

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00495

扬子鳄卵巢性类固醇激素受体的免疫细胞化学研究

许多¹ 吴孝兵¹ 王力¹ 李琴¹ 朱红星² 王朝林²

(1. 安徽师范大学生命科学学院, 重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室, 芜湖 241000;

2. 安徽省扬子鳄繁殖研究中心, 宣城 242034)

摘要: 为探讨扬子鳄卵巢内不同性类固醇激素受体在卵泡发育中的调控作用, 研究采用组织学和免疫细胞化学方法, 运用激光共聚焦显微镜, 对扬子鳄不同发育时期卵泡中的雌激素受体、雄激素受体和孕激素受体进行了检测。结果发现, 3 种类固醇激素受体在卵巢各期滤泡细胞中均有表达, 在 4 月 II-IV 期卵泡的滤泡细胞中阳性反应最强; 9 月卵巢的滤泡细胞中阳性反应最弱; ER 和 AR 不仅在各期滤泡细胞中存在阳性位点, 在 6 月卵泡的卵母细胞胞质中也有表达。结果说明, 在扬子鳄卵母细胞生长发育和成熟过程中, 3 种激素受体通过与其对应的激素结合对滤泡细胞的发育、卵黄的合成与积累以及排卵起着重要的调控作用。

关键词: 扬子鳄; 性类固醇激素受体; 免疫细胞化学

中图分类号: Q571 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)03-0495-07

在脊椎动物卵巢发育和卵子成熟过程中, 性类固醇激素受体即雌激素受体、雄激素受体和孕激素受体发挥着重要的调控作用。近年来, 国内外学者在这方面做了很多的工作, 相关报道多见于鱼类^[1]、两栖类^[2-4]和哺乳类^[5-8]。关于爬行纲性类固醇激素受体在卵巢中的免疫化学定位尚未见报道。本实验采用免疫细胞化学方法, 运用激光共聚焦显微镜进行观察, 对性类固醇激素受体在扬子鳄卵巢发育中的定位及其调控作用分析研究, 旨在探索扬子鳄生殖活动的特点, 进一步探讨激素对爬行类动物卵巢发育的作用机制, 为爬行动物生殖生理学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

扬子鳄 5 条, 均为成体雌鳄, 分别于 2007 年 6 月、9 月、10 月, 2008 年 3 月、4 月各一条, 取自安徽省扬子鳄繁殖研究中心。解剖取其性腺, 切成小块, 浸入新配制的 4% 多聚甲醛中固定 24h, 梯度酒

精脱水, 石蜡包埋, 切片厚 6 μm 。

1.2 方法

主要试剂 即用型兔抗人雌激素受体(ER)单克隆抗体, 即用型兔抗人雄激素受体(AR)单克隆抗体, 即用型兔抗人孕激素受体(PR)单克隆抗体, 即用型 FITC (绿色, 485—535 nm)标记的羊抗兔 IgG, 正常封闭山羊血清, 抗体稀释液, 以上试剂均购于武汉博士德生物工程有限公司。细胞膜荧光染料 DiI (红色, 550—565 nm)购于 Biotium; 细胞核荧光染料 Hoechst 33258 (蓝色, 365—460 nm)购于 Sigma 公司。

免疫组织化学法 石蜡切片常规脱蜡至水后, 放入新鲜配制的 3% 过氧化氢(H_2O_2)处理 10min 以抑制内源性氧化物酶活性。抗原热修复 15min, 暴露易被固定破坏的抗原。5% BSA 封闭液处理 20min 以减少非特异性背景。一抗 4℃ 孵育过夜(18h), 第一抗体分别为兔抗人雌激素受体(Estrogen Receptor, ER, 1 : 200 稀释)、兔抗人雄激素受体(Androgen Receptor, AR, 1 : 200 稀释)、兔抗人孕激素受体(Progesterone Receptor, PR, 1 : 200 稀释)。细胞膜荧

收稿日期: 2008-10-09; 修订日期: 2009-06-23

基金项目: 国家自然科学基金(30770312); “动物生物学”安徽师范大学优秀学术团队基金; 安徽省学术与技术带头人专项基金; 生物环境与生态安全安徽省高校省级重点实验室基金资助

作者简介: 许多(1983—), 女, 内蒙古通辽人; 硕士研究生; 主要从事繁殖生物学方面的研究。E-mail: xuduo1983@yahoo.com.cn

通讯作者: 吴孝兵, E-mail: wuxb@mail.ahnu.edu.cn

光染料 DiI 和细胞核荧光染料 Hoechst 33258 在 37℃ 下处理 20min, FITC 标记的二抗(1:200 稀释)处理 20min, 第二抗体为即用型羊抗兔 IgG, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照组, PBS 冲洗后甘油封片, 激光共聚焦显微镜观察摄片。

2 结果

2.1 卵巢发育分期的组织学特征

期卵泡 卵原细胞处于增殖期, 数量多且排列紧密, 形态不规则, 细胞核被染成深紫色, 嗜碱性强(图版 I-1)。

II 期卵泡 卵原细胞已完成了向初级卵母细胞的过渡, 此时细胞形状不规则, 椭圆形或多角形; 细胞核强嗜碱性, 椭圆形位于细胞的一侧, 核仁多个紧靠核膜内缘分布, 有些细胞核中可见被染成深紫色的块状结构, 可能是异染色质; 细胞质嗜碱性弱, 呈淡紫色, 网状分布, 远离细胞核的细胞质较为疏松; 细胞膜的内侧出现了小的液泡状结构; 卵母细胞外有一层滤泡细胞环绕, 滤泡细胞梭形, 核较大(图版 I-1, 2)。

期卵泡 卵母细胞体积增大, 形状不规则, 圆形、椭圆形或多角形; 细胞质形成弱嗜碱性的疏松网状结构, 细胞核周围的细胞质也变得疏松, 可见一些小的卵黄颗粒; 小液泡的数量增加, 多在细胞膜内侧分布; 细胞核椭圆形, 嗜碱性强, 核仁染色深, 靠近核膜内缘; 卵母细胞外可见双层滤泡细胞, 滤泡细胞长梭形, 细胞核大且染色深(图版 I-3)。

IV 期卵泡 此期卵母细胞的细胞质中卵黄颗粒增多, 细胞体积继续增大, 大小不一的卵黄颗粒几乎充满整个卵母细胞, 有些卵黄颗粒互相融合成块状, 着色较深; 细胞形状不规则, 细胞核椭圆形, 嗜碱性强, 在细胞的一侧分布, 有些细胞中的细胞核不能清晰的观察到; 细胞膜内侧的液泡结构已消失; 卵母细胞外双层滤泡细胞结构增厚, 形状仍为梭形(图版 I-4)。

V 期卵泡 卵母细胞逐渐萎缩退化, 细胞核溶解, 卵黄分解, 此期卵泡不易观察到。

2.2 雌激素受体在卵巢中的分布

在 3 月 IV 期卵泡中, ER 阳性反应广泛分布于滤泡细胞; 4 月 II-IV 期卵泡中, 滤泡细胞呈阳性反应; 6 月 II-III 期卵泡中, 滤泡细胞呈梭形, ER 阳性反应

分布于卵母细胞胞质和滤泡细胞胞质等部位; 9、10 月 III-IV 期卵泡中, 滤泡细胞呈阳性反应。4 月卵泡的滤泡细胞中雌激素受体的阳性反应最强, 9、10 月卵巢的滤泡细胞中阳性反应较弱(图版 I-5—10)。

2.3 雄激素受体在卵巢中的分布

在 3 月 II-IV 期卵泡的滤泡细胞中, AR 的阳性反应较弱; 4 月 II-IV 期卵泡中, 激素受体在滤泡细胞中的阳性反应增强; 6 月 II-IV 期卵泡中, 雄激素受体的阳性位点广泛分布于卵母细胞胞质和外层滤泡细胞胞质等部位; AR 在 9 月 II-IV 期卵泡的滤泡细胞中阳性反应减弱; 10 月 IV 期卵泡中, AR 的阳性反应在两层滤泡细胞中分布(图版 I-11—16)。

2.4 孕激素受体在卵巢中的分布

在 3 月 II-IV 期卵泡中, PR 阳性反应定位于滤泡细胞; 4 月 II-IV 期卵泡中, PR 在滤泡细胞中的阳性反应增强; 6 月 II-IV 期卵泡中, 滤泡细胞呈梭形, 分布不规则, 受体阳性反应广泛分布于滤泡细胞胞质中; 9 月 II-IV 期卵泡中, 滤泡细胞中的 PR 阳性反应减弱; 10 月 II-IV 期卵泡中, PR 阳性反应仅见于滤泡细胞(图版 I-17—22)。

3 讨论

3.1 扬子鳄卵巢中三种性类固醇激素受体的分布

三种性类固醇激素受体在各种动物卵巢中均有表达, Lenie, *et al.*^[5]用免疫组织化学法研究了鼠卵巢雌激素受体在粒层细胞核和滤泡细胞中的定位。雷忻等^[2]观察了北方山溪鲵卵巢中性类固醇激素受体的分布, 结果发现 AR、ER、PR 在卵母细胞中阳性反应较强。汪安云等^[4]用免疫细胞化学法对中华蟾蜍卵巢中三类固醇激素受体进行检测, 发现它们在不同发育时期的滤泡细胞、卵母细胞胞质和核膜等部位均有表达。而我们的研究发现, 在扬子鳄卵巢中三类固醇激素受体多在滤泡细胞质中分布, 卵母细胞中少见阳性反应, 仅在 6 月卵泡的卵母细胞质中可见阳性反应部位。与汪安云等^[4]研究的中华蟾蜍卵巢类固醇激素受体分布特征不尽相同, 而同 Lenie, *et al.*^[5]和雷忻等^[2]的研究结果相差较大。扬子鳄属爬行类, 一般在 6 月上旬进行交配, 7 月中上旬产卵, 我们把其卵巢发育分成五个时期^[9-16], 它的卵巢类固醇激素受体的分布特点和中华蟾蜍、北方山溪鲵、鼠存在一定共同点, 体现了动物之间生殖生理的共性, 但由于扬子鳄的生活环境和繁殖

习性与之不同, 阳性反应部位有其自己的特点。

3.2 三种性类固醇激素受体与卵巢发育的关系

ER Morán^[6]对新生鸡卵巢发育中 ER α 的免疫组织化学观察表明, ER 对卵巢功能的表达、滤泡的发育起着调控作用, 若缺乏会导致成年鸡胚胎发育和滤泡成熟的停滞。Hulas-Stasiak, *et al.*^[8]研究了毛鼠卵巢发育过程中 ER α 和 ER β 的免疫组织化学定位, 结果发现, ERs 在粒层细胞的增殖和分化中起重要的作用, ERs 随着毛鼠年龄的增加表达增强而随着滤泡的发育减弱。雌激素在卵子发生过程中起重要作用, 其生殖效应是通过受体介导的^[17], ER 作为转录因子, 被激活后通过与 DNA 上的反应元件结合, 从而调节靶基因的转录, 刺激卵子的发育^[18]。在本研究对扬子鳄卵泡的免疫细胞化学检测中可见, ER 在 II-IV 期的滤泡细胞中均有表达, 其中 4 月卵泡中的阳性反应最强, 9 月卵巢滤泡细胞中的阳性反应最弱。卵巢中滤泡细胞是性类固醇激素生成细胞^[1]。推测在卵巢滤泡细胞中, E₂ 和 ER 结合形成复合体, 调控滤泡细胞的成熟以及卵黄的形成。产卵前 ER 表达增强而在产卵后减弱, 说明产卵前物质积累的过程中 ER 起着重要的作用, 可能介导卵黄的合成^[19], 同时对排卵也起着调节作用; 产卵后卵巢逐渐退化, ER 阳性反应位点减少推测在卵巢发育后期 ER 的作用减小^[20]。

AR 雷忻等^[3]用免疫细胞化学法对隆肛蛙卵巢的类固醇激素受体进行了检测, 发现雄激素受体在各期滤泡细胞中均可表达, 可能在滤泡细胞的生长发育中扮演重要角色。卵巢滤泡细胞分泌的雄激素主要是睾酮, 而雄激素是卵母细胞成熟的主要启动因子^[21]。雄激素发挥作用要通过与 AR 的结合来实现^[22]。在本研究中, 仅在 6 月卵巢的卵母细胞胞质中可见阳性反应位点, 而 AR 在各期滤泡细胞中均有分布, 其中 4 月卵泡的滤泡细胞中的阳性位点最多, 9 月卵泡中的阳性位点最少。推测 AR 存在于卵母细胞胞质中可能发挥其介导作用, 通过与胞质中的信号分子结合调控卵母细胞的成熟; 滤泡细胞中的 AR 与睾酮结合促进滤泡细胞的发育。产卵前阳性位点增多说明 AR 可能对卵黄的积累、雌激素受体作用的发挥起到一定的促进作用, 随着产卵的结束, 卵巢逐渐退化, AR 表达减弱, 推测在卵巢发育后期, AR 的调控作用减小^[23]。在卵母细胞和滤泡细胞中的详细调控机制还需进一步研究。

PR Vermeirsch, *et al.*^[7]以犬为对象, 对卵巢中孕激素受体的免疫定位进行研究, 观察到 PR 在上皮细胞、膜细胞、粒层细胞、滤泡细胞等部位都有表达, 滤泡细胞中的 PR 在排卵和卵黄的生成过程中发挥重要作用。卵巢是孕激素产生的主要部位, 并且孕激素对卵泡功能和黄体的维持以及排卵很重要^[24], 这些效应大部分是 PR 介导的^[21]。雷忻等^[21]在研究中发现, 滤泡细胞分泌的孕酮在卵黄合成与积累、卵泡成熟过程中发挥重要作用。从本研究对卵泡中 PR 的检测结果可见, 各期滤泡细胞中均有表达, 其中 4 月卵泡中的阳性位点最多, 9 月滤泡细胞中的阳性位点最少。因此推测, PR 可以介导滤泡细胞的成熟, 同时, 在产卵前的卵黄合成和随后的排卵过程中也起到一定的作用, 调节卵母细胞的发育和成熟, 产卵后阳性位点减少说明孕激素对卵巢发育后期的作用减小。观察还发现仅有 6 月的卵母细胞胞质中有 PR 的表达, 根据雷忻^[2]、汪安云^[4]等对非基因调控的阐述, 我们推测胞质中的 PR 可能作为信号转导因子来调节卵母细胞的发育和成熟^[25]。但爬行动物卵巢发育过程中, 3 种激素受体的相互关系以及详细的调控机制等仍有待深入研究。

参考文献:

- [1] Fang Y Q, Weng Y Z, Hu X X. Distribution of sex steroid hormones and their receptors in the gonads and nervous system of amphioxus [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, **47**(4): 398—403 [方永强, 翁幼竹, 胡晓霞. 性类固醇激素及其受体在文昌鱼性腺和神经系统中的分布. 动物学报, 2001, **47**(4): 398—403]
- [2] Lei X, Zhang Y H, Lian Z M. Distribution of three sex steroid hormones and receptors in developmental oocytes of *Batrachuperus tibetanus* [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2007, **35**(1): 13—18 [雷忻, 张育辉, 廉振民. 3 种性类固醇激素及其受体在北方山溪鲵卵母细胞发育中的分布. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, **35**(1): 13—18]
- [3] Lei X, Zhang Y H. Immunocytochemistry of sex steroid receptors of ovary of the *Rana quadranus* [J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2004, **32**(7): 33—36 [雷忻, 张育辉. 隆肛蛙卵巢类固醇激素受体的免疫细胞化学研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, **32**(7): 33—36]
- [4] Wang A Y, Wu X B. Immunocytochemical localization of sex steroid receptors in the ovary of *bufo gargarizans* [J].

- Journal of Anhui Normal University* (Natural Science), 2006, **29**(3): 262—265 [汪安云, 吴孝兵. 中华蟾蜍卵巢性类固醇激素受体的免疫细胞化学研究. 安徽师范大学学报(自然科学版), 2006, **29**(3): 262—265]
- [5] Lenie S, Smits J. Estrogen receptor subtypes localization shifts in cultured mouse ovarian follicles [J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, **129**: 827—840
- [6] Morán M G G. Immunohistochemical detection of estrogen receptor alpha in the growing and regressing ovaries of newly hatched chicks [J]. *Journal of Molecular Histology*, 2005, **36**: 147—155
- [7] Vermeirsch H, Simoens P, Coryn M, *et al.* Immunolocalization of progesterone receptors in the canine ovary and their relation to sex steroid hormone concentrations [J]. *Reproduction*, 2001, **122**: 73—83
- [8] Hulas-Stasiak M, Gawron A. Immunohistochemical localization of estrogen receptors ERa and ERb in the spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary during postnatal development [J]. *Journal of Molecular Histology*, 2007, **38**: 25—32
- [9] Uribe M C A, Guillelte L J. Oogenesis and ovarian histology of the American Alligator *Alligator mississippiensis* [J]. *Journal Morphology*, 2000, **245**: 225—240
- [10] Zhang Y H, Liu Q H, Ren Y H, *et al.* Microstructure and ultrastructure of developing oocytes of Chinese Giant Salamander [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, **45**(1): 15—22 [张育辉, 刘全宏, 任耀辉, 等. 中国大鲵卵母细胞发育的显微和超微结构. 动物学报, 1999, **45**(1): 15—22]
- [11] Zheng S M, Xiong Q M. The study on the fine structure of the ovary of *Coreius heterodon* [J]. *Journal of Wuhan University* (Natural Science Edition), 1993, **3**: 103—109 [郑曙明, 熊全沫. 铜鱼卵巢的显微和超微结构研究. 武汉大学学报(自然科学版), 1993, **3**: 103—109]
- [12] Fu L R, Hong M L, Shi H T, *et al.* Seasonal changes of female reproductive organs of *Sacalia quadriocellata* [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2006, **25**(2): 360—364 [傅丽容, 洪美玲, 史海涛, 等. 四眼斑水龟雌性生殖器官组织结构的季节变化. 四川动物, 2006, **25**(2): 360—364]
- [13] Zhao H H, Liu X C, Wang Y X, *et al.* Seasonal cycles of ovarian development and serum sex steroid levels of female grouper *Epinephelus coioides* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2003, **42**(6): 56—63 [赵会宏, 刘晓春, 王云新, 等. 斜带石斑鱼雌鱼卵巢发育与血清性类固醇激素的生殖周期变化. 中山大学学报(自然科学版), 2003, **42**(6): 56—63]
- [14] He D K, Chen Y F, Cai B. Histological studies on the gonad development of an endemic Tibet fish *Gymnocypris selincuoensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2001, **25**(1): 1—13 [何德奎, 陈毅峰, 蔡斌. 纳木错裸鲤性腺发育的组织学研究. 水生生物学报, 2001, **25**(1): 1—13]
- [15] Ni H E, Du L Q. Observation on the ovary development of *Ilisha elongata* in the East China Sea [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, **25**(4): 317—324 [倪海儿, 杜立勤. 东海鲷卵巢发育的组织学观察. 水产学报, 2001, **25**(4): 317—324]
- [16] Tang H Y, Chen D Q, Shi J Q, *et al.* A histological study of the gonad development of *Gymnocypris przewalskii przewalskii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(2): 166—172 [唐洪玉, 陈大庆, 史建全, 等. 青海湖裸鲤性腺发育的组织学研究. 水生生物学报, 2006, **30**(2): 166—172]
- [17] Lei X, Zhang Y H, Li Y L. Research advance of estrogen receptor in the ovary [J]. *Journal of Yanan University* (Natural Science Edition), 2004, **23**(3): 73—76 [雷忻, 张育辉, 李亚琳. 卵巢雌激素受体的研究进展. 延安大学学报(自然科学版), 2004, **23**(3): 73—76]
- [18] Su X H, Xi G S. Immunocytochemical localization of estrogen receptor in the oogenesis of termites [J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2005, **38**(6): 545—549 [苏晓红, 奚耕思. 雌激素受体在白蚁卵发生过程中的免疫细胞化学定位. 实验生物学报, 2005, **38**(6): 545—549]
- [19] Zhan X Q, Wang X Z, Zhang J H. Progress on estrogen receptor and female reproduction [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2005, **26**(12): 35—39 [詹晓庆, 王鲜忠, 张家骅. 雌激素受体和雌性生殖研究进展. 动物医学进展, 2005, **26**(12): 35—39]
- [20] Zhao X M, Xu X M. Estrogen receptor and its molecular mechanism [J]. *Jour. of Northwest Sci-Tech Univ. of Agri. and For.* (Natural Science Edition), 2004, **32**(12): 154—158 [赵晓民, 徐小明. 雌激素受体及其作用机制. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, **32**(12): 154—158]
- [21] Lei X, Zhang Y H, Li Y L. A study on immunocytochemistry of sex steroid hormones of ovary of the *Rana quadranus* [J]. *Journal of Northwest University* (Natural Science Edition), 2004, **34**(4): 446—448 [雷忻, 张育辉, 李亚琳. 隆肛蛙卵巢性类固醇激素的免疫细胞化学研究. 西北大学学报(自然科学版), 2004, **34**(4): 446—448]
- [22] Xie F, Liu J, Zhang Y L. Action mechanisms of androgen receptor [J]. *Prog. Biochem. Biophys.* 1999, **26**(2): 131—134 [解芳, 刘峻, 张永莲. 雄激素受体的作用机制. 生物化学与生物物理进展, 1999, **26**(2): 131—134]
- [23] Wen H S, Gao L. Studies on immunohistochemical response of testosterone receptors and estradiol and its receptors in stone flounder (*Kareius bicolor at us*) [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, **29**(4): 161—164 [温海深, 高玲. 石鲈卵巢雌二醇及其受体和睾酮受体免疫组织化学研究. 海洋学报, 2007, **29**(4): 161—164]
- [24] Zhou D G, Zheng W M, Zhang D X. Changes of sex steroid in *Monopterus albus* during its spawning induced with injec-

- tion of LHRH-A [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1995, **19**(4): 311—316 [周定刚, 郑维明, 张大祥. 催产时黄鳝性类固醇激素含量变化的研究. 水生生物学报, 1995, **19**(4): 311—316]
- [25] Lei X, Zhang Y H. Regulation of sex steroid hormones in the development of amphibian oocyte [J]. *Journal of Yanan University* (Natural Science Edition), 2004, **23**(1): 79—83 [雷忻, 张育辉. 性类固醇激素在两栖动物卵母细胞发育中的调控作用. 延安大学学报(自然科学版), 2004, **23**(1): 79—83]

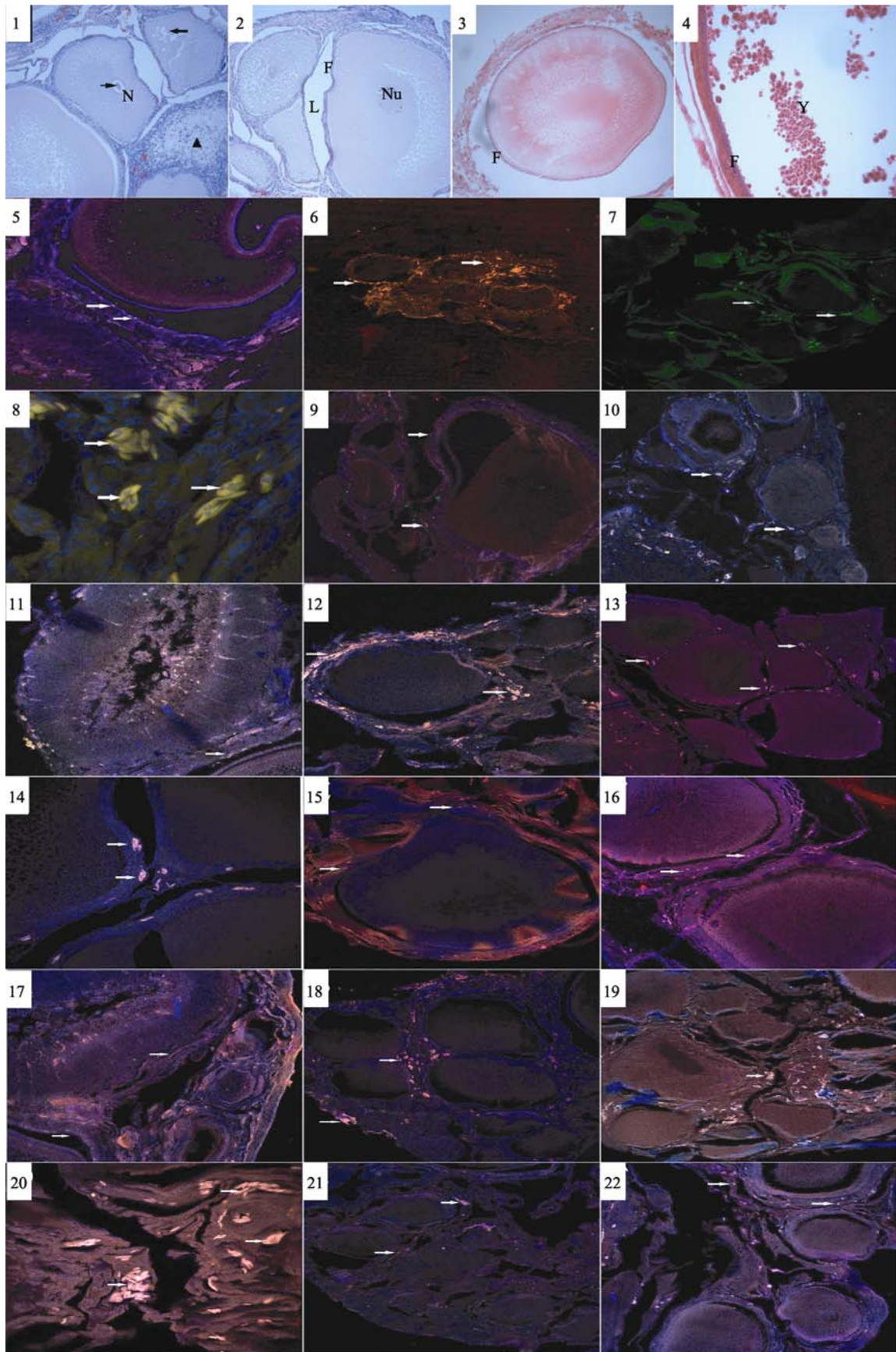
IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF SEX STEROID RECEPTORS IN THE OVARY OF CHINESE ALLIGATORS, *ALLIGATOR SINENSIS*

XU Duo¹, WU Xiao-Bing¹, WANG Li¹, LI Qin¹, ZHU Hong-Xing² and WANG Chao-Lin²

(1. Key Laboratory for Conservation and Exploitation of Biological Resource in Anhui Province, College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China; 2. Anhui Research Center for Chinese Alligator Reproduction, Xuancheng 242034, China)

Abstract: The sex steroid hormone receptors, specifically such as estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and androgen receptor (AR), play an important role during the oocyte development and oogenesis cycle of Reptilia. Immunocytochemical localization and regulations were researched in different developmental stages of the follicles of *Alligator sinensis* by using estrogen, progesterone and androgen receptors. In order to look for the characteristic deeply of procreation in *Alligator sinensis*, discuss the mechanism of hormone in the oocyte development of Reptilia farther and served as valuable referenced materials to provide scientific theory in breeding animals, we adopted histologic and immunocytochemical methods in this paper, moreover, the results of the study were observed by Laser Scanning Confocal Microscopy. The development of the ovary had seasonal changes and was divided into five periods (stage -) according to morphological changes of oocyte. AR, ER and PR were detected in Chinese alligator's ovary, and positive responses positions were developed with fluorescence. The results indicated that the three kinds of hormone receptors expressed in different stages of the follicles. There were expressed strongly in the stage II-IV follicle in April and weakly in September, ER and AR expressed in the follicle but in the cytoplasm of oocyte only in June: ER expressed broadly in the follicle cells in March and April, but ER in the stage II-III follicle in June distributed both in the cytoplasm of oocyte and follicle cells; immunolabelling of AR was localized weakly in the stage II-IV follicle in March and existed double layers of follicle cells in the stage IV follicle in October; immunolabelling of PR was localized mostly cytoplasm of follicle cells in the stage II-IV follicle in June and the follicle cells were spindle in shape with arranging erratically. The connection was osculatory between the three kinds of sex steroid hormone receptor and oocyte development. These results suggested that follicle cells in the ovary of alligators could produce sex steroid hormone, therefore, we presumed estradiol(E) combined ER to form compound to regulate maturation of follicle cells and composition of yolk, ER expressed strongly before the oviposit but weakly after that, it illuminated that ER operated importantly during the procession of objective accumulation before spawning; AR located in the cytoplasm of the oocyte might control oocyte maturation by combining with signal molecule in cytoplasm, and AR in the follicle cells might promote follicle development by means of integrating with testosterone (T), the ovary degenerated gradually and AR expressed weakly along with the ending of laying eggs, the function of AR decreased in a later period of oocyte development; progesterone (P) was significant in the function of follicles, luteal maintainability and ovulation, but these action came true by linking with PR, which might tune up the development and maturation of oocyte served as signal numerator. In conclusion, the three kinds of sex steroid hormone receptors related with each other and might play affection on regulating the development of follicles, vitellogenic stage and ovulation in the oocyte maturation of alligators. But particular mechanism of reptilian sex steroid hormone receptors is looked ahead.

Key words: Chinese alligator; Sex steroid hormone receptor; Immunocytochemistry



图版 I 扬子鳄卵巢的发育过程及 ER、AR 和 PR 在扬子鳄不同时期卵巢中的分布

Plate I The development of ovary and ER, AR and PR located in the different stages of ovary in *Alligator sinensis*

1. I、II期卵泡 The ovary in the stage I and II $\times 200$; 2. II期卵泡 The ovary in the stage II $\times 200$; 3. III期卵泡 The ovary in the stage III $\times 100$; 4. IV期卵泡 The ovary in the stage IV $\times 200$; 5. 3月ER免疫阳性物定位在IV期卵泡的滤泡细胞 ER located in the follicle cell of IV stage oocyte in March $\times 100$; 6. 4月ER免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞 ER located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in April $\times 100$; 7. 6月ER免疫阳性物定位在II-III期卵泡的卵母细胞胞质、滤泡细胞 ER located in the follicle cell, cytoplasm of II-III stage oocyte in June $\times 100$; 8. 6月ER免疫阳性物定位在II-III期卵泡的滤泡细胞 ER located in the follicle cell of II-III stage oocyte in June $\times 400$; 9. 9月ER免疫阳性物定位在III-IV期卵泡的滤泡细胞 ER located in the follicle cell of III-IV stage oocyte in September $\times 100$; 10. 10月ER免疫阳性物定位在III-IV期卵泡的滤泡细胞 ER located in the follicle cell of III-IV stage oocyte in October $\times 100$; 11. 3月AR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞 AR located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in March $\times 100$; 12. 4月AR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞 AR located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in April $\times 100$; 13. 6月AR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞质、卵母细胞胞质 AR located in the follicle cell, cytoplasm of II-IV stage oocyte in June $\times 100$; 14. 6月AR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞质 AR located in the cytoplasm of follicle cell of II-IV stage oocyte in June $\times 400$; 15. 9月AR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞 AR located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in September $\times 100$; 16. 10月AR免疫阳性物定位在IV期卵泡的滤泡细胞 AR located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in October $\times 100$; 17. 3月PR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞 PR located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in March $\times 100$; 18. 4月PR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞 PR located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in April $\times 100$; 19. 6月PR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞 PR located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in June $\times 100$; 20. 6月PR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞质 PR located in the cytoplasm of follicle cell of II-IV stage oocyte in June $\times 400$; 21. 9月PR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞 PR located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in September $\times 100$; 22. 10月PR免疫阳性物定位在II-IV期卵泡的滤泡细胞 PR located in the follicle cell of II-IV stage oocyte in October $\times 100$

N: 细胞核 Nuclear; Nu: 核仁 Nucleolus; Y: 卵黄颗粒 Yolk; F: 滤泡细胞 Follicle cells; L: 空隙 Lacuna; \rightarrow : 异染色质 Heterochromatin; \uparrow : 液泡 Vacuole; \blacktriangle : 增殖细胞 Proliferation of cells