

动物受精生物学的近代概念

(二) 哺乳动物精子获能、顶体反应和精卵融合

石 其 贤

(浙江医学研究院)

受精是生物学家饶有兴味的课题。因为受精代表了一类特殊细胞即精子与卵子间的相互作用。当今生物学家使用现代细胞生物学和生物化学的工具来从事受精的研究。受精对广大读者来说也具有—种魅力。基于受精是新生命的开始,又是妊娠的一个重要阶段,加之,现今节育和不育的世界性问题尚未解决,因此,受精的重要性是不言而喻的。当然,受精是一个相当复杂的事件,涉及两性生殖细胞的发育和成熟,精子获能、顶体反应、精卵激活、精子穿过透明带、精卵的相互作用及其融合,雌雄原核的形成及其发育等。大多数哺乳动物的受精地点发生在输卵管里。通常只有 200 个左右精子到达输卵管壶腹部受精地点^[38]。如此少的精子即可发生受精,那末可以推测卵子可产生一种能吸引精子的化学吸引素(chemotaxis)。这在某些无脊椎动物(如水螅)已经证实。然而,对于哺乳动物,这种精卵间的联络系统尚无依据可循。精卵的最终接触可能是一种机遇^[4],以海胆和其他类群所使用的联络方式,即卵子外层包裹物上存在着一些表面活性分子来吸引精子。此

外,精子进入卵子或与卵子结合方式,哺乳动物与其他动物迥然不同。因此,受精过程与生殖的其他方面不同动物不尽一致。本文主要讨论动物精子如何为其受精作准备以及精子与卵子在受精期间如何相互作用诸问题。

一、精子附睾成熟

大多数无脊椎动物(如海胆)和非哺乳动物(如鱼类和两栖类)精子离开睾丸后即具有同卵子受精的能力。而哺乳动物精子离开睾丸时,既不能游动,又无受精能力。只有当精子通过附睾后才获得受精能力,该过程称为精子的**附睾成熟**^[39]。精子在附睾中转运的时间,各种动物不一致。鸟类为 1—2 天。哺乳动物 11—16 天。精子在通过附睾后,在形态、生理及生化方面均发生一系列变化。当精子从附睾头部向尾部迁移时,伴随着胞浆脂滴从精子颈部移向精子尾部中段,绝大部分精子胞浆脂滴在附睾尾部丧失^[4]。随着精子附睾成熟,精子的代谢发生了改变,精子逐渐积累起来的 cAMP 为精子活动提供能量,因而精子获得了前向运动。前

向运动是精子受精能力的重要指标,关系到精子能否通过卵子外层的卵丘细胞。此外,精子质膜表面从附睾分泌物中吸收各种物质,如抗原、糖蛋白和唾液酸等,故引起精子表面分子排列特征的改变,导致某些哺乳动物(如豚鼠和松鼠)精子产生头对头的凝集现象,宛如许多铜钱叠在一起,称为缙线状结构(roureaux)^[5];美洲有袋类精子则以顶体表面以成对方式粘连。但在低离子强度的等渗溶液中,凝集现象就会消失。因此这种凝集不是免疫学上的凝集,可能是与精子表面电荷有关。其确切机制尚不清楚。凝集现象是否代表了精子获能的必要步骤,尚未确定。

二、精子获能

哺乳动物精子在同卵子受精前必须经过获能和顶体反应。精子在雌性生殖道中获得受精能力的过程称为**精子获能**。获能时间各种动物不相同。地鼠精子体外获能需2—3小时,小鼠1小时,大鼠6小时,人7小时^[9]。体外获能是否反映体内的复杂情况,尚不清楚。兔子子宫精子获能可被孕酮抑制,而在输卵管中又可恢复。多数动物精子获能也可被精浆逆转。但在雌性生殖道中又可恢复,因而精子“去获能效应”受到广泛的重视。近年来研究表明,去能因子是一种糖蛋白,分子量大于2000^[9]。精子获能后耗氧量增加,活动类型发生改变,尾部摆动幅度和频率明显增大,呈现一种特殊的高度激活型式活动(hyperactivated motility)^[29]。获能伴随着精子质膜表面蛋白及其吸附物质的丧失和改变,从而引起质膜稳定性降低,而流动性增加。精子获能可能还包括抑制因子或去能因子的去除,以及质膜脂类成分的改变(见图1)。精子获能的本质尚未完全了解。获能后的精子可特异地与透明带上的主要糖蛋白相结合,这种结合被认为是触发精子发生顶体反应,从而使包裹在精子外部的顶体囊泡内容物释放出来^[2]。在释放物中主要是水解酶,它有助于精子穿透。

某些哺乳动物精子可在含白蛋白或其他体

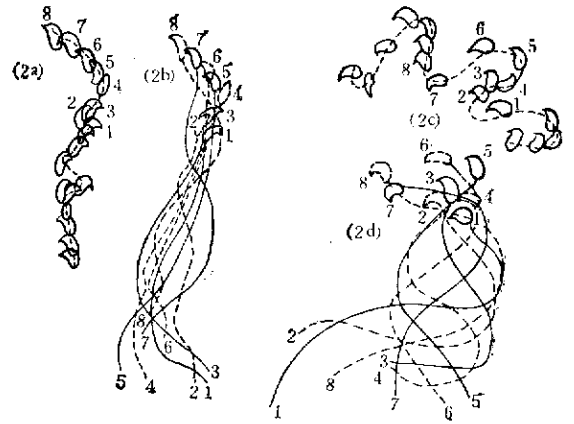


图1 地鼠精子获能前后运动类型的变化
2b和2d 分别为未获能和获能地鼠精子在0.02秒内连续运动位置; 2a和2c 分别为精子头运行的轨迹^[28]

液的人工培养基中获能^[2]。除了葡萄糖、丙酮酸钠和乳酸钠提供精子能量外,白蛋白在精子获能,特别是体外获能中的功用一直未弄清楚。目前虽已提出了一些假设,但仍未完全明了。如,1. 除去或改变包裹在精子表面的一些物质^[30]; 2. 通过脂类交换或水解作用,改变精子脂类成分^[7]; 3. 促进质膜蛋白的水解^[8]; 4. 作为精子甾醇接受器以调节精子脂类水平和传递获能过程^[16]。

三、顶体反应

哺乳动物精子顶体是一个膜性帽状结构,包围着精子核的前端^[10]。顶体分为三部分,即前部、体部和赤道板区(见图2)。细胞化学研究表明,顶体内含物是糖蛋白或糖脂类物质。晚近用生物化学研究证明,顶体类似于溶酶体的结构,含有许多水解酶类。如透明质酸酶、蛋白酶、脂酶、神经酰胺酶和磷酸酶等^[30]。其中以透明质酸酶和顶体素(以顶体素原形式存在)与受精关系最为密切。透明质酸酶可分解卵丘细胞的透明质酸,有助于精子的穿透。顶体素是一种类胰蛋白酶。它与精子穿过透明带及顶体反应有关。关于顶体素酶原在精子顶体部位的分布问题,以前认为它分布于顶体内膜,参与精子穿过卵子透明带。最近发现它分布于顶体腔

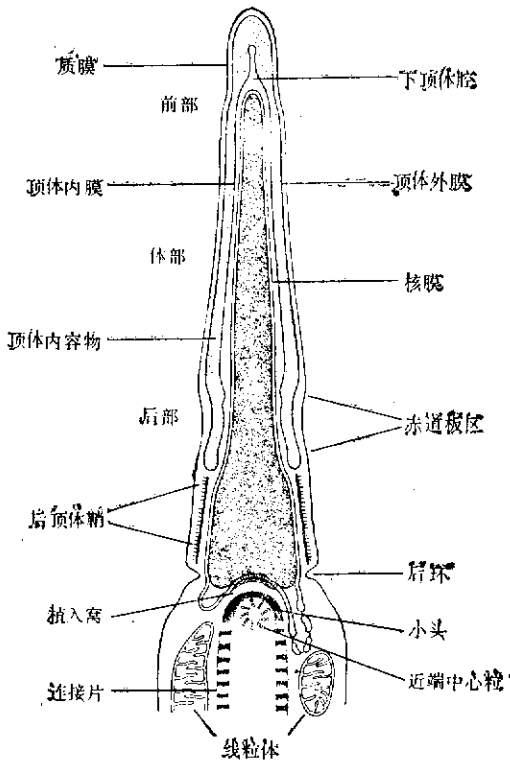


图2 灵长类精子头部纵切面观^[10]

内,是整个顶体的基本组成成分^[21]。顶体反应后,酶原开始被激活,顶体基质破裂,顶体素和顶体基质内容物被释放出来。此时精子头部变成裸露。其反应过程(见图3)。由于精子在穿过透明带前,精子裸头现象已经发生,因而顶体素在受精过程中的确切作用仍未明了。

勃朗(Brown)最近研究了几种动物纯的精子顶体素对卵膜、卵丘细胞和透明带的作用,

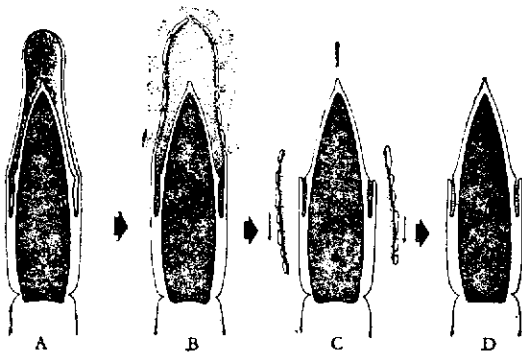


图3 精子顶体反应步骤^[30]

A. 顶体反应前; B. 顶体反应; C—D. 顶体反应完毕。

并检验了纯羊顶体素对绵羊、猪、地鼠、沙鼠和小鼠卵膜的消化能力。绵羊卵膜及猪和沙鼠卵膜具有阻止纯羊顶体素的消化和去除;而小鼠和地鼠卵膜则可被羊顶体素迅速地除去。相反,羊顶体素既不能消化也不能去除绵羊卵膜。纯小鼠顶体素可除去所有小鼠卵膜。这些结果表明,在顶体水解酶类的分散及其与卵膜相互作用,特别是与透明带作用方面,显然存在着种间差异。这些不同可能来自一种复杂的相互作用系统,它们需要协同作用,或许需要几种水解酶(如羊)的先后作用。或者象小鼠是一种简单系统,即单独一种酶的作用就可以满足。

象其他细胞膜融合一样,哺乳动物精子的顶体反应完全是依赖于细胞外 Ca^{2+} 的存在^[29],改变 Ca^{2+} 通透性似乎是引起顶体反应的早期过程,虽然改变 Ca^{2+} 转运机理目前还不了解。豚鼠精子在无 Ca^{2+} 培养中预先孵育 10—16 小时,加 Ca^{2+} 15 分钟后即可引起顶体反应。但在无 Ca^{2+} 培养基中,精子即使预先孵育 16 小时也不能发生顶体反应。某些化合物(如镧)可阻止细胞膜 Ca^{2+} 转运,因而可抑制豚鼠精子的顶体反应。反之,可加速 Ca^{2+} 通过细胞膜的物质,如离子载体^D (A_{23187}) 可促进顶体反应的发生。这些观察表明 Ca^{2+} 在精子顶体反应中起重要作用。

精子膜上的磷脂酶 A_2 ^[41] 和鞘磷脂酶可将膜上的磷脂分解成溶血卵磷脂和脂肪酸,从而参与地鼠和豚鼠精子顶体反应^[23]。某些不饱和脂肪酸,如花生四烯酸甲酯和油酸与膜上的溶血磷脂协同作用,也可促进膜的融合^[26]。

发生顶体反应的分子机理,目前尚未完全阐明。但已有多种假说来解释顶体反应的分子机理。如 Ca^{2+} -ATP 酶激活说^[47] 和磷脂酶激活说^[24]。限于篇幅,仅择一种予以说明。根据梅日尔(Meizel)等的磷脂酶激活说,通过儿茶酚胺、ATP 酶、腺苷酸环化酶和 cAMP 等的传递,使 Ca^{2+} 流入精子的下顶体腔;进入空隙的 Ca^{2+}

1) 离子载体 (ionophore) 是一类脂溶性化合物,它们可与某些金属离子形成复合物,并能携带这些离子通过线粒体膜或细胞膜。

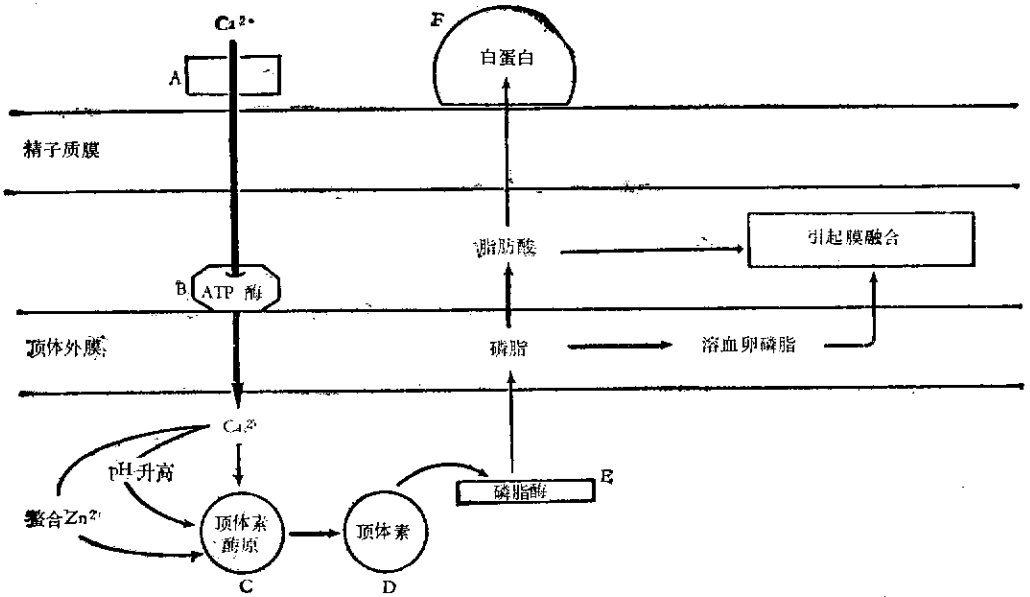


图4 顶体反应的磷脂酶激活说^[24]

可刺激 Ca^{2+} 依赖性 ATP 酶，引起顶体对 Ca^{2+} 摄取增加；并将顶体素酶原转化为生物学上有活性的顶体素； Ca^{2+} 可直接激活顶体素酶原，或提高顶体内 pH 值（由 H^+ 替代）或螯合顶体内 Zn^{2+} ，从而间接激活顶体素酶原；顶体素然后激活磷脂酶，将精子质膜上的磷脂分解为溶血卵磷脂和游离脂肪酸。后者可抑制细胞间的白蛋白吸收磷脂酶（见图 4）。近年来这一假说已得到一些实验支持。如在精子顶体反应前夕，外源性磷脂酶^[27]可将精子质膜上的磷脂转化为溶血卵磷脂和游离脂肪酸。梅日尔和特纳（Turner）证明花生四烯酸和油酸可增加地鼠精子的顶体反应。获能和顶体反应除了 Ca^{2+} 外，尚需 Na^+ ^[22] 和 K^+ ^[22] 的参与。因而可以推测 Na^+-K^+-ATP 酶可能参予精子获能过程^[25]。

四、精卵融合

（一）精卵结合 哺乳动物精卵之间的作用，很可能是通过它们的表面膜蛋白的相互作用所介导。单克隆抗体已被用来检测单个精子表面蛋白，抗原以及确定其特性的重要工具。应用间接免疫荧光方法发现大鼠精子头部存

在着两类不同的抗原，即散在性分布于质膜上的“固定抗原”（fixed-antigens）和整个精子质膜表面的“活动抗原”（motile-antigens），并对抗体引起的抗原决定簇具有易感性。其中一种活动抗原称为 2 B 1，是一种多肽，分子量为 40,000。固定表面抗原位于精子头部，因此，在受精中可能起直接作用。但如何正确区分上述两类抗原尚未完全解决。精卵相互作用见图 5。

卵透明带表面与获能精子质膜上特殊成分之间的结合以及精子穿过透明带也是依赖于 Ca^{2+} 的存在^[14]，故可推测这种结合在质膜上必定存在着精子受体。经过顶体反应的精子是否有受体存在？精子上的何种结构是这种结合基础，均未肯定。然而，在穿透前已丧失顶体外膜的精子不可能在透明带表面上建立一个功能性的结合点。确立精子质膜表面受体及其性质和透明带上的补体成分，是当前受精生物学研究的主要课题之一。

（二）精卵结合的种间差异 人精子在体内外都能穿透长臂猴卵透明带，但它不能与灵长类狒狒或鼠猴的卵透明带结合。啮齿类中的大鼠和地鼠的精子既不能与对方的卵子透明带

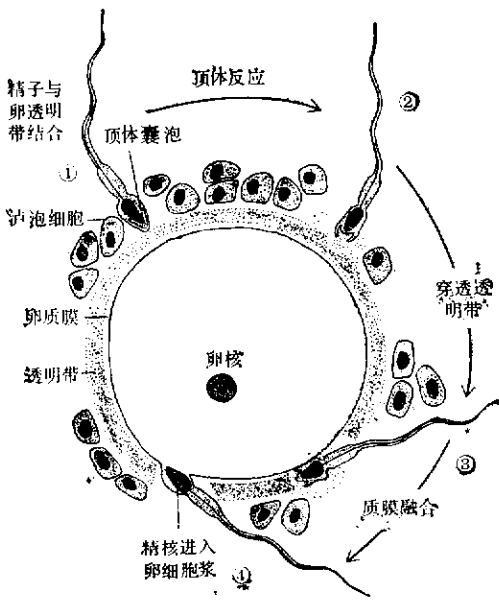


图5 哺乳动物精子与卵子受精时的相互作用^[4]

透明带上的一种糖蛋白是负责精卵结合并引起精子顶体反应。注意精子与卵子质膜相互作用，从而导致精卵融合的发生。这种融合发生在精子两侧而不是精子顶部^[4]。

结合，也不能与它接触，因而不能穿过透明带。但如果用机械或酶学方法将透明带除去，精子便能与卵膜融合，这表明透明带上存在着种族特异性的精子受体^[20]。最近邓巴 (Dunbar) 报道了猪和兔卵透明带上含有三种糖蛋白。沃寒曼 (Wasserman) 等已从小鼠卵透明带上分离和纯化并证明它是精卵的结合成分，其分子量为 83,000，这种受体称之为 2P3。因此，一般认为种族专一性的识别和精子穿透透明带是由透明带上的精子受体决定的。

于是 1976 年 Yanagimachi 首次报道了利用无透明带地鼠卵子的穿透试验来评价人精子的受精能力。利用这种种间系统来衡量上述精子功能，其中最重要的是精子与卵膜融合能力。在超微结构水平上，人精子与地鼠卵膜的融合似乎是同种精卵融合的正确反应。然而，人卵能够与不能穿透地鼠卵子的精子受精的事实提示，在分子水平上，人及地鼠卵膜成分是不同的。此外，人卵与地鼠卵之间明显不同的是前者存在着透明带。因此对于损伤结合或穿透透明带能力的精子，就不能采用该检测系统。可

见鉴定人精子与卵受精能力，无透明带地鼠卵子应当认为是一个不完臻的替代者^[21]。

(三) 精卵融合 精子通过卵丘细胞后，它便以倾斜(约 45° 角)而弯曲的方式向透明带穿透。有时也以垂直于透明带或水平方向穿透。在地鼠精子体外穿过透明带需时约 5—10 分钟，体内穿透时间可能更短，最后在透明带上留下一条狭长孔道，顶体素有助于精子的穿透，有时称它为“透明带穿透酶”，它可以和其他酶协同作用参与穿透过程。精子穿过透明带后，可在围卵腔中作短暂的游泳，然后精子头部便平卧于卵膜上(c-d)。当精子质膜与卵膜融合时，头部即埋入卵子胞浆中(e)。最近电镜研究表明，精卵融合的方式，是精子先以头部的中段与卵膜接触，卵子皮层包围精子头前区部分，继而精子核区被卵膜组成的囊泡吞没。已穿入卵膜的精子，赤道板仍保持着完整性，为顶体具有特殊稳定性提供了依据。精卵融合的确切机理尚不清楚，但在融合开始时，可能涉及到卵子微绒毛的相互作用。此后卵子的皮层颗粒发生崩解反应而消失(c-d)，卵膜收缩(c-f)，开始第二次减数分裂，第二极体排出(f)，精子的整个尾部进入卵膜(如小鼠、大鼠和兔)或部分尾部进入卵膜(如中国地鼠、鼯类)，精子头部发育成为雄性原核。卵子染色体形成雌性原核(f)，核仁出现，并形成一层新核膜，雌、雄原核同步发育(g)。DNA 开始复制，双亲的基因开始翻译并在卵裂期间达到了高峰。在受精期间有少量 RNA 合成，原前核含有少量的 RNA，蛋白质的合成在卵裂前期已经开始发生。当两个配子接近融合时，两个原前核接近对合(但未完全融合)，原前核核仁的核膜破裂，核仁消失，染色体膨胀并迅速地聚集，染色体混合成第一次分裂纺锤体的前中期，受精以卵子分裂成两个分裂球而告终。家兔精子从穿透到第一次卵裂通常需要 12 小时。上述过程见图 6^[4]。

精子表面抗原的单克隆抗体已被用来检验受精精子表面组分的去向。由于精卵质膜的融合，活动表面抗原 2Db 在卵子表面向侧面扩散。在穿透的精子尾部前方，由于抗原扩散形

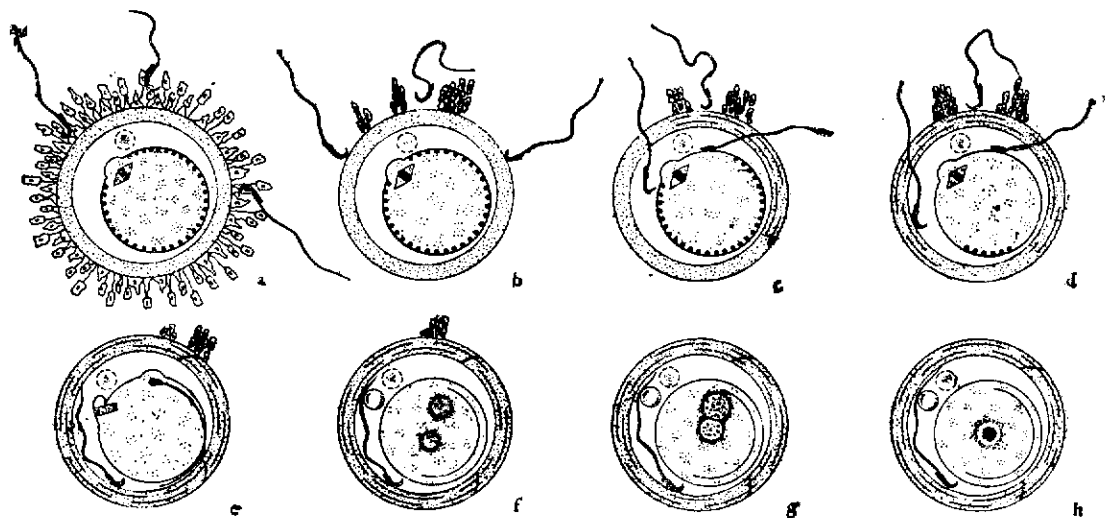


图6 大鼠卵受精阶段(转引自 Austin)

a. 排卵后精子与卵子外层的卵丘细胞接触； b. 精子通过卵丘细胞后与透明带表面结合； c. 精子穿过透明带后附着于卵膜上，并与卵膜融合，卵膜随之收缩，导致围卵腔扩大(排出的皮层颗粒引发了透明带反应)； d. 精子头部开始膨大，第二极体正在排出(在精子进入透明带上留下一条狭长的孔道)； e. 第二极体完全排出，精子染色体膨胀； f. 雌、雄原核形成，卵丘细胞几乎消失； g. 雌、雄原核接近并对合(但未融合)； h. 雌、雄原核染色体在从中期到整个末期有丝分裂纺锤体上排列成一条直线。此即新胚胎将行第一次卵裂的先兆。

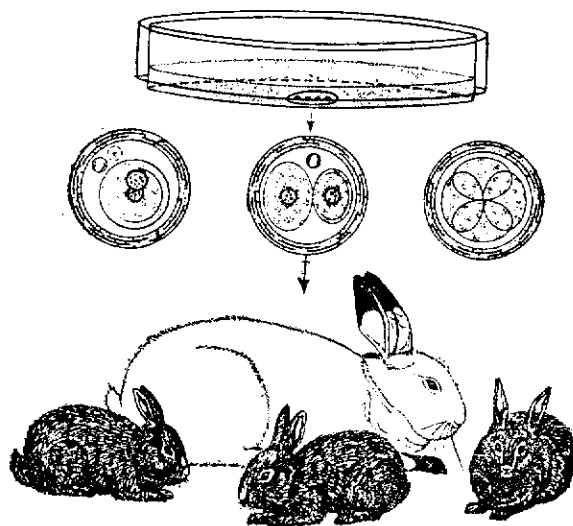


图7 兔体外受精(仔兔的遗传标记)^[63]

成了一个扇形区域，并包围整个卵子达8时之久^[4]。

五、体外受精

哺乳动物卵子的体外受精研究已进行多年，从1959年张明觉将体外受精的兔卵移植到假孕母兔子宫内生下了仔兔，证实体外受精的

成功。此后体外受精在地鼠、小鼠、中国地鼠、猫、豚鼠、大鼠和鼠猴相继获得成功^[9]。

自1979年美国医生爱德华(Edward)报道了世界上第一例试管婴儿成功后，近几年来，由于体外受精和胚胎移植技术和经验的迅速增长，试管婴儿的研究突飞猛进。体外受精技术涉及到内分泌学、细胞学、胚胎学、生殖生物学

和遗传学等诸学科,因而有人提出体外受精是衡量一个国家生物科学发达的水准。到1984年3月底,美国试管婴儿已超过了300例,成功率可达30%以上^[45]。

体外受精需有合适的培养基,分别培养精子和卵子。培养基中各种盐类浓度、渗透压、pH值和温度至关重要。实验条件、精子浓度和成熟的实验技术,对于获得体外受精的成功也十分必要。在液体石蜡及特殊气相(如5% CO₂和95%空气;5% CO₂、5% O₂和90% N₂)也是成功的关键。仔兔的遗传标记(如从一个白兔受体接受卵移植,生下黑仔兔)可供体外受精成功的佐证(见图7)。

六、结 语

近几十年来获得了大量的有关受精机理的资料。受精是个复杂的生物学过程,存在一定的顺序现象,它以双亲配子提供的遗传信息的融合和新生命形成达到高潮。精子在附睾中最终获得成熟,各种附睾因子对精子成熟所起的作用及其确切机理;精子获能时,精子表面、精子活动类型和代谢参数发生一系列改变,这些改变是否真正使精子质膜与顶体外膜发生多点融合导致顶体反应,从而使精子获能;受精涉及到质膜的相互作用及其融合,在哺乳动物中精卵如何相互识别、结合,最后发生融合的机理等仍有待进一步解决。但这些研究必须推动动物育种和人类不育症的治疗。

参 考 文 献

[1] Aitken, J. 1984 The zona-free hamster egg penetration test. In: Clinical practice in urology. Male infertility, ed by Hargreave, T. B. 75—86, New York, Tokyo.

[2] Alberts B. et al. 1983 Germ cells and fertilization. In: Molecular biology of the cell. 769—813. Garland Publishing Inc. New York, London.

[3] Barros C. 1974 Capacitation of mammalian spermatozoa. In: Physiology and Genetics of Reproduction. Part B. 3—24. Coutinho, E. M. and Fuchs, F. eds. Plenum Publishing Co. N. Y.

[4] Bedford J. M. 1982 Fertilization. In: Reproduction in mammals; I Germ cells and Fertilization. Austin, C. A. and Short, R. V. eds. 128—163. Cambridge

University Press, UK.

[5] Brown C. R. 1982 Effects of ram sperm acrosin on the investments of sheep, pig, mouse and gerbil eggs. *J Reprod Fert* 64: 457—462.

[6] ————— 1983 Purification of mouse sperm acrosin its activation and effect on homologous egg investment. *J Reprod Fert* 69: 289—295.

[7] Davis B. K. et al. 1979 Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro. *Biochem Biophys Acta* 558: 257—266.

[8] ————— and A. F. Gergely 1977 Studies on the capacitation: Changes in plasma membrane proteins of the rat spermatozoa during incubation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 88: 613—618.

[9] Edwards R. G. 1976 Mammalian fertilization. *Res in Reprod* 8: 1—10, Cambridge, UK.

[10] Fawcett D. W. 1977 The Spermatozoa. In: Frontiers in reproduction and fertility control. eds. by Greep, R. O. and Koblinsky, M. A. I. Cambridge, Mass.

[11] Fleming A. and R. Yanagimachi 1984 Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Expl Zool* 229: 485—489.

[12] Fraser L. R. 1983 Potassium ions modulate expression of mouse sperm fertilizing ability acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *J Reprod Fert* 69: 539—553.

[13] Gaunt S. J. 1983 Spreading of a sperm surface antigen within the plasma membrane of the egg after fertilization in the rat. *J Embryol Exp Morph* 75: 259—270.

[14] ————— et al. 1983 Identification of mobile and fixed antigens on the plasma membrane of rat spermatozoa using monoclonal antibodies. *Expl Cell Res* 144: 275—284.

[15] Glass R. H. 1984 In vitro fertilization. In: The cutting edge. Jaffe, R. B. ed. pp. 49—50 University of California Press. S. F.

[16] Go K. J. and D. P. Wolf, 1985 Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 32: 145—153.

[17] Gordon M. et al. 1978 Identification of phosphates on the membranes of guinea pig sperm. *Anal Rec* 191: 123—134.

[18] Hafez E. S. E. and C. G. Thibault 1974 International symposium on the biology of spermatozoa. Transport, survival, and fertilizing ability. *Fertil and Steril* 25: 825—834.

[19] Hamilton D. W. 1977 The Epididymis. In: Frontiers in Reproduction and Fertility Control. Part II. Greep, R. O. ed. MIT press, Cambridge, Mass. 411—426.

[20] Hinrichsen-Kohane A. C. et al. 1984 Molecular events leading to fertilization—A review. *Andrologia* 16: 321—341.

[21] Huncau D. et al. 1983 Ultrastructural localization of proacrosin and acrosin during the acrosome reaction in ram sperm. 4th International Spermatology. France.

- [22] Hyne R. V. et al. 1984 Sodium requirement for capacitation and membrane fusion during the guinea sperm acrosome reaction. *J Reprod Fert* 70: 83—94.
- [23] Lianos M. N. et al. 1982 Studies of phospholipase A related to the hamster sperm acrosome reaction. *J Expl Zool* 224: 107—117.
- [24] Meizel S. 1978 The mammalian sperm acrosome reaction. A biochemical approach. In: Development in Mammals. 3: pp1—62. Johnson, M. H. ed. North-Holland, Amsterdam.
- [25] Mrsny R. J. and S. Meizel 1981 Potassium ion influx and Na-K-ATPase activity are required for the hamster sperm acrosome reaction. *J Cell Biol* 91: 77—82.
- [26] Ohzu E. and R. Yanagimachi 1982 Acceleration of acrosome reaction in hamster spermatozoa by lysolecithin. *J Expl Zool* 224: 259—263.
- [27] Singleton C. L. and G. J. Killian 1983 A study of phospholipase in albumin and its role in inducing the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa in vitro. *J Androl* 4: 150—156.
- [28] Yanagimachi R. 1970 The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fert* 23: 193—196.
- [29] Yanagimachi R. 1981 Mechanism of fertilization in mammals. In: Fertilization and Embryonic Development in vitro. Mastroianni, L. and Biggers, J. D. eds. Plenum Publishing, New York 81—182.
- [30] ————— 1982 Requirements of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Res* 5: 323—344.
- [31] Yanagimachi R. and N. Usui 1974 Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig sperm. *Expl Cell Res* 89: 161—171.
- [32] ————— et al. 1976 The use of zonafree animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15: 471—476.