

3 种性类固醇激素及其受体在北方山溪鲢 卵母细胞发育中的分布*

雷 忻^{1,2}, 张育辉¹, 廉振民^{1,2}

(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] 为探讨性类固醇激素对北方山溪鲢(*B atrachuperus tibetanus*) 卵泡发育的调控作用, 采用组织学与免疫细胞化学方法, 观测卵子发生周期中雌二醇(17β estradiol, E_2)、孕酮(progesterone, P)、睾酮(testosterone, T) 3 种性类固醇激素及其受体(雌激素受体(Estrogen Receptor, ER)、孕激素受体(Progesterone Receptor, PR)、雄激素受体(Androgen Receptor, AR)) 在不同发育时期卵泡中的表达特征。结果可见, 北方山溪鲢卵巢中 I 期卵泡数量在 10 月达到最大值, II 期卵泡数量在翌年 5 月达到最大值, III 期卵泡数量在 6 月最多, IV 期卵泡数量在 11 月最多。 E_2 与 ER 在 III 期卵泡卵母细胞胞质中的阳性反应最强, P 与 PR, T 与 AR 均在 IV 期卵泡卵母细胞中的阳性反应最强。结果表明, 北方山溪鲢的卵泡为异步发育, 其从发生至成熟后排出需要的最短时间应为 20~ 22 个月。 E_2 在卵母细胞的卵黄形成中起作用, P 与 T 均对卵母细胞成熟起重要作用。3 种性类固醇激素分泌的变化规律与北方山溪鲢卵泡发生、发育、成熟和排出的周期一致。

[关键词] 北方山溪鲢; 卵母细胞; 性类固醇激素; 受体; 免疫细胞化学

[中图分类号] Q 959. 5⁺ 2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0013-06

Distribution of three sex steroid hormones and receptors in developmental oocytes of *Batrachuperus tibetanus*

LEI X in^{1,2}, ZHANG Yu-hui¹, LIAN Zhen-min^{1,2}

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

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

Abstract: To investigate the regulations of sex steroid hormones on follicle development of *Batrachuperus tibetanus*, the oogenesis cycle was observed by histologic method, and the expressive characteristics of 17β estradiol (E_2), progesterone (P), testosterone (T), estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and androgen receptor (AR) in follicles at different developmental stages were examined using the immunocytochemical method. Results showed that the number of stage I follicle was greatest at October, the maximum of stage II follicle was at May of the second year, the stage III follicles were present abundantly in June and the number of stage IV follicles was greatest in November of the second year. E_2 and ER were expressed strongly in the cytoplasm of oocyte at stage III follicle. Immunopositive reactions to P and PR in the cytoplasm of oocyte strengthened notably at stage IV, T and AR were also expressed strongly in the cytoplasm of oocyte at stage IV. These results suggest that the follicles of *B. tibetanus* are asynchronous development, and it takes 20- 22 months at least from oogenesis to ovulation after maturing. E_2 is concerned with vitellogenesis in oocyte. P and T regulate follicle maturation. The secreted rules of the three sex steroid hormones are consistent with the cycles of oogenesis, development, maturation and ovulation of *B. tibetanus*.

Key words: *Batrachuperus tibetanus*; oocyte; sex steroid hormone; receptor; immunocytochemistry

[收稿日期] 2006-06-21

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2001SM 26); 陕西省教育厅专项基金项目(05JK314)

[作者简介] 雷 忻(1972-), 女, 陕西延安人, 副教授, 在读博士, 主要从事动物生殖、发育及生态学研究。

[通讯作者] 张育辉(1956-), 男, 陕西兴平人, 教授, 主要从事动物生殖与发育研究。E-mail: yu-huizhang@163.com

性类固醇激素在脊椎动物卵子发育过程中有着重要的调控作用,其中雌激素、雄激素、孕激素的作用在鱼类和哺乳动物中研究的较为清楚,并有相关模型和机制被提出^[1-3]。在两栖类动物中, Kwon 等^[4-5]用放射免疫测定法对黑斑蛙(*Rana nigramaculata*)不同发育时期卵泡的类固醇激素水平进行测定认为,卵黄合成期卵泡主要产生雌二醇(17β estradiol, E_2),卵黄合成后期卵泡主要产生睾酮(testosterone, T),即将进入减数分裂的卵泡产生孕酮(Progesterone, P);并用两类细胞模型解释卵巢类固醇激素的合成,即颗粒细胞产生 P 和 E_2 ,膜细胞产生 T。Lutz 等^[6]发现,雄激素可介导光滑爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞的成熟。Ahn 等^[7]对 4 种蛙(*R. dybowskii*, *R. rugosa*, *R. catesbeiana*, *Bombina orientalis*)卵巢的类固醇激素合成细胞进行研究,发现颗粒细胞含有合成 P、 17α -羟孕酮(17α -OHP4)、雄烯二酮(AD)和 E_2 必需的酶系统;膜细胞则含有 17β -羟类固醇脱氢酶(17β HSD),这是 AD 转化为 T 所必须的活性酶,且这两种细胞在类固醇激素合成中是相互协作的。Tian 等^[8]和 Bayaa 等^[9]用分子克隆方法对爪蟾卵母细胞发育和成熟中孕激素受体的调控作用进行研究,结果表明,其可能也存在于卵母细胞胞质中,进行快速的非基因调控。笔者曾对隆肛蛙(*Rana quadranus*)卵巢中不同发育阶段卵子的性类固醇激素及其受体进行免疫细胞化学检测认为, E_2 与卵黄合成关系密切,而 T 和 P 在卵母细胞成熟中起着重要的调控作用;雌激素受体(Estrogen Receptor, ER)和孕激素受体(Progesterone Receptor, PR)主要调控卵黄合成及合成后期 E_2 和 P 的合成与分泌^[10-11]。

上述研究多集中在无尾两栖类动物,而关于有尾两栖类卵巢类固醇激素的分泌及其对卵母细胞发育调控作用的研究较少,对在体的内源性激素的细胞定位研究更少。北方山溪鲵(*Batrachuperus tibetanus*)属两栖纲有尾目小鲵科,地方名为羌活鱼、衫木鱼、白龙等,地理分布范围较广,北部达甘肃天水,南到四川九龙,生活在较高海拔的山区溪流中,秦岭北坡亦有分布,可作为药用、食用,具有一定的经济开发价值。有关山溪鲵卵巢滤泡细胞和卵黄发生的显微和超微结构研究已有报道^[12-13],而有关卵子发生周期及其类固醇激素分泌与调节的研究未见报道。本试验运用组织学与免疫细胞化学方法,对北方山溪鲵卵泡的发生、发育、成熟的年周期变化,以及 E_2 , P, T 与其受体 ER, PR, 雄激素受体(Androgen

Receptor, AR)在各期卵母细胞中的调控作用进行初步研究,旨在探索北方山溪鲵生殖活动的特点,探讨类固醇激素在有尾两栖类动物卵子发育中的调节机制,为有尾两栖类生殖生理学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

由于北方山溪鲵卵巢在冬季处于休眠状态,故标本的采集时间为 2002-04~11,采集地点为秦岭北坡东经 107°58'15",北纬 33°47'03"的溪流中,海拔 1600~1900 m。每月取 5 例雌性成体,共 40 例。体重 19~30 g,体长 175~260 mm。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 动物被麻醉后剖腹,取出卵巢,切成 1 cm^3 的小块,在新配制的改良 Bouin 液中固定 8~12 h,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片厚 8 μm 。

1.2.2 H.E 染色 用 H.E 方法染色,光镜观察。每月随机选取 5 张切片(共计 40 张),每张切片随机选取 6 个视野,统计每月卵巢中各个发育时期卵泡的数量,计算它们之间的比例,用 Excel 进行统计分析,并绘制变化曲线图。卵泡的分期标准参见文献[14]。

1.2.3 免疫细胞化学反应程序 切片脱蜡复水后,置入新配制的质量分数 3% H_2O_2 溶液 5~10 min,以灭活内源性酶,浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波热修复抗原。然后采用 SABC (Strept Avidin-biotin Complex) 法进行免疫细胞化学反应。第一抗体分别为兔抗人孕酮(P, 1:3500 稀释)、兔抗人睾酮(T, 1:2500 稀释)(二者均为 Sigma 公司产品)、兔抗人雌二醇(E_2 , 1:50 稀释)以及 3 种类固醇激素受体(ER, PR, AR)的多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司产品,经该公司鉴定,各种受体的多克隆抗体不与其他两种受体发生交叉反应,3 种受体的抗体均为 1:100 稀释),4 h 孵育 24 h。第二抗体为即用型羊抗兔 IgG (Boster 公司产品),室温下孵育 30 min。再加入 SABC 复合物(Boster 产品),室温下孵育 30 min。最后用 DAB 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。

1.2.4 图像分析 用 Leica DMLB2 型光学显微镜观察并摄像。用 Qwin V3 图像分析系统(Leica)对不同发育阶段卵母细胞的 E_2 , P, T 3 种激素及其受体 ER, PR, AR 的免疫反应结果进行灰度检测。每个材料随机选 8 张切片,每张切片随机选 6 个视野内的阳性颗粒测定灰度值,灰度值分为 256 级,阳性反应越强灰度值越小。用 SPSS 12.0 软件进行统计

分析, 所测数据符合正态分布, 经 Bartlett 检验, 方差齐性后, ANOVA 双尾检测, 并用 LSD (Little Significant Difference) 检验进行比较。根据平均值 ± 标准误差 ($M \pm SE$) 绘制统计表。

2 结果与分析

2.1 北方山溪鲵各期卵泡数量的季节性变化

北方山溪鲵各期卵泡数量季节性变化见图 1。

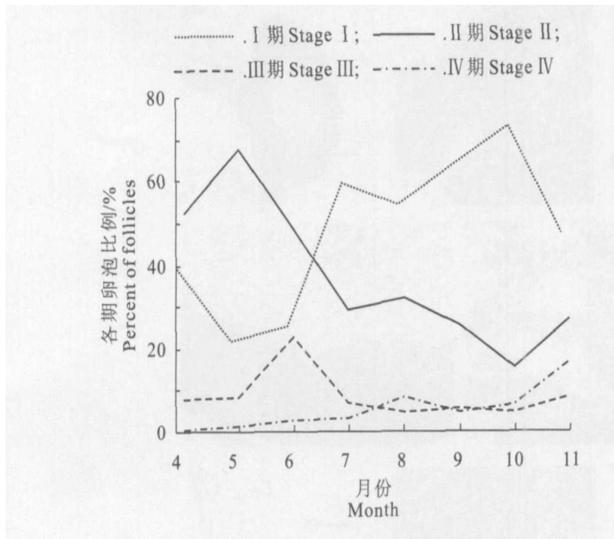


图 1 北方山溪鲵各期卵泡比例的季节性变化

Fig 1 Seasonal variation of number of follicles at different developmental stages of *B. atrachuperus tibetanus*

由图 1 可知, 不同发育时期卵泡比例呈现明显的季节性变化(各期卵泡特征参见文献[14]), 其中

表 1 3 种性类固醇激素及其受体在北方山溪鲵卵母细胞中免疫细胞化学反应的平均灰度值 ($n = 30$)

Table 1 Grey level of positive reaction of steroid hormone and receptor in oocytes of *B. tibetanus* ($n = 30$)

激素及其受体 Steroid hormone and receptor	I 期卵泡 Stage I	II 期卵泡 Stage II	III 期卵泡 Stage III	IV 期卵泡 Stage IV
E ₂	-	138.77 ± 2.56	124.30 ± 5.39	127.64 ± 4.31
ER	-	161.46 ± 2.46	100.93 ± 6.24 ^{II}	104.66 ± 8.00 ^{II}
P	-	141.96 ± 9.21	123.66 ± 2.45 ^{II}	93.16 ± 3.88 ^{II, III}
PR	-	125.33 ± 1.83	116.70 ± 10.07	71.10 ± 6.05 ^{II, III}
T	-	197.23 ± 10.04	160.23 ± 5.03 ^{II}	139.20 ± 11.09 ^{II}
AR	-	-	155.23 ± 8.10	135.83 ± 14.97

注: - 表示阴性反应。右上角的序号表示与之相应的时期相比, 灰度值有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: - Representing negative reaction. The numbers at top right corner of $M \pm SD$ denote significantly different from this stage group ($P < 0.05$).

PR 在 IV 期卵泡卵母细胞的阳性反应较 II, III 期增强(图 2 J, K), 其在 IV 期卵泡的平均灰度值与 II, III 期卵泡相比差异显著 ($P < 0.05$), 而 II, III 期卵泡之间差异不显著 ($P < 0.05$) (表 1)。

与 II 期相比, T 在 III, IV 期卵泡卵母细胞中的阳

I 期卵泡数量在 6 月开始增加, 10 月达到最大值, 占卵泡总数的 70% ~ 80%; II 期卵泡数量在 10 月降到最低, 次年 5 月达到最大值, 占卵泡总数的 60% ~ 70%; III 期卵泡数量在 6 月最多, 占卵泡总数的 20% ~ 30%; IV 期卵泡数量在 7 月开始增加, 在 11 月达到最大值, 占卵泡总数的 15% ~ 20%。

2.2 北方山溪鲵 3 种性类固醇激素及其受体在卵母细胞中的分布

经观察可知, 在 I 期卵母细胞中, 均未见 E₂, P 和 T 3 种激素及其受体 ER, PR 和 AR 的阳性反应物。

E₂ 在 II 期卵泡的卵母细胞胞质中阳性反应较弱, 在 III, IV 期卵泡中阳性反应有所增强, 其中在 III 期卵泡中的阳性反应最强(图 2 A, B, C)。经统计处理可知, 在 II, III, IV 期卵泡中, E₂ 的平均灰度值差异均不显著 ($P > 0.05$) (表 1)。

与 II 期相比, ER 在 III, IV 期卵泡的卵母细胞阳性反应增强(图 2 D, E, F), 其在 II 期卵泡的平均灰度值与 III, IV 期卵泡相比差异显著 ($P < 0.05$), 而 III, IV 期卵泡之间差异不显著 ($P > 0.05$) (表 1)。

P 在 II 期卵泡的阳性反应较弱, 在 III, IV 期卵泡的卵母细胞胞质、卵黄颗粒中阳性反应增强(图 2 G, H, I), 其在 II 期卵泡的平均灰度值与 III, IV 期卵泡相比差异显著 ($P < 0.05$); P 在 IV 期卵泡的阳性反应比 III 期卵泡更强, 二者之间的平均灰度值差异显著 ($P < 0.05$) (表 1)。

性反应增强(图 2 L, M), 其在 II 期卵泡的平均灰度值与 III, IV 期卵泡相比差异显著 ($P < 0.05$); 与 III 期相比, T 在 IV 期卵泡卵母细胞中的阳性反应有所增强, 但 III, IV 期卵泡的平均灰度值差异不显著 ($P < 0.05$) (表 1)。

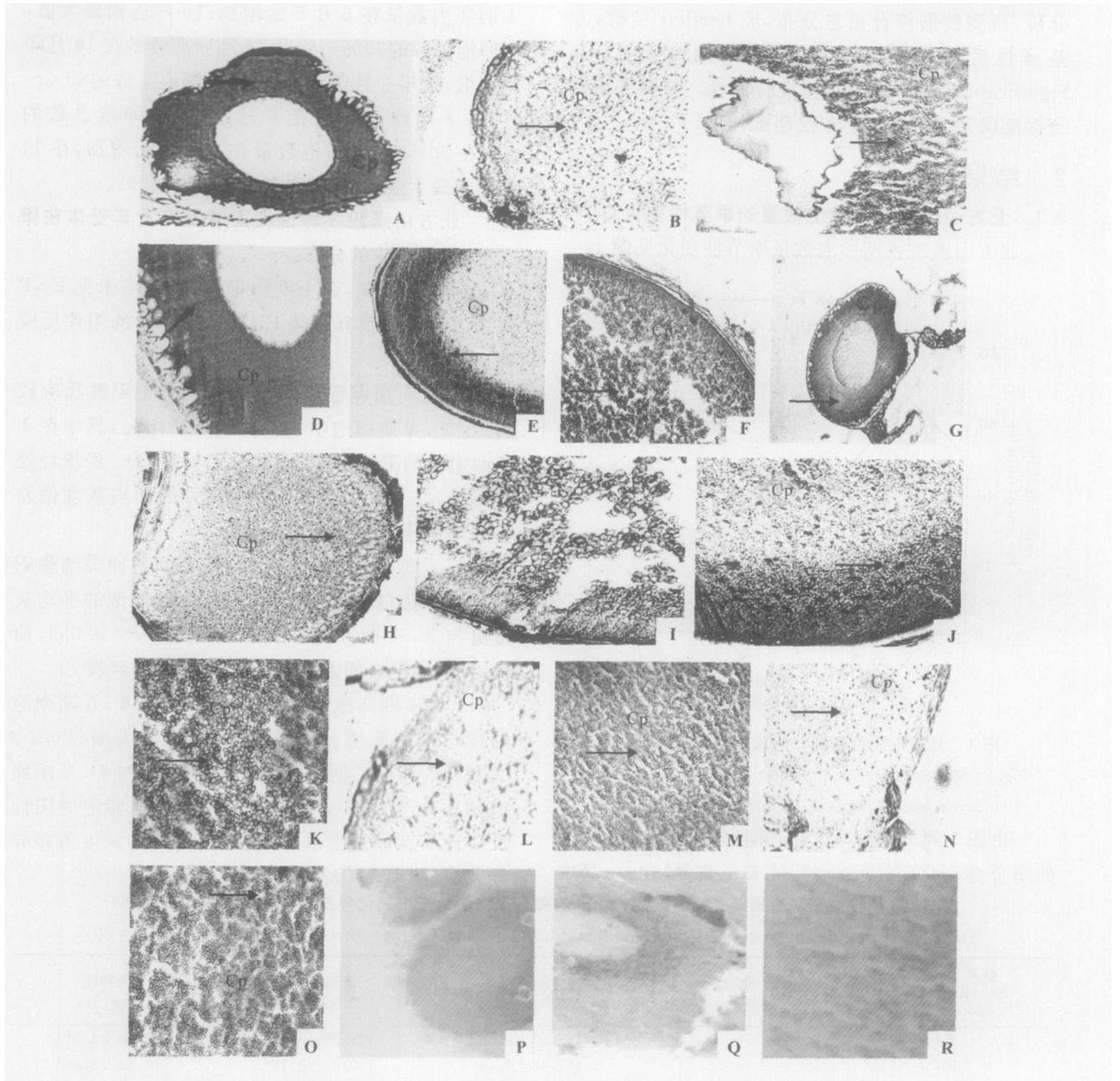


图 2 3 种性类固醇激素及其受体在北方山溪鲵卵母细胞发育中分布的显微观察

A. E₂() 在 II 期卵母细胞胞质中的分布(×149); B. E₂() 在 III 期卵母细胞中的分布(×149); C. E₂() 在 IV 期卵母细胞中的分布(×74); D. ER() 在 II 期卵母细胞中的分布(×149); E. ER() 在 III 期卵母细胞中的分布(×149); F. ER() 在 IV 期卵母细胞中的分布(×74); G. P() 在 II 期卵母细胞中的分布(×149); H. P() 在 III 期卵母细胞中的分布(×149); I. P() 在 IV 期卵母细胞中的分布(×149); J. PR() 在 III 期卵母细胞中的分布(×149); K. PR() 在 IV 期卵母细胞中的分布(×149); L. T() 在 III 期卵母细胞中的分布(×149); M. T() 在 IV 期卵母细胞中的分布(×149); N. AR() 在 III 期卵母细胞中的分布(×149); O. AR() 在 IV 期卵母细胞中的分布(×149); P. II 期卵母细胞的空白对照(×74); Q. III 期卵母细胞的空白对照(×74); R. IV 期卵母细胞的空白对照(×74); Cp. 细胞质

Fig 2 Microscopical observation of distribution of three sex steroid hormones and receptors in developmental oocytes of *B. atrachuperus tibetanus*

A. E₂() immunopositive in cytoplasm of oocytes at stage II (×149); B. E₂() in oocytes at stage III (×149); C. E₂() in oocytes at stage IV (×74); D. ER() in oocytes at stage II (×149); E. ER() in oocytes at stage III (×149); F. ER() in oocytes at stage IV (×74); G. P() in oocytes at stage II (×149); H. P() in oocytes at stage III (×149); I. P() in oocytes at stage IV (×149); J. PR() in oocytes at stage III (×149); K. PR() in oocytes at stage IV (×149); L. T() in oocytes at stage III (×149); M. T() in oocytes at stage IV (×149); N. AR() in oocytes at stage III (×149); O. AR() in oocytes at stage IV (×149); P. Blank control of oocytes at stage II (×74); Q. Blank control of oocytes at stage III (×74); R. Blank control of oocytes at stage IV (×74); Cp. Cytoplasm

AR 在 II 期卵泡的卵母细胞中未见阳性反应, 在 III, IV 期卵泡的卵母细胞中可见阳性反应产物, 且阳性反应在 IV 期卵泡增强(图 N, O)。但在 III, IV 期卵泡之间的平均灰度值差异不显著 ($P > 0.05$) (表 1)。II, III, IV 期卵泡的空白对照均呈阴性反应(图 P, Q, R)。

3 讨 论

3.1 北方山溪鲵的卵子发生和排卵周期

徐剑^[15]对分布在甘肃、宁夏地区的北方山溪鲵进行研究, 认为繁殖期在每年的 3~4 月。王宏元等^[16]对分布于秦岭北坡北方山溪鲵精子发生的年周期进行研究, 对从精原细胞的发生到精子的形成过程做了仔细观察, 确定排精时间在 2~4 月。有关北方山溪鲵卵泡从发生到成熟排出所需的时间周期, 目前尚未见报道。由本研究 4~11 月雌性北方山溪鲵卵巢中各期卵泡比例的分析可知, I 期卵泡数量从第 1 年 6 月开始上升, 10 月达到高峰, 说明卵原细胞在 6~10 月分裂增生, 发育为初级卵母细胞, 并形成 I 期卵泡; II 期卵泡数量从 10 月开始上升, 翌年 5 月达到高峰, 说明部分 I 期卵泡在此之间发育为 II 期卵泡; III 期卵泡数量在第 2 年 5 月开始上升, 6 月达到高峰, 说明部分 II 期卵泡在 5~6 月发育为 III 期卵泡; IV 期卵泡数量从第 2 年 7 月开始上升, 11 月达到高峰, 第 3 年 4 月降到最低值, 说明一部分 III 期卵泡在第 2 年 7~11 月发育为 IV 期卵泡并成熟, 越冬后在第 3 年的 2~4 月排出体外。由此推测, 北方山溪鲵的卵泡从发生到成熟后排出需的最短时间应为 20~22 个月, 为 1 年 1 次产卵。卵泡在卵巢中分期分批发育成熟, 表现出明显的异步发育特征。

3.2 性类固醇激素及其受体对卵母细胞发育的调控

对无尾两栖类动物卵母细胞发育的性类固醇激素及其受体的研究报道较多。在有关有尾两栖类动物卵巢类固醇激素的研究中, 贾林芝等^[12]曾对山溪鲵卵泡的类固醇激素合成与分泌超微结构特点进行过报道。但是性类固醇激素在北方山溪鲵卵母细胞发育及排卵周期中具有何种功能, 本研究试图通过激素和受体在不同发育阶段卵母细胞中的表达强度给予解释。

Fortune^[17]和 Kwon 等^[4]对爪蟾 (*Xenopus laevis*) 和黑斑蛙 (*Rana nigromaculata*) 不同发育时期卵泡类固醇激素分泌的研究中证实, III 期卵泡分泌

E_2 增多, E_2 可促进卵黄的合成。Migliaccio 等^[18]和 Castoria 等^[19]在爪蟾中发现, ER 存在于卵母细胞胞质中, 且具介导 E_2 的作用。在本研究对北方山溪鲵卵泡的免疫细胞化学检测中可见, 与 II 期(卵黄合成前期)卵泡相比, E_2 在 III, IV 期卵泡的卵母细胞中阳性反应有所增强, 且在 III 期(卵黄合成期)卵泡最强。说明北方山溪鲵卵泡在 III 期卵泡分泌的 E_2 量增多, 在 IV 期卵泡略有减少。在 III, IV 期卵泡的卵母细胞中, ER 阳性反应较 II 期显著增强, 而 III, IV 期卵泡之间差异不显著, 说明 ER 在 III 期卵泡的卵母细胞中表达增强, 在 IV 期卵泡虽有减少, 但还保持在一定的水平。推测 E_2 在 III 期卵泡卵黄的形成中起重要作用, 而在卵黄合成期 E_2 与 ER 结合, 可能在卵黄合成过程中起信号介导的作用。由于 E_2 与 ER 在 IV 期(卵黄合成后期)卵泡中表达的减弱, 推测在卵黄合成后期发育中 E_2 的作用减小。

早先的研究认为, P 可诱导两栖类动物卵母细胞成熟^[20]。Callard 等^[14, 21]在研究脊椎动物进化过程中, 卵黄合成与孕酮的关系时指出, 在低等脊椎动物的卵巢周期中, 孕酮对抑制卵黄合成具有重要的生理意义。本研究认为, 在北方山溪鲵卵母细胞发育过程中 P 的表达逐渐增强, 其在 III 期卵泡卵母细胞中的阳性反应较 II 期显著增强, IV 期较 III 期又显著增强, 说明在卵泡中 P 的含量逐渐增加, 在 IV 期卵泡达到最高, 而 IV 期卵泡是卵母细胞开始成熟的时期, 可见 P 在北方山溪鲵卵母细胞成熟过程中起重要的调控作用。与 P 不同的是, PR 在 II 期和 III 期卵泡的卵母细胞中表达差异不显著, 而在 IV 期卵泡中表达最多。说明在 IV 期卵泡中, P 与 PR 结合介导 P 启动卵母细胞的成熟过程, 并可对卵黄合成起抑制作用。

Fortune 等^[22]对爪蟾卵巢类固醇激素进行检测发现, 在促性腺激素作用下, 睾酮浓度大于孕酮和雌二醇。Lutz 等^[6]认为, 在爪蟾的卵母细胞成熟中, 雄激素具有比 P 更强的促进作用, 是卵母细胞成熟的主要启动因子。在本试验中, 与 II 期卵泡相比, T 在 III, IV 期卵泡卵母细胞中的表达显著增强, 并在 IV 期卵泡最强, 说明 T 在卵黄合成后期分泌量增大, 且 T 与卵母细胞成熟过程有关。AR 的表达在卵母细胞发育过程中也呈增强趋势, 在 IV 期卵泡最强。因此推测, 在卵黄合成后期, AR 与 T 大量结合介导 T 的功能, 从而调控卵母细胞的成熟过程。

Zerani 等^[23]以冠蝶螈 (*Triturus carnifex*) 为对象, 对类固醇激素在生殖周期中的变化趋势进行研

究,观察到血浆雄激素水平在生殖期(1~3月)最高, E_2 水平在3月升高, P 水平变化不显著。Degani 等^[24]对斑点蝶螈(*Salamandrina atra*)生殖周期研究发现, IV期卵泡出现在冬季和春季, II, III期卵泡则在各个季节均存在; 并发现 E_2 和 T 水平分别在卵黄合成和卵母细胞成熟期间升高, P 水平的提高与卵黄合成的水平有关。将本研究3种类固醇激素及其受体的检测结果, 与北方山溪鲵的排卵周期结合起来分析可知, 在秋、冬季, IV期卵泡数量快速增多, 成熟卵母细胞较多, 卵巢中 P 与 T 的分泌量逐渐上升, 排卵期(2~4月)达到最大, 之后下降到最低水平; 5~6月, 一部分 I 期卵泡发育为 II 期卵泡, II 期卵泡发育为 III 期卵泡, II, III 期卵泡数量增加, E_2 的分泌量逐渐上升, 到夏季(6月)达到最大; 从7月开始, III 期卵泡逐渐发育为 IV 期卵泡, IV 期卵泡数量逐渐增加, 到10月, 卵母细胞即将接近成熟, P 与 T 分泌量也在增加。因此, 北方山溪鲵卵巢类固醇激素分泌的变化规律与其卵母细胞发生、发育、成熟和排出的周期是一致的。

Thomas 等^[25]研究了硬骨鱼卵母细胞成熟过程中 PR 的功能, 提出 P 的代谢产物是卵母细胞成熟的直接介导者。Tian 等^[8]从爪蟾卵母细胞胞质中分离出 PR, 并对其进行研究, 提出 PR 在 P 介导的成熟中只起部分作用。Hammes^[26]提出卵母细胞类固醇激素可能利用不同代谢途径完成发育、成熟及排卵过程。从本研究对卵母细胞成熟过程中 P 与 T 的检测结果可见, P 与 T 在北方山溪鲵卵母细胞的成熟过程中均起一定作用, 但是哪一种激素起主要作用, 二者在调控中的相互关系及如何调控卵母细胞成熟等仍有待深入研究。

近年来, 对卵母细胞发育过程中受体的非基因调控作用研究已有许多报道。Bayaa 等^[9]对爪蟾 PR 的研究发现, 卵母细胞的胞质中有 PR, 且其在去核卵母细胞中仍能激活促分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK), 提出 PR 在胞质中具有介导卵母细胞成熟的非基因调控作用。Migliaccio 等^[18]和 Castoria 等^[19]在爪蟾中发现, ER 也可存在于卵母细胞胞质中, 并发挥其介导作用。在对光滑爪蟾卵母细胞减数分裂调控的研究中发现, 雌激素受体的非基因调控因子(Modulator of Nongenomic Actions of the Estrogen Receptor, MNAR)参与了 G 蛋白的活动, 其表达减少可以促进由 T 启动卵母细胞的成熟^[27]。在对隆肛蛙卵泡的

免疫细胞化学检测中发现, 卵母细胞胞质和胞核中均存在3种性类固醇激素受体, 且其具有核调控与胞质调控两种作用机制^[11]。本研究观察到, 北方山溪鲵卵母细胞的胞质中均有3种激素受体的表达, 在 III, IV 期卵泡中分布较为广泛。因此推测, 在两栖类动物卵母细胞的发育和成熟过程中, 胞质中的受体可作为信号转导因子, 通过非基因调控机制快速调节卵母细胞的发育和成熟。

[参考文献]

- [1] Gore-Langton R E, Armstrong D T. Follicular steroidogenesis and its control[G]//Knobil E, Neill J D. The physiology of reproduction New York: Raven Press, 1988: 331-385.
- [2] Bahr J M, Wang S C, Huang M Y, et al. Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen[J]. Biol Reprod, 1983, 29(2): 326-334.
- [3] Nagahama Y. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads[J]. Zool Sci, 1987, 4: 209-222.
- [4] Kwon H B, Choi H H, Ahn R S. Steroid production by amphibian (*Rana nigromaculata*) ovarian follicles at different developmental stages[J]. Exp Zool, 1991, 260: 66-73.
- [5] Kwon H B, Ahn R S. Relative roles of theca and granulosa cells in ovarian follicular steroidogenesis on the amphibian *Rana nigromaculata*[J]. Gen Comp Endocrinol, 1994, 94: 207-214.
- [6] Lutz L B, Cole L M, Gupta M K. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24): 13728-13733.
- [7] Ahn R S, Yoo M S, Kwon H B. Evidence for two-cell model of steroidogenesis in four species of amphibian[J]. Exp Zool, 1999, 284: 91-99.
- [8] Tian J D, 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.
- [9] Bayaa M, Booth R A, Sheng Y. The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(23): 12607-12612.
- [10] 雷忻, 张育辉, 李亚琳. 隆肛蛙卵巢类固醇激素的免疫细胞化学研究[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2004, 34(4): 446-448.
- [11] 雷忻, 张育辉. 隆肛蛙卵巢类固醇激素受体的免疫细胞化学研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(7): 33-36.

(下转第 23 页)

对实验要求不高, 不需要无菌操作, 可以自动化操作, 检测灵敏, 结果可靠, 适于实验室血清学诊断、海关检疫及大规模疫病普查。当前诊断 BR 的 ELISA 试剂盒是利用全病毒粒子作为包被抗原, 存在成本高和生物安全性差的缺点。本试验中, 作者对编码 BHV-1 gB 蛋白主要抗原区域的核苷酸序列进行了原核高效表达, Western-blot 检测结果表明, 该重组蛋白具有很好的反应原性和特异性, 有望替代全病毒粒子作为检测抗原, 从而降低抗原生产成本, 解决全病毒粒子作为包被抗原时散毒的潜在威胁。

由此可见, BHV-1 gB 基因片断在大肠杆菌中的高效表达, 是获得重组 gB 抗原蛋白的有效途径。本试验为进一步应用以 BHV-1 主要抗原区基因表达蛋白作为抗原, 建立 BR ELISA 检测方法的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 于大海, 崔砚林. 中国进出境动物检疫规范[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 456-462
- [2] 艾玉萍, 谭诗文, 冉懋韬, 等. 贵州省奶牛传染性鼻气管炎的血清学调查[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2004(5): 19
- [3] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 988-1030
- [4] Tikoo S K, Campos M, Babiuk L A. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1) biology, pathogenesis, and control[J]. Adv Virus Res, 1995, 45: 191-193
- [5] Van Drunen Littel-van Den Hurk S, Tikoo S K, Liang S, et al. Bovine herpesvirus-1 vaccines[J]. Immunol Cell Biol, 1993, 71: 405-408
- [6] Babiuk L A, Van Drunen Littel-van Den Hurk S, Tikoo S K, et al. Novel viral vaccines for livestock[J]. Vet Immun Immunopath, 1996, 54: 355-358
- [7] 古红, 杨汉春, 郭鑫, 等. PRRSVB 4 株 ORF5 基因的原核表达与重组蛋白的纯化[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1): 64-69
- [8] Zhu X P, Wu S X, Geoffrey J L. Yeast-secreted bovine herpesvirus type 1 glycoprotein D authentic conformational structure and immunogenicity[J]. Vaccine, 1997, 15(6): 679-688
- [9] 世界动物卫生组织. 哺乳动物、禽、蜜蜂 A 类和 B 类疾病诊断试验及疫苗标准手册[M]. 农业部畜牧兽医局, 译. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002: 359-361
- [10] Terpstra C. Diagnosis of infectious bovine rhinotracheitis by direct immunofluorescence[J]. Vet Q, 1997, 1: 138-144
- [11] Suresh S. Detection of BHV-1 in bovine by immunodiffusion and counter immunoelectrophoresis tests[J]. Journal of Bombay Veterinary College, 1993, 4: 37-40
- [12] 贾林芝, 张育辉. 山溪鲵卵巢滤泡细胞的显微与超微结构[J]. 动物学研究, 2000, 21(5): 419-421
- [13] Zhang Y H, Jia L Z. Microstructure and ultrastructure of vitellogenesis in oocytes of the stream salamander (*Batrachuperus tibetanus*) [J]. Act Zool Sin, 2002, 48(4): 534-542
- [14] Callard I P, Ho S M. Vitellogenesis and viviparity [M] // Chester-Jones I, Ingleton P M, Phillips J G. Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology. New York: Plenum Press, 1987: 214-216
- [15] 徐剑. 西藏山溪鲵生殖腺的季节性变化[J]. 动物学杂志, 1995, 30(3): 47-49
- [16] 王宏元, 张育辉. 北方山溪鲵精巢显微结构的年周期变化[J]. 动物学研究, 2004, 25(6): 484-490
- [17] Fortune J E. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages[J]. Dev Biol, 1983, 99: 502-509
- [18] Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor[J]. J Embo, 1998, 17: 2008-2018
- [19] Castoria G, Barone M V, Domenico M D, et al. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis[J]. J Embo, 1999, 18: 2500-2510
- [20] Thibier-Fouchet C, Mulner O, Ozon R. Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes of *Xenopus laevis*[J]. Biol Reprod, 1976, 14(3): 317-326
- [21] Callard I P, Fileti L A, Perez L E, et al. Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity[J]. Am Zool, 1992, 32: 264-275
- [22] Fortune J E, Tsang P C. Production of androgen and estradiol-17 β by *Xenopus* ovaries treated with gonadotropins in vitro[J]. Gen Comp Endocrinol, 1981, 43(2): 234-242
- [23] Zerani M, Vellano C, Amabili F. Sex steroid profile and plasma vitellogenin during the annual reproductive cycle of the crested newt (*Triturus cristatus* Laur) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1991, 82(3): 337-344
- [24] Degani G, Sharon R, Warburg M. Ovarian steroid levels in *Salamandra atra* during the reproductive cycle[J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 106(3): 356-360
- [25] Thomas P, Zhu Y, Pace M. Progesterin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings[J]. Steroids, 2002, 67: 511-517
- [26] Hammes S R. Steroid and oocyte maturation- a new look at an old story[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(4): 769-775
- [27] Haas D, White S N, Lutz L B, et al. The modulator of nongenomic actions of the estrogen receptor (MNAR) regulates transcription-independent androgen receptor-mediated signaling: evidence that MNAR participates in G protein-regulated meiosis in *Xenopus laevis* oocytes[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(8): 2035-2046

(上接第 18 页)

- [12] 贾林芝, 张育辉. 山溪鲵卵巢滤泡细胞的显微与超微结构[J]. 动物学研究, 2000, 21(5): 419-421
- [13] Zhang Y H, Jia L Z. Microstructure and ultrastructure of vitellogenesis in oocytes of the stream salamander (*Batrachuperus tibetanus*) [J]. Act Zool Sin, 2002, 48(4): 534-542
- [14] Callard I P, Ho S M. Vitellogenesis and viviparity [M] // Chester-Jones I, Ingleton P M, Phillips J G. Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology. New York: Plenum Press, 1987: 214-216
- [15] 徐剑. 西藏山溪鲵生殖腺的季节性变化[J]. 动物学杂志, 1995, 30(3): 47-49
- [16] 王宏元, 张育辉. 北方山溪鲵精巢显微结构的年周期变化[J]. 动物学研究, 2004, 25(6): 484-490
- [17] Fortune J E. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages[J]. Dev Biol, 1983, 99: 502-509
- [18] Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor[J]. J Embo, 1998, 17: 2008-2018
- [19] Castoria G, Barone M V, Domenico M D, et al. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis[J]. J Embo, 1999, 18: 2500-2510
- [20] Thibier-Fouchet C, Mulner O, Ozon R. Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes of *Xenopus laevis*[J]. Biol Reprod, 1976, 14(3): 317-326
- [21] Callard I P, Fileti L A, Perez L E, et al. Role of the corpus luteum and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity[J]. Am Zool, 1992, 32: 264-275
- [22] Fortune J E, Tsang P C. Production of androgen and estradiol-17 β by *Xenopus* ovaries treated with gonadotropins in vitro[J]. Gen Comp Endocrinol, 1981, 43(2): 234-242
- [23] Zerani M, Vellano C, Amabili F. Sex steroid profile and plasma vitellogenin during the annual reproductive cycle of the crested newt (*Triturus cristatus* Laur) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1991, 82(3): 337-344
- [24] Degani G, Sharon R, Warburg M. Ovarian steroid levels in *Salamandra atra* during the reproductive cycle[J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 106(3): 356-360
- [25] Thomas P, Zhu Y, Pace M. Progesterin membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings[J]. Steroids, 2002, 67: 511-517
- [26] Hammes S R. Steroid and oocyte maturation- a new look at an old story[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(4): 769-775
- [27] Haas D, White S N, Lutz L B, et al. The modulator of nongenomic actions of the estrogen receptor (MNAR) regulates transcription-independent androgen receptor-mediated signaling: evidence that MNAR participates in G protein-regulated meiosis in *Xenopus laevis* oocytes[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(8): 2035-2046