

弱精症患者精子 基因表达谱的 建立及分析

Construction and Analysis of Gene-expression Profiles in the Sperms of Patients with Asthenospermia

陈德宇^{1,2}/刘利敏²/谢庆东²/

吴清宏³/黄天华^{2,*}

(1. 阜阳师范学院生物系, 安徽 阜阳 236041;

2. 汕头大学医学院生殖医学研究中心细胞生物

与遗传学教研室, 广东 汕头 515041; 3. 汕头

市生殖保健中心, 广东 汕头 515041)

CHEN De-yu^{1,2}, LIU Li-min², XIE Qing-dong²,

WU Qing-hong³, HUANG Tian-hua^{2,*}

(1. Department of Biology, Fuyang Normal College, Fuyang

236041, Anhui; 2. Research Center for Reproductive Medicine,

Department of Cell Biology and Genetics, Shantou University Medical

College, Shantou 515041, Guangdong; 3. Shantou Center for

Reproductive Health, Shantou 515041, Guangdong, China)

【摘要】背景与目的:应用基因芯片技术建立弱精症患者精子基因表达谱。材料与方法:收集30份弱精症患者精液标本和20份成年健康有生育能力男性的精液标本,提取精子RNA,制备生物素标记的cDNA探针,与含有30968个探针的PhalanxOneArray™芯片杂交,分析弱精症患者与健康有生育能力成年男性精子中基因的表达情况。结果:高活力精子和低活力精子共1995个基因存在表达差异,上调基因394个,下调基因437个。功能聚类分析结果提示,弱精症患者精子中表达上调的基因集中在物理化学刺激、压力应激、炎症反应等聚类,或一些催化酶聚类,这些因素可能是导致精子活力降低的重要诱因,而弱精症患者精子中表达下调的基因主要集中在一些与精子发生和抗凋亡相关的基因聚类中。结论:弱精症患者精子基因表达谱的建立对分析精子运动的分子机制和探讨弱精症的病因将会有所帮助。

【关键词】弱精症;精子;基因芯片;mRNA;表达谱

中图分类号:R711.6

文献标识码:A

文章编号:1004-616X(2009)04-0286-05

【ABSTRACT】 BACKGROUND AND AIM: To construct and analyze the gene-expression profiles in the sperms of asthenospermic patients. MATERIALS AND METHODS: 30 semen samples from asthenospermia patients and 20 semen samples from healthy normal adult men were collected, and total RNAs extracted to produce cDNAs probes. Hybridization with Phalanx OneArray™ contained 30 968 probes was carried out after the labeled cDNAs were purified by PCR Product Purification Kit. RESULTS: Among the 30 968 probes, 394 genes were up-regulated, 437 genes were down-regulated, the others showed no different expressions. Functional cluster displayed that response to external stimulus, defense, stress and inflammation were the most important reasons leading to asthenospermia, and protease inhibitor could also lead to asthenospermia. Furthermore, genes associated with spermatogenesis and negative regulation of apoptosis were very important to maintain high sperm motility. CONCLUSION: Construction of gene-expression profiles in the sperms of asthenospermic patients could help to analyze the molecular mechanism of sperm motility and to study the etiopathogenesis of asthenospermia.

【KEY WORDS】 asthenospermia; sperm; microarrays; gene-expression profiles

不孕不育是个全球性医学问题,据世界卫生组织统计,全球约有15%~20%的育龄夫妻存在不孕不育问题,其中因男性原因导致的不育占一半左右。而精子活力低下是男性不育的重要原因之一,82%的男性不育与精子活力低下直接相关^[1]。精子活力低下导致的弱精症

(asthenospermia)是指精液中前向运动的精子数量(A类和B类)小于50%或快速直线向前运动的精子数量小于25%的病症。弱精症主要特征表现为精子活力差,前向运动能力低^[2]。关于精子活力低下的分子机制一直是国内外男性生殖的研究热点。目前对弱精症发病机制的

收稿日期:2008-12-04;修订日期:2009-02-18

基金项目:广东省自然科学基金(81515031020000027),广东省社会规划项目(2008B03031242)

作者简介:陈德宇(1971-),男,安徽太湖人,博士,副教授,研究方向:生殖遗传学。

* Correspondence to HUANG Tian-hua, E-mail: thhuang@stu.edu.cn.

了解不是很充分,本研究用基因芯片技术,绘制正常生育男性和弱精症患者精子中 mRNA 的表达谱,比较其表达差异,以期为进一步探讨精子活力低下的分子机制并为弱精症提供新的治疗靶标。

1 材料与方法

1.1 标本收集

20 份成年健康有生育能力男性的精液标本从汕头大学医学院生殖医学研究中心收集,志愿者平均年龄为(26±4)岁。30 份弱精症患者精液标本从汕头市生殖保健中心收集,患者平均年龄为(30±5)岁。用计算机辅助分析系统分析精液参数。所有的志愿者及患者均签订知情同意书。

1.2 标本处理

1.2.1 高活力精子处理 将健康有生育能力男性的精液 2~5 ml 于 37℃ 液化 30 min 后用标准 SWIM-UP 上游技术获取上层高活力精子,再用 Percoll 细胞分离液做 40% 和 80% 二层密度梯度离心,1 000 g 离心 25 min。取下层高活力精子,用 BWB (Biggers, Whitten and Whittingham, BWB) 培养基 5 ml,混匀,1 000 g 离心 5 min,清洗 2 次后 -80℃ 保存,备用。

1.2.2 低活力精子处理 弱精症患者精液 2~5 ml,37℃ 液化 30 min 后,2 000 g 离心 8 min 去除精浆,将精子用 BWB 重悬,1 000 g 离心 8 min 清洗 2 次,用 Percoll 细胞分离液做 30%、60%、90% 三层密度梯度离心,1 000 g 离心 25 min 后,取第 2 层精子,再做 40% 和 80% 二层密度梯度离心,1 000 g 离心 25 min 取第 1 层低活力精子,用 BWB 清洗 2 次后 -80℃ 保存,备用。

1.3 RNA 的提取

按照 PURELINK™ 试剂盒操作说明书提取总 RNA。紫外吸收法测定 RNA 在分光光度计 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,以计算浓度并评估纯度。用甲醛电泳试剂进行变性琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 纯度及完整性。-80℃ 保存,备用。

1.4 制备生物素标记的 cDNA 探针

采用 SuperArray 公司的 AmpoLabeling-LPR 试剂盒合成生物素标记的 cDNA 探针,采用 Superscript II 逆转录酶,以及 Cy5(正常组)和 Cy3(弱精子组)标记的 dUTP 将 mRNA 进行逆转录反应合成 cDNA,再在逆转录反应液中加入 LPR 缓冲液 30 μl,75 mmol/L 基因特异性引物 4 μl,生物素标记的 dUTP 和耐高温 DNA 聚合酶,线性扩增生物素标记的 cDNA 探针。

1.5 芯片杂交

参照康成生命科学实验中心优化的缓冲液和实验

方法将合成的上述探针与含有 30 968 个探针的 Phalanx OneArray™ 芯片置于 60℃ 杂交箱进行杂交。15~17 h 后揭开盖玻片,依次以 2×SSC、0.2% SDS、0.1×SSC 和 0.2% SDS、0.1×SSC 洗涤 10 min,室温晾干。探针与芯片杂交后,加链亲和素偶联的碱性磷酸酶 (AP) 及化学发光底物反应。X 射线胶片曝光,在胶片上显示检测结果。

1.6 图像采集与数据分析

图像经 X-射线胶片曝光后,将胶片上的图像用扫描仪扫描并转换为灰度 TIFF 格式的图片保存。运行 ScanAnalyze 软件,将灰度 TIFF 格式图片的点阵转化为数字型数据,将此原始数据储存为 Microsoft Excel 文件。以下两个条件为判定基因差异表达的标准: Cy5 和 Cy3 的比值大于 2.0 或小于 0.5 (基因的表达变化在 2 倍以上); Cy5 和 Cy3 信号其中之一必须大于 800 或二者均大于 200。同时要求线性表达数据在所有样本中能够重复。使用芯片配套软件 GEArray Analyzer 对原始数据进行去背景计算以及比较运算。每张芯片均点有负对照 (PUC18DNA 和空白) 以及管家基因,包括 *β-actin*, *GAPDH*, *Cyclophilin A* 和核糖体蛋白 L13a。原始数据将首先被减掉背景最小值,继而用管家基因来进行校正,校正后的数据用来进行样品间基因转录的相对丰度分析。

1.7 基因 Cluster 分析

将基因 ID 号输入 David 数据库 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>) 作基因的分类以及功能分析。

2 结果

2.1 标本处理结果

显微镜下观察,正常精液标本经上游和密度梯度离心后,精液中的体细胞均已去除。弱精症患者精液经第 1 次密度梯度离心后观察结果显示精液中还混杂了部分体细胞,包括一些白细胞和精原细胞等,第 2 次密度梯度离心后精子中含有的体细胞则均已去除。

2.2 杂交结果的数据分析

数据分析结果显示在 30 968 个基因中,高活力精子和低活力精子共有 1 995 个基因存在表达差异。表达量最高的基因是 *ZNF430*,它在低活力精子中的表达量是 30 952.75,表达差异最大的基因是 *OSGEP*,它的表达差异倍数是 54.607。表达差异较大的基因如表 1。其中上调基因是指低活力精子与高活力精子的表达差异超过 2 倍以上的基因,有 394 个;下调基因指低活力精子与高活力精子的表达差异低于 0.5 倍以下的基因,有 437 个。

2.3 基因 Cluster 分析

基因的分类以及功能分析结果显示,这些基因分别

表 1 在高活力与低活力精子间表达差异较大的基因

Table 1 Gene with different expression levels between high motility and low motility sperm

Index	Gene	Gene description	Ratio of expression level (low/high)
Up-regulated	<i>OSGEP</i>	O-sialoglycoprotein endopeptidase	54.60651948
	<i>KIAA0635</i>	centrosomal protein 135 kD	54.1735339
	<i>FLJ45202</i>	family with sequence similarity 74, member A4	52.15555446
	<i>ZNF492</i>	zinc finger protein 492	44.90385498
	<i>ZNF430</i>	zinc finger protein 430	43.31950942
	<i>FLJ33979</i>	methyltransferase 5 domain containing 1	42.70221499
	<i>LOC440833</i>	LOC440833	34.91954849
Down-regulated	<i>BMP8B</i>	bone morphogenetic protein 8b	31.60251783
	<i>TRIM36</i>	tripartite motif-containing 36	0.086113
	<i>NUP155</i>	nucleoporin 155 kD	0.104505
	<i>CRISP2</i>	cysteine-rich secretory protein 2	0.104549
	<i>SPAG5</i>	sperm associated antigen 5	0.117151
	<i>IDE</i>	insulin-degrading enzyme	0.12301
	<i>DDX5</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	0.125809
	<i>ICA1</i>	islet cell autoantigen 1, 69 kD	0.127983
	<i>FAM44B</i>	family with sequence similarity 44, member B	0.132035
	<i>STK22D</i>	serine/threonine kinase 22D (spermiogenesis associated)	0.135002
	<i>RAD51C</i>	RAD51 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>)	0.141233
	<i>KLK8</i>	kallikrein-related peptidase 8	0.146448
	<i>RPP38</i>	ribonuclease P/MRP 38 kD subunit	0.146876
	<i>C9orf36</i>	family with sequence similarity 75, member A1	0.149571
	<i>PARP10</i>	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 10	0.151489
	<i>NDUFA8</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8, 19 kD	0.151566
	<i>LOC440737</i>	similar to ribosomal protein L35	0.152751
	<i>QP-C</i>	UQCQR ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5 kD	0.158684

存在于细胞核和细胞质或各种细胞器中。

功能聚类结果表明一些基因参与了多种生物过程。其中 *CoQ4*、*QP-C*、*NDUFA8* 等基因是呼吸链的成员，直接参与了线粒体呼吸链氧化磷酸化途径，调节精子体内的能量代谢。*RAD51C*、*TNKS1BP1*、*RBBP8*、*APEX2*、*RAD9A* 等基因参与了 DNA 的合成、修复、重组。*RAD51C*、*PLEKHJ1*、*MADCAM1*、*CBLB*、*COLEC11*、*PTAFR* 等基因参与了炎症反应。*VCL*、*RGS19IP1* 等基因参与了细胞骨架组成及运动过程。

一些基因参与多种疾病，例如 *JTPR3*、*TMEM38B* 与 I 型糖尿病易感性有关。*ALDH2*、*PDHA2* 与胎儿酒精综合征、酒精不耐易感性有关。*CSTB* 与 I 型癫痫有关。*NDUFS3*、*NDUFB2*、*NDUFCL1*、*NDUFA8*、*NDUFB4* 基因与亚急性坏死脑病有关。*PEX5*、*STIP1* 参与了泽韦格综合征、脑白质肾上腺萎缩症。

一些基因参与了多种信号通路。例如：*PSCD2*、*GRB2*、*GNA11*、*ALOX12*、*CCR1*、*PTAFB*、*PAK1*、*GNG7*、*PLA2G4E* 参与了由趋化因子和苏氨酸激酶介导的信号通路、G 蛋白耦联通路、Wnt 信号通路、组胺 H1 受体介导信号通路、Ras 信号通路。*BM8P* 参与了 TGF-beta 信号通路，*DFFA* 参与了天冬氨酸级联凋亡通路、FAS 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路。*GRB2* 参与了血管紧张

素 II 介导的 JNK 信号通路、乙型肝炎病毒介导的钙离子信号通路、p38 MAPK 信号通路、Insulin 信号通路。

在分析对比上调和下调基因的功能时，我们发现不同功能类型的基因在高活力和低活力精子中存在表达差异。一些与应激、炎症、负调控酶的催化活力相关的基因在低活力精子中大量表达，例如：*PTAFR*、*GP6*、*S100A8*、*SALL4* 等。具体相关基因分别见表 2。一些与精子发生及生殖有关、抗细胞凋亡相关的基因在高活力精子中大量表达，例如 *CREM*、*SOX30*、*TNPI* 等。相关基因分别见表 3。这些结果提示，物理化学刺激、压力应激、炎症反应等因素可能会导致精子活力降低；一些酶的催化活力受到抑制也可以导致精子活力的降低；并且一些与精子发生和抗凋亡相关基因的大幅下调可能是弱精症活力不高的原因之一。

3 讨 论

我们首次用基因芯片技术，建立了弱精症患者精子的基因表达谱，并分析了高、低活力精子间的基因表达差异，初步探讨了导致精子活力低下的原因。

在高、低活力精子分离方面，最后确定了有效分离高、低活力精子的方法。一般来说，高活力的精子中经过 SWIM-UP 方法上游后分布在上层，活力较低的精子分布

表 2 低活力精子中高表达的特异性基因

Table 2 High expressional genes in low motility sperm

Goterm-bp-all	Genes	DAVID gene name species
Inflammatory response	7	Platelet-activating factor receptor; RNA binding motif protein 4; regenerating islet-derived 3 alpha; complement component 1; chemokine (c-c motif) receptor 1; phospholipase a2; phospholipase a2
Response to external stimulus	9	Platelet-activating factor receptor; rna binding motif protein 4; glycoprotein vi; regenerating islet-derived 3 alpha; complement component 1; chemokine (c-c motif) receptor 1; phospholipase a2; gamma-glutamyltransferase-like activity 1; plasminogen activator; urokinase receptor
Defense response	12	Platelet-activating factor receptor; rna binding motif protein 4; regenerating islet-derived 3 alpha; guanine nucleotide binding protein (g protein); tar (hiv-1) rna binding protein 2; complement component 1; chemokine (c-c motif) receptor 1; phospholipase a2; gamma-glutamyltransferase-like activity 1; apolipoprotein b rna editing enzyme; defensin; class ii major histocompatibility complex; transactivator
Response to stress	22	Platelet-activating factor receptor; reticulon 3; rna binding motif protein 4; glycoprotein vi (platelet); kinesin family member 22; mitogen-activated protein kinase ; chemokine (c-c motif) receptor 1; uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier); plasminogen activator; urokinase receptor; hiv-1 tat interacting protein; tao kinase 2; rad9 homolog a; apex nuclease (apurinic/aprimidinic endonuclease) 2; thymine-dna glycosylase; guanine nucleotide binding protein (g protein); regenerating islet-derived 3 alpha; complement component 1; polymerase (dna directed); retinoblastoma binding protein 8; phospholipase a2; stress- induced-phosphoprotein 1; gamma-glutamyltransferase-like activity Ireticulon 3
Serine-type endopeptidase inhibitor activity	4	Peptidase inhibitor 3; skin-derived (scalp); peptidylprolyl isomerase (cyclophilin) - like 5; wap four-disulfide core domain 3; serpin peptidase inhibitor
Inhibitor activity	6	Peptidase inhibitor 3; skin-derived; cystatinc; peptidylprolyl isomerase (cyclophilin) -like 5; wap four-disulfide core domain 3; timp metallopeptidase inhibitor 3; serpin peptidase inhibitor
Negative regulation of nucleobase; nucleoside; nucleotide and nucleic acid metabolic process	7	S100 calcium binding protein a11 (calgizzarin); rad9 homolog a ; sal-like 4; hexamethylene bis-acetamide inducible 2; forkhead box p1; ets variant gene 3; hairy and enhancer of split 1
Negative regulation of cellular metabolic process	7	S100 calcium binding protein a11 ; rad9 homolog a (s. Pombe); sal-like4 (drosophila); hexamethylene bis-acetamide inducible 2; forkhead box p1; ets variant gene 3; hairy and enhancer of split 1

表 3 高活力精子中高表达的特异性基因

Table 3 High expressional genes in high motility sperm

Goterm-bp-all	Genes	DAVID gene name species
Spermatogenesis	14	Spermatogenesis associated 19 ;camp responsive element modulator ;sry (sex determining region y)-box ; cyclin a1; microtubule associated serine/threonine kinase 2 ;transition protein 1 (during histone to protamine replacement) ;spermatogenesis associated 6 ;sperm associated antigen h2a histone family, member x; calicin; testis-specific serine kinase 3; testis-specific serine kinase 7 pseudogene; ribosomal protein l39-like ;platelet- activating factor acetylhydrolase
Negative regulation of apoptosis	8	Tumor necrosis factor; alpha-induced protein 3; ccaat/enhancer binding protein (c/ebp); ring finger protein 7; tumor protein; translationally-controlled 1; polymerase (DNA directed); beta;protein kinase; amp-activated; annexin a1; stam binding protein
Cell motility	12	Contactin 4; adenylate cyclase- associated protein 1; transition protein 1 (during histone to protamine replacement); interleukin 8; tetraspanin 6; cd9 antigen (p24); sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein; actin related protein 2/3 complex; thrombospondin3; platelet-activating factor acetylhydrolase; annexin a1; chemokine-like factor

在中下部。上层只混有少量的比较大的组织碎片,经过2层 precoll 后,去除组织碎片,剩下的就是高活力的精子。而活力低的精子由于活力有限而不能采用 SWIM-UP 方法分离。同时活力低的精子内含有比较多的细菌、微生物等。首先用 30%、60%、90%的 precoll 分离 除去上层比较大的组织碎片和下层微小的细菌、微生物颗粒。实验中我们在相差显微镜下观察,发现分离后的精子仍混有和精子大小相近的微生物颗粒,所以我们进行用 precoll 进行第 2 次分离,得到了纯度达 95% 以上的低活力精子。

关于弱精症产生的可能原因,国内外学者做了大量的研究。精子尾部轴丝中约有 200 多种蛋白质,其中 25 种蛋白能够影响轴丝的装配,52 种轴丝蛋白与精子运

动直接相关^[3]。精子的外致密纤维里也含有许多运动相关蛋白。尾部的纤维鞘也是精子运动的重要细胞骨架,纤维鞘上定位有大量的蛋白家族和代谢相关的信号通路^[4],它们作为多信号通路和代谢级联的组织中心,对维持鞭毛的运动有着重要的作用^[5]。一些信号通路的异常比如 cAMP/PKA 通路、钙离子信号、G 蛋白耦联通路等都可以导致精子运动能力的下降^[6]。我们发现在弱精症中有很多基因通过各种信号通路而引起精子内的炎症反应及氧化应激反应。PSCD2、GRB2、GNA11、ALOX12、CCR1、PTAFB、PAK1、GNG7、PLA2G4E 参与了由趋化因子和苏氨酸激酶介导的信号通路、G 蛋白耦联通路、Wnt 信号通路、组胺 H1 受体介导信号通路、Ras



信号通路等。实验结果提示我们,今后弱精症有必要从信号通路这一角度深入研究其分子机制。

对于精子运动的 ATP 来源, Ford 等学者认为, 获能前精子鞭毛的运动主要依靠糖酵解提供能量, 获能时主要依靠线粒体的呼吸链提供 ATP^[7], 因此糖酵解相关酶^[8]和有氧呼吸相关酶类的表达异常^[9]都可以影响精子的运动。在比对这些基因在高、低活力精子间的表达差异时, 我们发现 *QP-C*、*NDUFA8* 等基因在弱精症精子中表达显著下调, 而线粒体 ATP 酶的抑制因子 *ATPIF1* 上调, 提示弱精症中精子活力低下与供能不足有关。我们的结果也支持这些学者的结论。以前对弱精症机制的探讨只是对某一单基因或蛋白的研究, 可单基因的表达异常难以完全阐述精子活力改变的机制, 弱精症是多基因多因素相互作用的综合结果。具体的基因之间相互作用的分子机制需要进一步的研究。

聚类分析结果显示, 弱精症精子中差异表达的基因也参与了多种疾病, 提示非生殖系统的疾病可能也会影响精子活力。另外, 弱精症精子中上调基因主要集中在应激、炎症、负调控活力的催化酶, 与临床检测弱精症患者时常发现少、弱精症不育患者生殖器官发炎相符。弱精症精子中表达下调基因主要分布在精子生成及抗凋亡的基因, 除表 3 列出的外, 表 1 中的显著下调的基因 *CRISP2*、*SPAGE5*、*DDX5*、*STK22D*、*IDE* 等参与精子的形成、成熟及性别分化^[10-11]。

关于精子 RNA 与男性生殖的相关性研究, 国内外专家也做了大量的工作。Huang 等^[12]用人精子 cDNA 探针与人睾丸 cDNA 芯片杂交, 研究了精子 RNA 选择性剪切与精子发生之间的关系; Zhang 等^[13]利用 Oligo-microarray 研究了人附睾不同区域的基因表达谱; 毛向明等^[14]应用基因芯片技术研究了成年男性精子与淋巴细胞间的基因表达差异; Ostermeier 等^[15]用含有近 30 000 个 Tag 的人 cDNA 芯片与精子 cDNA 杂交, 得到了近 2 780 个 ESTS; Zhao 等^[9]用基因序列分析 (SAGE) 技术研究了 10 个不育病人精子 mRNA 的表达谱, 得到了 2 712 个 Tag; Burczynski 等^[16]认为人精子中近 3 000 个转录本既包含了精子发生期间的各种遗传信息, 又蕴涵着精子的受精能力、受精卵的发育和胚胎发育等遗传信息。因此精子 RNA 可以作为一个衡量精子质量、预测精子受精能力的重要指标。

参考文献:

[1] Harat ZN, Sadeghi MR, Sadeghipour HR, et al. Immobilization effect of *Ruta graveolens* L. on human sperm: A new hope for male contraception[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115(1):

36-41.

- [2] The ESHRE Capri Workshop Group. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 2006: evidence and evolution[J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13(6):515-526.
- [3] Chu Diana S, Liu Hongbin, Nix Paola, et al. Sperm chromatin proteomics identifies evolutionarily conserved fertility factors [J]. *Nature*, 2006 443(7107):101-105.
- [4] Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, et al. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation[J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(7):535-541.
- [5] Correa LM, Thomas A, Meyers SA. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility[J]. *Biol Reprod*, 2007, 77(6):942-953.
- [6] Fraser LR, Adeoya-Osiguwa S, Baxendale RW, et al. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP[J]. *J Reprod*, 2005, 51(1):37-46.
- [7] Ford WCL. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(3):269-274.
- [8] DeJong J. Basic mechanisms for the control of germ cell gene expression[J]. *Gene*, 2006, 366(1):39-50.
- [9] Zhao Y, Li Q, Yao C, et al. Characterization and quantification of mRNA transcripts in ejaculated spermatozoa of fertile men by serial analysis of gene expression[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(6):1583-1590.
- [10] Busso D, Goldweic NM, Masaru H, et al. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion[J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(4):701-708.
- [11] Clark EL, Coulson A, Dalglish C, et al. A helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer[J]. 2008, 8(19):7938-7946.
- [12] Huang X, Li J, Lu L, et al. Novel development-related alternative splices in human testis identified by cDNA microarrays[J]. *J Androl*, 2005, 26(2):189-196.
- [13] Jin-Song Zhang, Qiang Liu, Yi-Ming Li, et al. Genome-wide profiling of segmental-regulated transcriptomes in human epididymis using oligo microarray[J]. *Mol and Cellular Endocrinol* 2006, 250(1/2):169-177.
- [14] 毛向明, 冯春琼, 邹亚光, 等. 应用基因芯片技术研究成年男性精子的基因表达 [J]. *中华男科学杂志*, 2006, 12(5):401-407.
- [15] Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, et al. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men[J]. *The Lancet*, 2002, 360(9335):772-777.
- [16] Burczynski ME. Urrogate tissue analysis: genomic proteomic and metabolic profiling of surrogate tissues [M]. Boca Raton: CRC Press, 2006: 77-90.