

# 小鼠睾丸发育过程中 Si1 基因表达的研究\*

罗 兰<sup>1,2</sup>, 李水冰<sup>1</sup>, 余 敏<sup>1</sup>, 谭德勇<sup>1</sup>

(1. 云南大学 生命科学学院 生物化学与分子生物学实验室, 云南 昆明 650091;

2. 昆明医学院 基础医学院细胞生物学暨医学遗传学教研室, 云南 昆明 650031)

**摘要:** 以 1 天龄、未成熟(3 周龄)、成熟期(10 周龄以上)的昆明正常小鼠睾丸组织为实验材料, 利用地高辛标记的 Si1 基因探针在其组织切片上进行 DNA-mRNA 分子原位杂交, 探讨 Si1 基因在小鼠睾丸发育过程中的表达变化。同时, 分别在生后 15、20 d 及 25 d 的昆明小鼠睾丸组织切片上进行凋亡细胞原位检测, 验证小鼠睾丸上述发育时期的细胞凋亡情况。结果发现: ① Si1 基因在 1 天龄小鼠的睾丸组织生精上皮内无杂交信号; 在未成熟小鼠的睾丸组织部分生精上皮内有极强的杂交信号; 在成熟小鼠的睾丸组织生精上皮内无杂交信号。② 小鼠睾丸组织生精上皮内, 凋亡细胞数从生后第 15~20 天呈增加趋势, 于生后第 20 天出现峰值, 生后第 25 天又降低。上述结果表明 Si1 基因可能参与了小鼠睾丸的发育过程, 在小鼠睾丸发育的特定时期发挥作用, 由于 Si1 基因的表达与小鼠生精细胞凋亡发生的时期同步, 表明该基因可能与小鼠睾丸发育过程中的细胞凋亡有关。

**关键词:** 小鼠; 睾丸; Si1 基因; 基因表达; 凋亡

**中图分类号:** Q 344.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2007)02-0208-05

Si1 基因是一个新的功能基因(GenBank 接受号: AY050169), 目前对于 Si1 基因的功能还知之甚少, 以往的研究中表明它与细胞周期的增殖调控有关, 可能是一个细胞生长抑制基因, 即一个细胞周期负调控基因<sup>[1]</sup>。在肿瘤中, 一个 SNP 位点被发现, 该位点在非肿瘤人群中的分布频率为 14%, 而在肠癌中的分布频率达到 51.5%。表明该基因与肠癌有密切关系<sup>[2]</sup>。

生殖细胞的发育是一个极为特殊的分化过程, 也是一个极特殊的细胞周期运行过程。在这一过程中, 既有生殖细胞本身的频频分裂增殖, 又有其不断地发育分化和死亡<sup>[3]</sup>。研究细胞周期调控基因在生殖细胞发育过程中的表达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, 并可探讨细胞周期调控基因在生殖细胞发育过程中的生理功能。此外, 近年来的研究表明, 小鼠睾丸发育过程不仅存在细胞的生长和分化过程, 也

涉及了生精细胞的退化过程。有形态学及生化研究表明, 生精细胞的退化主要通过细胞凋亡来实现<sup>[4]</sup>。有学者对不同发育阶段小鼠生精细胞的凋亡作了系统的研究, 发现凋亡细胞数从生后 1 d 到生后 3 周有增加的趋势, 于生后第 3 周出现峰值, 之后降低<sup>[5]</sup>。

Si1 基因既然与细胞周期和肿瘤发生有关<sup>[1,2]</sup>, 它与发育过程也许有一定的联系。探讨 Si1 基因在小鼠睾丸生殖细胞发育过程中的表达, 对探讨小鼠睾丸中生殖细胞发育的分子机制有重要的参考意义。由于小鼠睾丸生精细胞在发育过程中存在退化, 因此本文同时考察小鼠睾丸生精细胞发育过程的凋亡, 以探讨 Si1 基因与生精细胞凋亡过程的联系。

## 1 材料与方法

### 1.1 生物学材料

\* 收稿日期: 2006-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39960030, 30360040); 云南省应用基础研究基金资助项目(1999C002Z)。

作者简介: 罗 兰(1973-), 女, 湖南人, 硕士, 主要从事细胞生物学及医学遗传学方面的研究。

1.1.1 小鼠睾丸 Si1 基因原位杂交实验选用昆明种健康雄鼠, 小鼠分组为: 1 天组为 1 天龄小鼠; 未成熟组为 3 周龄小鼠; 成熟组为 10 周龄以上小鼠。每组选 3 只小鼠。细胞凋亡原位杂交检测亦选用昆明种健康雄鼠, 小鼠分组为: 生后 15, 20 d 及 25 d, 每组选 3 只小鼠。

1.1.2 Si1 基因探针 Si1 基因 cDNA 由本实验室克隆并保存。DIG(地高辛) 标记、检测试剂盒(购自德国宝灵曼公司), 细胞凋亡检测试剂盒购于迈新公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 组织切片制备 小鼠断颈处死后取睾丸, 10% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋。切片厚 9  $\mu\text{m}$ , 用甘油蛋白粘片剂贴于预先用 APES(3-氨基丙基三乙氧基硅烷) 处理过的载玻片上, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 24 h 后, 室温干燥备用。

1.2.2 Si1 基因探针制备 按常规方法扩增并抽提克隆的 Si1 基因质粒 DNA, 用 *Bam*HI 和 *Hind* II 酶切, 胶回收插入的 cDNA 片段。取回收的 cDNA 片段约 1  $\mu\text{g}$ , 加入混合六聚寡核苷酸引物 2  $\mu\text{L}$  (Hexamincleotidemixture), 标记 Digoxigenin dUTP 2  $\mu\text{L}$ , Klenow 聚合酶 1U, 消毒四蒸水补充到总体积为 20  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 20 h, 然后加 2  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L EDTA, 2  $\mu\text{L}$  4 mol/L LiCl 终止反应。-20  $^{\circ}\text{C}$  无水乙醇(2.5 倍) 沉淀 DNA, -20  $^{\circ}\text{C}$  过夜。12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用 50  $\mu\text{L}$  1 $\times$ TE 溶解。

1.2.3 H.E 染色 按常规 H.E 染色操作。

1.2.4 Si1 基因组织原位杂交 小鼠睾丸组织按常规组织化学方法进行固定, 切片。每组随机取 5 张切片。原位杂交按文献[6]进行, 稍加修改。

1.2.4.1 预处理 石蜡切片经二甲苯脱蜡 2 次, 每次 20 min。用无水乙醇洗 2 次, 每次 10 min。置空气中干燥, 在 2 $\times$ SSC 中常温饱和 20 min。

1.2.4.2 预杂交 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 6 $\times$ SSC 饱和的湿盒中, 组织材料上加 40~50  $\mu\text{L}$  预杂交液, 42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4~5 h。

1.2.4.3 杂交 在预杂交液中加入适量的变性标记探针达最终质量浓度 50 ng/mL, 每张玻片上滴加 40~50  $\mu\text{L}$ , 42  $^{\circ}\text{C}$  湿盒过夜。

1.2.4.4 免疫显色 将杂交后的玻片置 2 $\times$ SSC

中洗 1 h, 1 $\times$ SSC 中洗 1 h, 0.5 $\times$ SSC 37  $^{\circ}\text{C}$  洗 30 min, 0.5 $\times$ SSC 室温洗 30 min。封闭剂(3% 牛血清白蛋白, 0.3% TritonX-100, Buffer I (100 mmol/L Tris $\cdot$ HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 稀释) 中室温孵育 2 h, 以消除非特异性抗原。复合抗体 Dig-AP 用 Buffer I 按 1:500 稀释, 室温孵育过夜。Buffer I 洗 2 次, 每次 15 min, NBT 显色液暗盒显色 6 h, EDTA 终止反应。乙醇系列脱水, 二甲苯透明, 树胶封片。Olympus 显微镜下观察照相。

1.2.5 细胞凋亡原位检测 切片于 37  $^{\circ}\text{C}$  的二甲苯中脱蜡 10 min, 然后在室温下保温 5 min。系列酒精逐级复水(100%, 95%, 85%, 70%, 50% 室温各 3 min) 后, 用 0.85% NaCl 洗 5 min, 1 $\times$ PBS 洗 5 min。4% 的多聚甲醛室温固定 15 min 后, 1 $\times$ PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的蛋白酶 K 室温消化 20 min, 1 $\times$ PBS 洗 5 min。4% 的多聚甲醛室温再固定 10 min 后, 1 $\times$ PBS 洗 3 次, 每次 5 min。在切片上滴加平衡缓冲 Buffer 液, 室温 10 min。在冰上混匀平衡 Buffer 液、生物素标记的核苷酸的混合物、末端转移酶(TdT 酶)(体积比 98:1:1), 滴加到切片上, PBS 湿盒内 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min。2 $\times$ SSC 终止反应, 室温 15 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 以除去生物素标记的 dNTP。滴加 0.3% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温封闭 5 min, 以封闭内源性的过氧化物酶。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用 PBS 稀释辣根过氧化物酶标记生物素(500:1), 进行抗体连接, 室温孵育 30 min, 随后 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。每张切片加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察 5~10 min, 阳性颗粒为棕黄色。自来水冲洗终止反应, 二甲苯透明, 中性树胶封固。Olympus 显微镜下观察照相。

## 2 结果

### 2.1 小鼠睾丸的 H.E 染色

2.1.1 1 天龄睾丸(见图 1A) 曲精小管呈实心的管状, 由支持细胞和原始生精细胞构成。细胞基本排列成 1 层, 紧贴基膜, 核呈长圆形。局部区域也有 2 层细胞。部分节段上, 近中央部位有一些核大而圆的细胞。曲精小管之间有大量的间质细胞。

2.1.2 未成熟鼠睾丸(见图 1B) 这一时期的睾丸曲精小管多已经空腔化, 有些截面上可见到 2 种类型的细胞, 靠近管壁的 1 层或几层细胞体积小, 排列

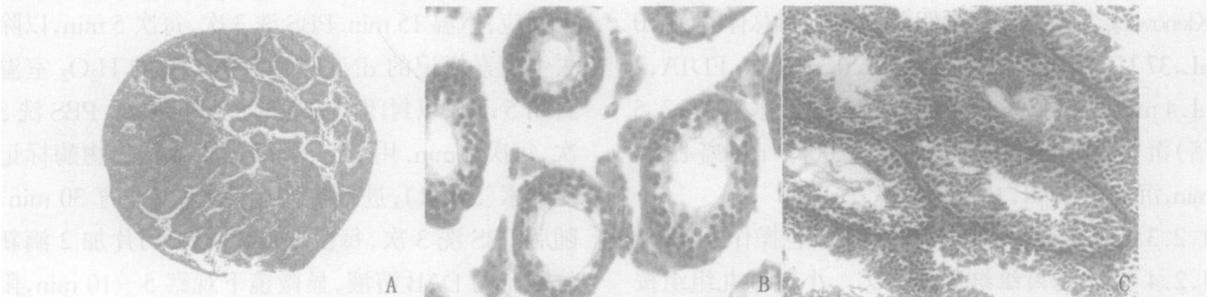
紧密,细胞核小而致密(染色深),核为圆形.而近管腔中间的内层细胞则体积稍大,细胞核亦稍大,且染色较浅;有些截面上只见到 1 种类型的细胞,细胞体积小,排列紧密,细胞核小而致密(染色深),核为圆形,呈 1 层或几层排列.总体上,曲精小管之间的距离较大,不像成熟组睾丸中那样多彼此贴近.

2.1.3 成熟鼠睾丸(见图 1C) 该组曲精小管的组织结构与未成熟组有很大区别,其生精上皮细胞已完全有了分化.所有截面上可见精原细胞层、初级精母细胞层、精子细胞及成熟精子等各级细胞.在绝大多数曲精小管正(中)横截面上,包括精原细胞和生精干细胞在内的细胞,贴近基膜,排列成 1 层,这 1 层细胞体积小,排列紧密,细胞核小而致密(染色深),多数核为圆形,个别为椭圆形.从第 2 层细胞开始,细胞的体积与其核的体积都变大,有些为精原细胞的 2 倍以上,从形态学指征判断:第 2, 3 层(个别地方还包括第 4 层)为初级和次级精母细胞.初级精母细胞和次级精母细胞以内细胞的特点是其胞体和胞核均明显比精母细胞小得多,大致与精原细胞相同或更小,胞核也较致密,从形态学指征判断为精子细胞.这一时期曲精小管中已有大

量充分变态或正在变态中的精子.

2.2 Si1 基因原位杂交结果 Si1 基因在 1 天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明显的杂交信号(见图 2A).在未成熟小鼠睾丸组织部分生精上皮内出现或强或弱的杂交信号,部分生精上皮内的信号极强,并且具有杂交信号的细胞是离开基底膜第 2, 3 层及其以内的细胞(见图 2B);而在成熟小鼠睾丸组织中生精上皮的无论哪一层细胞中均未检测到明显的杂交信号(见图 2C).

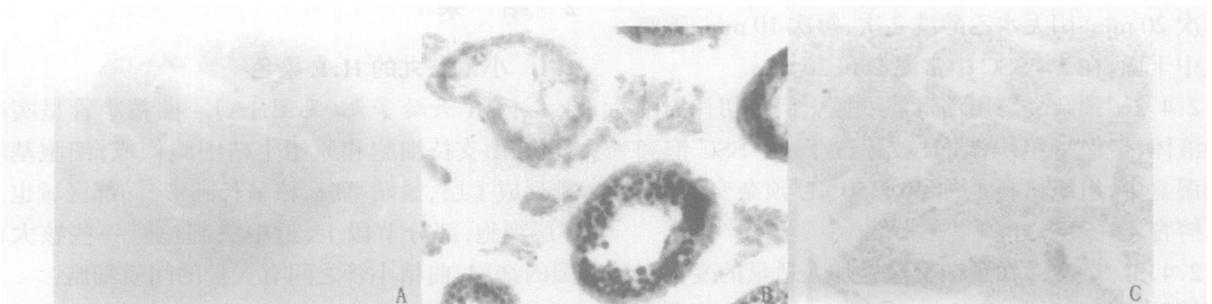
2.3 细胞凋亡原位检测结果 原位检测的阳性细胞,其阳性颗粒呈棕黄色,大小不一,形态各异,分布不均匀.生后第 15 天,生精上皮内已经有凋亡细胞出现,凋亡细胞集中于生精上皮内离开基底膜第 3 层及其以内的细胞(见图 3A).至生后第 20 天,生精上皮内的凋亡细胞数量达到了高峰,信号也最强,离开基底膜第 2 层及其以内的各层均有凋亡细胞(见图 3B).但至生后第 25 天起,生精上皮内的凋亡细胞数量便急剧下降,且凋亡细胞仅集中于离开基底膜的第 1 层及第 2 层细胞,且信号强度减弱(见图 3C).



A: 1 天龄小鼠; B: 未成熟小鼠; C: 成熟小鼠

图 1 小鼠睾丸的 H. E 染色结果

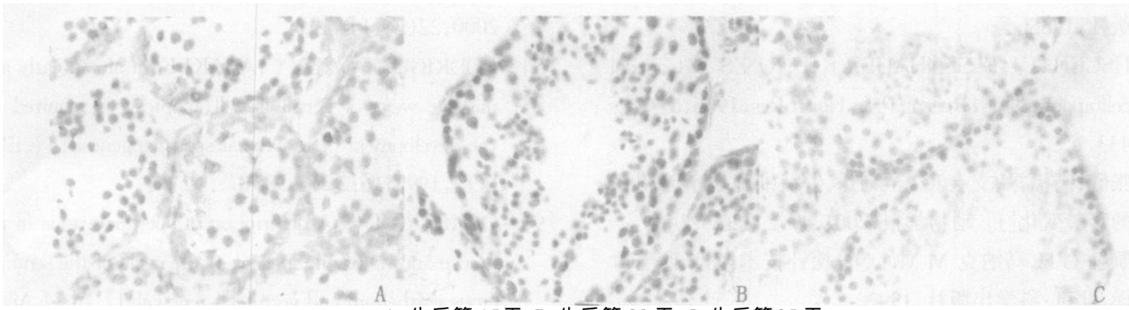
Fig. 1 The results of H. E staining in mice testis



A: 1 天龄小鼠; B: 未成熟小鼠; C: 成熟小鼠

图 2 Si1 基因在小鼠睾丸中的表达结果

Fig. 2 The expression of Si1 gene in mice testis



A: 生后第 15 天; B: 生后第 20 天; C: 生后第 25 天

图 3 小鼠睾丸发育过程中的细胞凋亡原位检测结果

Fig. 3 The results of detection of apoptotic cells in situ during the development of mice testis

### 3 讨 论

**3.1 Si1 基因在小鼠睾丸发育过程中的作用** 本研究小组通过比较血清培养细胞和血清饥饿细胞的基因表达差异, 获得了一段血清饥饿细胞中特异表达的 cDNA 序列, 以此序列出发, 通过搜索表达序列标签 (EST), 拼接出完整的基因序列, 通过 PCR 分段克隆获得全长 cDNA 序列. 该基因 cDNA 全长 5 429 bp, 编码框预测有 791 个氨基酸残基, 共有 21 个外显子. GenBank 搜索, 该基因与已有的细胞周期调控基因没有同源性. 所以, 该基因是一个新的与细胞周期有关的基因 (GenBank 接受号: AY050169). 由于该基因最初发现在无血清培养条件下表达, 故叫血清抑制基因 (serum inhibit gene, Si1 基因)<sup>[1]</sup>. 目前对于 Si1 基因的功能研究还处于起步阶段. Si1 基因在 U251 细胞血清抑制培养中有较高的表达, 而 U251 细胞在血清抑制培养后大量进入到 G<sub>0</sub> 期, 由此推测其可能是细胞由 G<sub>1</sub> 期进入 G<sub>0</sub> 期的调控基因, 是一个细胞周期负调控基因. 我们曾对 p16, p21 和 p53 基因在血清培养和血清饥饿细胞中的表达进行过研究<sup>[7]</sup>, 发现在血清饥饿细胞中较血清培养细胞中表达较强, Si1 基因也有一样的表达特征, 表明该基因有可能是一个细胞生长抑制基因.

本研究中, Si1 基因在 1 天龄小鼠和成熟小鼠的睾丸组织中生精上皮内没有表达, 但在未成熟小鼠的睾丸组织部分生精上皮内出现表达, 部分生精上皮内的表达信号极强, 这一结果表明: Si1 基因可能参与了小鼠睾丸的发育过程, 并在小鼠睾丸发育的特定时期发挥作用.

**3.2 Si1 基因与生精细胞凋亡** 在细胞凋亡原位

检测的组织切片中, 我们发现, 在小鼠睾丸发育过程中, 特定时期存在着生精细胞的凋亡现象. 本研究表明: 凋亡细胞从生后 15~20 d 有增加的趋势, 于生后第 20 天出现峰值, 之后迅速降低. 这一结果与张健等人的研究结果<sup>[5]</sup>一致. 本研究表明, 在小鼠个体发育首次精子发生期间, 出现了一个较为明显的凋亡波, 有学者认为此凋亡波的出现是保证随后的精子正常发生所必需的, 其生理意义很可能是调节并保持生精细胞与支持细胞的最适数目比, 以保证生精细胞发育和分化的正常进行<sup>[8]</sup>. 也有学者认为, 在精子发生过程中, 由于增殖而产生一些染色体异常的细胞, 细胞凋亡是对这些细胞的负选择<sup>[9]</sup>. 本研究表明, 在未成熟 (3 周龄) 小鼠睾丸组织的部分生精上皮内出现极强的 Si1 杂交信号, 并且具有杂交信号的细胞是离开基底膜第 2, 3 层及其以内的细胞; 而同期 (生后第 20 天) 有强烈凋亡信号的细胞也是离开基底膜第 2 层及其以内的各层细胞. 二者的阳性结果是吻合的. 这一结果提示 Si1 基因强表达的时期与小鼠生精细胞强凋亡信号出现的时期一致, 表明 Si1 基因与小鼠睾丸生精细胞的凋亡过程有一定联系, 当然, 这还有待进一步的研究.

### 参考文献:

- [1] 谭德勇, 赖建华, 钱伟, 等. 一个血清抑制基因的克隆 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29 (5): 816-819.
- [2] 杨克, 杨举伦, 覃扬, 等. Si1 基因中的一个多态位点的初步分析 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2004, 26 (5): 450-453.
- [3] 俞慧珠, 叶百宽. 小白鼠胚胎发生 [M]. 北京: 科学出

版社, 1985.

[4] HSUCH A J, ELSENHAEUER K, CHUN S Y. Conadal cell apoptosis[J]. Recent Prog Horm Res, 1996, 51(1): 433.

[5] 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.

[6] 凯勒 G H, 马纳克 M M. DNA 探针技术[M]. 孙士勇译. 北京: 科学出版社, 1992.

[7] 罗兰, 何云刚, 舒昆贤, 等. 血清对胶质瘤细胞株 U251 基因的表达式的影响[J]. 云南大学学报: 自然科学版,

2000, 22( 2) : 144- 147.

[8] 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: 2 262-2 270.

[9] OAKBERG E F. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal[J]. Am J Anat, 1956, 99: 391-413.

### The expression of the Si1 gene in the testis of mice at different development stage

LUO Lan<sup>1,2</sup>, LI Shu+bing<sup>1</sup>, YU Min<sup>1</sup>, TAN De-yong<sup>1</sup>

( 1. Lab. of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China; 2. Department of Cell Biology and Genetics, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

**Abstract:** Using in situ hybridization technique with Dig Labeled DNA probe, the expression of Si1 gene in testis of one-day old, 3 weeks old and mature Kunming mice were studied. At the same time, TUNEL method were used for detection of apoptotic cells in situ to detect the cell apoptosis of the spermatogenic cells in testis of mice at 15th day after birth, 20th day after birth and 25th day after birth. The results are as follows: (1) The expression of Si1 gene was very strong in partial seminiferous tube of 3 weeks old mice, but the expression of Si+ 1 gene was not be observed in testis of one-day old mice and mature mice. (2) The number of apoptotic cells increased from 15th day after birth to 20th day after birth, reached its peaks on postnatal 20th day and descended on 25th day after birth. So the conclusion that Si1 gene participates in the development of testis of mice, and the period of Si+ 1 gene expression and the cell apoptosis of the spermatogenic cells in mice were synchronously get.

**Key words:** mouse; testicle; Si1 gene; gene expression; apoptosis

\* \* \* \* \*

(上接第 189 页)

### Chemical constituents from *Hedyotis diffusa*

YANG Ya-bin, YANG Xue-qiong, DING Zhong-tao

( Key Laboratory of Medicinal Chemistry for Natural Resource, Ministry of Education, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** From the *Hedyotis diffusa* seven known compounds were isolated. Their structures were determined as 3-methoxy-5, 7-dihydroxy flavonol( I ), 10-acetyl scandoside( II ), asperuloside( III ), 5, 7, 4'-trihydroxy flavonol( IV ), ursolic acid( V ), daucosterol( VI ),  $\beta$ -Stiosterol( VII ).

**Key words:** *Hedyotis diffusa*; rubiaceae; flavone; iridoid