

雌二醇及其受体在北方山溪鲵精巢中的周期性分布

李亚琳^{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 渭南师范学院 化学系, 陕西 渭南 714000)

[摘要] 用免疫组织化学方法检测雌二醇 (estradiol) 及其受体 (estrogen receptor) 在北方山溪鲵 (*Batrachuperus tibetanus*) 精巢发育周期中的表达变化。结果表明, 在4~5月, 雌二醇及受体在精原细胞的胞质中强表达; 6月, 雌二醇在精母细胞的胞质中表达较弱, 其受体在精母细胞的核质中有较强表达; 7月, 雌二醇及受体在精子细胞的胞质中表达; 8月, 雌二醇及受体在精原细胞的胞质中和变态后的精子头部有弱表达; 9~11月, 两者均在精原细胞的胞质中及精子头部有较强表达。说明雌二醇及其受体存在于整个精巢周期中, 二者在生精细胞中的强弱变化基本一致, 其变化规律与精子发育周期密切相关; 雌激素受体多存在于生精细胞的胞质中, 雌激素可能以非基因组效应调控细胞的增殖, 并与精子的发育成熟密切相关。

[关键词] 北方山溪鲵; 雌二醇; 受体; 精子发生

[中图分类号] Q959.5+20.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0058-05

Localization of estradiol and estrogen receptor in the testis of the stream salamander *Batrachuperus tibetanus*, during the annual reproductive cycle

L I Ya-lin^{1,2}, ZHANG Yu-hui¹

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

2 Chemistry Department, Weinan Teacher College, Weinan, Shaanxi 714000, China)

Abstract Location of estradiol and estrogen receptor in testis of *Batrachuperus tibetanus* was examined by immunohistochemistry. The results were as follows: in Apr-May, estradiol and estrogen receptor presented in the cytoplasm of spermatogonia (SPG); in Jun, estradiol presented in the cytoplasm of spermatocyte (SPC), and estrogen receptor presented in the nuclear of spermatocyte (SPC); in Jul, they were all detected in the cytoplasm of spermatid (SPD); In Aug, estradiol and estrogen receptor had slightly receptor in the cytoplasm of spermatogonia (SPG) and cephalic spermatozoa after metamorphoses; in Sep-Nov, estradiol and estrogen receptor presented in the cytoplasm of spermatogonia (SPG) and cephalic spermatozoa. In conclusion, variation estradiol and estrogen receptor exist in the all process when the testis was developing, they had the same in reactive intensity that was correlative with the annual reproductive cycle. Estrogen receptor chiefly distributed in the cytoplasm of germ cells, estradiol regulated the proliferation of SPG by nongenomic action probably. In addition, estradiol promoted maturation of spermatozoa further after metamorphoses.

Key words: *Batrachuperus tibetanus*; estradiol; estrogen receptor; spermatogenesis

类固醇激素在精子发生中的作用一直是备受关注的问题。传统观点认为, 精子发生主要受到雄激素的调控, 而雌激素在这一过程中的作用仍不很明确。

有关类固醇激素在季节性繁殖的两栖动物体内的分布规律与作用已有报道, 如在冠蝶螈 (*Triturus carnifex* Laur) 的血液中, 雄激素在繁殖季节含量最

· [收稿日期] 2006-01-09

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2001 SM 26); 渭南师范学院基金项目(04YKZ009)

[作者简介] 李亚琳(1972-), 女, 陕西渭南人, 讲师, 在读博士, 主要从事两栖动物生殖与发育研究。

高,雌二醇含量在3月出现峰值,孕酮含量的变化很小,但却与精巢质量有明显的相关性^[1]。Fasano等^[2]在食用蛙(*Rana esculenta*)中检测发现,睾酮和二氢睾酮在秋季和早春含量较高,而雌二醇在春季达到峰值,随后减少到可检测量,孕酮含量则从秋季到冬季再到春季逐渐增加。但前人的工作大都是用放射免疫测定法检测血清的激素含量,未能做到细胞定位,并且血清中激素含量的变化与精巢中激素的变化是否一致仍需探讨。此外,对类固醇激素功能的分析,也大都是通过注射外源性激素后观察其效应而作出的判断。

北方山溪鲵(*Batrachuperus tibetanus*)生活在海拔较高的山区溪流中,隶属有尾目,小鲵科,其精巢的形态和结构具有年周期性变化,精巢内精原细胞增生有2个高峰期,分别在9~11月和翌年的3~5月,初级精母细胞的成熟分裂期在6月末到7月,7月末到8月是精子形成期^[3]。本研究用免疫组织化学方法,检测北方山溪鲵精巢中雌二醇及其受体在生精细胞中的分布规律及精确定位,并与精子发生周期相联系,以期探讨雌二醇在精子发生中的调节功能。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性成体北方山溪鲵16尾,质量20~30 g,全长175~260 mm。2002-04~11采自秦岭北坡的溪流中,每月2尾。

1.2 样品制备

剖腹取雄性北方山溪鲵精巢后,置改良Bouin's液(不含醋酸)中固定10~12 h,系列酒精脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚5~8 μm。

1.3 免疫组织化学反应程序

切片常规脱蜡复水后,用0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)热修复2~3次。再浸入质量分数

3% H₂O₂中,室温下放置10 min以灭活内源性酶。然后按SABC(strept avidin-biotin complex)法进行免疫组织化学反应。

每组试验均设对照,对照用PBS代替第一抗体进行孵育,各组均为免疫阴性反应。

2 结果与分析

2.1 雌二醇(E₂)在北方山溪鲵生精细胞中的免疫组织化学反应

本研究观察结果表明,4~5月,在北方山溪鲵精原细胞的胞质中,尤其是核膜周围有较强的E₂阳性反应(图版1);6月,次级精母细胞胞质中E₂阳性反应较弱(图版2);7月,精子细胞核膜周围的胞质中有强的E₂阳性反应(图版3);8~11月,北方山溪鲵增生区精原细胞的胞质中和成熟区的精子头部均有E₂阳性反应(图版4~7),其中8月精巢中E₂阳性反应较弱。

2.2 雌激素受体(ER)在北方山溪鲵生精细胞中的免疫组织化学反应

本研究观察结果表明,4~5月,在北方山溪鲵精原细胞的胞质中出现ER阳性反应,其中5月精原细胞核膜周围的胞质中ER阳性反应最强(图版8~9);6月,精母细胞的核质中有较强的ER阳性反应(图版10);7月,ER在精子细胞核膜周围的胞质中形成帽状的强阳性反应产物(图版11);在8~11月,北方山溪鲵精巢生精区精原细胞的胞质及核膜周围均有ER阳性反应,在成熟区的精子头部也有ER阳性反应(图版12~14),但在8月和11月的ER均呈弱阳性反应。

由表1可见,E₂及其受体ER在北方山溪鲵精巢中的定位基本一致,在生殖周期中两者都呈现出规律分布。在6月和8月,二者在北方山溪鲵细胞质中的阳性反应相对较弱,但在6月,ER在核质中有较强的阳性反应。

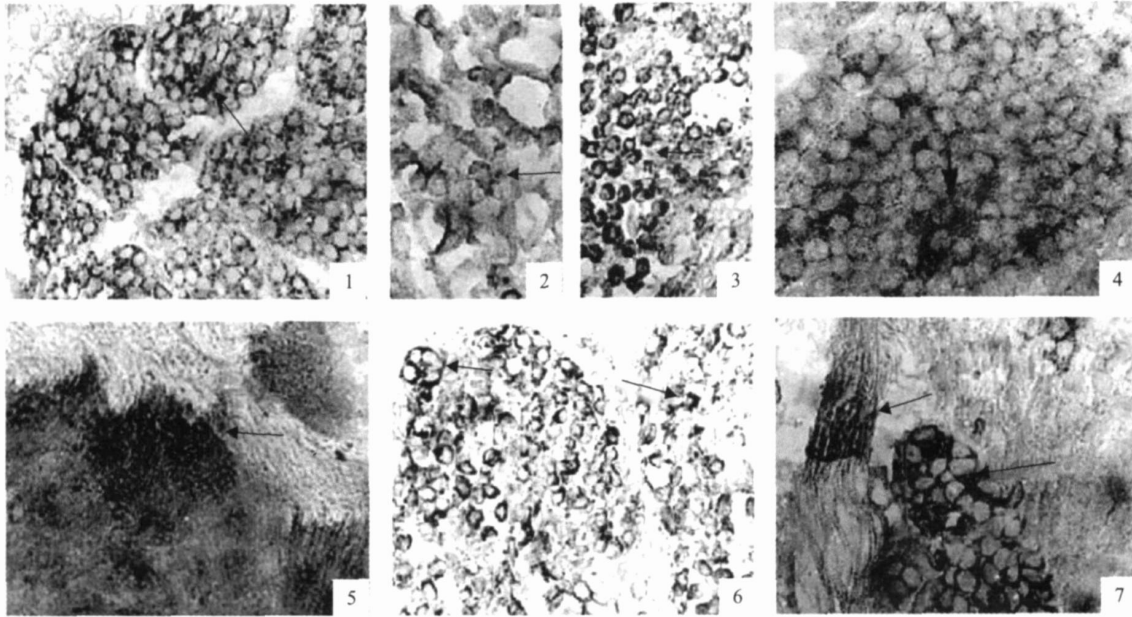
表1 雌二醇及其受体在北方山溪鲵生精细胞中的免疫细胞化学定位

Table 1 Localization of E₂ and ER immunoreactivity in the testis of *Batrachuperus tibetanus* during the annual cycle

项目 Item	4月 Apr	5月 May	6月 Jun	7月 Jul	8月 Aug	9月 Sep.	10月 Oct	11月 Nov
	SPG I	SPG II	SPC	SPD	SPG I SPZ	SPG I SPZ	SPG I SPZ	SPG I SPZ
E ₂	Cp(++)	Cp(+++)	Cp(+)	Cp(++)	Cp(++)	Cp(++++)	Cp(++++)	Cp(++++)
ER	Cp(++)	Cp(+++)	Np(++)	Cp(+++)	Cp(++)	Cp(++++)	Cp(++++)	Cp(+++)

注:SPG I. 初级精原细胞;SPG II. 次级精原细胞;SPC. 精母细胞;SPD. 精子细胞;SPZ. 精子;Cp. 细胞质;Np. 核质;++++. 强阳性反应;++. 较强阳性反应;+. 弱阳性反应。

Note: SPG I. primary spermatogonia; SPG II. secondary spermatogonia; SPC. spermatocyte; SPD. spermatid; SPZ. spermatozoa; Cp. cytoplasm; Np. nucleoplasm; + + + +. strong immunopositive reaction; + +. medium immunopositive reaction; +. weak immunopositive reaction



图版1~7 北方山溪鲵精巢中雌二醇(E₂)的免疫组织化学观察结果

1 4月, E₂ 定位在精原细胞(SPG)胞质中, ×316; 2 6月, E₂ 在精母细胞(SPC)核膜周围的胞质中呈弱阳性反应, ×316; 3 7月, E₂ 在精子细胞(SPD)核膜周围的胞质中呈阳性反应, ×316; 4 8月, E₂ 在非成熟区(immature region)的精原细胞(SPG)胞质中呈弱阳性反应, ×316; 5 9月, E₂ 在成熟区(mature region)的精子中有阳性反应, ×316; 6 10月, E₂ 在非成熟区(immature region)的精原细胞(SPG)胞质中呈阳性反应, ×316; 7 11月, E₂ 在非成熟区(immature region)的精原细胞(SPG)胞质和成熟区(mature region)精子中有阳性位点, ×316

Plate 1-7 Immunohistochemical result of estradiol (E₂) in the testis of the stream salamander *Batrachuperus tibetanus*

1 In Apr, estradiol (E₂) was presented in the cytoplasm of spermatogonia (SPG), ×316; 2 In Jun, E₂ had slight reactivity in the cytoplasm of spermatocyte (SPC) around the nuclear, ×316; 3 In Jul, E₂ was detected in the cytoplasm of spermatid (SPD) around the nuclear, ×316; 4 In Aug, there was slight E₂ positive reaction scattered in the cytoplasm of SPG in immature region, ×316; 5 In Sep, spermatozoa (SPZ) in mature region had E₂ positive reactivity, ×316; 6 In Oct, E₂ was detected in cytoplasm of SPG in immature region, ×316; 7 In Nov, E₂ positive reactivity was in the cytoplasm of SPG in immature region and in SPZ in mature region, ×316

3 讨论

3.1 雌二醇(E₂)及其受体(ER)在北方山溪鲵精巢中的分布

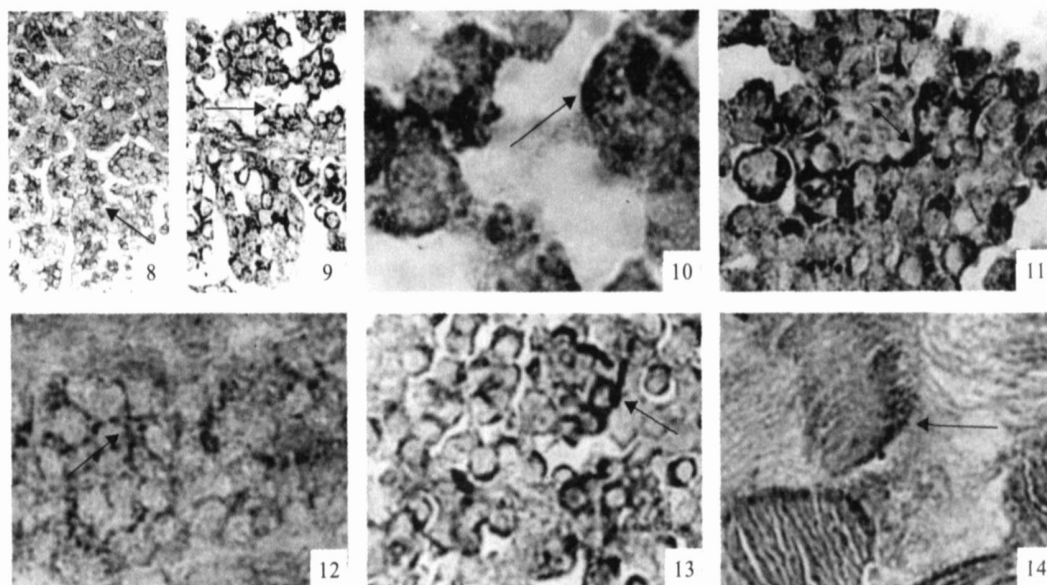
有关两栖动物精巢中类固醇激素的研究已有很多报道,但这些研究大都限于对激素水平的测定。在有肋鲵(*Pleurodeles waltl*)的血液中,17 β 雌二醇的浓度在2~3月和11月有所不同,激素在血液中是散在的,而且浓度总是很低,推测这些17 β 雌二醇可能是雄激素分泌降解时的代谢产物^[4]。雄性冠欧鲵(*Triturus carnifex*)不交配个体血液中的睾酮水平比交配个体高;而雌二醇却与其相反,在不交配的个体中含量很低,在开始交配时可达到最大值^[5]。这些结果均说明,雌二醇在两栖动物血液中是呈周期性分布的,其分布规律与精巢的发育周期有明显的相关性。

本试验通过免疫组织化学检测可见,雌二醇及其受体在北方山溪鲵精巢的发育周期中呈现出规律性分布。雌二醇在4~5月及9~11月表现出较强的

阳性反应,而在6月和8月反应较弱。可见雌二醇在精巢中一直存在,其含量在生精细胞的不同发育阶段确有差异。在春、秋细胞增殖季节,雌二醇含量稍高,非增殖季节偏低,这种变化与前人测定有尾两栖类动物血清中激素浓度所得出的结论基本一致^[1,5]。本试验结果中,除6月和8月份外,其他月份生精细胞中雌二醇的阳性反应都很明显,这与前人所述的有肋鲵血清中雌二醇浓度总是很低的结果不一致。推测这种差异的存在,一方面是由检测的组织及方法不同所致,另一方面是由不同区域不同动物的种属间差异所造成。

3.2 雌二醇(E₂)与精子发生

本试验结果表明,在精巢发育周期中雌激素受体也一直存在于生精细胞中,其定位和强度与雌二醇基本一致。如在8月份,二者阳性反应均相对较弱。雌二醇与其受体在精巢发育周期中相似的分布规律以及二者周期性的表达,说明雌激素确实参与调节精子发生的某个过程。



图版 8~ 14 北方山溪鲵精巢中雌激素受体(ER)的免疫组织化学观察结果

8 4月, ER 定位在精原细胞(SPG)胞质中, $\times 158$; 9 5月, ER 在精原细胞(SPG)核膜周围的胞质中呈阳性反应, $\times 158$; 10 6月, ER 在精母细胞(SPC)核质中呈阳性反应, $\times 632$; 11 7月, ER 在精子细胞核膜周围的胞质中呈阳性反应, $\times 632$; 12 8月, ER 在非成熟区(imature region)的精原细胞(SPG)胞质中呈弱阳性反应, $\times 632$; 13 10月, ER 在非成熟区(imature region)的精原细胞(SPG)胞质中呈阳性反应, $\times 632$; 14 11月, ER 在成熟区(mature region)精子中有阳性位点, $\times 632$

Plate 8- 14 Immunohistochemical result of estrogen receptor (ER) in the testis

of the stream salamander *Batrachuperus tibetanus*

8 In Apr, estrogen receptor (ER) was presented in the cytoplasm of spermatogonia (SPG), $\times 158$; 9 In May, there was ER positive reaction in the cytoplasm of SPG around the nuclear, $\times 158$; 10 In Jun, ER had positive reactivity in the nucleoplasm of spermatocyte (SPC), $\times 632$; 11 In Jul, ER was detected in the cytoplasm of spermatid (SPD) around the nuclear, $\times 632$; 12 In Aug, there was slight ER positive reaction scattered in the cytoplasm of SPG in immature region, $\times 632$; 13 In Oct, ER was detected in cytoplasm of SPG in immature region, $\times 632$; 14 In Nov, ER positive reactivity was in spermatozoa (SPZ) in mature region, $\times 632$

3.3 雌激素(E)的作用机制

一般认为, 雌激素受体ER 属于典型的核受体, 并作为配体激活的核转录因子, 调控着靶基因的表达, 在繁殖的许多过程中起着重要作用, 包括调控配子的产生与释放、繁殖行为和第二性特征的产生^[6]。ER 有2种亚型, 即ER- α 和ER- β 二者在与配基结合方面有许多相似的特点, 与雌二醇也有相似的亲和力。这2种亚型以同源或异源二聚体的形式存在于细胞中, 雌激素对配子产生和腺组织发育的作用主要靠ER- α 来介导^[7]。

目前的试验已证明, 雌激素受体并非经典的核激素受体。在雌性食用蛙的肝细胞^[8]、海产八目鳗(*Petromyzon marinus*)精巢的生殖细胞^[9]以及雌性海龟的肝细胞中^[10], 均已观察到雌激素受体在胞质及核质中的定位。雌激素也在小鼠精巢生精细胞的胞质中高度表达^[11]。已有证据表明, 雌激素可通过非基因组效应作用于靶器官, 如以非基因组方式调控青春期大鼠附睾上皮细胞的功能^[12]。雌激素对卵泡颗粒细胞也存在不依赖于核受体的非基因组作用

方式^[13]。本试验观察到, 在4~ 5月及9~ 11月, 当精原细胞处于增殖期时, 雌二醇及其受体同时存在于精原细胞的胞质及核膜周围, 而没有在核质中。推测此时的雌二醇可能通过其受体, 以非基因组效应调控精原细胞的增殖分裂。雌二醇通过胞浆受体发生作用, 可能是甾体激素非基因组效应多样性的一种表现, 其具体机制还有待于进一步研究。

3.4 雌激素受体(ER)在细胞核中的积累

在海龟精巢中, 雌激素受体定位在生殖细胞的胞质中。但当注射外源性雌二醇后, 则使胞质雌激素受体耗尽, 而核受体出现增加的趋势^[14]。在大鼠精巢中, 雌激素受体定位在支持细胞的胞质中, 当细胞暴露在雌二醇中时, 就引起核受体的积累^[15]。在北方山溪鲵精巢中, 6月份雌激素受体在精母细胞的核质中有表达, 此时雌二醇在精母细胞的胞质中表达非常弱。推测在精原细胞增殖期, 胞质中的雌激素受体及雌二醇已被大量消耗, 所以在6月份精母细胞核中出现了雌激素受体的积累。对雌激素受体在细胞核中积累的机制和意义, 有待于更深入的研究。

3.5 雌二醇(E₂) 在精子成熟中的作用

本试验还观察到,在北方山溪鲵精巢的成熟区,雌二醇及其受体均存在于精子头部。推测雌二醇在精子成熟中仍起着一定的作用。

综上所述,在北方山溪鲵精巢中,雌激素及其受体规律性地分布于生精周期的不同阶段和生殖细胞的不同部位,可能以非基因组效应的方式调节精原细胞的增殖。雌二醇还可能对变态后精子的进一步成熟起一定作用。山溪鲵精巢中是否存在雌二醇的基因组作用方式,以及其非基因组作用的具体机制如何,均有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Zerani M, Vellano C, Amabili F, et al. 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
- [2] Fasano S, Minucci S, Di Matteo L, et al. Intratesticular feedback mechanisms in the regulation of steroid profiles in the frog, *Rana esculenta* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1989, 75(3): 335-345
- [3] 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
- [4] Garnier D H, Joly J. Preliminary investigations on estrogen levels in *Pleurodeles waltlii* and *Salamandra salamandra* (Amphibia caudata) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1980, 40: 321-322
- [5] Zerani M, Amabili F, Gobbetti A. Plasma testosterone and 17 beta-estradiol concentrations, and aromatase activity, during courtship in male *Triturus cristatus* [J]. Horm Behav, 1992, 26(1): 56-61
- [6] Evans Rm. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily [J]. Science, 1988, 240: 889-895
- [7] Kuiper G, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta [J]. Endocrinology, 1997, 138: 863-870
- [8] Paolucci M, Botte V. Estradiol-binding molecules in the hepatocytes of the female water frog, *Rana esculenta*, and plasma estradiol and vitellogenin levels during the reproductive cycle [J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 70(3): 466-476
- [9] Ho SM, Press D, Liang L C, et al. Identification of an estrogen receptor in the testis of the sea lamprey, *Petromyzon marinus* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1987, 67(1): 119-125
- [10] Ho SM, Fehrer S, Yu M, et al. High-affinity binding of [³H] estradiol-17 beta by an estrogen receptor in the liver of the turtle [J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 70(3): 382-394
- [11] Kuhn-Velten N, Bos D, Staib W. Further characterization of estrogen binding to rat testis cytosol [J]. Steroids, 1984, 43(1): 57-69
- [12] 童明汉, 郭强苏, 王如瑶. 雌激素对大鼠附睾上皮细胞非基因组作用及其机制研究[J]. 解剖学杂志, 2000, 23(3): 229-232
- [13] 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
- [14] Mak P, Ho SM, Callard I P. Characterization of an estrogen receptor in the turtle testis [J]. Gen Comp Endocrinol, 1983, 52(2): 182-189
- [15] Nakhla A M, Mather J P, Janne O A, et al. Estrogen and androgen receptors in Sertoli, Leydig, myoid, and epithelial cells: effects of time in culture and cell density [J]. Endocrinology, 1984, 115(1): 121-128