

大鼠睾丸前促甲状腺激素释放激素原及其受体的表达与发育变化*

李臻^① 刘新平^② 张远强^① 许若军^③

(^① 第四军医大学组织学与胚胎学教研室, 西安 710032)

(^② 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

(^③ 香港大学动物学系, 香港)

摘要 为研究促甲状腺激素释放激素 (thyrotrophin-releasing hormone, TRH) 及其受体 (TRH receptor, TRH-R) 在大鼠睾丸组织中的表达规律和在生殖发育调节中的作用, 依据大鼠下丘脑中的前 TRH 原 (preproTRH, ppTRH) 和垂体中的 TRH-R cDNA 设计引物, 采用 RT-PCR 法从大鼠睾丸组织中获得了 ppTRH 和 TRH-R 的 cDNA 克隆, 测序后构建表达载体, 在大肠杆菌中表达了可溶性的 ppTRH 和 TRH-R 融合蛋白。利用实时动态定量 RT-PCR (real time quantitative RT-PCR) 法观察了 ppTRH 和 TRH-R 在不同发育阶段大鼠睾丸中的表达变化, 发现在睾丸间质细胞发育的初期阶段 (第 8 天), 没有 ppTRH 和 TRH-R 的表达, 但从第 15 天起能观察到 ppTRH 和 TRH-R 的表达, 并且表达量在 20 天、35 天、60 天和 90 天逐渐增加。这些结果表明: 大鼠睾丸组织能特异性表达 ppTRH 和 TRH-R, 并且表达量与发育过程相关。ppTRH 和 TRH-R 体外表达产物的获得为后续研究其功能奠定了基础。

关键词 大鼠 睾丸 前促甲状腺激素释放激素原 (ppTRH) 促甲状腺激素释放激素受体 (TRH-R) 实时动态定量 RT-PCR

TRH 最初是从羊和猪的下丘脑中提取并分离纯化的 3 肽 (Burgus *et al.*, 1970; Shally *et al.*, 1969)。TRH 与垂体前叶促甲状腺激素细胞表面特异性受体结合, 刺激促甲状腺激素 (TSH) 的合成和分泌。应用放射免疫分析, 发现具有免疫活性的 TRH 不仅存在于下丘脑以外的中枢神经系统中, 而且广泛分布于外周组织, 包括胃肠道、胰腺、肾上腺、胎盘和男性生殖系统 (Fuse *et al.*, 1990)。而且也发现下丘脑的促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) (Yoon *et al.*, 1988)、促性腺激素释放激素 (GnRH) (Bhasin *et al.*, 1983)、生长激素释放激素 (GHRH) (Berry *et al.*, 1990)、前阿片促黑激素皮质素 (POMC) (Pinter *et al.*, 1984) 等神经肽也存在于睾丸组织中, 并对精子的分化发育起到重要调控作用。以后证实在中枢神经系统, TRH 作为神经递质或神经调质与神经细胞表面受体结合, 这种受体的 cDNA 序列与垂体前叶 TRH-R 的 cDNA 类似 (Sato *et al.*, 1993)。免疫组织化学证明 TRH 定位于大鼠睾丸间质细胞 (Feng *et al.*, 1993), 近期我

们应用原位杂交观察到小鼠睾丸间质细胞可特异性表达 TRH-R mRNA (Zhang *et al.*, 1995; 张远强等, 1996), 说明睾丸间质细胞可合成 TRH 和 TRH-R。鉴于免疫组织化学和原位杂交技术的局限性, 我们应用 RT-PCR 技术从大鼠睾丸组织中成功地获得了 ppTRH 和 TRH-R 的 cDNA 克隆, 得到了 ppTRH 和 TRH-R 的体外表达产物, 使前期发现在分子生物学水平得到进一步证实。为了系统地研究 TRH 和 TRH-R 在哺乳动物睾丸中的存在意义, 本文利用实时动态定量 RT-PCR 法观察了 ppTRH 和 TRH-R 在不同发育阶段大鼠睾丸中的表达变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 天、15 天、20 天、35 天、60 天和 90 天雄性 SD (sprague dawley) 大鼠, 由本校动物实验中心提供。所有动物均饲以标准食料, 自由摄水, 分笼饲养。

表 1 引物序列及 RT-PCR 产物大小

2000-02-02 收稿, 2000-04-13 修回

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39870109) 和全军医药卫生科研基金 (No. 98M106) 资助课题

第一作者简介 李臻, 女, 26 岁, 博士研究生。研究方向: 生殖生物学。E-mail: zhen.li@263.net

Table 1 Primer sequence and sizes of RT-PCR products

引物 Primer	序列 Sequence	位置 Position
	P1 : 5'CGGAATTCACCTCTTCAGCTCAGCATCTTG 3'	Bp 44 ~ 65
ppTRH	P2 : 5'CGGGATCCTTACTCCTCCAGAGGTTCCCTTGT 3'	Bp 848 ~ 870 (827bp)
TRH-R	P3 : 5'ACCACCTCTAGATCTTTCAACAGC 3'	Bp 834 ~ 857
外 (Outer)	P4 : 5'AGGTATTCTAGAGGAAGTTCATAT 3'	Bp 1323 ~ 1346 (513bp)
内 (Inner)	P5 : 5'CGGAATTCAGGAAGCAGGTCACCAAG 3'	Bp 870 ~ 887
	P6 : 5'CGGGATCCCTCAGAGGCCAAGCAGGT 3'	Bp 1248 ~ 1265 (396bp)

1.2 大鼠睾丸组织总 RNA 的制备

取成年 (90 天) 大鼠, 断头法处死后迅速取出睾丸组织, 去被膜, 称重, 剪碎, 异硫氰酸胍一步法提取睾丸组织总 RNA (TriPure Isolation Reagent, Promega 公司产品)。用紫外分光光度计测定 RNA 的纯度及含量。

1.3 PCR 引物的设计

ppTRH 和 TRH-R 的引物序列根据已发表的大鼠下丘脑 ppTRH、GH₃ 垂体肿瘤细胞 TRH-R cDNA 的序列 (Mandel *et al.*, 1987; Zhao *et al.*, 1992) 设计而成, 引物序列如附表所示。P1 和 P5 的 5' 端均加有 *EcoR* I 酶切位点, P2 和 P6 的 5' 端均加有 *BamH* I 酶切位点。

1.4 RT-PCR

取 10 μg 成年大鼠睾丸组织总 RNA, 4 μl 25 mmol/L MgCl₂, 2 μl 10 × 逆转录缓冲液, 2 μl 10 mmol/L dNTP, 0.5 μl RNA 酶抑制剂, 15 U AMV 逆转录酶, 0.5 μg oligo (dT)₁₅ 引物, 加 DEPC 处理的 H₂O 至总反应体积 20 μl, 42℃ 温浴 60 min, 合成 cDNA 第 1 链。99℃ 5 min 终止反应, 0 ~ 5℃ 5 min 复性。用上述 3 对引物分别对 ppTRH 和 TRH-R 进行 PCR。ppTRH: P1 和 P2, 94℃ 30 s, 53℃ 90 s, 72℃ 90 s 30 个循环。TRH-R: 用 2 对寡核苷酸引物进行“巢式”PCR。先用外引物 P3 和 P4 对反转录后的 cDNA 进行扩增, 94℃ 1 min, 52℃ 2 min, 72℃ 2 min 30 个循环。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳获得 500 bp 的片段, 胶中片段回收后再用内引物 P5 和 P6 扩增, 94℃ 30 s, 48℃ 1 min, 72℃ 1 min 30 个循环。用不含 cDNA 模板的 PCR 反应体系作为阴性对照, 以排除反应操作中 DNA 污染。取 PCR 产物各 10 μl, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色。从而获得大鼠 ppTRH 和 TRH-R 的特异性 cDNA 片段。为进一步确定 ppTRH 和 TRH-R mRNA 扩增的特异性, 将 PCR 产物克隆入 PUC19 载体, 酶切

鉴定后, 用 310 型全自动 DNA 测序仪 (PE 公司产品) 进行正、反双向序列测定。

1.5 表达载体的构建

用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切 PUC-ppTRH 和 PUC-TRH-R 质粒, 回收并纯化含 ppTRH 和 TRH-R 的基因片段。将 ppTRH 片段定向插入 PGEX-4T-2 载体 GST 基因下游的多克隆位点 *EcoR* I 和 *Sal* I 处, 得到重组质粒 PGEX-ppTRH。同法将 TRH-R 片段定向插入 PGEX-4T-1 载体 GST 基因下游的多克隆位点 *EcoR* I 和 *Sal* I 处, 得到重组质粒 PGEX-TRH-R。用重组质粒转化 *E. coli* DH5α 钙化菌, 筛选阳性克隆, 扩增、提取质粒 DNA。用酶切法鉴定重组质粒。

1.6 可溶性 ppTRH 和 TRH-R 的体外表达

接种单菌落于 2 ml 含氨苄青霉素的 LB 培养基, 37℃ 培养过夜。按 1:100 转接于含 1.0% 葡萄糖和氨苄青霉素的 LB 培养基, 37℃ 250 r/min 培养约 3 hr, 至菌液 OD = 0.2 ~ 0.3。取出菌液待降至室温后, 加入 IPTG 至终浓度 0.4 mmol, 26℃ 继续培养 1 hr, 离心收菌。用 STE 液悬浮菌体, 加入溶菌酶至终浓度为 0.1 mg/ml, 加入 PMSF 至终浓度为 1 mmol/L, 冰浴 15 min。加入 DTT 至终浓度为 5 mmol/L, 加入 10% 的 Sankosyl 至终浓度为 1.5%, 待菌液变为粘稠后超声破菌, 4℃ 15 000 r/min 离心 20 min 分离上清和沉淀, 采用 SDS-PAGE 进行可溶性表达产物的鉴定。

1.7 实时动态定量 RT-PCR

实时动态定量 RT-PCR 采用 5700 型定量 PCR 仪 (PE 公司产品) 对各种 mRNA 起始拷贝进行分析。其原理和方法以前有过描述 (Ursula *et al.*, 1996), 现作简要介绍。在实时动态定量 PCR 中, 靶基因扩增信息在 PCR 扩增过程中被实时动态检测, 全过程掌握 PCR 对数扩增期、线性扩增期与平台期扩增之信息。SYBR Green I 染料能与双链

DNA 特异结合, 而不影响 PCR 的扩增效果。利用这一特性, 可以非常简便地在 5700 上动态监测 PCR 双链 DNA 产物的增加, 随着 PCR 过程中双链 PCR 产物的指数式增加, 这种染料的荧光强度 (RQ) 也成比例地增强。实时动态定量 PCR 采用参数 C_t (threshold cycle) 反映靶基因的起始量。 C_t 即当定量 PCR 系统监测到的荧光信号开始呈线性增长时 PCR 反应达到的循环数。 C_t 和靶基因的起始量之间呈线性关系, 靶基因的起始量越高, 荧光信号开始呈线性增长所需的循环数越少, 即 C_t 值越小。因此, 在通过对已知样品的 PCR 反应建立标准曲线后, 就能根据待测样品的 C_t 值反映靶基因的相对或绝对拷贝数。

本实验以 5 个 10 倍梯度稀释的重组质粒 PGEX-ppTRH 和 PGEX-TRH-R 分别作为 ppTRH 和 TRH-R 标准反应的样品。分别取 8 天、15 天、20 天、35 天、60 天和 90 天大鼠, 每组 3 只。按前述方法提取睾丸组织总 RNA 并反转录为 cDNA, 各取 2 μ l cDNA 产物作为待测样品。所有的标准样品和待测样品均一式两份, 以 P1 和 P2、P3 和 P4 为引物, 分别对 ppTRH 和 TRH-R 进行扩增, 扩增反应用 SYBR Green 定量 PCR 试剂盒和 5700 型定量 PCR 仪完成。将不含 cDNA 模板的 PCR 反应体系设为阴性对照。为了检测各 RNA 样品完整性和反转录效率之间的差别, 将待测样品中的看家基因 β -肌动蛋白设为内参照。

1.8 数据分析

每组数据用平均值 \pm 标准误 ($X \pm SE$) 表示, 用 ANOVA 检验各期间的差异 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 大鼠睾丸组织 ppTRH 和 TRH-R cDNA 的获得

对所设计的特定引物进行 RT-PCR 扩增后, 产物均显示为一条特异性的扩增带 (图 1), 分别获得编码大鼠睾丸组织 ppTRH 827 bp 片段和编码大鼠睾丸组织 TRH-R 396 bp 片段, 与设计方案一致。测序结果表明, 从大鼠睾丸组织中获得的 ppTRH 和 TRH-R cDNA 序列分别与大鼠下丘脑中的 ppTRH cDNA 序列和 CH₃ 垂体肿瘤细胞中的 TRH-R cDNA 序列完全一致。

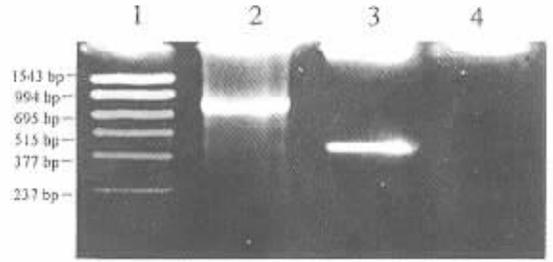


图 1 电泳鉴定 PCR 产物

Fig. 1 The electrophoretic analysis for PCR products

1. PCR Maker 2. ppTRH PCR 产物: 827bp (ppTRH PCR product: 827bp) 3. TRH-R PCR 产物: 396bp (TRH-R PCR product: 396bp) 4. 不含模板的 PCR 反应混合物 (PCR mixture without template cDNA)

2.2 重组表达载体的构建及鉴定

PGEX-ppTRH 表达载体的构建流程见图 2, 同法构建表达载体 PGEX-TRH-R。用限制性内切酶消化重组质粒, 表明 ppTRH 和 TRH-R 基因的单一拷贝, 已正确插入载体中的多克隆位点 (图 3)。

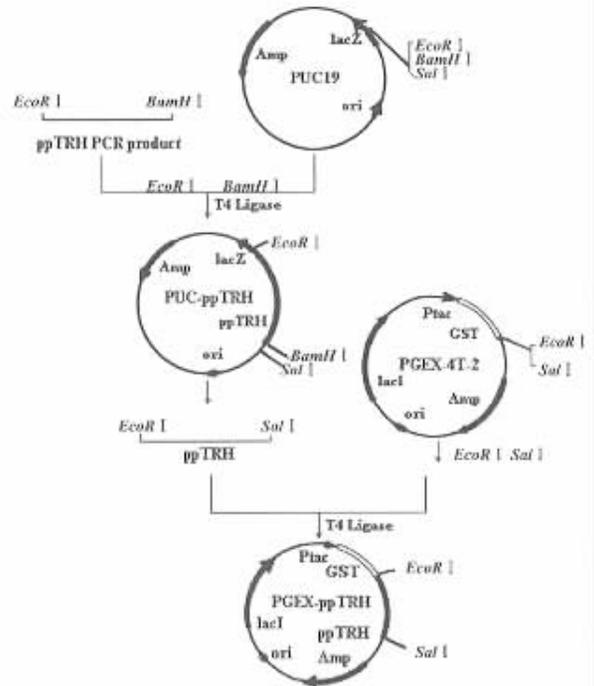


图 2 重组表达载体 PGEX-ppTRH 的构建流程

Fig. 2 Construction scheme of the expression vector PGEX-ppTRH

2.3 可溶性 ppTRH 和 TRH-R 蛋白的鉴定

对 IPTG 诱导和未诱导的菌体进行裂解, 经 SDS-PAGE 后, PGEX-ppTRH 的上清在 M_r 为 60 000 处多出一条明显的新生蛋白带, 与预计的 ppTRH-

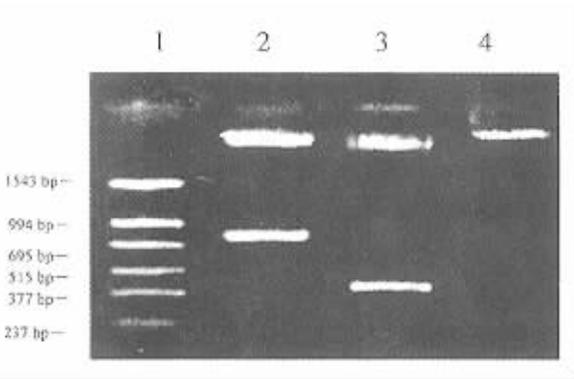


图 3 酶切图谱鉴定重组体

Fig.3 The electrophoretic analysis for reconstruction

1. PCR Maker
2. PGEX-ppTRH/*EcoR* I , *Sal* I 双酶切, 产生 4.97 kb 和 827 bp 片段 (PGEX-ppTRH/*EcoR* I , *Sal* I 4.97 kb and 827 bp fragments)
3. PGEX-TRH-R/*EcoR* I , *Sal* I 双酶切, 产生 4.97 kb 和 396 bp 片段 (PGEX-TRH-R/*EcoR* I , *Sal* I 4.97 kb and 396 bp fragments)
4. 未经酶切的重组质粒 (Recombinant plasmid without enzyme digestion)

GST 融合蛋白的大小 M_r 为 60 000 相符; PGEX-TRH-R 的上清在 M_r 为 40 000 处多出一条明显的新生蛋白带, 与预计的 TRH-R-GST 融合蛋白的大小 M_r 为 40 000 相符 (图 4)。

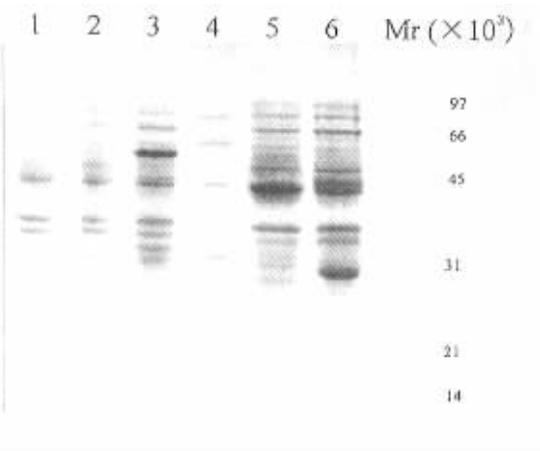


图 4 ppTRH 和 TRH-R 可溶性表达产物的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE of soluble expression products of ppTRH and TRH-R gene

1. 未经诱导的 PGEX-ppTRH (Uninduced PGEX-ppTRH)
2. 未经诱导的 PGEX-TRH-R (Uninduced PGEX-TRH-R)
3. IPTG 诱导的 ppTRH-GST (IPTG induced ppTRH-GST)
4. 蛋白 Make(Protein Maker)
5. IPTG 诱导的 TRH-R-GST (IPTG induced TRH-R-GST)
6. IPTG 诱导的 GST (IPTG induced GST)

2.4 大鼠睾丸发育过程中 ppTRH 和 TRH-R mRNA 表达变化

用 5 个 10 倍梯度稀释的重组质粒 PGEX-ppTRH

样品建立 ppTRH 扩增的标准反应, 实时动态 PCR 过程中扩增产物荧光信号强度的变化与循环数之间的关系见图 5: A, 将各反应的 C_t 值与相对拷贝数的对数作线性回归分析, 得到线性回归方程为 $Y = 30.815 - 2.277X$ ($r = -0.99853, P < 0.001$) (图 5: B)。在各年龄组中, 内参照 β -肌动蛋白的表达基本一致 (图 6)。由 5700 型 PCR 仪检测到各发育时期 ppTRH 的 C_t 值, 再结合标准曲线, 推算出各期的相对表达量如图 7 所示。同法, TRH-R mRNA 在各时期的相对表达量见图 8。可以看出, 在最早期 (8 天), 没有 ppTRH 和 TRH-R 的表达信号, 而从 15 天起可观察到 ppTRH 和 TRH-R 的表达, 且表达量随 20 天、35 天、60 天和 90 天逐渐升高。方差分析结果显示, 从 35 天开始, ppTRH 和 TRH-R 的表达量有显著性提高 ($P < 0.01$), 而 35 天以后的各期表达量无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

哺乳类动物生殖细胞的发育及其调控一直是发育生殖学的前沿课题, 近年的研究表明, 雄性生殖细胞发育除受到下丘脑-垂体-性腺轴的神经内分泌调控外, 还受到睾丸局部组织细胞之间的相互调节 (Skinner, 1991)。近年来, 人们发现睾丸含有多种神经肽, 包括促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH)、促性腺激素释放激素 (GnRH)、生长激素释放激素 (GHRH)、前阿片促黑激素皮质素 (POMC)、生长抑素 (SS)、促胃泌素释放肽、心房利钠尿多肽和胆囊收缩素等, 但这些神经肽在睾丸中的生理作用至今仍不清楚。

本实验应用 RT-PCR 技术从大鼠睾丸组织中分别获得了 ppTRH 和 TRH-R 的 cDNA 片段, 并经克隆和序列分析证明与下丘脑中的 ppTRH 和垂体中的 TRH-R 具有相同的序列, 进一步在分子生物学水平上验证了免疫组织化学及原位杂交的发现, 并为 ppTRH 和 TRH-R mRNA 在大鼠睾丸组织中的表达提供了新证据, 说明睾丸组织中的 TRH 来源于与下丘脑中的 ppTRH 类似的前导物。这一结果结合我们前期的研究工作充分证实大鼠睾丸组织具有合成 TRH 和 TRH-R 的功能, 其合成细胞为间质细胞, 但仍不排除支持细胞和各级生精细胞表达 TRH 和 TRH-R 的可能性。后续的研究工作将通过纯化的间质细胞、支持细胞和各级生精细胞的 RT-PCR 的检测进一步证实。本实验的

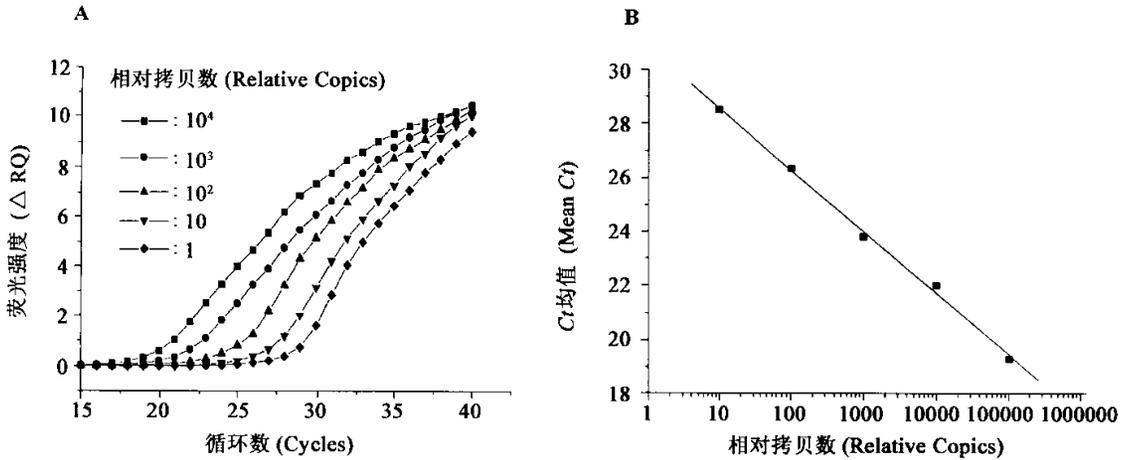


图5 ppTRH 实时动态 RT-PCR 的标准曲线

Fig.5 ppTRH standard curve by real time RT-PCR

- A. 5 个梯度稀释样品 (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 和 1) 的标准扩增曲线 [Amplification plots for reactions with the five serially diluted samples (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 and 1) of the ppTRH standard curve]
- B. C_t 与靶基因相对拷贝数对数的线性关系 (A linear relationship between the C_t and the log target relative copies)

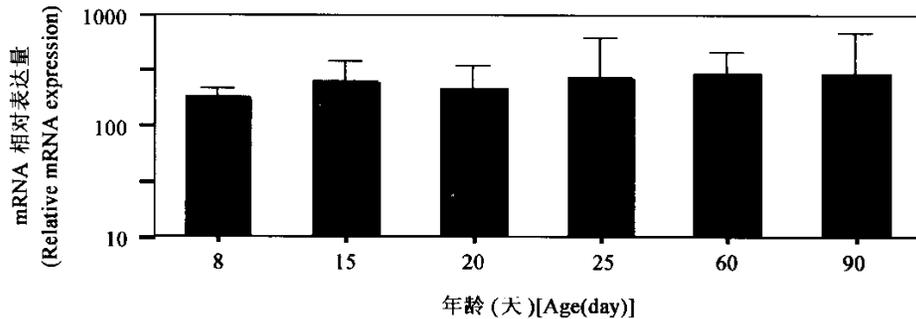


图6 β-肌动蛋白表达在各标本基本一致, 以为参照

Fig.6 β-actin mRNA expression was used to ensure equal taking of RNA sample

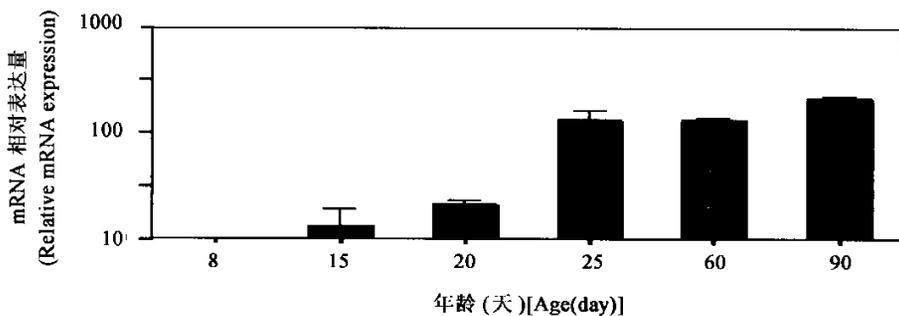


图7 不同发育时期 ppTRH mRNA 的表达

Fig.7 ppTRH mRNA expression in different developmental stages

发现说明睾丸生殖细胞的发育存在相当复杂的局部调节机制。这种局部调节, 可能通过细胞间的直接作用, 或通过自分泌或旁分泌激素和细胞因子的方

式来实现。目前有多种方法来测定基因表达的变化, 这些包括 Northern 印迹、RNA 酶保护分析、原位杂交和 RT-PCR。由于 RT-PCR 具有高度敏感性,

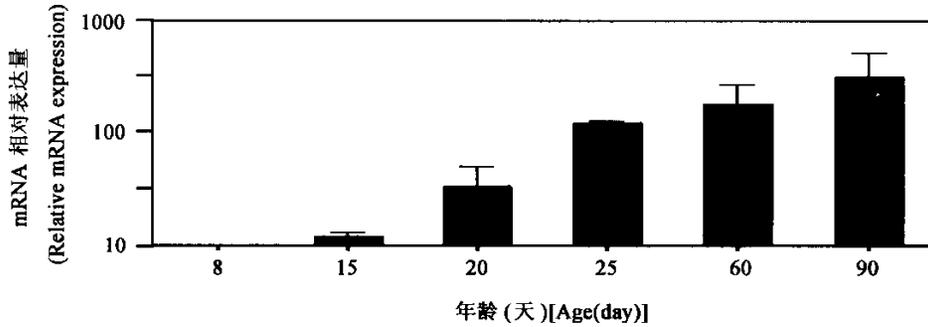


图 8 不同发育时期 TRH-R mRNA 的表达

Fig.8 TRH-R mRNA expression in different developmental stages

在目标信号低时, RT-PCR 逐渐代替其它方法检测 mRNA 的表达。同时, 由于本实验应用的实时动态 RT-PCR 全程监测扩增信息, 结果准确, 重现性极好, 设立了标准反应体系和内参照, 是一种完全满足 mRNA 起始拷贝定量之需求的新方法, 为研究 ppTRH 和 TRH-R mRNA 在大鼠睾丸发育过程中的表达规律提供了有力证据。大鼠睾丸间质细胞的发育在出生后可分为 3 个时期: 在出生后 21 天之前为先祖样间充质细胞 (mesenchymal-like progenitors, PLC), 从 21 天至 35 天为未成熟间质细胞 (immature leydig cells, ILC), 从 36 天至 90 天为成熟间质细胞 (adult leydig cells, ALC) (Ge *et al.*, 1997)。本实验分别选取 PLC 早期 (8 天)、PLC 中期 (15 天)、PLC 晚期 (20 天)、ILC (35 天)、ALC 中期 (60 天) 和 ALC 晚期 (90 天) 的

大鼠, 观察 ppTRH 和 TRH-R 的表达变化。结果表明, 从 15 天起可观察到 ppTRH 和 TRH-R 的 mRNA 信号, 随着睾丸的发育信号强度逐渐增加, 且从 35 天起有显著性提高 ($P < 0.01$)。这些变化证明, 在生殖腺成熟过程中, ppTRH 和 TRH-R 基因的转录水平有所提高。

大鼠睾丸间质细胞表达 TRH 和 TRH-R 的意义现仍不清楚, 猜测睾丸中的 TRH 可能通过自分泌或旁分泌途径与胞膜表面特异性受体蛋白发挥作用, 其作用可能涉及到睾酮的产生和分泌调节。由于本实验获得了 ppTRH 和 TRH-R 的可溶性体外表达产物, 因此为今后观察 TRH 和 TRH-R 在体外培养的睾丸间质细胞中的表达意义, 以及研究 TRH 与睾酮分泌的相互关系, 奠定了基础。

参 考 文 献 (References)

- Berry, S. A. and O. H. Pescovitz 1990 Ontogeny and pituitary regulation of testicular growth hormone releasing hormone-like messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* **127**: 1404 ~ 1411.
- Bhasin, S., D. Heber, M. Peterson and R. Swerdloff 1983 Partial isolation and characterization of testicular GnRH-like factors. *Endocrinology* **112**: 1144 ~ 1146.
- Burgus, R., T. F. Dunn, D. Desiderio, D. N. Ward, W. Vale and R. Guillemin 1970 Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature* **226**: 321 ~ 325.
- Feng, P., J. Gu, U. J. Kim and J. F. Wilber 1993 Identification, localization, and developmental studies of rat preprothyrotropin-releasing hormone mRNA in the testis. *Neuropeptides* **24**: 63 ~ 69.
- Fuse, Y., D. H. Polk, R. W. Lam and J. M. Hershman 1990 Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and precursor peptide (TRH-Gly) in adult rat tissues. *Endocrinology* **127**(5): 2501 ~ 2505.
- Mandel, G. and R. H. Goodman 1987 Using the brain to screen cloned genes. *Trends Neurosci.* **10**(1): 101 ~ 104.
- Pinter, J. E., B. S. Schanchter, A. B. Herman, S. Durgerian and D. T. Kreiger 1984 Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in adult rat testis. *Science* **225**: 632 ~ 634.
- Ge, R. S., L. X. Shan and P. H. Matthew 1996 Pubertal development of leydig cells. In: Payne, A. H., P. H. Matthew and L. D. Russell ed. *The Leydig Cell*. Vienna: Cache River Press, 159 ~ 174.
- Satoh, T., P. Feng, U. J. Kim and J. F. Wilber 1993 Identification of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in the rat central nervous system and eye. *Mol. Brain Res.* **19**: 175 ~ 178.
- Shally, A. V., T. W. Redding, C. Y. Bowers and J. F. Barrett 1969 Isolation of properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.*

244 : 4 077 ~ 4 088.

- Skinner, M. K. 1991 Cell-cell interactions in the testis. *Endocr. Rev.* **12** : 45 ~ 77
- Ursula, E. , M. Gibson, A. Hied Christian and P. M. Williams 1996 A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6** : 995 ~ 1 001.
- Yoon, D. J. , C. Sklar and R. David 1988 Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in rat testis. *Endocrinology* **122** : 759 ~ 761.
- Zhao, D. , J. Yang and K. E. Jones 1992 Molecular cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the thyrotropin-releasing hormone receptor and regulation of its messenger ribonucleic acid in rat GH cells. *Endocrinology* **130**(7) 3 529 ~ 3 536.
- Zhang, S. H. , Y. Q. Zhang and L. Vacca-Galloway 1995 Identification of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA in the leydig cells of mouse testis by in situ hybridization. *Neuropeptides* **29**(1) 309 ~ 313.
- Zhang, Y. Q. , S. H. Zhang, and X. P. Liu 1996 Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor gene in mouse testis. *Sci. Bulletin* **41**(6) 540 ~ 543. [张远强, 张舒华, 刘新平 1996 促甲状腺激素释放激素受体基因在小鼠睾丸中的表达. 科学通报 **41**(6) 540 ~ 543.]

外 文 摘 要(Abstract)

EXPRESSION AND DEVELOPMENT OF RAT PREPROTHYROTROPIN-RELEASING HORMONE AND ITS RECEPTORS IN THE TESTIS OF RAT *

LI Zhen^① LIU Xin-Ping^② ZHANG Yuan-Qiang^① XU Ruo-Jun^③

(① Department of Histology and Embryology, The Fourth Military Medical University, Xi 'an 710032, China)

(② Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University, Xi 'an 710032, China)

(③ Department of Zoology, University of Hong Kong, Hong Kong)

Recently, testis has been known as a source of numerous hypothalamic neuropeptides, including thyrotropin-releasing hormone (TRH). We have found that TRH receptor (TRH-R) mRNA was identified in leydig cells of mouse testis using *in situ* hybridization. In order to investigate the expression regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and TRH receptor (TRH-R) in rat testis, and to study their function in reproduction and development, we designed oligonucleotide primers from the sequences of rat hypothalamus prepro (pp)TRH and pituitary TRH-R cDNA for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Specific fragments of ppTRH and TRH-R cDNA were cloned and sequenced. Expression plasmids containing ppTRH and TRH-R genes were then constructed and expression carried out in *E. coli* DH5 α cells. Based on the developmental pattern of sexual maturation of the rat, ppTRH and TRH-R mRNA in the testis was quantitated in RNA samples prepared from rats of 8, 15, 20, 35, 60 and 90 days of age by real time quantitative RT-PCR. SDS-PAGE showed that the supernatant of PGEX-ppTRH demonstrated a new obvious protein band of 60 kD and that of PGEX-TRH-R demonstrated 40 kD, which were of the same as the expected size of fusional proteins respectively. The quantitative analyses demonstrated that no ppTRH and TRH mRNA could be detected at the earliest stage (day 8). PpTRH and TRH mRNA signals were detected on day 15 and increased progressively on day 20, 35, 60 and 90. These Results suggest that rat testis specifically express TRH and TRH-R, and the transcription of ppTRH and TRH-R gene in the rat testis is development-dependent. The acquirement of expressed products for ppTRH and TRH-R can be used for further research on physiological significance of TRH and TRH-R expression in rat testis.

Key words Rat, Testis, Preprothyrotrophin-releasing hormone, Thyrotrophin-releasing hormone, RT-PCR