



# BMP4 调控睾丸支持细胞增殖的初步研究

黄思艺, 乔 蕾, 何莉娜, 王 磊, 李碧筠, 陈俊材, 赵中权\*

(西南大学动物科学技术学院, 重庆 400715)

**摘要:** 旨在研究 BMP4 对睾丸支持细胞增殖的调控。本试验选取 0、1、2 和 3 月龄组的健康大足黑山羊公羊各 3 只, 采集睾丸支持细胞, 每次试验均设 3 个生物学重复和 3 次技术重复, 通过体外培养、细胞免疫荧光、基因干扰、过表达、qPCR 和 Western blotting 等技术对 BMP4 是否通过 Id2 对山羊睾丸支持细胞进行调控以及它们的调控关系进行验证。结果发现, BMP4 在 2 月龄组大足黑山羊睾丸支持细胞中的表达量极显著高于 0、1 月龄组 ( $P < 0.01$ ); 在一定范围内, 随着 BMP4 浓度的增加睾丸支持细胞的增殖活性有所增强, BMP4 浓度为  $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  时其增殖能力最强 ( $P < 0.05$ ); 干扰 BMP4 后, 细胞增殖活力显著下降 ( $P < 0.05$ ), 但在 72 h 后回到正常水平 ( $P > 0.05$ ), PCNA 的表达极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 表明干扰 BMP4 后细胞的增殖能力受到限制, 细胞增殖指数测定结果进一步说明, 干扰 BMP4 后细胞的增殖能力受到限制; 过表达 BMP4 后, Id2 基因表达水平极显著增加 ( $P < 0.01$ ), 表明 BMP4 对 Id2 具有正向调控作用; 相对过表达 BMP4 再干扰 Id2 试验组, 干扰 Id2 试验组的 PCNA 基因的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 这进一步证明 BMP4 可以调控该基因和蛋白表达。综上所述, 山羊睾丸支持细胞的增殖活力在一定范围内与 BMP4 的浓度呈正相关; 且 BMP4 能够正向调控 Id2 的表达, 并通过促进 Id2 的表达进而促进支持细胞的增殖。本研究为阐明 BMP4 调控山羊睾丸支持细胞的分子机制和生理功能提供了基础。

**关键词:** 山羊; 支持细胞; BMP4; Id2; 增殖

中图分类号: S827.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2021)04-0987-09

## Preliminary Study on BMP4 Regulating Proliferation of Testicular Sertoli Cells

HUANG Siyi, QIAO Lei, HE Lina, WANG Lei, LI Bijun,

CHEN Juncai, ZHAO Zhongquan\*

(College of Animal Science and Technology, Southwest University,

Chongqing 400715, China)

**Abstract:** The study aimed to explore the the regulation of BMP4 on the proliferation of testicular sertoli cells. Three healthy Dazu black goat rams in the 0-, 1-, 2- and 3-month-old groups were selected respectively, and the testicular sertoli cells were collected. Each experiment set up 3 biological replicates and 3 technical replicates. Whether BMP4 regulated goat testicular sertoli cells through Id2 and their regulatory relationship were verified by *in vitro* culture, cell immunofluorescence, gene interference, overexpression, qPCR and Western blotting and other technologies. The results showed that the expression level of BMP4 in testicular sertoli cells of Dazu black goat in 2-month-old group was extremely significantly higher than that in 0-, 1-month-old groups ( $P < 0.01$ ); Within a certain range, with the increase of BMP4 concentration, the proliferation activity of testicular sertoli cells increased, and the proliferation ability was the strongest when

收稿日期: 2020-09-11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0502003); 中央高校基本科研业务费(XDJK2020B013)

作者简介: 黄思艺(1996-), 男, 江西芦溪人, 硕士生, 主要从事动物分子遗传研究, E-mail: 1299436591@qq.com

\* 通信作者: 赵中权, 主要从事动物分子遗传研究, E-mail: zhaozhongquan@swu.edu.cn

the concentration of BMP4 was  $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ); After interfering BMP4 expression, the cell proliferation activity significantly decreased ( $P < 0.05$ ), but returned to the normal level after 72 h ( $P > 0.05$ ), and the expression of PCNA was extremely significantly reduced ( $P < 0.01$ ), indicating that the cell proliferation ability was restricted after interfering BMP4 expression, and the cell proliferation index measurement results further illustrated that the cell proliferation ability was restricted after interfering BMP4 expression; After BMP4 overexpression, the expression levels of *Id2* extremely significantly increased ( $P < 0.01$ ), indicating that BMP4 had a positive regulatory effect on *Id2*; Compared to the overexpressing BMP4 and then interfering *Id2* group, in the interfering *Id2* group, the expression levels of PCNA gene significantly reduced ( $P < 0.05$ ), which further proved BMP4 could regulate the expression of this gene and protein. In summary, the cell proliferation activity of goat testicular sertoli cells is positively correlated with the concentration of BMP4 within a certain range; BMP4 can positively regulate the expression of *Id2*, and promote the proliferation of goat testicular sertoli cells through promoting the expression of *Id2*. This study provides a basis for elucidating the molecular mechanism and physiological functions of BMP4 regulating goat testicular sertoli cells.

**Key words:** goat; sertoli cells; BMP4; *Id2*; proliferation

\* **Corresponding author:** ZHAO Zhongquan, E-mail: zhaozhongquan@swu.edu.cn

哺乳动物支持细胞的增殖在出生后可以分为两个阶段,即出生期前后和青春期前,幼年睾丸最初的增长比生物体慢,之后随着青春期的临近其增长速度比生物体快。睾丸在这一时期的变化包括曲细精管直径的增大、间质空间的缩小以及曲细精管长度的增大,但这些发育变化并不一定是以相同的速度发生<sup>[1-2]</sup>,牛支持细胞数量呈线性增加,表明在牛体内不存在分离为两个不同的出生后波的现象,这推翻了哺乳动物(实验室小鼠和大鼠除外)产后支持细胞增殖存在两个阶段的理论<sup>[3]</sup>。而公羊与牛相似,支持细胞的数量在出生后表现出相似的线性增长<sup>[4]</sup>。由于睾丸支持细胞在青春期前停止分裂,此后支持细胞群体变得稳定,且支持细胞只能支持有限数量的生殖细胞,故雄性哺乳动物在青春期前建立的支持细胞数量决定了最终性成熟后的睾丸大小和精子数量<sup>[5]</sup>。因此,影响支持细胞发育和增殖能力的因素也可能对成年动物睾丸功能产生重要影响。

体内多种激素会影响睾丸支持细胞的增殖。其中关于促卵泡素、甲状腺激素和睾酮等激素可刺激睾丸支持细胞增殖的报道居多。例如,促卵泡素(follicle stimulating hormone, FSH)在精子细胞代谢和精子形成中起重要作用,被认为是睾丸支持细胞分裂的主要有丝分裂因子<sup>[6-8]</sup>;而且,外源性的FSH给药能够增加精子发生速率,有利于治愈男性

不育症<sup>[9]</sup>。甲状腺激素受体在睾丸发育过程中高度表达,但在成年睾丸中不表达,它可以延长睾丸支持细胞有丝分裂时间,诱导睾丸支持细胞的早期成熟,从而改变成年动物睾丸支持细胞的总数<sup>[10-12]</sup>。睾酮是由睾丸中的间质细胞产生的,可以与雄激素受体结合,调节睾丸支持细胞的合成和分泌<sup>[13-14]</sup>。这些研究都说明,睾丸支持细胞的增殖受到了体内多种激素的调控。

骨形态发生蛋白4(bone morphogenetic protein, BMP4)是转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )家族的成员,在两性繁殖方面起着重要的作用,其表达与卵细胞的活力和功能、精子质量和胚胎发育有关。研究表明,BMP4突变型雄性小鼠不育,存在生殖细胞退化、精子计数低、精子质量差等问题<sup>[15]</sup>。在雌性哺乳动物中,BMP4促进催乳素细胞的产生,并与Smad(Sma and Mad homologue)-雌激素受体(estrogen receptor, ER)相互作用以促进泌乳素的产生,其作用机制表现为BMP4抑制ER的转录活性,进而减弱SMAD信号的表达<sup>[16-17]</sup>。DNA结合抑制剂(*Id*)属于碱性螺旋-环-螺旋因子的内源性负调节剂,可通过防止异二聚体与DNA结合来抑制细胞分化,促进增殖,促进胚胎干细胞的自我更新和再生<sup>[18-20]</sup>。*Id*家族成员的DNA结合抑制剂2(*Id2*)是BMP目标基因中最重要的成员,作为BMP4的下游基因参与BMP4诱导

的细胞功能改变<sup>[21]</sup>。本研究着重于 BMP4-Id2 信号轴,探讨其在睾丸支持细胞中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物和细胞

试验动物选自西南大学动物科学技术学院试验羊场的健康大足黑山羊,4 组山羊分别为 0、1、2 和 3 月龄,每组选择 3 只公山羊。所有试验均得到西南大学动物实验伦理委员会的批准。

山羊麻醉后,立即用消毒的外科手术设备收集睾丸组织,酒精消毒,将它们放入含有双抗的生理盐水中,立即送回实验室进行细胞培养。使用十字法切开睾丸的白膜以及附睾,以暴露睾丸中间的实质组织,并将其放入新的无菌培养皿中,切成约 1 mm×1 mm×1 mm 的组织块,使其均匀。两步酶法消化匀浆,将含有 DMEM/F12 的混合物通过 80 目和 400 目细胞筛过滤到烧杯中,以获得单细胞悬液,将其以 1 300 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 获得细胞沉淀。最后,向细胞沉淀物中添加适量的胎血培养基,移液混合,添加到细胞培养瓶,在显微镜下观察细胞密度。调整到烧瓶底部的约 60%,并标记每个细胞培养瓶。置于 37 °C 和 5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中。在 2、12、18 和 24 h 后更换培养基,以去除未附着精原细胞、基质细胞和杂质细胞。

### 1.2 BMP4 下游靶基因的预测

本课题组前期对大足黑山羊睾丸组织进行转录组测序,其结果的准确性已经过检验<sup>[22]</sup>。通过转录组分析发现,BMP4 与 BMPRI 结合,使 SMAD4 参与磷酸化 SMAD1、SMAD5、SMAD8,并最终调控

Id 家族基因,从而影响 DNA 的复制。通过初步的试验研究发现,山羊睾丸支持细胞中 Id1 和 Id3 基因的表达水平极低。因此,本试验选择 Id2 基因作为研究对象。

### 1.3 贴壁细胞总 RNA 提取和反转录

根据制造商的说明,使用 RNAiso 试剂(TaKaRa,中国)从细胞中提取总 RNA。使用型号 Nano-drop1000 分光光度计(中国)测定 RNA 浓度和纯度。研究中仅考虑吸光度比 A260/A280 为 1.8~2.0 的样品。根据 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书的要求首先去除基因组 DNA,之后进行反转录反应。

### 1.4 山羊睾丸支持细胞总蛋白提取和 Western blotting

根据制造商的说明,使用动物总蛋白提取试剂盒(Sangon Biotech,中国)提取山羊睾丸支持细胞的总蛋白,BCA 法测量蛋白水平。通过电泳、转印、封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显影等步骤测定对应抗体的相对表达量水平。

### 1.5 引物设计和实时荧光定量 PCR

所有基因扩增引物均使用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)设计(表 1),委托重庆擎科生物有限公司合成。TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 荧光定量 PCR 的反应体系为 15 μL: TB Green<sup>TM</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 7.5 μL, Forward primer 0.3 μL, Reverse primer 0.3 μL, cDNA 0.6 μL, RNase Free H<sub>2</sub>O 6.3 μL。反应条件:95 °C 30 s;95 °C 5 s, 60 °C 30 s,循环 40 次;63.5 °C 检测信号,熔解曲线根据引物不同设置为 65~95 °C 每 0.5 °C 读取一次 Ct 值。

表 1 研究中使用的 PCR 引物序列

Table 1 Sequences of PCR primers used in the study

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	GenBank 登录号 GenBank accession No.
BMP4	BMP4-F	GCCGACCACCTCAACTCAAC	100860789
	BMP4-R	CGGCAACCACATCCCTCTAC	
Id2	Id2-F	TCCATCGTCAGCCTCCATCACC	102189873
	Id2-R	GATGTCTGTGTTGAGCGTGGTCAG	
<i>βactin</i>	<i>βactin</i> -F	GACGACAGCAGGAAGGATTCAAGG	102179831
	<i>βactin</i> -R	CATCTGGCATCATAGTGGCTGGTC	
PCNA	PCNA-F	TTGGCATGAATGTGGACTCCTTGG	102172276
	PCNA-R	TCAGCGATCCGATCATCCTCTCC	

## 1.6 质粒构建和基因干扰片段

用于过表达的质粒载体是 pReceiver-07-Expression Clone(图 1),使用的标签抗体是血凝素(HA)。

BMP4 干扰片段: BMP4 (goat)-si-1: GAGC-CAUGCUGUUUGAUAAtt; BMP4 (goat)-si-2:

GCAGGGCUUUCAUCGUAUAAtt; BMP4 (goat)-si-3:GCCCCGAAGAAGAAUAAGA tt。Id2 干扰片段: Id2 (goat)-si-1: GCCUGCUGUACAACAUGAAAtt; Id2 (goat)-si-2: GGCUUCUGAAU-CCCUCUtt; Id2 (goat)-si-3: GCAAGAUGGAA-AUCCUGCAtt。

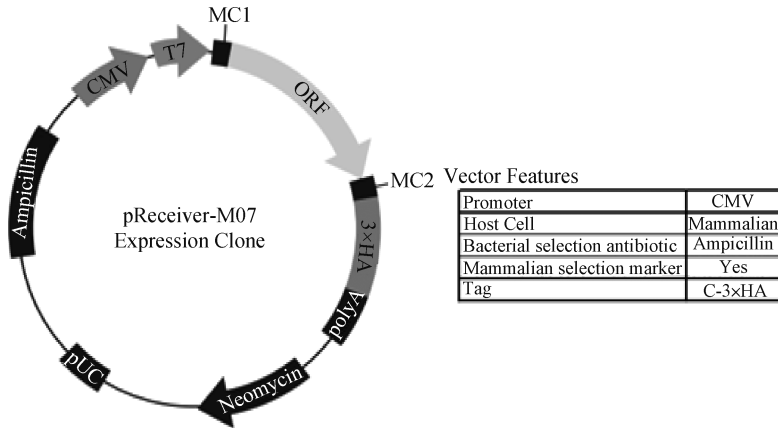


图 1 pReceiver-07-Expression Clone 过表达载体

Fig. 1 pReceiver-07-Expression Clone overexpression vector

## 1.7 辜丸支持细胞免疫荧光鉴定

将单细胞悬浮液加入放有细胞爬片的 12 孔板中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后,用无菌的 PBS 冲洗 3 次。4% 的多聚甲醛进行固定,0.5% Triton X-100 溶液进行细胞通透,柠檬酸钠抗原修复液修复抗原,5% 的 BSA 溶液封闭后,孵育一抗(Rabbit Anti-WT1,Rabbit Anti-PCNA)、二抗(山羊抗兔 IgG),再用 DAPI 进行核染,DAB 对相关蛋白进行显色。

## 1.8 统计分析

所有 qPCR 数据均表示为“平均值±SEM”,用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法测定基因的相对表达水平。使用 SPSS 19.0 软件单因素方差 One-Way ANOVA 分析对多个数据进行比较,使用独立 *t* 检验对两组数据进行分析。每个选择鉴定的基因均进行 3 个生物学重复以及 3 次技术重复。

## 2 结果

### 2.1 辜丸支持细胞鉴定

WT1 蛋白(wilms tumor protein-1)在辜丸支持细胞中特异性表达,而在辜丸其他细胞中不表达,因此 WT1 蛋白表达可作为鉴定辜丸支持细胞的标准<sup>[23]</sup>。培养细胞的 DAPI 核染色和 WT1 蛋白的

AlexaFluor647 红色荧光标记显示,几乎 100% 的细胞核被染成红色,表明大多数培养细胞是辜丸支持细胞,可用于后续试验(图 2)。

### 2.2 BMP4 在各年龄阶段辜丸支持细胞中的表达

为筛选出辜丸支持细胞中 BMP4 表达最高的时期,使用 qPCR 来检测 BMP4 在 0、1、2 和 3 月龄时期辜丸支持细胞中的表达。发现 0~3 月龄的辜丸支持细胞中都存在 BMP4 表达,并且 BMP4 在 2 月龄组的表达量极显著高于 0、1 月龄组( $P < 0.01$ ,图 3)。因此,使用 2 月龄的辜丸支持细胞进行后续试验。

### 2.3 不同浓度 BMP4 对辜丸支持细胞增殖的影响

细胞复苏后接种到 96 孔板,按分组向不同的孔中加入不同浓度的 BMP4。具体分组设置为对照组、50、100、150 和 200 ng·mL<sup>-1</sup>组(每组 4 个重复孔)。放入细胞培养箱分别培养 24、48、72 h。CCK8 法检测细胞的活性,结果发现,24 h 后细胞增殖无明显变化,48、72 h 后细胞随 BMP4 浓度的增加其增殖活力也增加。其中 200 ng·mL<sup>-1</sup> 的 BMP4 处理组与对照组相比,其增殖能力最强( $P < 0.05$ ,图 4)。

### 2.4 BMP4 干扰效果检测

为深入了解 BMP4 表达水平对辜丸支持细胞

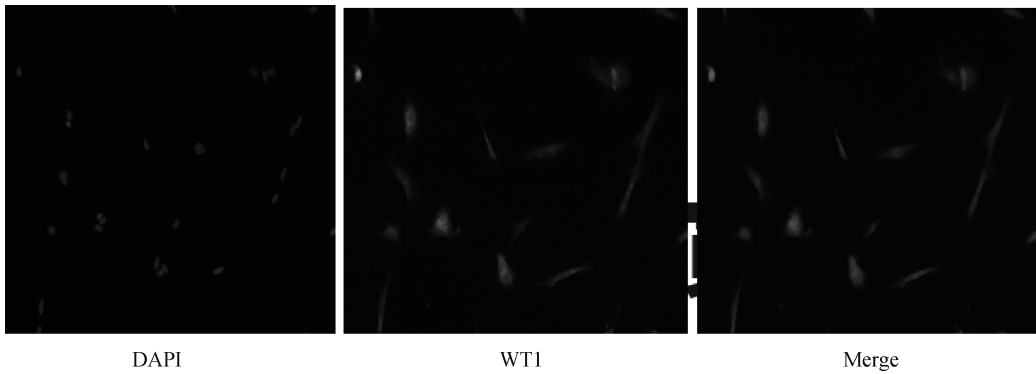
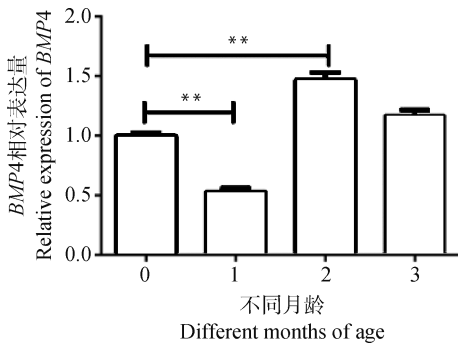


图 2 睾丸支持细胞的免疫荧光鉴定(100×)

Fig. 2 Immunofluorescence identification of testicular sertoli cells(100×)



\*.  $P < 0.05$ , \*\* .  $P < 0.01$ . 下同

\*.  $P < 0.05$ , \*\* .  $P < 0.01$ . The same as below

图 3 BMP4 在不同月龄睾丸支持细胞中的表达

Fig. 3 The expression of BMP4 in testicular sertoli cells at different months of age

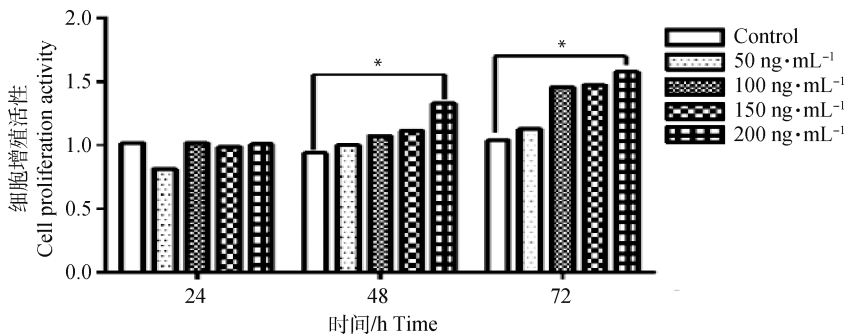


图 4 不同浓度 BMP4 对睾丸支持细胞增殖的影响

Fig. 4 The effect of BMP4 with different concentrations on the proliferation of testicular sertoli cells

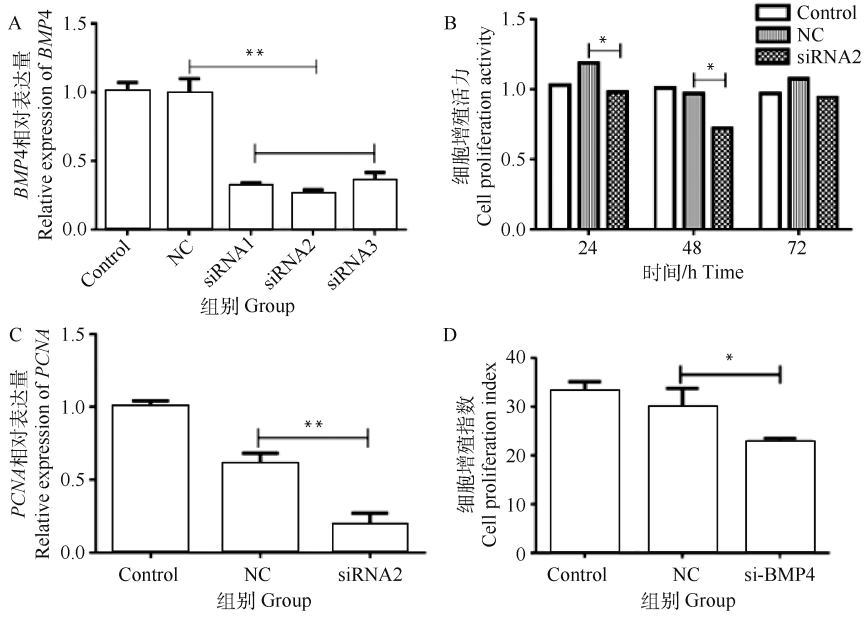
增殖能力受到限制。测量细胞增殖指数表明,与 NC 组相比, BMP4 干扰组的增殖水平显著降低 ( $P < 0.05$ , 图 5D), 进一步说明 BMP4 干扰后细胞的增殖能力受到限制。

## 2.5 BMP4 敲低/过表达对 Id2 的影响

为验证 BMP4 对 Id2 的作用, 本研究敲低了

的影响, 本研究用 RT-PCR 检测干扰片段对 BMP4 表达的影响。结果表明, 阴性对照 (NC) 对 BMP4 基因表达无显著影响 ( $P > 0.05$ ), 而 3 对干扰片段对 BMP4 基因表达均有一定的干扰作用, 干扰效率分别为 67.85%、73.44% 和 64.05% ( $P < 0.01$ , 图 5A), 其中, BMP4 siRNA2 具有最高的干扰效率, 被选作后续试验的干扰片段。利用 CCK8 法检测细胞的活性, 结果表明, 与 NC 组相比, siRNA2 组的细胞活力分别在 24 和 48 h 后下降了 21% 和 34% ( $P < 0.05$ ), 并在 72 h 后恢复, NC 和 siRNA 组之间无显著差异 ( $P > 0.05$ , 图 5B)。在睾丸支持细胞中, BMP4 干扰后, 试验组中 PCNA 的表达极显著降低 ( $P < 0.01$ , 图 5C), 表明 BMP4 干扰后细胞的

BMP4 或使其过表达。敲低 BMP4 后, 试验组其下游靶基因 *Id2* 的 mRNA 水平较 NC 组降低, 但无显著差异 ( $P > 0.05$ , 图 6A), 因此没有对其进行后续试验。BMP4 过表达后, 试验组 BMP4 的表达水平极显著高于 NC 组和对照组 ( $P < 0.01$ , 图 6B)。使用 HA 标签确定了 BMP4 过表达后 Id2 的蛋白水

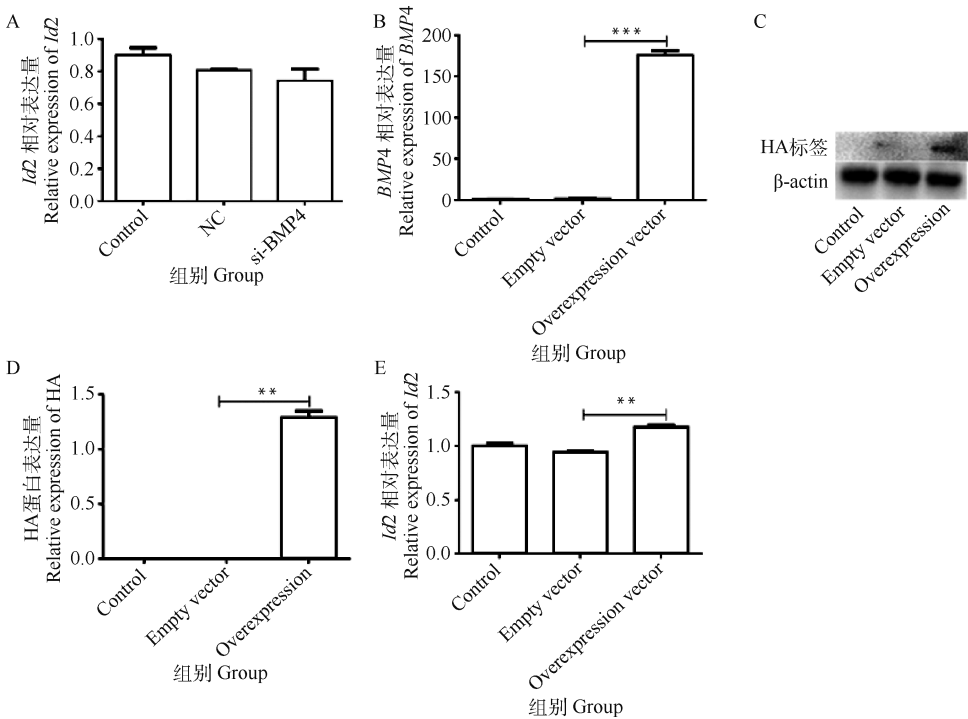


A. siRNA 干扰后 *BMP4* 的相对表达; B. siRNA2 干扰后细胞增殖活性水平; C. siRNA2 干扰后 *PCNA* 的相对表达水平; D. *BMP4* 干扰后的细胞增殖指数

A. The relative expression of *BMP4* after siRNA interference; B. The level of cell proliferation activity after siRNA2 interference; C. The relative expression level of *PCNA* after siRNA2 interference; D. The cell proliferation index after *BMP4* interference

图 5 *BMP4* 干扰效果检测

Fig. 5 *BMP4* interference effect detection



A. *BMP4* 干扰后下游基因 *Id2* 的相对表达; B. 质粒转染后 *BMP4* 的相对表达水平; C、D. 质粒转染后 HA 蛋白的相对水平; E. 质粒转染后的 *Id2* 的相对水平

A. The relative expression of the downstream gene *Id2* after *BMP4* interference; B. The relative expression level of *BMP4* after plasmid transfection; C, D. The relative level of HA protein after plasmid transfection; E. The relative expression level of *Id2* after plasmid transfection

图 6 *BMP4* 敲低/过表达对 *Id2* 的影响

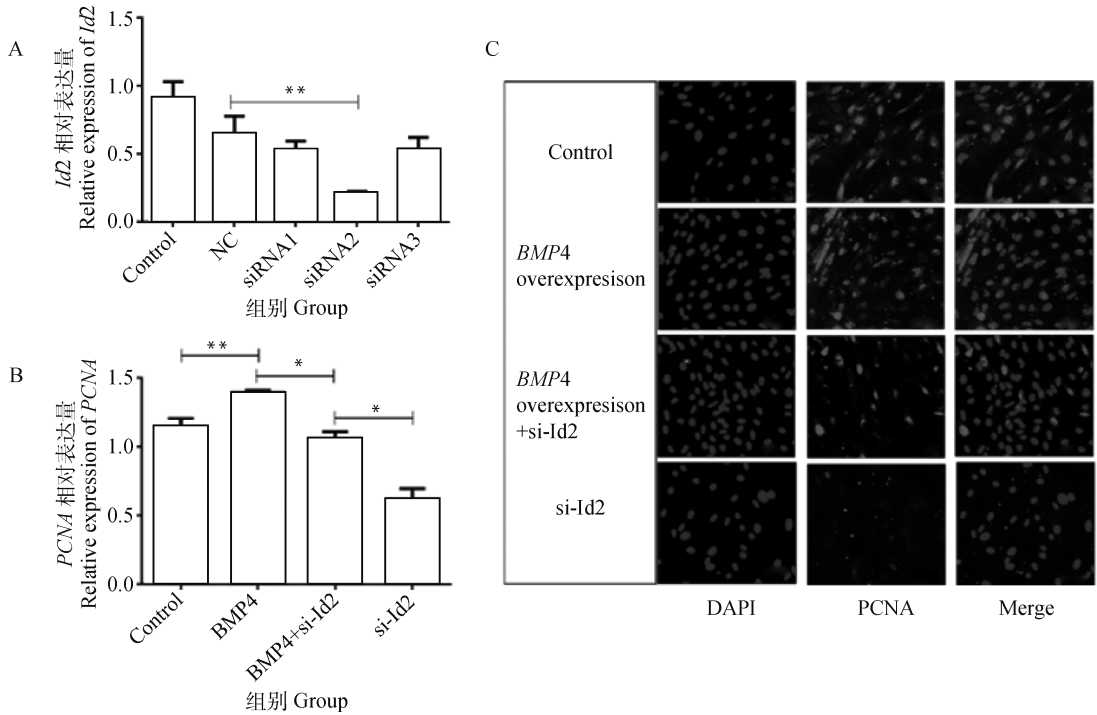
Fig. 6 The effect of *BMP4* knockdown/overexpression on *Id2*

平,并使用 qPCR 检测了 *Id2* 的 mRNA 表达。结果显示, *BMP4* 过表达后,不仅其自身表达增加,而且其靶基因 *Id2* 也显著增加,并且过表达组中 *Id2* 的表达比 NC 组高 1.25 倍,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 6C、D、E)。这些结果表明, *BMP4* 对 *Id2* 有正向的调节作用。

## 2.6 干扰 *Id2* 对睾丸支持细胞增殖的影响

为筛选出对 *Id2* 干扰效果最佳的 siRNA,将 3 个干扰片段分别转染睾丸支持细胞。转染 24 h 后, *Id2*-siRNA2 的干扰效率最高,为 77.72% ( $P <$

0.01,图 7A)。因此,选择 *Id2*-siRNA2 进行后续研究。为验证 *Id2* 干扰对睾丸支持细胞增殖基因表达的影响,首先过表达 *BMP4*,然后将 *Id2* 干扰片段转染 24 h,最后提取总 RNA,利用细胞免疫荧光检测 *PCNA* 的表达。对荧光定量结果分析表明,单独过表达 *BMP4* 后, *PCNA* 的表达较对照组极显著增加 ( $P < 0.01$ )。 *BMP4* 过表达再转染 *Id2* 干扰片段后, *PCNA* 的表达与对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),单独干扰 *Id2* 组 *PCNA* 的表达水平与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ,图 7B、C)。



A. siRNA 干扰后睾丸支持细胞中 *Id2* 表达; B. *BMP4* 过表达、*Id2* 干扰、*BMP4* 过表达 + *Id2* 干扰后睾丸支持细胞中 *PCNA* 表达; C. *BMP4* 过表达、*Id2* 干扰、*BMP4* 过表达 + *Id2* 干扰后睾丸支持细胞中 *PCNA* 蛋白表达 (200 $\times$ )

A. The expression of *Id2* in testicular sertoli cells after siRNA interference; B. The *PCNA* expression in testicular sertoli cells after *BMP4* overexpression, *Id2* interference, *BMP4* overexpression + *Id2* interference; C. The *PCNA* protein expression in testicular sertoli cells after *BMP4* overexpression, *Id2* interference, *BMP4* overexpression + *Id2* interference (200 $\times$ )

图 7 干扰 *Id2* 对睾丸支持细胞增殖的影响

Fig. 7 The effect of interfering *Id2* on the proliferation of testicular sertoli cells

## 3 讨论

*BMP4* 对两性的生殖功能都有重要影响,其表达会影响精子的健康、卵细胞的活力和功能以及正常的胚胎发育<sup>[24]</sup>。本试验首先筛选出了 *BMP4* 在大足黑山羊睾丸支持细胞中作用的最佳年龄。 *BMP4* 的表达在 2 月龄组最高,这可能与大足黑山羊的生殖发育阶段有关,2 月龄正处于青春期前期,

睾丸的发育处于旺盛阶段,睾丸体积增大,支持细胞也处于大幅度增长状态<sup>[25]</sup>。基于这种推测,本研究探讨了 *BMP4* 浓度对睾丸支持细胞生长活力的影响,发现睾丸支持细胞的增殖能力随着 *BMP4* 浓度的增加而增加,这种状态与细胞接触异质后的生长趋势相一致。同样, Hai 等<sup>[26]</sup>发现, *BMP4* 能使人睾丸支持细胞的生长呈剂量依赖性。随后,为验证此结果,本研究构建了 3 条 siRNA 干扰片段,经过荧

光检测证实, siRNA 能够被有效地转入到睾丸支持细胞内, 且 siRNA2 干扰效率最高, 可以作为 BMP4 的干扰靶点。

Id 的生理功能主要是抑制细胞分化和促进细胞增殖。Yang 等<sup>[27]</sup>表明, Id 蛋白是人肺动脉平滑肌细胞中 BMP 信号转导的关键下游效应子, Fei 等<sup>[28]</sup>发现, 在小鼠胚胎干细胞中, Id 基因的启动子区域有 SMAD 的结合位点, 进一步表明 BMP / SMAD 途径可以通过 Id 基因起作用。在本研究中, 干扰 BMP4 后, 睾丸支持细胞中 Id2 表达水平无明显变化; 而在 BMP4 过表达后, 睾丸支持细胞中 Id2 的表达水平显著上升, 表明在睾丸支持细胞中 BMP4 能够正向调控 Id2。相对过表达 BMP4 再干扰 Id2 试验组, 干扰 Id2 的试验组中 PCNA 基因以及蛋白的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 这说明 BMP4 可以通过 Id2 影响支持细胞的增殖。这与 Hua 等<sup>[29]</sup>发现的 BMP4 通过 Id2 蛋白促进胰腺祖细胞增殖的结果是相似的。但过表达 BMP4 再干扰 Id2 的试验组 PCNA 表达水平与对照组差异不显著, 而只干扰 Id2 试验组显著低于对照组, 说明 BMP4 可能不仅仅通过 Id2 这一基因对睾丸支持细胞起作用, 如作为 BMPs 主要调控通路的 SMAD 通路很有可能在其中起着重要作用<sup>[30-31]</sup>。这些结果与 Carlomagno 等<sup>[32]</sup>对小鼠精原干细胞的发现是相似的。但是, Id2 下游是否存在调控睾丸支持细胞生长的基因需要进一步研究。

#### 4 结 论

本研究结果显示, 山羊睾丸支持细胞的增殖活力在一定范围内与 BMP4 的浓度呈正相关; 且 BMP4 能够正向调控 Id2 的表达, 并通过促进 Id2 的表达进而促进支持细胞的增殖。

#### 参考文献 (References):

[1] AHMAD N, UMAIR S, SHAHAB M, et al. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Nili-Ravi buffalo bulls [J]. *Theriogenology*, 2010, 73(1): 20-25.

[2] MOURA A A, SOUZA C E A, ERICKSON B H. Early prepubertal testis criteria, seminiferous epithelium and hormone concentrations as related to testicular development in beef bulls [J]. *Anim Reprod Sci*, 2011, 124(1-2): 39-47.

[3] FRANÇA L R, SILVA V A, CHIARINI-GARCIA

H, et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(6): 1629-1636.

[4] HERRERA-ALARCÓN J, VILLAGÓMEZ-AMEZCUA E, GONZÁLEZ-PADILLA E, et al. Stereological study of postnatal testicular development in Blackbelly sheep [J]. *Theriogenology*, 2007, 68(4): 582-591.

[5] RUSSELL L D, PETERSON R N. Determination of the elongate spermatid-sertoli cell ratio in various mammals [J]. *J Reprod Fert*, 1984, 70(2): 635-641.

[6] ODUWOLE O O, PELTOKETO P, HUHTANIEMI I T. Role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 763.

[7] CRESPO D, LEMOS M S, ZHANG Y T, et al. PGE<sub>2</sub> inhibits spermatogonia differentiation in zebrafish: interaction with FSH and an androgen [J]. *J Endocrinol*, 2020, 244(1): 163-175.

[8] SCHULZ R W, DE FRANÇA L R, LAREYRE J J, et al. Spermatogenesis in fish [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 165(3): 390-411.

[9] SANTI D, CRÉPIEUX P, REITER E, et al. Follicle-stimulating hormone (FSH) action on spermatogenesis: a focus on physiological and therapeutic roles [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(4): 1014.

[10] CAROSA E, LENZI A, JANNINI E A. Thyroid hormone receptors and ligands, tissue distribution and sexual behavior [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 467: 49-59.

[11] FIGUEIREDO A F A, WNUK N T, TAVARES A O, et al. Prepubertal PTU treatment in rat increases Sertoli cell number and sperm production [J]. *Reproduction*, 2019, 158(2): 199-209.

[12] HATEF A, UNNIAPPAN S. Metabolic hormones and the regulation of spermatogenesis in fishes [J]. *Theriogenology*, 2019, 134: 121-128.

[13] BERGER T. Testicular estradiol and the pattern of Sertoli cell proliferation in prepubertal bulls [J]. *Theriogenology*, 2019, 136: 60-65.

[14] BHATTACHARYA I, BASU S, PRADHAN B P, et al. Testosterone augments FSH signaling by upregulating the expression and activity of FSH-Receptor in Pubertal Primate Sertoli cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 482: 70-80.

[15] HU J, CHEN Y X, WANG D, et al. Developmental expression and function of *Bmp4* in spermatogenesis



- and in maintaining epididymal integrity[J]. *Dev Biol*, 2004,276(1):158-171.
- [16] GIACOMINI D, PÁEZ-PEREDA M, STALLA J, et al. Molecular interaction of BMP-4, TGF- $\beta$ , and estrogens in lactotrophs; impact on the PRL promoter [J]. *Mol Endocrinol*, 2009,23(7):1102-1114.
- [17] MIYOSHI T, OTSUKA F, OTANI H, et al. Involvement of bone morphogenetic protein-4 in GH regulation by octreotide and bromocriptine in rat pituitary GH3 cells[J]. *J Endocrinol*, 2008,197(1):159-169.
- [18] PATEL D, MORTON D J, CAREY J, et al. Inhibitor of differentiation 4 (ID4): from development to cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2015,1855(1):92-103.
- [19] LING F, KANG B, SUN X H. Chapter Five-Id proteins: small molecules, mighty regulators[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2014,110:189-216.
- [20] YING Q L, NICHOLS J, CHAMBERS I, et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 [J]. *Cell*, 2003,115(3):281-292.
- [21] SMADJA D M, BIÈCHE I, SILVESTRE J S, et al. Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis [J]. *Arterioscl Throm Vas Biol*, 2008,28(12):2137-2143.
- [22] ZHAO Z Q, QIAO L, DAI Z N, et al. LncNONO-AS regulates AR expression by mediating NONO [J]. *Theriogenology*, 2020,145:198-206.
- [23] GAO F, MAITI S, ALAM N, et al. The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006,103(32):11987-11992.
- [24] BORGES L, IACOVINO M, KOYANO-NAKAGAWA N, et al. Expression levels of endoglin distinctively identify hematopoietic and endothelial progeny at different stages of yolk sac hematopoiesis [J]. *Stem Cells*, 2013,31(9):1893-1901.
- [25] MÄKELÄ J A, KOSKENNIEMI J J, VIRTANEN H E, et al. Testis development [J]. *Endocr Rev*, 2019,40(4):857-905.
- [26] HAI Y N, SUN M, NIU M H, et al. BMP4 promotes human Sertoli cell proliferation via Smad1/5 and ID2/3 pathway and its abnormality is associated with azoospermia [J]. *Discov Med*, 2015,19(105):311-325.
- [27] YANG J, LI X H, LI Y, et al. Id proteins are critical downstream effectors of BMP signaling in human pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013,305(4):L312-L321.
- [28] FEI T, XIA K, LI Z W, et al. Genome-wide mapping of SMAD target genes reveals the role of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination [J]. *Genome Res*, 2010,20(1):36-44.
- [29] HUA H, ZHANG Y Q, DABERNAT S, et al. BMP4 regulates pancreatic progenitor cell expansion through Id2 [J]. *J Biol Chem*, 2006,281(19):13574-13580.
- [30] WANG W, WANG L, LI X X, et al. Effect of interrupted endogenous BMP/Smad signaling on growth and steroidogenesis of porcine granulosa cells [J]. *J Zhejiang Univ Sci-B (Biomed & Biotechnol)*, 2010,11(9):719-727.
- [31] YU D L, ZHANG L, WANG H J, et al. A potential role for SMAD9 in goose follicular selection through regulation of mRNA levels of luteinizing hormone receptor [J]. *Theriogenology*, 2019,135:204-212.
- [32] CARLOMAGNO G, VAN BRAGT M P A, KORVER C M, et al. BMP4-induced differentiation of a rat spermatogonial stem cell line causes changes in its cell adhesion properties [J]. *Biol Reprod*, 2010,83(5):742-749.

(编辑 郭云雁)