

网络出版时间:2022-09-07 09:38

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2023.03.003

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20220906.0949.001.html

降钙素基因相关肽在牦牛附睾中的定位与表达

陈少宇,袁莉刚,杨大鹏,王 华,张 勇

(甘肃农业大学 动物医学院 甘肃省动物生殖生理及繁殖调控重点实验室,甘肃 兰州 730070)

[摘 要] **【目的】**分析降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide,CGRP)在牦牛附睾中的转录水平及蛋白分布特点,探究其对精子运输及成熟的功能。**【方法】**采集 6 头 3~4 岁健康成年牦牛的附睾,将其解剖为头、体、尾三部分,应用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)、Western blotting 分别检测 CGRP mRNA 和蛋白在附睾的头、体、尾中的表达水平;采用 H. E 染色法分析附睾组织结构特点;采用免疫组化和免疫荧光技术分析附睾各部分 CGRP 的分布及表达情况。**【结果】**RT-qPCR 结果表明,CGRP 在牦牛附睾头的相对表达量显著高于附睾体和附睾尾($P<0.05$),附睾尾表达量最低($P<0.05$);Western blotting 检测结果表明,CGRP 蛋白水平在附睾尾中的表达水平显著高于附睾头和附睾体($P<0.05$)。显微镜下观察表明,牦牛附睾组织纤毛长度从头部至尾部逐渐降低,差异显著;附睾头间质组织的间质平滑肌层厚度显著低于附睾体和附睾尾($P<0.05$);基细胞和晕细胞在附睾尾分布显著,上皮厚度亦在附睾尾显著降低。免疫组化及免疫荧光分析发现,CGRP 主要分布于附睾上皮、基底膜及附睾间质小血管,附睾上皮晕细胞的表达强度最高。**【结论】**CGRP 主要分布于牦牛附睾上皮和间质小血管,提示 CGRP 对牦牛附睾间质小血管的收缩发挥调节作用。牦牛附睾尾晕细胞数量最多,晕细胞中 CGRP 的高强度表达提示其可能参与附睾尾的免疫调节。

[关键词] 降钙素基因相关肽(CGRP);牦牛;附睾;晕细胞

[中图分类号] S823.85

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2023)03-0019-10

Location and expression of calcitonin gene-related peptide in yak epididymis

CHEN Shaoyu, YUAN Ligang, YANG Dapeng, WANG Hua, ZHANG Yong

(College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Animal Reproductive Physiology and Reproductive Regulation of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: **【Objective】**This study analyzed the transcription level and protein distribution characteristics of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in epididymis of plateau yak and explored its function on sperm transport and maturation. **【Method】**The epididymis of 6 adult yaks at the age of 3 to 4 years were collected and dissected into three parts of caput, corpus and cauda. The expression levels of CGRP mRNA and protein in caput, corpus and cauda of epididymis were detected by RT-qPCR and Western blotting. The structure characteristics of epididymis were analyzed by H. E staining. Immunohistochemistry and immunohistofluorescence were used to analyze the distribution and expression of CGRP in epididymis. **【Result】**RT-qPCR showed that the expression of CGRP in yak caput was significantly higher than that in corpus and cauda ($P<0.05$), and the expression in cauda was the lowest ($P<0.05$). Western blotting showed that the expression level of CGRP protein in cauda was higher than that in caput and corpus ($P<0.05$).

[收稿日期] 2022-01-13

[基金项目] 甘肃省动物生殖生理及繁殖调控重点实验室建设项目(20JR10RA563);甘肃农业大学科技创新基金项目(GAU-XKJS-2018-056);宁夏回族自治区农业特色优势产业育种专项(2013NYYZ0402)

[作者简介] 陈少宇(1995—),男,甘肃陇南人,在读硕士,主要从事动物生殖生物学研究。E-mail:2325245659@qq.com

[通信作者] 袁莉刚(1974—),女,甘肃陇南人,教授,博士生导师,主要从事动物生殖生物学研究。E-mail:909846897@qq.com

Microscopic observations showed that the distribution of basal cells and halo cells in cauda was significantly higher than that in caput and corpus. The length of cilia from caput to cauda of yak decreased significantly. The thickness of cauda epithelium was significantly lower than that of caput and corpus. The interstitial tissue thickness of caput was significantly lower than that of corpus and cauda ($P < 0.05$). The interstitial smooth muscle layer thickened gradually. Immunohistochemistry and immunofluorescence analysis showed that CGRP was mainly distributed in epididymal epithelium, basal lamina and small vessels of epididymal interstitium. The positive expression intensity of CGRP was different in epididymal epithelium, and the highest in halo cells. 【Conclusion】 CGRP mainly distributed in epididymal epithelium and small interstitial vessels in yaks, indicating that CGRP played a regulatory role in the contraction of small interstitial vessels in yaks. The number of cauda halo cells was the largest in yak epididymis. The high expression of CGRP in the cauda of yak suggested that CGRP may be involved in the immune regulation of cauda.

Key words: CGRP; yak; epididymis; halo cells

降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 是来自降钙素超家族的一种生物活性多肽, 广泛分布于各种动物的中枢和外周神经系统中^[1]。CGRP 大量分布于胃肠道迷走神经和内脏传入神经纤维以及壁内神经丛^[2]。研究报道, 大鼠睾丸中 CGRP 免疫阳性纤维伴随睾丸血管分布或密集分布于睾丸动脉血管壁^[3]。CGRP 阳性神经纤维在出生后的雄性大鼠生殖系统中最先分布于附睾管和输精管的间质组织^[4]。犬 CGRP 免疫阳性神经纤维丰富, 密度由附睾尾向附睾头方向明显下降, CGRP 调控着附睾管和输精管上皮细胞的发育^[5]。CGRP 也存在于非神经元细胞中。研究表明, CGRP 基因在体外培养的人 B 淋巴细胞中强烈表达^[6]。CGRP 通过调控 B 淋巴细胞表面脂多糖和球蛋白的表达而抑制小鼠早期 B 淋巴细胞的分化^[7]。CGRP 也参与胃肠道蠕动及免疫调节, 通过抑制电刺激神经引起的鼠胃平滑肌的收缩, 抑制肠胃蠕动^[2,8], 在肠道应激状态下 CGRP 含量上升, 可减轻大鼠胃黏膜损伤因子的损害作用^[9]。对小鼠隐睾模型的研究表明, 睾丸组织中 CGRP 含量的下降会引起生精损害^[10]。CGRP 的降低可促进大鼠单侧隐睾生精上皮凋亡^[11]。本课题组前期研究表明, CGRP 在牦牛睾丸组织神经纤维、Leydig 细胞和血管内皮细胞中均有分布, 对血管内皮细胞以及促性腺激素分泌发挥调节作用, 提示 CGRP 在动物生殖生理及免疫调节过程中发挥着重要的作用^[12]。

牦牛是我国西北部高原、高山地区特有经济牛种, 其生精细胞较低的增值率影响了繁殖效率, 而良好的附睾管腔微环境是保证精子质量的重要条件之一, 附睾微环境的平衡又与附睾组织的发育状况以及代谢水平密切相关^[13]。本课题组前期研究发现,

附睾组织在不同繁殖季节的形态学特征与牦牛季节性繁殖密切相关, 并证明了 CGRP 在牦牛睾丸组织中的分布存在季节性变化的特点^[12,14], 推测 CGRP 在牦牛附睾中可能发挥重要的生物学功能。基于此, 本试验采用实时荧光定量 PCR (real time-quantitative PCR, RT-qPCR)、蛋白免疫印迹 (Western blotting, WB)、免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 及组织免疫荧光 (immunofluorescence, IF) 等技术分析了成年雄性牦牛附睾组织中 CGRP 的含量及其分布, 旨在探究 CGRP 在牦牛生殖中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 从青海西宁湟中县可可西里有限公司屠宰场采集 6 头 3~4 岁健康成年牦牛的附睾, 根据附睾的结构, 将附睾解剖为头、体、尾三部分, 于液氮和 4% 福尔马林固定液分别保存和固定。

1.1.2 试验材料 RNA 提取试剂盒 (ER501-01)、实时荧光定量试剂盒 (AQ141-01)、蛋白提取试剂盒 (DE201-01)、cDNA 反转录试剂盒 (AT311-02), 均购自北京全式金科技有限公司; DNA Marker (MD101-01), 购自北京博迈德基因技术有限公司; 苯甲磺酰氟 (PMSF, P0100)、蛋白酶抑制剂混合液 (P6730)、彩虹 245plus 广谱蛋白 Marker (5~245 ku), 均购自北京索莱宝科技有限公司。CGRP 多克隆抗体 (ab-189786) 购自艾博抗上海贸易有限公司; β -actin (bs-0061R)、BCA 蛋白定量试剂盒 (C05-02001)、免疫组化染色试剂盒 (sp-0023), 均购自北京博奥森生物技术有限公司; DAB 显色试剂盒 (PA110), 购自天根生化科技有限公司; 免疫组化荧

光素 Alexa Fluor 647 标记 IgG (ab-150079)、DAPI 染色液 (ab-104139),均购自艾博抗上海贸易有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 将附睾各部分切成 1 cm×1 cm×0.6 cm 的小块,用 4%福尔马林固定液固定 1 周,备用。取附睾头、附睾体、附睾尾各 3 块,常规梯

度酒精脱水,石蜡包埋,超薄切片机连续切片(厚 4 μm),相邻切片分为 5 套备用。

1.2.2 引物设计 根据 NCBI 公布的牦牛 CGRP 及 β-actin 序列信息 (GenBank 登陆号分别为 NM001143737 和 DQ838049.1),在其保守区域设计引物(表 1),交由兰州天启基因生物有限公司合成。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因 Gene	引物序列(5'→3') Sequence(5'→3')	产物长度/ bp Product length
CGRP	F: CAGAGAGGCATCATGGCTT, R: TCCAAAGCTGACCTGAGTGG	110
β-actin	F: GCAATGAGCGTTCC, R: CCGTGTGGCGTAGAG	141

1.2.3 附睾组织 CGRP mRNA 表达的检测 使用 RNA 提取试剂盒提取健康成年牦牛附睾组织样品总 RNA,超微量核酸蛋白检测仪(美国 Pultton)测量 RNA 的质量浓度和纯度,调节其质量浓度为 500 ng/mL;用 0.1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,凝胶成像仪成像。使用 cDNA 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,超微量核酸蛋白检测仪检测 cDNA 质量浓度,将其质量浓度调节为 300 ng/mL,备用。采用常规 PCR 检测引物的特异性。PCR 总体系为 20 μL,其中 300 ng/mL cDNA 模板 1 μL,10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL,2×Easy Taq PCR SuperMix 10 μL,补充 ddH₂O 7 μL。PCR 反应条件为 94℃预变性 5 s;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 10 s,循环 35 次;72℃延伸 10 min。对扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳。

以 β-actin 基因为内参,采用 RT-qPCR 检测 CGRP mRNA 在附睾不同部位的表达水平。RT-qPCR 反应总体系为 20 μL,其中 cDNA 模板 1 μL,2×TransStart Tip Green qPCR SuperMix 10 μL,上、下游引物各 1 μL,ddH₂O 7 μL。每个样品 3 个重复。RT-qPCR 扩增条件为 94℃预变性 30 s;94℃变性 5 s,60℃退火延伸 30 s,循环 45 次。根据实时荧光定量溶解曲线判断引物特异性,根据每个样品的循环阈值(Ct),用 2^{-ΔΔCt} 计算 CGRP mRNA 在牦牛不同分段附睾中的相对表达量。

1.2.4 附睾组织中 CGRP 蛋白表达的检测 以 β-actin 为内参蛋白,采用 Western blotting 检测 CGRP 蛋白的表达情况。分别取附睾的头、体、尾各部位样品 0.1 g,于液氮中研磨成粉末,再加入裂解液 1 mL,PMSF 和蛋白酶抑制剂混合液各 10 μL,继续研磨 2~3 min,刮取混合粉末于 EP 管内,冰浴 7 min 后匀浆 5 min,重复冰浴匀浆操作 8 次,低温离

心机 10 000 r/min 离心 10 min,取少量上清液通过 BCA 法进行蛋白定量。取各部位样品蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(80 V,100 min)分离后,湿转法转移到 PVDF 膜上,将 PVDF 膜置于 5%脱脂奶粉封闭液中室温摇床上封闭 2 h。用 0.1%TBST 缓冲液润洗封闭后的 PVDF 膜 3 次,加入 1:400 倍稀释的一抗(CGRP 多克隆抗体)4℃过夜。TBST 缓冲液振荡洗膜后加入 1:3 000 倍稀释的二抗(羊抗兔 IgG),室温孵育 1 h,洗膜 2 h 后加 ECL 超敏发光液反应 3 min,化学发光仪进行曝光及成像采集,并用 Image J 图像分析软件进行灰度扫描分析。

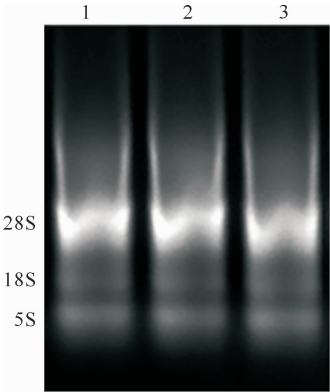
1.2.5 牦牛附睾的形态学观察 通过常规 H.E 染色观察牦牛附睾不同部位的形态结构特征。石蜡切片经脱蜡、水化后,Mayer 苏木精染色 3 min,置于自来水中反蓝,梯度酒精上行至无水乙醇,醇溶伊红染色 3 s,经苯酒、二甲苯后中性树胶封片。于正置显微镜(日本 Olympus)拍摄图像,并用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件统计附睾上皮细胞数量及形态特征指数。

1.2.6 CGRP 在牦牛附睾组织中的分布 (1)免疫组化检测。石蜡切片经脱蜡、水化后,水浴加热抗原修复 15 min,冷却后加入 3%过氧化氢溶液去除内源性过氧化物酶;略水洗后加入 5%封闭血清,37℃孵育 20 min,加入 1:300 倍稀释的一抗(CGRP 多克隆抗体),其中阴性对照组使用 PBS 缓冲液代替一抗 4℃孵育过夜,于 PBS 清洗 10 min 后加入 1:500 倍稀释的二抗(羊抗兔 IgG),37℃孵育 30 min,辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液室温孵育 30 min,DAB 显色剂显色,显色后经蒸馏水阻断反应,Mayer 苏木精复染,置于自来水中反蓝,梯度酒精上行至无水乙醇,经苯酒、二甲苯后中性树胶封

片。于正置显微镜(日本 Olympus)拍摄图像,并用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测定 CGRP 阳性反应的平均光密度值。

(2)免疫荧光检测。操作步骤均与免疫组化检测相同,将生物素标记羊抗兔 IgG 二抗替换为免疫组化荧光素 Alexa Fluor 647 标记 IgG(稀释度 1 : 800)孵育 2 h,PBS 振洗 3 次,每次 5 min;DAPI 染色液孵育 10 min 后 PBS 振洗,抗荧光淬灭封片剂封片。采用激光扫描共聚焦显微镜(德国 ZEN)观察拍照。观察时,红色组织显示 AF647 的荧光着色;蓝色组织表示 DAPI 标记的核荧光着色。

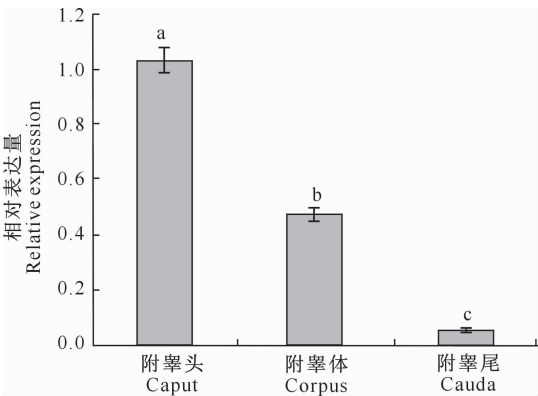
1.2.7 数据分析 所得数据采用 Microsoft Excel 软件进行处理和绘图,采用 SPSS 22.0 软件对数据进行单因素 ANOVA 检验,并进行多重比较,使用



1. 附睾头;2. 附睾体;3. 附睾尾
1. Caput;2. Corpus;3. Cauda

图 1 牦牛附睾总 RNA

Fig. 1 Total RNA of yak epididymis



图柱上不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。图 4 同
Different lowercase letters mean significant
difference($P<0.05$). The same Fig. 4

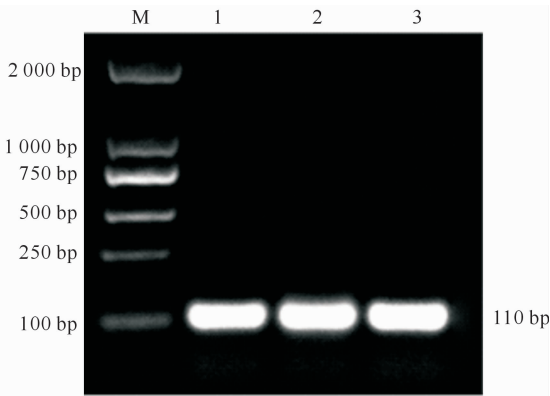
图 3 牦牛附睾中 CGRP 基因的相对表达量
Fig. 3 Relative expression of CGRP gene in
yak epididymis

LSD 法进行组间差异显著性检验,测定结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 牦牛附睾中 CGRP 基因的表达水平

RNA 琼脂糖凝胶电泳结果有 3 条清晰的条带,分别为 28S、18S 和 5S 条带(图 1),表明 RNA 提取产物合格,可用于反转录试验。CGRP 基因 PCR 扩增产物大小为 110 bp(图 2),与预期片段大小相符,表明引物特异性强,可用于后续 RT-qPCR 试验。RT-qPCR 结果(图 3)显示,牦牛附睾 CGRP 转录水平以附睾头相对表达量最高,附睾尾最低,且各部位间有显著性差异($P<0.05$)。



M. DNA Maker;1. 附睾头;2. 附睾体;3. 附睾尾
M. DNA Maker;1. Caput;2. Corpus;3. Cauda

图 2 牦牛 CGRP 基因的扩增

Fig. 2 Amplification of CGRP gene in yaks

2.2 牦牛附睾中 CGRP 蛋白的表达水平

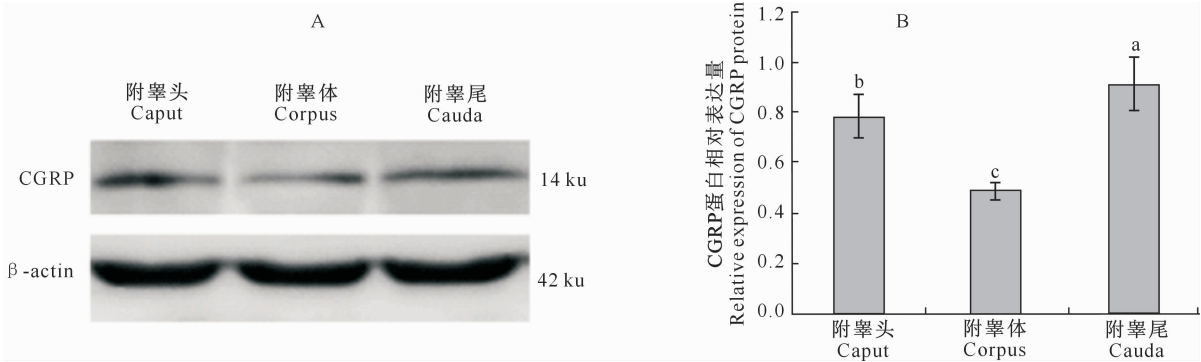
试验结果显示,CGRP 蛋白分子质量为 14 ku (图 4-A),与预期大小基本一致,说明 CGRP 能够在牦牛附睾中正常表达。对目的条带和内参条带进行灰度扫描并定量分析,结果(图 4-B)显示,CGRP 蛋白在附睾尾中的表达水平高于附睾头和附睾体,附睾头高于附睾体,各部位之间差异显著($P<0.05$)。

2.3 牦牛附睾的结构观察

由图 5 和表 2 可知,牦牛附睾上皮中以主细胞居多,呈长棒状或椭圆形,核位于细胞中央,胞质中有大小不等的囊泡分布,附睾头的主细胞数量显著高于附睾体和尾;附睾尾上皮主细胞形态较其他分区矮小,细胞内囊泡密集,主要分布于核上区与核下区;基底膜有基细胞和晕细胞广泛分布,基细胞呈长梭状,核呈椭圆形,单层分布于上皮基底膜,附睾尾部的基细胞数量显著高于附睾头和附睾体($P<$

0.05); 晕细胞细胞核深染,胞质淡染,细胞数量由附睾头向附睾尾逐渐增多。由图 5 和表 3 可知,附睾管上皮为假复层纤毛柱状上皮,近腔面可见不同长度的纤毛;管腔游离面纤毛较长,纤毛由附睾头向附睾尾逐渐变短,附睾尾上皮纤毛显著低于附睾头和附睾体

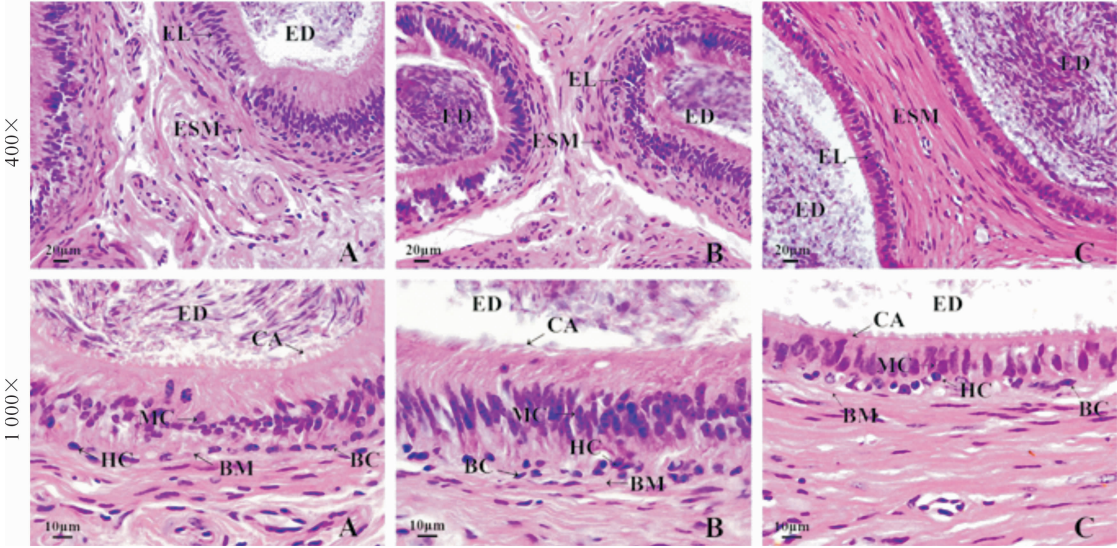
($P<0.05$); 附睾尾上皮厚度显著低于附睾头和附睾体;附睾间质组织由紧贴基底膜的平滑肌层和纤维结缔组织组成,附睾头间质组织厚度显著低于附睾体和附睾尾,附睾头仅有一层薄的环状平滑肌,附睾尾平滑肌分层增厚,出现较明显的平滑肌细胞层。



A. CGRP 蛋白 Western blotting 结果;B. 灰度值分析结果
A. Result of Western blotting CGRP protein;B. Gray value analysis results

图 4 牦牛附睾中 CGRP 蛋白的表达

Fig. 4 Expression of CGRP protein in yak epididymis



A. 附睾头;B. 附睾体;C. 附睾尾。

BC. 基细胞;BM. 基底膜;CA. 纤毛;ED. 附睾管;ESM. 附睾平滑肌;EL. 附睾上皮层;HC. 晕细胞;MC. 主细胞

A. Caput;B. Corpus;C. Cauda.

BC. Basal cell;BM. Basement membrane;CA. Cilia;ED. Epididymis duct;ESM. Epididymis smooth muscle;
EL. Epididymis epithelial layer;HC. Halo cells;MC. Master cell

图 5 牦牛附睾 H. E 染色结果

Fig. 5 H. E staining of yak epididymis

表 2 牦牛附睾上皮细胞数量

Table 2 Number statistics of yak epididymal epithelial cell mm⁻²

细胞 Cell	附睾头 Caput	附睾体 Corpus	附睾尾 Cauda
主细胞 Master cell	3 669±279 a	3 184±431 b	3 514±510 b
基细胞 Basal cell	770±101 b	779±108 b	1 247±231 a
晕细胞 Halo cell	320±53 b	354±76 b	726±79 a

注:同行数据后标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$). 下表同。
Note:Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

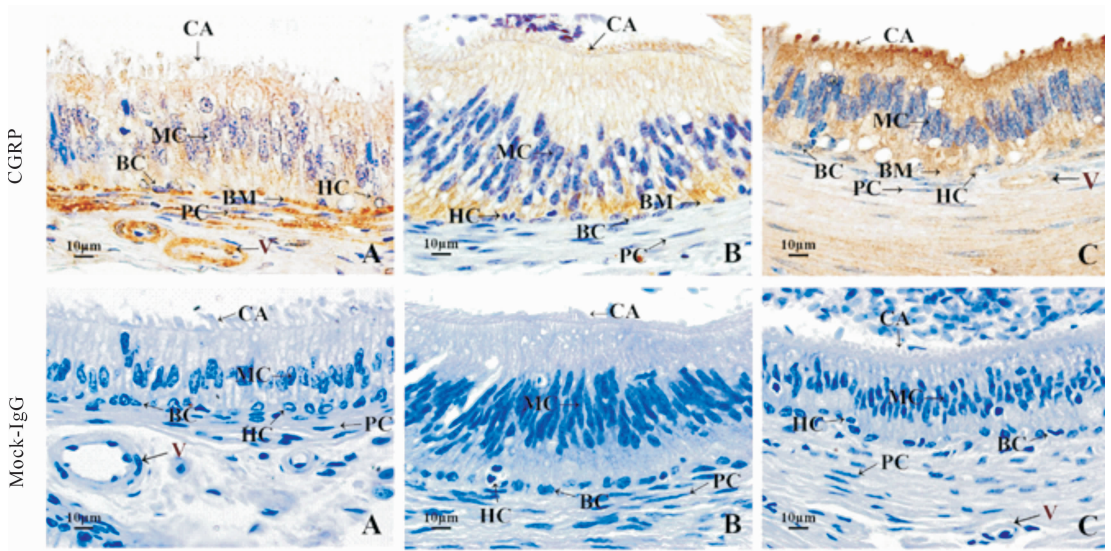
表 3 牦牛附睾组织的形态特征指数
Table 3 Characteristics of yak epididymis

指标 Items	附睾头 Caput	附睾体 Corpus	附睾尾 Cauda
上皮厚度/ μm Epithelial thickness	55.76 $\pm$ 1.92 a	59.92 $\pm$ 2.40 a	26.04 $\pm$ 1.75 b
间质组织厚度/ μm Interstitial tissue thickness	11.38 $\pm$ 0.70 b	15.09 $\pm$ 1.40 a	17.23 $\pm$ 2.10 a
纤毛长度/ μm Cilia length	20.88 $\pm$ 2.21 a	10.97 $\pm$ 0.74 b	2.58 $\pm$ 0.37 c

2.4 CGRP 在牦牛附睾中的分布

免疫组化检测结果显示,CGRP 在附睾的头、体、尾部均有表达,平均光密度值分别为 0.57 $\pm$ 0.03,0.26 $\pm$ 0.02 和 0.48 $\pm$ 0.03,附睾头的平均光密度值显著高于附睾体和附睾尾($P<0.05$),附睾

体的表达强度显著低于附睾尾($P<0.05$)。由图 6 可知,CGRP 主要分布于附睾管上皮、基底膜和间质小血管;在附睾尾上皮游离面、纤毛以及基底部高强度表达($P<0.05$),附睾头管腔游离面 CGRP 中等阳性表达,基底部强阳性表达。



A. 附睾头;B. 附睾体;C. 附睾尾。

BC. 基细胞;BM. 基底膜;CA. 纤毛;HC. 晕细胞;MC. 主细胞;PC. 管周肌样细胞;V. 血管

A. Caput;B. Corpus;C. Cauda.

BC. Basal cell;BM. Basement membrane;CA. Cilia;HC. Halo cell;MC. Master cell;

PC. Peritubular myoid cells;V. Vessels

图 6 CGRP 在牦牛附睾中分布的免疫组化检测(1 000 $\times$)

Fig. 6 Immunohistochemical detection of CGRP distribution in yak epididymis(1 000 $\times$)

免疫荧光检测结果(图 7)表明,CGRP 在晕细胞、主细胞、基细胞、管周肌样细胞均有不同强度表达。CGRP 在附睾头的晕细胞强阳性表达,主细胞和基细胞中等阳性表达,管周肌样细胞偶有阳性表达。CGRP 在附睾体晕细胞中呈强阳性表达,偶有中等阳性表达,基细胞中等阳性表达,主细胞阳性表达,管周肌样细胞偶有阳性表达。CGRP 在附睾尾晕细胞高密度强阳性表达,主细胞和基细胞强阳性表达,管周肌样细胞偶有阳性表达。

3 讨论

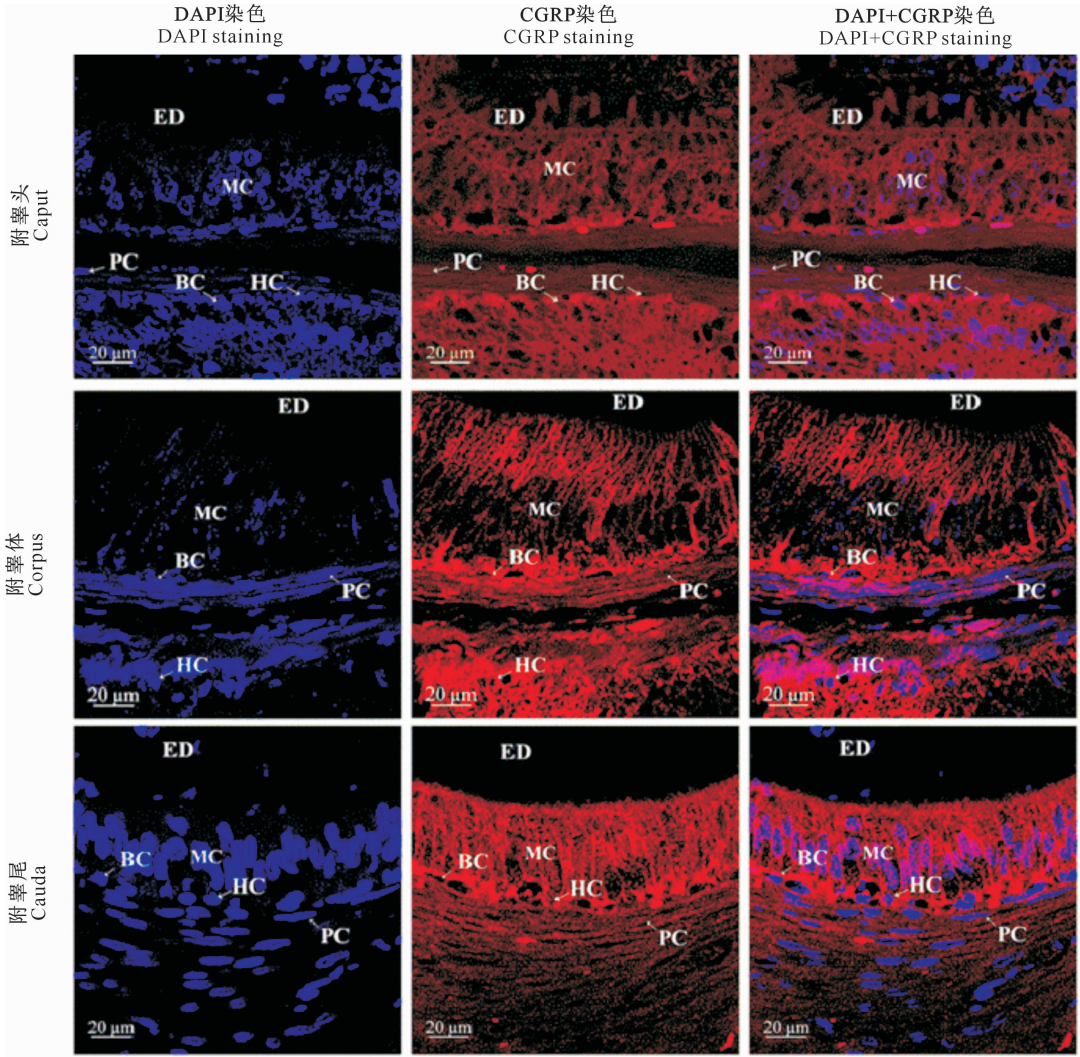
3.1 牦牛附睾上皮细胞组织学变化特点

哺乳动物附睾主要由迂曲的管道组成,分为附睾头、体、尾三部分,附睾头和附睾体分别调控早期

和晚期的精子成熟,尾部则主要是成熟精子的储存部位。附睾管黏膜上皮是由主细胞、基细胞、晕细胞等构成的假复层纤毛柱状上皮^[15]。研究表明,小鼠附睾上皮高柱状的主细胞数量最多,在物质转运和小分子蛋白分泌及其代谢等方面发挥重要作用,主细胞的纤毛能感知局部微环境的动态变化,细胞中分布的囊泡与附睾组织的物质运输和细胞自噬等调节相关^[16-18]。与此相一致,本研究发现牦牛附睾中主细胞含有大小不等的囊泡,在附睾头部分布较丰富,附睾尾部主细胞形态较其他分区更矮小,囊泡较小且分布密集,主要位于核上区与核下区,提示牦牛附睾头和尾具有较强的物质转运及代谢能力。附睾基细胞是附睾管壁基底部的的重要组成部分,其通过调节主细胞的物质转运而间接影响管腔微环境^[19]。

研究报道,小鼠附睾基细胞呈扁平状,单层分布于附睾上皮的基部,哺乳动物基细胞形态与啮齿动物相似,都是附睾上皮的基本构成细胞,并参与附睾局部微环境的调整^[20]。研究表明,大鼠附睾尾部的基细胞通过释放 NO,调节相邻细胞 V-型质子泵转运 H⁺ 以维持附睾管腔酸性微环境^[21]。本研究中,牦

牛附睾基细胞呈长梭状,单层分布于附睾上皮基底层,是附睾组织基底膜的重要组成部分;附睾尾部基细胞数量显著高于附睾头和附睾体,提示基细胞与附睾尾酸性微环境的维持有关,具体作用机制还需进一步研究。



BC. 基细胞;ED. 附睾管;HC. 晕细胞;MC. 主细胞;PC. 管周肌样细胞
BC. Basal cell;ED. Epididymis duct;HC. Halo cells;MC. Master cell;PC. Peritubular myoid cells

图 7 CGRP 在牦牛附睾中的免疫荧光检测(400×)

Fig. 7 Detection of CGRP in yak epididymis by immunofluorescence (400×)

附睾管上皮的纤毛与精子在附睾管的运动密切相关,研究证实啮齿动物附睾管纤毛参与精子的流动,可以防止精子在附睾管内滞留^[22]。研究发现,小鼠附睾纤毛和微纤毛摆动形成了从睾丸向附睾的液体流,有利于推动精子在附睾管内运动^[23]。小鼠的附睾头管腔游离面的纤毛较长,附睾体纤毛长度变短,附睾尾仅存非常短的刷状纤毛^[17]。当小鼠附睾上皮纤毛结构发生异常时,会造成精子在输出管

中积聚,影响精子正常迁移^[24]。相较于正常附睾组织,阻塞性无精子症患者的附睾纤毛长度变短,影响精子在附睾管中的正常运动^[25]。本研究中牦牛附睾纤毛长度由附睾头向附睾尾逐渐变短,提示附睾头纤毛对精子的流动发挥着重要作用。研究表明,分布在附睾头和附睾体的平滑肌,可产生节律性收缩,从而推动精子在附睾管内缓慢向尾部移动,附睾尾间质组织的平滑肌平时较少蠕动,在射精反射时

会产生强有力的节律收缩,将储存在附睾尾部的成熟精子快速送入输精管内^[26]。骆驼附睾管上皮的厚度从附睾头到附睾尾逐渐减小,对管腔内物质的吸收能力也逐渐下降,附睾间质的平滑肌层有助于射精活动^[27]。本试验结果表明,牦牛附睾头部的上皮厚度显著高于尾部,提示管腔内物质的吸收能力在附睾头部高于附睾尾;间质薄层环状平滑肌从附睾头向附睾尾逐渐增厚,且在附睾尾的分层现象较为明显。进一步表明,精子在附睾头、体的迁移及附睾尾的射精活动与间质环状平滑肌的分布特点密切相关。

3.2 CGRP 在牦牛附睾中的分布特点

CGRP 主要通过旁分泌的形式释放,是目前已知活性最强的扩血管物质,CGRP 定位于血管内皮细胞并对其具有保护作用,可刺激血管内皮细胞增殖并向受损血管壁迁移,促进血管修复^[28]。研究表明,小鼠附睾管结缔组织及小血管附近有 CGRP 阳性纤维分布^[24]。猪附睾尾的 CGRP 分布最为丰富,而在附睾头部分布较少^[29]。对骆驼 CGRP 的研究表明,其在附睾中的分布无明显的区域性差异,具有调节血管平滑肌舒张的作用^[27,30]。本试验中,CGRP 主要分布于附睾上皮和间质小血管,提示 CGRP 对牦牛附睾间质小血管的收缩具有调节作用。本研究中,CGRP 在转录水平由附睾头向附睾尾呈逐渐下降的趋势,表明牦牛附睾中有合成 CGRP 的途径且存在区域性差异。Western blotting 检测 CGRP 蛋白水平显示,在牦牛附睾尾中 CGRP 含量较高,其次是附睾头,在附睾体中含量最少,这与 CGRP 在转录水平和蛋白表达水平的趋势不一致。研究表明,CGRP 在血管和神经组织中分布广泛^[1-3],主要通过旁分泌方式作用于靶细胞^[28],提示 CGRP 在转录水平和蛋白表达水平的趋势不一致可能与 CGRP 在附睾组织中的旁分泌方式有关,牦牛附睾合成的 CGRP 通过旁分泌的方式蓄积于附睾尾,具体作用机制有待深入研究。

附睾管各区域具有不同功能,晕细胞是分布于附睾上皮基底部和相邻主细胞之间的淋巴细胞^[31-32]。研究表明,CGRP 由活化的 B 淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞分泌,可直接或间接靶向作用于外周免疫细胞,如树突状细胞、肥大细胞、T 细胞和巨噬细胞^[33-34];且对抗原呈递细胞的功能、小鼠早期 B 淋巴细胞的分化及 T 淋巴细胞的增殖具有不同程度的抑制作用^[35-37]。基细胞介导细胞的吞噬且与巨噬细胞作用有关^[38]。本研究中,CGRP 在牦牛附睾

头的分布位置与附睾体相一致,主要分布于晕细胞和基细胞,其次是主细胞。CGRP 在牦牛附睾尾的表达强于附睾头和附睾体。研究表明,大鼠晕细胞亦位于上皮细胞基底部,胞质透明,其内含含有数量不等的致密颗粒,由辅助性 T 细胞、细胞毒性 T 细胞和单核细胞组成^[39]。本研究中,相较于牦牛的附睾头和附睾体,附睾尾中晕细胞数量最多,同时 CGRP 在附睾尾晕细胞高强度表达,提示其可能参与局部的免疫调节。

4 结 论

牦牛附睾纤毛长度及管壁平滑肌层的厚度与精子在附睾中的迁移及射精密切相关。附睾基细胞参与基底膜的形成,并与附睾尾酸性微环境的维持有关,其具体作用尚需进一步研究。CGRP 主要分布于牦牛附睾上皮、基底膜和间质小血管,提示 CGRP 对间质小血管的收缩发挥调节作用。牦牛附睾尾晕细胞数量较多,且 CGRP 在晕细胞高强度表达,提示其可能参与附睾尾的免疫调节。本试验为牦牛附睾微环境的研究奠定了一定的形态学基础,亦为研究 CGRP 在牦牛生殖系统中的作用机理提供了思路。

【参考文献】

- [1] Arulmani U, Maassen Van DenBrink A, Villalón C M, et al. Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 500(1/2/3): 315-330.
- [2] Caronna E, Starling A J. Update on calcitonin gene-related peptide antagonism in the treatment of migraine [J]. *Neurol Clin*, 2021, 39(1): 1-19.
- [3] Lissbrant E, Collin O, Bergh A. Localization and effects of calcitonin gene-related peptide in the testicular vasculature of the rat [J]. *Journal of Andrology*, 1997, 18(4): 385-392.
- [4] Properzi G, Cordeschi G, Francavilla S. Postnatal development and distribution of peptide-containing nerves in the genital system of the male rat [J]. *Histochemistry*, 1992, 97(1): 61-68.
- [5] Tamura R, Hanesch U, Schmidt R F, et al. Calcitonin gene-related peptide- and substance P-like immunoreactive fibers in the spermatic nerve and testis of the dog [J]. *Neuroscience Letters*, 1997, 235(3): 113-116.
- [6] Bracci-laudiero L, Aloe L, Buanne P, et al. NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2002, 123(1/2): 58-65.
- [7] Schlomer J, Storey B, Ciornei R T, et al. Calcitonin gene-related peptide inhibits early B cell development in vivo [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 81(3): 802-808.

- [8] 李启祥. 降钙素基因相关肽与胃肠运动调节 [J]. 国际消化病杂志, 2000, 20(1): 20-23.
Li Q X. Calcitonin gene-related peptide and regulation of gastrointestinal motility [J]. International Journal of Digestive Diseases, 2000, 20(1): 20-23.
- [9] 雷银雪, 湛先保, 李兆申, 等. 应激状态下大鼠胃黏膜降钙素基因相关肽含量的动态变化及意义 [J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(5): 560-561.
Lei Y X, Zhan X B, Li Z S, et al. Dynamic changes of calcitonin gene-related peptide in rat gastric mucosa under cold restraint stress condition and its significance [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2007, 28(5): 560-561.
- [10] 袁耀美, 张 茨, 白 晨. 小鼠隐睾动物模型中 CGRP 的表达变化 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2013, 33(4): 439-441.
Yuan Y M, Zhang C, Bai C. Establishment of cryptorchidism mice model and the change expression of calcitonin gene-related peptide [J]. International Journal of Urology and Nephrology, 2013, 33(4): 439-441.
- [11] 朱保平, 郑新民, 李世文, 等. 单侧隐睾对侧睾丸损害机制的实验研究 [J]. 中华小儿外科杂志, 2003, 24(6): 549-551.
Zhu B P, Zheng X M, Li S W, et al. The mechanism of contralateral testicular impairment induced by unilateral cryptorchid in rats [J]. Chinese Journal of Pediatric Surgery, 2003, 24(6): 549-551.
- [12] 李 聪. 牦牛睾丸局部神经递质分布的增龄性及季节性变化研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
Li C. Study on the distribution of neurotransmitter in yak testis associated with age and season [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.
- [13] Prka I, Djordjevic B. Testicle size as indicator of fertility in bulls [J]. Veterinarski Glasnik, 2014, 68(5/6): 311-322.
- [14] 杨栋慧, 袁莉刚, 李 聪, 等. 不同繁殖季节成年牦牛附睾组织特征比较 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(10): 2672-2679.
Yang D H, Yuan L G, Li C, et al. Histological characteristics of adult yak epididymis in different breeding seasons [J]. Chinese Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 43(10): 2672-2679.
- [15] Karmore S K, Dalvi R S, Meshram B, et al. Age related changes in ultrastructure and histoenzymic distribution of epididymis in goat (*Capra hircus*) [J]. Indian Journal of Veterinary Anatomy, 2015, 27(2): 47-51.
- [16] Ramos-Ibeas P, Pericuesta E, Fernández-González R, et al. Most regions of mouse epididymis are able to phagocytose immature germ cells [J]. Reproduction (Cambridge, England), 2013, 146(5): 481-489.
- [17] Girardet L, Bernet A, Calvo E, et al. Hedgehog signaling pathway regulates gene expression profile of epididymal principal cells through the primary cilium [J]. The FASEB Journal, 2020, 34(6): 7593-7609.
- [18] Quintar A A, Nishioka S, Torres A I, et al. The initial segment of the rat epididymis is able to uptake immature germ cells shed by testicular damage [J]. Cells Tissues Organs, 2011, 193(3): 170-183.
- [19] Tajiri S, Fukui T, Sawaguchi A, et al. Cell-and region-specific expression of sugar chains in the mouse epididymal epithelium using lectin histochemistry combined with immunohistochemistry [J]. Okajimas Folia Anatomica Japonica, 2012, 88(4): 141-146.
- [20] Cheung K H, Leung G P, Leung M C, et al. Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat [J]. The Journal of General Physiology, 2005, 125(5): 443-454.
- [21] Nagashima H, Mahlakoiv T, Shih H Y, et al. Neuropeptide CGRP limits group 2 innate lymphoid cell responses and constrains type 2 inflammation [J]. Immunity, 2019, 51(4): 682-695.
- [22] L  gar   C, Sullivan R. Differential gene expression profiles of human efferent ducts and proximal epididymis [J]. Andrology, 2020, 8(3): 625-636.
- [23] Yuan S Q, Liu Y, Peng H Y, et al. Motile cilia of the male reproductive system require miR-34/miR-449 for development and function to generate luminal turbulence [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2019, 116(9): 3584-3593.
- [24] Aprea I, N  the-m  nchen T, Dougherty G W, et al. Motility of efferent duct cilia aids passage of sperm cells through the male reproductive system [J]. Molecular Human Reproduction, 2021, 27(3): gaab009.
- [25] Pal P C, Manocha M, Kapur M M, et al. Obstructive infertility: changes in the histology of different regions of the epididymis and morphology of spermatozoa [J]. Andrologia, 2006, 38(4): 128-136.
- [26] Girardet L, Augi  re C, Asselin M P, et al. Primary cilia: biosensors of the male reproductive tract [J]. Andrology, 2019, 7(5): 588-602.
- [27] Zayed E Z, Aly K H, Ibrahim A A, et al. Morphological studies on the seasonal changes in the epididymal duct of the one-humped camel (*Camelus dromedarius*) [J]. Veterinary Science Development, 2012, 2(1): 7-14.
- [28] Kumar A, Potts J D, Dipette D J. Protective role of α -calcitonin gene-related peptide in cardiovascular diseases [J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 821-834.
- [29] Amelia F R, Jerzy K, Magdalena K, et al. Noradrenergic and peptidergic innervation of the mammary gland in the immature pig [J]. Folia Histochemica et Cytobiologica, 2002, 40(1): 17-25.
- [30] Sienkiewicz W, Szczurkowski A, Dudek A, et al. Innervation of the chinchilla testis, epididymis, and vas deferens [J]. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2015, 59(4): 547-556.
- [31] Hermo L, Robaire B. Epididymal cell types and their functions [J]. Springer US, 2002, 9(5): 81-102.
- [32] Serre V, Robaire B. Segment-specific morphological changes in aging Brown Norway rat epididymis [J]. Biology of Reproduction, 1998, 58(2): 497-513.

[33]

赵 敏,王 宪.降钙素基因相关肽的新近研究进展 [J].生理科学进展,2001,32(2):163-164.
Zhao M,Wang X. Recent research progress of calcitonin gene-related peptide [J]. Progress in Physiological Sciences, 2001, 32(2):163-164.

[34]

Assas B M,Pennock J I,Miyan J A. Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis [J]. Frontiers in Neuroscience,2014,8;23.

[35]

Ding W,Wagner J A,Granstein R D. CGRP,PACAP,and VIP modulate Langerhans cell function by inhibiting NF- κ B activation [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2007, 127 (10):2357-2367.

[36]

Fernandez S,Knopf M A,Mcgillis J P. Calcitonin-gene related peptide (CGRP) inhibits interleukin-7-induced pre-B cell colony formation [J]. Journal of Leukocyte Biology,2000,67(5): 669-676.

[37]

Granstein R D,Wagner J A,Stohl L L,et al. Calcitonin gene-related peptide:key regulator of cutaneous immunity [J]. Acta Physiologica,2015,213(3):586-594.

[38]

Seiler P,Cooper T G,Nieschlag E. Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis [J]. International Journal of Andrology,2000,23(2):65-76.

[39]

Mohanty D,Lippmann S. CGRP inhibitors for migraine [J]. Innovations in Clinical Neuroscience,2020,17(4/5/6):39-40.

(上接第 18 页)

[59]

Dolatshad H,Campbell E A,O’Hara L,et al. Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice [J]. Hum Reprod,2006,21(1):68-79.

[60]

Chavan R,Preitner N,Okabe T,et al. REV-ERB α regulates *Fgf21* expression in the liver via hepatic nuclear factor 6 [J]. Biol Open,2017,6(1):1-7.

[61]

Cho H,Zhao X,Hatori M,et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β [J]. Nature,2012,485(7396):123-127.

[62]

Baburski A Z,Sokanovic S J,Janjic M M,et al. Melatonin replacement restores the circadian behavior in adult rat Leydig cells after pinealectomy [J]. Mol Cell Endocrinol,2015,413: 26-35.

[63]

Baburski A Z,Sokanovic S J,Bjelic M M,et al. Circadian rhythm of the Leydig cells endocrine function is attenuated during aging [J]. Exp Gerontol,2016,73:5-13.

[64]

丁 赫,郭乐薇,徐高青,等. BMAL1 对小鼠睾丸间质细胞凋亡的影响 [J]. 中国畜牧杂志,2019,55(6):63-67.
Ding H,Guo L W,Xu G Q,et al. Effect of BMAL1 on apoptosis in mouse Leydig cells [J]. Chinese Journal of Animal Science,2019,55(6):63-67.

[65]

Nakao N,Yasuo S,Nishimura A,et al. Circadian clock gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles [J]. Endocrinology, 2007,148(7):3031-3038.