

微丝在卵母细胞成熟过程中的作用及调控

王清泉 曹翊杰¹ 倪 华*(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; ¹哈尔滨医药集团生物工程有限公司, 哈尔滨 150030)

摘要 微丝作为细胞骨架的组成部分, 在卵母细胞成熟过程中的作用及调控近年来日益受到关注。微丝介导了卵母细胞中细胞器迁移、分散染色质收集、皮质重组、极性建立、第一极体排出等过程。现对微丝在卵母细胞的发育和成熟中作用机制的研究进展进行综述。

关键词 微丝; 卵母细胞; 减数分裂

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, 产生机械运动。微丝参与卵母细胞减数分裂过程中的多个细胞动力学事件。卵母细胞由原始生殖细胞分化而来, 卵母细胞的成熟是受精和胚胎发育的必要条件。研究卵母细胞的成熟机制具有十分重要的意义, 可以为转基因动物、体外受精等技术提供大量的成熟卵母细胞, 对生殖生物学、发育生物学、辅助生殖、遗传病研究、稀有生物的保种等众多相关学科的发展具有重要意义。微丝在卵母细胞成熟过程中的作用及调控在近年的研究中受到越来越多的关注。本文重点介绍近年来该领域取得的新进展。

1 微丝的聚合和解聚

1.1 微丝的聚合

肌动蛋白有两种存在形式, 即球形肌动蛋白单体(G-actin, GA)和它的多聚体-纤维形肌动蛋白(F-actin, FA)。聚合和解聚就是指这两种形态之间的改变。微丝的聚合分两个阶段: 首先, GA形成寡聚体, 这一过程称为成核阶段。形成的寡聚体指导GA从两端添加到寡聚体上, 使微丝生长。GA在寡聚体两端聚合的速度不同, 聚合快的一端称为正端(刺端), 聚合慢的一端称为负端(点端)。

FA增长的方式包括分支增长和直线增长。这两种增长方式分别由两类微丝结合蛋白Arp2/3和形成素(formin)调控。

Arp2/3是一种影响成核和分支过程的复合物, 属于肌动蛋白关联蛋白(actin-related protein, Arp), 在某些依赖肌动蛋白聚合而发生的细胞运动中起重要作用^[1]。单独的Arp2/3复合体只有简单的成核作用, 而当它与成核促进因子(nucleation-promoting factors,

NPFs)、ATP、微丝母链结合后, 就会在它存在的位置形成分支点。形成素是另一种调控微丝增长的蛋白质, 它具有FH1 (formin homology 1)和FH2 (formin homology 2)两个基本结构域, FH1与肌动蛋白-前纤维蛋白(actin-profilin)复合物结合, 将肌动蛋白单体传递给FH2结构域, 前纤维蛋白被释放出来, 最终形成一个直线增长的微丝结构。形成素的活性受Rho家族蛋白调控。形成素和Arp2/3的不同在于: Arp2/3诱导的微丝聚合, 成核中心只要有一个肌动蛋白单体即可, 而形成素诱导的微丝聚合, 成核中心需要有两个肌动蛋白单体组成二聚体。

1.2 微丝的解聚

微丝的解聚与微丝的聚合不是两个对立的过程, 微丝聚合所需GA部分来源于FA解聚。由于FA自发解聚所得GA不足以维持细胞内的微丝快速聚合, 因此细胞中存在使微丝解聚的因子。两类微丝结合蛋白: 溶胶蛋白和肌动蛋白解聚因子/丝切蛋白(actin depolymerizing factor/cofilin, ADF/cofilin)家族蛋白都能促进微丝解聚^[2]。二者的活性依赖于RhoA通过两条不同的信号通路调控: RhoA的下游效应物磷脂酰肌醇-4-磷酸盐-5-激酶, 将磷脂酰肌醇-4-磷酸盐转变为磷脂酰肌醇4,5-二磷酸盐(PIP₂), PIP₂可以与溶胶蛋白结合并使其失活^[3,4]; RhoA的下游效应物ROCK使Limk激酶(Limk)磷酸化, 磷酸化的Limk使活性形式丝切蛋白磷酸化, 从而转变成非活性形式。

2 微丝对卵母细胞成熟过程的影响

卵母细胞在成熟过程中发生一系列的变化, 调控

收稿日期: 2007-11-27 接受日期: 2008-03-10

国家自然科学基金(No.30500361)和黑龙江省教育厅科学研究项目(No.11511040)资助

* 通讯作者。Tel: 0451-55190846, E-mail: huani@neau.edu.cn

机制复杂，彼此看似独立，实际相互影响。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^[5]。

2.1 微丝与生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)过程中细胞器迁移和极性建立的关系

GVBD是卵母细胞减数分裂过程的标志事件，目前存在一种假设：GVBD的发生伴随着卵母细胞与其周围卵丘细胞在细胞通信和细胞黏附方面的改变。卵丘细胞的扩展依赖于微丝的重组^[6]。微丝在GVBD过程中还与纺锤体、染色体、内质网和中心体等细胞器的位置变化有关。纺锤体、染色体和内质网等细胞器对于卵母细胞极性的建立有重要作用，哺乳动物卵母细胞极化的标志就是纺锤体定位到动物极皮质，而内质网定位到植物极皮质^[7]。

GVBD后，纺锤体在细胞中心形成，并迁移到皮质中。这与同时期微丝的分布变化一致。用细胞松弛素B或者D温育小鼠卵母细胞，GVBD可以发生，并且纺锤体照常在细胞中心形成，但不能迁移定位到皮质。Jasplakinolide是踏车运动的阻滞剂，可促进微丝聚合和稳定FA。用Jasplakinolide处理小鼠卵母细胞的效果与细胞松弛素B或者D的效果相同^[8]。由此说明，纺锤体从细胞中心迁移到皮质的过程由微丝介导。近来研究表明染色体可能参与这一迁移过程。微丝与染色体通过PAR蛋白家族的PARD6A结合，形成复合物调节纺锤体的运动^[9]。PARD6A是第一种被发现与纺锤体迁移有关的蛋白质。小鼠卵母细胞中，纺锤体刚开始迁移时，PARD6A均匀的分布在纺锤体上，GVBD后6 h，PARD6A聚集到接近皮质的纺锤体极上^[10]。Rac-GTP对纺锤体在皮质中定位有重要调节作用。Rac-GTP是通过染色体携带的GTP/GDP转换因子(GEF)活化Rac-GDP而来。免疫荧光实验表明，在生发泡期(germinal vesicle, GV)小鼠卵母细胞中，Rac-GTP是均匀分布在卵母细胞皮质中的，纺锤体向皮质迁移时，Rac-GTP在纺锤体即将迁移到的皮质上方聚集，而在其余细胞皮质中消失。在卵母细胞成熟过程中抑制Rac活性，使卵母细胞停滞在第一次分裂前期，纺锤体无法延长；在卵母细胞第二次分裂中期停滞时，抑制Rac活性，纺锤体不能定位在皮质区^[11]。

染色体聚合和分离的主要调节者是微管，关于微丝的作用一直处于假设阶段。但是，最新研究描述了微丝在海星卵母细胞中对染色体移动的调节。核

膜破裂(nuclear envelope breakdown, NEBD)后，染色体分散在细胞内，将要形成纺锤体的微管并不能接触到所有的染色体。这时，微丝形成一个网状结构，收集分散的染色体，运送到将要形成纺锤体的微管处^[12]。

内质网(endoplasmic reticulum, ER)伴随着卵母细胞的成熟发生改变。在GV期，ER定位在细胞质；在GVBD后的M2期，ER在皮质聚集。许多研究证实内质网与微管关系紧密，但是，最近有实验表明微丝参与ER在皮质区的定位。在体外培养小鼠卵母细胞中加入一种微丝解聚因子——LatA，发现皮质区域无内质网，即内质网无法定位到皮质；而加入微管解聚因子，对内质网定位到皮质无影响^[13]。

微丝-微管共同调控的细胞器也包括中心体，细胞松弛素B处理后，微丝解聚，但并不影响中心体迁移。中心体、线粒体的迁移由微管调控^[14]。分裂间期用LatA处理爪蟾体外成熟细胞，使微丝解聚，发现中心体分裂停止。但细胞仍可以进入第二次分裂得到双核细胞。这一结果证明微丝参与G₂/M期中心体的变化^[15]。

1985年，首次发现小鼠卵母细胞的皮质并非均匀的，而是极性分布的。纺锤体定位的膜下皮质是一个富含肌动蛋白、缺乏皮质颗粒和微绒毛的区域，极体的排出依赖这一区域的存在。皮质极性的建立是减数分裂细胞极性建立的必要条件^[16]。皮质极性是卵母细胞成熟过程中，肌动蛋白骨架重新排列所引起的。部分染色体诱导了这种骨架重排，形成皮质颗粒缺失区。卵母细胞在将要有纺锤体定位的动物极皮质上方形成一个肌动蛋白帽，纺锤体在细胞中心装配完成后，一端与肌动蛋白帽相连，然后沿最短线路向皮质移动，一组染色体伴随纺锤体移动到动物极皮质。纺锤体到达皮质后，皮质极性形成。有实验证明，正是这部分移动到皮质的染色质启动了皮质重组，限定了卵裂沟形成位置。位于纺锤体上方的肌球蛋白、Par家族蛋白(Par3、Par6)，以及Rho家族蛋白(Rho、Rac、Cdc42)都是形成皮质极性必不可少的调节物^[17]。

细胞极性调控机制复杂，Par家族蛋白和Rho家族蛋白对细胞极性的维持起到关键作用^[18]。小鼠卵母细胞中，Par3、Par6、和PKC ζ 组成一个复合体，并定位到动物极皮质纺锤体上方。实现这种定位，依靠复合体中的Par6激活Rho蛋白家族中的与Rac1或Cdc42的活性。以Cdc42为例：它通过与Par6结合参与卵母细胞的极化^[19]。向GV期小鼠卵母细胞

注射 CDC42 显性负突变体, 培养 15 h 后发现: 纺锤体不能正常定位到动物极皮质, 而是均匀向两侧皮质扩散, 细胞的极性被破坏, 同源染色体不能分离。进一步培养还发现第一极体不能排出^[20]。Ras 超家族的 Ran 也影响小鼠卵母细胞的极性, 与 Rho 影响纺锤体迁移不同, Ran 更多的是影响肌动蛋白帽形成。显微注射 Ran 的显性负突变体抑制 Ran 活性发现, 卵母细胞的肌动蛋白帽无法形成。

果蝇卵母细胞的极化始于卵子发生, 在受精前完成。果蝇的卵母细胞极化是微管和微丝共同作用的结果。Oskar mRNA 及其蛋白质定位到果蝇卵母细胞后极是果蝇极性建立的重要事件。微管介导 Oskar mRNA 向果蝇卵母细胞后极转运。微丝的主要作用是使 Oskar mRNA 的蛋白质产物锚定在后极^[21]。

2.2 微丝对皮质和皮质颗粒的作用

小鼠卵母细胞质膜下方存在大量微丝。这些微丝一端铆定在质膜上, 另一端互相结合, 形成皮质区。随着卵母细胞发育, 皮质中肌动蛋白发生重排, 这种重排受减数分裂染色体的影响: 第一次减数分裂末期, 皮质中仅存在 GA 和少量肌动蛋白纤维; 细胞发育到第二次减数分裂中期, 皮质中形成大量的 FA, 皮质肌动蛋白重排完成。GA 聚合成 FA 由 Rho 家族的 Cdc42 和 Rac 调控 Arp2/3 来完成^[22]。

皮质颗粒(cortical granule, CG)最初是由高尔基体形成, 然后迁移到卵皮质中并定位在质膜之下^[23]。细胞松弛素 D 可以阻止迁移过程的发生, 说明 CG 的迁移是由微丝介导的。海胆卵母细胞中, Rho 家族蛋白和成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)

都是 CG 迁移的重要调节物, 抑制二者的活性都可以抑制 CG 迁移。Rho 对 CG 迁移的调节过程见图 1。Rho 首先与鸟苷酸抑制因子(guanine nucleotide inhibitor, GDI)分离, 然后在鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange protein, GEF)的作用下, 由无活性形式的 Rho-GDP 转变为有活性形式的 Rho-GTP。Rho-GTP 与 CG 结合, 使 CG 迁移到皮质区。Rho 通过 ROCK 和 Dia 影响 CG 的迁移^[24]。CG 迁移到卵膜下方的过程是由微丝介导的, 但后续的 CG 在皮质中定位是一个既不受微丝也不受微管调控的过程。

2.3 微丝对极体排出的调控

卵母细胞的分裂是典型的不对称分裂, 分裂的结果是形成较大的卵母细胞和较小的极体。这种胞质不对称的分裂是由于纺锤体和卵裂沟的偏心定位所造成的。细胞分裂需要在后期形成一个肌动蛋白收缩环, 微丝调控收缩环的收缩。收缩环将在末期收缩形成卵裂沟, 分离卵母细胞和极体^[25]。PIP₂ 介导的信号通路对维持收缩环的完整和卵裂沟的稳定十分重要。磷脂酶(phospholipase C, PLC)可以水解 PIP₂ 形成二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)和三磷酸肌醇(IP₃), 加入 PLC 的抑制剂, 使已经形成的卵裂沟快速退化。PIP₂ 在卵裂沟处集中, 吸引质膜定位到肌动蛋白环。实验表明, PIP₂ 无法启动卵裂沟的形成, 这个信号是由 RhoA 提供的。Rho-GEF(Ect2)和雄性生殖细胞 Rac-GTP 酶活化蛋白基因(MgcRacGAP)联合作用激活 PIP₂, 通过 PIP₂ 调节 ERM(埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白)活性, 促进收缩环定位和形成。PIP₂ 的两种水解产物: IP₃ 和 DAG 通过通路下游的钙离子和

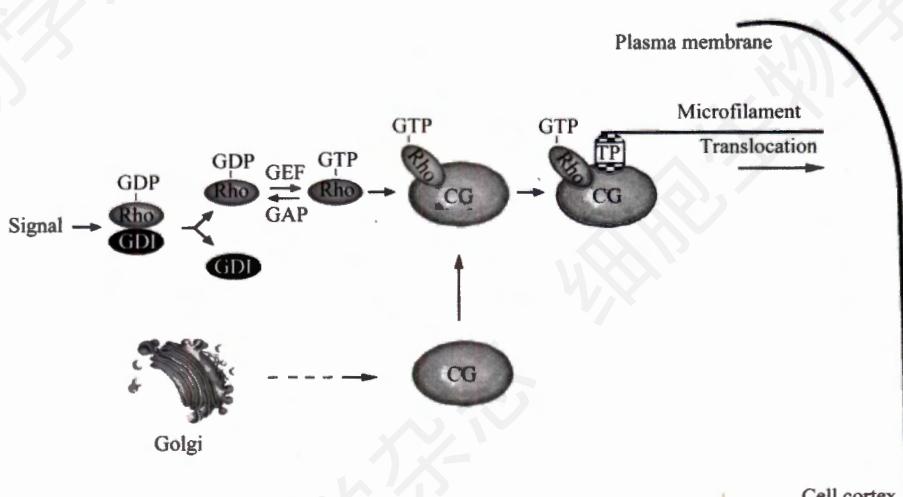


图 1 RHO 对 CG 迁移过程的调控^[24]

蛋白激酶C (protein kinase C, PKC)促进肌球蛋白II的收缩。而肌球蛋白II是构成收缩环的另一组成^[26]。

对海星卵母细胞极体形成与极体排出的研究表明, 在将要形成极体的位置首先形成一个突起, 同时, 染色体发生分离。当突起变大后, 一组染色体进入其中, 之后形成分裂沟, 最终形成极体。这也是大部分动物减数分裂排极体的模式。采用荧光染色方法对海星卵母细胞的观察发现: 当突起形成时, 本来在动物极顶端表达很强的微丝荧光下降到了峰值的一半, 而突起基部的微丝荧光剧烈上升。这就说明, 极体的形成是由于皮质处微丝缺乏形成突起, 极体的排出要依赖微丝构成的分裂沟^[27]。用 ROCK (Rho-associated kinase)的特异性抑制剂处理过的卵母细胞无法排出第一极体和第二极体。这是由于 ROCK 活性的下降, 上调了丝切蛋白的活性, 促进微丝解聚^[28]。

极体排出的机制十分复杂, 除了以上所述, 还有多种分子参与调控。对大鼠卵母细胞的研究表明, 显微注射一种微丝装配关键酶 Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2)的抗体会抑制第一极体的排出^[29]。还有研究表明, PKC 与第二极体排出过程有关。PKC 活性升高时正是第二极体排出的时间, 而且PKC在第二极体区域的质膜上表达。P-MARCKS 是PKC 在这一过程中的作用底物^[30]。极体排出的位置是由纺锤体迁移定位的位置决定, 纺锤体所在位置突起, 排出极体。随后还将影响胚胎卵裂的位置^[31]。对小鼠卵母细胞的研究表明, 形成素 2 (fmn2)与极体排出关系密切, 缺失 fmn2 的卵母细胞纺锤体无法迁移到皮质, 因此细胞染色体不能迁移至皮质, 而且无法排出第一极体^[32]。通过对 GV 期小鼠卵母细胞注射 Rac 抑制剂, 发现纺锤体从细胞一极拉伸至另一极, 染色体随机分布在细胞内, 形成两个肌动蛋白帽。由于纺锤体受到影响, 卵母细胞无法排出第一极体。Rho 家族另一种蛋白质 Cdc42 的异常也会影响极体排出。有实验通过比较 Cdc42 显性负突变体与正常对照后发现, 突变体的分裂后期时间很短, 只有 1~2 min, 并且不能排出第一极体。进一步研究表明, 正常对照组的 FA 在 GVBD 后 115 min 聚集, 收缩环在分裂后期形成。突变体的 FA 聚集时间正常, 但聚集的 FA 数量显著减少, 收缩环发生定位错误, 由正常的纺锤体下方形成, 变为纺锤体上方聚集。这说明 Cdc42 的活性影响肌动蛋白聚集和收缩环定位。Cdc42 促

进形成一个GA快速转换区, 为收缩环提供更多的FA 并且舒张皮质区。皮质区舒张有利于收缩环正确定位^[33]。

3 存在问题与展望

尽管目前已经证明微丝在卵母细胞成熟过程中的纺锤体迁移、皮质形成、皮质颗粒不对称分布、极性建立、第一极体排出等事件中起作用, 但是对微丝在染色体的迁移, 极性建立等事件中的作用机制了解的还不透彻。对于卵母细胞成熟过程中, 微丝、微管、中间纤维三者靠何种机制协同发挥作用也不了解。随着对微丝骨架在卵母细胞成熟过程中作用的研究不断深入, 以上问题必将得到解释。

参考文献(References)

- [1] Egile C et al. *PLoS Biol*, 2005, **3**: e383
- [2] Ono S. *Int Rev Cytol*, 2007, **258**: 1
- [3] Coburn RF et al. *J Cell Physiol*, 2006, **209**: 405
- [4] Liepina I et al. *Biopolymers*, 2003, **71**: 49
- [5] Liang CG et al. *Mol Endocrinol*, 2007, **21**: 2037
- [6] Yi YJ et al. *Biol Reprod*, 2008, **78**: 115
- [7] Carroll J et al. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004, **115**: S61
- [8] Terada Y et al. *Mol Reprod Dev*, 2000, **56**: 89
- [9] Brunet S et al. *Reproduction*, 2005, **130**: 801
- [10] Vinot S et al. *Curr Biol*, 2004, **14**: 520
- [11] Halet G et al. *Dev Cell*, 2007, **12**: 309
- [12] Rizk RS et al. *Curr Biol*, 2005, **15**: R841
- [13] FitzHarris G et al. *Dev Biol*, 2007, **305**: 133
- [14] Calarco PG *Microsc Microanal*, 2005, **11**: 146
- [15] Uzbekov R et al. *Biol Cell*, 2002, **94**: 275
- [16] Deng M et al. *Dev Cell*, 2007, **12**: 301
- [17] Cowan C. *Dev Cell*, 2007, **12**: 174
- [18] Sun QY et al. *Reproduction*, 2006, **131**: 193
- [19] Cui XS et al. *Mol Reprod Dev*, 2007, **74**: 785
- [20] Na J et al. *Curr Biol*, 2006, **16**: 1249
- [21] Januschke J et al. *Development*, 2007, **134**: 3419
- [22] Di Ciano C et al. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, **283**: C850
- [23] Liu XY et al. *Hum Reprod*, 2005, **20**: 3402
- [24] Covián-Nares F et al. *Mech Dev*, 2004, **121**: 225
- [25] Matsumura F. *Trends Cell Biol*, 2005, **15**: 371
- [26] Logan MR et al. *Biol Cell*, 2006, **98**: 377
- [27] Hamauchi Y et al. *Cell Struct Funct*, 2007, **32**: 29
- [28] Zhong ZS et al. *Mol Reprod Dev*, 2005, **71**: 256
- [29] Meng XQ et al. *Reproduction*, 2006, **132**: 859
- [30] Michaut MA et al. *Dev Biol*, 2005, **280**: 26
- [31] Moore CA et al. *Reproduction*, 2005, **130**: 311
- [32] Dumont J et al. *Dev Biol*, 2007, **301**: 254
- [33] Ma C et al. *Curr Biol*, 2006, **16**: 214

Effect and Regulation of Microfilaments in Mature Process of Oocyte

Qing-Quan Wang, Yi-Jie Cao¹, Hua Ni*

(College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; ¹Harbin Pharmaceutical Group Biological Engineering Co., Ltd, Harbin 150020, China)

Abstract Microfilaments, which is an ingredient of the cytoskeleton, exists in all kinds of cells. In recent years, the effect and regulation of microfilaments in the mature process of oocyte take more and more attentions. Microfilaments can regulate many cell activities, such as organelles migration, dispersed chromatin collection, cortex reorganization, polarity establishment, first polar body emission and so on. This article reviews the research progression about the mechanism of microfilaments in oocyte development and maturation.

Key words microfilaments; oocyte; meiosis

Received: November 27, 2007 Accepted: March 10, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30500361) and Science Research Item of the Education Office of Heilongjiang (No.11511040)

*Corresponding author. Tel: 86-451-5519084, E-mail: huani@neau.edu.cn