

miR-135a-5p 对氟他胺致隐睾小鼠胰岛素样因子 3 及睾酮表达的影响

杨远贵, 安妮妮, 陈辉, 何国庆, 占雄, 吴谋东, 汪丹, 王蔚, 彭金普

摘要 目的 探讨 miR-135a-5p 对氟他胺导致的隐睾症小鼠睾丸组织中胰岛素样因子 3 (INSL3) 和睾酮表达水平的影响。方法 构建氟他胺致隐睾小鼠模型, 将实验分为正常对照组、氟他胺组、氟他胺 + miR-135a-5p 敲降组及氟他胺 + miR-135a-5p 过表达组。用 RT-qPCR 法检测小鼠睾丸组织中 miR-135a-5p 和 INSL3 mRNA 的表达水平; 用 Western blot 检测 INSL3 蛋白的表达水平; 用 ELISA 法检测睾酮的表达水平。结果 氟他胺致隐睾小鼠睾丸组织中 miR-135a-5p、INSL3 mRNA 和蛋白以及睾酮的表达水平均显著下调 ($P < 0.05$)。敲降 miR-135a-5p 可下调隐睾睾丸组织中 INSL3 mRNA 和蛋白以及睾酮的表达水平 ($P < 0.01$), 而过表达 miR-135a-5p 则具有相反的结果。结论 miR-135a-5p 在氟他胺致隐睾小鼠睾丸组织中低表达, 过表达 miR-135a-5p 可恢复 INSL3 和睾酮的表达水平。

关键词 隐睾症; 氟他胺; miR-135a-5p; 胰岛素样因子 3; 睾酮

中图分类号 R 339.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)10-1662-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.10.009

隐睾症是一种常见的先天性泌尿生殖系统畸形, 也是导致男性不育的最常见的病因之一^[1]。隐睾症患者睾丸位于腹腔或腹股沟管, 使其睾丸持续暴露于高温环境下, 最终导致精子生成受到严重损害。隐睾是由于胚胎发育期睾丸没有正常下降到阴囊内形成的, 而胰岛素样因子 3 (insulin-like factor 3, INSL3) 和睾酮水平均可影响睾丸向阴囊的下降^[2-3]。微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类非编码小 RNA, 长约 22 个核苷酸^[4]。研究^[5-6]表明, miRNAs 在隐睾症精原干细胞维持和稳态等调控中发挥重要作用。例如, miR-34c 可扰乱精原干细胞在隐睾内的稳态^[6]。已经有研究表明 miR-135a-5p

与很多疾病如胆囊癌、脊髓损伤和糖尿病肾病等有关^[7-9]。但 miR-135a-5p 在隐睾症中的作用机制尚不清楚。该研究采用雄激素受体拮抗剂氟他胺构建小鼠隐睾模型, 通过检测睾丸组织中 miR-135a-5p、INSL3 mRNA 和蛋白、睾酮的表达水平验证 miR-135a-5p 对隐睾小鼠 INSL3 和睾酮表达的影响, 为隐睾症患者治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂 SPF 级 BALB/c 小鼠, 16 只雄性和 32 只雌性均购于北京维通利华实验动物有限公司。氟他胺购于美国 Sigma 公司; anti-miR-135a-5p 和 agomiR-135a-5p 购于上海生工生物工程股份有限公司; RT-qPCR 引物购于上海吉玛制药技术有限公司; Lipofectamine 2000、逆转录试剂盒均购于日本 TaKaRa 公司; 睾酮 ELISA 试剂盒购于上海谷研实业有限公司; TRIzol 试剂、RIPA 裂解液、BCA 定量检测试剂盒购于美国 Bio-Rad 公司。

1.2 氟他胺致隐睾小鼠模型构建与分组 所有小鼠适应性培养 1 周后进行隐睾小鼠模型的构建。将雌雄小鼠按 2:1 比例合笼喂养, 并随机分为 4 组: 正常对照组、氟他胺组、氟他胺 + miR-135a-5p 敲降组和氟他胺 + miR-135a-5p 过表达组。合笼次日检查雌性阴栓, 若有阴栓存在, 该日即定为妊娠第 0.5 天。从妊娠第 12 天开始, 每天用 1% 羧甲基纤维素配置 700 mg/kg 氟他胺给孕鼠灌胃, 共灌胃 10 d。正常对照组灌胃同体积的 1% 羧甲基纤维素。幼鼠出生后 4 周观察幼鼠有无阴囊或睾丸是否下降至阴囊, 依此判断是否建模成功。建模成功后, 在氟他胺组基础上, 将 anti-miR-135a-5p 或 agomiR-135a-5p 通过尾静脉分别注射至幼鼠体内, 在注射 2 d 后, 取睾丸组织进行后续分析。

1.3 RT-qPCR 检测 miR-135a-5p 和 INSL3 mRNA 的表达水平 收集各组小鼠睾丸组织, 用 TRIzol 试剂提取睾丸组织中的总 RNA, 逆转录成 cDNA 后进行 RT-qPCR 检测 miR-135a-5p (上游引物: 5'-CG-CAGTATGGCTTTTATTCCT-3', 下游引物: 5'-GGT-

2023-04-30 接收

基金项目: 贵州省科技计划项目 (编号: 黔科合基础 (2018) 1102)

作者单位: 贵州省人民医院小儿外科, 贵阳 550002

作者简介: 杨远贵, 女, 硕士研究生;

彭金普, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail:

pink-floyd@foxmail.com

CCAGTTTTTTTTTTTTTCACA-3') 和 INSL3 (上游引物: 5'-TACTGATGCTCTGGCTCTG-3', 下游引物: 5'-TGCAGGAGATGTCTCTGCTCT-3') mRNA 的表达水平。反应程序为: 预变性 95 °C 30 s、95 °C 5 s、60 °C 30 s 45 个循环。以 U6 和 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量。

1.4 Western blot 检测 INSL3 蛋白表达水平 收集各组小鼠睾丸组织, 用 RIPA 裂解液提取睾丸组织总蛋白, 按照 BCA 蛋白检测试剂盒说明书测定蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 根据 Marker 条带指示, 采用半干法将目的条带转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 用 INSL3 一抗 4 °C 过夜孵育; 次日, TBST 后加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 2 h; TBST 后加入 ECL 化学发光液进行显影, 最后在凝胶成像仪上进行曝光拍照, 采用 Image J 分析蛋白条带灰度值。

1.5 ELISA 法检测睾酮表达水平 采用 ELISA 法检测睾丸组织睾酮的表达水平。将预冷 PBS 加入睾丸组织中, 并用玻璃匀浆将样本充分匀浆, 3 000 r/min 离心 20 min 后, 收集上清液。加入 PBS 稀释上清后按照 ELISA 试剂盒说明书检测各组睾酮水平, 并在酶标仪上检测 450 nm 波长处的吸光度值。

1.6 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素 ANOVA 进行检测。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氟他胺致隐睾模型结果 32 只 BALB/c 小鼠 8 只为正常对照组, 24 只为氟他胺致隐睾模型组。正常对照组隐睾发生率均为 0, 氟他胺致隐睾模型组隐睾发生率为 100%, 其中 75% 为双侧隐睾, 25% 例为单侧隐睾。隐睾模型组小鼠睾丸位置: 肾

下极有 3 只, 腹股沟区 6 只, 膀胱两侧 15 只。

2.2 氟他胺对隐睾睾丸组织中 miR-135a-5p 表达的影响 RT-qPCR 结果显示: 与正常对照组比较, 氟他胺组睾丸组织中 miR-4485-3p、miR-135a-5p、miR-196a-5p 及 miR-582-5p 等多个 miRNAs 发生差异表达, 其中 miR-135a-5p 在氟他胺处理组中的表达水平显著低于正常对照组 ($P < 0.01$), 差异表达最显著 (图 1)。因此, 选择 miR-135a-5p 进行后续实验。

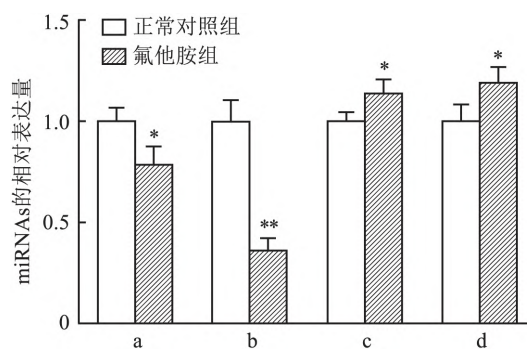


图 1 氟他胺对隐睾睾丸组织中 miRNAs 表达的影响

a: miR-4485-3p; b: miR-135a-5p; c: miR-196a-5p; d: miR-582-5p; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 氟他胺对隐睾睾丸组织中 INSL3 和睾酮表达的影响 RT-qPCR 结果显示: 与正常对照组比较, 氟他胺组小鼠睾丸组织中 INSL3 mRNA 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$, 图 2A); Western blot 结果显示: 与正常对照组比较, 氟他胺组小鼠睾丸组织中 INSL3 蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.05$, 图 2B); ELISA 结果显示: 氟他胺组小鼠睾丸组织中睾酮的表达水平明显低于正常对照组 ($P < 0.05$, 图 2C)。以上结果说明, INSL3 和睾酮在氟他胺致隐睾睾丸组织中低表达。

2.4 敲降 miR-135a-5p 对睾丸组织中 INSL3 和睾酮表达水平的影响 RT-qPCR 结果显示: 与氟他胺

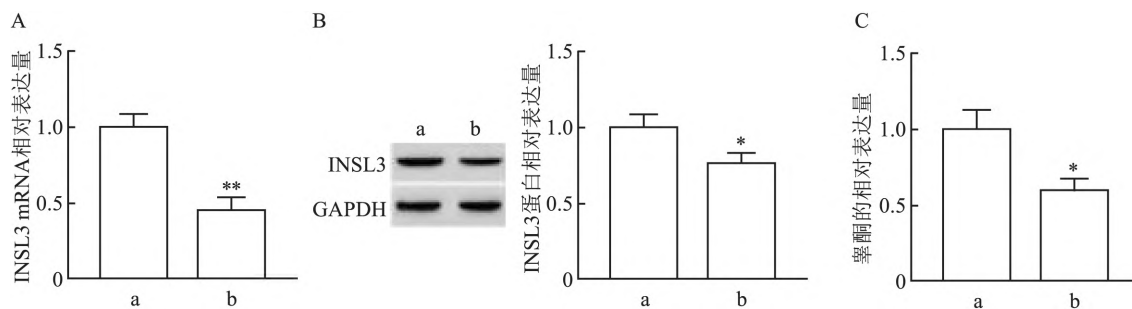


图 2 氟他胺对隐睾睾丸组织中 INSL3 和睾酮表达的影响

A: RT-qPCR 检测 INSL3 mRNA 的表达水平; B: Western blot 检测 INSL3 蛋白的表达水平; C: ELISA 检测睾酮的表达水平; a: 正常对照组; b: 氟他胺组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

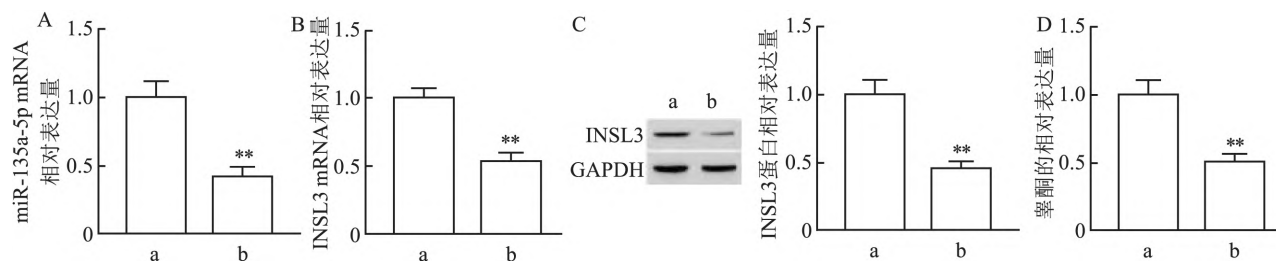


图3 敲降 miR-135a-5p 对睾丸组织中 INSL3 和睾酮表达水平的影响

A: RT-qPCR 检测 miR-135a-5p mRNA 的表达水平; B: RT-qPCR 检测 INSL3 mRNA 的表达水平; C: Western blot 检测 INSL3 蛋白的表达水平; D: ELISA 检测睾酮的表达水平; a: 氟他胺组; b: 氟他胺 + miR-135a-5p 敲降组; 与氟他胺组比较: ** $P < 0.01$

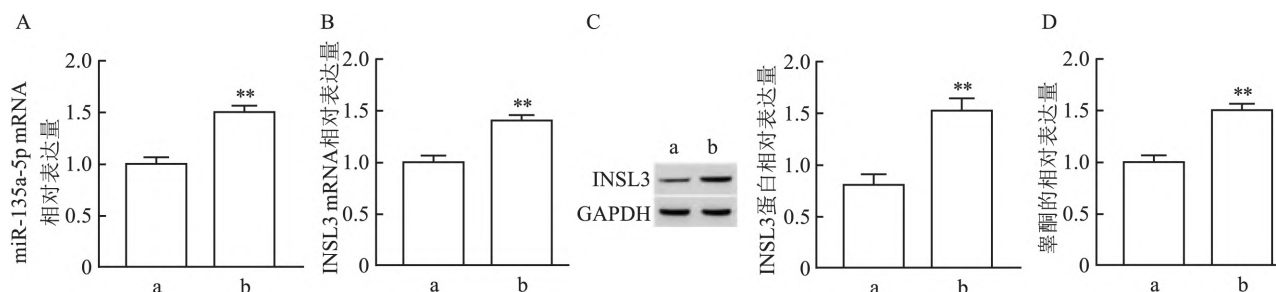


图4 过表达 miR-135a-5p 对睾丸组织中 INSL3 和睾酮表达水平影响

A: RT-qPCR 检测 miR-135a-5p mRNA 的表达水平; B: RT-qPCR 检测 INSL3 mRNA 的表达水平; C: Western blot 检测 INSL3 蛋白的表达水平; D: ELISA 检测睾酮的表达水平; a: 氟他胺组; b: 氟他胺 + miR-135a-5p 过表达组; 与氟他胺组比较: ** $P < 0.01$

组比较,敲降 miR-135a-5p 显著下调睾丸组织中 miR-135a-5p 和 INSL3 mRNA 的表达水平(均 $P < 0.01$,图 3A、B); Western blot 结果显示:氟他胺 + miR-135a-5p 敲降组中 INSL3 蛋白的表达水平显著低于氟他胺组($P < 0.01$,图 3C); ELISA 结果显示:氟他胺 + miR-135a-5p 敲降组中睾酮的表达水平显著低于氟他胺组($P < 0.01$,图 3D)。以上结果说明,敲降 miR-135a-5p 可下调睾丸组织中 INSL3 和睾酮的表达水平。

2.5 过表达 miR-135a-5p 对睾丸组织中 INSL3 和睾酮表达水平的影响 RT-qPCR 结果显示:与氟他胺组比较,过表达 miR-135a-5p 显著上调睾丸组织中 miR-135a-5p 和 INSL3 mRNA 的表达水平($P < 0.01$,图 4A、B); Western blot 结果显示:氟他胺 + miR-135a-5p 过表达组中 INSL3 蛋白的表达水平显著高于氟他胺组($P < 0.01$,图 4C); ELISA 结果显示:氟他胺 + miR-135a-5p 过表达组中睾酮的表达水平显著高于氟他胺组($P < 0.01$,图 4D)。以上结果说明,过表达 miR-135a-5p 可上调睾丸组织中 INSL3 和睾酮的表达水平。

3 讨论

男性不育是世界范围内备受关注的问题,隐睾作为先天性生殖系统畸形,是导致男性不育的重要

因素^[10-11]。隐睾不仅能导致男性不育,而且发生癌变的几率也较正常睾丸高^[12]。但隐睾的发病机制尚不明确。

INSL3 和睾酮是性腺正常分化和胚胎发育的关键物质,其异常表达往往导致生殖系统先天性畸形。INSL3 是睾丸间质细胞分泌的一种脂类激素,表达于各种生殖组织中,是判断睾丸间质细胞是否分化成熟的重要指标。研究^[13]表明,INSL3 可作用睾丸引带,诱导引带细胞增生膨大,是睾丸下降至阴囊的主要影响因素。氟他胺是一种非类固醇类雄激素受体阻滞剂,可与雄激素受体结合阻滞睾酮和双氢睾酮发挥作用,从而阻止睾丸向阴囊的下降^[14]。本研究利用氟他胺构建隐睾小鼠模型,检测发现隐睾小鼠睾丸组织中 INSL3 mRNA 和蛋白以及睾酮的表达水平均显著下调。

临床上关于 miRNAs 调控异常与导致男性不育等多种疾病的关系的研究越来越广泛。Duan et al^[15]研究表明,miR-210 在不育雄性成熟停滞睾丸和隐睾中显著上调,可作为隐睾症的生物标志物。Sun et al^[16]研究表明,miR-509-5p 表达下调与男性不育相关,且可靶向调控 MDM2 在睾丸生殖肿瘤细胞中起抑制作用。Moritoki et al^[5]研究证实,miR-135a-5p 在隐睾中低表达,并通过与 FOXO1 相互作用参与精原干细胞的维持。本研究表明,miR-135a-

5p 在氟他胺致隐睾小鼠睾丸组织中低表达。过表达 miR-135a-5p 可显著上调隐睾睾丸组织中 INSL3 mRNA 和蛋白以及睾酮的表达水平,而敲降 miR-135a-5p 具有相反的结果。

参考文献

- [1] Loebenstein M, Thorup J, Cortes D, et al. Cryptorchidism, gonocyte development and the risks of germ cell malignancy and infertility: a systematic review [J]. *J Pediatr Surg* 2020, 55(7): 1201–10.
- [2] Bay K, Main K M, Toppari J, et al. Testicular descent: INSL3, testosterone genes and the intrauterine milieu [J]. *Nat Rev Urol*, 2011, 8(4): 187–96.
- [3] Li Y, Kobayashi K, Murayama K, et al. FEAT enhances INSL3 expression in testicular leydig cells [J]. *Genes Cells* 2018, 23(11): 952–62.
- [4] 何迪, 李斌, 喻镁佳, 等. miR-193a-5p/HOXA7 轴对急性髓细胞白血病细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(3): 374–9.
- [5] Moritoki Y, Hayashi Y, Mizuno K, et al. Expression profiling of microRNA in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FOXO1 [J]. *J Urol* 2014, 191(4): 1174–80.
- [6] Huang Z, Tang D, Gao J, et al. miR-34c disrupts spermatogonial stem cell homeostasis in cryptorchid testes by targeting Nanos2 [J]. *Reprod Biol Endocrinol* 2018, 16(1): 97.
- [7] Diao H, Xu X, Zhao B, et al. miR-135a-5p inhibits tumor invasion by targeting ANGPT2 in gallbladder cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(1): 528.
- [8] Wang N, Yang Y, Pang M, et al. MicroRNA-135a-5p promotes the functional recovery of spinal cord injury by targeting SP1 and ROCK [J]. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020, 22: 1063–77.
- [9] Zhang J, Zhang L, Zha D, et al. Inhibition of miRNA-135a-5p ameliorates TGF- β 1 induced human renal fibrosis by targeting SIRT1 in diabetic nephropathy [J]. *Int J Mol Med* 2020, 46(3): 1063–73.
- [10] Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, et al. A unique view on male infertility around the globe [J]. *Reprod Biol Endocrinol* 2015, 13: 37.
- [11] Clavijo R I, Carrasquillo R, Ramasamy R. Varicoceles: prevalence and pathogenesis in adult men [J]. *Fertil Steril* 2017, 108(3): 364–9.
- [12] Rubben I. Cryptorchidism and fertility [J]. *Urologe A* 2016, 55(7): 890–7.
- [13] Ivell R, Anand-Ivell R. Biological role and clinical significance of insulin-like peptide 3 [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011, 18(3): 210–6.
- [14] Nation T R, Buraundi S, Balic A, et al. The effect of flutamide on expression of androgen and estrogen receptors in the gubernaculum and surrounding structures during testicular descent [J]. *J Pediatr Surg* 2011, 46(12): 2358–62.
- [15] Duan Z, Huang H, Sun F. The functional and predictive roles of miR-210 in cryptorchidism [J]. *Sci Rep* 2016, 6: 32265.
- [16] Sun J, Niu L, Gao S, et al. miR-509-5p downregulation is associated with male infertility and acts as a suppressor in testicular germ cell tumor cells through targeting MDM2 [J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 10515–22.

Effects of miR-135a-5p on the expression of insulin-like factor 3 and testosterone in flutamide-induced cryptorchidism mouse

Yang Yuangui, An Nini, Chen Hui, He Guoqing, Zhan Xiong, Wu Moudong, Wang Dan, Wang Wei, Peng Jinpu
(Dept of Pediatric Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002)

Abstract **Objective** To investigate the effect of miR-135a-5p on the expression levels of insulin-like factor 3 (INSL3) and testosterone in the testicular tissues of flutamide-induced cryptorchidism mouse. **Methods** A model of flutamide-induced cryptorchidism in mouse was constructed and the experiment was divided into normal control group, flutamide group, flutamide + miR-135a-5p knockdown group and flutamide + miR-135a-5p overexpression group. RT-qPCR was used to detect the expression levels of miR-135a-5p and INSL3 mRNA. Western blot was employed to assess the protein expression level of INSL3. ELISA was performed to measure the expression level of testosterone. **Results** The expression levels of miR-135a-5p, INSL3 mRNA and protein and testosterone were significantly down-regulated in the testis of cryptorchid mice by flutamide ($P < 0.05$). Knockdown of miR-135a-5p could downregulate the expression of INSL3 mRNA, INSL3 protein and testosterone ($P < 0.01$), while overexpression of miR-135a-5p had the opposite result. **Conclusion** miR-135a-5p decreased in flutamide-induced cryptorchidism mouse testicular tissues, and overexpression of miR-135a-5p could restore the expression levels of INSL3 and testosterone.

Key words cryptorchidism; flutamide; miR-135a-5p; insulin-like factor 3; testosterone