

[文章编号] 1671-587X(2024)04-0891-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240402

SGK3在小鼠卵母细胞第一次减数分裂恢复中的作用及其机制

郭文秀¹, 庄妍¹, 张慧灵¹, 何文宁¹, 孟峻²

(1. 内蒙古医科大学临床检验诊断教研室, 内蒙古 呼和浩特 010059; 2. 内蒙古医科大学附属医院
检验科, 内蒙古 呼和浩特 010050)

[摘要] **目的:** 探讨血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶3 (SGK3) 在小鼠卵母细胞第一次减数分裂恢复中的作用, 初步阐明SGK3在哺乳动物卵母细胞早期发育中的调控机制。**方法:** 利用超排卵技术获取生发泡 (GV) 期小鼠卵母细胞, 利用显微注射技术将表达质粒体外转录获得的SGK3 mRNA注射至GV期卵母细胞, 分为对照组、Tris-EDTA缓冲液 (TE) 组和SGK3 mRNA组, 采用Western blotting法检测各组小鼠卵母细胞中SGK3蛋白表达水平, 显微注射SGK3 mRNA后1、2、3和4 h观察并计算各组卵母细胞生发泡破裂 (GVBD) 率, 采用SGK3抗体稀释抑制实验观察各组卵母细胞形态表现, 采用Western blotting法检测体外培养不同时间点卵母细胞中磷酸化SGK3 (pSer48) (SGK3-pSer48) 和磷酸化细胞分裂周期蛋白2 (CDC2) (pTyr15) (CDC2-pTyr15) 蛋白表达水平。**结果:** 与对照组和TE组比较, SGK3 mRNA组小鼠卵母细胞中SGK3蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$), 显微注射后1和2 h时GVBD率升高 ($P < 0.01$)。SGK3抗体稀释抑制实验, 随着SGK3抗体浓度增加, 各组小鼠卵母细胞GVBD率呈浓度依赖性降低。过表达SGK3后, 与对照组比较, SGK3 mRNA组小鼠卵母细胞中检测不到CDC2-pTyr15蛋白表达的时间至少提前1 h。不同稀释浓度SGK3抗体作用后, 与对照组比较, 随着SGK3抗体浓度升高和时间的延长, 小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达水平逐渐降低 ($P < 0.01$), SGK3-pSer486蛋白表达水平逐渐升高 ($P < 0.01$)。**结论:** 过表达SGK3可以增加小鼠卵母细胞GVBD率, 加快CDC2-pTyr15的脱磷酸化, 而CDC2-pTyr15的脱磷酸化晚于SGK3-Ser486的磷酸化。SGK3可能作为CDC2上游调节因子参与调控小鼠卵母细胞第一次减数分裂的恢复。

[关键词] 血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶3; 小鼠卵母细胞; 减数分裂; 细胞分裂周期蛋白2; 生发泡; 生发泡破裂

[中图分类号] Q132 **[文献标志码]** A

Effect of SGK3 on recovery of first meiotic division of oocytes in mice and its mechanism

GUO Wenxiu¹, ZHUANG Yan¹, ZHANG Huiling¹, HE Wenning¹, MENG Jun²

(1. Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the role of serum and glucocorticoid-induced protein kinase 3 (SGK3)

[收稿日期] 2023-08-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81360109, 81660267); 内蒙古自治区科技厅自然科学基金项目 (2021MS08158)

[作者简介] 郭文秀 (1989-), 女, 内蒙古自治区呼和浩特市人, 在读硕士研究生, 主要从事临床生物化学和生殖分子生物学方面的研究。

[通信作者] 孟峻, 主任检验师, 硕士研究生导师 (E-mail: nmfrank@163.com)。

in the resumption of the first meiotic division in the oocytes of the mice, and to preliminarily clarify the regulatory mechanism of SGK3 in the early development of mammalian oocytes. **Methods:** The germinal vesicle (GV) stage mouse oocytes were obtained by superovulation techniques. The SGK3 mRNA, obtained from *in vitro* transcription of expression plasmids, was injected into the GV stage oocytes by microinjection techniques. The oocytes were divided into control group, Tris-EDTA buffer (TE) group, and SGK3 mRNA group. Western blotting method was used to detect the expression levels of SGK3 protein in the oocytes in various groups; the germinal vesicle breakdown (GVBD) rates of the oocytes in various groups were observed and calculated at 1, 2, 3, and 4 h after microinjection of SGK3 mRNA; the morphological appearance of the oocytes in various groups was observed by SGK3 antibody dilution inhibition experiment; Western blotting method was used to detect the expression levels of phosphorylated SGK3 (pSer48) (SGK3-pSer48) and phosphorylated cell division cycle protein 2 (CDC2) (pTyr15) (CDC2-pTyr15) proteins in the oocytes cultured *in vitro* at different time points. **Results:** Compared with control group and TE group, the expression level of SGK3 protein in the oocytes in SGK3 mRNA group was increased ($P < 0.01$), and the GVBD rates at 1 and 2 h after microinjection were increased ($P < 0.01$). The SGK3 antibody dilution inhibition experiment results showed that as the increasing of concentration of SGK3 antibody, the GVBD rates of the oocytes in various groups were decreased in a concentration-dependent manner. After overexpressing SGK3, compared with control group, the time when CDC2-pTyr15 protein expression could not be detected in the oocytes in SGK3 mRNA group was advanced by at least 1 h. After treated with different concentrations of SGK3 antibody, compared with control group, as the increasing of concentration of SGK3 antibody and the extending of treatment time, the expression level of CDC2-pTyr15 protein in the oocytes was gradually decreased ($P < 0.01$), and the expression level of SGK3-pSer486 protein was gradually increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Over-expression of SGK3 can increase the GVBD rate of oocytes of the mice and accelerate the dephosphorylation of CDC2-pTyr15, while the dephosphorylation of CDC2-pTyr15 is later than the phosphorylation of SGK3-Ser486. SGK3 likely serves as an upstream regulator of CDC2 and participates in controlling the resumption of the first meiotic division in the oocytes of the mice.

KEYWORDS Serum and glucocorticoid-induced protein kinase3; Mouse oocytes; Meiotic division; Cell division cyclin protein 2; Germ-vesicle; Germ-vesicle breakdown

卵母细胞的减数分裂是哺乳动物生殖过程中至关重要的步骤,直接关系到正常的生殖能力和后代的遗传稳定性^[1]。减数分裂的第一次分裂是其中的关键阶段,也是容易受到干扰和损伤的阶段之一^[2]。第一次减数分裂的恢复过程受到多种分子和蛋白的严密调控^[3]。血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶3 (serum and glucocorticoid-induced protein kinase 3, SGK3) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在真核生物体内参与基因快速转录调节。作为磷脂酰肌醇3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) /磷酸肌醇依赖性激酶1 (phosphoinositide-dependent kinase 1, PDK1) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物2 (mammalian target of rapamycin complex 2, mTORC2) 信号通路的下游调节因子,SGK3被PDK1和mTORC2分别在Thr320和Ser486位点磷酸化,激活其功能。细胞周期蛋白B1

(cyclin B1) 和细胞分裂周期蛋白2 (cell division cyclin protein 2, CDC2) 是调节减数分裂恢复的关键细胞因子。cyclin B1和CDC2共同组成成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF), MPF的合成、激活和降解是划分细胞减数分裂进程的关键^[4-5]。当CDC2单独存在时,不表现出激酶活性,只有当CDC2与其调节亚基细胞周期蛋白 (cyclin) 结合后, CDC2的Tyr15位点发生去磷酸化,才具有激酶活性^[6-7]。该去磷酸化过程对于卵母细胞第一次减数分裂的恢复至关重要。研究^[8-10]表明:在海星卵母细胞中,SGK3能直接激活细胞分裂周期蛋白25B (cell division cyclin protein 25B, CDC25B),导致CDC2的Thr14和Tyr15位点脱磷酸化,从而激活细胞周期蛋白B (cyclin B)-CDC2复合物,促进细胞G₂/M期转换和减数分裂的恢复。在哺乳动物卵母细胞中,SGK3是否通过直接或间接激活

CDC2来促进卵母细胞的成熟发育尚不明确, 关于SGK3在小鼠卵母细胞减数分裂恢复中的作用尚未见相关报道。本研究旨在探讨SGK3在小鼠卵母细胞第一次减数分裂恢复中的作用及其机制, 并进一步探索SGK3与细胞周期调控关键因子CDC2之间的相互作用, 为进一步研究卵母细胞减数分裂的分子机制和相关疾病的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 昆明系SPF级3~4周龄雌性小鼠6只, 体质量15~20 g, 购于内蒙古医科大学动物实验中心, 动物使用许可证号: SYXK(蒙)2020-0003。孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG)(香港岑氏实业集团), MB培养液和二丁酰环腺苷酸(dibutyl-cAMP, dbcAMP)(美国Sigma公司), 胚胎培养用矿物油M2460(南京爱贝生物科技有限公司), SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒和预染蛋白Marker(北京索莱宝科技有限公司), RIPA蛋白解液、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、磷酸酶抑制剂、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS) Tween20(上海碧云天生物技术公司), Tris-EDTA缓冲液(Tris-EDTA buffer, TE), 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(5×)(Bio-Channel)、Tris-base和甘氨酸(Glycine)(福州飞净生物科技有限公司), 0.45 μm NC膜(爱西默科技中国有限公司), SGK3抗体和CDC2抗体(美国Proteintech公司), 磷酸化SGK3(phosphorylated SGK3, p-SGK3)(pSer486)抗体和磷酸化CDC2(phosphorylated CDC2, p-CDC2)(pTyr15)抗体(美国Affinity公司), β-actin抗体(圣克鲁斯生物技术上海有限公司), HRP标记的山羊抗兔抗体(上海艾博生物科技有限公司), ECL化学发光试剂盒(美国Pierce Biotechnology公司)。35和60 mm胚胎培养皿(南京爱贝生物科技有限公司), 体式显微镜(日本Nikon公司), 相差显微镜(日本Olympus公司), CO₂恒温培养箱(德国BINDER公司), 超低温冰箱(青岛海尔公司), 低温离心机和紫外分光光度计(德国Thermo Scientific公司), 垂直电泳槽和凝胶自动成像仪(美国Bio-Rad公司), 往复式

脱色摇床(美国ENVIRO-GENIE公司), 基因扩增仪(中国HEMA公司), 电泳仪(中国北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 小鼠卵母细胞的采集和培养 取3~4周龄昆明系SPF级雌性小鼠, 腹腔注射PMSG 10 IU, 48 h后采用颈椎脱臼法处死小鼠, 剖出两侧卵巢放入生理盐水液中, 在体式显微镜下, 使用1 mm注射器刺破并挤压卵巢中的透明卵泡, 使卵母细胞流出, 挑出卵母-卵丘细胞团, 去除卵母细胞周围附着的卵丘细胞。挑出胞体呈圆球形、直径约80~90 μm的卵母细胞, 将生发泡(germinal vesicle, GV)期裸卵放入提前加入MB培养基和矿物油的培养皿中, 置于恒温和恒湿CO₂培养箱中培养, 用于后续实验。

1.3 SGK3基因的体外转录 制备线性SGK3 DNA, 配制50 μL反应体系: 10×QuickCutBuffer 5 μL, 质粒1 μg, QuickCutApa I 1 μL, ddH₂O 39 μL。37℃酶切30 min。室温静置5 min。加蛋白酶K(20 g·L⁻¹) 0.5 μL, 10% SDS 2.5 μL, 加等体积酚/氯仿抽提, 12 000 r·min⁻¹离心2 min, 将上层相转移至EP管中; 加1/10体积的3 mol·L⁻¹醋酸钠(pH 5.2)和3倍体积的无水乙醇沉淀, -20℃、15 min; 12 000 r·min⁻¹离心10 min, 弃上清后, 4℃、12 000 r·min⁻¹离心15 min, 用作体外转录的模板。将线性化的DNA进行体外转录, 配制20 μL转录体系: 线性化SGK3 DNA 6 μL, T7 Enzyme Mix 2 μL, T7 Reaction Buffer(5×) 4 μL, rNTP 6 μL, RNase Free H₂O 2 μL。置于PCR仪上, 设置孵育程序为37℃、3 h。向混合液中加入1 μL DNase I, 去除DNA模板, 加Poly(A)。反应体系100 μL: 上述反应混合物20 μL, 无核酸酶水30 μL, 5×E-PAP缓冲液20 μL, 25 mmol·L⁻¹ MnCl₂ 10 μL, ATP溶液10 μL, E-PAP酶4 μL。RNA产物纯化体系100 μL: SGK3 mRNA 21 μL, RNase Free H₂O 67 μL, Purification Assistant A 10 μL, Purification Assistant B 2 μL。将反应液轻轻混合均匀, 加入预冷无水乙醇300 μL, 混匀后置于-20℃冰箱过夜沉淀; 4℃、13 000 r·min⁻¹离心30 min, 弃上清, 加入1 mL预冷70%乙醇, 反复颠倒混匀, 4℃、13 000 r·min⁻¹离心10 min, 弃上清, 重复上一步骤晾干RNA沉淀至透明。使用Nanodrop微量分光光度计通过吸光度(A)值对RNA的浓度和纯度进行检测, A(260)/A(280)为1.8~2.0即

纯化RNA, 可用于后续实验。

1.4 显微注射SGK3 mRNA后计算小鼠卵母细胞生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)率和Western blotting法检测卵母细胞中SGK3蛋白表达水平 采用Eppendorf Transferrman显微操作系统进行显微注射。实验分为对照组、TE组和SGK3 mRNA组, 取GV期卵母细胞放入含 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dbcAMP的MB培养液中, 按分组方法通过显微注射将TE和SGK3 mRNA分别注入GV期卵母细胞质, 注射剂量为5 pL(浓度约为 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 注射后放在不含抑制剂(dbcAMP)的MB培养液中培养, 计算卵母细胞GVBD率, $\text{GVBD率} = \text{卵裂的卵母细胞数} / \text{卵母细胞总数} \times 100\%$ ($n=100$)。采用Western blotting法验证SGK3 mRNA过表达是否成功: 配制裂解液, 取100 μL RIPA裂解液加入1 μL 蛋白酶裂解液、1 μL 磷酸酶裂解液和1 μL PMSF, 颠倒混匀。提取总蛋白, 将对照组、TE组和SGK3 mRNA组卵母细胞放于MB培养液中培养1 h后, 将卵母细胞转移全1.5 mL EP管中, $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 弃上清液, 加入配制好的裂解液, 离心10 min。将蛋白提取液和SDS上样缓冲液按2:1混合, $100\ ^\circ\text{C}$ 煮沸5 min。与Marker分别加入SDS-PAGE孔内点样, 每孔30 μL , 进行电泳。在80 V、30 min和120 V、60 min条件下电泳, 结束后将凝胶取出, $4\ ^\circ\text{C}$ 、90 V、200 mA恒流湿转2 h, 将条带转移至NC膜, 用封闭液室温封闭NC膜1 h, 加入1:1 000稀释的抗SGK3和抗 β -actin抗体, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜。第2天将NC膜移入1:1 000稀释的HRP-山羊抗兔IgG抗体中, 室温孵育2 h。采用TBST溶液对含有目的条带的NC膜进行脱色, 重复3次, 每次20 min, 按说明书加入ECL化学发光试剂, 采用Bio-Rad显微成像系统, 以 β -actin作为内参蛋白进行显影分析, 计算SGK3蛋白表达水平。 $\text{SGK3蛋白表达水平} = \text{SGK3蛋白条带灰度值} / \beta\text{-actin蛋白条带灰度值}$ 。

1.5 抗体稀释抑制实验观察各组小鼠卵细胞形态表现 取4 μL SGK3抗体加入装有96 μL LMB培养液的EP管中混匀, 依次配制成浓度分别为1:25、1:50、1:100和1:200的SGK3抗体稀释液, 用移液器按照抗体稀释液浓度由低到高的顺序取稀释液33 μL 加入至35 mm胚胎专用培养皿, 同时设不加SGK3抗体的对照组。将取出的GV期卵母细胞放入提前预热后的培养液中, 采用相差显微镜在培

养1、2、3和4 h时观察卵母细胞GVBD情况、卵母细胞存活情况和各组卵母细胞形态表现。

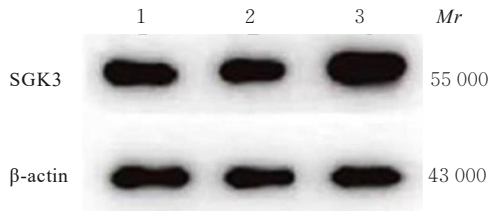
1.6 Western blotting法检测不同时间点小鼠卵母细胞中SGK3-pSer486和CDC2-pTyr15蛋白表达水平 将分别培养1、2、3和4 h的卵母细胞转移至1.5 mL EP管中, $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 弃上清, 加入100 μL RIPA裂解液、1 μL 蛋白酶裂解液、1 μL 磷酸酶裂解液和1 μL PMSF, 离心10 min。上样、电泳, $4\ ^\circ\text{C}$ 、90 V、200 mA恒流湿转2 h, 将条带转移至NC膜, 封闭液室温封闭1 h; 将封闭处理的NC膜加入1:1 000稀释的SGK3-pSer486抗体和1:500稀释的CDC2-pTyr15抗体中, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜。次日将NC膜移入1:1 000稀释HRP标记IgG中, 室温孵育2 h, 用TBST溶液对含有目的条带的NC膜进行脱色, 重复3次, 每次20 min。按说明书加入ECL化学发光试剂, 利用Bio-Rad显微成像系统, 以 β -actin为内参, 分析各蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。 $\text{目的蛋白表达水平} = \text{目的蛋白条带灰度值} / \text{内参蛋白条带灰度值}$ 。

1.7 统计学分析 采用GraphPad Prism 9.0统计软件进行统计学分析。每组实验重复3~4次。小鼠卵母细胞GVBD率以百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。卵母细胞中SGK3、SGK3-pSer486和CDC2-pTyr15蛋白表达水平符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠卵母细胞中SGK3蛋白表达水平 与对照组(0.692 ± 0.003)和TE组(0.757 ± 0.010)比较, SGK3 mRNA组小鼠卵母细胞中SGK3蛋白表达水平(1.195 ± 0.010)明显升高($P < 0.01$); 与对照组比较, TE组小鼠卵母细胞中SGK3蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。

2.2 各组小鼠卵母细胞不同时间点GVBD率 显微注射SGK3 mRNA后检测GV期小鼠卵母细胞不同时间点GVBD率, 结果显示: 显微注射后1、2、3和4 h各组小鼠卵母细胞GVBD率依次升高。显微注射后1和2 h, 与对照组和TE组比较, SGK3 mRNA组小鼠卵母细胞GVBD率升高($P < 0.01$)。见表1。



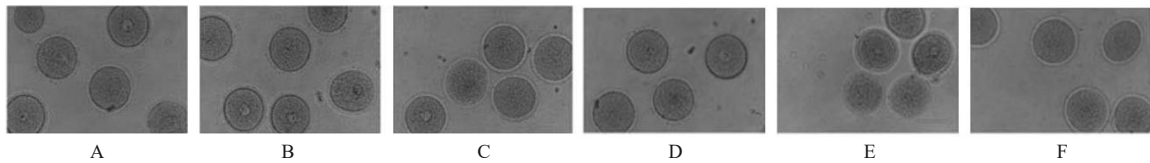
Lane 1: Control group; Lane 2: TE group; Lane 3: SGK3 mRNA group.

图1 Western blotting法检测 SGK3 mRNA注射2 h后各组卵母细胞中SGK3蛋白表达电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of expressions of SGK3 protein in oocytes after 2 h injection of SGK3 mRNA in various groups detected by Western blotting method

2.3 不同时间点各组小鼠卵母细胞形态表现

SGK3-mRNA注射2 h后, 相差显微镜下观察,



A-C: 1 h; D-F: 2 h; A, D: Control group; B, E: TE group; C, F: SGK3 mRNA group.

图2 相差显微镜观察显微注射 SGK3 mRNA后1和2 h各组小鼠卵母细胞形态表现($\times 100$)

Fig. 2 Morphology of oocytes in various groups after microinjection of SGK3 mRNA for 1 and 2 h observed by phase contrast microscope($\times 100$)

2.4 不同时间点各组小鼠卵母细胞GVBD率

采用SGK3抗体抑制GV期卵母细胞中SGK3的表达, 检测经不同浓度(1:200、1:100、1:50和1:25)SGK3抗体稀释液处理后各组卵母细胞GVBD率, 结果显示: 体外培养1、2、3和4 h时, 随着SGK3抗体浓度增加GVBD率呈浓度依赖性降低, 与对照组比较, 1:100 SGK3抗体作用2、3和4 h, 1:50及1:25 SGK3抗体作用1、2、3和4 h时GVBD率均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图3。

2.5 各时间点不同浓度SGK3抗体组小鼠卵母细胞形态表现

GV期小鼠卵母细胞在浓度为1:200、1:100、1:50和1:25的SGK3抗体中体外培养1、2、3和4 h, 相差显微镜下观察并拍照。1 h时, 对照组和1:200 SGK3抗体组中超过半数小鼠卵母细胞发生GVBD, 1:100 SGK3抗体组中部分小鼠卵母细胞发生GVBD, 1:50 SGK3抗体仅有少数小鼠卵母细胞发生GVBD, 1:25 SGK3抗体组中小鼠卵母细胞几乎未发生GVBD。4 h时, 对照组和1:200 SGK3抗体组中小鼠卵母细胞几乎全部发生GVBD, 1:100 SGK3抗体组中大部分小鼠卵母

表1 显微注射 SGK3 mRNA后不同时间点各组小鼠卵母细胞GVBD率

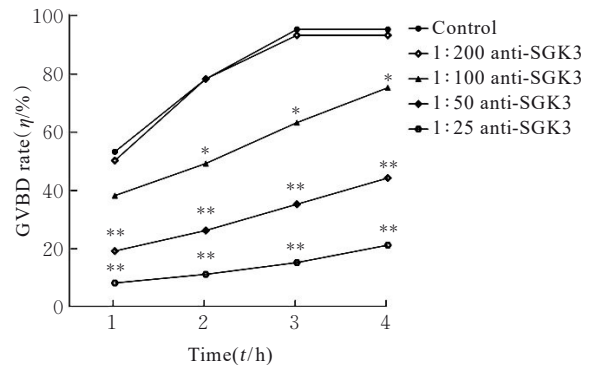
Tab. 1 GVBD rates of oocytes in mice after microinjection of SGK3 mRNA in various groups at different time points

($n=100$, $\eta/\%$)

Group	GVBD rate			
	(t/h) 1	2	3	4
Control	53	76	90	95
TE	51	73	91	96
SGK3-mRNA	78 [△]	94 [△]	96	100

^{*} $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs TE group.

对照组和TE组仍有部分小鼠卵母细胞未发生GVBD, 但SGK3 mRNA组在注射2 h后小鼠卵母细胞已全部发生GVBD。见图2。



^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ compared with control group.

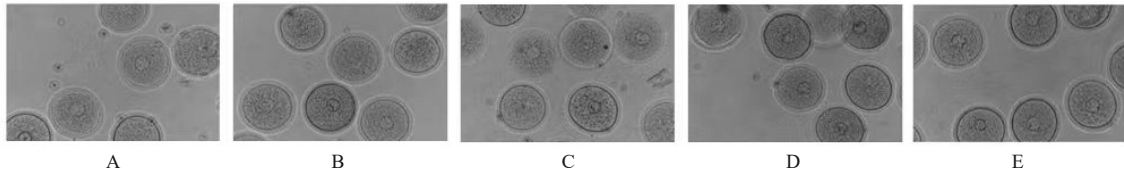
图3 不同时间点各组小鼠卵母细胞GVBD率

Fig. 3 GVBD rates of oocytes in mice in various groups at different time points

细胞发生GVBD, 1:50 SGK3抗体组中部分小鼠卵母细胞发生GVBD, 1:25 SGK3抗体组中少量小鼠卵母细胞发生GVBD。不同时间点1:25 SGK3抗体组小鼠卵母细胞GVBD率明显低于其他各组。见图4~7。

2.6 过表达SGK3后不同时间点各组小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达情况

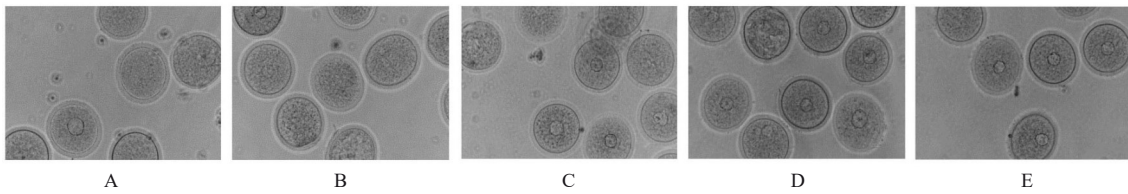
SGK3 mRNA组



A: Control group; B: 1:200 SGK3 antibody group; C: 1:100 SGK3 antibody group; D: 1:50 SGK3 antibody group; E: 1:25 SGK3 antibody group.

图4 相差显微镜观察不同浓度SGK3抗体作用1 h时各组小鼠卵母细胞形态表现($\times 100$)

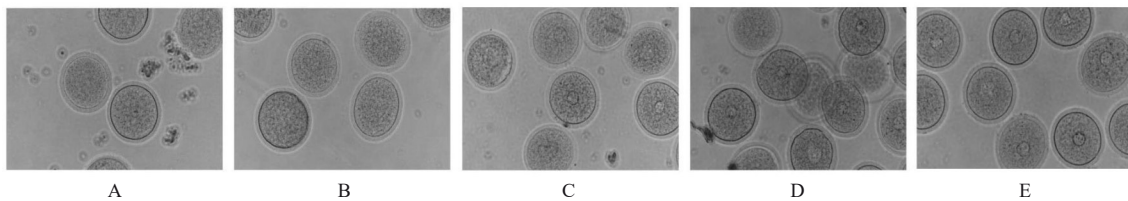
Fig. 4 Morphology of oocytes in mice after treated with different concentrations of SGK3 antibodies for 1 h in various groups observed by phase contrast microscope ($\times 100$)



A: Control group; B: 1:200 SGK3 antibody group; C: 1:100 SGK3 antibody group; D: 1:50 SGK3 antibody group; E: 1:25 SGK3 antibody group.

图5 相差显微镜观察不同浓度SGK3抗体作用2 h时各组小鼠卵母细胞形态表现($\times 100$)

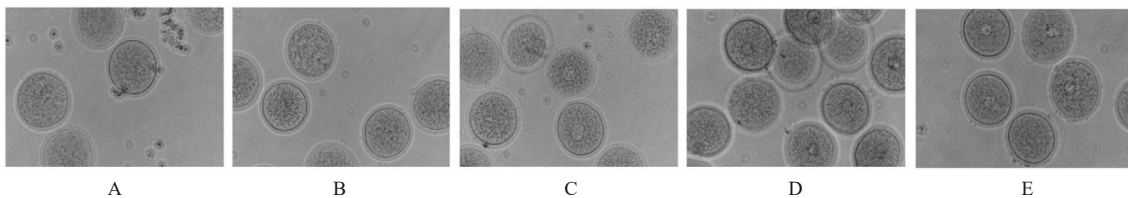
Fig. 5 Morphology of oocytes in mice after treated with different concentrations of SGK3 antibodies for 2 h in various groups observed by phase contrast microscope ($\times 100$)



A: Control group; B: 1:200 SGK3 antibody group; C: 1:100 SGK3 antibody group; D: 1:50 SGK3 antibody group; E: 1:25 SGK3 antibody group.

图6 相差显微镜观察不同浓度SGK3抗体作用3 h时各组小鼠卵母细胞形态表现($\times 100$)

Fig. 6 Morphology of oocytes in mice after treated with different concentrations of SGK3 antibodies for 3 h in various groups observed by phase contrast microscope ($\times 100$)



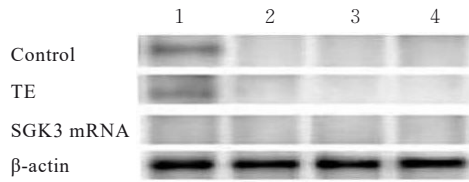
A: Control group; B: 1:200 SGK3 antibody group; C: 1:100 SGK3 antibody group; D: 1:50 SGK3 antibody group; E: 1:25 SGK3 antibody group.

图7 相差显微镜观察不同浓度SGK3抗体作用4 h时各组小鼠卵母细胞形态表现($\times 100$)

Fig. 7 Morphology of oocytes in mice after treated with different concentrations of SGK3 antibodies for 4 h in various groups observed by phase contrast microscope ($\times 100$)

小鼠卵母细胞中 CDC2-pTyr15 蛋白表达在显微注射后 1 h 已检测不到, 对照组和 TE 组小鼠卵母细胞中 CDC2-pTyr15 蛋白表达在培养后 2 h 完全消

失; 与对照组比较, SGK3 mRNA 组小鼠卵母细胞中检测不到 CDC2-pTyr15 蛋白表达的时间至少提前 1 h。见图 8。

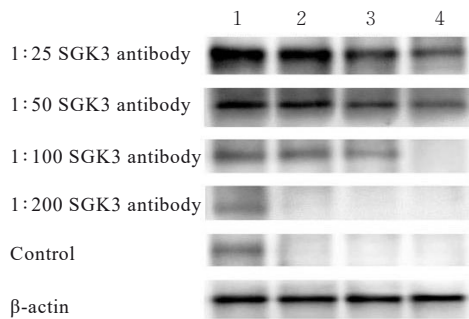


Lane 1: 1 h; Lane 2: 2 h; Lane 3: 3 h; Lane 4: 4 h.

图8 Western blotting法检测过表达SGK3后不同时间点各组小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达电泳图

Fig. 8 Electrophoregram of expressions of CDC2-pTyr15 in mouse oocytes in various groups at different time points after over-expression of SGK3 detected by Western blotting method

2.7 各时间点不同浓度SGK3抗体组小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达情况 与对照组比较, 1:200 SGK3抗体组小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15完全脱磷酸化时间无差异, 2 h后已检测不到CDC2-pTyr15蛋白表达; 1:100 SGK3抗体组小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达2 h后开始减弱, 4 h完全消失; 1:50和1:25 SGK3抗体组小鼠卵母细胞中1、2、3和4 h时均能检测到CDC2-pTyr15蛋白表达。见图9。



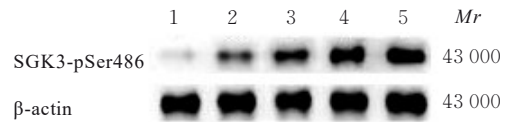
Lane 1: 1 h; Lane 2: 2 h; Lane 3: 3 h; Lane 4: 4 h.

图9 Western blotting法检测各时间点不同浓度SGK3抗体组小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达电泳图

Fig. 9 Electrophoregram of expressions of CDC2-pTyr15 in mouse oocytes in different concentrations of SGK3 antibodies groups at different time points detected by Western blotting method

2.8 体外培养不同时间点小鼠卵母细胞中SGK3-pSer486蛋白表达水平 体外培养0、30、60、90和120 min时GV期小鼠卵母细胞中SGK3-pSer486蛋白表达水平分别为 0.156 ± 0.003 、 0.775 ± 0.002 、 0.858 ± 0.004 、 0.959 ± 0.005 和

0.981 ± 0.007 。与0 min时比较, 30 min后小鼠卵母细胞中SGK3-pSer486蛋白表达水平逐渐升高 ($P < 0.01$), 60~120 min时仍然维持在较高的水平。见图10。

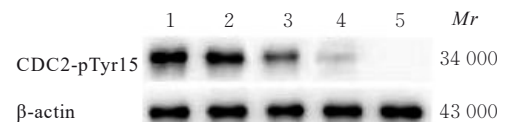


Lane 1: 0 min; Lane 2: 30 min; Lane 3: 60 min; Lane 4: 90 min; Lane 5: 120 min.

图10 Western blotting法检测体外培养不同时间点小鼠卵母细胞中SGK3-pSer486蛋白表达电泳图

Fig. 10 Electrophoregram of expressions of SGK3-pSer486 in mouse oocytes cultured *in vitro* at different time points detected by Western blotting method

2.9 体外培养不同时间点小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达水平 体外培养0、30、60、90和120 min时GV期小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达水平分别为 0.956 ± 0.008 、 0.941 ± 0.015 、 0.567 ± 0.011 、 0.477 ± 0.011 和 0.030 ± 0.020 。体外培养0和30 min时小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达水平较高, 与0和30 min时比较, 60 min后小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达水平逐渐降低 ($P < 0.01$), 120 min时已检测不到CDC2-pTyr15蛋白表达。见图11。



Lane 1: 0 min; Lane 2: 30 min; Lane 3: 60 min; Lane 4: 90 min; Lane 5: 120 min.

图11 Western blotting法检测体外培养不同时间点小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达电泳图

Fig. 11 Electrophoregram of expressions of CDC2-pTyr15 in mouse oocytes cultured *in vitro* at different time points detected by Western blotting method

3 讨论

SGK3在卵母细胞减数分裂中发挥重要的调控作用。减数分裂是卵母细胞发育的关键过程, 涉及到细胞周期的精确调节、染色体的对分离和遗传物质的平衡分配^[11-12]。SGK3作为丝氨酸/苏氨酸激

酶在卵母细胞的减数分裂中具有多方面的功能。本研究结果表明:SGK3可能与细胞周期调控关键因子CDC2相互作用,并参与调节CDC2的激活。在减数分裂的恢复过程中,SGK3可通过直接激活CDC25B促使CDC2的脱磷酸化,进而激活CyclinB-CDC2复合物^[13-15]。该活化过程是卵母细胞实现G₂/M期转换的重要步骤,可促进减数分裂的恢复^[16-17]。卵母细胞到胚胎的转变过程中,减数分裂的成功与否决定了卵子的质量和胚胎的受精率^[18]。因此,卵母细胞中G₂/M期转换的发生对于减数分裂的恢复至关重要。有学者^[19-21]研究发现:SGK3在卵巢癌、子宫内膜癌和前列腺癌等生殖系统肿瘤中呈现高表达,造成细胞周期严重紊乱。利用微小RNA(microRNA, miRNA)靶向抑制SGK3可促进卵巢颗粒细胞凋亡,从而改善多囊卵巢综合征的功能失调^[22-24]。但SGK3在小鼠卵母细胞第一次减数分裂恢复中的作用尚不清楚。

为了进一步研究SGK3在小鼠卵母细胞第一次减数分裂恢复中的分子调控机制,本研究首先通过显微注射技术将SGK3-mRNA注入GV期小鼠卵母细胞中,结果显示:与对照组比较,注射SGK3-mRNA后小鼠卵母细胞GVBD率明显升高,提示过表达SGK3能够加快卵母细胞GVBD进程;同时,过表达SGK3-mRNA可以加快卵母细胞中CDC2-Tyr15脱磷酸化,进而促进小鼠卵母细胞发生G₂/M期转化;用SGK3抗体稀释液处理GV期卵母细胞,随着抗体浓度升高,与对照组比较,在各检测时间点发生GVBD的卵母细胞数量减少,GVBD率降低,卵母细胞发生GVBD速度降低,且抑制SGK3可以延迟CDC2-Tyr15脱磷酸化,提示抑制SGK3后卵母细胞发生G₂/M期转换阻滞,进一步证明SGK3在小鼠卵母细胞减数分裂中起正向调节作用。本研究结果显示:SGK3-mRNA组小鼠卵母细胞中CDC2-pTyr15蛋白表达在显微注射后1h已检测不到,对照组CDC2-pTyr15蛋白表达在培养后2h完全消失;与对照组比较,过表达SGK3使小鼠卵母细胞中CDC2-Tyr15完全脱磷酸化时间至少提前1h,说明SGK3可能是通过缩短CDC2-Tyr15完全脱磷酸化时间来增加GVBD率。此外,SGK3还可能与其他信号通路和调控因子相互作用,如与PI3K/PDK1/TORC2信号通路有关^[25],其相互作用可能进一步调控着卵母细胞减数分裂的进程。本研究结果显示:在体外培养小鼠

卵母细胞的过程中,SGK3的磷酸化开始于30min,而CDC2的完全脱磷酸化则发生在90min后,说明在小鼠卵母细胞第一次减数分裂恢复过程中,SGK3的激活早于CDC2的激活,SGK3可能是CDC2的上游调控因子,但其具体机制需要进一步研究。

综合上述,SGK3是小鼠卵母细胞第一次减数分裂恢复的正性调节因子,具有促进其减数分裂的作用。本研究结果为卵母细胞减数分裂恢复机制提供了进一步的补充,为不孕症并发卵母细胞成熟障碍患者提供了新的诊断靶点和治疗方向,同时有助于更好地认识细胞生长、发育、凋亡和癌变的深层机制,也可为今后优化动物繁殖、人类体外生殖辅助技术和肿瘤的靶向治疗提供理论依据。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

郭文秀和庄妍参与研究方案的制定、研究实施过程、数据采集和论文撰写,张慧灵和何文宁参与数据的统计分析和文献整理,孟峻参与论文修订和审校。

[参考文献]

- [1] LEE D Y, LEE H H, LEE J R, et al. Effects of cyclic adenosine monophosphate modulators on maturation and quality of vitrified-warmed germinal vesicle stage mouse oocytes[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2020, 18(1): 5.
- [2] JIA B Y, XIANG D C, SHAO Q Y, et al. Inhibitory effects of astaxanthin on postovulatory porcine oocyte aging *in vitro*[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 20217.
- [3] WANG Q, WEI H J, DU J, et al. H3 Thr3 phosphorylation is crucial for meiotic resumption and anaphase onset in oocyte meiosis[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(2): 213-224.
- [4] LAMOTHE S M, ZHANG S T. The serum- and glucocorticoid-inducible kinases SGK1 and SGK3 regulate hERG channel expression via ubiquitin ligase Nedd4-2 and GTPase Rab11[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(21): 15075-15084.
- [5] SUNADA S, SAITO H, ZHANG D D, et al. CDK1 inhibitor controls G₂/M phase transition and reverses DNA damage sensitivity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 550: 56-61.
- [6] SMITS V A, MEDEMA R H. Checking out the G₂/M transition[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1519(1/2): 1-12.

- [7] ZHANG Y, ZHANG Z, XU X Y, et al. Protein kinase A modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes[J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(12): 3777-3786.
- [8] PARK J, LEONG M L, BUSE P, et al. Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway[J]. *EMBO J*, 1999, 18(11): 3024-3033.
- [9] BASNET R, GONG G Q, LI C Y, et al. Serum and glucocorticoid inducible protein kinases (SGKs): a potential target for cancer intervention[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(5): 767-771.
- [10] HOSODA E, HIRAOKA D, HIROHASHI N, et al. SGK regulates pH increase and cyclin B-Cdk1 activation to resume meiosis in starfish ovarian oocytes[J]. *J Cell Biol*, 2019, 218(11): 3612-3629.
- [11] YANG Z F, ZHANG M L, ZHANG J, et al. MiR-302a-3p promotes radiotherapy sensitivity of hepatocellular carcinoma by regulating cell cycle via MCL1[J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 1450098.
- [12] YUAN Y P, ZHAO H, PENG L Q, et al. The SGK3-triggered ubiquitin-proteasome degradation of podocalyxin (PC) and ezrin in podocytes was associated with the stability of the PC/ezrin complex[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(11): 1114.
- [13] PENG L Q, ZHAO H, LIU S, et al. Lack of serum- and glucocorticoid-inducible kinase 3 leads to podocyte dysfunction[J]. *FASEB J*, 2018, 32(2): 576-587.
- [14] LIU J L, YU X Y, YU H Y, et al. Knockdown of MAPK14 inhibits the proliferation and migration of clear cell renal cell carcinoma by downregulating the expression of CDC25B[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(3): 1183-1195.
- [15] CUI C, REN X L, LIU D J, et al. 14-3-3 epsilon prevents G2/M transition of fertilized mouse eggs by binding with CDC25B [J]. *BMC Dev Biol*, 2014, 14: 33.
- [16] LANG F, VOELKL J. Therapeutic potential of serum and glucocorticoid inducible kinase inhibition[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2013, 22(6): 701-714.
- [17] FIRESTONE G L, GIAMPAOLO J R, O'KEEFFE B A. Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2003, 13(1): 1-12.
- [18] 冯少青, 孟峻. 血清和糖皮质激素诱导蛋白激酶3与肿瘤发生发展关系的研究进展[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(2): 540-545.
- [19] CRISTOFANO A D. SGK1: the dark side of PI3K signaling[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 123: 49-71.
- [20] NALAIRNDRAN G, HASSAN ABDUL RAZACK A, MAI C W, et al. Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) regulates serum/glucocorticoid-regulated kinase 3 (SGK3) for prostate cancer cell survival[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(20): 12188-12198.
- [21] HUO Q Y, XU C, SHAO Y H, et al. Free CA125 promotes ovarian cancer cell migration and tumor metastasis by binding Mesothelin to reduce DKK1 expression and activate the SGK3/FOXO3 pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(2): 574-588.
- [22] WANG Y Z, ZHOU D J, CHEN S. SGK3 is an androgen-inducible kinase promoting prostate cancer cell proliferation through activation of p70 S6 kinase and up-regulation of cyclin D1[J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(6): 935-948.
- [23] XU L S, XIONG F, BAI Y Y, et al. Circ_0043532 regulates miR-182/SGK3 axis to promote granulosa cell progression in polycystic ovary syndrome [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, 19(1): 167.
- [24] 周嘉禾, 陈志静, 李洁明, 等. PGRMC1在多囊卵巢综合征患者中的表达及其调控卵巢颗粒细胞凋亡和糖脂代谢的分子机制[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2023, 48(4): 538-549.
- [25] OCHI H, AOTO S, TACHIBANA K, et al. Block of CDK1-dependent polyadenosine elongation of Cyclin B mRNA in metaphase-i-arrested starfish oocytes is released by intracellular pH elevation upon spawning[J]. *Mol Reprod Dev*, 2016, 83(1): 79-87.