

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

生長停滯特異性基因於男性不孕症相關性及臨床應用之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-038-049-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：臺北醫學大學醫學系

計畫主持人：江漢聲

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 11 月 6 日

前言

男性不孕症無論再病因或治療都是男性醫學上一個困難的課題，即使在試管嬰兒生殖科技發達的今天，仍有許多患者因無法製造精蟲而沒有兒女。本研究團隊近年來一直致力於男性不孕症的相關研究，發現新的生長停滯基因(Gas 8, Gas 7, Gas 11)並且此基因強烈的表現在正常的小鼠睪丸，先驅研究並發現人類正常的睪丸也有此三個基因表現，本計畫之目的在進一步探討 GAS 基因與男性不孕症之相關性，並利用此基因開發新的精細胞標識或造精功能的指標。

中文摘要

生長停滯基因 (Growth Arrest Specific Gene 簡稱 GAS) 第八型在我們先前的研究中發現對小鼠的睪丸曲精小管的各種精原細胞上有所表現，在本研究中，我們希望瞭解是否在人類的生殖細胞中也有同樣的角色。在正常生育男性的睪丸切片中，我們可以把 GAS8 抗體以免疫染色至曲精小管中各種精原細胞和成熟精蟲的尾部上。在精蟲成熟中斷的男性不孕病人睪丸切片中，也可染到不成熟的精原細胞上，而在完全沒有精蟲生成(Sertoli cell only)男性不孕病人的睪丸切片中，則看不到 GAS 8 抗體的染色。在 PCR 對 GAS 8 DNA 的偵測中，我們共作了 328 位各種男性不孕病人的檢查，發現祇有兩位病人以 PCR 的方法偵測不到 GAS 8 DNA 的存在。臨床上來看，屬於完全沒有精原細胞的個案，由本年度的研究結果可以知道，GAS 8 存在於人類各種精原細胞中，以及成熟精蟲的尾部，表示為相當基本的精蟲生成和成熟掌控的基因。至於 GAS8 如何調控人類精蟲和生育的機轉，進一步的研究正在進行中。

關鍵字：生長停滯基因 (Growth Arrest Specific Gene 簡稱 GAS)、精原細胞、PCR 偵測

Abstract

Growth-arrest specific (Gas 8) genes, were originally isolated and cloned from cultured mouse 3T3 cells in serum starvation or contact inhibition. From our previous research, we have identified and characterized two novel growth-arrest specific (Gas 7 and Gas 8) by a retrovirus gene trapping strategy. The amino-acid sequence of Gas 8 is highly conserved between the mouse and human species. In the pubertal development of mouse testis, Gas 8 mRNA was detected at a low level in neonates and young adolescents, but increased rapidly post-meiotically. In our first year study, we found that the expression of the Gas 8 homolog in human normal testis is similar to that in the mouse testis. In the seminiferous tubules from patients with Sertoli cell only syndrome, no Gas 8 immuno-reaction can be detected. This result further confirms that Gas 8 expression is highly localized in the germ cells, but not in Sertoli cell. Gas 8 showed premature expression in germ cells (Spermatocytes or

spermatogonia) in human seminiferous tubules with maturation arrest or hypospermatogenesis. PCR screening by two pairs of Gas 8 specific primers from genomic DNA of 328 patients with male infertility found that two in totally 328 patients were candidates of Gas 8 gene deletion from PCR screening. Based on the result of our first year study, we can conclude that the Gas 8 is functioning as a fundamental gene in the role of spermatogenesis and sperm maturation. For the detail of the mechanism concerning how Gas 8 involved in the human spermatogenesis, further investigation is now ongoing.

Keywords: Growth-arrest specific (Gas 8) genes, spermatogenesis, PCR screening

一、緣起與目的

自從卵細胞質內單一精蟲注射 (intracytoplasmic sperm injection) 成為人工生殖科技的突破之後⁽¹⁾, 男性不孕的研究逐漸走向對於精蟲遺傳訊息的研究與開發, 醫學上關心的是: 用原本不會懷孕的男人的精蟲做人工生殖科技成功生產的後代是否會有遺傳的病變? 有那些基因決定精蟲的生成和品質, 可以讓我們在做人工生殖科技時, 能提早選擇品質較好的精蟲⁽²⁾。

本研究室在過去十年間, 專心投入對男性不孕的遺傳基因做研究, 包括篩檢 415 位男性不孕病人的 Y 染色體⁽³⁾, 發現共有 86 位有染色體或 Y 基因的問題, 比率為 20.3%, 63 位是染色體的問題, 32 名有 Y 染色體基因缺損的情形, 並做詳細的追蹤和研究; 也對 40 名先天無輸精管的男性做纖維化囊腫 (CFTR) 的篩檢⁽⁴⁾, 確定台灣先天無輸精管病人的基因突變和白種人完全不一樣。我們同時也做一些新的基因檢測, 包括箱型同源基因在動物精蟲生成中的表現⁽⁵⁾及最近在小鼠身上所發現的生長停滯基因 Gas 8 和 Gas 7, 其中 Gas 8 和 1998 年所發現的一種可能是人類腫瘤抑制的基因 Gas 11 非常相近⁽⁶⁾在小鼠生殖細胞有高度的表現⁽⁷⁾使我們對 Gas 8 是否也作用在人類精細胞上, 將來可否有作為男性不孕檢查的一個標記(Marker)感到興趣, 因此設計本研究。

在本年度的研究中, 我們將 Gas 8 的抗體用來染在正常人類睪丸切片, 觀察在其中的表現; 同時以 PCR 技巧去觀察病人血液中 genomic DNA Gas 8 基因的存在, 再和臨床的生育力和其他檢查結果做一比較, 做為 Gas 8 是否在精蟲生成或成熟上扮演什麼角色的初步研判。

文獻探討

1. Chiang, H. S., Liu, C. H., Tzeng, C. R., and Fang, C. L. Surgical and pathologic observations of epididymal tubules during microscopic epididymal sperm aspiration for intracytoplasmic sperm injection. J Formos Med Assoc. 97:838-844, 1998.
2. Chiang H. S., Wei H. J.; Chen Y.T: Genetic screening for patients with azoospermia and severe oligo-asthenspermia. Int. J. Andrology 23(Suppl) 2: 20-25,2000.
3. Chiang H.S., Yeh S.D., Lin W.M., Fang C.L., Wei H.J.: Correlation Between Fluorescence In

Situ Hybridization (FISH) And Testicular Biopsy For The Prediction Of Spermatogenesis In 37 Patients With Non-Obstructive Azoospermia. *Urology*. 60: 1063-1068, 2002.

4. Wu C.C., Chiang H.S., et al, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene screening and clinical correlation in Taiwanese males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Human reproduction* 2003, in revise.
5. Lai Y.L., Li H., Chiang H.S., Li-Hsieh H.M.: Expression of a novel TGIF subclass homeobox gene, *Tex1*, in the spermatids of mouse testis during spermatogenesis. *Mech. Dev.* 113: 185-187, 2002.
6. Whitmore SA. Settasatian C. Crawford J. Lower KM. McCallum B. Seshadri R. Cornelisse CJ. Moerland EW. Cleton-Jansen AM. Tipping AJ. Mathew CG. Savnio M. Savoia A. Verlander P. Auerbach AD. Van Berkel C. Pronk JC. Doggett NA. Callen DF. Characterization and screening for mutations of the growth arrest-specific 11 (GAS11) and C16orf3 genes at 16q24.3 in breast cancer. *Genomics*. 52(3):325-31, 1998
7. Yeh S.D., Chen Y.J., Chang Annie C.Y., Ray R., She B.R., Lee W.S., Chiang H.S., Cohen S.N., Lin-Chao S.: Isolation and properties of Gas8, a growth arrest-specific gene regulated during male gametogenesis to produce a protein associated with the sperm motility apparatus. *J. Biol. Chem.* 277(8): 6311-6317, 2002.

二、研究方法

Immunoprecipitation and immunoblotting

Tissue lysate is first pre-cleared with 30- μ l protein A-sepharose slurry (1:1 in the lysis buffer used) for at least 30 minutes. After spinning down the protein A-sepharose beads, the supernatant is transferred into a fresh tube. One- μ g of anti-Gas8 antiserum or pre-immune serum is added to the pre-cleared lysate. The tube is incubated for 2 hours to overnight at 4°C. The antibody-antigen complex is captured by adding 50 μ l protein A-sepharose slurry to each tube and rotating for more than 1 hour. Protein A-sepharose beads are collected by spinning and were then washed five to seven times with 1 ml RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate (DOC), 1% NP-40). All steps are performed on ice or at 4°C. Tubes are rotated on a rotating mixer in all incubation steps. The immune complex is boiled in SDS sample buffer for further analysis by immunoblotting.

Protein samples are separated in SDS-PAGE according to standard protocol (Laemmli, 1970) and transferred onto PVDF-nylon membranes (Millipore) using the tank transfer method (Towbin et al., 1979). The membrane is blocked with 5% non-fat milk in TBST for 30 min. After a brief wash, the membrane is incubated with primary antibody diluted in TBST for 60-90 min. The membrane is then washed 3 times with TBST and probed with horseradish

peroxidase-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Amersham, 1:5000) for 30-60 min. After extensive washes, specific signals are visualized by an enhanced chemiluminescence (ECL) system (Pierce) according to the manufacture's instruction.

聚合酶連鎖反應(PCR)

從血液中將 genomic DNA 萃取出來，溶於 200 μ l 的去離子水並置於 55-60°C 水溫約 2-3 小時至 genomic DNA 完全溶於水中，最終濃度約 100-200ng/ μ l。取 1 μ l genomic DNA，1.5 μ l 10XPCR buffer，1.2 μ l 2.5 μ M dNTP，Forward primer and Backward primers 0.6 μ l(6 μ M) and pro Taq plus (5u/ μ l)，final volume is 15 μ l。兩組 primers 分別是針對 human Gas8 中間及尾部的部分。EX6-8: 94 45sec，56 30sec，72 2min，35cycles。Forward primer: 5'- AAGAT GCTGA GGGAC GAAC-3' Backward:5-TCTCC CTGAC TTTCA AACG-3'所得片段大小約 1.4kb。EX10-11 94 45sec，56 30sec，72 2min，35cycles。Forward primer:5-GAAGA ACAGC ACCAT CAAGGA C-3' Backward: 5-AGCAG CTTTG CCTCA TACG-3'所得片段大小約 750bp。

三、結果與討論 (含結論與建議)

我們將 Gas 8 抗體染在人類正常的睪丸組織上，發現 Gas 8 在人類睪丸組織中的表現和在小鼠的睪丸組織非常類似(圖一、圖二)，在正常生育力男性的睪丸切片中，Gas 8 大部分表現在精細胞(Germ Cells)而非 Sertoli cell，而且集中在 elongated spermatids 的 flagella(尾部)區域，或是在 round spermatid 的 Cytosol 區域。

如果我們再以男性不孕的病人睪丸切片來做染色觀察，可以發現完全沒有精原細胞，祇有 Sertoli cell 的切片中看不到 Gas 8 的表現(圖三)。而在成熟中斷(Maturation Arrest)的睪丸切片中，發現仍有部分表現在曲精小管中的 Spermatocytes 或 Spermatogonia (圖四)。

由不同人類睪丸切片的染色來看，Gas 8 表現在人類各種精原細胞中，愈是成熟的精原細胞愈是明顯，而且在成熟精蟲的尾部有大量的表現，我們可以推測，Gas 8 和人類睪丸精蟲生成是有關的，也影響到精蟲的成熟和活動力。

我們以聚合酶連鎖反應 (PCR) 的方法，來偵測人類血液中 genomic DNA Gas 8 基因的存在；在正常生育力的男性血液都可以偵測得到，我們也對 328 位各種男性不孕病人做偵測，發現祇有其中兩位偵測不到 Gas 8 的存在 (圖五)。

對於兩位偵測不到 Gas 8 存在的病人，我們再反覆做進一步的確認，發現和正常男性、女性的對比，無 Gas 8 存在，在臨床資料的對照上發現一位是睪丸幾無精蟲生成的 47XXY 病例。可見就臨床男性不孕的病人中，大部分仍有精蟲生成的病例身上仍有 genomic DNA Gas 8 的存在，顯然在精蟲生成的過程中，是一種相當基本的掌控基因。

四、計畫成果和自評

在本年度研究計畫中我們將 Gas 8 從原先小鼠的表現做到人類睪丸的印證，結果顯示是一種掌控精蟲生成的基因。從不同病人的睪丸切片組織抗體染色以及 328 位各種男性不孕病人血液中 genomic DNA 的偵測知道它存在於男性精原細胞、精蟲的頭尾各部分，至於它在精蟲生成或成熟中扮演什麼角色，可能要進一步去作探討和分析才能知道，包括未來我們將往更多病人的組織和血液標本去做研究，以及不同病人 Gas 8 的定量分析，或許能為將來 Gas 8 的臨床運用做更多的思考。

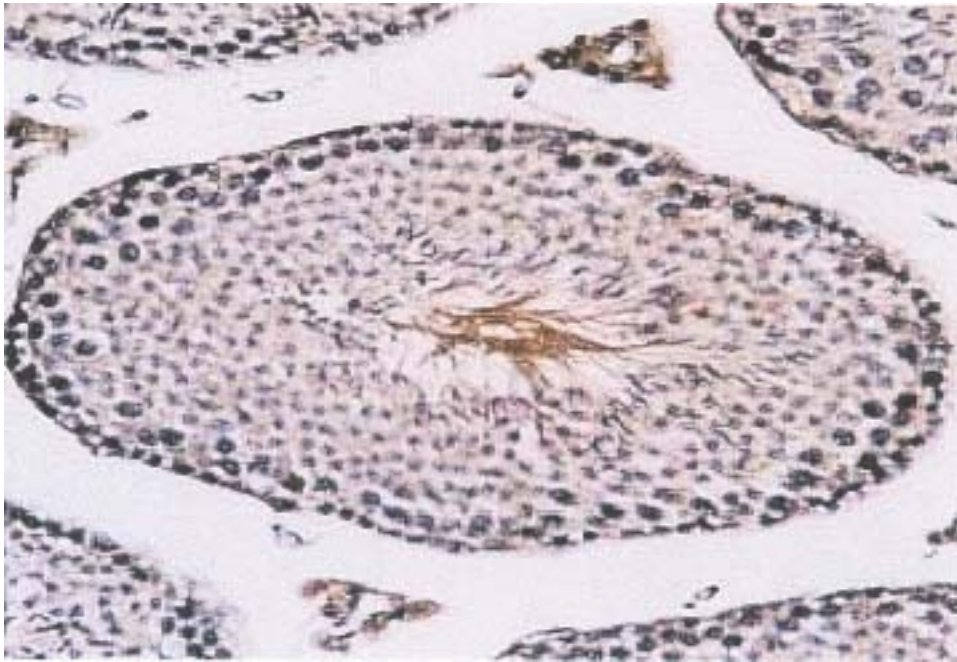


Fig 1. Gas8 protein was localized to the flagella region of elongated spermatids.



Fig 2. The localization of Gas8 protein in human testis was similar to its pattern

in mice testis.



Fig 3. Gas8 protein cannot be detected in testis showed Sertoli cell only syndrome.

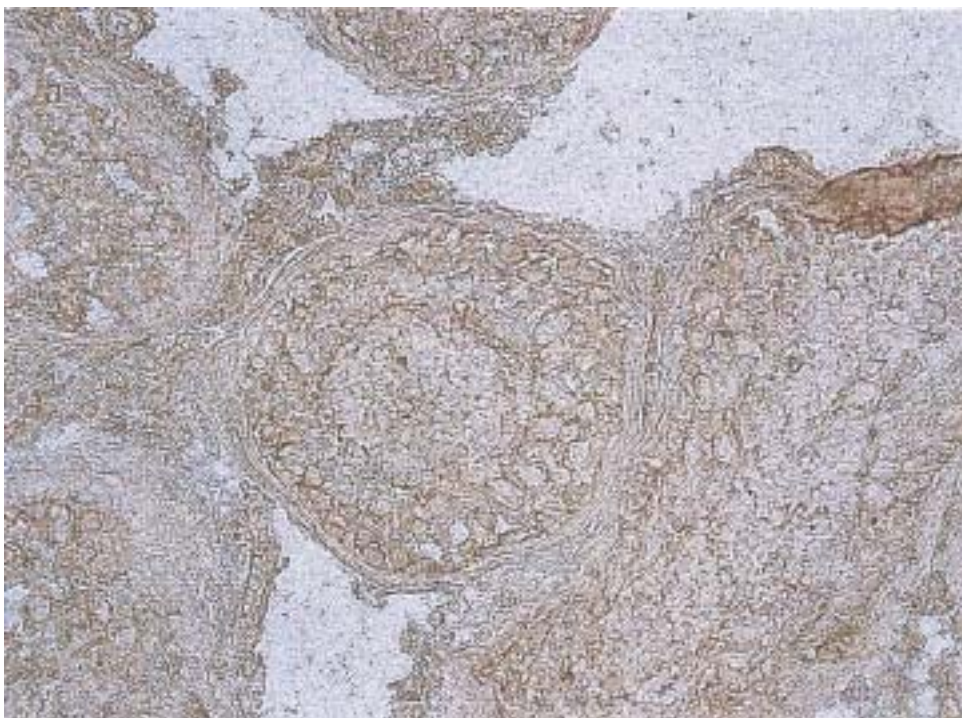


Fig 4. Gas8 showed premature expression in germ cells (Spermatocytes or spermatogonia) in human seminiferous tubules with maturation arrest or hypospermatogenesis.

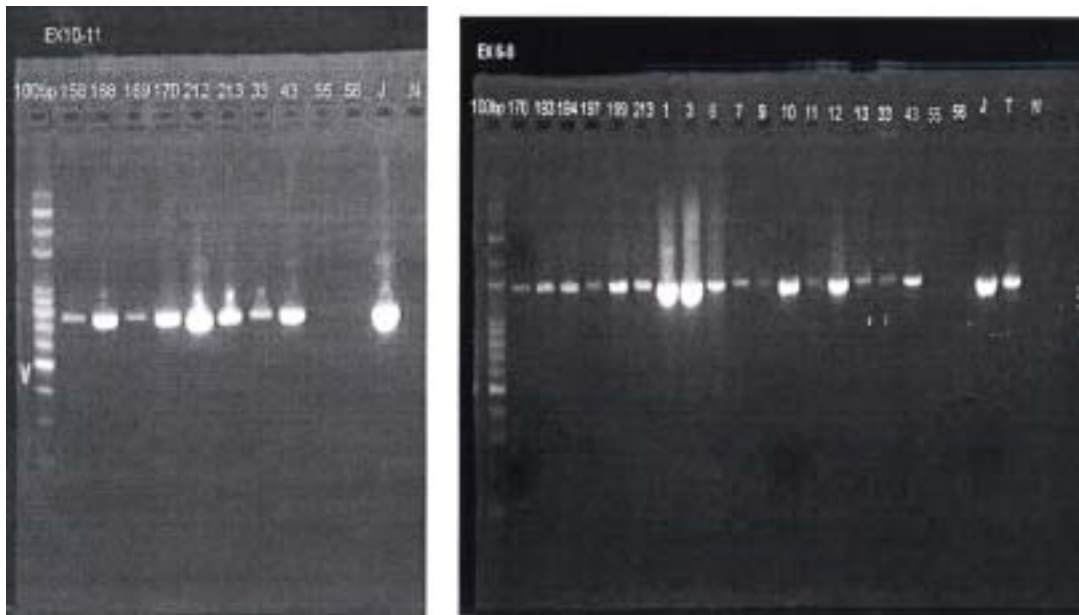


Fig 5. PCR results in screening Gas8 deletion from infertile male. The patients No. 55 and 56 were possible deleted of Gas 8 gene in genomic DNA..