

- [21] Rohwedel, J., V. Maltser, E. Bober 等, 1994, *Dev. Biol.*, **164**:87-101.
- [22] Dinsmore, R., J. Ratliff, T. Deacon 等, 1996, *Cell Transplant.*, **5**(2):131-143.
- [23] Bain, G., D. Kitchens, M. Yao 等, 1995, *Dev. Biol.*, **168**:342-357.
- [24] Struebing, C., A. H. Gugrun, S. Jin 等, 1995, *Mech. Dev.*, **53**:275-287.
- [25] Fraichard, A., O. Chassande, G. Bilbaut 等, 1995, *J. Cell. Sci.*, **108**:3181-3188.
- [26] Okabe, S., K. F. Nilsson, A. C. Spiro 等, 1996, *Mech. Dev.*, **59**:89-102.

## 细胞信号传导与果蝇卵轴的建立

赵 德 标

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

雌性生殖细胞——卵细胞是上下世代间生命延续的环节。作为新一代个体的开端,它们是未分化的细胞,受精后通过胚胎发育,分化形成个体的各种组织细胞,包括生殖细胞。在个体发育终期,它们又是个体中终末分化的细胞。成熟卵细胞不仅外表具有极性,而且细胞内的物质(如形态发生原等)也呈极性分布。正是这些物质极性分布所体现的位置信息决定了未来胚胎的前后和背腹体轴<sup>[1-3]</sup>。

卵细胞的极性是在卵发生中,通过卵室内的生殖细胞和体细胞之间一系列交互(双向)信号传导,以及所引发的基因活动而建立起来的<sup>[4-6]</sup>。无论是卵的前后轴还是背腹轴的建立过程都经历这两种细胞交互(双向)的信号传递,并使用了相同的起始信号传递途径。作为起始信号的配体是由转化生长因子 $\alpha$ (TGF $\alpha$ )的同源基因 *grk*(*gurken*)编码,由卵细胞产生。信号受体则是上皮生长因子受体同源的基因 *top*(*torpedo*)编码,由体细胞来源的滤泡细胞产生。卵细胞与滤泡细胞之间第一次双向信号交流,以及卵细胞内细胞骨架极性的改变先建立了卵细胞的前后极性,随后导致背方化信号定位在卵的背前方,再建立起卵的背腹轴。

### 一、卵细胞的产生

雌性果蝇有一对卵巢,每个卵巢由 16 根卵小管组成。每根卵小管又分为两个区,卵母细

胞发生区和生长区。卵母细胞发生区位于卵小管的前端。在这个阶段,雌性生殖干细胞(stem cell)通过分裂产生一子干细胞和一个包囊母细胞(cystblast)。包囊母细胞经过 4 次不完全的有丝分裂产生 16 个相联通的包囊细胞。其中只有一个包囊细胞与其他包囊细胞相联,并具有微管组织中心,以后将决定并分化为卵细胞,故又称预卵母细胞(preocyte)。其余 15 个包囊细胞将分化为营养细胞(nurse cell)<sup>[6]</sup>。

卵小管的极大部分为卵细胞生长区。合胞体包囊被一层体细胞来源的滤泡细胞包围后形成卵室,随后进入卵细胞生长区。这时营养细胞核先出现多倍体化,继而基因大量表达。所产生的各种基因产物,以 RNA 或蛋白质形式输送到卵母细胞内。卵母细胞相应地不断长大、成熟,并随着卵室从卵小管的前部向中、后部迁移,直至排出卵巢。

成熟的卵细胞内含有大量的母体效应基因产物(如形态发生原物质),用于指导建立未来胚胎的前后轴和背腹轴。胚胎前后轴的决定取决于 *bcd*(*bicoid*)mRNA 在卵细胞前区的定位和 *osk*(*oskar*)mRNA 及其蛋白产物在卵细胞后区极小囊中的聚集<sup>[1,2]</sup>。这些基因产物扩散而产生的浓度梯度控制沿前后轴不同位置的分裂球内合子基因的表达,从而建立起胚胎前后轴。

曾弥白和王亚辉教授曾对本文提出宝贵的意见,特表谢意。

胚胎背腹轴的建立需要卵内的形态发生原 DI (Dorsal)。DI 蛋白在卵内虽然呈均匀分布,但在胚胎腹方信号作用下,进入卵裂核内的 DI

形成从腹方到背方的浓度梯度。核内 DI 则通过调控位于背腹轴上不同合胞体囊胚细胞内合子基因的表达,而建立起胚胎的背腹轴<sup>[3,7]</sup>。

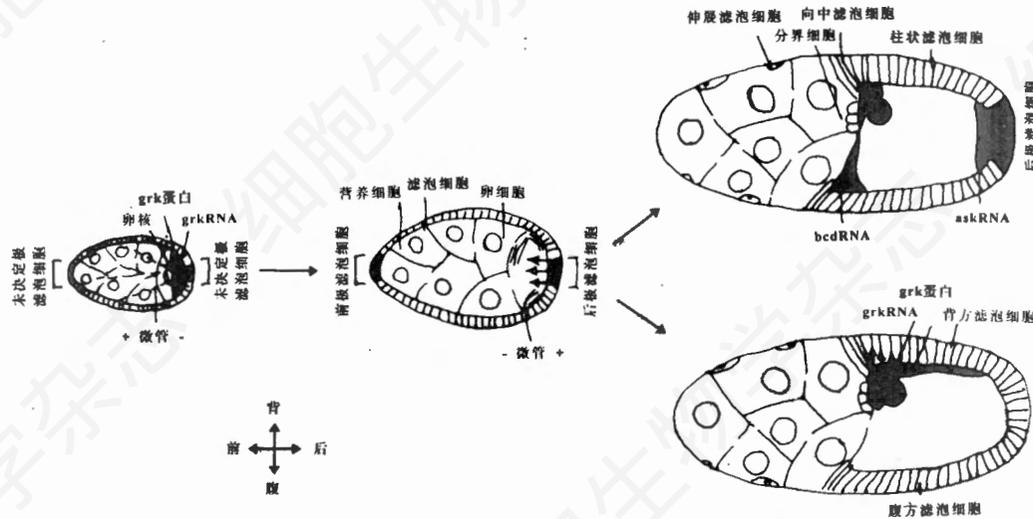


图 1 果蝇卵细胞轴的决定

从左到右分别显示 1-6 期, 7-9 期和两个 10 期的卵室。卵室的左右和上下分别表示前后和背腹侧。从卵发生的第 1 期到第 7 期, *grk* mRNA 逐步积累在卵后区, 产生的蛋白质作为信号传向后端未决定极滤泡细胞。正负符号表示微管骨架的正负极方向。从第 7 期到第 9 期, 后极滤泡细胞又将信号传回卵细胞(箭头, *N* RNA, 蛋白 Delta 受体), 使卵细胞内的微管骨架改变极性方向。上方第 10 期卵室显示卵室和卵细胞的极性, 以及母体基因产物(*bcd* 和 *osk* mRNAs)的极性分别。分界细胞来自前极滤泡细胞, 以后将形成卵孔。围绕卵细胞的柱状细胞将产生卵黄膜和外壳。下方第 10 期卵室显示 *grk* mRNA 定位在卵细胞的背前方。其蛋白质作为信号传向前方滤泡细胞(箭头), 使之决定为背方滤泡细胞<sup>[14]</sup>。

卵细胞内上述形态发生原都是由营养细胞合成。它们的输送和在卵细胞内的极性分布都依赖于微管骨架的排布方向(图 1)。在卵细胞发生的早期, 预卵母细胞内的微管组织中心(MTOC)位于卵细胞的后极, 并从卵细胞向位于卵室前区的营养细胞放射出微管骨架。显然卵细胞与营养细胞间的这种精确位置就已经决定了卵细胞内在的前后极性。如果 mRNA 或蛋白质与微管负极指导的动力区连接, 这些大分子就可在卵细胞发生的早期, 被选择性地从营养细胞输入卵细胞。在卵细胞发生中期, 微管骨架重新极化, 即微管在卵细胞后区的密度降低, 而在前区的密度上升(增加), 导致微管骨架的正极末端向着后区<sup>[8-9]</sup>。有人将驱动蛋白的正极末端定向动力区与  $\beta$ -gal 融合形成融合基

因(kinesin-lacZ), 结果观察到产生的融合蛋白在卵发生的第 8-9 时期定位于卵的后区, 证明了卵细胞内微管骨架的极性排布<sup>[10]</sup>。此外, *bcd* 和 *osk* mRNA 各自在卵细胞前后区的定位, 以及 *grk* mRNA 在卵细胞内的定位都有赖于完整的微管骨架<sup>[4, 8-9]</sup>。这也表明微管蛋白的极性直接参与了 mRNA 分子在卵细胞内的分选和定向输送。

## 二、前后轴的形成

卵母细胞一旦决定就迁移到卵室的后端, 营养细胞位于前区。卵细胞与营养细胞的这种相对位置似乎已决定了卵母细胞的未来前后轴。一个典型极性标志是 MTOC 及其他一些 mRNA, 其中包括 *grk* mRNA, 逐渐在卵母细

胞后区的定位(图1)。但成熟卵细胞的前后极性只有通过卵细胞和滤泡细胞之间交互的信号传递后才能建立起来。在这个过程中,需要两次细胞间信号传导。一次是从卵母细胞到滤泡细胞的信号传导,由 Grk 和 Top 为一对配体和受体<sup>[4-5]</sup>。另一个信号系统则相反,从滤泡细胞到卵细胞,由 N(Notch)和 Delta 为一对配体和受体<sup>[11]</sup>。

早期卵发生中,围绕着卵细胞的滤泡细胞已有所区别,两极的滤泡细胞已不同于其余滤泡细胞<sup>[12]</sup>。位于卵室后端的极滤泡细胞一旦接受来自卵后区的 Grk 信号,细胞膜上的酪氨酸蛋白激酶就被激活。该蛋白激酶由 top 基因编码,一旦激活就通过一系列胞内的信号传递,使这些细胞转化为后极滤泡细胞。如果 grk 或 top 基因突变,后端的滤泡细胞也将与前端的滤泡细胞一样都成为前极滤泡细胞<sup>[4]</sup>。在 spindle 基因突变时,卵细胞内的 grk 信号位于卵的中部,结果卵室前后两端的滤泡细胞也都分化为前极滤泡细胞<sup>[13]</sup>。

后端滤泡细胞在 top 受体激活后,通过一系列信号传递,又产生了一个新的信号<sup>[14]</sup>。这个信号被卵细胞接受后通过蛋白激酶(PKA)引起卵细胞内的细胞骨架发生重新极化(图1)<sup>[15]</sup>。原先位于卵细胞后区的 MTOC 将迁移到前区,相应地微管的极性也反转。这一对信号和受体可能就是 N 和 Delta 基因的产物。它们通过激活卵 PKA 活性使微管发生重新极化。它们中任何一个基因的突变(如温度敏感型突变)所产生的卵细胞都能改变微管骨架的极性,其结果与 grk 或 top 基因突变相似。在这些突变中,正常情况下位于卵细胞前区的 bcd 基因产物就会同时出现在卵细胞的前区和后区,而原来位于卵细胞后区的 osk 基因产物则定位到卵细胞的中部<sup>[15-16]</sup>。

在滤泡细胞的信号作用下,卵细胞内微管重新定向。蛋白激酶 A(PKA)在这个过程中可能起了关键的作用。Lane 和 Kaleron<sup>[15]</sup>用实验证明 PKA 催化亚基的突变影响卵细胞内微管

定向和 RNA 的定位,产生的表型与 grk 和 top 突变表型相似。与滤泡细胞所需的 top 相反,PKA 活性是卵细胞所需。因而滤泡细胞内 top 的激活必然需通过另一条信号传递通道,才能导致卵母细胞内 PKA 的激活,从而反过来引起 MTOC 向卵细胞前区的迁移,继而改变微管的极性。

### 三、背腹轴的形成

卵细胞的前后轴是在卵发生的第 7-8 期中建立。随后在第 9-10 期,卵细胞将形成第二个极性,即背腹轴。这个轴的形成过程,也受到 grk 和 top 突变的影响<sup>[4-5]</sup>。由于突变表型分析提示 grk 信号在背方起作用,而 top 基因在围绕卵细胞的滤泡细胞内都表达,所以首先产生的问题是 grk 信号的作用如何从卵后区转移到背方。现已知微管骨架的重新极化在这过程中起了非常重要的作用。在卵细胞发生的第 7 期,随着细胞骨架的重新极化,卵核仍然与微管的生长负端相连接。无论是被收缩着的微管拉来或被负端指导的动力蛋白推去,卵核都向着卵的前区运动(图1)<sup>[14]</sup>grk mRNA 一直与卵核紧密相伴。随着陷在微管网络中的卵核移向卵的背方位置,grk 基因产物也从卵后区转移到卵的背前方<sup>[17]</sup>。此外 f(1)k10,spire, squid, capu 等基因也参与确定 grk mRNA 在卵细胞背前方的正确的定位<sup>[18]</sup>。其中任何一个基因突变都会引起 grk RNA 分布在整个卵前区,并导致卵细胞的背方化<sup>[19]</sup>。

grk mRNA 一旦迁移到卵细胞的背前方后又启动了卵细胞向滤泡细胞的第二个信号传递过程(图2)。在此过程中,新合成的 grk 蛋白激活了位于卵细胞背前方的滤泡细胞上的 top 受体;继而通过一系列胞内信号传递过程,致使这些细胞决定为背方滤泡细胞<sup>[20]</sup>。而其余未得到此信号的滤泡细胞将发展为腹方(滤泡细胞)命运。在缺乏 grk 信号时,围绕卵细胞的背前方滤泡细胞也转变为腹方细胞。相反在 k10 突

变时,由于 *grk* 产物分布在整个卵细胞的前方,结果围绕卵细胞前方的滤泡细胞都成为背方滤泡细胞<sup>[21]</sup>。因而只有当 *grk* 基因产物正确定位在卵细胞的背前方时,围绕卵细胞的滤泡细胞才能形成正常的背方和腹方图式。

在背腹轴形成中,*grk* 信号的传递还需其他许多基因的共同作用。在背前方滤泡细胞上 *top* 受体接受 *grk* 信号时,*rho*, *brn* 和 *cni* 等基因主要起协同作用<sup>[5,22]</sup>。*top* 受体激活后,再通

过一系列的胞内信号传递,滤泡细胞才能向背方命运分化。其中几个胞内信号传递分子已知道,如癌基因 *ras*, *raf*, *MEK* 和致分裂原蛋白激酶(*MAPK* or *rolled*)等<sup>[20]</sup>。这些基因都在滤泡细胞中表达,一旦突变都会影响背腹轴的形成。例如活性的 *raf* 定位在背前方滤泡细胞中表达可拯救 *grk* 或 *top* 突变表型。但如果这种活性的 *raf* 在围绕卵细胞的所有滤泡细胞中表达,则会引起背方化<sup>[20]</sup>。

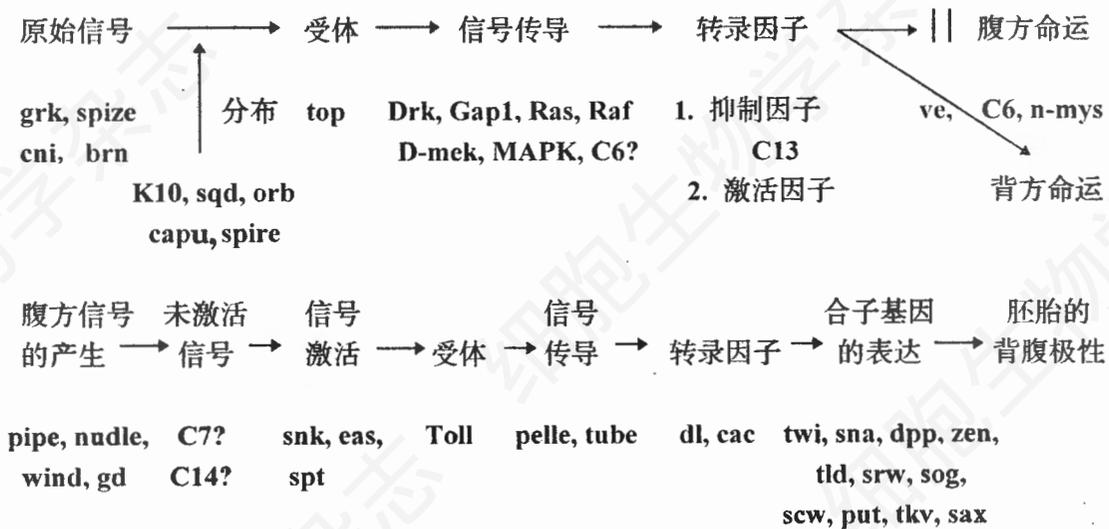


图2 卵和胚胎背腹极性形成中的细胞信号传导

两个不同的但密切关联的细胞信号传导途径参与了卵和胚胎背腹轴的形成。在第一个信号传导途径中,卵细胞产生的信号(*grk* 蛋白)被背前方滤泡细胞上受体接受,经一连串蛋白激酶活化,激活了转录调控因子,通过调控基因的表达而抑制了这些细胞的腹方命运(∥),并使之朝着背方命运分化。在没有背方信号的情况下,其他围绕卵细胞的滤泡细胞则朝向腹方命运分化,并产生一个腹方信号(*C7*)。这个信号通过启动一个蛋白激酶级联反应,激活受精卵膜上的受体,经蛋白磷酸化酶的作用,使卵内 *Dl* 蛋白从与 *Cac* 蛋白的复合体中释放后进入合胞体囊胚的核内,并形成从腹方到背方的浓度梯度,最后通过调控合子基因的表达而控制胚胎背腹方组织的分化。(细胞信号传导途径涉及的基因见正文;*C6*, *C7*, *C13*, *C14* 为本实验室克隆的 4 个新基因可能参与卵背腹轴的决定)

*grk* 信号引起的胞内信号传递结果主要是通过抑制腹方化基因的表达和激活背方化基因,使得这些细胞分化为背方滤泡细胞。目前,起激活作用的基因还未发现,只找到了一种转录调控抑制因子(*HLH*)<sup>[12]</sup>。在这些基因的作用下,背方滤泡细胞中的 *rho*, *brn*, 非肌肉型肌球蛋白 *myosin* 等基因被激活,使这些细胞分化形成卵细胞的气孔和背方附肢(*dorsal appendage*)等结构。

与此同时,位于腹方的滤泡细胞由于未得到 *grk* 信号,就表达腹方分化所必需的基因,如 *nudle*, *gd*, *pipe* 等,从而分化为腹方滤泡细胞。这些细胞形成的一个重要作用就是产生一个腹方信号,并再次传回卵细胞(图 2)。由于信号源限制在腹方滤泡细胞层,这个滤泡细胞向卵细胞的信号传递过程只能在腹方进行。腹方信号通过在腹方激活受精卵膜上的 *Toll* 受体和一系列蛋白激酶,使合胞体囊胚内转录调

控因子 DI 进入卵裂核内,并形成从腹方到背方的浓度梯度。核内的 DI 再通过调控合子基因的表达而建立胚胎的背腹轴<sup>[3,7]</sup>。腹方信号的性质目前还不清楚。我们已克隆了两个分泌蛋白。已知它在腹方细胞中具有独特的表达<sup>[12]</sup>,其中一个参与翅膀背腹轴的形成,但它们是否就是上述腹方信号仍有待证实。

#### 四、一个信号,两种反应

果蝇卵细胞的前后和背腹轴形成过程虽然由两个不同的遗传途径控制,但都由卵细胞分泌的同一个信号先后启动。这个信号先被卵室后端滤泡细胞接受后导致前后轴的建立。一旦前后轴形成后,仍是这个信号被背前方的滤泡细胞接受后再导致背腹轴的建立<sup>[4,5]</sup>。在两个轴的形成过程中,这个信号及其受体分别由 grk 和 top 基因编码,并控制了卵细胞向滤泡细胞的信号传递。然而后端极滤泡细胞和背前方的滤泡细胞对此信号产生反应不同,形成了两种不同的滤泡细胞,分别为后极滤泡细胞和背方滤泡细胞。

围绕卵细胞的滤泡细胞对 grk 信号反应的不同主要是由于卵细胞内信号作用的调谐或滤泡细胞内 top 基因下游的其它基因差异的缘故。尽管现在知道有几个基因如 cni 和 brn 是在卵细胞内表达,为 grk 信号作用所需,而 ras, raf, gap, MAPK 等都在围绕卵细胞的滤泡细胞中表达,为 grk 信号在滤泡内的信号传递所需<sup>[20]</sup>。但是卵室一形成,前后极滤泡细胞就显示了不同于背腹方滤泡细胞。早在卵细胞发生的第 1—6 期,一系列专一表达的标志基因(如 FC I, C7 等)只在前后极滤泡细胞中表达<sup>[12,16]</sup>。而在背前方滤泡细胞中专一表达的基因(如 rho, c6 等)要在卵发生第 9 期后才出现<sup>[12,22]</sup>。上述滤泡细胞中专一表达的基因可能通过影响信号的接受和反应,而决定细胞进一步分化的命运。例如 rho 编码了一个推测的膜蛋白。它有可能通过增强 grk 和 top 受体之间的结合强度,从而影响背方轴滤泡细胞的分化

命运<sup>[22]</sup>。此外,这两种滤泡细胞中转录调控因子的差异目前还不清楚。但这种差异在滤泡细胞对 grk 信号的不同反应中显然会起很大的作用。

滤泡细胞对 grk 信号反应的结果之另一个特点是抑制向一种细胞分化的命运,并激活向另一种细胞分化的命运。后端极细胞将抑制前极细胞的命运,而激活后极细胞的命运。因此在 grk 突变时,这些后端极细胞也将变成与前端极细胞相同的命运。同样,背前方的滤泡细胞在 grk 作用下,也必须抑制向腹方细胞分化的命运,并激活向背方细胞分化的命运,才能使这些细胞分化为背方滤泡细胞。从 grk 信号开始,经 top 受体,到信号传递途径有关的各成份,其中任何一个基因突变都将使这些细胞继续分化为前端极滤泡细胞或腹方滤泡细胞。滤泡细胞的命运无论是激活或抑制都必须通过基因表达的调控而进行。目前,相应的转录正调控因子还未找到。已克隆的一个是转录负调控基因。该基因在卵细胞发生的第 3—7 期和第 9—10 期分别在后端的极滤泡细胞和背前方的滤泡细胞中都有表达<sup>[12]</sup>。即使如此,这个基因如何参与抑制细胞命运仍有待进一步证实。总之,在这些调控基因的作用下,滤泡细胞内新的基因表达产物是整个从卵细胞到滤泡细胞信号传递的直接结果。它们将进一步负责滤泡细胞的分化命运,甚至启动从滤泡细胞向卵细胞的信号反向传递。

#### 小 结

细胞信号传导在果蝇卵轴形成中起了非常重要的作用。卵细胞的前后和背腹轴的形成分别都经过了卵细胞向滤泡细胞和继而滤泡细胞向卵细胞的信号传导两个过程。尽管这两个轴的形成一直被认为由两个独立的遗传途径控制,实际上,这两个轴的建立都起始于一个共同的信号(grk)和受体(top)及相应的信号传递途径。而且背腹轴的形成还依赖于前后轴的形成。这个起始信号来自卵细胞,被滤泡细胞接受后,

另一个信号从滤泡细胞反向传递到卵细胞,并通过改变卵细胞内微管骨架的极性,从而先建立起卵细胞的前后极性。在此基础上,相同的信号启动背方滤泡细胞的分化而建立背腹轴。腹方滤泡细胞产生的某种腹方信号再反向传递给受精卵,最后建立胚胎的背腹体轴。

### 参 考 文 献

- [1] St Johnston, R. D. and Nusslein-Volhard, C. 1992, *Cell*, **68**:1-20.
- [2] Debiao Zhao, 1991, *Chinese J of Cell Biology*, **13**(1):12-20, **13**(2):57-64.
- [3] Debiao Zhao, 1993, *Chinese J of Cell Biology*, **15**(1):15-22.
- [4] Gonzales-Reyes, A. et al., 1995, *Nature*, **375**:654-658.
- [5] Roth, S. et al., 1995, *Cell*, **81**:967-978.
- [6] Lasko, P. 1994, *Molecular Genetics of Drosophila Oogenesis*. R. G. Landes Company.
- [7] Rushlow, C. A. et al., 1989, *Cell*, **59**:1165-1177, Steward, R. *ibid*, p1179, and Roth, S. et al., *ibid*, p1189.
- [8] Cooley, L. and Theurkauf, W. E. 1994, *Sciences*, **266**:590-596.
- [9] Theurkauf, W. E., et al., 1992, *Development*, **115**:923-936.
- [10] Clark, I., et al., 1994, *Curr. Biology*, **4**:289-300.
- [11] Rongo, C. and Lehmann, R. 1996, *Trends in Genetics*.
- [12] Zhao, D. B. and Bownes, M. *Unpublished data*.
- [13] Gonzalez-reyes, A. and St Johnston, D. 1994, *Sciences*, **266**:639-642.
- [14] Lehmann, R. 1995, *Cell*, **83**:353-356.
- [15] Lane, M. E. and Kalderon, D. 1994, *Genes and Development*, **8**:2986-2995.
- [16] Ruohola, H. et al., 1991, *Cell*, **66**:433-449.
- [17] St Johnston, D. 1995, *Cell*, **81**:161-170.
- [18] Neuman-Silberberg, F. S. and Schubach, T. 1993, *Cell*, **75**:165-174.
- [19] Roth, S. and Schaubach, T. 1994, *Development*, **120**:2245-2257.
- [20] Brand, A. H. and Perrimon, N. 1994, *Genes and Development*, **8**:629-639.
- [21] Forlani, S. et al., 1993, *Mechanism of Development*, **14**:109-120.
- [22] Ruohola-Baker H. et al., 1993, *cell*, **73**:953-965.

## 猪瘟病毒与宿主细胞间的相互关系

王 镇 丁明孝

(北京大学生命科学学院细胞与遗传学系 北京 100871)

猪瘟病毒旧称猪霍乱(Hog cholera virus, HCV),现称经典猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)。感染猪可引起高热、皮肤变色、白细胞减少、大量内出血等及神经系统症状<sup>[1,2]</sup>,死亡率很高。猪瘟最早于19世纪30年代在美国的俄亥俄州发现。根据感染CSFV毒力的差异,可导致急性、亚急性及慢性猪瘟。强毒力CSFV导致的急性猪瘟可使猪在感染后10-20天内全部死亡。中低毒力CSFV感染也可使猪死亡,不死的猪可发展成持续感染、排毒的“CSFV携带者”。因此,猪瘟病毒是世界上危害养猪业的重要病毒之一。据统计,在我国每年死亡的猪中有三分之一是由CSFV感染造成的。每年造成的经济损失是巨大的。因此,猪瘟

病毒一直是家畜病害研究及兽病检测与防治的一个重点<sup>[3]</sup>。

猪瘟病毒是有囊膜的正链RNA病毒,在分类学上属黄病毒科(Flaviviridae),瘟病毒属(Pestivirus)<sup>[4]</sup>。病毒粒子直径40-60nm。囊膜上有病毒编码的糖蛋白:gp44/48、gp33、gp55<sup>[5]</sup>。核心由病毒蛋白衣壳蛋白p14与病毒基因组RNA组成,直径约30nm,超薄切片中呈六角形<sup>[6]</sup>,具有二十面体对称性<sup>[5]</sup>。猪瘟病毒在蔗糖中浮力密度为1.12g/ml,沉降系数 $S_{20} = 140-150$ 。猪瘟病毒能在多种动物细胞中增殖,且一般不使培养细胞产生病理变化(cytopathic effect, CPF)<sup>[7]</sup>。近年来,随着对猪瘟病毒分子生物学研究的深入,人们对CSFV及其