

# CG8005 基因在果蝇睾丸生殖细胞中的功能分析

陈万银, 颜一丹, 栾晓瑾, 王敏, 方杰

江苏大学附属医院妇科, 镇江 212001

**摘要:** 生殖细胞的自我更新及分化过程对于男性不育及生殖细胞肿瘤的发生至关重要, *CG8005* 基因作为果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 睾丸生殖干细胞的调控因子之一, 其功能机制尚不清楚。为了探讨 *CG8005* 基因在果蝇睾丸生殖细胞中的生物学功能, 本研究首先通过 UAS-gal4 系统介导的 RNAi 途径, 驱动果蝇睾丸生殖细胞和包囊细胞中 UAS-*CG8005* RNAi 的表达, 观察后代雄性果蝇的生育能力; 其次, 通过免疫荧光染色方法检测对照组和 *CG8005* RNAi 雄性果蝇睾丸中 Vasa、IBI、锌指结构域 1 蛋白 (Zn finger homeodomain 1, Zfh1)、眼缺陷蛋白 (eyes absent, Eya)、DE-cad、FasIII 以及磷酸化组蛋白 H3 (phospho-histone H3, PH3)、TUNEL 等表达模式; 最后, 使用小干扰 RNA (siRNA) 在果蝇 S2 细胞中将 *CG8005* 基因表达沉默, 用 PH3 检测对照组和 *CG8005* siRNA 组中果蝇 S2 细胞增殖能力, TUNEL 及流式凋亡检测技术分析果蝇 S2 细胞凋亡情况; 通过荧光定量 PCR 检测剪接体亚基的 mRNA 水平, 观察剪接体的相对表达量。结果表明, 与对照组果蝇比较, 在生殖细胞和包囊细胞中缺失 *CG8005* 基因, 雄性果蝇的生育能力降低甚至完全丧失; 另外, nos-gal4 驱动 UAS-*CG8005* RNAi 的雄性果蝇中生殖细胞及生殖融合体消失, 并且生殖细胞增殖能力减弱, 而 tj-gal4 驱动 UAS-*CG8005* RNAi 的果蝇睾丸中出现生殖细胞样肿瘤; 在果蝇 S2 细胞中敲减 *CG8005* 基因导致细胞凋亡增加, 增殖受到抑制; *CG8005* 基因在果蝇 S2 细胞中沉默引起剪接体亚基的信使 RNA 水平升高。可见, *CG8005* 基因在果蝇睾丸生殖细胞的自我更新与分化过程中必不可少, 其缺失可能导致生殖细胞存活受限甚至生殖细胞样肿瘤的形成; 并且 *CG8005* 基因可参与果蝇 S2 细胞的增殖和凋亡, 对于细胞生命的维持至关重要, 同时可竞争性调节剪接体亚基的 mRNA 水平。

**关键词:** *CG8005* 基因; 果蝇睾丸; 生殖细胞; 自我更新与分化; 增殖与凋亡

## Functional analysis of *CG8005* gene in *Drosophila* testis

Wanyin Chen, Yidan Yan, Xiaojin Luan, Min Wang, Jie Fang

Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

**Abstract:** The processes of self-renewal and differentiation of germ cells are crucial to the development of male infertility and germ cell tumors. *CG8005* gene is one of the regulatory factors of the testicular germ stem cells in *Drosophila*

收稿日期: 2020-06-01; 修回日期: 2020-08-11

基金项目: 镇江市社会发展项目(编号: SH2018065)资助[Supported by the Zhenjiang Social Development Project(No.SH2018065)]

作者简介: 陈万银, 在读硕士研究生, 专业方向: 妇科肿瘤。E-mail: 1031693689@qq.com

通讯作者: 方杰, 博士, 副教授, 主任医师, 研究方向: 妇科肿瘤。E-mail: fangjie070@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.20-163

网络出版时间: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20201106.0928.002.html>

URI: 2020/11/9 10:25:56

*melanogaster*, and its functional mechanism is still unknown. To explore the biological function(s) of *CG8005* gene in the germ cell niche of *Drosophila* testis, first, the UAS-gal4 system was used to drive the expression of UAS-*CG8005* RNAi in *Drosophila* testicular germ cells and cyst cells. Fertility tests were then performed to determine the fertility rate of male flies. Second, the expression patterns of Vasa, IBI, Zn finger homeodomain 1 (Zfh1), eyes absent (Eya), DE-cad, FasIII and Phospho-Histone H3(PH3), and TUNEL were analyzed by immunofluorescence staining in both control and *CG8005* RNAi testes. Lastly, small interfering RNA (siRNA) was used to silence the *CG8005* gene expression in *Drosophila* S2 cells; and PH3 was used to detect the proliferation ability of *Drosophila* S2 cells in the control group and *CG8005* siRNA group. Apoptosis of *Drosophila* S2 cells was analyzed with TUNEL and flow cytometry. To observe the relative expression of the spliceosome, the mRNA levels of the spliceosome subunits were detected by fluorescence quantitative RT-PCR. As compared with the control group, the results showed that deletion of the *CG8005* gene in the germ cells and cyst cells of the testis reduced or even completely abolished the fertility of male fruit flies. In addition, nos-gal4 driven UAS-*CG8005* RNAi led to loss of fusomes and reduce the proliferative ability of germ cells. Noticeably, tj-gal4-directed UAS-*CG8005* RNAi knockdown of *CG8005* gene in the testis led to germ cell tumor development. Knockdown of *CG8005* gene in *Drosophila* S2 cells resulted in increase in apoptosis and inhibition of proliferation. Further, the silencing of the *CG8005* gene in *Drosophila* S2 cells caused increases in the mRNA levels of the spliceosome subunits. Hence, *CG8005* gene is essential for the self-renewal and differentiation of germ cells in *Drosophila* testis. Its deletion may lead to restricted germ cell survival and the formation of germ cell-like tumors. *CG8005* gene can participate in the regulation of proliferation and apoptosis of *Drosophila* S2 cells, which is essential for the maintenance of cell life, and might competitively regulate the mRNA levels of spliceosome subunits.

**Keywords:** *CG8005*; *Drosophila* testis; germ cells; self-renewal and differentiation; proliferation and apoptosis

通常认为干细胞需要在特定的环境中才能保持自我更新及分化的性状,对于组织稳态及细胞生长至关重要<sup>[1,2]</sup>。果蝇(*Drosophila melanogaster*)睾丸中存在有两种干细胞类型,包括生殖干细胞(germline stem cells, GSCs)和体细胞干细胞(cyst stem cells, CySCs)<sup>[3,4]</sup>,它们均与睾丸顶端的中心(Hub)细胞相连,共同构成生殖干细胞微环境(stem cell niche)<sup>[5~7]</sup>。GSCs产生的一个子代细胞经过4轮有丝分裂分化为16个精原细胞,继而经过精母细胞、圆形精子、长形精子和成熟精子完成整个生精过程<sup>[8]</sup>。两个由CySCs分化而来的包囊细胞包裹着生殖细胞并且支持着生殖细胞的生长<sup>[3]</sup>。而Hub细胞主要维持着GSCs和CySCs的自我更新及分化<sup>[9,10]</sup>。

干细胞微环境内的多条重要信号通路调控着干细胞的自我更新及分化过程<sup>[8,11]</sup>,许多研究表明,Hub细胞通过分泌Upd因子在GSCs和CySCs激活JAK-STAT信号通路,维持这两类细胞自我更新的能力<sup>[12,13]</sup>。另外,Hub细胞通过CySCs激活Hh信

号通路来维持干细胞自我更新的性状<sup>[14]</sup>。此外,大量研究证明多种细胞因子也参与调控干细胞微环境,其中,剪接体亚基与果蝇睾丸干细胞自我更新及分化之间存在密切关系。比如U2A剪接因子通过影响生殖细胞分化从而影响雄性果蝇生育能力<sup>[15]</sup>。PrP3作为PrP复合体中的关键剪接体成分,对于雄性果蝇生育及生殖系干细胞的自我更新及分化至关重要<sup>[16]</sup>。

果蝇遗传学研究中常用UAS-gal4系统异位表达转基因果蝇,用于激活UAS下游靶基因。Yu等<sup>[6]</sup>通过对2881个果蝇睾丸进行RNA干扰(RNAi),共鉴定到221个参与生殖细胞自我更新过程的调控因子,其中*CG8005*基因的表达具有差异性。*CG8005*基因在细胞周期进程及信使RNA衰减等过程中发挥作用,通过Flybase数据库(<http://flybase.org/>)显示*CG8005*基因与维持细胞壁完整性有关,起到凋亡调节剂的作用,而其对果蝇睾丸生殖细胞凋亡的影响尚不明确。因此,本研究分析了*CG8005*基因在果

蝇睾丸生殖细胞中的生物学功能及 *CG8005* 基因对果蝇 S2 细胞增殖及凋亡的影响,探索了 *CG8005* 基因沉默与剪接体亚基之间的潜在联系,为研究 *CG8005* 基因的作用机制提供方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 果蝇品系及饲养

UAS-*CG8005* RNAi 转基因果蝇购自清华果蝇中心(Tsinghua Fly Center, THFC),该品系来源于 TRiP RNAi 转基因果蝇库(Transgenic RNAi Project)。*gal4* 转基因果蝇品系信息如下: *nos-gal4* (BDSC, #4937), *tj-gal4* (DGRC, #104055)。WT 品系果蝇为野生型果蝇,作为对照组,来源于 THFC 果蝇库。本研究经江苏大学附属医院生物医学伦理学委员会批准。

所有果蝇均在温度 25℃、相对湿度 60% 的条件下饲养。

### 1.2 果蝇杂交策略

分别挑选 *nos-gal4*、*tj-gal4* 品系雄性果蝇与 UAS-*CG8005* RNAi 的处女蝇进行杂交。在出生 2 d 内的 F<sub>1</sub> 代中挑选特定基因型(*nos>CG8005* RNAi、*tj>CG8005* RNAi)的果蝇用于后续实验。*nos>CG8005* RNAi 和 *tj>CG8005* RNAi 基因型分别指的是在生殖细胞和包裹细胞中敲减 *CG8005* 基因。

### 1.3 生育率测试

在 F<sub>1</sub> 代果蝇中挑选单只特定基因型(UAS-*CG8005* RNAi)的成年雄蝇与 3 只野生型处女蝇杂交,观察其是否可以获得后代果蝇。通过统计 F<sub>1</sub> 代成年雄性果蝇生育比例判断雄性果蝇的生育能力。

### 1.4 细胞培养与转染

利用快冻慢融的原理复苏果蝇 S2 细胞后,放入 DMEM+10%胎牛血清(以色列 Bioind 公司)配制的培养基中进行培养,培养环境为 28℃ 恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),根据细胞生长速度和状态,及时进行细胞换液和细胞传代,并以适当密度重新接种至新的培养瓶中继续培养<sup>[17]</sup>。待细胞生长至

80%~90% 密度后进行转染。转染步骤如下:由苏州吉玛基因公司设计并合成 siRNA 序列,使用 Lipo2000 脂质体(美国 Invitrogen 公司)转染 S2 细胞。使用 250 μL Opti-MEM (美国 Gibco 公司)稀释成 15 μL 的 Lipo2000,轻轻混匀后室温放置 5 min,在 250 μL opti-MEM 中加入 15 μL 小干扰 RNA (siRNA),将两管混合物充分混匀后,室温放置 20 min,使 siRNA 终浓度为 150 nmol/L 作为最终培养基加入细胞培养板中,6 h 后更换成完全培养基继续培养至 48 h。siRNA 序列见表 1。

### 1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)检测

果蝇 S2 细胞总 RNA 的提取及逆转录反应按照反转录试剂盒说明书(日本 TaKaRa 公司)进行。将目的 DNA 及相应的引物与 SYBRGreen 染料配成 10 μL 反应体系在反应管中充分混匀,4℃ 短暂离心,置入 *Mx3000P* 荧光定量 PCR 仪(美国安捷伦公司)中进行反应。反应条件为:95℃ 预变性 10 min,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 10 s,40 个循环。溶解曲线分析:95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 30 s,60℃ 15 s。以 *GAPDH* 作为内参,以  $\text{Folds}=2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示目的基因在实验组与对照组中表达的倍比关系。qRT-PCR 引物序列见表 2。

### 1.6 免疫荧光检测果蝇 S2 细胞的增殖与凋亡

将转染 24 h 后的果蝇 S2 细胞放入六孔板中进行种板,孵育 24 h 后在培养皿中进行免疫染色。具体步骤如下:4%多聚甲醛固定 30 min。在含有 0.1% Triton X-100(PBST)的 1×PBS 中洗涤 3 次,并在 5%牛血清白蛋白 BSA (上海生工生物工程股份有限公司)中封闭 30 min 后,将样品与一抗(Vasa 购自

表 1 本研究所用的 siRNA 序列

Table 1 siRNA sequences used in this study

siRNA 名称	序列(5'→3')
阴性对照	F:UUCUCCG AACGUGUCACGUTT
	R:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
siCG8005-1	F:GGACCAAAUAGACAGCCAUTT
	R:AUGGCUGUCUAAUUGGUCCTT
siCG8005-2	F:CCACGUUCAUGGGUUCAUUTT
	R:AAUGAACCCAUGAACGUGGTT

表 2 本研究所用的 qRT-PCR 引物序列  
Table 2 qRT-PCR primer sequences used in this study

基因名称	引物序列(5'→3')
GAPDH	F: GTGGTGAACGGCCAGAAGAT
	R: GCCTTGTC AATGGTGGTGAA
CG8005	F: CTGGACTCGTGGTGGACATTCTG
	R: ACACTGAGTAATCCGCTCCATTGC
Prp19	F: GCTGCCACGAAGGACCTGTAC
	R: CCTGTGCGGATATCGGAGAATGC
Prp18	F: GCTGCTCACCTTCTGCTCAAG
	R: AGCGGCTTAACGTATTCCTTAGTCTG
SmB	F: CATGAAC TTGATCCTCGGCGACTG
	R: CCTCTGGCGGCGGTGGTC
SmD1	F: CACCTGAAGAGCGTTCGATGAC
	R: TGTCGTCGATGAGGAGCGTCTC
SmE	F: CCATCAACCTGATCTTCCGTTACCTG
	R: GCGTCGTCCAGCACCAGATTC
SmF	F: GCTCCGTGACTGGTAATCTTGGC
	R: TCCTCGTCGTCGTCCTCCATG
SmG	F: TCTGAGCAGCGTGGTTATTGACATC
	R: CGTAGCATGGCATCGAGTCCTTG

美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 1B1、Zfh1、Eya、DE-cad、FasIII 均购自美国 Developmental Studies Hybridoma Bank 公司, PH3 购自美国 Cell Signaling Technology 公司)在室温孵育 1 h 或 4℃过夜。之后 0.1%PBST 中洗涤 3 次, 每次 10 min。然后将样品在室温下与二抗(包括 488-兔二抗、cy3-小鼠二抗、647-大鼠二抗,均购自美国 Molecular Probes and Jackson Immunologicals 公司)一起孵育 1 h, 之后在 0.1%PBST 中洗涤 3 次。用 Hoechst 33342(美国 Invitrogen 公司)染色 10 min, 加入 20 μL 80%甘油, 盖上盖玻片封片。在奥林巴斯 BX51 荧光正置显微镜上捕获图像并使用 Adobe Photoshop CS5 软件处理。使用 Image J 软件对荧光强度进行定量分析。

### 1.7 流式细胞分析果蝇 S2 细胞凋亡

将 siRNA 转染 48 h 后的果蝇 S2 细胞, 根据 Annexin V-Alexa Fluor 647/PI 细胞凋亡检测试剂盒(南京福麦斯生物技术有限公司)的说明书进行操作。根据细胞计数取  $1\times 10^6$  个细胞进行离心, 用 250 μL 结合缓冲液重悬细胞沉淀, 与 2.5 μL Annexin

V-Alexa Fluor 647 和 5 μL PI 混合, 然后将其在黑暗室温下孵育 15 min, 每个样品加入 200 μL PBS, 使用 FACSscan 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司)分析样品。

### 1.8 统计学分析

采用 Graphpad 软件(<https://www.graphpad.com/>)进行数据的处理和分析, Student-*t* 检验评估数据的统计学差异, 定量结果表示为平均值(Mean)±标准误(SEM)。\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, n.s 无统计学意义。所有的实验生物学样本重复至少 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 在生殖细胞与包囊细胞中敲减 *CG8005* 基因导致雄性果蝇生育率下降

为了探究 *CG8005* 基因与雄性果蝇生育能力的相关性, 本研究分别在生殖细胞和包囊细胞中表达的 *gal4* 来驱动 UAS-*CG8005* RNAi。生育率测试(表 3)结果表明, 生殖细胞中敲减 *CG8005* 基因(*nos*>*CG8005* RNAi)导致雄性果蝇完全不育, 生育率为 0.00% (*n*=59, *P*<0.001); 包囊细胞中敲减 *CG8005* 基因(*tj*>*CG8005* RNAi), 雄性果蝇生育率下降至 19.67% (*n*=61, *P*<0.001)。

### 2.2 在生殖细胞中敲低 *CG8005* 基因导致生殖细胞缺失

本研究首先利用免疫荧光技术, 并通过多种睾丸细胞相关抗体观察 *CG8005* 基因在果蝇睾丸中的功能。其中, 生殖细胞可以被 Vasa 抗体标记, 融合体(fusome)可用 IBI 蛋白标记, 其在睾丸头部顶端呈点状分布, 随着生殖细胞的分化, 逐渐发展成树杈

表 3 敲减 *CG8005* 基因雄性果蝇生育率的测试结果  
Table 3 Test results of knocking down *CG8005* gene on male fruit fly fertility

组别	总数	可育数	生育率	<i>P</i> 值
野生型	74	71	95.94%	—
<i>nos</i> > <i>CG8005</i> RNAi	59	0	0	<0.001
<i>tj</i> > <i>CG8005</i> RNAi	61	12	19.67%	<0.001

采用卡方检验计算统计学差异。

状; CySCs 可被锌指结构域 1 蛋白(Zn finger homeodomain 1, Zfh1)标记; 成熟的包裹细胞被眼缺陷蛋白(eyes absent, Eya)标记。通过共聚焦显微镜观察结果显示, 与对照组相比, *nos>CG8005* RNAi 组睾丸形态坍塌、内部结构紊乱, 呈现小睾丸表型, 此时生殖细胞及融合体均全部消失(图 1)。为了进一步探索被 DNA 标记的细胞核来源, 利用体细胞相关免疫抗体进行检测, 睾丸顶部的 CySCs 和包裹细胞的细胞数目明显增多, Eya 积累与 Zfh1 信号发生重合(图 1)。以上结果提示, *CG8005* 基因在早期生殖细胞中导致生殖细胞缺失。

### 2.3 在生殖细胞中敲低 *CG8005* 基因生殖细胞增殖能力减弱

黏附蛋白 DE-cad 是中心细胞和体细胞的标记物, 生殖细胞中缺失 *CG8005* 基因, 睾丸头部顶端的中心细胞消失不可见, 体细胞与增多的包裹细胞同步定位(图 2), 包裹细胞属于种系而不是生殖系。磷酸化组蛋白 H3 (phospho-histone H3, PH3)作为增殖细胞的标记物, 在正常果蝇睾丸早期生殖细胞中仅存在 1~3 个。本研究进一步利用免疫荧光技术检测生殖细胞消失后其增殖能力的改变, 结果显示在

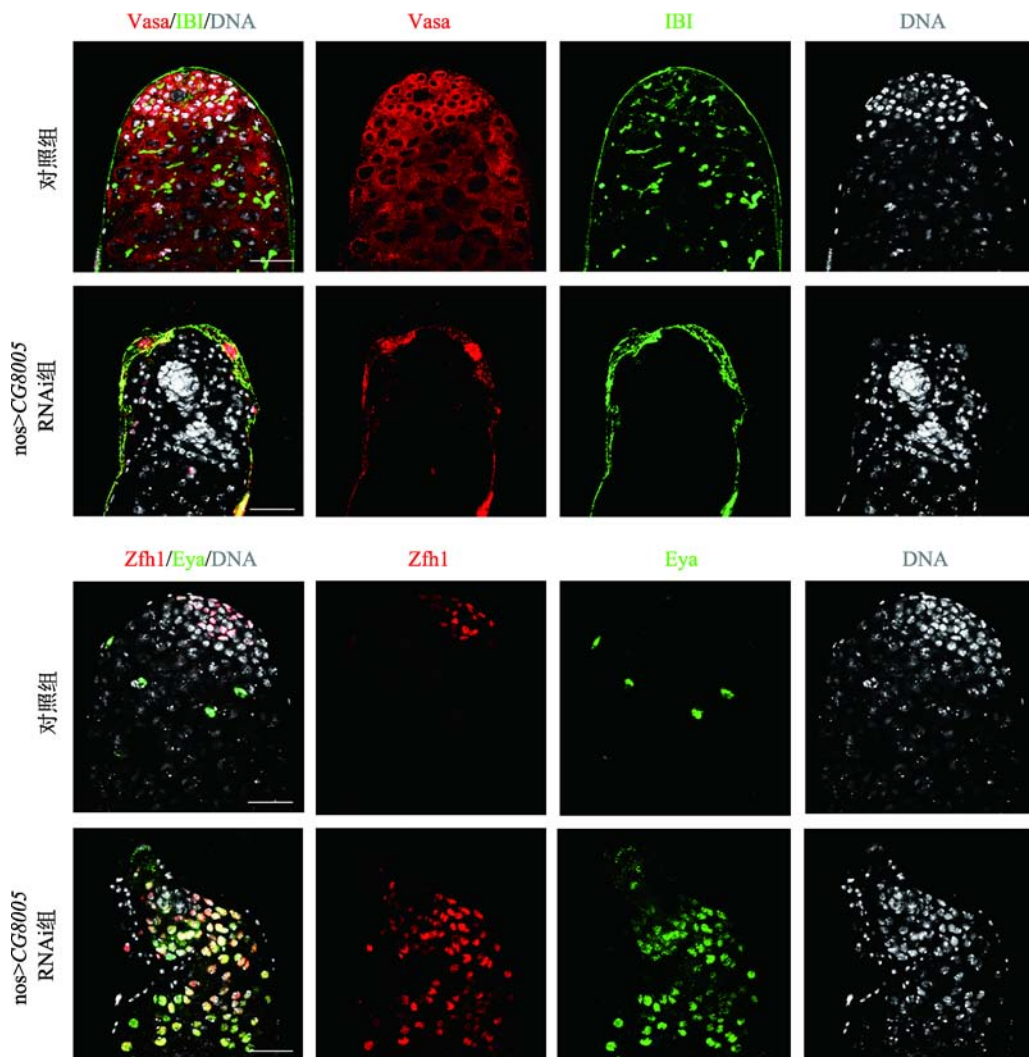


图 1 缺失 *CG8005* 基因生殖细胞的表达模式

Fig. 1 The expression patterns of germ cells with the knockdown of the *CG8005* gene

Vasa 抗体(红色)标记生殖细胞, IBI 抗体(绿色)标记生殖融合体。Zfh1 抗体(红色)标记体细胞干细胞, Eya 抗体(绿色)标记包裹细胞, DNA 标记细胞核(灰色)。标尺: 20  $\mu\text{m}$ 。



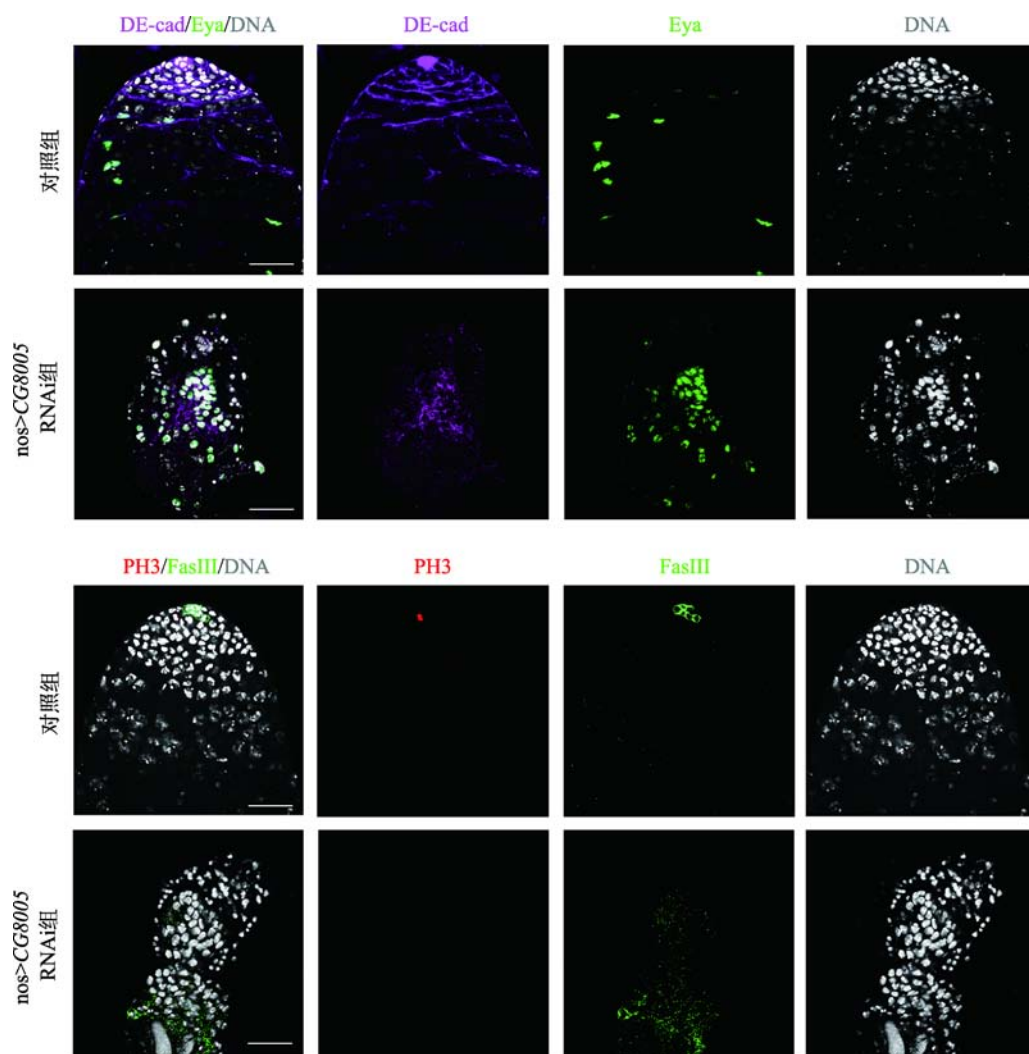


图 2 生殖细胞中敲低 *CG8005* 基因对生殖细胞增殖能力的影响

**Fig. 2** Effects of *CG8005* gene knockdown on the cell proliferation ability in germ cells

体细胞被 DE-cad 抗体(紫色)识别, Eya 抗体(绿色)标记包囊细胞。PH3 抗体(红色)检测细胞增殖能力, FasIII 抗体(绿色)标记中心细胞, DNA 标记细胞核(灰色)。标尺: 20  $\mu\text{m}$ 。

对照组果蝇睾丸头部顶端可检测到 PH3 信号, 而 *nos>CG8005* RNAi 组中未检测到 PH3 表达(图 2), 提示生殖细胞缺失可能与其增殖能力减弱有关。

#### 2.4 在包囊细胞中敲低 *CG8005* 基因影响生殖细胞分化

为了探索果蝇睾丸中 *CG8005* 基因在包囊细胞中的功能, 本研究利用 *tj-gal4* 在包囊细胞中敲低 *CG8005* 基因。免疫荧光结果显示, 对照组睾丸顶部的中心细胞被 FasIII 抗体识别, 而实验组中 FasIII 信号消失, Zfh1 和 Eya 染色结果显示不存在 CySCs

和包囊细胞(图 3)。有研究表明, 中心细胞参与调控生殖干细胞自我更新与分化过程, 本研究结果显示, *tj>CG8005* RNAi 组睾丸失去了正常的形态, 中心细胞缺失, 并在果蝇睾丸中出现被 Vasa 抗体标记的异常细胞团块, 此时树杈状的融合体变成点状(图 4), 最终导致细胞过度增殖, 形成生殖细胞样肿瘤。这些未分化的生殖细胞团块被 TUNEL(末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP-生物素缺口末端)标记, 统计学结果显示凋亡细胞比率近 30% (图 4), 提示这些细胞具有凋亡能力, 表明 *CG8005* 基因是生殖细胞形成所必需的。以上结果揭示了 *CG8005* 基因在包

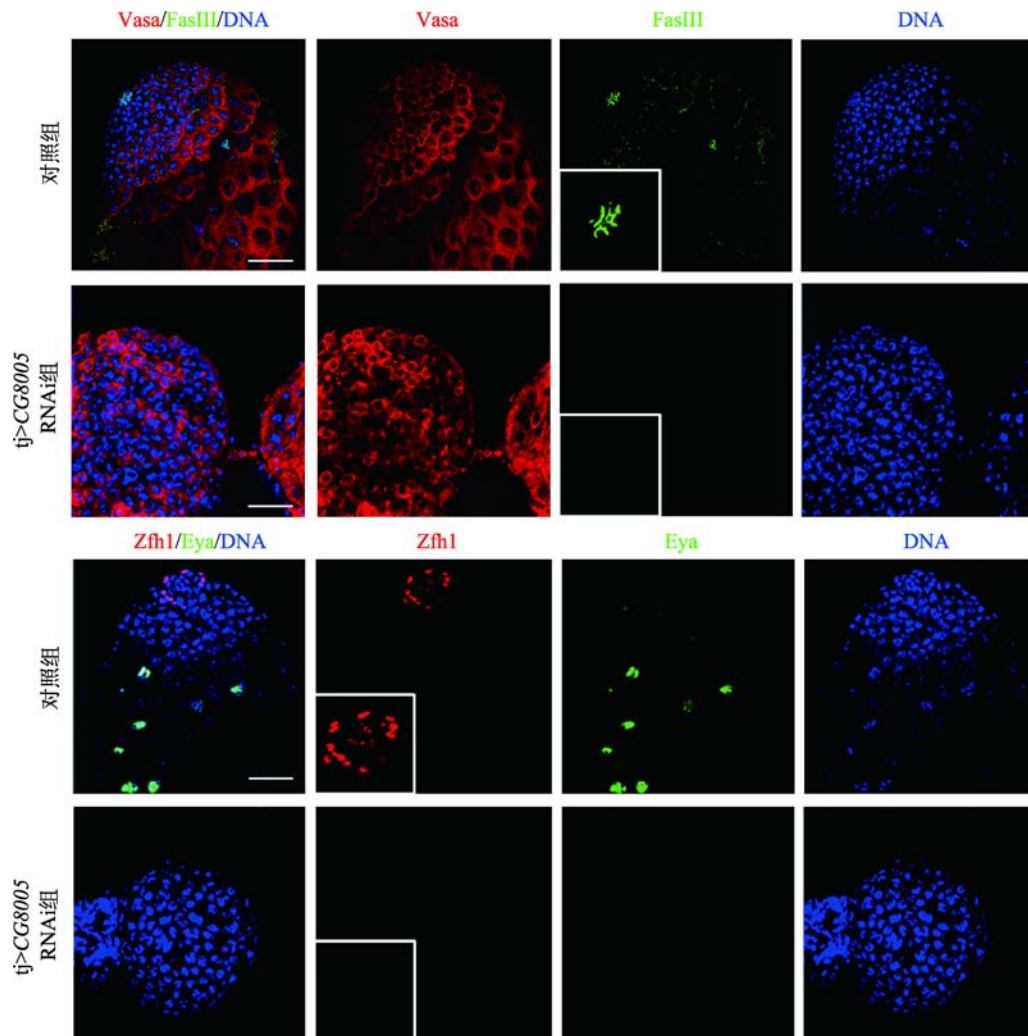


图 3 在包裹细胞中敲低 *CG8005* 基因对生殖细胞及体细胞的影响

Fig. 3 Effects of *CG8005* gene knockdown on germ and somatic cells among the cyst cells

Vasa 抗体(红色)标记生殖细胞, FasIII 抗体(绿色, 放大)标记中心细胞。Zfh1 抗体(红色, 放大)标记体细胞干细胞, 包裹细胞被 Eya 抗体(绿色)识别。DNA 标记细胞核(蓝色)。标尺: 20  $\mu\text{m}$ 。

囊细胞中影响生殖细胞的分化过程。

## 2.5 *CG8005* 基因缺失抑制果蝇 S2 细胞增殖

为了进一步探究 *CG8005* 基因的体外功能, 本研究使用两个 siRNA (si*CG8005*-1 和 si*CG8005*-2) 将 *CG8005* 基因在果蝇 S2 细胞中表达沉默。通过荧光定量 PCR 检测对照组、si*CG8005*-1 组和 si*CG8005*-2 组中 *CG8005* 信使 RNA (mRNA) 表达水平, 结果显示片段 si*CG8005*-1 敲减效率 52%, 而 si*CG8005*-2 敲减效率达 70%, 因此选用片段 si*CG8005*-2 进行后续实验(图 5A)。在果蝇 S2 细胞中敲减 *CG8005* 基因, 用检测细胞增殖能力标记物 PH3 进行免疫荧光染色,

结果显示, 与对照组相比, si*CG8005*-2 组 PH3 阳性细胞减少(图 5B), 对照组 PH3 阳性信号百分比为 5.8%, 实验组下降至 4.3%, 具有统计学差异(图 5C)。以上结果表明, 在果蝇 S2 细胞中敲减 *CG8005* 基因抑制细胞的增殖。

## 2.6 *CG8005* 基因缺失导致果蝇 S2 细胞凋亡

运用 UAS-gal4 系统实现 *CG8005* 基因在睾丸中缺失, 导致生殖细胞自我更新和分化异常。本研究进一步分析 *CG8005* 基因对果蝇 S2 细胞存活的影响, 利用 TUNEL 免疫荧光技术检测凋亡细胞, 结果显示, 与对照组相比, si*CG8005*-2 组果蝇 S2 细胞中

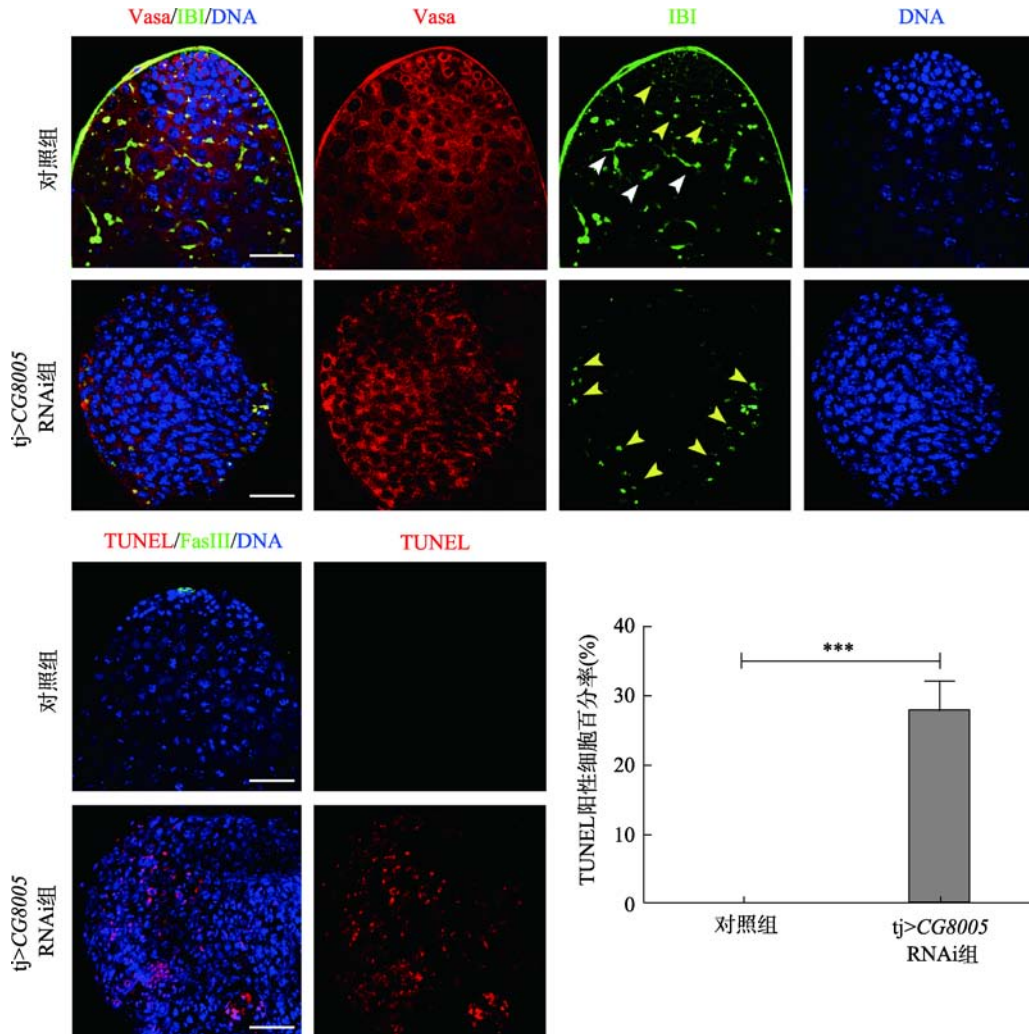


图 4 在包囊细胞中敲低 *CG8005* 基因对生殖融合体和细胞凋亡影响

Fig. 4 Effects of *CG8005* gene knockdown on fusomes and apoptosis among the cyst cells

IBI 抗体(绿色)标记生殖细胞间融合体,黄色箭头表示点状融合体,白色箭头表示树杈状融合体。TUNEL 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP-生物素缺口末端。柱状图表示 TUNEL 阳性细胞百分比。DNA 标记细胞核(蓝色)。标尺: 20  $\mu\text{m}$ 。

TUNEL 阳性细胞增加(图 6A), 实验组中 TUNEL 阳性细胞百分比从 2% 上升至 7% (图 6B)。流式细胞术的检测结果显示与 TUNEL 免疫荧光结果一致(图 6C), 凋亡细胞增加存在统计学意义(图 6D)。反映 *CG8005* 基因敲减后, 果蝇 S2 细胞凋亡增加。

## 2.7 *CG8005* 基因沉默影响剪接体亚基的表达

剪接体在疾病的发生中具有重要的意义, 主要的剪接体对于 mRNA 加工和细胞存活至关重要, 剪接体亚基 U2A 的突变会损害精原细胞的分化, 阻碍生殖细胞成熟为精子。为了初步探索 *CG8005* 基因与剪接体亚基之间的联系, 本研究主要利用 qRT-PCR

方法, 对主要剪接体的相对表达量进行分析。结果表明, 剪接体亚基(*Prp18*、*Prp19*、*SmB*、*SmD1*、*SmE*、*SmF* 和 *SmG*)的 mRNA 水平均在敲减 *CG8005* 基因的果蝇 S2 细胞中表达上调(图 7), 提示 *CG8005* 基因沉默可能促进了剪接体亚基的表达, 从而影响它们的功能。

## 3 讨论

精子发生过程中任何障碍最终可能导致男性不育, 其中生殖细胞的功能异常对于男性生育能力尤为重要。并且有证据显示, 生殖细胞肿瘤患者在年



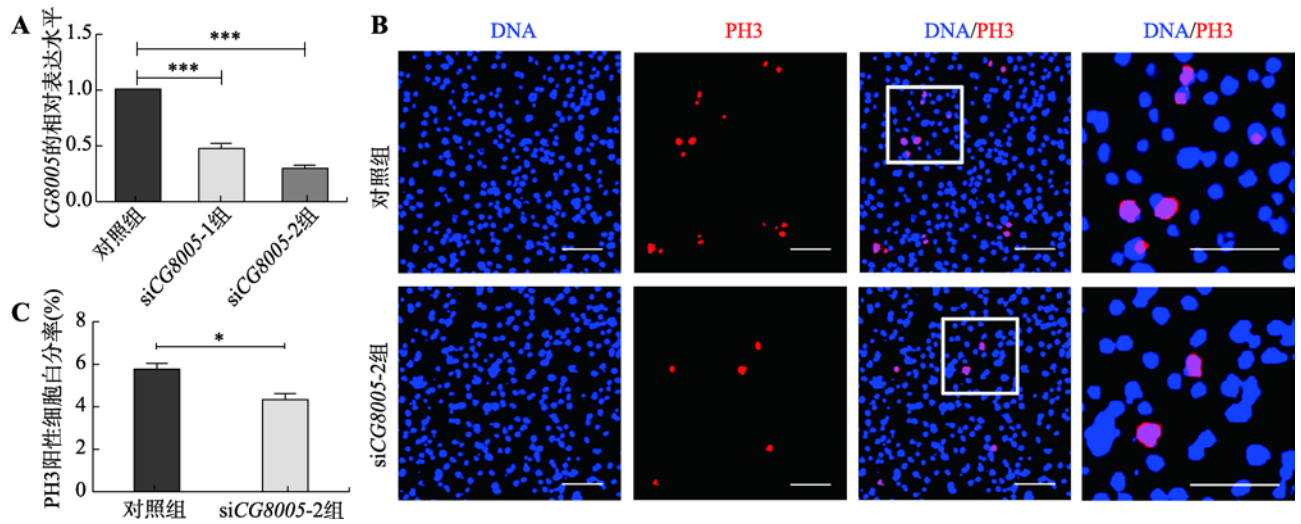


图 5 在果蝇 S2 细胞中缺失 *CG8005* 基因对细胞增殖能力的影响

**Fig. 5** Effects of *CG8005* gene knockdown on the proliferation ability of the *Drosophila* S2 cells

A: qRT-PCR 法检测在果蝇 S2 细胞中转染 siCG8005-1、siCG8005-2 验证干扰效率; B: 免疫荧光检测在果蝇 S2 细胞中转染 siCG8005-2 细胞的增殖能力; C: PH3 阳性细胞百分比。\*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。标尺: 30 μm。

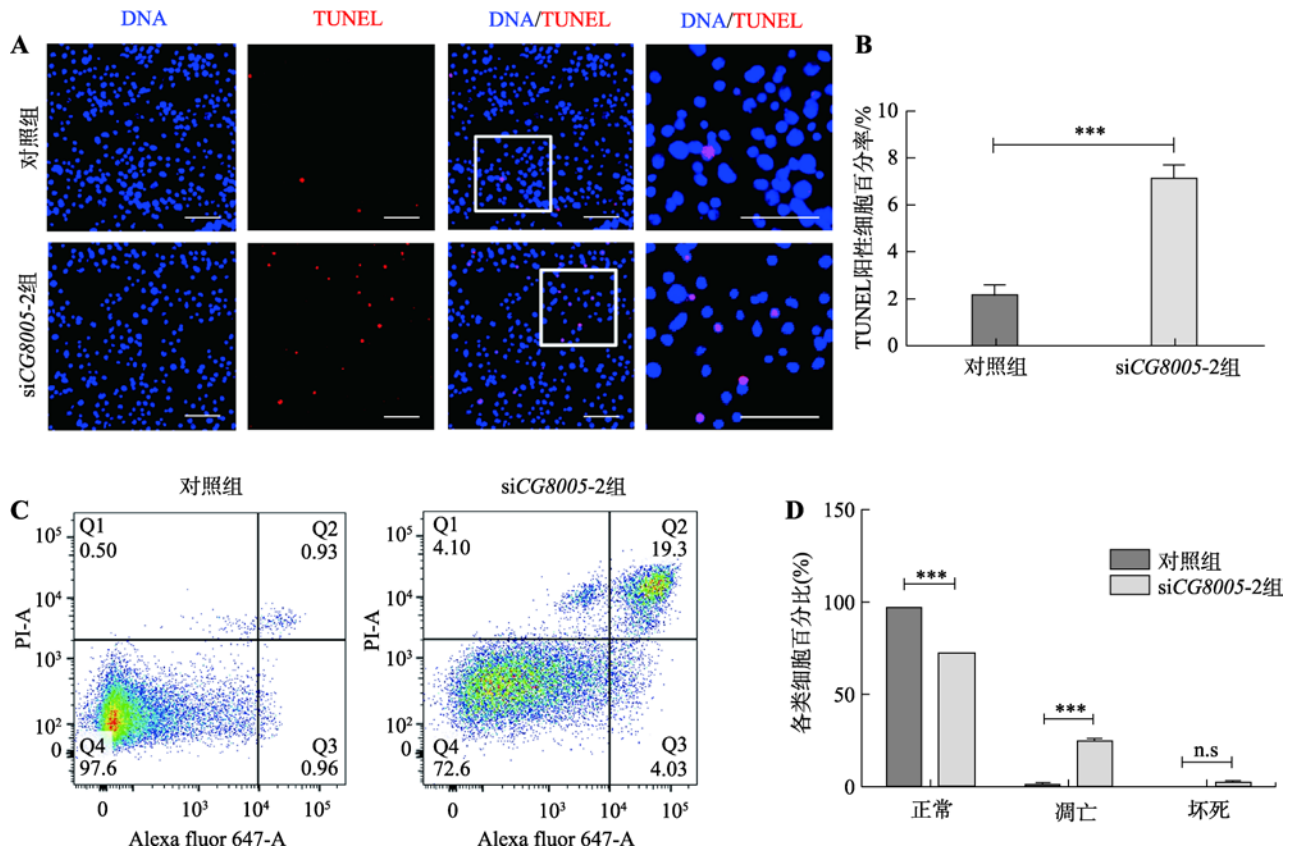


图 6 在果蝇 S2 细胞中缺失 *CG8005* 基因对细胞凋亡水平的影响

**Fig. 6** Effects of *CG8005* gene knockdown on the apoptosis level of the *Drosophila* S2 cells

A: 免疫荧光检测在果蝇 S2 细胞中转染 siCG8005-2 细胞的凋亡情况; B: TUNEL 阳性细胞百分比; C: 流式检测细胞凋亡情况; D: 流式各组细胞百分比。\*\*\*  $P < 0.001$ ; n.s. 无统计学差异。标尺: 30 μm。

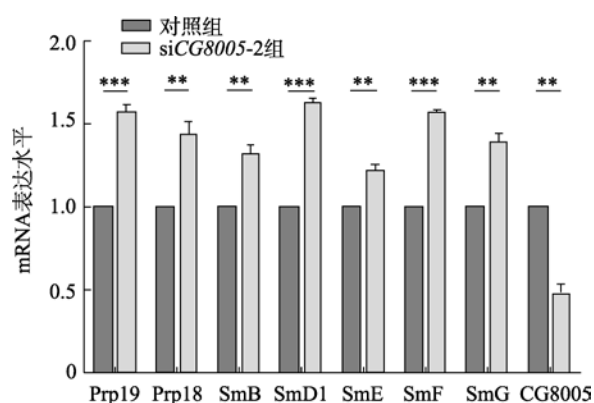


图 7 *CG8005* 基因沉默对剪接体亚基表达水平的影响  
Fig. 7 Effects of *CG8005* gene knockdown on the expression of spliceosome subunits

\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

轻的时候存在生育相关问题,提示不育症可能是生殖细胞肿瘤发病的高危因素<sup>[17]</sup>。

果蝇具有繁殖时间短、遗传操作性强、靶基因的 RNAi 品系资源丰富等优势,在雄性生殖系统(特别是生殖细胞)的研究中具有优势。果蝇睾丸中 GSCs 是果蝇精子产生的源头, CySCs 为生殖细胞的增殖、生长及分化提供环境,它们的自我更新与分化过程均需要 Hub 细胞的维持<sup>[18]</sup>。Yu 等<sup>[6]</sup>运用果蝇模型在睾丸中筛选到 221 个生殖干细胞调控因子,并进一步对这些调控因子进行深入研究,发现一些调控因子可以通过包裹细胞影响生殖细胞的分化过程,最终形成生殖细胞样肿瘤<sup>[6,19]</sup>。

*CG8005* 蛋白是一种可能的脱氧苏氨酸合酶, Bing 在线工具分析 *CG8005* 基因参与细胞周期进程、信使 RNA 衰减等过程,可催化亚精胺的 NAD 依赖性氧化裂解,与真核翻译起始因子 5A(elf-5A)的相互作用蛋白,它可能参与应激反应并维持细胞壁的完整性,充当细胞凋亡的调节剂。然而, *CG8005* 基因在果蝇睾丸生殖细胞中的研究报道十分少见。

本研究结果提示,缺失 *CG8005* 基因雄性果蝇尽管可以存活,但其生育能力明显下降。更重要的是, *nos-gal4* 主要在生殖干细胞和精原细胞中表达,并在生精过程中逐渐下降, *CG8005* RNAi 组中睾丸形态缩小,生殖细胞及融合体消失,包裹细胞及 CySCs 代偿性增加,尽管这些细胞具有一定的增殖能力,最终依然导致生殖细胞死亡。而 *tj-gal4* 主要在体细胞的包裹细胞中表达,有研究报道 GSCs 正

常分化过程受到 CySCs 的调控, CySCs 缺陷可以介导生殖细胞分化阻滞最终发展为生殖细胞肿瘤<sup>[1]</sup>。本研究运用 *tj-gal4* 介导 *CG8005* RNAi 使用 Vasa 抗体观察这些过度增殖细胞的表达模式,结果发现异常的细胞团块被生殖细胞信号捕捉,通过 FasIII 的表达模式中心细胞缺失,连接生殖细胞之间的融合体逐渐由树杈状变为点状, CySCs 和包裹细胞消失更进一步的说明细胞不受调控的增长,形成生殖细胞肿瘤。S2 细胞是果蝇中经典的细胞模型,在果蝇 S2 细胞中敲减 *CG8005* 基因导致细胞数目减少,抑制细胞增殖并加重细胞凋亡。最后, *CG8005* 基因可能竞争性地影响剪接体亚基的表达,已有证据表明剪接体复合物可能在无精症和生殖细胞肿瘤中起关键作用<sup>[16]</sup>,使用种系干细胞模型将在未来的研究中进一步评估。

综上所述,本研究初步揭示了 *CG8005* 基因在果蝇睾丸生殖细胞中的生物学功能, *CG8005* 基因是一个果蝇睾丸优势表达的生殖细胞作用因子,在生殖干细胞微环境中发挥重要的作用,主要影响生殖细胞的自我更新和分化过程。干涉效率验证筛选到 *CG8005* siRNA 片段,为制备 *CG8005* RNAi 果蝇提供靶向序列。而 *CG8005* 基因与剪接体亚基之间的竞争性关系为未来的研究提供方向,为理解男性不育及睾丸生殖细胞肿瘤的发病机理提供实验基础。

## 参考文献(References):

- [1] de Cuevas M, Matunis EL. The stem cell niche: lessons from the *Drosophila* testis. *Development*, 2011, 138(14): 2861–2869. [DOI]
- [2] Fuller MT, Spradling AC. Male and female *Drosophila* germline stem cells: two versions of immortality. *Science*, 2007, 316(5823): 402–404. [DOI]
- [3] Spradling A, Fuller MT, Braun RE, Yoshida S. Germline stem cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(11): a002642. [DOI]
- [4] Chen DS, Zhu XX, Zhou LJ, Wang J, Tao XQ, Wang S, Sun FL, Kan XZ, Han ZQ, Gu YL. Gilgamesh is required for the maintenance of germline stem cells in *Drosophila* testis. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5737. [DOI]
- [5] Amoyel M, Anderson J, Suisse A, Glasner J, Bach EA. Socs36E controls niche competition by repressing MAPK signaling in the *Drosophila* testis. *PLoS Genet*, 2016,

- 12(1): e1005815. [DOI]
- [6] Yu J, Lan X, Chen X, Yu C, Xu YW, Liu YJ, Xu L, Fan HY, Tong C. Protein synthesis and degradation are essential to regulate germline stem cell homeostasis in *Drosophila* testes. *Development*, 2016, 143(16): 2930–2945. [DOI]
- [7] Davies EL, Fuller MT. Regulation of self-renewal and differentiation in adult stem cell lineages: lessons from the *Drosophila* male germ line. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, 73: 137–145. [DOI]
- [8] Roessler E, Ouspenskaia MV, Karkera JD, Vélez JI, Kantipong A, Lacbawan F, Bowers P, Belmont JW, Towbin JA, Goldmuntz E, Feldman B, Muenke M. Reduced nodal signaling strength *via* mutation of several pathway members including FOXH1 is linked to human heart defects and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet*, 2008, 83(1): 18–29. [DOI]
- [9] Demarco RS, Uyemura BS, D'Alterio C, Jones DL. Mitochondrial fusion regulates lipid homeostasis and stem cell maintenance in the *Drosophila* testes. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(6): 710–720. [DOI]
- [10] Chang YC, Tu H, Chen JY, Chang CC, Yang SY, Pi HW. Reproduction disrupts stem cell homeostasis in testes of aged male *Drosophila* via an induced microenvironment. *PLoS Genet*, 2019, 15(7): e1008062. [DOI]
- [11] Evans-Anderson HJ, Alfieri CM, Yutzey KE. Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by foxo transcription factors. *Circ Res*, 2008, 102(6): 686–694. [DOI]
- [12] Kiger AA, Jones DL, Schulz C, Rogers MB, Fuller MT. Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science*, 2001, 294(5551): 2542–2545. [DOI]
- [13] Tulina N, Matunis E. Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science*, 2001, 294(5551): 2546–2549. [DOI]
- [14] Zhang Z, Lv XD, Jiang J, Zhang L, Zhao Y. Dual roles of Hh signaling in the regulation of somatic stem cell self-renewal and germline stem cell maintenance in *Drosophila* testes. *Cell Res*, 2013, 23(4): 573–576. [DOI]
- [15] Yu J, Yan YD, Luan XJ, Qiao C, Liu YY, Zhao D, Xie B, Zheng QW, Wang M, Chen WY. Srlp is crucial for the self-renewal and differentiation of germline stem cells *via* rpL6 signals in *Drosophila* testes. *Cell Death Dis*, 2019, 10(4): 294. [DOI]
- [16] Chen X, Luan XJ, Zheng QW, Qiao C, Chen WY, Wang M, Yan YD, Xie B, Shen C, He ZY, Zhang J, Liu MX, Hu X, Li H, Zheng B, Fang J, Yu J. Precursor RNA processing 3 is required for male fertility, and germline stem cell self-renewal and differentiation *via* regulating spliceosome function in *Drosophila* testes. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 9988. [DOI]
- [17] De Meyts ER, McGlynn KA, Okamoto DK, Jewett MAS, Bokemeyer C. Testicular germ cell tumours. *Lancet*, 2016, 387(10029): 1762–1774. [DOI]
- [18] Yu J, Yan YD, Luan XJ, Qiao C, Liu YY, Zhao D, Xie B, Zheng QW, Wang M, Chen WY, Shen C, He ZY, Hu X, Huang XY, Li H, Shao QX, Chen X, Zheng B, Fang J. Srlp is crucial for the self-renewal and differentiation of germline stem cells *via* Rpl6 signals in *Drosophila* testes. *Cell Death Dis*, 2019, 10(4): 294. [DOI]
- [19] Fairchild MJ, Smendziuk CM, Tanentzapf G. A somatic permeability barrier around the germline is essential for *Drosophila* spermatogenesis. *Development*, 2015, 142(2): 268–281. [DOI]

(责任编辑: 史庆华)