

哺乳动物透明带糖蛋白及其生物活性

周 乐 钱菊汾 王建辰

(西北农业大学动物医学系, 杨陵 712100)

摘要 透明带在哺乳动物的受精过程中发挥着重要作用, 透明带化学成分及其生物活性的研究对于了解精卵识别、顶体反应的诱导等过程的分子机理具有重要意义. 近 10 年来的研究表明透明带主要由糖蛋白 (ZPGPs) 组成, 是在细胞质内合成后转移至透明带的. 大多数动物的 ZPGPs 为 4~5 种, 不同种类动物的 ZPGPs 的氨基酸序列存在高度同源性. 在受精过程中, ZPGPs 具有精子受体和诱导顶体反应的双重作用, ZPGPs 含有 N-连接和 O-连接寡聚糖, 这些寡糖链是 ZPGPs 行使生物活性不可缺少的部分.

关键词 透明带, 糖蛋白, 生物活性, 哺乳动物

哺乳动物的透明带 (zona pellucida, ZP) 是包围在卵母细胞质膜外的一层半透明非细胞物质, 其厚度随动物种类不同而有差异, 一般在 1~6 μm 之间, 牛的较厚为 27 μm . ZP 一般由多层组成, 对卵母细胞起着保护作用, 并且参与精卵识别、顶体反应的诱导及受精等重要生理过程. 因此, 研究透明带化学物质, 特别是糖蛋白 (zona pellucida glycoprotein, ZPGPs) 对于了解精卵反应的分子机理具有重要意义. 目前, 有关 ZPGPs 的研究报道日趋增多, 文章主要就近 10 年来的研究进展作一简述.

1 透明带糖蛋白的化学特性

ZP 主要是由糖蛋白组成. 例如, 猪的 ZP 组成为蛋白质 71%、糖 19%, 其余为唾液酸、硫酸酯、磷酸脂等, 蛋白质为多相性, 分子量 (M_r) 为 40 000~70 000. 动物的种类不同, 其 ZPGPs 也不同, 所以它们对某些酶的反应性也不同.

1.1 ZPGPs 的研究

小鼠 ZPGPs (mZPGPs) 的研究已比较清楚. mZPGPs 由 3 种糖蛋白组成, 即 mZP1、mZP2 和 mZP3, 其 M_r 分别为 200 000、120 000 和 83 000, 其中相应的蛋白含量为

36%、47% 和 15%, mZP1 是同质二聚体, 其间由二硫键相连, 这点已被许多实验所验证. 大量的研究还证实 mZP1~3 也存在于仓鼠、大鼠和人的 ZP 中. 猪和牛的 ZPGPs 各有 4 种. 早先 Koyama 等^[1]报道, 猪的 ZPGPs 有 5 种, 分子量分别为 92 000 (pZP1)、69 000 (pZP2)、55 000 (pZP3) 和 23 000 (pZP4). 其中 pZP3 脱糖后产生分子量为 37 000 (pZP3 α) 和 32 000 (pZP3 β) 两种蛋白. 1993 年 Yurewicz 等^[2]发现在还原条件下, 猪的 pZP1 分解成 pZP2 和 pZP4, 这说明 pZP1 是由 pZP2 和 pZP4 通过二硫键相连的, 因此, 应该说 pZPGPs 的数目是 4, 而不是 5. Bercegeay 等^[3]利用 SDS-PAGE 技术发现奶牛的 bZPGPs 在单向电泳上显示 3 条带即 bZP1 (80 000~90 000)、bZP2 (66 000~63 000) 和 bZP3 (60 000), 而在双向电泳上表明还存在 bZP4, 值得注意的是到目前为止, 基于 mZP3 表观分子量而命名的其他动物 ZPGPs 与 mZP3 之间的关系还不清楚.

不同种动物 ZPGPs 存在一定程度的同源性, 这一点已从两个方面得到了证实. a. 异种动物的 ZPGPs 的蛋白质一级结构存在同源

性; b. 异种动物的 ZPGPs 存在免疫交叉反应. 通过基因组克隆技术确定了 mZP3 的氨基酸 (aa) 序列, 经比较发现 mZP3 和人的 hZP3 aa 序列具有高度同源性. 有人以此为依据, 合成了 3 段 ZP3 小肽即 ZP3-2 (mZP3 所特有, aa No.219~237)、ZP3-5 (aa No.151~165) 和 ZP3-6 (aa No.360~369), 并制备了相应的抗血清即 ASZP3-2、ASZP3-5 和 ASZP3-6. Hinsch 等^[4]利用这些抗血清对小鼠、兔、仓鼠、猪、牛和人卵巢的卵母细胞进行了免疫反应试验. 结果正如合成肽的序列一样, ASZP3-2 仅对小鼠的 ZP 呈阳性, 而 ASZP3-5 和 ASZP3-6 几乎能和所有试验动物和人的 ZP 及卵质物质反应, 同时发现在猪的卵质里存在丰富的 ASZP3-5 阳性物质, 这点与 Takagi 等^[5]早先利用抗 pZP3 单抗所做的实验一致. 由此可见, 至少有一部分 ZPGPs 是在细胞内合成后转移至 ZP 的. 纠正了过去认为 ZP 是来自于卵泡的附着物的观点. 免疫印迹显示 ASZP3-5 可识别 mZP3 和分子量为 53 000 的一种 pZP (可能是 pZP3), 但与 pZP3 α 和 pZP3 β 无反应. 作者认为这是由于 ASZP3-5 不能与糖基化的 ZPGPs 反应造成的. 以上结果表明抗合成肽抗血清可以作为鉴定哺乳动物中类 mZP3 样物质的标志物和评价 ZPGPs 同源性和功能的有用工具.

猪的类 mZP3 样蛋白的氨基酸序列还没有完全确定, 但是 Topfer-Petersen 等^[6]和 Yurewicz 等^[2]证实 pZP3 水解产生的肽的 aa 序列与 mZP3 的 aa 序列具有高度同源性. 事实上 Hinsch 等^[4]用于制备 ASZP3-5 的合成肽即 ZP3-5 (aa No.137~150) 的 aa 序列与 Yurewicz^[2]发现的 pZP3 β 部分 aa 序列是相同的, 这证明 pZP3 β 的 aa 序列与 mZP3 的密切相关. Hasegawa 等^[7]利用 cDNA 克隆技术对猪的两种 ZP4 进行了测序, 发现 pZP4 α 含 128 aa, pZP4 β 含 133 aa, 后者比前者在 C 端增加了 5 个 aa, 两种 pZP4 都含有 2 个潜在的 N-糖基化位点. pZP4 α 和 mZP2 多肽的 N 端具有 39.1% 的同源性, pZP4 α 的 5 个半胱氨酸的位

置与 mZP2 的完全一致. pZP4 β 基因的 3' 端具有 195 个额外的核苷酸, 是负责编码 pZP2 多肽 N 端 10 个序列的. 这些结论显示 pZP2 和 pZP4 由同一前体多肽在 aa 序列 133 和 134 处断裂衍生的.

1.2 ZPGPs 寡聚糖的研究

糖是 ZPGPs 的重要成分, 也是 ZPGPs 行使生物活性不可缺少的部分. 在 ZPGPs 上连接的寡聚糖 (oligosaccharide, OS) 主要有二类, 即 O 连接 OS (O-OS) 和 N 连接 OS (N-OS). 由于难于获得足量的纯 OS, 所以, 直接对各种 ZPGPs 的 OS 进行化学分析是比较困难的. 为此, Bleil 等^[8]首次采用了 ZPGPs 放射性标记法. Florman^[9]发现 mZP2 和 mZP3 上分别连有对内切酶-F 敏感的 N-OS, 对 mZP2 和 mZP3 分子量的贡献分别为 40 000 和 30 000, 此外还含有对碱敏感的 9000 O-OS. Nagdas 等^[10]则采用另一种酶即 N-糖苷酶分别处理 mZP2 和 mZP3, 发现二者的分子量分别减少 49 000 和 42 000. 这比文献 [8] 的报道多出 10 000~12 000. Nagdas 认为“这是由于 ZPGPs 在电泳上迁移速度不恒定及内切酶-F 和 N-糖苷酶具有不同底物特异性造成的”. 这一观点是基于人们发现 N-OS 上的磷酸脂、硫酸酯和唾液酸会影响内切酶-F, 但对 N-糖苷酶无影响的事实而提出的.

Bleil 等^[8]发现 mZP2 和 mZP3 上存在乳糖胺多糖, 后者对 mZP2 和 mZP3 分子量的贡献分别为 23 000 和 16 000. Nagdas 等^[10]不仅证实了这一点, 而且发现此多糖还存在于 N-OS 上, 糖链含有重复的 N-乙酰乳糖胺单位 (3Gal β -1, 4 Galc NAc β 1). 此后, Yurewicz 等^[2]发现 pZP3 (M_r = 55 000) 上存在有乳糖胺多糖, Mori 等^[11]证实其存在形式与 mZP2 和 mZP3 上的相同. 有人认为此类多糖一般只存在于复合型的三天线和四天线 N-OS 上. mZP2 和 mZP3 上含有丰富的乳糖胺多糖可能暗示聚乳糖胺有几种结构. 这样说是因为已有资料表明, 在小鼠淋巴组织细胞系存在有 4 种不同末端序列的聚乳糖残基, 包括 α -连接的半

乳糖残基, 而且后者存在于一些细胞表面的糖蛋白上.

此外, 在 mZP3 的 N-OS 上还发现有 β -天冬氨酰葡萄糖胺和 N-乙酰葡萄糖胺. 最近, Nagdas^[10] 等进一步证实 mZP3 上的 N-乙酰葡萄糖胺存在于 O-OS 上, 此 O-OS 为三糖体, 结构为 $\text{GlcNAc}\beta \rightarrow \text{Gal}\beta 1, 3 \text{ GalNAc}$. 该实验证明此三糖是直接连于 mZP3 蛋白上唯一的 O-OS, mZP2 上不存在此三糖. 此三糖对 mZP3 的表观分子量贡献为 2000~3000, 而三糖本身的分子量仅为 568, 这说明 mZP3 上可能含有 4~5 个这样的三糖链. 与此类似, mZP2 上可能存在 1~2 个这样的三糖链, 因其对 mZP2 分子量贡献较少, 故电泳检测不到. 与 mZP3 相似, 高度糖化的 pZP3 含有 N-OS 和 O-OS, 包括三糖体及聚 N-乙酰乳糖胺多糖, 其中 O-OS 三糖体的非还原端与 mZP3 一样都是 N-乙酰葡萄糖胺.

2 ZPGPs 的生物活性

在小鼠受精过程中, mZP3 是精子的一级受体, 担负着精子和卵子种属特异结合及顶体反应诱导的功能^[12], mZP2 是二级受体, 在卵子激活后, 由卵子蛋白酶裂解, 分子量由 120 000 降至 90 000, 它可使位于透明带中的精子失去活动能力^[13], 这点已趋于一致. Kopf^[14] 曾详细阐述了 mZP3 介导的顶体反应的各种信号传递途径. Ward^[15] 发现 mZP3 与精子结合后先表达为顶体内含物的外排, 这一作用是依靠 mZP3 选择性地活化精子中的 Gi1 和 Gi2 蛋白而实现的. 表皮生长因子 (EGF) 能增加 ZPGPs 诱导顶体反应的频率.

Beebe 等^[16] 从免疫学方面也证实了上述作用. 他们利用编码 mZP3 的完整 cDNA 获得了重组 mZP3 即 rmZP3, 后者可诱导顶体反应和降低精卵结合, 这有力地证实 mZP3 的精子受体和诱导顶体反应的双重作用. Rosiere 等^[17] 进一步发现 mZP3 活性部位位于其肽链的 C 端, 因为抗合成的 mZP3 肽 (aa No. 306~321) 抗体可与从 mZP3 降解下来的活性小肽

反应. 另有资料表明, ZPGPs 可激发顶体素前体转变成 β -顶体素, 随后又通过降低该过程中的酰胺酶活性而抑制 β -顶体素的产生. Williams^[18] 认为“受精的种间特异性最重要的调节位点处于精子和 ZP 的结合水平, 配子间的受体分子必须高度互补且具有高度的亲和性”, 并证实精子的受体是顶体素前体或顶体素, 卵子的受体是 ZPGPs, 此外, 精卵结合的特异性还与两种受体间的结合能力大小有关, ZPGPs 特定立体化学方面存在的多种硫酸酯基参与配子种间特异性的识别.

许多实验表明 mZP3 上的 OS 是 mZP3 与精子结合不可缺少的部分. 对于与 mZP3 活性有关的 OS 是 O-OS, 还是 N-OS 或二者都有, 目前的实验结果还很不一致, Florman 等^[9] 利用内切酶 F 除去 mZP3 上的 N-OS 后, 发现 N-OS 并不影响 mZP3 与精子的结合活性, 但作者认为与表观分子量为 3900 的 O-OS 有关, 进一步研究证实是与 O-OS 的非还原端的 α 连接的半乳糖残基有关. 但是, Miller 等^[19] 则发现小鼠精子表面的半乳糖转移酶 (galtase) 识别的是 ZP 上的 N-乙酰葡萄糖胺而不是 α -半乳糖. Yamagata 等^[20] 用杏仁糖肽酶处理带有完整 ZP 的卵子后, 发现精卵结合大大降低, 这表明 N-OS 对精卵反应有作用. 上述两个相互矛盾的研究结果可能暗示 ZP 中的受体可能有多个而不仅 mZP3. 有研究表明 mZP2 和 mZP3 上存在 N-连接甘露糖杂糖链, 而且是精子表面甘露糖酶的结合位点, 是精卵识别的一部分. 这些进一步证实了上述推测.

综上所述, ZPGPs 研究已在糖蛋白的种类、化学特性、蛋白一级结构的测序和寡糖链的组成及结构分析等方面取得许多进展, 人们借此对配子识别、顶体反应的诱导和受精等重要生理过程的分子机理已有了初步了解. 同时, 我们也看到 ZPGPs 的研究是一项相当复杂的工作, 许多因素阻碍着人们对 ZPGPs 作更深入的研究: a. 难于获得足量的纯 ZPGPs, 因此, 难于对 ZPGPs 进行化学分析; b. ZPGPs 的研究内容多, 研究方法和手段涉

及多学科, 唯有多学科的联合攻关方能解决问题. 例如, 就研究内容而言, 涉及许多学科目前最先进的研究方法和分析手段, 如放射性标记、电泳、酶降解、各种免疫学方法、化学分析、有机合成、cDNA 克隆技术、各种分离技术包括亲和层析、高压液相、离子交换及各种离心技术等. 因此, 要想彻底了解 ZPGPs 的生物功能, 还需进行大量艰苦的劳动. 但是, 随着人们对 ZPGPs 的不断认识, 不仅会使我们深入地了解配子反应和受精的分子机理, 而且针对 ZPGPs 的抗原决定簇可能会产生有应用价值的避孕疫苗.

参 考 文 献

- Koyama K, Hasegawa A, Isoyima S. *J Reprod Immunol*, 1991; **19**: 131
- Yurewicz E C, Sacco A G, Subramanian M G. *J Biol Chem*, 1987; **262**: 564
- Bercegeay S, Allaire F, Jean M *et al.* *Reproduction, Nutrition, Development*, 1993; **33** (6): 567
- Hinsch K D, Hinsch E, Meinecke B *et al.* *Biol Reprod*, 1994; **51**: 193
- Takagi J, Dobashi Araki M D Y, Imai Y *et al.* *Biol Reprod*, 1989; **40**: 1103
- Topfer-petersen E, Mann K, Calvete J J. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*, 1993; **374**: 411
- Hasegawa A, Koyama K, Okazaki Y *et al.* *J Reprod Fertility*, 1994; **100** (1): 245
- Bleil J D, Wassarman P M. *Dev Biol*, 1980; **76**: 185
- Florman H M, Wassarman P M. *Cell*, 1985; **41**: 313
- Nagdas S K, Araki Y, Chayko C A *et al.* *Biol Reprod*, 1994; **51**: 262
- Mori E, Takasaki S, Hedrick J L *et al.* *Biochemistry*, 1991; **30**: 2078
- Bleil J D, Wassarman P M. *Dev Biol*, 1983; **95**: 317
- Vazquez M H, Philips D M, Wassarman P M. *J Cell Sci*, 1989; **92**: 713
- Kopf G S. *J Reprod Fertil Suppl*, 1990; **42**: 35
- Ward C R, Story B T, Kopf G S. *J Biol Chem*, 1994; **269** (18): 13254
- Beebe S J, Leyton L, Burkd D *et al.* *Dev Biol*, 1992; **15** (1): 48
- Rosiere T K, Wassarman P M. *Dev Biol*, 1992; **154**: 309
- Williams R M, Jones R J. *J Experimental Zoology*, 1993; **266** (1): 65
- Miller D J, Macek M B, Shur B D. *Nature*, 1992; **357**: 589
- Yamagata T. *Dev Growth Deffer*, 1985; **27**: 176

Glycoproteins in Zona Pellucida of Mammalian and Its Bioactivities. Zhou Le, Qian Jufen, Wang Jianchen (*Department of Animal Medical Science, Northwestern Agricultural University, Yangling 712100, China*).

Abstract The mammalian zona pellucida plays a major role in the fertilization. The study of chemical substances in zona pellucida and its bioactivities is of importance in studying the molecular mechanism of species-specific sperm-egg recognition and the induction of acrosome reaction. Studies in latest ten years show that zona pellucida mainly consists of glycoproteins which are synthesized inside oocyte and then transferred to the outside of oocyte. Most animals have 4 or 5 kinds of ZPGPs, and of which proteins possess homologous. During the process of fertilization, ZPGPs are responsible for spermatozoa receptors and for the induction of acrosome reaction. ZPGPs contain N-linked and O-linked oligosaccharides, which are essential to the bioactivities of ZPGPs.

Key words zona pellucida, glycoprotein, bioactivity, mammalian