

# 表皮生长因子和前列腺素 E<sub>1</sub> 对小鼠精原细胞增殖的促进作用

王凯明 张大雷\* 米玉玲 曾卫东 张才乔\*\*

(浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

**摘要** 利用生殖细胞-体细胞无血清共培养模型研究了表皮生长因子(EGF)和前列腺素 E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>)对小鼠 A 型精原细胞增殖的影响。A 型精原细胞在 ITS 培养液(添加胰岛素、转铁蛋白和亚硒酸钠的 DMEM)中培养 24 h 后进行 *c-kit*、EGF、表皮生长因子受体(EGFR)、环氧化酶-1 (COX-1) 及环氧化酶-2 (COX-2)的免疫细胞化学检测, 72 h 后测定其形成集落数的情况。结果显示, A 型精原细胞呈 *c-kit* 阳性, EGF、EGFR、COX-1 及 COX-2 主要表达于精原细胞。EGF (10<sup>-7</sup>~10<sup>-6</sup> mol/L) 或 PGE<sub>1</sub> (10<sup>-8</sup>~10<sup>-6</sup> mol/L) 均可显著促进精原细胞集落的形成。此外, 前列腺素(PG)受体拮抗剂 SC19220 (10<sup>-6</sup>~10<sup>-5</sup> mol/L) 可抑制 PGE<sub>1</sub> 对精原细胞的促增殖作用, COX-1 抑制剂 SC560 (10<sup>-7</sup>~10<sup>-5</sup> mol/L) 和 COX-2 抑制剂 NS398 (10<sup>-7</sup>~10<sup>-5</sup> mol/L) 能抑制 EGF 促进精原细胞增殖的作用。因此, EGF 可通过促进局部 PG 的产生而刺激精原细胞的增殖。

**关键词** 表皮生长因子; 前列腺素 E<sub>1</sub>; 精原细胞; 细胞增殖; 小鼠

精子发生是十分复杂的生殖细胞增殖和分化的过程, 受到多种激素、生长因子和细胞因子的精确调控。其中表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是精子发生过程中重要的旁分泌调控因子, 能够刺激精原细胞 DNA 的合成, 促进精原细胞的有丝分裂和集落形成<sup>[1,2]</sup>。体内外研究均表明, EGF 通过其受体(EGFR)促进前列腺素(prostaglandin, PG)合成酶, 即环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX-2)的过度表达, 致使细胞有丝分裂活性的增高<sup>[3]</sup>。因此, EGF 和 PG 可能都参与精原细胞发育的调控。然而, 也有研究表明 EGF 能够抑制 A 型精原细胞的分化<sup>[4]</sup>。

PG 是由细胞膜释放的花生四烯酸通过 COX 途径合成的一类脂类信号介导分子<sup>[5]</sup>。研究表明, PG 在哺乳类体内参与排卵、受精、胚泡的植入、蜕膜化等多种生殖过程的调控。PG 广泛存在于成年人体及其他哺乳动物的睾丸内, 但 PG 在精子发生过程中的作用尚不清楚。COX 是一种 PG 内过氧化物合成酶, 在花生四烯酸转化为 PG 及血栓素的过程中起到关键性作用。COX 具有 COX-1 及 COX-2 两种同功酶。COX-1 广泛表达于各种组织中, 对生理应答进行调控; 而 COX-2 可受细胞因子、生长因子以及肿瘤促进剂的诱导产生。本实验利用小鼠精原细胞-体细胞无血清共培养模型研究 EGF 和前列腺素 E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>)对小鼠 A 型精原细胞体外增殖的影响, 以

揭示这两种重要的局部调控因子对 A 型精原细胞发育的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 生殖细胞分离和培养

ICR 乳鼠由浙江省医学科学院实验动物中心提供。颈椎脱臼法处死 6 日龄小鼠, 取出两侧睾丸, 除去白膜, 分离曲细精管, 经 PBS 和 DMEM 培养液 (Sigma)清洗, 反复吹打曲细精管以去除间质细胞。将组织剪碎形成 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块后用 1 mg/ml 胶原酶(Gibco BRL)在 37 °C 下消化 2 次(10 min、5 min)。经 75 μm 滤网过滤后, 滤液以 1 000 r/min 离心 10 min, 再用新鲜培养液洗涤后用台盼蓝染料排除法计算细胞活率。基础培养液为高糖 DMEM 培养液, 其中添加 1.75 mmol/L Hepes、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 IU/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素。在基础培养液中添加 10 μg/ml 胰岛素、5 μg/ml 转铁蛋白和 3×10<sup>-8</sup> mol/L 亚硒酸钠作为完全培养液(ITS 培养液)。细胞按 5×10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种到 96 孔细胞培养板(Nunc, Denmark), 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培

收稿日期: 2008-03-17 接受日期: 2008-05-06

教育部新世纪优秀人才支持计划资助(NECT-05-0514)

\* 现工作单位: 南昌大学医学院, 南昌 330031

\*\* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-86971976, E-mail: cqzhang@zju.edu.cn

养箱中培养。

## 1.2 药物处理

在细胞培养的同时加入PGE<sub>1</sub> (10<sup>-8</sup>~10<sup>-6</sup> mol/L, 宁波激素制品厂)和EGF (10<sup>-8</sup>~10<sup>-6</sup> mol/L, Cytolab Ltd., Israel)单独或联合进行处理。此外, PGE<sub>1</sub>处理组添加其EP1亚型受体拮抗剂SC19220 (10<sup>-7</sup>~10<sup>-5</sup> mol/L), EGF组添加COX-1合成酶抑制剂SC560或COX-2合成酶抑制剂NS398 (10<sup>-7</sup>~10<sup>-5</sup> mol/L, Sigma, USA)。对照组仅添加ITS培养液。每个处理4孔, 实验重复3次。

## 1.3 细胞形态观察及免疫细胞化学鉴定

在倒置相差显微镜下观察细胞贴壁状况以及细胞形态和集落形成的变化。细胞培养72 h后, 每孔随机取四个视野用显微数字成像系统(Pixera Pro 150ES, USA)拍照, 使用图象分析软件Simple PCI (Compix, Inc., USA)统计贴壁的精原细胞集落的数目及面积。细胞培养24 h后参考已有方法进行*c-kit*、COX-1、COX-2、EGF和EGFR免疫细胞化学鉴定<sup>[6]</sup>。

## 1.4 数据分析

所得数据采用SAS(6.12版本)软件中GLM过程进行方差分析及Duncan's多重分析比较, 检验误差为5%和1%水平。

## 2 结果

### 2.1 精原细胞体外培养状态

刚分离的睾丸内细胞包含生殖细胞和体细胞, 体细胞主要是支持细胞与极少量未除尽的间质细胞。在无血清ITS培养体系中培养5 h后, 支持细胞呈梭状贴在培养板底部, 生殖细胞呈圆形。培养72 h后支持细胞形成平滑的单层平铺在培养板底部, A型精原细胞形成集落状紧贴的支持细胞单层上生长。

### 2.2 免疫细胞化学鉴定

细胞培养24 h后进行*c-kit*、EGF、EGFR、COX-1和COX-2免疫细胞化学鉴定。结果显示, A型精原细胞呈*c-kit*阳性, 支持细胞基本不着色, 阴性对照的生殖细胞和体细胞均不着色, EGF和EGFR主要表达在精原细胞上, 此结果与先前的报道一致<sup>[6]</sup>。COX-1和COX-2免疫细胞化学结果显示, COX-1和COX-2主要表达在精原细胞上, 在支持细胞上亦有少量表达, 阳性精原细胞呈棕红色, 支持细胞浅着色(图1)。

### 2.3 EGF和PGE<sub>1</sub>对精原细胞集落数的影响

细胞培养72 h后, 与对照组相比, EGF (10<sup>-8</sup>~10<sup>-6</sup> mol/L)显著增加精原细胞集落的数目( $P<0.05$ ), 但10<sup>-8</sup> mol/L组刺激的作用不显著(图2A)。PGE<sub>1</sub> (10<sup>-8</sup>~10<sup>-6</sup> mol/L)显著增加精原细胞集落的数目及面积( $P<0.05$ ) (图2B)。

### 2.4 各种抑制剂对EGF和PGE<sub>1</sub>的促精原细胞集

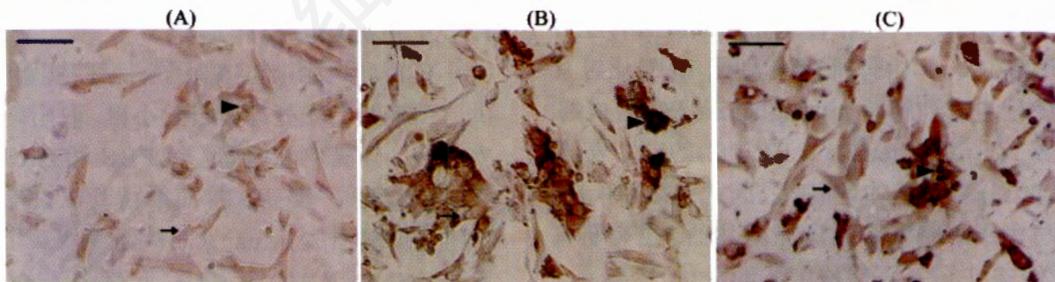


图1 精原细胞COX-1和COX-2免疫细胞化学染色(200×, 标尺50 μm)  
A: 阴性对照; B: COX-1阳性; C: COX-2阳性。▶示A型精原细胞; →示体细胞。

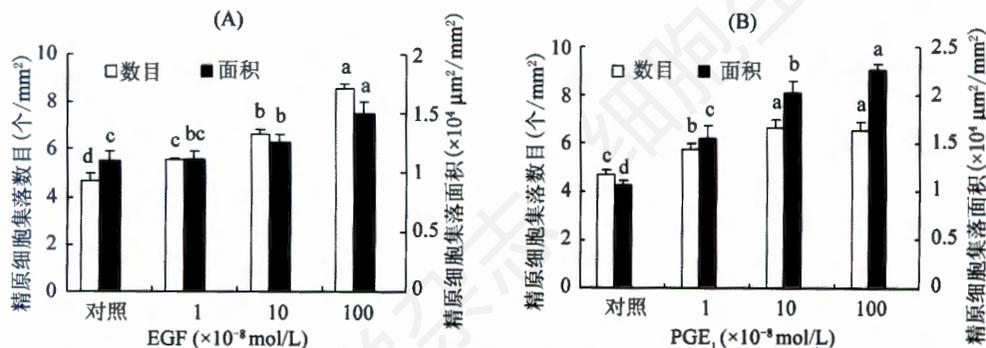


图2 EGF (A)及PGE<sub>1</sub> (B)对精原细胞集落数目和面积的影响  
各组数据均为平均数±标准差(n=4), 不同字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

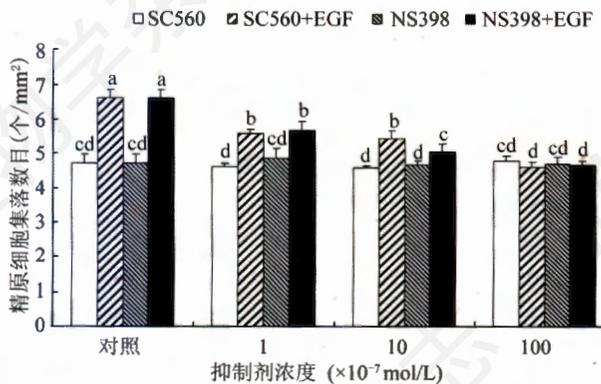


图3 EGF ( $10^{-7}$  mol/L) 联合 SC560 或 NS398 对精原细胞集落数目的影响

各组数据均为平均数 ± 标准差 ( $n=4$ ), 不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

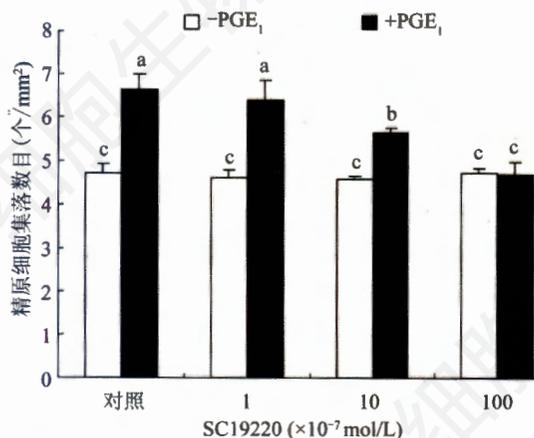


图4 PGE<sub>1</sub> ( $10^{-7}$  mol/L) 联合 SC19220 对精原细胞集落数目的影响

各组数据均为平均数 ± 标准差 ( $n=4$ ), 不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

### 落增殖作用的影响

EGF ( $10^{-7}$  mol/L) 对精原细胞的促增殖作用能够分别被 COX-1 抑制剂 SC560 ( $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$  mol/L) 和 COX-2 抑制剂 NS398 ( $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$  mol/L) 显著抑制 ( $P<0.05$ ) (图 3)。PG 受体拮抗剂 SC19220 ( $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$  mol/L) 能显著抑制 PGE<sub>1</sub> ( $10^{-7}$  mol/L) 对精原细胞的促增殖作用 ( $P<0.05$ ), 但较低浓度的 SC19220 ( $10^{-7}$  mol/L) 作用不明显 (图 4)。

## 3 讨论

在本实验的细胞培养系统中, 因为 6 日龄的小鼠生精上皮只包含 A 型精原细胞和支持细胞, B 型精原细胞从第 8 天开始分化形成<sup>[7]</sup>。c-kit 的表达作为 A 型精原细胞的标记已被广泛接受<sup>[8]</sup>。本实验利用 c-kit 免疫细胞化学结果表明 c-kit 在生殖细胞上表达, 从而

证实了所分离和培养的生殖细胞为 A 型精原细胞。

本实验结果表明, PGE<sub>1</sub> ( $10^{-8}$ ~ $10^{-6}$  mol/L) 能够显著促进精原细胞增殖。近期研究表明 PG 能够通过环氧化酶途径在细胞内自身合成, 并参与调控造血干细胞内环境稳态, 促进干细胞增殖<sup>[9]</sup>。在对第二信使的调节作用上, PGE<sub>1</sub>/PGE<sub>2</sub> ( $10^{-9}$ ~ $10^{-4}$  mol/L) 均能剂量相关地增加细胞内环磷酸腺苷浓度积累量, 最高可达 8 倍于基础生理水平, PGE<sub>2</sub> 还能对胞内游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度进行调控, 而 PGE<sub>1</sub> 主要调控 cAMP- 蛋白激酶 A 系统<sup>[10]</sup>。COX-2 在体细胞与精原细胞中的表达对 PG 的合成起到重要作用<sup>[11]</sup>。在本试验中, PG 受体拮抗剂 SC19220 可抑制 PGE<sub>1</sub> 对精原细胞的促增殖作用, 提示 PGE<sub>1</sub> 可能通过受体途径, 参与细胞内环境稳态调节, 激活 cAMP- 蛋白激酶 A 第二信使系统, 从而促进精原细胞的增殖。

EGF 也称为促有丝分裂因子, 是一种热稳定、含有 53 个氨基酸的多肽, 具有很强的促细胞分裂作用, 对于细胞周期调控、能量代谢、生物合成以及胚胎发育等具有广泛的生物学作用<sup>[12]</sup>。EGF 的促生长功能主要是通过与其细胞膜上的 EGFR 结合而发挥作用的。EGFR 为原癌基因 *cerbB1* 所编码, 并具有酪氨酸激酶活性。当 EGF 与 EGFR 结合时可引起胞浆内 EGFR 酪氨酸蛋白激酶活性迅速提高, 引起细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度上调, 基因转录加速; 同时还能激活蛋白激酶 C 和腺苷酸环化酶, 改变细胞的骨架结构, 促进细胞分化<sup>[13]</sup>。免疫细胞化学结果表明, EGF 及其受体在支持细胞和生殖细胞中都有表达。在本试验中, EGF ( $10^{-8}$ ~ $10^{-6}$  mol/L) 显著促进 A 型精原细胞集落数的增加, 并且这种促增殖作用可被 COX-1 或 COX-2 抑制剂所抑制, 提示 EGF 亦可通过促进局部 PG 的产生而对精原细胞产生促增殖作用。

### 参考文献 (References)

- [1] Wahab-Wahlgren A et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 201: 39
- [2] Anjamrooz SH et al. *Reprod Fertil Dev*, 2006, 18: 709
- [3] Coffey RJ et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 657
- [4] Haneji T et al. *J Endocrinol*, 1991, 128: 383
- [5] Tsuboi K et al. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002, 68-69: 535
- [6] 张大雷等. *细胞生物学杂志*, 2007, 29: 565
- [7] Bellve AR et al. *J Cell Biol*, 1977, 74: 68
- [8] Schrans-Stassen BH et al. *Endocrinology*, 1999, 140: 5894
- [9] North TE et al. *Nature*, 2007, 447: 1007
- [10] Lowe GN et al. *Endocrinology*, 1996, 137: 2208
- [11] Winnall WR et al. *Biol Reprod*, 2007, 76: 759
- [12] 马宏等. *细胞生物学杂志*, 2002, 24: 313
- [13] Fantl WJ et al. *Ann Rev Biochem*, 1993, 62: 453

## Promoting Effects of Epidermal Growth Factor and Prostaglandin E<sub>1</sub> on the Proliferation of Mouse Spermatogonia

Kai-Ming Wang, Da-Lei Zhang\*, Yu-Ling Mi, Wei-Dong Zeng, Cai-Qiao Zhang\*\*

(College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** A serum-free germ-somatic cell coculture model was established to evaluate the effects of epidermal growth factor (EGF) and prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) on the proliferation of mouse type A spermatogonia. Immunocytochemical stains for *c-kit*, EGF, EGF receptor (EGFR), cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) were performed after culture for 24 h and the cell proliferation was assessed after culture for 72 h. The results showed that type A spermatogonia were *c-kit* positive; EGF, EGFR, COX-1 and COX-2 were mainly expressed in spermatogonia; EGF (10<sup>-7</sup>–10<sup>-6</sup> mol/L) or PGE<sub>1</sub> (10<sup>-8</sup>–10<sup>-6</sup> mol/L) treatment significantly increased spermatogonial colony number and area. Furthermore, the promoting effect of EGF on spermatogonia proliferation was diminished by COX-1/COX-2 inhibition, while the effect of PGE<sub>1</sub> was blocked by PG receptor inhibition. The above results suggest that EGF may promote local PGE<sub>1</sub> production to enhance the proliferation of spermatogonia.

**Key words** epidermal growth factor; prostaglandin E<sub>1</sub>; spermatogonia; cell proliferation; mouse

Received: March 17, 2008 Accepted: May 6, 2008

This work was supported by the Ministry of Education of China (NECT-05-0514)

\*Current organization: Medical School of Nanchang University, Nanchang 330031, China

\*\*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971976, E-mail: cqzhang@zju.edu.cn

### *The Anatomical Record* 征稿简则

被美国《科学引文索引》(Science Citation Index, SCI)收录的 *The Anatomical Record* (AR)是一本具有百年历史的、在美国本土出版的老牌生物医学月刊杂志。

近年来, AR 开始关注中国学者的投稿, 并欢迎来自中国高水平的论文。为此, AR 主编、犹他大学教授 Kurt H. Albertine 博士专程访华, 聘请浙江大学基础医学院李继承教授为 AR 副主编, 负责中国区的征稿、组稿、审稿、指定稿件评审人和稿件录用等。

AR 优先发表细胞和分子生物学论著, 尤其欢迎: (1)细胞和分子生物学在形态学和功能学方面的新发现; (2)由于基因缺损、活化、过度表达等对于细胞、组织和器官结构造成的形态学的新发现和功能改变; (3)通过影像模式做出的新发现、新进展等稿件。

AR 不收版面费及彩版费, 稿件刊出率为30%~45%, 编辑部从收到作者来稿到决定录用或退稿最快时间为一个月。来稿具体要求请参阅 *The Anatomical Record* 网页: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117927936/group/home/ForAuthors.html>。

来稿请以网上投稿的方式提交。首先请在以下网页免费建立个人账号: <http://mc.manuscriptcentral.com/ar-wiley>

AR 目前正在组稿编辑淋病学(lymphology)专刊和干细胞(stem cells)专刊(论文要求与AR以往各期一致), 并定于2008年11月14日~16日召开征稿讨论会, 专刊预期于2009年出版, 热诚欢迎相关内容的来稿。具体通知可参见 [www.zjscb.org](http://www.zjscb.org)。

鉴于部分中国作者英语写作水平有限, 不能及时将科研成果发表于国际期刊, AR 中国区办公室决定, 组织精通中英双语的留美专家、学者, 帮助英语写作困难的作者将论文整理并翻译成适合发表的英文论文, 推荐给 AR 发表。

*The Anatomical Record* 中国区办公室地址: 浙江大学医学院56号信箱, 邮编310058; 电话: 0571-88208153; 传真: 0571-88208094; E-mail: [anatomicalrecord@zju.edu.cn](mailto:anatomicalrecord@zju.edu.cn)。

*The Anatomical Record* 中国区办公室

2008年6月