



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目：基于睾丸组织共培养体系的 Ddit3-Trib3-Akt 信号通路与大鼠精子发生相关性的研究

作者：李妍，刘珊珊，高林，孔令怡，云霞，刘陶迪，张岩

收稿日期：2025-09-23

网络首发日期：2025-11-05

引用格式：李妍，刘珊珊，高林，孔令怡，云霞，刘陶迪，张岩．基于睾丸组织共培养体系的 Ddit3-Trib3-Akt 信号通路与大鼠精子发生相关性的研究[J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20251105.1012.006>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于睾丸组织共培养体系的 Ddit3-Trib3-Akt 信号通路与大鼠精子发生相关性的研究

李妍^{1,2}, 刘珊珊¹, 高林¹, 孔令怡¹, 云霞¹, 刘陶迪¹, 张岩¹

(¹ 内蒙古医科大学医学神经生物学实验室, 呼和浩特 011011; ² 内蒙古乌兰察布市中心医院检验医学科, 乌兰察布 012000)

摘要 目的 通过构建睾丸体外共培养体系来验证 Ddit3-Trib3-Akt 信号通路与大鼠精子发生相关。**方法** 取 20 ~ 25 日龄雄性大鼠摘取睾丸组织块置于体外培养体系中, 每隔 2 ~ 3 d 更换 1 次培养液。利用 PCR 验证各级生精细胞的标记基因。利用 RNA 干扰技术验证信号通路 Ddit3-Trib3-Akt 与大鼠精子发生的相关性。**结果** 该共培养体系可在体外连续培养超过 2.5 月, PCR 结果显示精原细胞、精母细胞和精子细胞特异标记基因均有表达。利用 RNA 干扰技术, 分别抑制 Ddit3 和 Trib3 后, Trib3 和 Akt 基因的 RNA 和蛋白表达变化证明 Ddit3-Trib3-Akt 信号通路在大鼠精子发生中存在。**结论** 该培养体系能够短暂维持干细胞的增殖和分化, 在简单的体系上同时实现了维持与稳定的精子发生。Ddit3-Trib3-Akt 信号通路的成功验证也证实该培养体系可用于体外研究精子发生的可能分子机制。

关键词 组织共培养体系; 精子发生; Ddit3-Trib3-Akt 信号通路; 大鼠; RNA 干扰

中图分类号 Q 2-33

文献标志码 A

Research on the correlation between Ddit3-Trib3-Akt signaling pathway and spermatogenesis in rats based on the testicular tissue Co-culture System

Li Yan^{1,2}, Liu Shanshan¹, Gao Lin¹, Kong Lingyi¹, Yun Xia¹, Liu Taodi^{1*}, Zhang Yan^{1*}

(¹Laboratory of Medical Neurobiology, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 011011; ² Dept of Laboratory Medicine, Ulanqab Central Hospital, Ulanqab 012000)

Abstract Objective To verify the association between the Ddit3-Trib3-Akt signaling pathway and rat spermatogenesis by constructing an in vitro co-culture system of testis. **Methods** Testicular tissue blocks from 20 ~ 25-day-old male rats were placed in an in vitro culture system, and the

2025-09-23 接收

基金项目: 内蒙古自然科学基金面上项目(编号: 2022LHMS03002、2024MS08083); 内蒙古医科大学重点项目(编号: YKD2022ZD012); 内蒙古医科大学面上项目(编号: YKD2024MS001)

作者简介: 李妍, 女, 硕士研究生

刘陶迪, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: taodiliu@163.com

张岩, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: 15848165885@163.com

culture medium was replaced every 2 to 3 days. PCR was used to verify the expression of marker genes of various spermatogenic cells. RNA interference technology was employed to verify the correlation between the Ddit3-Trib3-Akt signaling pathway and rat spermatogenesis. **Results** The co-culture system could be continuously cultured for more than 2.5 months *in vitro*. RT-PCR showed that specific marker genes of spermatogonia, spermatocyte and spermatoblast were expressed. The RNA and protein expression of Trib3 and Akt changed after the knocking down of Ddit3 and Trib3, respectively. It demonstrated the existence of Ddit3-Trib3-Akt signaling pathway in rat spermatogenesis. **Conclusion** The culture time of more than 2.5 months indicates that the culture system can temporarily maintain the proliferation and differentiation of stem cells, and simultaneously maintain and stabilize spermatogenesis in a simple system. The successful validation of the Ddit3-Trib3-Akt signaling pathway also confirms that this culture system can be used to study possible molecular mechanisms of spermatogenesis *in vitro*.

Key words tissue co-culture system; spermatogenesis; Ddit3-Trib3-Akt signaling pathway; rat; RNA interference

Fund programs Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (Nos.2022LHMS03002, 2024MS08083); Key Project of Inner Mongolia Medical University (NO. YKD2022ZD012); General Project of Inner Mongolia Medical University (NO. YKD2024MS001)

Corresponding authors Liu Taodi, E-mail: taodiliu@163.com; Zhang Yan, E-mail: 15848165885@163.com

随着世界经济文化的不断提升,在全世界范围内越来越多的人群遭受着不孕不育症的影响。据统计,约 8%~12%的育龄夫妇存在不孕不育问题,其中一半的不育是由男性因素造成^[1]。精子发生是一个复杂的过程,受到多种机制的调控,对男性生殖至关重要^[2]。生精潜能的维持需要在精原干细胞的更新和分化之间取得适当的平衡,这种严密而高效的调控才能持续不断的产生精子,然而其中具体的机制尚不完全清楚^[3]。若能在体外建立一套完整的精子发生培养体系,对深入了解精子发生机制和男性精子发生障碍性不育的治疗均有重要意义。课题组前期通过免疫共沉淀和 RNA 干扰实验证实 Tribbles 假激酶-3 (Tribbles pseudokinase-3, Trib3) 与 Akt 在大鼠睾丸细胞间存在相互作用关系, RNA 干扰抑制 Trib3 可升高 Akt 蛋白磷酸化,从而激活 Akt-mTOR 信号通路^[4]。该研究在大鼠睾丸曲细精管组

组织共培养体系中利用 RNA 干扰的方式探讨 Ddit3-Trib3-Akt 信号通路在精子发生中的相关性,并证实体外共培养体系能够简单模拟曲细精管内复杂有序的生理生化条件,让体外研究精子发生的分子机制成为可能。该培养体系的建立也为阐明精子发生相关的分子机制和开发新的男性不育症诊断和治疗技术提供体外模型和思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar-Imamichi 大鼠由内蒙古医科大学动物中心提供,20 ~ 25 d 雄性大鼠(出生当日定为第 1 天)。动物实验符合内蒙古医科大学伦理委员会的规定并被授权(伦理委员会批号:YKD202401196)。所有实验大鼠均饲养于 SPF 环境中,光照时间为 6:00~18:00(明/暗循环 12 h),温度为 $(22 \pm 3)^\circ\text{C}$,所有动物可自由饮食与活动。

1.2 主要试剂

DMEM/ F12 培养, Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E, β -巯基乙醇, Penicillin- Streptomycin 均购自美国 GIBCO 公司。胎牛血清(fatal bovin serum, FBS)购自天津 TBD 公司。总 RNA 提取试剂盒,及 RNase-Free ddH₂O, 10 μm oligo-dt, 5 $\times$ RT-M-MlV Buffer, dNTPs(10 mmol/L), RRI(10 U), RT-M-Mlv, SYBR Prelnix Ex TaqTM 试剂盒均购自大连宝生物公司。兔抗大鼠 DDIT3 单克隆抗体、兔抗 TRIB3 单克隆抗体、兔抗大鼠 AKT 单克隆抗体、鼠抗 GAPDH 单克隆抗体、辣根酶标记羊抗兔 IgG、辣根酶标记羊抗鼠 IgG 均购自 Abcam(USA)公司。其他生化试剂均购自上海生工生物公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

20 ~ 25 日龄大鼠颈椎脱臼法处死,无菌条件下取双侧睾丸,去除白膜和血管,睾丸组织剪成大约 2 mm 的小块,放置 10 块左右到含有培养液的 60 mm 培养皿中。在添加 Penicillin-Streptomycin、Vitamin A、Vitamin C、Vitamin E、 β -巯基乙醇和 10%FBS 的 DMEM-F12 培养液中,37 $^\circ\text{C}$ 、5%CO₂、饱和湿度的恒温培养箱中培养,隔 1 d 换液 1 次。换液时动作轻缓,避免将组织块和细胞冲起。

1.3.2 细胞形态观察

每隔 2 ~ 3 d 显微镜下对细胞的生长进行观察和拍照记录。培养体系中的各种细胞的鉴定标准根据以往文献报道整理如下:培养体系中的细胞分为贴壁细胞和上层细胞。贴壁细胞一般为曲细精管中的体细胞,能够分泌黏附因子贴壁生长,细胞体积较生殖细胞大,多为梭形或椭圆形,在培养过程中可以一直生长,直到铺满整个培养皿底部。上层细胞为各级生精

细胞, 圆形, 直径 12 ~ 14 μm 圆形的细胞为精原干细胞, 无附器; 大于 16 μm 为精母细胞, 有附器; 圆形精子细胞直径小于 10 μm 。

1.3.3 RT-PCR 与 RT-qPCR

培养 30 d 各级生精细胞爆发后 72 h 收集细胞提取总 RNA (天根, DP419), 以 1.0 μg RNA 为模板反转录合成 cDNA 第一条链。以 cDNA 为模板 PCR 检测各级生精细胞的标记基因是否有表达, 具体 PCR 反应条件见表 1。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应结果。经琼脂糖凝胶电泳法鉴定后进行 RT-qPCR, 以 cDNA 为模板分别对部分 *ddit3* 片段、*trib3* 片段、*akt* 片段进行 RT-qPCR 扩增。根据 SYBR Prelnix Ex Taq™ 试剂盒说明书设定 20 μL 体系, SYBR Prelnix Ex Taq II 10 μL , cDNA 1 μL , 上下游引物各 0.8 μL , ddH₂O 7 μL 。设定条件: 预变性, 95.0 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 变性, 95.0 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; 退火延伸, 60.0 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 进行 35 个循环。采用 Ct 法分析各基因 mRNA 的表达量, 结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达倍数, 数据及图表用 GraphPad Prism7 分析。各基因引物序列见表 2。

1.3.4 RNA 干扰

由江苏吉玛公司购买合成的 DDIT3, Trib3 siRNA, 序列为: ① DDIT3 siRNA 5'-AGCCAUAGAACUCUGACUGTT-3'; ② Trib3 siRNA 5'-AUAGGUGCAGUUGCCUUGCTT-3'。待共培养细胞浓度达到 70% ~ 90%时, 利用 LipofectaMine™ 3000 试剂盒进行转染: 取 125 μL Opti-MEM™培养基与 7.5 μL LipofectaMine™ 3000 试剂缓慢混合, 静置 5 min, 再取 125 μL Opti-MEM™培养基与 5 μL siRNA 缓慢混合, 静置 5 min。然后将用 Opti-MEM™培养基稀释好的 LipofectaMine™ 3000 加入稀释好的 siRNA 中, 轻轻吹打混匀配制成 siRNA-脂质体混合物, 室温静置 15 min。在此期间, 配不含抗生素的工作液给细胞换液, 然后将 siRNA-脂质体混合物逐滴加入细胞中, 轻晃混匀。48 h 后提蛋白做 Western blot 验证转染后目的蛋白的敲除效率, 或提 RNA 后做 Real-time qPCR 验证转染后目的基因的抑制效率。

表 1 *Id4*, *Plzf*, *C-kit*, *Sycp3*, 及 *Tnp2* 基因的 RT-PCR 引物序列
Tab.1 RT-PCR primer sequences of *Id4*, *Plzf*, *C-kit*, *Sycp3*, and *Tnp2* genes

Primer name	Primer sequence	length (bp)	PCR reaction conditions
<i>Id4</i>	F:5'ACCATCCCGCCCAACAAGAAAG 3'	236	94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,
	R:5'CATGTTCTGTACTGTTCATCCCA 3'		55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min

Plzf	F:5' CGTGGAGCAGCACAGGAAGC 3' R:5' CAGCCATGTCCGTGCCAGTATG 3'	215	94°C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 72 °C 5 min
C-kit	F:5' GACGGGCAGATGTATGTAGCAAGAC3' R:5' CTCGTTCTCAGCATGACCAGACTTC 3'	130	94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 72 °C 5 min
Sycp3	F:5' GCCCAGTGAGTAAAGGTGCC 3' R:5' AGGGAACCTATGTGGAGGGC 3'	122	94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 72 °C 5 min
Tnp2	F:5' AGGAGATAGCCATCACTAGGGG 3' R:5' CATGTTCTGTACTGTCATCCCA 3'	50	94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 72 °C 5 min

表 2 Ddit3, Trib3, Akt, Gapdh 基因的 qPCR 引物序列
Tab.2 qPCR primer sequences of Ddit3, Trib3, Akt, Gapdh genes

Primer name	Upstream sequence (5'→3')	Downstream sequence (5'→3')
Ddit3	GTCACAAGCACCTCCCAAAGCC	CGCACTGACCACTCTGTTTCCG
Trib3	GTCGATTTGTCTTCAGCAACTG	CTGAGTATCTCTGGTCCCACAT
Akt	CAGGAGGAGGAGACGATGGACTTC	CACACGGTGCTTGGGCTTGG
Gapdh	TGCTGAGTATGTCGTGGAGT	AGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT

1.3.5 蛋白质印迹法 (Western blot, WB) 验证干扰效率

转染 48 h 后收集细胞利用凯基全蛋白试剂盒 (KeyGEN BioTECH, KGP2100) 提取总蛋白, 通过 WB 验证目的蛋白的敲除效率, 同时提取总 RNA 利用 RT-qPCR 做双重验证。剪下 PVDF 膜上的 Ddit3、Trib3、AKT 蛋白条带、内参 Gapdh 蛋白条带, 将目的条带浸入含有相应抗体的一抗稀释液中, Ddit3 抗体 (1:200), Trib3 抗体 (1:500), AKT 抗体 (1:1000), Gapdh 抗体 (1:5000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。将目的条带浸入含有相应二抗的二抗稀释液中, 羊抗兔 IgG (1:5000), 羊抗鼠 IgG (1:5000), 避光室温慢摇孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。ECL 法显色。

1.4 统计学处理

应用 GraphPad Prism7 软件进行统计学分析, 绘图, 组间比较采用 *T* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养体系中细胞形态的观察

培养初期，观察到体细胞率先从曲细精管中游出并贴壁生长，增殖中的体细胞逐渐拉长细胞体，出现伪足使得细胞呈星状、梭状等不规则细胞体（图 1A），大约 1 ~ 2 周的时间，体细胞逐渐占据整个培养皿底，形成单层滋养细胞层。生殖细胞较体细胞生长缓慢，随着体细胞的增殖，生殖细胞单个、成对或成团分散在体细胞滋养层表面（图 1A），细胞呈圆形，直径 5 ~ 20 μm 。

经过一段时间的培养，大约在共培养的第 30 天时，会井喷式出现大量的生精细胞（图 1B），其中绝大多数为体积较小的圆形精子细胞，之后随着培养时间的延续生精细胞数量逐渐减少。大约 3 ~ 4 周后又会出现一波井喷式生精细胞，如此反复，类似精子发生规律。在培养过程中，同一发育阶段的生精细胞聚集在一起，形成克隆群（如图 1C）。许多精母细胞和精子细胞在体外培养体系中也是以单个细胞存在的，这可能是由于不断更换培养液使得细胞质桥被破坏造成的。在该培养体系中还观察到长有鞭毛的精子细胞（图 1D），但是只有极少数，绝大部分圆形精子细胞都已凋亡，并随着陈旧的培养液离开培养体系。

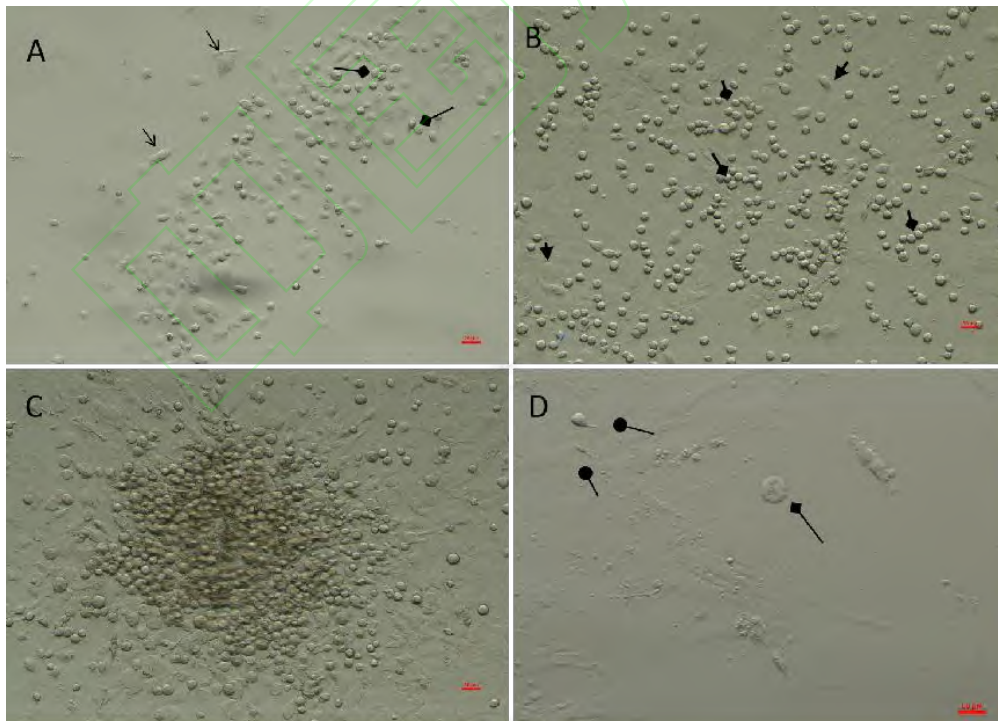


图 1 大鼠睾丸共培养体系中细胞形态的观察

Fig. 1 Observation of cell morphology in rat testicular co-culture system

注：A: Primary spermatogenic cells (indicated by diamond arrows) and somatic cells (indicated by

triangular arrows) freshly isolated from the seminiferous tubule tissue; B: A large number of spermatogenic cells emerged explosively, with diamond arrows indicating round spermatids with a diameter $< 10\ \mu\text{m}$ and triangular arrows indicating adherent somatic cells; C: The phenomenon that spermatogenic cells at the same developmental stage aggregating together was observed in the culture system; D: Flagellated sperm cells (indicated by circular arrows) and round spermatids (indicated by diamond arrows) observed in the culture system; Scale bar: $50\ \mu\text{m}$.

2.2 培养体系中各级生精细胞的鉴定

培养 30 d, 各级生精细胞爆发后 72 h 提取培养体系中细胞总 RNA, 应用 RT-PCR 检测各级生精细胞的标记基因。结果显示, 与睾丸组织来源的 cDNA 相比, 共培养体系中的 *plzf*, *c-kit* 基因表达较弱 (3 次重复实验中, 只有 1 次有微弱的表达), *id4*、*sycp3*、*tp2* 在该培养体系中均有表达 (图 2)。由于各级生精细胞属于终末分化细胞, 不可自我增殖, 说明该体系中一直有精子发生, 并能够从精原细胞持续分化产生精子细胞, 但是不能完成精子形成, 所以没有成熟的精子产生。

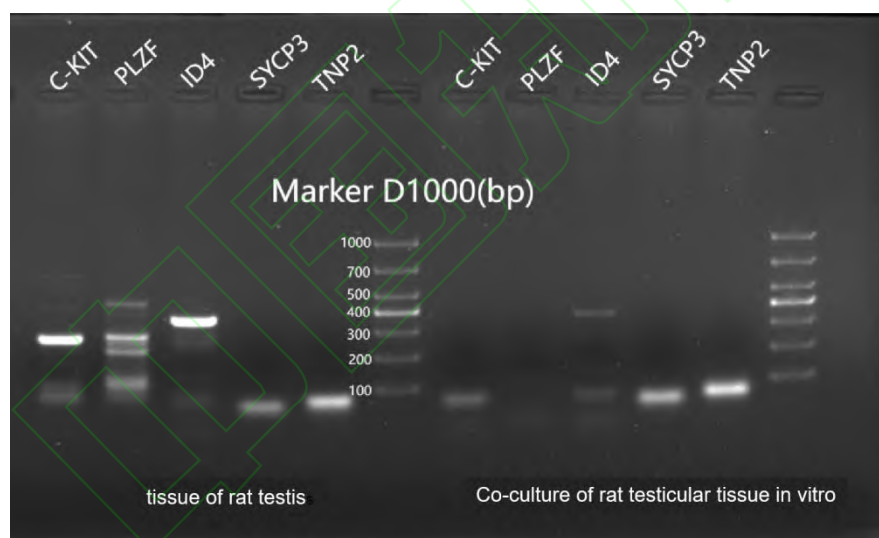


图 2 RT-PCR 检测 *Id4*、*Sycp3*、*Tp2*、*Plzf*、*C-kit* 基因的表达

Fig.2 Expression of *Id4*、*Sycp3*、*Tp2*、*Plzf* and *C-kit* genes detected by RT-PCR

2.3 RT-PCR 和 WB 检验 *Ddit3* 和 *Trib3* 的抑制效果

Ddit3 siRNA、无效转染片段 (阴性对照, NC) 和 *Trib3* siRNA、无效转染片段 (阴性对照, NC) 转染到共培养细胞体系中, 48h 后 WB 和 RT-PCR 检测转染效率见图 3。如图 3A 所示, 与 Control 组比较, 转染组 *ddit3* 基因 mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.0001$); 与 Control 组比较, NC 组 *ddit3* 基因 mRNA 表达量几乎没有差异 ($P > 0.05$)。如图 3B、C 所示, 与 Control 组比较, NC 组 *ddit3* 表达量无明显差异 ($P > 0.05$), 与 Control 组比较, 转

染组 *ddit3* 蛋白表达量降低 ($P<0.0001$)。RT-qPCR 结果和 WB 结果一致, 表明 *ddit3* siRNA 转染成功。

如图 3D 所示, 与 Control 组比较, 转染组 *trib3* 基因 mRNA 表达量明显降低 ($P=0.0013$); 与 Control 组比较, NC 组 *Trib3* 基因 mRNA 表达量几乎没有差异 ($P>0.05$)。如图 3D 和 3F 所示, 与 Control 组比较, NC 组 *Trib3* 表达量无明显差异 ($P>0.05$), 与 Control 组比较, 转染组 *Trib3* 蛋白表达量降低 ($P<0.0001$)。RT-qPCR 结果和 WB 结果一致, 共同表明 *trib3* siRNA 转染成功。

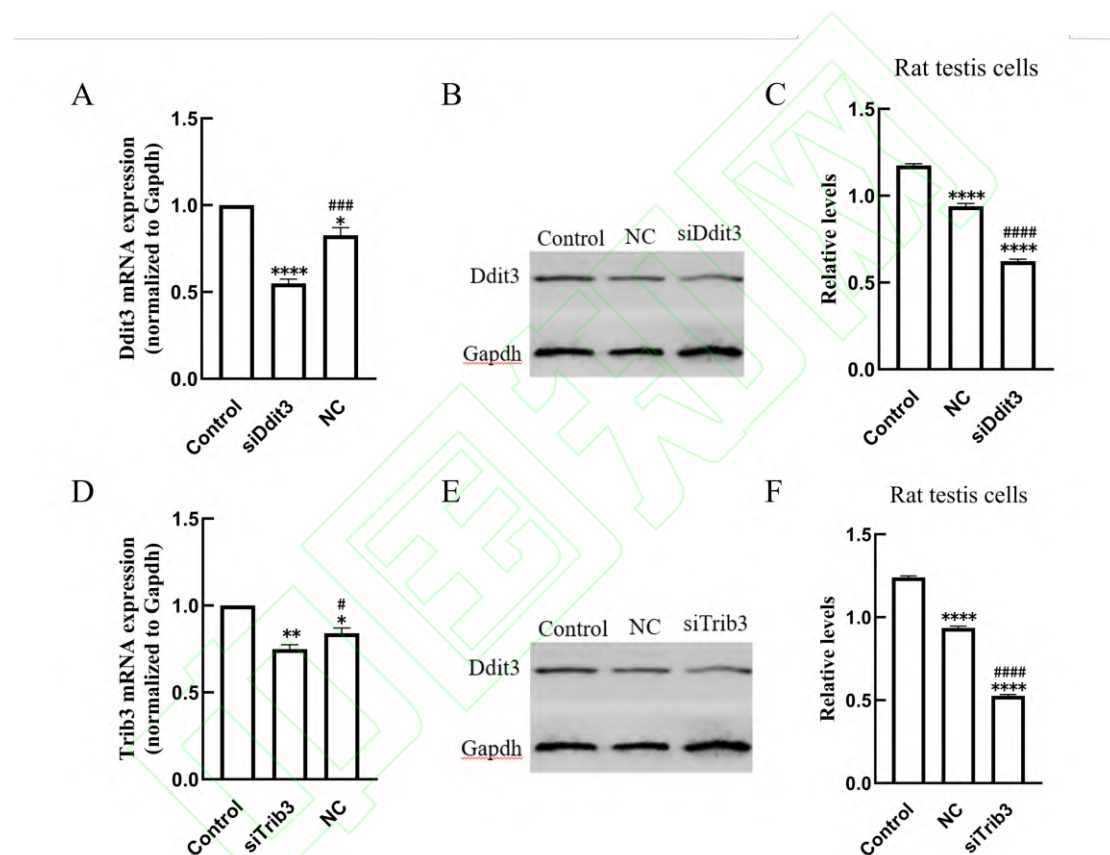


图3 Real-time PCR 和 Western blot 检验 Ddit3 和 Trib3 的抑制效果

Fig.3 The knock-down effects of Ddit3 and Trib3 were tested by Real-time PCR and Western blot

注: A: The relative expression level of *ddit3* mRNA in the rat testicular co-culture system; B: Western blot grayscale band map of Ddit3 protein; C: The relative expression level of Ddit3 protein; D: The relative expression level of *trib3* mRNA in the rat testicular co-culture system; E: Western blot grayscale band map of Trib3 protein; F: The relative protein expression level of Trib3; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ vs Control group; # $P<0.05$, ### $P<0.01$, #### $P<0.0001$ vs NC group.

2.4 分别抑制 Ddit3 和 Trib3 后 trib3、Akt 基因转录水平和蛋白表达情况的检测

将 *ddit3* siRNA 转染到共培养细胞中, Real-time qPCR 检测 *trib3*、*Akt* 基因的 mRNA 表达水平, 以未做处理的总 RNA 为 Control 组, 结果如图 4。抑制 *ddit3* 后, *trib3* 的转录表达水平降低 ($P=0.0020$), *Akt* 的转录表达水平上升 ($P=0.0004$) (图 4 A)。WB 检测 Trib3、Akt 的蛋白表达水平, 以未做处理的总蛋白为 Control 组, 结果显示, 抑制 *Ddit3* 后, Trib3 的蛋白表达水平降低 ($P=0.0005$) (图 4 B、C), *Akt* 的蛋白表达水平上升 ($P=0.0488$) (图 4 E、F)。WB 结果和 RT-qPCR 结果一致, 表明 Ddit3 在信号通路中位于 Trib3、Akt 的上游。

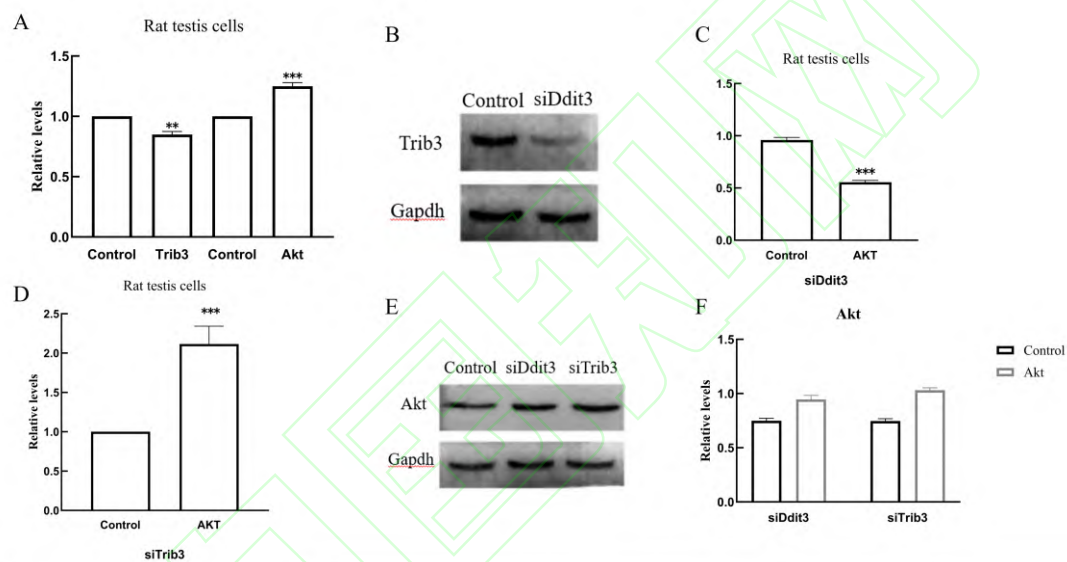


图 4 分别抑制 *ddit3* 和 *trib3* 后 Trib3 和 Akt mRNA 和蛋白的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of Trib3 and Akt mRNA and protein after *ddit3* and *trib3* knockdown, respectively

注: A: The relative expression levels of *trib3* and *Akt* mRNA in rat testicular cells after *ddit3* inhibition; B: Western blot grayscale band map of Trib3 in rat testicular cells after *Ddit3* inhibition; C: The relative expression level of Trib3 protein in rat testicular cells after the inhibition of *ddit3*; D: The relative expression level of *Akt* mRNA in rat testicular cells after the inhibition of *trib3*; E: Western blot grayscale band images of Akt in rat testicular cells after the inhibition of *ddit3* and *trib3*, respectively; F: The relative expression levels of Akt protein in rat testicular cells after the inhibition of *Ddit3* and *Trib3*, respectively; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$ vs Control group.

将 *trib3* siRNA 转染到共培养细胞中, Real-time qPCR 检测 *akt* 基因的转录表达水平,

以未做处理的总 RNA 为 Control 组, 结果如图 4。抑制 *trib3* 后, *Akt* 的转录表达水平上升 ($P<0.05$, $P=0.0009$) (图 4 D)。将 *trib3* siRNA 转染到共培养细胞中, Western blot 检测 *Akt* 的蛋白表达水平, 以未做处理的总蛋白为 Control 组, 抑制 *trib3* 后, *Akt* 的蛋白表达水平上升 ($P<0.05$, $P=0.0038$) (图 4 E, F)。Western blot 结果和 Real-time qPCR 结果一致, 表明 Trib3 在信号通路中位于 *Akt* 的上游。

3 讨论

体外精子发生的研究可以追溯到大约一个世纪前。1937 年, Martinovitch^[5]首次将新生小鼠的睾丸组织置于凝胶块上, 精子发生一直持续到减数分裂的粗线期。组织培养法是将睾丸组织碎片利用多种方法进行体外培养来完成体外精子发生。它最大的优势在于, 用于培养的组织能够给予生殖细胞及体细胞的特定的空间排列, 短时间内最大限度地模拟曲细精管内的微环境^[6]。2011 年, Sato et al^[7]将新生小鼠的睾丸组织碎片在体外培养基中进行组织培养, 并维持了 2 个多月, 采集培养体系中产生精细胞和精子通过显微受精产生了健康和生殖能力强的后代。以上的研究证明, 在体内没有循环系统的器官培养条件下, 可以支持小鼠的完整精子发生。本研究也得到了类似的结果, 在体外共培养体系中, 睾丸体细胞贴壁生长为滋养层, 之后陆续出现各级生精细胞, 并表现出时间间隔性, 生精细胞有规律的一波一波发生, 整个培养过程大约可持续 2.5 月。RT-PCR 结果也证实, 在该共培养体系中精原干细胞的标记基因 *id4*^[8]、精母细胞的标记基因 *sycp3*^[9]、精子细胞的标记基因 *tp2*^[10]在该培养体系中均有表达, 成功在体外构建了精子发生体系。但是在该体系中 *plzf* 和 *c-kit* 基因与睾丸组织相比表达极其微弱几乎没有, 主要是由于该体系中的精原祖细胞和分化型的精原细胞数量比较少。但是可以检测到较强的 *id4* 基因, 说明该体系中是有精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs), 并且可以维持精子发生。

Trib3 (Tribbles homolog 3) 是假性激酶 Tribbles 蛋白家族成员之一, 通过与转录因子、蛋白激酶、泛素连接酶等形成蛋白-蛋白相互作用参与一系列细胞内信号传导过程^[11]。已报道的作用模式包括阻断其结合伙伴的活性, 作为接头/支架蛋白的功能, 以及改变相互作用蛋白的亚细胞定位^[12]。Trib3 既是 DNA 损伤诱导转录本 3 (DNA damage inducible transcript 3, Ddit3) 的靶标分子, 同时也作为 Ddit3 的调节因子存在, Ddit3 信号通路通过 Trib3 介导的负反馈机制受到严格的调控^[13]。从生理学意义来看, Trib3 可能充当内质网应激诱导凋亡的传感器——当内质网应激短暂且轻微时, 诱导产生的 Trib3 会通过结合 Ddit3 和激活转录因子 4(activating transcription factor 4, Atf4) 来阻断其功能; 但当强烈且持续的内质网应激发生时, 过量的 Trib3 将产生并最终导致细胞凋亡^[13]。在应激细胞中, 根据细胞环境和应激类型,

Trib3 具有显著的促生存和促死亡作用。在遭受应激的细胞中, Akt 可以发挥促存活作用, 而抑制 Akt 活性是应激诱导的 Trib3 诱导细胞死亡的一种方式^[14]。Trib3 被发现直接结合 Akt1/2 并降低 Akt 在 Ser473 和 Thr308 位点的磷酸化, 这两个修饰表明 Akt 被激活, 并降低 Akt 靶蛋白的磷酸化^[15]。Ddit3-Trib3-Akt 信号通路被证实可在多种肿瘤细胞和肿瘤干细胞中诱导细胞凋亡、调控细胞增殖和凋亡的平衡^[16]。本研究首次在大鼠睾丸曲细精管组织共培养体系中利用 RNA 干扰的方式探讨 Ddit3-Trib3-Akt 信号通路在精子发生中的具有相关性, 然而更具体的机制目前仍未被揭示, 这也是接下来的工作重点。

本研究所构建的体外培养体系操作简单、成分明确、易于取材且方便培养。因此, 若将目前的研究结果扩展到更广泛的物种, 改进和优化每个物种的培养条件, 是有极大的可能获得成功。如果能够用于临床, 这些进展能够协助精子发生分子机制的研究及新的男性不育症诊断和治疗技术的开发, 以及为新药物的研发提供更多的分子靶标。

参考文献

- [1] 郭彦, 杨乐乐, 戚华宇. 小鼠雄性生殖干细胞转录组分析揭示成熟精原干细胞特征[J]. 遗传, 2022, 44(7): 591-609. doi:10.16288/j.ycz.22-047.
- [1] Guo Y, Yang Y, Qi H Y. Transcriptome analysis of mouse male germline stem cells reveals characteristics of mature spermatogonial stem cells[J]. Hereditas (Beijing), 2022, 44(7): 591-609. doi:10.16288/j.ycz.22-047.
- [2] 曹云霞. 高通量测序技术在生殖医学领域的研究与应用[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(6): 929-34. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.001.
- [2] Cao Y X. Research and application of high-throughput sequencing technology in reproductive medicine[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(6): 929-34. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.001.
- [3] 闫慧敏, 李雪玲. PLZF 蛋白在精原干细胞自我更新与分化中作用的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(11): 2411-22. doi:10.3969/j.issn.1674-7968.2023.11.018.
- [3] Yan H M, Li X L. Research progress on the role of PLZF protein in self-renewal and differentiation of spermatogonial stem cells[J]. J Agric Biotechnol, 2023, 31(11): 2411-22. doi:10.3969/j.issn.1674-7968.2023.11.018.
- [4] 刘娜, 张岩, 李妍, 等. TRIB3 与 AKT 在大鼠睾丸细胞中的相互关联[J]. 中国男科学杂志, 2022, 36(1): 34-7, 67. doi:10.3969/j.issn.1008-0848.2022.01.002.
- [4] Liu N, Zhang Y, Li Y, et al. Interaction between TRIB3 and AKT in rat testicular cells[J]. Chin

J Androl, 2022, 36(1): 34-7, 67. doi:10.3969/j.issn.1008-0848.2022.01.002.

[5] Martinovitch P N. Development *in vitro* of the mammalian gonad[J]. Nature, 1937, 139(3514): 413. doi:10.1038/139413a0.

[6] Ishikura Y, Yabuta Y, Ohta H, et al. *In vitro* derivation and propagation of spermatogonial stem cell activity from mouse pluripotent stem cells[J]. Cell Rep, 2016, 17(10): 2789-804. doi:10.1016/j.celrep.2016.11.026.

[7] Sato T, Katagiri K, Gohbara A, et al. *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes[J]. Nature, 2011, 471(7339): 504-7. doi:10.1038/nature09850.

[8] Önen S, Köse S, Yersal N, et al. Mesenchymal stem cells promote spermatogonial stem/progenitor cell pool and spermatogenesis in neonatal mice *in vitro*[J]. Sci Rep, 2022, 12: 11494. doi:10.1038/s41598-022-15358-5.

[9] Zhang D, Jin W, Cui Y, et al. Establishment and characterization of testis organoids with proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells into spermatocytes and spermatids[J]. Cells, 2024, 13(19): 1642. doi:10.3390/cells13191642.

[10] Jazireian P, Favaedi R, Sadighi Gilani MA, et al. Dynamic Expression and Chromatin Incorporation of ACT and CREM Transcription Factors in Testis Tissues of Infertile Men [J]. Cell J, 2021, 23(7): 736-741. doi: 10.22074/cellj.2021.7634.

[11] Bao X Y, Sun M, Peng T T, et al. TRIB3 promotes proliferation, migration, and invasion of retinoblastoma cells by activating the AKT/mTOR signaling pathway[J]. Cancer Biomark, 2021, 31(4): 307-15. doi:10.3233/cbm-200050.

[12] Cheng W P, Wang B W, Lo H M, et al. Mechanical stretch induces apoptosis regulator TRB3 in cultured cardiomyocytes and volume-overloaded heart[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123235. doi:10.1371/journal.pone.0123235.

[13] He X, Wu D, Xu Y, et al. Perfluorooctanoic acid promotes pancreatic β cell dysfunction and apoptosis through ER stress and the ATF4/CHOP/TRIB3 pathway[J]. Environ Sci Pollut Res, 2022, 29(56): 84532-45. doi:10.1007/s11356-022-21188-9.

[14] Gallo-Oller G, Pons G, Sansa-Girona J, et al. TRIB3 silencing promotes the downregulation of Akt pathway and PAX3-FOXO1 in high-risk rhabdomyosarcoma[J]. Exp Hematol Oncol, 2024, 13(1): 38. doi:10.1186/s40164-024-00503-9.

[15] Deng C Y, Lv M, Luo B H, et al. The role of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway in

male reproduction[J]. Curr Mol Med, 2021, 21(7): 539-48.
doi:10.2174/1566524020666201203164910.

[16] Zhu S L, Qi M, Chen M T, et al. A novel DDIT3 activator dehydroevodiamine effectively inhibits tumor growth and tumor cell stemness in pancreatic cancer[J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155377. doi:10.1016/j.phymed.2024.155377.

