

研究论文

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)在不同发育阶段SD大鼠睾丸中的表达及作用

许 皓 陈雪梅 丁裕斌 何俊琳 王应雄 杨德辉 刘学庆*

(重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室, 重庆 400016)

摘要 精子发生是男性生殖中的主要过程, 精原细胞的不断分裂增殖又保证了精子发生的顺利进行。随着年龄的不断增长, 男性精子的数量、质量出现下降趋势。mTOR信号转导通路在细胞增殖分化中发挥着中心调控作用, 因此, mTOR信号通路可能在精子发生过程中有着重要的地位。为了探明mTOR信号通路与精子发生的关系, 首先, 通过SD大鼠睾丸组织切片的免疫组化, 发现mTOR是在生精小管的精原细胞胞浆中表达; 其次, 采用FQ-PCR检测mTOR mRNA在SD大鼠睾丸中的表达。结果显示, 80周龄组mTOR的转录与8周龄组相比差异显著。最后利用Western blot检测出mTOR蛋白的表达及其对下游靶蛋白P70S6K的磷酸化效率均随年龄的增长逐渐下降。同时, 在用雷帕霉素处理8周龄SD大鼠中, 发现精子数量减少, P70S6K磷酸化效率降低并伴随生精小管萎缩和空泡化。通过这些结果, 可以看出mTOR信号转导通路可能在精子发生中发挥着重要作用。

关键词 睾丸; 精子发生; mTOR; 雷帕霉素; P70S6K

精子发生是指精原细胞经过一系列分裂分化演变为精子的过程, 包括精原细胞的有丝分裂、精母细胞的减数分裂和精子形成三个阶段, 它持续发生在男性性成熟后的整个生命活动中。其中, 精原细胞的不断分裂增殖为精子发生提供数量支持, 保证了精子发生的顺利进行, 在男性生殖中有着重要地位。这一特殊的细胞增殖过程受到复杂的基因/蛋白网络的调控, 而在这些网络中, 信号因子和信号通路起着非常重要的作用^[1]。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是近年来发现的一类进化上非常保守的蛋白激酶家族, 广泛存在于各种生物细胞中。mTOR是一类脯氨酸调控的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 属于磷酸肌醇相关激酶(phosphatidylinositol kinase-related kinases, PIKKs)家族成员^[2-3]。作为一种重要的信号传导分子, mTOR可与不同上游信号传导分子结合, 接受生长因子信号、营养信号和激素信号等调控下游翻译抑制分子eIF-4E结合蛋白1(4E-BP1)和核糖体蛋白S6激酶p70S6K, 从而控制蛋白质的合成。现有的研究表明, mTOR在细胞的增殖、生长、分化和凋亡过程中起着中心调控点的作用^[4-7]。

有研究报道表明, 在用雷帕霉素治疗肿瘤或免疫抑制反应过程中, 男性病人表现出不同程度的少精甚至无精症^[8-11]。但是, 关于mTOR与这种少精或无精症之间的关系却未见报道。在我们的前期研究中发现睾丸因为其较高的增殖活性, mTOR的表达也较其他组织高。于是, 我们推测mTOR在精子发生过程中可能起着重要作用。本研究将通过检测mTOR在大鼠睾丸组织中的表达规律, 探讨其与精子发生的关系, 为进一步研究具体机制打下重要基础, 同时为临床上对雷帕霉素的风险评估提供一个参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD雄性大鼠, 由重庆医科大学动物中心提供, 动物合格证号: SCXY(渝)20020003。

1.1.2 主要试剂 Trizol Reagent(美国Invitrogen公司), SYBR Premix Ex Taq™(大连宝生物公司), 兔SP检测试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物

收稿日期: 2011-11-11 接受日期: 2012-01-04

重庆医科大学重点基金(No.XBED201007)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68485001, E-mail: cqmu_liuxueqing@126.com

技术有限公司), 细胞裂解液、超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究), 抗mTOR抗体、抗P70S6K抗体、抗P-P70S6K(Thr389)抗体(美国CST公司), 雷帕霉素(台州科瑞生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与取材 选取健康的不同发育阶段的SD雄性大鼠15只, 分为三组: 性成熟期8周龄组、中年期38周龄组、老年期80周龄组, 每组5只。在取材前断颈处死大鼠。将一侧睾丸去掉白膜后放入冻存管中-80 °C冰箱冻存, 另一侧睾丸保留白膜整个放入4%多聚甲醛中固定。同时, 取双侧附睾称重并加

入1 mL生理盐水后剪碎制成悬浮液, 不同样本均称取相同重量的附睾。所有操作均在低温环境中进行。

1.2.2 精子计数 吸取剪碎后的悬浮液20 μ L至4 mL生理盐水中, 即稀释200倍, 37 °C水浴箱孵育一小时后, 用细胞计数板计数。

1.2.3 PCR、FQ-PCR 液氮碾磨组织, 用Trizol Reagent提取SD大鼠心脏、肝脏、肾脏、脑组织和各发育阶段睾丸组织总RNA, 逆转录成cDNA, 用SYBR green PCR混合物完成实时定量PCR反应, 采用 β -actin作为内参, 进行归一化。所用引物见表1。

1.2.4 HE染色 脱蜡: 二甲苯I 5 min, 二甲苯II 10 min;

表1 定量PCR所用引物

Table 1 The primers of FQ-PCR

引物 Primers	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	解链温度(°C) Tm(°C)
mTOR F	CAC ATC ACT CCC TTC ACC A	50.85
mTOR R	GCA ACA ACG GCT TTC CAC	52.14
β -actin F	CCT GAG GCT CTT TTC CAG CC	54.84
β -actin R	TAG AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG T	55.58

梯度酒精水化: 100%、90%、80%、70%各3 min, 流水冲洗2 min; 苏木素染色 4~8min, 自来水冲洗; 1%盐酸水溶液分化5~10 s, 自来水洗返蓝15~30 min; 0.5%伊红染色30 s~1 min; 梯度酒精脱水: 70%、80%、90%、100%各3 min; 透明: 二甲苯I 2~3 min, 二甲苯II 5 min。

1.2.5 免疫组织化学 睾丸组织在4%多聚甲醛中固定3 d后, 75%、80%、95%、100%乙醇梯度脱水, 在经过浸蜡、包埋后用石蜡切片机切成4 μ m睾丸组织切片。脱蜡: 二甲苯I 20 min, 二甲苯II 20 min; 梯度酒精水化: 100%、90%、80%、70%各3 min, 流水冲洗5 min; 蒸馏水水化5 min; PBS浸洗5 min; 抗原热修复; 去离子水室温孵育10 min后PBS 3 min \times 3次; 加入免疫组化试剂盒A液(封闭用的正常血清), 37 °C孵育30 min; mTOR抗体(1:50, Cell Signaling Technology) 4 °C过夜; 加入免疫组化试剂盒B液(生物素标记羊抗兔IgG), 37 °C孵育30 min后, PBS 3 min \times 3次; 加入免疫组化试剂盒C液(辣根酶标记链酶卵白素工作液), 37 °C孵育30 min后, PBS 3 min \times 3次; DAB显色。并通过Image Pro Plus软件测定平均光密度。所有发育阶段睾丸组织切片均在相同条件, 即一抗浓度一致, 显色时间一致的前提下进行。

1.2.6 Western blot 细胞裂解液提取组织总蛋白, 用BCA蛋白定量法测定总蛋白浓度。配制分离

胶(8%~10%)和浓缩胶(5%); 60 V恒压预电泳1 h后上样, 80 V恒压电泳; 待充分分离后将蛋白转移至PVDF膜上; 5%脱脂奶粉封闭1 h后, 一抗4 °C过夜; PBST清洗三次, 5 min/次; 辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1 h后, PBST清洗3次, 5 min/次; ECL法显色。

1.2.7 雷帕霉素SD大鼠模型及分组 选取健康的8周SD雄性大鼠15只, 将其分为空白组、溶剂对照组、雷帕霉素组, 5只一组采用腹腔注射处理30 d。空白组注射蒸馏水, 溶剂对照组注射DMSO, 雷帕霉素组注射由DMSO溶解的雷帕霉素, 浓度为2 mg/(kg·day)。

1.2.8 统计学分析 每个实验至少重复3次, 采用SPSS17.0软件进行统计学分析, 结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用t检验, $P\leq 0.05$ 为差异有显著性。

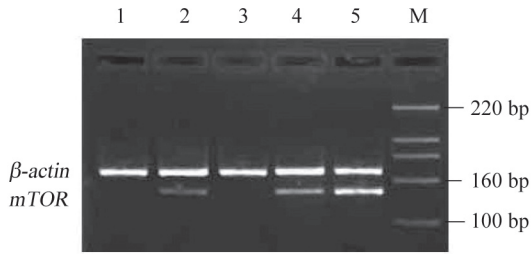
2 结果

2.1 在几个主要器官中mTOR的表达

我们做了不同组织中mTOR表达的RT-PCR, 结果显示, mTOR在睾丸中的表达远高于心脏和肝脏组织, 而肾脏及脑组织几乎没有表达(图1)。

2.2 SD大鼠在不同发育阶段中精子数量及生精小管的改变

通过对正常SD大鼠的精子计数, 我们发现随着年龄的增长SD大鼠的精子数量逐渐减少(图2)。在



1: 脑组织; 2: 心组织; 3: 肾组织; 4: 肝组织; 5: 睾丸组织; M: DNA marker。

Lane 1: brain; lane 2: heart; lane 3: kidney; lane 4: liver; line 5: testis; M: DNA marker.

图1 *mTOR*在大鼠不同组织中的表达

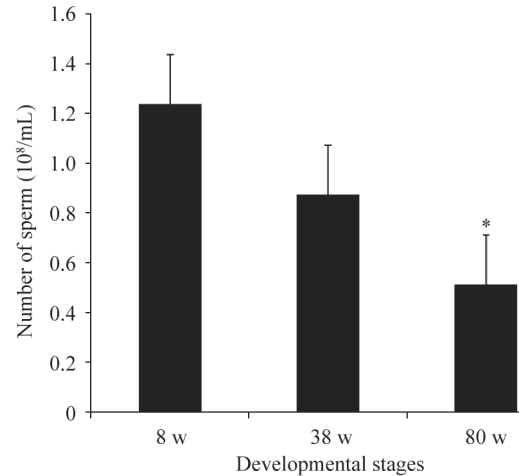
Fig.1 The expression of *mTOR* in different organizations of rat

对各年龄段SD大鼠睾丸切片HE染色时, 我们观察到随着年龄的增长生精小管会逐渐发生空泡化, 这一过程并非所有的生精小管都会发生, 但是年龄越大发生空泡化的生精小管数量越多, 程度越大(图3A~图3C)。

2.3 *mTOR*在不同发育阶段SD大鼠睾丸中的表达

2.3.1 *mTOR* mRNA在不同发育阶段SD大鼠睾丸中的表达 在对3个发育阶段SD大鼠睾丸中的*mTOR*表达进行检测时, 发现3个发育阶段中的*mTOR*表达有差异。FQ-PCR结果显示*mTOR*在老龄组SD大鼠睾丸中的表达与性成熟组相比差异显著(图4)。

2.3.2 *mTOR*蛋白在不同发育阶段SD大鼠睾丸中的表达 为了探明*mTOR*在睾丸组织中的表达部位, 我们做了睾丸组织切片的免疫组织化学(图5A~图5D)。结果显示, *mTOR*主要表达在生精小管外



* $P < 0.05$, 与8周龄组相比。

* $P < 0.05$ vs 8 weeks group.

图2 大鼠不同发育阶段精子数量情况

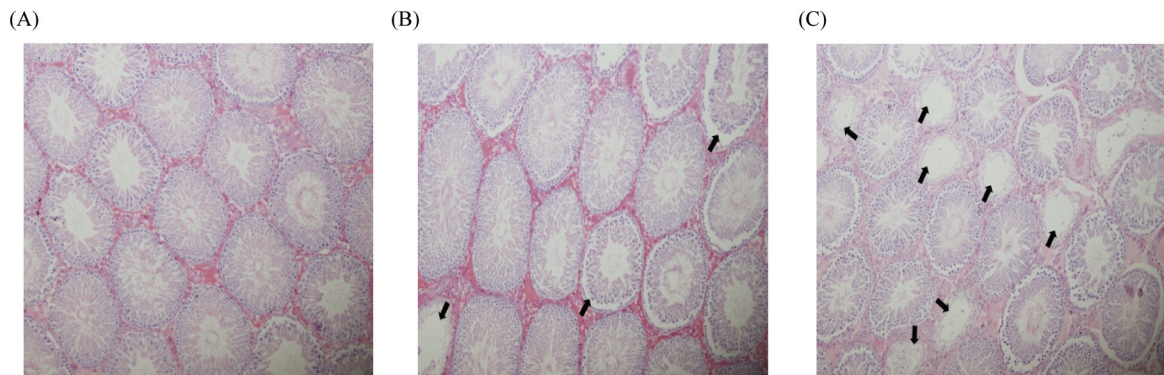
Fig.2 The number of sperm in different developmental stages of rat

层的精原细胞和初级精母细胞, 次级精母细胞及精细胞中也有非常少量的表达, 并且随着年龄的增长*mTOR*在生精小管中的表达在逐渐降低。

随后利用Western blot进行了定量分析。其结果与免疫组化光密度分析一致, 即随着年龄的增长*mTOR*在睾丸中的表达逐渐降低(图5E)。

2.4 P70S6K在不同发育阶段SD大鼠睾丸中的表达

最后, 我们通过Western blot发现, P70S6K虽然在38周龄中的表达最高, 被*mTOR*磷酸化激活的P-P70S6K却在8周龄中的活性最高(图6A), 比较三个发育阶段P70S6K磷酸化效率即P-P70S6K/P70S6K,

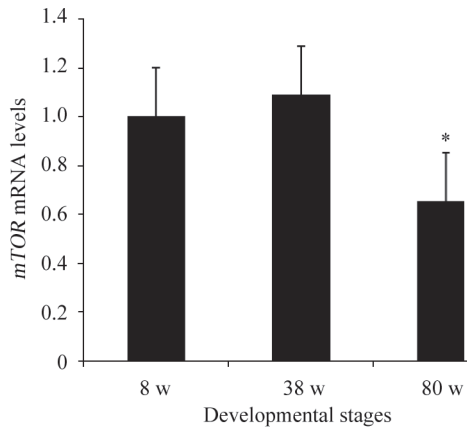


A: 8周龄组; B: 38周龄组; C: 80周龄组。箭头所指为生精小管萎缩、空泡化部位。

A: 8 weeks group; B: 38 weeks group; C: 80 weeks group. Arrowhead was the seminiferous tubular atrophy and vacuolization site.

图3 不同发育阶段大鼠睾丸生精小管萎缩、空泡化情况(100×)

Fig.3 Seminiferous tubular atrophy and vacuolization in different developmental stages of rat testis(100×)



* $P < 0.05$, 与8周龄组相比。

* $P < 0.05$ vs 8 weeks group.

图4 mTOR mRNA在不同发育阶段大鼠睾丸中的表达情况

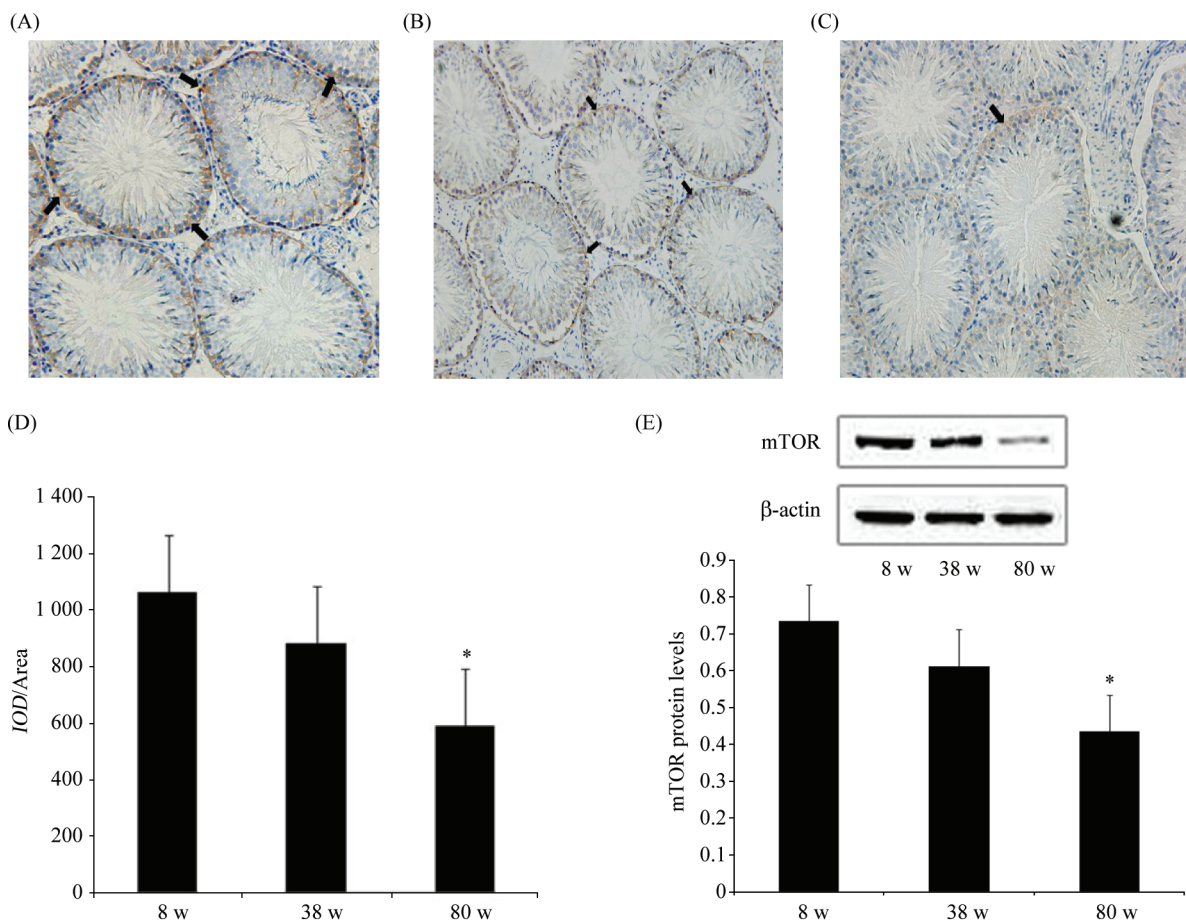
Fig.4 The expression of mTOR mRNA in different developmental stages of rat testis

我们发现性成熟期的P70S6K磷酸化效率最高,并且随着年龄的增长其磷酸化效率逐渐降低(图6B)。

2.5 雷帕霉素处理SD大鼠模型功能验证

2.5.1 mTOR被雷帕霉素抑制后SD大鼠精子数量及生精小管的改变 在功能验证实验中发现, mTOR被雷帕霉素抑制后SD大鼠的精子数量显著降低(图7, $P=0.000\ 981$)。HE染色结果显示, 与空白和对照组相比, 雷帕霉素组大鼠生精小管发生明显的萎缩及空泡化(图8A~图8C)。

2.5.2 mTOR被雷帕霉素抑制后P70S6K及其磷酸化表达的改变 经雷帕霉素处理后, SD大鼠睾丸中的P70S6K表达没有明显变化, 而P-P70S6K却显著降低(图9)。

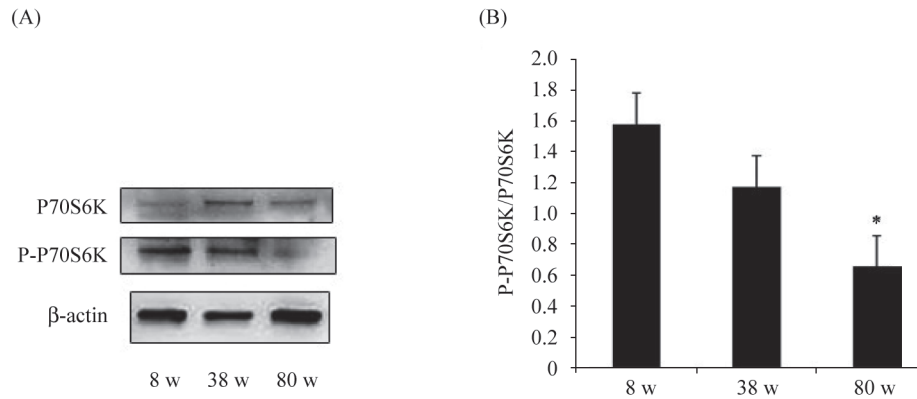


A: 8周龄组; B: 38周龄组; C: 80周龄组; D: 平均光密度量化分析; E: mTOR蛋白的表达水平。 * $P < 0.05$, 与8周龄组相比。

A: 8 weeks group; B: 38 weeks group; C: 80 weeks group; D: quantitative analysis of IOD/Area; E: protein expression of mTOR. * $P < 0.05$ vs 8 weeks group.

图5 mTOR蛋白在不同发育阶段大鼠睾丸中的表达情况(200×)

Fig.5 The expression of mTOR protein in different developmental stages of rat testis(200×)

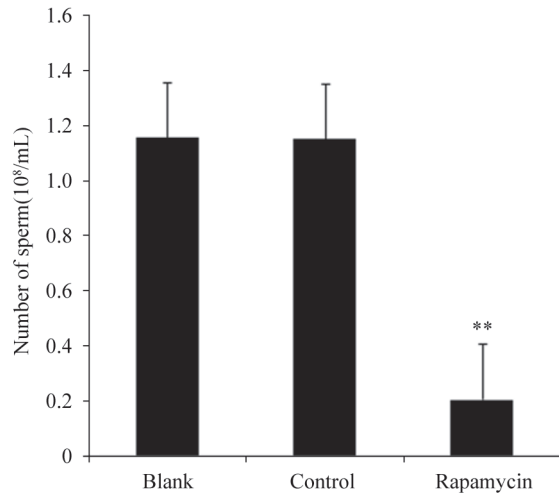


A: P70S6K、P-P70S6K的表达水平; B: P-P70S6K/P70S6K量化分析。* $P < 0.05$, 与8周龄组相比。

A: protein expression of P70S6K and P-P70S6K; B: the ratio between the P-P70S6K and P70S6K. * $P < 0.05$ vs with 8 weeks group.

图6 不同发育阶段SD大鼠睾丸中mTOR对P70S6K的磷酸化调控

Fig.6 P70S6K phosphorylated by mTOR in different developmental stages of rat testis



** $P < 0.01$, 与空白组相比。

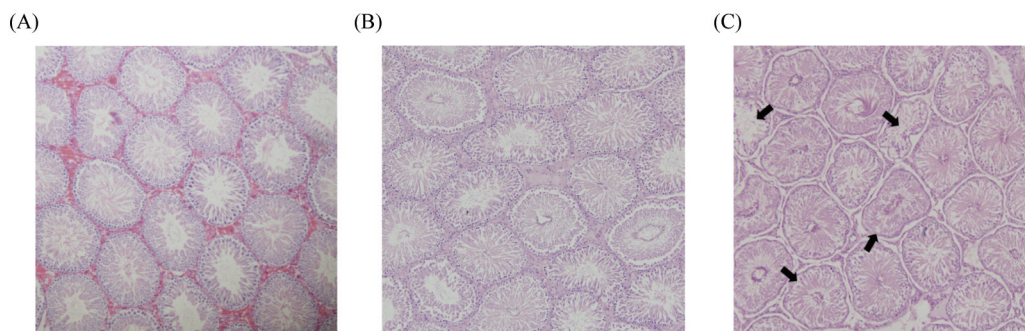
** $P < 0.01$ vs with blank group.

图7 雷帕霉素对大鼠精子数量的影响

Fig.7 Effects of rapamycin on number of sperm

3 讨论

mTOR信号通路在细胞增殖中的作用已经在众多的肿瘤研究中得到证实, 因此成为目前比较热门的治疗肿瘤的靶点^[12-15]。本研究发现, mTOR在SD大鼠睾丸中的表达具有时空特异性。mTOR表达主要在精原细胞中, 并且随着年龄的增长mTOR的表达量逐渐降低。而精原细胞在精子发生过程中持续进行着有丝分裂, 表现出极高的增殖活性, 对维持精子数量起着重要作用; 同时雄性大鼠性成熟后, 随着年龄的增长, 精子数量呈下降趋势。由于mTOR的表达与细胞增殖成正相关, 因此, mTOR在精原细胞中的表达及变化可能与精子发生有着重要联系。已有研究表明, 一些与细胞增殖相关的细胞因子参与精原细胞的增殖过程, 如精子发生相关蛋白激酶(SPK)、tssk1以及其他与增殖相关的蛋白在精子发

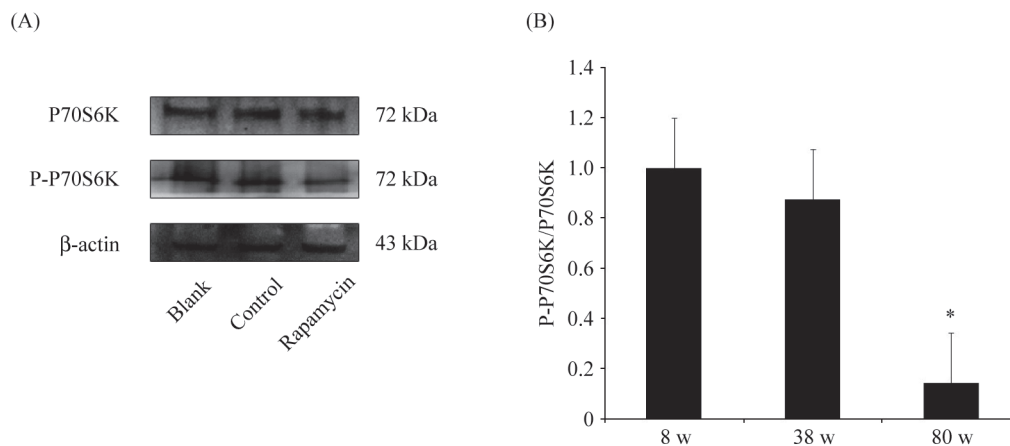


A: 空白组; B: 对照组; C: 雷帕霉素组。箭头所指为生精小管萎缩、空泡化部位。

A: blank group; B: control group; C: rapamycin group. Arrowhead was the seminiferous tubular atrophy and vacuolization site.

图8 不同分组大鼠睾丸生精小管萎缩、空泡化情况(100 \times)

Fig.8 Seminiferous tubular atrophy and vacuolization in different groups of rat testis(100 \times)



A: P70S6K、P-P70S6K的表达水平; B: P-P70S6K/P70S6K量化分析, * $P < 0.05$, 与空白组相比。

A: protein expression of P70S6K and P-P70S6K; B: the ratio between the P-P70S6K and P70S6K, * $P < 0.05$ vs with blank group.

图9 不同分组P70S6K的磷酸化效率

Fig.9 P-P70S6K/P70S6K in different groups

生过程中起着重要作用^[16-18]。为了证实mTOR与精子发生的关系,本研究用mTOR特异性抑制剂雷帕霉素处理性成熟雄性大鼠,结果表明处理组的雄性大鼠精子数量明显低于对照组,并且发生了与老龄大鼠相似的生精小管萎缩及空泡化。这些结果证实mTOR信号通路在精子发生中起着非常重要的作用。

那么, mTOR在精子发生过程中产生作用的机制是什么? 本研究结果显示: P70S6K在SD大鼠睾丸中的磷酸化水平随着其年龄的增长逐渐降低。P70S6K是mTOR下游的直接作用底物,其Thr389位点能被mTOR磷酸化,被磷酸化激活的P70S6K能够控制5'-TOP结构的mRNA的翻译,促进细胞增殖^[19-22]。通过这些事实,对mTOR在精子发生中的作用机制可以作出如下推论: 在SD大鼠精原细胞中, mTOR接受信号通路上游信号后,对下游靶蛋白P70S6K进行磷酸化,磷酸化的P70S6K调控促进精原细胞增殖的蛋白合成,从而促进精子发生。雄性SD大鼠从性成熟期到中年期,虽然P70S6K的表达量有所增加,但由于mTOR的表达下降,它对P70S6K的磷酸化效率即P-P70S6K/P70S6K降低,因此精原细胞增殖减缓甚至终止,最后导致生精小管出现萎缩并最终形成空泡;而在雷帕霉素处理组中,由于mTOR被抑制使P70S6K的磷酸化效率显著降低,同时也有相应的空泡化发生。表明mTOR通过调控P70S6K的磷酸化水平在精子发生中起着重要的作用。

在实验过程中有一个值得注意的现象, mTOR蛋白在大鼠睾丸中随着年龄的增长表达是逐渐降低的,但是FQ-PCR的结果却显示mTOR的mRNA在38周龄即中年期的表达最高。我们推测,这种mRNA、蛋白表达的不一致可能跟miRNAs有关。也就是说,虽然在SD大鼠中年期时, mTOR的转录达到最高,但是由于miRNAs的调控mTOR mRNA翻译被抑制,导致mTOR蛋白表达降低。目前,已知的对mTOR进行调控的miRNA有mir-199a-3p和mir-100^[23-25],但是在精子发生过程中它们是否对mTOR进行调控以及还有哪些其他miRNA参与其中都还不清楚,需要进一步证实。

本研究已初步证实, mTOR作为一种对细胞增殖、分化起关键作用的信号因子,在SD大鼠的精子发生过程中起着非常重要的作用。因此,明确人类精子发生与mTOR之间的关系,将为临床诊断及治疗男性不育症和睾丸癌,以及为新的男性避孕药物提供新的分子靶标打下基础。

参考文献 (References)

- 1 He Z, Kokkinaki M, Dym M. Signaling molecules and pathways the fate of spermatogonial stem cells. *Microsc Res Tech* 2009; 72(8): 586-95.
- 2 Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): An integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004; 23(18): 3151-71.
- 3 Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell*

- Sci 2009; 122(20): 3589-94.
- 4 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307(5712): 1098-101.
 - 5 Asnaghi L, Bruno P, Priuna M, Nicolin A. mTOR: A protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res* 2004; 50(6): 545-9.
 - 6 Foster KG, Fingar DC. mTOR: Conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* 2010; 285(19): 14071-7.
 - 7 Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJ, Chen X, Peng H, Sun Q, *et al.* Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through the STAT3/p63/Jagged/Notch cascade. *J Clin Invest* 2010; 120(1): 103-14.
 - 8 Deutsch MA, Kaczmarek I, Huber S, Schmauss D, Beiras-Fernandez A, Schmoekel M, *et al.* Sirolimus-associated infertility: Case and literature review of possible mechanisms. *Am J Transplant* 2007; 7(10): 2414-21.
 - 9 Skizypek J, Krause W. Azoospermia in a renal transplant recipient during sirolimus (rapamycin) treatment. *Andrologia* 2007; 39(5): 98-9.
 - 10 Huyghe E, Zairi A, Nohra J, Kamar N, Plante P, Rostaing L. Gonadal impact of target of rapamycin inhibitors (sirolimus and everolimus) in male patients: An overview. *Transpl Int* 2007; 20(4): 305-11.
 - 11 Kaczmarek I, Groetzner J, Adamidis I, Landwehr P, Mueller M, Vogeser M, *et al.* Sirolimus impairs gonadal function in heart transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4(7): 1084-8.
 - 12 Abraham RT, Gibbons JJ. The mammalian target of rapamycin signaling pathway: Twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13(11): 3109-14.
 - 13 Roper J, Richardson MP, Wang WV, Richard LG, Chen W, Coffee EM, *et al.* The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 induces tumor regression in a genetically engineered mouse model of PIK3CA wild-type colorectal cancer. *PLoS One* 2011; 6(9): e25132.
 - 14 Sukumari-Ramesh S, Singh N, Dhandapani KM, Vender JR. mTOR inhibition reduces cellular proliferation and sensitizes pituitary adenoma cells to ionizing radiation. *Surg Neurol Int* 2011; 2: 22.
 - 15 Janus A, Robak T, Smolewski P. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: Its role in tumorigenesis and targeted antitumor therapy. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10(3): 479-98.
 - 16 赵思汇. 一个新的人类精子发生相关蛋白激酶基因的克隆及功能研究. 上海: 复旦大学, 2000, 1-46.
 - 17 Kueng P, Nikolova Z, Djonov V, Hemphill A, Rohrbach V, Boehlen D, *et al.* A novel family of Serine/Threonine kinases participating in spermiogenesis. *J Cell Biol* 1997; 139(7): 1851-9.
 - 18 葛少钦, 康现江, 刘桂荣, 郭明申. 精子发生过程中相关酶及蛋白因子的功能. *生物学杂志* 2008; 25(2): 1-6.
 - 19 Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol* 2004; 24(1): 200-16.
 - 20 Pene F, Claessens YE, Muller O, Viguié F, Mayeux P, Dreyfus F, *et al.* Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 2002; 21(43): 6587-97.
 - 21 Peponi E, Drakos E, Reyes G, Leventaki V, Rassidakis GZ, Medeiros LJ. Activation of mammalian target of rapamycin signaling promotes cell cycle progression and protects cells from apoptosis in mantle cell lymphoma. *Am J Pathol* 2006; 169(6): 2171-80.
 - 22 Hou G, Xue L, Lu Z, Fan T, Tian F, Xue Y. An activated mTOR/p70S6K signaling pathway in esophageal squamous cell carcinoma cell lines and inhibition of the pathway by rapamycin and siRNA against mTOR. *Cancer Lett* 2007; 253(2): 236-48.
 - 23 Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Calin GA, Grazi GL, *et al.* MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* 2010; 70(12): 5184-93.
 - 24 Nagaraja AK, Creighton CJ, Yu Z, Zhu H, Gunaratne PH, Reid JG, *et al.* A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer. *Mol Endocrinol* 2010; 24(2): 447-63.
 - 25 Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, *et al.* MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2011; 123(9): 999-1009.

Expression of mTOR in Different Developmental Stages of SD Rat, and the Research of Relationship between mTOR and Spermatogenesis

Xu Hao, Chen Xuemei, Ding Yubin, He Junlin, Wang Yingxiong, Yang Dehui, Liu Xueqing*
(Reproductive Biology Laboratory, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Spermatogenesis was very important in male reproductive and the proliferate of spermatogonia ensure the spermatogenesis successfully. As the growth of the age, the quantity and quality of sperm reduce gradually. mTOR signaling pathway played a central regulatory role in cell proliferation and differentiation. Therefore, mTOR signaling pathway played an important role in spermatogenesis probably. To investigate the relationship between the mTOR signaling pathway and spermatogenesis, we did the SD rat testis tissue sections by immunohistochemistry and we found mTOR expressed in the spermatogonia. Then, we detected the expression of *mTOR* mRNA in the different developmental stages of rat testis by FQ-PCR, and the results showed the significant differences of transcription between 80 weeks group and 8 weeks group. At last, we found the expression of mTOR and the phosphorylation efficiency of P70S6K reduced gradually as the growth of the age by Western blot. After treated with rapamycin, the P-P70S6K/P70S6K and the number of sperm reduced in the normal 8 weeks SD rat. These results convinced us that mTOR signaling pathway was very important in the spermatogenesis.

Key words testis; spermatogenesis; mTOR; rapamycin; P70S6K

Received: November 11, 2011 Accepted: January 4, 2012

This work was supported by the Foundation of Key Project of Chongqing Medical University (No.XBED201007)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485001, E-mail: cqmu_liuxueqing@126.com