

• 研究简报 •

中华鳖脾脏雄激素受体 mRNA 的原位杂交检测

李梅英, 张莉, 包慧君, 张晖, 柳金雄, 陈秋生

(南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 采用原位杂交技术 (In situ hybridization, ISH) 研究雄激素受体 (Androgen receptor, AR) mRNA 在中华鳖 (*Pelodiscus Sinensis*) 脾脏的存在及细胞定位。取 5 只健康成年中华鳖的脾脏, 进行石蜡切片。用地高辛标记的寡核苷酸探针对组织切片进行原位杂交 (In situ hybridization, ISH), 检测雄激素受体 mRNA 在脾脏免疫细胞内的表达定位。结果显示, 大部分雄激素受体 mRNA 阳性细胞呈圆形或椭圆形, 数量少胞体大且呈不规则形。阳性细胞在脾脏动脉周围淋巴鞘 (Periarterial lymphatic sheath, PALS) 和红髓 (Red pulp, RP) 内分布密集。髓周淋巴鞘 (Periellipsoidal lymphatic sheath, PELS) 内 AR mRNA 阳性细胞分布极少。杂交阳性信号物质在细胞质和细胞核均有分布。在标记为阳性的中华鳖脾脏中, 推测圆形的阳性细胞可能为 B 淋巴细胞, 而另一部分胞体大且形状不规则的阳性细胞则可能为巨噬细胞。脾脏内 AR mRNA 的存在进一步证实雄激素可能是调节脾脏等免疫器官功能的因素之一。[中国水产科学, 2008, 15(2): 337-341]

关键词: 中华鳖; 脾脏; 雄激素受体 mRNA; 原位杂交

中图分类号: Q45, Q959.6

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0337-05

爬行动物属于变温动物, 免疫系统受季节变化影响明显, 季节变化将导致其淋巴器官结构以及白细胞功能的改变^[1]。Leceta 等^[2]推测循环系统内周期性变化的类固醇激素水平可能是导致淋巴器官发生季节性变化的主要原因。雄激素属于类固醇激素, 其生物学作用是通过特异的雄激素受体 (Androgen Receptor, AR) 介导的^[3]。因此, 了解 AR mRNA 在免疫器官内的分布, 对探讨雄激素水平变化影响免疫器官结构及功能变化有着十分重要的意义。目前已有研究证明, 在大鼠、小鼠及人淋巴组织中存在着雄激素受体, 其中研究最多的是在胸腺淋巴组织中^[4]。Lu 等^[5]和 Blazquez 等^[6]均利用 RT-PCR 技术分别在犬和鲈鱼 (*Dicentrarchus labrax*) 的脾脏内检测到了 AR mRNA 的存在。Bruce 等^[7]检测到正常小鼠脾脏中 CD4⁺T 细胞及 Mac-1⁺ 巨噬细胞 AR mRNA 的表达。但迄今为止, 未见到有关爬行动物免疫系统雄

激素受体的报道。本实验采用原位杂交技术, 对中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 脾脏组织内的免疫细胞进行 AR mRNA 的检测, 为研究爬行动物性激素水平与免疫功能的关系提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与样品处理

1 月中旬, 自南京水产市场购买 5 只健康中华鳖, 其中 3 雄 2 雌, 体质量为 350~600 g, 且均已达到性成熟。割断颈部动脉放血后迅速摘取脾脏, 一部分组织置于 4% 多聚甲醛溶液内 4℃ 固定, 4 h 后浸入 15% 蔗糖溶液中, 置 4℃ 冰箱过夜, 次日进行连续冰冻切片, 厚为 12 μm, 用于原位杂交; 另一部分固定于 10% 的福尔马林溶液中, 用于制备常规石蜡切片, 切片厚度为 5 μm, 苏木精-伊红染色。

1.2 探针的设计、合成及标记

首先从 GenBank 中获得巴西红耳龟 (*Trachemys scripta*)、密西西比短吻鳄 (*Alligator*

收稿日期: 2007-05-11; 修订日期: 2007-09-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671513).

作者简介: 李梅英 (1982-), 女, 硕士, 主要从事中华鳖脾脏免疫细胞方面的研究. E-mail: lmy630@126.com

通讯作者: 陈秋生. Fax: 025-84398669; Tel: 025-84395305; E-mail: chenqsh305@yahoo.com.cn

mississippiensis)、变色树蜥 (*Calotes versicolor*) 的雄激素受体的基因序列, GenBank 登录号分别为 DQ848989、AB186356、AF275370。利用 DNA STAR 软件将这几种爬行动物的 AR 基因序列进行比对, 找出同源序列, 在 NCBI 网站中基于巴西红耳龟基因组数据库做 BLAST 分析, 确认该同源序列具有特异性。而后设计出 1 对 AR 寡核苷酸探针, 序列为: 5'-GCAGCAAAGGAGTCGGGCTGGTTGTTGTCATGACC-3' (Antisense), 5'-GGTCATGACAACAACCAGCCCGACTCCTTTGCTGC-3' (Sense)。正义探针序列与红耳龟 AR mRNA 的 209-244nt 相对应。上述 2 条探针由南京基天生物技术有限责任公司合成并用地高辛分别标记。

1.3 原位杂交实验

1.3.1 杂交前组织及实验用品的处理 实验用玻璃器皿及镊子都在实验前 1 日置高温 (240 °C) 烘烤 6 h 以达到消除 RNA 酶的目的。取上述冰冻切片 42 °C 回温 2 h, 切片依次经过 PBS (PH 7.4, 室温, 5 min×2)、0.1 mol/L 甘氨酸 (室温, 15 min×2)、0.3% Triton X-100 (室温, 15 min)、PBS (PH 7.4, 室温, 5 min×2)、1 μg/mL 蛋白酶 K (37 °C 水浴, 30 min)、4% 多聚甲醛 (4 °C, 5 min)、PBS (PH 7.4, 室温, 2×5 min)、0.25% 乙酰胺 (用 0.1 mol/L 三乙醇胺新鲜配制, 5 min) 中漂洗。

1.3.2 预杂交 将不含探针的杂交液 (50% 去离子甲酰胺、5×SSC、5×Denhardt's 液、0.5% SDS、100 μg/mL 变性鲑精 DNA) 滴加于组织切片上, 37 °C 2 h, 封闭非特异性结合位点。

1.3.3 杂交 将含有地高辛标记探针的杂交液 (50% 去离子甲酰胺、5×SSC、5×Denhardt's 液、0.5% SDS、100 μg/mL 变性鲑精 DNA、10% 硫酸葡聚糖和 0.25 μg/mL AR 反义复核苷酸探针) 30 μL 滴加到组织切片上, 封口膜覆盖, 42 °C 湿盒过夜。对照实验: 杂交液中含有地高辛标记的 AR 正义复核苷酸探针 (0.25 μg/mL), 其余步骤均与杂交相同。

1.3.4 杂交后洗涤 切片顺次经 2×SSC (37 °C 15 min×2)、1×SSC (37 °C 15 min×2)、0.5×SSC (37 °C 15 min×2) 洗涤。

1.3.5 免疫学检测 封闭液作用 30 min 后, 组织切片上滴加桥联碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体 (1:500) 约 30 μL, 室温下孵育 2 h, 0.5×PBS (室温 10 min×3) 中漂洗, 硝基四氮唑蓝 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吡啶 (BCIP) 混合液避光显色, 室温孵育 3 h。

1.4 结果判定

雄激素受体的原位杂交实验所得切片分别进行显微镜下观察, 组织切片内细胞显紫蓝色者为阳性细胞。

2 结果与分析

2.1 脾脏形态学观察

脾脏由红髓 (Red pulp, RP) 和白髓 (White pulp, WP) 两部分构成。白髓包括髓鞘周围淋巴鞘 (Periellipsoidal lymphatic sheath, PELS) 和动脉周围淋巴鞘 (Periarterial lymphatic sheath, PALS) (图 I-1)。其中 PELS 的数目多于 PALS, 且前者细胞排列较后者紧密。PELS 中央的动脉为笔毛微动脉, 其内皮细胞呈立方状或矮柱状。中央动脉被 PALS 包裹着, 其内皮为单层扁平上皮 (图 I-2)。

2.2 原位杂交结果

中华鳖脾脏组织内存在 AR mRNA 的阳性细胞, 细胞核及胞浆均呈紫蓝色。脾脏 PALS 内可见密集分布的 AR mRNA 阳性细胞, 并且管腔越大的中央动脉周围的 PALS 内 AR mRNA 阳性细胞越密集, RP 内也存在大量的 AR mRNA 阳性细胞, 但呈弥散状分布 (图 I-3), 而 PELS 内偶尔出现 AR mRNA 阳性细胞 (图 I-4)。大部分 AR mRNA 阳性细胞呈圆形或椭圆形, 少数大且形状不规则 (图 I-5)。杂交阳性信号物质在细胞质和细胞核均有分布。阴性对照的组织切片内未显示免疫阳性 (图 I-6)。

3 讨论

本实验采用原位杂交技术对中华鳖脾脏免疫细胞内 AR mRNA 的分布进行了研究, 结果显示, AR mRNA 存在于中华鳖脾脏免疫细胞内, 从基因水平上证实了中华鳖脾脏免疫细胞内 AR 的存在, 即免疫细胞上存在雄激素结合位点, 从而为雄激素对免疫系统有调节作用提供了理论基础和形态学依据。刘晓柳等^[8-9]采用原位杂交的方法观察到成年雄性大鼠心肌中 AR mRNA 存在于胞浆中, 同时也证实了大鼠心内神经节 AR mRNA 也存在胞浆中。但张宝刚等^[10]发现人脾脏免疫细胞中除胞浆外细胞核内也存在 β-肾上腺素能受体的 mRNA。这与本实验观察到的中华鳖脾脏中 AR mRNA 于细胞质和细胞核中均存在有相似之处。

本实验 AR mRNA 阳性细胞主要分布于 PALS

和 RP 内, 而 PELS 内仅有零星的阳性细胞存在。有研究证明中华鳖脾脏中, B 淋巴细胞主要分布于 PALS 中, RP 次之, 而 PELS 最少^[11-12]。这一结果与本实验得出的 AR mRNA 分布特点基本吻合, 从而推测, 这些 AR mRNA 阳性细胞主要为 B 淋巴细胞。这一结果与 Benten 等^[13]得出的 B 淋巴细胞表达雄激素受体的研究结果一致。根据其分布和形态学特点, 本实验观察到的数量少且呈不规则形的 AR mRNA 阳性细胞可能为中华鳖脾脏的巨噬细胞。这也与 Benten 等^[14]在小鼠试验中发现的巨噬细胞存在雄激素受体的表达的试验结果一致。由此推测, 分布在中华鳖脾脏的 AR mRNA 阳性细胞为 B 淋巴细胞和巨噬细胞。

爬行动物属于变温动物, 其体内性激素水平受季节影响较为明显, 呈现一定的季节性变化。雄性陆龟 (*Gopherus polyphemus*) 血浆中睾酮 (Testosterone, T) 水平从 5 月开始持续升高至 7、8 月份达到最高, 9 月和 10 月略有降低, 但仍高于 5 月水平。而雌性陆龟在 5 月时血浆中 T 就处于较高水平, 6、7 月降低至基础水平, 8、9 月再次升高^[15]。毛伟平等^[16]对中华鳖血浆睾酮水平进行了研究, 结果显示, 血浆睾酮浓度从 4 月开始上升, 但在 5、6 月间有所下降, 到 7 月其浓度迅速上升到最高水平, 而后下降到最低。然而, 受季节影响的不仅是雄激素水平, 其免疫系统受季节变化影响也较大。季节的改变导致免疫器官的组织结构发生改变^[17-19]。爬行动物免疫器官的季节性变化将致使免疫反应发生相应的季节性变化。有人认为变温动物这种免疫反应的改变是由温度及光周期的变化引起的^[20]。但是, 在实验室的恒温条件下, 免疫反应仍然受季节周期的影响^[21], 这提示免疫系统的变化直接受激素和神经内分泌因子分泌的周期影响^[22-24]。中华鳖脾脏白髓的发达程度表现为明显的季节性变化, 5、6、9 月份的白髓比 10、12 和 1 月份的发达, 表现为淋巴鞘壁较厚, 淋巴细胞密集^[25], 中华鳖脾脏组织结构的季节性变化与其血浆中雄激素水平的变化基本一致。本实验从形态学水平证实中华鳖脾脏免疫细胞上存在雄激素的结合位点。由此推测, 体内循环中雄激素水平的季节性变化可能是导致脾脏结构季节性变化的影响因素之一。

参考文献:

- [1] Muñoz F J, De la Fuente M. The effect of the seasonal cycle on the splenic leukocyte functions in the turtle *Mauremys caspica*[J]. *Physiol Biochem Zool*, 2001, 74(5): 660-667.
- [2] Leceta J, Zapata A. Seasonal changes in the thymus and spleen of the turtle, *Mauremys caspica*. A morphometrical, light microscopical study[J]. *Dev Comp Immunol*, 1985, 9(4): 653-668.
- [3] 谭家余. 性激素与免疫系统关系的研究进展 [J]. *西北国防医学杂志*, 2004, 25(5): 369-371.
- [4] de Fougères Nunn E, Greenstein B, Khamashta M, et al. Evidence for sexual dimorphism of estrogen receptors in hypothalamus and thymus of neonatal and immature Wistar rats[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1999, 21: 869-877.
- [5] Lu B, Smock S L, Castleberry T A, Owen T A. Molecular cloning and functional characterization of the canine androgen receptor[J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 226(1-2): 129-140.
- [6] Blázquez M, Piferrer F. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) androgen receptor: cDNA cloning, tissue-specific expression, and mRNA levels during early development and sex differentiation[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 237(1-2): 37-48.
- [7] Bebo B F Jr, Schuster J C, Vandenbark A A, et al. Androgen alter the cytokine profile and reduce of myelin-reactive T cells[J]. *J Immunol*, 1999, 162(1): 35-40.
- [8] 刘晓柳, 吴秀卿, 李光千, 等. 雄性大鼠心肌雄激素受体及其 mRNA 的表达 [J]. *解剖学研究*, 2005, 27(4): 243-245.
- [9] 刘晓柳, 吴秀卿, 李光千, 等. 中老年雄性大鼠内心神经节雄激素受体及其的表达变化 [J]. *神经解剖学杂志*, 2006, 22(1): 85-88.
- [10] 张宝刚, 纪祥瑞, 郭文君. 脾脏免疫细胞内 β -肾上腺素能受体 mRNA 的原位杂交检测 [J]. *潍坊医学院学报*, 2004, 3(26): 173-176.
- [11] 陈秋生, 聂其灼. 中华鳖脾脏白髓的组织结构与组织化学特性 [J]. *甘肃农业大学学报*, 1993, 28(3): 220-223.
- [12] 简纪常. 爬行动物的免疫 [J]. *浙江海洋学院学报*, 1999, 18(3): 153-158.
- [13] Benten W P, Stephan C, Wunderlich F. B cells express intracellular but not surface receptors for testosterone and estradiol[J]. *Steroids*, 2002, 67: 647-654.
- [14] Benten W P, Lieberherr M, Stamm O, et al. Testosterone signalling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages [J]. *Mol Biol Cell*, 1999, 10(10): 339-348.

- 3 113 3 123.
- [15] Ott J A, Mendonça M T, Guyer C, et al. Seasonal changes in sex and adrenal steroid hormones of gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 2000, 117 (2): 299-312.
- [16] 毛伟平, 王昭贤. 中华鳖睾丸、附睾结构和血浆睾酮水平的季节性变化 [J]. 南京师大学报, 1997, 20 (2): 53-57.
- [17] Hussein M F, Badir N, el-Ridi R, et al. Differential effect of seasonal variation on lymphoid tissue of the lizard, *Chalcides ocellatus* [J]. Dev Comp Immunol, 1978, 2 (2): 297-309.
- [18] Hussein M F, Badir N, el-Ridi R, et al. Effect of seasonal variation on lymphoid tissues of the lizard, *Mabuya quinquetaeniata* Licht and *Uromastix aegyptia* Forsk [J]. Dev Comp Immunol, 1978, 2 (3): 469-478.
- [19] Hussein M F, Badir N, el-Ridi R, et al. Lymphoid tissues of the snake, *Spalerosophis diadema*, in the different seasons [J]. Dev Comp Immunol, 1979, 3 (1): 77-88.
- [20] Wright R K, Cooper E L. Temperature effects on ectothermic immune response [J]. Dev Comp Immunol, 1981, 5: 117-122.
- [21] Yamaguchi A, Teshima C, Kurashige S, et al. Seasonal modulation antibody formation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [M]//Solomon J B. Aspects of Developmental and Comparative Immunology. Oxford: Pergamon Press, 1981: 438-484.
- [22] Zapata A, Garrido E, Leceta J, et al. Relationship between neuroendocrine and immune systems in amphibians and reptiles [J]. Dev Comp Immunol, 1983, 7: 771-774.
- [23] Saad A H. Corticosteroids and immune systems of non-mammalian vertebrates: a review [J]. Dev Comp Immunol, 1988, 12 (3): 481-494.
- [24] Saad A H, Nabil M, Raheem K A, et al. Neuroimmunomodulation in reptiles. II. Seasonal changes in immune response and brain monamine levels in the lizard, *Eumeces schneideri* [J]. J Egypt Ger Soc Zool, 1993, A 10: 355-371.
- [25] 陈秋生, 聂其灼. 中华鳖脾脏的显微与亚显微结构研究 [J]. 南京农业大学学报, 1995, 18 (4): 91-97.

ISH detection of androgen receptor mRNA in spleen cells of *Pelodiseus sinensis*

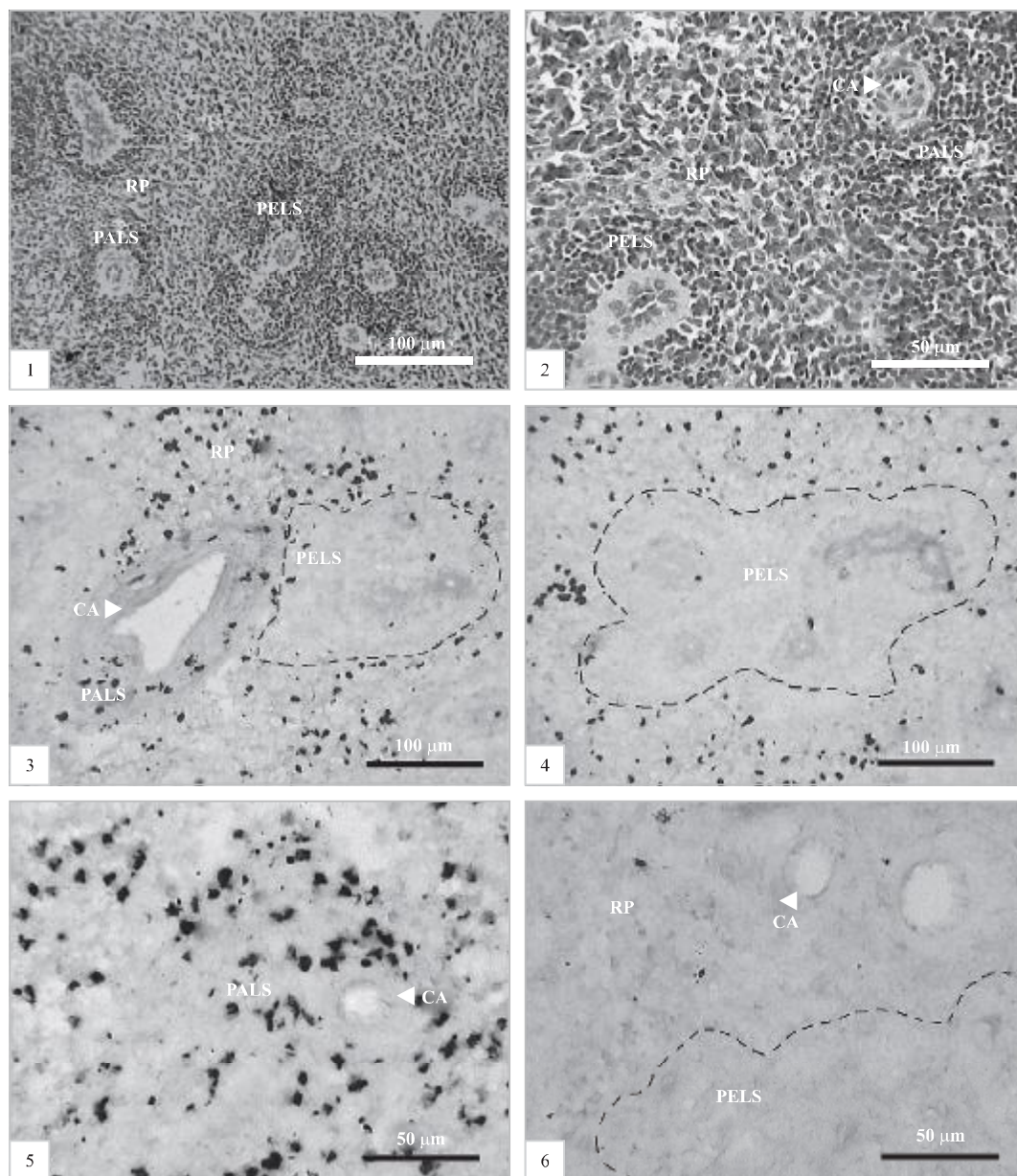
LI Mei-ying, ZHANG Li, BAO Hui-jun, ZHANG Hui, LIU Jin-xiong, CHEN Qiu-sheng

(Nanjing Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Nanjing 210095, China)

Abstract: The reptile's immune system is strikingly affected by seasonal variation, which induces changes in the structure of the lymphoid organs and in the function of the immune cells. Morphological changes of lymphoid organs (thymus and spleen) throughout the year may relate to annual variations of circulating steroid hormones. Androgen is a kind of steroid hormones and may have direct effects on immune system via androgen receptors. Therefore, to study whether androgen receptor mRNA exists in spleen of reptile and its cellular localization is very important. In this study, Paraffin sections of spleen in five healthy *Pelodiseus Sinensis* were made. In situ hybridization (ISH) was conducted on the tissue sections by oligonucleotide probe marked by cardiox. The expressions and localization of androgen receptor mRNA were detected in the cells of spleen tissue. The results of in situ hybridization indicate that the AR positive cell distributing in the periarterial lymphatic sheath (PALS) and red pulp were more than those in the periellipsoidal lymphatic sheath (PELS). The results of this study demonstrate that AR mRNA exists in immune cells of spleen. Most AR mRNA positive cells are round or oval-shap in shape, the others are larger and more irregular. The signals distributed in cytoplasm and nuclei of all positive cells. The results suggest that the round or oval-shap cells might be B lymphocytes, the others might be macrophages. The presence of androgen receptor mRNA in the spleen would provide further evidence that androgen might be one of the factors which influence function of spleen and other immune organs. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2): 337-341]

Key words: *Pelodiseus Sinensis*; spleen; androgen receptors mRNA; in situ hybridization

Corresponding author: CHEN Qiu-sheng. E-mail: chenqsh305@yahoo.com.cn



图版 I

1. 脾脏内椭圆周围淋巴鞘 (PELS)、动脉周围淋巴鞘 (PALS) 及红髓 (RP) (苏木精-伊红染色)。2. 脾脏结构的放大。3. 深染的颗粒为阳性细胞, 动脉周围及红髓内阳性细胞密集, 箭头 (▲) 所指的是中央动脉 (CA); 椭圆周围淋巴鞘几乎无阳性细胞。4. 椭圆周围淋巴鞘处几乎无阳性细胞分布, 虚线勾勒出 PELS 的轮廓。5. 动脉周围淋巴鞘阳性细胞密集, 箭头 (▲) 指的是阳性细胞。6. 阴性对照。

RP: 红髓; PELS: 椭圆周围淋巴鞘; PALS: 动脉周围淋巴鞘; CA: 中央动脉。

Plate I

1. Location of periellipsoidal lymphatic sheath (PELS), Periarterial lymphatic sheath (PALS), and red pulp (RP) in spleen respectively (HE Staining). 2. Higher magnification showing constitution of spleen. 3. Dark staining cells are AR positive cells, The distribution of AR positive cells around the CA (arrowheads) and RP were more than those in the PELS. 4. A light micrograph of a section shows the PELS (outlined), there were no AR positive cells in PELS. 5. PALS have a plenty of AR positive cells (arrows). 6. Negative control.

RP: red pulp; PELS: periellipsoidal lymphatic sheath; PALS: periarterial lymphatic sheath; CA: central artery.