

小鼠睾丸表皮生长因子受体及增殖细胞核抗原表达的加龄变化研究

张健^① 高福祿^② 支会英^③

(^①河北师范大学生命科学学院 石家庄 050016 ;^②承德医学院组胚教研室 承德 067000 ;

^③河北医科大学生化教研室 石家庄 050017)

摘要 :观察了表皮生长因子受体及增殖细胞核抗原在生后 1 天至生后 10 月龄昆明种小鼠睾丸内的表达。结果表明,精原细胞及初级精母细胞从生后第 2 周至生后 4 周龄 DNA 复制旺盛,增殖细胞核抗原免疫反应阳性细胞面密度于生后 14 天出现峰值。表皮生长因子受体在间质细胞、精母细胞内均有表达。生后 4 周时,精母细胞表皮生长因子受体表达较强,便于表皮生长因子发挥调节细胞增殖、凋亡的作用。

关键词 :小鼠,增殖细胞核抗原,表皮生长因子受体

中图分类号 :Q954 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2000)04-05-04

Study on the Age-Specific Changes of EGFR and PCNA in the Seminiferous Epithelium of the Mouse

ZHANG Jian^① GAO Fu-Lu^② ZHI Hui-Ying^③

(^①Biology Department, Hebei Normal University Shijiazhuang 050016, China ;

^②Histology and Embryology Department, Chengde Medical University Chengde 067000, China ;

^③Biochemistry Department, Hebei Medical University Shijiazhuang 050017, China)

Abstract :The express of EGFR and PCNA in the seminiferous epithelium was observed during a series of developing stages from birth to postnatal 10th month with SP method. The results show that :between 2nd and 4th weeks after birth replicating activity of DNA in spermatogonia and primary spermatocytes were flourishing. Surface densities of PCNA-positive cells reached up their peaks on 14th day after birth through measurements of IP-8 computer image analysis system. There were expression of EGFR in Leydig cells and spermatocytes, and the stronger expression of EGFR was located at spermatocytes during postnatal fourth week.

Key words :Mouse ;EGFR ;PCNA

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)最早是从雄性小鼠颌下腺提纯的一种多肽^[1],其来源主要是颌下腺。EGF 通过自分泌或旁分泌机制对组织器官的生长发育起调节作用,刺激各种上皮细胞的分裂、分化和增殖。其受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)

是存在于细胞质膜中的糖蛋白,被质膜分为内外两个区域的单一肽链。当 EGF 与其受体结

第一作者介绍 张健,男,28岁,助教,硕士,研究方向:发育生物学、生殖生物学;

收稿日期:1999-04-02,修回日期:2000-04-17

合后,具有多种生物学活性。EGFR 在睾丸内是如何分布的?近年来报道较少^[2]。本文观察了 EGFR 及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)在各发育阶段小鼠睾丸内的表达,以确定其细胞定位及其在不同发育阶段表达的特异性;研究了生精上皮细胞群体增殖活性的变化过程,探讨 EGF 在生精细胞增殖中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 动物、取材及切片制备

选用昆明种小鼠(华北制药股份有限公司动物场提供),分为生后 1 天(生后 8 小时内),生后 3、5、7 天,2、3、4、6、8 周,6、10 月龄共 11 组,每组选用 7 只动物。动物称重断头处死后,剖腹取其睾丸,固定于 4% 的多聚甲醛,常规脱水,石蜡包埋,制成 6 μm 的连续切片,切片裱于覆有 3-氨基三羟乙基硅烷(3-Aminopropyl-Triethoxysilane, APES)的载玻片上。

1.2 免疫细胞化学染色

切片脱蜡后用 1% 甲醇-过氧化氢液处理 30 分钟,经山羊血清于 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 分钟后,采用北京中山公司提供的美国 ZYMED 公司 SP 试剂盒进行染色。加入 EGFR(1:50 SANTA CRUZ)或 PCNA 抗体(1:50 ZYMED)后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,再加入生物素标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 分钟之后加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素孵育 30 分钟,经二甲氨基偶氮苯(DAB)过氧化氢显色约 5 分钟,0.01 mol/L 的 PBS 充分冲洗以终止反应,以上各步间均用 0.01 mol/L 的 PBS 冲洗 3 次,每次 5 分钟,对照组用 0.01 mol/L 的 PBS 替代第一抗体进行免疫细胞化学染色。

1.3 PCNA 免疫反应阳性细胞图像分析

10 倍接物镜下,用 IP-8 计算机图像分析系统(北京凌志公司设计)进行 PCNA 免疫反应阳性细胞面密度(免疫反应阳性细胞与所选整个视野的百分比)分析,每只动物选取 3 张切

片,每张切片检查 10 个视野。

2 结果

2.1 PCNA 免疫细胞化学观察

PCNA 阳性细胞,其阳性颗粒为浅黄色至棕黄色,位于细胞核内。生后 1~3 天,生殖母细胞染色浅,数量少,分布不广泛(图版 I:1)。阳性的生殖母细胞在生后第 5 天出现。生后第 7 天,生精小管中出现阳性的精原细胞(图版 I:2)。生后 2~3 周,精原细胞、初级精母细胞都呈阳性,但初级精母细胞核染色比精原细胞核染色深(图版 I:3)。生后第 4 周,精原细胞呈阳性的生精小管比例增加,阳性初级精母细胞层次变少,多为 1~2 层(图版 I:4)。从生后第 6 周开始,大部分生精小管内阳性精原细胞排为一层,染色深,但初级精母细胞呈弱阳性或阴性(图版 I:5),该状态一直保持到生后第 8 周。在生后 6 月和 10 月龄,可见精原细胞呈阳性反应,分布不均匀,大部分初级精母细胞呈弱阳性反应(图版 I:6)。

对 PCNA 免疫细胞化学染色结果进行面密度分析,结果提示:从出生到生后 14 天,面密度随日龄变化有增加的趋势,到生后第 14 天出现峰值。出生 14 天以后,面密度呈下降的趋势(表 1)。

2.2 EGFR 免疫细胞化学观察

EGFR 免疫反应阳性细胞内可见阳性颗粒,呈浅黄色至棕黄色,大小均一,位于胞膜下方。从新生到生后第 7 天,间质细胞呈弱阳性反应,多为浅黄色。随日龄增加间质细胞内的阳性反应逐渐增强,生后 3 周龄时最强,之后逐渐下降,到生后第 8 周则呈弱阳性反应。精母细胞在生后第 2 周呈弱阳性反应,生后 4 周龄时,精母细胞胞浆内可见阳性颗粒(图版 I:7),并一直保持到生后第 8 周(图版 I:8)。生后 6 月和生后 10 月龄,精母细胞呈阴性。从生后 1 天到生后 10 月龄,睾丸支持细胞未见 EGFR 免疫阳性染色,未见阳性肌样细胞。

表 1 PCNA 免疫反应阳性细胞面密度的加龄变化

编号	动物分组										
	生后 1 天	生后 3 天	生后 5 天	生后 7 天	生后 14 天	生后 21 天	生后 28 天	生后 42 天	生后 56 天	生后 6 月	生后 10 月
1	0.98	1.36	1.56	1.48	2.48	2.49	2.47	1.06	1.00	0.73	0.71
2	1.35	1.33	1.59	1.91	3.07	2.47	2.38	0.95	0.85	0.80	0.75
3	1.07	1.51	1.37	1.92	3.86	2.48	2.56	0.97	0.79	0.84	0.81
4	1.05	0.85	1.50	2.22	3.83	1.98	1.98	0.73	0.74	0.84	0.77
5	1.05	0.84	1.73	2.35	2.94	2.58	1.63	0.61	0.61	0.68	0.62
6	1.40	0.77	1.34	1.62	3.66	3.11	2.38	0.78	0.64	0.62	0.56
7	1.08	1.10	1.37	2.20	3.41	2.21	2.37	1.03	1.04	0.99	0.91
$\bar{X} \pm S$	1.14 ± 0.16	1.11 ± 0.30	1.49 ± 0.14	1.96 ± 0.32	3.32 ± 0.51	2.47 ± 0.35	2.25 ± 0.33	0.88 ± 0.17	0.81 ± 0.17	0.79 ± 0.12	0.73 ± 0.12

3 讨论

表皮生长因子受体是存在于细胞质膜中的糖蛋白,并被质膜分为内外两个区域的单一肽链。当表皮生长因子与其受体结合后,激活 EGFR 细胞内域的酪氨酸蛋白激酶(PTK)活性,PTK 使受体自身及胞浆中多种蛋白质底物磷酸化,调节细胞的分裂、分化、生存和死亡^[3]。

孙亚平等^[4]发现,EGF 阳性反应主要定位于睾丸间质细胞,偶见于生精小管周边肌样细胞,进入性成熟期以后,EGF 阳性反应尚可出现于精原细胞、精母细胞,以及个别精子细胞。大鼠、小鼠和人的睾丸支持细胞均未见明显阳性染色。我们在实验观察中发现,小鼠在生后第 4 周,精母细胞 EGFR 阳性反应强,以便 EGF 通过膜受体介导而分化,使 EGF 有机会进入细胞核,与染色质 DNA 的活性转录区结合,表现出调节生精细胞增殖、分化、生存和凋亡的作用,有利于精子发生。

另外,我们发现生后 3 周龄间质细胞内 EGFR 表达最强,而该阶段是生精细胞 DNA 复制最旺盛的阶段之一。如果正如推测的那样,间质细胞是睾丸中主要的 EGF 分泌细胞,EGF 就通过自分泌的途径,调节间质细胞内睾酮的生物合成^[5]。通过激素这个第二信使调节生精细胞的功能状态。

从生后 1 天到生后 3 日龄,生殖母细胞呈 PCNA 阴性或弱阳性,说明刚出生时生殖母细胞 DNA 复制、合成不旺盛。我们认为在该阶段生殖母细胞增殖有一短暂的休止期。到生后

第 5 天,生殖母细胞核 PCNA 免疫反应才增强,这与高福祿^[6]的研究结果相吻合。他发现,生殖母细胞在胚胎 19 天暂停³H 标记胸腺嘧啶的掺入,生后第 4 天,生殖母细胞迁移到睾丸索周边时开始 DNA 合成。

令人感兴趣的是,生后 2~4 周龄时可见数层 PCNA 阳性的精原细胞和初级精母细胞,生后第 6 周到 10 月龄大部分生精小管内仅存一层阳性的精原细胞。高福祿等^[6]已发现,正常状态下,老年大鼠的精原细胞尚未失去 DNA 合成的能力,这说明在生后各发育阶段中,部分精原细胞始终保持 DNA 复制细胞增殖的能力。

参 考 文 献

- [1] Tsutsumi O., H. Kurachi, T. A. Oka. Physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science*, 1986, **233**(11):975.
- [2] Suarez Quian, C. A., W. Niklinski. Immunocytochemical localization of the epidermal growth factor receptor in mouse testis. *Biol. Reprod.*, 1990, **43**:1087.
- [3] 于雪艳, 胡国强, 田克立等. 肺癌组织中表皮生长因子受体的研究. 山东医科大学学报, 1996, **34**(1):5.
- [4] 孙亚平, 严缘昌, 张尚权等. 大鼠和小鼠睾丸表皮生长因子表达的免疫组织化学定位观察. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1997, **6**(1):18.
- [5] Sordoillet C., M. A. Chauvin, J. C. Hendrick *et al.* Sites of interaction between epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 in the control of steroidogenesis in cultured porcine Leydig cells. *Endocrinology*, 1992, **130**:352.
- [6] Gao, F. L. Study on the macromolecular synthesis in aging mouse seminiferous tubules by light and electron microscopic radioautography. *Cell Mol. Biol.*, 1993, **39**(6):659.

图 版 说 明

1. 光镜观察示生后 1 天 PCNA 弱阳性的生殖母细胞(▲) [Light micrograph showing the PCNA positive cell(▲) on postnatal 1st day] × 400 ;
2. 示生后 7 天 PCNA 阳性的精原细胞(▲) [Light micrograph showing the PCNA positive spermatogonia(▲) on postnatal 7th day] × 400 ;
3. 示生后 21 天 PCNA 阳性的精原细胞(▲)和初级精母细胞(△) [Light micrograph showing the PCNA positive spermatogonia(▲) and primary spermatocyte(△) on postnatal 21st day] × 200 ;
4. 生后 28 天 ,PCNA 阳性的初级精母细胞(▲)层次变少 [The layer of PCNA positive primary spermatocyte(▲) decrease on postnatal 28th day] × 400 ;
5. 生后 42 天 ,阳性的精原细胞(▲)排为一层 [Light micrograph showing the PCNA positive spermatogonia(▲) on postnatal 42nd day] × 200 ;
6. 生后 10 月 ,PCNA 阳性的精原细胞(▲)分布不均匀 [The PCNA positive spermatogonia(▲) distribute discontinuously on postnatal 10th month] × 100 ;
7. 生后 4 周 ,示阳性的精母细胞(▲) [Light micrograph showing the EGFR positive spermatocyte(▲) on postnatal 4th weeks] × 200 ;
8. 生后 8 周 ,示阳性的精母细胞(▲) [Light micrograph showing the EGFR positive spermatocyte(▲) on postnatal 8th weeks] × 400

