

热应激对小鼠睾丸 Hsp70-2 基因 mRNA 转录水平的影响

姜忠玲 (青岛农业大学动物科技学院, 山东青岛 266109)

摘要 用半定量 RT-PCR 方法检测不同温度、相同时间(4 h)热应激处理小鼠睾丸组织中 Hsp70-2 基因的 mRNA 转录水平,以研究热应激对 Hsp70-2 基因 mRNA 转录的影响。结果显示,各热应激组小鼠睾丸 Hsp70-2 mRNA 转录水平下降,并且温度越高,其下降幅度越大。与对照组相比,33 组小鼠 Hsp70-2 mRNA 相对转录水平显著 ($P < 0.05$) 下降,而 37 组和 42 组下降极显著 ($P < 0.01$)。42 组 Hsp70-2 mRNA 相对转录水平仅为对照组的 44.7%。上述结果说明,热应激使 Hsp70-2 基因 mRNA 转录水平下降,热应激对雄性生殖机能的影响与 Hsp70-2 减少有关,而 Hsp70-2 mRNA 转录水平可以作为热应激对雄性生殖机能损伤程度的判断指标之一。

关键词 热应激;小鼠;睾丸;RT-PCR;Hsp70-2 mRNA

中图分类号 S865.1+3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)36-15799-03

Effects of Heat Stress on the Transcriptional Level of mRNA of Hsp70 2 Gene in Mice Testis

JIANG Zhongling (College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract Semi-quantitative RT-PCR method was used to detect the transcriptional level of mRNA in Hsp70-2 gene in testis tissue of mice which were treated at different temperature for the same time of heat stress. The effects of heat stress on mRNA transcription of Hsp70-2 gene were studied. The results showed the transcriptional level of mRNA in Hsp70-2 gene in mice testis in each heat stress group decreased. And the higher the temperature was, the greater decreasing extent of transcription level was. Compared with control group, the relative transcriptional level of Hsp70-2 mRNA in mice significantly decreased in 33 group ($P < 0.05$) and that extremely significantly decreased in the groups of 37 and 42 ($P < 0.01$). The relative transcriptional level of Hsp70-2 mRNA in 42 group was 44.7% of that in the control group. The above results indicated that heat stress decreased the transcriptional level of Hsp70-2 mRNA. The effects of heat stress on the reproductive performance of male mice were related with the reduction of Hsp70-2. And the transcriptional level of Hsp70-2 mRNA could be taken as one index to judge the injury degree of heat stress on the reproductive performance of male mice.

Key words Heat stress; Mice; Testis; RT-PCR; Hsp70-2 mRNA

自 Ritassa 在果蝇的研究中首次发现热休克反应(heat shock respond, HSR)和 Tissieres 等发现热休克反应中转录合成热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)至今^[1],有关学者已经相继从生物体的细胞中发现和分离出 Hsps 家族的系列成员,并根据分子量及等电点不同将 Hsps 分为 7 大家族:即大分子量 Hsp 家族(100~110 kDa),Hsp90 家族(83~90 kDa),Hsp70 家族(66~78 kDa),Hsp60 家族,Hsp40(40 kDa)家族,小分子量 Hsp 家族(18~30 kDa)和泛素 8 kDa)。

Hsp70 家族包括结构型 Hsp70(heat shock constitutive protein 70, Hsc70)和诱导型 Hsp70^[2]。结构型 Hsp70 在所有细胞内均有表达,应激情况下会略有增加。而诱导型 Hsp70 在正常细胞中并不表达或表达量很少,但是在热应激或其他环境或生理应激原的诱导下,则表达迅速增加。小鼠 Hsp70 家族至少有 7 种不同的蛋白质^[2]:包括应激原诱导表达的 Hsp70-1 和 Hsp70-3;结构型表达的 Hsc70、葡萄糖调节蛋白 75(glucose-regulated protein 75, Grp75)和葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78, Grp78);还有 2 种特殊类型的 Hsp70 家族成员,Hsp70-2 和 Hsc70t。Hsp70-2 在精子发生过程中的减数分裂期的粗线期精母细胞中特异性高表达,Hsc70t 在减数分裂后的单倍体精子细胞中特异性表达。而小鼠睾丸组织 Hsp70 表达相当丰富,目前认为,在小鼠生精细胞中有 Hsc70、Hsp70-1、Hsp70-2、Hsp70-3、Hsc70t 和 Grp78 共 6 种 Hsp70 表达^[3]。

Hsp70 是 Hsp 家族中目前被研究最多、最深入的 Hsp,在分子伴侣、细胞凋亡和周期调控、细胞免疫、衰老等方面均对其有所研究^[4]。此外,Hsp70 在精子形成和胚胎发育中也起了重要作用。而高温引发的热应激能够导致家畜或人的不

孕不育。笔者利用半定量 RT-PCR 方法检测热应激处理小鼠睾丸特异性高表达 Hsp70-2 mRNA 转录水平的变化及与热应激温度强弱的关系,为研究 Hsp70-2 在雄性生殖机能损伤中的作用提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物。供试动物为 8 周龄昆明系纯种健康小鼠 12 只。

1.1.2 主要试剂与仪器。RNA 抽提试剂盒(W6701)购自上海华舜生物工程有限公司,Trizol Reagent、低熔点琼脂糖购自 Invitrogen 公司,AMV、LA Taq DNA 聚合酶、DL2000 Marker、Hexadeoxynucleotide mixture 随机引物、RNasin、pMD18T 载体购自大连 Takara 公司,焦碳酸二乙酯(DEPC)购自 Anresco 公司,DH5 感受态为笔者的研究室保存。PTC-200 PCR 仪(Bo-Rad),凝胶成像系统(美国 UVP)。

1.2 方法

1.2.1 试验动物分组及模型的建立。试验小鼠自购买之日起,饲养于人工控制条件下,每天 14 h 光照(06:00~20:00),10 h 黑暗,自由采食、饮水,室温 18~22℃,适应 7 d 后进入正式试验。随机取出 3 只小鼠为对照组,常规饲养,其余为热应激组。热应激组按不同温度分为 3 个亚组,即 33、37 和 42 组。利用化学恒温培养箱实施 4 h 的全身热应激处理,然后颈椎脱臼处死小鼠,无菌快速取两侧睾丸。

1.2.2 引物的设计与合成。根据 GenBank 中已发表的小鼠睾丸 Hsp70-2 cDNA 序列,并与 GenBank 中的其他相关序列进行了同源性比较后设计一对引物,扩增片段大小为 492 bp。引物序列如下:上游引物为 5'-TCGTGCGTGGCTGGGGTATTC-3',下游引物为 5'-CGCTGCTGTGGGCTCAIT-3'。以小鼠 18 S rRNA 作为内标,参照 Naohiro Yoshida 等发表的小鼠 18 S rRNA 引物序列^[9],预期产物大小为 100 bp。引物序列如下:上游引物为 5'-TTCGGAAGTGGGCT-

作者简介 姜忠玲(1976-),女,黑龙江宾县人,讲师,从事动物生殖机理及调控的研究。

收稿日期 2008-10-10

CAATGATT-3, 下游引物为 5-TTTCGCTCTGGTCCGTCTTG-3。由大连 Takara 公司合成。

1.2.3 总 RNA 的提取。用 Trizol 法提取睾丸组织总 RNA。研钵中约 10 ng 睾丸组织, 加入 1 ml Trizol Reagent, 充分裂解后加入 200 μ l 氯仿, 离心, 取上清, 然后分别用异丙醇沉淀, 75% 乙醇清洗后, 加入 30 μ l 0.1% DEPC 水溶解。

1.2.4 RT-PCR。采用 20 μ l 的 RT 反应体系: 取 5 μ l RNA 水溶液加入 1 μ l 25 pmol/ μ l 随机引物, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 冰上冷却 5 min 后, 依次加入 2 μ l dNTP, 4 μ l 5 \times Tarse buffer, 1 μ l RNasin, 1 μ l AMV, 6 μ l 0.1% DEPC 水。42 $^{\circ}$ C 水浴 1 h 后, 95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 然后冰上冷却 5 min, -20 $^{\circ}$ C 保存备用或进行 PCR 反应。

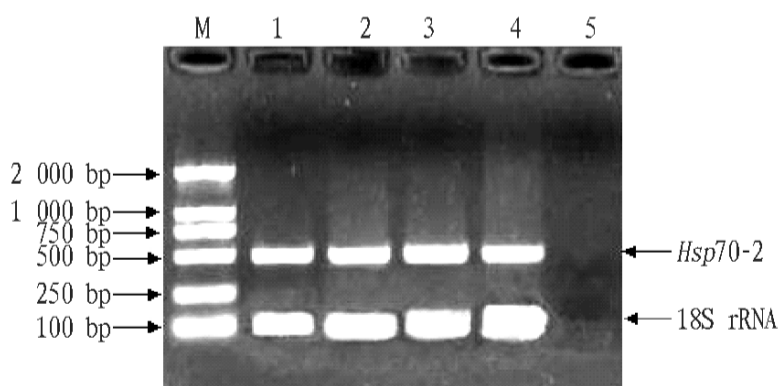
采用 50 μ l 反应体系: 5 μ l 10 \times PCR buffer, 4 μ l dNTP, 上下游引物各 1 μ l, 0.5 μ l Taq DNA 聚合酶, 3 μ l 模板 cDNA, 35.5 μ l 双蒸水。PCR 扩增反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.5 PCR 扩增产物检测。取 PCR 产物 50 μ l 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。用 Bandsan 分析软件对琼脂糖凝胶电泳条带进行灰度扫描, 用于 Hsp70-2 基因 mRNA 转录水平的半定量分析。回收 RT-PCR 电泳条带, 与 pMD18-T 载体相连, 转化感受态 DH5, 铺 LB 琼脂平板 37 $^{\circ}$ C 倒置培养, 经鉴定后挑取阳性菌落进行扩大培养, 送上海联合基因公司测序。

1.3 数据处理 用 SPSS10.0 数据统计分析软件, 差异显著性分析用 t 检验。数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物的电泳结果 琼脂糖凝胶电泳显示, 对照组和各热应激组都扩增出了大小约为 492 bp 以及约 100 bp 的条带(图 1)。



注: M 为 DNA Marker, 1~5 分别为对照组、33 组、37 组、42 组、阴性对照的 RT-PCR 产物。

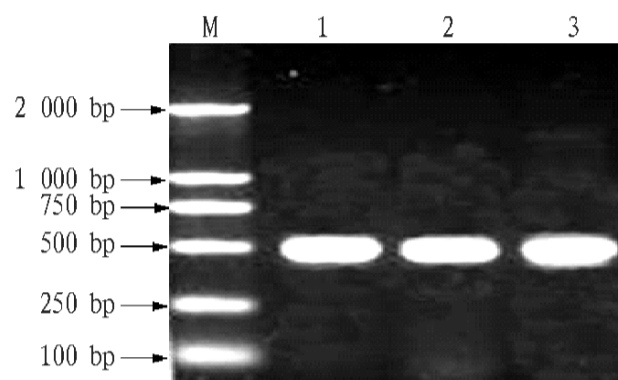
Note: M, DNA Marker; 1-5 stand for RT-PCR products of control group, 33 group, 37 group, 42 group and negative control respectively.

图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis results of RT-PCR products

2.2 Hsp70-2 基因的鉴定结果 选取 3 条琼脂糖电泳条带回收, 回收产物连入 pMD18-T 载体上后转化入 DH5 感受态细胞, 筛选的可疑阳性单克隆子通过质粒提取和 PCR 鉴定得到 3 条明亮的大小约 492 bp 的目的条带(图 2)。测序结果显示, 扩增的序列与 GenBank 中已发表的 Hsp70-2 mRNA 序列同源性达 100%, 为 Hsp70-2 mRNA 的序列。扩增产物测序结果如下:

TCGTGCGTGGGGGIATTC CAACATGGCAAGGTGGAGATCAT
CGCCAACGACCAGGGTAACCGCACCCAGCTACGTGGCCT
TCACTGACACCGAGCGTCTCATCGGCGACGCCGCCAAGAACCAG
TGCCATGAACCCACAAACACCATCTTCGACGCCAAGCGGCTG
ATCGGACGGAAGTTCGAGGACGCCACAGTGCAGTCCGATATGAA
GCACTGGCCGTTCCGAGTGGTGAGCGAAGGTGGGAAGCCCAAAG
TGCAGGTGGAATATAAAGGGGAGATGAAGACCTTCTCCCTGAG
GAGATTTCTTCCATGGTCTCACTAAGATGAAGGAGATCGCCGA
AGCCTACCTGGGGGGCAAGGTGCAGAGCGCAGTCATCACTGTTC
CTGCCTATTTCAACGACTCGCAGCGCCAGGCCACCAAGGATCGG
GGCACCATCACCGGCCTCAACGTGTTGCGCATCATC
AATGAGCCCACAGCAGCG(划横线部分为引物)。



注: M 为 DNA Marker, 1、2、3 分别为阳性克隆质粒。

Note: M, DNA Marker, 1, 2 and 3, Positive clone plasmids.

图 2 RT-PCR 产物的质粒鉴定结果

Fig.2 Plasmid identification results of RT-PCR products

2.3 热应激小鼠睾丸组织 Hsp70-2 mRNA 转录的半定量分析 用 Bandsan 软件对 RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳条带进行灰度扫描分析, 结果显示, 对照组 Hsp70-2 mRNA 转录水平最高, 各热应激组 Hsp70-2 mRNA 相对转录水平下降, 且热应激温度越高其转录水平下降趋势越明显。42 组和 37 组 Hsp70-2 mRNA 相对转录水平分别为对照组的 44.7% 和 70.2%, 与对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$); 33 组 Hsp70-2 mRNA 相对转录水平为对照组的 87.0%, 较对照组显著 ($P < 0.05$) 下降(表 1)。

表 1 Hsp70-2 mRNA 的相对转录水平 ($n=3$, $\bar{x} \pm SD$)

Table 1 The relative transcription level of Hsp70-2 mRNA

组别 Group	Hsp70-2 mRNA/18SrRNA	相对变化水平 Relative change level
33 组 33 group	0.366 \pm 0.036 *	0.870 \pm 0.090 *
37 组 37 group	0.297 \pm 0.014 **	0.702 \pm 0.042 *
42 组 42 group	0.189 \pm 0.009 **	0.447 \pm 0.016 *
对照组 Ctrl group	0.423 \pm 0.006	-

注: * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, 均为与对照组比较。

Note: * and ** stand for difference with control group at 0.05 and 0.01 levels respectively.

3 讨论

哺乳动物睾丸内的精子发生过程包括干细胞再生、细胞有丝分裂和减数分裂、细胞周期调控、细胞分化和细胞凋亡等很多生命科学领域中的关键问题, 但是由于雄性生殖细胞的体外培养要达到产生有受精能力的精子还面临很多的难题, 因此目前主要是用活体睾丸组织研究精子发生机制及调控、建立雄性机能障碍疾病的模型等。大多数哺乳动物的睾丸温度较腹腔低 5~7 $^{\circ}$ C [5], 只有这种低温条件才能保证睾

丸的发育和正常的精子发生。精子发生对温度变化非常敏感,睾丸温度稍微升高精子发生则遭受破坏^[6]。目前,高温对精子发生影响方面的研究国内外报道较多,且多采用局部水浴法或隐睾模型使睾丸温度升高。结合畜牧生产分析,家畜所发生的热应激一般是持续性全身热应激。该试验采用全身热应激小鼠试验动物模型,能从个体水平反应热应激对雄性生殖机能损伤的影响。

Hsp70-2 是粗线期精母细胞特异性高表达的一种 Hsp70。Eddy 用基因敲除技术建立 Hsp70-2 基因缺陷小鼠模型,发现此种小鼠精原细胞有丝分裂障碍,精母细胞停滞于减数分裂期,生殖细胞凋亡增加,表现为不育,睾丸体积只有正常小鼠的 1/3^[7]。Hsp70-2 对联会复合物形成、DNA 修复以及基因重组过程非常重要。而雌性 Hsp70-2^{-/-} 小鼠无论生殖细胞的减数分裂还是生育能力均不受影响。目前,认为 Hsp70-2 基因敲除导致精子发生中断的机制有:Hsp70-2 是 Cdc2 的分子伴侣,只有在 Hsp70-2 的帮助下,Cdc2 获得必需的空间构象才能和周期素 B 形成异构体,即促成熟因子(MPF),使精子细胞跨越细胞成熟周期中的 G2/M 期^[8];缺乏 Hsp70-2 将导致联会复合体染色体分离障碍^[9],使生精细胞周期停滞。提示 Hsp70-2 参与精子发生,并对小鼠的精母细胞完成减数分裂是必需的。

该试验采用半定量 RT-PCR 检测到各热应激组小鼠睾丸 Hsp70-2 基因的转录水平都明显下降,且温度越高,其相对转录水平越低。42 组 Hsp70-2 基因 mRNA 相对转录水平仅为对照组的 44.7%。Son 等发现,生精功能障碍的患者,其睾丸生殖细胞的 HspA2 基因表达水平下调^[10]。认为 HspA2 表达的缺失可能为男性不育的病因之一。HspA2 基因是与 Hsp70-2 基因高度同源的人 Hsp 基因。Gao 等报道,隐睾恒河猴生精细胞凋亡, Hsp70-2 基因表达下降^[11]。Dada 等报

道,如厨师、锅炉工和染色工等因高温作业导致无精或少精^[12]。笔者的试验结果与以上文献基本相符,提示,热应激影响精子发生,导致雄性生殖机能损伤与 Hsp70-2 基因 mRNA 转录水平下降有关。Christians 等也认为, Hsp70-2 是精子发生过程中减数分裂阶段所必需的^[13]。

参考文献

- [1] TISSI RES A, MITCHELL H K, TRACY U M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs[J]. *J Mol Biol*, 1974, 84(3): 389 - 398.
- [2] DIX DJ, ALLEN J W, COLLIES B W, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis and male infertility[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(8): 3264 - 3268.
- [3] HUNT C R, CASSER DL, CHAPLIN D D, et al. Chromosomal localization of five murine Hsp70 gene family members: Hsp70-1, Hsp70-2, Hsp70-3, Hsp70t, and Gp78[J]. *Genomics*, 1993, 16(1): 193 - 198.
- [4] JULIANN G K, GEORGE C T. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology[J]. *Pharmacol Ther*, 1998, 80(2): 184 - 185.
- [5] KANDEEL F R, SWERDLOFF R S. Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception[J]. *Fertil Steril*, 1988, 49: 1 - 23.
- [6] CHOWDHURY A K, STEINBERGER E A. Quantitative study of heat on germinal epithelium of rat testes[J]. *Am J Anat*, 1964, 115: 509 - 524.
- [7] EDDY E M. Role of heat shock protein Hsp70-2 in spermatogenesis[J]. *Rev Reprod*, 1999, 4(1): 23 - 30.
- [8] ZHU D, DIX DJ, EDDY E M. Hsp70-2 is required for Cdc2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes[J]. *Development*, 1997, 124(15): 3007 - 3014.
- [9] FENG H L, SANDLOW J I, SPARKS A E. Decreased expression of the heat shock protein Hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility[J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(6): 1136 - 1139.
- [10] SON W Y, HAN C T, HWANG S H, et al. Repression of HspA2 messenger RNA in human testes with abnormal spermatogenesis[J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(6): 1138 - 1144.
- [11] GUO C X, MA J, ZHOU X C H, et al. Expression of Hsp70-2 gene during germ cell apoptosis in rat unilateral cryptorchid testes[J]. *Arch Androl*, 2001, 46(2): 109 - 115.
- [12] DADA R, GUPTA NP, KUCHERIA K. Spermatogenic arrest in non-orchidopexy testicular hypothermia[J]. *Teratog Carcinog Mutagen*, 2003(SI): 235 - 243.
- [13] CHRISTIANS E S, ZHOU Q, RENARD J, et al. Heat shock proteins in mammalian development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(5): 283 - 290.
- [28] YANG Y, LIU Q, YAN L F, et al. Expression of Chlamydomonas reinhardtii gfp fusion gene in tobacco suspension cell and polymerization of the actin gfp protein in vitro[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46(10): 806 - 811.
- [29] KOST B, SHELHOFER P, CHUA N H. A GFP mouse tail infusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes[J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(3): 393.
- [30] KIEGLE E, MOORE C A, HASELOFF J, et al. Cell type specific calcium responses to drought, salt and cold in the arabidopsis root[J]. *Plant J*, 2000, 23(2): 267 - 278.
- [31] JENS ANDERSEN, CLAUS STERNBERG, LARS KONGSBAX POULSEN. New unstable Variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in Bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 2240 - 2246.
- [32] PETER J, GREGORY D. Development of a transformation system for Mycosphaerella pathogens of banana: a tool for the studies of host/pathogen interactions[J]. *FEMS Microbiology Lett*, 2001, 195: 9 - 15.
- [33] ZHANG C X, GAI Y, WANG W Q, et al. Construction and analysis of a plant transformation binary vector pBDGG harboring a bi-directional promoter fusing dual visible reporter genes[J]. *J Genet Genomics*, 2008, 35: 245 - 249.
- [34] 黄国存, 朱生伟, 董越梅, 等. 绿色荧光蛋白及其在植物研究中的应用[J]. *植物学通报*, 1998, 5(5): 24 - 30.
- [35] 郝敏, 邢达, 谢波, 等. 含有绿色荧光蛋白基因的质粒载体的构建及其在水稻白叶枯细菌中的表达[J]. *激光生物学报*, 2002, 11(6): 427 - 430.
- [36] 冯娜, 郑慧芬, 何绍江, 等. 用 gfp 基因检测饭豆根瘤菌在饭豆根部的定殖动态[J]. *华中农业大学学报*, 2005, 24(1): 49 - 51.
- [37] 张昕, 张炳欣, 喻景权. 生防菌 ZJY1 及 ZJY116 的 GFP 标记及其在黄瓜根围的生态适应性[J]. *应用生态学报*, 2005, 16(11): 2144 - 2148.
- [38] 张阳德, 廖允军. 绿色荧光蛋白及其在细胞生物学中的应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2001, 11(5): 34 - 37.
- [39] HALFILL MD, RICHARDS H A, MABONS A, et al. Expression of GFP and Bt transgenes in Brassica napus and hybridization with Brassica rapa[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 659 - 667.
- [40] CHAO Y C, CATHERINE Y, LIU Y, et al. Simulation of baculovirus transcriptional expression in mammalian cells by baculovirus transcriptional activators[J]. *Journal of General Virology*, 2007, 88: 2176 - 2184.

(上接第15790页)