

低水平脂多糖持续暴露对小鼠睾丸天然免疫及紧密连接蛋白 Occludin 的影响

娄江涛, 胡伟娇, 史波, 魏任雄

【摘要】目的 探讨低水平脂多糖(LPS)持续暴露对小鼠睾丸天然免疫反应及血睾屏障(BTB)紧密连接相关蛋白 Occludin 的影响。**方法** 选取雄性 balb/c 小鼠 20 只, 随机分为对照组和实验组, 每组 10 只。实验组腹腔注射低水平 LPS, 2 次/周, 共 3 个月; 对照组腹腔注射同体积的 0.9%氯化钠注射液。采用酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测小鼠睾丸组织提取液中一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 α (IL-1 α)和白细胞介素 6(IL-6)的浓度; 采用 RT-qPCR 检测天然免疫模式识别受体 TLR4 及 BTB 紧密连接相关蛋白 Occludin mRNA 表达量; 采用 Western Blot 法测定睾丸组织 TLR4 及 Occludin 蛋白表达量。**结果** 与对照组相比, 实验组小鼠睾丸组织提取液中 NO、TNF- α 、IL-1 α 和 IL-6 的浓度均明显增高(均 $P < 0.05$), 睾丸组织 TLR4 mRNA 及蛋白表达增高(均 $P < 0.05$), Occludin mRNA 及蛋白表达降低(均 $P < 0.05$)。**结论** 低水平 LPS 持续暴露能诱导小鼠睾丸组织发生天然免疫反应, 并引起 BTB 紧密连接蛋白 Occludin 表达下调。

【关键词】 TLR4; 睾丸; 紧密连接; Occludin

doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2025.06.003

【中图分类号】 R698 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2025)06-0557-04

The effect of continuous exposure to low-level LPS on the innate immunity and tight junction protein Occludin of mouse testis

LOU Jiangtao, HU Weijiao, SHI Bo, WEI Renxiong (Ningbo Traditional Chinese Medicine Hospital, Ningbo 315012, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To explore the effect of continuous exposure of low level lipopolysaccharide (LPS) on the innate immune response of the testis and the tight junction related protein Occludin of the blood-testis barrier (BTB) in mice. **Methods** Twenty male balb/c mice were selected and randomly divided into control group and experimental group, with ten mice in each group. The experimental group received intraperitoneal injection of low level LPS twice a week for three months, while the control group received injection of the same volume of normal saline. The concentrations of nitric oxide (NO), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 α and IL-6 in testicular tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of toll-like receptors 4 (TLR4), Occludin were detected by Real-time qPCR (RT-qPCR). The protein expressions of TLR4, Occludin were detected by Western blot. **Results** Compared to the control group, the concentrations of NO, TNF- α , IL-1 α and IL-6 in testicular tissue of experimental group were significantly increased (all $P < 0.05$), the TLR4 mRNA and protein expression increased (all $P < 0.05$), while Occludin mRNA and protein expression decreased (all $P < 0.05$). **Conclusion** Sustained exposure to low levels of LPS induces a natural immune response in testicular tissue and decreases the expression of tight junction protein Occludin.

【Key words】 TLR4; Testis; Tight junctions; Occludin

[Modern Practical Medicine, 2025, 37(6):557-560]

基金项目: 宁波市科技计划项目(2021J299、2022J283); 国家中医药管理局科技司-浙江省中医药管理局共建科技计划项目(GZY-ZJ-KJ-23091)

作者单位: 315012 宁波, 宁波市中医院

通信作者: 娄江涛, Email: LJT16148@yeah.net

免疫性不育在男性不育症中占较大比重,血睾屏障(blood-testis barrier, BTB)的异常开放使精子细胞暴露于自身免疫系统之下,是其常见的发病因素之一^[1]。造成 BTB 异常开放的原因较多,炎症是其常见原因之一。炎症反应不仅可导致 BTB 的破坏,还可诱导睾丸天然免疫反应,并产生多种能使 BTB 异常开放的炎症因子^[2-3]。大肠杆菌是泌尿生殖系统感染常见的致病菌,其细胞壁上的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是重要的致炎因子。小鼠腹腔注射 LPS 可引起睾丸炎的发生,造成睾酮分泌减少,生精细胞凋亡和 BTB 的异常开放^[4]。研究显示^[5-6],人类通过隐性感染、胃肠道疾病、肥胖和饮酒等途径持续不断地暴露于低 LPS 水平中。但低水平持续暴露是否会引起睾丸天然免疫反应及 BTB 的异常开放却鲜有报道。本研究拟通过低水平 LPS 持续暴露观察小鼠睾丸内天然免疫模式识别受体 TLR4、炎症因子及紧密连接蛋白 Occludin 的变化,以探讨男性免疫性不育的可能发病机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 普通级雄性 balb/c 小鼠 20 只,6 ~ 8 周龄,体质量 18 ~ 23 g,购自并饲养于浙江中医药大学动物实验中心[实验动物使用许可证号:SYXK(浙)2021-0012]。

1.2 主要试剂和仪器 LPS 购于 sigma 公司(批号: L2880);一氧化氮(nitric oxide, NO)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)的酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购于上海科兴生物科技有限公司(批号:202302),cDNA 及 qPCR 试剂盒购于北京全式金生物科技股份有限公司(批号: Q40920);TLR4、Occludin 单克隆抗体购于自 Affinity 公司(批号分别为 AF7017, DF7504),羊抗兔 IgG 抗体购于 sigma-Aldrich 公司(批号: AP132)。2720 普通 PCR 仪和 7500 型实时荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司产品,酶标仪为安图 A200。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组 保持室内温度(24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相

对湿度 40%~ 60%,动物自由进食和饮水,适应性饲养 2 周后,将小鼠随机分为对照组和实验组,每组 10 只。实验组小鼠腹腔注射 LPS,剂量从 5 μ g/kg 逐步增加,至小鼠体温不低于 37.5 $^{\circ}$ C 且无明显不适时的浓度为实验剂量,确定剂量后对小鼠进行腹腔注射,每周进行 2 次,持续 3 个月。对照组以等剂量的 0.9% 氯化钠注射液进行腹腔注射,时间、次数与实验组保持一致。本研究获得浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准,批准编号:20230220-09。

1.3.2 睾丸组织提取液检测 末次给药后 2 h 处死小鼠并取出睾丸组织,-70 $^{\circ}$ C 冰冻保存待用。取睾丸组织,按 1 g : 9 ml 比例制成 10%组织匀浆,3 000 r/min 离心 15 min 取上清液,采用 ELISA 检测 NO、TNF- α 、IL-1 α 和 IL-6 浓度,实验操作参照说明书进行。

1.3.3 TLR4、Occludin mRNA 检测 将小鼠睾丸组织匀浆后,实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测 TLR4、Occludin mRNA 表达。采用 trizol 提取总 RNA,cDNA 合成及 qPCR 均按试剂盒说明书操作。以 β -actin 作为内参照进行扩增,cDNA 合成反应条件为 50 $^{\circ}$ C 5 min; qPCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,94 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 10 s,共 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算各组基因相对表达量。所有引物由上海科兴生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。

1.3.4 TLR4、Occludin 蛋白检测 将小鼠睾丸组织匀浆裂解,采用 BCA 法检测总蛋白浓度后进行 SDS-PAGE 电泳,将电泳后分离的蛋白转移至硝酸纤维膜上。5%脱脂牛奶封闭后,分别加入 TLR4 及 Occludin 蛋白兔多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗涤 3 次。再加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG,室温下反应 1.5 h,0.1% TBST 洗膜后 ECL 显色,以 β -actin 作为内参照,采用 Image J 1.48 分析软件分析蛋白相对表达量。

1.4 统计方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,

表 1 引物序列

引物	引物序列(5' $\rightarrow$ 3')
Occludin	上游: TATGATGAACAGCCCCCAAT
	下游: TCAGGCACCAGAGGTGTTGAC
TLR4	上游: AGATCTGAGCTTCAACCCTT
	下游: GTCTCCACAGCCACCAGATT
β -actin	上游: AGCCATGTACGTAGCCATCC
	下游: CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

计量资料以均数±标准差表示,两组比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 NO、TNF-α、IL-1α和 IL-6 浓度比较 实验组 NO、TNF-α、IL-1α和 IL-6 浓度均高于对照组,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05),见表 2。

2.2 两组 TLR4、Occludin mRNA 表达比较 实验组 TLR4 mRNA 的表达量高于对照组,而 Occludin mRNA 的表达量低于对照组,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.05),见表 3。

2.3 两组 TLR4 和 Occluding 蛋白表达比较 实验组 TLR4 蛋白表达高于对照组(*P* < 0.05),而 Occluding 蛋白表达低于对照组,差异均有统计学意义(*P* < 0.05),见图 1。

3 讨论

造成男性免疫性不育的病因复杂,其中炎症是常见的原因之一。研究表明,大肠杆菌、衣原体、溶脲脲原体及淋球菌等泌尿生殖道感染的男性不育患者抗精子抗体量明显高于正常人群^[7-8]。炎症不仅可导致 BTB 的破坏,还可诱导多种炎症因子的释放。大肠杆菌是泌尿生殖系统常见的致病菌之一,其细胞壁上的致炎因子 LPS 可引起男性生殖系统炎症反应。目前 LPS 腹腔注射已被广泛用于建立睾丸炎动物模型,基本采用短期内 1 mg/kg 以上剂量进行。赵欢欢等^[9]采用 20 mg/kg 剂量对小鼠进行 LPS 腹腔注射 6 h 后发现,小鼠曲细精管管腔体积缩小,管壁增厚,生精细胞排列紊乱或脱落,炎因子 TNF-α、IL-6

等浓度明显增加,BTB 相关蛋白 ZO-1、Occludin 蛋白表达明显降低。本研究结果显示,实验组睾丸提取液中 NO、TNF-α、IL-1α和 IL-6 浓度均较对照组有所增高(均 *P* < 0.05)。BTB 位于生精上皮基底三分之一的支持细胞紧密连接处,支持细胞间紧密连接(tight junction, TJ)是构成 BTB 的主要结构。BTB 的开闭与 TJ 的解离和重组密切相关。Occludin 蛋白是构成 TJ 结构的基础之一,其表达水平的变化可反映出 TJ 的解离重组及 BTB 的开闭状态^[10]。另外研究显示 NO、TNF-α、IL-6 和 IL-1α均可引起 BTB 的开放,除 IL-1α外其他 3 种因子亦能下调 Occludin 蛋白的表达^[11-12]。本研究结果亦显示,持续低水 LPS 暴露能引起 Occludin 表达下调,提示此时 BTB 处于异常开放状态。

睾丸是免疫豁免器官,特异性免疫应答在睾丸内被明显抑制。在应对病原微生物感染时,由模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)介导的局部天然免疫发挥重要作用^[13]。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)家族,是近年来发现的一类重要的 PRR,多数 TLRs 位于细胞质膜上,能识别微生物的 LPS、肽聚糖、细菌脂肽及核酸等^[14]。其中 TLR4 特异性识别 LPS^[15]。TRL4 主要表达于 sertoli 细胞和生精细胞。当其被 LPS 激活后,可进一步引起核因子κB(nuclear factor-κB, NF-κB)的活化,并介导炎症因子的产生。本研究结果显示,低剂量 LPS 可引起小鼠睾丸组织 TLR4 蛋白明显增高,这提示小鼠腹腔低剂量注射 LPS 诱导了睾丸天然免疫的发生。

综上所述,持续低剂量 LPS 暴露可激活睾丸组

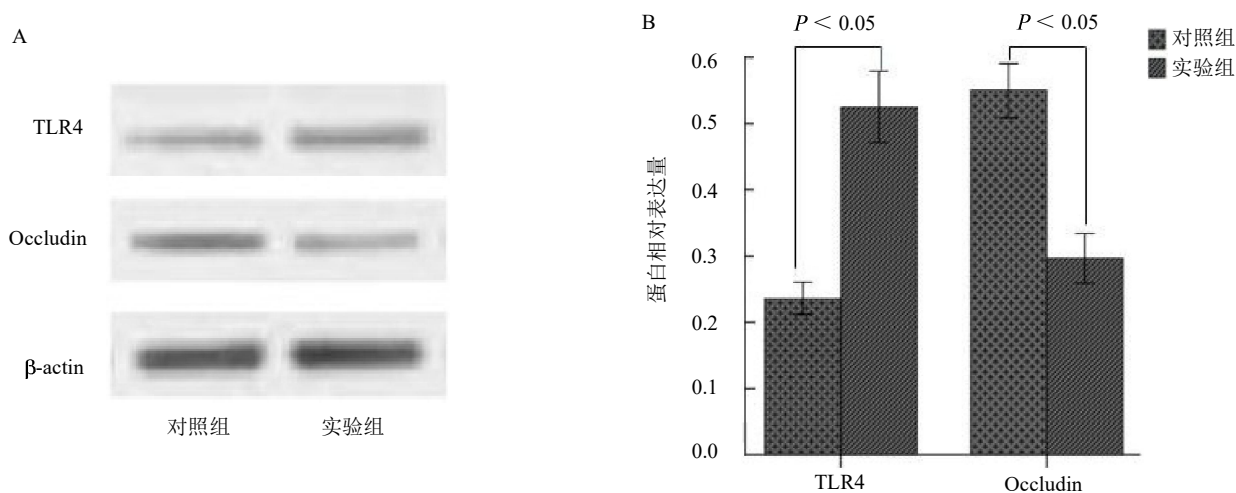
表 2 两组小鼠睾丸提取液中 NO、TNF-α、IL-1α和 IL-6 浓度比较

组别	只数	NO(μmol/L)	TNF-α(pg/ml)	IL-1α(pg/ml)	IL-6(pg/ml)
对照组	10	38.79±4.94	393.32±45.07	460.69±47.51	78.73±9.99
实验组	10	58.37±6.06	473.50±46.35	550.05±57.97	115.59±13.53
<i>t</i> 值		7.92	3.90	3.80	6.93
<i>P</i> 值		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:NO 为一氧化氮,TNF-α为肿瘤坏死因子α,IL-1α为白细胞介素 1α,IL-6 为白细胞介素 6

表 3 两组小鼠睾丸 Occludin 和 TRL4 mRNA 相对表达量比较

组别	只数	TRL4 mRNA 相对表达量	Occludin mRNA 相对表达量
对照组	10	1.01±0.01	1.00±0.02
实验组	10	1.54±0.10	0.60±0.08
<i>t</i> 值		16.71	15.52
<i>P</i> 值		< 0.05	< 0.05



注: A 为 Western blot 检测 TLR4、Occludin 相对蛋白表达, B 为 TLR4 和 Occludin 相对蛋白表达量的灰度值比较

图 1 两组 TLR4 和 Occludin 蛋白表达比较

织天然免疫反应 TLR4 信号通路,并引起炎症因子浓度增高,及 Occludin 蛋白的下调。但它们之间是否存在因果联系以及能否通过干预 TLR4 信号通路中的关键因子,进而阻断 LPS 暴露而引起的炎症因子浓度增高及 Occludin 蛋白的下调还有待进一步研究。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 姜江涛:实验操作、数据整理、统计分析及论文修改;胡伟娇:论文撰写及实验操作;史波:实验操作;魏任雄:研究指导

参 考 文 献

- [1] GUPTA S, SHARMA R, AGARWAL A, et al. Antisperm antibody testing: A comprehensive review of its role in the management of immunological male infertility and results of a global survey of clinical practices[J]. World J Mens Health, 2022, 40(3): 380-398.
- [2] SHEN Y F, YOU Y D, ZHU K, et al. Bibliometric and visual analysis of blood-testis barrier research[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 969257.
- [3] PEIROUVI T, ALIAGHAEI A, ESLAMI FARSAANI B, et al. COVID-19 disrupts the blood-testis barrier through the induction of inflammatory cytokines and disruption of junctional proteins[J]. Inflamm Res, 2021, 70(10/11/12): 1165-1175.
- [4] ZHU C L, WANG L, ZHAO X Q, et al. Antimicrobial peptide MPX attenuates LPS-induced inflammatory response and blood-testis barrier dysfunction in Sertoli cells[J]. Theriogenology, 2022, 189: 301-312.
- [5] 叶丹,胡晓娜,保志军.肠源性内毒素血症与代谢相关脂肪性肝病研究进展[J].老年医学与保健,2023,29(4):843-847.
- [6] 刘春辉,陕文生.肥胖相关的内毒素血症对男性性腺功能影响的

研究进展[J].中国性科学,2023,32(3):9-13.

- [7] 陈艳,刘智敏,符雄,等.不育男性合并 UU 感染者抗精子抗体及不同类型分布[J].中国性科学,2020,29(1):4-7.
- [8] FARSIMADAN M, MOTAMEDIFAR M. Bacterial infection of the male reproductive system causing infertility[J]. J Reprod Immunol, 2020, 142: 103183.
- [9] 赵欢欢,谢炳坤,刘念,等.细胞保护蛋白 PTD-FNK 对脂多糖诱导的小鼠睾丸炎性损伤的保护作用[J].中国兽医科学,2024,54(5): 702-709.
- [10] LIU J, ZENG D W, LUO J Y, et al. LPS-induced inhibition of miR-143 expression in brown adipocytes promotes thermogenesis and fever[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 13805.
- [11] ZHU M, LU J, SHEN J, et al. A 22-amino-acid peptide regulates tight junctions through occludin and cell apoptosis[J]. PeerJ, 2020, 8: e10147.
- [12] PAN Z K, GAO Y X, LIU S, et al. Wu-Zi-Yan-Zong-Wan protects mouse blood-testis barrier from Tripterygium wilfordii Hook. f. multiglycoside-induced disruption by regulating proinflammatory cytokines[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 280: 114440.
- [13] CHEN R, WANG F, CHEN Y M, et al. Immune homeostasis and disorder in the testis - Roles of Sertoli cells[J]. J Reprod Immunol, 2022, 152: 103625.
- [14] DOGAN G, SANDIKCI M, KARAGENC L. Stage-specific expression of Toll-like receptors in the seminiferous epithelium of mouse testis[J]. Histochem Cell Biol, 2024, 162(4): 323-335.
- [15] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1233-1261.

收稿日期:2024-11-29

(本文编辑:孙海儿)