

日粮纳米锌水平对公羊睾丸和附睾 Cu-ZnSOD 表达的影响

任有蛇, 秦小伟, 郭丽娜, 赵 辉, 刘文忠, 张建新, 张春香*

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘 要: 旨在研究日粮纳米锌对公羊睾丸和附睾铜锌超氧化物歧化酶基因(*Cu-ZnSOD*) mRNA 和蛋白表达的影响。将 16 只 9 月龄体重相近、健康状况良好的晋中绵羊公羊随机分成 4 组, 分别喂给基础日粮(对照组), 基础日粮+纳米锌(50、100 和 150 mg·kg⁻¹DM)。预饲期 10 d, 正试期 80 d。试验结束时采集绵羊睾丸和附睾组织。采用 RT-PCR、Western blotting 和免疫组化技术检测其 *Cu-ZnSOD* mRNA、Cu-ZnSOD 蛋白表达及在睾丸中定位情况。结果显示: 绵羊睾丸和附睾组织 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量顺序是附睾头≥睾丸>附睾体>附睾尾。日粮添加 50~100 mg·kg⁻¹ 纳米锌可增加其睾丸和附睾组织 *Cu-ZnSOD* mRNA 和蛋白表达量。免疫组化结果显示 Cu-ZnSOD 在睾丸的生精细胞中有强阳性信号, 间质细胞有弱阳性信号。综上所述, 绵羊睾丸和附睾不同区段 *Cu-ZnSOD* mRNA 和蛋白表达有差异。日粮添加适量锌可提高睾丸和附睾中 *Cu-ZnSOD* mRNA 和蛋白表达量, 其作用机制仍需进一步研究。

关键词: *Cu-ZnSOD*; RT-PCR; Western blotting; 睾丸; 附睾; 公羊

中图分类号: S826.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)10-1622-09

Effect of the Supplementation of Different Nano-zinc Levels on Expression of Copper Zinc Superoxide in Testis and Epididymis of Ram Lambs

REN You-she, QIN Xiao-wei, GUO Li-na, ZHAO Hui, LIU Wen-zhong,
ZHANG Jian-xin, ZHANG Chun-xiang*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The objectives of this study were to evaluate the expression of copper zinc superoxide dismutase and its cellular localization in testis and epididymis of ram lambs from different levels of Nano-zinc supplementation groups. Sixteen 9-month-old Jinzhong ram lambs with approximately weight and good healthy were randomly divided into 4 treatments, fed with a basal diet with supplementation of 0, 50, 100 and 150 mg·kg⁻¹ DM Nano-zinc respectively. Experimental period was 90 d. At the end of test, the samples of testis and epididymis were collected. Expression of *Cu-ZnSOD* mRNA and protein was detected by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blotting. Cellular localization of Cu-ZnSOD in testis was examined by immunohistochemistry. The quantitative real-time PCR results showed the rank order of *Cu-ZnSOD* mRNA expression was caput ≥ testis > corpora > cauda. The mRNA and protein expression of Cu-ZnSOD in testis and epididymis were higher in the group with supplementation of 50 and 100 mg·kg⁻¹ Nano-zinc than those in control group ($P < 0.05$). The strong positive signals of Cu-ZnSOD protein were detected in spermatogenic cells of testis, and weak signals in interstitial tissue. The expression of Cu-

收稿日期: 2014-03-24

基金项目: 国家肉羊产业技术体系建设专项资金(CARS-39)

作者简介: 任有蛇(1970-), 男, 山西岢岚人, 副教授, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: rys925@126.com

* 通信作者: 张春香, Tel: 0354-6285990; E-mail: zhchx66@126.com

ZnSOD was different among testis, caput, corpora and cauda of epididymidis. The optimal supplementation of Nano-zinc in diet could improve the expression of Cu-ZnSOD in testis and epididymis of rams. And the mechanisms needs to be further researched.

Key words: *Cu-ZnSOD*; real-time PCR; Western blotting; testis; epididymidis; rams

锌是动物生长繁殖必需的微量元素^[1-2],其构成多种酶的活性中心^[3]。日粮缺锌会致使睾丸组织结构发生变化,产生精子的数量减少^[4-5],且精子形态异常,活力降低^[6-7]。Cu-ZnSOD是具有抗氧化作用的一种重要含锌酶,能转移性地清除超氧阴离子自由基^[8-10]。精子和精浆中含大量的 Cu-ZnSOD^[11],对维持精子形态和保持精子活力有重要作用^[12-14]。有研究显示睾丸间质细胞胞浆中、精子的滑面内质网膜上、顶体、中段和尾部均有锌离子分布^[15-16],附睾的主细胞、纤毛细胞和管腔中也均有锌离子分布^[17-18],以附睾头中锌离子分布最多^[19],雄性生殖器官中锌离子大量而广泛地分布,说明其在精子发生和精子成熟中发挥着重要作用。日粮中添加锌可明显提高种公牛^[20-21]和公羊^[22]的精液品质,增加直线运动精子数,增强精子活力。人精浆中 Cu-ZnSOD活性与精液中精子数量、精子活力呈正相关^[23-24],公羊^[25]、公牛^[26]和公犬^[27]方面的研究也证实了这一点。猪和家鼠精浆 Cu-ZnSOD 活性降低使精子活力严重下降,精子在体内外的受精能力降低^[28-30],精浆 Cu-ZnSOD 活性增加可显著提高精子

活力^[31]。F. T. Celino 等 Western blotting 分析显示日本鳊鱼睾丸细胞共培养体系中精子发生早期 Cu-ZnSOD 蛋白含量较高,免疫组化结果显示精原细胞中 Cu-ZnSOD 信号较强^[32]。然而关于雄性动物性腺组织 Cu-ZnSOD 表达特点的研究还未见报道,日粮锌对生殖器官 Cu-ZnSOD 表达影响的研究也尚未见报道。因此本研究以晋中绵羊为试验动物,通过 RT-PCR、Western blot 和免疫组化研究日粮纳米锌水平对睾丸和附睾 Cu-ZnSOD 表达的影响,为研究 Cu-ZnSOD 在精子发生和成熟中作用的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物和饲养管理

试验动物由山西农业大学动物科技学院试验基地提供,选择体重相近((35.8±1.5)kg)、健康状况良好的 9 月龄公羊 16 只,随机分为 4 组,对照组饲喂基础日粮(表 1),基础日粮参照 NRC 绵羊营养需要量标准配制,试验组分别饲喂基础日粮+50 mg·kg⁻¹DM、基础日粮+100mg·kg⁻¹DM和基

表 1 基础日粮组成及营养成分(DM 基础)

Table 1 Ingredient and chemical composition of diet(DM basis)

原料 Ingredient		营养水平 Nutrient level	%
玉米秸秆 Corn stalk	30.02	ME/(MJ·kg ⁻¹ DM)	9.16
秕葵花籽 Sunflower seed null	23.15	CP	10.05 ^②
玉米 Cracked corn	18.70	ADF	20.36 ^②
麸皮 Wheat bran	2.07	NDF	32.26 ^②
豆饼 Soybean meal	7.91	Ca	0.40
葵花饼 Sunflower meal	4.04	P	0.29
DDGS Distiller's dried grain with solubles	6.64	Zn/(mg·kg ⁻¹)	8.83
胡麻饼 Linseed meal	5.97		
食盐 Salt	0.50		
预混料 ^① Trace mineral mix	1.00		
合计 Total	100.00		

①. 每千克基础日粮中提供:铁 40 mg;锰 40 mg;铜 15 mg;钴 0.2 mg;碘 0.2 mg;硒 0.3 mg。②. 实测值

①. Provided per kilogram of the diet:Fe 40 mg;Mn 40 mg;Cu 15 mg;Co 0.2 mg;I 0.2 mg;Se 0.3 mg。②. Analyzed values except metabolizable energy

础日粮+150 mg·kg⁻¹ DM 纳米锌(由广州博仕奥生化技术研究有限公司提供,含量 75%),将其加工成 4 种颗粒饲料,装袋标记,贮存在通风干燥处。试验羊单栏饲养,每天饲喂 1.1 kg 颗粒饲料,自由饮水。预饲期 10 d,正试期 80 d。试验期结束后,手术取睾丸、附睾头、附睾体和附睾尾等,一部分放入 DEPC 水处理过的 1.5 mL EP 管迅速置于液氮中,-80℃ 冰箱保存。一部分切成 0.5 cm×0.5 cm×0.2 cm 的组织,4.0% 多聚甲醛固定,供免疫组化使用。

1.2 主要试剂

RNAiso plus 试剂盒、PrimeScript™ RT Reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒购自 TaKaRa 公司,哺乳动物组织总蛋白提取试剂、Rabbit Anti-Cu-ZnSOD 多克隆一抗、HRP 标记的 Goat

Anti-Rabbit 二抗、即用型 SABC 免疫组化试剂盒、NC 膜、脱脂奶粉、蓝色 DAB 染料、G250 考马斯亮蓝快染试剂盒、1.0 和 1.5 mol·L⁻¹ Tris·HCl 购自博士德公司,其他常用试剂为国产分析纯。

1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 提取 按照 RNAiso plus 试剂盒操作说明提取睾丸和附睾组织总 RNA,DEPC 处理水溶解,核酸蛋白测定仪(北京 Nanodrop)测定总 RNA 浓度和纯度,调整浓度至 1 μg·μL⁻¹ 左右,-80℃ 保存。

1.3.2 引物设计与合成 参考 GenBank 已登录的绵羊 *Cu-ZnSOD* (FJ546075) 和 18S rRNA (DQ222453) 的 mRNA 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计合成两对特异性引物,由北京六合华大基因科技股份有限公司,引物参数见表 2。

表 2 *Cu-ZnSOD* 和 18S rRNA 基因引物序列

Table 2 Oligo-nucleotide primers pairs for the SOD and 18S rRNA genes

基因 Gene	登录号 Accession No.	引物序列(5'-3')Primer sequence		产物/bp Product
		上游 Forward primer	下游 Reverse primer	
<i>Cu-ZnSOD</i>	FJ546075	GAGCCTTTCCCCGAGTCAT	GTTACCTTCAGTCAGCCCT	152
18S	DQ222453	AACCACCTCACTAAACAGAC	TGAGGACCACCACGGGAA	159

1.3.3 cDNA 合成 按照 PrimeScript™ RT Reagent Kit 试剂盒操作说明,Buffer 2.0 μL、Oligo dT 0.5 μL、RNA 模板 1.0 μL、RT Enzymes Mix 0.5 μL、RNase Free ddH₂O 5.5 μL 和 Random 6 mers 0.5 μL 共 10 μL,37℃ 15 min,85℃ 5 s 进行反转录,反转录产物-20℃ 保存。

1.3.4 相对定量标准曲线的绘制 反转录产物 cDNA 按照 2× 稀释,起始模板数分别是 2⁶、2⁵、2⁴、2³、2²、2,同时使用不添加模板的空白作阴性对照,根据 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒说明构建反应体系,SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL、引物 1.2 μL、Rox Reference Dye II 0.4 μL、cDNA 模板 2.0 μL 和 ddH₂O 6.4 μL 总体积 20 μL,95℃ 变性 10 s,95℃ 5 s,60℃ 25 s,共 40 个循环,进行 RT-PCR 扩增,软件自动得出扩增曲线、熔解曲线和循环阈值。

1.3.5 RT-PCR RT-PCR 反应体系和反应条件与标准曲线制作相同,每个样本重复 3 次,根据标准曲线以及荧光曲线 Ct 值采用 2^{-ΔΔCt} 计算定量结果。

1.3.6 Westernblot 分析 根据哺乳动物组织

蛋白抽提剂说明提取睾丸和附睾蛋白。采用 4.0% 的浓缩胶和 15% 的分离胶,100℃ 沸水变性,蛋白上样量 100 μg,SDS-PAGE 电泳时电压为浓缩胶 100 V 30 min,分离胶 120 V 1.5 h。使用半干转膜仪(美国 BioRad)对 NC 膜进行转膜,稳流 100 mA 30 min。TBST 稀释脱脂奶粉封闭 1 h,1:200 稀释 Rabbit Anti-Cu-ZnSOD 多克隆一抗和 1:200 稀释内参蛋白 β-actin,37℃ 孵育 2 h,Goat Anti-Rabbit 二抗常温孵育 1 h,凝胶成像仪器(美国 BioRad)中 ECL 显色,拍照。

1.3.7 免疫组化分析 石蜡包埋睾丸和附睾组织,切片厚度 0.5 μm。二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,3.0% H₂O₂ 室温封闭 10 min,PBS 洗 3 次各 5 min;抗原修复,PBS 冲洗 3 次;滴加胎牛血清封闭液,室温 30 min,甩去多余液体;滴加 1:200 稀释的 Rabbit Anti-Cu-ZnSOD 一抗,湿盒内 4℃ 过夜后 PBS 冲洗 3 次;加 HRP 标记二抗 37℃ 30 min,PBS 冲洗 3 次;加 SABC 复合物 37℃ 30 min;PBS 冲洗 4 次;用蓝色或黄色 DAB 显色,蒸馏水冲洗 2~3 次终止显色;苏木精复染 1 min,盐酸酒精分化;蒸

馏水冲洗 10~15 min;脱水、透明和封片待检。同时用 PBS 代替一抗设置阴性对照。Olympus 生物显微镜下观察,拍照。

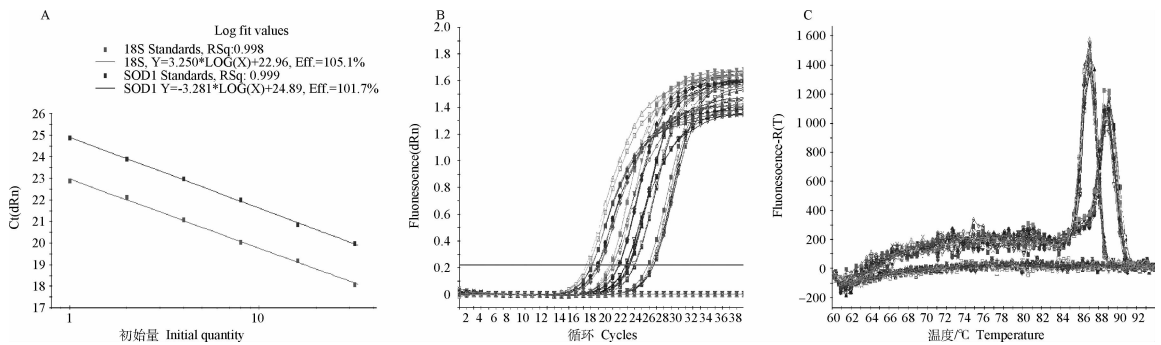
1.4 数据处理与图像分析

性腺不同组织 mRNA 表达量计算时睾丸设为 1。不同纳米锌水平同一组织 mRNA 表达量计算时对照组设为 1。Western blotting 图片的灰度值和免疫组化图片的光密度值使用 Image Pro Plus 7.0 图像分析软件分析。用 SAS 8.5 进行统计分析,差异显著性($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 绵羊性腺组织 Cu-ZnSOD mRNA 表达特点

2.1.1 定量标准曲线的建立 软件自动绘制的



A. 标准曲线;B. 扩增曲线;C. 溶解曲线

A. Standard curves;B. PCR amplification plots;C. Dissociation curves for *Cu-ZnSOD* and 18S genes

图 1 *Cu-ZnSOD* 与 18S 基因标准曲线、扩增曲线及溶解曲线

Fig. 1 Standard curves, PCR amplification plots and dissociation curves for *Cu-ZnSOD* and 18S genes

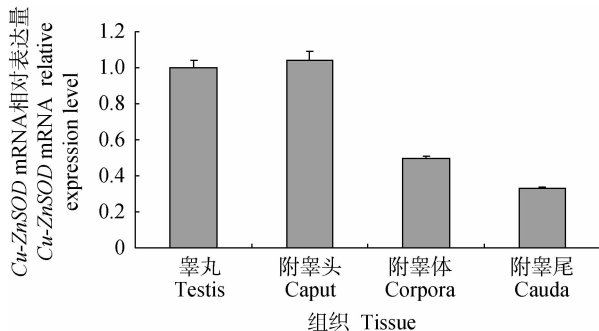


图 2 绵羊性腺组织 *Cu-ZnSOD* mRNA 相对表达量

Fig. 2 *Cu-ZnSOD* mRNA relative expression levels in ovine reproduction tissues

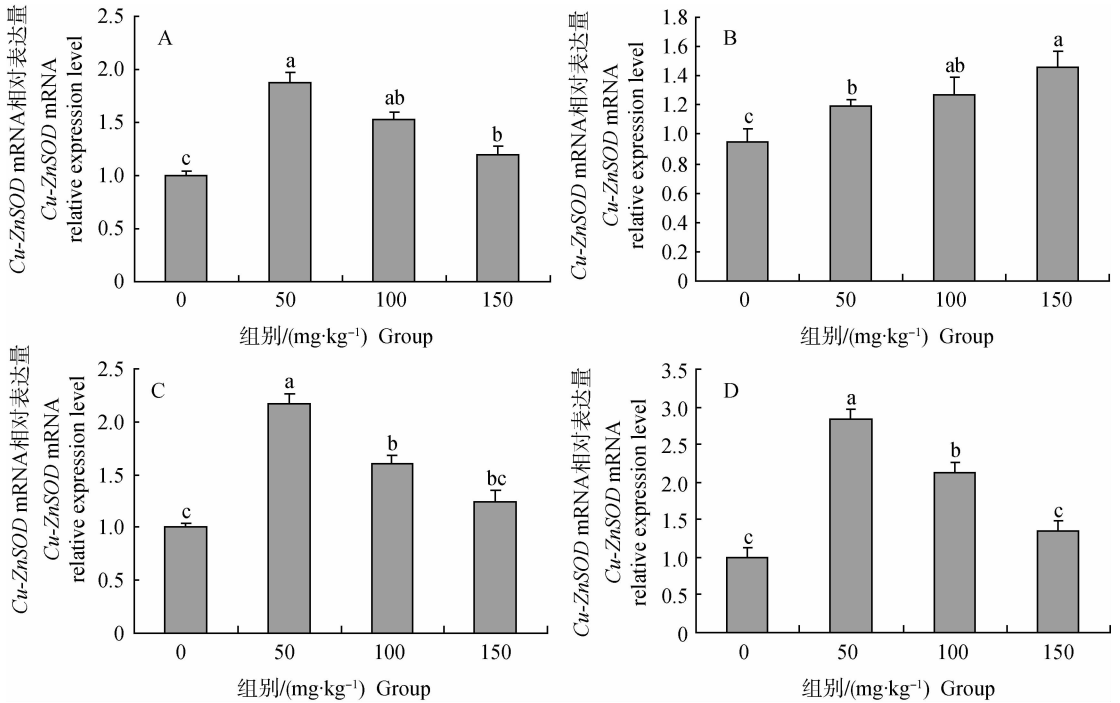
2.2 纳米锌水平对睾丸和附睾头、体、尾 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量的影响

不同纳米锌水平对绵羊睾丸和附睾头、体、尾 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量影响的结果分别见图 3A~D。从图 3A 可以看出,50 mg·kg⁻¹ 纳米锌组睾丸 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量显著高于对照组和 150

标准曲线见图 1A,相对浓度 2⁶、2⁵、2⁴、2³、2²、2¹ 的 *Cu-ZnSOD* 和 18S rRNA 定量 PCR 的 Ct 值在 6 个数量级梯度上呈良好的线性关系,且目的基因和内参基因平行性较好,回归系数分别为 0.998 和 0.999,扩增效率 100%~110%,说明用该引物进行 *Cu-ZnSOD* mRNA 定量检测有效。

2.1.2 绵羊性腺组织 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达特点 睾丸和附睾组织 *Cu-ZnSOD* 和 18S rRNA 的扩增动力学曲线和溶解曲线分别见图 1B 和图 1C,图 1B 显示扩增拐点清楚,基线平稳;图 1C 溶解曲线只有单一的峰,无非特异性产物和引物二聚体。对照组绵羊性腺组织 *Cu-ZnSOD* mRNA 定量 PCR 结果见图 2。从图 2 可知,*Cu-ZnSOD* mRNA 表达量顺序是附睾头≥睾丸>附睾体>附睾尾。

mg·kg⁻¹ 纳米锌组 ($P < 0.05$),100 mg·kg⁻¹ *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$),与 150 mg·kg⁻¹ 纳米锌组差异不显著 ($P > 0.05$)。图 3B 显示,50 mg·kg⁻¹ 和 100 mg·kg⁻¹ 纳米锌添加组显著高于对照组 ($P < 0.05$),150 mg·kg⁻¹ 纳米锌组附睾头 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量显著高于 50 mg·kg⁻¹ 纳米锌组 ($P < 0.05$),与 100 mg·kg⁻¹ 纳米锌组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。图 3C 显示,50 mg·kg⁻¹ 纳米锌组附睾体 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量显著高于其他组 ($P < 0.05$),100 mg·kg⁻¹ 纳米锌组 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$),与 150 mg·kg⁻¹ 纳米锌组相比,差异不显著 ($P > 0.05$)。图 3D 显示 50 mg·kg⁻¹ 纳米锌组附睾尾 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量显著高于其他组 ($P < 0.05$),100 mg·kg⁻¹ 纳米锌组 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量显著高于对照组和 150 mg·kg⁻¹ 纳米锌组 ($P < 0.05$)。



A. 睾丸; B. 附睾头; C. 附睾体; D. 附睾尾

A. Testis; B. Caput epididymis; C. Corpora epididymis; D. Cauda epididymis

图3 不同纳米锌水平组睾丸、附睾头、体、尾 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量

Fig. 3 *Cu-ZnSOD* mRNA relative expression in ovine testis, epididymis from different levels of Nano-zinc supplementation groups

2.3 纳米锌水平对睾丸和附睾头、体、尾 *Cu-ZnSOD* 蛋白表达量的影响

不同锌水平组绵羊睾丸和附睾头、体、尾 *Cu-ZnSOD* 蛋白 Western blotting 结果见图4。采用 β -actin 作为内参蛋白, *Cu-ZnSOD* 蛋白大小为 15 ku 左右, β -actin 蛋白大小为 43 ku。图4A是 *Cu-ZnSOD* 蛋白 ECL 显色结果, 图4B是 β -actin 蛋白 ECL 显色结果。相对灰度值分析结果见图5。从图4和5可知, 在睾丸组织中不同纳米锌组 *Cu-ZnSOD* 蛋白表达量为 50 mg · kg⁻¹ 组 > 100 mg · kg⁻¹ 组 > 150 mg · kg⁻¹ 组 > 对照组; 在附睾头中其 *Cu-ZnSOD* 蛋白表达量为 150 mg · kg⁻¹ 组 > 100 mg · kg⁻¹ 组 > 50 mg · kg⁻¹ 组 > 对照组; 在附睾体中其 *Cu-ZnSOD* 蛋白表达量均为 50 mg · kg⁻¹ 组 > 100 mg · kg⁻¹ 组 > 150 mg · kg⁻¹ 组 > 对照组; 在附睾尾中不同纳米锌添加组的 *Cu-ZnSOD* 蛋白表达量差异不明显。

2.4 睾丸 *Cu-ZnSOD* 表达定位及纳米锌水平对其表达的影响

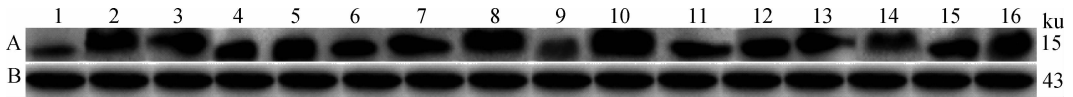
从图6看出, 在睾丸组织管腔上皮细胞、精原细胞中检测到强阳性产物, 在间质细胞中有较弱的阳

性信号。图7显示睾丸 *Cu-ZnSOD* 蛋白平均光密度值 50 mg · kg⁻¹ 组 > 100 mg · kg⁻¹ 组 > 150 mg · kg⁻¹ 组 > 对照组, 50 mg · kg⁻¹ 组和 100 mg · kg⁻¹ 纳米锌组显著高于对照组和 150 mg · kg⁻¹ 纳米锌组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 雄性主要性腺组织 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达特性

Cu-ZnSOD 是一种重要含锌酶^[1], 是动物机体抗氧化系统的主要成员, 能有效清除超氧自由基^[8-10]。精浆中大量的 *Cu-ZnSOD* 可保护精子免受脂质过氧化物的损伤, 维持精子形态和功能正常^[12-14]。目前有关雄性主要性腺组织 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达特性研究还较少, J. Baumber 等^[33] 研究结果显示马睾丸和附睾中 *Cu-ZnSOD* 活性差异不显著。M. Kozirowska Gilun 等^[34] 研究表明欧洲野驴附睾头和附睾尾中 *Cu-ZnSOD* 活性显著高于睾丸, 但是主要性腺器官 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达水平差异不显著, 这说明 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达与其活性之间不是呈正相关。M. Stoltenberg 研究



A 和 B 分别是 Cu-ZnSOD 蛋白和 β -actin 内参蛋白 ECL 显色结果。1~4. 睾丸组织;5~8. 附睾头组织;9~12. 附睾体组织;13~16. 附睾尾组织。顺序依次是对照组 ($0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、50、100 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 纳米锌组

A and B. Western blotting results of Cu-ZnSOD protein and β -actin protein respectively. 1-4. Results of Cu-ZnSOD protein expression of testis in control group ($0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 50, 100 and $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Nano-zinc groups, respectively; 5-8. That in cauda epididymis tissue in respective groups; 9-12. That in corpora epididymis tissue in respective groups, 13-16. That in caput epididymis tissue in respective groups

图 4 不同锌水平组绵羊睾丸和附睾 Western blotting 分析结果

Fig. 4 Results of Western blotting of Cu-ZnSOD protein in ovine testis and epididymis from different levels of Nano-zinc supplementation groups

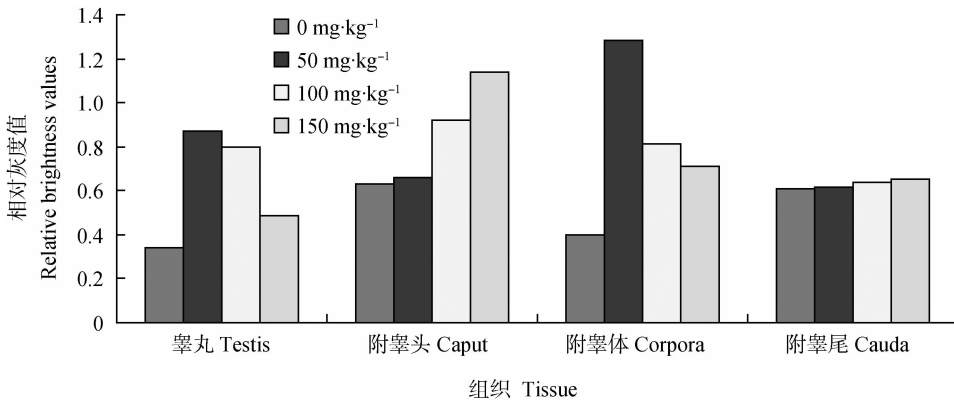
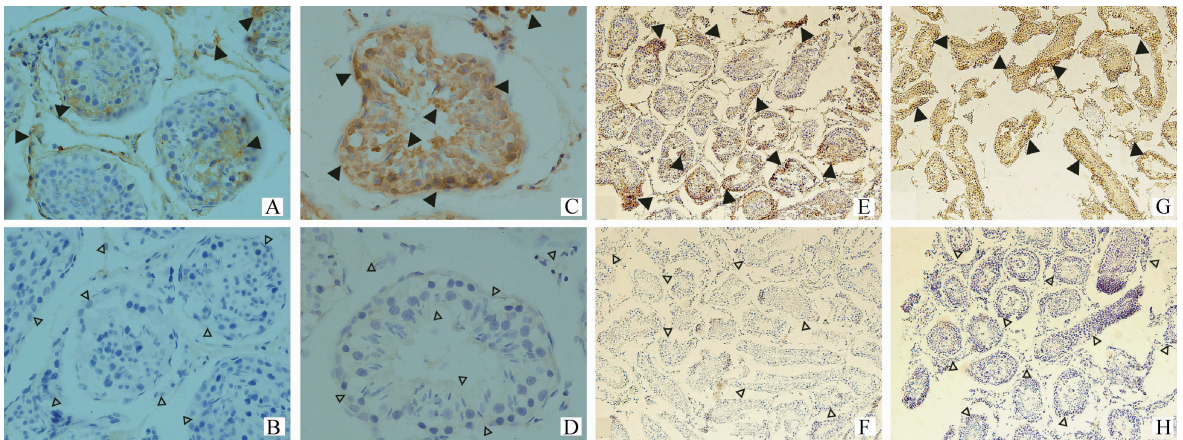


图 5 不同纳米锌水平组睾丸、附睾头、体、尾 Cu-ZnSOD 蛋白相对灰度值

Fig. 5 Relative brightness values of Cu-ZnSOD in sheep testis, epididymis from different levels of Nano-zinc supplementation groups



A、C、E、G 分别是对照组、50、100 和 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 纳米锌组阳性，B、D、F 和 H 分别为相应阴性对照。图 A、B、C 和 D 放大倍数为 $400\times$ (蓝色 DAB 染色)；E、F、G 和 H 放大倍数为 $100\times$ (黄色 DAB 染色)。▲. 强阳性产物；△. 无阳性产物

A, C, E and G were positive expression of Cu-ZnSOD in ovine testis from control group, 50, 100 and $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Nano-zinc group respectively; B, D, F and H were the negative control respectively. The magnification times of A, B, C and D were $400\times$ (Blue DAB stained), The magnification times of E, F, G and H were $\times 100$ (Yellow DAB stained).

▲. Strong positive signals; △. None positive signals

图 6 不同纳米锌组睾丸免疫组化结果

Fig. 6 Immunohistochemistry of Cu-ZnSOD in testis from different Nano-zinc group

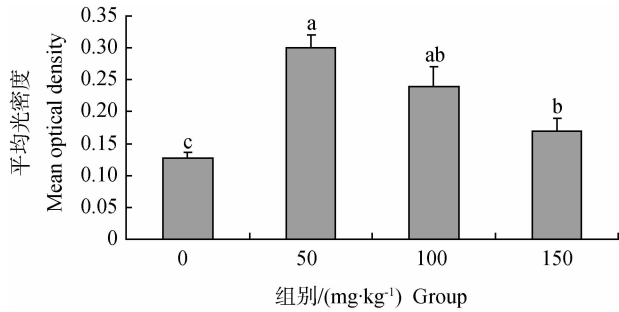


图7 不同纳米锌组睾丸 Cu-ZnSOD 的平均光密度
Fig.7 Mean optical density of Cu-ZnSOD in testis from different Nano-zinc group

结果显示附睾头中锌离子分布最多,附睾体和尾中分布的较少^[19]。本研究结果显示对照组绵羊附睾头和睾丸中 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量相近,高于附睾体和附睾尾,与欧洲野驴附睾头中 *Cu-ZnSOD* 活性显著高于睾丸组织,不同生殖器官的组织之间 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达差异不显著的结果不一致,欧洲野驴的这种表达不一致现象有可能是生殖器官 *Cu-ZnSOD* 转录后调控引起的^[34]。关于雄性生殖器官中 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达特性还需在其他动物上进一步验证。

3.2 微量元素锌水平对性腺组织 Cu-ZnSOD 表达的影响

目前关于日粮锌水平对精液品质影响以及精浆 *Cu-ZnSOD* 活性与精液品质相关性的研究较多。研究表明,日粮中添加锌可明显增加种公牛^[20-21]和公羊^[22]精子的活力;也有报道称精浆中 *Cu-ZnSOD* 活性与精液中精子数量、精子活力呈正相关^[23-27],且精浆中添加 *Cu-ZnSOD* 后,精子受精能力增强^[31],但这些都研究均未涉及日粮锌对性腺组织 *Cu-ZnSOD* 表达的影响。F. T. Celino 等用日本鳟鱼研究睾丸细胞体外共培养体系时发现,精子发生早期 *Cu-ZnSOD* 蛋白表达量较高,培养液中缺锌降低了 *Cu-ZnSOD* 蛋白的合成,用 RNAi 技术敲除其 *Cu-ZnSOD* 基因后,*Cu-ZnSOD* 蛋白表达显著降低^[32],表明锌离子浓度对 *Cu-ZnSOD* 蛋白表达有显著影响。本研究结果显示,日粮添加 50 或 100 mg·kg⁻¹ 纳米锌可使绵羊睾丸、附睾头、体和尾的 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量显著增加。Western blotting 分析睾丸和附睾 *Cu-ZnSOD* 蛋白的结果与其 mRNA 定量分析结果一致,说明绵羊日粮添加 50~100 mg·kg⁻¹ 纳米锌可增加其生殖器官 *Cu-ZnSOD* mRNA 和蛋白表达量,过量添加反而会降低其 *Cu-*

ZnSOD mRNA 和蛋白的表达量。因此,还需进一步研究其表达调控的机制。

3.3 睾丸 Cu-ZnSOD 的表达定位

早期研究主要集中在雄性的生殖器官的锌离子分布上。超微结构观察结果显示,锌离子分布于睾丸间质细胞的胞浆、精子滑面内质网膜上、顶体、中段和尾部^[15-16];而在附睾中,附睾头中锌离子分布最多,附睾体和尾中分布的较少^[19]。本试验免疫组化研究结果表明,*Cu-ZnSOD* 在睾丸的生精细胞中有强阳性信号,间质细胞也有阳性信号,这与 T. Nonogaki 等^[35]在人类男性生殖器官的研究结果一致,其研究表明 *Cu-ZnSOD* 主要在人睾丸的精原细胞中表达,分化的精母细胞和支持细胞检测到弱阳性。此外,有研究发现大鼠的 *Cu-ZnSOD* mRNA 主要表达在幼龄期的睾丸中^[36],这些结果表明 *Cu-ZnSOD* 对精子发生过程中的精原细胞有重要保护作用。

4 结论

绵羊公羊主要生殖器官 *Cu-ZnSOD* mRNA 表达量顺序是附睾头≥睾丸>附睾体>附睾尾。公羊日粮添加 50~100 mg·kg⁻¹ 纳米锌增加其附睾和睾丸 *Cu-ZnSOD* mRNA 和蛋白表达量。免疫组化结果显示 *Cu-ZnSOD* 在睾丸的生精细胞中有强阳性信号,间质细胞有弱阳性信号。其表达调控机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] BEDWAL R S, NAIR N, MATHUR R S. Effects of zinc deficiency and toxicity on reproductive organs, pregnancy and lactation—a review [J]. *Trace Elem Med*, 1991, 8: 89-100.
- [2] BEDWAL R S, BAHUGUNA A. Zinc, copper and selenium in reproduction [J]. *Experientia*, 1994, 50: 626-640.
- [3] AULD D S. The ins and outs of biological zinc sites [J]. *Biomaterials*, 2009, 22: 141-148.
- [4] KUMARI D, NAIR N, BEWAL R S. Effect of dietary zinc deficiency on testes of Wistar rats: Morphometric and cell quantification studies [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2011, 25(1): 47-53.
- [5] KUMARI D, NAIR N, BEWAL R S. Testicular apoptosis after dietary zinc deficiency: ultrastructural and TUNEL studies [J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2011, 57

- (5):233-243.
- [6] WALLACE E, CALVIN H I, SALGO M P, et al. Normal levels of zinc and sulphhydryls in morphologically abnormal populations of spermatozoa from moderately zinc deficient rats[J]. *Gamete Res*, 1984, 9: 375-386.
- [7] MERRELLS K J, BLEWETT H, JAMIESON J A, et al. Relationship between abnormal sperm morphology induced by dietary zinc deficiency and lipid composition in testes of growing rats[J]. *Br J Nutr*, 2009, 102(2):226-232.
- [8] WANG C L, WU C J, WANG Y R, et al. Study progress of Cu/Zn superoxide dismutase - from gene to function [J]. *Progr Modern Biomed*, 2008, 8(5): 940-943.
- [9] AIVAREZ J G, STOREY B T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation[J]. *J Androl*, 1992, 13:232-242.
- [10] SANOCKA D, MIESEL R, JEDRZEJCZAK P, et al. Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems in human semen; association with male infertility[J]. *Intern J Andro*, 1997, 20:255-264.
- [11] PEEKER R, ABRAMSSON L, MARKLUND S L. Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa [J]. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3(12):1061-1066.
- [12] MRUK D D, SILVESTRINI B, MO M Y, et al. Antioxidant superoxide dismutase - a review; its function, regulation in the testis, and role in male fertility [J]. *Contraception*, 2002, 65:305-311.
- [13] MURAWSKI M, SACZKO J, MARCINKOWSKA A, et al. Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2007, 45 (Suppl 1):S123-126.
- [14] WAHEED M M, GOUDA E M, KHALIFA T A. Impact of seminal plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase on cryopreserved buffalo spermatozoa[J]. *Anim Reprod Sci*, 2013, 142(3-4):126-130.
- [15] SØRENSEN M B, STOLTENBERG M, HENRIKSEN K, et al. Histochemical tracing of zinc ions in the rat testis[J]. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4:423-428.
- [16] STOLTENBERG M, SØRENSEN M B, DANSCHER G, et al. Autometallographic demonstration of zinc ions in rat sperm cells[J]. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3(9):763-767.
- [17] FUJIMORI O, TSUKISE A, YAMADA K. Histochemical demonstration of zinc in rat epididymis using a sulphide-silver method[J]. *Histochemistry*, 1988, 88(3-6):469-473.
- [18] STOLTENBERG M, ERNST E, ANDREASEN A, et al. Histochemical localization of zinc ions in the epididymis of the rat[J]. *Histochem J*, 1996, 28(3):173-185.
- [19] STOLTENBERG M, LUND L, JUHL S, et al. Histochemical demonstration of zinc ions in human epididymis using autometallography[J]. *Histochem J*, 1997, 29(10):721-726.
- [20] ROWE M P, POWELL J G, KEGLEY E B, et al. Effect of supplemental trace-mineral source on bull semen quality[J]. *Prof Anim Sci*, 2014, 30, 1:68-73.
- [21] KUMAR N, VERMA R P, SINGH L P, et al. Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* × *Bos taurus*) bulls[J]. *Reprod Nutr Dev*, 2006, 46(6):663-675.
- [22] KENDALL N R, MCMULLEN S, GREEN A, et al. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs[J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 62(4):277-283.
- [23] SAID T M, AGARWAL A, SHARMA R K, et al. Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility[J]. *Fertil Steril*, 2004, 82:871-877.
- [24] MARZEC-WRÓBLEWSKA U, KAMIŃSKI P, LAKOTA P, et al. Zinc and iron concentration and SOD activity in human semen and seminal plasma[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 143(1):167-177.
- [25] KASIMANICKAM R, PELZER K D, KASIMANICKAM V, et al. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs[J]. *Theriogenology*, 2006, 65(7):1407-1421.
- [26] KASIMANICKAM R, KASIMANICKAM V, THATCHER C D, et al. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls[J]. *Theriogenology*, 2007, 67(5):1004-1012.
- [27] CASSANI P, BECONI M T, OFLAHERTY C. Rela-

- tionship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen[J]. *Anim Reprod Sci*, 2005, 86(1-2):163-173.
- [28] ROCA J, RODRIGUEZ M J, GIL M A, et al. Survival and *in vitro* fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase[J]. *J Andro*, 2005, 26:15-24.
- [29] GARRATT M, BATHGATE R, GRAAF S P. Copper-zinc superoxide dismutase deficiency impairs sperm motility and *in vivo* fertility[J]. *Reproduction*, 2013, 146(4):297-304.
- [30] TSUNODA S, KAWANO N, MIYADO K, et al. Impaired fertilizing ability of superoxide dismutase 1-deficient mouse sperm during *in vitro* fertilization[J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(5):121.
- [31] KOBAYASHI T, MIYAZAKI T, NATORI M, et al. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa [J]. *Hum Reprod*, 1991, 6(7):987-991.
- [32] CELINO F T, YAMAGUCHI S, MIURA C, et al. Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(2):e16938.
- [33] BAUMBER J, BALL B A. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues[J]. *Am J Vet Res*, 2005, 66(8):1415-1419.
- [34] KOZIOROWSKA-GILUN M, GILUN P, FRASER L, et al. Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in reproductive tract of adult male European Bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) [J]. *Reprod Domest Anim*, 2013, 48(1):7-14.
- [35] NONOGAKI T, NODA Y, NARIMOTO K, et al. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs [J]. *Hum Reprod*, 1992, 7(1):81-85.
- [36] JOW W W, SCHLEGEL P N, CICHON Z, et al. Identification and localization of copper - zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development[J]. *Andrology*, 1993, 14:439-447.

(编辑 程金华)