

X射线全身照射对成年小鼠睾丸 Smad4 表达的影响

朱华萍¹ 张远强¹ 齐宇红² 赵洁¹ 赵勇¹ 马静¹ 候武刚¹

¹ (第四军医大学组织学与胚胎学教研室 西安 710032)

² (第四军医大学唐都医院放疗科 西安 710032)

摘要 探讨转化生长因子- β 超家族细胞内信号转导分子 Smad4 在 X 射线全身照射后小鼠睾丸中表达变化及其意义。采用不同辐射剂量 0.1 Gy、0.5 Gy、1.0 Gy、1.5 Gy 和 2.0 Gy 对成年 BALB/c 小鼠进行全身照射,于照射后 16 h、1 周、2 周、3 周、4 周分别取小鼠睾丸组织制备标本,免疫组织化学 ABC 法检测 Smad4 的表达及变化,并通过图像分析技术对实验结果进行统计学分析。正常小鼠睾丸 Smad4 的阳性表达主要集中在间质细胞,支持细胞有少量表达,生精细胞呈阴性反应。照射后各时间点 Smad4 在间质细胞的表达明显减少;而 Sertoli 细胞的表达随剂量增加和时间延长均无明显变化。照射后 16 h 2.0 Gy 组,Smad4 在生精小管的减数分裂前生精细胞内出现少许表达,从第 2 周起,1.0 Gy 和 1.5 Gy 组生精细胞内也出现少量表达;第 3 周,各照射剂量组 Smad4 在减数分裂前精原细胞和精母细胞内呈强阳性反应,持续至第 4 周。统计学分析,随辐射剂量增大,观察时间延长,Smad4 在减数分裂前生精细胞内的表达量逐渐增加。Smad4 在小鼠睾丸不同剂量全身照射后不同时间点表达及分布的变化,表明 Smad4 及其介导的 TGF- β /Smad 信号转导通路参与了小鼠睾丸辐射损伤及损伤修复过程。

关键词 转化生长因子- β , Smad4, X 射线, 小鼠, 睾丸

中图分类号 R811.5, R329

转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族是一类重要的睾丸功能局部调节因子, TGF- β 及其受体在精子发生、发育的过程中起重要调节作用^[1]。Smads (Sekelsky mothers against dpp) 蛋白是 TGF- β 超家族下游一类细胞内信号转导分子,可将信号直接从细胞膜转导入细胞核内,具有转录活化的作用^[2]。目前已证明 Smad1-8 在睾丸中均有表达,具有细胞类型及时空特异性,说明不同 Smads 介导 TGF- β 参与生精过程的不同时相^[3-6]。

Smad4 是 TGF- β 超家族信号转导途径中必不可少的共同中介分子,可与其他 R-Smads (Receptor-regulated Smads, 受体激活的 Smads) 结合,共同转导 TGF- β 、BMPS (Bone morphogenetic proteins, 骨形态蛋白)、Activin (激活素) 等的信号^[7]。实验证实 Smad4 在哺乳动物胚胎发育不同时期具有广泛的表达^[7,8],在睾丸发育的不同阶段及出生后精子生成过程中间质细胞内表达^[9],从而直接或间接影响精子的发生、成熟及整个睾丸的功能^[10],但其在精子发生发育过程中具体的调控机制尚不清楚。

睾丸是辐射敏感器官,小剂量照射就会导致精子减少、不育以及性功能降低^[11]。对辐射损伤机制的研究发现,包括 TGF- β 及其受体在内的许多生长因子和细胞因子在照射后的小鼠睾丸中不同细胞类型中有表达,这些生长因子对辐射造成的损害有修复或加强照射后细胞凋亡或死亡的作用^[12,13]。而且照射后 TGF- β 受体 I 在减数分裂前的生精细胞中的表达减少,而在 Sertoli (支持细胞) 的表达增多,说明对辐射敏感的生精细胞及对辐射相对耐受的间质细胞的改变与 TGF- β 及其受体的作用相关^[12]。但对其下游分子 Smads 在辐射后变化的研究目前甚少。

本实验在对 Smads 蛋白前期研究的基础上,通过在致死剂量以下不同剂量 X 射线全身照射造成小鼠睾丸损伤,观察照射后一定时段睾丸组织中 Smad4 的表达和变化情况,借以分析和探讨 TGF- β /Smads 信号转导途径在睾丸辐射损伤及修复中的作用,为进一步揭示 Smad4 在精子发生发育过程中的具体调控机制提供有益信息。

国家自然科学基金 (30370750) 资助

第一作者:朱华萍,女,1970 年 6 月出生,2000 年毕业于第四军医大学,获实验动物学硕士学位,现为组织学与胚胎学专业在读博士研究生

通讯联系人:张远强

收稿日期:初稿 2005-05-25,修回 2005-07-11

1 材料与方法

1.1 主要试剂

山羊抗 Smad4 多克隆抗体, 生物素标记的兔抗山羊 IgG 抗体为 Santa Cruz 公司的产品。ABC (Avidin Biotin-peroxidase Complex, 生物素-抗生物素复合物) 试剂盒从 Dakopatts 公司购进。DAB (Diaminobenzidine, 3,3 四盐酸二氨基联苯胺) 为 Sigma 公司产品。

1.2 实验动物

健康雄性的成年 BALB/c 小鼠 (6—8 周大, 体重 $20\text{ g}\pm 2.5\text{ g}$) 60 只, 实验前两周购自第四军医大学实验动物中心, 饲养于室温 (22 ± 3) °C, 空气湿度 50% 以上, 饲料垫料均干燥消毒, 标准饲料饮水无限制用。根据照射剂量, 将实验动物分为 0.1 Gy、0.5 Gy、1.0 Gy、1.5 Gy 和 2.0 Gy 5 个照射组, 以非照射正常小鼠为对照。

1.3 照射处理及取材

采用第四军医大学唐都医院放疗科西门子 M2 数字直线加速器 (6MV-X 射线), 对上述五剂量组给予全身照射。

实验动物分别于照射后 16 h、1 周、2 周、3 周和 4 周取材。采用颈脱臼活杀, 立即取出睾丸, 一侧置于 Bouin's 固定液中, 4°C 冰箱固定过夜, 石蜡包埋, 切成 4 μm 厚的标本, 贴于涂有 APES (3-aminopropyltriethoxy-silane, 氨丙基三乙氧基硅烷, Sigma 公司) 的载玻片上, 用于免疫组织化学染色。另一侧保存于 -70°C 低温冰箱中备用。

1.4 免疫组织化学

石蜡切片脱蜡至水, 放入 0.03% 甲醇-双氧水室温孵育 30 min, 用以封闭内源性过氧化物酶。山羊抗 Smad4 抗体 (1:100 稀释), 4°C 冰箱孵育过夜, 生物素标记兔抗山羊 IgG 抗体 (1:200 稀释) 室温孵育 2 h, ABC 复合物 (1:100 稀释) 室温孵育 1 h。各步骤间均用 0.01 mol/L pH 7.3 的 PBS (Phosphate buffered saline, 磷酸盐缓冲生理盐水) 振荡 10 min $\times$ 3 次。DAB 显色 10—20 min, 脱水、透明, 中性树胶封片。用 Olympus BH-2 型光学显微镜观察并摄影。对照实验分别用 0.01 mol/L PBS 和正常山羊血清取代第一抗体进行孵育作为空白对照和替代对照。

1.5 图像分析和统计分析

用 ImageJ 图像分析软件对不同照射剂量, 不同时间观察点的小鼠睾丸的呈 Smad4 免疫阴阳性的生精细胞的灰度值进行测试, 镜下同一倍数 (200 倍) 下每张组织切片, 随机取 4 个面积, 每个面积为 0.015 mm², 随机测定 5 个阳性细胞的灰度值, 用 SPSS10.0 for Windows 统计软件进行统计学分析。所有数据符合正态分布和方差齐性的条件, 各组间采用 *t* 检验, $p<0.05$ 为显著差异。根据平均值 $\pm$ 标准差绘制统计图。

2 结果

2.1 Smad4 在正常成年小鼠睾丸中的表达

免疫组织化学染色结果显示, 正常成年小鼠睾丸中, Smad4 蛋白免疫反应主要集中在睾丸的间质细胞, 免疫反应阳性产物存在于细胞浆中, DAB 染色呈棕褐色, 细胞核中无染色; 生精小管的 Sertoli 细胞中, Smad4 也有少量表达, 免疫染色呈弱阳性。位于生精小管中的各级发育不同阶段的生精细胞呈阴性反应 (见图 1a)。

2.2 Smad4 在全身照射后小鼠睾丸中的表达

在小鼠睾丸组织切面不同部位, 全身照射处理后, Smad4 的免疫反应结果出现了变化: Smad4 在间质细胞中染色强度减弱。在照射后同一观察时段, 照射剂量从 0.1 Gy 到 2.0 Gy, Smad4 在间质细胞中免疫染色强度明显减弱 (见图 1:b—j)。在不同照射剂量和照射后的不同观察时段, Smad4 在 Sertoli 细胞的表达均无明显变化 (见图 1:b—j)。

照射后 16 h, 2.0 Gy 照射组 Smad4 在减数分裂前的生精细胞出现免疫阳性染色 (见图 1:c), 随着照射后观察时间的延长, 阳性细胞数逐渐增加; 第 2 周开始, 1.0 Gy 和 1.5 Gy 照射组 Smad4 也在精原细胞及初级精母细胞出现免疫阳性染色 (见图 1:d—e), 第 3 周, 各照射剂量组 Smad4 在减数分裂前的精原细胞及精母细胞均出现较强的免疫阳性染色 (见图 1:f—h), 并一直持续到第 4 周 (见图 1:i—j)。睾丸切面各级生精小管上皮呈 Smad4 免疫反应的生精细胞的分布区域根据观察时间不同和照射剂量不同而有所不同, 照射后 16 h, 2.0 Gy 照射组 Smad4 主要位于生精小管周边的精原细胞和初级精母细胞 (见图 1:c), 照射后 3 周、4 周, 各照射组 Smad4 主要是位于精子发生的减数分裂前的生精细胞。Smad4 免疫阳性物质位于各级生精细胞的细胞质内, DAB 显色为棕褐色颗粒状物质 (见图 1:f—j)。

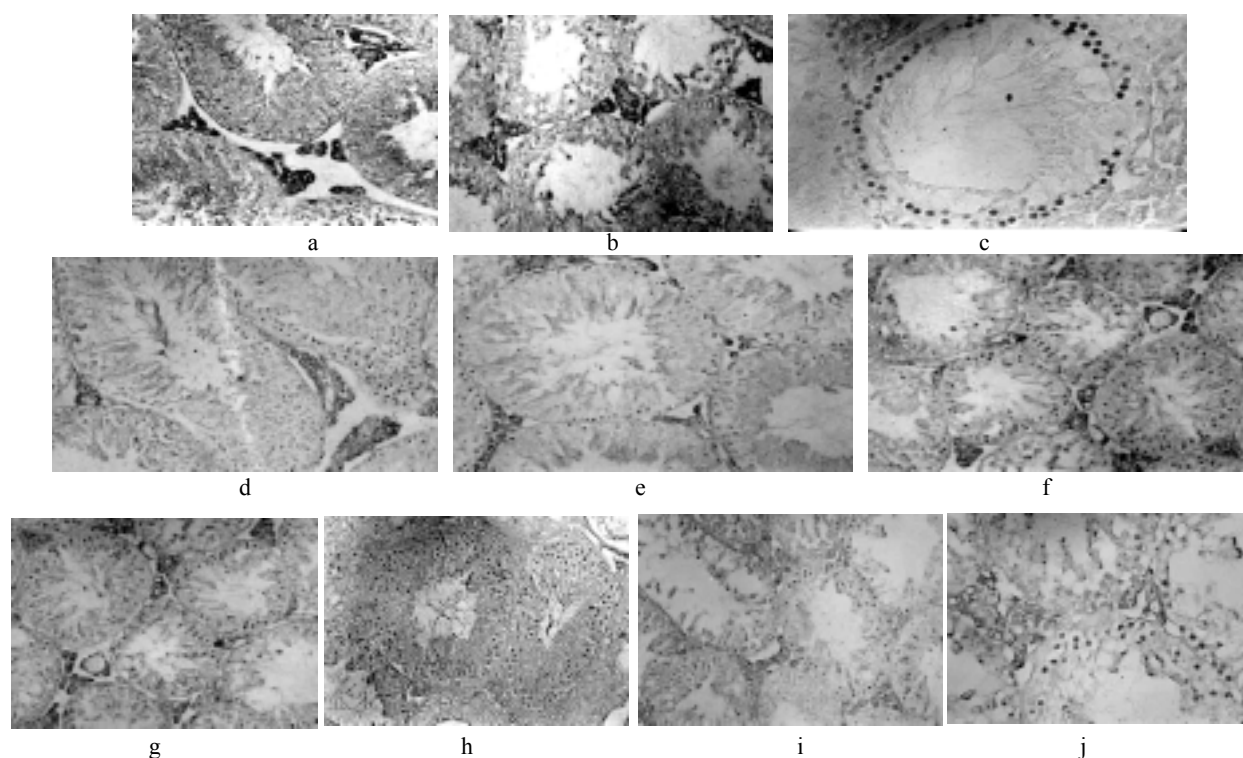


Fig.1 Expression of Smad4 proteins in mice testes

a. Expression of Smad4 in normal adult mice testes $\times 400$; b. Expression of Smad4 in 0.1 Gy group 16 hour after expose $\times 200$, c. Expression of Smad4 in 2.0 Gy group 16 hour after expose $\times 400$; d. Expression of Smad4 in 1.0 Gy group 2 weeks after expose $\times 400$, e. Expression of Smad4 in 1.5 Gy group 2 weeks after expose $\times 200$; f. Expression of Smad4 in 0.1 Gy group 3 weeks after expose $\times 200$, g. Expression of Smad4 in 0.5 Gy group 3 weeks after expose $\times 200$; h. Expression of Smad4 in 1.5 Gy group 3 weeks after expose $\times 200$, i. Expression of Smad4 in 1.0 Gy group 4 weeks after expose $\times 200$; j. Expression of Smad4 in 2.0 Gy group 4 weeks after expose $\times 400$

2.3 图像分析及统计分析结果

根据免疫组织化学染色结果进行图像分析和统计分析,不同剂量组的不同观察时间段的 Smad4 蛋白表达量进行组间 t 检验。同一剂量照射,在照射后不同观察时段,Smad4 在睾丸间质细胞的染色各照射组与正常小鼠染色强度减少极其明显,故未作灰度值测定和统计学分析;同一时间段,不同照射剂量组间两两比较 Smad4 在睾丸生精细胞系列的染色,在照射后 16h 和 1 周时,0.1 Gy 组与 2.0 Gy 组有显著差异 ($^{(2)} p < 0.05$);照射后 2 周时,各照射组间无显著差异 ($^{(2)} p > 0.05$);照射后 3 周、4 周时,0.1 Gy 组、0.5 Gy 组与 1.0 Gy 组、1.5 Gy 组、

2.0 Gy 组比较,有显著差异 ($^{(2)} p < 0.05$) (见表 1 和图 2)。

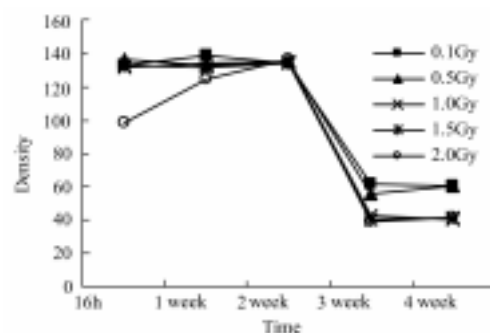


Fig.2 Time-effect and dose-effect relationship of Smad4 protein expression in mice testis in five groups during 5 time points after whole-body irradiation

Table 1 Content of Smad4 protein immunoreactive product in mouse testis in five groups during 5 time points after whole-body irradiation (mean $\pm$ SE) Sample size: $n=20$, t -test: between irradiation groups

Dose / Gy	16 h	1 week	2 week	3 week	4 week
0.1	133.135 $\pm$ 6.723 $^{(2)}$	138.890 $\pm$ 13.296 $^{(2)}$	134.251 $\pm$ 12.589 $^{(1)}$	61.209 $\pm$ 7.155 $^{(1)}$	60.742 $\pm$ 6.175 $^{(2)}$
0.5	136.280 $\pm$ 11.295 $^{(1)}$	132.931 $\pm$ 12.191 $^{(1)}$	134.684 $\pm$ 11.712	56.220 $\pm$ 6.455 $^{(1)}$	60.655 $\pm$ 6.314 $^{(2)}$
1.0	131.628 $\pm$ 9.810 $^{(1)}$	134.297 $\pm$ 11.511 $^{(1)}$	135.079 $\pm$ 11.474	42.443 $\pm$ 3.937 $^{(2)}$	40.832 $\pm$ 4.822 $^{(1)}$
1.5	133.046 $\pm$ 11.363 $^{(1)}$	131.704 $\pm$ 12.518 $^{(1)}$	134.446 $\pm$ 12.105	40.309 $\pm$ 4.574 $^{(2)}$	41.338 $\pm$ 5.374 $^{(1)}$
2.0	97.896 $\pm$ 12.398 $^{(2)}$	123.863 $\pm$ 12.09 $^{(2)}$	136.241 $\pm$ 12.333	39.660 $\pm$ 4.959 $^{(2)}$	41.039 $\pm$ 5.242 $^{(1)}$

$^{(1)} p > 0.05$, $^{(2)} p < 0.05$

3 讨论

放疗已广泛应用于肿瘤治疗,但患者在原发病恢复的同时经常出现精子减少或不育的问题^[14]。目前,辐射所致雄性生殖系统损伤的组织学、形态学改变已经比较明确^[15,16],主要是生精上皮、附睾上皮、生精小管上皮出现超微结构改变,破坏睾丸生精过程,并导致初级精母细胞、早期和晚期精子细胞的形态学异常等;停止照射后一段时间,这些改变可根据照射剂量的不同而出现不同程度的恢复^[17,18]。但是,辐射造成这些病理损伤的分子机制尚不清楚。

目前已有实验证明, TGF- β 超家族及其受体在正常哺乳动物的睾丸中有表达,而且,在全身照射或睾丸局部照射后也有表达,并且随着照射强度的改变和照射后观察时间的不同而表达及分布有所不同^[12]。但它们在精子发生发育过程中的具体作用,以及在睾丸辐射损伤及修复过程中的调控机制尚不清楚。为了揭示 TGF- β 超家族成员及其受体这一调节作用的内在机理,有必要更多地了解在辐射造成睾丸损伤及损伤修复过程中, TGF- β 超家族成员及其受体的表达及细胞应答情况。因此,对 TGF- β 信号转导的下游分子 Smads 研究,可为进一步阐明 TGF- β 超家族的作用机理和信号转导途径提供直接证据。

本研究采用致死剂量以下五个不同辐射剂量对小鼠进行全身照射,在照射后五个不同时间段观察和检测 Smad4 在小鼠睾丸的表达及定位分布进行免疫组织化学染色。结果显示,照射后各时间段 Smad4 在小鼠睾丸间质细胞的表达均明显减少;在支持细胞的表达无明显变化。本实验中与正常小鼠截然不同的是,在辐射后, Smad4 在睾丸生精小管内的各级生精细胞中出现表达,而且随着照射剂量的增加,表达量增加,随着观察时间延长,在精原细胞和初级精母细胞的表达量增多,其表达量的变化及定位分布的不同,说明 Smad4 在全身照射造成睾丸损伤及损伤修复过程中起不同作用。

首先,在正常小鼠睾丸组织中, Smad4 主要表达在间质细胞及少量支持细胞,这种分布可能与 Smad4 参与间质细胞合成、分泌雄性激素及相关因子的不同功能状态,以及间接调控周围生精小管中的不同时相的生精细胞的发育有关。但在照射后,这种功能状态受到影响,已有实验证明,睾丸组织中的非生殖细胞(指间质细胞和支持细胞)具有相对的辐射耐受性,在照射剂量 ≤ 4 Gy 时,其形态及细胞生化活性不会受到明显的改变^[19]。而本实验选择的几个辐射剂量都相对较小, Smad4 在间质细胞

中的表达减少是相对而言,因为辐射后有大量的 Smad4 在生精细胞中表达。 Smad4 在小鼠睾丸 Sertoli 细胞的表达随照射剂量的增大和观察时间的延长无明显变化。可能由于包括 Sertoli 细胞在内的睾丸非生殖细胞对辐射相对耐受, 3Gy 以内的辐射剂量不会造成睾丸 Sertoli 细胞的明显损伤^[19]。

不同的是,辐射造成睾丸生精细胞表达 Smad4,主要是对辐射敏感的减数分裂前的生精细胞影响较大。而且分布和表达随照射剂量和观察时间段的不同而改变。在照射后 16h, 2.0Gy 组的睾丸组织切片中的生精小管内可见 Smad4 的阳性反应物质,主要位于减数分裂前的精原细胞和初级精母细胞。随着观察时间延长,到第 3 周、第 4 周,各个剂量组的减数分裂前生精细胞均出现 Smad4 阳性颗粒。其分布及表达有所不同,有的分布在靠近管腔周边的精原细胞和初级精母细胞,有的则分布在不同时相的精母细胞,但精细胞和成熟的精子均为阴性反应。 Smad4 在不同时相生精细胞中的表达,推测其参与辐射损伤生精上皮的病理变化过程,导致生殖细胞减少及不育,而且 Smad4 可能与一些细胞因子共同作用,促进辐射早期生精细胞凋亡或死亡。先前的研究已证明,电离辐射可以选择性地造成减数分裂前的生精细胞的凋亡,而且凋亡细胞的数量随辐射剂量的增加而加强^[13]。

照射后第 3 周、第 4 周,正是小鼠生精上皮新的一波生精过程的开始。在这一时段,各个剂量组的减数分裂前精原细胞、精母细胞均出现 Smad4 强阳性免疫反应。这一现象说明, Smad4 作为 Smads 家族共同中介型的信号转导分子,是 TGF- β S 和 BMP 等信号转导通路必需的中介分子^[2],此时在生精细胞中的强表达,显示出其与不同的磷酸化的 R-Smads 结合形成异聚体增多,转移入核内调节基因的转录,在精子发生和发育的过程中直接或间接发挥重要调节作用。

综上所述, Smad4 在辐射后的小鼠睾丸的表达定位发生改变,揭示了其在睾丸辐射损伤及损伤修复过程中具有重要的调控机制,主要表现为在辐射损伤早期参与减数分裂前生精细胞的损害,以及在新一波的生精过程中与其他因子共同作用于生精细胞,直接或间接调节精子的发生和发育。至于 Smad4 通过何种途径、如何介导生精细胞凋亡或促进辐射生精细胞减少的具体机制,以及如何与其他因子结合调节生精过程,目前知之甚少,还需进一步研究。

参考文献

- 1 Olaso R, Pairault C, Habert R. *Histochem Cell Biol*, 1998, **110**(6): 613-618
- 2 Susumu Itoh, Fumiko Itoh, Marie-José Goumans, *et al.* *Eur J Biochem*, 2000, **267**(24): 6954-6967
- 3 Hu J, Zhang YQ, Liu XP. *Asian J Androl (China)*, 2003, **5**(1): 51-55
- 4 Wang R A, Zhao G Q. *Biol Reprod*, 1999, **61**(4): 999-1004
- 5 Luukko K, Ylikorkala A, Makela T P. *Mech Dev*, 2001, **101**(1-2): 209—212
- 6 Xu J, Beyer A R, Walker W H, *et al.* *J Androl*, 2003, **24**(2): 192-200
- 7 Reinhart B Billiar, J Benjamin St Clair, Nicholas C Zachos, *et al.* *Biol Reprod*, 2004, **70**(3): 586—592
- 8 Chu G C, Dunn N R, Anderson D C, *et al.* *Development*, 2004, **131**(15): 3501-3512
- 9 张远强, 胡 静, 刘新平, 等. *实验生物学报*, 2002, **35**(1): 7-14
ZHANG Yuanqiang , HU Jing, LIU Xinping, *et al.* *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 2002, **35**(1): 7-14
- 10 Narula A, Kilen S, Ma E, *et al.* *Am J Pathol*, 2002, **161**(5): 1723-1734
- 11 Songthaveesin C, Saikhun J, Kitiyanant Y, *et al.* *Asian J Androl (China)*, 2004, **6**(4): 331-336
- 12 Mauduit C, Siah A, Foch M, *et al.* *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, **50**(1): 203-212
- 13 Hasegawa M, Zhang Y, Niibe H, *et al.* *Radiat Res*, 1998, **149**(3): 263-70
- 14 Colpi G M, Contalbi G F, Nerva F, *et al.* *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004, **113** Suppl: S2-S6
- 15 Centola G M, Keller J W, Henzler M, *et al.* *J Androl*, 1994, **15**(6): 608-613
- 16 Van der Meer Y, Huiskamp R, Davids J A, *et al.* *Radiat Res*, 1992, **130**(3): 296-302
- 17 Jagetia G C, Krishnamurthy H. *Mutat Res*, 1995, **332**(1-2): 97-107
- 18 Jacquet P. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2004, **18**(2): 106-114
- 19 Pinon-Lataillade G, Viguier-Martinez M C, Touzalin A M. *Reprod Nutr Dev*, 1991, **31**(6): 617-629

Expression and localization of Smad4 protein in mouse testis after whole-body X-ray irradiation

ZHU Huaping¹ ZHANG Yuanqiang¹ QI Yuhong² ZHAO Jie¹ ZHAO Yong¹ MA Jing¹ HOU Wugang¹

¹ (Department of Histology and Embryology, Fourth Military University, Xi'an 710032)

² (Department of Radiotherapy, Tangdu Hospital, the Fourth Military University, Xi'an 710032)

ABSTRACT The work is to determine whether and where Transforming growth factor-betas downstream Signaling molecule Smad4 is expressed in the testes after whole-body X-ray irradiation and shed light on the mechanisms of Transforming growth factor-betas/Smad signal pathway mediates cell fate decisions following X-ray exposure. Five groups of adult BALB/c mice, with ten mice in each group, received whole-body of X-ray at dose levels of 0.1 Gy, 0.5 Gy, 1.0 Gy, 1.5 Gy and 2.0 Gy. They were sacrificed at 16 hour, 1 week, 2 weeks, 3 weeks and 4 weeks after the irradiation. Cellular localization and expression changes were examined by immunohistochemical ABC method. Quantitative analysis of the immunostaining was made by an image analysis system. In the seminiferous tubules, the expression of Smad4 was modulated by irradiation. The immunostaining showed that 16 hour post-irradiation, there was a significant decline in the Leydig cell, and it was dose and time depended. In addition, the immunolocalization showed that Smad4 was not exclusively localized in the cytoplasm of Leydig cells, but also localized in various Stages of spermatogenesis after the exposure, especially in premeiotic spermatogonia and primary spermatocytes. There was just a little expression in the 2.0 Gy group 16 h after the irradiation and the 1.0 Gy and 1.5 Gy groups at 2 weeks after the irradiation. Therefore in the 0.1 Gy to 2.0 Gy groups at 3 weeks after the irradiation, the immunostaining positive cells were significantly increased in spermatogonia and primary spermatocytes. There was no significant change in sertoli cells with different doses and different times after the exposure. The different expression patterns and change by dose and time of Smad4, suggest that TGF- β /smad signal pathway may affect aspect after X-ray impairment and Smad4 may play an important role during these periods.

KEYWORDS Transforming growth factor- β , Smad4, X-ray, Testicular cells, Mouse

CLC R811.5, R329