

# 哺乳类有丝分裂期细胞染色体凝集因子

安捷\*

(北京师范大学二分校生物系)

薛绍白

(北京师范大学生物系)

在细胞周期中细胞内部进行着活跃的生理生化活动,在各个周期时相表现出不同的特点。最显著的是S期内进行着DNA的合成;M期内细胞核中的染色质凝集成染色体,并伴有核被膜破裂、染色体分离等现象,最终形成两个子细胞。染色质是经过怎样的机制而凝集成染色体?由于细胞融合技术的发展,使我们有可能探讨这个问题。

## 一、有丝分裂因子<sup>[1]</sup>

用灭活的仙台病毒诱导一个分裂期细胞和一个间期细胞融合,结果间期核提前进入有丝分裂期,表现为间期核的染色质凝集成染色体样的结构,核被膜消失。此现象称为“早熟染色体凝集”(PCC),所形成的染色体称为“早熟凝集染色体”(PC染色体)<sup>[2]</sup>。

PCC的出现提示:有丝分裂期细胞中具有能引起间期细胞出现PCC的因子。鉴于此因子的作用是引起染色质的凝集,并进而导致细胞有丝分裂,故名为“有丝分裂期细胞染色体凝集因子”,简称“有丝分裂因子”(Mitotic Factors)。

用人类有丝分裂期细胞(例如HeLa细胞),与其他哺乳类、鸟类、两栖类、鱼类以及昆虫等动物的细胞进行融合,都能在后者的间期细胞中诱导出PCC现象;反之,这些动物的分裂期细胞也能通过细胞融合诱导出HeLa细胞的PC染色体<sup>[3]</sup>。这说明有丝分裂因子存在的普遍性,而且也没有种属特异性和细胞特异性。

为鉴定有丝分裂因子的性质,Sunkara等人<sup>[4]</sup>把有丝分裂期HeLa细胞的提取物注射到未成熟的两栖类卵母细胞中,由于有丝分裂因子的作用,诱使卵母细胞胚泡破裂、染色体凝集。这些征兆与卵母细胞进行减数分裂的初期

过程类似,亦即象HeLa细胞这样的哺乳类细胞的有丝分裂因子,诱导了两栖类卵母细胞的成熟。从上述事实可知,有丝分裂因子能导致三种不同现象的出现:有丝分裂,减数分裂和染色体早熟凝集。由于有丝分裂因子在诱导卵母细胞出现PCC的过程中具有启动卵母细胞减数分裂成熟的作用,故称此诱导效应为“成熟启动活性”(Maturation-Promoting Activity, MPA)。可见,MPA可作为有丝分裂因子存在的鉴定指标。有丝分裂因子对两栖类卵母细胞的MPA作用并不是直接的,而是由于有丝分裂因子活化了卵母细胞中的“成熟启动因子”(MPF),再通过MPF促使PCC的出现。

有丝分裂因子的鉴定,通常是以非洲爪蟾卵母细胞为材料。实验步骤大致如下:(1)用不同方法处理的有丝分裂期细胞(注:以下未经特别说明,均指HeLa细胞)提取物,注射到非洲爪蟾卵母细胞内;(2)计算被注射的卵母细胞数;(3)计算卵母细胞中胚泡破裂的细胞数;(4)计算被诱导的胚泡破裂率(%)。胚泡破裂率即为对比、鉴定的指标。

## 二、HeLa细胞有丝分裂因子的性质

### 1. 蛋白质性质<sup>[5]</sup>

用有丝分裂期细胞提取物作为注射物,结果胚泡破裂率达100%。分别用核酸酶和蛋白酶注射到卵母细胞中,胚泡破裂率为零,显然,这里缺少有丝分裂因子,故胚泡不会破裂。单独用核酸酶处理过的有丝分裂期细胞提取物注射卵母细胞,胚泡百分之百破裂,而只用蛋白酶处理过的有丝分裂期细胞提取物注射卵母细胞,胚泡破裂率为18%。比较后面两个结果,

\* 现地址北京市肿瘤防治研究所。

说明核酸酶对有丝分裂因子没有作用,而蛋白酶则不然。显而易见,有丝分裂因子具有蛋白质性质。

## 2. 在诱导过程中不需要蛋白质的合成<sup>[5]</sup>

在有丝分裂因子诱导两栖类卵母细胞出现PCC的过程中,是否存在其他中间因素的作用即有丝分裂因子是否直接作用于染色质,使其凝集成染色体。从下面的实验可看出蛋白质合成抑制剂——放线菌酮对有丝分裂因子MPA的影响。

以注射有丝分裂期细胞提取物为对照,其诱导的胚泡全部破裂。当卵母细胞只同放线菌酮一起温育时,无胚泡破裂。将有丝分裂期细胞提取物注射到用放线菌酮处理过的卵母细胞中,结果胚泡仍百分之百破裂。可见,虽然放线菌酮能抑制诱导过程中蛋白质的合成,但对有丝分裂因子的MPA没有影响。这说明,在有丝分裂因子作用于染色质的过程中没有新合成的蛋白质作为中间物。

## 3. $\text{Ca}^{2+}$ 敏感性, $\text{Mg}^{2+}$ 依赖性

有丝分裂因子对于 $\text{Ca}^{2+}$ 有高度的敏感性。即 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为1mM时,使胚泡破裂率降低,甚至不能诱导胚泡破裂。为避免这种干扰,可在反应体系中加入 $\text{Ca}^{2+}$ 的螯合剂——EGTA,来保证有丝分裂因子的活性。 $\text{Mg}^{2+}$ 对有丝分裂因子的MPA无影响,在 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度高达10mM时仍无作用。并且,有丝分裂因子的MPA会因 $\text{Mg}^{2+}$ 浓度的逐渐增加而提高。有丝分裂因子为何对 $\text{Ca}^{2+}$ 具有高度的敏感性,现在还不得而知。

## 4. 非渗透性<sup>[5]</sup>

将有丝分裂期细胞提取物,在注射前一天用不同pH的提取液(包含0.2MNaCl,0.25M蔗糖,0.01MMgSO<sub>4</sub>,0.002M EGTA和0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)进行透析,然后把透析过的提取物注射到卵母细胞中。结果是经pH分别为6.5、7.0、7.5的提取液透析过的有丝分裂期细胞提取物,诱导胚泡破裂率均为100%;pH为8.0时,破裂率显著下降到10%。这说

明在一定pH范围内,有丝分裂因子是非渗透性的蛋白质。

## 5. 分子大小<sup>[5]</sup>

应用蔗糖密度梯度离心的方法,对有丝分裂期细胞提取物进行离心,然后收集不同区段部分进行有丝分裂因子的MPA分析。结果表明,有一个显著的单峰值表现出高的MPA活性。这部分蛋白质的沉淀系数约在4—5S左右。这只是HeLa细胞有丝分裂因子所显示的结果;在两栖类成熟的卵母细胞中,分离到的成熟启动因子(MPF)则有三种不同的沉降系数,分别为4S,15S和32S。

## 6. DEAE-纤维素层析<sup>[6]</sup>

Sunkara等人将有丝分裂期细胞提取物进行DEAE-纤维素层析。首先配制一系列从0—1MNaCl盐浓度梯度的0.01M磷酸盐缓冲液(含EGTA)作为洗脱液,对收集部份进行蛋白质组分和MPA活性分析。结果发现一种离子强度相当于0.15MNaCl的蛋白质,呈现出MPA的高峰值。

## 7. 有丝分裂因子的稳定性<sup>[5,6]</sup>

在50℃以上的高温影响下,有丝分裂因子的MPA迅速降低。这可能是由于蛋白质变性所引起的。在50℃,将有丝分裂期细胞提取物保温10分钟,然后再经30,000g(4℃)离心,取上清液注射卵母细胞,胚泡破裂率只有8.3%。温度再升至60℃,100℃,则无胚泡的破裂,有丝分裂因子的MPA已完全丧失。

有丝分裂因子保存在-70℃下是相当稳定的。37℃保温15分钟对其MPA活性无显著影响。有蛋白酶的抑制因子(1mMPMSF)和磷酸酶抑制因子(1mMATP,5mMNaF,5mMβ-磷酸甘油钠)存在时,有丝分裂因子可稳定地保存于室温24小时。

然而Sunkara等人注意到,部分纯化(12—15倍)的有丝分裂因子(20—40%硫酸铵部分),保存在0°或-70℃,甚至存在上述抑制剂的情况下,在24小时以内都丧失其MPA活性。为了证实这种活性的丧失是否是总蛋白量

减少所引起的,加入 1—5mg/ml 的小牛血清蛋白作为载体蛋白,提高总蛋白量的水平。结果,有丝分裂因子在 0℃和 -70℃放置时间超过 2 个月,仍然很稳定。

此外,ATP 能增加 MPA 的活性,磷酸蛋白磷酸酶的抑制剂对 MPA 起稳定作用<sup>[7]</sup>,故 Sunkara 等人认为磷酸化—脱磷酸化作用在有丝分裂和减数分裂的染色体凝集过程中,可能是一个重要事件。

### 三、有丝分裂因子在中期染色体上的定位

#### 1. 有丝分裂因子的合成期——G<sub>2</sub> 期<sup>[4]</sup>

不同细胞周期时相的 HeLa 细胞提取物,具有不同的成熟诱导活性。G<sub>1</sub> 期和 S 期细胞的提取物不能诱导胚泡破裂。早 G<sub>2</sub> 期和中 G<sub>2</sub> 期出现了慢速的有丝分裂因子的积累。有丝分裂因子经晚 G<sub>2</sub> 期内的迅速合成积累,在 G<sub>2</sub>—M 转变期,细胞核被膜破裂,染色质凝集成染色体。此时,有丝分裂因子达到一个阈值,诱导卵母细胞的胚泡全部破裂。用 cis 酸(cis-4-[[[ (2-chloroethyl) Nitrosoamino] carbonyl] amino]cyclohexane(arboxylic acid)使细胞阻断在 G<sub>2</sub> 期,将这种 G<sub>2</sub> 期细胞的提取物注射卵母细胞中,无 MPA 出现。

#### 2. 核、质中有丝分裂因子 MPA 的比较<sup>[8]</sup>

对离心分离的细胞质部分和染色体部分进行分析,发现有丝分裂期细胞的这两部分提取物,都具有 MPA。但染色体部分中有丝分裂因子的比活性比胞质部分的比活性至少大三倍。胞质部分和染色体部分的因子在许多方面是相同的。两者都是对热不稳定, Ca<sup>2+</sup> 敏感, Mg<sup>2+</sup> 依赖,非渗透性的蛋白质,并均能溶于 2% 三氯乙酸以及可被 40% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀。Sunkara 等人<sup>[6]</sup>观察到早 G<sub>2</sub> 期和中 G<sub>2</sub> 期的胞质提取物没有 MPA,而相当高的 MPA 出现于细胞核提取物中。晚 G<sub>2</sub> 期的胞质提取物虽然具有 MPA,但同时期的细胞核提取物的 MPA 比前者要大 3—4 倍。这证明有丝分裂因子在 G<sub>2</sub> 期一经合成,便迅速与染色质结合。当细胞为

有丝分裂需要合成更多的有丝分裂因子时,则因子数量大增,并保留于胞质中。

#### 3. 有丝分裂因子的定位

Rao 和 Johnson 的细胞融合实验<sup>[9]</sup>,证明有丝分裂因子具有通向核内的自由通道,此通道可能是核孔。即有丝分裂因子可能是通过扩散作用进入核内,并在和染色质接近的位置与其结合,最终导致染色体的凝集。

Adlakha 等<sup>[10]</sup>用核酸内切酶消化中期染色体,只有 30—40% 的有丝分裂因子释放出来,而主要部分仍与中期染色体相连。一方面,这一少量有丝分裂因子的释放,可能是由于中期染色体在温和条件下,非随机地被核酸内切酶所消化,所谓非随机,是指这一消化作用可能是有一定部位的。

另一方面,除释放的一部分外,有丝分裂因子的主要部分仍位于中期染色体上,用 0.2 M NaCl 溶液可将这一部分完全提取出来。这表明,有丝分裂因子与染色质是以相当微弱的离子键结合的。这些键比 DNA 和组蛋白,以及核小体和高迁移率蛋白之间相互作用的离子键还弱。另外,用盐溶液提取有丝分裂因子,没有破坏核小体结构的完整性,表明有丝分裂因子并不是核小体的结构成份。Adlakha 等人认为,关于有丝分裂因子在中期染色体的空间分布情况,对于揭示中期染色体的结构是重要的。

参考染色体结构的核小体模型,以及核酸内切酶温和消化中期染色体的结果,说明少部分(30—40%)的有丝分裂因子可能结合于联丝部位,而大部分可能与核心颗粒的组蛋白结合,并在这个最基础水平上,有丝分裂因子导致染色质纤维的折叠、卷曲,最终形成具有显著形态特征的中期染色体。

根据上述结果,Adlakha 等人推测有丝分裂因子结合于染色质的 20—30 nm 的纤维上,这些因子或直接导致染色质凝集;或对染色质永久成分的结构蛋白(如组蛋白)进行修饰(如磷酸化),诱导染色质凝集。至于是哪种作用方式,还有待于阐明。

总之,关于有丝分裂因子的定位,迄今较为肯定的是在有丝分裂期细胞内位于中期染色体上。但在染色体的确切位置,还没有充分的证据来确定。

#### 四、哺乳类体细胞有丝分裂因子(MF)和两栖类卵母细胞减数分裂成熟启动因子(MPF)的比较<sup>[6]</sup>

##### 1. 相同点

MF和MPF都能诱导两栖类卵母细胞的胚泡破裂和减数分裂期染色体凝集;都具有对 $Ca^{2+}$ 的敏感性,对 $Mg^{2+}$ 的依赖性和对热的不稳定性(MF临界温度为 $40^{\circ}C$ ,MPF临界温度为 $25^{\circ}C$ )。两者的MPA均能被蛋白酶钝化,不受核酸酶的作用;也不受放线菌酮的影响。MF和MPF在其胞质转移中都有自动催化能力;对分离的卵裂球有细胞毒性,并且都能诱导间期核的染色质提早凝集成染色体。

HeLa细胞有丝分裂期提取物和成熟的两栖类卵母细胞提取物的细胞毒活性(CSA)也非常相似。它们的细胞毒因子对 $Ca^{2+}$ 都具敏感性。Sunkara等人发现,有丝分裂因子的细胞毒活性比它的成熟启动活性低。

##### 2. 不同点

MF和MPF的分子大小不同。MF的沉降系数为4—5S,MPF分离后得到三种形式,其沉降系数分别为4S,15S和32S。现在还不清楚如何导致这些差异,但有丝分裂和减数分裂毕竟是两种不同的分裂方式,这两个过程中的染色体凝集机制有可能是不尽相同的。然而,就存在诱导染色质凝集成染色体的因子来说,两者又都不乏相似之处。

有些资料表明,有丝分裂因子直接与体细胞染色质相连,而在两栖类(非洲爪蟾)的卵母细胞中,则没有得到证明<sup>[8]</sup>。有丝分裂因子的诱导作用,是通过卵母细胞中的MPF而实现的。成熟的卵母细胞(可用孕酮处理)的胞质提取物注射于未成熟的卵母细胞中,即使是在缺少蛋白质合成的情况下,也能诱导后者的成熟。这些提取物还能刺激更多的MPF的合成。如果

将这个卵母细胞的MPF注射到另一个卵母细胞中,则在后者中MPF的数量进一步增加。这说明在一系列诱导过程中,虽无新蛋白质合成,但MPF具有自动催化的性质,即MPF能够自我激活,使存在于细胞中无活性的MPF转变为有活性的形式。有丝分裂因子也具有激活MPF的作用。正是通过这种激活作用,哺乳类体细胞有丝分裂因子诱导了两栖类卵母细胞减数分裂过程中的染色体凝集。

#### 五、结 论

综上所述,有丝分裂因子是一类对热不稳定、 $Ca^{2+}$ 敏感、 $Mg^{2+}$ 依赖的高分子量蛋白质。此因子与染色质关系密切,并最终导致染色体的形成。有丝分裂因子在 $G_2$ 期合成。在分裂期细胞中位于中期染色体上。有丝分裂因子与三种不同现象有关,即有丝分裂、减数分裂、早熟染色体凝集。其作用无种属和细胞特异性。对于有丝分裂因子的深入了解,有待于进一步纯化这种蛋白质,分析其化学组成和性质,以及对其作用机制的进一步探讨。

#### 参 考 文 献

- [1] Rao P. N. et al., 1981. In "Genes, Chromosomes, and Neoplasia" 49—60. Raven Press, New York.
- [2] Johnson R. T. and Rao P. N., 1970. *Nature* 226, 717—723.
- [3] Johnson R. T. et al., 1970. *J. Cell. Physiol.* 76, 151—158.
- [4] Sunkara P. S. et al., 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 2799—2802.
- [5] Sunkara P. S. et al., 1979. *J. Supramol. Struct.* 11, 189—195.
- [6] Sunkara P. S. et al., 1982. In "Premature Chromosome Condensation" 233—251. Academic Press Inc.
- [7] Wu M. and Gerhart J. C., 1980. *Dev. Biol.* 79, 465—477.
- [8] Adlakha R. C. et al., 1982. *J. Cell Sci.* 54, 193—206.
- [9] Rao P. N. and Johnson R. T., 1974. In "Control of Proliferation in Animal Cells" Vol I, 785—800. Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, New York.
- [10] Adlakha R. C. et al., 1982. *Nucleic Acids Res.* 10, 4107—4117.