

李卫杰,梁冬丽,刘永忠,等. 生殖细胞条件性敲除 Usp16 基因小鼠的建立、鉴定及表型分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 376-383.

Li WJ, Liang DL, Liu YZ, et al. Establishment, identification and phenotyping of a germ cell-specific deubiquitinating enzyme 16 conditional knockout mouse [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 376-383.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.03.010

生殖细胞条件性敲除 Usp16 基因小鼠的建立、鉴定及表型分析

李卫杰¹, 梁冬丽², 刘永忠³, 王朝霞², 乔中东¹, 徐汪节^{2*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2. 上海交通大学实验动物中心, 上海 200240; 3. 上海交通大学医学院仁济医院上海肿瘤研究所癌基因与相关基因国家重点实验室, 上海 200240)

【摘要】 目的 建立生殖细胞特异性敲除去泛素化酶 Usp16 小鼠, 并分析其生殖表型, 探究 Usp16 是否在精子发生过程发挥功能。**方法** 首先, 将 Vasa-cre 转基因小鼠与 Usp16 条件性小鼠 (Usp16^{flox/flox}) 杂交获得生殖细胞特异性敲除 Usp16 小鼠; 其次, 利用 qPCR、Western Blot 和免疫荧光检测睾丸中 Usp16 表达; 并通过合笼交配、计算机辅助精子分析和 HE 染色法进行生殖表型分析。**结果** 成功获得了生殖细胞特异性敲除 Usp16 纯合子 (Usp16^{flox/flox}/Vasa-cre⁺), 及杂合子小鼠 (Usp16^{flox/wt}/Vasa-cre⁺)。与野生型相比, Usp16^{flox/wt}/Vasa-cre⁺ 雄鼠生殖表型没有显著性变化, 但与纯合子雄鼠交配的雌鼠受孕率仅为 7%, 精子数量减少约 79%, 活力下降约 87%, 精子畸形率高达 83%, 睾丸曲细精管中出现多核细胞, 附睾中早熟精子数增多了约 3 倍。**结论** 小鼠睾丸内生殖细胞 Usp16 纯合敲除会严重降低精子质量, 从而降低雄性生育能力。

【关键词】 精子发生; Usp16; 生殖力; Cre-loxP

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0376-08

Establishment, identification and phenotyping of a germ cell-specific deubiquitinating enzyme 16 conditional knockout mouse

LI Weijie¹, LIANG Dongli², LIU Yongzhong³, WANG Zhaoxia², QIAO Zhongdong¹, XU Wangjie^{2*}

(1. School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China. 2. Laboratory Animal Center, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240. 3. State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200240)

Corresponding author: XU Wangjie. E-mail: hover_xwj@sjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To study the role of deubiquitinating enzyme 16 (Usp16) in spermatogenesis by establishing a mouse model of conditional Usp16 knockout in germ cells. **Methods** Vasa-cre transgenic mice were crossed with Usp16 transgenic mice (Usp16^{flox/flox}) to obtain germ cell-specific Usp16 knockout mice. To confirm that Usp16 had been conditionally inactivated in germ cells, genotyping by PCR and western blotting was performed to evaluate Usp16 expression. Initial characterization of the phenotype of conditional knockout (CKO) mice was then conducted by co-cage mating, computer-assisted sperm analysis, and HE staining. **Results** We confirmed that Usp16 expression was appropriate in the conditional knockout mouse. Compared with the wild type, the conception rate of female mice mated with

[基金项目] 上海市自然科学基金 (20ZR1427400), 上海交通大学决策咨询课题 (JCXSJA-02)。
Funded by Natural Science Foundation of Shanghai (20ZR1427400), Shanghai Jiao Tong University Decision-Making Consultation Project (JCXSJA-02).

[作者简介] 李卫杰 (1995—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 精子发生。Email: lwj897586647@sjtu.edu.cn

[通信作者] 徐汪节 (1976—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向: 环境因素对生殖发育的影响和人类疾病动物模型。
Email: hover_xwj@sjtu.edu.cn

CKO mice had decreased to only 7%, while no significant difference was observed in heterozygous knockout mice male mice. The sperm count of CKO mice was decreased by approximately 79%, motility was decreased by approximately 87%, and the rate of sperm deformity was as high as 83%. Multinucleated cells appeared in the seminiferous tubules of the testes and the number of precocious sperm in the epididymis had increased by approximately 76%. **Conclusions** Homozygous mutation of *Usp16* in germ cells severely reduces sperm quality, thereby reducing male fertility.

[Keywords] spermatogenesis; *Usp16*; fertility; Cre-loxP

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

精子发生是一个由一系列基因的精细调控完成的复杂过程,其间经历剧烈的形态与功能的变化。我们前期发现,不育患者精子中的 *Usp16* 表达下调^[1],提示 *Usp16* 可能与精子质量有关。

去泛素化酶 *Usp16* 可特异性去除组蛋白 H2A 的泛素化修饰,调节 *Hox* 基因表达^[2]、影响胚胎干细胞和造血干细胞分化^[3-4]、对 DNA 损伤修复起着负调控作用^[5]。*Usp16* S552 的磷酸化是细胞正常增殖和细胞周期 G2/M 期进程的基础^[6-8]。此外,*Usp16* 参与 Wnt 途径的调节^[9]、参与 T 细胞介导的自身免疫病的发展^[10]、还影响肿瘤的生长^[11]。但是 *Usp16* 在精子发生中相关的功能研究较少。

由于 *Usp16* 全身性敲除导致动物胚胎死亡^[3],所以本研究拟通过 Cre-loxP 系统^[12]构建生殖细胞特异性(*Vasa-cre*)敲除 *Usp16* 小鼠,并分析其生殖表型来初步探究 *Usp16* 在小鼠生精过程中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

3 只野生型雄鼠(WT)、3 只杂合敲除 *Usp16* 雄鼠(*Usp16*^{flox/wt}/*Vasa-cre*⁺)和 3 只纯合敲除 *Usp16* 雄鼠(*Usp16*^{flox/flox}/*Vasa-cre*⁺)为 4 月龄,体重约为 28 g,用于表型分析。5 只野生型雄鼠(WT)、27 只野生型雌鼠(WT)和 2 只纯合敲除 *Usp16* 雌鼠(*Usp16*^{flox/flox}/*Vasa-cre*⁺)用于生育实验,3 月龄,体重约为 26 g(雄鼠)和 22 g(雌鼠)。1 只 *Vasa-cre* 转基因雄鼠(B6. FVB-Tg(*Ddx4-cre*)1Dcas/KnwJ)购自赛业模式生物研究中心(太仓)有限公司【SCXK(苏)2018-0003】,6 月龄,约 29 g。1 只 *Usp16*^{flox/flox}雌鼠由上海市肿瘤研究所刘永忠课题组【SYXK(沪)2018-0028】赠送,4 周龄,约 15 g。以上小鼠均为 SPF 级,遗传背景均为 C57BL/6 N,饲养于上海交通大学实验动物中心【SYXK(沪)2018-0028】,温度为 20 ~ 25℃,湿度为 40% ~ 70%,昼夜各半循环照明,笼具、饲料、垫料和饮水经高压灭菌处理。繁

殖采用雌雄比 1 : 1 或 2 : 1 合笼,小鼠出生 21 ~ 28 d 后分笼,至 8 周龄性成熟。所有操作均符合上海交通大学实验动物伦理与使用委员会要求(审批号:A2021025)。

1.1.2 主要试剂与仪器

引物合成(上海桑尼生物科技有限公司)、血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304,天根生化科技(北京)有限公司)、2 × Es Taq MasterMix(Dye)(CW0690,北京康为世纪生物科技有限公司)、RNAiso plus(9109, TaKaRa)、PrimeScript™ RT Reagent Kit(RR037A, TaKaRa)、FastStart Universal SYBR Green Master(Rox)(04913850001, Roche)、兔抗小鼠 *Usp16* 抗体(14055-1-AP,武汉菲恩生物科技有限公司)、β-actin 抗体(ab6276, Abcam)、Alexa Fluor 594 山羊抗兔荧光二抗(A-11012, 赛默飞世尔科技公司)、山羊抗小鼠 IgG(H+L)-HRP(CW0102S,北京康为世纪生物科技有限公司)、山羊抗兔 IgG(H+L)-HRP(CW0103S,北京康为世纪生物科技有限公司)、抗荧光淬灭封片液(含 Hoechst 33342)(P0133-5 mL,上海碧云天生物技术有限公司)、ECL 发光试剂(C510043,生工生物工程(上海)股份有限公司)、Diff-Quick 染色液(G1541,北京索莱宝科技有限公司)。

迈朗精子分析仪(南宁松景天伦生物科技有限公司,中国)、电泳仪、PCR 扩增仪、实时荧光定量 PCR 仪和凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国)、荧光显微镜(Zeiss, 德国)。

1.2 方法

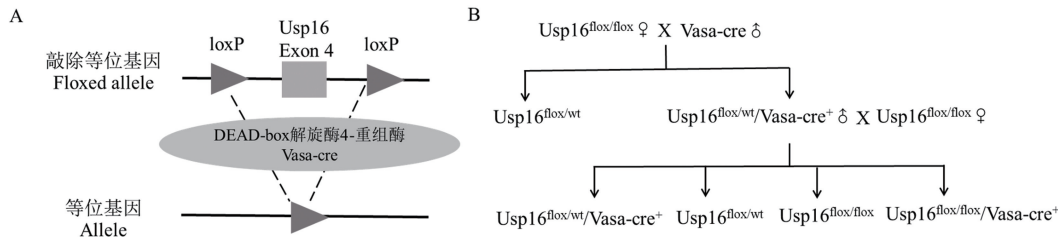
1.2.1 小鼠的繁殖与筛选鉴定

应用 Cre-loxP 基因编辑技术(图 1A),将 *Vasa-cre* 转基因雄鼠与雌鼠 *Usp16*^{flox/flox} 杂交,得 F1 代雄鼠 *Usp16*^{flox/wt}/*Vasa-cre*⁺ 为杂合敲除组,继续与雌鼠 *Usp16*^{flox/flox} 回交得 F2 代雄鼠 *Usp16*^{flox/flox}/*Vasa-cre*⁺ 为纯合敲除组(图 1B)。

剪取 7 日龄左右小鼠脚趾,按照 TIANGEN 试剂盒提取 DNA,通过 PCR 扩增并进行 2% 琼脂糖凝胶

电泳的方法确定小鼠基因型。PCR 扩增 10 μ L 体系为 2 $\times$ Es Taq MasterMix (Dye) 5 μ L, ddH₂O 4 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.25 μ L, 模板 DNA 0.5 μ L。Vasa-cre 基因扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C

45 s, 33 个循环; Usp16-wt 基因扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 38 个循环; Usp16-loxP 基因扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 33 个循环。所使用的引物信息见表 1。



注: A: Cre-loxP 敲除原理; B: 繁殖策略。

图 1 条件性敲除 Usp16 小鼠的构建与繁殖

Note. A. Cre-loxP knockout principle. B. Reproductive strategy.

Figure 1 Construction and reproduction of Usp16 conditional knockout mice

表 1 小鼠基因型鉴定引物信息

Table 1 Primers for mouse genotyping

基因 Gene	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')	扩增片段 (bp) Amplified fragment (bp)
Vasa (cre)	CACGTCAGCCGTTTAAAGCCGCGT	TTCCCAATTCTAAACAACACCCTGAA	240
Usp16 (wt)	CTGTATTGCTCTTGCTAGTTG	CTACTGTACTTTCCAGTCC	607
Usp16 (loxP)	GGCGCATAACGATACCACGAT	ACTGATGGCGAGCTCAGACC	961/170

1.2.2 小鼠组织总 RNA 提取及 qPCR

新鲜组织经液氮研磨后,用 RNAiso plus 提取组织总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 按反转录试剂盒合成 cDNA。cDNA 为模板,依照 Roche 荧光定量试剂盒说明书,用 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪进行 qPCR。目的基因 Usp16 上游引物: 5'-CTGCCAAGACT GTAAGACTGAC-3', 下游引物: 5'-GGTGTCTGTG TAGTGCTTCAAG-3', 内参基因 GAPDH 上游引物: 5'-TGGCCCTTCCGTGTTCTAC-3', 下游引物: 5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'。反应体系: FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 10 μ L, ddH₂O 6.8 μ L, 上下游引物各 0.6 μ L, cDNA 2 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min 预变性, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析结果。

1.2.3 Western Blot

用 RNAiso plus 提取组织总蛋白后,加入 5 $\times$ 蛋白质凝胶电泳上样缓冲液后煮沸 10 min,取 30 μ L 上样,恒压 60 V 浓缩蛋白,恒压 120 V 分离蛋白 (8%分离胶),恒流 300 mA 湿转 90 min,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗 (1:2000 稀释) 于 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜后加入相应 HRP 偶联二抗 (1:20 000 稀释) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后 ECL 化学发光显色于成像仪成像,结果用软件 Image J 进行灰度分析, β -actin 为内参。

1.2.4 HE 染色和免疫荧光

组织于 4%多聚甲醛中固定,常规石蜡切片, HE 染色,显微镜下拍照。免疫荧光: 切片脱蜡至水,放入预热的柠檬酸钠抗原修复液中微波加热 30 min 自然冷却后, 0.5% Triton X-100 通透 20 min, PBS 洗后 5%山羊血清 37 $^{\circ}$ C 封闭 90 min, PBS 洗后一抗 (1:200 稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗后二抗 (1:200 稀释) 室温孵育 1 h, PBS 洗后滴加抗荧光淬灭封片液封片, 荧光显微镜下拍照。

1.2.5 精液分析及精子涂片

取小鼠一侧附睾,剪开小口使精液置于精子获能液 HTF 中,放入二氧化碳培养箱 10 min, 稀释 100 倍后用迈朗精子分析仪分析。其中取 10 μ L 精液涂片风干后, Diff-Quick 快速染色, 显微镜下拍照。

1.3 统计学分析

独立重复实验 3 次,结果用 GraphPad Prism 8 软件统计分析,以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间平均值比较采用 Student's *t* 检验,多组间平均数比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 Usp16 在野生型成年雄鼠不同组织中表达情况

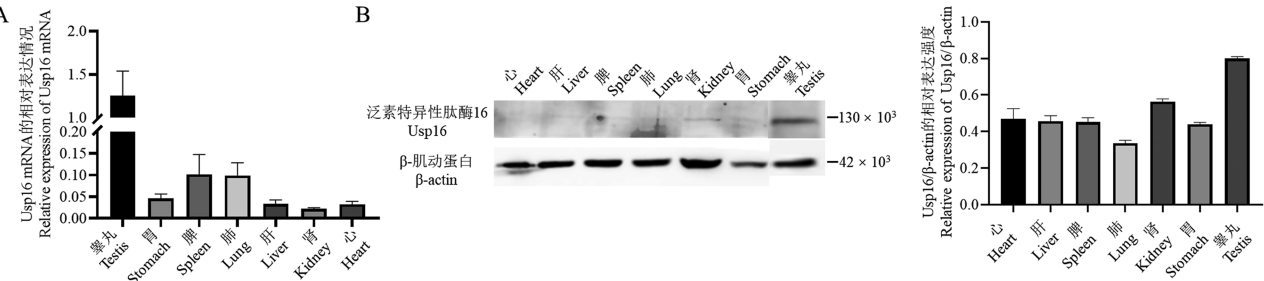
qPCR 和 Western Blot 结果显示 Usp16 在成年

雄鼠睾丸组织表达量最高,在其他组织中(心、肝、脾、肺、肾和胃)表达量较低(图 2)。

2.2 Usp16 条件性小鼠的建立及验证

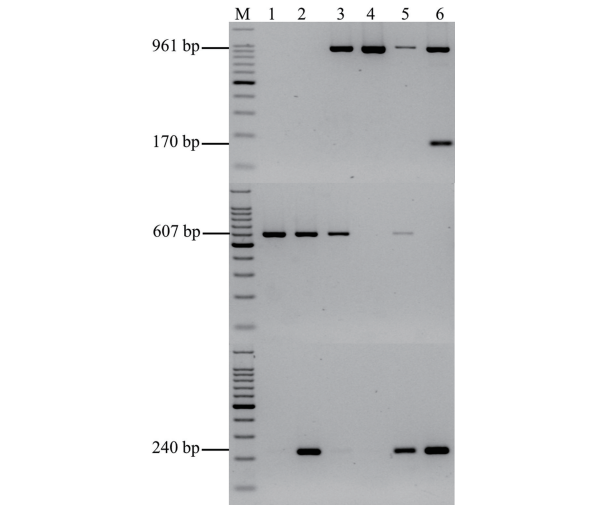
Usp16 条件性小鼠是在 Usp16 基因第 4 个外显子两端插入 loxP 位点,PCR 条带大小为 961 bp,若被 Vasa-cre 重组酶敲除则为 170 bp,野生型和 Vasa-

cre 阳性条带大小分别为 607 bp 和 240 bp, Usp16^{flox/wt} 小鼠可见 607 bp 和 961 bp 条带, Usp16^{flox/flox} 小鼠只可见 961 bp,杂合子 Usp16^{flox/wt}/Vasa-cre⁺小鼠可见 961、607 和 240 bp 条带,纯合子 Usp16^{flox/flox}/Vasa-cre⁺小鼠可见 961、170 和 240 bp 条带(图 3)。



注:A;qPCR 检测 Usp16 mRNA 表达水平;B:Western Blot 检测 Usp16 蛋白表达水平。
图 2 Usp16 在野生型成年雄鼠不同组织中的表达情况
Note. A. Usp16 mRNA expression level detected by qPCR. B. Usp16 protein expression level detected by Western Blot.

Figure 2 Expression of Usp16 in different tissues of wild-type adult male mice



注:1:野生型;2:Vasa-cre;3:Usp16^{flox/wt};4:Usp16^{flox/flox};5:Usp16^{flox/wt}/Vasa-cre⁺;6:Usp16^{flox/flox}/Vasa-cre⁺。
图 3 小鼠脚趾 DNA 经 PCR 扩增后电泳条带
Note. 1. Wild type. 2. Vasa-cre. 3. Usp16^{flox/wt}. 4. Usp16^{flox/flox}. 5. Usp16^{flox/wt}/Vasa-cre⁺. 6. Usp16^{flox/flox}/Vasa-cre⁺.

Figure 3 Electrophoresis band of PCR amplification of mouse toe DNA

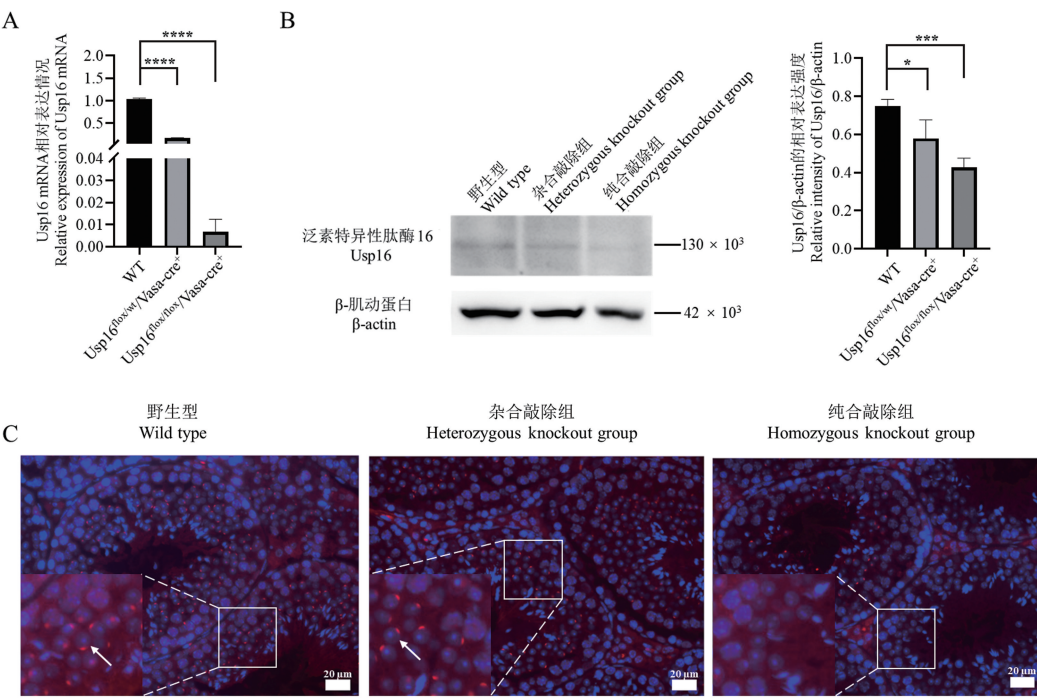
Usp16^{flox/wt}/Vasa-cre⁺雄鼠与 Usp16^{flox/flox} 雌鼠杂交共产仔 80 只(雄鼠 43 只,雌鼠 37 只)。其中 Usp16^{flox/wt} 基因型小鼠 26 只,Usp16^{flox/flox} 基因型小鼠 21 只,Usp16^{flox/wt}/Vasa-cre⁺ 基因型小鼠 27 只,Usp16^{flox/flox}/Vasa-cre⁺ 基因型小鼠 6 只(雌鼠 3 只,雄

鼠 3 只)。
qPCR 结果显示:相较于野生型,杂合敲除组和纯合敲除组雄鼠睾丸中 Usp16 mRNA 表达显著降低,分别降低了约 83%和 99%(Mean 0.17 SD 0.01 vs Mean 1.03 SD 0.03, $P < 0.0001$; Mean 0.01 SD 0.01 vs Mean 1.03 SD 0.03, $P < 0.0001$)(图 4A)。Western Blot 结果显示相较于野生型,杂合敲除组和纯合敲除组雄鼠睾丸中 Usp16 蛋白表达显著降低,分别降低了约 22%和 43%(Mean 0.58 SD 0.10 vs Mean 0.75 SD 0.03, $P = 0.0445$; Mean 0.43 SD 0.05 vs Mean 0.75 SD 0.03, $P = 0.0007$)(图 4B)。免疫荧光结果显示 Usp16 高表达于圆形精子,在体细胞中弱表达,纯合敲除组雄鼠睾丸中 Usp16 阳性圆形精子明显少于野生型(图 4C)。这些结果从基因和蛋白水平证明生殖细胞特异性敲除 Usp16 小鼠建立成功。

2.3 Usp16 条件性敲除小鼠表型分析

2.3.1 Usp16 敲除对睾丸组织形态的影响

野生型、杂合敲除组和纯合敲除组的睾丸中曲细精管排列紧密,结构完整,直径大小没有明显变化,管腔空腔化明显,管壁至管腔的各类生精细胞层次分明,但纯合敲除组睾丸中部分管腔中含有少量圆形精子相融形成的多核细胞(见图 5)。

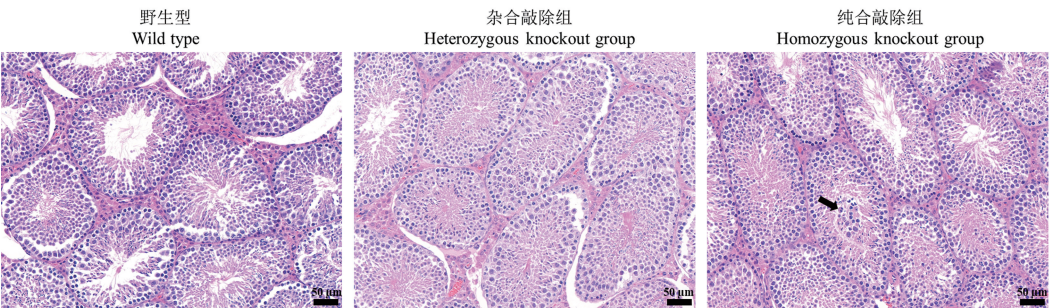


注:A;qPCR 验证野生型、杂合敲除组和纯合敲除组睾丸中 Usp16 mRNA 表达水平,与野生型对比,**** $P < 0.0001$;B:Western Blot 验证野生型、杂合敲除组和纯合敲除组睾丸中 Usp16 蛋白表达水平,与野生型对比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;C:睾丸中 Usp16 的免疫荧光,红色荧光代表 Usp16,蓝色荧光代表细胞核,箭头:阳性圆形精子。

图 4 条件性敲除 Usp16 小鼠验证

Note. A. The expression of Usp16 mRNA levels in the testis of the wild type, heterozygous knockout and homozygous knockout group detected by qPCR. Compared with the wild type, **** $P < 0.0001$. B. The expression of Usp16 protein levels in the testis of the wild type, heterozygous knockout and homozygous knockout group detected by Western Blot. Compared with the wild type, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. C. Immunofluorescence detection of Usp16 in the testis. Red fluorescence represents Usp16 and blue fluorescence represents cell nucleus. Arrow. Positive germ cells.

Figure 4 Verification of Usp16 conditional knockout mice



注:箭头:多核细胞。

图 5 睾丸 HE 染色

Note. Arrow. Multinucleated cell.

Figure 5 HE staining of the testis

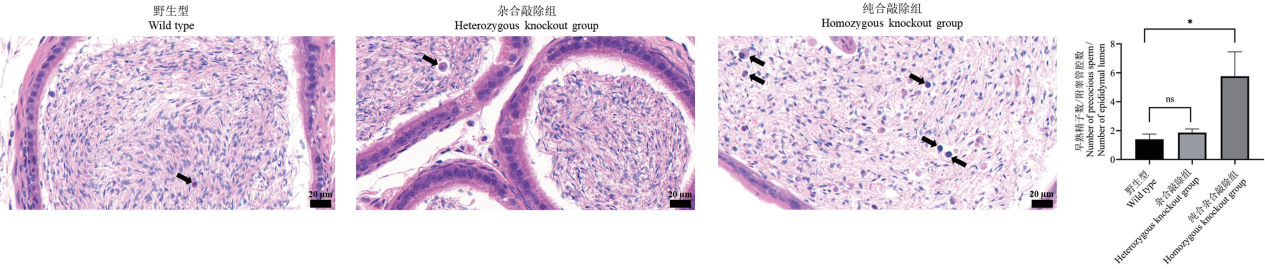
2.3.2 Usp16 敲除对附睾组织形态的影响

相较于野生型,纯合敲除组附睾中精子密度减小,且附睾中早熟精子数显著增加了约 3 倍 (Mean 5.77 SD 1.68 vs Mean 1.40 SD 0.36, $P = 0.0117$),而杂合敲除组无明显差异 (图 6)。

2.3.3 Usp16 敲除对精子质量及出生率的影响

野生型和杂合敲除组雄鼠生育能力正常,纯合敲除雌鼠也能正常生育产仔。而纯合敲除组雄鼠仅与其交配的 15 只雌鼠中的 1 只成功生育鼠仔,受孕率约 7% (表 2)。

纯合敲除组雄鼠的精子数量、活率和活力相较于野生型显著下降,分别下降了约 79%、81% 和 87%,精子运动速度(VSL、VCL、VAP)与精子空间位移程度(ALH、BCF、MAD)也显著降低,分别降低了约 80%、80%、80%、80%、78% 和 78%,而杂合敲除组精子各参数没有显著差异(表 3)。



注:实心箭头:早熟精子;与野生型相比, ^{ns}*P* > 0.05, * *P* < 0.05。

图 6 附睾 HE 染色

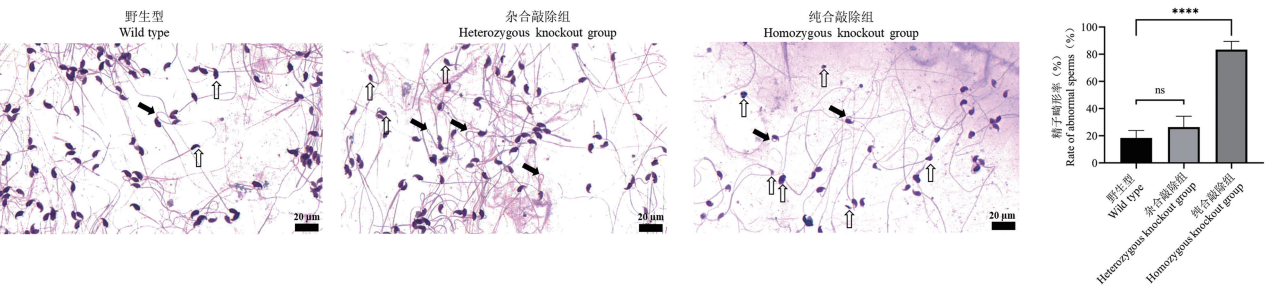
Note. Solid arrow. Precocious sperm. Compared with the wild type, ^{ns}*P* > 0.05, * *P* < 0.05.

Figure 6 HE staining of the epididymis

表 2 生育能力测试

Table 2 Fertility test

雄鼠基因型 Genotype of male mice	受孕雌鼠数/配繁雌鼠数 Pregnant female mice/mating female mice	产仔数 Number of litter
WT#1	2/2 (WT)	8,9
WT#2	2/2 (WT)	11,9
WT#3	2/2 (WT)	9,10
WT#4	1/1 (Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺)	7
WT#5	1/1 (Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺)	8
Usp16 ^{flox/wt} /Vasa-cre ⁺ #1	2/2 (WT)	8,9
Usp16 ^{flox/wt} /Vasa-cre ⁺ #2	2/2 (WT)	7,9
Usp16 ^{flox/wt} /Vasa-cre ⁺ #3	2/2 (WT)	7,8
Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺ #1	0/4 (WT)	0
Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺ #2	0/4 (WT)	0
Usp16 ^{flox/flox} /Vasa-cre ⁺ #3	1/5 (WT)	6



注:实心箭头:精子颈部或尾部异常弯曲;空心箭头:精子头部异常;与野生型相比, ^{ns}*P* > 0.05, **** *P* < 0.0001。

图 7 精子涂片染色

Note. Solid arrow. Curved neck and tail. Hollow arrow. Abnormal head. Compared with the wild type, ^{ns}*P* > 0.05, **** *P* < 0.0001.

Figure 7 Staining of sperm smear

表 3 计算机辅助精子分析

Table 3 Computer-aided sperm analysis

精子参数 Parameter of sperm	野生型 Wild type	杂合敲除组 Heterozygous knockout group	纯合敲除组 Homozygous knockout group
密度(10 ⁶ /mL) Density(10 ⁶ /mL)	30.27 ± 1.39	29.93 ± 1.09 ^{ns}	6.27 ± 0.96 ^{****}
活率(%) Viability(%)	92.06 ± 7.00	91.93 ± 2.71 ^{ns}	17.54 ± 3.94 ^{***}
活力(%) Motility(%)	85.85 ± 9.36	81.96 ± 4.85 ^{ns}	11.23 ± 2.15 ^{***}
直线速度(μm/s) VSL(μm/s)	82.13 ± 3.15	82.28 ± 4.48 ^{ns}	16.32 ± 4.89 ^{****}
曲线速度(μm/s) VCL(μm/s)	88.50 ± 3.82	87.66 ± 3.15 ^{ns}	17.62 ± 5.36 ^{***}
平均路径速度(μm/s) VAP(μm/s)	62.13 ± 2.68	61.55 ± 2.22 ^{ns}	12.37 ± 3.76 ^{***}
侧摆幅度(μm) ALH(μm)	26.37 ± 1.14	26.12 ± 0.94 ^{ns}	5.25 ± 1.60 ^{***}
鞭打频率(Hz) BCF(Hz)	15.08 ± 2.32	15.47 ± 1.38 ^{ns}	3.34 ± 0.65 ^{**}
平均移动角度(°) MAD(°)	16.52 ± 1.76	16.46 ± 1.30 ^{ns}	3.61 ± 0.74 ^{***}
摆动性 WOB	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00 ^{ns}	0.00 ± 0.00 ^{ns}
直线性 LIN	0.93 ± 0.03	0.94 ± 0.02 ^{ns}	0.93 ± 0.02 ^{ns}
前向性 STR	1.33 ± 0.04	1.34 ± 0.03 ^{ns}	1.32 ± 0.03 ^{ns}

注:与野生型相比,^{ns} $P > 0.05$,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$,^{****} $P < 0.0001$ 。
Note. Compared with the wild type,^{ns} $P > 0.05$,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$,^{****} $P < 0.0001$.

3 讨论

本研究通过 Vasa-cre 转基因小鼠与 Usp16 条件性小鼠(Usp16^{flox/flox})杂交成功获得生殖细胞特异性敲除 Usp16 小鼠,并从基因和蛋白水平得到证实。Vasa 蛋白从 12.5 dpc 开始表达持续至减数分裂后的精子细胞,通过与 Vasa-cre 小鼠杂交,雄鼠睾丸中生殖细胞中的 Usp16 被定向敲除,而除了睾丸中生殖细胞外,Usp16 在支持细胞和间质细胞中也有表达,故敲除后 Western Blot 中仍能看到条带,在免疫荧光中也有荧光表达。

精子发生是一个复杂而有序的过程,从精原细胞分化、精母细胞减数分裂至精子成熟,任何一个环节出现问题都有可能造成生殖缺陷。杂合敲除组相对于野生型,Usp16 表达量也显著降低,但生殖细胞中还存在 Usp16,可能降低的 Usp16 表达量不足以影响精子发生,故其精子质量和数量与野生型相比没有明显差异。纯合敲除雄鼠(Usp16^{flox/flox}/Vasa-cre⁺)附睾中精子浓度明显减少,曲细精管管腔中出现更多的早熟精子被释放入附睾中,可能是

由于精子释放过程异常^[13],使得精细胞未能完成重塑形成成熟精子而被释放入附睾中。而纯合敲除雄鼠睾丸中出现的少量多核细胞可能是由于圆形精子相融来抵抗细胞凋亡^[14]。此外,精子变态形成过程包含顶体发生、鞭毛形成和多余胞质脱落,其中生殖细胞染色质重塑^[15]和组蛋白与鱼精蛋白的交换^[16]对精子形成至关重要,此过程的异常往往导致精子畸形,精子质量下降。例如,E3 泛素连接酶 RNF8 的缺失^[17]或是 Miwi 的杂合突变^[18]都导致组蛋白上泛素化修饰的缺失,使得组蛋白和鱼精蛋白无法完全交换造成精子少弱畸形症,而纯合敲除 Usp16 雄鼠的生殖表型与其类似。去泛素化酶 Usp16 可特异性去除组蛋白 H2A 泛素化修饰,且它在圆形精子细胞中表达上调^[19],推测其可能参与圆形精子至精子成熟的变态过程,其是否在此过程中调节组蛋白的泛素化修饰使得组蛋白和鱼精蛋白交换异常,从而造成精子畸形、精子活力低和精子数量少等,还需进一步研究。此外,纯合敲除雌鼠能正常生育产仔,推测 Usp16 对其卵子形成没有明显影响。

综上所述,本文从基因和蛋白层面证实了成功构建了生殖细胞特异性敲除 *Usp16* 小鼠。通过对其生殖表型进行分析,发现纯合敲除雄鼠精子数量和活力严重下降,大量精子形态出现异常,这些表型提示,去泛素化酶 *Usp16* 可调节精子生成过程来影响精子质量和数量,最终对雄性生殖能力产生作用,具体作用机制还需进一步研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Xu W, Hu H, Wang Z, et al. Proteomic characteristics of spermatozoa in normozoospermic patients with infertility [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(17): 5426–5436.
- [2] Joo HY, Zhai L, Yang C, et al. Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination [J]. *Nature*, 2007, 449(7165): 1068–1072.
- [3] Yang W, Lee YH, Jones AE, et al. The histone H2A deubiquitinase *Usp16* regulates embryonic stem cell gene expression and lineage commitment [J]. *Nat Commun*, 2014, 5(1): 3818.
- [4] Gu Y, Jones AE, Yang W, et al. The histone H2A deubiquitinase *Usp16* regulates hematopoiesis and hematopoietic stem cell function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(1): 51–60.
- [5] Zhang Z, Yang H, Wang H. The histone H2A deubiquitinase *USP16* interacts with *HERC2* and fine-tunes cellular response to DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(47): 32883–32894.
- [6] Cai SY, Babbitt RW, Marchesi VT. A mutant deubiquitinating enzyme (Ubp-M) associates with mitotic chromosomes and blocks cell division [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(6): 2828–2833.
- [7] Xu Y, Yang H, Joo HY, et al. Ubp-M serine 552 phosphorylation by cyclin-dependent kinase 1 regulates cell cycle progression [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(19): 3219–3227.
- [8] Zhuo X, Guo X, Zhang X, et al. *Usp16* regulates kinetochore localization of *Plk1* to promote proper chromosome alignment in mitosis [J]. *J Cell Biol*, 2015, 210(5): 727–735.
- [9] Adorno M, di Robilant BN, Sikandar SS, et al. *Usp16* modulates Wnt signaling in primary tissues through *Cdkn2a* regulation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17506.
- [10] Zhang Y, Liu RB, Cao Q, et al. *USP16*-mediated deubiquitination of calcineurin A controls peripheral T cell maintenance [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(7): 2856–2871.
- [11] Yang YL, Li J, Geng YH. Exosomes derived from chronic lymphocytic leukaemia cells transfer miR-146a to induce the transition of mesenchymal stromal cells into cancer-associated fibroblasts [J]. *J Biochem*, 2020, 168(5): 491–498.
- [12] 李端, 刘亚坤, 段冰霞, 等. 少突胶质细胞条件性敲除 *FGF9* 基因小鼠模型的建立、鉴定及初步表型 [J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 455–460.
- Li D, Liu YK, Duan BX, et al. Establishment, identification and preliminary phenotyping of an oligodendrocyte-specific fibroblast growth factor 9 conditional knockout mouse [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2021, 29(4): 455–460.
- [13] O'donnell L, Nicholls PK, O'bryan MK, et al. Spermiation: The process of sperm release [J]. *Spermatogenesis*, 2011, 1(1): 14–35.
- [14] Pryor WA, Houk KN, Foote CS, et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(3): R491–R511.
- [15] Rajender S, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility [J]. *Mutat Res*, 2011, 727(3): 62–71.
- [16] Oliva R. Protamines and male infertility [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(4): 417–435.
- [17] Lu LY, Wu J, Ye L, et al. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(3): 371–384.
- [18] Gou LT, Kang JY, Dai P, et al. Ubiquitination-deficient mutations in human *piwi* cause male infertility by impairing histone-to-protamine exchange during spermiogenesis [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 1090–1104.
- [19] Jung Hoon P, Kye Sung K, Soo Kyung K, et al. Gene expression profiles in mouse pachytene spermatocytes and round spermatids revealed by cDNA microarray [J]. *Genes Genom*, 2005, 27(2): 169–177.

[收稿日期] 2021-09-24