

成熟促进因子及其对卵母细胞成熟 调控机制研究的新进展*

冯伯森 李美娜

(辽宁师范大学生命科学学院 大连 116029)

摘要: 卵母细胞成熟调控机制一直是发育生物学和生殖生物学领域的热点问题。以现代分子生物学理论为基础, 科学家们对卵母细胞成熟分裂的分子生物学调控机理进行了大量研究。发现了细胞周期中许多关键的调控因子: cdc 基因、周期蛋白依赖性激酶(CDKs)及细胞周期蛋白(cyclin)等。本文对卵母细胞成熟调控的核心调控物质——成熟促进因子(maturation-promoting factor, MPF)的分子结构、周期变化及其在卵母细胞成熟过程中与丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)相互作用关系的最新进展进行了综述。

关键词: 成熟促进因子; 卵母细胞成熟; 调控机制

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)01-89-04

Advances in Research on the Maturation-promoting Factor and Its Control of Oocyte Maturation

FENG Bo-Sen LI Mei-Na

(College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: The mechanism of oocyte maturation is a hot topic in developmental and reproductive biology and there is currently a considerable amount of biotechnological research in this area. Many regulation-factors have been determined such as, cell division cycle genes (cdc) and Cyclin-dependent Kinases(CDKs). Here we review progress in research on MPF—the core of oocyte maturation, in particular its structure, cycle and interplay with MAPK during oocyte maturation.

Key words: MPF; Oocyte maturation; Control mechanism

卵母细胞成熟的调控机制是近年来国内外科学工作者研究较多的问题, 随着现代分子生物学基础理论和技术的发展, 对于卵母细胞成熟调控机制的研究逐步深入, 取得了许多重大成果和突破性进展。

1 MPF 的组成及其活化机制

MPF 由催化亚基 P34^{cdc2} 和调节亚基 Cyclin 组成。P34^{cdc2} 和 Cyclin 的变化直接影响到 MPF 的活性。cdc2 (cdc, cell division cycle) 的 cDNA 已成功克隆并测序, 其 cDNA 编码的蛋白质由 302 个氨基酸组成, 分子质量为 34 ku。该蛋白质上的 Thr14、Tyr15 和 Thr161 这三个氨基

酸残基是引发酶活性的磷酸化位点, 具有高度保守性^[1]。Cyclin 是 cdc13⁺ 基因的产物, 由 482 个氨基酸组成, 分子质量为 56 ku。Cyclin 族蛋白质很多, 包括 Cyclin A、B、C、D、E 和 H 等, 而每一种又包括数个亚种, 如 Cyclin B 至少有 B1、B2 等。但不同的蛋白质分别在细胞周期的不同阶段起作用, 例如 Cyclin B 就在 G2 期或 G2/M

* 辽宁省教育厅资助项目(No.990321088);

第一作者介绍 冯伯森, 男, 56 岁, 教授, 硕士生导师; 研究方向: 动物早期发育。

收稿日期: 2002-03-20, 修回日期: 2002-11-11

转变期起作用。在绝大多数动物卵母细胞中 MPF 的调节亚基是 CyclinB, CyclinB1 首先出现在卵的动物半球的皮质里, 在 GVBD 发生前在生发泡附近或内部增多^[2]。cyclinB 的结构分为两部分: N-末端区和 C-末端区, N-末端区具有一段保守性序列, 是 cyclin 降解系统的识别信号。C-末端区的作用是与 cdc2 结合并使其激活^[3,4]。

G2 期的卵母细胞中已经有 cdc2 和 cyclinB, cdc2 上的 Thr161 在 cdc-2 激酶 CAK(cyclin-dependent kinase activating kinase)的作用下发生磷酸化, 而使 cdc2 激活, 激

活的 cdc2 与 cyclinB 结合成 cdc2-cyclinB 复合体, 激酶 (Wee1 和 Myt1)使 cdc2 上的 Tyr15 和 Thr14 磷酸化, 从而使 cdc2-cyclinB 复合体处于无活性状态, 通常称该复合体为 pre-MPF^[5]。成熟的卵母细胞在促性腺激素的作用下, 滤泡细胞产生孕酮, 孕酮作用于卵母细胞, 在其它因素的协同作用下激活 MPF。MPF 的活化实质就是在 cdc25 磷酸化酶催化下, p34^{cdc2} 的 Thr14 和 Tyr15 的残基去磷酸化, 同时 cyclin 磷酸化^[6] (图 1)。

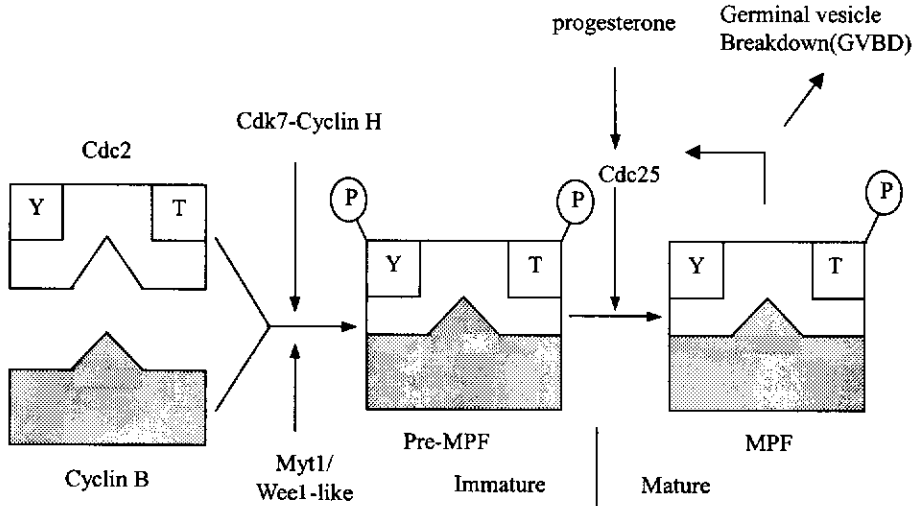


图 1 MPF 在爪蟾卵母细胞中的形成与激活机制 (引自 Yoshida N *et al.*, 2000)

近年来许多科学家研究使 MPF 获得活性的物质, 发现了许多激活 MPF 的必需物质。通常认为使 MPF 激活的物质存在于细胞质中, 但最近研究表明核内物质对激活 MPF、卵母细胞恢复减数分裂是必需的^[7]。在非洲爪蟾卵母细胞中, 发现了一种新的蛋白质 p33ringo (rapid inducer of G2/M progression in oocytes), 其作用于 p34ringo 并激活使其具有活性, 但 p33 并不是 MPF 的组成成分, p33 对于 G2/M 期转变是必需的^[8]。原癌基因产物 Mos 的合成, 在促进非洲爪蟾卵母细胞成熟, 即使 MPF 发生过磷酸化过程中是必需的, 但对两栖纲中其它动物和鱼类的卵母细胞成熟却是非必需的^[6]。此外核 (nuclei) 和微管星状骨针 (microtubule asters) 能分别使 MPF 出现活性^[9]。到目前为止, 人们只是对何种物质能激活 MPF 进行了研究, 但对于各种物质激活 MPF 的具体作用机理还有待于进一步研究。

2 MPF 在卵母细胞成熟过程中的周期变化

MPF 在卵母细胞周期中的调节机制, 在无脊椎动

物如海星和低等脊椎动物如爪蟾中报道较多, 而在哺乳动物中研究较少, 本文仅就近时期对哺乳动物卵母细胞成熟调节机制研究中有关 MPF 活性变化的报道做一概述。

将猪和牛的 COCS (cumulus-oocyte complexes) 细胞培养于 TCM199 培养基中, 牛卵母细胞共培养 24 h, 猪卵母细胞共培养 48 h, 每隔 1 h 从培养基中取出部分卵母细胞做 MPF 和 MAPK 活性检测。MPF 的活性水平通过测定组蛋白 H1 激酶的活性来确定, MAPK 的活性水平通过髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein) 来确定。结果是两种卵母细胞在培养过程中 MPF 均出现两次高峰, 这两次活性高峰是与两次分裂中期 (metaphases) 相对应的。猪卵母细胞 MPF 活性高峰出现在培养后 27 ~ 32 h 之间和 46 h 之后, 牛卵母细胞 MPF 活性高峰出现在 6 ~ 9 h 之间和 22 h 之后。猪卵母细胞在 33 ~ 38 h 之间、牛卵母细胞在 19 h 之后出现了短暂的 MPF 活性降低, 这是与后期 I (anaphase I) 和末期 I (telephase I) 相对应的。MAPK 的活性在整个培养过程中逐渐升高, 猪卵

母细胞在培养 47 h 后 MAPK 活性达到最高水平,牛卵母细胞中 MAPK 活性最高值出现在培养 22 h 后^[10]。郭泽坤等人通过 Western 杂交检测了小鼠卵母细胞体外成熟过程中 P34^{cdc2}磷酸化的变化。用抗 P34^{cdc2}C 末端抗体杂交的结果显示,小鼠卵母细胞体外成熟过程中 P34^{cdc2}表现为上、中、下三条带,其中中带在 4 h 出现,并持续增加直到培养 16 h,在 20 h 有一个下降趋势,并在培养 24 h 又回升。用特异性识别 P34^{cdc2}去磷酸化的 Tyr-15 和 Thr-14 的抗 P34^{cdc2}N 末端抗体杂交,结果证明中带为 P34^{cdc2}在 Tyr-15 和 Thr-14 上去磷酸化的形式^[11]。

牛卵母细胞 MPF 激活与 MAPK 的激活几乎与 GVBD 的同时发生。而在猪的卵母细胞中 MAPK 的激活出现在 MPF 激活和 GVBD 之前^[10]。培养未成年和成年羊卵母细胞,发育至 M II 的卵母细胞比例相似,但未成年羊发育至 M II 期的卵母细胞由于 MPF 水平低不能诱发其它卵母细胞发生 GVBD,而成年羊则可以^[12]。通常认为 cyclin 降解是 MPF 失活的直接原因,但近年来的研究结果对此又提出了一些异议。小鼠卵母细胞中,MPF 的失活以致于发生第一次胚胎有丝分裂不仅仅是因为细胞周期蛋白 B1 的降解,同时也受 P34^{cdc2}去磷酸化的调控^[13]。卵母细胞离开 M 期进入间期的影响因素很多,近期发现 cAMP-PKA 通路在周期蛋白(cyclin protein)降解和向间期转变中发挥着重要作用^[14]。

3 卵母细胞成熟过程中 MPF 与 MAPK 的相互关系

研究证实,MAPK 在卵母细胞成熟、M II 期停滞、受精后精核转化及原核形成等方面均发挥重要的作用,在调节微管组装/去组装和核膜破裂/重建方面的作用尤为重要。一般认为卵母细胞成熟过程中微管和染色体的行为是由 MAPK 而不是 MPF 调节的。在小鼠、大鼠和山羊卵母细胞中 MAPK 的激活要比 MPF 的激活晚 2 个小时,它不参与减数分裂启动,只与微管和染色体的组织变化相关。而对于一些大动物如猪、牛、马等,MAPK 在 GVBD 时被磷酸化而被激活,证明 MAPK 在卵母细胞成熟启动时起着极重要的作用。

以前都是将 MPF 与 MAPK 作为两种行使不同功能的物质分别进行研究,但经过近几年的研究发现,MPF 与 MAPK 在卵母细胞成熟过程有时是有一定相互关系的,不能将两者绝对割裂开。猪和牛的成熟卵母细胞在即将发生 GVBD 时,MPF 与 MAPK 都被激活。当用 cdk 激酶(cyclin-dependent protein kinase)的抑制因子丁酸内酯(Butyrolactone I, BL I)处理时,MPF 与 MAPK 都失去活性,卵母细胞被抑制在 GV 期。当用冈甜酸

(okadaic acid)处理时,MAP 激酶恢复其活性,cdc2 激酶仍被 BL I 抑制,这时的 MAPK 能替代 MPF 促使卵母细胞发生 GVBD^[15]。将 MKP-1 mRNA(能够编码一种特异性 MAPK 磷酸化酶)注射到成熟的牛卵母细胞中,能有效抑制 MAPK 的活性。注射 MKP-1 的卵母细胞能够恢复减数分裂,但却没有发生 M II 期停滞,原因是抑制了 MPF 的正常活性水平。可见牛卵母细胞中 MAPK 对于 M II 期停滞,维持 MPF 的活性是必需的^[16]。U0126 是 MAPK 的抑制物,LY294002 是 PI-3 激酶的抑制因子。Shimada 等人研究了二者在猪卵母细胞减数分裂过程中 M I / M II 期转变中的影响,实验结果是 U0126 和 LY294002 能明显降低 P34^{cdc2}激酶的活性,使卵母细胞恢复减数分裂发育到 M II 期的比例大大减少。由实验结果可得出,在猪卵母细胞中(确切的说是 COCS 细胞)通过 PI-3 信号通路提高 MAP 激酶的活性能够激发 MPF 的活性使减数分裂超越 M I 期直接到达 M II 期,即发生了 M I / M II 期停滞^[17]。但 Anas 等人的实验结果却似乎与以上的结论相矛盾。他们用 wortmanin(一种 PI-3 激酶的特异性抑制因子)在牛的卵母细胞中进行了实验,检测 wortmanin 对 GVBD 的发生和卵母细胞成熟过程中对 MPF 和 MAPK 活性的影响。结果是 PI-3 激酶不能影响 GVBD 发生的时间和 MAP 激酶的作用方式,但却可能是影响 MPF 在 M I / M II 转变期间活性骤减的因素之一^[18]。Sadder 等人实验得出海星卵母细胞中的 MAPK 与 MPF 激活和卵母细胞成熟无关,MAPK 的主要作用是抑制卵母细胞中 DNA 的合成^[19]。这又与先前的研究成果 MAPK 在卵母细胞成熟中的作用相矛盾。MPF 与 MAPK 在卵母细胞成熟过程中的相互作用关系是近年来研究较多的问题,在不同动物中所得出的不同结果还有待于今后的进一步研究。

4 结束语

卵母细胞成熟的调控不是一个单纯的级链式的作用,而是一个非常复杂的多因子调节的过程,需要特定的基因在特定的时期准确地表达。MPF 在卵母细胞成熟过程中也不是独立作用的,它与其它多种因子如何协同作用,共同调节卵母细胞成熟的作用机制还有待于进一步研究与探索。

参 考 文 献

- [1] Bandyopadhyay J, Bandyopadhyay A, Choi H S, et al. Cloning and characterization of cDNA encoding cdc2 kinase, a component of maturation-promoting factor in *Rana dybowskii*. *Gen Comp Endocrinol*, 2000, 117(2): 313 ~ 322.

- [2] Sakamoto I, Takahara K, Yamashita M, *et al.* Changes in cyclin B during oocyte maturation and early embryonic cell cycle in the newt, *Cynops pyrrhogaster*: requirement of germinal vesicle for MPF activation. *Dev Biol*, 1998, **195**(1): 60 ~ 69.
- [3] Glozier M, Murray A W, Kirschner M W. Cyclin is degraded by the Ubiquitin pathway. *Nature*, 1991, **349**: 132 ~ 138.
- [4] Holloway S L, Glotzer M, King R W, *et al.* Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor. *Cell*, 1993, **73**: 1 393 ~ 1 402.
- [5] Coleman T R. Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol*, 1994, **6**: 877 ~ 882.
- [6] Yoshida N, Mita K, Yamashita M. Comparative study of the molecular mechanism of oocyte maturation in amphibians. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2000, **126**(2): 189 ~ 197.
- [7] Iwashita J, Hayano Y, Sagata N. Essential role of germinal vesicle material in the meiotic cell cycle of *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(8): 4 392 ~ 4 397.
- [8] Ferby I, Blazquez M, Palmer A, *et al.* A novel p34 (cdc2)-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G (2)/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev*, 1999, **13**(16): 2 177 ~ 2 189.
- [9] Perez-Mongiovi D, Beckhelling C, Chang P, *et al.* Nuclei and microtubule asters stimulate maturation/M phase promoting factor (MPF) activation in *Xenopus* eggs and egg cytoplasmic extracts. *J Cell Biol*, 2000, **150**(5): 963 ~ 974.
- [10] Wehrend A, Meinecke B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro* maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Anim Reprod Sci*, 2001, **66**(3-4): 175 ~ 184.
- [11] Guo Z K, Zhang Y. Phosphorylation change of P34^{cdc2} in mouse oocyte cultured *in vitro* during the maturation. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2001, **9**(2): 194 ~ 197.
- [12] Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, *et al.* Cell coupling and maturation-promoting factor activity in *in vitro*-matured prepubertal and adult sheep oocytes. *Biol Reprod*, 2001, **65**(1): 247 ~ 252.
- [13] Josephberg L B, Kaufman O, Galiani D, *et al.* Inactivation of M-phase promoting factor at exit from first embryonic mitosis in the rat is independent of cyclin B1 degradation. *Biol Reprod*, 2001, **64**(3): 871 ~ 878.
- [14] Grieco D, Porcellini A, Avvedimento E V, *et al.* Requirement for cAMP-PKA pathway activation by M phase-promoting factor in the transition from mitosis to interphase. *Science*, 1996, **271**(5 256): 1 718 ~ 1 723.
- [15] Modlik J, Pavlok A, Kubelka M, *et al.* Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 1998, **49**(2): 461 ~ 469.
- [16] Gordo A C, He C L, Smith S, *et al.* Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2001, **59**(1): 106 ~ 114.
- [17] Shimada M, Zeng W X, Terada T. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase of mitogen-activated protein kinase leads to suppression of p34 (cdc2) kinase activity and meiotic progression beyond the meiosis I stage in porcine oocytes surrounded with cumulus cells. *Biol Reprod*, 2001, **65**(2): 442 ~ 448.
- [18] Anas M K, Shoja A, Shimada M, *et al.* Effects of wortmannin on the kinetics of GVBD and the activities of the maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase during bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 2000, **53**(9): 1 797 ~ 1 806.
- [19] Sadler K C, Ruderman J V. Components of the signaling pathway linking the 1-methyladenine receptor to MPF activation and maturation in starfish oocytes. *Dev Biol*, 1998, **197**: 25 ~ 38.