

• 临床检验研究论著 •

新基因 TSG23 在正常和无精子症睾丸组织中的表达差异*

周永翠¹, 唐爱发², 桂耀庭^{2△}

(1. 汕头大学医学院第一附属医院生殖中心, 广东汕头 515041; 2. 北京大学深圳医院

广东省与深圳市男性生殖与遗传重点实验室, 广东深圳 518036)

摘要:目的 研究 TSG23 基因在正常和无精子症睾丸组织中的表达差异。方法 应用 PCR 方法检测 TSG23 基因在人和小鼠多组织中的表达特征, 并比较其在正常和无精子症睾丸组织中的表达差异。结果 PCR 结果显示 TSG23 为睾丸组织特异性表达。与正常睾丸组织比较, TSG23 基因在无精子症睾丸组织的表达减弱或消失。结论 TSG23 基因对精子发生可能具有重要作用, 其表达降低或消失可能是男性不育症发生的重要原因之一。

关键词:精子发生; 睾丸; 无精子症; 基因, TSG23

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.008

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)05-0530-02

The expression characteristics of new gene TSG23 in normal and azoospermic testis*

Zhou Yongcui¹, Tang Aifa², Gui Yaoting^{2△}

(1. The Reproductive Medicine Center, First Affiliated Hospital of Shantou University Medical College,

Shantou, Guangdong 515041, China; 2. Guangdong and Shenzhen Key Laboratory of Male Reproductive

Medicine and Genetics, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong 518036, China)

Abstract: Objective To investigate the expression difference of TSG23 gene in normal and azoospermic testis. **Methods** Detected the expression of TSG23 in multi-tissues of human and mouse; and compared the difference of the genes in normal and azoospermic testis by PCR. **Results** RT-PCR analysis from multiple human and mouse tissues indicated TSG23 mRNA was only expressed in the testis. There was no expression or less expression of TSG23 in azoospermic testis compared with normal testis. **Conclusion** TSG23 may participate in spermatogenesis, and its abnormal expression may be one of the important factors in male infertility.

Key words: spermatogenesis; testis; azoospermia; genes, TSG23

全世界大约有 15% 的夫妇受到不育症的影响, 其中由男性原因引起的不育占 50%, 而无精子症在男性不育的致病因素中占 5%~20%^[1]。精子发生经历精原细胞的增殖、精母细胞的减数分裂和精子形成三个阶段, 这个精确复杂的发育过程需要一系列睾丸特异性表达基因的参与^[2], 且受到高度有序的基因表达网络的调控^[3]。在精子形成的过程中任何一个环节出现异常, 如染色体核型异常, 与精子生成相关的基因缺失、突变或表达异常都会引起精子发生过程停滞, 形成少精症和无精子症^[4], 引起男性不育。TSG23 基因是采用 Affymetrix 公司的人类全基因组表达谱芯片和小鼠全基因组芯片, 对正常成人睾丸和人胚胎期睾丸组织及 4、9、18、35、54 日龄和 6 月龄小鼠睾丸组织进行了全基因组芯片分析鉴定筛选的人和小鼠同源的睾丸特异性基因^[5]。本研究通过采用 RT-PCR 的方法检测 TSG23 在正常人和小鼠的睾丸组织及其无精子症患者和小鼠睾丸组织中的表达差异, 探讨该基因在精子发生过程中的作用。

1 资料与方法

1.1 材料 实验用 BALB/C 小鼠购自中山大学实验动物中心。对照组的睾丸组织和其他组织取材于意外死亡的健康人, 年龄 24~40 岁。收集手术切除或活检的无精子症患者新鲜标本, 年龄 22~36 岁。该研究获北京大学深圳医院医学伦理委员会批准, 死者家属签署人体组织捐献知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 小鼠无精子症模型的制备 7~8 周龄雄性 BALB/C

小鼠 24 只, 体重 26~28 g。随机分成正常对照组和给药后 4 周组, 8 周组, 12 周组, 每组 8 只。参考文献[6]将白消安溶于 DMSO 溶液后加等体积的灭菌 PBS, 使白消安的终浓度为 4 mg/mL, 于 37℃ 水浴中保持恒温防止 DMSO 凝固, 每只小鼠按 40 mg/kg 行腹腔内单次注射。

1.2.2 组织 RNA 提取及 RT-PCR 将人和小鼠组织加 1.0 mL TRIzol (美国 Invitrogen 公司), 组织匀浆后加入氯仿 200 μ L, 振荡 15 s, 离心 15 min (4℃, 12 000 rpm), 取上清加入 500 μ L 的异丙醇, 混匀后再离心 10 min, 沉淀物经 75% 乙醇洗涤后, 溶于焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的水中, 紫外分光光度计定量后于一 80℃ 储存备用。采用 Fermentas 反转录试剂盒 (美国 MBI 公司) 进行 RT 反应, 合成 cDNA 第一链。取睾丸组织总 RNA 1 μ g, OligodT181 μ L, 经 DEPC 处理的水 12 μ L, 70℃ 加热 5 min; 加入 5 $\times$ 反转录缓冲液 4 μ L, 10 mM dNTP 2 μ L, RNA 酶抑制剂 1 μ L, 37℃ 反应 5 min; MulV 反转录酶 1 μ L, 42℃ 60 min, 70℃ 10 min 后, 置于冰上, 待用。根据人和小鼠 TSG23 cDNA 设计引物如下: 人 TSG23 上游引物: 5'-GGG ACA ATG GCT ACT CCA GAA GCA GA-3', 下游引物: 5'-GGA TGG GCC ATC ATG AAA GCT TGA G-3', 扩增片段 256 bp; 小鼠 TSG23 上游引物: 5'-CTG TTC CAG AAG CAG AGC TCC CTA TCT-3', 下游引物: 5'-GGA TCT CAC TAA AGG CAT CTG TCC AGA AG-3', 扩增片段 337 bp。用上述引物对正常和无精子症的睾丸进行 PCR 扩增。在 20 μ L 的反应总体积中加入下列物质: cDNA 1 μ L, dNTP 0.4 μ L, MgCl₂

* 基金项目: 广东省教育厅“育苗工程”项目 (LYM10076); 广东省医学科研基金项目 (B2010214)。 作者简介: 周永翠, 女, 主管检验师, 主要从事男性生殖研究。△ 通讯作者, E-mail: guiyaoting2007@yahoo.com.cn。

1.6 μL , *Taq* 酶 1 μL , 10 $\times$ Buffer 2 μL , 上游引物 0.2 μL , 下游引物 0.2 μL , DEPC 水 13.6 μL 。在 PTC-200 型 PCR 扩增仪上完成 PCR 扩增, 条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 完成 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温, 1% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物大小。以 β -actin 作为对照。

2 结 果

2.1 TSG23 mRNA 在人各种组织中的分布 人 7 种组织(肺、肌肉、肝、肾、食管、胃、睾丸)RT-PCR 结果表明, TSG23 基因在人睾丸组织中特异性高表达, 在其他组织中均不表达, 而 β -actin 对照引物均能扩增出特异性 DNA 条带(图 1)。

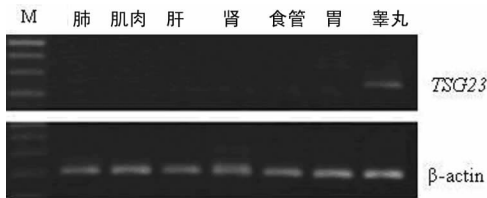


图 1 TSG23 在人多组织中的表达

2.2 TSG23 mRNA 在小鼠各种组织中的分布 在小鼠 10 种组织包括心、肺、脑、肾、肝脏、脾、胰腺、结肠、附睾和睾丸进行的 RT-PCR 结果中可见, TSG23 基因在睾丸组织中见到很强的目的扩增条带, 而在其他组织中均未见目的扩增条带(图 2)。

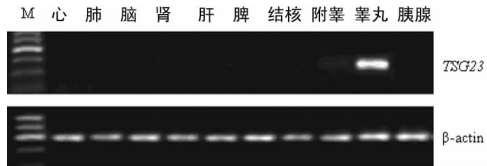


图 2 TSG23 小鼠多种组织中的表达

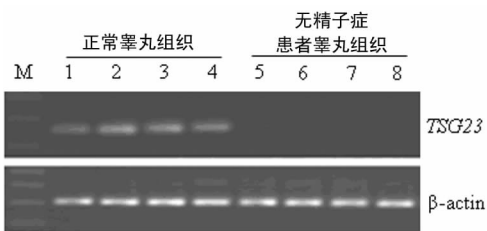
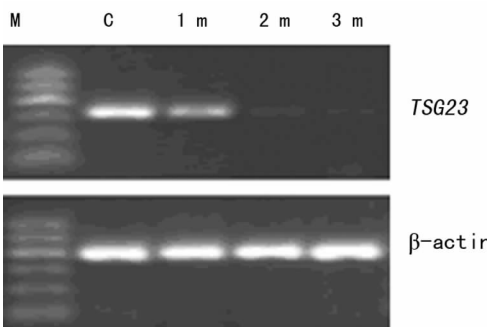


图 3 TSG23 在无精子症患者睾丸组织的表达



C: 对照组; 1 m: 白消安处理 1 个月组; 2 m: 白消安处理 2 个月组; 3 m: 白消安处理 3 个月组。

图 4 TSG23 在无精子症小鼠睾丸组织的表达

2.3 TSG23 mRNA 在健康人和无精子症患者睾丸组织中的表达差异 RT-PCR 结果分析显示, 与正常人的睾丸组织比较, TSG23 基因在生精阻滞的无精子症患者的睾丸组织中表达消失(图 3)。

2.4 TSG23 mRNA 在正常和无精子症小鼠睾丸组织中的表达差异 小鼠 TSG23 基因在正常小鼠的睾丸组织中表达最强, 在白消安处理 1 个月的小鼠睾丸中表达减弱, 而在白消安诱导无精子症模型 2 个月和 3 个月的小鼠睾丸中表达微弱甚至消失(图 4)。

3 讨 论

近年来无精子症的发病率呈现出上升趋势^[7], 而引起无精子症的病因至今仍未完全明了, 多种因素可导致无精子症, 包括药物、内分泌、免疫、感染、创伤等, 遗传缺陷和基因的改变与无精子症的发生密切相关^[8]。精子发生过程中, 一些体细胞表达的结构基因静止, 而一系列睾丸生精细胞特异的基因如 Fank1^[9], Septin12^[10]、NANOS2^[11] 和 Tex24^[12] 等表达。人睾丸组织中表达大量基因, 但大部分基因的功能不清楚, 同时与正常生育过程有关的许多基因尚未被发现。这些基因与无精子症的关系仍有待阐明, 越来越多的学者开始关注基因对精子发生的影响。

TSG23 是通过基因芯片鉴定的一个人鼠同源的睾丸特异性基因。对该基因在人和小鼠多种组织中表达的研究结果显示其仅在睾丸组织中高表达, 而其余被检测的组织中没有表达。这种睾丸组织特异性的表达模式表明 TSG23 参与了睾丸特有的生理功能, 如精子的发生。TSG23 基因可能在精子发生中具有重要的作用。通过 RT-PCR 方法检测该基因在健康者和无精子症患者睾丸组织中的表达情况, 结果发现与正常睾丸组织相比, TSG23 基因在无精子症患者睾丸中表达消失; 在白消安制备的无精子症小鼠模型中发现 TSG23 mRNA 的表达减弱或消失。TSG23 在无精子症中的表达沉默进一步证实了其参与了精子发生过程。该基因在无精子症中表达微弱或不表达, 说明该基因在精原细胞及初级精母细胞中没有表达, 而此阶段即是精子发生过程的有丝分裂阶段, 从而推测该基因至少是在减数分裂期开始表达。对于该基因的深入了解还需要进一步的实验研究。

另外, TSG23 在生精阻滞型无精子症患者睾丸组织的表达明显减少或消失, 提示这些患者可能存在 TSG23 基因的突变、缺失或显著性差异 SNP 位点, 因此, 基因敲除小鼠和无精子症患者的基因突变筛选将更进一步地确定 TSG23 在精子发生过程中的确切机制以及它与临床男性不育的关系。

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] Grimes SR. Testis-specific transcriptional control[J]. Gene, 2004, 343(1): 11-22.
- [3] Vasco C, Zuccotti M, Redi CA, et al. Identification, isolation, and RT-PCR analysis of single stage-specific spermatogenic cells obtained from portions of seminiferous tubules classified by transillumination microscopy[J]. Mol Reprod Dev, 2009, 76(12): 1173-1177.
- [4] 郭应禄, 辛钟成. 男子生殖医学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2002: 28-71.
- [5] Zhou Y, Qin D, Tang A, et al. Developmental expression pattern of a novel gene, TSG23/Tsg23, suggests a role in spermatogenesis[J]. Mol Hum Reprod, 2009, 15(4): 223-230.
- [6] 唐爱发, 周永翠, 余振东, 等. Mm. 158494 基因在白消安引起的无精子症小鼠中的表达[J]. 中国男科学杂志, 2008, 22(9): 1-4.
- [7] Maria RM, Dolores JL. Understanding new genetics(下转第 533 页)

1.263%，计算得出 GA 的参考值上、下限分别为 11.04%、15.99%。

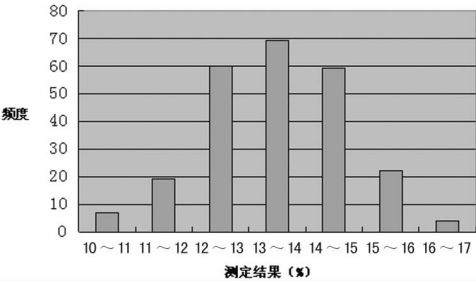


图 1 GA 测定结果柱状图

表 1 GA 测定结果频度分析

GA 检测结果(%)	频度(n)		
	男性	女性	合计
10~<11	3	4	7
11~<12	12	7	19
12~<13	29	31	60
13~<14	35	34	69
14~<15	29	30	59
15~<16	10	12	22
16~<17	2	2	4

3 讨 论

临床实验室应能够并可以很方便地检测出参考区间在人口统计学和地域方面的差异。依据 C28-2A 文件,慎重选择参考个体,参考人群必须是合理的,而且有助于确定患者的疾病和异常症状。参考个体健康状况的评价必须以文档的形式保存。参考区间指的是最高限和最低限的之间的全部数组成的区间,从参考人群中抽出来的个体检测值可以用一个特定的百分比(通常是 95%)来评估[6]。

目前,GA 的检测方法有亲和色谱法、高效液相色谱法、免疫化学法和比色法,这些方法都存在检测时间长、精确度差的缺陷[7]。酶法 GA 采用高特异性的酮氨酸氧化酶保证检测结果的特异性,准确检测人血清或血浆中 GA 的含量。虽然 HbA1c 是国际上监测长期血糖控制水平的金标准,由于血液中血红蛋白的半衰期长,其更新速度对 HbA1c 监测结果有一定影响,且其易受血红蛋白变异的影响,故短期内,除受清蛋白水平的干扰外,高特异性的酶法 GA 能及时、准确的反映出糖尿病患者的血糖控制水平。

具有较高、有效的临床诊断参考价值的 GA 参考值范围的建立对于其在临床诊断的推广、应用是非常必要和急迫的。目前,沈霞等[8]报道对 56 名健康志愿者使用酶法 GA 试剂盒检

测并确定成人 GA 的参考范围为(14.35±2.00)%,周健等[9]采用液态酶法检测全国 10 个中心 380 名体质量、糖耐量正常者的 GA 水平,得出正常参考值范围为10.8%~17.1%,周海翔等[10]对 576 名糖耐量正常者采用酶法 Lucica GA-L 法检测并确定 GA 参考范围是 11.89%~16.87%。本次实验研究采用 C28-2A 文件要求,通过筛选新疆地区昌吉市木垒哈萨克自治县哈萨克族体检健康标本 240 份,同时检测样本 HbA1c、GLU、ALT、TBIL、CR 结果确保实验参考健康标本的合理性,确认酶法 GA 试剂盒(宁波美康生物科技股份有限公司提供)在 BS-800 检测体系上的应用于哈萨克族人群的正常参考范围为 11.04%~15.99%。

在检测样本的过程中,分析前、中及后期处理过程中,需要严格执行质量管理要求,不排除各个环节的控制水平因素及区域性人群分布的差异的影响。本次实验研究的是新疆地区哈萨克族人群的 GA 参考值范围,建议有差异的临床实验室依据相关文件要求建立适合实验室的合理、有效的参考值范围。

参考文献

[1] 毛佳丽. 糖化血红蛋白检测在临床中的应用价值[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32(3): 231-235.

[2] 华红. 糖化血清清蛋白与糖化血红蛋白在糖尿病诊疗中的价值比较[J]. 中国卫生产业, 2012, 9(18): 132-133.

[3] 薛邦禄, 李妍, 徐维家. 糖化血清清蛋白在糖尿病人群中的应用评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2012(6): 1367-1369.

[4] 李青, 包玉倩, 潘洁敏, 等. 糖化血清清蛋白在 2 型糖尿病患者中的临床应用[J]. 中国新药与临床杂志, 2011(6): 440-443.

[5] Inaba M, Okuno S, Kumeda Y, et al. Glycated albumin is a better glycemic indicator than glycated hemoglobin values in hemodialysis patients with diabetes: effect of anemia and erythropoietin injection[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(3): 896-903.

[6] Paroni R, Ceriotti F, Galanello R, et al. Performance characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycated albumin in plasma[J]. Clin Biochem, 2007, 40(18): 1398-1405.

[7] 李青, 贾伟平. 糖化血清清蛋白检测的临床应用及研究进展[J]. 药品评价, 2009, 6(3): 99-101.

[8] 沈霞, 王连升, 黎明. 酶法测定糖化清蛋白及其临床意义[J]. 检验医学, 2006, 21(2): 132-135.

[9] 周健, 李红, 杨文英, 等. 糖化血清清蛋白的多中心临床研究[J]. 中华内科杂志, 2009, 4(期缺失): 469-472.

[10] 周翔海, 纪立农, 张秀英, 等. 我国正常糖耐量人群糖化清蛋白的参考范围[J]. 中国糖尿病杂志, 2009, 17(8): 572-575.

(收稿日期: 2012-10-09)

(上接第 531 页)

of male infertility[J]. J Urol, 2002, 168(5): 2197-2205.

[8] Babu SR, Swarna M, Padmavathi P, et al. PCR analysis of Yq microdeletions in infertile males, a study from South India[J]. Asian J Androl, 2002, 4(4): 265-268.

[9] Zheng Z, Zheng H, Yan W. Fank1 is a testis-specific gene encoding a nuclear protein exclusively expressed during the transition from the meiotic to the haploid phase of spermatogenesis[J]. Gene Expr Patterns, 2007, 7(7): 777-783.

[10] Lin YH, Lin YM, Wang YY, et al. The expression level of septin12 is critical for spermiogenesis[J]. Am J Pathol, 2009, 174

(5): 1857-1868.

[11] Kusz KM, Tomczyk L, Sajek M, et al. The highly conserved NANOS2 protein: testis-specific expression and significance for the human male reproduction[J]. Mol Hum Reprod, 2009, 15(3): 165-171.

[12] Fan J, Graham M, Akabane H, et al. Identification of a novel male germ cell-specific gene TESF-1 in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340(1): 8-12.

(收稿日期: 2012-11-02)