

## 敲低热休克转录因子 5(*Hsf5*) 对小鼠睾丸间质细胞和支持细胞中热休克家族的影响

钟琳, 钟洪莉, 代宇婕, 张庆华\*

陆军军医大学 陆军特色医学中心 妇产科, 重庆 400042

**摘要:**目的 探讨敲低热休克转录因子 5(*Hsf5*)对小鼠睾丸间质细胞(TM3)和支持细胞(TM4)中热休克家族表达的影响。方法 培养小鼠 TM3 和 TM4 细胞,随机分为对照组(control group)和 *Hsf5* 敲低组(*Hsf5* knockdown group)。用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测两种细胞中热休克转录因子(HSFs)和热休克蛋白(HSPs)mRNA 的表达。根据 RT-qPCR 结果分别选取两种细胞中变化具有显著差异的 HSPs( $P<0.01$ ),应用 Western blot 检测 TM3 细胞中 HSPA2、HSPA5、HSP90ab1 和 TM4 细胞中 HSPA2、HSP90aa1 蛋白表达。结果 用 siRNA 干扰技术成功构建 *Hsf5* 敲低模型。敲低 *Hsf5* 后, TM3 细胞中 *Hspa2*、*Hspa5*、*Hsp90ab1* 和 TM4 细胞中 *Hsf2*、*Hspa2*、*Hsp90aa1*、*Hsp90ab1*、*Hspd1* 的 mRNA 表达明显下调( $P<0.05$ )。与对照组相比,在 *Hsf5* 敲低组中, TM3 细胞中 HSPA2、HSPA5 和 TM4 细胞中 HSPA2 蛋白表达明显下调( $P<0.05$ )。结论 HSF5 可能通过调控小鼠睾丸间质细胞和支持细胞中 HSPA2 和 HSPA5 的表达参与精子发生。

**关键词:** 热休克转录因子 5;热休克转录因子;热休克蛋白;精子发生

中图分类号:R363.1+6 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2023.04.0626

## Effect of heat shock transcription factor 5(*Hsf5*) knockdown on heat shock family in mouse Leydig cells and Sertoli cells

ZHONG Lin, ZHONG Hongli, DAI Yujie, ZHANG Qinghua\*

Department of Obstetrics and Gynecology, Army Medical Center of PLA, Army Medical University, Chongqing 400042, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of knockdown heat shock transcription factor 5(*Hsf5*) on the expression of heat shock family in mouse Leydig cells (TM3) and Sertoli cells(TM4). **Methods** Mouse TM3 and TM4 cells were cultured and randomly divided into control group and *Hsf5* knockdown group. The expression of heat shock transcription factor(HSF) and heat shock protein(HSP) mRNA in the two groups of cells was detected by real-time quantitative PCR. According to the results of RT-qPCR, HSPs with significant differences in the two kinds of cells were selected ( $P<0.01$ ). Western blot were used to detect the expression of HSPA2, HSPA5, HSP90ab1 in TM3 cells and HSPA2, HSP90aa1 in TM4 cells. **Results** *Hsf5* knockdown model was successfully constructed by RNA interference. After knockdown of *Hsf5*, the mRNA expression of *Hspa2*, *Hspa5*, *Hsp90ab1* in TM3 cells and *Hsf2*, *Hspa2*, *Hsp90aa1*, *Hsp90ab1*, *Hspd1* in TM4 cells was all significantly down-regulated( $P<0.05$ ). In *Hsf5*

收稿日期:2022-09-23 修回日期:2022-12-27

基金项目:2021 年度大学指令性计生专项科研课题(2021XZL06)

\* 通信作者 (corresponding author): zhangqh1123@163.com

knockdown group, the expression of HSPA2, HSPA5 proteins in TM3 cells and HSPA2 protein in TM4 cells were significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** HSF5 is potentially involved in spermatogenesis by regulating the expression of HSPA2 and HSPA5 in mouse Leydig cells and Sertoli cells.

**Key words:** heat shock transcription factor 5; heat shock transcription factors; heat shock proteins; spermatogenesis

不孕症是全球性健康问题,发病率逐年上升。中国的不孕症发病率约 10%,其中男性因素约占 50%<sup>[1]</sup>。在引起男性不育的因素中,热应激所占比例逐渐上升。它可通过引起热休克反应激活热休克转录因子(heat shock transcription factors, HSFs),使精子发生异常,进而导致男性不育。HSFs 是调控真核细胞热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)转录的关键因子,主要通过诱导 HSPs 表达使细胞耐受应激,从而维持正常生理功能。人类基因组中有以下几种 HSFs: HSF1、HSF2、HSF4、HSF5、HSFX 和 HSFY,它们均在睾丸中表达<sup>[2]</sup>。其中 HSF1 和 HSF2 在精子发生中有重要作用<sup>[3]</sup>。最近有证据指出<sup>[4]</sup>: 睾丸特异性表达的 *Hsf5* 缺失会使雄性斑马鱼因精子异常而不育,但具体的机制尚不明确。因此,研究 HSF5 在睾丸中的机制,能为深入探讨热应激对男性生育力的影响提供理论依据。本研究拟用 siRNA 干扰技术构建小鼠睾丸间质细胞(mouse Leydig cells, TM3)和支持细胞(mouse Sertoli cells, TM4)的 *Hsf5* 敲低模型以探讨对其它与精子发生相关的 HSFs<sup>[2]</sup> 和 HSPs<sup>[5-10]</sup> 的 mRNA 及蛋白表达的影响,以期初步探索 HSF5 在精子发生中的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

细胞:小鼠睾丸间质细胞(mouse Leydig cells, TM3)和支持细胞(mouse Sertoli cells, TM4)(陆军军医大学预防医学系惠赠)。主要试剂:TM3 细胞专用培养基和 TM4 细胞专用培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司);荧光定量 PCR 试剂盒 2×SYBR Green qPCR Mix、羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗(山东思科捷生物技术有限公司);OPTI-MEM 培养液和 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 试剂盒(美国赛默飞世尔科技公司);小鼠 *Hsf5* siRNA 转染试剂(北京擎科生物生物技术有限公司);HSPA2 单克隆抗体(杭州华安生物技术有限公司);HSPA5 单克隆抗

体、HSP90aa1 多克隆抗体及 HSP90ab1 单克隆抗体(武汉云克隆科技股份有限公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 TM3 细胞、TM4 细胞的分组及处理:将培养的 TM3 和 TM4 细胞进行消化传代时,按  $1 \times 10^6$ /mL 浓度接种于 6 孔板中,每孔添加 2 mL 培养液,接种完成后放回培养箱中孵育,待细胞贴壁到孔底 70% 进行转染操作。将孔板按照随机数字表法分为对照组、*Hsf5* 敲低组。转染前稀释相关试剂(每孔用量):1) 每 2.5  $\mu\text{g}$  *Hsf5* siRNA 转染试剂(siRNA 干扰靶点:上游 5'-CGUUCAACAAGGUCCUCAATT-3'、下游 5'-UUGAGACCUUGUUGAACGTT-3') 用 125  $\mu\text{L}$  OPTI-MEM 培养液稀释;2) 每 3.75  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000 用 125  $\mu\text{L}$  OPTI-MEM 培养液稀释。将稀释后的 *Hsf5* siRNA 转染试剂加入稀释 Lipofectamine<sup>TM</sup> 3000,混匀后室温放置 10~15 min。*Hsf5* 敲低组加入以上稀释的混合试剂;对照组加入 250  $\mu\text{L}$  OPTI-MEM 培养液。将两组细胞放回培养箱中继续孵育 48~72 h。

1.2.2 RT-qPCR 验证 siRNA 干扰效果以及相关热休克家族 mRNA 表达:经 SteadyPure Quick RNA Extraction Kit 法提取总 RNA, SPARKscript II RT Plus Kit 法反转录生成相应 cDNA,再根据 2×SYBR Green qPCR Mix(SYBR Green I) 法行 RT-qPCR,采取以下反应条件进行扩增:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 59  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环。最后按照  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法以 *Gapdh* 为内参计算目的基因 mRNA 相对表达量。具体引物序列(表 1)。

1.2.3 Western blot 检测热休克蛋白的表达:RIPA 法充分裂解细胞提取总蛋白。经 BCA 法对蛋白进行定量,定量后行电泳,采用湿转法冰浴转膜 1 h(恒流 235 mA),封闭约 2 h。封闭后分别置于对应的一抗溶液中 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBST 溶液洗膜 3 次

表1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of real-time fluorescent quantitative PCR

gene	upstream primer sequence(5'-3')	downstream primer sequence(5'-3')
<i>Hsf5</i>	GAGATGCTAAAGGTGGAGCCTGTTG	AGCCTGACTGCTGGAAGATGGG
<i>Hsf1</i>	GACATGAGCCTGCCTGACC	ACCAGTGCCTTCTCTGAGTC
<i>Hsf2</i>	ACCATCATAAAGTTCCACACAGC	CCTCATTGTTTCTGGAATAACTGG
<i>Hspa2</i>	GCAGAGCGGTACAAATCGGA	TTGCCCTCAGTTTCTCGTC
<i>Hspa5</i>	GTCTTCAATGGCAAGGAGCC	TGATTATCGGAAGCCGTGGA
<i>Hsp90aa1</i>	CGTCTCGTGCCTGTTTCATTC	ACTGGGCAATTTCTGCCTGA
<i>Hsp90ab1</i>	TGCTAAGTCTGGCACGAAGG	AGACGACTCCAGGCATACT
<i>Hspd1</i>	AGTCCATTGTCCCTGCTCTTG	TGCCACAACCTGAAGACCAA
<i>Gapdh</i>	ACTCTTCCACCTTCGATGCC	TGGGATAGGGCTCTCTTGC

(15 min/次),洗膜后置于相应二抗溶液中,37 °C 孵育 1 h。洗膜后加显影液,然后曝光。采用 ImageJ 软件对条带进行吸光度值转化,并计算目的蛋白相对于 GAPDH 蛋白的表达量。一抗和二抗稀释比例(表 2)。

表2 一抗和二抗稀释比例

Table 2 Dilution ratio of primary antibody and secondary antibody

antibody	dilution ratio of primary antibody	dilution ratio of secondary antibody
HSPA2	1 : 1 000	1 : 5 000
HSPA5	1 : 500	1 : 5 000
HSP90aa1	1 : 400	1 : 5 000
HSP90ab1	1 : 500	1 : 5 000
GAPDH	1 : 1 000	1 : 5 000

### 1.3 统计学分析

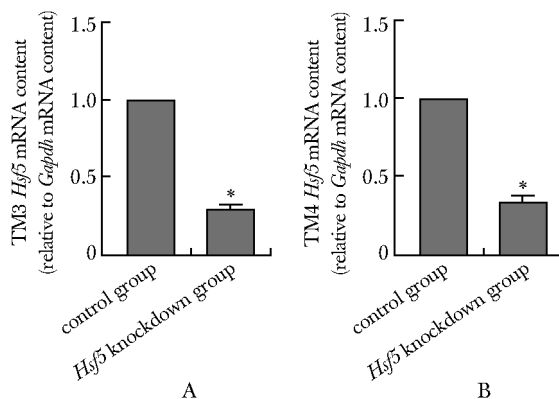
采用 ImageJ 软件对 Western blot 蛋白条带进行灰度值转化,SPSS 25.0 软件对所有数据进行分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用非配对 *t* 检验,同时使用 GraphPad Prism 9.3.0 作图。

## 2 结果

### 2.1 敲低 *Hsf5* 后,两种细胞中 *Hsf1*、*Hsf2*、*Hspa2*、*Hspa5*、*Hsp90aa1*、*Hsp90ab1*、*Hspd1* mRNA 相对表达量变化

两种细胞的 *Hsf5* 敲低组中 *Hsf5* mRNA 表达

量显著低于对照组( $P<0.05$ )(图 1),可用于下一步实验。与对照组相比,*Hsf5* 敲低组中:TM3 细胞中 *Hspa2*、*Hspa5*、*Hsp90ab1* 和 TM4 细胞中 *Hsf2*、*Hspa2*、*Hsp90aa1* mRNA 表达均明显下调( $P<0.01$ )(表 3)。



A. *Hsf5* mRNA expression levels in TM3 cells; B. *Hsf5* mRNA expression levels in TM4 cells; \* $P<0.05$  compared with control

图1 RT-qPCR 验证 TM3 和 TM4 细胞中 siRNA 干扰效果

Fig 1 RT-qPCR verified siRNA effect in TM3 and TM4 cells

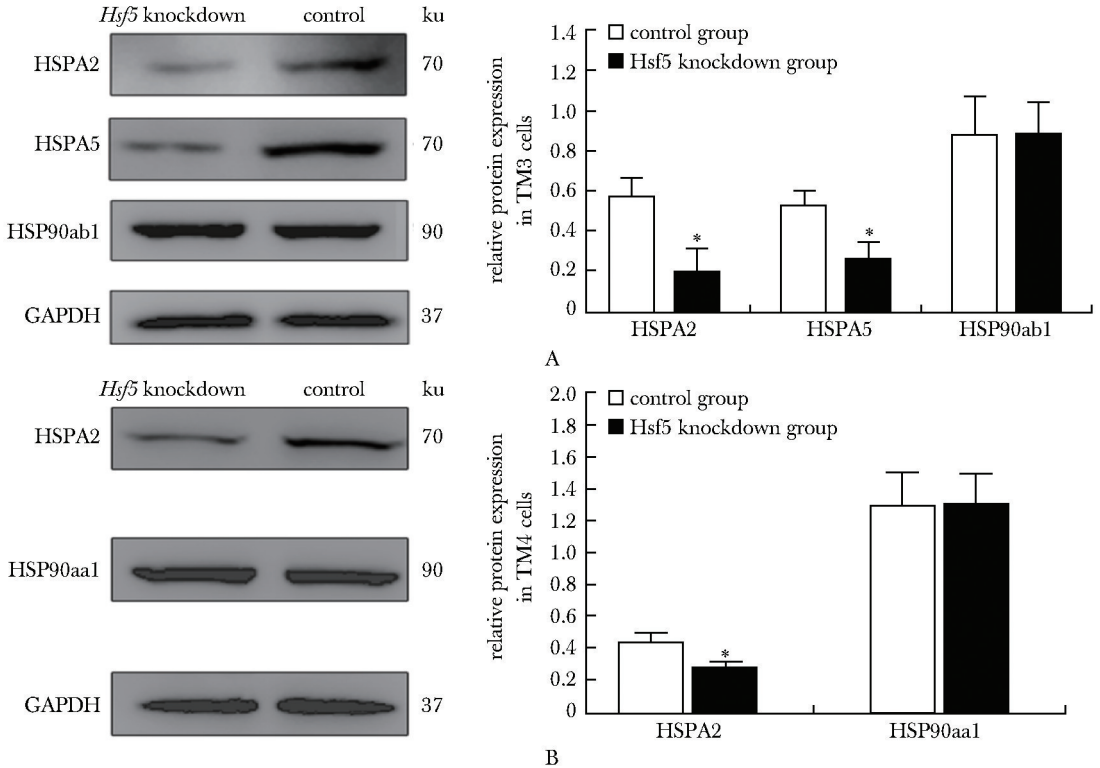
### 2.2 *Hsf5* 敲低后, TM3 细胞中 HSPA2、HSPA5、HSP90ab1 和 TM4 细胞中 HSPA2、HSP90aa1 蛋白表达变化

在 TM3 细胞中,与对照组相比,*Hsf5* 敲低组中 HSPA2 和 HSPA5 蛋白相对表达明显下调( $P<0.05$ )(图 2A);TM4 细胞中,*Hsf5* 敲低组 HSPA2 蛋白相对表达明显下调( $P<0.05$ )(图 2B)。

**表 3 RT-qPCR 验证敲低 *Hsf5* 后 TM3 和 TM4 细胞中其他热休克转录因子和热休克蛋白 mRNA 表达水平**  
**Table 3 RT-qPCR verified mRNA expression levels of other heat shock transcription factors and heat shock proteins in TM3 and TM4 cells after knockdown of *Hsf5* ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

gene	TM3 cells		TM4 cells	
	control group	<i>Hsf5</i> knockdown group	control group	<i>Hsf5</i> knockdown group
<i>Hsf1</i>	1.00±0.26	1.05±0.42	1.00±1.72	1.27±0.21
<i>Hsf2</i>	1.00±1.29	0.66±0.38	1.00±0.17	0.35±0.18**
<i>Hspa2</i>	1.00±0.11	0.56±0.11**	1.00±0.15	0.42±0.14**
<i>Hspa5</i>	1.00±0.10	0.45±0.09**	1.00±0.33	1.14±0.37
<i>Hsp90aa1</i>	1.00±0.17	1.51±0.39	1.00±0.10	0.58±0.12**
<i>Hsp90ab1</i>	1.00±0.05	0.78±0.05**	1.00±0.13	0.52±0.24*
<i>Hspd1</i>	1.00±0.34	0.85±0.14	1.00±0.14	0.62±0.16*

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.



A. Western blot of HSPA2, HSPA5 and HSP90ab1 proteins in TM3 cells; B. Western blot of HSPA2 and HSP90aa1 proteins in TM4 cells; \* $P < 0.05$  compared with control group

**图 2 Western bolt 验证 HSPA2、HSPA5、HSP90aa1 和 HSP90ab1 蛋白表达情况**

**Fig 2 Western blot verified protein content of HSPA2, HSPA5, HSP90aa1 and HSP90ab1**

### 3 讨论

近年来,男性不育发病率逐年上升。其病因较复杂,而热应激引起精子质量下降是男性不育的重

要原因。热应激可诱导 HSFs 的改变,进而影响精子发生。当前证据表明<sup>[2]</sup>:在基因敲除鼠中,无论敲除 HSF1 还是 HSF2,都可以观察到精子的异常,但生育力正常;若两者都敲除,则表现为绝对不育。

另有证据指出缺失 *Hsf5* 的雄性斑马鱼表现为不育, 但机制不明<sup>[4]</sup>。此外, 本课题组在探讨 HSF5 结构<sup>[11]</sup>的基础上进一步行功能研究表明<sup>[12]</sup>: 敲低小鼠精母细胞中的 *Hsf5* 后会引起 HSF1 mRNA 及蛋白表达量下调以及免疫相关因子发生变化; 故推测, HSF5 可能会通过与 HSF1 协同及介导免疫等途径参与精子发生。但精子正常发生离不开辅助细胞, 故本研究选取小鼠 TM3 和 TM4 细胞, 探讨 HSF5 在这两种细胞中的作用。

本研究发现敲低 *Hsf5* 后, 在 mRNA 及蛋白水平均可检测到 TM3 和 TM4 细胞中 HSPA2 的下调。HSPA2 在精子获能和精卵识别的过程中发挥着重要作用<sup>[13]</sup>, 它的缺失可能会造成精卵识别失败。除此之外, 有证据指出小鼠选择性敲除 HSPA2 后, 精子细胞表现为减数分裂过程中的异常<sup>[14]</sup>。另在 *Hsf5* 缺失的斑马鱼模型中也发现精子发生中减数分裂后细胞减少以及精子结构异常<sup>[4]</sup>。故猜想, HSPA2 可能是 HSF5 参与精子发生过程的关键靶蛋白。

本研究还发现, 敲低 *Hsf5* 后, TM3 细胞中 HSPA5

在 mRNA 及蛋白水平均有下调。既往研究指出, HSPA5 可能通过钙依赖途径调节精子和透明带的结合参与精子的获能<sup>[15]</sup>, 而且它的启动子突变与弱精症相关<sup>[16]</sup>。HSPA5 还被证明在内质网中可维持  $Ca^{2+}$  浓度的稳定<sup>[17]</sup>。睾丸间质细胞合成雄激素主要受黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)-黄体生成素受体 (luteinizing hormone receptor, LHR)-环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)-蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 这一经典途径调控。但现有报道称: 胞质  $Ca^{2+}$  浓度与睾酮生成平行<sup>[16]</sup>。故据此推测, HSPA5 可能通过调节  $Ca^{2+}$  浓度参与雄激素合成、调节精子发生和获能, 而 HSF5 则可能通过调节 HSPA5 的表达间接参与这一过程。

综上所述, HSF5 可能通过调节 HSPA2 和 HSPA5 的表达, 影响雄激素的生成、精子的分化、获能以及精卵识别, 最终导致男性不育。但本研究方法较单一, 具有局限性, 其具体机制还需深入探讨, 为男性不育的临床诊疗开拓新思路、寻找新方法。

## 参考文献:

- [1] Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, *et al.* Male infertility [J]. *Lancet*, 2021, 397:319-333.
- [2] Widlak W, Vydra N. The role of heat shock factors in mammalian spermatogenesis [J]. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2017, 222:45-65.
- [3] Abane R, Mezger V. Roles of heat shock factors in gametogenesis and development [J]. *FEBS J*, 2010, 277:4150-4172.
- [4] Saju JM, Hossain MS, Liew WC, *et al.* Heat shock factor 5 is essential for spermatogenesis in zebrafish [J]. *Cell Rep*, 2018, 25:3252-3261.
- [5] Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2016, 21:379-404.
- [6] Nowicka-Bauer K, Malcher A, Wlozczowska O, *et al.* Evaluation of seminal plasma HSPA2 protein as a biomarker of human spermatogenesis status [J]. *Reprod Biol*, 2022, 22:100597. doi:10.1016/j.repbio.2021.100597.
- [7] Lobo V, Parte P. Membrane-bound glucose regulated protein 78 interacts with alpha-2-macroglobulin to promote actin reorganization in sperm during epididymal maturation [J]. *Mol Hum Reprod*, 2019, 25:137-155.
- [8] Kajiwara C, Kondo S, Uda S, *et al.* Spermatogenesis arrest caused by conditional deletion of Hsp90alpha in adult mice [J]. *Biol Open*, 2012, 1:977-982.
- [9] Saribek B, Jin Y, Saigo M, *et al.* HSP90beta is involved in signaling prolactin-induced apoptosis in newt testis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349:1190-1197.
- [10] Asquith KL, Harman AJ, McLaughlin EA, *et al.* Localization and significance of molecular chaperones, heat shock protein 1, and tumor rejection antigen gp96 in the male reproductive tract and during capacitation and acrosome reaction [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72:328-337.
- [11] 钟洪莉, 肖城良, 史祥睿, 等. 精子发生调控因子重组人 HSF5 的原核表达、活性检测与结构预测 [J]. *基础医*

- 学与临床, 2021. 41:1323-1328.
- [12] 钟洪莉, 钟琳, 代宇婕, 等. 热休克转录因子 5 在小鼠睾丸不同细胞中的表达及其功能探索[J]. 免疫学杂志, 2022, 38:890-895.
- [13] Redgrove KA, Nixon B, Baker MA, *et al.* The molecular chaperone HSPA2 plays a key role in regulating the expression of sperm surface receptors that mediate sperm-egg recognition.[J]. PloS one, 2012, 7:e50851.doi:10.1371/journal.pone.0050851.
- [14] Dix DJ, Allen JW, Collins BW, *et al.* Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93:3264-3268.
- [15] Lachance C, Bailey JL, Leclerc P. Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions[J]. Hum Reprod, 2007, 22:2606-2614.
- [16] Abdou HS, Villeneuve G, Tremblay JJ. The calcium signaling pathway regulates leydig cell steroidogenesis through a transcriptional cascade involving the nuclear receptor NR4A1 and the steroidogenic acute regulatory protein[J]. Endocrinology, 2013, 154:511-520.
- [17] Guzel E, Basar M, Ocak N, *et al.* Bidirectional interaction between unfolded-protein-response key protein HSPA5 and estrogen signaling in human endometrium [J]. Biol Reprod, 2011, 85:121-127.

## 本刊稿件格式要求(4)

**4.1 科学名词:**采用全国自然科学名词审定委员会公布的术语。药物名称以最新版本《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编写的《中国药品通用名称》为准,英文药物名称采用国际非专利药名,不用商品名。国际通用的缩写词在正文第一次出现时用“中文全称(英文全称,英文缩写)”格式。例:转化生长因子(transforming growth factor, TGF)。

**4.2 需用斜体者:**坐标系符号,如:横坐标( $X$ );拉丁学名;统计学符号( $n, t$  检验, 概率  $P$  等)。基因的英文缩写用斜体大写,蛋白的英文缩写用正体大写。例:“*SHH*”表示基因,“SHH”表示蛋白。

**4.3 单位:**按国家公布的法定计量单位,如:米(m)、升(L)、克(g)、天(d)、小时(h)、分(min)、秒(s)。在1个组合单位内,不能有1条以上的斜线,如:用药剂量 mg/kg/d 应为 mg/(kg·d),心脏指数 L/min/m<sup>2</sup> 应为 L/(min·m<sup>2</sup>)。数值范围用“~”,数字与单位间空1格,如:10~20 mg; 1~8 h; 55%~64%(不能用 55-64%); (3~6)×10<sup>4</sup> 或 3×10<sup>4</sup>~6×10<sup>4</sup>(不能用 3-6×10<sup>4</sup>)。

**4.4 短篇综述要求:**1)近期内人们普遍关注及研究热门领域的短篇综述,一般在4 000字以内(不包括参考文献);2)近3年内相关外文参考文献占70%以上;3)结合文献进行一定深度的评述,不能只是文献罗列介绍;4)结合自己的研究工作,对该领域存在的问题和解决方法提出自己的观点;5)请在稿件最后附上第一作者和通信作者的科研背景资料,包括作者的科研简介以及所在课题组的相关科研工作简介。