

# 牦牛和雄性不育犏牛睾丸 *FABP5* 和 *FABP9* 基因 mRNA 水平及能量代谢相关酶活力的比较

付伟<sup>1</sup>, 黄林<sup>1</sup>, 刘文静<sup>2</sup>, 任亮<sup>1</sup>, 李彩霞<sup>1</sup>, 金素钰<sup>1</sup>, 林亚秋<sup>1</sup>, 郑玉才<sup>1\*</sup>

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; 2. 西南科技大学生命科学与工程学院, 绵阳 621010)

**摘要:** 本研究旨在测定牦牛表皮细胞型脂肪酸结合蛋白(*FABP5*)和睾丸型脂肪酸结合蛋白(*FABP9*)基因序列, 比较其在牦牛和雄性不育犏牛睾丸中的表达, 并结合睾丸中部分能量代谢相关酶的活力分析, 以探索这两个基因及能量代谢与牦牛雄性不育之间的联系。试验从牦牛睾丸中提取总 RNA, 采用 PCR 方法获得了牦牛 *FABP5* 和 *FABP9* 基因的 cDNA 序列, 编码区长度分别为 408 和 399 bp, 与普通牛相比分别有 1 个和 6 个碱基差异, 后者导致 *FABP9* 基因推导的氨基酸序列存在 5 个氨基酸差异。实时荧光定量 PCR 分析显示, *FABP5* 基因在犏牛睾丸中的表达量极显著大于牦牛, 而 *FABP9* 基因表达量差异不显著。犏牛睾丸中异柠檬酸脱氢酶活力极显著高于牦牛 ( $P < 0.01$ ), 而  $\beta$ -羟脂酰 CoA 脱氢酶和乳酸脱氢酶活力与牦牛接近。犏牛睾丸中 *FABP5* 基因表达上调以及参与三羧酸循环的柠檬酸脱氢酶活力提高, 可能提示雄性不育犏牛睾丸组织在脂肪酸氧化供能水平上高于成年牦牛。

**关键词:** 牦牛; *FABP* 基因; 杂交雄性不育; 睾丸; 能量代谢

中图分类号: S823.8

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)04-0561-07

## Comparison of the mRNA Levels of *FABP5* and *FABP9* Genes and Activities of Some Enzymes Related to Energy Metabolism in the Testes of Yak and Sterile F1 Male Hybrids between Male Cattle and Female Yak

FU Wei<sup>1</sup>, HUANG Lin<sup>1</sup>, LIU Wen-jing<sup>2</sup>, REN Liang<sup>1</sup>, LI Cai-xia<sup>1</sup>,  
JIN Su-yu<sup>1</sup>, LIN Ya-qiu<sup>1</sup>, ZHENG Yu-cai<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 2. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China)

**Abstract:** The epidermal type fatty acid binding protein (*FABP5*) and testicular fatty acid binding protein (*FABP9*) genes of yak were sequenced, and their expressions as well as activities of some enzymes related to energy metabolism in the testes were compared between yak and sterile F1 males (male cattle  $\times$  female yak), aiming to explore the association between the two genes and energy metabolism with the sterility of F1 males. Total RNA was extracted from yak testes and the cDNA sequences of *FABP5* and *FABP9* genes were obtained using conventional PCR methods. The coding region of yak *FABP5* and *FABP9* genes were 408 and 399 bp, respectively, and showed 1 and 6 nucleotide differences compared with those of cattle, respectively, the latter caused

收稿日期: 2014-07-02

基金项目: 国家自然科学基金(31240053)

作者简介: 付伟(1989-), 男, 四川资阳人, 研究生, 主要从事动物生化与分子遗传学研究, E-mail: fuwei11223344@163.com

\* 通信作者: 郑玉才, 教授, 博士, E-mail: yucaizheng65@hotmail.com

5 amino acid substitutions in the deduced amino acid sequences. Real-time quantitative PCR analysis showed that the expression of *FABP5* gene in the sterile F1 testes was significantly greater than yak, but not for *FABP9* gene. Isocitrate dehydrogenase activity in sterile F1 testes was significantly higher than yak ( $P < 0.01$ ), while  $\beta$ -hydroxyacyl CoA dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities were similar in the testes of yak and sterile F1 males. The up-regulated expression of *FABP5* gene and the increased activity of isocitrate dehydrogenase involved in citric acid cycle in the sterile F1 testes may indicate that the level of fatty acid oxidation for energy is higher in the testes of sterile F1 males than adult yak.

**Key words:** yak; *FABP* gene; hybrid male sterility; testes; energy metabolism

脂肪酸结合蛋白(FABPs)广泛存在于动物组织的多种细胞内,主要参与长链脂肪酸的吸收、转运及代谢<sup>[1-2]</sup>。根据表达及功能差异,可将 FABPs 分为 9 种类型,包括脑型(B-FABP)、肝型(L-FABP)、心型(H-FABP)、肠型(I-FABP)、脂肪细胞型(A-FABP)、回肠型(IL-FABP)、髓磷脂型(My-FABP)、表皮细胞型(E-FABP)和睾丸型(T-FABP)。E-FABP(又称 FABP5)来源于动物上皮细胞,参与并调控脂肪酸代谢、信号转导及癌症发生等多个过程,对细胞的正常生长发育至关重要<sup>[3-4]</sup>;T-FABP(又称 FABP9、PERF15)是动物睾丸特异的,在圆形精子和早期长形精子中大量表达,也是精子顶体的主要组分<sup>[5]</sup>,参与精子发生、成熟和受精,在雄性生殖中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。

牦牛(*Bos grunniens*)是青藏高原特有的牛种,它与普通牛(*Bos taurus*)的杂交后代(称犏牛)在产乳、产肉等方面具有明显的杂种优势,但表现为回交 3 代内雄性不育,无法产生正常的精子<sup>[8]</sup>,而雌性杂交后代生殖正常,其机制一直未得到令人信服的解释。已有的研究表明,与生殖相关的很多基因在犏牛睾丸中的 mRNA 水平都低于其亲本(牦牛和普通牛),如 *SYCP3*、*PIWIL1*、*Dmrt7*、*Bvh* 等<sup>[9-12]</sup>。本课题组在研究牦牛睾丸蛋白质组学时发现,与牦牛相比,犏牛睾丸中大多数蛋白质表达下调,而 *FABP5* 表达显著上调<sup>[13]</sup>。后续研究又观察到犏牛睾丸中参与脂肪酸氧化的中链酰基辅酶 A 脱氢酶表达亦上调(待发表资料)。另外,成年牦牛睾丸中参与脂肪酸氧化的  $\beta$ -羟脂酰 CoA 脱氢酶(HAD)活力显著低于性未成熟的牦牦牛<sup>[14]</sup>。这些结果促使人们提出这样的假设:雄性不育犏牛睾丸的能量代谢(特别是脂肪酸氧化)可能与成年牦牛有显著差异。

本研究通过 PCR 产物直接测序的方法,比较牦牛与犏牛 *FABP5* 和 *FABP9* 基因序列,并利用实

时荧光定量 PCR 分析其在牦牛和犏牛睾丸中的 mRNA 水平;另外测定睾丸中分别参与脂肪酸氧化、三羧酸循环和糖酵解的 3 种酶活力,包括  $\beta$ -羟脂酰 CoA 脱氢酶(HAD)、异柠檬酸脱氢酶(ICDH)和乳酸脱氢酶(LDH),以探索 *FABP5* 和 *FABP9* 表达水平及能量代谢与犏牛雄性不育的可能关联。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集

麦洼牦牛(*Bos grunniens*)和犏牛(公黄牛与母麦洼牦牛的杂交后代)的睾丸组织均采自成都市青白江区屠宰场。健康的成年公牦牛( $n=13$ )和公犏牛( $n=7$ )在屠宰后立刻取其睾丸,纵切面剖开后用干冰带回实验室,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 主要试剂和仪器

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自美国 Thermo Scientific 公司;Trizol Reagent 购自美国 Ambion 公司;Cycle-pure Kit 购自美国 OMEGA 公司;QuantiFast SYBR Green PCR Kit 购自德国 QIAGEN 公司;Super Taq DNA Polymerase 购自美国 GeneCopoeia 公司;丙酮酸钠、异柠檬酸、乙酰乙酰-CoA、NADH 和 NADP 均购自美国 Sigma 公司;DL2000 marker 购自天根生化科技(北京)有限公司。

C1000 Thermal Cycler 梯度 PCR 仪、C1000 Touch Thermal Cycler 荧光定量 PCR 仪、Versa Doc 1000 凝胶成像系统均为美国 Bio-Rad 公司产品;DR 2800 分光光度计为美国 HACH 公司产品;CR21G 高速冷冻离心机为日本日立公司产品。

### 1.3 总 RNA 的提取及反转录

按试剂盒说明书用 Trizol 法提取牦牛睾丸总 RNA。用紫外分光光度法测定核酸浓度。用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 以  $2\text{ }\mu\text{g}$

总 RNA 为模板,利用随机引物进行反转录,得到 cDNA 第一链。

#### 1.4 引物设计与 PCR 扩增

参照 GenBank 中野牦牛 *FABP5* 预测序列 (XM\_005897263.1) 和普通牛 *FABP5* 序列 (NM\_

174315.3),以及野牦牛 *FABP9* 预测序列 (XM\_005897261.1) 和普通牛 *FABP9* 序列 (NM\_001192410.1),用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 PCR 引物(表 1)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 本试验所用引物序列

Table 1 Primers for the present experiment

目的基因 Target gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	产物长度/bp Fragment size
<i>FABP5</i>	F:AGCTCACCTGTCACGCCTGT R:TTTCTGTGCAAAATGATGAGGG	62	470
<i>FABP9</i>	F:CACCTCTTCTCTGCAAGCTTTC R:CACATCTTCTTCAAGTCCCAGC	60	489
<i>FABP5</i> (Q-PCR)	F:ACTGGGAGAGAAGTTTGAAGAGACC R:GACCCGAGTACAGGTAACATTGTTC	62	187
<i>FABP9</i> (Q-PCR)	F:GAACTGGGAGTGAGTGTTCACCTC R:TGCCGTTATCTATGGTGGTTTC	62	173
<i>GAPDH</i>	F:CGACTTCAACAGCGACACTCA R:GGTCCAGGGACCTTACTCCTT	60	169
18SRNA	F:CTGAGAAACGGCTACCACATC R:CAGACTTGCCCTCCAATGG	60	168

牦牛睾丸总 RNA 经反转录得到 cDNA,再进行 PCR 扩增,反应体系 (25  $\mu$ L): 10  $\times$  Reaction Buffer 2.5  $\mu$ L, Super *Taq* DNA Polymerase 0.2  $\mu$ L, 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP 0.5  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L, 加超纯水至 25  $\mu$ L。PCR 程序: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60~62  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 1.5 基因的测序及序列分析

以 3 头牦牛睾丸 cDNA 为模板,用 PCR 分别扩增 *FABP5* 和 *FABP9* 基因序列,PCR 产物送上海生工生物工程有限公司进行直接测序。用 DNA-MAN4.0 软件分析测序结果。

#### 1.6 睾丸组织 *FABP5* 和 *FABP9* 基因的定量分析

以本研究获得的牦牛睾丸 *FABP5* 和 *FABP9* 基因序列为模板设计定量 PCR 引物,以普通牛 *GAPDH* (NM\_001034034) 和 18SRNA (NR\_036642) 为内参基因。以反转录获得的牦牛 ( $n=13$ ) 和犏牛 ( $n=7$ ) 睾丸组织 cDNA 为模板,采用实时荧光定量 PCR 方法检测 *FABP5* 和 *FABP9* 基因的相

对表达量。PCR 体系 (25  $\mu$ L): 2  $\times$  QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L, 模板 cDNA 1  $\mu$ L, RNase-free water 9.5  $\mu$ L。PCR 条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60~62  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 40 个循环, 65~95  $^{\circ}$ C 制作熔解曲线。

#### 1.7 睾丸组织中酶活力测定

在冰上解冻牦牛 ( $n=13$ ) 和犏牛 ( $n=7$ ) 睾丸组织,分别准确称取 0.1 g 于装有 1.4 mL 匀浆液 (10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris, pH 8.0, 0.25 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 蔗糖, 2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> EDTA) 的 EP 管中,参照 C. Jurie 等的方法<sup>[15]</sup>,在冰上匀浆 20 s, -80  $^{\circ}$ C 冻融 2 次,超声波 2 min (每 9 s 停止 3 s, 输出功率 250 W)。取 0.5 mL 匀浆液以 1 700 g 于 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min, 上清液用于 HAD 活力测定; 剩余部分 10 000 g 于 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min, 上清液分装用于测定 ICDH 和 LDH 活力。所有样品于 -80  $^{\circ}$ C 保存。

HAD 和 ICDH 活力测定参照 C. Jurie 等的方法<sup>[15]</sup>, LDH 活力测定参照 L. Marchat 等的方法<sup>[16]</sup>。酶活力的定义为在 25  $^{\circ}$ C 条件下, 每克新鲜

组织每分钟催化  $1 \mu\text{mol}$  底物转化为 1 个单位。

### 1.8 数据统计

采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 *FABP5* 和 *FABP9* 基因在睾丸中的相对表达水平。数据以 Bio-Rad 公司的 CFX manager 3.0 用 *GAPDH* 和 *18SRNA* 为内参进行标准化,以牦牛睾丸的表达量为对照。试验数据用“平均值±标准误”表示,用 SPSS18.0 软件对荧光定量数据和酶活力数据进行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 牦牛 *FABP5* 和 *FABP9* 基因测序

试验设计的 PCR 引物从牦牛睾丸总 RNA 中均扩增出了与预期长度相符的产物(图 1)。PCR 产物经测序证实为 *FABP5* 和 *FABP9* 基因,长度分别为 470 和 489 bp。

牦牛 *FABP5* 基因(GenBank 登录号: KM659856)的编码区(CDS)长度为 408 bp,与野牦牛预测序列(XM\_005897263.1)完全相同;与普通牛序列(NM\_174315.3)相比存在 1 个碱基差异(第 372 位碱基,牦牛为 T 而普通牛为 C),相似性为 99.75%。牦牛 *FABP5* 基因推导的氨基酸序列包含 135 个氨基酸,与野牦牛预测序列(XP\_005897325.1)和普通牛序列(NP\_776740.1)相同,理论分子量为 15.039 ku,预测等电点为 7.82。

牦牛 *FABP9* 基因(GenBank 登录号: KM659857)的编码区与野牦牛预测序列(XM\_005897261.1)和普通牛序列(NM\_001192410.1)的长度均为 399 bp,但与后者存在 6 个碱基差异,相似性 98.50%。牦牛 *FABP9* 基因推导的氨基酸序列含有 132 个氨基酸,理论分子量为 14.854 ku,预测等电点为 5.96,与野牦牛预测氨基酸序列(XP\_005897323.1)相同,但与普通牛 *FABP9* (NP\_

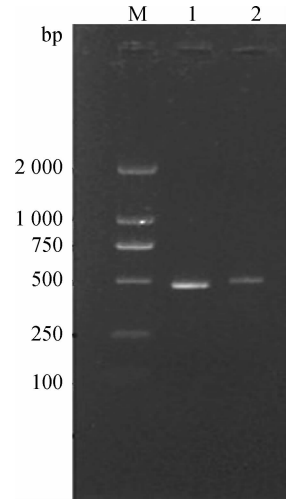
表 2 牦牛与普通牛 *FABP9* 基因推导的氨基酸序列对比

Table 2 Comparison of deduced amino acid sequences of *FABP9* gene between yak and cattle

牛种 Species	氨基酸位置 Amino acid position				
	25	30	80	129	132
牦牛 Yak	Glu	Leu	Gln	Tyr	Val
普通牛 Cattle	Gly	Val	Lys	Cys	Leu

### 2.3 牦牛和犏牛睾丸中酶活力分析

睾丸组织酶活力测定显示,犏牛睾丸中参与三



M. DNA 相对分子质量标准 DL2000; 1, 2. *FABP5* 和 *FABP9* 基因 PCR 产物

M. DL2000 marker; 1, 2. PCR products of *FABP5* and *FABP9* genes, respectively

图 1 牦牛 *FABP5* 和 *FABP9* 基因的扩增结果

Fig. 1 Amplification of *FABP5* and *FABP9* genes of yak

001179339.1)在预测等电点(8.46)上存在明显差异,这是由于二者序列存在 5 个氨基酸差异(表 2),且普通牛中第 25 和 80 位分别为甘氨酸(中性氨基酸)、赖氨酸(碱性氨基酸),而牦牛中相应位置分别为谷氨酸(酸性氨基酸)、谷氨酰胺(中性氨基酸),氨基酸序列相似性为 96.21%。

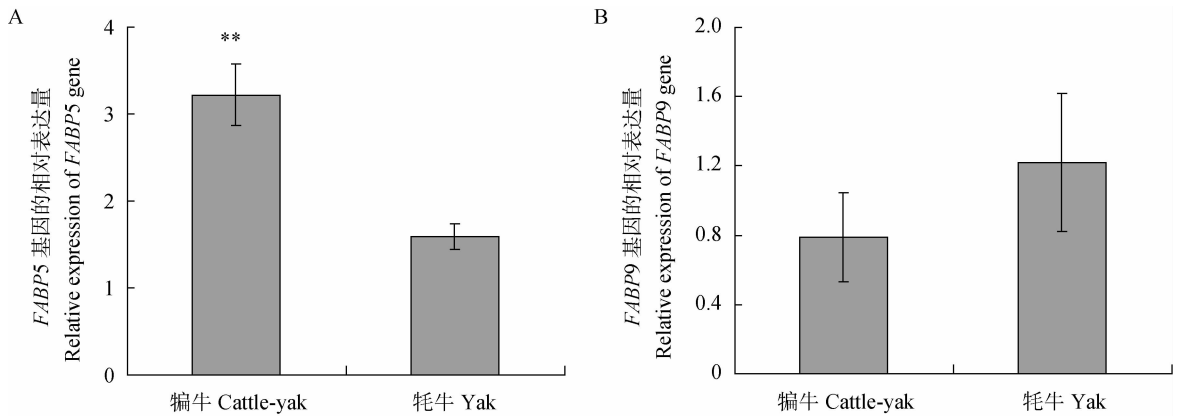
### 2.2 *FABP5* 和 *FABP9* 基因在牦牛和犏牛睾丸中的表达

以 *GAPDH* 和 *18SRNA* 为内参基因,对牦牛和犏牛睾丸中 *FABP5* 和 *FABP9* 基因 mRNA 表达水平进行了荧光定量 PCR 检测,扩增效率为 98.6%~99.8%,标准曲线线性关系好( $R^2 > 0.99$ )。犏牛睾丸中 *FABP5* 基因的表达量极显著高于牦牛( $P < 0.01$ ),相差约两倍;而 *FABP9* 基因表达量差异不显著(图 2)。

羧酸循环的 ICDH 活力极显著高于牦牛( $P < 0.01$ ),而参与脂肪酸氧化的 HAD 和参与糖酵解的

LDH 活力未见显著改变(表 3)。另外,睾丸 FABP5 和 FABP9 的 mRNA 水平与酶活力之间未

见显著相关性。



\*\* .  $P < 0.01$

图 2 FABP5(A)和 FABP9 基因(B)在牦牛和犏牛睾丸中的相对表达量

Fig. 2 Relative expression of FABP5 (A) and FABP9 (B) genes in the testes of yak and F1 hybrids

表 3 牦牛和犏牛睾丸中的酶活力

Table 3 Enzyme activities in the testes of yak and F1 hybrids

酶 Enzyme	犏牛 F1 hybrids(n=7)	牦牛 Yak(n=13)
β-羟脂酰 CoA 脱氢酶 β-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (HAD)	3.58±0.24	3.62±0.27
异柠檬酸脱氢酶 Isocitrate dehydrogenase(ICDH)	1.44±0.11**	0.96±0.09
乳酸脱氢酶 Lactate dehydrogenase(LDH)	31.92±1.83	27.94±1.01

\*\* .  $P < 0.01$

### 3 讨论

本研究从牦牛睾丸中成功获得了 FABP5 和 FABP9 基因的 cDNA 序列。牦牛 FABP5 基因编码的氨基酸序列与普通牛完全相同,说明该基因具有高度的保守性;而牦牛 FABP9 基因编码的氨基酸序列与普通牛相比存在较大差异,相似性为 96.21%,稍低于已报道的其他一些蛋白质<sup>[17-18]</sup>,提示牦牛 FABP9 基因进化相对较快。FABP9 氨基酸序列的差异是否会影响到其功能尚需进一步研究。

实时荧光定量 PCR 分析显示,FABP5 基因在犏牛睾丸中的表达量极显著高于牦牛,表达量相差约两倍,这与本实验室近期发现的 FABP5 蛋白在犏牛睾丸中的表达量比牦牛高 2.6 倍的结果吻合<sup>[13]</sup>。有研究表明,FABP5 在牛睾丸支持细胞中表达<sup>[19]</sup>,也存在于脂肪细胞、肝、心等细胞或组织中<sup>[20]</sup>。M. Furuhashi 等发现,敲除 FABP5 基因可

提高小鼠对胰岛素的敏感性,而在脂肪细胞中过量表达该基因则产生相反的效果<sup>[21]</sup>,提示 FABP5 基因表达直接影响机体的能量代谢。犏牛睾丸中参与脂肪酸氧化的中链酰基辅酶 A 脱氢酶表达上调(本课题组待发表资料),以及犏牛睾丸中 HAD 活力显著高于成年牦牛的结果<sup>[14]</sup>,提示睾丸脂肪酸代谢(也可能包括糖代谢)与睾丸精子发生可能有一定关系。犏牛睾丸中 FABP5 基因 mRNA 水平和中链酰基辅酶 A 脱氢酶蛋白水平的上调,均提示其脂肪酸 β-氧化代谢的加强,但本研究未检测到参与脂肪酸 β-氧化的 HAD 活力的显著改变,可能与 HAD 基础水平高,不属于限速酶有关。

有研究证实,男性不育患者睾丸中某些酶的活力存在异常<sup>[22]</sup>。睾丸组织的间质细胞和支持细胞中存在丰富的参与脂肪酸 β-氧化的酶<sup>[23]</sup>,部分酶也存在于精母细胞和精子细胞中<sup>[24]</sup>。支持细胞可以通过 β-氧化为精子发生提供能量<sup>[25]</sup>。对精子尾部

蛋白质组学研究发现,约 1/4 的蛋白质与脂肪代谢有关,抑制脂肪酸氧化相关酶的活性可显著降低精子活力<sup>[26]</sup>。这些说明脂肪酸代谢对精子发生十分关键。本研究发现,犏牛睾丸中参与三羧酸循环的 ICDH 活力极显著高于牦牛,而 HAD 和 LDH 活力则未见显著差异。大鼠精子中三羧酸循环相关酶活力显著低于精母细胞、精子细胞等生殖细胞<sup>[27]</sup>,表明精子发生不同阶段能量代谢情况存在差异。牦牛与犏牛睾丸组织在细胞组成方面有显著差异<sup>[28]</sup>,犏牛睾丸中无正常精子,这很可能与犏牛睾丸 ICDH 活力高有直接关系。笔者推测,犏牛睾丸 ICDH 活力的提高可能与脂肪酸代谢的改变相关。

FABP9 特异表达于动物睾丸组织,是精子顶体的结构蛋白,与精子发生、获能等过程关系密切<sup>[6-7]</sup>。本研究表明,FABP9 基因在牦牛和犏牛睾丸中均表达,但表达量差异不显著。J. Jamshidi 等<sup>[29]</sup>研究发现,精子发生障碍患者睾丸中 FABP9 基因无突变体存在;另有研究表明,缺乏 FABP9 的小鼠精子头部发育异常,但小鼠仍具有生殖能力,说明 FABP9 虽然是精子形成的重要蛋白,但该蛋白的单独缺失并不能完全阻断整个生殖过程<sup>[30]</sup>。本研究结果初步表明,牦牛与普通牛 FABP9 存在较多的氨基酸差异,但可能不是导致犏牛雄性不育的关键蛋白质。

## 参考文献 (References):

- [ 1 ] CHMURZYŃSKA A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism[J]. *J Appl Genet*, 2006, 47(1): 39-48.
- [ 2 ] ZIMMERMAN A W, VEERKAMP J H. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(7): 1096-1116.
- [ 3 ] SANSON B, WANG T, SUN J, et al. Crystallographic study of FABP5 as an intracellular endocannabinoid transporter[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70(Pt 2): 290-298.
- [ 4 ] ZHANG Y, SUN Y, RAO E, et al. Fatty acid binding protein E-FABP restricts tumor growth by promoting IFN $\beta$  responses in tumor-associated macrophages [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(11): 2986-2998.
- [ 5 ] KORLEY R, POURESMAEILI F, OKO R. Analysis of the protein composition of the mouse sperm perinuclear theca and characterization of its major protein constituent[J]. *Biol Reprod*, 1997, 57(6): 1426-1432.
- [ 6 ] KIDO T, ARATA S, SUZUKI R, et al. The testicular fatty acid binding protein PERF15 regulates the fate of germ cells in PERF15 transgenic mice[J]. *Dev Growth Differ*, 2005, 47(1): 15-24.
- [ 7 ] OKO R, MORALES C R. A novel testicular protein, with sequence similarities to a family of lipid binding proteins, is a major component of the rat sperm perinuclear theca[J]. *Dev Biol*, 1994, 166(1): 235-245.
- [ 8 ] 张旭静. 牦牛和普通牛种间杂种公牛睾丸的组织学观测与研究[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(4): 314-318. ZHANG X J. An observation and study of testicular histology in hybrid bull copulated by yak and cattle [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2001, 32(4): 314-318. (in Chinese)
- [ 9 ] 屈旭光, 李齐发, 刘振山, 等. 牦牛、犏牛睾丸组织中 SYCP3 基因 mRNA 表达水平研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(8): 1132-1136. QU X G, LI Q F, LIU Z S, et al. The study on the expression level of SYCP3 mRNA in yak and cattle-yak testis [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(8): 1132-1136. (in Chinese)
- [10] GU Y, LI Q, PAN Z, et al. Molecular cloning, gene expression and methylation status analysis of PIWIL1 in cattle-yaks and the parental generation[J]. *Anim Reprod Sci*, 2013, 140(3-4): 131-137.
- [11] 金 帅, 郭 宪, 包鹏甲, 等. 牦牛和犏牛 Dmrt7 基因序列分析及其在睾丸组织中的表达水平[J]. 中国农业科学, 2013, 46(5): 1036-1043. JIN S, GUO X, BAO P J, et al. Sequence analysis and study on the expression level of Dmrt7 gene in yak and cattle-yak testis [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(5): 1036-1043. (in Chinese)
- [12] LUO H, ZHOU Y, LI Y, et al. Splice variants and promoter methylation status of the bovine vasa homology (*Bvh*) gene may be involved in bull spermatogenesis [J]. *BMC Genet*, 2013, 14(1): 58. doi: 10.1186/1471-2156-14-58.
- [13] 付 伟, 李彩霞, 刘文静, 等. 利用双向电泳-质谱技术鉴定牦牛和犏牛睾丸中的差异表达蛋白质[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2014, 40(1): 11-15. FU W, LI C X, LIU W J, et al. Identification of the differentially expressed testis proteins between yaks and cattle-yaks by two-dimensional electrophoresis combined with mass spectrometry [J]. *Journal of Southwest University for Nationalities, Natural Sci-*

- ence Edition, 2014, 40(1): 11-15. (in Chinese)
- [14] 邱翔, 林亚秋, 王国生, 等. 牦牛睾丸组织能量代谢相关酶活力的分析[J]. 四川动物, 2010, 29(5): 590-592. QU X, LIN Y Q, WANG G S, et al. Analysis of energy metabolism-related enzyme activities in yak testis tissue[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2010, 29(5): 590-592. (in Chinese)
- [15] JURIE C, ORTIGUES-MARTY I, PICARD B, et al. The separate effects of the nature of diet and grazing mobility on metabolic potential of muscles from Charolais steers[J]. *Livest Sci*, 2006, 104(1-2): 182-192.
- [16] MARCHAT L, LOISEAU P M, PETEK F. Purification and characterization of lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 2 from *Molinema dessetae* (Nematoda, Filarioidea) [J]. *Parasitol Res*, 1996, 82(8): 672-680.
- [17] BAI W L, YIN R H, ZHENG Y C, et al. Cloning and molecular characterization of a yak  $\alpha$ -lactalbumin cDNA from mammary tissue[J]. *Livest Sci*, 2010, 129(1-3): 122-128.
- [18] DING Y, XU Y O, LIN Y Q, et al. Cloning and expression profiles of yak lipoprotein lipase gene[J]. *J Applied Anim Res*, 2012, 40(4): 311-315.
- [19] KINGMA P B, BOK D, ONG D E. Bovine epidermal fatty acid-binding protein: determination of ligand specificity and cellular localization in retina and testis [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(10): 3250-3257.
- [20] MAEDA K, UYSAL K T, MAKOWSKI L, et al. Role of the fatty acid binding protein mall in obesity and insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2003, 52(2): 300-307.
- [21] FURUHASHI M, HOTAMISLIGIL G S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(6): 489-503.
- [22] AMORY J K, ARNOLD S, LARDONE M C, et al. Levels of the retinoic acid synthesizing enzyme aldehyde dehydrogenase-1A2 are lower in testicular tissue from men with infertility[J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(4): 960-966.
- [23] FUKASAWA M, ATSUZAWA K, MIZUTANI K, et al. Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation enzymes in rat testis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2010, 58(2): 195-206.
- [24] BAJPAI M, GUPTA G, JAIN S K. Lipid metabolising enzymes in isolated rat testicular germ cells and changes associated with meiosis[J]. *Andrologia*, 1998, 30(6): 311-315.
- [25] XIONG W, WANG H, WU H, et al. Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells [J]. *Reproduction*, 2009, 137(3): 469-479.
- [26] AMARAL A, CASTILLO J, ESTANYOL J M, et al. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(2): 330-342.
- [27] BAJPAI M, GUPTA G, SETTY B S. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat[J]. *Eur J Endocrinol*, 1998, 38(3): 322-327.
- [28] LOU Y N, LIU W J, WANG C L, et al. Histological evaluation and Prdm9 expression level in the testis of sterile male cattle-yaks[J]. *Livest Sci*, 2014, 160: 208-213.
- [29] JAMSHIDI J, POURESMAEILI F, DARVISH H, et al. FABP9 mutations are not detected in cases of infertility due to sperm morphological defects in Iranian men[J]. *Int J Fertil Steril*, 2014, 7(4): 275-280.
- [30] SELVARAJ V, ASANO A, PAGE J L, et al. Mice lacking FABP9/PERF15 develop sperm head abnormalities but are fertile[J]. *Dev Biol*, 2010, 348(2): 177-189.