

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.01.0022

甾类激素对原代培养附睾头部上皮细胞中 Bin1b 表达的影响

苏 杰, 卢 建, 黄高翔, 曹冬梅*

第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨甾类激素对原代培养的大鼠附睾头部上皮细胞中 Bin1b 表达的影响。**方法** 不同浓度(10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} mol/L)的二氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT)、(10^{-9} , 10^{-8} mol/L)雌二醇(estradiol, E_2)及(10^{-8} , 10^{-7} mol/L)地塞米松(dexamethasone, Dex)处理原代培养的附睾头部上皮细胞 0~5 d, 分别采用 1.2%琼脂糖凝胶电泳和 PCR 的方法检测 Bin1b mRNA 的表达。**结果** 原代培养的附睾上皮细胞中 Bin1b mRNA 的表达呈时间依赖性减少, 培养第 2 天 Bin1b mRNA 水平下调约 40%, 第 3 天下调约 70%, 5 d 时附睾上皮细胞中几乎检测不到 Bin1b mRNA 的表达。不同浓度的 DHT 对 Bin1b mRNA 表达的下降有不同程度的减缓, 10^{-9} mol/L 的 DHT 使 Bin1b mRNA 表达较对照细胞增加约 37% ($P < 0.05$), 10^{-8} mol/L 及 10^{-7} mol/L DHT 处理后 Bin1b mRNA 表达进一步的增加。不同浓度的 E_2 和 Dex 对 Bin1b mRNA 表达的下降无明显调节作用。**结论** 雄激素能上调原代培养的附睾头部上皮细胞中 Bin1b 的表达, 而雌激素和糖皮质激素没有明显的调节作用。

[关键词] 附睾; β 防御素; Bin1b; 性腺甾类激素

[中图分类号] R 339.212

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)01-0022-05

Influence of steroid hormone on expression of Bin1b in primary cultured epididymal epithelial cells

SU Jie, LU Jian, HUANG Gao-xiang, CAO Dong-mei*

Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the expression of Bin1b in primary cultured epididymal epithelial cells treated with different steroid hormones at various concentrations. **Methods** Expression of Bin1b mRNA was examined by agarose gel electrophoresis and PCR in primary cultured epididymal epithelial cells, which were treated with dihydrotestosterone (DHT, 10^{-9} , 10^{-8} and 10^{-7} mol/L), estradiol (E_2 , 10^{-9} and 10^{-8} mol/L) or dexamethasone (Dex, 10^{-8} and 10^{-7} mol/L) at different concentrations. **Results** The expression of Bin1b mRNA in primary cultured epididymal epithelial cells was decreased in a time-dependent manner. The mRNA level of Bin1b was decreased by 40% at day 2 and 70% at day 3; and it was hardly detectable at day 5. DHT up-regulated the expression of Bin1b mRNA in a dosage-dependent manner compared with corresponding vehicle control. 10^{-9} mol/L DHT up-regulated Bin1b mRNA level by 37% compared with corresponding vehicle control ($P < 0.05$), and it was further up-regulated after the treatment with 10^{-8} mol/L and 10^{-7} mol/L DHT. E_2 and Dex at various concentrations showed no significant effects on the expression of Bin1b mRNA in primary cultured epididymal epithelial cells. **Conclusion** Dihydrotestosterone can up-regulate the expression of Bin1b mRNA in primary cultured epididymal epithelial cells, while estradio and dexamethasone can not.

[Key words] epididymis; β -defensins; Bin1b; gonadal steroid hormone

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(1): 22-26]

附睾具有精子贮存、成熟和运输的功能, 附睾上皮细胞能合成和分泌多种蛋白, 这些分泌蛋白在附睾中呈高度的区域性和时间特异性表达, 精子通过与这些蛋白相互作用逐步成熟, 并获得了运动能力

和受精能力^[1-2]。防御素(defensin)是一类具有广谱抗菌活性的阳离子多肽, 哺乳动物防御素可分为 α 、 β 和 θ 三类。附睾是 β 防御素表达最丰富的组织之一, 有近 50 种 β 防御素被证实在附睾高表达, 且绝

[收稿日期] 2015-06-18 **[接受日期]** 2015-09-06

[作者简介] 苏 杰, 硕士. E-mail: 441362661@qq.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871021, E-mail: dm_cao@smmu.edu.cn

大部分是近年来新发现的附睾特异基因^[3-7]。许多具有 β 防御素样结构的附睾特异蛋白的功能尚不清楚。有研究显示,它们可能在宿主天然防御和精子成熟过程中发挥双重作用^[8]。Bin1b 是国内学者张永莲等^[9]发现的特异表达于大鼠附睾头部上皮细胞的 β 防御素样分子。Bin1b 能有效抑制附睾上皮原代培养上清液中大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的生长^[10],并可在大鼠附睾不同区域以不同的方式与精子头部结合,通过上调 Ca^{2+} 水平诱导未成熟精子的前向运动^[11]。我们前期的研究也发现细菌脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)可以抑制大鼠附睾头部 Bin1b 基因的表达,并抑制精子的成熟和运动能力;我们还发现原代培养的附睾上皮细胞在培养期间 Bin1b 的表达呈时间依赖性减少^[12]。提示体内一些因素可上调 Bin1b 的表达。本研究观察了甾体激素对原代培养的附睾上皮细胞中 Bin1b mRNA 表达的影响,以寻找体内维持 Bin1b 生理性表达的因子,这将有助于阐明 Bin1b 在体内的调节机制。

1 材料

1.1 动物 4个月龄雄性 Sprague-Dawley 大鼠购自中国科学院上海实验动物中心[SYXK(沪)2014-0028]。

1.2 试剂和仪器 二氢睾酮(DHT)、Hank's 平衡液、胰酶和蛋白酶购自 Sigma 公司;TRIzol RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司;反转录试剂盒购自 MBI Fermentas 公司;实时定量 PCR 试剂盒购自 TOYOBO 公司;0.45 μ m 孔径尼龙膜和 0.22 μ m 孔径 PVDF 膜分别为 Osmonic 公司和 PALL 公司产品;非必需氨基酸、DMEM 和 IMDM 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 BI 公司;小鼠抗大鼠 Bin1b 单克隆抗体和多克隆抗体由中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所张永莲院士实验室提供。其他化学药品购自国药集团化学试剂有限公司和 Amresco 公司。

2 方法和结果

2.1 大鼠附睾头部上皮细胞分离培养 雄性 SD 大鼠(体质量 250~300 g)颈椎脱臼处死,取双侧附睾头部组织,剔除多余脂肪,放入 60 mm 培养皿中,

加入 2 mL Hank's 平衡盐溶液,剪碎组织,反复吹打,过 200 目滤网,收集组织碎块,重复 10 次,洗去精子,用滴管将上述组织碎块移入 10 mL 0.25% 胰蛋白酶液中,放入 32°C 摇床,60 转/min 消化 30 min,消化后组织 800 \times g 离心 5 min,弃上清,Hank's 平衡盐溶液重复洗 2 次,将组织移入 10 mL 0.1% 胶原酶液中,放入 32°C 摇床,60 转/min 消化 60 min,消化后组织用 200 目滤网过滤,滤液 800 \times g 离心 5 min,弃上清,Hank's 平衡盐溶液重复洗 2 次,移入培养瓶中,加原代细胞培养液,置于 37°C、5%CO₂ 培养箱中孵育 12 h,收集上清,离心计数后重种于 6 孔板。

2.2 RNA 抽提 原代培养的附睾头部上皮细胞,弃掉培养液,加入 1 mL TRIzol,静置 5 min 充分裂解,反复吹打数次,后吸入 1.5 mL EP 管。加 200 μ L DEPC 水平衡的氯仿,充分震荡混匀,静置 10 min。15 000 \times g、4°C 离心 20 min,取上清加等体积异丙醇充分震荡,-20°C 沉淀 2 h。15 000 \times g、4°C 离心 20 min,弃上清,沉淀用清洗液(无水乙醇:DEPC 水=3:1)1 mL 清洗 2 遍,16°C 晾干沉淀,适量 DEPC 水溶解,测 RNA 浓度。

2.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 软件进行统计学分析,各组间数据处理采用方差分析,两组比较采用 *t* 检验。检验水准(α)为 0.05。

2.4 PCR

2.4.1 反转录 反应总体积为 10 μ L,反应体系中包括 RNA 2 μ g,1 mmol/L dNTP,12 U RNA 酶抑制剂,15 U AMV 反转录酶,1 \times RT 反应缓冲液,2.5 μ mol/L 随机引物。反应条件依次为:25°C 10 min,42°C 1 h,70°C 10 min。反应在 PCR 仪中进行。反应产物置于-20°C 中备用。

2.4.2 引物 Bin1b、GAPDH 的引物序列分别为:Bin1b (产物 337 bp):forward 5'-GGA CAC CCA GTC ATC AGT CAC AT-3',reverse 5'-TTT GGG GTG CTT CCA GGT CTC T-3';GAPDH (产物 443 bp):forward 5-TTC ATT GAC CTC AAC TAC ATG-3',reverse 5'-GTG GCA GTG ATG GCA TGG AC-3'。Bin1b 及其他 β 防御索引物为中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所张永莲院士馈赠。

2.4.3 半定量 PCR 反应总体积为 10 μ L,反应体系中包括:cDNA 100 ng,1 \times PCR 反应缓冲液,1.8

mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μmol/L 上、下游引物, 2 U Taq DNA 聚合酶。反应条件: *Bin1b*、*GAPDH*, 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 40 s; *Defb21*, 94°C 30 s, 51°C 30 s, 72°C 40 s; *Defb29*, 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 40 s。对 PCR 扩增循环数进行优化, 并将扩增条件定为: *GAPDH*, 19 cycles; *Bin1b*, 原代细胞样品 32 cycles。PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳并拍照。

2.4.4 实时定量 PCR 反应总体积为 15 μL, 包括 cDNA 50 ng, 2 × PCR master mix 7.5 μL, 20 μmol/L 的上、下游引物各 0.15 μL, 剩余体积由水补足。反应条件同半定量 PCR。

2.5 原代培养的附睾上皮细胞中 *Bin1b* 的表达呈时间依赖性减少 原代分离培养的大鼠附睾上皮细胞中观察 *Bin1b* 和另外 2 个附睾头部特异的 β 防御素 *Defb21* 和 *Defb29* 的表达情况。结果显示 *Bin1b* mRNA 表达量随培养时间延长逐步降低, 原代培养第 2 天 *Bin1b* mRNA 水平下调约 40%, 第 3 天 *Bin1b* mRNA 水平下调约 70%, 5 d 后附睾上皮细胞中几乎检测不到 *Bin1b* mRNA 表达(图 1)。 *Defb21* 的表达模式与 *Bin1b* 类似, 呈时间依赖性降低, 而 *Defb29* mRNA 在体外原代培养附睾上皮中的表达不随时间增加而减少。

2.6 雄激素能够上调原代培养附睾头部上皮细胞中 *Bin1b* 的表达 不同浓度 (10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷ mol/L) 的 DHT 处理原代培养的附睾头部上皮

细胞 24 h 后检测 *Bin1b* 的表达情况。结果显示, DHT 能进行性上调 *Bin1b* mRNA 的表达量。其中 10⁻⁹ mol/L DHT 使 *Bin1b* mRNA 表达较对照细胞增加约 37% (P<0.05), 10⁻⁸ mol/L 及 10⁻⁷ mol/L 的 DHT 处理后 *Bin1b* mRNA 表达进一步增加(图 2A)。进一步延长 DHT 处理细胞的时间至 5 d, 检测不同时间点 (0、4、8、16 h, 1、2、3、4、5 d) *Bin1b* mRNA 的表达情况。结果显示, 与对照细胞相比, 不同浓度 (10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷ mol/L) 的 DHT 处理不同时间点后 *Bin1b* 的表达下降速度减慢, 但不能逆转原代附睾上皮细胞中 *Bin1b* 时间依赖性的表达下调(图 2B)。

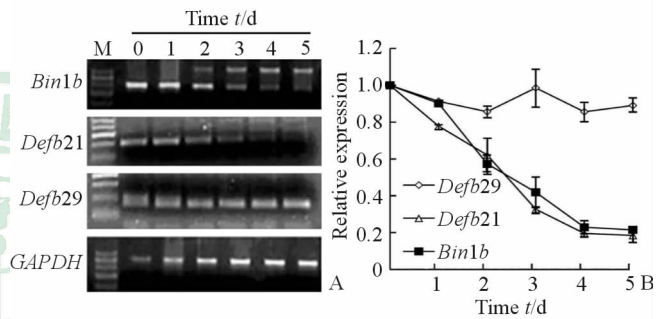


图 1 *Bin1b*、*Defb21* 和 *Defb29* mRNA 在原代培养大鼠附睾头部上皮细胞中的表达

Fig 1 Expressions of *Bin1b*, *Defb21* and *Defb29* mRNA in primary cultured rat epithelial cells from epididymis head

A: RT-PCR analysis of mRNAs extracted from primary cells cultured for different day; B: Relative expressions of mRNAs. M: DNA marker. n=3, $\bar{x} \pm s$

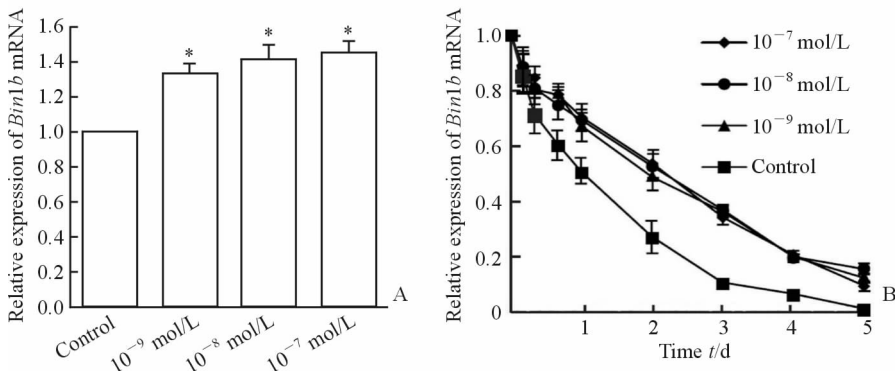


图 2 不同浓度 DHT 对原代培养的附睾头部上皮细胞中 *Bin1b* mRNA 表达的影响

Fig 2 Effect of DHT on *Bin1b* mRNA expression in primary cultured epididymal epithelial cells

A: Quantitative RT-PCR analysis of mRNA extracted from primary cells treated with control (equivalent ethanol), 10⁻⁹, 10⁻⁸, or 10⁻⁷ mol/L DHT for 24 h; B: Quantitative RT-PCR analysis of mRNA extracted from primary cells treated with equivalent ethanol, 10⁻⁹, 10⁻⁸, or 10⁻⁷ mol/L DHT for 0 h, 4 h, 8 h, 16 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d. DHT: Dihydrotestosterone. * P<0.05 vs control group. n=3, $\bar{x} \pm s$

2.7 雌激素、糖皮质激素对原代培养附睾头部上皮细胞中 *Bin1b* 的表达没有影响 进一步观察不同浓

度雌二醇 (10⁻⁹ mol/L、10⁻⁸ mol/L, E₂) 和地塞米松 (10⁻⁸ mol/L、10⁻⁷ mol/L, Dex) 处理原代培养的附睾

上皮细胞不同时间点(0、4、8、16 h, 1、2、3、4、5 d)后 *Bin1b* mRNA 的表达。结果显示,不同浓度 E_2 或 Dex 处理后的 *Bin1b* mRNA 的变化趋势与对照组

相同,都随着培养时间的延长而进行性下降,且处理组在各个时间点与对照相比差异都无统计学意义(图 3A、3B)。

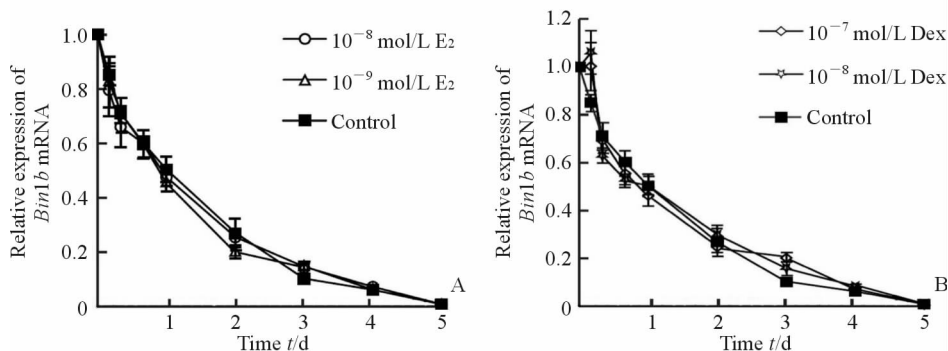


图3 E_2 及 Dex 对原代培养的附睾头部上皮细胞中 *Bin1b* mRNA 表达的影响

Fig 3 Effect of E_2 or Dex on *Bin1b* mRNA expression in primary cultured epididymal epithelial cells

A: Quantitative RT-PCR analysis of mRNA extracted from primary cells treated with control (equivalent ethanol), 10^{-9} mol/L and 10^{-8} mol/L E_2 for 0 h, 4 h, 8 h, 16 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d and 5 d; B: Quantitative RT-PCR analysis of mRNA extracted from primary cells treated with equivalent ethanol, 10^{-8} mol/L and 10^{-7} mol/L Dex for 0 h, 4 h, 8 h, 16 h, 1 d, 2 d, 3 d, 4 d, 5 d. E_2 : Estradiol; Dex: Dexamethasone. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

在体外培养的附睾上皮细胞株中,很多附睾特异蛋白会发生表达缺失。本研究在进行大鼠附睾头部上皮细胞原代培养时也发现 *Bin1b* mRNA 的表达随着培养时间的增加不断减少,原代培养 2 d 时表达减少近 50%,5 d 后附睾上皮细胞中几乎检测不到 *Bin1b* mRNA 的表达。除 *Bin1b* 外,附睾头部特异性表达的 β 防御素家族成员 Defb21 的表达在原代培养的附睾上皮细胞中也随时间增加而减少;而另一个 β 防御素家族成员 Defb29 的表达在同样条件下没有表现出明显改变,始终维持比较恒定的水平,提示 *Bin1b* 和 Defb21 的表达可能属于诱导性表达,而 Defb29 的表达属于组成性表达。目前还不清楚体内哪些因素调节 *Bin1b* 的表达,寻找调节 *Bin1b* 生理性表达的分子将有助于更深入地了解附睾特异 β 防御素的表达调控机制。

附睾液中的雄激素主要是睾酮和 DHT,它们在附睾中含量很高,其来源除了睾丸液和血循环外,一些研究认为附睾上皮也能合成和分泌雄激素,实验证明附睾上皮中有 5α 还原酶等与雄激素代谢有关的酶的表达^[13-14]。睾酮和 DHT 在附睾的发育和精子成熟方面发挥重要作用。已知雄性大鼠性成熟时,附睾中 *Bin1b* 的表达水平达峰值,并在整个性成熟期维持较高水平。此外有研究显示,给雄性大鼠

实施双侧去势手术后, β 防御素 Defb21、24、30 和 36 等基因的 mRNA 水平大幅下降,而补充外源性雄激素后,上述基因的表达很快恢复到术前水平^[5]。近年来在不同种属中的研究均发现部分附睾特异性 β 防御素的表达受雄激素的调节^[15-17]。这些结果提示在体内 *Bin1b* 的表达可能也受雄激素的调节。本研究观察了不同浓度 DHT 对原代培养的附睾头部上皮细胞中 *Bin1b* 表达的影响,结果发现, DHT 能上调原代培养附睾上皮细胞中 *Bin1b* 的表达,其中 10^{-9} mol/L DHT 使 *Bin1b* mRNA 表达较对照细胞增加约 37%,且 10^{-8} mol/L 及 10^{-7} mol/L 的 DHT 处理后 *Bin1b* mRNA 表达进一步增加。但是于原代附睾上皮细胞培养液中仅使用 DHT 处理并不能完全逆转 *Bin1b* 的时间依赖性表达减少,提示除了雄激素外,还存在其他能够上调 *Bin1b* 表达的因子。

文献报道,大、小鼠及人的成熟睾丸 Leydig 细胞和(或)精原细胞可分泌雌激素,使其在睾丸液中维持较高浓度,而睾丸和附睾中都有雌激素受体(estrogen receptor, ER)表达;雌激素在附睾精子成熟过程中发挥重要作用,ER α 被敲除或被拮抗剂阻断后,附睾尾部精子数量减少、形态畸形^[18-19]。本研究采用不同浓度的 E_2 处理原代培养的附睾上皮细胞,结果发现雌激素对 *Bin1b* mRNA 表达没有影响。此外,考虑到 *Bin1b* 是防御素家族成员,有抗菌作用并参与体内的天然免疫,而糖皮质激素是体内

重要的免疫调节因子,因此我们还观察了 Dex 对原代培养附睾上皮细胞中 *Bin1b* mRNA 表达的影响,但结果显示 Dex 对 *Bin1b* mRNA 表达也没有明显影响。寻找维持体内 *Bin1b* 生理性表达的调节因子仍是今后要继续的工作。

综上所述,本实验发现雄激素能上调附睾上皮细胞中 *Bin1b* 表达,但是雌激素和糖皮质激素没有上述作用。以上发现有助于更深入地了解 β 防御素样附睾特异蛋白 *Bin1b* 的调节机制及其在精子成熟过程中的病理生理作用,并可能为附睾源性男性不育的防治提供药靶位点。

[参考文献]

- [1] Dacheux J L, Gatti J L, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation[J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 61: 7-17.
- [2] Johnston D S, Turner T T, Finger J N, Owtscharuk T L, Kopf G S, Jelinsky S A. Identification of epididymis-specific transcripts in the mouse and rat by transcriptional profiling[J]. *Asian J Androl*, 2007, 9: 522-527.
- [3] Com E, Bourgeon F, Evrard B, Ganz T, Colletu D, Jegou B, et al. Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 95-104.
- [4] Zaballos A, Villares R, Albar J P, Martinez A C, Marquez G. Identification on mouse chromosome 8 of new beta-defensin genes with regionally specific expression in the male reproductive organ[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 12421-12426.
- [5] Yenugu S, Chintalgattu V, Wingard C J, Radhakrishnan Y, French F S, Hall S H. Identification, cloning and functional characterization of novel beta-defensins in the rat (*Rattus norvegicus*) [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2006, 4: 7.
- [6] Jelinsky S A, Turner T T, Bang H J, Finger J N, Solarz M K, Wilson E, et al. The rat epididymal transcriptome: comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides[J]. *Biol Reprod*, 2007, 76: 561-570.
- [7] Johnson G P, Lloyd A T, O'Farrelly C, Meade K G, Fair S. Comparative genomic identification and expression profiling of a novel β -defensin gene cluster in the equine reproductive tract[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2015 Apr 30. [Epub ahead of print].
- [8] Dorin J R, Barratt C L. Importance of β -defensins in sperm function[J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20: 821-826.
- [9] Li P, Chan H C, He B, So S C, Chung Y W, Shang Q, et al. An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats[J]. *Science*, 2001, 291:1783-1785.
- [10] Sun X J, Wang D N, Zhang W J, Wu X F. Expression of an antimicrobial peptide identified in the male reproductive system of rats[J]. *Mol Biotechnol*, 2004, 28:185-189.
- [11] Zhou C X, Zhang Y L, Xiao L, Zheng M, Leung K M, Chan M Y, et al. An epididymis-specific beta-defensin is important for the initiation of sperm maturation[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6: 458-464.
- [12] Cao D M, Li Y D, Yang R, Wang Y, Zhou Y C, Diao H, et al. Lipopolysaccharide-induced epididymitis disrupts epididymal beta-defensin expression and inhibits sperm motility in rats[J]. *Biol Reprod*, 2010, 83: 1064-1070.
- [13] Cooke G M, Robaire B. The effects of diethyl-4-methyl-3-oxo-4-aza-5 α -androstane-17 β -carboxamide (4-MA) and (4R)-5, 10-SECO-19-norpregna-4, 5-diene-3, 10, 20-trione (SECO) on androgen biosynthesis in the rat testis and epididymis [J]. *J Steroid Biochem*, 1986, 24:877-886.
- [14] Henderson N A, Cooke G M, Robaire B. Effects of PNU157706, a dual 5 α -reductase inhibitor, on gene expression in the rat epididymis[J]. *J Endocrinol*, 2004, 181:245-261.
- [15] Hu S G, Zou M, Yao G X, Ma W B, Zhu Q L, Li X Q, et al. Androgenic regulation of beta-defensins in the mouse epididymis[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2014, 12:76.
- [16] Ribeiro C M, Queiróz D B, Patrão M T, Denadai-Souza A, Romano R M, Silva E J, et al. Dynamic changes in the spatio-temporal expression of the β -defensin SPAG11C in the developing rat epididymis and its regulation by androgens[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 404:141-150.
- [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]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2013, 11:59.
- [18] Rommerts F F, Brinkman A O. Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1981, 21:15-28.
- [19] Nitta H, Bunick D, Hess R A, Janulis L, Newton S C, Millette CF, et al. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase [J]. *Endocrinology*, 1993, 132:1396-1401.