

小鼠胚胎紧密化现象分子基础的研究进展

李 汶, 卢光琇

(中南大学 湘雅医学院 人类生殖工程研究室, 中国湖南 长沙 410078)

摘要:就小鼠植入前胚胎紧密化过程中胚胎的形态变化、细胞极化、细胞间连接及紧密化的物质基础、时控机制等作了综述.对紧密化现象的分子基础研究大多数都集中在翻译后水平的调控,而在基因水平的研究较少.

关键词:紧密化;小鼠;植入前胚胎

中图分类号:Q343

文献标识码:A

文章编号:1007-7847(2002)S0-0001-04

Advances in Molecular Basis for Compaction of Mouse Embryos

Li Wen, LU Guang-xiu

(Reproductive Engineering Lab of Xiangya Medical School of Central South University,
Changsha 410078, Hunan, China)

Abstract: During mammalian preimplantation development after fertilization, there are three morphological changes, which include pronuclei forming, compaction at 8-cell stage and blastocyst forming. In this review, morphological changes, cell polarity and junctions between blastomeres during compaction, and materials involved in compaction and timing of compaction are discussed. Most researches about molecular basis for compaction focus on post-translation modification other than on genes.

Key words: compaction; mouse; preimplantation development

(Life Science Research, 2002, 6(Suppl.): 1~4)

差别基因表达(differential gene expression)是哺乳动物胚胎发育过程中细胞分化的分子基础.在哺乳动物精卵结合形成合子至植入前的发育阶段,发生的形态变化事件有原核形成、8-细胞期胚胎紧密化和囊胚的形成.关于8-细胞胚胎细胞分化机制有两种假说:极化假说(polarization hypothesis)和内外微环境假说(inside-outside microenvironment hypothesis).前者认为细胞以顶基方向形成顶-基轴后,下一次细胞分裂以垂直与顶-基轴方向横裂为两个子细胞:顶区在外,为极性细胞;基侧区在内,为非极性细胞.由于两个子细胞所获得的细胞成分不同而最终导致细胞的分化命运不同.而后者认为由于紧密化所形成的紧密连接封闭了

胚内部细胞与外界环境之间的直接通路,导致外表细胞与内部细胞分化形成不同的细胞系.由此可见,卵裂球的分化开始于紧密化的发生.

1 紧密化现象的形态学改变和细胞极化

研究表明,在小鼠植入前胚胎的发育过程中,一直到8-细胞胚胎早期,每个卵裂球仍是全能性的(totipotent),具有分化形成各种类型的组织乃至发育成正常个体的潜能;各个卵裂球仍是独立的,能在体视镜下清晰可辨.随着8-细胞胚胎晚期紧密化现象(compaction)的发生,细胞由圆变扁(flatting),细胞间由点状接触变为紧密相嵌,难以区分

收稿日期:2002-04-09;修回日期:2002-05-10

作者简介:李汶(1968-),女,湖南双峰人,助理研究员,中南大学博士研究生,专业方向为生殖遗传学,电话:+86-0731-4805300;卢光琇(1939-),女,湖北天门人,中南大学湘雅医学院教授,博士生导师,从事生殖遗传学研究, E-mail:lgxdirect@sina.com.

各个卵裂球的边界;卵裂球间形成各种连接,包括间隙连接、粘附连接、紧密连接,形成一个真正的胚胎。间隙连接为卵细胞间小于 1 000 Da 的分子运输提供通道,这些分子多为代谢物,但也可以是如 cAMP 等的第二信使;粘附连接通过钙依赖的细胞质外周质区粘附素家族成员相互作用来促进细胞间的联系;紧密连接则形成渗透封闭,以阻止

细胞间小分子(如 Na^+ 、 Cl^- 等)的通过。这些连接的形成,使原来松散接触、对称分布、无细胞间通讯的胚胎状态转化为互相通讯、高度极化的紧密联系的整体^[1]。

在紧密化过程中胚胎细胞表面和细胞成份的分布均发生高度极化(polarization),形成顶区(apical domain)和基侧区(basolateral domain)(图 1)。

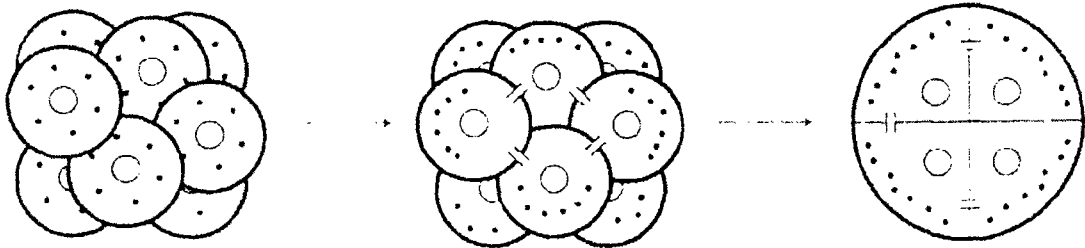


图 1 紧密化过程示意图

粗圆弧线表示有微绒毛存在区;细线表示无微绒毛区;小点表示细胞质极化的成分,如内含小泡、肌动蛋白纤维等;小圆圈示细胞核;短平行线表示间隙连接和紧密连接。在紧密化的起始阶段,细胞间开始相互作用,间隙连接和紧密连接开始形成,内含小泡、肌动蛋白纤维等胞质成分出现极化;接着细胞开始扁平化接触,细胞表面出现极化;同时整个胚胎中的细胞核都位于卵裂球的基底侧(胚胎中心侧)。

Fig.1 Schematic diagram depicting the events that occur during compaction

The thick lines of the circles represent the presence of microvilli. The small dots represent elements of cytoplasmic polarity, e.g. endocytotic vesicles and actin filaments. During the initial stages of compaction cell-cell interactions, both gap and tight junctions form (depicted by parallel lines) and cytoplasmic polarity can be observed. These early events are then followed by cell flattening and the development of surface polarity (the thick lines represent microvillar regions, whereas the thin lines represent anmicrovillar regions). Also note that the nucleus becomes basolaterally localized in the fully compacted embryo.

有实验结果提示细胞表面和细胞核位置是中国仓鼠胚胎紧密化前细胞极化的最先表现,早在 8-细胞期已发生,而且细胞核迁移的方向可能与细胞质中微管再分布的方向平行^[2]。一些实验结果表明,胞质极化对 nocodazole、细胞松弛素等破坏细胞骨架的因素非常敏感。如:用 nocodazole 处理后,虽然不抑制胚细胞间的扁平化接触(flattening)和连接通讯,却抑制胞质极化;放线菌素 D 处理既抑制胚细胞间的扁平化接触(flattening)和连接通讯,同时也抑制胞质极化。表面极化(surface polarity)对这些抑制因子有更好的抵抗能力,一旦表面极化建立起来,就能稳定保持,并在有丝分裂后仍然维持。而且,极化并不需要延续的细胞间接触,用实验室方法去紧密化后及在分离开的卵裂球中极化仍然维持^[1]。

2 紧密化现象发生的物质基础

研究表明,紧密化的发生并不需要预先的

DNA 复制过程,也不一定需要 4-细胞期的蛋白质合成。蚜栖菌素(一种 DNA 聚合酶抑制剂)处理后,四细胞胚的卵裂休眠,却与对照组胚胎在同一时间开始发生细胞扁平化接触和极化。蛋白质合成抑制剂处理后的 4-细胞胚卵裂失败,却同样进行极化和细胞接触扁平化。因此,4-细胞期胚胎可能含有某些紧密化所需的蛋白质。抑制蛋白质合成导致提前紧密化(premature compaction)发生,提示胚胎中含有抑制紧密化的某种活性因子,而表达和维持这种因子活性则需要蛋白质的合成。目前尚不知道这种活性因子是什么分子^[1]。

2.1 与紧密化现象密切相关的蛋白质

已知有蛋白激酶 C、E-钙粘蛋白、 β -连环蛋白等几种蛋白分子可能与紧密化密切相关。

在早期发育中已知蛋白激酶 C(PKC)是受精和胚胎紧密化两个转变期起作用的蛋白激酶。PKC 参与许多细胞活动的调节,特别是细胞分化和增殖的调控。PKC 是一个酶家族,已知有 $\text{PKC}\alpha$ 、

β I、 β II、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 9种同工酶.其中 PKC α 、 β I、 β II、 γ 是一类 Ca²⁺ 依赖的或常规的蛋白激酶 C (cPKC); PKC δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 、 θ 是另一类不依赖 Ca²⁺ 的或新型的蛋白激酶 C (nPKC). 前者的活性依赖 Ca²⁺、二酰甘油 (DG) 及 Ca²⁺ 磷脂酰丝氨酸 (PS), 后者的活性只依赖 DG/PS 或 PMA/PS. PKC 的底物很多, 有 1) 与信号转导有关的底物 (如生长因子受体等), 2) 与控制代谢有关的底物 (如膜上的通道和泵), 3) 调节基因表达的底物 (如转录因子、翻译因子及次一级的激酶等). 尤其是控制细胞增殖的 3 种 PKC 底物蛋白: DNA 拓朴异构酶 I、Lamin B 及 MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate, 富丙氨酸豆蔻酸化的 PKC 底物). Pauken CM 等的实验结果证明在小鼠植入前胚胎中存在 7 种构形的 PKC, 其中一些是母源性的, 另一些似乎是受精后表达的^[3].

E-钙粘蛋白, 又叫桑椹(胚)粘着蛋白, 在钙依赖的紧密化事件中起作用; 其抗体抑制紧密化, 但不抑制间隙连接的细胞间通讯或表面极化, 但胞质和表面极化不再沿原来细胞间接触的垂直方向轴而发生. 在小鼠胚胎中, 在 8-细胞期启动的 E-钙粘蛋白介导的细胞粘附通过蛋白激酶 C 及其他信号分子进行翻译后调节. E-钙粘蛋白在紧密化过程中组织卵裂球的皮质极化^[4]. 研究证明早期胚胎中并不含有有功能的 E-钙粘蛋白基因, 即使在发生紧密化时也是这样; 这可能是因为持久活性的母源储备的 E-钙粘蛋白转录子存在. 在卵子和植入前胚胎的所有阶段均可检测到 E-钙粘蛋白的表达, 其表达量在 4-细胞期和 8-细胞期之间迅速减少, 随后在囊胚期显著增加. 伴随 E-钙粘蛋白的表达变化方式, 其在植入前胚胎中的分布位置也发生明显的变化, 在未受精卵中, E-钙粘蛋白主要分布于卵胞质中, 卵子表面则只有痕迹量存在; 其在受精后 6~11 h 卵子表面的分布量似乎与卵子活性一致, 而研究证明 E-钙粘蛋白与极体排出无关. E-钙粘蛋白在卵裂球表面的分布方式一致, 都集中与卵裂球接触的区域. 在紧密化过程中 E-钙粘蛋白在细胞间接触区域积累, 而在非接触区域相应地减少; 而且紧密化的 8-细胞胚中 E-钙粘蛋白与 β -连环蛋白联合分布^[1].

因为 PKC 的活化因能诱导小鼠胚胎紧密化的提前发生, 则在诱导发生的紧密化中有细胞粘附系统的蛋白质成员磷酸化, 而这些蛋白质成员

紧密化现象中这些蛋白质应当也发生磷酸化. 新的、更特异的蛋白激酶 C 的活性抑制剂将抑制正常发育和诱导实验中的紧密化的发生^[5].

Beta-连环蛋白在胚胎早期发育中的作用涉及细胞粘附、细胞信号传导、发育方向的调控等; 在诱导和自然状态的紧密化中 Beta-连环蛋白的丝氨酸或/和酪氨酸残基发生磷酸化^[5]. Beta-连环蛋白是小鼠卵子成熟和着床前发育中的一大酪氨酸残基发生磷酸化蛋白质. 在小鼠着床前发育过程中, E-钙粘蛋白-连环蛋白复合体的组分来自母源储存和合子基因活化粘着复合体以不活化形式不断累积和储存, 准备为紧密化的发生及滋养外胚层形成所用^[7].

2.2 紧密化现象中钙离子的变化

损耗细胞外 Ca⁺⁺、干扰细胞内 Ca⁺⁺ 的调节 (如阻断 Ca⁺⁺ 离子通道, 抑制钙调整作用, 整合包质内在自由 Ca⁺⁺ 等)、干扰细胞骨架等处理, 均会引起紧密化的胚胎去紧密化. 在去紧密化过程中, 胚胎细胞内有持续、稳定、均一的 Ca⁺⁺ 浓度上涨. 但试验证明非特异性的 Ca⁺⁺ 浓度上涨并不导致去紧密化. 未紧密化的胚胎, 在上述处理中没有 Ca⁺⁺ 浓度的变化^[6].

在紧密化过程中, E-钙粘蛋白与 fodrin 共同分布于细胞相接触区域, 去紧密化后, 则发生去区域化, 在此过程中肌动蛋白在皮质层的分布并不变化^[6].

以上试验提示着维持紧密化形态是 Ca⁺⁺ 调控的, 通过调控细胞骨架成分的重新分布 (而不是重新合成) 而实现.

3 紧密化发生的时控机制

紧密化发生的时控机制尚不知道. 核质比虽然能加速紧密化的发生和囊胚的形成, 但在调节胚胎形态发生中并没有直接起作用. 然而, 一种在 1-细胞期和 2-细胞期有所改变的细胞质调节因子以浓度依赖方式调节小鼠植入前胚胎的形态发生, 尤其是紧密化^[8]. 在 4-细胞胚胎中已有足够数量的紧密化所需的物质存在. 用蛋白激酶 C 的激活剂佛波二酯处理 4-细胞胚, 能在 15 min 内诱导紧密化的发生; 处理时间延长则导致去紧密化, 这可能是因为随后微丝和微管解聚所致. 用二酰甘油酸 (diacylglycerides) (一种更天然的蛋白激酶 C 激活剂) 处理 4-细胞胚, 同样诱导紧密化的发生,

抑制剂鞘氨醇能抑制上述实验所诱导的提前发生的紧密化现象,而鞘氨醇本身能抑制正常状态的 8-胚胎的紧密化发生.有研究表明紧密化的发生由一种不依赖于第三次细胞周期完成的生物钟所调控;已知蛋白激酶 C 调节器与提前紧密化现象有关,二酰甘油酸依赖的激酶(而不是蛋白酪氨酸酶)可能是紧密化的上调因子^[9].有实验结果证实二酰甘油酸依赖的激酶促进(upregulate) β -连环蛋白的再分布和紧密化的发生,意味着在适时的紧密化发生中所必需的既不是酪氨酸激酶也不是酪氨酸磷酸酶,紧密化的发生与 β -连环蛋白的酪氨酸磷酸化没有因果关系^[10].上述实验结果提示:实验中观察到的与蛋白激酶 C 活性相关联对应的紧密化现象与自然状态下所发生的紧密化现象是十分相似的.同时,E-钙粘蛋白的单克隆抗体不仅能阻断正常的紧密化现象,也能阻断佛波二酯诱导的 4-细胞胚的紧密化现象,说明 E-钙粘蛋白在这种提前紧密化现象中起作用^[1].

前述研究结果提示翻译后修饰可能控制着紧密化发生的时间.人们首先在 8-细胞胚中观察到 E-钙粘蛋白磷酸化,很可能与紧密化有关;而无钙培养基中培养胚胎,其 E-钙粘蛋白磷酸化被抑制,同时其紧密化现象也被抑制.然而,蛋白激酶 C 诱导的磷酸化在紧密化过程中的作用尚不清楚,在蛋白激酶 C 活化因子诱导的提前紧密化中并没有伴随 E-钙粘蛋白磷酸化的上升;同时,二甲基氨基嘌呤(是一种相对非特异性的蛋白激酶抑制剂)也能诱导提前紧密化的发生,但 E-钙粘蛋白磷酸化并不增加.相应而相反地,细胞松弛素 D 处理可抑制胚胎紧密化的发生,却并不减少伴随正常紧密化过程的 E-钙粘蛋白的磷酸化.即: E-钙粘蛋白磷酸化与紧密化现象可相分开存在.与紧密化现象发生的时控机制尚不清楚一样, E-钙粘蛋白磷酸化在 E-钙粘蛋白调节的细胞粘附特性中的作用也不清楚^[1].

4 结语

综上所述,对紧密化现象的分子基础还知之

甚少.大多数研究都集中在翻译后水平的调控,而在基因水平的研究较少.

参考文献(References):

- [1] BCJ M, FAUSER A J, RUTHERFRD R M S. Preimplantation embryo development. *Molecular Biology in Reproductive Medicine* [M]. USA: Published in the USA by The Parthenon Publishing Group Inc, 1999. 313-327.
- [2] SUZUKI H, AZUMA T, KOYAMA H, *et al.* Development of cellular polarity of hamster embryos during compaction [J]. *Biol Reprod*, 1999, 61(2): 521-526.
- [3] PAUKEN C M, CAPCO D G. The expression and stage-specific localization of protein kinase C isotypes during mouse preimplantation development [J]. *Dev Biol*, 2000, 223(2): 411-421.
- [4] FLEMING T P, SHETH B, FFESENKO I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis [J]. *Front Biosci*, 2001, 1(6): 1000-1007.
- [5] PAUKEN C M, CAPCO D G. Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: roles for PKC and beta-catenin [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54(2): 135-144.
- [6] ROXANA P, CLARISA V, GERALD S, *et al.* Increase of intracellular Ca^{2+} and relocation of E-cadherin during experimental decompaction of mouse embryos [J]. *Cell Biology*, 1998, 95(22): 12977-12982.
- [7] OHSUGI M, BUTZ S, KEMLER R. Beta-catenin is a major tyrosine-phosphorylated protein during mouse oocyte maturation and preimplantation development [J]. *Dev Dyn*, 1999, 216(2): 168-176.
- [8] LEE D R, LEE J E, YOON H S, *et al.* Compaction in preimplantation mouse embryos is regulated by a cytoplasmic regulatory factor that alters between 1- and 2-cell stages in a concentration-dependent manner [J]. *J Exp Zool*, 2001, 290(1): 61-71.
- [9] GOVAL J J, ALEXANDRE H. Effect of genistein on the temporal coordination of cleavage and compaction in mouse preimplantation embryos [J]. *Eur J Morphol*, 2000, 38(2): 88-96.
- [10] GOVAL J J, CAUWENBERGE A V, ALEXANDRE H. Respective roles of protein tyrosine kinases and protein kinases C in the up-regulation of beta-catenin distribution, and compaction in mouse preimplantation embryos: a pharmacological approach [J]. *Biol Cell*, 2000, 92(7): 513-526.