

孤雌活化诱导恢复的小鼠减数分裂期间 细胞骨架的动态与作用*

朱子玉^{1,2)} 文端成¹⁾ 韩之明¹⁾ 雷 蕾¹⁾ 刘忠华¹⁾ 寇朝辉¹⁾ 徐 莹¹⁾ 王敏康¹⁾ 陈大元^{1)**}

(¹⁾中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; ²⁾苏州大学生命科学学院, 苏州 215006)

摘要 减数分裂的顺利完成是胞质分裂和核分裂在时间和空间上的协调结果, 细胞骨架系统在减数分裂的一系列事件中具有重要的调节作用. 实验通过孤雌活化诱导小鼠 M II 期卵减数分裂恢复, 采用激光共聚焦显微术检测了减数分裂期间的微管、微丝和核的动态变化, 并通过细胞骨架药物处理, 以分析微管和微丝在减数分裂事件中的不同作用. 结果显示: 纺锤体微管为核的定位、分离和运动所必需; 纺锤体从与质膜平行旋转至与质膜垂直是极体排放的前提; 微丝是控制纺锤体旋转的关键因素; 纺锤体旋转完成后微丝随即解聚, 不参与极体的最后排出, 形成原核后再重新组装.

关键词 卵母细胞, 减数分裂, 纺锤体, 微管, 微丝, 孤雌活化

学科分类号 Q132.1, Q245

哺乳动物卵母细胞经过第一次减数分裂, 排出第一极体后, 停滞在 M II 期, 受精或孤雌活化诱导减数分裂的恢复和完成. 减数分裂和有丝分裂都需要胞质分裂和核分裂在空间和时间上的协调^[1]. 在减数分裂细胞周期中纺锤体的组装与功能上的协调保证了两次减数分裂的顺利完成^[2].

微管和微丝是细胞骨架的主要成分. 在一些低等动物^[3-6]和哺乳动物如小鼠^[7,8]、猪^[9,10]、牛^[11]、马^[12]以及人^[13], 已有较多研究报道了减数分裂期间微管和微丝的组装与去组装的动态变化. 哺乳动物的减数分裂是一个复杂的过程, 微管和微丝为染色体重组和细胞分裂提供框架^[12]. 染色体的排列、分离和核分裂的完成都依赖于由微管组成的减数分裂纺锤体. 但微管和微丝对于纺锤体的形成与运动、染色体运动、极体排放和原核形成与迁移等事件的作用和如何协同还没有充分的认识.

我们通过对小鼠卵母细胞的孤雌活化处理诱导减数分裂的恢复, 采用激光共聚焦显微术检测卵母细胞激活后微管、微丝及核的动态. 并在活化期间通过解聚微管或微丝的细胞骨架药物处理, 以分析微管和微丝在减数分裂事件中的作用.

1 材料与方法

1.1 小鼠超排与卵母细胞收集

6~8 周龄的昆明种白雌鼠腹腔注射 PMSG 7.5U, 间隔 48 h 注射 hCG 7.5 U, 小鼠饲养采用自由采食和饮水, 人工控温 22~26℃, 控光 14L:10D. 注射 hCG 后 14~17h, 将小鼠颈椎脱臼处

死, 取输卵管, 在 M2 (Sigma 公司) 操作液中划开壶腹部, 收集卵丘卵母细胞复合体 (cumulus oocyte complexes, COC). COC 在含 300 U 透明质酸酶 (Sigma 公司) 的 M2 中处理, 将消化去卵丘细胞的 M II 卵洗涤后用于孤雌活化.

1.2 孤雌活化

临使用前在无 Ca^{2+} 的 M16 中加入 SrCl_2 , 使其终浓度为 10 mmol/L, 平衡后加入去卵丘的 M II 卵, 37℃、5% CO_2 、饱和湿度下培养 4 h, 洗涤后继续用 CZB 培养液培养.

1.3 细胞骨架药物处理

在活化液中分别添加促微丝解聚药物细胞松弛素 B (cytochalasin B, CB) 和促微管解聚药物 nocodazole. 两种药物均用 DMSO 配成 1 g/L 浓贮液, -20℃ 保存. 临用前加入活化液中, CB 和 nocodazole 的终浓度均为 20 $\mu\text{mol/L}$. 药物处理时间与活化时间相同, 处理 4 h 经 M2 (Sigma 公司) 洗后在无药物的 CZB 中继续培养.

1.4 免疫荧光化学与激光共聚焦显微镜观察

每隔 1 h, 对孤雌活化以及活化期间经药物处理的卵分别取样固定, 直至形成明显原核 (0~7 h). 3.7% 多聚甲醛 (PBS 配制) 室温固定 40 min, 固定的样品可在 PBS 中保存一周左右, 以便集中处理. 固定后的卵移入含 0.1% Triton X-100

* 国家自然科学基金资助项目 (39360028).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62560528, Fax: 010-62565689

E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2003-03-28, 接受日期: 2003-06-05

和 0.3% BSA 的 PBS 中, 37℃ 孵育 30 ~ 40 min 作打孔处理. 用含 0.01% Triton X-100 的 PBS 清洗 3 次后, 移入含 150 mmol/L 甘氨酸和 0.3% BSA 的 PBS 中, 37℃ 孵育 30 ~ 40 min 作封闭处理. 染微管的样品与 1:160 稀释的抗 β 管蛋白抗体 (monoclonal anti- β -tubulin, Sigma 公司) 共同孵育, 37℃ 下孵育 30 ~ 40 min 或 4℃ 过夜. 清洗液洗涤 3 次, 每次 5 min, 再与 1:80 稀释的 FITC 标记的二抗 (FITC-goat-anti-mouse IgG, Sigma 公司) 37℃ 孵育 30 ~ 40 min, 清洗 3 次, 每次 5 min. 最后与 10 mg/L 碘化丙啶 (PI) 孵育 10 min, 进行核酸荧光染色. 染微丝的样品直接与 1:200 稀释的 FITC

标记的鬼笔环肽孵育, 37℃, 30 ~ 40 min, 清洗后与 PI 孵育.

在洁净的载玻片上加一滴防荧光淬灭剂 (DABCO, Sigma 公司), 将处理好的卵转移其中, 封片后置于暗盒, 低温保存, 尽快用 Leica TCS-4D 激光共聚焦显微镜 (confocal laser microscope) 观察, 取图. 图像用 Photoshop 6.0 处理.

2 结果与分析

2.1 孤雌活化期间的微管动态

从图 1 可看出, 活化 0 h, M II 期卵母细胞的减数分裂纺锤体已组装完成, 通过对微管的免疫

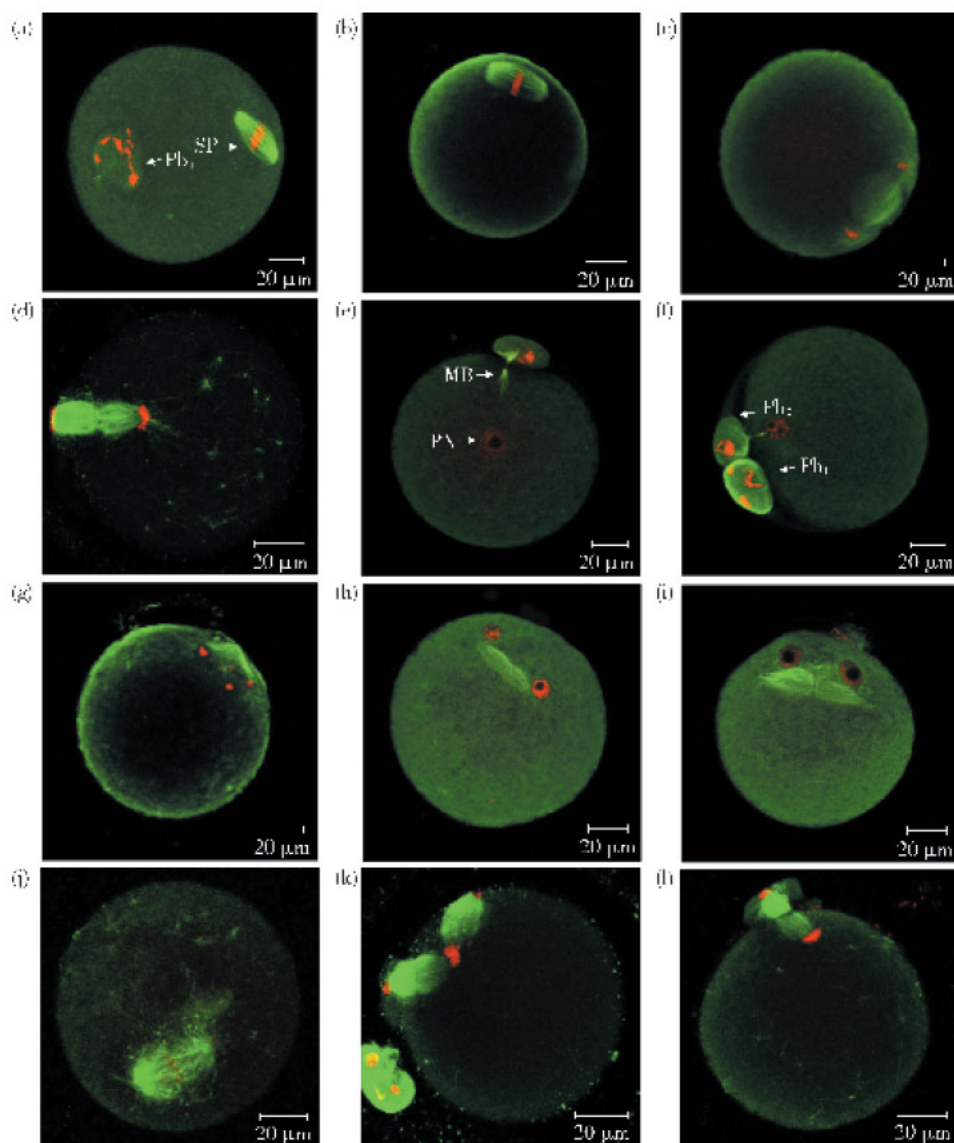


Fig. 1 Immunofluorescence localization of microtubules and influence of the drugs against cytoskeleton during meiosis II in mouse oocytes

green: microtubules; red: chromatin. (a), (b) M II oocyte. Pb₁: first polar body, SP: spindle. (c) anaphase II oocyte at 1 h postactivation. (d) telophase II oocyte at 2 h. (e), (f) oocyte fulfilled meiosis II. Pb₂: second polar body, PN: pronucleus, Mb: middle body. (g) ~ (i) oocyte treated with CB for 4 h. (j) ~ (l) oocyte treated with nocodazole for 4 h.

荧光染色, 显示微管主要分布在纺锤体中, 纺锤体定位在靠皮层区域, 与质膜平行, 呈一对称、桶形的双极结构, 染色体排列在赤道板上 (图 1a, b). 活化 1 h, 活化卵进入后期 II, 纺锤体进一步向皮层迁移, 姐妹染色单体分离, 被拉向纺锤体两极 (图 1c). 活化 2 h, 纺锤体旋转至与质膜垂直, 一端紧贴质膜, 进入末期 II (图 1d). 活化 3 ~ 4 h, 纺锤体靠质膜一端形成第二极体 (second polar body, Pb_2) 排至卵周隙, 另一极染色质去凝集. 4 ~ 6 h 时在胞质中形成一雌原核 (female pronucleus, fPN), PN 与 Pb_2 之间由中体相连 (图 1e, f).

2.2 细胞骨架药物处理对微管动态的影响

活化期间 CB 处理 4h, 姐妹染色单体正常分离, 但纺锤体始终与质膜平行, 表明纺锤体旋转被抑制, 但核分裂不受影响 (图 1g, h). 活化 4 ~ 6 h, 因纺锤体旋转的抑制, 卵周隙中未见 Pb_2 , 而是在胞质中出现两原核, 之间由中体相连 (图 1i).

活化期间用 nocodazole 处理 4h, 再洗去药物继

续培养后, 胞质中出现大量微管星体, 纺锤体重新组装, 染色体仍位于其赤道板, 之前的核分裂被抑制 (图 1j). 部分经 nocodazole 处理的卵, 其重新组装的纺锤体出现异常, 并出现染色体碎裂现象 (图 1k), 多数卵在洗去药物后, 减数分裂重新启动, 重新组装的纺锤体经过旋转, Pb_2 被延迟排放 (图 1l).

2.3 孤雌活化期间的微丝动态

活化 0 h, M II 期卵微丝定位在染色体所在的皮层区域 (图 2a, b). 活化 1 ~ 2 h, 活化卵进入后期 II, 姐妹染色单体分离, 染色体运动, 位置发生改变, 一半染色体紧贴质膜, 另一半移向卵中央. 微丝则锚定于姐妹染色单体附近的皮层区域, 在二者之间相当于纺锤体赤道板的位置也有明显的微丝富集 (图 2c, e). 活化 3 ~ 4 h, 即减数分裂 II 的末期, 排出 Pb_2 , 极体细胞中微丝仍然聚集, 而卵内核附近皮层基本没有微丝分布 (图 2f). 活化 4 ~ 6 h, 已完成减数分裂的卵形成原核, 此时原核周围皮层重新出现微丝的聚集 (图 2g).

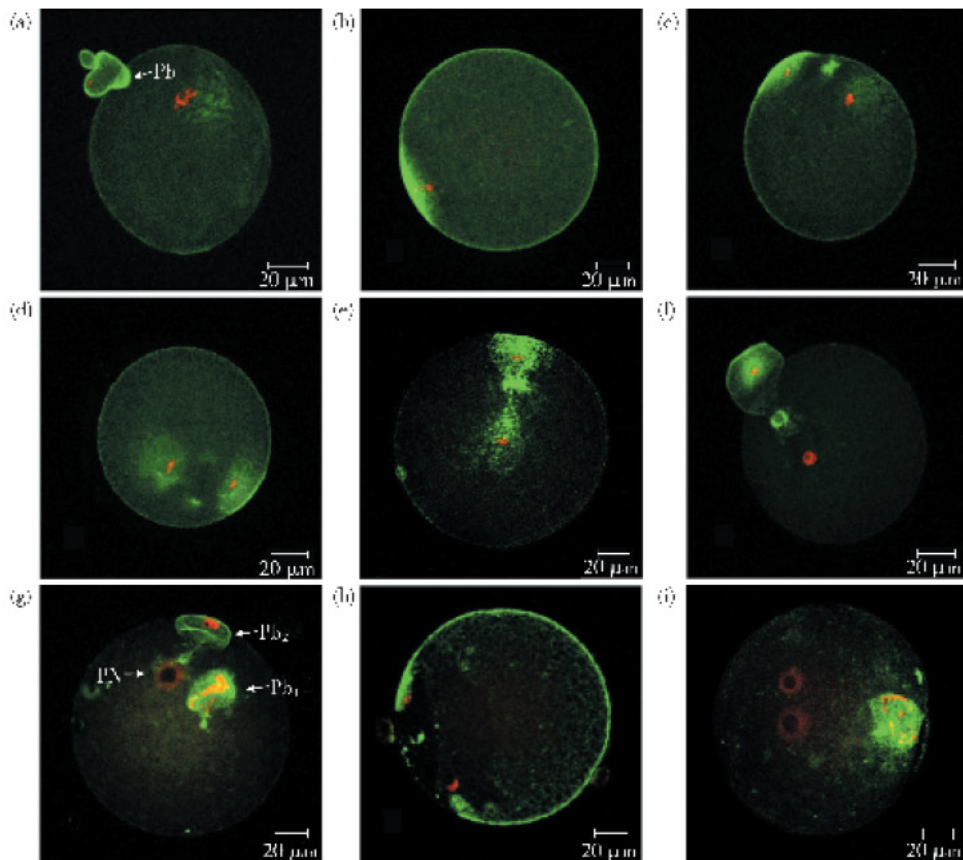


Fig. 2 Immunofluorescence localization of microfilaments and influence of the drug against cytoskeleton during meiosis II in mouse oocytes

green: microfilaments; red: chromatin. (a), (b) M II oocyte; (c) ~ (e) anaphase II oocyte at 1 ~ 2 h postactivation; (f), (g) oocyte fulfilled meiosis II; (h), (i) oocyte treated with CB for 4 h.

2.4 细胞骨架药物对微丝动态的影响

活化期间 CB 处理后, 微丝被解聚, 皮层无明显微丝聚集. 染色单体分离即核分裂不受影响, 但始终靠近卵皮层, 染色单体之一不能运动到卵中央 (图 2h). CB 处理的卵活化至 4~6 h, 胞质中出现两原核, 未见极体排出 (图 2i).

3 讨 论

本实验通过激光共聚焦显微术, 检测了小鼠 M II 期卵母细胞恢复减数分裂以后的微管和微丝的动态变化, 显示了细胞骨架系统的协同作用对减数分裂的重要意义.

M II 期卵母细胞的微管聚集组装成减数分裂中期纺锤体, 由于纺锤体微管的作用, 染色体被捕获并排列在纺锤体的赤道板上, 纺锤体与质膜平行. 染色体附近皮层的微丝富集是纺锤体向皮层迁移的重要因素^[14], 也与维持纺锤体及染色体在外周位置有关^[9,13], Sun 等^[10]的研究也说明了 M II 纺锤体的正确定向和锚定依赖于微丝. 成熟卵母细胞中微管和微丝的正常组装对于受精的成功是必需的^[13]. 通过孤雌活化诱导减数分裂恢复, 活化卵进入后期 II, 姐妹染色单体分离并移向纺锤体两极. 随后纺锤体旋转 90°, 排出 Pb₂, 留在胞质中的一半染色体去凝集, 形成原核. 纺锤体的旋转是极体排放的前提.

微管聚合抑制剂 nocodazole 处理导致纺锤体的破坏, 染色体分离不能发生, 即核分裂被抑制. 解除抑制后纺锤体重新组装, 核分裂得到恢复. 表明微管在染色体分离、运动和核分裂中具有积极的调节作用.

微丝在皮层与染色体相伴的定位策略说明微丝可能与染色体运动关系密切, 但实际上, 微丝并非控制染色体本身的运动, 而是控制染色体附着的纺锤体的运动. 因为 CB 处理解聚微丝不影响染色体分离, 但随后的纺锤体旋转和胞质分裂被抑制, 表明微丝是参与纺锤体旋转和胞质分裂的关键因素^[15]. CB 处理使本应排至卵周隙的 Pb₂ 被胞质中一个额外的原核代替, 由对照的一个单倍体原核转变成两个单倍体原核, 这是 CB 用于多倍体制作的基础^[16,17].

微丝控制了纺锤体的旋转, 一旦旋转结束, 微丝可能就开始解聚, 因为 Pb₂ 排出时卵皮层已基本没有微丝聚集, 说明极体的最终排出过程不需微丝参与. 小鼠卵原核向中央的迁移受微丝控制^[7],

因此, 原核形成后, 去组装的微丝还要重新组装.

CB 处理 4 h 时, Pb₂ 排放被不可逆地抑制, 可能是因为在纺锤体旋转和极体排放的关键时期受到 CB 解聚微丝的作用, 即使洗去 CB, 但纺锤体旋转的时空条件已不再具备, 因此旋转不能恢复, Pb₂ 不能延迟排放. 我们进一步的实验显示 CB 处理不超过 2 h 时, Pb₂ 排放能按时发生, 也有报道提出了这种可逆性^[1,7]. 另外 nocodazole 处理 4 h, 再洗去药物后培养, 结果纺锤体重新组装, 完成核分裂和胞质分裂, 整个减数分裂的完成被延迟. 经 nocodazole 处理的卵部分发生染色体碎裂^[18]和多极纺锤体的产生, 可能是因为纺锤体微管的解聚导致了染色体行为的异常, 重新组装的纺锤体和染色体的异常导致非整倍体的产生. 细胞骨架药物作用存在的可逆性表明: 虽然为确保受精前后及胚胎发育按时有序地进行, 卵胞质结构变化具有精确的时空性^[19], 但卵母细胞必然同时具备某种保护和调节机制, 以适应环境的改变.

参 考 文 献

- 1 Wang W H, Abeydeera L R, Prather R S, *et al.* Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development. *Biol Reprod*, 2000, **62** (5): 1177~1183
- 2 Albertini D F. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutation Research*, 1992, **296** (1~2): 57~68
- 3 Gard D L. Microtubule organization during maturation of *Xenopus* oocytes: assembly and rotation of the meiotic spindles. *Dev Biol*, 1992, **151** (2): 516~530
- 4 Roeder A D, Gard D L. Confocal microscopy of F-actin distribution in *Xenopus* oocytes. *Zygote*, 1994, **2** (2): 111~124
- 5 Riparbelli M G, Callaini G. Meiotic spindle organization in fertilized *Drosophila* oocyte: presence of centrosomal components in meiotic apparatus. *J Cell Sci*, 1996, **109** (Pt 5): 911~918
- 6 Palmer R E, Sullivan D S, Huffaker T, *et al.* Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 1992, **119** (3): 583~593
- 7 Maro B, Johnson M H, Pickering S J, *et al.* Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J Embryol Exp Morph*, 1984, **81**: 211~237
- 8 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** (4): 1017~1025
- 9 Kim N H, Funahashi H, Prather R S, *et al.* Microtubule and microfilament dynamics in porcine oocytes during meiotic maturation. *Mol Reprod Dev*, 1996, **43** (2): 248~255
- 10 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** (3): 879~889
- 11 Kim N H, Cho S K, Choi S H, *et al.* The distribution and

- requirements of microtubules and microfilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. *Zygote*, 2000, **8** (1): 25 ~ 32
- 12 Tremoleda J L, Schoevers E J, Stout T A, *et al.* Organisation of the cytoskeleton during *in vitro* maturation of horse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2001, **60** (2): 260 ~ 269
 - 13 Kim N H, Chung H M, Cha K Y, *et al.* Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Hum Reprod*, 1998, **13** (8): 2217 ~ 2222
 - 14 Longo F J, Chen D Y. Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol*, 1985, **107** (2): 382 ~ 394
 - 15 Zhu Z Y, Chen D Y, Li J S, *et al.* Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biol Reprod*, 2003, **68** (3): 943 ~ 946
 - 16 Washitani-Nemoto S, Saitoh C, Nemoto S. Artificial parthenogenesis in starfish eggs: behavior of nuclei and chromosomes resulting in tetraploidy of parthenogenotes produced by the suppression of polar body extrusion. *Dev Biol*, 1994, **163** (2): 293 ~ 301
 - 17 Winger Q A, De La Fuente R, King W A, *et al.* Bovine parthenogenesis is characterized by abnormal chromosomal complements: implications for maternal and paternal co-dependence during early bovine development. *Dev Genet*, 1997, **21** (2): 160 ~ 166
 - 18 Hewitson L, Haavisto A, Simerly C, *et al.* Microtubule organization and chromatin configurations in hamster oocytes during fertilization and parthenogenetic activation, and after insemination with human sperm. *Biol Reprod*, 1997, **57** (5): 967 ~ 975
 - 19 Combelles C M H, Albertini D F. Microtubule patterning during meiotic maturation in mouse oocytes is determined by cell cycle-specific sorting and redistribution of γ -tubulin. *Dev Biol*, 2001, **239** (2): 281 ~ 294

The Dynamics and Functions of Cytoskeleton During Meiotic Resumption Induced by Parthenogenetic Activation in Mouse Oocytes *

ZHU Zi-Yu^{1,2)}, WEN Duan-Cheng¹⁾, HAN Zhi-Ming¹⁾, LEI Lei¹⁾, LIU Zhong-Hua¹⁾,

KOU Zhao-Hui¹⁾, XU Ying¹⁾, WANG Min-Kang¹⁾, CHEN Da-Yuan^{1) **}

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

⁽²⁾ College of Life Science, Suzhou University, Suzhou 215006, China)

Abstract The completion of meiosis requires the spatial and temporal coordination of cytokinesis and karyokinesis. Cytoskeleton system is important for regulating a series of events during meiotic maturation. M II stage mouse oocytes were induced to resume meiosis by parthenogenetic activation, and part of them were treated with cytochalasin B and nocodazole, drugs against cytoskeleton. In order to study functions of microtubules and microfilaments in meiosis, the dynamic changes of microtubules, microfilaments and chromosomes were observed by fluorescent confocal microscopy, and the following results were obtained. Meiotic spindle made up of microtubules is essential to location, separation and movement of chromosomes. The spindle rotation from parallel to vertical with respect to plasmalemma is a premise of polar body extrusion. Microfilaments play a crucial role in regulating spindle rotation. After fulfilling the rotation, microfilaments depolymerize immediately, and therefore do not participate in final extruding of polar body. After forming the pronuclei, microfilaments will assemble again, so as to control the migration of pronuclei.

Key words oocyte, meiosis, spindle, microtubule, microfilament, parthenogenetic activation

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39360028).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62560528, Fax: 86-10-62565689, E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn

Received: March 28, 2003 Accepted: June 5, 2003