

私立東海大學生命科學系  
博士論文

指導教授：羅能文 博士

Neng-Wen Lo, PhD

鄭 葳 博士

Vie Cheng, PhD

*Esx1* 基因在小鼠睪丸及胎盤中之特定表現以及在睪丸生殖

細胞中啟動子之區域分析

Differential expression of *extraembryonic*  
*tissue-spermatogenesis-homeobox gene 1 (Esx1)* in mouse testes and in  
placentae and its promoter analysis in testicular germ cells

研究生：葉月嬌

Yueh-Chiao Yeh

中華民國九十五年一月

# 私立東海大學生命科學系博士論文

*Esx1* 基因在小鼠睪丸及胎盤中之特定表現以及在睪丸生殖  
細胞中啟動子之區域分析

Differential expression of *extraembryonic  
tissue-spermatogenesis-homeobox gene 1 (Esx1)* in mouse testes and in  
placentae and its promoter analysis in testicular germ cells

研究生：葉月嬌

Yueh-Chiao Yeh

指導教授：羅能文 博士

Neng-Wen, Lo, PhD

鄭 葳 博士

Vie Cheng, PhD

中華民國九十五年一月

## 誌謝

這份論文的完成首先感謝指導教授羅能文老師對於論文實驗的指導，以及鄭葳老師對於研究態度及方式的啟發及鼓勵是我遇到困難及瓶頸時努力往前的最佳動力。其次，感謝本論文研究期間中山醫學大學醫技系林培正老師在實驗動物處理的協助、本校畜產與生物科技系楊錫坤主任及歐柏榮老師在研究實驗上的啟發、本校食品科學系盧錫祺老師指導定量 PCR 實驗、本系范聖興老師對於共軛焦聚顯微鏡使用技術的指導以及黃光裕主任在基因操作技術上的指導。另外，感謝中華民國細胞及分子生物學會以及美國研究生殖學會提供旅費獎學金，使得以順利參加國際學術研討會發表部分研究結果。

完成這份論文的過程讓我自己對人生有了一番省思，並也體驗到突破瓶頸的甘甜。期間，感謝本實驗室學弟妹文鴻、淑玲及瑞昇等人的協助，以及偉廷、莉瑛、智翔、婉玲、美芳、元凱、維文、玉俊、書槐及展延等同學的支持與協助。另外，撰寫論文過程中特別感謝淑麗及富美老師不斷鼓勵方得以順利完成。也感謝家人在這些年來無怨無悔的支持，士勳叔叔的鼓勵、公婆及父母的勉勵、姊妹及弟弟的支持。最後，這份論文謹獻給我最愛的承逸及孟亮，你們的鼓勵是我能夠完成這份艱難工作的最大能量來源。

于東海

## 目錄

目錄 .....	1
<b>Part I. ESX1 的階段性表現-作為 X 精子的候選標識蛋白</b>	
中文摘要.....	6
英文摘要.....	7
前言.....	8
一、 生精作用與精子生成.....	8
二、 <i>Esx1</i> 基因.....	9
三、 X-及 Y-精子之辨識.....	11
材料及方法.....	14
一、 試驗動物 ( Assay animals ) .....	14
二、 隱睪手術 ( Induction of cryptorchidism ) .....	15
三、 分離精細胞及附睪尾取精 ( The separation of testicular germ cell populations and collection of spermatozoa from the cauda epididymis ) .....	15
四、 西方點墨分析法 ( Western blotting analysis ) .....	17
五、 免疫螢光顯微鏡分析法 ( Immunofluorescent microscopy ) ....	18
六、 統計分析 ( Statistical analysis ) .....	19
結果.....	20

一、 ESX1 在小鼠胎盤及睪丸組織的空間表現(Spatial expressions of ESX1 in mouse placenta and testis) .....	20
二、 ESX1 在睪丸發育過程中的階段性表現區域 (Stage-specific locations of ESX1 during testicular development) .....	21
三、 SRY 在睪丸中的專一性分佈位置 (Specific localizations of SRY in testis) .....	22
四、 ESX1 及 SRY 在小鼠精子之不同分佈表現 (Differential localizations of ESX1 and SRY in mouse sperm populations) ...	22
五、 利用 ESX1 及 SRY 抗血清辨識以向上游動技術所分離之 X-及 Y-精子 (Use of both ESX1 and SRY antisera to recognize the X- and Y- sperm separated by swim-up technique) .....	23
討論.....	25
參考文獻.....	30
 <b>Part II. 熱緊迫誘導不同表現型的 <i>Esx1</i> 轉錄子在睪丸及胎盤中的轉換表現以及 <i>Esx1</i> 基因啟動子在雄性生殖細胞中之區域分析</b>	
中文摘要.....	38
英文摘要.....	41
前言.....	42

一、 熱緊迫對生精作用的影響.....	42
二、 <i>Esx1</i> 基因之文獻探討及基因序列分析.....	44
三、 熱緊迫對 <i>Esx1</i> 轉錄子表現在睪丸及胎盤組織的作用.....	45
材料及方法.....	50
一、 試驗動物 ( Assay animals ) .....	50
二、 隱睪手術 ( Induction of cryptorchidism ) .....	50
三、 誘發熱緊迫試驗模式 ( Experimentally-induced heat stress ) .....	51
四、 反轉錄-PCR 及定量 rt-PCR ( Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative real time (rt)-PCR analyses ).....	51
五、 西方點墨分析 ( Western blotting analysis ).....	54
六、 組織切片分析及免疫螢光顯微鏡分析法 ( Histology and immunofluorescent microscopy ) .....	54
七、 TUNEL 試驗 ( Terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyl-UTP nick-labeling (TUNEL) analysis ) ..	55
八、 小鼠 <i>Esx1</i> 基因體 DNA 之選殖 ( Isolation of the mouse <i>Esx1</i> genomic DNA ) .....	55
九、 質體建構與製備 ( Plasmid constructions and preparations ) .....	59
十、 精細胞分離及附睪尾取精 ( The separation of testicular germ cell populations and collection of spermatozoa from the cauda	

epididymis ) .....	60
十一、 短暫轉染分析作用與冷光素酶分析 (Transient transfection and luciferase assays) .....	60
十二、 統計分析 (Statistical analysis) .....	62
結果.....	63
一、 x-型 <i>Esx1</i> 轉錄子在隱睪手術後之睪丸中被誘導表現 (Induced expression of x-form <i>Esx1</i> transcript in testis with cryptorchidism) .....	63
二、 <i>Esx1</i> mRNA 在受到急性熱緊迫下的睪丸中異常的表現 (Aberrant expression of <i>Esx1</i> mRNA in testes under acute heat stress) .....	65
三、 ESX1 在受到嚴重熱損害的睪丸中之分佈表現 (Spatial expression of ESX1 in severely heat-injured testes) .....	66
四、 受到嚴重熱緊迫的睪丸生殖細胞發生計畫性細胞凋亡 (Programmed cell death in the germ cell population of the testis suffered severe stress) .....	66
五、 <i>Esx1</i> 轉錄子之特定表現型在胎盤中的獨特性表現 (Isoform-specific expressions of <i>Esx1</i> transcripts in placentae) .....	67
六、 觀察受熱緊迫處理的小鼠胎盤組織形態及 ESX1 的表現	

(Morphological observations of cross sections and expression of ESX1 in heat-stressed placenta) .....	69
七、 獲取及定序小鼠 <i>Esx1</i> 基因之 5'-端調節區域及 5'-端非轉譯區序 列 (Obtaining and sequencing of the 5'-regulatory region and the 5'-untranslated region of mouse <i>Esx1</i> gene).....	69
八、 <i>Esx1</i> 基因啟動子在分離後的睪丸生殖細胞中之活性 ( <i>Esx1</i> promoter activities in fractionated testicular germ cell populations) .....	70
討論.....	74
參考文獻.....	83
表目錄.....	91
表說明.....	92
圖目錄.....	94
圖說明.....	96
附件目錄.....	116
附件說明.....	117
個人資料.....	122
論文發表.....	123

## Part I. ESX1 的階段性表現-作為一 X 精子的候選標識蛋白

### 中文摘要

胚外組織-生精作用-同源箱基因 1 (*Esx1* 基因) 會轉譯出一具有 X-性聯鎖的同源箱蛋白質。過去對於 *Esx1* 基因之表現形態，除了其 mRNA 在睪丸中的表現已被研究外，對於 *Esx1* 蛋白質 (ESX1) 在睪丸中的分佈型式仍然未知。在本論文中，以過去本實驗室所製作的 ESX1 抗血清探究 ESX1 在小鼠中的階段性及組織專一性表現。西方點墨分析及免疫螢光分析結果顯示 ESX1 的分佈與 RNA 的表現形式一致，主要是在胎盤及睪丸組織中。免疫螢光分析顯示 ESX1 在三週齡後的小鼠睪丸中表現，而此時生精細管開始出現圓形精細胞。此外，在圓形精細胞形成精子的過程中，在生精細管的管腔部位中 ESX1 的表現增強。相反的，在隱睪手術處理後的睪丸中，ESX1 的表現量會下降。由此結果得知，ESX1 之表現主要是在生精作用中減數分裂後的階段。為了更進一步了解 ESX1 是否在 X-精子中表現，本研究利用 ESX1 抗血清進行免疫螢光顯微鏡分析試驗，分析 ESX1 在小鼠精子中的表現，結果發現大約一半的精子能被 ESX1 抗血清所辨識。從本研究中，我們認為 ESX1 能做為 X-精子之標識蛋白質。

## 英文摘要

*Extra-embryonic tissue-spermatogenesis-homeobox gene 1 (Esx1)* encodes an X-linked homeobox protein. Despite the fact that the temporal and spatial mRNA expression pattern has been studied extensively in the testis, specific localization of the *Esx1* protein (ESX1) in the testis remains to be determined. In my study, the ESX1 antiserum was used to investigate the stage- and tissue-specific expression of ESX1 in the mouse. Western blotting and immunofluorescent analyses revealed that general localizations of ESX1 were consistent with its RNA expression patterns; that is, it was restricted mainly to the placenta and testis. Immunofluorescent studies demonstrated that ESX1 existed in the testes after 3 weeks of age, coincident with the appearance of round spermatids in the seminiferous tubules. Moreover, ESX1 expression became more abundant in the luminal regions of the seminiferous tubules as the development of round spermatids progressed into spermatozoa. In contrast, reduced expression of ESX1 was observed in experimentally induced cryptorchid testes. The later expression of ESX1 suggests a role in post-meiotic germ cell development. To further understand ESX1 expression in sperm with respect to X chromosome-bearing sperm, we used ESX1 antiserum to immunostain sperm and examined the sperm by confocal laser microscopy. Approximately half the sperm population was recognized by the ESX1 antiserum. On the basis of results of the present study, we suggest that ESX1 could be recognized as a protein marker for X-sperm.

## 前言

### 一、 生精作用與精子生成

生精作用 (spermatogenesis) 是一發生在雄性睪丸生精細管中生成精子的過程，始於精原細胞 (spermatogonium)，最後形成兩大不同性別的精細胞族群 (Bellvé *et al.*, 1977; Russel *et al.*, 1990; Dym, 1997; Eddy, 2002) (如附圖一)。整個精子形成的過程可分為：(一) 精原細胞進行有絲分裂期 (mitotic process)。(二) 初級精母細胞 (primary spermatocyte) 經過第一次減數分裂 (meiosis process) 產生次級精母細胞 (secondary spermatocyte)，之後再經過第二次減數分裂產生具有單套染色體的精細胞 (spermatid)。(三) 精細胞經過最後階段的化學性及結構性修飾作用 (spermiogenesis)，亦即精子形成，才能變成具有受精功能的精子 (spermatozoa) (Monesi, 1965; Solari, 1974; Hendriksen *et al.*, 1995)。在生精作用的減數分裂時期，X-及 Y-染色體與體染色體 (autosomes) 分開，形成異質性染色質 (heterochromatic sex body)。在減數分裂完成之後，性染色體會形成濃縮形態而與體染色體不同，此階段被認為是一基因轉錄作用不活化期 (Sachs, 1954; Monesi, 1965; Sassone-Corsi, 2002)。然而過去的研究中也有不同的觀點指出，許多基因在減數分裂末期的生精細胞 (spermatogenic cells) 中仍有被轉譯為蛋白質的可能 (Hendriksen *et al.*, 1995)，而此類基因的產物或許是組成

精細胞之細胞質成份，與雄性生殖細胞之分化有關聯性 (Dym and Fawcett, 1971; Li *et al.*, 1997)。所以這些在減數分裂後期才被轉錄出來的基因，大大地提高了某些特定表現在 X-或 Y-染色體基因的產物可以表現於圓形精細胞及細胞質片段的可能性 (Hendriksen *et al.*, 1995)。

## 二、 *Esx1* 基因

過去曾被提及在睪丸生殖細胞發育後期表現且具重要性的基因，包括 *Xist*、*CREMtau*、*p63*、*SREBP2gc* 及 *Extra-embryonic tissue-spermatogenesis-homeobox gene 1 (Esx1)* (Dolci *et al.*, 1994; Poulat *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997; Li and Behringer, 1998; Nakamuta and Kobayashi, 2004; Wang *et al.*, 2004)。不過，對於這些基因的產物是否能專一表現於帶有 X-或 Y-染色體的精子 (X-或 Y-精子)，以及是否能進一步作為辨識不同性別的精子之蛋白質標幟物 (protein marker) 的研究尚付之闕如。為了瞭解這些基因的產物是否能做為 X-精子的標識蛋白質之可能性，本論文首先針對 *Esx1* 基因產物之表現進行一連串研究。*Esx1* 基因 (也被命名為 *Spermatogenesis-paired-liked homeobox gene 1 (Spxl)*)，是以同源箱基因篩選調控小鼠胚胎形成的基因所獲得的基因序列 (Branford *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997)。*Esx1* 基因定位於 X-染色體長臂的遠端區域 (Xq21.33-Xq22)，其 cDNA 序列可以轉譯為包含 315 個胺基酸所組成的蛋白質 (Li *et al.*, 1997)。以原位雜交試驗 (*in situ*

hybridization) 分析及北方點墨分析 (Northern blot analysis) 顯示, *Esx1* 的 RNA 表現主要侷限在胚外組織以及小鼠睪丸之生精作用週期第四至第七階段的精原細胞及精細胞 (Branford *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Li and Behringer, 1998)。

*Esx1* 基因是同源箱基因 (homeobox gene) 家族的成員之一 (Li and Behringer, 1998; Yan *et al.*, 2000; Fohn and Behringer, 2001; Singh *et al.*, 2004)。同源箱基因最初發現於果蠅體內, 轉譯為包含有 60 個胺基酸的同源箱區域 (homeodomain), 主要是與決定身體結構的分子機制有關, 是一種廣泛表現於許多種真核生物的調節性蛋白質, 如: 果蠅、脊椎動物及人等 (McGinnis *et al.*, 1984a; McGinnis *et al.*, 1984b; Scott and Weiner, 1984)。同源箱區域是負責與 DNA 結合的部位, 也是辨認 DNA 序列中特定結合位置所必需的, 在胚胎發育過程中體軸的建立及胎盤發育過程扮演非常重要的角色。過去對於同源箱基因家族的研究, 如 *Hox*, *Paired*, *LIM* 及 *POU* 基因等, 皆顯示在調控胚胎發育過程中具有高度特異性 (Gehring *et al.*, 1990; Gehring *et al.*, 1994)。所以為了研究屬於同源箱基因的 *Esx1* 對於調控胎盤發育及胎盤生長的主要作用, Li and Behringer 於小鼠胚胎幹細胞進行 *Esx1* 基因標的去除突變 (targeted null mutation) 分析, 結果發現具有去除 *Esx1* 基因的純合子 (hemizygote) 的突變會因胎盤發育異常而導致胎 (fetus) 生長不良而

死亡。進一步的分析研究也發現具有去除 *Esx1* 基因的雜合子 (heterozygote) 的  $X^{Esx1}Y$  雄性及  $X^{Esx1}X$  雌性突變的胎會發生生長遲滯現象，造成的原因主要是因為胎盤的迷路層細胞 (labyrinthine layer) 產生過度生長而造成胎盤組織形態受損。不過，Li and Behringer 的試驗研究結果也顯示具有去除 *Esx1* 基因的異質染色體  $X^{Esx1}Y$  的公鼠仍具有生殖後代的能力，因而提出 *Esx1* 基因對於生精作用中精子的形成並非必需的說法 (Li and Behringer, 1998)。另外，Yan 等人曾以 ESX1 抗血清進行免疫組織染色以定位 ESX1 在胎盤組織中的分佈，結果發現 ESX1 的表現位置侷限於胎盤的迷路層區域，此發現顯示 *Esx1* 基因在胎盤中的蛋白質與 RNA 的分佈正好一致 (Yan *et al.*, 2000)。然而，對於 ESX1 在睪丸組織中確實的表現區域，以及 ESX1 在生精作用過程中可能的作用功能及分子機制，到目前為止仍未見相關文獻。

### 三、 X-及 Y-精子之辨識

生精作用過程中因發生兩次減數分裂而產生在其單套 DNA 組成中有基因層次上不同的兩大類精子，即 X-精子和 Y-精子。過去的研究對於辨識 X-精子和 Y-精子的不同，是根據預期 X-精子和 Y-精子的大小不同 (如 Y-精子較小、游動力較快)，以及 X-精子有較高的負電性等現象。然而，對於是否能精確辨識，進而分離 X-精子及 Y-精子的目

標仍需後續研究改進。過去有許多方法被用來分離 X-及 Y-精子，包括以離心技術 (centrifugation)、向上游動技術 (swim-up) 及沉降分離技術 (sedimentation) 等 (Vidal *et al.*, 1993; Risopatron *et al.*, 1996)。可是到目前為止，唯一可信賴的技術是以螢光 DNA 染劑進行流動細胞分離技術 (flow cytometry) 來分離 DNA 含量不同的 X-及 Y-精子 (Johnson *et al.*, 1989; Johnson, 2000)。而螢光原位雜交方式則是常被用來決定不同技術分離效率的方法之一。此方法需要利用 X-或 Y-染色體上基因與螢光 DNA 探針結合與分析之 (Han *et al.*, 1993; Andersen and Byskov, 1997; Johnson and Welch, 1999a; Johnson and Welch, 1999b)。

基於上述對於 X-及 Y-精子在物理化學特性上的不同，過去的生理學家也尋求能發現許多可能的專一表現在某一精子族群的標識蛋白質，希望能藉以辨識不同性別的精子 (Koopman *et al.*, 1990; Han *et al.*, 1993)。目前的策略包括以細胞基因學的方法進行偵測 H-Y 抗原、測量 X-性聯酵素以及偵測位於 Y-染色體的專一 DNA 序列，進一步利用分離技術獲取的 X-或 Y-精子，最後，達到能夠預先選擇所期望性別的目的。遺憾的是，到目前為止這些技術並未能有效運用於辨識與分離不同性別或不同物種的精子 (Grabske *et al.*, 1975; Krco *et al.*, 1976; Vidal *et al.*, 1993; Risopatron *et al.*, 1996; Johnson and Welch, 1999a; Kim *et al.*, 1999)。所以本研究提問 ESX1 蛋白質是否能專一表現於 X-精子，以作

為一辨識小鼠 X-精子的候選標識蛋白質，以及是否能利用抗 ESX1 免疫血清做為一辨識 X-精子的抗體，進行一連串試驗。

## 材料及方法

本研究目的在於分析 ESX1 抗血清是否能辨識 X-精子。以西方點墨法及免疫螢光顯微鏡法探究小鼠睪丸及胎盤中 ESX1 之分佈表現。進一步以免疫螢光顯微鏡法分析不同發育階段的小鼠睪丸組織中 ESX1 之表現位置。本試驗也取四週齡公鼠執行隱睪手術後，分別飼養至六、十二及十八週齡階段，以免疫螢光顯微鏡法分析不同階段的正常小鼠睪丸組織以及隱睪睪丸中 ESX1 之表現位置是否不同，以探究 ESX1 在睪丸中之表現是否具專一性。同時，本試驗嘗試以 SRY 抗血清作為辨識 Y-精子的抗體，以免疫螢光顯微鏡法分析 SRY 在小鼠睪丸中的分佈表現。此外，以附睪尾部取精方式獲得小鼠精子，同時以 ESX1 及 SRY 抗血清進行免疫螢光顯微鏡試驗，分析 ESX1 及 SRY 在小鼠精子中的專一性分佈。為了探究以 ESX1 抗血清辨識 X-及 Y-精子的效率，本試驗分別取一萬隻小鼠精子以及以向上游動方式（swim up technique）預先分離精子的方法所獲得的精子，以 ESX1 抗血清進行分析 X-及 Y-精子的比例。

### 一、 試驗動物（Assay animals）

本論文所使用的 ICR 品系小鼠（購自台大實驗動物中心，台北），以鼠飼料（購自福壽，台灣）及飲水飼養於具定溫（25 °C）控制之動

物飼養房中，維持 12 小時光照。睪丸樣本取自各週齡小鼠，胎盤及卵巢樣本取自八週齡的懷孕母鼠，懷孕第 14 天的組織以進行後續試驗。另外，取十二週齡小鼠的心臟、肺臟、肌肉、腎臟、脾臟及腦等組織作為西方點墨分析的對照組。

## 二、 隱睪手術 (Induction of cryptorchidism)

根據過去文獻所提出對小鼠進行隱睪手術的方法 (Sun *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Danno *et al.*, 2000; Shinohara *et al.*, 2000; Rockett *et al.*, 2001; Senoo *et al.*, 2002; Barqawi *et al.*, 2004)，本研究經中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系林培正博士指導，並部分修正調整如下：取四週大的小鼠，麻醉固定後在腹部切開一小傷口，以鑷子將下腹腔附睪部位拉至腹部，再以針線將附睪組織縫至肌肉層，再進行傷口縫合。手術後的小鼠個別飼養至第六、十二或十八週齡，利用頸椎脫臼法犧牲後，分別取其睪丸以進行後續試驗。

## 三、 分離精細胞及附睪尾取精 (The separation of testicular germ cells and collection of spermatozoa from the cauda epididymis)

本研究依據過去文獻報導以活細胞淘洗式離心分離法 (centrifugal elutriation system) (Grabske *et al.*, 1975; Bellvé *et al.*, 1977; Meistrich *et al.*, 1981; Mays-Hoopers *et al.*, 1995; Odorisio *et al.*, 1996; Marret and

Durand, 2000; Izadyar *et al.*, 2002) 修正調整後，進行分離不同階段的雄性生殖細胞。將睪丸去外膜後，以刀片將生精細管切成小片段，浸泡培養於含每毫升 1 毫克胰酶、每毫升 0.75 毫克膠原蛋白酶、每毫升 1 微克蛋白酶抑制劑，每毫升 5 微克 DNase I 及每毫升 100 IU 的青黴素-鏈黴素的細胞培養液 (Dulbecco's modified Eagle's medium ; DMEM/F12) (Cat.#12400-024, Gibico BRL, Cathersburg, MD, USA)，含有睪丸生殖細胞的培養液於溫度 37°C 的振盪水浴槽中，以 140 rpm 轉速振盪 1 小時後，分別以 80 及 40  $\mu\text{m}$  孔洞大小的篩網過濾後，以針筒將細胞懸浮液注入活細胞淘洗式離心分離系統，依不同流速及轉速將不同大小及質量的睪丸生殖細胞加以分離 (JE-5.0 rotor, Beckman Instruments, Palo Alto, CA)。分離初級精母細胞、次級精母細胞、圓形精細胞以及精原細胞的條件為依序以下列條件分別收集：轉速 750 g 以及每分鐘 60 毫升的流速、轉速 420 g 以及每分鐘 60 毫升的流速、轉速 190 g 以及每分鐘 40 毫升的流速和轉速 50 g 以及每分鐘 40 毫升的流速。收集後的細胞以 1,500 rpm 轉速離心 10 分鐘後分離純化的生殖細胞。收集純化的細胞以顯微鏡檢查後純度為：初級精母細胞約 89%、次級精母細胞約 76%、圓形精細胞約 80% 及精原細胞約為 85%。

依據過去的文獻，精子收集自第八至十二週齡性成熟的雄性小鼠附睪尾端 (Chomczynski, 1992; Munne, 1994; Howes *et al.*, 1997;

Kawarasaki *et al.*, 1998; Welch and Johnson, 1999)。方法如下：將附睪切成小片段後置於 15 毫升離心管中，加入培養精子的細胞培養液（HEPES-buffered conditioned medium）置於 37°C 培養箱中 30 分鐘，使活動力佳的精子能完全自附睪組織片段中游出。收集培養液中或培養液上層的精子，分別以 300 g 轉速離心 10 分鐘後，收集下層沈澱物作為抽取蛋白質之用。另外也取一些所收集的精子加入 PBS 水溶液，重新懸浮精子後滴於載玻片上，風乾後儲存於-20°C 以作為後續免疫螢光染色試驗用。

#### 四、 西方點墨分析法（Western blotting analysis）

ESX1 抗血清是過去本實驗室利用重組 ESX1 蛋白質免疫紐西蘭大白兔所產生者（黃，2001）。抗血清以酵素聯結免疫吸附分析法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA）測得抗體力價（titer）後進行後續試驗。分別取 50 微克的各組織蛋白質，加入樣品緩衝液（包含 1 % 十二烷基硫酸鈉（Sodium dodecylsulfate, SDS）、5 % 硫醇（mercaptoethanol）、20 % 甘油（glycerol）、0.1 % 二氯溴甲烷酚藍（Bromo-phenol-blue, BPB）以及 pH 值 6.85 的 50 mM Tris-HCL）。蛋白質經此變性處理後，以含 12 % 的十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳（Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis,

SDS-PAGE) 分析蛋白質，再轉漬於 PVDF 膜 (Cat.#NEF1002, Perkin Elmer Life Science, Inc., Boston, MA)。加入含 5 % 脫脂奶粉的 PBS-T 緩衝溶液，於室溫下反應 1 小時，使酪蛋白覆蓋住膜上不含蛋白質之部位，再以 PBS-T 清洗後分別加入 ESX1 抗血清 (稀釋比例 1:5000)、山羊抗小鼠 SRY 抗血清 (goat anti-mouse SRY antibody; 稀釋比例 1:5000, SC-8233, Santa Cruz Biotechnology, USA) 或 Actin 單株抗血清 (monoclonal anti-Actin antibody; 稀釋比例 1:5000, A-5316, Sigma, USA)。室溫下反應 1 小時以及以 PBS-T 清洗後，加入接有顯色酶的二級抗體 (horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (稀釋比例 1:5000)、rabbit anti-goat IgG (稀釋比例 1:5000) 或 goat anti-mouse IgG (稀釋比例 1:5000); Zymed Laboratories, Inc)，於室溫下作用 1 小時，再經 PBS-T 緩衝溶液清洗後，加入 ECL 測試試劑 (enhanced chemiluminescence reagent, NEN<sup>TM</sup> Life science, MA) 反應後，在暗房中進行顯影及定影後照相存檔。

##### 五、 免疫螢光顯微鏡分析法 (Immunofluorescent microscopy)

新鮮的各睪丸及胎盤組織分別於室溫下浸泡於含 4 % 多聚甲醛 (paraformaldehyde/PBS) 的固定液 (大約 20 毫升)，1 小時後置換新鮮的固定液於 4°C 冰箱中作用約 16 個小時。固定後，各組織以 PBS 緩

衝溶液置換清洗三次後再換成含 20 % 蔗糖水溶液，置放於 4°C 冰箱中作用至隔夜，再包埋於 Tissue-Tek OCT 冷凍包埋液（Sakura Finetek, Torrance, CA）後，在冷凍切片機（Leica CM1850, Wetzlar, Germany）中進行冷凍切片為 10  $\mu$ m 厚度。各組織切片及風乾於載玻片的精子分別以 4 % 副甲醛固定液，在室溫下固定 30 分鐘後以 PBS 水溶液清洗，再浸泡於含 5 % 脫脂奶粉室溫下 30 分鐘，以 PBS 緩衝液清洗後加入初級抗體 ESX1 抗血清（稀釋 1:100）或抗 SRY 抗血清（稀釋 1:100）於 4°C 冰箱中反應隔夜。第二天以 PBS-T 緩衝液清洗組織切片後加入次級抗體（Fluorescein-conjugated goat anti-rabbit or Texas red- conjugated rabbit anti-goat IgG）（稀釋 1:200）室溫下反應 1 小時，以 PBS-T 清洗後，以 propidium iodine（PI）（稀釋 1:500）染核後於 LSM510 共軛焦距掃描式顯微鏡下鏡檢（Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）。

#### 六、 統計分析 (Statistical analysis)

統計結果呈現是以平均值 $\pm$ 標準機差（S.E.M.）表示。統計比較結果依據 Student's *t*-test 分析變異度。\*， $p < 0.05$  及\*\*， $p < 0.01$  視為顯著差異。

## 結果

### 一、 ESX1 在小鼠胎盤及睪丸組織的空間表現 (Spatial expression of ESX1 in mouse placenta and testis)

本試驗首先以 ELISA 分析方法確定抗小鼠 ESX1 抗血清的專一性，結果顯示由免疫方法產生的抗小鼠 ESX1 抗血清能與重組 ESX1 進行專一性反應。因此，進一步以此抗血清進行西方點墨分析，結果發現分析的分子量大小與預估的 ESX1 分子量大小一致 (41-kDa)。西方點墨分析結果指出 ESX1 表現量只在胎盤及睪丸中較高，卵巢組織中則未見 ESX1 表現 (圖一 A)。另外十二週齡公鼠的心臟、肺臟、肌肉、腎臟、脾臟及腦等組織亦沒有 ESX1 表現 (資料未顯示)。在先前的預備試驗中，也以 ESX1 抗血清與重組 ESX1 混合之後再進行免疫螢光染色分析，結果發現沒有任何染色的訊號，也證明本實驗室所產生的 ESX1 抗血清具有專一性。本研究進一步以此抗血清進行免疫螢光染色分析 ESX1 在懷孕 14 天的小鼠胎盤之分佈區域，結果亦顯示 ESX1 訊號確實分佈在胎盤組織中的迷路層細胞區域 (圖一 C)。

因此，本研究以 ESX1 抗血清進行西方點墨分析及免疫螢光染色分析試驗，以決定 ESX1 在睪丸生殖細胞的主要分佈區域。如圖一 B 所示，西方點墨分析結果說明 ESX1 主要表現位置與圓形精細胞族群以及精細胞分佈區域一致。然而，少部分的次級精母細胞也有 ESX1 的

表現，這些表現較弱的訊號可能是因為分離細胞時次級精母細胞與圓形精細胞出現污染，分離不完全所造成的。此外，以免疫螢光顯微鏡觀察 ESX1 在睪丸切片中的分佈位置後，更進一步證實 ESX1 主要表現於精細胞分佈的位置（圖一 D）。圖一 E 顯示以三度空間觀察共軛焦距顯微鏡之雷射掃描的圖片之 Z-軸切片所組成的影像，顯示 ESX1 分佈區域接近於生精細管的管腔部位。

## 二、 ESX1 在睪丸發育過程中的特定階段性表現區域 (Stage-specific locations of ESX1 during testicular development)

以 PI 進行不同週齡睪丸切片組織細胞核染色，由圖二可以看出濃縮的圓形精細胞首先出現在出生後第三週的生精細管中。以 ESX1 抗血清探究不同發育階段的睪丸組織切片中 ESX1 的表現，發現在第一及二週齡的小鼠睪丸切片中不見 ESX1 的表現（圖二 A、B），而在三週齡睪丸切片中的圓形精細胞首度表現（圖二 C）。在六、十二及十八週齡的睪丸切片中，接近生精細管管腔的精細胞族群位置也有明顯的 ESX1 表現（圖二 D 至 F）。對照生精作用過程精子的發育階段可知 ESX1 在生精細管中的表現主要分佈位置是在睪丸組織的第四至第七發育階段中。

隱睪手術是一廣被用以探討睪丸組織受熱緊迫的研究模式，手術的作用是破壞減數分裂後期精細胞的生成。所以本論文藉此模式探討

ESX1 在精細胞被破壞的睪丸組織中分佈位置是否受到改變。以 PI 進行核染色分析結果發現隱睪睪丸組織切片中減數分裂後期的生殖細胞數目明顯下降 (圖三 A 及 D)。以 ESX1 抗血清在生精細管切片進行免疫螢光染色, 結果顯示相較於對照組睪丸切片中在圓形精細胞及精子分佈位置之 ESX1 表現, 隱睪睪丸 ESX1 的表現量明顯下降 (圖三 B 及 E)。

### 三、 SRY 在睪丸中的專一性分佈位置 (Specific localizations of SRY in testis)

為了選擇一定位於 Y-染色體的基因產物作為本研究的對照組, 經過基因庫搜尋及文獻參考後, 嘗試選擇 Y-染色體上之性別決定區域 *Sex-determining region on Y chromosome* (*Sry* 基因) 的抗血清進行免疫染色分析。*Sry* 基因包括一 high mobility group (HMG) 同源箱的 DNA 結合區域, 是一在性別決定機制中的轉錄調節因子 (Capel *et al.*, 1993; Rossi *et al.*, 1993; Hacker *et al.*, 1995; Poulat *et al.*, 1995)。以 SRY 抗血清對八週齡小鼠睪丸組織進行免疫螢光顯微鏡觀察 SRY 的表現, 顯示 SRY 專一表現於睪丸中的精細胞 (如箭頭所示) 及賽透利細胞中 (如箭頭尖端所示) (圖四)。

### 四、 ESX1 及 SRY 在小鼠精子之不同分佈表現 (Differential

## localizations of ESX1 and SRY in mouse sperm populations)

為了進一步探討 ESX1 及 SRY 是否表現在不同族群的小鼠精子細胞核中，同時利用 ESX1 及 SRY 抗血清執行免疫螢光顯微鏡法分析試驗。結果顯示一半的小鼠精子細胞核能被 ESX1 抗血清所偵測(圖五 A 中藍色螢光所示)，而另一半的精子能被 SRY 抗血清所染色(圖六 B 中綠色螢光所示)。在圖五 C 中，所有的精子以 PI 進行核染色以作為對照(如紅色螢光所示)，以共軛焦距顯微鏡影像分析軟體將圖 A、B 及 C 的影像重疊後，顯示 ESX1 及 SRY 分別分佈表現在兩個不同的精子族群中(圖五 D)。

## 五、 利用 ESX1 及 SRY 抗血清辨識以向上游動技術所分離之 X-及 Y-精子 (Use of both ESX1 and SRY antisera to recognize the X- and Y- sperm separated by the swim-up technique)

以 ESX1 及 SRY 抗血清進行免疫螢光顯微鏡法分析小鼠精子，結果顯示此兩種抗體能分別辨識不同性別的精子。為了進一步探究利用此兩種抗體辨識預先選擇的精子性別技術或方法的效率，針對分析利用向上游動(swim up)預先分離精子的技術(Andersen and Byskov, 1997; Seidel and Johnson, 1999)，收集的精子作後續分析。統計結果發現以免疫螢光顯微鏡法分析大約一萬隻的小鼠精子，初步結果顯示在每次的收集檢測精子樣本中，大約有超過 95 % 以上的受檢測精子有正向

(positive) 的訊號。統計結果顯示在正常小鼠精子中，X-精子與 Y-精子的性別比例約為 49.9 比 50.1。而以向上游動技術分離精子後，發現 X-精子與 Y-精子的比例是 46.7 比 53.3 (如表一)。分析結果顯示以向上游動分離精子性別的方式，並沒有顯著增加取得 Y-精子的比例。

## 討論

利用預先篩選的精子產生所期望性別的子代，長久以來一直是研究人員努力追尋的目標。精子分離對畜產業者尤其具有極高的應用價值，例如能提高生產效益和增加經濟效益，並且對於畜群飼養管理更為簡易。舉例而言，對酪農來說，雌性之乳牛或乳羊才有泌乳能力，有較高的經濟價值。另外，台灣養鹿戶則因為看上了具藥用價值的鹿茸，而偏愛飼養雄鹿。在醫學上精子分離對於避免人類致命的性聯遺傳疾病悲劇的產生也是有貢獻的。如血友病是一種性聯遺傳疾病，發病者多為男性，因為此基因帶原的女性在生育時可以藉性別預選選擇生下女兒，避免生下有病的兒子；其它如 X-染色體脊髓病性肌肉萎縮症（X-linked Duchenne's muscular dystrophy）、X-性聯遺傳精神障礙症（X-linked mental retardation）等也是如此。除此之外，在受精前基於預先喜好的性別預先選擇精子性別，曾被提出能保存瀕臨絕種的物種。例如能透過精子分離技術製造大量的雌性動物以利繁殖下一代而避免瀕臨絕種的野生動物絕跡於世上（Jafar and Flint, 1996; Reubinoff and Schenker, 1996; Howes *et al.*, 1997; Hendriksen, 1999; Seidel and Johnson, 1999）。

根據過去的研究顯示，現今預先選擇性別的方法主要著重於：調控交配（intercourse）、排卵（ovulation）及授精（insemination）的時間

不同等。體外分離精子以增加精液中 X-精子或 Y-精子含量以及在胚移植前之性別鑑定 (embryo sexing) (Reubinoff and Schenker, 1996)，可達到預先選擇所期望性別之目的。過去對於預先選擇精子性別的技術開發，主要依據是憑藉精子的物理及化學性的不同特徵。過去以免疫分析方法作為應用基礎的技術，包括利用單株抗 H-Y 抗體以辨識 X-與 Y-精子 (Epstein *et al.*, 1980; Ali *et al.*, 1990; Han *et al.*, 1993; Andersen and Byskov, 1997; Howes *et al.*, 1997; Gardon *et al.*, 2004)。此專一於雄性的 H-Y 抗原只有表現在雄性細胞，研究人員利用包括雙向的 SDS-PAGE 分析法的分離技術獲得此 H-Y 抗原 (Blecher *et al.*, 1999)。在 1990 年，Ali 等人利用單株抗 H-Y 抗體以辨識 Y-及 X-精子的不同，其結果顯示此辨識 H-Y 抗原的抗體能與大約一半的精子結合 (Ali *et al.*, 1990)。然而，與此單株抗 H-Y 抗體結合處理過的精子並不能有效改變子代的性別。相似的情況下，本論文第一部份主要的研究目的是試圖證實一個具專一表現於 X-精子的候選蛋白質標幟物，ESX1，其表現主要在生精作用過程中的減數分裂後期之精細胞 (圖二及三) 以及專一表現在 X-精子 (圖五)。本論文首度提出一個真正專一表現在 X-精子的蛋白質標幟物，並以本實驗室所產生的 ESX1 抗體有效地分辨出 X-精子。

過去的文獻指出大多數位於性染色體上的基因在生精作用的減數

分裂後期並不能被成功轉譯為蛋白質 (Salas-Cortes *et al.*, 1999; Shinohara *et al.*, 2000)。然而，也有不同研究指出性染色體上的基因能表現在減數分裂後期的生殖細胞，特別是在精細胞，此類基因在生精作用中甚或是在 X-及 Y-精子分化過程中扮演某種重要角色 (Koopman *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1992; Odorisio *et al.*, 1996; Modi *et al.*, 2005)。過去的研究常以隱睪手術的睪丸組織切片探究基因在生精作用後期的表現與受熱緊迫的關聯性，如 *K48R* 及 *p59<sup>scr</sup>* 等基因的研究。隱睪睪丸組織中生殖細胞的細胞凋亡率會增加，而且成熟的生殖細胞數會下降 (Shinohara *et al.*, 2000; Senoo *et al.*, 2002; Sassone-Corsi, 2002; Rasoulpour *et al.*, 2003; Barqawi *et al.*, 2004)。本論文也以此睪丸損傷系統作為研究 ESX1 分佈的主要模式。過去對於 *Esx1* 基因的探討多著重在雌性胎盤組織 (Li *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2000)，然而於雄性生殖細胞內的探討也只有針對 RNA 表現進行討論 (Branford *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997)，所以為了探究 ESX1 蛋白質在不同發育階段的雄性生殖細胞中的分佈，以活細胞淘洗式離心分離技術在活體外將睪丸組織中不同的生殖細胞依大小及重量比例不同分開後 (May-Hoopers *et al.*, 1995)，進一步以抗 ESX1 抗體進行免疫組織分析，以證實 ESX1 在睪丸生殖細胞發育過程中的特定表現。以西方點墨分析及免疫螢光分析法探討 ESX1 在正常睪丸及隱睪睪丸組織中生殖細胞之分佈表現後，

本研究證實 ESX1 首度出現於三週齡睪丸的精細胞中，此點與 Branford 等人以 *in situ* 技術探討 RNA 表現及 Li 等人以北方點墨分析法所提出的 *Esx1* 基因之 RNA 的分佈階段是一致的 (Branford *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997)。然而，本研究顯示 ESX1 並沒有表現於精原細胞及精母細胞中 (圖二)，這個結果與 Branford 等人及 Li 等人兩篇論文所提出的結果顯示 *Esx1* RNA 大量表現在精原細胞/精母細胞前期中有所不同，這個不一致的結果可能與轉錄後 (post-transcriptional) 調控有關。本研究結果發現 ESX1 只存在於一半的精子族群，與 *Esx1* RNA 同時表現於帶有 X-及 Y-染色體的精原細胞之結果不同 (圖五)。

本論文其它重要的發現是提出 SRY 表現在小鼠睪丸組織中的結果 (圖四)，先前的報導指出 *Sry* 轉錄子會大量表現於減數分裂及減數分裂後期的睪丸生殖細胞分佈位置，然而因為形成圓形結構而造成轉譯不活化作用 (Poulat *et al.*, 1995)。不過其他的研究團隊也指出 SRY 會表現在胎兒及成人的睪丸組織的細胞核，包括生殖細胞 (Rossi *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1994; Salas-Cortes *et al.*, 1999; Salas-Cortes *et al.*, 2001)。另外 Modi 等人也指出 *Sry* 除了於對早期的胚發育機制具有重要功能外，*Sry* 轉錄子表現在 50 % 的精子中段部位，顯示 *Sry* 基因對於雄性生殖發育作用及精子生成亦有一定的重要性 (Modi *et al.*, 2005)。這個研究發現有助於支持本論文所提出的 SRY 表現在一半的精子中，

以及能以 SRY 抗血清作為辨識 Y-精子的可能性。本研究以 ESX1 抗血清進行免疫染色分析，提供了另一個新的技術以分辨 X-精子。但是 ESX1 位於精子的細胞核而非細胞膜上，想用來做為分離精子的抗體仍有困難需克服。

## 參考文獻

黃信忠。2001。Esx1 蛋白質在小屬雄性生殖細胞內的表現。私立東海

大學畜產系研究所碩士論文。

- Ali, J. I., Eldridge, F. E., Koo, G. C., and Schambacher, B. D. (1990). Enrichment of bovine X-and Y-chromosome-bearing sperm with monoclonal H-Y antibody-fluorescence-activated cell sorter. *Arch. Androl.* 24, 235-245.
- Andersen, C.Y., and Byskov, A. G. (1997). Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combined density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 76, 131-134.
- Barqawi, A., Trummer, H., and Meacham, R. (2004). Effect of prolonged cryptorchidism on germ cell apoptosis and testicular sperm count. *Asian J. Androl.* 6, 47-51.
- Bellvé, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M., and Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol.* 74, 68-85.
- Blecher, S. R., Howie, R., Li, S., Detmar, J., and Blahut, L. M. (1999). A new approach to immunological sexing of sperm. *Theriogenology* 52, 1309-1321.
- Branford, W. W., Zhao, G. Q., Valerius, M. T., Weinstein, M., Birkenmeier, E. H., Rowe, L. B., and Potter, S. S. (1997). *Spx1*, a novel X-linked homeobox gene expressed during spermatogenesis. *Mech. Dev.* 65, 87-98.
- Capel, B., Swain, A., Nicolis, S., Hacker, A., Walter, M., Koopman, P., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1993). Circular transcripts of the testis-determining gene *Sry* in adult mouse testis. *Cell* 73, 1019-1030.

- Chomczynski, P. (1992). One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 201, 134-139.
- Cohen, D. R., Sinclair, A. H., and McGovern, J. D. (1994). SRY protein enhances transcription of Fos-related antigen 1 promoter constructs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4372-4376.
- Danno, S., Itoh, K., Matsuda, T., and Fujita, J. (2000). Decreased expression of mouse Rbm3, a cold-shock protein, in Sertoli cells of cryptorchid testis. *Am. J. Pathol.* 156, 1685-1692.
- Dolci, S., Geremia, R., Albanesi, C., and Rossi, P. (1994). Expression of the Xist gene in urogenital ridges of midgestation male embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205, 334-340.
- Dym, M. (1997). The male reproduction system. In 'Histology'. 4th edn. (Eds L. Weiss and R. O. Greep.) pp. 979-1038. (McGraw Hill: New York, USA.)
- Dym, M., and Fawcett, D. W. (1971). Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biol. Reprod.* 4, 195-215.
- Eddy, E. M. (2002). Male germ cell gene expression. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 103-128.
- Epstein, C. J., Smith, S., and Travis, B. (1980). Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigens* 15, 63-67.
- Fohn, L. E., and Behringer, R. R. (2001). ESX1L, a novel X chromosome-linked human homeobox gene expressed in the placenta and testis. *Genomics* 74, 105-108.
- Gardon, J. C., Aguera, S., and Castejon, F. (2004). Sexing in vitro produced bovine embryos, at different stages of development, using rat H-Y antiserum. *Theriogenology* 62, 35-43.
- Gehring, W. J., Affolter, M., and Bürglin. (1994). Homeodomain proteins.

*Annu. Rev. Biochem.* 63, 487-526.

Gehring, W. J., Müller, M., Affolter, A., Percival, S. A., Billeter, M., Qian, Y. Q., Otting, G., and Wüthrich, K. (1990). The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends. Genet.* 6, 323-329.

Grabske, R. J., Lake, S., Gledhill, B. L., and Meistrich, M. L. (1975). Centrifugal elutriation: separation of spermatogenic cells on the basis of the sedimentation velocity. *J. Cell. Physiol.* 86, 177-189.

Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121, 1603-1614.

Han, T. L., Ford, J. H., Webb, G. C., Flaherty, S. P., Correll, A., and Matthews, C. D. (1993). Simultaneous detection of X-and Y-bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 308-313.

Hendriksen, P. J. (1999). Do X and Y sperm differ in proteins? *Theriogenology* 52, 1295–1307.

Hendriksen, P. J., Hoogerbrugge, J. W., Themmen, A. P., Koken, M. H., Hoeijmakers, J. H., Oostra, B. A., van der Lende, T., and Grootegoed, J.A. (1995). Postmeiotic transcription of X and Y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 170, 730-733.

Howes, E. A., Miller, N. G., Dolby, C., Hutchings, A., Butcher, G. W., and Jones, R. (1997). A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting. *J. Reprod. Fertil.* 110, 195-204.

Izadyar, F., Spierenberg, G. T., Greemers, L. B., den Quden, K., and de Rooij, D. G. (2002). Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 124, 85-94.

- Jafar, S. I., and Flint, A. P. F. (1996). Sex selection in mammals. *Theriogenology* 46, 191-200.
- Johnson, L. A. (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 93-107.
- Johnson, L. A., and Welch, G. R. (1999a). The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *J. Anim. Sci.* 77(Suppl. 2), 213-220.
- Johnson, L. A., and Welch, G. R. (1999b). Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52, 1323-1341.
- Johnson, L. A., Flook, J. P., and Hawk, H. W. (1989). Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.* 41, 199-203.
- Kawarasaki, T., Welch, G. R., Long, C. R., Yoshida, M., and Johnson, L. A. (1998). Verification of flow cytometrically-sorted X-and Y-bearing porcine spermatozoa and reanalysis of spermatozoa for DNA content using the fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques. *Theriogenology* 50, 625-635.
- Kim, N. H., Jun, S. H., Do, J. T., Uhm, S. J., Lee, H. T., and Chung, K. S. (1999). Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse, or human spermatozoon into porcine oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 84-91.
- Koopman, P., Munterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348, 450-452.
- Krco, C. J., and Goldberg, E. H. (1976). H-Y (male) antigen: detection on eight-cell mouse embryos. *Science* 193, 1134-1135.
- Li, Y., and Behringer, R. R. (1998). *Esx1* is an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nat. Genet.* 20,

309-311.

- Li, Y., Lemaire, P., and Behringer, R. R. (1997). Esx1, a novel X chromosome-linked homeobox gene expressed in mouse extraembryonic tissues and male germ cells. *Dev. Biol.* 188, 85-95.
- Marret, C., and Durand, P. (2000). Culture of porcine spermatogonia: effects of purification of the germ cells, extracellular matrix and fetal calf serum on their survival and multiplication. *Reprod. Nutr. Dev.* 40, 305-319.
- Mays-Hoopers, L. L., Bolen, J., Riggs, A. D., and Singer-Sam, J. (1995). Preparation of spermatogonia, spermatocytes, and round spermatids for analysis of gene expression using fluorescence-activated cell sorting. *Biol. Reprod.* 53, 1003-1011.
- McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A., and Gehring, W. J. (1984a). A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature* 308, 428-433.
- McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A., Gehring, W., J. (1984b). A homologous protein coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-408.
- Meistrich, M. L., Longtin, J., Brock, W. A., Grimes, S. R., and Jr, Mace, M. L. (1981). Purification of rat spermatogenic cells and preliminary biochemical analysis of these cells. *Biol. Reprod.* 25, 1065-1077.
- Modi, D., Shah, C., Sachdeva, G., Gadkar, S., Bhartiya, D., and Puri, C. (2005). Ontogeny and cellular localization of SRY transcripts in the human testes and its detection in spermatozoa. *Reproduction* 130, 603-613.
- Monesi, V. (1965). Differential rate of ribonucleic acid synthesis in the autosomes and sex chromosomes during male meiosis in the mouse. *Chromosoma* 17, 11-21.

- Munne, S. (1994). Flow cytometry separation of X and Y spermatozoa could be detrimental for human embryos. *Hum. Reprod.* 9, 758.
- Nakamuta, N., and Kobayashi, S. (2004). Developmental expression of p63 in the mouse testis. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 681-687.
- Odorisio, T., Mahadevaiah, S. K., McCarrey, J. R., and Burgoyne, P. S. (1996). Transcriptional analysis of the candidate spermatogenesis gene *Ube1y* and of the closely related *Ube1X* shows that they are coexpressed in spermatogonia and spermatids but are repressed in pachytene spermatocytes. *Dev. Biol.* 180, 336-343.
- Peterson, R. L., Jacobs, D. F., and Awgulewitsch, A. (1992). Hox-3.6: isolation and characterization of a new murine homeobox gene located in the 5' region of the Hox-3 cluster. *Mech. Dev.* 37, 151-166.
- Poulat, F., Girard, F., Chevron, M. P., Goze, C., Calas, X., Lamb, N., and Berta, P. (1995). Nuclear localization of the testis determining gene products SRY. *J. Cell Biol.* 128, 737-748.
- Rasoulpour, R. J., Schoenfeld, H. A., Gray, D. A., and Boekelheide, K. (2003). Expression of a K48R mutant ubiquitin protects mouse testis from cryptorchid injury and aging. *Am. J. Pathol.* 163, 2595-2603.
- Reubinoff, B. E., and Schenker, J. G. (1996). New advances in sex preselection. *Fertil. Steril.* 66, 343-350.
- Risopatron, J., Sanchez, R., Sepulveda, N., Pena, P., Villagran, E., and Miska, W. (1996). Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology* 46, 65-73.
- Rockett, J. C., Mapp, F. L., Garges, J. B., Luft, J. C., Mori, C., and Dix, D. J. (2001). Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol. Reprod.* 65, 229-239.
- Rossi, P., Dolci, S., Albanesi, C., Grimaldi, P., and Geremia, R. (1993). Direct evidence that the mouse sex-determining gene *Sry* is expressed

in the somatic cells of male fetal gonads in the germ cell line in the adult testis. *Mol. Reprod. Dev.* 34, 369-373.

Russel, L. D., Ettlín, R. A., Sinha Hikim, A. P., and Clegg, E. D. (1990). Mammalian spermatogenesis. In 'Histological and Histopathological Evaluation of the Testis'. (Eds L. D. Russel, R. A. Ettlín, A. P. Sinha Hikim and E. D. Clegg.) pp. 1-40. (Cache River Press: Clearwater, FL, USA.)

Sachs, L. (1954). Sex-linkage and the sex chromosomes in man. *Ann. Eugen.* 18, 255-261.

Salas-Cortes, L., Jaubert, F., Baraux, S., Nessmann, C., Bono, M. R., Fellous, M., McElreavey, K., and Roseblatt, M. (1999). The human SRY protein is present in fetal and adult sertoli cells and germ cells. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 135-140.

Salas-Cortes, L., Jaubert, F., Bono, M. R., Fellous, M., and Roseblatt, M. (2001). Expression of the human SRY protein during development in normal male gonadal and sex-reversed tissues. *J. Exp. Zool.* 290, 607-615.

Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176-2178.

Scott, M. P., and Weiner, A. J. (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the Antennapedia, Ultrabithorax, and fushi tarazu loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81, 4115-4119.

Seidel, G. E., Jr, and Johnson, L. A. (1999). Sexing mammalian sperm: overview. *Theriogenology* 52, 1267-1272.

Senoo, M., Hoshino, S., Mochida, N., Matsumura, Y., and Habu, S. (2002). Identification of a novel protein p59scr, which is expressed at specific stages of mouse spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 992-998.

- Shinohara, T., Avarbock, M. R., and Brinster, B. L. (2000). Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models. *Dev. Biol.* 220, 401-411.
- Singh, U., Fohn, L. E., Wakayama, T., Ohgane, J., Steinhoff, C., Lipkowitz, B., Schulz, R., Orth, A., Ropers, H.H., Behringer, R.R., Tanaka, S., Shiota, K., Yanagimachi, R., Nuber, U.A., and Fundele, R. (2004). Different molecular mechanisms underlie placental overgrowth phenotypes caused by interspecies hybridization, cloning, and *Esx1* mutation. *Dev. Dyn.* 230, 149-164.
- Solari, A. J. (1974). The behavior of the XY pair in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 38, 273-317.
- Sun, J. G., Jurisicova, A., and Casper, R. F. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.* 56, 602-607.
- Vidal, F., Moragas, M., Catala, V., Torello, M. J., Sanatlo, J., Calderon, G., Gimenez, C., Barri, P. N., Egozcue, J., and Veiga, A. (1993). Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum. Reprod.* 8, 1740-1743.
- Wang, H., San Agustin, J. J., Witman, G. B., and Kilpatrick, D. L. (2004). Novel role for a sterol response element binding protein in directing spermatogenic cell-specific gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10 681-10 688.
- Welch, G. R., and Johnson, L. A. (1999). Sex preselection: laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X-and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. *Theriogenology* 52, 1343-1352.
- Yan, Y. T., Stein, S. M., Ding, J., Shen, M. M., and Abate-Shen, C. (2000). A novel PF/PN motif inhibits nuclear localization and DNA binding activity of the *ESX1* homeoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 20, 661-671.

## Part II. 熱緊迫誘導不同表現型的 *Esx1* 轉錄子在睪丸及胎盤中的轉換

### 表現以及 *Esx1* 基因啟動子在雄性生殖細胞中之區域分析

#### 中文摘要

*Esx1* 是一性聯染色體的同源箱基因，已知其 mRNA 高度表現於成鼠睪丸 (a-型 *Esx1*) 以及胎盤中 (b-型 *Esx1*)。根據過去文獻以及基因庫序列所分析的結果顯示還有另一個新的 mRNA 表現型存在 (在此命名為 x-型 *Esx1*)，但是過去對於此新的表現型在睪丸中的表現型態及重要性，並沒有任何相關研究被發表。本研究利用兩個能誘導產生熱緊迫的動物模式系統：分別是執行隱睪手術以及將小鼠暴露在高溫環境下，以探究不同型式的 *Esx1* mRNA 之專一性表現。以異構型特殊性 RT-PCR 分析結果發現此新的 *Esx1* 轉錄子表現在隱睪睪丸中，並且顯示會受到熱緊迫誘導而高度表現。此 x-型 *Esx1* 在隱睪睪丸中會取代 a-型轉錄子的表現，以維持 *Esx1* mRNA 及 ESX1 蛋白質的穩定表現量。然而在受到嚴重熱緊迫下，x-型 *Esx1* 表現量有延遲表現的情形。當小鼠在 37°C 熱緊迫處理時間延長，*Esx1* 在睪丸中的表現量伴隨著減數分裂後期生殖細胞的受損而下降。另外，探究懷孕母鼠在受到熱緊迫傷害下，*Esx1* 基因在胎盤中的轉錄表現，發現當懷孕母鼠受到 37°C 處理一小時後，胎盤中的主要表現型 b-型會轉變為 a-型 *Esx1* 轉錄子。組織學研究也發現受到熱緊迫傷害的胎盤組織損傷主要發生在迷路層細胞

區域，然而免疫螢光分析結果顯示 ESX1 的表現訊號並沒有因此造成表現量下降。這些結果指出在睪丸及胎盤中，不同 *Esx1* 轉錄子的轉換表現，部分發生原因可能是由於不同啟動子的轉換使用。為了探討此論點的可能性，整個 *Esx1* 基因之 5'-端的序列被選殖出，以探討在不同階段的睪丸生殖細胞中 *Esx1* 啟動子是否有不同的調節區域。短暫轉染分析結果顯示 *Esx1* 啟動子可能有二個主要的近端作用調節區域存在：一是從核酸序列-965 至-438 之間的 DNA 區域以及另一介於核酸序列+25 至+227 之間的近端作用區域。前者能充份調控報導基因在圓形精細胞和初級精母細胞的表現；後者則能於精原細胞啟動報導基因的表現。這些試驗結果將幫助我們了解 *Esx1* 基因啟動子區域在睪丸中可能的作用與功能。

## 英文摘要

*Esx1*, an X-linked homeobox gene, is highly expressed in adult testis (as a-form *Esx1*) and in placenta (as b-form *Esx1*). Surveys of literatures and GenBank sequences identified the other novel isoform (herein referred to as x-form *Esx1*), which has not been histologically defined. In the present study, two heat-induced stress models, experimentally induced cryptorchidism and heat incubation, were carried out to examine the isoform-specific expression of *Esx1* mRNA. The novel *Esx1* isoform was revealed without precedent in cryptorchid testes and showed highly stress-inducible. Isoform-specific RT-PCR results revealed that x-form *Esx1* replaces the a-form transcript, and maintains comparatively stable transcriptional expressions of *Esx1* RNA and ESX1 protein in cryptorchid testes. However, under severe heat challenge, expression of the x-form transcript was delayed. Reduced expression of *Esx1* in testes of mice under prolonged incubation at 37°C coincided with deteriorating cellular damage in postmeiotic germ cells. In addition, the effects of thermal insult on the transcriptional regulation of the *Esx1* gene in the placenta were studied in pregnant mice. The results demonstrated that exposure of pregnant mice to 37 °C for one hour caused the constitutive b-form in placenta to switch to the a-form transcript. Histological examination of heated placenta revealed that damage had occurred in labyrinthine layer; however, immunofluorescent analysis showed that ESX1 signals were not reduced. The results of isoform switching suggest that the existences of different *Esx1* transcripts might be partially due to the usage of alternative promoters in testis and in placenta. To investigate this proposition, the

entire 5'-flanking sequences of *Esx1* gene were used to study the distinct promoter regions that would regulate the *Esx1* expression in testicular germ cells. Transient transfection assays revealed that there were two putatively distinct promoter regions: a distal promoter region between nt -965 and -438 and a proximal promoter region between nt +54 and +227, which were sufficient to retain the promoter activities in round spermatids and primary spermatocytes, and in spermatogonia, respectively. These results will help us to understand the possible promoter regions essential for *Esx1* alternative gene expression in testes.

## 前言

### 一、 熱緊迫對生精作用的影響

生精作用是一發生在睪丸內生殖細胞進行分裂與分化的複雜過程，涉及化學性、物理性及基因性的交互作用（Dix and Hong, 1998; Aguilar-Mahecha *et al.*, 2001; Eddy, 2002）。在生精作用的過程中，精子之成熟過程發生於睪丸的生精細管中，共分成三個主要階段：進行有絲分裂以擴增產生精原細胞、行減數分裂以產生初級及次級精母細胞以及圓形精細胞轉型為精子的過程（見附圖一）。研究顯示整個精子生成的過程非常容易受到熱緊迫的傷害，如隱睪作用以及受到蒸汽浴或熱水浴等作用下睪丸生殖細胞容易受到熱損害作用（Danno *et al.*, 2000; Rockett *et al.*, 2001）。因此，在過去的文獻中為了研究熱緊迫對生殖細胞發育機制所造成的效應，在雄性動物方面大多是將小鼠浸泡於高溫水浴或是直接將睪丸取下暴露於單一的熱緊迫處理（如高溫水浴法），或是以體外試驗操作執行隱睪手術誘導生殖細胞受到破壞（Rasoulpour *et al.*, 2003; Hirai *et al.*, 2004）。研究也指出雄性的睪丸組織在受到熱緊迫傷害下，特定階段的生殖細胞，尤其是初級精母細胞階段前期的生殖細胞會產生細胞凋亡的現象（Rockett *et al.*, 2001; Senoo *et al.*, 2002）。引起細胞凋亡的機制包括降低生殖細胞合成 DNA、RNA 及蛋白質的能力，以及經由降低賽透利細胞和萊迪吉細胞合成蛋白質的功

能所引發的間接作用的機制 (Mieusset and Bujan, 1995; Ohta *et al.*, 2003; Rasoulpour *et al.*, 2003)。然而到目前為止，對於受到熱緊迫傷害後導致生殖細胞死亡，以及受到熱傷害後生殖細胞內產生分子標地物 (molecular targets) 之分子機制及交互作用仍然不清楚 (Nakai *et al.*, 2000)。

環境溫度升高所引發的緊迫會影響動物行為、免疫及神經系統的協調，並可能影響雄性生精作用過程中基因的表現 (Dobson *et al.*, 2001)。過去文獻中曾提到有許多基因的表現會因受到環境緊迫而被誘導表現，例如 *PPI*、*BRE*、*eIF4* 以及 *HIF-1a* 等基因。這些基因的表現可能與調控細胞處於緊迫下以維持正常功能有密切關係 (Dobson and Smith, 2000; Miao *et al.*, 2001; Rockett *et al.*, 2001; Depping *et al.*, 2004; Ptushkina *et al.*, 2004; Tomascik-Cheeseman *et al.*, 2004)。在本論文的第一部份研究結果指出 *ESX1* 在隱睪睪丸中表現量下降，顯示 *Esx1* 基因的表現會受到熱傷害所影響。為了進一步探究 *Esx1* 基因表現在小鼠受到環境熱緊迫下在睪丸中可能的表現調控分子機制，本論文後半部分別建立兩種不同的熱緊迫處理模式，以期能對 *Esx1* 基因的轉錄調控表現有進一步瞭解。另外，過去的研究對 *Esx1* 基因的表現及功能分析多著重於對胎盤發育的重要性，而當懷孕母鼠受到熱緊迫時胎盤中的基因表現也可能受到影響。所以本研究也希望能比較 *Esx1* 基因的轉錄子

在熱緊迫處理後的小鼠睪丸及胎盤中是否有不同的轉錄表現，以及其調控轉錄表現的機制是否利用不同啟動子以產生不同表現形式的 mRNAs。

## 二、 *Esx1* 基因之文獻探討及基因序列分析

*Esx1* 基因首先在 1997 年 Branford 所發表的文獻中被提出其 RNA 主要表現在生精作用第四至第七階段的精原細胞及圓形精細胞中，可能在調控生精作用中扮演某種重要的角色（命名為 *Spx1* 基因，基因庫序列號碼為 AF085715）（Branford *et al.*, 1997）。同年，Li 等人以 8.5 天的小鼠胎 cDNA 基因庫中進行選殖與胎發育有關的同源箱基因時，也獲得 *Esx1* 基因（基因庫序列號碼 AF004211）（Li *et al.*, 1997），研究指出 *Esx1* 基因除了在小鼠睪丸減數分裂後的生殖細胞中有表現外，也保守表現於其它多種脊椎動物中：包括兩棲類動物、鳥類及哺乳動物等。但是與 Branford 等人於 1997 年所發表的研究結果不同的是，Li 等人更提出 *Esx1* 基因的 RNA 主要分佈於胚外組織中，包括羊膜外胚層以及胎盤迷路層細胞中。為了瞭解 Branford 及 Li 等人所發表的 *Esx1* 基因序列是否一致，經由 NCBI 基因庫序列比對後顯示兩者所提出的 *Esx1* 基因之 5'-端 cDNA 序列有所不同(如圖六圖示)，Li 所發表的 *Esx1* 基因是以合成 cDNA 序列方式所獲得的，其 5'-端序列較複雜，這個比

較分析結果大大提高了 *Esx1* 基因有多個不同基因序列的表現型式存在之可能性。

除了 Branford 及 Li 兩個研究團隊所提出的 *Esx1* 基因之外，Yan 等人在 2001 年文獻中，以 RNase protection 分析方式指出 *Esx1* 基因可以轉錄出兩個主要不同型式的轉錄子：即 a-和 b-型轉錄子，分別存在於睪丸及胎盤中（基因庫序列號碼為 AF017735 及 AF017734）（Yan *et al.*, 2000）。其研究結果主要是強調 *Esx1* 基因的 RNA 及蛋白質在小鼠胎盤中的專一性表現是一致的，也說明 *Esx1* 基因參與胎盤發育的分子機制。進一步比對基因庫中所有 *Esx1* 基因的 cDNA 序列後發現，Branford 所發表的 *Spx1* 基因之 5'-端非轉譯區序列與 Yan 等人所發表的 a-型 *Esx1* 序列組成幾乎是相似的（如圖六所示），在此統稱為 a-型 *Esx1*。此外，Li 等人所提出的 *Esx1* 基因 cDNA 之 5'-端核酸序列與 a-及 b-型 *Esx1* 轉錄子不相同，也未有直接證據加以探究其組織表現分佈型態，所以將此 *Esx1* 轉錄子重新命名為 x-型 *Esx1*（基因庫序列號碼為 DQ059551）（如圖六所示）。

### 三、 熱緊迫對 *Esx1* 轉錄子表現在睪丸及胎盤組織的作用

睪丸生殖細胞對於熱緊迫非常敏感，以實驗進行執行隱睪手術誘導生殖細胞受到破壞是常用的動物模式系統（Danno *et al.*, 2000;

Rasoulpour *et al.*, 2003)。本論文的後半部份首度以定量 rt-PCR、半定量異構型特殊性 RT-PCR (semi-quantitative isoform-specific RT-PCR analysis)、西方點墨法及免疫螢光組織染色分析方法，比較 *Esx1* 轉錄子及 ESX1 在正常睪丸及隱睪睪丸中的分佈表現是否不同。另外，為了探究當小鼠處於高溫及高濕環境下 *Esx1* 轉錄子在睪丸中的表現型式是否與隱睪睪丸中的表現一致，同樣進行上述分析方法以比較及分析 *Esx1* 轉錄子的表現。希望能藉由探究當小鼠受到不同熱緊迫處理後，睪丸中 *Esx1* 轉錄子的表現型式是否會改變，以及不同轉錄子的型式轉變在維持 *Esx1* 基因表現的機制中是否扮演重要角色。

另外，由 Yan 所發表的研究結果指出 b-型 *Esx1* 轉錄子主要是表現在懷孕母鼠的胎盤中，對於 *Esx1* 轉錄子在受熱緊迫的懷孕母鼠胎盤中的表現是否與在睪丸中 *Esx1* 轉錄子的調控機制具有相關性頗感興趣。過去的文獻指出，胎盤是哺乳類動物支持胎兒及母體交互作用的重要構造 (Figueiredo *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004)。小鼠胎盤屬於絨毛尿囊模型胎盤 (chorioallantoic placenta；如附圖二)，主要功能是提供胎兒及母體之營養物及廢棄物交換的場所 (Ohlsson *et al.*, 1999)。胎盤中的特化細胞包括滋養層 (trophoblast)、內胚層 (endoderm) 與胚外中胚層 (extraembryonic mesoderm)，在小鼠胚發育早期就已經形成。而滋養層中最深層的迷路層細胞在胚發育階段第十天出現在胚中並持續

至懷孕末期，是由高度彎曲、分支而且重覆的薄壁所形成的，主要是提供胚營養及氧氣交換的場所 (Wilson, 2002)。控制胎盤發育的基因很多，依過去的研究報導指出包括 *ERR-β*、*Dlx3*、*Mash*、*Plac1*、*Pem*、*PPARγ*、*Wnt7b* 及 *Esx1* 基因等皆曾被提及與調控哺乳類動物胎盤的形成及形態發生作用具有重要性 (Guillemot *et al.*, 1994; Maiti *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 1997; Morasso *et al.*, 1999; Parr *et al.*, 2001; Fant *et al.*, 2002; Asami-Miyagishi *et al.*, 2004)。其中，細胞核轉錄因子基因在胎盤發育過程中扮演極重要的角色 (Li and Behringer, 1998)，屬於此類基因的 *Esx1* 基因產物表現在胎盤的迷路層中對於維持正常胎盤功能具重要性 (Yan *et al.*, 2000)。所以本論文也著重於探討懷孕小鼠在熱緊迫下 b-型 *Esx1* 轉錄子在胎盤中表現的調控。

過去的研究顯示，當雌性動物受到熱緊迫會影響其生殖作用，特別是降低胚胎埋殖及受孕率 (Alexander *et al.*, 1987; Dobson *et al.*, 2003; Tomascik-Cheeseman *et al.*, 2004)。熱緊迫會破壞生理調控的平衡性，包括性腺釋放荷爾蒙 (gonadotroph-releasing hormone) 分泌、改變如 HSPs 等基因的表現以及不孕的機會增加 (Vatnick *et al.*, 1991; Dobson *et al.*, 2001; Nepomnaschy *et al.*, 2004)。在 Sonna 等人所發表的文獻回顧中指出，熱緊迫影響細胞的功能有幾種可能性；包括 1：抑制 DNA 合成與轉錄作用，以及 RNA 修飾與轉譯作用；2：經由改變細胞週期來

抑制細胞生長作用；3：蛋白質變性作用及不正常聚集現象 (misaggregation)；4：增加蛋白質經由蛋白質體 (proteasomal) 或溶酶體 (lysosomal) 途徑的分解作用；5：破壞細胞骨架成份 (cytoskeleton components)；6：改變代謝作用導致細胞中 ATP 含量下降；以及 7：改變細胞膜通透性導致增加細胞內的鈉、氫及鈣離子含量 (Sonna *et al.*, 2002)。除此之外，我們對於當懷孕母鼠受到熱緊迫後是否能藉由改變其轉錄子的表現型式以調控基因的正常表現及胎盤正常功能頗感興趣，但是相關的研究卻很少。值得注意的是，表現在鼠睪丸中的 Heme oxygenase isozymes (HO) 有兩種表現型式，HO-1 型 (也被稱之為熱誘導蛋白 HSP-32) 及 HO-2 型式，主要是調控運鐵蛋白 (transferrin)、鐵蛋白 (ferritin) 及一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase) 的基因表現。在正常睪丸中精細胞表現以 HO-2 為主，然而在受到高溫熱緊迫 1 小時後睪丸中 HO-1 的表現量快速增加為正常睪丸中的 2.8 倍。此結果說明 HO-1 在受到熱處理 1 小時後大量表現，可能參與調控生殖細胞在熱緊迫下的維持正常功能的機制 (Ewing and Maines, 1995)。所以我們對於不同型式的 *Esx1* 轉錄子在受熱處理的小鼠胎盤中是否也能以轉變其轉錄子的表現型式以維持胎盤正常功能的基因調控機制頗感興趣。

哺乳動物的基因經常以選擇性啟動子調控其在不同組織或不同發

育階段的表現，而不同型式的 mRNA 表現可能是以不同轉錄起始點或在同一個表現子 (exon) 產生不同的啟動子來調控表現。所產生的轉錄子可能編碼為不同的蛋白質表現型，也有可能只改變其 5'-端非轉譯區序列影響其 mRNA 穩定度 (stability) 及轉譯效率，也就是說啟動子可能也會參與調控改變基因的表現強度與組織專一性 (Kilpatrick *et al.*, 1990; Burch and Davis, 1994; Ayoubi and van de Ven, 1996)。過去 Zavolan 等人指出在 60,770 個 RIKEN 全長小鼠 cDNA 序列及 44,122 個已知的 mRNA 序列中，有 101,356 個序列可以比對到 36,617 個基因座 (loci)。因而提出選擇性切割 (alternative splicing) 的遺傳操作 (genetic manipulation) 可能產生基因的不同表現 (differential expression) 以及改變基因產物的分佈位置 (Zavolan *et al.*, 2003)。另外，統計結果也指出多數的切割型式 (splice form) 的轉錄單位有 49% 的轉錄是以不同的轉錄起始或終止點 (alternative transcription start or stop)。Esx1 基因以不同轉錄子型式表現在正常小鼠睪丸及隱睪睪丸中，所以推測 Esx1 基因可能以不同的啟動子區域調控 Esx1 基因在不同的睪丸生殖細胞中之轉錄表現。所以選殖出 Esx1 基因之 5'端基因組序列及部分 5'端非轉譯區序列，進一步分析在不同睪丸生殖細胞中 Esx1 基因之啟動子區域也是本論文的重點。

## 材料及方法

本研究以兩個誘發熱緊迫試驗，分別是執行隱睪手術以及將公鼠及懷孕母鼠置於 37°C 及 85% 相對溼度的高溫環境以探究熱處理對 *Esx1* 基因表現的作用。本研究以定量 rt-PCR 分析 *Esx1* mRNA 總相對表現量，以及以異構型特殊性 RT-PCR 分析個別 *Esx1* 轉錄子的相對表現量。另外，以西方點墨分析法及免疫螢光顯微鏡法分析 ESX1 的表現以及分佈位置。為了分析受熱緊迫的睪丸組織是否有細胞凋亡現象，本試驗亦進行組織形態分析以及 TUNEL 試驗分析。在分析 *Esx1* 基因在睪丸生殖細胞中啟動子之區域分析試驗中，本研究在小鼠基因庫中篩選出可能包含 *Esx1* 基因的啟動子序列，以系列刪剪 (serial deletion) 分析各個啟動子區域在睪丸生殖細胞中啟動冷光報導基因的活性。另外，以電腦分析軟體分析主要啟動子區域中可能的轉錄因子結合區域。

### 一、 試驗動物 (Assay animals)

取年齡約在 6 週至 18 週之間的公鼠進行試驗。懷孕母鼠胎盤取樣天數以交配後第二天檢視陰道出現交配栓 (copulation plug) 的當天作為懷孕第 1 天。

### 二、 隱睪手術 (Induction of cryptorchidism)

同論文 part I. 材料方法二。

### 三、 誘發熱緊迫試驗設計 (Experimentally-induced heat stress)

根據過去文獻中所提的試驗方法調整誘發熱緊迫試驗如下

(Harikai *et al.*, 2003a), 取大約八週齡的性成熟公鼠, 個別放在鼠籠中再把鼠籠放在溫度保持 37°C 及相對濕度 85 % 的恆溫培養箱中(每組至少三隻), 分別放置 1、2 或 4 小時。另外對照組的小鼠置放在恆溫空調環境下 (25±1 °C)。懷孕母鼠熱緊迫處理試驗是取懷孕第 14 天的母鼠在 34、36 或 37°C 下進行熱處理 1 小時。除此外以 37°C 熱處理下分別進行 1、2 或 4 小時。各試驗動物在各個時間點犧牲後抽取睪丸或胎盤組織以進行 RNA 及蛋白質抽取或免疫組織分析。

### 四、 反轉錄-PCR 及定量 rt-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative real time (rt)-PCR analyses)

抽取正常對照組及實驗處理組的睪丸及胎盤組織之總 RNA, 分別將 RNA 利用 oligo (dT)<sub>12-18</sub> 做為引子進行反轉錄反應。作用條件為每 20 µl 內含 0.1 µg RNA, 50 mM Tri-HCl, 75 mM 氯化鉀 (pH 8.3), 3 mM 氯化鎂, 0.1 M DTT, 500 ng Oligo (dT)<sub>12-18</sub> 及 0.5 mM dNTP 混和物和 20 U 的反轉錄酶 (Promega, Madison, USA), 在 42°C 下反應 1 小時後, 以 70°C 處理 15 分鐘終止反應, 合成之 cDNA 立刻進行以下的試驗或保存於 -20°C 冰箱中。

取 100 ng 的 cDNA 及分別加入 2 pmole 的引子組如下列所示 (1F: 5'-GAGAAGCAGCTGGTACCAC-3', 2F:5'-TACCTAGGCTCCAAACC GCT-3', R: 5'-CTCGGGTTCCTGGTAGTTG-3', *actin*-F:5'-CCTTCCACC CCAGCCATGTA-3', *actin*-R: 5'-CTTGCTCGAAGTCCAGGGCG-3'), 分別加入 5  $\mu$ l 的 10 倍反應液, 7.5 mM 鎂離子、1 mM dNTP 以及 1  $\mu$ l 的 Taq 聚合酶 (20 U/ $\mu$ l) (Promega, Madison, USA), 最後加水調至 50  $\mu$ l 體積, 進行下列 PCR 反應: 94°C 反應 30 秒、57°C 反應 30 秒及 72°C 反應 1 分鐘, 共進行 30 個循環。PCR 產物以 1.5 % 洋菜凝膠 (agarose gel) 分離後照相處理。PCR 產物的表現量曲線分析是以 PCR 反應進行不同的反應循環數, 分析其表現數據後所獲得最佳的反應循環數。相對的表現量是以各個 *Esx1* mRNA 表現量除以 *actin* 表現量的值表示。

*Esx1* 基因的三個轉錄子主要的差異在其 5'-端 cDNA 序列 (如圖六所示), 我們發現以定量 rt-PCR 分析方法僅能比較 *Esx1* 基因的相對 RNA 表現量, 無法比較各個轉錄子的相對表現量。所以為了進一步分析 a-、b-及 x-型 *Esx1* 轉錄子的相對表現量, 將各個 PCR 產物的表現量相對與 *actin* 表現量以 ChemiDoc XRS 影像處理軟體 (Bio-Rad Laboratory, Inc., Hercules, CA, USA) 量化之後求其倍數。再利用以下數學公式求其相對表現值 ( $V_a$ )。

(1).  $V_a$  of x-form =  $V_a$  of 596-bp band (以引子 1F 及 R 進行擴增反應)

- 獲得 596-bp 大小的 PCR 產物量化得到的表現值 (value, 以  $V_a$  表示), 即為 x-型轉錄子的量化值)
- (2).  $V_a$  of a-form =  $V_a$  of 349-bp band (以引子 1F 及 R 進行擴增反應獲得 349-bp 大小的 PCR 產物量化得到的表現值  $V_a$ , 即為 a-型轉錄子的量化值)
- (3).  $V_a$  of 238-bp band =  $V_a$  of b-form +  $V_a$  of x-form  
 $\Rightarrow V_a$  of b-form =  $V_a$  of 238-bp band -  $V_a$  of x-form
- (4).  $\Rightarrow V_a$  of b-form =  $V_a$  of 238-bp band -  $V_a$  of 596-bp band (以引子 2F 及 R 進行擴增反應獲得 238-bp 大小的 PCR 產物量化得到的表現值  $V_a$ , 為 b-及 x-型轉錄子的表現量總和, 計算結果得到 b-型轉錄子的量值為 238-bp 大小的 PCR 產物量化值減去 596-bp 大小的 PCR 產物量化值)。

另外, 定量 rt-PCR 分析所得到的量化值為 *Esx1* 基因的總相對 RNA 表現量。在 25  $\mu$ l 總反應溶液中加入 100 ng cDNA 及 200 mM 的各引子對 (f: 5'-CAAACCTACCAGGAACCCGAG-3', r: 5'-TAGCAAACAGGTC CGGGTAC-3'), 以及分別加入 12.5  $\mu$ l 的 SYBR Green PCR 主要混合液 (Invitrogen, San Diego, CA)。每一個樣本試驗皆重複三次, 並將以 ABI PRISM 7000 分析軟體分析獲得相對數據。

## 五、 西方點墨分析法 (Western blotting analysis)

分別取 50 微克的第六、十二及十八週齡的小鼠睪丸及隱睪丸組織蛋白質，加入樣品緩衝液（包含 1 % 十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecylsulfate, SDS)、5 % 硫醇(mercaptoethanol)、20 % 甘油(glycerol)、0.1 % 二氯溴甲烷酚藍 (Bromo-phenol-blue, BPB) 以及 pH 值 6.85 的 50 mM Tris-HCl)。蛋白質變性處理後以含 12 % 的十二烷基硫酸鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳 (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析蛋白質，再轉漬於 PVDF 膜。加入含 5 % 脫脂奶粉的 PBS-T 緩衝溶液，室溫下反應 1 小時使酪蛋白覆蓋住膜上不含蛋白質部位，再以 PBS-T 清洗後分別加入 ESX1 抗血清（稀釋比例 1: 5000）或 Actin 抗血清（稀釋比例 1:5000, A-5316, Sigma, USA）。室溫下反應 1 小時以及以 PBS-T 清洗後，加入接有顯色酶的二級抗體 (horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (稀釋比例 1: 5000) 或 goat anti-mouse IgG [ (稀釋比例 1:5000); Zymed Laboratories, Inc] )，於室溫下作用 1 小時，再經 PBS-T 清洗後，加入 ECL 測試試劑 (enhanced chemiluminescence reagent, NEN<sup>TM</sup> Life science, MA) 反應後，在暗房中進行顯影及定影作用後，照相存檔。

## 六、 組織切片分析及免疫螢光顯微鏡分析法 (Histology and

immunofluorescent microscopy)

分別將正常對照組及試驗組取下的睪丸及胎盤組織浸泡於含 4 % 多聚甲醛溶液，於 4°C 冰箱中作用約 16 小時。固定作用後，分別以 PBS 水溶液清洗樣本三次後，以含 20 % 蔗糖的水溶液作用至少 16 到 18 小時後，包埋於冷凍包埋液中，再以冷凍切片方式獲取 10 μm 厚度的組織切片。沾黏在載玻片上的切片組織再以固定液固定 30 分鐘後以 PBS 水溶液清洗三次，再浸泡於含 5 % 脫脂奶粉的 PBS 水溶液於室溫下作用 30 分鐘，以 PBS-T 水溶液清洗後加入初級抗體 ESX1 抗血清(稀釋 1: 100)，於 4°C 冰箱中反應至少 16 到 18 小時。第二天清洗後加入綠色螢光或紅色螢光標定的次級抗體 (Fluorescein-conjugated goat anti-rabbit 或 Texas red-conjugated rabbit anti-goat IgG) (稀釋 1: 200) 室溫下反應 1 小時，以 PBS-T 水溶液清洗三次後，再以 PI (稀釋 1: 500) 染核及封片後於螢光顯微鏡下鏡檢。另外完成的切片以 PBS 清洗後，以蘇木紫及伊紅染色以進一步觀察其組織形態。

#### 七、 TUNEL 試驗 (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyl-UTP nick-labeling (TUNEL) analysis)

為了決定細胞凋亡的生殖細胞位置，分別將組織以含 10 % 福馬林水溶液固定、包埋後利用 TUNEL Apoptosis detecting kit (DNA

fragmentation/Fluorescence staining ; Cat.# 17-141, Upstate, NY, USA ) ,  
以體外原位雜交方式利用末端 dioxynucleotidyl transferase (TdT)-  
mediated deoxyl-UTP nick-labeling 方式測得 DNA 斷裂端。簡言之，組  
織切片脫水後以 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)的水溶液加入每毫升含 20  $\mu$ g  
的蛋白酶 K (Sigma, St Louis, MO, USA) , 於 37 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘。最  
後在 20  $\mu$ l 的水溶液中加入包含 TdT 之 3'-端標定反應溶液以及結合綠  
色螢光 FITC 的核酸，在 37 $^{\circ}$ C 的培養箱中反應一小時。反應完成後以  
共軛焦聚顯微鏡鏡檢及照相存檔。

#### 八、 小鼠 *Esx1* 基因體 DNA 之選殖 (Isolation of the mouse *Esx1* genomic DNA)

以 *Esx1* 基因之第二個表現子 (exon) 序列，設計一對引子  
(*Esx1*-<sup>631</sup>F : 5'-CAAACCTACCAGGAACCCGAG-3' ; *Esx1*-<sup>1032</sup>R :  
5'-TAGCAAACAGGTCCGGGTAG-3') 進行 RT-PCR 增幅反應，得到  
可以作為探針 (probe) 的片段 (內含 401-bp 的 *Esx1* cDNA 片段)，經  
由膠上純化獲得此 PCR 反應產物後，以酒精沈澱純化作用後測量此  
DNA 的 OD<sub>260/280</sub> 值，並以  $\alpha$ -<sup>32</sup>p 標定作為篩選基因庫中 *Esx1* 基因進行  
雜合反應的探針。為了得到含 *Esx1* 基因的 genomic DNA 片段，以此探  
針進一步篩選小鼠 129 品系的基因庫 (genomic library) (Clontech, Palo  
Alto, CA)。

將含小鼠基因庫的噬菌體以不同的稀釋倍數，取 1  $\mu\text{l}$  噬菌體與 200  $\mu\text{l}$  的宿主 K802 (*E. coli* host strain)，於 37°C 培養箱中混合培養 15 分鐘，再置於 3 ml 的軟質洋菜膠 (soft top agar) 後，一起倒入含有 2% 麥芽糖 (maltose) 的 LB 固態培養基上 (15 mm-plate) (每 1 公升水溶液中加入 5 克酵母萃取物 (yeast extract)、10 克色氨酸 (tryptone) 及 5 克氯化鈉 (sodium chloride))，在 37°C 下隔夜培養後分別計算所產生之菌斑至少約為  $5 \times 10^5$  個菌斑數，以待雜交作用 (hybridization)。然後取與培養基同樣大小的帶正電尼龍膜 (positive charged nylon membrane) 分別覆蓋在培養基上，並在尼龍膜上以 18 號針頭作出不對稱點記號，之後將尼龍膜取出經過強鹼變性作用 (denaturation) 及中和反應 (neutralization) 後，在紫外燈下照射 5 秒鐘。進行雜交反應前以 2 倍 SSC 水溶液清洗尼龍膜後 (20 倍的 SSC 水溶液，配方為：3.0 M 氯化鈉及 3.0 M 檸檬酸鈉 (pH 7.0))。加入雜交溶液 (50% formamide、每毫升 0.1 毫克鮭魚精子 DNA、10% 硫化葡聚糖 (dextran sulphate)、1 倍 Denhardt's 水溶液 (50 倍 Denhardt's solution 如下：5 克 Ficoll 加 5 克 polyvinylpyrrolidone 加 5 克 BSA fraction V, 再加水至 500 毫升，通過 0.45  $\mu\text{m}$  膜過濾)、0.2 M 氯化鈉、5 mM EDTA、10 mM Tris 水溶液 (pH 7.5)、5 mM 磷酸鈉以及 5 mM 磷酸氫鈉 (sodium phosphate))，在 60°C 培養箱中作用 2

小時後，加入包含 50 ng 的 $\alpha$ -<sup>32</sup>p 標定 *EsxI* 探針在 60 °C 培養箱下進行雜交反應至少 18 小時。反應結束後，分別以含 0.2 倍 SSC 水溶液以及含 0.1 % SDS 的 0.1 倍 SSC 水溶液清洗尼龍膜，再進行壓片、顯影定影反應後以便比對挑選正確的菌斑。前後經過三次篩選得到具有 *EsxI* 基因陽性反應的噬菌體菌斑，對其 DNA 進行後續之次選殖及序列分析如後。取適量的噬菌體 DNA，分別以 *EcoRI*、*BamHI* 及 *HindIII* 限制酶切割後，以 0.8 % 洋菜膠電泳分析。以先前 $\alpha$ -<sup>32</sup>p 標定的探針進行南方點墨分析確定為具有 *EsxI* 基因的 DNA 片段後，將膠體內 DNA 片段切下進行膠上純化後 (Gel extraction miniprep kit ; Millipore, USA)。取 100 ng *EsxI* 基因體 DNA 片段加入 50 ng 同樣以限制酶切割及去磷酸化處理過的 pBlueScript SK II (-)載體，以 T4 DNA 接合酶接合反應後，經過轉型作用至 JM109 細菌後，經由菌落篩選以製備質體 DNA 及進行定序分析。

$\alpha$ -<sup>32</sup>p 標定 DNA 探針製備的方法如下，取 50 ng *EsxI* cDNA 片段，在沸水中加熱 10 分鐘後置於冰上冷卻，再將 DNA 加入含有 *Prime-a-gene* 標定反應液 (Promega, Madison, USA) 的離心管中，待混合物均勻溶解後加入 5  $\mu$ l 的 $\alpha$ -<sup>32</sup>p [dCTP] (deoxycytidine-5'-triphosphate) (10  $\mu$  Ci / $\mu$ l , 3000 Ci /nmol NEN Research Product, Boston, MA, USA)。於 37 °C 反應 1 小時。隨後以 Sephadex<sup>®</sup> G-50

Column (Millipore) 純化 DNA 探針。純化後之探針於 95°C 加熱 5 分鐘後置於冰上冷卻，待雜合反應使用。

以南方點墨發初步確認 DNA 序列，其方法如下：將固定量的 DNA 放進電泳膠凹槽中，以 100 mV 固定電壓進行 40 分鐘電泳，以 H<sub>2</sub>O 清洗膠體後，經過強鹼變性作用及中和反應後，再與含 0.5 M Tri-HCl (pH 7.4) 及含 1.5 M 氯化鈉水溶液反應 30 分鐘後，以 20 倍的 SSC 水溶液反應 30 分鐘，利用半乾式轉漬器 (BioRad, Hercules, CA, USA) 進行 DNA 轉漬反應，調整電流至 250A，30 分鐘後洋菜膠上的 DNA 便轉移到尼龍膜 (nylon membrane) (Hybon-N, Amersham-Pharmacia Biotech)。待尼龍膜略乾時，在紫外燈下照射 5 秒後晾乾。將此尼龍膜先與含 0.1 % SDS 的 SSC 溶液在 65°C 下作用 30 分鐘，再置入雜交溶液中反應 2 小時，加入  $\alpha$ -<sup>32</sup>P 標定之探針進行雜交作用 16 至 18 小時後，以含 0.1 % SDS 及 0.1 X SSC 水溶液清洗尼龍膜，再將尼龍膜進行自動放射顯影術分析 (autoradiography)。

## 九、 質體建構與製備 (Plasmid constructions and preparations)

以冷光酵素報導基因 (Luciferase reporter gene) 來偵測啟動子活性是常用的系統 (Maiorino *et al.*, 2003)。設計多對包含 *Sma*I 及 *Bgl*II 限制酶的引子進行 PCR 增幅出 *Esx1* 基因的可能啟動子序列 (promoter

constructs 分別是: nt -1453/+227, -965/+227, -965/-438, -438/+503, -438/+227, +54/+227, +227/+503; 以基因庫序列 AF004211 的轉錄起始點為+1, ”-”代表起始點上游序列; ”+”代表起始點下游序列), 進行膠上純化後的 DNA 及接有冷光報導基因的 pGL3-Basic 載體 (Cat.# E1751, Promega), 以及 *SmaI* 及 *BglIII* 限制酶切割後以 T4 DNA 接合酶接合, 同樣以 *SmaI* 及 *BglIII* 限制酶切割後的上述 *Esx1* 基因啟動子序列, 進行細菌轉型作用。取 2  $\mu$ l 的 DNA 接合反應完畢的混合溶液, 加入 50  $\mu$ l 的寄主菌株 JM109 細胞 (Cat.#P9801, Promega), 置於冰上 30 分鐘後, 42 $^{\circ}$ C 熱處理 90 秒, 冰上靜置 5 分鐘後, 加入 1 毫升的 LB 培養液, 於 37 $^{\circ}$ C 培養箱中搖盪培養 1 小時。依據過去發表的文獻中抽取 DNA 的方法獲得質體 DNA (Mori *et al.*, 2003), 測其 OD<sub>260/280</sub> 值後, 置於-20 $^{\circ}$ C 冰箱中待用。

#### 十、 精細胞分離及附睪尾取精 (The separation of testicular germ cell populations and collection of spermatozoa from the cauda epidymis)

同論文 part I. 材料方法三。

#### 十一、 短暫轉染分析作用與冷光素酶分析 (Transient transfection and luciferase assays)

取八週齡小鼠睪丸組織以淘洗式活細胞分離系統取得精原細胞、

初級精母細胞、次級精母細胞、圓形精細胞及精子作為本試驗材料。另外纖維母細胞之 3T3 細胞株 (ATCC#: CRL-1658) 作為轉染作用分析之對照細胞。所有細胞在轉染分析的前一天下午在 24 孔的培養盤約八分滿，放置在含 5 % CO<sub>2</sub> 的 37°C 恆溫培養箱中，在 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12, Cat. # 12400-024, Gibico BRL, Cathersburg, MD, USA) 細胞培養液中加入 10% 胎牛血清 (fetal calf serum, Cat.#. 16170-078)、每毫升 100 單位的盤尼西林-G 及每毫升 100 單位的鏈黴素培養。

根據 TransFast<sup>TM</sup> Transfection Reagent (Promega, Madison, USA) 系統的試驗步驟，對睪丸生殖細胞及 3T3 細胞進行短暫轉染分析，方法如下：將 1 µg 質體 DNA (包括插入 *Esx1* 啟動子區域的 pGL3-Basic plasmids (參照材料方法九) 及含有 SV40 promoter 的 pGL3-Control plasmid)，以及 2 µg 的轉染試劑分別加入 100 µl 的 DMEM 的細胞培養液 (Gibico BRL, Cat.# 23700-040)，在室溫下混合靜置反應 15 分鐘。此時前一晚加入培養盤的細胞已平貼在底部，小心將細胞培養液移除後加入 PBS 緩衝溶液小心清洗兩次後，加入上述與試劑混合的 DNA 於 300 µl 的 DMEM/F12 細胞培養液中，培養在 37°C 的恆溫控濕培養箱中 1 小時，再加入 1 ml 含 10% 胎牛血清的細胞培養液，持續培養 48 小時後進行冷光素酶活性測試。冷光素酶活性測試是以 Bright-Glo<sup>TM</sup>

Luciferase Assay System (Cat.# E2610, Promega, Madison, USA) 進行分析，方法如下：將細胞培養盤中的細胞培養液去除，以 PBS 緩衝溶液清洗後加入 100  $\mu$ l 的細胞解離液 (Glo Lysis Buffer) (Cat. # E2661, Promega, Madison, USA) 收集細胞漿液 (cell lysates)，加入 100  $\mu$ l 的冷光分析試劑作活性測試，每個試驗分析組至少重覆三次，以機型 Microplate scintillation & luminescence counter (Perlin Elmer<sup>®</sup>, Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) 測得冷光素酶活性數值後以 Excel 電腦軟體進行統計分析。

## 十二、統計分析 (Statistical analysis)

統計結果呈現是以平均值 $\pm$ 標準機差 (S.E.M.) 表示。統計比較結果依據 Student's *t*-test 分析變異度。\*， $p < 0.05$  及\*\*， $p < 0.01$  視為顯著差異。

## 結果

### 一、 x-型 *Esx1* 轉錄子在隱睪手術後之睪丸中被誘導表現 (Induced expression of x-form *Esx1* transcript in testes with cryptorchidism)

小鼠隱睪手術於第四週齡執行，為了觀察及比較生精作用受到熱處理的破壞程度以及 *Esx1* 的表現，本試驗分別取完成手術後生長至第六、十二或十八週齡的隱睪睪丸，以及相對應週齡數的正常小鼠睪丸為對照組織。如圖七 A 所示，以定量 rt-PCR 分析 *Esx1* mRNA 在正常睪丸中的階段性表現，結果顯示 *Esx1* RNA 相對於 *actin* 的表現量在第十二週齡的對照組小鼠睪丸中最高 (以 100% 表示)。第六週齡的表現量約為十二週齡的 81.9%，第十八週齡為十二週齡的 45.9%。另外，比較分析隱睪睪丸中 *Esx1* RNA 的表現量，發現第六週齡的隱睪睪丸比同階段的正常睪丸 *Esx1* 表現量為低，但不顯著 ( $p=0.37$ )。比較第十二週齡的隱睪睪丸與正常睪丸之 *Esx1* 表現量後，發現前者 *Esx1* 表現量顯著較低 ( $p=0.005$ )。另外，*Esx1* 表現量在第十八週齡的隱睪睪丸表現量顯著比十二週齡者低 ( $p=0.007$ )，也比同階段的正常睪丸低，但是並沒有顯著差異 ( $p=0.196$ ) (如表二分析)。以定量 rt-PCR 分析只能分析 *Esx1* RNA 的總相對表現量，無法分別計算 a-及 x-型轉錄子的個別表現量 (如圖六所示 a-及 x-型轉錄子的示意圖)。為了探究 *Esx1* 基因在正常及隱睪睪丸中是否有不同轉錄子表現的可能性，設計引子對 1F 及 R

(依圖六所示) 進行 a-型專一表現 RT-PCR 分析 (isoform-specific RT-PCR), 結果顯示 *Esx1* 轉錄子的表現與定量 rt-PCR 所分析結果是一致的 (圖七 B)。在正常小鼠睪丸中 *Esx1* 的表現以 a-型轉錄子 (349-bp) 為主, 然而, 在隱睪睪丸中並沒有擴增出 a-型轉錄子的 DNA 片段, 而是擴增出另一個非預期的 596-bp 大小的 DNA 片段, 以 DNA 定序方式分析此 596-bp 片段, 顯示此 DNA 片段就是 x-型 *Esx1* 轉錄子 5' 的端 cDNA 序列 (儲存為基因庫序列號碼 DQ059551; 如圖六所示)。

為了探究 ESX1 的表現在隱睪手術後的睪丸中是否也和 RNA 表現降低一致, 進一步以西方點墨分析及免疫螢光分析 ESX1 在正常小鼠睪丸及隱睪睪丸中的分佈表現。如圖七 C 所示, 在正常小鼠睪丸中 ESX1 在六週齡及十二週齡的表現量比十八週齡為高 (如表二之比較分析)。另外, ESX1 在六週齡的隱睪睪丸中能維持其表現, 可是在十二及十八週齡階段表現量則明顯比同階段的正常小鼠之蛋白質表現量為低。以西方點墨分析發現 ESX1 在十二週齡的隱睪睪丸中表現量明顯比正常睪丸低, 為了探究 ESX1 在六及十二週齡的隱睪睪丸中的分佈情形是否不同, 以免疫螢光顯微鏡分析法正常睪丸及隱睪睪丸切片組織後發現 ESX1 在六週齡的隱睪睪丸中仍維持穩定表現於生精作用末期的睪丸精細胞 (圖八 A 及 B)。可是在十二週齡的隱睪睪丸生精細管中精細胞及精子數目明顯降低, ESX1 的表現量也降低 (圖八 C 及 D)。

## 二、 *Esx1* mRNA 在受到急性熱緊迫下的睪丸中異常的表現

(Aberrant expression of *Esx1* mRNA in testes under acute heat stress)

為了進一步分析成鼠受到熱緊迫(37°C 及 85 % 相對濕度)後, *Esx1* 轉錄子在睪丸中的相對表現量是否不同, 以定量 rt-PCR 分析法分別分析十二週齡小鼠 (*Esx1* 表現量最高) 以 37°C 處理 1、2 或 4 小時的小鼠, 其睪丸之 *Esx1* 轉錄子表現是否不同。以定量 rt-PCR 分析結果指出 *Esx1* 轉錄子的總表現量在熱處理 1 小時後 *Esx1* 表現量為正常量的 88.5% (圖九 A)。處理 2 小時後 *Esx1* 表現量為正常量的 53.1%; 處理 4 小時後 *Esx1* 表現量則為正常量的 12.7%。統計結果顯示當小鼠以 37°C 熱處理 2 或 4 小時, *Esx1* RNA 表現量顯著下降 ( $p < 0.01$  及  $p < 0.005$ )。以半定量 RT-PCR 分析法探究 a-型及 x-型 *Esx1* 轉錄子的個別表現後, 顯示 a-型 *Esx1* 在以熱處理 1 及 2 小時的小鼠睪丸中仍是最主要的表現型式 (圖九 B 及表二分析)。在第 1 小時階段 a-型轉錄子表現量為 84.5%, x-型轉錄子表現量為 3.6%。在第 2 小時階段 a-型轉錄子表現量為 44.3%, x-型轉錄子表現量為 8.8%。可是, 以 37°C 處理第四小時階段時與未處理前 (0 小時) 比較下, a-型轉錄子表現量為 6.7%, x-型轉錄子表現量為 6.0%, 其 RNA 總表現量約降為原來的 12.7%。也就是說在第四小時階段 x-型轉錄子表現量約為 *Esx1* 總相對表現量的 50%。這

些分析結果顯示 x-型 *Esx1* 轉錄子受熱誘導表現，也證實以定量 rt-PCR 分析的結果所指出的 *Esx1* RNA 表現量在小鼠以熱處理後，睪丸中 *Esx1* 表現量會顯著下降（圖九及表二）。

### 三、 ESX1 在受到嚴重熱損害的睪丸中之分佈表現 (Spatial expression of ESX1 in severely heat-injured testes)

以定量 rt-PCR 及 RT-PCR 分析結果顯示 *Esx1* RNA 在以 37°C 熱處理 4 小時後的睪丸組織中表現量顯著降低（圖九）。為了探究 ESX1 在熱處理後的睪丸中分佈表現是否受到影響，首先以蘇木紫及伊紅染色觀察比較正常十二週齡的小鼠睪丸組織及以 37°C 熱處理 4 小時後的睪丸組織之生精細管的生殖細胞形態。如圖十 A 所示，正常對照組睪丸組織的生精細管中生殖細胞排列規則，生精細管管腔部位有許多精子分佈（如圖十 A 左下角放大區域所示）。但是以 37°C 熱處理 4 小時後的睪丸組織（如圖十 B 所示），除了生精細管的空腔變大外，減數分裂後階段的精細胞數目也減少許多（如圖十 B 左下角放大區域所示）。以 ESX1 抗血清進行免疫螢光顯微鏡觀察 ESX1 在受到嚴重熱緊迫的睪丸中的表現位置，也發現 ESX1 的表現訊號明顯下降（比較圖十 C 及 D）。

### 四、 受到嚴重熱緊迫的睪丸生殖細胞發生計畫性細胞凋亡

( Programmed cell death in the germ cell population of the testis  
suffered severe stress )

為了探究受熱緊迫小鼠睪丸組織之形態變化以及 *ESX1* 在睪丸生殖細胞中的異常表現是否與細胞凋亡有關，以 TUNEL 分析正常睪丸與受 37°C 熱緊迫處理 4 小時的睪丸發生細胞凋亡的現象是否有差異。結果顯示 TUNEL 染色訊號普遍分佈在受急性熱緊迫後的小鼠生精細管中的初級精母細胞及精細胞中 (圖十一 B)。然而在正常的對照組睪丸切片中卻沒有發現 TUNEL 染色訊號 (圖十一 A)；此分析結果說明在受到嚴重熱緊迫的小鼠睪丸中，生殖細胞會有細胞作用發生，而且集中在生精作用的末期。

##### 五、 *Esx1* 轉錄子之特定表現型在胎盤中的獨特性表現

( Isoform-specific expressions of *Esx1* transcripts in placentae )

小鼠胎盤迷路層大約在懷孕第八至第十天形成，並且維持到懷孕後期。為了分析 *Esx1* RNA 在胎盤形成過程中不同階段的表現量，本試驗以定量 rt-PCR 技術分析 *Esx1* 在懷孕母鼠胚胎發育的第八、十、十二、十四及十六天胎盤中之表現。結果顯示 *Esx1* 的總表現量在懷孕後第八天開始增加，而且持續增加至第十四天，但是在第十六天時下降 (圖十二 A)。而以引子對 1F、2F 及 R (如圖六所示) 進行半定量 RT-PCR

分析法，探究 *Esx1* 轉錄子在胎盤中的個別表現後，顯示在胎盤中之主要表現型式為 b-型，尤其是第十四天階段的相對表現量達到最高（約為總相對表現量的 90 %）。不過，相對表現量低的 a-型及 x-型表現在發育中胎盤中也有表現（圖十二 B）。

為了研究熱緊迫對於 *Esx1* 在胎盤中表現的作用，我們取 *Esx1* 相對表現量最高的懷孕第十四天的小鼠，分別放置於 34、36 或 37°C 的培養箱中接受 1 小時的熱緊迫處理。與正常環境（25°C）下的懷孕小鼠胎盤組織相比較，接受 34°C 或 36°C 熱處理一小時的 *Esx1* RNA 總表現量並沒有明顯下降（圖十三 A）。然而，隨著環境溫度上升，*Esx1* RNA 在胎盤中的表現量逐漸下降。以 RT-PCR 分析以 37°C 處理 1 小時的小鼠胎盤，結果顯示 b-型轉錄子（238-bp）幾乎全部轉變成專一表現於睪丸的 a-型 *Esx1* 轉錄子（349-bp）（圖十三 B）。此外，*Esx1* RNA 在受到 37°C 熱緊迫處理 1、2 或 4 小時後，*Esx1* 表現量急遽下降至僅有對照組（正常 25°C）之相對表現量的 20 %（圖十四 A）。此外，受到熱緊迫所誘發表現的 a-型 *Esx1* 轉錄子僅短暫表現於接受熱處理 1 小時的胎盤中（圖十四 B）。而在第 2 小時階段 b-型 *Esx1* mRNA 恢復其表現至約 70 % 的量，定量 rt-PCR 的結果也顯示在第 4 小時，*Esx1* 總表現量急遽下降，而降低至正常對照組的 10.2% ( $p=0.002$ )（圖十四 B）。

## 六、 觀察受熱緊迫處理的小鼠胎盤組織形態及 ESX1 的表現

(Morphological observations of cross sections and expression of ESX1 in heat-stressed placenta)

為了觀察胎盤組織在受到熱緊迫後的形態改變，同樣以蘇木紫及伊紅進行染色分析。圖十五 A 顯示正常小鼠懷孕第十四天的胎盤組織切片的形態觀察結果，圖十五 B 是圖十五 A 框線區域放大四倍圖顯示胎盤的迷路層血管網。觀察結果也顯示在受到 37°C 熱緊迫處理 1 小時的胎盤組織中，有許多受到損害的細胞聚集在一起（圖十五 C，框線區域），也發現有大量的紅血球細胞堆積在迷路層細胞的血管網中（圖十五 D，箭頭尖端所示）。進一步以免疫螢光染色分析 ESX1 的分佈表現量，結果顯示 ESX1 的表現侷限在迷路層位置（圖十六 A），以熱處理 1 小時的胎盤中 ESX1 的表現在部份區域表現降低（圖十六 B），但是某些區域仍能維持其表現量。

## 七、 獲取及定序小鼠 *Esx1* 基因之 5'-端調節區域及 5'-端非轉譯區序列 (Obtaining and sequencing of the 5'-regulatory region and 5'-untranslated region of mouse *Esx1* gene)

為了能進一步分析不同表現型式的 *Esx1* mRNA，尤其是 a-型 *Esx1* 在睪丸生殖細胞中的表現是否具有不同的啟動子調節區域。本研究以

小鼠 *Esx1* 之 cDNA 片段 (nt +631 至 +1032, 以基因庫號碼 AF004211 的基因轉錄起始點為 +1) 作為篩選基因庫的探針。篩選大約  $1 \times 10^6$  個含小鼠基因庫的噬菌斑，結果一共獲得兩個包含 *Esx1* 基因的噬菌斑命名為  $\lambda^{Esx1-1}$  及  $\lambda^{Esx1-2}$ 。經選殖獲取噬菌體 DNA 後進一步分別以 *EcoRI*、*BamHI* 及 *HindIII* 限制酶切割，進行南方點墨分析確認有插入 *Esx1* 基因的噬菌體 DNA 後，將 DNA 片段進行次選殖後進行 DNA 序列分析，再進一步與基因庫中的基因組序列進行比對以確定所獲得的序列確定無誤。獲得一個約 2-kb 大小，包含 *Esx1* 基因的 DNA 以進行可能的啟動子區域分析 (核酸序列 nt -1496 至 +503，以基因庫號碼 AF004211 的起始轉錄位置為 +1 計算)。

#### 八、 *Esx1* 基因啟動子在分離後的睪丸生殖細胞中之活性 (*Esx1* promoter activity in isolated testicular germ cell populations)

獲得 *Esx1* 基因之 5'-端基因組序列後，為了能確認是否有任何 *cis*-acting regulatory elements 以及相關的轉錄因子調節區域以作為轉錄調控 *Esx1* 基因在生殖細胞的表現。針對包含 *Esx1* 基因第一個 exon 部分序列及 5'-端上游調節區共 2-kb 大小 DNA 片段 (nt -1496 至 +503)，設計 5'-端具有 *SmaI* 及 3'-端具有 *BglIII* 限制酶切點的引子對其進行 PCR 擴增後，將此 PCR 片段接於含有相同限制酶切點的載體 (pGL3-Basic

promoterless *Firefly*, luciferase reporter gene)，此載體包含冷光報導基因但不具有啟動子區域。此具 *Esx1* 基因之表現質體 (expression plasmid) 被名為 p*Esx1*-Luc。進一步以 p*Esx1*-Luc 載體進行活體外雄性生殖細胞的短暫轉染分析。在試驗中測量 p*Esx1*-Luc 在各生殖細胞進行短暫轉染分析試驗的之冷光值分別減去以 pGL3-Basic 進行轉染分析的冷光值，再除以 pGL3-Control (含 SV40 啟動子) 進行轉染分析值的冷光值，所得之倍率表示啟動子活性。此外 3T3 纖維母細胞係進行轉染分析之對照組細胞。結果發現，*Esx1* 基因啟動子序列在圓形精細胞中最高的冷光活性 (圖十七)。此分析結果與過去的研究結果指出圓形精細胞中 *Esx1* 的 RNA 表現量較其它細胞為高是一致的 (Branford *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997)。

爲了瞭解各分離後的生殖細胞中 *Esx1* 啟動子中的主要活性區域，乃利用 PCR 擴增方式對 5'-端序列進行一系列截段，而分別構築出 7 個不同的啟動子區域片段 (如圖十八 A 所示): nt -965 至 +503, +227 至 +503, -965 至 -438, -1453 至 +227, -965 至 +227, -438 至 +227, +54 至 +227，再分別將其接於 pGL3-Basic 載體後進行轉染試驗。結果發現以這七個不同的截段構築，進行五種不同的雄性生殖細胞短暫轉染分析，所產生的結果多所不同 (圖十八 B)。統計分析結果指出核酸序列在 -965 至 -438 區域共 528-bp 大小的 DNA 片段能在圓形精細胞和初級

精母細胞中充分促進啟動子活性（分別為 3T3 細胞冷光值的 12.5 倍及 5.5 倍）。另外一個重要的區域是核酸序列在+54 至+227 之間共 173-bp 大小的 DNA 片段，對於精原細胞啟動子轉錄活性明顯高於 3T3 對照組細胞（約 7.5 倍）的轉錄活性。這些結果說明 *Esx1* 基因的 5'-啟動子序列至少有 2 個主要的轉錄調節區：分別是遠端的 DNA 序列-965 至-438 區域及+54 至+227 區域。另外，以統計分析在圓形精細胞及初級精母細胞中的啟動子活性，可以發現核酸序列+54 至+227 區域對於啟動子轉錄活性有明顯抑制活性的趨勢。另外一個 DNA 區域在-965 至-438 之間則對精原細胞的啟動子活性有抑制作用（圖十八 B）。這些結果說明這兩個啟動子區域（nt -965 至-438 及+54 至+227）可能包含有某些負調節因子（negative factors），分別調控圓形精細胞及初級精母細胞中，以及在精原細胞中的啟動子活性（如圖十九分析結果）。

在得到兩段可能的啟動子區域後，本研究進一步利用電腦分析軟體 TRANSFAC<sup>TM</sup>-6.0 資料庫（TRANSFAC<sup>®</sup> Version 6.0 Public Database Match Program (Biobase, Wolfenbüttel, Germany)）搜尋此兩段區域的主要 *cis*-acting regulatory elements

（<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>）。分析結果顯示在 *Esx1* 基因的 5'-端序列有許多可能的轉錄調節因子結合區域，包括兩個 TATA，分別在 nt +50 及 nt -950 位置、一個 GATA box，在 nt +8 位置、

一個 CREBP1，在 nt -34 位置、4 個可能的 SRY 區域，分別在 nt -429、nt -517、nt -606 及 nt -818 位置，一個 Sp1，在 nt -450 位置，以及一個 CEBPB，在 nt -796 位置（圖二十）。這些結果顯示 *Esx1* 基因具有多個可能的轉錄因子調節區域以調控生殖細胞中不同的轉錄表現強度。

## 討論

過去的研究指出環境溫度升高會影響睪丸生殖細胞發育 (Danoo *et al.*, 2000)，然而對於動物處於熱緊迫環境下睪丸生殖細胞所產生的生理及細胞層次上的反應，與基因表現的分子機制交互作用多所未知 (Rockett *et al.*, 2001)。在本論文前半段部份提到 ESX1 在隱睪睪丸中的表現量會受到熱作用而下降 (Yeh *et al.*, 2005)，因此本論文的後半段希望能更進一步探討個別 *Esx1* 轉錄子在以熱處理後的睪丸及胎盤中表現是否具有特殊表現性。為了瞭解熱緊迫對 *Esx1* 轉錄子表現的效應，以 a-及 b-型表現型 RT-PCR 分析法進行探究個別的轉錄子表現。利用此分析法發現與 a-及 b-型不同的 x-型 *Esx1* 轉錄子顯著表現在隱睪睪丸組織中 (圖七 B)。對於此新發現的 *Esx1* 表現型在生精作用中所扮演的角色在進行本論文研究之初都是未知的。經過與 a-及 b-型轉錄子的 5'-端未轉錄區序列比對後發現，x-型轉錄子的 5'-端結構比 a-型多了 149-bp DNA 序列 (圖六、灰色區域)。目前的研究結果說明 a-型及 x-型 *Esx1* 表現型式的轉換表現，幫助睪丸在受到長時間熱緊迫下進行轉錄調控以保持相對穩定的 ESX1 表現，此發現強烈說明 x-型 *Esx1* 轉錄子在轉譯作用確實具有活性，而且不同 mRNA 型式表現的轉換在基因調節作用中的轉錄層次上確實扮演重要的角色。在過去文獻中對於以不同表現型調控專一表現於睪丸的基因之轉錄作用付之闕如。但是對

於其他組織中基因的調控作用則是有許多例證可循的，如 Bcl-2 和 Bcl-xL 在人類的白血病 HL-60 細胞中表現的轉換，與細胞凋亡的作用有關 (Han *et al.*, 1996)。另外，不同型式的 alpha-myosin heavy chain (MHC) mRNA 由 alpha 型轉換為 beta-型 MHC，也被提出可能與適應心肌的新功能需求有關 (Kurabayashi *et al.*, 1990)。在過去的文獻報導中指出以選擇性切割進行基因的操作會導致特定的基因表現、改變基因表現能力以及許多基因產物的異常分佈現象 (Zavolan *et al.*, 2003)。

高溫作用會誘發許多生理反應，如血壓增加，以及血中腎上腺皮質素、多巴胺和 dehydroxyphenylacetic acid 等濃度的上升。熱緊迫也會造成生理失調，如體重下降、食慾缺乏和胃潰瘍等症狀 (Harikai *et al.*, 2003a)。研究顯示睪丸是一個容易受到熱傷害的器官，尤其是對生精作用過程中減數分裂末期的生殖細胞發育影響最為嚴重 (Han *et al.*, 2004)。到目前為止，有許多熱緊迫傷害睪丸的研究模式系統 (model systems)，以探究熱緊迫對基因表現之改變為主要目的。其中最先被提出的研究模式是以隱睪手術方式提高睪丸的溫度，以觀察漸進性的生殖細胞喪失或產生細胞凋亡過程或現象 (Danno *et al.*, 2000; Rockett *et al.*, 2001; Rasoulpour *et al.*, 2003)。另一個已知的睪丸熱緊迫處理模式 (heat-shocked testis model) 是將睪丸自活體取下或是直接將小鼠暴露在高溫環境，如 40°C、42°C 或 43°C 的水浴槽，這種方式會導致精母

細胞的凋亡率增加以及由附睪取精得到的精子游動能力之明顯降低 (Rockett *et al.*, 2001; Senoo *et al.*, 2002)。最近，Harikai 等人建立了另一種可以引起急性熱緊迫的研究模式，便是將老鼠置放在可以調控溫、溼度的特製加熱培養箱中做處理 (Harikai *et al.*, 2003a)，這個系統顯然是一個相當好的熱緊迫誘導系統，它能真正反應出環境的熱緊迫，更有利於探討熱緊迫所誘導的生理或化學反應，包括如 glucocorticoidal 及荷爾蒙釋放等生理改變所致的神經內分泌系統病變因。而且，對於研究基因的表現方面，在 37°C 及 85 % 相對濕度下的熱緊迫處理比將睪丸浸泡高溫熱水所產生的緊迫來得適當。例如，*c-Fos* 基因在小鼠腦部中隔區域的表現，在 37°C 以上高溫時會被誘導表現，但是在 37°C 以下並不會被誘導表現 (Harikai *et al.*, 2003b)。與本研究利用異構型特殊的 RT-PCR 分析，可以令 x-型 *Esx1* 在睪丸中的表現只有在 37°C 處理 2 小時才會出現 (圖八)，但在 34°C 以下不會被誘導產生這樣的結果與上述相當類似。

a-型 *Esx1* 在睪丸中的生精作用階段專一性表現是在圓形精細胞中，而在睪丸發育過程中扮演重要的角色 (Branford *et al.* 1997)。a-型轉變為 x-型 *Esx1* 轉錄子的作用被認為在面臨熱緊迫處理下，如隱睪手術，是為了保護生殖細胞的形成。然而在受到嚴重熱緊迫情況下，x-型 *Esx1* 並沒有快速被表現，而是遲至受處理後的 2 小時後才被誘導表

現(圖八)。*Esx1* mRNA 及蛋白質的表現在受熱緊迫處理 4 小時後的睪丸中表現量明顯下降(圖九及十)，以組織形態分析後也確定此表現量的下降可能是因表現 *Esx1* 的精細胞數目受熱傷害減少而下降。也就是說 *Esx1* mRNA 及蛋白質的表現下降，是因生精作用在受到嚴重熱傷害處理的睪丸中受到破壞所致。另外可以解釋 *Esx1* 基因表現量下降的原因，還包括在發育後期的生殖細胞產生細胞凋亡作用，在睪丸發育及生精作用中控制雄性生殖細胞的數目以及去除受損的生殖細胞作用中扮演舉足輕重的角色(Ohta *et al.*, 2003; Hirai *et al.*, 2004)。未來的研究對於 *Esx1* 基因表現的分子機制或許可以提供相對應的決策以探討許多雄性生殖議題，如不孕症或某些抗緊迫藥物之效用等。對於 *Esx1* 轉錄子的轉換表現之真正作用，到目前為止仍舊不完全瞭解，利用標的突變 a-及 x-型的分析試驗，將可以幫助我們瞭解熱緊迫影響生精作用的分子機制。另外，本論文也提出可能存在有多個不同的啟動子區域以調控 *Esx1* 基因在不同情況下的表現議題，所以探究主要的啟動子區域以控制 *Esx1* 轉錄子的選擇性起始表現是重要的。

本論文以異構型特殊的 RT-PCR 分析在懷孕後期之胎盤中 *Esx1* 的表現，發現確實有三個不同型的 *Esx1* 轉錄子存在，分別是 a-、b-及 x-*Esx1* 轉錄子(圖十二)，也證實 b-型 *Esx1* 確實是表現在胎盤中的 *Esx1* 轉錄子的優勢型。在睪丸受到熱緊迫的試驗中，x-型轉錄子主要是作為

轉錄調控 *Esx1* 基因表現的重要表現型。熱緊迫對懷孕的母鼠而言是一非常嚴重的傷害，尤其是在胎盤發育的後期階段 (Alexander *et al.*, 1987; Dobson *et al.*, 2003)。有趣的是，本研究另一個結果顯示 x-型轉錄子確實表現在懷孕後期的胎盤中 (圖十二)。但是，令人訝異的是 x-型轉錄子在受到熱緊迫傷害的懷孕母鼠的胎盤中並未如預期有大量表現 (圖十三)。這些發現或許能說明仍有其它的基因調節系統涉及 *Esx1* 基因在受到熱緊迫的小鼠胎盤中的表現。其中可能的原因之一便是高溫造成懷孕母鼠的細胞凋亡率增加，以及導致熱緊迫所誘導產生的基因表現因而下降 (Vatnick *et al.*, 1991; Nepomnaschy *et al.*, 2004)。有趣的是，本研究結果發現 b-型轉換為 a-型的表現是另一個調控 *Esx1* 基因的機制，以維持在受到熱緊迫傷害下胎盤發育的正常功能 (圖十三)。如此利用不同型式的 *Esx1* 轉錄子以自我調控的過程或許可以解釋在受到熱緊迫下 *Esx1* 基因的選擇性啟動子出現的作用 (Harikai *et al.*, 2003b)。因此，a-型 *Esx1* 轉錄子可能是在懷孕小鼠受到嚴重熱緊迫下，胎盤為維持正常功能而調控 *Esx1* 基因轉錄表現的中間表現型產物。

胎盤組織是一形成運送營養及氣體交換的重要構造，尤其是維持胎兒生長方面。*Esx1* 表現下降造成胎盤不正常與迷路層受到破壞有關聯 (Li and Behringer, 1998)。本研究結果說明懷孕小鼠在受到熱緊迫初期，胎盤形態雖受到破壞，但是若能維持 ESX1 在受到熱緊迫的胎盤

中之表現，則可能是維持胎盤的基本功能（圖十五及十六）。先前的報導提供了一有趣的線索，說明當細胞暴露在緊迫下，會以改變基因表現的過程來應變不利的處境（Shepherd *et al.*, 2000; Boellman *et al.*, 2004），本論文對 *Esx1* 基因表現的探討也驗證了此一論點。

過去文獻指出利用轉譯抑制作用（translational repression）作為反應緊迫發生的現象，而受到緊迫誘導表現的 mRNAs 以及其轉譯出來的蛋白質，同時會發生轉譯復原的現象（translational recovery）（Novoa *et al.*, 2003），此論證部分與本研究的結果是一致的。本研究發現 a-型 *Esx1* 是在胎盤受到熱緊迫傷害初期誘導轉錄 *Esx1* mRNA 時 ESX1 蛋白質的主要型式。可能的理由是受到熱緊迫反應的變異表現型，a-型 *Esx1* 編碼為 381 個胺基酸，比 b-型 *Esx1*（含 386 個胺基酸片段）容易（Yan *et al.*, 2000）。也就是說 a-型 *Esx1* 這個中間型轉錄子將轉譯出較短的 ESX1 蛋白質以維持 ESX1 在遭受到熱緊迫初期階段的胎盤之正常功能。然而，因 a-及 b-型的胺基酸數目差異太小不容易分辨，所以這個假說仍待能產生可以同時辨識兩個長短不同的蛋白質之抗體後方可作更進一步驗證。另一方面，不同型式的 5'-端非轉譯區的二級結構，也可能是回答此問題的重要線索（van der Velden and Thomas, 1999）。二級結構在轉譯效率（translation efficiency）上有相反的效應，亦即 RNA 結構較複雜則轉譯為蛋白質的效率較差（Kozak, 1998）。根據電腦軟體分析

*Esx1* 轉錄子的 5'-端二級結構後，如附圖三至五所示 b-型 *Esx1* 的 stem-and-loop 構造(約-26.3 kcal/mol)比 a-型 *Esx1* 轉錄子(-8.1 kcal/mol) 複雜，而 x-型轉錄子的 stem-and-loop 構造(約-116.1 kcal/mol) 又更為複雜(以電腦程式分析網址為：<http://www.genebee.msu.su/cgi-bin/nph-ma>)。這些結果或許可以提供有關 b-型的折疊形 RNA 分子是較穩定的型式。另一可能是比較複雜的調控機制，主要是利用不同的啟動子以涉及改變表現的型式，和調控 *Esx1* mRNA 在睪丸及胎盤面臨熱緊迫下的反應。

本論文後半部分著重於初步分析 *Esx1* 基因在生殖細胞中調控轉錄表現的啟動子區域的活性。但是對於決定 *Esx1* 基因表現在生殖細胞或是在胎盤中轉錄子表現的啟動子區域仍待解決。在過去的文獻報導中，選擇性啟動子的利用曾在許多基因中被發現(Ayoubi and van de Ven, 1996)，所以多個啟動子存在於同一基因的目的主要是藉此以調控基因在不同組織中的表現，也是本論文所關心的。過去對 *Esx1* 基因參與生殖細胞基因轉錄作用之 *cis*-acting regulatory elements 的研究尚付之闕如。所以 *Esx1* 基因在睪丸及胎盤中的個別表現也提高了比較雄性生殖細胞及胎盤細胞中相同基因有不同啟動子選擇之可能性。因此本論文利用系列刪剪方式改變啟動子區域進行生殖細胞短暫轉染分析，決定了兩段主要在生殖細胞內可激活基因表現的啟動子區域，分別是核酸

序列-965 至-438 片段及+54 至+227 區域(圖十八及十九)。前段遠端區域在圓形精細胞及初級精母細胞能促進調節 *Esx1* 基因啟動子活性，但是相對的，後段的近端啟動子則可能有抑制性的調節因子存在。有趣的是，遠端的啟動子在精原細胞可能存在有許多抑制性的調節因子(negative regulatory elements)，而近端啟動子區域則可能包含有促進性調節因子(positive regulatory elements)。未來希望能進一步分析可能的調節因子的存在。過去對可能的調節因子的研究主要是以 footprinting 方式加以分析(Ip *et al.*, 2000)。另一方面是利用電腦軟體分析可能的轉錄因子結合區域再進一步進行電泳遲滯分析以證明某些特定區域的可能調節因子(Mori *et al.*, 2003)。未來希望能進而分析調控不同型式的 *Esx1* 表現於胎盤、圓形精細胞、精原細胞及初級精母細胞之啟動子區域或特定轉錄因子結合區域。依所分析的遠端啟動子區域有 SRY 轉錄因子結合區(GCCAACTC)可能是扮演抑制調節角色，SRY 是一哺乳動物 Y-染色體上性別決定基因(Bowles *et al.*, 1999)。本研究發現在 *Esx1* 基因啟動子區域具有 SRY 結合區域，令人感到興趣，後續針對此點則需進一步探討。另外，在近端的啟動子分別包含有 GATA (CCTATAAAA) 可能作為抑制的轉錄調控因子結合區，以及 TATA (CCACTCGG) 可能為正向的轉錄因子結合區。GATA 是一表現於睪丸賽透利細胞的重要基因(Ketola *et al.*, 2000; Lindeboom *et al.*,

2003), GATA 在賽透利細胞的基因表現具有發育階段特殊的角色, 並在生精週期某一階段中作為專一性調節因子 (Lindeboom *et al.*, 2003)。所以, 在本研究已發現 *Esx1* 的近端啟動子區域 GATA 結合區, 然而對於 *Esx1* 在生殖細胞中的表現所參與的機制仍需後續試驗加以瞭解。另外, 在 *Esx1* 的近端啟動子區域的 TATA 結合區似乎扮演正向調控 *Esx1* 表現, 而在初級精母細胞中則可能扮演一負向調控 *Esx1* 因子的角色。而 CREB 參與重要的分子調節機制, 大多數在不同的生精階段, 尤其在 cAMP-dependent 的轉錄調控是圓形精細胞被認為在具調節功能 (Kessler *et al.*, 1998; Stelzer and Don, 2002; Saxlund *et al.*, 2004)。這個結果認同我們的研究發現: *Esx1* 啟動子在睪丸中具組織專一性調控的功能。總而言之, 在本論文中所建立的兩個主要的 *Esx1* 啟動子區域分別是遠端 527-bp 大小及近端 173-bp 大小的片段, 分別可能調控 *Esx1* 基因表現於睪丸生殖細胞中的表現。未來, 將可持續利用此不同區域的啟動子片段, 使其能分別表現於小鼠睪丸或胎盤中, 以進一步探討不同型式的 *Esx1* 對於生精作用及胎盤發育的調控, 尤其是在熱緊迫下的轉錄調控作用。另外, 對於是否能大量誘導一外源性標幟物 (marker) 使其大量表現於 X-精子, 進而加以分離 X-及 Y-精子, 也是未來探討的目標。

## 参考文献

- Aguilar-Mahecha, A., Hales, B. F., and Robaire, B. (2001). Expression of stress response genes in germ cells during spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 65, 119-127.
- Alexander, G., Hales, J. R., Stevens, D., and Donnelly, J. B. (1987). Effects of acute and prolonged exposure to heat on regional blood flows in pregnant sheep. *J. Dev. Physiol.* 9, 1-15.
- Asami-Miyagishi, R., Iseki, S., Usui, M., Uchida, K., Kubo, H. and Morita, I. (2004). Expression and function of *PPARgamma* in rat placental development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 497-501.
- Ayoubi, T. A., and van de Ven, W. J. 1996. Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J.* 10, 453-460.
- Boellmann, F., Guettouche, T., Guo, Y., Fenna, M., Mnayer, L. and Voellmy, R. (2004). DAXX interacts with heat shock factor 1 during stress activation and enhances its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA.* 101, 4100-4105.
- Bowles, J., Cooper, L., Berkman, J., and Koopman, P. (1999). Sry requires a CAG repeat domain for male sex determination in *Mus Musculus*. *Nat. Genet.* 22, 405-408.
- Branford, W. W., Zhao, G. Q., Valerius, M. T., Weinstein, M., Birkenmeier, E. H., Rowe, L. B., and Potter, S. S. (1997). *Spx1*, a novel X-linked homeobox gene expressed during spermatogenesis. *Mech. Dev.* 65, 87-98.
- Burch, J.B.E., and Davis, D.L. (1994). Alternative promoter usage and splicing options result in the differential expression of mRNAs encoding four isoforms of chicken VBP, a member of the PAR subfamily of bZIP transcription factors. *Nuclei Acids Res.* 22, 4733-4741.
- Danno, S., Itoh, K., Matsuda, T. and Fujita, J. (2000). Decreased expression of mouse *Rbm3*, a cold-shock protein, in sertoli cells of cryptorchid

testis. Am. J. Pathol. 156, 1685-1692.

Depping, R., Hägele, S., Wagner, K. F., Wiesner, R. J., Camenisch, C., Wenger, R. H., and Katschinski, D. M. (2004). A dominant-negative isoform of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  specifically expressed in human testis. Biol. Reprod. 71, 331-339.

Dix, D. J., and Hong, R. L. (1998). Protective mechanism in germ cells: stress proteins in spermatogenesis. Adv. Exp. Med. Biol. 444, 137-143.

Dobson, H., and Smith, R. F. (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? Anim. Reprod. Sci. 60-61, 743-752.

Dobson, H., Ghuman, S., Prabhakar, S. and Smith, R. (2003). A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. Reproduction 125, 151-163.

Dobson, H., Tebble, J. E., Smith, R. F. and Ward, W. R. (2001). Is stress really all that important? Theriogenology 55, 65-73.

Eddy, E. M. (2002). Male germ cell gene expression. Recent. Prog. Horm. Res. 57, 103-128.

Ewing, J. F., and Maines, M. D. (1995). Distribution of constitutive (HO-2) and heat-inducible (HO-1) heme oxygenase isozymes in rat testis: HO-2 displays stage-specific expression in germ cells. Endocrinol. 136, 2294-2302.

Fant, M., Weisoly, D. L., Cocchia, M., Huber, R., Khan, S., Lunt, T. and Schlessinger, D. (2002). *PLAC1*, a trophoblast-specific gene, is expressed throughout pregnancy in the human placenta and modulated by keratinocyte growth factor. Mol. Reprod. Dev. 63, 430-436.

Figueiredo, A. L., Salles, M. G., Albano, R. M. and Porto, L. C. (2004). Molecular and morphologic analyses of expression of ESX1L in different stages of human placental development. J. Cell Mol. Med. 8, 545-550.

- Guillemot, F., Nagy, A., Auerbach, A., Rossant, J. and Joyner, A. L. (1994). Essential role of *Mash-2* in extraembryonic development. *Nature* 371, 333-336.
- Han, Z., Chatterjee, D., Early, J., Pantazis, P., Hendrickson, E. A. and Wyche, J. H. (1996). Isolation and characterization of an apoptosis-resistant variant of human leukemia HL-60 cells that has switched expression from Bcl-2 to Bcl-xL. *Cancer Res.* 56, 1621-1628.
- Harikai, N., Tomogane, K., Miyamoto, M., Shimada, K., Onodera, S. and Tashiro, S. (2003a). Dynamic responses to acute heat stress between 34 °C and 38.5 °C, and characteristics of heat stress response in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 701-708.
- Harikai, N., Tomogane, K., Sugawara, T. and Tashiro, S. (2003b). Differences in hyperthalamic *Fos* expressions between two heat stress conditions in conscious mice. *Brain Res. Bull.* 61, 617-626.
- Hirai, K., Sasaki, H., Yamamoto, H., Tanooka, H., Sakamoto, H., Iwamoto, T., Takahashi, T., Terada, M. and Ochiya, T. (2004). HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition. *Exp. Cell Res.* 297, 77-85.
- Ip, Y. C., Lee, W. M., and Hammond, G. L. (2000). The rabbit sex hormone-binding globulin gene: structure organization and characterization of its 5'-flanking region. *Endocrinology* 141, 1356-1365.
- Kessler, S. P., Rowe, T. M., Blendy, J. A., Erickson, R. P., and Sen, G. C. (1998). A cyclic AMP response element in the angiotensin-converting enzyme gene and the transcription factor CREM are required for transcription of the mRNA for the testicular isozyme. *J. Biol. Chem.* 273, 9971-9975.
- Ketola, I., Pentikainen, V., Vaskivuo, T., Ilvesmaki, V., Herva, R., Dunkel, L., Tapanainen, J. S., Toppari, J., and Heikinheimo, M. (2000). Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3925-3931.

- Kilpatrick, D. L., Zinn, S. A., Fitzgerald, M., Higuchi, H., Sabol, S. L., and Meyerhardt, J. (1990). Transcription of the rat and mouse proenkephalin genes is initiated at distinct sites in spermatogenic and somatic cells. *Mol. Cell Biol.* 10: 3717-1726.
- Kozak, M. (1988). Leader length and secondary structure modulate mRNA function under conditions of stress. *Mol. Cell Biol.* 8, 2737-2744.
- Kurabayashi, M., Shibasaki, Y., Komuro, I., Tsuchimochi, H and Yazaki, Y. (1990). The myosin gene switching in human cardiac hypertrophy. *Jpn. Circ. J.* 54, 1192-1202.
- Li, Y., and Behringer, R. R. (1998). *Esx1* is an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. *Nat. Genet.* 20, 309-311.
- Li, Y., Lemaire, P. and Behringer, R. R. (1997). *Esx1*, a novel X chromosome-linked homeobox gene expressed in mouse extraembryonic tissues and male germ cells. *Dev. Biol.* 188, 85-95.
- Lindeboom, F., Gillemans, N., Karis, A., Jaegle, M., Meijer, D., Grosveld, F., and Philipsen, S. (2003). A tissue-specific knockout reveals that *Gata1* is not essential for Sertoli cell function in the mouse. *Nucleic Acids. Res.* 31, 5405-5412.
- Luo, J., Sladek, R., Bader, J. A., Matthyssen, A., Rossant, J. and Giguere, V. (1997). Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor *ERR-beta*. *Nature* 388, 778-782.
- Maiorino, M., Scapin, M., Ursini, F., Biasolo, M., Bosello, V., and Flohe, L., (2003). Distinct promoters determine alternative transcription of *gpx-4* into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. *J. Biol. Chem.* 278, 34286-34290.
- Maiti, S., Doskow, J., Li, S., Nhim, R. P., Lindsey, J. S. and Wilkinson, M. F. (1996). The *Pem* homeobox gene. Androgen-dependent and -independent promoters and tissue-specific alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.* 271, 17536-17546.

- Miao, J., Panesar, N. S., Chan, K. T., Lai F. M. M., Xia, N. S., Wang, Y. B., Johnson, P. J., and Chan, Y. H. (2001) Differential expression of a stress-modulating gene, BRE, in the adrenal gland, in adrenal neoplasia, and in abnormal adrenal tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 491-499.
- Mieusset, R. and Bujan, L. (1995). Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Intl. J. Androl.* 18, 169-184.
- Morasso, M. I., Grinberg, A., Robinson, G., Sargent, T. D. and Mahon, K. A. (1999). Placental failure in mice lacking the homeobox gene *Dlx3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 162-167.
- Mori, D., Okuro, N., Fujii-Kuriyama, Y., and Sogawa, K. (2003). Gene structure and promoter analysis of the rat BTEB2 gene. *Gene* 304, 163-170.
- Nakai, A., Suzuki, M. and Tanabe, M. (2000). Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J.* 19, 1545-1554.
- Nepomnaschy, P. A., Welch, K., McConnell, D., Strassmann, B. I. and England, B. G. (2004). Stress and female reproductive function: a study of daily variations in cortisol, gonadotrophins, and gonadal steroids in a rural Mayan population. *Am. J. Hum. Biol.* 16, 523-532.
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H. P. and Ron, D. (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* 22, 1180-1187.
- Ohlsson, R., Falck, P., Hellstrom, M., Lindahl, P., Bostrom, H., Franklin, G., Ahrlund-Richter, L., Pollard, J., Soriano, P. and Betsholtz, C. (1999). PDGFB regulates the development of the labyrinthine layer of the mouse fetal placenta. *Dev. Biol.* 212, 124-136.
- Ohta, H., Aizawa, S. and Nishimune, Y. (2003). Functional analysis of *p53* gene in apoptosis induced by heat stress or loss of stem cell factor signaling in mouse male germ cells. *Biol. Reprod.* 68, 2249-2254.

- Parr, B. A., Cornish, V. A., Cybulsky, M. I. and McMahon, A. P. (2001). Wnt7b regulates placental development in mice. *Dev. Biol.* 237, 324-332.
- Ptushkina, M., Malys, N., and McCarthy, J. E. (2004). *eIF4E* isoform 2 in *Schizosaccharomyces Pombe* is a novel stress-response factor. *EMBO Rep.* 5, 311-316.
- Rasoulpour, R. J., Schoenfeld, H. A., Gray, D. A. and Boekelheide, K. D. A. (2003). Expression of a *k48R* mutant ubiquitin protects mouse testis from cryptorchid injury and aging. *Am. J. Pathol.* 163, 2595-2603.
- Rockett, J. C., Mapp, F. L., Garges, J. B., Luft, J. C., Mori, C. and Dix, D. J. (2001). Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol. Reprod.* 65, 229-239.
- Saxlund, M. A., Sadler-Riggleman, I., and Skinner, M. K. (2004). Role of basic helix-loop-helix (bHLH) and CREB transcription factors in the regulation of sertoli cell androgen-binding protein expression. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 269-278.
- Senoo, M., Hoshino, S., Mochida, N., Matsumura, Y. and Habu, S. (2002). Identification of a novel protein *p59<sup>scr</sup>*, which is expressed at specific stages of mouse spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 992-998.
- Shepherd, C. E., Bowes, S., Parkinson, D., Cambray-Deakin, M. and Pearson, R. C. (2000). Expression of amyloid precursor protein in human astrocytes *in vitro*: isoform-specific increases following heat shock. *Neuroscience* 99:317-325.
- Singh, U., Fohn, L. E., Wakayama, T., Ohgane, J., Steinhoff, C., Lipkowitz, B., Schulz, R., Orth, A., Ropers, H. H., Behringer, R. R., Tanaka, S., Shiota, K., Yanagimachi, R., Nuber, U. A. and Fundele, R. (2004). Different molecular mechanisms underlie placental overgrowth phenotypes caused by interspecies hybridization, cloning, and *Esx1* mutation. *Dev. Dyn.* 230, 149-164.

- Sonna, L. A., Fujita, J., Gaffin, S. L., and Lilly, C. M. (2002). Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 92, 1725-1742.
- Stelzer, G., Don, J. (2002). Atce1: a novel mouse cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element-binding protein-like gene exclusively expressed in postmeiotic spermatids. *Endocrinology* 143, 1578-1588.
- Tomascik-Cheeseman, L. M., Coleman, M. A., Marchetti, F., Nelson, D. O., Kegelmeyer, L. M., Nath, J. and Wyrobek, A. J. (2004). Differential basal expression of genes associated with stress response, damage control, and DNA repair among mouse tissues. *Mutat. Res.* 561, 1-14.
- van der Velden, A. W., and Thomas, A. A. (1999). The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 87-106.
- Vatnick, I., Ignatz, G., McBride, B. W. and Bell, A. W. (1991). Effect of heat stress on ovine placental growth in early pregnancy. *J. Dev. Physiol.* 16, 163-166.
- Wilson, M. E. (2002). Role of placental function in mediating conceptus growth and survival. *J. Anim. Sci.* 80, E195-E201.
- Yan, Y. T., Stein, S. M., Ding, J., Shen, M. M. and Abate-Shen, C. (2000). A novel PF/PN motif inhibits nuclear localization and DNA binding activity of the *Esx1* homeoprotein. *Mol. Cell Biol.* 20, 661-671.
- Yeh, Y. C., Yang, V. C., Huang, S. C. and Lo, N. W. (2005). Stage-dependent expression of extraembryonic tissue-spermatogenesis-homeobox gene 1 (ESX1) protein; a candidate marker for X chromosome-bearing sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 447-455.
- Zavolan, M., Kondo, S., Schonbach, C., Adachi, J., Hume, D. A., Hayashizaki, Y., Gaasterland, T.; RIKEN GER Group, GSL Members,

HAYASHIZAKI Y and GAASTERLAN. (2003). Impact alternative initiation, splicing, and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome. *Genome Res.* 13, 1290-1300.

## 表目錄

表一、以向上游動技術分離後的精子其 X-及 Y-精子的分佈比例

表二、*Esx1* RNA 以及 ESX1 蛋白質的相對表現量

表一、以向上游動技術分離後的精子其X-及Y-精子的分佈比例  
(平均值±S.E.M)

處理方式	X-精子	Y-精子	
未處理 (n=4)	49.9±2.0	50.1±2.0	NS
向上游動技術 (n=4)	46.7±3.3	53.3±3.3	NS

註、NS 表示X-與Y-精子比例沒有顯著差異

表二、 *Esx1* RNA以及ESX1蛋白質的相對表現量

處理方式		<i>Esx1</i> mRNAs		ESX1 protein
		a-form (%)	x-form (%)	
正常睪丸 (週齡)	6	81.9±1.1	ND	+++
	12	100±0.5	ND	+++
	18	45.9±0.5	ND	++
隱睪睪丸 (週齡)	6	ND	69.8±0.4	+++
	12	ND	43.8±0.5	++
	18	ND	35.5±0.5	+
受熱處理睪丸 (小時)	0	98.5±0.4	1.5±0.2	+++
	1	84.9±0.1	3.6±0.1	+++
	2	44.3±0.1	8.8±0.1	++
	4	6.7±0.1	6.0±0.1	-

ND: non-detected

+++ : Strong ESX1 expression was observed (over 60% relative expression to Actin)

++ : High ESX1 expression was observed (under 60% yet above 30% relative expression to Actin)

+ : Rare ESX1 expression was observed (under 30% relative expression to Actin)

- : No ESX1 expression was observed (less than 10% relative expression to Actin)

## 圖目錄

圖一、ESX1 在胎盤及睪丸的分佈。

圖二、以免疫螢光顯微鏡法分析 ESX1 在睪丸發育過程中的空間及時間表現。

圖三、共軛焦顯微鏡圖片顯示在隱睪睪丸中 ESX1 表現量下降。

圖四、SRY 專一表現在睪丸中。

圖五、ESX1 及 SRY 分別表現在小鼠精子中。

圖六、三個不同型式的 *Esx1* mRNAs 代表圖。

圖七、*Esx1* 在正常睪丸及隱睪睪丸之不同表現。

圖八、ESX1 在六及十二週齡的正常睪丸及隱睪睪丸組織中之表現圖。

圖九、以定量 rt-PCR 及特定專一性 RT-PCR 分析法分析 *Esx1* mRNA 表現量在受到熱緊迫的睪丸中下降。

圖十、觀察正常對照組睪丸及暴露在 37°C 4 小時的小鼠睪丸之精細管形態及分析 ESX1 的表現。

圖十一、以 TUNEL 法分析正常及熱處理 4 小時的睪丸生殖細胞的細胞凋亡作用。

圖十二、*Esx1* mRNA 在發育中胎盤的表現。

圖十三、*Esx1* 轉錄子在受熱緊迫處理胎盤中的相對表現量。

圖十四、*Esx1* 轉錄子在小鼠受嚴重熱緊迫處理胎盤中的相對表現量。

圖十五、以蘇木精及伊紅染色觀察正常對照組(25°C)及小鼠暴露於 37°C 1 小時的小鼠胎盤組織形態。

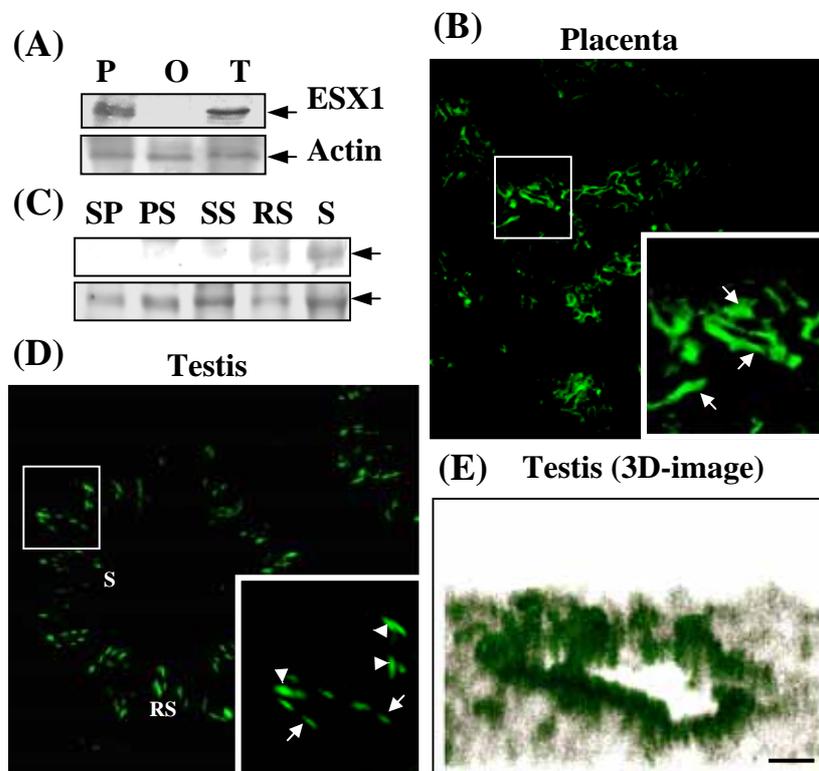
圖十六、共軛焦距顯微鏡圖片顯示在懷孕小鼠以 37°C 處理 1 小時後胎盤組織中 ESX1 的表現量。

圖十七、分析小鼠 *Esx1* 基因 5'-端 DNA 片段在雄性生殖細胞中的轉錄活性。

圖十八、分析八個系列截段的 p*Esx1*-Luc DNA 轉染至雄性生殖細胞的轉錄活性。

圖十九、*Esx1* 基因主要啟動子區域在雄性生殖細胞中的調控區域示意圖。

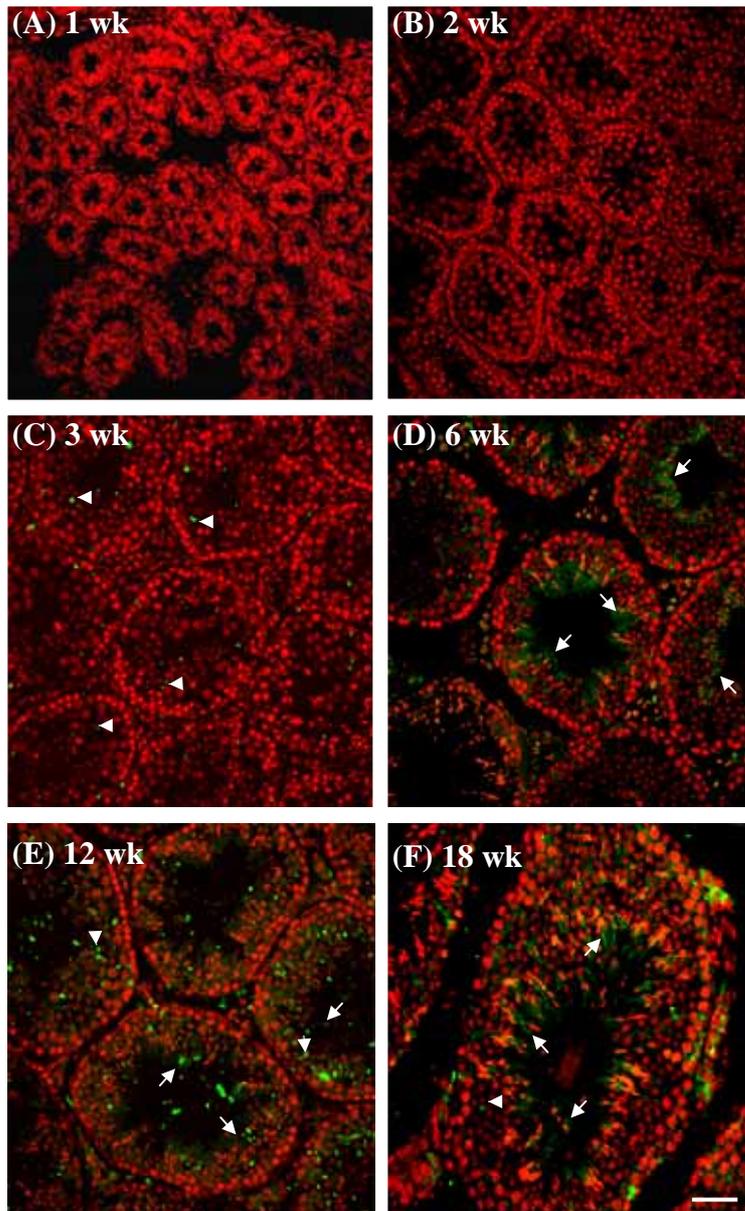
圖二十、以 TRANSFAC™-6.0 軟體預期遠端 *Esx1* 啟動子區域(nt -965 至-438) 及近端啟動子區域 (nt +54 至+227) 中主要的轉錄因子結合區。



圖一、ESX1在胎盤及睪丸的主要分佈圖。

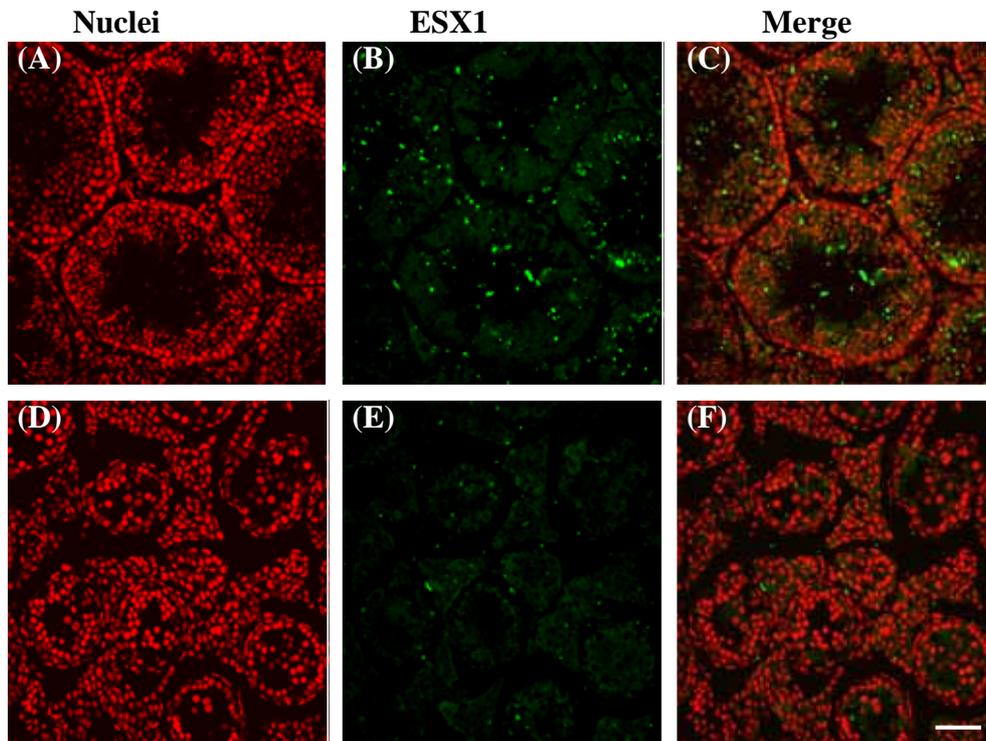
以西方點墨分析小鼠 ESX1表現在胎盤、睪丸及精細胞中（圖 A 及 C 的上列以箭頭指示ESX1）。Actin 作為相對等量蛋白質對照（下列以箭頭指示Actin）。

”P”、”O”、”T”、”SP”、”PS”、”SS”、”RS”及”S”分別代表胎盤、卵巢、睪丸、精原母細胞、初級精母細胞、次級精母細胞、圓形精細胞及精子。圖 B 及 D 代表以共軛焦顯微鏡觀察 ESX1 表現在懷孕第十四天的胎盤及第十二週齡的睪丸組織切片中。圖 B 表示以較低倍率觀察 ESX1 在胎盤的迷路層細胞表現位置。右下角的圖片代表圖 B 框線區域的放大兩倍圖。在睪丸中，較高倍率的區域(右下角)顯示圓形精細胞(箭頭所示)及精細胞(箭頭尖端所示)在核中有許多綠色螢光訊號為ESX1表現的位置(圖 D)。圖 E 表示由上往下看的 3D 共軛焦聚圖片顯示 ESX1 (綠色螢光所示) 主要分佈在精細管的管腔區域。量尺，25  $\mu\text{m}$ 。

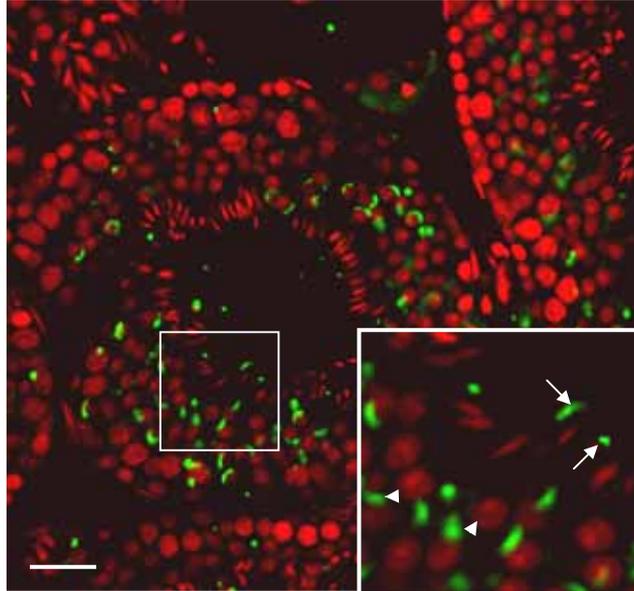


圖二、以免疫螢光顯微鏡法分析 ESX1 在睪丸發育過程中的空間及時間表現圖。

1 (圖A)、2 (圖B)、3 (圖C)、6 (圖D)、12 (圖E) 及 18 (圖F) 週齡的小鼠睪丸進行組織切片。綠色螢光指示 ESX1 的表現位置，紅色代表以 PI 染色的細胞核對照區域。較強的 ESX1 表現主要分佈於圓形精細胞 (箭頭尖端所示) 及精子 (箭頭所示)。量尺，25  $\mu\text{m}$ 。

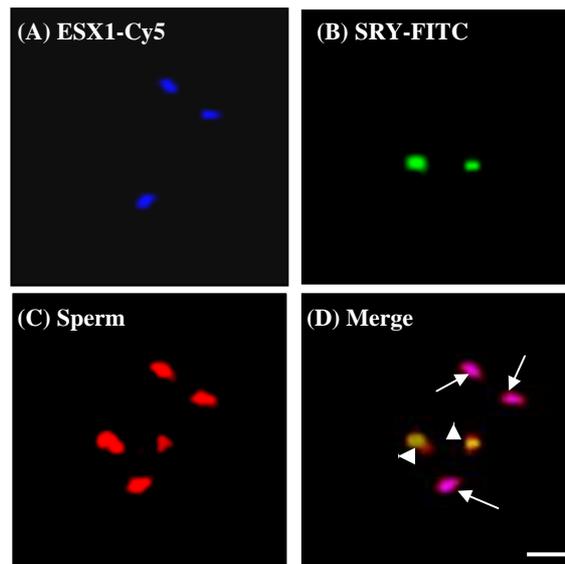


圖三、共軛焦顯微鏡圖片顯示在隱睪睪丸中 ESX1 表現量下降。綠色螢光指出 ESX1 的分佈區域(圖 A 及 D)。紅色代表睪丸切片以 PI 染色的細胞核對照區域(圖 B 及 E)。圖 C 及 F 分別是圖 A 及 B、圖 D 及 E 的重疊影像圖。ESX1 在隱睪睪丸中(如圖 B 所示)比正常睪丸中(如圖 E 所示)。量尺，25  $\mu\text{m}$ 。



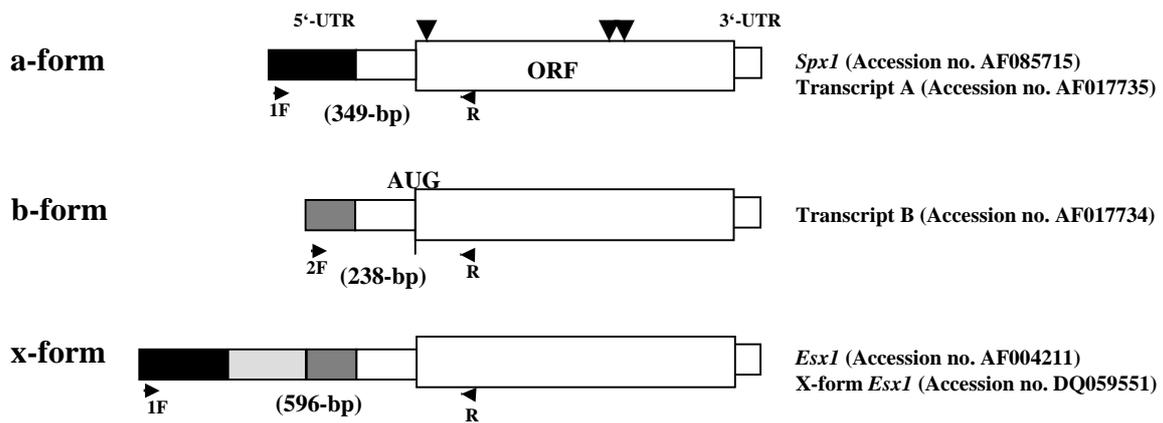
**圖四、SRY 專一表現在睪丸中。**

共軛焦顯微鏡圖片顯示 SRY 表現在睪丸組織切片中。低倍率圖片顯示 SRY 表現在部分精細胞及賽托利細胞中。右下角的圖示是框線區域的兩倍放大。較強的 SRY 訊號(綠色螢光所示)主要表現在賽托利細胞(箭頭尖端所示)及精子中(箭頭所示)。量尺，25  $\mu\text{m}$ 。



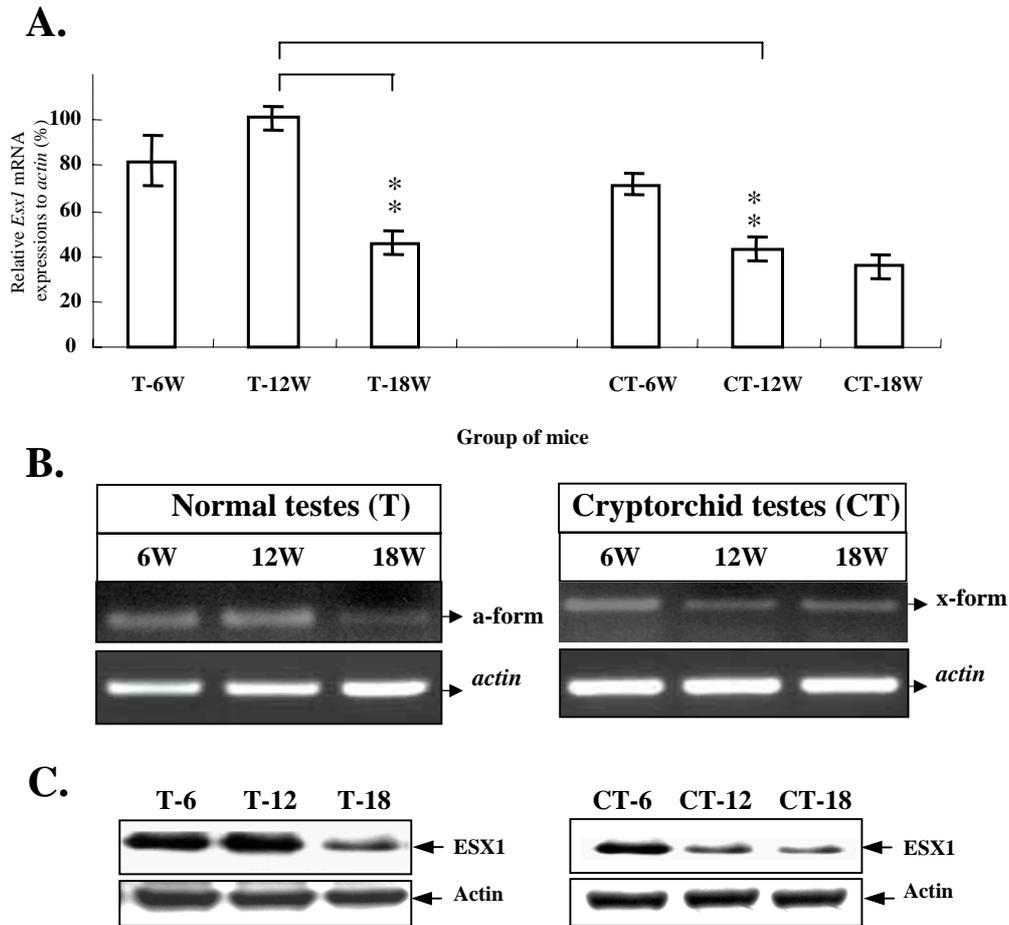
**圖五、ESX1 及 SRY 分別表現在小鼠精子中**

藍色及綠色螢光分別代表 ESX1 及 SRY 的分佈區域(圖 A 及 B)；圖 C 中紅色訊號代表以 PI 染精子細胞核的結果(箭頭尖端)，圖 D 代表 ESX1 及 SRY 在精子核的分佈圖。量尺，25  $\mu\text{m}$ 。



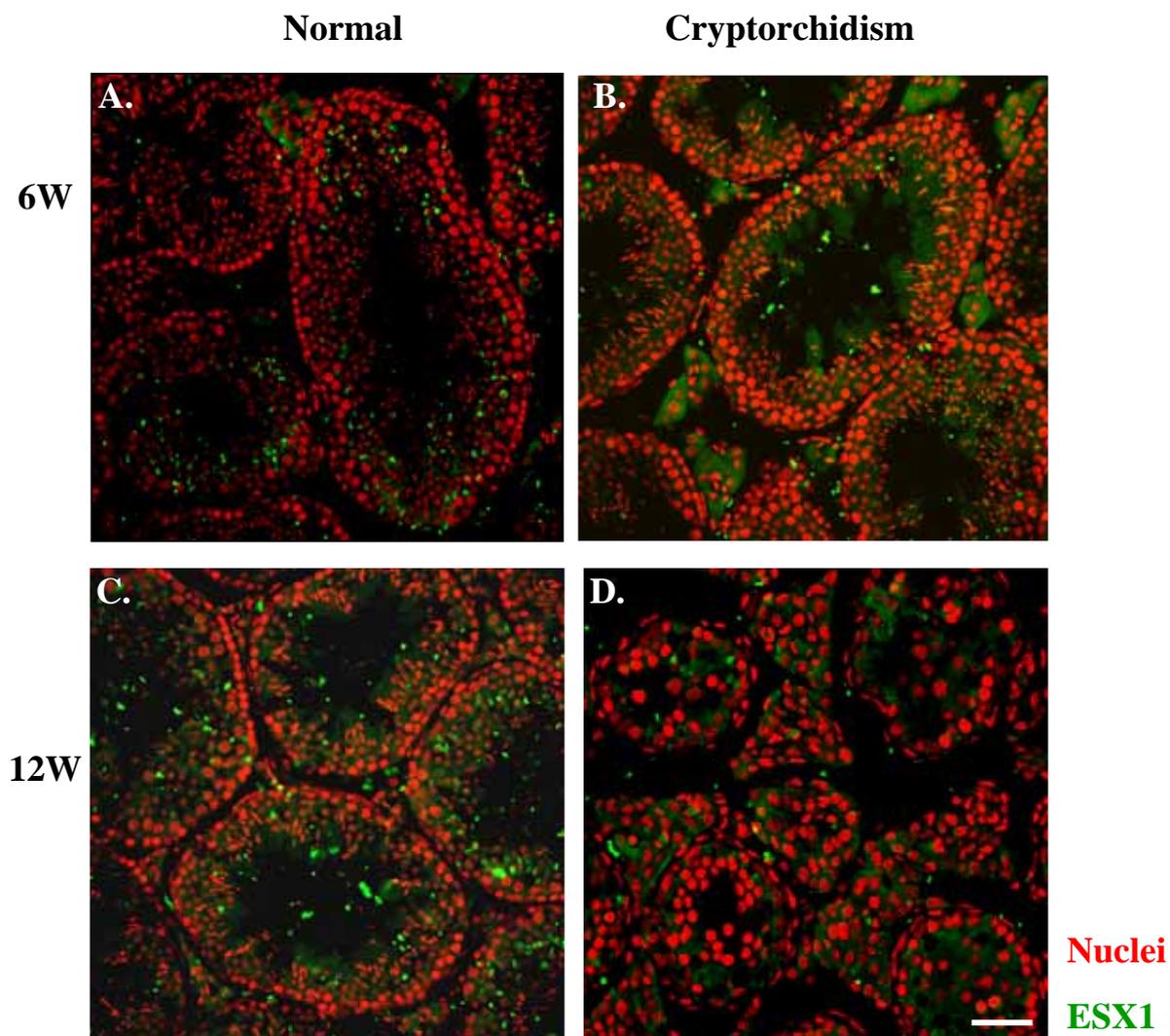
圖六、三個不同型式的 *Esx1* mRNAs 代表圖。

此三個不同型式的 *Esx1* mRNAs 具有相同的開放讀碼區 (寬的空白區域代表 open reading frame, ORF)。窄的區域代表 5'-端的未轉譯區 (untranslated region, UTR)。箭頭尖端代表內插子 (intron) 及外插子 (exon) 的交界。本圖的區域間隔不依比例表示。引子對 1F、2F 及 R 代表進行表現型專一性 RT-PCR 分析法反應的引子位置。



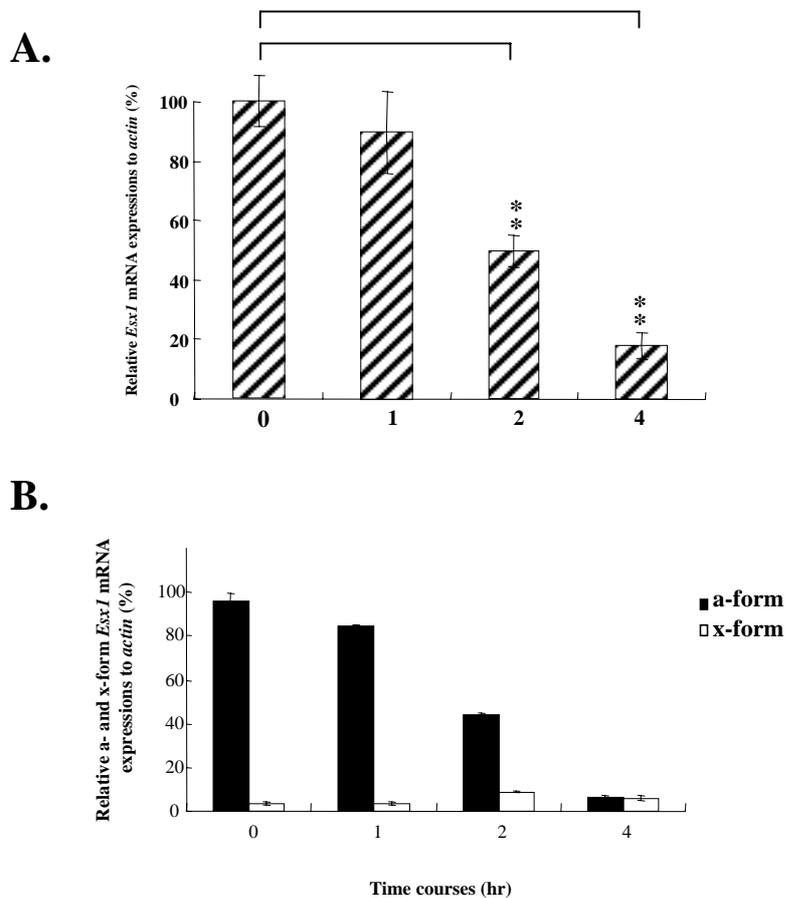
圖七、*Esx1* 在正常睪丸及隱睪睪丸之不同表現。

圖 A 是以定量 rt-PCR 法分析 *Esx1* mRNA 在正常對照組及隱睪睪丸中 (第六、十二及十八週齡的小鼠) 之相對於 *actin* 的表現量統計圖。\*\*\*代表  $p < 0.01$ 。圖 B 代表以 a-型異構特殊性 RT-PCR 分析法分析 a- 及 x- 型 *Esx1* 的特定表現。以箭頭指出 a- 及 x- 型 *Esx1* 的片段 (分別是 349-bp 及 596-bp 大小)。Actin 代表各組織的相對 RNA 表現量。T 代表正常對照組睪丸。圖 C 代表以西方點墨分析法分析 ESX1 的表現。T-6、T-12 及 T-18 分別代表第 6、12 及 18 週齡的小鼠睪丸組織。CT 代表隱睪睪丸，CT-6、CT-12 及 CT-18 分別代表小鼠於第四週齡進行隱睪手術後，分別生長至第 6、12 及 18 週齡小鼠的睪丸組織。



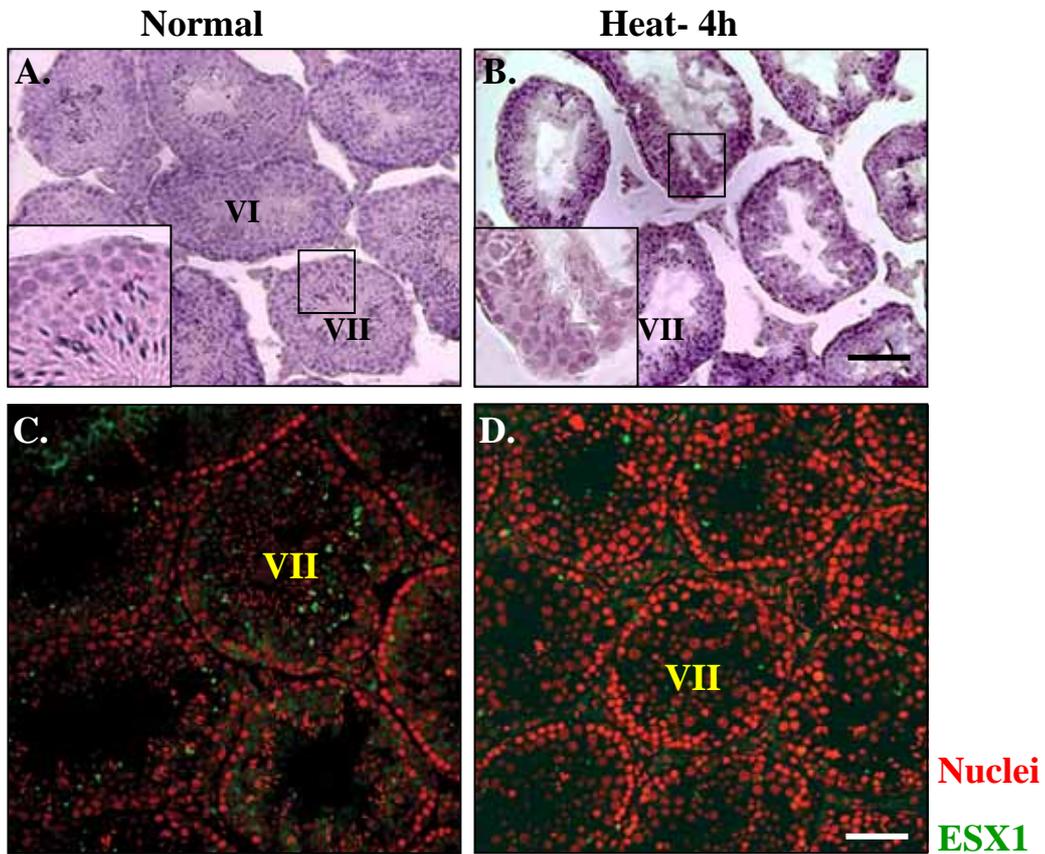
圖八、ESX1 在六及十二週齡的正常睪丸及隱睪睪丸組織中之表現圖。

紅色訊號代表在睪丸切片中以 PI 進行核染色分析結果。綠色訊號指出ESX1 分佈的位置。圖中正常的睪丸取自 (A) 第六及 (C) 十二週齡的小鼠。隱睪睪丸取自隱睪手術後 (B) 第六及 (D) 十二週齡大的睪丸。ESX1在正常十二週齡小鼠睪丸中表現量比六週齡小鼠睪丸高。而十二週齡的隱睪睪丸中ESX1表現量下降。量尺是50  $\mu\text{m}$ 。



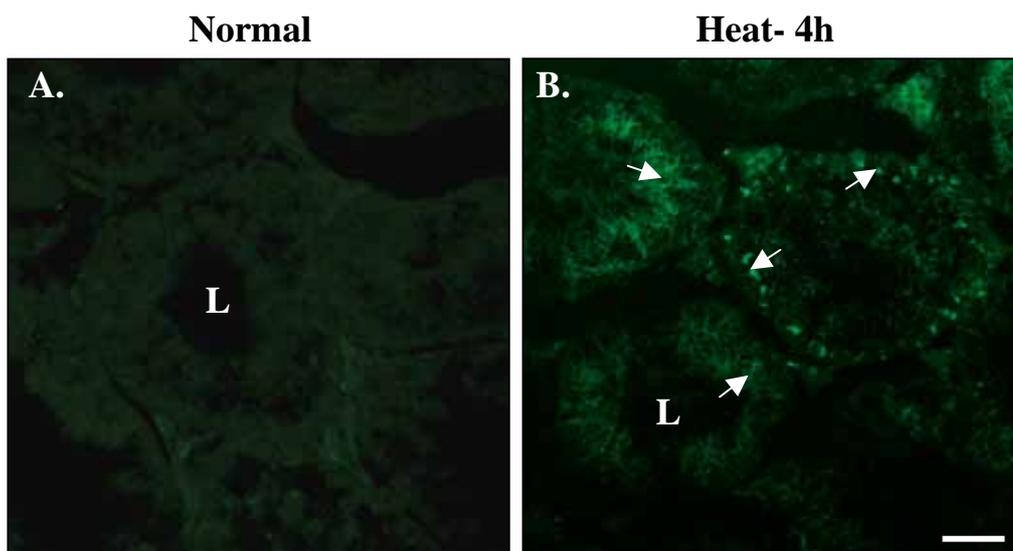
圖九、以定量 rt-PCR 及特定專一性 RT-PCR 分析法分析 *Esx1* mRNA 表現量在受到熱緊迫的睪丸中下降。

總RNA 分別取自對照組睪丸及分別以 37°C 熱緊迫處理 1、2 或 4 小時後的睪丸。圖 A 表示 *Esx1* mRNA 以定量 rt-PCR 分析後對照於 *actin* 的表現量。圖 B 以半定量式專一性表現 RT-PCR 分析後的產物以箭頭分別表示 x- 及 a- 型轉錄子的片段。*Actin* 代表 RNA 表現量的對照。\* 代表  $p < 0.01$ 。其值是相對於對照組 (0 小時) 的數值。圖 B 代表以特定專一性分析法分析 *Esx1* 轉錄子在睪丸中的表現。■ 及 □ 分別代表 a- 及 x- 型 *Esx1* mRNA 相對於 *actin* 的個別表現量。



圖十、觀察正常對照組睪丸及暴露於 37 °C 熱緊迫 4 小時的小鼠睪丸的精細管形態及分析 ESX1 的表現。

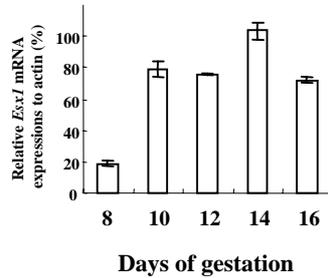
圖 A 及 B 是以蘇木精及伊紅進行睪丸組織切片染色結果。受熱緊迫 4 小時的生精細管管腔變大，精子量變少。量尺是 100  $\mu\text{m}$ 。圖 C 及 D 的綠色訊號顯示 ESX1 的分佈。紅色訊號代表以 PI 進行睪丸切片核染色分析結果。VII 代表生精細管中精子發育階段。ESX1 與正常睪丸相同階段的熱處理後的睪丸生精細管中的表現量明顯降低。量尺是 50  $\mu\text{m}$ 。



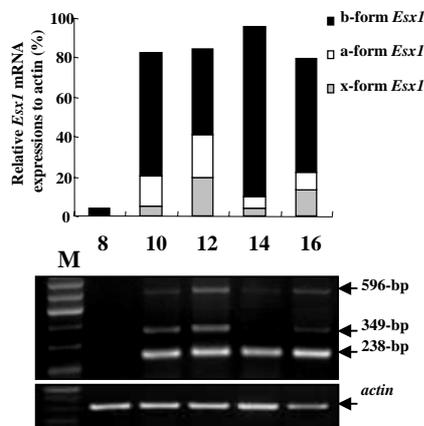
圖十一 以 TUNEL 法分析正常及熱處理 4 小時的睪丸生殖細胞的細胞凋亡作用。

圖 A 顯示在正常八週齡小鼠睪丸中沒有任何 TUNEL 染色訊號。圖 B 綠色螢光代表 37°C 處理 4 小時後睪丸生殖細胞核中的 DNA 斷裂片段。量尺為 25  $\mu\text{m}$ 。

A.



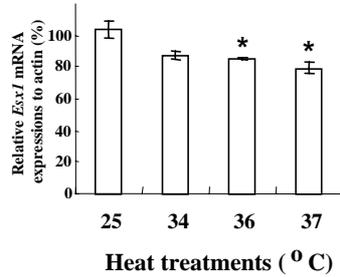
B.



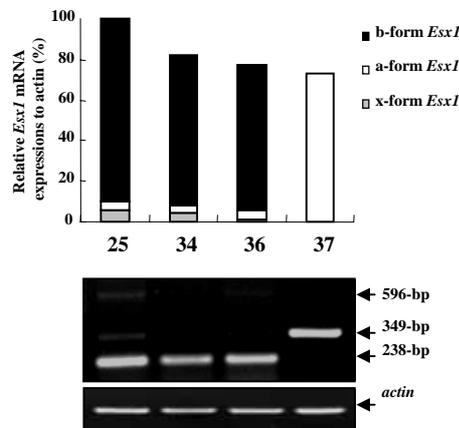
圖十二、*Esx1* mRNA在發育中胎盤的表現。

RNA 分別取自懷孕第8、10、12、14及16天的小鼠胎盤組織。圖A表示以定量 rt-PCR 分析 *Esx1* mRNA 對照於 *actin* 的表現量統計圖。圖 B 以不同型式專一表現 RT-PCR 分析法擴增的產物片段。以箭頭分別表示 596-、349-及 238-bp 大小。*Actin* 代表 RNA 表現量的對照。上圖代表 a-、b- 及 x- 型 *Esx1* 相對於 *actin* 的個別表現量統計圖。

A.



B.

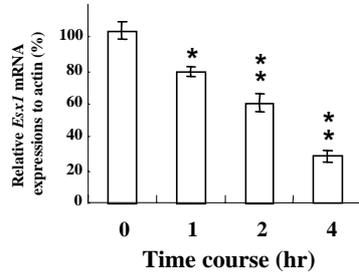


圖十三、*Esx1* 轉錄子在小鼠受熱緊迫處理後胎盤中的相對表現量。

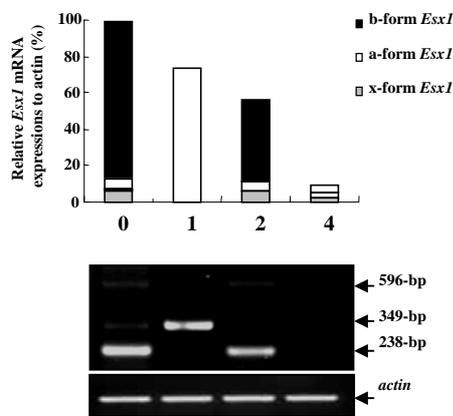
RNA 分別取自懷孕第14天的小鼠胎盤分別以34、36或37 °C熱緊迫處理一小時。圖A表示 *Esx1* mRNA以定量 rt-PCR分析後對照於 *actin* 的表現量統計圖。圖B以專一表現 RT-PCR分析後的產物以箭頭分別表示 596-、349-及 238-bp大小。Actin 代表 RNA 表現量的對照。上圖代表 a-、b- 及 x- 型 *Esx1* mRNA 相對於 *actin* 的個別表現量統計圖。

\* 代表  $p < 0.05$ ；\*\* 代表  $p < 0.01$ 。其值是相對於對照組 (25 度) 的數值。

A.

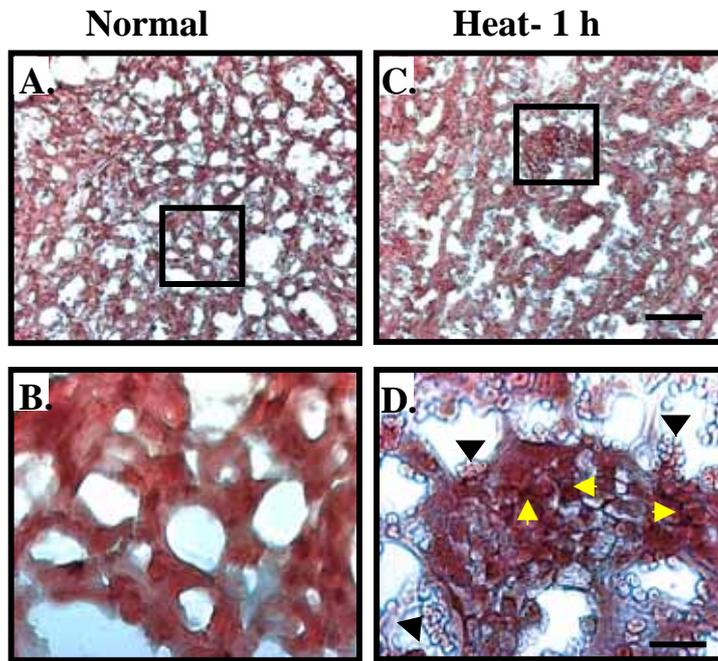


B.



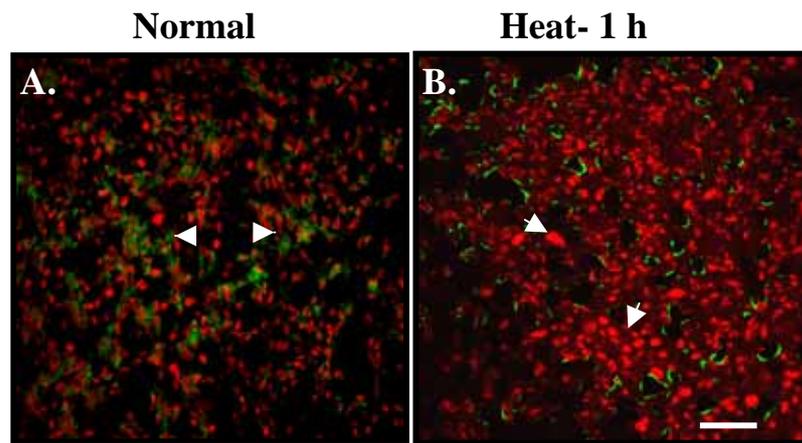
圖十四、*Esx1* 轉錄子在小鼠受嚴重熱緊迫處理後胎盤中的相對表現量。

RNA 分別取自懷孕第14天的胎盤 分別在 37 °C 的熱緊迫處理下處理 1、2 及 4 小時。圖 A 表示 *Esx1* mRNA 以定量 rt-PCR 分析後對照於 *actin* 的表現量統計圖。圖 B 以專一表現 RT-PCR 分析後的產物以箭頭分別表示 596-、349-及 238-bp 大小。Actin 代表 RNA 表現量的對照。上圖代表 a-、b- 及 x- 型 *Esx1* mRNA 相對於 *actin* 的個別表現量統計圖。\* 代表  $p < 0.05$ ；\*\* 代表  $p < 0.01$ 。其值是相對於對照組 (25 °C) 的數值。



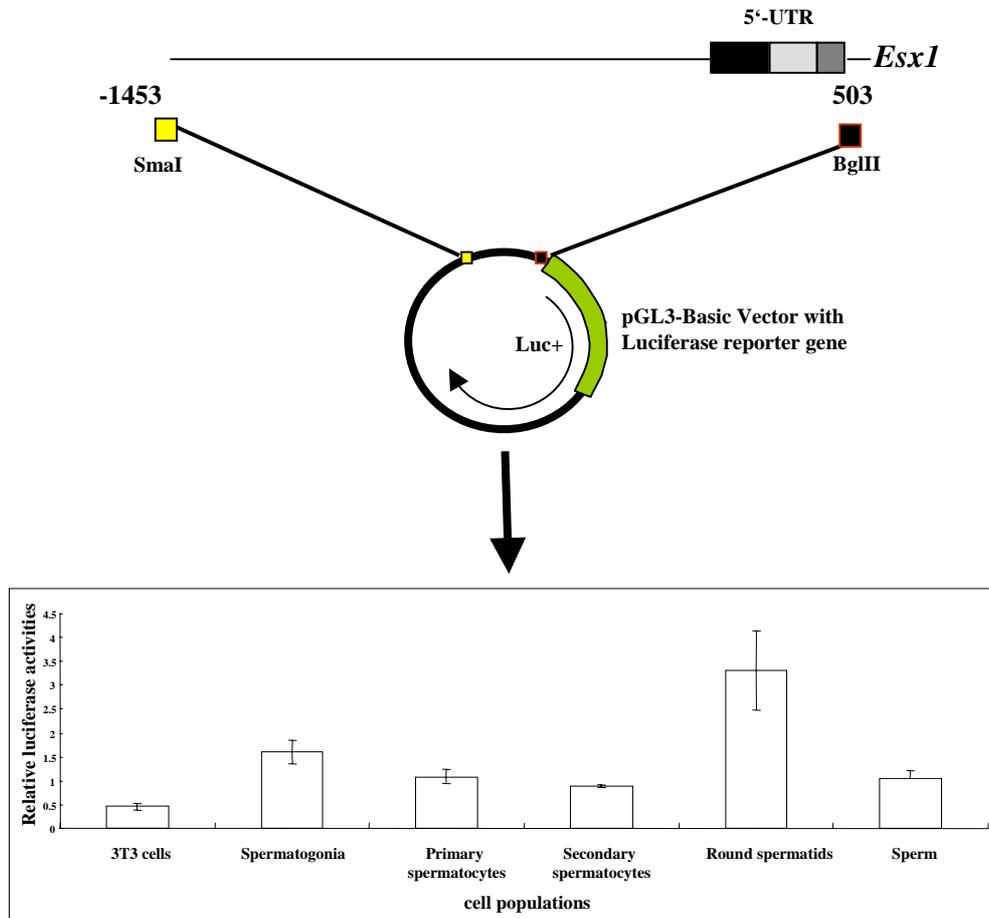
圖十五、以蘇木精及伊紅染色觀察正常對照組 (25°C) 及小鼠暴露於 37 °C 熱緊迫 1 小時的胎盤組織形態。

圖 A 是正常小鼠懷孕第 14 天的胎盤組織切片。可以看到胎盤迷路層細胞規則排列。圖 B 代表圖 A 中框線區域的放大四倍圖。圖 C 是懷孕第 14 天小鼠以熱緊迫處理 1 小時的胎盤組織形態圖。許多血球及細胞堆積在迷路層。圖 D 是圖 C 的框線區域放大四倍圖，黃色箭頭尖端代表不正常堆積的細胞。黑色箭頭尖端指示紅血球堆積區域。圖 A 及 B 的量尺是 50  $\mu\text{m}$ 。圖 C 及 D 的量尺是 12.5  $\mu\text{m}$ 。



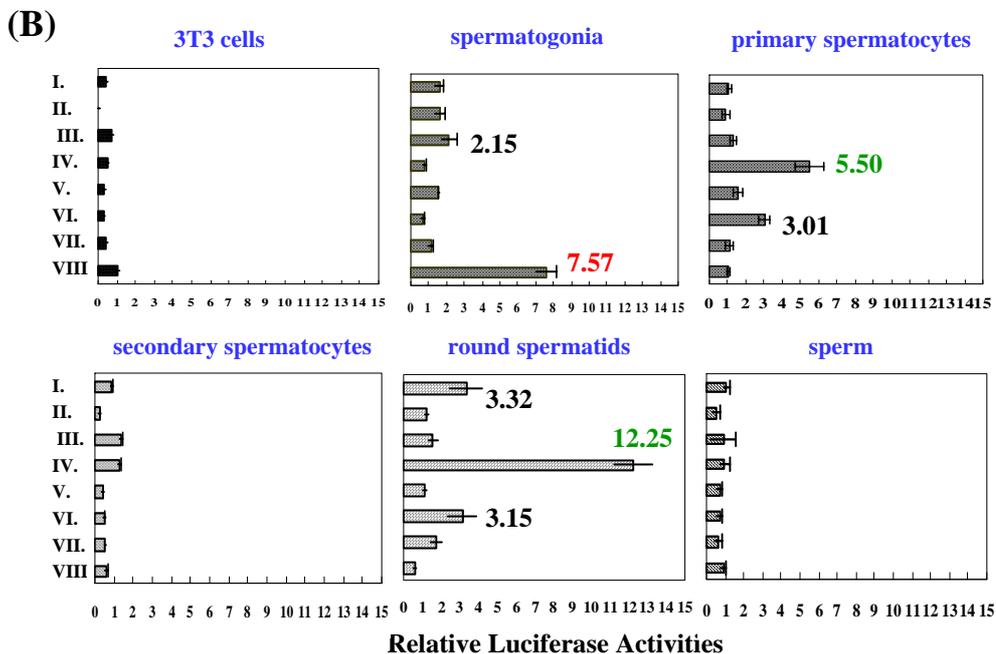
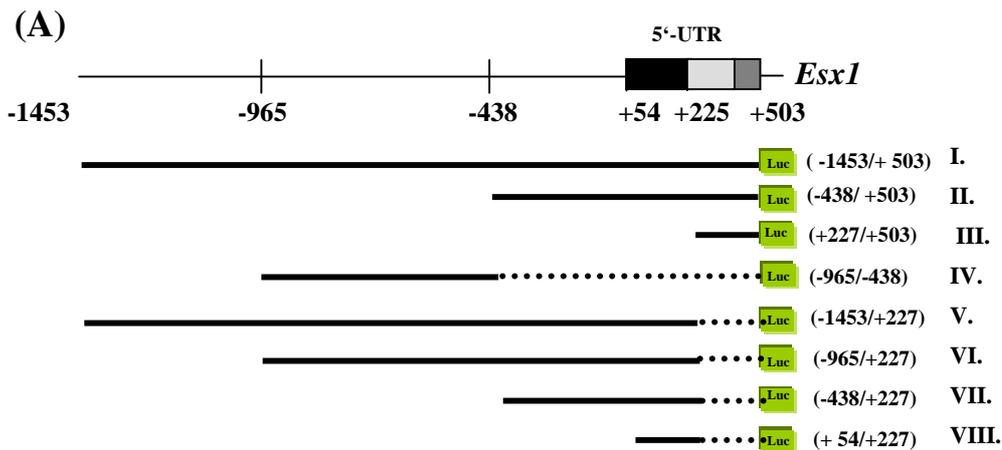
圖十六、共軛焦距顯微鏡圖片顯示懷孕小鼠以37°C熱緊迫處理1小時後胎盤組織中ESX1的表現量。

圖A代表以ESX1抗血清在懷孕第十四天的小鼠胎盤組織切片進行免疫螢光顯微鏡分析結果。紅色螢光訊號代表以PI進行細胞核對照染色位置，綠色螢光代表ESX1的分佈區域（箭頭尖端所示）。圖B表示懷孕母鼠以熱處理1小時的胎盤組織切片進行免疫染色的結果。白色箭頭代表不正常細胞堆積的區域。ESX1表現量在部分迷路層細胞中仍能維持表現量。量尺為25  $\mu\text{m}$ 。



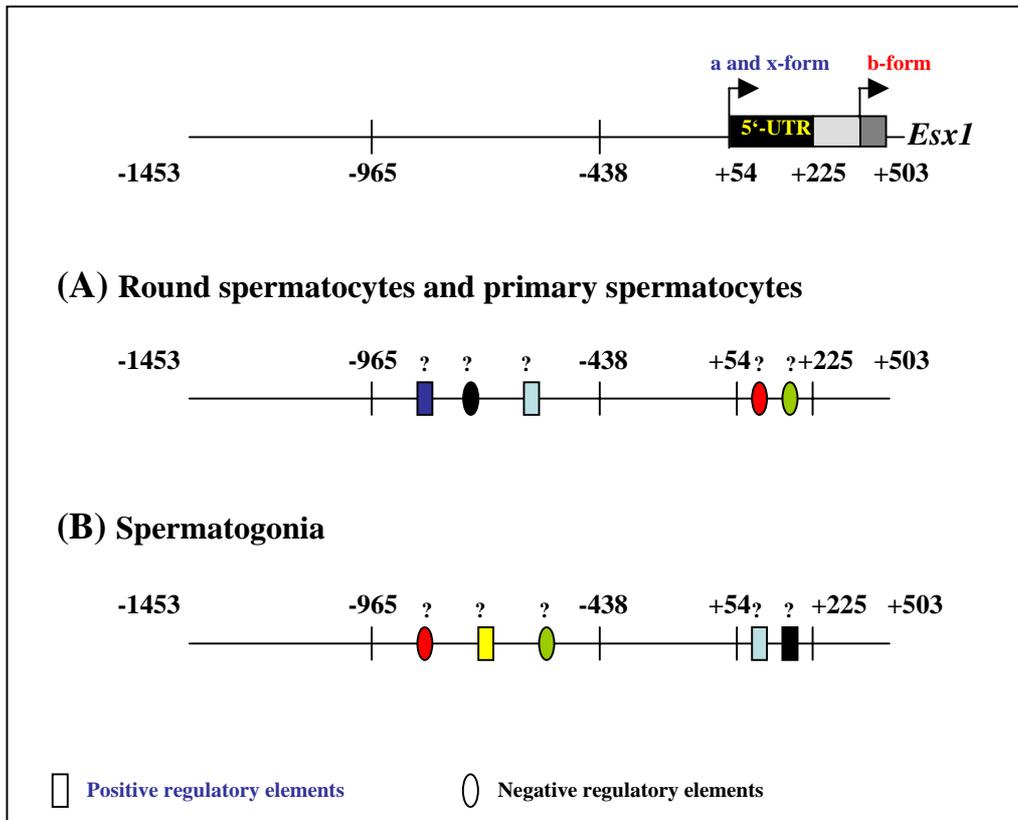
圖十七、分析小鼠 *Esx1* 基因 5'-端 DNA 片段在雄性生殖細胞中的轉錄活性。

圖示整個 *Esx1* 基因之 5'-端調節區域及非轉譯區 (由 DNA 序列 -1453 至 +503, 分別以 *SmaI* 及 *BglIII* 限制酶切割) 連接至含冷光酵素報導基因的載體 (pGL3-Basic Vector) 後, 將構築物分別轉染至體細胞 3T3 細胞以及分離後的生殖細胞; 包括精原細胞、初級精母細胞、次級精母細胞、圓形精細胞及精子。此 2-kb 大小的啟動子片段所進行的分析試驗共重複三次。冷光酵素活性分析結果是以此構築的片段轉染結果減去以 pGL3-Basic 轉染結果後再除以以 pGL3-Control 轉染結果的相對倍數。統計結果以平均值  $\pm$  S.E.M. 表示。



圖十八、分析八個serial deletion的 *EsxI*-Luc DNA轉染至雄性生殖細胞的轉錄活性。

圖 A 為 *EsxI* 啟動子區域 (nt -1453至+503) 以 PCR 方式進行系列刪剪 (serial deletion) 後分別以 *SmaI* 及 *BglIII* 限制酶切割連接至螢光報導基因的區域 (分別是nt -1453/+503, -438/+503, +227/+503, -965/-438, -1453/+227, -965/+227, -438/+227, +54/+227)。圖 B 表示分別轉染至體細胞 3T3 細胞及分離後的雄性生殖細胞的結果。冷光酵素活性分析結果是以此構築的片段轉染結果減去以 pGL3-Basic 轉染結果後再除以以 pGL3-Control 轉染結果的相對倍數。統計結果以平均值 ± S.E.M. 表示。本試驗共重複三次。



圖十九、*Esx1* 基因主要啟動子區域在雄性生殖細胞中的調控區域示意圖。

上圖表示整個 *Esx1* 基因之5'-端調節區域及非轉譯區域 (nt -1453 至 +503)。箭頭代表轉錄起始點。圖 A 表示遠端 *Esx1* 啟動子區域 (nt -965至-438) 在圓形精細胞及初級精母細胞中可能存在的轉錄調節因子；以及近端 *Esx1* 啟動子區域 (nt +54至+225) 中可能存在的負向轉錄調節因子(negative regulatory elements)。圖 B 表示遠端 *Esx1* 啟動子區域在精原細胞中可能存在的轉錄調節因子；以及近端 *Esx1* 啟動子區域中可能存在的正向轉錄調節因子(positive regulatory elements)。

- (A) -957 TCCTTTATAG TAAGCCGGTT CGTCCCAAA AATTACAACG CTCTAGAAGT  
TATA  
-907 ATTTGAAGAG GCATAAAGGG TTTCTTGCAAGGTGCCGTCCTACTTGCGC  
-857 CTGTGTCACC CCAAAGACGC TGCTGAGTTT GTTGCAAAG CCAACTCACT  
SRY  
-807 ACGTTCTGGG AAAGCTTTGG GAACCAACTC AAGCTCGAA A AGCTGGCCT  
CEBPB  
-757 TGTTGGCTTC CAGCACTTGG GAGGCAGCGG CAAGCAAGAG ATCTCTAAG  
GATA  
-707 TTCGAGGCCA GCACACTCTA CGGTGTGTGT CTAGGACAG CTAGGGATGC  
-657 ACAGAGAAAC TTTGCCTCGA AAAGCCACAA AAAAAAAGC CAAAAAGCC  
-607 AAAACAAAAC CCCCAAAAA CTACAAAACC CAGCTTCCTG CCTACCTAAA  
SRY  
-557 CATATTAGGG CTCTAATTCA GACTCTAGGT GCAAGAGTAC AAAACAACA  
SRY  
-507 AACAAAGCTC TAGTCATAAG TCACCGAGTC CTTGGTCGAG TCCAGTGTCC  
-457 AAAGGGTGGC GGGAGGGGG AACCCATTTG TTAGACTGTG CGTCCCAAC  
SP1 SRY  
-407CCGTAAGTCC ACGTAAATTTTTCTTGGGGACGTAAAATGACATGCTT
- (B) -57 GGGGGCTTGA GCGGAGGCAC ACTACGTA AA ATCTGATCCC TAAGAGGCAC  
CREBP1  
-7 AAGGGCTGAC CACCCTATAA AAGGGGCGTG ACTCCTCAAC GAGCGCCACT  
GATA3 TATA  
57 CGGGTACGGG AGAAGCAGCT GGTACCACCT CTGGCCAGGA CCTCGGAAGC  
107 CAAGAAGTCC GCAGAAGCTG GTGACTTAAC AACCCACCGC GCTCCGGTCA  
157 TGGAATCTCA CAAAAAGTGC CCCTGCTGCT ACTGCACTGA CTTGAAGACC  
207 TTTGTTGGAG CAGTGAAGGA GGAAACACTT CAGGGTCAGT CGGTGCCGCC

圖二十、以TRANSFAC™-6.0 軟體預期遠端 *Esx1* 啟動子區域 (nt -965至-438) 及近端啟動子區域 (nt +54至+227) 中主要的轉錄因子結合區。

圖 A 表示遠端 *Esx1* 啟動子區域 (nt -965至-438) 可能存在的轉錄因子結合區；包括TATA (TATAG)、SRY (GCCAACTC)、CEBPB (AGCTTTGGGAACCA)、GATA (AGAGATCTCTAAG)、SRY (CAAAACAAAACCC)、SRY (AAAAACAACAAA)、Sp1 (GGCGGGAGGGGGA) 及 SRY (TTGTTAGA) 等。這些區域以加底線表示。圖 B 代表近端 *Esx1* 啟動子區域 (nt +54至+227) 中可能存在的轉錄因子結合區；包括 CREBP1 (ACGTAAAATCTGA)、GATA3 (CCTATAAAAG) 及 TATA (CCTACTCGG)。

## 附件目錄

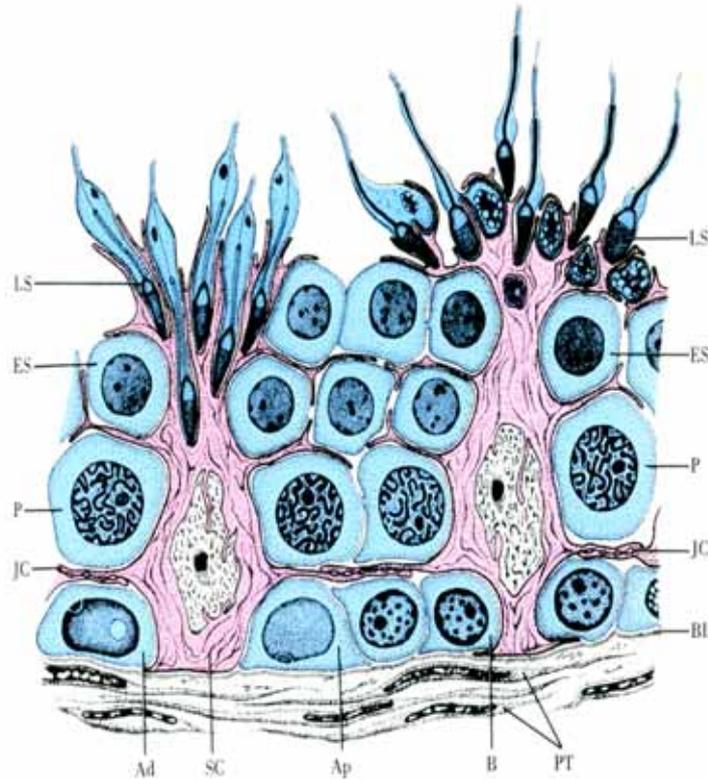
附圖一、睪丸的生精作用圖。

附圖二、圖示說明胎盤迷路層形成微血管網組織以進行營養及氧氣交換。

附圖三、圖示說明以電腦程式分析 x-型 *Esx1* 轉錄子的二級結構。

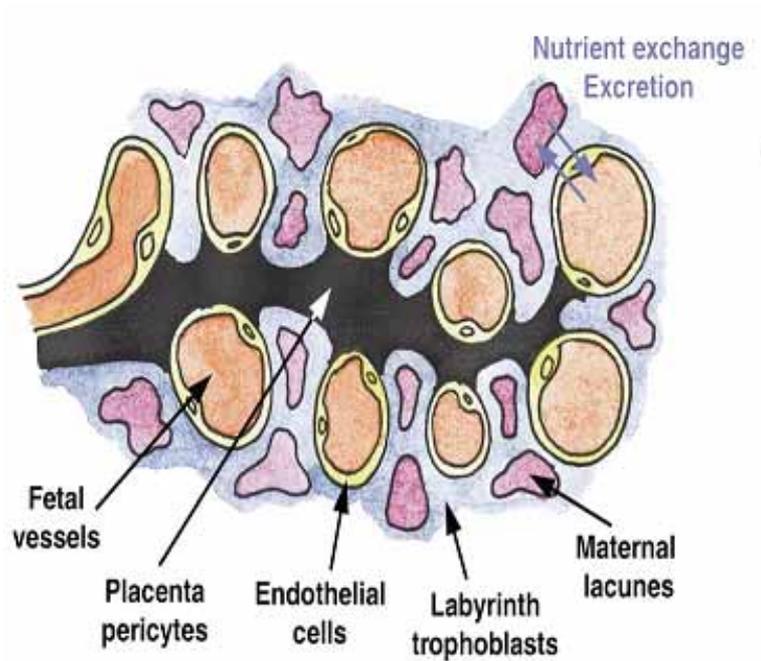
附圖四、圖示說明以電腦程式分析 a-型 *Esx1* 轉錄子的二級結構。

附圖五、圖示說明以電腦程式分析 b-型 *Esx1* 轉錄子的二級結構。



附圖一、睪丸的生精作用圖。

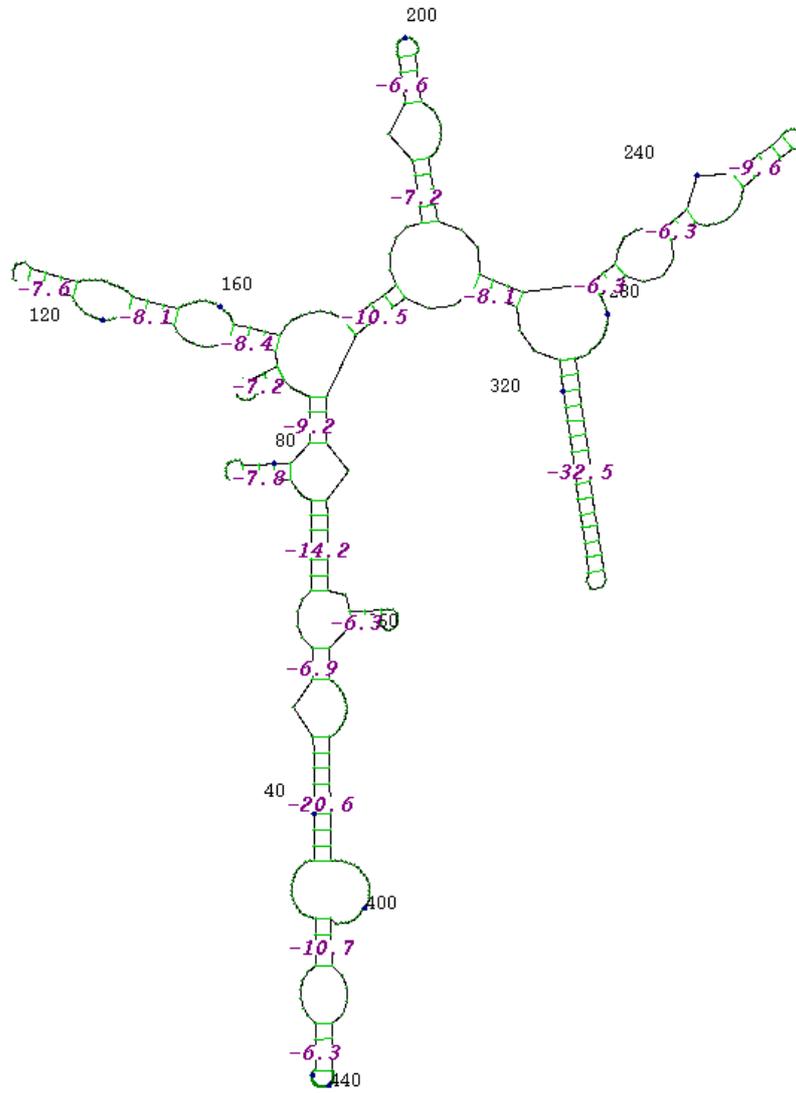
在人的睪丸生精細管中精子生成過程有不同種類的生殖細胞形成，包括：A型精原細胞（Type A spermatogonia dark; Ad 及 Type A spermatogonia pale; Ap）、精母細胞（Pachytene primary spermatocyte; P）、精細胞（Early spermatid; ES 及 Late spermatids; LS），最後生成成熟的精子。SC 代表賽透利細胞（Sertoli cells）、BL 代表 basal lamina、PT 代表 peripheral tissues、JC 代表 junctional complex。（Dym, 1997）



附圖二、圖示說明人的胎盤迷路層形成微血管網組織以進行營養及氧氣交換

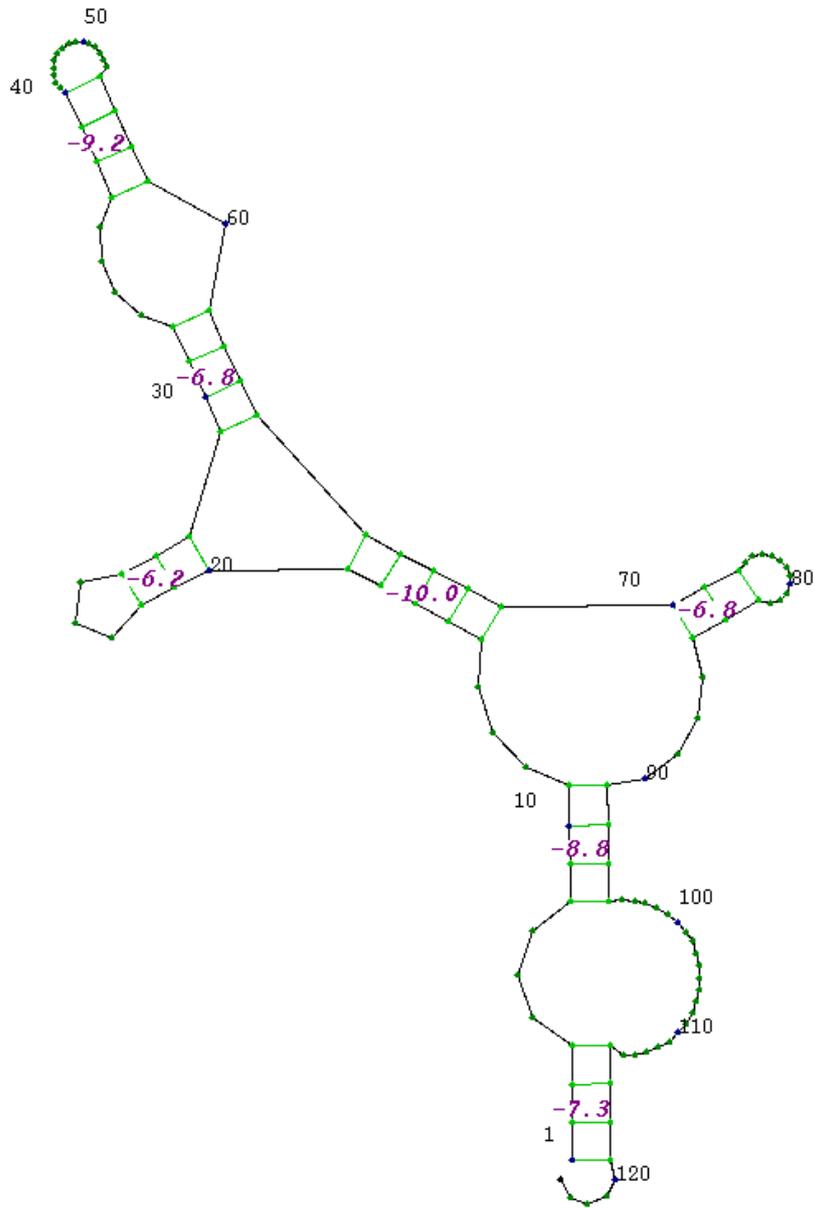
Fetal vessels代表胎兒血管；Placenta pericytes代表胎盤週層；Endothelial cells代表內皮細胞；Labyrinthine trophoblasts代表迷路滋養層；Maternal lacunes代表母體與胎兒間隙細胞。(Ohlsson *et al.*, 1999)

Free Energy of Structure = -116.1 kkal/mol



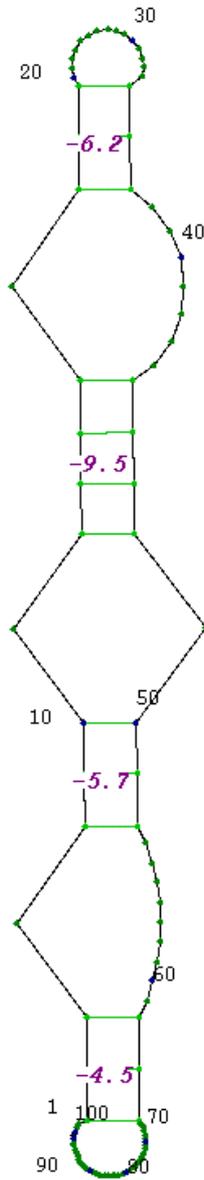
附圖三、圖示說明以電腦程式分析x-型EsxI轉錄子的二級結構。

Free Energy of Structure = -26.3 kkal/mol



附圖四、圖示說明以電腦程式分析 $\alpha$ -型*EsxI*轉錄子的二級結構。

Free Energy of Structure = -8.1 kkal/mol



附圖五、圖示說明以電腦程式分析b-型*Esx1*轉錄子的二級結構。

## 個人資料

中文姓名：葉月嬌

英文姓名：Yeh Yueh-Chiao

出生日期：1968 年 3 月 27 日

戶籍地：台中市北區賴厝東巷 45 號

電子信箱：stellar.yeh@msa.hinet.net

學歷：中興大學畜牧系學士

東海大學生物系碩士

經歷：台中市大同國小自然科教師

東海大學生物系兼任助理

東海大學生物系兼任助教

逢甲大學、朝陽科技大學、弘光科技大學、僑光技術學院

及育達商業技術學院兼任講師

榮譽：

2001 14<sup>th</sup> Joint Annual Conference of Biomedical Science, Excellent  
Poster Award. Taiwan

2005 Chinese Society of Cell and Molecular Biology, Research Assistant,  
Graduate Student and Postocs Traveling Award. Taiwan

2005 The Phi Tau Phi Scholastic Honor Society of The Republic of China

2005 38<sup>th</sup> Society for the Study of Reproduction, Larry Ewing Memorial  
Trainee Travel Fund Award. USA

## 論文發表

### 期刊論文

**Yeh, Y. C.**, Hwang, G. Y., Liu, I. P., and Yang, V. C. (2002) Identification and expression of scavenger receptor SR-BI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo. **Atherosclerosis** 161: 95-103.

**Yeh, Y. C.**, Yang, V. C., Huang, S. C., and Lo, N. W. (2005) Stage-dependent expression of extraembryonic tissue-spermatogenesis-homeobox gene 1 (ESX1) protein; a candidate marker for X chromosome-bearing sperm. **Reprod. Fertil. Dev.** 17: 447-455.

### 研討會論文

**Yeh, Y. C.**, Huang, S. C., and Lo, N. W. (2002). Stage-dependent expression of the *Esx1* in mouse testis. Proceedings of the 4th Asian-Pacific Organization for Cell Biology Congress. POS9-5, Taipei, Taiwan. (poster)

**Yeh, Y. C.**, Huang, W. H., Yan, C. C., and Lo, N. W. (2003). Characterization of the *Esx1* promoter activities in mouse male germ cells. J. Chin. Soc. Anim. Sci. 32 (4): 91, Taipei, Taiwan. (platform)

**Yeh, Y. C.**, Lee, S. L., Lee, K. C., Yang, V. C., and Lo, N. W. (2004). Stage-dependent expression of the *Esx1* protein and functional analysis of the *Esx1* antiserum in sperm sexing. The 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. POS595, Vancouver, Canada. (poster)

**Yeh, Y. C.**, Yang, V. C., and Lo, N. W. (2004). Analysis of the putative promoter regions of *Esx1* gene in mouse testicular germ cells. The 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. POS495, Washington D.C., USA. (poster)

Lee, S. L., **Yeh, Y. C.**, Yang, V. C., and Lo, N. W. (2004). Effects of melatonin and L-carnitine on the expression of stress response gene, x-form *Esx1*, in mouse testis under transport stress. J. Chin. Soc. Anim. Sci. 33 (4): 73.

**Yeh, Y. C.**, Yang, V. C., and Lo, N. W. (2005). *In vitro* analysis of the putative promoter regions of *Esx1* gene in testis and placenta. The 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. P161, Quebec, Canada. (Platform)