

小鼠受精卵中蛋白激酶 C 底物的鉴定

于爱鸣 宗志宏 武迪迪 于秉治*

(中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110001)

摘要 为研究蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 在小鼠早期发育中的调节作用, 运用超排卵和体外受精技术, 采用体外磷酸化和放射自显影的方法, 鉴定小鼠 1- 细胞期受精卵中 PKC 的底物。经特殊的反复冻融处理, 消除卵中内源性蛋白激酶活性。55 个受精卵的样品中加入部分纯化的 PKC, 结合应用较强的 PKC 抑制剂 H-7 和星形孢菌素以及促分裂原活化蛋白激酶抑制剂 PD 098059 作为对照, 观察到 12 条 PKC 底物蛋白的放射自显影带, 根据标准蛋白质 R_f 值绘制的标准曲线计算, 这些磷酸化蛋白的相对分子量分别约为 120 kDa、100 kDa、79 kDa、63 kDa、59 kDa、47 kDa、40 kDa、34 kDa、32 kDa、26 kDa、24 kDa 和 22 kDa。实验结果表明, PKC 可通过底物蛋白活性的调节, 在小鼠早期发育中发挥重要作用。

关键词 蛋白激酶 C; 受精卵; 底物

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一种钙活化的、磷脂依赖性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。已知该家族有 12 个成员, 由 11 个基因编码。PKC 的各种亚型按其序列同源性和生化性质可以分为三类: 常规型 PKC (conventional PKC, cPKC) 包括 α 、 β I、 β II 和 γ , 是二脂酰甘油(DAG)和 Ca^{2+} 依赖性激酶; 新型 PKC (novel PKC, nPKC) 含有 δ 、 ϵ 、 η 和 θ , 其活性仅依赖于 DAG, 但对 Ca^{2+} 却是非应答性的; 非典型 PKC (atypical PKC, aPKC) 含有 ζ 、 λ /1、 μ , 对 DAG 和 Ca^{2+} 都是非应答性的。PKC 普遍地存在于生物体内的各种组织和细胞中, 参与细胞的生长、增殖、分化等过程^[1]。为了阐明 PKC 家族成员多种多样的生物学功能, 鉴定 PKC 的底物蛋白及研究底物蛋白的相关性质, 是非常必要和重要的。

近些年来, 随着发育生物学研究技术的不断改进和提高, 有关动物胚胎早期发育的研究取得了相应的长足进展, 大量的实验证据充分表明, PKC 在卵母细胞成熟、卵活化、受精及胚胎早期发育中起着关键性的作用^[2]。研究表明, 当 PKC 活化时, 可引起卵母细胞生发泡破裂^[3]; 导致受精卵的皮质颗粒出胞^[4]; 促进卵母细胞减数分裂完成; 并激活 M 期促进因子(MPF)^[5]; 活化受精卵 Na^+/H^+ 交换体, 胞质碱化^[6]; 促进第二极体开始形成; 原核形成^[7]; PKC ζ 参与了小鼠受精卵基因组早期转录的调控^[8]。然而, 小鼠受精卵中 PKC 底物蛋白的研究未见报道。本研究是用部分纯化的 PKC 经体外磷酸化反应

鉴定小鼠 1- 细胞期受精卵中该激酶底物蛋白。小鼠受精卵中 PKC 底物蛋白的相关研究, 将有助于阐明 PKC 在小鼠早期胚胎发育中的调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 昆明系小鼠和大鼠均由中国医科大学实验动物部提供。

1.1.2 试剂 孕马血清促性腺激素(PMSG)购自天津华孚高生物中心, 人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自上海生物生化制药厂, 二脂酰甘油(DAG)、磷脂酰丝氨酸(PS)、H-7、星形孢菌素(staurosporine)、PD 098059 均购自美国 Sigma 公司, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (比活度 $>185 \text{ TBq/mmol}$) 购自北京亚辉生物医学工程公司, 牛血清白蛋白(BSA)购自北京邦定泰克生物技术公司, Triton X-100 为 Boehringer Mannheim GmbH 产品。快速蛋白层析系统(FPLC)为 Pharmacia Fine Chemicals 产品, 电动组织匀浆机为瑞典产的 polytron。

1.2 方法

1.2.1 超排卵及卵的收集^[9] 取 4~5 周雌性昆明小

收稿日期: 2005-03-10 接受日期: 2005-05-26

国家重点基础研究发展规划项目(973 计划)资助(No.G1999055900-2)和国家自然科学基金重点项目资助(No.39730460)

* 通讯作者。Tel: 024-23256666-5299, Fax: 024-23261253, E-mail: yzbiochem@hotmail.com

鼠腹腔内注射 10 IU/只 PMSG, 47~48 h 后再次腹腔内注射 10 IU/只 hCG, 进行超排卵处理。为得到体内受精卵时, 应将注射 hCG 后的雌鼠与 8 周以上的成熟雄鼠合笼交配。hCG 注射 17 h 后, 将有阴栓的雌鼠断脊椎处死, 然后迅速开腹剔除输卵管壶腹部于 M2 培养液中, 在实体解剖显微镜下用针刺破壶腹膨大部, 让卵细胞团自然流出。用 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 透明质酸酶(用 M2 培养液配制)消化, 以去除卵细胞周围的颗粒细胞, 促使卵细胞彼此分开。用口控微量毛细管将受精卵在 M2 培养液中反复淋洗 3 次, 最后将受精卵转移到 M16 培养液(与 M2 培养液不同的是含有 25 mmol/L NaHCO_3 无 HEPES 成分)中, 置放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中, 待全部受精卵收集结束后, 从培养箱取出计数, 并转移到 0.5 ml 的 Eppendorf 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。如不能在当日做实验时, 应将离心后得到的受精卵沉淀置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 以待后用。

1.2.2 体外受精^[9] 4~5 周的雌性小鼠超排卵处理如前所述。在雌鼠 hCG 注射 12 h 后, 将 8 周以上的雄性小鼠经断脊椎法处死, 剔除附睾尾部及输精管到 500 ml Whittingham's 培养液, 补充 3% BSA。然后用眼科镊子将精子挤压排出到培养液中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 1.5 h 以上, 促使精子获能。同时, 在 hCG 注射 12.5 h 后, 取雌鼠断脊椎处死, 并收集卵细胞。将卵细胞放在含 3% BSA 的 100 μl Whittingham's 培养液, 置培养箱中培养。在 hCG 注射后的 13.5 h, 取获能后的 100 μl 精子液放入到有卵细胞的培养孔内, 继续在培养箱温育 4 h, 最后将受精卵吸出, 并转移到 M16 培养液的孔内, 培养到适当时间。

1.2.3 卵细胞的裂解 根据收集的受精卵数目, 适当地将一定量的裂解缓冲液(含 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L EGTA, 0.25 mmol/L 蔗糖)加入到卵细胞沉淀的样品管中, 充分振荡混匀, 然后经过 4~5 次的冻(-30 $^{\circ}\text{C}$, 30 min)、融(室温, 30 min)循环, 裂解受精卵。

1.2.4 PKC 的分离及部分纯化 将 4 只雄性大白鼠断头处死, 剔除小脑后取大脑称重, 加 6 倍体积的粉碎缓冲液(含 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.25 mol/L 蔗糖, 2 mmol/L EDTA, 10 mmol/L EGTA, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 亮抑蛋白酶肽, 20 mmol/L 2-巯基乙醇和 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟), 用电动组织匀浆机进行

匀浆, 然后转移到离心管, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、100 000 g 高速离心 1 h, 取上清液浓缩后加到与 FPLC 系统相连接的 Mono Q 柱(0.5 cm \times 5 cm), 用 0~0.7 mol/L 的 NaCl 梯度洗脱, 每管收集 1 ml, 测定 PKC 活性, 集中 PKC 活性较高的各管, 进行浓缩。酶蛋白含量按照 Lowry 法, 以 BSA 为标准液进行测定。实验中所用部分纯化的 PKC 液约为 0.8 mg/ml, 保存在 60% 甘油、0.3% Triton X-100 的液体中, 分装后置 -30 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用。

1.2.5 体外磷酸化反应 除卵细胞裂解液提供 PKC 磷酸化底物外, 磷酸化反应体系还含有 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mmol/L 醋酸镁, 1.25 mmol/L CaCl_2 , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PS, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAG, 约 1.6 μg 部分纯化的 PKC, 74 KBq [γ - ^{32}P]ATP。磷酸化反应是由混合液加到样品裂解液时开始, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、恒温振荡水浴 20 min, 用 5 \times 样品缓冲液终止酶促反应。

1.2.6 电泳及放射自显影 上述磷酸化反应后的样品加入 5 \times 样品缓冲液后, 沸水煮 5 min。该样品经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳使磷酸化蛋白得以分离。电泳凝胶染色、脱色及风干后, 可直接与 X 光底片一起放在带有增感屏的暗盒, 置 -70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影约 72 h。

2 结果

2.1 小鼠 1-细胞期受精卵的 PKC 体外磷酸化

在体外磷酸化反应中, 既然受精卵细胞裂解液作为底物样品, 则实验中设法避免或消除细胞内源性蛋白激酶活性, 是非常重要的和必要的。因此, 进行受精卵细胞冻融裂解时, 没有采用常规的快速冷冻, 而是选取 -30 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢且长时间冷冻, 再结合室温融解, 有效地消除了细胞内源性蛋白激酶活性的影响, 确保了体外磷酸化反应的可信性和重复性。图 1 显示的是 55 个受精卵样品的实验结果, 没有外加 PKC 激酶时, 未见任何磷酸化蛋白的放射自显影带(泳道 1), 当加入部分纯化 PKC 时, 可以分辨出 12 条放射自显影带(泳道 2), 分子量约 35 kDa 以上的蛋白质较多, 且带密度大, 而 35 kDa 以下的蛋白质较少, 且带密度较小。根据标准蛋白质 R_f 值绘制的标准曲线, 图中放射自显影带对应的磷酸化蛋白相对分子量分别约为 120 kDa、100 kDa、79 kDa、63 kDa、59 kDa、47 kDa、40 kDa、34 kDa、32 kDa、26 kDa、24 kDa 和 22 kDa。但

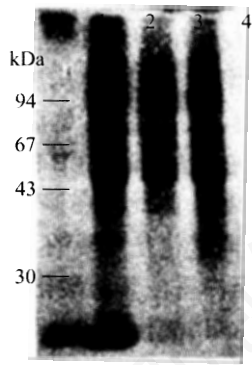


图1 小鼠1-细胞期受精卵的PKC体外磷酸化

1: 无纯化PKC; 2: 纯化PKC; 3: 纯化PKC和40 $\mu\text{mol/L}$ H-7; 4: 纯化PKC和10 nmol/L 星形孢菌素。

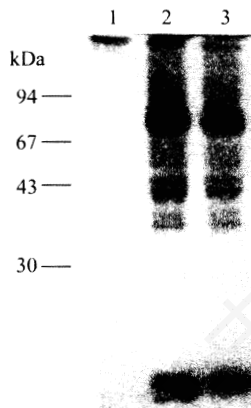


图2 小鼠1-细胞期受精卵的PKC体外磷酸化的特异性

1: 无纯化PKC; 2: 纯化PKC; 3: 纯化PKC和50 $\mu\text{mol/L}$ PD 098059。

加入部分纯化PKC的同时, 添加H-7 (40 $\mu\text{mol/L}$) 和星形孢菌素(10 nmol/L), 磷酸化蛋白的放射自影带明显地趋淡, 甚至偏小分子的蛋白质带已难以辨认(泳道3和4)。

2.2 小鼠1-细胞期受精卵的PKC体外磷酸化的特异性

在研究中, 为确保体外磷酸化反应的特异性, 又选择促分裂原活化蛋白激酶抑制剂PD 098059作为对照, 观察其对PKC所催化的磷酸化反应的影响。实验结果显示, PD 098059对PKC体外磷酸化受精卵底物蛋白没有影响(图2)。

2.3 小鼠体外受精卵的PKC体外磷酸化

为了进一步证实上述实验结果的正确性, 又以小鼠体外受精卵作为对象进行观察, 在实验中, 使用80 $\mu\text{mol/L}$ H-7和50 $\mu\text{mol/L}$ PD 098059, 显示的

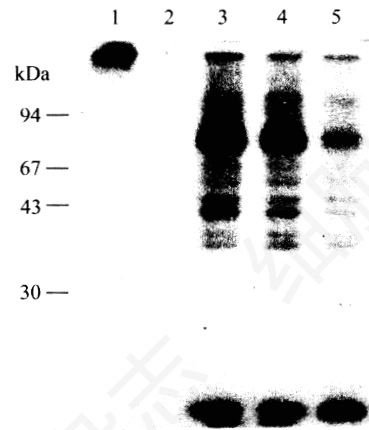


图3 小鼠体外受精卵的PKC体外磷酸化

1: 无纯化PKC; 3: 纯化PKC; 4: 纯化PKC和50 $\mu\text{mol/L}$ PD 098059; 5: 纯化PKC和80 $\mu\text{mol/L}$ H-7。

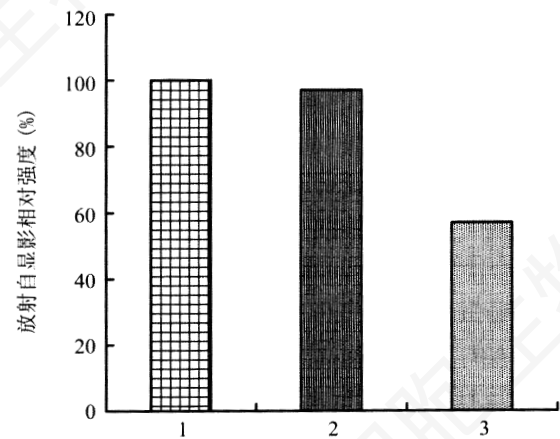


图4 63kDa底物蛋白放射自显影带的相对强度比较

1: 纯化PKC; 2: 纯化PKC和PD 098059; 3: 纯化PKC和H-7。

放射自显影与上述体内受精卵的实验结果完全一致(图3)。

对感兴趣的63 kDa的底物蛋白放射自显影带, 经凝胶成像系统运用分析软件Gelworks ID进行了灰度的测定, 以未加PKC抑制剂样品的PKC体外磷酸化放射自显影带的灰度作为100%, 则添加PD 098059和H-7抑制剂样品的灰度值分别是99%和57%(图4)。

3 讨论

磷酸化这种化学修饰方式对于许多蛋白质的功能, 特别是对酶活性的可逆性调节起着十分重要的作用。在本研究的体外实验中, 利用部分纯化的PKC, 检测到小鼠1-细胞期受精卵中的多种蛋白质

可被磷酸化, 结合应用 PKC 激酶抑制剂, 根据磷酸化蛋白电泳分离后放射自显影的比较分析, 显示至少有 12 种蛋白质是 PKC 磷酸化作用的靶分子, 或者说是 PKC 底物的候选者, 它们的分子大小各异, 主要为分子量在 35 kDa 以上的蛋白质。

PKC 介导的磷酸化作用参与许多复杂的生物学反应, 如分化、增殖和细胞凋亡。除 PKC γ 主要在脑组织和脊髓特异地被表达外, 大多数 PKC 组织分布较为广泛。当激动剂如激素、神经递质、生长因子等作用于靶细胞表面的特异性受体时, 磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸降解生成的二脂酰甘油(DAG)引起 PKC 短暂活化; 而 PKC 的持久活化则是由磷脂酰胆碱(PC)降解而生成的 DAG 或者佛波醇酯处理所引起。PKC 一旦活化, 就会作用于合适的靶分子, 导致后者发生磷酸化修饰, 进而体现出各种细胞生物学功能。除了常常用于测定 PKC 活性而作为底物的组蛋白、髓鞘碱性蛋白、鱼精蛋白外, 报道的其他 PKC 底物包括有糖原合酶-3 β 、上皮生长因子受体、维生素 D 受体、神经钙调蛋白和 Raf 等。MARCKS 是研究得比较清楚的、分布较为广泛的一个 PKC 特异性底物蛋白, 具有与钙调蛋白和肌动蛋白的结合能力^[10], 经 PKC 作用发生磷酸化后, 其交联肌动蛋白的能力相应改变^[11]。PKC 活化导致 Mac MARCKS(MARCKS 的另一成员)磷酸化后, 则可降低后者结合钙调蛋白的能力^[12]。F52 蛋白(MARCKS 同源序列)受 PKC 催化作用被磷酸化后, 同样导致结合钙调蛋白的能力减弱^[13]。Pleckstrin 是存在于血小板和白细胞中的一种功能蛋白质, 该蛋白质最初就是作为 PKC 磷酸化底物而被鉴定出来。Pleckstrin 磷酸化后可以调节肌动蛋白细胞骨架的重排。鱼精蛋白参与小鼠 1-细胞期受精卵转录的调控^[14]。总之, PKC 信号转导途径在细胞的多种生理过程中起着举足轻重的作用。本实验研究显示, 小鼠 1-细胞期受精卵中至少存在 12 种以上的 PKC 底物分子, 其中包括 63 kDa 的蛋白质。根据本研究室有关小鼠受精卵 1-细胞期发育到 2-细胞期过程中, PKC 对 M 期促进因子(MPF)活性影响的研究表

明, PKC 可以通过调节 MPF 活性发挥对受精卵细胞早期发育的调控作用^[15]。MPF 是由调节亚基细胞周期蛋白 B 和催化亚基 Cdc2 构成的异二聚体, 其活性状态在很大程度上取决于细胞周期蛋白 B 的调节作用。有研究显示周期蛋白 B 的磷酸化在时间上与 MPF 活化相一致, 因此, 在调节 MPF 的活性方面, 周期蛋白 B 的磷酸化是重要的。小鼠细胞周期蛋白 B 是 62 kDa 蛋白质, 其磷酸化形式为 63 kDa。在本研究中, PKC 磷酸化底物分子之一恰好为 63 kDa 蛋白质, 它极有可能是周期蛋白 B。如果是这样, 可以认为, PKC 可通过磷酸化细胞周期蛋白 B, 改变后者与 Cdc2 的结合能力, 从而影响 MPF 的激酶活性, 这就进一步支持了本研究室前期的观察。这些实验结果也与其他相关的研究报道大体相一致^[6]。由于材料所限, 虽不能明确其他 PKC 底物分子究竟为何种蛋白质, 但根据已知的研究资料, 可以推测它们多数是信号转导分子, 如接合蛋白、受体、调节酶等, 一部分为功能效应蛋白质。可以确信, 广泛深入地研究小鼠受精卵中 PKC 底物蛋白的特性, 将有助于进一步阐明 PKC 在小鼠早期胚胎发育中的调控机制, 也必将为认识小鼠早期胚胎发育的整体调控作用提供有益的资料。

参考文献 (References)

- [1] Nishisuka Y. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001, **25**: 3S
- [2] Pauken CM *et al. Dev Biol*, 2000, **223**: 411
- [3] Eckberg WR *et al. Dev Biol*, 1987, **124**: 57
- [4] Ducibella T *et al. Biol Reprod*, 1993, **48**: 1251
- [5] Eckberg WR *et al. Dev Biol*, 1992, **149**: 395
- [6] Olds JL *et al. Dev Biol*, 1995, **172**: 675
- [7] Gallicano GI *et al. Dev Biol*, 1993, **156**: 94
- [8] 付伟等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, **19**: 240
- [9] Hogan B *et al. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986, 89
- [10] Seykora JT *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 2505
- [11] Hartwig JH *et al. Nature*, 1992, **356**: 618
- [12] Li J *et al. Cell*, 1992, **70**: 791
- [13] Blackshear PJ *et al. J Biol Chem*, 1992, **267**: 13540
- [14] 于爱鸣等. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, **18**: 217
- [15] Yu BZ *et al. Cell Biochem Funct*, 2004, **22**: 291

Identification of Substrates of Protein Kinase C at 1-Cell Fertilized Eggs in Mouse

Ai-Ming Yu, Zhi-Hong Zong, Di-Di Wu, Bing-Zhi Yu*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract To study regulatory effects of protein kinase C (PKC) in early development of mouse, identification of the PKC substrates at fertilized eggs was carried out with super-ovulation, *in vitro* fertilization, *in vitro* phosphorylation and autoradiography. The endogenous protein kinase in fertilized egg lysates was deactivated through multiply freezing and thawing cycles. The sample without purified PKC did not show any autoradiography band, so it served as blank control in this study. The sample of 55 fertilized eggs with partially purified PKC showed 12 bands in autoradiography. While less autoradiography bands were observed in samples containing both purified PKC and more potent PKC inhibitor (H-7 or staurosporin). According to *R_f* value of proteins, the relative molecular weights of these phosphorylated proteins were determined as 120 kDa, 100 kDa, 79 kDa, 63 kDa, 59 kDa, 47 kDa, 40 kDa, 34 kDa, 32 kDa, 26 kDa, 24 kDa and 22 kDa, respectively. These results suggested that PKC played an important role in early development of mouse.

Key words protein kinase C; fertilized eggs; substrate

Received: March 10, 2005 Accepted: May 26, 2005

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.G1999055900-2) and the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (No.39730460)

*Corresponding author. Tel: 86-24-23256666-5299, Fax: 86-24-23261253, E-mail: yzbiochem@hotmail.com