

哺乳动物精卵融合机制

毕聪明^{1,2*} 彭树英² 曹俊伟^{2,3} 王 珅¹

(1 锦州医学院畜牧兽医学院 锦州 121001 2 西北农林科技大学生物工程研究所 杨凌 712100)

(3 内蒙古农业大学生物工程学院 呼和浩特 010018)

摘要 最近基因打靶研究揭示出了参与精卵结合和融合的各种分子。精子中 ADAMs 因子(是含有裂解蛋白和金属蛋白酶结构域蛋白质家族),包括繁殖因子 α 、繁殖因子 β 以及 cyritestin, 经过研究已经发现它们对精卵结合有重要作用,而对精卵的融合不重要。通过研究推测出其受体为卵母细胞整合蛋白,其对精卵交互作用是必需的。最近,一些研究表明 CD9 和卵母细胞上 GPI 锚定蛋白(glycosyl phosphatidyl inositol 糖基磷脂酰肌醇),以及精子上的附睾蛋白 DE 均是精卵融合过程中的候选因子,如果缺乏这些蛋白质分子或其作用受到干扰将导致精卵融合机制紊乱。综述重点讨论了参与精卵交互作用的相关分子的最新研究进展。

关键词 精卵融合 哺乳动物 CD9 DE ADAMs GPI

长期以来,人们试图找到精卵融合过程中的相关分子。早期利用抗精子单克隆抗体(mAbs)抑制受精作用,表明一些分子参与了精卵的融合过程。精卵融合的详细分子机制还没有搞清楚,但是最近的研究已揭示出特定的分子与精卵融合反应有关^[2]。下面就探讨一下与精卵融合相关分子在此交互作用中所起的作用。

1 卵母细胞 CD9(CD9 on oocytes)

CD9 是跨膜四超蛋白家族的一个成员,这种蛋白质家族成员有 4 个跨膜区域和 2 个胞外环^[1]。第二个环比第一个环大并且有高度保守氨基酸残基^[2]。尽管目前还未发现四超家族转膜蛋白与其他蛋白质家族有相同的功能结构域,但其可能与整合蛋白、免疫球蛋白和蛋白多糖、调节蛋白和生长因子受体共同作用。四超家族与胞膜上相关因子形成多分子复合体,这一复合体与细胞连接、运动、增殖和分化有关^[3]。CD9 对细胞运动和分化的调节可能是通过其调节信号传导功能决定的。其中包括细胞内钙离子水平的调节、酪氨酸磷酸化以及 PKC 的依赖功能。CD9 对细胞运动、转移和生长的影响部分与 CD9 调节细胞的粘附有关。

首先是从抗 CD9 的实验中发现了 CD9 能在受精中产生作用的^[4]。在这一研究中,陈和他的同事发现在体外受精过程中抗 CD9 抗体抑制了精卵细胞结合和融合。进一步研究发现,除了有丝分裂纺锤体集中区域外,CD9 在整个卵母细胞表面大量分布,这是卵母细胞表面唯一缺乏微绒毛的区域,精子在这里不能与卵母细胞融合^[5]。CD9 的这种分布模式与整合蛋白-6 相契合。整合蛋白-6 可能是精子致育因子的一个受体,是 ADAM 家族成员,并可以在卵细胞表面与 CD9 相互作用^[6]。据报告 CD9 缺陷的雌性小鼠不育主要是由于 CD9 缺陷的卵母细胞缺乏融合性导致^[7]。精子可以以同种方式吸附到野生型和 CD9 缺陷型小鼠卵母细胞表面,但是 CD9 缺陷的卵母细胞在体内外难以与精子发生精卵融合。采用胞质内受精的方法(ICSI)把精子注射到取自 CD9 缺陷型的小鼠的卵母细胞中,受精卵能够发育,这种方法表明 CD9 缺陷的卵母细胞受精后能发育成合子。尽管成功率很低,但 CD9 缺陷型雌鼠才用此种受精方法产下了正常后代。延长 CD9 缺陷的卵母细胞和精子的培养时间似乎增加融合的成功几率。以上研究以及超四家族所形成胞膜多蛋白复合体中各种成分相互进行功能调节,均说明 CD9 可能与一些其他的因子对精卵融合有协同作用。

根据多蛋白质复合体的观点,CD9 可能是精子

收稿日期:2004-11-23 修回日期:2004-12-29

* 通讯作者,电子信箱:bcm818417@yahoo.com

结合的功能分子和促进精卵融合的分之间的连接蛋白。抗 CD9 抗体对精卵结合的影响还未搞清楚。一些报道证明该抗体仅抑制精卵的融合,用 CD9 抗体处理去除透明带的卵母细胞,其结合配体的水平降低。精子中的繁殖因子 α 、繁殖因子 β 和 cyritestin 因子与卵细胞表面结合受阻^[8]。虽然 CD9 缺陷和用抗 CD9 抗体处理的卵母细胞有何差异还不清楚,可以确定 CD9 干扰了整合蛋白 $\alpha 6$ 与多蛋白复合体 CD9 间的吸附力。除了采用抗体处理外,还可用重组卵母细胞胞外的 CD9 大环(LEL)处理鼠卵母细胞,导致精卵融合率降低,这种处理方式对精子无影响^[9]。这一发现表明在卵母细胞表面上完整的 CD9 中 LEL 含量与一些分子之间存在交互作用,这对精卵融合是必要的,由于重组 LEL 和内生的 CD9 分子与作用因子的竞争使这种互作不稳定。值得注意的是,来自老鼠 CD9 分子的 LEL 仅抑制了精卵融合,但是来自人的 CD9 分子的 LEL 即能抑制精卵结合又能抑制精卵融合^[10]。造成这种差异的原因难以解释,可能人和小鼠的这种嵌合体组成不同导致其识别的功能区不同。

注射 CD9 mRNA 可以弥补 CD9-缺陷型鼠卵母细胞 CD9 含量的不足。应用这个方法^[11],确定了小鼠精卵融合过程中 CD9 的功能区。在 CD9 的第二个环中,174 位(F 突变为 A)的一个点突变和 173-175 位氨基酸残基(SFQ 突变为 AAA)的突变,被突变的 CD9 mRNA 拯救 CD9 缺陷卵母细胞融合性的能力被显著降低了。这些特殊的氨基酸位点对 CD9 功能区很重要。研究结果表明 CD9 与人的 CD81 有相同的功能区,CD81 也属于四超家族蛋白,其是 HCV 的关键结合位点^[12]。人的 CD81 作为 HCV 的受体,186 位的苯基丙氨酸对 HCV 结合是必需的位点。其他物种的四超家族与 CD81 在这一位点缺乏苯基丙氨酸,故无精卵结合的能力。人的 CD9 能完全恢复 CD9 不足的鼠卵母细胞与精子结合的能力,鼠 CD81 能部分拯救卵母细胞的融合性,尽管人 CD9 分子和鼠 CD81 分子中与小鼠 CD9 分子中 SFQ 相对应氨基酸分别为 TFT 和 TPL。可能由于此区域位于四超家族第二个环的胞外结构上,CD9 在卵母细胞膜上的这一区域与其他的分子交互作用可能对精卵有效融合是必要的^[13]。

2 卵锚定蛋白 GPI

除了 CD9 不足的卵母细胞之外,磷脂酰肌糖 A

(PIG-A)缺陷型小鼠的卵母细胞精卵融合率明显降低。GPI 锚定蛋白是一类通过其羧基末端的糖基化磷脂酰肌醇结构锚定于真核细胞膜表面的蛋白。细胞中存在很多此种蛋白,它们是包括各种功能的细胞表面蛋白,如酶、受体、粘附分子、特异性抗原等,起着免疫识别、补体调节及跨膜信号转导等重要作用。PIG-A 基因编码 N-乙酰葡(萄)糖胺转移酶(参与 GPI 的生物合成第一个步的酶)的亚单位^[14]。用磷脂酰肌醇磷脂酶 C(PI-PLC)处理卵母细胞,研究表明卵母细胞特异性锚定蛋白(GPI)参与精卵交互作用^[15]。导致两种 GPI 锚定蛋白(35-45 kDa 和 70 kDa)的释放和精卵结合率降低以及精卵融合受阻。完全缺乏 PIG-A 会造成胚胎的死亡。因此卵母细胞 PIG-A 缺陷小鼠(由 Cre-loxP 系统基因敲除制作),在卵母细胞特异启动子 ZP3 的调控下表达 Cre-肌醇,这种小鼠自然交配后,有 1.3% 正常细胞成功地进入二细胞阶段正常受精,而有 83% 的野生型雌小鼠卵母细胞正常受精并发育。在 PIG-A 缺陷卵母细胞卵周隙中发现多个精子,CD9 缺陷的雌鼠交配后也有多精子入卵。去卵母细胞透明带的体外受精实验表明,与野生型小鼠卵母细胞相比,PIG-A 缺陷的卵母细胞的受精率($\sim 10\%$)和精子结合率($\sim 60\%$)均较低。这一个结果证明 GPI 锚定蛋白在精卵细胞融合中的作用比精卵结合作用重要。用 PI-PLC 处理卵母细胞能释放出一种 GPI 锚定蛋白 CD55^[16]。分子量为 70 kDa,CD55-缺陷的小鼠有正常的生殖能力^[17]。阐明 PIG-A 缺陷表型机制,及这些蛋白与 CD9 之间的交互作用机制,首先必须弄清 35-45 kDa 的 GPI 锚定蛋白(其含量很低难以检测到)的特性,这有助于观察这些蛋白与 CD9 之间的交互作用。

3 精子 DE 蛋白

在精子表面表达的 DE 附睾蛋白/半胱氨酸分泌蛋白 1(CRISP1)参与精卵融合,DE 最初由大鼠附睾的近位片段合成,在附睾转运精子过程中 DE 定位与精子表面^[18]。许多研究结果说明 DE 参与了精卵融合过程。在顶体反应之前,DE 定位于大鼠精子顶体的背侧区域随后迁移到近赤道段精卵融合部位^[19]。多克隆抗 DE 抗体能有效地阻止精子与去透明带卵母细胞融合,但不会改变精子活性及与卵子结合的能力。除了减数分裂纺锤体区外,纯化的 DE 蛋白可与卵母细胞表面的任何其他

部位相结合,这说明 DE 能够启动精卵融合过程。

小鼠附睾蛋白 AEG-1/CRISP-1 与大鼠 DE 蛋白有 70% 的同源性。被大鼠抗 DE 抗体识别的蛋白位于精子顶体的背侧区域,虽然不清楚他们是否就是 AEG-1,小鼠卵母细胞也有与大鼠卵母细胞相似的 DE 结合位点^[19]。此外,大鼠抗 DE 抗体能降低小鼠精子穿透力,但并不改变其与小鼠卵子结合的能力。人的顶体蛋白 ARP/hCRISP-1 与大鼠 DE 蛋白有 40% 同源性,这种蛋白位于人精子上,抗-ARP 抗体能显著地降低精子穿透仓鼠卵母细胞的能力,而不改变精子存活率、活力及与卵子结合力,因此可用这种抗体检测人精卵融合的能力^[20]。

4 精子 ADAMs 因子与卵母细胞整合蛋白

发现 CD9 精卵融合中的功能以前,多数研究主要集中在精子中的繁殖因子上。繁殖因子 α 、繁殖因子 β 和 cyritestin 均是 ADAM 家族的成员,分别是 ADAM1、ADAM2 和 ADAM3,均有整合裂解酶功能域和金属蛋白酶功能域。最初繁殖因子 β 被认为是一种抗精子抗体 mAb PH-30 识别的抗原,这种抗体能抑制豚鼠卵母细胞受精能力,与繁殖因子能形成异源二聚体^[21]。繁殖因子除了有一个能和卵母细胞整合的功能域还有一个氨基酸序列-融合肽序列。融合肽符合多肽结构:有锚定于膜上的亚单位;强疏水性;其结构模型是一侧是有较多疏水残基的结构的内螺旋,另一侧是带正电的氨基酸。其与病毒融合肽具有相同的特性,病毒融合肽在病毒粒子与靶细胞融合过程中表现出其穿透性^[22]。因此,精子的 ADAMs 家族有可能在精卵结合和融合过程有重要作用。

ADAMs 的功能是在抗体肽和孤立蛋白作用下进行体外受精过程中发现的,在小鼠卵母细胞膜上能检测到 cyritestin 的重组形式,这种重组体能抑制精卵结合,导致受精率降低。除了体外受精,将这些特异性基因敲除的小鼠行业能证明精子 ADAMs 家族参与了精卵互作。例如,繁殖因子 β 缺陷型的小鼠精子与卵膜结合的能力显著降低(80%),很少的一部分精子能与卵母细胞结合。无 Cyritestin 的精子虽然有正常的融合力,但其与卵子结合力却明显降低^[23]。

在卵母细胞表面有精子 ADAMs 家族的受体即整合蛋白,它已成为用于研究影响精卵互作的候选基因。在整合蛋白家族中最活跃的成员是 6 β 1。

GoH3 是整合蛋白 6 亚单位功能受阻单克隆抗体,能抑制精卵结合与融合, β 整合蛋白裂解蛋白的部分或全部肽功能域能与整合蛋白 6 β 1 结合^[24]。然而,6 β 整合蛋白在精卵交互作用中的作用有争议,在不同条件用 GoH3 mAb 研究其抑制作用,并没有证明对交互作用的阻断。

5 结论与展望

尽管精卵融合是触发个体发育的重要过程之一,但由于条件有限及膜蛋白质-蛋白质间分析的难度,因此不能完全阐明其分子机制。最近的研究结果表明,CD9 与一些其他因子对精卵融合有协同作用;卵母细胞表面上 CD9 中 LEL 的含量与一些分子之间存在交互作用,对精卵融合很重要;确定卵母细胞特异的 CD9 相关分子的作用有助于阐明精卵融合的机制。GPI 锚定蛋白在精卵融合中的作用要比在精卵结合中重要。精子的 ADAMs 家族也在精卵结合与融合中发挥重要作用。如要弄清这些结合蛋白的作用机制,必须先搞清卵母细胞上附睾蛋白 DE 的受体—GPI 锚定蛋白(35 - 45kDa)及其特性。深入研究将特异性基因敲除的小鼠生殖状况并分析蛋白因子的互作,有利于弄清精卵结合及其融合的分子机制。

参考文献

- [1] Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. Cellular and Molecular Life Science, 2001, 58: 1189 ~ 1205
- [2] Seigneuret M, Delaguardie A, Lagaudriere-Gesbert C, et al. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 40055 ~ 40064
- [3] 严泽军. MRP21/CD9 与膀胱癌的关系, 国外医学泌尿系统分册, 2004, 24(4): 448 ~ 450
- [4] Chen M S, Tung K S, Coonrod S A, et al. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: implications for murine fertilization. PNAS, 1999, 96: 11830 ~ 11835
- [5] Kaji K, Oda S, Shikano T, et al. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. Nature Genetics, 2000, 24: 279 ~ 282
- [6] Miyado K, Yamada G, Yamada S, et al. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. Science, 2000, 287: 321 ~ 324
- [7] Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, et al. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. Science, 2000, 287: 319 ~ 321

- [8] Chen M S, Tung K S, Coonrod S A, et al. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: implications for murine fertilization. PNAS, 1999, 96 : 11830 ~ 11835
- [9] Zhu X, Evans J P. Analysis of the roles of RGD-binding integrins, $\alpha 4 \beta 1 / \alpha 9 \beta 1$ integrins, $\alpha 6 \beta 1$ integrins, and CD9 in the interaction of the fertilin beta (ADAM2) disintegrin domain with the mouse egg membrane. Biology of Reproduction, 2002, 66 : 1193 ~ 1202
- [10] Higginbottom A, Takahashi Y, Bolling L, et al. Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 311 : 208 ~ 214
- [11] Zhu G Z, Miller B J, Boucheix C, et al. Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. Development, 2002, 129 : 1995 ~ 2002
- [12] Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. Science, 1998, 282 : 938 ~ 941
- [13] Seigneuret M, Delaguerre A, Lagaudriere-Gesbert, C et al. Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 40055 ~ 40064
- [14] Tiede A, Nischan C, Schubert J, et al. Characterisation of the enzymatic complex for the first step in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2000, 32 : 339 ~ 350
- [15] Coonrod S A, Naaby-Hansen S, Shetty J, et al. Treatment of mouse oocytes with PI-PLC releases 70-kDa (pI 5) and 35- to 45-kDa (pI 5.5) protein clusters from the egg surface and inhibits sperm-oolemma binding and fusion. Developmental Biology, 1999, 207 : 334 ~ 349
- [16] Alfieri J A, Martin A D, Takeda J, et al. Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. Journal of Cell Science, 2003, 116 : 2149 ~ 2155
- [17] Sun X, Funk C D, Deng C, et al. Role of decay-accelerating factor in regulating complement activation on the erythrocyte surface as revealed by gene targeting. PNAS, 1999, 96: 628 ~ 633
- [18] Kohane A C, Cameo M S, Pineiro L, et al. Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. Biology of Reproduction, 1980, 23 : 181 ~ 187
- [19] Rochwerger L, Cuasnicu P S. Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation. Molecular Reproduction and Development, 1992, 31 : 34 ~ 41
- [20] Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers B J. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biology of Reproduction, 1976, 15 : 471 ~ 476
- [22] Blobel C P, Wolfsberg T G, Turck C W, et al. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. Nature, 1992, 356 : 248 ~ 252
- [22] De Parseval A, Lerner D L, Borrow P, et al. Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. Journal of Virology, 1997, 71 : 5742 ~ 5749
- [23] Nishimura H, Cho C, Branciforte D R, et al. Analysis of loss of adhesive function in sperm lacking cyritestin or fertilin beta. Development Biology, 2001, 233 : 204 ~ 213
- [24] Almeida E A, Huovila A P, Sutherland A E, et al. Mouse egg integrin $\alpha 6 \beta 1$ functions as a sperm receptor. Cell, 1995, 81 : 1095 ~ 1104

The Mechanism of Sperm-oocyte Fusion in Mammals

BI Cong-ming^{1,2} PENG Shu-ying² CAO Jun-wei^{2,3} WANG Shen¹

(1 Department of Veterinary Medicine, Jinzhou Medical University Jinzhou 121001, China)

(2 Institute of Bio-Engineering, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry Yang Ling 712100, China)

(3 College of Biotechnology, Inner Mongolia Agricultural University Huhhot 010018, China)

Abstract Recent studies involving gene targeting have clearly demonstrated the various molecules that are involved in sperm-oocyte binding and fusion. Sperm ADAMs (family of proteins with a disintegrin and metalloprotease domain), including fertilin α , fertilin β and cyritestin, have been investigated and found to be important for binding rather than for fusion and painstaking studies have raised suspicions that their putative receptors, oocyte integrins, are necessary for the sperm-oocyte interaction. Recently, several studies have focused the spotlight on CD9 and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins on oocytes, and epididymal protein DE on sperm, as candidate molecules involved in sperm-oocyte fusion. Lack of, or interference with the function of, these proteins can disrupt the sperm-oocyte fusion without changing the binding. The candidate molecules involved in the sperm-oocyte interaction suggested from the recent progress in this research field was highlighted.

Key words Sperm-oocyte fusion Mammals CD9 DE ADAMs GPI