

[文章编号] 1671-587X(2012)02-0180-03

ER81 在白消安模型小鼠睾丸和附睾中的表达及其意义

金 波, 刘 洋, 车冠宇, 孙艺学, 张学明

(吉林大学畜牧兽医学院 动物胚胎工程吉林省重点实验室, 吉林 长春 130062)

[摘 要] 目的: 检测 Ets 家族转录因子 ER81 在白消安模型小鼠睾丸及附睾中的表达水平, 探讨其对精原细胞增殖和分化的影响。方法: 成年小鼠腹腔注射白消安 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别在注射后第 0、3、5、8、10 和 18 天取睾丸和附睾, 半定量 RT-PCR 分析 ER81 mRNA 的相对表达量。结果: 在睾丸组织内, 与第 0 天比较, ER81 的表达量在第 5 天显著降低 ($P < 0.01$), 随后基本恢复; 在附睾组织内, 与第 0 天比较, ER81 表达量于第 8 天显著降低 ($P < 0.05$), 并随后恢复。结论: 转录因子 ER81 可能对精原细胞的分化有调节作用。

[关键词] Ets 家族转录因子 ER81; 睾丸; 附睾; 白消安; 小鼠

[中图分类号] S 814.1 [文献标志码] A

Expressions of transcription factor ER81 in testis and epididymis of busulfan-treated mice and their significances

JIN Bo, LIU Yang, CHE Guan-yu, SUN Yi-xue, ZHANG Xue-ming

(Jilin Province Key Laboratory of Animal Embryo Engineering, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expressions of Ets family transcription factor ER81 in testis and epididymis of busulfan-treated mice, and explore its function on the proliferation and differentiation of spermatogonia. **Methods** Busulfan peritoneal injection ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was performed and mouse testis and epididymis were collected on the 0th, 3rd, 5th, 8th, 10th, 18th days after injection, respectively. The mRNA expression levels of ER81 in samples were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. **Results** Compared with the 0th day, the expression of ER81 in testis was significantly decreased on the 5th day ($P < 0.01$) and then recovered gradually. In epididymis, compared with the 0th day, the expression of ER81 on the 8th day was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** ER81 may modulate the differentiation of spermatogonia.

Key words: Ets family transcription factor ER81; testis; epididymis; busulfan; mouse

精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSCs) 的更新和分化是维持精子发生的基础^[1]。研究^[2]表明: Ets 转录因子家族成员 ERM 对 SSCs 的发育有重要调节作用。ERM 亚家族包括 Pea3、ER81 及 ERM 3 个成员, 都有一个保守的 DNA 结构域, 能结合到含有 GGAA/T 中心序列的相似位点上, 广泛参与多种细胞的发育、分化、生长及转化等过程^[3]。研究^[4]表明: Pea3 和 ER81 在卵巢

中有表达, 但在雄性生殖系统中, 特别是在睾丸中二者是否表达目前国内外报道较少。本文作者前期研究^[5]证实: Pea3 和 ER81 在正常小鼠睾丸中的表达随性成熟达到高峰, 随后下降, 并保持一定水平。本研究采用白消安注射模型小鼠, 拟进一步探讨 ER81 在模型小鼠睾丸和附睾中的表达及其与未分化精原细胞增殖、分化的关系。

[收稿日期] 2011-12-21

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (30771555); 吉林大学基本科研业务费资助课题 (20090333)

[作者简介] 金 波 (1987-), 男, 湖南省安乡县人, 基础兽医学硕士, 主要从事哺乳动物生殖干细胞研究。

[通信作者] 张学明 (Tel: 0431-87836162, E-mail: zhangxuem@jlu.edu.cn)

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂 2月龄雄性昆明小鼠由本校白求恩医学院实验动物中心提供。白消安购自Sigma, Trizol 购自 Invitrogen, 反转录酶(AMV)、反转录试剂盒和 pGEM-T 载体均购自 Promega, ExTaq DNA 聚合酶购自 TaKaRa。

1.2 实验分组及白消安处理 将白消安按 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 室温搅拌溶于用灭菌去离子水 1:1 配制的 DMSO 中, 对 18 只小鼠进行腹腔注射 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 随机分成 6 组, 分别于注射后第 0、3、5、8、10 和 18 天取睾丸和附睾组织, 于液氮中冻存备用。

1.3 RT-PCR 根据已知序列, 设计合成 ER81 及内参 β -actin 的 PCR 上下游引物。ER81: F, 5'-AGTGCCTATGATCAGAAGC-3'; R, 5'-GGGATGTTTGGCTCAGAC-3', 扩增片段长 299 bp。 β -actin: F, 5'-GATATCGCTGCGCTGGTCGTC-3'; R, 5'-ACGCAGCTCATTGTAGAAGGTGTGG-3', 276 bp。用 Trizol 从睾丸及附睾组织中分别提取总 RNA, 常规反转录。PCR 条件如下: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 退火 30 s (ER81 和 β -actin 的退火温度分别为 55°C 和 60°C), 72°C 延伸 1 min, 扩增 (ER81 为 28 个循环, β -actin 为 20 个)。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的片段, 连入 pGEM-T 载体并进行转化、筛选、测序。

1.4 半定量 PCR 将 ER81 和 β -actin 扩增产物及 DL 2 000 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 用紫外凝胶成像系统成像, 用 Gel-Pro Analyzer 4.0 软件进行

灰度分析, 重复 3 次, 将 ER81 的灰度值与相应时间点、相应组织中 β -actin 的灰度值比值的均值作为 ER81 的表达量。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, ER81 的表达水平以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同时间点 ER81 表达水平比较采用 *t* 检验。

2 结果

睾丸及附睾组织中内参 β -actin 的扩增产物在各时间点的电泳条带均一稳定。在睾丸组织中, 白消安注射后第 5 天, ER81 mRNA 的电泳条带明显弱于其他时间点; 在附睾组织中, 其第 8 天的条带弱于其他时间点。见图 1。

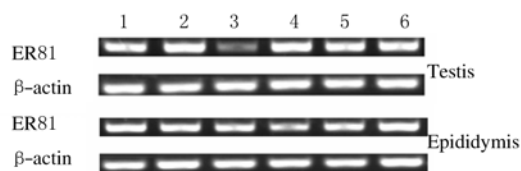


图 1 ER81 在白消安模型小鼠睾丸及附睾组织中表达的 RT-PCR

Fig. 1 RT-PCR of the expressions of ER81 in testis and epididymis of busulfan-treated mice

Lane 1-6: 0, 3, 5, 8, 10, 18 d after busulfan injection.

半定量分析结果显示: 在睾丸组织中, 与第 0 天比较, ER81 mRNA 的表达量在白消安注射后第 5 天显著下降 ($P < 0.01$), 随后基本恢复, 但其第 18 天的表达量仍显著低于第 3 天 ($P < 0.05$); 在附睾组织中, 与第 0 天比较, 其表达量于第 8 天显著降低 ($P < 0.05$), 随后恢复。见表 1。

表 1 ER81 在白消安处理模型小鼠睾丸及附睾中的表达

Tab. 1 Expressions of ER81 in testis and epididymis of busulfan-treated mice ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Expression of ER81					
	(t/d) 0	3	5	8	10	18
Testis	0.77 ± 0.04	0.84 ± 0.04	$0.46 \pm 0.08^{**}$	0.74 ± 0.07	0.72 ± 0.03	$0.66 \pm 0.04^{\Delta}$
Epididymis	0.82 ± 0.06	0.68 ± 0.04	0.73 ± 0.03	$0.61 \pm 0.08^*$	0.77 ± 0.05	0.72 ± 0.04

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with the 0th day; Δ $P < 0.05$ compared with the 3rd day.

3 讨论

Ets 转录因子家族共有 30 多个成员, 广泛参与多种细胞的发育、分化、生长和转化等过程, 在许多生理和病理过程中都发挥着重要的调控作用^[3]。研究^[2]表明: 该家族分子 ERM 在 SSCs 微

环境的转录调控中扮演重要角色。鉴于 ERM 亚家族成员间结构的同源性、功能的相似性及分布的广泛性, 本文作者在前期工作中, 研究了 Pea3 和 ER81 在正常小鼠睾丸中的表达, 证实二者的表达水平随性成熟达到高峰, 随后下降并保持一定水平^[5]。此外, 还探讨了 Ets 家族 Ets1、Ets2 及

Elk1 等在小鼠睾丸中的表达^[6-7]。结果提示: 这些因子的正常表达与睾丸发育、精子发生均有密切关系。白消安是一种 DNA 烷化剂, 在雄性生殖生物学研究中常用于消除生殖细胞, 该法操作简便、效果确实^[8-9]。啮齿类的未分化精原细胞可分为 A_s 型、A_{pr} 型及 A_{al} 型^[1]。Nakagawa 等^[10]报道: 白消安处理成年雄性小鼠后, E-CAD⁺ 细胞(A_s、A_{pr}、A_{al} 精原细胞)于第 3 天后开始大量死亡, 第 5 天其数量显著低于第 0 天及第 3 天, 并于第 8 天降至最低, 随后开始逐渐恢复, 于第 18 天左右 E-CAD⁺ 细胞数目基本恢复到处理前水平。本研究中, 在白消安处理后的睾丸和附睾中, ER81 的表达分别于第 5 天和第 8 天非常显著或显著下降, 随后基本恢复。这种变化与 Nakagawa 等报道的 E-CAD⁺ 精原细胞的变化基本一致, 说明 ER81 在睾丸生精上皮中的正常表达与小鼠精原细胞的增殖和分化有关。另外, 与 ER81 在睾丸中较大的变化幅度相比较, 其在附睾中变化幅度较小, 说明该分子与精子成熟的关系不十分密切。

[参考文献]

- [1] 金波, 刘洋, 岳占碰, 等. 精原干细胞自我更新和分化的调控 [J]. 生命科学, 2011, 23(3): 244-248.
[2] Chen C, Ouyang W, Grigura V, et al. ERM is required for

- transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche [J]. Nature, 2005, 436(7053): 1030-1034.
[3] Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors [J]. Gene, 2003, 303: 11-34.
[4] Eo JW, Han KY, Murphy KM, et al. Etv5, an ETS transcription factor, is expressed in granulosa and cumulus cells and serves as a transcriptional regulator of the cyclooxygenase-2 [J]. J Endocrinol, 2008, 198(2): 281-290.
[5] Zhang XM, Lei S, Yue ZP, et al. Expression of Ets transcription factors Etv4, Etv1 in mouse testis [J]. Biol Reprod, 2010, 83 (1 Supplement): 517.
[6] 刘洋, 金波, 郭斌, 等. 转录因子 Ets1 和 Ets2 在小鼠睾丸组织中的表达及其意义 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2011, 37(1): 6-10.
[7] 廖梅坚, 余裕强, 朱良杰, 等. 小鼠睾丸组织中转录因子 Elk1 cDNA 的克隆 [J]. 中国实用医药, 2011, 6(22): 229-230.
[8] Wang DZ, Zhou XH, Yuan YL, et al. Optimal dose of busulfan for depleting testicular germ cells of recipient mice before spermatogonial transplantation [J]. Asian J Androl, 2010, 12(2): 263-270.
[9] Anjamrooz SH, Movahedin M, Mowla SJ, et al. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment [J]. Iran Biomed J, 2007, 11(1): 15-22.
[10] Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Y, et al. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment [J]. Science, 2010, 328(5974): 62-67.

无痛人流术中 B 超监测的应用

武警吉林省总队医院妇产科 (吉林 长春 130052) 孙彦君, 王鸿艳

本文作者观察 B 超(日本 Aloka620 型 B 超、探头 3.5 MHz)监测下无痛人流手术 272 例, 现报道如下。

1 临床资料

- 1.1 一般资料 2009 年 7 月—2010 年 10 月在本院门诊就诊的早孕并要求终止妊娠患者 272 例, 除外子宫畸形及并发子宫肌瘤患者。患者年龄 18~45 岁, 停经 36~64 d, 术前均经尿妊娠试验和 B 超检查确认宫内妊娠。无人工流产手术禁忌证。
1.2 方法 术前常规禁食水 4~6 h, 准备心电监护、麻醉机、吸痰器和氧气, 建立静脉通道, 由麻醉师实施静脉麻醉。麻醉方法: 采用丙泊酚配伍小剂量芬太尼静脉麻醉, 丙泊酚 2.5 mg·kg⁻¹ 静推, 芬太尼 20~25 mg 静推。患者取膀胱截石位, 适度充盈膀胱。B 超医生检查子宫位置、形态及孕囊大小, 孕囊于宫腔位置。探查宫腔时引导手术医生将手术器械导入宫腔, 达到孕囊着床部位, 吸取孕囊, 指导环刮宫腔蜕膜组织, 切面观察至宫腔干净, 宫腔线清晰, 无残留和积血。术后常规消炎, 7 d 后复查, 随访至第 1 次转经时间。术中观察子宫穿孔、出血量、人工流产综合征的发生、手术持续时间及生命体征; 术后由术者和 B 超医生一同常规检查吸出物; 手术后 7 d 复查子宫恢复及残留情况。
1.3 结果 272 例患者均未发生人工流产综合征, 手术时间缩短, 均未发生子宫穿孔、大出血; 术中生命体征平稳; 转经时间为 28~57 d; 发生残留 1 例, 为子宫过度后倾后曲位, 术后仍有轻度妊娠反应, 7 d 复查时宫腔内见不均质回声, 行二次手术, 术后病理为坏死绒毛组织。本组患者 1 次手术成功率为 99.63%。

2 讨论

人工流产手术仅凭术者根据宫腔的缩小、子宫壁粗糙及吸管紧贴宫壁的包裹感判断吸宫是否完全存在很大隐患。尤其对于复杂的人工流产, 如早孕并发子宫畸形、子宫肌瘤、瘢痕子宫等更容易造成子宫穿孔、吸宫不全、大出血、感染及宫腔黏连等。无痛技术和 B 超监测的结合使人工流产术日益完善。B 超引导下的人工流产术, 实时监测手术操作的全过程, 提高了手术的一次性成功率与安全性。术中由超声医生引导手术医生准确确定孕囊位置、大小, 完整吸取孕囊; 吸管在宫腔内运行轨迹完全在 B 超监控中, 避免穿出于宫外造成穿孔; 吸刮宫腔蜕膜组织时可以观察到子宫收缩情况, 随时处理出血; 随着子宫的收缩, 宫腔线也渐变清晰, 显示吸宫完全干净, 无需反复吸宫, 避免宫腔黏连等并发症的发生。