

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 在 小鼠卵母细胞成熟过程中的表达及作用

杨彩荣 魏延昌 张 岩 郑可佳 李 宁 严云勤*

(东北农业大学动物细胞与发育生物学教研室, 哈尔滨 150030)

摘要 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种 Ser/Thr 激酶, 属于 PIKK 超家族, 对调节细胞周期、蛋白质合成等具有重要作用, 是细胞生长、增殖、分化、凋亡的中心调控器, 但在哺乳动物卵母细胞中的研究还未见报道。以小鼠卵母细胞为研究对象, 采用免疫荧光为主要研究方法, 对 mTOR 在小鼠卵母细胞中的表达进行研究, 并通过 mTOR 的特异性抑制剂雷帕霉素(rapamycin, RAPA)对卵母细胞进行处理, 对 mTOR 在卵母细胞成熟过程中的作用进行研究。结果显示: 小鼠卵母细胞成熟过程中, 生发泡(germinal vesicle, GV)期 mTOR 主要集中在核膜处表达, 生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)后 mTOR 伴随染色体分布, 第二次减数分裂中期(second metaphase, M II 期) mTOR 伴随纺锤体分布; 雷帕霉素处理后, 小鼠卵母细胞的成熟受到抑制, 且这种抑制作用具有浓度依赖性, 同时其 mTOR 的表达部位和形态也发生变化。研究表明, 在小鼠卵母细胞成熟过程中, mTOR 在各个时期的表达及分布具有阶段特异性, 并对小鼠卵母细胞 GVBD 的发生和第一极体的排放都具有重要作用。

关键词 雷帕霉素靶蛋白(mTOR), 小鼠卵母细胞, 雷帕霉素, 免疫荧光

学科分类号 Q2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00446

雷帕霉素靶蛋白(mTOR)结构与功能上高度保守, 是一种存在于哺乳动物细胞中的 Ser/Thr 激酶, 属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶(phosphatidylinositol kinase-related kinase, PIKK)家族成员。mTOR 信号通路可以汇聚和整合来自于营养、生长因子、能量和环境胁迫对细胞的刺激信号^[1~3], 通过其下游的靶蛋白核糖体蛋白 S6 激酶 1 (ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1)和蛋白质翻译起始因子 eIF4E 结合蛋白 1(eIF4E binding protein 1, 4EBP1)调控蛋白质的翻译, 加快细胞 G1 期/S 期的转换, 促进细胞生长和增殖, 抑制细胞凋亡^[4~6]。mTOR 信号通路紊乱与肿瘤的形成及细胞的恶性转化密切相关^[7]。

雷帕霉素(rapamycin, RAPA, RPM)是一种大环内酯类抗生素和免疫抑制剂, 它进入体内后与胞浆受体 FKBP12 结合形成复合物, 此复合物能够结合在 mTOR 蛋白羧基端的 FRB 结构域内, 形成三元复合物, 使得 mTOR 的激酶催化域失去接近并磷酸化下游靶蛋白的能力, 从而抑制 mTOR 的生物学功能^[8~10]。

mTOR 在卵母细胞成熟和早期胚胎发育中的研究较少, 且大多集中在海星、海胆等动物中^[11, 12],

而在哺乳动物卵母细胞中的研究还未见报道。以往的研究表明, mTOR 与一些蛋白质的合成有关^[13], 而特定蛋白质的合成对卵母细胞成熟具有重要的作用, 因此我们推测, mTOR 可能在哺乳动物卵母细胞成熟过程中有重要作用。所以本研究以小鼠卵母细胞为研究对象, 观察了 mTOR 在卵母细胞成熟各个阶段的表达及分布情况, 同时通过雷帕霉素的处理观察 mTOR 对卵母细胞成熟的重要作用, 为进一步探索 mTOR 在小鼠卵母细胞成熟过程中的分子机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验选用昆明白品系 6~8 周龄性成熟雌鼠, 购自哈尔滨肿瘤医院实验动物中心。

1.2 主要试剂

α -MEM 购自 Gibco 公司; 雷帕霉素购自江苏碧云天生物技术有限公司; 孕马血清(pregnant mare

* 通讯联系人。

Tel: 0451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com

收稿日期: 2009-07-23, 接受日期: 2009-09-04

serum gonadotropin, PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 购自天津市华孚高新技术公司; FRAP 抗体购自 Santa Cruz 公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 由 Santa Cruz Biotechnology, Inc. 生产; 荧光染料 DAPI 购自 Sigma 公司; 培养用试剂均为 Sigma 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 卵母细胞的获取和体外培养.

20~25 g 的雌性昆明小鼠, 每只注射 10 U PMSG, 48 h 后颈椎脱臼法处死小鼠, 摘取双侧卵巢置于 M2 操作液中, 在实体镜下用 4 号半灭菌针头穿刺有腔卵泡, 释放卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus-oocyte complex, COC), 选择卵丘细胞完整的 COCs, 再用直径稍大于卵母细胞的玻璃吸管反复吹打, 得到无卵丘的生发泡 (GV) 期卵母细胞进行培养, 在培养过程中选取所需成熟水平的卵母细胞进行数据统计及免疫荧光检测。

培养分为 5 组: 0.5 g/L 雷帕霉素处理组、2.5 g/L 雷帕霉素处理组、3.3 g/L 雷帕霉素处理组、5 g/L 雷帕霉素处理组、10 g/L 雷帕霉素处理组。上述各组均设对照组, 分别加入相同浓度的二甲亚砜 (DMSO)。

卵母细胞成熟培养液为添加 4 g/L BSA 的 α -MEM 培养液 (Gibco 公司)。操作液配方依照《小鼠胚胎操作实验手册》^[13] 进行配制。培养条件为:

饱和湿度、恒温 37℃、5% CO₂。

1.3.2 激光共聚焦显微镜检测. 将经过一定时间培养的卵母细胞取出后, 在 M2 操作液中清洗 3 遍。以 4% 多聚甲醛 (溶解于 PBS 中) 室温固定 30 min, 或 PBST (PBS 加 0.01% Tween 20) 洗涤 3 遍, 0.1% TritonX-100 (溶解于 PBS) 透膜 30 min, 封闭液 (含 1% BSA 的 PBS) 避光封闭 1 h, 将卵细胞转入一抗 (FRAP 兔多克隆抗体用封闭液按 1:50 稀释) 中 4℃ 过夜, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 将卵细胞转入二抗 (FITC 标记羊抗兔 IgG, 用封闭液按 1:50 稀释) 中, 室温下避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用 DAPI 染色 5 min, 使 DNA 染色。激光共聚焦显微镜观察、照相。

1.4 数据分析与统计

每组实验至少重复 5 次, 获得的数据最后使用 SPSS 13.0 的 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 认为差异显著。

2 结 果

2.1 mTOR 在小鼠卵母细胞中的表达

激光共聚焦检测表明, 在 GV 期, mTOR 主要集中在核膜处表达, 在核内也呈现一些点状分布, 但在核仁区没有表达, 生发泡破裂 (GVBD) 后, mTOR 主要伴随染色体表达, 第二次减数分裂中期 (M II) 期主要伴随纺锤体表达 (图 1)。

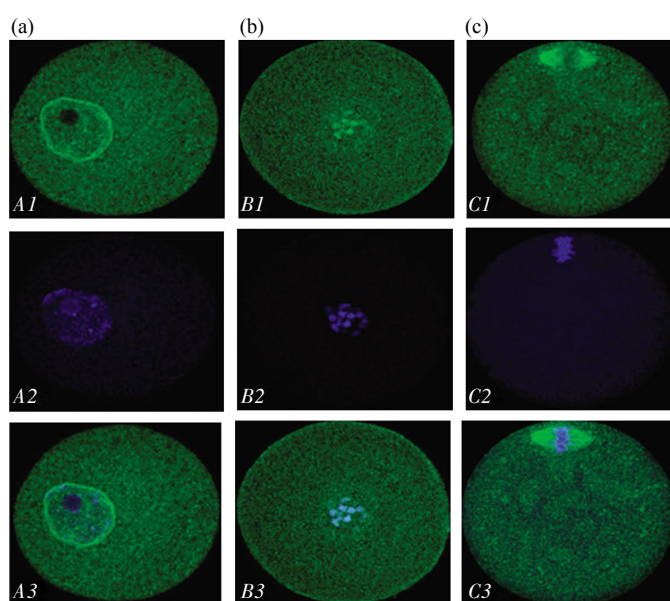


Fig. 1 The mTOR expression of mouse oocytes

(a) Germinal vesicle (GV) stage. (b) Germinal vesicle breakdown (GVBD) stage. (c) Second metaphase (M II) stage. A1~C1: The expression of mTOR, FITC-antibody tagged, green; A2~C2: Chromatin stained with DAPI, blue; A3~C3: Merged figures.

2.2 雷帕霉素处理对小鼠卵母细胞成熟的影响

2.2.1 雷帕霉素处理对小鼠卵母细胞 GVBD 的影响. 注射 PMSG 48h 后将卵母细胞置于 α -MEM 培养液中培养, 实验组加入不同终浓度的雷帕霉素, 对照组加相应体积的二甲基亚砜. 结果发现, 雷帕

霉素能抑制 GVBD 率, 该作用具有浓度依赖性, 浓度越高, 抑制作用越明显. 当雷帕霉素浓度达到 3.3 g/L 时, 卵母细胞 GVBD 的发生率与对照组相比明显降低, 差异具有显著性($P < 0.05$). 见表 1.

Table 1 The effect of rapamycin on the rate of GVBD

Treatment factor	The quantity of oocytes with GVBD	The quantity of oocytes without GVBD	The rate of GVBD/%	<i>t</i> -test
Control	110	14	88.9	$P > 0.05$
Rapamycin (0.5 g/L)	96	16	85.3	
Control	105	15	87.6	$P > 0.05$
Rapamycin (2.5 g/L)	90	22	80.5	
Control	105	13	88.6	$P < 0.05$
Rapamycin (3.3 g/L)	74	36	67.2	
Control	110	13	89.4	$P < 0.05$
Rapamycin (5 g/L)	59	51	54.0	
Control	106	16	87.5	$P < 0.01$
Rapamycin (10 g/L)	42	69	38.0	

2.2.2 雷帕霉素处理对小鼠卵母细胞第一极体 (PB1) 发生率的影响. 注射 PMSG 48 h 后将卵母细胞置于 α -MEM 培养液中培养, 实验组加入不同终浓度的雷帕霉素, 对照组加相应体积的二甲基亚砜, 到排出第一极体时观察结果. 结果发现, 雷帕

霉素能抑制 PB1 发生率, 该作用具有浓度依赖性, 浓度越高, 抑制作用越明显. 当雷帕霉素浓度达到 3.3 g/L 时, 卵母细胞 PB1 的发生率与对照组相比明显降低, 差异具有显著性($P < 0.05$). 见表 2.

Table 2 Effect of rapamycin on the rate of PB1

Treatment factor	The quantity of oocytes with PB1	The quantity of oocytes without PB1	The rate of PB1/%	<i>t</i> -test
Control	101	23	81.5	$P > 0.05$
Rapamycin (0.5 g/L)	86	26	76.5	
Control	95	25	79.2	$P > 0.05$
Rapamycin (2.5 g/L)	79	33	70.3	
Control	93	25	78.8	$P < 0.05$
Rapamycin (3.3 g/L)	68	42	62.1	
Control	99	24	80.7	$P < 0.01$
Rapamycin (5 g/L)	54	56	48.7	
Control	96	26	78.6	$P < 0.01$
Rapamycin (10 g/L)	31	80	28.0	

2.3 雷帕霉素处理对小鼠卵母细胞 mTOR 表达的影响

激光共聚焦结果显示: GV 期, 对照组和雷帕霉素处理组卵母细胞虽然都能检测到 mTOR 的表达, 但表达部位和形态有明显差异, 对照组 mTOR 在核膜处表达, 处理后的 GV 期卵母细胞在核膜处表达明显减弱, 更多地在核内区域表达; GVBD

期, 对照组和雷帕霉素处理组也有明显差异, 对照组 mTOR 伴随染色体表达, 处理后 mTOR 没有伴随染色体表达, 且染色体形态异常; M II 期卵母细胞中, 对照组 mTOR 主要伴随纺锤体分布, 染色体规律地排列在赤道板上, 而雷帕霉素处理组没有检测到 mTOR 阳性信号, 且染色体排列不规则 (图 2).

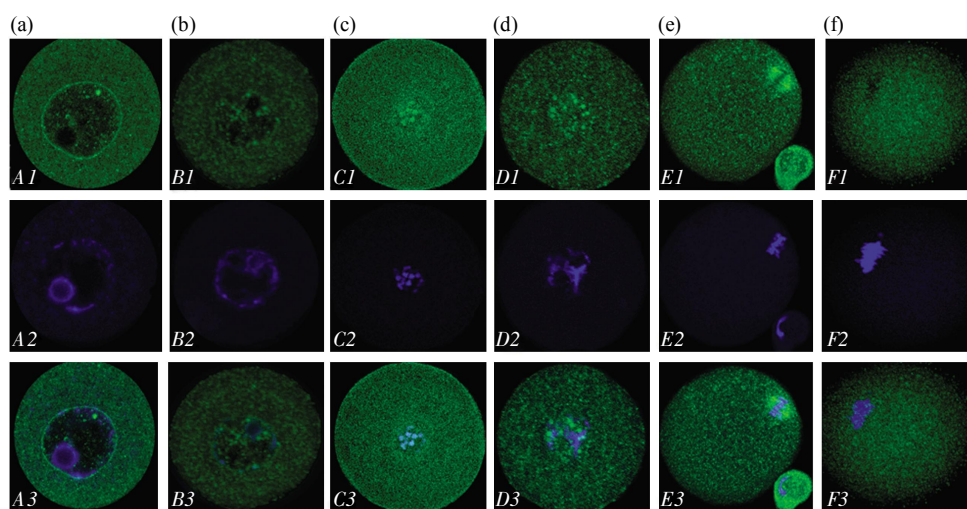


Fig. 2 The expression of mTOR of control and rapamycin retreat

(a) Control GV stage. (b) Treatment GV stage. (c) Control GVBD stage. (d) Treatment GVBD stage. (e) Control M II stage. (f) Treatment M II stage. A1~F1: The expression of mTOR, FITC-antibody tagged, green; A2~F2: Chromatin stained with DAPI, blue; A3~F3: Merged figures.

3 讨 论

本研究表明, 在小鼠卵母细胞 GV 期, mTOR 主要集中在核膜处表达, 在核内也呈现一些点状分布, 但在核仁区没有表达, 发生 GVBD 后, mTOR 主要伴随染色体表达, M II 期主要伴随纺锤体表达。一旦其表达发生异常, 则卵母细胞 GVBD 的发生、第一极体的排放都会受到影响。这是首次对 mTOR 在小鼠卵母细胞中的表达进行定位, 同时证明了 mTOR 对小鼠卵母细胞第一次减数分裂具有重要的作用。

mTOR 在细胞中的定位及分布一直是研究人员关注的问题, 但至今仍没有一致的结论。Zhang 等^[14]对 mTOR 在成纤维细胞、人胚肾细胞 (HEK293)、分化及生长过程中的鼠生肌细胞等 10 个细胞系的表达研究表明, 只有 HEK293 细胞大部分 mTOR 分布在细胞质, 其余的细胞系中 mTOR 主要在核内分布。Drenan 等^[15]在 HeLa 细胞的研究发现, mTOR 主要分布于核周区域, 它是内质网膜和高尔基体膜的外周蛋白, 另有少量的 mTOR 位于线粒体上, 此外, 对其他哺乳动物细胞, 鼠生肌细胞 C2C12、人二倍体成纤维细胞 MRC5、鼠的胚胎成纤维细胞、Rh30 横纹肌肉瘤细胞的亚细胞定位研究也表明, mTOR 主要分布在高尔基体和内质网上, 其分布没有细胞特异性。Kim 等^[16]在人胚肾 293(HEK293)细胞系及猴的肾上皮 CV-1 细胞系的研究中发现, mTOR 是个核穿梭蛋白, mTOR 能与

其他的核转运蛋白集合, 从而转移分布的位置, 它的穿梭与雷帕霉素敏感的 mTOR 信号途径及蛋白质翻译起始有关。

我们的结果表明, 在小鼠卵母细胞中, mTOR 的分布主要在细胞核内, 且具有明显的阶段性。GV 期, mTOR 主要集中在核膜处表达, 在核内也呈现一些点状分布, 但在核仁区没有表达, 发生 GVBD 后, mTOR 主要伴随染色体表达, M II 期 mTOR 伴随纺锤体表达。这可能是与 mTOR 在不同阶段的作用有关。

在 GV 期的卵母细胞中, mTOR 主要集中在核膜处表达, 可能是与 mTOR 的核 - 胞质穿梭有关^[16], 当大量的 mTOR 与核转运蛋白结合, 通过核膜在核 - 胞质之间转移时, 在核膜处会出现 mTOR 聚集的现象。雷帕霉素处理后的 GV 期卵母细胞在核膜处表达明显减弱, 更多地集中在核内区域, 这是因为雷帕霉素抑制了 mTOR 的活性^[8~10], 从而使其表达减弱, 同时没有进行核穿梭的 mTOR 集中在核内区域。这表明在小鼠卵母细胞中, mTOR 的穿梭也与雷帕霉素敏感的 mTOR 信号途径有关^[16]。

GVBD 期 mTOR 伴随染色体分布, 染色体的正确凝集状态需要特定蛋白质的参与, mTOR 可能与此类这些特定蛋白质的合成有关, 以维持染色体的正确形态, 由于核膜破裂, 染色体分布于不含任何细胞器的原核区, 其周围有丰富的线粒体包围^[17], 可能此时也有部分 mTOR 分布在线粒体

上^[15, 18]。另外, mTOR 伴随染色体表达, 可能也与纺锤体的重新组建有关^[11, 19], 雷帕霉素处理后 GVBD 期卵母细胞, mTOR 没有伴随染色体表达, 且染色体形态异常, 表明此时的 mTOR 可能与染色体形态的正确形成有关。同时经过雷帕霉素处理后, 小鼠卵母细胞 GVBD 的发生率受到抑制, 这说明 mTOR 与核膜破裂有关, 而影响核膜破裂的关键因素是成熟促进因子(maturation prompting factor, MPF)的活化状态, 只有当细胞周期蛋白 B (cyclinB)的合成达到阈值时和 p34cdc2 结合, 才能活化 MPF, 从而启动减数分裂^[20]。这说明 mTOR 可能与卵母细胞中 cyclinB 的积累有关。Laure 等^[11]在海星、海胆的卵母细胞研究中发现, cyclinB 的合成依赖于储存的卵内 mRNA, 它的翻译受雷帕霉素敏感的途径调节。这与我们的结果一致。

M II 期, mTOR 伴随纺锤体表达, 染色体规律地排列在赤道板上, 雷帕霉素处理后的卵母细胞没有检测到 mTOR 阳性信号, 而且染色体的排列不规则, 表明 mTOR 可能与纺锤体的正常形成有关。Laure 等^[11]在研究海星卵母细胞中发现, 抑制 mTOR 的表达后, 形成的纺锤体产生缺陷。这与我们的结果类似。Jacinto 等^[19]在 HEK293 细胞的研究中发现, mTOR 能够调节微丝的形成, 而 mTOR 对微管的形成可能也有一定的关系。雷帕霉素处理后, 小鼠卵母细胞第一极体的排放受到抑制, 这是因为 mTOR 受到抑制后, 影响正常的纺锤体形成^[11], 从而抑制第一极体的排放。此外, 雷帕霉素的这种抑制作用具有浓度依赖性, 浓度越高抑制作用越明显。有研究表明, 雷帕霉素对肿瘤细胞的生长活性及细胞增殖的抑制均具有浓度依赖性^[21~23]。

以上结果说明, mTOR 在小鼠卵母细胞成熟过程的各时期都有表达, 如果其表达发生异常, 则会对卵母细胞 GVBD 的发生及第一极体的排放产生影响。目前哺乳动物卵母细胞发生及成熟过程中 mTOR 的调控机制尚未见报道, mTOR 可能作为重要的调控分子参与卵母细胞成熟过程, 对其进一步研究将对揭示小鼠卵母细胞的成熟机制具有重要意义。

参 考 文 献

- Wullschlegel S, Loewith R, Hall M N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006, **124**(3): 471~484
- Shamji A F, Nghiem P, Schreiber S L. Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Mol Cell*, 2003, **12**(2): 271~280
- Menand B, Meyer C, Robaglia C. Plant growth and the TOR pathway. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, **279**(2): 97~113
- Fingar D C, Salama S, Tsou C, *et al.* Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev*, 2002, **16**(12): 1472~1487
- Beck T, Hall M N. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient regulated transcription factors. *Nature*, 1999, **402**(6762): 689~692
- Fingar D C, Richardson C J, Tee A R, *et al.* mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(1): 200~216
- Foster D A. Targeting mTOR-mediated survival signals in anticancer therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2004, **4**(4): 691~701
- Vezina C, Kudelski A, Sehgal S N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, 1975, **28**(10): 721~726
- Brunn G J, Hudson C C, Sekulic A, *et al.* Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, 1997, **277**(5322): 99
- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 2004, **18**(16): 1926~1945
- Laure L, Berengere P, Pradet B, *et al.* Cyclin B synthesis and Rapamycin-sensitive regulation of protein synthesis during starfish oocyte meiotic divisions. *Mol Rep Dev*, 2008, **75**(11): 1617~1626
- Salaun P, Pyronnet S, Morales J, *et al.* eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Dev Biol*, 2003, **255**(2): 428~439
- Nagy A, 等. 孙青原, 陈大元, 主译. 小鼠胚胎操作实验手册. 第3版. 北京: 化学工业出版社, 2006. 147~149
- Nagy A, *et al.* Translated by Sun Q Y, Chen D Y. *Manipulating The Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. 3rd. Beijing: Chemical Industry Press, 2006. 147~149
- Zhang X W, Shu L L, Hosoi H, *et al.* Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture. *J Biol Chem*, 2002, **277**(31): 28127~28134
- Drenan R M, Liu X Y, Bertram P G, *et al.* FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *J Biol Chem*, 2004, **279**(1): 772~778
- Kim J E, Chen J. Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(26): 14340~14345
- 陈大元. 受精生物学: 受精机制与生殖工程. 北京: 科学出版社, 2000. 78~85
- Chen D Y. *Fertilization Biology: Fertilization Mechanism and Reproduction Engineering*. Beijing: Science Press, 2000. 78~85
- Desai B N, Myers B R, Schreiber S L. FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **99**(7): 4319~4324
- Jacinto I E, Loewith R, Schmidt A, *et al.* Mammalian TOR

- complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biol*, 2004, **6**(11): 1122~1132
- 20 杨增明, 孙青原, 夏国良. 生殖生物学. 北京: 科学出版社, 2005. 182~187
- Yang Z M, Sun Q Y, Xia G L. *Reproductive Biology*. Beijing: Science Press, 2005. 182~187
- 21 Mayerbofer M, Aichberger K J, Florian S, *et al.* Identification of a novel bifunctional target in chronic myeloid leukemia: dissection of growth-inhibitory and VEGF-suppressive effects of rapamycin in leukemic cells. *FASEB J*, 2005, **19**(8): 960~962
- 22 Wu Q, Kiguchi K, Kawamoto T, *et al.* Therapeutic effect of rapamycin on gallbladder cancer in a transgenic mouse model. *Cancer Res*, 2007, **67**(8): 3794~3800
- 23 Semela D, Piguet A C, Kilev M, *et al.* Vascular remodeling and antitumoral effects of mTOR inhibition in a rat model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatology*, 2007, **46**(5): 840~848

The Expression and Effect of mTOR During Mouse Oocyte Maturation

YANG Cai-Rong, WEI Yan-Chang, ZHANG Yan, ZHENG Ke-Jia, LI Ning, YAN Yun-Qin*

(Department of Animal Cell and Developmental Biology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a serine-threonine kinase downstream in the PI3K-Akt pathway, which belongs to the phosphatidylinositol kinase-related kinase (PIKK) family. The mTOR plays an important role in cell cycle regulation and protein synthesis. mTOR signaling pathway is evolutionarily conserved, which can integrate and converge a wide range of signals, including intracellular and extracellular nutrients, growth factors, energy and stress conditions, and has a crucial role in vertebrate growth control. The upstream regulation and downstream effects mediated by mTOR form a network of critical growth signaling pathways. Hence, dysregulation of components within mTOR signaling network result in impaired internal environment conditions, and first meiotic division can also be influenced if occurring during starfish and sea urchin oocyte maturation. However, its functions in mammalian meiosis are unclear. The localization and function of mTOR during mouse oocyte meiotic maturation were investigated with the oocytes of Kunming mouse. Location of mTOR was examined in Germinal vesicle (GV) stage, Germinal vesicle breakdown (GVBD) stage and second metaphase (M II) stage during mouse oocyte maturation by immunofluorescence technology. The rate of GVBD and polar body extrusion (PB1) during mouse oocytes maturation was also detected by treatment with different concentration rapamycin (0.5 g/L, 2.5 g/L, 3.3 g/L, 5.0 g/L, 10 g/L). Immunofluorescent staining showed that mTOR mainly is located on nuclear membrane during GV stage, distributed with the chromosome after GVBD, and distributed with the spindle apparatus during M II stage. The oocyte maturation was inhibited by treatment with rapamycin, and the inhibitory action was concentration dependent, when the drug concentration reached to 3.3 g/L, the disparity was significant ($P < 0.05$). Meanwhile, the location and morphous of mTOR were changed: under treatment with 3.3 g/L rapamycin, mTOR protein expression became obviously weaker and distributed more in intranuclear in the stage of GV; and didn't distribute with the chromosome after GVBD, the morphous of chromosome was changed. The mTOR can not be detected in M II stage, and the chromosome arrangement was irregular. The results suggest that the expression and distribution of mTOR shows stage specificity during mouse oocyte maturation, rapamycin had an effect on mouse first meiotic division, including chromosome arrangement and spindle formation, demonstrating that a rapamycin-sensitive pathways is involved in this mechanism. mTOR plays an important role during procedure of GVBD and first polar body extrusion, which could regulate maturation process of mouse oocyte through the changes of its expression and localization.

Key words mTOR, mouse oocytes, rapamycin, immunofluorescence

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00446

*Corresponding author.

Tel: 86-451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com

Received: July 23, 2009 Accepted: September 4, 2009