小鼠精子发生后期生精细胞的基因表达谱

俞作仁 关纪奎 葛晔华 马 静 郭 睿 李 赛 薛社普 韩代书*

(中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学细胞生物学系, 北京 100005. * 联系人, E-mail: daishu@public.bta.net.cn)

摘要 在精子发生后期由圆形精子细胞分化为成熟精子的过程称为精子形成(spermiogenesis). 为探索参与精子细胞变态的相关基因, 利用 cDNA 微阵列技术研究了 Balb/c 小鼠精母细胞、圆形精子细胞及长形精子细胞的 1176 个已知基因的表达谱. 结果表明在这 3 种生精细胞中, 共检测到 208 个基因的表达, 其中大多数基因从精母细胞到圆形精子和长形精子表现为表达下调, 但有 7 个基因在圆形精子细胞中表达上调, 3 个基因在长形精子细胞中表达上调. 从以上差异表达的基因中选取了 7 个基因, 利用半定量 RT-PCR 方法对微阵列的结果进行了验证. 发现其中的 6 个基因在不同生精细胞中的差异表达与微阵列结果一致, 1 个基因未显示出差异表达. 这些结果为研究精子形成相关基因的表达、调节以及功能提供了重要的线索.

关键词 精子发生 精子形成 cDNA 微阵列 基因表达谱 RT-PCR

精子发生(spermatogenesis)是生殖生物学领域中的一个重大课题. 这一过程表现了许多在体细胞分化过程中所没有的现象. 精子发生过程可分为 3 个时期, 有丝分裂期、减数分裂期和精子形成期. 有丝分裂期指原始精原细胞(primitive spermatogonia)通过有丝分裂进行增殖, 产生 A, B 型精原细胞, A 型精原细胞继续保持原始精原细胞的特性进行有丝分裂; B 型精原细胞进入分化途径变为初级精母细胞(primary spermatocyte)开始减数分裂. 在减数分裂期, 初级精母细胞通过第 1 次减数分裂产生次级精母细胞, 次级精母细胞不进行 DNA 复制就进入第 2 次减数分裂, 产生单倍体的圆形精子细胞(round spermatid). 然后圆形精子细胞变态成形, 形成长形精子细胞(elongating spermatid). 精子发生的分子机制尚不清楚, 特别是还未见精子形成过程中细胞变态相关基因的报道. 本研究试图寻找调控精子形成的关键基因, 从而深入研究精子细胞变态的分子机理.

大规模研究基因表达特性是由结构基因组学向功能基因组学转变的桥梁, 基因组全序列的完成是认识基因功能的第 1 步, 更重要的是研究基因在细胞增殖与分化过程中的生物学功能. 要研究基因的功能, 重要的一步是要首先了解大量基因的表达特性, 筛选出可能与某些功能相关的基因, 进而对这些基因的功能进行深入的研究. 新近发展起来的 DNA 微阵列技术可以同时对大批量基因的表达特性进行定量分析[1]. 这一技术已被广泛应用于研究肿瘤细胞生长及分化相关基因[2~5], 人类成纤维细胞在血清的影响下基因短暂表达的变化[6], 胚胎干细胞分化相关基因[7], 精子发生过程中应激反应基因的表达变化[8]及温度对精子发生过程中基因表达的影响[9]等.

在本研究中, 我们利用改良的细胞分离方法 1), 从不同周龄的 Balb/c 小鼠睾丸中分离纯化了高纯度的各期生精细胞, 选择减数分裂中的粗线期精母细胞、减数分裂后的圆形精子细胞以及变态成形后的长形精子细胞为对象, 利用 Clontech 的 cDNA 阵列尼龙膜研究了 1176 个已知基因在这 3 类生精细胞中的表达谱, 并对差异表达的基因进行了分析.

1 材料与方法

(ⅰ) 动物. 不同周龄(3, 5, 8 周)雄性 Balb/c 小鼠购自北京生物制品鉴定所, 为二级实验动物. 3, 5 及 8 周龄小鼠的睾丸分别用以分离纯化精母细胞、圆形精子细胞及长形精子细胞.

(ⅱ) 阵列膜. cDNA 阵列尼龙膜(8 cm × 12 cm)购自美国 Clontech 公司, 为 Atlas Mouse 1.2 Expression Array. 膜上点有 1176 个已知基因的 cDNA 片段, 其长度在 200 ~ 600 bp 之间, 它们是由转录区扩增而来, 缺少 poly(A)尾、重复元件及其他高同源性序列以降低非特异性的杂交. 这些基因根据其功能的相似性被排列在 6 个区域中, 所有这些基因的名称、在膜中的位置以及 GenBank 中的注册号等信息均公布在 Clontech 的网站(www.clontech.com).

(ⅲ) 生精细胞的分离. 各期生精细胞的分离步骤参照文献[10]的改良方法: (1) 每次取 10 只雄性小

1) 俞作仁, 孙晓冬, 关纪奎, 等. 长白猪精原细胞的分离与纯化. 解剖学报, 2002 (待发表)

鼠, 无菌操作取睾丸, 去除包膜, 把管状结构组织用弯头剪剪成碎块, 移入离心管, 加 5 mL 含有 0.5 mg/mL 胶原酶(Sigma)的 PBS, 33℃温育 15 min, 其间不断振摇并用吸管吹打数次. 静置 5 min, 待组织和细胞沉降管底后, 弃上清液并用 PBS 洗涤. 加入 5 mL 含 0.5 mg/mL 胰蛋白酶(Sigma)和 1.0 μg/mL DNase (Promega)的 PBS, 33℃温育 15 min, 用吸管轻轻吹打直至滴片镜检时视野中全是散在的单个细胞. 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 并用 PBS 洗 2 次, 细胞沉淀重悬在 10 mL 含 0.5% BSA 的 1640 培养基中, 100 目筛网过滤, 制成单细胞悬液并进行细胞计数. (2) 最终把细胞悬浮于 20 mL 含 0.5% BSA 的 1640 培养基中, 加入沉降池中沉降介质的表面, 沉降介质是自上而下形成的含 2% ~ 4% BSA 连续梯度的 1640 培养基. 细胞在沉降池中自然沉降 3 h 使不同大小的细胞分层, 然后收集细胞, 共收集 40 管, 10 mL/管, 收集时的流速为 5 mL/min. 不同发育阶段的生精细胞可根据其形态特征在光学显微镜下鉴别, 把高纯度(> 85%)的同类细胞组分合并在一起. (3) 把获得的生精细胞接种在培养瓶中, 于 33℃, 5%的 CO_2 培养箱中培养 6 h, 让混有的少量间质细胞及支持细胞贴壁, 进一步提高生精细胞的纯度. (4) 获得的细胞经苏木素染色, 在光学显微镜下观察形态, 并随机记数 300 个细胞, 根据其中混杂的细胞数计算各期生精细胞的纯度.

(ⅳ) RNA 的提取. 利用 Trizol^{TM}(Gibco, BRL)试剂, 按照说明书中的步骤, 提取各期生精细胞的总 RNA. 用不含 RNase 的 DNase Ⅰ(Sigma)处理 RNA, 除去基因组 DNA 的污染. 通过电泳、*A* 值以及 RT-PCR 扩增 *GAPDH* 基因的结果来评估 RNA 的质量.

(ⅴ) 探针标记及杂交. 所购买的 cDNA 微阵列试剂盒中提供了除同位素外所有需要的试剂, 探针标记及杂交严格按照产品说明书中的步骤进行. 在逆转录中用 5 μg 总 RNA 为模板, 在 MMLV 逆转录酶(Clontech)的作用下使[α-P^{32}]-dATP(Amersham)掺入到逆转录生成的 cDNA 序列中, 利用 Chroma Spin-200 分离柱(Clontech)过滤纯化标记的 cDNA, 测定探针的放射强度. 微阵列尼龙膜在适量 ExpressHyB (Clontech)杂交液中于 68℃预杂交 1 h, 把变性的探针以终浓度为 10^6 min^{-1} · mL^{-1} 的量加入杂交液中, 于 68℃杂交过夜. 第 2 天, 杂交膜用预热至 68℃的洗液Ⅰ(2 × SSC, 1%SDS)于 68℃洗 3 次, 然后用洗液Ⅱ(0.1 × SSC, 0.5%SDS)于 68℃洗 1 次, 每次洗脱 30 min. 最后用 2 × SSC 在室温下浸洗 10 min. 洗脱后的杂交膜与 X 射线片一起在曝光盒中于–80℃放射自显影.

(ⅵ) 基因表达分析. 通过肉眼观察, 根据杂交信号的强弱来评估基因表达水平的高低. 为了去除实验条件引起的误差, 每个杂交实验重复 2 次, 而每次的杂交膜经过不同时间(12, 24, 36, 48 h)的曝光. 选择管家基因杂交信号以及背景信号相同的曝光片进行比较, 选择两次重复实验结果一致的杂交点进行分析. 把杂交信号强度相差 3 倍以上的基因标记为差异表达基因, 包括上调表达和下调表达.

(ⅶ) 半定量 RT-PCR 验证. 选取 7 个在精子形成中表达上调的基因, 从 GenBank 调取它们的 cDNA 全长序列, 运用 Dnastar 核酸分析软件分别设计引物. 引物由赛百盛生物技术公司(北京)合成. RT 反应由 M-MLV(Promega)催化完成, PCR 扩增条件为: 94℃, 30 s, 55℃, 30 s, 72℃, 1 min, 循环 32 次(*GAPDH* 基因 25 次循环), 72℃延伸 10 min. 扩增产物以 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并用凝胶扫描系统定量分析. 每次 PCR 反应均以 *GAPDH* 基因作为对照, 通过目的基因和 *GAPDH* 电泳条带的光吸收灰度比值来衡量目的基因的表达强度.

2 结果

2.1 各期生精细胞的纯度

为了提高分离细胞的纯度, 我们对重力沉降法进行了改良, 即重力沉降后结合自然贴壁除去少量混杂的支持细胞及间质细胞, 提高了各期生精细胞的纯度. 选择不同周龄小鼠的睾丸来分离纯化不同发生阶段的生精细胞, 获得的精母细胞、圆形精子细胞及长形精子细胞的纯度分别为 95%, 96%及 92%, 各时相混杂的细胞主要为精原细胞. 各期生精细胞经苏木素染色后的形态见图 1. 精母细胞较大, 直径为 12 ~ 13 μm(图 1(a)); 圆形精子细胞较小, 直径约为 7 ~ 8 μm, 着色较深(图 1(b)); 长形精子细胞进一步变小, 形态不均一(图 1(c)).

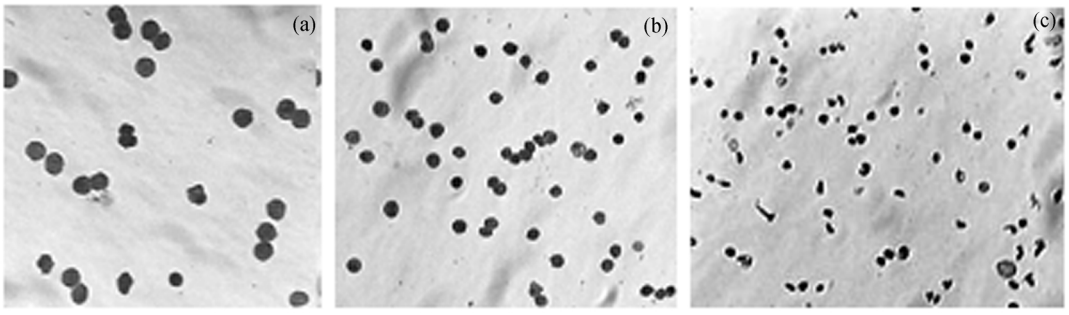


图 1 各期生精细胞的形态特征(苏木素染色)
(a) 精母细胞, (b) 圆形精子细胞, (c) 长形精子细胞

2.2 基因表达谱

利用 Atlas cDNA 微阵列尼龙膜检查了小鼠的 1176 个已知基因在精母细胞、圆形精子细胞和长形精子细胞中的表达. 杂交结果(图 2)显示: 每一个点代表一个基因, 在 3 种细胞中共检查到 208 个表达的基因, 精母细胞中表达的基因有 201 个(图 2(a)), 圆形精子细胞中有 180 个基因表达(图 2(b)), 长形精子细胞中有 155 个基因表达(图 2(c)). 从结果中可以看出背景信号稳定, 两次重复杂交的结果高度一致, 说明 RNA 质量、探针的标记以及杂交条件是稳定的.

2.3 基因的差异表达

为了鉴定 3 种细胞中差异表达的基因, 我们用肉眼对表达的基因逐一进行了比较, 只把那些上调和下调 3 倍以上的基因视为差异表达基因. 结果显示: 与精母细胞相比, 在圆形精子和长形精子细胞中许多基因的表达出现了下调, 只有少数基因表达上调. 从精母细胞到圆形精子共有 67 个基因表达下调, 其中有 20 个基因表达下调幅度在 10 倍以上; 从精母细胞到圆形精子细胞有 7 个基因表达上调, 分别为 IgG2b 的 Fc 受体(*FCGR2B*), LIM 结构域结合蛋白Ⅱ(*LIM2*), 果蝇 MAD 同源分子 1(*MADH1*)、热休克蛋白 86(*HSP86-1*)、细胞死亡防卫蛋白 1(*DAD1*)、神经胶质细胞源神经生长因子(*GDNF*)及有丝分裂激活蛋白激酶 14(*MAPK14*). 它们的位置在图 2(b)中用箭头标出; 从圆形精子到长形精子细胞表达上调的基因有 3 个, 分别为细胞因子信号抑制因子-1(*SOCS-1*), CEK7 配体(*CEK7-L*)/ephrin A2 (*EFNA2*)及 ERA-1 蛋白(*ERA-1*), 其位置在图 2(c)中用箭头标出. 这些差异表达基因主要为转录因子、细胞周期蛋白、骨架蛋白、生长因子以及它们的受体.

2.4 半定量 RT-PCR 分析

为了进一步验证差异表达基因的准确性, 根据各基因的已知背景资料和功能特点, 选择了 7 个有可能参与调节精子形成的基因, 利用半定量 RT-PCR 方法对它们在 3 种细胞中的表达特征进行了进一步验证. 凝胶电泳结果见图 3(a), 目的基因与参照基因 *GAPDH* 的凝胶扫描光吸收灰度比值的变化曲线见图 3(b). 结果表明其中 6 个基因的表达特征与微阵列膜的杂交结果一致, 1 个基因(*MAPK14*)在不同细胞中的表达未见明显差异.

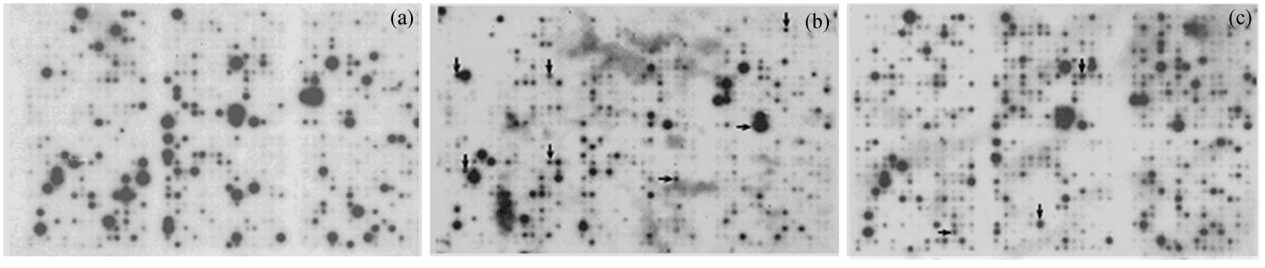


图 2 cDNA 微阵列杂交结果
(a) 精母细胞 RNA 为探针, (b) 圆形精子细胞 RNA 为探针, (c) 长形精子细胞 RNA 为探针. 箭头标注的为比前一期生精细胞表达上调的基因

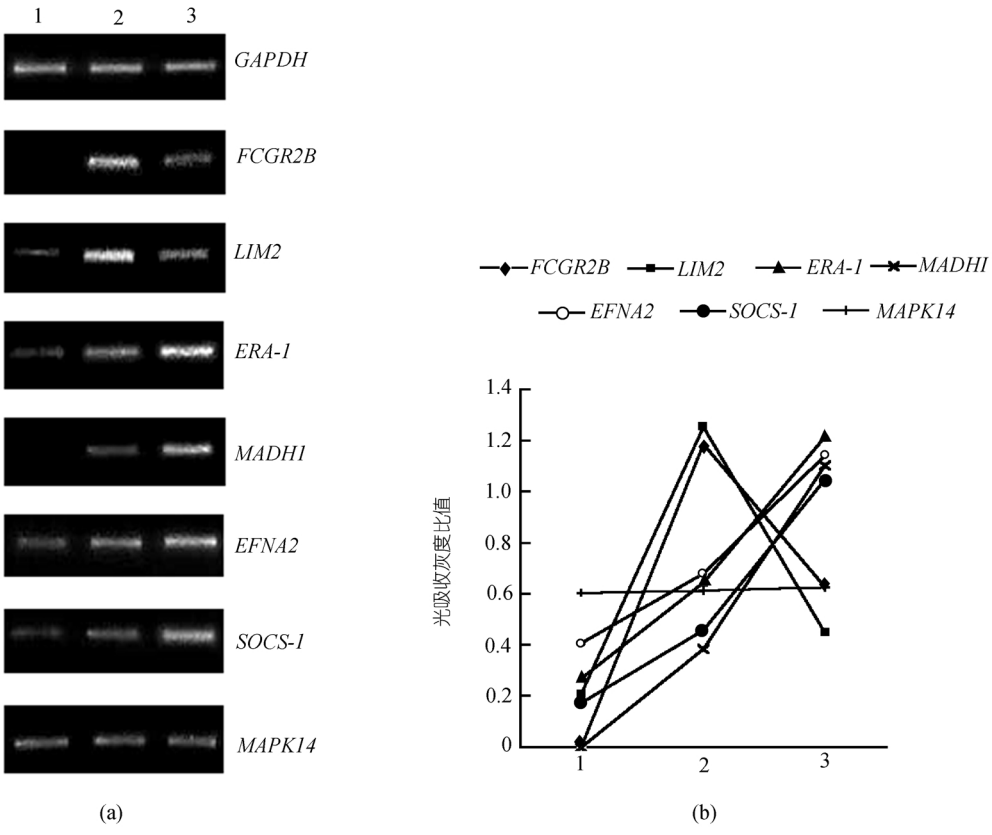


图 3 半定量 RT-PCR 实验结果

(a) 7 个目的基因和 1 个对照基因在不同生精细胞中的 PCR 产物凝胶电泳图谱. (b) 7 个目的基因在 3 种生精细胞中的表达特征量化曲线图, 以不同生精细胞为横坐标, 目的基因与对照基因 *GAPDH* 的凝胶扫描光吸收灰度比值为纵坐标. 1 示精母细胞, 2 示圆形精子细胞, 3 示长形精子细胞

3 讨论

精子发生过程是一个特殊的细胞分化过程, 在这一过程中表现出了许多其他细胞分化过程中所没有的现象, 如减数分裂及变态成形, 正是这一过程中的特有现象吸引着众多研究者. 精子发生过程受多种因素的调节, 人们对外部因素, 如激素对精子发生的影响进行了长期广泛的研究, 有了比较清楚的认识[10]. 与此相比, 对于这一过程的内因, 即精子发生基因水平的调节所知甚少. 现代生物学技术, 如 DDRT-PCR, 转基因小鼠和基因敲除小鼠模型的应用, 使得人们对于精子发生相关基因有了更多的了解. 我们最近报道[11~13]了中心体蛋白在精子发生过程中的表达及可能的功能, 但是对于整个精子发生过程的分子机理、哪些关键基因起决定作用尚不清楚, 特别是尚未见有关“精子变态成形相关基因”方面的报道.

精子发生是一个复杂的过程, 它一定涉及许多基因的调节, 研究大量基因的表达特征是认识这一过程中基因调控的重要手段. DNA 芯片技术的出现使得人们能够同时研究大量基因的表达变化. 本研究应用 cDNA 微阵列技术研究了小鼠的 1176 个已知基因在小鼠精子形成期不同阶段生精细胞中的表达. 为了集中研究精子形成过程中细胞变态的分子机制, 本研究选择分析了变态之前的精母细胞, 变态起始的圆形精子细胞以及其后的长形精子细胞的基因表达谱. 在这 3 种生精细胞中共检测到 208 个基因的表达, 其中精母细胞基因表达数量为 201 个, 在其后的圆形及长形精子细胞中基因表达的数量及表达水平普遍下降, 这可能是由于精子细胞的变态、细胞核开始浓缩、基因表达水平下降所致. 本研究中, 为了避免动物因素如饲养条件的不同或动物品系的不同等有可能造成基因表达谱的差异, 我们所使用的小鼠均来自同一动物室同一批次的同种品系, 且为二级实验动物.

有趣的是与精母细胞相比，圆形精子细胞中发现了 7 个表达上调的基因；与圆形精子细胞相比，在长形精子细胞中发现了 3 个表达上调的基因. 这些表达上调的基因可能在精子变态成形过程中起诱导作用. 在圆形精子中上调的基因包括 *FCGR2B*, *LIM2*, *MADH1*, *HSP86-1*, *DAD1*, *GDNF* 以及 *MAPK14*. 其中，对于热休克蛋白在睾丸中的表达及精子发生中的功能有了广泛的认识，早期的研究[14]发现 *HSP86* 主要是在生精细胞中表达，而在体细胞中的表达很低，并发现 *HSP86* 在睾丸发育过程中随着生精细胞的分化表达水平升高，这一结果与本研究结果相符. 本研究的结果还进一步证明了 *HSP86* 的表达在圆形精子细胞中最高. 最近报道[15]*GDNF* 在 Leydig 细胞及 Sertoli 细胞都可以检测到其表达，而在生精细胞中只在部分精母细胞及圆形精子细胞中有较高的表达，*GDNF* 可能在精子的发生及成熟过程中起重要的作用. 在长形精子细胞中发现了 3 个表达上调的基因: *SOCS-1*, *EFNA2* 和 *ERA-1*. 对我们发现的这些差异表达基因，通过 Medline 检索，发现有两种基因(*HSP86*, *GDNF*)已有人做了在睾丸中的表达研究，其结果均与本研究中的结果一致，说明本研究中的方法是可靠的. 为了进一步验证所获的结果，根据已知基因的背景资料和功能特点，我们从表达上调的基因中选择了 7 个未曾有与精子发生相关报道的基因，用半定量 RT-PCR 方法对它们的表达进行了定量分析. 结果发现除 1 个基因(*MAPK14*)的表达未见有显著差异外，其余 6 个基因表达特征均与微阵列结果一致. 表明 cDNA 阵列的结果基本上是稳定可靠的，但有必要用其他方法进行验证. 重要的是我们发现的多数差异表达的基因还未见在精子发生过程中的表达及功能的报道，所以本研究的结果为发现更多的精子发生，特别是精子变态的相关基因提供了许多新的信息，深入研究这些基因在精子发生过程中的功能可能为阐明精子发生的分子机制提供重要的线索.

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划资助项目(批准号: G1999055901).

参 考 文 献

1 Schena M, Shalon D, Davis R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 1995, 270: 467~470

2 Huang F, Adelman J, Jiang H, et al. Identification and temporal expression pattern of genes modulated during irreversible growth arrest and terminal differentiation in human melanoma cells. Oncogene, 1999, 18: 3546~3552

3 Wang K, Gan L, Jeffery E, et al. Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. Gene, 1999, 229: 101~108

4 Moch H, Schraml P, Bubendorf L, et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. Am J Pathol, 1999, 54: 981~986

5 Hoch R V, Thompson D A, Baker R, et al. GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. Int J Cancer, 1999, 84: 122~128

6 Iyer V R, Eisen M B, Ross D T, et al. The transcriptional program in the response of human fobroblats to serum. Science, 1999, 283: 83~87

7 Kelly D L, Rizzino A. DNA microarray analyses of genes regulated during the differentiation of embryonic stem cells. Mol Reprod Dev, 2000, 56: 113~123

8 Aguilar-Mahecha A, Hales B F, Robaire B. Expression of stress response genes in germ cells during spermatogenesis. Biol Reprod, 2001, 65: 119~127

9 Rockett J C, Mapp F L, Brian G J, et al. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. Biol Reprod, 2001, 65: 229~239

10 McLachlan R I. The endocrine control of spermatogenesis. Baill Clin Endocrinol Metabol, 2000, 14(3): 345~362

11 孙晓冬，俞作仁，马静，等. 中心体蛋白 Cenexin 在大鼠精子发生过程中的表达. 实验生物学报, 2002, 35(1): 21~25

12 孙晓冬，马静，葛晔华，等. 中心体蛋白 Centrin 在不育病人精子中的异常表达. 科学通报, 2002, 47(1): 139~140

13 孙晓冬，葛晔华，马静，等. 大鼠中心体蛋白家族基因的克隆及其在睾丸中的表达特征. 中国科学, C 辑, 2002, 32(4): 366~372

14 Gruppi C M, Wolgemuth D J. HSP86 and HSP84 exhibit cellular specificity of expression and co-precipitate with an HSP70 family member in the murine testis. Dev Genet, 1993, 14(2): 119~129

15 Davidiff M S, Middendorff R, Koeva Y, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptors GFRalpha-1 and GFRapha-2 in the human testis. Ital J Anat Embryol, 2001, 106(2 Suppl 2): 173~180

(2002-05-10 收稿, 2002-07-08 收修改稿)