

胸腺肽- $\beta 4$ 在小鼠卵母细胞和早期胚胎中的表达与分布规律

张 岩 李树峰 杨彩荣 郑可佳 李 宁 严云勤*

(东北农业大学动物细胞与发育生物学教研室, 哈尔滨 150030)

摘要 胸腺肽- $\beta 4$ (thymosin- $\beta 4$, Tb4)是一种重要的 G-actin 遮蔽因子(G-actin sequestering factor), 在细胞微丝活动中有着调节 G-actin 活性的作用。以往报道证实了 Tb4 在细胞中具有广泛的生理作用, 但其在哺乳动物卵母细胞成熟和早期胚胎发育等方面的作用, 迄今还没有系统的研究报道。以昆明白小鼠卵巢、卵母细胞和早期胚胎作为实验材料, 以免疫(荧光)组织化学和 RT-PCR 技术为主要研究方法, 对 Tb4 的表达与分布进行了研究。结果显示, Tb4 在相关发育过程中, 存在差异性的表达和定位变化。结果表明, 在小鼠卵母细胞成熟和早期胚胎的发育过程, Tb4 能够通过表达与分布的变化对细胞微丝活动和细胞增殖活动进行调控, 对小鼠卵母细胞成熟、早期胚胎发育以及胚胎着床过程有重要的作用。

关键词 胸腺肽- $\beta 4$, 小鼠, 卵母细胞, 胚胎, 微丝, 免疫荧光组织化学, 激光共聚焦扫描显微镜

学科分类号 Q2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00043

胸腺肽最初是从动物胸腺组分中分离获得的一类生物活性物质, 在机体免疫和神经内分泌等方面有着重要的调节功能。1972 年, Goldstein 等^[1,2]从小牛胸腺组分 V 中分离提纯了一种分子质量 5 ku、由 43 个氨基酸残基组成、亲水性较强的胸腺肽家族新成员——胸腺肽- $\beta 4$ (thymosin- $\beta 4$, Tb4)。Tb4 普遍存在于脊椎动物的多种组织器官^[3,4]和部分无脊椎动物机体当中^[5], 且具有高度的保守性^[6]。Tb4 具有十分广泛的生物学功能, 近期研究表明, 其与免疫调节^[7]、神经发育^[8]、伤口愈合与炎症反应^[9,10]、血管发生^[11]、细胞凋亡^[12]以及肿瘤发生与迁移^[13]等生理和病理活动均有关系。

细胞各种微丝活动的动态调整均伴随 G-actin 活性的变化, Tb4 能够与 G-actin 以 1:1 的比例结合, 从而抑制其聚合成微丝^[14]。细胞中接近一半的 G-actin 是通过结合各种遮蔽因子(G-actin sequestering factor)而达到活性抑制与储备的目的^[15], 而 Tb4 正是 G-actin 活性遮蔽作用的主要执行者^[16]。近期研究还证实, Tb4 分子具有形成配体参与内分泌与细胞核内信号转导的作用^[17,18], 此外, 该分子本身还是谷氨酰胺转移酶的作用底物, 能够参与凝血过程中纤连蛋白与胶原蛋白的合成与组装^[19]。

迄今针对 Tb4 多样性功能性的研究已经取得了许多突破, 但其在哺乳动物卵母细胞成熟与早期胚胎发育方面的作用还没有系统的研究报道。因此, 本实验尝试以小鼠卵母细胞和早期胚胎为主要实验材料, 初步揭示 Tb4 在哺乳动物卵母细胞成熟和早期胚胎发育中的表达与分布规律。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物为昆明白品系小鼠, 雌鼠 5~8 周龄, 雄性适龄, 由东北农业大学组织胚胎研究室提供。小鼠饲养于室温 22℃, 人工光控条件, 保证自由取食、饮水。所用雄鼠均单笼饲养, 雌性小鼠集中饲养。

1.2 主要试剂和仪器

山羊抗 thymosin- $\beta 4$ 单克隆抗体与 FITC 标记兔抗山羊二抗(Santa Cruz 公司), 生物素标记兔抗山羊二抗与 HRP 标记链酶卵白素(北京中杉金桥公

* 通讯联系人。

Tel: 0451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com

收稿日期: 2009-01-06, 接受日期: 2009-03-25

司), 罗丹明标记的鬼笔环肽(rhodamine-phalloidin, Cytoskeleton 公司), hoechst 33258 (Sigma 公司), M-MLV 反转录酶(Promega 公司). Taq 酶和其他 PCR 试剂均购自宝生物公司. 培养用试剂均为 Sigma 公司产品, 实验用其他药品为分析纯级别国产试剂.

CO₂ 培养箱 (Forma 公司), 电子分析天平 (Mettler Toledo 公司), 摄像显微镜与激光共聚焦显微镜 (Leica 公司), 梯度 PCR 仪 (Bio-Rad 公司), 紫外光凝胶成像仪 (UVP 公司).

1.3 卵母细胞和胚胎的获得

雌鼠注射 5 U 孕马血清 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 48 h 后, 取卵巢, 扎取颗粒细胞完好、形态完整的颗粒细胞卵母细胞复合物 (cumulus-oocyte complexes, COCs). 经透明质酸酶去除颗粒细胞后, 选取 GV 期细胞进行培养, 在培养过程中选取所需成熟水平的卵母细胞进行实验研究. 胚胎采用雌鼠注射 5 U 孕马血清 48 h 后, 再注射 5 U 人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 并与雄鼠合笼交配的方法获得. 依据小鼠胚胎发育日龄依次获得受精卵、2 细胞胚胎直至早期着床囊胚. 同时进行合子的体外培养, 并挑选出不同发育时期的胚胎进行实验研究.

卵母细胞成熟培养液是添加了 4 g/L BSA 和 0.2 g/L 丙酮酸钠的 a-MEM 液体培养基 (Gibco 公司), 胚胎培养液为添加了 2 g/L BSA 的自制 KSOM 培养液. 实验中其他用液均参考文献 [20] 配制. 培养条件为: 饱和湿度、恒温 37℃、5% CO₂.

1.4 石蜡切片 HE 染色和免疫组织化学实验步骤

常规方法制备由孕马血清 (PMSG) 调控的不同生殖周期的小鼠卵巢石蜡切片, 连续切片厚度为 4 μm. HE 染色用染料为爱氏配方苏木精和 1% 的伊红 Y 水溶液. 免疫组织化学方法流程为: a. 常规脱蜡复水处理后, 切片使用 10 mmol/L 柠檬酸钠水溶液 (pH 6.0) 进行抗原修复, 80℃ 处理 20 min. 10% 过氧化氢甲醇溶液进行内源性过氧化物酶的灭活, 室温 10 min. b. 复水后切片经含有 10% 封闭用马血清的 PBS 溶液 37℃ 封闭非特异性抗原 1 h. c. 倾出封闭液, 直接滴加 1:50 体积比例稀释的一抗封闭液, 200 μl/片, 4℃ 过夜. d. 含 0.1% Tween 20 的 PBS 清洗液清洗 3 次, 每次 5 min. e. 滴加 1:200 体积比例由封闭液稀释的生物素标记二抗, 200 μl/片, 37℃ 孵育 1 h. f. 清洗液清

洗 3 次, 每次 5 min. g. 滴加 1:200 体积比例由封闭液稀释的 HRP 标记链酶卵白素, 37℃ 孵育 1 h. h. 清洗液清洗 3 次, 每次 5 min. i. DAB 显色液显色. j. 常规脱水, 中性树脂封片, 摄像显微镜拍摄记录实验图像.

1.5 小鼠卵母细胞和早期胚胎免疫荧光组织化学实验步骤

本实验免疫荧光组织化学流程为: a. 各处理待研究卵母细胞和早期胚胎, 首先用 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液 (PBS) 进行室温固定 30 min. b. 经 0.1% Tween 20 的 PBS 清洗液简单清洗后, 加入含 0.5% Triton X-100 的 PBS 中作室温透膜处理 30 min. c. 清洗液清洗 3 次, 每次 5 min. d. 封闭: 移入含 1% BSA 的 PBS 中, 37℃ 封闭非特异抗原位点 1 h. e. 封闭后的样本首先与含 1:50 体积比例的一抗封闭液 4℃ 共同孵育过夜. f. 清洗液清洗 3 次, 每次 5 min. g. 加入 1:100 体积比例由清洗液稀释的 FITC 标记抗山羊二抗孵育液室温孵育 1 h. h. 清洗液清洗 3 次, 每次 5 min. i. 样本与 100 nmol/L 由 PBS 稀释的罗丹明标记鬼笔环肽溶液共同室温孵育 30 min. j. 使用钠钾生理盐水溶液清洗 1 次, 5 min. k. 最后与 10 mg/L 浓度的 hoechst 33258 钠钾生理盐水溶液共同室温孵育 15 min. l. 使用钠钾生理盐水溶液清洗 3 次, 每次 5 min, 清洗结束后使用抗荧光猝灭剂对样本进行封片.

Tb4、微丝及染色质分别通过 FITC-antibody (绿色)、Rhodamine-phalloidin (红色) 和 hoechst 33258 (蓝色) 定位, 使用激光共聚焦扫描显微镜观察三者分布状态, 拍摄记录实验图像.

1.6 卵母细胞和胚胎 cDNA 的获取步骤

mRNA 获取步骤: a. 挑选形态、大小正常的卵母细胞或胚胎放入 DEPC 灭菌水配制的酸性台氏液中处理 1 min, 去除透明带. b. 将去透明带的胚胎移入 M2 操作液中洗涤 2 次. c. 将胚胎移入薄壁离心管中, 尽量不附带多余液体. d. 向离心管中加入 4 μl 裂解液、1 μl DNase、1 μl DNase 缓冲液和 1 μl RNA 酶抑制剂, 37℃ 孵育 40 min. e. 经 65℃ 10 min 灭活 DNA 酶, 消化后的产物即为总 RNA 模板. 裂解液配方为: NaCl 10 mmol/L, Tris 10 mmol/L, MgCl₂ 3 mmol/L, NP40 0.5%, DEPC 灭菌水配制, 调 pH 值至 8.0.

反转录步骤: a. 取所有消化后得到的 RNA, 向其中加入 1 μl oligodt (500 mg/L). b. 70℃ 孵育

5 min, 而后迅速置于冰上放置 10 min. c. 向其中加入 1 μ l (50 U) M-MLV 反转录酶、5 $\times$ 反转录酶缓冲液 4 μ l、2.5 mmol/L dNTP 4 μ l、0.1 mol/L DTT 2 μ l 和 Rnase 抑制剂 1 μ l, 总体积控制在 20 μ l. d. 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min 灭活反转录酶活性, 结束反应. 实验中每个获取 cDNA 的实验处理重复 3 次.

1.7 引物设计和 PCR 主要参数

本实验使用 Premier premier 5.0 软件进行引物设计. Tb4 引物设计依据 GenBank 核酸序列 X16053. 外引物序列: 正义引物, 5' TGTCTGACAAAC-CCGATAT 3', 反义引物, 5' GCAAGTTCCTTT-CCCTC 3', 退火温度 55 $^{\circ}$ C, 扩增 22 个循环, 产物 699 bp; 内引物序列: 正义引物, 5' ATCCTCT-GCCTTCAAAA 3', 反义引物, 5' CCTTCCTGCT-CAGTAGTTC 3', 退火温度 55 $^{\circ}$ C, 扩增 30 个循环, 产物 220 bp. PCR 内参为 Gapdh, 引物设计依据 GenBank 核酸序列 XM486720. 外引物序列: 正义引物, 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3', 反义引物, 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3', 退火温度 55 $^{\circ}$ C, 扩增 20 个循环, 产物 452 bp; 内引物序列: 正义引物, 5' GGAAAGCTGTGGCG-TGAT 3', 反义引物, 5' AAGGTGGAAGAGTG-GTGAGT 3', 退火温度 53 $^{\circ}$ C, 扩增 30 个循环, 产物 307 bp. 每个 cDNA 处理进行 3 次重复的外引物扩增, 扩增产物再分别进行 3 次重复的内引物扩增. 实验获得扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶中 EB 添加终浓度为 0.5 mg/L. 电泳完毕后将凝胶置于紫外光凝胶成像仪中记录实验图像.

1.8 数据分析与统计

免疫组织化学和激光共聚焦图像采用

Image-pro-plus 5.0 软件进行灰度和荧光密度扫描, 获得面积积分光密度 (A_{IOD}) 数值. 凝胶电泳图像采用 Lab Works 3.0 软件进行 IOD 值扫描, 因 PCR 获得的数据变异性较大, 故首先将各处理中的 IOD 数值进行加权平行处理, 然后丢弃 2 倍标准差以外的可疑数据. 获得的数据最后使用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析, 获得统计结论.

2 结 果

2.1 Tb4 在不同成熟水平卵泡中表达的免疫组织化学结果

免疫组织化学试验结果显示见图 1, 伴随卵泡发育, Tb4 蛋白在卵母细胞中的表达量逐渐增高. 该分子在初级卵泡的卵母细胞核、质区域呈现较弱表达. 而其在后期卵泡的卵母细胞质中表达量明显升高, 尤其在核膜处表达明显, 核内呈现较弱表达. 同时, Tb4 在有腔卵泡的颗粒细胞中呈现较弱表达, 在细胞核中没有分布. 该分子在卵巢皮质与髓质细胞中均有分布, 而在多数皮质肌层细胞的细胞核中有较高程度表达. Tb4 蛋白在不同成熟程度卵泡的卵母细胞中表达强度如图 2 所示.

2.2 卵母细胞与胚胎发育中 Tb4 蛋白免疫荧光组织化学的激光共聚焦结果

激光共聚焦结果显示, 以染色质构型不同划分的三类发育潜力不同的 GV 期卵母细胞当中, Tb4 蛋白的定位表达有所差异. 在弥散状染色质构型 (non surrounded nucleolus, NSN) 的卵母细胞中, 该分子在胞质中分布程度略高于核区, 并且在核膜处表现为集中的分布 (图 3-A); 在不完全环绕核仁染色质构型 (partly surrounded nucleolus, PSN) 中, 其在核内的分布量略有升高 (图 3-B), 而在核膜处

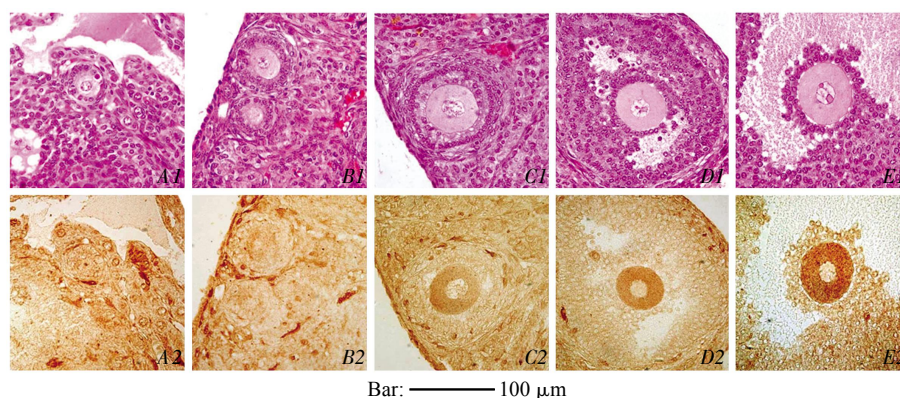


Fig. 1 Immuno-histochemistry results: Tb4 peptide expression in ovarian follicles of different mature levels

Numbers note: 1: Paraffin sections with HE stained; 2: Immuno-histochemistry results of Tb4 expression. Letters note: A, B: Primary follicles of different maturate levels; C: Secondary follicles; D: Tertiary follicles; E: Mature follicles.

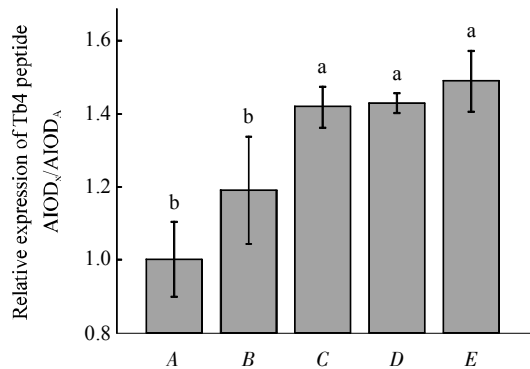


Fig. 2 Relative expression of Tb4 peptide ($\bar{x} \pm 2s$) in oocytes from ovarian follicles of different mature levels

A ~ E: The same as Figure 1. The groups with significant difference ($P < 0.05$) were noted with different lowercase letters.

仍有明显的强烈聚集；在完全环绕核仁染色质核构型(surrounded nucleolus, SN)中，该分子在核膜处呈现点状的表达，在核仁组织中心区域存在与环状

染色质位置重叠的表达(图 3-C)。无论在哪一种核质构型的 GV 期卵母细胞当中，在核仁区域内都没有明显的 Tb4 蛋白分布。

GV 期卵母细胞经过体外培养 2.5 h 后多数发生生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)，在该类卵母细胞当中，核膜轮廓呈现弥散状变化，Tb4 蛋白同样以较高强度分布于正在发生破裂的核膜区域(图 3-D)。经体外培养 3 h 后，在生发泡完全破裂的卵母细胞中，染色质高度凝集，逐渐转变为染色体状态，此时 Tb4 蛋白在原有核膜区域出现环状区域的阴性表达区域，而在染色体间的表达强度略高于胞质平均水平(图 3-E)。体外培养 5 h 时，该分子在胞质中还表现为弥散状分布，而在体外培养 7 h 的卵母细胞中，该分子则表现为均匀分布(图 3-F, G)。个别 GV 期卵母细胞，经过体外培养不能发生 GVBD，该类细胞生发泡膨大，Tb4 蛋白在细胞核内表达极弱，而在核膜位置仍然呈现高水平的凝集状态(图 3-G)。

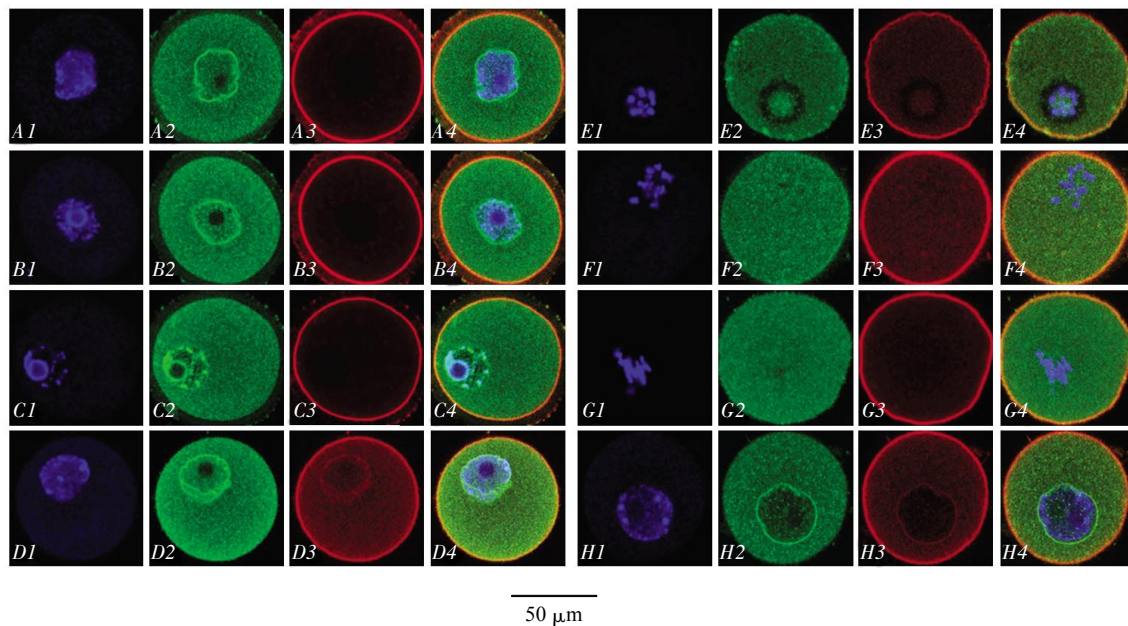


Fig. 3 Tb4 peptide expression in GV stage oocytes (with different chromatin conformation) and oocytes of different mature levels

Numbers note: 1, Chromatin stained with hoechst 33258, blue; 2, The expression of Tb4, FITC-antibody tagged, green; 3, The expression of microfilaments, rhodamine- phalloidin tagged, red; 4, Merged figures. Letters note: A, Non surrounded nucleolus (NSN) chromatin configuration; B, Partly surrounded nucleolus (PSN) chromatin configuration; C, Surrounded nucleolus (SN) chromatin configuration; D, Early germinal vesicle breakdown (GVBD) stage, IVC 2.5 h; E, IVC 3 h; F, IVC 5 h; G, IVC 7 h; H, GVBD blocked after IVC 5 h.

GV 期卵母细胞经体外培养 8 h 后，多数处于 M I 期，皮质区呈现微丝的高度极性凝集，Tb4 蛋白在中期染色质分布处有着类似纺锤体形态的分布，而在胞质皮质下缘也有较高强度的表达

(图 4-A)。当 M I 期染色体完成旋转之后，该分子在染色质与卵母细胞膜之间的表达水平略高于其他皮质部分(图 4-B)。GV 期卵母细胞经体外培养 9 h 第一极体排放时，微丝与 Tb4 蛋白均在即将形成极

体的皮质突起处表达(图 4-C). 第一次减数分裂后期, 同源染色体分离后, Tb4蛋白在分离的染色体之间出现类似纺锤体形态的表达(图 4-D). 体外培养 12 h 后, 多数卵母细胞停留在 M II 期, Tb4蛋白与微丝再次出现位置重叠的表达, 共同凝集在胞质染色体聚集的皮质区域(图 4-E).

待体内受精 10 h 后观察, Tb4蛋白在早期合子的雌雄原核中均有较弱表达, 而在合子皮质区域以及排出的极体内, 该分子表达强烈(图 4-F). 受精

后 20 h 的晚期合子中, 该分子的表达规律与早期合子类似, 并且在各阶段合子的核仁区域中均没有分布(图 4-G). 合子第一次有丝分裂中期, 胞质中该分子呈弥散状分布, 在排放的极体中仍然表达强烈(图 4-H). 而在合子分裂后期, 除凝集于极体内部和皮质区密集分布状态外, 并无特别的表达特点(图 4-I). 有丝分裂末期, 在新形成的核膜区域, Tb4蛋白重新出现凝集状表达(图 4-J).

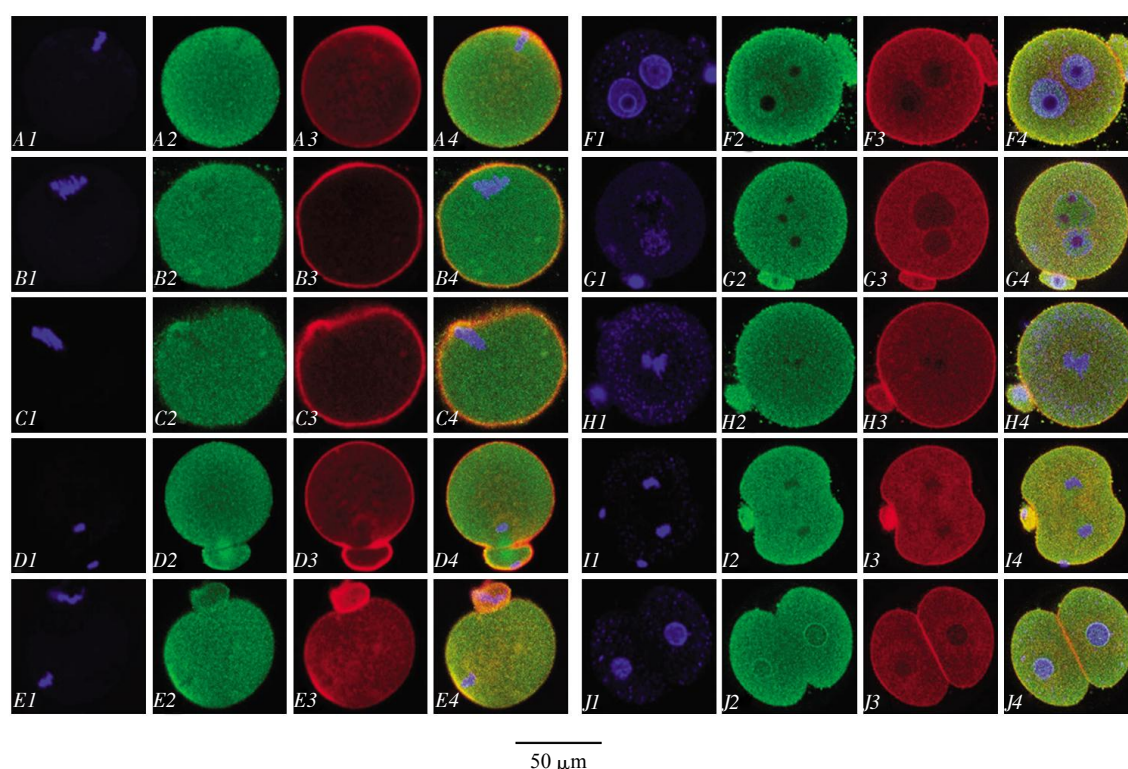


Fig. 4 Tb4 peptide expression in oocytes maturation (during forming polarbody) and zygotes development

Numbers note: The same as Figure 3. Letters note: A, Metaphase I of oocytes; B, Metaphase I of oocytes (spindle rotated); C, Forming first polarbody (early); D, Forming first polarbody (latter); E, Metaphase II of oocytes; F, Early stage of zygotes (fertilized 10 h); G, Latter stage of zygotes (fertilized 20 h); H, Metaphase of zygotes; I, Anaphase of zygotes; J, Telophase of zygotes.

试验研究了体内发育和体外培养各主要时期的胚胎, 由于所获得的分布与表达规律没有显著差异, 故所有结果使用体内发育胚胎的实验结果. 早期 2 细胞胚胎(受精后 30 h)中, Tb4蛋白在细胞核内有明显表达, 核膜处集中凝集现象不明显, 核内有大量的斑块状弱染区域存在(图 5-A). 而晚期 2 细胞胚胎(受精后 40 h)中, Tb4蛋白在核内呈现较弱表达, 核膜处凝集现象明显(图 5-B). Tb4在 4 细胞胚胎中多呈现核内弱表达, 部分细胞核膜处有凝集现象(图 5-C). 早期 8 细胞(非致密化)和晚期

8 细胞(致密化)的表达特点与 2 细胞胚胎特点类似(图 5-D, E). 早期桑椹胚表现为细胞核弱染类型(图 4-F), 而晚期桑椹胚和早、晚期囊胚中 Tb4蛋白表现为核质均一化表达. 在早期和晚期囊胚中, 该分子在核膜处聚集表达的细胞数量较多. 晚期桑椹胚和早、晚期囊胚处于分裂中期的细胞中, Tb4蛋白在胞质中表达强烈, 与其他细胞呈现明显的强度差异(图 5-G, H, I). 在早期着床囊胚(受精 5 天)中, 该蛋白质在胚胎的着床侧滋养层细胞中表达强烈, 内部细胞 Tb4基本为核、质均一型表达(图 5-J).

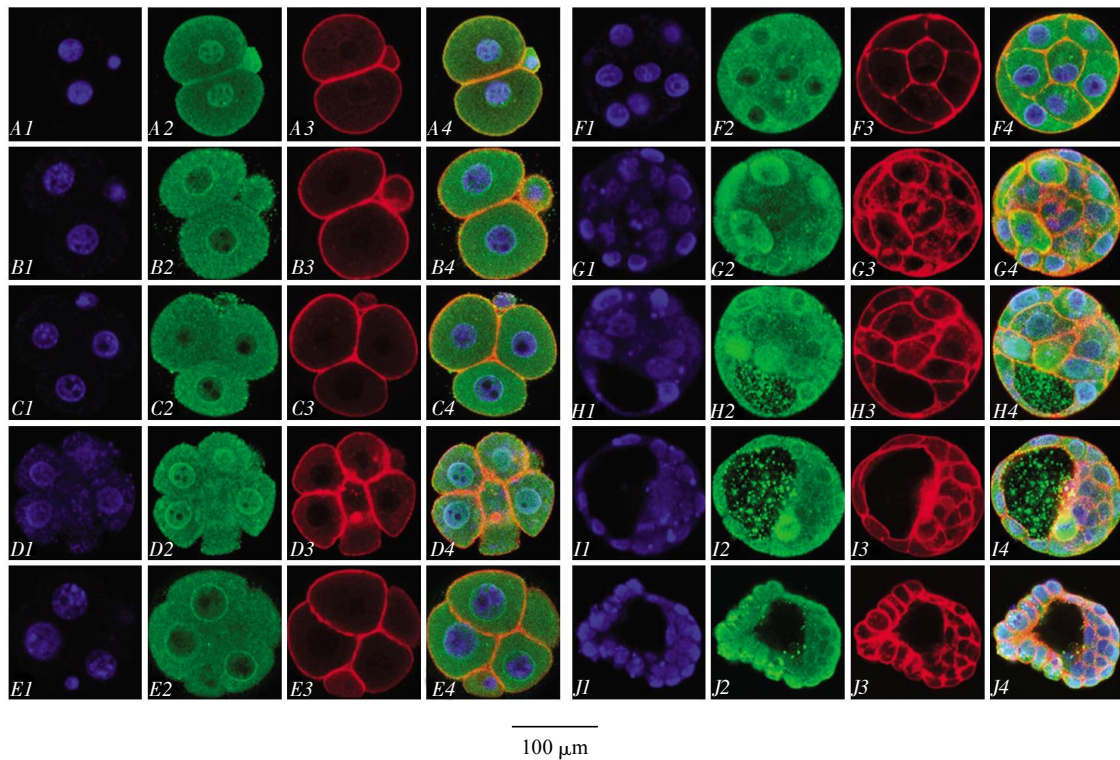


Fig. 5 Tb4 peptide expression in different stages of embryonic development and early implanted blastula

Numbers note: The same as Figure 3. Letters note: A, 2-cell embryos(early); B, 2-cell embryos(latter); C, 4-cell embryos; D, 8-cell embryos(early); E, 8-cell embryos (latter, densificated); F, Morular (early, approximate 16 cells); G, Morular (early, approximate 32 cells); H, Blastula (early); I, Blastula (latter); J, Early implanted blastula.

Tb4蛋白在卵母细胞和早期胚胎的几个主要时期的相对表达强度如图6所示, 在卵母细胞成熟过程中, 各时期 Tb4蛋白的荧光平均 AIOD 值无显著差异. 而在胚胎发育过程中, 从 8 细胞开始 Tb4 蛋白的表达量急剧增加.

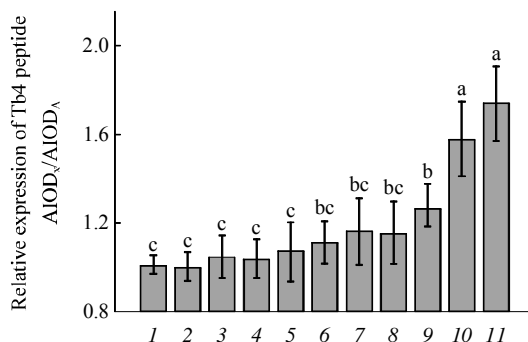


Fig. 6 Relative expression of Tb4 peptide ($\bar{x} \pm 2s$) in main stages of oocytes maturation and embryonic development

Numbers note: 1, GV stage; 2, GVBD stage, IVC 3h; 3, GVBD blocked, IVC 5h; 4, Metaphase II of oocytes(Matured *in vivo*); 5, Metaphase II of oocytes (Matured *in vitro*); 6, Zygotes; 7, 2-cell embryos; 8, 4-cell embryos; 9, 8-cell embryos; 10, Morular; 11, Blastula. The groups with significant difference ($P < 0.05$) were noted with different lowercase letters.

2.3 卵母细胞与胚胎发育过程中 Tb4 mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果

卵母细胞和胚胎发育过程中 Tb4 mRNA 表达的 RT-PCR 检测结果见图 7.

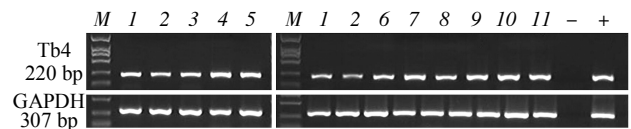


Fig. 7 Tb4 mRNA expression in main stages of oocytes maturation and embryonic development

1: GV stage; 2: Metaphase II of oocytes(matured *in vivo*); 3: Metaphase II of oocytes(matured *in vitro*); 4: GVBD blocked, IVC 5 h; 5: Oocytes without forming polarbody, IVC 12 h; 6: Zygotes; 7: 2-cell embryos; 8: 4-cell embryos; 9: 8-cell embryos; 10: Morular; 11: Blastula; -: Negative control; +: Positive control(cDNA from mouse liver). M: DL 2000.

依据凝胶成像系统获得 IOD 数值进行统计分析, 获得如下结果见图 8: 体内成熟卵母细胞中 Tb4 mRNA 表达量均值略低于 GV 期, 而体外成熟的表达量略高于 GV 期, 但差异不显著. 发

生 GVBD 阻断和不能排出极体的卵母细胞中, Tb4 mRNA 的表达量增高, 与正常成熟卵母细胞有显著的差异. 从受精合子发育到囊胚的过程中, Tb4 mRNA 的表达量逐渐升高, 其中在 2 细胞胚胎时期表达量出现一次高峰, 而在囊胚时表达量达到最高值.

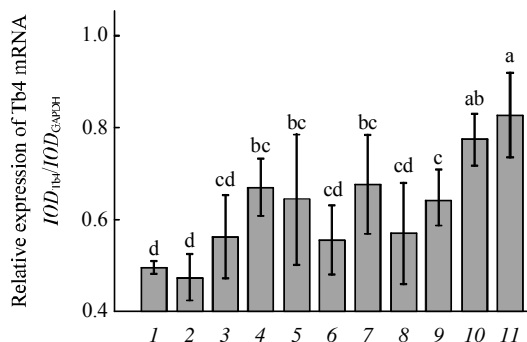


Fig. 8 Relative expression of Tb4 mRNA ($\bar{x} \pm 2s$) in main stages of oocytes maturation and embryonic development
1 ~ 11: The same as Figure 7. The groups with significant difference ($P < 0.05$) were noted with different lowercase letters.

3 讨 论

Tb4是一类参与众多生理与病理活动的多功能小肽类因子, 但其主要的作用是能够与 G-actin 结合, 使其失去聚合成微丝的能力, 即参与 G-actin 的活性遮蔽作用, 因此 Tb4等多肽物质常被称为遮蔽因子. 细胞微环境中非遮蔽状态的 G-actin 浓度水平能够直接影响微丝活动的效果, 使之倾向于聚合或是解聚. 当遮蔽因子与 G-actin 结合后, 使后者失去了重新聚合成微丝的能力, 从而提高了原有微丝的解聚效率; 反之去除遮蔽因子的作用有利于胞质微丝的聚合.

胸腺肽- $\beta 4$ 不仅限于在胞质中执行 G-actin 的活性遮蔽功能, 而且在细胞核中也有分布. Radoslaw 等^[18]研究表明, Tb4在细胞中具有广泛的定位特性, 将 Tb4酶解后, C 端片段只能定位于细胞质, 中段能够与 G-actin 结合, 而 N 端片段能够定位于细胞核当中. 并且有相关文献报道, 肌动蛋白在核内是以非常规的聚合形式存在的, 其与细胞核结构组成和核功能执行密切相关^[21, 22], 因此与微丝相关的细胞核活动也需要 G-actin 遮蔽因子的调节. 另有实验证据表明, Tb4与其他一些因子共同作用, 能够调节细胞核的解离、组装与形态变化, 并且还与 DNA 的转录和复制活动密切相关^[23~25].

Tb4还能够结合多种因子而产生配体作用, 能够结合细胞膜性受体或核内受体, 产生信号转导和调控 DNA 转录或复制的作用, 如 DNA 解旋酶 II 的激活就与该分子有关^[17, 18]. 综上所述, Tb4在细胞核中的定位表达有着重要的作用与意义.

以往较多报道均证实 Tb4在细胞核、质中具有广泛的表达. Yu 等^[26]采用放射性自显影方法研究表明, 在非洲爪蟾的卵母细胞胞质和细胞核中均有该蛋白质的分布, 且分布量较为均一. 而 Huff 等^[27]在研究 MCF-7 细胞系的报道中认为, Tb4的定位分布特点存在着与细胞生长状态相关的显著差异.

本试验通过小鼠卵泡免疫组织化学结果证实, 在卵母细胞体内成熟过程中, Tb4蛋白在胞质中处于积累状态. 但是 RT-PCR 结果显示, 体外成熟过程中 Tb4 mRNA 的表达水平上没有显著差异, 只是在发生 GVBD 阻断和没有排出极体的卵母细胞中, mRNA 的表达量有所升高. 说明卵母细胞在体外成熟受到影响时, Tb4 mRNA 处于激活转录状态. 通过激光共聚焦结果分析, Tb4蛋白在卵母细胞和早期胚胎的胞质和细胞核当中均有规律性的表达. 我们认为 Tb4在细胞核、质中的分布变化现象能够对核、质两处中遮蔽因子的浓度进行调节, 胞质中高浓度的 Tb4多与调节微丝解聚过程有关. 而伴随胞质中微丝聚合过程, Tb4往往向细胞核内转运, 从而解除 G-actin 活性的遮蔽作用, 以促进微丝的聚合效率. Tb4的这种核、质定位差异现象与细胞所处的发育阶段和增殖状态密切相关. 针对与 Tb4细胞核定位的研究发现, Tb4 在核膜破裂和重组的过程前后于细胞核膜处有大量的凝集, 证明其在细胞核形态变化、分解和重组过程中有重要的作用. 但在各阶段核仁结构中均无 Tb4蛋白的表达, 说明其与核仁功能执行并无密切关系. Zucotti 等^[28]报道, 不同染色质构型的 GV 期卵母细胞的发育潜力具有差异, 一般认为染色质构型的差异与细胞核成熟程度密切相关. 本试验获得的相关结果证实, Tb4在不同染色质构型的 GV 期卵母细胞中的表达定位也有所差异.

我们认为 Tb4蛋白的表达定位规律还与细胞所处周期有关. 我们在另一研究中发现, 处于 G1期的 MEFs 细胞核中有较高水平的 Tb4蛋白表达, 而在 S 期表达量显著降低. 这一结果与本实验若干现象相符, 例如 Tb4在早期 2- 细胞与早期 8- 细胞胚胎细胞核中表达强度较高, 而在晚期细胞核中的表

达量降低. 这可能与细胞周期有关, 因为晚期细胞处于 S 期或 G2 期.

在桑椹胚和囊胚阶段, Tb4 总体表达量急剧增加, 并且在处于细胞分裂中期的细胞质当中, 该蛋白质的表达水平极高. 而在早期着床囊胚中, Tb4 蛋白在着床侧细胞表达水平较高, 说明 Tb4 能够调节胚胎着床过程中的微丝解聚活动, 因此其对小鼠胚胎着床也有着重要的意义. 综上所述, Tb4 在小鼠卵母细胞成熟和早期胚胎发育过程中, 存在差异性的表达和定位变化, 能够对细胞微丝活动和细胞增殖等方面进行调节. 因此 Tb4 对卵母细胞成熟、早期胚胎发育以及胚胎着床等过程均有重要的作用.

参 考 文 献

- Goldstein A L, Guha A, Zatz M M, *et al.* Purification and biological activity of thymosin, a hormone of the thymus gland. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, **69**(7): 1800~1803
- Low T L, Hu S K, Goldstein A L. Complete amino acid sequence of bovine thymosin β 4: A thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**(2): 1162~1166
- Erickson V S, Ruggieri S, Natalini P, *et al.* Distribution of thymosin β 4 in vertebrate classes. *Arch Biochem Biophys*, 1983, **225**(2): 570~576
- Hannappel E, Xu G J, Morgan J, *et al.* Thymosin β 4: A ubiquitous peptide in rat and mouse-tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**(7): 2172~2175
- Safer D, Chowrashi P K. Beta-Thymosins from marine invertebrates: primary structure and interaction with actin. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1997, **38**(2): 163~171
- Conlon J M, Grimelius L, Wallin G, *et al.* Isolation and structural characterization of thymosin-beta from a human medullary thyroid carcinoma. *J Endocrinol*, 1988, **118**(1): 155~159
- Gondo H, Kudo J, White J W, *et al.* Differential expression of the human thymosin-beta 4 gene in lymphocytes, macrophages, and granulocytes. *J Immunol*, 1987, **139**(11): 3840~3848
- Yang H, Cheng X, Yao Q, *et al.* The promotive effects of thymosin β 4 on neuronal survival and neurite outgrowth by upregulating L1 expression. *Neurochem Res*, 2008, **33**(11): 2269~2280
- Philp D, Badamchian M, Scheremeta B, *et al.* Thymosin beta 4 and a synthetic peptide containing its actin-binding domain promote dermal wound repair in db/db diabetic mice and in aged mice. *Wound Repair Regen*, 2003, **11**(1): 19~24
- Sosne G, Szliter E A, Barrett R, *et al.* Thymosin β 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation *in vivo* following alkali injury. *Exp Eye Res*, 2002, **74**(2): 293~299
- Smart N, Rossdeutsch A, Riley P R. Thymosin beta 4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential. *Angiogenesis*, 2007, **10**(4): 229~241
- Müller C S, Huff T, Hannappel E. Reduction of thymosin β 4 and actin in HL60 cells during apoptosis is preceded by a decrease in their mRNAs. *Mol Cell Biochem*, 2003, **250**(1~2): 179~188
- Otto A M, Müller C S, Huff T, *et al.* Chemotherapeutic drugs change actin skeleton organization and the expression of β -thymosins in human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2002, **128**(5): 247~256
- Huff T, Müller C S, Otto A M, *et al.* β -Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, **33**(3): 205~220
- Pollard T D, Cooper J A. Actin and actin-binding proteins: a critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*, 1986, **55**: 987~1035
- Safer D, Elzinga M, Nachmias V T. Thymosin β 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem*, 1991, **266**(7): 4029~4032
- Hinkel R, El-Aouni C, Olson T, *et al.* Thymosin β 4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection. *Circulation*, 2008, **117**(17): 2232~2240
- Radoslaw B, Joanna B, Katarzyna S, *et al.* Ku80 as a novel receptor for thymosin β 4 that mediates its intracellular activity different from G-actin sequestering. *J Biol Chem*, 2008, **283**(3): 1534~1544
- Huff T, Ballweber E, Humeny A, *et al.* Thymosin beta(4) serves as a glutaminyl substrate of transglutaminase. Labeling with fluorescent dansylcadaverine does not abolish interaction with G-actin. *FEBS Lett*, 1999, **464**(1~2): 14~20
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, 等著. 孙青原, 陈大元, 主译. 小鼠胚胎操作实验手册. 北京: 化学工业出版社, 2006
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, *et al.* Sun Q Y, Chen D Y by translated. *Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual*. 3rd. Beijing: Chemical Industry Press, 2006
- Gonsior S M, Platz S, Buchmeier S, *et al.* Conformational difference between nuclear and cytoplasmic actin as detected by a monoclonal antibody. *J Cell Sci*, 1999, **112**(6): 797~809
- Sharon W K, Cynthia C, Sheldon P, *et al.* Nuclear actin and protein 4.1: Essential interactions during nuclear assembly *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(19): 10752~10757
- Rando O J, Zhao K, Crabtree G R. Searching for a function for nuclear actin. *Trends Cell Biol*, 2000, **10**(3): 92~97
- Olave I A, Reck-Peterson S L, Crabtree G R. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem*, 2002, **71**: 755~781
- Shumaker D K, Kuczmarski E R, Goldman R D. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, **15**(3): 358~366
- Yu F X, Lin S C, Morrison B M, *et al.* Effects of thymosin β 4 and thymosin β 10 on actin structures in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1994, **27**(1): 13~25
- Huff T, Rosorius O, Otto A M, *et al.* Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin β 4. *J Cell Sci*, 2004, **117**(22): 5333~5343
- Zucotti M, Piccinelli A, Rossi P G, *et al.* Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Develop*, 1995, **41**: 479~485

Expression and Distribution of Thymosin- $\beta 4$ in Mouse Oocytes and Early Embryos

ZHANG Yan, LI Shu-Feng, YANG Cai-Rong, ZHENG Ke-Jia, LI Ning, YAN Yun-Qin*

(Department of Animal Cell and Developmental Biology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Thymosin- $\beta 4$ (thymosin- $\beta 4$, Tb4) is an important G-actin sequestering factor in cells, which could regulate the activity of G-actin in various microfilaments events. Previously, many researches have reported that Tb4 has broad cellular and physiological functions, but until now, there is lack of systematic research on mammal oocytes and early embryonic development. Tb4 is a small hydrophilic peptide, initially, which separated and purified from bovine thymus component V, with a molecular mass of 5 ku, and compose of 43 amino acid residues. Tb4 molecule is highly conservative, which has been founded in a variety of tissues and organs in vertebrates, and also exists in part invertebrates. This peptide has extensive biological functions. Recent studies have shown that it closely relate with many physiological and pathological activities, such as immune regulation, neurological development, wound healing, inflammatory response, angiogenesis, apoptosis, tumor occurrence and migration. Dynamic events of microfilaments in cells always accompany with G-actin activity, while Tb4 could bind G-actin with a ratio of 1 : 1 to inhibit G-actin to polymerize into microfilaments. In cells, nearly half of G-actin are bound with various of sequestering factors, which effects on both G-actin activity regulation and its reservation, while Tb4 is the chief executer of G-actin sequestering factor family. The ovaries, oocytes and early embryos of Kunming mouse was used to investigate the expression and distribution of Tb4 in oocytes and early embryos. During the experiment, the immuno-histochemistry, immuno-fluorescence-histochemistry and RT-PCR technique were utilized as chief study methods. The discipline of Tb4 expression and distribution in oocytes maturation and early embryonic development were studied both *in vivo* and *vitro*. The results showed that Tb4 were different in expression and localization during mouse oocytes maturation and early embryonic development. Immuno-histochemistry results illustrated that, accompany with follicle growing, the expression amount of Tb4 peptide *in vitro* oocytes is gradually increased. There are different distribution characteristics of Tb4 in GV stage oocytes, which featured by chromatin configuration, such as divided the configuration into NSN, pNSN and SN type. In other stages of oocytes maturation and early embryonic development, Tb4 could locate both in nuclear and cytoplasm, and the expression amount always changing regularly, which are closely related with cells growing status and the cell cycle. AIOD value of Tb4 was not significantly different in the process of oocytes maturation *in vivo*, but the fluorescence intensity rapidly increased from 8-cell embryos to blastula stages in the process of embryonic development. The tendency of Tb4 mRNA transcription are similar to the peptide expression in those stages. Specifically, in early implantation blastula, Tb4 peptide highly expresses in implanted lateral cells of blastula, indicating that Tb4 can regulate the microfilaments depolymerization in embryos implantation, so Tb4 plays an important role in the process of embryos implantation. The research concluded that, Tb4 could regulate microfilaments events (such as polymerization and depolymerization) and proliferation of cells in the developmental processes through the changes of its expression and localization. Overall, Tb4 plays an important role for mouse oocytes maturation, early embryonic development and embryos implantation.

Key words thymosin- $\beta 4$, mouse, oocytes, embryos, microfilaments, immuno-fluorescence-histochemistry, confocal-laser-scanning-microscope

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00043

*Corresponding author. Tel: 86-451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com

Received: January 6, 2009 Accepted: March 25, 2009