

网络出版时间: 2020-2-19 12:58 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1527.015.html>

分选蛋白 SNX4 在小鼠睾丸中的表达和定位研究

李堃¹, 刘悦², 黄鹏³, 杨智昉¹, 胡茜¹, 张颖¹, 李志宏¹, 吕叶辉¹, 梁乐¹

摘要 目的 明确分选连接蛋白 4(SNX4) 在小鼠睾丸中的表达规律及其可能参与的内体分选功能。方法 利用荧光实时定量 PCR(Real-time PCR) 技术检测小鼠睾丸中 SNX 家族 23 个家族成员的 mRNA 的表达差异。利用 Real-time PCR 技术检测小鼠肝、脾、肾、脑和睾丸的 mRNA 的表达差异。利用免疫组织化学和免疫荧光染色的方法检测 SNX4 和大鼠肉瘤(Ras) 蛋白超家族成员中的 Rab 家族成员之一 Rab5 在睾丸及支持细胞中的定位。结果 在小鼠的睾丸中 SNX4 的相对表达量可达到肝脏的约(15.49 ± 4.92) 倍($P < 0.01$); 在睾丸中 SNX 家族中的 23 个家族成员中 SNX1 和 SNX4 的相对表达量较高。SNX4 在睾丸支持细胞(sertoli cells) 表达, 并且与早期内体的标志物 Rab5 具有共定位的特性。结论 SNX4 在小鼠睾丸 sertoli cells 高表达并且和 Rab5 共定位, SNX4 的蛋白分布提示其可能参与了 sertoli cells 中内体的运输和分选过程。

关键词 SNX4; 睾丸; Rab5; 内体

中图分类号 R 329; R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)02-0235-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.015

分选连接蛋白(sorting nexins, SNX) 家族是进化保守的磷酸化蛋白结合蛋白, 其在协调膜质货物分类过程中起着重要作用^[1]。可将 SNX 分为 SNX-BAR、SNX-FERM、PX only 等亚科^[2]。这些蛋白质在内吞小泡的降解途径中起着分选和回收货物的重要作用。

SNX4 是 SNX-BAR 亚科的一个成员。SNX-BAR 蛋白可以通过 BAR 结构域^[3]的相互作用在膜表面寡聚, 从而包裹膜小管。SNX4 可与双载体蛋白 2(amphiphysin 2) 协同作用^[4], 为转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)^[5]和钙黏蛋白^[6]脱离溶

酶体并进入循环途径的关键分子。SNX4 是唯一在体外形成稳定的同二聚体或者与 SNX7 或 SNX30 形成异二聚体的 SNX 家族成员^[3]。SNX4 通过与微管运动动力蛋白的辅激活剂 KIBRA 结合, 诱导内吞再循环小泡(endocytic recycling compartment, ETC) 转运到细胞的核周区域。该研究旨在探索 SNX4 在睾丸中的表达和定位, 进而推测其功能。

1 材料与方法

1.1 材料 选择出生后 8 周雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量约 25 g 根据实验分组, 每组 5 只, 由中科院上海实验动物中心提供。TRIzol RNA 抽提试剂(美国 Invitrogen 公司); 反转录试剂盒、DNA 分子量标准、Premix ex-Taq(大连宝生物公司); 抗 SNX4 抗体、抗 Rab5 抗体、正常兔 IgG、FITC 标记羊抗兔 IgG、TRITC 标记羊抗大鼠 IgG(美国 Abcam 公司)。Laminin 包被培养皿(美国 BD 公司)、DMEM 培养液中添加 5% FBS、青链霉素双抗(美国 Gibco 公司)。新鲜配制使用。DPBS、乙醚、BSA 等一般化学试剂购自上海化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠睾丸 SNX 家族基因表达分析 抽提小鼠睾丸总 RNA 后, 反转录成 cDNA。按照 Premix ex-Taq 说明书, 以表 1 所示引物在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行定量扩增。记录 CT 值, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 表达变化。

1.2.2 小鼠各脏器 SNX4 基因表达分析 抽提小鼠肝脏、脾脏、肾脏、脑、睾丸总 RNA 后, 反转录成 cDNA。按照 Premix ex-Taq 说明书, 以表 1 所示引物在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行定量扩增。记录 CT 值, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 表达变化。

1.2.3 睾丸 SNX4 免疫组化染色 迅速取出小鼠睾丸, 去除多余组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡切片, 入 PBS 洗 3 次, 每次 15 min。用新配置的 0.3% H_2O_2 处理, 室温 30 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。用 10% 山羊血清室温封闭 1 h。滴加兔抗小鼠 SNX4 抗体, 1:100 稀释, 4℃ 过夜。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。阴性对照采用免疫前兔血清或正常兔血

2019-11-29 接收

基金项目: 上海市科学技术委员会科研项目(编号: 15ZR1421800)

作者单位: 上海健康医学院¹ 基础医学院、³ 临床医学院, 上海 201318

² 上海交通大学医学院人体解剖与组织胚胎学教研室, 上海 200025

作者简介: 李堃, 男, 实验师, 责任作者, E-mail: lik@sumhs.edu.cn

表1 Real-time PCR 引物

引物名称	引物序列(5'-3')
SNX1	F: AATTCTCCGAAGCCACAGCC R: TCGGTAAGCTTGTCTGTGTGG
SNX2	F: AGCTAAAAACGAGATAAGAGACTGG R: GGAATGCCTCCCACTACTTT
SNX3	F: CTCGAGATCGACGTGAGCAA R: AGGGAGTGGGGAACTACAA
SNX4	F: AACCGGGACCTAAAGGAAGC R: TGGGGCTTTGATTGCAGAGA
SNX5	F: GCTGAGCCATAAATTGCCCG R: CTCAGCAACTCGGGAACC
SNX6	F: AGTCGTTGCAACATGAGG R: TTTGTCATCGACCCTTCCCC
SNX7	F: TCAGCATTTACAGACACGGCA R: GGGAGTCACTCTGTGATGTG
SNX8	F: GAGGAAGTCACGTGGGCGA R: CTCAGTGACCTGGGATGTTCCG
SNX9	F: AACCGCAGACGGAGTCG R: ACGGTCAGCTCATTGTTTCCA
SNX10	F: CTTGCCTCCTAGGCTGTGTT R: CCCAGACACTCAGCACTCC
SNX12	F: AAGACCTGACCGACGCTTAC R: TATAGCGTCGCCGTACACAG
SNX13	F: CCAACATCATCTGGGTTCTCT R: ATAACCTGCTGGAGAGGCTCAT
SNX14	F: CCAAAATTCACAGAAGCACACAAA R: ACCCCGTAATTAGGCAGCAC
SNX15	F: TTCCTGCGACACTACACAGTC R: ATCCTCTGGGTCCTTCTTTGAG
SNX16	F: CCACCAGGTCCATTTGATAGC R: TGCTCCAGGTTCTAAGGACAAT
SNX17	F: CTTGCGAAGGAGTATGGGGC R: GGTCTTGCCGAACAGCTTG
SNX18	F: ATTGCCTTCACTGGAGACGC R: TTCCACGTGTCGCCTACTCT
SNX19	F: CGGAGACAGAGTTAGCCGAC R: GCGCTGGGACATGTTAGAT
SNX27	F: AATCCGGCTACGGCTTCAAC R: CCTCAACATTCACGCCGTTTC
SNX30	F: CCAGTCTCTGCGCGACAT R: CACCGTTGGGCAAGATGAGA
SNX31	F: GTTGCCAGCAGTGGTTTGT R: TGGCTCGGGTGCTTTTACT
SNX32	F: TCACCCAAGCTCTTGAACG R: CAGATCCACTGACGTGGAGG
SNX33	F: AAATGTTTGGCGAACAGCCC R: CTTACCTTGGCAAAGGCAC
β -actin	S: CCCATCTACGAGGGCTAT R: TGTCACGCACGATTTCC

清替代一抗 在相同条件下孵育(实验组 $n=5$,阴性对照组 $n=5$)。滴加羊抗兔第二抗体 1:300 稀释,室温孵育 15~60 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min。滴加 ABC 复合物,室温 15~60 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min。用 0.01% H_2O_2 的 DAB 溶液,室温 5~30

min。用苏木精复染细胞核。镜检、拍照。

1.2.4 TM4 细胞培养 37 °C 水浴快速解冻复苏 TM4 细胞,加入 DMEM 高糖培养基 + 10% FBS + 1% 青链霉素中,37 °C、5% CO_2 培养。2~3 d 换液 1 次,待其生长恢复稳定后,每 2 d 按 1:3 传代 1 次。传代 1~3 次后取生长良好的细胞用于实验。

1.2.5 TM4 细胞 SNX4 与 Rab5 间接免疫荧光染色

取 TM4 细胞, PBS 洗 3 次,每次 3 min,用 10% 山羊血清室温封闭 1 h,加入兔抗小鼠 SNX4 单克隆抗体和大鼠抗小鼠 Rab5 单克隆抗体,1:100 稀释,4 °C 孵育过夜。PBS 洗 3 次,每次 3 min,再加入 FITC 标记羊抗兔 IgG,TRITC 标记羊抗大鼠 IgG,1:300 稀释,37 °C 孵育 1 h, PBS 洗 3 次,每次 3 min,甘油 PBS 封片。阴性对照组采用免疫前兔血清或正常兔血清替代一抗,在相同条件下孵育。激光共聚焦显微镜 (LSM-510 laser scanning confocal microscope, Carl Zeiss) 观察并扫描成像。

1.3 统计学处理 应用 SAS9.0 统计软件进行统计学分析。Real-time PCR 检测标志基因表达的数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间样本数据比较采用 t 检验,多组均数比较应采用单因素方差分析,多组均数间两两比较采用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠睾丸 SNX 家族基因表达分析 如图 1 所示,在小鼠睾丸中,SNX1 和 SNX4 两个 SNX 家族成员的 mRNA 相对表达量高于其它的家族成员,分别可以达到 SNX33mRNA 相对表达量的 (20.94 ± 0.05) 倍 ($P=0.0029, n=5$) 和 (10.11 ± 0.01) 倍 ($P < 0.0034, n=5$)。SNX3、SNX13、SNX14 的 mRNA 的相对表达量可以达到 SNX33 的约 5 倍左右 ($P =$

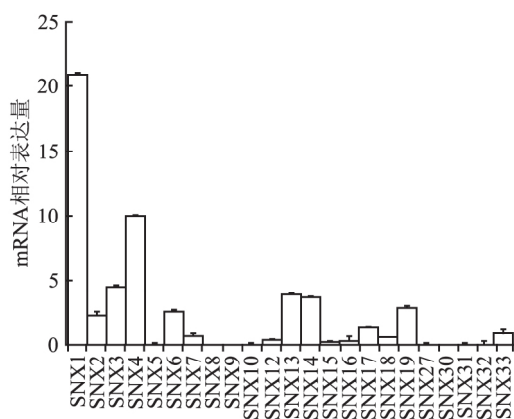


图1 小鼠睾丸 SNX 家族基因表达分析

0.033 $n=5$; $P=0.036$ $n=5$; $P=0.038$ $n=5$ 。

2.2 小鼠各脏器 SNX4 基因表达分析 如图 2 所示, 在小鼠的肝脏、脾脏、肾脏、脑和睾丸中, 其中睾丸的 SNX4 的 mRNA 的相对表达量高于其他的脏器。可以达到肝脏中 mRNA 相对表达量的 (15.49 ± 4.92) 倍 ($P=0.0036$ $n=5$)。其他几个主要脏器之间 SNX4 mRNA 相对表达量无明显差异。

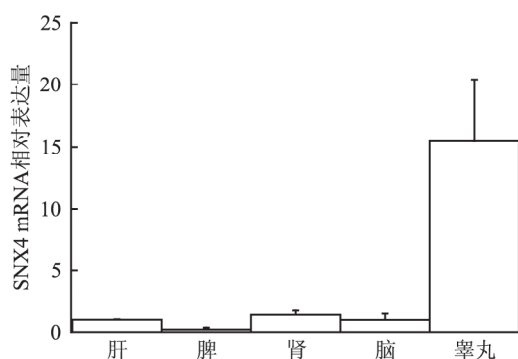


图 2 小鼠各脏器 SNX4 基因表达分析

2.3 小鼠睾丸中 SNX4 表达定位 免疫组织化学染色显示, 在小鼠睾丸中, SNX4 染色主要集中在支持细胞 (sustentacular cell, 又称 Sertoli 细胞) 中, 在各级生精细胞中和间质细胞 (Leydig 细胞) 中均未见明显染色。见图 3A。

2.4 TM4 细胞中 SNX4 和 Rab5 表达定位 免疫荧光染色显示, 在 TM4 细胞中 SNX4 (绿色) 和 Rab5 (红色) 定位于细胞质中, 染色呈现圆球点状。并且在细胞中部近核周区域, SNX4 和 Rab5 呈现共定位的状态 (黄色)。见图 3B。

3 讨论

内体系统的主要功能是获取营养、控制蛋白质和脂质代谢、保护机体免受病原体侵袭, 并作为细胞膜的储藏库, 支持 Sertoli 细胞膜表面积的快速变化。内吞作用将膜受体和细胞外配体进行内吞。然后, 他们进入内体系统进行分选和处理。其主要途径有: ① 分子经早期内体发育成晚期内体, 最终到溶酶体进行降解。② 分子由囊泡和管状运输载体介导, 运送到目的地。其中“循环”途径 (recycling) 将分子从内体传输到质膜, 而“逆行”途径 (retrograde) 将分子从内体传输到高尔基体, 从而远离降解途径^[7]。

SNX 家族成员在内体分选转运过程中发挥重要作用。所有的 SNX 家族成员都含有一个 PX 区域

(PX domain), PX 结构域对含有磷脂酰肌醇的内体膜具有特异性。有研究^[8]表明 SNX 家族成员 SNX16 与乳腺癌细胞的迁移和侵袭有关。

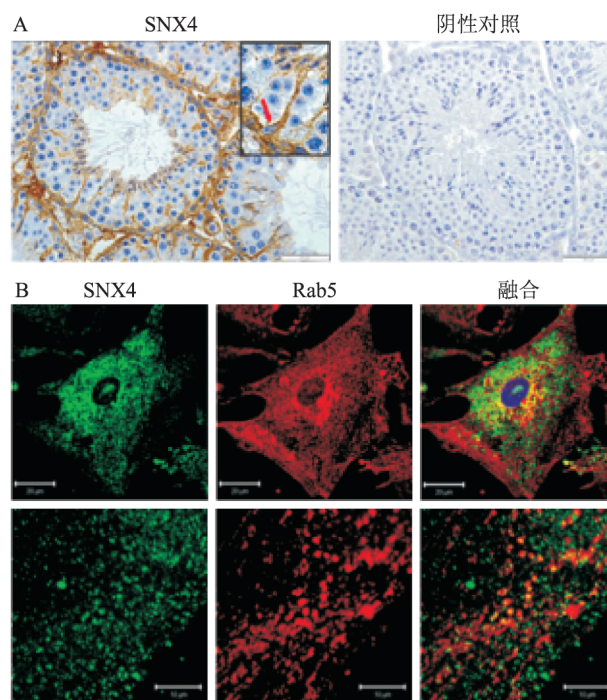


图 3 SNX4 在睾丸和 TM4 细胞中的定位 $\times 40$

A: SNX4 在睾丸中免疫组织化学; B: SNX4 和 Rab5 在 TM4 细胞中的免疫荧光染色, 上排 3 个图为单个 TM4 细胞免疫荧光染色, 图中比例尺为 $20 \mu\text{m}$; 下排 3 个图为共定位区域的局部放大图像, 图中比例尺为 $10 \mu\text{m}$

在 SNX 的众多家族成员中, 睾丸中 SNX1 和 SNX4 的表达高于其他的家族成员。SNX1 往往和 SNX5 或者 SNX6 形成二聚体而作为 retromer 的重要组成部分^[9], 在磷酸甘露糖受体、分拣相关受体 L (SORLA)、Wnt 信号因子 (Wls) 和二价金属转运受体 (DMT1) 等受体从内体到高尔基体的转运^[10-11]起重要作用。实验结果显示, 睾丸中 SNX5 的表达量相对较低, 推测睾丸中 SNX1 和 SNX6 形成二聚体而参与物质的“逆行”途径。

该实验结果表明, 睾丸中 SNX4 的表达高于肝脏、脾脏、肾脏和脑。这提示在睾丸中表达的 SNX4 可能参与了睾丸中特有的物质转运, 并且睾丸中 SNX4 定位于 Sertoli 细胞的胞质中。

Sertoli 细胞不仅为生精细胞提供营养和支持作用, 并且为精原细胞迁移、增殖、分化、精子发生、精子变形及结构成熟等活动提供必要的微环境。研究^[12-13]表明, 细胞内吞作用 (endocytosis) 是调节 Sertoli 细胞连接的重要途径。在雄激素和细胞因子

(如 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{TGF-}\beta 2$ 、 $\text{TGF-}\beta 3$) 的作用下, Sertoli 细胞通过细胞内吞作用清除细胞连接处的连接蛋白, 从而“打开”细胞连接结构。这些含有连接蛋白的内吞小泡可以与早期内体融合形成内体^[14]。然后, 根据不同信号的调控, 雄激素可以促进内体再循环^[15] 将连接蛋白运输至细胞膜, 形成新的细胞连接; 而 $\text{TGF-}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 信号则促进内体与溶酶体融合^[12-13] 降解连接蛋白, 从而有利于清除细胞连接结构。在生精周期中, Sertoli 细胞通过调节细胞内吞及后续囊泡运输的方向, 既保证了细胞连接周期性的“开放”, 又维持了正常的血睾屏障功能。

免疫荧光染色显示, SNX4 和 Rab5 在 Sertoli 细胞系中共定位于中部近核周区域。提示 SNX4 可能定位于早期内体, 并且可能参与了早期内体的成熟和早期内体中部分分子的再循环利用。

综上所述, 在小鼠睾丸中, SNX4 高表达, 定位于 Sertoli 细胞并且与早期内体的标志物 Rab5 具有共定位的特性。

参考文献

- [1] Cullen P J, Korswagen H C. Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 14(1): 29–37.
- [2] Gallon M, Cullen P J. Retromer and sorting nexins in endosomal sorting [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(1): 33–47.
- [3] van Weering J R, Sessions R B, Traer C J, et al. Molecular basis for SNX-BAR-mediated assembly of distinct endosomal sorting tubules [J]. *EMBO J*, 2012, 31(23): 4466–80.
- [4] Leprince C, Le Scolan E, Meunier B, et al. Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 10): 1937–48.
- [6] Hunt S D, Townley A K, Danson C M, et al. Microtubule motors mediate endosomal sorting by maintaining functional domain organization [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 11): 2493–501.
- [6] Solis G P, Hülsbusch N, Radon Y, et al. Reggins/flotillins interact with Rab11a and SNX4 at the tubulovesicular recycling compartment and function in transferrin receptor and E-cadherin trafficking [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(17): 2689–702.
- [7] Chi R J, Harrison M S, Burd C G. Biogenesis of endosome-derived transport carriers [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(18): 3441–55.
- [8] 周利利, 曾凡军, 涂珍珍, 等. 转录因子 GRHL3 抑制 SNX16 表达促进乳腺癌细胞迁移和侵袭 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(3): 391–6.
- [9] Trousdale C, Kim K. Retromer: structure, function, and roles in mammalian disease [J]. *Eur J Cell Biol*, 2015, 94(11): 513–21.
- [10] Harbour M E, Breusegem S Y, Antrobus R, et al. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 21): 3703–17.
- [11] Tabuchi M, Yanatori I, Kawai Y, et al. Retromer-mediated direct sorting is required for proper endosomal recycling of the mammalian iron transporter DMT1 [J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 5): 756–66.
- [12] Su L, Mruk D D, Lee W M, et al. Differential effects of testosterone and $\text{TGF-}\beta 3$ on endocytic vesicle-mediated protein trafficking events at the blood-testis barriers [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(17): 2945–60.
- [13] Xiong P, Shiratsuchi M, Matsushima T, et al. Regulation of expression and trafficking of perforin-2 by LPS and $\text{TNF-}\alpha$ [J]. *Cell Immunol*, 2017, 320: 1–10.
- [14] Cheng C Y, Wong E W, Lie P P, et al. Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events [J]. *Spermatogenesis*, 2011, 1(2): 105–15.
- [15] Yan H H, Mruk D D, Lee W M, et al. Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in sertoli cells [J]. *FASEB J*, 2008, 22(6): 1945–59.

Expression and localization of the sorting protein SNX4 in mouse testis

Li Kun¹, Liu Yue², Huang Peng³, et al

(¹Basic Medical College, ³Clinical Medicine College

of Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318;

²Dept of Histology and Embryology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025)

Abstract Objective To investigate the expression of sorting nexin 4 (SNX4) in mouse testis and its possible role in early endosomal substance transport. **Methods** Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time-PCR) was used to detect the difference in the expression of SNX 23 family members in mouse testis. Real-time PCR was used to detect the differences in the expression of mRNA in liver, spleen, kidney, brain and testis of mice. Immunohistochemistry and immunofluorescence staining localized the localization of SNX4 and Rab5 in testis

网络出版时间: 2020-2-19 12:58 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1527.016.html>

G3BP2 通过抑制 p53/p21 信号通路抑制结肠癌细胞衰老

唐帆¹, 黄永周¹, 庞丽娟², 侯吉学¹

摘要 目的 探讨 GTP 酶激活蛋白 SH3 功能结合蛋白 2 (G3BP2) 对结肠癌细胞衰老的影响及机制。方法 分别利用针对 G3BP2 的 siRNA (siG3BP2#1 和 siG3BP2#2) 和 G3BP2 过表达质粒分别构建低表达和过表达 G3BP2 的结肠癌细胞模型, 用 Western blot 检测 G3BP2 表达效果; CCK8 法检测细胞增殖变化, β -半乳糖苷酶染色法检测衰老细胞的比例, Western blot 检测 p53 及 p21 的变化; 利用针对 p53 的 siRNA 或 p53 过表达质粒进行阻遏实验, 用上述方法检测细胞增殖能力。结果 siG3BP2#1 和 siG3BP2#2 可明显下调 G3BP2 的蛋白表达, G3BP2 过表达质粒则显著上调 G3BP2 的蛋白表达; 低表达 G3BP2 后结肠癌细胞增殖能力下降, 衰老细胞比例从 $(32.00 \pm 5.10) \%$ 增加至 $(57.33 \pm 3.68) \%$ 和 $(56.00 \pm 6.68) \%$ ($P < 0.05$); 过表达 G3BP2 后结肠癌细胞增殖能力上升, 衰老细胞比例从 $(35.33 \pm 2.87) \%$ 降低至 $(25.00 \pm 2.94) \%$ ($P < 0.05$); 与对照组相比, G3BP2 低表达细胞中 p53 和 p21 蛋白水平明显升高, 而 G3BP2 过表达的细胞中 p53 和 p21 蛋白水平明显下降 ($P < 0.05$); 低表达 p53 能逆转下调 G3BP2 引起的抑制肿瘤增殖和促进细胞衰老, 而过表达 p53 则逆转上调 G3BP2 引起的促进肿瘤增殖和抑制细胞衰老。结论 G3BP2 通过抑制 p53/p21 信号通路抑制结肠癌细胞衰老, 为肿瘤治疗提供可能潜在的靶点。

关键词 结肠癌; G3BP2; 细胞增殖; 细胞衰老; p53

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)02-0239-06

2019-11-01 接收

基金项目: 新疆生产建设兵团中青年科技创新领军人才计划 (编号: 2017CB004)

作者单位: 石河子大学医学院第一附属医院¹ 普外二科、² 病理科, 石河子 832008

作者简介: 唐帆, 男, 主治医师;

侯吉学, 男, 副主任医师, 责任作者, E-mail: 3485846@qq.com

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.016

细胞衰老是指在多种内外因素刺激下, 细胞内一系列信号通路被激活导致不可逆的细胞周期停滞, 其特征主要有染色质改变、细胞代谢及形态的改变以及 β -半乳糖苷酶的活性增强^[1-2]。p53/p21 信号通路是调节细胞衰老的主要机制之一, 多种诱导细胞衰老的刺激因子主要通过激活该通路而发挥功能^[3]。诱导肿瘤细胞衰老可抑制肿瘤细胞的增殖, 激活机体免疫反应, 促进衰老的肿瘤细胞及周围正常的肿瘤细胞被清除^[4-5]。二磷酸鸟苷 (guanosine diphosphate, GTP) 激活蛋白 SH3 结构域结合蛋白 2 (RasGAP binding protein 2, G3BP2) 是 G3BPs 家族中的一员, 是大鼠肉瘤病毒 (rat sarcoma, Ras) 信号通路的关键调控因子^[6], 参与多种细胞内信号传递。另外 G3BP2 是应激颗粒的重要组成部分, 保护其中的 RNA 不被细胞中的 RNA 酶所降解^[7], 是目前肿瘤领域研究中的重要目标。该研究以结肠癌肿瘤细胞为主要研究对象, 初步探讨 G3BP2 对结肠癌细胞衰老的调控及作用机制, 为肿瘤治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 结肠癌细胞 LoVo 来自于石河子大学医学院第一附属医院病理科实验室。Lipofectamine 2000 购于美国 Thermo Scientific 公司; 胎牛血清 (FBS) 购于美国 Gibco 公司; 高糖 DMEM 培养基购于美国 HyClone 公司; CCK8 试剂购于美国 MedChemExpress 公司; 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; G3BP2 抗体购于美国 Abcam 公司; p53 和 p21 抗体购于美

and TM4 cells. **Results** The relative expression of SNX 4 in the testis of mice was about (15.49 ± 4.92) times that in the liver ($P < 0.01$). In the testis, the relative expressions of SNX1 and SNX4 in SNX family were higher. Immunohistochemical staining showed that SNX4 was localized in Sertoli cells of testis. Immunofluorescence staining showed that SNX4 and Rab family member of rat sarcoma (Ras) protein superfamily (Rab5), a marker of early endosome, were co-localized in Sertoli cell lines in testis of normal mice (TM4 cells). **Conclusion** SNX4 is highly expressed in Sertoli cells of mouse testis and co-localized with Rab5. The distribution of SNX4 protein suggests that it may be involved in the endosomal transportation and sorting of Sertoli cells.

Key words SNX4; testis; Rab5; endosomal