

- [10] 张洪德等, 1991, 中华器官移植杂志, 12: 72.
- [11] Norman, M. et al., 1989, *Diabetes*, 38: 386.
- [12] Deber, A. et al., 1989, *Diabetes*, 38: 448.
- [13] Kemp, J. A. et al., 1981, *Transplantation*, 32: 10.
- [14] Rajotte, R. V. et al., 1981, *Cryobiology*, 18: 17.
- [15] Foreman, J. et al., 1989, *Diabetes Res.*, 11: 149.
- [16] Shiogama, T. et al., 1987, *Transplantation*, 44: 602.
- [17] Rajotte, R. V. et al., 1990, *Horm Metab Res Suppl.*, 25: 72.
- [18] Ishiara, K. et al., 1989, *Diabetes Res Clin Pract.*, 6: 243.
- [19] Taylor, M. J. et al., 1987, *Diabetes*, 36: 59.
- [20] Flesch, B. K. et al., 1991, *Horm Metab Res.*, 23: 1.
- [21] Evans, M. G. et al., 1990, *Transplantation*, 50: 202.

哺乳动物早期胚胎发育调控过渡研究的进展

李逸平 左嘉客

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

哺乳动物的发育进程与其他脊椎动物一样, 早在卵子发生期间, 即在卵母细胞生长和成熟过程中已经开始准备并积累一套为胚胎发育所需的母型 RNA 和蛋白质。胚胎发生则是随着受精作用而开始的, 由精子进一步激发卵子发生期间早已启动的发育程序。早期胚胎的发育是受贮存在卵母细胞内 mRNA 和蛋白质的调控, 简称母型调控 (maternal regulation)。随着胚胎发育的继续推进, 它就必须依赖于胚胎自身的合子型基因组的调控, 简称合子型调控 (zygotic regulation)。

由母型调控向合子型调控的转变, 常简称

调控过渡。各种哺乳动物早期胚胎进行这种过渡所处的发育时期不尽相同。在过渡阶段, 细胞水平上和分子水平上却都发生着一系列深刻的变化。如果不能顺利实现这种过渡, 则出现发育阻滞。哺乳类早期胚胎发育阻滞的时间往往与发育调控过渡的时间相关联^[1,2]。

本文将从细胞和分子水平的角度, 就哺乳类早期胚胎发育调控由母型向合子型过渡的特征及机制的研究现状作一概述。

一、核纤层 nuclear lamina 的变化

在哺乳动物发育过程中, 核纤层蛋白的表

表 1 胚胎不同发育时期核纤层中核纤层蛋白出现、消失和复现的情况

核纤层蛋白	动物种	小鼠	猪	牛
胚胎发育期				
卵母细胞到 2 细胞期		A、B、C	A、B、C	A、B、C
4 细胞期		B	A、B、C	A、B、C
8 细胞期		B	B	A、B、C
16 细胞期		B	B	B
桑椹胚		B	B	B
囊胚		B	B	B
组织分化		A、B、C	A、B、C	A、B、C

达时序比较复杂，尤其在调控过渡期间，变化很大。在小鼠、牛和猪的卵母细胞核纤层中均含3种核纤层蛋白，A、B和C；自生殖细胞到囊胚后期的各个发育阶段中，核纤层蛋白B未曾消失过，而核纤层蛋白A和C却在调控过渡期间消失，并在囊胚后期随着组织的分化又恢复出现（表1）^[8,9]。有关核纤层蛋白A和C在合子型调控期消失的生物学意义尚不清楚。

曾将猪16细胞期胚胎的细胞核转移至处于分裂中期Ⅱ的去核卵母细胞中，结果发现核纤层蛋白A、C抗原决定簇从卵母细胞质移位到16细胞期胚胎细胞核中^[1]。这表明，核纤层中的消失和存在很可能反映核纤层蛋白在细胞质中的积累和自胞质向核内的转移。

二、功能核仁的形成

在发育调控过渡期的哺乳类早期胚胎中，所涉及的形态变化是多方面的、深刻的和复杂的，除了上述的核纤层变化，还包括其他形态事件，其中值得介绍的是核仁组织区和功能核仁形成的形态变化。

在小鼠、牛、羊以及人的胚胎中，唯有在合子型基因组被激活之后，中期染色体的核仁组织区才被银染^[5-7]。被银染的为rRNA聚合酶I亚单位，分子量为195 kD^[8]。

功能核仁的形成及其形态变化与转录活动密切相关。在母型调控期，核仁小，呈匀质球体，称为均一核仁前体（homogeneous nucleolar precursor），不含rDNA。当核仁被活化时，染色质进入均一核仁前体中，核仁由均一转变为不均一状态，开始出现45S前核糖体RNA（pre-rRNA）。随着核仁中出现活跃的pre-rRNA合成和加工过程（大量产生28S rRNA），核仁由致密纤维颗粒状转变为网状^[10]。在胚胎中，于8细胞期末才建立起功能完全的核仁，而8细胞期牛胚胎细胞核仁呈液泡状，直到8细胞期后才检测到³H尿苷的掺入，同时可观察到反映rRNA合成活动的网状形态特征^[10,12]。显然，功能核仁的建成与合子型转录活动相关。

三、细胞周期由短向长过渡

就一般体细胞而言，其细胞周期的长短主要取决于G₁相的长短。体外培养的体细胞往往因条件欠缺而停顿在G₁相某个时刻，该时刻被称为限制点，简称R点。细胞一旦通过G₁相，就往往能完成S、G₂和M相。生殖细胞，如成熟之前的卵母细胞，它们都停顿在G₂/M相，而受精之前的成熟卵母细胞，其R点处在MⅡ相中期。与上述两类细胞不同，哺乳类早期胚胎的R点在G₂相。例如，小鼠早期胚胎细胞的R点在第二细胞周期的G₂相；人的在第三细胞周期的G₂相，等等^[1]。

表2以牛和羊早期胚胎为例，呈示它们从受精卵到囊胚前的各个细胞周期的时程。它们都有一个较长的起步的细胞周期（从受精到分裂为2细胞），随后是一些短的细胞周期，一直持续到母型向合子型调控过渡为止（即16细胞期之后）；当发育调控依赖于合子型转录活动以及合子型蛋白质的出现，又恢复长的细胞周期^[9,10]。猪胚胎的情况相类似，4细胞期（第三细胞周期）为着床前最长细胞周期之一^[11]。那么，在哺乳类着床前胚胎发育调控实现完全过渡之前，其细胞周期为何短呢？Prather等人（1987）曾在牛卵母细胞中作了细胞核移植实验分析，根据实验结果推测细胞周期的时程长短与核质比有关^[12]。

表2 牛、羊早期胚胎的各个细胞周期的时程（小时）

胚胎发育期(细胞周期)	动物	牛	羊
成熟卵母细胞—2细胞期(第一、二周期)	32	24	
2—4细胞期(第三周期)	13	12	
4—8细胞期(第四周期)	14*	12	
8—16细胞期(第五周期)	24	12	
	**	**	
16—32细胞期(第六周期)	20	24	
32—64细胞期(第七周期)	20	18	

* 最初出现的合子型转录活动。

** 最初依赖于合子型转录活动的发育。

在两栖类中也有类似的现象。爪蟾胚胎的最初一些细胞周期持续时间短，甚至缺乏 G_1 和 G_2 相，直到发生合子型调控的第十二个细胞周期，即中囊胚过渡期 (Mid-Blastula Transition, MBT)，才恢复为长细胞周期^[13]。注射 DNA 亦能提早诱发转录活动^[14]。在实验条件下，适当消耗其必要的细胞质组分，或者用放线菌酮或 *aphidicolin* 处理，均能延长其细胞周期，提前发生转录活动^[15]。然而，目前尚未掌握有关的直接证据，包括介入延缓细胞周期的物质，以及激活转录活动的因子^[16]。为此，Glenn 等人(1992)对于把 MBT 看作是爪蟾胚胎发育调控过渡唯一的、最重要的时刻提出了异议。他们认为，早期发育瞬时调控过渡的观点并不完全符合实际的情况；早期发育是建立在多元化的独立过渡的模式基础上^[17]。看来，这一观点对胚胎发育调控过渡的认识不是没有其一定道理的。

四、母型 mRNA 的降解和消失， 以及母型 rRNA 的变化

调控过渡的特征之一就是：母型 mRNA 选择性地降解，合子型 mRNA 含量迅速上升。

小鼠调控过渡发生在 2 细胞期^[8, 18]。在小鼠胚胎第一次卵裂之前，母型 mRNA 大量被多聚腺苷酸化；到 4 细胞期，绝大部分的母型 poly(A)mRNA 迅速降解消失，而合子型 mRNA 从 2 细胞期到 4 细胞期迅速地增加^[19]。母型 mRNA 是以无法被翻译的形式被稳定地贮存在卵母细胞和早期胚胎细胞中。通过 3' 端的多聚腺苷酸化，它们被转化为具翻译活力的形式，在完成其有限的功能寿命之后，即被降解^[20]。有实验证据表明，小鼠卵母细胞中 poly(A) mRNA 的半衰期为 8—12 天^[21]。在受精之前，大约已有 50% 的贮藏 poly(A)mRNA 消失；在受精时，poly(A) mRNA 含量回升，增加 40%；然而，自 1 细胞期到 2 细胞后期减少 70%^[19, 22]。由此推测，在此期间，大部分贮藏的母型 mRNA 已完成它们的功能而被降解。至

于它们究竟是否被用于翻译，或是自身降解，尚不清楚。

母型 mRNA 的稳定水平是受选择性降解作用影响的，而与合子型基因的转录活动无关。mRNA 的结构以及细胞的内环境两者自然影响着 mRNA 的更新。由于大多数 mRNA 5' 端是加帽的，所以 5' 端编码区可能在信使稳定性方面不起重要作用。RNA 的降解通常是从 3' 端开始的^[23]。另外，在某些仅作短暂表达的 mRNA 的 3' 端非翻译区中，发现 AU 富集序列，推测它能促进 mRNA 的降解^[24]。在稳定的 mRNA 中并没有发现长的 AU 富集序列^[23]。poly(A) 尾和 AU 富集序列可能导致 mRNA 或 mRNP 复合物的特定二级结构的形成，致使能与细胞质因子相互作用，影响 mRNA 的稳定性——或起保护 mRNA 的作用，或促进核酸酶对它的降解作用。

对猪、牛、羊等动物以及人早期胚胎的母型 mRNA 降解情况还未作直接检测，但从它们各自合成的蛋白质谱中获知，牛、羊胚胎的母型 mRNA 降解主要发生在 8—16 细胞期^[10, 25]，猪发生在 4 细胞期^[11]；人发生在 4—8 细胞期^[26]。这与它们各自的体外发育阻滞时间基本吻合。

在哺乳动物早期胚胎发育调控过渡期间，母型 rRNA 和核糖体并未随 mRNA 一起降解。在 1—2 细胞期的小鼠胚胎中，母型 rRNA 和核糖体的数量只下降约 25%^[27]。在 2 细胞期胚胎开始产生的新转录物得依赖于核内小 RNA (sn RNAs) 及其小核糖核蛋白颗粒 (snRNPs) 剪接成可翻译的 mRNAs^[28]。已经发现，卵母细胞中存在大量所需要的“U”snRNAs，在过渡期间不被降解。在 GVBD 和减数分裂成熟期间，snRNAs 和 snRNPs 被释放至细胞质中，随后重新聚集到受精卵的原核和 2-细胞胚胎的核中^[29]。同样，在卵母细胞成熟期间保留着 U3 snRNP 颗粒，并且聚集在早期胚胎的核仁中；U3 snRNP 参与 28 S rRNA 前身物 3' 端的加工^[30]。这样，在 2 细胞期胚胎合子型基

因组的转录激活期间,首次合成的RNAs前体就需要来自母型的snRNPs对其进行加工。可见,胚胎中部分母型组分在过渡期适当时间内的保留,为实现正常合子型调控提供了保证,也可以说,它们起着承上启下的重要作用。

五、合子型基因的激活

抑制转录活动并不影响1细胞期小鼠胚胎卵裂,但能完全阻断2细胞期小鼠胚胎的进一步分裂;1细胞期胚胎合成的蛋白质均源自母型mRNAs^[31]。在牛胚胎中,从卵母细胞到8细胞期的蛋白质合成逐渐下降;从8细胞到16细胞期,直至囊胚期,蛋白质合成大幅度上升;蛋白质谱的重要变化发生在8—16细胞期,正是在此期间有新合成的RNA,合子型基因被激活^[26]。在猪胚胎中,α-鹅膏蕈碱能阻断4细胞期胚胎的进一步发育;在4细胞期的第16小时由母型信息指导合成的蛋白质降解,同时检测到³H-尿苷和³⁵S-甲硫氨酸的掺入^[11];人胚胎蛋白合成谱变化发生在4—8细胞期,α-鹅膏蕈碱可以阻断之^[26]。

大量的实验证据显示,由合子基因组编码的首批蛋白质是一类分子量为68-74kD的蛋白质,属于热休克蛋白(heat shock proteins,hsp),具高度保守性,从昆虫到人的整个动物界普遍存在这类蛋白^[32]。大多数真核基因的转录物包含插入序列,并且必须剪接成功能mRNA。热休克蛋白保护这种剪接加工不受热的影响^[33]。

关于早期胚胎合子型基因组被激活的原因和机制,目前还不清楚。Maria等人(1991)提出了“合子钟(Zygotic Clock)”的概念。他们认为调节合子型基因表达启动的生物钟(即合子钟)是脊椎动物早期胚胎发育中普遍存在的一一个组成部分。合子钟可能起延迟转录活动的作用,直至减数分裂后染色体完成改组。小鼠胚胎的实验证明,合子钟作用于所有RNA聚合酶Ⅱ启动子,似乎对RNA聚合酶Ⅱ转录复合物的关键组分起灭活作用,或阻止其关键组分的合成^[34]。

复制的起始点、启动子和增强子是控制DNA复制和转录起步的3个主要组分。在成体动物分化和未分化细胞中,为了提高转录活动中启动子的活性,以及为了激活DNA复制过程中某些复制起始点的核心组分,经常需要有增强子参与^[35]。在合子型调控启动时,是否同样需要这些调节组分呢?在爪蟾、海胆和鱼的发育早期阶段,有些复制起始点,有时包括一些启动子都不是必需的^[36]。但在小鼠胚胎的发育中,则总是需要复制起始点和启动子,唯在2细胞胚胎形成之前无需增强子激活复制起始点或启动子。

在过渡之前的小鼠早期胚胎内注入外源基因,只需启动子即可高效表达;一旦早期胚胎发育被阻断而未能实现过渡时,届时注入的外源基因就需要有相应的增强子才能满足其高效表达^[34]。这些结果证实,启动子与合子型基因表达密切相关,在发育调控过渡后的合子型基因表达时就需要增强子来刺激启动子的活性。

六、关于发育调控的过渡机制问题

哺乳类动物早期胚胎发育调控过渡期间出现诸多方面的变化,其中最关键的无疑是合子型基因的表达,由此激发胚胎进一步正常发育。实验证明,这类调控过渡的实现依赖于外源信号,特别是源自输卵管粘膜上皮细胞分泌的信号^[11]。很自然,它必然也依赖于某类相应的信号转导系统。然而,有关这方面的研究尚未见有突破性进展。

合子型基因转录活动在过渡前遭抑制的原因尚不清楚。据爪蟾卵球上的研究结果^[37],有一种细胞质蛋白因子“许可因子(licensing factor)”似乎起抑制转录活动的作用。

从表3中可以看出,合子型基因开始出现表达的时间并不是胚胎发育开始依赖于合子型基因活动的时间,前者往往发生在早一轮细胞周期中。尽管提早出现的转录活动并不活跃,它却为进一步激起调控过渡奠定基础。

利用贮存的母型mRNA合成蛋白质的战

表3 胚胎合子型基因转录活动

动物	开始出现转录活动的时间	发育开始依赖于合子型基因转录活动的时间
小鼠	1 细胞期	2 细胞期
牛	8 细胞期	8—16 细胞期
羊	8 细胞期	8—16 细胞期
人	4 细胞期	8 细胞期

略,对于低等动物早期胚胎的发育是极为重要的,因为它们无需依赖转录活动,以保证在受精数小时之后就能发育抵达囊胚。但是,对于高等哺乳动物的早期胚胎,它们的卵裂活动历时达数天之久,为何仍将此类战略保留下来,原因还不清楚。贮存在胚胎中的大部分母型基因表达产物的降解和部分地被保存,对合子型基因的正常表达以及表达产物正常功能的实现可能都有着千丝万缕的联系。

综上所述,由于还缺乏足够的证据,对于哺乳类早期胚胎发育调控过渡的机制目前还无法作出令人满意的解释。其机制可能是多元的、复杂的。对其他动物,如爪蟾、果蝇、海胆所作的相关问题研究和阐述,不啻为我们了解哺乳类胚胎发育调控过渡机制提供了很好的思路和佐证。可以预见,随着研究的不断深入,哺乳动物的早期胚胎发育调控由母型向合子型过渡的详尽机制必将最终被揭示。

摘要

哺乳动物早期胚胎最初的发育是受卵母细胞发生期间就已贮存在细胞质内的 mRNAs 和蛋白质调控的;发育到特定阶段,母系遗留的物质被耗尽或降解,转由合子型基因组调控。在此过渡阶段,胚胎细胞核纤层中核纤层蛋白 A 和 C 消减,核与胞质之比值由小向大转变,细胞周期由短向长过渡,功能核仁建立;母型 mRNA 降解、消失,但是大部分母型 rRNA、核糖体、snRNAs 和 snRNPs 继续留存,后者与合子型 mRNA 前体的加工有关。合子型基因的表达需要增强子以激活启动子的活性。由合子基因组编码的最初蛋白质是一类分子量为

68—74 kD 的热休克蛋白质。哺乳类早期胚胎发育调控过渡的实现,可能依赖于源自输卵管上皮细胞分泌的信号和相应的信号转导系统。有关机制已引起人们的极大兴趣。

参考文献

- 李逸平,左嘉客,1992,细胞生物学杂志,14(4):153—157.
- Telford, N. A., et al., 1990, Mol. Reprod. Dev., 26: 90—100.
- Schatten, G., et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4727—4731.
- Prather, R., et al., 1988, Proc. 4th. Inter. Congr. Cell. Biol. Montreal., 413—418.
- King, W., et al., 1988, J. Reprod. Fertil., 82: 87—95.
- Calarco, P. G. et al., 1976, J. Embryol. exp. Morph., 36: 609—622.
- Tesarik, J., et al., 1987, Development, 101: 777—791.
- Williams, M. A., et al., 1982, Exp. Cell. Res., 137: 341—351.
- Camous, S., et al., 1986, Biol. Cell., 58: 195—200.
- Crosby, I. M. 1988, J. Reprod. Fertil., 82: 769—775.
- Schoenbeck, R. A., et al., 1992, Biol. Reprod., 47: 1118—1125.
- Prather, R. S., et al., 1987, Biol. Reprod., 37: 859—866.
- Newport, J., et al., 1982 (a), Cell, 30: 675—686.
- Newport, J., et al., 1982 (b), Cell, 30: 687—696.
- Kimelman, D., et al., 1987, Cell, 48: 399—407.
- Wolff, E., et al., 1988, Science, 241: 1626—1632.
- Glenn, K. Y., et al., 1992, TIG 8 (4): 124—127.
- Bolton, V. N., et al., 1984, J. Embryol. exp. Morph., 79: 139—169.
- Bachvarova, R., et al., 1985, Dev., Biol., 108: 325—331.
- Goldman, D. S., et al., 1988, Oncogene, 3: 159—162.
- De. Leon, V., et al., 1983, Dev. Biol., 98: 400—408.
- Paynton, B. V., et al., 1988, Dev. Biol., 129: 304—314.

- [23] Ross, J., 1988, *Mol. Biol. Med.*, 5: 1—14.
- [24] Shaw, G., et al., 1986, *Cell*, 46: 659—667.
- [25] Frei, R. E., et al., 1989, *J. Reprod. Fertil.*, 86: 637—641.
- [26] Braude, P., et al., 1988, *Nature*, 332: 459—461.
- [27] Piko, L., et al., 1982, *Dev. Biol.*, 89: 362—378.
- [28] Maniatis, T., et al., 1987, *Nature*, 325: 673—678.
- [29] Dean, W. L., et al., 1989, *Development*, 106: 325—334.
- [30] Parker, K. A., et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2899—2913.
- [31] Braude, P., et al., 1979, *Nature*, 282: 102—105.
- [32] Bensaude, O., et al., 1983, *Nature*, 305: 331—332.
- [33] Yost, H. J., et al., 1986, *Cell*, 45: 185—193.
- [34] Maria, W., et al., 1991, *Dev. Biol.*, 147: 403—414.
- [35] Wasylky, B., 1988, *Biochim. Biophys. Acta*, 951: 17—35.
- [36] Marini, N. J., et al., 1991, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 299—308.
- [37] Blow, J. J., et al., 1988, *Nature*, 332: 546—548.

细胞生存与死亡的社会性控制

Martin C. Raff

于动物发育的某些阶段，大多数组织中都会发生程序性细胞死亡(programmed cell death)，但对其作用的分子机制迄今未明。对于某些哺乳动物细胞来说，除非受到其他细胞所发信号的抑制，不然程序性死亡似由“无信号”(default)所致。这种对特异性生存信号的依赖为机体提供了一种消除“错位”细胞的简捷途径，并可籍此调节细胞的数量，或许还可选择出最适细胞。然而对生存信号的这种依赖性，其普遍性究竟如何呢？

经过多年忽略之后，正常的(或程序性的)细胞死亡最终又被人们所重视。长期以来，人们已知道这是动物发育的一个基本特征，并可发生于许多的成体组织。然而只有新近才成为生物界的一个热门话题。虽然其分子机制仍然不清楚，但认为细胞通常是通过激活自杀程序(suicide programme)而死亡的。有关正常细胞死亡的许多研究都集中于那些似乎是特殊的事例，如变态时的细胞死亡，突触形成的神经元死亡，受体全数选择(receptor repertoire selection)期间淋巴细胞的死亡，凡此等等，因而细胞自杀并未被认为是总体细胞演绎的一个组成部分。但是，愈来愈多的证据表明，大多数动物细胞皆能自我致死，而且这种普遍

性的细胞自杀程序能由发自其他细胞的信号所激活或抑制。另外，细胞生存和细胞死亡也与细胞增殖一样受到相同的社会性控制。然而与细胞增殖的控制相比起来，关于细胞生存的控制所知相对较少。

细胞自杀为消除不再需要的细胞提供了一个有效的机制。这些细胞通常是正常的，但出于某种原因不再需要了。它们可能产生得过多了，一如许多脊椎动物的神经元那样；它们可能于进化和发育过程中的某些时候是有功能的，然而目下不再需要了，如变态时的蝌蚪尾部细胞；有些细胞在一种性别中是有用的，在另一种性别中便无用了，如哺乳类的穆勒氏管只在雌性有用，在雄性无用；有些细胞在形成某些特殊结构过程中必须作出牺牲，如羊膜动物指(趾)间的区域，那些迁徙至异常位置的细胞也可因自杀而消失，有如淋巴细胞不能产生有功能的抗原特异性受体，因此不再有用；或是产生了高亲合性的自身反应性受体，对机体具有潜在危害，都会自杀身亡。在上述这些情况里，人们很易看出，籍与其他细胞的相互反应而调节的细胞自杀程序是有其用处的。

细胞因“无信号”而自杀

一种极端的观点是：至少在较高等的动物，正如细胞为了增殖需要从其他细胞得到信号一样，为了生