



## 论文

## AURKB 与 MAPK 参与调控小鼠受精卵早期发育

许琳<sup>①</sup>, 刘彤<sup>②</sup>, 韩峰<sup>①</sup>, 宗志红<sup>①</sup>, 王国丽<sup>①</sup>, 于秉治<sup>①</sup>, 张杰<sup>①\*</sup><sup>①</sup> 中国医科大学生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110001;<sup>②</sup> 中国医科大学附属盛京医院妇产科, 沈阳 110001

\* 联系人, E-mail: jiezhangcmu@hotmail.com

收稿日期: 2011-01-16; 接受日期: 2011-04-15

国家自然科学基金(批准号: 81070527)资助项目

**摘要** Aurora 激酶是肿瘤研究领域的热点, 近年来有研究表明该激酶家族在卵母细胞减数分裂中也起着重要的调节作用, 但对于其在哺乳动物早期胚胎发育中的研究鲜有报道. 本研究通过实时荧光定量 PCR、免疫印迹、免疫荧光检测了 Aurora 激酶 B(Aurora kinase B, AURKB)在小鼠受精卵中的表达和定位, 运用 RNA 干扰技术观察了 AURKB 功能缺失后对小鼠受精卵发育早期的影响, 并检测丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路抑制后小鼠受精卵卵裂及 AURKB 表达、活性变化. 结果表明, 在小鼠受精卵第一次卵裂进程中, G2/M 期为 AURKB 的稳定表达时相, 其蛋白在 G1/S 期少量分布于细胞浆, G2 期聚集于染色质周围, 进入有丝分裂后分布于全细胞. AURKB 的功能缺失可导致受精卵发生异常分裂. MAPK 通路的抑制亦可破坏受精卵的正常卵裂, 并下调 AURKB 的蛋白表达及活性. 结果提示, Aurora 激酶 B 是小鼠受精卵早期发育所必需的, 并与 MAPK 通路的激活相关.

**关键词**Aurora 激酶 B  
丝裂原激活蛋白激酶  
小鼠受精卵  
早期发育  
有丝分裂

Aurora 激酶是进化上保守的丝、苏氨酸激酶, 对细胞周期事件起重要调节作用, 是近年来有丝分裂调节蛋白激酶研究的热点. 在体细胞中, Aurora 激酶参与中心体的成熟、分离, 纺锤体的组装、稳定, 染色体的浓集、中板聚合和稳定等多个事件. 哺乳动物独特地编码 3 种 Aurora 激酶, 即 Aurora 激酶 A, B, C. 所有 Aurora 激酶家族成员都具有相似的蛋白结构: 相对保守的 C 末端酶催化区和长度多变的 N 末端调控区<sup>[1]</sup>. 它们的表达呈细胞周期依赖性, 在亚细胞定位、激酶活性等方面各不相同. Aurora 激酶 A(Aurora kinase A, AURKA)参与中心体成熟及分离、纺锤体组装与中期染色体排列, 在 S 期时开始累积于中心体,

到有丝分裂时聚集于纺锤体极的中心体上, 并沿微管表达<sup>[2]</sup>. 而 Aurora B 激酶(AURKB)是染色体乘客蛋白复合物(chromosome passenger complex, CPC)的唯一激酶中心, 对染色质凝集、分离和胞质分裂起关键作用. 细胞分裂前期 AURKB 定位于染色体, 前中期和中期集中定位于着丝粒, 后期则离开染色体转至纺锤体<sup>[3]</sup>. Aurora 激酶 C 也是一种染色体乘客蛋白, 在睾丸组织中特异表达, 其功能与 AURKB 相互弥补, 以满足细胞有丝分裂进程的需要<sup>[4]</sup>. 已知 Aurora 激酶能磷酸化一系列蛋白, 包括驱动蛋白样动力蛋白、纺锤体蛋白、着丝粒蛋白、组蛋白等<sup>[5]</sup>, 为其功能的初步确定提供了依据.

Aurora 激酶在许多肿瘤细胞系中过表达,提示其在肿瘤发生中发挥重要作用,目前已成为肿瘤诊断和治疗的潜在靶点。近年来,对 Aurora 激酶在生殖发育领域的研究已初见端倪。有研究发现,减数分裂未成熟的小鼠卵母细胞中包含 3 种 Aurora 激酶亚型的转录本,转录水平在整个减数分裂期间维持稳定,且 AURKA 是主要表达亚型<sup>[6]</sup>。对 Aurora 激酶的抑制导致进入第二次减数分裂中期(metaphase of meiosis II, Met II)的细胞减少和染色质重塑缺陷。AURKA 过表达导致中心体扩增甚至多倍体形成,而 AURKB 过表达则导致染色体无法正确排列<sup>[7]</sup>。有文献<sup>[8]</sup>报道, AURKB 在有丝分裂期能够使组蛋白 H3 的 Ser10 磷酸化。对小鼠卵母细胞的研究表明, H3 的 Ser 磷酸化在哺乳动物细胞中高度保守,是染色体装配的必要条件<sup>[9]</sup>。AURKB 参与染色体分离及纺锤体检查点调控,主要通过募集定位于着丝粒的检查点保守蛋白来实现。AURKB 还能通过对有丝分裂着丝粒相关驱动蛋白(mitotic centromere-associated kinesin, MCAK)的磷酸化<sup>[10]</sup>,调节微管的解聚来修正着丝粒与微管的错误结合。在小鼠卵母细胞第一次减数分裂前期至中期转换时抑制 AURKB 的活性会导致染色体异常就位,破坏染色体的正确凝集和二倍体分离,通过 RNA 干扰抑制 AURKB 的表达能引发染色质非正确排列<sup>[9]</sup>。这与在爪蟾卵提取物中抑制 AURKB 后的结果相类似<sup>[10]</sup>。AURKB 在胞质分裂过程中也发挥重要的作用。胞质分裂的完成需要许多细胞骨架蛋白的参与,而许多骨架蛋白,如 MgcRacGAP<sup>[11]</sup>, vimentin<sup>[12]</sup>等,均可被 AURKB 磷酸化。在许多模式生物研究中均发现,干扰 AURKB 表达会引起胞质分裂失败从而形成多倍体<sup>[13]</sup>。这些研究提出疑问: Aurora 激酶在受精卵的发育过程中发挥怎样的作用?在体细胞中, Aurora 激酶已被公认为有丝分裂的重要调节者,而在哺乳动物胚胎发育中的作用仍鲜为人知。

众所周知,丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联行驶重要的细胞内功能。在孕酮诱导爪蟾卵母细胞成熟研究中,爪蟾特有的 Aurora 激酶家族成员 Eg2 激酶,能激活 MAPK 途径<sup>[14]</sup>。该研究提出了 Aurora 激酶通过 MAPK 途径参与信号转导调节的可能性。另外, Gigoux 等人<sup>[15]</sup>报道称, AURKA 通过与 Ras GTP 酶激活蛋白相互作用而降低自身激酶活性,而后者是 Ras 的负调控因子。

Tseng 等人<sup>[16]</sup>认为,野生型 AURKA 加强了 Ras 突变转化细胞的集落形成及侵袭能力,是通过 Ras/MEK/ERK 信号通路介导的。关于 AURKB 和 MAPK 的关系, Kanda 等人<sup>[17]</sup>研究表明, AURKB 的激酶活性受 Ras 调节。Eves 等人<sup>[18]</sup>证明, Raf 激酶抑制蛋白(raf inhibition protein, RKIP)的缺失通过对 Raf/MEK/ERK1 和 2 的活化抑制 AURKB。而 Kosik 等人<sup>[19]</sup>却声称, Aurora 激酶并非 Ras/MAPK 途径的直接作用因子,该激酶的活性不是该通路必需的。卵母细胞的研究证明, AURKA 的激活独立于 MAPK 途径<sup>[20]</sup>。哺乳动物中, MAPK 成员包括细胞内调节激酶 1 和 2 (extracellular signal regulated kinase 1, 2, ERK1/2)。Mos, MAPK 和 MAPK 的底物参与小鼠卵母细胞纺锤体动力及第一极体释放调节<sup>[21,22]</sup>。Maekawa 等人<sup>[23]</sup>证明了 ERK 对 2-细胞到 8-细胞期胚胎的重要作用。然而,关于 MAPK 和 Aurora 激酶在小鼠早期胚胎发育中如何相互作用的研究未见报道。探讨 Aurora 激酶能否作为 MAPK 的下游底物或上游调节因子来发挥作用,对于进一步阐明这些基因对细胞周期事件的调控是有意义的。本研究关注 AURKB,首先建立 AURKB 在小鼠受精卵第一次卵裂进程中的表达模式,继而探讨该激酶功能缺失对于小鼠受精卵早期发育的影响,及其与 MAPK 信号通路的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 小鼠超排卵及受精卵的采集和培养

昆明系小鼠由中国医科大学实验动物部提供,雌鼠为 4 周(18 g),雄鼠为性成熟 8 周(30 g)。雌鼠经严格明暗循环饲养 4 天后,腹腔注射孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)(宁波第二激素厂)10 IU/只,48 h 后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)(宁波第二激素厂)10 IU/只,当晚与 8 周龄以上性成熟雄性昆明系小鼠合笼过夜。次日晨检查雌鼠阴栓,有阴栓者视为交配成功。脱颈法处死雌鼠,取双侧输卵管,剪下末端膨大置于 M2 培养液中。在实体显微镜下撕开壶腹部,让卵细胞团自然流出,用 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  透明质酸酶(Sigma)除去颗粒细胞,在 M2 培养液(Sigma)中洗 3 次,在 M16 培养液(Sigma)中洗 2 次后转入 12 孔板,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  预先在培养箱中平衡的 M16 培

养液, 上覆矿物油, 在 37℃, 5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养至指定时间进行收集冻存或进行实验. 对受精卵各期的判断按注射 hCG 后的时间, 并结合相差显微镜观察受精卵的形态来确认. 经成熟分裂的卵母细胞在注射 hCG 后 11~13 h 到达壶腹部, 与精子相遇并开始受精, 完成第二次减数分裂并排出第二极体, 进入第一次有丝分裂. G1 期开始, 持续约 9 h. 故在注射 hCG 后 19 h 左右收集 G1 期受精卵. 此时, 卵细胞内可见体积较小的雌、雄原核, 彼此之间距离较远. 注射 hCG 后 21~26 h 是 S 期, 此时雌雄原核体积增大并相互靠近, 原核内有可见的核仁. 本研究在 hCG 后 23 h 左右收集 S 期受精卵. 受精卵进入 G2 期时, 细胞内雌、雄原核消失, 胞质颗粒粗大, 折光率增高. 在注射 hCG 后 27 h 收集 G2 期卵细胞. 在注射 hCG 后 29~32 h 为 M 期, 此时受精卵胞体拉长, 胞质分裂. 在 hCG 后 30 h 收集 M 期卵细胞.

## 1.2 mRNA 提取及实时荧光定量 PCR

100 个各期受精卵收集到 2 mL 微量离心管中, 按快速微量 mRNA 提取纯化试剂盒(GE healthcare)说明书进行, 主要包括样品的提取、mRNA 的分离、mRNA 的洗涤及洗脱. 将 mRNA 溶于 50 μL 无核酸酶溶解缓冲液中, 取 5 μL mRNA 用反转录酶(Promega)进行反转录得到 cDNA. 再取 5 μL cDNA(相当于 2.5 个细胞)为模板进行实时荧光定量 PCR(Qiagen). 以 Met II 期卵母细胞作为校正样本进行 4 个期受精卵基因表达的相对定量. 跨外显子设计引物以避免基因组污染(TaKaRa 合成), *AURKB*(NM\_011496)上游引物为 5'-ccaccatcagttcatagca-3', 下游引物为 5'-cctgaggaggaagaccat-3'; *ACTB*(NM\_007393)上游引物为 5'-gtctttacggatgtcaacg-3', 下游引物为 5'-tttcagccttcctt-3'. 反应体系 25 μL, 循环条件为: 95℃ 15 min, 94℃ 15 s, 53℃ 30 s, 72℃ 35 s, 43 个循环. 每组实验重复 3 次.

## 1.3 免疫印记分析

分别收集 G1, S, G2, M 期受精卵 250 个/期, 在蛋白裂解液中经反复冻融 3 次后, 加入蛋白上样缓冲液, 100℃煮沸 5 min, 以 12%SDS-PAGE 电泳分离, 转印至 PVDF 膜(PALL), 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别与 1:200 羊 *AURKB* 多克隆抗体(Santa Cruz)、1:1000 兔总 ERK1/2 多克隆抗体(Cell Signaling)、1:

1000 兔磷酸化 ERK1/2 多克隆抗体(Cell Signaling)及 1:1000 鼠  $\alpha$ -tublin 单克隆抗体(Beyotime)4℃结合过夜. 含吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline with tween 20, TBST)洗涤 3 次后, 分别与相应的辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)偶联二抗(北京中山金桥生物技术有限公司)室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 用 ECL 化学发光法显影. UVP 凝胶成像系统扫描成像, 图像分析软件分析灰度值. 每组实验重复 3 次.

## 1.4 间接免疫荧光

将各期受精卵移入 4%多聚甲醛, 4℃固定过夜. 中性磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)中清洗 3 次后, 3%Triton X-100, 37℃透膜 20 min, PBS 清洗 3 次, 2%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭 30 min. 分别与 1:100 羊 *AURKB* 多克隆抗体、1:500 兔总 ERK1/2 多克隆抗体、1:500 兔磷酸化 ERK1/2 多克隆抗体及 1:500 鼠  $\alpha$ -tublin 单克隆抗体 4℃孵育过夜. PBS 清洗 3 次, 移入相应的荧光标记二抗(北京中山金桥生物技术有限公司), 37℃避光结合 1 h, 清洗 3 次, 4 μg/mL Hoechst 33342(Sigma)避光染核 5 min, 再次清洗 3 次后, 利用激光共聚焦扫描显微镜成像系统(Olympus)成像. 激发波长为 594, 346 和 488 nm. 放大倍数 400 倍.

## 1.5 干扰质粒构建及显微注射

针对小鼠 *AURKB* 的 cDNA 序列(NM\_011496)寻找候选 RNAi 靶点序列. 通过 BLAST 同源性比对分析其是否具有基因特异性. 上游 5'-caccgccagaagt-tggtcgagaaacattcaagagatgttctcagccaactcttgctttttg-3', 下游 5'-gatccaaaaagccagaatttggtcgagaaacatctcttgaatgtctc-agccaactcttggc-3'. 将合成的寡核苷酸分别溶解在 3.36 μL H<sub>2</sub>O 中(终浓度为 1 mmol/L), 取 1 μL 寡核苷酸, 加入 48 μL 退火缓冲液(100 mmol/L 醋酸钾、2 mmol/L 醋酸镁、30 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸-氢氧化钾, pH 7.4)中, 95℃ 5 min 后缓慢冷却退火至室温, 形成短双链. 连接入经 *Bbs* I (TaKaRa)和 *Bam*H I (TaKaRa)双酶切线性化的载体 pGPU6/GFP/Neo(上海吉玛生物制药有限公司)中. 经测序证实构建正确. 将鉴定后质粒 pGU6-*AURKB* shRNA/scramble shRNA 转化到感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$ (TaKaRa)中: 取连接产物 2 μL, 加入 60 μL 冰中溶化的 *E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞中,

混匀后冰浴 30 min, 42℃水浴 90 s, 迅速放入冰中骤冷 3 min, 然后加入 1 mL LB 培养基(Invitrogen), 220 r/min 于 37℃振荡培养 1 h 后, 取 100  $\mu$ L 涂布于 Kana<sup>+</sup> 的琼脂平板培养基中, 37℃培养过夜. 挑取单菌落于 Kana<sup>+</sup> LB 培养基中培养 6~8 h, 测其 A<sub>600</sub> 值约 4~6 时, 用去内毒素质粒量提取试剂盒(OMEGA)提取质粒. 质粒经沉淀后溶解于适量无内毒素的 Tris-EDTA 缓冲液(TE)中. 显微注射使用 Eppendorf Transferrman 显微操作系统, Olympus IX-70 倒置显微镜, DIC 调制相差观察. 将 G1 期受精卵移入到 M2 液滴中, 用持卵针将受精卵固定, 将吸好一定量无内毒素质粒的注射针刺入细胞将样品注入胞核. 为尽量减少显微注射对受精卵的影响, 一般注入到受精卵内的样品体积为 10 pL(相当于其总体积的 5%). 对照组注射等量无内毒素 TE 缓冲液及 scramble shRNA 质粒.

### 1.6 MEK 抑制剂 U0126 处理受精卵

MEK 特异性抑制剂 U0126(Sigma)溶解在二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中. 使用酸性台式液除去 G1 期小鼠受精卵的透明带, 并在 24 孔板中分别使用不同浓度的 U0126(0, 10, 20 和 30  $\mu$ mol/L)来孵育受精卵. 对照组的受精卵仅使用等量的 DMSO 孵育. 在 hCG 注射后 30~35 h, 收集各组受精卵, 通过免疫印迹检测不同浓度 U0126 的抑制效果, 以确定出最适作用浓度. 在最终确定浓度下培养受精卵, 使用解剖显微镜来观察卵裂率, 并使用相差显微镜观察此时受精卵的形态.

### 1.7 激酶活性检测

U0126 最适浓度下处理受精卵至 hCG 注射后 30~35 h, 收集 15 个/组用作激酶活性检测. 加入 4 倍体积的 EB 缓冲液(80 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸酯, pH 7.3, 20 mmol/L 乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L 二硫苏糖醇), 补充蛋白酶抑制剂复合物及 1  $\mu$ mol/L 冈田酸充分裂解细胞, 12000 $\times$ g, 4℃离心 15 min, 通过免疫沉淀法获得目的蛋白后, 加入激酶活性测定液(含 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.2, 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L 乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 3  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP, 50  $\mu$ mol/L ATP, 和 0.5 mg/mL 组蛋白 H3), 30℃孵育 30 min. 产物加入 SDS 上样缓冲液, 煮沸以终止反应, 一部分进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后把分

离胶切下放在滤纸上, 在分离胶的上面覆盖上保鲜膜, 然后通过放射自显影的方法, 利用底物蛋白自带的 <sup>32</sup>P 感光胶片显影、漂洗、定影. 将另一部分反应产物点于 Whatman P81 强阳离子交换滤纸上, 75 mmol/L 磷酸溶液终止反应, 置于液闪瓶中, 用 Beckman 液闪计数器测定每分钟计数(count per minute, cpm).

### 1.8 数据处理

各组数据以  $\bar{x} \pm SD$  表示, 用 SPSS11.5 软件分析, 对照组与处理组间进行 *t* 检验, 以  $P \leq 0.05$  示差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 小鼠受精卵第一次有丝分裂中的表达与定位

相对定量实验中以 MII 期卵母细胞作为校准样本, 其 AURKB 的 mRNA 表达量归化为 1, 其他各期与之比值定为相对表达水平. 实验结果显示, G1, S, G2, M 期均有 AURKB 的 mRNA 表达, 相对表达量分别为 1.7495 $\pm$ 0.2872, 4.2212 $\pm$ 0.0493, 14.5844 $\pm$ 2.8314 和 113.4071 $\pm$ 7.0600. 表明 G2, M 期共为 Aurora 激酶 B 在 mRNA 水平上的高表达或稳定表达期(图 1A).

AURKB 的蛋白表达规律与其 mRNA 表达规律基本一致. 实验结果显示, AURKB 的 G2 期蛋白相对表达量分别为 G1 期的(8.0244 $\pm$ 5.7037)倍, 到 M 期则高达(20.7236 $\pm$ 4.3941)倍(图 1B).

收集到的 G1 期受精卵雌雄原核清晰, 相距较远. S 期时 2 个原核逐渐靠近并最终完成 DNA 复制. G2 晚期时发生核被膜破裂, 细胞骨架重塑为分裂做准备. 进入 M 期后细胞体拉长, 胞质分裂, 染色体分开移至两极. 由图 2 可见, G1 和 S 期中 Aurora 激酶 B(红色荧光标记)主要表达于胞质, 核中表达很少. 进入 G2 期后, 其在胞核的表达强度明显高于胞质. 而进入 1-细胞后期(anaphase)则均匀充满整个细胞.

### 2.2 Aurora 激酶 B 表达水平敲低对小鼠受精卵卵裂的影响

将不同浓度质粒通过显微注射导入小鼠 G1 期受精卵细胞核, 通过实时 PCR 及免疫印记检测重组质粒的干扰效能. 当 shRNA 浓度达到 1 mg/mL 时, 内源性 AURKB 的 mRNA 及蛋白表达能够被充分抑

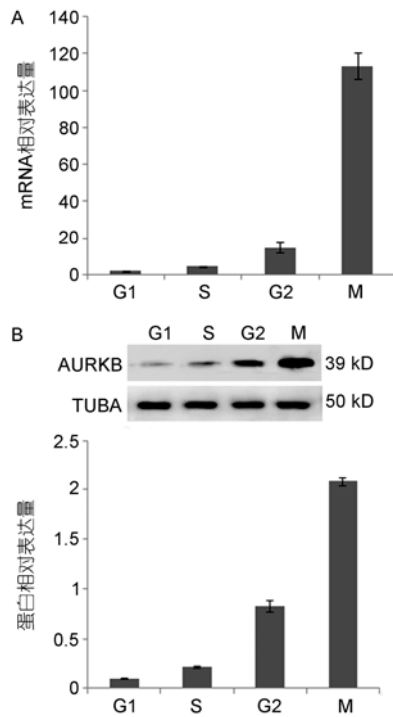


图 1 Aurora 激酶在小鼠受精卵第一次卵裂 4 个期的表达

A: 实时荧光定量 PCR 法检测 *AURKB* mRNA 的相对表达量; B: 免疫印迹法检测 *AURKB* 蛋白的表达

制, 而对照质粒在同样浓度下不能影响内源性 *AURKB* 表达(图 3A 和 B), 说明可以使用 1 mg/mL shRNA 来沉默 *AURKB*. 与对照组相比, *AURKB* 的敲低使超过 50% 的受精卵发生异常卵裂, 部分受精卵无法完成卵裂而死亡(图 3C 和 D). 采用激光共聚焦显微镜观察干扰后的 Aurora 激酶 B 与  $\alpha$ -微管定位, 发现处理组受精卵的染色质、胞浆存在不对称分离现象(图 3E).

### 2.3 MEK 抑制剂对小鼠受精卵卵裂的影响

首先, 由免疫印迹检测了 ERK1/2 在小鼠受精第一次卵裂各期的蛋白表达规律. 结果表明, ERK1/2 的蛋白于 G1/S 期低表达, G2/M 高表达, 其磷酸化程度在 M 期达到峰值(图 4).

用 MEK 的特异性抑制剂 U0126, 以 3 个浓度梯度作用 G1 期受精卵直至对照组的 M 期, 发现当抑制剂浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$  时能够把内源性的 ERK1/2 磷酸化程度抑制在对照组的 10% 以下(图 5A), 故采用该浓度进行后续实验. 采用 30  $\mu\text{mol/L}$  U0126 处理 G1 期受精卵后发现, 80% 以上的受精卵发生了明显的异常卵裂, 典型表现为不等大子细胞、或奇数倍数子细胞的发生(图 5B 和 C). 这些发生卵裂的细胞

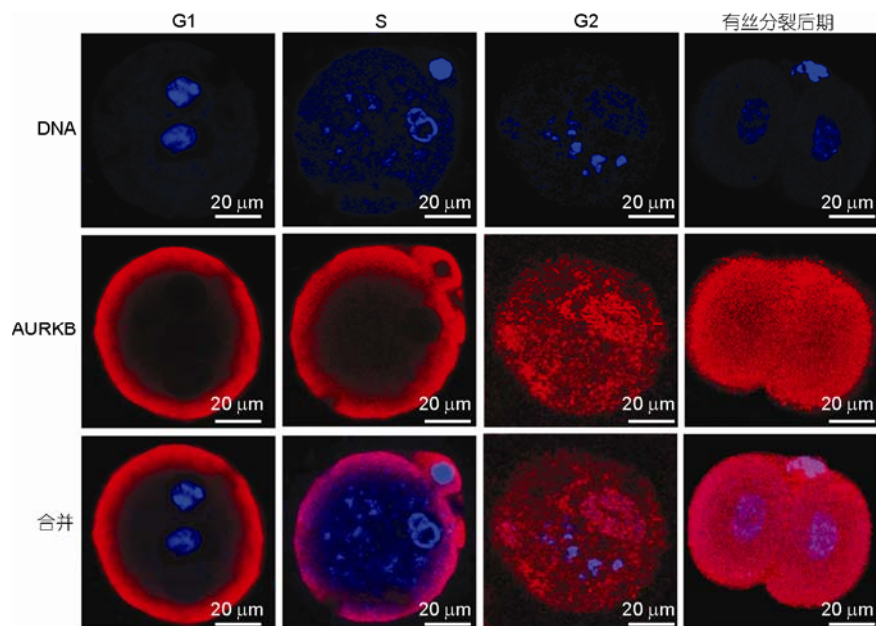


图 2 间接免疫荧光法检测 Aurora 激酶 B 在 1-细胞期各发育阶段的细胞定位

红色荧光标记 AURKB, 蓝色荧光标记染色质. 放大倍数: 400 $\times$

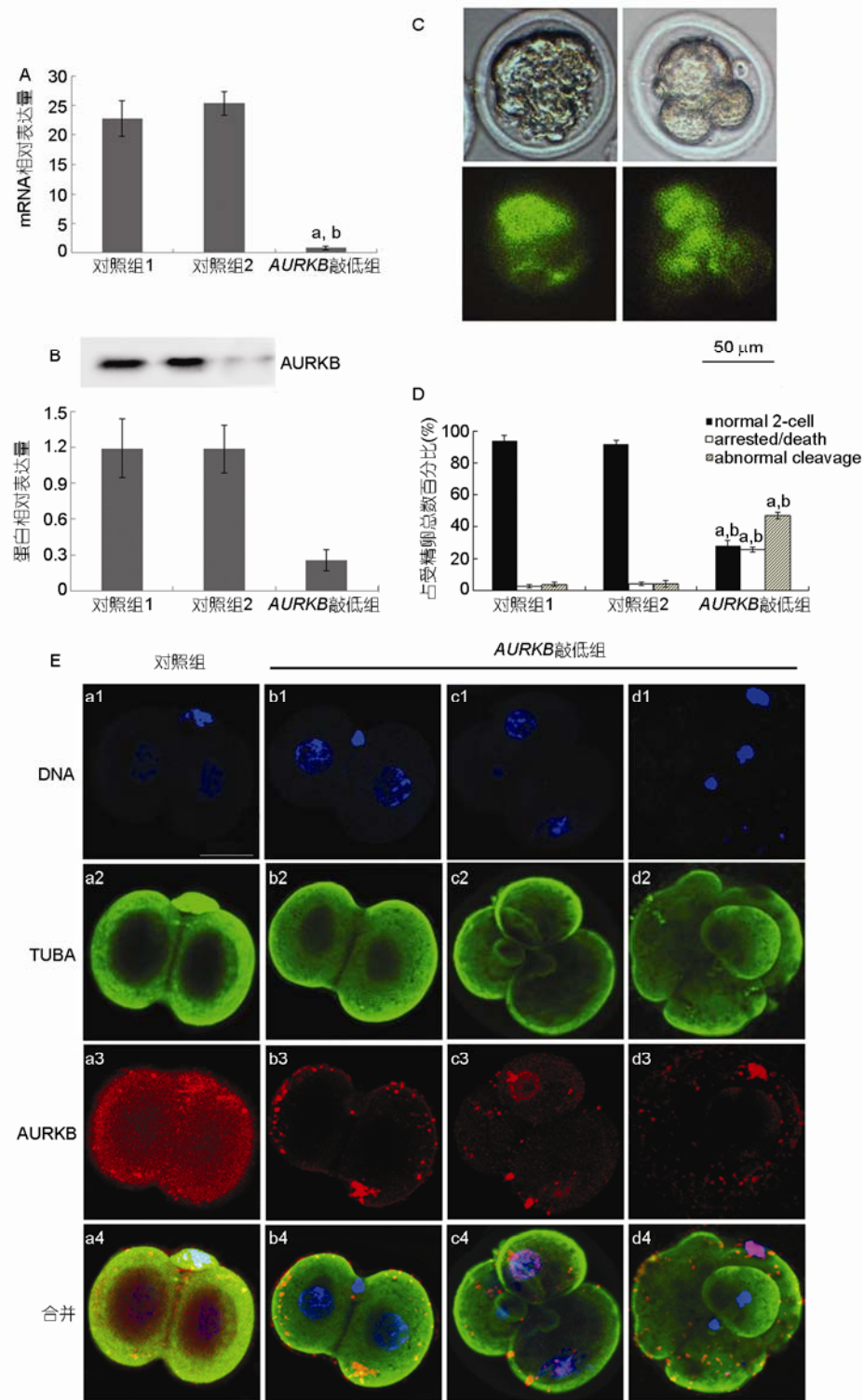


图3 显微注射干扰质粒后 Aurora 激酶 B 的表达变化及细胞形态改变

A 和 B: 实时荧光定量 PCR 及免疫印迹检测显微注射后 Aurora 激酶 B 的 mRNA 及蛋白表达变化; C 和 D: 荧光显微镜下观察受精卵形态, 计算正常、异常、死亡卵率. 以正常培养及 0.01%DMSO 孵育作为对照组 1 和 2. a, b 分别表示与两个对照组相比, 差异显著( $P<0.01$ ); E 间接免疫荧光法观察 Aurora 激酶 B 表达敲低后受精卵形态. 绿色荧光标记  $\alpha$ -微管蛋白, 红色荧光标记 AURKB, 蓝色荧光标记染色质. 放大倍数: 400 $\times$

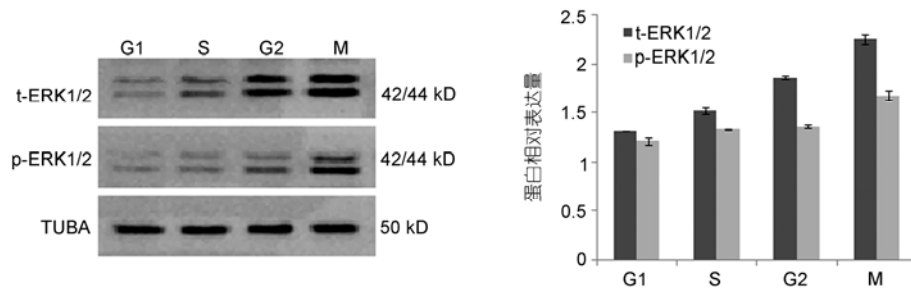


图 4 免疫印迹法检测 ERK1/2 在小鼠受精卵第一次卵裂各阶段的表达与激活

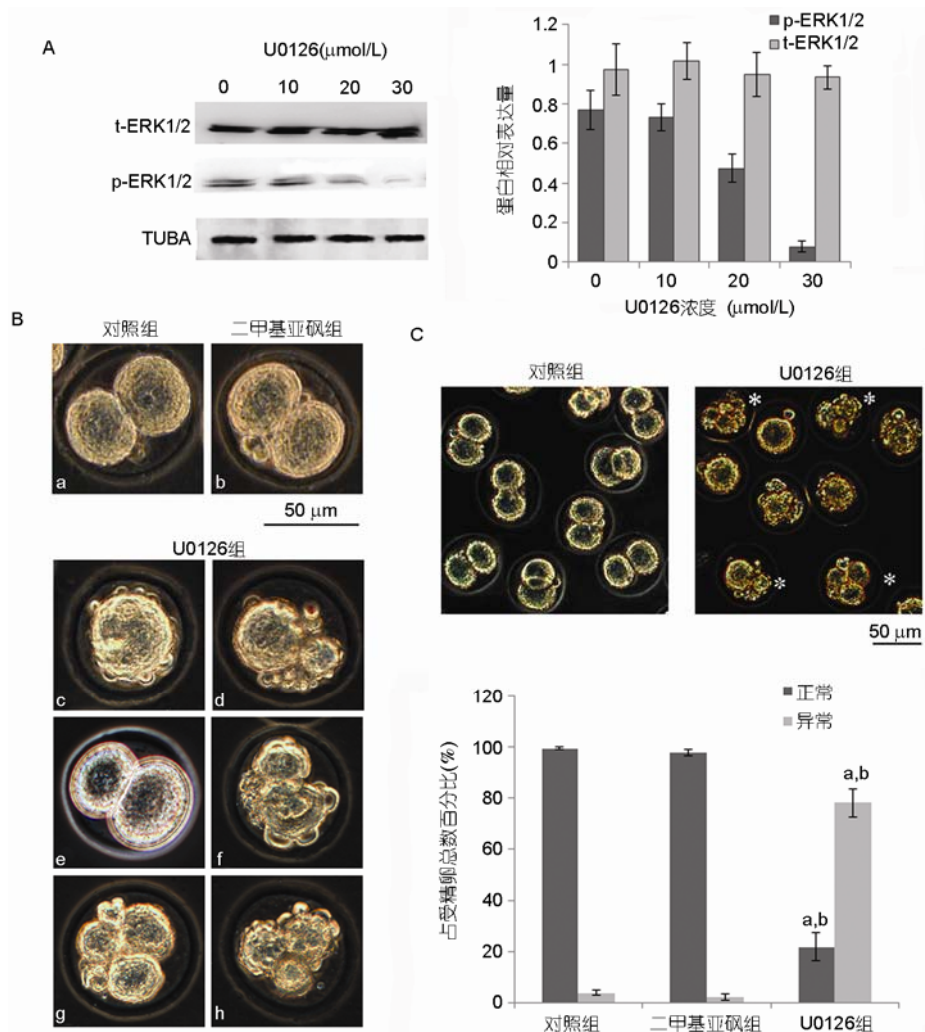


图 5 ERK1/2 活性抑制对小鼠受精卵卵裂的影响

A: 不同浓度 U0126 对内源性 ERK1/2 的抑制作用; B: 30 μmol/L U0126 处理小鼠受精卵后发生异常卵裂; C: 相差显微镜下观察细胞形态, 统计正常与异常卵裂率. 以正常培养及 0.01%DMSO 孵育作为对照组 1 和 2. a, b 分别表示与两个对照组相比, 差异显著( $P<0.01$ )

没有良好的后续发育,大部分在发育到桑葚胚前死亡.

### 2.4 MAPK 途径抑制对 Aurora 激酶 B 的影响

G1 期受精卵在含 30  $\mu\text{mol/L}$  U0126 的培养基中培养 15 h 后,经免疫印迹检测发现,与对照组相比,AURKB 的蛋白表达下降了 68.77%(图 6A),而以组蛋白 H3 为底物的激酶活性下降了 65.86%(图 6B),均与对照组相比差异显著.最后,通过免疫荧光法观察 U0126 处理后 AURKB 与激活型 ERK1/2 亚细胞定位的变化.实验发现,正常组中 AURKB 与激活型 ERK1/2 在细胞浆中均匀分布. U0126 处理后激活型 ERK1/2 与 AURKB 的表达均明显减少(图 6C).

### 3 讨论

实验结果显示,小鼠受精卵第一次卵裂各期均有 AURKB 的表达,其中 G1/S 期低表达, G2/M 期高表达,并于 M 期达峰值.可见与人类体细胞有丝分裂类似,在小鼠受精卵中该激酶在表达量上也呈现细胞周期依赖性.在体细胞中,AURKB 作为染色体乘客蛋白复合物的激酶核心,主要有丝分裂事件,特别是染色体凝集和分离、纺锤体检测点和胞质分裂中起调控作用<sup>[24]</sup>.在小鼠受精卵中,推测 AURKB 参与了卵裂前细胞周期进程中重要环节的调节,并在有丝分裂启动进而发生胞质分裂时发挥了重要的作用. Aurora 激酶生物学功能的正常发挥依赖其在细

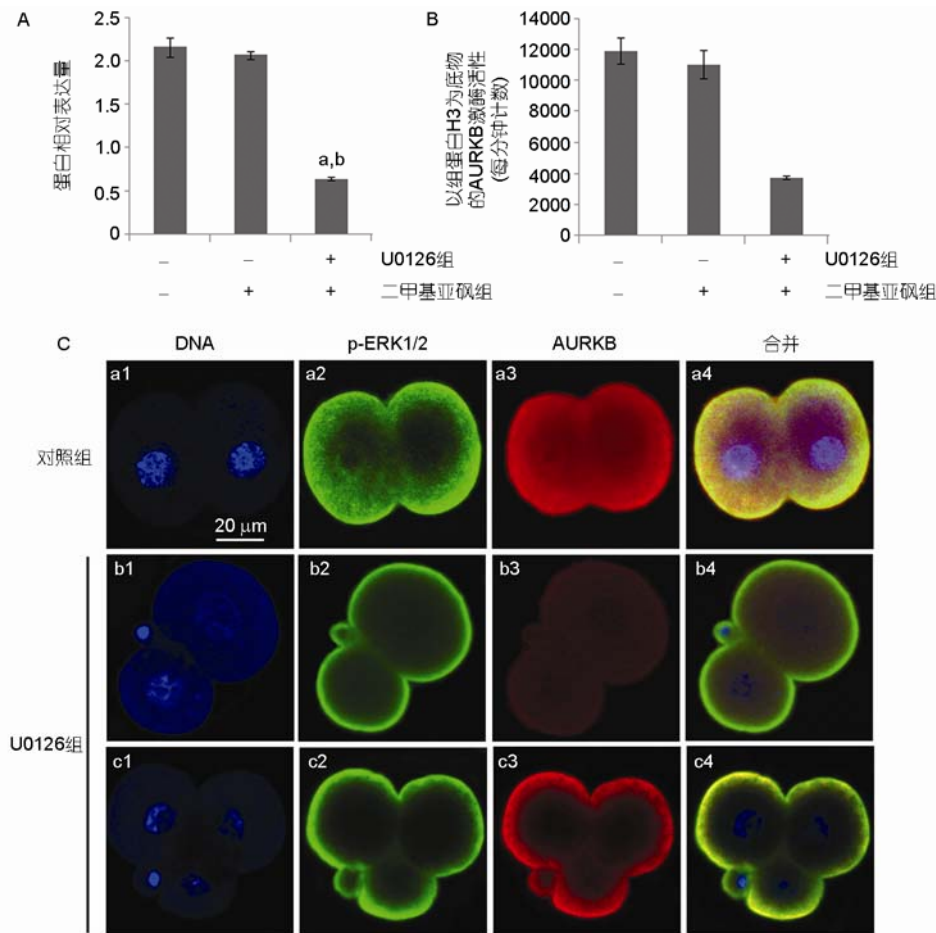


图 6 ERK1/2 活性抑制对 Aurora 激酶 B 的影响

A 和 B: 分别以免疫印记法和放射自显影法分析 30  $\mu\text{mol/L}$  U0126 处理后 AURKB 的蛋白表达及激酶活性变化,以正常培养及 0.01%DMSO 孵育作为对照组 1 和 2. a, b 分别表示与两个对照组相比,差异显著( $P < 0.01$ ); C: 间接免疫荧光分析 U0126 处理后激活型 ERK1/2 与 AURKB 的亚细胞定位变化. 绿色荧光标记磷酸化的 ERK1/2, 红色荧光标记 AURKB, 蓝色荧光标记染色质. 放大倍数: 400 $\times$

胞内受到的时间、空间上的精确调节. G1/S 期 AURKB 主要微量地表达于细胞质中, 核中表达甚少或无. 进入 G2 期后, 除胞质表达剧增外, 在染色质附近也观察到蛋白表达, 在染色质区有更集中的表达. 这与 AURKB 作为一种染色体乘客蛋白的性质相符. 随着分裂进入后/末期相, AURKB 随着染色体乘客蛋白复合物的其他组分逐渐从着丝粒转位到中央纺锤体的中间区以及分裂沟的预定细胞皮层, 在此过程中纺锤体上许多蛋白参与了该复合物在纺锤体上的锚定, 从而通过不同的底物分子调控胞质分裂各个阶段, 最终完成子代细胞的分离<sup>[25]</sup>. 本研究中, 随着小鼠受精卵第一次有丝分裂进程各阶段的依次进行, AURKB 的表达呈现了精密的时间、空间依赖性, 与其对细胞周期进程中各关键事件的调控是密切相关的.

关于 AURKB 在哺乳动物早期胚胎发育中的研究未见报道. 本研究初步证实了 AURKB 是小鼠受精卵正常卵裂所必需的. 实验中, 干扰 AURKB 的表达使得一部分受精卵不能完成分裂而死亡, 但更多的卵发生异常卵裂, 表现为卵裂的随机现象, 产生多个不同大小的子细胞. 姐妹染色单体的正常分离只有在染色体对正确地黏附到对向纺锤体两极方可实现. 因此, 对于该实验现象的一个解释可能是, AURKB 的表达沉默导致染色质排列缺陷, 且细胞无法纠正错误的微管着丝粒黏附, 从而出现了染色质的不对称分离. 有研究表明, AURKB 可通过控制微管捕获关键因子来影响微管与着丝粒相互作用. 在体细胞中, 微管与着丝粒的错误黏附可被 AURKB 纠正<sup>[26]</sup>. 有丝分裂后期, AURKB 定位于中间体和细胞皮质, 以发挥胞质分裂的调节作用. 卵裂沟由收缩环形成, 其在染色质分离后的正确定位对细胞质能否均等地一分为二很重要. 许多研究表明, AURKB 能控制卵裂沟特异蛋白 Vimentin 及其他参与胞质分裂的蛋白的磷酸化<sup>[11,27,28]</sup>. 本研究中, AURKB 功能的缺失也许破坏了卵裂沟的正常定位, 继而引起胞质不对称分裂. 另外, AURKB 的活性对于纺锤体检查点蛋白的募集是必需的, 表达敲低后减弱了纺锤体检查点功能, 也可能是导致多核化表型的原因之一.

已知细胞内信号调节激酶(ERK)途径在不同种属卵母细胞成熟各环节起到调节作用<sup>[29,30]</sup>. 最近研

究发现, 在海胆胚胎的有丝分裂中存在 MEK/ERK 样信号通路<sup>[31]</sup>. 在哺乳动物卵母细胞中, Mos/MAPK 级联已被认为是第二次减数分裂中期停滞的重要调节因子. 但 Kashima 等人<sup>[32]</sup>的研究发现, MAPK 及其底物并未引起小鼠早期胚胎的有丝分裂停滞. 本研究报道了 ERK1/2 在小鼠受精卵第一次卵裂的 G2/M 期最大程度激活, 且其活性对于正常卵裂是必要的. 本研究中 ERK 通路的抑制导致小鼠受精卵无法正常分裂, 在体细胞的研究中也观察到类似的现象. 在体细胞中, MEK 抑制剂可导致各种有丝分裂缺陷, 如有丝分裂极的不确定、染色质错误分离等, 提示 ERK 级联对纺锤体形成的重要性<sup>[33,34]</sup>.

有趣的是, ERK1/2 的总蛋白表达和活化水平变化与 AURKB 的表达模式相似, 从 G1 期开始逐渐升高, 于 M 期达到蛋白表达峰值和最大激活. 另外, ERK1/2 的失活使 M 期细胞核中的 AURKB 表达减少. 在 AURKB 敲低及 MAPK 通路抑制实验中均观察到相似的受精卵不规则卵裂现象. 推测, 在小鼠受精卵细胞周期进程中 AURKB 与 MAPK 的作用可能是相关联的. 运用 U0126 阻滞 MAPK 通路后发现, AURKB 的蛋白表达和激酶活性均有不同程度的下降, 表明 AURKB 的表达与激活均受到 MAPK 活性的影响. Furukawa 等人<sup>[35]</sup>研究发现, 在胰腺癌细胞中, MAPK 途径的抑制会导致包含 AURKB 及 Xklp2 靶蛋白(targeting protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2, TPX2)、着丝粒蛋白 A(centromere protein A, CENPA)的下调. Oktay 等人<sup>[36]</sup>报道, c-Jun N-端激酶(c-Jun HN2 terminal kinase, JNK)信号通路通过调节周期素依赖性激酶-1(cyclin dependent kinase 1, CDK1)的激活来影响 AURKB 的表达及其对底物组蛋白 H3 的磷酸化, 从而得出结论, JNK 通过作为 AURKB 的上游来调节细胞周期进程. 结合本研究结果, 可以认为在 AURKB 和 MAPK 信号通路之间存在调控关系, 两者对于小鼠受精卵的正常卵裂起协同作用.

本研究证实了 AURKB 是小鼠受精卵发育不可缺少的重要蛋白激酶, 并可能通过 MAPK 信号通路发挥作用. 今后的研究重点应是探讨和阐明 AURKB 参与 MAPK 途径调节小鼠受精卵早期发育的分子机制.

## 参考文献

- 1 Adams R, Carmena M, Earnshaw W C. Chromosomal passengers and the (Aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol*, 2001, 11: 49–54

- 2 Crane R, Gadea B, Littlapage L, et al. Aurora A, meiosis and mitosis. *Biol Cell*, 2004, 96: 215–229
- 3 Murata M, Tatsuka M, Wang Y L. Probing the dynamics and function of aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 1099–1108
- 4 Yan X M, Wu Y H, Li Q, et al. Cloning and characterization of a novel human aurora C splicing variant. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 328: 353–361
- 5 Gerben V, Susanne L. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1786: 60–72
- 6 Shuda K, Schindler K, Ma J, et al. Aurora kinase B modulates chromosome alignment in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76: 1094–1095
- 7 Saskova A, Solc P, Baran V, et al. Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Cell Cycle*, 2008, 7: 2368–2376
- 8 Yang Z, Kenny A E, Brito D A, et al. Cells satisfy the mitotic checkpoint in Taxol, and do so faster in concentrations that stabilize syntelic attachments. *J Cell Biol*, 2009, 186: 675–684
- 9 Swain J E, Ding J, Wu J W, et al. Regulation of spindle and chromatin dynamics during early and late stages of oocyte maturation by aurora kinases. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14: 291–299
- 10 Gomez M A, Delhommais A, Presicci P F, et al. Partial thrombosis of an idiopathic -zygotes vein aneurysm. *Br J Radiol*, 2004, 77: 342–343
- 11 Minoshima Y, Kawashima T, Hirose K, et al. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell*, 2003, 4: 549–560
- 12 Goto H, Yasui Y, Kawajiri A, et al. Aurora-B regulates the cleavage furrow specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J Biol Chem*, 2003, 278: 8526–8530
- 13 Giet R, Glover D M. Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensing recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during Cytokinesis. *J Cell Biol*, 2001, 152: 669–682
- 14 Andresson T, Ruderman J V. The kinase Eg2 is a component of the *Xenopus oocyte* progesterone-activated signaling pathway. *EMBO J*, 1998, 17: 5627–5637
- 15 Gigoux V, L'Hoste S, Raynaud F, et al. Identification of Aurora kinases as RasGAP Src homology 3 domain-binding proteins. *J Biol Chem*, 2002, 277: 23742–23746
- 16 Tseng Y S, Lee J C, Huang C Y, et al. Aurora-A overexpression enhances cell-aggregation of Ha-ras transformants through the MEK/ERK signaling pathway. *BMC Cancer*, 2009, 9: 435
- 17 Kanda A, Kawai H, Suto S, et al. Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogen*, 2005, 24: 7266–7272
- 18 Eves E M, Shapiro P, Naik K, et al. Raf kinase inhibitory protein regulates Aurora B kinase and the spindle checkpoint. *Mol Cell*, 2006, 23: 561–574
- 19 Kosik A, Bekier M E, Katusin J D. Investigating the role of Aurora kinases in RAS signaling. *J Cell Biochem*, 2009, 106: 33–41
- 20 Maton G, Thibier C, Castro A, et al. Cdc2-Cyclin B triggers H3 kinase activation of Aurora-A in *Xenopus oocytes*. *J Biol Chem*, 2003, 278: 21439–21449
- 21 Yu L Z, Xiong B, Gao W X, et al. MEK1/2 regulates microtubule organization, spindle pole tethering and asymmetric division during mouse oocyte meiotic maturation. *Cell Cycle*, 2007, 6: 330–338
- 22 Terret M E, Lefebvre C, Djiane A, et al. DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development*, 2003, 130: 5169–5177
- 23 Maekawa M, Yamamoto T, Kohno M, et al. Requirement for ERK MAP kinase in mouse preimplantation development. *Development*, 2007, 134: 2751–2759
- 24 Vas A, Clarke D. Aurora B kinases restrict chromosome decondensation to telophase of mitosis. *Cell Cycle*, 2008, 7: 1–4
- 25 Zhang X, Lan W, Ems-McClung S C, et al. Aurora B phosphorylates multiple sites on mitotic centromere-associated kinesin to spatially and temporally regulate its function. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 3264–3276
- 26 Lampson M A, Renduchitala K, Khodjakov A, et al. Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 232–237
- 27 Murata-Hori M, Fumoto K, Fukuta Y, et al. Myosin II regulatory light chain as a novel substrate for AIM-1, an aurora/Ipl1p-related kinase from rat. *J Biochem*, 2000, 128: 903–907
- 28 Kawajiri A, Yasui Y, Goto H, et al. Functional significance of the specific sites phosphorylated in desmin at cleavage furrow: aurora-B may phosphorylate and regulate type III intermediate filaments during cytokinesis coordinatedly with Rho-kinase. *Mol Biol Cell*, 2003, 14: 1489–1500

- 29 Abrieu A, Doree M, Fisher D. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAPK during maturation of oocytes. *J Cell Sci*, 2001, 114: 257–267
- 30 Karaïskou A, Dupre' A, Haccard O, et al. From progesterone to active Cdc2 in *Xenopus oocytes*: a puzzling signalling pathway. *Biol Cell*, 2001, 93: 35–46
- 31 Zhang W L, Huitorel P, Glass R, et al. A MAPK pathway is involved in the control of mitosis after fertilization of the sea urchin egg. *Dev Biol*, 2005, 282: 192–206
- 32 Kashima K, Kano K, Naito K, et al. Mos and Mitogen-activated protein kinase do not show cytotstatic factor activity in early mouse embryos. *J Reprod Dev*, 2007, 53: 1175–1812
- 33 Willard F S, Crouch M F. MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells: a role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit. *Cell Signal*, 2001, 13: 653–664
- 34 Shibuya E K, Boulton T G, Cobb M H, et al. Activation of p42 MAP kinase and the release of oocytes from cell cycle arrest. *EMBO J*, 1992, 11: 3963–3975
- 35 Furukawa T, Kanai N, Shiwaku H O, et al. AURKA is one of the downstream targets of MAPK1/ERK2 in pancreatic Cancer. *Oncogene*, 2006, 25: 4831–4839
- 36 Oktay K, Buyuk E, Oktem O, et al. The c-Jun N-terminal kinase (JNK) functions upstream of Aurora B to promote entry into mitosis. *Cell Cycle*, 2008, 7: 533–541