

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001585

Plac8l1 在小鼠精子发生过程中的表达特征研究

王慧英¹, 张蕊¹, 张瑾¹, 昌文林²

(1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院妇产科, 北京 100038; 2. 男性生殖与遗传广东省和深圳市重点实验室、北京大学深圳医院泌尿外科研究所、深圳北京大学香港科技大学医学中心, 深圳 518036)

【摘要】目的:探讨 *Plac8l1* (placenta-specific 8 like 1) 基因在小鼠睾丸组织的表达特征, 及其与精子发生的相关性。**方法:**经生物信息学方法初步筛选到一个睾丸特异性表达候选基因 *Plac8l1*, 并推测其可能与小鼠精子发生相关; 采用半定量 RT-PCR 和实时定量 RT-PCR 对 *Plac8l1* 表达的时空特异进行了研究; 应用原位杂交技术对 *Plac8l1* mRNA 在成年小鼠睾丸中的细胞类群表达特征进行初步研究; 通过构建过表达 PLAC8L1-EGFP 重组蛋白质粒及生物信息学分析进行亚细胞定位研究与功能预测。**结果:**① *Plac8l1* 是 1 个睾丸特异性转录基因。②在成年小鼠, *Plac8l1* 只在睾丸和附睾组织发生特异性转录, 而且睾丸中的表达水平明显高于附睾 [睾丸 vs. 附睾 = (1.000 ± 0.000) vs. (0.036 ± 0.018) , $P=0.000$]。③随着小鼠精子发生的起始, 睾丸中 *Plac8l1* 转录水平逐渐升高 ($P=0.000$)。④mRNA 原位杂交结果显示 *Plac8l1* mRNA 主要定位在成年小鼠睾丸中的间质细胞和精母细胞。⑤经生物信息学分析, PLAC8L1 也有着类似于 PLAC8 的功能域, 过表达重组蛋白显示 PLAC8L1 在细胞膜上聚集。**结论:** *Plac8l1* 是 1 个睾丸特异性基因, 可能与精子发生过程中的精母细胞分化相关; PLAC8L1 具有 1 个富含半胱氨酸的 PLAC8 结构域, 这一结构域可能介导了 PLAC8L1 在细胞膜上聚集并与其他蛋白相互作用, 并可能在精母细胞分化中发挥重要作用。

【关键词】睾丸特异性基因; *Plac8l1*; 精子发生; 睾丸; 小鼠**【中图分类号】**R318.16**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-08-31

Expression characteristics of *Plac8l1* in mouse testicular tissue

Wang Huiying¹, Zhang Rui¹, Zhang Jin¹, Chang Wenlin²(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University;
2. Guangdong and Shenzhen Key Laboratory of Male Reproductive Medicine and Genetics, Institute of Urology, Peking University Shenzhen Hospital, Biomedical Research Institute, Shenzhen Peking University-The Hong Kong University of Science and Technology Medical Center)

【Abstract】Objective: To study the expression characteristics of Placenta-specific 8 like 1 (*Plac8l1*) in mouse testicular tissue, and to reveal its possible function during spermatogenesis. **Methods:** The candidate gene *Plac8l1* was preliminarily screened to be specific expression in testis by bioinformatics methods, and it is speculated that the gene was related to the spermatogenesis. Besides, semi quantitative RT-PCR and real-time quantitative RT-PCR were used to investigate the tissue specificity of *plac8l* and the temporal and spatial characteristics of the process of spermatogenesis, while *in situ* hybridization was used to preliminarily study the expression characteristics of *Plac8l1* mRNA in the testis of adult mouse. Finally, the subcellular localization was studied and its functional was predicted by constructing PLAC8L1-EGFP recombinant protein particle and bioinformatics analysis. **Results:** ①The results of preliminary bioinformatics showed that *Plac8l1* is one of gene for specific transcription. ②Semi-quantitative and quantitative real-time RT-PCR indicated that *Plac8l1* only transcript in adult mice testis and epididymis, and testicular expression level was significantly higher than epididymis. ③As the mouse matured, the *Plac8l1* transcription level in testis increased gradually. ④RNA *in situ* hybridization showed that mRNA was mainly positioned in ledig cell and sperm mother cell in mature mouse testis. ⑤Bioinformatics analysis showed that PLAC8L1 also had a function domain similar to the PLAC8 and the over expression of recombinant proteins showed that protein aggregated in the cell membrane. **Conclusion:** *Plac8l1* is a testis specific gene, and is very likely to associate with spermatocyte differentiation in the process of spermatogenesis. PLAC8L1 has a cystine which riches in PLAC8 domain, and the domain may mediate PLAC8L1 to aggregate in cell membrane and interact with other protein and play an important role in spermatocyte differentiation.

作者介绍:王慧英, Email: 13683266138@163.com,

研究方向: 生殖生物学的分子基础与临床。

通信作者:昌文林, Email: wenlin_chang2006@163.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目 (编号: 31701305); 深圳市科
创委 2017 年度基础研究 (自由探索) 资助项目 (编号: JCYJ
20170306161657672)。**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1425.012.html>
(2018-04-08)**【Key words】**testis specific gene; *Plac8l1*; spermatogenesis; testis; mice

近几年,全球成年男女患有不孕不育症的比例越来越大,据统计男女各占一半^[1]。其中,超过 30% 的男性不育是因为遗传因素导致生精功能障碍^[2]。男性生精功能障碍可导致精子数量相对减少、活动度变差或射精功能受损及精子畸形率变高,从而引起男性不育。男性精子发生的完整过程受到多基因精确调控。比如 *MFSJ1* (macaca fuscata spermatogenic cell-specific DNA J homolog)^[3]、*Ddr1* (discoidin domain receptor 1)^[4]、*PHF7* (plant homodomain finger protein 7)^[5]、*CERM* (cAMP responsive element modulator)^[6] 都已被报道为睾丸特异性基因,在生精过程中有着关键作用。还有研究表明,*SPATA16* (spermatogenesis associated 16)^[7]、*PICK1* (protein interacting with PRKCA 1)^[8] 和 *DPY19L2* (Dpy-19 like 2)^[9-10] 基因的缺失或突变可致圆头精子的发生。但是,组学分析揭示的大量在睾丸具有特征性表达的基因,在精子发生过程中具体表达模式和功能还未知。

基于生物信息学分析和基因表达谱芯片数据挖掘分析,推测在哺乳动物中,与精子发生有关的基因达 2 000 多个^[11]。前期分析中,本研究基于美国国家生物信息中心的表达序列标签数据库 (unigene database) 和 BioGPS 数据库,筛选出了一个功能未知的基因 *Plac8l1*,发现该基因是一个小鼠睾丸特异性候选基因,可能与小鼠睾丸的精子发生相关。本研究目的是揭示 *Plac8l1* 的时空表达特征,并初步揭示其与精子发生的相关性。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级的 B6 小鼠购自广东省医学实验动物中心,由北京大学香港科技大学深圳医学中心实验动物中心饲养管理。动物的使用按照北京大学深圳医院医学伦理委员会和广东省实验动物使用管理条例的指导进行。

1.2 RNA 提取与 cDNA 的逆转录合成

颈椎脱臼法处死 1、2、3、4、6 和 8 周龄的 B6 小鼠 (各 6 只,共 36 只),提取睾丸。采集成年小鼠 (6 月龄) 6 只分别提取各组织 (睾丸、附睾、膀胱、肝、肾、心、脾、肺、脑)。新鲜组织经液氮研磨后,利用 TRIZOL 提取总 RNA 提取过程按照操作手册进行。逆转录自由引物 OligodT (18) 由广州艾基生物技术有限公司合成。提取的总 RNA 定量后,各取 1 μ g 总 RNA 按照逆转录试剂盒 (Takara) 的说明书进行,合成 cDNA。

1.3 PCR

反转录后的 cDNA 进行半定量 PCR 反应,反应总体积为

20 μ L。反应体系为 PCR Master Mix (Takara, 日本) 10 μ L、ddH₂O 7.2 μ L、cDNA 1 μ L、正反引物各 0.5 μ L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 32 个循环 (内参为 20 个循环);72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 后 4 $^{\circ}$ C 冷却。用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

qRT-PCR:SYBR Premix Ex TaqTM II PCR Mix (Takara, 日本) 10 μ L,DEPC H₂O 7.2 μ L,cDNA 1.2 μ L,正反引物各 1 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s,45 个循环。以 Gapdh 作为内参,以 2^{- $\Delta\Delta$} 分析结果。实时定量 RT-PCR 用 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪 (Roche, 德国) 进行检测。PCR 引物见表 1,Gapdh 为内参。

表 1 PCR 引物信息

Tab.1 PCR primer information

基因名称	引物序列 (5'-3')	产物 (bp)
<i>Plac8l1</i>	正向引物 CTCCAGATGCTGCAAGGACA	161
	反向引物 ACTGTGCTCTACCAATGGC	
<i>Gapdh</i>	正向引物 GGTGAAGTCGGTGTGAACG	213
	反向引物 CTCGCTCTGGAAGATGGTG	

1.4 构建载体与探针制备

RT-PCR 扩增 *Plac8l1* CDS 全长基因片段,琼脂糖凝胶电泳鉴定并胶回收后,TA 克隆将纯化的目的片段连接到 pGM-T 载体,挑选并测序验证阳性克隆;10 μ g 质粒经限制性内切酶线性化后,回收并用作体外 cRNA 探针合成的模板。采用 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche) 体外合成 *Plac8l1* 的反义探针和正义探针 (用作原位杂交的阴性对照)。

1.5 睾丸冰冻切片与 mRNA 原位杂交

新鲜小鼠睾丸经液氮速冻,并于 -80 $^{\circ}$ C 保存。利用冰冻切片机 (Leica CM1900) 制作 6 μ m 厚度的冰冻切片,切片经 4% 的中性多聚甲醛固定 1 h 后,用于后续的原位杂交分析。冰冻切片原位杂交具体过程按照文献中描述进行^[12]。

1.6 生物信息学分析

不同物种间 PLAC8L1 蛋白序列的比对,及 PLAC8L1 和 PLAC8 蛋白间的同源比对,采用在线生物信息学工具 ESPrnt3.0^[13] 进行。

1.7 统计分析

统计分析采用 SPSS 17.0 的单因素方差分析进行,实验计量数据表示为均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 *Plac8l1* mRNA 在成年小鼠各组织器官的表达特征

利用半定量 RT-PCR 检测 *Plac8l1* 在成年小鼠各组织器官的转录特征,结果显示 *Plac8l1* mRNA 为睾丸特异性高表达 (图 1A)。实时定量 RT-PCR 分析结果显示,*Plac8l1* 的转录本主要存在于睾丸组织中,在其他组织几乎不表达 (图 1B)。

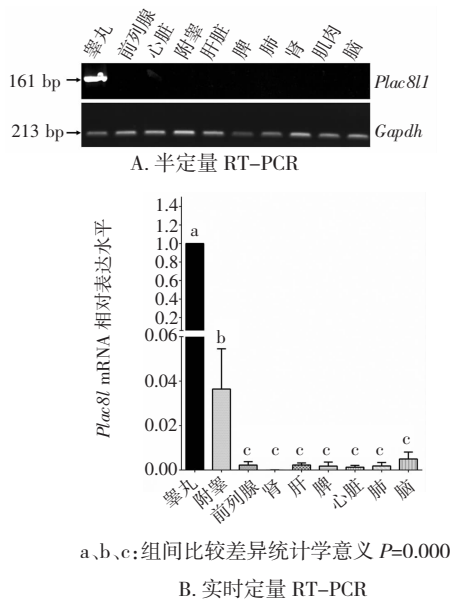


图 1 *Plac8l1* mRNA 在成年小鼠(6 月龄)不同组织器官的表达特征
Fig.1 The expression characteristics of *Plac8l1* mRNA in different tissues of adult mice

2.2 *Plac8l1* mRNA 在不同生理阶段小鼠睾丸的表达特征

在出生后前 2 周的小鼠睾丸中,*Plac8l1* mRNA 水平很低;从出生后第 3 周开始,随着精子发生的起始,该基因表达开始升高,并呈年龄依赖性逐渐上升,成年时达到最高表达水平(图 2)。

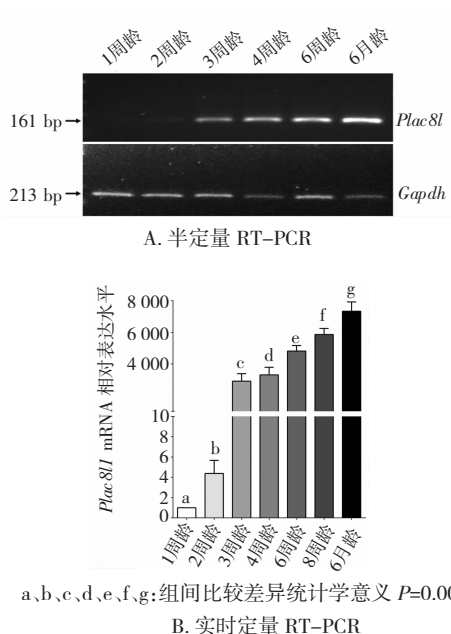


图 2 *Plac8l1* 基因 mRNA 在不同周龄小鼠睾丸组织的表达特征
Fig.2 The expression characteristics of *Plac8l1* mRNA in mouse testis at different postnatal week

2.3 在成年小鼠睾丸的定位

采用 mRNA 原位杂交技术在睾丸冰冻切片对 *Plac8l1* mRNA 进行定位(图 3)。反义探针孵育切片显示成年小鼠 *Plac8l1* mRNA 主要定位睾丸中的间质细胞(图 3A,白色箭头)

和精母细胞中(图 3A,红色箭头)。连续切片经正义探针孵育并显色用作对照,无明显特异性显色(图 3B)。

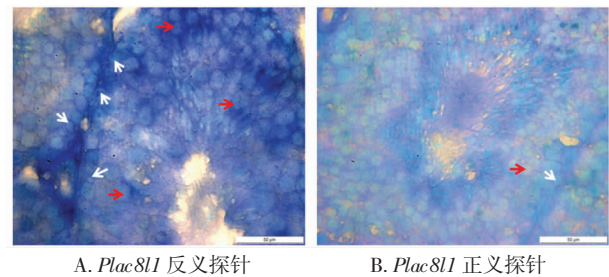
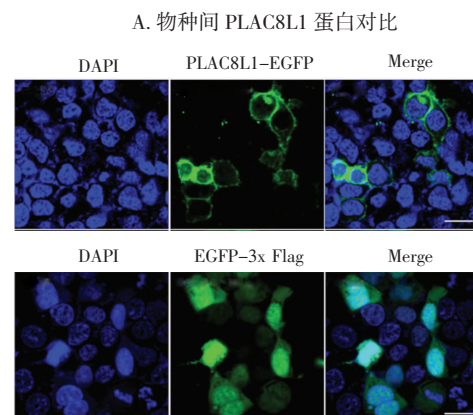
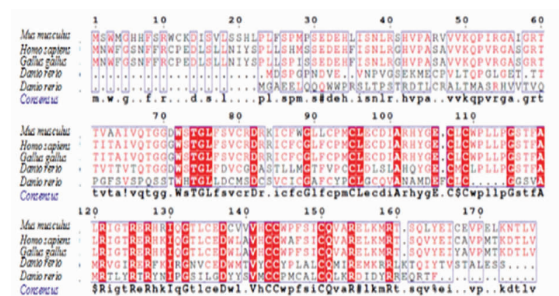


图 3 *Plac8l1* mRNA 在成年小鼠睾丸中的定位

Fig.3 Location of the *Plac8l1* mRNA in the adult mouse testis by in situ hybridization

2.4 PLAC8L1 的可能结构和亚细胞定位

PLAC8L1 是一个物种间高度保守的小分子量蛋白(图 4A),因其与 PLAC8 蛋白一样,也具有富含半胱氨酸的区域(PLAC8 功能域),因此被命名为 PLAC8L1。本研究前期研究发现,人 PLAC8 蛋白在胎盘滋养层细胞的亚细胞定位特征表现为在细胞膜和细胞核一侧聚集,并且这种亚细胞定位特征可能由其富含半胱氨酸残基的 PLAC8 功能域所决定(结果未发表)。如图 4 所示,PLAC8L1 也具有类似于 PLAC8 蛋白的富含半胱氨酸残基的功能域(图 4A,蓝色星号所示)。因此,这极有可能也是 PLAC8L1 的功能域。在 293T 细胞系中过表达 PLAC8L1-EGFP 重组蛋白,结果显示该重组蛋白也有着类似于 PLAC8 的亚细胞定位特征,主要表现为在细胞膜上和细胞核的一侧聚集(图 4B)。



B. PLAC8L1-EGFP 亚细胞定位

图 4 PLAC8L1 蛋白序列比对和亚细胞定位特征

Fig.4 PLAC8L1 protein sequence alignment and subcellular localization of PLAC8L1-EGFP recombinant protein in testis of adult mouse

3 讨论

精子发生是一个复杂的生理过程,包括精原干细胞的有丝分裂、精母细胞的减数分裂和精子形变 3 个阶段。组学分析结果显示,在睾丸有表达的基因占人类基因组总基因数量的 74%,其中有 1 980 个基因在睾丸的表达明显高于其他组织器官^[14]。精子发生受许多睾丸特异性基因,或在睾丸具有时空特异性表达规律的基因的严格调控。不孕不育根据其病因和严重程度来看,主要来源于精子发生障碍^[15]。小鼠在出生第 10 天精原细胞开始进入减数分裂期,第 2 周和第 3 周单倍体的圆形精子开始形成,第 4 周圆形精子开始形态转变后形成长形精子,第 5 周左右成熟精子排出并进入附睾中^[16]。*Plac8l1* 是一个新的睾丸特异性基因。从以下几点可以说明该基因通过介入小鼠精母细胞分化而与精子发生相关:①不同组织检测发现 *Plac8l1* 在睾丸中高表达,而在其他组织几乎不表达,提示 *Plac8l1* 基因在小鼠睾丸发育过程中有很重要的作用。②*Plac8l1* 基因在小鼠出生后第 3 周表达突然明显上升,并呈年龄依赖性逐渐增加,成年后表达量达到最高,这与精母细胞减数分裂的开始和圆形精子的发生保持一致,说明该基因与小鼠的精子发生紧密相关。③原位杂交结果显示,*Plac8l1* mRNA 主要定位于成熟小鼠睾丸中的间质细胞和精母细胞,睾丸间质细胞是分泌雄激素的主要细胞,说明 *Plac8l1* 基因可能参与精母细胞分化。④*Plac8l1* mRNA 在成熟睾丸中高表达,但是在包含大量成熟精子的附睾中表达水平却很低,这进一步表明该基因主要参与了精母细胞的分化过程。⑤过表达 PLAC8L1-EGFP 重组蛋白,亚细胞定位结果显示该重组蛋白在细胞膜上和细胞核的一侧聚集,与已知 PLAC8 的亚细胞定位特征表现相似。⑥PLAC8L1-EGFP 的亚细胞定位特征及与 PLAC8 蛋白的生物信息学分析,为研究 PLAC8L1 的分子作用机制提供的思路,即这 2 个蛋白都有一个富含半胱氨酸残基的功能域,已知这一功能域能直接与 ERK2、AKT1、PLSCR1 等直接结合。

本研究采用 RT-PCR、real-time PCR、原位杂交、免疫荧光、生物学信息分析等技术,验证了 *Plac8l1* 基因属于睾丸特异性新基因,并可能通过参与精母细胞分化而与精子的发生相关。进一步探讨研究 *Plac8l1* 的功能,可能有助于更深入了解精子发生的分子调控机制。

参 考 文 献

- [1] Nishimune Y, Tanaka H. Infertility caused by polymorphisms or mutations in spermatogenesis-specific genes[J]. J Androl, 2006, 27(3): 326-334.
- [2] Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons[J]. Hum Reprod, 1999, 14(11): 2689-2694.
- [3] Yu SS, Takenaka O. Molecular cloning, structure, and testis-specific expression of MFSJ1, a member of the DNAJ protein family, in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(2): 443-449.
- [4] Mullenbach E, Walter L, Dressel R. A novel discoidin domain receptor 1 (Ddr1) transcript is expressed in postmeiotic germ cells of the rat testis depending on the major histocompatibility complex haplotype [J]. Gene, 2006, 372: 53-61.
- [5] Xiao J, Xu M, Li J, et al. NYD-SP6, a novel gene potentially involved in regulating testicular development/spermatogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(1): 101-110.
- [6] Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, et al. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene [J]. Nature, 1996, 380(6570): 162-165.
- [7] Dam AH, Kosciński I, Kremer JA, et al. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia [J]. Am J Hum Genet, 2007, 81(4): 813-820.
- [8] Liu G, Shi QW, Lu GX. A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia[J]. Asian J Androl, 2010, 12(4): 556-560.
- [9] Zhu F, Gong F, Lin G, et al. DPY19L2 gene mutations are a major cause of globozoospermia; identification of three novel point mutations [J]. Mol Hum Reprod, 2013, 19(6): 395-404.
- [10] Kosciński I, Elinati E, Fossard C, et al. DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia[J]. Am J Hum Genet, 2011, 88(3): 344-350.
- [11] Ewing B, Green P. Analysis of expressed sequence tags indicates 35 000 human genes[J]. Nat Genet, 2000, 25(2): 232-234.
- [12] Chang WL, Yang Q, Zhang H, et al. Role of placenta-specific protein 1 in trophoblast invasion and migration[J]. Reproduction, 2014, 148(4): 343-352.
- [13] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Web Server issue): W320-324.
- [14] Uhlen M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome[J]. Science, 2015, 347(6220): 1260419.
- [15] Kolesnikova LI, Kolesnikov SI, Kurashova NA, et al. Causes and factors of male infertility[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2015(5): 579-584.
- [16] Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, et al. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization[J]. J Cell Biol, 1977, 74(1): 68-85.

(责任编辑:方 济)