绕精子头部并和精子头部表面镶嵌。当这些微绒毛被重新吸入时，精子即被拉入卵内。海胆及小鼠的精卵融合时刻，精子运动停止；因此，精子的进入并不需要精子运动。卵皮质含有收缩蛋白，为肌动蛋白及肌球蛋白，肌动蛋白细丝束从微绒毛伸入皮质。受精时这些收缩蛋白的收缩可能把微绒毛和已融合的精子均拉入卵胞质内。

皮质反应

在小鼠卵母细胞生长期就出现了皮质颗粒(高尔基复合物产物)。随卵母细胞直径的增大，其皮质颗粒的数目也在增多。这些具膜的溶酶

体样的细胞器直径为200到600毫微米(nm)，绝大部分位于卵皮质部分。每一个未受精的小鼠卵有近4000个皮质颗粒，而海胆卵约为15,000个。小鼠及海胆卵在受精时的皮质反应包括皮质颗粒膜与卵质膜的融合(图5)。源于精-卵融合点的膜的融合，犹如波浪一样扩展，

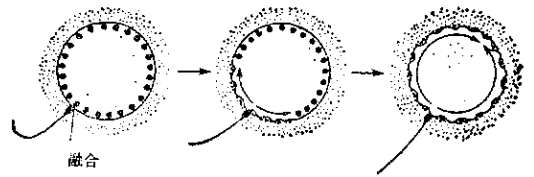


图5 小鼠精-卵融合后的皮质反应

最后遍及整个卵表面。显然，胞质贮库中 Ca^{2+} 的释放是决定刚刚受精的卵的融合波的扩展，皮质内游离钙离子的浓度可超过 $1-5\text{mol/L}$ 。离子载体A23187在体外诱发未受精卵皮质反应正象其诱导精子顶体反应一样。皮质反应使卵表面许多微绒毛伸长和质膜重组，卵表面积暂时增加。

随皮质反应的终止，皮质颗粒内含物释入卵周隙中。其内含物包括各种水解酶，如蛋白酶和过氧化物酶。由于透明带多孔，一些大分子甚至小的病毒都能穿过，因而这些酶能进入透明带并改变其组分，也就是诱导透明带反应。海胆卵皮质颗粒内含物也包括各种酶、结构蛋白及多糖类，它们与卵膜结合并使精子受体失活，卵膜随后形成受精膜。这些现象有助于阻止多精入卵并为受精卵及卵裂期的胚胎提供保护层。

透明带反应

在小鼠透明带反应过程中，透明带所经历的变化远较海胆受精膜的形成更为复杂。在这两类动物中，由于受精作用及孤雌生殖激活作用(例如被离子载体A23187激活)引起了卵皮质颗粒组分的改变，并出现了细胞外被层硬化及精子受体的失活。前者使精子难于穿入，后者阻止了精子与受精卵结合，两者构成了对多精入卵的阻断。当海胆受精膜形成时，其卵膜的超微结构发生广泛的重组，而小鼠受精卵的

透明带超微结构却与未受精卵的相似。

海胆受精卵的受精膜较未受精卵的卵膜,对增溶剂具有更大的抗性。卵膜的硬化是酪氨酸残基发生大部分交联,它是被卵皮质颗粒过氧化物酶催化。2-及3-酪氨酸残基的形成,把单个卵膜及皮质颗粒蛋白(二者共同组成受精膜)转变为一个广泛的、共价连接的不溶性的蛋白网。

小鼠透明带反应不仅包括精子受体的失活,也包括透明带硬化。在体外加入分解共价键的药物如蛋白酶及还原剂等,受精卵透明带对这些药物较未受精卵透明带具有大得多的抗性。这种溶解性的不同,被认为是反映了结构改变,它可使受精卵的透明带具有抗精子穿入能力。因而,在透明带反应前,已部分穿入透明带的精子在带反应后,透明带可阻止其进一步的穿透。小鼠卵受精后透明带的硬化不是酪氨酸发生交联。在皮质反应过程中,从皮质颗粒释放卵过氧化物酶到卵周隙中,而受精卵透明带中的 ZP_1 、 ZP_2 及 ZP_3 并不相互共价交联。因为在受精卵透明带的样品中,并未发现高分子量的 ZP_1 、 ZP_2 及 ZP_3 的交联低聚物。另一方面,伴随皮质反应, ZP_2 发生有限的蛋白水解,

生成一个或多个小分子肽,它们借分子内的二硫键共价附着到糖蛋白上。在受精之后, ZP_2 的有限蛋白水解是否是造成透明带硬化的唯一原因,尚有待实验测定。由于 ZP_2 及 ZP_3 共同构成透明带细丝的重结构单位,因而 ZP_2 构象的改变可能是细胞外膜物理性质改变的原因。

从受精卵透明带分离出的 ZP_3 称为 ZP_{3f} ,它在体外并不具有精子受体和诱发顶体反应的作用。因此,有理由假定,当小鼠精-卵融合后, ZP_3 就已发生变化,以致不能执行其生物学功能。从 ZP_3 到 ZP_{3f} 的转变,也可解释为什么精子在体外不能与曾和皮质颗粒渗出物接触过的未受精卵的透明带相结合。鉴于 α -寡糖的作用,应考虑在 ZP_3 转变为 ZP_{3f} 过程中,是皮质颗粒糖苷酶而不是蛋白酶起作用的可能性。

综上所述,受精是一种高度特化的过程,受精过程的每一步骤均已在细胞生物学的其它领域内发现了相应的环节。因此,真核生物及原核生物的生物学研究进展有助于鉴定在受精过程中起作用的药物以及阐明它们的作用抑制。