

doi: 10.3969/j.issn.1007-855x.2011.02.012

p53 基因在小鼠睾丸发育过程中的表达规律

罗兰 张 闻 张 彦 曾慧芳 李 清

(昆明医学院 基础学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 以 17 组出生后不同发育阶段的昆明种正常小鼠睾丸组织为材料, 利用地高辛标记的 p53 基因探针在其石蜡组织切片上进行 DNA-mRNA 分子原位杂交, 探讨 p53 基因在小鼠睾丸生后发育全过程中的表达规律. 结果发现: p53 基因的首次表达出现在生后第 15 d 的初级精母细胞中, 在睾丸后续发育至 57 d 的全过程中, 初级精母细胞中均有表达信号; 次级精母细胞和圆形精子细胞至生后 27 d 时也开始出现表达; 而精原细胞和精子中始终均无阳性表达信号. p53 基因的表达活跃期分别出现在生后 20 d、33 d 和 50 d. 上述结果表明: p53 基因在小鼠睾丸生后发育过程中发挥着重要的作用; 其表达活跃期和凋亡高峰期基本同步.

关键词: 睾丸发育; 小鼠; p53 基因; 原位杂交; 基因表达

中图分类号: Q954.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-855X(2011)02-0056-06

Role of p53 Gene Expression in Development of Mouse Testis

LUO Lan, ZHANG Wen, ZHANG Yan, ZENG Hui-fang, LI Qing

(Faculty of Basic Medicine, Kunming Medical College, Kunming 650500, China)

Abstract: The testis tissue samples of normal Kunming mice are taken at 17 different stages of postnatal development. Dig-labeled p53 gene probe is used for DNA-mRNA *in situ* hybridization on the paraffin tissue sections. The expression of p53 gene in mouse testis is examined throughout the postnatal development. The results show that p53 gene is firstly expressed in the primary spermatocytes at postnatal day 15 (d15), and the expression signals keep positive in all stages to d57 in the primary spermatocytes. The expressions in the secondary spermatocytes and round spermatids are detected firstly at d27. No expression of p53 is observed at all of the stages in the spermatogonia and sperms. The active stages of p53 expression are at d20, d33, and d50, respectively. These results suggest that p53 gene plays an important role in the postnatal development of mouse testis. The active stages of p53 expression are roughly synchronous with the peaks of apoptosis.

Key words: testis development; mouse; p53 gene; *in situ* hybridization; gene expression

0 引言

精子发生是指从精原细胞开始, 历经有丝分裂、减数分裂和精子变态三个阶段, 形成外形成熟精子的全过程. 这是一个极特殊的分化过程, 也是一个极特殊的细胞周期运行过程. 在这一过程中, 既有生精细胞本身的频频分裂增殖; 又有其不断的发育分化; 同时也涉及了生精细胞的退化, 其退化过程主要是通过细胞凋亡来实现的^[1]. 生精细胞发生凋亡, 以保证存活生精细胞的数量和质量^[2].

肿瘤抑制基因 p53 基因是一个细胞周期负调控因子, 通过使细胞停顿于特定的周期位点来实现对细胞周期的调控, 被认为是基因组完整性的卫士^[3]. 此外, 研究发现 p53 基因还可以指导遗传损伤的细胞进

收稿日期: 2010-11-01. 基金项目: 云南省应用基础研究计划面上项目(2007C071M); 国家自然科学基金项目(30971454).

作者简介: 罗兰(1973-), 女, 硕士, 副教授. 主要研究方向: 细胞生物学. E-mail: luolan91@hotmail.com

通信作者: 张闻(1968-), 男, 硕士, 教授. 主要研究方向: 生物信息学. E-mail: zw810@hotmail.com

入凋亡,是一个凋亡相关基因^[4].因此,探讨 p53 基因在小鼠睾丸生殖细胞发育过程中的作用,既可探讨生殖细胞的发育机制,也可从另一个角度探讨细胞周期调控机制和凋亡机制.

关于 p53 基因在睾丸组织中的研究,多集中于如热压、电离辐射、超声辐照或相关基因敲除等因子诱导下 p53 基因病理性表达的探讨^[5-9].而正常睾丸发育过程中 p53 基因的表达,系统性、能涵盖小鼠生后睾丸发育全过程的实验研究尚不多见.因此,本研究拟系统观察处于不同发育时期昆明种正常小鼠睾丸组织生精上皮内 p53 基因 mRNA 的表达情况,期望较为完整揭示小鼠生后睾丸发育全过程中 p53 基因表达的变化规律,探讨其与功能活动的相互关系,为男性生育的临床研究提供理论及动物实验的依据.

1 实验材料

1.1 小鼠睾丸

实验选用昆明种健康雄鼠,购于昆明医学院实验动物中心.小鼠分组为:生后 1 d 龄、4 d 龄、8 d 龄、11 d 龄、15 d 龄、20 d 龄、23 d 龄、27 d 龄、30 d 龄、33 d 龄、36 d 龄、40 d 龄、43 d 龄、47 d 龄、50 d 龄、54 d 龄和 57 d 龄.每组 5 只小鼠.

1.2 p53 基因原位杂交检测试剂盒

p53 原位杂交探针及原位杂交检测试剂盒购自天津灏洋生物制品公司.

2 实验方法

2.1 组织切片制备

小鼠断颈处死后迅速取睾丸,10% 中性甲醛固定,酒精系列脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋.切片厚 5 μm ,贴于预先用多聚赖氨酸处理过的载玻片上,62 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 1 h 后,室温贮存备用.

2.2 p53 基因探针制备

p53 探针采用地高辛标记的寡核苷酸探针,其合成序列为:5'-GCCTT CAAAA AACTC CTCAA CATCC TGGGG -3';5'-CAGTG TGATG ATGGT AAGGA TAGGT CGGCG GTTC -3'.

2.3 H. E 染色

常规 H. E 染色操作,参照病理学技术^[10]进行.

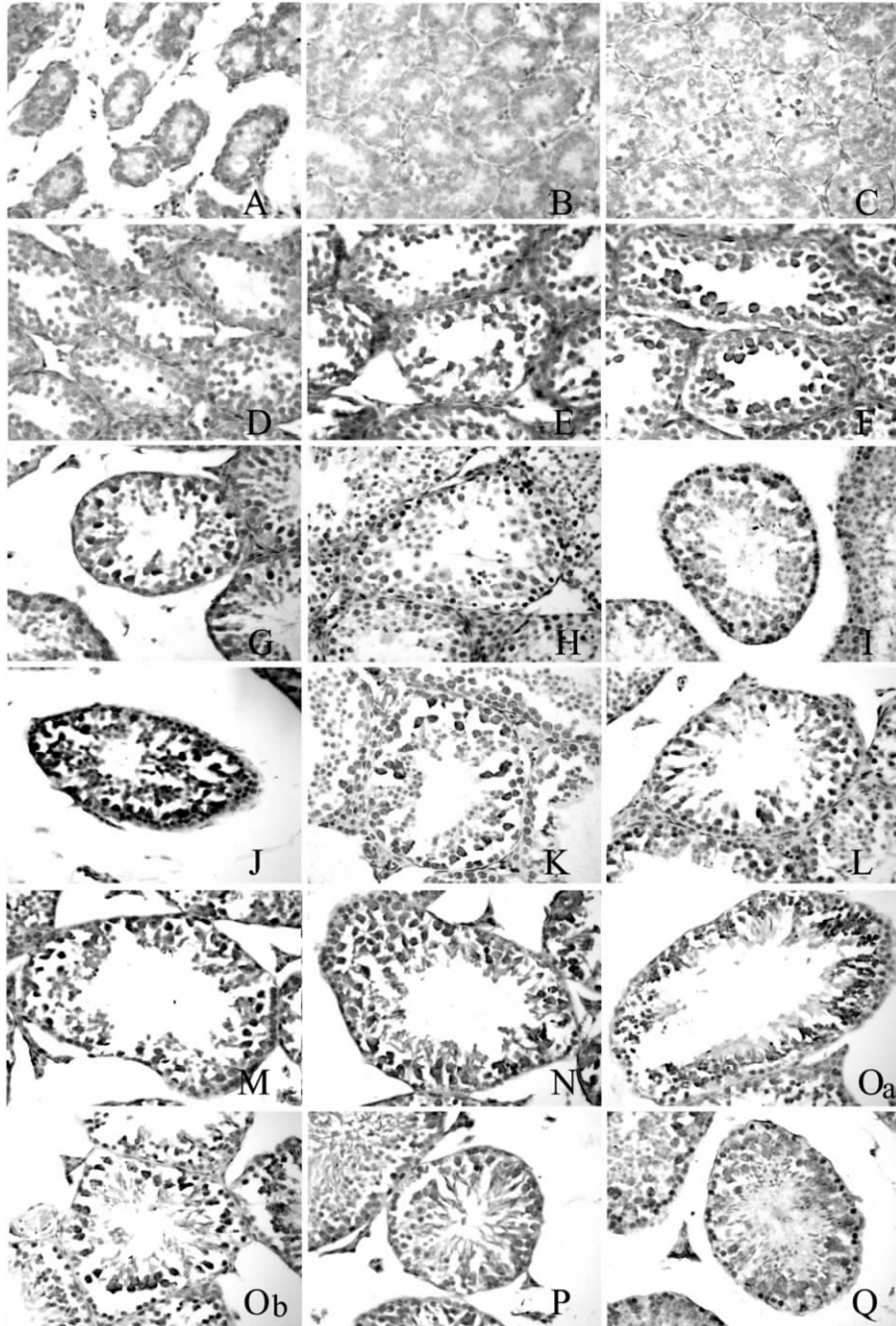
2.4 p53 基因组织原位杂交

每组随机取 5 张切片.原位杂交按文献[11]加以修改进行.

石蜡切片经二甲苯脱蜡,乙醇系列复水;0.01 M PBS 冲洗三次.置打孔液中室温 10 min;0.01M PBS 冲洗三次.之后置过氧化氢封闭液室温 20 min,以封闭内源性过氧化氢酶.0.01M PBS 冲洗三次.滴加复合消化工作液,覆盖组织表面,室温 20 min.0.01M PBS 冲洗三次.0.2 \times SSC 室温 3 min.用消毒滤纸擦干组织切片周围的液体,但保持组织湿润.玻片置于湿盒中,滴加预杂交工作液覆盖组织,盖上原位杂交专用盖玻片,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 1 h.揭去盖玻片以 0.2 \times SSC 室温洗三次,每次 5 min.滴加杂交工作液覆盖组织,盖上原位杂交专用盖玻片,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒过夜.揭去盖玻片以 2 \times SSC 37 $^{\circ}\text{C}$ 洗三次,每次 5 min;0.2 \times SSC 37 $^{\circ}\text{C}$ 洗三次,每次 5 min.滴加抗地高辛生物素标记的抗体工作液覆盖组织,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 45 min.0.01M PBS 洗三次,每次 5 min.滴加高敏过氧化物酶链亲和素复合物工作液覆盖组织,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 45 min.0.01M PBS 洗三次,每次 5 min.DAB 显色,光学显微镜下观察至细胞内胞质阳性颜色与细胞外背景颜色对比度反差明显时蒸馏水洗终止反应.细胞质显棕黄色颗粒为阳性反应.苏木素复染,使胞核为蓝色.乙醇系列脱水,二甲苯透明,中性树胶封片.Olympus 显微镜下观察照相.PBS 代替探针作阴性对照.

2.5 p53 阳性细胞百分率统计

p53 阳性细胞在显微镜下进行计数,每组计数 3 张切片,每张切片随机选取 20 个存在阳性结果的曲细精管,在显微镜下计数总生精细胞数和 p53 原位杂交检测阳性的生精细胞数,计算出阳性生精细胞所占的比率.实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示.



A: 1 d龄 B: 4 d龄 C: 8 d龄 D: 11 d龄 E: 15 d龄 F: 20 d龄
G: 23 d龄 H: 27 d龄 I: 30 d龄 J: 33 d龄 K: 36 d龄 L: 40 d龄
M: 43 d龄 N: 47 d龄 Oa: 50 d龄 Ob: 50 d龄 P: 54 d龄 Q: 57 d龄

图1 不同发育时期昆明种小鼠睾丸p53基因原位杂交结果 (×200)

Fig 1. The results of p53 gene expression with *in situ* hybridization in the testis of Kunming mice at different development stage (×200)

3 结果

3.1 p53 基因原位杂交结果

p53 基因在 1、4、8 及 11 d 龄小鼠的睾丸组织中, 生精上皮无论哪一层细胞中均未检测到阳性杂交信号(见图 1: A~D)。

在 15 d 及 20 d 龄小鼠睾丸组织少部分曲细精管中, p53 基因检测到阳性杂交信号, 杂交信号阳性的细胞是离开基底膜第 2 层或第 3 层直至以内细胞的胞质. 根据形态学指标、结合 H. E 染色结果判断, 表达阳性的细胞为初级精母细胞(见图 1: E 和 F).

在 23 d 龄小鼠睾丸组织少部分曲细精管中, p53 基因检测到较弱的阳性杂交信号, 杂交信号阳性的细胞是离开基底膜第 2 层或第 3 层细胞的胞质. 根据形态学指标、结合 H. E 染色结果判断, 表达阳性的细胞为初级精母细胞(见图 1: G).

在 27 d 龄小鼠睾丸组织少部分曲细精管中, p53 基因均检测到弱阳性杂交信号, 杂交信号阳性的细胞主要是离开基底膜第 2 层或第 3 层细胞的胞质, 部分离开基底膜第 4-6 层的细胞也有极弱的杂交信号. 根据形态学指标、结合 H. E 染色结果判断, 表达阳性的细胞为初级精母细胞、少部分次级精母细胞及圆形精子细胞(见图 1: H).

在 30 d 龄小鼠睾丸组织几乎每个曲细精管中, p53 基因均检测到较弱的阳性杂交信号, 杂交信号阳性的细胞是离开基底膜第 2 层或第 3 层直至以内的细胞胞质区. 结合形态学指标和 H. E 染色结果判断, 阳性细胞为初级精母细胞、部分次级精母细胞及圆形精子细胞. 其中, 初级精母细胞信号较强, 而次级精母细胞及圆形精子细胞信号较弱(见图 1: I).

在 33 d 龄小鼠睾丸组织几乎每个曲细精管中, p53 基因均检测到强烈的阳性杂交信号, 杂交信号阳性的细胞是离开基底膜第 2 层或第 3 层直至第 6 层细胞的胞质区. 结合形态学指标和 H. E 染色结果判断, 阳性细胞为初级精母细胞、次级精母细胞及圆形精子细胞(见图 1: J).

在 36、40、43 及 47 d 龄小鼠睾丸组织大部分曲细精管中, p53 基因均检测到阳性杂交信号, 杂交信号阳性的细胞是离开基底膜第 2 层或第 3 层直至第 6 层的细胞胞质区. 其中, 初级精母细胞信号较强, 而次级精母细胞及圆形精子细胞信号较弱(见图 1: K~N).

在 50 d 龄小鼠睾丸组织几乎每个曲细精管中, p53 基因均检测到阳性杂交信号, 杂交信号阳性的细胞是离开基底膜第 2 层或第 3 层直至第 6 层细胞的胞质区. 阳性细胞为初级精母细胞、次级精母细胞及圆形精子细胞. 其中, 有的曲细精管初级精母细胞阳性信号强烈, 而靠近管腔的次级精母细胞及圆形精子细胞信号强度明显减弱; 但有的曲细精管中杂交信号强烈的阳性细胞又集中在次级精母细胞和圆形精子细胞(见图 1: 0a 和 0b).

在 54 和 57 d 龄小鼠睾丸组织绝大部分曲细精管中, p53 基因均检测到较弱的阳性杂交信号, 杂交信号阳性的细胞是离开基底膜第 2 层或第 3 层直至第 6 层的细胞胞质区. 其中, 初级精母细胞信号相对较强, 而次级精母细胞及圆形精子细胞信号极弱甚至没有阳性信号(见图 1: P 和 Q).

3.2 p53 基因原位杂交阳性细胞百分率统计

p53 基因在小鼠睾丸生精细胞中原位杂交检测后阳性细胞百分率统计结果表明: 阳性细胞百分率从生后 1 d 至 11 d 为 0; 生后 15 d (25.23 ± 3.58) 大幅上升; 于 20 d (32.02 ± 5.13) 达到高峰; 至生后 23 d (18.23 ± 4.52) 时有所下降, 此后历经 27 d (21.25 ± 6.85) 直至生后 30 d (20.28 ± 5.28) 时保持基本平稳水平, 但 33 d (47.86 ± 6.77) 时突然又大幅上升, 出现一个更高的峰值, 36 d (21.95 ± 6.36) 时阳性细胞百分率重新减少至与 30 d 基本相同的水平, 并保持相对平稳历经 40 d (24.86 ± 5.42) 延续至 43 d (20.16 ± 6.67); 从 47 d (30.12 ± 7.09) 至 50 d (36.36 ± 7.94), 阳性细胞百分率又不断升高, 至生后 50 d 时达到一个新的峰值, 之后于 54 d (17.53 ± 5.25) 及 57 d (24.23 ± 4.91) 时重新下降, 见图 2.

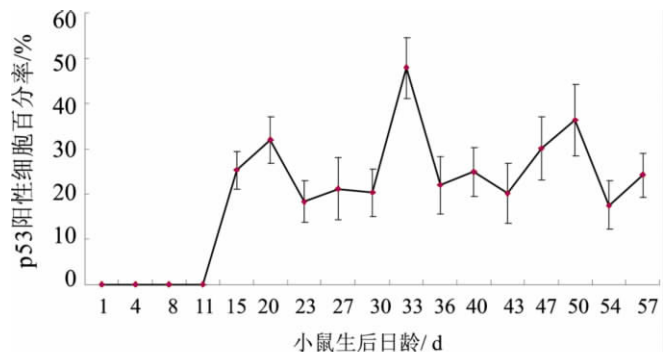


图2 小鼠p53基因原位杂交阳性细胞百分率的日龄变化
Fig.2 The age change with percentage of p53 positive germs cells in mice

4 讨论

p53 是一种受到广泛重视的肿瘤抑制基因, 在细胞的周期调控过程中起关键作用. 在哺乳动物中, 如果细胞的 DNA 受损或者遭受到其它类型的损伤时, 野生型 p53 蛋白能够阻止细胞周期从 G₁ 进入 S 期. 其通过结合转录因子 E₂F, 使之不能够结合到一些如 c-myc 的原癌基因启动子上, 实现对细胞周期的阻滞. 如细胞损伤较大、不能被修复时, 野生型 p53 蛋白会促使细胞进行凋亡^[12]. p53 与细胞内许多分子相互联系, 共同调节生精细胞的凋亡. 其具体过程包括: 活化与氧化还原作用相关基因; 产生活性氧; 氧化降解线粒体组分, 使得凋亡因子从线粒体释放至胞质活化 Caspases^[13-14].

原位杂交结果显示: p53 基因在生后 1、4、8 及 11d 龄小鼠的睾丸组织生精上皮内未检测到阳性杂交信号; 生后 15、20 及 23d 龄小鼠睾丸曲细精管中阳性杂交信号出现在初级精母细胞; 从 27d 龄开始, 除初级精母细胞外, 部分次级精母细胞及圆形精子细胞也开始出现杂交信号; 至 33d 龄时初级精母细胞、次级精母细胞及圆形精子细胞均出现强烈的杂交信号; 从 36d 龄开始, 直至 47d 龄, 初级精母细胞信号相对较强, 而次级精母细胞及圆形精子细胞信号较弱; 至 50d 龄时初级精母细胞、次级精母细胞及圆形精子细胞均出现强烈的杂交信号; 至 54 和 57d 龄时, 阳性表达信号基本只出现于初级精母细胞, 次级精母细胞及圆形精子细胞信号极弱甚至没有阳性信号.

上述结果表明: 在小鼠睾丸生后发育全过程中, p53 基因主要在初级精母细胞中表达, 部分发育时期在次级精母细胞和圆形精子细胞中也有表达, 而在原始生精细胞和各型精原细胞中自始至终均无表达. 多个时段睾丸组织中阳性表达信号的出现意味着 p53 基因在小鼠睾丸生后发育过程中发挥着重要的作用. 其表达特点和该基因在细胞周期中的抑制作用是相吻合的. 细胞周期调控中, p53 基因通过抑制细胞从 G₁ 期到 S 期的转变, 从而抑制细胞分裂. 原始生精细胞和精原细胞要进行有丝分裂, p53 基因的不表达才能对细胞的有丝分裂不发挥抑制作用. 初级精母细胞、次级精母细胞、圆形精子细胞已退出细胞周期, 开始细胞分化过程, 这些细胞中 p53 基因的表达可能参与了抑制细胞从 G₁ 期向 S 期的转变, 以保证精母细胞在减数分裂中染色体减半的作用. 有研究表明, p53 基因敲除的小鼠其精母细胞不能完成减数分裂^[15]. 缺乏 p53 表达的生精细胞不易凋亡^[16-17]. p53 的作用机制被认为是通过上调 Bax 基因的表达诱发生精细胞的自发性凋亡, 参与精子的质量控制, 减少有缺陷的生精细胞, 保证雄性配子的遗传稳定性^[8].

p53 基因原位杂交阳性细胞百分率统计结果中, 出现了三个基因表达的活跃时期. 第一个波峰出现在小鼠生后第 20 d, 这一时期和小鼠生精细胞凋亡的高峰期在出现时间上是基本吻合的^[2]. 第二个波峰也是最明显的波峰出现在小鼠生后第 33 d, 这一时期 p53 mRNA 的表达强度较 30 d 急剧增强, 且初级精母细胞、次级精母细胞和精子细胞中都有表达, 至 36 d 时又恢复与 30 d 同样的分布特点, 即初级精母细胞信号较强, 而次级精母细胞及圆形精子细胞信号较弱. 这意味着在小鼠生后睾丸发育的第 33 d, p53 基因的表达出现短暂性活跃. 我们的前期研究结果表明, 在小鼠生后第 33 d, 生精细胞的自发性凋亡也出现了一个短暂性活跃期; 与此同时, 在 H. E 染色的同期组织学观察中, 小鼠在生后 30 d 时首次观察曲细精管管腔中有精子的出现, 但 33 d 时却基本未发现精子, 至 36 d 时管腔中又有精子的大量重新出现^[18]. 组织学观察结果亦表明在 33 d 时出现了生精细胞分化的相对停滞. 这一时期同时出现了 p53 基因表达的活跃、自发性凋亡现象的活跃, 以及生精细胞分化的相对停滞. 综上所述, p53 基因活跃表达的前两个波峰在出现时间上与生精细胞凋亡的波峰是基本同步的, 这均从另一个角度验证了 p53 基因的表达与生精细胞的凋亡密切相关. 但自发性凋亡现象在小鼠一出生后就出现^[19], 较 p53 基因的表达早得多, 这提示生精细胞的凋亡是一个复杂的网络过程, 可能涉及了更多凋亡相关基因的综合性调控. 而第三个波峰出现在小鼠生后第 50 d. 有研究表明, 自发性凋亡的活跃时期集中在小鼠个体发育首次精子发生期间^[20], 而昆明种小鼠生精细胞的首次发育成熟时间约为生后 5 周^[18-21]. 这意味着生后 50 d 显然已经不是凋亡的活跃时期, p53 基因在这一时期出现活跃表达的意义何在, 还有待于进一步研究.

5 结论

p53 基因在小鼠生后 17 个时段睾丸组织中的表达规律意味着在小鼠睾丸生后发育成熟过程中, p53 基因发挥着重要的作用, 参与了小鼠睾丸生后发育过程的调控。

p53 基因活跃表达的前两个波峰在出现时间上与生精细胞凋亡的高峰基本同步, 这从另一个角度验证了 p53 基因的表达与生精细胞的凋亡密切相关。

参考文献:

- [1] Hsueh A J, Elsenhauer K, Chun Y. Conadal cell apoptosis [J]. Recent prog. Horm. Res., 1996, 51(1): 433.
- [2] Rooij D G. Stem cells in the testis [J]. Int J Exp Pathol, 1998, 79: 67 - 80.
- [3] Lane D P. p53, guardian of the genome [J]. Nature, 1992, 358(6381): 15 - 16.
- [4] Vousden K H, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53 [J]. Nature Reviews Cancer. 2002, 2(8): 594.
- [5] 刘光伟, 吕文天, 王珍琦, 等. 低剂量电离辐射诱导小鼠睾丸生精细胞凋亡及 P53 基因和蛋白表达 [J]. 中国病理生理杂志 2003, 19(12): 1618 - 1622.
- [6] Ohta H, Aizawa S, Nishimune Y. Functional analysis of the p53 gene in apoptosis induced by heat stress of loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells [J]. Biol Reprod, 2003, 68(6): 2249 - 2254.
- [7] 杜联芳, 张青萍, 刘望彭. 诊断超声辐照后大鼠睾丸生精细胞 p53 mRNA、Bcl-2 mRNA 表达改变 [J]. 中华超声影像学杂志, 2001, 10(3): 182 - 184.
- [8] Fujisawa M, Shirakawa T, Fujioka H et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer to rat testis impairs spermatogenesis [J]. Arch Androl, 2001, 46(3): 223 - 331.
- [9] 魏宏权, 王向远, 任重. p53 蛋白在周期调节蛋白 A1 变异引起的雄性小鼠生殖细胞凋亡中的作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(2): 241 - 243.
- [10] 王伯云, 李玉松, 黄高升, 等. 病理学技术. 北京: 人民卫生出版社, 2000, 130 - 134; 210 - 213.
- [11] Keller G H, Manak M M. DNA 探针技术 [M]. 孙士勇, 等译. 北京: 科学出版社, 1992: 133 - 153.
- [12] Finaly C A, Hinds P W, Levine A J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation [J]. Cell, 1989, 57: 1083 - 1093.
- [13] Peng Li, Deepak Nijhawan, Xiaodong Wang. Mitochondrial activation of apoptosis [J]. Cell, 2004, 116: 57 - 61.
- [14] 黄宇烽. 生精细胞凋亡的基因调控 [J]. 中华男科学杂志, 2005, 11(9): 643 - 646.
- [15] 葛少钦, 康现江, 刘桂荣, 等. 精子发生过程中的相关基因 [J]. 遗传, 2008, 30(1): 3 - 12.
- [16] Kilinc F, Guvel S, Kayaselcuk F et al. p53 expression and apoptosis in varicocele in the rat testis [J]. J Urol, 2004, 172(6 pt 1): 2475 - 2478.
- [17] Matsui Y, Naqano R, Obinata M. Apoptosis of fetal testicular cells is regulated by both p53-dependent and independent mechanisms [J]. Mol Reprod Dev 2000, 55(4): 399.
- [18] 罗兰, 张彦, 杨芳, 等. 小鼠睾丸发育全过程的组织学观察 [J]. 实验动物科学, 2010, 27(3): 10 - 13.
- [19] 张健, 高福祿, 支会英, 等. 小鼠生精细胞增殖与凋亡的年龄变化 [J]. 动物学报, 2001, 47(2): 209 - 214.
- [20] Rodriguez I, Ody C, Araki K et al. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis [J]. EMBO J, 1997, 16: 2262 - 2270.
- [21] 于洁, 万汇涓, 蔡志明, 等. 新生小鼠睾丸组织移植到裸鼠体内不同时期移植物的组织学观察 [J]. 解剖学报, 2007, 38(2): 213 - 217.