

超表达线粒体融合蛋白2基因(*Mfn2*)抑制小鼠卵母细胞体外成熟

陈西锐 李建 李科瑛 许晓磊 雷安民*

西北农林科技大学 动物医学院/陕西省干细胞工程技术研究中心/陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

*通讯作者, anminleiryan@nwsuaf.edu.cn

摘要 线粒体融合蛋白2基因(mitofusin2, *Mfn2*)参与细胞凋亡和细胞周期调控,在卵母细胞和胎盘发育中起着重要作用。本研究旨在探讨 *Mfn2* 基因对小鼠(*Mus musculus*)卵母细胞体外成熟过程的影响。从小鼠卵巢中克隆 *Mfn2* 基因并构建 p*Mfn2*-Venus 真核表达载体。经脂质体2000介导重组质粒 p*Mfn2*-Venus 转染 293T 细胞(病毒包装细胞),确认重组质粒在 293T 细胞内的表达及定位。将 p*Mfn2*-Venus 体外转录为 cRNA,并注射入小鼠卵细胞中,进行体外成熟培养,并统计卵母细胞生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)发生率以及第一极体(first polar body, PB1)排出率,荧光显微镜下观察其表达及定位。结果显示,注射了 *Mfn2*-Venus cRNA 的卵母细胞,其 GVBD 发生率以及 PB1 排出率与对照组相比显著降低($P < 0.0001$, $P < 0.05$)。本研究首次揭示了 *Mfn2* 基因对小鼠卵母细胞体外成熟过程的影响,为卵母细胞体外成熟的研究提供了一个新方向,同时也为研究减数分裂过程中 *Mfn2* 基因提供了一个平台。

关键词 小鼠卵母细胞,线粒体融合蛋白2基因(*Mfn2*),体外转录,显微注射

Over-expression of Mitofusin 2 Gene(*Mfn2*) Has Effect on Mouse(*Mus musculus*) Oocytes *In vitro* Maturation

CHEN Xi-Rui LI Jian LI Ke-Ying XU Xiao-Lei LEI An-Min*

College of Veterinary Medicine, Shaanxi Stem Cell Engineering and Technology Research Center, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China

* Corresponding author, anminleiryan@nwsuaf.edu.cn

Abstract Mitofusin 2(*Mfn2*) participates in apoptosis and cell cycle regulation, which also has an important role in oocyte and embryo development. In order to determine *Mfn2* gene effect on mouse(*Mus musculus*) oocytes during *in vitro* maturation(IVM) in the present study, firstly, the *Mfn2* gene was cloned from mouse ovary by RT-PCR, and an eukaryotic expression vector p*Mfn2*-Venus was constructed. p*Mfn2*-Venus was transfected into 293T cells(virus package cell) after mediation by Lipofectamine 2000, identified by fluorescence microscopy observation and Real-time PCR. Then, the cRNA of *Mfn2*-Venus transcribed *in vitro* was microinjected into mouse oocytes, and the expression and location was observed under fluorescence microscopy. Finally, the oocytes which were injected *Mfn2*-Venus cRNA were collected for mature cultivation and the rate of germinal vesicle break down(GVBD) and first polarbody(PB1) were calculated, respectively. The results showed that the recombinant vector p*Mfn2*-Venus was successfully constructed. After transfection or microinjection, the fusion protein could express efficiently and localize accurately both in 293T cells and mouse oocytes. This greatly facilitated the further study of *Mfn2*, especially its role on oocytes maturation and early embryo development. The rate of GVBD and PB1 were reduced significantly($P < 0.0001$, $P < 0.05$)

compared with the that of control group. In conclusion, these data demonstrated that *Mfn2* gene had effect on mouse oocytes maturation, it provides a new direction in the research of *in vitro* maturation of oocytes and a platform for the study of the *Mfn2* gene in the process of meiosis.

Keywords Mouse oocyte, Mitofusin 2 gene(*Mfn2*), Transcription *in vitro*, Microinjection

线粒体融合蛋白2(mitofusin2, *Mfn2*), 即细胞增殖抑制基因(hyperplasia suppressor gene, *HSG*), 首次发现于1997年, 是中国学者陈光慧利用差异显示技术得到的一个与高血压相关的新基因(陈光慧等, 1997)。有研究表明, *Mfn2*能够以多种途径抑制细胞增殖并阻遏细胞周期, *Mfn2*通过抑制细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)/有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导途径, 使细胞周期停滞在G₀/G₁期(Chen et al., 2004; Wang et al., 2012); 也有报道显示, *Mfn2*过表达引起细胞周期蛋白E及其形成的细胞周期蛋白E-CDK2复合物表达下调, 从而使细胞周期停滞在G₀/G₁期, 达到抑制细胞增殖的作用(Miele et al., 2005)。*Mfn2*还可明显调控细胞凋亡, 几乎在所有的凋亡细胞中, *Mfn2*与抗凋亡基因B细胞淋巴瘤基因-2(B cell lymphoma 2, *Bcl-2*)和促凋亡基因*Bcl-2*相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)共定位, 有研究称*Mfn2*基因通过Bax信号通路促进细胞凋亡(Wang et al., 2012), 反之Bax和Bcl-2对抗物(Bcl-2killer, Bak)也能使*Mfn2*复合物的形成及定位发生改变(Karbowksi et al., 2006)。*Mfn2*基因促进细胞凋亡的分子机制是抑制原癌基因(*Ras*)信号途径的活化, 主要分子作用靶点可能是Ras-磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinaseB, PKB/Akt)信号通路(Guo et al., 2007)。*Mfn2*具有抗增殖作用, 并且参与细胞凋亡, 但在卵母细胞和胚胎中是否有类似作用目前还不清楚。

Santel和Fuller(2001)发现, *Mfn2*还具有调节线粒体融合的功能, 与线粒体融合素1(mitofusin 1, *Mfn1*)类似, 故又命名为*Mfn2*。此外, 有研究表明, 利用维生素K3复制子宫颈癌Hela细胞损伤模型, 在损伤的Hela细胞模型中, *Mfn2*表达降低, 推测*Mfn2*表达降低或许是促使氧化应激加重的重要因素(于春燕等, 2009)。氧化应激时, 细胞内氧化活性物质(reactive oxygen species, ROS)增多, ROS聚集所诱导的巨型线粒体的产生可能由线粒体融

合加剧所致。*Mfn2*还与II型糖尿病的发生有关, 在离体和在体模型研究中发现, 葡萄糖氧化能力随着*Mfn2*表达水平改变而变化(Bach et al., 2005)。此外, 人类基因学研究发现, 线粒体融合对神经元功能有很重要的作用, 腓骨肌萎缩症(charcot-marie-tooth disease type 2A, CMT2A)是一种外周神经性疾病, 主要损害运动神经元和感觉神经元, *Mfn2*基因的突变会引起CMT2A的发生(Zuchner et al., 2004)。

*Mfn2*作为线粒体和内质网之间的连接桥梁, 调节线粒体摄取Ca²⁺的能力。在*Mfn2*缺失的小鼠(*Mus musculus*)胚胎成纤维细胞中发现, 内质网Ca²⁺浓度显著升高。当肌醇三磷酸(inositol triphosphate, IP3)触发Ca²⁺从内质网释放, 在*Mfn2*缺失的线粒体中, 其摄取Ca²⁺的能力显著降低(Merkwirth, Langer, 2008; de Brito, Scorrano, 2008)。线粒体是细胞内形成ATP的主要场所, 卵母细胞以及早期胚胎发育中所需的能量大部分来源于线粒体。在哺乳动物卵母细胞成熟过程中, 线粒体的分布发生着显著的变化, 这种线粒体的重新分布对卵母细胞质量有非常重要的影响。在小鼠和人卵母细胞成熟过程中发现, 线粒体的平均直径明显增加(van Blerkom, 2011), 这会很自然地联想到线粒体融合。*Mfn2*定位于线粒体的外膜, 参与线粒体的融合, 调节线粒体的新陈代谢和维持线粒体的数量、形态稳定。在卵母细胞和早期胚胎中, *Mfn2*在胞质中以与β微管蛋白共结合的方式参与细胞骨架的构成及相关功能的调节(Jiang et al., 2005)。另外, 有研究显示, 超表达*Mfn2*能够增加早期胚胎致死率(Chen et al., 2003)。

基于以上研究, 推测*Mfn2*在卵母细胞减数分裂过程中可能具有重要的调控作用。本研究通过RT-PCR、酶切、连接等手段构建了真核表达载体p*Mfn2*-Venus, 并体外转录为cRNA, 显微注射入小鼠卵母细胞中, 统计卵母细胞生发泡破裂(germinalvesiclebreakdown, GVBD)发生率以及第一极体(first polarbody, PB1)排出率。结果发现, 卵母细胞GVBD发生率以及PB1排出率与对照组相比显著

降低。这说明 *Mfn2* 基因影响小鼠卵母细胞体外成熟, 抑制了小鼠卵母细胞体外成熟进程, 这为今后研究 *Mfn2* 基因在减数分裂中的作用打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8 周龄 ICR(Institute of Cancer Research) 雌鼠 (*Mus musculus*) 由西安交通大学实验动物中心提供。真核表达载体 pVenus(在 pcDNA3.1 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点之间插入荧光蛋白 Venus)、293T 细胞(病毒包装细胞)由西北农林科技大学陕西省干细胞工程技术研究中心提供。*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Hind* III、*Nhe* I、*Xba* I、*Not* I 和定量 PCR 体系购自日本 Takara 公司。*T₄* 连接酶、逆转录试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 DH5 α 、高纯度质粒小提中量试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒由北京天根生化科技公司提供。Trans2KTMPlus DNA marker 由北京全式金生物技术有限公司提供。脂质体 2000、cDNA 合成试剂盒、Opti-MEM I、DMEM 培养基、Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司。mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra 体外转录试剂盒购自美国 Ambion 公司。Hoechst 33342、M2 培养基、矿物油购自美国 Sigma 公司。线粒体融合蛋白 2(*Mfn2*) 抗体购自美国 proteintech 公司, 异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记山羊抗兔 IgG 二抗、免疫荧光染色固定液、免疫荧光染色封闭液由碧云天生物技术研究所提供。反应引物合成和 DNA 测序依托上海生工生物工程技术有限公司。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequence	扩增长度/bp Length	Tm/°C	用途 Purpose
Mfn2-F	ATAGCTAGCGTCCACGATGCCCAACCT	2300	55	<i>Mfn2</i> 扩增
Mfn2-R	TAGAAGCTTGCCCTGGCTGCCCAATAT			<i>Mfn2</i> amplification
qMfn2-F	GTCCAAGGTCAGGGGTATCA	417	58	RT-PCR
qMfn2-R	ATCAGCATCCAGGCAAACCT			
Gapdh-F	TGGCCTTCCGTGTTCCCTAC	178	58	
Gapdh-R	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA			

粗体分别表示 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点

Bolds represent *Nhe* I and *Hind* III site, respectively

1.2 方法

1.2.1 *Mfn2* 基因的扩增及真核载体的构建

根据 GenBank 中小鼠 *Mfn2* CDS 序列(NM_133201.2)和真核表达载体 pVenus 的多克隆位点序列设计引物 Mfn2-F 和 Mfn2-R(表 1), 扩增 *Mfn2* 基因全长, 扩增产物 2 300 bp(粗体分别表示 *Nhe* I 和 *Hind* III 酶切位点。利用 Trizol 提取小鼠卵巢总 RNA, 去除基因组 DNA(DNase I), 反转录合成 cDNA。PCR 反应体系(25 μ L): 引物终浓度 0.2 μ mol/L; cDNA 模板 \leq 100 ng; *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L。PCR 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2.5 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。*Mfn2* 基因 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和试剂盒回收纯化后, 与表达载体 pVenus 分别进行 *Hind* III/*Nhe* I 双酶切并连接, 然后转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单菌落, 然后 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜; 培养物用以提取质粒 DNA 后, 进行限制性酶切鉴定, 经鉴定正确后由上海生物工程公司测序, 通过与 NCBI 数据库中序列进行比对分析, 将测序正确的质粒用于后续实验。

1.2.2 p*Mfn2*-Venus 转染 293T 细胞

用胰蛋白酶消化生长状态良好的 293T 细胞后制成单细胞悬液, 调整细胞数量, 接种至 24 孔培养板内, 用含 10% 胎牛血清的高糖改良杜氏伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养。第 2 天, 细胞融合率为 70%~80% 时, 用无血清培养液进行饥饿培养, 按照 Lipofectamine 2000 转染说明书, 分成 p*Mfn2*-Venus 和 pVenus 转染组及未转染组分别进行瞬时转

染, 5 h 后, 换成高糖 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)进行常规培养, 24 h 后, 用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤细胞, 用荧光倒置显微镜(AMG EVOS f1, 美国)观察基因表达和细胞定位情况(赵贵民等, 2011)。

1.2.3 Real-time PCR 鉴定 p*Mfn2*-Venus 在 293T 细胞中的表达

转染 24 h 后, 分别提取各实验组总 RNA, 去除基因组 DNA 污染后, 反转录获得 cDNA, 用此 cDNA 为模板, 内参基因为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*) (表 1), 重复 3 次。荧光定量 PCR 反应体系 25 μ L: 引物终浓度 0.4 μ mol/L; cDNA 模板 \leq 100 ng; SYBR Premix Ex *Taq* DNA 聚合酶 2 \times 浓度。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环; 70 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 70~95 $^{\circ}$ C 融解曲线 20 s。

1.2.4 体外转录及 cRNA 显微注射卵母细胞

空载质粒 pVenus 和重组质粒 p*Mfn2*-Venus 分别用内切酶 *Xba* I 和 *Not* I 进行单酶切, 线性化后, 根据 mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra 体外转录试剂盒转录 *Mfn2*-Venus cRNA, 通过加帽、加尾和 RNA 纯化得到体外转录的 cRNA, 将纯化后的 cRNA 溶解于 Nuclease-free water 中, 调整其浓度为 0.06 μ mol/L, 用于显微注射生发泡(germinal vesicle, GV)期卵母细胞。分别为 Venus 注射组和 *Mfn2*-Venus 注射组, 注射后的卵母细胞移入成熟培养液 M2 中继续培养, 14 h 后用 16 μ mol/L Hoechst 33342 处理, 室温 5 min 后, 用荧光显微镜鉴定其表达及细胞定位。

1.2.5 Real-time PCR 鉴定 p*Mfn2*-Venus 在卵母细胞中的表达

显微注射后的卵母细胞在成熟培养液中培养数小时后, 分别取同一时期的 *Mfn2*-Venus 注射组、Venus 注射组和未注射组卵母细胞各 10 枚, 利用 SuperScript[™] III CellsDirect cDNA Synthesis System 合成 cDNA, 荧光定量 PCR 检测不同组中 *Mfn2* 的 mRNA 水平。荧光定量 PCR 反应体系和反应程序同 1.2.3。

1.2.6 超表达 *Mfn2* 对小鼠卵母细胞体外成熟的影响

将分别显微注射 *Mfn2*-Venus cRNA、Venus cRNA 的卵母细胞移入成熟液 M2 中继续培养, 在培养 4 h 后统计各组中发生生发泡破裂(germinal

vesicle breakdown, GVBD) 的卵母细胞数量; 在成熟培养 14 h 后统计各组中排出第一极体(first polar body, PB1) 的卵母细胞数量。

1.2.7 数据分析

实验数据使用 Graphpad Prism 5.0 进行方差分析, * $P < 0.05$ 为显著, *** $P < 0.0001$ 为极其显著。

2 结果与分析

2.1 小鼠 p*Mfn2*-Venus 真核表达载体的构建

2.1.1 *Mfn2* 基因扩增

从小鼠卵巢组织中提取总 RNA, 反转录合成 cDNA, 以此 cDNA 为模板, 扩增小鼠 *Mfn2* 基因 CDS 区全长序列, 结果见图 1, 在 2 300 bp 处有明显的目的条带, 与预期大小一致。

2.1.2 p*Mfn2*-Venus 重组质粒双酶切鉴定

分别用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Hind* III 对重组质粒 p*Mfn2*-Venus 进行双酶切鉴定, 鉴定结果见图 2(图中所示为 3 个平行样品), 双酶切获得 2 300 和 6 618 bp 的两条带, 前者为 *Mfn2* 基因的目的片段, 后者为 pVenus 空载体的目的片段。双酶切结果与预期一致。

2.2 p*Mfn2*-Venus 在 293T 细胞中的表达、定位

p*Mfn2*-Venus 转染 293T 细胞后荧光蛋白表达情况见图 3(pVenus 为空载体对照组), 对照组中绿色荧光分布在整个细胞中; p*Mfn2*-Venus 转染的实验组中, 绿色荧光分布在细胞质中, 这与线粒体的分布一致, *Mfn2* 定位于线粒体外膜, 所以此转染组中重组质粒准确定位。

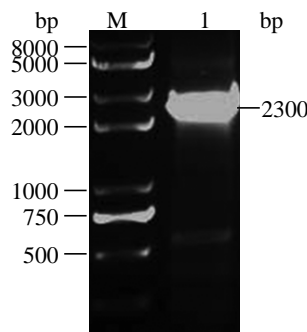


图 1 小鼠 *Mfn2* 基因 PCR 产物

Figure 1 PCR product of *Mfn2* gene in mouse

M: DNA 相对分子质量标准; 1: *Mfn2* 基因 PCR 产物

M: DNA marker; 1: PCR product of *Mfn2* gene

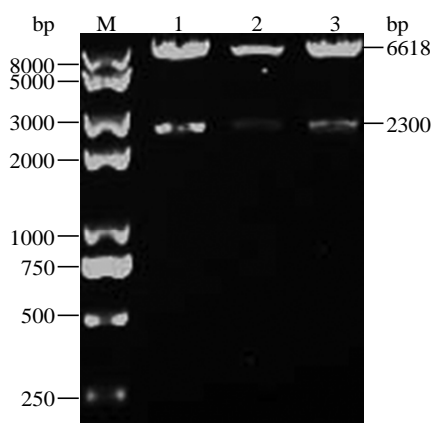


图2 p*Mfn2*-Venus 酶切鉴定

Figure 2 Identification by endonucleases analysis of p*Mfn2*-Venus

M: DNA 相对分子质量标准; 1~3: *Nhe* I / *Hind* III 双酶切产物

M: DNA marker; 1~3: Digestion product by *Nhe* I / *Hind* III

2.3 Real-time PCR 鉴定重组质粒 p*Mfn2*-Venus 的表达

分别提取转染 24 h 后 p*Mfn2*-Venus 转染组、pVenus 转染组和未转染组细胞的总 RNA, 反转录成 cDNA, 以此 cDNA 为模板, 进行荧光定量 PCR 检测各组中 *Mfn2* mRNA 的表达量, 结果见图 4, p*Mfn2*-Venus 转染组与空白对照组相比, *Mfn2* mRNA 水平极其显著升高 ($P < 0.0001$)。

2.4 融合蛋白在 GV 期卵母细胞中的表达和定位

注射 Venus cRNA 和 *Mfn2*-Venus cRNA 后的

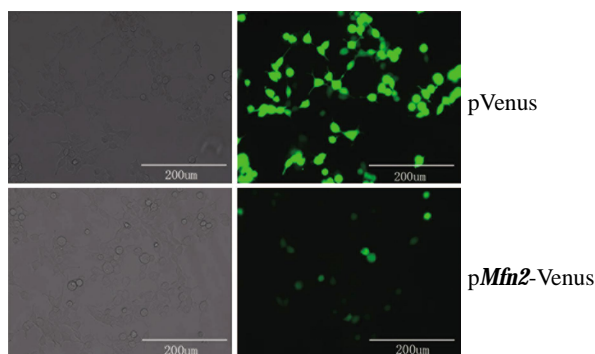


图3 p*Mfn2*-Venus 和 pVenus 转染 293T 细胞的荧光表达

Figure 3 Expression of fluorescent protein in p*Mfn2*-Venus and pVenus transfected cells

左边为明场图片; 右边为荧光图片; p*Mfn2*-Venus 为细胞质定位

Left was bright field images and the right was fluorescent images; p*Mfn2*-Venus located in the cytoplasm

GV 期卵母细胞培养 14 h 后, 荧光显微镜下观察其表达及定位情况, 如图 5 所示, 注射 Venus 的对照组中, 绿色荧光分布于整个细胞中; 注射 *Mfn2*-Venus 组中, 绿色荧光广泛分布于细胞质中。

2.5 Real-time PCR 鉴定 *Mfn2* 在卵母细胞中的表达

分别取注射 6 h 后发生 GVBD 的 *Mfn2*-Venus 注射组、Venus 注射组和未注射组卵母细胞各 10 枚, 合成 cDNA, 以此 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR, 结果见图 6, *Mfn2*-Venus 注射组与对照组相比 *Mfn2*

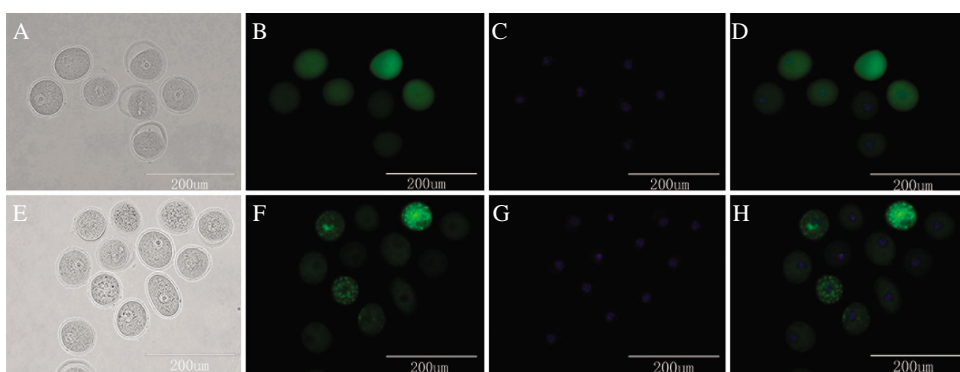


图5 *Mfn2*-Venus 融合蛋白在卵母细胞中的荧光定位

Figure 5 Location of *Mfn2*-Venus fusion protein in oocyte

A~D: Venus cRNA 注射组, 绿色荧光分布于整个细胞中; E~H: *Mfn2*-Venus cRNA 注射组, 绿色荧光广泛分布于细胞质中; C 和 G: DNA (蓝色); A 和 E: 明场图片; B、C、F 和 G: 荧光图片; D 和 H: 合并图

A~D: Venus cRNA injected cells, green fluorescence distributed throughout the cell; E~H: *Mfn2*-Venus cRNA injected cells, green fluorescence distributed widely in the cytoplasm; C and G: DNA (blue); A and E: Bright field images; B, C, F and G: Fluorescent images; D and H: Merged images

表2 超表达 *Mfn2* 对小鼠卵母细胞体外成熟的影响Table 2 Effect of *Mfn2* gene on *in vitro* maturation of mouse oocytes

组别 Groups	注射卵母细胞数 Number of oocytes injected	GVBD/%	PB1/%
Venus cRNA	244	63.30±7.74(158)	32.39±6.21(77)
<i>Mfn2</i> -Venus cRNA	378	49.17±5.27(186)***	20.51±5.51(71)*

GVBD: 卵母细胞生发泡破裂; PB1: 第一极体; *: 差异显著 ($P < 0.05$); ***: 差异极其显著 ($P < 0.0001$); $n \geq 3$; 下同

GVBD: Germinal vesicle breakdown; PB1: First polar body; *: Significant difference ($P < 0.05$); ***: Extremely significant difference ($P < 0.0001$); $n \geq 3$; The same below

mRNA 水平极其显著升高 ($P < 0.0001$)。

2.6 超表达 *Mfn2* 对小鼠卵母细胞体外成熟的影响

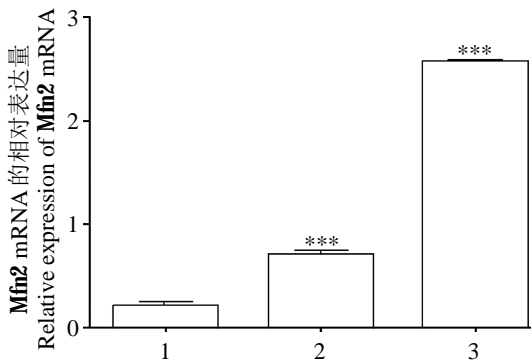
表2中各组细胞分别根据显微注射 *Mfn2*-Venus cRNA、Venus cRNA 4 h 后发生 GVBD 的卵母细胞数量计算 GVBD 发生率 (GVBD%), 以及 14 h 后排出 PB1 的卵母细胞数计算第一极体排出率 (PB1%)。从表2可看出, 注射 *Mfn2*-Venus cRNA 的卵母细胞与注射 Venus cRNA 的卵母细胞相比, GVBD 发生率极其显著降低 ($P < 0.0001$), 同时 PB1 排出率也显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

卵母细胞的成熟包括细胞核成熟和细胞质成熟, 而胞质中的线粒体为卵母细胞的发育提供能量, 在卵母细胞成熟、受精过程中起着关键性作用。卵母细胞生发泡的发育以及极体的排出都需要大量的

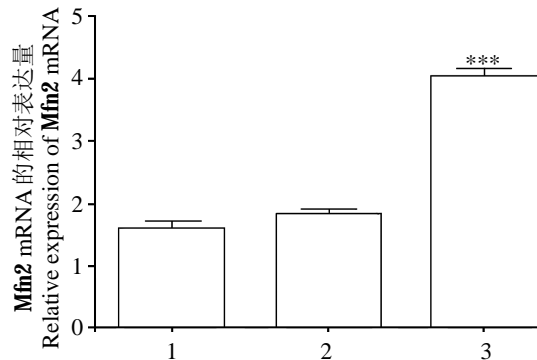
能量。*Mfn2* 参与线粒体融合, 与线粒体形态、结构和功能有着密切关系。此外, *Mfn2* 还可以增加线粒体的活动性, *Mfn2* 基因剔除的小鼠线粒体融合效率降低, 线粒体片段化, 进而导致线粒体移动能力减弱, 同时线粒体形态也有明显的改变 (Chen et al., 2003)。有研究显示, *Mfn2* 在不同时期卵母细胞中均有表达, 在 GV 期卵母细胞主要分布在胞质中, 其他时期主要呈质膜下分布, 在第二次减数分裂中期 (meiosis II, M II) 卵中, 除了在质膜下存在外, 在纺锤体和染色体部位也有分布 (Jiang et al., 2005)。在卵母细胞成熟分裂过程中, *Mfn2* 基因和蛋白质表达活性逐渐增加 (Jiang et al., 2005), 说明 *Mfn2* 在卵母细胞成熟分裂过程中担任重要的角色。

本研究结果表明, 超表达 *Mfn2* 基因使小鼠卵母细胞 GVBD 发生率和 PB1 排出率明显降低, 抑制了卵母细胞的体外成熟发育。结合前人对于 *Mfn2* 的研究, 推测超表达 *Mfn2* 影响 GVBD 发生率和极

图4 转染细胞中 *Mfn2* mRNA 的表达Figure 4 Expression of *Mfn2* mRNA in transfected cells

1: 未转染组(对照); 2: 空载体 pVenus 转染组; 3: 重组质粒 p*Mfn2*-Venus 转染组; 内参基因: *Gapdh*; 下同

1: No injection group(control); 2: pVenus transfection group; 3: p*Mfn2*-Venus transfection group; Reference gene: *Gapdh*; The same below

图6 显微注射卵母细胞中 *Mfn2* mRNA 的表达Figure 6 Expression of *Mfn2* mRNA in the microinjected oocytes

1: 未注射组(对照); 2: Venus cRNA 注射组; 3: *Mfn2*-Venus cRNA 注射组

1: No injection group(control); 2: Venus cRNA injection group; 3: *Mfn2*-Venus cRNA injection group

体排出率的原因有两个:一方面是 *Mfn2* 通过影响线粒体的代谢,导致线粒体在卵母细胞成熟发育过程中供能不足,进而影响卵母细胞成熟发育过程;另一方面是 *Mfn2* 与卵母细胞减数分裂过程中某些调控细胞周期的蛋白及因子有关,从而参与减数分裂周期的调控,影响卵母细胞成熟发育。

4 结论

本研究构建了真核表达载体 *pMfn2-Venus*, 其能够在人的体细胞中表达(293T 细胞), 其融合蛋白 *Mfn2-Venus* 在卵母细胞胞质中呈颗粒状分布, 与线粒体的定位一致, 表明融合蛋白实现了精确定位。真核表达载体 *pMfn2-Venus* 表达的融合蛋白带有绿色荧光, 是一种追踪观察 *Mfn2* 表达情况及位置变化的有效工具, 对研究 *Mfn2* 在卵母细胞中的调控规律提供了线索。目前, *Mfn2* 在卵母细胞成熟发育过程中的作用未见报道, 本研究首次探讨了 *Mfn2* 对于小鼠卵母细胞体外成熟 GVBD 发生率以及 PB1 排出率的影响, *Mfn2* 可能作为重要的调控分子参与卵母细胞减数分裂过程, 为研究卵母细胞成熟发育机制提供了一个新观点。

参考文献

陈光慧, 张晨晖, 朱燕青, 等. 1997. 一个新的高血压病相关基因的克隆和表达[J]. 中华医学杂志, 77(11): 823-828. (Chen G H, Zhang C H, Zhu Y Q. 1997. Cloning and expression of a novel gene related to hypertension[J]. National Medical Journal of China, 77(11): 823-828.)

于春艳, 李洪岩, 康劲松, 等. 2009. 线粒体分裂融合基因在氧化应激诱导宫颈癌 Hela 细胞损伤中的作用[J]. 中国妇幼保健, (33): 4723-4725. Yu C Y, Li H Y, Kang J S, et al. 2009. Effect of mitochondria l fusion and fission genes on cervical carcinoma Hela cells injury induced by oxidative stress[J]. China' Maternity and Child Care, (33): 4723-4725.)

赵贵民, 杨文琳, 吴苏君, 等. 2011. *p21* 基因在牛卵成熟中的表达检测及其真核表达载体构建[J]. 畜牧兽医学报, 42(8): 1071-1080. (Zhao G M, Yang W L, Wu S J, et al. 2011. Detection for *p21* gene expression in bovine oocytes maturation and construction of eukaryotic expression vector *pVenus-p21*[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary, 42(8): 1071-1080.)

Bach D, Naon D, Pich S, et al. 2005. Expression of *Mfn2*, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: Effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6[J]. Diabetes, 54: 2685-2693.

Chen H, Detmer S A, Ewald, et al. 2003. Mitofusins *Mfn1* and *Mfn2* coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development[J]. Journal of Cell Biology, 160: 189-200.

Chen K H, Guo X, Ma D, et al. 2004. Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders[J]. Nature Cell Biology, 6: 872-883.

de Brito O M, Scorrano L. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria[J]. Nature, 456: 605-610.

Guo X, Chen K H, Guo Y, et al. 2007. Mitofusin 2 triggers vascular smooth muscle cell apoptosis via mitochondrial death pathway[J]. Circulation Research, 101(11): 1113-1122.

Jiang G J, Pan L, Huang X Y, et al. 2005. Expression of HSG is essential for mouse blastocyst formation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 335: 351-355.

Karbowski M, Norris K L, Cleland M M, et al. 2006. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis[J]. Nature, 443: 658-662.

Merkwirth C, Langer T. 2008. Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria[J]. Cell, 135: 1165-1167.

Miele A, Braastad C D, Holmes W F, et al. 2005. HiNF-P directly links the cyclin E/CDK2/p220NPAT pathway to histone H4 gene regulation at the G1/S phase cell cycle transition[J]. Molecular Cellular Biology, 25: 6140-6153.

Santel A, Fuller M T. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin[J]. Journal of Cell Science, 114: 867-874.

Van Blerkom J. 2011. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence[J]. Mitochondrion, 11: 797-813.

Wang W, Lu J, Zhu F, et al. 2012. Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via Bax signaling in hepatocellular carcinoma cells[J]. Medical Oncology, 29: 70-76.

Zuchner S, Mersiyanova I V, Muglia M, et al. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A[J]. Nature Genetics, 36: 449-451.