

胚胎发育由母型调控向合子型调控过渡的机制

沈虹 顾正 左嘉容

(上海市计划生育科学研究所 上海 200032)

对有性繁殖的生物而言,合子的产生意味着胚胎发育的开始。随后的发育均具备如下通性:第一阶段为细胞分裂,由单个受精卵逐步分裂成为多细胞;第二阶段为细胞运动、分配、三胚层(外胚层,中胚层和内胚层)形成;最终为组织与器官的形成。第一阶段的细胞分裂基本上属母型调控,即由源自卵母细胞发生期间合成的大量蛋白质和 mRNAs 调控。母型 mRNAs 逐步消耗,必然需要合子型基因的适时表达,并完全取代之,以实现由母型向合子型调控的过渡。合子型基因表达的 80%—90% 转录本与母型 mRNA 相同;10%—20% 为不同于母型的新型 mRNA,于受精后的胚胎发育调控过渡中逐步表达和累积^[1]。因此,合子型转录本包括两类 mRNA:一类为等同母型转录本的合子型 mRNA,另一类为胚胎基因组新表达而在卵母细胞中并不存在的 mRNA。大批合子型基因表达的时间正是母型向合子型调控过渡的时间,实现此类过渡的时间因物种而异。调控过渡之后,胚胎的发育开始完全依赖于合子型基因组表达的遗传信息。迄今,这一早胚发育事件的分子机制鲜为人知。

多年来,两栖类中囊胚过渡 (mid blastula transition, MBT) 被视为研究该调控过渡的最佳模型。本文则就中囊胚过渡,以及一些涉及母型向合子型调控过渡的相关问题,包括两栖类 MBT 是否能看作为一种由母型调控向合子型调控的过渡? 何时合子型转录活动成为早胚发育所必需的? 转录活动何时启动? 胚胎细胞周期与转录活动之间有何联系? 母型 mRNA 降

解与合子型转录是否为相互依赖的过程? 早胚发育由母型向合子型调控过渡是否依赖一种固有的天然“信号”? 合子型基因活化与染色质结构之间有何关系? 等问题,分别作简单扼要地讨论或评述,以达到抛砖引玉的作用。

一、中囊胚过渡

对大多数动物胚胎而言,早期的卵裂速度快,而且同步,其细胞周期几乎仅包含 S 相 (DNA 合成) 和 M 相 (核分裂)。随后的卵裂周期减慢,且不同步。两栖类动物的胚胎,由同步化向非同步化卵裂过渡的时间发生在 MBT 期。因此,MBT 的原有定义是完全客观地按细胞动力学来限定的。对美西螈的大量研究表明,其同步化卵裂周期包括 S、M 和 G₂ 相,MBT 发生在第 11 卵裂周期,该过渡似乎依赖一定的核/质比^[2]。爪蟾 MBT 发生于第 12 卵裂周期,过渡并不依赖细胞分裂,也不依赖受精至第 12 卵裂周期的间隔时间长短或 DNA 复制周期数。就是在 MBT 期间(远在原肠胚形成之前),出现首批细胞分化^[3],并明显地检测到转录活动。MBT 期间合子型基因转录的活力直接与早期卵裂阶段建立的核/质比有联系。

MBT 可按照下列标准定义:(1) 非同步化有丝分裂启动;(2) 大批合子型基因转录活化,和(3) 细胞运动能力获得。正如 Yasuda 和 Schubiger^[4]提到的那样,MBT 绝不能仅仅理解为单一的过渡,而是包含了多个相互独立的早胚发育事件。因此,按 MBT 所具备的上述一

些通性,不难理解:水蛭第7卵裂期(约100细胞)、果蝇第14细胞周期和斑马鱼第10细胞周期分别相当于美西螈第11细胞周期或爪蟾第12细胞周期出现的MBT。然而,迄今尚未能揭示由哪种因子(或哪些因子)诱发MBT。早年Signoret和Lefresne^[5]提出的模型推测在美西螈卵母细胞发生过程中,细胞质中逐步累积一种为进入S相所必需的细胞因子,受精后自细胞质逐渐消失,并选择定位到核内;经多次卵裂,胞质内的该因子耗尽,于第11细胞周期首次跨入G1相(过去的卵裂周期无G1相),重新合成该因子,从而推动G1相细胞进入S相。因此,该模型认为作为细胞核成份的这种母型细胞质因子的滴度在MBT中起着重要作用。

由于MBT阶段首次检测到成批合子型转录活动,且为胚胎进一步发育所必需,因此,MBT被视为是两栖类胚胎早期发育由母型调控向合子型调控过渡的开关。

二、何时的合子型转录成为胚胎进一步发育所必需?

为确证MBT之前合子型转录活动的作用,选用RNA聚合酶II的抑制剂 α -amanitin处理动物胚胎,并进行了分析。经 α -amanitin处理,蛔虫、软体动物、昆虫、鱼类和两栖类卵裂活动仍正常,但胚胎无法发育进入原肠胚形成期。在小鼠,受精后第一次卵裂不受 α -amanitin干扰,而其第二次卵裂受阻,表明小鼠的第二次卵裂依赖合子型基因的转录^[6]。兔和羊是第四次卵裂受阻^[7,8]。因此,不同物种早胚经 α -amanitin处理,抑制合子型基因转录所导致的胚胎发育阻断时期各不相同。哺乳动物的早胚被阻断于卵裂阶段,而其它动物阻断于原肠胚形成早期。早胚发育阻断发生的时间相当于母型调控向合子型调控过渡的时间或紧挨其后。因此,胚胎早期阶段发育并不依赖合子型基因转录本,而是仅仅依赖母型mRNA。虽然 α -

amanitin阻断实验能确定各种动物胚胎发育从何阶段起依赖于合子型基因表达,但并不能确定合子型基因转录的具体时间。应指出的是,所有上述实验, α -amanitin是在受精后立即被显微注入卵的,故能抑制早胚的所有合子型基因转录活动。引起胚胎发育阻断于特定阶段的原因可为:(1)抑制了相当于发育阻断发生阶段并对今后进一步发育亦必需的转录活动,或(2)抑制了胚胎发育阻断前的某些合子型基因转录,而这些转录本为续后的胚胎发育所必需。后一原因如果成立,则正常的调控过渡有可能依赖一些在正常第一次卵裂期间最早产生的合子型转录本。

三、胚胎发育何阶段开始能检测到合子型转录本? 胚胎细胞周期与早期转录之间有何联系?

不同报道证实,在一些进化上不同的物种中,包括线虫、水蛭、果蝇、海胆、两栖类、鹌鹑及哺乳类(小鼠)等(表1),每在成批合子型基因转录开始之前,均发生过少量合子型基因转录活动。所涉及的转录产物包括tRNA,小核RNA和rRNA,也包括mRNA或前身物。在海胆和小鼠,最早的合子型基因转录活动出现在1细胞期,其它动物则晚些,蛔虫4细胞期,线虫8细胞期,水蛭16细胞期,果蝇在32个核期,美西螈和爪蟾在32细胞期,鹌鹑为50细胞期。关于专一基因转录活动,最近在水蛭和蛔虫等上得到证实,如水蛭的htr-wnt-1基因^[9],蛔虫的肌动蛋白基因^[10],在果蝇为histone和engrailed基因^[11]。这些合子型转录远在被视作由母型调控向合子型调控过渡开始的大量转录活动出现之前发生。对于某些物种而言,受精后似乎并未曾有转录休止现象。

在母型调控向合子型调控过渡之际,常常伴有细胞周期时限的延长,如果蝇和爪蟾G2相延长,美西螈S相之前出现G1相。细胞周期的延长明显与大批合子型基因转录的起始相

关,特别是果蝇和爪蟾的胚胎。但是,细胞周期的延长并不是激活转录活动所依赖的唯一因素。海胆和线虫早期卵裂周期相对迅速,此时RNA也以高速率合成。这些在早期卵裂阶段以高速率进行转录活动的胚胎(海胆)与较晚发育阶段才开始大批转录活动的胚胎(果蝇)之间

存在一个重要差别,即前者的早期细胞周期中有G2相。例如,海胆、水蛭、美西螈和小鼠早期胚胎细胞周期的时相包括S、G2和M相,而爪蟾和果蝇的只包括S和M相。总之,合子型基因的转录似乎不仅与细胞周期的持续时间长短而且与细胞周期时相的组成有关。

表1 不同物种动物胚胎由母型调控向合子型调控过渡情况的小结

动物	首次观察到典型特征的时期				
	非同步化分裂的起始	大批合子型基因转录的起始	细胞运动的获得时期	α -amanitin处理后发育阻断时期	最早的转录活动出现时期
蛔虫(线形动物)	未报道	未报道	未报道	未报道	4-8细胞期
线虫(线形动物)	未报道	90-125细胞期	30细胞期(原肠形成)	未报道	1至30细胞期
水蛭(环节动物)	第5-7期	第7期(100-1000细胞)	第7期	第7期	第4-5期(25细胞)
果蝇(昆虫)	第14细胞周期	第14细胞周期	第14细胞周期(原肠胚形成)	第14细胞周期	第6-9细胞周期
海胆(棘皮动物)	一般为第10细胞周期,但依种而定	受精后不存在转录休止现象	原肠胚形成期(500-1000细胞)	囊胚	自第1细胞周期起
美西螈(两栖类,有尾目)	第11细胞周期中囊胚过渡	第11细胞周期	未报道	晚卵裂期(30000细胞)	第1细胞周期至32细胞期
爪蟾(两栖类,无尾目)	第12细胞周期中囊胚过渡	第12细胞周期	第12细胞周期	晚卵裂期(30000细胞)	32细胞期
鹌鹑(鸟类)	未报道	未报道	原肠形成期	原条形成期(原肠胚形成过程)	胚胎分裂期
小鼠(哺乳类)	卵裂期(4-32细胞期)	2细胞期	胚泡期	2细胞期	1细胞期

四、母型 mRNA 降解与合子型转录是否为相互依赖的过程?

在所研究的大部分品种动物中,由母型调控向合子型调控的过渡总是伴以两个现象:母型 mRNA 的降解,以及合子型基因转录的活化。然而,前一过程对后一过程究竟有何影响?在研究果蝇 string 基因表达的过渡调控时,获得了有一定价值的答案(见图1)。

string 是裂殖酵母 cdc25 的同源分子,具有促使 p34^{cdc2} 激酶去磷酸化的作用。在果蝇早胚第14细胞周期, string 转录模式发生了由母型向合子型过渡的重要变化。在早先的13个细胞周期中,母型 string mRNA 很稳定,到了第14细胞周期S相起始阶段却突然地迅速降

解,而合子型 string 基因在第14细胞周期G2相开始转录^[12]。如果在第14细胞周期将 α -amanitin 显微注入果蝇胚胎中(即在母型 string mRNA 降解之后、合子型表达之前),随后的分裂就遭抑制。在 string 突变体中也看到了完全相同的表型结局,胚胎发育在第14细胞周期M相前停顿。上述两种相似的结局提示第14细胞周期G2相的合子型 string 基因转录是胚胎进一步正常发育所必需的。如果在更早时期(第9细胞周期)注入 α -amanitin,发育中止时间就与上述的不同,胚胎是在完成第14细胞周期M相之后才停止发育^[13]。该现象的出现可理解为母型 string mRNA 未被降解。也可进一步理解为:第9周期开始的早期合子型转录产物具控制特定母型 mRNAs、特别是 string

mRNA 降解的作用。在线虫、海胆和爪蟾的早胚中也观察到类似的现象。

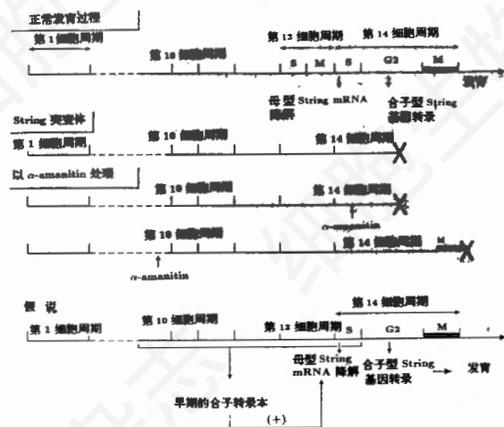


图1 果蝇早胚发育中母型 string mRNA 降解与合子型基因转录关系示意图

我们的研究亦证实(未发表资料),在第2细胞周期 G2 相的小鼠早胚细胞中,母型 *cdc25* 转录本完全降解,合子型 *cdc25* 基因表达,致使 *p34^{cdc2}* 去磷酸化、MPF 活化,实现由 G2→M 相的过渡。我们的研究还表明,母型 *cdc25* 转录本的降解并不能导致合子型 *cdc25* 基因的表达,尚需要其它信号通路的介入和调控。

总之,这些实验表明在实现特定阶段胚胎发育调控过渡并继续正常发育时需要有关子型基因表达;少量早期合子型基因的表达产物(可能包括一些核糖核酸酶)通过有选择地降解一些特定的母型 mRNA,促进过渡的完成。这种选择性降解某些母型转录本可能是一种存在于绝大多数调控过渡过程中的必要环节。

五、早胚发育由母型向合子型调控过渡是否依赖一种固有的“天然信号”(natural signal)?

最近几年,逆转录-PCR(RT-PCR)、原位杂交等等微量分析基因表达的生物学技术相继出现,使得研究哺乳动物早胚发育相关基因的表达成为可能。从此,以哺乳动物特别是小鼠,作为研究早胚发育调控由母型向合子型过渡机

制的动物模型,也正在被越来越多的研究者所接受。

多年来人们发现这样一个事实,即哺乳动物受精卵离体培养在化学组份确定的常规培养基中,往往不能完成由受精卵到囊胚发育的全过程,而是停顿在某个特定的发育阶段。如1细胞期小鼠胚胎离体培养,其发育被阻断于两细胞期,称为“2细胞阻断”。然而引起人们高度重视的是这类发育阻断不仅普遍存在于哺乳动物中,而且其发生的时间与早胚发育由母型向合子型调控过渡的时间相吻合^[14]。相反,倘若将受精卵置于输卵管,或于输卵管液中培养,或与输卵管上皮细胞共培养,或在输卵管上皮细胞条件培养液中培养,均能克服此类发育阻断,继续正常发育。源自输卵管上皮细胞分泌物的促发育作用无物种专一性。由此推测,输卵管不仅是早胚发育的“场所”,而且分泌某些参与克服发育阻断作用的因子,从而确保早胚实现其正常的发育调控过渡。在缺乏源自输卵管上皮细胞的外源“信号”的条件下,小鼠早胚发育就停顿在第2细胞周期的 G2 相,发生早胚发育阻断。

然而迄今为止,只见有涉及提示可能存在该类信号或因子“相关证据”的报道,而对这类因子进一步的确证、分离纯化及克隆尚未见报道。因此,是否存在该类调控过渡的因子就一直有争议。特别是在将其它躯体细胞(如成纤维细胞)作为体外培养“饲养层细胞”(feeder cells)与早胚共培养,或在常规培养基中加入生长因子、离子螯合剂或去自由基试剂,或去除葡萄糖,都在一定程度上起克服早胚发育阻断的作用。Bavister 在 1992 年甚至提出,只要严格控制体外培养的环境质量,选择适当的培养基,早胚能顺利发育,无需输卵管上皮细胞的存在^[15]。

然而, Poueymirou 等证实由依赖 cAMP 的蛋白激酶(PKA)催化的蛋白质磷酸化反应参与了小鼠2细胞期早胚合子型基因活化的调控机制^[16]。Schwartz 等进一步又证实佛波酯

“TPA”无能刺激具完整细胞核的卵母细胞中 TPA 反应元件(TRE)驱动的 β -半乳糖苷酶报告基因的表达,却能刺激经 aphidicolin 处理而被阻遏在 1 细胞期早胚(其时相 2 细胞期的)中的报告基因的表达^[17]。这些实际分析结果均提示有不同的信号转导系统参与活化合子型基因的可能性。

自从我们实验室获得有关此类输卵管因子存在的“功能缺失证据”^[18],就确信体内早胚全面的正常发育必须依赖源自躯体细胞合成和分泌的固有天然“信号”。该观点的提出是基于过去大量其它相关工作基础之上的。当然,我们也正在努力分离纯化,以取得足量的该类天然“信号”供功能方面的进一步实验分析,以便早日澄清它对早胚发育的促进作用是直接的抑或间接的(即具消除阻断早胚发育的抑制信号的作用)。

众所周知,细胞的天然信号及其信号传导系统是一个极其复杂的组成系统。这种信号传导通路组成了庞大的网络,与其它一些信号通路还可相互偶联相互作用。不同的外加信号,经由不同的信号传导通路,牵连不同网络,最终又可经由支路,汇合在同一条通路上,导致细胞某一相同的表型变化。所以,以某一表型变化来反映细胞的某一综合性生理反应是不恰当的,会误导并引出错误结论。例如,长足的两栖类卵母细胞的成熟进程停顿在第一次减数分裂前期(双线期),相当于细胞周期 G2→M 相的过渡期。天然信号孕酮的刺激或加入某种外源信号(如胰岛素)都可导致卵母细胞恢复减数分裂、引发生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)、并受阻于第二次减数分裂中期。然而孕酮及胰岛素诱导卵母细胞恢复减数分裂并停顿在第二次减数分裂中期的过程所采纳的信号传导途径并不相同。胰岛素是通过癌基因蛋白 ras 途径活化促成熟因子(maturation-promoting factor, MPF)来调控 G2→M 相过渡^[19];而孕酮则采用完全不同于上述的信号传导途径。若将 ras 蛋白抗体注射到爪蟾卵母细胞,它可

抑制胰岛素诱导的卵母细胞 GVBD,却不能抑制孕酮诱导的 GVBD^[20,21]。由于天然信号孕酮引发了一系列符合正常生理要求的生物学反应,最终能导致卵全面成熟,确保了受精卵全面地正常发育。与此相反,胰岛素诱发的成熟率不高,受精后的正常发育率亦不高。显然,以核分裂图象作为卵母细胞成熟的这种传统指标是有它不够完善的一面,因为它只是成熟过程中的一个终末事件,不包含正常卵母细胞生理性成熟所涉及的多元生物学反应(或事件)。以此类推,虽然其它躯体细胞“饲养层”的分泌产物,或培养基中加入的螯合剂及能去自由基的试剂等等在一定程度上促进哺乳动物早胚克服发育阻断,但发育阻断的克服率较低;即使胚胎能克服发育阻断,发育至囊胚的比例也很低;即使胚胎能发育至囊胚,构成囊胚的细胞数目远远低于正常的^[22]。

总观上述,早胚发育所依赖的天然信号的全面作用应受到重视,并加以全面研究。在尚未全面掌握其生物学功能之前,很难设想有可能科学地选择一种合适的外加“信号”以取代之。

六、染色质结构与合子型基因活化

目前推测^[23],决定着小鼠胚胎合子型基因活化的基础和时间是染色质的结构而不是转录器的活性。雄性和雌性原核的转录能力不同,在第一次有丝分裂过程中则出现转录阻遏状态,届时基因得借助于功能化的增强子实现有效的表达。通过增加组蛋白 H4 的乙酰化水平也能解除此类转录的阻遏状态。在合子型基因活化过程中,染色质中高度乙酰化的组蛋白 H4 量增加,在周边的核基质中 RNA 聚合酶 I 量也增加。母系组蛋白的消失亦是实现合子型基因活化的一个标志。

结 语

不同物种动物由母型调控向合子型调控过

渡所处的胚胎发育阶段不尽相同。两栖类的过渡最初定义为中囊胚过渡(MBT),但它绝不是一个简单、短暂的时序上的过渡,而是早胚发育进程中多个相互独立的、多层次发育事件的总和。绝大多数动物中,该时序过渡似乎与细胞周期的非同步化、合子型转录本最初的转录和胚胎细胞运动能力的获得等事件发生的时间相吻合,这些事件并不相互排斥。

由母型调控向合子型调控过渡之际至少可涉及下列四个过程:(1)细胞核与细胞质间的比例发生改变(通过一种母型细胞质因子在核内滴度的改变而实现的);(2)通过母型转录本的专一降解实现 mRNA 的稳定性降低;(3)最早合子型基因表达参与调控母型转录本的降解;(4)外源天然信号的作用以及染色质结构的改变。当然并不排斥其它机制(包括重新合成转录因子以及/或改变 mRNA 的半衰期)的存在。随着高效的生物学技术和方法的不断出现,分离及分析早期合子型转录本成为可能,对这些转录本的研究必然有助于理解它们在受精后早胚发育过渡调控中所起的作用。

参 考 文 献

- [1] Davidson E. H., 1986, *Gene activity in early development*, 3rd end, Academic press, New York.
- [2] Signoret J., 1980 Evidence of the first genetic activity required in axolotl development, In: McKinnel R. G(ED) *Differentiation and neoplasia*, (Results and problems in cell differentiation, vol II) Springer, Berlin, Heidelberg New York.
- [3] Newport J., Kirschner M., 1982, *Cell*, 30:687-696.
- [4] Yasuda G. K., Schubiger G., 1992, *Trends Genet*, 8:124-127.
- [5] Signoret J., Lefresne J., 1973, *Ann Embryol Morphol*, 6:299-307.
- [6] Bolton V. N. et al., 1984, *J Embryol Exp Morphol*, 79:139-169.
- [7] Van Blerkom J., McGanghey W., 1978, *Dev Biol*, 63:151-164.
- [8] Crosby I. M. et al., 1988, *J Reprod Fertil*, 82:769-775.
- [9] Bissen S. T., Weisblat D. A., 1991, *Dev Biol*, 146:12-23.
- [10] Cleavinger P. J. et al., 1989, *Dev Biol*, 133:600-604.
- [11] Kar T. L. et al., 1989, *Development*, 105:605-612.
- [12] Edgar B. A., O' Farrell P. H., 1989, *Cell*, 57:177-187.
- [13] O' Farrell P. H., et al., 1989, *Science*, 246:635-640.
- [14] Telford, N. A. et al., 1990, *Mol. Reprod. Dev.*, 26:90-100.
- [15] Bavister, B. D., 1992, *Human Reprod.*, 7(10):1339-1341.
- [16] Poueymirou, W. T., Schultz, R. M., 1987, *Dev. Biol.*, 121:489-498.
- [17] Schwartz, D. A., D. A., Schultz, R. M., 1992, *Mol. Reprod. Dev.*, 32:209-216.
- [18] 沈虹等, 1996, *实验生物学报*, 29(4):403-412.
- [19] Barrett, C. B. et al., 1990., *Mol. Cell. Biol.*, 10:310-315.
- [20] Deshpande, A. K. and H. F. Kung, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1285-1288.
- [21] Korn, L. J. et al., 1987, *Science*, 236:840-843.
- [22] Minami, N. and A. Iritani, 1993, *Mol. Reprod. Dev.*, 36:279-281.
- [23] Schultz, R. M., et al., 1995, *Seminars in Cell Biology*, 6:201-208.

胚胎干细胞体外分化的研究进展

杜忠伟 丛笑倩

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

从一个受精卵发育为完整机体的过程中, 具有相同基因的未分化干细胞如何产生形态和