

Laser Capture Microdissection으로 절제된 마우스의 특정 단계별 정세관에서 Glutathione Peroxidase 유전자의 발현 분석

연정민^{1,§} · 임춘매^{1,§} · 박정훈¹ · 홍민기¹ · 정아영¹ · 김미라¹ · 백인정² · 이범준¹ · 남상윤¹ · 윤영원^{1,†}

¹충북대학교 수의과대학, ²연세대학교 생화학과

Expression Analysis of Glutathione Peroxidase Genes in the Stage-Specific Seminiferous Tubules of Mice Excised by a Laser Capture Microdissection

Jung-Min Yon^{1,§}, Chunmei Lin^{1,§}, Jung-Hoon Park¹, Min Ki Hong¹, A-Young Jung¹, Mi-Ra Kim¹, In-Jeoung Baek², Beom Jun Lee¹, Sang-Yoon Nam¹ and Young Won Yun^{1,†}

¹College of Veterinary Medicine & Research Institute of Veterinary Medicine,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

²Laboratory of Mammalian Molecular Genetics, Dept. of Biochemistry, College of Science,
Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT : The seminiferous epithelium, with its division into 12 spermatogenic stages in the mouse, is a very complex tissue. Glutathione peroxidase (GPx) is a representative antioxidant enzyme that is capable of reducing organic hydroperoxides to their corresponding hydroxyl compounds utilizing glutathione and is related to the mammalian spermatogenesis. In this study, a real-time PCR was performed in the stage-specific seminiferous tubules of mouse testes excised by a laser capture microdissection (LCM) in order to quantitate the expression levels of a series of GPx genes including cytosolic GPx (cGPx), gastrointestinal GPx (GI-GPx), plasma GPx (pGPx), and phospholipid hydroperoxide GPx (PHGPx). Frozen sections (10 μ m) were obtained from normal adult mouse testes. LCM was used to capture all the cells that were grouped into stages I-V, VII-VIII, and IX-XI in cross-sections of seminiferous tubules. The expression level of PHGPx mRNA was remarkably higher than those of other GPx mRNAs in mouse testes. During spermatogenesis, the expressions of GI-GPx, pGPx, and PHGPx mRNAs were highest on stages VII-VIII, began to decrease after stage XI, and showed a lowest level on stage I-V. However, the expressions of cGPx mRNA were highest on stages VII-VIII, and showed a lowest level on stage XI-XI. These findings indicate that GPx genes are expressed differentially on mouse spermatogenesis and also LCM can be an useful tool in cellular quantitative analysis of testes.

Key words : Glutathione peroxidase, Spermatogenesis, Laser capture microdissection, Real-time PCR.

요 약 : 정세관은 매우 복잡한 조직으로 마우스의 정자 발생 과정은 12단계로 구성되어 있다. Glutathione peroxidase (GPx)는 glutathione을 이용하여 과산화물(hydroperoxide)을 환원시키는 대표적인 항산화효소로서 포유류 정자 발생 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 laser capture microdissection(LCM)을 이용하여 마우스 정소에서 발생 단계별로 정세관을 채취하여 real-time PCR로 cytosolic GPx(cGPx), gastrointestinal GPx(GI-GPx), plasma GPx(pGPx) 및 phospholipid hydroperoxide GPx(PHGPx)와 같은 GPx family 유전자의 발현 정도를 비교분석하였다. 동결절편(10 μ m)은 정상 성숙 마우스의 정소를 사용하였다. LCM 방법으로 정세관의 단면을 I~V, VII~VIII, IX~XI 단계로 구별하여 채취하였다. PHGPx mRNA의 발현은 다른 GPx mRNA보다 정소에서 현저하게 높게 발현되었다. 정자 발생 단계에서 GI-GPx, pGPx 및 PHGPx의 mRNA는 VII~VIII 단계에서 가장 높았고 XI 단계 이후에 감소되었으며, I~V 단계에서 가장 낮은 발현을 보였다. 그러나, cGPx mRNA는 VII~VIII 단계에서 가장 높았고, XI~XI 단계에서 가장 낮은 발현을 보였다. 본 연구

결과, GPx family 유전자는 정자 발생 단계에서 서로 다르게 조절되며, LCM 방법은 정소세포의 정량 분석에서 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

[§] 본 연구에 동일한 기여를 하였음.

[†] 교신저자: 충북 청주시 흥덕구 성봉로 410 충북대학교 수의과대학. (우) 361-763, (전) 043-261-2597, (팩) 043-271-3246, E-mail: ywyun@cbu.ac.kr

서 론

포유동물의 정상적인 에너지 대사과정에서 대사산물로 형성되는 superoxide anions, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide(H_2O_2)와 같은 활성산소(reactive oxygen species; ROS)는 세포성장, 분화, apoptosis와 같은 중요한 세포내 조절인자이지만, 과도한 양의 ROS는 세포막의 손상을 일으킨다. 따라서, ROS에 대한 세포내 방어 작용으로서 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase 등 다양한 항산화효소가 알려져 있다(Valko et al., 2007).

GPx는 활성부위에 셀레노시스테인을 가지고 있으며, 적은 양의 H_2O_2 에도 반응을 하며(Ursini & Bindoli, 1978), 반응 특성이나 위치에 따라서 크게 4가지의 subtype을 가지고 있다. 대부분의 장기에서 존재하고 있고, 세포질 내에 분포하는 cytosolic GPx(cGPx; Flohe et al., 1973), 장내에 주로 분포하고 있는 gastrointestinal GPx(GI-GPx; Chu & Esworthy, 1995), 세포외액에 존재하고 있는 plasma GPx(pGPx; Avissar et al., 1994), 세포막을 보호하며 정소에서 높게 분포하는 phospholipid hydroperoxide GPx(PHGPx; Imai et al., 1995)가 알려져 있다.

정자 발생(spermatogenesis)은 미성숙 생식세포가 세포분열, 분화, 감수분열을 거쳐 원형정자세포(round spermatid)를 생성하고, 길쭉정자세포(elongated spermatid)로 분화되는 과정으로 정소의 정세관(seminiferous tubules) 안에서 일어나며, 정세관 단면은 분화가 서로 다른 단계(stage)의 세포로 구성되어 있으며, 마우스는 12단계로 구성이 되어 있다(Lonnie et al., 1990).

미성숙 정자세포의 산화적 손상은 유전적 질환의 원인이 될 수 있으며, 성숙 정자세포의 산화적 손상은 불임의 원인(Fraga et al., 1991; Richburg, 2000)이 되므로 정자 발생 과정에서 SOD, GPx, catalase 등의 항산화효소는 다양한 산화적 손상으로부터 정자를 보호하는 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Gu et al., 1996). 특히 GPx는 포유류의 정자와 남성 생식기에서 ROS로 인한 산화적 손상에 중요한 방어효소로서 역할을 하고 있다고 알려져 있다(Brigelius-Flohé, 1999; Moreno et al., 2003; Drevet, 2006). PHGPx 유전자의 변이는 정자의 운동성과 정자수의 유의적인 감소를 보였으며, 불임남성에서 PHGPx 활성의 감소를 보였다(Foresta et al., 2002; Drevet, 2006). Acrylamide를 투여 후 정자 생성과

GPx의 활성이 감소되었으며, aroclor 1254 투여 후에도 정소의 독성이 관찰되어 정소 무게, 정자수, 정자의 운동성의 감소와 GPx의 활성이 감소되었다(Aly et al., 2009; Zhang et al., 2010). 그러나, 정자 발생 과정 동안 각 단계 특이적으로 각각의 GPx 유전자 발현에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

최근 개발된 방법 중 laser capture microdissection(LCM)은 복잡한 구조의 조직으로부터 현미경을 이용하여 세포를 관찰하면서 원하는 세포만을 레이저로 절개하여 얻는 기술로서 정상 조직의 세포 종류에 따른 유전자 발현 차이와 함께 종양 조직이나 병변이 있는 조직으로부터 특이적인 세포만을 추출하여 유전자 발현 변화를 비교 관찰할 수 있는 방법이다(Sluka et al., 2008; Agarwal et al., 2010; Wang et al., 2010).

본 연구에서는 LCM 기술을 이용하여 정상 마우스의 정세관상피에서 발생 단계별로 정자 발생세포를 분리하여 total RNA를 추출한 후, real-time polymerase chain reaction (PCR) 방법을 이용하여 항산화효소인 GPx의 4가지 isoforms에 대하여 유전자 발현 정도를 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

7주령의 성숙한 수컷 ICR 마우스를 (주)샘타코로부터 구입하여 충북대학교 실험동물연구지원센터 내에서 1주일간 사육실 및 실험실 환경에 적응시켜 일반 증상에 이상이 없음을 확인하고 실험에 사용하였다. 5마리를 polycarbonate cage에 수용하고, 실험동물용 고형사료(Purina® pellet 사료)와 음료를 자유롭게 공급하였다. 사육 실험실 환경으로는 온도 $23\pm 2^\circ C$, 상대 습도 $50\pm 10\%$, 환기 횟수 10~12회/hr, 조명시간 12 hrs, 조도 150~300 lux로 조절하였다. 모든 실험은 충북대학교 동물실험윤리위원회 규정에 입각하여 실시하였다(Chungbuk National University Animal Care Committee, according to NIH #86-23).

2. 조직 채취 및 처리

에테르로 마취시킨 후 부검을 하여 정소를 적출하고 바로 액체질소에 동결시킨 다음 RNA 추출에 이용하였다. LCM을 위해서 OCT compound에 포매하여 10 μm 두께로 PEN

membrane slides(MDS Analytical Technologies, Germany)를 이용하여 슬라이드를 제작하였고, 사용 전까지 -80°C 에 보관하였다. 동결된 정소 조직이 부착된 슬라이드는 0°C 에서 acetone에 1분간 고정을 하였으며, 95%와 75% 알코올과 RNase free인 증류수에 처리하였으며, hematoxylin(Sigma, USA) 용액으로 핵을 염색한 후 증류수에 수세한 다음 75%, 95%, 100% 알코올에 30초씩 탈수 과정을 거친 후 후드에서 20분간 공기 중 건조하여 LCM을 시행하였다.

3. LCM과 RNA 추출

정자 발생시기의 구별은 hematoxylin에 의해 염색된 핵에 의해서 구별을 하였다. I ~ V 단계는 버팁세포(Sertoli cell) 깊숙이 정세관내에서 길쭉정자세포를 볼 수 있으며, VII~VIII 단계는 정자방출을 위해서 길쭉정자세포가 정세관 상피내강 표면에 배열되었다. IX~XI 단계의 정세관에는 길쭉정자세포가 존재하지 않으며, 정자세포의 핵 모양은 납작하며 뚜렷한 응축이 나타나지 않았다. 제VI 단계와 XII 단계 정자세포는 발달의 진행이 다양하므로 세포들의 모양을 근거로 시기를 결정할 수가 없었다(Sluka et al., 2008). 각 단계별 정자 발생 과정 시료는 real-time PCR을 위하여 각 단계별로 32개의 정세관이 포함되도록 LCM을 하였으며, 시료는 각기 다른 5개의 정소에 대하여 각각 3번 반복하여 채취하였다. LCM은 Arcturus XT laser capture microdissection microscope (Molecular Devices, California, USA)를 이용하였고, 각 slide는 Prepstrip tissue preparation strip(Arcturus, USA)을 이용하여 잔존물을 제거한 후 사용하였다. 조직절편은 20배 검경렌즈를 사용하여 관찰하였으며, $30\ \mu\text{m}$ 깊이의 laser를 사용하였고, power는 5 msec 간격으로 20~30 mW 범위에서 사용하였다. 세포는 CapSure LCM macro caps(Arcturus, USA)에 포획한 직후 PicoPure RNA Isolation Kit(Arcturus, USA)을 이용하여 시약설명서에 따라 total RNA를 추출하였다.

4. Real-time PCR 분석

위의 방법으로부터 얻어진 total RNA 약 $1\ \mu\text{g}$ 을 cDNA synthesis kit(BIO-RAD, USA)을 이용하여 총 반응용액 20 μl 의 cDNA 용액을 합성하여 real-time PCR을 실시하였다. TaqMan Universal PCR Master Mix Kit(Applied Biosystems, USA)으로 총 25 μl 를 맞춘 후 7500 Real-Time

PCR System(Applied Biosystems, USA) 기계를 이용하여 실시하였다. cGPx primers와 probe는 mouse 유전자 특이적으로 cGPx forward primer가 5'-CCC CAC TGC GCT CAT GA-3', cGPx reverse primer가 5'-GGC ACA CCG GAG ACC AAA-3', cGPx TaqMan probe로서 FAM이 표지된 5'-CGA CCC CAA GTA CAT C-3'염기서열을 사용하였다. GI-GPx primers는 GI-GPx forward primer가 5'-TGA CCC GTT CTC CCT CAT G-3', GI-GPx reverse primer가 5'-GCG CAC GGG ACT CCA TAT-3' 및 FAM이 표지된 probe의 배열은 5'-CGA TCC CAA GCT C-3'였다. Mouse pGPx에 대한 primers와 probe는 Applied Biosystems (USA)에서 판매되는 Assay on demand # Mm00492427를 사용하였다. 또한, Mouse PHGPx에 대한 primers와 probe는 Applied Biosystems(USA)에서 판매되는 Assay on demand # Mm00515041를 사용하였다.

Beta-actin(Assay on demand #4352933E, Applied Biosystems, USA)은 내부표지인자로 사용하였다. 각 데이터(n=5)는 3회 반복 실시를 하여 실험하였으며, comparative Ct method로 mRNA 함량을 측정하였다.

5. 통계처리

결과의 통계분석은 유의수준 $p < 0.05$ 에서 비모수적 평균 분석법인 Kruskal-Wallis법을 이용하였다. 또한, 각 유전자의 발현 정도가 서로 상관관계가 있는지를 편상관분석을 통해 검증하였다.

결 과

마우스 정소의 정세관 내에서 12단계의 정자 발생 단계 중 길쭉정자세포의 모양과 위치를 중심으로 VI과 XII 단계 이외에 10단계에 대하여 I ~ V, VII~VIII와 IX~XI의 3분류로 나누어 구별하였으며(Fig. 1), LCM을 이용하여 성공적으로 정세관을 채취하여(Fig. 2) cGPx, GI-GPx, pGPx 및 PHGPx에 대한 mRNA 발현 양상을 비교하였다.

GPx mRNA는 모든 정자 발생 단계에서 발현되었으며, GPx 유전자 중에서 PHGPx mRNA는 1331~1401-fold로 정자 발생 단계 동안 가장 많은 양이 발현되었으며, cGPx mRNA는 50.4~79.4-fold, GI-GPx mRNA는 3.3~5.0-fold, pGPx mRNA는 0.86~1.05-fold 순으로 발현되었다(Figs. 3~6).

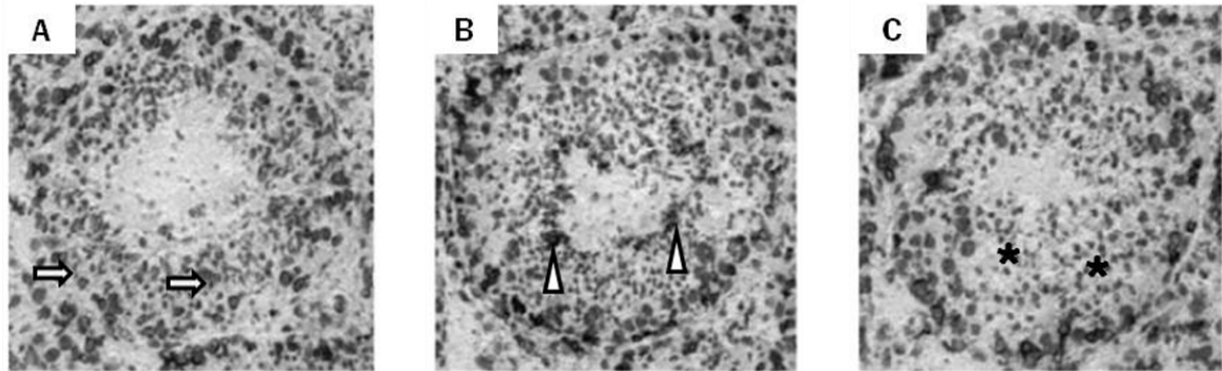


Fig. 1. Seminiferous tubules at the following stages of spermatogenesis were grouped. Arrows indicate the heads of compact elongated spermatids embedded within the seminiferous epithelium on stages I ~ V (A). Arrowheads indicate the elongated spermatids adjacent to the tubule lumen prior to spermiation on stages VII ~ VIII (B). Asterisks indicate absence of elongated spermatids on stages IX ~ XI (C). Magnification: $\times 200$.



Fig. 2. Isolation of a stage-specific seminiferous tubule using a laser capture microdissection (LCM). Micrograph of intact testis section viewed by light microscopy prior to LCM (A), an isolated tubule on the LCM cap following LCM (B), and the remaining tissue section (C). Magnification: $\times 100$.

cGPx mRNA는 I ~ V 단계에서 51.7-fold, VII ~ VIII 단계에서는 79.4-fold, IX ~ XI 단계에서는 50.4-fold로 정자방출 (spermiation)이 있기 전에 가장 높게 발현하였다(Fig. 3). GI-GPx mRNA는 정자 발생 I ~ V 단계에서는 3.38-fold로 가장 낮은 발현을, VII ~ VIII 시기에서는 5.0-fold로 가장 높게 발현되었고, IX ~ XI 단계에서는 3.69-fold를 보였다(Fig. 4). pGPx mRNA는 다소 낮은 발현량으로서 GI-GPx와 유사한 발현 양상을 보여 정자 발생 VII ~ VIII 시기에 1.05-fold로 가장 높게 발현되었고, IX ~ XI 단계에서는 1.0-fold, I ~ V 단계에는 0.86-fold로 가장 낮은 발현을 보였다(Fig. 5). PHGPx mRNA는 정자가 방출되기 전단계인 VII ~ VIII 단계에서 1672-fold로 가장 높았으며, IX ~ XI 단계에서는 1401-fold, I ~ V 단계에서는 1331-fold로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 6).

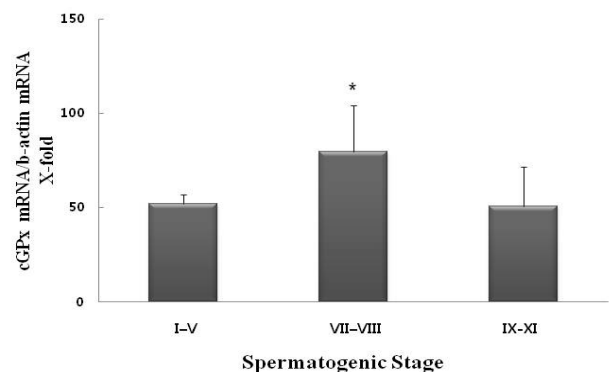


Fig. 3. Stage-specific expressions of cytosolic glutathione peroxidase (cGPx) mRNA during spermatogenesis. Gene expression for cGPx in the cross-sectioned seminiferous tubules defining the spermatogenic stages (I-V, VII-VIII, and IX-XI) excised by a laser capture microdissection was assessed by real-time PCR. * Significantly different from stage I-V at $p < 0.05$.

고찰

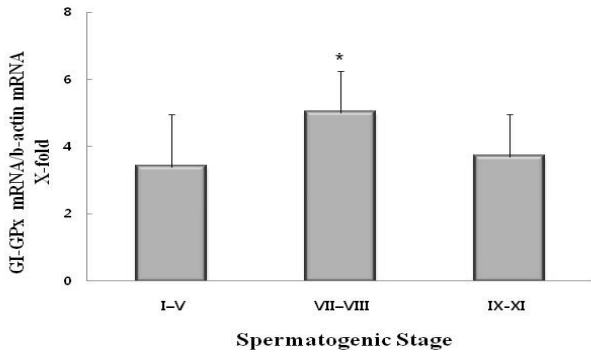


Fig. 4. Stage-specific expressions of gastrointestinal glutathione peroxidase (GI-GPx) mRNA during spermatogenesis. Gene expression for GI-GPx in the cross-sectioned seminiferous tubules defining the spermatogenic stages (I-V, VII-VIII, and IX-XI) excised by a laser capture microdissection was assessed by real-time PCR. * Significantly different from stage I-V at $p < 0.05$.

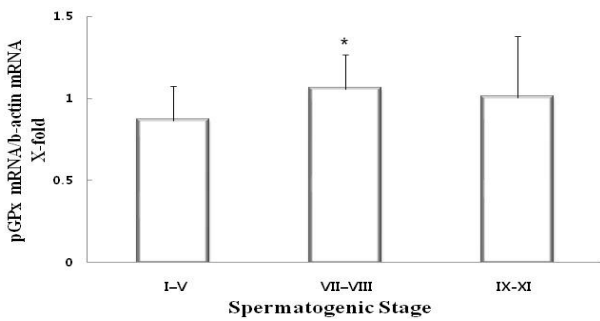


Fig. 5. Stage-specific expression of plasma glutathione peroxidase (pGPx) mRNA during spermatogenesis. Gene expression for pGPx in the cross-sectioned seminiferous tubules defining the spermatogenic stages (I-V, VII-VIII, and IX-XI) excised by a laser capture microdissection was assessed by real-time PCR. * Significantly different from stage I-V at $p < 0.05$.

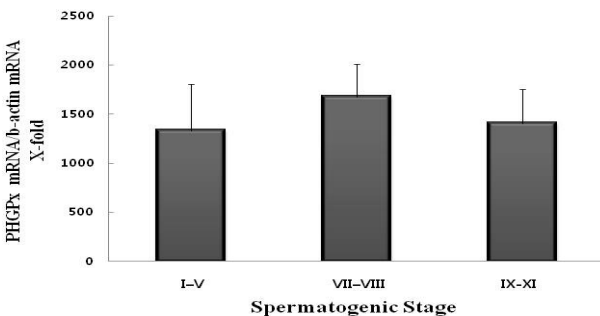


Fig. 6. Stage-specific expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA during spermatogenesis. Gene expression for PHGPx in the cross-sectioned seminiferous tubules defining the spermatogenic stages (I-V, VII-VIII, and IX-XI) excised by a laser capture microdissection was assessed by real-time PCR.

본 연구에서는 LCM과 real-time PCR법을 이용하여 마우스 정자 발생 단계에서 GPx의 mRNA 발현 변화를 관찰하였다. 정자 발생 단계 중 4가지 GPx 유전자 모두 정자 발생 단계에서 발현이 되었으며, PHGPx는 1331~1401-fold로 GPx 유전자 중 가장 많은 양이 발현되었으며, pGPx는 0.8~1.05-fold로 아주 적은 양이 발현되었다. 이러한 결과는 4가지 subtype의 GPx가 정소의 정자 발생 단계에서 항산화효소로서 각각 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다. 이전 연구 결과에 따르면, PHGPx 활성은 모든 조직에서 나타나지만 특히 정소에서 가장 높다는 보고(Diaconu et al., 2006; Baek et al., 2007)가 있으며, pGPx는 세포외액에서 발현되는 유전자로 남성생식기 중 정소상체와 정낭샘에서 높은 발현을 보여 정자의 성숙 과정과 정자환경에 중요한 항산화효소로 알려졌다(Schwaab et al., 1998).

ROS에 의해 손상된 정소의 생식세포에서 cGPx와 GI-GPx mRNA는 정상 정소보다 발현이 높게 관찰된다는 보고는 있지만(Suna et al., 2007; Paul et al., 2009), 정자 발생 단계에서의 자세한 연구는 이루어지지 않고 있다. 본 연구 결과, cGPx와 GI-GPx는 정자가 방출되기 전인 VII~VIII 단계에서 가장 높았으며, cGPx는 IX~XI 단계에서, GI-GPx는 I~V 단계에는 가장 낮은 발현을 보였다. 이것은 cGPx와 GI-GPx가 산화 손상 인자뿐만 아니라 정자의 발생 과정에서 발생할 수 있는 ROS로부터 정자 발생세포를 직접적으로 보호할 수 있다는 것으로 사료된다.

정소에서 pGPx의 발현에 대한 보고는 거의 알려진 바 없다. 본 연구 결과, 비록 발현 정도는 낮았지만, pGPx mRNA는 정자 발생 단계 VII~VIII 시기에 가장 높게 발현되는 것으로 보아 정자가 방출되기 이전 시기에 산화스트레스에 대한 방어역할을 할 수 있음을 시사한다.

PHGPx는 정소와 정자세포에서 높은 발현을 나타내며, PHGPx가 감소되거나 결손되었을 때는 정자 활성의 감소나 불임의 원인이 된다고 알려져 있다(Imai, 2010). *In situ* hybridization 결과, 정자의 발생 과정에서 PHGPx는 X단계의 pachytene spermatocyte에서 발현이 시작되어 원형정자세포에서 점차 증가되었고 steps 10~11의 길쭉정자세포에서 가장 높은 발현을 보였으며, step 12 이후 점차 감소되어 step 16 정자세포에서 약하게 발현되었다(Nam et al., 1998). 본 연구 결과,

PHGPx mRNA는 정자가 방출되기 전단계인 VII~VIII 단계에서 가장 높았으며, I~V 단계에서는 가장 낮은 발현양을 보였다. 따라서 PHGPx는 정자가 방출되기 이전 시기에서도 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

본 연구 결과로부터 정자 발생 과정에서 GPx의 subtypes 별 유전자 발현이 서로 다르게 조절되고 있음을 알 수 있었으며, 정자 발생 단계에서 GPx의 역할을 연구하는 기본적인 자료로 사용될 수 있다고 사료된다. 또한, 복잡한 정자 발생 과정에서 분화하는 정자세포별로 LCM을 이용하여 정확하게 분리할 수 있었으며, 향후 LCM이 정자 발생 과정에서 특정한 유전자 및 단백질의 정량과 기능 분석에 유용하게 사용되리라 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2008년 충북대학교 학술연구비로 수행하였습니다.

인용문헌

- Agarwal N, Lippmann ES, Shusta EV (2010) Identification and expression profiling of blood-brain barrier membrane proteins. *J Neurochem* 112:625-635.
- Aly HA, Domènech O, Abdel-Naim AB (2009) Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food Chem Toxicol* 47:1733-1738.
- Avissar N, Kerl EA, Baker SS, Cohen HJ (1994) Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. *Arch Biochem Biophys* 309:239-246.
- Baek IJ, Seo DS, Yon JM, Lee SR, Jin Y, Nahm SS, Jeong JH, Choo YK, Kang JK, Lee BJ, Yun YW, Nam SY (2007) Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *J Mol Histol* 38:237-244.
- Brigelius-Flohé R (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 27:951-965.
- Chu FF, Esworthy RS (1995) The expression of an intestinal form of glutathione peroxidase (GSHPx-GI) in rat intestinal epithelium. *Arch Biochem Biophys* 323:288-294.
- Diaconu M, Tangat Y, Bohm D, Kuhn H, Michelmann HW, Schreiber G, Haidl G, Glander HJ, Engel W, Nayermia K (2006) Failure of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in oligoasthenozoospermia and mutations in the PHGPx gene. *Andrologia* 38:152-157.
- Drevet JR (2006) The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol* 250:70-79.
- Flohe L, Günzler WA, Schock HH (1973) Glutathione peroxidase: selenoenzyme. *FEBS Lett* 32:132-134.
- Foresta C, Flohé L, Garolla A, Roveri A, Ursini F, Maiorino M (2002) Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biol Reprod* 67:967-671.
- Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN (1991) Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11003-11006.
- Gu W, Hecht NB (1996) Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. *J Androl* 17:256-262.
- Imai H (2010) New strategy of functional analysis of PHGPx knockout mice model using transgenic rescue method and Cre-LoxP system. *J Clin Biochem Nutr* 46:1-13.
- Imai H, Sumi D, Hanamoto A, Arai M, Sugiyama A (1995) Molecular cloning and functional expression of a cDNA for rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: 3'-untranslated region of the gene is necessary for functional expression. *J Biochem* 118:1061-1067.
- Lonnie DR, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990)

- Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, USA pp.4-47.
- Moreno SG, Laux G, Brielmeier M, Bornkamm GW, Conrad M (2003) Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathion peroxidase (PHGPx). *Biol Chem* 384:635-643.
- Nam SY, Fujisawa M, Kim JS, Kurohmaru M, Hayashi Y (1998) Expression pattern of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase messenger ribonucleic acid in mouse testis. *Biol Reprod* 58:1272-1276.
- Paul C, Teng S, Saunders PT (2009) A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod* 80:913-919.
- Richburg JH (2000) The relevance of spontaneous- and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicol Lett* 112-113:79-86.
- Schwaab V, Faure J, Dufaure JP, Drevet JR (1998) GPx3: the plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens. *Mol Reprod Dev* 51:362-372.
- Sluka P, O'Donnell L, McLachlan RI, Stanton PG (2008) Application of laser-capture microdissection to analysis of gene expression in the testis. *Prog Histochem Cytochem* 42:173-201.
- Suna S, Yamaguchi F, Kimura S, Tokuda M, Jitsunari F (2007) Preventive effect of D-psicose, one of rare ketohexoses, on di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular injury in rat. *Toxicol Lett* 173:107-117.
- Ursini F, Bindoli A (1987) The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids* 44:255-276.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84.
- Wang S, Wang L, Zhu T, Gao X, Li J, Wu Y, Zhu H (2010) Improvement of tissue preparation for laser capture microdissection: application for cell type-specific miRNA expression profiling in colorectal tumors. *BMC Genomics* 11:163.
- Zhang JX, Yue WB, Ren YS, Zhang CX (2010) Enhanced role of elaidic acid on acrylamide-induced oxidative stress in epididymis and epididymal sperm that contributed to the impairment of spermatogenesis in mice. *Toxicol Ind Health In press*.

(received 14 March 2010, received in revised form 29 April 2010, accepted 30 April 2010)