异翅负蝗配子发生过程中 c-kit 蛋白表达动态*

赵　卓[1]　奚耕思[2]**

（1. 吉林师范大学生命科学学院　四平　136000；2 陕西师范大学生命科学学院　西安　710062）

Dynamics expression of c-kit protein in gametogenesis of *Atractomorpha heteroptera*. ZHAO Zhuo[1], XI Geng-Si[2]** (1. *College of Life Science, Jilin Normal University*, Siping　136000, China; 2. *College of Life Science, Shaanxi Normal University*, Xi'an　710062, China)

Abstract　By using immunohistochemistry and biostatistics, the special expression dynamics of c-kit protein in gametogenesis were studied by rearing *Atractomorpha heteroptera* Bei-Bienko in natural conditions. The results showed that: (1) In spermatogenesis, there were different expression levels of c-kit protein in spermatogonia, primary spermatocytes, secondd spermatocytes and mature sperms, and the biggest positive granules were found at the end of spermary; (2) In oogenesis, there were different expression levels of c-kit protein from the 1st to 6th stage of oocytes but the positive granules disappeared with the following vitellogenesis; (3) The c-kit positive granules were also found in follicular cells and the gland cells of oviduct and spermathecae; (4) The dynamic change of c-kit positive expression showed that it became stronger in young periods than in old periods not only in spermatogenesis but also in oogenesis. All in all, the special expression of c-kit protein implied that those proteins might participated in the stage regulation and play crucial role in gametogenesis.

Key words　*Atractomorpha heteroptera*, gametogenesis, c-kit protein, dynamics

摘　要　应用免疫组织化学和生物统计分析相结合的方法，对异翅负蝗 *Atractomorpha heteroptera* Bei-Bienko 配子发生过程中 c-kit 特异表达特点和动态进行研究。结果表明，(1)精子发生过程中，精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞和成熟精子中均有不同程度的 c-kit 蛋白表达，精巢末端还有较粗大的阳性颗粒分布；(2)卵子发生过程中，第 1～6 阶段卵母细胞中有不同程度的 c-kit 蛋白特异性表达，但随着卵黄发生的开始逐渐消失；(3)此外，滤泡细胞、输卵管和受精囊的腺细胞中有 c-kit 蛋白颗粒的存在；(4)从 c-kit 蛋白季节动态变化看，精子发生和卵子发生中的阳性表达都随着时间的延续出现下降的态势。因此，c-kit 蛋白的特异性表达提示该蛋白参与配子发生过程的阶段性调控，具有重要的生理作用。

关键词　异翅负蝗，配子发生，c-kit 蛋白，动态

原癌基因 c-kit 发现于小鼠的第 5 染色体及人的第 4 染色体上，相对分子量为 145～160 kD，编码一个跨膜蛋白。c-kit 蛋白属于酪氨酸激酶受体家族Ⅲ亚族，由 953 个氨基酸组成，其中胞膜外区 497 个氨基酸，属免疫球蛋白超家族成员，组成 5 个 Ig 样的结构域；跨膜区由 23 个疏水氨基酸组成；胞内区的 433 个氨基酸含有酪氨酸激酶和自身磷酸化的结构域。C-kit 作为普通的跨膜蛋白，在 Src 激酶家族作用下，与网格蛋白结合，进入细胞质内，最终通过泛酸途径降解或重新被运送到细胞膜上行使其受体功能[1]。现有研究资料表明，c-kit 在生殖细胞增殖、分化、减数分裂和细胞凋亡等过程中起着重要的旁分泌调控作用[2～11]。c-kit 基因的点突变，在雄性可导致不育及分化型 A1-A2 精原细胞 DNA 合成停止，从而导致减数分裂时 c-kit 蛋白不表达，最终引起正常精子发生受阻和不育[12]。在雌性中，会引起卵泡发育受损伤，卵母细胞和卵巢小管发育异常，最终引起生殖能力的下降[13]。异翅负蝗 *Atractomorpha*

* 陕西省自然科学基金(2004C115)项目资助。

** 通讯作者，E-mail: xigengsi@snnu.edu.cn

收稿日期：2006-05-31，修回日期：2006-07-17，2006-10-16 再修回

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

heteroptera Bei Bienko 隶属直翅目 Orthoptera 锥头蝗科 Pyrgomorphidae 负蝗属 *atractomorpha* Saussure，在我国分布较为广泛，在吉林省四平地区发生时间为 7 月下旬并在 9 月下旬消亡，为该地区的优势蝗虫种群之一[14, 19]。本文首次报道异翅负蝗配子发生过程中 c-kit 蛋白表达特点和表达动态，旨在探索其基因水平调控与繁殖能力的关系，以期为蝗虫的生物防治工作提供生殖生态学方面的参考依据。

1 材料与方法

1.1 蝗虫的饲养与取样

2004 年 7 月下旬于吉林省四平市西郊，制作 100 cm×60 cm×60 cm 无底纱网笼数只置于野外，罩养异翅负蝗千余只，均从末龄蝗蝻开始罩养。成虫出现每隔 7 d 取雌、雄虫各 20 只，直至成虫全部死亡。

1.2 组织切片

活体蝗虫带回实验室后，迅速解剖蝗虫取出完整的卵巢、受精囊和精巢放入 Bouin's 液中固定 24 h，常规石蜡包埋与切片，切片厚度为 6 μm，选取 10 张切片用于免疫组织化学染色。

1.3 免疫组织化学方法

切片常规脱蜡后用 3%甲醇－H_2O_2 孵育 10 min，将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液（pH 6.0），10 min 后重复 1 次，自然冷却后，经 5%BSA 室温封闭 20 min，甩去多余液体不洗，采用武汉博士得生物工程有限公司购买的兔抗小鼠 c-kit 基因蛋白、免疫组织化学 SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒进行染色。加入一抗（兔 IgG 1∶100）后置于 4℃冰箱过夜，再加入生物素标记的二抗（山羊抗兔 IgG），37℃处理 20 min，滴加 SABC 复合物 37℃处理 20 min，经 DAB-H_2O_2 室温显色 3 min 终止反应，以上各步间均用 0.1 mol/L PBS（pH7.2～7.6）洗 3 次，每次 5 min，阴性对照用 0.1 mol/LPBS 代替一抗进行孵育，其余步骤、条件均相同。梯度酒精脱水，透明，中性树胶封片。显微镜观察、测量与拍照。

1.4 图像采集与统计学分析

利用 Motic Images Advanced 3.2 图像分析系统采集图像，每张切片选取 10 个视野，测量 400 视野下卵子发生 8 个阶段[15～17]和精子发生 4 个阶段[18]中 c-kit 蛋白免疫反应阳性面积百分比及阳性颗粒平均面积，以代表阳性表达强弱和颗粒大小。将测得数据经 SPSS 12.0 软件处理，所有数据行 ANOVA 分析及 S-N-K 和 LSD 组间两两比较，文中描述性统计值用平均值±标准误差表示，$P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

免疫组织化学结果显示，异翅负蝗配子发生过程中，各级精母细胞和第 1～6 阶段卵母细胞中均有 c-kit 阳性颗粒表达，阳性颗粒棕黄色，位于细胞质和细胞膜上。

2.1 异翅负蝗精子发生过程中 c-kit 蛋白表达

异翅负蝗精子发生过程中，精原细胞时期出现 c-kit 蛋白弱阳性表达，颗粒细小，阳性表达强度微弱（图 1：A）；在初级精母细胞时期阳性颗粒粗大，阳性表达强度增加差异显著（图 1：B）；在次级精母细胞时期阳性颗粒显著变小，阳性表达强度增加同初级精母细胞比差异不显著（图 1：C）；在成熟精子时期阳性颗粒在精子头部和尾丝处都有均匀分布，颗粒显著减小，但是同精原细胞时期颗粒大小相比差异不显著，阳性表达强度增加差异显著（图 1：D）；在精巢小管末端出现大量成团阳性颗粒，而且阳性颗粒大小和阳性表达强度同其他时期比差异极显著，达到峰值（图 1：E）。

2.2 异翅负蝗卵子发生过程中 c-kit 蛋白表达

异翅负蝗卵子发生过程，在卵原细胞中（图 2：A），出现较强 c-kit 蛋白阳性表达，阳性颗粒粗大，同其他各时期比差异极显著；在第 2 阶段卵母细胞中（图 2：B），阳性颗粒和阳性表达强度下降，变化幅度同卵原细胞比差异极显著；在第 3 阶段卵母细胞中（图 2：C），阳性颗粒和阳性表达强度略有增加，但二者变化幅度同第 2 阶段卵母细胞比差异不显著；在第 4 阶段卵母细胞中（图 2：D），阳性颗粒和阳性强度均显著下降；在第 5 阶段卵母细胞中（图 2：E），阳性颗粒略减小，与第 4 阶段卵母细胞阳性颗粒大小

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

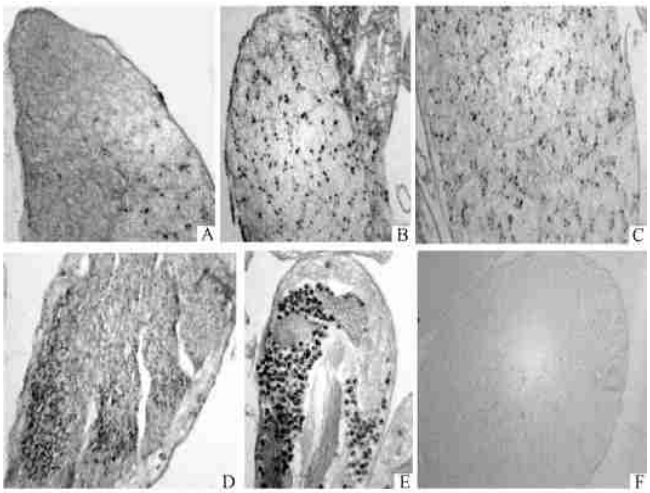

图 1　异翅负蝗精子发生过程 c-kit 蛋白表达图片(左)和数据分析(右)(400×)

A. 精原细胞　B. 初级精母细胞　C　次级精母细胞　D. 成熟精子　E　精巢管末端　F. 阴性对照

右图中数据为平均值±标准误; 单因子方差分析, S-N-K 和 ISD 检测, 样本量: $n=20$; 每组数据上的不同字母表示具有显著性差异($P<0.05$); 相同字母表示差异不显著($P>0.05$), 其中小写字母代表百分比组, 大写字母代表平均面积组, (下图同)。

差异不显著, 阳性强度开始下降, 下降幅度与第 4 阶段卵母细胞比差异显著; 在第 6 阶段卵母细胞中(图 2: F), 阳性颗粒大小和阳性强度均继续下降, 阳性颗粒大小和阳性强度与各阶段比差异显著; 在第 7 和第 8 阶段卵母细胞中未见阳性颗粒出现(图 2: G, H)。

异翅负蝗卵子发生第 4 阶段后, 滤泡细胞迅速发育, 免疫组织化学结果显示, 滤泡细胞质和细胞膜上出现 c-kit 蛋白阳性颗粒, 阳性表达强度随着滤泡细胞发育继续增强, 在卵子发生第 7 阶段达到峰值。尽管第 7 阶段后滤泡细胞大部分开始显著退化, 但仍可见滤泡细胞有阳性颗粒旺盛分泌, 阳性颗粒将滤泡细胞包围, 并大量分布于成熟卵子表面, 未见有向卵母细胞

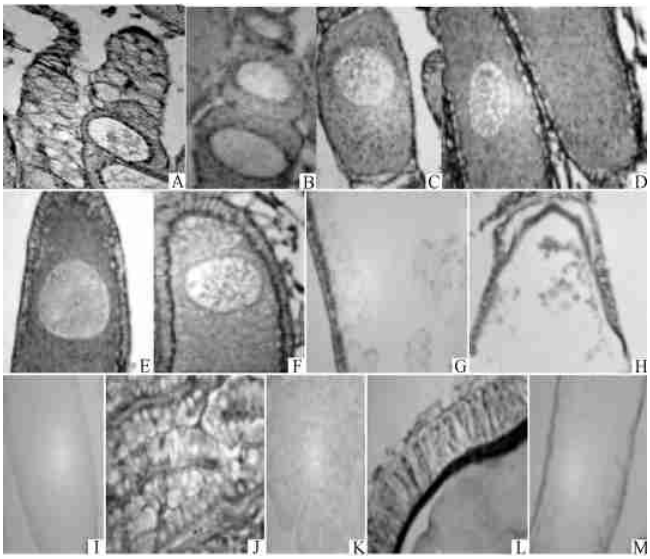

图 2　异翅负蝗卵子发生过程 c-kit 蛋白表达图片(左)和数据分析(右)(400×)

A ~ H. 分别为第 1 阶段至第 8 阶段卵母细胞　I　卵母细胞阴性对照　J. 输卵管 管壁细胞　K　输卵管 管壁细胞阴性对照　L　受精囊壁细胞　M. 受精囊壁细胞阴性对照(右图注解同图 1)

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

内迁移迹象(图 2: G, H)。

异翅负蝗卵子发生过程中输卵管出现明显形态变化, 最终发育成运送卵子的通道。卵母细胞发育初期输卵管开始膨大, 褶皱明显, 随着卵母细胞的发育, 中输卵管和侧输卵管继续膨大, 到产卵期时, 成熟卵子进入输卵管, 此时中输卵管和侧输卵管光滑, 无褶皱。免疫组织化学结果显示, 输卵管管壁腺细胞内存在大量的 c-kit 蛋白阳性颗粒(图 2: J), 尤其在卵子发育成熟的后期, 输卵管管壁内的腺细胞分泌和合成 c-kit 蛋白的能力越旺盛, c-kit 蛋白以颗粒状密布于输卵管管壁内侧和以弥散状分布于管腔基质里。

受精囊是蝗虫雌性贮存精子的器官, 免疫组织化学结果显示, 在异翅负蝗受精囊壁腺细胞内存在大量的 c-kit 蛋白阳性颗粒(图 2: L), 说明受精囊壁内腺细胞具有合成 c-kit 蛋白的能力。受精囊壁内腺细胞合成的 c-kit 蛋白向受精囊腔内释放, 并以颗粒状密布于受精囊腔的内侧和以弥散状分布于囊腔基质里。

2.3 异翅负蝗配子发生过程中 c-kit 蛋白表达的季节动态

异翅负蝗雄性成虫从 1 周龄到成虫第 6 周龄各期精巢小管中均有 c-kit 蛋白阳性表达, 而且阳性表达强度随时间推移而变化(图 3)。阳性表达在成虫 1 周龄较强, 并维持到成虫 2 周龄时达到峰值; 成虫 3 周龄后, 阳性表达强度逐渐减弱, 第 6 周的老熟蝗虫 c-kit 阳性表达维持在最低的表达水平。

异翅负蝗雌性成虫从 1 周龄到成虫第 8 周龄卵巢小管中均有 c-kit 蛋白阳性表达, 而且阳性表达的强度随时间增加而变化(图 3)。阳性表达强度在成虫 1 周龄时期达到峰值, 到第 4 周龄前阳性表达强度变化差异不显著, 成虫 5 ~6 周龄时阳性表达强度显著减弱, 成虫 6 周龄后阳性表达维持在较弱的表达水平。

3 讨论

3.1 c-kit 蛋白在配子发生中的表达与调控

异翅负蝗精子发生过程中, c-kit 蛋白阳性

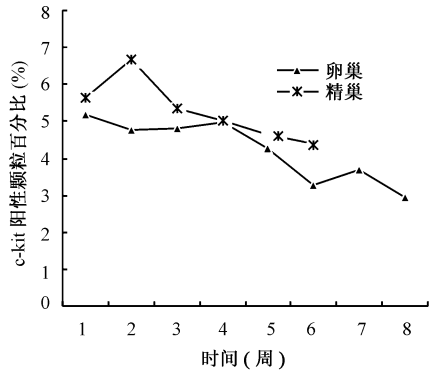

图 3 异翅负蝗卵巢和精巢 c-kit 阳性颗粒百分比的增龄变化

颗粒在精原细胞膜上出现微弱表达, 说明 c-kit 蛋白参与启动精原细胞分化。初级精母细胞时期处于减数分裂时期, 细胞膜上阳性表达强度显著增加, 推测对维持减数分裂, 确保同源染色体准确地分别移向 2 个次级精母细胞, 促进姐妹染色单体分离, 最终形成 4 个精子细胞有作用。次级精母细胞及圆形精子细胞的细胞质中阳性颗粒小而多, 阳性表达强度显著增加, 推测 c-kit 蛋白在次级精母细胞的第 2 次减数分裂中起着积极的调控作用。成熟精子头部和尾丝上密布细小 c-kit 蛋白阳性颗粒, 推测在成熟精子出现后 c-kit 蛋白可能参与精子生理活性维系和运动能力的维持。此外, 成熟精子在受精未发生之前, 不能过长时间存活, 而且成熟精子经过鞭毛生长、核凝缩、细胞质外排和顶体泡形成的系列变化后, 外部形态是极为简单的结构, 精子活性生理水平维系主要依赖于外界微环境的提供, 在精巢小管末端存在大量成团 c-kit 蛋白颗粒, 散布在成束精子之间, 分析 c-kit 蛋白具有维持成熟精子活性的生理作用。

异翅负蝗卵子发生过程中, 卵原细胞时期处于第 1 次减数分裂的各个时期, 此时 c-kit 蛋白大量合成与分布, 说明 c-kit/SCF 信号转导系统可能直接参与启动卵原细胞发育中的第 1 次减数分裂进程。第 2 阶段卵母细胞 c-kit 阳性表达强度出现下降态势, 卵母细胞合成 c-kit 蛋白速度远不及细胞体积迅速增长, 所以出现表达下降现象, 但事实上细胞合成 c-kit 蛋白也在

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

积极的进行当中,蛋白颗粒首先出现在细胞核附近,并逐渐向细胞质中扩散。第3阶段卵母细胞c-kit蛋白合成积累达到一定量的水平,随着卵母细胞生长发育在细胞质中表达仍很显著,并从细胞核周围向细胞质外周进行运输,细胞膜也开始出现阳性颗粒表达,推测卵母细胞中c-kit蛋白可能参与抑制成熟分裂以调控发育进程。第4阶段后卵母细胞c-kit阳性颗粒细小,阳性表达强度逐渐降低直至消失。总之,c-kit蛋白在异翅负蝗卵子发生过程中表达规律,显示在卵子发生的不同阶段发挥和执行其特异的生理功能。

滤泡细胞也具有合成c-kit蛋白功能,并且随着滤泡细胞周期性变化呈现出规律性变化,在立方形滤泡细胞出现前期,未见有c-kit蛋白出现,而柱状滤泡细胞出现后,随着卵黄积累开始出现大量c-kit蛋白合成并分泌到滤泡细胞顶端,而且滤泡细胞分泌合成的c-kit蛋白并不向卵母细胞中移动,只停留并分布在滤泡细胞周围,最后在第7阶段和第8阶段滤泡细胞开始分泌形成卵壳,大量c-kit蛋白分布在卵壳表面,推测滤泡细胞分泌合成的c-kit蛋白参与卵壳合成、卵子成熟和维系成熟卵子生理活性等生理功能,可能还具有识别精子等生理作用。

输卵管管壁腺细胞具有合成c-kit蛋白功能,c-kit蛋白以颗粒状或弥散状分布在输卵管管壁内侧。输卵管是成熟卵子必经之路,成熟卵子进入并在输卵管中运行过程中,一方面c-kit蛋白可能参与成熟卵母细胞表面活性的后期加工;另一方面成熟卵母细胞生理活性维系需要有c-kit蛋白存在,所以推测输卵管分泌合成c-kit蛋白对卵子后期成熟具有重要的润饰作用。

异翅负蝗受精囊壁腺细胞中具有合成c-kit蛋白功能,受精囊壁腺细胞在基部合成c-kit蛋白,然后以小泡形式运输到腺细胞顶端并分泌到受精囊腔内,c-kit蛋白以颗粒状或弥散状分布在受精囊的囊腔内和壁上。受精囊是雌性蝗虫受精后暂时贮存精子的场所,蝗虫受精后并不立即完成受精活动,而在交配和受精完成的这段时间差内,受精囊为其内贮存的精子提供保持生理活性的微环境,推测c-kit蛋白在受精囊内具有维系精子活性等功能。

3.2 c-kit蛋白表达的时间动态

异翅负蝗配子发生过程中,c-kit蛋白表达动态变化明显。在雄性蝗虫中,刚出现成虫个体精巢管中c-kit阳性表达较旺盛,说明在此时期c-kit对精子发生的调控能力很强,促进并维持精子发生有序进行;而在老熟个体,c-kit阳性表达强度减弱,说明c-kit对精子发生的调控能力降低。在雌性蝗虫中,刚出现成虫个体卵巢小管卵母细胞处于卵黄发生前期,此时期c-kit蛋白表达水平较高,说明对卵子发生的调控机能主要是在卵母细胞生长期,随着蝗虫个体老化,c-kit蛋白表达水平逐渐下降,在蝗虫个体发育中期至后期,c-kit阳性表达强度明显减弱,但是维持在较弱表达水平。

出现这种周期性变化的原因,其一,卵巢小管与精巢小管c-kit阳性表达强度整体水平上的减弱,估计与虫体老化直接相关,整体生理机能减退是导致生殖生理水平随之降低的结果;其二,发育后期雌性卵巢管中大量出现第7~8阶段卵母细胞,而在这些卵母细胞内未见有c-kit阳性表达,导致c-kit阳性表达在卵巢管内整体水平的下降;其三,估计与蝗虫的交配行为有关,c-kit阳性表达强度达到峰值基本都发生在交配前期,交配结束后c-kit阳性表达强度普遍下降,这里面是否有激素水平调控还需要进一步的研究。

综上所述,c-kit蛋白周期性表达与异翅负蝗配子发生过程中重要生理事件同步,暗示它在配子发生过程中起着重要的调控作用,而且这种条调控能力在青壮虫体中较强,老熟虫体具有较弱调控能力。此外,c-kit蛋白可能还具有成熟配子修饰和维系配子生理活性,甚至参与精卵识别等作用。

参 考 文 献

1 Virginia C., Broudy N.L., Lin W., Conrad L., Bridget O., *et al*. *Blood*, 1999, **94**: 1 979~1 986.

2 Koshimizu U., Watanabe D., Tajima Y., Nishimune Y.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

Development, 1992, **114**(4): 861 ~ 867.
3 Lamb D. J. *J. Urol.*, 1993, **150**: 583 ~ 592.
4 Loveland K. L., Schlatt S. *Endocrinology*, 1997, **153**: 337 ~ 344.
5 Mauduit C., Hamamah S., Benahmed M. *Hum. Reprod. Update*, 1999, **5**(5): 535 ~ 545.
6 Feng L. X., Ravindranath N., Dym M. J. *Biol. Chem.*, 2000, **275**(33): 25 572 ~ 25 576.
7 Ohta H., Tohda A., Nishimune Y. *Biol. Reprod.*, 2003, **69**(6): 1 815 ~ 1 821.
8 Clark D. E., Tisdall D. J., Fidler A. E., McNatty K. P. *Reprod. Fertil.*, 1996, **106**(2): 329 ~ 335.
9 Horie K., Takakura K., Taii S., Narimoto K., Noda Y., *et al*. *Biol. Reprod.*, 1991, **45**(4): 547 ~ 552.
10 Motro B., Bernstein A. *Dev. Dyn.*, 1993, **197**(1): 69 ~ 79.
11 Zhao Z., LÜS. M., Xi G. S. *Insect Sci.*, 2005, **13**(1): 445 ~ 450.
12 Rossi P., Sette C., Dolci S., Geremia R. *Endocr. Invest.*, 2000, **23**(9): 609 ~ 615.
13 Kissel H., Timokhina I., Hardy M. P., Rothschild G., Tajima Y., *et al*. *EMBO J.*, 2000, **19**(6): 1 312 ~ 1 326.
14 赵卓, 于艳萍, 任炳忠. 吉林农业大学学报, 2004, **26**(3): 267 ~ 271.
15 奚耕思, 郎冬梅. 昆虫知识, 2003, **40**(6): 538 ~ 541.
16 奚耕思, 窦向梅. 动物分类学报, 2004, **29**(2): 207 ~ 211.
17 赵卓, 奚耕思. 动物分类学报, 2006, **31**(3): 501 ~ 508.
18 赵卓, 任炳忠, 奚耕思. 吉林农业大学学报, 2005, **27**(6): 603 ~ 605.
19 赵卓, 奚耕思. 昆虫知识, 2005, **42**(5): 524 ~ 527.

西藏飞蝗的生物学特性*

李 庆[1] 封传红[2] 张 敏[1] 蒋 凡[2] 杨 刚[3] 罗林明[2]
(1. 四川农业大学植物保护系 雅安 625014; 2. 四川省农业厅植物保护站 成都 610041;
3. 甘孜州植保植检站 四川 康定 626000)

The biological characteristics of *Locusta migratoria tibetensis*. LI Qing[1], FENG Chuan-Hong[2], ZHANG Min[1], JIANG Fan[2], YANG Gang[3], LUO Lin-Ming[2] (1. *Department of Plant Protection, Sichuan Agricultural University*, Ya'an 625014, China; 2. *Plant Protection Station of Sichuan Agricultural Department*, Chengdu 610041, China; 3. *Plant Protection and Quarantine Station of Ganzi State*, Sichuan Kangding 626000, China)

Abstract The *Locusta migratoria tibetensis* Chen occurs 1 generation annually in Ganzi State of Sichuan Province but in some area (Xiangcheng County) it occurs incomplete 2 generations per year and the eggs are laid in soil to overwinter. The first generation begins to hatch at late March and reach the hatching peak in middle or late April. The 1 ~ 3 instar initial booming period is from middle April to middle May, and reaches the peak period in late May. The adult emergence time is in early July, and reaches the eclosin peak period from late July to early August. The adults begin to oviposit in early August, the ovipositional peak period is from late September to early October. Some eggs oviposited early by the first generation can hatch from soil in early September in the same year, but the incomplete second generation can not overwinter. Under the condition of 18, 21, 24, 27 and 30℃, the developmental threshold temperature of egg, the whole nymphs and the whole generation is 14.2, 16.1 and 14.6℃, respectively; the effective accumulative temperature is 179.1, 360 and 787.8 day-degrees, respectively.

Key words *Locusta migratoria tibetensis*, life cycle, biological characteristics, Ganzi State of Sichuan Province

摘 要 西藏飞蝗 *Locusta. migratoria tibetensis* Chen 在四川甘孜州 1 年发生 1 代, 某些地方(乡城县) 1 年

* 四川省科技厅应用基础项目(05JY029-007-3)。
** 通讯作者: E-mail: liqing633@yahoo.com.cn
收稿日期: 2006-04-10, 修回日期: 2006-06-28

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n