维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0039-03

大鼠睾丸组织中 ALR 的研究

张唯力[1], 郭书权[1], 刘 杞[2], 马 英[3], 乔天愚[1], 张 智[1]

(1.重庆医科大学第二临床学院泌尿外科;2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所;
3.重庆医科大学第二临床学院病理科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究大鼠睾丸组织中肝再生增强因子(ALR)的表达情况,探讨睾丸 ALR 与生殖的关系。方法:取幼年、成年、老年大鼠睾丸组织以及部分肝切除(PH)术前、术后 12h、24h、48h 大鼠肝脏、睾丸组织进行免疫组化,了解大鼠睾丸组织中 ALR 的表达。结果:睾丸组织中 ALR 广泛存在于间质细胞、支持细胞和生精细胞,其中尤以精原细胞、精母细胞表达最强。不同年龄段 ALR 的表达不一样,幼年最强、成年次之、老年最弱。70% PH 后肝脏 ALR 表达增强,24h 达峰值,睾丸组织中 ALR 表达无明显变化。结论:睾丸组织有较强 ALR 表达,不同脏器的 ALR 作用具有脏器特异性,ALR 与睾丸的发育以及精子生成及成熟密切相关。

【关键词】大鼠;睾丸组织;肝再生增强因子;精子生成;年龄
【中国图书分类法分类号】R691 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-06-28

Study of augmenter of liver regeneration in rat testis

GUO Shuquan, et al

(*Department of Urology, The Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To confirm the expression and localization of augmenter of liver regeneration(ALR) in baby, mature and the old rat testis and to evaluate the function of ALR in reproduction. *Methods*: ALR expression and localization in baby, mature and the old rat testis were examined by immunohistochemistry, ALR expressions of the mature rat testis and liver were examined in 12h, 24h and 48h after 70 percent partial hepatectomy(PH) as well. *Results*: ALR was expressed in the cytoplasm and membrane of cells and it commonly existed in Leydig cells, Sertoli cells and sperm cells of rat testis, especially in spermatogonia and spermatocytes. ALR expressions differed among baby, mature and the old rat testis, in the way from the strongest to the weakest. After 70 percent PH ALR expression increased in liver, peaking in 24h, while that in testis didn't change. *Conclusion*: ALR expression in testis is strong which is necessary for testis development, spermatogenesis and mature sperm. The function of ALR is organ special.

【Key words】Rat; Testis; ALR; Spermatogenesis; Age

肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration ALR)是一种小分子生物活性蛋白,已证实 ALR 具有强大的调节肝再生的功能,近年来通过对酵母菌、狗、鼠的研究表明:ALR 在线粒体的形成、细胞分裂、器官发育的过程发挥了极其重要的作用[1]。ALR 存在于不同的物种,且无组织特异性,其 mRNA 在各组织的表达强度有差异,哺乳动物以睾丸组织表达最强烈[2]。Klissenbauer 等[3]于幼年小鼠的睾丸组织发现较高浓度的完整的 ALR 的汇聚,推测 ALR 可能参与了精子生成过程。本实验研究不同年龄段睾丸组织 ALR 的表达情况及 PH 术前后睾丸组织表达 ALR 水平的变化,进一步了解睾丸组织 ALR 的表达规律、ALR 与雄性生殖的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

1.1.1 实验动物 Wistar 大鼠 44 只,雄性,购于第三军医大学大坪医院动物中心。

1.1.2 动物分组

睾丸检测组:幼年组:8 只,1 月龄以下,体重小于 50g;成年组:8 只,3~4 月龄,体重 300±40g;老年组:8 只,大于 20 月龄,体重大于 500g。

70%肝脏部分切除术(Partial Hepatectomy, PH)组:3 月

作者介绍:张唯力(1957-),男,教授,
主要研究方向:男科学,前列腺疾病。

基金项目:重庆市卫生局医学科技资助项目(编号 03-2-050)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

龄，20 只，体重 240±15g，随机分成非手术组、手术后后 12h 组、24h 组和 48h 组，每组 5 只。

1.2 标本采集和处理

乙醚麻醉后取所有组大鼠的睾丸及 PH 术组的肝脏、睾丸，睾丸剪开包膜后用 Bouin's 液固定 48h，肝脏用 10% 的福尔马林固定 24h，常规石蜡包埋切片，厚 5μm。

1.3 各组分别进行 HE 染色了解组织形态

1.4 ALR 的免疫组化检测

免疫组织化学染色一抗为兔抗大鼠 ALR 多克隆抗体（重庆医科大学病毒性肝炎研究所刘杞贤赠），SP 试剂盒购于北京中山公司。阳性对照为已知强表达的大鼠 70% PH 后 24h 肝脏组织；空白对照不加一抗，阴性对照用正常兔血清替代一抗。主要过程如下：石蜡切片脱蜡和水化后，过氧化酶阻断；依次加非免疫动物血清（1:100）的 ALR 兔多克隆抗体；生物素标记的第二抗体；链霉素抗生物素蛋白－过氧化物酶溶液；分别孵化并冲洗；DAB 显色，复染，中性胶固定；光镜下观察以定性及定位。

1.5 结果判断

ALR 免疫染色阳性为种棕黄色或褐色，呈胞浆胞膜型，根据染色的深浅可分为阴性（－），弱阳性（＋），阳性（＋－），强阳性（＋＋）。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 8.0 软件进行统计分析，χ^2 检验。

2 结 果

2.1 睾丸组织形态

HE 染色后镜下观察睾丸组织形态学均正常，幼年组大鼠睾丸生精细胞处于精原细胞和初级精母细胞阶段；老年组生精管内生精细胞减少，有间质和小管增生现象；70% 术后各组睾丸无组织形态学变化，肝脏细胞明显增殖。

2.2 ALR 的表达及定位

ALR 广泛分布于睾丸组织各细胞中，呈胞浆胞膜型，睾丸的表达明显强于肝脏。ALR 主要表达于生精细胞、间质细胞，支持细胞不明显；各级生精细胞均有不同的的表达以精原细胞和精母细胞最为强烈。

2.3 不同年龄段 ALR 的表达

不同年龄段大鼠睾丸组织 ALR 表达明显区别：幼年组大鼠睾丸组织 ALR 表达最强，成年组次之，老年组减弱（图 1～4）。

2.4 70% 术后组

70% 术后 12h、24h、48h 和 72h 组肝脏组织 ALR 表达逐渐增强，在 24h 时达峰值，睾丸组织 ALR 表达无明显变化。

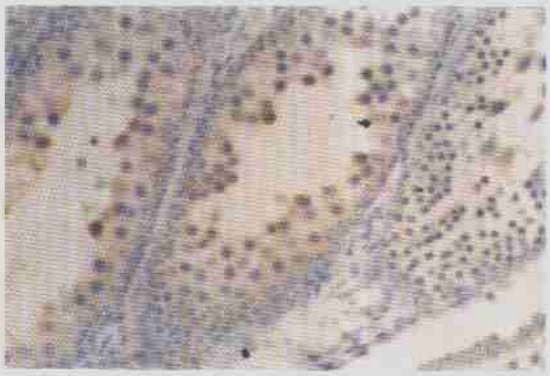


图 1 幼年大鼠睾丸组织 ALR 强阳性表达免疫组化 DAB 染色（×200）

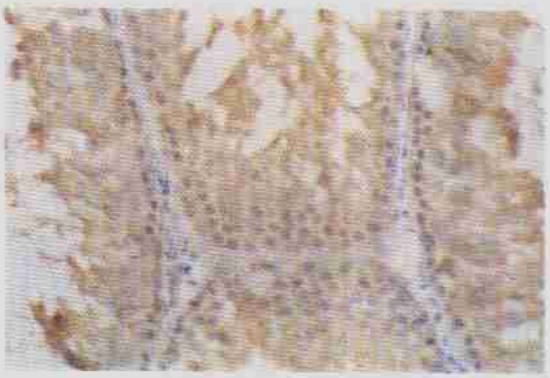


图 2 成年大鼠睾丸组织 ALR 阳性表达免疫组化 DAB 染色（×200）



图 3 幼年大鼠睾丸组织 ALR 强阳性表达免疫组化 DAB 染色（×200）

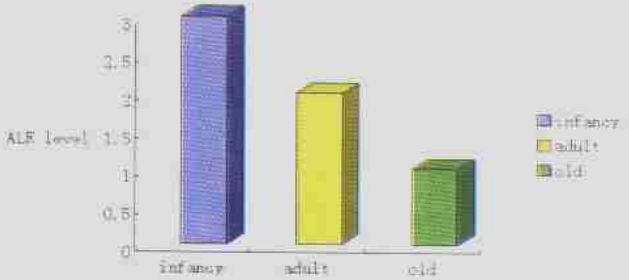


图 4 不同年龄段大鼠睾丸 ALR 表达的水平

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同年龄组大鼠睾丸 ALR 免疫组化结果比较

分组	例数	阴性(0 分)	弱阳性(1 分)	阳性(2 分)	强阳性(3 分)
幼年组	10	0	0	1	9
成年组*	10	0	1	8	1
老年组△★	10	0	7	2	1

注:* 成年组和幼年组间比较 $P<0.01$;△老年组和幼年组间比较 $P<0.01$;★老年组和成年组间比较 $P<0.05$。

表 2 pH 术前后不同时间点睾丸和肝脏 ALR 表达的比较

分组	例数	0h	12h	24h	48h	72h
睾丸	5	+ + (2 分)	+ + (2 分)	+ + (2 分)	+ + (2 分)	+ + (2 分)
肝脏	5	+ (1 分)	+ + (2 分)	+ + + (3 分)	+ + (2 分)	+ (1 分)

注:pH 术前后肝脏 ALR 的表达在不同时间点表达有明显区别 $P<0.01$;睾丸 ALR 的表达在不同时间点表达无明显区别 $P>0.05$。

3 讨 论

1994 年 Hagiya 等[4]从大鼠幼肝和部分肝切除再生肝中提纯并克隆出一种特异促进肝细胞再生的细胞因子命名为肝再生增强因子。研究表明 ALR 是一种分子量为 15081 的小分子生物活性蛋白,通过促进氧化磷酸化和抑制 NK 细胞的杀伤等作用机制调节肝再生,同时发现其可能参与精子生成[5]。除之外 ALR 还与线粒体的形成、细胞分裂、器官发育等过程密切相关。

ALR 广泛存在于真核细胞如酵母菌细胞,小鼠、大鼠、狗、人等哺乳动物组织器官中。ALR 在细胞内呈胞浆胞膜型分布。本实验对大鼠肝脏和睾丸 ALR 的免疫组化亦证实如此,并发现其在各级生精细胞中均表达,间质细胞和支持细胞中也有表达但较弱。

ALR 可能在人体内以多种形式存在,不同的组织、器官、同一器官不同时期分泌不同的 ALR 蛋白片段。Francavilla 等[6]发现小鼠肝细胞质中存在三种 ALR 蛋白片段;Klissenbauer 等[3]也证实小鼠体内可能存在 23kD、20kD、15kD 三种形式,而仅从精原细胞及初级精母细胞中提出 23kD 的全长蛋白。LU[7]等证明 ALR 氨基端的长短可能影响其功能,不同器官表达不同片段可能与其功能相适应的。肝脏部分切除(PH)的实验模型证实术后肝脏组织 ALR 的表达增强,而睾丸组织 ALR 的表达无明显的变化,推测刺激肝脏组织 ALR 表达增强的因素对其他的器官组织可能无效,睾丸组织表达的 ALR 与再生肝脏组织中发生作用的 ALR 可能为不同的蛋白片段,睾丸组织的 ALR 可能仅对睾丸发生作用。因此可推测不同器官的 ALR 作用具有器官特异性,其作用方式可能是通过自分泌或旁分泌实现的。

实验已证实胚胎期、1～30 天龄的大鼠睾丸组织 ALR 强表达。本实验亦发现 ALR 在幼年组睾丸中表达最强,成年次之,老年减弱,推断 ALR 与睾丸组织的生长发育密切相关,其可能机制是 ALR 参与线粒体的形成发育并在细胞内 Fe/S 蛋白生物合成过程中有着重要的作用,且维持细胞内离子的内环境的稳定[8]。

Klissenbauer 等[3]于幼年鼠睾丸中发现 ALR 在精原细胞及初级精母细胞表达较强。本实验结果显示 ALR 在各级生精细胞中均表达而以精原细胞及精母细胞表达较强与前报道相一致。睾丸组织 ALR 的强表达与精子生成有关。Lisowsky 等[9]证实 ALR 实质是一种黄素腺嘌呤核苷酸连接的巯基氧化酶(FAD - linked sulfdryl oxidase)。巯基氧化酶是一种催化巯基化合物氧化的酶,Klissenbauer 认为其功能除与氧化磷酸化外,还参与了精子生成。Bergmann[10],Aumuller[11]发现巯基氧化酶位于生精细胞的线粒体上,不仅是精子生成早期阶段特别是粗线期精母细胞的标志,也是精原细胞形成的驱动因子。Seitz 等[12]认为巯基氧化酶在粗线期精母细胞和早期精子细胞中浓缩,促进了线粒体分化。Meinhardt[13]认为巯基氧化酶在精子细胞线粒体的形态和功能的形成发展中有重要作用,有利于精子生成和成熟。ALR 还可刺激 DNA 的合成,促进细胞从 G_0 转向 G_1 期,促进精原细胞向精母细胞分化。

肝再生过程中 ALR 还发挥了免疫调节的作用,精子细胞的 ALR 在受精过程中是否具有免疫调节的作用尚须进一步探索。

(下转第 45 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

cused ultrasound for treatment of rat tumor[J]. Phys Med Biol, 1991;36:1495 - 1501.

[3] 刘宝琴,熊树华,王智彪,等.体外不同频率高强度聚焦超声的生物学焦域[J].中国超声医学杂志,2002;18(6):417 - 420.

[4] 伍 烽,王智彪,陈文直,等.高强度聚焦超声体外治疗肝肿瘤的剂量学研究[J].中华物理医学与康复杂志,2000;22(5):267 - 269.

[5] 王智彪,伍 烽,王芷龙,等.生物学焦域的概念及在高强度聚焦超声切除组织中的作用[J].临床超声医学杂志,1998;9(4):217 - 218.

[6] 邹建中,王芷龙,刘 川,等.高强度聚焦超声定位损伤小型香猪肝脏组织的影像学检查[J].中国超声医学杂志,1999;15(6):401 - 403.

[7] 伍 烽,王智彪,陈文直,等.高强度聚焦超声体外破坏原发性肝癌的病理学观察[J].中华肿瘤杂志,2001;23(3):237 - 239.

(上接第 41 页)

参 考 文 献

[1] Polimeno L, Lisowsky T, Francavilla A. From yeast to man—from mitochondria to liver regeneration: a new essential gene family. Ital J Gastroenterol Hepatol, 1999;31(6):494 - 500.

[2] Gandhi CR, Kuddus R, Subbotin VM, et al. A fresh look at augmenter of liver regeneration in rats. Hepatology, 1999;29(5):1435 - 1445.

[3] Klissenbauer M, Winters S, Heinlein UA, et al. Accumulation of the mitochondrial form of the sulphydryl oxidase Erv1p/Alrp during the early stages of spermatogenesis. J Exp Biol, 2002;205(Pt 14):1979 - 1986.

[4] Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. Proc Natl Acad Sci USA, 1994;91(17):8142 - 8146.

[5] Hernandez MR, Sanchez SL, Martinez GA, et al. Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration. Hepatology, 2003;37(4):842 - 851.

[6] Francavilla AT, Hagiya M, Starzl TE. Mammalian augmenter of liver regeneration and variants thereof. Biotechnology Advances, 1997;15(3 4). 678 - 678.

[7] Lu J, Xu WX, Zhan YQ, et al. Identification and characterization of a nove lisoform of hepatopoietin. World J Gastroenterol, 2002;8(2):353 - 356.

[8] Lange H, Lisowsky T, Gerber J, et al. A essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. EMBO Rep, 2001;2(8):715 - 720.

[9] Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, et al. Mammalian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. Dig Liver Dis, 2001;33(2):173 - 180.

[10] Bergmann M, Oehmen F, Kumari M, et al. Immunohistochemical localization of testicular sulphydryloxidase during sexual maturation of the D jungarian hamster (Phodopus sungorus). J Reprod Fertil, 1991;91(1):259 - 265.

[11] Aumuller G, Bergmann M, Seitz J. Immunohistochemical distribution of sulfhydryl oxidase in the human testis. Cell Tissue Res, 1991;266(1):23 - 28.

[12] Seitz J, Mobius J, Bergmann M, et al. Mitochondrial differentiation during meiosis of male germ cells. Int J Androl, 1995;18 S2:7 - 11.

[13] Meinhardt A, Wilhelm B, Seitz J. Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. Hum Reprod Update, 1999;5(2):108 - 119.