

6-DMAP 诱导 PM 胚胎形成过程中 核纤层蛋白 B 的动力学变化

林 飞 贾 超 邵根宝 徐世晶 刘 畅 刘 辉 乔真真 刘红林 *

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要 我们的前期研究发现: 被微管抑制剂 nocodazole 抑制在第一次有丝分裂中期的小鼠受精卵在加入 6-DMAP 处理后核膜重新出现, 并且父、母本的基因组未发生融合, 分别形成了类似雌、雄原核的两个细胞核, 它们共存于卵细胞质中, 我们把这种特殊的胚胎称之为 PM 胚胎(post-mitotic embryo)。本研究表明: 在去除抑制剂 3 h 后未能形成核膜的胚胎进一步卵裂, 而形成核膜的 PM 胚胎培养 24 h 未见进一步发育。此外, 我们采用免疫荧光染色观察 PM 胚胎核膜重现过程中核纤层蛋白 B 的动力学变化, 结果显示: 在加入 6-DMAP 后核纤层蛋白 B 在染色体周围逐渐聚集, 约 3 h 后核膜完全形成, 此时核纤层蛋白 B 在染色体周围的聚集达到最高峰。文中还对 6-DMAP 诱导核膜形成的机制进行了探讨。

关键词 核纤层蛋白 B; 6-DMAP; PM 胚胎; 免疫荧光染色

细胞由间期向分裂期转变的过程中, 成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)起了主要的推动作用, 它能促进相关蛋白质的磷酸化, 从而导致核膜崩解、染色质浓缩、微管重组等。尽管已经有很多关于蛋白质磷酸化导致的核膜崩解和染色质浓缩的研究报道, 但并不知道蛋白质去磷酸化是否足以导致核膜的重建和染色体解聚。我们的前期研究结果发现, 被微管抑制剂(nocodazole)阻断在中期的小鼠受精卵在加入 6-DMAP 后可以诱导胚胎进入间期, 包括核膜重新形成^[1], 但机制尚不清楚。

核膜在细胞周期的不同阶段发生着不同的变化。在间期, 染色质借核纤层附着于内核膜。在分裂期, 核被膜的变化最为显著, 可见核被膜周期性崩解、消失、重建^[2]。内核膜的内表面有一层网络状纤维蛋白质, 称为核纤层。核纤层普遍存在于真核细胞的间期核内, 可支持核膜、参与染色质和核的组装。核纤层在细胞分裂时亦呈现出周期性的变化: 在细胞分裂前期, 核纤层结构解体, 以蛋白单体(即核纤肽)形式存在于细胞质中。分裂末期, 核膜重现, 核纤层在染色体周围也重新装配。在分裂间期, 核纤层随核膜面积不断扩大亦相应伸展。核纤层由核纤层蛋白(lamin)构成, 核纤层蛋白可分为 A、B、C 三种类型。在细胞分

裂前期结束时, 核纤层蛋白被磷酸化, 核膜解体, 其中核纤层蛋白 B 与核膜残余小体结合, 而核纤层蛋白 A 和核纤层蛋白 C 则分散于胞质中。分裂末期, 核纤层蛋白去磷酸化, 重新组装, 介导了核膜的重建^[3]。因此示踪核纤层蛋白 B 的变化可以反映核膜的消长变化。本研究通过检测核纤层蛋白 B 的变化来研究 6-DMAP 诱导核膜形成的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄昆明系雌性小白鼠、昆明系雄鼠。

1.2 主要仪器与试剂

体视显微镜(SZ51, Olympus)、正置荧光显微镜(DM LB2, Leica)、CO₂ 培养箱和超净工作台等。

PMSG (100 IU/ml)、hCG (100 IU/ml)、PBS 溶液、CZB 溶液、nocodazole (0.5 μ g/ml, 购于 Sigma 公司)、6-DMAP (8 mmol/L, 购于 Sigma 公司)、核纤层蛋白 B 抗体(羊抗鼠, 购于 Invitrogen 公司)、FITC 标记二抗(兔抗羊, 购于 Invitrogen 公司)、DAPI (购于 Sigma 公司)、Triton X-100 溶液

收稿日期: 2005-11-18 接受日期: 2006-04-03

国家自然科学基金(No.30371034)和南京农业大学 SRT 项目资助

* 通讯作者。Tel: 025-84395278, Fax: 025-84395314, E-mail:

liuhonglin@263.net

(0.5%)、多聚甲醛(3.7%)、透明质酸酶(0.1%)。

1.3 超数排卵与胚胎获得

取4周龄雌性昆明系小鼠,在下午5时左右腹腔注射10 IU PMSG,间隔48 h后再腹腔注射10 IU hCG。注射hCG后立即与公鼠合笼。次日上午检查阴道栓。选出阴道栓阳性者,脱臼法致死。取出卵巢与输卵管,盛于PBS/BSA溶液中。在显微镜下找到输卵管膨大部,用清洁针头撕破,引出胚胎。将获得的胚胎在CZB培养液中洗涤3~5次,除去颗粒细胞。

1.4 诱导PM(post-mitotic embryo)胚胎形成

挑选出发育正常的胚胎转入含0.5 $\mu\text{g/ml}$ nocodazole的CZB培养液中,放入CO₂培养箱中培养,使胚胎抑制于有丝分裂中期。此时再加入8 mmol/L 6-DMAP溶液。约3 h后核膜重新出现,形成两个新的细胞核,父母本基因组分别存在于一个新核内^[1]。

1.5 免疫荧光染色

在加入6-DMAP后0、0.5、1、2、3 h分别取胚胎作免疫荧光染色。先取一定数量的胚胎于3.7%多聚甲醛溶液中,室温固定1 h;然后用0.5% Triton X-100溶液室温作用20 min,以提高胚胎细胞膜的通透性;再将胚胎移到核纤层蛋白B抗体(羊抗鼠)溶液中,室温温育1 h;继续将胚胎转入FITC标记的二抗(兔抗羊)溶液中,室温温育45 min,注意避光(用锡纸包裹置于暗处);最后用DAPI溶液染细胞核,室温作用20 min,避光处理(同上)。每次转移胚胎前用PBS/BSA清洗3次,以清除上次的溶液残余。

2 结果

2.1 6-DMAP诱导了PM胚胎的形成

正常情况下,受精后约4 h雌、雄原核开始形成(图1A);受精后16 h进入分裂中期,父母本基因组融合、排列在赤道板附近(图1B)。但用微管抑制剂nocodazole处理后,父母本基因组融合受阻,形成两个独立的基因组(图1C);在中期加入6-DMAP处理,诱导形成了两个细胞核,父母本基因组各自独立地存在于一个细胞核中,PM胚胎产生(图1D)。受精卵经Nocodazole和6-DMAP处理后,父母本的基因组未发生融合,分别形成类似雌雄原核的两个细胞核,共存于卵细胞质中,虽然没发生卵裂,但经历了第一次有丝分裂从间期到中期再到

间期的全过程,因此我们把这种特殊胚胎称之为PM胚胎(post-mitotic embryo)。与正常情况下的雌、雄原核不同,PM胚胎的两个细胞核大小相当(图1A,图1D)。

2.2 6-DMAP和nocodazole共处理后胚胎的发育潜能

我们的前期研究结果显示:尽管2 mmol/L的6-DMAP没有能诱导核膜形成(0/27),但4 mmol/L和8 mmol/L 6-DMAP处理后分别有46.8% (22/47)和97.4% (76/78)的胚胎被诱导形成了PM胚胎^[1]。本研究发现,在去除抑制剂3 h后未能形成核的胚胎进一步卵裂,而形成核膜的PM胚胎培养24 h未见进一步发育。不同浓度的6-DMAP和nocodazole共处理后胚胎的2-细胞发育率如图2所示。因为8 mmol/L 6-DMAP处理后的几乎所有胚胎都形成了两个核,所以去除抑制剂后没有卵裂发生(0/42),但2 mmol/L浓度组全部卵裂成2-细胞(15/15),4 mmol/L组55% (11/20)发育成2-细胞。

2.3 6-DMAP诱导PM胚胎形成过程中核纤层蛋白B的动力学变化

受精后雌、雄原核形成,此时核纤层蛋白B作为核纤层的组分存在于雌、雄原核的染色体周围,呈球状(图3g);进入分裂前期后,胚胎具有某种促进间期细胞进行分裂的因子,即MPF。MPF可使多种蛋白质磷酸化,核纤层蛋白亦是MPF的作用底物之一,有研究报道在MPF作用15 min后,核纤层蛋白的磷酸化增强,30 min后即达高峰,接着核纤层蛋白开始解聚,30 min后核纤层崩解^[4]。如此一直延续到中期,因而中期时荧光检测没有检测到核纤层蛋白B的存在(图3h);这时加入6-DMAP处理,0.5 h后人仍未检测到核纤层蛋白B的存在(图3i);1 h后有微量核纤层蛋白B出现在染色体周围(图3j);2 h后在染色体周围核纤层蛋白B进一步集聚,此时明显可见核纤层蛋白B的存在(图3k);3 h后达到高峰(图3l)。

3 讨论

3.1 6-DMAP诱导PM胚胎形成的过程

PM胚胎核的形成大致可分为两个阶段:核膜形成阶段和核纤层形成阶段。

核膜形成是一个高度有序的复杂过程。可分为囊泡锚定、囊泡融合、膨胀生长三个过程。核膜自然崩解后形成囊泡,这些囊泡是核膜重组的主要

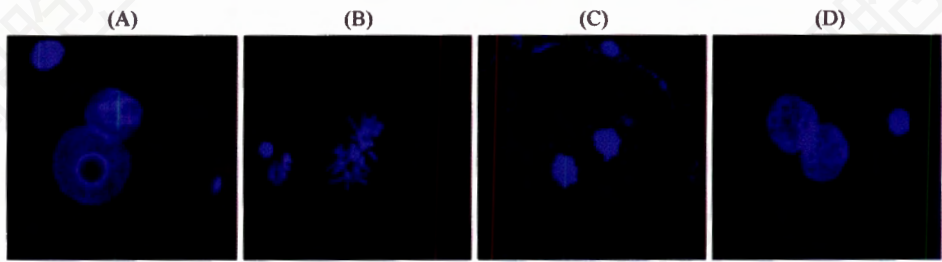


图 1 正常胚胎与 PM 胚胎的细胞核染色

受精后选取发育正常的胚胎转入含 0.5 $\mu\text{g/ml}$ nocodazole 的 CZB 培养液中(抑制于分裂中期), 约 4 h 后加入 8 mmol/L 的 6-DMAP, 6-DMAP 在 nocodazole 存在的条件下诱导形成了 PM 胚胎。受精后约 6 h 雌雄原核形成(A); 受精后约 16 h 处于分裂中期(B); 被 nocodazole 抑制在中期的 1- 细胞胚胎(C); PM 胚胎(D)。

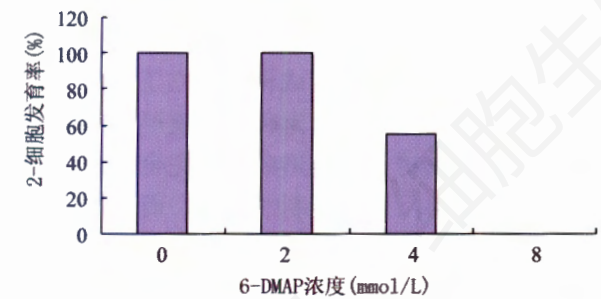


图 2 不同浓度 6-DMAP 对胚胎 2- 细胞形成率的影响

用不同浓度的 6-DMAP 和 nocodazole 处理后清洗胚胎, 转入清洗的 CZB 培养液中, 3 h 后检查胚胎的 2- 细胞形成率。

原料。囊泡首先在染色体周围锚定(图 3j, 图 3k, 图 3p, 图 3q)。这一过程依靠染色体两极的亲脂结

构、含核纤层蛋白 B 受体的囊泡以及核纤层蛋白 B 受体等^[5,6]。其中亲脂结构不仅是囊泡锚定的位点而且是核膜形成的必须结构, 它最终也将融合到新形成的核膜中^[7,8]。囊泡先在亲脂结构处锚定在染色体上, 然后逐步扩展, 最后覆盖整个染色体表面(图 3k, 图 3q), 这一过程需要 ATP 水解供能。然后锚定的囊泡开始相互融合, 亲脂结构也整合到核膜之中, GTP 水解可促进囊泡间的融合^[9], 囊泡融合后核膜初步形成。最后是核膜的膨胀生长, 这一过程是随着染色体的解聚和核的膨胀一起进行的。

核膜初步形成后细胞核开始膨胀, 水溶性的核纤层蛋白 B 通过核孔进入细胞核内^[5], 在核膜下重组核纤层, 因此图 3 中 k~l 和 q~r 过程中核纤层蛋白

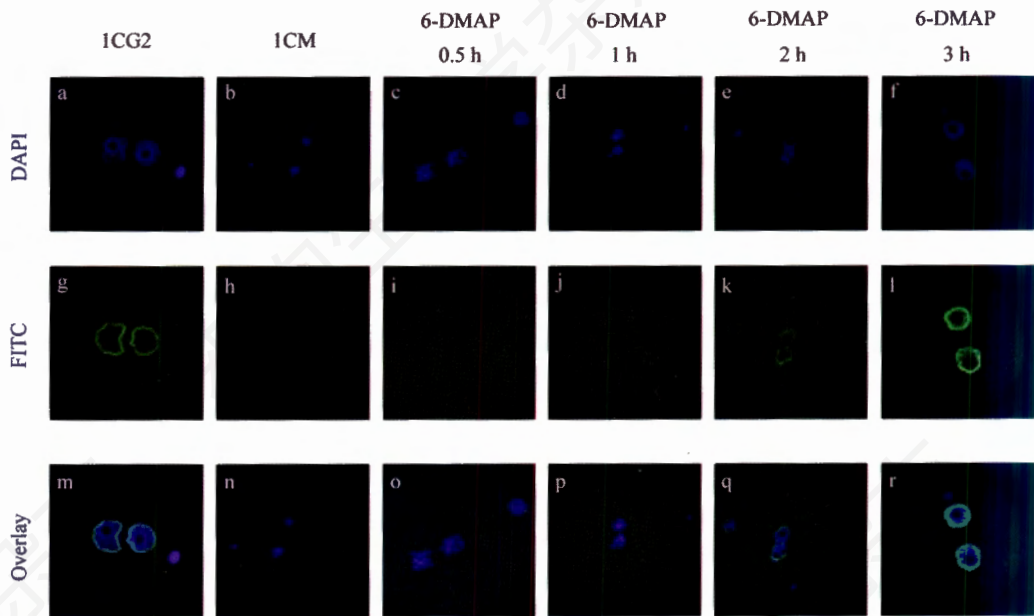


图 3 6-DMAP 诱导 PM 胚胎形成过程中不同时期核纤层蛋白 B 的变化图

6-DMAP 处理后约 3 h 核膜完全形成。在这一过程中分别在 6-DMAP 加入后 0、0.5、1、2、3 h 时作荧光染色, 观察核纤层蛋白 B 分布。DAPI 标记的 DNA(a~f); FITC 标记的核纤层蛋白 B(g~l); DNA 和核纤层蛋白 B 的组合(m~r)。1CG2: 1- 细胞 G₂ 期; 1CM: 1- 细胞中期。

B 荧光进一步加强。在这一过程中仍有囊泡继续和核膜融合,核膜进一步膨胀生长,且核纤层中的核纤层蛋白 B 与核膜上的核纤层蛋白 B 受体间相互作用,使核膜和核纤层的连接更加紧密^[9]。

3.2 6-DMAP 诱导核膜形成的机制

3.2.1 6-DMAP 能阻止幼小囊泡的破裂和染色质的浓缩 有研究表明 6-DMAP 可以阻止鼠、牛、猪细胞在 GV 期幼小囊泡的破裂和染色质的浓缩^[10-12]。囊泡是核膜重组的主要原料,囊泡之间相互融合形成新的核膜,6-DMAP 能阻止囊泡的破裂就为核膜重建提供了原料基础。另外,核纤层蛋白 B 受体在细胞核上定位的过程中,染色质与核纤层蛋白相比显得更加不可缺少^[13]。染色质上的某些位点可能是核纤层蛋白 B 受体与含有核纤层蛋白 B 受体囊泡在染色体上锚定的结合点。6-DMAP 抑制了染色质的浓缩,使这些位点充分暴露,从而更有利于锚定的进行。

3.2.2 6-DMAP 诱导了囊泡的锚定 6-DMAP 使磷酸化了的 MPF 去磷酸化,从而降低了其活性,活性降低了的 MPF 可能诱导了囊泡在染色体周围的锚定(图 3j, 图 3k, 图 3p, 图 3q)。尽管有研究显示含核纤层蛋白 B 受体的囊泡是核膜形成所必需的,而含核纤层蛋白 B 的囊泡并不是必需的^[5]。但我们的实验表明:当环境中存在含有核纤层蛋白 B 的囊泡时,它还是锚定在了染色体周围(图 3j, 图 3k, 图 3p, 图 3q)。这说明当环境中不存在含核纤层蛋白 B 的囊泡时,含核纤层蛋白 B 受体的囊泡能够取代它在染色体周围锚定,当环境中含有这种囊泡时,这种取代就没有必要了。另外,囊泡的锚定是一个依赖于 ATP 水解的过程^[9],ATP 水解恰恰是一个去磷酸化的过程,6-DMAP 能促进这一过程的发生,从而促进囊泡的锚定。

因此,6-DMAP 不仅间接地诱导了囊泡在染色体周围的锚定,而且也间接地为囊泡的锚定创造了

条件。这种条件不仅包括抑制染色质浓缩,使锚定位点充分暴露,还包括促进 ATP 水解,为囊泡锚定供能。

3.2.3 6-DMAP 促进了囊泡的融合 囊泡的融合是一个依靠 GTP 水解的过程,6-DMAP 通过促进 GTP 水解而促进了囊泡间的融合。

综上所述,6-DMAP 恰恰扮演了一个与 MPF 作用相反的角色。MPF 能促进蛋白质的磷酸化,而促进核膜崩解、染色质浓缩,但 6-DMAP 却能使蛋白质去磷酸化、诱导核膜重建、抑制染色质浓缩。

3.3 6-DMAP 诱导核膜形成的意义

6-DMAP 诱导核膜形成模型建立了一个良好的人工控制核膜形成过程,为研究核膜形成过程提供帮助。6-DMAP 诱导核膜形成过程完全是在人工控制条件下进行的,人工控制性更强。而且这样的过程完全是在细胞内发生,相比在细胞提取物环境中研究核膜的形成过程更具说服力。因此它是一个良好的核膜重建模型。

参考文献 (References)

- [1] Liu HL *et al.* *Cell Res*, 2005, **15**:127
- [2] 张迺衡主编. *医学分子生物学*, 北京:北京医科大学出版社, 241
- [3] 洪满贤编著. *细胞核分子生物学*, 厦门:厦门大学出版社, 122
- [4] Gilbert SF. *Developmental Biology*, 7th ed., Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2003
- [5] Collas P *et al.* *Theriogenology*, 1998, **49**: 67
- [6] Chaudhary N *et al.* *J Cell Biol*, 1993, **122**: 295
- [7] Collas P *et al.* *Eur J Cell Biol*, 1996, **71**: 22
- [8] Collas P *et al.* *Dev Biol*, 1995, **169**: 123
- [9] Collas P. *Mol Reprod Dev*, 2000, **56** (2 Suppl): 265
- [10] Motlik J *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1990, **27**: 230
- [11] Fulka JJ *et al.* *Mol Reprod Dev*, 1991, **29**: 379
- [12] Poccia DL *et al.* *Exp Cell Res*, 1990, **188**: 226
- [13] Krohne G *et al.* *Eur J Cell Biol*, 2005, **84**: 163

Dynamic Characteristics of Lamin B during the Formation of PM-embryos Induced by 6-DMAP

Fei Lin, Chao Jia, Gen-Bao Shao, Shi-Jing Xu, Chang Liu, Hui Liu, Zhen-Zhen Qiao, Hong-Lin Liu*
(College of Animal Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Our previous researches indicated that nuclear envelope reoccurred after adding 6-DMAP when mouse embryos were inhibited by nocodazole in the metaphase of the first mitosis. The paternal and maternal genomes reconstructed male and female pronuclear-like nuclei respectively, rather than fusing into one single karyocyte. These embryos were designated as post-mitotic embryos (PM-embryos), in which two special nuclei exist in zygotic cytoplasm. This study indicated that after being removed the inhibitor (6-DMAP and nocodazole), the embryos without nuclear envelope reoccurrence could further develop to cleavage, while the PM-embryos could not after being cultured for 24 hours. Furthermore, we investigated the dynamic characteristics of lamin B by immunofluorescence during the nuclear envelope reconstruction of PM-embryos. The result showed that lamin B recruited to the chromosome gradually after 6-DMAP was added into the culture solution. Integrated Nuclear envelope formed about 3 hours later when the recruitment of lamin B reached the maximum level. The mechanism of the formation of the nuclear envelope induced by 6-DMAP is also discussed in this article.

Key words lamin B; 6-DMAP; PM-embryos; immunofluorescence

Received: November 18, 2005 Accepted: April 3, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30371034) and SRT Program of Nanjing Agricultural University

*Corresponding author. Tel: 86-25-84395278, Fax: 86-25-84395314, E-mail: liuhonglin@263.net