

Advances in  
Developmental Biology

# 发育生物学进展

陈吉龙 马海飞 主编

高等教育出版社

# 发育生物学进展

陈吉龙 马海飞 主编

高等教育出版社

(京) 112 号

## 内 容 简 介

本书从细胞和分子水平上介绍了生命科学中的一个主要领域——发育生物学的研究进展。论述发育和分化的重要问题,及其近年来的最新研究成果。本书的主要特点是用现代细胞分子生物学的理论来阐明生物个体发育的本质问题,并对发育和分化的机理提出新的看法。全书包括四大部分。第一部分:生殖细胞发生、受精及早期胚胎发育;第二部分:细胞分化与形态发生的细胞和分子基础;第三部分:动物胚胎工程与基因工程;第四部分:植物发育的分子机理。四大部分又分成 19 个专题。每个专题的编写者在密切相关的研究工作中均积累了丰富的知识和经验。因此,本书是一本不可多得的有关发育生物学的参考书。

本书可供发育生物学、遗传学、胚胎学、细胞生物学和分子生物学的研究工作者和有关专业的师生参考。

### 发育生物学进展

陈吉龙 马海飞 主编

\*

高等教育出版社出版

新华书店总店北京发行发行

国防工业出版社印刷厂印刷

\*

开本 787×1092 1/16 印张 21.75 字数 500 000

1994年9月第1版 1994年9月第1次印刷

印数0001—1 660

ISBN7-04-005167-9·Q·228

定价 11.60 元

## 《发育生物学进展》编委会

顾问： 马 诚    吴乃虎    杜 森

主编： 陈吉龙    马海飞

编委：（按姓氏笔划为序）

王为先    邓辉南    李书鸿    李碧荣    张永清  
张传茂    林金安

## 序 言

生物体发育的研究已有很长的历史,但现代发育生物学的形成是从本世纪 50 年代开始的,是在胚胎学、细胞生物学、遗传学、生物化学和分子生物学等学科发展的基础上建立起来的一门新兴学科。近十多年来发育生物学取得了很大进展,对生物个体发育的分子机理有了越来越深刻的认识。目前发育生物学已成为生命科学领域中最活跃的分支学科之一。在发育生物学的形成过程中,胚胎学和细胞生物学的贡献极大,从一个受精卵分裂产生构成整个有机体的细胞,这些细胞从结构和功能上彼此分开,又相互联系,组成了各种不同的组织、器官,从而形成了一个完整的个体,并把父母本的性状,包括体积、形态、生理特性、行为等传递下来。因此,研究发育的基本过程要从细胞开始。

发育生物学又是一门综合性很强的学科,既包含着探讨生命活动奥秘的基本理论,又蕴含着极大的应用前景。在农牧业方面,培养高产、优质、抗逆新品种,必须懂得发育生物学的知识。在医学方面,细胞出现分化异常或不分化,人体就会产生严重疾病。如果发育生物学能阐明分化的机理,这些重大医学难题就可能容易解决了。所以,发育生物学研究不仅是认识自然现象和规律,搞清从核酸、蛋白质到生物有机体这个生命活动的发育变化的机理,而且还有重大的社会和经济效益。因此,发育生物学研究引起了广泛重视。

从事生物发育研究的科学家在生殖细胞的发生、受精机理及早期胚胎发育、细胞分化与形态发生的细胞和分子基础、动物胚胎工程和基因工程、发育过程中基因的表达调控等非常广泛的范围内取得了辉煌的研究成果。也许受此鼓舞,本书作者们编写了《发育生物学进展》一书。该书由四个部分,19 个专题组成,侧重从细胞和分子水平上介绍研究的最新进展和成就。内容新颖、准确,是一本有较好参考价值的学术书籍,相信会起到交流和参考作用。当然由于时间短,篇幅有限及作者工作范围的关系,本书定会有不足之处,相信经过读者在工作实践中给予指正、补充、完善,当本书再版时,会更富参考价值。

最后要特别提及的是,本书是几位热心发育生物学研究的年青同志组织的,除 6 位老专家外,其他参加编写的同志都是年青的博士和硕士。这些年青同志热心科研,学术思想活跃,积极进取,是从事发育生物学研究和教学工作的一支生力军。本书的出版和交流,配合不断发展壮大的研究队伍的形成,可以期望我国的发育生物学研究会呈现新的发展趋势。

马 诚

1994 年 5 月于北京

## 前 言

近十多年来,发育生物学的研究取得了实质性进展,其研究范畴在不断扩展和深化。越来越多的发育生物学家利用现代细胞生物学和分子生物学的理论和技术,来阐明生物个体发育的本质问题。日益增多的事实表明,发育生物学的研究给生命科学注入了新的活力,也促进了生命科学领域中其它学科的发展。

当前国内能反映发育生物学最新研究进展的书籍很少。一些老版本的书籍很难适应越来越快的学科发展的需要。为了推动我国发育生物学的发展,我们组织了活跃在发育生物学领域的专家学者,结合自己的研究,同时融汇国内外的最新研究成果,编写了这本《发育生物学进展》。我们期望本书的出版能对广大发育生物学工作者、研究生、大学生及相关领域的研究人员有所裨益,同时也有抛砖引玉之目的,衷心希望国内外同行提出宝贵意见,共同推进发育生物学的发展。

参加本书编写工作的有:中国科学院植物研究所白书农、谭克辉、赵大中,中国科学院微生物研究所张永清、田波,中国医学科学院肿瘤医院张连峰、雷薇,北京大学张传茂、杨贵波,兰州大学种康,北京农业大学周占祥,中国林业科学院林业研究所汪政科,福建医科大学江一平,首都师范大学罗玉英,中国科学院发育生物学研究所郑瑞珍、辛俭、邓辉南、陈清轩、萧灿、金振华、常华、于建康、马海飞、王为先、陈吉龙、刘晔、李书鸿、魏令波。参加本书部分评审工作的有:金振华研究员、于建康研究员、郑瑞珍研究员、费云标研究员、薛国雄研究员、周占祥教授、陈清轩副研究员、林金星副研究员。参加评审的专家在繁重的科研任务之中,抽出时间认真审阅,提出了许多宝贵的意见。特别值得一提的是,本书的学术顾问马诚先生、吴乃虎先生和杜森先生在本书的选编工作中提出了许多宝贵的意见和建议。中国科学院发育生物学研究所的领导张钟达先生、黄和祥先生在本书的编写过程中给予了支持和鼓励,代所长马诚先生在百忙中为本书写了序言。高等教育出版社责任编辑林金安同志为本书的问世付出了辛勤的劳动。对于大家的热情帮助和支持,特致衷心感谢。

由于本书内容广泛且更新迅速,选编难度较大。尽管我们已努力去减少错误,但限于编者的水平和经验,书中的缺点和错误在所难免,再次希望读者提出批评和建议。

编 者

1994年5月

# 目 录

## I. 生殖细胞发生、受精及早期胚胎发育

- 两栖类卵母细胞成熟与卵裂调控研究的新进展..... 张传茂(3)  
精子与卵子膜上凝集素受体及其在生殖中的功能..... 陈吉龙 周占祥(23)  
人和哺乳类精子获能与顶体反应研究进展..... 江一平(36)  
动物胚胎早期发育的分子生物学..... 马海飞(68)

## II. 细胞分化与形态发生的细胞和分子基础

- 细胞基质系统在动物胚胎发育和细胞分化中的作用..... 陈吉龙(90)  
哺乳动物胃肠道内分泌细胞的发生及功能研究进展..... 杨贵波(108)  
高等动物壕门基因研究..... 王为先(130)  
癌基因与发育..... 张连峰 雷 薇(151)

## III. 动物胚胎工程与基因工程

- 胚胎干细胞研究进展..... 郑瑞珍 辛 俭(172)  
鱼类细胞核移植..... 李书鸿(194)  
着床前胚胎遗传缺陷的诊断..... 刘 晔 马海飞(208)  
转基因鱼研究进展..... 常 华 于建康(220)  
转基因动物:在发育生物学及医学中的应用..... 邓辉南 陈清轩(233)

## IV. 植物发育的分子机理

- 雄核发育的分子遗传机理及花粉发育过程中的基因表达..... 魏令波 汪政科(251)  
成熟果实特异基因的表达调控..... 张永清 田 波(261)  
高等植物器官发育的基因表达调控..... 箫 灿 金振华(275)  
植物春化作用的分子基础..... 种 康 谭克辉 赵大中(299)  
植物细胞质遗传研究进展..... 罗玉英(315)  
拟南芥菜突变体及植物发育研究的遗传学途径..... 白书农(328)

# I. 生殖细胞发生、受精 及早期胚胎发育





# 两栖类卵母细胞成熟与卵裂调控研究的新进展

张传茂

(北京大学生命科学学院)

1. 引言
2. 两栖类卵母细胞成熟调控研究简史
  - 2.1 卵母细胞成熟的激素调节
  - 2.2 成熟促进因子(MPF)的早期研究
  - 2.3 细胞生长抑制因子(CSF)的早期发现
  - 2.4 受精时卵子内  $\text{Ca}^{2+}$  离子浓度增加
3. cdc 基因家族的发现与 p34<sup>cdc2</sup> 激酶
4. 细胞周期蛋白的发现
5. MPF 研究的深入及其的生化本质
6. MPF 的功能
7. MPF 的催化作用及其效应
8. CSF 研究的深入及其的生化本质
9. 卵母细胞成熟与卵裂的综合调控
  - 9.1 卵母细胞成熟
  - 9.2 受精或人工激活使卵子由 M 期向 G<sub>1</sub> 期转化
  - 9.3 卵裂综合调控
10. 结束语

## 1. 引 言

绝大多数高等动物的个体发育是通过精子(sperm)和卵子(egg)的结合而开始的。精子继承了父本的遗传物质,卵细胞继承了母本的遗传物质,通过相互结合和进一步发育,形成具有父母双亲遗传性状的子代个体。广义地说,个体的发育还应该包括生殖细胞的发生,即个体发育的早期物质准备阶段。只有两性生殖细胞才能够结合,开始个体发育。作为两性生殖细胞,精子和卵细胞各具特点。精子的结构和物质成份均相对简单;而卵细胞的结构和成份则比较复杂。卵细胞不仅在体积方面比精子大得多,如人的卵细胞比人的精子大 80 000 倍,海胆卵细

胞是其精子的 10 000 倍,蛙的卵细胞是其精子的近十万倍等而且,卵细胞中含有大量的供早期胚胎发育所需营养和调节物质的储备,更重要的是,成熟卵细胞的物质代谢要受调节物质的强烈抑制。通常情况下,只有通过精子和卵细胞的结合,即受精作用,才能够解除卵细胞的代谢抑制,使卵细胞活化,重新进入活跃的代谢状态,新的生命由此开始。如果卵细胞不经过受精,其代谢抑制状态不能被解除,卵细胞最终将自行消亡。但也有少数生物种类,卵细胞不经过受精,也可以活化并进一步发育为个体,称为孤雌生殖。也有一些生物种类,在人工状态下,可以诱导卵细胞活化,进行早期胚胎发育,甚至发育为无父的个体,称为人工孤雌生殖。而作为雄性生殖细胞的精子,则不能单独进行发育。在实验中,也有一些雄核发育(androgenesis)的例子,但多是精子在事先去核或使卵核失活的卵细胞质中发育。由此可见,卵细胞在动物个体发育中起着不可替代的重要作用。因而,研究卵细胞发生,一直是发育生物学领域的一项极其重要的课题,经过不懈的努力,已取得了许多成果,如卵细胞的起源、分化、基因表达与物质积累等。本文拟对近几年在两栖类卵母细胞成熟和卵裂调控方面所取得的突破性进展作一简要综述。由于不同生物在卵母细胞成熟、卵裂调控及一般细胞有丝分裂方面的一些共性,人们在研究工作中常相互参照不同来源的实验结果,大大加快了研究的进展。因而,本文在引用原始文献时,也常会引用一些来源于其它生物的实验资料,不一一赘述。

## 2. 两栖类卵母细胞成熟调控研究简史

### 2.1 卵母细胞成熟的激素调节

众所周知,两栖类卵母细胞成熟时处于第二次成熟分裂中期阶段。一般认为卵母细胞的成熟过程是从第一次成熟分裂前期开始的。此时的卵母细胞称为初级卵母细胞。其细胞核(即生发泡,GV)很大,细胞质中充满大量卵黄颗粒和色素颗粒等,细胞核和细胞质中还含有大量的供早期胚胎发育的其它物质贮备。进入第一次成熟分裂期,生发泡破裂,核膜物质以小膜泡的形式混入细胞质,核纤层(lamina)解体为纤维层蛋白(lamin) III 单体,染色质进一步凝集为染色体,核内物质成分与细胞质成分混合。经过第一次成熟分裂,产生一个极体和一个次级卵母细胞。随后,次级卵母细胞进行第二次成熟分裂;但此次分裂只能进行到分裂中期阶段,即成熟的卵细胞,等待受精。实验证明,卵母细胞成熟与一些激素(如绒毛膜促性腺激素、孕酮等)的调节有关。人们早已知道,给成年雌性动物注射此类激素,能够促进卵母细胞成熟与排卵。进一步研究发现,将初级卵母细胞及其周围的卵泡细胞从卵巢中解剖分离出来,在离体的情况下施以有关激素进行人工诱导,发现卵母细胞也能够完成成熟分裂过程,直接证明卵母细胞成熟与激素调节有关。长期以来,人们一直在探讨激素诱导卵母细胞成熟的机理,发现了一些重要的生命现象,如孕酮诱导非洲爪蟾卵母细胞成熟时,卵母细胞内  $Ca^{2+}$  离子浓度上升,cAMP 浓度下降,蛋白质合成增加,成熟促进因子活性上升等,但对孕酮诱导卵母细胞成熟的确切机理知之甚少<sup>[64]</sup>。由孕酮诱导母细胞成熟的一般过程见图 1。

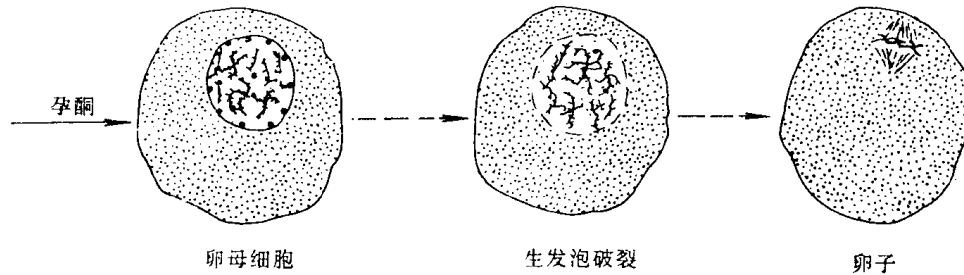


图1 孕酮诱导蛙卵母细胞成熟的一般过程

孕酮作用于卵母细胞,引起卵母细胞产生一系列生化活动,如细胞质 cAMP 浓度下降,蛋白质合成增加,成熟促进因子活性出现等,随后发生生发泡破裂(GVBD);经过一系列生化活动和形态变化,最终停留在第二次成熟分裂中期,等待受精

## 2.2 成熟促进因子(MPF)的早期研究

1971年, Masui 和 Markert<sup>[67]</sup>, Smith 和 Echer<sup>[106]</sup> 分别报道,将激素诱导成熟的蛙卵细胞的细胞质显微注射到蛙卵母细胞中,可以引起生发泡破裂,向分裂期转化并稳定在分裂中期。Masui 和 Markert 将成熟蛙卵中能促使卵母细胞成熟的成分称为成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF), 并认为 MPF 活性存在于成熟的处于分裂期的卵细胞质中; MPF 促进卵母细胞成熟的效力与 MPF 的量成正比。既然 MPF 能够诱导卵母细胞成熟,使卵母细胞由间期向分裂期转化,那么, MPF 在其它生物的卵母细胞中是否也存在? 在一般的有丝分裂细胞中是否也有 MPF 活性呢? 研究发现, MPF 的活性几乎存在于从酵母到人体细胞所有有核细胞的分裂期细胞(包括生殖细胞)中<sup>[1,26,31,37,44,45,74~76,86,96,113,117,119]</sup>, 并且证明 MPF 在进化上具有高度的保守性,将酵母或人的 MPF 显微注射到非洲爪蟾卵母细胞中,同样可以促进卵母细胞成熟<sup>[114]</sup>,从而证明了 MPF 是几乎所有真核细胞中普遍存在的一种活性物质,同时人们发现, MPF 活性在细胞周期内上下波动<sup>[117]</sup>。在 G<sub>2</sub> 期的晚期开始出现活性,在 M 期活性最强,到 G<sub>1</sub> 期的早期活性消失,因而推测 MPF 是真核细胞 M 期的一个基本的调节物质。但 MPF 的本质是什么? 以何种方式促进卵母细胞成熟或一般体细胞进入 M 期? 长期以来,人们对此问题几乎一无所知。人们在提纯 MPF 方面所遇到的困难也是阻碍人们深入认识 MPF 的重要原因之一。

## 2.3 细胞生长抑制因子(CSF)的早期发现

成熟的蛙卵细胞一般都处于分裂的中期,如果不受精则不会分裂。Masui 及其合作者<sup>[66,73,74]</sup>将成熟而未受精的蛙卵细胞的细胞质显微注射到 2 细胞期的一个卵裂球中,发现注有细胞质的卵裂球被抑制在分裂中期,而另一个未被注射的卵裂球则可以继续分裂。因此推

测,在成熟蛙卵的细胞质中必然还存在一种(类)物质,能够将细胞抑制在分裂期。他们将这种物质称为细胞生长抑制因子(cytostatic factor, CSF)。进一步实验显示,CSF 对  $\text{Ca}^{2+}$  离子敏感,CSF 活性随卵细胞受精而消失,推测 CSF 对 MPF 起稳定作用<sup>[73,74]</sup>。但 CSF 的本质是什么尚不清楚。

#### 2.4 受精时卵子内 $\text{Ca}^{2+}$ 离子浓度增加

人们早已发现,在受精时,卵细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度明显增加<sup>[46,87,110]</sup>用  $\text{Ca}^{2+}$  离子载体处理未受精的卵细胞,能够使其活化并由 M 期向间期转化。目前,用  $\text{Ca}^{2+}$  离子载体处理卵细胞已成为人工诱导卵细胞活化的常规手段。可见, $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化在卵细胞由 M 期向间期转化过程中起着重要的调节作用。

### 3. cdc 基因家族的发现与 p34<sup>cdc2</sup> 激酶

卵母细胞成熟及卵裂的调节过程实质上是细胞周期的调节过程。70 年代初,Hartwell 及其合作者<sup>[32~35]</sup>逐渐发现并分离出了许多条件突变株(condition mutant),其中主要是一些温度敏感性突变株(temperature-sensitive mutant)。这些条件突变株在允许温度条件下能够正常生长和繁殖,不表现出明显的异常。但是,将这些温度敏感突变株在限制温度下培养,最终可以将酵母抑制在细胞周期的某一特定时期,而且,不同突变株被抑制后停留的时期各不相同,因此,也称之为细胞分裂周期突变株(cell division cycle mutant, cdc mutant)。根据大量实验观察,Hartwell 等人提出,酵母细胞周期的运转受到一些与细胞周期调节有关基因的控制;酵母细胞分裂的正常进行必须有调节周期各过程的基因产物正常发挥机能。温度敏感突变株在允许温度下,这些基因可以正常发挥作用,而在限制温度下,这些基因则失去活性,细胞分裂即停止。根据对 100 多个温度突变株的实验观察和遗传学分析,Hartwell 等人查明了约 30 个与细胞周期调节有关的基因,其中稷酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的 cdc2 基因和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 cdc28 为等效基因,明显地与 M 期调节有关。早已证明,cdc2/cdc28 的基因产物为一种分子量约为 34kD 的蛋白质,是一种蛋白激酶。p34<sup>cdc2</sup> 的失活可以造成细胞停留在 M 期。可见其作用与 MPF 十分相似,但 p34<sup>cdc2</sup> 与 MPF 的关系所知甚少。

### 4. 细胞周期蛋白的发现

有关细胞周期调节研究的另一项杰出的工作是在 Woods Hole 的海洋生物学实验室进行的。1983 年,该实验室首次报道,海胆(*Arbacia punctulata*)受精卵在卵裂过程中,有一种蛋白质进行周期性地合成和降解。受精卵每卵裂一次,此蛋白质即合成和降解一次。这种蛋白质由母体 mRNA 翻译而成,在受精后开始合成与累积,卵裂时突然降解,然后再合成与累积,卵裂时再突然降解,如此反复。因此,他们将此蛋白质称为周期蛋白(cyclin)<sup>[16]</sup>。此后,cyclin 在其它生物,如青蛤<sup>[112]</sup>,海星<sup>[109]</sup>,非洲爪蟾<sup>[71]</sup>,果蝇<sup>[52]</sup>,酵母<sup>[5,28,30,107]</sup>等生物种中均得以发现并得到证实。这些生物种的 cyclin 的分子量在 4~60kD 之间,与海胆卵裂过程中的 cyclin 具有相似的生化

行为,在间期合成和累积,在晚  $G_2$  期达到高峰,随着细胞分裂,再陡然降解。1989年,Murray 等人<sup>[82,83]</sup>连续在“Nature”杂志上发表两篇文章,提出 cyclin 的合成驱动着早期胚胎的细胞周期; cyclin 在激活和保持 MPF 活性方面是必须的;将 cyclin 的 mRNA 降解,细胞便不能进入 M 期;再加入其 mRNA,阻滞则可以被解除。已证明裂殖酵母  $cdc13^+$  的基因产物是 cyclin 在此物种中的等效体。 $cdc13^+$  基因突变,则阻止  $p34^{cdc2}$  激酶活化<sup>[5]</sup>。由此可见,cyclin 的本质不是  $p34^{cdc2}$ ,但与 M 期的调节密切相关;去除 cyclin,细胞则不能进入 M 期。可见 cyclin、 $p34^{cdc2}$  和 MPF 三者均与 M 期调节有关,但三者之间有什么联系呢?人们仍是一无所知。

## 5. MPF 研究的深入及其生化本质

前面已经介绍,人们发现 MPF 广泛存在于从酵母到人类等多种生物类群中。因而人们推测:MPF 在卵母细胞成熟及细胞周期调节过程中必然起重要的作用,并试图对 MPF 进行更为深入的研究。但是,MPF 的提纯非常困难,经过多方努力,也只能得到一些 MPF 粗制品,难以断定 MPF 是粗制品中的哪种物质。MPF 在提纯方面的种种困难一直阻碍着人们对 MPF 的深入研究,对其生化本质则几乎一无所知。

非细胞体系的建立为研究 MPF 提供了有用的工具,大大促进了对 MPF 特性的了解。自 1983 年起,人们陆续建立了来自成熟蛙卵的两个非细胞体系。其一为应用体外激活的卵细胞制备的提取物,称为间期提取物(interphase extracts)。此提取物可以支持细胞核在体外重建(nuclear reassembly or reconstitution in cell free system),将精子染色质,外源纯化 DNA 等加入此提取物,并加入 ATP 再生系统,然后在一定条件下温育,可以组装成结构完整的间期核<sup>[19,56,85,122~127]</sup>。此类非细胞体系的实质在于模拟细胞周期由 M 期向  $G_1$  期转化的过程。其二,应用未被激活的成熟卵细胞制备提取物,并尽量降低其二价离子的浓度,使细胞周期的调节物质仍然被维系在分裂期状态而不向  $G_1$  期转化。所以,此提取物被称为分裂期提取物(mitotic extracts)。此类非细胞体系的特点是,将间期核与此分裂期提取物混合温育,能够促使间期核解体<sup>[55,57~59,76]</sup>,完全模拟了细胞周期由间期向 M 期的转化过程。由此可见,两类非细胞体系的实质是在体外模拟细胞周期由  $G_2$  期,经过 M 期,再向  $G_1$  期转化的整个变化过程。另外,在分裂期提取物中加入一定量的二价离子(主要是  $Ca^{2+}$ ),可以诱导分裂期提取物转化为间期提取物<sup>[57]</sup>,再将间期提取物中的二价离子去除,还可以再转化为分裂期提取物<sup>[82]</sup>,不仅证明两种类型的提取物可以相互转化,同时说明两种提取物中均含有 MPF 成分。不过,在两种提取物中,MPF 在所表现的生物活性存在强弱差异。但是,这种差异通过二价离子(主要是  $Ca^{2+}$ )可以调节并相互转化。因而人们可以根据这些特点,通过一定方式在体外(非细胞体系中)研究 MPF 的生物活性、生化、生理机能及其调节等。

1988年,Lohka 等人<sup>[60]</sup>以非洲爪蟾分裂期卵提取物为材料,经过多种提取步骤,将 MPF 活性浓缩到 3000 倍以上,几乎得到了 MPF 纯品。经过分裂期非细胞体系和卵母细胞注射等细致的方法检测,证明 MPF 主要含有两种蛋白质成分,即 45kD 蛋白和 32kD 蛋白。两种蛋白联合作用可以使 MPF 达到最高活性;并证明提取的 MPF 能够催化内源性的 45kD 蛋白、组蛋白

H<sub>1</sub> 等磷酸化,显示 MPF 具有磷酸激酶活性。随后,有人应用海星为材料,也提纯了 MPF<sup>[49]</sup>。MPF 的提纯,加深了人们对其生化本质的了解,更加刺激了人们对 MPF 生物活性的研究,从而导致了遗传学家、发育生物学家和细胞生物学家在研究细胞周期调节方面的汇合,使几个完全不同路径的研究成果最终得到统一。

自 1988 年 Lohka 等人提纯 MPF 以后,人们马上联想到 MPF 的 45kD 蛋白与 cyclin (45kD 左右),32kD 蛋白与 p34<sup>cdc2</sup> 是否存在联系?很快,Lohka 所在的研究小组与 Nurse 研究小组合作,用抗酵母 p34<sup>cdc2</sup> 的抗体与 Lohka 等人提取的 MPF 进行免疫印迹实验(immunoblotting)和免疫沉淀实验(immunoprecipitation),结果显示,抗酵母 p34<sup>cdc2</sup> 的抗体能够特异地与 MPF 的 32kD 蛋白反应。证明 MPF 的 32kD 蛋白是 p34<sup>cdc2</sup> 在非洲爪蟾中的同效物<sup>[22]</sup>。几乎与此同时,冷泉港的 Beach 实验室与加州大学的 Newport 实验室合作,应用与上述完全不同的技术路线,也证明 MPF 的 32kD 蛋白是酵母 p34<sup>cdc2</sup> 的等效物<sup>[13]</sup>。因为此时人们已经知道,酵母的 *suc1* 基因产物 P13 能够特异地与酵母的 p34<sup>cdc2</sup> 结合,并抑制 p34<sup>cdc2</sup> 的激酶活性。上述两个实验室的研究人员发现,p13 也能够体外(非细胞体系中)特异地与非洲爪蟾卵内 MPF 的 32kD 蛋白结合并抑制 MPF 的活性。用 p13 层析柱层析爪蟾卵提取物后,此提取物即失去 MPF 活性。因而从另一个侧面证明了爪蟾卵 MPF 的 32kD 蛋白与酵母的 p34<sup>cdc2</sup> 是等效物,执行同样的功能。至此,人们已经认识到 MPF 的 32kD 蛋白与酵母的 p34<sup>cdc2</sup> 为同一类物质,但 MPF 的 45kD 蛋白的本质是什么?执行什么功能?与在青蛤中发现的 cyclin 有没有联系?人们试图弄清这些问题。1989 年,Beach 实验室以青蛤为材料证明,cyclin 能够与 p34<sup>cdc2</sup> 基因产物直接结合并构成复合物,共同构成 MPF,并推测 cyclin 的降解可能是 MPF 失活,使 M 期向 G<sub>1</sub> 期转化的机制<sup>[11,23,48,70]</sup>。随后,人们进一步证明,p34<sup>cdc2</sup> 和 cyclin 的复合物执行 MPF 功能<sup>[6]</sup>。至此,人们把从酵母、海胆、青蛤、蛙类中所获结果完全统一起来,进一步推动了 MPF 及 M 期调节等研究工作的发展。

## 6. MPF 的功能

MPF 是一种蛋白激酶。几年来,MPF 已被广泛证明具有蛋白激酶功能,可以催化多种蛋白质发生磷酸化,引起这些蛋白质的结构和功能的改变。在 MPF 中,p34<sup>cdc2</sup> 是其催化亚单位,常被单独称为 p34<sup>cdc2</sup> 激酶,主要表现丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶活性。根据 *cdc2* 基因序列推测,p34<sup>cdc2</sup> 本身也是一种磷蛋白,在进入 M 期之前去磷酸化,才表现出蛋白激酶活性;当 p34<sup>cdc2</sup> 重新被磷酸化,其激酶活性随之丧失,细胞即由 M 期释放出来,进入 G<sub>1</sub> 期。MPF 中的 cyclin 构成其调节亚单位,执行激活 MPF(p34<sup>cdc2</sup>)激酶和选择激酶底物的功能。cyclin 在细胞间期合成并逐渐累积,到 G<sub>2</sub> 期,其量达到最大值,p34<sup>cdc2</sup> 蛋白则逐渐被激活,细胞由间期进入 M 期。细胞进入分裂中期后 cyclin 陡然降解,MPF 活性丧失,细胞由 M 期逐步向 G<sub>1</sub> 期转化。在整个细胞周期中,p34<sup>cdc2</sup> 仅出现去磷酸化和磷酸化作用,表现出激酶活性的变化,而 cyclin 则进行着周期性的合成和降解,对 p34<sup>cdc2</sup> 的去磷酸化和磷酸化进行调节。Kirschner 实验室的工作证明,cyclin 合成驱动着胚胎细胞的周期性循环;cyclin 的合成与降解在 MPF 活化过程中起着重

要作用<sup>[82,83]</sup>。此外,随着研究工作的进一步深入,不断发现还有许多其它因素对 MPF 的激酶活性进行精密的调节。

## 7. MPF 的催化作用及其效应

实验证明,MPF 的催化底物范围相当广泛,涉及到许多已知的与细胞核解体和重建密切相关的蛋白质,可能还有更多的作为其底物的蛋白质尚待鉴定。

MPF 能够催化组蛋白 H<sub>1</sub> 磷酸化。近 20 年来人们发现,在不同生物细胞的 G<sub>2</sub>/M 转化时期存在组蛋白 H<sub>1</sub> 激酶活性,认为组蛋白 H<sub>1</sub> 激酶在细胞内催化 H<sub>1</sub> 上的与有丝分裂有关的特殊位点磷酸化<sup>[50]</sup>。这些特殊位点的磷酸化发生在早中期的染色体凝集时期<sup>[120]</sup>,因此推测此酶直接参与染色质凝集<sup>[68]</sup>及有丝分裂的启动<sup>[7,38]</sup>。Lohka 等人<sup>[60]</sup>在纯化 MPF 时证明 MPF 能够直接磷酸化组蛋白 H<sub>1</sub>。Arion 等人<sup>[2]</sup>以海星卵细胞位材料,直接证明组蛋白 H<sub>1</sub> 激酶含有 cdc2 蛋白。由于 cdc2 蛋白是 MPF 的一个组成部分,所以他们认为,组蛋白 H<sub>1</sub> 激酶和 MPF 是同一种物质,而组蛋白 H<sub>1</sub> 则是 MPF 的一个催化底物<sup>[2]</sup>,组蛋白 H<sub>1</sub> 激酶与 MPF 的相似性也得到了其他研究者的证明<sup>[12,22,36,39,49,82]</sup>。因而,组蛋白 H<sub>1</sub> 激酶活性已被广泛用作鉴别 MPF 的一个重要指标。

MPF 能够催化 lamin 磷酸化,使 lamina 结构解体。人们早已发现,lamin 在细胞分裂期处于高度磷酸化状态,并从 lamina 结构中解离出来;在细胞分裂结束时,lamin 去磷酸化,再重新构建 lamina 结构<sup>[10,24,25,40,89~91]</sup>。G.race 等人<sup>[25]</sup>推测 lamina 的解体与重建可能是 lamin 的酶促磷酸化所引起的。Fisher 等人<sup>[18]</sup>通过 cDNA 克隆推导出了 lamin A 和 C 的氨基酸序列,显示出 lamin 分子中具有能够发生磷酸化的特殊位点。Ward 和 Kirschner<sup>[115]</sup>观察了鸡胚胎细胞核在非细胞体系中由 MPF 活性诱导的 lamina 解体及细菌表达的 lamin C 在体外组装的纤维经 MPF 诱导而解聚,认为 MPF 能够促使 lamin C 的特殊位点磷酸化。Heald 和 Mckee 则进一步通过定点突变的方法使 lamin A 的 Ser-22 和 Ser-392 氨基酸残基被更换,使其在此二位点不能发生磷酸化,结果阻止了 lamina 在分裂期解聚。最近,Dessev 等人<sup>[10]</sup>更直接地证明,将去垢剂处理纯化的青蛤卵母细胞核与免疫沉淀技术去除 p34<sup>cdc2</sup> 的分裂期青蛤卵非细胞体系一起温育,则细胞核的 lamin 不能解聚,lamin 不被磷酸化,当加入人的 p34<sup>cdc2</sup>/p62 复合物后,lamin 随之被磷酸化,lamina 解聚。由此可见,lamin 的磷酸化是由 MPF 所特异催化的;MPF 催化 lamin 磷酸化,是促使 lamina 结构解体的直接原因。

MPF 作用于微管蛋白,控制着细胞周期中微管的动力学变化。在细胞周期的不同时期,微管有着不同的存在形式。有的相对稳定,如中心粒微管,有的则处于组装与去组装的动态变化状态,如纺锤体微管。纺锤体微管的动态变化与细胞分裂时染色体的运动密切相关。在微管的周围,还存在一些与微管相结合的微管伴随蛋白(microtubule-associated protein,MAP)和 Tau 蛋白质(也是一种微管伴随蛋白),这些伴随蛋白对微管空间结构的稳定及微管的组装起协调作用。有资料表明,MPF 与微蛋白的动态变化有关<sup>[42,65,69,79,112,113]</sup>。但 Masuda 等人<sup>[65]</sup>证明,提纯的具有活性的 p34<sup>cdc2</sup> 激酶-cyclin B 复合体本身并不能引起微管蛋白聚集成微管。因而推测,微



管蛋白聚集成微管是通过由 p34<sup>cdc2</sup> 激酶调节的下游路径所激发的。由于微管的动态变化过程是一个十分复杂的过程,必然涉及许多因素参与调节。目前虽然已经观察到 MPF 参与了微管的动态变化过程的调节,但这种调节的机制和方式目前仍不清楚。

MPF 能使 nucleolin 磷酸化,可能对于 M 期核仁分解以及核仁染色体凝集具有重要作用<sup>[4,90,91]</sup>。

MPF 能够使一些原癌基因发生磷酸化,产生一系列与细胞分裂有关的生物学效应,如 MPF 使 c-myc 原癌基因产物磷酸化,可能降低这些磷酸化的蛋白质在 M 期与 DNA 结合的功能,利于染色体凝集<sup>[62]</sup>;使 p60<sup>src</sup> 蛋白磷酸化,参与细胞骨架的重排<sup>[81]</sup>。使癌基因产物 p105Rb<sup>[44]</sup>、p60<sup>c-src</sup><sup>[81]</sup>、p53<sup>[8,108]</sup>、c-Abl<sup>[43]</sup>、c-myc<sup>[62]</sup>、SW15<sup>[80]</sup>;还可以使其它多种蛋白发生磷酸化,如 RNA 聚合酶 II<sup>[9]</sup>、myosin 轻链<sup>[104]</sup>、Caldesmon<sup>[63,121]</sup>、GTP 结合蛋白<sup>[3]</sup>、HMG<sub>1</sub><sup>[95]</sup> 等,产生一系列有关的生理效应。由此可见,MPF 在卵母细胞和一般体细胞由 G<sub>2</sub> 期向 M 期转化调节过程中处于中心位置,起着不可替代的重要作用。

## 8. CSF 研究的深入及其生化本质

由前面可见, cyclin 和 p34<sup>cdc2</sup> 共同构成 MPF。MPF 活性的表现促进卵母细胞成熟和体细胞由 G<sub>2</sub> 期向 M 期转化; CSF 对 MPF 活性起稳定作用。由于 CSF 的作用,成熟的卵细胞才能一直被维系在分裂中期。又由于 CSF 活性只在生殖细胞中出现,卵细胞一旦受精, CSF 活性立即消失,所以, CSF 和 MPF 不可能为同一种物质。CSF 的本质是什么?这一问题在 1988 年以前依然悬而未决,直到最近几年逐步得以阐述。

一些相关的研究发现,原癌基因 c-mos 编码一种 Ser/Thr 蛋白质激酶<sup>[72]</sup>。c-mos 也至少在脊椎动物的生殖细胞中高效表达<sup>[29,41,84,94,101]</sup>。进一步研究发现,在孕酮诱导非洲爪蟾卵母细胞成熟过程中,其 c-mos 基因产物 p39<sup>mos-xe</sup> 的合成得到促进;而且, p39<sup>mos-xe</sup> 是 MPF 活性的表现和生发泡破裂所必需的;将合成的 c-mos RNA 注射到二细胞期胚胎的一个卵裂球中,能够将此卵裂球抑制在分裂中期。用免疫沉淀反应去除内源性 p39<sup>mos</sup> 的卵提取物将失去分裂抑制作用;因而断定 c-mos 基因产物是一种 CSF<sup>[101,103]</sup>。c-mos 基因产物的蛋白质激酶活性在卵母细胞成熟过程中与 MPF 活性相伴随(图 2)。

## 9. 卵母细胞成熟与卵裂的综合调控

### 9.1 卵母细胞成熟

两栖类卵母细胞的成熟过程由第一次成熟分裂前期开始并持续到第二次成熟分裂的中期。在此过程中,两个最为显著的生化活动是 MPF 和 CSF 活性的充分表现。MPF 直接催化一些与细胞分裂有关的蛋白质磷酸化,促使细胞由间期向 M 期转化。CSF 则促进和维持 MPF 活性的充分表现,使细胞维系在 M 期状态。由此可见,MPF 是卵母细胞成熟分裂的中心调控物