

# 雄激素受体类似物在雄性拟黑多刺蚁性腺中的表达和定位

詹光杰<sup>1</sup>, 王慧丽<sup>2</sup>, 奚耕思<sup>3</sup>

(1. 湖北民族学院医学院, 湖北恩施 445000; 2. 山东省昌邑市文山中学, 山东昌邑 261300; 3. 陕西师范大学生命科学院, 陕西西安 710062)

**摘要** [目的]探讨雄激素类似物在雄性拟黑多刺蚁性腺中的表达情况。[方法]以雄性拟黑多刺蚁为试验材料,采用SABC免疫组织化学方法检测雄性拟黑多刺蚁性腺是否存在雄激素受体类似物,并研究雄激素类似物在其性腺中的表达情况。[结果]免疫组织化学研究结果显示,在雄蚁的性腺内有雄激素受体类似物的免疫阳性颗粒表达,主要分布在雄性附腺与精巢里。表明拟黑多刺蚁体内存在内源性类固醇雄激素类似物,其信号通路在调解其精卵发生方面有重要的作用,并且有与脊椎动物类似的性激素调控性征的通路。[结论]该研究为雄激素类似物功能的研究奠定了基础。

**关键词** 拟黑多刺蚁;雄激素受体类似物;雄激素类似物;性腺

**中图分类号** Q951 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08499-02

## Expression and Location of Androgen Receptor Analogue in Sex Gland of Male *Polyrhachis vicina* Roger

ZHAN Guang-jie et al (Medical School of HuBei University for Nationalities, Enshi, Hubei 445000)

**Abstract** [Objective] The aim was to discuss the expression condition of androgen analogue in sex gland of male *Polyrhachis vicina*. [Method] With male *P. vicina* as experimental material, whether there existed androgen receptor analogue in sex gland of male *P. vicina* or not was detected by SABC immunohistochemistry and the expression condition of androgen analogue in sex gland of male *P. vicina* was studied. [Result] The result of immunohistochemistry showed that the immunoreactive grain of androgen receptor analogue were expressed in sex gland of male *P. vicina* and mainly distributed in male accessory gland and testis, which showed that there existed endogenous steroid androgen analogue in *P. vicina* body, and its signal pathway played an important role in mediating the occurrence of its sperm egg and it had pathway similar to sex hormone regulation characteristic of vertebrate. [Conclusion] The research laid the foundation for study on the function of androgen analogue.

**Key words** *Polyrhachis vicina* Roger; Androgen receptor analogues; Androgen analogues; Sex gland

雄激素存在于所有脊椎动物体内,但无脊椎动物仅限于高等类群,如在软体动物、棘皮动物以及甲壳动物中发现雄激素的存在,并且具有脊椎动物类似的生物功能<sup>[1-2]</sup>。1966年, Naisse 报道在萤火虫(*Lampyrus noctiluca*)幼体辜丸中发现了雄性激素<sup>[3]</sup>,这一雄性激素不仅控制着萤火虫外生殖器的发育和成虫第二性征的形成,而且影响性腺的发育并引发辜丸的分化。Mechoulam 等采用放射免疫分析法发现,在昆虫体内有类似脊椎动物雄性激素和雌性激素的物质存在<sup>[4]</sup>。此外,利用气相色谱和质谱分析技术,在蝗虫的子宫与辜丸的组织匀浆中也检测到了辜酮、雌二醇等典型的脊椎动物性类固醇激素<sup>[5]</sup>。

雄激素受体(AR)在脊椎动物的各组织中均有分布,而且在雄性与雌性体内都有发现。在甲壳动物中也有发现<sup>[2]</sup>,但在昆虫基因组的全序列分析尚未发现性类固醇激素受体基因,不过果蝇体内存在雌激素相关受体(ERR),与脊椎动物的雌激素受体高度同源<sup>[6]</sup>。拟黑多刺蚁是一种社会性昆虫,有着相当复杂的行为习性,品级分化及胚后发育较为复杂。有关AR在蚂蚁性腺的分布及相关作用尚未见报道。为此,笔者采用SABC免疫组织化学方法(抗体为脊椎动物源),检测雄性拟黑多刺蚁性腺是否存在雄激素受体类似物,并研究雄激素类似物在其中的表达定位。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 拟黑多刺蚁,购自河北邯郸华龙蚁力王开发有限公司,实验室饲养。

**1.2 样品制备** 从蚁巢中取出蚁蛹数只,在解剖镜下选出雄蚁蛹,迅速用手术刀片除去外层茧,置于新配制的 Bouin

氏液中固定8~12 h。放入70%酒精中4℃过夜;而后梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,连续切片,切片厚度为8 μm,捞片后置于烘箱内37℃烤干备用。

**1.3 SABC免疫组织化学染色反应程序** ①将烘干后的石蜡切片入二甲苯脱蜡2次,每次15 min;组织切片入100%酒精2次,脱去切片上残留的二甲苯,每次5 min;而后依次进入95%、90%、80%、70%酒精,每梯度各3 min;②入蒸馏水内5 min;③入新配制的3%过氧化氢溶液(30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1份+蒸馏水10份混合)15 min,灭活组织内源性过氧化物酶活性,而后用0.02 mol/L PBS(pH 7.2~7.6)洗2 min×3次;④采用水浴加热修复抗原;⑤加入5% BSA 封闭液,室温孵育25 min;⑥加一抗(兔抗人雄激素受体,购自博士德公司),4℃过夜,而后PBS洗2 min×3次;⑦加二抗(山羊抗兔IgG,购自博士德公司),37℃孵育25 min,而后PBS洗2 min×3次;⑧加入SABC试剂(SABC试剂盒,购自博士德公司),37℃孵育25 min,而后PBS洗5 min×4次;⑨DBA显色;⑩梯度酒精脱水;⑪二甲苯透明,最后中性树脂封片后光镜下观察。对照实验为空白对照,用0.01 mol/L PBS代替一抗。

## 2 结果与分析

**2.1 雄性拟黑多刺蚁内生殖系统的构造** 雄性拟黑多刺蚁内生殖系统由精巢、输精管、贮精囊、射精管和雄性附腺组成,位于后消化道背面、侧面和腹面。成熟的精巢饱满、球状,每个精巢包含9~12根,呈椭圆形,各自相互分开的精巢小管,最后合并于侧输精管。侧输精管起始端呈扭曲形的环状,后端延伸至于贮精囊(不明显)。输精管是整个雄性生殖器官最长的部分,沿腹部向下后方延伸,第4或第5腹节处渐渐埋于直肠下方,延伸至第5或第6腹节处的输精管开始有稍稍膨大,为贮精囊。雄性附腺发达,位于第4或第5腹节消化道下,左右一对,肾形膨大囊状物,前、后端钝圆,光

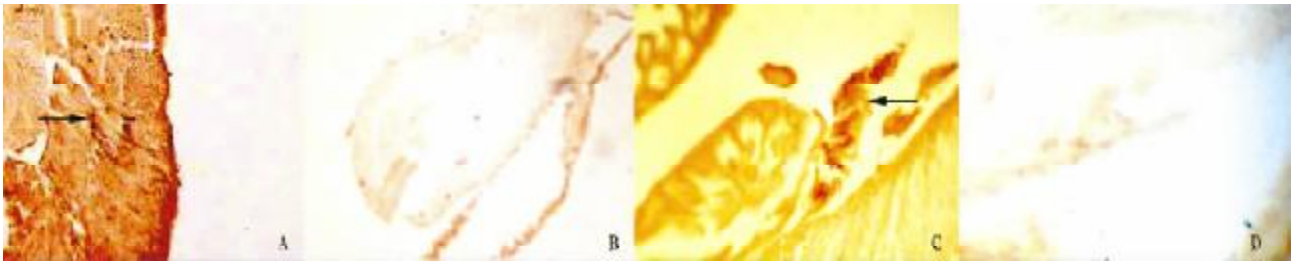
作者简介 詹光杰(1973-),男,湖北鹤峰人,讲师,从事动物生理生化研究。

收稿日期 2009-03-17

滑,质较硬。

**2.1 雄激素受体类似物在性腺上的定位** 免疫组织化学研究结果显示(图1),在拟黑多刺蚁雄蚁性腺中存在有雄激素

受体类似物免疫阳性颗粒的分布,主要分布在雄性附腺与精巢里。对照实验为阴性。



注:A.雄激素受体类似物在雄蚁精巢中的阳性表达分布,×400;B.对照;C.雄激素受体类似物在雄蚁附性腺中的阳性表达分布,×400;D.对照。

Note:A. Positive expression distribution of androgen analogous in aner spermary, ×400;B. CK; C. Positive expression distribution of androgen analogous in aner glandula accessoria, ×400; D. CK.

图1 雄激素类似物在雄性拟黑多刺蚁性腺中的免疫细胞化学定位

Fig.1 Immune cells chemical location of androgen analogous in sex gland of *Polyrhachis vicina* Roger

### 3 讨论

性别是生物的一种重要性状,主要涉及到性别决定(sex determination)和性别分化(sex differentiation)。性别决定是指决定未分化性腺向精巢方向发育,还是向卵巢方向发育的过程;而性别分化则是指建立功能型性别、性别二态型和次级性征的所有形态和生理变化。性别决定和分化通路是由大量的转录因子、生长因子以及环境因子相互作用、协调控制的结果。对于不同动物来说,性别决定机制不尽相同,但在雄性性别分化中,雄性激素都发挥了重要的作用。

(1)哺乳动物中,性别决定的关键是受精时X精子或Y精子与卵子结合,未分化性腺的分化发育是由性染色体复合物(XX或XY)决定的。如人第7周之前,男女两性胚胎的未分化性腺在外观上是无差别的。此后,女性表现型的发育不需要激素,而男性表现型的发育则需要胎儿睾丸激素的存在。大约8周时,胚胎间质细胞开始分泌雄激素,诱导中肾管和外生殖器向男性分化。到青春期时,间质细胞又增多,重新开始分泌雄激素,形成男性的第二性征。胚胎时期睾丸产生的雄激素(睾酮)决定男性性征分化,但胚胎早期女性的性征分化则不依赖激素,在没有卵巢形成的情况下也可以发生女性性征分化。

(2)非哺乳类动物的雄性形成过程中,雄激素同样具有重要的功能。如鱼类中,雄激素能使遗传上的雌性个体雄性化。有研究认为鱼类性腺分化方向取决于哪一类性类固醇激素占优势,而这种平衡的改变能完全改变遗传因素决定的分化通路<sup>[7]</sup>。Cronin首先报道了软甲亚纲优游蟹属雄蓝蟹(*Callinectes sapidus*)具有雄性腺(Androgenic gland),研究发现,高等甲壳动物中,其雄性腺和卵巢产生的性激素能使异性性反转或抑制异性性征发育<sup>[8]</sup>。软甲亚纲雌雄异体的种类,在幼体性未分化时,均有雄性腺原基。若雄性个体是异型配子,其性别决定基因M/m,M基因控制雄性腺的发育,雄性腺原基继续发育,并分泌激素控制精巢和第二性征的发育。在遗传雌性个体中,其性别控制基因m/m,雄性腺原基不发育,生殖原基分化为卵巢,并分泌激素诱导暂时和永久的雌性第二性征;若雌性个体是异型配子,则M抑制雄性腺原基的发育,在雄性个体则不受抑。Sagi认为罗氏沼虾雄性

腺不仅控制第二性征的分化,而且也控制其形态分化<sup>[8]</sup>。李富华等认为雄性腺的破坏对中国对虾雄性交接器(即第二性征)的发育有明显的影晌<sup>[9]</sup>。在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的雄性个体中,雄性腺控制精巢和第二性征的分化<sup>[10]</sup>。此外,利用外源激素也可使一些种类发生性逆转。在给一种雌沙蟹(*Ocypod* SP.)注射丙酸睾丸酮后,可使卵巢分化为精巢。

(3)昆虫的性别决定因物种的不同而不同,传统理论认为昆虫如果蝇的性别分化受到基因的控制,激素不参与其中<sup>[11]</sup>。不过,Naisse证实萤火虫(*Lampyrus noctiluca*)存在性别分化激素<sup>[3]</sup>。这种昆虫的成虫有很明显的性二态现象,其雄性睾丸有一中胚层的顶端组织,而雌性则没有。这一组织在精子发生时即消失,将带有顶端组织的睾丸移植至雌性幼虫体内能使该幼虫的第一和第二性征完全雄性化。同时,所有的节肢动物都具有明显的第二性征。有些种类在刚孵化时就已经表现出来(如蝗虫),有些种类在幼虫发育的第二阶段才表现出来,也有些种类只有在成虫蜕皮之后才表现出来。在外观上,拟黑多刺蚁的雄蚁与工蚁以及雌蚁有明显的区别,雄蚁的个体较小,有翅,尤其是腹末端外生殖器发达、外露;而工蚁与雌蚁体形相对较大,尤其是雌蚁。

(4)在另一种社会性昆虫白蚁的性腺中存在雌激素受体,并且与精子的发生有一定的联系,说明白蚁具有与哺乳动物的下丘脑—垂体—生殖腺轴系相似的脑—生殖腺轴系调节机制。类固醇激素在调解性腺发育和精、卵成熟中起最终执行的作用。

(5)拟黑多刺蚁雄蚁性腺中存在有雄激素受体类似物免疫阳性颗粒的分布,主要分布在雄性附腺与精巢里,说明在拟黑多刺蚁体内存在雄激素类固醇类似物,提示雄激素受体类似物信号通路在调解其精卵发生方面有重要的作用,并且有与脊椎动物类似的性激素调控性征的通路。笔者认为拟黑多刺蚁的性腺发育以及第二性征的形成方面同样受到雄激素受体类似物所介导的信号通路的调解。不过,此激素类似物与脊椎动物的性激素是否同源还未见报道,有待进一步研究。不过,果蝇体内的雌激素受体相关受体(ERR)与人类

(下转第8679页)

100 ml 作为空白样品,按照试验方法进行分析测试,亦未检出目标物。

**2.2 方法检出限** 在未加入氯化钠的纯净水体样品中,需取浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液 4  $\mu\text{l}$  于 5 ml 纯净水样品中进行试验分析,才能检测出环氧氯丙烷。在向纯净水中加入 15.0% 的氯化钠时,需取浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液 2  $\mu\text{l}$  于 5 ml 纯净水样品中进行试验分析才能检测出环氧氯丙烷。而在向纯净水中加入 30.0% 的氯化钠时,仅需取浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液 1  $\mu\text{l}$  于 5 ml 水样品中进行试验分析即可检测出环氧氯丙烷。从上述试验结果对比中可以得出,在水中加入氯化钠时,通过盐析作用可以降低环氧氯丙烷的检出限,而且加入 30.0% 的氯化钠会得到更低的检测限值。

下面的试验即按照上述的试验对比结果,在水体中加入 30.0% 的氯化钠,开展水体中环氧氯丙烷的检测试验的具体分析与验证。取浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液 1  $\mu\text{l}$  于 5 ml 纯净水样品中进行试验分析,平行处理并测定 7 个样品,结果检出浓度分别为:18.2、18.9、19.2、19.1、19.7、17.9、18.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,标准偏差 0.7,方法检出限为 2.6  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,定量检出下限为 7.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。其中,方法检出限 = 标准偏差  $\times t_{(n-1,99\%)}$ ,查表知  $t_{(6,99\%)} = 3.71$ 。

与 GB/T 5750.8-2006 方法相比,该试验采用了吹扫捕集与毛细管色谱柱相结合气相色谱法,检出限低于 GB/T 5750.8-2006(0.02 mg/L)<sup>[3]</sup>。

**2.3 方法精密度** 取浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液 1  $\mu\text{l}$  于 5 ml 纯净水样品中进行试验分析,平行处理并测定 7 个样品,结果检出浓度分别为:18.2、18.9、19.2、19.1、19.7、17.9、18.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,平均值为 18.7  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,标准偏差为 0.7  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,相对标准偏差为 3.7%。

该试验中环氧氯丙烷的相对标准偏差优于 GB/T 5750.8-2006 方法所提供的数据(6.2% ~ 8.3%)<sup>[3]</sup>。

**2.4 方法准确度** 取浓度为 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液 1  $\mu\text{l}$  于

5 ml 纯净水样品中进行试验分析,平行处理并测定 7 个样品,结果样品浓度未检出,加标浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,加标后检出浓度分别为 49.0、51.8、56.3、52.3、48.4、52.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,平均值为 51.4  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,平均回收率为 102.8%。

该试验中环氧氯丙烷的回收率要高于 GB/T 5750.8-2006 方法所提供的数据(96.0%、95.0%)。

**2.5 注意事项** ①环氧氯丙烷具有较强的挥发性,样品不能长期暴露于高温、敞口环境中,若进行浓缩处理,也要注意小心使用旋转蒸发仪等浓缩装置,否则会导致环氧氯丙烷的回收率下降。②水样中加入的氯化钠百分比要稍微高一些,这样才能增加水样中环氧氯丙烷的析出浓度。③由于水样中加入了较多的氯化钠,所以在样品的吹扫过程中要注意收集水样装置的清洁,否则容易导致导管堵塞现象。

### 3 结论

在实验室现有条件下,各项标准曲线、方法检出限、方法精密度、方法准确度等均优于国家标准(GB/T 5750.8-2006)方法和质量控制要求,而且该方法操作简单,检测限低,可以运用该方法开展水体环境中环氧氯丙烷的分析测试项目。

### 参考文献

- [1] WHO. Epichlorohydrin in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality[R]. 2004.
- [2] 朱铭洪. 空气中环氧氯丙烷的新测定方法[J]. 中国卫生检验杂志, 2006(16):680-681.
- [3] 卫生部,中国标准化管理委员会. 生活饮用水标准检验方法有机物指标(GB/T 5750.8-2006)[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
- [4] NEU H J, SPRENGER R. Trace analysis of epichlorohydrin in water samples [J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1997, 359:285-287.
- [5] LASA M, GARCIA R, MILLAN E. A convenient method for epichlorohydrin determination in water using headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography[J]. Journal of Chromatographic Science, 2006, 44: 438-443.
- [6] 曹建明,张文芸. P&T-GC-MS 测定饮用水中痕量有机污染物[J]. 净水技术, 2001, 20(4):39-40.

(上接第 8500 页)

以及鼠类的结构同源性很高,而且类固醇激素在进化上较保守,这可能也说明雄激素受体类似物也具有类似的结构同源性,并且在功能上与脊椎动物相近。

### 参考文献

- [1] JANER G, LEBLANC G A, PORTE C. Androgen metabolism in invertebrate and its modulation by X enoandrogens: a comparative study[J]. Annals of the New York Academy of Science, 2005, 1040(1):354-356.
- [2] 叶海辉, 黄辉祥. 锯缘青蟹视神经节存在雄激素受体[J]. 解剖学报, 2004, 35(5):547.
- [3] DE LOOF A, HUYBRECHTS R. Insects do not have sex hormone: a myth [J]. General and Comparative Endocrinology, 1998, 111(3):245-260.
- [4] MECHOULAM R, BRUEGGEMEIER R W, DENLINGER D L. Estrogen in insects [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1984, 40(9):942-944.
- [5] NOVAK F J, LAMBERT J G. Pregnenolone, testosterone, and estradiol in the migratory locust *migratoria*; a gas chromatographical-mass spectromet-

- rical study[J]. General and Comparative Endocrinol, 1989, 76(1):73-82.
- [6] THORNTON J W, NEED E, CREWS D. Resurrecting the ancestral steroid receptor: ancient origin of estrogen signaling [J]. Science, 2003, 301(5640):1714-1717.
- [7] 周林燕, 张修月, 王寿德. 脊椎动物性别决定和分化的分子机制研究进展[J]. 动物学研究, 2004, 25(1):81-88.
- [8] SAGI A. Effect of androgenic gland ablation on morphotypic differentiation and sexual characteristics of male freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1990, 77:15-22.
- [9] 李富华, 相建海. 中国对虾促雄腺形态结构和功能的初步研究[J]. 科学通报, 1996, 41(15):1419-1422.
- [10] TAKETOMI Y S, NISHIKAWA S J, SHINJI K. Testis and androgenic gland during development of external sexual characteristics of the crayfish *Procambarus clarkia* [J]. J Crust Biol, 1996, 16(1):24-34.
- [11] BEYE M, HUNT G J, PAGE R E, et al. Unusually high recombination rate detected in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*) [J]. Genetics, 1999, 153:1701-1708.