

OCTN2 在 1 例正常生育男性附睾中的表达报告*

李东¹ 冯自卫¹ 毕学成¹ 沈志勇¹ 叶楚津¹
罗耀雄¹ 王怀鹏¹ 郑祥光¹ 刘久敏¹

[摘要] 目的:研究人类附睾有机阳离子转运子 2(OCTN2)的 mRNA 表达特征及蛋白表达特征,为进一步探讨附睾肉碱转运机制提供理论依据。方法:采用 RT-PCR 方法检测人类附睾组织头部、体部及尾部 OCTN2 基因的表达;并用 Westernblot 方法检测该基因在附睾中的蛋白表达,计算其在蛋白水平的相对表达量。结果:OCTN2 mRNA 在人附睾头、体、尾组织中均有 OCTN2 表达,表现为附睾头部表达较弱,而附睾体、尾部分表达丰富;OCTN2 蛋白在人附睾头部表达较弱,表达量为 (0.71 ± 0.09) ,附睾体、尾部分表达较丰富,表达量分别为 (0.95 ± 0.22) 与 (0.99 ± 0.15) 。结论:两种方法均证实有机阳离子转运子 2 在人类附睾中有表达,且呈现附睾头部表达较弱,附睾体、尾部分表达丰富的特征,为进一步研究附睾肉碱转运机制奠定基础。

[关键词] 人类附睾;OCTN2;蛋白表达;westernblot

[中图分类号] R69 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1420(2013)05-0383-03

Expression of OCTN2 in human epididymis and its significance

LI Dong FENG Ziwei BI Xuecheng XIAN Zhiyong YE Chujin LUO Yaoxiong
WANG Huaipeng ZHEN Xiangguang LIU Jiumin

(Department of Urology, Guangdong Academy of Medical Science, Guangdong General Hospital, Guangzhou, 510080, China)

Corresponding author: FENG Ziwei, E-mail: endourologic@126.com

Abstract Objective: To study the expression of OCTN2 mRNA and protein in human epididymis so as to provide a further theoretical basis for the mechanism of L-Carnitine transport. **Method:** We collected epididymides from a prostate cancer patient and determined the expressions of OCTN2 mRNA and its protein in the caput, corpus and cauda of the epididymis by RT-PCR and Westernblot and calculated the relative content of the protein. **Result:** OCTN2 Mrna was expressed in the caput, corpus and cauda of the epididymis and the expression level in the corpus and cauda of the epididymis were higher than in the caput. OCTN2 protein was also expressed in human epididymis and the relative content was (0.71 ± 0.09) in the caput of the epididymis. It was lower than the relative content (0.95 ± 0.22) and (0.99 ± 0.15) respectively in the corpus and cauda of the epididymis. **Conclusion:** The expression of OCTN2 mRNA and protein in human epididymis was certificated by RT-PCR and westernblot. They both indicated that the expression level was low in the caput of the epididymis and the expression level was high in the corpus and cauda of the epididymis. This conclusion will play an important role in the study of the mechanism of L-Carnitine transport.

Key words human epididymis; OCTN2; protein expression; westernblot

精子在睾丸中产生,进入附睾与附睾微环境中的分泌蛋白相互作用而发育成熟^[1],其在附睾中的成熟受到精子自身因素和附睾微环境的影响,而附睾微环境中的肉碱与精子的成熟密切相关^[2]。有机阳离子转运子 2(organic cation/carnitine transporter 2, OCTN2 或 SLC22A5)是目前已知高亲和力的肉碱运载体蛋白,是附睾转运肉碱的主要转运蛋白^[3~5]。迄今为止,关于 OCTN2 在人类附睾中的蛋白表达特性尚无报道,本研究拟通过对 OCTN2 在人类附睾中的 mRNA 表达特征和蛋白质表达特征进行研究,以进一步探讨人类附睾 OC-

TN2 对肉碱的转运机制,探究人类附睾精子的成熟机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2011 年 6 月~2012 年 6 月前来我院就诊的 4 名前列腺癌患者,年龄 75~83 岁,平均 79 岁。经广东省人民医院伦理委员会批准,并与患者签署知情同意书。取行去势手术时切下的附睾组织,去除外周组织,分离出附睾的头、体、尾三部分,再将头、体、尾各剪成三份,两份置于液氮罐中(分别用于提取组织总 RNA 及蛋白),迅速送回实验室置于一 80℃保存备用。第三份分别放入装有 2 ml 培养液的 3001 细胞培养皿中,用两根细针互相挤压研磨,直到组织完全破碎,精子全部释放到培养液中为

* 基金项目:广东省科技计划基金资助项目(编号 2010B080701090)

¹ 广东省人民医院泌尿外科(广州,510080)

通信作者:冯自卫, E-mail: endourologic@126.com

止,立刻在 100 倍倒置显微镜下检查,只发现 1 例患者附睾有较好的活动精子存在,遂将其标本用于后续研究。

1.2 试剂

Trizol 及蛋白上样缓冲液 NuPAGE LDS sample buffer 购于 Invitrogen 公司,兔多克隆抗 OCTN2 抗体购于 Epitomics 公司,HRP 标记抗兔二抗购于 Cell Signaling Technology 公司,引物由上海英潍捷基公司合成,PrimerScript RT Master 及 Premix Ex Taq 试剂盒购于 Takara 公司,蛋白酶抑制剂 Protease Inhibitor Cocktail Set I 购于 Merck 公司,Western 及 IP 细胞裂解液及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物科技有限公司,聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene difluoride PVDF) 购于 Millipore 公司,ECL 化学发光剂购于 Pierce 公司,其余生化试剂为国产分析纯。

1.3 仪器

高速冷冻离心机(Beckman 公司,德国),垂直电泳及电转装置(Bio-rad 公司,美国),核酸蛋白分析仪(Thermo 公司,美国),PTC-200 梯度 PCR 仪(MJ research 公司,美国),多通道酶标仪(Bio-tek 公司,美国)。

1.4 RT-PCR 检测人类附睾组织 OCTN2 mRNA 的表达

参照试剂说明书用 Trizol 法提取人体附睾头、体、尾组织总 RNA,用核酸蛋白分析仪测定所提取 RNA 的 A260/A280 的比值和浓度,−80℃保存备用。采用两步法 RT-PCR 检测 OCTN2 mRNA 表达。所用引物由上海英潍捷基公司合成。上游引物:5' GCTTACTTCATCCGAGACTGGC 3',下游引物:5' GGAAGGCACAACAATCCCATT 3',β-actin 作为内参照。按以下反应体系及反应程序进行 PCR 反应。PCR 反应体系为:Premix Ex Taq 12.5 μl,模板(逆转录产物)2 μl,上、下游引物各 1 μl(终浓度为 0.4 μmol),加 ddH₂O 至总体积为 25 μl。反应条件为:94℃ 5 min,(94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,30 循环),72℃ 10 min。反应结束后,将产物于 2% 琼脂糖凝胶中电泳,在紫外灯下观察产物条带情况。

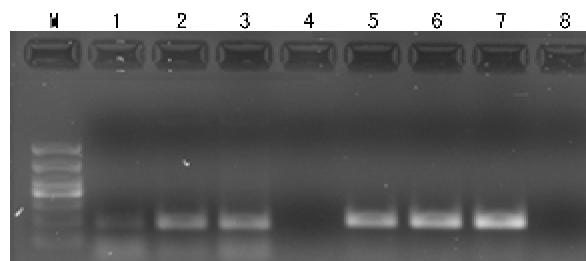
1.5 Western blot 检测人体附睾组织中 OCTN2 蛋白表达

参照说明书,分别取适量人附睾组织头、体、尾部分,按照每 20 mg 组织加入 100~200 μl 裂解液的比例加入裂解液,进行组织匀浆至充分裂解。裂解后以离心力 RCF≤12 000 g,4℃离心 12 min 收集上清蛋白液,采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白印迹杂交步骤包括:①组织蛋白上样 80 μg/孔,进行 SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。②在 200 mA 恒流条件下将蛋白质转移至 PVDF 膜上,转膜时

间 90 min。③抗原抗体反应:将 PVDF 膜在含 5% 牛奶的 TBST(Tris-Buffered Saline and Tween 20)中室温封闭 1 h。加入用封闭液稀释(1:200)的一抗,4℃冰箱过夜。取出转印膜以 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入封闭液稀释(1:1 000)的二抗,室温 1 h。取出转印膜以 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。采用 ECL 化学发光法进行显色反应。以 β-actin 作为内参,运用 Image J 1.39 U 软件分析目的条带与内参的光密度值,将目的条带光密度值/内参光密度值,得到经内参校正后各样品中目的蛋白的相对含量,利用该数值进行样品间的比较和分析,所有计量资料均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

在人类附睾头、体、尾组织总均抽提得到 A260/A280 的比值在 1.8~2.0 之间的总 RNA,表明其纯度符合实验要求。人类附睾头、体、尾组织中 OCTN2 mRNA 表达水平见图 1。结果显示,在人类附睾头、体、尾组织中均有 OCTN2 表达,表现为附睾头部表达较弱,而附睾体、尾部分表达丰富。表明 OCTN2 在人类附睾组织中的不同部位其表达水平不同。



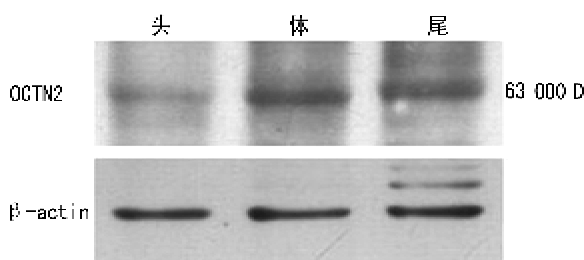
M:marker;1:附睾头部 mRNA 表达情况;2:附睾体部 mRNA 表达情况;3:附睾尾部 mRNA 表达情况;4、8:阴性对照;5、6、7:内参表达情况

图 1 RT-PCR 检测人类附睾组织中 OCTN2 mRNA 表达

人类附睾头、体、尾组织中 OCTN2 蛋白表达水平见图 2、图 3。结果显示,在 63 000 D 处能检测到 OCTN2 目的条带,表明在人类附睾头、体、尾组织中均有 OCTN2 蛋白表达,其中附睾头部该蛋白表达较弱,表达量为(0.71±0.09),附睾体、尾部分表达较丰富,表达量分别为(0.95±0.22)与(0.99±0.15)。

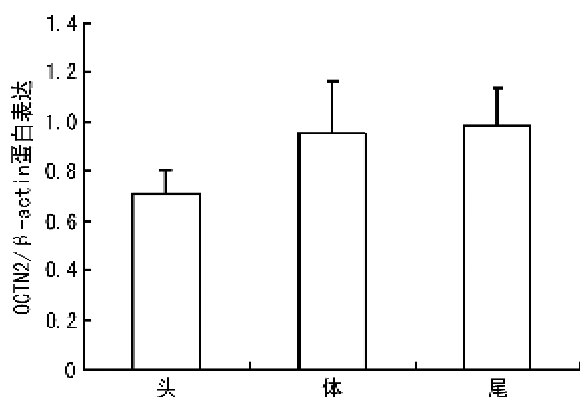
3 讨论

本研究明确了 OCTN2 在人类附睾组织不同部位的 mRNA 表达特征及蛋白表达特征。结果表明,人类附睾中存在 OCTN2 肉碱转运系统,OCTN2 在人类附睾组织的头、体、尾部的表达水平不同,从基因水平及蛋白水平一致表现为附睾头部的表达水平较低,体尾部的表达水平较高。另外,本



1~3泳道分别为来自人附睾组织头、体、尾部分的蛋白样品,目的条带分子量为63 000 D

图2 OCTN2蛋白印迹图



人附睾组织中头、体、尾部分OCTN2蛋白的相对表达量

图3 蛋白条带的灰度统计图

研究首次明确了OCTN2在人类附睾组织中的蛋白表达特征。

附睾是精子由发生到成熟一个极为重要的器官,它不仅是精子运行的通道,也是促进精子成熟主要的培育室。精子在附睾中的成熟是一个相当复杂的过程,不仅受到精子自身因素的影响,而且受到附睾微环境的影响,其中附睾内的肉碱与精子运动能力的获得密切相关^[2]。目前关于附睾OCTN2肉碱转运方面的研究主要集中在大鼠等试验动物方面,人类附睾肉碱转运的研究较少。曾有研究表明^[6],人类附睾组织中存在OCTN2 mRNA的表达,但尚未见OCTN2在人类附睾中蛋白质的表达特征报道,其作用机制仍然未知。本研究成功阐述了OCTN2在人类附睾组织中的蛋白表达特性,弥补了当前研究的空白,希望能为进一步研究OCTN2在人类附睾中的转运机制提供新的思路。

目前,不育问题对人类的困扰日趋严重,据WHO预测,大约15%的夫妇存在着不育问题,其中男性因素约占一半^[1]。世界范围内男性的精子数量与运动明显下降,男性不育症发病率逐年上

升^[3]。精子成熟障碍是引起男性不育的重要原因之一,临床证实^[8~10],肉碱在促进精子成熟方面发挥着重要作用,同时人类附睾依赖OCTNs转运系统将肉碱转运至附睾管,为精子运动提供能量,促进精子成熟^[3]。

本研究希望后期通过逐渐扩大样本量,进一步的研究不育男性附睾不同部位OCTN2的表达差异及相关因素,进一步深入研究附睾肉碱转运机制,在基因表达水平及蛋白表达水平揭示精子在附睾中的成熟机制,为临床不育症的诊断及治疗,也为研制有效的男性避孕药物提供依据。

[参考文献]

- 1 刘美君,李建远,王海燕. 附睾分泌蛋白与精子成熟的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(5): 457-460.
- 2 De Rosa M, Boggia B, Analfi B, et al. Correlation between seminal carnitine and functional spermatozoal characteristics in men with semen dysfunction of various origins[J]. Drugs R D, 2005, 6: 1-9.
- 3 Gazouli M, Mantzaris G, Archimandritis A J, et al. Single nucleotide polymorphisms of OCTN1, OCTN2, and DLG5 genes in Greek patients with Crohn's disease[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11: 7525-7530.
- 4 Bene J, Magyari L, Talián G, et al. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12: 5550-5553.
- 5 Kobayashi D, Irokawa M, Maeda T, et al. Carnitine/organic cation transporter OCTN2-mediated transport of carnitine in primary-cultured epididymal epithelial cells[J]. Reproduction, 2005, 130: 931-937.
- 6 龚东明,李铮,朱晓斌,等. 有机阳离子转运子2在人类附睾中的表达及其意义[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(3): 242-244.
- 7 王一飞主编. 人类生殖生物学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2005: 1-5.
- 8 王胜,钟影,吴东,等. 应用复方左旋肉碱在卵细胞胞质内单精子注射治疗男性不育中的临床观察[J]. 中华男科学杂志, 2011, 17(4): 366-367.
- 9 唐凌峰,姜辉,商学军,等. 精浆左旋肉碱与精子密度、活力和活动率关系的研究[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(8): 704-708.
- 10 陈怀瑾,陈廷. 左旋肉碱和乙酰左旋肉碱复合制剂对特发性弱精子症精子质量的影响[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(2): 149-151.

(收稿日期:2013-03-03)