

# PKB/Akt 通过 Girdin 蛋白调控小鼠受精卵微丝聚集

武迪迪<sup>1</sup>, 张盼盼<sup>2</sup>, 刘莹<sup>1</sup>, 于秉治<sup>1</sup>

1 中国医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 沈阳 110001

2 沈阳市第五人民医院, 辽宁 沈阳 110001

武迪迪, 张盼盼, 刘莹, 等. PKB/Akt 通过 Girdin 蛋白调控小鼠受精卵微丝聚集. 生物工程学报, 2016, 32(9): 1204–1211.  
Wu DD, Zhang PP, Liu Y, et al. PKB/Akt regulates the aggregation of actin by Girdin in mouse fertilized eggs. Chin J Biotech, 2016, 32(9): 1204–1211.

**摘要:** 通过研究 PKB/Akt 与 Girdin 蛋白之间的关系, 目的在于揭示 Girdin 蛋白在 PKB/Akt 调控小鼠受精卵微丝聚集中的作用。研究中首先结合软件 (<http://scansite.mit.edu/>) 预测了 PKB/Akt 对 Girdin 蛋白的磷酸化位点, 并制定特定位点磷酸化抗体, 通过蛋白免疫印迹检测经 PKB/Akt mRNA 或 PKB/Akt siRNA 处理后的小鼠受精卵中 Girdin 蛋白磷酸化改变情况。同时检测了磷酸化的 Girdin 蛋白亚细胞定位及同微丝骨架的定位关系。进一步通过显微注射 PKB/Akt mRNA 再注射 Girdin siRNA 检测小鼠受精卵微丝骨架的聚集。结果显示经持续激活型 PKB/Akt mRNA、野生型 PKB/Akt mRNA 处理后的小鼠受精卵中 p-Girdin-1 417 分布位置更加集中在 2-细胞分裂沟处。经野生型和持续激活型 PKB/Akt mRNA 注射组 p-Girdin-1 417 表达增强, 但是并不影响 Girdin 蛋白的总的表达。说明 siRNA 介导的 PKB/Akt 表达敲低非常明显地降低了 Girdin 蛋白的磷酸化。激光共聚焦研究显示在 Akt mRNA 和 Girdin siRNA 共注射组微丝骨架分布明显散乱。本研究结果充分说明 Girdin 蛋白在小鼠受精卵中受到 PKB/Akt 的调节, PKB/Akt 通过磷酸化 Girdin 蛋白改变微丝骨架的聚集。

**关键词:** PKB/Akt, Girdin 蛋白, F-actin, 小鼠受精卵

**Received:** January 12, 2016; **Accepted:** April 27, 2016

**Supported by:** National Nature Science Foundation of China (Nos. 31501162, 81270654, 31570819).

**Corresponding authors:** Bingzhi Yu. E-mail: yzbiochem@yeah.net

Ying Liu. E-mail: yliu@mail.cmu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31501162, 81270654, 31570819) 资助。

# PKB/Akt regulates the aggregation of actin by Girdin in mouse fertilized eggs

Didi Wu<sup>1</sup>, Panpan Zhang<sup>2</sup>, Ying Liu<sup>1</sup>, and Bingzhi Yu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemical and Molecular Biology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China

<sup>2</sup> The Fifth People's Hospital of Shenyang, Shenyang 110001, Liaoning, China

**Abstract:** The purpose of this study is to reveal the role of Girdin in regulating the aggregation of actin filaments by studying the relationship between PKB/Akt and Girdin. First we used Scansite software (<http://scansite.mit.edu>) to predict relevant target sites of PKB/Akt on mouse Girdin. To gain insight into the role of phosphorylation of Girdin by PKB/Akt, we assessed the location of phosphorylated Girdin in fertilized eggs by staining with anti-P-Girdin 1 417 Ab. We detected a distinct increase in the fluorescence signal of F-actin and P-Girdin 1 417 after microinjection of Akt WT and myr-Akt. The addition of myr-Akt induced phosphorylation of Girdin in mouse fertilized eggs. In addition, siRNA-mediated Akt-knockdown blocked phosphorylation of Girdin. The distribution of actin filaments was obviously scattered. These results strongly suggest that PKB/Akt could directly phosphorylate Girdin on Ser1 417 and promote its function in mouse fertilized eggs.

**Keywords:** PKB/Akt, Girdin, F-actin, mouse fertilized eggs

微丝骨架 (Microfilament cytoskeleton) 在受精卵早期分裂及发育中对精卵融合、纺锤体旋转、分裂沟形成及胞质分裂等事件的完成发挥重要作用<sup>[1]</sup>。但在哺乳动物尤其在小鼠受精卵细胞的分裂及早期发育过程中, 微丝骨架形成和变化的调控因子及信号调控机制尚不清楚。

蛋白激酶 B (Protein kinase B, PKB) 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, 与 *v-akt* 基因编码的 Akt 蛋白同源, 又被称为 Akt。PKB/Akt 主要通过 PI3K 途径调节细胞多种生理功能, 并被确定为参与肿瘤侵袭和转移的重要信号途径<sup>[2-4]</sup>。研究报告显示敲低 PKB/Akt 表达能够抑制神经胶质瘤细胞的迁移和侵袭。进一步研究发现 PKB/Akt 参与乳腺癌细胞迁移同微丝骨架的重新构建密切相关<sup>[5-7]</sup>。而我们的前期研究发现 PKB/Akt 在小鼠卵母细胞及早期受精卵中存在且能够促进受精卵的分裂<sup>[8-9]</sup>。并进一步发现 PKB/Akt 在小

鼠卵母细胞及受精卵一、二细胞期中同微丝骨架存在着共定位。同时我们也已证明 PKB/Akt 可影响小鼠受精卵细胞微丝骨架的正确聚集及分布<sup>[10-11]</sup>。

上述研究虽然初步证明了 PKB/Akt 可以影响小鼠受精卵微丝骨架的聚集, 但是其作用途径还很不明确。多项研究显示微丝骨架可受到多种微丝交联/成束蛋白调控, 包括 fimbrin、villin、scruin、fascin、families 和 Girdin 蛋白等的影响。其中 Girdin (Girders of actin filaments) 是一个新近发现参与微丝交联的 PKB/Akt 底物蛋白, 也被称为 APE (Akt phosphorylation enhancer)、GIV ( $G\alpha$ -interacting vesicle associated protein)。其在多种类型癌细胞及未成熟的血管内皮细胞中表达, 参与多种细胞进程, 包括重新构建微丝骨架、内吞作用, 最终导致癌症的侵袭和血管的再生<sup>[12-13]</sup>。Girdin 蛋白最早是通

过酵母双杂交方法作为 PKB/Akt 连接蛋白而被发现的。研究显示在多种类型的生长因子刺激下, PKB/Akt 能够磷酸化 Girdin 蛋白 C-末端区域的 ser-1416 位点, 使其在细胞迁移过程中细胞骨架的重构扮演重要角色。Girdin 蛋白仅同 Akt 的 C 末端连接但是不能同其他 AGC 家族成员包括蛋白激酶 C 和 SGKs 相结合。表明 Girdin 仅参与了 PKB/Akt 信号途径<sup>[14]</sup>。最新研究发现, PKB/Akt 依赖的 Girdin 磷酸化过程调节了急性心肌梗死的修复<sup>[15]</sup>。在鼠中 PKB/Akt 介导的磷酸化 Girdin 蛋白对肿瘤相关的成纤维细胞 (CAF) 的侵袭和肿瘤细胞的生长也起很重要的作用<sup>[16]</sup>。然而, 关于 Girdin 蛋白在鼠受精卵早期分裂中同 PKB/Akt 的相互关系, 国内、外文献却未见报道。我们根据 Scansite 软件 (<http://scansite.mit.edu>) 预测了 PKB/Akt 和鼠 Girdin 蛋白的相关位点。结果发现鼠在 1 417 位有一个丝氨酸残基, 而这一位点恰恰和人 Girdin 蛋白丝氨酸 1 416 位点相一致。结合 Girdin 蛋白在鼠受精卵中的研究空白及其在肿瘤细胞中的作用, 进而提出假设: 即 PKB/Akt 通过磷酸化 Girdin 蛋白参与调节鼠受精卵早期发育微丝骨架的形成和分布, 从而调节鼠受精卵早期的发育。我们大胆推测 PKB/Akt 蛋白能够使 Girdin 蛋白磷酸化, 磷酸化的 Girdin 蛋白从质膜上分离, 牵引着微丝聚集在受精卵分裂处, 参与形成溢缩环, 并且磷酸化的 Girdin 蛋白同 PKB/Akt 结合促进 PKB/Akt 锚定于细胞质膜上, 进而维持 PKB/Akt 蛋白高催化活性, 促进受精卵的分裂。但是具体机制需要相应实验进行验证。因此, 我们认为十分有必要对 Girdin 蛋白同 PKB/Akt 的关系进行更深一步的研究。

本研究中, 在预测了鼠受精卵中 PKB/Akt

和鼠 Girdin 蛋白的相关位点的基础上, 通过实验证明了过表达 PKB/Akt 蛋白能够促进 Girdin 蛋白的磷酸化, 而敲低 PKB/Akt 蛋白表达则抑制 Girdin 蛋白磷酸化。更进一步, 通过共注射激活型 PKB/Akt 及 Girdin siRNA 检测鼠受精卵发育及微丝聚集变化情况, 进一步明确 Girdin 在 PKB/Akt 调控鼠受精卵微丝聚集中的作用。为深入探讨鼠受精卵早期发育中 PKB/Akt 与 Girdin 及微丝之间的关系、阐明鼠受精卵早期发育的分子机理有十分重要的意义。

## 1 材料与试剂

中国医科大学实验动物部提供昆明系 SPF 级雌 (4-5 周, 16-18 g)、雄 (8 周, 30-35 g) 小白鼠 (许可证号: SCXK (辽宁) 2008-0005) Girdin 抗体 (Santa cruz); Girdin siRNA (Santa cruz); Akt siRNA (m) sc-19169 (Santa cruz); pcDNA-Akt-WT、pcDNA-Akt-KD、pcDNA-myr-Akt 由本研究室构建并保存; TRITC-phalloidin (Invitrogen 公司); mMMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit 体外转录试剂盒 (Ambion 公司); 鼠 Girdin-S1 417 磷酸化抗体和非磷酸化抗体由中国南京川博生物技术有限公司合成; 辣根过氧化物酶二抗、FITC/TRITC 荧光二抗 (北京中山金桥); 蛋白裂解液、ECL 发光试剂盒 (碧云天公司); 快速微量 mRNA 提取纯化试剂盒 (GE healthcare 公司); 反转录酶、RNA 酶抑制剂 (Promega 公司); Hoechst33258、透明质酸酶、M2 培养液、M16 培养液、BSA (Sigma 公司); LB 培养基 (Invitrogen 公司); 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细菌、限制性内切酶 (TaKaRa 公司); 去内毒素质粒中量提取试剂盒 (OMEGA 公司); 孕马血清促性腺激素、人绒毛膜促性腺激素 (宁

波第二激素厂);其他试剂为国产分析纯。

## 2 方法

### 2.1 小鼠超排卵及受精卵的采集

昆明系 SPF 级 4–5 周龄性成熟雌鼠 (18–22 g), 腹腔注射 PMSG 10 IU/只, 46–48 h 后腹腔注射 hCG 10 IU/只, 当晚与 8 周龄以上性成熟雄性昆明系 SPF 级小鼠 (30–35 g) 合笼过夜。次日检测阴栓, 有阴栓者视为交配成功。脱颈椎处死雌鼠, 取双侧输卵管, 剪下置于  $M_2$  培养液中, 在实体镜下撕开壶腹部, 让细胞团自然流出, 透明质酸酶 (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 溶于  $M_2$  培养液中) 5–10 min 去除颗粒细胞, 在  $M_2$  培养液中洗 3 次, 加入 200  $\mu\text{L}$  预先在培养箱中平衡的  $M_{16}$  培养液, 上覆矿物油, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的  $\text{CO}_2$  培养箱内培养至指定时间点进行收集或进行实验。受精卵培养及收集时间按照冷泉港-小鼠胚胎实验操作手册进行。

### 2.2 小鼠蛋白的 PKB/Akt 作用靶位点的确定

将小鼠 Girdin 蛋白序列 (Q5SNZ0) (GenBank Accession No. AB087827) 输入 Scansite 分析软件中, 分析并预测 Girdin 蛋白中的 ser1 417 位点为可能的磷酸化位点, 并且这个位点符合 PKB/Akt 作用的一致序列 RXXRX (S/T)。根据预测的位点进行特异位点磷酸化抗体的制备。

### 2.3 体外转录

将已有的野生型、激酶激活型和失活型 PKB/Akt 的 pcDNA3.1/myc-his 表达载体进行体外转录, 制备野生型、磷酸化位点突变型激酶激活型和失活型 PKB/Akt 的 mRNA, 纯化 mRNA 并进行浓度测定 (Myr-Akt 代表激酶激活型、KD-Akt 是激酶失活型、WT-Akt 为野生

型)。体外转录应用的是 Ambion 公司的 mMESSAGE mMACHINE 体外转录试剂盒, 方法参照试剂盒说明书。

### 2.4 显微注射

显微注射应用 Eppendorf Transferman 显微操作系统, Olympus IX-70 倒置显微镜, DIC 调制相差观察。显微注射在  $M_2$  液滴中进行。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 10 pL (相当于其总体积的 5%)。mRNA 溶解于无核酸酶污染的 5 mmol/L Tris 和 0.5 mmol/L EDTA (pH 7.4) 中, 稀释成不同浓度, 对照组为非注射组及注射 TE 缓冲液组。用 DEPC 处理水溶解 Girdin siRNA, 稀释成不同浓度。

### 2.5 Western 印迹法检测蛋白表达

分别收集经各种处理后的小鼠受精卵 250 个; 在蛋白裂解液 (20  $\mu\text{L}$ ) 中经反复冻融 3 次后, 加入蛋白上样缓冲液, 100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 min, 瞬时离心后上样, 以 12% 或 10% SDS-PAGE 电泳分离, 转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别与 Girdin-Ser1417 磷酸化或非磷酸化抗体、PKB/Akt 抗体及  $\beta$ -actin 抗体 (1:1000) 4  $^{\circ}\text{C}$  结合过夜。TBST 洗涤 3 次后, 分别与相应的 HRP 偶联二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 用 ECL 化学发光法显影。UVP 凝胶成像系统扫描成像图像分析软件分析灰度值。以目标蛋白与  $\alpha$ -tubulin 的灰度值比值计算各组相对表达量。每组实验重复 3 次。

### 2.6 微丝的免疫荧光化学

收集经各种处理后的小鼠受精卵移入 4% 多聚甲醛中 37  $^{\circ}\text{C}$  固定 40 min 或 4  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜。将固定后的样品移入清洗液 (含 0.1% BSA 的

DPBS) 中清洗 3 次, 每次 5 min。将清洗后的样品移入透膜液 (清洗液中加入 0.2% TritonX-100), 在 37 °C 温箱中温育 40 min, 增加细胞膜的通透性, 以利于抗体进入。透膜处理后的样品移入清洗液中洗 3 次, 每次 5 min; 每毫升清洗液中添加 0.125 g 甘氨酸和 10 mg BSA 作为封闭液, 37 °C 温育 1 h。样品放入 1:100 封闭液稀释的小鼠抗 Girdin 或 Akt 抗体中, 37 °C 温育 1 h。清洗液清洗 3 次, 每次 5 min。样品与 1:100 清洗液稀释的 FITC 标记的抗兔二抗 37 °C 温育 40 min, 未经一抗处理、只做二抗结合的样品作为阴性对照。在含有 300 U/mL 罗丹明标记的鬼笔环肽 (TRITC-phalloidin) 的 DPBS 溶液中, 37 °C 共同温育 40 min, 进行微丝 F-actin 染色, 用清洗液清洗 3 次, 每次 5 min。将经过微丝染色的样品清洗后, 在含有 (Hoechst33258) 的清洗液中室温下温育 5–10 min。在洁净的载玻片上加一滴防荧光淬灭剂 DABCO, 将处理好的卵转移其中, 封片后置于暗盒, 低温保存, 尽快用激光共聚焦显微镜观察、照相。每组实验重复 3 次, 每次至少观察 30 个样品。

## 2.7 激光共聚焦显微镜成像分析

TRITC 545 nm, Hoechst33258 所用激发波长为 352 nm, 在图象分析系统中选择目标区域取图, 并做 Z 轴方向的光切片合成。

## 3 结果与分析

### 3.1 小鼠 Girdin 蛋白的 PKB/Akt 作用靶位点的确定

将小鼠 Girdin 蛋白序列 (Q5SNZ0) 输入 Scansite 分析软件中, 根据评分 (0.481 2) 及序列 (INRERQKSLTLTPTR) 分析并预测 PKB/Akt 的作用位点。结合已有的文献, 最后确定小鼠 Girdin 蛋

白中的 ser1 417 位点为可能的磷酸化位点, 并且这个位点符合 PKB/Akt 作用的一致序列 RXXRX (S/T)。

### 3.2 PKB/Akt 影响 Girdin 蛋白的磷酸化

取小鼠 G1 期受精卵显微注射野生型和持续激活型 PKB/Akt 的 mRNA 或利用 siRNA 沉默 PKB/Akt 蛋白编码基因, 通过激光共聚焦显微镜观察经持续激活型 PKB/Akt mRNA、野生型 PKB/Akt mRNA、激酶失活型 PKB/Akt mRNA 及 PKB/Akt siRNA 处理后小鼠受精卵中 p-Girdin-1 417 及 F-actin 的定位状态。结果显示, 对照组中 p-Girdin-1 417 弥散分布在胞浆中, 而经持续激活型 PKB/Akt mRNA、野生型 PKB/Akt mRNA 处理后的小鼠受精卵中 FITC 标记的 p-Girdin-1 417 荧光信号较对照组及 PKB/Akt siRNA 处理组明显增强, 并且分布位置更加集中在 2-细胞分裂沟处, 进一步观察发现微丝的荧光信号也在分裂沟处增强, 这也说明磷酸化的 Girdin 蛋白可能参与了微丝的聚集 (图 1)。

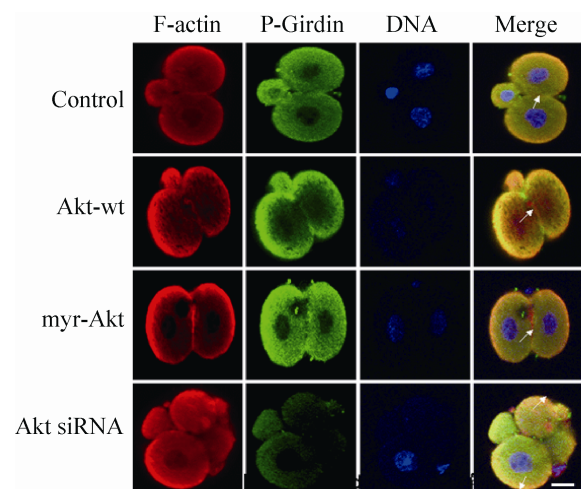


图 1 PKB/Akt 影响磷酸化 Girdin 蛋白定位

Fig. 1 PKB/Akt affects the localization of phosphorylated Girdin protein. A distinct increase in the fluorescence signal of F-actin and P-Girdin after microinjected of Akt1-WT and myr-Akt1. Bar=20 μm.

进一步通过免疫印迹检测 Girdin 的 1 417 位磷酸化及 Girdin 蛋白的总表达情况。结果显示野生型和持续激活型 PKB/Akt 的 mRNA 注射组 Girdin 的 ser1 417 位磷酸化增强但是并不影响 Girdin 蛋白的总的表达。siRNA 介导的 PKB/Akt 表达敲除非常明显地降低了 Girdin 的磷酸化水平 (图 2)。结果说明 PKB/Akt 可磷酸化小鼠受精卵中 Girdin 蛋白的 1 417 位丝氨酸。

### 3.3 小鼠受精卵中微丝重构及分布与 PKB/Akt、Girdin 之间的关系

在进一步的研究中我们首先用 myr-Akt mRNA 处理小鼠 G1 期受精卵, 随后再注射 Girdin siRNA。M<sub>16</sub> 培养液中 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 20 h 后取出进行微丝染色。通过激光共聚焦荧光显微镜观察每一组卵细胞的微丝聚集状态。正如我们所预期, 在 Akt mRNA 和 Girdin siRNA 共注射组微丝荧光信号出现了明显的降低, 并且干扰了微丝的正确聚集 (图 3)。说明 PKB/Akt 可通过作用 Girdin 蛋白影响微丝聚集。

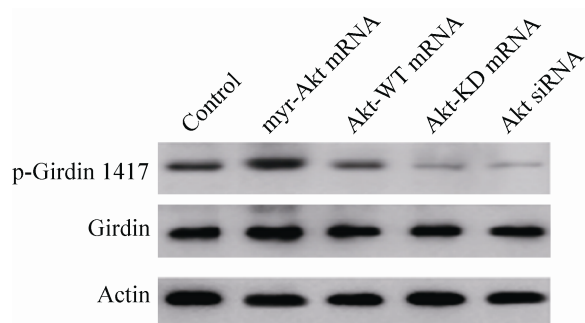


图 2 PKB/Akt 影响 Girdin 蛋白磷酸化

Fig. 2 PKB/Akt affects the phosphorylation of Girdin protein. Treatment with myr-Akt1 caused significant increases in phosphorylation of Girdin 1 417. In addition, treatment with KD-Akt1 mRNA or siRNA-mediated Akt1 knockdown blocked phosphorylation of Girdin.

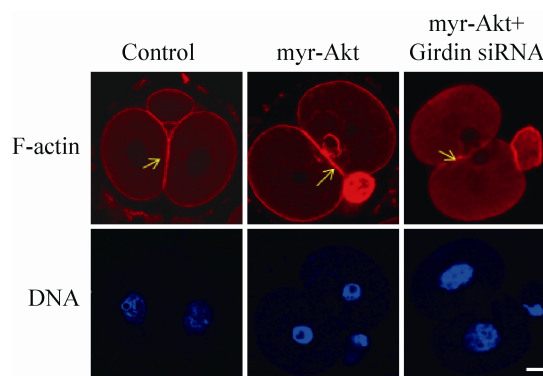


图 3 PKB/Akt 通过 Girdin 蛋白调控小鼠受精卵微丝聚集

Fig. 3 PKB/Akt regulation of the aggregation of actin filaments by the action of Girdin protein in mouse fertilized eggs. A distinct decrease in the fluorescence signal of F-actin and the disrupted microfilament aggregation after microinjected of Akt1 mRNA and Girdin siRNA. Bar=20  $\mu$ m.

## 4 讨论

Girdin 蛋白最早是通过酵母双杂交方法作为 PKB/Akt 连接蛋白而被发现的。有文献研究表明 PKB/Akt 可磷酸化 Girdin 的 serine1 416 位, 磷酸化的 Girdin 使微丝从质膜上分离, 随后聚集在迁移细胞边缘, 导致微丝骨架的重新排列影响细胞的运动<sup>[14]</sup>。多项研究表明 Girdin 在肿瘤细胞的迁移、浸润和转移中都扮演重要角色<sup>[17-20]</sup>。新近研究发现, Girdin 蛋白通过 PI3K-Akt 途径调控胶质瘤细胞的迁移及侵袭<sup>[21]</sup>。也有研究小组提出 Girdin 蛋白可增强 PKB/Akt 活性调控 DNA 合成<sup>[22]</sup>。而 Cenni 等则提出 PKB/Akt 可直接作用于微丝<sup>[23]</sup>。然而, 关于 PKB/Akt 调控小鼠受精卵微丝的聚集过程是否通过 Girdin 蛋白的作用还未见报道。

本实验研究结果显示 PKB/Akt 能够磷酸化 Girdin 蛋白的 Ser-1 417 位点, 用 phospho-Ser-1 417

抗体检测发现在野生型 Akt mRNA 及激活型 Akt mRNA 处理后的小鼠受精卵中 Girdin 蛋白呈磷酸化状态, 而 Akt siRNA 处理后阻止了 Girdin 的磷酸化。激光共聚焦观测显示, 同非磷酸化的 Girdin 蛋白相比较, 磷酸化的 Girdin 蛋白突出显现在受精卵卵裂沟处。上述结果说明 PKB/Akt 能通过调控 Girdin 蛋白的磷酸化, 通过亚细胞定位发现能够促进小鼠受精卵细胞的分裂。我们分析磷酸化的 Girdin 蛋白从质膜上分离, 牵引着微丝聚集在受精卵分裂处, 参与形成溢缩环, 进而促进受精卵的分裂。为了进一步明确 PKB/Akt 同 Girdin 蛋白的调控关系, 我们采取激活型 Akt mRNA 和 Girdin siRNA 共注射的方法检测受精卵中微丝聚集改变情况。结果显示在 Akt mRNA 和 Girdin siRNA 共注射组微丝荧光信号在二细胞分裂沟处出现了明显的降低, 显示微丝的正确聚集受到影响。综上所述, 我们认为在小鼠受精卵中 PKB/Akt 通过磷酸化 Girdin 蛋白改变微丝的聚集进而影响受精卵早期的正常卵裂。

## REFERENCES

- [1] Liu H, Chen DY. The Pola of microfilament in the formation in oocytes of polarity, cleavage furrow and the emission of polar body. *Acta Zool Sin*, 1994, 40(4): 351-355 (in Chinese).  
刘辉, 陈大元. 微丝在卵子极性产生、分裂沟形成和极体排放中的作用. *动物学报*, 1994, 40(4): 351-355.
- [2] Liu W, Bagaitkar J, Watabe K. Roles of Akt signal in breast cancer. *Front Biosci*, 2007, 12(8/12): 4011-4019.
- [3] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, 2002, 14(5): 381-395.
- [4] Zhang BG, Gu F, She CH, et al. Reduction of Akt2 inhibits migration and invasion of glioma cells. *Inter J Cancer*, 2009, 125(3): 585-595.
- [5] Qiao M, Iglehart JD, Pardee AB. Metastatic potential of 21T human breast cancer cells depends on Akt/protein kinase B activation. *Cancer Res*, 2007, 67(11): 5293-5299.
- [6] Scheid MP, Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(10): 760-768.
- [7] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(7): 489-501.
- [8] Chen F, Yu AM, Feng C, et al. Activity and expression changes of protein kinase B in 1-cell stage fertilized eggs of mouse. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2003, 19(4): 542-545 (in Chinese).  
陈菲, 于爱鸣, 冯晨, 等. 蛋白激酶 B 在小鼠 1-细胞期受精卵中活性及表达变化. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19(4): 542-545.
- [9] Feng C, Yu AM, Liu Y, et al. Involvement of protein kinase B/AKT in early development of mouse fertilized eggs. *Biol Reprod*, 2007, 77(3): 560-568.
- [10] Wu DD, Ju YH, Meng J, et al. Effects of protein kinase B/Akt on polymerization of the actin in mouse oocyte and embryos by laser confocal microscopy. *Chin J Cell Biol*, 2011, 33(3): 263-268 (in Chinese).  
武迪迪, 具英花, 孟峻, 等. 激光共聚焦显微镜观察小鼠早期胚胎中 PKB/Akt 对微丝聚合的影响. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(3): 263-268.
- [11] Wu DD, Gao J, Meng J, et al. Studies of the microfilaments in oocytes and preimplantation embryos by confocal laser scanning microscopy. *Reproduct Contracept*, 2011, 31(10): 652-655 (in Chinese).  
武迪迪, 高建, 孟峻, 等. 激光共聚焦显微镜观察小鼠卵母细胞及早期胚胎中微丝的分布. *生殖与避孕*, 2011, 31(10): 652-655.
- [12] Jiang P, Enomoto A, Jijiwa M, et al. An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1310-1318.

- [13] Kitamura T, Asai N, Enomoto A, et al. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(3): 329–337.
- [14] Enomoto A, Murakami H, Asai N, et al. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell*, 2005, 9(3): 389–402.
- [15] Hayano S, Takefuji M, Maeda K, et al. Akt-dependent Girdin phosphorylation regulates repair processes after acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 88: 55–63.
- [16] Yamamura Y, Asai N, Enomoto A, et al. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. *Cancer Res*, 2015, 75(5): 813–823.
- [17] Ono S. Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int Rev Cytol*, 2007, 258: 1–82.
- [18] Enomoto A, Ping J, Takahashi M. Girdin, a novel actin-binding protein, and its family of proteins possess versatile functions in the Akt and Wnt signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1086(1): 169–184.
- [19] Weng L, Enomoto A, Ishida-Takagishi M, et al. Girding for migratory cues: roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis. *Cancer Sci*, 2010, 101(4): 836–842.
- [20] Gu F, Wang L, He J, et al. Girdin, an actin-binding protein, is critical for migration, adhesion, and invasion of human glioblastoma cells. *J Neurochem*, 2014, 131(4): 457–469.
- [21] Ni WM, Fang Y, Tong L, et al. Girdin regulates the migration and invasion of glioma cells via the PI3K-Akt signaling pathway. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5086–5092.
- [22] Anai M, Shojima N, Katagiri H, et al. A novel protein kinase B (PKB)/AKT-binding protein enhances PKB kinase activity and regulates DNA synthesis. *J Biol Chem*, 2005, 280(18): 18525–18535.
- [23] Cenni V, Sirri A, Riccio M, et al. Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(12): 2710–2720.

(本文责编 郝丽芳)