

文章编号: 1674 - 5566(2011)06 - 0801 - 07

斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂过程中 MAPK 的表达及定位

李国鹏, 陈阿琴, 曹娜, 吴婷婷, 魏华

(上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 用不同浓度的促滤泡激素(FSH)和 $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮分别作用于斑马鱼卵母细胞。结果表明, 1 IU/mL的FSH和5 ng/mL的 $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮对斑马鱼卵母细胞生发泡破裂都具有明显促进作用。其中 $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮的作用效果较好, 经过SDS-PAGE电泳和Western Blot检测发现, 5 ng/mL $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮对斑马鱼卵母细胞诱导后, 分裂原蛋白激酶被激活, 生发泡破裂的卵母细胞数目增多。免疫组化检测证实, 第I期的卵母细胞中分裂原蛋白激酶没有激活, 第II期、第III期细胞质中分裂原蛋白激酶开始激活, 第V期卵母细胞的胞质与核区同时存在活性的分裂原蛋白激酶, 并伴有生发泡破裂。以上结果说明分裂原蛋白激酶在斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂恢复过程中发挥重要作用, 并且随着分裂原蛋白激酶激活, 其活性部位从细胞质转移到细胞核。

研究亮点: 阐明了FSH和 $17\alpha, 20\beta$ -DHP诱发斑马鱼卵母细胞以生发泡破裂为标志的成熟是通过MAPK激活途径实现的; 证明MAPK在激活过程中发生了从细胞质转移到细胞核的空间位置变化。

关键词: 斑马鱼; 分裂原蛋白激酶; 促滤泡激素; $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮

中图分类号: Q 492

文献标志码: A

动物性成熟前卵母细胞在第一次减数分裂前期有一个阻滞现象, 此时细胞内有一个生发泡(germinal vesicle, GV), 故又称生发泡期。性成熟后, 在相应的促性腺成熟激素作用下, 减数分裂恢复, 并伴随生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD), GVBD是第一次减数分裂恢复的重要标志^[1-2]。

分裂原蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)是一类Ser/Thr蛋白激酶^[1], 参与调节各种生理活动。该家族中的胞外信号调节酶(the extracellular signal regulated kinase, ERK), 又包含多种蛋白家族成员, 其中研究最多的是ERK1和ERK2, 通常MAPK就是指ERK1和ERK2。

促滤泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)和孕激素 $17\alpha, 20\beta$ -双羟孕酮($17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, $17\alpha, 20\beta$ -DHP)都能促进体外卵母细胞最终成熟, 这种作用被认为是

通过诱导产生成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)和MAPK通路等方法实现的^[3]。MAPK是哺乳动物卵母细胞减数分裂恢复及卵母细胞最后成熟排卵的最终调节酶之一^[1]。但是目前有关FSH, $17\alpha, 20\beta$ -DHP和MAPK相互关系及它们对卵母细胞发育成熟机制的研究, 多集中在哺乳动物体内, 在低等脊椎动物中相关研究较少^[1-2]。本文所阐述的斑马鱼卵母细胞成熟过程中MAPK表达定位研究不仅有助于丰富鱼类生殖生理学内容, 也可为正确认识高等动物及人类卵母细胞发育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

实验用斑马鱼苗购买于上海江桥先农热带鱼繁殖场, 体长3~4 cm。置于光暗比为12 h: 12 h, 24℃水族箱喂养, 每周换2次水, 每天投食2次, 直至性成熟后进行实验。

收稿日期: 2011-04-19 修回日期: 2011-06-22

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20103104110003)

作者简介: 李国鹏(1983—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生生物生理学。E-mail: nelson9@163.com

通讯作者: 魏华, E-mail: hwei@shou.edu.cn

1.2 试剂与仪器

主要试剂与仪器有倒置解剖镜(OLYMPUS, 日本)、硝酸纤维素膜(Osmonics, 美国)、 17α , 20β -DHP(Sigma, 美国)、D-Hank's 溶液(上海迪申生物技术公司)、MAPK 一抗、Phospho-p44/42 MAPKinase(Thr202/Tyr204) Antibody、抗兔多克隆抗体(Cell Signaling 公司, 美国)、山羊抗小鼠 IgG HRP(Cayman Chemical, 挪威)、山羊抗兔 IgG + 1 HRP(ICL, 美国)、预染蛋白质标准品(Fermentas, 美国)、FSH(宁波第二激素厂)、浓缩型 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒、枸橼酸缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司)、苦味酸(国药集团)和改良布恩氏液(苦味酸饱和水溶液 75 mL: 福尔马林 25 mL: 冰醋酸 5 mL)。

1.3 培养液

对照组培养液(培养液 A): 125 mmol/L NaCl, 2.4 mmol/L KCl, 0.28 mmol/L $MgSO_4$, 0.89 mmol/L $MgCl_2$, 22.4 mmol/L $CaCl_2$, 22 mmol/L HEPES, 5.6 mmol/L 葡萄糖, 100 U/mL 青霉素, 0.2 mg/mL 链霉素, pH 7.5。

FSH 实验组培养液(培养液 B): 125 mmol/L NaCl, 2.4 mmol/L KCl, 0.28 mmol/L $MgSO_4$, 0.89 mmol/L $MgCl_2$, 22.4 mmol/L $CaCl_2$, 22 mmol/L HEPES, 5.6 mmol/L 葡萄糖, 100 U/mL 青霉素, 0.2 mg/mL 链霉素, pH 7.5。FSH 浓度: 1 IU/mL, 2 IU/mL, 5 IU/mL, 10 IU/mL。

17α , 20β -DHP 实验组培养液(培养液 C): 125 mmol/L NaCl, 2.4 mmol/L KCl, 0.28 mmol/L $MgSO_4$, 0.89 mmol/L $MgCl_2$, 22.4 mmol/L $CaCl_2$, 22 mmol/L HEPES, 5.6 mmol/L 葡萄糖, 100 U/mL 青霉素, 0.2 mg/mL 链霉素, pH 7.5。 17α , 20β -DHP 浓度: 1 ng/mL; 2 ng/mL; 5 ng/mL; 10 ng/mL。

1.4 样品处理

1.4.1 卵母细胞收集

用 75% 乙醇消毒性成熟的雌性斑马鱼体表, 剪开腹部取两侧卵巢置于装有已除菌 D-Hank's 溶液的灭菌培养皿中, 用 D-Hank's 溶液清洗卵巢 3 次, 去除卵巢边缘的无用结缔组织, 将清洗后的卵巢转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, 再用 D-Hank's 溶液洗涤分离好的卵母细胞 3 次。

1.4.2 卵巢组织固定

用 75% 乙醇消毒性成熟的雌性斑马鱼体表, 剪开腹部取出两侧卵巢并置于布恩氏液中固定, 4 °C 避光过夜, 保存。

1.5 卵母细胞培养

对照组: 将剥离好的斑马鱼卵母细胞置于含有培养液 A 的培养皿中, 不添加激素, 于 28 °C 培养箱中培养。

FSH 实验组: 将剥离好的斑马鱼卵母细胞置于 4 个含有培养液 B 的培养皿中, 添加不同浓度 FSH, 于 28 °C 培养箱中培养。

17α , 20β -DHP 实验组: 将剥离好的斑马鱼卵母细胞置于 4 个含有培养液 C 的培养皿中, 添加不同浓度 17α , 20β -DHP, 于 28 °C 培养箱中培养。

1.6 卵母细胞的形态观察

各组在培养后 0、2、4、6 和 8 h 分别提取 40 个卵母细胞, 用固定液[V(乙醇): V(乙酸): V(福尔马林) = 6: 1: 3]处理, 在 OLYMPUS 倒置解剖镜下观察斑马鱼卵母细胞形态。将未观察到细胞核、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 的卵母细胞数除以样本总卵母细胞数。运用 SPSS 统计软件对所得数据进行处理。

1.7 免疫印迹

(1) 将 40 个卵母细胞移入 1.5 mL 离心管中; (2) 加入裂解液裂解后, 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min 取上清液; (3) 95 °C 条件下, 蛋白质变性 10 min; (4) 选用 110 V 电压, 30 mA 电流 SDS-PAGE 电泳 1.5 h; (5) 选用 10 mA/h, 转膜 10 h; (6) 5% 脱脂奶粉封闭; (7) 添加 p44/p42MAPK 抗体(1: 1 000), 4 °C 孵育过夜; (8) 添加二抗(兔 IgG)(1: 2 000), 24 °C 孵育 2 h; (9) 加入发光底物, 暗室下显影、定影; (10) 使用 Quantity One 软件对所获得的条带进行灰度值分析计算, 以灰度值大小表示 MAPK 活性大小。

1.8 石蜡切片

卵巢组织固定按以下程序处理: (1) 70% 乙醇 15 min; (2) 75% 乙醇 10 min; (3) 80% 乙醇 10 min; (4) 90% 乙醇 10 min; (5) 100% 乙醇 10 min; (6) 二甲苯 1 min; (7) 二甲苯 + 石蜡[V(二甲苯): V(石蜡) = 1: 1] 3 min; (8) 二甲苯 + 石蜡[V(二甲苯): V(石蜡) = 1: 2] 3 min; (9) 石蜡 10 min; (10) 石蜡 40 min; (11) 制备 7 μ m 厚的连续切片裱于载玻片中, 烤片固定, 用于免疫组化。

1.9 免疫组化

(1)切片脱蜡至水;(2)10% 蛋清 10 min 封闭内源性生物素,蒸馏水洗 3 次,每次 2 min;(3)新鲜配制 3% H_2O_2 10 min 灭活内源性酶,蒸馏水洗 3 次,每次 2 min;(4)0.01 mol/L, pH 7.5 的枸橼酸缓冲液,水浴锅热修复,加热到 98 $^{\circ}C$ 冷却,重复两次;(5)山羊血清封闭;(6)添加 p44/p42MAPK 抗体(1:200),4 $^{\circ}C$ 孵育过夜;(7)生物素标记的二抗(兔 IgG)(1:100),24 $^{\circ}C$ 孵育 2 h;(8)SABC 工作液(1:100)40 min;(9)DAB 显色(DAB 显色试剂盒),镜下显色 10~30 min;(10)脱水、透明、封片。阴性对照用 0.02 mol/L PBS 取代一抗进行孵育,其余步骤、条件均与实验组相同。

2 结果

2.1 FSH 对卵母细胞 GVBD 的影响

不同浓度的 FSH 对斑马鱼卵母细胞 GVBD 的影响。实验组添加 FSH 浓度依次为 1 IU/mL、2 IU/mL、5 IU/mL 和 10 IU/mL,对照组不添加任何激素。结果显示各个 FSH 浓度组作用后 2~8 h 内,卵母细胞的 GVBD 率呈极显著上升($P < 0.01$)。其中浓度为 1 IU/mL FSH 的实验组对斑马鱼卵母细胞 GVBD 促进效果最明显,与对照组相比卵母细胞 GVBD 率在 2、4、6 和 8 h 分别提高了 11.98%、16.67%、6.31% 和 14.25% (图 1)。

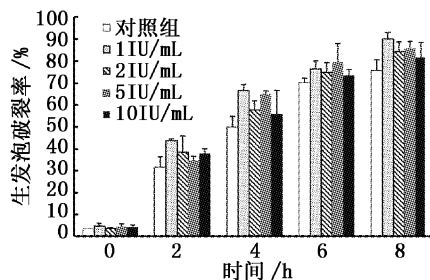


图 1 FSH 对卵母细胞 GVBD 的影响
Fig.1 The GVBD of oocytes induced by FSH in zebrafish

2.2 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 对斑马鱼卵母细胞 GVBD 的影响

实验组添加 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 浓度依次为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL 和 10 ng/mL,对照组不添加任何激素。结果显示各个 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 浓度组作用后 2~6 h 内,卵母细胞 GVBD 率极显著上

升($P < 0.01$),在 2 h 内上升最快,而 6~8 h 之间 GVBD 率变化不大。浓度为 5 ng/mL $17\alpha, 20\beta$ -DHP 的实验组对斑马鱼卵母细胞 GVBD 促进效果最明显,与对照组相比卵母细胞 GVBD 率在 2、4、6 和 8 h 分别提高了 17.84%、44.67%、27.62% 和 23.03% (图 2)。

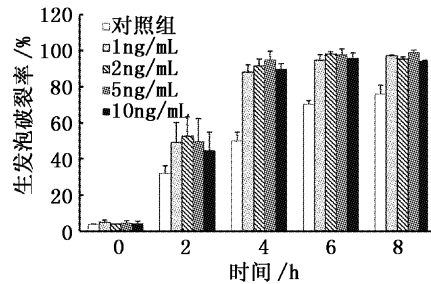


图 2 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 对卵母细胞 GVBD 的影响
Fig.2 The GVBD of oocytes induced by $17\alpha, 20\beta$ -DHP in zebrafish

2.3 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 对 MAPK 表达的影响

为了观察 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 对卵母细胞 MAPK 活性的影响,本实验通过 Western Blot 检测了 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 作用下卵母细胞 MAPK 磷酸化水平。添加 5 ng/mL $17\alpha, 20\beta$ -DHP 实验组中,卵母细胞在培养 2 h 后可以检测到活性 MAPK (pMAPK),随着时间推移 pMAPK 表达逐渐增多,6 h 时 pMAPK 表达量达到最大,此后持续稳定(图 3)。同时随着 MAPK 激活,卵母细胞发生 GVBD,完成第一次减数分裂。对照组中,活性 MAPK 在 3 h 时才可以检测到,随着时间推移,表达量虽有所增加,但没有实验组变化显著。

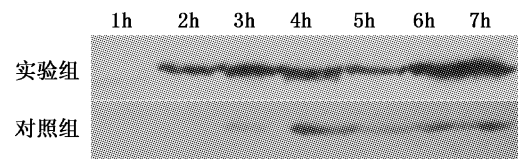


图 3 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 诱导的斑马鱼卵母细胞 MAPK 表达趋势
Fig.3 MAPK expression during oocyte maturation in zebrafish

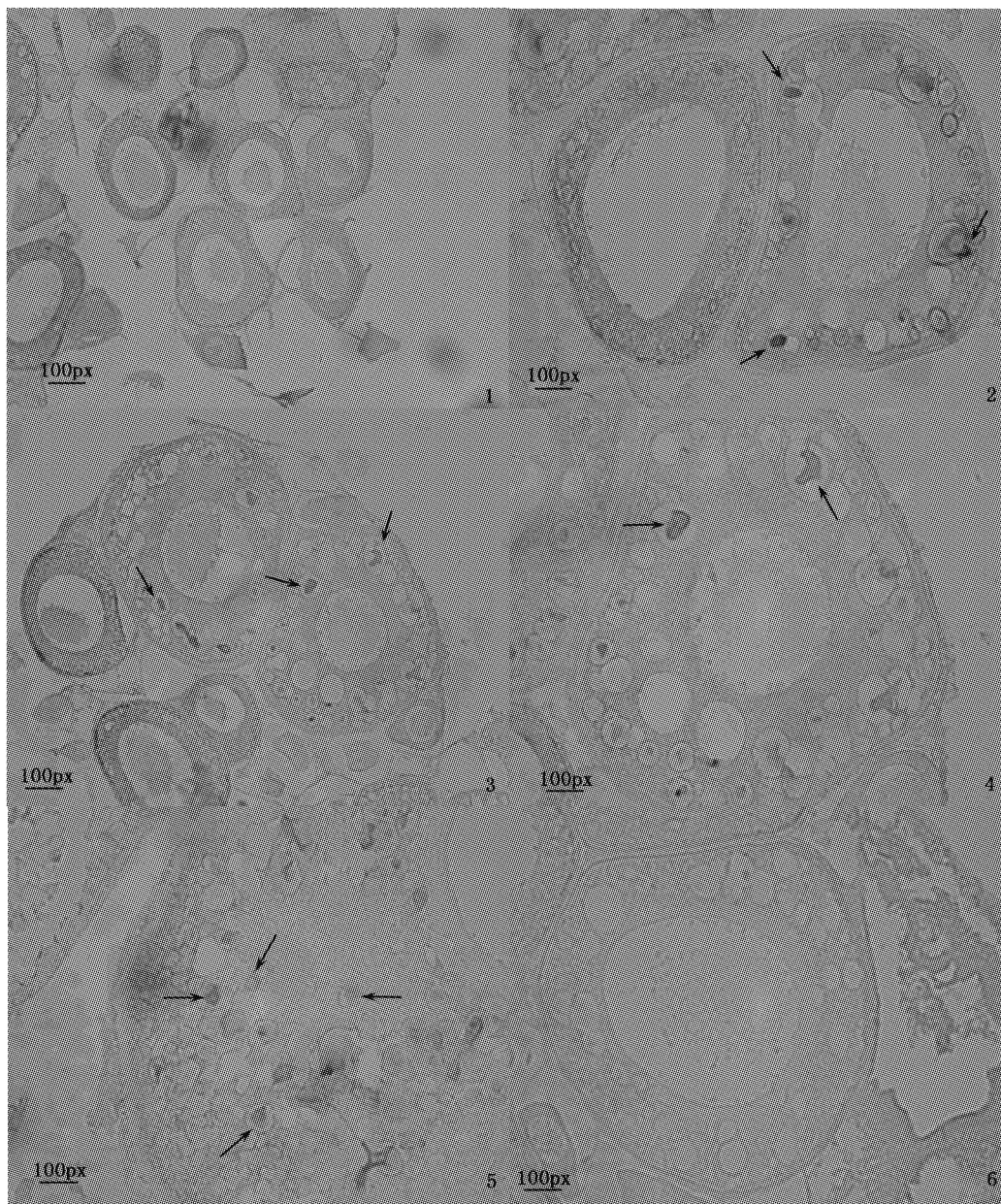
2.4 MAPK 在卵母细胞中的定位

我们利用免疫组化技术研究卵母细胞第一次减数分裂不同时期,pMAPK 在细胞中的表达定位。

免疫组化结果显示 I 期时 MAPK 没有被激活(图版 -1);在 II 期时,活化的 MAPK 开始在细胞

质中表达(图版-2);在Ⅲ、Ⅳ期的时候,活化的 MAPK 表达量增多(图版-3、4);卵母细胞在 V 期时已经发生 GVBD,此时在细胞质和核区均可观察到激活的 MAPK(图版-5)。由此可以推

断,MAPK 在胞质区被激活,继而从细胞质向细胞核转移,从而促进卵母细胞第一次减数分裂完成(图版-6)。



图版 MAPK 在卵母细胞不同时期的定位

Plate The location of MAPK (pMAPK) in different stages of zebrafish oocytes

箭头所指为 MAPK 的活性形式(pMAPK)

1. I 期 pMAPK; 2. II 期 pMAPK; 3. III 期 pMAPK; 4. IV 期 pMAPK; 5. V 期 pMAPK; 6. 阴性对照。

3 讨论

脊椎动物卵母细胞最后的成熟过程受到多种因子调控,其中由垂体释放的 FSH 作用于卵

巢,促进 $17\alpha,20\beta$ -DHP 的合成,进而促进卵母细胞最后成熟,是经典调控途径之一。但是对于 $17\alpha,20\beta$ -DHP 以外的一些信号的生理功能了解还不够充分。哺乳动物卵母细胞体外研究表明,

活性 MAPK 是另一个调控卵母细胞最后成熟的重要因子,它在孕酮或 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 作用后,对卵母细胞最后成熟有着重要作用^[4]。哺乳动物中 MAPK 在卵母细胞最后成熟中的生理功能已有不少研究成果^[5]。虽然普遍认为 FSH、 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 是一条促进鱼类卵母细胞最后成熟的通路^[4],但对于除 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 外还有哪些信号分子参与调控鱼类卵母细胞最后成熟,还研究甚少。

多数硬骨鱼类中,卵母细胞发育成熟分为两个阶段:第一个阶段,卵母细胞不依赖于类固醇激素而发育成具有生殖成熟活力的细胞(MIS-independent);第二个阶段,卵母细胞在类固醇激素作用下,最后成熟(MIS-dependent)^[6];鱼类促性腺激素作用于卵母细胞使其产生类固醇激素 $17\alpha, 20\beta$ -DHP, $17\alpha, 20\beta$ -DHP 可与卵母细胞表面的受体直接结合,引发一系列生理反应,最终促进卵母细胞的成熟^[6]。

哺乳动物的 FSH 已广泛应用在哺乳动物如牛、羊等繁殖研究和生产上^[7]。鱼类促性腺激素(GtH)同时具有促黄体激素(LH)和促卵泡激素(FSH)的功能,在生产中也得到了较为广泛的应用。然而关于 FSH 在鱼类卵母细胞中的调控机制研究还不多见。本实验的研究结果表明,FSH 对于卵母细胞 GVBD 的发生有促进作用(图 1),其中 1 IU/mL FSH 促进作用最为明显,并且这种作用是与 MAPK 的激活相关。这与曲杨燕等^[8]在绵羊卵母细胞得到的结果类似。目前认为促性腺激素作用方式可能有以下几种:(1)作用于卵泡细胞,使卵泡细胞产生孕酮,孕酮再作用于卵母细胞,参与促成熟因子(MPF)的激活^[9]。SHIMADA 和 TERADA 证实在猪卵母细胞中,FSH 作用于颗粒细胞产生孕酮,孕酮刺激卵母细胞中癌蛋白(c-Mos)的合成,激活细胞静止因子(cytostatic factor, CSF)触发 MPF 激活和 MAPK 级联反应^[9-10]; (2)作用于卵丘细胞,使卵母细胞与卵丘细胞之间的通讯联系中断,卵丘细胞产生的环磷酸腺苷(cAMP)不能进入卵母细胞,致使卵母细胞内的 cAMP 浓度下降,诱使卵母细胞恢复减数分裂^[11]。夏国良^[12]在研究猪 FSH 的作用机理时证实,FSH 对猪卵母细胞成熟的正调节是通过激活卵丘细胞内 cAMP 信号通路,使胞浆内 cAMP 的浓度迅速提高而促进卵丘细胞扩散。与

卵丘细胞的分化成熟不同,卵母细胞减数分裂的恢复是由于卵母细胞中 cAMP 浓度的下降,因而解除了对卵母细胞的抑制作用,使其具备了减数分裂恢复的能力。傅国栋等也认为 FSH 可刺激卵丘细胞分泌一种克服次黄嘌呤的物质,这种物质可能通过 cAMP 依赖性通道作用于猪卵母细胞,从而诱导其成熟^[13]。

$17\alpha, 20\beta$ -DHP 促进鱼类卵母细胞的最终成熟和排卵。现在已经证明 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 是大多数鱼类促进成熟的类固醇激素(maturation-inducing steroids, MIS)^[14]。董玉兰和王树迎^[15]研究发现 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 能够诱导泰山螭霖鱼卵母细胞成熟,并认为类固醇激素能够诱导泰山螭霖鱼卵母细胞最后成熟,这与汪小东和林浩然^[16]在鲤科鱼类上的研究结果一致。对一些硬骨鱼的研究证明, $17\alpha, 20\beta$ -DHP 是在卵母细胞滤泡膜合成后释放,诱导细胞核溶解和排卵^[4]。虽然 FSH 与 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 对卵母细胞 GVBD 形成都有促进作用,但在鱼类中其作用过程是不同的。FSH 首先要作用于颗粒细胞产生 $17\alpha, 20\beta$ -DHP, 后者再促进卵母细胞最后成熟;而在培养细胞中添加的 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 是直接作用于卵母细胞使其最后成熟。本实验在研究 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 的作用机制中发现, $17\alpha, 20\beta$ -DHP 能提高斑马鱼卵母细胞的 GVBD 变化和 MAPK 活性,在 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 作用 6 h 时,卵母细胞几乎全部发生 GVBD,同时 MAPK 也被激活,且 MAPK 的活性越大,GVBD 率越高。这一结果也表明 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 能直接促进斑马鱼卵母细胞最后成熟,并且这种成熟是通过激活 MAPK 而实现的。

哺乳动物上的研究表明,卵母细胞中 MAPK 在被激活时,会发生从细胞质到细胞核的空间位置转移,这种转变有助于其锚定于适配体蛋白、细胞骨架及细胞质膜结构,或与其上游激酶和下游底物进行结合来发挥正常功能^[17]。在细胞质中活性 MAPK 可通过激活翻译因子,间接诱导蛋白合成^[4]。MAPK 被激活后发生核转位可直接激活转录因子 Elk-1,启动即早基因(immediately early genes, IEGs)的转录;MAPK 也可通过激活核糖体 S6 激酶(ribosomal S6 kinase, Rsk),来激活转录因子 cAMP 效应元件结合蛋白(cAMP response-element-binding protein, CREB),从而作用于 cAMP 效应元件(cAMP response element,

CRE),启动 CRE 依赖性的转录^[18]。

研究表明,MAPK 在斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂过程中也会发生类似的情况。MAPK 首先在 II 期卵母细胞胞浆中被激活,随后发生由胞浆向细胞核的空间位置转移,在 V 期发生 GVBD 的卵母细胞胞质和核区中均可以检测到活性 MAPK,这种空间位置变化与蛋白质的磷酸化与去磷酸化相关^[17];未激活的 MAPK 主要位于胞质中,这是由于未磷酸化的 MAPK 与某些胞质蛋白具有高亲和力所致,而在核中与 MAPK 相互作用的蛋白质含量较低或与 MAPK 相互作用的亲和力较低。MAPK 被磷酸化激活后与胞质蛋白的亲和力下降,而与 MAPK 具有高亲和力的核蛋白丰度及亲和力增加,从而导致 MAPK 移位入核^[17,19]。在信号失活后,MAPK 去磷酸化,与胞质蛋白的相互作用增加及失去高亲和力的核结合位点,再返回到胞质中^[17,19]。此外 CYERT 也证实决定核定位中起关键作用的不是激酶活性本身,而是 MAPK 的磷酸化^[19]。研究证明,JNK、Spcl 和 Hog1 等 MAPK 家族,在静息状态下的亚细胞定位及刺激后的移位具有一定的相似性^[19-20]。

虽然在所有动物卵母细胞成熟过程中 MAPK 均被激活,但是由于不同动物 MAPK 激活时间不同,因而在细胞周期不同阶段所发挥的作用也有所差异^[11],小鼠、大鼠和山羊卵母细胞中 MAPK 激活发生在 GVBD 之后,而在爪蟾、马等动物中 MAPK 激活与 GVBD 同时发生,MAPK 直接参与减数分裂的启动。因为不同物种间 MAPK 作用机制存在差异,所以关于其在鱼类卵母细胞发育中的作用机制还有待更深入的研究。

参考文献:

- [1] 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[J]. 科学通报, 2002, 47(9): 650 - 655.
- [2] RICHARDS J S. Hormonal control of gene expression in the ovary[J]. Endocrine Reviews, 1994, 5(6): 725 - 751.
- [3] KELLEHER R J, GOVINDARAJAN A, JUNG H Y, et al. Translational control by MAPK signaling in long term synaptic plasticity and memory[J]. Cell, 2004, 116(3): 467 - 479.
- [4] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2007: 164 - 210.
- [5] 李满玉,范衡宇,佟超,等. MAPK 参与调节猪卵母细胞和受精卵细胞周期的转变[J]. 科学通报, 2002, 47(5): 374 - 378.
- [6] PATINO R, THOMAS P. Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the Atlantic croaker: evidence for two distinct stages of gonadotropin control of final oocyte maturation[J]. Biology of Reproduction, 1990, 43(5): 818 - 827.
- [7] 吕津,桑润滋. 牛羊超数排卵方法研究进展[J]. 黑龙江动物繁殖, 2005, 13(1): 13 - 15.
- [8] 曲杨燕,赵雁伟,李凯,等. FSH 对绵羊卵母细胞体外核成熟的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(12): 80 - 83.
- [9] 周荣,杨秀萍. 卵母细胞减数分裂的调控机制研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2008, 27(2): 80 - 84.
- [10] SHIMADA M, TERADA T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes[J]. Molecular Human Reproduction, 2002, 8(7): 612 - 618.
- [11] 陈大元. 受精生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 316 - 383.
- [12] 夏国良. 小鼠胚胎卵巢体外培养中卵细胞的生长及其数量的调节[J]. 中国农业大学学报, 1996, 1(5): 41 - 45.
- [13] 傅国栋,张似青,夏国良. Forskolin 和促性腺激素对猪卵母细胞体外成熟的影响[J]. 上海农业学报, 2002, 18(1): 84 - 87.
- [14] NAGAHAMA Y, ADACHI S. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*)[J]. Development Biology, 1985, 109(2): 428 - 435.
- [15] 董玉兰,王树迎. 泰山螭鱼卵巢年周期中卵母细胞发育及其性腺类固醇激素作用[J]. 中国农业科学, 2006, 39(6): 1264 - 1271.
- [16] 汪小东,林浩然. 硬骨鱼类卵母细胞最后成熟的调控[J]. 水产学报, 1998, 22(1): 72 - 77.
- [17] 龚小卫,姜勇. MAPK 的细胞内定位与激活后移位机制[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(4): 509 - 513.
- [18] DAVIS S, VANHOUTTE P, PAGES C, et al. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo[J]. The Journal of Neuroscience, 2000, 20(12): 4563 - 4572.
- [19] CYERT M S. Regulation of nuclear localization during signaling[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(24): 20805 - 20808.
- [20] KHOKHLATCHEV A V, CANAGARAJAH B, WILSBACHER J, et al. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation[J]. Cell, 1998, 93(4): 605 - 615.

The activity and localization of MAPK during the first meiosis in zebrafish oocytes

LI Guo-peng, CHEN A-qin, CAO Na, WU Ting-ting, WEI Hua

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Zebrafish oocyte maturation was induced by various concentrations of FSH and $17\alpha, 20\beta$ -DHP. The results indicated that FSH of 1IU/mL and $17\alpha, 20\beta$ -DHP of 5ng/mL could initiate significantly germinal vesicle breakdown (GVBD) of zebrafish, separately, while the $17\alpha, 20\beta$ -DHP of 5ng/mL had better performance. The analysis of SDS-PAGE and Western blot showed that $17\alpha, 20\beta$ -DHP of 5ng/mL activated oocyte MAPK and increased GVBD in the zebrafish. The histochemistry assay showed MAPK was activated at the stages II and III of oocyte development in the plasm while no MAPK activity was observed at the stage I. At the stage V, the activated MAPK could be observed both in the plasm and nucleus while GVBD took place. The results indicated that activated MAPK played an important role in promoting the ovary development and began to move from the plasm to the nucleus while it was activated.

Key words: zebrafish; mitogen-activated protein kinases; follicle-stimulation hormone; $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one