

GPx5 在内蒙古绒山羊附睾中的表达

范晓梅^{1,2} 栗瑞兰¹ 张通¹ 边小娜¹ 张家新^{1*}

(1. 内蒙古农业大学 动物科学学院/内蒙古自治区动物遗传育种与繁殖重点实验室, 呼和浩特 010018;

2. 内蒙古医科大学 基础医学院, 呼和浩特 010110)

摘要 为研究 GPx5 在内蒙古绒山羊附睾中的表达模式, 对初情期、体成熟期、老龄期 3 个生殖生理阶段绒山羊附睾及睾丸中的 GPx5 从 mRNA 和蛋白水平进行了检测。结果显示各生殖生理阶段绒山羊睾丸中均未见 GPx5 表达, 附睾中均有 GPx5 表达。各生殖生理阶段附睾表达区域及表达量存在差异: 初情期, GPx5 mRNA 和蛋白主要表达于附睾头部; 体成熟期, 附睾各区域 GPx5 mRNA 和蛋白的表达量极显著高于其他阶段, 附睾起始部和附睾头部为主要表达区; 老龄期, GPx5 mRNA 和蛋白主要表达于附睾头部, 但较体成熟期明显减少。免疫组化定位显示 GPx5 蛋白主要分布于附睾上皮细胞, 而且各年龄阶段绒山羊附睾腔内精子都有明显的 GPx5 阳性信号。研究表明绒山羊附睾 GPx5 的表达区域及表达量变化与动物生殖生理阶段直接相关。

关键词 绒山羊; 附睾; 精子; GPx5

中图分类号 S813.3

文章编号 1007-4333(2017)10-0084-07

文献标志码 A

Expression of GPx5 in the epididymis of Inner Mongolia Cashmere goat

FAN Xiaomei^{1,2}, LI Ruilan¹, ZHANG Tong¹, BIAN Xiaona¹, ZHANG Jiaxin^{1*}

(1. College of Animal Science/Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Inner Mongolia,

Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Basic Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

Abstract In order to study the expression pattern of GPx5 in the epididymis of Inner Mongolia Cashmere goat, GPx5 mRNA and protein in epididymis and testis were detected at three reproductive physiology stages: Puberty stage, body mature stage and aged stage. The results showed that GPx5 was expressed in the epididymis of Cashmere goat in all reproductive physiology stages, but not in testis. However, there were differences in the expression region and quantity of epididymis in the three stages. At the puberty stage, GPx5 mRNA and protein were mainly expressed in epididymal caput. At the body mature stage, the expression of GPx5 mRNA and protein in each epididymal region was significantly higher than that in other stages. Initial segment and epididymal caput were the main expression regions. At the aged stage, GPx5 mRNA and protein were mainly expressed in epididymal caput and a significant expression level reduction was detected compared to that in body mature stage. Immunohistochemistry results showed that GPx5 protein mainly existed in epididymal epithelial cell and obvious GPx5 positive signals in epididymal sperm of Cashmere goat at different ages. These results indicated that the expression region and quantity of GPx5 in epididymis were directly related to the reproductive physiology stage of Cashmere goat.

Keywords Cashmere goat; epididymis; sperm; GPx5

收稿日期: 2017-02-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460598)

第一作者: 范晓梅, 副教授, 博士研究生, 主要从事动物繁殖技术与胚胎工程专业研究, E-mail: 1997-lxh@163.com

通讯作者: 张家新, 教授, 博士生导师, 主要从事动物繁殖技术与胚胎工程专业研究, E-mail: zjxcau@163.com

GPx5 在附睾高度特异表达,也被称作附睾 GPx。因其催化部位不存在硒代半胱氨酸,而成为硒非依赖型谷胱甘肽过氧化物酶的代表。在猪^[1]、小鼠^[2]和绵羊^[3]的研究中显示 GPx5 主要表达于附睾上皮细胞胞浆,并分泌于附睾管中。分泌入管腔的 GPx5 以附睾小体形式存在,可结合到精子质膜顶体^[4],也可以被定位于精子细胞核^[5]。无硒饲养的小鼠,其硒依赖 GPxs 的活力会下降,但附睾头部 GPx5 mRNA 水平和蛋白水平均增加,保证了附睾液总 GPx 的活力不变,保护精子免受过氧化损伤^[6];GPx5 基因敲除小鼠附睾尾部呈现高 ROS 水平,表现出精核膨胀、DNA 碎片增多等氧化损伤^[5]。这些结果表明,精子在附睾成熟和储存过程中,GPx5 充当了重要的抗氧化剂角色。而且在附睾总 GPx 中,GPx5 占了 95% 以上^[7],因此 GPx5 被认为是精浆抗氧化的主要成分。但目前国内外尚没有 GPx5 在羊附睾表达规律的详细研究报道。本研究以内蒙古地区绒山羊为研究对象,旨在探讨不同生殖生理阶段绒山羊附睾各部位 GPx5 的表达规律,为进

一步研究绒山羊附睾精子抗氧化机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验仪器

NANODROP 2000 紫外分光光度仪(美国 Thermo 公司);MX3000P 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent 公司);ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(美国 BIORAD 公司);Imager A2 显微镜(德国蔡司)。

1.2 试验材料

根据内蒙古白绒山羊的生殖生理特点分为 3 个年龄段进行取样:初情期(3~4 个月)、体成熟期(1.0~1.5 岁)和老龄期(6.0~7.0 岁),每个年龄段各取 3 只健康绒山羊的睾丸组织样品。为消除季节因素对试验结果的影响,本试验中不同生殖生理阶段绒山羊睾丸样品均采自 9 月份。采样时保证睾丸白膜完整。冰上将附睾起始部、附睾头、附睾体和附睾尾分别进行分割(图 1),一部分固定于 4% 多聚甲醛,一部分投于液氮,后转入 -80 °C 冰箱保存,用于提取 RNA 和组织蛋白。

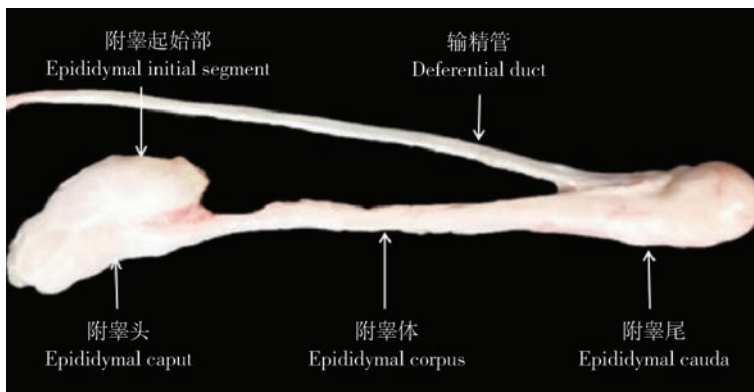


图 1 附睾的不同部位

Fig. 1 Different parts of epididymis

1.3 试验方法

1.3.1 总 RNA 的提取、cDNA 的合成及 PCR 分析

参照 TRIzol(TIANGEN)试剂盒操作说明,提取绒山羊睾丸及附睾冻存组织总 RNA;1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性;PrimeScript™ RT Master Mix kit(Takara)进行反转录。Taq PCR Mastermix kit(TIANGEN)试剂盒对 GPx5 基因和管家基因 β -actin 进行普通 PCR 扩增,循环条件为:预变性(95 °C、5 min),变性(95 °C、30 s),退火(62 °C、30 s),延伸(72 °C、30 s),35 个循环之后总延伸(72 °C、10 min);琼脂糖凝胶电泳对扩增条带

大小进行检测分析。引物序列和 PCR 退火温度见表 1。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 分析

使用 SYBR Premix ExTaq™ II (Takara)对 GPx5 基因进行相对定量试验。阴性对照用 ddH₂O 代替模板进行。反应条件如下:95 °C、10 min;95 °C、30 s,62 °C、30 s,72 °C、30 s,进行 40 个循环反应。反应体系为 20 μ L:SYBR Premix ExTaq™ II (2 \times) 10 μ L,cDNA 1 μ L,上下游引物各 1 μ L,ROX 0.4 μ L,ddH₂O 6.6 μ L。利用 2^{- $\Delta\Delta$} 法与 β -actin 进行相对定量计算。

表1 PCR引物和退火温度

Table 1 List of primers and annealing temperature used in PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Sequence of primer (5'-3')	产物大小/bp Length of product	退火温度/°C Annealing temperature
<i>GPx5</i>	F:5'GCAATCCTGTCTCACCCCTT 3' R:5'ACGCCATCAGGTCCCACT 3'	120	62
<i>β-actin</i>	F:5'GTCATCACCATCGGCAATGA 3' R:5'CGTGAATGCCGAGGATT 3'	88	62

1.3.3 组织总蛋白的提取和 Western blot 分析

PMSF(5 μL)加入 1 mmol/L western 及 IP 细胞裂解液(500 μL)中,混匀待用。绒山羊睾丸和附睾不同部位加液氮研磨,取 50 mg 样品粉末到如上配制好的溶液中,冰上裂解 20 min,超声波细胞破碎仪破碎 15 s,12 000 r/min、4 °C 离心 15 min,吸取上清为样品总蛋白。使用 BCA(Biotek)试剂盒进行总蛋白浓度测定。样品加入 SDS-PAGE loading buffer(1×)开水煮沸变性 10 min,-20 °C 保存。蛋白样品经过 12%的 SDS-PAGE 电泳分离,将转膜有蛋白的 PVDF 膜在 5%的脱脂奶粉中室温封闭 2 h;再分别使用兔源 GPx5 一抗(Santa cruz)(1:500)和鼠源 β-actin(Abcam)一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜(约 15 h);带有 HRP 标签的山羊抗兔二抗(博奥森)(1:1 000)和山羊抗鼠二抗(博奥森)(1:1 000)室温孵育 1 h;ECL(Thermo fashier)曝光。

1.3.4 免疫组化

固定好的标本制成蜡块,进行 5 μm 厚度切片。抗原修复使用 0.01 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液进行,煮沸 15 min 冷却至室温。5% BSA 室温封闭 1 h 后,滴加兔源 GPx5 一抗(1:250),4 °C 孵育过夜(约 15 h),5% BSA 作为阴性对照孵育,带有 HRP 标签的山羊抗兔二抗(1:500)室温孵育 1 h,DAB(迈新)试剂盒显色,苏木素(迈新)复染。GPx5 蛋白信号为棕色,细胞核为蓝色。

1.4 统计分析

本试验基因相对表达量采用 SAS 9.0 软件中的 ANAVO 进行单因素方差分析和显著性检验。

2 结果与分析

2.1 GPx5 基因在绒山羊睾丸和附睾的转录表达

对不同生殖生理阶段绒山羊睾丸、附睾起始部、

附睾头、附睾体和附睾尾组织提取的 RNA 进行转录水平下的相对定量检测,结果见图 2(a)和(b)。结果显示 *GPx5* 基因主要表达于附睾组织,睾丸不表达。随生殖生理阶段的不同,附睾表达区域及表达量也有明显差异。初情期,附睾头是 *GPx5* 的主要表达区域,表达量显著高于其他部位,附睾起始部显著多于附睾体,附睾尾几乎不表达;体成熟期,附睾起始部和附睾头 *GPx5* 表达量急剧增加,起始部略高于头部,两者间无显著性差异,均极显著高于附睾体和附睾尾,附睾体显著高于附睾尾;老龄期,附睾头为 *GPx5* 的主要表达区,附睾起始部 *GPx5* 表达量明显降低,但高于附睾体,附睾尾仅检测到微量 *GPx5* 表达(图 2(a))。通过比较发现体成熟期绒山羊附睾各部位的 *GPx5* 表达量都显著高于另 2 个生理阶段(图 2(b))。

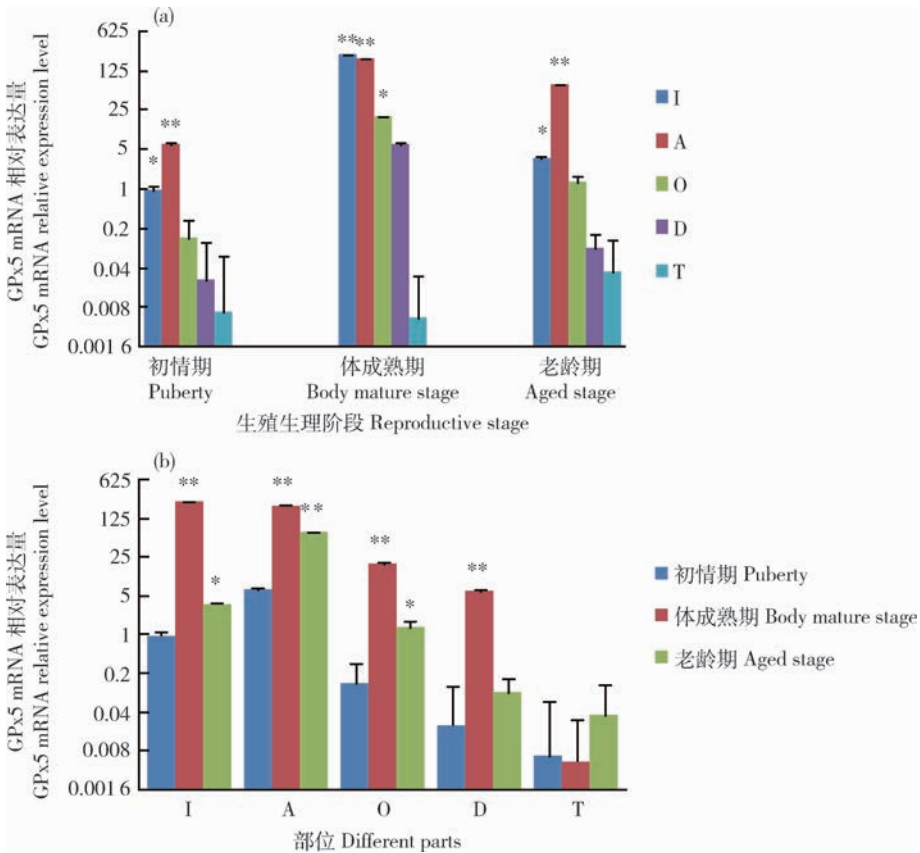
2.2 GPx5 蛋白在附睾的表达

检测到的目的条带约 24 ku,β-actin 约 42 ku(图 3a)与预测条带大小一致,说明抗体可用于本试验研究。

Western blot 分析结果显示,各生殖生理阶段绒山羊睾丸均未检测到 GPx5 蛋白表达,附睾各部 GPx5 蛋白表达量也不同。初情期,附睾头和附睾体检测到了 GPx5 蛋白相对较弱的表达条带;体成熟期,附睾起始部和附睾头 GPx5 表达量显著,附睾体的表达量相对较弱;老龄期,GPx5 在附睾头表达量显著,附睾起始部和附睾体表达量较弱(图 3(b))。

2.3 GPx5 蛋白在绒山羊附睾中的定位

采用免疫组化技术对 GPx5 蛋白在绒山羊各生殖生理阶段附睾及睾丸定位,棕色代表阳性信号,蓝色为细胞核(图 4)。结果显示 GPx5 蛋白主要表达于附睾,睾丸不表达。初情期 GPx5 在附睾起始部、附睾头和附睾体都有微弱表达,附睾尾上皮细胞中未见阳性信号,此期附睾管腔中仅见少量精子,精子

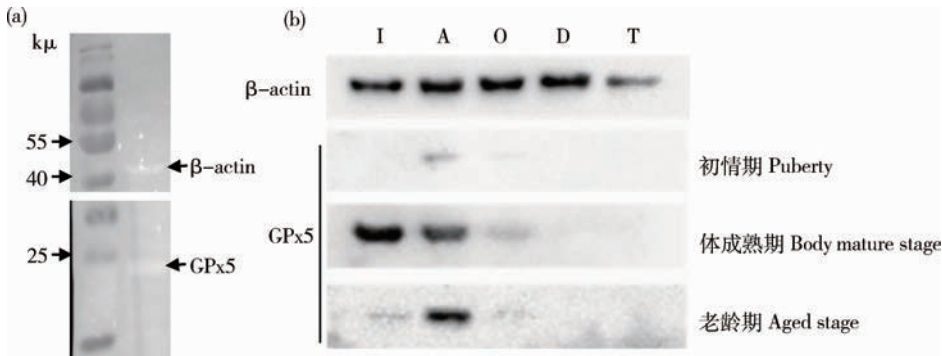


(a) GPx5 在相同生殖生理阶段绒山羊附睾不同部位相对表达量。初情期和老龄期:附睾起始部、头和体之间比较,体成熟期:附睾起始部、头、体和尾之间比较。(b) GPx5 在不同生殖生理阶段绒山羊附睾的相同部位相对表达量比较。I:附睾起始部;A:附睾头;O:附睾体;D:附睾尾;T:睾丸。* 差异显著($P < 0.05$); ** 差异极显著($P < 0.01$)。

(a) The relative expression level of GPx5 mRNA in different parts of epididymis of Cashmere goat at the same reproductive physiology stage. Epididymal initial segment, caput and corpus were compared respectively in puberty and aged stage. Epididymal initial segment, caput, corpus and cauda were compared respectively in body mature stage. (b) The relative expression level of GPx5 mRNA in the same parts of epididymis of Cashmere goat at different reproductive physiology stage. I, initial segment; A, epididymal caput; O, epididymal corpus; D, epididymal cauda; T, testis. *, significant difference ($P < 0.05$); **, extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 2 GPx5 基因在附睾不同部位和睾丸的表达

Fig. 2 GPx5 mRNA expression in different parts of epididymis and testis



(a) β -actin 和 GPx5 的标准大小分别为 42 和 24 kDa; (b) 不同生殖生理阶段绒山羊附睾不同部位以及睾丸中 GPx5 蛋白的检测。

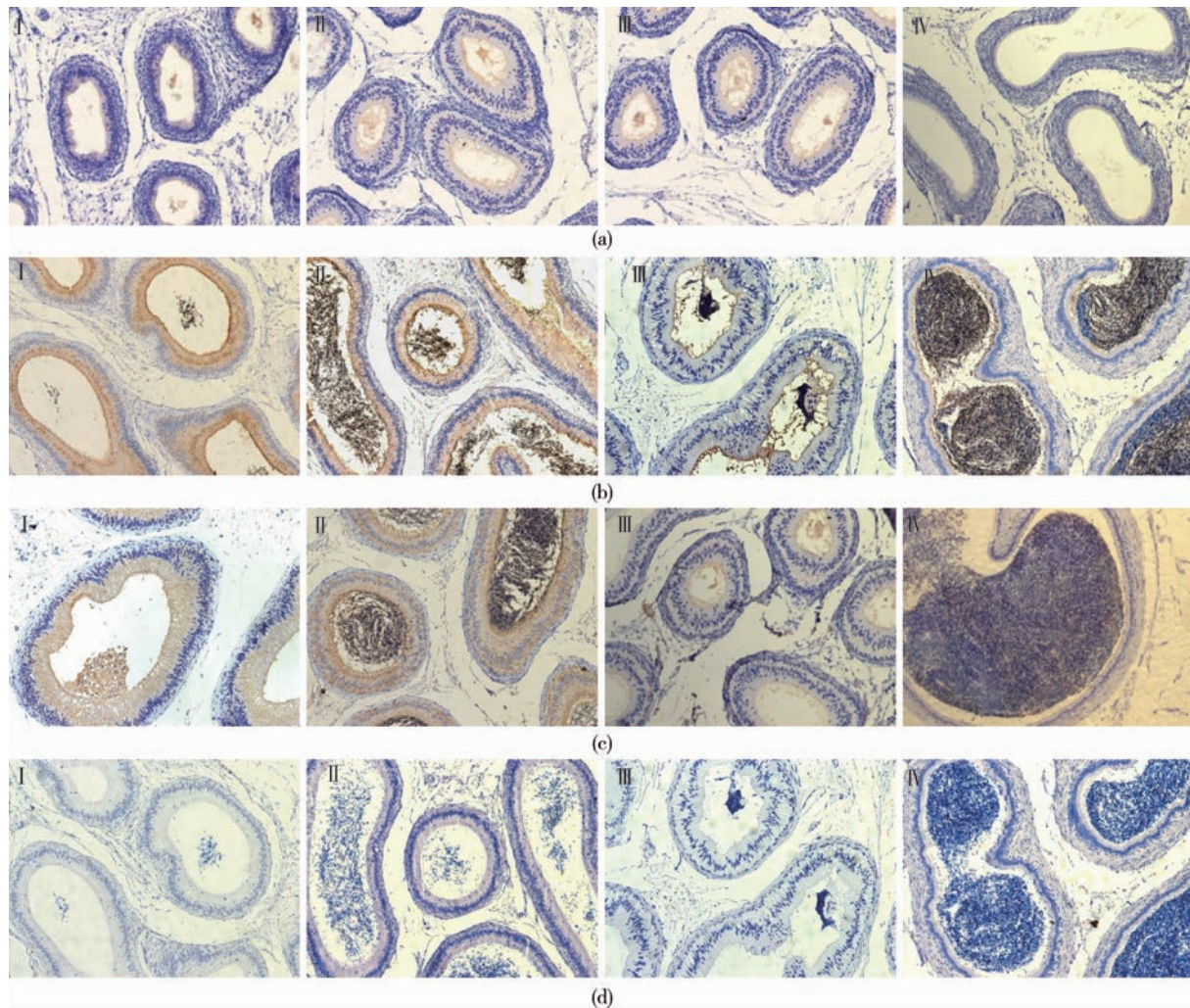
(a) The standard sizes of β -actin and GPx5 are 42 and 24 ku, respectively; (b) The expression of GPx5 protein in different parts of epididymis and testis at different reproductive physiology stage of Cashmere goat.

图 3 GPx5 蛋白在附睾及睾丸中的表达

Fig. 3 The expression of GPx5 protein in different parts of epididymis and testis

上阳性信号明显,GPx5 蛋白主要分布在上皮细胞胞浆及纤毛。体成熟期附睾起始部及附睾头部 GPx5 均高表达,附睾体和尾表达量较起始部及头部减弱,附睾管腔中见大量精子,精子上阳性信号强

烈。老龄期附睾各部阳性信号较体成熟期减弱,附睾尾上皮细胞中未见阳性信号,但其管腔内精子却检测到明显阳性信号。以上结果与各生殖生理阶段附睾各部 GPx5 mRNA 及蛋白表达描述基本一致。



(a)、(b)、(c)分别是初情期、体成熟期和老龄期;(d)是体成熟期对照组;I、II、III和IV分别是附睾起始部、附睾头、附睾体和附睾尾(100×)。棕色为阳性信号。

(a), (b) and (c) are puberty, body mature stage and aged stage of the epididymis of Cashmere goat, respectively; (d) Control group of epididymis at body mature stage; I, II, III and IV are the initial segment, epididymal caput, epididymal corpus and epididymal cauda (100×). Brown is positive signal.

图4 绒山羊附睾不同部位 GPx5 蛋白的免疫组化结果

Fig. 4 Immunohistochemistry localization of GPx5 protein in different parts of the epididymis of Cashmere goat

3 讨论与结论

附睾由附睾起始部、附睾头、附睾体和附睾尾四部分组成^[8],是精子成熟的主要场所,精子经附睾微环境的作用和修饰逐渐成熟,获得受精能力。GPx5 作为附睾特异性表达的 GPx,即为附睾微环境的重

要组成成分,它结合于精子顶体后,不易被蛋白水解酶水解^[9],有保护精子免受过氧化损伤及防止精子过早发生顶体反应^[4-10]的作用,如:GPx5 基因敲除小鼠,附睾尾部呈现高 ROS 水平,精子表现有精核膨胀、DNA 碎片增多等氧化损伤^[5],另外有试验证明 GPx5 与精子结合后成为了精子的结构蛋白^[5]。

本试验选取了 3 个生殖生理阶段(初情期、体成熟期和老龄期)不同的绒山羊进行研究,检测了其睾丸和附睾不同部位 GPx5 基因表达和蛋白分布规律,为绒山羊精子的抗氧化机制提供理论依据。

研究结果显示,绒山羊在 3 个生殖生理阶段睾丸中都不表达 GPx5,这与野猪^[10]、马^[11]、牛^[11]、小鼠^[12]、大鼠^[13]、和绵羊^[3]等的研究结果相似。不同物种 GPx5 表达存在一定的差异,已有研究在野牛睾丸中检测到一定量的 GPx5 表达^[14]。

GPx5 在 3 个生殖生理阶段绒山羊附睾中的表达存在一定差异。初情期是动物生殖细胞开始成熟的阶段,该期雄性动物刚开始产生具有受精能力的精子。Vernet 等^[15]研究发现小鼠在出生后 15 d 时附睾上皮细胞开始有 GPx5 基因及蛋白表达,约 30 d 时,GPx5 开始分泌入附睾腔,随后几天附睾腔中精子出现,显示 GPx5 的出现是附睾腔提前为精子的出现而做的微环境准备。本研究在初情期绒山羊附睾头检测到了 GPx5 相对较高的基因表达量及明显的蛋白印迹,免疫组化结果显示,此期附睾腔中已出现了少量精子,精子上有明显的 GPx5 蛋白的阳性信号,印证了 GPx5 的分泌是附睾腔提前为精子的出现而做的微环境准备。初情期绒山羊附睾头是 GPx5 基因及蛋白的主要表达区。

体成熟期绒山羊附睾各部位均有 GPx5 表达,附睾起始部和附睾头部表达量极显著,附睾起始部甚至是表达量最高的区域,这与马附睾起始部是 GPx5 主要表达区的的结果相一致^[11]。GPx5 表达量从附睾头到附睾尾呈现逐渐减少趋势。已有关于 GPx5 在附睾上表达的研究,通常都是以体成熟期的动物为研究对象,如野猪^[10]、小鼠^[12]、大鼠^[13]和狗^[16]等,对附睾的部位划分常把附睾起始部和附睾头合为一个部位进行研究,表明体成熟期动物附睾头也是 GPx5 的主要表达区,从附睾头到附睾尾,GPx5 的表达量逐渐降低,这与本研究结果相似。不同物种 GPx5 表达模式会有所不同,如成年欧洲野牛附睾头虽然是主要表达部位,在附睾尾表达量却高于附睾体^[14]。GPx5 分泌到附睾管腔后形成附睾小体的形式与精子结合,不易解离^[9],此阶段绒山羊附睾腔中仍可见大量精子,精子上检测到较强的 GPx5 阳性信号,表明 GPx5 可能在精子成熟中发挥重要作用^[23]。

老龄期绒山羊附睾各部位 GPx5 表达量均较体成熟期明显减退,在附睾尾只检测到微量 GPx5 基

因表达,未检测到 GPx5 蛋白。这可能与雄激素表达下降有关,有研究表明,雄激素依赖性分泌蛋白对精子成熟有重要的调节作用^[15,17],GPx5 为雄激素调控性蛋白之一^[18-19],睾丸间质细胞产生大量雄激素进入血液或由睾丸网随睾丸液进入附睾,调节附睾上皮的分化和发育^[20-21],进而调节 GPx5 的表达。老龄雄性动物体内雄激素会有明显下降^[22]。此外,免疫组化结果显示,老龄期绒山羊附睾尾上皮细胞并未观察到 GPx5 的阳性信号,但其附睾尾腔内精子上却有明显的阳性信号,这些精子上的 GPx5 蛋白可能来源于附睾尾以上部位的上皮细胞。老龄期 GPx5 表达量的下降,对精子的保护作用减弱,这也可能是老龄期动物生育能力下降的可能原因之一,但具体机制有待进一步研究。

综上所述,内蒙古绒山羊附睾 GPx5 表达区域及表达量随生殖生理阶段不同而出现规律性变化,附睾起始部及附睾头是 GPx5 的主要来源,GPx5 在附睾腔与精子结合而发挥其作用。

参考文献 References

- [1] Barranco I, Tvarijonavičute A, Perez-Patiño C, Vicente-Carrillo A, Parrilla I, Ceron J J, Martinez E A, Rodriguez-Martinez H, Roca J. Glutathione Peroxidase 5 is expressed by the entire pig male genital tract and once in the seminal plasma contributes to sperm survival and *in vivo* fertility[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162958
- [2] Vernet P, Rigaudière N, Ghyselinck N, Dufaure J P, Drevet J R. *In vitro* expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage[J]. *Biochemistry & Cell Biology*, 1996, 74(1): 125-31
- [3] 栗瑞兰, 张通, 范晓梅, 欧阳效晴, 张春强, 曹俊伟, 张家新. GPX5 在成年绵羊附睾中的表达与蛋白定位[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(24): 4989-4995
Li R L, Zhang T, Fan X M, Oyang X Q, Zhang C Q, Cao J W, Zhang J X. Study on expression of glutathione peroxidase type-5 (GPX5) and protein localization in epididymis of adult sheep [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(24): 4989-4995 (in Chinese)
- [4] Taylor A, Robson A, Houghton B C, Jepson C A, Ford W C, Frayne J. Epididymal specific, selenium-independent GPX5 protects cells from oxidative stress-induced lipid peroxidation and DNA mutation[J]. *Human Reproduction*, 2013, 28(9): 2332
- [5] Chabory E, Damon C, Lenoir A. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in

- mice[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119(7): 2074-85
- [6] Vernet P, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y, Dufaure J P, Drevet J R. Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency [J]. *Molecular Reproduction & Development*, 1999, 54(4): 362-370
- [7] Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1830(5): 3289-3303
- [8] 马丽. 肿瘤转移相关蛋白 MTA1 在小鼠附睾中的表达及功能研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2009
- Ma L. Expression and function of metastasis-associated protein 1 (MTA1) in mouse epididymis [D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2009 (in Chinese)
- [9] Hanae R, Patrick V, Drevet J R. GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2002, 63(1): 96-103
- [10] Okamura N, Iwaki Y, Hiramoto S, Tamba M, Bannai S, Sugita Y, Syntin P, Dacheux F, Dacheux J L. Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1997, 1336(1): 99
- [11] Grignard E, Morin J, Vernet P, Drevet J R. GPX5 orthologs of the mouse epididymis-restricted and sperm-bound selenium-independent glutathione peroxidase are not expressed with the same quantitative and spatial characteristics in large domestic animals[J]. *Theriogenology*, 2005, 64(4): 1016-33
- [12] Ghyselinck N B, Dufaure I, Lareyre J J, Rigaudière N, Mattéi M G, Dufaure J P. Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis [J]. *Molecular Endocrinology*, 1993, 7(2): 258-272
- [13] Williams K, Frayne J, Hall L. Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract[J]. *Molecular Human Reproduction*, 1998, 4(9): 841-8
- [14] Kozirowska-Gilun M, Gilun P, Fraser L, Kozirowski M, Kordan W, Stefanczyk-Krzyszowska S. Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in reproductive tract of adult male European bison (*Bison bonasus*, Linnaeus 1758) [J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2012, 48(1): 7-14
- [15] Vernet P, Faure J, Dufaure J P, Drevet J R. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 1997, 47(1): 87-98
- [16] Beiglböck A, Pera I, Ellerbrock K, Kirchhoff C. Dog epididymis-specific mRNA encoding secretory glutathione peroxidase-like protein [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1998, 112(2): 357-367
- [17] Pujianto D A, Loanda E, Sari P, Midoen Y H, Soeharso P. Sperm-associated antigen 11A is expressed exclusively in the principal cells of the mouse caput epididymis in an androgen-dependent manner [J]. *Reproductive Biology & Endocrinology Rb & E*, 2013, 11(1): 342-344
- [18] Rigaudière N, Ghyselinck N B, Faure J, Dufaure J P. Regulation of the epididymal glutathione peroxidase-like protein in the mouse: Dependence upon androgens and testicular factors [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 1992, 89(1-2): 67-77
- [19] Perry A C, Jones R, Niang L S, Jackson R M, Hall L. Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon [J]. *The Biochemical Journal*, 1992, 285 (Pt 3)(3): 863
- [20] Moisan V, Bomgardner D, Tremblay J J. Expression of the Ladybird-like homeobox 2 transcription factor in the developing mouse testis and epididymis [J]. *BMC Developmental Biology*, 2008, 8(1): 1-15
- [21] Feng S, Bogatcheva N V, Truong A, Korchin B, Bishop C E, Klonisch T, Agoulnik I U, Agoulnik A I. Developmental expression and gene regulation of insulin-like 3 receptor RXFP2 in mouse male reproductive organs [J]. *Biology of Reproduction*, 2007, 77(4): 671
- [22] Emmelot-Vonk M H, Verhaar H J, Nakhai-Pour H R, Grobbee D E, van der Schouw Y T. Low testosterone concentrations and the symptoms of testosterone deficiency according to the androgen deficiency in ageing males (ADAM) and ageing males' symptoms rating scale (AMS) questionnaires [J]. *Clinical Endocrinology*, 2011, 74(4): 488-494
- [23] Ahsan U, Kamran Z, Raza I, Ahmad S, Babar W, Riaz M H, Iqbal Z. Role of selenium in male reproduction; A review [J]. *Animal Reproduction Science*, 2014, 146(1-2): 55-62