

MAPK 和 p90^{rsk} 在大鼠卵泡发育中的表达与活性*

于海泉^{①②} 孙青原^① 陈大元^① 旭日干^②

(^①中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080;

^②内蒙古大学实验动物研究中心 呼和浩特 010021)

摘要: 利用免疫组织化学方法研究丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 及其底物之一 p90^{rsk} 在大鼠卵泡发育过程中的表达与活性。结果表明, 非活性形式的 MAPK 存在于大鼠各生长期卵泡的卵母细胞和颗粒细胞中, 但磷酸化活性形式的 MAPK 只存在于部分具有分裂增殖活性的颗粒细胞中。MAPK 的作用底物 p90^{rsk} 只在各期卵泡的卵母细胞中表达, 在颗粒细胞中无着色, 说明 MAPK 信号级联在卵母细胞和颗粒细胞中具有不同的作用方式。另外, 胎鼠卵巢的免疫组化染色结果显示, MAPK 在卵原细胞增殖过程中具有活性, 表明 MAPK 信号级联在这一过程中起作用。

关键词: 大鼠; 卵泡发育; 丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK); p90^{rsk}; 卵母细胞; 颗粒细胞

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2002)04-27-04

The Expression and Activation of MAPK and p90^{rsk} during Folliculogenesis in Rat

YU Hai-Quan^{①②} SUN Qing-Yuan^① CHEN Da-Yuan^① BOU Shorgan^②

(^①Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080; ^②Research Center for Laboratory

Animal Science, Inner Mongolia University Huhhot 010021, China)

Abstract: The expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) and the expression of p90^{rsk}, one of the substrate of MAPK, in immature and mature rat follicle growth have been investigated by immunohistochemical staining with antibodies against ERK2, active MAPK and p90^{rsk}. The results show that ERK2 was expressed in both granulosa cells and oocytes at all stages of developmental follicles, whereas phosphorylated MAPK was detected only in some granulosa cells, which were in proliferation. Meanwhile, p90^{rsk} was exclusively expressed in oocytes, and could not be detected in granulosa cells, it maybe represented that the differences of the action pattern of MAPK cascade in oocyte and granulosa cell. The phosphorylation of MAPK was also detected in oogonia from fetal rat ovaries, suggesting that MAPK play a role in the mitosis of oogonia.

Key words: Rat; Follicle growth; Mitogen-activated protein kinases (MAPK); p90^{rsk}; Oocyte; Granulosa cell

* 国家自然科学基金项目 (No. 39970545), 内蒙古自然科学基金项目 (No. 99105), 国家重大基础研究项目 (No. G199055902) 及中国科学院知识创新工程项目资助;

第一作者介绍 于海泉, 男, 33 岁, 副研究员; 研究方向: 繁殖生物学。

收稿日期: 2001-09-01, 修回日期: 2002-03-10

丝裂原激活蛋白激酶 MAPK 属于丝/苏氨酸蛋白激酶,也被称为细胞外信号调节激酶(extracellular regulated kinase, ERK),是激素、生长因子、细胞因子和环境刺激等细胞外信号的中间传导物。MAPK 在体细胞普遍表达,其激活需要苏氨酸和酪氨酸残基同时磷酸化。这一激活过程是受一系列激酶调节的,MAPKKK/MAPKK/MAPK 级联将不同的细胞外信号转移至细胞内靶目标上^[1],从而调节细胞周期。MAPK 存在两种异构物 p42 ERK1 和 p44 ERK2,在受到外界刺激时,被迅速激活,活性的 MAPK 在细胞质和细胞核内都存在广泛的作用底物,通过细胞以及磷酸化转录因子、细胞骨架蛋白和其它蛋白激酶及酶类而起调节作用^[2,3]。

对于 MAPK 信号级联在卵母细胞成熟过程中表达与激活及作用的研究表明,在不同动物的卵母细胞 MAPK 可诱导卵母细胞减数分裂成熟的启动,或者参与后续事件的调控^[4,5]。另外,MAPK 在精子发生中也具有一定的作用,MAPK 可能参与原始精原细胞有丝分裂增殖和生精细胞减数分裂的启动,其活性在精子获能和顶体反应过程中增加^[6],我国学者的研究也表明,MAPK 与精子运动能力的获得有关^[7],但目前还未见到有关 MAPK 在卵子发生早期阶段的研究报道。早期卵泡发育缓慢以及体积较小是限制其研究的因素,卵泡的生长和分化对于繁殖的成功延续是关键的,有关调节卵泡发育的机制还不清楚,本研究利用免疫组织化学的方法对 MAPK 级联在大鼠卵泡发生中的表达与活性进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 免疫组化标本制作 雌性成年 Wistar 大白鼠以及妊娠 10 d 左右的雌性胎鼠用于卵巢收集,供体鼠断颈处死后,摘出卵巢置于含 4% 多聚甲醛的 PBS 固定液中,4℃ 过夜。固定后的卵巢经酒精梯度脱水,石蜡包埋。6 μm 切片贴片于事先用 0.5% poly-L-lysine 涂布的干净载片上,37℃ 温箱烘干后备用。

1.2 免疫组化染色 卵巢切片经二甲苯脱蜡,

梯度酒精复水。3% H₂O₂ 水溶液处理消除内源性过氧化物酶的活性,92 ~ 98℃ 枸橼酸盐缓冲液中微波炉处理 10 ~ 15 min 完成抗原修复后,利用辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素进行免疫组化染色。经 DAB 显色系统显色、苏木精衬染后封片观察。以正羊血清代替一抗作为阴性对照,每组试验重复至少 3 次。所用抗体及染色系统均购自美国 Santa Cruz Biotech. 公司中国代理。工作浓度见表 1。

表 1 抗体种类、作用时间及工作浓度

抗体及试剂	工作浓度	作用时间
Rabbit anti-ERK2 IgG	1:150	4℃, 过夜
Rabbit anti-active MAPK IgG	1:500	4℃, 过夜
Goat anti-90 ^{nm} polyclonal IgG	1:200	4℃, 过夜
Biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG	1:1 000	37℃, 1 h
Biotin-conjugated anti-goat IgG	1:1 000	37℃, 1 h
HRP-linked streptavidin	1:1 000	37℃, 1 h

2 结果与讨论

利用抗 ERK2 抗体、抗活性 MAPK 抗体和抗 p90^{nm} 抗体对大鼠卵巢组织切片进行免疫组织化学染色。结果表明 MAPK 信号级联在卵母细胞和颗粒细胞中具有不同的作用方式,MAPK 普遍表达于卵泡发育过程中各期的卵母细胞和颗粒细胞中,但多数以非活性形式存在(图版 I:1),活性形式的 MAPK 只存在于具有分裂活性的颗粒细胞中(图版 I:2,3);MAPK 的作用底物之一 p90^{nm} 只表达于卵母细胞中,在颗粒细胞中无着色(图版 I:4,5)。MAPK 还作用于卵原细胞增殖过程中,胎鼠卵巢切片的染色结果显示 MAPK 在这一过程中被磷酸化激活(图版 I:7)。

哺乳类卵子发生(oogenesis)起始于胎儿发育的早期阶段,原始生殖细胞的形成标志着卵子发生的开始。原始生殖细胞迁移至生殖嵴后失去运动能力成为卵原细胞。卵原细胞经过有丝分裂增殖,开始减数分裂,大鼠的卵原细胞减数分裂开始于出生前并在出生后即停止,之后被前颗粒细胞包围形成原始卵泡,原始卵泡群一旦形成便不断有卵泡被启动生长,目前对原始卵泡被激活生长以及卵泡发育的调节机制还

不清楚。卵泡是由卵母细胞及周围的颗粒细胞、膜细胞和基膜构成的。卵泡的生长首先表现为颗粒细胞被激活生长,由扁平的前颗粒细胞转型为立方型细胞,这一现象被认为是原始卵泡被激活的标志,但也有否定这一实验结论的报道^[8]。小鼠和大鼠初级卵泡大约出现在出生后第3 d的卵巢,次级卵泡出现在第5~7 d。

MAPK在多种动物卵母细胞的成熟分裂中起作用,其中包括海星、蛤、爪蟾、小鼠、大鼠、猪、牛、山羊、马和人等^[9]。由于动物种类的不同,MAPK的磷酸化激活或者与生发泡破裂(GVBD)同步发生从而调节卵母细胞的减数分裂成熟的重新启动^[10],或者发生在GVBD之后参与调节卵母细胞微管活动和染色体行为以及参与维持第二次减数分裂阻滞^[7,11]。本实验免疫组化的结果表明在卵泡发育过程中,虽然卵母细胞表达MAPK,但MAPK始终处于非活性状态,这也进一步证实MAPK主要作用于卵母细胞减数分裂成熟的重新启动或后续事件。

颗粒细胞与卵母细胞的发育关系密切,颗粒细胞不仅增殖快速而且同时进行分化并作用于卵母细胞的发育过程。在卵泡细胞中有大量的受体酪氨酸激酶、丝/苏氨酸激酶、细胞因子以及G蛋白偶联的和甾体激素受体等信号受体的表达。它们在卵泡发生阶段,尤其是早期阶段具有一定的作用^[12]。MAPK级联是体细胞普遍表达的信号转导通路,广泛存在于各种细胞中,MAPK的激活将许多细胞外信号传递至细胞核,对于细胞周期具有重要的调节作用。在本研究中,MAPK的磷酸化激活只发生在具有分裂活性的颗粒细胞,胎鼠卵巢的免疫组化染色结果也显示MAPK在卵原细胞的增殖过程中具有活性,表明MAPK级联在有丝分裂中具有一定的作用。

对于MAPK的底物的研究表明p90^{msk}只在卵母细胞中特异地表达,说明颗粒细胞与卵母细胞具有不同的MAPK级联途径,但p90^{msk}在二者中表达差异的原因还不清楚。虽然p90^{msk}是MAPK的生理底物,但p90^{msk}的激活可能还存在其它作用机制^[13]。Gavin等最近的研究表明,

一种p90^{msk}突变体可与失活和活性状态的MAPK结合,以阻断MAPK的激活,干扰爪蟾卵母细胞成熟,但并不阻断内源p90^{msk}的激活^[14]。对兔卵母细胞成熟过程中MAPK级联的研究也表明p90^{msk}的激活存在不依赖于MAPK的磷酸化激活(待发表)。这也说明MAPK信号级联的作用方式是多途径的,但有关p90^{msk}不依赖于MAPK的激活还有待进一步研究。

参 考 文 献

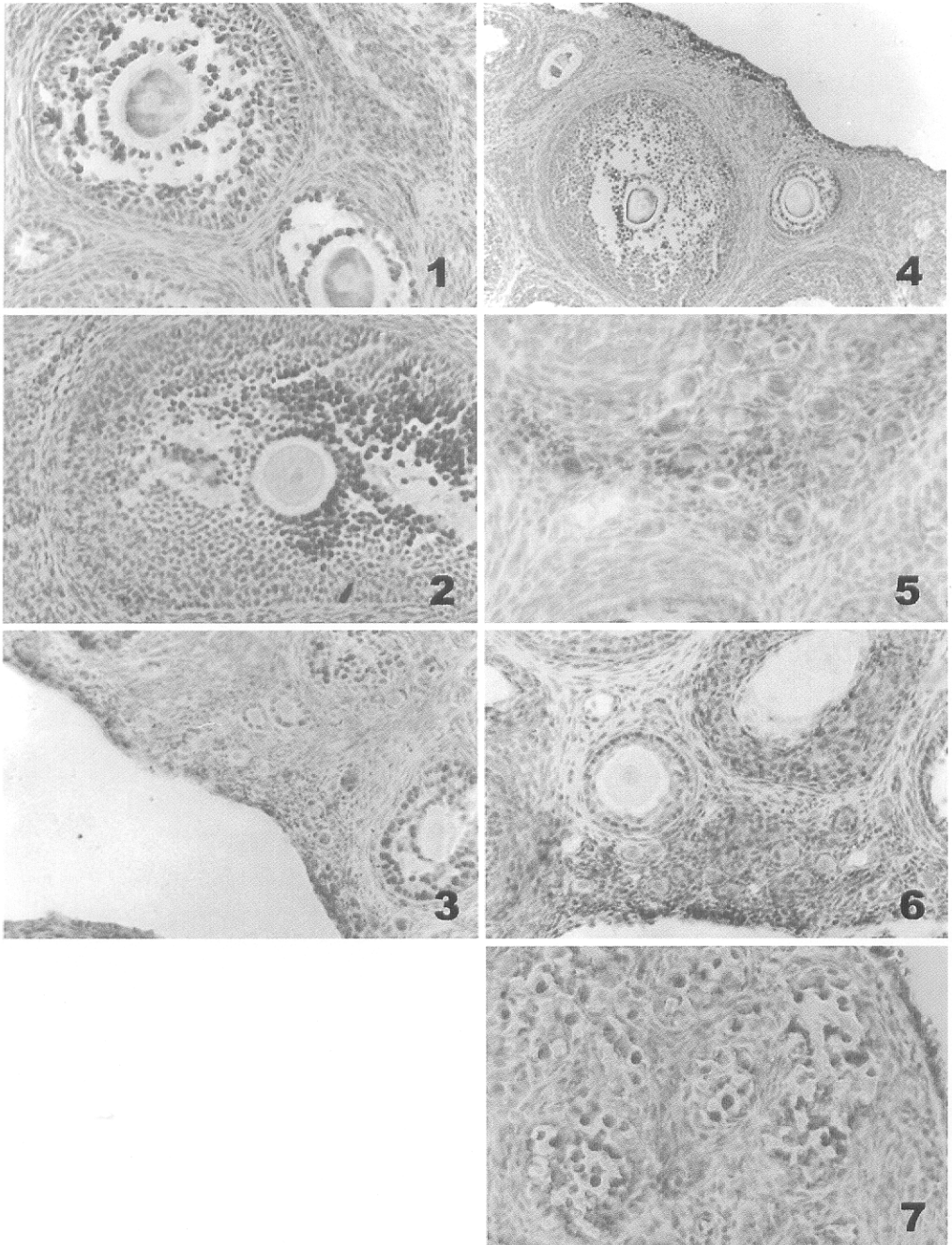
- [1] Gotoh Y, Nishida E. Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade. *Mol Reprod Dev*, 1995, 42:486~492.
- [2] Davis R J. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 1993, 268: 14 553~14 556.
- [3] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 1995, 9:726~735.
- [4] Inoue M, Naito K, Nakayama K *et al.* Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocyte. *Biol Reprod*, 1998, 58:130~136.
- [5] Dedieu T, Gall L, Croset N *et al.* Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol Reprod Dev*, 1996, 45:351~358.
- [6] Luconi M, Krausz C, Barni T *et al.* Progesterone stimulates p42 extracellular signal-regulated kinase (p42 ERK) in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4:251~258.
- [7] Lu Q, Sun Q Y, Duan C W *et al.* Expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinase during mouse spermatogenesis and epididymal sperm maturation in mice. *Archives Andro*, 1999, 43:55~66.
- [8] Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 145:27~37.
- [9] Sun Q Y, Blumenfeld Z, Rubinstein S *et al.* Mitogen-activated protein kinase in human eggs. *Zygote*, 1999, 7:181~185.
- [10] Fissore R A, He C L, Wande G F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod*, 1996, 55:1 261~1 270.
- [11] Zernicka-Goetz M, Verlhac M H, Geraud G *et al.* Protein phosphatases control MAP kinase activation and microtubule organization during rat oocyte maturation. *Eur J Cell Biol*, 1997, 72:30~38.
- [12] Sirard M A, Richard F, Mayes M. Controlling meiotic re-

sumption in bovine oocytes: a review. *Theriogenology*, 1998, **49**:483 ~ 497.

- [13] Kalab P, Kubiak J Z, Verkac M H *et al*. Activation of p90^{rk} during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggsz: MAP kinase-independent and-dependent activa-

tion. *Development*, 1996, **122**:1 957 ~ 1 964.

- [14] Gavin A C, Nidle A N, Chierici E *et al*. A p90^{rk} mutant constitutively interacting with MAP kinase uncouples MAP kinase from p34cdc2/cyclin B activation in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell*, 1999, **10**:2 971 ~ 2 986.



1. 非活性的 MAPK 存在于各生长期卵泡的卵母细胞和颗粒细胞; 2, 3. MAPK 的磷酸化激活只发生在具有分裂活性的颗粒细胞; 4, 5. p90^{msk} 的表达仅存在于卵母细胞中, 在颗粒细胞中无着色; 6. 阴性对照, 以正羊血清代替一抗染色; 7. 卵原细胞分裂增殖中 MAPK 处于磷酸化激活状态(放大倍数: 图 4 × 50; 其余 × 100)