

丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 参与调节斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂的恢复

李旭鹏 吕众 魏华* 曹娜 马晓航

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306)

摘要: 旨在阐明 MAPK 的激活在斑马鱼 (*Danio rerio*) 卵母细胞第一次减数分裂恢复中的作用。用 $17\alpha, 20\beta$ 双羟孕酮 ($17\alpha, 20\beta$ -DHP) 单独作用及 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 与 U0126 (MAPK 上游信号 MEK 阻断剂) 共同作用两种方法, 分别培养斑马鱼卵母细胞。采集不同培养时间的卵母细胞, 经裂解变性后利用 SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 蛋白质免疫印迹技术, 检测 MAPK 磷酸化变化, 并且观察生发泡破裂 (GVBD) 发生情况。结果表明, 斑马鱼卵母细胞在 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 诱发下 6 h 基本发生 GVBD, MAPK 活性在 2 h 明显升高, 一直到 6 h 都保持在较高水平。而加入 U0126 后, 斑马鱼卵母细胞 MAPK 活性受到明显抑制, 同一时间 GVBD 发生率均低于对照组斑马鱼卵母细胞。以上结果表明, MAPK 参与调节斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂的恢复, 是斑马鱼卵母细胞 GVBD 正常发生所必需的。

关键词: 斑马鱼; MAPK; GVBD; U0126

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2010)02-19-08

Mitogen-Activated Protein Kinase Participates in the Reinitiation of the First Meiosis in *Danio rerio* Oocytes

LI Xu-Peng LÜ Zhong WEI Hua* CAO Na MA Xiao-Hang

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Shanghai Ocean University, Ministry of Education, Shanghai 201306, China)

Abstract: The purpose of this study is to clarify the function of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity in the reinitiation of the first meiosis in Zebra Fish (*Danio rerio*) oocytes. The oocyte maturation of *D. rerio* was induced *in vitro* by $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha, 20\beta$ -DHP). Another group of oocytes were treated by $17\alpha, 20\beta$ -DHP with U0126, the inhibitor of MAPK phosphorylation. MAPK phosphorylation in oocytes obtained at different culture time points was analyzed with Western Blot, and germinal vesicle breakdown (GVBD) of oocytes was observed. The results showed that MAPK activity in oocytes in response to the $17\alpha, 20\beta$ -DHP induction (without U01266) was significantly increased at 2 h of culture and was maintained at a high level until 6 h, and GVBD also almost completed at 6 h. In contrast, U0126 completely blocked MAPK phosphorylation in oocytes exposed to $17\alpha, 20\beta$ -DHP. GVBD rate of oocytes cultured with both of $17\alpha, 20\beta$ -DHP and U0126 was lower than that of oocytes cultured with only $17\alpha, 20\beta$ -DHP. The results suggest that MAPK participates in the resumption of the first meiosis in *D. rerio* oocytes.

基金项目 上海市水生生物重点学科建设项目 (No. S30701);

* 通讯作者, E-mail: hwei@shou.edu.cn;

第一作者介绍 李旭鹏, 男, 硕士; 研究方向: 水生动物生理学; E-mail: patrickxp@163.com.

收稿日期: 2009-08-27, 修回日期: 2009-12-21

Key words: Zebra Fish (*Danio rerio*); MAPK; GVBD; U0126

以生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD) 为标志的脊椎动物卵母细胞减数分裂恢复是卵母细胞发育成熟的重要事件^[1-2]。GVBD 后卵母细胞继续发育,直至性成熟、受精。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 在卵母细胞减数分裂恢复中具有重要启动作用,MAPK 的磷酸化可诱导 GVBD 的发生及染色体凝聚、微管重组和 M II 期停滞^[1]。在真核细胞中已发现 20 个 MAPK 成员^[3-4]。MAPK 激酶 (MAPK kinase, MAPKK) 是 MAPK 的上游激活分子,MAPK 的下游分子包括多种蛋白激酶、磷脂酶,以及转录因子^[5]。

研究表明,MAPK 磷酸化后对不同动物卵母细胞减数分裂恢复的生理作用并不完全一致:有些动物 MAPK 磷酸化发生在卵母细胞减数分裂恢复后,在后续过程中发挥生理作用,如山羊 (*Capra hircus*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*);而有些动物 MAPK 磷酸化发生在卵母细胞减数分裂恢复之前或几乎同时发生,如爪蟾 (*Xenopus laevis*)、猪 (*Sus scrofa domestica*)、牛 (*Bos taurus*)、小鼠 (*Mus musculus domesticus*)^[6-12]。相对而言,鱼类和其他水生动物 MAPK 对卵母细胞作用的研究明显不足,只有少量文献报道。Mishra 发现鲑鱼 (*Heteropneustes fossilis*) 卵母细胞中 MAPK 的激活和 GVBD 的发生同步^[13]。金鱼 (*Carassius auratus*) MAPK 的大量激活发生于 GVBD 以前,Hiroko 发现抑制 17 α 20 β -双羟孕酮作用的金鱼卵母细胞 MAPK 活性后,卵母细胞依然发生 GVBD^[14]。MAPK 虽然在卵母细胞减数分裂恢复中有重要作用,但在不同动物中,其作用的具体过程还是有差异的,其激活的时间在不同种类和不同的卵细胞成熟发育模式中存在差异,因此一种动物的结果不能推断所有动物,必须分别研究,特别是在作为重要脊椎动物之一的鱼类中的研究需进一步加强。

斑马鱼 (*Danio rerio*) 作为一种著名的模式生物,广泛应用于胚胎学、发育生物学、毒理

学、分子生物学等领域^[15]。但对于其卵母细胞的生理学基础研究,特别是卵母细胞发育生物学研究,还相对比较缺乏。利用这一模式生物开展 MAPK 在卵母细胞发育作用的研究,有助于丰富这一模式动物生殖生理学和鱼类生理学内容,也可为正确认识高等动物及人类卵母细胞发育提供有用信息。

1 材料与方法

1.1 材料 斑马鱼苗购买于上海杨浦区花鸟市场,带回实验室进行饲养。按照每 24 h 内光照 14 h 黑暗 10 h 循环,饲养于水族箱内,每天投食一次,直至性成熟后进行实验。

1.2 试剂与仪器 K-40F200 倒置解剖镜 (OLYMPUS, 日本);硝酸纤维素膜 (Osmonics, 美国);17 α , 20 β -双羟孕酮 (17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, 17 α , 20 β -DHP) (Sigma, 美国);U0126 (Sigma);D-Hank's 溶液 (上海迪申生物技术公司);p-MAPK 一抗 Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody, 抗兔多克隆抗体,购于美国 Cell Signaling 公司,该抗体对人 (*Homo sapiens*)、小鼠、大鼠、猴 (*Cercopithecidae*)、貂 (*Martes*)、猪、鸡 (*Gallus domestica*)、仓鼠 (*Cricetidae*)、牛、果蝇 (*Drosophila*)、斑马鱼都有交叉反应性; α -Tubulin 小鼠单克隆抗体 (江苏碧云天);山羊抗小鼠 IgG HRP (Cayman Chemical 挪威);山羊抗兔 IgG h + 1 HRP (ICL, 美国);预染蛋白质标准品 (Fermentas 美国)。

1.3 方法

1.3.1 培养液 培养液 A (不添加 U0126 的培养液): 125 mmol/L NaCl, 2.4 mmol/L KCl, 0.28 mmol/L MgSO₄, 0.89 mmol/L MgCl₂, 22.4 mmol/L CaCl₂, 22 mmol/L Hepes, 5.6 mmol/L 葡萄糖, 100 U/ml 青霉素, 0.2 mg/ml 链霉素, 10 ng/ml 17 α 20 β -DHP, pH 7.5。

培养液 B (添加 U0126 的培养液): 用 DMSO 溶解 U0126, 配制成母液, 冰箱 -20 $^{\circ}$ C 保存。用培养液 A 将 U0126 母液稀释成 5 μ mol/

L、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度(DMSO 占培养液的体积比不大于 0.1%)。

1.3.2 卵母细胞的收集 (1)发育成熟雌性斑马鱼体表用 75% 酒精消毒,剪开腹部取出鱼腹两侧卵巢置于装有已除菌 D-Hank's 溶液的培养皿中。(2)用 D-Hank's 溶液清洗卵巢 3 遍,去除周围杂质。(3)将清洗后的卵巢移到另一只装有新鲜 D-Hank's 溶液的培养皿中,小心将卵母细胞剥离卵巢。用移液管轻轻吹打卵母细胞,去除其周围体壁细胞。用 D-Hank's 溶液洗涤分离好的卵细胞 3 次。

1.3.3 卵母细胞培养 将剥离好的斑马鱼卵母细胞放到装有培养液的培养皿中,放入培养箱中 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 培养。

1.3.4 卵母细胞的形态观察 用固定液(乙醇:乙酸:福尔马林体积比为 6:1:3)处理斑马鱼卵母细胞,在 OLYMPUS CK-40F200 倒置解剖镜下观察斑马鱼卵母细胞形态。将看不到细胞核、颜色透亮的卵母细胞计为发生 GVBD 的卵母细胞。GVBD 率是指每个样本中发生 GVBD 的卵母细胞数比上该样本总卵母细胞数。运用 SPSS 统计软件对所得数据进行处理。

1.3.5 电泳和免疫印迹 (1)将 50 个卵母细胞移入 1.5 ml 离心管中,加入裂解液裂解后,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清。(2)95 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,蛋白质变性 10 min。(3)选用 110 V 电压,30 mA 电流 SDS-PAGE 电泳 1.5 h。(4)选用 1 000 mA \cdot h 转膜过夜。(5)蛋白质免疫印记(western blot)。一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h。(6)加入发光底物,暗房拍照,显影,定影。(7)使用 Quantity One 软件对所获得的条带进行灰度值分析计算,用灰度值大小表示 MAPK 活性大小。

2 结果

2.1 斑马鱼卵母细胞体外培养成熟情况 斑马鱼卵母细胞在 17 α ,20 β -DHP (10 ng/ml) 的

诱导下,6 h 后即有 80% 以上的卵母细胞发生 GVBD (图 1)。为研究斑马鱼卵母细胞体外培养成熟情况,实验分别在 0、2、4、6 h 随机取 50 个卵母细胞检测 MAPK 磷酸化情况,并同时记录卵母细胞的 GVBD 率。结果如图 1、2 所示:在培养 2 h 以内,卵母细胞的 GVBD 率呈缓慢上升趋势,上升幅度小,而在这段时间内,MAPK 的磷酸化却有大幅度的上升($P < 0.05$)。在培养时间为 2~4 h 内,卵母细胞的 GVBD 率大幅上升($P < 0.05$),而 MAPK 的磷酸化却呈缓慢下降的趋势。在培养时间为 4~6 h 内,卵母细胞的 GVBD 率继续上升,而与此同时 MAPK 的磷酸化也继续下降。总体来看,在卵母细胞 GVBD 率逐渐上升的过程中,MAPK 的磷酸化呈现上升后下降的趋势,且 GVBD 率的显著上升阶段与 MAPK 磷酸化的下降同时发生。MAPK 的磷酸化虽然在斑马鱼卵母细胞培养 4 h 后呈下降趋势,但在第 6 h 的表达量依然比 0 h 的多。

2.2 U0126 对斑马鱼卵母细胞中 p-MAPK 的抑制作用 本实验选用 U0126 来抑制 MAPK 的磷酸化。U0126 是 MAPK 上游激酶 MEK 的抑制剂,可抑制 MEK 1 和 MEK 2^[16],从而阻断 MAPK 的磷酸化。本实验用不同浓度的 U0126 分别对培养在培养液 B 中的卵母细胞作用 3 h,观察这一过程中 MAPK 磷酸化情况和 GVBD 的变化。

首先观察了 U0126 对 17 α ,20 β -DHP 诱导下斑马鱼卵母细胞 MAPK 磷酸化的抑制作用。结果表明,U0126 对 MAPK 磷酸化具有明显抑制作用。5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 4 个浓度的 U0126 在对斑马鱼卵母细胞作用 3 h 后,其 p-MAPK 条带均明显变淡($P < 0.05$)。20 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 组的 p-MAPK 条带用本实验方法几乎检测不到(图 3)。表明斑马鱼卵母细胞在 20 $\mu\text{mol/L}$ 、30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 U0126 作用 3 h 后,MAPK 的磷酸化受到明显抑制。

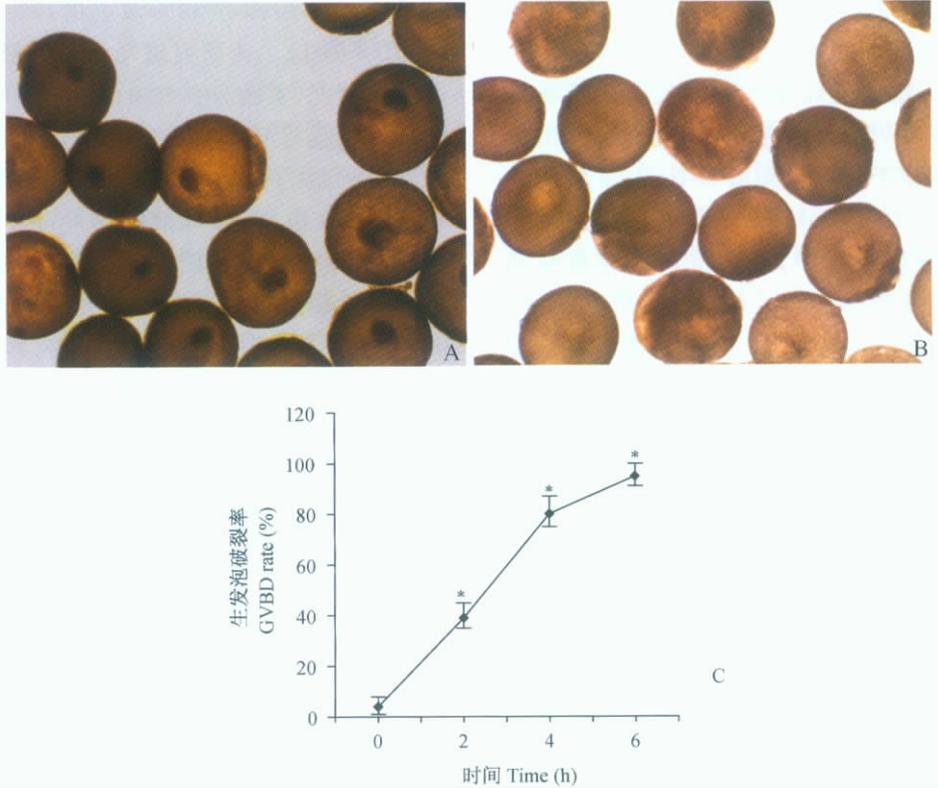


图1 17 α 20 β -DHP 诱导的斑马鱼卵母细胞 ($\times 40$) 及 GVBD 率

Fig. 1 The GVBD of oocytes induced by 17 α 20 β -DHP ($\times 40$) in *Danio rerio*

A. 在 10 ng/ml 17 α 20 β -DHP 培养液中培养 0 h 的斑马鱼卵母细胞,可见多数细胞具有 GV; B. 在 10 ng/ml 17 α 20 β -DHP 培养液中培养 6 h 的斑马鱼卵母细胞,可见多数细胞 GVBD。C. 在 10 ng/ml 17 α 20 β -DHP 培养液中培养 6 h 的斑马鱼卵母细胞生发泡破裂率变化;图中数值均为 3 次平行实验的平均值; * 表示与 0 h 差异显著 ($P < 0.05$)。

A. Most oocytes had a GV before 17 α 20 β -DHP induction; B. Most oocytes underwent GVBD at 6 h of 17 α , 20 β -DHP induction. C. Culture time-dependent GVBD rate of oocytes induced by 17 α 20 β -DHP; Values are Mean \pm SE; * shows significant difference compared to the value at 0 h ($P < 0.05$).

2.3 U0126 作用下的斑马鱼卵母细胞的 GVBD 率 在 30 μ mol/L U0126 的作用下,斑马鱼卵母细胞的成熟率 (GVBD%) 变化如图 4 所示,在培养的 12 h 内,同一时刻 U0126 组的斑马鱼卵母细胞的 GVBD 率显著低于对照组 ($P < 0.05$); 12 h 后的最终 GVBD 率也显著低于空白对照 ($P < 0.05$)。

3 讨论

动物卵母细胞在减数分裂过程中,在第一次减数分裂前期有一阻滞现象,因此时细胞内有一生发泡 (GV), 又称生发泡期。性成熟后,

在相应的促性腺成熟激素作用下 (不同动物此种激素有差异), 卵母细胞又恢复减数分裂, 出现生发泡破裂 (GVBD)。GVBD 的发生是第一次减数分裂重新启动的重要标志^[1]。卵母细胞在完成第一次减数分裂, 直至第二次减数分裂中期 (依不同动物这一期可能有所不同) 后, 再次阻滞。在不同动物的研究证实, 有多种细胞信号参与此过程, 如细胞周期素 B (cyclin B)、cdc2、PKC、Ca²⁺、MAPK 等^[3, 17-18]。

MAPK 作为卵母细胞减数分裂过程中的一种重要调节因子已被广泛关注, 经研究表明, MAPK 的激活时间存在较大的种间差异。某些

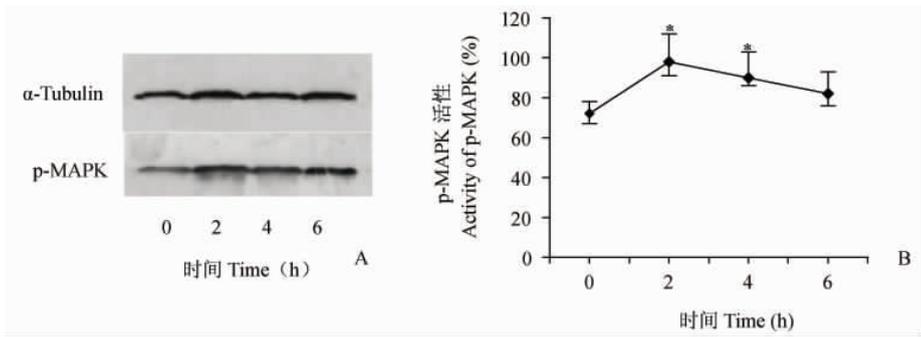


图2 17 α 20 β -DHP 诱导 6 h 的斑马鱼卵母细胞 p-MAPK 表达趋势

Fig.2 p-MAPK expression induced by 17 α 20 β -DHP during oocyte maturation

A. 17 α 20 β -DHP (10 ng/ml) 诱导 6 h 内卵母细胞中 p-MAPK 的 Western Blot 检测结果; B. 17 α , 20 β -DHP (10 ng/ml) 诱导 6 h 内卵母细胞中 p-MAPK 的表达趋势, 数据为经 Quantity One 软件分析后, 以 p-MAPK 与 α -Tubulin 条带的灰度值的比值 (p-MAPK/ α -Tubulin) 作为 p-MAPK 相对定量的结果; 图中数值均为 3 次平行实验的平均值; * 表示与 0 h 差异显著 ($P < 0.05$)。

A. p-MAPK expression induced by 17 α 20 β -DHP (10ng/ml) during oocyte maturation as detected by Western Blot; B. Relative activity of MAPK during the oocyte maturation induced by 17 α ,20 β -DHP (10 ng/ml). Data were analyzed by Quantity One , and the p-MAPK was semi quantified by comparing the grey level of p-MAPK with that of α -Tubulin; Values are Mean \pm SE; * shows significant difference from the control ($P < 0.05$). The same is applied to the following figure.

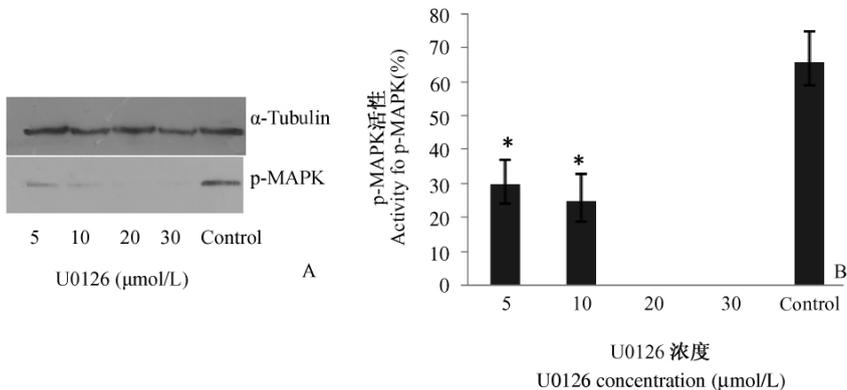


图3 不同浓度 U0126 对斑马鱼卵母细胞中 p-MAPK 的抑制作用

Fig.3 The effect of different concentrations of U0126 on p-MAPK expression

A. U0126 (0 μ mol/L , 5 μ mol/L , 10 μ mol/L , 20 μ mol/L , 30 μ mol/L) 与 17 α 20 β -DHP (10 ng/ml) 同时作用于卵母细胞 3 h 后, 其 p-MAPK 的 Western Blot 检测结果; B. 经 Quantity One 软件分析后, 以 p-MAPK 与 α -Tubulin 条带的灰度值的比值 (p-MAPK/ α -Tubulin) 作为 p-MAPK 相对定量的结果; 图中数值均为 3 次平行实验的平均值; * 表示与对照差异显著 ($P < 0.05$)。

A. Expression of p-MAPK in oocytes cultured with both U0126 (0 μ mol/L , 5 μ mol/L , 10 μ mol/L , 20 μ mol/L , 30 μ mol/L) and 17 α 20 β -DHP (10 ng/ml) for 3 h , as detected by Western Blot; B. Relative activity of MAPK activity in oocytes cultured with both U0126 and 17 α ,20 β -DHP. Values are Mean \pm SE; * shows significant difference from the control ($P < 0.05$).

动物 MAPK 在 GVBD 之后激活,对 GVBD 的发生没有作用。如山羊卵母细胞, p-MAPK 在成

熟培养后 10~12 h 后才升高,而 GVBD 则在 8 h 时就发生了^[6];大鼠 MAPK 的磷酸化发生在

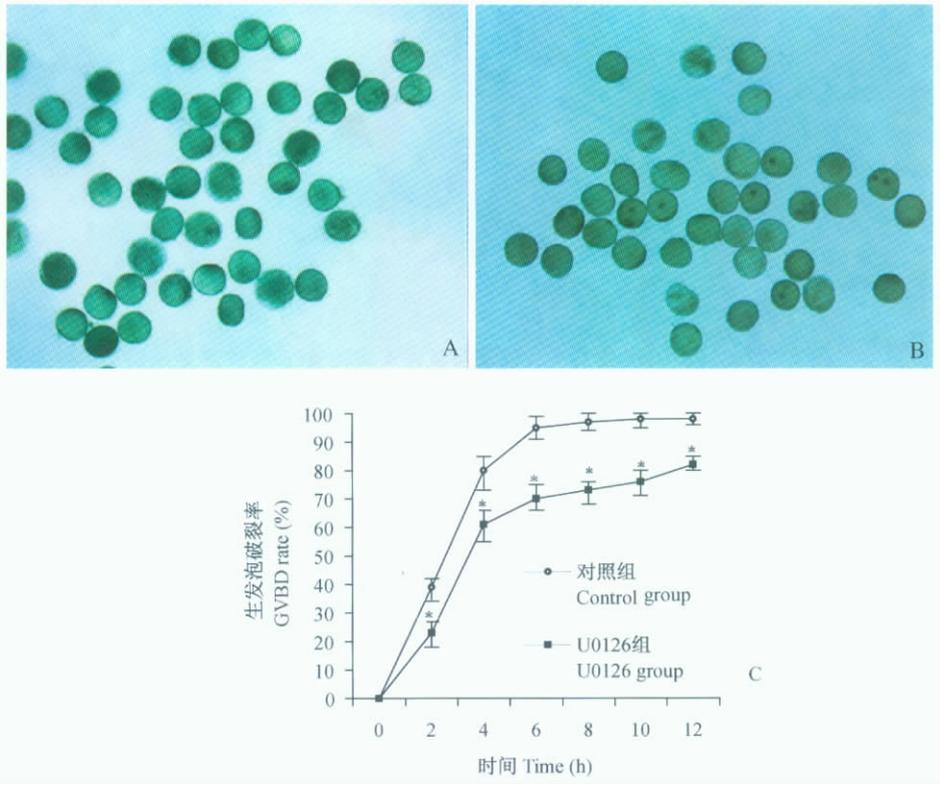


图 4 U0126 对斑马鱼卵母细胞生发泡破裂率的影响

Fig. 4 The effects of U0126 on GVBD rate of *Danio rerio* oocyte

A. 含 $17\alpha, 20\beta$ -DHP (10 ng/ml) 的培养液 A 中培养 12 h 的卵母细胞; B. 含 $17\alpha, 20\beta$ -DHP (10 ng/ml) 和 U0126 (30 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液 B 中培养 12 h 的卵母细胞; C. 分别在培养液 A、B 中各培养 12 h 的卵母细胞生发泡破裂率; 图中数值均为 3 次平行实验的平均值; * 表示与空白组差异显著 ($P < 0.05$)。

A. Oocytes were cultured for 12 h in solution A with $17\alpha, 20\beta$ -DHP (10 ng/ml); B. Oocytes were cultured for 12 h in solution B with $17\alpha, 20\beta$ -DHP (10 ng/ml) and U0126 (30 $\mu\text{mol/L}$); C. GVBD rate of oocytes cultured for 12 h in solution A or B; Values are Mean \pm SE; * shows significant differences from the control ($P < 0.05$).

GVBD 之后 3 h^[7]。某些动物 MAPK 激活发生在 GVBD 之前或伴随 GVBD 同时发生,可能对 GVBD 的发生有调节作用。如爪蟾的卵母细胞在发生 GVBD 之前 30 min,MAPK 被大量磷酸化^[8];猪卵母细胞中,MAPK 的磷酸化与 GVBD 基本同步^[9];在牛卵母细胞中,MAPK 在成熟培养后 6 h 就可被检测到其活性,8 h 后则 GVBD 开始发生^[10];小鼠 MAPK 的磷酸化发生在 GVBD 之前^[11-12];对金鱼的研究发现,MAPK 的大量激活也发生于 GVBD 以前^[14];日本林蛙 (*Rana japonica*) 的实验发现 MAPK 的大量磷酸

化与 GVBD 几乎同时发生^[19];成熟的海星 (*Asterina miniata*) 卵母细胞在其生理成熟激素甲基腺嘌呤 (1-methyladenine, 1-MA) 诱发下,10 min 后 MAPK 磷酸化就可被检测出,随后观察到 GVBD 发生^[20]。

尽管 MAPK 的激活时间存在较大种间差异,但 MAPK 对卵母细胞减数分裂中某些特定过程的作用保守,表现一致。如在卵母细胞减数分裂中,MAPK 的磷酸化对于 GVBD 后续事件:微管蛋白的重组,染色体凝集,保持 M II 期阻滞具有保守的调节作用^[1]。如剔除 MOS 基

因的小鼠卵母细胞在培养后虽然发生 GVBD,但其纺锤体结构与染色体凝集现象均发生异常^[21]。加入丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶(MKP-1,一种 MAPK 活性抑制剂)后的牛卵母细胞纺锤体不能正常形成^[22]。

此次实验首先对斑马鱼卵母细胞在发生 GVBD 的过程中 MAPK 磷酸化变化进行了研究。体外培养的斑马鱼卵母细胞在大量发生 GVBD 之前,MAPK 的磷酸化有显著上升。在斑马鱼卵母细胞体外培养 2 h 以内的时间里,尽管 GVBD 率只有较低水平, p -MAPK 的 Western Blot 检测结果却表明 MAPK 在此期间被大量磷酸化。在接下来的时间里,斑马鱼卵母细胞的 GVBD 率急剧上升,而 MAPK 的磷酸化却相对停滞(图 1、2)。此实验结果表明在斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂恢复过程中,MAPK 的磷酸化发生在 GVBD 之前。由此可见,斑马鱼 MAPK 的激活很有可能诱发 GVBD 的发生。

为进一步验证 MAPK 的激活是否对 GVBD 的发生具有直接作用,本实验中在培养斑马鱼卵母细胞的培养液中又加入 U0126,观察在 MAPK 激活受到抑制时,是否仍有 GVBD 发生。

首先,本实验对于 U0126 是否能够抑制斑马鱼卵母细胞 MAPK 的活性进行了实验验证。相关文献表明,U0126 能很好地抑制日本林蛙、海星中 MAPK 的活性^[19,23]。斑马鱼卵母细胞在 U0126 的培养液中培养 3 h 后,激活的 MAPK 量相对于对照组明显减少,20 $\mu\text{mol/L}$ 以上的 U0126 即可明显抑制斑马鱼卵母细胞中 MAPK 的磷酸化(图 3)。

其次,我们检测到在添加 30 $\mu\text{mol/L}$ U0126 的培养液中培养的斑马鱼卵母细胞,GVBD 的发生率显著低于在对照培养液中培养的斑马鱼卵母细胞(图 4)。在斑马鱼卵母细胞中,抑制 MAPK 活性抑制了 GVBD 的正常发生。在对鲇鱼的研究中发现,100 $\mu\text{mol/L}$ PD98059(另一种 MEK 抑制剂)可以明显抑制鲇鱼卵母细胞 GVBD 的发生,培养后的鲇鱼卵母细胞 GVBD 率不到 10%^[13]。而在日本林蛙

的研究中,在 MAPK 的活性被完全抑制后,培养后的卵母细胞最终 GVBD 率没有降低,只是时间延滞了 3 h^[24]。对于金鱼的研究表明,尽管 MAPK 磷酸化发生在 GVBD 之前,但并非激活卵母细胞成熟所必需的^[25]。

由此可见,作为众多减数分裂恢复调节因子中的一种,MAPK 在多种动物卵母细胞减数分裂过程中发挥调节作用,但其调节作用不尽相同。MAPK 的激活并非是所有动物卵母细胞 GVBD 发生所必需的。不同动物,MAPK 的激活可能发生在卵母细胞 GVBD 之前,也可能发生在卵母细胞 GVBD 之后。而对于 MAPK 激活发生在卵母细胞 GVBD 之前的动物,MAPK 的作用也不尽相同:抑制不同动物 MAPK 活性可能会显著影响 GVBD 的正常发生,导致最终 GVBD 率大幅下降,如鲇鱼^[13];可能影响 GVBD 的正常发生,但最终 GVBD 率下降幅度不会很大,如斑马鱼;可能只会延迟 GVBD 的发生时间,如日本林蛙^[24];甚至有可能对于 GVBD 的发生并非必需,如金鱼^[25]。

本实验结果表明:MAPK 的激活对于斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂的恢复具有调节作用。MAPK 的激活对于斑马鱼卵母细胞 GVBD 的正常发生是必需的,如果抑制 MAPK 的活性会导致斑马鱼卵母细胞最终 GVBD 率的下降,影响斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂的恢复。目前对于 MAPK 在鱼类卵母细胞发育中研究的文献很少,因此,MAPK 的磷酸化在鱼类卵母细胞第一次减数分裂恢复中的作用,将是一个非常值得进一步研究的问题。

参 考 文 献

- [1] 陈大元. 受精生物学. 北京:科学出版社,2000,316-383.
- [2] 张红卫. 发育生物学(2版). 北京:高等教育出版社,2006,117-118.
- [3] 范衡宇,佟超,陈大元,等. MAPK 信号通路在卵母细胞减数分裂中的作用. 科学通报,2002,47(9):650-655.
- [4] Abrieu A, Doree M, Fisher D. The interplay between cyclin B cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during

- maturation of oocytes. *Cell Sci*, 2001, 114 (2): 257 - 267.
- [5] Sturgill T W, Ray L B, Erikson E, et al. Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, 1988, 334 (6184): 715 - 718.
- [6] Dedieu T, Gall L, Crozet N, et al. Mitogen-activated protein kinase activity during goat oocyte maturation and the acquisition of meiotic competence. *Mol Reprod Dev*, 1996, 5 (3): 351 - 358.
- [7] 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 (5): 1444 - 1450.
- [8] Ferrell J E Jr, Wu M, Gerhart J C, et al. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol Cell Biol*, 1991, 11 (4): 1965 - 1971.
- [9] Inoue M, Naito K, Aoki F, et al. Activation of mitogen activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*, 1995, 3 (3): 265 - 271.
- [10] Fissore R A, He C L, Van de Woude G F. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol Reprod*, 1996, 55 (6): 1261 - 1270.
- [11] Su Y Q, Rubinstein S, Luria A, et al. Involvement of MEK-mitogen-activated protein kinase pathway in follicle-stimulating hormone-induced but not spontaneous meiotic resumption of mouse oocytes. *Biol Reprod*, 2001, 65 (2): 358 - 365.
- [12] Su Y Q, Wigglesworth K, Pendola F L, et al. Mitogen-activated protein kinase activity in cumulus cells is essential for gonadotropin-induced oocyte meiotic resumption and cumulus expansion in the mouse. *Endocrinology*, 2002, 143 (6): 2221 - 2232.
- [13] Mishra A, Joy K P. Involvement of mitogen-activated protein kinase in 2-hydroxyestradiol-17 β -induced oocyte maturation in the catfish heteropneustes fossilis and a note on possible interaction with protein phosphatases. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 147 (3): 329 - 335.
- [14] Tokumoto T, Tokumoto M, Horiguchi R, et al. Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation. *PNAS*, 2004, 101 (10): 3686 - 3690.
- [15] 周玉国, 温海深. 斑马鱼繁殖内分泌学研究进展. *中国实验动物学报* 2007, 15 (6): 465 - 469.
- [16] 端木德强, 李宁海, 王敬泽. MAPK 信号转导通路研究进展. *细胞生物学杂志* 2002, 24 (3): 151 - 155.
- [17] Sun Q Y, Lu Q, Breitbar H, et al. cAMP inhibits MAP kinase activation and reinitiation of meiosis, but exerts no effects after germinal vesicle breakdown in mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev*, 1999, 11 (3): 81 - 86.
- [18] Carroll D J, Albay D T, Hoang K M, et al. The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. *Developmental Biology*, 2000, 217 (1): 179 - 191.
- [19] Kotani T, Yamashita M. Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Developmental Biology*, 2002, 252 (2): 271 - 286.
- [20] Sadler K C, Ruderman J V. Components of the signaling pathway linking the 1-methyladenine receptor to MPF activation and maturation in starfish oocytes. *Developmental Biology*, 1998, 197 (1): 25 - 38.
- [21] Araki K, Naito K, Haraguchi S, et al. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod*, 1996, 55 (6): 1315 - 1324.
- [22] 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.
- [23] Carroll D J. Calcium-mediated inactivation of the MAP kinase pathway in sea urchin eggs at fertilization. *Developmental Biology*, 2001, 236 (1): 244 - 257.
- [24] Yoshida N, Mita K, Yamashita M. Function of the Mos/MAPK pathway during oocyte maturation in the Japanese brown frog *Rana japonica*. *Mol Reprod Dev*, 2000, 57 (1): 88 - 98.
- [25] Kajiura-Kobayashi H, Yoshida N, Sagata N, et al. The Mos/MAPK pathway is involved in metaphase II arrest as a cytostatic factor but is neither necessary nor sufficient for initiating oocyte maturation in goldfish. *Development Genes and Evolution*, 2000, 210 (8): 416 - 425.