

精子 β -actin 下调对小鼠怀孕率影响的实验研究谢斌¹,刘世学¹,翁宏庆²,唐伟²

(1. 重庆市巴南区人民医院泌尿外科,重庆 401320;2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400042)

【摘要】目的:通过构建精子 β -actin 下调的小鼠模型探讨 β -actin 下调对小鼠精子活力及怀孕率的影响。**方法:**首先构建携带下调 ACTB 基因表达的 shRNA 序列的慢病毒载体。然后将昆明小鼠随机分为 ACTB-RNAi-LV 组(实验组)、5X-1-RNAi-LV 组(空病毒对照组)、生理盐水组(空白对照组),每组雄性、雌性小鼠各 20 只,于雄鼠 4 周大时睾丸局部分别注射慢病毒载体、空病毒颗粒、生理盐水。饲养至性成熟后,将各组小鼠进行组内交配,观察各组雌鼠怀孕率并提取雄性小鼠精子进行 real-time PCR、Western blot 及精子活力的分析。**结果:**成功构建 β -actin 下调精子的小鼠模型;实验组与空病毒对照组、空白对照组相比,精子中 β -actin 的 mRNA 表达量、 β -actin 表达量、精子的活力均有所降低且有统计学意义(P 均 <0.05),空病毒对照组与空白对照组之间无统计学差异($P>0.05$)。**结论:** β -actin 下调精子活力明显下降,同时导致雌鼠受孕率降低。

【关键词】 β -actin;精子活力;怀孕率;shRNA 慢病毒**【中图分类号】**R698⁺.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-04-15Effects of gene silencing of sperm β -actin on the pregnant rate of ratsXie Bin¹, Liu Shixue¹, Weng Hongqing², Tang Wei²

(1. Department of Urinary Surgery, People's Hospital of Chongqing Banan District;

2. Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective:To discuss the effects of gene silencing of sperm β -actin on the vitality of sperm and pregnant rate of rats.**Methods:** Firstly, lentivirus carrying shRNA sequence was constructed to down regulate the expression of ACTB gene. Secondly, the 60 male and 60 female rats were randomly divided into three groups: blank control group (normal saline group), empty lentivirus group (5X-1-RNAi-LV group) and experimental group (ACTB-RNAi-LV group). Male rats were administrated with saline or lentivirussolution by tissue injection at testis at the fourth week. Rats were mated when they reached sexual maturity. Finally, the pregnancy rate of female rats and the motility of sperm were observed. The expression of ACTB gene and β -actin in sperm were detected by reverse transcription PCR and Western blot.**Results:** The model of sperm expressing low level of β -actin**作者简介:**谢斌, Email: 125504436@qq.com,

研究方向, 男性不育。

通信作者:唐伟, Email: tangwei2060@163.com,**基金项目:**重庆市渝中区科技计划资助项目(编号:20120209);重庆市卫生局面上资助项目(编号:2012-2-418)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000304.html>

jury[J]. Acta Clin Belg Suppl, 2007(2): 326-331.

[2] Faubel S. Acute kidney injury and multiple organ dysfunction syndrome[J]. Minerva Urol Nefrol, 2009, 61(3): 171-188.

[3] GeröD, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase: a new therapeutic target?[J]. Current Opinion in Anaesthesiology, 2008, 21(2): 111-121.

[4] Pradelli LA, Beneteau M, Ricci J. Mitochondrial control of caspase-dependent and independent cell death[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(10): 1589-1597.

[5] Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, et al. Ischemic and nonischemic acute kidney injury cause hepatic damage[J]. Kidney Int, 2009, 75(8): 783-792.

[6] 邵姝元, 刘玉玲, 邵佑之, 等. 大鼠肾缺血再灌注损伤对肝微结构的影响[J]. 解剖学杂志, 2012, 35(4): 441-443.

[7] Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, et al. Hepatic changes during various period of reperfusion after induction of renal ischemia in

rats[J]. Transplant Proc, 2009, 41(7): 2749-2750.

[8] Kadkhodae M, Golab F, Zahmatkesh M, et al. Effect of different period of renal ischemia on liver as remote organ[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(9): 1113-1118.

[9] Park SW, Chen SW, Kim M, et al. Cytokines induce intestine and liver injury after renal ischemia or nephrectomy[J]. Lab Invest, 2011, 91(1): 63-84.

[10] Alano CC, Garnier P, Ying W, et al. NAD depletion is necessary and sufficient for PARP-1 mediated neuronal death[J]. J Neurosci, 2010, 30(8): 2967-2978.

[11] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(1): 107-120.

(责任编辑: 关蕴良)

was successfully construed. The expression of β -actin and mRNA of ACTB gene as well as pregnant rate in experimental group were significantly reduced compared with those in blank control group and empty lentivirus group ($P < 0.05$). There was no difference in the expression of β -actin and pregnant rate in blank control group and empty lentivirus group ($P > 0.05$). **Conclusion:** The motility of sperm expressing the low level of β -actin could decline, which leads to the fall of pregnant rate.

【Key words】 β -actin; sperm vitality; pregnant rate; lentivirus carrying shRNA sequence

弱精子症是导致男性不育的主要原因之一,约占男性不育总病例的 50%^[1],如将弱精症患者禁欲 5~7 d 的精液进行分析,发现其中 A 级(快速向前运动的精子)+B 级(慢速向前运动的精子) $< 50\%$ 或 A 级精子 $< 25\%$ ^[2]。可见,精子活力低下是弱精症的主要表现之一。关于正常精子与弱精子症精子的蛋白组学差异的研究发现,弱精子症患者精子中 β -actin 表达量有所降低^[3]。 β -actin 为肌动蛋白亚族中的一种,也是维持细胞的正常生理活动的一种重要蛋白。它不仅参与细胞功能建立、胞浆移动^[4],还介导和维持细胞的迁移活动^[5]。但 β -actin 与精子活力及怀孕率是否有关目前仍不明确,本实验将结合小鼠模型探讨 β -actin 下调对精子活力及怀孕率的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药品与试剂 台盼兮购自上海捷倍思基因技术有限公司,胎牛血清购自上海微科生化试剂有限公司,二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自上海生物试剂厂,DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司,胰酶购自上海化学试剂公司, Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,PCR 反应试剂、primer(R&F)、dsDNA oligo、T293 细胞株、慢病毒载体购自上海吉凯基因技术有限公司,Taq 酶购自日本 Takara 公司, QIAGEN Plasmid 大抽 Kit 购自德国 QIAGEN 公司,BSA 购自上海捷倍思基因技术有限公司, LB 培养基, SOB 培养基, SOC 培养基购自 ATCC, CaCl₂ 上海越俊生化有限公司, T4 DNA ligase、T4 DNA ligase 缓冲液、Age I EcoR I Hpa I Hpa I Xho I 购自美国 NEB 公司,硫酸镁(MgSO₄)购于上海吴化化工有限公司,琼脂糖购自上海赛百盛公司,250 bp DNA ladder Marker 购自上海捷瑞生物工程有限公司,positive clon 测序购自上海美季生物技术有限公司。RIPA 组织细胞快速裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司,30%丙烯酰胺(29:1)、1.0 mol/L Tris-HCl, pH=8.8 电泳缓冲液、1.0 mol/L Tris-HCl, pH=6.8 电泳缓冲液、10%十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),10% 过硫酸铵、N,N,N', N'-四甲基乙二胺、4×蛋白上样缓冲液、丽春红 S 均购自重庆博培生物公司,蛋白预染 Marker 购自加拿大 Fermentas 公司,硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC)购自美国 Millipore 公司,脱脂奶粉购自美国 BD 公司,PBS 磷酸盐

缓冲液购自北京中衫公司,Tween-20 购自美国 Amresco,发光液购自美国 Immunoway,显影粉、定影粉购自上海冠龙公司。Trizol 试剂购自于美国 GIBCO 公司,焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)处理水购自重庆博培生物,氯仿,异丙醇 HPLC 级,无水乙醇 AR 级购自上海国药集团,SYBRGreen PCR 试剂盒、逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司。

1.1.2 动物 选用 4 周大健康昆明小白鼠,雌、雄各 60 只,体质量为 17~18 g,购自重庆医科大学动物实验中心,饲养环境为重庆医科大学动物实验中心无特定病原体(specific pathogen free, SPF)动物房,动物房温度为(25±2)℃,湿度为(60±5)%,12 h 昼夜节律。小鼠可以自由饮水和进食。

1.1.3 仪器 稳压电泳仪(上海西巴斯),凝胶成像仪(天能公司),细菌摇床(华利达实验设备公司),细菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),PCR 仪,高速离心机(日立公司),一次性平皿(湖南长沙天地人生物科技有限公司),1 L 烧瓶(鳌坛市晶纶实验仪器厂),50 ml 聚丙烯管(上海吴化化工有限公司),Gilson 移液器(吉尔森公司),测序仪(ABI3733 型测序仪),CO₂ 培养箱(日本三洋),生物安全柜(上海振样创空气冷化设备有限公司),Plus-20 离心超滤装置(MILLIPOR),光学显微镜、荧光显微镜 BX51(日本 Olympus),旋涡振荡器(上海青浦泸西仪器厂),手握式电动匀浆机(德国 FLUKO),低温冷冻离心机(美国 Sigma),real-time 检测仪(ABI-7500),电泳仪(BIO-RAD 公司),电转仪(北京六一),酶标仪(芬兰雷勃酶标仪),水浴锅(莱卡公司),暗匣(粤华医疗器械)。

1.2 方 法

1.2.1 RNAi 慢病毒载体构建 通过公用网站设计目的基因 ACTB 的 RNA 干扰靶点序列,得到针对 ACTB 基因表达下调的 shRNA 基因序列,并合成含干扰序列的单链 DNA oligo(构建框架见表 1),把成对的双链 DNA oligo 引物干粉溶于退火缓冲液中,进行退火配对,形成带状双链 DNA。将制备的双链 DNA 通过 T4 DNA 连接酶作用于 2 端所含酶切位点直接连入酶切后的 RNAi 慢病毒载体上。将连接后的产物转入制备好的感受态细胞悬液进行转化实验,再通过 Amp 抗性(100 μg/ml)的 LB 琼脂培养基进行筛选,挑取重组阳性的克隆,用 ABI3733 型测序仪进行测序,测序结果通过 Chromas 软件进行分析,测序结果经比对确认正确的克隆即为目的基因 RNAi 慢病毒载体。

1.2.2 目的 RNAi 慢病毒的包装与滴度测定 制备编码慢病毒颗粒的重组病毒载体及 pHelper 1.0 载体、pHelper 2.0 载体 2 种辅助包装原件载体质粒加入灭菌的 EP 管中,并加入相应体积的 Opti-MEM 进行混合,调整总体积为 2.5 ml,在室温下温育 5 min。将稀释后的 DNA 和用 Opti-MEM 稀释

表 1 ACTB 基因短发卡干扰寡核苷酸片段

Tab.1 Fragments of short hairpin ACTB gene interference oligonucleotide

序号	5'	STEM	Loop	STEM	3'
Actb-RNAi (9880-2)-a	T	CGTGCCTGACATCAAAGAGAA	CTCGAG	TTCTCTTTGATGTCACGCACG	TTTTTTC
Actb-RNAi (9880-2)-b	TCGAGAAAAAA	CGTGCCTGACATCAAAGAGAA	CTCGAG	TTCTCTTTGATGTCACGCACG	A

后的 Lipofectamine 2000 进行混合,在室温下温育 20 min。再将 DNA 和 Lipofectamine 2000 混合液转移至 293T 细胞的培养液中转染 293T 细胞。转染 8 h 时,用 PBS 液洗涤残余的转染混和物,并更换为 10% 血清的细胞培养基,再培养 48 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液,在 293T 细胞中测定并标定病毒滴度^[6]。

1.2.3 小鼠 β -actin 下调的精子模型建立与分组 将昆明小鼠随机分成 3 组,每组雄性、雌性小鼠各 20 只,分别标记为实验组、空病毒对照组、空白对照组。根据文献[7],解剖出各组雄性小鼠睾丸,分别向小鼠睾丸注射 RNAi 慢病毒载体病毒溶液(病毒滴度为 1×10^9 TU/ml),空病毒载体病毒溶液(滴度为 1×10^9 TU/ml),生理盐水,每组每只小鼠注射液均为 10 μ l。注射完毕后在 SPF 级喂养室中喂养至性成熟。

1.2.4 雄性小鼠与雌性小鼠交配并统计怀孕数 待各组小鼠成长至 8 周时,将雄鼠和雌鼠以 1:1 的比例一起喂养过夜,次日对雌鼠进行观察,以雌鼠阴道里有阴道栓为受孕成功。交配后的雌鼠继续喂养,统计各组交配后怀孕雌鼠的数目并计算怀孕率。

1.2.5 提取精子及精子活动度的评估 交配后的各组雄性小鼠通过手术取出小鼠的附睾及输精管,分别放于无菌 PBS 液并中并以 37.0 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后^[8],取少许洗涤的 PBS 液,进行精子活率得分评估^[9],每组随机计 100 个精子,按 0 级精子无运动,1 级仅有尾部摆动,2 级有缓慢前向运动,3 级表现为快速直线运动的方式进行分级,每一级别下的精子数目并与级别数乘积后求和即为各组小鼠的精子活率得分,每组重复 3 次,再做统计学分析。余下的洗涤 PBS 液体以 4 $^{\circ}$ C 及 1 500 g 的条件进行离心 15 min,去除上清液后再加入无菌 PBS 液体以上述条件再次离心,如此反复 3 次,然后去除上清液,留下沉淀物。

1.2.6 Real-time PCR 检测 β -actin 的 mRNA 表达情况 各组分别取 100 mg 上述沉淀物,加入相应量的 Trizol 裂解精子,转移到无 RNA 酶的 EP 管充分匀浆。将匀浆液转移到无 RNA 酶的 EP 管中,加入预冷的氯仿、振荡、离心。取上清液,加入等体积的异丙醇,颠倒混匀,-20 $^{\circ}$ C 冰箱放置 30 min 后离心即见 RNA 沉淀,弃上清,75%乙醇洗涤沉淀离心弃上清液自然干燥 RNA 沉淀物,20 μ l DEPC 处理水,溶解 RNA,-20 $^{\circ}$ C 冰箱,保存。取出 RNA 溶液按照 Thermo 的逆转录试剂盒的说明并以下述反应条件进行逆转录:37 $^{\circ}$ C;1 h;95 $^{\circ}$ C,5 min,灭活 MMLV。再将获得的 cDNA 进行 PCR 扩增,加入的 β -actin 上游引物为 5'-CGGTCAGGTCATCACTATC-3',下游引物为 5'-CAGGGCAGTAATCTCCTTC-3',扩增长度为 229 bp,GC 含量为 52%。95 $^{\circ}$ C、10 min 进行与变性,之后以 95 $^{\circ}$ C 变性、15 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸、45 s 的条件进行 40 个循环,每个循环的退火延伸阶段进行吸光度的测量。完成 PCR 扩增后

制作扩增曲线进行分析。

1.2.7 Western blot 检测 β -actin 的表达情况 取 1.2.5 步骤中获得精子标本至 EP 管中,加入 PMSF 及 RIPA 裂解液(强),在 4 $^{\circ}$ C 的环境中进行充分裂解,然后离心取上清液获得样品蛋白液。根据碧云天公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对样品进行蛋白浓度的测定。配制蛋白电泳用的浓缩胶及 8% 的分离胶待用。取 20 μ g 的各组蛋白样本,加入上样缓冲液后 37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后离心取上清上样,进行蛋白电泳。待蛋白电泳结束,用半干转法进行转膜。取出聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜用 5% 脱脂奶粉封闭液进行封闭后,先后进行一抗体和二抗体的孵育,抗体孵育完成后使用电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)发光检测蛋白并进行结果分析。

1.3 统计学分析

数据应用统计学软件 SPSS 17.0 进行分析,计量资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示,多组之间采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 RNAi 慢病毒载体测序

将重组病毒 Amp 抗性阳性的克隆 RNAi 慢病毒载体,进行基因测序,从测序结果中可看出目的基因已插入序列中,并且与设计的目的基因序列相同,故 β -actin 下调的 RNAi 慢病毒载体构建成功(图 1)。

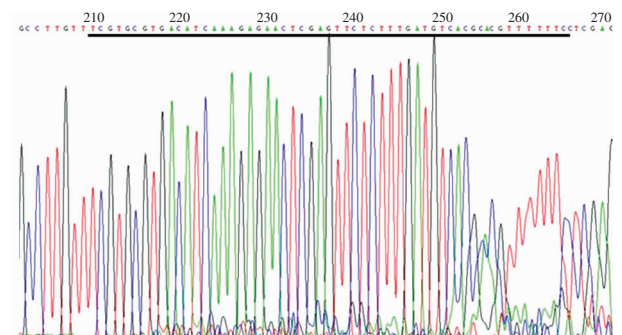


图 1 干扰基因 ACTB 所表达的 mRNA 的 shRNA 基因序列 (画线部分)

Fig.1 shRNA gene sequences of ACTB interference gene (underlined part)

2.2 Real-time PCR 检测 β -actin 的 mRNA 表达结果

将获得的扩增曲线使用仪器自带软件分析;ABI Prism 7300 SDS Software 进行分析获得扩增曲线,得出各组的 CT 值,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的数据方法进行分析获得各组 β -actin 的

mRNA 相对表达水平柱状图(图 2)空白对照组的相对表达水平值为 1.00,空病毒对照组相对表达水平值为 0.71,实验组的相对表达水平为 0.12,组间比较差异有统计学意义($F=27.28, P=0.00$)。实验组与空病毒对照组相比 β -actin 的 mRNA 表达明显下降($P=0.00$),差异有统计学意义;实验组与空白对照组 β -actin 的 mRNA 表达明显下降($P=0.00$),差异有统计学意义;空病毒对照组与空白对照组之间 β -actin 的 mRNA 表达差异无统计学意义($P=0.06$)。

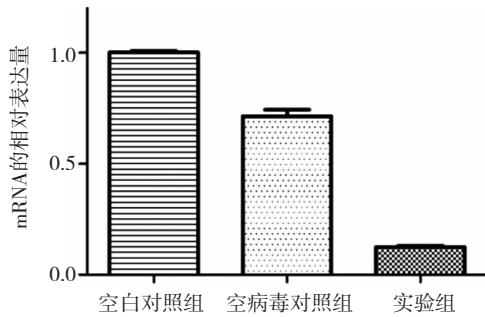
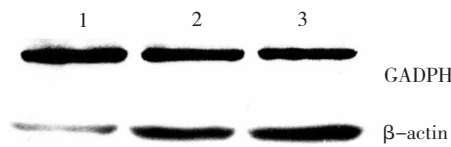


图 2 β -actin 的 mRNA 相对表达量
Fig.2 Relative expression of β -actin

2.3 Western blot 检测 β -actin 蛋白表达

提取的精子蛋白通过 Western blot 检测 β -actin 蛋白表达情况(图 3、图 4),实验组 β -actin 蛋白表达值为 0.20,空病毒对照组 β -actin 蛋白表达值为 0.93,空白对照组 β -actin 蛋白表达值为 1.56,差异有统计学意义($F=13.31, P=0.01$)。实验组与空病毒对照组相比 β -actin 的表达明显下降,差异有统计学意义($P=0.03$);实验组与空白对照组 β -actin 的表达有明显下降,差异有统计学意义($P=0.00$);空病毒对照组与空白对照组之间差异无统计学意义($P=0.06$)。



1. 实验组;2. 空病毒对照组;3. 空白对照组

图 3 β -actin 的表达

Fig.3 Protein expression of β -actin

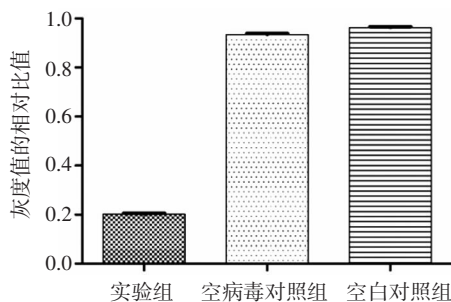


图 4 Western blot 检测各组 β -actin 的灰度值相对比值

Fig.4 Relative β -actin gray level detected by Western blot

2.4 雌性小鼠怀孕率和雄鼠精子活力对比

将获得的各组精子进行涂片,按方法中提及的记分标准进行精子活率的评估,获得精子活率得分进行比较,组间比较差异有统计学意义($F=202.26, P=0.00$)。实验组精子活率相对于空病毒对照组、空白对照组有所降低,差异有统计学意义($P=0.00, P=0.00$)。空病毒对照组与空白对照组之间差异无统计学意义($P=0.73$)。通过观察交配后的雌鼠得出各组的雌鼠怀孕情况,结果提示实验组怀孕率低于空病毒与空白对照组。

表 2 各组雄鼠精子活力与雌鼠怀孕情况

Tab.2 Sperm vitality of male mice and pregnant condition of female mice

组别	雄鼠精子活率得分(分)	雌鼠怀孕数(只)	未怀孕的雌鼠数(只)	怀孕率(%)
实验组	56.00 \pm 7.81	7	10	41.2
空病毒对照组	252.00 \pm 4.36	16	4	80.0
空白对照组	256.00 \pm 2.82	16	3	84.2

3 讨论

β -actin 是由 ACTB 基因编码的一种参与细胞骨架构成的蛋白^[10]。该蛋白呈细丝状,广泛存在于各组织中,是肌动蛋白中最为重要的一种亚型^[11]。有研究证明 β -actin 在细胞变性、运动、迁移过程中起着重要作用,并且能够调节基因表达,甚至与肿瘤的侵袭性和转移有关^[11-13]。Martinez-Heredia 等^[3]对正常精子与弱精子症精子的蛋白组学差异的研究发现,弱精子症患者精子中 β -actin 表达量有明显所降低,本课题组亦曾将弱精症患者精子中 β -actin 的含量与健康人群进行对照研究,发现弱精症患者精子中 β -actin 表达量有所降低^[14]。众所周知,精细胞发育至精子的过程中,存在细胞的变形、迁移、运动等过程,这些均与 β -actin 功能有关联,作者推测 β -actin 在精子成熟、排精、维持精子活动的能力中发挥重要的作用。

为探讨 β -actin 对精子的影响,本实验对雄性小鼠睾丸局部注射携带下调 ACTB 基因表达的 shRNA 的慢病毒来构建动物模型。运用 real-time PCR 及 Western blot 技术分别对各组雄性小鼠精子的 ACTB 基因表达量、 β -actin 的表达量进行检测,发现实验组相对于另外 2 组,精子中 β -actin 的 mRNA 表达量、 β -actin 表达量均有所降低且有统计学意义($P < 0.05$),证明慢病毒携带的 shRNA 长期 RNA 干扰作

用^[15]能有效地将实验组中小鼠精子 β -actin 表达量下调。再进行精子活率测试,发现实验组的精子活率较另外 2 组有所降低且空病毒对照组及空白对照组这 2 组的精子活力无明显差异,提示 β -actin 的下调将影响精子的活力。与此同时,对比各组雌鼠的怀孕率发现实验组也较另外 2 组降低,且有统计学意义,因此认为小鼠精子 β -actin 蛋白的表达量下调将导致精子的活力下降进而影响怀孕率。

在正常生理情况下,精子需经过阴道、子宫等通道后才能与卵细胞结合受精。因此,正常的精子活力是保证在自然交配后精子与卵细胞结合以致雌鼠成功受孕的一个重要因素。而目前认为影响精子活力的蛋白有 3 类:能量产生和代谢相关蛋白;与细胞信号和应激反应相关蛋白;精子尾部超微结构相关蛋白^[16]。而 Capková 等^[17]就通过荧光免疫的方法在精子的尾部发现聚集了大量的 β -actin。有研究亦发现 β -actin 与精子活动器官——微管结构有着密切的关系,Upadhyay 等^[18]认为在精细胞重构、排精以及精子活动过程中,由 β -actin 参与构成的微管球样复合体起着重要的作用,结合实验结果作者推断 β -actin 通过影响精子运动器官——尾部微管系统的活动,从而影响精子的活力,使精子的活力降低。综上所述, β -actin 是保证精子正常活动的重要因素之一,当雄性小鼠精子中 β -actin 表达量下降时,精子活动能力降低,从而精子游动至输卵管与卵细胞结合为受精卵的能力减弱,最终导致雌鼠怀孕率下降,但目前更为详尽的机制仍不明确,有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] McLachlan RI, O'Bryan MK. State of the art for genetic testing of infertile men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(3): 1013-1024.
- [2] 佟雪松, 许海霞. 少弱精症 35 例的临床诊治分析 [J]. *中国当代医药*, 2012, 19(24): 30-31.
- [3] Martínez-Heredia J, De Mateo S, Vidal-Taboada JM, et al. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples [J]. *Hum Reprod*, 2008, 23(4): 783-791.
- [4] Kondrikov D, Fonseca FV, Elms S, et al. Beta-actin association with endothelial nitric-oxide synthase modulates nitric oxide and superoxide generation from the enzyme [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(7): 4319-4327.
- [5] Golub T, Caroni P. PI(4,5)P2-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(1): 151-165.
- [6] 陶 轶, 孙 涛, 华长春. 大鼠 Ngf 基因慢病毒表达载体构建及鉴定 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2013, 8(4): 235-238.
- [7] Ikawa M, Tergaonkar V, Ogura A, et al. Restoration of spermatogenesis by lentiviral gene transfer: offspring from infertile mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(11): 7524-7529.
- [8] Chiu WW, Chamley LW. Use of antisperm antibodies in differential display Western blotting to identify sperm proteins important in fertility [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(4): 984-989.
- [9] 程治平. 生殖医学实验技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 123-124.
- [10] Gentner B, Schira G, Giustacchini A, et al. Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(1): 63-66.
- [11] Guo C, Liu S, Wang J, et al. ACTB in cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 18(417): 39-44.
- [12] Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, et al. β -actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool [J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(21): 4047-4058.
- [13] Gundersen GG, Gomes ER, Wen Y. Cortical control of microtubule stability and polarization [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(1): 106-112.
- [14] 何 彝, 唐 伟, 罗华铭, 等. 精索静脉曲张不育患者精子蛋白组双向电泳技术的建立与优化 [J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(2): 143-146.
- [15] Ye JM, Wu Y, Huang JS, et al. Construction of recombinant lentiviral vector containing integrin $\beta 1$ shRNA and its effects on integrin $\beta 1$ gene expression in Sombati cell culture model of refractory epilepsy [J]. *Chinese Medical Journal*, 2013, 93(31): 2511-2515.
- [16] Siva AB, Kameshwari DB, Singh V, et al. Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex [J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(7): 452-462.
- [17] Capková J, Elzeinová F, Novák P. Increased expression of secretory actin-binding protein on human spermatozoa is associated with poor semen quality [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(5): 1396-1404.
- [18] Upadhyay RD, Kumar AV, Ganeshan M, et al. Tubulobulbar complex: cytoskeletal remodeling to release spermatozoa [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012, 10: 27.

(责任编辑:唐宗顺)