

网络出版时间: 2019-8-12 17:30 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190812.1006.003.html>

miR-401 和 RanBP9 在隐睾睾丸组织中的表达及其意义

程 鹏^{1,2,3}, 黄振宇^{1,2,3}, 窦贤明⁴, 毛 军⁵, 徐雨辰^{1,2,3}, 张贤生^{1,2,3}

摘要 目的 探讨 miR-401 和 RanBP9 在隐睾睾丸组织中的表达情况及其可能作用。方法 取 60 只雄性 6 周龄 ICR 小鼠, 随机选取 30 只进行左侧隐睾造模手术, 视为隐睾组 (Cry 组), 右侧睾丸位于阴囊内, 视为自身对照组 (SC 组); 另外 30 只进行假手术后睾丸仍位于阴囊内, 视为假手术组 (Con 组)。小鼠根据手术后时间随机分为 5 组, 每组包含 6 只隐睾组小鼠和 6 只假手术组小鼠, 分别于术后 3、7、14、21、28 d 处死小鼠。称量小鼠体质量、睾丸重量, 睾丸进行 HE 染色观察组织形态学改变, qRT-PCR 检测 miR-401 表达水平, Western blot、qRT-PCR 和免疫荧光用于检测 RanBP9 的表达变化情况。结果 与假手术组及自身右侧睾丸对照相比, 隐睾组小鼠左侧睾丸在术后 7 d 出现结构损坏, 且睾丸体质量比出现明显下降 ($P < 0.05$); miR-401 在隐睾中表达增加而 RanBP9 的表达减少 ($P < 0.05$)。结论 隐睾中 miR-401 表达增加而 RanBP9 表达量减少, 这可能是隐睾中精子发生障碍的原因之一。

关键词 miRNA-401; RanBP9; 隐睾; 男性不育

中图分类号 R 691.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1343-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.003

隐睾是指在生长发育过程中, 一侧或者双侧睾丸未能下降到阴囊内, 又称为睾丸下降不全, 是男性生殖系统中一种常见的先天性疾病。隐睾症在足月新生儿中的发病率约为 2% ~ 4%, 但在早产儿中可达到 30%; 但是, 大约有 80% 的隐睾患儿在出生后的第一年内睾丸会下降到阴囊内, 从而使得隐睾症的发病率约为 1%^[1]。隐睾可以破坏正常的精子发生, 导致男性不育, 是成年男性非梗阻性无精症的一

2019-04-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81370749)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科, 合肥 230022

² 安徽医科大学泌尿外科研究所, 合肥 230022

³ 泌尿生殖系统疾病安徽省重点实验室, 合肥 230022

⁴ 安徽省第二人民医院泌尿外科, 合肥 230041

⁵ 皖南医学院第一附属医院弋矶山医院泌尿外科, 芜湖 240000

作者简介: 程 鹏, 男, 硕士研究生;

张贤生, 男, 博士生导师, 主任医师, 教授, 责任作者, E-mail: xiansheng-zhang@163.com

种常见病因, 但是其发病机制尚不明确。

近年来, 越来越多的文献报道 microRNAs (miRNAs) 参与精子发生。miR-401 是一种脊椎动物中进化上保守的 miRNA, 已被鉴定为前列腺癌中的肿瘤抑制因子^[2]。RanBP9 是一种脚手架蛋白, 研究^[3-4]显示 RanBP9 敲除的小鼠精子发生过程严重受损。前期研究^[5]表明 miR-401 在小鼠海马神经元中靶向结合 RanBP9 并调控其表达, 但是 miR-401 和 RanBP9 在隐睾中的作用尚未见报道。该研究通过构建隐睾小鼠模型, 研究 miR-401 和 RanBP9 在隐睾中的表达变化情况及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞及主要试剂 ICR 雄性小鼠购自安徽医科大学实验动物中心, SPF 级, 6 周龄, 共 60 只。饲养于室温 24 °C、湿度 50%、通风良好环境中。小鼠精母细胞系 GC-2 细胞由中国科学技术大学生命科学院馈赠; 该实验所用的小鼠 miR-401 模拟物 (miR-401 mimic)、miR-401 抑制剂 (miR-401 inhibitor) 及对照组购自广州锐博生物科技有限公司; 兔抗 RanBP9 抗体、山羊抗兔 GAPDH 抗体购自 abcam 公司; 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 免疫荧光二抗: 山羊抗兔荧光二抗抗体购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠隐睾造模 将 60 只 ICR 小鼠随机分为单侧隐睾组和假手术组, 每组各 30 只。30 只隐睾组小鼠麻醉后, 将左侧睾丸牵拉至腹腔内, 切断引带, 缝合脂肪垫于腹膜上, 造左侧隐睾组 (Cry 组); 右侧睾丸仍位于阴囊内, 作为自身对照组 (SC 组)。另外 30 只假手术组小鼠麻醉后做相同腹侧切口, 牵拉左侧睾丸, 但睾丸仍处于阴囊内, 左侧睾丸作为对照组 (Con 组)。分别于术后 3、7、14、21、28 d 行颈椎离断处死。

1.2.2 细胞培养与转染 GC-2 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的

DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养; 当细胞长满时, 用胰酶消化, 将细胞接种于 6 孔板中培养 24 h, 进行 RNA 转染实验, 具体操作步骤严格按照 Lipofectamine 2000 转染说明书进行。转染 48 h 后收集 miR-401 mimic 组(记为 miR-101)、miR-401 inhibitor 组(记为 ImiR-401) 及其各自对照组(NC: miR-101 mimic 组的对照组; INC: miR-101 inhibitor 组的对照组) 细胞提取 RNA, 进行荧光定量 PCR 检测 miR-401 的表达量; 收集各组细胞提取蛋白后进行 Western blot 实验, 检测 RanBP9 的表达量。

1.2.3 Western blot 实验 将各时间段收集的小鼠睾丸组织和转染后的细胞用 RIPA 裂解液处理 30 min, 之后 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, BCA 法进行蛋白定量, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 蛋白分离后, 转移到 PVDF 膜, 室温下 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加抗 RanBP9 抗体(1:1 000), 抗 GAPDH 抗体(1:2 000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加二抗(1:5 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加 ECL 显影液显影。

1.2.4 荧光定量 PCR 实验 收集转染后的细胞和各时间段的小鼠睾丸组织, 按 TRIzol 试剂说明书提取各组总 RNA, 逆转录成 cDNA, 再进行荧光定量 PCR 检测。引物序列如下: miR-401 F: 5'-CACG-CATACAGTACTGTG-3', R: 5'-CCAGTGCAGGGTC-CGAGGT-3'; RanBP9 F: 5'-AATGTGGCAAGAACACAGCA-3', R: 5'-TGGGTCAAGCTGATTCCA-3'; 18S RNA F: 5'-CGCTACTACCGATTGGATGG-3', R: 5'-AGTCGACCGTCTCTCAGC-3'。以 18S mRNA 表达水平作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 比较分析各组间 miR-401 和 RanBP9 的表达差异。

1.2.5 HE 染色 睾丸组织经过 10% 福尔马林固定 24 h 后, 经梯度酒精脱水和二甲苯透明后制作蜡块。4 μm 连续切片, 切片经二甲苯、酒精脱蜡水化, 苏木精染色, 流水冲洗, 盐酸酒精分化, 流水冲洗, 氨水返蓝, 流水冲洗。切片放入伊红染液中染色。脱水封片, 置于显微镜下观察。

1.2.6 免疫荧光染色 4 μm 的石蜡切片, 60 °C 烘片 2 h, 经二甲苯、酒精脱蜡水化; 切片置于柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0) 中抗原修复, 微波炉加热 20 min, 自然冷却到室温; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 5% BSA 封闭 30 min; 加一抗(1:100) 4 °C 过夜; 复温 30 min 后 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加相应二抗(1:100) 室

温孵育 1 h(避光); PBS 洗 3 次, 每次 5 min; DAPI 避光孵育 5~10 min, PBS 洗 3 次, 每次 1 min; 封片, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析(ANOVA), 两组之间比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠睾丸形态学变化 术后 3、7、14、21、28 d 小鼠体质量的改变无统计学意义, 表明手术对小鼠的生长无明显影响(表 1)。术后 3 d Cry 组小鼠睾丸较 SC 组和 Con 组稍增大, 可能是因为术后水肿。在术后 14 d 时 Cry 组睾丸体积明显减小(图 1A)。通过对小鼠睾丸体质量比(睾丸重量/体质量 $\times 100\%$)进行分析, 如图 1B 显示, 在术后第 7 天, Cry 组较 SC 组和 Con 组明显减小, 差异有统计学意义(*F* = 8.764, *P* < 0.01)。通过对睾丸组织进行 HE 染色, 术后 3 d Cry 组与 SC 组及 Con 组进行比较后发现睾丸形态结构基本正常, 生精细胞数目及形态无明显改变, 术后 7 d 开始 Cry 组睾丸组织生精细胞数目开始减少, 同时睾丸结构也出现了损坏, 至术后 28 d 时睾丸结构完全破坏, 显微镜下睾丸组织出现空泡, 各级生精细胞缺失且不易辨认, 无法形成完整的精子细胞; 相反, SC 组和 Con 组睾丸组织可见各级生精细胞, 睾丸组织形态完好(图 1C)。

表 1 各个时间段 Cry 组和 Con 组小鼠体质量比较(g, $\bar{x} \pm s$)

术后天数(d)	Cry 组	Con 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
3	30.270 0 ± 2.453 0	29.005 0 ± 2.572 4	0.871	0.404
7	31.515 0 ± 3.894 0	33.051 7 ± 1.810 9	0.877	0.401
14	34.280 0 ± 2.279 0	35.030 0 ± 2.676 7	0.523	0.613
21	35.300 0 ± 2.281 0	33.676 7 ± 4.353 3	0.809	0.437
28	38.406 7 ± 1.802 2	36.511 7 ± 2.963 7	1.338	0.210

2.2 miR-401 影响 RanBP9 在睾丸中的表达 向 GC-2 细胞转染 miR-401 mimic 和 inhibitor 48 h 后, qRT-PCR 结果显示 miR-401 表达量在 mimic 组显著增加, 而在 miR-401 inhibitor 组表达量显著较少, 差异有统计学意义(*P* < 0.05), 见图 2A、2B。通过 Western blot 实验检测 RanBP9 的表达量, 结果显示转染 miR-401 mimic 后 RanBP9 的表达是减少的, 相反, 转染 miR-401 inhibitor 后 RanBP9 的表达是增加的(图 2C、2D)。以上结果表明在生精细胞系中 miR-401 可以下调 RanBP9 的表达。

2.3 miR-401 和 RanBP9 在隐睾中的表达情况

qRT-PCR 结果显示与 SC 组和 Con 组相比, 隐睾组中 miR-401 的表达量在术后 7 d 开始升高, 而 RanBP9 的表达量在术后 14 d 出现明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3A、B。隐睾组睾丸中 miR-401 表达量随着隐睾手术后时间的推移发生改变, 从第 3 天起开始增加, 在第 14 天时表达量最高, 在第 21 天和第 28 天时稍有所下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 RanBP9 的表达量在术后第 7 天出现减少 ($P < 0.05$), 之后 RanBP9 的表达量随着时间的增加而持续下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4A、B。Western blot 和免疫荧光实验结果表明: Cry 组 RanBP9 的表达量随着手术时间的延长逐渐降低, 至第 14 天后几乎无 RanBP9 的表达,

在 SC 组和 Con 组中 RanBP9 的表达量丰富且无明显改变, 见图 4C、D。

3 讨论

目前全世界范围内大约有 15% 的育龄夫妇不能生育, 其中男性因素占 50%^[6]。隐睾作为一种常见的男性生殖系统先天性疾病, 可导致精子发生障碍, 进而影响男性生育能力。近年来, 越来越多的研究^[7]表明 miRNAs 参与精子发生的过程。Duan et al^[1]研究表明 miR-210 通过靶向结合 NR1D2 调控精子发生, 且证实了 miR-210 与隐睾的关系, 其可作为一种生物学标志物, 可用于对隐睾的预测作用。Huang et al^[8]的研究表明 miR-34c 通过靶向结合 Nanos2 调控精子发生, 且 miR-34c/Nanos2 的异常

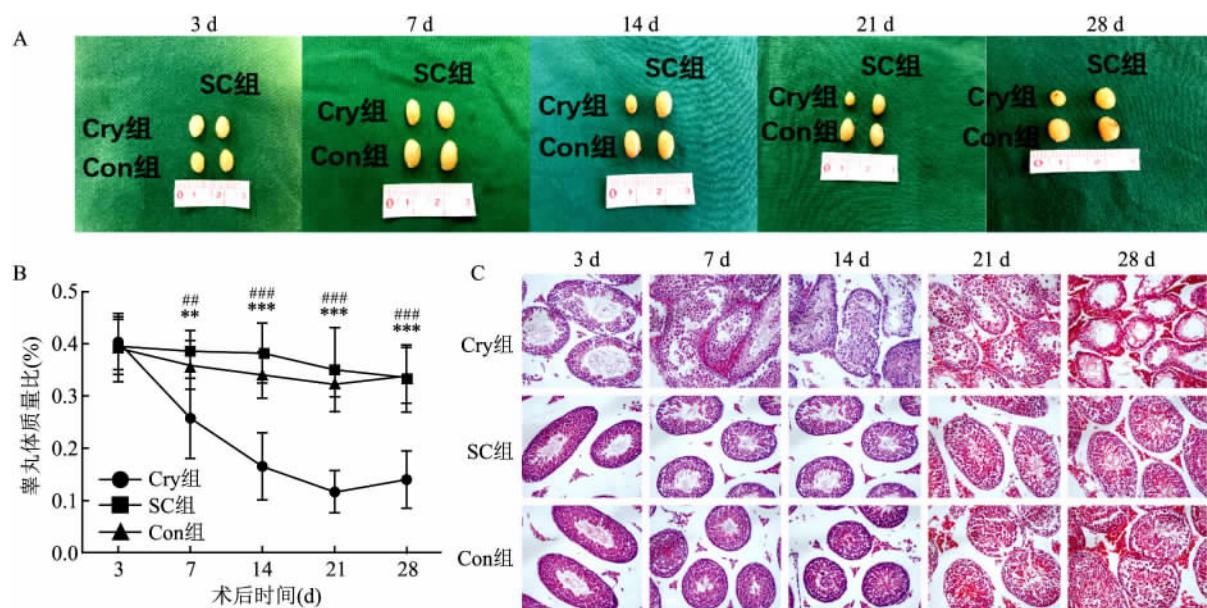


图 1 隐睾小鼠术后睾丸形态学分析

A: 术后不同天数睾丸肉眼观大体改变; B: 术后不同时间段睾丸体质量比; C: 术后不同时间段睾丸 HE 染色 Bar: 100 μ m; 与 SC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 Con 组比较: # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$

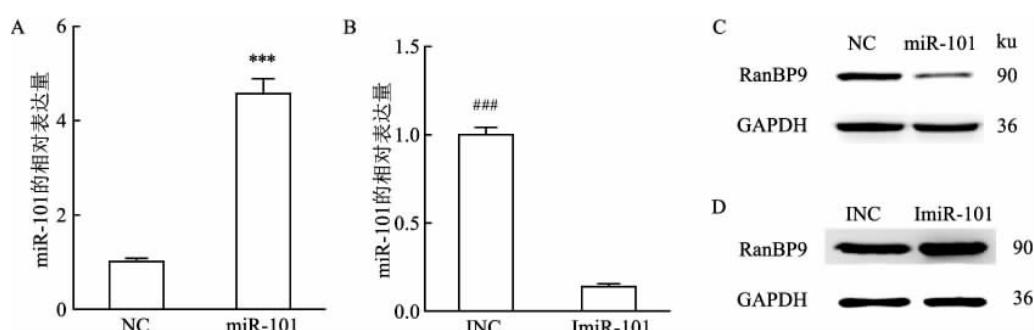


图 2 miR-401 转染后 RanBP9 的表达量变化

A: 转染 miR-401 mimic 后 miR-401 的表达量; B: 转染 miR-401 inhibitor 后 miR-401 的表达量; C: 转染 miR-401 mimic 后 RanBP9 的表达情况; D: 转染 miR-401 inhibitor 后 RanBP9 的表达情况; 与 NC 组比较: *** $P < 0.001$; 与 INC 组比较: ## $P < 0.001$

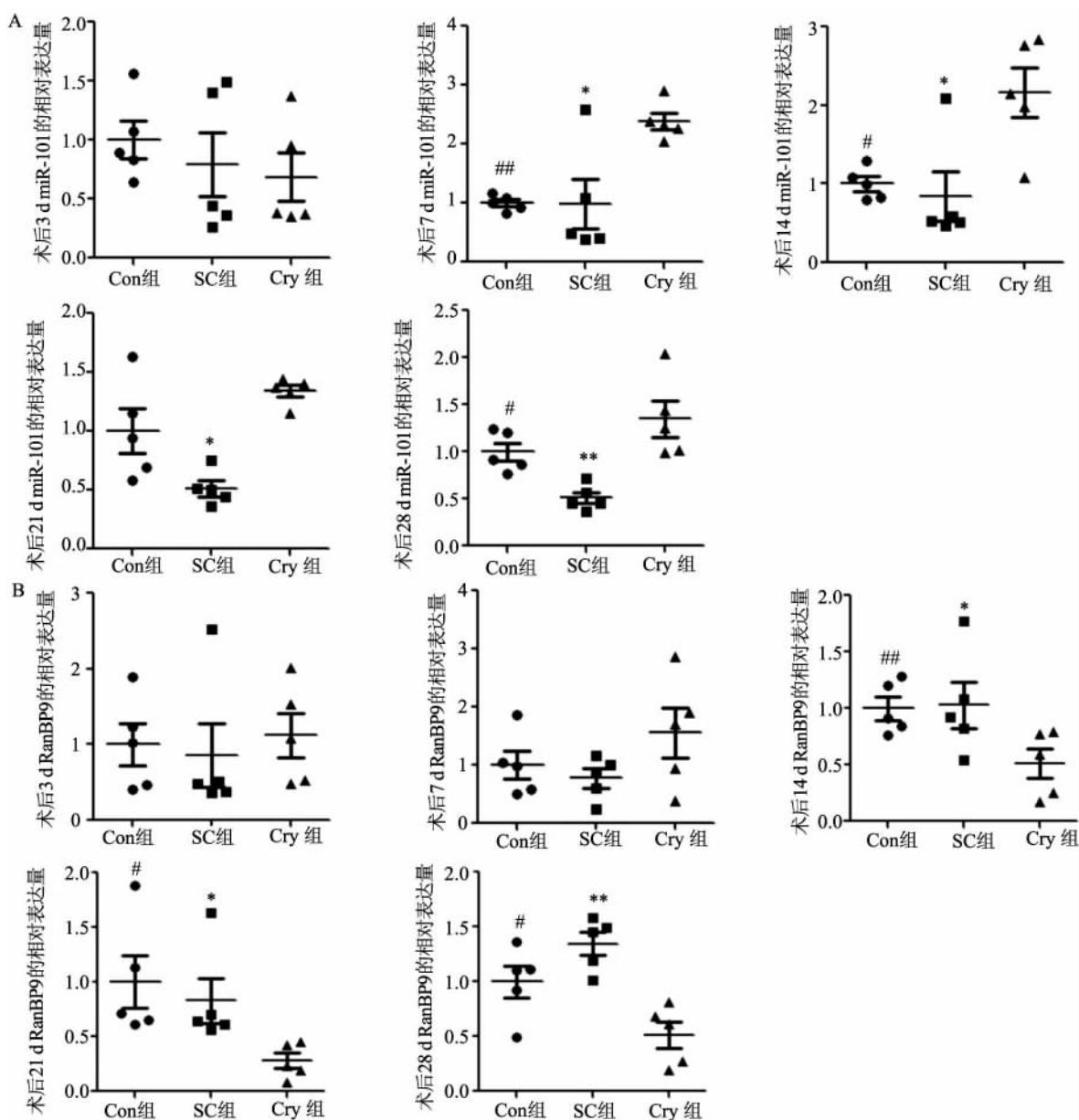


图 3 miR-101 和 RanBP9 在隐睾组、SC 组和 Con 组中的表达情况

A: miR-101 在各组睾丸中的表达情况; B: RanBP9 在各组睾丸中的表达情况; 与 SC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Con 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表达破坏了 SSCs 自我更新和分化之间的平衡, 最终破坏了隐睾睾丸的精子发生。目前关于 miRNAs 在隐睾中的研究较少。

miRNAs 是一类小的非编码 RNA 分子(通常长度为 19~23 个核苷酸), 通过靶向 mRNA 的 3' 非翻译区(3'-UTR) 调控转录和翻译效率。研究^[9~11] 表明, miRNA 参与许多生物过程, 包括细胞增殖、细胞凋亡和精子发生。miR-101 作为一种脊椎动物进化上保守的 miRNA, 在别的系统中的作用已有很多报道, 其表达水平与某些肿瘤的恶性程度、细胞增殖的

抑制、集落形成和淋巴结转移有关^[12]。但 miRNA 在男性生殖系统中的作用尚不是十分清楚。本实验通过构建小鼠隐睾模型, 通过 qRT-PCR 检测发现, 相较于 SC 组、Con 组、Cry 组中 miR-101 的表达量是升高的, 且 miR-101 随着时间推移而逐渐增加, 这表明 miR-101 的表达与隐睾是有相关性的。

RanBP9 是一种普遍表达的脚手架蛋白, 主要分布于细胞核和细胞质, 其可与多种蛋白发生相互作用而在多种生物过程中起重要作用, 如细胞黏附、细胞增殖、细胞凋亡、迁移和信号转导等^[13]。在生殖

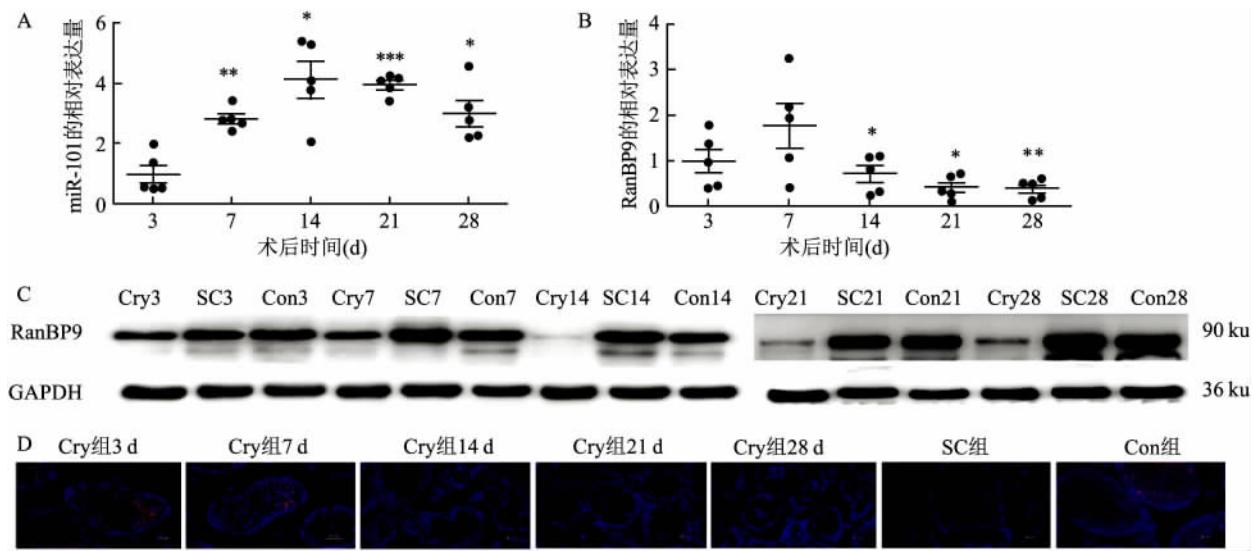


图4 miR-401 和 RanBP9 在隐睾不同时间段表达情况

A: 术后不同时间 miR-401 的表达情况; B: 术后不同时间 RanBP9 的表达情况; C: 术后不同时间 RanBP9 蛋白的表达情况; D: 术后不同时间免疫荧光染色检测 RanBP9 表达情况 Bar = 40 μ m; 与术后 3 d 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

细胞中, RanBP9 通过与 DDX4、种系特异性 RNA 解旋酶和 GASZ(在精母细胞中广泛表达的生殖细胞蛋白)相互作用而发挥细胞功能, 并且对于转座子抑制是必不可少的^[14-15]。研究^[3-4]表明 RanBP9 在精子发生中发挥重要作用, 敲除了 RanBP9 的小鼠出现了严重的生精障碍。但 RanBP9 与隐睾的关系目前尚未见报道。本研究中, 通过 qRT-PCR、Western blot 和免疫荧光实验证实 RanBP9 在隐睾中表达量是下降的, 其减少可能是隐睾小鼠精子发生障碍的原因之一。

尽管有研究^[5]表明在海马组织中 miR-401 可以靶向结合 RanBP9 并调控其表达, 但在生殖系统中, 特别是男性睾丸中这种调控关系是否存在尚不能确定, 因此进行了小鼠精母细胞系(GC-2)细胞转染实验, 相较于对照组, 转染 miR-401 mimic 后 GC-2 细胞中 RanBP9 表达量是下降的; 相反, 转染 miR-401 inhibitor 后 GC-2 细胞中 RanBP9 的表达量是增加的。结果证实了 miR-401 和 RanBP9 在睾丸中也具有调控关系。在隐睾组织进行 qRT-PCR 分析显示, 隐睾中 miR-401 表达量是增加的, 而 RanBP9 的表达量是减少的, 且它们的增加和减少的发生是同步的。这表明在体内 miR-401 和 RanBP9 的调控关系也是存在的。

综上所述, 该研究通过外科手术构建小鼠隐睾模型及一系列相关实验证实了 miR-401 在体内体外都参与调控 RanBP9 的表达, 并首次证实了 miR-401

与隐睾症的关系。但是该研究仍尚浅, miR-401 和 RanBP9 在隐睾所致精子发生障碍中的具体机制目前仍不明确。及早的诊断与治疗对于隐睾患者来说是非常重要的。该研究表明 miR-401 通过调控 RanBP9 的表达在隐睾所致男性不育中发挥着重要的作用, miR-401 可以作为隐睾症的一种生物学标志物。

参考文献

- [1] Duan Z, Huang H, Sun F. The functional and predictive roles of miR-210 in cryptorchidism [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32265.
- [2] Liu N, Xia W Y, Liu S S, et al. MicroRNA-101 targets von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL) to induce HIF1alpha mediated apoptosis and cell cycle arrest in normoxia condition [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20489.
- [3] Bao J, Tang C, Li J, et al. RAN-binding protein 9 is involved in alternative splicing and is critical for male germ cell development and male fertility [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(12): e1004825.
- [4] Puverel S, Barrick C, Dolci S, et al. RanBPM is essential for mouse spermatogenesis and oogenesis [J]. *Development*, 2011, 138(12): 2511-21.
- [5] Barbato C, Pezzolla S, Caggiano C, et al. A lentiviral sponge for miR-401 regulates RanBP9 expression and amyloid precursor protein metabolism in hippocampal neurons [J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 37.
- [6] 程鹏, 张贤生. TDP-43 在男性不育中的研究进展 [J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(10): 942-5.
- [7] Hilz S, Modzelewski A J, Cohen P E, et al. The roles of microRNAs and siRNAs in mammalian spermatogenesis [J]. *Develop-*

- ment, 2016, 143(17) : 3061 – 73.
- [8] 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.
- [9] Sun K, Lai E C. Adult-specific functions of animal microRNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(8) : 535 – 48.
- [10] Lian J, Tian H, Liu L, et al. Downregulation of microRNA-383 is associated with male infertility and promotes testicular embryonal carcinoma cell proliferation by targeting IRF1 [J]. *Cell Death Dis*, 2010, 1: e94.
- [11] Yao C, Liu Y, Sun M, et al. MicroRNAs and DNA methylation as epigenetic regulators of mitosis, meiosis and spermiogenesis [J]. *Reproduction*, 2015, 150(1) : R25 – 34.
- [12] Wang C, Lu S, Jiang J, et al. Hsa-microRNA-101 suppresses migration and invasion by targeting Rac1 in thyroid cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4) : 1815 – 21.
- [13] Das S, Suresh B, Kim H H, et al. RanBPM: a potential therapeutic target for modulating diverse physiological disorders [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(12) : 1816 – 24.
- [14] Ma L, Buchold G M, Greenbaum M P, et al. GASZ is essential for male meiosis and suppression of retrotransposon expression in the male germline [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5(9) : e1000635.
- [15] Shibata N, Tsunekawa N, Okamoto-Ito S, et al. Mouse RanBPM is a partner gene to a germline specific RNA helicase, mouse vasa homolog protein [J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 67(1) : 1 – 7.

The expression and role of miR-101 and its target gene RanBP9 in cryptorchidism testes

Cheng Peng^{1,2,3}, Huang Zhenyu^{1,2,3}, Dou Xianming⁴, et al

(¹Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²The Urological Institute of Anhui Medical University, Hefei 230022;

³Anhui Province Key Laboratory of Genitourinary Diseases, Anhui Medical University, Hefei 230022;

⁴Dept of Urology, Anhui NO. 2 Provincial Peoples's Hospital, Hefei 230041)

Abstract **Objective** To study the role and expression of miRNA-101 (miR-101) and Ran-binding protein 9 (RanBP9) in cryptorchidism testes. **Methods** Sixty 6-week-old male ICR mice were randomly divided into two groups. Mice in cryptorchidism group (Cry group) underwent operation to fix left testes with fat pad onto peritoneum. Mice in the control group (Con group) underwent sham operation that the left testes were kept in the scrotum. Right testes of mice in Cry group were used as self-controls (SC group) . The mice were sacrificed at 3, 7, 14, 21 and 28 days after operation. The body weight and testicular weight of the mice were recorded. The histological changes were examined by HE staining. Western blot, qRT-PCR and immunofluorescence were used to detect the expression of miR-101 and RanBP9. **Results** The testis index of mice in cryptorchidism group was significantly decreased at 7 days after operation compared with those in SC group and Con group ($P < 0.05$) . HE staining showed impaired testis structure in cryptorchid mice at 7 days after surgery. The expression of miR-101 was significantly increased in the cryptorchidism group while the expression of RanBP9 was decreased ($P < 0.05$) . **Conclusion** The expression of miR-101 is increased in cryptorchidism while RanBP9 is decreased in cryptorchidism, suggesting that miR-101 and RanBP9 may contribute to spermatogenesis disorder in cryptorchidism.

Key words miRNA-101; RanBP9; cryptorchidism; male infertility