

Cdc42 和球形肌动蛋白在卵母细胞胞质分裂中的定位分析

程大也^{1,2*} 梁彬^{1,3*} 李丰^{1**}

(¹中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室, 沈阳 110001; ²中国医科大学附属第一医院输血科, 沈阳 110001;

³中国医科大学高等职业技术学院, 沈阳 110001)

摘要 研究活性Cdc42与球形肌动蛋白(G-actin)在爪蟾卵母细胞胞质分裂中的定位关系。分别用 GFP-wGBD mRNA 与罗丹明-594-微管蛋白、Alexa-488-球形肌动蛋白与罗丹明-594-微管蛋白、GFP-wGBD mRNA 与 Alexa-594-球形肌动蛋白共同显微注射爪蟾卵母细胞。利用共聚焦显微镜, 时间延迟摄影方法, 分别观察活体卵母细胞中活性 Cdc42、球形肌动蛋白在胞质分裂过程中的定位, 以及活性 Cdc42 与球形肌动蛋白在胞质分裂中的定位关系。在卵母细胞胞质分裂中, 活性 Cdc42 与球形肌动蛋白存在空间上共定位现象, 并且在时相上具有一致性。结果提示活性 Cdc42 和球形肌动蛋白在卵母细胞胞质分裂过程中密切相关。

关键词 Cdc42; 球形肌动蛋白; 卵母细胞; 胞质分裂

卵母细胞需要经过胞质分裂才能形成并释放极体, 收缩环(contractile ring)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^[1], 释放极体。

Cdc42作为小G蛋白Rho家族中一类能结合GTP的蛋白质, 在哺乳动物细胞信号转导中发挥着“分子开关”样的重要作用。研究表明 Cdc42 通过调节肌动蛋白等细胞骨架物质来调节细胞形态学变化^[2]。Ma 等^[3]研究人员以爪蟾卵母细胞为不对称细胞分裂模型, 证明了 Cdc42 在调节收缩环形成和极体释放中起关键作用, 注射了 Cdc42^{T17N} (dominant negative Cdc42)的爪蟾卵母细胞无收缩环形成。细胞内的肌动蛋白以球形肌动蛋白(G-actin)和纤维状肌动蛋白(F-actin)两种形式存在^[4]。球形肌动蛋白在 Mg²⁺、K⁺、Na⁺ 离子及 ATP 诱导下能自我聚合形成高分子量、双螺旋结构纤维状肌动蛋白^[5]。在真核细胞中肌动蛋白的动态变化是细胞活动的基础, 其结构及功能研究成为细胞生物学和结构生物学的重要内容。先前研究提示纤维状肌动蛋白参与细胞收缩环形成及其与活性 Cdc42 的关系。由此我们设想: 活性 Cdc42 与球形肌动蛋白在细胞收缩环形成过程中空间定位及时相上存在何种关系? 本研究以爪蟾卵母

细胞的极体形成及释放过程为不对称细胞分裂模型, 研究活性 Cdc42 与球形肌动蛋白在卵母细胞收缩环形成和胞质分裂过程中的空间和时相上的定位关系, 并探讨其在细胞分裂中可能具有的普遍性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、动物 GFP-wGBD 质粒[含有微奥综合征蛋白(Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP)]片段的质粒, 其表达蛋白能结合活性 Cdc42, 呈现绿色荧光)由美国威斯康辛-麦迪逊大学惠赠; 爪蟾由本单位动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 罗丹明-594-微管蛋白(rhodamine-594-tubulin)、Alexa-488-球形肌动蛋白(Alexa-488-G-actin)和 Alexa-594-球形肌动蛋白(Alexa-594-G-actin) (Molecular Probes 公司); 体外合成 mRNA 试剂盒(Ambion 公司); 限制性内切酶 BamHI (Promega 公司); 胶原酶(Sigma 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 卵母细胞的准备 实验前 3 日将成熟雌性爪蟾皮下注射 50 IU 孕马血清促性腺激素(serum

收稿日期: 2007-01-17 接受日期: 2007-05-08

国家自然科学基金资助项目(No.30370736, No.30570966)、教育部博士点基金(No.20050159023)和教育部回国人员科研启动基金资助

* 共同第一作者

** 通讯作者。Tel: 024-23261056, E-mail: fli@mail.cmu.edu.cn

gonadotrophin, PMSG)。实验当日断头处死爪蟾,取腹腔两侧卵巢组织并在显微镜下将其撕裂成 10~15 个卵左右的碎片,以胶原酶(1.5 mg/ml)消化 3 h,显微镜下观察卵母细胞状态并取大小相似,发育成熟的 VI 期卵母细胞,置于无 Ca^{2+} $1\times\text{OR}2$ 培养液(83 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L Na_2HPO_4 , 5 mmol/L HEPES pH 7.8)中,室温震荡培养 4 h。

1.2.2 体外合成 GFP-wGBD mRNA GFP-wGBD 质粒用 *Bam*HI 进行酶切线性化, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,以线性化的质粒 DNA 为模板,体外合成 GFP-wGBD mRNA, $-70\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 共聚焦显微镜观察卵母细胞的变化 活性 Cdc42 在卵母细胞胞质分裂中的定位:用 10 nl 0.25 mg/ml GFP-wGBD mRNA 和 10 nl 3 mg/ml 罗丹明-594-微管蛋白共同注射爪蟾卵母细胞,室温温育过夜,1 $\mu\text{mol/L}$ 孕酮刺激卵母细胞,利用共聚焦显微镜观察卵母细胞形态学变化,扫描间隔 2 μm ,时间延迟摄影法(time-lapse)进行活体观察。

球形肌动蛋白在卵母细胞胞质分裂中的定位:14 nl 4 U/ml Alexa-488-球形肌动蛋白和 10 nl 3 mg/ml 罗丹明-594-微管蛋白共同显微注射爪蟾卵母细胞。室温用 1 $\mu\text{mol/L}$ 孕酮刺激卵母细胞,生发泡破裂(GVBD)发生 90 min 后,观察卵母细胞收缩环形成。

活性 Cdc42 与球形肌动蛋白的定位关系:10 nl 0.25 mg/ml GFP-wGBD mRNA 和 14 nl 4 U/ml Alexa-594-球形肌动蛋白共同注射爪蟾卵母细胞,方法同活性 Cdc42 观察。

2 结果

2.1 活性 Cdc42 在卵母细胞胞质分裂中的定位

GFP-wGBD 探针(绿色)可观察卵母细胞内活性 Cdc42 变化。在生发泡(GV)期和 GVBD 发生后,未观察到活性 Cdc42 的出现。在极体释放前数分钟,纺锤体(红色)上方和周边可见微弱的活性 Cdc42, 2~4 min 内,活性逐渐增强,随后胞质分裂发生。活性的 Cdc42 向下扩展,包绕整个极体(图 1)。

2.2 球形肌动蛋白在卵母细胞胞质分裂中的定位

Alexa-488-球形肌动蛋白和罗丹明-594-微管蛋白共同显微注射爪蟾卵母细胞。通过时间延迟摄影法实验发现:球形肌动蛋白(绿色)逐渐聚集于纺锤体(红色)上方和周边,向下向内收缩,切断纺锤体,形成极体(图 2)。

2.3 活性 Cdc42 与球形肌动蛋白的定位关系

Alexa-594-球形肌动蛋白(红色)和 GFP-wGBD mRNA(绿色)共同显微注射后可见在卵母细胞的胞质分裂过程中,活性 Cdc42 和球形肌动蛋白存在明显的共定位现象,在出现的时间上具有一致性(图 3)。

3 讨论

在卵母细胞胞质分裂发生前,分裂中期 I 纺锤体向动物极方向移动,纺锤体一端与卵母细胞皮质层接触诱发了肌动蛋白等参与细胞收缩环形成的物质的聚集,继而卵母细胞发生了胞质分裂,形成极体和成熟卵细胞^[6]。在纺锤体迁移和极体形成过程中,需要肌动蛋白微丝参与^[7-9]。最近文献报道,Cdc42 在爪蟾和小鼠的卵母细胞成熟过程中参与胞质分裂和极体形成,Cdc42 通过调节纤维状肌动蛋白的聚集,促进细胞收缩环形成,完成胞质分裂过程^[3]。

目前研究主要观察在 Cdc42 调节下,在特定皮质层区域纤维状肌动蛋白聚集并参与细胞收缩环形成,球形肌动蛋白是如何参与收缩环形成及细胞分裂尚不知晓,而且活性 Cdc42 与收缩环在空间及时间上的定位关系也不十分清楚。为了探讨胞质分裂过程中是否球形肌动蛋白参与收缩环形成并发现其与活性 Cdc42 的定位关系,我们利用爪蟾卵母细胞为不对称细胞分裂模型,采用带有荧光标签的能特异结合活性 Cdc42 的分子探针 GFP-wGBD^[10]、荧光标记的球形肌动蛋白和微管蛋白动态观察活性 Cdc42 和球形肌动蛋白定位,并探讨二者在空间及时间上的定位关系。结果表明:活性 Cdc42 只在极体释放数分钟前出现并逐渐增强,随后细胞发生胞质分裂,释放极体。既然球形肌动蛋白和纤维状肌动蛋白之间存在动态平衡,而且球形肌动蛋白需要聚合成纤维状肌动蛋白发挥生理功能,那么观察球形肌动蛋白的变化来反映肌动蛋白就具有更加敏感及特异性。我们把荧光标记的球形肌动蛋白显微注射卵母细胞,动态观察的结果表明:在极体释放前,球形肌动蛋白大量聚集到纺锤体的上方和周边,并且可见收缩环形成。既然球形肌动蛋白参与胞质分裂收缩环形成,那么球形肌动蛋白与活性 Cdc42 是何种定位关系呢?我们利用荧光共定位技术,采用荧光标记的球形肌动蛋白和能特异结合活性 Cdc42 的荧光分子探针 GFP-wGBD mRNA 共同注射卵母细胞,结果表明球形肌动蛋白与活性 Cdc42 出现的时间和空间上具有一致性,提示在卵母细胞胞质分裂过程中,活性 Cdc42 与球形肌动蛋

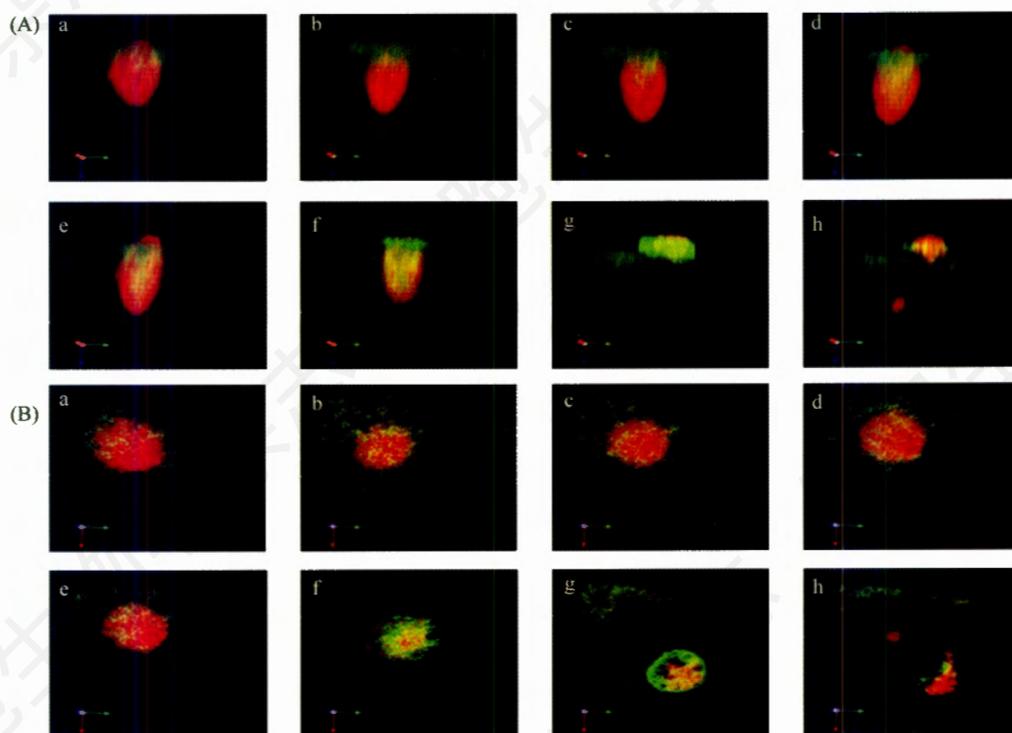


Fig. 1 Cdc42 activity localization during oocyte cytokinesis

(A) shows from time-lapse experiment showing Cdc42 activity (green) changes in oocyte. a–e showing spindle (red) touched the cortex. f–g showing Cdc42 activity increased. h showing the cytokinesis ensued. (B) En face series from time-lapse experiment were corresponding with (A).

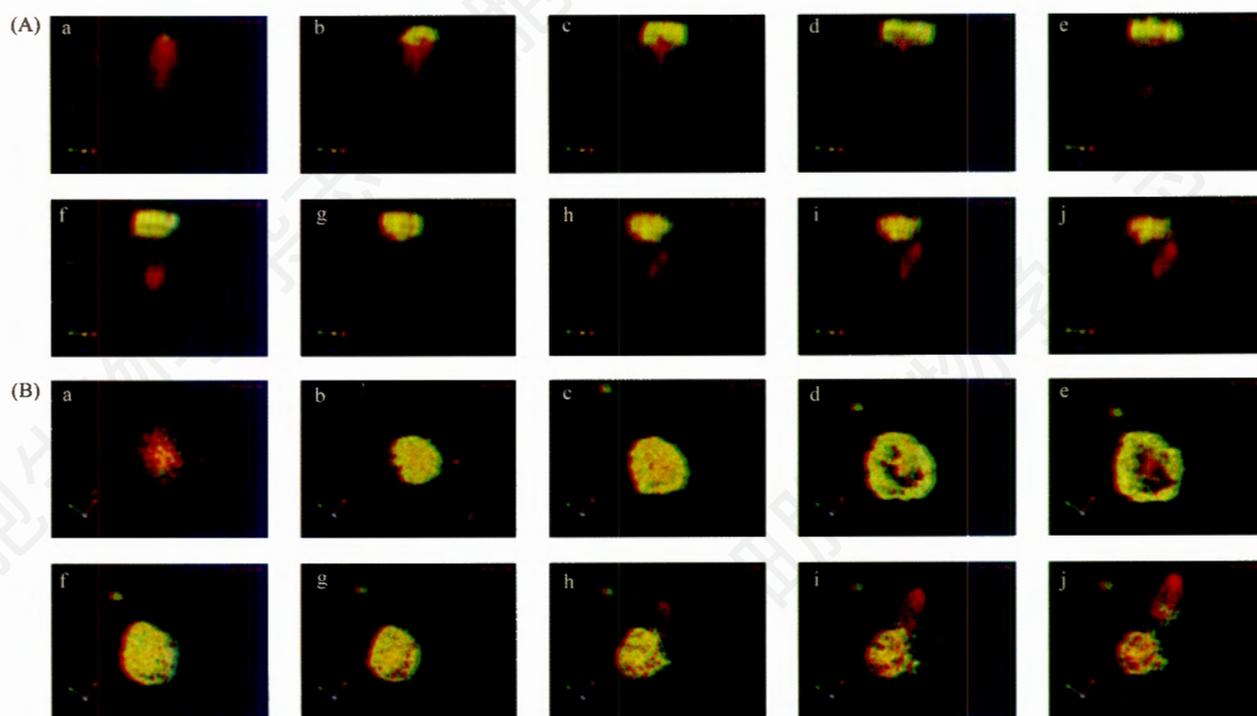


Fig.2 G-actin changes during oocyte cytokinesis

(A) shows from time-lapse experiment showing G-actin changes in oocyte. a–b showing G-actin signal increased gradually. c–d showing obvious contractile ring formation. e–j showing the spindle was severed by contractile ring, and polar body was emitted. (B) En face series from time-lapse experiment were corresponding with (A).

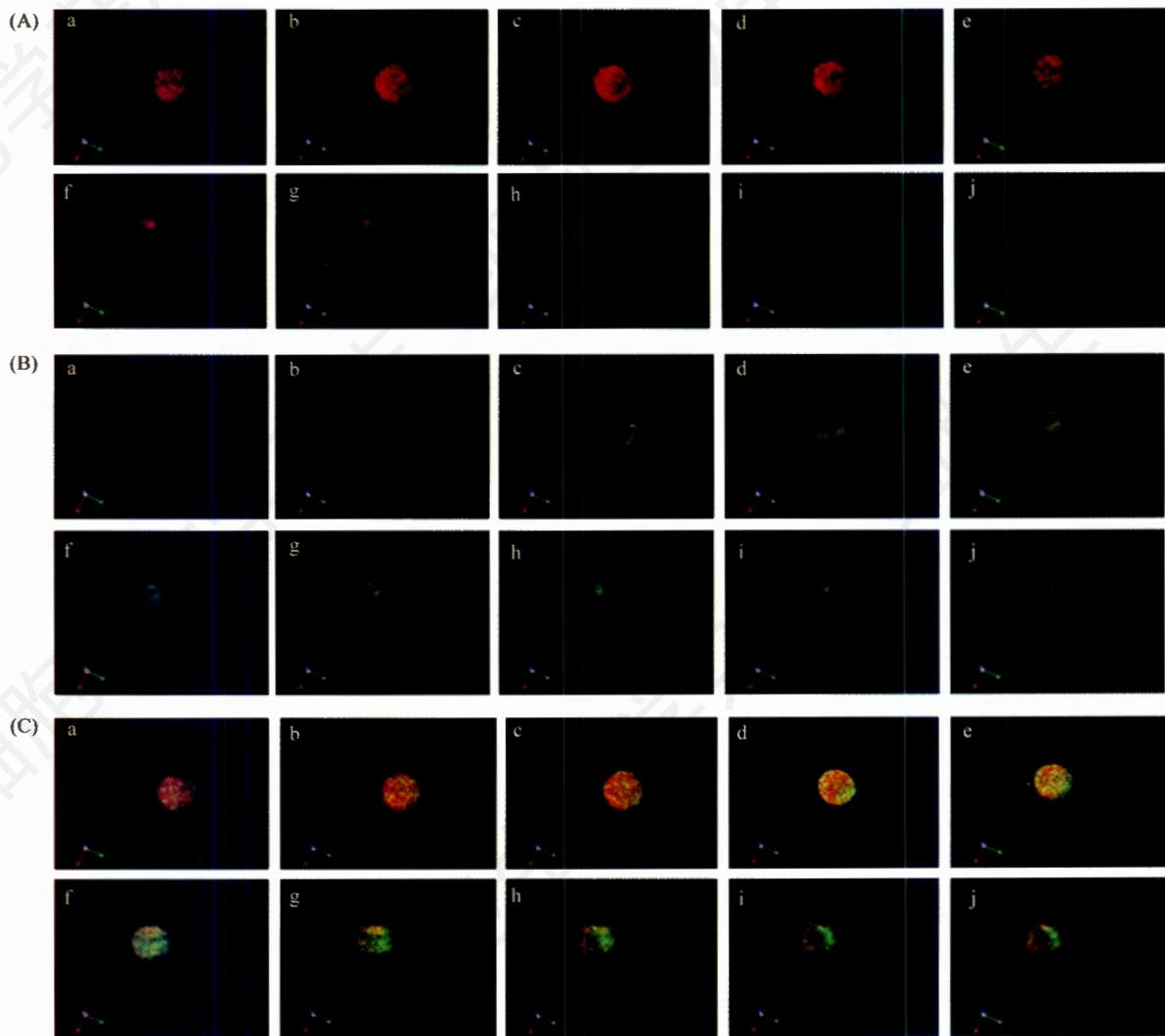


Fig.3 Colocalization of active Cdc42 and G-actin during oocyte cytokinesis

(A) showing G-actin localization and changes. (B) showing active Cdc42 localization and changes. (C) showing colocalization of Cdc42 activity and G-actin.

白可能与细胞收缩环形成及胞质分裂密切相关。

Cdc42、纤维状肌动蛋白、球形肌动蛋白三者之间的调节机制目前未知。研究表明球形肌动蛋白和纤维状肌动蛋白的动态平衡受多种因素调节,细胞内含有多种球形肌动蛋白隔离蛋白,例如抑制蛋白(profilin)和胸腺嘧素(thymosin)均能够与球形肌动蛋白结合,并且抑制其聚合。改变胞质中隔离蛋白浓度或者改变它们的活性,会使胞质中肌动蛋白单体-聚合体的平衡发生变化^[11]。Yang等^[12]报道,抑制蛋白通过与N-WASP和Cdc42共同作用调节肌动蛋白聚合。还有文献报道Cdc42参与调节肌动蛋白纤维去聚合蛋白(ADF/cofilin)^[13]。由此我们推测,Cdc42可能通过调节微丝结合蛋白调控两种肌动蛋白状态

的转换并参与之后事件的调控。本实验分析了活性Cdc42和球形肌动蛋白的共同定位现象,结果提示活性Cdc42与球形肌动蛋白在胞质分裂过程中紧密联系,但通过何种信号通路及其分子机制还有待进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] 宋今丹等. 医学细胞生物学, 第三版, 北京: 人民卫生出版社, 2004, 262
- [2] Garrard SM *et al.* *EMBO J*, 2003, **22**: 1125
- [3] Ma C *et al.* *Curr Biol*, 2006, **16**: 214
- [4] Pollard TD *et al.* *Annu Rev Biochem*, 1986, **55**: 987
- [5] Furukawa R *et al.* *Int Rev Cytol*, 1997, **175**: 29
- [6] Na J *et al.* *Curr Biol*, 2006, **16**: 1249
- [7] Maro B *et al.* *J Embryo Exp Morphol*, 1986, **92**: 11

- [8] Simerly C *et al.* *Mol Biol Cell*, 1998, **9**: 2509
[9] Leader B *et al.* *Nat Cell Biol*, 2002, **4**: 921
[10] Benink HA *et al.* *J Cell Biol*, 2005, **168**: 429
[11] Goode BL *et al.* *J Cell Biol*, 1998, **142**: 723
[12] Yang C *et al.* *J Cell Biol*, 2000, **150**: 1001
[13] Chen TJ *et al.* *J Neurobiol*, 2006, **66**: 103

Colocalization of Cdc42 and G-actin during *Xenopus* Oocyte Cytokinesis

Da-Ye Cheng^{1,2*}, Bin Liang^{1,3*}, Feng Li^{1**}

¹Key Laboratory of Cell Biology of Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China;

²Transfusion Department, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China;

³Advanced Technical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Study the colocalization of active Cdc42 and G-actin during *Xenopus* oocyte cytokinesis. GFP-wGBD mRNA and rhodamine-594-tubulin, alexa-488-G-actin and rhodamine-594-tubulin, GFP-wGBD mRNA and alexa-594-G-actin were microinjected into *Xenopus* oocytes respectively. Employ confocal microscopy and time-lapse experiments to observe localization of active Cdc42 and G-actin as well as colocalization of active Cdc42 and G-actin during oocyte cytokinesis. Results showed that active Cdc42 colocalized with G-actin spatially and temporally, and indicated active Cdc42 might tightly correlated with G-actin during *Xenopus* oocyte division process.

Key words Cdc42; G-actin; oocyte; cytokinesis

Received: January 17, 2007 Accepted: May 8, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370736, No.30570966), Doctoral Fund of Ministry of Education of China (No.20050159023) and Scientific Research Foundation for Returned Scholars, Ministry of Education of China

*Da-Ye Cheng and Bin Liang contributed equally to this work

**Corresponding author. Tel: 86-24-23261056, E-mail: fli@mail.cmu.edu.cn