

LSS 基因功能缺失对雄性小鼠生殖的影响

孙晓梅¹, 李名聪^{1,2}, 李 涛³, 魏 翔⁴, 葛若木¹, 张 军¹, 李昱昊¹, 周 青¹, 汪 渊¹, 张胜权¹, 张素梅¹

摘要 目的 研究羊毛固醇合成酶(LSS)基因功能缺失对小鼠生殖的影响。方法 取8周龄的LSS^{+/+}(WT)型和LSS^{-/-}(KO)型鼠雌雄共30只鼠,分别按♂WT×♀WT、♂WT×♀KO、♂KO×♀WT、♂KO×♀KO分组进行1:1合笼,时长4个月,统计每胎生仔个数及平均产仔周期;取WT型和KO型小鼠的血清,进行性激素检测;用TUNEL染色观察睾丸中生精细胞的凋亡情况;用Western blot检测睾丸组织中Tubulin、LSS和凋亡相关蛋白(GPX4/Bax/Bcl-2)的表达。结果 配种结果显示♂WT×♀WT与♂KO×♀KO相比,每胎平均生仔个数差异有统计学意义,其余组别均无差异,产仔周期4组的差异均无统计学意义;WT型和KO型小鼠性激素检测结果相比,差异也无统计学意义;TUNEL染色结果可以观察到,基因敲除鼠的睾丸组织中生精细胞凋亡增多;Western blot结果中,与WT型相比,KO型小鼠的凋亡相关蛋白(GPX4/Bax/Bcl-2)表达量均无差异。结论 LSS基因功能缺失会导致小鼠生精细胞凋亡增加,其可能影响小鼠的生育能力。

关键词 羊毛固醇合成酶;基因敲除小鼠;凋亡;性激素;生殖

中图分类号 R 339.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0208-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.009

不育症影响了全球8%~12%的夫妻,其中男性因素约占50%。男性不育与损害精子发生有关^[1]。精子发生是一个高产且高度组织化的过程^[2],精子发生是从二倍体精原干细胞(spermatogonial stem cell, SSC)提供单倍体精子的细胞分化过程。睾酮、促卵泡生成激素(follicle-stimulating hor-

mone, FSH)和促黄体生成激素(luteinizing hormone, LH)等激素的缺失会引起生殖细胞凋亡^[3]。胆固醇是哺乳动物细胞生长和生存所必需的,并且是性激素合成的前体^[4]。羊毛固醇合成酶(lansterol synthase, LSS)是胆固醇合成途径中的一个关键酶,催化(S)-2,3-环氧角鲨烯转化成羊毛固醇。LSS双等位基因突变的患者不仅会表现少毛症、白内障、脱发伴智力低下(alopecia with mental retardation, APMR)综合征、隐形神经外胚层综合征等疾病,还会出现小阴茎的现象^[5-7]。有研究^[8]显示,LSS抑制剂会降低前列腺癌细胞的活力,并在体外诱导细胞凋亡。该研究通过LSS敲除小鼠模型,探讨LSS基因缺陷对雄性小鼠生殖功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

1.1.1 实验动物 实验采用的动物均为C57BL/6品系,LSS基因敲除的F1代小鼠购自南京大学南京生物医药研究所,于安徽医科大学动物中心SPF级环境中饲养及配种,动物饲养环境严格保证在温度为(20±2)℃,相对湿度为40%~70%且明暗交替时间12/12 h的环境下,自由进食水。所有实验动物的操作与饲养均符合国标及安徽省实验动物中心管理饲养条例。

1.1.2 主要试剂 Premix Taq (TaKaRa Taq Version 2.0 Plus dye)和DL2000 bp DNA marker 购自大连宝生物工程(上海)股份有限公司;鼠尾基因型鉴定试剂盒购自上海碧云天生物公司;LSS基因引物由南京大学南京生物医药研究所设计,引物及琼脂糖粉末购自生工生物工程(上海)股份有限公司,LSS引物序列为:Primer F:5'-ACCTCTGCGGAGTCTAAGGAAG-3'、Primer R:5'-AAGGCTCTTCACTGTTTCAGAGCT-3';Tubulin 购自上海 Abmart 公司;LSS/Bax/Bcl-2 购自美国 Santa Cruz 公司;GPX4 购自美国 Thermo Scientific 公司;所有使用的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 仪器 DYY-6C 电泳仪购自北京市六一仪器厂;普通PCR仪购自美国赛默飞公司;酶标仪

2021-11-12 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究项目(编号:KJ2020A0143)

作者单位:¹ 安徽医科大学分子生物学实验室,生物化学与分子生物学教研室,安徽省省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

² 合肥市第二人民医院病理科,合肥 230011

³ 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230032

⁴ 合肥市第二人民医院高压氧科,合肥 230011

作者简介:孙晓梅,女,硕士研究生;

张素梅,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:379236778@qq.com

(1510) 购自美国 Thermo Scientific 公司;制冰机 (SCOTSMAN) 购自德国 Leica 公司;全自动数码凝胶图像分析仪购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠基因型鉴定 ① 鼠尾基因组 DNA 提取:将 DNA Extraction Solution 和 Enzyme Mix 按照 48:2 的比例充分混匀,配制成消化液。剪取 0.2~1 cm 的小鼠尾尖放置于 250 μ l 的 PCR 管内,向其中加入配置好的消化液 50 μ l。将样品置于 PCR 仪中,55 $^{\circ}$ C、15 min,95 $^{\circ}$ C、5 min,结束后加入 50 μ l Stop Solution,在涡旋器上混匀,以提取小鼠基因组 DNA。② PCR 扩增:PCR 扩增反应体系 (25 μ l):12.5 μ l Premix Taq、1 μ l F 引物 (10 μ mol/L)、1 μ l R 引物 (10 μ mol/L)、1 μ l DNA 模板、加入灭菌 ddH₂O 9.5 μ l。采用 PCR 扩增仪进行循环扩增,反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C、3 min,变性 94 $^{\circ}$ C、30 s,退火 55 $^{\circ}$ C、30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C、40 s,循环 35 次,72 $^{\circ}$ C、10 min 终止反应。③ 琼脂糖凝胶电泳:取 PCR 产物 5 μ l,在 1.6% 琼脂糖凝胶中及电压 90 V 下,电泳 90 min,于化学发光凝胶成像系统中进行拍照分析。④ 基因型结果判定:根据 PCR 扩增产物长度来进行判断,扩增产物在 328 bp 左右的为野生型 (WT),扩增产物在 328 bp 和 282 bp 左右两条带均存在的为杂合子 (LSS^{+/-})。

1.2.2 生育力检查 将 8 周龄的鼠按基因型和雌雄不同,分组配繁,第一批 WT 型和 KO 型雌雄各取 2 只,共 8 只鼠;第二批 WT 型雌雄各取 5 只,KO 型鼠雌雄各取 6 只,共 22 只,两批总计 30 只鼠,分别按 δ WT $\times$ δ WT、 δ WT $\times$ δ KO、 δ KO $\times$ δ WT、 δ KO $\times$ δ KO 进行 1:1 合笼,时长 4 个月,统计每胎平均生仔个数、产仔周期。

1.2.3 性激素检测 取雄性 WT 型和 KO 型小鼠各 10 只,留取血清检测性激素。

1.2.4 TUNEL 染色观察睾丸中生殖细胞凋亡情况 常规制备石蜡切片,脱蜡、水合,加入细胞通透液 8 min,PBS 漂洗 2 次,滴加 TUNEL 反应混合物,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,冲洗样品,在荧光显微镜下观察分析,滴加转化剂-POD,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,洗样品,滴加 DAB 底物溶液,室温孵育 10 min,光学显微镜镜下观察凋亡细胞并拍照。

1.2.5 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达 根据小鼠睾丸组织的大小,加入适量的裂解液以提取总蛋白,在 BCA 法检测蛋白浓度后,采用 SDS-PAGE 凝胶电泳,配置相应浓度的胶,分离蛋白并转至

PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h,加入相应的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,加入对应的由辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,每步结束后,均要用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。用 ECL 化学发光剂进行显色,用 Image J 软件进行灰度值分析,计算蛋白表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS Statistics 统计软件对数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数的比较采用 *t* 检验,各组均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA)、组间两两比较用 SNK-*q* 检验;两组性激素各项指标对比采用独立样本 Mann-Whitney U 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果和 LSS 蛋白表达 提取鼠尾 DNA 进行 PCR 扩增,电泳后的结果如图 1 所示:其中 1、3、6、7、8 号只出现一条 328 bp 左右的条带,为野生型 (WT);2、4、5、9、10 号出现 328 bp 和 282 bp 左右的两条带,为杂合子 (LSS^{+/-});与 WT 型相比,基因敲除小鼠的 LSS 蛋白表达量降低 (*t* = 18.00, *P* < 0.05)。见图 1。

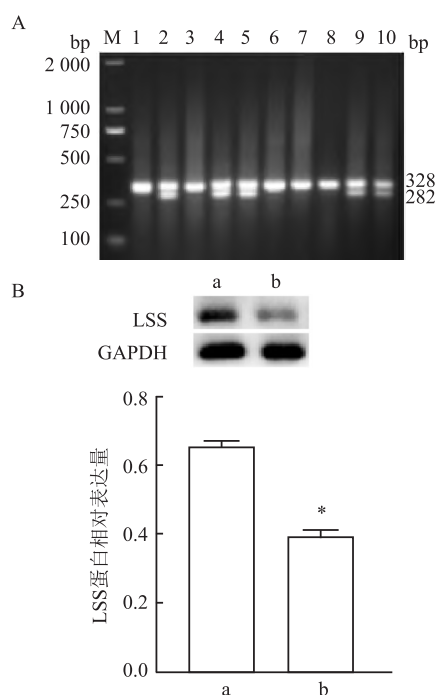


图1 小鼠 PCR 基因型鉴定和 Western blot 法检测 LSS 蛋白在野生型和杂合子小鼠睾丸组织中表达水平的结果

A:基因型鉴定结果;B:LSS 蛋白表达;M:DL2000 DNA marker;1、3、6、7、8:WT 小鼠;2、4、5、9、10:LSS^{+/-} 小鼠;a:野生型小鼠对照组;b:杂合子小鼠组;与野生型小鼠对照组比较,**P* < 0.05

2.2 LSS 基因缺陷对雄性小鼠生育力可能有影响

4组两两比较,平均产仔周期($F = 1.837, P = 0.155$)差异均无统计学意义;每胎平均生仔个数($F = 4.602, P = 0.007$),差异有统计学意义,根据SNK-q检验分析显示 δ WT $\times$ δ WT与 δ KO $\times$ δ KO组比较有差异,其余组别差异均无统计学意义(表1)。

表1 LSS基因缺陷对雄性生育力无影响($n = 30$)

组别	组数	生仔总数 (只)	平均产仔 周期(d)	每胎平均生仔 个数(只)
δ WT $\times$ δ WT	4	90	24.33 ± 5.11	6.92 ± 2.02
δ WT $\times$ δ KO	3	62	30.70 ± 10.41	6.20 ± 2.78
δ KO $\times$ δ WT	3	40	31.25 ± 11.08	5.00 ± 1.69
δ KO $\times$ δ KO	5	52	26.09 ± 6.88	$4.13 \pm 1.85^*$

与 δ WT $\times$ δ WT组比较: * $P < 0.05$

2.3 LSS基因缺陷对雄性小鼠性激素无影响 采用独立样本Mann-Whitney U检验对KO型与WT型小鼠两组分析,性激素五项水平差异均无统计学意义,表明LSS基因敲除对C57小鼠性激素水平无影响(表2)。

2.4 TUNEL染色观察睾丸中生殖细胞凋亡情况

TUNEL阳性细胞为红色颗粒的细胞,TUNEL染色结果显示,凋亡细胞多存在于精原细胞和精母细胞,凋亡细胞染色较深,可见细胞核固缩、裂解等形态学改变。WT组的睾丸组织中很少见到凋亡细胞,KO型小鼠睾丸组织凋亡细胞增多(图2)。

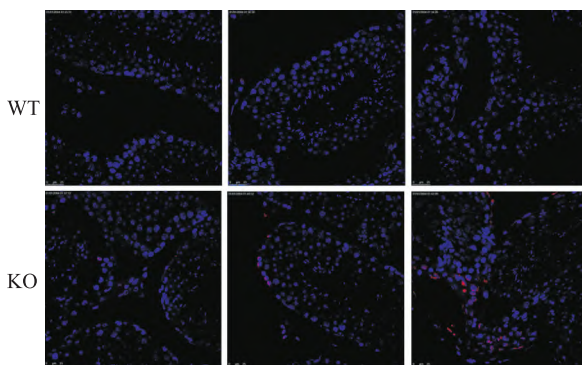


图2 6只野生型和杂合子小鼠睾丸TUNEL染色的结果
WT:野生型小鼠对照组;KO:基因杂合敲除型小鼠

2.5 Western blot检测凋亡相关蛋白表达 基因缺陷小鼠的睾丸组织中,凋亡相关蛋白Bax($t = 0.340, P = 0.751$)、Bcl-2($t = 0.962, P = 0.390$)、GPX4($t = 0.641, P = 0.557$)与野生型小鼠相比,差异均无统计学意义(图3)。

3 讨论

LSS在胆固醇合成途径的关键环化反应中合成

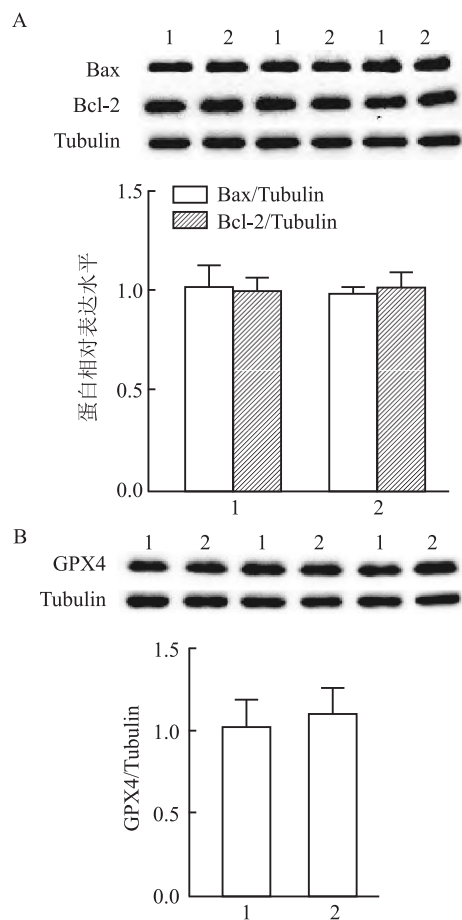


图3 Western blot法检测凋亡相关蛋白在野生型和杂合子小鼠睾丸组织中表达水平

A: Bax、Bcl-2蛋白表达; B: GPX4蛋白表达; 1: 野生型小鼠对照组; 2: 杂合子小鼠组

羊毛固醇。LSS在胆固醇合成过程中起决定性作用,它可能成为新型抗胆固醇药的目标,也可以确定为抗心绞痛药物吗多明的靶标^[9-11]。而LSS功能缺失对小鼠生殖功能的影响至今未有文献报道。

本研究结果表明,当LSS基因敲除后,与野生型小鼠相比,小鼠睾丸组织TUNEL染色结果显示,KO型小鼠生精细胞凋亡水平高于WT型小鼠。两组配繁结果显示生仔周期无差异,每胎平均生仔个数当雌雄均为LSS型小鼠时有差异,性激素水平相比也无差异。用Western blot法检测凋亡相关蛋白在野生型和杂合子小鼠睾丸组织中表达水平时,显示促凋亡相关蛋白Bax和抗凋亡相关Bcl-2的蛋白表达无差异,表明睾丸组织生精细胞发生凋亡可能不是通过控制线粒体膜的通透性来调节凋亡刺激物。由于GPX4是一种可以修复脂质过氧化物,抑制其触发由脂质膜的氧化损伤驱动的一种细胞死亡(铁死

表2 LSS 基因缺陷对雄鼠性激素水平无影响 ($n=10$)

组别	促黄体生成激素 (IU/L)	睾酮 (nmol/L)	雌二醇 (pmol/L)	促卵泡生成激素 (IU/L)	孕酮 (nmol/L)
WT	0.23 ± 0.04	16.04 ± 14.29	26.52 ± 16.86	0.64 ± 0.29	8.37 ± 1.50
KO	0.24 ± 0.03	6.13 ± 11.59	26.95 ± 17.09	0.59 ± 0.23	9.72 ± 3.15
P 值	0.341	0.315	0.395	0.762	0.203

亡)^[12],本研究结果显示 GPX4 蛋白表达无差异,表明引起睾丸组织生精细胞发生凋亡的不是因为铁死亡这条凋亡通路。参与细胞凋亡的途径众多,介导 LSS 敲除小鼠生精细胞凋亡的蛋白和分子机制尚有待进一步研究。此外,研究^[13]表明:他汀类药物(羟甲基戊二酸单酰 CoA 抑制剂)可通过降低类固醇激素睾酮的生成和精子膜胆固醇的量来对男性生殖有负面影响。也有研究^[14]发现对仓鼠和狗中使用 LSS 抑制剂治疗后,在身体多个部位观察到组织病理学变化,而睾丸病变的特征是睾丸萎缩,生殖细胞耗竭和变性、生精小管塌陷及前列腺和精囊萎缩变小等。本研究在 LSS 基因杂合敲除小鼠中观察到睾丸生精细胞凋亡水平高于 WT 型小鼠,提示 LSS 基因敲除通过抑制睾丸生殖细胞生产而抑制小鼠生殖能力。

参考文献

- [1] Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, et al. Male infertility[J]. Lancet. 2021, 397(10271): 319–33.
- [2] Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, et al. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice[J]. Nature, 2002, 418(6899): 778–81.
- [3] Sofikitis N, Giotitis N, Tsounapi P, et al. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008, 109(3–5): 323–30.
- [4] Jinn S, Brandis K A, Ren A, et al. snoRNA U17 regulates cellular cholesterol trafficking[J]. Cell Metab, 2015, 21(6): 855–67.
- [5] 刘莉,顾亚男,周宏,等.羊毛固醇合成酶抑制剂 RO 对 KCS 细胞增殖的影响[J].安徽医科大学学报, 2021, 56(2): 176–9.
- [6] Wada Y, Kikuchi A, Kaga A, et al. Metabolic and pathologic profiles of human LSS deficiency recapitulated in mice[J]. PLoS Genet, 2020, 16(2): e1008628.
- [7] Besnard T, Sloboda N, Goldenberg A, et al. Biallelic pathogenic variants in the lanosterol synthase gene LSS involved in the cholesterol biosynthesis cause alopecia with intellectual disability, a rare recessive neuroectodermal syndrome[J]. Genet Med, 2019, 21(9): 2025–35.
- [8] Liang Y, Mafuvadze B, Aebi J D, et al. Cholesterol biosynthesis inhibitor RO 48-8071 suppresses growth of hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer cells[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9:3223–32.
- [9] Zhao L, Chen X J, Zhu J, et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts[J]. Nature, 2015, 523(7562): 607–11.
- [10] Thoma R, Schulz-Gasch T, D'Arcy B, et al. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase[J]. Nature, 2004, 432(7013): 118–22.
- [11] Lum P Y, Armour C D, Stepaniants S B, et al. Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes[J]. Cell, 2004, 116(1): 121–37.
- [12] Garcia-Bermudez J, Birsoy K. A mitochondrial gatekeeper that helps cells escape death by ferroptosis[J]. Nature, 2021, 593(7860): 514–5.
- [13] Drobnis E Z, Nangia A K. Miscellaneous drugs and male reproduction[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1034: 211–26.
- [14] Funk J, Landes C. Histopathologic findings after treatment with different oxidosqualene cyclase (OSC) inhibitors in hamsters and dogs[J]. Exp Toxicol Pathol, 2005, 57(1): 29–38.

The effects of knockout of LSS on female mice fertility

Sun Xiaomei¹, Li Mingcong^{1,2}, Li Tao³, Wei Xiang⁴, Ge Ruomu¹, Zhang Jun¹, Li Yuhao¹,
Zhou Qing¹, Wang Yuan¹, Zhang Shengquan¹, Zhang Sumei¹

(¹Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology of Anhui Medical University,
Key Laboratory of Gene Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032;

²Dept of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032;

³Dept of Pathology, Hefei Second People's Hospital, Hefei 230011;

⁴Dept of Hyperbaric Oxygen, Hefei Second People's Hospital, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of lanosterol synthase (LSS) gene knockout on reproductive function in male mice. **Methods** 30 male and female 8-week-old LSS^{+/+} (WT) and LSS^{+/-} (KO) mice were selected,

伯格替尼通过抑制 EGFR 磷酸化增强 结直肠癌细胞的辐射敏感性

胡关朔^{1,2}, 赵国平¹

摘要 目的 探究伯格替尼对结直肠癌(LOVO)细胞辐射敏感性的影响及机制。方法 Western blot 和免疫荧光检测检测不同辐射剂量处理之后 LOVO 细胞中 EGFR、p-EGFR 表达量。Western blot 检测 LOVO 细胞中 EGFR、p-EGFR、 γ -H2AX、cleaved caspase-3、cleaved caspase-7 和 cleaved caspase-9 表达量, DR-GFP 质粒系统检测非同源末端连接修复(NHEJ)水平, CCK-8 检测细胞活力, AnnexinV FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡。结果 ①辐射处理后, LOVO 细胞 EGFR 磷酸化水平显著升高, 伯格替尼呈剂量依赖性的抑制 EGFR 磷酸化。②伯格替尼抑制非同源末端连接修复, 伯格替尼联合辐射处理 LOVO 细胞后, 细胞凋亡水平增加。结论 伯格替尼通过抑制 EGFR 磷酸化, 抑制 LOVO 细胞的非同源末端连接修复, 促进细胞凋亡, 最终增加了 LOVO 细胞的辐射敏感性。

关键词 结直肠癌 LOVO 细胞; 伯格替尼; EGFR; p-EGFR

中图分类号 Q 691.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)02-0212-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.010

结直肠癌是第三大最常见的癌症^[1], 在世界范围内, 每年有超过 180 万结直肠癌新增病例, 88 万例与结直肠癌有关的死亡报告^[2]。临床上, 手术切除被认为是结直肠癌的主要治疗手段, 放疗被认为是手术前后有效的治疗方式^[3]。因此, 迫切需要适当的策略来提高结直肠癌的辐射敏感性。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关, EGFR 磷酸化激活下游通路, 促进肿瘤细胞存活, 辐射之后磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)表达显著升高, p-EGFR 通过促进 DNA 损伤修复, 从而促进细胞存活^[4-7]。抑制 EGFR 磷酸化可能是提高肿瘤细胞辐射敏感性的有效手段。该文以辐射作为处理肿瘤细胞的治疗手段, 伯格替尼作为 EGFR 磷酸化抑制剂, 以结直肠癌 LOVO 细胞作为研究对象, 旨在通过使用伯格替尼抑制 EGFR 磷酸化, 增强结直肠癌细胞辐射敏感性, 从而为结直肠癌治疗提供可能的治疗方案。

2021-08-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31870845)

作者单位: ¹ 中国科学院合肥物质科学研究院强磁场中心, 合肥 230031

² 中国科学技术大学, 研究生院科学岛分院, 合肥 230026

作者简介: 胡关朔, 男, 硕士研究生;

赵国平, 男, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: gpz@ipp.ac.cn

and respectively according to δ WT $\times$ η WT, δ WT $\times$ η KO, δ KO $\times$ η WT, δ KO $\times$ η KO carries out 1 : 1 cages for four months, and the number of litters per litter and reproductive cycle were counted. The serum of LSS^{+/+} (WT) and LSS^{+/-} (KO) mice was taken for sex hormone testing. The apoptosis of spermatogenic cells in the testis was observed by TUNEL staining. Western blot was used to detect the expression of Tubulin, LSS and apoptosis-related protein (GPX4/Bax/Bcl-2) in testis tissue. **Results** The breeding results showed that there was a statistically difference in the number of litters per litter between δ WT $\times$ η WT and δ KO $\times$ η KO, and there was no difference in the other groups. There was no statistically difference in the four groups in the reproductive cycle. There was no statistically difference between the sex hormone test results of WT and KO mice. TUNEL staining results showed that there was an increase in spermatogenic cell apoptosis in the testis tissue of the knockout mice. In the results of Western blot, there was no difference in the expression of apoptosis-related proteins (GPX4/Bax/Bcl-2) in KO mice compared with WT mice. **Conclusion** Loss of LSS gene function can lead to increased apoptosis of mouse spermatogenic cells, which may affect the fertility of mice.

Key words lanosterol synthase; knockout mice; apoptosis; sex hormones; reproduction