

梗阻性无精子症患者附睾蛋白 P34h 的表达及其意义

邓仲磊,程欢,徐东亮,谭若芸,鲁佩,张炜,顾民*

(南京医科大学第一附属医院泌尿外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨梗阻性无精子症患者的附睾组织中附睾蛋白 P34h mRNA 及蛋白表达情况,并探讨其在梗阻性无精子症患者中的意义。方法:采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 30 例因不同梗阻(输精管或射精管水平梗阻)所致的梗阻性无精子症患者附睾组织中 P34h 基因 mRNA 的表达水平,Western Blot 检测 2 组 P34h 蛋白的表达。结果:2 组均有 P34h mRNA 的表达,输精管梗阻的 P34h/ β -actin 均值为 0.418 ± 0.045 ,射精管梗阻的 P34h/ β -actin 均值为 0.719 ± 0.069 ,输精管梗阻的附睾组织中 P34h mRNA 水平显著低于射精管梗阻($P < 0.05$)。2 组亦均有 P34h 蛋白的表达,输精管梗阻平均光密度为 0.095 ± 0.014 ,射精管梗阻为 0.276 ± 0.054 ($P < 0.05$),两组 P34h 蛋白的表达差异有统计学意义。结论:P34h mRNA 及其蛋白在不同梗阻因素所致的无精子症患者的附睾中表达水平有明显差异,提示 P34h 可能是梗阻性无精子症时导致精子成熟障碍的一个重要因素。

[关键词] 梗阻性无精子症;附睾蛋白;P34h;精子成熟

[中图分类号] R698+.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-058-04

The expression and significance of epididymis protein P34h in obstructive azoospermia patients

DENG Zhong-lei, CHENG Huan, XU Dong-liang, TAN Ruo-yun, LU Pei, ZHANG Wei, GU Min*

(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression and significance of P34h in the patients with obstructive azoospermia. **Methods:** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot assay were used to examine different mRNA and protein expressions of P34h in epididymis tissues in 30 cases of obstructive azoospermia due to different obstruction sites which located at the vas deferens or ejaculatory duct. **Results:** The mRNA expression level of P34h in epididymis tissues was different. P34h mRNA expression of the group with obstructive site at vas deferens was lower than that with obstructive site at ejaculatory duct (mean value of P34h/ β -actin; 0.418 ± 0.045 vs. 0.719 ± 0.069 , $P < 0.05$). P34h protein in the group with obstruction at vas deferens was significantly lower than that with obstruction at ejaculatory duct (protein; 0.095 ± 0.014 vs. 0.276 ± 0.054 , $P < 0.05$). **Conclusion:** The mRNA and protein expressions of P34h were significantly different in epididymis tissues due to various obstructive factors. It may play an important role in sperm mature obstacles in the patient with obstructive azoospermia.

[Key words] obstructive azoospermia; epididymis protein; P34h; sperm mature

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 058-061]

梗阻性无精子症占无精症患者比例最多(高达 42.4%~48.0%),是由于精道梗阻使精子的运输发生障碍而产生的无精子症,约占男性不育率的 1%^[1]。目前多数人认为精道梗阻引起不育的原因仅是物理上精子的运输困难,而精道梗阻引起与精子有关

的生化改变,从而导致精子成熟障碍却知之甚少。已有研究证实,在精道梗阻的患者中,一些精浆成分会发生改变,如果糖,柠檬酸等^[2]。P34h 是脱氧还原酶家族成员,分子量约为 34 000,是附睾分泌的一种精子表面蛋白。有文献报道,P34h 在精子穿过附睾转移到精子顶体区时,影响精卵结合^[3]。且 P34h 是人精子成熟的主要标志物^[4]。目前对附睾来源的蛋白研究甚少,尤其 P34h 在精道梗阻引起梗阻性无精

[基金项目] 江苏省卫生厅医学重点人才资助项目

*通讯作者, E-mail: lancetgu@yahoo.com.cn

子症患者中的意义尚未报道,因此在梗阻性无精子症中深入了解附睾蛋白 P34h 的变化显得尤为重要。本研究通过检测因不同梗阻(输精管或射精管水平)所致的梗阻性无精子症患者附睾组织中 P34h 表达差异,以期在分子水平阐明精道梗阻引起男性不育的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 对象

收集 2008~2010 年间南京医科大学第一附属医院泌尿外科 30 例因精道梗阻导致的无精子症患者正常附睾体组织的穿刺标本,患者年龄 23 岁~40 岁,平均 30.5 岁,其中输精管梗阻患者 16 例,射精管梗阻患者 14 例。入选标准:①诊断均采用精液检查和精道造影确诊;②均为后天性因素所致精道梗阻,梗阻时间平均约 2 年左右。穿刺标本立即放入 DEPC 水处理过的 EP 管内且 -80℃ 保存。此项研究均获得患者知情同意并通过南京医科大学第一附属医院伦理委员会同意。

1.1.2 主要试剂

逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司,主要包括 MMLV 及 Oligo dT;PCR 扩增试剂,包括 Taq 酶、dNTP 购自北京天为时代公司;TRIzol 和蛋白提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;鼠抗人 P34h 单克隆抗体购自美国 BD Bioscience Parmingen 公司;目的基因 P34h 和内参 β -actin 引物使用引物设计软件 primer 2.0 设计,P34h 上游引物:5'-GGAAACAGC-TATGACCATG-3',下游引物:5'-GTAAAACGGCCA-GT-3'; β -actin 上游引物:5'-TGGACCACACCTTC-TACAA-3';下游引物:5'-AGCCCTGGATAGCAACG-TACA-3'。扩增片段分别为 912 bp 和 159 bp,2 对引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测

按总 RNA 提取试剂盒(TRIzol 法)的操作说明提取组织的总 RNA,SmartSpec3000RNA/DNA/蛋白浓度检测仪(美国 BIO-RAD 公司)测定 RNA 的浓度和纯度后置于 -75℃ 中冻存待用。逆转录反应取 RNA 1 mg,5×RT Buffer 4 ml,10 mmol/L dNTP 1 ml,50 mU/L RNasin 0.5 ml,0.5 g/L Oligo dT 1 ml,200 mU/L MMLV 1 ml,DEPC 水定容至 20 ml,充分混匀,42℃ 反应 60 min,94℃ 变性 5 min,阴性对照为不加 RNA 的反应体系。取上述反应产物 cDNA 2 ml,

10 mmol/L dNTP 2 ml,10×Buffer 2.5 ml,25 mmol/L MgCl₂ 2 ml,12.5 pmol/L P34h 及 β -actin 引物 1 ml,去离子水定容至 24.5 ml,充分混匀后 94℃ 热启动 5 min,加入 2.5 mU/L Taq 酶 0.5 ml。扩增条件:95℃ 热变性 1 min,60℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 30 s,30 个循环,72℃ 补偿 5 min,同时扩增 P34h 及 β -actin。空白对照为不加入 cDNA 模板的反应体系。取 PCR 反应产物 3 ml,与 6×PCR 上样缓冲液 0.5 ml 混合后,于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)中电泳,75 V,40 min,于紫外光灯下观察结果,凝胶分析系统拍照并分析结果。

1.2.2 Western blot 检测

按蛋白提取试剂盒的操作说明提取组织的总蛋白,SmartSpec3000RNA/DNA/蛋白浓度检测仪(美国 BIO-RAD 公司)测定蛋白的浓度和纯度,平衡浓度并 100℃ 加热 5 min 后置于 -20℃ 中备用。提取的蛋白经 10%SDS-PAGE 电泳后,切除 SDS-PAGE 胶多余的边缘部分,剥下胶放入转膜缓冲液中平衡,取与胶同样大小的硝酸纤维素膜 1 张,均用转膜缓冲液平衡,在电极(正极)上依次叠放硝酸纤维素膜和凝胶,接通负极,以 15V 电压转移 30 min。转膜结束,将膜浸入封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 TBS)中缓慢振荡 60 min,用 TBST 液洗涤 3 次,每次 5 min;加一抗(鼠抗人 P34h 单克隆抗体,1:50 稀释),4℃ 缓慢振荡过夜;用 TBST 液洗涤 3 次,每次 5 min,加 HRP 标记的酶标二抗(1:500 稀释),室温缓慢振荡 2 h;用 TBST 液洗涤 3 次,每次 5 min,ECL 发光 X 线曝光观察条带。

1.3 统计学方法

用 SPSS10.0 软件进行统计学分析。数据以算术平均值及标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析及多组比较的 SNK 法分析不同组之间的差异, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

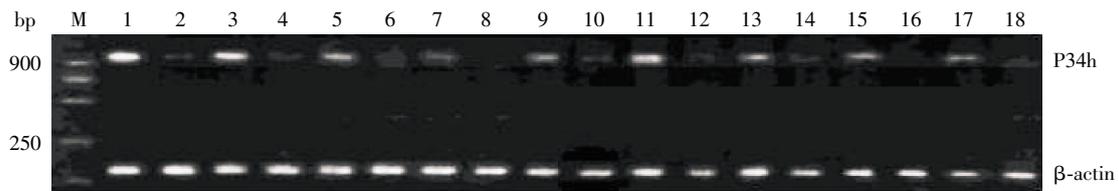
2 结果

2.1 不同梗阻因素所致的梗阻性无精子症正常附睾体 P34h mRNA 的表达

射精管梗阻附睾组织(14 例)P34h/ β -actin 为 0.719 ± 0.069 ,输精管梗阻附睾(16 例)则为 0.418 ± 0.045 ,射精管梗阻附睾 P34h mRNA 的表达水平较输精管梗阻附睾组织低($P < 0.05$,图 1)。

2.2 Western blot 检测不同梗阻因素所致的梗阻性无精子症正常附睾体 P34h 蛋白的表达

Western blot 显示两组附睾组织多数存在有

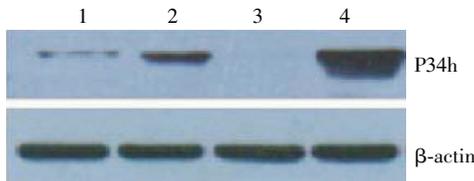


1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17: 射精管梗阻; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18: 输精管梗阻。

图 1 不同梗阻位置所致梗阻性无精症患者的正常附睾组织 P34h mRNA 表达情况

Figure 1 Expression of P34h mRNA in epididymis tissues in obstructive azoospermia patients due to various obstructive factors

P34h 蛋白的表达, 其 P34h/ β -actin 平均光密度分别为, 输精管梗阻正常附睾组织(16 例): 0.095 ± 0.014 ; 射精管梗阻正常附睾组织(14 例): 0.276 ± 0.054 , 二者的平均光密度经统计学分析均有显著性差异($P < 0.05$, 图 2, 各显示 2 例)。



1, 3: 输精管梗阻附睾组织; 2, 4: 射精管梗阻附睾组织。

图 2 不同梗阻位置所致梗阻性无精症患者的正常附睾组织 P34h 蛋白的表达情况

Figure 2 Expression of P34h protein in epididymis tissues in obstructive azoospermia patients due to various obstructive factors

3 讨论

附睾是精子成熟的重要场所, 尽管至今还没有直接的证据表明精子在附睾成熟后有利于与卵子结合, 但是已经有大量的间接证据支持这个观点。对大量哺乳动物的研究发现, 当精子转移到附睾体或者附睾尾的时候就获得了与卵子结合的能力^[5,6], 熊芳等^[7]采用附睾精子单精子卵泡浆内注射的方法治疗无精症, 已经取得了满意的治疗效果, 因此对附睾功能的研究是生殖医学研究的重要内容。

由于精子必须经过附睾管道内的成熟过程才能获得受精能力, 因此对附睾生理学及附睾液的生物化学研究引起人们越来越多的重视^[8]。附睾内精子成熟的整个过程包括前向运动能力、透明带结合能力及受精能力的获得, 而这些能力的获得主要依赖于雄激素调控下的附睾蛋白的合成和分泌。P34h 是在研究人精子透明带相互作用时发现的精子表面蛋白, 主要分布在附睾体部的近端和远端。由于人 P34h 与仓鼠精子蛋白 P26h 具有较高的同源性, 因此抗 P26h 的抗血清可以与 P34h 发生交叉反应。在精子-透明带结合实验中加入抗 P26h 的抗血清

后, 平均每个透明带结合精子数比对照组显著下降, 但该抗血清并没有诱导精子成熟前顶体反应的发生, 对精子的运动能力亦无影响^[9]。P34h 能够介导精子和透明带的结合, 并可作为精子在附睾中成熟的标志物, 低水平的 P34h 与原发性男性不育相关^[10]。经过冷冻保存的精子, P34h 的表达下降达 50%, 影响了精子的活力, 改变了精子的细胞成分^[11]。可见 P34h 的表达变化势必会对附睾管腔内精子成熟微环境的形成产生重要影响。行输精管切除术的患者 P34h 就可以作为一个指标来反映输精管切除术后对精子成熟的影响^[12]。

本研究结果显示 P34h mRNA 及其蛋白在不同梗阻位置导致的梗阻性无精子症患者附睾组织中均有表达, 其中因射精管梗阻所致的无精症患者的附睾组织中 P34h 的表达量较输精管梗阻的高, 其机制可能由于在输精管梗阻时, 梗阻下段附睾管腔内压力增高, 精子成熟的局部微环境稳态受到破坏, 进一步引起附睾蛋白 P34h 表达和转录障碍, 其合成和分泌受阻, 最终影响精子的成熟及功能的获得, 致使男性不育的发生, 由此可见, 附睾管腔内的压力高低也是调节 P34h 表达强弱的重要因素之一^[13]; 另一方面, 输精管和射精管的功能不同, 输精管不仅担负运输精子的功能且是精子成熟的重要场所, 而射精管主要是排除精子的重要通道, 同时输精管道梗阻时不仅阻碍了精子的正常运送, 也会对 P34h 的表达进行负调控, 对精子的成熟造成毁灭性打击。

总之, 本研究结果表明输精管道梗阻时可能通过影响附睾管腔内压力参与了 P34h 的转录和翻译过程, 它的低表达与男性不育发生发展相关。这为男性不育的发生预测和早期诊断寻求了新的指标, 为输精管道梗阻致男性不育的预防和治疗, 甚至为男性避孕提供了新的靶点^[14]。目前针对 P34h 基因以及其抗体的研究也有了大量的进展, 国内夏欣一等^[15-17]已经成功扩增出该基因的全长并进行了相关功能的研究, 也制备出了相关的单克隆抗体, 势必对该种蛋白会有更深的研究, 因为有关该蛋白与生

殖及不育的研究还有很多未知亟待解决,我们将在今后的实验中进一步讨论。

[参考文献]

- [1] Vaidyanathan S, Hughes PL, Soni BM, et al. Ureteral obstruction by the vas deferens after urostomy[J]. *Scientific World Journal*, 2010, 10: 1707-1713
- [2] Said L, Galeraud-Denis I, Carreau S, et al. Relationship between semen quality and seminal plasma components: alpha-glucosidase, fructose and citrate in infertile men compared with a normospermic population of Tunisian men[J]. *Andrologia*, 2009, 41(3): 150-156
- [3] Sullivan R, Legare C, Villeneuve M, et al. Levels of P34H, a sperm protein of epididymal origin, as a predictor of conventional in vitro fertilization outcome [J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(5): 1557-1559
- [4] Legare C, Gaudreault C, St-Jacques S, et al. P34H sperm protein is preferentially expressed by the human corpus epididymidis [J]. *Endocrinology*, 1999, 140 (7): 3318-3327
- [5] Moore HD, Hartman TD, Pryor JP. Development of the oocyte-penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis[J]. *Int J Androl*, 1983, 6(4): 310-318
- [6] Dacheux F, Dacheux JL. The intracellular pathway of antagglutinin secretion in the boar caput epididymis as revealed by immunogold labeling [J]. *Cell Tissue Res*, 1987, 249(1): 89-99
- [7] 熊芳, 黄筱金, 唐海勋. 附睾及睾丸精子卵胞浆内单精子注射治疗无精子症[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2007, 27(10): 1177-1178
- [8] Brandenburger T, Strehler EE, Filoteo AG, et al. Switch of PMCA4 splice variants in bovine epididymis results in altered isoform expression during functional sperm maturation[J]. *J Biol Chem*, 2010, 14 (8): 27-33
- [9] Dube E, Legare C, Gaudreault C, et al. Contraceptive responses of female hamsters immunized with recombinant sperm protein P26h[J]. *Contraception*, 2005, 72(6): 459-467
- [10] Moskovtsev SI, Jarvi K, Legare C, et al. Epididymal P34H protein deficiency in men evaluated for infertility[J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(5): 1455-1457
- [11] Desrosiers P, Légaré C, Leclerc P, et al. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events[J]. *Fertil Steril*, 2006, 85(6): 1744-1752
- [12] Légaré C, Thabet M, Picard S, et al. Effect of vasectomy on P34H messenger ribonucleic acid expression along the human excurrent duct: a reflection on the function of the human epididymis [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64 (2): 720-727
- [13] Nagdas SK, Hamilton SL, Raychoudhury S. Identification of acrosomal matrix-specific hydrolases binding proteins of bovine cauda epididymal spermatozoa [J]. *J Androl*, 2010, 31(2): 177-187
- [14] Sipila P, Jalkanen J, Huhtaniemi IT, et al. Novel epididymal proteins as targets for the development of post-testicular male contraception[J]. *Reproduction*, 2009, 137(3): 379-389
- [15] 夏欣一, 黄宇烽, 高云, 等. 人精子表面蛋白P34H的基因克隆及其在睾丸和附睾中表达的半定量分析[J]. *解放军检验医学杂志*, 2003, 2(1): 52-54
- [16] 夏欣一, 吴永明, 潘连军, 等. 抗人精子表面蛋白P34H单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *中华男科学*, 2006, 12(11): 1004-1006
- [17] Xia X, Huang Y, Gao Y, et al. Construction of recombinant expression vector and prokaryotic expression of human epididymal sperm protein P34H [J]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2004, 10(12): 925-927

[收稿日期] 2011-09-22