

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00780

PIAS2 蛋白在不同病理分型的无精子症患者睾丸组织中的表达

冼志勇¹, 李 飞¹, 邹亚光², 邓永键³, 丁彦青³, 毛向明^{1*}

1. 南方医科大学南方医院泌尿外科, 广州 510515
2. 南方医科大学南方医院口腔科, 广州 510515
3. 南方医科大学南方医院病理科, 广州 510515

[摘要] **目的:**探讨 PIAS2 在不同生精功能状态的人睾丸组织中的表达情况。**方法:**对 80 例无精子症患者进行睾丸组织病理检查诊断,根据病理形态的不同分为:生精功能正常或基本正常($n=40$)、精子发生低下($n=20$)、唯支持细胞综合征($n=20$)等。选择上述各型结构完整的睾丸组织,分别应用免疫组化法(SP)对 PIAS2 在不同生精功能状态的睾丸组织进行研究。**结果:**PIAS2 在各级生精细胞多为强阳性表达,呈深棕黄色;PIAS2 在间质细胞及支持细胞表达弱阳性表达或不表达。**结论:**PIAS2 染色强弱与睾丸生精功能的强弱有一定关系,是一个潜在的判断睾丸生精功能的指标。

[关键词] 男性不育; 无精子症; PIAS2; 睾丸; 活组织检查; 免疫组织化学染色

[中图分类号] R 698.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)07-0780-03

Expression of PIAS2 in testis tissues of patients with different pathological types of azoospermia

XIAN Zhi-yong¹, LI Fei¹, ZOU Ya-guang², DENG Yong-jian³, DING Yan-qing³, MAO Xiang-ming^{1*}

1. Department of Urinary Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China
2. Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515
3. Department of Pathology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of PIAS2 in the testis tissues of patients with different spermatogenic functions. **Methods:** Eighty testicular biopsy samples from patients with azoospermia were subjected to pathological diagnosis and were divided into the following groups according to the pathological findings: normal or basically normal spermatogenesis group ($n=40$), hypo-spermatogenesis group (HS, $n=20$), and sertoli cell-only syndrome group (SCOS, $n=20$). Immunohistochemical method (SP) was used to examine the expression of PIAS2 in the testis tissues with different spermatogenic functions. **Results:** PIAS2 was strongly positive (dark brown) in the spermatogenic cells of different functions. It was weakly positive or absent in the Leydig cells and Sertoli cells. **Conclusion:** The status of PIAS2 in the testicular tissues is associated with the spermatogenic functions, and it may serve as a potential parameter for predicting of spermatogenic function.

[KEY WORDS] male infertility; azoospermia; PIAS2; testis; biopsy; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(7): 780-782]

PIAS 蛋白是 STATs (signal transducer and activator of transcrip tion, STATs)信号通路的负调控因子。PIAS 蛋白家族包括 PIAS1、PIAS3、PIASx α (PIAS2)、PIASx β 和 PIASy 5 个成员。近年的研究发现 PIAS 家族蛋白具有小泛素相关修饰 E3 (small ubiquitin like modifier E3, SUMO E3)连接酶活性^[1],并能够通过多种机制上调或下调 60 多种蛋白的活性。这 60 多种蛋白中绝大多数是转录

因子,包括了已知的原癌蛋白 JUN、MYB、STAT3 和抑癌蛋白 p53,除此之外,PIAS 蛋白还能够调节与肿瘤发生密切相关的 NF- κ B 的 p65 亚单位、SMAD3、SMAD4 等转录因子的活性^[2]。

为了进一步探讨 PIAS2 与睾丸生精功能的确切关系及其来源,本实验对无精子症患者不同类型睾丸组织中 PIAS2 进行了研究。

[收稿日期] 2009-03-15 **[接受日期]** 2009-06-17

[基金项目] 国家自然科学基金(30772167);广州市科技计划项目(2008J1-C131). Supported by National Natural Science Foundation of China(30772167) and Science and Technology Program of Guangzhou Municipality(2008J1-C131).

[作者简介] 冼志勇,硕士生,主治医师. E-mail: urologist@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:020-62787210, E-mail: mxm@fimmu.com

1 资料和方法

1.1 研究对象 南方医科大学南方医院泌尿外科随诊不育男性患者,年龄 27~55 岁,平均(32.67±3.24)岁。正常性生活 1~5 年,无生育;活检术前内分泌检测正常,3 次精液检查属于无精子症或少精子症。睾丸活检指征:(1)至少 2 次精液检验均为无精子症;(2)临床睾丸体积大小、质地、激素水平测定正常;(3)14 岁以后就诊为双侧隐睾。

1.2 试剂和仪器 小鼠抗人 PIAS2 单克隆抗体购自 Sigma 公司,SP 试剂盒购于深圳晶美生物工程有限公司。

1.3 标本处理 睾丸活检切取组织约 5 mm×3 mm 大小,取材后立即置 Bouin 液中固定,常规 H-E 染色,镜下观察曲细精管(细胞种类、数量、比例与排列方式、管径大小、曲细精管与间质的比例)、界膜和睾丸间质(间质细胞、血管)的病理变化;按照第 9 版阿克曼《外科病理学》睾丸生殖病理的最新标准,将病变分为六大类^[1]:生精功能正常或基本正常、精子发生低下、唯支持细胞综合征、生精细胞发育完全阻滞、生精细胞发育不完全阻滞及 Klinefelter 综合征等。生精功能基本正常型标本用作对照。选择上述各型病理切片中睾丸组织结构完整、色清晰的标本,对其相对应的石蜡包块,再行 5 μm 连续切片,将切片裱于涂有 3-氨基丙基三乙氧基硅胶烷(APES)的载玻片上用于免疫组化染色。

1.4 实验分组 生精功能正常或基本正常($n=40$);睾丸组织曲细精管可见各级生精细胞和支持细

胞,管腔面有很多精子,曲细精管界膜及间质无明显异常;精子发生低下($n=20$);曲细精管包括精原细胞在内的各级生精细胞都存在且相对比例亦基本正常,但各级生精细胞的数量比正常减少,曲细精管界膜、管径和支持细胞无异常或仅有轻度变化;唯支持细胞综合征($n=20$);睾丸曲细精管生精细胞完全缺失,生精上皮仅由支持细胞组成。

1.5 免疫组化染色 睾丸切片经干燥 25 h 后,常规脱蜡,以 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;0.3% H₂O₂ 甲醇溶液封闭,室温下 20 min 蒸馏水清洗 3 次,每次 5 min;0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)抗原高压热修复 2 min;冷却至室温 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;10% 正常山羊血清封闭室温 10 min;除去多余血清封闭剂;加小鼠抗人 PIAS2 单克隆抗体 37℃ 30 min;PBS 清洗 3 次,每次 5 min;与生物素标记的羊抗小鼠 IgG 抗体 37℃ 孵育 15 min;PBS 清洗 3 次,每次 5 min;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素蛋白工作液,37℃ 孵育 15 min;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;自来水充分冲洗,复染,封片。

1.6 结果判断 PIAS2 阳性染色位于细胞核中,呈黄色或黄褐色颗粒。根据染色范围及程度综合判断,无阳性着色或阳性细胞数<25% 为阴性(-),阳性细胞数≥25% 为阳性(+).

2 结果

2.1 免疫组化观察结果 本实验结果显示,PIAS2 在各级生精细胞多为强阳性表达,呈深棕黄色;PIAS2 在间质细胞及支持细胞弱阳性表达或不表达(图 1)。

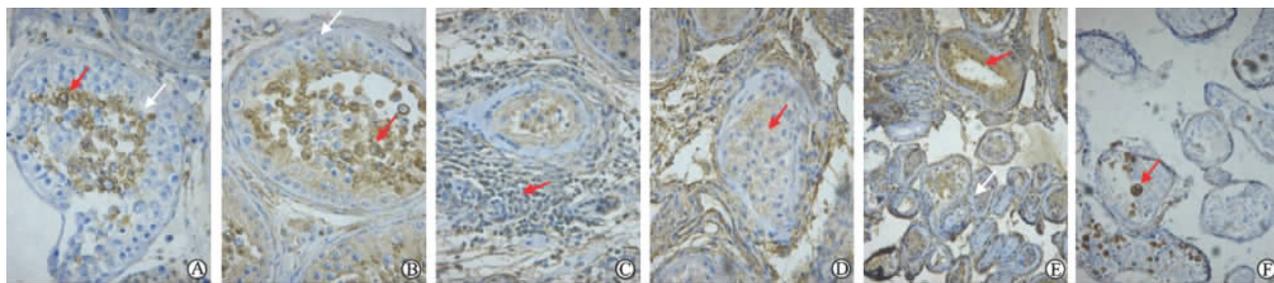


图 1 PIAS2 在无精子症睾丸组织和正常睾丸组织的表达

Fig 1 Expression of PIAS2 in human testis tissues with different spermatogenic functions

A, B: In normal or basically normal spermatogenesis group, PIAS2 was strongly positive in spermatogenic cells (dark brown, red arrow); but was negative in Sertoli cells (white arrow); C: Negative expression or weak expression of PIAS2 was observed in Leydig cells (red arrow); D: In Sertoli cell-only syndrome group, PIAS2 was negative (red arrow); E: A few patients with most part of the testis showing Sertoli cell-only syndrome were associated with changes in seminiferous tubule sclerosis (white arrow), but some seminiferous tubules had normal spermatogenesis and positive expression of PIAS2 (red arrow); F: Diffused PIAS2 expression was observed in the hypo-spermatogenesis group (red arrow)

2.2 各组 PIAS2 免疫组化观察结果 生精功能基本正常组 PIAS2 表达均呈阳性(40/40, 阳性率

100%), PIAS2 定位于各级生精细胞的胞核内,呈深棕黄色强阳性表达;唯支持细胞综合征组支持细胞

大部分呈阴性表达,有意义的是部分唯支持细胞综合征的患者 PIAS2 呈阳性表达(2/20,阳性率10%),结合患者的组织学观察发现,此类患者睾丸病理改变为大部分呈现唯支持细胞综合征伴生精小管硬化改变,但部分生精小管生精功能尚正常,这些患者存在人工辅助受精的机会,PIAS2 阳性表达与其组织学改变一致。生精功能低下组部分病例 PIAS2 表达虽然较正常对照组弱且少(8/20,阳性率40%),但是具有一定数量的生精小管 PIAS2 表达阳性,这类患者从理论上推断也具有人工辅助受精的机会,是临床治疗中需要特别关注的人群。尽管我们也观察到其中相当数量的患者生精小管有 PIAS2 表达,但非常散在,且数量非常少。统计学分析发现,唯支持细胞综合征组及精子发生低下组与生精功能正常组比较 PIAS2 阳性率存在明显的差异(Pearson χ^2 检验, $P < 0.05$)。

3 讨论

PIAS 蛋白最初鉴定为 DNA 结合抑制辅助因子,被 STAT 家族转录因子转录激活。这些蛋白特征性地在 N 端包含 SAP 区域、中心环状锌指蛋白区域和 C 端酸性结构域区。其功能有:(1)调节 STATs 在胞核中的转录活性。PIAS1 和 PIAS3 通过阻断 STAT1 和 STAT3 与 DNA 结合活性从而抑制其介导的转录。与此相反,PIASy 抑制 STAT1 蛋白而不影响 DNA 结合。PIASx α 和 PIASx β 可抑制 STAT4 介导的基因激活。他们组成一个大的转录共抑制复合物(STAT4-DNA 结合复合物)。(2)作为一种雄激素受体(AR)转录共调节。PIASx α 调节 AR 的转录活性。其他 PIAS 蛋白质,如 PIAS1 和 PIASy,最近已经证明作为 AR 共同调节器。(3)作为 SUMO-1-圈合蛋白质和锌指依赖 SUMO E3 蛋白质连接酶。一些文献^[3-7]报道,PIAS 蛋白可提高 SUMO 蛋白修饰的蛋白质,其中包括 AR、p53 和糖皮质激素受体。在体细胞和体外试验也证实,PIAS1 和 PIASx α 可作为 AR 特异 SUMO-E3 连接酶^[3-7]。

无精子症占男性不育的 10%~20%,是临床男性不育原因之一,可分为睾丸生精功能障碍和精子通道梗阻,即非梗阻性和梗阻性无精子症。梗阻性无精子症的睾丸生精过程正常,非梗阻性无精子症常提示生精功能障碍,一般按生精障碍由严重到低下可分为唯支持细胞综合征、生精阻滞、生精功能低下等常见病理类型。睾丸组织中生精上皮、支持细胞、界膜、间质在结构和功能上是密切相关的整体,它们相互影响,互为因果,在不同病理类型中其病变

常混合存在,因而诊断时应综合分析^[8]。另外病理诊断要充分结合临床,并注意进行随访研究,根据自体人工辅助生殖受孕的情况作出相应的修正。

精子的发生是由精原细胞有丝分裂增殖、精母细胞的减数分裂、精子细胞的变态形成等过程组成。这个高度有序的过程,需要一个精确的和协调一致的程序来控制不断变化的基因表达模式。文献^[9]报道有 PIAS 的家族成员都在睾丸中表达。PIAS 蛋白协调控制精子的发生是可能的。本研究证实,在人睾丸组织中有 PIAS2 蛋白表达,PIAS2 蛋白主要表达于各级生精细胞的胞核内而在间质细胞及支持细胞表达弱阳性表达或不表达。

本研究证实 PIAS2 蛋白主要表达于各级生精细胞的胞核内而在间质细胞及支持细胞表达弱阳性表达或不表达。PIAS2 染色强弱与睾丸生精功能的强弱有一定关系。提示 PIAS2 在精子发生中有作用,可能是一个潜在的判断睾丸生精功能的指标,但具体的机制有待进一步研究^[10]。

[参考文献]

- [1] Ali M M, Yoshizawa T, Ishibashi O, Matsuda A, Ikegame M, Shimomura J, et al. PIASx β is a key regulator of osterix transcriptional activity and matrix mineralization in osteoblasts[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 15): 2565-2573.
- [2] Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 593-605.
- [3] Arora T, Liu B, He H, Kim J, Murphy T L, Murphy K M, et al. PIASx is a transcriptional co-repressor of signal transducer and activator of transcription 4[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 21327-21330.
- [4] Tan J A, Hall S H, Hamil K G, Grossman G, Petrusz P, Liao J, et al. Protein inhibitor of activated STAT-1 (signal transducer and activator of transcription-1) is a nuclear receptor coregulator expressed in human testis[J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14: 14-26.
- [5] Tan J A, Hall S H, Hamil K G, Grossman G, Petrusz P, French F S. Protein inhibitors of activated STAT resemble scaffold attachment factors and function as interacting nuclear receptor coregulators[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 16993-7001.
- [6] Gross M, Liu B, Tan J, French F S, Carey M, Shuai K. Distinct effects of PIAS proteins on androgen-mediated gene activation in prostate cancer cells[J]. *Oncogene*, 2001, 20: 3880-3887.
- [7] Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 593-605.
- [8] 欧建平,李阳,庄广伦.无精症睾丸活检病理学特点及对男性不育诊治的指导意义[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2004, 25: 354.
- [9] Santti H, Mikkonen L, Anand A, Hirvonen-Santti S, Toppari J, Panhuysen M, et al. Disruption of the murine PIASx gene results in reduced testis weight[J]. *J Mol Endocrinol*, 2005, 34: 645-654.
- [10] 滕若冰,党裔武,吕自力. Survivin 在无精子症患者睾丸组织中的表达[J]. *广东医学*, 2008, 29: 452-454.