

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.014.html>

Pkhd1 基因缺陷对雄性小鼠生育能力的影响

毛 军, 徐雨辰, 高晶晶, 彭党委, 奚贤明, 黄振宇, 程 鹏, 沈旭峰, 张贤生

摘要 目的 观察 Pkhd1 基因缺陷对雄性小鼠生育能力的影响。方法 取同龄成年野生型和 Pkhd1 基因缺陷 (Pkhd1^{-/-}) 小鼠各 10 只, 取附睾尾精子, 观察记录两组精子各项参数: 精子浓度、活力、活率及形态; 另外, 取同龄成年野生型和 Pkhd1^{-/-} 小鼠各 5 只, 将野生型雌鼠与之进行合笼试验, 观察记录两组小鼠的各项生育指标: 交配率 (FM)、怀孕率 (RP) 及平均产仔率 (ANP)。结果 与野生型比较, Pkhd1 基因缺陷小鼠精子浓度下降 ($P < 0.01$)、精子活力降低 ($P < 0.01$) 且精子尾部形态异常; 且与 Pkhd1^{-/-} 小鼠交配后的雌性小鼠 RP 显著下降 ($P < 0.01$)。结论 Pkhd1 基因缺陷可降低雄性小鼠的生育力。此研究结果为男性常染色体隐性多囊肾患者在生育能力方面的潜在并发症提供了新的见解。

关键词 男性不育; ARPKD; Pkhd1; 精子; 小鼠模型

中图分类号 R 691.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)10-1551-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.014

常染色体隐性多囊肾 (autosomal recessive polycystic kidney disease, ARPKD) 是婴儿和儿童时期最常见的囊性肾病, 其发生率约为 1/20 000; 在人群中, 其隐性致病基因-纤囊蛋白基因 (polycystic kid-

ney and hepatic disease 1, Pkhd1) 携带率估计为 1/70^[1]。遗传连锁研究^[2]表明, 致病基因突变位于人类染色体区域 6p21.1-6p12。由 Pkhd1 基因编码的 FPC 是一种包含 4 074 个氨基酸的完整膜蛋白。ARPKD 患者的临床表现差异很大, 其典型的表现为先天性肝纤维化和多囊性肾病。因此, 至今对于 ARPKD 的研究主要集中在肾脏和肝脏。而常染色体显性多囊肾 (autosomal recessive polycystic kidney disease, ADPKD) 的男性生育力已有长期大量的相关研究^[3], 且男性 ADPKD 患者的生育方面有相关缺陷。但相较于 ADPKD, ARPKD 的发病率低和死亡率高, 鲜有研究男性 ARPKD 患者的生育相关问题。然而, Dell^[4]发现 ARPKD 可以在从婴儿期到成年期的任何年龄发病。而且, 随着现代肝肾移植手术进步和呼吸系统并发症护理水平提高, 其存活率已经得到了极大的改善。相关数据^[5]显示, 接受肾移植的 ARPKD 患者的生存率可达到 78%~92%。因此, ARPKD 不再局限于儿科疾病, 成人患者也可有相对温和的临床表现。随着此类患者逐渐达到生育年龄, 生育问题将不可避免。所以对于男性 ARPKD 患者, 其生殖相关问题尤为迫切。研究^[6]表明 PKHD1 基因及其产物与小鼠同源且功能相似。该研究主要通过观察 APPKD 模型小鼠的生殖功能, 探究 Pkhd1 基因对雄性生育能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 Pkhd1 基因敲除小鼠

supernatant. Western blot and qRT-PCR were used to detect the expression of Fas in three pancreatic cancer cells. Immunohistochemistry was used to detect the expression of Fas in 60 cases of pancreatic cancer and its relationship with clinicopathological parameters was analyzed. **Results** ELISA method showed that the content of sFasL in the supernatant of DNT cells was higher than that of the control group ($t = 3.00$, $P < 0.01$). The results of Western blot suggested that Fas was highly expressed in all three pancreatic cancer cells, ranging from low to high were Capan-1, BXPC-3 and Panc-1. The expression of Fas mRNA was detected by qRT-PCR in all three pancreatic cancer cells, and the sequence was Capan-1, BXPC-3 and Panc-1 from low to high ($F = 211.56$, $P < 0.05$). Immunohistochemistry results showed that the expression of Fas was decreased in pancreatic tissue compared with paracancerous tissue ($\chi^2 = 8.62$, $P < 0.05$). **Conclusion** The sFasL/Fas pathway may be one of the mechanisms by which DNT cells kill pancreatic cancer cells.

Key words pancreatic cancer; double negative T cells; sFasL; Fas

(C57BL/6) 10 只, 此小鼠模型(Pkhd1 基因是否已敲除及其敲除程度) 在本团队之前的研究已作详细描述^[7]。野生型小鼠各 10 只及若干只雌鼠, 雄性鼠龄 2~3 个月, 雌鼠鼠龄 2~4 个月, 由中国医学科学院肿瘤医院实验动物中心提供。动物饲养环境严格保证, 昼夜明暗交替时间 12/12 h, 温度 20~24 °C, 相对湿度 40%~70%, 自由进食水。实验结束后, 颈椎脱臼处死雄性小鼠并称重, 分离每只小鼠的睾丸和附睾并称重, 并计算相对体重。

1.2 组织苏木精伊红染色(HE) 标本经 10% 中性甲醛充分固定后, 经梯度酒精脱水 and 二甲苯透明后, 制作成蜡块。4 μm 连续切片, 切片做 HE 染色。

1.3 精子分离及其相关参数检测

1.3.1 精子分离 颈离断处死小鼠后, 分离一侧附睾尾置于 1.5 ml EP 管内并剪碎, 滴加已预热 37 °C 的 HTF 液 1 ml, 微微震荡后放入 CO₂ 培养箱(37 °C) 培养 15 min, 取上清液用于精子参数检测。以下操作均重复计数 200 个精子, 且严格按照《世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册(第 5 版)》施行。

1.3.2 精子浓度检测 在 200 $\times$ 倍数显微镜下, 用改良 Neubauer 血细胞计数板计数精子数量并计算精子浓度。

1.3.3 精子活力检测 在 200 $\times$ 倍数显微镜下观察已制备好的湿片, 按照精子的活力大小, 将每个所观察到的精子活力分为向前运动(PR) (精子主动地呈直线或沿一大圆周运动, 不管其运动速度如何)、非向前运动(NP) (所有其他非向前运动的形式, 如以小圆周泳动, 尾部动力几乎不能驱使头部移动, 或者只能观察到尾部摆动) 和不活动(IM) (没有运动) 三类, 并统计分析。

1.3.4 精子存活率检测 将精子用苯胺黑伊红染色(试剂购自印度 solarbio 公司), 在 400 $\times$ 倍数显微镜下计数评定精子死活。头部白色被认定为活精子, 头部红色被认定为死精子, 并统计分析。

1.3.5 精子形态学检测 精子经巴氏染色(试剂购自印度 solarbio 公司), 依用亮视野在 1 000 $\times$ 油镜下观察涂片, 记录精子形态。

1.4 生育力检查 参照 Mao et al^[8] 的方法, 生育力实验采用雌雄合笼的方式。Pkhd1^{-/-} 和野生型雄鼠各 5 只, 按照雌雄比 2:1, 每个笼里放 3 只小鼠。每天检查雌鼠是否“见栓”, 将“见栓”雌鼠替换并单独饲养至生产。每周替换未“见栓”的雌鼠。统计所有的“见栓”雌鼠、未“见栓”雌鼠、对应生产窝数、

总子代数, 用于计算交配率(frequency of mating, FM)、怀孕率(rate of pregnancy, RP) 及平均产仔率(average number of pups, ANP)。t 检验和 χ^2 检验被用于计算两组的差异性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pkhd1^{-/-} 和野生型小鼠之间的肝脏、肾脏和生殖系统的形态学 在 3 月龄的小鼠中, Pkhd1^{-/-} 和野生型的肾脏之间没有明显的差异, 见图 1A、1B; 然而, 相较于正常小鼠, 3 月龄的 Pkhd1^{-/-} 小鼠的肝脏布满囊肿。见图 1C、1D。其囊肿数量虽多, 但因体积小而未压迫正常肝组织, 此时肝功能基本无影响。另外, 睾丸体重比($P = 0.138$) 和附睾体重比($P = 0.179$) 在 Pkhd1^{-/-} 和野生型之间差异无统计学意义(图 1E、1F)。而且, 两组雄性小鼠的生殖系统(睾丸、附睾、输精管和精囊) 的生物形态基本相似(图 1G~N)。在大体形态上, Pkhd1 基因似乎对雄性小鼠生殖系统未产生影响。

2.2 精子数目、活动力和存活率分析 对小鼠附睾尾的精子数目的分析显示, 相较于野生型小鼠, Pkhd1^{-/-} 的精子总数显著降低($P = 0.029$)。见图 2A。两组精子活动力的差异性主要体现在向前运动类型精子(PR) 方面, 而野生型的非向前运动精子(NP) 比例略低于 Pkhd1^{-/-} 小鼠。但是, Pkhd1^{-/-} 的总精子活动力(PR + NR) 明显低于野生型组小鼠($P = 0.013$)。见图 2B。通过苯胺黑伊红染色(图 2C) 显示, Pkhd1^{-/-} 和野生型小鼠的精子存活率分别为 $(76.40 \pm 8.289)\%$ 和 $(70.30 \pm 9.452)\%$, 两组差异无统计学意义($P = 0.118$)。见图 2D。且都在正常范围($> 58\%$)。

2.3 精子形态学分析 经巴氏染色后观察显示野生型和 Pkhd1^{-/-} 小鼠的精子畸形率分别为 11% 和 17%, 两者差异有统计学意义(T: $P = 0.015$; C: $P = 0.012$)。Pkhd1^{-/-} 精子畸形率较高主要体现在其尾部卷曲比率较野生型小鼠精子高。Pkhd1^{-/-} 精子的尾部更加容易发现胞质滴(CDs) ($P = 0.018$)。见图 3。

2.4 Pkhd1 基因缺陷影响雄性小鼠的生育力 表 1 显示两组小鼠的交配频率($P = 0.501$) 和受孕后小鼠的平均产仔率($P = 0.255$) 差异无统计学意义; Pkhd1^{-/-} 组交配后雌鼠的受孕率(FP) 明显低于野生型组($P = 0.028$), 说明 Pkhd1 基因缺失可使雄性小鼠的生育力降低。

表1 Pkhd1 基因缺陷可导致雄性生育力下降

雄鼠	雌鼠	见栓雌鼠	已孕雌鼠	鼠仔(雌/雄)	交配率(%)	怀孕率(%)	平均产仔率(%)
WT (n=5)	WT (n=52)	18	16	117(63/54)	34.6	88.9	7.3 ± 2.3
Pkhd1 ^{-/-} (n=5)	WT (n=47)	13	7	43(24/19)	27.7	53.8	6.1 ± 1.9

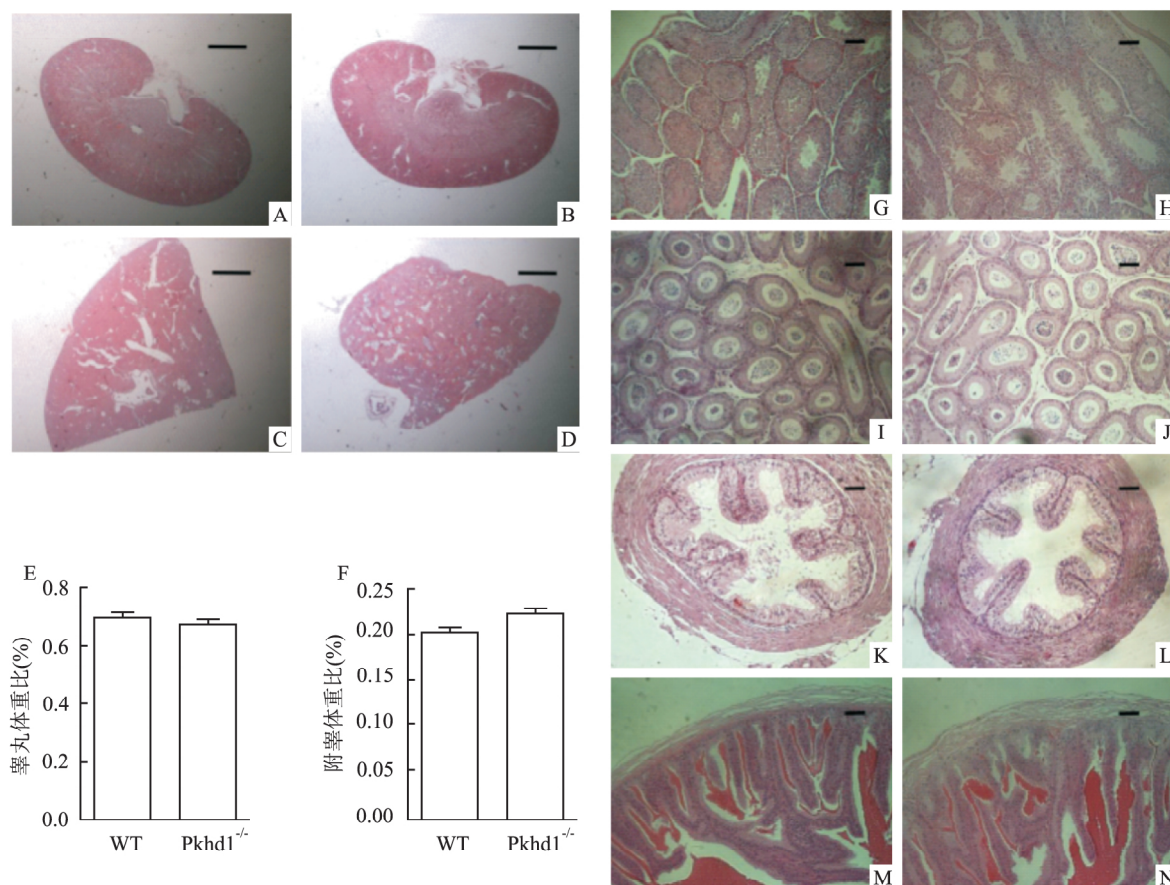


图1 WT 和 Pkhd1^{-/-} 小鼠的肾脏、肝脏和生殖系统的形态学分析

A: WT 肾脏组织切片; B: Pkhd1^{-/-} 肾脏组织切片; C: WT 肝脏组织切片; D: Pkhd1^{-/-} 肝脏组织切片; E: 睾丸相对体重比; F: 附睾相对体重比; G: WT 睾丸; I: WT 附睾; K: WT 输精管; M: WT 精囊; H: Pkhd1^{-/-} 睾丸; J: Pkhd1^{-/-} 附睾; L: Pkhd1^{-/-} 输精管; N: Pkhd1^{-/-} 精囊; A ~ D: × 30; G ~ N: × 100

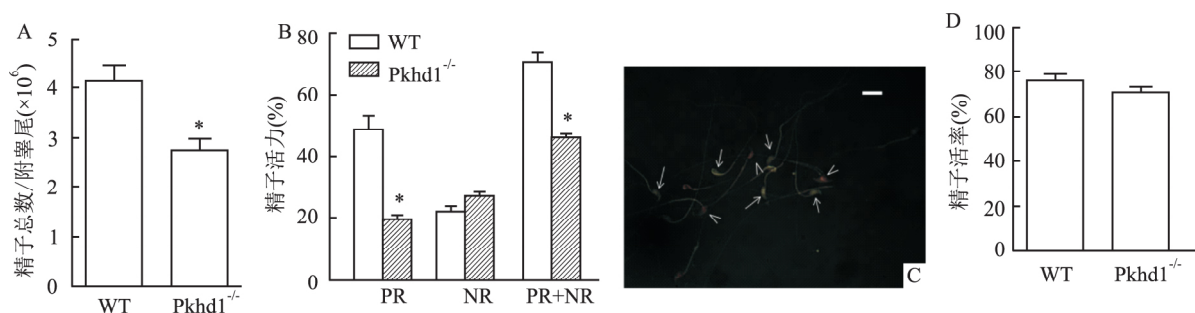
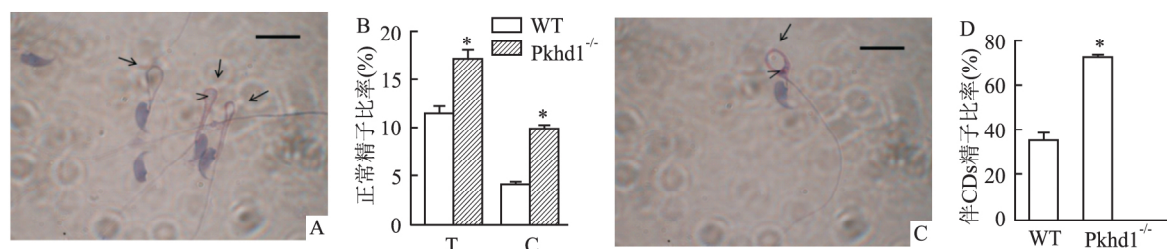


图2 Pkhd1 基因缺失对精子浓度、活力和活率的影响 ×630

A: 小鼠的精子数量; B: 精子活力; C: Pkhd1^{-/-} 小鼠精子苯胺黑伊红染色, “↑”: 活精子, “∧”: 死精子; D: 精子活率; 与 WT 比较: * $P < 0.05$

图3 Pkhd1^{-/-}小鼠精子的形态特征

A、C: Pkhd1^{-/-}小鼠精子巴氏染色×1000; B: 畸形精子比率; D: 精子尾部伴CDs比率; T: 总精子; C: 尾部卷曲精子; “↑”: 卷尾 “^”: CDs; 与WT比较: * $P < 0.05$

3 讨论

随着越来越多的ARPKD患者达到生育年龄,其部分可能面临生育问题。另一方面,大量研究^[3]表明男性ADPKD患者存在生育缺陷,文献中鲜有关于ARPKD患者生育力方面研究。本研究系统地对比研究了Pkhd1^{-/-}和野生型小鼠生殖系统的大体形态、相对质量及组织学检查,结果并未发现异常。但是,Pkhd1基因选择性拼接模式复杂,并产生多种不同功能蛋白,且Ward et al^[9]通过免疫组织化学研究发现FPC(PKHD1基因产物)在胚胎的睾丸和附睾中表达。这就进一步促使思考Pkhd1基因是否会对小鼠的生育能力产生影响。

基于以上研究结果及假设,对小鼠附睾尾精子进行了检测,结果显示Pkhd1^{-/-}小鼠附睾尾精子浓度和活力显著降低,精子的活率没有显著差距。见图3。精子的活力决定于其正常形态,尾部畸形的精子一般无活性或者运动障碍且无法使卵子受精。因此,对Pkhd1^{-/-}和野生型两组小鼠进行了附睾尾精子的形态学检查。结果显示Pkhd1^{-/-}小鼠精子尾部有更多的胞质滴(CDs),且其尾部趋于卷曲。见图4。在小鼠精子形成过程中,CDs来源于精子细胞的胞质中,主要附着在精子尾部的中间部分。Xu et al^[10]研究发现CDs的异常可能对精子发生和精子活力产生影响。之前有研究^[11]表明CDs被认为与渗透压的调节有关,因为当精子在低渗透性的情况下,附睾精子的鞭毛很容易盘绕在CDs的位置上,这可能是由CDs上附着的几个水通道蛋白的缺陷而导致的结果。在ARPKD中,尽管其囊肿形成、生长和扩张的病理生理学仍不清楚,但是有研究^[12]表明,ARPKD患者的水通道AQP1的表达和功能异常,且与ARPKD患者的囊肿扩张有关。这提示在ARPKD小鼠中,异常的水通道可能是造成异常CDs的原因,而且CDs异常可以导致ARPKD

小鼠精子尾畸形率上升,这些因素均可降低Pkhd1^{-/-}小鼠的精子活力。

精子鞭毛结构和生物起源很复杂,最近的蛋白质组学分析显示了超过700种蛋白质与其相关。在小鼠的精子发生过程中,基因异常会导致不同的表型,包括精子尾部的卷曲。尾部鞭毛的基因丝由中心体变形组装而成,是精子尾部的重要组成部分。Zhang et al^[13]研究报告显示FPC定位于细胞中心粒,并参与中心粒的复制,且破坏FPC可影响中心粒功能并导致细胞分裂缺陷。因此,Pkhd1基因缺陷可能影响原始生殖细胞的有丝分裂和精原细胞的减数分裂,导致小鼠精子浓度下降;Pkhd1基因的破坏也可能会影响鞭毛的基因丝结构,导致精子尾动力系统的功能紊乱,最终致使雄性小鼠精子活力下降。

需要注意的是,小鼠生育能力过强,所以并不是一个完美的反映人类生育力的动物模型。人类更容易受到不健康的生活方式和致病因素的影响,包括吸烟、环境污染、生殖道感染和遗传疾病等。有报道^[14]表明诸如活性氧和辐射等累积性破坏在男性不育方面起着关键作用。此外,ARPKD小鼠模型与人类ARPKD严重症状相比,其临床表现有一些不同:多数Pkhd1^{-/-}小鼠可以摆脱胚胎致死而存活到成年,并表现出较轻的临床症状^[7]。本研究中,小鼠的生育力实验结果表明Pkhd1^{-/-}小鼠的生育能力明显低于野生型小鼠。因此,推测Pkhd1基因缺失不仅会降低男性生育能力,更可能会造成部分患者不育。对于此类人群,必须指出的是,在青春期罹患终末期肾病的患者,即使通过肾移植手术治愈,但其精子发生并不能恢复,可能是因为青春期对睾丸发育及精子发生至关重要^[15]。因此,在青少年ARPKD患者发展为尿毒症之前,可以采取一些预防措施,如精液冻存等。

综上,Pkhd1基因缺失可以使小鼠精子异常和

相关参数下降,包括精子浓度减少、活力减弱、精子尾畸形率升高和 CDs 残留比例提高。生育力实验进一步验证了 $Pkhd1^{-/-}$ 小鼠生育能力明显降低。 $Pkhd1$ 基因导致男性生育力下降的作用机制仍需进一步研究。且患有 ARPKD 的青少年可能面临生殖问题的风险,需要更多这方面的关注。

参考文献

- [1] Gunay-Aygun M, Tuchman M, Font-Montgomery E, et al. PKHD1 sequence variations in 78 children and adults with autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis[J]. *Mol Genet Metab*, 2010, 99(2): 160–73.
- [2] Ward C J, Hogan M C, Rossetti S, et al. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein[J]. *Nat Genet*, 2002, 30(3): 259–69.
- [3] Vora N, Perrone R, Bianchi D W. Reproductive issues for adults with autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *Am J Kidney Dis* 2008, 51(2): 307–18.
- [4] Dell K M. The spectrum of polycystic kidney disease in children[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2011, 18(5): 339–47.
- [5] Chapal M, Dehout A, Dufay A, et al. Kidney and liver transplantation in patients with autosomal recessive polycystic kidney disease: a multicentric study[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(5): 2083–8.
- [6] Nagasawa Y, Matthiesen S, Onuchic L F, et al. Identification and characterization of $Pkhd1$, the mouse orthologue of the human ARPKD gene[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(9): 2246–58.
- [7] Kim I, Fu Y, Hui K, et al. Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function[J]. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19(3): 455–68.
- [8] Mao S, Wu F, Cao X, et al. TDRP deficiency contributes to low sperm motility and is a potential risk factor for male infertility[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(1): 177–87.
- [9] Ward C J, Yuan D, Masyuk T V, et al. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia[J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(20): 2703–10.
- [10] Xu H, Yuan S Q, Zheng Z H, et al. The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis[J]. *Asian J Androl*, 2013, 15(6): 799–805.
- [11] Chen Q, Peng H, Lei L, et al. Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration[J]. *Cell Res*, 2011, 21(6): 922–33.
- [12] Banales J M, Masyuk T V, Bogert P S, et al. Hepatic cystogenesis is associated with abnormal expression and location of ion transporters and water channels in an animal model of autosomal recessive polycystic kidney disease[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(6): 1637–46.
- [13] Zhang J, Wu M, Wang S, et al. Polycystic kidney disease protein fibrocystin localizes to the mitotic spindle and regulates spindle bipolarity[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(17): 3306–19.
- [14] Shamsi M B, Kumar K, Dada R. Genetic and epigenetic factors: role in male infertility[J]. *Indian J Urol*, 2011, 27(1): 110–20.
- [15] Inci K, Duzova A, Aki F T, et al. Semen variables and hormone profiles after kidney transplantation during adolescence[J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(2): 541–2.

Effect of $Pkhd1$ gene deficiency on fertility in male mice

Mao Jun, Xu Yuchen, Gao Jingjing, et al

(Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of $Pkhd1$ gene deficiency on fertility of male mice. **Methods** 10 adult wide-type mice and 10 $Pkhd1^{-/-}$ mice of same age were taken respectively and epididymal spermatozoa was separated to observe the sperm parameters of the two groups: sperm concentration, vitality and morphology; Furthermore, 5 adult wide-type mice and 5 $Pkhd1^{-/-}$ mice of same age were taken respectively and the wild-type female mice were caged with two groups to observe the fertility indicators: frequency of mating (FM), rate of pregnancy (RP) and average number of pups (ANP). **Results** Compared with wild-type, sperm concentration in $Pkhd1$ -deficient mice decreased ($P < 0.01$), sperm motility decreased ($P < 0.01$), and sperm tail morphology was abnormal; and RP in female mice mated with $Pkhd1^{-/-}$ mice declined significantly. **Conclusion** $Pkhd1$ deficiency is sufficient to reduce male fertility in mice. This study provides new insights into the potential complications of fertility in men with autosomal recessive polycystic kidney disease.

Key words male fertility; ARPKD; $Pkhd1$; sperm; mouse model