

哺乳动物的受精

韩之明 孙青原

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室 北京 100101)

摘要 受精是单倍体配子(精子和卵子)融合产生新生命的过程,是有性生殖个体发育的起点。根据动物种类的不同,受精可以发生在体内,也可以发生在体外。它一方面恢复了染色体双倍体数目,保证了双亲的遗传作用;另一方面,受精可以把生殖细胞通过减数分裂同源重组获得遗传物质变化和个体发生过程中产生的变异遗传下去,保证了物种的遗传多样性,在生物进化上具有重要意义。

关键词 哺乳动物 受精

中国图书分类号:Q132.1 文献标识码:A

1 受精的概述

受精现象的发现最早始于1875年和1876年,是由 Hertwig 和 Fol 分别在海胆中观察到的。由于哺乳动物受精发生在体内,很难得到大量卵子,不易进行研究,对哺乳动物的受精研究工作起步较晚。19世纪末到20世纪中叶,很多人进行过哺乳动物体外受精的实验,然而哺乳动物的体外受精研究真正发展是在 Austin 和美籍华人张明觉于1951年发现精子获能(capacitation)现象以后。2位科学家几乎同时在大鼠和兔中发现,精子必须在雌性生殖道内滞留一段时间才能获得受精的能力。从精子获能现象发现后大约20年,即70年代初开始,人们实现了哺乳动物精子的体外获能,使哺乳动物的体外受精更易操作。1978年,Stepstone 和 Edwards 利用体外受精技术成功地获得第1例试管婴儿,使体外受精成为造福于人类的技术,此后又建立了显微授精技术,使少精症和无精症患者可以得到后代。到目前,全世界已有数百万不育夫妇通过体外受精技术获得了后代。此外,体外受精也已应用于畜牧业生产当中。

受精涉及到精子和卵子之间多步骤、多成分的相互作用。就哺乳动物而言,受精包括精子获能、精子识别卵子透明带(zona pellucida, ZP)及发生顶体反应(acrosome reaction, AR)、精子穿过透明带、精卵质膜发生结合和融合、卵子的激活及第二极体的排放、雌雄原核的形成及融合等多步骤的复杂过程。

2 精子获能

精子获能是哺乳动物精子在受精前必须经历的一个重要阶段,是指精子获得穿透卵子能力的

生理过程。哺乳动物的精子在附睾内已经获得了运动能力,但由附睾分泌的一种物质附于精子表面,抑制了受精能力,这种物质被称为去能因子。精子进入雌性生殖道以后,去能因子的作用被解除,精子才具有真正的受精能力,这就是精子获能,能够解除去能因子的物质称为获能因子。精子获能过程中,发生了一系列的变化,包括膜流动性增加、蛋白酪氨酸磷酸化、胞内cAMP浓度升高、表面电荷降低、质膜胆固醇与磷脂的比例下降和游动方式变化等。通过精子获能,可以去除精子表面的覆盖物,暴露出精子膜表面与卵子相识别的位点,精子获能后,精子头部出现流动性不相等的区域,为精子膜与顶体膜融合做好准备,精子顶体后区膜的流动性加大,为与卵膜结合做准备。

3 精子识别卵子透明带、顶体反应及穿过透明带

低等动物和高等动物生殖细胞的结构和受精过程存在较大的差异。大多数哺乳动物的卵子在排卵时并没有完成减数分裂,而是处于第2次减数分裂的中期(MII期)。MII期的卵子周围由2层成分包围,一是透明带,它是由生长期的卵母细胞分泌的非细胞成分,由ZP1、ZP2和ZP3 3种糖蛋白组成;其二是卵丘细胞层,它是由卵丘细胞(cumulus cell)和细胞间富含透明质酸的非细胞成分组成。精子与卵子间的识别和结合是通过精子表面的卵子结合蛋白(egg-binding protein)与卵子ZP表面的精子受体(sperm receptor)相互作用而实现的。精卵之间的识别和结合发生在卵子透明带上,精子与卵子透明带之间的识别分为初级识别和次级识别。未发生顶体反应的精子与透明带

之间首先发生初级识别,诱发精子顶体反应;顶体反应后的精子与 ZP 发生次级识别。顶体反应释放出许多水解酶类,在透明带上溶解出一条通道,借助精子本身的运动,穿过透明带。

在精子与卵子透明带的相互作用中, β -1,4-半乳糖基转移酶 I(GalT I)是最早报道的卵子结合蛋白。GalT I 与 ZP3 寡糖链识别并结合可使精子表面 GalT I 聚集,激活耦联的 G 蛋白,引发精子发生顶体反应。但是 GalT 缺失的精子仍然可以与卵子透明带结合,提示精卵结合过程中存在其他不依赖于 GalT-ZP3 的结合机制。卵子表面成分作为精子表面受体的配体,起着信号分子的作用,实现精卵识别,诱发精子顶体反应。研究表明,ZP3 作为精子受体在精卵识别、诱发顶体反应过程中起重要作用,也对精卵结合后下游信号通路的调节起重要作用。精卵之间的相互作用具有种特异精卵质膜的融合。当一种哺乳动物的卵子在体外与另一种哺乳动物的精子相互作用时,精子很少能与透明带结合而穿过透明带。但是,在很多情况下,去掉卵子周围的透明带,异种之间的受精屏障随之消失。例如,人精子在体外不能与仓鼠卵子 ZP 结合,而当把 ZP 去掉后,人精子就可穿入仓鼠卵。因此,大多数情况下,透明带是阻止种间受精的主要屏障。

精子头部前端与卵子透明带接触以后,通过受体-配体的相互作用,顶体外膜与精子质膜发生融合,释放顶体内的水解酶类,这一胞吐过程称为顶体反应。顶体反应释放的水解酶类消化透明带,使精子穿过透明带而到达卵子表面,并使卵子受精。只有获能精子才能与卵子透明带相互作用而发生顶体反应。精子顶体反应的发生是通过精子膜蛋白与卵子透明带上糖蛋白间的相互识别完成的。精子与卵子之间这种蛋白-糖的结合以及进一步的蛋白-蛋白的结合通过跨膜信号传导引发精子内部一系列快速的生理生化反应,如离子浓度、蛋白磷酸化水平、环磷酸腺苷(cAMP)浓度的改变等,从而使得 Ca^{2+} 水平上升,pH 下降,最终导致顶体反应的发生。

除了透明带以外,孕酮也是精子顶体反应的自然诱导物。孕酮可以诱导精子细胞内发生顶体反应所需的信使分子如二酰基甘油(DAG)等。 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid,GABA)与孕酮有相似的作用。孕酮很可能通过作用于精子的 GABA 受体而引

发精子的顶体反应。有人提出,在正常生理条件下,孕酮可能与透明带协同作用,引起精子顶体反应的发生。在体外,可用溶解的透明带或钙离子载体 A23187 处理诱发获能精子发生顶体反应。

4 精子与卵质膜结合和融合的分子基础

精子发生顶体反应穿过透明带以后,很快到达卵质膜表面,并与卵质膜结合并融合,整个精子(连同尾部)进入卵子。在大多数情况下,首先精子头的尖部与卵子质膜接触,随后精子头侧面附着在卵子质膜上。精子与卵质膜的作用至少涉及到 2 个主要步骤,即结合和融合。精卵之间的结合可发生在精子膜的任何区域,包括顶体内膜。因此,精卵结合属于非特异性的细胞间相互作用。与精卵结合相比,精卵融合要求比较严格,需一定的温度、pH 和离子条件。精卵结合和融合是 2 个截然不同的过程,可能涉及到不同的分子。生理性结合,即粘附(adhesion)是精卵融合的前提。在非哺乳类动物和非真兽类哺乳动物,精子的顶体内膜与卵子质膜融合;而在真兽类(胎盘类)哺乳动物,一般认为,参与精卵融合的是精子头部赤道段的质膜。精子的顶体反应对精卵融合却是必不可少的。没有发生顶体反应的精子不能与卵质膜融合。这说明,顶体反应不仅对精子穿过透明带是必要的,在顶体反应过程中,精子质膜蛋白质的迁移和变化构成精卵融合的分子基础。此外,精子运动有助于精子穿过卵丘和透明带,但对精卵质膜的融合而言,精子运动并不是必要的。精卵质膜融合不像精子与卵子透明带作用时具有严格的种特异性。例如,几乎所有动物的精子均可穿入金黄仓鼠的卵子,小鼠的精子可穿入多种动物去透明带的卵子。但是,精卵融合还是具有一定的种特异性,而这是由参与融合的蛋白特异性决定的。例如,金黄仓鼠的卵子最容易与同种精子融合,小鼠的卵子质膜只允许同种精子穿入,豚鼠的精子更易与同种卵子融合,狗的精子不能与仓鼠卵融合等。

卵质膜上参与精卵相互作用的分子包括整合素(integrin)、糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白(glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein,GPI-anchored protein)、膜蛋白 CD9 和 CD81 等。其中 CD9 是第 1 个被发现的与精卵质膜融合直接相关的分子,CD9 是 4 次跨膜蛋白(tetraspanin)超家族成员,这种蛋白不仅能在同类分子间而且还能与膜上其他分子相互作用,从而形成广泛的分子协同网络。

精子中参与膜融合的蛋白分子包括去整合素金属蛋白酶(ADAM)家族成员、Izumo、DE/CRISP蛋白和赤道素(equatorin)等。Izumo 是第1个被证实与精卵质膜融合相关的关键精子蛋白,它的发现被认为是生殖生物学研究领域的一个重要突破。Izumo 在新鲜精子无法测出,但出现在顶体反应后的精子膜上,说明 Izumo 可能存在于顶体内膜,在顶体反应后才暴露。研究表明,Izumo 的缺失可特异性地抑制精卵质膜的融合过程,但不影响精卵融合后的发育过程。这一研究说明,顶体内膜也可能参与精卵质膜的融合。

5 卵子激活

在大部分脊椎动物中,未受精的卵母细胞被细胞静止因子(cytostatic factor,CSF)阻滞在MII期。CSF首先是在两栖类发现的。把MII期卵子的细胞质移入2-细胞胚胎中的一个卵裂球中,注射的卵裂球停滞在分裂中期,而没有注射的卵裂球继续分裂。采用细胞融合技术,在小鼠也证实了同一现象。多年前已发现c-mos基因的产物具有CSF的活性,近年的研究证明,内源性减数分裂抑制剂2(Emi2)是后期促进复合体(anaphase-promoting complex,APC)的抑制分子。Mos和Emi2都是CSF的重要组成部分,是诱导MII期阻滞的必要成分,Mos通过下游的蛋白激酶将Emi2磷酸化,从而促进Emi2的稳定性和活性,两者协同作用,抑制了APC,把未受精的成熟卵子阻滞在MII期。

精子入卵使“休眠”的卵子复苏,启动一系列生化事件的发生、代谢的变化和减数分裂的完成,最终导致细胞分裂、分化和新的生命个体的诞生。卵子的这种复苏过程被称为卵子激活(activation)。精子入卵引起卵胞质内Ca²⁺浓度上升(Ca²⁺振荡),升高的Ca²⁺水平激活了钙/钙调依赖性激酶II(Calcium/calmodulin-dependent kinase II, CaMKII),此外,高的Ca²⁺水平使Emi2迅速降解,恢复活性的APC可以降解Cyclin B和使Cdc2失活,从而破坏了CSF诱导的MII期阻滞,实现中期到后期的转化。精子引发卵胞质内Ca²⁺浓度上升的机制一直没有定论,长期以来存在2种假说:第一种是精子因子假说,该假说认为是精子与卵质膜融合后精子将可溶性因子释放到卵胞质中,从而引起Ca²⁺浓度的上升;另一种是受体控制假说,该假说认为是精子与卵子质膜表面的受体相互作用,活化的受体

激活与之相偶联的G蛋白或酪氨酸蛋白激酶,从而引发级联反应。对哺乳动物精子特异性磷脂酶C亚型(PLC ζ)诱发了卵胞质中Ca²⁺浓度上升的发现,使精子因子假说得到了更多人的认可。

6 卵子皮质反应及多精受精的阻止

鸟类、鱼类及许多无脊椎动物是多精受精动物。在正常生理条件下,受精过程中可有多个精子入卵,卵子中形成多个雄原核,但最终只有1个雄原核与雌原核结合,完成正常的胚胎发育,而其他雄原核在发育中途退化。胎盘类哺乳动物是单精受精动物,受精时只需1个精子入卵,以保证合子重新恢复二倍体。如果1个以上精子入卵,通常会导致胚胎发育异常或发育阻滞,最终夭折。在人类,尽管有三倍体和四倍体婴儿出生的报道,在绝大多数情况下多精受精会导致自然流产。并且,多倍体婴儿通常有严重的缺陷或功能异常。与其他动物相比,猪的多精受精率很高,体内多精受精率可达30%~40%,而体外多精受精率可高达65%。研究表明,猪卵母细胞质具有一定的清除多余精子的能力,多精受精的卵子中有多个雄原核形成,但如果多余的精子不干扰正常的雌雄原核结合,胎儿能发育到期。当有多个雄原核与雌原核结合时,可形成二倍体、三倍体、四倍体胎儿,甚至有的胎儿中既有二倍体细胞,也有四倍体细胞,但生下来的小猪中未发现多倍体现象。绝大多数情况下,哺乳动物受精时,只有1个精子入卵。阻止多精受精的机制主要有2种。一种机制是雌性生殖道的初步筛选。尽管哺乳动物一次射出的精子数量可达数千万甚至上亿个,但最终通过生殖道达到受精部位的精子数量很少,通常精子数与卵子数比例不超过10:1,只有那些活力相当好的获能精子才能到达受精部位。例如,小鼠一次排精大约5千万个左右,但真正到达输卵管受精部位的仅有100~200个。阻止多精受精的另一个机制是卵子本身具有强烈的阻止多精受精的能力,皮质颗粒参与了阻止多精受精。精子穿入卵子后,卵子皮质颗粒的内容物很快释放到卵周隙中,使透明带硬化,精子受体失活(透明带反应);与此同时,精子膜与卵质膜融合,皮质颗粒膜也与卵质膜融合,也改变了卵质膜的性质(卵质膜反应),从而达到阻止多精受精的目的。

7 精子核去浓缩及雄原核形成

在哺乳动物受精过程中精子入卵后,精子核直接与卵胞质作用,发生核膜破裂,精子染色质去浓缩;与此同时,卵母细胞恢复减数分裂,排出第二极体。随后在去浓缩的雄染色质周围进行核膜重建,最后形成雄原核。哺乳动物的圆形精子细胞核的组蛋白在完全被精子特有的鱼精蛋白取代后,染色质变得高度浓缩,形成精子,这就是精核浓缩化的过程。这种独特的浓缩包装方式保护了精核染色质,使得精子基因组处于无转录活性状态。在受精过程中精子核的去浓缩过程与精子发生精核浓缩化的过程相反。精子特有蛋白被卵源组蛋白替代的过程与精子核的去浓缩过程是相关联的。精子染色质在卵内去浓缩的过程是受精后精子DNA参与胚胎发育的关键。在原核形成时,内质网可能参与了核膜的组建,精子的核膜和其它膜性成分也可能参与雄原核核膜的形成。

8 受精过程的中心体遗传

一般情况下,中心体中央含有1对中心粒,周围由无定形物质组成,从无定形物质伸出微管束。目前明确的中心体组成蛋白有100多种,其中主要的功能蛋白有 γ -微管蛋白(γ -tubulin)、中心体蛋白(centrin)和核有丝分裂器蛋白(Nuclear mitotic apparatus protein, NuMA)等。在大多数哺乳动物配子形成过程中,精子保留了1个中心粒但失去了大部分中心体周蛋白,反之,卵母细胞失去中心粒,但保留了大部分中心体周蛋白。受精后,2个配子的中心体组分彼此互补,形成1个中心体在胚胎发育过程中行使功能。但小鼠的情况有所不同。受精前小鼠卵母细胞中有许多(约16个)星体微管结构。有研究表明,小鼠MII期卵母细胞中非纺锤体微管组织中心来自卵母细胞减数分裂成熟过程中的中心体。在小鼠成熟精子中,没有发现中心粒;精子入卵后,也不形成精子星体结构。这些事实说明,小鼠中心体是母方遗传的。受精后卵子胞质中的星体,负责原核的相互靠近。大多数动物的情况与小鼠不同。例如,牛、羊、兔和人卵子胞质中没有微管组织中心。精子进入卵子后,在精子颈部区域形成1个微管星体结构,并随着原核生长及迁移而增大。超微结构观察显示,羊精子入卵后,在形成的2个原核之间,从精子颈部区域的近端中心粒衍生出放射排列的微管,中心粒位于第1次有丝分裂纺锤体的一极。利用电镜观察和抗微管免疫荧光标记等方法证明,兔受精后微管的

组织发生在精子头的基部。在对猪体外受精过程中中心粒的遗传机制的研究中发现,精子中心粒在受精后即被进一步降解,直到囊胚期才重新出现,是来源于卵母细胞和精子的中心体周蛋白(主要是 γ -微管蛋白)形成的微管组织中心在早期胚胎分裂过程中组织纺锤体形成。在大多数哺乳动物(除了灵长类)早期胚胎分裂过程中纺锤体的形成是不需要中心粒参与的,可能是MTOCs中具有微管成核功能的 γ -微管蛋白起了主要作用。

哺乳动物受精生物学的研究开展几十余年来,已经积累了大量的研究成果,随着先进研究手段在受精生物学研究中的应用,对受精过程的各个步骤的生理生化以及分子生物学机制的研究正在进一步地开展,将使我们对哺乳动物受精过程及机理有更深入的了解。

主要参考文献

- 1 陈大元,孙青原,李光鹏.受精生物学-受精机理与生殖工程,北京:科学出版社,2000.
- 2 张天荫.动物胚胎学.济南:山东科技出版,1996.
- 3 秦鹏春.哺乳动物胚胎学.北京:科学出版社,2001.
- 4 Bavister B.D. Early history of in vitro fertilization. *Reproduction* 2002,124:181—196.
- 5 Breitbart H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187: 139—144.
- 6 De Blas G., Michaut M., Trevino C.L., Tomes C.N., Yunes R., Darszon A., Mayorga L.S. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem*, 2002, 277:49326—49331.
- 7 Primmakoff P., Myles D.G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, 2002, 296: 2183—2185.
- 8 Sun Q. Y. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Micro Res Tech*, 2003, 61:342—348.
- 9 Sun Q. Y., Nagai T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev*, 2003, 49: 347—359.
- 10 Yanagimachi R. Mammalian Fertilization. In Knobil E., Neil JD (eds). *The physiology of Reproduction*, 2nd ed. New York: Raven Press, 1994:178—317.
- 11 Inoue N., Ikawa M., Isotani A. et al. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature*, 2005, 434(7 030): 234—8.
- 12 Litscher E.S., Williams Z., Wassarman P. M. Zona pellucida glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals. *Mol Reprod Dev*. 2009, 76(10):933—941.

(E-mail: hanzhiming@yahoo.com)