

p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在小鼠卵泡与黄体中的表达

陈五妍,王正虹,陈树林,韩苗苗,周 涛

(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】研究 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在成年小鼠卵泡发育与黄体形成及退化过程中表达的变化规律。【方法】取 20 只成年雌性小鼠的卵巢,制作石蜡切片,经免疫组织化学 SP 法染色后,观察 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、三级卵泡、成熟卵泡、闭锁卵泡、早期黄体、中期黄体以及晚期黄体中的定位及表达。【结果】卵泡发育和黄体形成及退化过程中均有 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达;p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在此过程中呈先升高后降低的趋势,峰值出现在三级卵泡时期。【结论】p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在卵母细胞中发挥一定作用,可能参与优势卵泡的选择,并对卵泡发育及黄体形成和退化有影响。

【关键词】 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白;卵泡发育;黄体形成与退化

【中图分类号】 Q459

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0029-05

The expression of p21^{WAF1/CIP1} protein in adult mouse follicle and corpus luteum

CHEN Wu-yan, WANG Zheng-hong, CHEN Shu-lin, HAN Miao-miao, ZHOU Tao

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The study was done to investigate the changes of p21^{WAF1/CIP1} protein expression in adult mouse ovary during follicular development, corpus luteum formation and regression. 【Method】 Ovarian tissues were obtained from 20 adult mice with normal estrus cycle. Paraffin slice and immunohistochemical SP method were applied for the expression and variation of p21^{WAF1/CIP1} protein in the periods of primordial, primary, secondary, tertiary, mature, atresic follicles, and forepart, metaphase and anaphase corpus luteums. 【Result】 It was found that p21^{WAF1/CIP1} protein was expressed in all periods. The variation of p21^{WAF1/CIP1} protein in this process generally increased first and then decreased. The peak value appeared in the period of the tertiary follicle. 【Conclusion】 p21^{WAF1/CIP1} protein plays a role in oocytes during follicular development, may participate in choosing dominant follicle, and has a potential influence on follicular development, corpus luteum formation and regression.

Key words: p21^{WAF1/CIP1} protein; follicular development; corpus luteum formation and regression

抑癌基因 p21^{WAF1/CIP1} 为单拷贝基因,定位于人第 6 号染色体短臂上(6p21.2),DNA 长度为 85 kb,有 3 个外显子。该基因的表达产物 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白由 164 个氨基酸构成,是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白^[1]。研究表明,

p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的低表达预示肿瘤的进展和高度恶性倾向,可作为判断肿瘤分化程度和预后的一个参考指标^[2-5]。p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在肿瘤组织中的高表达是机体对肿瘤的一种抵抗措施,故 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白与肿瘤的早期诊断、浸润深度及分化程度有关。

* [收稿日期] 2009-04-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30972151,30170683);陕西省自然科学基金项目(2006C130)

[作者简介] 陈五妍(1983—),女,江苏盐城人,在读硕士,主要从事神经生物学研究。

[通信作者] 陈树林(1965—),男,陕西汉中,副教授,主要从事神经生物学和细胞生物学研究。E-mail: csl-1359@163.com

目前,对于 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在正常组织中的表达鲜见报道。研究 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在卵泡发育及黄体形成与退化中的表达变化,对于了解 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在此过程中的调节作用具有重要参考价值。本研究采用超敏的双标记免疫组化链霉菌抗生物素-过氧化物酶法(Streptavidin-peroxidase, SP 法),研究 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在成熟小鼠卵泡发育及黄体形成、退化各个时期的表达情况,探讨该蛋白在上述过程中的调节作用,以期对卵泡发育和黄体形成与退化研究提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康、体质量 25~30 g 成年雌性昆明系小白鼠 20 只,购自第四军医大学实验动物中心,饲养于清洁级动物房,自然光照,自由饮水和采食,1 周适应性饲养后用于试验。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗 p21^{WAF1/CIP1} 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司产品,工作浓度 1:150)、山羊抗兔链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化超敏 SP 试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司产品)、葡萄糖过氧化物酶(美国 Sigma 公司进口)、四盐酸 3,3-二氨基联苯胺(DAB)(Sigma 公司进口,华美生物工程公司分装)、柠檬酸盐抗原修复液(福州迈新生物技术开发有限公司)、APES(Sigma 公司),其他试剂均为国产分析纯。

Leica RM2235 石蜡切片机(德国莱卡),Motic 数码生物显微镜(厦门 Motic 实业有限公司),Sartorius AA-160 型电子读数天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),OLYMPUS CHC 型光学显微镜(日本 OLYMPUS 光学工业株式会社),超纯水仪(美国密理博)。

1.2 小鼠卵巢切片的制备

用 100 g/L 水合氯醛对供试小鼠腹腔注射(3.5 μ L/g)进行麻醉,取卵巢,迅速置于 4 $^{\circ}$ C 多聚甲醛后固定 48 h。梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,片厚 4 μ m,制成切片 3 套,用于 HE 染色、免疫组化及阴性对照。

1.3 小鼠卵巢切片的染色观察

免疫组织化学 SP 法的操作步骤按试剂盒说明进行。

1.4 结果判定

经免疫组织化学 SP 法染色的切片,背景无色或浅蓝色,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白阳性产物呈蓝色或蓝黑

色着色。随机选择 10 个高倍视野($\times 400$),每个视野计数 100 个细胞,共计数 1 000 个细胞,计算阳性细胞百分率。综合细胞染色强度和阳性细胞计数进行半定量分析:阴性(-),无阳性染色细胞或阳性细胞数 $<5\%$;弱阳性(+),阳性细胞数 $5\%\sim 25\%$;阳性(++),阳性细胞数 $25\%\sim 50\%$;强阳性(+++),阳性细胞数 $>50\%$ 。

1.5 图像分析与数据处理

小鼠卵巢切片在 Motic 数码生物显微镜下拍照,用江苏捷达 801 形态分析软件计算每个视野的阳性强度均值(用平均光密度表示)和阳性面积,计算相对表达量 μ^2 : $\mu^2 = \text{光镜倍数} \times \text{阳性强度均值} \times \text{阳性面积} / 260\ 000$ (式中 260 000 表示像素),并求 μ^2 均值进行数据统计。

试验数据用“平均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm SD$)”表示,应用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析,采用单因素方差分析法(ANOVA)中的 Duncan 进行多重比较,比较小鼠卵巢及黄体不同时期 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的相对表达量, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在成年小鼠卵泡发育各个时期的表达

参照马泽芳等^[6]的方法,本研究将卵泡发育分为 5 个阶段:原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、三级卵泡、成熟卵泡。当卵泡出现以下 2 个或多个变化时,为闭锁卵泡:核固缩、颗粒细胞之间出现腔隙、颗粒细胞游离和(或)分层不均匀。

在成年小鼠卵泡发育的各个时期,卵母细胞和颗粒细胞中均有 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达(图 1),其表达水平随着卵泡发育大致呈先升高后降低的趋势,最大值出现在三级卵泡时期。p21^{WAF1/CIP1} 蛋白相对表达量在原始卵泡发育至成熟卵泡的过程中,除次级卵泡、成熟卵泡分别与初级卵泡之间差异不显著($P > 0.05$)外,其他类型卵泡之间差异均极显著($P < 0.01$)(表 1)。

卵泡闭锁在发育过程中是不可避免的,发生于卵泡生长的各个时期,主要表现为卵母细胞核偏于一侧,是原始卵泡、初级卵泡和次级卵泡闭锁的主要形式(图 1-G);颗粒细胞出现核致密化、游离及分层不均匀现象,这在三级卵泡的闭锁中容易看到(图 1-H)。闭锁卵泡的 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白相对表达量与其他时期的卵泡(除成熟卵泡外)间具极显著差异($P < 0.01$)。

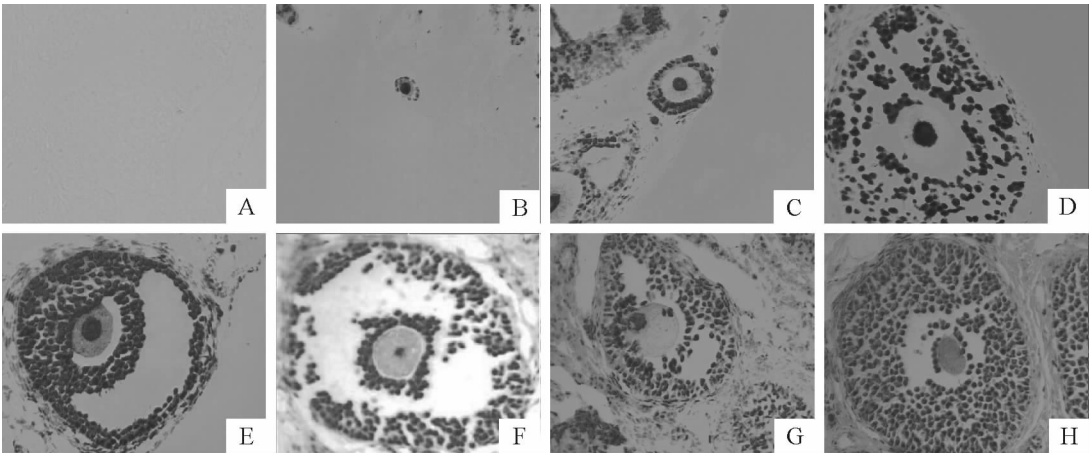


图 1 p21^{WAF1/CIP1}蛋白在成年小鼠卵泡发育各个时期的表达(×400)

A. 阴性对照;B. 原始卵泡;C. 初级卵泡;D. 次级卵泡;E. 三级卵泡;F. 成熟卵泡;G,H. 闭锁卵泡

Fig. 1 Expression of p21^{WAF1/CIP1} protein in adult mice during follicular development(×400)

A. Negative control;B. Primordial follicle;C. Primary follicle;D. Secondary follicle;E. Tertiary follicle;F. Mature follicle;G,H. Atresic follicle

表 1 成年小鼠卵泡发育各个时期 p21^{WAF1/CIP1}蛋白的表达

Table 1 Survey of expression of p21^{WAF1/CIP1} protein in adult mice during follicular development

时期 Period	卵泡数 Number of follicles	表达强度 Expression intensity			相对表达量 μ^2 Relative expression
		颗粒细胞 Granulosa cells	卵泡膜细胞 Theca cells	卵母细胞 Oocytes	
原始卵泡 Primordial follicle	6	+++	—	+++	3.084±1.429 Aa
初级卵泡 Primary follicle	6	+++	+	+++	21.776±5.173 CDc
次级卵泡 Secondary follicle	6	+++	++	+++	27.769±3.147 Dd
三级卵泡 Tertiary follicle	6	+++	+++	+++	35.548±4.193 Ee
成熟卵泡 Mature follicle	6	+++	+++	+++	20.936±1.955 BCc
闭锁卵泡 Atresic follicle	6	+++	+	++	15.164±4.391 Bb

注:同列数据后标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下表同。
Note: Values in a row with the different superscript capitalization are extremely different, ($P<0.01$), values in a column with the different superscript lower cases are significantly different($P<0.05$). The same as follows.

2.2 p21^{WAF1/CIP1}蛋白在成年小鼠黄体形成及退化各个时期的表达

参照李尚为等^[7]的方法,本研究将黄体分为早期、中期和晚期黄体。由图 2 和表 2 可知,早期黄体中,p21^{WAF1/CIP1}蛋白表达较多,核呈蓝黑色,并且可以看到扁平、梭形卵泡膜细胞核,说明卵泡膜也参与

黄体的形成,该时期 p21^{WAF1/CIP1}蛋白相对表达量与其他时期差异极显著($P<0.01$)。中期黄体呈蓝色,p21^{WAF1/CIP1}蛋白相对表达量较早期极显著减少($P<0.01$)。晚期黄体着色浅,p21^{WAF1/CIP1}蛋白相对表达量较中期黄体极显著减少($P<0.01$)。

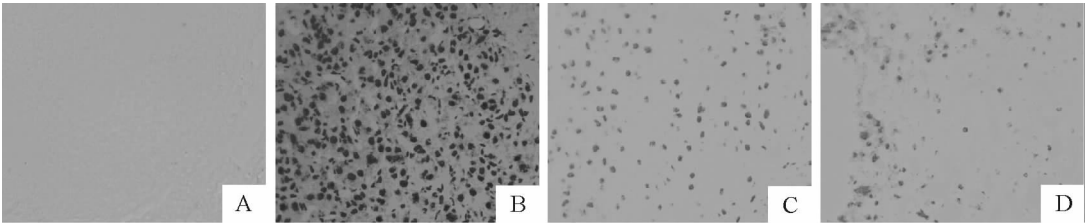


图 2 p21^{WAF1/CIP1}蛋白在成年小鼠黄体形成和退化各个时期的表达(×400)

A. 阴性对照;B. 黄体早期;C. 黄体中期;D. 黄体晚期

Fig. 2 Expression of p21^{WAF1/CIP1} protein in adult mice during corpus luteum formation and regression(×400)

A. Negative control;B. Forepart corpus luteum;C. Metaphase corpus luteum;D. Anaphase corpus luteum

表 2 成年小鼠各个时期黄体 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达

Table 2 Survey of expression of p21^{WAF1/CIP1} protein in adult mice corpus luteum

时期 Period	黄体数 Number of corpus luteum	表达强度 Expression intensity	相对表达量 μ^2 Relative expression
早期黄体 Forepart corpus luteum	6	+++	17.015±1.699 A
中期黄体 Metaphase corpus luteum	6	++	9.105±1.856 B
晚期黄体 Anaphase corpus luteum	6	+	5.154±0.798 C

由表 1 和表 2 可知,在卵泡发育及黄体的形成和退化过程中,除闭锁卵泡时期外,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白相对表达量呈先增高后降低的趋势,最大值出现在三级卵泡时期。

3 讨 论

抗癌基因 p21^{WAF1/CIP1} 是 1993-11 由 El-Deiry 等^[1]克隆出的 1 个基因,其编码的 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白是一种广谱的 CDKs 的抑制因子,可以通过细胞周期调控作用间接参与细胞凋亡(依赖 p53 途径)和直接导致细胞异化或恶变(非依赖 p53 途径),负向调节细胞依赖性激酶功能,参与细胞生长、发育、分化、衰老及 DNA 损伤修复等多种功能的调节^[8-9]。所以,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在细胞周期调节和细胞凋亡中具有重要作用,其能抵抗凋亡,同时又抑制增殖、促进凋亡,这主要依靠特定的细胞环境^[10]。Bene 等^[11]研究表明,过表达 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白可作为抗凋亡因子,延缓长春碱的作用;而 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的促凋亡作用经常出现在有 p53 突变的细胞中^[12]。

卵泡发育是一个以形态变化为特征的生长过程,同时伴随着卵泡功能的分化。原始卵泡至成熟卵泡,需要卵母细胞扩大及颗粒细胞增殖^[13]。排卵后由残存的颗粒细胞和内膜细胞分化形成黄体,是一个暂时性内分泌器官。卵子受精后,黄体分泌的孕酮参与受精卵的着床和早孕维持的调节;在未受精时,黄体的正常退化又是下一轮生殖周期启动所必需的^[14]。本研究发现,在成年小鼠卵泡的生长、成熟和闭锁过程中,卵母细胞核中都有 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达,染色呈蓝黑色;随着卵泡发育及黄体的形成与退化,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白相对表达量大致呈先增加后降低的变化趋势,峰值出现在三级卵泡时期。这提示,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在卵母细胞中发挥着一定的作用,并对卵泡发育及黄体形成与退化有影响,但其具体作用机制尚不清楚。

值得注意的是,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白相对表达量的峰值出现在三级卵泡时期,该时期卵泡进行优势化(Dominance)。现有研究表明,优势卵泡的选择是

促卵泡素、促黄体素及其受体和雌二醇共同作用的结果^[15-16]。被选择的优势卵泡产生大量的雌二醇,高水平雌二醇负反馈抑制垂体的促卵泡素分泌。随着优势卵泡的出现,促卵泡素浓度逐渐下降至基础水平,并维持到下一次峰值出现。促卵泡素对卵泡生长发育起抑制其凋亡的作用。本研究对此作出了进一步的补充,笔者推测,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白可能参与卵泡优势化。至于促卵泡素与 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达是否具有协同性,这有待于进一步研究。

综上所述,在内分泌因素(促性腺激素)和卵巢内调节因子(性激素、生长因子和细胞因子)等的作用下,卵泡发育和闭锁及随后的黄体形成和退化的调节是一个极其复杂的过程。p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达在该过程中存在着规律性的变化,大致呈先升高后降低的趋势,峰值出现在三级卵泡时期。笔者推测,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在卵母细胞中发挥一定作用,可能参与优势卵泡的选择,并对卵泡发育及黄体形成和退化有影响。

当然,本研究是在组织学水平上进行的,所得结果仍需从分子生物学、细胞生物学等方面做精细检测。有关 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白在卵泡发育及黄体形成和退化各个时期中的精细作用机制,尚有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] El-Deiry W S, Harper J W, O'Connor P M, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis [J]. Cancer Res, 1994, 54: 1169-1174.

[2] Augustas P, Jurate S, Grazina T, et al. PI 3-k signaling pathway suppresses PMA-induced expression of p21 WAF1/Cip1 in human leukemia cell [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2007, 302(1/2): 9-18.

[3] Tao S, Jun W, Fang F, et al. Correlation analysis between the expression of p21 WAF1/Cip1, p16 proteins and human glioma [J]. Clinical and Experimental Medicine, 2008, 8(3): 151-157.

[4] Thordur O, Marieke A, Gertruda E, et al. Skin epidermis lacking the c-myc gene is resistant to Ras-driven tumorigenesis but can reacquire sensitivity upon additional loss of the p21Cip1 gene [J]. Genes and Development, 2006, 20(15): 2024-2029.

[5] Vassliki Z, Anna B, Athanassias C T, et al. Immunohistochemical expression of TGF- β 1, p21WAF1, p53, Ki67, and angiogenesis in gastric carcinomas [J]. International Journal of Gastrointestinal Cancer, 2002, 32(2/3): 83-89.

[6] 马泽芳, 田长勇, 张林媛, 等. 东北梅花鹿卵泡发育的显微结构 [J]. 经济动物学报, 2007, 11(2): 70-75.
Ma Z F, Tian C Y, Zhang L Y, et al. Microstructure of follicular development of northeast sika deer [J]. Journal of Economic Animal, 2007, 11(2): 70-75. (in Chinese)

[7] 李尚为, 丸尾猛. 转化生长因子- α 和 myc 癌基因蛋白在卵泡发育与黄体形成及退化中的表达 [J]. 中华妇产科学, 1997, 32(10): 593-596.
Li S W, Maruo T. Expression of transforming growth factor- α and myc oncoprotein in the human ovary during follicular growth, atresia and corpus luteum formation regression [J]. Chin J Obstet Gynecol, 1997, 32(10): 593-596. (in Chinese)

[8] Mahyar R M, Roemer K. p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural preventive and therapeutic agents [J]. Oncogene, 2001, 20: 3387-3398.

[9] Evangelos K, Christoforos T, Eleni L, et al. Rosmarinic acid failed to suppress hydrogen peroxide-mediated apoptosis but induced apoptosis of Jurkat cells which was suppressed by Bcl-2 [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006, 285(1/2): 111-120.

[10] Timofeev O V, Pospelova T V, Pospelor V A. Functions of p21Waf1 in norm and in stress [J]. Molecular Biology, 2004, 38(3): 309-321.

[11] Bene A, Chambers T C. p21 functions in a post-miotic block checkpoint in the apoptotic response to vinblastine [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 380: 211-217.

[12] Raj K, Ogston P, Beard P. Virus-mediated killing of cell that lack p53 activity [J]. Nature, 2001, 412(6850): 914-917.

[13] Satosi K, Motoaki U. Histological analysis of the critical point' in follicular development in mice [J]. Reproductive Medicine and Biology, 2004, 3(3): 141-145.

[14] Claudia A K, Timo D V, Andreas H, et al. Functional and structural regression of the rabbit corpus luteum is associated with altered luteal immune cell phenotypes and cytokine expression patterns [J]. Histochemistry and Cell Biology, 2002, 118(6): 479-489.

[15] Bao B, Garverick H A, Smith G W, et al. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P4502 side chain cleavage, and acromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles [J]. Biol Reprod, 1997, 56: 1158-1168.

[16] Anita C G, Izabella R G, Barbara K. Gonadotropin (LH, FSH) levels in serum and cyst fluid in epithelial tumors of the ovary [J]. Archives of Gynecol and Obstetrics, 2004, 270(3): 151-156.

(上接第 28 页)

[10] Morar D. The development of an interferon-gamma (IFN- γ) assay for the diagnosis of tuberculosis in African elephants (*Lox odonta Africana*) and black rhinoceros (*Diceros bicornis*) [D]. South Africa; University of Pretoria, 2005: 1227.

[11] Gwozdz J M, Thompson K G, Murray A, et al. Comparison of three serological tests and an interferon- γ assay for the diagnosis of paratuberculosis in experimentally infected sheep [J]. Aust Vet J, 2000, 78(11): 779-782.

[12] Suradhat S, Intrskamhaeng M, Damrongwatanapokin S. The correlation of virus specific interferon gamma production and protection against classical swine fever virus infection [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2001, 83(324): 177-189.

[13] 王鹏彦, 李德生. 大熊猫饲养管理 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 128-143.
Wang P Y, Li D S. Feeding and management of ailuropoda melanoleuca [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003: 128-143. (in Chinese)

[14] Wan Q H, Wu H, Fang S G, et al. A new subspecies of panda (*Ailuropoda melanoleuca*) from Shaanxi, China [J]. Journal of Mammalogy, 2005, 86(2): 397-402.

[15] Wen Z, Zhong Z. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation [J]. Cell, 1995, 82: 241-250.

[16] Vinkemeier U, Moarefi L. Structure of the amino-terminal protein interaction domain of STAT-4 [J]. Science, 1998, 279: 1048-1052.

[17] Chen Q, Gong B, Mahmoud-Ahmed A, et al. Apo2L/TrAIL and Bcl-2-related proteins regulated type interferon-induced apoptosis in multiple myeloma [J]. Blood, 2001, 98(7): 2182.

[18] Imada K, Leonard J W. The Jak-STAT pathway [J]. Molecular Immunology, 2000, 37: 1-11.