

FAAH 在小鼠精原干细胞中的表达研究

高亭亭¹, 邵彬彬², 张 茜¹, 蔡金洋¹, 黄晓燕^{1*}

(¹南京医科大学生殖医学国家重点实验室, 组织胚胎学系, 江苏 南京 211166; ²南京医科大学第二附属医院妇产科, 江苏 南京 210011)

[摘要] 目的: 验证脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydrolase, FAAH)在小鼠精原干细胞(spermatogonial stem cell, SSCs)中的表达。方法: 构建稳定的小鼠 SSCs 培养平台, Western blot 法检测 FAAH 在小鼠各组织脏器和 SSCs 的表达, 免疫荧光法检测 FAAH 在睾丸组织及 SSCs 中的定位情况。结果: Western blot 结果表明 FAAH 在睾丸组织高表达。免疫荧光显示 FAAH 定位于小鼠 SSCs 的细胞膜并且与已知的分选标记神经胶质细胞源性的神经营养因子(GDNF)家族受体 $\alpha 1$ (GDNF family receptor $\alpha 1$, GFR $\alpha 1$)共定位。结论: FAAH 可作为一个新的 SSCs 分选富集的表面分子标记, 为进一步研究 FAAH 在精子发生的作用打下基础。

[关键词] 精原干细胞; 脂肪酰胺水解酶; 细胞分选

[中图分类号] R339.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)07-778-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160703

A study of FAAH expression in spermatogonial stem cells

Gao Tingting¹, Shao Binbin², Zhang Xi¹, Cai Jinyang¹, Huang Xiaoyan^{1*}

(¹State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Department of Histology and Embryology, NJMU, Nanjing 211166; ²Department of Gynaecology and Obstetrics, the No.2 Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To validate fatty acid amide hydrolase (FAAH) expression in mouse spermatogonial stem cells (SSCs). **Methods:** We established a stable mouse SSCs line *in vitro* and verified FAAH expression in various tissues of mice and the cell line by Western blotting assay. Immunofluorescence was performed to detect FAAH location in the testis and SSCs. **Results:** Western blotting assay showed that FAAH was highly expressed in testicular tissues. Double-immunofluorescent staining showed that FAAH located on the membrane of mouse SSCs and co-localized with SSCs separation marker, GDNF family receptor $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$). **Conclusion:** FAAH is a new candidate separation surface marker of SSCs, which provides a basis for the research of FAAH function in spermatogenesis.

[Key words] spermatogonial stem cells; fatty acid amide hydrolase (FAAH); cell sorting

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07):778-782]

精子发生这一生物学事件依赖于比例很少的精原干细胞(spermatogonial stem cell, SSCs), 成年睾丸中每 1×10^4 个细胞中只有 2~3 个 SSCs^[1-2]。虽然 SSCs 数量稀少, 但是它们是精子发生过程中唯一能够自我更新的生殖细胞, 从而维持雄性一生的精子发生。近几年研究发现可以通过 SSCs 表面特异表达的蛋白分子标记来分选并且富集 SSCs; 分选后荧光标记的小鼠 SSCs 经过体外移植实验^[3]移植到无

荧光标记的白消安处理的受体小鼠睾丸网, 可以重建受体小鼠的精子发生过程, 从而能进一步研究 SSCs 的功能。因此 SSCs 的富集具有重要的生物学研究意义和临床应用价值。

在前期研究工作中, 参照日本 Shinohara 课题组培养体系^[4], 构建了稳定带有红色膜荧光标记的小鼠 SSCs 体外培养平台, 并对 SSCs 自我更新和分化能力进行了体内外各项鉴定, 进而构建了小鼠 SSCs 蛋白表达谱系并筛选出一批与 SSCs 自我更新和分化调控相关的蛋白质及网络, 共鉴定出 682 个蛋白质^[5], 脂肪酰胺水解酶(fatty acid amide hydro-

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31271537)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: bbhxy@njmu.edu.cn

lase,FAAH)就是其中的一员。FAAH 是存在于哺乳动物中完整的膜酶,属于降解内源性大麻素等内源性信号脂质脂肪酸酰胺家族^[6]。FAAH 被证实为将内源性大麻素(anandamide,AEA)分解为花生四烯酸和乙醇胺的最主要关键酶^[7]。FAAH 的四级结构显示其每个结构单元的 $\alpha 18$ - $\alpha 19$ 二聚体同在细胞膜的外侧^[6],与膜蛋白结构类似。FAAH 有 FAAH1 和 FAAH2 两种亚型,小鼠中只表达 FAAH1。FAAH 敲除的小鼠精子穿越透明带的能力受损,精子运动能力减弱^[8],但 FAAH 在 SSCs 中的功能未有报道。本研究验证 FAAH 是否为小鼠 SSCs 表面表达的分子蛋白,为提高 SSCs 富集效率增加新的标记物,并为其基因和蛋白在精子发生中相关功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠 SSCs 系及培养试剂见参考文献^[5],小鼠品系 CD-1(ICR,清洁级),雄性,购自北京维通利华公司,并经南京医科大学伦理学委员会同意后取材使用。Western 及 IP 细胞裂解液(P0013)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(南通碧云天公司),预染蛋白 marker (26616,Thermo 公司,美国),actin 单克隆鼠抗(MAB1501,Merck Millipore 公司,美国),FAAH 单克隆鼠抗(ab54615,Abcam 公司,美国),山羊抗鼠(31430,Thermo 公司,美国),羊抗鼠 PLZF 多克隆抗体(AF2944,R&D 公司,美国),兔抗鼠 GFR $\alpha 1$ 多克隆抗体(ab84106,Abcam 公司,美国),驴抗兔 Alexa Fluor 555 IgG(A31572)、Alexa Fluor 555 标记的驴抗羊 IgG(A21432)、Alexa Fluor 488 标记的驴抗鼠 IgG(A21202)(Life 公司,美国),ECL 试剂盒(Perkin Elmer 公司,美国),Hoechst H33342(Sigma 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 检测 FAAH 蛋白表达水平

为检测 FAAH 在小鼠各组织脏器及不同周龄小鼠睾丸组织中的表达情况,提取 SSCs 细胞、0.5 d 和 1 周龄小鼠的睾丸组织以及成年小鼠心、脾、肾、胃、肠、子宫、卵巢、睾丸、肌肉、脑组织蛋白用 SDS-PAGE 分离,转膜后用 FAAH 鼠单克隆抗体(1:500)和 actin 鼠单克隆抗体(1:10 000)4℃孵育过夜,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000)37℃孵育 1 h,用 ECL 化学发光检测试剂盒显色,FluorChem 5 500(AlphaInnotech)成像系统检测杂交信号。

1.2.2 小鼠睾丸组织和 SSCs 细胞免疫荧光染色

取出生后 3.5 d 小鼠睾丸全组织,分离睾丸曲细精管,4% PFA 固定 30 min,PBS 洗 3 遍,每遍 5 min,1%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 2 h。然后分别以一抗 PLZF(1:200)、FAAH(1:200)、GFR $\alpha 1$ (1:200)4℃过夜,Alexa Fluor 555 标记的驴抗兔 IgG、Alexa Fluor 555 标记的驴抗羊 IgG、Alexa Fluor 488 标记的驴抗鼠 IgG(1:500)室温避光孵育 2 h,PBS-T 洗 3 遍,每遍 5 min。阴参一抗使用兔 IgG 和鼠 IgG。使用 5 μ g/mL 的 Hoechst H33342 染核 30 s,封片后共聚焦显微镜观察拍照。SSCs 以 0.3×10^5 个/mL 的密度种于提前 1 d 铺于平皿 Feeder 上,隔天换液,待 5~7 d 后弃培养液,DPBS 洗 1 遍。4% PFA 固定 30 min 后,一抗、二抗孵育,染色观察,步骤同前。

2 结果

2.1 FAAH 在小鼠和 SSC 细胞中的表达情况

Western blot 检测 FAAH 在小鼠各组织脏器中的表达,结果显示,FAAH 是一种广泛表达于多脏器的蛋白质,其在肠、肾脏、脑及睾丸组织中优势表达,在胃、脾脏、子宫、卵巢中较高表达,而在心脏和肌肉中表达量较低(图 1)。Western blot 和灰度值分析结果显示 FAAH 在 SSCs 中有一定量的表达,而在 0.5 d 和 1 周龄小鼠睾丸中表达较高(图 2)。

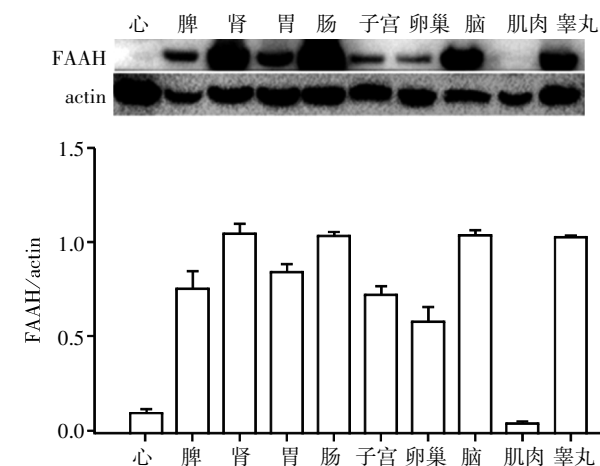


图 1 Western blot 检测小鼠各组织脏器中 FAAH 表达情况
Figure 1 Expression of FAAH in different tissues of mouse by Western blot assay

2.2 免疫荧光染色显示 FAAH 在小鼠睾丸和 SSCs 中的定位

PLZF 是未分化的小鼠 SSCs 标志性标记,定位于细胞核^[9]。睾丸曲细精管免疫荧光结果显示,FAAH 的定位信号在 3.5 d 小鼠睾丸生精小管中,与 PLZF 基本一致,主要定位在未分化的 SSCs,并且定位在

PLZF 的外侧; 在 小鼠 SSCs 中,FAAH 也分布于 PLZF 的外周 1 圈(图 3),提示可能为膜荧光信号。

2.3 细胞免疫荧光双标法观察 FAAH 在 SSCs 中的定位

GFR α 1 是 小鼠 SSCs 表面公认的膜蛋白之一^[10]。为了验证 FAAH 是否为新的膜蛋白,我们对 SSCs 进行了 GFR α 1 和 FAAH 的定位比较。细胞免疫荧光共染结果显示 GFR α 1 定位于 SSCs 胞膜,FAAH 在 SSCs 的定位与 GFR α 1 基本一致,为细胞膜定位(图 4)。

3 讨论

鉴于 SSCs 特殊的生物学功能,目前有很多关于 小鼠 SSCs 特异性分子标记物的研究,如 α 6-integrin、 β 1-integrin、CD24、thy-1、CD9 等^[11-15],但这些分子在其他干细胞中也有表达。造血干细胞中表达 thy-1 和 β 1-integrin^[16-17],胚胎干细胞中表达 α 6-inte-

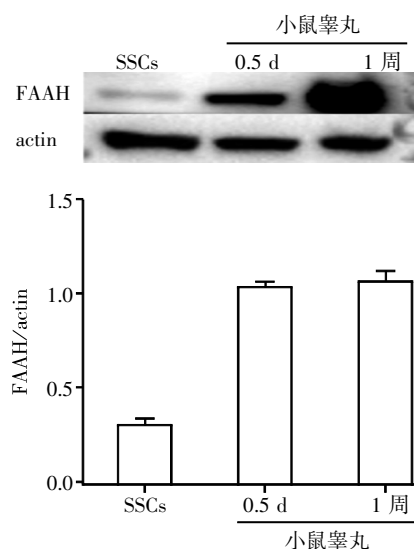
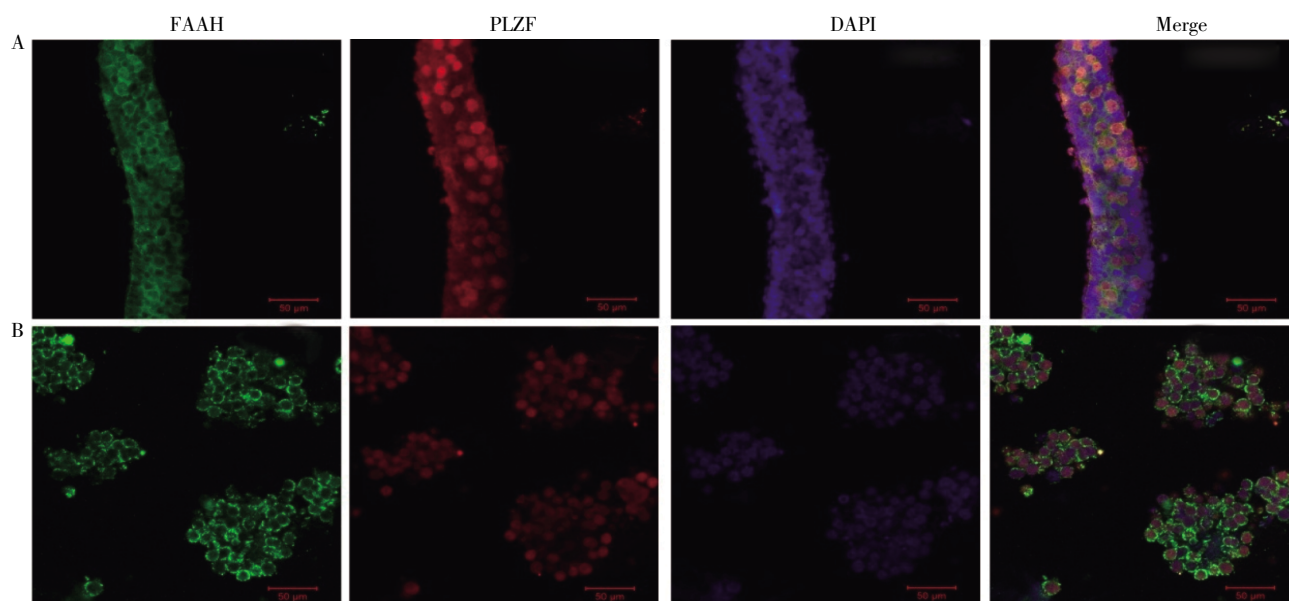


图 2 Western blot 检测 SSCs 和小鼠睾丸组织中 FAAH 的表达情况

Figure 2 FAAH expression in mouse SSCs and the testis by Western blot assay



A:3.5 d 睾丸曲细精管 FAAH 定位于 SSCs;B:小鼠精原干细胞系 SSCs 免疫荧光,FAAH 定位于 PLZF 外周 1 圈。

图 3 免疫荧光检测睾丸和 SSCs 中 FAAH 的定位($\times 200$)

Figure 3 FAAH location in the testis and SSCs by immunofluorescence($\times 200$)

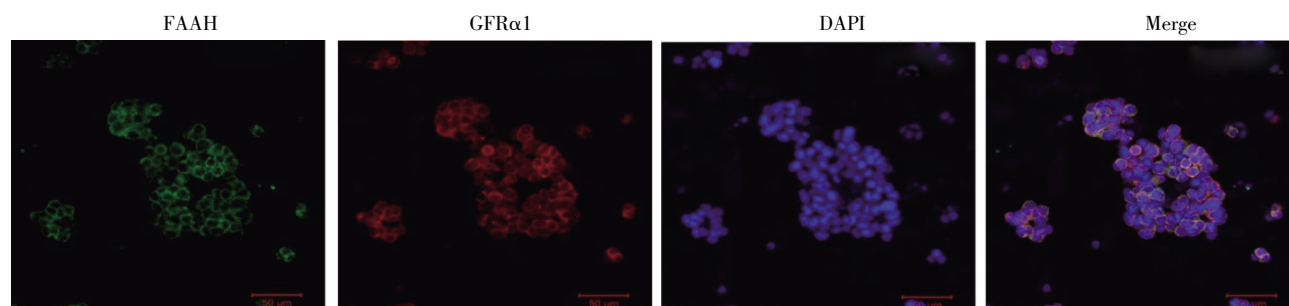


图 4 免疫荧光双标法检测比较 FAAH 与 GFR α 1 在 SSCs 的定位情况($\times 400$)

Figure 4 Comparison of localization of FAAH and GFR α 1 positioning in SSCs by double immunofluorescent($\times 400$)

grin^[18]。然而 SSCs 和其他干细胞不同,造血干细胞表达的 $\alpha 4$ -integrin 和 c-kit^[17,19]在 SSCs 不表达^[12]。尽管现状如上所述,但是不同干细胞之间共同表达分子的寻找促进了干细胞表面识别标记物的鉴定。细胞表面的跨膜蛋白 $\alpha 6$ -integrin 和 $\beta 1$ -integrin 是 SSCs 分选的表面标记物,流式分选显示 $\alpha 6$ -integrin 和 $\beta 1$ -integrin 标记的 SSCs 细胞数分别高于对照组 13.2%、23.0%。将 $\alpha 6$ -integrin 和 $\beta 1$ -integrin 标记的 SSCs 进行移植,所得到的克隆数和克隆区域均比对照组高^[12]。胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)的协同受体 GFR $\alpha 1$ 已被证实表达于人 SSCs,将 GFR $\alpha 1$ 标记的细胞进行流式分选 SSCs 富集倍数可达到 4.5 倍^[15],这说明使用表面标记物分选细胞确实起到富集细胞的作用。然而,已知的分子标记物有限,还需要我们进一步挖掘以提高 SSCs 富集的效率。

前期研究中,我们首先运用两步消化酶消化法分离 3~4 d 的雄性小鼠睾丸构建了稳定的 SSCs 系,并且可以体外观察小鼠 SSCs 的自我更新和分化能力^[22]。同时,我们通过细胞免疫荧光验证了 SSCs 特定标记物 OCT4、PLZF 和 GFR $\alpha 1$ 的表达,通过体外移植实验重建精子发生来验证小鼠 SSCs 系^[5]。本研究在蛋白水平和组织细胞定位验证 FAAH 在 SSCs 的表达,并且细胞免疫荧光显示 FAAH 与 GFR $\alpha 1$ ^[10,15]这个经典的 SSCs 分选标记物细胞定位基本一致,所以我们考虑将 FAAH 列入几种干细胞共同表达的分子标记物中。在睾丸中 FAAH 并不特异表达于 SSCs,这与我们免疫荧光显示的结果是一致的。然而通过联合其他的 SSCs 标记物来分离 FAAH 阳性细胞是可行的。新的 SSCs 表面抗原的发现将会提升富集小鼠 SSCs 的技术方法。我们假设 SSCs 与其他可以自我更新的器官组织中的干细胞共享相同的分子标记,FAAH 作为 SSCs 分选富集的分子标记物可以为今后干细胞的高效富集提供基础。

由于我们没有找到可以做流式分选的商业化直标 FAAH 抗体,本研究只能通过蛋白水平和荧光定位来验证 FAAH 是 SSCs 表面表达的蛋白,后续我们会继续关注 FAAH 的直标抗体,以通过流式分选来证实 FAAH 标记细胞可以提高 SSCs 的富集效率的假设。同时已有研究表明 FAAH 表达于一些干细胞^[20],并且与其增殖和分化功能相关^[20-21],这提示研究 FAAH 在 SSCs 自我更新和分化中所扮演的角色,并深入揭示 FAAH 在这些生物事件中的调控机制,将为今后更好地认识 SSCs 自我更新和分化的调控机制提供依据。

[参考文献]

- [1] Meachem S, Von Schönfeldt V, Schlatt S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective[J]. *Reproduction*, 2001, 121(6):825-834
- [2] Tegelenbosch RA, De Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse[J]. *Mutat Res*, 1993, 290(2):193-200
- [3] Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24):11298-11302
- [4] Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(2):612-616
- [5] Zhou Q, Guo Y, Zheng B, et al. Establishment of a proteome profile and identification of molecular markers for mouse spermatogonial stem cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(3):521-534
- [6] McKinney MK, Cravatt BF. Structure and function of fatty acid amide hydrolase[J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74: 411-432
- [7] Battista N, Pasquariello N, Di Tommaso M, et al. Interplay between endocannabinoids, steroids and cytokines in the control of human reproduction[J]. *J Neuroendocrinol*, 2008, 20(Suppl 1):82-89
- [8] Sun X, Wang H, Okabe M, et al. Genetic loss of Faah-compromises male fertility in mice[J]. *Biol Reprod*, 2009, 80(2):235-242
- [9] Bujaas FW, Kirsh AL, Sharma M, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal [J]. *Nat Genet*, 2004, 36(6):647-652
- [10] Grisanti L, Falcioni I, Grasso M, et al. Identification of spermatogonial stem cell subsets by morphological analysis and prospective isolation[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(12):3043-3052
- [11] Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, et al. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(15):8346-8351
- [12] Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. Beta1-and alpha 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(10): 5504-5509
- [13] Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11):6487-6492

- [14] Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells[J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(1): 70-75
- [15] Zohni K, Zhang X, Tan SL, et al. CD9 is expressed on human male germ cells that have a long-term repopulation potential after transplantation into mouse testes[J]. *Biol Reprod*, 2012, 87(2): 27
- [16] Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells [J]. *Science*, 1988, 241(4861): 58-62
- [17] Williams DA, Rios M, Stephens C, et al. Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions[J]. *Nature*, 1991, 352(6334): 438-441
- [18] Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(10): 971-974
- [19] Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their Generation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(4): 1502-1506
- [20] Galve-Roperh I, Chiurchiù V, Díaz-Alonso J, et al. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation[J]. *Prog Lipid Res*, 2013, 52(4): 633-650
- [21] Aguado T, Monory K, Palazuelos J, et al. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation [J]. *FASEB J*, 2005, 19(12): 1704-1706
- [22] 薛江阳, 高亭亭, 邵彬彬, 等. 小鼠精原干细胞系自我更新和分化能力的体外观察[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016(2): 155-159

[收稿日期] 2016-03-15

(上接第 773 页)

- [12] Mo R, Freer Am, Zink DL, et al. Patterning and development. specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 Zinc finger genes in skeletal[J]. *Development*, 1997, 124(1): 113-123
- [13] Briscoe J, Thérond PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(7): 416-429
- [14] 田孝东, 杨尹默, 汤坚强, 等. Hedgehog 信号通路对胰腺癌细胞增殖的影响[J]. *中华普通外科杂志*, 2008, 23(2): 129-132
- [15] Shima H, Suzuki H, Sun J, et al. Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites of DNA damage[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 22): 5284-5292
- [16] Galanty Y, Belotserkovskaya R, Coates J, et al. Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks[J]. *Nature*, 2009, 462(7275): 935-939
- [17] Kahyo T, Nishida T, Yasuda H. Involvement of PIAS1 in the sumoylation of tumor suppressor p53[J]. *Mol Cell*, 2001, 8(3): 713-718
- [18] Munarriz E, Barcaroli D, Stephanou A, et al. PIAS-1 is a checkpoint regulator which affects exit from G1 and G2 by sumoylation of p73[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(24): 10593-10610
- [19] Pühr M, Hoefer J, Neuwirt H, et al. PIAS1 is a crucial factor for prostate cancer cell survival and a valid target in docetaxel resistant cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(23): 12043-12056
- [20] Cox B, Briscoe J, Ulloa F. SUMOylation by Pias1 regulates the activity of the Hedgehog dependent Gli transcription factors[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e11996
- [21] 唐 阳, 蔡松柏, 张 旭, 等. Hedgehog 信号通路异常对人结肠腺癌多药耐药性的影响[J]. *肿瘤*, 2012, 32(11): 886-891

[收稿日期] 2016-03-21