

Dvl3-DEP肽段对rpS6诱导的大鼠睾丸生精上皮损伤的修复作用

褚津津 赵鑫 全荷花 桑建民 李林溪*

(温州医科大学附属第二医院, 温州 325027)

摘要 为了确定Dvl3-DEP肽段对rpS6诱导的大鼠睾丸生精上皮损伤的修复作用及其潜在机制, 该文采用大鼠睾丸内rpS6四重磷酸化突变体表达模型诱导了生精上皮损伤, 并进一步在睾丸内过表达DEP肽段以修复rpS6诱导的损伤, 进而分析DEP肽段对睾丸生精上皮功能的调控作用。该文还对血睾屏障通透性、睾丸生精上皮损伤、细胞骨架蛋白结构及其聚合能力、细胞骨架结构调控蛋白的表达等进行了检测。结果显示, DEP可有效修复rpS6诱导的血睾屏障损伤, 同时显著降低睾丸生精小管损伤比例。对睾丸组织切片中的肌动蛋白和微管蛋白的鬼笔毒素染色和免疫荧光染色结果显示, DEP肽段的过表达有效维持了细胞骨架蛋白的功能性结构。进而, DEP肽段可维持组织中肌动蛋白和微管蛋白的聚合水平。肌动蛋白调控蛋白Eps8的上调表达和微管蛋白调控蛋白MARK4的下调表达提示, DEP对rpS6诱导的细胞骨架结构损伤的修复作用是通过以上两种调控蛋白的表达差异来实现的。研究证实了DEP肽段对睾丸生精上皮功能的保护作用, 并创新性地采用了rpS6四重磷酸化突变体作为诱导睾丸损伤的模型, 为动物睾丸损伤的疗法研究及药物开发提供了参考依据。

关键词 血睾屏障; DEP结构域; 生精上皮; 细胞骨架

Rescue of Dvl3-DEP Peptide on rpS6 Induced Seminiferous Epithelium Injury in Rat Testis

CHU Jinjin, ZHAO Xin, QUAN Hehua, SANG Jianmin, LI Linxi*

(The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

Abstract In order to determine the rescue effect of Dvl3-DEP peptide on rpS6 induced testicular seminiferous epithelium injury in rats and its potential mechanism, the rat testicular overexpression animal model was used. Seminiferous epithelium injury was induced by rpS6 tetrakisphosphorylation mutant overexpression, furthermore, DEP peptide was overexpressed in testis. The mechanism of DEP peptide rescue rpS6 induced seminiferous epithelium injury was then analyzed. The permeability of blood testis barrier, damage of seminiferous epithelium, cytoskeleton structures and its aggregation ability, and expression of cytoskeleton regulatory proteins were detected. Results showed that DEP peptide could effectively rescue rpS6 induced damage on the blood testis barrier and significantly reduce the proportion of seminiferous tubule injury. Phalloidin and immunofluorescence staining of actin and tubulin from testis sections showed that DEP overexpression effectively maintained the functional structure of cytoskeleton proteins. Furthermore, DEP overexpression could effectively maintain the aggregation levels of actin

收稿日期: 2022-07-20 接受日期: 2022-09-07

国家自然科学基金(批准号: 81971367)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13957740769, E-mail: lilinxi1234@163.com

Received: July 20, 2022 Accepted: September 7, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81971367)

*Corresponding author. Tel: +86-13957740769, E-mail: lilinxi1234@163.com

and tubulin in tissues. The up-regulated expression of actin regulatory protein Eps8 and down-regulated expression of tubulin regulatory protein MARK4 suggested that DEP renovated rpS6 induced cytoskeletal structure damage through the expression differences of the above two regulatory proteins. The study confirmed the protective effect of DEP peptide on seminiferous epithelium function, and creatively used rpS6 tetraphosphorylation mutant as the model of testicular injury induction, which provided a reference for the research of animal testicular injury therapy and drug development.

Keywords blood testis barrier; DEP domain; seminiferous epithelium; cytoskeleton

在雄性动物睾丸生精上皮中,大量成熟精子持续不断地从睾丸生精上皮中脱离并被输送至附睾进而释放,保证了雄性动物的生殖功能。在这一精子发生过程中,成熟精子自睾丸生精上皮释放之前,在生精上皮靠近生精小管管腔的表面呈有序排列。这一现象被我们称为生精上皮的精子平面细胞极化现象。平面细胞极化现象受到PCP(planer cell polarity)信号通路的两种膜蛋白复合物(即Dvl-Invs-Fzd复合物和Vangl-Frizzle复合物^[1])的直接操纵。这两种复合物在相邻细胞间结合但在同一细胞内互斥,即形成了类似于内耳毛细胞或毛发的在平面上具有方向性的有序排布。我们的前期研究发现,Dvl3可调控细胞骨架蛋白结构功能,这是维持生精上皮紧密连接的必要保证^[2]。在进一步的研究中我们发现,Dvl3-DEP肽段可有效修复环境污染诱导的睾丸支持细胞的体外损伤^[3]。

哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,参与了多种哺乳动物细胞的能量水平调控^[4],同时也是一种睾丸精子发生过程中的关键信号蛋白^[5]。mTOR与其适配蛋白,mTOR雷帕霉素敏感伴侣(Raptor),可形成mTORC1复合物,而mTORC1复合物可维持上皮内稳态^[6]。进而,mTORC1/核糖体蛋白S6(rpS6)信号复合物促进支持细胞血睾屏障重构,使得血睾屏障“开放”,以支持前细线期精母细胞穿越血睾屏障^[7]。p-rpS6-S235/S236和p-rpS6-S240/S244在睾丸中过表达后,在mTORC1/rpS6信号复合物介导下,破坏了支持细胞紧密连接屏障功能^[8],并进一步下调了p-Akt1/2的表达,进而在体内破坏了肌动蛋白细胞骨架结构^[9]。因为rpS6的磷酸化可诱导细胞骨架结构损伤,我们在前期的研究中构建了rpS6四重持续磷酸化突变表达质粒。这一质粒通过对rpS6的编码基因以PCR方法定点突变,使得其235、236、240、244位丝氨酸(Ser)突变为谷氨酸(Glu),我们称之为p-rpS6-MT^[8-9]。体外^[10]和体内^[11]过表达p-rpS6-MT突变体可显著诱导睾丸生精上皮和血睾屏障功能损伤,这一损伤

是通过诱导肌动蛋白和微管蛋白细胞骨架结构破坏来实现的^[12]。为了进一步研究rpS6诱导睾丸生精上皮损伤和DEP结构域调控生精上皮功能的机制,在本研究中我们拟采用大鼠睾丸内p-rpS6-MT过表达为动物模型,对DEP结构域调控睾丸生精上皮及血睾屏障功能进行较为全面的研究。

1 材料与方法

1.1 动物体内p-rpS6-MT和Dvl3-DEP的过表达

实验动物成年雄性大鼠购自温州医科大学实验动物中心,本文中相关动物实验经过温州医科大学实验动物伦理委员会审查,批准编号为WYDW2019-0719。rpS6四重磷酸化突变载体pCI-neo/p-rpS6-MT^[8]和DEP过表达载体^[3]由本课题组前期研究构建。动物实验分组为pCI-neo空载体对照组、rpS6过表达+pCI-neo空载体对照组、rpS6过表达+pCI-neo-DEP过表达实验组,每组6只大鼠。具体过表达操作参考本课题组前期研究^[13],简述如下。rpS6的过表达采用pCI-neo/p-rpS6-MT质粒,DEP肽段的过表达采用pCI-neo-DEP质粒,对照组过表达空质粒pCI-neo。成年大鼠每个睾丸每次转染15 μg质粒,参考转染试剂盒(In vivo-jetPEI, Cat: 101000030, PolyPlus-transfection, Illkirch-FRANCE)说明书,将质粒与1.8 μL转染试剂配制成70 μL转染混合物,睾丸内注射。对照组仅在第一天过表达pCI-neo质粒(实验结果中标注pCI-neo);阴性对照组在第一天过表达pCI-neo/p-rpS6-MT质粒后,在第三天和第五天过表达pCI-neo质粒(实验结果中标注rpS6+pCI-neo);实验组在第一天过表达pCI-neo/p-rpS6-MT质粒后,在第三天和第五天过表达pCI-neo-DEP质粒(实验结果中标注rpS6+pCI-neo-DEP)。实验第七天处死大鼠。

1.2 血睾屏障通透性检测

血睾屏障通透性检测参考本课题组的前期研究^[14],简述如下。大鼠处死前30 min,以60 mg每

公斤体重剂量的盐酸氯胺酮和10 mg每公斤体重剂量的甲苯噻嗪腹腔注射麻醉。麻醉后睾丸注射生物素(EZ-Link sulfo-NHS-LC-Biotin, Cat: 21335, Thermo Fisher Scientific, 美国)溶液100 μ L(浓度为10 mmol/L, 溶于含有1 mmol/L氯化钙的PBS中)。注射生物素30 min后处死大鼠, 取睾丸并以液氮速冻。冰冻组织切片, 厚度7 μ m, 以绿色荧光标记的链霉素亲和素(Alexa Fluor™ 488链霉素亲和素偶联物, Cat: S11223, Thermo Fisher Scientific, 美国)染色, 以含有DAPI(蓝色荧光)的抗淬灭封片剂[ProLong™ Diamond抗淬灭封片剂(含DAPI), Cat: P36962, Thermo Fisher Scientific, 美国]封片后于荧光显微镜下观察拍摄。

1.3 HE染色

大鼠处死后取睾丸, 以MDF固定液(30%福尔马

林、15%乙醇、5%冰醋酸、50%水)进行组织固定, 固定4~6 h后脱水、常规方法石蜡包埋, 石蜡切片, 厚度6 μ m。对睾丸石蜡切片进行脱蜡后, 以HE染色试剂盒(Cat: G11020, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)染色。封片后在显微镜下观察并拍照。

1.4 目的蛋白免疫印迹检测

大鼠处死后取睾丸, 以液氮速冻后, 切取5~10 mg睾丸组织块, 加入800 μ L NP-40组织裂解液(Cat: N8032, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)后匀浆, 再以超声破碎。12 000 \times g离心1 h后收取上清, 用BCA蛋白浓度测定试剂盒(Cat: PC0020-50T, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)测定蛋白浓度。SDS-PAGE凝胶电泳采用Precast-Gel变性蛋白预制胶(Cat: PG41510-S-1pk, 北京索莱宝科技有限公司, 北京), 分离胶浓度为4%~15%。一抗与二抗信息如表1所示。转膜采用硝酸纤维素膜(NC膜,

表1 本文不同实验所采用抗体的相关信息

Table 1 Antibodies used for different experiments in this report

抗体 Antibodies	种属 Host specises	供应商 Vendor	货号 Catalog No.	工作浓度 Working dilution	
				IB	IF
INVS	Rabbit	Protein Tech	10585-a-AP	1:500	—
Dvl3	Rabbit	Cell Signaling Technology	3218	1:1 000	—
Prickle2	Rabbit	Abclonal	A8023	1:500	—
Vangl2	Rabbit	Abclonal	A7825	1:500	—
CAR	Mice	Santa Cruz Biotechnology	sc-56892	1:200	—
N-cadherin	Mice	Thermo Fisher Scientific	33-3900	1:200	—
β -catenin	Rabbit	Thermo Fisher Scientific	71-2700	1:200	—
Eps8	Mice	Thermo Fisher Scientific	610143	1:5 000	—
Formin1	Mice	Abcam	ab68058	1:500	—
Arp3	Mice	Sigma-Aldrich	A5979	1:3 000	—
MARK4	Rabbit	Cell Signaling Technology	4834	1:500	—
EB1	Mice	BD	610534	1:500	—
Dynein1	Mice	Santa Cruz Biotechnology	Sc-514579	1:200	—
α -Tubulin	Mice	Abcam	ab7291	1:1 000	1:200
β -Actin	Mice	Santa Cruz Biotechnology	sc-47778	1:500	—
Vimentin	Mice	Santa Cruz Biotechnology	sc-6260	1:200	—
GAPDH	Mice	Abcam	ab8245	1:1 000	—
Occludin	Rabbit	Thermo Fisher Scientific	71-1500	1:500	—
mTOR	Rabbit	Cell Signaling Technology	2972S	1:500	—
rpS6	Rabbit	Cell Signaling Technology	2217S	1:500	—
p-rpS6 s235/236	Rabbit	Cell Signaling Technology	4858S	1:500	—
p-rpS6 s240/244	Rabbit	Cell Signaling Technology	5364S	1:500	—
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Goat	Thermo Fisher Scientific	A16104	1:20 000	—
Goat anti-mouse IgG-HRP	Goat	Thermo Fisher Scientific	A16072	1:10 000	—
Mouse IgG-Alexa Fluor 488	Goat	Thermo Fisher Scientific	A-11029	—	1:250

—: 未知。

—: not available.

0.45 μm) Millipore分装(Cat: YA1711-15*20 cm, 北京索莱宝科技有限公司, 北京)。

1.5 特异性荧光染色与免疫荧光染色

大鼠处死后取一侧睾丸, 置入液氮中速冻后, 进行冰冻组织切片, 切片厚度为7 μm 。以4%多聚甲醛固定组织切片后进行免疫荧光染色, 相关抗体信息如表1所示。二抗孵育完成后, 以含有DAPI(蓝色荧光)的抗淬灭封片剂(ProLong Diamond Antifade Mountant, Cat: P36971, Thermo Fisher Scientific, 美国)封片。对于肌动蛋白染色(F-actin), 我们采用了绿色荧光标记的鬼笔环肽试剂(Alexa Fluor 488 Phalloidin, Cat: A12379, Thermo Fisher Scientific, 美国)进行染色, 操作参考试剂说明, 封片方法同上。在荧光显微镜下观察荧光染色样本并拍照。

1.6 肌动蛋白和微管蛋白Spin-Down检测

游离肌动蛋白(G-actin)与聚合肌动蛋白(F-actin)相对水平的Spin-Down检测采用了G-Actin/F-actin体内生化检测试剂盒(Cat: BK037, Cytoskeleton, Inc., 美国), 游离微管蛋白(α/β -Tubulin)与聚合微管蛋白(Microtubule)相对水平的Spin-Down检测采用了Microtubule/Tubulin体内生化检测试剂盒(Cat: BK038, Cytoskeleton, Inc., 美国), 主要操作流程参考试剂盒说明书, 简述如下。将超速离心机(Optima L80-XP, Beckman)预热至35 $^{\circ}\text{C}$ 。配制每份含有2 μL GTP(100 mmol/L)、10 μL ATP(100 mmol/L)、1 mL蛋白酶抑制剂的LMS2缓冲液。准备对照组样本, 其中肌动蛋白Spin-Down检测阳性对照为0.1 $\mu\text{mol/L}$ 鬼笔毒素溶液, 阴性对照为80 mmol/L尿素溶液; 微管蛋白Spin-Down检测阳性和阴性对照分别为20 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇溶液、2 mmol/L氯化钙溶液。在新鲜的睾丸组织样本中加入LMS2缓冲液, 匀浆后超声破碎, 2 000 $\times\text{g}$ 离心5 min后取上清, 将上清加入超速离心管中并配平。100 000 $\times\text{g}$ 离心30 min后, 收取各管中上清与沉淀。对于肌动蛋白Spin-Down检测的沉淀以尿素溶液溶解沉淀, 对于微管蛋白Spin-Down检测以氯化钙溶液溶解沉淀。各样本准备好后, 分别进行肌动蛋白(Actin)和微管蛋白(α -Tubulin)的相应免疫印迹检测。

1.7 肌动蛋白聚合检测

肌动蛋白的聚合能力检测采用了Actin聚合荧光生化检测试剂盒(Cat: BK003, Cytoskeleton, Inc., 美国), 主要操作流程参考试剂盒说明书, 简述如下。按照试剂盒说明准备G缓冲液、G-actin等试剂。用G缓冲液尽量收集较高浓度的睾丸裂解液, 并以超速离心机

150 000 $\times\text{g}$ 离心1 h。收集离心上清, 准备各组实验管。其中1、2管为G缓冲液阴性对照; 3、4管为G缓冲液与荧光标记Actin阳性对照; 5、6管为rpS6+pCI-neo过表达组样本; 7、8管为rpS6+pCI-neo-DEP过表达组样本。将各组样本加入试剂盒提供的96孔板中, 注意间隔加注以防止荧光干扰。将96孔板置于多功能读板机(Infinite M200 Pro, TECAN)中, 激发波长为360 nm, 荧光波长为420 nm, 连续读取60 min, 其中每分钟振荡5 s。

1.8 统计学分析

所有实验数据均以均值 \pm 标准误(mean \pm SEM)表示, 运用GraphPad Prism 8软件对实验结果进行分析, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析方法进行统计学分析, 分析两者之间的相关性采用双变量相关分析与线性回归分析。分别以* P <0.05、** P <0.01、*** P <0.001表示有显著性差异。

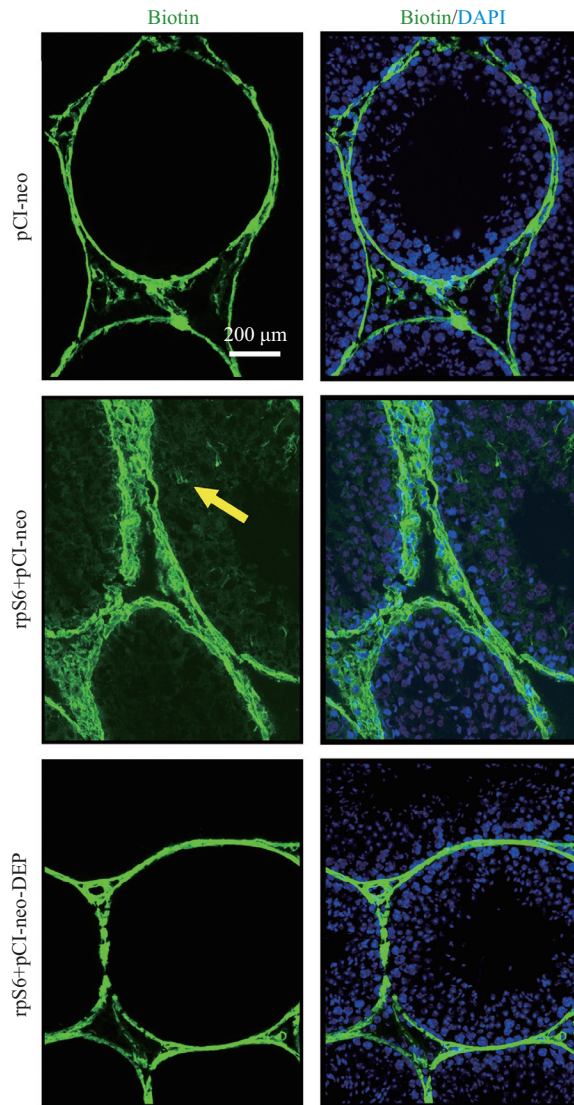
2 结果

2.1 血睾屏障功能的检测

我们对体内过表达rpS6和DEP肽段后的睾丸组织进行了血睾屏障通透性检测, 这一检测可通过生物素的跨血睾屏障递送, 来反映睾丸血睾屏障的通透性。如果血睾屏障功能受到破坏, 生物素就可以穿过血睾屏障, 进入生精上皮。结果如图1所示, rpS6过表达后, 血睾屏障受到破坏, 通透性增加, 生精小管管腔内可见明显的绿色荧光信号(黄色箭头所示)。而过表达了DEP后, rpS6诱导的血睾屏障通透性增加被抑制, 血睾屏障功能趋于恢复正常。rpS6+pCI-neo-DEP组的生物素分布情况与对照组类似, 即基本分布在睾丸组织间质和生精小管基底膜上, 生精小管管腔内基本没有绿色荧光信号。

2.2 rpS6和DEP体内过表达后的组织病理变化

我们对过表达后的睾丸组织进行了病理学检测(HE染色), 结果如图2A所示。rpS6过表达可诱导睾丸生精上皮发生广泛的病变, 包括管腔闭合(绿色箭头所示)、生殖细胞脱离、精原细胞多核现象(黄色箭头所示)等。而与之对应地, 对照组睾丸生精小管及生精上皮的HE染色一般呈现管腔具有一定空腔、各发育阶段的生殖细胞有序排布等特点。在DEP过表达组可见, 虽然rpS6的过表达仍然造成了一定的生精小管管腔闭合趋势以及部分精子提前脱离等病变, 但总



分组信息标注于图左侧, 图顶端标注为染色的相应生物学标记, 文字颜色同免疫荧光染色的颜色。黄色箭头所示为荧光标记的生物素广泛渗入生精上皮中。

Grouping method were labeled in the left, corresponding biological markers of staining were marked at the top of each column, and the text color represented the color of immunofluorescence staining. The yellow arrow indicated that fluorescently labeled biotin extensively infiltrated into the seminiferous epithelium.

图1 rpS6+DEP和rpS6过表达后的血睾屏障功能检测

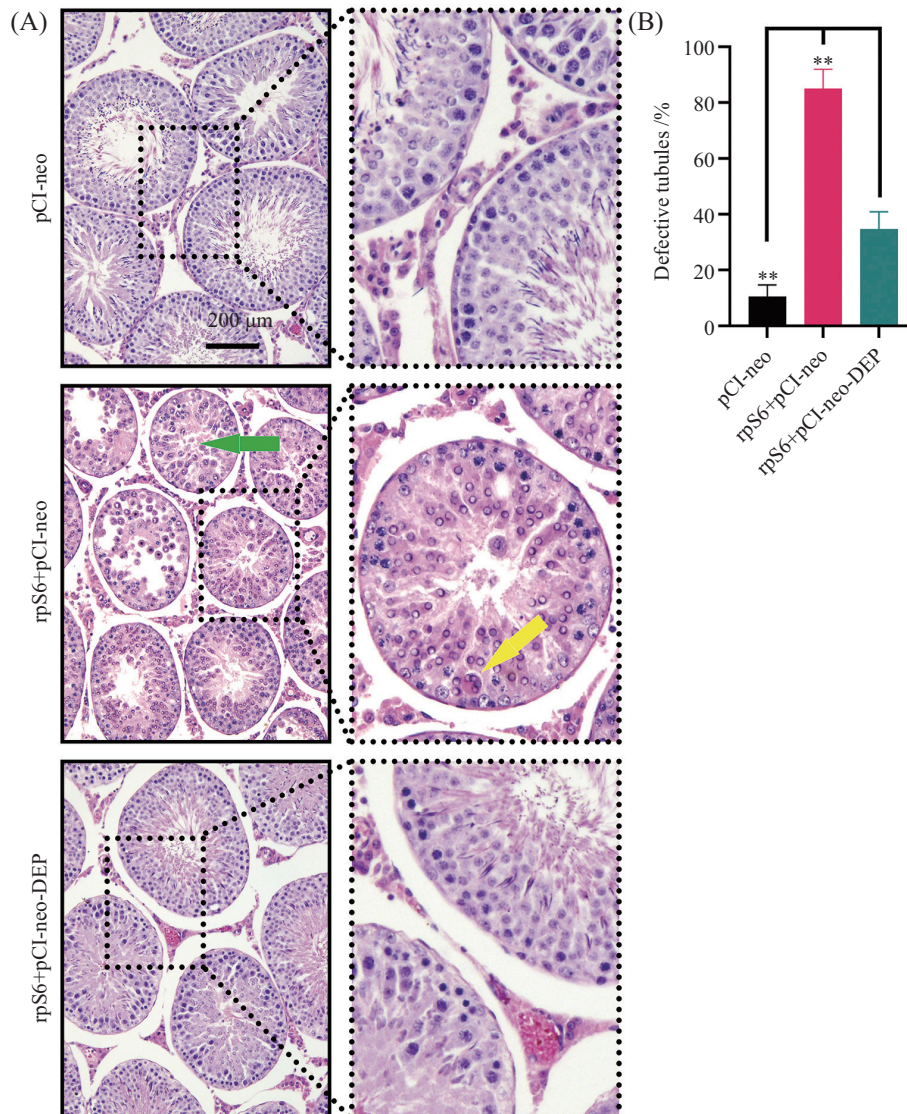
Fig.1 Blood-testis barrier function analysis after rpS6+DEP overexpression and rpS6 overexpression

体的病变程度较低, 且有一大部分生精小管病变轻微或无病变。我们对病理学检测(HE染色)的睾丸切片中的生精小管总数和发生病变生精小管数目进行了计算, 结果如图2B所示。rpS6过表达后, 有80%~85%的生精小管发生了病变, 而在DEP过表达后, DEP肽段修复了rpS6诱导的睾丸生精小管/生精上皮病变, 使得病变的生精小管的比例降低至30%~40%。

2.3 rpS6和DEP体内过表达后相关蛋白表达水平检测

我们对体内(睾丸内) rpS6和DEP过表达后的相

关蛋白表达水平进行了检测。检测的蛋白包括肌动蛋白(Actin)相关调控蛋白、微管蛋白(Microtubule, 或称为Tubulin)相关调控蛋白、紧密连接(tight junction, TJ)相关蛋白和细胞骨架蛋白。检测结果如图3A所示, 过表达了rpS6蛋白的处理组中rpS6和磷酸化rpS6的表达量显著增加。在调控蛋白方面, 过表达DEP片段后, Eps8蛋白的表达上调, 而MARK4蛋白的表达下调。我们对体内rpS6和DEP过表达后睾丸组织的部分生物标记的蛋白表达水平检测结果进行了定量分析, 结果如图3B所示。首先, 过表达rpS6蛋白的处理组中,



A: 不同过表达组睾丸切片的HE染色结果, 右侧图为左侧相应位置的放大视野, 绿色箭头所示为生精小管管腔闭合, 黄色箭头所示为精原细胞多核现象; B: 病变生精小管在总生精小管中的比例, $**P<0.01$ 。

A: HE staining of testis sections from different groups, selected areas in the left columns were boxed in dot line and magnified in the right columns; the green arrow indicated the closed lumen of the seminiferous tubule, and the yellow arrow indicated multinucleated spermatogonia; B: ratio of defective seminiferous tubules in total seminiferous tubules, $**P<0.01$.

图2 睾丸组织病理学变化及病变生精小管比例

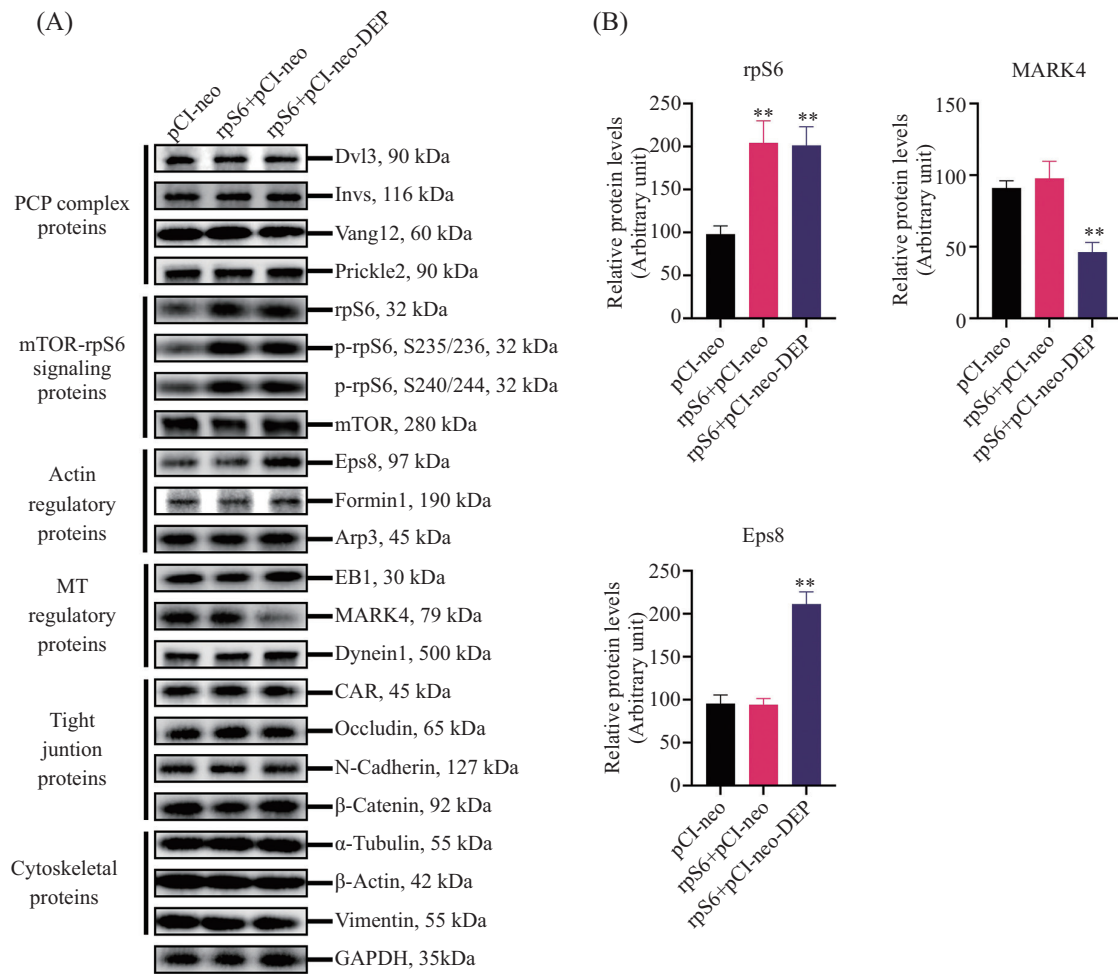
Fig.2 Testis histological analysis and defective tubules ratio

rpS6的表达水平显著上调($P<0.01$)。而对部分重要的细胞骨架调控蛋白的表达水平进行分析的结果显示, Eps8的表达在DEP过表达组中显著上调($P<0.01$); MARK4的表达在DEP过表达组中显著下调($P<0.01$), 这些上调和下调的趋势同时表明, DEP对体外紧密连接功能具有显著的正调控作用, 即DEP肽段可提高血睾屏障/生精上皮中细胞间连接的紧密程度。

2.4 rpS6和DEP体内过表达后组织肌动蛋白的结构变化

生殖细胞在生精上皮中的发育、运输、释放等

生物学过程以及血睾屏障在生精上皮中的屏障功能, 均依赖于细胞骨架蛋白结构。我们对冰冻组织切片进行了肌动蛋白(Actin)染色(鬼笔毒素), 结果如图4所示。在rpS6过表达后(图4第二行), 生精上皮中F-actin结构发生了广泛的损伤, Actin的鬼笔毒素染色荧光信号呈弥散状分布于整个生精小管中(橙色箭头所示), 同时, 靠近基底膜的血睾屏障也发生了F-actin的解聚, 因此与对照组相比, 构成血睾屏障的F-actin分布呈更加疏松且趋于靠近生精小管管腔的形态(黄色箭头所示)。在DEP过表达后(图4第三行), DEP肽段拯救了生



A: 重要生物标记物的免疫印迹检测结果; B: 部分重要生物标记表达水平定量分析结果, ** $P < 0.01$, 与pCI-neo组相比。

A: immunoblot analysis results of important biomarkers; B: quantitative analysis results of important biomarkers' expression. ** $P < 0.01$ compared with pCI-neo group.

图3 rpS6+DEP和rpS6过表达后相关蛋白表达水平检测

Fig.3 Relative protein expression analysis after rpS6+DEP overexpression and rpS6 overexpression

精上皮中的F-actin细胞骨架结构,其分布与对照组较为相似(图4第一行),即主要分布于生精小管基底膜、血睾屏障及生精上皮靠近管腔处(在某些精子发育阶段,F-actin在生精上皮中也会形成贯穿生精上皮的束状结构)。以上结果表明,DEP过表达可通过维持Actin细胞骨架蛋白结构来修复rpS6诱导的生精上皮损伤。

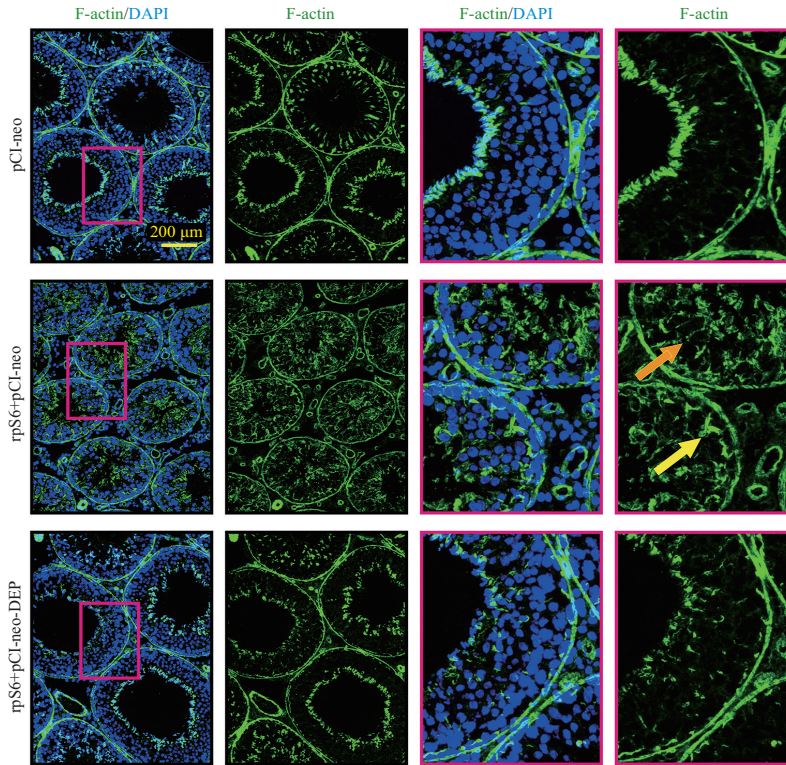
2.5 rpS6和DEP体内过表达后细胞骨架蛋白Actin的聚合水平

生精上皮中细胞骨架蛋白Actin的存在形式为聚合状态的F-actin(Filamentous actin)和游离状态的G-actin(Globin actin),在受到rpS6诱导等因素的影响下,组织中不同形态Actin的比例将发生改变。我们可以通过超速离心,分离出聚合形态的F-actin(沉淀)和游离形态的G-actin(上清),并对其进行免疫印

迹检测,以确定在rpS6处理组中,DEP的过表达是否对Actin的不同形态比例产生影响。这一检测的阳性对照为鬼笔毒素,鬼笔毒素可将绝大部分游离G-actin聚合成为F-actin;阴性对照为尿素,尿素可将绝大部分聚合的F-actin解聚成为G-actin。结果如图5所示,在睾丸组织中,总蛋白提取物的超速离心沉淀中,rpS6的过表达可诱导大部分F-actin解聚成为游离的G-actin。DEP肽段的过表达可显著缓解rpS6诱导的F-actin解聚,使得F-actin成为睾丸组织中总Actin的主要成分。以上结果说明,DEP可有效提高Actin的聚合水平。

2.6 rpS6和DEP体内过表达后细胞骨架蛋白Actin的聚合能力

Actin的聚合能力是睾丸生精上皮功能尤其是

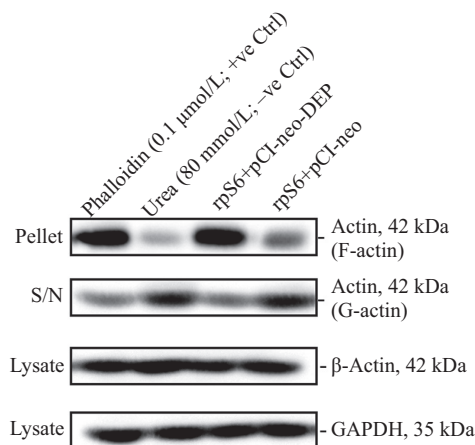


分组信息标注于图左侧, 图顶端标注为染色的相应生物学标记, 文字颜色同染色的颜色。每行右侧两幅图为截取放大的最左侧图中粉色框处。橙色箭头所示为生精上皮中Actin的鬼笔毒素染色荧光信号呈弥散破碎状; 黄色箭头所示为构成血睾屏障的F-actin分布呈更加疏松且趋于靠近生精小管管腔的形态。

Grouping method were labeled in the left, and corresponding biological markers of staining were marked at the top of each column. The text color represented the color of immunofluorescence staining. Selected areas in the first columns were boxed in pink and magnified in the corresponding insets to illustrate defects. The orange arrow indicated that the diffuse and fragmented fluorescence signal of phalloidin staining for Actin in the seminiferous epithelium. The yellow arrow indicated that the distribution of F-actin cytoskeleton structure, which constitutes the blood-testis barrier, was looser and tends to be closer to the lumen of seminiferous epithelium.

图4 rpS6+DEP和rpS6体内过表达后组织肌动蛋白结构变化

Fig.4 F-actin cytoskeleton structure after rpS6+DEP overexpression and rpS6 overexpression



以鬼笔毒素(0.1 μmol/L)和尿素(80 mmol/L)分别作为阳性对照和阴性对照(鬼笔毒素是一种Actin解聚抑制剂, 尿素是一种Actin聚合抑制剂)。S/N, 上清。Phalloidin (0.1 μmol/L) and urea (80 mmol/L) served as the corresponding positive and negative controls (Phalloidin, an inhibitor of actin depolymerization; urea, an inhibitor of actin polymerization). S/N, supernatant.

图5 rpS6+DEP和rpS6过表达诱导的睾丸裂解液肌动蛋白聚合水平的变化(Actin spin-down检测)

Fig.5 Relative levels of actin polymerization in testis lysates from rpS6+DEP overexpression and rpS6 overexpression (Actin spin-down assay)

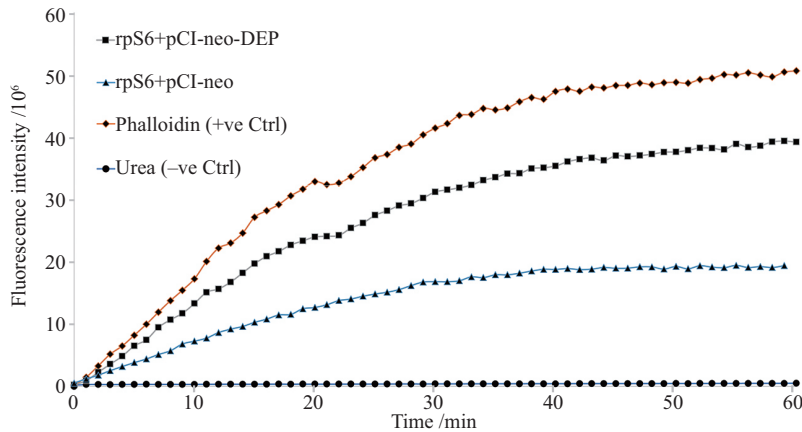


图6 rpS6+DEP和rpS6体内过表达后细胞骨架蛋白Actin的聚合催化检测

Fig.6 Actin polymerization kinetics following rpS6+DEP overexpression and rpS6 overexpression

血睾屏障及生殖细胞运输功能的重要保证。Actin聚合催化反应(Actin polymerization kinetics)是检测组织裂解物中Actin聚合能力的一种有效手段。这一检测手段是在组织裂解产物中加入荧光标记的Actin和供能物质如ATP、GTP等,构成一种体外模拟Actin聚合反应的体系。在35 °C的反应条件下,反应体系中聚合的Actin可被激发出特定波长的荧光,因此体系中随时间变化的荧光强度可代表其Actin聚合能力。这一检测的阳性对照和阴性对照物质同上文所述,即鬼笔毒素和尿素。检测结果如图6所示,在rpS6处理组(三角形标记曲线)中,组织裂解液反应体系的Actin聚合能力显著低于DEP过表达组(方块标记曲线)。以上结果说明,DEP的过表达可有效增强Actin的聚合能力。

2.7 rpS6和DEP体内过表达后组织微管蛋白结构变化

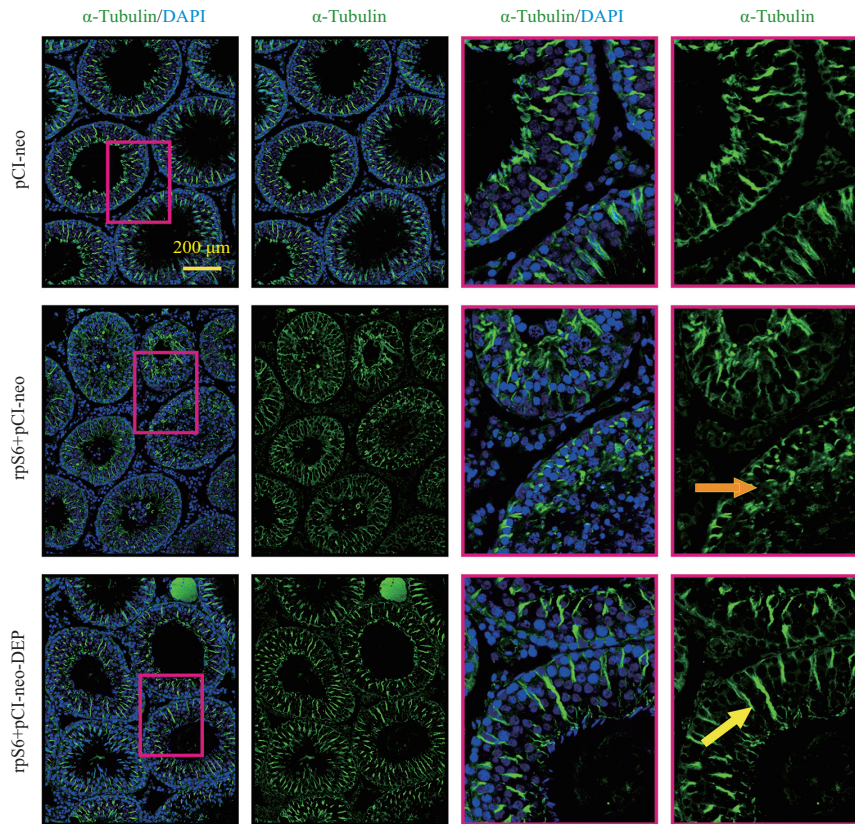
除了Actin,微管蛋白(Microtubule, Tubulin)也是另一种主要的细胞骨架蛋白之一。我们对冰冻组织切片进行了 α -Tubulin免疫荧光染色,结果如图7所示。在rpS6过表达后(图7中间横行),生精上皮中Tubulin结构发生了广泛的损伤,呈卷曲、弥散的分布于整个生精小管中(橙色箭头所示)。在DEP过表达后(图7下方横行),DEP肽段拯救了生精上皮中的微管蛋白细胞骨架结构, α -Tubulin分布与对照组较为相似(图7上方横行),即主要呈现垂直于基底膜方向贯穿整个生精上皮结构(黄色箭头所示),且其在生殖细胞发育的不同阶段也可能呈束状分布。以上结果表明,DEP过表达可通过维持微管蛋白细胞骨架结构来修复rpS6诱导的生精上皮损伤。

2.8 rpS6和DEP体内过表达后细胞微管蛋白的聚合水平

生精上皮中微管蛋白骨架结构(Microtubule)是由 α -Tubulin和 β -Tubulin单体聚合形成的。在受到rpS6诱导等因素的影响时,组织中微管蛋白骨架结构会发生解聚。我们可以通过超速离心,分离出聚合形态的Microtubule(沉淀)和游离形态的 α/β -Tubulin(上清),并对其进行免疫印迹检测,以确定在rpS6处理组中,DEP的过表达是否对不同形态的Microtubule/Tubulin的比例产生影响。这一检测的阳性对照为紫杉醇,紫杉醇可将绝大部分单体的Tubulin聚合成为Microtubule;阴性对照为氯化钙,氯化钙可将绝大部分聚合的Microtubule解聚成为Tubulin。结果如图8所示,在睾丸组织中,总蛋白提取物的超速离心沉淀中,rpS6的过表达可诱导大部分Microtubule解聚,成为游离的Tubulin(在此以 α -Tubulin抗体检测)。DEP肽段的过表达可逆转Microtubule的解聚过程,使得组织裂解产物中的Microtubule成为总Tubulin的主要成分。以上结果说明,DEP可有效促进Tubulin的聚合。

3 讨论

生精上皮是精子发生的起点,其主要结构包括连接在基底膜之上的支持细胞以及生殖细胞。支持细胞之间的细胞间连接结构组成了机体的重要屏障结构之一即血睾屏障,其可阻止细胞毒性物质进入生精小管管腔内。在生精上皮中,支持细胞-支持细胞以及支持细胞-生殖细胞之间的多种细胞间连接结构对BTB(blood-testis barrier)屏障功能、生殖细

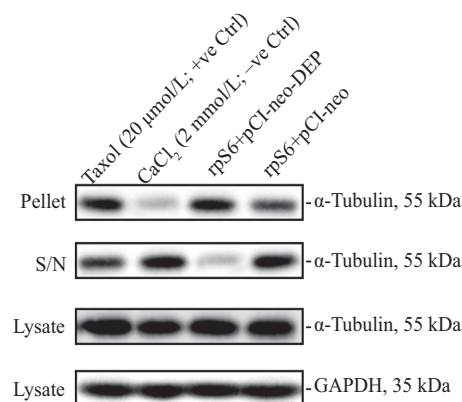


图左侧标注为各不同处理组,图顶端标注为染色的相应生物学标记,文字颜色同染色的颜色。每行右侧两幅图为截取放大的最左侧图中粉色框处。橙色箭头所示为生精上皮中 α -Tubulin免疫荧光染色, Microtubule结构呈卷曲、弥散的分布于整个生精小管中;黄色箭头所示为Microtubule的分布呈现垂直于基底膜方向贯穿整个生精上皮结构。

Grouping method were labeled in the left, corresponding biological markers of staining are marked at the top of each column, the text color represent the color of immunofluorescence staining. Selected areas in the first columns were boxed in pink and magnified in the corresponding insets to illustrate defects. The orange arrow indicated the immunofluorescence staining for α -Tubulin in the seminiferous epithelium. Microtubule were curled and dispersed throughout the seminiferous tubules. The yellow arrows indicated Microtubule structure laid perpendicular to the basement membrane throughout the seminiferous epithelium.

图7 rpS6+DEP和rpS6体内过表达后组织微管蛋白细胞骨架结构的变化

Fig.7 Microtubule cytoskeleton structure after rpS6+DEP overexpression and rpS6 overexpression



以紫杉醇(20 $\mu\text{mol/L}$)和氯化钙(2 mmol/L)分别作为阳性对照和阴性对照(紫杉醇是一种微管蛋白解聚抑制剂,氯化钙是一种微管蛋白聚合抑制剂)。S/N, 上清。

Taxol (20 $\mu\text{mol/L}$) and CaCl_2 (2 mmol/L) served as the corresponding positive and negative controls (Taxol, an inhibitor of MT depolymerization; CaCl_2 , an inhibitor of MT polymerization). S/N, supernatant.

图8 rpS6+DEP和rpS6过表达后睾丸组织裂解液中微管蛋白聚合水平变化(Tubulin spin-down检测)

Fig.8 Relative level of polymerized MTs in testis lysates from rpS6+DEP overexpression and rpS6 overexpression groups (Tubulin spin-down assay)

胞运输、精子释放等多种细胞生物学活动发挥核心作用^[15]。顶体外质特化、基底外质特化、紧密连接、平面细胞极性复合物等细胞间连接结构的功能受到细胞骨架蛋白结构的直接作用,且肌动蛋白和微管蛋白在其中发挥了主要功能^[16]。

生精上皮和血睾屏障功能是雄性动物生殖能力的基本保证,现有的大量研究表明,疾病、环境污染等因素对生殖功能特别是雄性精子发生功能会产生多种不利影响,尤其是会影响到睾丸生殖细胞的极性分布^[17]。对PCP蛋白Dvl(Dishevelled)的研究表明,Dvl3的敲除会诱导睾丸支持细胞紧密连接功能损伤,使血睾屏障通透性增加,这一损伤是通过诱导支持细胞骨架结构解聚实现的^[2]。哺乳动物Dvl蛋白由DIX、PDZ、DEP等结构域组成,且可与Invs、Fzd等蛋白构成PCP蛋白复合物,进而在PCP信号通路的调控下发挥诱导平面细胞极性形成的功能。其中,DEP结构域是一个小的球状结构域,由三个 α 螺旋组成,并且具备与Fzd相结合的功能^[18]。DEP结构域的这一功能使其在Wnt/ β -catenin信号转导中发挥重要作用^[19]。我们在前期研究中发现,DEP结构域的过表达可有效修复全氟辛烷磺酰基化合物等环境污染物诱导的体外支持细胞损伤,这显著提高了支持细胞紧密连接功能,并且维持了支持细胞骨架蛋白的聚合水平,阻止了肌动蛋白和微管蛋白的解聚^[3]。

在生精上皮中,肌动蛋白的聚合与解聚过程对血睾屏障通透性和精子脱离生精上皮等生物学活动发挥了重要的作用^[20]。肌动蛋白细胞骨架结构的功能受到多个调控因子的控制,包括Arp3(Actin-related protein 3,一种肌动蛋白丝束促分支蛋白,可使得生精上皮中聚合形态的F-actin解聚形成G-actin^[21])、Eps8(epidermal growth factor receptor pathway substrate 8,可在生精上皮中促进肌动蛋白聚合^[22])、Formin1(一种成型蛋白,在生精上皮中可促进线性的肌动蛋白黏附聚合形成肌动蛋白束^[23])等。在rpS6和DEP过表达后,Eps8的表达显著上调,说明DEP对肌动蛋白细胞骨架结构的拯救作用可能是通过上调Eps8实现的。有报道指出,PCP蛋白复合物可通过Rho GTPase信号通路调控肌动蛋白细胞骨架结构^[24],而Eps8可激活Rho GTPase信号通路^[25],这为本文的进一步研究提出了新的思路。此外,微管蛋白在生精上皮中发挥了重要的结构蛋白功能,同时与生殖细胞的跨生精上皮运输息息相关。微管蛋白细胞骨架

结构在生精上皮中的功能受到MARK4(microtubule affinity-regulating kinase 4,一种微管蛋白亲和调控激酶,在生精上皮中可促进微管蛋白结构解聚^[26])、EB1(end-binding protein 1,一种微管蛋白末端结合蛋白,在生精上皮中可在微管结构延伸的末端定位并促进其聚合^[27])、Dynein1(一种动力蛋白,在生精上皮中可促进微管蛋白结构形成^[28])等蛋白的调控。在rpS6和DEP过表达后,MARK4的表达显著下调,提示DEP对微管蛋白细胞骨架结构的拯救作用是通过MARK4实现的。以上DEP通过Eps8和MARK4调节细胞骨架蛋白功能的研究,与本课题组前期对Dvl3调控生精上皮功能的研究结果相呼应^[2],提示DEP结构域在调控生精上皮功能尤其是精子PCP现象过程中发挥了重要作用。

本研究通过rpS6和DEP结构域的体内过表达研究,发现DEP可有效拯救rpS6诱导的生精上皮损伤和血睾屏障功能障碍,并且DEP可有效恢复睾丸组织细胞骨架蛋白功能,从而维持其聚合形态。以上研究为进一步深入研究相关PCP蛋白调控生精上皮的机制打下了基础。同时,以rpS6这一非毒物/药物的内源性基因的表达作为研究生精上皮损伤的模型,也为相关疾病尤其是雄性动物生殖功能障碍的研究提供了新的思路。

参考文献 (References)

- [1] LI L, LI H, WANG L, et al. Role of cell polarity and planar cell polarity (PCP) proteins in spermatogenesis [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2020, 55(1): 71-87.
- [2] LI L, MAO B, YAN M, et al. Planar cell polarity protein Dishevelled 3 (Dvl3) regulates ectoplasmic specialization (ES) dynamics in the testis through changes in cytoskeletal organization [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 194.
- [3] 李林溪, 吕莉秀, 郑泉恩, 等. Dvl3-DEP肽段在制备修复睾丸中支持细胞损伤的药物中的应用, ZL202011398853.7 [P/OL]. 2021-11-12. <http://epub.cnipa.gov.cn/cred/CN112494661B>.
- [4] LAPLANTE M, SABATINI D M. mTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-93.
- [5] LI N, CHENG C Y. Mammalian target of rapamycin complex (mTOR) pathway modulates blood-testis barrier (BTB) function through F-actin organization and gap junction [J]. *Histol Histopathol*, 2016, 31(9): 961-8.
- [6] JESUS T T, OLIVEIRA P F, SOUSA M, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR): a central regulator of male fertility [J]? *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2017, 52(3): 235-53.
- [7] MOK K W, MRUK D D, SILVESTRINI B, et al. rpS6 Regulates blood-testis barrier dynamics by affecting F-actin organization and protein recruitment [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(10): 5036-48.

- [8] MOK K W, MRUK D D, CHENG C Y. rpS6 regulates blood-testis barrier dynamics through Akt-mediated effects on MMP-9 [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 22): 4870-82.
- [9] MOK K W, CHEN H, LEE W M, et al. rpS6 regulates blood-testis barrier dynamics through Arp3-mediated actin microfilament organization in rat sertoli cells. An *in vitro* study [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(5): 1900-13.
- [10] LI L X, WU S W, YAN M, et al. Regulation of blood-testis barrier dynamics by the mTORC1/rpS6 signaling complex: an *in vitro* study [J]. *Asian J Androl*, 2019, 21(4): 365-75.
- [11] YAN M, LI L, MAO B, et al. mTORC1/rpS6 signaling complex that modifies BTB transport function: an *in vivo* study using the adjuvin model [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 317(1): E121-E38.
- [12] WANG L, LI L, WU X, et al. mTORC1/rpS6 and p-FAK-Y407 signaling regulate spermatogenesis: insights from studies of the adjuvin pharmaceutical/toxicant model [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, doi: 10.1016/j.semdb.2021.03.024.
- [13] LI L, MAO B, WU S, et al. Endogenously produced LG3/4/5-peptide protects testes against toxicant-induced injury [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 436.
- [14] LI L, GAO S, WANG L, et al. PCP protein inversin regulates testis function through changes in cytoskeletal organization of actin and microtubules [J]. *Endocrinology*, 2022, doi: 10.1210/endo/bqac009.
- [15] KAPRARA A, HUHTANIEMI I T. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men [J]. *Metabolism*, 2018, 86: 3-17.
- [16] LI L, MAO B, WU S, et al. Regulation of spermatid polarity by the actin- and microtubule (MT)-based cytoskeletons [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 81: 88-96.
- [17] MAO B P, LI L, YAN M, et al. Environmental toxicants and cell polarity in the testis [J]. *Reprod Toxicol*, 2018, 81: 253-8.
- [18] WONG H C, MAO J, NGUYEN J T, et al. Structural basis of the recognition of the dishevelled DEP domain in the Wnt signaling pathway [J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(12): 1178-84.
- [19] GAMMONS M V, RUTHERFORD T J, STEINHART Z, et al. Essential role of the Dishevelled DEP domain in a Wnt-dependent human-cell-based complementation assay [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(20): 3892-902.
- [20] LI L, GAO Y, CHEN H, et al. Cell polarity, cell adhesion, and spermatogenesis: role of cytoskeletons [J]. *F1000Res*, 2017, 6: 1565.
- [21] LIE P P, CHAN A Y, MRUK D D, et al. Restricted Arp3 expression in the testis prevents blood-testis barrier disruption during junction restructuring at spermatogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(25): 11411-6.
- [22] LIE P P, MRUK D D, LEE W M, et al. Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) is a novel regulator of cell adhesion and the blood-testis barrier integrity in the seminiferous epithelium [J]. *FASEB J*, 2009, 23(8): 2555-67.
- [23] LI N, MRUK D D, WONG C K, et al. Formin 1 regulates ectoplasmic specialization in the rat testis through its Actin nucleation and bundling activity [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(8): 2969-83.
- [24] AW W Y, DEVENPORT D. Planar cell polarity: global inputs establishing cellular asymmetry [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 44: 110-6.
- [25] DI FIORE P P, SCITA G. Eps8 in the midst of GTPases [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(10): 1178-83.
- [26] TANG E I, XIAO X, MRUK D D, et al. Microtubule affinity-regulating kinase 4 (MARK4) is a component of the ectoplasmic specialization in the rat testis [J]. *Spermatogenesis*, 2012, 2(2): 117-26.
- [27] TANG E I, MOK K W, LEE W M, et al. EB1 regulates tubulin and actin cytoskeletal networks at the sertoli cell blood-testis barrier in male rats: an *in vitro* study [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(2): 680-93.
- [28] WEN Q, TANG E I, LUI W Y, et al. Dynein 1 supports spermatid transport and spermiation during spermatogenesis in the rat testis [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2018, 315(5): E924-E48.