

小鼠初级精母细胞 GC-2 中 TUBB4B 的表达及其对 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的调控

刘桐佳¹, 王万伦¹, 张婷¹, 刘爽¹, 边艳超¹, 张传领², 肖瑞¹

内蒙古医科大学¹内蒙古自治区分子病理学重点实验室,²药学院, 内蒙古 呼和浩特 010059

摘要:目的 探究微管蛋白(TUBB4B)与胞浆羧肽酶(CCP1)在小鼠初级精母细胞(GC-2)中的相互作用关系,以及TUBB4B在调控GC-2发育中的作用。方法 使用慢病毒感染GC-2细胞分别构建TUBB4B基因敲减组(TUBB4B-KD组)和阴性对照组(NC-KD组);TUBB4B基因过表达组(TUBB4B-OE组)与阴性对照组(NC-OE组),利用嘌呤霉素筛选稳定细胞株。采用RT-qPCR和Western blot分别在mRNA和蛋白水平上检测细胞模型是否构建成功,并进一步探究在GC-2细胞中TUBB4B与CCP1二者之间相互调控的表达关系。CCK8及流式细胞术检测TUBB4B沉默和过表达后对GC-2细胞增殖及周期的影响;Western blot及细胞免疫荧光实验找出TUBB4B沉默和过表达后发生表达改变的信号通路因子,并在细胞水平上进行标记验证。结果 GC-2中与NC-KD(NC-OE)组相比,TUBB4B沉默和过表达后,CCP1在mRNA和蛋白水平上的表达均发生一致的性改变($P<0.05$);同样CCP1敲减和恢复表达后与NC组相比,TUBB4B的表达也随之发生一致的性改变($P<0.05$)。CCK8和流式细胞术实验发现TUBB4B敲减和过表达对GC-2的增殖速率和细胞的周期无明显改变。Western blot和细胞免疫荧光实验显示TUBB4B敲减和过表达后,细胞中核因子 κ B(NF- κ B)信号通路关键蛋白:p65,p-p65与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路关键蛋白:ErK1/2,p-ErK1/2会发生相应的明显改变($P<0.05$);而CCP1敲减后会明显影响PolyE表达($P<0.05$)。结论 在GC-2细胞中TUBB4B与CCP1表达相互调控为正向作用,且CCP1对TUBB4B具有去谷氨酰化修饰作用,TUBB4B参与初级精母细胞中NF- κ B和MAPK信号通路的调控。

关键词:雄性不育;胞浆羧肽酶;微管蛋白;初级精母细胞;NF- κ B通路;MAPK通路

Expression of TUBB4B in mouse primary spermatocyte GC-2 cells and its regulatory effect on NF- κ B and MAPK signaling pathway

LIU Tongjia¹, WANG Wanlun¹, ZHANG Ting¹, LIU Shuang¹, BIAN Yanchao¹, ZHANG Chuanling², XIAO Rui¹

¹Key Laboratory of Molecular Pathology of Inner Mongolia Autonomous Region, ²Department of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Huhehaote 010059, China

Abstract: Objective To explore the interaction between Tubulin beta 4B class IVb (TUBB4B) and Agtbp1/cytosolic carboxypeptidase-like1 (CCP1) in mouse primary spermatocytes (GC-2 cells) and the role of TUBB4B in regulating the development of GC-2 cells. **Methods** Lentiviral vectors were used to infect GC-2 cells to construct TUBB4B knockdown and negative control (NC-KD) cells. The stable cell lines with TUBB4B overexpression (Tubb4b-OE) and the negative control (NC-OE) cells were screened using puromycin. RT-qPCR and Western blotting were used to verify successful cell modeling and explore the relationship between TUBB4B and CCP1 expressions in GC-2 cells. The effects of TUBB4B silencing and overexpression on the proliferation and cell cycle of GC-2 cells were evaluated using CCK8 assay and flow cytometry. The signaling pathway proteins showing significant changes in response to TUBB4B silencing or overexpression were identified using Western blotting and immunofluorescence assay and then labeled for verification at the cellular level. **Results** Both TUBB4B silencing and overexpression in GC-2 cells caused consistent changes in the mRNA and protein expressions of CCP1 ($P<0.05$). Similarly, TUBB4B expression also showed consistent changes at the mRNA and protein after CCP1 knockdown and restoration ($P<0.05$). TUBB4B knockdown and overexpression had no significant effect on proliferation rate or cell cycle of GC-2 cells, but caused significant changes in the key proteins of the nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signaling pathway (p65 and p-p65) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway (ErK1/2 and p-ErK1/2) ($P<0.05$); CCP1 knockdown induced significant changes in PolyE expression in GC-2 cells ($P<0.05$). **Conclusions** TUBB4B and CCP1 interact via a mutual positive regulation mechanism in GC-2 cells. CCP-1 can deglutamate TUBB4B, and the latter is involved in the regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in primary spermatocytes.

Keywords: male sterility; cytosolic carboxypeptidase-like1; TUBB4B; primary spermatocytes; nuclear factor kappa-B pathway; mitogen-activated protein kinase MAPK pathway

收稿日期:2022-11-30

基金项目:国家自然科学基金(31760304);教育部“春晖计划”项目;内蒙古科技计划项目(2019GG154);内蒙古自然基金项目(2020LH03016);内蒙古医科大学重点项目(YKD2022ZD018);内蒙古医科大学科技创新团队项目

Supported by National Natural Science Foundation of China (31760304).

作者简介:刘桐佳,在读硕士研究生,E-mail: Lyj950686@163.com

通信作者:肖瑞,博士,教授,E-mail: Xiaorui79@hotmail.com

微管蛋白(TUBB4B)是 β -tubulin的一种同型异构体,微管蛋白家族成员之一^[1]。微管是构成细胞骨架的基础成份,由 α -tubulin和 β -tubulin构成异二聚体^[2]。参与细胞生长发育,分化,迁移,以及细胞凋亡等多个生命过程^[3]。在雄性生殖领域已有研究表明,微管作为细胞骨架的重要组成部分,参与了许多关键性的生精过程^[4];

微管动力学可能参与精子发生过程中精细胞的重塑、物质运输和细胞器的极性分布^[5];圆形精子中微管蛋白首先在精子核的周围负极,逐渐增加并与肌动蛋白结合形成manchette结构,以促进分化形成长型精子;随着精子发生的进行, α -tubulin和 β -tubulin蛋白从中心体延伸形成精子尾部,并与鞭毛轴突的其他组成成份排列形成独特的9+2结构^[6];且在精子获能过程中伴随着微管蛋白(TUBB4B, TUBB1A)的氧化激活^[7];在这些精子发生与获能的过程中微管蛋白扮演者重要的角色。

浦肯野细胞变性小鼠,由于Nna1基因突变导致,成年雄性小鼠因精原细胞与精子细胞细胞凋亡而引起精子数量显著减少,同时出现精子头部严重畸形与精子尾部粗细不均的发育异常的精子^[8]。Nna1具有ATP/GTP结合位点,所编码的蛋白质C末端具有金属羧肽酶结构域因此也称胞浆羧肽酶CCP-1(CCP1)^[9]。在我们前期研究中发现,在小鼠睾丸中TUBB4B与CCP1相互作用,暗示TUBB4B可能在雄性不育和生殖细胞发育过程中存在重要的作用^[10]。并有最新研究报道TUBB4B作为关键因子,其表达缺失可造成精原细胞增殖抑制与细胞周期阻滞等现象^[11]。

精子发生是一个连续性多阶段的单向性的进程,在此过程中涉及细胞分裂,分化,以及细胞间的相互作用^[12]。而对于精子发生的调控作用不仅依赖于各基因的有序表达,也依赖于各分子间的相互作用以及相应信号通路的适时开启与关闭。就目前研究进展来看,我们对于TUBB4B在雄性生殖细胞各细胞阶段中所发挥调控机制还不明确。在整个生精过程中,初级精母细胞是开启减数分裂的关键,也是决定后续单倍体精子形成的重要细胞时段,初级精母细胞作为衔接精原细胞与精细胞之间的桥梁,同时也是精原细胞进行定向分化的第一个细胞时段^[13]。因此我们选择初级精母细胞(GC-2)作为研究对象,进一步探究TUBB4B对雄性生殖细胞的调控作用机制以及与羧肽酶CCP1之间的相互作用,来揭示其在雄性生殖系统中的重要功能。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验使用的初级精母细胞(GC-2)购自中国科学院细胞库(www.cellbank.org.cn);DMEM、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗、DMSO(Gibco);总RNA提取试剂盒(#DP431, TIANGEN);反转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(Takara);DAPI(F6057, SIGMA);Phospho-NF-kB p65(93H1),NF-kB p65,MAPK(ErK1/2),Phospho-MAPK(ErK1/2),MAPK p38(Cell Signaling);Anti-beta II Tubulin (abcam), Anti- PolyE (AdipoGen), CCP1 (proteintech)。TUBB4B,CCP1基因敲减和过表达所用慢病毒由吉凯基因构建及包装,慢病毒介导的siRNA

目标片序列为:TUBB4B-RNAi:gcGCATCAACGTGTACTACAA;阴性病毒CON313:gcTTCTCCGAACGTGTCACGT;CCP1-RNAi:gcGAGTTTCTTAGTTGCCAAA;阴性病毒CON077:gcTTCTCCGAACGTGTACACGT。慢病毒介导的过表质粒信息为:LV-TUBB4B,Ubi-MCS-3FLAG-CBh-gcGFP-IRES-puromycin,阴性对照组病毒(CON335);LV-CCP1,原件顺序:Ubi-MCS-3FLAG-CBh-gcGFP-IRES-puromycin,阴性对照组病毒(CON335)。

1.2 细胞培养

GC-2细胞培养需要用DMEM高糖培养基(DMEM, Gibco Island, NY, USA)配制成含10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素双抗(Gibco)的完全培养基,培养条件37℃,5%CO₂湿度下,每2~3d传代。

1.3 慢病毒感染

慢病毒感染,使用24孔板每孔接种 6×10^4 GC-2细胞,并加入300 μ L 2 mg/mL的感染增强液,辅助慢病毒感染,使用病毒量1.5 μ L/孔:TUBB4B敲减阳性组加入病毒:TUBB4B-RNAi,TUBB4B敲减阴性组加入病毒:阴性病毒CON313;TUBB4B过表达阳性组加入病毒:LV-TUBB4B,TUBB4B过表达阴性组加入病毒:阴性对照组病毒(CON335),并补足1 mL完全培养基。12 h后撤病毒。得到TUBB4B基因敲减阳性组(TUBB4B-KD),TUBB4B基因敲减阴性组(NC-KD);TUBB4B基因过表达阳性组(TUBB4B-OE),TUBB4B基因过表达阴性组(NC-OE)。并用含嘌呤霉素5 μ g/mL的培养基筛选稳定表达的GC-2细胞5~7 d。用荧光显微镜观察感染后的细胞荧光。CCP1基因敲减组(CCP1-KD)与恢复表达组(CCP1-RE)的GC-2细胞为本课题组前期试验制备,以经嘌呤霉素筛选并稳定表达。

1.3 细胞免疫荧光

预冷的4%多聚甲醛溶液1 mL,固定细胞20 min,1 mL PBS润洗吸干。1 mL 0.5% TritonX-100(10 mL PBS+50 μ L TritonX-100)(AMRESCO)透化10 min。1 mL PBS润洗3次,吸干。向载玻片中央滴加一抗Phospho-NF-kB p65(稀释浓1:200),NF-kB p65(稀释浓度1:200);37℃恒温箱放置1 h;1 mL PBS润洗3次,吸干。滴加荧光二抗(CY3稀释浓度1:50);室温避光孵育30 min;1 mL PBS润洗3次后吸干。中央滴加DAPI染色液,盖上盖玻片,封片剂封片,荧光显微镜下观察。

1.4 细胞总RNA提取及实时荧光定量PCR

细胞沉淀中加入1 mL/90 mm培养皿的RZ裂解液,用移液枪吹打混匀。放在冰盒中静置3 min,使之充分裂解;高速离心4℃12 000 r/min离心5 min;取上清,转移至新的1.5 mL无酶EP管中;依照天根总RNA提取试剂盒(TIANGEN)说明书提取组织总RNA。使用NanoDrop 2000检测RNA浓度。以每2000 ng总RNA

按反转录试剂盒(Takara)说明书进行反转录。将反转录cDNA为模板依照TaKaRa定量PCR试剂盒(Takara)说明书,配反应体系后,将配置好的体系混匀,短暂离心后放入PCR仪中。反应条件:95 °C 30 s;95 °C 5 s;60 °C

34 s,共40个循环。根据NCBI的GenBank数据库存储的TUBB4B(NM_146116),CCP1(NM_001048008),基因保守区域使用primer5软件设计本实验所用定量PCR引物(表1)。

表1 引物序列表

Tab.1 Primer sequences used in this study

Primer name	Primer sequence 5'→3'	Annealing temperature
GAPDH	Forward AGGTCGGTGTGAACGGATTG	60 °C
	Reverse TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
TUBB4B	Forward ATCCCACTGGCACTTACCAC	60 °C
	Reverse AGCCCCACTCTGACCAAAGA	
CCP-1	Forward GGGGTCGAAGAGCGAGTTTC	60 °C
	Reverse GAATGGAGTGAGTCTGCACCA	

1.5 Western blot检测

按照100 μL/90 mm培养皿的比例向细胞沉淀中加入RIPA细胞裂解液,同时加入蛋白酶抑制剂PMSF(按比RIPA:PMSF=100:5)提取总蛋白。蛋白定量后,取60 μg的蛋白用8%的分离胶70 V电泳,蛋白样达到浓缩胶和分离胶交界时,电压调为110 V电泳,电泳约1 h,终止电泳。将蛋白胶样转到NC膜,5%脱脂牛奶封闭室温2 h,后孵育一抗:Phospho-NF-kB p65;p38 MAPK Antibody;NF-kB p65(Cell Signaling),浓度按1:1000,摇床4 °C过夜;用1×TBST在摇床上摇洗10 min 3次;孵育相应种属的荧光二抗(荧光二抗;抗体稀释液=1:1000),室温1 h;1×TBST在摇床上摇洗10 min 3次;避光条件下置于Odyssey CLX红外激光成像系统(Licor)扫描并观察结果。

1.6 CCK-8检测细胞增殖速率

按1×10⁴孔在96孔板接种,用培养基补足至100 μL,96孔板四周加入PBS,放置细胞培养箱中6 h使细胞贴壁。分别在细胞接种后的6、12、24、48、72 h向相应孔位中加入10 μL CCK Solution溶液,放入细胞培养箱中继续培养2 h。取出,开盖放置在酶标仪上测定吸光度A_{450nm},导出数据并统计分析。

1.7 流式细胞术检测细胞增殖周期

90 mm培养皿的细胞生长密度为80%时(约8×10⁶个细胞)去除旧培养基,1 mL PBS清洗细胞后,500 μL胰酶消化细胞离壁。后离心将细胞沉淀使用PBS清洗两次后,弃废液。用4 °C预冷70%乙醇(无水乙醇7 mL+PBS 3 mL)缓慢加入细胞沉淀中,4 °C过夜。将固定好的细胞1500 r/min离心5 min,弃上清。用1 mL的1×PBS清洗细胞3次,1500 r/min离心5 min,弃上清。加入50 μg/mL PI溶液、200 μg/mL RNase Staining Buffer溶液各500 μL重悬细胞,37 °C恒温箱中避光孵育30 min。使用200目的细胞筛网,将待测样本筛入流式管中,

上机检测。

1.8 统计学处理

数据以均数±标准差表示,采用SPSS 22.0统计软件进行分析,两组样本均数比较使用独立样本t检验,qPCR结果通过2^{-ΔΔCt}[ΔCt=目的基因Ct-内参基因Ct,ΔΔCt=ΔCt(实验组)-ΔCt(对照组),相对表达=2^{-ΔΔCt}]方法统计分析。P<0.05时被认为差异具有统计学意义,并用GraphPad Prism 5进行制图。

2 结果

2.1 GC-2细胞中TUBB4B与CCP1互相调控表达

慢病毒感染后GC-2细胞带绿色荧光,慢病毒成功感染GC-2细胞(图1A)。TUBB4B-KD与NC-KD相比mRNA与蛋白质表达水平均明显降低(mRNA表达量降低近58倍,P<0.0001,图1B、D);TUBB4B-OE与NC-OE相比mRNA与蛋白质表达水平均升高(mRNA表达量升高2倍,P<0.05,图1C、E)。进一步通过RT-qPCR及Western blot发现TUBB4B沉默后CCP1表达量降低(TUBB4B: P<0.0001,CCP-1: P<0.05,图1F、I);TUBB4B过表达后与CCP1表达升高(TUBB4B: P<0.05,CCP-1: P<0.0001,图1G、J);CCP1沉默(P<0.0001)和恢复过表达(0.05>P>0.0001),TUBB4B表达也随之降低(P<0.05)与升高(P<0.05,图1H、K);CCP1沉默后在TUBB4B表达降低的同时聚谷氨酰化PolyE表达水平升高,且当CCP1表达量升高后在TUBB4B表达升高的同时聚谷氨酰化PolyE表达水平降低(图1K)。

2.2 TUBB4B敲减和过表达对初级精母细胞周期没有明显的影响

记录不同时段TUBB4B沉默与过表达阳性试验组与其阴性对照组的细胞CCK8荧光值即细胞数目,绘制相应的细胞生长曲线发现TUBB4B沉默和过表达后细胞的累计增长量无明显差别(图2A、B);通过流式细胞

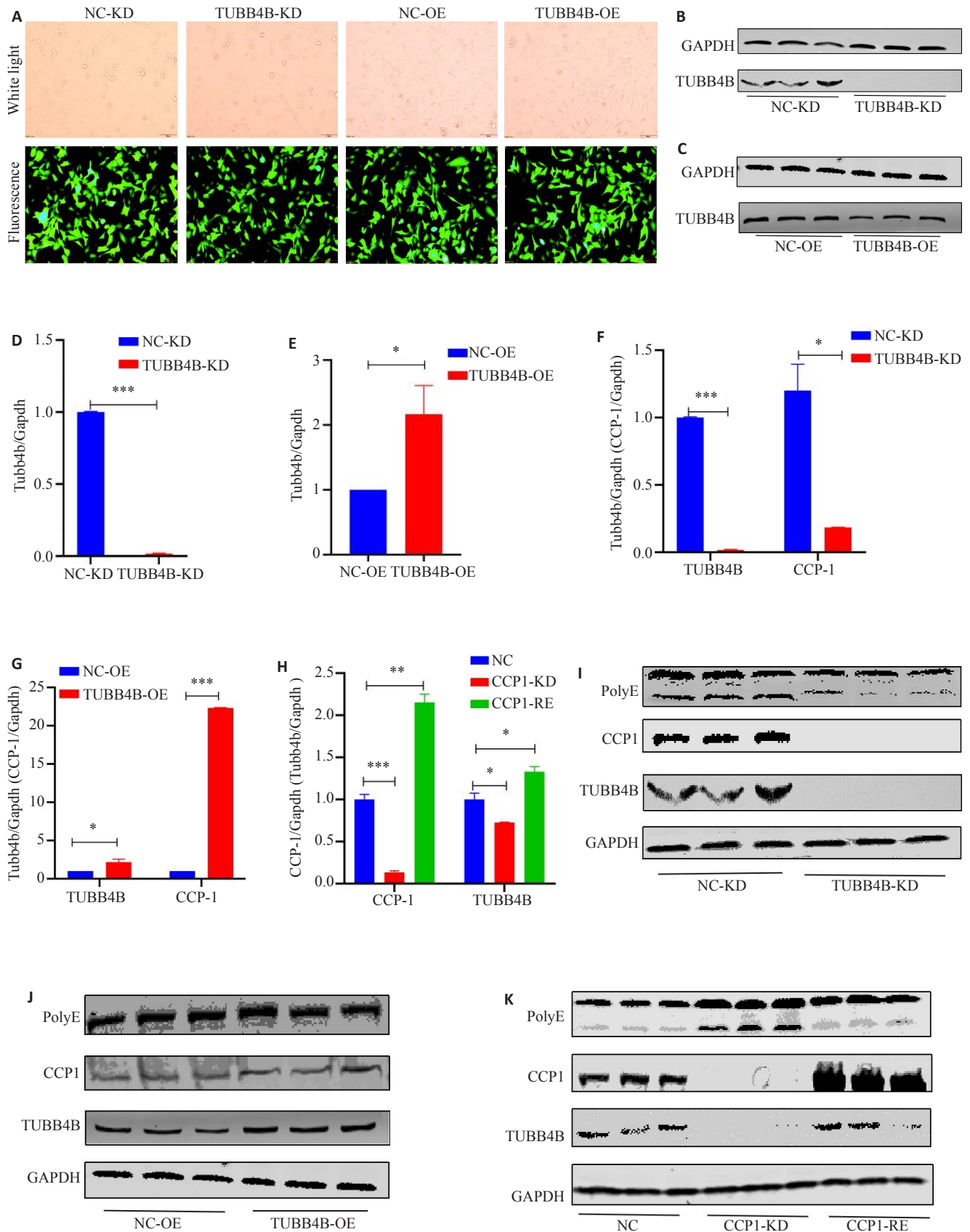


图1 检验构建的稳定细胞系并验证TUBB4B与CCP1之间的表达调控关系及相互作用

Fig.1 Examination of the constructed stable cell lines and verification of the regulatory relationship and interaction between TUBB4B and CCP1. A: Fluorescence microscopy of GC2 cells infected with lentivirus (Original magnification: $\times 40$). B, C: Western blotting results after TUBB4B silencing and overexpression. D, E: RT-qPCR results of TUBB4B mRNA expression after TUBB4B silencing and overexpression. F-K: Mutual regulatory relationship between TUBB4B and CCP1. I-K: CCP1-mediated polyglutamylated PolyE modification on TUBB4B. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$, $n = 3$.

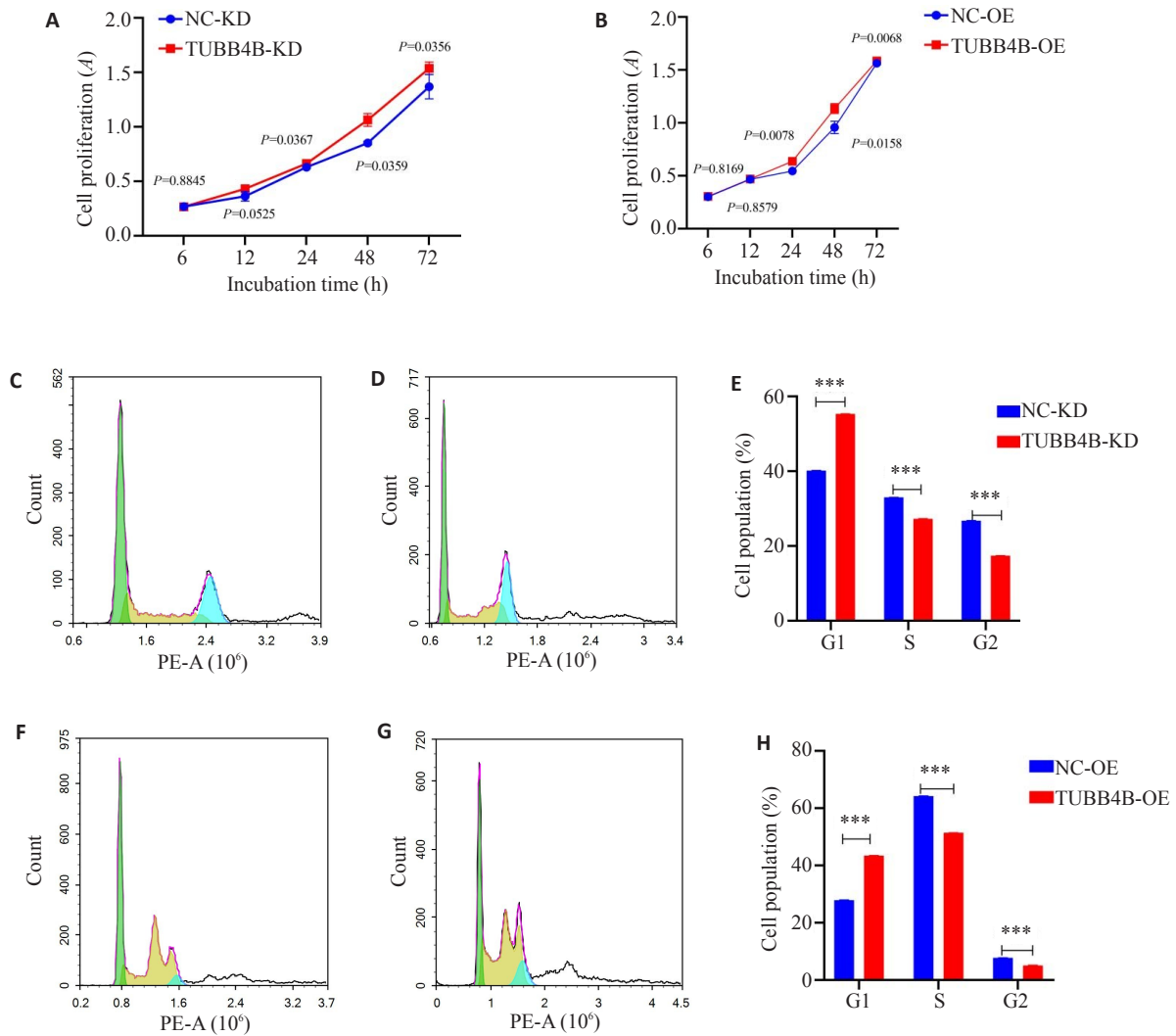


图2 探究 TUBB4B 沉默和过表达后其增殖与周期的改变

Fig.2 Changes in proliferation and cell cycle of GC2 cells with TUBB4B silencing and overexpression. **A, B:** Cell proliferation rate did not change significantly after TUBB4B silencing or overexpression. **C, D:** Flow cytometry for analyzing cell cycle in GC2 cells with TUBB4B silencing. **E:** Cell cycle analysis of the cells with TUBB4B silencing. **F, G:** Flow cytometry for analyzing cell cycle of GC2 cells with TUBB4B overexpression. **H:** Cell cycle analysis of GC2 cells with TUBB4B overexpression. *** $P < 0.0001$, $n = 3$.

术检测发现 TUBB4B 沉默与过表达后与其阴性对照做相比各细胞周期未出现明显的改变(图2 C~H)。

2.3 在初级精母细胞中 TUBB4B 调控 MAPK 信号通路与 NF- κ B 信号通路

Western blot 检测 TUBB4B 沉默后 NF- κ B 信号通路相关因子 p-p65 表达无明显改变, p65 表达明显降低(图 3A); MAPK 信号通路相关因子 ErK1/2, p38 表达无明显变化, 而 p-ErK1/2 表达明显升高; 当 TUBB4B 表达量升高后 p65, p-p65 明显升高, p-ErK1/2 明显降低, ErK1/2 与 p38 表达无明显改变(图 3B); 细胞免疫荧光检测 TUBB4B 表达量改变后发生变化的相应通路因子在细胞水平定位, 发现在核内与胞质均有表达(图 3D~F); CCP1 沉默和恢复表达后仅 ErK1/2 发生表达量相应的升高与降低(图 3C)。

3 讨论

微管作为细胞结构的基本骨架之一, 在细胞分裂、细胞器定位、细胞内运输和细胞迁移等基本细胞过程中起着关键作用^[14]。形成微管的主要蛋白为 α , β -微管蛋白, 大多数真核生物具有多种微管蛋白亚型, 但它们在细胞骨架中的作用机制尚不清楚, 需要进一步深入研究^[15]。已有研究报道微管蛋白的表达与化学结构的改变与多种疾病的病理生理状态密切相关^[1, 16-18]; 在精子发生中, 微管蛋白与精子运动, 获能、精子与卵子结合等方面具有重要作用^[4-7]; 正常条件下, 精子特征的 8 字形尾鞭结构和渐进式的运动方式, 会阻止精子与上皮细胞的结合, 而精子获能的过程中通常伴随着精子过度激活的运动模式的改变: 肌动蛋白聚合(CAPZB)和微管蛋白过度活化(TUBB4B, TUB1A), 这种改变为精子与卵

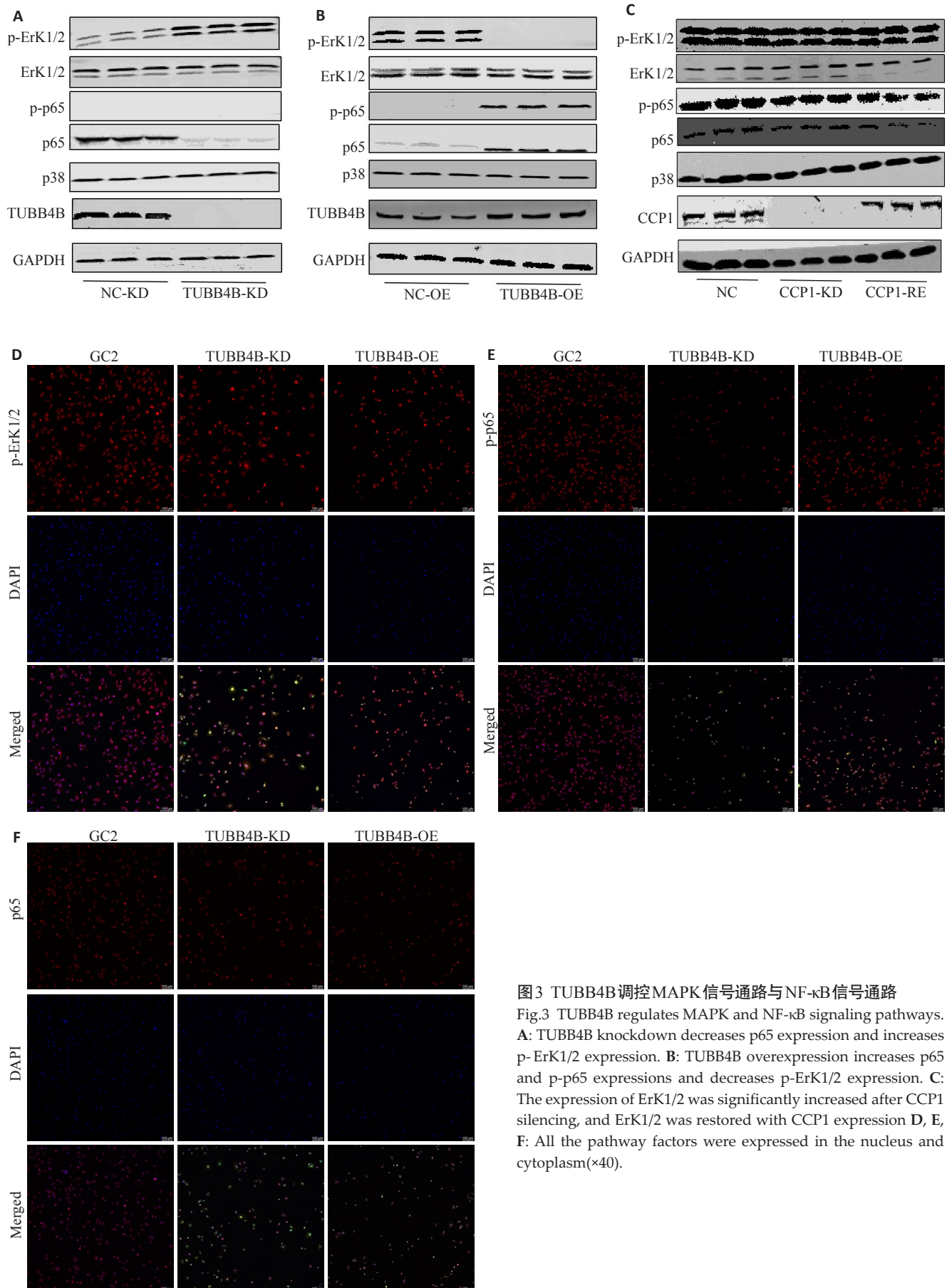


图3 TUBB4B调控MAPK信号通路与NF-κB信号通路

Fig.3 TUBB4B regulates MAPK and NF-κB signaling pathways. A: TUBB4B knockdown decreases p65 expression and increases p-Erk1/2 expression. B: TUBB4B overexpression increases p65 and p-p65 expressions and decreases p-Erk1/2 expression. C: The expression of Erk1/2 was significantly increased after CCP1 silencing, and Erk1/2 was restored with CCP1 expression. D, E, F: All the pathway factors were expressed in the nucleus and cytoplasm(×40).

子的结合提供了重要的条件^[19]。微管蛋白的表达以及其在不同类型细胞或者细胞发育阶段中发挥的作用可能不同。有最新研究发现,在精原细胞中TUBB4B的缺失会引起细胞增殖速率的减慢,细胞G1期明显阻滞,G1/0期细胞群体增加,S期细胞群体显著减少^[11]。精子发生是一个连续性多阶段的单向性的进程,精原细胞经历多次有丝分裂后一部分细胞进行定向分化成为初级精母细胞,生精过程中,初级精母细胞是开启减数分裂的关键,也是决定后续单倍体精子形成的重要细胞时段^[13,14]。TUBB4B在初级精母细胞中的关键作用还未有相关研究报道。在我们前期实验中发现TUBB4B在小鼠睾丸中广泛表达^[11],而本次研究结果显示TUBB4B在初级精母细胞GC-2中表达且该基因缺失后对细胞存活,形态及细胞增殖周期无明显影响。该结果与在精原细胞中的研究结果有所不同^[22]。提示TUBB4B在雄性生殖细胞不同发育进程中所发挥的功能不同。

CCP1作为生精过程中的重要因子,在生精细胞的多时期普遍表达,参与整个生精活动。CCP1缺失的浦肯野细胞变性小鼠精子数量减少且形态发育异常^[8]。研究发现该基因缺失会引起生精细胞发育阻滞在初级精母细胞的粗线期。TUBB4B作为潜在的CCP1作用底物^[20,21],提示二者在生精过程中具有重要作用。根据我们的研究发现,两者在初级精母细胞GC2中存在正向的相互表达调控关系,且CCP1对TUBB4B具有去谷氨酰化修饰作用。已有研究发现,在精子细胞中微管蛋白各亚型的谷氨酰化的翻译后修饰,与微管结构的稳定性相关;在黑腹果蝇大脑和睾丸中谷氨酰化的 α 和 β 微管蛋白大量表达,且在精子鞭毛中也存在大量的这种翻译后修饰现象^[22];TTL1介导的 α -微管蛋白聚谷氨酰化途径是精子成熟和运动所必需的,并且与男性生育能力密切相关^[23];以上结果说明了谷氨酰化对维持微管蛋白结构稳定具有重要作用^[24]。但在此次研究中CCP1对TUBB4B的表达和修饰虽然具有调控作用,但其表达和修饰的变化并未引起初级精母细胞增殖异常,因此其具体分子机制需要进一步探索。

已知NF- κ B和MAPK信号通路对于精子发生具有重要调控作用^[25-29],且有研究发现CCP1会影响NF- κ B信号通路关键蛋白的表达以及微管蛋白的谷氨酰胺化修饰从而引起浦肯野细胞发育异常^[8,21,30]。TUBB4B的缺失在精原细胞中会引起增殖的抑制以及细胞周期的阻滞现象。但在本研究中TUBB4B的敲减并未引起初级精母细胞GC2增殖与周期的改变。为了探究这一现象发生的分子机制,我们对NF- κ B和MAPK信号通路的关键因子进行检验,结果发现在GC2细胞中,TUBB4B的敲减会引起p53表达量的明显降低,抑制NF- κ B信号

通路;反之P-Erk1/2表达明显升高,MAPK信号通路被激活。NF- κ B信号通路与MAPK信号通路的相互代偿作用可能是TUBB4B敲减后初级精母细胞增殖分裂未受影响的关键。

综上所述,在初级精母细胞GC-2细胞中TUBB4B与CCP1表达相互调控,且CCP1对TUBB4B具有去谷氨酰化修饰作用,TUBB4B调控NF- κ B和MAPK信号通路,在生精过程中尤其是初级精母细胞阶段具有重要作用。

参考文献:

- [1] Dharmapal D, Jyothy A, Mohan A, et al. β -tubulin isotype, TUBB4B, regulates the maintenance of cancer stem cells [J]. *Front Oncol*, 2021, 11(3): 788024.
- [2] Manka SW, Moores CA. The role of tubulin-tubulin lattice contacts in the mechanism of microtubule dynamic instability [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(7): 607-15.
- [3] Lin ZW, Gasic I, Chandrasekaran V, et al. TTC5 mediates autoregulation of tubulin via mRNA degradation [J]. *Science*, 2020, 367(6473): 100-4.
- [4] Dunleavy JEM, O'Bryan MK, Stanton PG, et al. The cytoskeleton in spermatogenesis [J]. *Reproduction*, 2019, 157(2): R53-72.
- [5] Daojun, Tang. Cytological features of spermatogenesis in *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) [J]. *Animal Reprod Sci*, 2020, 222(10): 106608.
- [6] Fujii Y, Fujita H, Yokota S. Synthesis of β -tubulin occurs within chromatoid body of round spermatids [J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2017, 74(5): 197-204.
- [7] Mostek A, Janta A, Majewska A, et al. Bull sperm capacitation is accompanied by redox modifications of proteins [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7903.
- [8] Li JX, Snyder EY, Tang FH, et al. Nna1 gene deficiency triggers Purkinje neuron death by tubulin hyperglutamylation and ER dysfunction [J]. *JCI Insight*, 2020, 5(19): e136078.
- [9] Zhou L, Konno K, Yamazaki M, et al. Nna1, essential for Purkinje cell survival, is also associated with emotion and memory [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12961.
- [10] 李文秀. CCP1 互作蛋白 TUBB4B 在小鼠睾丸发育中分子机制的初步研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2020.
- [11] Feng MY, Wang K, Fu SY, et al. Tubulin TUBB4B is involved in spermatogonia proliferation and cell cycle processes [J]. *Genes*, 2022, 13(6): 1082.
- [12] Du L, Chen W, Cheng ZX, et al. Novel gene regulation in normal and abnormal spermatogenesis [J]. *Cells*, 2021, 10(3): 666.
- [13] Staub C, Johnson L. Review: spermatogenesis in the bull [J]. *Animal*, 2018, 12(s1): s27-35.
- [14] Sulimenko V, Draberova E, Draber P. gamma-Tubulin in microtubule nucleation and beyond [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10(2): 880761.
- [15] Nsamba ET, Gupta ML. Tubulin isotypes-functional insights from model organisms [J]. *J Cell Sci*, 2022, 135(9): jcs259539.
- [16] Sobierajska K, Ciszewski WM, Wawro ME, et al. TUBB4B downregulation is critical for increasing migration of metastatic colon cancer cells [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 810.

- [17] Furihata C, You XY, Toyoda T, et al. Using FFPE RNA-Seq with 12 marker genes to evaluate genotoxic and non-genotoxic rat hepatocarcinogens[J]. *Genes Environ*, 2020, 42(5): 15.
- [18] Chie, Furihata. Evaluation of 12 mouse marker genes in rat toxicogenomics public data, Open TG-GATEs: discrimination of genotoxic from non-genotoxic hepatocarcinogens [J]. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*, 2019, 838(6): 9-15.
- [19] Suarez SS, Pacey AA. Sperm transport in the female reproductive tract[J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(1): 23-37.
- [20] Berezniuk I, Vu HT, Lyons PJ, et al. Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing α - and β -tubulin[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(9): 6503-17.
- [21] Magiera MM, Bodakuntla S, Žiak J, et al. Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport[J]. *EMBO J*, 2018, 37(23): e100440.
- [22] Yves, Bobinac, et al. Microtubule polyglutamylation in *Drosophila melanogaster* brain and testis[J]. *Eur J Cell Biol*, 1999, 78(9): 671-4.
- [23] Geun-Shik, Lee. Disruption of Ttl15/stamp gene (tubulin tyrosine ligase-like protein 5/SRC-1 and TIF2-associated modulatory protein gene) in male mice causes sperm malformation and infertility[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(21): 15167-80.
- [24] Bodakuntla S, Yuan XD, Genova M, et al. Distinct roles of α - and β -tubulin polyglutamylation in controlling axonal transport and in neurodegeneration[J]. *EMBO J*, 2022, 41(11): 231-9.
- [25] Zhang K, Guo JH, Zhu Y, et al. Zhibai Dihuang pill alleviates *Ureaplasma urealyticum*-induced spermatogenic failure and testicular dysfunction via MAPK signaling pathway [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 7174399.
- [26] Li SD, Wang QM, Yu H, et al. Polystyrene microplastics induce blood-testis barrier disruption regulated by the MAPK-Nrf2 signaling pathway in rats[J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2021, 28(35): 47921-31.
- [27] Cheng LX, Yi X, Shi Y, et al. Abnormal lipid metabolism induced apoptosis of spermatogenic cells by increasing testicular HSP60 protein expression[J]. *Andrologia*, 2020, 52(11): e13781.
- [28] Saki J, Sabaghan M, Arjmand R, et al. Curcumin as an indirect methylation inhibitor modulates the effects of *Toxoplasma gondii* on genes involved in male fertility[J]. *EXCLI J*, 2020, 19(8): 1196-207.
- [29] Adelakun SA, Ukwenya VO, Akintunde OW. Vitamin B12 ameliorate Tramadol-induced oxidative stress, endocrine imbalance, apoptosis and NO/iNOS/NF- κ B expression in Sprague Dawley rats through regulatory mechanism in the pituitary-gonadal axis [J]. *Tissue Cell*, 2022, 74: 101697.
- [30] Li JX, Gu XS, Ma YH, et al. Nna1 mediates Purkinje cell dendritic development *via* lysyl oxidase propeptide and NF- κ B signaling [J]. *Neuron*, 2010, 68(1): 45-60.

(编辑:孙昌朋)