

卵细胞膜电学特性与受精过程

杨文修

(南开大学物理系生物物理教研室,天津)

卵细胞受精是新生命的开端。已知,精子与卵相遇时,在卵周围的颗粒细胞上可同时吸附许多精子,但实际只能有一个精子与卵细胞融合,进一步发育成胚胎。在胚胎发育的生物学研究中,下述问题与受精过程密切相关:精子和卵细胞相互融合的机制是什么?卵细胞在受精过程中发生那些结构的和物理、化学特性的变化?那些内部和外界因素能影响受精过程及其后果等。下面仅就卵细胞的电学特性与受精过程的关系,概述近年来的研究进展和可能的应用前景。

一、卵细胞膜的电学特性

Tyler^[1] 和 Hiramoto^[2] 先后用玻璃微电极技术测量到海星 (*starfish*) 卵细胞膜具有外正内负的静息电位 (V_r),这是由于膜对 K^+ 选择性通透的结果。至今对各种生物卵细胞静息电位的测量结果表明,多数卵细胞都具有典型的与 K^+ 平衡电位相近似的静息电位值,即在一60—90mV 范围^[3]。少数卵细胞有较低的静息电位,如鱼卵为一10—40mV,小鼠卵为一20—25 mV,这种非通常的静息电位可归

表 I 已研究的一些有电兴奋性的生物卵

—哺乳动物—	[<i>mouse</i> (Okamoto 等, 1977) <i>hamster</i> (Miyazaki, 未发表)
—两栖动物—	[<i>Xenopus</i> (Baud 等, 1982) <i>Rana</i> (Schlichter, 1982)
—鱼—	<i>Medaka</i> (Nuccitelli, 1980)
—被囊动物—	<i>Halocynthia</i> (Miyazaki 等, 1972)
—棘皮动物—	海星纲: <i>Mediaster</i> (Hagiwara 等, 1975) <i>Asterina</i> (Miyazaki 等, 1975) <i>Patiria</i> (Shen and Steinhardt, 1976)
	蛇尾纲: <i>Ophiopsila</i> (Jaffe and Brehm, 未发表)
	斜海胆纲: <i>Strongylocentrotus</i> (Okamoto 等, 1977)
	<i>Lytechinus</i> (Chambers and Armendi, 1978)
	海参纲: <i>Cucumaria</i> (Hagiwara 等, 未发表)
—环节动物—	[<i>Chaetopterus</i> (Hagiwara and Miyazaki, 1977) <i>Neanthes</i> (Fox, 1981)
—腔肠动物—	<i>Renilla</i> (Hagiwara 等, 1981)

因于膜对其他离子也有相对的非特异性通透。各种卵细胞膜静息电位值与其环境溶液的组分有密切关系,因此,具体分析各种卵的自然生理状态下的环境溶液组分、物理化学特性,并在实验时保持这些环境条件是十分必要的。

1971年, Takahashi 等^[4]对未受精的海胆(*sea urchin*)卵细胞施以电刺激,意外地发现这种卵膜能产生动作电位,其特征与神经、肌肉等可兴奋细胞的动作电位相似。近年来大量研究结果表明,从低等到高等生物的卵细胞,从未成熟到发育成熟的卵,从未受精的卵到已受精的卵的胚胎发育初期,都具有这种电兴奋性。表1列举了已研究过的一些生物种类^[5]的卵的电兴奋特性。

卵细胞膜动作电位的产生,同样是由于膜对各种离子通透性瞬态变化的结果。研究表明,卵细胞膜上存在着 Na^+ 、 Ca^{++} 、 Cl^- 和 K^+ 通道。应用电压箝位技术和药物对不同离子通道的特异性阻塞作用,研究了卵细胞膜各种离子流的特性^[6,7],发现多种生物卵细胞动作电位的上升时相,来源于 Na^+ 或 Ca^{++} 通道的瞬态开放,并可区别出有两种 Ca^{++} 通道和三种不同的 K^+ 通道。对卵发育的不同阶段、受精后早期胚胎阶段与分化了的神经、肌肉等可兴奋细胞的离子通道进行了比较研究,结果表明,不同的离子通道在上述各阶段经历有不同的发生、保持和消失过程。不同动物的 Na^+ 通道的结构和功能特性基本上相同,如被囊类(tunicates)和环节类(annelids)的卵受精前、胚胎早期阶段和分化后的可兴奋细胞中的 Na^+ 通道都是相同的。但是,不同动物的卵和成长了的组织中的 Ca^{++} 通道,彼此间却有不同的结构和功能特性。卵细胞存在各种离子通道及其电兴奋性的生物学功能目前尚不完全清楚,一种可能的作用是为保证实现“电致阻塞多精受精”(electrical polyspermy block)服务的,还有一种可能的作用是为了提供给分化后的可兴奋细胞。

二、受精电位及其发生机制

许多生物的卵在受精过程中,细胞膜电位

会发生暂态的位移,这种因受精而触发的膜电位变化被称为“受精电位”(Fertilization potential)。与卵细胞受电刺激产生的动作电位比较,虽然受精时多数卵膜电位也发生从负向到正向的位移,并到达外负内正的峰值,但受精电位的时程比动作电位要长得多,¹可达数分到数十分钟,并有较复杂的时相,少数生物(如鱼)的卵受精电位有双相性变化。图1是几种研究较多的生物种类卵的受精电位^[3]。下面分别具体说明几种受精电位的特性和离子机制。

1. 棘皮类动物 (Echinoderms) 1956年, Tyler 首先在海星卵上记录到受精时跨膜电位的变化,以后的研究更多地使用了海胆和沙钱(*sand dollar*)的卵。海胆卵直径较大(约100 μm),是体外受精。如图1(a)所示,未受精的海胆卵膜静息电位约 -70mV ,当加入精子并被吸附于卵表面后,膜电位位移到约 $+20\text{mV}$ 的峰值,上升时相发生在受精后的数秒钟内,约1分钟后,幅值下降到负值,10分钟后,电位恢复到 -70mV 的稳定态。受精卵第一次分裂期间,电位继续保持在该水平,与受精电位相对应的膜的通透性变化,至少包括有 Na^+ 、 Ca^{++} 、 K^+ 三种离子^[8]。电学的研究表明,电位的上升时相依赖于 Na^+ 通道的开放,但上升过程中也打开了 Ca^{++} 通道,放射性示踪证明了受精时 Na^+ 和 Ca^{++} 离子的内流都增加了,受精电位的下降时相伴随着 K^+ 的通透性增大,但尚未确定是否 Na^+ 和 Ca^{++} 的通透性已迅速衰减。已证实,膜对 K^+ 的通透性在受精前后发生很大变化,受精10分钟后, K^+ 的电导率增加了8—10倍。

精子触发卵细胞产生受精电位的机制是什么?一个有趣的现象是:在没有精子存在时,在溶液中加入一种水解蛋白酶(pronase)也能诱使棘皮类的卵膜电位正向超射到 0mV 以上^[3],这种用化学物质诱发的电位变化可称为“活化电位”。因此可见,与受精或活化电位相对应的离子通道的控制机构在卵膜上,精子与化学物质相似起一种触发作用,这种机制可以用兴奋性传导过程中突触后电位的发生机制来模拟:

卵膜上的精子受体通道由几个不同结构和功能的亚单位组成,当精子附着到卵膜上与受体部分结合时,触发受体发生构象变化,并进一步调控离子通道闸门的开放。

2. 螯类动物 (Echiurans) 一种属于螯类的生物, *Urechis caupo*, 它的卵直径约 $120\mu\text{m}$, 也是在海水中受精, 受精电位如图 1(b) 所示。在受精数秒钟后, 卵膜电位从 -30mV 静息值上升到约 $+50\text{mV}$ 的峰值, 然后下降到约 $+30\text{mV}$ 的平台, 受精后 10 分钟回复到静息值, 但仍缓慢下降直到最后稳定在 -50 — -60mV 。Jaffe 等^[9]对该种卵受精过程离子通透性的实验研究指出, 受精电位的上升时相主要来源于 Na^+ 通透性的增加, 但在 15 秒以前 Ca^{++} 的通透性也已增加, 受精后 10 分钟, Na^+ 和 Ca^{++} 流的绝对值之比是 16:1, 与此同时, 还有相当于 Na^+ 流量的 H^+ 内流, 但 H^+ 流与电活动的关系尚不清楚。在受精电位后期, 伴随着 Na^+ 和 Ca^{++} 通透性的降低, K^+ 通透性却增加。同样有趣的是, 在没有精子时, 加入胰蛋白酶 (trypsin) 也能诱发与上述特征相似的电位变化

和离子流, 这进一步提示: 精子的触发作用与神经传导中的递质相似。实验不但证实 Na^+ 和 Ca^{++} 在卵膜上各有自己的通道, 而且这两种通道的特性有重要差别: Na^+ 通道的开放是由精子触发的, 具有“精子门控”的特性; 而 Ca^{++} 流的产生却是由于通常的“电压门控”作用使 Ca^{++} 通道开放。 Ca^{++} 内流产生的膜电位变化在前 15 秒钟内叠加到 Na^+ 流产生的电位变化上, 这个时间也正是用电刺激未受精卵产生动作电位的上升时程, 这说明不但受精电位与动作电位的特征不同, 而且产生的离子机制也不同。图中的电位变化实际是依赖于 Na^+ 的精子受体电位与依赖于 Ca^{++} 的动作电位的叠加。

3. 两栖类动物 蛙和蟾蜍的卵直径约 1mm , 在池水中体外受精。1978 年, Cross 和 Elision 观测了蟾蜍的精子进入卵的位点并记录了受精电位, 如图 1(d) 所示^[3]。在 10% Ringer 溶液中, 受精时卵膜电位从静息值 -30mV 升高到约 $+10$ — $+20\text{mV}$ 峰值, 随后逐渐下降, 历时约 20 分钟。与前述的不同, 蛙卵的受精电位

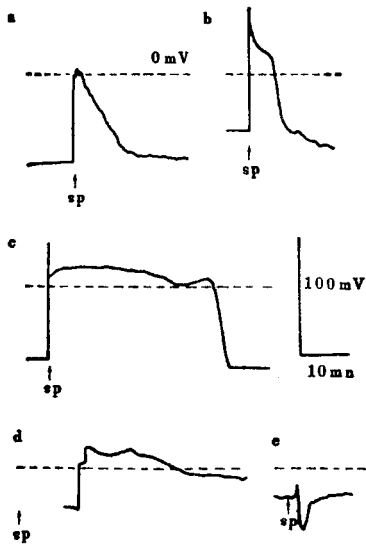


图 1 受精电位

a: 海胆类, *Strongylocentrotus purpuratus*;
b: 螯类, *Urechis caupo*; c: 环节类,
Chaetopterus permanentaceus; d: 蛙类,
Rana pipiens; e: 鱼类, *Oryzias latipes*.
(sp: 受精开始时间)

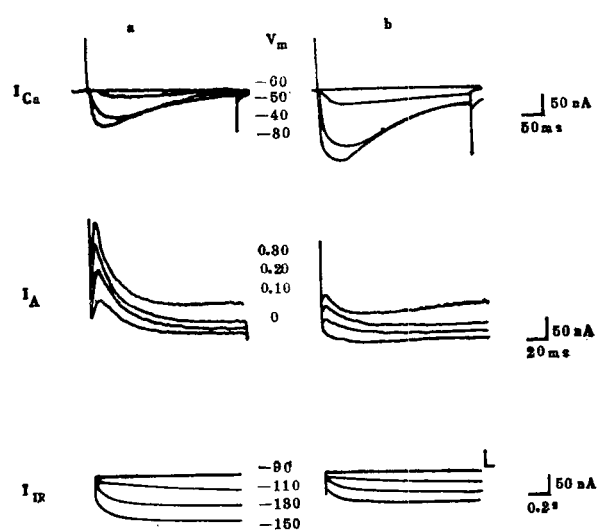


图 2 海星卵的膜电流

a: 未成熟卵; b: 成熟卵。 I_{Ca} : Ca^{++} 电流; I_{A} : 暂
态 K^+ 电流; I_{IR} : 内向整流 K^+ 电流。予置保持电
位: -70mV 。

是膜对 Cl^- 选择通透性增加的结果。值得注意的是,把乙酰胆碱加到含有爪蟾的胚泡期卵母细胞的溶液中,也能观测到与受精电位相似的膜电位变化^[10],该电位变化时程持续 5—10 分钟,乙酰胆碱同样也引起膜对 Cl^- 通透性的增加,这种精子诱导的和乙酰胆碱诱导的卵膜电反应的相似性,再次提示精子在打开卵膜上离子通道过程中可能起一种递质的作用。

4. 鱼类 研究过的鱼卵的受精电位如图 1(e) 所示^[11],在 10% Ringer 溶液中,鱼卵受精后电位从静息值 -25mV 先正向上升到 -15mV ,然后负向下降到约 -55mV ,再上升到 -25mV ,这种双向电位变化时程约 5 分钟,已知下降时相与 K^+ 通透性增加有关,但受精电位的离子机制仍不完全清楚。鱼卵受精机构有它的特殊性:在卵膜上有专门的精子进入的狭窄通道——卵孔,精子只可能单一顺序地进入,但第一个精子进入后卵孔就堵塞了。人为地使鱼卵膜电位保持在 -80 — $+50\text{mV}$ 之间变化,对精子进入卵没有影响。

目前,对精子门控的离子通道的结构及通道开关动力学从分子水平了解甚少。关于由精子触发引起的膜对 Na^+ 、 Ca^{++} 等离子电导的增加与膜电位的关系, Lansman (1983)^[12] 用电压箝位技术对海星卵研究的结果表明,精子门控的通道开放以后,其开关动力学过程仍与膜电位有关。所以,精子只是引起电导变化的起始条件,随后的电导变化动力学受膜电位的调控。1984 年, Jaffe^[13] 进一步用膜片箝位技术研究了蛙卵受精过程中单个离子通道的变化,测出 K^+ 的单通道电导值是 30 — 40ps 。

三、卵细胞发育各阶段离子通道的变化

日本的 Takahashi 研究组对卵细胞各个发育阶段离子通道的变化进行了开创性的研究,他们采用被囊类动物 *Halocynthia roretzi* 的卵,研究了受精前、受精后直到分化出有条纹的肌纤维各阶段电兴奋性的变化,发现在未受精和刚受精的卵膜中含有 Na^+ 和 Ca^{++} 通道,到完

全长成的肌纤维中, Ca^{++} 通道占了统治地位、结果提示:在发育分化期间,有些类型的通道消失了,有些类型的通道密度增加了,并可能有新型的通道产生。Takahashi 和 Yoshii (1981)^[14] 用细胞松弛素 B (cytochalasin B) 对被阻滞在不同分裂期的海鞘 (*ascidian*) 胚胎的电兴奋性进行了分析,主要结果有:当对照胚胎已孵化成幼虫时,在被阻滞于 64 细胞分裂期的胚胎中,对标定的肌肉分裂球 (muscle blastomeres) 诱发出了 Ca^{++} 流,并在一些外胚层分裂球中诱导出与 Na^+ 和 Ca^{++} 相关的动作电位。用电压箝位技术记录到阻滞于 16 细胞分裂期的胚胎膜电流,该胚胎在电特性上与单个卵细胞相似,原因在于各分裂球间有紧密的电偶联,直到 25 小时后才发生去偶联。膜电流随发育时间的变化是,开始的 10 小时期间, Na^+ 和 Ca^{++} 电流逐渐减小到几乎消失,但 17 小时时,两种电流再次增加;17 小时以后, Na^+ 和 Ca^{++} 电流与膜电位的关系又与单个卵细胞的相似了,而延迟的外向 K^+ 电流在 20 小时前逐渐增加,然后保持不变。他们的结论是:在海鞘胚胎的兴奋膜的分化过程中,看来没有各种通道特性的变异,而是各种通道的数目发生了变化。但 Takahashi 随后的文章又指出,离子通道自身的性能也发生了变化。

卵膜离子通道的变化还发生于受精前的成熟期, Moody 和 Lansman^[5] 的实验结果是:把海星类 *Leptasterias hexactis* 的未成熟的卵放到成熟激素 N-甲基腺嘌呤 ($4 \times 10^{-5}\text{M}$) 中,在 70—90 分钟完成成熟过程,其间发生的 Ca^{++} 流、暂态 K^+ 流和 K^+ 整流电流的变化如图 2 所示,成熟的卵的 Ca^{++} 流增加而两种 K^+ 流减小。这种变化的结果是使成熟的卵的动作电位阈值降低,上升速率增加并有大的超射,其意义可能是有利于实现“电致阻塞多精受精”功能。

四、电场对卵细胞受精过程的调控

1976 年, Jaffe^[15] 对海胆的卵进行研究发现,在卵受精后 35—45 秒,膜电位上升并能阻止其他精子再进入卵内;而在前 35—45 秒钟期

间,其他精子可进入卵内导致多精受精。之后大量的研究表明,受精电位的正向变化具有阻止多精受精的功能是确定无疑的,称为“电致阻塞多精受精”。近年的一些实验结果可概括如下:(1)在卵受精产生受精电位的同时,可以人为地对卵施以电刺激,再叠加上一个外电场来调节膜电位,当外加电场与受精电位电场反向时,被调节后的膜电位越低,发生多精受精的机率越大。(2)对未受精的卵通以电流,使卵膜电位升高到正的水平,精子就不能再进入卵内,即可阻止受精过程的发生,这个结果提供了一种用电场调节阻止受精的途径。(3)当卵受精产生的受精电位已上升到正的水平后,再通以电流,使卵膜电位下降到负的水平,则又能诱使其他精子再次与卵融合,这个结果提示了用电场调节实现多精受精的途径。

由上述用电场调节卵受精过程的实验使我们对卵受精过程的认识得到如下的启示:(1)与电场有关的精卵融合可分为两个过程:首先,精子的头部与卵膜上的受体相结合,使精子“固着”于卵膜上;其次,发生卵细胞膜的融化,精子进入卵内实现精核和卵核的融合。(2)精子与卵膜的“固着”只有在负的膜电位条件下才能实现,即必须有外正内负的电场取向时,精子头部才能与卵膜上的受体相结合,这提示精子头部顶端的信息分子可能带有负电荷基团。(3)精-卵“固着”后,精子触发了其受体的离子通道开放,导致 Na^+ 、 Ca^{++} 等离子大量内流,使膜电场变为外负内正的取向。由于电场取向的改变,当其他精子再接近卵膜表面时,由于电的排斥作用,阻止精子头部与卵膜上的受体相结合,

以实现电致阻塞多精受精的功能。

人为地用电场控制受精过程,不但可通过对卵细胞直接通以电流来实现,而且可能利用对精子和卵共存的环境施加电场来控制。改变外加电场的条件,既可改变卵细胞膜电位的方向和大小,也可由作用于精子的电场影响精子向卵的游动、接近和“固着”,就有可能根据人们的愿望,实现促进单精受精、阻止单精受精、阻塞多精受精或促进多精受精。就至今已研究过的生物品种而言,除少数(如鱼、仓鼠)外,都具有电致精-卵融合的机制,因此,今后把深入研究精卵融合机制与发展电场调控技术结合起来,将展现出有积极的经济和社会效益的前景。

参 考 文 献

- [1] Tyler, A. et al.: *Biol. Bull.*, **111**, 153, 1956.
- [2] Hiramoto, Y.: *Embryologia*, **4**, 219, 1959.
- [3] Hagiwara, S. and Jaffe, L. A.: *Ann. Biophys. Bioeng.*, **8**, 385, 1979.
- [4] Takahashi, K. et al.: *Science*, **171**, 415, 1971.
- [5] Hagiwara, S.: *Membrane Potential-Dependent Ion Channels in Cell Membrane*, Part VI, Raven Press, N. Y., 1983.
- [6] Hagiwara, S. et al.: *J. Gen. Physiol.*, **65**, 617, 1975.
- [7] Hagiwara, S. et al.: *J. Physiol.*, **318**, 123, 1981.
- [8] Chambers, E. L. and Armendi, J. de.: *J. Gen. Physiol.*, **72**, 3a, 1978.
- [9] Jaffe, L. A. et al.: *J. Gen. Physiol.*, **73**, 469, 1979.
- [10] Kusano, K. et al.: *Nature*, **270**, 739, 1977.
- [11] Nuccitelli, R.: *Dev. Biol.*, **76**, 483, 1980.
- [12] Lansman, J. B.: *J. Physiol.*, **345**, 353, 1983.
- [13] Jaffe, L. A.: in “8th International Biophysics Congress Book of Abstracts”, 264, 1984.
- [14] Takahashi, K. and Yoshii, M.: *J. Physiol.*, **315**, 515, 1981.
- [15] Jaffe, L. A.: *Nature*, **261**, 68, 1976.

[本文于1985年9月18日收到]