

# 环化腺苷酸(cAMP)在孕酮诱导两栖类卵母细胞成熟过程中的作用

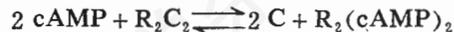
阳良生 左嘉容

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

五十年代末, Sutherland<sup>[1]</sup>在分析肾上腺素和胰高血糖素在肝脏糖原分解过程中的作用时, 发现了cAMP。接着, 一些科学工作者证明cAMP为一种第二信使, 起着将细胞外来刺激信号(激素或神经递质)转化为细胞内各种生理活动的媒介作用。cAMP广泛参与细胞的活动, 包括离子通透、脂肪形成、氨基酸代谢、蛋白质合成、肌肉收缩、激素分泌等活动; cAMP在炎症反应和免疫反应系统中, 在前列腺素的作用中, 细胞的生长分裂和分化调节过程中, 以及癌变过程中, 都起着重要的作用。一般来讲, cAMP的大部分生理作用是通过酶的影响而实现的, 其途径主要有两条: 一是影响酶的活性, 即激活依赖cAMP的蛋白激酶活性, 由此催化其它酶和蛋白质(结构蛋白和功能蛋白)磷酸化, 产生有关的生理效应; 另一是通过调节遗传基因的活性, 控制mRNA的转录, 从而影响与生理效应有关的酶和蛋白质的生成。其实, 在真核生物中, cAMP调节遗传基因活性的作用主要也是通过依赖cAMP的蛋白激酶实现的, 例如催化组蛋白的磷酸化, 解除它对基因的抑制作用; 催化 $\sigma$ 因子的磷酸化, 活化RNA聚合酶, 使之容易找到转录起始位点, 加快模板mRNA的合成<sup>[2]</sup>。

在真核细胞内, 依赖cAMP的蛋白激酶的活化过程涉及到一个无活性复合体的解离过程, 即由催化亚基(C)和调节亚基(R)组成的复合体(C<sub>2</sub>R<sub>2</sub>), 在cAMP的参与下, 转化成游离的催化亚基, 以及由调节亚基与cAMP组成的复合物<sup>[3]</sup>。在无cAMP的条件下, 如果将游离的调节亚基与催化亚基混合, 又会导致两者的

重新聚合, 成为无活性的复合体:



在两栖类动物, 长足的卵母细胞停留于第一次成熟分裂前期的双线期, 经激素(孕酮)的诱导, 恢复成熟分裂, 直至第二次成熟分裂中期, 成为可以正常受精和发育的卵球。对于孕酮诱发的卵球成熟过程, 甲基黄嘌呤或罂粟碱具有抑制的作用<sup>[4]</sup>。众所周知, 甲基黄嘌呤和罂粟碱是磷酸二酯酶的抑制剂, 既然具有抑制卵球成熟的作用, 从而也表明细胞内cAMP水平的递增可能具有抑制卵球成熟的作用。

根据卵球成熟过程中cAMP的定量分析结果, 确实发现在接触孕酮后的初始几分钟, 卵母细胞cAMP量迅速下降, 含量为原有基础水平的40—60%<sup>[5]</sup>; 还发现孕酮可以迅速降低用霍乱毒素处理过的卵母细胞cAMP水平<sup>[6]</sup>。在中华大蟾蜍卵母细胞成熟中, 也测得上述类似的cAMP递减的现象(徐国江等, 未发表资料)。

为了进一步确定cAMP水平下降在卵球成熟过程中的作用, Maller和Krebs<sup>[7]</sup>将分离纯化的蛋白激酶的催化亚基和调节亚基分别注入卵母细胞, 观察其对卵球成熟的影响。他们观察到催化亚基具有抑制孕酮诱导卵球成熟的作用, 这意味着卵母细胞内cAMP水平的下降为卵球成熟早期的必要变化之一; 当把调节亚基注入到卵母细胞中, 即使未经孕酮处理, 卵球也能成熟。由此证明, 孕酮诱导的cAMP水平下降, 对成熟来说是充分的条件。更为有趣的是, 将依赖cAMP的蛋白激酶的热稳定抑制剂注入卵母细胞<sup>[5]</sup>, 也能诱导卵球成熟。依赖cAMP的

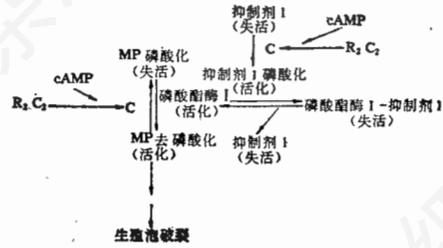
蛋白激酶的热稳定抑制剂所特有的剂量反应曲线<sup>[8]</sup>，并不因霍乱毒素的预处理而有所改变。由此 Maller 和 Krebs 等设想<sup>[6]</sup>：在卵母细胞中有一种蛋白因子，能被依赖 cAMP 的蛋白激酶磷酸化，造成卵母细胞一直停留于减数分裂双线期的阶段；而这种蛋白质的脱磷酸化，具有解除抑制成熟的作用，Ozon<sup>[9]</sup>称之为成熟蛋白质 (Maturation Protein, 简称 MP)。Bellé<sup>[10]</sup> 将腺苷-5'-O-(3-硫三磷酸) (ATP- $\gamma$ -S) 注入爪蟾卵母细胞中，发现由孕酮诱导的卵球成熟受到抑制，其抑制效果与注射的剂量和时间有关。一旦由孕酮刺激的卵母细胞已产生促成熟因子 (Maturation Promoting Factor, 简称 MPF)，再注入 ATP- $\gamma$ -S 就不能抑制卵球成熟的进程。因此认为，这种卵内的经 ATP- $\gamma$ -S 磷酸化的抑制因子或成熟蛋白质，由于不易被脱磷酸化，故具有稳定其强烈抑制孕酮诱发卵球成熟起动的的作用，致使卵球失去了由孕酮诱发而恢复减数分裂的能力。

cAMP 对卵球成熟调节的一个更为直接证据是，将 cAMP 或其衍生物注入卵母细胞，也能抑制其成熟<sup>[11]</sup>。

然而，在其他一些系统中，特别是在骨骼肌的系统中，cAMP 还能通过磷酸酯酶解除蛋白的磷酸化，从而控制脱磷酸化的速度。此外，在骨骼肌中还存在两种具有抑制磷酸酯酶作用的抑制蛋白<sup>[12]</sup>，命名为抑制剂 1 和抑制剂 2。两者的主要区别不仅仅在于分子量，抑制剂 1 还得依赖 cAMP 蛋白激酶的催化，致使磷酸化后，才显示抑制功能，而抑制剂 2 的活性并不依赖于磷酸化。这些抑制剂仅仅作用于 Cohen 命名的磷酸酯酶 I。

通过在卵母细胞中注入抑制剂 1 的实验分析<sup>[13]</sup>，间接证明卵母细胞中磷酸酯酶 I 存在的可能性。倘若卵母细胞中确实存在抑制剂 1 和磷酸酯酶 I，且参与卵母细胞成熟过程中的早期调控机制，则下列的假设图是有可能成立的：

Foulkes<sup>[14]</sup> 等将抑制剂 2 注入卵母细胞，观



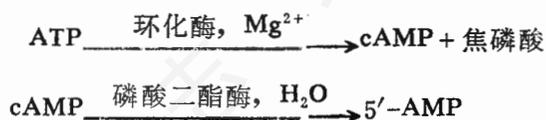
察卵球成熟和磷酸化酶 a 的脱磷酸化情况。结果发现卵内 40% 的磷酸化酶 a 的脱磷酸化反应受到抑制，即无法由具有活性的磷酸化酶 a 转变为无活性的磷酸化酶 b，这意味着在卵母细胞内，40% 的磷酸化酶 a 的脱磷酸化反应可能受到磷酸酯酶 I 的控制；同时还发现抑制剂 2 只能延迟但不能抑制由孕酮诱发的卵球成熟。由此推测，具有抑制卵球成熟作用的磷酸化蛋白的稳定状态，主要是由依赖 cAMP 的蛋白激酶来调节的。不过也有人<sup>[15]</sup>认为，磷酸酯酶抑制剂的作用效果之所以不如依赖 cAMP 的蛋白激酶的催化亚单位，可能是由于注入后的磷酸酯酶抑制剂的易于失活，致使不能百分之百地抑制磷酸酯酶 I 的活性，或者是由于卵内存在着多种作用于此类磷酸化蛋白的磷酸酯酶，致使单靠一种磷酸酯酶抑制剂是不可能百分之百地抑制卵球成熟。

关于有多种磷酸酯酶可能参与卵球成熟启动控制的设想是非常有趣的，因为在卵球成熟的早期变化过程中，游离钙离子 ( $Ca^{2+}$ ) 浓度的升高几乎与 cAMP 量的下降同时发生。因此有些学者认为<sup>[16]</sup>，在孕酮诱导下，依赖  $Ca^{2+}$  的磷酸酯酶 II 被活化，参与控制具有抑制成熟作用的磷酸化蛋白的脱磷酸化反应。还有些初步的实验结果表明，卵母细胞中磷酸酯酶抑制剂 1 和抑制剂 2 的含量很低，而磷酸酯酶 II 的浓度高，故磷酸酯酶 II 可能起着其他更重要的作用。

所有上述的实验分析结果启示，由孕酮诱发卵母细胞成熟的信号是 cAMP 水平的下降。然而，引起卵球内 cAMP 水平下降的机制究竟

是什么呢？为了深入了解这一问题，我们不妨先讨论一般真核细胞内 cAMP 含量的调节控制机理。

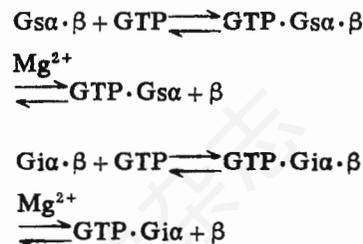
业已清楚，一般真核细胞内 cAMP 的水平是取决于腺苷酸环化酶和环化腺苷酸磷酸二酯酶的相对活性。腺苷酸环化酶具有催化 ATP 转化成 cAMP 的能力，而 cAMP 又能在磷酸二酯酶的作用下水解生成 5'-AMP：



高等真核生物细胞的腺苷酸环化酶<sup>[17]</sup>，实际上是一种存在于质膜上的复合调节系统。该系统至少包括三种组分，即接受激素和神经递质的受体蛋白(R 亚基)，能与 GTP 结合并由此调节腺苷酸环化酶催化亚单位活性的鸟苷酸结合蛋白(G-蛋白)，以及催化亚单位(C 亚基)。一般，细胞膜腺苷酸环化酶的 G-蛋白有两种：一种是刺激环化酶活性的 Gs 蛋白；另一种是抑制环化酶活性的 Gi 蛋白。在 S<sub>49</sub> 淋巴细胞突变株的细胞膜上缺少 Gs 蛋白<sup>[18]</sup>，但具有 R 亚基和 C 亚基，因此即使有作用底物 Mg<sup>2+</sup> - ATP，仍无法显示催化活性；如果人工地把 Gs 蛋白组合到该细胞膜上，环化酶活性就完全恢复。

不论是 Gs 或是 Gi 蛋白，它们均由三个亚基组成，即 α, β 和 γ 等三个亚基。从氨基酸组成，蛋白多肽图谱和功能分析来看，Gs 和 Gi 蛋白的 α 亚基相差甚大，而 β 和 γ 亚基的差别不大。不论是 Gs 的或是 Gi 的 α 亚基，都含有两个结合位点：一是结合鸟苷酸或其衍生物的位点；另一是 ADP 核糖化的位点。核糖化后的 G-蛋白对 GTP 具有高亲和力。在膜结合蛋白辅助因子(ARF)存在的情况下，霍乱毒素具有催化依赖于 NAD 的 Gsα(Gs 蛋白的 α 亚基) ADP 核糖化的作用；而百日咳毒素(即岛状活化蛋白，简称 IAP)具有催化 Giα(Gi 蛋白的 α 亚基)核糖化的作用。只有与鸟苷酸(如 GTP)或氟化物(需 Mg<sup>2+</sup> 和 Al<sup>3+</sup> 的存在)结合之后，

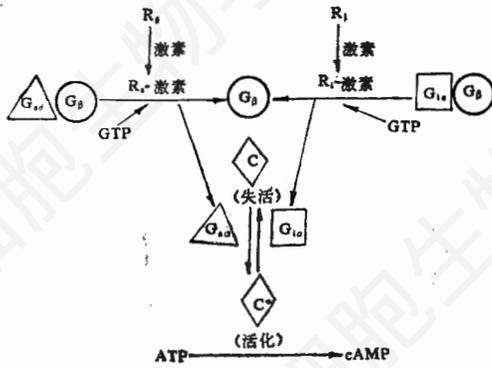
Gs 和 Gi 才有活性，即 Gs 获得刺激 C 亚基的活性，Gi 获得抑制 C 亚基的活性。腺苷酸环化酶的整个活化过程，涉及包括 G-蛋白本身在内的几个亚基的分离过程：



α 亚基和 β 亚基的分离对于环化酶的活化或抑制是必需的。

实验证明 GTP·Gsα 是 C 亚基最有效的活化剂<sup>[17]</sup>，而 Gs 的 β 亚基通过刺激 Gs 寡聚体(Gsα·β)的形成，抑制 C 亚基的活性，甚至能促进 C 亚基的去活化。从 Gi 解离的 β 亚基具有与 GTP·Gsα 结合的能力，并达到“清扫”GTP·Gsα 的作用，从而达到抑制酶活性的目的。还有实验发现 α 亚基具有 GTP 水解酶活性<sup>[17]</sup>，但只有与 β 亚基结合之后才表现出活性，致使 GTP 向 GDP 转化，cAMP 含量伴随下降；如果用不易被 GTP 水解酶作用的类似物(Gpp[NH]p)取代 GTP，与 Gsα 牢固结合，刺激 C 亚基活性，由此可产生大量的 cAMP。至于某一种激素或神经递质所具有的刺激或抑制环化酶活性的作用，都是通过它们对固有的膜受体的进一步作用而表现出来的。

与 Gs 和 Gi 蛋白相对应，细胞膜上存在两种受体，一类受体(Rs)能接受刺激环化酶活性的激素或递质，另一类受体(Ri)能接受抑制环化酶活性的激素或递质，不过 Rs 受体在细胞膜上占有优势，这就是为什么大多数的生理效应是通过升高 cAMP 的含量实现的。总之，多数的激素或递质都是先与受体(Rs 或 Ri)结合成复合物，然后在 GTP 存在的情况下，改变 G-蛋白构象，游离 α 亚基，或刺激或抑制 C 亚基的活性，从而 ATP 转化成 cAMP 产生影响。



腺苷酸环化酶的活性除了受到激素、递质、毒素和氟化物等的调节，还受到  $Ca^{2+}$  浓度、蛋白激酶 C 及焦磷酸酯酶等的影响。 $Ca^{2+}$  浓度的升高抑制环化酶活性<sup>[19]</sup>，蛋白激酶 C 能催化 Gs 蛋白的磷酸化而抑制环化酶活性。

目前普遍认为孕酮导致卵母细胞内 cAMP 水平下降的途径有两条，其一是抑制腺苷酸环化酶活性，其二是激活磷酸二酯酶活性。Ozon 等<sup>[20]</sup>发现注入卵球内的  $\alpha$ -[ $P^{32}$ ]ATP 向 cAMP 的转化速度，受孕酮阻遏，表明腺苷酸环化酶的活性为孕酮抑制。孕酮能抑制卵母细胞腺苷酸环化酶的基础活性<sup>[5]</sup>，又能抑制被霍乱毒素、氟化物、Gpp[NH]p 等激活的活性，却不能抑制由  $10 \times 10^{-3} \text{ mol/L Mn}^{2+}$  激活的活性。根据对  $S_{40}$  细胞变异株腺苷酸环化酶的研究结果，估计孕酮抑制卵母细胞腺苷酸环化酶活性涉及到 G-蛋白。由于百日咳毒素能消除乙酰胆碱对环化酶 Gi 亚单位的抑制作用，而不能消除由孕

酮引起的环化酶的抑制作用，表明孕酮具有抑制环化酶 Gs 亚单位的作用<sup>[21]</sup>。但孕酮在 Gs 蛋白上的作用位点却不甚清楚。从已知的一些腺苷类似物的作用效应来看，腺苷可区分成两类，一类为作用于 R 位点的腺苷类似物，其核糖基的 2'-和 3'-位上都有羟基；另一类为作用于 P 位点的腺苷类似物，它们均有一个完整的嘌呤环，而核糖基可作任何修饰。经过比较，孕酮的作用效应近似于作用 P 位点的腺苷类似物<sup>[22]</sup>。

有关卵球磷酸二酯酶在成熟启动中的作用研究，注意力主要集中在依赖钙调素的磷酸二酯酶上<sup>[4]</sup>。以 Aequorin 作为探针注入卵母细胞，发现孕酮处理的卵母细胞中游离  $Ca^{2+}$  含量增加，而 cAMP 水平下降<sup>[23]</sup>；注射  $Ca^{2+}$  到卵母细胞内可降低 cAMP 含量；卵内注入离子载体  $A_{23187}$  可降低卵母细胞内 cAMP 含量；钙调素抗体与卵内源钙调素结合后，能使钙调素的构象活化，致使 cAMP 含量下降。种种现象表明孕酮可通过上述的另一途径降低卵母细胞内 cAMP 的含量，即通过增加细胞质游离钙离子含量，从而活化钙调素，由此再激活依赖钙调素的磷酸二酯酶，达到水解 cAMP 的作用。

综上所述，我们可简单地把孕酮诱导卵球成熟的起始过程划分为三个阶段(见图 1)：(1) 孕酮抑制腺苷酸环化酶活性，刺激磷酸二酯酶活性，降低卵球内 cAMP 水平；(2) cAMP 水

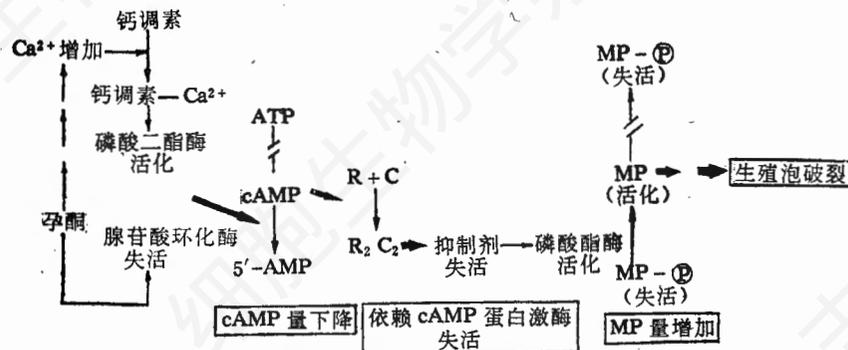


图 1 孕酮诱发两栖类卵母细胞成熟的起始过程

平降低, 导致依赖 cAMP 蛋白激酶的失活, 同时激活磷酸酯酶; (3) 抑制成熟的磷酸化 MP 水平降低。

毫无疑问, 在孕酮诱发两栖类卵母细胞成熟的过程中, 蛋白质的磷酸化反应和去磷酸化反应起着调控的作用, 所以催化这些反应的蛋白激酶和磷酸酯酶就成为引人关注的研究对象。在两栖类卵母细胞, 孕酮的第二信使之一——cAMP 是借助于依赖它的蛋白激酶, 调控着蛋白质的磷酸化反应。然而在各种组织或细胞中, 被发现的蛋白激酶的种类繁多, 有的酶活性是依赖于上述的 cAMP, 有的则依赖于 cGMP, 也有的依赖于钙调素-Ca<sup>2+</sup>、或磷脂-Ca<sup>2+</sup>、或多胺、或其它信使。就控制蛋白质去磷酸化反应的磷酸酯酶而言, 种类也不少。因此, 在两栖类卵母细胞的成熟过程中, 蛋白质磷酸化和去磷酸化的连锁反应, 必然会涉及到不同种类的蛋白激酶或磷酸酯酶。故以两栖类卵母细胞为材料, 深入分析其成熟过程中分子水平的变化, 无疑会有助于了解细胞分裂和细胞分化的机制, 对诸如癌细胞之类的异常分裂机制的认识也是有益的。

### 摘 要

环腺苷酸(cAMP)作为一种第二信使, 通过影响依赖于它的蛋白激酶活性, 广泛参与细胞各种生理活动。孕酮既能够抑制卵母细胞腺苷酸环化酶的活性(作用位点在Gs亚单位上), 又可从激活其磷酸二酯酶的活性, 从而使卵母细胞内cAMP水平下降。实验证明, 孕酮诱发的cAMP水平下降为卵球成熟早期的必要变化之一, 同时对成熟来说又是充分的条件。cAMP水平下降似乎导致一种所谓的成熟蛋白质(MP)的磷酸化速度的减慢或抑制, 和导致该蛋白脱磷酸化速度的加快, 从而解除了它对卵球成熟的抑制作用。

### 参 考 文 献

- [1] Sutherland, F. W., et al., 1958, *J. Biol. Chem.*, 232: 1077.
- [2] 王身立等, 1976, 生物化学与生物物理进展, 3:45.
- [3] Beavo, J. A. et al., 1975, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 5: 241-251.
- [4] Allende, C. C. et al., 1977, *J. Biol. Chem.*, 252: 4662-4666.
- [5] Mallor, J. L. 1983, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 15: 295-336.
- [6] Schorderet-Slatkine, S. et al., 1978, *Cell*, 15: 1269-1275.
- [7] Maller, J. L. et al., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254: 579-582.
- [8] Huchon, D. et al., 1981, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 22: 211-222.
- [9] Mulner, O. et al., 1983, *Mol. Cell Endocrinol.*, 31: 151-160.
- [10] Bellé, R. et al., 1984, *J. Exp. Zool.*, 231: 131-136.
- [11] Cho. W. R. et al., 1974, *J. Exp. Zool.*, 187: 383-386.
- [12] Huang, F. L. et al., 1976, *Eur. J. Biochem.*, 70: 419-426.
- [13] Huchon, D. et al., 1981, *Nature(Lond.)*, 294: 358-359.
- [14] Foulkes, J. G. et al., 1982, *FEBS Lett.*, 150: 155-160.
- [15] Foulkes, J. G. et al., 1979, *Eur. J. Biochem.*, 105: 195-203.
- [16] Cohen, P. 1982, *Nature (Lond.)*, 296: 613-620.
- [17] Gilman, A. G. 1984, *Cell*, 36: 577-579.
- [18] Ross, E. M. et al., 1978, *J. Biol. Chem.*, 253: 6401-6412.
- [19] Gancedo, J. M. et al., May. 1985, *TIBS*, 210-212.
- [20] Mulner, O. et al., 1979, *Biochem. Biophys. Acta*, 582: 179-184.
- [21] Sadler, S. E. et al., 1984, *Mol. Pharmacol.*, 26: 526-531.
- [22] Maller, J. L. 1985, *Cell Differ.*, 16: 211-221.
- [23] Wasserman, J., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77: 1534-1536.