

隆肛蛙卵巢类固醇激素受体的免疫细胞化学研究^{*}

雷 忻^{1,2}, 张育辉¹

(1 陕西师范大学 生命科学学院, 陕西 西安 710062; 2 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000)

[摘 要] 用免疫细胞化学方法, 对隆肛蛙不同发育时期卵泡雌激素受体、孕激素受体和雄激素受体进行了定位检测。结果表明, 雌激素受体和孕激素受体主要在卵黄合成和卵黄合成后期的滤泡细胞中表达; 3种激素受体在各期卵母细胞胞质中均有表达, 雌激素受体和孕激素受体在卵黄合成和卵黄合成后期表达强烈; 3种类固醇激素受体在卵母细胞核膜中都有表达。这些结果说明, 在隆肛蛙卵母细胞生长发育和成熟中, 雌激素受体和孕激素受体主要调控卵黄合成及合成后期雌二醇和孕酮的合成与分泌, 其受体可能通过基因组和非基因组两种机制发挥作用。

[关键词] 隆肛蛙; 性类固醇激素受体; 免疫细胞化学

[中图分类号] Q 959.5⁺ 3; Q 954.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)07-0033-04

有关高等脊椎动物卵巢类固醇激素受体的研究已有一些报道, Madhabananda 等^[1]用免疫组化方法研究了大鼠卵巢中 ER α 和 ER β 两种雌激素受体的表达, 结果表明, ER β 在颗粒细胞中表达, ER α 在膜细胞、间质细胞和生发上皮中表达。Vemeirsch 等^[2]用免疫组化方法对犬卵巢的孕激素受体(PR)进行了检测, 结果发现 PR 在滤泡细胞核、膜细胞核、黄体细胞核等中都有表达, 而且随着卵泡的发育表达增强, 提示孕酮在排卵和黄体化过程中具有一定的作用。Iso la 等^[3]对鸡卵巢的 PR 进行定位, 用雌激素作用后, 发现 PR 在滤泡细胞中显阳性。在两栖动物中, Tian 等^[4], Bayaa 等^[5]以爪蟾为材料, 用分子克隆方法对 PR 在卵母细胞发育和成熟中的调控作用进行了研究, 证明 PR 可能也存在于卵母细胞胞质中, 能进行快速的非基因调控。目前, 有关两栖动物卵巢类固醇激素受体的研究报道较少, 许多方面仍存在分歧和不明之处, 如类固醇激素受体的存在部位, 其是否也像在高等脊椎动物中那样调节激素的分泌以及如何调节, 其是否参与调节卵母细胞的发育和成熟等。而且上述研究多采用放射免疫法、离体培养及注射外源激素等方法进行定量测定, 而对体内细胞的激素定位研究较少。

隆肛蛙(*Rana quadranus* Liu) 属无尾目, 蛙科, 蛙属, 是秦巴山区的优势种, 具有一定的药用和食用价值。本试验首次采用免疫组织化学方法, 对隆肛蛙

不同发育时期卵泡中的雌激素受体、孕激素受体和雄激素受体的多克隆抗体进行了定位研究, 对性类固醇激素受体在卵泡发育成熟中的调控作用进行了初步分析, 旨在探讨激素对卵子发育的调控机制, 并为两栖动物生殖生理学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

雌性成体隆肛蛙, 共 14 例, 体重 28~95 g。于 2002-04~10 采自秦岭北坡的溪流中, 每月 2 例。采集点在东经 107°58'15"~16", 北纬 33°47'03"~04", 海拔高度为 1 200~1 400 m。

1.2 样品制备

动物经乙醚麻醉后剖腹, 取出卵巢, 切成 1 cm³ 的小块, 新鲜配制改良 Bouin 液固定 8~12 h, 系列酒精脱水, 石蜡包埋, 切片厚 6 μ m。

1.3 免疫细胞化学反应程序

切片脱蜡水化后, 放入新鲜配制的质量分数 3% 的 H₂O₂ 溶液中 5~10 min, 以灭活内源性酶, 然后采用 SABC (streptavidin-biotin complex) 法进行免疫细胞化学反应。第一抗体分别为兔抗人雌激素受体 (Estrogen Receptor, ER, 1:100 稀释)、兔抗人孕激素受体 (Progesterone Receptor, PR, 1:100 稀释)、小鼠抗人雄激素受体 (Androgen Receptor, AR, 1:100 稀释), 三者均为武汉博士德公司产品。

^{*} [收稿日期] 2003-12-30

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目 (2001 SM 26); 延安大学专项基金资助项目 (YD2003-190)

[作者简介] 雷 忻 (1972-), 女, 陕西延安市人, 讲师, 硕士, 主要从事动物生殖与发育研究。

4 孵育 24 h。第二抗体为即用型羊抗兔 IgG (博士德公司产品), 室温下孵育 30 min; 再加 SABC 复合物(博士德公司产品), 室温下孵育 30 min; 最后用二氨基联苯胺显色 5~30 min。对照片用 PBS 代替第一抗体进行孵育, 为阴性反应。

本试验统计了免疫染色反应的 3 种受体各 10 张片子, 各 50 个不同发育时期的卵泡。按阳性部位免疫反应着色强弱, 分为四级: + + + 为强免疫阳性反应, 显深棕色; + + 为中等阳性反应, 显棕色; + 为

弱阳性反应, 显浅棕色; - 为阴性反应, 显浅黄色或无色。

2 结果与分析

2.1 雌激素受体在卵巢中的分布

由表 1 知, 在卵巢 I~II 期卵泡中, 受体阳性反应定位在滤泡细胞、卵母细胞的胞质、核膜中。在 III~IV 期卵泡中, 除了滤泡细胞, 卵母细胞的胞质、卵黄颗粒也有较强阳性反应(图版-1~4)。

表 1 隆肛蛙不同发育时期卵泡中类固醇激素受体的分布

Table 1 Distribution of steroid hormone receptors at different stages of follicle development of *Rana quadranus*

发育时期 Developmental stages	ER					PR					AR					对照 Control
	Fc	Cp	Nm	Np	Num	Fc	Cp	Nm	Np	Num	Fc	Cp	Nm	Np	Num	
I~II	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
III~IV	++	++	+	-	-	++	++	++	+	-	+	+	+	-	-	-

注: ER. 雌激素受体; PR. 孕激素受体; AR. 雄激素受体; Fc. 滤泡细胞; Cp. 胞质; Nm. 核膜; Np. 核质; Num. 核仁膜。

Note: ER. Estrogen receptor; PR. Progesterone receptor; AR. Androgen receptor; Fc. Follicle cell; Cp. Cytoplasm; Nm. Nuclear membrane;

Np. Nucleoplasm; Num. Nucleolar membrane

2.2 孕激素受体在卵巢中的分布

表 1 表明, 在卵巢 I~II 期卵泡中, 受体阳性反应广泛分布在滤泡细胞、卵母细胞胞质和核膜等部位。III~IV 期卵泡中, 上述部位阳性反应有所增强, 卵母细胞核周围的胞质阳性反应较强。此时, 核质也呈阳性反应, 但较弱(图版-5~8)。

2.3 雄激素受体在卵巢中的分布

由表 1 可知, 在卵巢各个时期的卵泡中, 滤泡细胞、卵母细胞胞质、核膜均呈弱阳性反应(图版-9)。

3 讨论

3.1 滤泡细胞中的类固醇激素受体

M adhabananda 等^[1]用免疫组化方法对大鼠卵巢雌激素受体的表达进行研究后发现, 雌激素受体 β 可在滤泡细胞中表达, 因而认为其在卵泡生长发育的调控中可能介导某些激素的活动。Pasanen 等^[6]用同样方法对鸡卵巢孕激素受体的表达进行了研究, 发现其在滤泡细胞中也有表达。而这些受体在两栖类卵巢滤泡细胞中是否存在, 迄今未见报道。本试验对隆肛蛙卵巢 3 种类固醇激素受体表达的观察发现, 雌激素受体和孕激素受体主要在 III~IV 期滤泡细胞中表达, 而雄激素受体在各期滤泡细胞中均可表达, 说明在卵黄合成及合成后期, 雌激素受体和孕激素受体对雌二醇和孕酮的合成与分泌有重要的调控作用; 睾酮作为孕酮和雌二醇转化的中间产物, 其受体在 3 种激素的转化和分泌中也有一定的调节作用。此外, 类固醇激素受体可能在滤泡细胞的生长

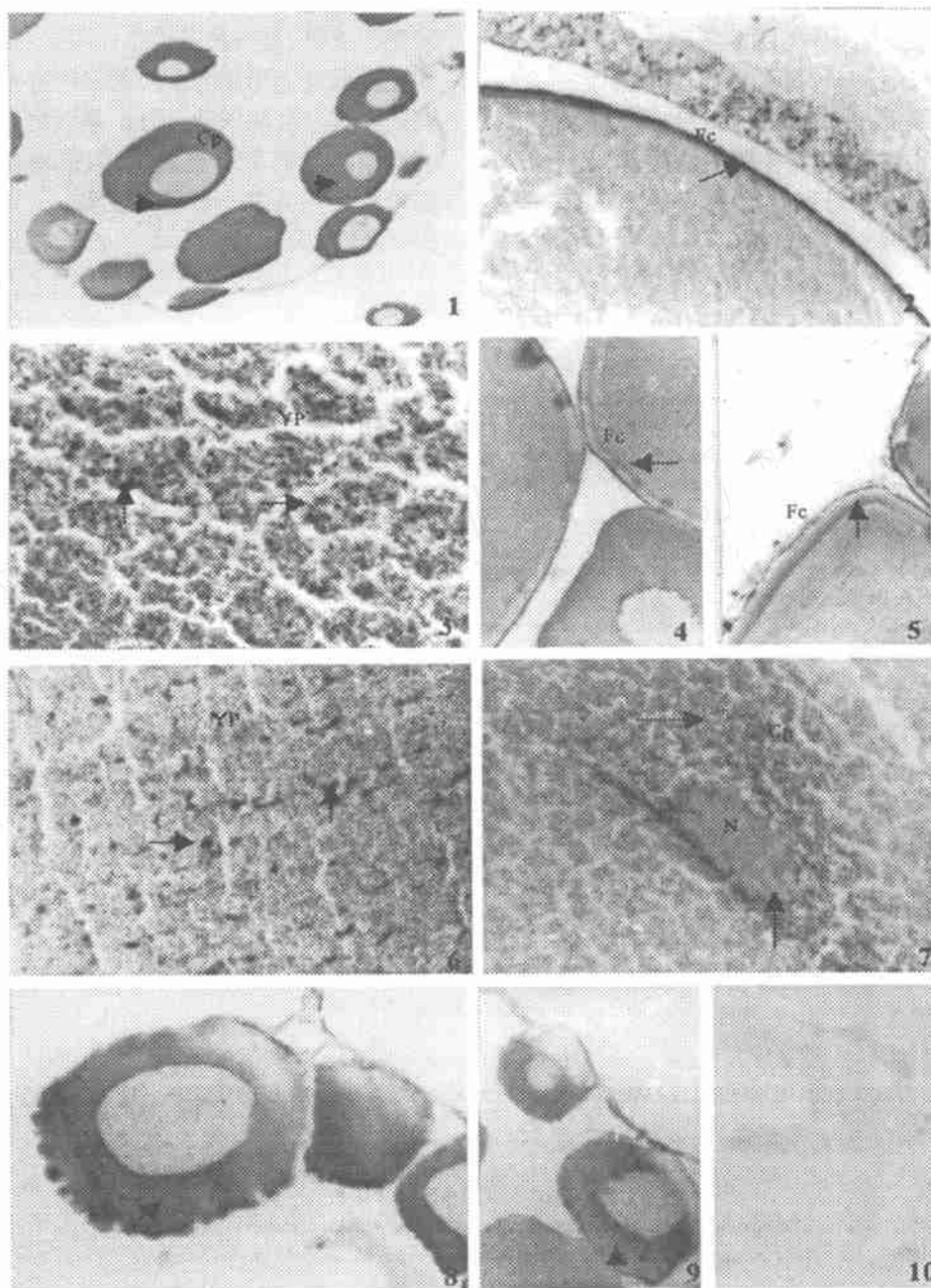
发育中也扮演着重要角色。

3.2 卵母细胞胞质中的类固醇激素受体

M asui 等^[7]证明, 孕酮介导的成熟促进因子在去核卵母细胞中仍具有活性, 提出了卵母细胞胞质中可能存在孕酮受体的假说。Bayaa 等^[8]对爪蟾孕酮受体介导卵母细胞成熟的研究发现, 卵母细胞胞质中有孕酮受体, 且在去核卵母细胞中, 仍能激活分裂原活化蛋白激酶(MAPK), 提出孕酮受体在胞质中有介导卵母细胞成熟的非基因调控作用。M igliaccio 等^[9]和 Castoria 等^[10]在爪蟾研究中发现, 雌激素受体可存在于卵母细胞胞质中, 并可发挥其介导作用。本研究观察发现, 隆肛蛙各期卵母细胞胞质中均有雌激素受体、孕激素受体和雄激素受体的表达, 前两者在 III~IV 期表达较为强烈。因而推测在隆肛蛙卵母细胞胞质中, 3 种激素受体除可介导激素作用于核基因外, 还可能作为核外胞质信号转导因子, 对卵母细胞的生长、发育和成熟进行非基因调控。但这种调控方式的详细机制还需进一步研究。

3.3 卵母细胞核中的类固醇激素受体

传统观点认为^[11, 12], 类固醇激素受体主要存在于卵母细胞核中, 是一种核转录调节因子。本研究在隆肛蛙卵母细胞核膜中均观察到有类固醇激素受体的存在, 证明在卵母细胞的发育和成熟过程中, 雌二醇、孕酮和睾酮通过与核内受体结合, 作为核内转录活性因子作用于 DNA 的特定部位, 改变基因的转录活动, 从而调控卵母细胞的发育和成熟, 这是一种基因组作用机制。



图版 1~ 10 类固醇激素受体在隆肛蛙不同发育时期卵泡中的分布

1 ER 免疫阳性物定位在 II 期卵泡的滤泡细胞 (Fc)、卵母细胞胞质 (Cp)、核膜 (Nm), $\times 74$; 2 ER 免疫阳性物定位在 III 期卵泡的滤泡细胞 (Fc), $\times 74$; 3 ER 免疫阳性物定位在 III 期卵母细胞的卵黄颗粒 (Yp) 中, $\times 297$; 4 ER 免疫阳性物定位在 II 期卵泡的滤泡细胞 (Fc), $\times 74$; 5 PR 免疫阳性物定位在 II 期卵泡的滤泡细胞 (Fc), $\times 74$; 6 PR 免疫阳性物定位在 III 期卵母细胞胞质 (Cp), $\times 297$; 7 PR 免疫阳性物定位在 IV 期卵母细胞核膜 (Nm) 及其周围胞质 (Cp), $\times 74$; 8 PR 免疫阳性物定位在 II 期卵泡的滤泡细胞 (Fc)、卵母细胞胞质 (Cp)、核膜 (Nm), $\times 149$; 9 AR 免疫阳性物定位在 II 期卵泡的滤泡细胞 (Fc)、卵母细胞胞质 (Cp)、核膜 (Nm), $\times 74$; 10 对照, $\times 297$

Plate 1- 10 Distribution of steroid hormonal receptors at different stages of follicle development of *Rana guadrana*

1 Immunopositive ER receptor located in the follicle cell (Fc), cytoplasm (Cp) and nuclear membrane (Nm) of II stage oocyte, $\times 74$; 2 Immunopositive ER receptor located in the follicle cell (Fc) of III stage oocyte, $\times 74$; 3 Immunopositive ER receptor located in the yolk platelet (Yp) of III stage oocyte, $\times 297$; 4 Immunopositive ER receptor located in the follicle cell (Fc) of II stage oocyte, $\times 74$; 5 Immunopositive PR receptor located in the follicle cell (Fc) of II stage oocyte, $\times 74$; 6 Immunopositive PR receptor located in the cytoplasm (Nm) of III stage oocyte, $\times 297$; 7 Immunopositive PR receptor located in the cytoplasm (Cp) and nuclear membrane (Nm) of IV stage oocyte, $\times 74$; 8 Immunopositive PR receptor located in the follicle cell (Fc), cytoplasm (Cp) and nuclear membrane (Nm) of II stage oocyte, $\times 149$; 9 Immunopositive AR receptor located in the follicle cell (Fc), cytoplasm (Cp) and nuclear membrane (Nm) of II stage oocyte, $\times 74$; 10 Control, $\times 297$

结合上述分析,本研究认为,在隆肛蛙卵母细胞生长发育和成熟过程中,类固醇激素受体可能通过两种途径发挥作用:一种是存在于卵母细胞的胞质中,作为信号转导因子,通过快速的非基因组机制来调节类固醇激素在卵母细胞发育和成熟中的作用;另一种则是存在于卵母细胞核中,作为核转录活性

因子,通过改变基因的转录活动来调节卵母细胞的发育和成熟,是一种基因组作用机制。这两种作用方式在隆肛蛙卵母细胞中可能同时存在,相互协作,共同调控其发育和成熟。因此,类固醇激素受体在卵母细胞中可能具有双重功能,但这种双重功能的具体作用机制还需进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Madhabananda S, Frank W. Differential expression of estrogen receptor- β and estrogen receptor- α in the rat ovary[J]. Endocrinology, 1999, 140(2): 963- 971.
- [2] Vemeirsch H, Simoens P, Coryn M. Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations[J]. Reproduction, 2001, 122(1): 73- 83.
- [3] Isola J, Korte JM, Tuohimaa P. Immunocytochemical localization of progesterone receptor in the chick ovary[J]. Endocrinology, 1987, 121(3): 1034- 1040.
- [4] Tian JD, Kim S, Heilig E. Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(26): 14358- 14363.
- [5] Bayaa M, Booth RA, Sheng Y. The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 12607- 12612.
- [6] Pasanen S, Ylikomi T, Syvala H. Distribution of progesterone receptor in chicken: novel target organs for progesterone and estrogen action[J]. Mol Cell Endocrinol, 1997, 135: 79- 91.
- [7] Masui Y, Markert CL. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes[J]. Exp Zool, 1971, 177: 129- 146.
- [8] Bayaa M, Booth RA, Sheng Y. The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 12607- 12612.
- [9] Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor[J]. EMBO, 1998, 17: 2008- 2018.
- [10] Castoria G, Barone MV, DiDomenico. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis[J]. EMBO, 1999, 18: 2500- 2510.
- [11] Bagchi M K, Tsai M J, O'Malley BW, et al. Analysis of the mechanism of steroid hormone receptor-dependent gene activation in cell-free system[J]. Endocr Rev, 1992, 13: 525- 535.
- [12] Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors[J]. Endocr Rev, 1993, 14: 459- 479.

Immunocytochemistry of sex steroid receptors of ovary of the *Rana quadranus*

LEI Xin^{1,2}, ZHANG Yu-hui¹

(1 College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China;

2 College of Life Sciences, Yanan University, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

Abstract: Immunocytochemical localization was investigated at different developmental stages of the follicles of the *Rana quadranus* using antibodies against 17 β estradiol, progesterone and testosterone receptors. The results indicate that 17 β estradiol and progesterone receptors are expressed strongly in the follicle cells at the vitellogenic and postvitellogenic stages. Three receptors are expressed in the cytoplasm of oocyte at all stages, especially 17 β estradiol and progesterone receptors strengthened at the vitellogenic and postvitellogenic stage. Three receptors are expressed in the nuclear membrane of oocyte. These results prove that for the *Rana quadranus*, 17 β estradiol and progesterone receptors play key roles in the synthesis and secretion of 17 β estradiol and progesterone at the vitellogenic and postvitellogenic stage. The receptors can function in two ways as nongenomic and genomic actions. These results provide a cytochemical proof that sex steroid receptors may regulate the oocyte development of amphibian.

Key words: *Rana quadranus*; sex steroid receptor; immunocytochemistry