

细胞周期和卵母细胞成熟调控机制研究的新进展

陈寒柏 左嘉客

(中国科学院上海细胞生物研究所 200031)

随着分子生物学和细胞生物学的飞速发展,人们从单纯追求生物大分子的化学和物理结构的研究,逐步转移到在分子水平上洞察和认识生命活动的基本规律,自然也就包括了细胞周期的调控问题。

自从细胞的分裂图象第一次在显微镜下被观察到之后,关于细胞周期以及它与分化和发育等的关系,就一直引起细胞生物学家和发育生物学家的注意。按形态,细胞周期被划分为两个时期,即分裂期和分裂间期。分裂间期的细胞外观虽属平静,但按其生化行为,可区分为三个不同阶段,致使整个细胞周期有四个不同的时期:1. M期,细胞分裂期;2. S期, DNA 合成期;3. G_1 期,相当于从M期到S期之间的间隔期;4. G_2 期,相当于从S期到M期之间的间隔期。尽管该美妙的“生物钟”被划分为四个不同的时期,但迄今对其各个时期的变化和它们之间的过渡问题的认识,远不如我们所了解的那么简单。

实际上在一个完整的细胞周期中,有多个影响各时期过渡的限制点(主要有 R_1 、 R_2 和 R_3),它们分别处在由 G_1 期到S期、 G_2 期到M期和M期到 G_1 期的过渡阶段中(图1)。这类正常的过渡一般受到两个方面的信号调控,一为外源的,如:生长因子、激素或受精之类的刺激等等;另一为内源的,由细胞自身合成或再经修饰的分子,通称调控因子。

在体外培养的哺乳类体细胞中,控制细胞增殖的主要“事件”发生在 G_1 期。以具有组织专一性的生长因子处理处于静止状态的 G_0 期细胞或处于细胞周期早 G_1 期的细胞,将促进

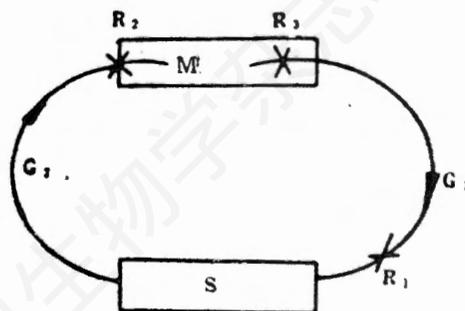


图1 细胞周期中各时期及各时期过渡中的限制点

这些细胞的某些基因的转录活动。转录产物或许还调控着其他基因的转录活动。其结果使细胞获得跨越 R_1 限制点的能力,实现由 G_1 到S期的过渡。

另一类被研究得较透彻的调控“事件”发生在晚 G_2 期,结果导致 MPF (Maturation promoting factor 或称 M-phase promoting factor) 的产生,从而实现由 G_2 到M期的过渡。以未成熟的长足的卵母细胞为例,它们被长时间地“休止”在晚 G_2 期,直至受到某种性激素的刺激,经历一系列的生理、生化的变化之后,才摆脱 R_2 限制点,由 G_2 期过渡到M期。

上述成熟的卵球,它们再次被阻断在M期后阶段的 R_3 限制点,等待受精。由受精激起的有丝分裂的细胞周期稍不同于体细胞的,大部分的这类早期胚胎细胞的细胞周期简短,具有快速交替出现的S期和M期,而且可能是由于早期胚胎细胞所需的大部分物质已在卵母细胞的发生期间合成,故 G_1 期和 G_2 期非常短,甚至缺无。目前尚无证据表明,这类早期胚胎细

胞的周期活动得以依赖于外源信号。所以在卵裂期,早期胚胎完全依赖于内源的调控,即细胞内调控 MPF 活性的起伏,致使细胞离开 M 期进入下一细胞周期。

MPF 首先是在两栖类卵中发现的,它具有导致卵母细胞恢复减数分裂直至成熟的作用。不久,发现 MPF 也能诱导有丝分裂,还发现 MPF 的活性是随细胞周期的循环而波动,由 G₂ 期进入 M 期时活性迅速上升,在 M 期的中/后期活性迅速下降。这就是为什么 MPF 成了细胞周期“钟”中最引人注目的“部件”。之后,细胞生物学家在海胆卵中首先观察到一种周而复始出现和消失的“新蛋白质”,它调控着细胞周期,被命名为周期蛋白(Cyclins),有 Cyclin A 和 Cyclin B 两类之分。该蛋白质也是在 G₂/M 期时大量合成,在 M 期的中/后期被迅速降解。同时值得提出的是,遗传学家们在另一条战线上利用酵母突变种研究分裂活动,发现了许多与细胞周期调控有关的基因,其中颇为出名的是 cdc 2 和 cdc 28 基因(cdc, cell division cycle 的缩写),它们编码的蛋白质就是 P³⁴,即 MPF 的催化亚单位。在细胞周期的调控问题上,细胞生物学家和遗传学家不约而同地走到了一起,携手解开了 MPF 之谜,并深入地阐明了细胞周期的调控机制^[1]。

一、MPF 的组成及其活化机制

——从 G₂ 进入 M 期

人们对于 MPF 的认识也有一个过程。过去认为 MPF 的活性出现依赖于蛋白质合成;依赖于蛋白质磷酸化;对 Ca²⁺ 敏感;并且能自我扩增。而目前的研究提示 MPF 即 M 期激酶,由两个亚单位组成(表 1),一个为催化亚单位,即 P³⁴,分子量 34,000,具有 H₁ 组蛋白激酶作用;另一个为调节亚单位,即 cyclin,分子量 60,000—62,000,亦称 P⁶⁰ 或 P⁶²^[2]。另外还发现在整个细胞周期过程中, P³⁴ 无量的变化,只有活性的变化。从 G₂ 进入 M 期时, P³⁴ 通过去磷酸化而显示出激酶活性;而在离开 M 期时,又通过

磷酸化而失活。具体地说,当细胞从 G₂ 向 M 期过渡时, P³⁴ 和在这一时期新合成的 cyclin 结合,致使 P³⁴ 的 Tyr-15 去磷酸化,恢复其激酶活性;同时, cyclin 磷酸化。细胞由此从 G₂ 期进入 M 期(图 2)^[3]。

表 1 不同生物中 M 期激酶的组成*

| 生物种类 | 催化亚单位 | 调节亚单位 |
|------|--------------------------|---|
| 裂殖酵母 | cdc 2 = P ³⁴ | cdc 13 = P ⁶⁰ = Cyclin B |
| 芽生酵母 | cdc 28 = P ³⁴ | 不详 |
| 非洲爪蟾 | P ³⁴ | Cyclins A, B ₁ , B ₂ |
| 人 | P ³⁴ | P ⁶² = Cyclin B, P ⁶⁰ = Cyclin A |
| 海星 | P ³⁴ | P ⁶⁰ = Cyclin B |
| 蛤蜊 | P ³⁴ | Cyclins A, B ₁ , B ₂ |

* M 期激酶由其催化亚单位 P³⁴ 和其调节亚单位 Cyclin A 或 Cyclin B 组成。

既然 MPF 是一种激酶,那其作用的底物是什么呢?目前认为有如下几种主要底物:一为 H₁ 组蛋白,它磷酸化后使染色体更紧密地超聚在一起,和 M 期染色体的浓缩现象相吻合;二为核层蛋白(Lamins),它与核膜的破裂和再现有关;三为肌球蛋白的轻链,它磷酸化后可能起抑制胞质分裂的作用(详见表 2)。

表 2 M 期激酶的可能作用底物

| M 期激酶的作用底物 | 作用时期 | 结果 |
|---------------------|-------------------------|--------------|
| H ₁ 组蛋白 | M 期, S 期 | M 期染色体浓缩 |
| 核层蛋白 | M 期早期 | 核膜破裂 |
| 核仁蛋白 | M 期早期 | 阻止核糖体合成 |
| 肌球蛋白的轻链 | M 期 | 抑制胞质分裂 |
| PP ^{60src} | M 期 | 进一步激起其他磷酸化反应 |
| SWI 5 | S, G ₂ , M 期 | 出核 |
| T 抗原 | S 期 | 使复制起始 |

此外,不论是裂殖酵母,芽生酵母,蛤蜊,或是非洲爪蟾,其 P³⁴ 均为同系物,都具有 H₁ 组蛋白激酶的活性,并且在从 G₂ 到 M 期的过

渡过程中,均有和 cyclin 的类似结合,本身去磷酸化后活化等的过程。进一步分析表明,这些不同种生物的 P³⁴ 的氨基酸顺序有 60% 的同源性,其中有 14 个氨基酸“EGVPSTAIRESLKE”是一段十分保守的序列,简称 PSTAIR 序列。这种进化中的保守性也反映了 P³⁴ 在细胞周期中所处的重要地位。

二、某些原癌基因在卵母细胞成熟过程中的作用——首次直接证实原癌基因在细胞周期调控中占有重要的地位

卵母细胞的成熟过程实际上是 G₂ 向 M 期转化的过程。在这个过程中,细胞中发生了一系列生理、生化变化。在正常情况下,卵母细胞的成熟必须依赖一个外来的信号作用。这个信号在两栖类是孕酮,在鱼类是 20 β -17 α -二

羟孕酮,在海星是 1-甲基腺嘌呤等。两栖类卵母细胞经孕酮刺激后,细胞中 cAMP 含量迅速下降,同时伴随 Ca²⁺ 大量流入,膜去极化,细胞内 pH 值上升,整个细胞内的蛋白质磷酸化加剧,特别是组成核糖体小亚基的 S6 蛋白磷酸化,致使动员大量 mRNA 参与翻译,合成大量蛋白质。cyclin 的合成,和未活化的 P³⁴ 结合, P³⁴ 去磷酸化而被活化, cyclin 本身被磷酸化,有活性的 M 期激酶形成,导致 GVBD(生殖泡破裂),卵母细胞成熟。

早先的研究并未发现有关原癌基因和细胞周期的直接联系,但最近的研究启示某些原癌基因在卵母细胞成熟过程中起着重要的作用。在胰岛素刺激下而引起的卵母细胞成熟过程中, c-ras 基因产物和 M 期激酶的产生有关^[4]。另外还发现 c-mos 基因的产物 PP^{39mos} 或 c-mos 的 mRNA 均能使 MPF 活化,从而使卵母细

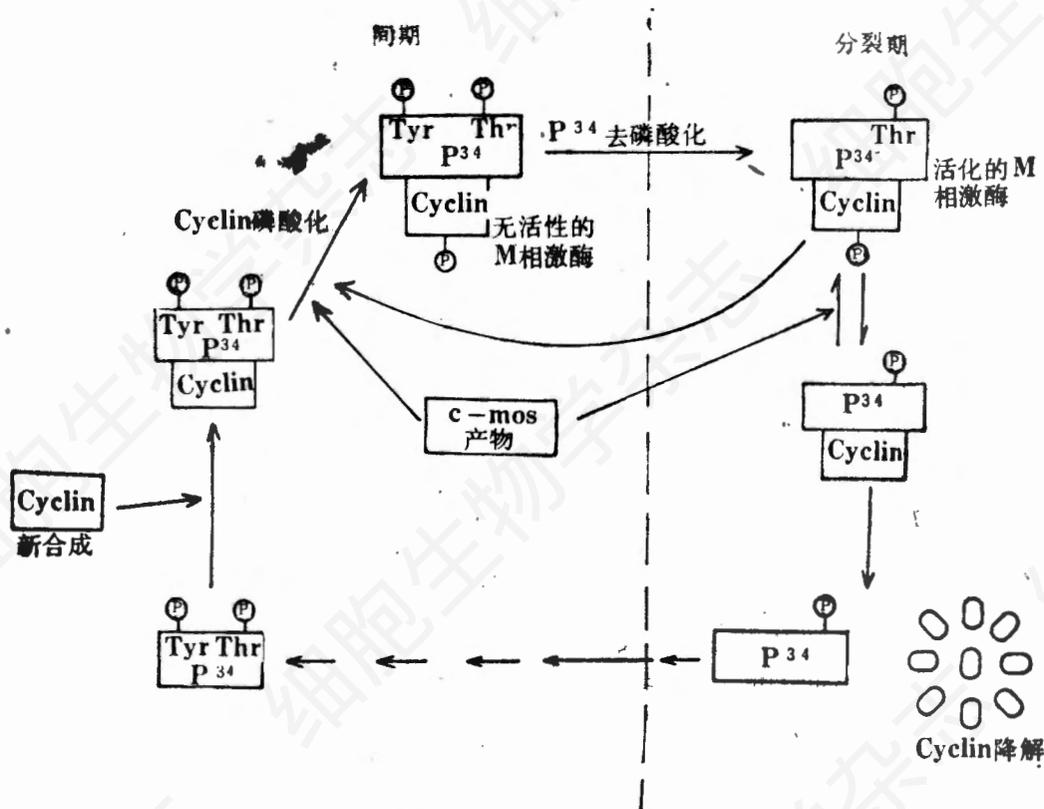


图 2 M 期激酶的活性及 Cyclin 的含量在细胞周期中的变化及 c-mos 产物对细胞周期的可能作用

胞成熟^[6]。在作用时序上, c-ras 在先, c-mos 在后, 随即出现 MPF 的活化^[6]。另外, 还发现某些原癌基因的产物是 MPF 的作用底物, 例如: PP^{60src} 磷酸化后成为有活性的酪氨酸激酶; c-abl 基因的产物 PP^{120abl} 也在这一时期被磷酸化, 显示酪氨酸激酶的活性。它们均参与了最后导致 GVBD 的过程。虽然我们开始认识到原癌基因对卵母细胞成熟和细胞分裂的调控至关重要, 但是关于这些原癌基因参与细胞周期活动的确切时间, 它们的作用方式, 以及哪些是它们的作用底物等等问题, 仍不甚了解, 需作进一步的研究。

三、周期蛋白的降解——离开M期

正如前述, 在细胞进入 M 期之前, MPF 的活性大大增加; 在 M 期的中/后期时, 活性迅速下降直至消失。cyclin 含量也是如此地变化着, 由 G₂ 向 M 期过渡时大量合成, 在 M 期的中/后期降解。这种相关现象是否具有某些内在的联

系呢? cyclin 是否调节着 MPF 的活性呢?

卵母细胞从 G₂ 期进入 M 期后, 均停留在 M 期的中期, 具体地说是停留在第二次减数分裂的中期。此时卵中发现了一种新蛋白质, 称作细胞静止因子 (cytostatic factor, 简称 CSF), 它具有使细胞停顿在 M 期中期的作用, 阻止细胞离开 M 相。实际上 CSF 就是原癌基因 c-mos 的产物, 它不仅能够使 cyclin 磷酸化, 进而使 P³⁴ 活化, 产生有活性的 M 期激酶, 使细胞从 G₂ 进入 M 期; 而且能维持 cyclin 的磷酸化, 使它不被降解, 从而维持 M 期激酶的活性, 阻止细胞离开 M 期, 使它停顿在 M 期中期 (图 2)^[7]。在卵受精之后, 恢复有丝分裂时, 细胞内 Ca²⁺ 浓度迅速增加, 致使 CSF 活性消失, 不再回升 (图 3)。足见, CSF 有维持 cyclin 不被降解的作用, 一旦 CSF 消失, cyclin 被降解, MPF 活性消失, 细胞离开 M 期。

最新的研究还表明, P³⁴ 本身在活性高时, 能促使 cyclin 降解, 进而其本身失活。说明在

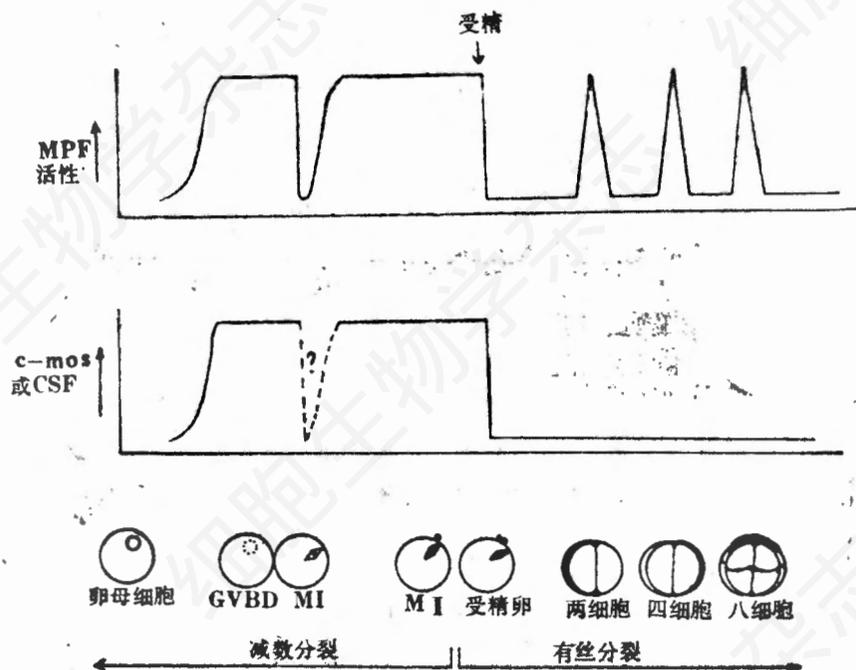


图3 MPF活性和CSF(c-mos)含量在爪蟾卵成熟发育过程中的变化
GVBD: 生殖泡破裂, 表明卵母细胞成熟
MI: 第一次减数分裂中期 MII: 第二次减数分裂中期

M期的中/后期, P^{34} 自身也参与一个由 cyclin 参加的反馈调节过程^[8]。

四、 G_1 期周期蛋白—跨入 S 期

遗传学家们在芽生酵母中发现了 3 个基因: CLN 1、CLN 2 和 CLN 3。它们的产物称为 G_1 期周期蛋白(G_1 cyclins)。这些蛋白均是 G_1 期所固有的, 与上述的 G_2/M 期中的 cyclin A 和 cyclin B 不同。CLN 2 蛋白在细胞中的半衰期短, 一边合成, 同时又被降解。当合成量大于降解量, 蛋白积累到一定的阈值时, 与 P^{34} 结合, 激活 P^{34} , 使细胞离开 G_1 期而进入 S 期; 反之, 当蛋白含量未达到阈值时, P^{34} 不被活化, 细胞仍停留在 G_1 期^[9]。

值得提出的是: 在过去的文献中, 曾将一种在 G_1/S 期开始在核中出现又在 S 期结束后消失的与细胞周期有关的蛋白质称为 cyclin。但它与本文所提到的 cyclins 和 G_1 cyclins 完全不同, 它是增殖细胞核抗原 (PCNA, proliferating cell nucleus antigen), 在哺乳类细胞中是 DNA 聚合酶 δ 的附属蛋白, 能促进 DNA 聚合酶 δ 延伸 DNA 链; 在酵母中具有促进 DNA 聚合酶 III 的活性的作用, 显然它与 S 期的 DNA 复制活动有关。目前为了避免混淆, 常称之为 PCNA 或 PCNA/cyclin。

(上接封三)

上不饱和脂肪酸的氧化、细胞蛋白质的氧化和/或 DNA 的损伤而引起细胞的死亡。过氧化氢酶可破坏过氧化氢而保护细胞的生长^[13,14]。已证明, 在培养基贮藏过程中的主要有害物质是过氧化氢, 但其中 40% 可被过氧化氢酶除去。

各种细胞的生长、分化和机能发挥均需较特异的营养物质和生长因子, 所以要制备一种适合于所有种类细胞生长的培养基十分困难。从本实验结果看, SFM-1 不仅可以用于正常和恶性淋巴祖细胞, 而且可以用于其他种类的造血祖细胞, 培养结果和有血清培养无明显差

结 语

细胞周期的调控, 包括卵母细胞成熟的调控, 不是一个单纯的级链式的作用, 很有可能是一个多元调控。在离体实验中, 蛙卵母细胞经孕酮或胰岛素的刺激, 均能够成熟。但经两者处理后, 成熟的具体途径是不同的。具体地说, 两者早期的作用后事件有所不同, 但最后又一致地产生活性的 MPF。那么细胞本身是怎样协调这些多元调控的呢? 来自外源的信号和来自内源的调控因子又是怎样相互协调, 共同调控细胞周期的呢? 换句话说: 这个细胞周期的调控网是怎样运行的呢? 这将有赖于今后进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Marx J. L., 1989, *Science*, 245:252-255.
- [2] Lohka K. J. et al., 1988, *Proc. Natl. Aca. Sci., U. S. A.*, 85:3009-3013.
- [3] Lewin B., 1990, *Cell*, 61:743-752.
- [4] Birchmeier C. et al., 1985, *Cell*, 43:615-621.
- [5] Sagata N. et al., 1989, *Science*, 245:643-646.
- [6] Barrett C. B. et al., 1990, *Mol. Cell Biol.*, 10:310-315.
- [7] Sagata N. et al., 1989, *Nature*, 342:512-518.
- [8] Felix M. A. et al., 1990, *Nature*, 346:379-382.
- [9] Richardson H. E. et al., 1989, *Cell*, 59:1127-1133.

异, 效果是比较理想的。

摘 要

最近, 我们研制了一种可用于正常和恶性造血祖细胞半固体克隆培养的无血清培养基, 不仅可用于正常和恶性淋巴祖细胞, 而且可用于其他种类的造血祖细胞。这种无血清培养基称之为 SFM-1, 由 IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) 补充以牛血清白蛋白 10 mg/ml、转铁蛋白 1 μ g/ml、胰岛素 8 μ g/ml、胆固醇 20 μ g/ml 和过氧化氢酶 20 μ g/ml 组成。通过 CFU-ALL、CFU-ANLL、BL-CFU、TL-

(下转40页)

调。我们推测,正是由于间隙连接的形成受到抗体 NC 6 的作用而减少,从而使细胞分裂失控,水晶体的增大正是细胞分裂失控的反映。我们过去的原位注射实验结果^[6]可支持这种推测,因为它证明,在 NC 6 作用下,水晶体的增大与纤维细胞数的增多是同时发生的。正因为 NC 6 影响水晶体生长的直接原因可能是由于细胞分裂失控,所以这种影响与培养时间正相关,培养时间越长,影响越明显(见表 1 和表 3)。

整体水晶体的立体观察指出,无论是原位水晶体(图版图 3、4),还是离体培养水晶体(图版图 5—8),其实验组与对照组水晶体都十分相似,说明抗体 NC 6 并不影响水晶体的形态。

摘 要

用器官培养技术研究了抗连接蛋白单克隆抗体 NC 6 对鸡胚水晶体发育的影响,同时进行了原位眼内注射 NC 6 的实验。水晶体大小的统计分析结果指出,离体器官培养结果与原位眼内注射结果完全一致:实验组水晶体均明显地大于对照组;这种差异显著性又与培养时间正相关。但正常水晶体左右侧之间无显著的

(上接12页)

CFU 和 GM-CFU 测定对 SFM-1 和 SCM 进行全面比较后显示, SFM-1 和 SCM 对上述造血祖细胞的生长支持作用没有显著性差异,而且 SFM-1 优于另外 2 种无血清培养基(SFM-2 和 SFM-3)。未发现 SFM-1 对细胞形态、表型和结构有明显影响。

参 考 文 献

- [1] Hayashi, I., et al., 1984, In: Cell culture methods for molecular and cell biology. Ed: Barnes, D. W., et al., volume 2, p. 1-216, Alan R. Liss, Inc., New York.
- [2] 吴祖泽主编, 1988, 造血干细胞移植基础, p. 124-126, 人民卫生出版社。
- [3] 顾涵英等, 1990, 生物化学与生物物理进展, 17(4): 255-259.
- [4] 李黎等, 1990, 国外医学(预防、诊断、治疗用生物制品分册), 13(3): 118-120.

大小差异。这些结果表明, NC 6 确有促使水晶体增大的作用。以前的工作已经证明, NC 6 能阻断间隙连接的形成。因此,作者推测,可能是 NC 6 阻断了水晶体纤维细胞中的间隙连接形成,造成了细胞分裂的失控,从而导致水晶体的增大。本文结果进一步证实了间隙连接在生长控制中起重要作用。

参 考 文 献

- [1] 李新人等, 1988, 实验生物学报, 21(3): 393-399.
- [2] Bennett, MVL., et al., 1981, *Am. Zool.*, 21: 413-427.
- [3] Warner, AE., et al., 1984, *Nature*, 311: 127-131.
- [4] Caveney, S., 1985, *Ann. Rev. Physiol.*, 47: 319-335.
- [5] 蒋晞东, 1983, 鸡胚发育图谱, 科学出版社, 北京, 34-46 页。
- [6] 李新人等, 1989, 自然杂志, 12: 715-716.
- [7] Sas, DF., et al., *Curr. Eye Res.*, 4: 1171-1182.
- [8] Zeng, M.-B. (曾弥白), 1987, *J. Electron Microscop-Technique*, 7: 85-89.
- [9] 林文娜等, 1990, 显微与亚显微形态科学会第四届第六次学术讨论会文集, 湖南索溪峪, 38 页。
- [10] Loewenstein, WR., 1979, *Biochem. Biophys. Acta*, 560: 1-65.

- [5] 黎旭光等, 1988, 中华微生物学和免疫学杂志, 8(1): 38-41.
- [6] 崔运昌等, 1989, 中华微生物学和免疫学杂志, 9(3): 190.
- [7] 施渭康等, 1987, 细胞生物学杂志, 9(2): 77-79.
- [8] Dai, Y. C., et al., 1987, *Int. J. Cell Cloning.*, 5: 480-491.
- [9] Iscove, N. N., Melchers, F., 1978, *J. Exp. Med.*, 147: 923-933.
- [10] 唐佩弦、扬天檀主编, 1985, 造血细胞培养技术, p. 161-170, 陕西科学技术出版社。
- [11] Hayashi, I, Sato, G. H., 1976, *Nature*, 259: 132-134.
- [12] Konwalinka, G., et al., 1986, *Exp. Hematol.*, 14: 899-903.
- [13] Darfler, F. J., Insel, P. A., 1983, *J. Cell. Physiol.*, 115: 31-36.
- [14] Whisler, R. L., Newhouse, Y. G., 1982, *Cell Immunol.*, 69: 34-45.