

# 牦牛 *AQP2* 基因克隆及其在雄性生殖道中的表达研究

黄向月<sup>1</sup>,熊显荣<sup>1,2</sup>,海卓<sup>2,3</sup>,穆松银<sup>2,3</sup>,李键<sup>1,2</sup>

(1. 西南民族大学 生命科学与技术学院,四川 成都 610041;2. 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部

重点实验室,四川 成都 610041;3. 动物科学国家民委重点实验室,四川 成都 610041)

**摘要:**旨在克隆牦牛水通道蛋白2基因(Aquaporin 2, *AQP2*),并检测其在牦牛不同组织及其雄性生殖道发育过程中的表达模式,为探索 *AQP2* 在牦牛雄性生殖中的作用机制提供可靠数据。以牦牛为研究对象,利用 RT-PCR 技术获取牦牛 *AQP2* cDNA 序列,使用生物信息学软件分析其功能和结构。利用实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR) 检测 *AQP2* 在牦牛肾、睾丸、附睾、脾脏、脑、肺脏、心脏和肝脏组织中的表达模式以及不同发育时期雄性生殖道中的表达规律。结果显示,得到 *AQP2* 基因 CDS 序列,长 816 bp,共编码 271 个氨基酸,并发现牦牛 *AQP2* 基因与黄牛、水牛和山羊的同源性较高,*AQP2* 在睾丸和肾中高表达,显著高于其他组织 ( $P < 0.05$ )。免疫组化结果发现,*AQP2* 仅在曲细精管的圆形精子细胞中表达,而精原细胞、精母细胞、长形精子细胞、间质细胞及支持细胞均未见其表达。qRT-PCR 结果显示,在牦牛雄性生殖道中,输精管中的 *AQP2* 表达量最高 ( $P < 0.05$ ),且 *AQP2* mRNA 在睾丸和输精管中的表达水平随年龄增长逐渐升高 ( $P < 0.05$ ),而在前列腺中其表达水平随年龄增加稍有降低,但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。以上结果表明,*AQP2* 在遗传进化上高度保守,在睾丸和肾组织中高表达,参与精子成熟及运输过程,可能是通过调节水重吸收和液体形成来完成。

**关键词:**牦牛;*AQP2*;睾丸;组织表达

中图分类号:Q78;S823 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2021)01-0225-07

doi:10.7668/hbxb.20191334



## Cloning of *AQP2* Gene and Its Expression Analysis in Male Reproductive System of Yak

HUANG Xiangyue<sup>1</sup>, XIONG Xianrong<sup>1,2</sup>, HAI Zhuo<sup>2,3</sup>, MU Songyin<sup>2,3</sup>, LI Jian<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Reservation and Exploitation of

Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 3. Key Laboratory of Animal Science of State

Ethnic Affairs Commission, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** The aim of this research was to clone the aquaporin 2 (*AQP2*) gene, identify its expression pattern in various tissues, and to analyze the expression in different growth periods of the male reproductive system in yak. This research may provide important foundation for exploration the role of *AQP2* for reproductive development in yak. The samples of yak kidney, testis, epididymis, spleen, brain, lung, heart and liver were collected after slaughtering. The total RNA of different samples were extracted and the coding sequence of *AQP2* gene was cloned by RT-PCR. Meanwhile the function and structure of *AQP2* gene were analyzed by bioinformatics softwares. Then, the mRNA expression of *AQP2* in different tissues and in different growth periods of the male reproductive system was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed that the CDS region of *AQP2* gene was 816 bp, encoding 271 amino acids. It had high homology with cattle, buffalo and goat. The tissues expression analysis showed that *AQP2* highly expressed in testis and kidney, which was significantly higher than other tissues ( $P < 0.05$ ). The results of immunohistochemistry indicated that *AQP2* was expressed in round spermatids of semi-

收稿日期:2020-10-20

基金项目:国家“十三五”重点研发专项(2018YFD0502304);西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(2020PTJS15005)

作者简介:黄向月(1993-),女,四川广汉人,硕士,主要从事动物细胞与胚胎工程研究。

通讯作者:熊显荣(1984-),男,江西赣州人,副研究员,博士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

李键(1967-),男,四川理县人,研究员,博士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

niferous tubules, but no expression was found in spermatogonia, spermatocytes, elongated spermatids, leydig cells and sertoli cells. The results of qRT-PCR was found that the expression of *AQP2* in vas deferens was the highest ( $P < 0.05$ ). The expression trend of *AQP2* mRNA in testis and vas deferens was increased with age ( $P < 0.05$ ). While the expression level in prostate was slightly decreased with age, but the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). The above results indicated that *AQP2* was highly conserved during evolution, and it was highly expressed in testis and kidney. It was involved in sperm maturation and transportation, which might be completed by water reabsorption and liquid formation.

**Key words:** Yak; *AQP2*; Testis; Tissue expression

牦牛 (*Bos grunniens*) 是在低氧环境中具有较强适应能力的牛属动物之一, 有“高原之舟”的美誉<sup>[1]</sup>。但其繁殖性能较低, 阻碍了高原地区牧业经济的发展。为此, 开展牦牛繁殖性能的相关研究可丰富中国畜种资源<sup>[2-3]</sup>。影响哺乳动物繁殖性能的因素多种多样, 而精子发生则是众多因素之一。其过程包括了在睾丸曲细精管中各种精细而复杂调控的细胞分化, 生殖细胞经历一系列分化以及形态变化后形成单倍体雄性配子<sup>[4]</sup>, 由生精上皮连续产生液体有助于将精子释放到腔内, 在这之后, 精子离开睾丸并进入附睾头部。在附睾中, 精子通过获得进行性运动并获能, 最后形成特殊形态的成熟精子。这一过程在诸多因素的协同调控下进行, 其中水转运在精子运输、成熟等进程中起着特殊的作用<sup>[5-7]</sup>。例如, 由雄性生殖道上皮细胞分泌和重吸收的水分含量是影响其管腔微环境稳定性及腔内液体组分浓度的原因之一, 并通过酶活性的调节来调控精子的成熟<sup>[8]</sup>。因此, 雄性生殖系统中水转运的平衡可能是管腔内精子获得运动和生育能力所必需的条件。

多个存在于哺乳动物中的水通道蛋白家族成员 (Aquaporin), 具有不同的通透性特征和不同的亚细胞定位<sup>[9]</sup>。其具有 6 个跨膜结构域, 是质膜的组成部分, 可促进跨膜的水转运。水通道蛋白家族的成员之一, *AQP2* 在多种组织和细胞中广泛表达。最初发现于肾脏的集合管<sup>[10]</sup>, 其细胞表面 *AQP2* 的表达不足会导致肾性尿崩症<sup>[11-12]</sup>。目前研究发现, *AQP2* 在绵羊、兔<sup>[13]</sup>、小鼠、牛<sup>[14]</sup> 和人类肾脏<sup>[15]</sup> 中表达量极其丰富, 主要富集在集合管主细胞和内髓集合管中。有研究表明, *AQP2* 在上皮形态发生方面有着关键作用, 并与整联蛋白相互作用促进细胞迁移, 有助于肾的结构和功能完整性<sup>[16]</sup>。此外, *AQP2* 还存在于生殖系统中<sup>[17-19]</sup>, 人子宫内膜中的雌激素可介导 *AQP2* 的表达水平, *AQP2* 低表达可能导致子宫受体受损, 影响胚胎着床<sup>[20-21]</sup>。*AQP2* 在这些组织中的表达显示出高水渗透性, 并且主要负责肾水浓度以及精子运输的水转运机制。由此可知, *AQP2* 在生殖发育相关生物学活动的调节中起着一定作用。

目前, 关于 *AQP2* 在牦牛雄性生殖道中的研究仍未见相关报道。本试验利用 RT-PCR 技术得到牦牛 *AQP2* 基因的 CDS 序列, 同时分析该序列并预测其蛋白结构。运用免疫组化方法检测牦牛睾丸组织中 *AQP2* 的细胞定位, 同时通过 qRT-PCR 方法检测牦牛各组织及不同发育阶段雄性生殖器官中 *AQP2* mRNA 的表达情况, 为进一步从分子水平开展牦牛雄性生殖繁育相关研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂与仪器

pMD<sup>TM</sup>19-T 载体、Premix Taq<sup>TM</sup> DNA 聚合酶、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 试剂盒、PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit 反转录试剂盒购自 TaKaRa; 荧光定量 PCR 仪购自 Bio-Rad; 感受态细胞 DH5 $\alpha$ 、DEPC、DNA Marker 购自天根生化科技有限公司; DNA 胶回收试剂盒购自康宁生命科学有限公司。

### 1.2 样本采集

牦牛样本均采自四川广汉市盛大食品厂, 收集肾、睾丸、附睾、脾、脑、肺、心和肝组织; 随后收集胎儿时期 (5~6 月)、幼年时期 (1~2 岁)、性成熟时期 (4~5 岁) 牦牛睾丸、附睾、输精管、前列腺和精囊组织。均采集 3 头, 置于液氮中。

### 1.3 总 RNA 的提取及检测

根据 TRIzol 法从牦牛各个组织中提取样本 RNA, 使用核酸分析仪测定其浓度和纯度, 选取符合 OD<sub>260/280nm</sub> 值在 1.8~2.0 作为模板 RNA, 依照使用说明合成 cDNA, -20℃ 保存。

### 1.4 *AQP2* 的扩增与克隆

利用 NCBI 已报道的黄牛 (*Bos taurus*) *AQP2* mRNA 序列 (登录号: NM\_001101199.1), 使用 Primer 5.0 设计引物 (表 1)。由金斯瑞生物科技有限公司合成。反应体系为 25  $\mu$ L, 其中 ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L, Premix Taq<sup>TM</sup> DNA 聚合酶 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物各 1.0  $\mu$ L, cDNA 1.0  $\mu$ L。扩增条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 30 个循

环;72 ℃ 5 min。1.5% 凝胶电泳检测产物,紫外光照切下目的条带,并回收目的 DNA。将 pMD™19-T 载体与胶回收产物在 16 ℃ 的金属浴中连接 15 h 后,转换于感受态细胞,二者混合培养 1 h 后离心。将沉淀均匀涂于 LB 固体培养基(AMP<sup>+</sup>)上,37 ℃ 培养 12 h,选取单菌落,摇床振荡培养 8 h,进行 PCR 筛选阳性菌液送由 Sangon Biotech 公司测序。

### 1.5 牦牛 AQP2 基因生物信息学分析

使用 NCBI 中的 Blast 在线工具获得 AQP2 基因的核苷酸序列,通过 ORF Finder(ORF)预测其氨基酸序列。使用在线软件分别预测牦牛 AQP2 蛋白的基本理

化性质(ProtParam)、亲疏水性(ProtScale)和二级结构(PredictProtein)。使用 Megalign 软件比对物种同源性。

### 1.6 牦牛 AQP2 基因组织表达谱分析

根据已获得的牦牛 AQP2 和 NCBI 中黄牛 GAPDH mRNA 序列(登录号:AC\_000162.1)分别设计引物(表 1),采用 qRT-PCR 方法检测该基因在牦牛各组织的表达量。反应体系为 15 μL:ddH<sub>2</sub>O 5.5 μL,SYBR® Premix Ex Taq™II 7.5 μL,cDNA 1.0 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL。扩增条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 10 s,60 ℃ 退火 10 s,72 ℃ 延伸 15 s,40 个循环。2<sup>-ΔΔCt</sup>法均一化处理结果。

表 1 引物序列及 PCR 反应条件

Tab.1 Primer sequences and reaction conditions

基因 Gene	引物序列(5'-3') Sequence of primer	退火温度/℃ Tm	产物长度/bp Product size	用途 Utilization
AQP2	F: GAGACAGACAGACAGAGGGAGA R: GCGTCTTGGAAGCAGCTACT	59	937	克隆
AQP2-Q	F: TCATCGGTTCCCTCCTCTAC R: GTTCCTCCCAGTCAGTGTC	60	108	qRT-PCR
GAPDH	F: GAGAAACCTGCCAAGTATGA R: CGAAGGTAGAAGAGTGAGTG	60	139	qRT-PCR

注:F.上游引物;R.下游引物。

Note:F. Sense primer;R. Antisense primer.

### 1.7 AQP2 在牦牛睾丸中的定位

通过免疫组化法检测 AQP2 蛋白的定位。从 4% 多聚甲醛固定液中取出性成熟时期的牦牛睾丸组织,并制成石蜡切片。脱蜡复水后封闭在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.88 mol/L)中,PBS(0.01 mol/L,pH 值 7.4)冲洗 3 次;5% 胎牛血清封闭,滴加一抗(单克隆兔抗 AQP2,BSA 500 倍稀释,Abcam 公司产品)孵育过夜(4 ℃);PBS(0.01 mol/L,pH 值 7.4)冲洗 3 次后滴加二抗(多聚化山羊抗兔 IgG,Abcam 公司产品)孵育 2 h(37 ℃);PBS(0.01 mol/L,pH 值 7.4)冲洗,DAB 显色,复染,脱水、透明、封片,镜下观察。

### 1.8 牦牛雄性生殖道中 AQP2 的表达模式

同样以 GAPDH 为内参基因,利用 qRT-PCR 检测 AQP2 在牦牛雄性生殖道的 3 个阶段(胎儿时期、幼年时期、性成熟时期)的表达水平,反应体系同 1.6。

### 1.9 数据分析

每组试验至少检测 3 次,数据使用“平均值 ± 标准误(Mean ± s)”表示。SPSS 软件分析显著性, $P < 0.05$  差异显著, $P > 0.05$  差异不显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 牦牛 AQP2 基因的克隆

以牦牛肾组织总 cDNA 为模板,进行扩增 AQP2

基因的 CDS 区,经凝胶电泳检测,获得 937 bp 大小的条带,对其进行测序并拼接所得序列,结果显示,其 CDS 区为 816 bp,共编码 271 个氨基酸。

将牦牛 AQP2 基因与其他物种通过 Megalign 软件进行同源性比对发现,牦牛 AQP2 mRNA 序列与其他哺乳动物的相似度极高,均在 90% 以上(图 1)。牦牛 AQP2 基因序列与黄牛、水牛、山羊、藏羚羊、绵羊的相似性分别为 99.9%、98.9%、97.3%、97.3%、97.2%。同时对 14 个物种 AQP2 基因 CDS 区进行系统进化树构建,结果显示,该基因 CDS 区序列具有很高的保守性,与牦牛亲缘关系最近是黄牛,其次是水牛、山羊等(图 2)。由此可见,AQP2 基因在物种进化过程中表现高度保守,且多为同义突变。

### 2.2 牦牛 AQP2 蛋白结构和功能预测

通过 ExPASy 工具进行预测 AQP2 蛋白的理化性质。得到该蛋白分子式为 C<sub>1322</sub>H<sub>2080</sub>N<sub>352</sub>O<sub>360</sub>S<sub>7</sub>,半衰期为 30 h,分子量为 28.889 62 ku,等电点为 6.70,脂肪族系数为 115.94,不稳定系数为 43.04,推测为酸性不稳定蛋白。该蛋白包含 20 种氨基酸,出现频率较高的有 Leu(14.8%)、Ala(13.3%)、Val(9.6%)、Gly(8.1%)和 Ser(7.0%)。带正电荷氨基酸(Arg + Lys)有 17 个,带负电荷氨基酸(Asp + Glu)有 18 个,由此表明,该蛋白整体带负电。疏水性预测发现,牦牛 AQP2 蛋白的平均亲水指数为 0.547,最大疏水指



数存在于 20,21 位点(2.789),最小亲水指数存在于 251 位点(-3.089),为疏水性蛋白。

		同源性 / % Percent identity														变异度 / % Divergence	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
1	■	99.9	98.9	92.4	97.3	92.5	89.8	96.7	96.7	97.2	92.6	97.3	92.2	92.5	1	牦牛 ▲ <i>Bos grunniens</i>	
2	0.1	■	98.8	92.3	97.4	92.6	90.0	96.8	96.8	97.3	92.5	97.4	92.2	92.4	2	黄牛 <i>Bos taurus</i>	
3	1.1	1.2	■	92.8	97.4	93.1	90.7	97.3	97.3	97.5	92.4	97.7	92.5	92.8	3	水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	
4	8.1	8.2	7.7	■	92.3	92.9	90.9	93.0	93.0	92.3	91.5	92.2	93.8	99.3	4	骆驼 <i>Camelus ferus</i>	
5	2.8	2.6	2.6	8.2	■	92.5	90.7	96.8	96.8	98.9	92.2	98.7	92.2	92.4	5	山羊 <i>Capra hircus</i>	
6	7.9	7.8	7.2	7.6	7.9	■	90.9	93.1	93.1	92.4	91.4	92.3	93.6	92.9	6	鲸 <i>Delphinapterus leucas</i>	
7	11.0	10.9	10.0	9.7	10.0	9.7	■	91.3	91.3	90.8	90.7	90.7	90.9	90.9	7	人 <i>Homo sapiens</i>	
8	3.4	3.3	2.8	7.4	3.3	7.2	9.3	■	100.0	96.9	92.3	97.1	93.1	93.1	8	猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	
9	3.4	3.3	2.8	7.4	3.3	7.2	9.3	0.0	■	96.9	92.3	97.1	93.1	93.1	9	鹿 <i>Odocoileus virginianus texanus</i>	
10	2.9	2.8	2.5	8.2	1.1	8.1	9.9	3.1	3.1	■	92.0	98.5	92.5	92.4	10	绵羊 <i>Ovis aries</i>	
11	7.8	7.9	8.0	9.0	8.3	9.2	10.0	8.2	8.2	8.4	■	91.8	91.8	91.3	11	豹 <i>Panthera pardus</i>	
12	2.8	2.6	2.4	8.3	1.4	8.2	10.0	3.0	3.0	1.5	8.7	■	91.9	92.3	12	藏羚羊 <i>Pantholops hodgsonii</i>	
13	8.3	8.3	7.9	6.6	8.3	6.7	9.7	7.2	7.2	7.9	8.7	8.6	■	93.8	13	猪 <i>Sus scrofa</i>	
14	7.9	8.1	7.7	0.7	8.1	7.6	9.7	7.2	7.2	8.1	9.3	8.2	6.6	■	14	羊驼 <i>Vicugna pacos</i>	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			

图 1 牦牛与其他物种 AQP2 基因的同源性比对

Fig. 1 Alignment of AQP2 gene sequences between yak and other species

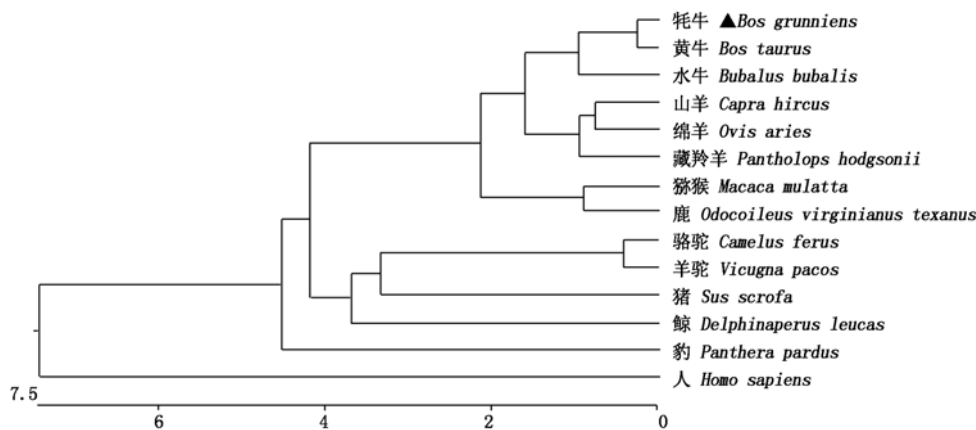


图 2 AQP2 基因核苷酸进化树分析

Fig. 2 Nucleotide phylogenetic analysis of AQP2 gene

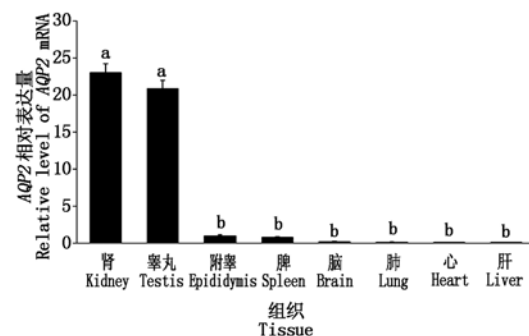
SignalP 和 TMHMM 预测发现 AQP2 蛋白具有 6 个跨膜结构域,在第 31-32 位氨基酸存在信号肽。磷酸化位点预测显示,AQP2 蛋白共有 17 个磷酸化位点,包含 Ser(11 个)、Thr(5 个)、Tyr(1 个)。二级结构预测显示,该蛋白的  $\alpha$ -螺旋占 41.33%, $\beta$ -转角占 2.95%,无规则卷曲占 37.27%,延伸链占 18.45%。

### 2.3 牦牛 AQP2 基因的组织表达谱

利用 qRT-PCR,参照 GAPDH,对 AQP2 基因在牦牛心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸、附睾组织中的表达模式进行检测(图 3)。结果显示,牦牛各组织中 AQP2 差异表达,以附睾 AQP2 的表达量为参考,其在睾丸和肾中的表达水平显著高于其他组织( $P < 0.05$ ),附睾、脾、心、肝、肺、脑中该基因表达水平无显著差异( $P > 0.05$ )。

### 2.4 牦牛睾丸中 AQP2 蛋白的表达与定位

免疫组化检测牦牛睾丸中 AQP2 的定位结果见图 4。棕黄色或黄色着色判定为阳性细胞,主要定



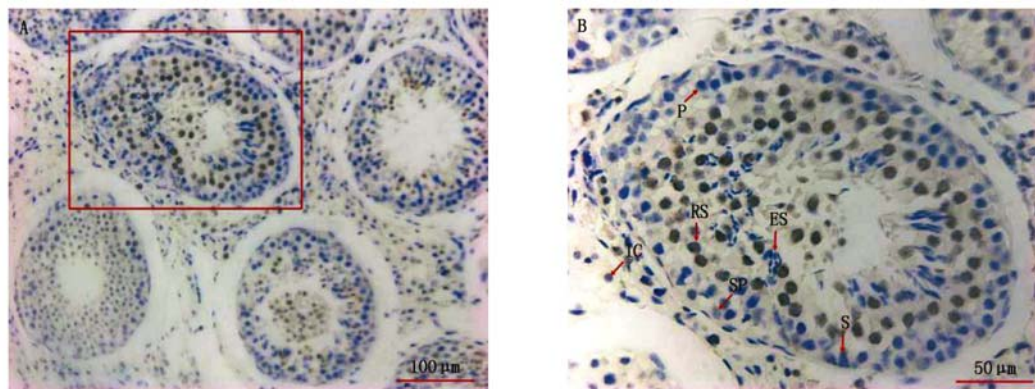
对照组、附睾组织。相同字母表示差异不显著( $P > 0.05$ );不同字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。图 5 同。

Control group. Epididymal tissue. The same letter shows no significant differences( $P > 0.05$ ); Different letter shows significant differences( $P < 0.05$ ). The same as Fig. 5.

图 3 牦牛 AQP2 基因的组织表达

Fig. 3 Tissues expression of AQP2 in yak

位于圆形精子细胞,而其他生精细胞、间质细胞、上皮细胞以及支持细胞均未见阳性反应。



A. 牦牛睾丸(200 ×); B. 牦牛睾丸(400 ×)。 (SP. 精原细胞; P. 初级精母细胞; RS. 圆形精子细胞; ES. 长形精子细胞; IC. 间质细胞; S. 支持细胞)。

A. Yak testicle(200 ×); B. Yak testicle(400 ×)。 (SP. Spermatogonium; P. Primary spermatocyte; RS. Round spermatid; ES. Elongating spermatid; IC. Leydig cells; S. Sertoli cells)。

图4 牦牛睾丸中 *AQP2* 的定位

Fig. 4 The localization of *AQP2* in yak testicle

## 2.5 不同发育时期牦牛雄性生殖道中 *AQP2* 基因的表达

利用 qRT-PCR, 参照 *GAPDH*, 对 *AQP2* 基因在不同时期牦牛雄性生殖道中的表达情况进行检测(图5)。结果显示, *AQP2* 基因在牦牛雄性生殖道发育过程中表达呈动态变化。其中, 在睾丸和输精管中该基因从胎儿到性成熟时期, 即随着年龄增长, 其表达水平呈明显的上升趋势。以该基因在胎儿时期睾丸中的表达量作为参考, 幼年性和性成熟时期显著高于该时期 ( $P < 0.05$ )。 *AQP2* 基因在附睾及精囊

中基本不表达, 而在输精管中高表达, 性成熟时期其表达量达到最高, 约为胎儿时期的 12.3 倍 ( $P < 0.05$ )。该基因在胎儿期前列腺中的表达量较高, 随生长发育的进行, 其表达水平稍有降低, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论与结论

*AQP2*, 血管加压素依赖性组成型水通道蛋白, 主要受抗利尿激素血管加压素 (ADH) 的调节, 通过 cAMP/PKA 信号转导的级联反应使水通道 *AQP2* 磷酸化, 从而调节主要细胞对水的跨上皮重吸收<sup>[22-23]</sup>。除此之外, *AQP2* 还受泛素化、糖基化等其他多种修饰<sup>[24-25]</sup>。研究表明, 许多水通道亚型在哺乳动物雄性生殖系统发育和精子浓度方面发挥关键作用。例如, *AQP1* 参与调节小鼠雄性生殖生理过程中的水稳态<sup>[26]</sup>。 *AQP3* 基因敲除小鼠的精子细胞显示出正常的运动性, 但其在输卵管中的迁移能力受损, 导致雄性生育能力降低<sup>[27]</sup>。此外, *AQP1*、2 和 7 在成年犬雄性生殖道中差异表达, 对犬的雄性生育能力同样至关重要<sup>[28]</sup>。最近研究发现, *AQPs* 的功能还与细胞体积的控制有关, 可通过在附睾液巾发生渗透性变化或在精子成熟过程中参与细胞质去除阶段, 从而调控细胞体积<sup>[6]</sup>。因此, 探索 *AQP2* 在牦牛雄性生殖道发育过程中的表达规律将对解析其在牦牛雄性生殖中的作用机制奠定基础。

本试验获得了牦牛 *AQP2* 基因的核苷酸序列。比较分析结果显示, *AQP2* 序列在哺乳动物中的同源性相对较高。同时发现, 黄牛、水牛与牦牛 *AQP2* 的氨基酸序列高度吻合, 由此可见, *AQP2* 在蛋白质结构水平上及物种进化过程中具有较高保守性。进而推测 *AQP2* 氨基酸序列及其蛋白功能的稳定性对

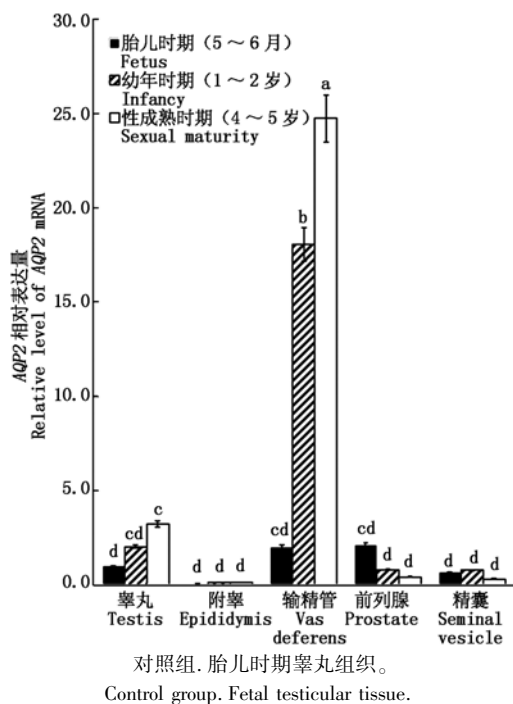


图5 *AQP2* 基因在不同发育时期牦牛雄性生殖道中的表达水平

Fig. 5 The expression of *AQP2* in different growth periods of male yak reproductive system

协调生物体适应其生存环境是必要的。

本试验采用 qRT-PCR 的方法检测到 *AQP2* 基因在牦牛组织中的表达水平存在差异。结果表明, *AQP2* mRNA 在睾丸和肾中的表达水平显著高于其他组织, 附睾和脾中的表达相对较低。Nelson 等<sup>[29]</sup> 研究发现, *AQP2* 在小鼠肾集合管、输精管上皮细胞和睾丸内的生精小管中高表达, 这与本试验结果吻合。为进一步确认 *AQP2* 蛋白在牦牛睾丸中的细胞定位, 本试验采用免疫组织化学技术对牦牛睾丸 *AQP2* 的表达进行了检测, 发现睾丸中仅圆形精子表达 *AQP2* 蛋白。Klein 等<sup>[30]</sup> 发现 *AQP2* 在马曲细精管的圆形精子细胞中表达, 推测该基因可能参与精子发生过程中精子的变态成形阶段。该基因在肾和睾丸中表达量高的原因可能与其各自的生物学功能有关, 肾中水的重吸收以及睾丸中的生精过程对水浓度的要求比较高, 因此, 负责水转运的 *AQP2* 在两者中显著表达, 以上结果提示 *AQP2* 基因可能通过调节水重吸收和/或精子转运过程中液体形成和精子发生等过程, 从而对牦牛睾丸发育起重要作用。

本研究检测了不同发育阶段雄性牦牛生殖器官中 *AQP2* 的表达。qRT-PCR 结果显示, 在雄性牦牛生殖道发育过程中 *AQP2* 基因的表达呈现动态变化。该基因 mRNA 在睾丸和输精管中从胎儿到性成熟期的表达水平随年龄依赖性逐渐增加, 直至性成熟时期其表达量达到最高。其表达趋势与精母细胞减数分裂的开始和圆形精子的发生等过程相一致, 表明该基因可能与精子形成以及后续的精子运输有关。已有研究发现, 在输精管和曲细精管的主要细胞中 *AQP2* 高表达, 但在附睾中不存在<sup>[28]</sup>。Da silva 等<sup>[31]</sup> 发现, *AQP2* 蛋白在出生后的幼年期大鼠附睾尾部短暂表达, 尽管存在 mRNA, 但在成年大鼠附睾中不表达, 这与本试验结果基本吻合, 而另一研究发现 *AQP2* 蛋白在兔的附睾中表达较高<sup>[32]</sup>, 这可能与物种间的差异相关。Ramli 等<sup>[33]</sup> 发现睾酮可通过上调 *AQP2* 的表达水平来促进输精管液分泌速率的增加, 从而对输精管液体内稳态有重要作用, 以确保正常的雄性生育能力。*AQP2* 是输精管中不受血管加压素调节的组成型顶膜蛋白, 在输精管中高表达, 可能是由于其参与改变腔内液体含量的过程, 通过提取腔内液体进入输精管来改变精子浓度。因此, *AQP2* 在睾丸和输精管中的表达水平可能随着生殖道的发育和睾酮的增多而逐渐升高, 促使精子成熟。而该基因在胎儿时期的前列腺中高表达, 后随生长发育的进行逐渐降低。这一结果与文献报道一致<sup>[34]</sup>。以上结果表明, 雄性生殖系统中 *AQP2* 的功能可能与

维持适当的腔内环境有关, 精子可以在该环境中进一步成熟。

本研究克隆获得了牦牛 *AQP2* 基因序列, 其具有显著的组织特异性表达, 且在生物进化过程中高度保守。在睾丸中 *AQP2* 蛋白主要定位于圆形精子细胞, 且该基因在牦牛雄性生殖道中表达模式存在显著差异, 提示 *AQP2* 可能与牦牛精子发生、运输及睾丸生殖功能完善相关, 具体作用机制有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Lan D L, Xiong X R, Mipam T D, Fu C X, Li Q, Ai Y, Hou D C, Chai Z X, Zhong J C, Li J. Genetic diversity, molecular phylogeny, and selection evidence of Jinchuan yak revealed by whole-genome resequencing [J]. *G3-Genes Genom Genet*, 2018, 8 (3): 945 - 952. doi: 10.1534/g3.118.300572.
- [2] Qiu Q, Zhang G J, Ma T, Qian W B, Wang J Y, Ye Z Q, Cao C C, Hu Q J, Kim J, Larkin D M, Auvil L, Capitani B, Ma J, Lewin H A, Qian X J, Lang Y S, Zhou R, Wang L Z, Wang K, Xia J Q, Liao S G, Pan S K, Lu X, Hou H L, Wang Y, Zang X T, Yin Y, Ma H, Zhang J, Wang Z F, Zhang Y M, Zhang D W, Yonezawa T, Hasegawa M, Zhong Y, Liu W B, Zhang Y, Huang Z Y, Zhang S X, Long R J, Yang H M, Wang J, Lenstra J A, Cooper D N, Wu Y, Wang J, Shi P, Wang J, Liu J Q. The yak genome and adaptation to life at high altitude [J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(8): 946 - 949. doi: 10.1038/ng.2343.
- [3] 柴志欣, 王会, 王吉坤, 王嘉博, 钟金城. 牦牛、犏牛 *TB-RBP* 基因克隆及在睾丸组织中的表达 [J]. 华北农学报, 2020, 35(1): 230 - 238. doi: 10.7668/hbxb.20190277.
- [4] Chai Z X, Wang H, Wang J K, Wang J B, Zhong J C. Cloning of *TB-RBP* gene and expression in testis during in yak and yak-cattle [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2020, 35(1): 230 - 238.
- [5] Manku G, Culty M. Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges [J]. *Reproduction*, 2015, 149(3): 139 - 157. doi: 10.1530/REP-14-0431.
- [6] Kasimanickam R K, Kasimanickam V R, Arangasamy A, Kastelic J P. Associations of hypoosmotic swelling test, relative sperm volume shift, aquaporin7 mRNA abundance and bull fertility estimates [J]. *Theriogenology*, 2017, 89: 162 - 168. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.011.
- [7] Laforenza U, Pellavio G, Marchetti A L, Omes C, Todaro F, Gastaldi G. Aquaporin-mediated water and hydrogen peroxide transport is involved in normal human spermatozoa functioning [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(1): 66. doi: 10.3390/ijms18010066.
- [8] Takei G L, Mukai C, Okuno M. Regulation of salmonid fish sperm motility by osmotic shock-induced water influx across the plasma membrane [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part A Molecular and Integrative Physiology*, 2015, 182: 84 - 92. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.12.013.
- [9] Zhou W, Stanger S J, Anderson A L, Bernstein I R, De Iulius G N, McCluskey A, McLaughlin E A, Dun M D, Nixon B. Mechanisms of tethering and cargo transfer during epididymosome-sperm interactions [J]. *BMC Biology*, 2019, 17(1): 35. doi: 10.1186/s12915-019-0653-5.
- [10] Laforenza U, Bottino C, Gastaldi G. Mammalian aquaglyceroporin function in metabolism [J]. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 2016, 1858(1): 1 - 11. doi: 10.1016/j.bbmem.2015.10.004.



- [10] Matsuzaki T, Yaguchi T, Shimizu K, Kita A, Ishibashi K, Takata K. The distribution and function of aquaporins in the kidney: resolved and unresolved questions[J]. *Anatomical Science International*, 2017, 92 (2): 187 – 199. doi:10.1007/s12565-016-0325-2.
- [11] Long B C, Weber Z J, Oberlin J M, Sutter D E, Berg J M. Nephrogenic diabetes insipidus in a 15-year-old Hispanic female with a novel AQP2 mutation[J]. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 2019, 32 (9): 1031 – 1034. doi:10.1515/jpem-2019-0099.
- [12] Ozer E S, Moeller H B, Karaduman T, Fenton R A, Mergen H. Molecular characterization of an aquaporin-2 mutation causing a severe form of nephrogenic diabetes insipidus[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77 (5): 953 – 962. doi:10.1007/s00018-019-03219-w.
- [13] Bogner B, Schroedl F, Trost A, Kaser-Eichberger A, Runge C, Strohmaier C, Motloch K A, Bruckner D, Hauser-Kronberger C, Bauer H C, Reitsamer H A. Aquaporin expression and localization in the rabbit eye [J]. *Experimental Eye Research*, 2016, 147: 20 – 30. doi:10.1016/j.exer.2016.04.013.
- [14] Michałek K, Laszczyńska M, Ciechanowicz A K, Herosimczyk A, Rotter I, Oganowska M, Lepczyński A, Dratwa-Chałupnik A. Immunohistochemical identification of aquaporin 2 in the kidneys of young beef cattle [J]. *Biotechnic & Histochemistry*, 2014, 89 (5): 342 – 347. doi:10.3109/10520295.2013.858828.
- [15] Xing L, Wen J G, Frøkiær J, Djurhuus J C, Nørregaard R. Ontogeny of the mammalian kidney: expression of aquaporins 1, 2, 3, and 4[J]. *World Journal of Pediatrics*, 2014, 10 (4): 306 – 312. doi:10.1007/s12519-014-0508-7.
- [16] Chen Y, Rice W L, Gu Z Z, Li J M, Huang J M, Brenner M B, Van Hoek A, Xiong J P, Gundersen G M, Norman J C, Hsu V W, Fenton R A, Brown D, Lu J. Aquaporin 2 promotes cell migration and epithelial morphogenesis [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2012, 23 (9): 1506 – 1517. doi:10.1681/ASN.2012010079.
- [17] Zhang H P, Liu T J, Zhou Z Y, Zhang A X, Zhu Y, Zhang J, Pan L J, Ma J H. miR-137 affects vaginal lubrication in female sexual dysfunction by targeting aquaporin-2 [J]. *Sexual Medicine*, 2018, 6 (4): 339 – 347. doi:10.1016/j.esxm.2018.09.002.
- [18] Zhang Z J, Xu P, Xie Z W, Shen F X, Chen N, Yu L M, He R H. Downregulation of AQP2 in the anterior vaginal wall is associated with the pathogenesis of female stress urinary incontinence[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16 (3): 3503 – 3509. doi:10.3892/mmr.2017.7014.
- [19] Zhao M D, Cheng J L, Yan J J, Chen F Y, Sheng J Z, Sun D L, Chen J, Miao J, Zhang R J, Zheng C H, Huang H F. Hyaluronic acid reagent functional chitosan-PEI conjugate with AQP2-siRNA suppressed endometriotic lesion formation[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2016, 11: 1323 – 1336. doi:10.2147/IJN.S99692.
- [20] He R H, Han W L, Hu Y J, Chen X J, Hu X L, Zhu Y M. AQP2 is regulated by estradiol in human endometrium and is associated with spheroid attachment *in vitro* [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 20 (2): 1306 – 1312. doi:10.3892/mmr.2019.10338.
- [21] Zhang D, Xu G F, Zhang R J, Zhu Y M, Gao H J, Zhou C Y, Sheng J Z, Huang H F. Decreased expression of aquaporin 2 is associated with impaired endometrial receptivity in controlled ovarian stimulation[J]. *Reproduction Fertility and Development*, 2016, 28 (4): 499 – 506. doi:10.1071/RD13397.
- [22] Jung H J, Kwon T H. Molecular mechanisms regulating aquaporin-2 in kidney collecting duct[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2016, 311 (6): F1318-F1328. doi:10.1152/ajprenal.00485.2016.
- [23] Ranieri M, Di Mise A, Tamma G, Valenti G. Vasopressin-aquaporin-2 pathway: recent advances in understanding water balance disorders[J]. *F1000 Research*, 2019, 8: 1 – 8. doi:10.12688/f1000research.16654.1.
- [24] Trimpert C, Wesche D, de Groot T, Rodriguez M M P, Wong V, van den Berg D T M, Cheval L, Ariza C A, Doucet A, Stagljar I, Deen P M T. NDFIP allows NEDD4/NEDD4L-induced AQP2 ubiquitination and degradation[J]. *PLoS One*, 2017, 12 (9): e0183774. doi:10.1371/journal.pone.0183774.
- [25] He J Z, Yang B X. Aquaporins in renal diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (2): 366. doi:10.3390/ijms20020366.
- [26] Lu D Y, Li Y, Bi Z W, Yu H M, Li X J. Expression and immunohistochemical localization of aquaporin-1 in male reproductive organs of the mouse[J]. *Anatomia Histologia Embryologia*, 2008, 37 (1): 1 – 8. doi:10.1111/j.1439-0264.2007.00827.x.
- [27] Chen Q, Peng H Y, Lei L, Zhang Y, Kuang H B, Cao Y J, Shi Q X, Ma T H, Duan E K. Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration[J]. *Cell Research*, 2011, 21: 922 – 933. doi:10.1038/cr.2010.169.
- [28] Domeniconi R F, Orsi A M, Justulin L A, Cristina C, Beu L, Felisbino S L. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog[J]. *Cell and Tissue Research*, 2008, 332 (2): 329 – 335. doi:10.1007/s00441-008-0592-x.
- [29] Nelson R D, Stricklett P, Gustafson C, Stevens A, Ausiello D, Brown D, Kohan D E. Expression of an AQP2 Cre recombinase transgene in kidney and male reproductive system of transgenic mice[J]. *American Journal of Physiology*, 1998, 275 (1): 216 – 226. doi:10.1152/ajpcell.1998.275.1.C216.
- [30] Klein C, Troedsson M H T, Rutlant J. Region-specific expression of aquaporin subtypes in equine testis, epididymis, and ductus deferens [J]. *The Anatomical Record*, 2013, 296 (7): 1115 – 1126. doi:10.1002/ar.22709.
- [31] Da Silva N, Silberstein C, Beaulieu V, Piétrement C, Van Hoek A N, Brown D, Breton S. Postnatal expression of aquaporins in epithelial cells of the rat epididymis[J]. *Biology of Reproduction*, 2006, 74 (2): 427 – 438. doi:10.1095/biolreprod.105.044735.
- [32] Arrighi S, Aralla M. Immunolocalization of aquaporin water channels in the domestic cat male genital tract [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2014, 49 (1): 17 – 26. doi:10.1111/rda.12213.
- [33] Ramli N S K, Giribabu N, Karim K, Salleh N. Hormonal control of vas deferens fluid volume and aquaporin expression in rats[J]. *Journal of Molecular Histology*, 2019, 50 (1): 21 – 34. doi:10.1007/s10735-018-9804-1.
- [34] Pei L J, Yang G S, Jiang J, Jiang R, Deng Q F, Chen B, Gan X L. Expression of aquaporins in prostate and seminal vesicles of diabetic rats[J]. *The Journal of Sexual Medicine*, 2013, 10 (12): 2975 – 2985. doi:10.1111/jsm.12276.