



研究报告

Research Report

6 天龄与 10 天龄大鼠的睾丸组织的基因差异表达

刘陶迪^{1,2} 罗奋华¹ 于泊洋¹ 吴应积¹

1 内蒙古大学, 哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 呼和浩特, 010021;

2 内蒙古医学院, 基础医学院, 呼和浩特, 010050

✉ 通讯作者: yingji_wu@yahoo.com 作者

基因组学与生物技术, 2012 年, 第 1 卷, 第 4 篇 doi:10.5376/gb.cn.2012.01.0004

收稿日期: 2012 年 01 月 18 日

接受日期: 2012 年 06 月 24 日

发表日期: 2012 年 06 月 27 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2012 年第 31 卷第 1 期 40-44 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

刘陶迪等, 2012, 6 天龄与 10 天龄大鼠的睾丸组织的基因差异表达, 基因组学与生物技术(online) Vol.1 No.4 pp.22-26 (doi:10.5376/gb.cn.2012.01.0004)

引用格式(英文):

Liu et al., 2012, Differential Gene Expression of Rat Testicle's Tissues in the Age of 6 and 10 Days, Jiyinzuxue Yu Shengwu Jishu (online) Vol.1 No.4 pp.22-26 (doi:10.5376/gb.cn.2012.01.0004)

摘要 通过基因芯片技术, 利用 Roche-NimbleGen 公司制作的大鼠 12×135K 全基因组表达谱芯片, 对日龄为 6 d 和 10 d 的大鼠睾丸组织进行全基因组表达差异分析。结果显示: 具有 2 倍以上的差异表达基因有 4 298 个, 其中表达上调的基因共 1 878 个, 表达下调的基因共 2 420。这些差异表达的基因中有 3 154 个基因具有基因本体注释, 参与了 154 个生物学通路。进一步分析表明具有 8 倍以上差异表达的基因有 13 个, 这些基因参与了生物学过程, 细胞组分, 分子功能等基因本体分类, 进一步选择 3 个差异表达的基因, *LOC686076*、*Cxcl6* 和 *Trib3*, 做了实时定量 RT-PCR 检测。其结果趋势与芯片数据一致。因此, 我们初步认为精原干细胞的发生与增殖在大鼠早期的发育过程中已经有大量的基因参与, 是一个多基因协调表达的过程。
关键词 大鼠; 睾丸组织; 精原干细胞; 差异表达; 基因芯片

Differential Gene Expression of Rat Testicle's Tissues in the Age of 6 and 10 Days

Liu Taodi^{1,2} Luo Fenhua¹ Yu Boyang¹ Wu Yingji¹

1 Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education, Inner Mongolia University, Hohhot, 010021;

2 Basic Medical College, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010050

✉ Corresponding author, yingji_wu@yahoo.com 作者

Abstract In this research, differential analysis of genome-wide expression of the rat testis tissues in the age of 6 and 10 days was conducted by gene chip technology based on the 12×135K genome-wide EST microarray of rat produced by Roche-NimbleGen. The results showed that there were 4 298 genes with 2-fold or more differentially expressed in the rat testis tissues between the ages of 6 and 10 days, thereinto, 1 878 genes were up-regulated expression and 2 420 genes were down-regulated expression. 3 154 genes of these differentially expressed genes have been annotated with gene ontology, participating in the 154 biological pathways. Further analysis showed that there were 13 genes with more than 8 fold differential expression, those genes involved in Gene Ontology categories, such as biological processes, cellular components and molecular functions and so on. Three differentially expressed genes, *LOC686076*, *Cxcl6* and *Trib3*, were chosen to detect by real-time quantitative RT-PCR, the results exhibited a trend toward the microarray data. Therefore, we preliminary thought that a large number of genes should be involved in the occurrence and proliferation of spermatogonial stem cell in early stages of growth and development of the rat, it might be a synchronizing process of multi-gene expression.

Keywords Rat (*Rattus norvegicus*); Testis tissues; Spermatogonial stem cells (SSCs); Gene chip; Differential expression

精原干细胞可以转化为类胚胎干细胞, 而且具有多能性(Kanatsu-Shinohara et al., 2004; Guan et al., 2006; Seandel et al., 2007; Conrad et al., 2008; Kanatsu-

Shinohara et al., 2008; Kossack et al., 2009)。精子发生是精原干细胞自我更新和分化从而产生精子的复杂过程, 这个过程是数以千计的基因通过程序化的表



达在特定阶段编码蛋白发挥特定的作用而完成的。特定基因独特的时空表达模式在调节精原干细胞早期发育及自我更新和分化过程中起着非常重要的作用。前人研究指出, 大鼠出生7~8 d日龄, A型精原细胞是唯一的生殖细胞, 因为B型精原细胞直到11 d才能发育形成(Dym et al., 1995; Fouchécourt et al., 2006)。本实验以大鼠为动物模型, 在前期的研究工作中, E型钙黏连蛋白基因(*Cdh1*)在大鼠出生后睾丸组织的转录表达变化很大, *Cdh1*是精原干细胞标志性基因(Tokuda et al., 2007), *Cdh1* mRNA在出生后第2天、第4天和第6天保持较高的水平, 在出生后第8天突然下降, 在出生后第10天又开始升高(刘陶迪等, 2011)。也就是说, 大鼠出生后第6天与第10天*Cdh1* mRNA的表达都保持较高水平, 第10天*Cdh1* mRNA表达的再次升高是不是受到其它基因的调控, 在这两个时间点睾丸组织其它基因的表达又有哪些变化呢? 这些变化的基因与哪些生物学功能有关? 这一系列的问题都有待回答。因此, 我们选定大鼠出生后第6天与第10天的睾丸组织作为研究对象, 对全基因组表达谱基因芯片数据进行初步的比较分析。

1 结果与分析

1.1 芯片杂交差异表达基因数据统计

我们通过基因芯片技术检测了大鼠出生后第6天与第10天睾丸组织的基因差异表达。第10天与第6天相比, 表达水平相差两倍以上基因共4 298个(图1)。这些基因参与了3 154个GO功能条目分析; 参与了154个信号通路。差异表达上调的基因共1 878个, 表达下调的基因共2 420个。差异表达的倍数相差2~36.4倍。差异表达相差8倍以上的基因有31个, 6个基因表达上调, 25个基因表达下调。其中, 13个基因参与GO功能分析(表1)。分别与生物学过程, 细胞组分和分子功能有关(表2)。

1.2 实时定量RT-PCR验证

为了进一步验证基因芯片的结果, 我们从基因芯片的结果中选择了3个差异表达的基因, *LOC686076*, *Cxcl6*和*Trib3*, 做了实时定量RT-PCR检测。实时定量RT-PCR的结果与基因芯片的结果趋势一致(表3)。

2 讨论

在大鼠出生早期, 睾丸内的生殖细胞除了有精原干细胞, 还存在原生殖细胞(PGCs)和精原干细胞的前体, 即生殖母细胞(Lacham-Kaplan et al., 2004; Forand and Bernardino-Sqherri, 2009), 大鼠出生第8天, 除了精原干细胞的标志性基因*Cdh1*发生显著

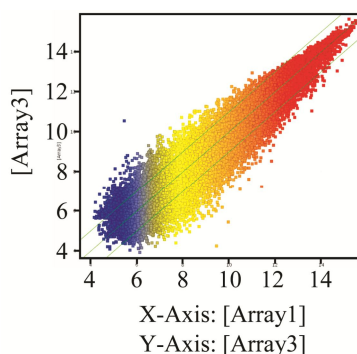


图1 10天龄与6天龄大鼠相差两倍以上4 298个差异表达基因的散点图

Figure 1 The scatter plot of 4 298 genes with 2-fold or more differentially expressed in the rat testis tissues between the ages of 6 and 10 days

表1 差异表达相差8倍以上的13个基因

Table 1 13 genes with 8-fold differentially expressed in the rat testis tissues between the ages of 6 and 10 days

基因序列号 GenBank accession	基因符号 Gene symbol	差异表达倍数 Fold of differential expression
上调基因 Up-regulated genes		
NM_138825	<i>Serpinal2</i>	+34.8
NM_022175	<i>Rhox5</i>	+9.4
NM_017145	<i>Mcpt1</i>	+8.6
下调基因 Down-regulated genes		
NM_022214	<i>Cxcl6</i>	-36.4
NM_053372	<i>Slpi</i>	-22.6
NM_012494	<i>Agtr2</i>	-17.8
NM_013004	<i>Phex</i>	-10.8
NM_001080756	<i>Car12</i>	-10.2
NM_017086	<i>Egr3</i>	-10.0
NM_019280	<i>Gja5</i>	-9.3
XM_001066755	<i>Lrba</i>	-8.4
NM_017067	<i>Chm</i>	-8.1
NM_130822	<i>Lphn3</i>	-8.1

变化之外, 促进精原干细胞自我更新与增殖的重要基因*Gdnf* (Meng et al., 2000)也呈现表达增高的趋势。也就是说, 从第8天开始, 精原干细胞发生大量增殖, 那么, 第10天*Cdh1*表达升高, 应该与精原干细胞数量增多有关。而第10天与第6天的睾丸组织相比有4 298个基因出现了表达差异。它们分别参与多个生物学过程。所以从*Cdh1*表达水平上看, 似乎这两个时间点没有差异, 其实睾丸组织内的众多基因表达水平已发生了剧烈的变化。这些基因的表达水平呈现差异, 说明与这些基因相关的生物学过程是呈阶段进展性的。因此, 在精原干细胞早期



表 2 差异表达相差 8 倍以上参与 GO 功能条目分析的基因
 Table 2 Gene Ontology analysis of the genes with 8-fold differential expression

基因功能条目 Annotation by Gene Ontology	基因数目 Gene Number	百分比(%)* Percentage (%)
生物学过程 Biological process involved		
信号转导 Signal transduction	4	30.8
细胞间信号传递 Inter-cell signaling	3	23.1
G-蛋白偶联受体信号通路 G-protein coupled receptorprotein signaling pathway	2	15.4
蛋白水解作用 Proteolysis	2	15.4
转录 Transcription	2	15.4
DNA 依赖的转录调节 DNA-dependent regulationof transcription	2	15.4
血管发育 Blood vessel development	2	15.4
细胞组分 Cellular component involved		
胞外空间 Extracellular space	4	30.8
浆膜 Plasma membrane	2	15.4
细胞膜的组成部分 Integral to plasma membrane	2	15.4
膜 Membrane	4	30.8
膜的组成部分 Integral to membrane	4	30.8
细胞核 Nucleus	2	15.4
分子功能 Molecular function involved		
肽酶活性 Peptidase activity	2	15.4
受体活性 Receptor activity	2	15.4
蛋白结合 Protein binding	2	15.4
锌离子结合 zinc ion binding	3	23.1
DNA 结合 DNA binding	2	15.4
转录因子活性 Transcription factor activity	2	15.4

注: *参与该条目的基因占 13 个基因的百分比

Note: The percentage of genes involved in the Gene Ontology analysis in the 13 genes

发育过程中, 精原干细胞的发生与增殖需要多个生物学过程的配合。基因芯片的结果通过荧光定量 PCR 得到进一步验证, 在我们检测的三个基因中, *LOC686076* 的功能没有文献报道, 也没有参

与 GO 功能分析。TRB3 蛋白(tribbles 3)也叫神经细胞死亡诱导蛋白(NIPK neuronal cell death-inducible protein kinase), 是蛋白激酶 B (PKB protein kinase B)抑制剂(Iynedjian, 2005)。也有报道认为 TRB3 可能通过



表3 实时定量 RT-PCR 验证 3 个基因差异表达

Table 3 Differential expression of three genes validated by quantitative real-time PCR.

基因库序列号 GenBank accession	基因符号 Gene symbol	芯片结果 Results from Microarray	实时定量PCR qRT-PCR
XM_001066439	<i>LOC686076</i>	4.4	7.3
NM_022214	<i>Cxcl6</i>	-36.4	-14.3
NM_144755	<i>Trib3</i>	6.5	1.32

抑制蛋白激酶 A 活性来参与代谢综合征(Bi et al., 2008)。CXCL6 除了参与炎症免疫反应和信号转导之外, 最近发现能够调节多巴胺能神经元的发育, 包括神经元的增殖, 神经发生以及分化(Edman et al., 2008), 芯片检测显示 *Cxcl6* 基因在 10 天与第 6 天之间转录表达下调 36.4 倍之多, PCR 检测下调达到 14.3 倍。这一结果暗示 *Cxcl6* 基因的表达很可能对精原干细胞的发生与增殖起负面影响。这有待以后的研究工作进一步验证。

通过大鼠精原干细胞早期发育过程中第 10 天与第 6 天睾丸组织基因芯片的检测结果, 得到大量功能各异的差异表达的基因, 尽管这些差异表达基因的功能和作用机制还有待进一步研究, 但至少可以得到以下结论: 第一, 大鼠青春期前睾丸发育过程中第 6 天至第 10 天是非常关键的时期; 第二, 精子发生早期的生物学过程是通过数以千计的基因表达特定的蛋白而起作用的; 第三, 大鼠精原干细胞早期发育过程, 是一个多基因参与的过程。这些结果为我们下一步研究精子发生的分子机制提供了新的思路和信息。

3 材料与方法

3.1 实验动物与样品

实验用大鼠 (*Rattus norvegicus*) 取三月龄的 Wistar-Iamichi 雄性大鼠一只, 雌性大鼠两只, 体重约 250 g, 合笼, 自然交配。在内蒙古大学哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室国家二级清洁型动物房饲养, 每周换垫料一次, 保证饲料和饮水的清洁和充足。新生大鼠出生当日定为第 1 天,

分别取出生后第 6 天和第 10 天的雄性大鼠, 颈椎脱臼处死后, 取睾丸组织样品, 提取总 RNA。

3.2 芯片杂交分析

分别收集大鼠出生后第 6 天和第 10 天睾丸组织样品, 按照 Trizol 试剂 (Invitrogen) 的标准操作抽提总 RNA。RNA 浓度和纯度分别用 Nanodrop ND-1000 和甲醛变性凝胶电泳检测, 制备 cDNA, 用 NimbleGen One-Color DNA Labeling 试剂盒标记 cDNA 样品, 通过 NimbleGen 杂交系统将 cDNA 样品与大鼠 12×135K 芯片探针进行杂交。杂交和清洗之后, 用 Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪进行扫描。本文所有芯片原始数据均上传至 GEO 公共数据库中, 序列号为 GSE29666。

3.3 实时定量 RT-PCR 验证

按总 RNA 提取试剂盒说明, 提取大鼠睾丸组织总 RNA, 根据各样品总 RNA 的浓度, 取相同质量的一组样品按照 M-MLV 反转录酶说明书进行反转录反应。利用 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 反应。

我们从基因芯片的结果中选择了 3 个差异表达的基因, 采用 SYBR Green I 荧光染料法进行实时荧光定量 PCR 扩增, 检测它们在出生后第 10 天与第 6 天的转录表达水平。每个基因的实时定量 PCR 检测在 Bio-Rad Chromo4™ 实时 PCR 检测仪上重复三管。实时定量 PCR 引物见表 4。数据分析通过 MJ Opticon Monitor 分析软件 (Bio-Rad) 完成。计算方法用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。Gapdh 做内参基因, H₂O 作阴性对照。所有 PCR 产物的分子量通过琼脂糖凝胶电泳验证。

表 4 实时定量 PCR 引物序列及参数

Table 4 Primer sequences and real-time PCR parameters.

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)	产物大小(bp) Product size (bp)
<i>Cxcl6</i>	PF: GATCGCTAATTTGGAGGTGAT PR: TCTTTATCAACGGAGCTTGTG	58	119
<i>Loc686076</i>	PF: GAAGACCCTTACAACGTCCAA PR: GTCACCCTGTAGCTGAATGACT	58	142
<i>Trib3</i>	PF: GTCGATTTGTCTTCAGCAACTG PR: CTGAGTATCTCTGGTCCCACAT	59	139
<i>Gapdh</i>	PF: GCAAGTTCAACGGCACAG PR: GCCAGTAGACTCCACGACAT	55	140



作者贡献

刘陶迪是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 完成论文初稿的写作; 罗奋华参与数据分析; 于泊洋参与饲养动物和样品收集; 吴应积是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究受教育部“春晖计划”合作科研项目(项目批准号-Z2007-1-01036)和内蒙古自然科学基金项目(项目批准号2009ZD05)资助。基因芯片杂交实验由上海康成生物工程有限公司完成。

参考文献

- Bi X.P., Tan H.W., Xing S.S., Wang Z.H., Tang M.X., Zhang Y., and Zhang W., 2008, Overexpression of *TRB3* gene in adipose tissue of rats with high fructose-induced metabolic syndrome, *Endocr J.*, 55(4): 747-752 <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.K08 E-049> PMID:18497449
- Conrad S., Renninger M., Hennenlotter J., Wiesner T., Just L., Bonin M., Aicher W., Buhning H.J., Mattheus U., Mack A., Wagner H.J., Minger S., Matzkies M., Reppel M., Hescheler J., Sievert K.D., Stenzl A., and Skutella T., 2008, Generation of pluripotent stem cells from adult human testis, *Nature*, 456:344-349 <http://dx.doi.org/10.1038/nature07404> PMID:18849962
- Dym M., Jia M.C., Dirami G., Price J.M., Rabin S.J., Mocchetti I., and Ravindranath N., 1995, Expression of c-kit receptor and its autophosphorylation in immature rat type a spermatogonia, *Biology of Reproduction*, 52(1): 8-19 <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod52.1.8> PMID:7536046
- Edman L.C., Mira H., Erices A., Malmersjö S., Andersson E., Uhlén P., and Arenas E., 2008, Alpha-chemokines regulate proliferation, neurogenesis, and dopaminergic differentiation of ventral midbrain precursors and neurospheres, *Stem Cells*, 26(7): 1891-1900 <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2007-0753> PMID:18436867
- Forand A., and Bernardino-Sqherri J., 2009, A critical role of PUMA in maintenance of genomic integrity of murine spermatogonial stem cell precursors after genotoxic stress, *Cell Res.*, 19(8): 1018-1030 <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2009.50> PMID:19417777
- Fouchécourt S., Godet M., Sabido O., and Durand P., 2006, Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis, *Journal of Endocrinology*, 190(1): 59-71 <http://dx.doi.org/10.1677/joe.1.06699> PMID:16837611
- Guan K., Nayernia K., Maier L.S., Wagner S., Dressel R., Lee J.H., Nolte J., Wolf F., Li M., Engel W., and Hasenfuss G., 2006, Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis, *Nature*, 440(7088): 1199-1203 <http://dx.doi.org/10.1038/nature04697> PMID:16565704
- Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba S., Kato T., Kazuki Y., Toyokuni S., Toyoshima M., Niwa O., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., and Shinohara T., 2004, Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis, *Cell*, 119(7): 1001-1012 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.011> PMID:15620358
- Kanatsu-Shinohara M., Lee J., Inoue K., Ogonuki N., Miki H., Toyokuni S., Ikawa M., Nakamura T., Ogura A., and Shinohara T., 2008, Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice, *Biol. Reprod.*, 78 (4): 681-687 <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.107.066068> PMID:18199882
- Kossack N., Meneses J., Shefi S., Nguyen H.N., Chavez S., Nicholas C., Gromoll J., Turek P.J., and Reijo-Pera R.A., 2009, Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells, *Stem Cells*, 27(1): 138-149 <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2008-0439> PMID:18927477 PMID:2729695
- Lacham-Kaplan O., 2004, In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse, *Reproduction*, 128(2): 147-152 <http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00220> PMID:15280553
- Meng X.J., Lindahl M., Hyvönen M.E., Parvinen M., de Rooij D.G., Hess M.W., Raatikainen-Ahokas A., Sainio K., Rauvala H., Lakso M., Pichel J.G., Westphal H., Saarma M., and Sariola H., 2000, Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF, *Science*, 287(5457):1489-1493 <http://dx.doi.org/10.1126/science.287.5457.1489> PMID:10688798
- Iynedjian P.B., 2005, Lack of evidence for a role of TRB3/NIPK as an inhibitor of PKB-mediated insulin signalling in primary hepatocytes, *Biochem. J.*, 386(Pt1): 113-118 PMID:15469416 PMID:1134772
- Seandel M., James D., Shmelkov S.V., Falcatori I., Kim J., Chavala S., Scherr D.S., Zhang F., Torres R., Gale N.W., Yancopoulos G.D., Murphy A., Valenzuela D.M., Hobbs R.M., Pandolfi P.P., and Rafii S., 2007, Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors, *Nature*, 449: 346-350 <http://dx.doi.org/10.1038/nature06129> PMID:17882221 PMID:2935199
- Tokuda M., Kadokawa Y., Kurahashi H., and Marunouchi T., 2007, CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes, *Biol. Reprod.*, 76(1): 130-141 <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.106.053181> PMID:17035642