

Bcl-2和 Bax 在 ICR 小鼠睾丸中的表达及与 eNOS 的关联性研究

左俐俊¹, 任亚萍², 赵 玮¹, 宋婉玲³

摘要 目的 探讨 B 淋巴细胞瘤/白血病-2 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 在雄性 ICR 小鼠睾丸中的表达及与内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的联系和意义。方法 30 只 (分别为 4、8、12 周龄, 各 10 只) 健康雄性 ICR 小鼠, 分为性成熟前 (4 周龄组)、性成熟 (8 周龄组)、性成熟后 (12 周龄组), 取左侧睾丸经石蜡切片, 免疫组化法检测小鼠睾丸中 eNOS、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达分布情况; 取右侧睾丸, Western blot 法检测 eNOS、Bcl-2 和 Bax 的表达情况。结果 Bcl-2 在睾丸间质细胞高表达, Bax 在生精上皮有表达; 8 周龄小鼠睾丸间质细胞 Bcl-2 表达明显高于 4、12 周龄组, 且 8 周龄组小鼠 Bax 表达明显低于 4、12 周龄组小鼠 ($P < 0.05$); 4 周龄组小鼠睾丸 eNOS 蛋白表达明显高于 8、12 周龄组 ($P < 0.01$)。结论 Bcl-2、Bax 与 eNOS 在睾丸间质细胞的表达并没有直接的相关性, 提示 NO 或许未直接参与睾丸间质细胞的凋亡活动。

关键词 eNOS; Bcl-2; Bax; 雄激素; 精子

中图分类号 R 332; R 322.33; R 321.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0018-04

生精过程是一个自我选择的凋亡过程, 适度凋亡可形成优质精子, 过度凋亡则可能少精或弱精。B 淋巴细胞瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 作为一类重要的凋亡基因, 通过“二聚体化”过程^[1-2], 参与精子的发生与成熟, Bcl-2 高表达抑制凋亡, Bax 高表达促进凋亡, Bcl-2、Bax 两者的相对含量是启动凋亡与否的关键因素^[3]。而精子的发生也许不仅仅与凋亡有关, 已知一氧化氮 (nitric oxide, NO) 为目前体内研究较多的一种信使分子, 其广泛分布于雄性动物睾丸、附睾、输精管等生殖系统及精子的顶体和尾部, 且 NO 在阴茎勃起、

调节睾丸血供、参与精子的发生与成熟方面都有重要作用^[4]。同时, NO 也是一种调节精子发生的双重效应物质, 这种双重作用是由精液中 NO 浓度所决定的, 过量的 NO 对精子有毒性作用, 降低精子成活率和活力, 适量的 NO 则有利于生育。但 NO 半衰期短, 性质活泼, 故通过测定内皮型一氧化氮合成酶 (endothelia nitric oxide synthase, eNOS) 含量来探讨 NO 的作用机制。那么, 小鼠生殖发育的不断凋亡过程是否是 NO 活性的表达过程, 或是两类基因相互协调的结果, 又是如何协调, 该研究拟探讨 Bcl-2、Bax 和 eNOS 对不同发育阶段雄性 ICR 小鼠睾丸发育和精子形成的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂 正置显微镜 (日本奥林巴斯公司); 化学发光成像仪 (上海天能科技有限公司); Bcl-2、Bax (武汉博士德公司); eNOS (美国 Affinity 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG、DAB 试剂盒 (北京中杉金桥公司); PMSF (江苏碧云天公司); RIPA 裂解液 (北京康为世纪公司); PVDF 膜、Western blot 膜再生液 (北京索莱宝公司); 普通 ECL Plus 发光液 (北京泛博生物化学有限公司); SABC 免疫组化染色试剂盒 (福州迈新公司)。

1.2 动物及其分组、处理 30 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 将小鼠分为 3 组, 每组 10 只, 分别为性成熟前 (4 周龄组), 体重 (30 ± 3) g; 性成熟期 (8 周龄组), 体重 (43 ± 3) g; 性成熟后 (12 周龄组), 体重 (45 ± 3) g。于桂林医学院实验动物中心饲养, 环境温度 25 ℃, 湿度 55% ~ 65%, 光照 10 ~ 12 h/d, 饲料、饮用水均经消毒处理。

1.3 方法

1.3.1 取材 小鼠取材前 1 d 禁食, 颈椎脱臼处死, 75% 酒精消毒皮肤, 切开下腹部皮肤, 另换一套无菌器械打开腹腔, 用食指和拇指轻微挤压阴囊皮肤, 使睾丸滑入腹腔, 用无菌镊子轻轻分离出双侧睾丸及附睾, 去离子水冲洗。左侧睾丸取出后用手术

2015-10-13 接收

基金项目: 广西高校科学技术研究项目 (编号: 2013ZD043); 桂林市科学研究与技术开发项目 (编号: 20130416-3)

作者单位: 桂林医学院¹ 研究生学院、² 组织与胚胎教研室、³ 2010 级临床本科 桂林 541004

作者简介: 左俐俊, 女, 硕士研究生;

任亚萍, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yapin-grengl@163.com

刀片将其划一小口,利于固定液进入组织,10%中性甲醛固定,用于免疫组化检测;右侧睾丸取出后迅速置于冻存管,液氮保存,-80℃超低温冰箱储存备用,行Western blot法检测。

1.3.2 免疫组化检测 10%中性甲醛固定48h后(睾丸固定时间略长易于固定液渗入组织),常规石蜡包埋、切片,厚度5mm,贴于预先用赖氨酸处理的玻片上,62℃烤片1h,脱蜡和水化后,用柠檬酸盐缓冲液抗原修复,过氧化酶室温孵育10min,PBS冲洗3次,每次3min,滴加一抗(Bcl-2稀释度为1:100,Bax稀释度为1:300),室温孵育60min,PBS冲洗3次,每次3min,滴加二抗,PBS冲洗3次,每次3min。100μl DAB染色,苏木精复染,PBS冲洗,脱水,透明封片。正置显微镜Axio Vision软件拍摄图片,每组10个视野,分别记录10×40倍视野图,观察各组蛋白表达情况,图像处理软件Image-Pro-Plus 6.0测定各组Bcl-2和Bax染色平均吸光度。eNOS表达情况为引用本课题组前期实验中的部分结果,故本实验仅做定位检测^[5]。

1.3.3 Western blot法检测 取右侧睾丸组织放入无菌研钵中,使用液态氮充分研磨组织,使其成为粉末状,按照1:100加入PMSF与裂解液,静置30min后,震荡、离心、取上清液,沸水煮沸蛋白样品使其变性,置冰上冷却后待用。电泳蛋白样品,湿式电转法转膜,Bcl-2、Bax:260mA、40min;eNOS:260mA、100min。使用PVDF膜,丽春红染色见蛋白条带,TBST洗膜10min,封闭液封闭1h,TBST洗膜5次,每次6min,4℃一抗孵育过夜(Bcl-2、Bax、eNOS稀释度均为1:250),隔日室温孵育一抗1h,TBST洗膜5次,每次6min,孵育二抗1h(二抗稀释度1:5000),TBST洗膜5次,每次6min,滴加发光液,Tanon计算机发光成像软件成像。Tanon Gel Image System ID分析软件,分别测得各组内参、目的蛋白灰度值,计算目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值比值。

1.4 统计学处理 采用SPSS 18.0统计软件进行分析,采用单因素方差分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用LSD检验。

2 结果

2.1 免疫组化结果分析 8、12周龄小鼠睾丸曲细精管壁较4周龄小鼠明显增厚,且8、12周龄小鼠增厚的生精上皮中可见各级生精细胞和支持细胞分布,并呈现漩涡状分布轮廓。Bcl-2和Bax在各组辜

丸组织中均有表达,呈棕黄色颗粒。Bcl-2主要表达于4周龄小鼠精原细胞、精母细胞以及8周龄小鼠精子细胞,且3组小鼠睾丸间质细胞的细胞质均可见阳性表达,8周龄小鼠睾丸表达阳性率高于4、12周龄小鼠,差异有统计学意义(0.574 ± 0.065 vs 0.435 ± 0.040 vs 0.489 ± 0.064 , $F = 8.774$, $P < 0.05$)。Bax主要表达于精原细胞、精子细胞和睾丸间质细胞的细胞质,8周龄性成熟期小鼠表达明显低于4、12周龄小鼠,差异有统计学意义(0.431 ± 0.052 vs 0.513 ± 0.023 vs 0.485 ± 0.036 , $F = 5.873$, $P < 0.05$)。eNOS主要表达于精母细胞、间质细胞和支持细胞的细胞质,且结合免疫印迹结果显示4周性成熟前小鼠表达高于8、12周龄小鼠,见图1、2。

2.2 Western blot法检测结果 8周龄组小鼠睾丸Bcl-2蛋白表达明显高于4、12周龄组,差异有统计学意义($F = 8.774$, $P < 0.05$);8周龄组小鼠睾丸Bax蛋白表达明显低于4、12周龄组,差异有统计学意义($F = 6.975$, $P < 0.05$);4周龄组小鼠睾丸eNOS蛋白表达明显高于8、12周龄组,差异有统计学意义($F = 9.125$, $P < 0.01$),见表1、图2。

表1 Western blot法检测小鼠Bcl-2和Bax表达($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

项目	Bcl-2	Bax	eNOS
4周	$0.338 \pm 0.218^{**}$	$0.749 \pm 0.648^{**}$	0.712 ± 0.119
8周	0.946 ± 0.275	0.139 ± 0.070	$0.456 \pm 0.121^{##}$
12周	$0.697 \pm 0.189^*$	$0.758 \pm 0.298^{**}$	$0.427 \pm 0.163^{##}$

与8周龄组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与4周龄组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

Bcl-2、Bax协同在睾丸间质细胞或生精细胞的表达调节雄激素合成,进而影响精子发生^[6]。本实验将8周与4、12周龄小鼠比较,Bcl-2高表达,Bax低表达,说明机体通过调节凋亡基因,抑制睾丸间质细胞凋亡,促进合成大量雄激素,维持小鼠生精,也提示睾丸间质细胞的凋亡抑制过程很可能是精子的发生过程。而性成熟期小鼠Bcl-2表达强于性成熟后小鼠,这也从另一个角度说明精子发生过程的启动需要足够量的雄激素来维持,即青春期萌动时分泌的大量雄激素。而Bcl-2表达于精子细胞、精子(生精小管腔面),也提示精子的变态反应一定程度上依赖Bcl-2基因的调控。那么,此两种基因异常表达是否影响机体正常发育,有关Bcl-2转基因小鼠和Bax基因敲除小鼠的实验显示,Bcl-2过度表达,早期生殖细胞的凋亡则被抑制,大多处于发育的

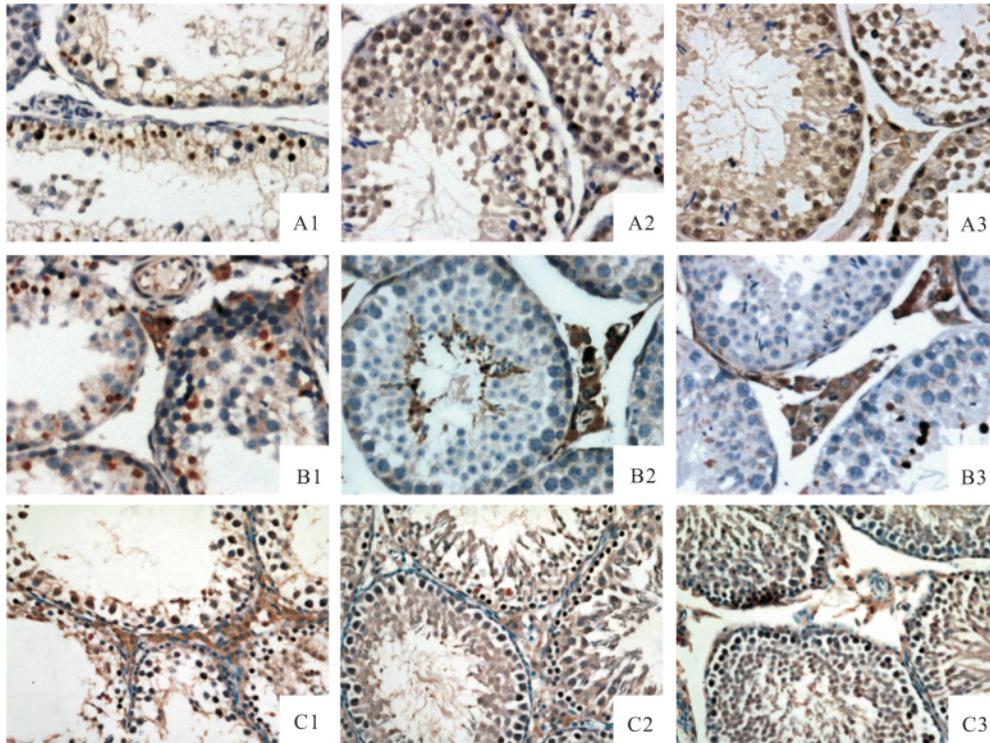


图1 小鼠睾丸 Bcl-2、Bax 和 eNOS 免疫组化 ×400
A: Bax; B: Bcl-2; C: eNOS; 1: 4 周龄; 2: 8 周龄; 3: 12 周龄

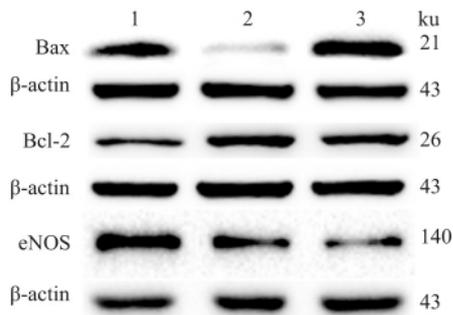


图2 Western blot 法检测小鼠睾丸 Bcl-2、Bax 和 eNOS 表达
1: 4 周龄; 2: 8 周龄; 3: 12 周龄

初期阶段 精子形成明显减少而不育; Bax 基因敲除小鼠曲细精管中有大量不正常精原细胞累积, 最终也导致不育^[7-8]。精子 DNA 损伤也是不育的重要原因之一^[9], 那么 Bcl-2 阻止包膜脂质过氧化及 DNA 损伤的作用便显得尤为重要^[10], 此外, Bcl-2 和 Bax 的协调表达也避免机体产生畸形精子或无精, 而低质量的精子可能与不明原因的流产有关^[11]。可见 Bcl-2 和 Bax 对机体生殖发育起着至关重要的作用。

本实验显示 8、12 周小鼠睾丸曲细精管壁较 4 周明显增厚, 管腔中有大量精子发生, 且增厚的生精

上皮中分布着多数支持细胞和生殖细胞, 说明进入性成熟期, 生精上皮需增加并持续维持一定厚度, 以便精子发生。睾丸微血管承担氧气、营养物质、代谢产物等的运输, 血睾屏障同时为精子发生提供一个稳定环境。性成熟前期小鼠, 血睾屏障及睾丸微循环并未发育完善, 而雄激素对血睾屏障发育有促进作用, 本实验 4 周龄小鼠较 8、12 周龄 eNOS 表达最高, 说明此时为成熟期的启动做准备, 而性成熟的启动需要较高的雄激素, 机体可能通过 NO 调节合成大量雄激素, 进而完善自身的睾丸微循环和血睾屏障, 完成启动过程。而 8、12 周龄 eNOS 含量虽略低于 4 周龄小鼠, 但仍保持一定含量, 少量的 NO 有利于精子形成, 提示也许当其已经性成熟, 机体便不必合成过多雄激素来维持睾丸微循环和血睾屏障的发育, 只需一定量的雄激素维持并促进生精。4 周龄小鼠高表达的 eNOS, 也提示较高的 NO 含量, NO 作为一种血管舒张因子, 扩张的血管也更有利于加快物质运输, 提高代谢率, 更利于小鼠尽快完成性成熟过程。

综上所述, Bcl-2、Bax 与 eNOS 均持续表达于小鼠各个发育时期, 虽然作用高峰时间段不同, 但共同促进性成熟发育, 而在这之间是否仍存在一些未知因子参与启动和调节这一过程, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] Rong Y P, Bultynck G, Aromolaran A S, et al. The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106(34): 14397-402.
- [2] Kelly P N, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(9): 1414-24.
- [3] Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *FEBS J* 2011, 278(3): 403-13.
- [4] 相文佩, 水丽君, 温子娜, 等. 弱精子症患者睾丸组织中 NOS-TRIN 的表达及其与 eNOS 的相关性研究 [J]. *华中科技大学学报* 2009, 38(2): 247-9.
- [5] 任亚萍, 廖卒, 孙莉, 等. 雄性大鼠发育期生精小管 NOS 和 P450 的表达及意义 [J]. *实用医学杂志* 2011, 27(20): 3653-5.
- [6] Mostafa T, Rashed L, Nabil N, et al. Seminal BAX and BCL2 gene and protein expressions in infertile men with varicocele [J]. *Urology* 2014, 84(3): 590-5.
- [7] Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, et al. Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia [J]. *Development*, 1996, 122(6): 1703-9.
- [8] Knudson C M, Tung K S, Tourtellotte W G, et al. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death [J]. *Science*, 1995, 270(5233): 96-9.
- [9] 徐秀民, 于德新, 张志强, 等. 男性不育患者精子 DNA 损伤与非整倍体精子的研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(11): 1355-9.
- [10] 张凯, 吕正梅, 贾雪梅, 等. 褪黑素对高脂饮食小鼠睾丸 Bcl-2 和 Bax 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(4): 368-71.
- [11] Brahem S, Mehdi M, Landolsi H, et al. Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss [J]. *Urology* 2011, 78(4): 792-6.

The correlation research on the expression of Bcl-2, Bax and eNOS in the ICR mice testicles

Zuo Lijun¹, Ren Yaping², Zhao Wei¹, et al

(¹Graduate School of Guilin Medical University, ²Dept of Histology and Embryology, Guilin Medical University, Guilin 541004)

Abstract Objective To explore the expression and significance of the B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) in ICR mice testicles, and the correlation with endothelial nitric oxide synthase (eNOS). **Methods** 30 (4 weeks, 8 weeks and 12 weeks respectively, each 10) healthy male ICR mice were divided into three groups randomly: young period, adolescent period and the period of sexual maturity. Paraffin section of the left testis was made, the expressions of the Bcl-2, Bax and eNOS in the testis of male mice were observed with immunohistochemical method. Then Western blot was carried out to screen the protein of Bcl-2, Bax and eNOS in the right side of the mice testicles. **Results** The Bcl-2 highly appeared in Leydig cells, while Bax in rawhide cell. The expression of Bcl-2 in the 8-week-old mice Leydig cells was significantly higher than that in 4 or 12-week-old groups. The protein levels of Bax in the 8-week-old mice was lower than that in 4 or 12-week-old group ($P < 0.05$). Besides, the expression of eNOS in 4-week-old group was obviously higher than that of 8 or 12-week-old groups. ($P < 0.01$). **Conclusion** There is no direct correlation between the expression of Bcl-2, Bax and eNOS in Leydig cells. Nitric oxide (NO) may not directly be involved in the apoptosis activities of Leydig cells.

Key words eNOS; Bcl-2; Bax; androgen; sperm