

昆虫卵母细胞对卵黄物质的摄取过程

龚 和

(中国科学院动物研究所)

昆虫具有强大的繁殖力,能在短时间内产生大量含有卵黄的成熟卵。因而卵黄发生是研究昆虫生殖调控的一个核心问题,它包括卵黄原蛋白(vitellogenin 缩写为 Vg)在脂肪体内的合成、释放,最后被发育的卵母细胞选择性地吸收并沉积为卵黄物质。这一系列过程均在内分泌激素的调控下进行。卵黄发生研究对于进一步阐明比较生理学和分子进化,激素在分子水平方面的作用机理,真核细胞基因表达的调控,膜的分子识别等方面都具有理论意义,同时对于昆虫繁殖力的控制具有实践意义^[1]。

30 多年来对卵黄发生中第一个问题,即卵黄原蛋白的合成和激素调节作用已进行了大量的研究工作,发表了几百篇有关论文。特别是对埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、蝗虫(*Locusta*)、蜚蠊(cockroach)、烟草角蛾(*Manduca sexta*)等不同类型昆虫的卵黄发生规律、Vg 的性质、Vg 的合成和运转,以及在卵子发生过程中的激素作用等进行了深入研究^[5]。例如,分离出 Vg mRNA,合成了 cDNA,以及基因水平上的激素调控研究。

关于昆虫卵黄发生的第二个问题,即卵母细胞怎样摄取卵黄物质。它作为细胞摄取生物大分子的一个重要模式并有助于进一步阐明细胞膜的分子识别的基本生物学规律而受到昆虫生理学家和生物化学家的重视。目前已被广大生物学工作者所公认的细胞摄取生物大分子的途径—内吞作用(endocytosis),最早是在蚊卵母细胞摄取卵黄物质的超微结构研究中观察到^[2,3]。当卵黄开始沉积时滤泡上皮收缩,滤泡细胞之间形成间隙,然后卵膜上出现陷窝,陷窝内充满卵黄物质后形成液泡进入卵母细胞。这种以细胞膜上出现被膜小凹(coated pit)和

被膜液泡(coated vesicle)的内吞作用已在很多生物细胞中被证实,即称为受体调节的内吞作用(Receptor-mediated endocytosis)。

人们对昆虫卵母细胞摄取卵黄过程感兴趣的原因,不但因为蚊卵母细胞为研究细胞内吞作用奠定了基础,而且还因为昆虫滤泡(Follicle)是多细胞结构的复合体,研究摄取活动中细胞间的相互作用,以及研究摄取活动的特异性和选择性都具有意义。本文对昆虫卵母细胞摄取卵黄过程研究中的几个关键问题作一介绍。

一、卵母细胞摄取卵黄蛋白的特性

昆虫卵内的卵黄蛋白是怎样产生的? Telfer^[2,5]首先利用免疫化学方法发现在惜古比天蚕蛾(*Hyalophora cecropia*)的血淋巴中有一种雌性特异蛋白(female specific protein)同卵母细胞中的卵黄物质具有相同的抗原性质,提出了卵内卵黄物质来自卵巢外组织,并把这种特异的卵黄蛋白前体物质(specific yolk protein precursor)称为卵黄原蛋白。现在已在近百种昆虫中证明,这种 Vg 是脂肪体合成的。卵母细胞在发育过程中不断从血淋巴中摄取和积累这种特异蛋白,沉积为卵黄。卵母细胞的摄取活动具有两个明显的特性,即高度的选择性和种属特异性。卵母细胞表面与混杂的多种血淋巴蛋白接触,但是卵母细胞能从中识别并挑选出 Vg 分子进行摄取。Ferenz^[6,7]详细研究了蝗虫卵母细胞对 Vg 的摄取规律和特性。结果表明卵母细胞摄取活动从 1.5 毫米开始到 6.5 毫米时停止。其摄取的速率变化为 1.5 微克/小时/卵母细胞(2.2 毫米)—13.8 微克/小时/卵母细胞(4.7 毫米)。在离体条件下,当 Vg 和 BSA 同时存在时,2.1 毫米卵母细胞摄取 Vg

比摄取 BSA 的量要大 3—4 倍, 4 毫米的卵母细胞摄取 Vg 比摄取 BSA 的量要大 20 倍。随着对于血淋巴蛋白研究的深入和蛋白质分离技术的进展, Kulakosky^[13]比较了天蚕蛾的滤泡对各种血蛋白的特异性摄取及摄取动力学和生理学, 结果表明当卵黄发生期滤泡能特异地摄取 Vg 和 microvitellin, 而对其他两种含量极丰富的血蛋白 arylphorin 和 flavoprotein (均为储存蛋白) 积累速率极低, 放射自显影结果表明后者位于滤泡上皮的基底膜。Osir^[17]进一步用烟草角蛾滤泡的膜制备物研究了这种选择性的特异结合, 实验结果表明滤泡膜上存在 Vg 特异受体。

第二是摄取具有种属特异性, Kunkel 和 Pan^[15]报道德国小蠊 (*Blattella germanica*) 和惜古比天蚕蛾这两种不同目昆虫的 Vg, 虽然理化性质十分相近, 但它们的免疫学上不起交叉反应, 不能相互摄取。Kunkel 等^[14]还报道了几种蜚蠊对于德国小蠊 Vg 的摄取能力随着系统发生的距离增加而下降, 其顺序是 *B. germanica* > *B.* (接近 *bumbertiana*) > *Symploce capitata* > *Suppella longipalpi*。上述这种摄取特性提出了一个很有趣的问题, 即卵母细胞如何识别和选择 Vg。虽然各种昆虫在种属上相差甚远, 但其 Vg 的分子量、形状、电荷、氨基酸组成等理化性质十分相近, 和蛙、鸡的 Vg 性质也没有很大区别。因而选择性的基础不可能是普通的理论性质, 而可能是分子结构的微妙差异。但对于 Vg 这样的大分子, 阐明其一级结构还十分困难。尽管像分子结构中甘露糖基团被认为是一个识别的活性部位, 但甘露糖基团普遍存在于 Vg 表面, 所以这种识别活性又被否定, 因而寻找这种特异的识别位点是十分有趣的问题。

二、滤泡开放现象 (Patency)

以果蝇 (*Drosophila*) 为代表的昆虫滤泡结构是滤泡细胞 (follicle cell) 形成的滤泡上皮包裹着 15 个滋养细胞 (nurse cell) 和 1 个卵母细

胞 (oocyte)。在滤泡发育过程中卵母细胞因不断沉积卵黄而增大, 滋养细胞不断缩小, 最后滤泡细胞合成卵壳蛋白形成卵壳, 此时卵即成熟。卵巢外 Vg 如何穿越滤泡上皮细胞层到达卵母细胞表面, 是一种具高度组织的和十分巧妙的事件。Telfer^[26]首先在天蚕蛾卵巢发育过程中观察与描述了这种滤泡开放现象, 即滤泡在沉积卵黄前, 滤泡细胞之间以及滤泡细胞和卵母细胞之间其细胞排列十分紧密, 细胞间具有间隙连接 (gap junction)。卵黄发生期的滤泡有摄取能力, 此时的滤泡细胞间及滤泡上皮和卵母细胞间出现了间隙, 而且间隙随着摄取能力增强而增大, 这种间隙出现被称为滤泡开放。研究工作又证明卵母细胞摄取 Vg 时, 大量的 Vg 首先积累在细胞间隙之间。

滤泡开放现象是在卵黄沉积过程中普遍存在的, 这种现象可以用染色方法直接观察, 即卵巢在体外含有伊纹斯兰的培养液中培养几分钟后, 在解剖镜或显微镜下就可以看到滤泡上蓝色的网状结构。蓝色的网线越宽表明滤泡开放越大, 因而人们常用滤泡开放指数 (PI) 来研究卵母细胞的摄取能力。

进一步感兴趣的问题是: 究竟怎样引起滤泡开放? 这种引起开放的信号是来自滤泡细胞还是来自于某种激素, 大量的 Vg 又为什么能在细胞间隙积聚? Davey 等对吸血蟀 (*Rhodnius prolixus*) 滤泡开放的研究, 详细阐述了激素和滤泡开放的关系。

三、摄取活动的激素调节

关于昆虫生殖的激素调节, 早在 1936 年 Wigglesworth 在吸血蟀的卵巢发育过程研究中就指出咽侧体 (corpora allata 简称 CA), 是昆虫体内分泌保幼激素 (Juvenile hormone 简称 JH) 的内分泌器官, 其保幼激素和卵巢发育有关。至今, 已有大量的研究工作证明激素对卵黄发生的调节作用。在绝大多数昆虫中起调节作用的主要激素是保幼激素。但由于 Vg 的合成和卵母细胞对 Vg 的摄取作用是两个密切相关联的过程, 因而 JH 的调节摄取作用是通过

调节 Vg 合成的间接效应呢?还是 JH 的直接作用呢?

Joly^[11]把 CA 移入一种甲虫的卵巢鞘,结果同 CA 接触的滤泡沉积速度加速。De Loof^[16]直接把 JH 注射到马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)一侧卵巢,结果受注射一侧卵巢发育良好。但究竟启动摄取活动的直接因子是 JH 呢?还是 Vg 本身呢?Bell^[3]把处在卵黄发生前期(previtellogenesis)的卵巢植入结扎的雄虫腹部,分别注入 JH、Vg、和 JH+Vg,结果只有 Vg 和 JH 同时注入的一组才能沉积卵黄,表明是 JH 直接作用于摄取活动。JH 的作用首先影响滤泡开放,在多种昆虫中无论使用咽侧体或 JH,在离体或整体试验中均证明了这种作用。Davey 和 Ilenchuk 用吸血蟀卵巢详细研究了 JH 引起滤泡开放的机理。当滤泡处于开放程度最大时,其滤泡细胞体积可以减小 50%,而且这种滤泡开放能力并不依赖于大分子的合成。放线菌酮和嘌呤霉素等蛋白质合成抑制剂都不能抑制滤泡开放,但是细胞松弛素 B、秋水仙素和乌本苷(ouabain)等均能抑制滤泡开放。前两种试剂可以破坏细胞骨架,而后者为 Na⁺/K⁺ ATP 酶的抑制剂。Davey^[4]的实验证明 JH 促使的滤泡开放可以被乌本苷所抑制,因而表明 JH 引起的滤泡开放是 JH 增加了细胞膜上 Na⁺/K⁺ATP 酶的活力而起作用的,卵巢组织的 ATP 酶对 JH 的作用具有极强的敏感性。Ilenchuk^[9]的实验还比较了不同 JH 的作用,结果表明 JH I 在激活膜上 Na⁺/K⁺ATP 酶的活性方面明显大于 JH II、JH III 和 FME(farnesyl methyl ether),卵巢组织的 Na⁺/K⁺ATP 酶被 JH 激活,其 JH 最适剂量为 4×10^{-8} mol/L。Ilenchuk^[10]进一步利用 ³H-JH 证明标记的 JH 能特异的结合于卵黄发生的滤泡膜制备物,SDS-PAGE 分离分析滤泡膜微粒体制备物表明,³H-JH 结合于 43 KD 和 150 KD 的蛋白带,³H-乌本苷也能结合于 150 KD 和 100 KD 的蛋白带,说明 JH 可以直接结合 Na⁺/K⁺ATP 酶复合物中一个重要肽链,有可能这

个肽本身就是 JH 在滤泡膜上的受体。但只有进一步把这个结合位点从膜上分离、纯化,才能真正从分子水平上阐明 JH 和激活 ATP 酶的关系。

四、摄取作用的分子机理

关于卵母细胞摄取卵黄物质的分子机理的研究主要集中在以下三方面:1. Vg 的分子性质和摄取活动的关系。2. 滤泡细胞对摄取活动的作用。3. Vg 的受体及受体调节的内吞作用。

Vg 是分子量在 500 KD 左右的糖脂复合蛋白,一般脂类占 5-15%,包括中性脂、胆固醇、和各种磷脂。碳水化合物占 10%,含有极丰富的甘露糖、氨基葡萄糖及唾液酸等。氨基酸组份分析表明其共同特点是含有丰富的天门冬氨酸、谷氨酸,而硫氨基酸含量很低。分子通常由大小两种亚基组成,亚基分子量分别为 140 KD 和 50 KD。上述分子性质的研究还不能说明和特异摄取的内在关系。

在一个复杂的滤泡结构中,滤泡细胞对于卵母细胞摄取活动的作用一直是人们非常感兴趣的问题。借古比天蚕蛾的滤泡发育是研究摄取活动的极好模式。Bast 和 Telfer^[21]证明滤泡细胞在卵母细胞摄取活动时合成一种糖蛋白,当时称为滤泡细胞产物(Follicle cell product 称为 FCP),认为 FCP 作为卵母细胞表面的一个结合分子为选择摄取 Vg 服务,后来又把 FCP 称为类卵黄原蛋白(paravitellogenin),实际上这种滤泡细胞分泌蛋白也就是家蚕卵中被称为卵特异蛋白(egg specific protein)。由于放线菌酮能抑制 FCP 的合成而不能抑制摄取,因而 Telfer^[27]对于 FCP 的作用提出怀疑,而且还有一些昆虫的滤泡并不产生 FCP。究竟在天蚕蛾滤泡中引起滤泡开放和 Vg 在间隙积聚的因子是什么呢?Telfer^[27]发现滤泡细胞首先分泌一种硫化葡萄糖胺聚糖(sulfated glycosaminoglycan),它促进天蚕蛾滤泡开放,并能积聚在细胞间隙中可逆地结合血淋巴蛋白,同样这种分

分泌物也不是在各种昆虫的滤泡中能检测到。

昆虫卵母细胞能特异的选择摄取 Vg, 其关键在于卵母细胞膜上存在 Vg 的受体, 这种以受体为介导的内吞作用摄取生物大分子的过程已在多种高等动物细胞中进行详细研究, 相对来说昆虫中已显得很落后了。但由于昆虫滤泡的复合结构对研究细胞间相互作用等方面有其独特的优点, 因而近几年间已在蚌蠊^[12]、蝗虫^[21, 22]、埃及伊蚊^[18-20]、烟草角蛾^[17]和惜古比天蚕蛾^[13]都证明了卵黄发生期的滤泡膜上存在特异的 Vg 受体, 并研究了受体结合特性, 内吞过程及其调节。分析其受体结合特性, 表明结合依赖于 pH, 是特异性结合。随着配体的增加结合活性达到饱和、明显具有组织特异性。其 Kd 常数蚌蠊中为 $5 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 、飞蝗中为 $1 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 、烟草角蛾中为 $1.3 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 。

Raikhel 等^[20]用免疫组织化学方法详细研究了吞入卵母细胞后功能大分子的命运, 根据不同的受体配体系统和不同的细胞类型, 受体一般循环使用(也有不再循环), 而功能大分子分别受到降解、积累或转移。而控制这些吞入大分子命运的机理是什么? Raikhel 用标记的特异 Vg 和非特异蛋白-辣根过氧化物酶(HRP), 发现无论是对 Vg 是特异摄取还是对 HRP 的非特异摄取, 其摄取途径是同样的, 即从被膜小凹→被膜液泡→内吞泡(endosome 或 receptosome)→转移体(transitional yolk body), 然后 Vg 不断积累成为卵黄球, Vg 成为晶体状, 而 HRP 逐渐被转移体排斥, 并被溶酶体所介离。因而认为 Vg 和受体的相互作用是一个控制特异摄取后朝向积累途径的一个跨膜信号。

蚌蠊的每个卵母细胞结合 Vg 的最大量为 7.2×10^{10} f mol, 即每克膜蛋白为 60 n mol, 这和鸡的卵母细胞和人类成纤维细胞内吞 LDL 时结合位和结合量相比, 昆虫具有很高的结合位和较低的结合常数的特点, 因而阐明了为什么昆虫卵母细胞在如此短的时间内累积卵黄的内在原因。

在内吞泡中受体和配体介离和促使介离的

内环境是什么, 也是倍受关注的问题。一般认为膜泡酸化是引起受体和配体介离的重要条件, Stynen 等^[24]研究了离子载体 Nigericin、Monensin、Carbonyl cyanide m-chlorop-henylhydrazone 称 CCCP)、Valinomycin 对天蚕蛾卵母细胞摄取过程的影响, 结果表明前面三种载体抑制 Vg 从内吞泡中向卵黄球转移, 即受体和配体在膜泡中介离受到抑制。其根本原因是这些离子载体阻抑了 $\text{H}^+ - \text{K}^+$ 同细胞交换而产生的膜泡酸化, 相反 valinomycin 不抑制这一过程。

Ferenz^[8]已从蝗虫卵小管膜制备物中用亲和层析法分离纯化了 Vg 受体, 并研究了受体的性质, 受体的分子量为 156 KD, 等电点值为 pH 3.5。受体的分离是研究内吞过程机理的重要工具, 全面地阐明这种特异性选择摄取的原理还将有大量的工作要做。

总的来说, 用现代分子生物学的方法来研究昆虫卵母细胞摄取卵黄原蛋白的过程仅仅只有近 10 年时间, 但由于昆虫卵母细胞摄取和沉积卵黄的过程在昆虫生理学中是研究生殖调控的关键问题之一, 因而其研究进展十分快, 相信这一快速发展的研究课题对于阐明生物学中一个基本问题, 即膜的分子识别问题将起很大的推动作用。同时随着问题的深入也会给昆虫的繁殖控制提供理论基础和有潜在的应用意义。

摘 要

昆虫卵母细胞如何摄取卵黄物质是卵黄发生研究中的关键问题之一, 摄取作用具有高度的选择性和种属特异性。滤泡通过滤泡开放作用使 Vg 积聚在卵母细胞表面, 保幼激素作用于 Na^+/K^+ ATP 酶而调节滤泡开放, 其摄取作用的分子机理在于卵母细胞膜上有 Vg 特异受体, Vg 分子通过受体调节的内吞作用进入卵母细胞, 并积累形成卵黄球。

参 考 文 献

- [1] 龚和、翟启慧, 1979, 昆虫学报, 22:

- 219—236.
- [2] Bast, R. E. and Telfer, W. H., 1976, *Develop. Biol.*, 52: 83-97.
- [3] Bell, W. J. and Barth, R. H. Jr., 1971, *Nature New Biol.*, 230: 220-222.
- [4] Davey, K. G., 1981, In juvenile hormone biochemistry. pp. 233-240.
- [5] Engelmann, F., 1978, *Adv Insect Physiol.*, 15: 49-108.
- [6] Ferenz, H. J., 1978, *J. Insect Physiol.*, 24: 273.
- [7] Ferenz, H. J. et al., 1981, *J. Insect Physiol.*, 27: 869-875.
- [8] Ferenz, H. J. et al., 1989, Fifth International congress of invertebrate reproduction. (abstracts) S 1304.
- [9] Ilenchuk, T. T. and Davey, K. G., 1982, *Insect Biochem.*, 12: 675-679.
- [10] Ilenchuk, T. T. and Davey, K. G., 1985, *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 63: 102-106.
- [11] Joly, P., 1945, *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 84: 49-164.
- [12] König, R. and Lanzrein, B., 1985, *Insect Biochem.*, 15: 735-747.
- [13] Kulakosky, P. C. and Telfer, W. H., 1987, *Insect Biochem.*, 17: 845-858.
- [14] Kunkel, J. G. et al., 1976, *Amer. Zool.*, 16: 249.
- [15] Kunkel, J. G. and Pan, M. L., 1976, *J. Insect Physiol.*, 22: 809-818.
- [16] de Loof, A. and de Wilde, J., 1970, *J. Insect Physiol.*, 16: 1455-1466.
- [17] Osir, E. O. and John, H. L., 1986, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.*, 3: 513-528.
- [18] Raikhel, A. S., 1984, *J. Ultrastruct. Res.*, 87: 285-302.
- [19] Raikhel, A. S. and Lea, A. O., 1985, *Gen. Comp. Endocr.*, 57: 422-433.
- [20] Raikhel, A. S. and Lea, A. O., 1986, *Tissue & Cell.*, 18: 559-574.
- [21] Röhrkasten, A. and Ferenz, H. J., 1985, *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.*, 194: 411-416.
- [22] Röhrkasten, A. and Ferenz, H. J., 1986, *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development.*, 10: 133-142.
- [23] Roth, T. F. and Porter, K. R., 1964, *J. Cell Biol.*, 20: 313-332.
- [24] Stynen, D. et al., 1988, *Arch of Insect Biochem and Physiol.*, 8: 261-276.
- [25] Terfer, W. H., 1954, *J. Gen. Physiol.*, 37: 539-558.
- [26] Terfer, W. H., 1961, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 747-759.
- [27] Telfer, W. H. et al., 1981, In Regulation of Insect Development and Behavior International Conference., ed. by Sehnaal, F. et al., pp: 637-654.

会 讯

Ⅲ 届欧洲细胞生物学会会议简介

由欧洲细胞生物学联盟(EOCB)举办的第三届欧洲细胞生物学会会议于1990年9月2日至9月7日在意大利著名城市佛罗伦萨举行。这是一次大规模,高水平的细胞生物学会会议。

这次会议吸引了来自欧洲各国的学者及来自亚洲国家,美国,加拿大,澳大利亚,南美及一些非洲国家的科学工作者共1600多人,其中相当多的国际著名细胞生物学家。会议共印发了1200多篇论文摘要,有200个专题报告在会上进行了交流。北京大学翟中和教授与兰州大学贾敬芬教授由国家教委委派参加了会议,翟中和应邀在会上做了题为“在植物细胞与原始真核细胞中可能存在类角蛋白中间纤维的实验依据的报告,引起了与会者的很大兴趣。

这次会议交流的内容具有很大的广泛性,几乎涉及到细胞生物学与分子生物学的各个领域。但就论文内容而言,有些领域诸如基因的表达与调节,染色质的结构与功能,细胞骨架(包括核骨架)的成份与功能,膜内蛋白,受体与胞外基质,细胞周期的调节,细胞的分化,瘤细胞以及神经细胞生物学仍然是论文数量最多、较为活跃的研究领域;关于各种多肽生长因子,细胞器结构与功能,细胞衰老的论文也占有相当数量。