

小鼠受精卵早期发育过程中 PKB/Akt 对 p21 蛋白表达及定位的影响 The Effect of Protein Kinase B on the Expression and Location of p21 in Early Development of Mouse Fertilized Eggs

武迪迪, 冯 晨, 刘 莹, 张 杰, 宗志宏, 具英花, 李雪松, 于秉治*

WU Di-Di, FENG Chen, LIU Ying, ZHANG Jie, ZONG Zhi-Hong, JU Ying-Hua,
LI Xue-Song and YU Bing-Zhi*

中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110001

Department of Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China

摘 要 初步探讨在小鼠受精卵早期发育过程中 PKB/Akt 对 p21 蛋白表达及定位的影响。通过显微操作技术注射野生型、持续激活型及激酶失活型的 PKB 的 mRNA, 用免疫荧光方法检测 p21 蛋白的细胞定位、Western blot 方法检测 p21 蛋白的表达。结果显示在注射不同形式的 PKB mRNA 后 p21 蛋白的表达无明显差别, 但是细胞定位发生改变, PKB 被激活后, p21 蛋白滞留在胞浆中。因而初步认为在小鼠受精卵中, PKB/Akt 通过影响 p21 的细胞定位而影响细胞周期的进程。

关键词 蛋白激酶 B, p21, 细胞周期, 小鼠受精卵

中图分类号 Q132.7 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0493-04

Abstract To investigate the effect of Protein kinase B on the expression and location of p21 in mouse early development. Immunoprecipitation technology was used to detect the localization of p21 and Western blotting was used to analyze the expression of p21 after microinjecting mRNA of WT-PKB, myt-PKB and PKB-KD to mouse eggs. There was no obvious difference between the three kinds of mRNA in the expression of p21. But the cell localization altered. The p21 retain in cytoplasm after microjecting myt-PKB. In mouse fertilized egg PKB/Akt controls the cell cycle by changing the cell localization of p21.

Key words protein kinase B, p21, cell cycle, fertilized eggs

小鼠受精卵早期发育集中在细胞周期进程的研究, 细胞周期进程受正、负两方面的调控。p21 蛋白是细胞周期抑制蛋白。通过同 CDK、cyclin 的结合抑制细胞周期的进程。研究显示 p21 蛋白可广泛地抑制各种 cyclin-ckd 复合物, 如 cyclinD1-cdk4, cyclinE-cdk2 和 cyclinA-cdk2。其作用机制为 p21 蛋

白的第 21 - 26 及 49 - 71 氨基处分别与 cyclin, cdk 结合, 使 cyclin-cdk 复合物地激酶活性丧失, 从而使 Rb 蛋白不能磷酸化, 使细胞生长停滞, 细胞周期停滞在 G1 期^[1-2]。

p21 蛋白对细胞周期的调控多集中在对其表达的研究, 近期研究表明 p21 调控细胞周期的能力还

Received: November 7, 2006; Accepted: December 14, 2006.

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 39730460); National Pivot Basic R&D Program (No. G1999055900-2); Doctor Initiative Foundation of Liaoning Province (No. 20041043).

* Corresponding author. Tel: +86-24-23261253; E-mail: yzbzbio@yahoo.com.cn

国家自然科学基金资助项目 (No. 39730460), 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (No. G1999055900-2) 和辽宁省博士启动基金 (No. 20041043) 资助。

依赖于其亚细胞定位。p21 蛋白是核定位蛋白,发挥功能多位于细胞核内,其定位改变将影响功能的发挥。

蛋白激酶 κ (PKB) 是一种多功能丝/苏类蛋白激酶,活化的 Akt 在介导细胞生长和增殖、细胞运动和侵袭、细胞凋亡有重要作用。现在发现 PKB/ Akt 的下游底物越来越多,PKB/ Akt 下游底物发挥功能多位于核内,据报道在 HER-2 过表达细胞中,AKT 磷酸化 p21 蛋白 145 位使 p21 蛋白滞留在胞浆中^[3]。

本实验室前期工作研究表明,PKB 可促进小鼠受精卵的发育,那么 PKB 是否可通过影 p21 蛋白影响受精卵的发育呢?因而本研究通过显微注射技术,将野生型、持续激活型及激酶失活型的 PKB 的 mRNA 注射入小鼠一细胞期受精卵中,观察注射后受精卵内 p21 蛋白细胞定位及表达情况,并对其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明系小鼠由中国医科大学实验动物部提供。pBSK-PKB-WT(野生型),pBSK-myr-PKB(持续激活型)及 pBSK-PKB-KID(激酶失活型)重组质粒本实验室博士生构建。限制性内切酶 *Xba* I (Fermentas 公司) mMESSAGE mMACHINE 体外转录试剂盒 (Ambion 公司) HEPES (E. Metck, Darmstadt) 小鼠抗 p21 单克隆抗体和 FITC(异硫氰酸荧光素)标记的兔抗鼠 IgG 抗体(北京中山生物技术公司)透明质酸酶 (Sigma 公司)矿物油 (Sigma 公司) BSA (Sigma 公司) 孕马血清促性腺激素 (PMSG, 天津华孚高新技术生物中心) 人绒毛膜促性腺激素 (hCG, 北京赛生药业有限公司) PKB kinase (c-19)_{sc}-7686 抗体 (Santa Cruz 生物技术公司) 马抗羊二抗 (北京中山生物技术公司) 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 小鼠超排卵及受精卵的采集和培养: 昆明系小白鼠 4~5 周龄成熟雌鼠,腹腔注射 PMSG 10IU/只,48h 后腹腔注射 hCG 10IU/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,透明质酸酶 (300 μ g/mL,溶于 M2 培养液中) 除颗粒细胞,在 M2 培养液中洗 3 次,在 M16 培养液(与 M2 培养液不同的失含有 25mmol/L NaHCO₃,无 HEPES 成分,

5% CO₂ 95% O₂ 调 pH 值 7.3) 中洗两次后转入 12 孔板,每孔加入 200 μ L 预先在培养箱中平衡的 M16 培养液,上覆矿物油,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 模板制备: 取质粒 pBSK-PKB-WT(野生型), pBSK-myr-PKB(持续激活型)及 pBSK-PKB-KID(激酶失活型)经 *Xba* I 酶切线性化作为模板用于体外转录。酶切反应体系为(质粒 1 μ g, 10 \times Y+ /Tanq(with BSA) 2 μ L, *Xba* I 10u, 补水至 20 μ L)。37 $^{\circ}$ C 酶切反应 3 h, 65 $^{\circ}$ C 灭活 20min, 然后加入 SDS 及蛋白酶 K, 50 $^{\circ}$ C 反应 30min, 经酚:氯仿抽提后 12000r/min 离心 2min, 转移上层水相至一新管中,以 3mol/L 醋酸钠 (pH5.2) 及无水乙醇沉淀, 12000r/min 离心 10min, 弃上清, 加入不含 RNA 酶的去离子水溶解, 作为体外转录的模板。

1.2.3 体外转录: 应用体外转录试剂盒 (mMESSAGE mMACHINE kit) 将上述制备好的线性模板体外转录成带帽 mRNA。

反应体系为(2 \times NTP/Cap 10 μ L; 10 \times 反应缓冲液 2 μ L; 模板 DNA 1 μ g; 酶混合物 2 μ L 补无核酸酶水至 20 μ L)。于 37 $^{\circ}$ C 反应 1h, 然后加入 2u DNase I 37 $^{\circ}$ C 反应 15min 用于消化 DNA 模板, 用酚:氯仿抽提纯 mRNA, 经氯化锂沉淀 mRNA 后 12000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 弃上清, 沉淀中加入 70% 乙醇洗涤后溶解于无核酸酶污染的 5mmol/L Tris 和 0.5mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA, pH7.4) 中, 用于显微注射。同时测定 mRNA 在 260nm 的吸光度来定量 mRNA。

1.2.4 mRNA 显微注射: 显微注射应用 Eppendorf Transferman 显微操作系统, 首先将 G1 期受精卵 15~20 个移入到 M2 液滴中, 用持卵针将受精卵固定, 将吸好一定量 mRNA 的注射针刺入细胞将样品注入胞浆。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 10pL (相当于其总体积的 5%)。对照组为非注射组及注射 TE 缓冲液组。

1.2.5 免疫荧光检测 p21 蛋白细胞内定位^[4]: 将对对照组及处理组受精卵各 20 个移入新鲜配制的 4% 多聚甲醛液中, 固定 30min (37 $^{\circ}$ C), 然后在清洗液滴中 (含 0.1% BSA 的 PBS) 清洗 3 次后, 用含 0.2% Triton-X100 的 PBS 处理 15min (37 $^{\circ}$ C) 以增加细胞膜透性, 用清洗液充分清洗后把卵移入封闭液滴 (含 1% BSA 的 PBS) 中, 37 $^{\circ}$ C 下处理 1h。鼠单克隆 p21 抗体室温孵育 1h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。用清洗液洗卵 3 遍以充分去除未结合的抗体, 然后移入二抗 (FITC 标记)

中,室温避光孵育 30min,用清洗液洗 3 次,去除未结合的二抗。PI 染色 5min,荧光镜下观察。同时,用不加一抗的受精卵作为对照,其他处理过程与实验组相同。

1.2.6 Western 印迹:将处理组及对照组小鼠受精卵各 200 个取出,转移到 Eppendoff 管中,5000r/min 离心 4min,弃去上清,加入 10 μ L 粉萃缓冲液,充分振荡混匀,在液氮中经过 2~3 次的冻融循环,迫使卵细胞裂解,加入等量的样品缓冲液沸水中煮 5min,用于 Western 印迹分析。样品蛋白经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转印到硝酸纤维素膜上,与小鼠 p21 单克隆一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,经 TBS 洗涤后,再与第二抗体室温孵育 2h,TTBS 充分冲洗后,显色观察。

2 结果

2.1 Western blotting 检测 PKB-WT、myr-PKB 及 PKB-KD 的 mRNA 注射后 PKB 蛋白表达情况

小鼠受精卵经注射野生型、持续激活型及激酶失活型的 PKB mRNA,培养一定时间(4~5h)后,检测 PKB 蛋白的表达情况。结果如图 1。

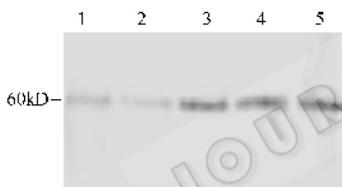


图 1 PKB-WT、myr-PKB 及 PKB-KD 的 mRNA 注射后 PKB 蛋白表达情况

Fig.1 The expression of PKB after PKB constructs mRNA microinjected

1 control; 2 injected with nothing; 3 injected with PKB-WT mRNA; 4 injected with myr-PKB mRNA; 5 injected with PKB-KD mRNA.

2.2 PKB-WT、myr-PKB 及 PKB-KD 的 mRNA 注射后 p21 蛋白定位情况

小鼠受精卵经注射野生型、持续激活型及激酶失活型的 PKB mRNA 后,培养一定时间(4~5h)后,免疫荧光检测 p21 蛋白的细胞定位情况,发现在注射不同形式的 PKB 后,p21 蛋白的细胞定位发生改

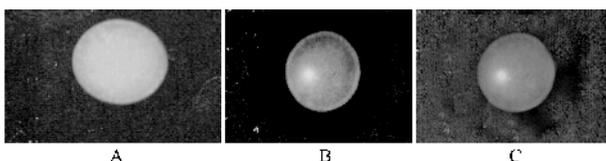


图 2 注射 PKB-WT 后的 p21 集中分布在细胞核中

Fig.2 p21 was detected in nuclear after microinjecting PKB-WT
A control; B PI stain; C the localization of p21.

变。注射 PKB-WT 后的 p21 集中分布在细胞核中(图 2B),注射 myr-PKB 后的小鼠受精卵中 p21 蛋白定位在胞浆中(图 3B),而经注射 PKB-KD 的 mRNA 后的小鼠受精卵中 p21 蛋白则定位在胞核中(图 4)。

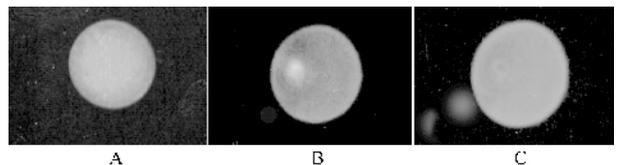


图 3 注射 myr-PKB 后的小鼠受精卵中 p21 蛋白定位在胞浆中

Fig.3 p21 was detected in cytoplasm after microinjecting myr-PKB

A control; B PI stain; C the localization of p21.

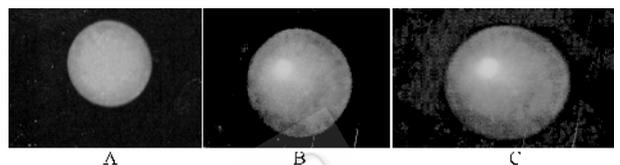


图 4 注射 PKB-KD 的 mRNA 后的小鼠受精卵中 p21 蛋白定位在胞核中

Fig.4 p21 was detected in nuclear after microinjecting PKB-KD

A control; B PI stain; C the localization of p21.

2.3 PKB-WT、myr-PKB 及 PKB-KD 的 mRNA 注射后 p21 蛋白的表达

用 Western 方法检测了注射不同形式的 mRNA 后的小鼠受精卵中 p21 蛋白的表达情况,结果显示,在注射不同形式的 mRNA 后 p21 蛋白的表达没有明显的差异(图 5)。

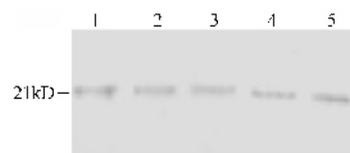


图 5 注射不同形式 PKB-mRNA 后 p21 蛋白表达

Fig.5 The expression of p21 after microinjecting different mRNA of PKB

经 Fluochim V2.0(美国 Alpha company)扫描分析,p21 蛋白表达无明显变化(如图 6,1-5 表达数值分别为 34.02 31.81 30.75 29.51 33.77)。

3 讨论

蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 又称为 Akt,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是在 1991 年作为蛋白激酶 C (PKC) 的同源物而被发现的^[5]。因其蛋白质产物与 PKA, PKC 有高度的同源性,所以命名为 PKB。活化的 PKB/Akt 在介导细胞生长和增殖、细胞运动和侵袭、细胞凋亡和抵抗化疗、放疗方

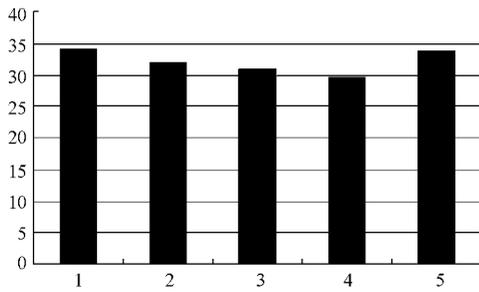


图6 Fluochim V2.0(美国 Alpha company)扫描分析得出的 p21 蛋白表达数值

Fig. 6 To analyze the expression of p21 by Fluochim V2.0

1: control 1 (non-injection); 2: control 2 (injection); 3: pKB-WT (injection); 4: myr-pKB (injection); 5: pKB-KIX (injection).

面有重要作用。研究证实,表达活性 Akt3 的 MCF27 细胞与不表达活性 Akt3 的细胞相比无论在体内或体外均能使 MCF27 细胞体积增加近 2 倍^[6]。活性的 Akt 表达能刺激无血清环境中的肝星状细胞的增殖,显性负性的 Akt 蛋白表达能抑制 PDGF(platelet-derived growth factor) 诱发的肝星状细胞的增殖^[7]。有研究者将 Akt 的 2 个磷酸化位点突变成丙氨酸,使 Akt 失去活性,将失去活性的 Akt 用腺病毒表达载体引入肿瘤细胞,结果发现表达高水平的磷酸化 Akt 的人类肿瘤细胞和老鼠肿瘤细胞的体外增殖被抑制^[8]。

PKB/Akt 通过调节细胞周期影响细胞生长、增殖。细胞周期的进程受细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)复合物和 CDK 抑制剂(CDIs)的协调作用所调节。有研究表明,PKB/Akt 通过直接磷酸化 GSK3 β 的激酶活性从而阻止 cyclinD1 的降解,cyclinD1 的水平对细胞周期 G1/S 的转换至关重要,GSK3 β 通过磷酸化作用促进泛素介导的 cyclinD1 的降解,PKB/Akt 磷酸化 GSK3 β 后激酶活性被抑制,不能介导 cyclinD1 降解,促进细胞周期,介导细胞生长、增殖。PKB/Akt 除可作用细胞周期正调因子外,还可通过磷酸化负调因子 CKI 来调节细胞周期。研究表明 PKB/Akt 能直接磷酸化 p27 的 Thr157,导致 p27 在细胞质中的滞留防治由 p27 所导致的细胞周期的阻滞^[9]。PKB/Akt 还可通过磷酸化 p21Thr145 位点阻止 p21 和 PCNA 复合物形成,从而使 PCNA 能与 DNA 聚合酶 δ 形成复合物,促进 DNA 复制,p21Thr 磷酸化能减少与 cyclinE-cdk2, cyclinD-cdk4 结合,削弱 p21 对 cdk 的抑制。

p21 蛋白是细胞周期抑制蛋白,可同 CDK - cyclin 复合物结合进而抑制 CDK 的活性,抑制细胞周期的进程,p21 蛋白对细胞周期的调控多集中在对其表达的研究,近期研究表明 p21 调控细胞周期

的能力还依赖于其亚细胞定位。p21 蛋白是核定位蛋白,发挥功能多位于细胞核内,其定位改变将影响功能的发挥。

本实验通过向小鼠一细胞期受精卵注射野生型、持续激活型及激酶失活型的 PKB mRNA,培养一定时间后,免疫荧光检测 p21 蛋白的细胞定位情况,发现在注射不同形式的 PKB mRNA 后,p21 蛋白的细胞定位发生改变。注射 PKB - WT mRNA 后的小鼠受精卵中 p21 蛋白集中分布在细胞核中,注射 myr-PKB 后的小鼠受精卵中 p21 蛋白则定位在胞浆中,而经注射 PKB-KD 的 mRNA 后的小鼠受精卵中 p21 蛋白定位在胞核中。Western 方法检测注射不同形式的 mRNA 后的小鼠受精卵中 p21 蛋白的表达情况,结果显示 p21 蛋白的表达没有明显的差异。p21 蛋白是核定位蛋白,在其 N 端有核定位信号,通过对实验结果的分析,PKB 被激活后,核定位信号的某一位点可能被磷酸化,导致 p21 蛋白滞留于胞浆。p21 蛋白定位改变影响功能的发挥,进而影响小鼠受精卵早期的发育。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bonfant M, Tarema S, Salmons M, et al. P21^{wal}-derived peptides linked to an internalization peptide inhibit human cancer cell growth. *Cancer Res*, 1997, **57**(8): 1442 - 1446.
- [2] Harper JW, Adam GR, Wei N, et al. The p21 cdk-interacting protein cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinase. *Cell*, 1993, **75**(4): 805 - 816.
- [3] Zhou BP, Liao Y, Xia W, et al. Cytoplasmic localization of p21Cip/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*, 2001, **3**(3): 245 - 252.
- [4] Fan HY(范衡宇), Tong C(佟超), Li MY(李满玉), et al. Methodology for detection of spindle-associated proteins by confocal microscopy in mammalian oocyte. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展) 2001, **28**(6): 900 - 903.
- [5] Persad S, Attwell IS, Gray V, et al. Regulation of protein kinaseB/Akt serine 473 phosphorylation by integrin linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem* 2001, **276**(29): 27462 - 27469.
- [6] Faridi J, Fawcett J, Wang L, et al. Akt promotes increased mammalian cell size by stimulating protein synthesis and inhibiting protein degradation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, **285**(5): E964 - 972.
- [7] Reif S, Lang A, Lindquist JN, et al. The role of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression. *J Biol Chem*, 2003, **278**(10): 8083 - 8090.
- [8] Lee SH, Kim HS, Park WS, et al. Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study. *APMIS*, 2002, **110**: 587 - 592.
- [9] Viglietto G, Motti ML, Bruni P, et al. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med*, 2002, **8**: 1136 - 1144.