

卵母细胞减数分裂的抑制与启动的生化机理*

赵志勇

(中国科学院发育生物学研究所)

卵子的发生,是一种在形态和物质上都极为复杂的变化过程,这个过程基本上经历了三种细胞形式——卵原细胞、卵母细胞和卵子。在卵原细胞向卵母细胞转化之时,减数分裂开始,并以排出第二极体结束。在整个减数分裂过程中,出现有两次中途停止的现象(以脊椎动

物为模式),称为减数分裂停滞(meiotic arrest)^[16,43]第一次是在第一次减数分裂前期的双线期(diplotene stage)。减数分裂停止后,卵母细胞便进行生长、结构建造和卵黄积累等活动。

* 感谢严绍颐教授给本文提出宝贵的意见。

然后,减数分裂再重新启动。从再次启动到第二次减数分裂中期这一阶段通常称为卵母细胞成熟时期。成熟活动以染色质浓缩和生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)为开始的标志。在生发泡破裂之前,有一个启动过程。如果将这一过程[以爪蟾(*Xenopus laevis*)为例]——从孕酮处理卵母细胞到诱导50%的生发泡破裂(0—1 GVBD₅₀)划分为10个单位,那么,0—1/10单位为初阶段,2—6/10为中阶段,6/10—1为后阶段^[24]。所谓成熟的卵子,其减数分裂实际上并未完成,而是停止在第二次减数分裂中期;这便是第二次减数分裂停滞。它需要精子入卵来重新启动后才能完成,排出第二极体^[27]。有些无脊椎动物的卵母细胞仅有一次减数分裂停滞,处在第一次减数分裂前期(海滨蛤, *Spisula*; 海星, *Anthenea*),或中期(毛翼虫, *Chaetopterus*);相当于第一次减数分裂停滞。那么,是什么因素使得减数分裂中途停止和重新启动呢?这些因素的作用机制如何呢?本文将着重讨论第一次减数分裂停滞和启动的调节。

(一) 抑制因子 继 Chang^[7]用兔滤泡液抑制了离体培养的卵母细胞成熟之后,陆续又发现了猪、牛、绵羊、鼠以及人等的滤泡液和颗粒细胞提取液的抑制作用^[39,44]。它们不仅抑制裸露的卵母细胞的自然成熟,而且还能够抑制由促黄体生成素(LH)诱导的、被卵丘细胞包裹着的卵母细胞的成熟^[44]。这种抑制作用未发现有种类的特异性^[44],例如,不仅哺乳动物种间可以相互起作用,而且人的滤泡液对爪蟾的卵母细胞也同样起作用^[39]。此外,海滨蛤肌肉和生殖腺的提取液不仅能够抑制自己和毛翼虫的卵母细胞的成熟,而且还能够同双丁酰环腺苷 dbcAMP)一起抑制小鼠卵母细胞的成熟^[34]。应用高效液相色谱等方法,已经从几种哺乳动物的滤泡液和颗粒细胞提取液中分离出这类具有抑制作用的物质。它们是一些热稳定性多肽,分子量一般小于6千道尔顿(KDa)^[39,44]。这些被称为卵母细胞成熟抑制因子(oocyte maturation inhibitor, OMI)的小分子量物质,是

由颗粒细胞合成的,通过卵丘细胞作用于卵母细胞^[37,44]。OMI抑制卵母细胞成熟的机制被认为是提高卵母细胞内部的环-磷酸腺苷(cAMP)的浓度^[42];然而,海滨蛤因子(*Spisula factor*)则是阻止促成熟因子的出现^[35]。

Downs 和 Eppig (1984)指出,猪滤液中除了热稳定性多肽外,还有其它的抑制因子^[12]。如腺嘌呤^[15]和次黄嘌呤^[10,15]。腺嘌呤进入卵母细胞中参加合成ATP,从而促进了cAMP的增加。次黄嘌呤则是阻止cAMP的水解^[15],它在卵丘细胞中转变为黄嘌呤或鸟嘌呤基,再通过间隙连接进入卵母细胞中^[11]。不仅碱基,一些核苷,如双丁酰环腺苷(dbcAMP)、双丁酰环鸟苷(dbcGMP)、环焦磷酸腺苷(cAPP)等也同样具有抑制作用^[8,30,31,35,36]。Sato等认为至少要有两种因子共同作用于被滤泡细胞包裹着的卵母细胞,才能使其减数分裂停止。其中OMI是很重要的因子,此外是与焦磷酸腺苷有关的物质^[36]。

(二) 诱导因子 滤泡细胞、颗粒细胞和卵丘细胞在脑垂体分泌的促性腺激素的刺激下,所产生的类固醇物质直接作用于卵母细胞,激发其成熟^[48]。这些物质被称为成熟诱导物质(maturation-inducing substance, MIS)。孕酮、皮质酮、皮质醇、雌二醇以及它们的衍生物等都能有效地诱导鱼类^[48]和两栖类^[27]卵母细胞的成熟。现已在爪蟾的卵母细胞膜上发现了孕酮的受体,是110 KDa的蛋白质。体外培养的裸露的哺乳动物卵母细胞可以自然成熟,而包裹在卵丘细胞内的则需要激素的诱导^[16,27]。海星的辐射神经支持细胞分泌的一种与脊椎动物促性腺激素相似的多肽物质,能够刺激滤泡细胞产生1-甲基腺嘌呤(1-MA),诱导卵母细胞成熟^[27,35]。

(三) 钙离子 海滨蛤、毛翼虫等无脊椎动物的卵母细胞在不含Ca²⁺的培养基中不能进行成熟活动^[27]。爪蟾卵母细胞在不含Ca²⁺、Mg²⁺的任格氏液(Ringer's solution)中对孕酮的诱导不发生反应^[27]。调钙蛋白和二价离子载体A23187在含Ca²⁺培养基中起到相当于

MIS 的作用^[6,25,27]。通过显微注射 Ca^{2+} 、调钙蛋白、 Ca^{2+} 载体 IP_3 、螯合物、亲钙蛋白等研究发现, Ca^{2+} 发挥调节作用的部位是在卵母细胞内部, 紧靠细胞膜^[25,27]。用 ^{45}Ca 标记和显微注射水母发光蛋白方法, 证明了卵母细胞在 MIS 的作用下, 能够从培养基中吸收 Ca^{2+} , 在生发泡破裂前达到最大吸收率^[25,27]。 Ca^{2+} 起初与卵母细胞膜上的 MIS 受体结合在一起, 当 MIS 与受体结合后, 便被释放出来, 发挥其作用^[27]。 Ca^{2+} 在调节卵母细胞成熟方面的作用是调节某些蛋白质因子的活性, 如磷酸二酯酶 (PDE)^[24,27]、细胞抑制因子 (CSF)^[25,32] 等。

(四) **Mp 蛋白质及蛋白质磷酸化与去磷酸化作用** 在海胆、蛤^[27]、两栖动物、哺乳动物等^[29]的卵母细胞中均发现了这样一些蛋白质, 它们与成熟的启动有密切的关系^[17,29]。因此被称为 Mp 蛋白质^[29]。在海胆和蛤的卵母细胞中, 40 KDa 的 Mp 蛋白质 (Mp-40) 是核糖核酸还原酶的一个亚基, 51 KDa 和 58 KDa 的是环化素 (cyclin)^[27]。在小鼠卵母细胞中 Mp-29 和 Mp-30 与生发泡有密切的关系。它们并非组蛋白 I, 而相当于核质素 (nucleoplasm), 与核仁的形成有关。其磷酸化部位是酪氨酸残基^[14]。

减数分裂的抑制和启动与有关的蛋白质磷酸化和去磷酸作用密切相关。在爪蟾的卵母细胞中, 某些蛋白质 (如 20 KDa 和 32 KDa) 处于磷酸化状态时, 具有抑制减数分裂的作用。用孕酮处理后, 它们便去磷酸化, 从而启动了减数分裂^[9]。未成熟的小鼠卵母细胞中的蛋白激酶 C 被激活后, 能抑制其成熟。此抑制作用与 13 KDa 和 80 KDa 的蛋白质磷酸化有关^[14]。如果将磷酸酶-1 的抑制因子-1 注射到爪蟾和小鼠的卵母细胞中, 会抑制或推迟 MIS 诱导的生发泡破裂^[22,24]。

然而, 在 MIS 处理的后阶段, 则需要某些蛋白质磷酸化水平的增高, 以促进生发泡破裂^[25,27,29]。这种磷酸化水平的增高往往是突发性的^[29]。 α -磷酸萘酚能够抑制酸性和碱性磷酸酶的活性, 使蛋白质磷酸化水平增高。如果把它

注射到海星卵母细胞中, 能够促进生发泡破裂^[32]。Endo 等把小鼠卵母细胞中与成熟活动有关的蛋白质分为三类^[14]。第一类, 从生发泡时期到生发泡破裂这段时间, 磷酸化水平不断增加; 而从减数分裂开始直到受精后, 磷酸化水平则不断降低。第二类, 磷酸化水平在成熟过程中逐渐降低, 但受精后又增高。第三类, 磷酸化水平在成熟过程中基本保持稳定, 但受精后则增高。

(五) **cAMP 及 cAMP 依赖性蛋白激酶** 在 MIS 诱导成熟的过程中, 伴随着卵母细胞内部 cAMP 浓度的大幅度下降^[25,27]。那些能够使 cAMP 浓度增高的物质, 如霍乱毒素、3-异-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、茶碱、鞘蕊花素 (forskolin) 等, 都能够抑制生发泡的破裂^[3,25-28,42]。cAMP 的作用是调节依赖于 cAMP 的蛋白激酶的活性。这种酶催化其底物磷酸化, 使之转变为具有抑制生发泡破裂的分子形式^[5,24,25]。cAMP 依赖性蛋白激酶可以直接催化蛋白质磷酸化, 将 ATP γ 位磷酸转到丝氨酸和苏氨酸残基上^[33]。此酶由两种亚基构成, 即催化亚基 (C) 和调节亚基 (R)。当 R 与 cAMP 结合时, 开启 C, 使之发挥催化作用。反之, 若 R 与 cAMP 脱离, 它就回来与 C 结合, 使之失去活性^[24,33]。显微

$$R_2C_2 + 4cAMP = [R(cAMP)_2]_2 + 2C$$
注射该酶的抑制因子使之活性降低, 结果使磷酸化的 Mp 去磷酸化, 促进了生发泡破裂^[24]。可见, cAMP 依赖性蛋白激酶是调节减数分裂的重要酶系统之一。当然, 与之相对的便是催化蛋白质去磷酸化的磷酸酶系统^[22,24]。

cAMP 是腺苷酸环化酶催化 ATP 所转化的产物^[25]。卵母细胞中的此酶能被 MIS 所抑制, 但能被鞘蕊花素所激活^[38]。然而, 在滤泡细胞和卵丘细胞中也有这种酶。其有两方面的功能, 一是在促性腺激素的诱导下, 合成类固醇激素; 二是在 OMI、鞘蕊花素、霍乱毒素等的作用下合成 cAMP, 并通过间隙连接进入卵母细胞^[3,13,26,38,41]。可见, 卵母细胞内 cAMP 的增加有内源和外源两个途径。

MIS 使卵母细胞内 cAMP 浓度降低, 是通过降低腺苷酸环化酶的活性, 并同时激活磷酸二酯酶 (PDE) 来实现的^[24]。PDE 催化水解 cAMP, 转变为 5'-AMP^[4,25]。PDE 的活性受 Ca²⁺ 和调钙蛋白 (CaM) 的调节。Ca²⁺ 与 CaM 结合所形成的复合体再与 PDE 结合使之激活^[24]。但是, PDE 又受其抑制因子和 IBMX



的抑制^[3,22,42]。dbcAMP 以竞争底物的方式阻止 cAMP 的水解。除了水解 cAMP 外, PDE 还具有抑制腺苷酸环化酶的作用^[24]。

另外, Nemoto 等^[31]报道了在海星卵母细胞中, 调节蛋白激酶的是 cGMP, 而不是 cAMP。cGMP 依赖性蛋白激酶早已在细胞中发现了^[34]。

(六) 促成熟因子 Masui 最早在豹蛙 (*Rana pipiens*) 的卵母细胞中发现了促成熟因子 (maturation-promoting factor, MPF)^[27]。目前在许多两栖动物^[24,25]、哺乳动物^[3,16,27]、以及海星^[33]等卵母细胞中都已发现。它在 MIS 的诱导下出现^[27]。不仅卵母细胞, 在其它类型的细胞以及酵母中也发现了 MPF。MPF 能促使染色质浓缩, 核膜破裂和纺锤体形成, 是一种有丝分裂的促进因子^[1,24,25,27]。当有丝分裂结束和卵子受精后, MPF 的活动便消失^[25]。对于去核的卵母细胞块, MIS 仍可诱导 MPF 的产生。说明 MPF 是不依赖于细胞核的相对独立的细胞

质因子^[1,27]。在 MIS 处理后的后阶段, MPF 出现并不断增加。MPF 的增加不被放线菌酮所抑制, 但是放线菌酮在 MPF 出现之前则可完全抑制生发泡破裂。被放线菌酮抑制了的细胞, 注射了外源 MPF 后, 仍能使核膜破裂^[25]。由此可见, MPF 的作用并不影响蛋白质的合成活动, 而 MPF 的出现以及在细胞周期中的变化都依赖于蛋白质的合成^[25]。

MPF 是一类蛋白激酶, 分子量一般为 0.6—1.0 × 10³KDa。Cyert 等用单克隆抗体免疫沉淀 MPF, 发现它呈焦磷酸化状态^[9]。MPF 一旦出现就迅速增加, 因为它具有自我催化磷酸化的能力^[27,28]。它的活性可被磷酸酶消除。但是, 在海星卵母细胞中, 1-MA 在诱导 MPF 出现的同时, 又抑制了磷酸酶的活性^[28], 从而保证了 MPF 的活性的不断增强。而且, α-磷酸萘酚能够间接地增高 MPF 磷酸化水平^[33]。除了磷酸酶外, 海滨蛤因子及鞘蕊花素也能抑制 MPF 的出现和自我激活^[23,35]。CSF 能抑制 MPF 的活动^[25,32]。MPF 的底物在其催化下磷酸化后, 能促使染色质浓缩, 生发泡破裂和纺锤体形成^[25,28]。Meijer 等已经发现了海星卵母细胞生发泡膜上的一种板层蛋白质 (lamina protein) 能被 MPF 磷酸化^[28], 说明 MPF 的底物与细胞核有密切的关系。同 cAMP 依赖性蛋白激酶一样, MPF 也是将 ATP 位磷酸转移到底物的丝氨酸和苏氨酸残基上^[28]。但是, 至少有两点差别是明显的; 第一, 两者起作

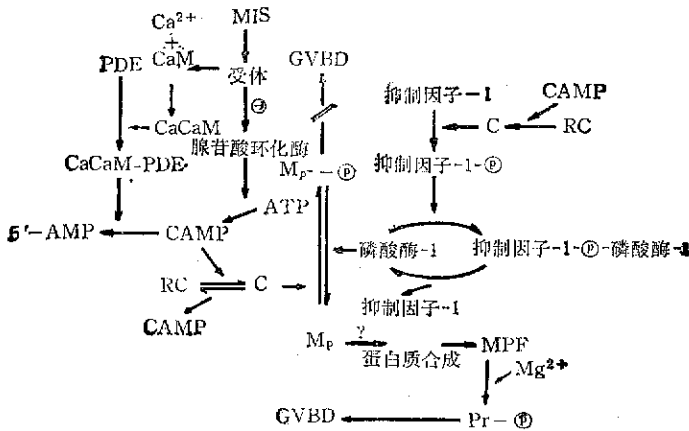


图1 卵母细胞减数分裂的抑制与启动

用的时期不同。前者是在减数分裂启动的初阶段,后者在中阶段。第二,两者的底物在磷酸化状态下的作用不同。前者的底物抑制生发泡破裂,而后者的却是促进生发泡破裂。此外,MPF的催化活动需要 Mg^{2+} ^[25,28],而且不受cAMP的影响^[35]。

(七) 结束语 减数分裂的抑制与启动依赖于卵母细胞内Mp蛋白质的磷酸化和去磷酸化的相互转化。对此cAMP依赖性蛋白激酶和MPF是两种重要的激酶系统,与之相对应的是各种磷酸酶。围绕着这些酶系统,存在着一系列的调节活动。OMI和MIS就是调节这些酶活动的外界因子,cAMP和 Ca^{2+} 是内部因子。然而,在调节cAMP浓度方面,PDE则是主要的酶,而它是受 Ca^{2+} 的调节(见图1)。

虽然减数分裂的调节机制有了一点线索,但是还有许多尚待解决的问题。然而,最终将要提这样的问题,在卵子发生过程中为什么要出现减数分裂停滞?它的生理意义是什么?

参 考 文 献

- [1] Balakier, H. and Y. Masui 1986 Chromosome condensation activity in the cytoplasm of anucleate and nucleate fragments of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 113: 155—159.
- [2] Bar-Ami, S. and A. Tsafirri, 1986, The development of meiotic competence in the rat: Role of hormones and of the stage of follicle development. *Gamete Res.* 13: 39—64.
- [3] Bornslaeger, E. A. and R. M. Schultz 1985 Regulation of mouse oocyte maturation: Effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biol. Reprod.* 33: 698—704.
- [4] Bornslaeger, E. A. et al. 1984 Regulation of mouse oocyte maturation: Involvement of cyclic AMP phosphodiesterase and calmodulin. *Dev. Biol.* 105: 488—499.
- [5] Boyer, J. et al., 1986 Progesterone and cAMP-dependent protein kinase regulated *in vivo* the level of phosphorylation of two proteins (Mr 20,000 and Mr 32,000) in *Xenopus* oocyte. *Dev. Biol.* 113: 420—428.
- [6] Carroll, Z. G. and W. R. Eckberg 1986 Inhibition of germinal vesicle breakdown and activative of cytoplasm contractivity in *Spisula* oocytes by calmodulin antagonists. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 170: 43—50.
- [7] Chang, M. C. 1955 The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation activation, fertilization and subsequent development in Fallopian tube. *J. Exp. Zool.* 128: 378—399.
- [8] Cho, W. K. et al 1974 Inhibitory effect. of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* 187: 383—386.
- [9] Cyert, M. et al. 1985 Isolation of monoclonal antibodies that precipitate maturation promoting factor. *Cell Differ.* 16 suppl., 180.
- [10] Downs, S. M. et al. 1985 Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation on a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 82: 454—458.
- [11] Downs, S. M. et al. 1986 Maintenance of murine oocyte meiotic arrest: Uptake and metabolism of hypoxanthine and adenosine by cumulus-cell-enclosed and denuded oocytes. *Dev. Biol.* 117: 174—183.
- [12] Downs, S. M. and J. J. Eppig 1984 Cyclic adenosine monophosphate and ovarian follicular fluid act synergistically to inhibit mouse oocyte maturation. *Endocrinol.* 114: 418—427.
- [13] Ekholm, C. et al. 1984 Stimulation and inhibition of rat oocyte meiosis by forskolin. *Biol. Reprod.* 30: 537—543.
- [14] Endo, Y. et al. 1986 Stage-specific changes in protein phosphorylation accompanying meiotic maturation of mouse and fertilization of mouse eggs. *J. Exp. Zool.* 239: 401—409.
- [15] Eppig, J. J. et al. 1985. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: Concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol. Reprod.* 33: 1041—1049.
- [16] Eppig, J. J., 1985 Oocyte-somatic cell interactions during oocyte growth and maturation in the mammal. In: "Developmental Biology", Browder, L. W. (ed). 1: Oogenesis. 313—347, Plenum Press, New York and London.
- [17] Evans, T. et al. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389—396.
- [18] Greely, M. S. et al. 1986. Oocyte maturation in the nummichog (*Fundulus heteroclitus*): Effects of steroids on germinal vesicle breakdown of intact follicle *in vitro*. *Gen. Comp. Endo.* 62: 281—298.
- [19] Hillensjö, T. 1977 Dissociation of preovulatory maturational events in rat oocytes and cumuli in the presence of dibutyryl cyclic AMP. *Acta Physiol. Scand* 100: 261—263.
- [20] Hubbard, C. J. 1985 The effects of forskolin and LH on cAMP changes and maturation in the follicle-enclosed oocytes of hamster. *Acta Endocrinol.* 110: 413—420.
- [21] Huchon, D. et al. 1981. The pure inhibitor of cAMP-dependent protein kinase initiates *Xenopus laevis* meiotic maturation. *Md. Cell Endocrinol.* 22: 211—222.
- [22] Huchon, D. et al. 1981 Protein phosphatase-1 is involved in *Xenopus* oocyte maturation. *Nature* 294: 358—359.
- [23] Kwon, H. B. and A. W. Schuetz 1985 Dichotomous effects of forskolin on somatic and germ cell components of the ovarian follicle: Evidence of cAMP in-

- volvement in steroid production and action. *J. Exp. Zool.* **236**: 219—228.
- [24] Maller, J. L. 1985. Oocyte maturation in amphibians. In: "Developmental Biology", Browander, L. W. (ed). 1: Oogenesis, 289—311. Plenum Press, New York and London.
- [25] Maller, J. L. 1985 Regulation of amphibian oocyte maturation. *Cell Differ.* **16**: 211—221.
- [26] Maller, J. L. et al. 1979 Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **254**: 579—582.
- [27] Masui, Y. and H. J. Clarke, 1979, Oocyte maturation. *Intern. Rev. Cytol.* **57**: 286—291.
- [28] Meijer, L. et al. 1986 Protein phosphorylation and oocyte maturation, II. Inhibition of starfish oocyte maturation by intracellular microinjection of protein phosphatase 1 and 2A and alkaline phosphatase. *Exp. Cell Res.* **163**: 489—499.
- [29] Moor, R. M. and I. M. Crosky 1986 Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **94**: 209—220.
- [30] Nekola, M. A. and D. M. Smith 1975 Failure of gonadotropins to induce *in vitro* maturation of mouse oocytes treated with dibutyryl cyclic AMP. *J. Exp. Zool.* **194**: 529—534.
- [31] Nemoto, S. and K. Ishida, 1985, Involvement of cyclic GMP in regulation of starfish oocyte maturation. *Cell Differ.* **16** Suppl.: 182.
- [32] Newport, J. W. and M. W. Kirschner, 1984 Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. *Cell* **37**: 731—742.
- [33] Pondaven, P. and L. Meijer 1986 Protein phosphorylation and oocyte maturation. I. Induction of starfish oocyte maturation by intracellular microinjection of a phosphatase inhibitor -naphthylphosphate. *Exp. Cell Res.* **163**: 477—488.
- [34] Rubin, C. S. and D. M. Rosen 1975 Protein phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* **44**: 831—887.
- [35] Sato, E. et al., 1985 Meiotic arrest in oocytes regulated by a *Spisula* factor. *Biol. Bull.* (Woods Hole) **169**: 334—341.
- [36] Sato, E. et al. 1985 Modulation of oocyte maturation by cyclic adenosine 3', 5'-pyrophosphate. *Cell Differ.* **17**: 169—174.
- [37] Sato, E. et al. 1986 Mouse oocyte maturation modulated by a granulosa cell factor and by heparin and heparan sulfate. *Gamete Res.* **13**: 115—124.
- [38] Sato, E. and S. S. Koide, 1984a, Forskolin and mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **230**: 125—129.
- [39] Sato, E., and S. S. Koide 1984b. A factor from bovine granulosa cells preventing oocyte maturation. *Differ.* **26**: 59—62.
- [40] Schultz, A. W. and J. Rock 1982 Stimulatory and inhibitory effects of human follicular fluid on amphibian oocyte maturation and ovulation *in vitro*. *Differ.* **21**: 41—44.
- [41] Schultz, R. M. et al. 1983 Regulation of oocyte maturation in the mouse: Possible roles of intercellular communication, cAMP, and testosterone. *Dev. Biol.* **95**: 294—304.
- [42] Schultz, R. M. et al. 1983 Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in commitment to resume meiosis. *Dev. Biol.* **97**: 246—273.
- [43] Tsafiriri, A. et al. 1982 The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J. Reprod. Fert.* **64**: 541—551.
- [44] Tsafiriri, A. and S. H. Pomerantz 1986 Oocyte maturation inhibitor. *Clinics Endocrinol. Metab.* **15**: 157—170.