

# 抑制泛素结合酶改变猪卵母细胞透明带泛素化状态及精-卵结合能力

徐 妲, 王 洋, 玄 彪, 汪秋月, 徐 曼, 陈 璇, 金 一\*

(延边大学农学院, 延吉 133002)

**摘 要:** 本研究旨在探究猪卵母细胞体外成熟过程中添加泛素结合酶(E2)抑制剂对卵母细胞透明带蛋白泛素化水平及精-卵结合能力的影响。试验分为6组: 对照组、DMSO组、5、10、15和20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923处理组。采用Western blot方法分析体外成熟培养液中添加不同浓度泛素结合酶抑制剂NSC697923对猪卵母细胞透明带泛素化水平表达的影响。通过Hoechst染色检测不同组别的精卵结合能力。结果表明: 1) 猪卵母细胞体外成熟培养液中, 添加10、15和20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923显著降低卵母细胞成熟率( $P < 0.05$ ), 透明带硬化时间( $P < 0.05$ )以及精卵结合率( $P < 0.05$ )。2) 对照组和各处理组的透明带蛋白在61、81、106 ku处发生不同程度的泛素化标记, 而添加15和20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923显著地降低透明带蛋白泛素化水平( $P < 0.05$ )。综上所述, 猪卵母细胞体外成熟过程中泛素结合酶(E2)改变成熟卵母细胞透明带泛素化水平以及精卵结合能力。

**关键词:** 猪; 卵母细胞; 泛素结合酶; 透明带泛素化; 精子-卵子结合

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2019)03-0544-07

## Inhibitor of Ubiquitin-conjugating Enzyme Alters the Ubiquitination Status of Porcine Oocyte Zona Pellucidus and Sperm-oocyte Binding Ability

XU Da, WANG Yang, XUAN Biao, WANG Qiuyue, XU Man, CHEN Xuan, JIN Yi\*

(Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002, China)

**Abstract:** The main purpose of this study was to investigate the influence of the adding of ubiquitin-conjugating enzyme (E2) inhibitors to oocyte zona pellucida (ZP) ubiquitination and sperm-oocyte binding ability *in vitro* maturation of porcine oocytes. There was 6 groups in this study: control group, DMSO, 5, 10, 15 and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 treatment groups. We analyzed the effect of different concentrations of ubiquitin-conjugating enzyme inhibitor NSC697923 on the expression of ubiquitination in porcine oocytes ZP with Western blot *in vitro* maturation. The difference of sperm-oocyte binding ability among different groups was examined by Hoechst staining. The result showed that: 1) *In vitro* maturation of porcine oocytes, the treatment groups with 10, 15 and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of NSC697923C significantly reduced oocyte maturation rate ( $P < 0.05$ ), ZP hardening time ( $P < 0.05$ ) and the sperms-oocyte rate ( $P < 0.05$ ). 2) The ZP proteins in the control group and each treatment groups showed different degrees of ubiquitination at 61, 81 and 106 ku, while the treatment group with 15 and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of NSC697923 significantly reduced the ZP ubiquitination protein level ( $P < 0.05$ ). In conclusion, ubiquitin-conjugating enzyme changes the level of ubiquitination of mature oocytes ZP and the ability of sperm-oocyte binding *in vitro* maturation of porcine oocytes.

收稿日期: 2018-05-18

基金项目: 国家自然科学基金(31260529); 吉林省科技厅重点科技攻关项目(20150204079NY)

作者简介: 徐 妲(1982-), 女, 满族, 吉林人, 博士, 主要从事动物繁殖与生物技术研究, E-mail: 9778022@qq.com

\* 通信作者: 金 一, 主要从事动物繁殖与生物技术研究, E-mail: yijin@ybu.edu.cn

**Key words:** pig; oocyte; ubiquitin-conjugating enzyme; zona pellucid ubiquitination; sperm-oocyte binding

泛素(Ub)是存在于所有真核生物中由 76 个氨基酸组成的调节蛋白。向底物蛋白添加泛素称为泛素化,其通过促进蛋白酶体靶向来启动泛素蛋白酶体途径(UPP)系统<sup>[1]</sup>。已知发生在真核细胞中的 UPP 具有多种重要的调节作用,如控制蛋白质降解<sup>[2]</sup>、细胞凋亡<sup>[1]</sup>、细胞周期<sup>[3]</sup>和信号<sup>[4]</sup>。泛素化过程中有 3 个成熟类型的酶参与,这些成熟类型的酶包括泛素激活酶(E1)、结合酶(E2)和连结酶(E3)。泛素激活酶(E1)通过在 Ub 的羧基末端和 E1 自身激活位点半胱氨酸之间形成一个硫酯键而激活泛素,再被转到泛素结合酶(E2)上,之后 E2 在 E3 作用下共价结合到需要降解的胞质或胞核的蛋白上,使底物蛋白发生泛素化,它们都依赖于 ATP 的酶促反应。配子发生受转录、翻译和翻译后修饰的调控,而蛋白质翻译后修饰尤其是泛素化及类泛素化修饰在精子形态建成、减数分裂和体细胞-生殖细胞互作调控过程中发挥重要作用。

初期卵母细胞成为可受精的成熟卵母细胞必须经历减数分裂<sup>[5]</sup>,这是多阶段精确有序的编排过程<sup>[6-7]</sup>,它通过多种信号转导途径参与卵母细胞成熟。第 1 次减数分裂前期的卵母细胞在受精前必须进入第 2 次减数分裂中期(MII),而这种减数分裂过程需要精确控制蛋白质的降解,其中部分卵母细胞中的蛋白质降解由泛素结合酶(E2)控制<sup>[8]</sup>。卵母细胞成熟是猪体外受精的关键过程,在卵母细胞成熟过程中透明带(ZP)对卵母细胞和胚胎起保护作用。而精子的作用也不容忽视,如果精子受体分子变性,就能阻止其他精子进入透明带<sup>[9]</sup>,精子一旦穿过 ZP 后,卵子细胞质内的皮质颗粒就释放溶酶体酶,引起透明带结构的改变。通过精子防止其他精子在单个胚胎内的聚集,从而精子的个体性有效地促进了精子在输卵管内的存活<sup>[10]</sup>。之后精子与分布在 ZP 上的糖蛋白(ZP1、ZP2、ZP3 和 ZP4)结合而实现配子结合<sup>[11]</sup>。猪、牛和狗有 3 个糖蛋白,ZP4 替代 ZP1。因此,猪卵母细胞 ZP 包含的 3 个糖蛋白为 ZP4、ZP2 和 ZP3。据报道通过调节 ZP 蛋白状态来控制与每个卵母细胞结合的最佳精子数量可以提高猪的繁殖效率<sup>[11]</sup>。NSC697923 是结合酶(E2)细胞选择透过性的抑制剂,在各种细胞系中发挥着主要的功能作用<sup>[12]</sup>。其在抑制人细胞中 DNA

损伤和 NF- $\kappa$ B 信号传导中起很大作用<sup>[13]</sup>。而在人体内高血糖下 Lys63 泛素化增加,导致细胞骨架破坏,NSC697923 的抑制剂逆转了这种效应<sup>[14]</sup>。还有研究表明,NSC697923 的抑制剂在人体中能抑制泛素化增高<sup>[14]</sup>,而在动物体内对泛素化的影响报道很少。目前,泛素结合酶(E2)在猪卵母细胞中的功能以及 E2 对猪 ZP 蛋白泛素化和 ZP 阻断发挥作用的机制尚不清楚。因此本研究中使用泛素结合酶(E2)的抑制剂 NSC697923 来调查在猪卵母细胞中蛋白质泛素化的动态变化,以及探索泛素结合酶(E2)在猪卵母细胞成熟、ZP 硬化和精子-卵母细胞结合中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 卵丘-卵母细胞复合体(COCs)的获取和卵母细胞成熟(IVM)

猪卵巢来自于当地屠宰场,用 20 mL 注射器抽取卵泡液,挑直径为 3~6 mm 卵泡,15 mL 离心管盛装卵泡液置于 38.5 °C 水浴锅中待挑取 COCs。在卵母细胞体外成熟液中添加 0(对照组)、DMSO、5、10、15、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923,将挑拣好的优质的 COCs 复合体放入平衡好的成熟液小滴中,然后放入 5%  $\text{CO}_2$  和 38.5 °C 饱和湿度的恒温培养箱内培养。COCs 培养 44 h 后,进行 IVM 判定,使 COCs 细胞裸露于 0.1% 透明质酸酶中,在体式显微镜下观察排出第一极体标志着卵母细胞核成熟,可视为卵母细胞发育成熟,达到 MII 期。

### 1.2 ZP 蛋白的提取和免疫印迹(Western blot)

挑选 300 个 MII 期形态完整的成熟卵母细胞。用细口吸管剥离卵母细胞质后,将卵母细胞的 ZP 在 70 °C 温育,加入 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液(pH 2.5) 20  $\mu\text{L}$ ,溶解 90 min, 4 °C 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,取上清液备用或-80 °C 冷冻待用<sup>[15]</sup>。

将 20  $\mu\text{L}$  ZP 蛋白与 5 $\times$  钠-十二烷基硫酸盐缓冲液在 100 °C 沸水中煮 5 min 后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电压为 100 V。然后将膜上蛋白通过电流 200 mA 电转移法转移到聚偏氟乙稀膜(PVDF)上,不留有气泡,转膜 40 min 结束后,室温将膜用 5% 牛血清白蛋白(BSA)在 Tris 缓冲盐水(TBST)中封闭 1 h,并与一抗(小鼠抗 GAPDH

抗体)在 4 °C 下孵育 15 h。弃一抗,用 TBST 洗涤膜 3 次,每次 5 min。洗涤后,将膜与二抗(山羊抗小鼠 IgG 过氧化物酶抗体)在室温 2 h。弃二抗,用 TBST 洗涤膜 3 次<sup>[16]</sup>。为了可视化蛋白质,使用 ECL 化学发光试剂盒。对印迹膜上的蛋白质强度进行量化,并确定每个靶标的强度蛋白质标准化为 GAPDH。

### 1.3 ZP 硬化分析

在 37 °C 电热恒温板上,使用 0.05% 的链酶蛋白酶做成 80  $\mu\text{L}$  的小滴,每滴放 10 个成熟卵母细胞,在显微镜下观察 ZP 硬化所需要的时间。

### 1.4 精子获能和诱导精子顶体反应

精液购自延吉育种公司,用 PBS 冲液洗涤 3 次,在室温下,1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。将精子沉淀用改良的 Tris-缓冲培养基(mTBM)洗涤两次持续 10 min。用 mTBM 将精子稀释至  $1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$ ,并在 38.5 °C、5%  $\text{CO}_2$  浓度下孵育 40~50 min。获能后,将精子与 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  钙离子载体一起培养,并在 38.5 °C、5%  $\text{CO}_2$  浓度饱和湿度的恒温培养箱中孵育 30 min。

### 1.5 精子-卵母细胞结合测定

获能精子制成 50  $\mu\text{L}$  的受精小滴。成熟卵母细胞轻轻吹打部分去除卵丘,之后移入受精微滴,每滴 30 个卵母细胞,共培养 6 h,将受精卵用 0.1% 聚乙

烯醇-PBS(PVA-PBS)培养基洗涤 4 次,在室温置于 5% 的戊二醛溶液固定 30 min,与 5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Hoechst 33342 在黑暗中温育 15 min, PVA-PBS 培养基中洗涤两次,然后用 Hoechst 染色 15 min,置于荧光显微镜下观察拍照<sup>[17]</sup>。

### 1.6 数据分析

Western blot 结果使用 Image J 软件分析。试验数据使用 SPSS19.0 软件进行统计分析,数据表示为“平均值 $\pm$ 标准误”, $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果

### 2.1 卵母细胞体外成熟液中添加不同浓度泛素结合酶(E2)抑制剂体外成熟培养

在卵母细胞体外成熟液中添加 0(对照组)、DMSO、5、10、15、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923,培养 44 h,检测卵母细胞成熟率(表 1)。对照组与 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 和 DMSO 处理组的卵母细胞体外成熟率差异不显著(表 1)。当 NSC697923 浓度达到 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时卵母细胞成熟率与对照组、DMSO 和 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组之间差异显著( $P < 0.05$ ),与浓度为 15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理的卵母细胞成熟率差异不显著,当浓度达到 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时成熟率最低( $P < 0.05$ )。

表 1 不同浓度 NSC697923 对猪卵母细胞成熟率的影响

Table 1 Effects of NSC697923 with different concentrations on maturation rate pig oocytes

组别 Group	卵母细胞数 Oocytes number	核成熟数 Nucleat maturation number	体外成熟率/% IVM rate
Control	658	527	80.09 $\pm$ 2.80 <sup>a</sup>
DMSO	496	340	78.46 $\pm$ 1.55 <sup>a</sup>
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	565	432	76.46 $\pm$ 1.96 <sup>a</sup>
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	628	460	73.24 $\pm$ 1.77 <sup>b</sup>
15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	558	396	70.97 $\pm$ 1.33 <sup>b</sup>
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	639	420	65.72 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );肩标相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ )。表 3 同

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), with the same letter superscripts mean no significant difference ( $P > 0.05$ ). The same as table 3

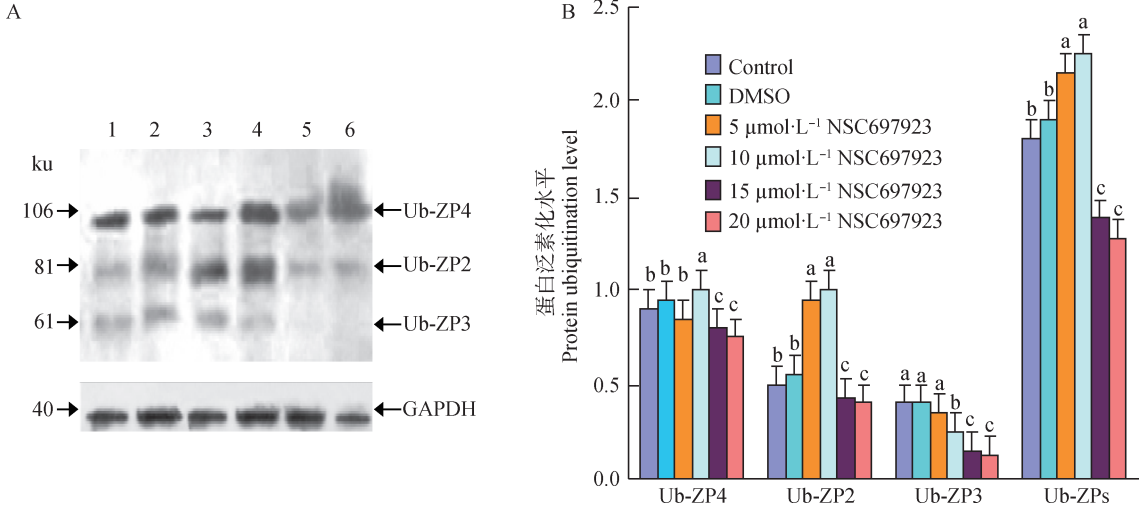
### 2.2 添加不同浓度泛素结合酶(E2)抑制剂对猪成熟卵母细胞透明带泛素化水平的影响

在卵母细胞体外成熟培养液中添加浓度为 0

(Control)、DMSO、5、10、15 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923,体外培养 44 h,提取猪卵母细胞透明带蛋白。使用免疫印迹分析各组的透明带蛋白在 61、

81 和 106 ku 处发生不同程度的泛素化标记(图 1A);并对各组卵母细胞透明带蛋白泛素化条带进行量化分析,结果表明,15 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

NSC697923 处理导致泛素化 ZP4、ZP2、ZP3 和 ZPs (ZP4、ZP2、和 ZP3 量的总和)蛋白量显著减少(图 1B,  $P < 0.05$ )。



A. Western blot 检测:1~6 分别为 0(Control)、DMSO、5、10、15 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 组;B. 灰度值分析:字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )

A. Western blot test:1-6 indicate 0(Control),DMSO,5,10,15 and 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 groups; B. Grayscale analysis: Different letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

图 1 NSC697923 对猪成熟卵母细胞 ZP 蛋白泛素化的影响

Fig.1 Effect of NSC697923 on the ubiquitination of ZP proteins in porcine maturation oocytes

### 2.3 添加不同浓度泛素结合酶(E2)抑制剂对卵母细胞透明带硬化的影响

在卵母细胞成熟液中添加浓度为 0(Control)、DMSO、5、10、15、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 后,培养 44 h,去除颗粒细胞后,进行 ZP 硬化检测(表 2),

当 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 时 ZP 的硬化时间与对照组、DMSO 和 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  处理组之间差异显著( $P < 0.05$ ),与 15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 处理组差异不显著(表 2),20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 处理组硬化时间最少( $P < 0.05$ )。

表 2 不同浓度 NSC697923 对卵母细胞 ZP 硬化的影响

Table 2 Effects of different concentrations of NSC697923 on oocytes ZP hardening

组别 Group	Control	DMSO	5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923
硬化时间/s Hardening time	294.20 ± 2.71 <sup>a</sup>	289.24 ± 2.96 <sup>a</sup>	283.82 ± 2.65 <sup>a</sup>	264.76 ± 2.83 <sup>b</sup>	258.51 ± 2.94 <sup>b</sup>	243.76 ± 3.06 <sup>c</sup>

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );肩标相同字母表示组间差异不显著( $P > 0.05$ )

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ( $P < 0.05$ ), with the same letter superscripts mean no significant difference among groups ( $P > 0.05$ )

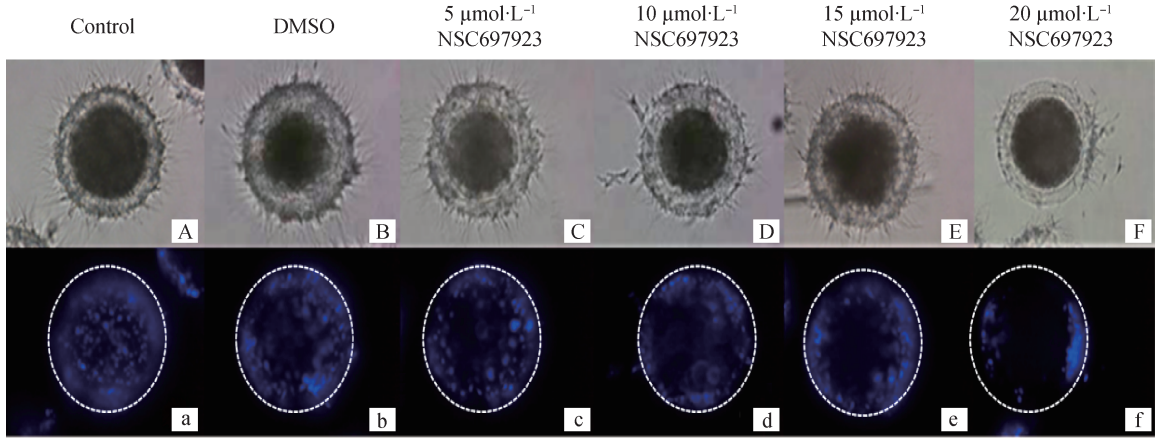
### 2.4 添加不同浓度泛素结合酶(E2)抑制剂对精子-卵母细胞结合能力的影响

在卵母细胞体外成熟液中分别添加浓度为 0 (Control)、DMSO、5、10、15、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923,培养 44 h,去除颗粒细胞,进行精子-卵

母细胞结合试验。精子与卵母细胞在 IVF 小滴中培养 5 h,用 Hoechst 33342 染色后进行精卵结合率检测。结果表明,添加 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 时蓝色荧光开始变少(图 2)。泛素结合酶 E2 抑制剂 NSC697923 可以降低附着于卵母细胞 ZP 的精子数

量,即降低精卵结合率(表 3)。10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 精卵结合率显著低于对照组、DMSO 和 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 处理组(表 3,  $P < 0.05$ ),

与 15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 组差异不显著。20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 组中精卵结合率最低,显著低于其他 5 组(表 3,  $P < 0.05$ )。



A~F. 精子附着在卵母细胞 ZP 上的图片; a~f. 荧光照片, 蓝色荧光指示精子头部

A-F. Pictures with sperm attached to the ZP of oocyte; a-f. Fluorescent pictures of the above results, blue fluorescence indicate sperm head

图 2 精子-卵母细胞结合测定(400×)

Fig. 2 Sperm-oocyte binding assay (400×)

表 3 不同浓度 NSC697923 对精子-卵母细胞结合率的影响

Table 3 Effects of different concentrations of NSC697923 on sperm-oocyte binding ability

组别 Group	卵母细胞数 Oocytes number	精卵结合率/% Sperms-oocyte rate
对照 Control	30	108.61 ± 2.15 <sup>a</sup>
DMSO	30	107.79 ± 1.37 <sup>a</sup>
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	30	90.24 ± 1.82 <sup>a</sup>
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	30	63.58 ± 2.29 <sup>b</sup>
15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	30	50.83 ± 1.75 <sup>b</sup>
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NSC697923	30	42.06 ± 1.68 <sup>c</sup>

### 3 讨论

蛋白质泛素化在真核细胞中作为一种重要的共价翻译后修饰,调控着多种细胞过程。它可以改变蛋白质活性,且目标蛋白质用于 26S 蛋白酶体的识别并降解。在大多数情况下,多种泛素与初始泛素部分结合形成多聚体蛋白链。26S 蛋白酶体复合物通常需要 4 个或更多泛素部分进行底物识别<sup>[18]</sup>。泛素激活酶(E1)负责泛素激活泛素-蛋白质连接的起始步骤<sup>[19]</sup>。催化不同类型的泛素链结合到特定蛋白底物上是由不同的泛素结合酶(E2)和泛素连

结酶(E3)联合而完成的,其中泛素链的长度和连接类型是由泛素结合酶(E2)决定,泛素结合酶 E2 对泛素链的组装起重要的调控作用<sup>[20]</sup>。并且泛素结合酶(E2)在泛素级联过程中具有十分重要的作用。NSC697923 是泛素结合酶(E2)一种细胞选择透过性的抑制剂,据报道小鼠腹腔注射 5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  NSC697923,显示出强大的抗肿瘤功效。5 和 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 可以诱导突变细胞凋亡<sup>[21]</sup>。因此,本研究在猪卵母细胞体外成熟培养液中添加浓度为 0 (Control)、DMSO、5、10、15、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 以便找到最合理的添加

浓度,为探究泛素结合酶(E2)在猪卵母细胞体外成熟中的动态变化提供依据。

卵母细胞成熟是一个复杂的生理过程,有许多因子参与调控,期间卵泡中发生泛素化从而影响卵母细胞成熟<sup>[22]</sup>。在卵母细胞中添加去泛素化酶抑制剂 UCHs,其通过调节卵母细胞皮质和减数分裂纺锤体抑制泛素蛋白来促进卵母细胞成熟<sup>[23]</sup>。本研究 10、15 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 持续降低了猪卵母细胞体外成熟率,进而支持了抑制 UPP 系统阻止猪卵母细胞周期的观点<sup>[24]</sup>。ZP 糖蛋白无论存在于内层还是外层,ZP 层都含有各种糖残基,并且在卵泡液中通过 UPP 系统进行差异泛素化<sup>[25]</sup>。这种多样性导致涉及对应于猪卵母细胞生长的不同阶段 ZP 蛋白质的不同量泛素化。在本研究中,在猪卵母细胞 ZP 蛋白中检测到了泛素化蛋白,不同的 ZP 糖蛋白对 NSC697923 的治疗反应不同。在体外成熟培养液中添加 15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 处理后,有效地降低 ZP4、ZP2、ZP3、ZPs(ZP4、ZP2 和 ZP3 量的总和)蛋白泛素化的量。在用 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 处理检测到少量泛素化的 ZP 蛋白,可见随着 NSC697923 抑制剂浓度的增加,透明带发生泛素化的程度逐渐减低。

胎盘类哺乳动物是单精受精动物,受精时只需一个精子入卵,若多个精子入卵通常会导致胚胎发育异常或发育阻滞<sup>[26]</sup>。精子与卵子的相互作用中,精子携带的蛋白酶体可以降解 ZP 上的精子受体蛋白质。在精子和卵子发生质膜融合时,皮层颗粒中的水解酶等也会释放物质到卵周隙,溶解的 ZP 蛋白被降解似乎被泛素化,ZP 硬化,阻止其他精子穿过 ZP 而成功受精<sup>[27]</sup>。因此,阻止多精入卵是成功受精的重要过程<sup>[28]</sup>。本研究使用 10、15 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 增强了猪卵母细胞的受精前 ZP 硬化,有效地减少了每个卵母细胞附着的精子数量。结果表明,NSC697923 抑制剂可调节猪卵母细胞透明带精子黏附及多精入卵。

#### 4 结 论

本研究结果表明,在猪卵母细胞 IVM 液中添加 10、15 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 能够显著降低卵母细胞成熟率。猪卵母细胞 ZP 在卵母细胞成熟过程中发生泛素化,添加 15 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 能够显著地降低猪卵母细胞 ZP 中泛素化蛋白含量。在猪卵母细胞 IVM 液和 IVF 液中添

加浓度为 10、15 和 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NSC697923 能够显著降低 ZP 硬化时间和精卵结合率。因此,泛素结合酶抑制剂 NSC697923 对猪卵母细胞的生长和发育至关重要。

#### 参考文献(References):

- [1] NATH D, SHADAN S. The ubiquitin system[J]. *Nature*, 2009, 458(7237): 421.
- [2] PICKART C M. Mechanisms underlying ubiquitination[J]. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503-533.
- [3] PICKART C M. Back to the future with ubiquitin[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 181-190.
- [4] KOMANDER D, RAPE M. The ubiquitin code[J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 203-229.
- [5] CARON D, BYRNE D P, THEBAULT P, et al. Mitotic phosphotyrosine network analysis reveals that tyrosine phosphorylation regulates Polo-like kinase 1 (PLK1)[J]. *Sci Signal*, 2016, 9(458): rs14.
- [6] TIWARI M, PRASAD S, SHRIVASTAV T G, et al. Calcium signaling during meiotic cell cycle regulation and apoptosis in mammalian oocytes[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(5): 976-981.
- [7] SENTHILKUMARAN B, SREENIVASULU G, WANG D S, et al. Expression patterns of CREBs in oocyte growth and maturation of fish[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145182.
- [8] FUJIOKA Y A, ONUMA A, FUJII W, et al. Contributions of UBE2C and UBE2S to meiotic progression of porcine oocytes[J]. *J Reprod Dev*, 2018, 64(3): 253-259.
- [9] ITO C, YAMATOYA K, TOSHIMORI K. Equatorin-related subcellular and molecular events during sperm priming for fertilization in mice[M]//SAWADA H, INOUE N, IWANO M. Sexual Reproduction in Animals and Plants. Tokyo: Springer, 2014: 85-95.
- [10] KALKAN T, OLOVA N, ROODE M, et al. Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency[J]. *Development*, 2017, 144(7): 1221-1234.
- [11] SPINACI M, BUCCI D, GADANI B, et al. Pig sperm preincubation and gamete coincubation with glutamate enhance sperm-oocyte binding and *in vitro* fertilization[J]. *Theriogenology*, 2017, 95: 149-153.
- [12] PULVINO M, LIANG Y, OLEKSYN D, et al. Inhibition of proliferation and survival of diffuse large B-cell lymphoma cells by a small-molecule inhibitor of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13-Uev1A[J]. *Blood*,

- 2012,120(8):1668-1677.
- [13] HODGE C D, EDWARDS R A, MARKIN C J, et al. Covalent inhibition of Ubc13 affects ubiquitin signaling and reveals active site elements important for targeting[J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(7):1718-1728.
- [14] PONTRELLI P, CONSERVA F, PAPAIE M, et al. Lysine 63 ubiquitination is involved in the progression of tubular damage in diabetic nephropathy [J]. *FASEB J*, 2017, 31(1):308-319.
- [15] HEDRICK J L, WARDRIP N J. Isolation of the zona pellucida and purification of its glycoprotein families from pig oocytes[J]. *Anal Biochem*, 1986, 157(1):63-70.
- [16] KOMATSU S. Western blotting using PVDF membranes and its downstream applications [M]//KURIEN B T, SCOFIELD R H. Western blotting: Methods and protocols. New York: Humana Press, 2015, 1312:227-236.
- [17] TANIHARA F, NAKAI M, KANEKO H, et al. Evaluation of zona pellucida function for sperm penetration during *in vitro* fertilization in pigs[J]. *J Reprod Dev*, 2013, 59(4):385-392.
- [18] LAM Y A, LAWSON T G, VELAYUTHAM M, et al. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal[J]. *Nature*, 2002, 416(6882):763-767.
- [19] YI Y J, ZIMMERMAN S W, MANANDHAR G, et al. Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm-egg coat penetration during porcine fertilization [J]. *Int J Androl*, 2012, 35(2):196-210.
- [20] SUTOVSKY P, AARABI M, MIRANDA-VIZUETE A, et al. Negative biomarker-based male fertility evaluation: sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(4):554-560.
- [21] CHENG J, FAN Y H, XU X, et al. A small-molecule inhibitor of UBE2N induces neuroblastoma cell death via activation of p53 and JNK pathways [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(2):e1079.
- [22] YE Y H, RAPE M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(11):755-764.
- [23] MTANGO N R, SUTOVSKY M, VANDEVOORT C A, et al. Essential role of ubiquitin C-terminal hydrolases UCHL1 and UCHL3 in mammalian oocyte maturation[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(5):2022-2029.
- [24] SUN Q Y, FUCHIMOTO D, NAGAI T. Regulatory roles of ubiquitin-proteasome pathway in pig oocyte meiotic maturation and fertilization[J]. *Theriogenology*, 2004, 62(1-2):245-255.
- [25] YI Y J, MANANDHAR G, OKO R J, et al. Mechanism of sperm-zona pellucida penetration during mammalian fertilization: 26S proteasome as a candidate egg coat lysin [J]. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007, 63:385-408.
- [26] MA R J, ZHANG J Q, LIU X H, et al. Involvement of Rab6a in organelle rearrangement and cytoskeletal organization during mouse oocyte maturation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:23560.
- [27] ZIMMERMAN S W, MANANDHAR G, YI Y J, et al. Sperm proteasomes degrade sperm receptor on the egg zona pellucida during mammalian fertilization[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2):e17256.
- [28] XU W T, LI H L, ZHANG N, et al. Expression analysis and characterization of an autosome-localized *Tesk1* gene in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. *Gene*, 2016, 582(2):161-167.

(编辑 程金华)