

# AKAP3 基因在被动吸烟雄鼠睾丸组织中的表达

孙丽萍, 韩亚伟, 周文珊, 时桂芹, 刘振兴

(郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001)

**摘要:** 采用前期建立的被动吸烟模型, 让性成熟成年雄鼠分别接受 1 个月、3 个月和 5 个月的被动吸烟, 以相同年龄的正常雄鼠为对照, 采用实时荧光定量 PCR 法(RT-PCR)分析 A 激酶锚定蛋白 3(AKAP3)在被动吸烟雄鼠睾丸组织中的表达变化规律。结果表明: 接受 1 个月被动吸烟雄鼠睾丸组织中 AKAP3 基因 mRNA 的表达量显著高于对照组, 而接受 3 个月和 5 个月被动吸烟雄鼠睾丸组织中该基因的表达量却与对照组无显著差别, 该实验结果为进一步研究 AKAP3 基因对雄性生殖功能的影响机制提供了理论基础和参考。

**关键词:** A 激酶锚定蛋白 3; 被动吸烟; 雄鼠; 生殖功能; 实时荧光定量 PCR 法

**中图分类号:** TS41<sup>+</sup>3; R994.6 **文献标志码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-476X.2015.02.005

## Expression of AKAP3 gene in the testis of passive smoking male mice

SUN Li-ping, HAN Ya-wei, ZHOU Wen-shan, SHI Gui-qin, LIU Zhen-xing  
(College of Food and Bioengineering Zhengzhou University of Light Industry Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** The mature male mouse suffered by one-month, three-month and five-month passive smoking by using the established passive smoking model, comparing with normal control male mouse, the expression rule of AKAP3 in the passive smoking male mice testicular tissue was analyzed by RT-PCR. The results showed that one-month passive smoking male mouse had greater AKAP3 mRNA expression quantity than that of control male mouse. However, no significant differences were observed among three-month and five-month passive smoking male mouse. The results of this study provided theoretical basis and reference for further study of AKAP3 in male mice reproduction function.

**Key words:** AKAP3; passive smoking; male mice; reproduction function; RT-PCR

## 0 引言

繁殖, 无论对动物还是人类都具有重要意义。繁殖障碍是限制动物生产性能和养殖效益的重要因素之一。在人工授精技术普及的今天, 种公畜的生殖健康是制约养殖业发展的一个重要原因, 不仅直接关系到育种公司的经济效益, 也会影响其后代的生育能力乃至整个种群的发展。引起繁殖障碍的因素很多, 除遗传因素外, 后天环境因素也会影响

到动物及人类的生殖健康。大量研究结果表明, 被动吸烟影响雄性生殖功能, 会导致精液质量整体下降, 尤其是精液量和精子活力下降, 畸形细胞数显著升高<sup>[1-2]</sup>。研究发现, 香烟烟雾能够以浓度和时间依赖的方式抑制精子活力、运动参数和精子与透明带的结合能力<sup>[3]</sup>, 从而增加低线粒体膜电位的精子数, 破坏线粒体完整性, 但对精子顶体状态无显著影响<sup>[4-6]</sup>。对接受 6 周测流烟处理的实验雄鼠进行观察发现, 其精子 DNA 可遗传突变标记区域的突变

收稿日期: 2014-12-31

基金项目: 郑州轻工业学院博士科研基金资助项目(2013BSJJ008)

作者简介: 孙丽萍(1980—), 女, 河南省许昌市人, 郑州轻工业学院讲师, 博士, 主要研究方向为烟草毒理。

率升高,但其红细胞的突变率没有明显变化,这一现象揭示精子可能对二手烟的致畸效应特别敏感<sup>[7]</sup>。被动吸烟使雄鼠血清睾酮水平显著下降,睾丸出现不同程度的萎缩,在吸烟 63 d 组,血清 LH, FSH 水平显著下降,表明长期吸烟可对雄鼠生殖内分泌造成损害<sup>[8]</sup>。

A 激酶锚定蛋白 3 (AKAP3) 是一类精子蛋白,主要在精子形成过程中的减数分裂后表达,在精子前体细胞形态变化和调节精子功能中起重要作用。基因及蛋白分析表明,单倍体精子的发育伴随着不同的基因表达程序。研究表明,AKAP3 的转录比蛋白合成早大约 2 周<sup>[9]</sup>。免疫组化和荧光定量 PCR 分析表明,其在早期生精细胞中不表达,随精子发生过程逐渐开始表达,至精子阶段表达量上升到最高<sup>[10]</sup>。而原位杂交分析显示,AKAP3 只在圆形精细胞中表达,免疫细胞化学分析检测到其存在于精子头部的顶体区<sup>[11]</sup>。AKAP3 在纤维鞘发育不良精子和正常精子间没有定量或定性差异<sup>[12]</sup>。在精子获能过程中,AKAP3 的降解受细胞内碱化和 PKAR II 锚固的调节<sup>[13]</sup>。

目前虽然有大量学者开展了吸烟对雄性生殖功能影响的研究,但没有得出一致的研究结论,而且研究结果多集中在对成熟精子相关参数等常规分析上,少有从分子水平来分析被动吸烟对雄性生殖功能影响的研究。作者在前期的表达谱芯片数据分析中发现,在应激条件下,AKAP3 表达量显著下降。而在有限的空间接受被动吸烟也是一种长期的慢性应激,在这种条件下 AKAP3 表达会发生什么变化? 这种改变又会对雄性生殖带来什么影响? 基于此,本研究拟参照国内外吸烟动物模型,以昆明雄鼠为实验动物,研究不同被动吸烟史下,AKAP3 基因表达水平的变化,为研究环境因素引起的动物生殖障碍和人类不孕症的治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与仪器

材料:昆明雄性小鼠(5 周龄,SPF 级),河南省实验动物中心提供;Trizol,Invitrogen 公司产;一步法 RT-PCR 试剂盒,美国伯乐 Bio-Rad 公司产;SYBR Green I 染料,宝生物工程(大连)有限公司产;反转录试剂盒, Fermentas 公司产;散花牌过滤嘴香烟(焦油量 11 mg/支,烟气烟碱量 0.7 mg/支),河南中烟工业有限责任公司产;多聚甲醛,美国 Sigma 公司产;二甲苯、酒精、盐酸,均为分析纯,碧云天生物技术公司产。

仪器:LightCycler-480 型荧光定量 PCR 仪,德国 Roche 公司产;DYCP-34A 型琼脂糖水平电泳槽,北京六一仪器厂产;DM LB2/DC180 型光学显微镜,Leica RM 2235 型石蜡切片机,均为德国 Leica 公司产;JS-680B 型凝胶成像分析仪,上海培清科技有限公司产。

### 1.2 实验设计

参照文献[14]的方法,将 20 只昆明雄鼠随机分配到被动吸烟 1 个月组、3 个月组、5 个月组和常规对照组(每组各 5 只)。除对照组外,被动吸烟各每天接受全烟气暴露 2 h,每次 10 支烟,1 周吸烟 6 次。实验结束后分别采集吸烟的睾丸组织,一侧置于液氮速冻后 -80 °C 保存备用,另一侧置于 4% 多聚甲醛固定。对照组除了不接受被动吸烟处理外,其他条件同吸烟组。被动吸烟期间每天观察吸烟箱内的环境和雄鼠的一般形态。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 RNA 的提取和 cDNA 的合成** 采用 Trizol 一步法提取睾丸组织总 RNA,利用琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的质量。用 DNase I 和 RNase Inhibitor 除去存在的少量基因组 DNA。具体步骤如下:将 2  $\mu$ L RNA,1  $\mu$ L 10  $\times$  DNase I Buffer,0.5  $\mu$ L Recombinant DNase I (RNase Free,5 U/ $\mu$ L) 及 0.5  $\mu$ L RNase Inhibitor 混合均匀并补充水至 10  $\mu$ L,混合后的反应体系 37 °C 孵育 30 min,然后加入 1  $\mu$ L 25 mM EDTA 65 °C 孵育 10 min。

cDNA 的合成参照反转录试剂盒说明书。取 8  $\mu$ L RNase Free 水,1  $\mu$ L Oligo (dT) 20 (10 pmol/ $\mu$ L) 和 3  $\mu$ L 总 RNA (10 ng/ $\mu$ L) 混匀,在 PCR 仪上 65 °C 预热 5 min,立即置于冰上冷却 2 min。将热变性后的 RNA 混合液 12  $\mu$ L,5  $\times$  RT Buffer 4  $\mu$ L,10 mM dNTP 2  $\mu$ L,RNase Inhibitor 1  $\mu$ L,ReverTra Ace 1  $\mu$ L 混匀后置于 PCR 仪,在如下条件下进行反应:42 °C 20 min,99 °C 5 min,4 °C 5 min。

反转录合成的 cDNA 第一链于 -20 °C 保存,作为后续荧光定量 PCR 反应的模板。

**1.3.2 实时荧光定量 PCR 法** 利用 Primer premier 5.0 软件设计引物。AKAP3 上游引物:5' - ACAC-CGTTCAACAAGCAA - 3',下游引物:5' - TTCATCGTCACCAGCAAAGTA - 3'。 $\beta$ -actin 作为内参,其上游序列:5' - GGCTGTATTCCCCTCCAT - 3',下游序列:5' - CCAGTTGGTAACAATGCCA - 3'。采用普通 PCR 进行反应条件的优化,之后采用 SYBR Green I 替换常规 PCR 的 Master mix 进行荧光定量

PCR,其扩增曲线反应条件为:94℃ 30 s,94℃ 20 s,60~66℃ 20 s,72℃ 30 s,共45个循环;其溶解曲线反应条件为60℃ 15 s,连续检测信号.以双蒸水代替cDNA模板作为阴性对照,每组设5个样品,每个样品作3次技术重复.

**1.3.3 石蜡切片的制备和常规HE染色** 经4%多聚甲醛固定后的睾丸组织先用自来水冲洗30 min,之后分别用70%、80%、90%、95%和100%的梯度酒精浸泡.梯度酒精脱水后的组织用冬青油透明过夜.透明后的组织用石蜡包埋、修蜡、编号.编号后可进行石蜡切片,切片厚度4 μm,42℃摊片后捞片,每组取3只雄鼠睾丸切片,每只雄鼠睾丸切片取3张.编好号的切片先在漂烘仪上39℃烘片1 h,然后于60℃烘箱中烤片过夜.

将制备好的切片置于二甲苯I、II、III各10 min进行脱蜡,梯度酒精(依次为100%、95%、85%、75%)浸泡各5 min,蒸馏水冲洗后进行苏木素染色,1%盐酸酒精分化后自来水水洗返蓝,伊红染色后梯度酒精(75%、85%、95%和100%)脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,最后在光学显微镜下观察不同组别的组织病理变化.

**1.4 统计学分析**

采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析样品 mRNA 的相对表达量, $\Delta\Delta CT$ 计算公式为

$$\Delta\Delta CT = (CT_{target} - CT_{control})_{sample2} - (CT_{target} - CT_{control})_{sample1}$$

其中 $\Delta\Delta CT$ 为雄鼠睾丸组织目的基因与同等条件下内参基因的CT值之差; $CT_{target}$ 为目的基因的CT值,即AKAP3基因的CT值; $CT_{control}$ 为内参基因的CT值,即 $\beta$ -actin基因的CT值.CT指每个反应管内荧光信号到达设定域值时所经历的循环数,反应了模板的起始拷贝数.

采用SPSS13.0软件单因子方差(one-way Anova)中的Least Significant Difference(LSD)进行统计,用平均值±标准差(Mean±SD)表示.

**2 结果与讨论**

睾丸组织HE染色发现,与对照组相比,吸烟组雄鼠睾丸组织各级精细胞并没有显著变化,也没有见到个别研究者所述的睾丸萎缩,这可能是长期被动吸烟使个体产生了适应机制所致.

**2.1 睾丸RNA提取**

实验选用传统的Trizol法进行组织总RNA的提取,经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,所提取的总RNA有清晰可见的28S和18S条带(如图1所示),

表明所提的总RNA无降解、完整性较好,满足后续分析的要求.

**2.2 实时荧光定量PCR的溶解曲线**

$\beta$ -actin和AKAP3的溶解曲线如图2所示.由图2可见,样品有一个单一峰值,拟合度良好,说明荧光定量PCR扩增的产物是特异性片段,无非特异性产物和引物二聚体的干扰,获得的CT值是可靠的.

**2.3 不同被动吸烟时间睾丸组织中AKAP3的表达差异**

通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算不同处理时间睾丸组织中

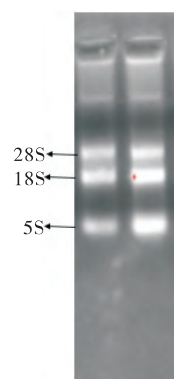
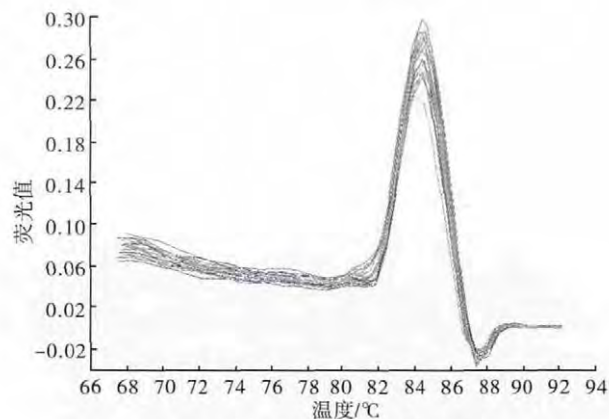
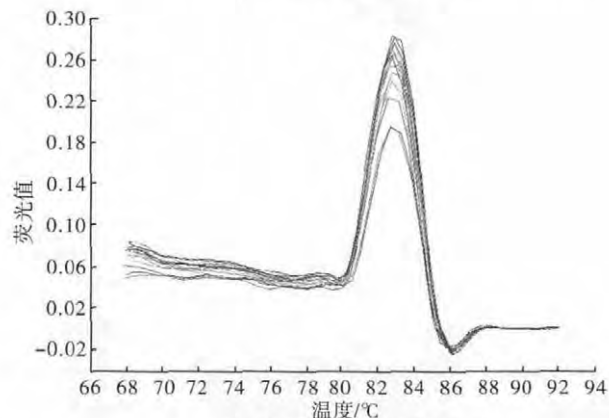


图1 提取的总RNA电泳检测图



a)  $\beta$ -actin的溶解曲线图



b) AKAP3的溶解曲线

图2  $\beta$ -actin和AKAP3的溶解曲线

AKAP3 基因的相对表达量的变化,结果见表 1。

由表 1 可知,与对照组相比,接受 1 个月被动吸烟雄鼠睾丸组织中 AKAP3 基因的表达量显著升高,而接受 3 个月和 5 个月被动吸烟的雄鼠睾丸组织中 AKAP3 基因的表达量却未发生显著变化。

表 1 不同被动吸烟时间处理的 AKAP3 基因表达水平

编号	平均值	SD	$\Delta CT$	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
对照组	18.30	0.01	1.28	0.00	1.00
1 个月组	20.17	0.04	0.23	-1.05	2.08*
3 个月组	18.59	0.14	1.14	-0.04	1.10
5 个月组	20.04	0.11	1.52	0.24	0.84

### 3 结论

本文参照文献 [14-15] 建立的被动吸烟模型,分析了不同被动吸烟史下雄鼠睾丸组织中 AKAP3 基因表达的变化。实验结果显示,被动吸烟 1 个月的雄鼠睾丸中 AKAP3 基因的表达明显高于对照组,而被动吸烟 3 个月和 5 个月的雄鼠其睾丸中 AKAP3 基因的表达量与对照组相比无显著变化,其原因可能是由于被动吸烟初期(1 个月)卷烟烟气中的氧自由基刺激睾丸细胞产生大量的活性氧,为了维持细胞内的氧化还原平衡,相关基因和编码酶被激活,促进了 AKAP3 基因的合成,从而使其表达量增加,或是卷烟烟气的氧化作用使得雄鼠睾丸中所产生的活性氧的量远远大于 AKAP3 基因的总抗氧化能力,因此出现了 AKAP3 基因的高表达量,但随着被动吸烟时间的延长(3~5 个月),卷烟烟气对睾丸氧化作用产生的炎症,消耗了部分 AKAP3 基因,雄鼠睾丸组织抗氧化能力下降,导致组织严重受损,最终促使基因 AKAP3 相对表达量降低,如徐庆阳等<sup>[16]</sup>研究发现,接受被动吸烟的大鼠睾丸组织出现了不同程度的病理改变。上述结果为进一步研究 AKAP3 基因对雄性生殖功能的影响机制提供了理论参考。

#### 参考文献:

[1] Kunzle R, Mueller M D, Hanggi W, et al. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples [J]. *Fertility and Sterility* 2003, 79(2): 287.

[2] Li W W, Li N, Wu Q Y, et al. Cigarette smoking affects sperm plasma membrane integrity [J]. *National Journal of Andrology* 2012, 18(12): 1093.

[3] Taha E A, Ezz-Aldin A M, Sayed S K, et al. Smoking influence on sperm vitality, DNA fragmentation, reactive oxygen species and zinc in oligoasthenoteratozoospermic men with varicocele [J]. *Andrologia* 2014, 46(6): 687.

[4] Calogero A, Polosa R, Perdichizzi A, et al. Cigarette smoke extract immobilizes human spermatozoa and induces sperm apoptosis [J]. *Reproductive Biomedicine Online*, 2009, 19(4): 564.

[5] Hung P H, Baumber J, Meyers S A, et al. Effects of environmental tobacco smoke in vitro on rhesus monkey sperm function [J]. *Reproductive Toxicology* 2007, 23(4): 499.

[6] Hung P H, Froenicke L, Lin C Y, et al. Effects of environmental tobacco smoke in vivo on rhesus monkey semen quality, sperm function, and sperm metabolism [J]. *Reproductive Toxicology* 2009, 27(2): 140.

[7] Marchetti F, Rowan-Carroll A, Williams A, et al. Side-stream tobacco smoke is a male germ cell mutagen [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(31): 12811.

[8] 王淑玲, 宗全和. 吸烟对雄性小鼠生殖内分泌系统的影响 [J]. *郑州大学学报: 医学版* 2002, 37(2): 164.

[9] Xu K B, Yang L L, Zhao D Y, et al. AKAP3 synthesis is mediated by RNA binding proteins and PKA signaling during mouse spermiogenesis [J]. *Biology of Reproduction* 2014, 90(6): 119.

[10] 张莹. 小鼠睾丸发育过程睾丸特异基因表达与不育的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学 2009.

[11] Vijayaraghavan S, Mohan J, Winfrey V P, et al. Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein [J]. *Molecular Endocrinology*, 1999, 13(5): 705.

[12] Turner R M, Musse M P, Mandal A, et al. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath [J]. *Journal of Andrology*, 2001, 22(2): 302.

[13] Hillman P, Ickowicz D, Vigel R, et al. Dissociation between AKAP3 and PKARII promotes AKAP3 degradation in sperm capacitation [J]. *Plos One*, 2013, 8(7): 68873.

[14] 宁维, 陈利平, 李瑜, 等. 全烟气致小鼠肺损伤模型的建立 [J]. *烟草科技* 2013(11): 36.

[15] 宁维, 陈利平, 李瑜, 等. 卷烟烟气体内安全评价方法研究 [J]. *河南农业科学* 2013, 42(9): 152.

[16] 徐庆阳, 祝茹, 彭弋峰, 等. 被动吸烟对大鼠睾丸和附睾抗氧化能力及生精功能的影响 [J]. *环境与健康杂志* 2008, 25(12): 1059.