

PCNA 等 5 种基因在小鼠睾丸发育过程中的表达

谭德勇, 罗兰, 赖建华, 舒坤贤, 李 鹏, 咎瑞光

(云南大学生物技术系, 昆明 650091)

摘要: 以出生 1 日、30 日和成年昆明小鼠睾丸组织为实验材料, 利用地高辛标记的基因探针在组织切片上进行 DNA-mRNA 分子原位杂交, 研究了 *PCNA*、*cyclinD1*、*cdc2*、*P21* 和 *P16* 基因共 5 种细胞周期调控基因在小鼠睾丸发育中的表达变化。结果发现: *PCNA* 基因在 30 日龄和成年鼠睾丸中都有强的表达; 而 *cyclin D1* 基因只在 30 日龄的小鼠睾丸组织中有表达; *P21*、*P16* 和 *cdc2* 基因在 3 个不同的发育阶段都没有表达。这些结果表明: (1) 细胞周期调控基因 *cyclin D1*、*cdc2*、*P16* 和 *P21* 与小鼠睾丸发育和精子发生过程的细胞增殖控制关系不大, 可能小鼠睾丸和精子发育过程中的细胞增殖调控与其他细胞的增殖调控有不同的机制; (2) *cyclin D1* 基因在小鼠睾丸中的表达模式表明, *cyclin D1* 基因在睾丸发育中有不同于细胞增殖促进的作用; (3) 小鼠睾丸发育中, 精子发生开始时期可能晚于 30 日龄。

关键词: 小鼠; 睾丸; 发育; 基因表达; 细胞周期

中图分类号: Q253; Q492.4

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)03-0149-04

The Expression of Five Cell Cycle Control-related Genes in the Test of Mouse at Different Development Stage

TAN De-yong, LUO Lan, LAI Jian-hua, SHU Kun-xian, LI Li, ZAN Rui-guang

(The Department of Biotechnology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstracts: Using *in situ* hybridization technique with Dig Labeled DNA probe, we studied the expression of *PCNA*, *cyclin D1*, *cdc2*, *P21* and *P16* gene in the test of one day old, 30 days old and adult Kunming mouse. The results shows that the expression of *PCNA* gene was strong in the test of 30 days old and adult mouse; *cyclin D1* gene only expressed in the test of 30 days old mouse; *cdc2*, *P21* and *P16* gene did not express in the test of all three groups of mouse. These results suggest that: (1) *cyclin D1*, *cdc2*, *P16* and *P21* genes are not related to the regulator of cell cycle during test development and germ generation, and possibly the mechanism of cell cycle regulation during test development and germ generation is different from other kind of cells; (2) *cyclin D1* has other functions except promoting cell proliferation; and (3) the germ generation during test development may start after 30 days old.

Key words: mouse; test; development; gene expression; cell cycle.

PCNA 基因的产物是真核生物 DNA 聚合酶 δ 的一个辅助因子, 它的功能是促进 DNA 的复制^[1], *cdc2* 基因和 *cyclin D1* 基因的产物分别是细胞周期激酶的催化亚基和调节亚基, 它们的作用是促进细胞从 G_1 期向 S 期转变^[2,3]。所以, 这 3 个基因的作用都是

促进细胞分裂增殖的。*P16* 基因和 *P21* 基因是 *P53* 的下游基因^[3,4,5], 它们的作用是抑制细胞的增殖。生殖细胞的发育过程也存在细胞的生长和分化过程, 那么这些基因的作用是否与这一过程中的细胞生长调控有关, 本研究检测了 *PCNA*、*cdc2*、*cyclin D1*、*P16*

收稿日期: 1999-04-06; 修回日期: 1999-11-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(39760034)和云南省应用基础研究基金项目(96c007R)

作者简介: 谭德勇(1955-), 男, 重庆市人, 博士学位, 专业: 生物化学与分子生物学; 罗兰(1973-), 女, 湖南邵阳人, 硕士学位, 现地址: 昆明医学院第一附属医院产科; 舒坤贤(1968-), 男, 湖南永胜县人, 硕士学位, 现址: 湖南医科大学生物化学教研室; 李鹏(1973-), 女, 湖南永胜县人, 硕士学位, 现址: 湖南吉首大学生物系。

负调控基因在生殖细胞发育中的作用。

1 材料与方 法

1.1 生物学材料

1.1.1 小鼠卵巢

实验用昆明种小白鼠 购于中科院昆明动物所。

睾丸组织 分别取自于出生 1 日龄、30 日龄和成年(3 个月)鼠的睾丸组织(各取 5 只)。

1.1.2 重组质粒

质粒 pBR322 购于北京东方公司; *P16* 基因重组质粒、*P21* 基因重组质粒、*PCNA* 基因重组质粒、*cdc2* 基因重组质粒和 *cyclin D1* 基因重组质粒均由美国冷泉港实验室 Beach 博士赠送。

1.2 实验方法

1.2.1 组织切片及探针制备

小鼠断颈处死后取睾丸组织, 10% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋。切片厚 9 μ 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 $^{\circ}$ C 温育 24 小时后, 室温干燥备用。

质粒转化、扩增及抽提按常规方法^[7]操作。

DNA 片段分离: 取 *P16*、*P21*、*PCNA*、*cdc2*、*cyclin D1* 基因的重组质粒 DNA 各 6 μ g, 分别按 0.2 U/ μ gDNA 加限制性内切酶及相应的缓冲液 8 μ l (*P16*: 用 *EcoRI* 和 *XhoI*; *P21*: 用 *SacI* 和 *XbaI*; *PCNA*: 用 *SacI* 和 *XbaI*; *cdc2*: 用 *EcoRI*; *cyclin D1*: 用 *EcoRI*)。再用消毒三蒸水调总体积达到 80 μ l, 37 $^{\circ}$ C 恒温过夜。酶切产物用 0.8% 的低熔点琼脂糖回收各基因 cDNA 片段, 各取 1 μ l 与定量的标准 DNA 一起电泳, EB 染色, 根据其荧光强度估计各自的 DNA 含量。

将上述回收的基因 cDNA 各取 1 μ g, 沸水中变性 10 分钟。取出速置于冰浴中放置 3 分钟, 然后顺序加入: 混合六聚寡核苷酸引物 2 μ l (hexamercleotide-mixture), digoxigenin 标记的 dUTP 2 μ l, Klenow 聚合酶 1U, 消毒四蒸水补充到总体积为 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 20 小时, 然后加 2 μ l 0.2mol/L EDTA, 2 μ l 4mol/L LiCl 终止反应。-20 $^{\circ}$ C 无水乙醇(2.5 倍)沉淀 DNA, -20 $^{\circ}$ C 过夜。12 000r/min, 离心 20 分钟, 沉淀用 50 μ l 1 \times TE 溶解。

1.2.2 组织原位杂交

每一组杂交实验均分别随机取 5 张切片。具体杂交方法按文献^[8]并稍加修改进行。

1.2.2.1 预处理 石蜡切片经二甲苯脱蜡两次, 每次 20 分钟。用无水乙醇洗两次, 每次 10 分

钟。置空气中干燥, 在 2 \times SSC 中常温浸泡 20 分钟。

1.2.2.2 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 μ l 预杂交液, 42 $^{\circ}$ C 孵育 4~5 小时。

1.2.2.3 杂交 在预杂交液中加入适量的变性标记探针达最终浓度 50ng/ml 配制成杂交液, 每张玻片上滴加 40~50 μ l 杂交液, 42 $^{\circ}$ C 湿盒过夜。

1.2.2.4 免疫显色 将杂交后的玻片置 2 \times SSC 中洗 1 小时, 1 \times SSC 中洗 1 小时, 0.5 \times SSC 37 $^{\circ}$ C 洗 30 分钟, 0.5 \times SSC 室温洗 30 分钟。封闭剂(3% 牛血清白蛋白, 0.3% TritonX-100, buffer I (100mmol/L Tris.HCl 150mmol/L NaCl, pH 7.5 稀释) 中室温孵育 2 小时, 以消除非特异性抗原。然后加复合抗体 Dig-AP (用 buffer I 按 1:500 稀释), 室温孵育过夜。buffer I 洗二次, 每次 15 分钟, NBT 显色液暗盒显色 6 小时。EDTA 终止反应。乙醇系列脱水, 二甲苯透明, 树脂封片。Olympus 显微镜下观察照相。

2 结 果

2.1 *PCNA* 基因杂交结果

1 日龄小鼠睾丸组织中没有杂交信号; 30 日龄小鼠睾丸组织中有杂交信号, 信号分布于整个曲精管中; 成年鼠睾丸组织中也有杂交信号, 信号分布于初级精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞中几乎没有杂交信号(见图 1A~图 1C)。

2.2 *cyclin D1* 基因杂交结果

1 日龄小鼠睾丸组织中没有杂交信号; 30 日龄小鼠睾丸组织中有杂交信号, 但并不是所有的精曲小管中都有杂交信号, 只有部分细胞有杂交信号; 成年鼠睾丸组织几乎没有杂交信号(见图 2A~图 2C)。

2.3 *cdc2*、*p21* 和 *p16* 基因杂交结果

三个不同发育时期小鼠睾丸组织中, *cdc2*、*P21* 和 *P16* 基因都没有杂交信号(见图 3A~图 3C, 图 4A~图 4C, 见图 5A~图 5C)。

3 讨 论

3.1 精子发生中细胞增殖调控与其他细胞增殖调控的差异

PCNA 基因产物 PCNA 蛋白(促细胞增殖核抗原)在哺乳类细胞中是 DNA 聚合酶 δ 的附属蛋白, 它和复制因子 α (RFC) 一起识别引物-模板复合物, 以帮助聚合酶 δ 的定位, 从而促进 DNA 的复制^[1],

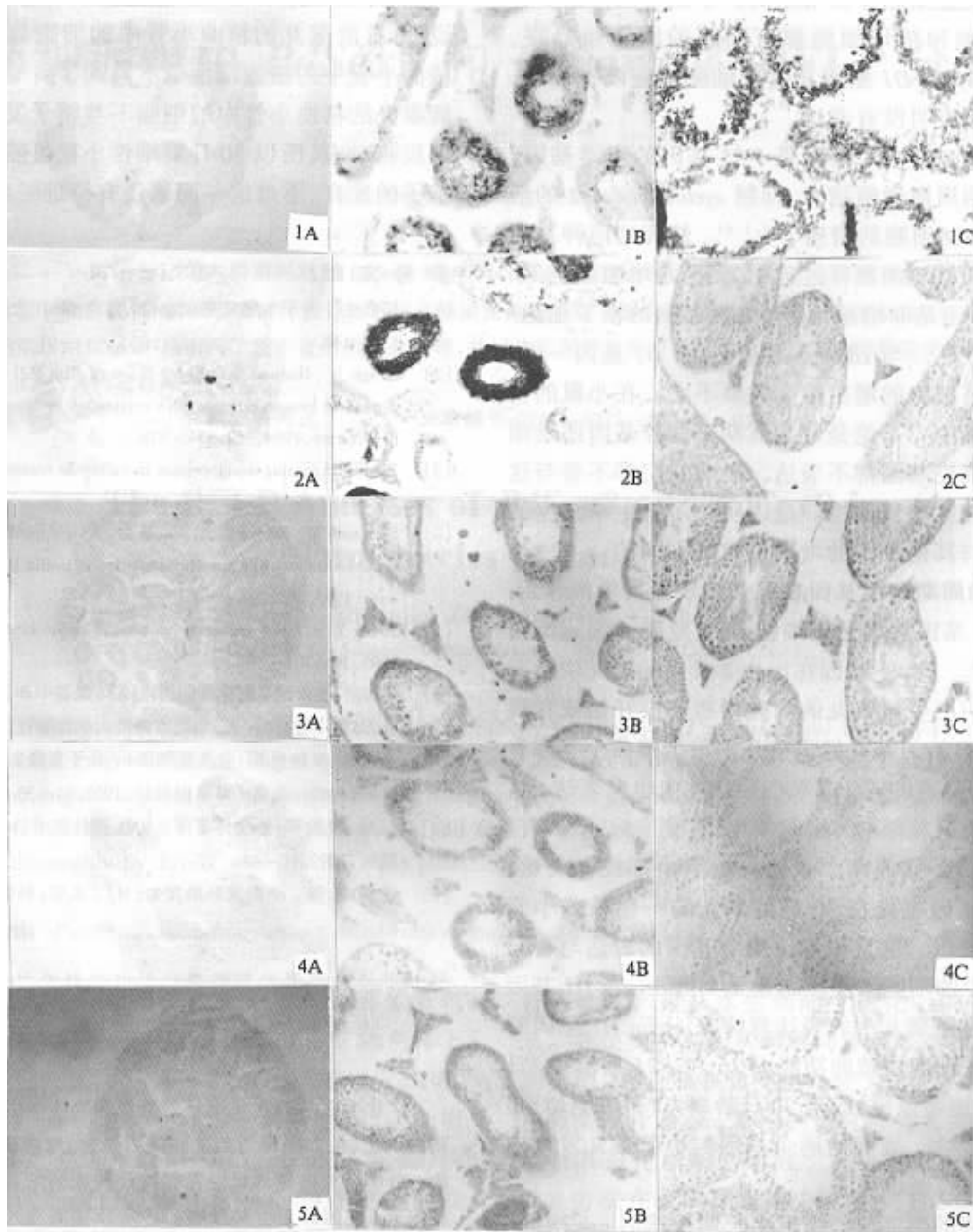


图 1 5 种基因在鼠睾丸发育过程中的表达

1A、1B、1C 分别示 1 日龄、30 日龄和成年鼠睾丸组织中 *PCNA* 基因的表达 ;2A、2B、2C 分别示 1 日龄、30 日龄和成年鼠睾丸组织中 *cyclin D1* 基因的表达 ;3A、3B、3C 分别示 1 日龄、30 日龄和成年鼠睾丸组织中 *cdc2* 基因的表达 ;4A、4B、4C 分别示 1 日龄、30 日龄和成年鼠睾丸组织中 *P21* 基因的表达 ;5A、5B、5C 分别示 1 日龄、30 日龄和成年鼠睾丸组织中 *P16* 基因的表达。

所以 *PCNA* 基因在所有具有 DNA 复制的细胞中都有表达。细胞中 DNA 复制在多数情况意味着细胞增殖,因此,*PCNA* 的表达是细胞增殖的标志。成年小鼠睾丸曲精小管中精原细胞、精母细胞都有 DNA 的复制,而精子细胞已是分化细胞、停止了细胞的分裂,所以 *PCNA* 基因在精原细胞、精母细胞细胞中有

表达,而在精子细胞中没有表达,这与该基因的功能是一致的。由此也推论在未成年小鼠睾丸中的表达表明小鼠睾丸在发育中期已有细胞的增殖。

cdc2 基因和 *cyclin D1* 基因的产物分别是细胞周期激酶的催化亚基和调节亚基,它们的作用是促进细胞从 G_1 期向 S 期转变^[2,3]。所以,这两个基因的

作用都是促进细胞分裂增殖的。小鼠睾丸精曲小管的精原细胞和精母细胞都有细胞的增殖和分裂，*cdc2* 基因 *cyclin D1* 基因在这些细胞中应该有表达，但实验结果表明没有表达。

P16 基因和 *P21* 基因是 *P53* 基因的下流基因，它们与细胞周期激酶结合，抑制 *cyclin D1/cdc2* 的活性，从而抑制细胞的增殖^[3,4,5,6]。然而这两种基因在小鼠睾丸组织的发育过程中，无论是增殖细胞（如精原细胞）还是非增殖细胞（如成年鼠的精子细胞）中都没有表达；与 *cdc2* 基因和 *cyclin D1* 基因一样，可能它们与细胞的增殖控制关系不大。在小鼠的精子发生过程中，不论是细胞周期正调控基因还是细胞周期负调控基因都不表达，表明它们都不参与这一过程的细胞增殖调控。这表明精子发生中细胞的增殖调控与其他细胞的增殖调控是不同的。

3.2 细胞周期调控基因在睾丸组织发育中的作用

PCNA 基因的表达是细胞 DNA 复制、细胞增殖的一个标志。*PCNA* 基因在出生 1 日龄的睾丸中没有表达，表明出生鼠睾丸的细胞增殖还没开始或者很慢。在 30 日龄的睾丸组织中几乎每个精曲小管都有表达，有的强有的弱，成年小鼠睾丸中也有表达，这表明睾丸组织发育中有细胞的增殖。但 *cdc2* 基因在 1 日龄、30 日龄和成年小鼠睾丸组织中都没有表达，*cyclin D1* 基因也只在 30 日龄睾丸的一些精曲小管节段中有表达，这意味着这两个基因的表达与否与睾丸发育中的细胞增殖控制是无关系的。*cyclin D1* 基因在未成年小鼠睾丸中的表达意味着 *cyclin D1* 基因有不同于促进细胞增殖的功能。*P16* 和 *P21* 基因在 1 日龄睾丸（细胞增殖慢）或是 30 日龄睾丸（有细胞增殖）中都没有表达，表明这两个基因与小鼠睾丸发育中的细胞增殖控制也无关。

从上述的事实看，细胞生长调控基因 *cdc2*，*cyclin D1*，*P21* 和 *P16* 与小鼠精子发生和睾丸发育中的细胞增殖调控都无关，进一步推知小鼠睾丸与精子发育和发生中的细胞增殖控制可能有不同的机制。

3.3 30 日龄的睾丸中是否开始精子的发育

按经典的观念^[9]，小鼠生后 4~5 天精子发生开始，到 18 天发生第一次减数分裂，精子发生进入次级精母细胞时期，此后减数分裂 II 随即进行，并进一步发育成精子。但本研究结果，30 日龄睾丸的精曲小管中某些节段所有的细胞都有 *cyclin D1* 基因的表达，而在成年鼠的睾丸中没有任何精曲小管节段的任何细胞层有 *cyclin D1* 基因的表达。既然基因

表达有所不同,细胞特性也应该是有区别的,也就是说30日龄睾丸的精曲小管中的细胞与成年鼠睾丸精曲小管中的细胞特性是不同的,换句话说,30日龄睾丸的精曲小管中的细胞不与精子发育过程任一阶段相对应。所以30日龄雄性小鼠可能还没有开始精子的发育,不过这一问题还有待进一步的研究。

参 考 文 献:

- [1] 杨岐生. 分子生物学基础[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1994, 137~140.
- [2] Wagh. S, Hannon G J, Beach D, *et al.* The *P21* inhibitor of cyclin dependent kinases controls DNA replication by interaction with *PCNA* [J]. *Nature*, 1994, 369: 574~578.
- [3] Pines J. Arresting developments in cell-cycle control[J]. *TIBS*, 1994, 19: 143~145.
- [4] Serrano M, Hannon G J, Beach D. A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4[J]. *Nature*, 1993, 366: 704~707.
- [5] Xiong Y. *p21* is a universal inhibitor of cyclin kinases[J]. *Nature*, 1993, 366: 701~704.
- [6] 张四清, 王永潮. 细胞周期调控[A]. 见翟中和主编 细胞生物学动态(第一卷)[C]. 北京: 北京师范大学出版社, 1996, 46~60.
- [7] J. 萨姆布鲁克等(金冬雁等译). 分子克隆实验指南[M]. 第二版(1989), 北京: 科学出版社, 1992, 24~30, 259, 322~323.
- [8] G.H. 凯勒等(孙士勇等译). DNA 探针技术[M]. 北京: 科学出版社, 1992, 41~48.
- [9] 俞慧珠, 等. 小白鼠胚胎发生[M]. 北京: 科学出版社, 1985, 83~85.