# 激光共聚焦显微镜观察小鼠早期胚胎中PKB/Akt对微丝聚合的影响

武迪迪 具英花 孟 峻 刘 超 冯 晨 于秉治*

(中国医科大学基础医学院生化与分子生物学教研室, 沈阳 110001)

**摘要** 在本实验中我们用优化的免疫荧光化学法结合激光共聚焦显微技术，观察了微丝在小鼠卵细胞不同期的分布情况及PKB/Akt对小鼠卵母细胞和早期胚胎的微丝聚合的影响。结果显示，在小鼠卵母细胞及早期胚胎中均有微丝的表达，且主要集中在纺锤体处的质膜处、极体及分裂沟处。注射激活型PKB/Akt mRNA能够增强微丝的聚集。相反, 注射激酶失活型的PKB/Akt mRNA减弱了微丝的聚合。因而我们认为PKB/Akt可以影响小鼠卵细胞和早期胚胎的微丝聚集。

**关键词** 蛋白激酶B; 微丝; 小鼠卵母细胞; 小鼠受精卵 胚胎; 免疫荧光技术; 激光扫描共聚焦显微镜

受精卵早期发育的机制是一直深受细胞和发育生物学家关注的问题。其中细胞骨架对在哺乳动物卵母细胞正常发育、受精及早期发育具有相当重要的作用。哺乳动物卵母细胞和早期胚胎的细胞骨架具有其独特的分布和功能, 使卵母细胞和胚胎呈现出精确的时空性变化特点, 确保受精及胚胎发育按时有序地进行。细胞骨架由微丝、微管和中间纤维构成。其中微丝作为细胞骨架的组成部分, 其作用主要是确定细胞表面特征, 使细胞能够运动和收缩。研究表明在哺乳动物卵母细胞成熟和受精过程中, 微丝对于减数分裂器位置的维持、减数分裂器的旋转、受精锥的形成、极体形成和排放、原核迁移及胚胎卵裂等都具有重要作用[1~4]。在受精过程中微丝的作用是必要的, 有助于精子尾部进入卵子。精子入卵后, 精卵融合处也有微丝聚集, 参与受精锥形成。同时第二极体的形成也高度依赖于完整的微丝网络[5]。细胞骨架对哺乳动物卵母细胞正常发育和受精起着十分重要的作用, 但与体细胞中细胞骨架系统的研究而言, 对卵母细胞和早期胚胎中细胞骨架组装和功能的研究缺乏系统性。近年来, 借助于对细胞周期调控研究所取得的成果, 以及生化分析与胚胎学的结合, 使人们得以在分子水平上描述参与调节卵母细胞成熟和受精中细胞骨架系统的信号途径。但在哺乳动物卵母细胞成熟和受精过程尤其是在受精卵早期发育过程中, 细胞骨架及其信号转导调控机制仍有许多尚未阐明的问题。

蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 分子量约60 kDa。同时, PKB与*v-akt*基因编码的Akt蛋白同源, 又被称为Akt。PKB作为信号转导通路的重要调节因子, 主要通过PI3K/PKB途径调节细胞代谢、促进蛋白质合成、促进细胞生长和增殖, 同时还具有抗细胞凋亡作用。无论在海洋无脊椎动物还是在低等脊椎动物, 甚至在高等脊椎动物中, PKB均参与了卵母细胞减数分裂的调节过程, 对于减数分裂的重新启动是必需的[6~11]。PKB在高等生物早期胚胎发育过程的作用报道较少。本课题组前期工作对小鼠1-细胞期受精卵中PKB/Akt的活性、表达及其生物学功能进行了初步观察, 发现PKB/Akt的表达和活性在小鼠受精卵早期发育的过程中有变化[12]; 同时, 通过向1-细胞期受精卵注射表达不同活性形式PKB/Akt的mRNA, 发现PKB/Akt活性的变化可以影响MPF(成熟促进因子)的活性, 进而调节1-细胞期受精卵的卵裂率[13]。也就是说我们前期工作已经证明了PKB在小鼠卵母细胞及早期受精卵中存在且能够促进受精卵的分裂。但是其促进卵细胞的分裂机制并不十分明确。而且

收稿日期: 2010-10-28 接受日期: 2010-12-22

国家自然科学基金青年基金(No.30800649)和辽宁省高等学校科研项目(No.20060956)资助项目

*通讯作者。Tel: 024-23261253, E-mail: ybzbiochem@yeah.net

我们也并不明确这种促进分裂是不是也和改变了微丝的聚集有关。另有研究显示在人骨肉瘤Saos2细胞中, PKB/Akt是微丝骨架蛋白的上游调节因子, 参与了微丝骨架的聚集过程。但是其调控机制并不是很明确[14]。而在小鼠卵细胞及受精卵发育中PKB/Akt是否参与了微丝的聚集尚无报道。

本研究的目的就是在前期工作的基础上, 利用分子生物学和生殖生物学的方法进一步研究在受精卵早期发育中蛋白激酶B对受精卵细胞骨架蛋白的影响, 探讨PKB/Akt途径在调节受精卵早期发育细胞骨架上的作用机制。本研究的结果能进一步在分子水平上阐述和完善调节受精卵早期发育的信号途径, 为研究哺乳动物受精卵发育机理提供实验依据和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 小鼠超排卵及受精卵的采集

4~6周龄的雌性中国昆明白小鼠饲养在控光条件下(14 h 光照, 10 h 黑暗), 腹腔注射孕马血清促性腺激素( PMSG, 7. 5 IU/只), PMSG注射后46~48 h腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(hCG, 5 IU/只) 后与公鼠合笼,次日晨见阴栓鼠留用, 分别于注射hCG后的32 h、36 h从输卵管取出1-细胞期及2-细胞期胚胎。在M16培养液, 5 % $CO_2$ 37℃培养箱中进行培养, 再进行免疫荧光化学染色。

### 1.2 体外转录

将已有的野生型、激酶激活型和失活型PKB/Akt的pcDNA3.1/myc-his表达载体进行体外转录, 制备野生型、磷酸化位点突变型激酶激活型和失活型PKB/Akt的mRNA, 纯化mRNA并进行浓度测定(Myr-Akt 代表激酶激活型、KD-Akt是激酶失活型、WT-Akt为野生型)。体外转录应用的是Ambion公司的mMESSAGE mMACHINE 体外转录试剂盒, 方法参照试剂盒说明书。

### 1.3 显微注射

显微注射应用Eppendorf Transferman显微操作系统, OlympusIX-70 倒置显微镜, DIC调制相差观察。显微注射在M2 液滴中进行。为尽量减少显微注射对受精卵的影响, 一般注入到受精卵内的样品体积为10 pl(相当于其总体积的5%)。mRNA溶解于无核酸酶污染的5 mmol/L Tris和0.5 mmol/L EDTA(pH7.4)中, 稀释成不同浓度, 对照组为非注射组及注射TE缓冲液组。

### 1.4 微丝的免疫荧光化学

按照时间点取M2期、1-细胞期及2-细胞期卵细胞固定。经过去透明带、固定、透膜、封闭处理后, 在含有300 U/ml罗丹明标记的鬼笔环肽(TRITC-phalloidin)的DPBS溶液中, 37℃共同温育40 min, 进行微丝F-actin染色, 用清洗液清洗3次, 每次5 min。将经过微丝染色的样品清洗后, 在含有(Hoechst33258)的清洗液中于室温下温育10 min。在洁净的载玻片上加一滴防荧光淬灭剂DABCO, 将处理好的卵转移其中, 封片后置于暗盒, 低温保存, 尽快用激光共聚焦显微镜观察、照相。每组实验重复3次, 每次至少观察30个样品。

### 1.5 激光共聚焦显微镜成像分析

TRITC所用激发波长为545 nm, Hoechst33258所用激发波长为352 nm, 在图象分析系统中选择目标区域取图, 并做Z轴方向的光切片合成。

## 2 结果

### 2.1 激光共聚焦显微镜观察小鼠早期胚胎中actin的分布规律

微丝确定细胞表面特征, 使细胞能够运动和收缩。受精卵能够由一个细胞分裂为二细胞和其收缩环的正确形成密不可分, 而收缩环的形成又靠微丝的正确聚合来完成。本实验中我们首先明确了微丝在小鼠卵细胞中的分布情况。在卵母细胞中F-actin靠近皮层分布集中分布在纺锤体处的质膜处。1-细胞期中F-actin集中定位在和极体相连处。而在2-细胞胚胎中, 微丝则主要分布在卵裂球沟, 参与构成缢缩环(图1)。

### 2.2 显微注射各种PKB的mRNA可影响小鼠受精卵各期微丝的聚集状态

我们检测了显微注射各种PKB/Akt的mRNA以后微丝的聚集状态, 注射野生型和持续激活型PKB/Akt以后, 微丝聚集状态增加; 而当受精卵过表达激酶失活型PKB/Akt时, 荧光信号减弱, 说明PKB/Akt活性的变化确实可以影响微丝的聚集状态, 见图2~图4。LY294002 (PI3K的抑制剂可抑制PKB的活性)处理小鼠1-细胞期受精卵, F-actin也出现了聚集状态减弱的现象。加入CD(细胞松弛素)处理后的受精卵重新转入激活型PKB/Akt的mRNA, F-actin重又恢复聚集状态。上述结果证明了PKB/Akt确实可通过影

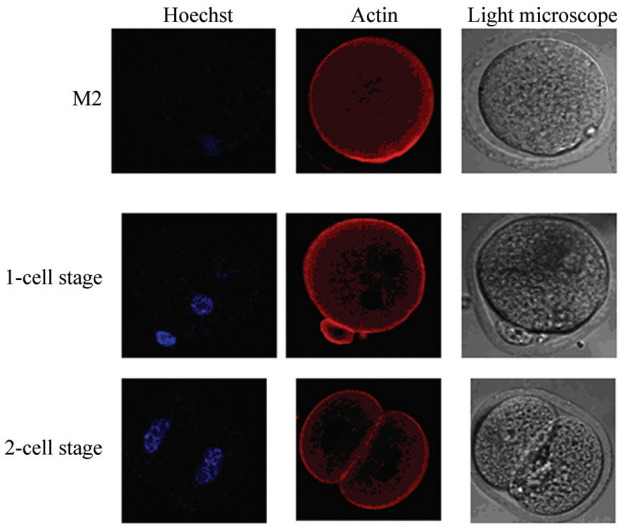


图1 M2、1-细胞期及2-细胞期小鼠卵细胞中actin的定位情况

Fig.1 The localization of actin in mouse M2 oocytes, one-cell and two-cell phase embryos

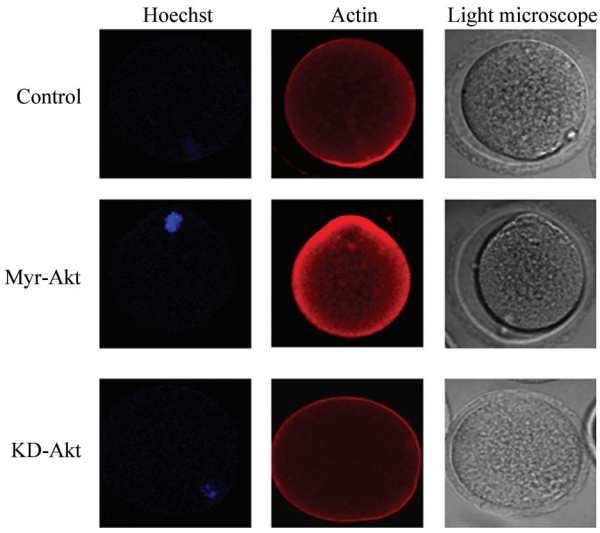


图2 M2期小鼠卵细胞中Akt mRNA对微丝聚集状态的影响

Fig.2 The effect of polymerization of the actin after treated with PKB/Akt mRNA in mouse M2 oocytes

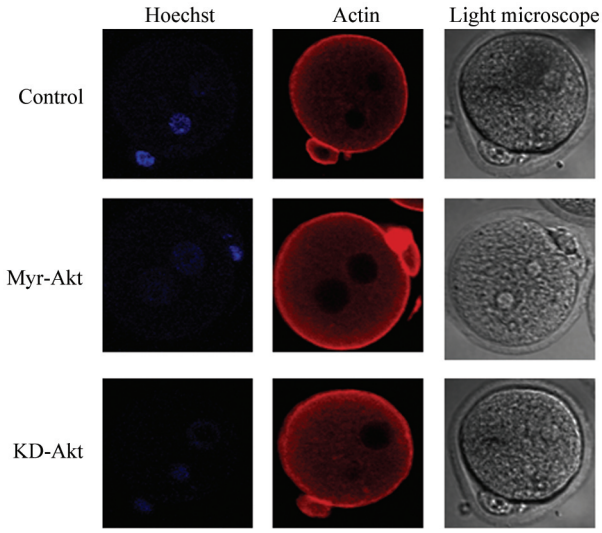


图3 小鼠1-细胞期受精卵中PKB/Akt mRNA对微丝聚集状态的影响

Fig.3 The effect of polymerization of the actin after treated with PKB/Akt mRNA in mouse one-cell embryos

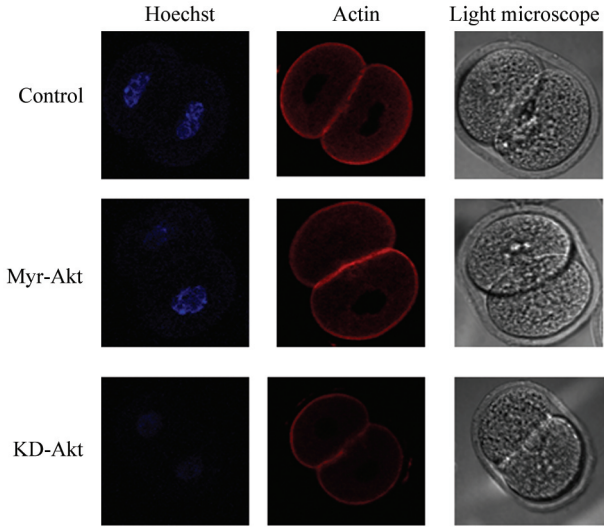


图4 小鼠卵细胞2-细胞期中PKB/Akt mRNA对微丝聚集状态的影响

Fig.4 The effect of polymerization of the actin after treated with PKB/Akt mRNA in mouse two-cell embryos

响小鼠受精卵细胞骨架F-actin的聚集情况影响早期的发育。结合以上的研究我们认为在小鼠受精卵中PKB/Akt和F-actin的聚集有关。

### 2.3 免疫荧光方法检测了PKB及p-PKB在受精卵早期发育过程中与actin的共定位情况

为了进一步探讨PKB/Akt的作用机制, 我们采用免疫荧光方法检测了PKB/Akt及p-PKB在受精卵早期发育过程中与actin的共定位情况(图5)。从所得的结果来看actin可同p473Akt共定位。这也进一步证明了在小鼠卵中PKB和actin的聚集可能有一定的关系。

## 3 讨论

微丝, 也称肌动蛋白丝, 由肌动蛋白组成。微丝与微丝结合蛋白、肌球蛋白三者构成化学机械系统,

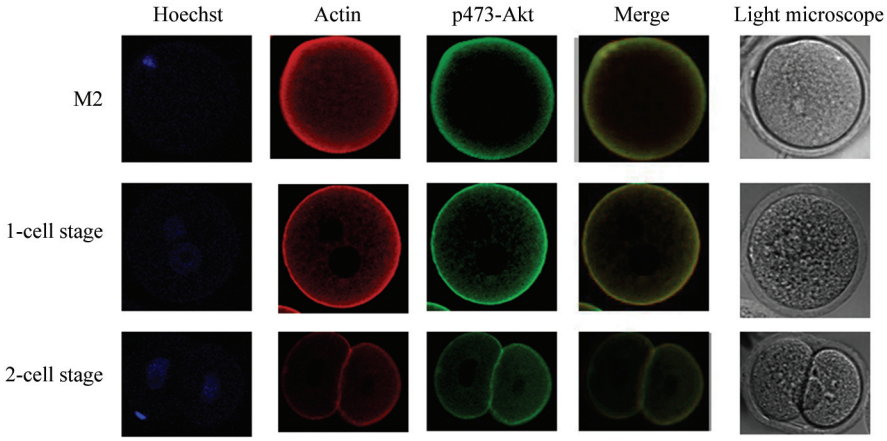


图5 p-Akt同actin共定位关系

Fig.5 The conlocalization of p-Akt and actin

产生机械运动。研究显示微丝在卵母细胞减数分裂成熟过程中参与了多个细胞学事件的调控: 如纺锤体迁移、皮质形成、皮质颗粒不对称分布、极性建立、第一极体排出等。而在哺乳动物受精及早期发育过程中, 受精卵要经过胞质分裂来实现其不断的增殖, 在这一过程中收缩环形成是细胞分裂末期胞质分裂的前提条件。收缩环主要由大量平行排列的肌动蛋白(actin)微丝组成, 在肌动蛋白微丝的作用下, 细胞膜及相应胞质向纺锤体呈垂直方向收缩形成胞质分裂沟, 胞质分裂沟随时间而逐渐加深, 最后细胞在此完全断开完成分裂[1~4]。微丝在这一过程中起了很重要的作用, 参与微丝组装的一些新的成分和功能需要被进一步揭示出来。而且微丝组装的信号转导调控机制在哺乳动物受精过程及早期发育中的作用, 尚有一些未阐明的问题, 有待于进行更深入的研究。

激光共聚焦显微镜(laser confocal scanning microscopy, LCSM)是近年来发展起来的一项重要技术, 被认为是目前世界上先进的分子细胞生物学分析仪器之一, 较传统的显微镜有着不可比拟的优越性。LCSM通过确定波长的入射光扫描样本的不同层面, 并收集各个层面所标记荧光物质发出的激发光, 实现了对样品的不同层面进行扫描从而产生不同层面的共焦图像[16~18]。小鼠早期胚胎是发育生物学研究的重要实验材料, 而在卵母细胞发生和早期胚胎发育过程中细胞骨架的作用也非常重要。LCSM因其独特的成像原理, 决定了它在细胞骨架研究中的重要地位, 这项技术的发展为更好地认识和研究细胞骨架结构、功能及其相互关系提供了很好的技术手段。但激光共聚焦显微镜在应用时, 对样品的处理要求比较严格, 若某一步骤操作不当就会导致整个实验的失败。结合现有的文献报道[19], 我们对实验进行了调整, 严格把握透膜、封闭、荧光标记处理时间和处理溶液的浓度, 并且在每一个步骤之间都需要严格的清洗, 这样才能保证获得满意的实验结果。透膜处理就是提高细胞膜的通透性, 这对于标记物进入卵母细胞或早期胚胎与特异蛋白充分结合非常重要。透膜不理想时可适当提高TritonX-100的浓度(一般使用0.1%~1%)和延长处理时间(一般情况下在37℃下温育30~40min, 也可在4℃中过夜), 以获得理想的实验结果。文中采用山羊血清进行封闭, 血清浓度为10%, 效果很好。

本实验中我们首先明确了F-actin在小鼠M2期及受精卵中的分布情况。研究结果显示在卵母细胞中F-actin主要靠近小鼠卵母细胞的皮层分布并且集中分布在纺锤体处的皮层处。在1-细胞期的小鼠受精卵中F-actin集中定位在细胞和极体连接处。而在2-细胞期的胚胎中, 微丝则主要分布在卵裂球沟, 参与构成缢缩环的形成。这些结果说明微丝在小鼠卵母细胞及受精卵早期可能参与了纺锤体的定位、细胞极体的释放及细胞的分裂等多种事件。在明确了微丝在小鼠M2期及受精卵中的分布的前提下我们进一步探讨了微丝组装的信号转导调控机制。主要研究PKB/Akt对受精卵发育过程中微丝聚集的影响及可能的作用机制。实验中我们将体外转录获得的各种PKB的mRNA注射入小鼠M2期及1-细胞期受精卵中, 使其呈现过表达状态, 进一步用免疫荧光方法

检测受精卵的微丝聚集状况。研究结果显示在注射野生型和持续激活型PKB/Akt以后, 免疫荧光信号增强, 这也就说明PKB/Akt活性增强增加了微丝聚集状态; 而当受精卵过表达激酶失活型PKB时, 荧光信号减弱。因而我们认为PKB/Akt活性的变化可以改变微丝的聚集状态。同时我们发现在不同期的卵细胞中微丝可同p473Akt共定位。这也进一步证明了在小鼠卵中PKB/Akt和actin的聚集可能有着密不可分的关系。

从以上所得的结果来看我们认为PKB/Akt为微丝骨架蛋白的上游调节因子, 其参与了微丝骨架的聚集过程。但是其调控机制并不是很明确, 我们认为在PKB/Akt与actin之间还可能有其他蛋白因子的参与。已有研究证明PKB/Akt是Girdin/APE的上游激酶之一, 可以将Girdin/APE的serine1416磷酸化影响细胞骨架的完整性[15]。有关PKB是否通过磷酸化Girdin/APE以后改变actin的聚集状而影响小鼠受精卵的发育还未见报道。接下来我们将进一步在受精卵中验证PKB/Akt磷酸化Girdin/APE, 改变actin极化状态, 促进受精卵的分裂。

## 参考文献(References)


1 Kim NH, Day BN, Lee HT, Chung KS. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilisation in the porcine oocyte. Zygote 1996; 4(2): 145-9.

2 DiMaggio AJ Jr, Lonergan TA, Stewart-Savage J. Cortical granule exocytosis in hamster eggs requires microfilaments. Mol Reprod Dev 1997; 47(3): 334-40.

3 Terada Y, Simerly C, Schatten G. Microfilament stabilization by jasplakinolide arrests oocyte maturation, cortical granule exocytosis, sperm incorporation cone resorption, and cell-cycle progression, but not DNA replication, during fertilization in mice. Mol Reprod Dev 2000; 56(1): 89-98.

4 Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. Mol Endocrinol 2007; 21(9): 2037-55.

5 Sampaio P, Rebollo E, Varmark H, Sunkel CE, González C. Organized microtubule arrays in gamma-tubulin-depleted Drosophila spermatocytes Curr Biol 2001; 11(22):1788-93.

6 Carsten BA, Richard AR, Maoco C. Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in *Xeonpus* oocytes. J Biol Chem 1998; 273(30): 18705-8.

7 Okumura E, Fukuhara T, Yoshida H, Hanada Si S, Kozutsumi R, Mori M, *et al*. Akt inhibits Myt1 in the signaling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. Nat Cell Biol 2002; 4(2):111-7.

8 Hoshino Y, Yokoo M, Yoshida N, Sasada H, Matsumoto H, Sato E. Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt participate in the FSH-induced meiotic maturation of mouse oocytes. Mol Reprod Dev 2004; 69(1): 77-86.

9 Kalous J, Solc P, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. Biol Cell 2006; 98(2): 111-23.

10 Wolfgang T, Tatjana S. Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. Reproduction 2005; 130(4): 423-30.

11 Hoshino Y, Sato E. Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes. Dev Biol 2008; 314(1): 215-23.

12 陈 菲, 于爱鸣, 冯 晨, 付 伟, 赵咏梅, 袁 莹, 等。蛋白激酶B在小鼠1-细胞期受精卵早期发育中活性及表达变化。中国生物化学与分子生物学报 2003; 19(4): 542-5.

13 Feng C, Yu A, Liu Y, Zhang J, Zong Z, Su W, *et al*. Involvement of protein kinase B/AKT in early development of mouse fertilized eggs. Biol Reprod 2007; 77(3): 560-8.

14 Cenni V, Sirri A, Riccio M, Lattanzi G, Santi S, de Pol A, *et al*. Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. Cell Mol Life Sci 2003; 60(12):2710-20.

15 Atsushi E, Hideki M, Naoya A, Nobuhiro M, Takashi W, Kumi K, *et al*. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. Dev Cell 2005; 9(3): 389-402.

16 Boiso I, Martí M, Santaló J, Ponsá M, Barri PN, Veiga A. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage. Hum Reprod 2002; 17(7): 1885-91.

17 Zucker RM, Keshaviah AP, Price OT, Goldman JM. Confocal laser scanning microscopy of rat follicle development. J Histochem Cytochem 2000; 48(6): 781-91.

18 Riparbelli MG, Callaini G, Schejter ED. Microtubule-dependent organization of subcortical microfilaments in the early Drosophila embryo. Dev Dyn 2007; 236(3): 662-70.

19 徐 营, 张庆华, 关 娜, 徐燕宁, 闫晓飞, 雷 蕾。应用激光扫描共聚焦显微镜研究卵母细胞和早期胚胎的细胞骨架。细胞生物学杂志 2008; 30(3): 406-10.

# Effects of Protein Kinase B/Akt on Polymerization of the Actin in Mouse Oocyte and Embryos by Laser Confocal Microscopy

Di-Di Wu, Ying-Hua Ju, Jun Meng, Chao Liu, Chen Fen, Bing-Zhi Yu*

(*Department of Biochemical and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, China*)

**Abstract** In the present study we aimed at elucidating the polymerization of the actin in mouse oocytes and embryos after treated with different kinase active mRNA of PKB. We observed the expression of actin and the polymerization after treated with PKB mRNA in the mouse oocytes and embryos by using modified immunofluorescent staining and laser confocal microscopy. The results showed that the actin was expressed in mouse oocytes and embryos mostly at spindle, polar body and contractile ring. Injection of mRNA coding for a constitytively active myristoylated PKB/Akt into oocytes or embryos induced polymerization of actin, whereas microinjection of mRNA of kinse-deficient PKB/Akt inhibited the formation of actin storage. So our findings confirmed that PKB activation was necessary for polymerization of actin in mouse oocytes and early embryos.

**Key words** protein kinase B; actin; mouse oocyte; embryo; immunofluorescence; laser confocal scanning microscopy

Received: October 28, 2010 Accepted: December 22, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30800649) and Liaoning Higher Education Foundation Program (No.20060956)

*Corresponding author. Tel: 86-24-23261253, E-mail: ybzbiochem@yeah.net