

# 卵母细胞在细胞周期调控研究中的贡献

桂建芳\*

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

[摘要] 本文在回顾卵母细胞成熟促进因子的发现、卵母细胞体外系统的应用、周期蛋白的发现和成熟促进因子的提纯及其成份的鉴定等一系列研究的基础上, 评述了卵母细胞在细胞周期调控研究中的贡献, 并由此提出天然雌核发育银鲫的卵母细胞是一个独特的尚待开拓的研究系统。

[关键词] 卵母细胞, 细胞周期, 体外系统, 天然雌核发育, 银鲫

细胞周期调控是近几年来细胞生物学和分子生物学中最活跃的研究领域之一, 在《Nature》、《Science》和《Cell》等国际重要学术期刊上, 几乎每期都有有关细胞周期调控研究的报道, 并常有专刊问世。这些研究不但阐明了细胞周期运行以及细胞生长、分化、发育、衰老和死亡的分子机制, 而且正在揭示细胞周期调控与细胞癌变的关联。然而, 纵观细胞周期调控研究的历史, 它虽是一个多学科综合协作的发展史, 但发展进步的关键主要来自于对卵母细胞的研究。这里, 特就卵母细胞在细胞周期调控研究历程中几个重要的研究事例及其贡献作一评述, 并力争从中找到一些有益的启示。

## 1 成熟促进因子的发现——细胞周期调控研究的里程碑

细胞周期调控研究的开创者是 Masui 和 Markert<sup>[1]</sup>。他们在 60 年代末至 70 年代初在豹蛙 (*Rana pipiens*) 成熟卵母细胞的细胞质中鉴定出成熟促进因子 (maturation-promoting factor, 简称 MPF)。1993 年 12 月, 美国的 NIH 研究杂志在“研究里程碑”栏目中, 重登了 Masui 和 Markert 于 1971 年发表于《J. Exp. Zool》上的论文, 并刊载了专访评论, 给予了高度评价<sup>[2]</sup>。

现今在加拿大多伦多大学工作的原日本籍学者 Yoshio Masui 教授, 在接受编者的采访时回顾说, 他于 1966 年以访问学者身份从日本来到美国耶鲁大学, 加入当时的生物学系主任 Clement Markert 教授的研究组。在用企鹅胚胎完成了一个项目之后, Markert 建议 Masui 选择较便宜的实验材料, 为返回当时仍处于穷困的日本作准备。当时, Masui 在读到一篇俄国学者 Dettlaff 等关于长垂体激素诱导蛙卵成熟的论文后, 迅速选用豹蛙作材料, 并采用我国朱洗教授建立的卵母细胞离体成熟系统(注: Masui 1971 年发表于《J. Exp. Zool》上的论文引用了朱洗的两篇文章。俄国女学者 Tatiana Dettlaff 1960 年曾在朱洗教授的实验室访问工作, 她的工作是在朱洗教授研究的基础上发展起来并介绍到西方去的), 很快取得了新的发现。在重复并修正了 Dettlaff 等人研究的基础上, Masui 以他精确的胚胎学技能和敏锐的观察力很快证明, 垂

\* 1994 年度国家杰出青年科学基金获得者。

本文于 1995 年 5 月 26 日收到。

体激素和孕酮都不能直接诱导卵母细胞成熟。他认为,孕酮可能是通过作用于卵母细胞的表面,使卵质中诱生出导致减数分裂的因子。接着,他首先去掉了卵核,再用孕酮处理这些去核了的前期 I 卵母细胞,然后将这无核的卵质转移到未成熟的卵母细胞中去。结果发现,这一卵质和从成熟的卵母细胞中抽提的卵质一样,都能诱导胚泡破裂(Germinal Vesicle Breakdown, GVBD),导致成熟。Masui 认为,卵母细胞在成熟过程中产生了促进卵母细胞成熟的活性因子,这种活性因子被称为 MPF<sup>[2]</sup>。

此后,一批发育和细胞生物学家相继在海星卵母细胞、人 HeLa 细胞、酵母、和小鼠卵母细胞中都鉴定出了 MPF,因此认为促成成熟因子和促有丝分裂因子是相同的,形成了 M-期促进因子的一般概念,并认为该因子在从酵母直到哺乳动物这些真核细胞中是保守的<sup>[3]</sup>。

Masui 的工作发表后,并没有很快引起细胞和分子生物学家们的关注。直到 80 年代,当体外受精研究、原癌基因及其与细胞分裂关系的研究以及酵母遗传与细胞周期调控的研究风行欧美时,这三大研究领域的学者们才共同认识到 Masui 工作的先进性和重要性。1993 年,美国杜克(Duke)大学细胞生物学系的年轻教授 Katherine Swenson 女士在接受 NIH 的编辑采访时说:“Masui 不是作浮夸文章的人,从他实验室出来的结果是周密而坚实的。他的工作建立了良好的知识框架,引导了包括我在内的许多人的实验研究”。美国儿童健康和人类发展研究所人口研究中心主任 Florence Haseltine 女士评价得更为生动,她说:“Masui 的 MPF 如同帽钩,可把任何东西挂在上面。它是一项无可挑剔的工作。当发现新的结果时,你不得不说它与 MPF 是如何相关”<sup>[2]</sup>。

## 2 卵母细胞体外系统——研究细胞周期调控的理想模式

事实上,使 Masui 名声大振的研究是在其工作基础上发展起来的卵母细胞体外系统(in vitro system)的应用。由于从成熟蛙卵中提取的非细胞体外系统含有胚胎早期快速分裂的必要物资,是 DNA 的合成、染色质组装、核形成和转录所需酶和前体分子的材料库<sup>[4]</sup>。根据提取液的制备方式,体外系统可用于核组装(间期提取液,interphase extracts)、去组装(分裂提取液,mitotic extracts)以及核组装和去组装多轮循环(周期性提取液,cycling extracts)的细胞周期体外调控研究<sup>[5]</sup>。

用  $Ca^{++}$  离子载体或在无蛋白合成(通过加入放线菌酮(cycloheximide)而达到)的条件下破碎以激活卵子获得的提取液为间期提取液。间期提取液中 MPF 失活了,可用来进行细胞核体外重建,将脱膜精子、染色体和外源 DNA<sup>[5,6]</sup>加入此提取物,并加入 ATP 再生系统,可以模拟细胞周期由 M 期向  $G_1$  期转化的过程,诱发形成结构完整的间期核。

分裂期提取液是通过加入 EGTA 螯合  $Ca^{++}$  以及  $\beta$ -甘油磷酸和 ATPYS 抑制去磷酸酶的条件下提取的,这样的提取液仍保持在细胞分裂状态,MPF 具有活性。将间期核置于分裂提取液中温育,可观察到细胞周期由间期向 M 期的转化事件,如核膜破裂、染色体凝缩和纺锤体形成等<sup>[5]</sup>。

周期性提取液与间期提取液基本类似,其差异在于它是通过电休克或离子载体先激活卵子,诱导  $Ca^{++}$  释放。在这样的条件下制备的提取液仍保持有蛋白合成的能力,可产生导致 S 期和 M 期波动的周期蛋白(cyclin)分子<sup>[7]</sup>。

卵母细胞提取液体外系统的优势是其所含的蛋白成份都自然存在于细胞分裂状态,在研

究期间,可以调节转化到间期状态,因而给细胞周期调控的分子研究提供了许多便利。在此基础上,还发展出采用同步培养获得处于  $G_0, G_1, S, G_2$  和  $M$  这些特定时相的培养细胞提取液的体外系统<sup>[8]</sup>。这些体外系统的结合更加速了细胞周期调控研究的进程,推进了一个繁荣的研究时代。

### 3 周期蛋白的发现——海胆卵母细胞的贡献

周期蛋白也是从研究卵母细胞发现的。80年代初,英国剑桥大学的 Tim Hunt 教授作为蛋白合成专家,来到美国位于 Woods Hole(在马萨诸塞州)的海洋生物学实验室,讲授夏季课程。在这里,丰富的海胆卵资源、装备精良的实验室和一批胚胎学家们的研究成就为 Tim Hunt 的研究创造了新的条件和机遇。

Tim Hunt 教授在回顾周期蛋白发现前后时说:“周期蛋白是一件幸运地发现。1982年7月22日,那是一个非常宁静的日子,我纯属出于好奇,作了一个简单的实验。我将<sup>35</sup>S标记的蛋氨酸加到受精的和单性发育激活了的海胆卵子,并在一定的时间间隔取样,置于 SDS-PAGE 胶上电泳,以比较受精卵和单性发育激活卵中蛋白合成的类型和速率。结果发现,当绝大多数蛋白带随着发育愈来愈强时,一个早期表现很强的蛋白带在1小时消失了。这一结果是完全没有料到的,具有很强的诱惑力。反复的进一步实验表明,这一蛋白还可再出现和消失,其出现和消失呈现出周期性,因而被命名为周期蛋白。它消失于细胞分裂前10分钟。当用秋水仙素或用抑制 DNA 合成来抑制细胞分裂时,周期蛋白的降解则被延缓或不降解。这些结果在极为愉快的心境中写就成文<sup>[9]</sup>,因为我们发现了人们多年来寻找的周期蛋白。”<sup>[10]</sup>。

随后,周期蛋白在青蛤、海星、酵母、果蝇以及脊椎动物爪蟾中都先后被发现和证实,并分离克隆出了周期蛋白 A 和周期蛋白 B 的基因。研究表明,在这些物种中,周期蛋白的分子量处于 45—60 kD 之间;在受精卵早期卵裂和细胞分裂过程中,都是在间期合成和积累,至  $G_2$  晚期达到高峰,随着细胞分裂,再陡然下降<sup>[10,11]</sup>。

### 4 成熟促进因子的提纯及其成份的鉴定——细胞周期调控研究的飞跃

自发现 MPF 后,包括 Masui 在内的一批学者都想提纯它,但成效甚微。与此同时,除上述关于周期蛋白的研究正开始显露出周期蛋白与 MPF 的关联<sup>[9,10]</sup>外,一批酵母遗传学家的工作从另一侧面也敲开了细胞周期调控的大门。他们以芽殖酵母和裂殖酵母为研究对象,分别鉴定分离出了 *cdc28* 和 *cdc2* 突变体及其基因,其表达蛋白为 P34<sup>[12]</sup>。研究还发现,P34<sup>[12]</sup> 必须与周期蛋白(cyclin)结合形成复合体后才具有活性,从而导致细胞进入有丝分裂<sup>[12]</sup>。

但至此为止,学者们还未追索到 *cdc2* 和 MPF 之间的联系。直到 80 年代末,Masui 在加拿大的学生 Manfred Lohka 来到美国科罗拉多大学生物化学家 James Maller 的实验室从事博士后研究,才从爪蟾卵母细胞体外系统中提纯了 MPF<sup>[13]</sup>。几乎与此同时,一批英法学者从海星的卵母细胞体外系统也提纯了 MPF<sup>[14]</sup>。接着鉴定发现,MPF 由两个蛋白组成,一个是酵母 P34<sup>[12]</sup> 的同源物<sup>[15,16]</sup>,另一个是在 80 年代初由英国学者 Tim Hunt 等最先在海胆中发现,后来在青蛤、海星、果蝇、酵母和爪蟾中相继鉴定并克隆了的周期蛋白 B<sup>[14-15]</sup>。至此,来自于不同领域和不同研究系统的发育生物学家、生物化学家、细胞生物学家、遗传学家和分子生物学家才汇于一处,由此明白了 MPF 这个近 20 年来令人甚为困惑的因子就是 *cdc2* 和 cyclin B 形成

的复合体,是细胞周期调控的关键因子<sup>[2,17]</sup>。不同领域的学者,采用不同的研究系统、从不同的角度探讨后最终汇合在一起而揭示出一个共同谜底,这的确是科学发展史上一个协作研究的成功范例,是细胞周期调控研究的一次飞跃。

此后,细胞周期调控研究的热潮陡然高涨。在短短的几年内,不但发现和克隆了一系列的在不同时期推动细胞周期运转的因子<sup>[3]</sup>,揭示出了大量的在细胞周期不同时相调控细胞周期运转的依赖于周期蛋白的蛋白激酶(cyclin-dependent protein kinases, CDKs)<sup>[18]</sup>,鉴定出了调节这些激酶和因子的内源信号和外源信号<sup>[19,20]</sup>,而且开始找到了一系列在不同时期阻止细胞周期运转的抑制因子,如 P16, P21, P27 等<sup>[21-24]</sup>,并开始找到了这些抑制因子与细胞癌变的联系<sup>[25-27]</sup>。

## 5 天然雌核发育银鲫的卵母细胞——一个独特的尚待开拓的研究系统

综上所述,卵母细胞及卵母细胞体外系统在细胞周期调控研究历程中作出了创造性的贡献,可谓是突破一点,带动全面。事实上,由于生命始于受精卵,有关卵母细胞成熟、受精和发育的调控机制历来是生命科学研究的焦点。1994年,我在美国参加了一次细胞周期调控研究的专题讨论会,从专家的报告了解到,不少从事细胞周期调控研究的专家仍对卵母细胞系统情有独钟,Masui等建立的有关卵母细胞操作技术仍是当代学者所需求的手段之一。

雌核发育是存在于脊椎动物中的一种罕见的生殖方式<sup>[28]</sup>。天然雌核发育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)尤其独特,是我国鱼类细胞工程育种实践的特色和创新,具有很大的理论研究意义和应用价值,是一个具有很大开拓潜力的研究系统<sup>[28]</sup>。近十几年来,我们实验室继发现银鲫特殊的雌核发育方式培育出具有明显生长效应的异育银鲫之后,对其“天然雌核发育”的特性和规律进行了系统的细胞学研究。迄今,我们不但对银鲫雌核发育的特性和规律有了一些新认识,而且在异育银鲫人工繁育群体中发现了具有212个染色体的复合四倍体个体<sup>[29]</sup>,同时还发现复合四倍体异育银鲫的卵子具有两种不同的发育方式——异精雌核发育和拟两性融合发育<sup>[30-31]</sup>。为了开拓这一研究系统,我于1992—1994年在美国进行了一期博士后研究。在此研究期间,不但鉴定、纯化并克隆出了一种新的在细胞周期中调控RNA剪接因子在细胞内定位的激酶<sup>[8,32]</sup>,而且对细胞周期调控研究的历史和现状以及近期的发展趋势有了一定的了解,并深受启发。

显然,银鲫天然雌核发育分子机制的阐明及其调控基因的鉴定和分离,不仅对揭示鱼类的雌核发育机制具有重要意义,而且有可能揭示出调控卵母细胞发育、成熟和受精这些生命发生基本过程中的某些关键因子。因此,天然雌核发育银鲫的卵母细胞是一个独特的尚待开拓的研究系统。

## 参 考 文 献

- [1] Masui Y, Markert C L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.*, 1971, **177**:129-145.
- [2] Steinberg J, Haglund K. The Landmark Interviews. *The J. NIH Research*, 1993, **5**:63-74.
- [3] Minshull J. Cyclin synthesis; who needs it? *BioEssays*, 1993, **15**:149-155.
- [4] Almouzni G, Wolffe A P. Nuclear assembly, structure, and function; the use of *Xenopus* in vitro system. *Exp. Cell Res.*, 1993, **205**:1-15.

- [5] Pfaller R, Newport J W. Nuclear envelope assembly following mitosis. *Methods in Enzymology*, 1992, **219**:60—72.
- [6] Hartl P, Olson E, Dang T, Forbes D J. Nuclear assembly with  $\lambda$  DNA in fractionated *Xenopus* egg extracts: an unexpected role for glycogen in formation of a higher order chromatin intermediate. *J. Cell Biol.*, 1994, **124**:235—248.
- [7] Murray A W, Kirschner M W. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, 1989, **339**:275—280.
- [8] Gui J -F, Lane W S, Fu X -D. A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle. *Nature*, 1994, **369**:678—682.
- [9] Evans T, Rosenthal E T, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 1983, **33**:389—396.
- [10] Hunt T. Finding cyclins and after. Wolfe SL. *Molecular and Cellular Biology*. 1993, pp. 930—931. Wadsworth Publishing Company.
- [11] Lewin B. Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners, and substrates. *Cell*, 1990, **61**:743—752.
- [12] Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*, 1990, **344**:503—508.
- [13] Lohka M J, Hayes M K, Maller J L. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**:3009—3013.
- [14] Labbe J C, Picard A, Peaucellier G, Cavadore J C, Nurse P, Doree M. Purification of MPF from starfish: identification as the H<sub>1</sub> histone kinase p34cdc2 and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell*, 1989, **57**:253—263.
- [15] Arion D, Meijer L, Brizuela L, Beach D. cdc2 is a component of the M-phase-specific histone H<sub>1</sub> kinase; evidence for identity with MPF. *Cell*, 1988, **55**:371—378.
- [16] Gautier J, Minshull J, Lohka M, Glotzer M, Hunt T, Maller J L. Cyclin is a component of MPF from *Xenopus*. *Cell*, 1990, **60**:487—494.
- [17] Kirschner M. The cell cycle then and now. *Trends Biochem. Sci.*, 1992, **17**:281—285.
- [18] Doree M, Galas S. The cyclin-dependent protein kinases and the control of cell division. *FASEB J.*, 1994, **8**:1114—1121.
- [19] Charbonneau M, Grandin N. A hypothesis on p34cdc2 sequestration based on the existence of Ca<sup>++</sup> coordinated changes in H<sup>+</sup> and MPF activities during *pis* egg activation. *Biol. Cell*, 1993, **74**:105—112.
- [20] Dunphy W G. The decision to enter mitosis. *Trends in Cell Biol.*, 1994, **4**:202—207.
- [21] Nasmyth K, Hunt T. Dams and sluices. *Nature*, 1993, **366**:634—635.
- [22] Hunter T, Braking the cycle. *Cell*, 1993, **75**:839—841.
- [23] Hengst L, Dulic V, Slingerland J M, Lees E, Reed S I. A cell cycle regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**:5291—5295.
- [24] Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G<sub>1</sub> cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 1994, **78**:67—74.
- [25] Nobori T, Miura K, Wu D J, Lois A, Takabayashi K, Carson D A. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 1994, **368**:753—756.
- [26] Spruck C H, Gonzalez-Zulueta M, Shibata A, Simoneau A R, Lin M. -F, Gonzales F, Tsai Y C, Jones P A. p16 gene in uncultured tumours. *Nature*, 1994, **370**:183—184.
- [27] Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*, 1994, **79**:573—582.
- [28] 桂建芳. 单性脊椎动物的进化遗传学. *自然杂志*, 1989, **12**(2):116—121.
- [29] 桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲等. 异育银鲫人工繁育群体中复合四倍体的发现及其育种潜力. *科学通报*, 1992a, **37**(7):646—648.
- [30] 桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲等. 人工复合四倍体异育银鲫雌核发育生殖方式的初步证明. *科学通报*, 1992b, **37**(9):836—838.
- [31] 桂建芳, 梁绍昌, 朱蓝菲等. 人工复合四倍体异育银鲫卵子应答父本种精子和母本种精子两种不同发育方式的发现. *科学通报*, 1992c, **37**(11):1030—1033.
- [32] Gui J -F, Tronchere H, Chandler S D, Fu X -D. Purification and characterization of a kinase specific for the serine-and arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1994, **91**:10824—10828.

## ROLES OF OOCYTES IN STUDIES ON CELL CYCLE REGULATION

Gui Jianfang

(*Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

**Abstract** The roles of oocytes were evaluated in studies of cell cycle regulation by reviewing the finding of maturation-promoting factor (MPF), the application of oocyte in vitro system, the discovery of cyclins, the purification of MPF and the identification of MPF components. Moreover, the oocytes of natural gynogenetic silver crucian carp were thought to be a unique exploitable study system.

**Key words** oocytes, cell cycle, in vitro system, natural gynogenesis, silver crucian carp

· 信 息 ·

### 我国测定的两元素原子量成为国际标准

《科技日报》与首都两院院士共同评出的 1995 年中国十大科技新闻中,有化学科学部资助的中国科学院院士、北京大学教授张青莲等 5 位科学工作者合作测定的两种元素铕(Eu)和铈(Ce)的原子量成为国际原子量新标准。张青莲教授的研究成果是 1995 年 8 月被国际纯粹与应用化学联合会原子量与同位素丰度委员会(简称国际原子量委员会)审定为新标准值的。

原子量是某元素一个原子的平均质量与一个 $^{12}\text{C}$ 原子质量的 1/12 之比,为自然科学中的一项基本常数。其精密测量代表着一个国家的科技水平。世界上只有包括中国在内的 3 个国家进行这种研究。国际原子量委员会两年一次开会进行评估,发表总结评述,选取最好的校准数据为国际原子量标准。

在国家自然科学基金的支持下,张青莲教授研究组多年来从事同位素的研究,在理论和实验方面均有较高造诣。他们对 H,C,N,O,S 等轻元素及 In, Sb, Ir, Eu, Sm 等金属元素的原子量进行了系统的标准测定工作,取得了一些国际先进水平的成绩。1993 年国际原子量委员会曾采用他们测定的铈原子量( $\text{Sb } 121.760 \pm 0.001$ )作为新的原子量标准。1995 年又把他们测定的铕、铈两种元素原子量作为标准( $\text{Eu } 151.964 \pm 0.001$ ,  $\text{Ce } 140.116 \pm 0.001$ )。

这是我国原子量测定工作对自然科学作出的新贡献。

(化学科学部 韩万书 供稿)