

GTP 结合蛋白与哺乳动物精子顶体反应过程中的信息传导

贾振宇 石其贤

(浙江省医学科学院 杭州 310013)

关键词 G-蛋白 信息传导 顶体反应 分子机制

在多细胞动物体内,细胞通过相互间的信息交流以调节他们的生长,发育和繁殖,协调他们的不同活动和功能。细胞信息交流的研究内容非常广泛,在这里主要讨论哺乳动物精子顶体反应过程中由 G-蛋白介导的信息传递。

1 G-蛋白的种类

鸟苷(G)结合调节蛋白(即 G-蛋白)是目前广泛研究的一类调节蛋白。各种类型的 G-蛋白均是由 α 、 β 、 γ 三个多肽亚单位组成的异三聚体(heterotrimer)的膜蛋白, β 、 γ 亚单位形成紧密的二聚体, α 亚单位与 β 、 γ 二聚体疏松结合。研究认为,G-蛋白的 α 亚单位具有激活效应蛋白的功能。不同类型的 G-蛋白的差异表现在 α 亚单位上。刺激性 G-蛋白(G_s)接受受体转导的信息后刺激腺苷酸环化酶活性,它的 α 亚单位大小为 45—52kD;抑制性 G-蛋白(G_i)接受受体信息之后则抑制 G-蛋白的活性,它的 α 亚单位大小为 41kD。与视觉传导有关的传导素(transducin)及目前功能不详的 G_o 的 α 亚单位大小为 39kD(有人推测 G_o 介导 Ca^{2+} 通道的受体的调节作用)。不同类型的 G-蛋白的 β 亚单位(35—36kD)高度保守, γ 亚单位(8kD)则彼此不同。G-蛋白的 α 亚单位可以与 GTP 结合,并催化 GTP 水解成 GDP。 α 亚单位一旦与 GTP 结合,即与 β 、 γ 二聚体分离,与效应蛋白发生作用。GTP 被水解成 GDP 后, α 亚单位重新与 β 、 γ 结合成非活性形式的复合体。GDP 与 GTP 之间的转换速度很慢,但激活的受体可以提高其转换率从

而活化 G-蛋白。

在 NAD^+ 辅助下,霍乱毒素(CTX)或百日咳毒素(PTX)能催化 G-蛋白的 α 亚单位上的 ADP 核糖化,其中 CTX 特异性地催化 G_s 与传导素,而 PTX 则特异性地催化 G_i 、 G_o 及传导素。毒素催化的 ADP 核糖化反应必须有 β 亚单位参与。G-蛋白核糖化以后,功能发生变化。CTX 通过催化 G_s 的 α 亚单位 ADP 核糖化而阻止 GTP 水解成 GDP,从而不可逆地激活 G_s ; PTX 则通过催化 G_i 、 G_o 的亚单位 ADP 核糖化而将 G_i 、 G_o 稳定在与 GDP 结合的非活性状态,从而抑制其功能^[1]。

除异三聚体的 G-蛋白外,还有许多 21—27KD 的小分子 G-蛋白,它们都不与 β 亚单位相互作用。这种小分子蛋白几乎存在于所有哺乳动物的细胞中,位于质膜或胞质中,可发生由肉毒素杆菌毒素(STX)催化的 ADP 核糖化反应^[2]。

2 G-蛋白介导的信息传导机制

G-蛋白传导受体蛋白传递的信息,一般通过激发环腺苷酸(cAMP)级联反应和磷酸肌醇(PI)级联反应的二种方式。

G_s 、 G_i 蛋白是通过激发 cAMP 级联反应而传导受体信息的。在细菌中,受体与腺苷酸环化酶(AC)直接作用,无需另一种蛋白介导。在动物细胞中,当受体与配体结合后被活化,活化的受体与 G-蛋白分子碰撞从而激活 G-蛋白,G-蛋白转而激活或抑制腺苷酸环化酶,提高或降低细胞内 cAMP 浓度。cAMP 的生物

效应通过 cAMP 依赖性蛋白激酶 A(PT-A)介导,激活磷酸化激酶,继而导致糖元磷酸化酶、糖元合成酶的磷酸化,活化糖元磷酸化、抑制糖元合成,改变葡萄糖浓度。在某些细胞中,cAMP 浓度上升以后可以激活特殊基因的转录、表达。例如,在下丘脑内分泌细胞中,cAMP 可刺激生长激素抑制素的表达。这种由 G-蛋白介导的信息传导系统有助于信息的放大、调节。

许多研究发现,受体激动剂诱发的磷酸肌醇(PI)级联反应中有 G-蛋白介入。这类不能发生由 PTX、CTX 催化的 ADP 核糖化反应的 G-蛋白称为 Gp、Gqo、Gp、Gq 触发的磷酸肌醇级联反应过程为:受体激活磷酸酯酶 C(PLC),继而 PLC 催化聚磷酸肌醇(PIP)降解成三磷酸肌醇(IP₃)与二乙酰甘油(DAG)。IP₃ 可促使细胞内储存钙释放,提高胞内 Ca²⁺浓度。DAG 则在 DAG 脂酶催化下生成乙酰甘油(MAG),MAG 被 MAG 脂酶降解生成花生四烯酸(AA)。花生四烯酸与一些脂质信息分子的合成有关。同时,DAG 直接激活 Ca²⁺依赖性蛋白激酶 C(PK-C)^[2]。

3 哺乳动物精子中 G-蛋白的研究

G-蛋白介导的信息传导的研究都集中在多细胞动物的体细胞内。从 80 年代初开始,许多研究者开始探索动物性细胞的信息传递方式与途径。在迄今所研究的所有动物的精子细胞中,均发现有 G-蛋白。人、小鼠、豚鼠、仓鼠及牛等精子中均有可发生由 PTX 催化的 ADP 核糖化反应的单一蛋白底物,分子量为 41kD。该底物的蛋白酶水解图谱类似于小鼠 S-49 淋巴细胞中 Gi 的 α 亚单位,同时特异性抗血清检验技术与免疫印迹方法检测到一种蛋白多肽,该蛋白多肽类似于体细胞中 G-蛋白异三聚体中的 β 亚单位,分子量为 35—36kD。因此断定精子细胞中的 G-蛋白为 G_j。小鼠精子中有三种类型的 Gi: Gi₁、Gi₂、Gi₃;除 Gi 外,还有二种无 PTX 底物活性的 G-蛋白,Gz、Gq。到目前为止,在动物精子细

胞中尚未发现 Gs,且纯化的外源 Gs 对精子的各种活动无调节作用。精子中可能不存在 Gs 介导的信息传导途径^[1,3-5]。

动物精子中存在的 Gi 蛋白提示,可能有一种类似于体细胞中的配体:受体:G 蛋白:第二信使的信息传导系统调控精子的活动与功能。众多研究表明,哺乳动物精子中的 Gi 蛋白参与同源卵透明带诱导的精子顶体反应过程中的信息传导^[6-9]。

顶体是精子细胞内类似于溶酶体的结构,位于精核上方,内含大量水解酶。正常生理状态下,当获能的精子通过卵丘细胞或接触同源卵的透明带后发生顶体反应,即顶体外膜与精子质膜融合,释放顶体内容物。顶体反应是精卵结合的前提,它使得精子能够穿过透明带,与卵膜融合即受精。透明带(ZP)是卵子在成熟过程中分泌的种特异性糖蛋白,具有结合精子、诱导顶体反应与阻止异种受精的双重作用。ZP 由三种硫酸糖蛋白:ZP₁、ZP₂、ZP₃ 组成。ZP₃ 能结合顶体完整的精子并诱发顶体反应,ZP₂ 则能结合顶体反应后的精子,ZP₁ 键合 ZP₂/ZP₃ 异二聚体,形成三维结构的 ZP。卵子一旦与精子融合后,即释放其皮质颗粒中的糖蛋白酶等,水解 ZP₃。经水解修饰后的 ZP₃ 不具结合精子的能力,因而阻止多精子受精^[9]。

ZP₃ 诱导的顶体反应类似于体细胞的胞吐作用(例如,肥大细胞在配体 IgE 刺激下,质膜与胞内管泡膜融合,释放管泡内容物),其信息传导也是通过配体:受体:G 蛋白:第二信使的方式^[7]。目前,精子通过 G-蛋白介导的信息传导研究主要以小鼠作动物模型。

小鼠 ZP₃ 具有许多理想配体的特点:它仅由生长的卵子合成,分子量为 83kD;氨基酸序列不同于任何蛋白多肽,且具有很强的种特异性;作用范围受到 ZP 三维结构的限制;在 nM 浓度下即可结合精子并诱发顶体反应;免疫荧光定位技术与放射自显影技术证实,小鼠精子表面有大量 ZP₃ 的结合位点(10,000—50,000 位点/精子),与激素调节的细胞的表面受体数目相仿^[5]。

早期的研究认为,顶体帽区的精子质膜表面蛋白酶抑制剂敏感位点、半乳糖转移酶、岩藻糖转移酶具有 ZP_3 受体活性。近年来的研究结果则倾向于顶体帽区质膜表面一种 95kD 的蛋白。获能精子上的 95kD 蛋白能与 ZP_3 结合,并发生聚集(在某些精子中,可自发聚集)。受体聚集正是配体刺激的信息传导过程中的重要环节。免疫印迹分析发现,该蛋白能与抗磷酸酪氨酸抗体发生抗原-抗体免疫结合反应,因而推测,它既是 ZP_3 受体,也是蛋白激酶的催化底物或本身具有蛋白激酶活性^[19-21]。

ZP_3 能增强小鼠精子膜与 $GTP\gamma S$ (GTP 的非水解类似物)的结合,提高膜组分中高亲和力的 $GTPase$ 活性。同时, ZP_3 这一功能类似于 mastoparan (一种黄蜂毒液),该毒液不通过受体介导能直接激活 G-蛋白。PTX 亦能抑制 ZP_3 诱导的精子顶体反应。免疫荧光定位技术证实,G-蛋白位于顶体区质膜,该区域恰是 ZP_3 与精子发生作用的区域。因此认为,小鼠精子膜中的 G_i 蛋白与 ZP_3 受体偶联,参与 ZP_3 诱导的顶体反应^[8]。

ZP_3 作为配体与 ZP_3 受体结合并激活受体,受体活化后相互聚集,继而激活 G-蛋白,G-蛋白转而激活精子细胞内第二信使,传递受体信息,最终诱发顶体反应。关于 G-蛋白传递受体信息的途径,目前有二种观点。一种观点认为,G-蛋白通过环腺苷酸(cAMP)级联反应,即 G-蛋白激活腺苷酸环化酶,提高胞内 cAMP 浓度,继而 cAMP 激活蛋白激酶 A,活化的蛋白激酶 A 激发一系列反应,最终诱发顶体反应。cAMP 同时也激活 Na^+ 通道,提高胞内 pH。另一种观点认为,G-蛋白通过磷酸肌醇(PI)级联反应,即 G-蛋白激活磷脂酶 C(PLC),活化的 PLC 催化聚磷酸肌醇(PIP)降解成三磷酸肌醇(IP_3)与二乙酰甘油(DAG)。 IP_3 促使胞内储存 Ca^{2+} 释放,或甲基化后形成 IP_4 , IP_4 打开质膜上电压调控的 Ca^{2+} 通道,引起细胞外 Ca^{2+} 内流。DAG 则激活 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶 C。与此同时,G-蛋白激活磷脂酶 A(PLA)与磷脂酶 D(PLD),PLA、PLD 分

别催化磷酸酰胆碱(PC)分解为溶血磷脂酰胆碱(LC)和花生四烯酸(AA)及胆碱和磷脂酸(PA)。 Ca^{2+} 、LC、AA 及 PA 均为融合因子,可促使顶体外膜与精子质膜融合^[9]。

4 哺乳动物精子顶体反应机制

小鼠精子顶体反应过程中的信息传导方式提示了一种哺乳动物精子顶体反应的分子机理。精子获能后,质膜流动性增高,钳制 ZP_3 受体的去能因子(DF)丢失或经修饰而失去活性, ZP_3 受体与 ZP_3 结合后被活化,受体分子彼此靠近聚集,继而激活 G-蛋白,通过 G-蛋白触发一系列反应,最终诱发顶体反应。除了 G-蛋白介导顶体反应的假说之外,目前还有另外二种假说,解释顶体反应的机理。一种认为, ZP_3 受体活化后相互聚集,活化的受体分子激活酪氨酸激酶(TK),或者活化的受体本身具有 TK 活性,激活的 TK 激发级联反应,诱发顶体反应。许多研究人员发现,这一假说和 G-蛋白介导的顶体反应的假说适用于小鼠、牛及人,但在羊精子中似不能成立,因为在羊精子细胞中检测不到蛋白激酶 C(PKC)的活性。因此,他们提出另一种假说,认为 ZP_3 受体活化后直接打开 Ca^{2+} 通道,流入精子细胞内的 Ca^{2+} 激活磷脂酶 C(PLC),继而触发一系列反应,最终导致顶体反应发生^[9,13]。

5 结 语

目前对哺乳动物精子顶体反应的分子机制的研究仍有许多问题需进一步探讨解决。外源 Ca^{2+} 是顶体反应必不可少的因素之一,G-蛋白介导的顶体反应过程中, Ca^{2+} 进入精子的方式和途径,仍不清楚。精子 G-蛋白的靶蛋白也是一个疑问。G-蛋白直接作用于腺苷酸环化酶(AC)或磷脂酶 C(PLC),抑或通过其它蛋白发生作用,这一问题仍需深入研究。目前研究认为,精子 G-蛋白是一种 G_i -蛋白。 G_i -蛋白对 AC 具有抑制作用,那么 G_i 以什么方式提高顶体反应过程中精子细胞内 cAMP 浓度?精子中可能存在着未被检测到的其它类型的蛋