论文

牦牛精子发生阻滞的比较转录组研究

曾贤彬^①, 柴志欣^①, 王永^①, 马志杰^②, 杨琴^①, 宋乔乔^①, 钟金城^{①*}^① 西南民族大学青藏高原研究院, 动物遗传育种学国家民委-教育部共建重点实验室, 成都 610041;^② 青海省畜牧兽医科学院畜牧研究所, 西宁 810016

* 联系人, E-mail: zhongjincheng518@126.com

收稿日期: 2014-03-31; 接受日期: 2014-04-22; 网络版发表日期: 2014-06-04

国家科技支撑计划(批准号: 2012BAD13B06)和西南民族大学研究生学位点建设项目(批准号: 2012XWD-S071007)资助

doi: 10.1360/N052013-00078

摘要 牦牛是牦牛与普通牛的杂交后代, 其雄性不育是牦牛杂交改良中的一大难题. 运用高通量测序技术对健康成年牦牛和牦牛的睾丸组织进行转录组测序和比较研究, 探讨了牦牛激素调节、精子发生及细胞凋亡等相关基因的表达情况. 结果表明, 牦牛、牦牛睾丸组织中分别有 17784 和 18529 个基因表达, 在牦牛中表达显著上调和下调的基因分别有 5000 和 4089 个. 牦牛睾丸组织中睾酮合成相关基因和抑制素基因表达均显著上调, 认为前者的表达上调可能促进睾丸内睾酮分泌和后者的表达, 而后者的表达上调可能分别抑制和几乎不影响脑垂体前叶合成、分泌促卵泡刺激素和黄体生成素. 比较睾丸组织中细胞标记基因在两种牛间的表达差异, 发现牦牛精原干细胞、支持细胞、间质细胞、肌样细胞(睾丸纤维化)和已分化精原细胞的标记基因分别呈显著表达上调和下调, 而减数分裂后期或精子形成期呈极显著下调. 精原干细胞自我更新与分化异常可能导致牦牛精子发生障碍, 认为其与视黄酸信号通路障碍密切相关. *Syce3*, *Fkbp6* 和 *Dmrt7* 等在牦牛睾丸组织中极显著表达下调与同源染色体间、尤其是性染色体间的联会复合体数量减少有关. *Spo11* 和 *Dmc1* 分别参与双链断裂和同源修复过程, 其在牦牛睾丸中表达下调分别可能使联会复合体减少和同源修复失常. 参与高度浓缩细胞核的相关基因, 尤其是 *Tnp2*, *Hmgb4* 和 *Hlfnt* 等几乎不表达, 其调控表达基因 *Crem*, *GRTH/DDX25* 等极显著表达下调, 该现象与牦牛生精细胞最终只能分化至圆形精子细胞阶段的结果相符. 促凋亡相关基因, 如 *p53*, *TNF- α* , *Trail*, *Bmp8b*, *Bax*, *Caspase-3*, *Caspase-6* 和 *Caspase-7* 表达均显著上调, 而抑凋亡基因, 如 *survivin*, *Bcl-2* 等显著下调, 这可能是导致牦牛睾丸组织中有更多的生精细胞发生凋亡的原因之一. 通过对生殖相关基因的表达分析研究, 为揭示牦牛雄性不育机理以及牦牛杂交改良研究提供了理论基础.

关键词

牦牛
牦牛
睾丸
转录组
精子发生

牦牛(*Bos grunniens*)是分布于青藏高原及其毗邻地区海拔 3000 m 以上高山草原上的特有牛种, 是青藏高原高寒牧区人民赖以生存的生产和生活资料,

具有适应力强、肉质好、用途广泛等优点. 但牦牛生长速度较慢, 生产性能较低. 为了提高牦牛业的经济效益, 人们采用普通牛与牦牛进行杂交, 杂种一代

引用格式: 曾贤彬, 柴志欣, 王永, 等. 牦牛精子发生阻滞的比较转录组研究. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 584–601

Zeng X B, Chai Z X, Wang Y, et al. Comparative transcriptome analysis of spermatogenesis arrest in cattle-yak. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 584–601, doi: 10.1360/N052013-00078

(F₁)犏牛表现出很强的杂种优势: 生长发育快、早熟, 适应范围扩大, 世代间隔缩短, 奶、肉、役力等大幅度提高. 但 F₁ 代雄犏牛不育, 限制了杂种优势的利用和新品种的培育^[1].

国内外学者对犏牛雄性不育的机理做了大量研究. 在生理解剖和组织形态学方面, 刘辉等人^[2,3]和罗晓林等人^[4,5]发现, F₁ 代雄性犏牛垂体中分泌促卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)的嗜碱性细胞存在差异, 分泌黄体生成素(luteinizing hormone, LH)的细胞与亲本的特征基本一致, 且血液中 LH、睾酮(testosterone, T)等激素水平和第二性征等均正常^[2~5]. 与牦牛的睾丸比较发现 F₁ 代雄性犏牛的睾丸、生精小管管径均更小且内部、白膜上的血管均减少以及界膜增厚等^[6,7]. 赵善廷等人^[7]和夏洛浚等人^[8]发现, F₁ 代雄性犏牛睾丸组织中各级生精细胞数均减少且出现较多的退化现象(主要是次级精母细胞退化)、精子发生只达到早期精细胞阶段(1~3 期早期精细胞)以及支持细胞数增多等. 在细胞遗传学研究方面, 通过对染色体形态及带型分析发现, 牦牛与普通牛的部分常染色体(尤其是第 1, 2, 27 号染色体)、Y 染色体在结构上存在差异^[9~13]. 胡欧明等人^[14,15]观察犏牛的联会复合体(synaptonemal complex, SC)发现, 仅有少数精母细胞的常染色体能形成 SC 结构, 出现三价体、插入环等异常现象, X 和 Y 染色体间没有明显的联会行为.

犏牛雄性不育的分子机制研究尚处于初步阶段, 目前, 主要包括克隆与精子发生相关的少量候选基因及分析其与亲本间的表达差异^[16~25]. Elsik^[26]和 Qiu^[27]等人相继公布了普通牛和牦牛基因组序列. 本研究选取健康成年犏牛和牦牛的睾丸组织, 依托 Illumina HiSeq™ 2000 测序平台获得两者的转录组表达谱, 首次从转录组学角度探讨牦牛与犏牛在激素调节、精子发生及细胞凋亡等过程的差异. 为进一步研究犏牛雄性不育机制、利用杂种优势和培育新品种等提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 实验动物

在青海省同德县河北乡金科村选取健康成年犏牛、牦牛各 5 头, 采集睾丸组织, 迅速放入液氮中保

存, 带回实验室备用.

1.2 总 RNA 提取与测序

用 RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒(Qiagen, 德国)分别提取 10 头牛的睾丸总 RNA, 制成犏牛、牦牛 2 个总 RNA 样品(每个样品为 5 头牛的睾丸总 RNA 按等浓度混合而成); DNase I 消化样品中的 DNA, Agilent 2100 Bioanalyzer(美国)质检合格(A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.8~2.2, 28S/18S>1.0, 浓度≥400 ng/μL, 总量≥20 μg, RIN(RNA integrity number)值≥6.5); 用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA, 加入打断试剂, 在恒温混匀仪中适温将 mRNA 打断成短片段; 以打断后的 mRNA 为模板, 6 碱基随机引物(random hexamers)为引物, 用 SuperScript™ II RT 试剂盒(Invitrogen, 美国)合成第一链 cDNA; 加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I (Invitrogen, 美国)合成第二链 cDNA; cDNA 双链合成后, 按照 Illumina 公司(美国)的操作手册, 构建双末端测序文库. 构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 ABI Step One Plus Real-time PCR System(美国)质检合格后, 用 Illumina HiSeq™ 2000 测序仪(美国)进行测序.

1.3 序列数据注释

由 Illumina HiSeq™ 2000 测序得到海量的原始数据(raw reads); 随后进行去除含接头、N 比例大于 5%和低质量(质量值 Q≤10 的碱基数占整条 read 的 30%以上)的 reads 等质控过程; 质控过滤得到的干净数据(clean reads)经 SOAPaligner/SOAP2^[28]将其比对到普通牛的参考基因组及普通牛或人的参考基因序列. 比对到某基因的 clean reads 中, 若至少有 1 条与参考基因唯一比对(unique match), 则将该参考基因定义为一个表达基因.

1.4 基因表达谱分析

基因表达量以每个基因单位长度序列数的 RPKM(reads per kilobase of exon model per million mapped reads)值^[29]来衡量. 用程序包中的 DEGseq 程序中的 MARS(MA-plot-based method with random sampling model)模型计算每个基因的 RPKM 值. 若 RPKM 值大于 1000, 认为是高表达基因. 统计基因的表达差异状况, 设置 FDR(false discovery rate)<0.001, 且|log₂ 比值(犏牛/牦牛 RPKM 值)|≥1 筛选出的基因

为显著差异表达基因. 用 GO(gene ontology)数据库对表达显著差异的基因进行 GO 注释, 然后将其按细胞组分、分子功能和生物过程等类别聚类^[30,31].

2 结果与分析

2.1 测序数据注释

经 Illumina HiSeq™ 2000 测序, 在犏牛、牦牛睾丸组织的总 mRNA 中各获得 51519136 和 53385024 条 clean reads. 将此与 UCSC 基因组数据库 (<http://genome.ucsc.edu/>) 中普通牛参考基因组以及普通牛或人的参考基因比对, 结果显示, 比对到参考基因组的序列数, 在犏牛和牦牛文库中分别有 29532720 和 31038326 条, 其中唯一比对的序列有 27983324 和 29853309 条, 占产出序列的 54.32%和 55.92%(表 1); 比对到参考基因的 reads 数, 在犏牛和牦牛文库中分别有 18768216 和 23024575 条, 其中唯一比对的序列分别有 18000468 和 22504373 条, 占产出序列的 34.94%和 42.15%(表 2).

2.2 犏牛、牦牛睾丸组织的基因表达谱

犏牛、牦牛睾丸组织中分别有 17784 和 18529

个表达基因, 2 种牛中共同表达的有 17120 个基因(网络版附表 1). 统计犏牛和牦牛睾丸组织中不同表达水平的基因数量, 结果显示(图 1), RPKM 值为 0~10 的基因数占对应文库的 52%和 54%, 大于 100 的基因数占 13%和 12%, 而大于 10000 的基因在犏牛、牦牛文库中分别有 2 和 1 个, 为 *Ins13*(Leydig insulin-like peptide), *Cst9*(Cystatin-9)和 *Ubc*(Ubiquitin C).

犏牛、牦牛睾丸组织中高表达(RPKM 值大于 1000)的基因数分别有 103 和 60 个(图 2, 网络版附表 2), 占文库的 0.58%和 0.32%. 在两文库中均高表达的基因有 33 个, 发现 23 个显著差异表达基因, 且除 *Ubc* 外均在犏牛睾丸组织中表达显著上调. 唯一在犏牛或牦牛文库中高表达的基因在两文库间均显著差异表达. 犏牛睾丸组织中显著下调的高表达基因有 *Hmgb4*(High mobility group protein B4), *Tnp2*(Nuclear transition protein 2), *Msy2*(Y-box-binding protein 2), *Hspb9*(Heat shock protein beta-9), *H3.3*(Histone H3.3), *Odj2*(Outer dense fiber protein 2), *CsdA*(Cysteine sulfinate desulfonase CsdA), *Dkk1*(Dickkopf-like 1)和 *Ubc* 等. 犏牛睾丸组织中表达显著上调的基因有 *Eef1a1*(Elongation factor 1-alpha 1), *Igf1bp7*(Insulin-like growth factor-binding protein 7)及 52 个核糖体大小亚基基因等.

表 1 犏牛和牦牛测序数据比对参考基因组的注释统计

数据	犏牛	牦牛
干净数据序列数	51519136	53385024
核苷酸数	4636722240	4804652160
比对到参考基因组的序列数	29532720(57.32%)	31038326(58.14%)
未比对到参考基因组的序列数	21986416(42.68%)	22346698(41.86%)
完全比对的序列数	18160128(35.25%)	22259392(41.70%)
不多于 5 个错配位点的序列数	11372592(22.07%)	87789341(6.44%)
唯一比对的序列数	27983324(54.32%)	29853309(55.92%)
多位点比对的序列数	1549396(3.01%)	1185017(2.22%)

表 2 犏牛和牦牛测序数据比对参考基因的注释统计

数据	犏牛	牦牛
干净数据序列数	51519136	53385024
核苷酸数	4636722240	4804652160
比对到参考基因的序列数	18768216(36.43%)	23024575(43.13%)
未比对到参考基因的序列数	32750920(63.57%)	30360449(56.87%)
完全比对的序列数	13085807(25.40%)	17997206(33.71%)
不多于 5 个错配位点的序列数	5682409(11.03%)	5027369(9.42%)
唯一比对的序列数	18000468(34.94%)	22504373(42.15%)
多位点比对的序列数	767748(1.49%)	520202(0.97%)

图 1 犏牛和牦牛睾丸组织基因表达量分布

图 2 牦牛与犏牛睾丸组织中高表达基因数

↑: 在犏牛睾丸组织中表达显著上调; ↓: 在牦牛睾丸组织中表达显著下调; —: 表达无显著差异

图 3 犏牛和牦牛睾丸组织显著差异表达基因数

2.3 表达差异基因 GO 分类

比较犏牛和牦牛睾丸组织的表达谱发现, 在前者中表达显著上调、下调的基因分别有 5000 和 4089 个(图 3, 网络版附表 3), 其中有 7864 个被 GO 注释. 注释数据经聚类显示(图 4), 犏牛睾丸组织中表达显著上调的基因在细胞组成(cell, cell part)、细胞器(organelle, organelle part)、大分子复合物(macromolecular complex)、结合(binding)、催化活性(catalytic activity)、生物调节(biological regulation)、细胞过程(cellular process)、发育过程(development process)、代谢过程(metabolic process)、多细胞生物过程(multicellular organismal process)、细胞组分组织(cellular component organization)、色素沉着(pigmentation)、定位建立(establishment of localization)、定位(localization)和应激反应(response to stimulus)类别下富集(>10%); 表达显著下调的基因还在膜腔封闭(membrane-enclosed lumen)和免疫系统过程(immune system process)类别下有富集(>10%).

2.4 睾丸特异性细胞中细胞标记物表达差异分析

本研究分析犏牛和牦牛睾丸组织中生精细胞标

志物的差异表达. 精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)有众多细胞标记物基因^[32-35], 如 *Foxo1* (Forkhead box protein O1), *Cd34* (Hematopoietic progenitor cell antigen CD34), *Cd9*, *Thy1* (Thy-1 membrane glycoprotein), *Gfral* (GDNF family receptor alpha 1), *Ptpcr* (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C), *Gpr125* (Probable G-protein coupled receptor 125), *C-kit* (Kit oncogene), *Itgb1* (Integrin beta-1), *Itga5* (Integrin alpha 5) 和 *Itga6* (integrin alpha-6) 等. 在犏牛睾丸组织中, 除 *Itga5* 外, 其他基因表达均显著上调(表 3). 在 *Stra8* (Stimulated by retinoic acid gene 8 protein), *Figla* (Factor in the germline alpha), *Scp3* (Synaptonemal complex protein 3), *Usp26* (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 26), *Ddx4* (Probable ATP-dependent RNA helicase DDX4), *Tktl1* (Transketolase-like protein 1), *Stk31* (Serine/threonine-protein kinase 31), *Nxf2* (Nuclear RNA export factor 2), *Fthl17* (Ferritin heavy polypeptide-like 17), *Tex11* (Testis-expressed sequence 11 protein), *Tex12* (Testis-expressed sequence 12 protein), *Tex15* (Testis-expressed sequence 15 protein) 和 *Tdrd1* (Tudor domain-containing protein 1) 等分化精原细胞的标记基因中^[35-37], *Stra8*, *Usp26*, *Tktl1*, *Tex11* 和 *Stk31* 在两种牛中的表达

均无显著差异, *Figla*, *Scp3*, *Ddx4*, *Fthl17*, *Nxf2*, *Tex12*, *Tex15* 和 *Tdrd1* 在犏牛睾丸中的表达显著下调(表 3). *Tenr*(Adenosine deaminase domain-containing protein 1), *Pgk2*, *Gapds*(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific), *Spef2*(Sperm flagellar protein 2), *Ldch*(L-lactate dehydrogenase C chain), *Tnp2*, *CatSper1*(Cation channel sperm-associated protein 1)和 *Klhl10*(Kelch-like protein 10)等减数分裂后期或精子发生期的特异标志基因^[38-41], 在犏牛睾丸中的表达均极显著下调(表 3).

在非生精细胞中, 除参与睾酮合成的基因, 如 *Star*(Steroidogenic acute regulatory protein), *Hsd3b6*(3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase VI), *Cyp11a1*(Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1)和 *Cyp17a1*(Cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1)外, 间质细胞的标记基因^[42-45]还有 *Lhcgr*(Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor), *Hsd3b1*(3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1), *Insl3*, *Vcam1*(Vascular cell adhesion protein 1)和 *Thbs2*(Thrombospondin 2)等; 在犏牛睾丸中, 除

Vcam1 和 *Thbs2* 基因外, 其余表达均显著上调(表 3). *Vim*(Vimentin), *Shbg*(Sex hormone binding globulin), *Amh*(Anti-Müllerian hormone), *Fshr*(Follicle stimulating hormone receptor), *Wt1*(Wilms tumor 1 homolog), *Trf*(transferrin), *Krt18*(Keratin 18), *Srrm2*(Serine/arginine repetitive matrix protein 2), *SOX9*(Sry-box containing gene 9), *Testin*, *Gata-1*(GATA binding protein 1)和 *Claudin 11* 等支持细胞标记物基因^[45-49], 除 *Shbg*, *Gata-1*, *Sox9* 和 *Testin* 外, 在犏牛睾丸中表达均显著上调(表 3). *Acta2*(Actin alpha 2), *Collagen 4-a1* 和 *Collagen 4-a2* 等睾丸中肌样细胞的标记基因^[50]在犏牛睾丸中表达也显著上调(表 3).

2.5 犏牛、牦牛睾丸组织精子发生相关基因表达分析

精子发生过程由 3 个阶段组成, 即 SSCs 的自我更新与分化、减数分裂和精子形成, 任一阶段受阻均会使精子发生阻滞在特定时期. 本研究分析了 SSCs 的自我更新与分化、减数分裂和精子形成相关基因的表达差异状况. 抑制 SSCs 分化或促进 SSCs 自我更新

图 4 犏牛与牦牛显著差异表达基因的 GO 分类

1: 胞外; 2: 细胞; 3: 膜腔封闭; 4: 包膜; 5: 大分子复合物; 6: 细胞器; 7: 胞外部分; 8: 细胞器部分; 9: 突触部分; 10: 细胞部分; 11: 突触; 12: 繁殖; 13: 细胞组分的合成; 14: 发育过程; 15: 细胞组分组织; 16: 死亡; 17: 繁殖过程; 18: 免疫系统过程; 19: 应激反应; 20: 多细胞生物过程; 21: 结构形成; 22: 涉及多个有机体的过程; 23: 定位的建立; 24: 黏附; 25: 代谢过程; 26: 病毒繁殖; 27: 节律过程; 28: 色素沉着; 29: 运动; 30: 定位; 31: 生长; 32: 细胞过程; 33: 细胞坏死; 34: 生物调节; 35: 催化活性; 36: 结构分子活性; 37: 运输活性; 38: 结合; 39: 电子载体活性; 40: 辅助转运蛋白; 41: 抗氧化活性; 42: 金属伴侣; 43: 酶调节活性; 44: 翻译调节活性; 45: 蛋白标签; 46: 趋化因子活性; 47: 转录调节活性; 48: 生长导向因子活性; 49: 分子传感器活性. 1~11 涉及细胞组成, 12~34 涉及生物学功能, 35~49 涉及分子功能

表 3 犏牛和牦牛睾丸中特异细胞标记物的差异表达

	RPKM 值		log ₂ 比值	上/下调	FDR 值
	犏牛	牦牛			
精原干细胞 ^[32-35]					
<i>Foxo1</i>	70.92	21.59	1.72	上调	6.61×10 ⁻¹⁶⁶
<i>Cd34</i>	52.84	17.42	1.60	上调	3.84×10 ⁻⁹³
<i>Cd9</i>	328.52	108.60	1.60	上调	0
<i>Thy1</i>	86.19	20.02	2.11	上调	1.65×10 ⁻⁹⁷
<i>Gfra1</i>	7.07	1.73	2.03	上调	2.22×10 ⁻¹⁶
<i>Ptprc</i>	20.71	6.47	1.68	上调	1.72×10 ⁻¹⁰⁴
<i>Gpr125</i>	35.23	9.42	1.90	上调	1.53×10 ⁻²⁷²
<i>C-kit</i>	36.28	8.99	2.01	上调	1.53×10 ⁻²³⁰
<i>Itgb1</i>	176.27	66.47	1.41	上调	0
<i>Itga5</i>	7.76	7.07	0.13	上调	2.00×10 ⁻¹
<i>Itga6</i>	15.56	5.71	1.45	上调	0
分化的精原细胞 ^[35-37]					
<i>Stra8</i>	4.88	7.96	-0.71	下调	5.85×10 ⁻⁵
<i>Figla</i>	0.15	0.61	-2.00	下调	2.53×10 ⁻¹
<i>Scp3</i>	7.50	21.44	-1.51	下调	1.49×10 ⁻²²
<i>Usp26</i>	3.47	6.22	-0.84	下调	2.34×10 ⁻¹⁰
<i>Ddx4</i>	19.67	89.88	-2.19	下调	0
<i>Tktl1</i>	190.01	138.39	0.46	上调	8.65×10 ⁻⁶⁸
<i>Stk31</i>	14.76	20.05	-0.44	下调	4.08×10 ⁻¹²
<i>Nxf2</i>	7.91	19.78	-1.32	下调	5.24×10 ⁻⁴²
<i>Fthl17</i>	3.02	7.57	-1.33	下调	5.67×10 ⁻⁶
<i>Tex11</i>	43.13	38.60	0.16	上调	3.16×10 ⁻⁴
<i>Tex12</i>	2.09	7.76	-1.89	下调	1.16×10 ⁻⁶
<i>Tex15</i>	7.76	19.79	-1.35	下调	8.88×10 ⁻¹⁹⁵
<i>Tdrd1</i>	11.64	54.17	-2.22	下调	0
减数分裂和减数分裂后生殖细胞 ^[38-41]					
<i>Tenr</i>	4.06	197.47	-5.6	下调	0
<i>Pgk2</i>	361.23	0.40	-9.82	下调	0
<i>Gapds</i>	6.46	890.66	-7.11	下调	0
<i>Spef2</i>	0.49	17.71	-5.17	下调	0
<i>Ldch</i>	99.49	2.52	-5.31	下调	0
<i>Tnp2</i>	0.69	3431.18	-12.27	下调	0
<i>CatSper1</i>	0.18	37.97	-7.69	下调	0
<i>Klhl10</i>	0.06	146.03	-11.23	下调	0
间质细胞 ^[42-45]					
<i>Star</i>	535.86	79.5	2.75	上调	0
<i>Insl3</i>	25323.21	4496.26	2.49	上调	0
<i>Cyp11a1</i>	131.05	13.62	3.27	上调	0
<i>Lhcgr</i>	51.04	6.97	2.87	上调	0
<i>Hsd3b1</i>	70.86	11.40	2.64	上调	1.26×10 ⁻²⁸²
<i>Hsd3b6</i>	70.86	11.40	2.64	上调	1.26×10 ⁻²⁸²
<i>Cyp17a1</i>	158.46	13.19	3.59	上调	0
<i>Thbs2</i>	3.36	6.91	-1.04	下调	1.68×10 ⁻¹⁷
<i>Vcam1</i>	2.65	2.12	0.32	上调	1.28×10 ⁻¹
支持细胞 ^[45-49]					
<i>Vim</i>	1031.27	213.25	2.27	上调	0
<i>Shbg</i>	39.20	22.62	0.79	上调	3.03×10 ⁻²⁵
<i>Amh</i>	638.59	83.89	2.93	上调	0
<i>Fshr</i>	67.47	18.26	1.89	上调	9.75×10 ⁻²⁶⁰

(续表 3)

	RPKM 值		log ₂ 比值	上/下调	FDR 值
	犏牛	牦牛			
<i>Trf</i>	195.29	51.18	1.93	上调	0
<i>Wt1</i>	141.74	46.16	1.62	上调	1.20×10 ⁻²⁶⁹
<i>Krt18</i>	33.99	7.47	2.19	上调	2.21×10 ⁻¹¹⁰
<i>Claudin 11</i>	626.85	238.06	1.40	上调	0
<i>Srrm2</i>	7811.22	2511.45	1.64	上调	0
<i>Sox9</i>	9.86	11.07	-0.17	下调	2.18×10 ⁻¹
<i>Testin</i>	13.51	189.12	-3.81	下调	0
<i>Gata-1</i>	0.00	0.11	-6.75	下调	2.25×10 ⁻¹
肌样细胞 ^[50]					
<i>Acta2</i>	1088.23	243.45	2.16	上调	0
<i>Collagen 4-a1</i>	134.71	17.56	2.94	上调	0
<i>Collagen 4-a2</i>	85.21	9.45	3.17	上调	0

的基因^[51], 如 *Gdnf*(Glial cell line-derived neurotrophic factor), *Igf1*(Insulin-like growth factor I)和 *Igf2*(Insulin-like growth factor II)等支持细胞分泌基因以及未分化的精原细胞中表达的 *N-myc*(N-myc proto-oncogene protein), *Taf4b*(TATA-binding protein-associated factor 4b)及 *Plzf*(Promyelocytic leukemia zinc-finger protein)等, 除 *Taf4b* 外, 其余基因在犏牛睾丸组织中表达均显著上调(表 4)。在犏牛睾丸组织中, *Scf*(Stem cell factor)和 *C-kit* 基因均表达上调, 合成视黄酸(retinoic acid, RA)的相关酶类及 RA 下游基因^[52-55], 如 *Raldh2*(Retinal dehydrogenase 2), *Rdh5*(11-*cis* retinol dehydrogenase), *Dmc1*(Dosage suppressor of mckhomolog), *Stra8*(Stimulated by retinoic acid gene 8 protein)和 *Scp3* 等均表达下调, *Stra8* 表达的抑制因子基因 *Nanos2*^[56]和 RA 代谢酶基因 *Cyp26b1*(Cytochrome P450 26B1)均表达显著上调(表 4, 图 5)。

在联会复合体组成及同源染色体重组的相关基因中, 联会复合体的主要组成基因^[57], 如 *Scp3*, *Scp2*, *Scp1*, *Syce3*(Synaptonemal complex central element protein 3)等在犏牛睾丸组织中表达显著下调。与同源染色体重组过程相关的基因^[57], 如 *Spo11*(Meiotic recombination protein SPO11), *Dmc1*, *Rad50*(DNA repair protein Rad50), *Rad51*, *Rad52*, *Rad54* 和 *Rdh54* 等, 除 *Rad50*, *Rad51*, *Rad52*, *Rad54* 和 *Rdh54* 外, *Spo11* 和 *Dmc1* 在犏牛睾丸组织中表达下调(表 4)。

精子发生相关基因中, *Tnp1*(Spermatid nuclear transition protein 1), *Izumo1*(Izumo sperm-egg fusion protein 1), *Ace*(Angiotensin-converting enzyme), *Tesk1*

(Dual specificity testis-specific protein kinase 1), *Tekt5*(Tektin-5), *Pgk2*(Phosphoglycerate kinase 2), *Tnp2*, *Tssk6*(Testis-specific serine/threonine-protein kinase 6), *Adcy10*(Adenylate cyclase type 10), *Prm3*(Protamine-3), *Akap4*(A-kinase anchor protein 4), *Kcnul1*(Potassium channel subfamily U member 1), *Camk4*(Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV), *Pcsk4*(Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4), *Pgk2*(Phosphoglycerate kinase 2), *Catsper3*(Cation channel sperm-associated protein 3), *Catsper4*(Cation channel sperm-associated protein 4), *Ldch* 和 *H1fnt*(Testis-specific H1 histone)等均受转录因子 *Crem* 调节表达^[58-60](表 4)。在犏牛睾丸组织中, 参与诱导 *Crem* 表达的睾丸组织特异基因 *Act*(Activator of CREM in testis)及 *Crem* 下游基因几乎都极显著下调表达, 其中, *Tnp1*, *Kcnul1*, *Prm3*, *Pgk3* 和 *H1fnt* 等不表达或低表达。

2.6 犏牛、牦牛睾丸中细胞凋亡基因表达分析

在犏牛、牦牛睾丸中, 促凋亡基因^[61], 如 *p53*, *FasL*, *Fas*, *TNF-α*(Tumor necrosis factor-α), *Trail*(Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10), *Bmp8b*(Bone morphogenetic protein 8B), *Bax*, *Caspase-3*, *Caspase-6* 和 *Caspase-7* 等, 除 *Caspase-3* 基因(FDR 值>0.001)外, 其余基因在犏牛睾丸组织中均表达显著上调(表 4)。而抗凋亡基因^[61], *Bcl-2* 和 *survivin* 在犏牛睾丸组织中表达均显著下调, *Scf* 和 *C-kit* 基因表达显著上调(表 4)。

2.7 犏牛、牦牛支持细胞和间质细胞基因表达分析

成年睾丸组织中有大量的间质细胞和支持细胞,

表 4 犏牛和牦牛睾丸中与生殖相关基因的差异表达

	RPMK 值		log ₂ 比值	上/下调	FDR 值
	牦牛	犏牛			
高表达基因					
<i>Hspb9</i>	2379.57	1.41	-10.72	下调	0
<i>Msy2</i>	2568.08	3.92	-9.35	下调	0
<i>CsdA</i>	2591.47	115.71	-4.49	下调	0
<i>Odf2</i>	1052.49	31.08	-5.08	下调	3.42×10 ⁻²⁵⁵
<i>Hmgb4</i>	1103.22	0.38	-11.50	下调	0
<i>Dkk1</i>	1649.81	21.19	-6.28	下调	0
<i>Eef1a1</i>	1629.47	4727.90	1.54	上调	0
<i>Igfbp7</i>	255.05	1691.00	2.73	上调	0
SSCs 自我更新及分化 ^[51-56]					
<i>Gdnf</i>	0.66	2.14	1.70	上调	1.23×10 ⁻³
<i>Plzf</i>	5.94	25.78	2.12	上调	2.99×10 ⁻¹²²
<i>Taf4b</i>	18.85	31.90	0.76	上调	1.17×10 ⁻³⁹
<i>N-myc</i>	5.78	34.16	2.56	上调	1.73×10 ⁻¹⁴⁰
<i>Col1a2</i>	28.64	226.71	2.98	上调	0
<i>Tpt1</i>	240.59	878.06	1.87	上调	0
<i>NuMA1</i>	44.98	102.82	1.19	上调	0
<i>Med1</i>	63.26	26.12	-1.28	下调	0.00
<i>Ccnd1</i>	6.94	23.72	1.77	上调	4.39×10 ⁻⁴⁰
<i>Scf</i>	3.18	9.46	1.57	上调	4.68×10 ⁻¹³
<i>Raldh2</i>	189.84	55.16	-1.78	下调	0
<i>Rdh5</i>	0.09	0.00	-6.54	下调	3.84×10 ⁻¹
<i>Nanos2</i>	0.21	2.80	3.71	上调	5.43×10 ⁻⁶
减数分裂 ^[57]					
<i>Scp2</i>	19.49	2.68	-2.86	下调	1.35×10 ⁻²⁷⁸
<i>Syce3</i>	262.29	11.24	-4.54	下调	0
<i>Scp1</i>	17.40	6.78	-1.36	下调	1.83×10 ⁻⁶³
<i>Fkbp6</i>	436.64	40.08	-3.45	下调	0
<i>Spo11</i>	3.12	0.73	-2.10	下调	1.56×10 ⁻⁹
<i>Dmc1</i>	25.43	3.00	-3.08	下调	1.22×10 ⁻⁸⁹
<i>Rad51</i>	14.90	13.73	-0.12	下调	3.73×10 ⁻¹
<i>Rad50</i>	19.39	14.63	-0.41	下调	1.18×10 ⁻¹²
<i>Rad52</i>	43.85	29.72	-0.56	下调	1.72×10 ⁻¹⁶
<i>Rad54B</i>	6.63	5.40	-0.29	下调	1.28×10 ⁻²
<i>Rdh54</i>	3.06	2.72	-0.17	下调	6.17×10 ⁻¹
<i>Dmrt7</i>	211.64	13.18	-4.01	下调	0
Crem 转录因子及下游基因 ^[58-60]					
<i>Act</i>	49.32	0.32	-7.25	下调	6.72×10 ⁻²³¹
<i>Crem</i>	301.95	6.49	-5.54	下调	0
<i>Tnp1</i>	181.98	0.00	-17.47	下调	1.99×10 ⁻¹⁷⁵
<i>Tesk1</i>	316.28	54.40	-2.54	下调	0
<i>Prm3</i>	402.02	0.40	-9.96	下调	0
<i>Ace</i>	39.58	0.58	-6.10	下调	0
<i>Tekt5</i>	40.66	0.23	-7.49	下调	0
<i>Tssk6</i>	253.76	0.90	-8.13	下调	0
<i>Izumol</i>	12.83	0.05	-7.87	下调	1.82×10 ⁻⁷²
<i>Pgk2</i>	361.23	0.40	-9.82	下调	0
<i>Adcy10</i>	8.69	0.11	-6.24	下调	5.40×10 ⁻²²²
<i>Catsper3</i>	33.28	0.42	-6.32	下调	7.65×10 ⁻²¹²
<i>Catsper4</i>	3.04	0.25	-3.58	下调	2.18×10 ⁻¹⁶

(续表 4)

	RPMK 值		log ₂ 比值	上/下调	FDR 值
	牦牛	犏牛			
<i>Akap4</i>	154.79	0.57	-8.09	下调	0
<i>Pcsk4</i>	326.87	12.61	-4.70	下调	0
<i>Kcnu1</i>	9.85	0.00	-13.27	下调	1.01×10^{-177}
<i>Camk4</i>	24.33	3.60	-2.75	下调	7.42×10^{-91}
<i>H1fnt</i>	292.49	0.49	-9.21	下调	0.00
细胞凋亡相关基因 ^[61]					
<i>P53</i>	16.27	70.44	2.11	上调	5.21×10^{-190}
<i>FasL</i>	0.53	1.33	1.32	上调	2.05×10^{-2}
<i>Bmp8b</i>	2.85	9.58	1.75	上调	5.13×10^{-16}
<i>Caspase-3</i>	1.18	2.02	0.77	上调	7.14×10^{-2}
<i>Caspase-6</i>	2.71	10.36	1.93	上调	3.95×10^{-20}
<i>Caspase-7</i>	4.40	12.77	1.54	上调	1.58×10^{-18}
<i>Bax</i>	28.93	64.09	1.15	上调	3.34×10^{-36}
<i>Tnf-α</i>	0.06	1.89	4.91	上调	8.30×10^{-8}
<i>Trail</i>	1.44	5.66	1.97	上调	1.33×10^{-11}
<i>Bcl-2</i>	0.14	0.00	-7.13	下调	6.53×10^{-1}
<i>Survivin</i>	105.37	11.53	-3.19	下调	7.21×10^{-184}
支持细胞分泌 ^[62]					
<i>Srrm1</i>	0.62	1.91	1.63	上调	1.97×10^{-5}
<i>Srrm2</i>	2511.45	7811.22	1.64	上调	0
<i>Igf1</i>	2.84	7.78	1.46	上调	2.94×10^{-7}
<i>Igf2</i>	164.88	683.44	2.05	上调	0
<i>Tgfb1</i>	21.93	56.69	1.37	上调	6.92×10^{-84}
<i>Tgfb2</i>	3.01	12.08	2.01	上调	6.41×10^{-36}
<i>Inha</i>	586.04	3143.19	2.42	上调	0
<i>Amh</i>	83.89	638.59	2.93	上调	0

图 5 犏牛睾丸精子发生障碍

□: 在犏牛睾丸组织中表达显著上调; □: 在犏牛睾丸组织中表达显著下调

它们分泌的许多蛋白质具有调控精子发生过程的生物学功能. 间质细胞主要分泌睾酮等雄性激素, 其相关基因在犏牛睾丸中表达显著上调. 除 Scf、胰岛素样生长因子外, 支持细胞还分泌多种物质^[62], 如

Srrm1(Serine/arginine repetitive matrix protein 1), Tgfb1(Transforming growth factor beta-1), Tgfb2 (Transforming growth factor beta-2), Mis(Mullerian inhibiting proteins)和抑制素(Inhibin alpha, Inha)等.

这些调节蛋白质的基因在犏牛睾丸组织中表达均显著上调(表 4)。

3 讨论

3.1 关于高表达基因

犏牛和牦牛睾丸组织中高表达的基因数仅占总文库的 0.68%, 这些基因在生物生殖上起重大作用。据报道, *Eef1a1*, *Tpt1*(Tumor protein, translationally-controlled 1) 及 *NuMA1*(Nuclear mitotic apparatus protein 1) 能够维持 SSCs 的多能性^[63,64]。支持细胞分泌的 IGF-1 是间质细胞前体的促有丝分裂因子, 其清除率、与受体的结合由 IGFBP7 调控, 能促进间质细胞增殖^[65,66]。*Hmgb4* 蛋白在粗线期精母细胞开始表达并持续至圆形精子细胞期, 其定位于细胞核基部的极端(核基极)^[67]。定位于相反一极(核顶极)的 *H1fnt* 蛋白参与染色质压缩、凝聚功能, 缺失会引起精子细胞不能伸长而降低雄性生育能力^[68]。*Tnp2* 和 *Tnp1* 主要参与染色质重塑等生物学活动, 同时敲除后, 生精细胞将阻滞于圆形细胞期^[69-71]。参与组蛋白-精蛋白取代反应的基因, 如 *Msy2*, *csdA* 和 *H3.3* 等能促使细胞核高度浓缩和精子细胞伸长^[72-74]。*Dkk1* 和 *Odf2* 分别参与顶体形成和鞭毛组成^[75]。于晖等人^[76]和费江枫等人^[77]研究表明, 睾丸中泛素化介导的核蛋白降解受阻, 会阻碍核蛋白转型而不育。本研究表明, 在犏牛睾丸组织中表达显著上调的高表达基因主要参与维持 SSCs 多能性、间质细胞增殖和蛋白质合成等生物学活动, 而表达显著下调的高表达基因主要参与精子形成, 即细胞核浓缩、顶体形成、鞭毛形成以及多余细胞质丢弃等。在犏牛睾丸组织中, *Odf2* 表达极显著下调, *Tnp2* 和 *Hmgb4* 几乎不表达, 表明从分子水平证实了前人研究认为犏牛的生精细胞最终只能分化至圆形精子细胞阶段的结果^[7]。*Tnp2* 等基因受转录因子 *Crem* 和 *miRNA-469* 等调控。*GRTH/DDX25* (DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 25)(本研究 $\log_2$ 比值为 -4.30) 参与调控小分子干扰 RNA(siRNA) 和 miRNA 等生物学过程, 敲除后小鼠(*Mus musculus*)的睾丸组织中 *miRNA-469* 显著上调^[78]。Juvan 等人^[59], Dai 等人^[78] 和 Gutti 等人^[79] 研究发现, *Crem*, *GRTH/DDX25* 基因缺失均会导致精子发生阻滞在圆形细胞期。本研究认为, 犏牛精子发生阻滞与 *Crem*

和 *GRTH/DDX25* 调控精子形成异常有关(图 5)。

3.2 关于犏牛、牦牛激素分泌及睾丸中非生精细胞

FSH, LH 和 T 等激素具有调节精子发生的作用^[80]。Qamar 等人^[81,82]研究表明, ARR19(Androgen receptor corepressor of 19 kD)通过抑制 *Nur77*(Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1)表达来抑制 T 合成, 其在间质细胞中的表达由介导 LH/cAMP 信号的 *Gata-1* 调控。罗晓林^[5]研究表明, 犏牛血液中 T 含量约为牦牛的 2 倍。本研究发现, 犏牛睾丸组织中睾酮合成基因表达显著上调且睾酮合成的负调控基因, 如 *Gata-1* 极显著下调表达, 认为犏牛中睾酮基因的活化极可能与 *Gata-1* 信号阻断有关。Narula 等人^[83]研究表明, 睾丸内睾酮分泌过多会促使支持细胞分泌抑制素, 其能选择性地抑制脑垂体前叶合成和分泌 FSH, 对 LH 的合成和分泌几乎不影响。O'Donnell 等人^[84]发现, FSH 缺乏时, $A_{pr}(A_{paired})$ 精原细胞增殖受阻、 $A_{pr} \rightarrow B$ 的转化显著降低、B 型精原细胞和精子细胞数减少。FSH 激素能刺激支持细胞使其分泌 *Shbg*。有文献^[85]报道, *Shbg* 能与睾酮高亲和力结合来维持曲细精管腔内高水平的睾酮和调节精子发生。犏牛睾丸中 *Inha* 和 *Shbg* 基因分别显著上调和无显著差异表达, 与罗晓林等人^[5]研究认为, 犏牛分泌 FSH 细胞异常和血液 T 含量在犏牛和牦牛间无显著差异相符^[2-5]。综合分析结果, 本研究认为, 犏牛睾丸中间质细胞 T 分泌较旺盛, FSH 分泌异常, 曲细精管中 T 浓度偏低, 即犏牛曲细精管中的激素分泌失衡或缺乏是精子发生阻滞的主要因素之一。

睾丸组织中非生精细胞有支持细胞、间质细胞以及肌样细胞等。Boyer 等人^[86]和李毅等人^[87]发现, 激活 Wnt/ β -catenin 信号能促进支持细胞增殖, 如 *C-myc*(Myc proto-oncogene protein)等。犏牛睾丸中支持细胞、间质细胞的标记基因和 *C-myc* 表达显著上调(本研究 $\log_2$ 比值为 2.28), 可以认为与赵善廷等人^[7]发现犏牛支持细胞和间质细胞数量显著增多的结果相符。大量合成核糖体大小亚基的基因在犏牛睾丸组织中表达显著上调, 认为与支持细胞和间质细胞蛋白合成与分泌活跃相关。此外, 肌样细胞的标记基因在犏牛睾丸中表达显著上调, 与赵善廷等人^[7]认为犏牛界膜中肌样细胞层显著增厚, 即睾丸组织存在一定程度的纤维化的结果相符。

3.3 关于 SSCs 自我更新及分化

精原细胞可分为 A 和 B 型. 单个未分化的 A 型精原细胞是 SSCs, 也称为 $A_{\text{single}}(A_s)$ 型精原细胞, 其数量占生殖细胞的 0.003%. A_s 型精原细胞能进行自我更新, 也能分裂增殖成 2 个精原细胞的合胞体, 称为 $A_{\text{paired}}(A_{\text{pr}})$ 精原细胞, 其分化形成 4, 8, 16 个精原细胞的合胞体, 称为 $A_{\text{aligned}}(A_{\text{al}})$ 精原细胞. A_{al} 型依次形成 A1, A2, A3, A4, In 和 B 型精原细胞, 而 B 型精原细胞进一步分化形成初级精母细胞. 有研究表明, *Gdnf* 对 SSC 的增殖和自我更新起着重要作用^[88,89], 如其下游激活基因 *N-myc* 是维持 SSC 自我更新的关键调节因子^[90]. Meng 等人^[91]研究发现, *Gdnf* 缺乏会使得睾丸和曲细精管萎缩及精子数量明显减少, 相反地, 则发现睾丸中富集未分化的精原细胞. 支持细胞的其他分泌物, 如 *Igf1*, *Igf2* 等, 及 SSCs 中的表达物, 如 *Plzf*, *Taf4b* 等均具有促进 SSCs 增殖和自我更新的作用^[92-94]. 本研究支持细胞分泌物及其下游调节物、SSCs 的标记基因等在犏牛睾丸中均表达显著上调, 而已分化精原细胞的标记物却显著下调表达, 认为犏牛的 SSCs 自我更新被激活而分化却严重受阻, 这可能由激素及 RA/*Stra8* 系统等调控 SSCs 自我更新与分化的机制存在异常引起.

Plant 和 Marshall^[95]研究表明, FSH 能刺激 A_{pr} 精原细胞分化, 使 B 型精原细胞增加. 支持细胞中分泌的 *Scf* 与 *C-kit* 结合, 能激活 *Ras/Erk* 和 *PI3K/Akt* 信号通路调节 SSCs 增殖和分化, 特别是从 A1~A4 型精原细胞. 有文献报道, *Stra8* 基因对哺乳动物减数分裂的起始调节发挥着关键性作用^[55,96,97]. *Stra8* 缺失小鼠的精原细胞无法启动减数分裂, 其表达下调可造成大量精母细胞停留在 DNA 复制阶段, 仅少数跨越了细线期精母细胞, 同时伴随如联会异常、染色体提前浓缩等异常, 最终无精子形成^[98,99]. *Stra8* 基因由 RA 激活表达, RA 还能抑制 *mir-146* 表达和通过抑制 *Lin28* 蛋白表达介导促使 *mir-let-7* 表达, 而其靶基因分别是 RA 受体表达调控因子基因 *Med1* 和 SSCs 增殖相关基因, 如 *N-myc*, *Col1a2* 和 *Ccnd1*^[52,53]. RA 还能促进减数分裂标志基因——*Scp3*, *Dmc1* 及 *C-kit* 基因表达^[54,55]. RA 是视黄醛经视黄醛脱氢酶家族成员氧化而成的, 在 *Cyp26b1* 酶介导下发生降解. *Nanos2* 是 *Stra8* 表达的重要抑制因子^[56]. 犏牛睾丸组织中的 *C-kit* 和 *Scf* 基因表达显著上调, 而 RA 相关的信号几乎均受到抑制, 认为犏牛睾丸中 SSCs 分化阻滞主要

与 RA 相关通路受阻有关(图 5). 值得一提的是, 犏牛睾丸组织切片特征与 Chung 等人^[100]研究维生素 A 缺乏导致的现象较一致, 即 A2~A4, In 和 B 型精原细胞、除细线前期精母细胞外的精母细胞和精子细胞退化变性脱落于生精小管管腔, 且在睾丸生精小管中仅有支持细胞、少量 A1 型精原细胞和细线前期的精母细胞.

3.4 关于犏牛和牦牛的减数分裂

减数分裂 I 过程中, 伴有许多精细的亚细胞结构形成和一系列精细调控事件, 如 SC 的装配、同源染色体重组等^[101-104]. SC 在减数分裂 I 过程中起着重要的作用, 如同源染色体的正确配对、双链断裂、重组和分离等^[105-107]. SC 蛋白质出现于减数分裂 I 前期的细线期, 消失于双线期. SC 主要由位于两侧的类似铁轨状的侧向组分(lateral element, LE)/轴向组分(axial element, AE)、位于中间的中央组分(central element, CE)及连接它们的横向细丝(transverse filament, TF)构成. *Scp3* 是 LE 的核心成分, 其与 *Scp2* 等多种蛋白质结合, 参与调节与 DNA 结合、姐妹染色单体聚合、联会及重组等生物学活动^[108-110]. Yuan 等人^[111]研究表明, *Scp3* 缺失小鼠无法形成 SC, 初级精母细胞被阻滞在减数分裂 I 的偶线期而不育. *Syce3* 定位于 CE, 其可促进其余 CE 组分装载, *Syce3* 敲除小鼠的联会过程受阻、重组过程也受到明显影响, 雌雄个体均出现了不育^[112]. *Scp1* 蛋白是 TF 的主要成分, 其 C, N 末端分别连接于 LE 和 CE, 是 SC 形成的主要决定因子^[104,113]. *Scp1* 与 *Fkbp6* 协同监视联会过程和维持同源染色体联会^[114]. Crackower 等人^[115]发现, *Fkbp6* 敲除雄鼠的粗线期精母细胞中大量的错配而不育. 同源染色体重组首先是由减数分裂重组 *Spo11* 蛋白催化形成双链断裂(double strand break, DSB), 其次由 *Rad50* 等外切形成 3'-ssDNA 重组尾, 进而在 *Dmc1*, *Rad51*, *Rad52*, *Rad54* 和 *Rdh54* 等蛋白作用下入侵同源染色体, 然后合成损伤的 DNA 链和分支迁移. 其中, *Dmc1* 基因突变或缺失小鼠的减数分裂细胞有大量的重组中间体, 导致减数分裂停滞在偶线期^[115-119]. 本研究中, *Scp3*, *Scp2*, *Scp1* 基因在犏牛中的表达量下调幅度与分化的精原细胞标记物下调幅度几乎一致, 但 *Syce3* 和 *Fkbp6* 等呈现极显著下调, 认为其与犏牛初级精母细胞中 SC 数目减少有关. *Dmrt7* 基因在粗线期精母细胞中高表达, 其蛋白

质选择性地集中于 XY 染色小体上, 调控雄性性染色体的联会过程. 在犏牛睾丸组织中, *Dmrt7* 基因极显著表达下调, 该现象与本实验室^[12]认为犏牛与牦牛的 Y 染色体核型有显著差异, 胡欧明等人^[14]发现性染色体间未见双线结构、无明显的配对行为等结果一致. 同源染色体重组相关基因中, *Spo11* 和 *Dmc1* 在犏牛睾丸组织中表达下调, 表明其初级精母细胞中形成的 DSB 更少且同源修复失常.

3.5 关于犏牛睾丸组织中细胞凋亡

细胞凋亡在睾丸组织的发育及成熟过程具有重要调控作用. 其可保证精子的正常发育和成熟, 维持各种细胞数量的平衡, 确保睾丸发挥正常的生理机能^[120-122]. Beumer 等人^[123]研究表明, *p53* 在成熟精子外的各级生殖细胞内均有表达, 与生殖细胞凋亡的启动有关. Shetty 等人^[124]证明, A 和 B 型精原细胞的凋亡由 *p53* 而非 *Fas-FasL* 系统调节. 免疫组化分析显示, *Fas* 主要见于精母细胞, 而 *FasL* 仅局限于支持细胞和生精细胞相连接区域的细胞质内. 支持细胞对生精细胞的凋亡调控与 *Fas-FasL* 介导有关^[125]. *Bcl-2/Bax* 家族成员通过调控线粒体中细胞色素 C 的释放来发挥其生物学功能, 其包括 2 大类: (i) 抗凋亡蛋白质, 包括 *Bcl-2*, *Bcl-xL* 等; (ii) 促凋亡蛋白质, 包括 *Bax*, *Bak* 等^[126]. 研究表明, *p53* 是 *Bcl-2* 的负调控因子和 *Bax* 的正调控因子^[127]. 在睾丸发育的早期和性成熟期, *Bcl-2* 基因分别在曲精小管中央和初级精母细胞以后的各级生精细胞中高表达, 分别参与调节曲精小管管腔的形成和抑制初级精母细胞及其以后的生殖细胞发生凋亡^[128]. *Bax* 表达上调会诱发生精细胞的自发性凋亡, 参与精子的质量控制, 保证雄性配子的遗传稳定性^[129,130]. *TNF* 家族成员 *TNF- α* 和 *Trail* 均能与膜上的死亡受体结合激活 *Caspase-3*, *Caspase-6*, *Caspase-7* 及线粒体依赖型凋亡信号, 最

终诱导细胞凋亡^[131]. *survivin* 可通过外源性和内源性途径干涉 *Caspase* 的功能而抑制细胞凋亡. 本研究中, *Caspase-3* 基因在犏牛睾丸中表达差异不显著 (FDR 值 > 0.001), *p53*, *TNF- α* , *Trail*, *Bax*, *Caspase-6* 和 *Caspase-7* 基因表达均显著上调, 而 *survivin* 和 *Bcl-2* 显著下调. 本研究认为, 生精细胞主要由 *p53* 介导信号通路诱导犏牛睾丸组织的生精细胞发生凋亡, 且 *Bcl-2* 基因的表达下调起着重要作用. 此外, *Bmp8b* 表达上调会促进精母细胞及其以后各级生殖细胞的凋亡, 但 SSCs 特异的 *Scf/C-kit* 信号介导抑制 *p53* 诱导 SSCs 发生凋亡^[132,133].

4 结论

本研究分别在犏牛、牦牛睾丸组织文库中鉴定出 17784 和 18529 个表达基因. 发现在犏牛睾丸组织中的高表达基因大多参与减数分裂前期和非生精细胞增殖及蛋白合成活动, 而参与精子生成的基因低表达或不表达. 比较分析了睾丸细胞特异标记基因在两文库间的表达差异, 结果发现, 犏牛睾丸组织中精原干细胞、支持细胞、间质细胞和肌样细胞等的标记基因表达上调, 而已分化精原细胞及其后期生精细胞的标记物表达量较低甚至几乎不表达. 这些基因表达下调可能受到激素合成、精原干细胞自我分化及更新、减数分裂和细胞凋亡等过程相关基因表达下降影响. 进一步分析, 表明犏牛精子发生阻滞可能由激素分泌失衡或不足、RA 信号相关通路受抑制及 *Syce3*, *Fkbp6*, *Dmrt7*, *Spo11*, *Dmc1*, *survivin* 和 *Bcl-2* 等基因表达下降所致. *GRTH/DDX25*, *Crem* 和 *Crem* 下游调控基因分别显著表达下调和极显著表达下调或不表达可能导致和证实了 F_1 代犏牛生精细胞只能分化至圆形细胞期. 这些结果有助于进一步了解犏牛雄性不育的机理和精子发生机制.

参考文献

- 1 《中国牦牛学》编写委员会. 中国牦牛学. 成都: 四川科学技术出版社, 1989. 2442-2452
- 2 刘辉, 田惠萍, 崔定中, 等. 牦牛、黄牛、犏牛的垂体、间质细胞和支持细胞的比较. 中国牦牛, 1990, 3: 25-29
- 3 刘辉, 王丽琴, 郑丕芝. 牦牛、黄牛、犏牛垂体远侧部细胞的定量组织学研究. 中国牦牛, 1994, 1: 34-36
- 4 罗晓林, 吴克选, 杨荣珍. 从血液中 LH、T、P₄、17 β -E₂ 含量昼夜变化探讨公犏牛性行为正常的生理机制. 草食家畜, 1996, 2: 41-43, 48
- 5 罗晓林. 从垂体的超微结构探讨公犏牛的不育性. 西南民族学院学报(自然科学版), 1993, 19: 4-13
- 6 谭春富, 孙延鸣, 赖明荣, 等. 牦牛、杂交一代犏牛雄性生殖器官的比较解剖. 中国牦牛, 1990, 3: 39-45

- 7 赵善廷, 秦传芳, 王士平, 等. 犏牛及其亲本(牦牛和黄牛)睾丸的定量组织学比较研究. 中国牦牛, 1990, 3: 30–34
- 8 夏洛浚, 刘辉, 成正邦, 等. 犏牛精子发生的观察与分析. 中国牦牛, 1990, 3: 19–24
- 9 Beginkulov B. K. 刘辉译. 家牦牛、黄牛及其杂种的细胞遗传学研究. 中国牦牛, 1988, 1: 70–72
- 10 郭爱朴. 牦牛、黄牛及其杂交后代犏牛的染色体比较研究. 遗传学报, 1983, 10: 137–143
- 11 李孔亮, 芦鸣计, 刘汉英, 等. 犏牛及其亲本(牦牛, 黄牛)体细胞染色体研究. 中国牦牛, 1984, 1: 42–46
- 12 钟金城, 张成忠, 蔡立. 牦牛(*Bos Grunniens*)染色体高分辨 G 带带型的研究. 西南民族学院学报(自然科学版), 1992, 18: 20–28
- 13 陈文元, 王喜忠, 王子淑, 等. 牦牛、黑白花牛及其杂交后代的染色体研究. 中国牦牛, 1990, 1: 23–29
- 14 胡欧明, 钟金城, 陈智华, 等. 犏牛精母细胞联会复合体与雄性不育关系的研究. 西南民族学院学报(自然科学版), 2000, 26: 61–66
- 15 胡欧明, 钟金城, 陈智华, 等. 牦牛与普通牛杂种一代精母细胞联会复合体分析. 云南大学学报(自然科学版), 1999, 21: 230
- 16 付永, 魏雅萍, 陈生梅. 黄牛、牦牛和犏牛睾丸组织中 *Boule* 基因 mRNA 表达水平. 中国畜牧杂志, 2013, 49: 10–13
- 17 付永, 魏雅萍, 吴克选, 等. Real-time PCR 检测黄牛、牦牛、犏牛睾丸组织中 *Boule*、*Dazl* 基因 mRNA 表达. 生物技术通报, 2012, 10: 150–155
- 18 付永. *Dazl* 基因 mRNA 表达水平与犏牛雄性不育关系的研究. 青海畜牧兽医杂志, 2012, 42: 9–11
- 19 骆骅, 贾超, 屈旭光, 等. 黄牛、牦牛和犏牛 *b-Sycp2* 基因的克隆与睾丸组织 mRNA 的表达水平. 中国农业科学, 2013, 46: 367–375
- 20 周阳, 骆骅, 李伯江, 等. 牦牛和犏牛睾丸组织 *DDX4* 基因 mRNA 表达水平与启动子区甲基化. 中国农业科学, 2013, 46: 630–638
- 21 李新福, 李齐发, 李隐侠, 等. 黄犏牛与黄牛 *b-Boule* 基因编码区序列、结构、表达模式和睾丸组织表达水平的差异分析. 自然科学进展, 2009, 19: 1042–1048
- 22 张庆波, 李齐发, 李家璜, 等. 牛精子发生相关新基因 *b-DAZL* 的克隆、生物信息学分析与组织表达研究. 自然科学进展, 2008, 18: 493–504
- 23 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. 畜牧兽医学报, 2008, 39: 1132–1136
- 24 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. 中国农业科学, 2013, 46: 1036–1043
- 25 刘振山, 李齐发, 张庆波, 等. 犏牛及其亲本 *IGF2* 基因 mRNA 表达水平、DNA 甲基化状态差异分析. 自然科学进展, 2009, 19: 380–385
- 26 Elsik C G, Tellam R L, Worley K C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. Science, 2009, 324: 522–528
- 27 Qiu Q, Zhang G, Ma T, et al. The yak genome and adaptation to life at high altitude. Nat Genet. 2012, 44: 946–949
- 28 Li R, Yu C, Li Y, et al. SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. Bioinformatics, 2009, 25: 1966–1967
- 29 Mortazavi A, Williams B A, McCue K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nat Methods, 2008, 5: 621–628
- 30 Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet, 2000, 25: 25–29
- 31 Ye J, Fang L, Zheng H, et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations. Nucleic Acids Res, 2006, 34: W293–W297
- 32 Yeh J R, Nagano M C. Spermatogonial stem cell biomarkers: improved outcomes of spermatogonial transplantation in male fertility restoration? Expert Rev Mol Diagn, 2009, 9: 109–114
- 33 Kubota H, Avarbock M R, Brinster R L. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 6487–6492
- 34 Goertz M J, Wu Z, Gallardo T D, et al. Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. J Clin Invest, 2011, 121: 3456–3466
- 35 Phillips B T, Gassei K, Orwig K E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. Philos Trans R Soc B-Biol Sci, 2010, 365: 1663–1678
- 36 Diatchenko L, Lau Y, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025–6030
- 37 Wang P J, McCarrey J R, Yang F, et al. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. Nat Genet, 2001, 27: 422–426
- 38 Schumacher J M, Lee K, Edelhoff S, et al. Distribution of Tenr, an RNA-binding protein, in a lattice-like network within the spermatid nucleus in the mouse. Biol Reprod, 1995, 52: 1274–1283
- 39 Welch J, Schatte E, O'Brien D, et al. Expression of a glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene specific to mouse spermatogenic cells. Biol Reprod, 1992, 46: 869–878

- 40 Kleene K C, Flynn J F. Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse. *J Biol Chem*, 1987, 262: 17272–17277
- 41 Ren D, Navarro B, Perez G, et al. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 2001, 413: 603–609
- 42 Zhang F P, Pakarainen T, Zhu F, et al. Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice. *Endocrinology*, 2004, 145: 1453–1463
- 43 Haider S G. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol*, 2004, 233: 181–241
- 44 O'Shaughnessy P, Willerton L, Baker P. Changes in Leydig cell gene expression during development in the mouse. *Biol Reprod*, 2002, 66: 966–975
- 45 O'Shaughnessy P, Hu L, Baker P. Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells. *Reproduction*, 2008, 135: 839–850
- 46 Suter L, Koch E, Bechter R, et al. Three-parameter flow cytometric analysis of rat spermatogenesis. *Cytometry*, 1997, 27: 161–168
- 47 Franke F E, Pauls K, Rey R, et al. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. *Anat Embryol (Berl)*, 2004, 209: 169–177
- 48 Yomogida K, Ohtani H, Harigae H, et al. Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor *GATA-1* in mouse Sertoli cells. *Development*, 1994, 120: 1759–1766
- 49 Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, et al. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol*, 1999, 145: 579–588
- 50 Pöllänen P P, Kallajoki M, Risteli L, et al. Laminin and type IV collagen in the human testis. *Int J Androl*, 1985, 8: 337–347
- 51 刘陶迪. 大鼠青春前期精原干细胞自我更新和分化相关基因表达的初步研究. 博士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2012
- 52 Tong M H, Mitchell D, Evanoff R, et al. Expression of Mirlet7 family microRNAs in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod*, 2011, 85: 189–197
- 53 Huszar J M, Payne C J. MicroRNA 146 (*Mir146*) modulates spermatogonial differentiation by retinoic acid in mice. *Biol Reprod*, 2012, 88: 15
- 54 Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development*, 2007, 134: 3401–3411
- 55 Bowles J, Knight D, Smith C, et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*, 2006, 312: 596–600
- 56 Koubova J, Menke D B, Zhou Q, et al. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2474–2479
- 57 谢文军, 史典义, 蔡泽熙, 等. 联会复合体的组成、功能及遗传控. *遗传*, 2012, 34: 167–176
- 58 De Cesare D, Fimia G M, Sassone-Corsi P. CREM, a master-switch of the transcriptional cascade in male germ cells. *J Endocrinol Invest*, 2000, 23: 592–596
- 59 Juvan P, Perse M, Budefeld T, et al. Novel insights into the downstream pathways and targets controlled by transcription factors CREM in the testis. *PLoS One*, 2012, 7: e31798
- 60 Tanaka H, Baba T. Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 344–354
- 61 王随心, 张玉华, 李向阳, 等. 生精细胞凋亡相关基因. *生命的化学*, 2011, 31: 389–394
- 62 孙秀娟, 韩辉. 动物支持细胞的研究进展. *当代畜牧*, 2011, 11: 36–38
- 63 Koziol M J, Garrett N, Gurdon J. Tpt1 activates transcription of oct4 and nanog in transplanted somatic nuclei. *Curr Biol*, 2007, 17: 801–807
- 64 Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, et al. Identification of differentially expressed genes in human cryptorchid testes using suppression subtractive hybridization. *J Urol*, 2009, 181: 1330–1337
- 65 Wang G, Hardy M P. Development of leydig cells in the insulin-like growth factor-I (*igf-I*) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. *Biol Reprod*, 2004, 70: 632–639
- 66 Baker J, Hardy M P, Zhou J, et al. Effects of an *IGF-I* gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol*, 1996, 10: 903–918
- 67 Catena R, Escoffier E, Caron C, et al. *HMGB4*, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids. *Biol Reprod*, 2009, 80: 358–366
- 68 Martianov I, Brancorsini S, Catena R, et al. Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 2808–2813
- 69 Kleene K C, Bagarova J. Comparative genomics reveals gene-specific and shared regulatory sequences in the spermatid-expressed

- mammalian *Odf1*, *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1*, and *Tnp2* genes. *Genomics*, 2008, 92: 101–106
- 70 Meistrich M L, Mohapatra B, Shirley C R, et al. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, 2003, 111: 483–488
- 71 Ullas K S, Rao M R. Phosphorylation of rat spermatid protein TP2 by sperm-specific protein kinase A and modulation of its transport into the haploid nucleus. *J Biol Chem*, 2003, 278: 52673–52680
- 72 Giorgini F, Davies H G, Braun R E. MSY2 and MSY4 bind a conserved sequence in the 3' untranslated region of protamine 1 mRNA *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 7010–7019
- 73 Yang J, Medvedev S, Yu J, et al. Absence of the DNA-/RNA-binding protein MSY2 results in male and female infertility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 5755–5760
- 74 Akhmanova A, Gunderson S I, Polycarpou-Schwarz M, et al. *In Vitro* Analysis of Polyadenylation of the *Drosophila melanogaster* Histone H3.3B Pre-mRNA. Nijmegen: Katholieke Universiteit Nijmegen, 1997
- 75 Kohn M J, Kaneko K J, DePamphilis M L. DkkL1 (Soggy), a Dickkopf family member, localizes to the acrosome during mammalian spermatogenesis. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71: 516–522
- 76 于晖, 王永潮, 费仁仁, 等. 小鼠精子发生过程中泛素的表达. *发育与生殖生物学报*, 2001, S1: 32
- 77 费江枫, 肖雪媛, 于晖, 等. 哺乳动物睾丸长形精子细胞及精子中泛素化蛋白的研究. *发育与生殖生物学报*, 2001, S1: 42
- 78 Dai L, Tsai-Morris C H, Sato H, et al. Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: implications of its role in germ cell development. *J Biol Chem*, 2011, 286: 44306–44318
- 79 Gutti R K, Tsai-Morris C H, Dufau M L. Gonadotropin-regulated testicular helicase (DDX25), an essential regulator of spermatogenesis, prevents testicular germ cell apoptosis. *J Biol Chem*, 2008, 283: 17055–17064
- 80 Wang C, Swerdloff R S. Male contraception. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2002, 16: 193–203
- 81 Qamar I, Gong E Y, Kim Y, et al. Anti-steroidogenic factor ARR19 inhibits testicular steroidogenesis through the suppression of *Nur77* transactivation. *J Biol Chem*, 2010, 285: 22360–22369
- 82 Qamar I, Park E, Gong E Y, et al. ARR19 (androgen receptor corepressor of 19 kDa), an antisteroidogenic factor, is regulated by GATA-1 in testicular Leydig cells. *J Biol Chem*, 2009, 284: 18021–18032
- 83 Narula A, Gu Y Q, O'Donnell L, et al. Variability in sperm suppression during testosterone administration to adult monkeys is related to follicle stimulating hormone suppression and not to intratesticular androgens. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 3399–3406
- 84 O'Donnell L, Narula A, Balourdos G, et al. Impairment of spermatogonial development and spermiation after testosterone- induced gonadotropin suppression in adult monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 1814–1822
- 85 Kavarthapu R, Tsai-Morris C H, Fukushima M, et al. A 5'-flanking region of gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25) gene directs its cell-specific androgen-regulated gene expression in testicular germ cells. *Endocrinology*, 2013, 154: 2200–2207
- 86 Boyer A, Hermo L, Paquet M, et al. Seminiferous tubule degeneration and infertility in mice with sustained activation of WNT/CTNNB1 signaling in sertoli cells. *Biol Reprod*, 2008, 79: 475–485
- 87 李毅, 张帅, 殷钢, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路在成人睾丸支持细胞增殖中的作用及其机制. *山东大学学报(医学版)*, 2012, 50: 55–61
- 88 Braydich-Stolle L, Kostereva N, Dym M, et al. Role of Src family kinases and N-Myc in spermatogonial stem cell proliferation. *Dev Biol*, 2007, 304: 34–45
- 89 Laurenti E, Varnum-Finney B, Wilson A, et al. Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 611–624
- 90 Caires K, Broady J, McLean D. Maintaining the male germline: regulation of spermatogonial stem cells. *J Endocrinol*, 2010, 205: 133–145
- 91 Meng X, Lindahl M, Hyvönen M E, et al. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 2000, 287: 1489–1493
- 92 van Bragt M P, Roepers-Gajadien H L, Korver C M, et al. Expression of the pluripotency marker UTF1 is restricted to a subpopulation of early A spermatogonia in rat testis. *Reproduction*, 2008, 136: 33–40
- 93 Marcon L, Zhang X, Hales B F, et al. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem/progenitor cells. *J Androl*, 2011, 32: 432–443

- 94 Falender A E, Freiman R N, Geles K G, et al. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev*, 2005, 19: 794–803
- 95 Plant T M, Marshall G R. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev*, 2001, 22: 764–786
- 96 Swain A. Sex determination: time for meiosis? The gonad decides. *Curr Biol*, 2006, 16: R507–R509
- 97 Zhou Q, Nie R, Li Y, et al. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (*Stra8*) in spermatogenic cells induced by retinoic acid: an in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes. *Biol Reprod*, 2008, 79: 35–42
- 98 Anderson E L, Baltus A E, Roepers-Gajadien H L, et al. *Stra8* and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 14976–14980
- 99 Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, et al. *STRA8*-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J Cell Sci*, 2008, 121: 3233–3242
- 100 Chung S S, Wang X, Wolgemuth D J. Expression of retinoic acid receptor alpha in the germline is essential for proper cellular association and spermiogenesis during spermatogenesis. *Development*, 2009, 136: 2091–2100
- 101 Roeder G S. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev*, 1997, 11: 2600–2621
- 102 Zickler D, Kleckner N. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet*, 1999, 33: 603–754
- 103 Heyting C. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, 8: 389–396
- 104 Page S L, Hawley R S. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20: 525–558
- 105 Egozcue J, Sarrate Z, Codina-Pascual M, et al. Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 111: 337–342
- 106 Bascom-Slack C A, Ross L O, Dawson D S. Chiasmata, crossovers, and meiotic chromosome segregation. *Adv Gene*, 1996, 35: 253–284
- 107 Page S L, Hawley R S. Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science*, 2003, 301: 785–789
- 108 Yuan L, Pelttari J, Brundell E, et al. The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers *in vivo*. *J Cell Biol*, 1998, 142: 331–339
- 109 Pelttari J, Hoja M R, Yuan L, et al. A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Biol Cell*, 2001, 21: 5667–5677
- 110 Liebe B, Alsheimer M, Hoog C, et al. Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 827–837
- 111 Yuan L, Liu J G, Hoja M R, et al. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science*, 2002, 296: 1115–1118
- 112 Schramm S, Fraune J, Naumann R, et al. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1002088
- 113 Öllinger R, Alsheimer M, Benavente R. Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 212–217
- 114 Yuan L, Liu J G, Zhao J, et al. The murine *SCP3* gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell*, 2000, 5: 73–83
- 115 Crackower M A, Kolas N K, Noguchi J, et al. Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science*, 2003, 300: 1291–1295
- 116 Pittman D L, Cobb J, Schimenti K J, et al. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmc1*, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell*, 1998, 1: 697–705
- 117 Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, et al. The mouse RecA-like gene *Dmc1* is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell*, 1998, 1: 707–718
- 118 Kagawa W, Kurumizaka H. From meiosis to postmeiotic events: uncovering the molecular roles of the meiosis-specific recombinase *Dmc1*. *FEBS J*, 2010, 277: 590–598
- 119 Habu T, Taki T, West A, et al. The mouse and human homologs of *DMC1*, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24: 470–477
- 120 Billig H, Furuta I, Rivier C, et al. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology*, 1995, 136: 5–12
- 121 Shaha C, Tripathi R, Mishra D P. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*, 2010, 365:

1501–1515

- 122 Rojas-García P P, Recabarren M P, Sarabia L, et al. Prenatal testosterone excess alters Sertoli and germ cell number and testicular FSH receptor expression in rams. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299: E998–E1005
- 123 Beumer T L, Roepers-Gajadien H L, Gademan I S, et al. The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death Differ*, 1998, 5: 669–677
- 124 Shetty G, Shao S H, Weng C C. p53-dependent apoptosis in the inhibition of spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (Utp14b jsd) mice. *Endocrinology*, 2008, 149: 2773–2781
- 125 Lee J, Richburg J H, Younkin S C, et al. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, 1997, 138: 2081–2088
- 126 Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 47–59
- 127 Yin C, Knudson C M, Korsmeyer S J, et al. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*. *Nature*, 1997, 385: 637–640
- 128 贺俊平, 游蓉丽, 谢建山, 等. *Caspase-3* 和 *Bcl-2* 在小鼠出生后睾丸发育和精子发生过程的表达. *新疆农业大学学报*, 2010, 33: 303–306
- 129 Fujisawa M, Shirakawa T, Fujioka H, et al. Adenovirus-mediated *p53* gene transfer to rat testis impairs spermatogenesis. *Arch Androl*, 2001, 46: 223–231
- 130 Aitken R J, Findlay J K, Hutt K J, et al. Apoptosis in the germ line. *Reproduction*, 2011, 141: 139–150
- 131 Mackay F, Kalled S L. TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update. *Curr Opin Immunol*, 2002, 14: 783–790
- 132 Zhao G Q, Deng K, Labosky P A, et al. The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev*, 1996, 10: 1657–1669
- 133 Feng H L, Sandlow J I, Sparks A E, et al. Decreased expression of the c-kit receptor is associated with increased apoptosis in subfertile human testes. *Fertil Steril*, 1999, 71: 85–89

Comparative Transcriptome Analysis of Spermatogenesis Arrest in Cattle-Yak

ZENG XianBin¹, CHAI ZhiXin¹, WANG Yong¹, MA ZhiJie², YANG Qin¹,
SONG QiaoQiao¹ & ZHONG JinCheng¹

¹ Key Laboratory of Animal Genetics and Breeding of State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

² Institute of Animal Science, Qinghai Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Xining 810016, China

The male infertility of cattle-yak, which is the hybrid offspring of cattle and yak, is a difficult problem for cross-breeding and improvement of yak. In this study, we used high-throughput sequencing technology to obtain the transcriptomes of the testicular tissues of both cattle-yak and yak, and investigated the expression profiles of the genes regulating hormones, spermatogenesis and apoptosis. The results showed that, there were 17784 and 18529 genes expressed in cattle-yak and yak testicular tissues respectively, and statistical analysis revealed 5000 genes with increased mRNA levels and 4089 with reduced levels in cattle-yak testicular tissue as compared with those in yak. The genes involved in testosterone synthesis and inhibin alpha chain have a high level of expression in cattle-yak testicular tissue. The former genes with increased expression may induce the secretion of intratesticular testosterone which can be up-regulated expression of the latter. Inhibin alpha chain with increased mRNA levels possible restrain the secretion of follicle-stimulating hormone of the pituitary gland, but not of luteinizing hormone. This may cause imbalance or deficiency of hormones in cattle-yak which lead to male infertility. By comparing the expression of the testicular marker genes between the two species, we showed that expressions of the marker genes of spermatogonial stem cell, sertoli cell, Leydig cell and myoid cell (fibrosis of testis) are increased, whereas those of differentiation of SSCs (especially those expressed at late stage of spermatid formation) are reduced. The abnormality of self-renewal and differentiation of SSCs, which may be tightly associated with the disorder of retinoic acid signaling pathway, might lead to spermatogenesis dysfunction in cattle-yak. *Syce3*, *Fkbp6* and *Dmrt7* are down-regulated significantly in cattle-yak testicular tissue, which may be related with the formation of synaptonemal complex between homologous chromosomes, especially between sex chromosomes. *Spo11* and *Dmc1* are involved in double strand break and homologous repair process respectively, and are down-regulated in cattle-yak resulting in reduced numbers of synaptonemal complex and impaired homologous repair respectively. *Tnp2*, *Hmgb4* and *H1fnt* that are involved in formation of concentrated nucleus are hardly transcriptionally active, which confirmed the finding that germocyte of cattle-yak arrest at round-spermatid stage. This may be caused by suppressed expression of *Crem*, *GRTH/DDX25* in cattle-yak. Proapoptosis genes, such as *p53*, *TNF- α* , *Trail*, *Bmp8b*, *Bax*, *Caspase-3*, *Caspase-6* and *Caspase-7* are up-regulated, and apoptosis genes, such as *survivin*, *Bcl-2* are down-regulated, suggesting increased cell death occurs in cattle-yak testicular tissue. Together, our analysis of transcriptomes of the testicular tissues of cattle-yak and yak moves a step toward revealing the mechanism of cattle-yak male infertility and provides the theoretical basis for cross-breeding and improvement of yak.

cattle-yak, yak, testis, transcriptome, spermatogenesis

doi: 10.1360/N052013-00078