

MAPK 信号通路在卵母细胞减数分裂中的作用

范衡宇 佟超 陈大元 孙青原*

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080. *联系人, E-mail: sunqyl@yahoo.com)

摘要 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是一类广泛存在于真核细胞中的 Ser/Thr 蛋白激酶, 在卵母细胞减数分裂过程中起重要调节作用. MAPK 的激活涉及一系列蛋白激酶的级联活化. $p90^{rsk}$ 是 MAPK 的重要底物, 介导 MAPK 的大部分生物活性. MAPK 在减数分裂的 G_2/M 转化期被激活, 在 M I 期达到活性高峰, 并维持这一水平直至受精以后、原核形成以前. MAPK 与 MPF 在减数分裂调节过程中具有复杂的相互作用. 另外, 其他信号转导途径, 如 cAMP 信号通路、蛋白激酶 C 信号通路以及蛋白磷酸酶等, 都在卵母细胞减数分裂的不同时期调节着 MAPK 的激活. 结合自己的工作, 对 MAPK 与减数分裂的研究进展进行了评价和展望.

关键词 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 卵母细胞 减数分裂 信号通路

哺乳动物卵母细胞在卵巢中停滞是在第一次减数分裂前期的双线期, 也称为生发泡(germinal vesicle, GV)期. 当卵母细胞生长并受到适宜信号刺激(在哺乳动物中为促性腺激素)后, 恢复减数分裂, 生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)、染色质凝集、纺锤体组装、排出第一极体(polar body 1, PB1)并发育到 M II 期, 此时卵母细胞的发育再次阻滞^[1]. 受精或孤雌活化以后, 卵子恢复第二次减数分裂并最终排出第二极体. 由蛋白激酶和蛋白磷酸酶调节的蛋白质磷酸化和去磷酸化, 在减数分裂细胞周期调控中发挥关键作用.

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)又名细胞外调节激酶(extracellular-regulated kinase, ERK), 是一类广泛存在于真核细胞中的 Ser/Thr 蛋白激酶, 其激活依赖于 Thr 和 Tyr 两个位点的磷酸化. 在 MAPK 家族中分布最广的是 44 ku (ERK1)和 42 ku (ERK2)两种亚型, 它们是卵母细胞减数分裂的重要调节激酶. 本实验室以小鼠、大鼠、兔和猪为实验材料, 对 MAPK 信号通路在哺乳动物减数分裂和受精中的作用进行了一系列研究. 以下结合我们的工作, 对该领域的研究做一评价和展望.

1 Mos/MEK/MAPK/ $p90^{rsk}$ 信号级联

MAPK 信号系统的核心是几种蛋白激酶的顺序磷酸化激活. MAPK 激酶(MAPKK, 又名 MEK)是 MAPK 的直接激活分子, 催化 MAPK 的 Tyr 和 Thr

残基双特异性磷酸化. MEK 也是通过磷酸化而被激活, 其上游激酶称做 MAPKKK, 目前已经发现多种. 其中 Mos 是一个 39 ku 的 Ser/Thr 蛋白激酶, 由 *c-mos* 原癌基因编码, 是脊椎动物生殖细胞中独有的 MAPK 上游激酶. *c-mos* mRNA 是卵母细胞生长时贮存的母源性信息, 在成熟过程中被翻译, 引发 MAPK 的级联活化^[2]. 目前在哺乳动物细胞中已经发现 10 个 MAPK 家族成员, 其中 MAPK-1 和-2 与减数分裂关系密切, 其他 MAPK 家族成员主要参与细胞在应激条件下的信号转导, 故又名刺激活化的蛋白激酶(stimulation-activated protein kinase, SAPK).

$p90^{rsk}$ (ribosome S6 kinase)是最早发现的 MAPK 底物, 分子量 90 ku. $p90^{rsk}$ 的激活涉及一系列 Ser/Thr 位点的磷酸化, 目前已知 $p90^{rsk}$ 在非洲爪蟾、海星、小鼠和大鼠等动物的卵母细胞成熟过程中的激活都依赖于 MAPK1/2 的活性^[3]. 在大鼠卵母细胞中我们发现, 如果阻止生发泡破裂和 MAPK 激活, $p90^{rsk}$ 也不能被磷酸化, 在卵受精或孤雌活化之后, $p90^{rsk}$ 随 MAPK 失活而发生去磷酸化^[4]. 这些结果都暗示着 MAPK 对 $p90^{rsk}$ 活性有关键性调节作用. 根据最新资料, $p90^{rsk}$ 基因敲除的小鼠仍然可生育, 说明缺失 $p90^{rsk}$ 还不足以完全阻止卵子的发育和受精^[5]. 我们认为, 动物体内很多重要的生化过程都存在替代途径, 对基因敲除的结果还需做出详细分析, 而且敲除 $p90^{rsk}$ 基因的研究组对基因敲除鼠的详细报道仅限于能量代谢方面^[5], 这种小鼠的卵母细胞减数分裂过程还有待深入研究, 因为“可育”并不意味着一切正常.

2 MAPK 与减数分裂启动

MAPK 在减数分裂的 G₂/M 转化期被激活,而在有丝分裂中却没有这一现象.哺乳动物卵母细胞中,因为 MAPK 的活化发生在 GVBD 之后或与 GVBD 同时发生,故 MAPK 活性不是成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)激活和 GVBD 所必需的,目前已研究过的物种包括小鼠、大鼠、猪、牛、山羊和马,结果无一例外.但是在其他物种,如爪蟾中,MAPK 的激活发生在 GVBD 以前,并且是 GVBD 所必需的,MAPK 上游激酶 Mos 是决定爪蟾卵母细胞启动成熟分裂的关键因子. MAPK 在 G₂/M 转化中的功能之一是阻止细胞分裂周期(cell division cycle, CDC)基因产物 Cdc2 的抑制性磷酸化.在爪蟾卵母细胞中,由 Myt1 激酶负责 Cdc2 的抑制性磷酸化.向未成熟卵母细胞中注射活性 MPF,由于 Myt1 的抑制作用,并不能引发 GVBD,但是如果事先使 MAPK 途径活化,注入的 MPF 就可以引发自身的正反馈激活.这是因为 Myt1 的 C 末端结构域可与 MAPK 的下游激酶 p90^{rsk} 特异性结合,后者被 MAPK 磷酸化并激活后再磷酸化抑制 Myt1,下调 G₂ 期卵母细胞对 MPF 的抑制机制^[6].

在所有研究过的动物(蛤、海星、小鼠和爪蟾)中,MAPK 活性与细胞周期蛋白 B(cyclin B)的合成在时间上高度一致. MAPK 激活后, cyclin B mRNA 的翻译立即增加. 爪蟾中,如果在 GVBD 时抑制 *c-mos* 原癌基因产物 Mos 的合成或活性, MPF 的活性在减数第一次分裂后保持低水平,卵母细胞不能进入第二次减数分裂.从 G₂ 期阻滞中释放出来的卵母细胞 cyclin B 的翻译速率之所以增加,可能是由于其 mRNA 的翻译屏蔽被解除,该过程依赖于其 3' 端不转录区的胞质 poly A 成分(cytoplasmic polyadenylation element, CPE).在未成熟卵母细胞中, CPE 是 cyclin B mRNA 的翻译屏蔽因子, MAPK 的作用在于可解除 CPE 对 cyclin B 翻译的屏蔽作用^[7].

动物界中, MAPK 对 cyclin B 的翻译起正反馈刺激作用,帮助卵母细胞突破 G₂ 期阻滞,这是 MAPK 参与 MPF 激活的一个明确机制.虽然这一机制不是所有卵母细胞 GVBD 都必需的,但却对后续减数分裂事件至关重要.我们在猪卵母细胞体外成熟的实验中也发现,在那些不具备成熟能力的卵母细胞中,体外培养后胞质 MAPK 的活性很低,说明获得激活

MAPK 的能力是卵胞质成熟的指标之一^[8].

在探讨 MAPK 与减数分裂启动的关系时,作者认为有 3 个重要思想应贯穿始终.首先,在小鼠和爪蟾这两种模式动物中, Mos 发挥作用的时间不同.在哺乳动物中, Mos 在 GVBD 之后合成,其作用主要是维持 M II 期阻滞,而不是像爪蟾那样启动 GVBD.但是缺失 *c-mos* 的小鼠卵母细胞常不能发育至 M II 期,而且 PB1 的排放延迟,说明在哺乳动物中,第一次减数分裂虽然可以不依赖于 Mos 进行,但正常情况下 Mos 仍然在 M I /M II 转化期发挥一定作用^[9].

其次,虽然我们^[10]和其他人的实验都证明 MPF 的作用没有种属特异性,但在不同物种间,甚至同一物种的不同品系间,卵母细胞中 MPF 的贮存量不同,其活化对 MAPK 的依赖性也可能不同,因此在有些情况下 MAPK 通过抑制 Cdc2 抑制激酶或促进 cyclin 合成而产生出足够的 Cdc2 激酶活性,完成 G₂/M 转化,而在另一些动物卵母细胞中则不需要上述机制.

第三, MAPK 与 MPF 的作用是相互的.在所有物种的卵母细胞中,只有当 Cdc2 活化以后 MAPK 才能被充分激活. Cdc2 可能直接或间接地激活 MAPK 的上游活化分子 Mos.在爪蟾的 Mos 分子中, Ser3 残基的磷酸化为 Mos 活性所必需,还可以增强 Mos 对蛋白水解的抗性. MPF 可能介导着 Mos 的磷酸化.一个可能的模式是: MAPK 在成熟早期通过不依赖于 MPF 的途径活化,而 MPF 在 GVBD 时通过激活 Mos, 促进 MAPK 大量活化.

3 MAPK 与纺锤体组装

在卵母细胞减数分裂启动后发生广泛的微管重构,细胞质中的游离微管组装成中期纺锤体.细胞的微管组织中心(microtubule organizing center, MTOC)成分发生磷酸化,使微管聚合能力增强.在小鼠卵母细胞中, MAPK 分布在 MTOC 和减数分裂纺锤体的两极,并且减数分裂期的微管和染色质行为受 MAPK 调控.即使在 MPF 活性被抑制的条件下, MAPK 也能诱导卵母细胞的染色质凝集和纺锤体形成^[11,12].在猪卵母细胞中发现, MAPK 在 GVBD 时发生磷酸化, GVBD 以后活性 MAPK 聚集在凝集的染色体周围^[13];在中期纺锤体上, MAPK 主要位于两极,在分裂末期迁移到纺锤体中部,最后当极体排出时 MAPK 存在

于细胞分裂环上. 用 U0126 抑制 MAPK 活性后, 染色体分离、第一极体排放和 M II 期纺锤体的形成都被抑制^[14]. 我们也发现用促进微管组装的药物紫杉醇(taxol)处理猪 M II 期卵母细胞, 可以诱导出现多个 MTOC, 在这些多余的 MTOC 中也有 MAPK 的聚集^[15]. 牛卵母细胞 GVBD 前 MAPK 向核内迁移, 如向生发泡中注射 MAPK 特异性磷酸酶 MKP-1 的 mRNA, 可以阻止 MAPK 激活. 注射过的卵母细胞仍能进行减数分裂, 但纺锤体畸形、染色体不能很好地排列在赤道板上, 而且自动进行孤雌活化^[16]. 以上实验都表明 MAPK 参与了中期纺锤体的组装和维持.

多细胞动物卵母细胞的减数分裂是不对称的, 这是由分裂前纺锤体的不对称定位所导致的. 纺锤体的运动取决于纺锤体星体和细胞皮质的相互作用. 在野生型小鼠卵母细胞中, 纺锤体在细胞中部形成, 并在排放第一极体之前迁移到皮质. 在后期, 纺锤体不再伸长; 但在 *mos* 基因敲除的卵母细胞中, 纺锤体在细胞中部形成以后不再迁移, 并且在后期纺锤体极度伸长, 结果排出一个异常大的第一极体^[17]. 已知卵母细胞中纺锤体的迁移不受微管活动调节, 而与微丝网络的活动有关^[18], 这说明 Mos-MAPK 途径也调节减数分裂中微丝网络的活动, 而且对于维持纺锤体和 PB1 的正常形态至关重要.

虽然 MAPK 对纺锤体组装有重要调节作用, 但对于纺锤体上的 MAPK 靶分子还所知甚少. Polo-like 激酶(PLK)是另一类调节真核生物纺锤体组装的蛋白激酶, 它在 M 早期集中在纺锤体两极, 在中-后期转化时向纺锤体中部迁移¹⁾. 我们发现, MEK 抑制剂 U0126 可以阻止小鼠 M II 期卵母细胞中 PLK 由纺锤体两极向中部迁移, 暗示 PLK 可能是 MAPK 途径的功能性靶分子²⁾.

近年来的研究表明, 在细胞中存在纺锤体组装检验点, 在细胞分裂期未正确组装的纺锤体可通过某种机制维持 MPF 活性, 使细胞不进入分裂后期. 既然 MAPK 是调节减数分裂纺锤体组装的重要分子, 那它的活性是否也受到纺锤体组装的反馈调节? 目前这方面的报道还很少. 我们发现, 在猪卵母细胞中

用秋水仙素破坏纺锤体、用 taxol 诱导微管组装, 或用细胞松弛素 B 解聚微丝, MAPK 的活性均不受影响^[19], 说明 MAPK 活性不受纺锤体组装的直接调控. MAPK 在纺锤体组装检验点中的作用还有待深入研究.

4 MAPK 途径与 M II 期阻滞

cyclin B 的降解是细胞 M 期结束所必需的, MPF 负反馈激活后期促进复合体(anaphase promoting complex, APC), APC 使细胞周期蛋白泛素化后, 再由 26S 蛋白酶体降解细胞周期蛋白. 在脊椎动物卵母细胞中存在细胞静止因子(cytostatic factor, CSF), 使卵母细胞的减数分裂阻滞在 M II 期. 目前认为 CSF 不是单一因子, 而是多种蛋白激酶的组合物. 虽然对 CSF 的本质还未完全认识, 但已知 Mos-MAPK-p90^{rk} 通路是其关键成分. 向蛙卵裂球中注射 Mos mRNA, 活化的 MAPK 或 p90^{rk} 都能阻止其进一步卵裂. *c-mos* 基因敲除的小鼠卵母细胞在排卵后不发生 M II 期阻滞, 而是自发的孤雌活化^[20]. MEK 抑制剂 U0126 能诱导猪卵母细胞突破 M II 期阻滞^[21]. 以上结果都表明, MAPK 通路在 M II 期能够阻止 APC 依赖的细胞周期蛋白降解和染色体分离过程. 但作者认为 CSF 不会仅仅由 MAPK 通路组成, 它一定还包含未知的重要分子, 因为 MAPK 途径在 M I 期已被完全激活, 但减数分裂并不阻滞在 M I 期, 说明在 M I 期与 M II 期之间有某个未知因子出现, 使卵母细胞具备了完全的 CSF 成分.

在卵母细胞中, cyclin B 处在合成与降解的动态平衡之中, CSF 的作用机制可能在于阻止 APC 对其底物的泛素化, 或者使 MAPK 依赖的蛋白合成水平超过泛素依赖的蛋白降解水平. 有趣的是, 虽然 CSF 导致了 M II 阻滞, 但卵母细胞在受精后突破 M II 阻滞却不需要 MAPK 或 CSF 失活. 在生理条件下, 卵母细胞突破 M II 期阻滞是由 Ca²⁺/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (calmodulin-dependent kinase II, CaMK II) 介导的. CaMK II 使 M 期细胞周期蛋白降解, 姊妹染色单体分离^[22]. 就是说, 如果 MAPK 抑制细胞周期

1) Tong C, Fan H Y, Lian L, et al. Polo-like kinase-1 is a pivotal regulator of microtubule assembly during mouse oocyte meiotic maturation, fertilization and early embryonic mitosis. Biol Reprod, 2002(待发表)

2) 本实验室待发表资料

蛋白降解, CaMK II 则可以克服这个抑制作用. 这就可以解释为什么在那些受精发生于 M II 期以前的无脊椎动物卵母细胞中, 即使 MAPK 仍处于活化状态, 减数分裂也不阻滞在 M II 期: 因为突破减数分裂阻滞的因素(CaMK II)已经被启动了. 但是, 什么机制在第一次减数分裂中推动分裂中-后期转换, 又是何种机制阻止其在 M II 期继续发挥作用? 这些机制又与 MPF, MAPK 有什么关系? 到目前为止这些问题还无法回答.

5 MAPK 在受精后的作用

受精是诱导卵母细胞突破 M II 期阻滞的生理刺激因素. 受精后卵母细胞发生一系列重要代谢变化, 包括胞质钙离子增加、细胞骨架重组和线粒体迁移等^[23].

在动物界, 受精后 MPF 的活性迅速降低, 这是卵母细胞突破 M II 期阻滞所必需的, 但 MAPK 在第二次减数分裂全程中维持高活性, 一直到原核形成稍前, 即第一次有丝分裂周期的 DNA 合成之前不久, MAPK 活性才降低, 并且在其后的细胞周期中不再出现. 显然 MPF 和 MAPK 的失活是通过不同机制实现的. MAPK 在第一次卵裂中的作用还所知甚少, 尤其是卵活化后 MAPK 的延迟失活对 M 期-间期转化的意义有待研究. 最近有人发现, 在海胆、海星、蛤等海洋无脊椎动物中, 抑制卵母细胞中的 MAPK 活性, 受精后会导致精子星体提前形成, 因此提出在受精后 MAPK 抑制精子星体的发育, 可能是动物普遍存在的一个机制^[24].

我们用多种化学试剂诱导小鼠卵母细胞孤雌活化, 如乙醇、钙离子载体 A23187^[25]、蛋白激酶抑制剂 staurosporine^[26], Ro-31-8220, genistein^[27]和蛋白合成抑制剂放线菌酮¹⁾, 发现原核形成之前都发生 MAPK 迅速失活. 在上述过程中, 蛋白磷酸酶 (protein phosphatase, PP) 抑制剂冈田酸(okadaic acid, OA)都可以阻止 MAPK 失活和原核形成. 说明这些试剂虽然通过不同机制诱导卵母细胞的孤雌活化, 但它们最后都导致一个共同的生化事件, 即 MAPK 失活, 而且暗示 MAPK 是抑制核膜形成的一个因素,

它的失活是受精后原核核膜组装的前提, 这与 MAPK 在减数分裂其他阶段的功能相一致. MAPK 失活是各种特异性磷酸酶作用的结果, 但到目前为止尚未在哺乳动物中发现 MAPK 的特异性磷酸酶, 虽然 PP1 和 PP2A 抑制剂 OA 能阻止 MAPK 失活, 但作者认为并不能以此断定是这两种磷酸酶负责 MAPK 的灭活, 可能有某些尚未发现的 OA 敏感的蛋白磷酸酶在调节 MAPK 活性中发挥关键作用.

MAPK 和 MPF 在卵母细胞成熟与受精过程中的活性变化及功能总结见图 1.

6 MAPK 与 cAMP/PKA 信号途径

哺乳动物卵巢中阻滞在 G₂ 期的卵母细胞在体外被从卵泡中释放出来, 可以自发恢复减数分裂, 该过程是由细胞内 cAMP 水平下降和由此导致的蛋白激酶 A (PKA)失活所引发的. cAMP 的膜通透性类似物 dbcAMP(dibutyryl cyclic AMP)、腺苷酸环化酶激活剂毛喉素(forskolin)和磷酸二酯酶抑制剂 IBMX (isobutyl-methyl-xanthine)都可以抑制 GV 期卵母细胞在体外自发恢复减数分裂. 但是到目前为止, PKA 失活后通过怎样的机制引发 GVBD 还不清楚.

我们研究了小鼠、大鼠和猪²⁾卵母细胞成熟过程中 MAPK 活化状态与 cAMP 信号途径之间的关系, 结果发现, 正常情况下 MAPK 以无活性状态存在于 GV 期卵母细胞中, 在 GVBD 稍后发生磷酸化而激活; 当培养液中加入 dbcAMP, IBMX 或 forskolin 使 cAMP 水平升高后, GVBD 和 MAPK 的激活均受到抑制, 但是如果在 GVBD 以后再加入上述试剂, 就不再能够抑制 MAPK 激活, 而且以后的减数分裂事件, 如 PB1 的排放、M II 期纺锤体的形成等, 也不再受到影响, 这说明 GV 期 cAMP 水平下降可能是 MAPK 激活的前提^[28,29]. 但是作者并不认为 cAMP 途径是通过抑制 MAPK 活性来阻止 GVBD 的, 因为在哺乳动物中 MAPK 激活并不是 GVBD 的前提, cAMP 通路也可能是通过某个抑制 MPF 激活的机制来阻止 GVBD.

但是 cAMP/PKA 途径又是怎样抑制 MAPK 活化的呢? 我们发现, 如果在升高卵母细胞中 cAMP 水平的同时加入 OA 就可以克服 PKA 激活对 GVBD 和

1) Tong C, Fan H Y, Chen D Y, et al. Parthenogenetic activation of mouse eggs induced by cycloheximide is calcium-dependent and can be blocked by okadaic acid. Acta Zool Sin, 2002 (待发表)

2) 本实验室待发表资料

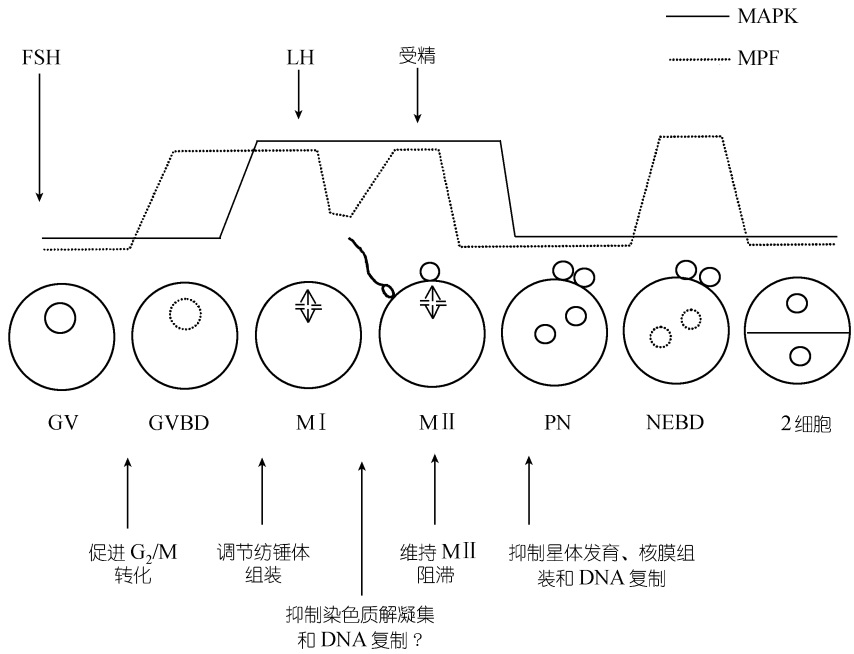


图 1 减数分裂和受精过程中 MAPK 和 MPF 的活性变化及 MAPK 的可能作用

MAPK 磷酸化的抑制作用. 另外, PKC 抑制剂钙感光蛋白 C(calphostin C)也能使一部分被 dbcAMP 阻滞在 GV 期的卵母细胞恢复减数分裂. 这些结果表明, cAMP/PKA 途径可能通过一个 OA 敏感的蛋白磷酸酶间接抑制 MAPK 激活, 而且 PKC 也可能参与 cAMP 对 MAPK 活性的调节^[30].

7 MAPK 与蛋白激酶 C

细胞内钙离子浓度升高是所有动物卵子活化所必需的, 但它的下游分子还不清楚. 近年来 PKC 作为 Ca^{2+} 可能的靶分子得到越来越多的关注^[31~33]. 我们在小鼠^[30]和大鼠¹⁾ 的 GV 期卵母细胞中都发现用佛波脂激活 PKC 以后, GVBD 被强烈抑制; 对于 MII 期卵母细胞, 佛波脂可以诱导孤雌激活并形成类原核, 即 PKC 的激活总是使卵母细胞阻滞在减数分裂的间期. 由于 PKC 和 MAPK 信号通路均参与减数分裂调节, 并且因为 MAPK 是多条信号途径的交汇点, 我们认为 PKC 和 MAPK 可能在卵母细胞成熟和活化的信号转导过程中存在对话. 该设想得到了实验结果的支持: 对于 GV 期卵母细胞, PKC 激活剂在抑制

GVBD 的同时也有效阻止了 MAPK 的激活, 而对于 MII 期卵母细胞, PKC 诱导的孤雌活化也伴随着 MAPK 的失活, 说明在减数分裂进程中, PKC 的激活起着下调 MAPK 水平的作用.

但是我们认为 MAPK 不是 PKC 在卵母细胞中调节减数分裂的惟一靶分子, 因为在 GVBD 和 MAPK 激活以后再用 PMA 处理卵母细胞, 可以在不影响 MAPK 活性的情况下阻止 PB1 排放, 而且佛波脂对 GVBD 的抑制作用可能也不是通过 MAPK 实现的, 因为 MAPK 非小鼠卵母细胞 GVBD 所必需. 作者认为, PKC 可能是通过 MPF, 而非 MAPK 来调节这两个过程.

在探讨了 MAPK 与 cAMP 和 PKC 两信号途径的关系以后, 可能会给人以这样的印象: 只要一种试剂能抑制或促进 GVBD, 那它也抑制或促进 MAPK 激活. 我们也曾怀疑 PKA 或 PKC 激活以后对 MAPK 活化的抑制作用只是阻止了 GVBD 的结果, cAMP 和 PKC 两信号途径与 MAPK 之间可能并没有直接的相互作用. 但我们和其他研究者的工作都表明, 在用显

1) Lu, Q, Smith G D, Chen D Y, et al. Activation of protein kinase C induces MAP kinase dephosphorylation and metaphase-interphase transition in rat oocytes. Biol Reprod, 2002, 66(待发表)

微操作去除卵母细胞的生发泡以后, MAPK 仍能按照正常的发育时程激活, 而 PKA 和 PKC 的激活在无核情况下也同样抑制 MAPK 活化, 这种抑制作用也同样可以被 PP 抑制剂 OA 所克服. 这表明 PKA, PKC 与 MAPK 的相互作用是在卵胞质中现实存在的, 而不是抑制 GVBD 的间接结果¹⁾.

8 MAPK 与蛋白磷酸酶

蛋白激酶与蛋白磷酸化对细胞生命活动调节的关键已经有目共睹. 其实, 其逆过程, 即蛋白磷酸酶介导的蛋白质去磷酸化也是细胞信号转导的重要方式之一. 蛋白磷酸酶 1 α 和 2A 已经从小鼠卵母细胞中鉴定出来. 在卵母细胞中 PP 调控着 MAPK 活性和微管组装. PP 可以通过使 ERK1/2 的苏氨酸残基去磷酸化而灭活 MAPK. PP1 和 PP2A 抑制剂 OA 可以完全克服活性 PKA 对 GVBD 和 MAPK 激活的抑制作用, 因此我们认为 PP 对 MAPK 的抑制作用处于 cAMP/PKA 的下游. OA 还可以导致小鼠 M II 期纺锤体组装紊乱. 即使在卵母细胞受精或孤雌活化以后, OA 也能使核膜破裂, 染色质凝集, MAPK 重新激活. OA 可以加速卵母细胞 GVBD 和 MAPK 激活, 猪卵母细胞经 OA 处理 5~10 min 后 MAPK 即被激活, 而且即使在 MPF 活性被抑制的情况下 OA 仍能诱发 GVBD 并激活 MAPK^[34]. 因此我们认为在卵母细胞恢复减数分裂前存在一个蛋白磷酸酶依赖的 MAPK 活性下调机制, OA 诱导 GVBD 和 NEBD 都是通过克服此抑制机制, 使 MAPK 实现激活的. 虽然在生理情况下是 MPF, 而非 MAPK 的活化启动了卵母细胞的 G₂/M 转化, 但经 OA 处理使 MAPK 提前激活, MAPK 也能充当 GVBD 的引发因子.

9 结语

MAPK 和 MPF 两个重要的蛋白激酶在卵母细胞成熟过程中逐步建立了多种联系, 它们均对减数分裂和受精具有重要的调节作用. 不论各种动物卵母细胞减数分裂阻滞和受精发生在哪个细胞周期时相, MAPK 的激活和失活总是具有同样规律, 即其活性与染色质凝集相伴始终, 并且不与核膜同时存在. 尤其是在两次减数分裂之间, MPF 失活, 但 MAPK 仍维

持高活性, 暗示着它此时可能阻止染色质去凝集和 DNA 复制, 从而保证了减数分裂的正常进行和受精过程中基因组的二倍体性. 虽然已发现在一些减数分裂事件中, p90^{rk} 位于 MAPK 的下游, 人们对 MAPK 的底物仍所知甚少, 这也是目前整个细胞信号转导研究所面临的难题: 即寻找蛋白激酶的生理性靶分子.

哺乳动物中受精信号转导的研究还落后于海洋无脊椎动物和低等脊椎动物的实验研究, 很多实验结果只是基于现象描述和间接推测, 对减数分裂和受精的功能性干预还很有限. 虽然部分原因是由于哺乳动物相对微小、稀少的卵母细胞和体内受精模式给研究造成不便, 但作者认为, 减数分裂和受精是一个多分子反应体系, 多个信号通路构成一张信息传递之网调节着该生理进程, 目前这种基于少数几个分子相互作用的“管中窥豹”式的研究思路 and 手段, 局限着人们对生命活动本质的更深入认识. 如何使实验设计承载更大的信息量将是今后生命科学研究的发展趋势. 哺乳动物受精在理论与实践上的重大意义, 正在鼓舞着科学工作者去寻求实验方法和科学理论的突破.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999055902)和中国科学院知识创新工程(批准号: KSCX2-SW-303)资助项目.

参 考 文 献

- 1 陈大元, 主编. 受精生物学. 北京: 科学出版社, 2000. 22~44
- 2 Sun Q Y, Breitbart H, Schatten H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod Fertil Dev*, 1999, 11: 443~450
- 3 Kalab P, Kubiak J Z, Verlhac M H. Activation of p90^{rk} during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and -dependent activation. *Development*, 1996, 122: 1957~1964
- 4 Tan X, Chen D Y, Yang Z, et al. Phosphorylation of p90^{rk} during meiotic maturation and parthenogenetic activation of rat oocytes: correlation with MAP kinases. *Zygote*, 2001, 9: 269~276
- 5 Dufresne S D, Bjorbaek C, El-Hashimi K, et al. Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 81~87
- 6 Palmer A, Gavin A C, Nebreda A R. A link between MAP kinase

1) 本实验室待发表资料

- and p34 (cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90^{tsk} phosphorylates and inactivates the p34^{cdc2} inhibitory kinase Myt1. *EMBO J*, 1998, 17: 5037~5047
- 7 Howard E L, Charlesworth A, Welk J, et al. The mitogen-activated protein kinase signaling pathway stimulates mos mRNA cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 1990~1999
- 8 Sun Q Y, Lai L, Bonk A, et al. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. *Mol Reprod Dev*, 2001, 59:192~198
- 9 Gebauer F, Richter J D. Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis. *Bio Essays*, 1996, 19: 23 ~ 28
- 10 Li G P, Chen DY, Lian L, et al. Mouse-rabbit germinal vesicle transfer reveals that factors regulating oocyte meiotic progression are not species-specific in mammals. *J Exp Zool*, 2001, 289: 322~329
- 11 Verlhac M H, Pennart H D, Maro B, et al. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol*, 1993, 158: 330~340
- 12 Verlhac M H, Kubiak J Z, Clarke H J, et al. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*, 1994, 120: 1017~1025
- 13 李满玉, 范衡宇, 佟超, 等. MAPK 参与调节猪卵母细胞和受精卵细胞周期的转变. *科学通报*, 2002, 47: 374~378
- 14 Lee J, Miyano T, Moor R M. Localization of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*, 2000, 8: 119~125
- 15 Sun Q Y, Lai L X, Wu G M, et al. Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, γ -tubulin and MAP kinase. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60: 481~490
- 16 Gordo A C, He C L, Smith S, et al. Mitogen activated protein kinase play a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2001, 59: 106~114
- 17 Verlhac M H, Lefebvre C, Guilaud P, et al. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Current Biol*, 2000, 10: 1303 ~ 1306
- 18 Chen D Y, Longo F J. Involvement of microfilaments and meiotic apparatus in the ova development of surface polarity in mouse eggs. *Ant Rec*, 1984, 208: 29A
- 19 Sun Q Y, Lai L, Park K W, et al. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 2001, 64: 871~ 889
- 20 Colledge W H, Carlton M B L, Udy G B, et al. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*, 1994, 370: 65 ~ 67
- 21 Tatemoto H, Muto N. Mitogen-activated protein kinase regulates normal transition from metaphase to interphase following parthenogenetic activation in porcine oocytes. *Zygote*, 2001, 9: 15 ~ 23
- 22 Descombes P, Nigg E A. The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J*, 1998, 17: 1328 ~ 1335
- 23 Sun Q Y, Wu G M, Lai L, et al. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, 2001, 122: 155 ~ 165
- 24 Stephano J L, Gould M C. MAP kinase, a universal suppressor of sperm centrosomes during meiosis? *Dev Biol*, 2001, 222: 420 ~ 428
- 25 Sun Q Y, Lax Y, Rubinstein S, et al. Mitogen-activated protein kinase and cell cycle progression during mouse egg activation induced by various stimuli. *Z Naturforsch[c]*, 1999, 54: 285 ~ 294
- 26 Sun Q Y, Liu H, Chen D Y. Calcium-independent, egg age-dependent parthenogenetic activation of mouse eggs by staurosporine. *J Reprod Dev*, 1997, 43: 189 ~ 197
- 27 Sun Q Y, Luria A, Rubinstein S, et al. Protein kinase inhibitors induce the interphase transition by inactivating mitogen-activated protein kinase in mouse eggs. *Zygote*, 1998, 6: 277 ~ 284
- 28 Sun Q Y, Rubinstein S, Breitbart H. MAP kinase activity is down-regulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg fertilization. *Mol Reprod Dev*, 1999, 52: 1 ~ 9
- 29 Lu Q, Smith G D, Chen D Y, et al. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase is regulated by protein kinase C, cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate, and protein phosphatase modulators during meiosis resumption in rat oocytes. *Biol Reprod*, 2001, 64: 1444 ~1450
- 30 Sun Q Y, Lu Q, Breitbart H, et al. cAMP inhibits MAP kinase activation and reinitiation of meiosis, but exerts no effects after germinal vesicle breakdown (GVBD) in mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev*, 1999, 11: 81 ~ 86
- 31 Sun Q Y, Wang W H, Hosoe M, et al. Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a Ca²⁺-independent manner, but not the resumption of cell cycle in porcine eggs. *Dev Growth Differ*, 1997, 39: 523 ~ 529
- 32 Fan H Y, Li M Y, Tong C, et al. Roles of protein kinase C isoforms in cortical reaction of pig eggs. *Dev Reprod Biol*, 2001, 10 (Suppl): 57
- 33 范衡宇, 佟超, 李满玉, 等. 用激光共聚焦显微镜在小鼠卵母细胞中检测蛋白激酶 C. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28: 900 ~ 903
- 34 Sun Q Y, Wu G M, Lai L X, et al. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, microtubule organization, chromatin behavior, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 2002, 66: 580~588

(2002-01-24 收稿, 2002-03-19 收修改稿)