基因芯片技术在睾丸支持细胞方面的应用进展

曹　奚　胡素芹　郭　健

摘　要　当前,基因芯片技术凭借其高通量、高敏感度、高度自动化和高效快速等特点,在不同领域得到了广泛应用和迅速发展。就男性不育的研究中,芯片技术可以直接快速、精准的反映与精子发生等相关的差异表达基因,并进一步利用 QT－PCR、Western blot、RNAi 等技术进行深入研究,取得了很多突破性进展。以往研究证实睾丸支持细胞的结构和功能与精子发生关系密切,故本文主要综述基因芯片技术在睾丸支持细胞方面的研究现状进展,并试图利用基因芯片技术探索睾丸支持细胞在不同情况下的基因改变,找出影响精子发生的关键基因或信号通路,为临床或基础在男性不育方面的研究提供新的靶向和依据。

关键词　睾丸支持细胞　基因芯片　血睾屏障　研究进展

中图分类号　R319　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2017.09.004

近年来,随着社会大环境和生活方式的改变,不育症患者日益增多,影响着全球超过 10% 的家庭[1,2]。夫妻关系中因男性因素造成不育的比例高达 50%,且具有上升趋势[1,2]。引起男性不育问题逐年严峻的原因有高剂量的电离辐射、吸烟、局部高热、药物滥用和重金属、农药等有害因素[3~8]。但是,这些有害因素如何引起男性不育的发生机制尚未阐明。目前,对男性不育的研究逐渐增多,在基础和临床研究中均已经涉及基因层次。在基因层次的研究中,基因芯片技术是广大研究者常用的检测工具之一,依据检测结果,可以筛选出找出影响精子发生进而导致不育的差异表达基因,为男性不育的诊疗或可提供新的方向。哺乳动物的精子发生是一个通过严格调节精子细胞增殖、分化的复杂的过程,在这个过程中,睾丸支持细胞为精子发生提供结构及营养等支持,显的尤为重要。任何导致睾丸支持细胞的结构或功能异常的不良因素,都会在一定程度上引起精子发生障碍或精子细胞的异常。因此探讨睾丸支持细胞的结构和功能具有很高的研究价值和意义。

一、基因芯片技术的概述

基因芯片,亦称为 DNA 微阵列或者 DNA 芯片。自 Schena 在 1995 年首次发表关于基因芯片的研究论文以来,基因芯片技术得到了迅速发展及应用。其测序原理是利用杂交测序的方法,即 DNA 根据碱基互补配对原则,通过与一组已知序列的核酸探针进行杂交,显示记录标记的样品分子与每个探针分子的杂交信号强度,进而分析得到样品分子的序列信息和数量。随着科学技术的进一步发展,芯片分类已逐渐完善,如 DNA、RNA、蛋白类。这些芯片可以检测相关的 DNA、RNA 等,如 miRNA 芯片可以检测人、小鼠、大鼠样本里已发现的所有 miRNA。如检测处理后的睾丸支持细胞的基因,可以采用相关的 mRNA 表达谱芯片,一次性筛选出处理后差异表达基因。然后根据这些差异表达的基因可以研究基因功能、相关的信号通路等,再结合动物水平、细胞水平的研究,从而为揭示睾丸支持细胞对精子发生过程的影响机制提供依据。

二、基因芯片技术在睾丸支持细胞相关研究中应用

睾丸支持细胞通过紧密连接形成一个腔室,称为血睾屏障,为精子的发生、发育、成熟建立了特殊的生物化学微环境。血睾屏障结构和功能的丧失可以直接导致不育。以往对血睾屏障的研究包括形成血睾屏障的细胞连接的分子成分和结构蛋白,以及对血睾屏障功能的内分泌和旁分泌调节等方面的研究。研究发现无论是对血睾屏障的结构,还是功能的研究,都是以支持细胞为主。

1. 在睾丸支持细胞结构方面研究的应用:睾丸支持细胞在结构上通过紧密连接形成血睾屏障,对睾丸支持细胞结构方面的研究主要集中在形成紧密连接的连接蛋白之上。形成血睾屏障的连接有共存紧密连接(T Js),桥粒样连接和缝隙连接[9]。上述引起不育的有害因素在结构上主要也是通过影响这些连接蛋白,增强血睾屏障通透性等,破坏血睾屏障。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273610)
作者单位:100029　北京中医药大学
通讯作者:郭健,教授,电子信箱:guojian323@sina.com

利用微阵列分析,已经揭示了暴露在吸烟环境中的动物睾丸支持细胞的紧密连接信号发生了改变,继而影响精子发生导致不育[10];在二硝基苯(DNB)早期睾丸毒性中,参与支持细胞细胞连接和紧密连接的信号转导通路的基因发生了差异性表达[11]。利用基因编辑技术使 Gata4 条件性缺失,发现血睾屏障的通透性增加,芯片分析显示由支持细胞紧密黏着或连接所维持血睾屏障正常功能的基因(Tjp1、Cldn12、Vcl、Tnc、Csk)发生了改变[12]。在睾丸老化引起不育的研究中,全基因组微阵列芯片结果显示,差异表达的基因中,有近 20% 与睾丸支持细胞间的黏着和连接有关,与青年相比,老龄化睾丸中 Vcl、Ctnna2、Jam2、Ocln、Cldn11、Profilin 和 Ncad 等基因显著下调,血睾屏障的结构和功能发生异常,进而引起不育[13]。另外,利用基因芯片数据进行紧密连接相关基因的变化分析,结果显示紧密连接蛋白 CLDN5 在睾丸支持细胞表达,CLDN5 mRNA 表达增加幼年小鼠的睾丸在 BTB 形成时间有助于 BTB 功能[14]。

2. 在睾丸支持细胞功能方面研究的应用:睾丸支持细胞的功能是多方面的,可以为生精细胞的分化和发育提供合适的微环境;给予生精细胞营养、保护、支持作用;可以吞噬变性的生精细胞、残余体和注入的颗粒性物质;可以促进精子向管腔的释放;还可以合成并分泌雄激素结合蛋白,分泌抑制素且能将孕酮醇酮及黄体酮转化为睾酮,并将睾酮转化成雌二醇等能力。由此可见,睾丸支持细胞在精子发生的过程中起着重要作用,任何影响或导致支持细胞功能异常的因素,都可以导致精子发生的异常,进而导致不育。

在基础研究中,从人或动物睾丸整体水平;细胞水平及蛋白、基因等分子水平对支持细胞都有涉及。当前,在大数据高通量信息化的大背景下,基因芯片技术受到了很多研究人员的青睐,也报道了一些关于睾丸支持细胞在功能方面的研究成果,包括代谢、氧化应激、增殖、凋亡及激素调节、信号通路等。睾丸支持细胞代谢积极维持着生殖细胞的营养需求,利用芯片耦合 RNA 免疫共沉淀技术对肌肉糖原合酶的研究发现,该酶在支持细胞中表达,但是以失活的形式存在;另外发现这种代谢酶与 RNA 分子有相互作用,且这些 RNA 分子大多数参与初级代谢过程[15]。

GATA 4 是一种进化保守的锌指结构转录因子,在多种器官发育的早期必不可少。其主要表达在睾丸内的体细胞(支持细胞和间质细胞)中,且在胚胎性腺和成人睾丸中始终保持着高表达。利用芯片分析发现 GATA 4 能够增加血睾屏障的通透性和调节小鼠睾丸支持细胞内的乳酸代谢等作用干扰精子发生[16]。也有研究表明 GATA 4 的缺失可损害精原干细胞,并且可通过衰减趋化因子(Cxcl12、Ccl3、Ccl9、Cxcr4、Ccr1、Xcl1 和 Ccrl2 在 GATA 4 敲除后显著下调)信号,引起生殖细胞的耗竭,结合 Q-PCR 进一步研究发现 GATA 4 主要通过调节趋化因子 Ccl9 和 Cxcl12,维持精原干细胞的正常功能[17]。

前文提到局部高热对睾丸有一定的损伤,就影响睾丸支持细胞的功能角度来看,利用芯片技术可以比较明确的看出类似局部高热等不良因素导致的改变。对实验性小鼠隐睾症的研究发现,芯片结果显示 Ndufa1、Ndufa4、Ndufs7、Ndufs8、Ndufb9 和 Cox6b、Cox6a、Cox6a2、Cox7a1、Cox7a2、Cox7c、Cox8a 等基因差异性表达显著[18]。这些基因都是和氧化应激有关,由此推断,当睾丸受到局部高热时,出现氧化应激反应,如果高热时间过长或者温度较高,使得睾丸支持细胞发现不可逆性改变,进而影响正常的精子发生,导致不育。同时有研究表明,在一定温度下处理睾丸支持细胞一段时间,发现睾丸支持细胞凋亡,增殖能力反而上升,但是具体是通过哪种方式引起的凋亡和提高增殖等,目前还没有定论。

生活中纳米二氧化钛用于化妆品、功能纤维、塑料、涂料、油漆等领域,该物质积累在器官具有毒性。对男性来说,二氧化钛纳米粒子可以穿过血睾屏障达到睾丸,并积累其中,达一定量时可以导致睾丸病变,精子畸形,并改变血清性激素水平。有研究表明,利用该物质灌胃可诱导雄性小鼠睾丸损伤和基因表达谱的改变,微阵列分析显示差异表达的基因中如 LY6E、Adam3、tdrd6、spata19、tnp2 和 Prm1 参与精子的发生,而 SC4MOL, psmc3ip、MVD、SRD5A2、LEP 和 CYP2E1 与类固醇和激素代谢[19]。由此可以指导人们在 TiO2 纳米粒子的生产和应用应谨慎进行。关于激素调节睾丸支持细胞的研究,主要涉及到雄激素、卵泡刺激素、黄体生成素等。利用微阵列分析,结果显示,睾丸支持细胞中黄体化激素缺乏,可增强 Wnt5α 表达,这说明睾丸支细胞不成熟;而采用抗雄激素治疗,可以促使 Wnt5α 上调,说明睾酮的产生需要促黄体生成素的作用,进而促进支持细胞的成熟,发挥正常的作用[20]。

三、展　　望

本文综述了利用芯片等技术在睾丸支持方面的研究,可以为不育症,尤其是精子发生障碍在细胞及

分子水平上提供新的视角。但这不等于说精子发生障碍一定和睾丸支持细胞结构和或功能的异常有关。精子发生是一个十分复杂的过程,在这个过程中,能够影响精子发展的任何一个因素都有可能引起精子发生的异常,而根据睾丸支持细胞独特的结构与功能特点,及其与各级生殖细胞的密切关系,自然可以想到支持细胞发生异常时所带来的影响。故以此为视角进行阐述。另外,芯片技术是在当今高通量、信息化社会大背景下比较前沿的技术手段,可以涉及到基因层次,能够更加深入的了解疾病发生的微观变化,或可在生活中给予人们以健康指导,给患者以新的治疗方法等。但是该技术由于当前成本比较高,专利限制、实验室操作标准问题等,不能在临床和基础研究中普及。而且就技术本身来说,由于科学发展的限制,单是芯片技术所得出的结果,说服力较差,还需要结合其他的实验技术和手段辅助说明。睾丸支持细胞作为精子发生的基石细胞,其受到的影响会很大程度上影响精子的质量和数量,综合以往文献,笔者认为利用全基因表达谱芯片技术从睾丸支持细胞方面入手或可得到导致男子精子发生障碍和精子质量下降的新路径,且可以验证某些药物在分子层次上对精子发生障碍的改善作用机制等,为男性不育的基础和临床研究提供新思路。

参考文献

1 Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility[J]. Hum Reprod, 1998, 13(Suppl 1): 33 – 44

2 Gnoth C, Godehardt E, Frank – Herrmann P, *et al*. Definition and prevalence of subfertility and infertility[J]. Hum Reprod, 2005, 20(5): 1144 – 1147

3 Sepehrimanesh M, Kazemipour N, Saeb M, *et al*. Analysis of rat testicular proteome following 30 – day exposure to 900 MHz electromagnetic field radiation[J]. Electrophoresis, 2014, 35(23): 3331 – 3338

4 Fowler PA, Cassie S, Rhind SM, *et al*. Maternal smoking during pregnancy specifically reduces human fetal desert hedgehog gene expression during testis development[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(2): 619 – 626

5 Thonneau P, Bujan L, Multigner L, *et al*. Occupational heat exposure and male fertility: a review[J]. Hum Reprod, 1998, 13(8): 2122 – 2125

6 Benavides – Garcia R, Joachim R, Pina N A, *et al*. Granulocyte colony – stimulating factor prevents loss of spermatogenesis after sterilizing busulfan chemotherapy[J]. Fertil Steril, 2015, 103(1): 270 – 280

7 Sharma P, Huq AU, Singh R. Cypermethrin – induced reproductive toxicity in the rat is prevented by resveratrol[J]. J Hum Reprod Sci, 2014, 7(2): 99 – 106

8 Ismail MF, Mohamed HM. Deltamethrin – induced genotoxicity and testicular injury in rats: comparison with biopesticide[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(10): 3421 – 3425

9 Paul C, Robaire B. Impaired function of the blood – testis barrier during aging is preceded by a decline in cell adhesion proteins and GTPases[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84354

10 Kopera I, Durlej M, Hejmej A, *et al*. Effects of pre – and postnatal exposure to flutamide on connexin 43 expression in testes and ovaries of prepubertal pigs[J]. Eur J Histochem, 2010, 54(2): e15

11 Oh JH, Heo SH, Park HJ, *et al*. Genomic and proteomic analyses of 1,3 – dinitrobenzene – induced testicular toxicity in Sprague – Dawley rats[J]. Reprod Toxicol, 2014, 43: 45 – 55

12 Schrade A, Kyronlahti A, Akinrinade O, *et al*. GATA4 regulates blood – testis barrier function and Lactate metabolism in mouse sertoli cells[J]. Endocrinology, 2016, 157(6): 2416 – 2431

13 Paul C, Robaire B. Impaired function of the blood – testis barrier during aging is preceded by a decline in cell adhesion proteins and GTPases[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84354

14 Morrow C M, Tyagi G, Simon L, *et al*. Claudin 5 expression in mouse seminiferous epithelium is dependent upon the transcription factor ets variant 5 and contributes to blood – testis barrier function[J]. Biol Reprod, 2009, 81(5): 871 – 879

15 Maldonado R, Mancilla H, Villarroel – Espindola F, *et al*. Glycogen synthase in sertoli cells: more than glycogenesis? [J]. J Cell Biochem, 2016, 117(11): 2597 – 2607

16 Schrade A, Kyronlahti A, Akinrinade O, *et al*. GATA4 regulates blood – testis barrier function and lactate metabolism in mouse sertoli cells[J]. Endocrinology, 2016, 157(6): 2416 – 2431

17 Chen SR, Tang JX, Cheng JM, *et al*. Loss of Gata4 in Sertoli cells impairs the spermatogonial stem cell niche and causes germ cell exhaustion by attenuating chemokine signaling[J]. Oncotarget, 2015, 6(35): 37012 – 37027

18 Li YC, Hu XQ, Xiao LJ, *et al*. An oligonucleotide microarray study on gene expression profile in mouse testis of experimental cryptorchidism[J]. Front Biosci, 2006, 11: 2465 – 2482

19 Gao G, Ze Y, Zhao X, *et al*. Titanium dioxide nanoparticle – induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice[J]. J Hazard Mater, 2013, 258 – 259: 133 – 143

20 Tanaka T, Kanatsu – Shinohara M, Lei Z, *et al*. The luteinizing hormone – testosterone pathway regulates mouse spermatogonial stem cell self – renewal by suppressing WNT5A expression in sertoli cells[J]. Stem Cell Reports, 2016, 7(2): 279 – 291

(收稿日期:2016 – 12 – 19)
(修回日期:2017 – 01 – 05)