

综 述

海胆精子入卵后受精机制研究概况*

蔡 亚 能

(海洋生物学系)

对于大多数生物来讲,受精是新生命开始的关键。这一课题一直受到学者们的注目。远在一个世纪前, O. Hertwig 就发现了海胆(*Paracentrotus lividus*)的精、卵原核在卵中融合,并认为这是受精的主要现象。百年来,许多学者在海胆卵上先后做了大量的研究工作,积累了系统的资料⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾。

近年来,精子入卵后的受精机制研究进展较快⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾。Epel 认为精子入卵后出现的生理生化现象与代谢过程中出现的生理生化现象,其控制系统是相似的。反过来,有的学者也早已从生物代谢过程的一般控制系统中得到启发,去探索卵子的受精生理,研究受精机制。此外,在分子生物学的影响下,受精研究也朝着分子生物学的方向发展。海胆卵可能成为分子生物学由研究原核细胞进入研究真核细胞的突破口。

一、精子入卵后的变化过程

精子入卵后出现两个明显的变化过程:早期变化过程(从精子入卵后开始,经过大约一分钟便告结束)与后期变化过程(约在受精后五分钟才开始)。而 pH 变化则贯穿了两个时期。现列表如下:

早期变化过程(约一分钟)	{ 膜的去极化(Na^+ 流入) Ca^{+2} 的释放 皮质反应(无需 Na^+ 的排出酸) H_2O_2 的产生 O_2 耗的增高 $\text{NAD} \rightarrow \text{NADP}$ 的转化 脂氧合酶的激活 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 的置换(需 Na^+ 排出酸)
后期变化过程	{ 运输能力增强 蛋白质合成加速 DNA 开始合成 精卵原核融合

* 本文是作者根据1980年在美国柏克莱加州大学工作时收集的资料整理的。
本文于1981年11月25日收到。

pH持续上升贯穿了两个时期。

(一)早期变化过程

随着精卵的结合,首先出现的变化是膜的去极化,这被称为受精电位或激动电位。这是 Na^+ 的内流引起的^[9]。膜的去极化已被证明能阻止多精受精^[10]。这属于快阻遏多精受精,它与皮质反应所引起的慢阻遏多精受精构成了双重阻遏。其次出现卵内 Ca^{+2} 浓度的上升,上升是暂时的、急剧的,接着又恢复到受精前的水平。 Ca^{+2} 浓度急剧上升的时刻正是皮质颗粒排出的时刻。在 Ca^{+2} 浓度急剧上升,皮质颗粒反应开始不久,出现了 H^+ 的排出,这是受精酸^[11]。先是无需 Na^+ 的排酸,接着是需 Na^+ 的排酸,即外界如无 Na^+ 的存在就不排酸。需 Na^+ 的排酸是通过 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交换系统进行的^[12]。与此同时烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的激酶也被激活,使NAD和NADH转化成NADP和NADPH,从而使NADP与NADPH在卵内增加了两倍半。脂肪氧化系统此时也被激活,这是脂氧合酶起了作用^[13]。这时与产生 H_2O_2 有关的呼吸活动剧增现象也出现了。由于 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 置换系统的活动,卵子失去了2.5—5mM的 H^+ ,卵内pH由6.8上升到7.3^{[12][14]}。置换系统停止活动时,卵内pH就停留在比较高的水平上。

(二)后期变化过程

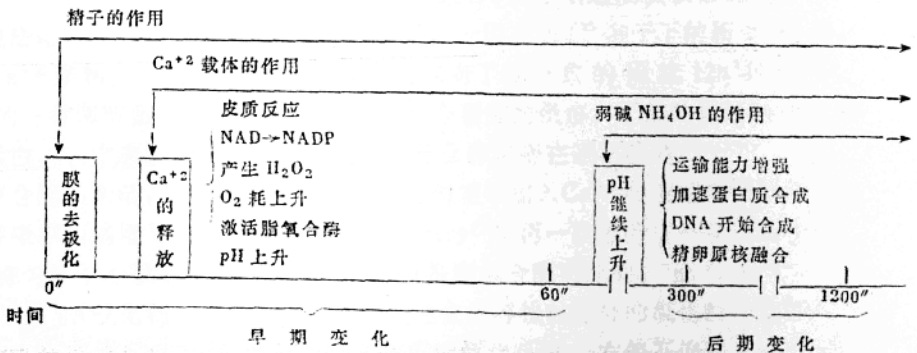
受精之后五分钟,后期变化开始,蛋白质合成速度加快^[15]。加速合成蛋白质不用新近合成的mRNA做模板,而用原先库存的mRNA做模板^[16]。可见这是属于转译水平上的速度调节。与此同时,氨基酸^[17]、核苷酸^[18]、磷酸^[19]和钾^[9]的运输能力也大大增强。在受精后二十分钟,即精卵原核融合时,第一轮DNA合成便开始^[6]。

卵内pH值的上升是早期变化发展成后期变化的重要特征。如果只出现早期变化的现象而pH不上升,后期变化就不出现,发育就停滞不前。而以 NH_4OH 等弱碱处理过的未受精卵,则可越过前期变化,出现卵内pH的上升,出现后期变化。因而可对早期变化和后期变化分别进行研究,进行对比分析。

(三)精子、 Ca^{+2} 载体和弱碱对卵子所起作用比较

用 Ca^{+2} 载体A23187处理的卵子,其结果与正常受精的情形相类似,可导致卵子进行卵裂,但其发育程度有限^[20],不出现膜的去极化变化。而用 NH_4OH 等弱碱处理的卵子,其结果则不大一样,它只能激发后期变化,对早期变化毫无作用。

现将精子、 Ca^{+2} 载体和弱碱对卵子的作用关系图示如下:



用离子载体处理的卵子, Ca^{+2} 的释放象正常受精一样都来自细胞内的同一贮库, 这贮库在四十分钟之后还可人为地再贮存和再释放。用 NH_4OH 处理的卵子不能释放细胞贮库里的 Ca^{+2} , 但允许外界 Ca^{+2} 进入细胞^[6]。

二、 Ca^{+2} 浓度上升和 H^+ 浓度下降的研究

自从确知受精后 Ca^{+2} 浓度上升, H^+ 浓度下降之后, 有许多学者围绕着这两个问题进行了深入的研究, 试图了解其机制和作用, 现分述如下:

(一) Ca^{+2} 浓度短暂上升的研究

Mazia^[21] 在 1937 年首先观察到海胆卵受精之后卵内 Ca^{+2} 浓度上升, 经四十年, 直到有了一种蛋白质 (aequorin), 在 Ca^{+2} 存在下能发光, 发光程度与 Ca^{+2} 浓度成正比, 这才完全肯定了 Mazia 的观察^{[22][23][24]}。根据推算, Ca^{+2} 浓度短暂升高达到 $5\mu\text{M}$ (全卵平均浓度), 若按卵表体积估算则 Ca^{+2} 浓度短暂升高达到 $50\mu\text{M}$ ^[25]。这样估算是因为有人认为 Ca^{+2} 浓度升高只限于卵表。

Ca^{+2} 浓度短暂升高的重要性, 可用人为地提高卵内 Ca^{+2} 浓度的办法来检验。当使用 Ca^{+2} 载体 A23187 处理卵子时, 出现了类似于正常受精时所出现的一系列变化^{[26][20]}; 相反, 如在卵内注入 Ca^{+2} 螯合剂 EGTA 后再进行正常受精, 则不出现前述一系列变化^[25]。这说明 Ca^{+2} 具有制动作用。受精作用、 Ca^{+2} 载体的作用都能引起卵内贮库里 Ca^{+2} 的释放, 与外界是否存在 Ca^{+2} 无关^[23]。这在海鞘类、两栖类和哺乳类都是一样的^[20]。但双壳类 *Spisula solidissima* 则例外, 在卵外没有 Ca^{+2} 存在下, A23187 不能激活卵子, 如在介质中补加 Ca^{+2} , 则 A23187 能激活卵子^[27]。这说明载体是通过提高卵内 Ca^{+2} 浓度而起作用的。

Ca^{+2} 浓度升高后如何制动一系列的变化呢?

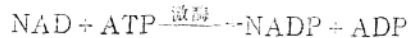
(1) 皮质颗粒反应: 皮质颗粒的排出受 Ca^{+2} 的影响早已有许多报道^[28]。Vacquier^[29]证实了皮质颗粒反应与 Ca^{+2} 的关系。他剥下带有皮质颗粒的海胆卵膜, 把卵膜翻转出来, 使皮质颗粒露在外面, 然后在卵膜上滴上 μM 级的 Ca^{+2} , 结果皮质颗粒破裂, 彼此融合起来^[30]。这与正常卵的皮质颗粒反应的情形相类似, 所不同的是卵内皮质颗粒反应是颗粒与质膜的融合, 而不是颗粒与颗粒的融合。至于引起皮质颗粒反应的 Ca^{+2} 浓度如何? 说法略有不同, 一说 $12-20\mu\text{M}$ ^{[30][23]}, 一说在 ATP 参于下的新鲜材料, 具有较高的 Ca^{+2} 亲和力, 浓度只要 $1\mu\text{M}$ ^[31]。后来有了较一致的说法 $12\mu\text{M}$ ^{[25][32]}。 Ca^{+2} 能激活的一种调节蛋白 Calmodulin, 它是现今研究的最多, 了解的最清楚的一种重要的调节蛋白, 在皮质颗粒反应中它到底起了什么作用现在还不清楚。

(2) 脂氧合酶的活动: Hultin^[33] 发现在卵的匀质中加入 Ca^{+2} 会引起氧耗剧增, 他首先提出: 呼吸率的剧增与 Ca^{+2} 的存在有关。Perry^[13] 再一次检验这一发现后指出: Ca^{+2} 诱发的卵匀质中呼吸率剧增, 至少有一部分是脂氧合酶引起的。他发现 Ca^{+2} 诱发的呼吸率的剧增对氰化物是不敏感的, 这启发他去找寻线粒体外的氧化酶, 从而找到了一个非常活跃的、需 Ca^{+2} 的而对氰化物不敏感的氧化系统, 它使不饱和的脂肪酸如廿碳四烯酸氧化。因此在卵匀质中加入 Ca^{+2} 后就出现了大量的氧化了的脂肪酸 HETE

(Hydroxy-eicostetraenoic acid)。Epel 进一步用 C^{14} 标志的廿碳四烯酸处理海胆卵，用薄层析法进行检验，发现未受精卵不出现 HETE，而受精卵则出现 HETE^[6]，这与离体实验，在匀质中加 Ca^{+2} 所得的结果一样。据生化分析，廿碳四烯酸在细胞里的变化有两条途径，一是在环氧化酶的作用下，产生类前列腺素的化合物；另一途径是在脂氧合酶的作用下产生 HETE^[34]。上述海胆卵的情况与第二途径相一致。

Ca^{+2} 是直接作用于脂氧合酶还是通过调节蛋白 Calmodulin 为媒介而起作用呢？从亲和力的情况分析， Ca^{+2} 与脂氧合酶的亲和力很强， Ca^{+2} 浓度在 $1 \times 10^{-7}M$ 就能起作用，而 Ca^{+2} 与 Calmodulin 的亲和力比较差， Ca^{+2} 浓度要达到 mM 级才能起作用。所以脂氧合酶似没有 Calmodulin 的介入。同时，冬眠灵（氯丙嗪）或 Trifluoperazine ($C_{21}H_{24}F_3N_3S \cdot 2HCl$) 对 Ca^{+2} 诱发的呼吸活动也无影响，这也符合 Calmodulin 没有介入的说法^[6]。

(3) NAD 激酶的活动：皮质颗粒反应后数秒钟，NAD 激酶就被激活，有 30% 的 NAD 转变成 NADP^[35]。因 NADP 总量比 NAD 少得多，结果 NADP 增加两到三倍，其化学公式如下：



NAD 激酶的活动时刻是在 Ca^{+2} 浓度开始上升直到恢复原状这一段时间里，因而认为 Ca^{+2} 有可能参与这个转化作用，而且 NH_4OH 处理的卵不出现 $NAD \rightarrow NADP$ 的转化作用^[36]。NAD 激酶对低浓度 Ca^{+2} 非常敏感，其活动力可被 EGTA 所约束，如随后再提供低浓度 Ca^{+2} 时，它又能被激活。其亲和力大约在 $8 \times 10^{-8}M$ ，是在 Calmodulin 能够介入的浓度范围里^[6]。

有决定意义的 Calmodulin 参与酶的活动证据，是从海胆卵子中已分离出类似于 Calmodulin 的一种调节蛋白质，这种蛋白质只在 Ca^{+2} 存在下激动，并且是热稳定的，煮开五分钟也不受影响，这些现象都是 Calmodulin 的特性^{[37][38]}。此外，NAD 激酶的活动还能被低浓度的 Trifluoperazine 所抑制，这也是 Calmodulin 参与了酶的活动表现。Epel^[39] 最近用放射免疫测定法证明， Ca^{+2} 浓度增加，一部分 Ca^{+2} 就与 Calmodulin 结合，并与 NAD 激酶起作用而激活 NAD 激酶；当 Ca^{+2} 浓度下降，结合物分解，激酶就恢复原状。

综上所述， Ca^{+2} 浓度短暂上升有三种作用。其中两种作用是，皮质颗粒反应和 NAD 激酶的活动， Ca^{+2} 浓度只要达到 μM 级就起作用；另一种作用，脂氧合酶的活动则需要有 mM 级的浓度才能起作用，这表明卵内 Ca^{+2} 的调节作用有浓度的差别。不同浓度有不同的作用目标^[6]。

当然，由于卵内情况复杂，因而存在着各种可能性。例如，脂氧合酶，其作用对象为游离的不饱和脂肪酸，而脂肪酸的出没也受到需要 Ca^{+2} 的磷酸脂酶的控制。初步估计表明，脂酶对 Ca^{+2} 的亲和力不如脂氧合酶，所以虽然脂氧合酶可以被 $10^{-7}M$ Ca^{+2} 所激活，但因受到磷酸脂酶的牵制， Ca^{+2} 浓度必需上升到足以使磷酸脂酶进行活动的 mM 级浓度，才能使脂氧合酶呈现出活性来^[6]。又如 Steinhardt 等，基于在卵内确实存在着 Ca^{+2} 的微领域，提出了卵内 Ca^{+2} 浓度短暂上升局限于皮质部分^{[23][40]}。Baker 和 Whitaker 对此也有论述^{[41][42]}。

(二) H^+ 浓度下降的研究

卵内 H^+ 浓度下降(即 pH 值上升)是引起后期变化的重要因素,主要有以下两点根据:其一是用 NH_4OH 处理的卵子,越过早期变化而直接激动后期变化^[12]。其二是观察到受精后有少量 Na^+ 流入卵内,而 H^+ 流出卵外,没有 H^+ 的流出,发育就进行不下去^[12]。

(1) $Na^+ - H^+$ 的置换:需要 Na^+ 的 H^+ 的外流,就是需要有 Na^+ 的流入来置换 H^+ 的流出,如果阻止了 Na^+ 流入就阻止了 H^+ 的流出,也就抑制了 pH 值的上升^[12]。例如:用 Ca^{+} 载体 A23187,在没有 Na^+ 的海水中激活卵子, pH 值就不上升^[12]。或者把正常受过精的卵迅速一洗,立即放入无 Na^+ 海水中,也阻止了 pH 值的上升^[12]。另一类似的办法是用 Na^+ 通道的阻遏剂 amiloride 来阻止 Na^+ 的内流,这也同样抑制了 pH 值的上升^{[12][5]}。更重要的是上述 pH 值,上升受到了阻遏,如果在此时加入 mM 浓度的 NH_4OH ,正常发育就得到恢复。这充分说明无 Na^+ 海水或有高浓度 amiloride 的海水阻遏了 $Na^+ - H^+$ 置换系统的活动,使 pH 值不能上升。此外,在 $Na^+ - H^+$ 置换过程完成之后,如再加入同样浓度的 amiloride 则照常发育,无害于胚胎^[6]。

pH 值的差别只有 0.5 单位,怎么会引起那么剧烈的变化呢?假说不一,其一是拮抗酶对说。例如蛋白激酶与蛋白磷酸化酶拮抗酶,腺苷酸环酶与磷酸二酯酶拮抗酶。它们都能随着 pH 值的微小变化而各自向相反的方向变动。其二是结构蛋白说。例如,烟草病毒就显示出 pH 值的变化对聚集的影响^{[5][7]}。这说明 pH 值的变化使蛋白质结构发生变化,从而引起卵内其他变化。

(2) 蛋白质的合成:在受精 5—10 分钟里,蛋白质合成剧增 5—30 倍^{[45][44][16][46][15]}。这时也正是受精后 pH 值上升的时期。为了弄清这两者的关系, Grainger 等用氨基酸标志法和细胞内 pH 电极直接测定法测出了蛋白质合成与 pH 值变化的关系^[47]。他测得正常受精卵经过 1—2 分钟,卵内 pH 值就开始上升。而 10mM NH_4OH 处理的卵子则要经过 3—4 分钟, pH 值才开始上升。如果蛋白质合成速率与 pH 值上升有关的设想是正确的,那么,蛋白质合成速率的变化,应该是正常受精的卵子,比经 10mM NH_4OH 处理的卵子早出现两分钟,测得的结果正是这样。Rudolf^[48]等还用 FORTRON 语言编出了计算机程序,用于计算和画出受精后蛋白质合成与 mRNA 的关系曲线。

(3) DNA 的合成:首先研究 DNA 的合成的是 Lison, L. 和 Pasteels, J. ^[49], 他们用显微分光光度计进行研究,其结论是 DNA 合成开始于细胞分裂末期(telophase),经 5 分钟,合成便告结束。Ficq, A 等^[50]用放射自显影技术, Nemer, M. ^[51]用放射计数器,分别进行测定,他们都认为 DNA 在间期(interphase)开始合成。Hinegardners^[52]等使用与 Nemer 相似的方法进行了细致的研究,提出了更为具体的 DNA 合成期。据他测定 DNA 合成共进行了 13 分钟(15℃):并认为从末期后数分钟开始合成,到进入间期不久才结束,即在末期染色体囊形成时才开始合成 DNA,一直延续到染色体囊融合,细胞核出现,合成才告结束。也就是合成开始于分裂沟出现之时,结束于分裂完成之后不久。