

盘基网柄菌多细胞体大小调节中细胞计数因子的研究

杨春霞 李丽 杨硕 王大磊 侯连生*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 在盘基网柄菌发育过程中, 通过细胞计数机制来调节发育中盘基网柄菌多细胞体的大小。计数因子是由 countin、CF50、CF45-1 等亚基组成的活性分子, 在多细胞体大小调节中有着重要作用。现对计数因子的各亚基及其功能, 以及它通过 cAMP 信号途径、糖代谢途径、AKI/PKB 信号途径协同调控子实体大小的作用机制进行综述。

关键词 计数因子; 子实体; cAMP 脉冲; AKI/PKB 途径

多细胞发育调控机制的研究已取得长足的进展, 并积累了丰富的理论, 但是发育中组织与器官的大小是如何控制的? 对此则知之甚少。研究果蝇、小鼠和奶牛后发现组织与器官的大小的控制主要依赖细胞生长及分裂的适当控制^[1-3], 小鼠的使依赖细胞周期蛋白蛋白激酶 2 失活的蛋白质(p27)在调节细胞数的过程中起重要作用, p27 的 N 端能与细胞周期蛋白及细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)结合并抑制它们的功能, 使细胞周期不能通过 G₁ 期, 停止分裂, 从而控制组织中的细胞数^[4]。Merlin 蛋白是 2 型纤维神经瘤基因(nf2)的产物, 在小鼠、果蝇和人类细胞中都有抑制肿瘤, 调节细胞凋亡和控制细胞数目的功能, 是组织生长的负调节因子。若 merlin 基因突变, 果蝇的某些组织, 如胸、触角、翅膀和腿, 会过度生长^[5]。盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)是多细胞发育最简单的生物之一。在其多细胞发育过程中, 细胞主要分化成孢子细胞和柄细胞, 因此也存在某种机制来调节多细胞体各组织的大小。尽管盘基网柄菌的多细胞体来自大量个员细胞聚集, 这与高等生物的细胞生长分裂不同, 但是, 多细胞体大小调节机制遵循的规律大致是相似的, 即度量组织的大小, 与临界值相比较并进行适当的调整。

盘基网柄菌在营养丰富条件下, 二分裂繁殖生长。剥夺营养后, 触发盘基网柄菌细胞进入多细胞发育期。在趋化因子调控下, 10⁵ 个细胞聚集起来形成细胞流样结构, 然后形成半圆的细胞丘, 这与组成果蝇或水螅原肠胚的细胞数几乎相同; 随后经历形态发生和细胞分化, 形成成熟的子实体。子实体由休眠的孢子球和空泡状的细胞组成的孢柄组成。为了

应付恶劣环境和种的延续, 必须具备尽可能多的休眠孢子, 但又要有足够高的和强壮的柄支撑孢子球, 使孢子能够扩散到营养丰富的环境中。如果在多细胞体终末分化前, 移走部分前孢子细胞或前柄细胞, 剩余的细胞体会再分化来校正错误的细胞比例。如果休眠孢子数量太少, 孢子发散到新环境中的效率就会降低, 反之, 如果孢子球太大, 孢柄支撑力不够而倒塌。为了阻止盘基网柄菌形成过大或过小的子实体, 细胞会自分泌一种称之为计数因子(counting factor, CF)的蛋白质来调节多细胞体中细胞比例。

1 细胞 CF 的发现

早在 1996 年, Spann 等^[6]用反义鸟枪法突变盘基网柄菌细胞时, 发现有一些突变株形成的子实体非常小, 其中有一突变株形成的子实体则异常大。后来 Brock 筛选到形成异常小的聚集体的突变细胞, 称为 *smlA* 突变细胞^[7]。在发育早期, *smlA* 突变细胞形成的细胞聚集体与野生型细胞聚集体大小相近, 之后前者分开形成由 10³ 个细胞组成的小聚集体; 而同样条件下的野生型细胞仍是 10⁵ 个细胞组成的聚集体。为验证 *smlA* 突变细胞是否会产生影响聚集体大小的胞外因子, 把突变细胞与野生型细胞混合, 使它们共聚集, 最后发育成嵌合体。令人兴奋的是在嵌合体中只要有 5% 的突变细胞就足以使占主导地位的野生型细胞形成小的多细胞体。进一步的研究发现, 用培养过饥饿的突变细胞的培养液来发育野生型

收稿日期: 2008-01-30 接受日期: 2008-09-10

国家自然科学基金项目资助(No.30470226)

* 通讯作者。Tel: 021-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

细胞,同样会产生不正常的小聚集体。这说明了在这种培养液中存在调节多细胞大小的因子,同时也表明在 *smlA* 突变细胞中与调节聚集体大小有关的蛋白质分泌发生了改变。

Brock 等^[8]纯化了 *smlA* 突变细胞分泌的活性因子,发现它们是一个复合物(>450 kDa),至少含有 5 个多肽。他们发现野生型细胞也分泌该复合物,只不过浓度十分低。据推测这个复合物可能起“CF”作用。假设发育中细胞用其浓度变化来监控聚集体的大小,那么 *smlA* 突变细胞有可能过多分泌计数因子,结果引起多细胞聚集体裂成几个较小的多细胞体,因为它们可能感知聚集体体积太大了。按照这个假设,降低 CF 的浓度应该有相反的结果,即形成异常的大聚集体。剔除细胞的 CF 中一个蛋白质亚单位 *countin*, 并使其发育,如同预料那样,结果形成了异常大的聚集体。这种聚集体分化成的子实体有很长的柄,在增大的孢子球的重压下,常常会倒塌。用野生型细胞条件培养液处理 *countin* 突变细胞,突变细胞形成多细胞体略小,但数目增多。表明剔除 *countin* 基因不影响细胞对添加的外源计数因子反应的能力。用来自 *smlA* 突变细胞的条件培养液会使 *countin* 突变细胞形成更小,数目更多的聚集体。这些数据说明了反应不仅是功能性的,而且也是浓度依赖性的。正如预料那样,用来自 *countin* 突变细胞的条件培养液处理 *countin* 突变细胞,它们的表现型不受任何影响。用抗 *countin* 抗体吸附来自 *smlA* 突变细胞的条件培养液,使其活性降低一半。这些实验都证实聚集体大小与 CF 浓度间存在一定的比例关系。

2 细胞 CF 的组成

CF 是一个由多亚基组成的多肽,目前鉴定出来的有 4 种,最早分离出来的是 *countin*, 是一个 40 kDa 的亲水蛋白,在 *countin* 基因突变的细胞株中,检测不到 CF 的分泌,形成了大约含有 2×10^5 个细胞的巨大子实体;将野生型细胞置于含有抗 *countin* 抗体的平板上发育时,形成的子实体的数目减少,体积增加;同时发现 *countin* 突变细胞存在很高的细胞间黏附^[8,9],提示 *countin* 与细胞黏附分子有一定关系。

Okuwa 等^[10]从盘基网柄菌的基因组发现一个新的基因,称为 *countin2*, 其氨基酸序列和 *countin* 有 40% 的一致性,和野生型细胞相比, *countin2* 突变细胞形成更小的子实体。RT-PCR 结果显示在多细胞发育过程中 *countin* 逐渐减少,而 *countin2* 是先增加

后减少。把 *countin* 突变细胞和 *countin2* 突变细胞混在一起发育而成的嵌合体,子实体大小和数目几乎和野生型细胞一样,这说明了 *countin* 和 *countin2* 的两者决定了网柄菌多细胞结构的正常大小,不过 *countin2* 是不是 CF 的一个组分,目前还不确定。

另一个亚单元分子量为 50 kDa (CF50),其基因编码的多肽主链只有 28 kDa,转录后糖基化修饰形成 50 kDa 产物,与溶菌酶有 30% 的同源性,但只有很低的酶活性,含有明显的丝氨酸-苷氨酸模体。*cf50* 基因突变细胞中,细胞间也存在的高黏附性和低的运动能力,突变细胞会形成异常大的子实体。将重组 CF50 整合到 *cf50* 缺失的细胞中,发现子实体逐渐恢复正常^[11]。分别用重组 *countin* 和重组 CF50 处理野生型细胞都可以降低细胞团大小,但是在重组 *countin* 存在的情况下,再用重组体 CF50 处理,影响细胞团大小的效果会有所增加^[12],说明两者在调控子实体大小上可能有协同作用。但缺乏 CF50,分泌的 *countin* 容易降解,提示 CF50 有保护 *countin*,使其免受降解的功能。与 *countin* 不一样,CF50 突变细胞引起前孢子细胞特有基因 *sp70* 高表达,因此 CF50 与细胞分化也有密切的关系。

CF45-1 也是 CF 的一个组成部分,然而与 *countin* 突变细胞和 *cf50* 突变细胞得到的结果不一样, *cf45-1* 突变细胞有时形成子实体比野生型细胞的要小,说明 CF45-1 在 CF 组分中可能起着与 *countin* 和 CF50 相反的作用。序列分析显示 CF45-1 与溶菌酶有一定的相似性,但重组 CF45-1 蛋白没有溶菌酶活性。CF45-1 主要在细胞发育的早期表达,和 *countin* 突变与 *cf50* 突变细胞一样,存在高的细胞黏附性和低的细胞运动,但 *cf45-1* 缺失细胞内葡萄糖水平较高^[13]。

CF60 是 60 kDa 的多肽,和酸性磷酸酶的氨基酸序列有相似性,但没有酸性磷酸酶的活性。在 CF50 缺乏的时候,形成 CF60,并被细胞所分泌。降低 CF60 水平能导致更大子实体的形成,过表达 CF60 则形成小的子实体^[14]。重组 CF60 降低细胞团大小的能力不需要 CF45-1 或 *countin* 组分,但需要 CF50 的存在,所以有可能 CF50 和 CF60 之间有相互作用。但最近有报道说 60 kDa 的多肽不是 CF 的组成部分,而是一个 150 kDa 的细胞增殖抑素的组成部分^[15],有抑制细胞增殖的功能,但这个增殖抑素和 CF 有什么关系,还不是很清楚。

3 细胞 CF 调节途径

3.1 影响细胞黏附和细胞运动

Bouffay 等^[9]观察了过表达 CF 的细胞(即 *smlA* 突变细胞)、野生型细胞和 *countin* 突变细胞早期的发育过程,发现三者细胞聚集区域大小几乎相同,但发育结果是 *smlA* 突变细胞形成小的子实体, *countin* 突变细胞则形成大的子实体。这说明 CF 可能是感知细胞聚集区域大小来调控细胞团大小的。计算机模拟细胞聚集结果表明影响子实体大小的关键因素取决于细胞流内细胞的运动力(FM)和细胞黏附力(FA)的比值,如果 $FM/FA > 1$,细胞流会分解形成小子实体;如果 $FM/FA < 1$,细胞流不会分解,结果形成大子实体。CF 过表达,可能会感知细胞流太大,结果大细胞流分解形成小细胞流。所以 CF 可能是通过影响细胞黏附性和细胞运动性来调节子实体大小的。

在早期的网柄菌细胞发育中,主要有两种类型的细胞黏附: EDTA 敏感型和 EDTA 耐受型。EDTA 敏感型黏附是由 *gp24* 所调节的,而 EDTA 耐受型黏附是由 *gp80* 调节的^[16]。把细胞暴露在抗 *gp24* 抗体中降低细胞间黏附水平可以导致更小的子实体的形成,相似的情况也出现在 *gp80* 上^[17]。比较野生型细胞和 *countin* 突变细胞,在 *smlA* 突变细胞中, *gp24* 的表达延迟并且数量也减少,与之对应,细胞黏附力较低。与野生型细胞和 *smlA* 突变细胞相比, *countin* 突变细胞则表达更多的 *gp24*^[9],这些都说明了 CF 可能是通过调节黏附蛋白的表达量来调控细胞间黏附力的。

CF 还可以通过增加细胞的运动性使细胞流分解。在盘基网柄菌细胞中,细胞的运动性是由肌动蛋白和肌球蛋白所调节的。两种蛋白质都会在 cAMP 刺激后经历一个动力学的重新分布,在 cAMP 刺激后几秒钟内 F-肌动蛋白(F-actin)就有明显的增加^[18]。刺激 *smlA* 突变细胞显示 F-肌动蛋白水平较高,而 *countin* 突变细胞的 F-肌动蛋白水平较低,若存在抗 *countin* 抗体,野生型细胞也显示出较低的 F-肌动蛋白水平^[9]。这些都说明了 CF 可以调节细胞内 F-肌动蛋白的量。CF 是不是也影响了其他主要调节细胞运动的蛋白质呢?比较 *smlA* 突变, *countin* 突变和野生型细胞的蛋白质表达差异,发现 ABP-120 蛋白(F-肌动蛋白交联蛋白,在稳定新形成的伪足中起主要作用^[19])表达存在差异。磷酸化可引起肌球蛋白解聚,去磷酸化则可激活肌球蛋白开始装配^[20]。CF 能提高肌球蛋白磷酸化的水平^[23],在一定程度上 CF 是抑制了肌球蛋白的装配。因此 CF 通过调节 ABP-120 表达水平,增强肌动蛋白聚合,降低肌球蛋白聚合来调控细胞流内细胞的运动,从而调节子实体大小。

3.2 cAMP 和 cGMP 脉冲的调控

高浓度的 cAMP 脉冲刺激可使野生型细胞形成小的子实体^[21]。如果把细胞暴露在纯的 CF 中,一分钟内即可增加 cAMP 脉冲,但降低 cGMP 脉冲则需较长时间^[22]。这提示存在一个快速的影响腺苷酸环化酶的反应途径和一个较慢的调节鸟苷酸环化酶的反应途径,很有可能是通过这两种途径协同作用来调节网柄菌子实体大小的。CF 不影响 cAMP 受体或与之相关联的 G 蛋白、胞浆腺苷环化酶调节子(cytosolic regulator of adenylyl cyclase, CRAC),所以调节有可能发生在 G 蛋白和腺苷酸环化酶之间。增强 cAMP 脉冲刺激可提高细胞的运动性,提高 cAMP 磷酸二酯酶活性则降低了细胞的运动性^[23]。

3.3 对葡萄糖和乙醛还原酶的调节

CF 能明显影响细胞内葡萄糖代谢途径,缺乏 CF 活性的细胞株和被抗体抑制 CF 活性的野生型细胞的内都有很高的葡萄糖水平,然而过量分泌 CF 的细胞株只有很低的葡萄糖水平^[24-27]。细胞暴露在 *countin* 中一分钟即能降低葡萄糖水平。细胞外葡萄糖浓度只要提高 1 mmol/L 就足以抵消高水平 CF 的影响:葡萄糖能部分地抵消 CF 的关键组分如 *countin* 和 CF50 的作用,这些结果说明葡萄糖可能是 CF 信号通路的一个下游组成部分。增加葡萄糖或是降低 CF 都可以提升 *gp24* 表达水平和肌球蛋白聚合,降低肌动蛋白聚合和细胞运动性。添加葡萄糖会减弱 CF 对 cAMP 脉冲的调节作用。然而葡萄糖本身还是它的代谢物影响这条调节途径的?还不是很清楚。

双向电泳结果发现还有一个蛋白质随着胞外 CF 浓度的变化而变化,后发现该蛋白质与乙醛还原酶有很高的同源性^[28]。醛糖还原酶可将葡萄糖和还原型辅酶 II 转变为山梨醇和辅酶 II^[21]。研究发现干扰乙醛还原酶的表达会形成巨大的子实体。乙醛还原酶的基因(*alrA*)突变细胞分泌极少 *countin* 和 CF50,细胞的黏附性正常但有较低的运动性^[29]。气相色谱分析显示 *alrA* 突变细胞中许多代谢物的浓度都发生了变化,所以有可能乙醛还原酶是通过影响糖代谢途径和 CF 分泌来影响子实体大小的。

3.4 对蛋白激酶 B(Akt/PKB)的调节

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB)也是细胞运动和肌球蛋白聚合的重要调节者,它处于 cAMP 信号途径中肌球蛋白的上游。cAMP 脉冲可以诱发 Akt/PKB 移位到质膜边缘处,同时激活激酶活性,再通过 Akt/PKB 途径,进一步细调细胞运动^[30]。在抗 *countin* 的抗体存在的条件下,发育的野生型细胞的

AKt/PKB 的膜转移能力和激酶活性都呈下降趋势。与此相反,在重组 countin 存在的条件下,野生型细胞表现出 Akt/PKB 转移活性及激酶活性都得到增强。进一步实验发现 countin 并不直接提升 AKt/PKB 的表达量^[31],这提示了 CF 增加细胞运动性是通过增加 cAMP 刺激,加快 Akt/PKB 的转移和提高酶活性来实现的。

4 展望

总之,盘基网柄菌多细胞体大小调节的研究取得了一定进展,但还有许多问题需要进一步的探索。因为胞外磷酸二酯酶的活性过高的话,也会产生小的子实体^[13],黏附分子 gp80 过表达或剔除 MEK1 激酶的基因都会产生小的多细胞体^[32, 33]。这说明计数因子可能不是决定子实体大小的唯一的因素。若用来自这些突变细胞的条件培养液研究对多细胞体大小的影响,将有助于阐明这些因子与计数因子在功能上的关系。组成计数因子复合物的其他蛋白质是什么,功能如何? *smIA* 是如何影响它们分泌的?使细胞以浓度依赖方式来监测计数因子并对之作出反应的受体及信号传递是什么?很有可能多细胞体大小的调节是一个复杂调控网络,其协同作用调节了细胞的数目。深入研究这些问题不但有助于阐明盘基网柄菌子实体大小调节的原因,而且也有助于理解高等生物组织器官大小调节的机制,并对由于细胞增殖或细胞数目感知调控紊乱所造成的疾病如肿瘤也会有很大

的帮助。

参考文献(Reference)

- [1] Herranz H *et al.* *Development*, 2006, **133**: 2617
- [2] Inagaki A *et al.* *J Nutr Sci Vitaminol*, 2007, **53**: 377
- [3] Baldwin RL *et al.* *J Dairy Sci*, 2004, **87**: 2977
- [4] Lacy ER *et al.* *Nat Struct Mol Biol*, 2004, **11**: 358
- [5] Hamaratoglu F *et al.* *Nat Cell Biol*, 2006, **8**: 27
- [6] Spann T *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 5003
- [7] Brock DA *et al.* *Development*, 1996 **122**: 2569
- [8] Brock DA *et al.* *Genes Dev*, 1999, **13**: 1960
- [9] Roisin-Bouffay C *et al.* *Mole Cell*, 2000, **6**: 953
- [10] Okuwa T *et al.* *Dev Growth Differ*, 2001, **43**: 735
- [11] Brock DA *et al.* *Development*, 2002, **129**: 3657
- [12] Brock DA *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 52262
- [13] Brock DA *et al.* *Eukaryot Cell*, 2003, **2**: 788
- [14] Brock DA *et al.* *Eukaryot Cell*, 2006, **5**: 1532
- [15] Brock DA *et al.* *Development*, 2005, **132**: 4553
- [16] Loomis WF. *Dev Genet*, 1988, **9**: 549
- [17] Siu CH *et al.* *Dev Genet*, 1990, **11**: 377
- [18] Dormann D *et al.* *Cell Motil Cytoskeleton*, 2002, **52**: 221
- [19] Funamoto S *et al.* *Cell*, 2002, **109**: 611
- [20] Iijima M *et al.* *Dev Cell*, 2002, **3**: 469
- [21] Newell PC. *Biosci Rep*, 1995, **15**: 445
- [22] Tang L *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 27663
- [23] Tang L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 1371
- [24] Jang W *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 39202
- [25] Jang W *et al.* *Eukaryot Cell*, 2005, **4**: 72
- [26] Jang W *et al.* *J Biol Chem*, 2006, **281**: 16377
- [27] Gao T *et al.* *Eukaryot Cell*, 2007, **6**: 1538
- [28] Lee H. *Yeast*, 1998, **14**: 977
- [29] Ehrenman K *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 837
- [30] Chung CY *et al.* *Mol Cell*, 2001, **7**: 937
- [31] Gao T *et al.* *Eukaryot Cell*, 2004, **3**: 1176
- [32] Faix J *et al.* *J Cell Sci*, 1992, **102**: 203
- [33] Ma H *et al.* *EMBO J*, 1997, **16**: 4317

Cell Counting Factor and Its Regulation on the Size of Multicell in *Dictyostelium discoideum*

Chun-Xia Yang, Li Li, Shuo Yang, Da-Lei Wang, Lian-Sheng Hou*
(School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract During the development of *Dictyostelium discoideum*, the size of multicell is regulated by counting mechanism. The cell number counting factor (CF) is a bioactive molecule composed of countin, CF50, CF45-1 and other subunits, and have important effects on the regulation of cells body size. This article review these subunits and their functions, and the mechanism of cAMP pulse, glycometabolic pathway, AKt/PKB pathway involved in regulation of CF.

Key words counting factor; fruiting body; cAMP pulse; AKt/PKB pathway

Received: January 30, 2008 Accepted: September 10, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470200)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn