

# PTEN 在小鼠卵细胞和早期胚胎发育中的功能研究

王喜宏<sup>1,2,\*</sup>, 和协超<sup>1</sup>, 韩树标<sup>1</sup>, 季维智<sup>1</sup>, 郑萍<sup>1</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

**摘要:** PI3K/AKT 信号通路在哺乳动物早期胚胎发育中起重要作用。抑癌基因 *PTEN* 是该通路中的负调节因子, 但 *PTEN* 在卵和早期胚胎中的表达、分布以及作用都还未见报道。本研究通过免疫荧光方法发现卵细胞及着床前胚胎都表达 *PTEN*, 且具活性的 *PTEN* 主要分布在生发泡期(germinal vesical, GV)卵细胞的皮层部位以及致密桑椹胚的卵裂球表面。在培养基中添加低浓度的 *PTEN* 特异性抑制剂 bpV(pic), GV 期卵母细胞的成熟不受影响, 但着床前胚胎发育受到阻滞。该结果提示 *PTEN* 在小鼠着床前胚胎发育中可能起重要作用。

**关键词:** 卵细胞; 着床前胚胎发育; *PTEN*; bpV

中图分类号: Q954.4; Q593.4; Q132.4 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2011)06-0647-04

## Role of *PTEN* in mouse pre-implantation development

WANG Xi-Hong<sup>1,2,\*</sup>, HE Xie-Chao<sup>1</sup>, HAN Shu-Biao<sup>1</sup>, JI Wei-Zhi<sup>1</sup>, ZHENG Ping<sup>1</sup>

(1. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

**Abstract:** The PI3K/Akt signal transduction pathway plays an important role in pre-implantation embryonic development. The tumor suppressor gene *PTEN* negatively regulates the PI3K/Akt pathway. Although PI3K is constitutively activated during pre-implantation embryonic development, currently no evidence shows the presence and possible involvement of *PTEN* in early embryo development. We investigated the expression of *PTEN* protein in germinal vesicle (GV) stage oocytes as well as in pre-implantation embryos. The activated form of *PTEN* was distributed in the peripheral of GV oocytes and compact morula. Treatment of GV oocytes with *PTEN* inhibitor bpV(pic) did not affect the maturation of the oocyte, but significantly impaired embryonic development. Thus, our study suggests the necessary role of *PTEN* in pre-implantation embryonic development.

**Key words:** Oocyte; Pre-implantation embryonic development; *PTEN*; bpV

磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)家族参与多种信号通路, 调节细胞的多种功能。正常情况下, 由其活化而产生的类脂产物 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 PtdIns(3,4,5)P3(PIP3)作为第二信使结合并激活多种细胞内的靶蛋白, 形成一个信号级联复合物, 最终调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等(Manning & Cantley, 2007)。PI3K/AKT 信号通路保持正常的平衡状态是细胞维持正常生理活动的关键。*PTEN* 是一种 PtdIns(3,4,5)P3-磷酸酶, 它可以通过去磷酸化将 PtdIns(3,4,5)P3 转变为 PtdIns(4,5)P2(PIP2), 从而负调节 PI3K/AKT 信号通路的稳态。PIP2 也是一种重要的信号分子, 可以与胞内或细胞膜上的许多蛋白质发生相互作用(McLaughlin & Murray, 2005)。

*PTEN* 的异常与多种肿瘤的发生、侵袭及转移密切相关(Keniry & Parsons, 2008)。因此, *PTEN* 是重要的抑癌因子之一, 在调节细胞正常生长也有着举足轻重的作用。

对 PI3K 信号通路在生殖和发育中的功能研究则相对较少, 但已有证据表明 PI3K 对着床前胚胎发育具有重要意义。敲除 PI3K 的 p110b 催化亚基会引发早期胚胎致死(Bi et al, 2002)。应用时差显微技术(time lapse microscopy)也发现早期胚胎中有持续的 PtdIns(3,4,5)P3 生成, 抑制 PtdIns(3,4,5)P3 的产生可导致胚胎发育受阻, 说明 PI3K/Akt 通路对早期胚胎发育起调控作用(Halet et al, 2008)。在卵细胞中特异性敲除 *PTEN*, 可使滤泡提前发育和过度激

收稿日期: 2011-06-16; 接受日期: 2011-08-15

\*通讯作者(Corresponding author), Tel/fax:+86-871-5198996, E-mail: wangxh06@post.kiz.ac.cn

活,从而产生卵巢早衰(Reddy et al, 2008);而在颗粒细胞中特异敲除 PTEN 则可以增加排卵率和产仔数并延长黄体寿命(Fan et al, 2008)。在小鼠初级卵泡中特异敲除 PTEN 不能影响卵母细胞成熟、排卵和产仔数(Jagarlamudi et al, 2009)。但是到目前为止,PTEN 是否也在早期胚胎中表达并起一定的调控作用,尚未见有关报道。我们利用免疫组化技术研究 PTEN 在小鼠卵和着床前胚胎中的分布,并利用 PTEN 特异性抑制剂研究其在卵成熟及早期胚胎发育中的可能功能,其结果表明,PTEN 在卵细胞和早期胚胎中持续表达,对早期胚胎发育可能起调控作用,但抑制 PTEN 对卵细胞的成熟没有显著作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 小鼠卵和胚胎的获取和培养

健康、性成熟的 ICR 品系 SPF (无特定病源)级小鼠购自昆明金殿动物中心。

超排方法:选择处于间情期和发情前期的雌性小鼠,腹腔注射 PMSG(5 IU),间隔 46~48 h 后腹腔注射 hCG(5 IU),随即与雄鼠合笼,翌日 8:00 检查阴栓,有阴道栓者认为已完成交配行为。

胚胎的获取和体外培养:取出输卵管和子宫,用消化或者冲洗的方法获得胚胎,在实体显微镜下检查受精胚胎的发育阶段。一细胞(两原核期)胚胎培养在 KSOM 培养基中,培养条件为 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>。

GV(生发泡)卵的获取:PMSG 注射 48 h 后取出小鼠卵巢,刺破卵泡获得质量好的 COCs,用机械吹吸的方法去除颗粒细胞。GV 卵在 KSOM 培养中进行成熟培养,培养条件同上。

培养中使用的 PTEN 抑制剂 bpV(pic)购自 Calbiochem(Cat: 203705)。

### 1.2 免疫组化

体内获取的不同发育阶段的胚胎用 PBS 洗两遍,在 3.7% 中性多聚甲醛中固定 15~20 min, 0.25% Triton-X100 中透膜 30 min, 1% BSA 封闭至少 1 h, 一抗 4 °C 过夜,二抗室温 1 h, Hoechst 染核。在激光共聚焦显微镜下进行观察。

使用的一抗购自恩晶公司, PTEN(Ab-380/382/383)Antibody(cat: E021056), PTEN(Phospho-Ser380/Thr382/Thr383)Antibody(cat: E11056)。100×稀释。

### 1.3 统计分析

使用 Excel 软件卡方检验进行统计分析,  $P < 0.05$  定义为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 PTEN 蛋白在卵细胞和早期胚胎中的表达和分布

我们首先利用 PTEN(Ab-380/382/383)抗体检测了 PTEN 总蛋白在卵细胞和早期胚胎中的表达和定位,继而利用 PTEN(Phospho-Ser380/Thr382/Thr383)抗体检测了卵和胚胎中磷酸化的 PTEN 蛋白的表达和定位。这些位点上磷酸化的 PTEN 被认为是非活化形式(Salmena et al, 2008; Vazquez et al, 2001; Vazquez et al, 2000)。

对卵细胞及体内发育各阶段的胚胎进行总 PTEN 和磷酸化 PTEN 免疫荧光染色,结果如图 1(大写 A-F 为磷酸化 PTEN,小写 a-f 为 PTEN 总蛋白)。PTEN 总蛋白在着床前各阶段胚胎(图 1a-e)及卵细胞(图 1f)中都有表达,主要分布在细胞核及近细胞膜上。磷酸化 PTEN 在一细胞、二细胞、四细胞及囊胚阶段与 PTEN 总蛋白的分布基本一致,但在致密化桑葚胚阶段,两者呈现不同的分布:PTEN 总蛋白同时分布在细胞核及卵裂球表面,而磷酸化 PTEN 只分布在细胞核中。GV 期卵细胞 PTEN 总蛋白和磷酸化 PTEN 也存在分布上的差异,总蛋白分布在细胞核和近细胞膜上(图 1f),而磷酸化 PTEN 则分布在细胞核中(图 1F)。

### 2.2 PTEN 在卵细胞成熟及早期胚胎发育中的作用

GV 期卵细胞在成熟培养中,加入不同浓度(0  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ )PTEN 特异性抑制剂 bpV,观察对生发泡破裂(Germinal vesicle breakdown, GVBD)的影响,结果显示,不加 bpV(0  $\mu\text{mol/L}$ )和加 1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  bpV 的 GVBD 率分别为 86.4% 和 86.2%、84.6%,无显著差异( $P > 0.05$ )。

取一细胞(两原核期)胚胎在 KSOM 中培养,培养基中添加 0  $\mu\text{mol/L}$ (对照)、2.5  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$  以及 10  $\mu\text{mol/L}$  浓度梯度的 bpV,每天观察并记录各组胚胎发育的情况。我们发现 bpV 的添加显著抑制胚胎发育,而且抑制的程度与浓度正相关。在浓度较低(2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$ )时,二细胞以后发育到每个阶段的胚胎数都有所下降,经过卡方检验,2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$  两组的四细胞、桑椹胚、囊胚的发育率与对照组相比都具有显著差异( $P < 0.05$ )。在较高浓度(10  $\mu\text{mol/L}$ )时没有胚胎可以发育到囊胚,几乎所有胚胎的发育全部被抑制在二细胞时期(图 2)。

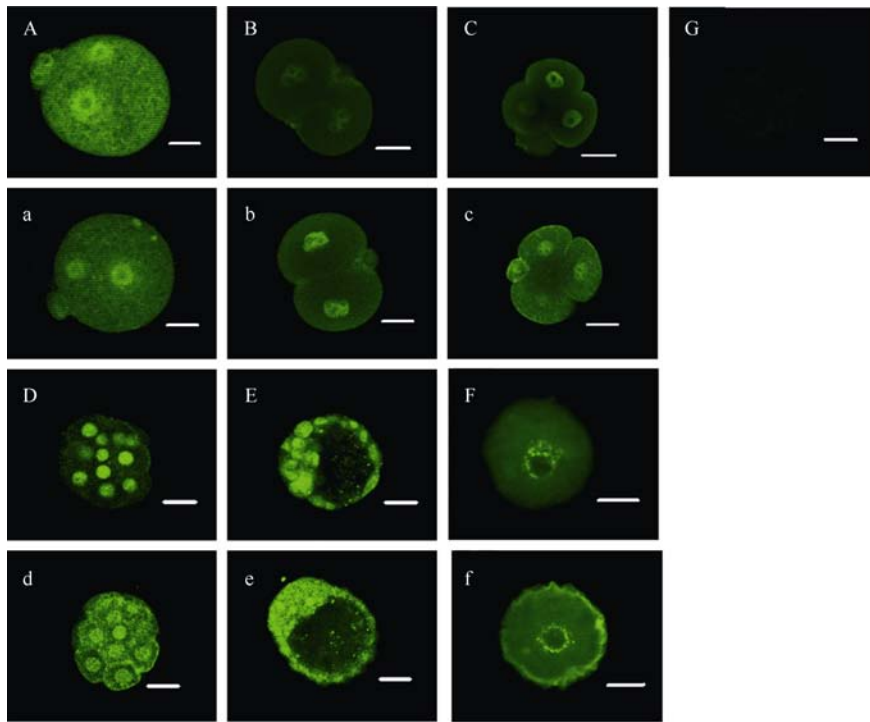


图 1 胚胎发育各阶段以及 GV 卵的磷酸化 PTEN 和总 PTEN 的分布

Fig. 1 Distribution of PTEN and phosphorylated-PTEN in pre-implantation embryos and GV oocytes

PTEN (Phospho-Ser380/Thr382/Thr383) Antibody(磷酸化 PTEN)以及 PTEN (Ab-380/382/383) Antibody (总 PTEN)两种抗体对胚胎以及 GV 卵的免疫荧光染色结果。二抗为 Alexa Fluor 488, 绿色荧光。注意在致密桑椹胚阶段和 VG 卵中, 总 PTEN 和磷酸化 PTEN 的分布有所不同。A~E) 胚胎发育各阶段磷酸化; a~e) 胚胎发育各阶段总 PTEN 免疫组化结果; F) GV 卵磷酸化 PTEN 免疫组化结果; f) GV 卵总 PTEN 免疫组化结果; G) 二细胞胚胎只加二抗的对照, 其他阶段情况基本相同, 都是几乎没有任何荧光。Bar=20  $\mu\text{m}$ 。

Immunofluorescent staining of GV oocytes by PTEN (Phospho-Ser380/Thr382/Thr383) antibodies specific for the phospho-PTEN or with PTEN (Ab-380/382/383) Antibody specific for total PTEN. The embryos were then incubated with a secondary antibody, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (green fluorescence). Note that total PTEN and p-PTEN located differently in compact morula and GV oocyte. A-E) phospho-PTEN in preimplantation embryos; a-e) total PTEN in preimplantation embryos; F) phospho-PTEN in GV oocytes; f) total PTEN in GV oocytes; G) a control with the secondary antibody alone. Bar=20  $\mu\text{m}$ .

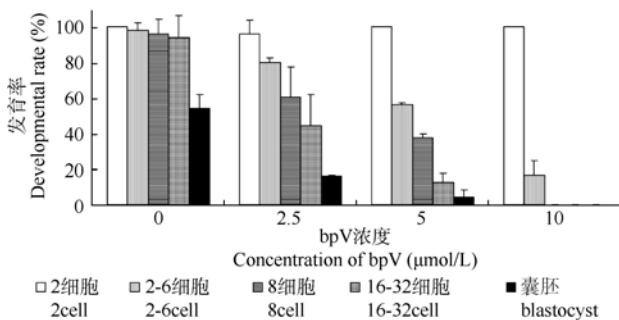


图 2 PTEN 抑制剂 bpV(pic)处理对早期胚胎发育的影响

Fig. 2 Effect of bpV(pic) treatment on the developmental competence of early embryos

在培养基中添加 0  $\mu\text{mol/L}$ (对照)、0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  的 bpV(pic), 统计 2 细胞、4-6 细胞、8 细胞、16-32 细胞及囊胚的各阶段胚胎发育率。0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、2.5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  三组与对照组相比, 在二细胞以后的所有发育阶段, 发育率均差异显著( $P<0.05$ )。

One-cell embryos were cultured continuously in the presence of 0  $\mu\text{mol}$  (control), 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 2.5  $\mu\text{mol/L}$  and 10  $\mu\text{mol/L}$  bpV(pic). The developmental rate was valued at the following stages (left to right): two-cell, four to six-cell, eight-cell, 16-cell morula and early blastocyst. About 50 embryos were scored in each experimental condition. The development rate had significant difference between test group and control group in all stage beyond 2 cells ( $P<0.05$ ).

### 3 讨论

PI3K 通路在小鼠胚胎发育中起重要作用, 在小鼠胚胎中, PI3K 从一细胞胚胎到囊胚都持续表达并激活, PI3K 和其磷酸化反应的产物 PtdIns(3,4,5)P3 都分布在细胞表面(Halet et al, 2008; Riley & Carayannopoulos, 2005)。敲除 PI3K 催化亚基或者抑制 PI3K 活性可引起早期胚胎致死(Bi et al, 2002; Halet et al, 2008)。PTEN 是 PtdIns(3,4,5)P3 发生的负调控因子, 所以在胚胎发育中很可能也有重要的作用。

我们的结果表明, PTEN 在卵母细胞和早期胚胎发育中持续表达。利用 PTEN 特异性抑制剂 bpV 阻断 PTEN 的活性, 可显著影响早期胚胎发育潜能, 其效果具剂量依赖性, 说明 PTEN 对早期胚胎发育具调控作用。PTEN 总蛋白和磷酸化蛋白在桑椹胚阶段卵分布不一致, 活化的 PTEN 主要分布在裂球表面。该结果暗示 PTEN 可能在桑椹胚阶段的致密

化过程中起某种作用。低浓度的 bpV 并不能阻断卵泡的成熟, 这与前人基因敲除的研究结果一致: 在小鼠在初级卵泡中敲除 PTEN 不能影响卵母细胞成熟(Jagarlamudi et al, 2009)。

本实验中使用的 bpV 最大浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ , 本实验证明该浓度对于体细胞和卵细胞都没有毒性(Lai, 2007; Schmid et al, 2004; Li et al, 2010)。因此, 在该浓度的 bpV 作用下观察到的表型应该是

PTEN 活性抑制后产生的真实作用, 而不是细胞毒性的副产物。当然, PTEN 对胚胎发育的作用还需通过 mRNA 表达的定量研究, 以及 PTEN 基因表达的干扰, 如 RNA 干扰或者基因敲除手段进行更为确凿的验证。抑制 PTEN 的功能, 一方面可破坏 PI3K/AKT 通路的平衡, 使 AKT 过度激活; 另一方面也可降低信使分子 PIP2 的生成。PTEN 对胚胎发育调控的详细分子机制还需进一步的深入研究。

### 参考文献:

- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL. 2002. Early embryonic lethality in mice deficient in the p110 catalytic subunit of PI 3-kinase[J]. *Mamm Genome*, **13**(3): 169-172.
- Fan HY, Liu Z, Cahill N, Richards JAS. 2008. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells[J]. *Mol Endocrinol*, **22**(9): 2128-2140.
- Halet G, Viard P, Carroll J. 2008. Constitutive PtdIns (3, 4, 5) P3 synthesis promotes the development and survival of early mammalian embryos[J]. *Development*, **135**(3): 425.
- Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D, Reddy P, Idahl A, Ottander U, Lundin E, Liu K. 2009. Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation[J]. *PLoS One*, **4**(7): e6186.
- Keniry M, Parsons R. 2008. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy[J]. *Oncogene*, **27**(41): 5477-5485.
- Lai J. 2007. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) as a molecular target in lung epithelial wound repair[J]. *Br J Pharmacol*, **152**(8): 1172-1184.
- Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Duan EK, Hsueh AJW. 2010. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**(22): 10280.
- Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. *Cell*, **129**(7): 1261-1274.
- McLaughlin S, Murray D. 2005. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics[J]. *Nature*, **438**(7068): 605-611.
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hmlinen T, Peng SL. 2008. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool[J]. *Science*, **319**(5863): 611.
- Riley JK, Carayannopoulos MO. 2005. The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo[J]. *Dev Biol*, **284**(2): 377-386.
- Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. 2008. Tenets of PTEN tumor suppression[J]. *Cell*, **133**(3): 403-414.
- Schmid AC, Byrne RD, Vilar R, Woscholski R. 2004. Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors[J]. *FEBS Lett*, **566**(1-3): 35-38.
- Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR. 2001. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex[J]. *J Biol Chem*, **276**(52): 48627.
- Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. 2000. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function[J]. *Mol Cell Biol*, **20**(14): 5010.