DOI:10.16016/j.1000-5404.202102044

Sox30 基因敲除致小鼠睾丸间质细胞增殖异常的研究

唐 莹[1,2],姜 晓[2],韩 飞[2],周洋西[2,3],崔志鸿[3],刘晋祎[2],杨惠芳[1],曹 佳[2] 750004 银川,宁夏医科大学公共卫生与管理学院劳动卫生与环境卫生教研室[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系毒理学研究所[2];400700 重庆,西南大学药学院中医药学院[3]

[**摘要**] **目的** 探讨 Sox30 基因敲除对小鼠睾丸间质细胞增殖的影响。**方法** 采用 HE 染色法观察 10 周龄 Sox30 基因野生型($Sox30^{+/+}$)、杂合型($Sox30^{-/+}$)及纯合缺失型($Sox30^{-/-}$)小鼠睾丸组织病理形态;采用免疫组化技术检测睾丸组织中间质细胞特异性表达蛋白 3β-HSD 的表达水平;采用慢病毒感染及 siRNA 干扰技术构建 Sox30 基因过表达及敲低 TM3 细胞模型,并在此细胞模型基础上分别采用 CCK-8 法、流式细胞术、RT-qPCR 法以及 Western blot 法检测细胞存活率、细胞周期分布及周期相关基因的 mRNA 及蛋白表达水平。采用 JASPAR 数据库预测 Sox30 与周期相关基因的启动子区结合位点。**结果** 与 $Sox30^{+/+}$和 $Sox30^{-/+}$小鼠比较,HE 染色结果显示 $Sox30^{-/-}$小鼠睾丸组织中间质细胞显著增生,同时免疫组化染色发现表达 3β-HSD 的间质细胞增多。与 Vector 组相比,Sox30 组 TM3 细胞存活率降低($P<0.05$),G_1 期细胞周期阻滞($P<0.05$),同时细胞周期相关基因 CyclinD1、Cdk2 等 mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与 Sox30-NC 组比较,siSox30-3 组 TM3 细胞存活率增加($P<0.05$),G_1 期细胞周期阻滞恢复($P<0.05$),同时细胞周期相关基因 CyclinD1、Cdk2 等 mRNA 和蛋白表达水平显著恢复($P<0.05$)。JASPAR 预测发现 CyclinD1、Cdk2 的启动子区域均存在 Sox30 蛋白质可能的结合位点。**结论** Sox30 基因敲除可导致小鼠间质细胞增殖异常,CyclinD1 和 Cdk2 可能是 Sox30 调控细胞周期的重要靶基因。

[**关键词**] Sox30;小鼠睾丸间质细胞;TM3 细胞;细胞周期
[**中图法分类号**] R322.64; R329.28; R394.3 [**文献标志码**] A

Abnormal proliferation of Leydig cells in Sox30 knockout mice

TANG Ying[1,2], JIANG Xiao[2], HAN Fei[2], ZHOU Yangxi[2,3], CUI Zhihong[3], LIU Jinyi[2], YANG Huifang[1], CAO Jia[2]
[1]Department of Occupational Health and Environmental Hygiene, School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia Hui Autonomous Region, 750004; [2]Institute of Toxicology, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]College of Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing, 400700, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Sox30 gene knockout on the proliferation of mouse Leydig cells. **Methods** The pathological morphology of the testis of 10-week-old $Sox30^{+/+}$, $Sox30^{-/+}$ and $Sox30^{-/-}$ mice was observed with HE staining. Immunohistochemical assay was adopted to detect the expression level of 3β-HSD in the Leydig cells. The cell models of Sox30 gene overexpression and knockdown were constructed by lentivirus infection and siRNA interference in TM3 cell line, respectively. On the basis of these cell models, CCK-8 assay, flow cytometry, RT-qPCR and Western blotting were used to detect the cell

[**基金项目**] 国家自然科学基金重点项目(81630087);重庆市基础科学与前沿技术研究重点项目(cstc2017jcyjBX0064)
[**通信作者**] 曹 佳,E-mail:caojia1962@126.com
杨惠芳,E-mail:joyceyhf@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

survival rate, cell cycle distribution, and expression of cell cycle-related genes and proteins. The JASPAR database was used to predict the binding sites of Sox30 protein in promoter region of cycle related genes. **Results** Compared with $Sox30^{+/+}$ and $Sox30^{-/+}$ mice, HE staining indicated that the number of Leydig cells were significantly increased, and immunohistochemical assay showed the expression of 3β-HSD were increased the Leydig cells in the testis tissue of $Sox30^{-/-}$ mice. Compared with the blank vector group, Sox30 overexpression led to the decrease of cell count ($P<0.05$), cell cycle arrest in G1 phase ($P<0.05$), and significantly decreased expression of CyclinD1 and Cdk2 at mRNA and protein levels ($P<0.05$). On the contrary, Sox30 knockdown resulted in opposite phenomena ($P<0.05$). JASPAR database predicted that Sox30 may bind to the promoter of CyclinD1 and Cdk2. **Conclusion** Knockout of Sox30 induces abnormal proliferation of Leydig cells in mice. CyclinD1 and Cdk2 may be important downstream targets of Sox30 gene in the regulation of cell cycle in Leydig cells.

[**Key words**] Sox30; mouse Leydig cells; TM3 cells; cell cycle

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81630087) and the Key Project of Basic Research and Frontier Technology of Chongqing (cstc2017jcyjBX0064). Corresponding author: CAO Jia, E-mail: caojia1962@126.com; YANG Huifang, E-mail: joyceyhf@163.com

随着社会的发展进步,人类显著增长的平均寿命和日趋下降的生殖健康水平之间出现了不对等、不均衡的发展。据估计,全世界有8%~12%的夫妻出现不孕不育症,其中男性不育症占一半以上[1-2]。研究表明,基因之间复杂的相互关系以及环境条件是造成男性生殖功能损伤的重要原因[3-5]。睾丸作为雄性生殖和内分泌系统的重要组成部分,其主要功能是产生精子和雄性激素。在哺乳动物的睾丸组织中,生殖细胞在生精小管中,主要产生精子;睾丸间质细胞分布在曲精小管之间,合成和分泌雄性必需的雄激素;睾丸支持细胞在曲细精管的基膜上附着,为生殖细胞的分化和成熟提供必要的环境。机体需要精确调节这些细胞的数目和形态,以确保雄性生殖和内分泌系统有条不紊地运转。既往针对睾丸发育和精子形成的研究多数集中在生精细胞的增殖调控、分化等方面,而睾丸间质细胞的增殖研究相对较少[6]。睾丸间质细胞增殖或功能受损会导致雄激素生成异常,并影响两性分化、性腺发育以及精子生成[7]。动物实验结果显示,全氟辛酸[8]、黄曲霉毒素B1[9]等化学物的暴露可能会抑制睾丸间质细胞的增殖和分化,进而影响其发育和功能。同时,也有研究表明邻苯二甲酸酯类物质暴露会造成睾丸间质细胞反馈性增生,其类固醇激素生物合成功能也显著降低[10-11]。可见睾丸间质细胞稳态的维持在雄性生殖和内分泌系统发挥着重要的作用,其异常的改变均可能造成雄性生殖功能不同程度的损害。因此,研究睾丸间质细胞增殖与功能的调控机制,对于全面认识生殖发育异常具有重要的意义。

我们前期研究发现,Sox30基因作为Sox[SRY(sex-determining region Y)-box]家族H亚族新发现的唯一成员,在成体小鼠睾丸中高表达,Sox30基因缺失会导致精子发生障碍和雄性小鼠不育[12]。最新的研究还发现,Sox30的甲基化失活会导致睾丸发育异常及精子发生障碍,并可能导致临床非梗阻性无精症(non-obstructive azoospermia, NOA)的发生,可作为临床NOA治疗的候选靶标[13]。同时,我们初步发现,Sox30基因敲除后,睾丸组织中睾酮水平显著下调,提示Sox30对睾丸间质细胞具有重要的影响。但是具体的调控作用还不清楚,这就有必要通过系统的体内外实验解析Sox30对睾丸间质细胞的调控作用。

因此,本课题利用前期成功构建的Sox30基因敲除小鼠模型[14],分析该基因敲除对小鼠睾丸间质细胞增殖的影响;采用慢病毒感染及siRNA干扰技术构建体外差异表达小鼠睾丸间质细胞模型,探讨Sox30基因对小鼠睾丸间质细胞增殖的作用及分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞株 利用课题组前期成功构建的Sox30敲除小鼠动物模型[14],通过PCR鉴定$Sox30^{-/+}$(杂合型)雌雄小鼠合笼繁殖的后代基因型,获得$Sox30^{+/+}$(野生型)、$Sox30^{-/+}$(杂合型)和$Sox30^{-/-}$(纯合缺失型)实验小鼠。TM3细胞购自美国ATCC细胞库,该细胞来源于小鼠睾丸间质,上皮细胞样形态,贴壁生长,可作为小鼠睾丸间质细胞体外细胞实验模型。TM3细胞于10%胎牛血清的DMEM培养基中培养,置于37 ℃,湿度70%~80%,CO_2浓度为5%的细胞培养箱

中培养,细胞生长至对数生长期进行传代培养。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基购自美国 Sigma 公司;胎牛血清、Opti-MEM 培养基购自美国 Gibco 公司;GoScript™ 逆转录试剂盒、2×GoTaq® qPCR GreenMaster Mix 购自美国 Promega 公司;Cell Counting Kit-8、RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒均购自中国上海碧云天公司。脂质体 Lipofectamin 2000 购自美国 Invitrogen 公司。Cyclin D1、Cdk2 抗体均购自英国 Abcam 公司;β-actin、GAPDH、Flag 抗体均购自中国上海碧云天公司;siRNA 购自上海生工生物工程股份有限公司;Sox30 过表达载体 PGMLV-6751 购自上海吉满生物科技有限公司。

1.2 *实验方法*

1.2.1 Sox30 基因敲除小鼠睾丸组织取材及病理分析 采用 PCR 技术鉴定 Sox30 敲除小鼠基因型,鉴定方法参考课题组前期研究报道[14],引物序列见表 1。分别选取 10 周龄的 $Sox30^{+/+}$(野生型)、$Sox30^{-/+}$(杂合型)和 $Sox30^{-/-}$(纯合缺失型)雄性小鼠各 5 只,脱臼颈椎法处死各组小鼠后用眼科剪切开腹部解剖出小鼠一侧睾丸,Boulin 固定液固定,经过梯度脱水、透明、浸蜡、包埋、修块、切片、脱蜡和水化后,进行 HE 染色,光学显微镜观察各组小鼠睾丸组织的病理学改变。

表 1 Sox30 敲除小鼠基因型鉴定 PCR 扩增引物序列

编号 名称	序列(5′→3′)	产物长度/bp
一号引物对		
Sox30-KItF1	GAAGTCACTACAACCAAATACTAC	659
Common En2-R	CCAACTGACCTTGGGCAAGAACAT	
二号引物对		
Sox30-KItR2	GAAGTCATTGACAGCAGATCGAGTG	648
Sox30-H4SeqF	CAGAACATTTCTCTCCGGAAC	
三号引物对		
Sox30-KItF2	GCAAGTCCTTAGAATTAGTTCAC	772
Sox30-wtR1	CTATGCAGTTCATAAAAGCACCATC	

1.2.2 Sox30 敲除小鼠组织免疫组化检测 将上述各组小鼠的睾丸石蜡切片,脱蜡至水,经柠檬酸抗原修复,放入 3%双氧水溶液避光孵育,3% BSA 封闭。一抗 4 ℃孵育过夜,加一抗相应种属的二抗室温孵育 50 min,DAB 显色。苏木精复染,苏木精返蓝液返蓝,脱水、透明,中性树胶封片,光镜下观察并拍照。

1.2.3 慢病毒感染构建 Sox30 过表达 TM3 细胞模型 将生长至对数期的 TM3 细胞以 1.0×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待完全贴壁后替换成含 Sox30 过表达慢病毒或空载体病毒的完全培养基(MOI=20),37 ℃培养 48 h,更换成新鲜完全培养基,继续培养。感染病毒 72 h 后,采用荧光显微镜观察细胞荧光强度及比例并收集细胞鉴定感染效率。

1.2.4 siRNA 转染构建 Sox30 敲低细胞模型 在上述 Sox30 过表达 TM3 细胞模型基础上,采用 siRNA 转染技术构建 Sox30 敲低细胞模型。待细胞培养至对数期时,按 1.2×10^5~1.5×10^5 个/孔接种至 6 孔板,配制 20 pmoL/μL 的 siRNA 溶液,先取 6 μL 的 siRNA 加入 250 μL Opti-MEM 培养基中混匀;再取 6 μL 的 Lipofectamine2000 加入 250 μL Opti-MEM 培养基中,混匀静置 5 min;最后将含有 Lipofectamine2000 的 Opti-MEM 培养基加入含有 siRNA 的 Opti-MEM 培养基中,轻轻混匀,室温孵育 20 min 后加入培养皿,培养 6 h 后更换完全培养基继续培养,48 h 后收集细胞进行转染效率检测。si-Sox30 干扰序列见表 2。

表 2 siRNA 干扰序列

名称	序列(5′→3′)
Sox30-NC	正义链:UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 反义链:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
siSox30-3	正义链:CCUACCUACUCUGUGGUAATT 反义链:UUACCACAGAGUAGGUAGGTT
siSox30-4	正义链:CCUUUCAUCACCCUUACUUTT 反义链:AAGUAAGGGUGAUGAAAGGTT

1.2.5 CCK-8 分析细胞增殖 TM3 细胞感染病毒 72 h 后,收集细胞以 3×10^3/孔接种于 96 孔板,Sox30 过表达细胞分为 2 组:Vector(空载)组和 Sox30(过表达)组;Sox30 敲低细胞分为 Sox30-NC(阴性对照)组、siSox30-3(干扰)组。待完全贴壁后,分别于 0、24、48、72 h 按试剂说明书加入增强型 CCK-8 溶液,37 ℃孵育 2 h,在酶标仪上测定 450 nm 波长处的光密度值[$D(450)$]。

1.2.6 检测细胞周期变化 将细胞以 1.0×10^5~2.0×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待完全贴壁后,用 1%的血清培养基饥饿 12 h 后,过表达和干扰 Sox30 基因 48 h,收集各组细胞,用 75%预冷的乙醇于-20 ℃冰箱内固定细胞 24 h,分别加入 RNase A 和碘化丙二醇(PI,碘化丙啶)溶液,37 ℃避光孵育 30 min。200 目尼龙网过滤粘连细胞,采用 C6 流式细胞仪检测细胞 DNA 含量

的变化。细胞周期结果通过 FlowJo 7.6.1 软件进行分析。

1.2.7 基因 mRNA 表达水平的验证 各组细胞生长达到 80%~90%,细胞样本通过 TRIzol 裂解液充分裂解以提取总 RNA。使用紫外可见分光光度仪测定 RNA 样本浓度及纯度。使用 GoScript™ 逆转录试剂盒,按照试剂盒说明书上的方法步骤吸取 2 μg 上述 RNA 进行逆转录合成 cDNA,于-20 ℃低温保存。使用 2×GoTaq® qPCR GreenMaster Mix 进行 RT-qPCR 试验,引物序列见表 3。反应条件如下:①1 个循环,预变性:95 ℃,40 s;②共 45 个循环,变性:95 ℃,40 s;退火:60 ℃,40 s;延伸:72 ℃,50 s;③72 ℃,5 min。每个样品 3 个复孔,以 GAPDH 为内参,采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对数据进行分析。

表 3 实时荧光定量 PCR 引物序列与产物长度

基因	序列(5′→3′)	产物长度/ bp
Sox30	正向:CCCATTCCACACTCACACGTCTA 反向:AACCAAGACATTCTGGCATTGAACT	130
Ccnd1	正向:GCGTACCCTGACACCAATCTC 反向:ACTTGAAGTAAGATACGGAGGGC	94
Ccne1	正向:CCGTCTTGAATTGGGGCAATA 反向:GAGCTTATAGACTTCGCACACC	167
Cdk2	正向:CTCTCACGGGCATTCCTCTTC 反向:CCCTCTGCATTGATAAGCAGG	133
Cdk4	正向:AAGGTCACCCTAGTGTTTGAGC 反向:CCGCTTAGAAACTGACGCATTAG	119
Cdk6	正向:TGGACATCATTGGACTCCCAG 反向:TCGATGGGTTGAGCAGATTTG	94
GAPDH	正向:AGGTCGGTGTGAACGHGATTTG 反向:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123

1.2.8 Western blot 检测 过表达或干扰 Sox30 基因 48 h 后,收集各组细胞,充分裂解收集上清,并按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)说明书步骤测定总蛋白浓度,蛋白变性后于-20 ℃保存。按 SDS-PAGE 凝胶后取每个样本 60 μg 进行电泳后,转移至 PVDF 膜,3%BSA 封闭 1 h,分别加入不同稀释比例的鼠来源 β-actin 抗体、Flag 抗体;兔来源 CyclinD1、Cdk2 抗体后,于摇床上 4 ℃低温过夜,室温孵育二抗 1 h,发光液 A 液与 B 液按 1∶1避光配比后曝光显影条带。以 β-actin 或 GAPDH 为内参蛋白,蛋白条带通过 Image J 软件进行分析。

1.2.9 JASPAR 数据库预测 在 NCBI 中以目的基因名称为“CyclinD1”、“Cdk2”,物种为“小鼠(小家鼠)”,搜索得到目的基因的基因组结构。判断它们的转录方向,以基因起点上游 2 000 bp 及下游 100 bp 为基因潜在启动子区域计算得到它们的启动子区域。在 JASPAR 数据库中检索转录因子名称为“Sox30”,物种为“小鼠(小家鼠)”,得到 Sox30 转录因子列表。设置分析阈值为 80%,将 NCBI 中获得的 CyclinD1、Cdk2 的启动子区域序列导入 JASPAR 预测网站中,得到 Sox30 与 CyclinD1、Cdk2 可能的结合位点。

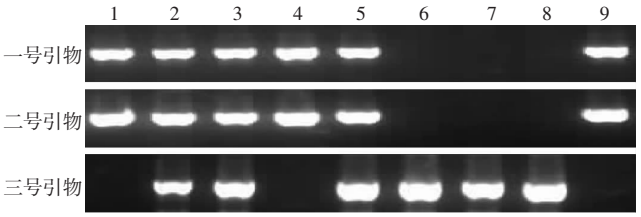
1.3 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 Sox30 基因敲除小鼠模型基因鉴定结果

一号和二号引物为纯合缺失 Sox30 基因型引物,三号引物为野生型引物。根据 PCR 结果判定小鼠基因型,当出现一号、二号引物未见扩增产物,三号引物有扩增产物时,鉴定为 $Sox30^{+/+}$(野生型);当三对引物同时有扩增产物时,鉴定为 $Sox30^{-/+}$(杂合型);引物一、二同时有扩增产物而三号引物扩增产物缺失,鉴定为 $Sox30^{-/-}$(纯合缺失型)。结果如图 1 所示:样本 6、7、8 鉴定为 $Sox30^{+/+}$(野生型);样本 1、4、9 鉴定为 $Sox30^{-/-}$(纯合缺失型);样本 2、3、5 鉴定为 $Sox30^{-/+}$(杂合型)。



1~9:为样本编号

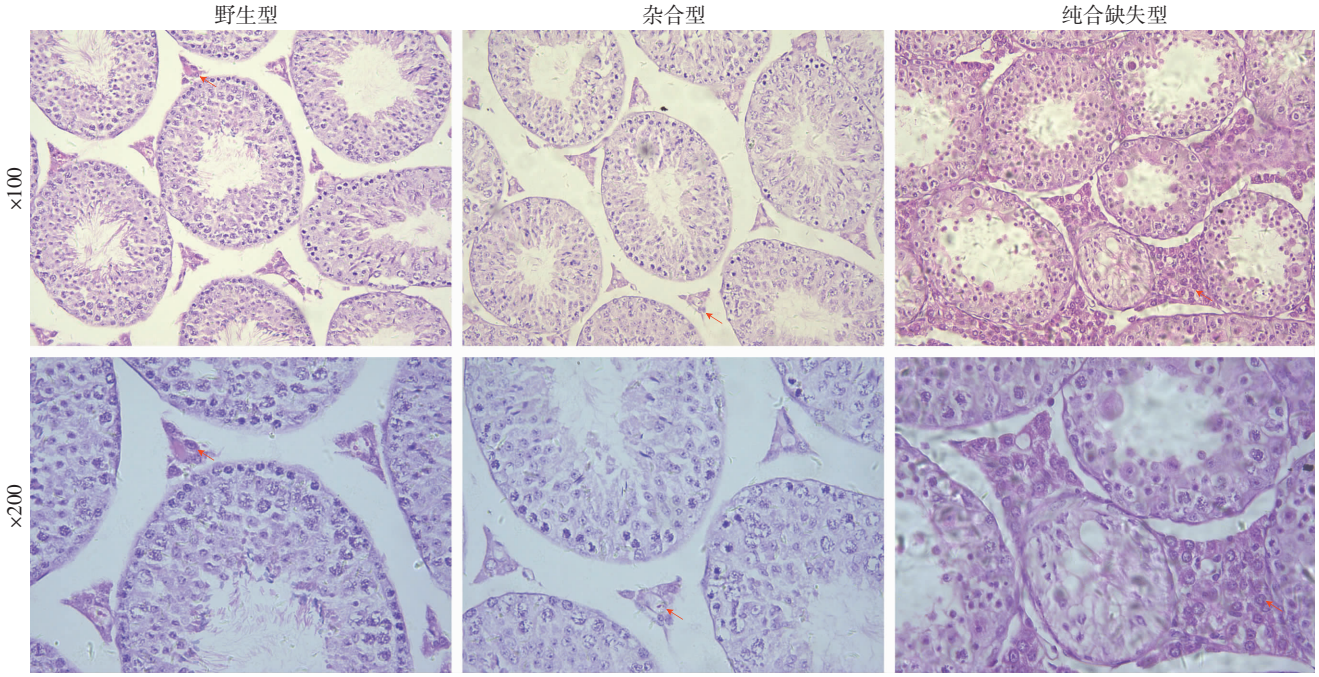
图 1 Sox30 敲除小鼠基因型鉴定结果

2.2 Sox30 敲除小鼠睾丸组织病理形态及睾丸间质细胞增殖分析

前期课题组成功构建了 Sox30 敲除小鼠[14],对 10 周龄 Sox30 敲除小鼠睾丸组织进行 HE 染色,通过光学显微镜进行病理形态学观察,发现 $Sox30^{+/+}$(野生型)和 $Sox30^{-/+}$(杂合型)小鼠睾丸组织的曲细精管形态规则呈圆形、类圆形,曲细精管外睾丸间质细胞分布均匀,曲细精管中含有大量的精子;而 $Sox30^{-/-}$(纯合缺失型)小鼠睾丸组织的曲细精管明显的发育不良,曲细精管中几乎不存在精子,睾丸间质细胞发现明显增生(图 2)。

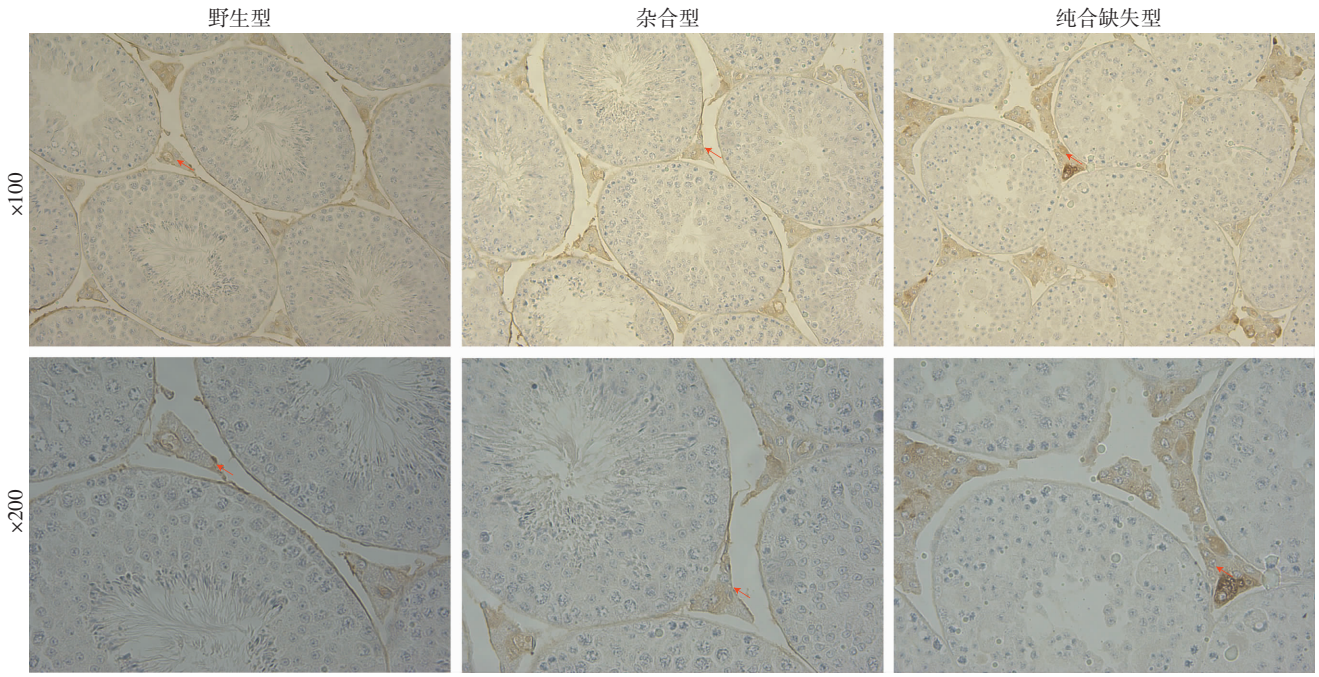
2.3　Sox30 敲除小鼠睾丸间质细胞免疫组化染色

为了明确 Sox30 基因敲除后小鼠睾丸间质细胞数目的改变,使用睾丸间质细胞特异性表达蛋白 3β-HSD 对 10 周龄 Sox30 敲除小鼠的睾丸组织进行免疫组化检测。结果显示,与 $Sox30^{+/+}$(野生型)和 $Sox30^{-/+}$(杂合型)相比,$Sox30^{-/-}$(纯合缺失型)小鼠睾丸组织中表达 3β-HSD 的睾丸间质细胞增多,进一步证实 Sox30 基因敲除后睾丸间质细胞增殖异常(图 3)。



箭头示小鼠睾丸间质细胞阳性染色区域阳性

图 2　HE 染色观察不同基因型小鼠睾丸间质细胞病理形态特征



箭头示小鼠睾丸间质细胞 3β-HSD 阳性染色区域

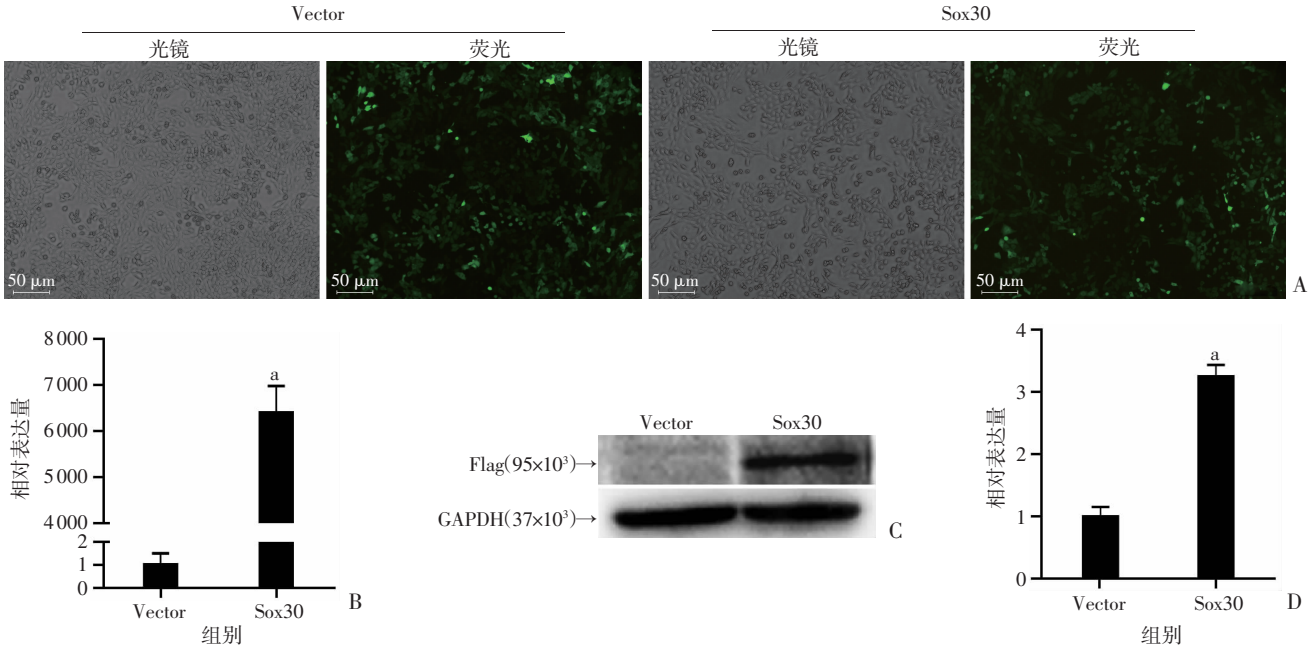
图 3　免疫组化染色观察 Sox30 敲除小鼠睾丸间质细胞特异表达蛋白 3β-HSD 变化

2.4 Sox30 过表达 TM3 细胞模型的构建以及对增殖的影响

2.4.1 Sox30 过表达 TM3 细胞模型的构建 为了进一步探讨体内 Sox30 敲除对小鼠睾丸间质细胞增殖的影响,利用体外小鼠睾丸间质细胞系 TM3 构建 Sox30 过表达细胞模型,并采用 RT-qPCR 对 Sox30 基因的 mRNA 表达水平进行检测。在构建 Sox30 基因过表达细胞过程中,光学和荧光显微镜观察显示,与 Vector 组相比,Sox30 过表达组细胞数量相对减少(图 4A)。RT-qPCR 结果显示,与 Vector 组比较,Sox30 组的细胞中 Sox30 表达明显增高($P<0.01$,图 4B);同时,Western blot 检测结果显示,其蛋白水平与其 mRNA 表达水平一致(图 4C、D)。说明成功构建了 Sox30 基因体外过表达细胞模型,并可用于后续的实验。

2.4.2 Sox30 过表达对 TM3 细胞增殖和周期的影响

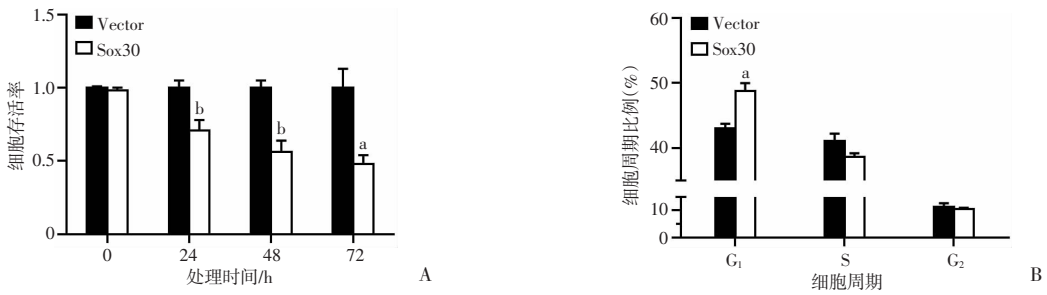
基于上述 Sox30 过表达细胞模型,采用 CCK-8 对细胞增殖进行定量分析。与对照组相比,结果显示随着时间的增加,Sox30 过表达组细胞存活率明显降低($P<0.05$,图 5A),提示 Sox30 过表达可以抑制睾丸间质细胞的增殖能力。为了明确 Sox30 引起睾丸间质细胞增殖抑制的原因,使用 PI 荧光染色和流式细胞术检测 Sox30 过表达 TM3 细胞周期进展情况。结果显示,与空载体组比较,Sox30 过表达 TM3 细胞 G_1 期比例增高,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示 Sox30 过表达可诱导 TM3 细胞 G_1 期阻滞。



a:$P<0.01$,与 Vector 组比较

A:光学显微镜、荧光显微镜观察 Vector 组和 Sox30 组 TM3 细胞数量变化;B:RT-qPCR 检测 Vector 组和 Sox30 组 Sox30 mRNA 相对表达;C、D:Western blot 检测 Vector 组和 Sox30 组中 Sox30 的蛋白表达及半定量分析

图 4 Sox30 过表达 TM3 细胞模型的构建



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Vector 组比较;A:CCK-8 检测 Vector 组和 Sox30 组在不同时间的细胞存活率变化;B:流式细胞术检测 Vector 组和 Sox30 组 TM3 细胞生长 48 h 后的周期分布情况

图 5 Sox30 过表达对 TM3 细胞增殖和周期的影响

2.5　Sox30 敲低 TM3 细胞模型的构建以及对增殖的影响

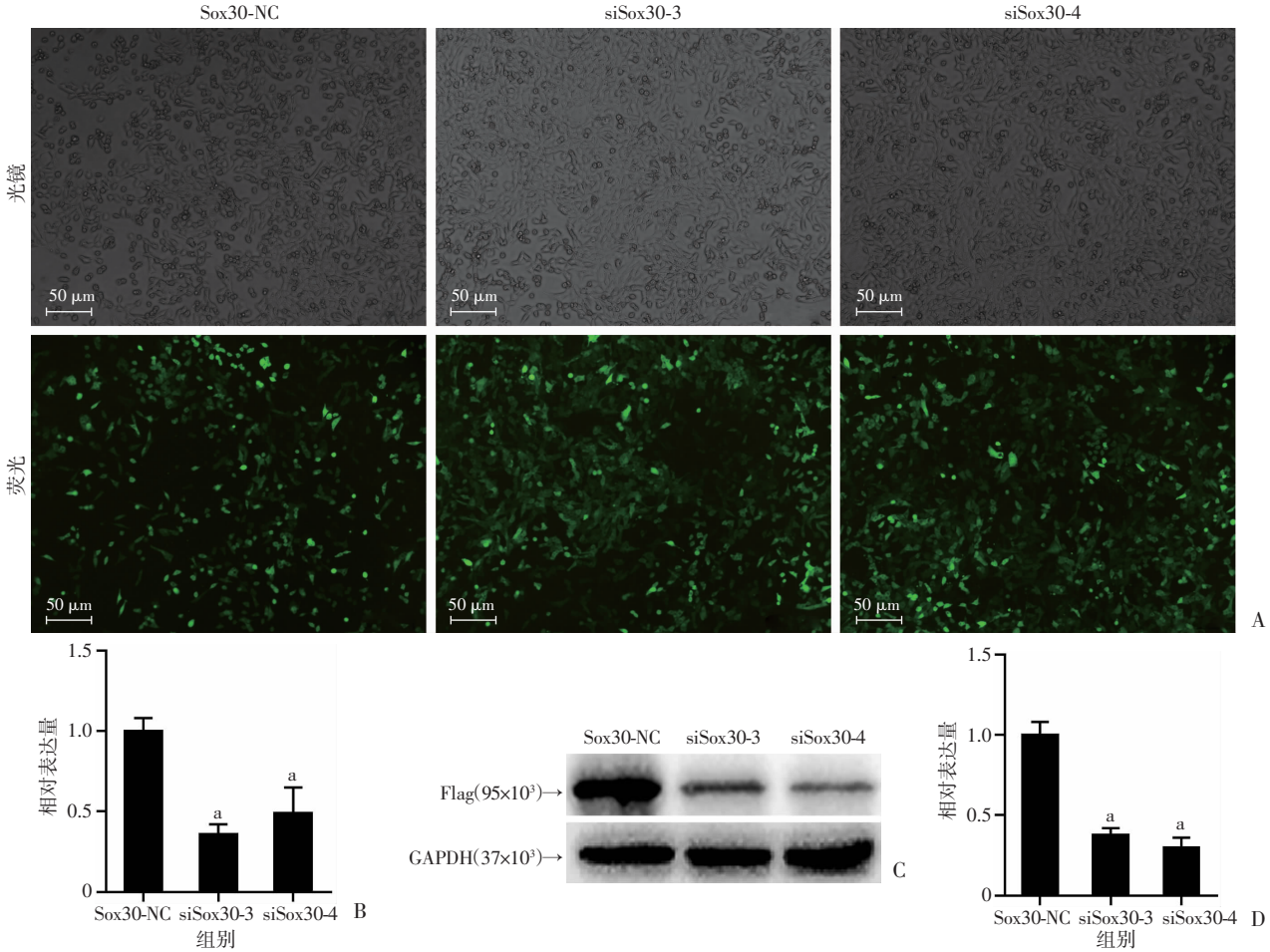
2.5.1　Sox30 敲低 TM3 细胞模型的构建　　为了进一步证实 Sox30 基因对小鼠睾丸间质细胞周期的调控作用,在 Sox30 过表达 TM3 细胞的基础上敲低了 Sox30 基因。在镜下发现,与 Sox30 基因过表达 TM3 细胞增殖抑制作用相反。结果显示,与 Sox30-NC 组相比,Sox30 基因干扰后,其细胞数目增多,明显促进了 TM3 细胞增殖(图 6A)。同时,RT-qPCR(图 6B)和 Western blot(图 6C、D)检测结果显示:与 Sox30-NC 组比较,siSox30-3 组、siSox30-4 组中 Sox30 基因的表达受到了抑制,尤其是 siSox30-3 的抑制更为显著,其差异具有统计学意义(P<0.01)。因此,选用干扰效率最高的 siSox30-3 组进行后续研究。

2.5.2　Sox30 敲低对 TM3 细胞增殖和周期的影响

进一步利用 CCK-8 对 TM3 细胞增殖进行了检测,与对照组相比(图 7A),随着时间的增加,Sox30 干扰组的细胞数量明显增加,其差异具有统计学意义(P<0.01)。Sox30 干扰细胞周期流式细胞术分析也表明,与 Sox30-NC 组比较(图 7C),siSox30-3 组(图 7D)细胞 G_1 期比例降低,差异具有统计学意义(P<0.05),提示 Sox30 敲低可部分恢复 TM3 细胞 G_1 期阻滞,促进细胞从 G_1 向 S 期转化。

2.6　Sox30 差异表达对 TM3 细胞周期关键分子 mRNA 水平的影响

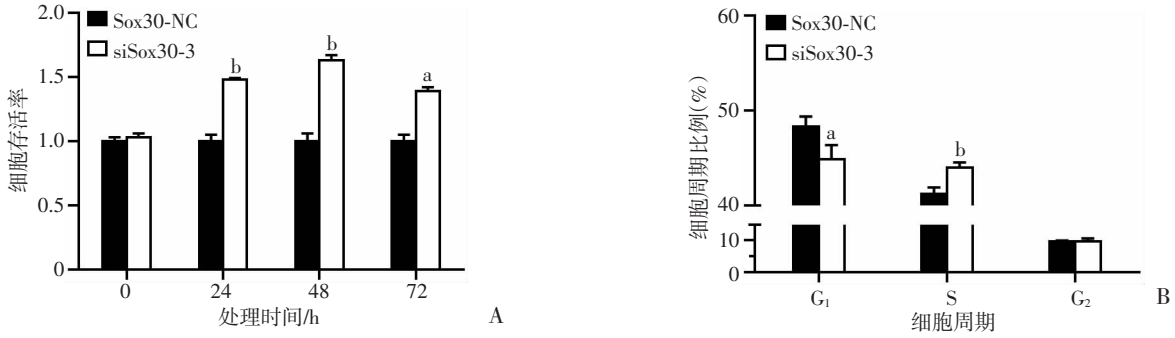
为了验证流式细胞术检测结果,进一步检测了调控细胞周期进展关键基因的 mRNA 水平表达情况。结果发现,与 Vector 组比较(图 8A),Sox30 过表达组 Ccnd1、Cdk6(P<0.05),Cdk2、Cdk4(P<0.01)的 mRNA 表达水平显著降低,Ccne1 的 mRNA 表达水平无明显改变。敲低 Sox30 基因后,发现与 Sox30-NC 组相比(图 8B),siSox30-3 组的 Ccnd1、Cdk6(P<0.01),Ccne1、Cdk2(P<0.05)的 mRNA 表达水平都显著增加,Cdk4 的 mRNA 表达水平无明显改变。



a:P<0.01,与 Sox30-NC 组比较

A:光学显微镜、荧光显微镜观察各组 TM3 细胞数量变化;B:RT-qPCR 检测各组 Sox30 基因的 mRNA 相对表达;C、D:Western blot 检测各组 Sox30 基因的蛋白表达及半定量分析

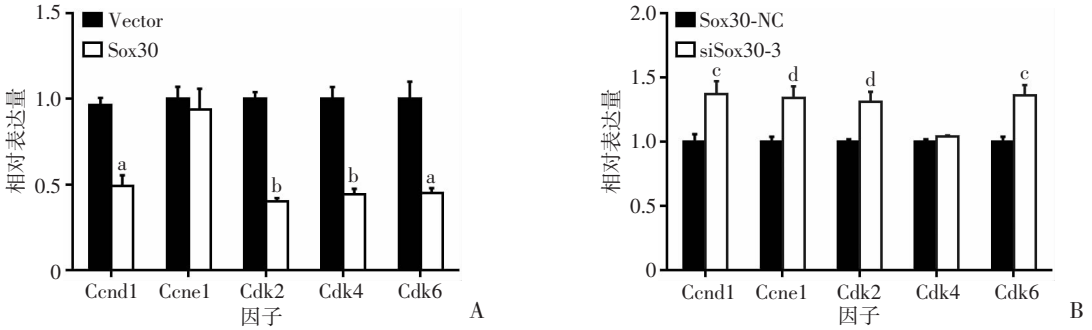
图 6　Sox30 敲低 TM3 细胞模型的构建



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Sox30-NC 组比较

A:CCK-8 检测 Sox30-NC 组和 siSox30-3 组在不同时间的细胞存活率变化;B:流式细胞术检测 Sox30-NC 组和 Sox30-NC 组 TM3 细胞生长 48 h 后的周期分布情况

图 7 Sox30 敲低表达对 TM3 细胞增殖和周期的影响



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Vector 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 Sox30-NC 组比较

A:RT-qPCR 检测 Vector 组和 Sox30 组 Ccnd1、Ccne1、Cdk2、Cdk4、Cdk6 的 mRNA 相对表达;B:RT-qPCR 检测 Sox30-NC 组和 siSox30-3 组 Ccnd1、Ccne1、Cdk2、Cdk4、Cdk6 的 mRNA 相对表达

图 8 Sox30 差异表达对 TM3 细胞周期相关分子 mRNA 水平的影响

2.7 Sox30 差异表达对 TM3 细胞周期相关分子蛋白水平的影响

结果显示,与 Vector 组比较(图 9A、B),Sox30 过表达组 CyclinD1($P<0.05$)、Cdk2($P<0.01$)蛋白表达水平显著降低。敲低 Sox30 基因后,我们发现与 Sox30-NC 组相比(图 9C、D),siSox30-3 组的 CyclinD1($P<0.01$)、Cdk2($P<0.05$)的蛋白表达水平显著增加。其结果提示,Sox30 差异表达后 CyclinD1、Cdk2 的蛋白表达水平较为一致,推测它们可能是 Sox30 参与周期调控的下游关键分子。

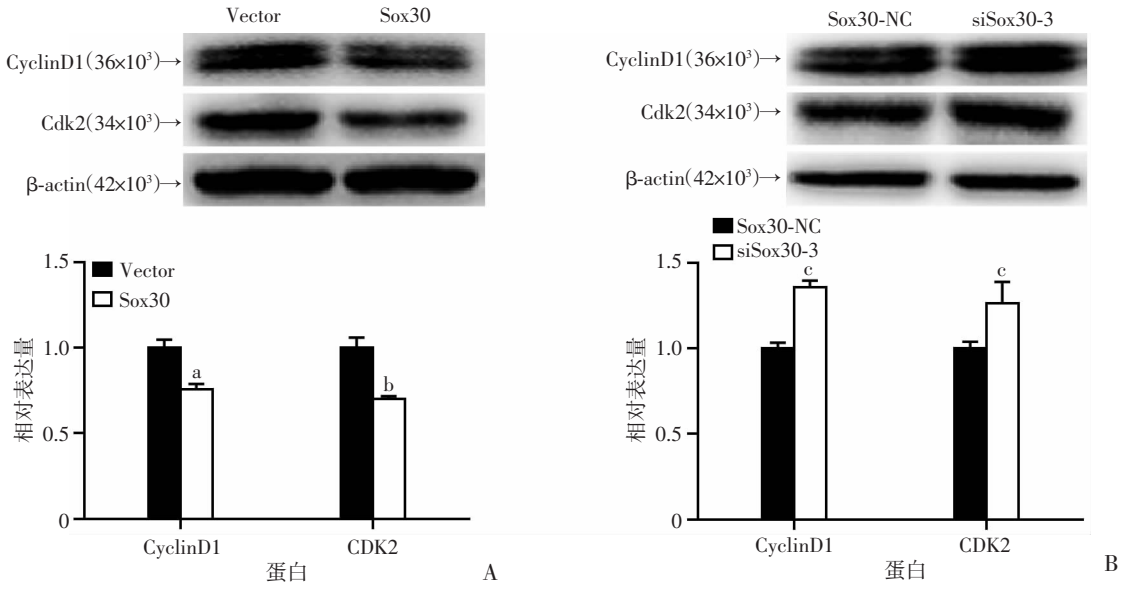
2.8 Sox30 与细胞周期相关分子的启动子区结合位点预测

利用 JASPAR 数据库从分子水平预测 Sox30 是否与细胞周期关键分子 CyclinD1、Cdk2 的启动子区存在结合位点(表 4)。其中,预测评分的分值越高,预测结果越可信。结果发现,细胞周期关键分子 CyclinD1、Cdk2 的启动子区域均可能存在 Sox30 的结合位点,提示 CyclinD1、Cdk2 可能是 Sox30 调控的下游候选基因。

3 讨论

细胞增殖是机体正常生长、发育、繁殖的生物基础,正常组织中特异性细胞增殖稳态的维持是组织器官功能正常执行的结构基础。睾丸间质细胞是位于男性性腺睾丸中的必需细胞,因此其正常增殖与数目的稳定对于睾丸功能具有重要的作用。

课题组前期研究发现,Sox30 基因敲除小鼠的生精小管中几乎没有精子,同时在成年小鼠中重新表达 Sox30 基因,精子的发生有所恢复[15]。本研究发现,与 $Sox30^{+/+}$(野生型)和 $Sox30^{-/+}$(杂合型)小鼠相比,$Sox30^{-/-}$(纯合缺失型)小鼠睾丸组织曲细精管外睾丸间质细胞发生明显增生。在睾丸组织中 3β-HSD 是完全定位于睾丸间质细胞的,因此 3β-HSD 可以作为睾丸



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 Vector 组比较;c:$P<0.05$,与 Sox30-NC 组比较

A:Western blot 检测 Vector 组和 Sox30 组 CyclinD1、Cdk2 的蛋白表达及半定量分析;B:Western blot 检测 Sox30-NC 组和 siSox30-3 组 CyclinD1、Cdk2 的蛋白表达及半定量分析

图 9 Sox30 差异表达对 TM3 细胞周期相关分子蛋白水平的影响

表 4 Sox30 结合到细胞周期相关分子的启动子区结合位点的预测

目的基因	转录因子的编号	转录因子的名称	预测评分	相对评分	起点	终点	正负链	预测的序列
CyclinD1	PB0070.1	Sox30_1	9.52	0.84	−775	−790	+	ACTAAATAATGGACGA
	PB0070.1	Sox30_1	9.34	0.83	−1263	−1278	+	ATGAAATAATGGCCAC
	PB0174.1	Sox30_2	11.04	0.82	−835	−850	−	TAAGTTTATAATTTAT
Cdk2	PB0070.1	Sox30_1	10.74	0.86	−1682	−1697	−	AAAGAATAATGTATTT
	PB0070.1	Sox30_1	8.66	0.82	−538	−553	+	CTTGAACAAATAAAAA
	PB0070.1	Sox30_1	8.54	0.81	−2043	−2058	−	TTGAAACAATGTTGCC

组织中间质细胞的特异性标志。通过对其睾丸组织进行 3β-HSD 蛋白的免疫组化染色处理,进一步证实 Sox30 基因敲除后小鼠睾丸组织中间质细胞数目显著增加。在前期研究中已证实,Sox30 基因敲除可以导致小鼠睾丸组织匀浆液中睾酮水平下降,ANITHA 等[16]在鱼类中也发现体内短暂沉默 Sox30 可导致血清睾酮水平下降。这些研究结果提示,Sox30 基因敲除后可能打破了小鼠睾丸间质细胞原本相对稳定的增殖状态以及激素分泌功能的调控能力。尽管在 Sox30 基因敲除雄性小鼠睾丸间质细胞数目增加,但是整体的睾酮水平与野生型相比反而更低,提示 Sox30 基因敲除导致的睾丸间质细胞增生可能属于病理性异常增生,从而导致睾酮合成受阻。

为了进一步验证 Sox30 影响小鼠睾丸间质细胞增殖的体内实验结果,本研究利用 TM3 小鼠睾丸间质细胞构建 Sox30 差异表达细胞体外模型,结果证实 Sox30 对 TM3 细胞增殖调控与体内的观察结果一致。表现为与 Vector 组相比,Sox30 组可导致 TM3 细胞存活率降低,G_1 期细胞周期阻滞。敲除 Sox30 基因后发生逆转,表现为 siSox30-3 组 TM3 细胞存活率增加,G_1 期细胞周期阻滞恢复。细胞分裂周期 G_1 期的重要作用是对下一个阶段的 S 期建立有效的 DNA 复制条件,如果 G_1 期出现了调控紊乱,则 DNA 复制可能受到损害以及出现基因组的不稳定,从而导致 DNA 损伤和肿瘤的发生[17]。目前,关于 Sox30 基因在细胞增殖过程中的作用研究主要集中在肿瘤细胞当中,例如肺腺癌[18]、前列腺癌[19],表明在体外 Sox30 基因高表达后显著抑制肿瘤细胞的增殖和调控细胞周期。进一步证实 Sox30 基因可以通过影响细胞周期调控睾丸间质细胞的正常增殖。

细胞周期功能异常通常意味着细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的表达改变以及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)的激活。在 G_1 期早期进程中,有丝分裂原刺激哺乳动物细胞从静止状态进入分裂周期,并且触发了细胞周期蛋白 D 的产生,随后它可以结合并激活 Cdk4 和 Cdk6 蛋白激酶(即细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 4 和 6)。细胞周期蛋白 D/Cdk4-6 复合物通过单磷酸化其抑制剂 Rb 去抑制 E2F 的表达。在 G_1 晚期进程中,编码细胞周期蛋白 E 被急剧激活,它可以结合并激活 Cdk2 蛋白激酶(即细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 2),然后在正反馈过程中过度磷酸化并且失活 Rb。有研究表明,Rb 单磷酸化的 14 个主要位点可以介导 E2F1 转录调控的不同模式,表明 G_1 期转录过程十分复杂[20]。通过 RT-qPCR 法检测发现,Sox30 表达水平升高时,Ccnd1、Cdk2 表达水平均出现不同程度的降低,对 Sox30 基因进行干扰后,可以少量恢复 Ccnd1、Cdk2 的表达。另外,本研究通过 Western blot 法对这些分子的蛋白水平进行检测,结果显示差异表达 Sox30 后,CyclinD1 和 Cdk2 在蛋白水平出现明显的改变。这提示 CyclinD1 和 Cdk2 可能是 Sox30 基因对小鼠睾丸间质细胞 G_1 期进程影响中的关键下游靶基因。CyclinD1 在有生长因子的情况下,首先被合成并于 G_1 中期达到高峰,该基因的异常表达会改变细胞周期进程,且常发生在多种肿瘤当中,如肾癌发生[21]。Cdk2 被称作细胞周期蛋白依赖性激酶 2。有研究表明在雄性生殖细胞发育中 Cdk2 激酶活性的精确调节对于促性腺细胞向精子细胞的转化和长期的生精稳态发挥着重要的作用[22]。最后,本研究采用生物信息学方法对 Sox30 基因与细胞周期关键基因的启动子区结合位点进行预测发现,细胞周期关键基因 CyclinD1、Cdk2 的启动子区域均存在 Sox30 可能的结合位点。该结果提示,Sox30 作为转录因子有可能特异性识别并结合于 CyclinD1、Cdk2 基因上游启动子区,进而调控这些基因的转录和表达。

此外,本研究还存在以下几个问题值得进一步探索:①细胞周期相关基因 CyclinD1、Cdk2 受 Sox30 调控,且启动子区存在 Sox30 的结合位点,但具体的分子调控机制还需要通过实验研究加以解析;②Sox30 缺失后,除可通过间质细胞影响睾酮水平影响精子发生外,我们最新的研究也证实 Sox30 在生精细胞中表达,可以直接通过调控减数分裂影响精子的发生,但是二者之间的重要性和因果关系还需要更深入的研究;③本研究发现,Sox30 基因敲除后小鼠睾丸组织匀浆中睾酮水平显著降低,然而 Sox30 缺失导致睾酮水平降低的具体原因和分子机制目前尚不清楚,仍需后续进一步的深入研究。

综上,本研究发现 Sox30 基因可能参与小鼠睾丸间质细胞正常增殖状态调控,其可能是通过转录调控 CyclinD1、Cdk2 的表达影响细胞周期 G_1 期来实现。Sox30 基因作为转录因子有可能通过转录调控影响相关分子的表达,后续我们将围绕转录调控机制开展更为详细的研究,为深入了解 Sox30 在男性生殖系统的功能和作用机制提供新的资料。

参考文献:

[1] VANDER BORGHT M, WYNS C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology[J]. Clin Biochem, 2018, 62: 2-10. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.

[2] FAINBERG J, KASHANIAN J A. Recent advances in understanding and managing male infertility[J]. F1000Res, 2019, 8: F1000 Faculty Rev-670. DOI: 10.12688/f1000research.17076.1.

[3] XAVIER M J, SALAS-HUETOS A, OUD M S, *et al*. Disease gene discovery in male infertility: past, present and future[J]. Hum Genet, 2021, 140(1): 7-19. DOI:10.1007/s00439-020-02202-x.

[4] HART K, TADROS N N. The role of environmental factors and lifestyle on male reproductive health, the epigenome, and resulting offspring[J]. Panminerva Med, 2019, 61(2): 187-195. DOI:10.23736/S0031-0808.18.03531-0.

[5] 曹佳,陈卿.生殖损害和不良妊娠结局的环境、生活方式和心理危险因素研究进展及展望[J].第三军医大学学报,2021,43(1):1-9. DOI:10.16016/j.1000-5404.202009204.
CAO J,CHEN Q. Progress and prospective of environmental, lifestyle and psychological risk factors for reproductive impairment and adverse birth outcome[J]. J Third Mil Med Univ,2021,43(1):1-9. DOI:10.16016/j.1000-5404.202009204.

[6] 蔡滨,孙大林,邓伟民,等.细胞周期蛋白在精子发生过程中的作用[J].中华男科学杂志,2019,25(2):168-171.
CAI B, SUN D L, DENG W M, *et al*. Roles of cyclins in the progression of spermatogenesis[J]. Natl J Androl, 2019, 25(2): 168-171.

[7] HEINRICH A, DEFALCO T. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function[J]. Andrology, 2020, 8(4): 903-914. DOI:10.1111/andr.12703.

[8] LU H M, ZHANG H S, GAO J, *et al*. Effects of perfluorooctanoic acid on stem Leydig cell functions in the rat[J]. Environ Pollut Barking Essex, 2019, 250: 206-215. DOI:10.1016/j.envpol.2019.03.120.

[9] CHEN X W, LI C, CHEN Y, *et al*. Aflatoxin B1 impairs leydig cells through inhibiting AMPK/mTOR-mediated autophagy flux pathway[J]. Chemosphere, 2019, 233: 261-272. DOI:10.1016/j.chemosphere.2019.05.273.

[10] YE J X, ZHANG K N, YUAN X D, *et al*. Di-n-Hexyl phthalate causes Leydig cell hyperplasia in rats during puberty[J]. Toxicol Lett, 2020,332:213-221. DOI: 10.1016/j.toxlet.2020.07.018.

[11] LYU Y, DONG Y Y, WANG Y Y, *et al*. Benzyl butyl phthalate non-linearly affects rat Leydig cell development during puberty[J]. Toxicol Lett, 2019, 314: 53-62. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.07.016.

[12] HAN F, DONG Y, LIU W B, *et al*. Epigenetic regulation of sox30 is associated with testis development in mice[J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e97203. DOI:10.1371/journal.pone.0097203.

[13] HAN F, JIANG X, LI Z M, *et al*. Epigenetic inactivation of SOX30 is associated with male infertility and offers a therapy target for non-obstructive azoospermia[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19: 72-83. DOI:10.1016/j.omtn.2019.10.038.

[14] 王平, 姜晓, 韩飞, 等. SOX30 基因敲除对雄性小鼠睾丸组织结构及激素分泌的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2020,32(5):329-335. DOI:10.3969/j.issn.1004-616x.2020.05.001.
WANG P, JIANG X, HAN F, *et al*. Effects of SOX30 gene knockout on testicular tissue structure and hormone secretion in male mice[J]. Carcinogen Teratogen Mutagen, 2020, 32(5):329-335. DOI:10.3969/j.issn.1004-616x.2020.05.001.

[15] HAN F, YIN L, JIANG X, *et al*. Identification of SRY-box 30 as an age-related essential gatekeeper for male germ-cell meiosis and differentiation[J]. Aging Cell, 2021, 20(5): e13343. DOI: 10.1111/acel.13343.

[16] ANITHA A, SENTHILKUMARAN B. Role of sox30 in regulating testicular steroidogenesis of common carp[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2020, 204: 105769. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2020.105769.

[17] HUME S, DIANOV G L, RAMADAN K. A unified model for the G1/S cell cycle transition[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(22): 12483-12501. DOI: 10.1093/nar/gkaa1002.

[18] 马帮靖, 郝翔麟, 韩飞, 等. SOX30 基因调控桥粒基因 DSC3 抑制肺腺癌的增殖与迁移[J]. 癌变·畸变·突变, 2018, 30(3): 165-170,175. DOI:10.3969/j.issn.1004-616x.2018.03.001.
MA B J, HAO X L, HAN E E, *et al*. Inhibition of proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells by SOX30 gene *via* regulation of DSC3 gene[J]. Carcinogen Teratoge Mutagen, 2018, 30(3): 165-170,175. DOI:10.3969/j.issn.1004-616x.2018.03.001.

[19] FU Q, SUN Z Y, YANG F, *et al*. SOX30, a target gene of miR-653-5p, represses the proliferation and invasion of prostate cancer cells through inhibition of Wnt/β-catenin signaling[J]. Cell Mol Biol Lett, 2019, 24(1): 1-13. DOI:10.1186/s11658-019-0195-4.

[20] SANIDAS I, MORRIS R, FELLA K A, *et al*. A code of mono-phosphorylation modulates the function of RB[J]. Mol Cell, 2019, 73(5): 985-1000. e6. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.01.004.

[21] WANG Q S, LI F, LIAO Z Q, *et al*. Low level of Cyclin-D1 correlates with worse prognosis of clear cell renal cell carcinoma patients[J]. Cancer Med, 2019, 8(9): 4100-4109. DOI:10.1002/cam4.2313.

[22] SINGH P, PATEL R K, PALMER N, *et al*. CDK2 kinase activity is a regulator of male germ cell fate[J]. Development,2019, 146(21):dev180273. DOI: 10.1242/dev.180273.

(**收稿**:2021-02-06;**修回**:2021-03-26)

(编辑 王 红)