



小鼠中年期和老年期睾丸组织转录组分析

张 涛,杨理凯,路宏朝,王 令,刘 欢,左甜甜

(陕西理工大学 生物科学与工程学院,陕西汉中 723001)

摘 要 为丰富小鼠睾丸组织转录组研究领域的基础数据,对中年期(180 日龄)和老年期(360 日龄)小鼠睾丸组织进行转录组测序分析,在中、老年期分别获得 25 187 980 个和 28 840 576 个可用 Reads,比对到参考基因组上的 Reads 分别有 18 861 721 和 22 355 657 个,占总读数的 74.88% 和 77.51%,并检测到中、老年期小鼠睾丸组织中分别有 17 770 和 18 073 个基因表达。以中年期为对照,老年期睾丸组织中下调基因 122 个,上调基因 185 个,其中可清楚注释的基因共 285 个。GO 分析发现 285 个差异表达被归纳到生物过程、细胞组分与分子功能 3 个大类的 25 个小类,主要涉及膜、氧化还原过程、转运蛋白活性、生殖发育及衰老等。KEGG 分析发现差异表达基因涉及 139 个信号通路,主要代谢通路为信号转导、脂代谢、碳水化合物代谢、内分泌系统和神经系统等生物学机制。差异表达基因中 RPKM>1 的有 57 个,其所涉及信号通路主要为脂代谢、固醇类激素生成、TNF 信号通路、补体系统、胰岛素和溶酶体等。

关键词 小鼠;睾丸;转录组;差异表达基因;功能分类

中图分类号 Q756

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2018)08-1088-09

老龄化问题已成为世界各国面临的共同课题,中国老龄化速度不断加快。衰老涉及内分泌系统多个方面的改变,包括肾上腺、甲状腺、垂体生长激素、性腺、骨矿物质代谢和糖代谢等^[1-2]。Holladne 等在 1958 年发现老年男子的睾丸精索静脉睾酮水平低于青年男子^[3],是衰老降低睾酮产生的有力证据。近年来,学者把由老龄化所导致的血液中雄激素低下为生物化学基础的症候群称之为“部分雄激素缺乏综合征(partial androgen deficiency of aging male, PADAM)”,临床表现为失眠、健忘、性功能障碍等多种老年性疾病^[4-5]。睾丸是精子产生的场所,并分泌雄激素。精子在曲精小管中从精原干细胞到精母细胞,然后通过减数分裂形成精子,该过程也涉及睾丸中支持细胞及间质细胞等。睾丸支持细胞分布在曲精小管,负责生殖细胞的营养与保护,而间质细胞分布于睾丸间质中^[6],在脑垂体分泌的黄体生成素作用下,生成和分泌雄激素——睾酮,促进性腺发育、精子发生,维持男性性征^[7],男性 40 岁后随着年龄的增长,下丘脑—垂体—睾丸轴功能减退,睾丸功能降低。

睾丸作为雄性的主要标志器官,其生长发育是一个复杂而精密的生理过程,随着年龄老化而出现睾丸内分泌变化与功能衰退,多数学者认为是由于衰老对下丘脑—垂体—睾丸轴功能产生影响而导致,目前已开展大量人与动物睾丸发育^[8]、损伤与保护^[9]及组织中基因表达差异^[10]等研究,但是相关的生理机制和分子机理仍然没有阐述清楚。测序技术的出现为人类从分子水平解析生命的奥秘提供新的途径,转录组测序与分析技术的应用已经有 20 多年,广泛应用于生物学的研究,且对小鼠不同发育阶段睾丸组织中不同类型细胞的基因表达进行研究^[11-13],但多数研究集中在胚胎期、幼年、青年和成年期,而关于中年期和老年期的睾丸组织的转录组研究未见报道。本研究选取出生后 180 日龄和 360 日龄小鼠,分别代表中年期和老年期,采用 Illumina Hiseq 测序平台对睾丸组织的基因表达情况进行比较分析,为探讨睾丸功能退化的分子机制提供基础数据,以期为老龄化过程中生物学与医学等某些方面科学问题的解决提供新思路。

收稿日期:2018-05-20 **修回日期:**2018-07-05

基金项目:陕西理工大学人才启动项目(SLGQD2017-10);陕西省科技厅农业科技创新与攻关(2016NY-084)。

第一作者:张 涛,男,博士,副教授,研究方向为分子遗传学。E-mail: zlt780823@163.com

1 材料与方法

1.1 试验动物

C57BL 小鼠购自第四军医大学实验动物中心,实验室长期饲养,选取中年期(180 日龄)和老年期(360 日龄)的睾丸组织进行研究。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取 每只小鼠取 1 个睾丸,按照 Trizol Reagent 试剂盒的操作流程提取总 RNA,测定质量浓度后按照中年期和老年期 2 个组分别将 3 个样本等量混合构建 cDNA 文库。

1.2.2 测序文库的构建 基于 mRNA 特有的 Poly(A)结构进行 mRNA 纯化。通过离子打断的方式将 mRNA 打断为 200~300 bp。采用随机引物和逆转录酶合成 cDNA 第 1 条链,合成第 2 条 cDNA 链时将 dTTP 替换成 dUTP,以提高结果的准确性。cDNA 文库构建完成后,采用 PCR 扩增进行文库片段富集,建立测序文库,文库大小在 300~400 bp,最后通过 Agilent 2100Bioanalyzer 对文库进行质检。

1.2.3 Illumina 测序 选择上海派森诺生物科技有限公司 Illumina Hiseq 测序平台对文库进行双末端(Paired End,PE)测序。

1.2.4 数据处理 采用 Cutadapt (Version 1.2.1)除去 3'端的接头,数据平均含量按照 Q20 标准控制。进行比对的参考基因组数据来源为 Ensembl 数据库(<http://www.ensembl.org/>),参考的基因组信息为 Mus_musculus.GRCm38.dna.primary_assembly.fa,数据库版本为 Ensembl 86.38。通过 Bowtie2 建立参考基因组索引,然后使用 Tophat2 (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>)将过滤后的 Reads 比对到参考基因组上。

1.2.5 差异基因筛选 使用 HTSeq 0.6.1p2 (<http://www.huber.embl.de/users/anders/HTSeq>)统计比对到每一个基因上 ReadCount 值,作为基因的原始表达量。采用 RPKM(Reads Per Kilo bases per Million reads)^[14]对表达量进

行标准化(Normalization)。采用 DESeq(version 1.18.0)^[15]对基因表达进行差异分析,筛选差异表达基因条件为:表达倍数差异 |fold change| > 2,显著性 $P<0.05$ 。采用 R 语言 ggplots2 软件包绘制差异表达基因的火山图和 MA 图。

1.2.6 GO 与 KEGG 分析 将所有检测到的基因映射到 GO(Gene Ontology)数据库每一个 Term,计算每个 Term 的差异基因数目,以整个基因组为背景,采用超几何分布计算差异基因显著富集的 Term 及相应功能;在 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)数据库比对差异表达基因,统计各个 KEGG Pathway 各层级的差异表达基因数目,确定差异表达基因主要参与的代谢途径和信号通路。

2 结果与分析

2.1 数据质量检测

由表 1 可知,2 个样品分别获得 25 479 636 和 29 158 408 条 reads,总碱基数分别为 3 847 425 036 bp和 4 402 919 608 bp,其中识别准确率在 99.9% 以上的碱基总数为 3 439 210 859 bp 和 3 967 709 437 bp;Q20 值均在 95% 以上,Q30 在 89% 以上,结果表明测序质量好,保证研究的可靠性。为了排除接头和低质量 Reads 对信息分析的干扰,试验进行数据的过滤处理(表 2),试验两个样品分别检测到 25 187 980 个和 28 840 576个有效的 Reads,比对到参考基因组上的分别有 18 861 721 个和 22 355 657 个,占总读数的 74.88% 和 77.51%。比对结果显示比对效率较好,能比对到功能基因的比例分别为 76.51% 和 79.96%,其中比对到外显子区的分别为 95.54% 和 96.06%,结果如表 3 所示,说明测序的数据丰富,有效性好。

2.2 差异表达基因的筛选

为系统了解小鼠中年期及老年期睾丸组织基因表达情况,笔者计算检测到的每一个基因的 RPKM 值,如表 4 所示。转录组研究领域的主流杂志提出,在有参转录组当中,一般认为RPKM

表 1 转录组测序数据评价分析

Table 1 Evaluation of transcriptome sequencing data

样品 Sample	Reads	碱基总数/bp Base pairs	Q30/bp	N/%	Q20/%	Q30/%	GC/%
中年期 Middle age	25 479 636	3 847 425 036	3 439 210 859	0.014733	95.39	89.38	51.82
老年期 Old age	29 158 408	4 402 919 608	3 967 709 437	0.013615	95.75	90.11	51.03

表 2 转录组测序数据比对结果基本统计
Table 2 Basic statistics of transcriptome sequencing data

样品 Sample	比对序列数 Useful reads	参考基因 比对有效数 Total mapped reads	参考基因有效 比对百分比/% Total mapped	多位点 比对数 Multiple mapped reads	单位点比对数 Uniquely mapped reads
中年期 Middle age	25 187 980	18 861 721	74.88	637 237	18 224 484
老年期 Old age	28 840 576	22 355 657	77.51	784 891	21 570 766

表 3 转录组数据比对区域分布统计
Table 3 Transcriptome data comparison regional distribution statistics

样品 Sample	比对到基因数 Mapped to gene count	比对到基因比例/% Mapped to gene	比对到基因内含子区比例/% Mapped to inter gene	比对到基因外显子比例/% Mapped to exon
中年期 Middle age	15 825 391	76.51	23.49	95.54
老年期 Old age	19 610 045	79.96	20.04	96.06

>1 的基因是表达的,RPKM 能够很好地反应基因的表达水平。在中年期小鼠的睾丸组织可检测到 17 770 个基因的表达,其中 RPKM 值小于 1 的基因占 62.15%,大于 100 的基因占 0.80%;在老年期小鼠的睾丸组织中,检测到 18 073 个基因的表达,其中 RPKM 值小于 1 的基因占 61.45%,大于 100 的基因占 0.74%。火山图可直观反映基因的分布情况,MA 图常用来评估文库 Normalization 的质量,结果表明(图 1、图 2)中

年期和老年期睾丸组织转录组表达水平存在较大差异。以中年期为对照,老年期表现下调基因 122 个,上调基因 185 个(图 3) 其中上调基因中可注释的 181 个,下调基因可注释的 104 个。所有差异表达基因中,RPKM>1 的基因共有 57 个,下调 18 个,上调 39 个。

2.3 GO 分类

利用 Blast2GO 软件对 307 个差异表达基因进行分析表明,285 个基因可以分为生物过程、细

表 4 不同生长时期睾丸组织 RPKM 值
Table 4 FPKM value of testis tissue in different growth stages

RPKM 值 RPKM value	0—1	1—5	5—10	10—100	>100	总计 Total
中年期 Middle age	11 108(62.51%)	4 194(23.35%)	1 074(6.04%)	1 253(7.05%)	141(0.80%)	17 770
老年期 Old age	11 106(61.45%)	4 445(24.60%)	1 139(6.30%)	1 250(6.92%)	133(0.74%)	18 073

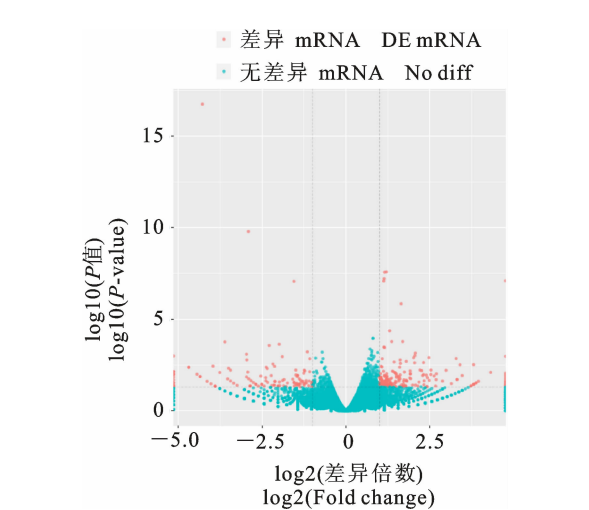


图 1 差异表达基因火山图
Fig. 1 Valcano chart of differentially expressed genes

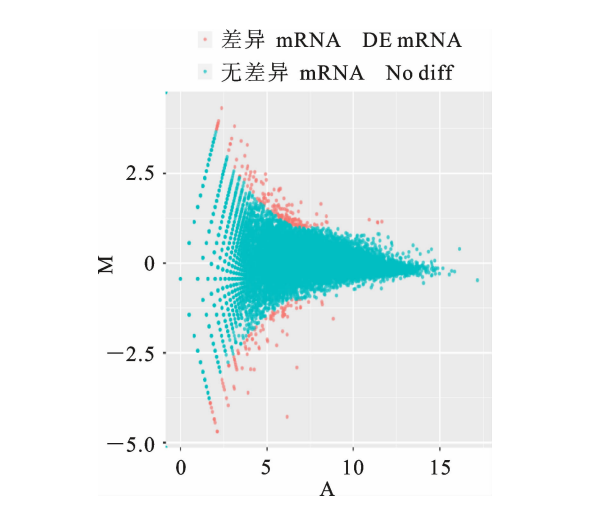


图 2 差异表达基因 MA 图
Fig. 2 MA chart of differentially expressed genes

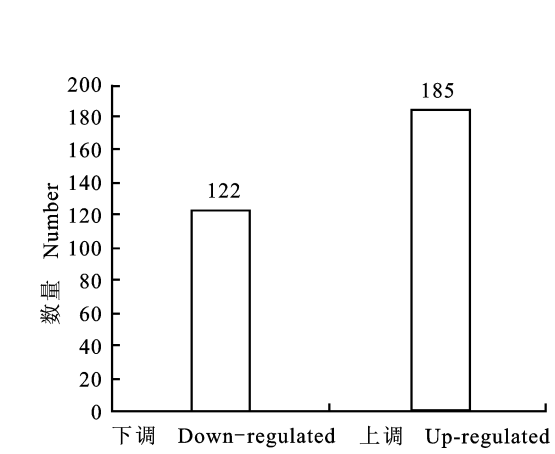
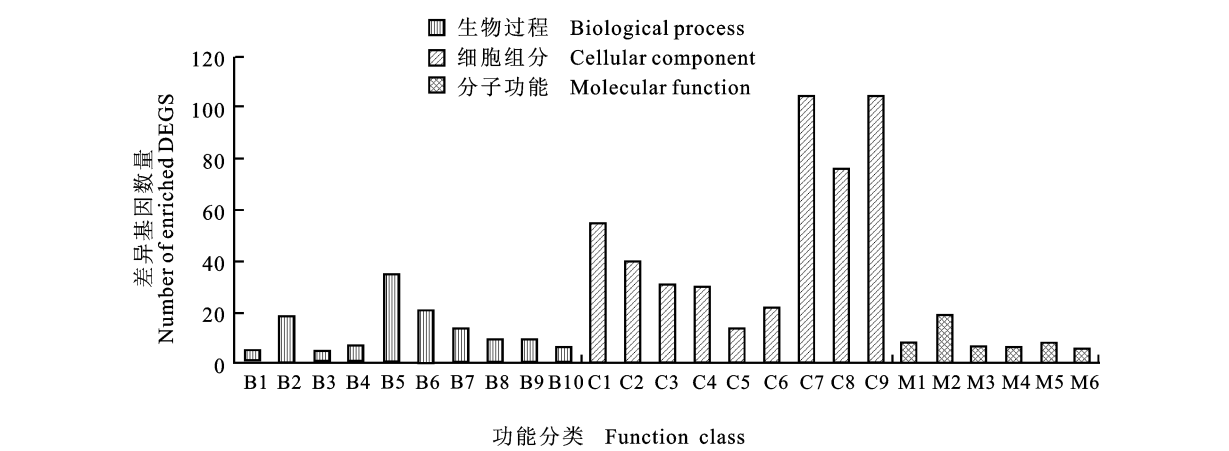


图 3 中年期与老年期睾丸组织差异表达基因统计
Fig. 3 Statistics of differentially expressed genes in middle-and old-aged mouse

胞组分和分子功能 3 大类别 25 小类,共涉及生物过程的 1 625 个条目,细胞组分的 244 个条目,分子功能的 333 个条目。差异表达基因在细胞组分分类下主要涉及膜及其组成相关的各种功能,其中最多的是膜的整体组成(图 4)。在生物过程大类下基因涉及的生物学功能最复杂,涉及基因较多的是转运、RNA 聚合酶 II 启动子转录调控、氧化还原过程、转录调控与 DNA 模板化和老龄化。在分子功能分类中,氧化还原酶活性所占比例最多,其次是转运蛋白活性、丝氨酸型内肽酶抑制剂活性、转运体活性和裂解酶活性。此外,从图 4 也可以看出,与生殖发育和衰老相关的生物学过程有细胞增殖调节、免疫系统过程、骨化、老化、丝氨酸型内肽酶抑制剂活性、氧化还原酶活性等。



B1. 炎症反应正向调节 Positive regulation of inflammatory response; B2. 氧化还原过程 Oxidation-reduction process; B3. 骨化 Ossification; B4. 老化 Aging; B5. 运输 Transport; B6. RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调节 Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; B7. 转录正调节, DNA 模板化 Positive regulation of transcription, DNA-templated; B8. 膜转运 Transmembrane transport; B9. 免疫系统过程 Immune system process; B10. 调节细胞增殖 Regulation of cell proliferation; C1. 细胞外外泌体 Extracellular exosome; C2. 细胞外区域 Extracellular region; C3. 内质网 Endoplasmic reticulum; C4. 细胞外空间 Extracellular space; C5. 内体 Endosome; C6. 质膜的整体成分 Integral component of plasma membrane; C7. 膜的整体组成部分 Integral component of membrane; C8. 质膜 Plasma membrane; C9. 膜 Membrane; M1. 丝氨酸型内肽酶抑制剂活性 Serine-type endopeptidase inhibitor activity; M2. 氧化还原酶活性 Oxidoreductase activity; M3. 转运体活性 Symporter activity; M4. 裂解酶活性 Lyase activity; M5. 运输活动 Transporter activity; M6. 肝素结合 Heparin binding

图 4 GO 功能分类图
Fig. 4 GO function classification

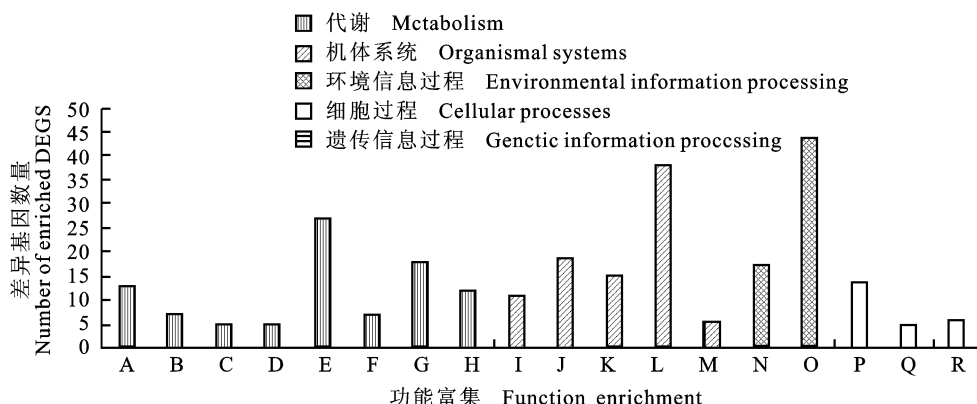
2.4 KEGG 富集分析

通过 KEGG 数据库进行差异基因比对与富集,结果发现 301 个基因归纳到 5 个大类的 18 个小类中,共涉及 139 个信号通路,如图 5 所示。结果表明,这些差异表达基因主要参与的前 5 个代谢通路为信号转导、脂代谢、碳水化合物代谢、内分泌系统和神经系统。KEGG 归类分析后,筛选出 RPKM>1 的 57 个基因,并统计分析这些

基因涉及的信号通路,最终检测到 20 个基因涉及 35 个信号通路(表 5)。小鼠中年期睾丸组织有 6 个基因显著上调,涉及 PPAR 信号通路、脂类调控、补体系统、氮代谢、嗅觉转导、吞噬体、肠免疫网络、抗原加工与展示和细胞粘附分子等 9 个信号通路。而在老年期检测到 15 个基因上调,涉及 20 个信号通路,主要包括花生四烯酸代谢、卵巢类固醇生成、类固醇激素生成、醛固酮的

生成与分泌、肾素血管生成素系统、血管平滑肌、肾素分泌、氨基酸代谢、催产素信号通路、促性腺

激素释放激素、TNF 信号通路、甘油三酯代谢、补体系统、胰岛素、溶酶体和鞘脂类代谢与信号通路。



A. 异生素的生物降解和代谢 Xenobiotics biodegradation and metabolism; B. 概述 Overview; C. 核苷酸代谢 Nucleotide metabolism; D. 其他氨基酸的代谢 Metabolism of other amino acids; E. 油脂代谢 Lipid metabolism; F. 聚糖生物合成和代谢 Glycan biosynthesis and metabolism; G. 碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism; H. 氨基酸代谢 Amino acids metabolism; I. 感官系统 Sensory system; J. 神经系统 Nervous system; K. 免疫系统 Immune system; L. 内分泌系统 Endocrine system; M. 循环系统 Circulatory system; N. 信号分子和相互作用 Signaling molecules and interaction; O. 信号传导 Signal transduction; P. 运输和分解代谢 Transport and catabolism; Q. 细胞群落 Cellular community; R. 翻译 Translation

图 5 差异表达基因 KEGG 功能聚类图

Fig. 5 KEGG function classification of differentially expressed genes

3 讨论与结论

3.1 转录组测序可靠性分析

转录组测序技术为基因表达及调控研究和生物重要性状候选基因的鉴定提供新的途径,尤其在物种、不同发育阶段及不同组织之间挖掘差异表达基因具有重要作用^[16]。本研究通过 Illumina HiSeq 测序平台分析检测小鼠中年期和老年期睾丸组织的 cDNA 文库,获得小鼠睾丸组织在中、老年期大量的基因表达信息与变化差异,结果表明,选择的试验材料测序质量好,各样品的 Q20 均在 95% 以上, Q30 均在 89% 以上;在小鼠中年期和老年期睾丸组织分别检测到 25 187 980 个和 28 840 576 个可用的 Reads, 比对效率分别达到 74.88% 和 77.51%;测序质量高于前期小鼠睾丸组织 6 日龄 (52.87%) 4 周龄 (56.70%) 和 10 周龄 (62.35%) 的转录组测序结果^[13],也比其他物种如鸭卵巢组织 (70.92% 和 72.70%)^[16] 和绵羊 (68.05% 和 71.82%)^[17] 等组织的高。

3.2 中年期和老年期睾丸组织基因差异表达分析

自从转录组分析技术出现以来,科学家就将该技术应用到小鼠睾丸的基因表达研究,如抑制

消减杂交 (SSH)、表达序列标签 (expressed sequence tag, EST)、cDNA 微阵列和基因表达系列分析 (serial analysis of gene expression, SAGE) 等技术。通过这些技术构建小鼠的睾丸体细胞基因表达谱,鉴定出大量小鼠睾丸组织唯一表达标签,发现一些在睾丸生精细胞、支持细胞和间质细胞特异表达的基因,并在小鼠不同发育阶段检测到许多与精子生成有关的差异表达基因^[11-12]。高通量转录组测序技术比传统转录组分析技术更能敏感地检测样本间的基因差异表达。龚未等^[13]采用超高通量新一代 Technologies SOLiD 测序平台分析 6 日龄、4 周龄和 10 周龄小鼠睾丸组织的基因表达数据,鉴定出 18 837 个基因,同时鉴定不同发育阶段差异表达的基因。但目前利用高通量转录组测序技术分析小鼠中年期和老年期睾丸组织的基因差异表达未见报道。

本研究对小鼠中年期和老年期睾丸组织 cDNA 文库进行分析,共检测到 307 个表达差异的基因,可注释的 271 个,上调 173 个,下调 98 个,其中 264 个基因获得 GO 功能注释,187 个基因清楚涉及 KEGG 代谢通路。由于小鼠作为模式生物研究的比较深入,比对数据库中的参考基因比较全面,所以本研究中检测到差异表达基因功能在 GO、KEGG 中被注释的比例比其他物种

表 5 差异表达基因涉及的信号通路

Table 5 Differentially expressed genes involved in signaling pathways

基因名称 Gene name	基因缩写 Abbreviation	表达水平 (中年期) RFPK of middle age	表达水平 (老年期) RFPK of old age	倍数变化 (老年期、中年期) Fold change (age/middle)	相关信号通路 Related pathway
脂肪酸结合蛋白 4 Fatty acid binding protein 4	<i>Fabp4</i>	5.180 907 889	0.727 952 662	0.133 168 536	PPAR 信号通路 PPAR signaling pathway 脂肪细胞中的脂肪酸调节 Regulation of lipolysis in adipocytes 补体和凝血 Complement and coagulation cascades
补体因子 4 complement factor D	<i>Cfd</i>	4.659 744 513	1.006 337 613	0.204 684 972	补体和凝血 Complement and coagulation cascades
碳酸酐酶 3 Carbonic anhydrase 3	<i>Car3</i>	2.819 056 956	0.153 099 104	0.051 472 25	氮代谢 Complement and coagulation cascades
嗅觉受体 461 Olfactory receptor 461	<i>Olf461</i>	1.189 834 268	0	0	嗅觉转导 Nitrogen metabolism
组织相容 II 抗原 Aahistocompatibility 2, class II antigen A, alpha	H2-Aa	1.782059998	0.828 443 093	0.440 600 228	吞噬小体 Olfactory transduction IgA 产生的肠免疫网络 Intestinal immune network for IgA production 抗原加工和呈递 Antigen processing and presentation
细胞粘附分子(CAMs) Cell adhesion molecules (CAMs) 前列腺素 D2 合成酶(脑) Prostaglandin D2 synthase (brain)	<i>Ptgds</i>	51.793 614	121.608 996 7	2.225 327 052	花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism
羟基-Δ-5 脱氢酶, 3-β 激素 Δ 异构酶 6 Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- andsteroid delta-isomerase 6	<i>Hsd3b6</i>	11.419 281 33	27.844 762 91	2.311 048 765	卵巢类固醇生成 Ovarian steroidogenesis 类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis 醛固酮合成和分泌 Aldosterone synthesis and secretion
血管紧张素原 Angiotensinogen	<i>Agt</i>	11.004 318 57	25.561 870 72	2.2015 767 86	肾素-血管紧张素系统 Renin-angiotensin system 血管平滑肌收缩 Vascular smooth muscle contraction 肾素分泌 Renin secretion
甜菜碱 - 高半胱氨酸甲基转移酶 Betaine-homocysteine methyltransferase	<i>Bhmt</i>	6.994 843 162	16.104 634 17	2.182 113 019	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism 半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism
羟基类固醇(17-β)脱氢酶 10 Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogen- ase 10	<i>Hsd17b10</i>	2.121 138 342	4.695 808 363	2.098 194 423	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation
镁依赖性磷酸酶 1 Regulator of G-protein signaling 2	<i>Rgs2</i>	1.723 212 502	3.748 282 177	2.061 568 637	催产素信号通路 Oxytocin signaling pathway cGMP-PKG 信号通路 cGMP-PKG signaling pathway 嗅觉转导 Olfactory transduction GnRH 信号通路 GnRH signaling pathway TNF 信号通路 TNF signaling pathway
基质金属蛋白酶 14(膜插入) Matrix metalloproteinase 14	<i>Mmp14</i>	1.6447419	3.678254666	2.119573085	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis
磺基转移酶家族 1E, 成员 1 Sulfotransferase family 1E, member 1	<i>Sult1e1</i>	1.177 536 928	2.755 796 24	2.218 0785 68	肾素-血管紧张素系统 Renin-angiotensin system 内分泌和其他因子钙调 Endocrine and other factor-regulated calcium
激肽释放酶 1 相关肽酶 b21 Kallikrein 1-related peptidase b21	<i>Klk1b21</i>	1.163135684	2.729974518	2.224500826	甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism
内皮脂肪酶 Lipase, endothelial	<i>Lipg</i>	0.885 407 617	2.048 588 207	2.192 884 573	补体和凝血 Complement and coagulation cascades
补体组分 1 q 亚基 C 链 Complement component 1, q subcompo- nent, C chain	<i>Clqc</i>	0.744 467 119	2.048 066 72	2.607 371 641	溶酶体 Lysosome
CD68 抗原 CD68 antigen	<i>Cd68</i>	0.384 964 41	1.982 853 207	4.881 736 578	溶酶体 Lysosome
蜡样脂褐质沉着症, 神经元 5 Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 5	<i>Cln5</i>	0.722 964 887	1.597 502 199	2.094250448	溶酶体 Lysosome
鞘磷脂磷酸二酯酶 1, 酸性溶酶体 Sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal	<i>Smpd1</i>	0.509 886 794	1.513 611 678	2.813 487 976	溶酶体 Lysosome 鞘脂代谢 Sphingolipid metabolism 鞘脂信号通路 Sphingolipid signaling pathway
RAB3A, 膜 RAS 原癌基因家族 RAB3A, member RAS oncogene family	<i>Rab3a</i>	0.303 632 376	1.125 849 956	3.514 283 516	胰岛素分泌 Insulin secretion 突触小泡循环 Synaptic vesicle cycle

覆盖度高。但是,也有一些基因没有被注释到,也没有归入到相应的 GO 和 KEGG 功能分类,分析原因可能是目前小鼠睾丸组织的研究多数集中于胚胎发育和青年期,而中年期和老年期的研究相对较少,而那些到中老年期后表达的一些特异基因没有被发现,也有可能是转录组测序及拼接序列较短,获得注释信息的可能性就降低。

3.3 差异表达基因的功能分析

GO 归类分发现在细胞组分大类中涉及的基因比较集中,主要是膜相关类别,说明在小鼠中老年期和老年期睾丸生理活动中的差异表达基因主要与膜的生物学功能相关,同时也发现一些基因涉及细胞外的活动,该结果与龚未等^[13]通过转录组分析技术研究小鼠出生后的基因差异表达研究是一致的,说明细胞外活动相关基因贯穿小鼠睾丸整个生理生化过程。而在生物过程中差异表达基因涉及的范围比较分散和多样,各组分中相关基因数量较少,且差异不明显,这与其前期关于小鼠睾丸组织和其他物种的研究基本一致,推断生物过程在睾丸组织中是最基本的代谢途径。对分子功能大类的分析发现,氧化还原酶活性所占比例最多,可能与老龄化密切相关,随着年龄增大,需要大量的氧化还原酶发挥抗衰老的作用。此外,也检测到明显与生殖发育、性功能及衰老相关的差异表达基因。本研究结果证实膜相关、细胞外、转运和氧化还原等类别在中老年睾丸组织中存在较大差别的基因表达,推测膜相关、细胞外、转运和氧化还原在睾丸功能退化的生理活动中可能具有重要的作用。

遗传学已经阐明,表型的产生有主效基因作用、微效多基因假说及其与环境互作效应等机制。现代生物学研究证明生物体中不同类型的生物学功能由多个基因相互协调进行调控,形成一个精密的调控网络,通过信号通路富集分析有助于系统而全面地解析基因功能。转录组分析可以检测到不同物种或者不同时间与空间的遗传表达差异,实现差异表达基因的信号通路富集分析。本研究检测到与小鼠中年期和老年期睾丸组织转录组表达差异相关的 139 个信号通路,其中信号转导、脂代谢、碳水化合物代谢、内分泌系统和神经系统等 5 个代谢通路涉及的差异表达基因较多,同时与癌症和免疫学疾病相关的信号通路富集一些基因。有研究报道,在有参照转录组分析当中,一般认为 RPKM>1 的基因是表达的,本研究着

重将差异表达基因中 RPKM>1 的进行分析,发现中年期和老年期小鼠睾丸组织在脂代谢、GnRH 信号通路、固醇类激素生成、TNF 信号通路、补体系统、胰岛素和溶酶体相关等信号通路存在较大差异。本研究中涉及脂肪合成与代谢的有脂肪酸结合蛋白 4(*FABP4*)、内皮脂肪酶(*Lipg*)、蜡样脂褐质沉着症神经元 5(*Cln5*)和鞘磷脂磷酸二酯酶 1 酸性溶酶体(*Smpd1*)。*FABP4* 在脂肪、卵巢和睾丸组织中广泛分布,能结合多种疏水性化合物,参与脂肪酸的合成^[18],该基因的缺失可增加脂肪酸浓度,促使脂肪分解^[19]。本研究中发现年小鼠睾丸组织中 *FABP4* 的表达水平高于老年小鼠,说明睾丸组织随着年龄的增加脂肪分解能力提高,贮存脂肪能力减少,为激素合成与精子生成提供的能量就不足。*Lipg* 在内皮细胞合成,冠状动脉、肝脏、肺、睾丸、肾脏和卵巢多种组织中表达,主要功能是参与脂蛋白代谢,其磷脂酶活性强于甘油三酯酶,对富含磷脂的高密度脂蛋白的水解作用更强,在动物试验和人体内均发现内皮脂肪酶的水平与高密度脂蛋白(HDL-C)的水平呈负相关^[20]。也有研究发现 *Lipg* 与炎症反应也有密切的联系,可促进细胞间黏附因子 1 的表达及单核细胞对血管内皮粘的附作用,这都与老龄化有密切的关系。本研究在小鼠中年期和老年期均检测到该基因表达,且老年小鼠睾丸组织中 *Lipg* 基因表达水平显著高于中年小鼠,结果与其组织器官的研究基本一致。

睾丸雄激素的合成由下丘脑分泌的 GnRH 调节,其通过促进垂体分泌促性腺物质影响性激素生成而影响雄性动物生殖活动^[21]。本研究中 GnRH 信号通路和 TNF 信号通路涉及基质金属蛋白酶(MMP-14),睾丸组织中老年鼠要显著高于中年鼠,有研究报道 MMP-14 异常表达与多种恶性肿瘤密切相关^[22-23],说明老龄化可增加患恶性肿瘤的风险。前列腺素 D 合成酶(Prostaglandin D synthase,PGDS)催化不稳定的中间产物前列腺素 H₂(PGH₂)发生异构化生成,其分为脑型脂质运载蛋白 PGDS(lipocalin-PGDS, LPGDS)和生血型 PGDS(hematopoietic PGDS, hPGDS)^[24]。LPGDS 在中枢神经系统、雄性生殖器官和心脏等组织分布,具有转运亲脂性物质和催化 PGD₂ 合成的双重功能,在脑脊液、精浆及血浆内都可检测到^[25-26]。关于 LPGDS 如何影响雄性生殖能力的研究还没有清楚解析,但推测

其携带肾上腺素、类固醇、维生素 A 等越过血—睾屏障帮助精子细生成与成熟。本研究中 *LPGDS* 基因在老年期小鼠睾丸组织的表达水平显著高于中年期,可以作为其功能研究的一个切入点。此外,补体系统、胰岛素、溶酶体、氨基酸代谢和嗅觉转导系统等检测到一些差异表达基因,其在睾丸生理生殖活动中的作用还需进一步研究。

本研究对中年期和老年期小鼠睾丸组织进行转录组分析,检测小鼠睾丸组织不同年龄阶段基因表达的差异及相关的信号通路。该研究为丰富小鼠睾丸组织转录组信息提供中老年期的数据,也为探讨睾丸功能退化及其在老龄化过程中生物学与医学等某些方面的研究奠定基础。

参考文献 Reference:

- [1] ELMLINGER M W, DENGLE RT, WINSTOCK C, *et al.* Endocrine alterations in the aging male[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2003, 41(7): 934-941.
- [2] LEIFKE E, GORENOI V, WICHES C, *et al.* Age-related changes of serum sex hormones, insulin-like growth factor-1 and sex-hormone binding globulin levels in men: cross-sectional data for healthy male cohort[J]. *Clinical Endocrinology*, 2000, 53(6): 689-695.
- [3] KANG Y G, BAE C Y, KIM S, *et al.* Age-related change in serum concentrations of testosterone in middle-aged Korean men[J]. *Aging Male*, 2003, 6: 8-12.
- [4] SCHATZL G, MADERSBAHNER S, TEMML C, *et al.* Serum androgen levels in men: impact of health status and age[J]. *Urology*, 2003, 61: 629-633.
- [5] FERRINI R L, BERRETTCONNO R E. Sex hormones and age: a cross-sectional study of testosterone and estradiol and their bioavailable fractions in community-dwelling men[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1998, 147: 750-754.
- [6] 卢 晖, 周新华. ICR 小鼠胚胎及出生后不同阶段睾丸内生殖细胞的发育[J]. 武汉大学学报(医学版), 2004, 25(4): 358-360.
- LU X, ZHOU X H. Development of germ cells in the testis of the ICR Mouse during fetal and postnatal period[J]. *Medical Journal of Wuhan University*, 2004, 25(4): 358-360.
- [7] 陈 坚, 潘钦石, 王瑜敏, 等. 中老年男性体检人群生殖激素水平的动态变化及相关因素分析[J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(2): 131-136.
- CHEN J, PAN Q SH, WANG Y M, *et al.* Dynamic changes of reproductive hormone levels and related factors in old and middle-aged men in health examination[J]. *National Journal of Andrology*, 2017, 23(2): 131-136.
- [8] 吴 森, 王燕燕, 陈福财, 等. 甘氨酸锌对受体羊血清激素水平、黄体数和受胎率的影响[J]. 西北农业学报, 2012, 21(4): 6-10.
- WU S, WANG Y Y, CHEN F C, *et al.* Effects of Zinc-Glycine supplement on the serum hormone level, corpus luteum count and conception rate of small-tail Han ewes[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2012, 21(4): 6-10.
- [9] 贾琦珍, 陈根元, 吴书奇, 等. 小花棘豆中毒对大鼠睾丸 α -甘露糖苷酶的影响[J]. 西北农业学报, 2015, 24(4): 6-12.
- JIA Q ZH, CHEN G Y, WU SH Q, *et al.* Effects of *Oxytropis glabra* DC poisoning on α -Mannosidase in rat testis[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2015, 24(4): 6-12.
- [10] 卢曾奎, 高建峰, 马友记, 等. 绵羊 *RBP4* 基因克隆及其在不同月龄睾丸中的表达[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(5): 750-757.
- LU Z K, GAO J F, MA Y J, *et al.* Cloning of *RBP4* gene and its expression in different months old testis of sheep (*Ovis aries*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(5): 750-757.
- [11] DIVINA P, VLCEK C, STRNAD P, *et al.* Global transcriptome analysis of the C57BL/6J mouse testis by SAGE: evidence for nonrandom gene order[J]. *BMC Genomics*, 2005, 6: 29.
- [12] LEE T L, CHEUNG H H, CLAUS J, *et al.* GermSAGE: a comprehensive SAGE database for transcript discovery on male germ cell development [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: 891-897.
- [13] 龚 未, 潘林林, 林 强, 等. 基于新一代测序方法的小鼠睾丸出生后发育的转录组研究[J]. 中国科学(生命科学), 2013, 43(2): 137-150.
- GONG W, PAN L L, LIN Q, *et al.* Transcriptome profiling of the developing postnatal mouse testis using next-generation sequencing[J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2013, 43(2): 137-150.
- [14] ROBERTS A, PACTHER L. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(1): 71-99.
- [15] WANG L, FENG Z, WANG X, *et al.* DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNAseq data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26: 1368.
- [16] 朱志明, 陈红萍, 林如龙, 等. 山麻鸭开产期和产蛋高峰期卵巢组织转录组分析[J]. 中国农业科学, 2016, 49(5): 998-1007.
- ZHU ZH M, CHEN H P, LIN R L, *et al.* Transcriptome analysis of ovary tissue in early laying period and egg laying peak period of shanma ducks [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(5): 998-1007.
- [17] HUANG W, KHATIB H. Comparison of transcriptomic landscapes of bovine embryos using RNA-Seq[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 711-720.
- [18] 范芮铭, 孟 博, 曹中赞, 等. 脂肪型脂肪酸结合蛋白的生理功能及在禽类中的研究进展[J]. 动物医学进展, 2017, 38(5): 89-92.
- FAN R M, MENG B, CAO ZH Z, *et al.* Physiological function of A-FABP and its research progress in poultry[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38(5): 89-92.
- [19] GARINSHKOLNIK T, RUDICH A, HOTAMISLIGIL G S, *et al.* *FABP4* attenuates *PPAR γ* and adipogenesis and is inversely correlated with *PPAR γ* in adipose tissues[J]. *Diabetes*, 2014, 63(3): 900-911.
- [20] 刘志豪, 程允就. 内皮脂肪酶与代谢综合征的研究进展[J]. 国际内科学杂志, 2009, 36(10): 564-567.

- LIU ZH H, CHENG Y J. Research progress in relationship between endothelial lipase and the metabolic syndrome[J]. *Internal Journal of Internal Medicine*, 2009, 36(10):564-567.
- [21] 徐文丹, 代晓南, 崔毓桂. 睾丸雄激素合成的调节机制及其研究进展[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2014, 33(6): 428-432.
- XU W D, DAI X N, CUI Y G. Testicular steroidogenesis and its regulation[J]. *Journal of international Reproductive Health/Family Planning*, 2014, 33(6):428-432.
- [22] BARBOLINA M, STACK M S. Membrane type -1 matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis[J]. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2008, 19:24-33.
- [23] LINAH A A, THOMAS E C J. Ovarian cancer: involvement of the matrix metalloproteinases[J]. *Reproduction*, 2015, 150(2):55-64.
- [24] 陆金春, 黄宇烽, 张锡然. Lipocalin 型前列腺素 D 合成酶研究进展: 基因结构和理化性质[J]. *中华男科学*, 2000, 6(1):38-42.
- LU J CH, HUANG Y F, ZHANG X R. Advances in Lipocalin-type prostaglandin D synthase: the gene structure and physicochemical characterization[J]. *National Journal of Andrology*, 2000, 6(1):38-42.
- [25] LEONE M G, HAQ H A, SASO L. Lipocalin-type prostaglandin D synthase: which role in male fertility[J]. *Contraception*, 2002, 65:293-295.
- [26] 陈德宇, 黄宇烽, 周开亚, 等. Lipocalin 型前列腺素合成酶的结构、定位与特性[J]. *中华男科学*, 2004, 10(2):134-138.
- CHEN D Y, HUANG Y F, ZHOU K Y. Structure, localization and characterization of Lipocalin-type prostaglandin D synthase[J]. *National Journal of Andrology*, 2004, 10(2):134-138.

Transcriptome Analysis of Mouse Testis Tissue in Middle Age and Old Age

ZHANG Tao, YANG Likai, LU Hongzhao, WANG Ling, LIU Huan and ZUO Tiantian

(School of Bioscience and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong Shaanxi 723001, China)

Abstract We had respectively analyzed mouse testis tissues of middle age (180-day-old) and old age (360-day-old) by transcriptome sequencing technique. The results showed that 25 187 980 and 28 840 576 reads were obtained in the middle age and old age, and 74.88% and 77.51% reads could be compared to the mouse reference genome. In addition, 17 770 genes were found in testis from middle age mouse, and 18 073 genes were detected in old age. As the middle age mouse for reference, 185 up-regulated genes and 122 down-regulated genes were detected in old age mouse, and 285 genes were annotated. Through GO analysis, a total of 285 genes were divided into 25 function categories, which involved membrane, transporter activity, oxidation-reduction process, extracellular region, reproductive development and aging et al. KEGG analysis showed different expression genes were annotated to 139 single pathways, including Signal transduction, lipid metabolism, Carbohydrate metabolism, Endocrine system and nervous system. In these differentially expressed genes, the RPKM values of 57 differentially expressed genes were greater than 1, and their corresponding signaling pathways included TNF signaling pathway, complement system, insulin and lysosome-related signaling pathways. In summary, the transcriptome analysis of the testis tissue in middle age and old age mouse revealed the differentially expressed genes, which provides the transcriptome information of middle and old age to enrich the transcriptome datas of mouse testis.

Key words Mouse; Testis; Transcriptome; Differentially expressed genes; Functional classification

Received 2018-05-20

Returned 2018-07-05

Foundation item Talent Development Fund Project of Shaanxi University of Technology (No. SL-GQD2017-10); Shaanxi Province Agricultural Science and Technology Innovation and Public Relations Project (No. 2016NY-084).

First author ZHANG Tao, male, Ph. D, associate professor. Research area: molecular genetics. E-mail: zl780823@163.com

(责任编辑: 顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)