

类 c-kit 原癌蛋白在多伊棺头蟋胚后精子发生中的表达和定位

奚耕思¹, 欧阳霞辉^{1,2}, 王雪峰^{1,3}, 何 慧¹

(1. 陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062; 2. 西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030;

3. 上海交通大学生物医学工程系, 上海 200030)

摘要: 为了了解类 c-kit 原癌蛋白在多伊棺头蟋 *Loxoblemmus doenitzi* Stein 胚后精子发生中的表达、定位及可能的调控作用, 采用常规免疫组织化学方法进行了相关研究。结果表明: 处于减数分裂中期 I 至末期 II 的初级精母细胞的细胞膜上有类 c-kit 原癌蛋白阳性颗粒; 精巢或受精囊内成熟精子头部也具有类 c-kit 原癌蛋白阳性颗粒。结果反映了类 c-kit 蛋白对于维持动物精子发生过程中减数分裂、精子成熟及受精能力具有特殊功能。

关键词: 多伊棺头蟋; 类 c-kit 原癌蛋白; 表达; 精子发生

中图分类号: Q965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2007)05-0539-05

Special expression of analogous proto-oncogene c-kit in postnatal spermatogenesis of *Loxoblemmus doenitzi* Stein

XI Geng-Si¹, OUYANG Xia-Hui^{1,2}, WANG Xue-Feng^{1,3}, HE Hui¹ (1. College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationality, Lanzhou 730030, China; 3. Department of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: The analogous proto-oncoproteins c-kit specially expressed in spermatocytes and sperm in postnatal spermatogenesis of *Loxoblemmus doenitzi* Stein were detected by immunohistochemistry. In meiosis, the analogous c-kit positive granules were on the cellular membrane of spermatocyte from metaphase I to telophase II. After meiosis, the analogous c-kit positive granules only existed in the head of the mature sperm in the testis and the spermatheca. The investigation indicated that the analogous proto-oncoprotein kit and its receptor as a signal transduction system may play some important role in keeping the meiosis process, the sperm maturation and the fertilization for *L. doenitzi*. These results are similar to those on mice which were marked by the proto-oncoproteins c-kit, but the difference still existed in some aspects. For example, there are many c-kit positive granules in mice's spermatogonium and spermatoon during spermatogenesis, but there are not the analogous c-kit positive granules in *L. doenitzi*'s spermatogenous and spermatoon. It is so inferred that the functions of the analogous c-kit may be similar to the c-kit in regulating animal reproduction aspects. They may belong to the same gene's product.

Key words: *Loxoblemmus doenitzi*; analogous proto-oncogene c-kit; expression; spermatogenesis

人们把细胞基因组中与癌基因同源的序列称为原癌基因(proto-oncogene), 它们是一组调控细胞生长、分裂增殖、分化及程序性死亡的重要基因(张连峰和雷薇, 1993)。原癌基因 c-kit 的产物是具有受体功能的酪氨酸蛋白激酶, 参与细胞信号转导, 在

小鼠中, c-kit 位于第 5 号染色体的 W 基因座位上, 编码一种跨膜蛋白, 是具有酪氨酸激酶活性的受体, 相对分子量为 145 ~ 160 kD。成熟的 c-kit 蛋白由 953 个氨基酸组成, 整个分子可分为 3 个结构区, 即细胞外配体结合区、细胞内酪氨酸激酶活性区域和

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2005C125)

作者简介: 奚耕思, 女, 1956 年生, 博士, 教授, 研究方向为动物的生殖与发育, E-mail: xigengsi@snnu.edu.cn

收稿日期 Received: 2006-09-26; 接受日期 Accepted: 2007-02-15

连接这 2 个区域的跨膜结构。c-kit 配体称干细胞因子(stem cell factor, SCF), 在小鼠中由第 10 号染色体的 steel 基因位点编码。天然的 SCF 是一种高度糖基化的跨膜蛋白。测序分析显示, SCF 在种间呈高度保守性。有关 SCF/kit 信号通路的研究表明, SCF 特异性地识别 c-kit 的细胞外 Ig 样结构域, 激活 c-kit, 诱导 c-kit 二聚化, 激活细胞内区域的酪氨酸激酶活性和自体磷酸化作用, 引起一系列的磷酸化级联反应, 调节靶基因表达, 最终影响相关的细胞生理过程(Hirota *et al.*, 1998; Longley *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 1999; 孙大业等, 2000)。

目前对哺乳动物的研究认为, SCF/kit 调节原始生殖细胞的迁移、增殖、分化和精子发生中精原细胞的增殖、减数分裂、分化、凋亡, 另外在受精过程中对于卵的激活也有一定的作用(Rossip *et al.*, 2000; Sette *et al.*, 2000; Vigodner *et al.*, 2001; Guerif *et al.*, 2002; Paronetto *et al.*, 2003)。关于原癌基因 c-kit 在昆虫精子发生中的特异性表达, 国内外还没有相关报道。

本实验采用常规免疫组织化学技术首次发现类 c-kit 原癌蛋白在直翅目蟋蟀科多伊棺头蟋 *Loxoblemmus doenitzi* Stein 胚后精子发生中的特异性表达, 目的在于初步了解类 c-kit 原癌蛋白在昆虫胚后精子发生中的定位及其可能的调节作用。

1 材料和方法

1.1 试虫

多伊棺头蟋于 2005 年 7 月到 9 月采自西安杜陵塬玉米地, 每隔 7 天捕捉不同发育阶段的雄性多伊棺头蟋, 带回实验室后立即在生理盐水中解剖。

1.2 试剂

实验中所用的一抗 c-kit (Ab-1) 是兔抗小鼠 c-kit 多克隆抗体, 为美国 Sauta 公司产品, 购于北京中山生物技术公司; SABC 试剂盒购于武汉博士德生物有限公司; DAB 显色试剂盒购于北京中山生物技术公司。

1.3 方法

1.3.1 染色体技术: 在昆虫生理盐水中解剖出多伊棺头蟋精巢, 投入蒸馏水中低渗 5 min, 转至固定液(甲醇: 冰醋酸 = 3: 1) 固定 4~6 h, 待组织块变白, 转入 70% 乙醇, 蒸馏水冲洗, 解剖镜下将外膜和脂肪剥离并剔除干净, 将分离的精细小管投入 60℃ 0.2 mol/L 盐水中离析 30 min, 蒸馏水洗 3 次, 每次

3 min, 室温下用改良苯酚品红染液染色 20 min, 挑取 3~4 条精细小管置于载玻片上的冰醋酸液滴中, 盖上盖玻片, 压片, 冰冻揭片, 二甲苯透明, 光学树胶封片, 日本 Olympus BH-2 显微镜观察, 拍照。

1.3.2 组织切片: 在生理盐水中解剖出多伊棺头蟋精巢, 立即置 Bouin 液中固定, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片, 其厚度为 6 μm , 铬矾明胶贴片, 37℃ 烘箱干燥备用。

1.3.3 免疫染色: 石蜡切片常规脱蜡至水; 将切片放入 EDTA (pH 8.0) 中高温修复 10 min, 室温放置 20 min; 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 3% 过氧化氢甲醇溶液封闭内源性酶, 37℃ 温育 20 min; 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加正常山羊血清, 室温孵育 20 min, 甩去多余液体, 不洗, 滴加一抗 c-kit 抗体(用 3% 小牛血清 PBS 液稀释), 4℃ 孵育过夜; 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加生物素标记的二抗, 37℃ 孵育 20 min; 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, 37℃ 孵育 30 min; 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; DAB 显色 1~5 min, PBS 终止反应, 镜检; Hanse 苏木精复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片; 日本 Olympus BH 显微镜观察, 照相。阴性对照, 以 PBS 取代一抗。

1.4 图象分析

将制好的组织切片在光镜下观察, 根据多伊棺头蟋精子发生的各个时期, 每一发育阶段取 5 张组织切片, 显微镜下用测微尺在面积为 20 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ 的精网格中计数各个发育阶段细胞内阳性颗粒的数目, 每张切片取 3 个单位, 用 SPSS11.0 软件进行统计学分析, 根据平均值 $\pm$ 标准误差 (mean $\pm$ SE) 绘制统计图。

2 结果与分析

2.1 免疫组织化学实验结果

由于本研究采用的是兔抗鼠 c-kit 多克隆抗体, 因此实验结果中出现的阳性颗粒为类 c-kit 蛋白颗粒。

多伊棺头蟋精巢约有 60 条生精小管, 内有处于不同发育阶段的育精囊, 育精囊的精原细胞经有丝分裂分化为初级精母细胞(图 1: 1), 初级精母细胞经 2 次减数分裂分别发育为次级精母细胞和精子细胞(图 1: 2, 3), 精子细胞经形态变化发育为精子(图 1: 4)。类 c-kit 蛋白在精原细胞和处于减数分

裂前期 I 的初级精母细胞中不表达(图 1:1)。

多伊棺头蟋的初级精母细胞进入第一次减数分裂中期 I 后至次级精母细胞第二次减数分裂后期 II 时细胞膜上出现明显的类 c-kit 蛋白阳性颗粒(图 1:

2,3)。多伊棺头蟋的精子细胞中没有类 c-kit 蛋白阳性颗粒表达(图 1:3)；在精巢和受精囊内的成熟精子的头部有类 c-kit 蛋白阳性颗粒表达(图 1:4, 5)；图 1(6)为受精囊内精子的对照。

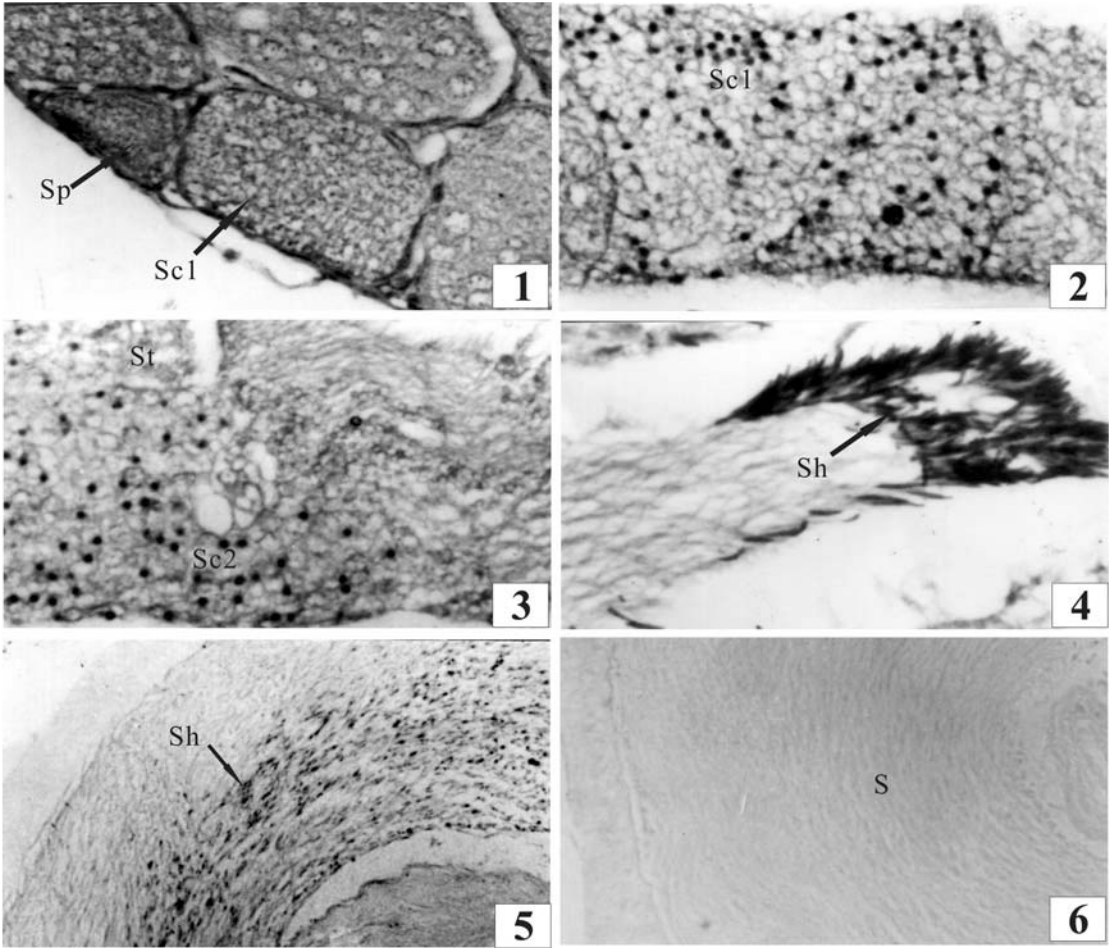


图 1 类 c-kit 蛋白在多伊棺头蟋精子发生中的特异表达

Fig. 1 The special expression of the analogous c-kit in the postnatal spermatogenesis of *Loxoblemmus doenitzii*

1:精原细胞(Sp)和减数分裂前期 I 的初级精母细胞(Sc1)中未见类 c-kit 蛋白阳性表达 Negative expression of the analogous c-kit protein in the spermatogonium and primary spermatocyte of the meiosis prophase I ;2:减数分裂中期 I、后期 I 和末期 I 的初级精母细胞(Sc1)质膜上具有类 c-kit 蛋白阳性颗粒 Positive expression of the analogous c-kit protein on the plasma membrane of secondary spermatocyte in the meiosis metaphase I, anaphase I and telophase I ;3:减数分裂中期 II 和后期 II 的次级精母细胞(Sc2)质膜上具有类 c-kit 蛋白阳性颗粒,精子细胞(St)上为阴性表达 Positive expression of the analogous c-kit protein on the plasma membrane of secondary spermatocyte in the meiosis metaphase II, anaphase II, and negative expression in the spermatid ;4:精巢内成熟精子的头部(Sh)具有类 c-kit 蛋白阳性表达 Positive expression of the analogous c-kit protein on the cephalic region of mature sperm in the testis ;5:受精囊内的精子头部(Sh)具有类 c-kit 蛋白阳性表达 Positive expression of the analogous c-kit protein on the cephalic region of sperm in the spermatheca ;6:类 c-kit 蛋白表达的阴性对照 Negative control of the analogous c-kit expression ;标尺 Scale bar = 50 μm .

2.2 图象分析及统计结果

将多伊棺头蟋精子发生不同阶段类 c-kit 蛋白特异表达的结果经图象分析后进行统计学处理(表 1)。精子发生不同阶段,细胞单位面积内阳性颗粒的数目以平均值 $\pm$ 标准误差表示,可见不同发育阶段类 c-kit 蛋白的表达程度不同,存在差异性。

3 讨论

多伊棺头蟋由精母细胞发育为精子细胞的过程需要经过减数分裂,而减数分裂涉及到大量基因表达、蛋白修饰、生物大分子的构建-解构-重构。有研

究发现,SCF/kit 对小鼠精子发生中的减数分裂起着关键作用,c-kit 突变能引起雄性小鼠不育,主要是由于细胞不能进入减数分裂的缘故(Yoshinaga *et al.*, 1991; Vigodner *et al.*, 2001)。多伊棺头蟋第一次减数分裂中期 I 至第二次减数分裂末期 II、次级精母

细胞和精子形成的关键环节都有类 c-kit 蛋白的持续性表达,而且表达量有递增的趋势,表明了该蛋白及其相应的信号系统对于起始、维持和终止多伊棺头蟋精子发生中的减数分裂也起着十分重要的作用。

表 1 类 c-kit 蛋白在多伊棺头蟋精子发生不同阶段中的特异表达

精子发生时期 Stage of spermatogenesis	单位面积阳性颗粒数(mean ± SE) Number of positive granules in a unit area	n
精原细胞期 Stage of spermatogonium	0.0 ± 0.000	15
初级精母细胞期 Stage of primary spermatocyte		
减数分裂前期 I Meiosis prophase I	0.0 ± 0.000	15
减数分裂中期 I – 末期 I Metaphase I – telophase I	37.8 ± 1.304	15
次级精母细胞期 Stage of secondary spermatocyte		
减数分裂中期 II – 末期 II Metaphase II – telophase II	41.2 ± 0.837	15
精子细胞期 Stage of spermatid	0.0 ± 0.000	15
成熟精子期 Stage of sperm	67.4 ± 0.673	15

类 c-kit 蛋白在成熟精子头部有强阳性颗粒表达,从标记范围看包括残留的胞质、核和顶体。在小鼠中 c-kit 蛋白在减数分裂期后停止表达,一种截断型 c-kit 转录本 tr-kit 开始表达,并且在成熟的精子上有所积累,显微注射 tr-kit 到小鼠卵子内,将引起卵子的孤雌生殖活动,由此表明 tr-kit 可能在受精中起重要作用(Rossip *et al.*, 2000; Sette *et al.*, 2000; Paronetto *et al.*, 2003),而多伊棺头蟋成熟精子头部的阳性反应可能反映了类 c-kit 蛋白的表达与精子的成熟及受精过程密切相关。

减数分裂是动物配子发生过程中非常关键的环节,大多数低等动物或高等动物的有性生殖都必须经历这一过程,而精子的成熟和受精能力对于参与精子竞争、与卵子有效结合产生受精卵非常重要。类 c-kit 蛋白在多伊棺头蟋精子发生过程中减数分裂期及成熟精子头部的特异性表达,由此反映了类 c-kit 蛋白与 c-kit 蛋白具有相似性,即对于维持动物精子发生过程中减数分裂、精子成熟及受精能力方面可能具有特殊功能。

与小鼠有所不同的是多伊棺头蟋在精子发生过程中的精原细胞、精子细胞上没有类 c-kit 蛋白表达,而前者在这两类细胞上具有 c-kit 蛋白表达,并且与大鼠和人类的相似(Orth *et al.*, 1996; Sanollow *et al.*, 1997)。

上述研究反映了类 c-kit 蛋白及 c-kit 蛋白在精子发生过程中的表达存在相似性,两者分别在低等类群和高等类群的精子发生过程中表达,由此推测类 c-kit 蛋白及 c-kit 蛋白在生物演化方面存在着必

然联系,并且可能行使相似的功能,两者是否属于同一基因的不同产物,还有待深入的研究。

参 考 文 献 (References)

Guerif F, Cadoret V, Rahal-Perola V, Lansac J, Bemex F, 2002. Apoptosis, onset and maintenance of spermatogenesis : evidence for the involvement of kit in kit-haplodeficient mice. *Biol. Reprod.*, 67(1) : 70 – 79.

Hirota S, Iozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Shingo I, Kawano K, 1998. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 279 : 577 – 580.

Longley BJ, Metcalfe DD, Tharp M, Wang X, Tyrrell L, Lu SZ, 1999. Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 : 1 609 – 1 614.

Orth JM, Jester WF, Qiu J, 1996. Gonocytes in testis of neonatal rats express the c-kit gene. *Mol. Reprod. Dev.*, 45(2) : 123 – 131.

Paronetto MP, Venables JP, Elliott DJ, Geremia R, Rossi P, Sette C, 2003. Tr-kit promotes the formation of a multimolecular complex composed by Fyn, PLC gamma 1 and Sam68. *Oncogene*, 22(54) : 8 707 – 8 715.

Rossip P, Sette C, Dolci S, Geremia R, 2000. Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J. Endocrinol. Invest.*, 23(9) : 609 – 615.

Sandlow JI, Feng HL, Sandra A, 1997. Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and sperm. *Urology*, 49(3) : 494 – 500.

Sette C, Dolci S, Geremia R, Rossip P, 2000. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int. J. Dev. Biol.*, 44(6) : 559 – 608.

Sun DY, Guo YL, Ma LG, 2000. Cellular Signal Transduction (Second Edition). Beijing : Science Press. [孙大业, 郭艳林, 马力耕, 2000. 细胞信号转导(第 2 版). 北京 : 科学出版社]

Tian Q, Frierson HF, Krystal GW, Moskaluk CA, 1999. Activating c-kit

gene mutations in human germ cell tumors. *Am. J. Pathol.*, 154 : 1 643 – 1 647.

Vigodner M, Lewin LM, Shohat L, Gilan R, 2001. Spermatogenesis in the golden hamster : the role of c-kit. *J. Mol. Reprod. Dev.*, 60(4) : 562 – 568.

Yoshinaga K, Nishikawa K, Ogawa M, Hayashi SI, Kunisada T, Fujimoto T, 1991. Role of c-kit in mouse spermatogenesis : identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development*, 113 : 689 – 699.

Zhang LF, Lei W, 1993. Oncogenes and development. In : Chen JL, Ma HF eds. *Advances on Developmental Biology*. Beijing : Higher Education Press. 151 – 169. [张连峰, 雷薇, 1993. 基因与发育. 见：陈吉龙, 马海飞主编. 发育生物学进展. 北京：高等教育出版社. 151 – 169]

(责任编辑：黄玲巧)