

Boule 基因在小鼠精子发生过程中的动态表达

晏媛,张辰望,朱梦怡,徐宇君*

(南京医科大学生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**研究雄性不育相关基因 Boule 在小鼠出生后首个精子发生波中的动态表达,探讨 Boule 在精子发生过程中的调控作用。**方法:**运用免疫印迹法分析 BOULE 蛋白在多组织中的表达情况。运用实时荧光定量、免疫组织化学和免疫荧光技术检测 Boule mRNA 和 BOULE 蛋白在雄性小鼠出生后首个精子发生波各个时间点中的表达。**结果:**①免疫印迹法显示 BOULE 蛋白在睾丸中特异性高表达,在出生后 16 d 睾丸可被检测到,并在随后的发育中睾丸和成年睾丸持续表达;②实时荧光定量方法证实 Boule mRNA 在雄鼠出生后 14 d 睾丸中可被检测到,20 d 呈现表达高峰;③免疫组织化学显示在精母细胞及圆形精子细胞胞质中存在 BOULE 蛋白阳性信号。**结论:**Boule 在精子发生过程中的表达是在发育水平精密调控的,在粗线期精母细胞和圆形精子细胞阶段的特异表达提示 Boule 可能在精母细胞进程和圆形精子细胞中发挥作用。

[关键词] Boule;不育;小鼠;精子发生

[中图分类号] Q954.43

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)01-001-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150101

Dynamic expression of Boule in mouse spermatogenesis

Yan Yuan,Zhang Chenwang,Zhu Mengyi,Xu Yujun*

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine,NJMU,Nanjing 210029,China)

[Abstract] **Objective:**To study the dynamic expression of male sterility related gene Boule in the first spermatogenesis wave of mouse testes as well as the function of Boule during spermatogenesis. **Methods:** The expression level of BOULE protein in various tissues and time points were examined using Western blotting. Real-time PCR was used to establish the Boule mRNA expression profile after birth. Immunohistochemistry and immunofluorescence were carried out to analyze the expression and distribution of BOULE protein in mouse testes. **Results:** Western blot confirmed the specific expression of BOULE protein in mouse testes. Real-time PCR showed that Boule mRNA was first detectable in the testis of mice 20 days after birth. Immunohistochemistry showed that BOULE protein located in the cytoplasm of pachytene spermatocyte and round spermatid during spermatogenesis. Immunofluorescence witnessed the BOULE granule,which formed in the cytoplasm. **Conclusion:** Boule expression is precisely regulated during spermatogenesis. The specific expression in the cytoplasm of spermatocyte and round spermatid suggested that Boule may be important for spermatocyte progressing and round spermatid differentiation.

[Key words] Boule;infertility;mouse;spermatogenesis

[Acta Univ Med Nanjing,2015,35(01):001-005]

12%~15%的非梗阻性男性无精子患者携带 Deleted in Azoospermia (DAZ) 缺失,这一重大发现为遗传性不育患者的诊治提供了可能^[1-2]。DAZ 属于包含常染色体基因 DAZL (DAZ-like) 及 BOULE 的 DAZ 大家族,编码 RNA 结合蛋白^[3-5]。Boule 基因作

为 DAZ 家族中最古老的基因在物种进化过程中先后产生了 Dazl 及 DAZ^[4,6]。Boule 在长期进化过程中高度保守,对 Boule 在雄性小鼠精子发生过程中表达的研究,将有助于揭示其家族成员在人类精子发生的功能^[6]。前期针对减数分裂阻滞的病例的研究显示,尽管探针未检测到 Boule 基因缺失,但组化显示 BOULE 蛋白未表达,这些患者不能产生正常精子,也无法产生体外授精 (IVF) 或单细胞核注射 (ICSI) 所需的单倍体精子,即 BOULE 蛋白不表达的

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81270737);江苏省自然科学基金面上项目(BK20122838)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:xuyujun@njmu.edu.cn

患者无法依靠自身精子受孕^[7]。因此,研究 Boule 表达及其在调控哺乳动物精子发生中的作用,将为探索男性不育靶向治疗提供潜在可能性。本研究选用出生后首个精子发生波完全同步的雄性小鼠,观察 Boule 基因的动态表达,探讨 Boule 在小鼠精子发生过程中的功能。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用小鼠为 ICR 品系,同批次于南京医科大学实验动物中心购买待产母鼠,按出生后第 3、6、8、10、12、14、16、18、20、21、28、35 天收集所产雄鼠。所有小鼠均在稳定的环境中进行饲养,温度 20~22℃;湿度 50%~70%;光周期 12 h/12 h;食物和水不限供应。动物使用经南京医科大学伦理委员会同意。

抗 BOULE 蛋白多克隆抗体由本实验室早期免疫兔子提纯血清制备^[3]。通过构建带有 BOULE 氨基端、全长编码区的 BOULE 的 GEX4T1 表达载体,转化 BL21 细胞,诱导细菌表达 GST 标签和氨基端 BOULE 重组蛋白(1~168 氨基酸),这段肽段包含最保守的 RNA 结合功能区^[3]。

1.2 方法

1.2.1 小鼠睾丸组织取材

14 d 及之前雄鼠冰中冷冻,其余时间点小鼠采用颈椎脱臼法处死后,立即取睾丸置于预先标记的 EP 管。

1.2.2 Real-time PCR 检测 Boule mRNA

混合 3 只以上 ICR 小鼠的睾丸,每份约 15 mg 组织,标准 TRIzol 法提取 RNA,随后反转录稀释至 50 ng/ μ l。Real-time PCR System 两步法 PCR 扩增(Applied Biosystems StepOne™)。反应结束后确认 Real-time PCR 的扩增曲线和溶解曲线,将实验结果进行 2^{- Δ Ct} 统计分析。小鼠出生后首个生精波是完全同步的,精子发生的不同发育阶段依次在不同时间出现。小鼠出生后精原细胞约第 6 天(6 dpp)起开始增殖,细线期精母细胞约在第 10 天出现。第 14 天到达粗线期并持续到约第 21 天,随后进入减数分裂,精子细胞开始产生。第 22~28 天精子延长过程开始,圆形精子细胞是此时最主要的细胞类型。第 28 天(28 dpp)开始出现长形精子,第 30 天长形精子丰富,第 35 天(35 dpp)成熟的长形精子释放到周围曲细精管的管腔^[8]。这一同步性提供了准确定位 Boule 基因 mRNA 和蛋白在精子发生发育过程中动态分布的有利条件,因此我们选择出生后正经历第

一个生精波的雄性小鼠,试图明确 Boule 表达的空间性。

本研究设计引物针对 Boule 最保守区域(Exon2~6),扩增 Boule mRNA。同时以 Dazl(Boule 同家族基因)、Vasa(早期生殖细胞即有表达)^[9]、Stra8(减数分裂起始阶段的标志基因)^[10]、Prm1(长形精子特异性基因)^[11]作为对照,引物序列如表 1。

表 1 Real-time PCR 所用引物序列

Table 1 Sequences used for Real-time PCR		
基因名		引物序列(5'→3')
mBoule	F	ACAGAGCTGGAGTGTCCTCAAAGGGT
	R	AGGCCAAGATGCTGGGACAGAAGT
mVasa	F	GAAGTTTCGGGTGACGAAGC
	R	CACGGGCATCTAGACCTTGT
mDazl	F	TCCCAACAGTCCCCTAGTGATGGC
	R	CTTCTGCACATCCACGTCATTA
mPrm1	F	CTGCTCTGAGCCAGCTCCCG
	R	ATCGCCTCCTCCGTCTGCGA
mStra8	F	TTAAACCAGGAACCAGAGCC
	R	GCTTAGCCAGGTTTCGAGGAT
mActin	F	CCGTAAAGACCTCTATGCC
	R	CTCAGTAACAGTCCGCCT

1.2.3 Western blot 检测 BOULE 蛋白

混合 3 只以上各时间点小鼠睾丸组织,每份约 40 mg,提取蛋白,SDS-PAGE 分离,转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h。用 5%脱脂奶粉的 1:1 000 稀释抗 BOULE 蛋白多克隆抗体,4℃摇床孵育过夜。次日用 TBS 洗去未结合抗体,1:1 000 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 二抗,37℃孵育 1 h。TBS 洗 3 次,每次 10 min,随后化学发光显色(ECL kit, Amersham Bioscience, 美国),Image Master VDS 凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国)检测杂交信号。Western blot 结果至少重复 3 次。

1.2.4 免疫组化、免疫荧光分析 BOULE 蛋白分布定位

免疫组化所用小鼠睾丸 Bouin 固定,梯度脱水后石蜡包埋,切成 5 μ m 的薄片贴附于防脱的载玻片上,置于 65℃恒温箱中至少 3~4 h,使切片干燥。切片经脱蜡,水化后用 3% H₂O₂ (H₂O₂ 与无水甲醇按 3:97 体积比配制)37℃处理 10 min 去除内源性过氧化物酶。0.01 mol/L 枸橼酸钠(pH6.0)进行抗原修复,0.01 mol/L PBS 洗涤后,进口羊血清工作液室温封闭至少 1.5 h。随后 1:1 000 加入兔抗 Boule 抗体(进口羊血清工作液配制),置于湿盒中 4℃过夜。0.01 mol/L PBS 洗涤后,1:1 000 加入 HRP 标记羊

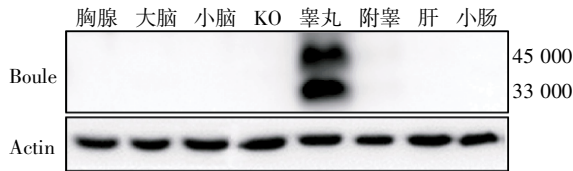
抗兔 IgG, 37°C 孵育 1 h。再次洗涤后用 DAB 试剂显色, 中性树脂封片后用兔 IgG 作为阴性对照, 以细胞核或胞浆中有棕黄色颗粒为阳性反应, Axioskop2 plus (ZEISS 公司, 德国) 显微镜观察。

免疫荧光所用小鼠睾丸 4% PFA 固定过夜。蔗糖梯度脱水后 OCT 包埋组织, 切片厚度 5 μ m。PBS 洗片后羊血清工作液室温封闭 1 h。1:1 000 加入兔抗 Boule 抗体(进口羊血清工作液配制), 4°C 孵育过夜。0.01 mol/L PBS 洗涤后, 1:500 加入 FITC 标记羊抗兔 IgG, 37°C 孵育 1 h(以下步骤均严格避光, 以防荧光淬灭)。Hoechst 染核 30 s, 洗片。DABCO 封片, 避光保存。Zeiss LSM710 激光共聚焦显微镜下观察, ZEN 2011 软件拍照。

2 结果

2.1 Western blot 检测 BOULE 蛋白在小鼠各组织中的表达

利用前期构建的 Boule KO 小鼠睾丸作为阴参, 明确了 BOULE 蛋白约 33 000 及 45 000 分子量的 2 个肽段。且其他组织中未检测到信号, 这一结果说明 BOULE 蛋白在小鼠睾丸组织中特异性表达(图 1)。



各组织相同处理提取蛋白上样 10 μ l, KO 为 Boule KO 雄鼠的简单缩写。
图 1 Western blot 结果显示 BOULE 蛋白在小鼠睾丸中特异性表达

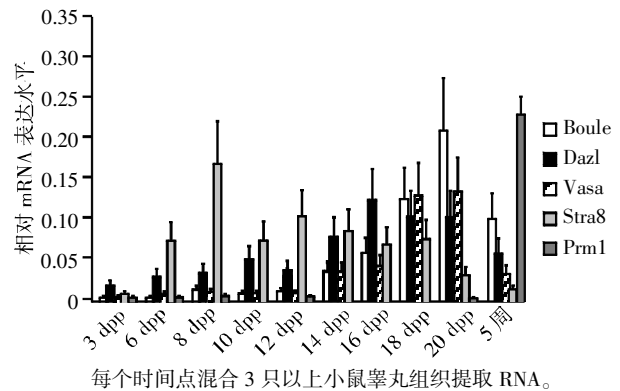
Figure 1 Western blot showed a specific expression of BOULE in mouse testes

2.2 Real-time 检测 Boule mRNA 在各时间点睾丸组织中的表达丰度

图 2 结果显示, Boule mRNA 在小鼠出生后第 12 天(12 dpp)之前表达水平较低, 后表达逐渐升高, 第 20 天(20 dpp)即精子发生推进到粗线期达到高峰。Dazl 和 Stra8 mRNA 从出生后第 8 天起即有一定转录水平, Vasa mRNA 持续表达, Prm1 mRNA 从第 20 天起出现特异性转录。

2.3 Western blot 检测 BOULE 蛋白在各时间点睾丸组织中的表达丰度

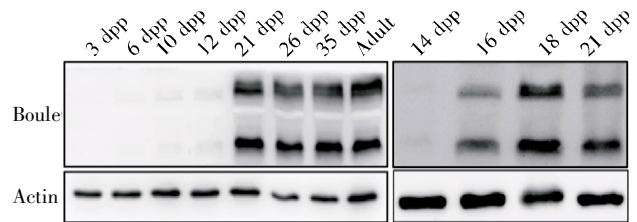
为了进一步明确在精子发生过程中 BOULE 蛋白的表达情况, 混合 3 只以上各时间点的睾丸组织提取蛋白, Western blot 结果显示 BOULE 蛋白于 21



每个时间点混合 3 只以上小鼠睾丸组织提取 RNA。

图 2 Boule mRNA 在第 20 天达到高峰

Figure 2 Real-Time PCR showed a Boule mRNA peak at 20 dpp



每个时间点混合 3 只以上小鼠睾丸组织提取蛋白。

图 3 BOULE 蛋白在粗线期中渐增性表达

Figure 3 Increasing expression of BOULE during pachytene stage

d, 即粗线期后期明显富集。细分粗线期为 14 dpp、16 dpp、18 dpp、21 dpp 可见 BOULE 蛋白在出生后第 14 天(14 dpp)的睾丸中就开始表达, 16 d 睾丸明确表达并随精子发育的推进, 表达量渐增(图 3)。

2.4 免疫组化、免疫荧光分析 BOULE 蛋白分布定位

因 Western blot 检测到 BOULE 蛋白于 21 d 后呈现高丰度表达, 后续选取 18、21、28 d 的雄鼠睾丸进一步研究 BOULE 蛋白的分布定位。

用抗 BOULE 蛋白抗体进行小鼠各时间点睾丸组织的免疫组化分析结果显示: BOULE 蛋白明确位于精母细胞及圆形精子细胞胞质, 各时间点无明显差异(图 4)。

用抗 BOULE 蛋白抗体进行小鼠各时间点睾丸组织的免疫荧光分析结果显示: BOULE 蛋白定位于胞质, 可形成颗粒小体(图 5)。

3 讨论

本研究证实小鼠 Boule 在睾丸中特异性表达, 精子发生过程中其表达被精密调控。以出生后进入首次精子发生波的雄鼠为研究对象, 在出生后 20 d Boule mRNA 出现高峰, 同时有较高水平蛋白表达。免疫组化揭示了 BOULE 蛋白在粗线期精母细胞和圆形精子细胞的胞质中存在。在精母细胞中证实了

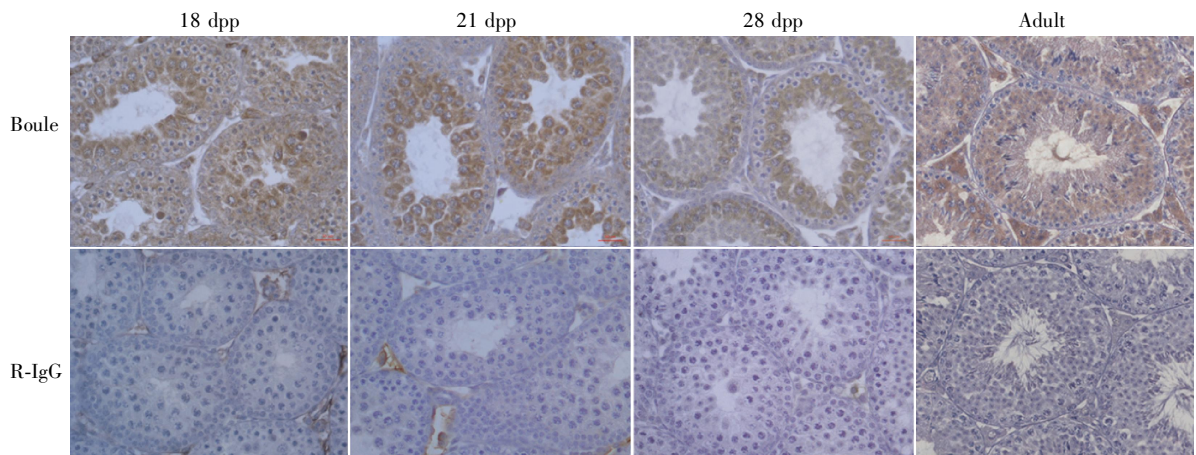
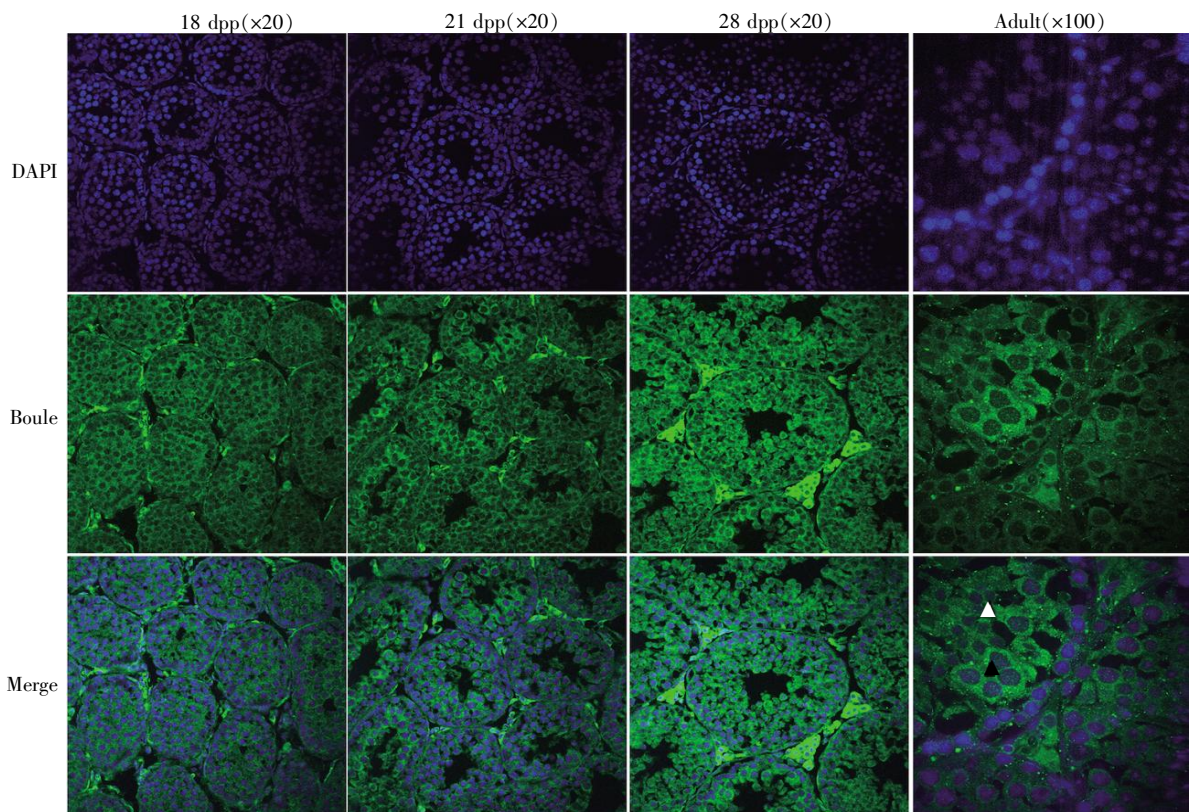


图 4 小鼠免疫组化显示 BOULE 蛋白在睾丸中的定位(×20)

Figure 4 The expression of BOULE in mouse testes by immunohistochemistry(×20)



黑色三角形标示精母细胞,白色三角形标示圆形精子细胞。Boule 抗体 1:1 000 稀释添加,DAPI 显示核定位。

图 5 小鼠免疫荧光明确 BOULE 蛋白定位

Figure 5 Location of BOULE in mouse testes by immunofluorescence

BOULE 蛋白的高表达,提示 BOULE 在其中起着关键的功能。前期研究表明果蝇中 Boule 首先在精母细胞核中出现,中期之后转移至精母细胞和精子细胞胞质^[8,13]。在出生后 18~28 d 的小鼠睾丸生殖细胞中并未发现 Boule 类似的细胞亚定位改变现象。

小鼠 Boule 最早在粗线期中期的精母细胞中出现表达高峰直至圆形精子细胞^[4]。Boule 基因缺失雄

鼠不育,减数分裂可以正常完成,但精子发生阻滞在圆形精子细胞阶段,无法形成成熟长形精子^[14]。Dazl 的表达模式与 Boule 不同,从 PGC 分化到精子发生最后产生圆形精子细胞过程中 Dazl 都持续表达。雌性和雄性 Dazl 基因缺失小鼠在出生时大多数生殖细胞不存在,极少部分细胞可进入减数分裂,但联会复合体不能形成,精母细胞不能前进过细线

期^[15-16]。Dazl 缺失后生殖细胞不能诱导减数分裂基因反应于视黄酸,揭示 Dazl 在减数分裂的启动时功能^[17]。

DAZ 家族蛋白空间上的功能替代性是值得深度探究的问题, Boule 和 Dazl 是否存在交叠的生理功能并不明确。这些在胞核或胞质中存在的 DAZ 家族蛋白是否有冗余的生理功能或共同的作用途径,如 Boule 基因缺失雄鼠之所以可以完成减数分裂是否由于 Dazl 弥补了 Boule 的功能,这些问题的解答将使我们对于翻译调控有新的认识。本研究结果提示 Boule 和 Dazl 在精母细胞阶段的重合,提示减数分裂阶段可能的协同作用。Boule 基因在圆形精子细胞中的特异性表达则说明了 Boule 在精子分化过程中不可或缺。对 Boule 基因这一雄性不育基因表达的研究对临床男性不育的诊治有重大意义。

[参考文献]

- [1] de Kretser DM. Infertility in men: recent advances and continuing controversies [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(10): 3443-3450
- [2] Reijo R, Lee TY, Salo P, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene [J]. *Nat Genet*, 1995, 10(4): 383-393
- [3] Vangompel MJ, Xu EY. A novel requirement in mammalian spermatid differentiation for the DAZ-family protein Boule [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(12): 2360-2369
- [4] Xu EY, Moore FL, Pera RA. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans [J]. *Proc Natl Sci USA*, 2001, 98(13): 7414-7419
- [5] Shan Z, Hirschmann P, Seebacher T, et al. A SPGY copy homologous to the mouse gene dazla and the drosophila gene boule is autosomal and expressed only in the human male Gonad [J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 12 (5): 2005-2011
- [6] Shah C, Vangompel MJ, Naeem V, et al. Widespread presence of human BOULE homologs among animals and conservation of their ancient reproductive function [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(7): e1001-1022
- [7] Luetjens CM, Xu EY, Rejo Pera RA, et al. Association of meiotic arrest with lack of BOULE protein expression in infertile men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(4): 1926-1933
- [8] Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, et al. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization [J]. *J Cell Biol*, 1977, 74(1): 68-85
- [9] Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, et al. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila vasa and its specific expression in germ cell lineage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(25): 12258-12262
- [10] Ohta K, Lin Y, Hogg N, et al. Direct effects of retinoic acid on entry of fetal male germ cells into meiosis in mice [J]. *Biol Reprod*, 2010, 83(6): 1056-1063
- [11] Cho C, Willis WD, Goulding EH, et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice [J]. *Nat Genet*, 2001, 28(1): 82-86
- [12] Cook HJ, Lee M, Kerr S, et al. A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads [J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(4): 513-516
- [13] Cheng MH, Mames JIG, Wasserman SA. Biphasic subcellular Localization of the DAZL-related protein Boule in drosophila Spermatogenesis [J]. *Dev Biol*, 1998, 204(2): 567-576
- [14] Bonilla E, Xu EY. Identification and characterization of novel mammalian spermatogenic genes conserved from fly to human [J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(3): 137-142
- [15] Ruggiu M, Speed R, Taggart M, et al. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis [J]. *Nature*, 1997, 389(6646): 73-77
- [16] Saunders PT, Turner J, Taggart M, et al. Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis [J]. *Reproduction*, 2003, 126(5): 589-597
- [17] Lin Y, Gill ME, Koubova J, et al. Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos [J]. *Science*, 2008, 322(5908): 1685-1687

[收稿日期] 2014-05-20