

郝肖琼,贾方毅,付旭阳. PLC γ 1 在 小鼠卵母细胞减数分裂恢复中的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(12): 16-22,51.
Hao XQ, Jia FY, Fu XY. The role of PLC γ 1 in mouse oocyte meiotic resumption [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(12): 16-22,51.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019. 12. 003

PLC γ 1 在 小鼠卵母细胞减数分裂恢复中的作用

郝肖琼^{1,2*}, 贾方毅¹, 付旭阳¹

(1.包头医学院生理学教研室,内蒙古 包头 014040;
2.中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室,北京 100094)

【摘要】 目的 探究磷脂酶(PLC) γ 1 在卵母细胞减数分裂恢复中的作用及机制,进一步阐明卵母细胞成熟的分子机理,为与相关的人体临床应用提供理论基础。**方法** 利用 Real-time PCR 检测 PLC 不同亚型在颗粒细胞与卵丘细胞中的表达情况,构建体外卵泡培养模型及 COC 培养模型研究 PLC γ 1 特异抑制剂 U73122 对 LH 及 EGF 诱导的减数分裂恢复的影响,利用钙离子荧光探针 Fluo 3-AM 检测胞内钙离子水平变化,酶联免疫法检测胞内 cGMP 水平变化,利用 Real-time PCR、Western blot 以及免疫组化检测不同亚型 1,4,5-三磷酸肌醇受体(IP₃R)的表达变化情况。**结果** 研究表明,颗粒细胞与卵丘细胞中 *Plc γ 1* mRNA 的表达均显著高于其它亚型($P<0.05$), U73122 能够有效抑制 LH 和 EGF 诱导的卵母细胞减数分裂恢复($P<0.05$)以及 EGF 诱导的卵丘细胞内钙离子水平升高($P<0.05$), U73122 还显著逆转了 EGF 介导的胞内 cGMP 水平下降($P<0.05$),此外,研究还发现在颗粒细胞,卵丘细胞与卵母细胞中 *Itpr1* mRNA 的表达量显著高于其它亚型($P<0.05$), Western blot 与免疫组化的结果也表明 IP₃R1 在三种细胞中均有表达。**结论** LH-EGFR 信号通过 PLC γ 1-IP₃R1 升高胞内钙离子水平诱导卵母细胞减数分裂恢复。

【关键词】 卵母细胞减数分裂;磷脂酶 γ 1;1,4,5-三磷酸肌醇受体;钙离子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 12-0016-07

The role of PLC γ 1 in mouse oocyte meiotic resumption

HAO Xiaoqiong^{1,2*}, JIA Fangyi¹, FU Xuyang¹

(1. Department of Physiology, Baotou Medical College, Baotou 014040, China. 2. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of PLC γ 1 in mouse oocyte meiotic resumption and to provide a reference for its study and clinical application in humans. **Methods** Real-time PCR was used to detect the mRNA expression levels of PLC isoforms in granulosa cells and cumulus cells. Models of follicle culture and cumulus-oocyte complexes (COCs) culture *in vitro* were generated to study the effect of U73122 (PLC γ 1 specific inhibitor) on LH- and EGF-induced oocyte meiotic resumption. Changes in intracellular calcium levels were monitored using Fluo 3-AM, and cGMP levels were measured by ELISA. The expressions of IP₃R isoforms (mRNA and protein levels) were detected by Real-time PCR, Western blot, and immunohistochemistry. **Results** The expression of *Plc γ 1* mRNA levels in granulosa cells and cumulus cells was significantly higher than that of other isoforms ($P<0.05$). Furthermore, U73122 inhibited LH/EGF-induced oocyte meiotic resumption ($P<0.05$) and decreased EGF-induced calcium levels in cumulus cells ($P<0.05$). In addition, U73122 significantly reversed the decline of cGMP levels mediated by EGF ($P<0.05$). The expression of *Itpr1* mRNA levels was significantly higher than other isoforms in granulosa cells, cumulus cells, and oocytes ($P<0.05$). Western blot and immunohistochemistry showed that IP₃R1 protein was expressed in all the three cell types.

【基金项目】内蒙古自治区自然科学基金项目(2018BS03022);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY18188);内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持计划”项目(NJYT-19-B23);包头市医药卫生科技计划项目(Wsjj2017025)。

【作者简介】郝肖琼(1989—),女,讲师,博士,研究方向:哺乳动物生殖内分泌。E-mail: haoxiaoqiong@126.com

Conclusions LH-dependent EGF receptor signaling increases calcium levels in cumulus cells through PLC γ 1-IP $_3$ R1, which ultimately induces meiotic resumption.

【Keywords】 oocyte meiosis; phospholipase C γ 1(PLC γ 1); inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP $_3$ R); calcium

哺乳动物的卵母细胞从胚胎时期起就被阻滞在减数分裂 I 前期的双线期,卵泡壁层颗粒细胞产生的 C 型钠肽(NPPC)结合其鸟苷酸环化酶受体 2(NPR2),产生的 cGMP 是维持减数分裂阻滞的关键因子^[1],青春期来临后,下丘脑产生促黄体激素(LH)峰,通过促进颗粒细胞中 EGF 样生长因子的表达^[2],转激活卵丘细胞中的 EGF 受体(EGFR),从而诱导卵母细胞恢复减数分裂^[3]。

前期的研究表明,LH-EGFR 信号升高卵丘细胞内的钙离子水平,高水平的钙离子降低 NPR2 与 NPPC 的亲合性,使 NPR2 失活,cGMP 水平下降,最终导致减数分裂的恢复^[4],因此,卵丘细胞内高浓度的钙离子是卵母细胞减数分裂恢复的关键所在,但卵丘细胞内钙离子水平究竟是怎样升高的,目前还不清楚。

激活磷脂酶 C(PLC)启动磷脂酰肌醇信号通路,产生的 1,4,5-三磷酸肌醇(IP $_3$)能够升高胞内钙离子水平。PLC 家族具有多种同工酶,目前已发现六大类:PLC β 、PLC γ 、PLC δ 、PLC ϵ 、PLC ζ 和 PLC η ,共 13 种亚型^[5]。PLC 广泛分布于机体的各组织中,对机体多种生理活动做出了重要的调控。其中,生长因子受体可引起 PLC γ 1 的活化^[6],产生 IP $_3$ 导致胞内钙离子释放,另外,PLC γ 1 还参与细胞增殖、分化、受体内吞、细胞运动等活动^[7-8]。

内质网 IP $_3$ R 钙库释放升高了胞内钙离子水平^[9-10],这一过程可通过激活 PLC γ 1 产生 IP $_3$ 实现。IP $_3$ R 基因家族编码三种同源 IP $_3$ 结合蛋白,形成三种亚型^[11]:IP $_3$ R1、IP $_3$ R2 以及 IP $_3$ R3,受体在不同组织中存在不同的表达多样性,在卵巢中的表达情况目前尚未有报道。

本文主要探究了 LH-EGFR 信号通过 PLC γ 1 促进卵母细胞减数分裂的恢复,以及下游分子 IP $_3$ R1 的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验所用 21~23 d(12~14 g) SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠(200 只)购于中科院遗传所实验动物中心[SCXK(京)2015-0019],本研究经包头医学院实验动物伦理委员会批准(包院字 20180901),实验动

物房[SYXK(京)2015-0028];22℃~24℃恒温,12 h/12 h 光照/黑暗交替,自由采食饮水,按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

孕马血清(PMSG,浙江宁波激素厂);NPPC、EGF、milrinone、U73122、牛血清白蛋白(Sigma 公司,美国);LH(Sigma 公司,美国);Fluo 3-AM(日本同仁化学研究所);MEM α 粉末状培养基(Gibco 公司,美国);RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒(Qiagen 公司,美国);TransStart Green qPCR SuperMix(全式金公司);cGMP 检测试剂盒(Cayman 公司,美国);免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);蛋白质浓缩胶缓冲液、分离胶缓冲液、30%丙烯酰胺-甲叉双丙烯酰胺溶液、5 $\times$ SDS 上样缓冲液(北京康为世纪生物科技有限公司);TEMED(Amresco 公司,美国);高灵敏度化学发光显色液、PVDF 膜(Millipore 公司,美国);IP $_3$ R1 抗体由中国科学院动物研究所唐铁山研究员惠赠。

体视显微镜、石蜡切片机(Lecia 公司,德国);A1 激光共聚焦扫描显微镜(Nikon 公司,日本);Real-time PCR 仪(Appplied Biosystems 公司,美国);电泳仪、电泳槽(Bio-Rad 公司,美国);化学发光成像系统(北京原平皓生物技术有限公司);细胞培养膜(Millipore 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 卵丘卵母细胞复合物(COCs)的分离及培养

小鼠腹腔注射 PMSG 5 IU/只,44~46 h 后处死取卵巢,卵巢放置在预先平衡好的 MEM α 液(含 1 μ mol/L milrinone 抑制卵母细胞成熟)中,用 1 mL 注射器刺破卵泡,捡取形态良好、卵丘细胞包裹均匀的 COCs,COCs 培养于含有 30 nmol/L NPPC 的 MEM α 液中,添加 10 ng/mL EGF 以及 40 μ mol/L U73122;进行 U73122 的剂量依赖性实验研究时,培养液中含有 30 nmol/L NPPC、10 ng/mL EGF 以及不同剂量的 U73122,此外,U73122(40 μ mol/L)对减数分裂自发恢复的影响也做了研究。COCs 于 37℃,5% CO $_2$,95%湿度的培养箱培养,4 h 后,脱去卵丘细胞,观察卵母细胞发生 GVBD 的比率。每次实验每组使用 30 枚 COCs。

1.3.2 卵泡的分离及培养

卵巢取自注射 PMSG 44~46 h 的小鼠,用 1 mL

注射器分离卵泡(直径 300~400 μm),将分离好的卵泡放置在 0.44 μm 孔径的细胞培养膜上,培养膜悬浮放置在 35 mm 细胞培养皿中(添加 1.5 mL MEMα 液),MEMα 液添加或者不添加 1 μg/mL LH 以及 40 μM U73122;于 37℃,5% CO₂,95%湿度的培养箱培养,4 h 后,刺破卵泡,脱去卵丘细胞,观察卵母细胞发生 GVBD 的比率。每次实验每组使用 20 枚卵泡。

1.3.3 卵丘细胞内钙离子水平的检测

COCs 取自注射 PMSG 44~46 h 的小鼠卵巢,培养于 MEMα 液中,MEMα 液含有 30 nmol/L NPPC,添加 10 ng/mL EGF 以及 40 μmol/L U73122,于 37℃,5% CO₂,95%湿度的培养箱培养 2 h,之后

PBS 清洗 3 次,加入 5 μmol/L 钙离子荧光探针 Fluo 3-AM 孵育 20 min,之后 PBS 清洗 3 次,在 A1 激光共聚焦显微镜下观察细胞内钙离子水平,绿色荧光表示胞内钙离子水平,荧光强度代表胞内钙离子水平相对值。每次实验每组使用 15 枚 COCs。

1.3.4 Real-time PCR

细胞样品取自注射 PMSG 44~46 h 的小鼠卵巢,PBS 清洗,总 RNA 的提取依照 RNeasy micro-RNA isolation kit 操作指南进行,总 RNA 的反转依照 QuantiTect 反转录体系进行,得到 cDNA。在 ABI 7500 Real-time PCR 系统下进行反应,每个样品重复 3 次,所有实验重复 3 次。实验所用引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 Realtime-PCR 引物序列
Table 1 Gene primer sequences

基因名称 Gene names	引物序列(5'→3') Primer sequences	片段大小(bp) Fragment size
<i>Rpl19</i>	F: CTGAAGGTCAAAGGGAATGTGTTTC R: TGGTACAGCCAGGAGCTTCTTG	101
<i>Plcβ1</i>	F: GCCCCTGGAGATTCTGGAGT R: GGGAGACTTGAGGTTACCTTT	124
<i>Plcβ2</i>	F: TGCTGATCGAAAACGGGTGG R: AGCTTTAGAGTGGTAGGAAGTGA	172
<i>Plcβ3</i>	F: CGCGGGAGTAAGTTCATCAAA R: CCTCCATGTTGGGTCCTGTC	112
<i>Plcβ4</i>	F: GGACAAGTGCTAGAATGTTCCC R: GAAGCCGATATTCACCAGATCC	165
<i>Plcy1</i>	F: ATCCAGCAGTCTAGAGCCTG R: GGATGGCGATCTGACAAGC	105
<i>Plcy2</i>	F: GTGGACACCCTTCCAGAATATG R: ACCTGCCGAGTCTCCATGAT	137
<i>Plcδ1</i>	F: CAGCTCGTGGCGTAGAGAAC R: CCTGAATGTCCTCGATGGAGAA	122
<i>Plcδ3</i>	F: GGCTACGGGCACTGAAGAAG R: GCTGCACGAAGAATATGTGCTT	198
<i>Plcδ4</i>	F: GAAGGTTATGAAGTGTCCGATGT R: AACTGCTTTGACAAGAGAATGGA	102
<i>Plce1</i>	F: TTCGTCGAGCTGTTCAAATCA R: GCAGGCTACAGAGTAGATGTCA	81
<i>Plcζ1</i>	F: GGGATATGTAAGACACCTGTGGA R: GCAGGAACCTACACGATGATTCT	107
<i>Plcη1</i>	F: GGCTCGTTCCGCTCTTTTAC R: CTGCCCTCGGTGACTTTGTAG	118
<i>Plcη2</i>	F: TTGGTCCGCTTCTACTACCTG R: TGGATGGAGTCGATGAAATCT	98
<i>Itpr1</i>	F: CGTTTTGAGTTTGAAGGCGTTT R: CATCTTGCGCCAATTCCCG	136
<i>Itpr2</i>	F: CCTCGCTACCACATCACC R: TCACCACTCTCACTATGTCGT	119
<i>Itpr3</i>	F: GGGCGCAGAACACGAGAT R: GAACTTTTGCAGGTCACGGTT	104

1.3.5 Western blot

颗粒细胞、卵丘细胞与裸卵均取自注射 PMSG 44~46 h 的小鼠卵巢,加入细胞裂解液进行细胞裂解,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,之后加入 1×SDS 上样缓冲液,沸水煮 10 min;将处理好的样品加入凝胶中,进行凝胶电泳(5%浓缩胶,60 V,40 min,10%分离胶,100 V,1.5 h),之后采用湿法转膜(100 V,1 h);含有 5%奶粉的 TBST 封闭 2 h,一抗孵育 4℃ 过夜;二抗孵育 1 h,使用化学发光成像系统曝光。

1.3.6 免疫组织化学

小鼠腹腔注射 PMSG 44~46 h 后取卵巢,置于 4%多聚甲醛中固定 48 h,酒精脱水、石蜡包埋、连续切片(组织厚度 5 μm),用柠檬酸缓冲液进行抗原热修复:微波炉高火 4 min,低火 3×4 min,然后按免疫组化试剂盒的说明进行染色、DAB 显色、苏木精复染,封片观察。

1.3.7 细胞内 cGMP 水平检测

COCs 取自注射 PMSG 44~46 h 的小鼠卵巢,放置于 MEMα 培养液中(每组需 100 枚 COCs)培养 2 h,MEMα 液含有 30 nmol/L NPPC,添加 10 ng/mL EGF 以及 40 μmol/L U73122,PBS 清洗后收集各组

COCs,cGMP 含量依据 cGMP 酶联免疫试剂盒中提供的方法进行检测。

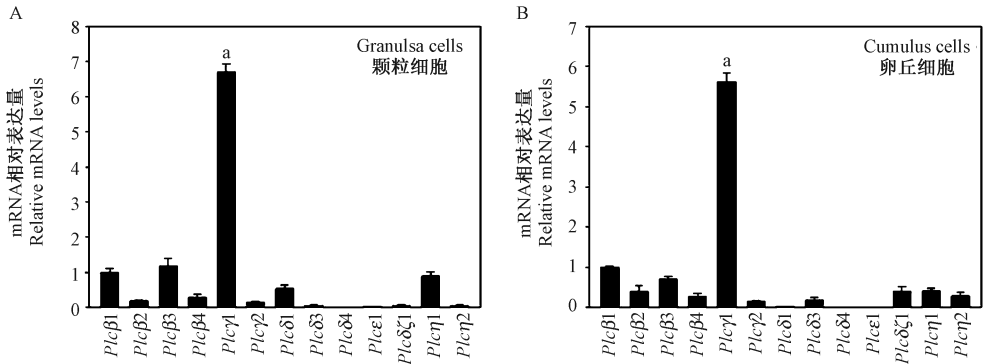
1.4 统计学分析

所有的实验均重复至少 3 次,并使用来自不同小鼠的样本进行。用 Sigma plot 13.0 软件进行统计学分析,数据类型采用方差分析(ANOVA)和 *t* 检验,实验数据以平均数±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 实验结果

2.1 PLC 不同亚型 mRNA 在颗粒细胞与卵丘细胞内的表达情况

激活 PLC 启动磷脂酰肌醇信号通路,使胞内钙离子水平升高,PLC 有多种亚型,我们检测了不同亚型在颗粒细胞与卵丘细胞中的表达情况。结果表明,小鼠注射 PMSG 44~46 h 后,卵泡壁层颗粒细胞中 *Plcγ1* mRNA 的表达水平远远高于其它亚型($P < 0.05$) (图 1A),这种现象同样出现在卵丘细胞中,卵丘细胞中 *Plcγ1* mRNA 的表达水平显著高于其它亚型($P < 0.05$) (图 1B),这些结果提示 PLCγ1 在减数分裂恢复中可能发挥主要作用。



注:与各组相比,^a $P < 0.05$ 。

图 1 PLC 不同亚型 mRNA 在颗粒细胞与卵丘细胞中的表达情况

Note. ^a $P < 0.05$, vs other groups.

Figure 1 The mRNA expression levels of PLC isoforms in granulosa cells and cumulus cells

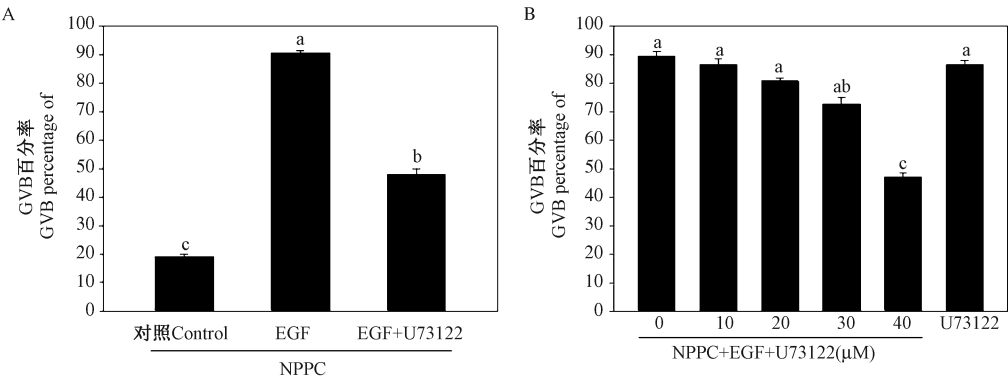
2.2 PLCγ1 抑制剂 U73122 抑制 EGF 诱导的卵母细胞减数分裂恢复

注射 PMSG 44~46 h 的小鼠卵泡颗粒细胞与卵丘细胞中 *Plcγ1* mRNA 的表达水平最高,因此 PLCγ1 可能主要参与了卵母细胞减数分裂恢复的过程。进一步研究发现添加 PLCγ1 特异的抑制剂 U73122 可显著抑制 EGF 诱导的卵母细胞减数分裂恢复($P < 0.05$) (图 2A),卵母细胞成熟率仅为 $(47.87 \pm 2.16)\%$,远低于对照组 $(90.53 \pm 0.86)\%$,且 U73122 的抑制效果呈剂量依赖性(图 2B),这些

结果表明 PLCγ1 在 EGF 诱导的卵母细胞减数分裂恢复中发挥重要作用。

2.3 PLCγ1 抑制剂 U73122 抑制 EGF 诱导的卵丘细胞内钙离子水平升高

卵丘细胞内钙离子水平的升高是 EGF 促进减数分裂恢复的关键^[4, 12],本研究提示 PLCγ1 参与了 EGF 诱导的卵母细胞减数分裂恢复,EGF 可能通过 PLCγ1 启动磷脂酰肌醇信号通路,使卵丘细胞内钙离子水平升高。因此,同时检测抑制 PLCγ1 对卵丘细胞内钙离子水平的影响。与之前的研究结果相



注:不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。

图 2 PLC γ 1 抑制剂 U73122 对 EGF 诱导的卵母细胞减数分裂恢复的影响

Note. Values not indicated by the same letter are significantly different ($P < 0.05$).

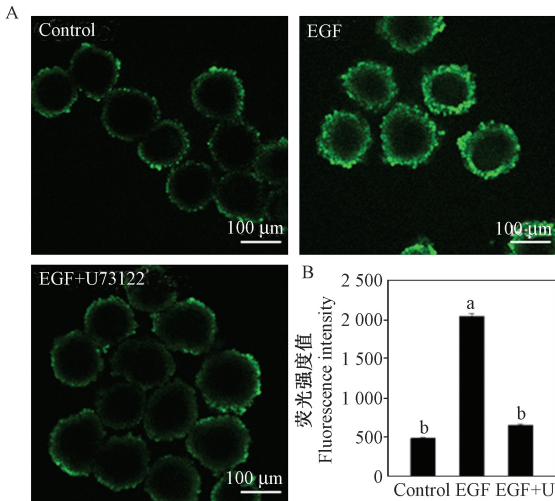
Figure 2 The effect of U73122 on EGF-induced meiotic resumption

同^[4],对照组卵丘细胞内钙离子荧光强度(绿色荧光)十分微弱(图 3A),添加 EGF 后显著增加了胞内钙离子荧光水平(图 3A),然而,PLC γ 1 的抑制剂 U73122 可明显逆转 EGF 介导的胞内钙离子水平增加($P < 0.05$)(图 3A),荧光强度同样也显著下降($P < 0.05$)(图 3B),这表明 EGF 确实通过 PLC γ 1 升高了卵丘细胞内的钙离子水平,抑制 PLC γ 1 的作用则导致胞内钙离子水平无法升高。

2.4 PLC γ 1 抑制剂 U73122 逆转 EGF 介导的胞内 cGMP 水平下降

卵丘细胞内钙离子水平升高可使 NPR2 失活, cGMP 水平下降,导致减数分裂恢复^[4]。cGMP 水平

的变化代表了 NPR2 鸟苷酸环化酶活性的变化,本研究检测了 U73122 对 COCs 内 cGMP 水平的影响。结果表明,对照组添加 NPPC 处理细胞,胞内 cGMP 水平上升,而 EGF 显著降低了胞内 cGMP 水平(图 4),与之前的报道一致^[1],添加 U73122 显著逆转 EGF 介导的胞内 cGMP 水平下降($P < 0.05$)(图 4),这说明 EGF 通过 PLC γ 1 升高了细胞内的钙离子水平,高水平的钙离子可降低 NPR2 活性,导致 cGMP 水平下降。

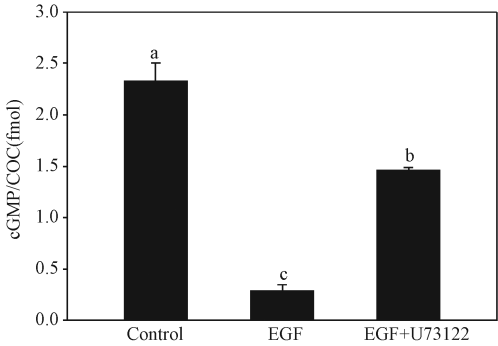


注:不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。

图 3 PLC γ 1 抑制剂 U73122 对卵丘细胞内钙离子水平的影响

Note. Values not indicated by the same letter are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 3 Effect of U73122 on EGF-mediated calcium elevation



注:不同字母表示有显著性差异($P < 0.05$)。

图 4 U73122 对 COCs 内 cGMP 水平的影响

Note. Values not indicated by the same letter are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 4 Effects of U73122 on cGMP levels in COCs

2.5 PLC γ 1 抑制剂 U73122 抑制 LH 诱导的卵母细胞减数分裂恢复

根据上述研究结果,本研究进一步采用卵泡培养模型模拟体内状态,研究 U73122 对 LH 诱导的减数分裂恢复的作用。结果显示,添加 LH 诱导了减数分裂的恢复,而 U73122 明显抑制 LH 诱导的减数分裂恢复($P < 0.05$)(图 5),卵母细胞的成熟率仅为(46.98 $\pm$ 1.43)%,LH 是通过激活卵丘细胞内的

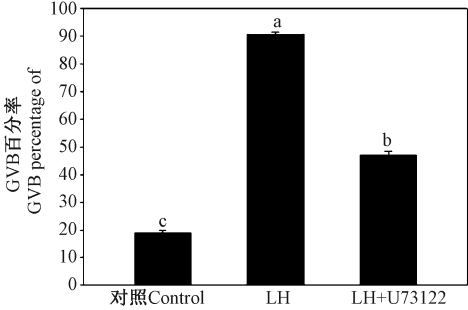
EGF 受体发挥作用的^[3], 因此, 这些结果说明 LH/EGFR 信号通过 PLC γ 1 升高卵丘细胞内的钙离子水平, 使 NPR2 失活, cGMP 水平下降, 最终导致卵母细胞恢复减数分裂。

2.6 IP₃R 不同亚型 mRNA 在颗粒细胞、卵丘细胞与卵母细胞中的表达情况

PLC γ 1 的下游分子 IP₃R, IP₃R 具有三种亚型 IP₃R1、IP₃R2 以及 IP₃R3, 其相应基因为 *Itpr1*、*Itpr2* 以及 *Itpr3*。本研究发现, 注射了 PMSG 44~46 h 的小鼠卵泡颗粒细胞、卵丘细胞与卵母细胞中, *Itpr1* mRNA 的表达水平均显著高于其它两种亚型 ($P < 0.05$) (图 6A、6B 和 6C), 提示三种亚型中 IP₃R1 发挥主要作用。

2.7 IP₃R1 在颗粒细胞、卵丘细胞与卵母细胞中的表达定位

Western blot 结果表明, IP₃R1 在颗粒细胞、卵丘细胞与卵母细胞中都有表达 (图 7A), 免疫组织化学的结果同样显示 IP₃R1 在三种细胞中均有表达 (图 7B), 这说明 IP₃R1 在 PLC γ 1 升高胞内钙离子水平的过程中发挥作用。

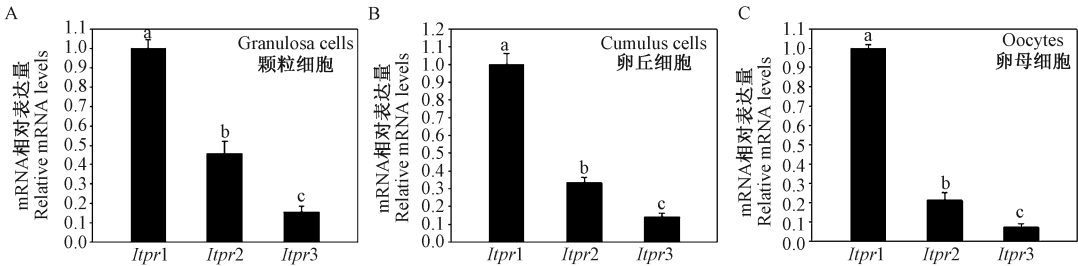


注: 不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 5 U73122 对 LH 诱导卵母细胞减数分裂恢复中的影响

Note. Values not indicated by the same letter are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 5 The effect of U73122 on LH-induced meiotic resumption

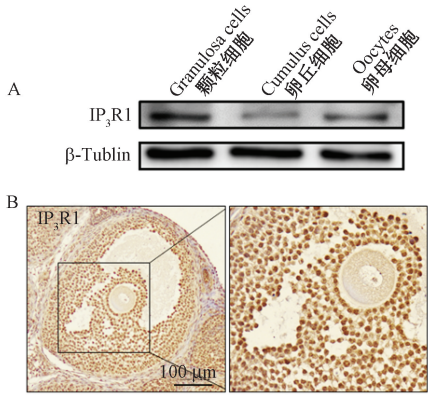


注: 不同字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 6 IP₃R 不同亚型 mRNA 在颗粒细胞、卵丘细胞与卵母细胞中的表达情况

Note. Values not indicated by the same letter are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 6 The mRNA expression levels of IP₃R isoforms in granulosa cells, cumulus cells and oocytes



注: A: IP₃R1 蛋白免疫印迹; B: IP₃R1 免疫组化。

图 7 IP₃R1 在颗粒细胞、卵丘细胞与卵母细胞中的表达情况

Note. A, Representative Western blots of IP₃R1.

B, Immunohistochemistry of IP₃R1.

Figure 7 The expression of IP3R1 protein in granulosa cells, cumulus cells and oocytes

3 讨论

卵泡壁层颗粒细胞表达的 NPPC, 可与卵丘细胞中的受体 NPR2 结合, 产生的 cGMP 是维持卵母细胞减数分裂阻滞的关键因子^[1], 前期研究表明, LH-EGFR 信号升高了卵丘细胞内的钙离子水平, 使 NPR2 与 NPPC 的亲合性下降, 导致 NPR2 失活, cGMP 水平下降, 最终诱导卵母细胞减数分裂的恢复^[4]。卵丘细胞内高水平的钙离子决定着减数分裂恢复的进程, 而胞内高浓度的钙离子是由内质网钙库动员导致的^[4]。本研究发现, LH/EGFR 信号通过 PLC γ 1 与 IP₃R1 升高了卵丘细胞内的钙离子水平, 导致 NPR2 失活与减数分裂恢复。

内源性的 PLC 是调控多种信号转导的关键分子, PLC 具有多种亚型, 其中, *Plc γ 1* mRNA 的表达水平在颗粒细胞与卵丘细胞中是多种亚型中最高的, 且远远高于其它亚型, PLC γ 1 特异的抑制剂

U73122 能够显著抑制 EGF 诱导的卵母细胞减数分裂恢复,新霉素(PLC 抑制剂)可抑制体外培养的牛和猪卵母细胞减数分裂的恢复^[13],这些结果说明 PLC 可能在这一过程中发挥作用。本研究进一步证明是 PLC γ 1 参与了减数分裂恢复的进程。EGFR 信号与 PLC γ 的活化相耦联^[14-15],而本研究表明 EGFR 信号通过 PLC γ 1 诱导减数分裂恢复,也间接证明了这一点。

前期的研究表明,EGF 诱导卵母细胞减数分裂恢复的核心是升高了卵丘细胞内的钙离子水平,使 NPR2 失活^[4, 12],而激活 PLC γ 1 即产生 IP₃,升高胞内钙离子水平。本研究发现 U73122 可以显著抑制胞内钙离子水平的增加,同时,U73122 也可以逆转 EGF 介导的胞内 cGMP 水平下降。结合前期研究结果,PLC 信号与钙离子信号以 EGFR 的胞内区为靶点^[16],本研究进一步阐明了激活 EGFR 通过 PLC γ 1/钙离子导致 NPR2 失活与减数分裂恢复。

LH 本质上是通过激活 EGFR 发挥作用的,本研究发现 U73122 显著抑制了 LH 诱导的卵母细胞减数分裂恢复,说明 PLC γ 1 在 LH/EGFR 信号诱导减数分裂恢复中发挥重要作用。有研究表明,PLC γ 1 在小鼠胚胎中广泛表达,敲除小鼠 PLC γ 1 后,小鼠胚胎发育受到损伤^[17],这可能是因为敲除 PLC γ 1 影响卵子的正常发育。

激活 PLC 产生的 IP₃ 是 IP₃R 钙库唯一的门控分子^[18-19],而 LH/EGFR 通过 PLC γ 1 导致的卵丘细胞内钙离子水平升高需要 IP₃R 钙库的作用,IP₃R 具有 3 种亚型,研究结果发现 *Itpr1* mRNA 的表达水平在三种亚型中最高,另外,免疫组化与 Western blot 均显示 IP₃R1 在颗粒细胞、卵丘细胞与卵母细胞中表达,IP₃R1 钙库被动员后释放钙离子,导致胞内钙离子水平升高,使 NPR2 失活,本研究发现 IP₃R1 在颗粒细胞中的表达丰度也比较高,可能是除了 NPR2 主要在卵丘细胞外,也表达于颗粒细胞^[20]。上述结果综合提示 PLC γ 1 通过 IP₃R1 升高卵丘细胞内钙离子水平,但 IP₃R1 究竟通过怎样的机制调控卵丘细胞内钙离子水平还需要进一步研究。

综上所述,本研究证实了 LH/EGFR 信号通过 PLC γ 1-IP₃R1 通路升高卵丘细胞内钙离子水平,使 NPR2 失活,cGMP 水平下降,诱导卵母细胞减数分裂恢复。

致谢 感谢中国农业大学生物学院张美佳教授提供实验场所,感谢张美佳教授在论文写作过程中给予的指导,感谢中国科学院动物研究所唐铁山教授赠予抗体。

参考文献:

- [1] Zhang M, Su YQ, Sugiura K, et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes [J]. *Science*, 2010, 330(6002): 366-369.
- [2] Wang Y, Hao X, Yang J, et al. CREB activity is required for luteinizing hormone-induced the expression of EGF-like factors [J]. *Mol Reprod Dev*, 2016, 83(12): 1116-1127.
- [3] Park JY, Su YQ, Ariga M, et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle [J]. *Science*, 2004, 303(5658): 682-684.
- [4] Hao X, Wang Y, Kong N, et al. Epidermal growth factor-mobilized intracellular calcium of cumulus cells decreases natriuretic peptide receptor 2 affinity for natriuretic peptide type C and induces oocyte meiotic resumption in the mouse [J]. *Biol Reprod*, 2016, 95(2): 45.
- [5] Nakamura Y, Fukami K. Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C [J]. *J Biochem*, 2017, 161(4): 315-321.
- [6] Wee P, Shi H, Jiang J, et al. EGF stimulates the activation of EGF receptors and the selective activation of major signaling pathways during mitosis [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(3): 638-651.
- [7] Choi JH, Park JB, Bae SS, et al. Phospholipase C-gamma1 is a guanine nucleotide exchange factor for dynamin-1 and enhances dynamin-1-dependent epidermal growth factor receptor endocytosis [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(17): 3785-3795.
- [8] Chou J, Burke NA, Iwabu A, et al. Directional motility induced by epidermal growth factor requires Cdc42 [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 287(1): 47-56.
- [9] Prole DL, Taylor CW. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and their protein partners as signalling hubs [J]. *J Physiol*, 2016, 594(11): 2849-2866.
- [10] Mak DO, Foskett JK. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the endoplasmic reticulum: A single-channel point of view [J]. *Cell Calcium*, 2015, 58(1): 67-78.
- [11] Kerkhofs M, Seitaj B, Ivanova H, et al. Pathophysiological consequences of isoform-specific IP3 receptor mutations [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(11): 1707-1717.
- [12] Wang Y, Kong N, Li N, et al. Epidermal growth factor receptor signaling-dependent calcium elevation in cumulus cells is required for NPR2 inhibition and meiotic resumption in mouse oocytes [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(9): 3401-3409.
- [13] Homa ST. Neomycin, an inhibitor of phosphoinositide hydrolysis, inhibits the resumption of bovine oocyte spontaneous meiotic maturation [J]. *J Exp Zool*, 1991, 258(1): 95-103.