

Nodal 在大鼠卵巢各不同发育时期卵泡中的表达模式

闫利平 李 闯¹ 郭炳冉*

(曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273165; ¹ 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 为探索在卵泡发育过程中 Nodal 的表达规律及其可能的作用机制, 本文应用免疫组化方法检测了 Nodal 在大鼠不同发育时期卵泡中的表达情况。在未成年大鼠中注射孕马血清(PMSG) 12、24、36 和 48 h 后分别收集卵巢, 进行石蜡切片; 分别选取相邻的连续切片, 苏木素-伊红(HE)染色观察PMSG诱导后大鼠卵泡不同发育阶段的形态; 免疫组化方法检测Nodal的表达情况。结果显示, Nodal 在腔前卵泡中未见表达。随着卵泡的增长, Nodal 在有腔卵泡的近卵泡腔颗粒细胞(granulosa cells, GC)的细胞质中表达, 且随着卵泡腔的增大其表达也有所增强, 说明 Nodal 在卵泡腔形成和卵泡生长过程中可能发挥了一定的作用。

关键词 Nodal; 卵巢; 卵泡腔; 颗粒细胞; 大鼠

哺乳动物卵泡发育是一个高度复杂且精密调控的过程。卵泡发育(follicular development)是指卵泡由原始卵泡发育成为初级卵泡、次级卵泡、三级卵泡和成熟卵泡的生理过程。卵泡细胞伴随卵泡抑素(follistatin)的表达由扁平变为立方开始增殖, 随后形成由单层立方形的颗粒细胞和卵母细胞组成的初级卵泡。初级卵泡继续生长成为次级卵泡, 此时卵泡体积更大, 细胞间出现卵泡腔, 腔内充满卵泡液。卵泡液是由卵泡细胞分泌液和卵泡膜血管渗出液组成。卵泡液除含有一般营养成分外, 还有卵泡分泌的类固醇激素和多种生物活性物质, 对卵泡的发育成熟有重要影响^[1]。生长期卵泡发育过程实为颗粒细胞增殖、分化和卵母细胞生长的过程^[2]。

Nodal 是从受精后 7.5 天的小鼠胚胎 cDNA 文库中克隆出来的^[3]。Nodal 是 TGF β 家族成员之一^[4,5], 其通过 II 型和 I 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体复合物和胞内 Smad2/Smad3 与 Smad4 作用入核发挥生物功能^[5]。Nodal 信号在脊椎动物胚胎发育的中、内胚层的诱导以及左右不对称性的建立、神经外胚层沿前后轴线的分化等方面起重要作用^[6,7]。在卵泡的发育过程中, Nodal 影响卵泡颗粒细胞的凋亡。颗粒细胞的凋亡是发育卵泡闭锁的基础^[8,9]。卵泡从腔前卵泡到有腔卵泡的发育取决于卵泡是否具有继续发育的能力还是闭锁, 这都与颗粒细胞的命运有关^[10]。

本文运用免疫组化(immunohistochemistry, IHC)方法检测了 Nodal 在大鼠卵巢不同发育阶段卵泡中的

表达定位, 发现 Nodal 主要定位于近卵泡腔的颗粒细胞细胞质。本研究为从形态学角度探讨 Nodal 在卵泡发育的卵泡腔形成中可能的作用机制提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

21 日龄雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由北京维通利华公司提供。首日接收大鼠, 饲养于标准的环境条件下, 温度 25 °C、光照 12 h、自由采食和进水。

1.2 取材

脱臼法处死大鼠取出卵巢, 将卵巢放于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 分别用 30%、50% 和 70% 酒精脱水各 1 h, 样品在 70% 酒精中置于 4 °C 至石蜡包埋。

1.3 材料包埋与石蜡切片制备

将卵巢从 70% 酒精中取出, 在 80%、90%、100%、100% 酒精中各脱水 1 h; 卵巢在 100% 酒精/二甲苯(1:1)中透明 30 min; 二甲苯透明, 以卵巢完全透明为宜; 卵巢在二甲苯/石蜡(1:1)、石蜡、石蜡中各浸蜡 2 h; 包埋; 将包埋的组织块做常规切片(5 μ m), 在 40 °C 过夜或 50 °C 烘 2 h, 室温保存。

收稿日期: 2009-01-14 接受日期: 2009-05-08

曲阜师范大学“十一五”计划省级重点建设项目资助

* 通讯作者。Tel: 0537-4458508, E-mail: guobingran@mail.qfnu.

edu.cn

1.4 苏木素-伊红染色

切片经二甲苯脱蜡; 分别经 100%、95%、85%、70%、50% 梯度酒精下行复水, 蒸馏水洗涤; 经苏木素染液染色 30~90 s (根据染色程度灵活掌握), 蒸馏水冲洗 10 min, 用含 1% HCl 的酸性酒精分化 3 s, 蒸馏水冲洗 10 min; 用水溶伊红染液染色 10~60 s, 蒸馏水冲洗 10 min; 95% 酒精脱色 45 min, 用 Histmount 封片剂封片。

1.5 免疫组化

石蜡切片经过二甲苯脱蜡和梯度酒精下行复水 (同上), 微波炉抗原修复 (92~98 °C) 15 min (1.8 mmol/L 柠檬酸、8.2 mmol/L 柠檬酸钠, pH 6.0), 自然冷却至室温; 用 3% 双氧水 (甲醇作溶剂) 温育 10 min, PBS 冲洗; 用 5%~10% 二抗同来源的正常血清封闭 30 min; 一抗温育 (兔抗 Nodal 抗体购自美国 Santa Cruz 公司, PBS 稀释) 4 °C 过夜, PBS 冲洗; 生物素连接的二抗温育 30 min, PBS 冲洗; 卵链白素生物素连接的三抗室温温育 20 min, PBS 冲洗; DAB 显色组分提前混合, 避光; 辣根过氧化物酶底物 DAB 显色 5~15 min (视情况而定); 自来水冲洗, 95 % 酒精脱色 45 min, 用

Histmount 封片剂封片。

2 结果

通过 HE 染色和免疫组织化学检测 Nodal 在各个时期卵泡中的表达。HE 染色中, 细胞核被苏木素染为蓝色, 阴性切片背景无色或淡蓝色。免疫组化中, 阳性信号细胞有着黄色或棕黄色反应颗粒, 对照组切片染色阴性, 无黄色或棕黄色染色, 说明免疫组化具有 Nodal 免疫反应的特异性。

如图 1、图 2 所示, 注射 PMSG 后 12 h, 卵泡主要处于腔前卵泡阶段, 有腔卵泡相对较少 (图 1、图 2A); 注射 PMSG 后 24 h, 卵泡开始出现较大腔隙 (图 1、图 2B); 注射 PMSG 后 36 h, 出现较多大腔卵泡 (图 1、图 2C); 注射 PMSG 后 48 h, 卵泡腔很大, 壁颗粒细胞层变得较薄 (图 1、图 2D)。在腔前卵泡中 Nodal 基本无表达; 而在有腔卵泡中, 近卵泡腔的颗粒细胞细胞质中有 Nodal 表达 (图 1E~图 1H), 随着卵泡腔的出现 Nodal 的表达逐渐增强 (图 2E~图 2H)。

如图 3 所示, 在卵泡腔刚出现时, Nodal 开始表达 (图 3A); 而随着卵泡腔的出现和逐步增大, Nodal 信

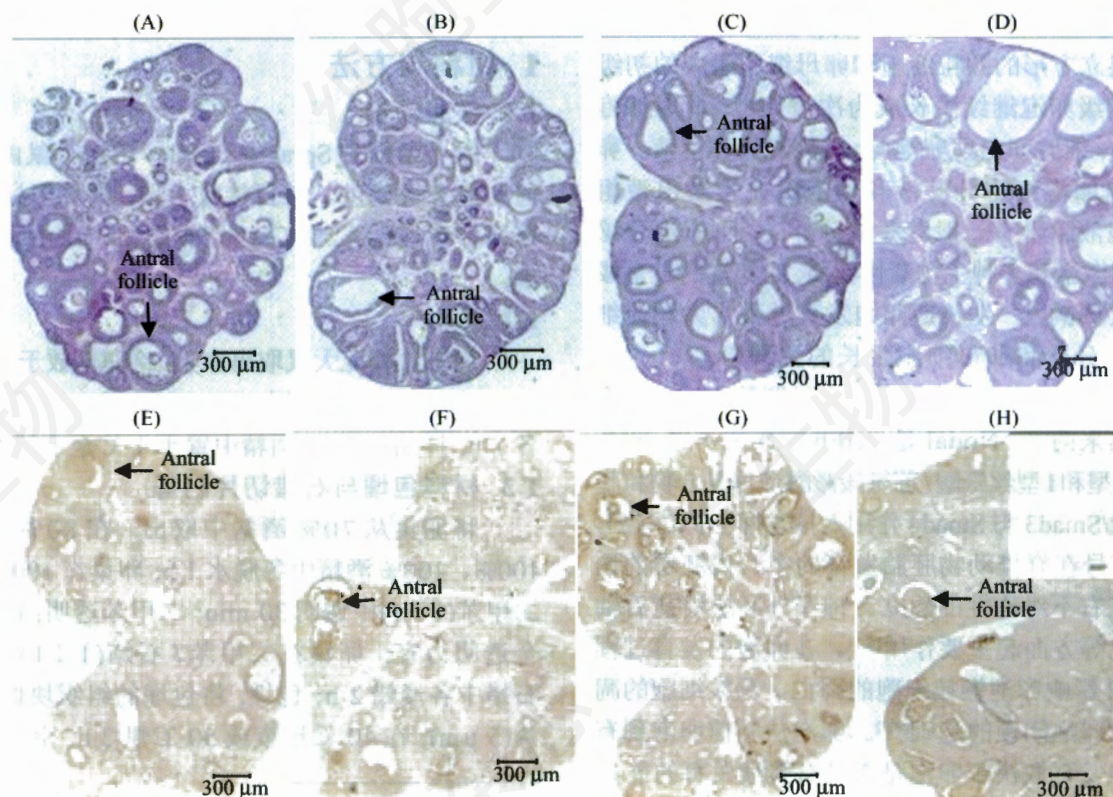


Fig.1 Ovaries from PMSG (10 IU; 12, 24, 36, or 48 h)-primed immature rats were processed for paraffin section

A-D: results of HE staining; E-H: results of IHC. Nodal was immunolocalized using polyclonal anti-Nodal antibody. The upper right corner of H is the negative control. 10×4; bar=300 μm.

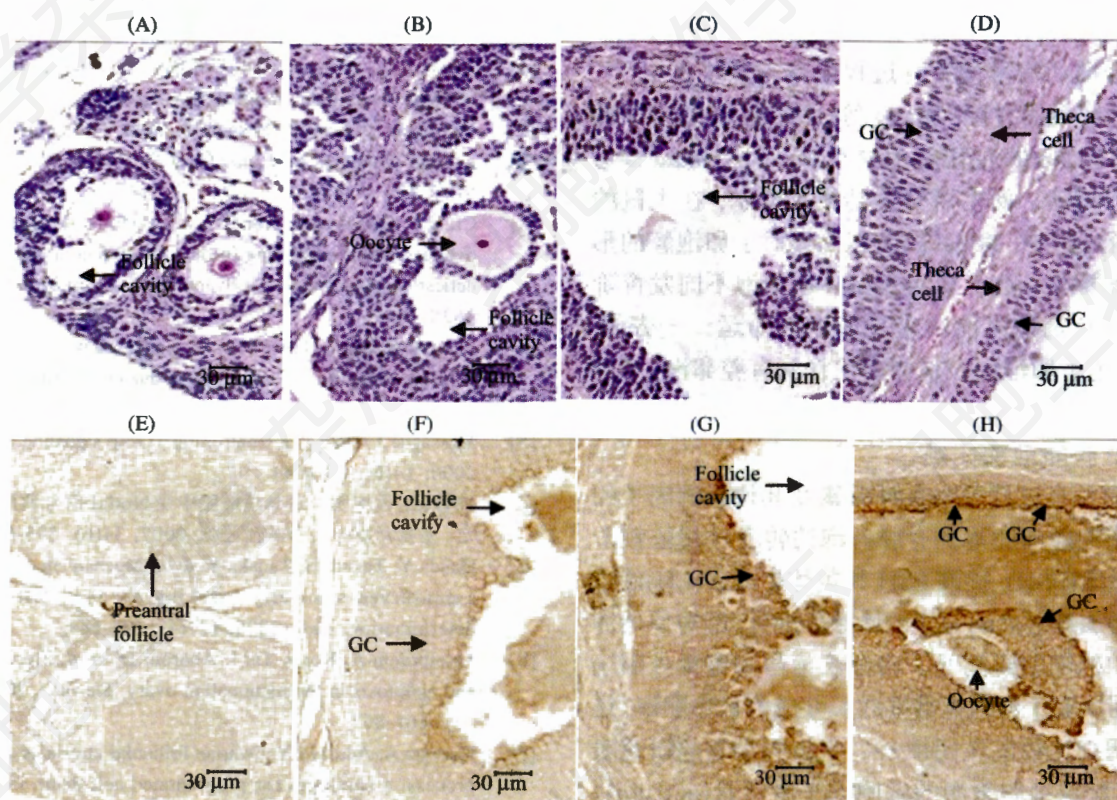


Fig.2 Ovaries from PMSG (10 IU; 12, 24, 36, or 48 h)-primed immature rats were processed for paraffin section

A-D: results of HE staining; E-H: results of IHC. Nodal was immunolocalized using polyclonal anti-Nodal antibody. GC: granulosa cells. 10×40; bar=30 μm.

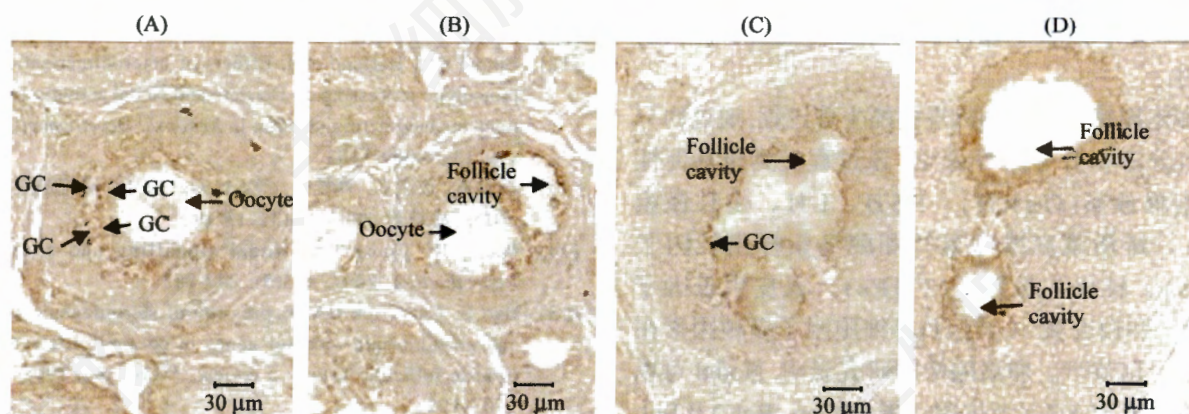


Fig.3 Distribution of Nodal in granulosa cells with the development of follicular cavity

A: follicular cavity appeared; B: follicular cavity increased; C: follicular cavity is larger; D: follicular cavity is gradually shrinking. GC: granulosa cells. 10×40; bar=30 μm.

号强度也有增强趋势(图 3B~图 3D)。

3 讨论

本研究通过 HE 染色及免疫组织化学的方法, 检测了细胞因子 Nodal 在大鼠卵巢卵泡发育过程中不同阶段的表达及定位。结果显示, 在腔前卵泡中 Nodal

基本无表达; 而随着卵泡的进一步发育, Nodal 在有腔卵泡中开始表达, 且表达随着卵泡腔的增大而增强, 这提示 Nodal 可能参与了卵泡发育过程中晚期腔前卵泡到早期有腔卵泡的过渡及卵泡腔的形成。

Nodal 作为早期胚胎诱导信号的关键成分, 参与了中胚层和内胚层的形成、前-后体轴位置的确定

和左-右体轴特化等一系列关键事件^[11,12],表明Nodal信号在脊椎动物早期发育过程中具有重要作用^[13]。在成体的卵巢器官中,Wang等^[14]发现,在卵泡不同的发育时期Nodal的表达部位不同,而且Nodal参与了卵泡的闭锁。而本研究的结果则提示,在大鼠的卵泡发育过程中,Nodal的表达上调对于卵泡腔的形成是很重要的。这就说明Nodal在卵泡不同发育阶段的表达及定位可能决定了卵泡的命运:一方面,Nodal促进了卵泡由腔前卵泡发育到有腔卵泡;另一方面,随着Nodal在有腔卵泡中的进一步表达,其也促进了有腔卵泡的闭锁。

卵泡发育过程受到多种激素及其他影响因子的调控。晚期腔前卵泡到有腔卵泡的转变过程依赖于促卵泡激素(FSH),提高FSH和黄体生成素(LH)的浓度能够增加参与启动募集的原始卵泡数,缩短原始卵泡在库中的停留时间^[15]。内分泌信号和卵巢外因子相互作用决定了卵泡是继续成长并成为优势卵泡,还是通过凋亡途径发生闭锁^[16]。啮齿类动物的研究表明,卵巢颗粒细胞来源的细胞因子激活素(activin)、骨发生蛋白(BMPs)和卵母细胞来源的GDF9、BMP15、BMP6能够与FSH协同作用促进卵巢颗粒细胞的增殖,进而影响晚期腔前卵泡到有腔卵泡的转变过程^[17]。作为与上述细胞因子同一家族的Nodal,有可能在这一过程中发挥了与上述细胞因子相类似的作用。

卵泡闭锁是雌性动物重要的生理过程,通过内分泌、自分泌和旁分泌等途径,该过程受到包括促性腺激素释放素(GnRH)、FSH、LH、生长激素(GH)、雌激素和雄激素等和胰岛素样生长因子(IGFs)、转化生长因子(TGFs)、表皮生长因子(EGF)、和白介素-1(IL-1)等细胞因子多种因素在内的综合调节^[18]。卵巢癌中的研究表明,Nodal可以通过其受体ALK7下调抗凋亡蛋白Xiap、Bcl-2及Bcl-x的表达,同时上调促凋亡蛋白Bax的表达,从而促进卵巢癌细胞的凋亡^[19]。

综上所述,Nodal在卵泡腔形成过程中有一定的伴随表达,且在大腔卵泡的颗粒细胞中,特别是在发育后期将要闭锁及发生闭锁的卵泡中表达更强。因而,Nodal可能与卵泡腔的形成有关,但是Nodal参与调节卵泡腔形成的具体机制还有待于进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Evans AC. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals, *Reprod Dom Anim*, 2003, 38(4): 240-246
- [2] Monniaux D, Huet C, Besnard N, et al. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals, *J Reprod Fertil Suppl*, 1997, 51: 3-23
- [3] Craig J, Orisaka M, Wang H, et al. Gonadotropin and intra-ovarian signals regulating follicle development and atresia: the delicate balance between life and death, *Front Biosci*, 2007, 12: 3628-3639
- [4] Zhou X, Sasaki H, Lowe L, et al. Nodal is a novel TGF-beta-like gene expressed in the mouse node during gastrulation, *Nature*, 1993, 361(6412): 543-547
- [5] Massagué J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling, *Genes Dev*, 2000, 14(6): 627-644
- [6] 孙智慧, 孟安明. 斑马鱼胚胎中受Nodal信号调控基因的鉴定, *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(6): 595-603
- [7] Okada Y, Takeda S, Tanaka Y, et al. Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination, *Cell*, 2005, 121(4): 633-644
- [8] Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D, et al. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary, *Steroids*, 2003, 68(10-13): 861-867
- [9] Hurwitz A, Adashi EY. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues, *Mol Cell Endocrinol*, 1992, 84(1-2): C19-C23
- [10] Jiang JY, Cheung CK, Wang Y, et al. Regulation of cell death and cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia, *Front Biosci*, 2003, 8: d222-d237
- [11] Brennan J, Norris DP, Robertson EJ. Nodal activity in the node governs left-right asymmetry, *Genes Dev*, 2002, 16(18): 2339-2344
- [12] Eimon PM, Harland RM. Effects of heterodimerization and proteolytic processing on Derrière and Nodal activity: implications for mesoderm induction in *Xenopus*, *Development*, 2002, 129(13): 3089-3103
- [13] 杨立新, 郁卫东, 刘桂生, 等. Nodal信号的研究进展, *中国生物工程杂志*, 2003, 23(3): 15-19
- [14] Wang H, Tsang BK. Nodal signalling and apoptosis, *Reproduction*, 2007, 133(5): 847-853
- [15] Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review, *J Anim Sci*, 1998, 76(7): 1903-1921
- [16] Webb R, Campbell BK, Garverick HA, et al. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection, *J Reprod Fertil Suppl*, 1999, 54: 33-48
- [17] Knight PG, Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development, *Reproduction*, 2006, 132(2): 191-206
- [18] Cooke ID, Lenton EA. Folliculogenesis-the natural way, *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 1994, 34(3): 268-271
- [19] Xu G, Zhou H, Wang Q, et al. Activin receptor-like kinase 7 induces apoptosis through up-regulation of Bax and down-regulation of Xiap in normal and malignant ovarian epithelial cell lines, *Mol Cancer Res*, 2006, 4(4): 235-246

The Expression of Nodal in Rat Ovarian Follicles at Different Developmental Stages

Li-Ping Yan, Chuang Li¹, Bing-Ran Guo*

(College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, China; ¹ State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract To examine the expression and the role of Nodal in rat follicles at different stages of development. Pre-mature rats were injected with PMSG (10 IU/rat), and ovaries were collected at 12, 24, 36 and 48 h after injection; Serial sections were prepared for each ovary; The structures of rat ovarian follicles were shown by HE staining after PMSG injection, and the localization of Nodal in rat ovaries was determined by immunohistochemistry. The results showed that Nodal was mainly distributed in granulosa cells close to the follicle cavity. It is suggested that Nodal may play a vital role in the formation of follicle cavity.

Key words Nodal; ovary; follicle cavity; granulosa cells; rat

Received: January 14, 2009

Accepted: May 8, 2009

This work was supported by the 11th Five-year Plan Provincial Key Construction Project of Qufu Normal University

*Corresponding author. Tel: 86-537-4458508, E-mail: guobingran@mail.qfnu.edu.cn