

- [7] Schepers, G. E. et al., 2000, *Nucleic. Acids. Res.*, **28**(6):1473-1480.
- [8] Hossain, A. et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, **276**(20):16817-16823.
- [9] Colvin, J. S. et al., 2001, *Cell*, **104**(6):875-889.
- [10] Moniot, B. et al., 2000, *Mech. Dev.*, **91**(1-2):323-325.
- [11] Muroya, K. et al., 2000, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**(9):3094-4100.
- [12] McElreavey, K. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**(8):3368-3372.
- [13] Bardoni, B. et al., 1994, *Nat. Genet.*, **7**(4):497-501.
- [14] Jimenez, R. et al., 1996, *Trends Genet.*, **12**(5):164-166.
- [15] Graves, J. A., 1998, *Bioessays*, **20**(3):264-269.
- [16] Pask, A. et al., 1997, *Genomics*, **41**(3):422-426.
- [17] Lim, H. N. et al., 2000, *Hum. Genet.*, **107**(6):650-652.
- [18] Veitia, R. A., et al., 2001, *Mol. Cell Endocrinol.*, **179**(1-2):3-16.
- [19] Graves, J. A., 1998, *J. Exp. Zool.*, **281**(5):472-481.
- [20] Bergstrom, D. E. et al., 2000, *Genesis*, **28**(3-4):111-124.
- [21] Pask, A. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**(24):13198-13202.
- [22] 郭金虎等, 2001, *动物学报*, **47**(2):145-149.
- [23] Renfree, M. B., et al., 2001, *Int. J. Dev. Biol.*, **45**(3 Spec No):557-567.
- [24] Bianchi, N. O. et al., 1993, *Chromosoma*, **(102)**:389-395.
- [25] Baumstark, A. et al., 2001, *Mol. Genet. Metab.*, **72**(1):61-66.
- [26] 朱必才等, 1998, *动物学报*, **44**(2):209-212.
- [27] Sutou, S. et al., 2001, *Mamm. Genome*, **12**(1):17-21.
- [28] Hanley, N. A., et al., 2000, *Mech. Dev.*, **91**(1-2):403-407.
- [29] Ostrer, H. et al., 2001, *Clin. Genet.*, **59**(4):207-215.

## 细胞周期蛋白和哺乳动物生殖

刁红录 徐立滨 杨增明\*

(东北农业大学生命科学学院 哈尔滨 150030)

细胞周期蛋白(cyclins)是一类随细胞周期变化而循环出现和消失的蛋白质。1983年首先在海胆卵中发现<sup>[1]</sup>。当时发现两种细胞周期蛋白,分子量分别为55kD和42kD,其中分子量较大的被称为细胞周期蛋白A,较小的称为细胞周期蛋白B。后来在酵母发现了3个与从细胞周期G1期向S期过渡有关的基因——CLN1、CLN2和CLN3<sup>[2]</sup>。这三种基因突变的酵母都不能实现G1→S期的过渡。通过对CLN基因突变的酵母进行挽救的方法从人的基因库中筛选得到三个基因,它们均与人体细胞G1→S期的过渡有关,其产物分别被命名为细胞周期蛋白C、D和E<sup>[3,4,5]</sup>。1993年Tamura等用交叉杂交筛选法,自大鼠成纤维细胞cDNA文库发现了新型的细胞周期蛋白G<sup>[6]</sup>。

细胞周期蛋白在整个细胞周期中的含量并非固定不变的,不同细胞周期蛋白的含量在其作用的细胞周期时相内达到高峰,然后迅速降解失活。根据其峰值和所起主导作用的时期通常分为G1期和M期细胞周期蛋白,前者包括细胞周期蛋白C、D、E,后者包括细胞周期蛋白A、B。细胞周期蛋白的结构均有高度保守的细胞周期蛋白盒结构,还有降解盒结构参与自身降解。细胞周期蛋白通过与相应的周期蛋白依赖激酶(Cdks)结合形成具有蛋白激酶活性的异源二聚体的复合物,细胞周期蛋白为调节亚基,Cdk为催化亚基,参与磷酸化多种蛋白,调节与

DNA复制和有丝分裂等有关的分子事件。

### 一、细胞周期蛋白和配子发生

成熟促进因子(MPF)在卵母细胞成熟的过程中起着很重要的作用,已证实它是由p34<sup>cd2</sup>和细胞周期蛋白B组成<sup>[7]</sup>。利用免疫细胞化学证实,细胞周期蛋白B定位在猪未成熟卵的细胞质中,而在成熟卵中则定位在细胞核中,并且在中期染色体上表达很强。猪卵成熟过程中细胞周期蛋白B的定位变化,以及在中期染色体的表达,与MPF在正发生有丝分裂的细胞中的分布相似,说明在卵成熟过程中细胞周期蛋白B可能起着重要的作用<sup>[8]</sup>。另外,MPF在猪卵成熟时期和活化时期的作用分子机制不同。已经有人证明卵子成熟是由于p34<sup>cd2</sup>磷酸化作用受到抑制,而卵活化是由于细胞周期蛋白B的降解<sup>[9,10]</sup>。

配子发生过程伴随着细胞的增殖,而细胞周期蛋白与细胞的增殖有着密切的关系。用原位杂交和RNA印迹检测发现,细胞周期蛋白B1主要在早期的圆形精子细胞核周围和正在生长的卵泡中表达<sup>[11]</sup>。以后发现,细胞周期蛋白B2主要在粗线期的精母细胞和正在生长的卵泡和颗粒细胞中表达<sup>[12]</sup>,暗示细胞周期蛋白B可能在配子发生过程中

\*通讯作者。

起重要作用。

细胞周期蛋白 A1 由 *Ccnal* 基因编码。已证实 *Ccnal* 基因敲除小鼠是不育的,原因是在第一次减数分裂以前的精子发生过程受到抑制,可能是由于 *Ccnal* 基因敲除小鼠的精子细胞细胞凋亡增加。这说明细胞周期蛋白 A1 在小鼠的精子发生过程中起着重要的作用<sup>[13]</sup>。

在未成熟小鼠睾丸中,细胞周期蛋白 A1 在第一次减数分裂的粗线期后期到双线期的细胞核中表达,并且一直持续到减数分裂中期,主要定位在次级精母细胞核中。细胞周期蛋白 A2 仅仅在细线期前的精母细胞中表达,并且当细胞进入减数分裂时迅速消失<sup>[14]</sup>。以后发现,在进行减数分裂的精子细胞上,细胞周期蛋白 A1 通过参与激活一些蛋白激酶及与 G2→M 期转换有关的磷酸化酶,或通过磷酸化细胞周期蛋白磷酸脂酶 *cdc25* 来参与成熟促进因子最初的扩增,并在精子发生过程中起作用<sup>[15]</sup>。

细胞周期蛋白 D2 对于卵泡的成熟是非常重要的。已证实证明,细胞周期蛋白 D2 基因敲除小鼠的卵泡不能发育,是由于与正常的小鼠相比,卵泡刺激素(FSH)诱导的颗粒细胞的增殖在细胞周期蛋白 D2 基因敲除小鼠明显的受到抑制<sup>[16]</sup>。同样细胞周期蛋白 D 在精子的发育过程中也起着重要的作用。在出生后早期的睾丸中,细胞周期蛋白 D3 主要在精原细胞和间质细胞中表达。在成年的睾丸中,细胞周期蛋白 D3 在最终分化的精细胞中表达。但在胚胎时的卵巢中,细胞周期蛋白 D3 仅仅在体细胞中表达,在出生后的卵巢中主要在原始和小卵泡的卵母细胞核中表达,并且随着卵母细胞的生长而减少。在未成熟个体的睾丸和卵巢中可检测到细胞周期蛋白 D3 相关激酶的活性。这表明细胞周期蛋白 D3 在配子发生过程中对生殖系的细胞分化和分裂,以及对有丝分裂和减数分裂的精密调控具有重要的作用<sup>[17]</sup>。

在睾丸发育时期,只有细胞周期蛋白 D2 在增殖期(E14.5 - 15.5)和休眠期的性原细胞中表达。当性原细胞在出生后再次增殖并且形成 A1 型精原细胞时,三种细胞周期蛋白 D 在性原细胞中都有表达,或者在新形成的 A1 型精原细胞上或者在二者上都能看到细胞周期蛋白 D 的特异性表达。随后在成年鼠的睾丸上进行相同的实验时,也发现细胞周期蛋白 D1 和 D3 在贯穿整个生精上皮的一些精原细胞中都有表达,这表明细胞周期蛋白 D3 可能对精原细胞的增殖有调节作用。但细胞周期蛋白

D2 只在当未分化的精原细胞发育成为分化的精原细胞时才有特异性表达。细胞周期蛋白 D2 与细胞周期蛋白 D1 及 D3 不同,在精子分化的过程中可能起着重要的作用<sup>[18]</sup>。

## 二、细胞周期蛋白和早期胚胎发育

细胞周期蛋白 D1 对小鼠的早期胚胎发育是至关重要的。细胞周期蛋白 D1 基因敲除后,小鼠在胚胎发育的早期有明显的缺陷,表现为在早期妊娠期间乳腺和小叶状肺泡发育的失败,以及视网膜细胞死亡等现象<sup>[19]</sup>。此外,在人着床前的胚胎中,细胞周期蛋白 B1 的表达从 6 细胞以前开始增加,说明活跃的转录和胚胎基因组的激活在 6 细胞阶段或 6 细胞之前,并且在转录和激活的过程中,细胞周期蛋白 B1 起着重要的作用<sup>[20]</sup>。

在成人细胞中,细胞周期蛋白 A2 依赖激酶对从 S 到 M 期、S 期的完成及中心体的复制是必需的。当细胞周期蛋白 A2 基因敲除时,缺乏细胞周期蛋白 A2 基因的小鼠胚胎仍然能够完成着床前发育,但是发育只能维持到妊娠 5.5 天左右,之后很快死亡<sup>[21]</sup>。这个结果说明细胞周期蛋白 A2 基因在早期胚胎发育时期可能起重要的作用。利用细胞周期蛋白 A2 基因敲除的小鼠可以更好地了解细胞周期蛋白 A2 在早期胚胎发育时期的作用及其作用机制,细胞周期蛋白 A2 缺失的小鼠从四细胞期到着床阶段能正常发育。因此细胞周期蛋白 A2 在这个时期可能不需要,即对早期胚胎发育的 DNA 的复制是不需要的。在 M 期后,细胞分裂的完成需要 MPF 的失活。Josefsberg 等发现第一次胚胎分裂的完成依赖包括细胞周期蛋白 B1 及多种蛋白酶的降解<sup>[23]</sup>。

## 三、细胞周期蛋白与蜕膜化和胎盘形成

子宫内蜕膜化和蜕膜功能的正常表达对胚胎着床、妊娠建立与维持,以及分娩发动均起着极为重要的作用。在胚胎着床过程中,子宫内膜首先发生蜕膜化反应。已经证实多种因子在蜕膜的过程中起着重要的作用,我们也证实前列腺素 E 受体<sup>[24]</sup>及白血病抑制因子<sup>[25]</sup>等与蜕膜化紧密相关。利用差异性 mRNA 展示方法证实,在胚泡着床位点细胞周期蛋白 D3 表达上调。妊娠第 1-2 天时细胞周期蛋白 D3 定位在子宫上皮细胞,第 3-4 天则定位在基质细胞和内皮细胞,妊娠第 5-7 天细胞周期蛋白 D3 mRNA 水平在子宫系膜侧和系膜对侧的基质细胞中明显上调,但在第 8 天则定位在子宫系膜侧的蜕膜细胞中。在

缺乏胚胎的人工诱导蜕膜化子宫中,细胞周期蛋白 D3 的表达明显增加。已证明 *Hoxa-10* 基因敲除的小鼠不能着床和发生正常的蜕膜化反应,这种小鼠中细胞周期蛋白 D3 mRNA 仅在妊娠第 5 天的子宫中表达,并且在第 8 天时表达明显减弱。细胞周期蛋白 D3 的异常表达可能是 *Hoxa-10* 基因敲除小鼠不能着床和发生蜕膜化的主要原因<sup>[26]</sup>。

细胞周期蛋白与正常人滋养层增殖也紧密相关。利用免疫组织化学发现,细胞周期蛋白 E 和 D3 主要定位在绒毛滋养层,细胞周期蛋白 D2 仅在胎儿巨噬细胞的绒毛状内部呈现表达,而细胞周期蛋白 D1 在第 2 和第 3 个月的胎盘中水平很高,并且细胞周期蛋白 E 蛋白在分化的细胞中占绝大多数<sup>[27]</sup>。这说明在滋养层的增殖过程中,细胞周期蛋白 D3 和 E 是重要的细胞周期调节蛋白,并且细胞周期蛋白 E 可能对滋养层的最终分化起着重要的作用。

#### 四、类固醇激素对子宫中细胞周期蛋白的调控

雌激素在哺乳动物生殖道中的重要作用是能刺激子宫细胞的增殖,并能刺激白血病抑制因子等很多与胚胎着床相关的分子的表达<sup>[28]</sup>。在雌激素处理后,细胞周期蛋白 D1 和 D3 的 mRNA 水平在 G1 期达到最高,并且在细胞进入 S 期时开始下降<sup>[29]</sup>。这说明雌激素可能通过上调细胞周期蛋白 D1 和 D3 来诱导小鼠子宫细胞的增殖。另外,用雌激素受体拮抗剂单独处理时并不能改变细胞周期蛋白 D1 和 D3 的基因表达,而抑制剂与雌激素共同作用时则明显降低细胞周期蛋白能通过作用于其受体。

孕酮对许多与生殖有密切关系的因子有重要的调节作用,并对子宫基质细胞的增殖有重要的作用。已经证明孕酮通过对细胞周期蛋白 D1 的调控来调节基质细胞的增殖,很可能细胞周期蛋白 D1 基因是孕酮调节基质细胞增殖的一个靶基因。用二甲脱氢孕酮的乙酸盐 (medroprogesterone acetate) 与 FGF(成纤维生长因子)共同处理时,基质细胞进入 S 期的数目比单独用 FGF 的有明显提高,且用二甲脱氢孕酮与 FGF 处理后细胞周期蛋白 D1 mRNA 在基质细胞中的表达明显增强。但当用孕酮受体拮抗剂 RU486 处理后,基质细胞中细胞周期蛋白 D1 mRNA 表达明显减弱,这表明其调控作用可能通过或至少部分通过孕酮受体来完成<sup>[30]</sup>。

#### 五、细胞周期蛋白的其他调控方式

卵泡刺激激素(FSH)对细胞周期蛋白具有一定

的调节作用。在 FSH 缺失小鼠的卵巢中,细胞周期蛋白 D2 mRNA 有一定量的减少,说明 FSH 可能对细胞周期蛋白 D2 有调节作用<sup>[31]</sup>。另外,不同的细胞周期蛋白之间也具有调节作用。研究表明细胞周期蛋白 B1 的磷酸化作用调节着它的核定位,细胞周期蛋白依赖激酶 2(CDK2)、细胞周期蛋白 B1 和细胞周期蛋白 F 能形成具有组蛋白激酶活性的复合物,并且细胞周期蛋白 B1 和细胞周期蛋白 F 总是在同一位置存在,而且细胞周期蛋白 F 还能够调节细胞周期蛋白的磷酸化作用。这说明细胞周期蛋白 F 的核定位信号区调节着细胞周期蛋白 B1 在核中的定位<sup>[32]</sup>。

#### 六、结语与展望

细胞周期是当前细胞生物学和分子生物学的热门研究课题之一。细胞周期的调控是多途径和多层次的,而细胞周期蛋白是细胞周期重要的调控因子。由于生殖过程中伴随有细胞增殖,细胞周期蛋白在配子发生、胚胎着床及器官发生等生殖过程中起着重要的作用。然而,由于生殖过程是一个由多因素控制的过程,如在胚胎着床和蜕膜化过程已证实白血病抑制因子及表皮生长因子家族等很多因子都与此相关<sup>[33]</sup>,关于细胞周期蛋白在这些过程中的作用机理需要进一步研究。

#### 摘要

细胞周期蛋白是真核细胞周期循环中主要的调节因子,它们参与细胞周期的精密调控,维持细胞正常生长及发育平衡。近年来发现,细胞周期蛋白与哺乳动物生殖有着密切的关系,本文简要论述了细胞周期蛋白与配子发生、早期胚胎发育、胚胎着床、蜕膜化等的关系,以及细胞周期蛋白在生殖系统中的表达与调控。

#### 参考文献

- [1] Evans T. et al., 1983, *Cell*, **33**(2):389-396.
- [2] Richardson HE. et al., 1989, *Cell*, **59**(6):1127-1133.
- [3] Lew DJ. et al., 1991, *Cell*, **66**(6):1197-1206.
- [4] Leopold P. et al., 1991, *Cell*, **66**(6):1207-1216.
- [5] Koff A. et al., 1991, *Cell*, **66**(6):1217-1228.
- [6] Tamura K. et al., 1993, *Oncogene*, **8**(8):2113-2118.
- [7] Gautier J. et al., 1990, *Cell*, **60**(3):487-494.
- [8] Casas. et al., 1999, *Zygote*, **7**(1):21-26.
- [9] Kikuchi K. et al., 1999, *Zygote*, **7**(2):173-179.
- [10] Liu L. et al., 1999, *Biol Reprod.*, **61**(1):1-7.
- [11] Chapman DL. et al., 1992, *Mol Reprod Dev.*, **33**(3):259-269.
- [12] Chapman DL. et al., 1993, *Development*, **118**(1):229-240.

- [13] Liu D. et al., 1998, *Nat Genet*, **20**(4):377-380.  
 [14] Ravnik SE. et al., 1999, *Dev Biol.*, **207**(2):408-418.  
 [15] Dong Liu. et al., 2000, *Dev. Bio.*, **224**:338-400.  
 [16] Moons DS. et al., 2002, *Endocrinology*, **143**(2): 647-654.  
 [17] Zhang Q. et al., 1999, *Endocrinology*, **140**(6): 2790-2800.  
 [18] Beumer TL. et al., 2000, *Biol Reprod.*, **63**(6): 1893-1898.  
 [19] Tong W. et al., 2001, *Mol Cell Biol.*, **21**(4): 1319-1328.  
 [20] Heikinheimo O. et al., 1995, *Hum Reprod.*, **10**(3): 699-707.  
 [21] Murphy M. et al., 1997, *Nat Genet.*, **15**(1):83-86.  
 [22] Winston N. et al., 2000, *Dev Biol.*, **223**(1):139-153.  
 [23] Josefsberg LB. et al., 2001, *Biol Reprod.*, **64**(3): 871-878.  
 [24] Yang ZM. et al., 1997, *Biol Reprod*, **56**(2):368-379.  
 [25] Yang ZM. et al., 1995, *Mol Reprod Dev.*, **42**(4):407-414.  
 [26] Das SK. et al., 1999, *J Mol Endocrinol.*, **22**(1): 91-101.  
 [27] DeLoia JA. et al., 1997, *Placenta*, **18**(1):9-16.  
 [28] Yang ZM. et al., 1996, *Mol Reprod Dev.*, **43**(4):470-476.  
 [29] Geum D. et al., 1997, *Mol Reprod Dev.*, **46**(4): 450-458.  
 [30] Stephanie R. et al., 2000, *Endocrinology*, **141**(2):637-648.  
 [31] Burns KH. et al., 2001, *Endocrinology*, **142**(7):2742-2751.  
 [32] Kong M. et al., 2000, *EMBO J.*, **19**(6):1378-1388.  
 [33] Yue ZP., Yang ZM. et al., 2000, *Biol Reprod.*, **63**(2): 508-512.

## 盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 细胞的分化及其调控\*

付卓敏 侯连生\*\*

(华东师范大学生命科学学院 200062 上海)

盘基网柄菌的发育过程类似于多细胞的胚胎发育,有着严格的时间和空间的发育程序,并且受到精密的调控。研究该过程中其细胞类型分化的调控机制对搞清高等生物发育中细胞类型分化机制也有启发作用。而且网柄菌多细胞发育阶段所需的基因与其营养生长所需的基因完全不同,即在不同的发育期,细胞启动不同的基因。这样就便于利用基因的分析方法分析这些基因及其产物,也容易用免疫方法研究细胞内外信号如何启动具发育特征的基因。这样得到的结果无疑具有重要的理论价值和医学价值。为此,本文对这一与细胞分化相关的细胞类型的研究动态作一概述。

### 一、生物学特征

盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) 隶属原生动物门肉足超纲,是一种“社会阿米巴”(social amoeba)。它们生活在潮湿、温暖及富有腐殖质的环境里,以细菌为生。实验室培养可用革兰氏阴性细菌喂养,也可接种在富含有机物的液体培养液中。单倍体细胞在有食物条件下,以二分裂方式繁殖后代。当食物耗尽时,进入多细胞发育阶段,整个发育过程约需 24 小时,其中包括细胞类型的分化。其发育过程大致可分为 4 个阶段:

(1) 细胞聚集 (aggregation) 阶段 当把食物移走后,饥饿细胞分泌一种诱导细胞迁移的化学信号 cAMP,诱导邻近的饥饿细胞形成细胞流向 cAMP 来源方向移动。

(2) 细胞丘 (mound) 阶段 细胞流样结构向聚集中心聚集并最终形成由多细胞组成的丘状结构,该阶段的细胞已有初步分化。

(3) 假原生质团或蛞蝓体 (slug) 阶段 细胞丘垂直向上延伸形成指状突出,这一指状结构随后倒向基质,形成“蛞蝓”。它能向光、热或多种化学源方向迁移,在蛞蝓体迁移过程中细胞得到进一步分化。

(4) 子实体 (fruiting body) 形成阶段 蛞蝓体迁移到一个合适的地方后停止迁移,形成子实体。子实体包括由空泡状细胞组成的坚硬的柄和基盘,支持着一团含有大量休眠孢子的顶囊,约有 10 万个细胞参与形成子实体。

盘基网柄菌发育到蛞蝓体阶段时,特殊细胞类型的分布已很明显(图 1)。遗传性一致的细胞群分化成几个亚群:前孢子细胞 (prespore cell),其大部分细胞将分化形成孢子细胞,约占整个蛞蝓体的 80%;而前端约占蛞蝓体 20% 的细胞为前柄细胞 (prestalk cell) 则分化为柄细胞,组成子实体的柄和基盘。以 *ecmA/LacZ* (*ecmA* 编码一种细胞外基质蛋白) 的表达产物为依据,又可将前柄细胞类群再分为几个亚群:

(1) 前柄细胞 A (prestalk A cells, *pstA*, *ecmA/LacZ*) 位于前柄细胞区最前端约 1/5 处。

\* 国家自然科学基金资助项目(批准号:30170107)。

\*\* 联系人。