

电磁脉冲辐射对小鼠睾丸 Smads 表达的影响

纪欣欣 侯武刚 赵洁 赵勇 李伟 张远强

(第四军医大学基础部组织学与胚胎学教研室 西安 710032)

摘要 探讨转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族细胞内信号转导分子 Smads 在电磁脉冲辐射后成年小鼠睾丸中的表达变化及其意义。采用场强为 400kV/m 的辐射场对成年 Balb/c 小鼠进行全身照射, 于照射后 1、7、14、21、28d 分别取小鼠睾丸组织制备标本, 免疫组织化学 ABC 法检测 Smad4、Smad1 和 Smad5 的表达及变化, 并通过图像分析系统以及统计学软件对实验结果进行统计学分析。结果显示辐射组小鼠 Smad4、Smad1 和 Smad5 在睾丸中的表达部位发生了细胞和时期特异性的变化, 表达强度也发生了显著变化。结果提示 Smad4、Smad1 和 Smad5 及其介导的信号转导通路在小鼠睾丸辐射损伤及其修复过程中可能发挥了重要作用。

关键词 Smads, 骨形成蛋白, 电磁脉冲, 小鼠, 睾丸

中图分类号 R818, Q492.4, R594

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, 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^[1]。Smads 在睾丸中表达具有细胞类型及时空特异性, 可介导上游分子参与生精过程的不同时相^[2-5]。

电磁脉冲 (Electromagnetic pulses, EMP) 是几乎包含电磁波谱的所有频段的电磁波。本室前期研究发现, 一定强度的 EMP 可直接造成小鼠支持细胞和血-睾屏障的损伤^[6], 但其作用机制尚不清楚。本研究拟观测 EMP 照射后 Smad1、Smad4 和 Smad5 在小鼠睾丸的表达变化, 并进一步分析和探讨 TGF- β 超家族 / Smads 信号转导途径在睾丸辐射损伤及修复中的作用, 为揭示 Smads 在 EMP 照射后精子发生发育过程中的具体调控机制提供信息。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

10 周龄雄性 Balb/c 小鼠 40 只, 体重 (28 $\pm$ 1) g, 购自第四军医大学实验动物中心。随机分为 400kV/m 照射组与假照射对照组各 20 只。各组小鼠分别在照射后 1、7、14、21、28d 各取 4 只处理。

1.2 照射条件

将照射组小鼠装入有机玻璃盒内, 垂直至于辐射场中, 接受场强为 400kV/m 的 EMP 全身照射, 脉冲前沿 3ns, 半宽 340ns, 脉冲间隔 25s, 共计 200 个 EMP, 对照组小鼠置于相同的环境中假照射。

1.3 主要试剂

山羊抗 Smad4、Smad1 和 Smad5 多克隆抗体, 生物素标记的兔抗山羊 IgG 抗体均为 Santa Cruz 公司的产品。生物素-抗生物素复合物 (Avidin Biotin-peroxidase Complex, ABC) 购自 Dakopatts 公司。DAB (Diaminobenzidine, 3, 3 四盐酸二氨基联苯胺) 为 Sigma 公司产品。

1.4 免疫组织化学 ABC 法

各组小鼠颈椎脱臼活杀, 取双侧睾丸, Bouin's 液固定 24h, 常规脱水石蜡包埋, 切成 4 μ m 厚的标本, 贴于涂有 APES (3-aminopropyltriethoxy-silane, 氨丙基三乙氧基硅烷, Sigma 公司) 的载玻片上备用。石蜡切片脱蜡至水, 0.03% 甲醇-双氧水室温孵育 30min, 封闭内源性过氧化物酶; 1:100 稀释的山羊抗 Smad4、Smad1 和 Smad5 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜; 生物素标记兔抗山羊 IgG 抗体 (1:400 稀释) 室温孵育 2 h; ABC 复合物 (1:300 稀释) 室温孵育 1h。以上各步骤间均用 0.01mol/L

国家自然科学基金 (30370750)、全军医药卫生科研基金 (01MA183) 资助

第一作者: 纪欣欣, 女, 1982 年 1 月出生, 2004 年毕业于第四军医大学, 目前为该校硕士研究生, 组织胚胎学专业
通讯联系人: 张远强

收稿日期: 初稿 2006-06-20, 修回 2006-08-08

pH 7.2 的 PBS 振洗 10min/3 次。DAB 显色以镜下观察为准,脱水、透明,中性树胶封片。用 Zeiss 光学显微镜观察并摄相。用 0.01mol/L PBS 和正常山羊血清取代一抗进行孵育分别作为空白对照和替代对照。

1.5 结果判定与图像分析

参照 Russell 和我室改进的小鼠生精周期判定标准,小鼠生精过程经历四个半生精周期,每个生精周期内的生精上皮按发生早晚在生精小管基底面到近腔面依次排列,形成 12 个生精时相^[7]。据此在苏木精复染切片上对每种抗体染色结果进行生精周期分析,划定其表达区间。

用 Image-Pro Plus (Zeiss) 软件进行灰度分析,200 倍下每张组织切片,随机取 4 个面积,每个面积为 0.015mm×0.015mm,随机测定 5 个阳性细胞的灰度值,采用 Excel 统计软件以 $\bar{x} \pm s$ 作折线图;用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,所有数据符合正态分布和方差齐性的条件,用方差分析检测, $p < 0.05$ 为显著差异。

2 免疫组织化学结果

2.1 Smad4

在正常成年小鼠睾丸中,Smad4 免疫反应主要集中在间质细胞胞质,在 Sertoli 细胞中也有少量表达,而各级生精细胞未见阳性表达(见图 1)。EMP 照射后 Smad4 在间质细胞中的表达明显减弱,照射后 1d 和 7d,Smad4 在近管腔的精子细胞中呈强阳性表达,并且在少量初级精母细胞中也有较弱表达(见图 2);照射后 14d 至 28d,可见 Smad4 在生精小管中粗线期精母细胞胞质以及近管腔的精子细胞呈强阳性表达。图象分析显示(见图 3),Smad4 在照射后 7d、14d 和 21d 组在间质细胞胞质表达强度较对照组显著降低($p < 0.05$)。

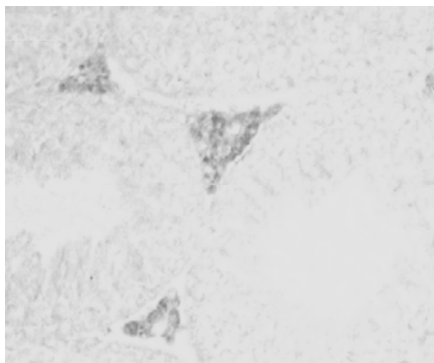


Fig.1 Expression of Smad4 in normal adult mice testes, Immunohistochemical method×400

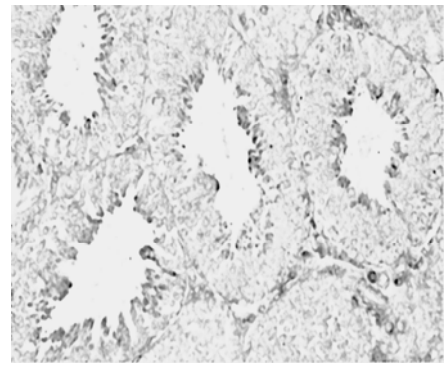


Fig.2 Expression of Smad4 at 7days after irradiation, Immunohistochemical method×200

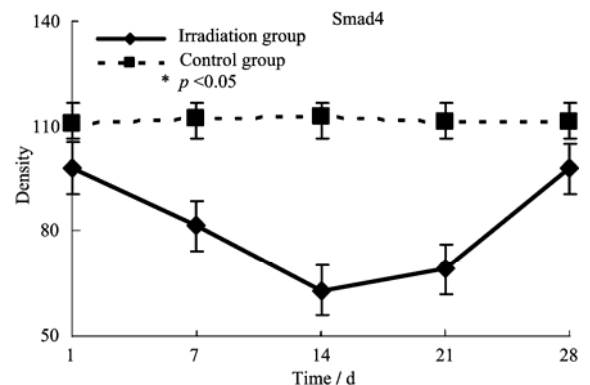


Fig.3 Expression of Smad4 in Leydig cells in the irradiation groups and the control groups

2.2 Smad1

在正常成年小鼠睾丸中,Smad1 主要表达于第 V 至第 X 期粗线期精母细胞胞质,随后弱表达于晚期精母细胞和早期圆形精子细胞,间质细胞胞质中也可见少量阳性产物,而在除早期圆形精子细胞、变形精子细胞和 Sertoli 细胞均未见阳性表达(见图 4)。EMP 照射后 1d,Smad1 在圆形精子细胞和释放期变形精子细胞中出现明显阳性反应,而在精母细胞中的表达却明显减弱;照射后 3—4 周,精母细胞中的表达逐渐恢复(见图 5)。图象分析显示,EMP 照射后 1d、7d 和 14d,Smad1 在精母细胞中的表达强度较对照组显著减弱(见图 6, $p < 0.05$)。

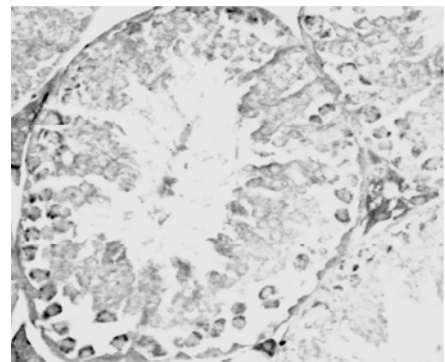


Fig.4 Expression of Smad1 in normal adult mice testes, Immunohistochemical method×400

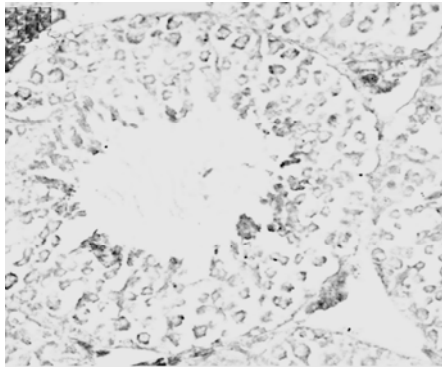


Fig.5 Expression of Smad1 at 21 days after irradiation, Immunohistochemical method $\times 200$

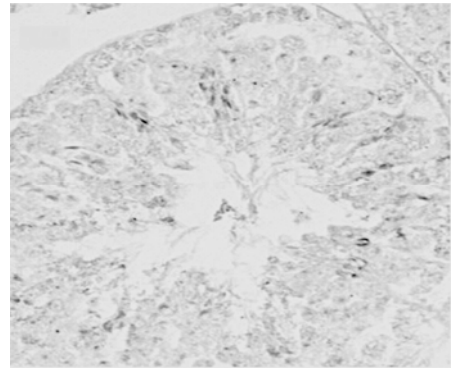


Fig.8 Expression of Smad5 at 7 days after irradiation, Immunohistochemical method $\times 200$

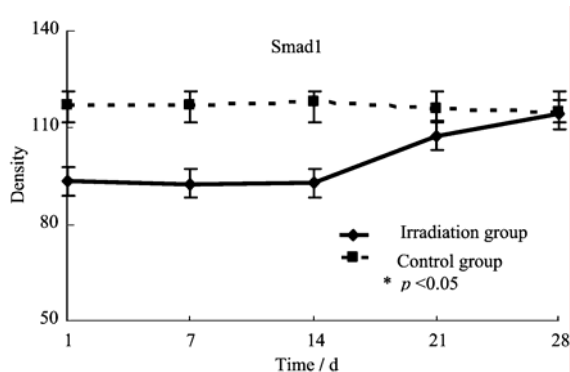


Fig.6 The expression of Smad1 in spermatocytes decreased significantly in 1d, 7d, 14d irradiation groups compared with that of control groups

2.3 Smad5

在正常成年小鼠睾丸中, Smad5 强阳性表达于早期精母细胞和圆形精子细胞胞核, 弱阳性表达于精原细胞胞核, 而在细线期以后精母细胞、变形精子细胞、Sertoli 细胞和间质细胞均未见阳性表达 (见图 7)。EMP 照射后 1d, Smad5 在释放期精子细胞出现阳性反应; 照射后 7d 和 14d 仅在变形精子细胞中有阳性表达 (见图 8); 照射后 21d 和 28d 与正常小鼠睾丸表达部位无明显变化, 但表达明显增强。

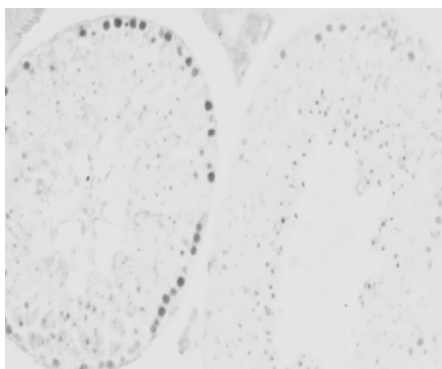


Fig.7 Expression of Smad5 in normal adult mice testes, Immunohistochemical method $\times 400$

3 讨论

电磁辐射在日常生活中较为常见, 近年来有关电磁辐射生物效应的研究不少。Lee 等^[8]发现成年小鼠持续性暴露于 60Hz 极低频电磁场中可发生以胞核退化、染色质浓缩为特征的精原细胞、各级精母细胞以及精子细胞的凋亡, 但体重和睾丸重量与对照组小鼠相比无明显变化。De 等^[9]应用流式细胞术检测极低频电磁场对小鼠生精细胞的影响, 发现暴露于场中 4h, 在 28d 后观察生精小管内变形精子量较对照组显著降低, 表明其可能抑制了精原细胞的分化。电磁脉冲不同于上述极低频电磁场辐射, 其特点是快速、高强、超短波^[10,11]。我们已发现(待发表), 电磁脉冲辐射可直接导致小鼠睾丸重量减轻、血睾屏障的破坏和生精障碍, 并伴随着 TGF- β 及其受体表达的变化, 但其作用机制尚需进一步研究。Smads 作为 TGF- β 信号转导系统的下游分子, 成为我们进一步研究 EMP 对生殖系统作用机制的有效分子。

已知 TGF- β 超家族是一类重要的睾丸功能局部调节因子, 包括 TGF- β , 激动素(Activins), 抑制素(Inhibins)及多种骨形成蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)^[12]。其中 BMPs 家族在调节细胞的增殖分化以及死亡方面发挥着重要作用^[13]。Smad1 和 Smad5 都是 BMPs 的细胞内信号转导分子, 在睾丸生精细胞的增殖分化中发挥重要作用^[14]。BMPs 信号通过作用于跨膜丝/苏氨酸激酶受体, 形成两种受体的异聚复合物。BMPs I 型受体活化 Smad1、5、8, 再与 Smad4 结合形成异源二聚体, 将其信号转导至细胞核内发挥基因调控作用^[15]。在核内, Smad 异源二聚体复合物在其他 DNA 结合蛋白的参与下作用于特异的靶基因。

Smad4 是信号转导通路中的通用型分子, 在正常情况下仅表达于睾丸间质细胞, 这与 Smad4 参与

间质细胞合成分泌雄激素以及相关因子有关。在照射后前一周 Smad4 在初级精母细胞以及精子细胞中有阳性表达,推测其参与了损伤细胞的凋亡;照射后 14—28d, smad4 在各粗线期精母细胞中表达逐渐增强,精子细胞中也有较强阳性表达,可能由于血清激素水平的变化影响了生精细胞发育,而 Smad4 作为生精过程中信号转导所必须的中介分子,参与了生精细胞发育的过程。此外,Smad4 在生精小管损伤恢复过程中可能直接参与了 TGF- β 或者 BMP/Smad 通路中的信号转导。

已知 Smad1 蛋白是 BMP8 的细胞内信号转导分子,主要表达于较晚期的粗线期精母细胞中,对小鼠胚胎的发生以及维持生精细胞的减数分裂起着重要作用^[3]。Pellegrini 等^[16]研究发现,BMP4 可使精原细胞 Smad4、Smad5 发生核转运并且与转录激活因子形成 DNA 连接复合物,诱导精原细胞增殖分化,smad5 在增殖的原始生殖细胞和出生后精原细胞中有特异性表达,在小鼠睾丸精子发生起始中必不可少。本实验显示,EMP 照射后短期内(1—14d),Smad1 和 Smad5 在变形期精子细胞或圆形精子细胞内都有不同程度的表达增强,说明 Smad1 和 Smad5 与通用型分子 Smad4 一起,参与了损伤精子细胞的凋亡;同时,辐射造成的血清激素水平变化可能使 Smad1 和 Smad5 的表达增强。短期内 Smad1 和 Smad5 在精母细胞中的表达明显减弱,推测精母细胞大量凋亡使可表达这两种分子的细胞数明显减少,从而表现为 Smad1 和 Smad5 的表达受到抑制。照射后 21—28d,Smad1 在粗线期精母细胞阳性表达逐渐增强;Smad5 在粗线期精母细胞胞核、精原细胞胞核以及细线前期、细线期、合线期精母细胞胞核有强阳性表达,说明照射损伤后一段时间(3—4 周),生精小管精子发生逐渐恢复正常,BMP/Smad 信号通路参与了生精过程。

本实验用 EMP 的强度较大、脉冲宽度较短,在短期内造成血清激素水平的上升和生精细胞的凋亡。综上所述,Smads 蛋白表达的变化可能由于以下几个原因:照射后早期 Smads 可能在某些阶段参与了细胞凋亡;照射造成血清激素的变化可能引起 Smads 表达水平及表达部位的变化;在照射后一段时间(3—4 周)生精小管恢复期,Smads 参与了生精细胞的增殖和分化。其中,Smad4 既是与其他两种 Smads 结合并发挥作用的通用型分子,又是参与激素合成的重要分子,必然在细胞的损伤以及修复过程中发挥更为重要的作用。

本研究通过观察 BMP 下游受体激活的分子 Smad1、Smad5 以及通用型分子 Smad4 在正常以及

受辐射小鼠睾丸的表达情况,辐射后随时间的变化情况,为 BMP/Smad 信号转导通路在小鼠睾丸生精过程的作用以及损伤修复中的作用提供直接证据。至于 Smads 蛋白在生精细胞凋亡过程中和修复过程中的信号转导通路,以及其他影响因子的参与等,尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Kretzschmar M, Massague J. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, **8**(1): 103-111
- 2 HU Jing, ZHANG Yuanqiang, LIU Xinping, *et al.* *Asian J Androl*, 2003, **5**(1): 51-55
- 3 ZHAO Guangquan, Hogan B L. *Mech Dev*, 1997, **61**(1-2): 63-73
- 4 WANG Ruian, ZHAO Guangquan. *Biol Reprod*, 1999, **61**(4): 999-1004
- 5 胡静, 张远强, 王红, 等. *中华男科学*, 2001, **7**(1): 10-13
HU Jing, ZHANG Yuanqiang, WANG Hong, *et al.* *National J Andrology*, 2001, **7**(1): 10-13
- 6 侯武刚, 赵洁, 张远强, 等. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2005, **23**(6): 366-370
HOU Wugang, ZHAO Jie, ZHANG Yuanqiang, *et al.* *J Radiat Res Radiat Process*, 2005, **23**(6): 366-370
- 7 赵洁, 侯武刚, 张远强. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2006, **15**(2): 130-134
ZHAO Jie, HOU Wugang, ZHANG Yuanqiang. *Chin J Histochem Cytochem*, 2006, **15**(2): 130-134
- 8 Lee J S, Ahn S S, Jung K C, *et al.* *Asian J Androl (in china)*, 2004, **6**(1): 29-34
- 9 De Vita R, Cavallo D, Raganella L, *et al.* *Bio electromagnetics*, 1995, **16**(5): 330-334
- 10 王水明, 王德文, 彭瑞云, 等. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2003, **21**(5): 329-331
WANG Shuiming, WANG Dewen, PENG Ruiyun, *et al.* *Chinese J Ind Hyg Occup Dis*, 2003, **21**(5): 329-331
- 11 Cobb B L, Jauchem J B, Mason P A, *et al.* *Bioelectromagnetics*, 2000, **21**(7): 524-537
- 12 Olaso R, Pairault C, Habert R. *Histochem Cell Biol*, 1998, **110**(6): 613-618
- 13 Chen M Y, Carpenter D, ZHAO Guangquan. *Bio Reprod*, 1999, **60**(6): 1503-1508
- 14 Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1998, **9**(1): 49-61
- 15 Ingman W V, Robertson S A. *Bioessays*, 2000, **24**(10): 904-914
- 16 Pellegrini M, Grimaldi P, Rossi P, *et al.* *J Cell Sci*, 2003, **116**(pt16): 3363-3372

Expression and localization of Smad4, Smad1 and Smad5 in testis of mice exposed to electromagnetic pulses

JI Xinxin HOU Wugang ZHAO Jie ZHAO Yong LI Wei ZHANG Yuanqiang

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

ABSTRACT Changes in expressions of smad4, smad1 and smad5 in the spermatogenic cells of mice after whole-body exposure to electromagnetic pulse (EMP) were studied to elucidate possible mechanisms of the EMP-induced injuries. Twenty adult Balb/c mice were irradiated with 400kV/m EMP to the whole-body. Specimens were harvested on 1, 7, 14, 21 and 28 days after the irradiation. Changes in cellular localizations and expressions of Smad4, Smad1 and Smad5 were examined by immunohistochemical ABC method. Quantitative analysis of the immunostaining was made by an image analysis system. In the seminiferous tubules, the localization of Smad4, Smad1 and Smad5 in the EMP group were significantly different from the control group. The expression densities of smad4, smad1 and smad5 changed significantly on 1, 7, 14, 21 and 28 days after irradiation. The study indicates that Smad4, Smad1, Smad5 and BMPs/Smad signal pathway may play an important role in the process of impairment and repair of mouse testis irradiated by EMP.

KEYWORDS Smad, BMPs, Electromagnetic pulse (EMP), Mouse, Testis

CLC R818, Q492.4, R594