

c-myc 和 c-fos 在隆肛蛙与北方山溪鲵卵巢中的表达^{*}

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, 对隆肛蛙与北方山溪鲵不同发育时期卵泡 c-myc 和 c-fos 的表达产物进行了定位检测。结果表明, Myc 在 2 种动物 I-II 期卵母细胞和滤泡细胞中表达较强, 以后逐渐减弱; Fos 在 2 种动物卵泡发育初期表达很弱, 在 III-IV 期卵泡中表达增强。上述结果说明, c-myc 在 2 种动物卵母细胞发育初期起重要作用, 而 c-fos 在发育中后期起重要的调控作用, 2 种原癌基因可能通过调节类固醇激素的合成与分泌来调控卵母细胞的发育。

[关键词] 隆肛蛙; 北方山溪鲵; c-myc; c-fos; 卵巢

[中图分类号] Q 959.5⁺ 3; Q 954.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)07-0001-04

隆肛蛙 (*Rana quadranus* Liu) 属无尾目、蛙科、蛙属, 主要分布在我国陕西南部、甘肃南部、湖北、四川、安徽等地, 在秦巴山区数量较多, 为这一地区的优势种, 有一定的药用和食用价值。雷忻等^[1,2]曾对其卵巢发育的类固醇激素及其受体调控作用进行了研究, 但对原癌基因调控的研究至今未见报道。北方山溪鲵 (*Batrachuperus tibetanus*) 属两栖纲、有尾目、小鲵科, 地理分布范围北达甘肃天水, 南到四川九龙, 秦岭北坡亦有大量分布, 可作药用、食用, 具有一定的经济开发价值。有尾目山溪鲵卵巢滤泡细胞和卵黄发生的形态学与组织学研究已有报道^[3,4], 而有关其卵巢发育中原癌基因调节作用的研究尚未见报道。

原癌基因 c-myc 和 c-fos 在脊椎动物卵母细胞发育中具有重要的调控作用, 这在两栖动物中已有相关报道。Nishikura 等^[5]以光滑爪蟾为材料, 研究 c-myc 在胚胎早期发育中的表达, 发现在完全成熟而未受精的卵中, c-myc mRNA 高水平表达, 但随着卵裂的开始, 这种表达则下降, 说明 c-myc 基因产物在早期胚胎发育中起重要作用。Kindy 等^[6]研究爪蟾卵巢和早期胚胎的 c-fos 表达, 发现 c-fos mRNA 在卵母细胞和卵子中表达水平较高, 到囊胚期则下降到相对较低的水平, 到神经胚期又出现短暂表达。

但目前有关 c-myc 和 c-fos 在两栖动物卵母细胞不同发育时期的调控作用, 及其表达产物的存在部位与作用等方面的研究, 仍存在一些不明之处, 且有对无尾类的研究更为少见。本试验在对隆肛蛙卵巢发育中类固醇激素及其受体调控作用研究的基础上^[1,2], 以无尾目的隆肛蛙和有尾目的北方山溪鲵 (*Batrachuperus tibetanus*) 为材料, 用免疫细胞化学方法, 对 Myc 蛋白和 Fos 蛋白在卵泡发育中的分布进行了初步研究, 旨在探讨 2 种原癌基因在卵子发育中的调节规律, 探索隆肛蛙和北方山溪鲵生殖活动的特点和规律, 特别为有尾两栖类动物生殖生理学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材 料

所用动物采自陕西周至国家自然保护区内的山间溪流中, 海拔 1 200~1 400 m。2002-04~11, 每月中旬采集 1 次。试验共采集隆肛蛙雌性成体 14 例, 北方山溪鲵雌性成体 16 例。

1.2 样品制备

活体剖腹, 取出卵巢, 切成 1 cm³ 的小块, 新鲜配制改良 Bouin 液固定 8~12 h, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 切片厚 6 μm。

^{*} [收稿日期] 2005-01-12

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

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

[通讯作者] 张育辉(1956-), 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

1.3 免疫细胞化学反应程序

切片脱蜡复水后,置于新鲜配制的质量分数 3% H_2O_2 溶液中浸泡 5~10 min,以灭活内源性酶。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 Fos 抗体(按体积比 1:100 稀释)和兔抗人 Myc 抗体(按体积比 1:80 稀释)(二者均为武汉博士德公司产品),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。对照用 PBS 代替第一抗体进行孵育,为阴性反应。

试验统计了 2 种抗体的免疫染色反应各 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 4 级:+++ 强阳性反应,显

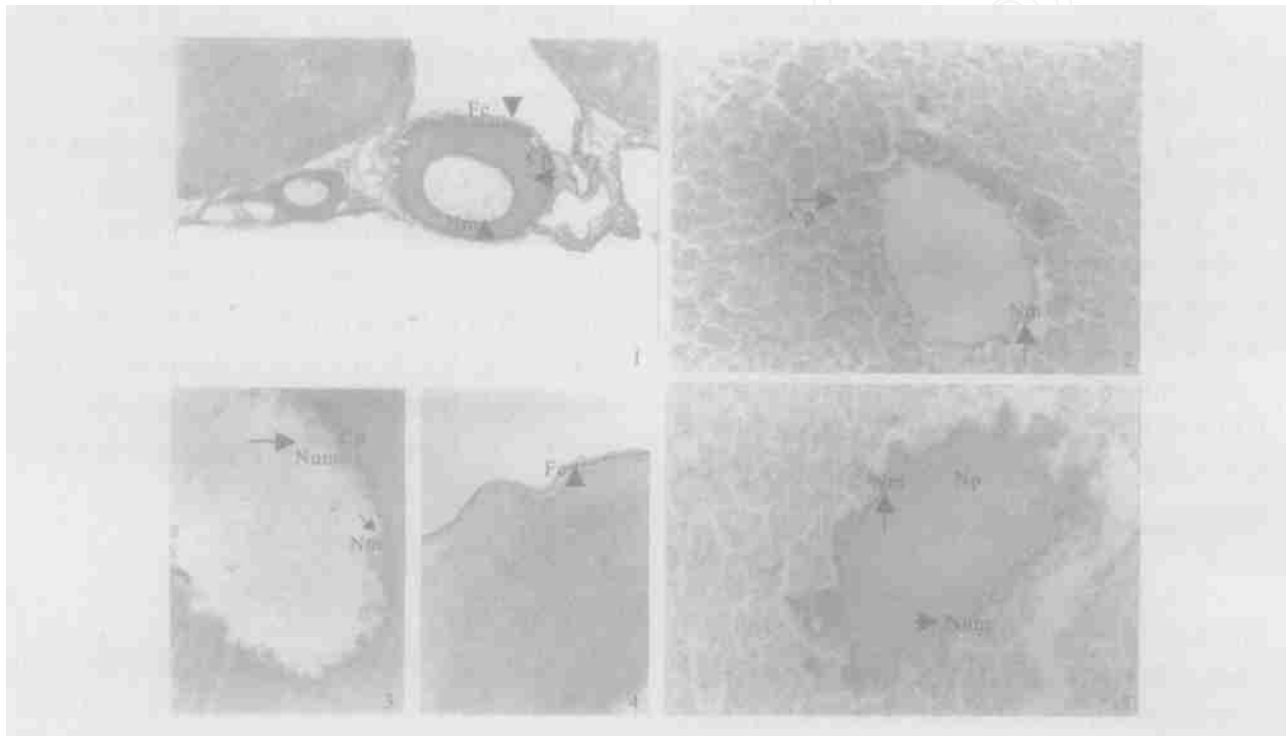
深棕色;++ 中等阳性反应,显棕色;+ 弱阳性反应,显浅棕色;- 阴性反应,显浅黄色或无色。

2 结果与分析

2.1 Myc 和 Fos 在隆肛蛙卵巢中的分布

2.1.1 Myc 的分布 由表 1 可以看出,在卵巢 I-II 期卵泡中,阳性反应在滤泡细胞、卵母细胞胞质、核膜中较强烈。III-IV 期卵泡中的阳性反应较弱,阳性产物分布在滤泡细胞、卵母细胞胞质、核膜及核仁膜等处(图版 1~3)。

2.1.2 Fos 的分布 由表 1 可知,在卵巢 I-II 期卵泡中,阳性产物在滤泡细胞中有分布。在 III-IV 期卵泡中,阳性产物广泛分布在滤泡细胞、卵母细胞胞质、核膜、核质、核仁膜等部位,其中在核膜、核仁膜等部位阳性反应强烈(图版 4,5)。



图版 1~5 *cmyc* 和 *cfos* 在隆肛蛙卵巢中的表达

1 Myc 免疫阳性物定位在隆肛蛙 II 期卵泡的滤泡细胞(Fc)、卵母细胞胞质(Cp)和核膜(Nm)中,×149; 2 Myc 免疫阳性物定位在隆肛蛙 IV 期卵母细胞胞质(Cp)和核膜(Nm)中,×74; 3 Myc 免疫阳性物定位在隆肛蛙 IV 期卵母细胞核膜(Nm)和核仁膜(Num)中,×149; 4 Fos 免疫阳性物定位在隆肛蛙 II 期卵泡的滤泡细胞(Fc)中,×149; 5 Fos 免疫阳性物定位在隆肛蛙 IV 期卵母细胞核膜(Nm)、核质(Np)和核仁膜(Num)中,×149

Plate 1- 5 Expression of *cmyc* and *cfos* in ovary of the *Rana quadranus*

1 Immunopositive Myc located in the follicle cell (Fc), cytoplasm (Cp) and nuclear membrane (Nm) of stage II oocyte of *Rana quadranus*, ×149; 2 Immunopositive Myc located in the cytoplasm (Nm) of stage IV oocyte of *Rana quadranus*, ×74; 3 Immunopositive Myc located in the nuclear membrane (Nm) and nucleolar membrane (Num) of stage IV oocyte of *Rana quadranus*, ×149; 4 Immunopositive Fos located in the follicle cell (Fc) of stage II oocyte of *Rana quadranus*, ×149; 5 Immunopositive Fos located in the nuclear membrane (Nm), nucleoplasm (Np) and nucleolar membrane (Num) of stage IV oocyte of *Rana quadranus*, ×149

2 2 *Myc* 和 *Fos* 在北方山溪鲵卵巢中的分布

2 2 1 *Myc* 的分布 表 1 结果表明, 在卵巢 I - II 期卵泡中, 卵母细胞胞质中的阳性反应较强, 而在其他部位为阴性。在 III-IV 期卵泡中, 卵母细胞胞质中的阳性反应减弱, 其他区域为阴性反应 (图版 6~

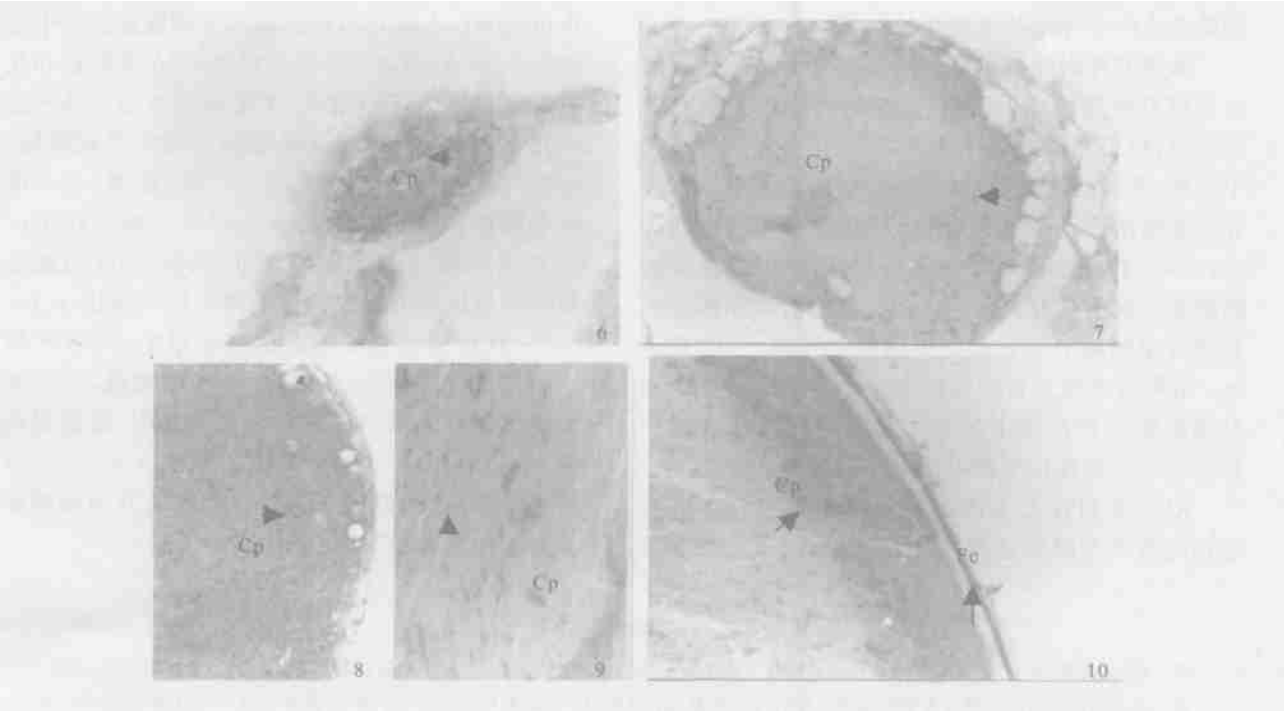
8)。
2 2 2 *Fos* 的分布 由表 1 可知, I - II 期卵泡在各个部位均无阳性反应, 但在 III-IV 期卵泡中, 于滤泡细胞、卵母细胞胞质等处可见阳性产物 (图版 9, 10)。

表 1 隆肛蛙和北方山溪鲵不同发育时期卵巢中 *Myc* 和 *Fos* 的分布

Table 1 Distribution of *Myc* and *Fos* in the different stages of ovary development of *Rana guadranus* and *Batrachuperus tibetanus*

物 种 Species	发育时期 Development stages	<i>Myc</i>					<i>Fos</i>					对照 CK
		Fc	Cp	Nm	Np	Num	Fc	Cp	Nm	Np	Num	
隆肛蛙 <i>Rana guadranus</i>	I - II	++	+	++	-	-	+	-	-	-	-	-
	III-IV	+	+	+	-	+	+	+	++	+	++	-
北方山溪鲵 <i>Batrachuperus tibetanus</i>	I - II	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	III-IV	-	+	-	-	-	++	++	-	-	-	-

注: Fc 滤泡细胞; Cp. 卵母细胞胞质; Nm. 核膜; Np. 核质; Num. 核仁膜
Note: Fc Follicle cell; Cp. Cytoplasm; Nm. Nuclear membrane; Np. Nucleoplasm; Num. Nuclear membrane



图版 6~ 10 *c-myc* 和 *c-fos* 在北方山溪鲵卵巢中的表达

6 *Myc* 免疫阳性物定位在北方山溪鲵 II 期早期卵母细胞胞质 (Cp) 中, ×297; 7 *Myc* 免疫阳性物定位在北方山溪鲵 II 期晚期卵母细胞胞质 (Cp) 中, ×297; 8 *Myc* 免疫阳性物定位在北方山溪鲵 III 期卵母细胞胞质 (Cp) 中, ×297; 9 *Fos* 免疫阳性物定位在北方山溪鲵 IV 期卵母细胞胞质 (Cp) 中, ×149; 10 *Fos* 免疫阳性物定位在北方山溪鲵 IV 期卵泡的滤泡细胞 (Fc) 和卵母细胞胞质 (Cp) 中, ×149

Plate 6- 10 Expression of *c-myc* and *c-fos* in ovary of the *Batrachuperus tibetanus*

6 Immunopositive *Myc* located in the cytoplasm (Nm) of stage II oocyte of *Batrachuperus tibetanus*, ×297; 7 Immunopositive *Myc* located in the cytoplasm (Cp) of stage II oocyte of *Batrachuperus tibetanus*, ×297; 8 Immunopositive *Myc* located in the cytoplasm (Cp) of stage III oocyte of *Batrachuperus tibetanus*, ×297; 9 Immunopositive *Fos* located in the cytoplasm (Cp) of stage IV oocyte of *Batrachuperus tibetanus*, ×149; 10 Immunopositive *Fos* located in the follicle cell (Fc) and cytoplasm (Cp) of stage IV oocyte of *Batrachuperus tibetanus*, ×149

3 讨 论

3 1 *c-myc* 与卵泡发育

c-myc 是发现较早, 生物学活性最复杂的原癌

基因之一, 其产物 *Myc* 蛋白是一类核蛋白转录因子, 能与特异的 DNA 序列结合, 对一系列启动子的活性发挥调节作用。 *Myc* 蛋白家族属于即刻早期应答 (immediate early response) 基因的编码产物。 这

种核蛋白在细胞周期、细胞分化、细胞程序化死亡及细胞的恶性转化过程中,均有重要的调节作用。

Delidow 等^[7]在用促性腺激素诱导大鼠卵巢 *c-myc* 表达中发现, *c-myc* 在颗粒细胞中表达,并可受促性腺激素的刺激而增强,这种增强发生在 DNA 合成和类固醇激素增强之前,因此认为, *c-myc* 的表达是促性腺激素调控颗粒细胞分子机制的一部分。随后,用免疫组化方法对大鼠卵巢 *c-myc* 的表达进行定位,也证实 *c-myc* 表达产物在颗粒细胞中。Hourdry 等^[8]发现, *c-myc* mRNA 可在幼小的光滑爪蟾卵母细胞胞质中高水平表达,但其表达随卵母细胞的生长而减弱。Godeau 等^[9]观察到在爪蟾卵母细胞卵黄合成期, *c-myc* 表达水平高,其产物主要定位在卵母细胞核。Maruo 等^[10]认为, *c-myc* 参与卵泡早期发生时小卵泡的自发生长。

本研究在对隆肛蛙卵泡的观察中,发现 *Myc* 蛋白在隆肛蛙卵巢 I - II 期卵母细胞和滤泡细胞中表达较强,以后逐渐减弱。雷忻等^[1,2]在这之前的研究中发现,随着隆肛蛙卵泡的发育,类固醇激素的合成分泌逐渐增多。而滤泡细胞是类固醇激素合成的场所, *c-myc* 在滤泡细胞中的表达,说明其可能在类固醇激素合成中具有负调控作用。通过对类固醇激素合成分泌的调节来影响卵母细胞的发育,可能是 *c-myc* 对卵母细胞发育的调控方式之一。而 *Myc* 在卵母细胞胞质和核膜中的表达则说明, *c-myc* 表达产物也可能直接作用于卵母细胞来调节其发育。

Myc 蛋白在北方山溪鲵卵母细胞发育中的表达趋势基本与隆肛蛙相同,因此认为, *c-myc* 在北方

山溪鲵卵母细胞发育早期也有一定的调控作用。

3.2 *c-fos* 与卵泡发育

c-fos 是一类核蛋白转录因子,属于即刻早期应答基因。 *c-fos* 是一种转录活化因子与原 *Ca* 基因产物所形成的一种复合物,其参与各个基因的转录和调节。用生物化学及免疫组化法均发现, *c-fos* 基因表达的产物位于核内,同时在细胞质中也有发现。 *c-fos* 基因的表达与细胞的增殖和程序化死亡过程有密切关系。

Delidow 等^[7]对大鼠卵巢 *Fos* 蛋白的免疫组织化学研究表明,其在颗粒细胞中有较强表达,这种表达在类固醇激素产生之前就已经开始,并且在促性腺激素刺激下得到迅速加强,由此推测 *c-fos* 可能在促性腺激素对颗粒细胞分泌功能的调控中有重要作用。同时,人们在爪蟾卵巢和早期胚胎发育中也发现有 *c-fos* 的表达^[6]。本研究发现,在隆肛蛙和北方山溪鲵卵巢中, *Fos* 在 I - II 期卵母细胞和滤泡细胞中几乎不表达,在 III - IV 期滤泡细胞中显阳性反应,而此时类固醇激素分泌最为旺盛,推测 *c-fos* 可能对类固醇激素的合成与分泌起着正调控作用; *Fos* 在 III - IV 期卵母细胞中的分布,说明 *c-fos* 可能直接调控卵母细胞的发育。由上述分析可看出, *c-fos* 与 *c-myc* 在卵泡发育中的表达刚好相反, *c-fos* 产物在 I - II 期卵泡中表达较弱,以后逐渐增强,故推测其在隆肛蛙和北方山溪鲵卵泡发育的中、后期起调节作用;而 *c-myc* 则在 I - II 期卵泡中有较强表达,以后逐渐减弱,故推测其在隆肛蛙和北方山溪鲵卵泡发育的初期有重要调节作用。

【参考文献】

- [1] 雷忻,张育辉,李亚琳.隆肛蛙卵巢性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
- [2] 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
- [3] 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.
- [4] ZHANG Yu-hui, JIA Lin-zhi. Microstructure and ultrastructure of vitellogenesis in oocytes of the stream salamander (*Batrachuperus p. inchonii*) [J]. Acta Zoologica Sinica, 2002, 48(4): 534-542
- [5] Nishikura K. Expression of *c-myc* proto-oncogene during the early development of *Xenopus laevis* [J]. Oncogene Res, 1987, (2): 179-191
- [6] Kindy M S, Vemra IM. Developmental expression of the *Xenopus laevis* *fos* protooncogene [J]. Cell Growth Differ, 1990, (1): 27-37
- [7] Delidow B C, White B A, Peluso J J. Gonadotropin induction of *c-fos* and *c-myc* expression and deoxyribonucleic acid synthesis in rat granulosa cells [J]. Endocrinology, 1990, 126: 2302-2306
- [8] Hourdry J, Brulvert A, Gusse M. Localization of *c-myc* expression during oogenesis and embryonic development in *Xenopus laevis* [J]. Development, 1988, 104(4): 631-641
- [9] Godeau F, Persson H, Gray H E. *c-myc* expression is dissociated from DNA synthesis and cell division in *Xenopus* oocyte and early embryonic development [J]. EMBO, 1986, 5(13): 3571-3577
- [10] Maruo T. Expression of oncogenes, growth factors and their receptors in follicular growth, regression and atresia: their roles in granulosa cell proliferation and differentiation [J]. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 1995, 47(8): 738-750

(下转第 8 页)

- [5] 刘平, 王学文 尿毒症患者血小板膜糖蛋白 Ib 含量和血浆 vWF 浓度变化及其意义[J]. 中华肾脏病杂志, 1995, 11(2): 69- 71.
- [6] 严海东, 赵丽娟, 项永迁, 等 血液透析对尿毒症患者血小板粘附聚集功能及膜糖蛋白 Ib 的作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999, 8(4): 346- 348.

Effect of PLC on platelet's adhesion and Gp Ib

WANG Chang-gao¹, QU Yong-hua², CHEN Tao³

(1 College of Bioengineering, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China;

2 Medical College, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China;

3 Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: The rounding glass ball method was taken to study the effect of phospholipase C (PLC) on platelet's adhesion administered via duodenum, and competitive enzyme-linked immunosorbent assay (CELISA) was taken to study the effect of PLC on platelet's Gp Ib molecular number at the same time. The result was that freeze-drying additive, 100 and 200 U/kg PLC, had no evident effect on platelet's adhesion rate, but 400, 600, 800 and 1 000 U/kg PLC had significant effect. Freeze drying additive had no apparent effect on platelet's Gp Ib molecular number, but 0.5, 1 and 2 U/mL PRP PLC had significant effect.

Key words: PLC; platelet; adhesion rate; Gp Ib

(上接第 4 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)07-0001-EA

Expression of *c-myc* and *c-fos* in ovary of the *Rana quadranus* and *Batrachuperus tibetanus*

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, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China)

Abstract: Immunocytochemical localization was investigated at different developmental stages of the follicles of the *Rana quadranus* and *Batrachuperus tibetanus* using antibodies against Myc and Fos. The results indicate that Myc is expressed strongly in the oocyte and follicle cells at the stages I-II, then more weakly at the stages III-IV. Fos is weakly expressed in the oocyte at early stages, but more strongly at stages III-IV. These results prove that for *Rana quadranus* and *Batrachuperus tibetanus*, *c-myc* plays a key role in the early development of oocyte, and *c-fos* in the medium and upper stages of oocyte. The two proto-oncogenes may regulate the oocyte development of *Rana quadranus* and *Batrachuperus tibetanus* by regulating the synthesis and secretion of sex steroids.

Key words: *Rana quadranus*; *Batrachuperus tibetanus*; *c-myc*; *c-fos*; ovary