

2021 届研究生硕士学位论文

分类号:

学校代码: 10269

密 级:

学 号: 51181300053



華東師範大學

East China Normal University

硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION

论文题目: ADAMTS18 缺失对雄性小鼠生殖
系统的影响

院 系: 生命科学学院

专 业: 神经生物学

研究方向: 发育与疾病

指导教师: 张巍 研究员

学位申请人: 林晓田

2021 年 5 月

2021届研究生硕士学位论文

分类号:

学校代码: 10269

密 级:

学 号: 51181300053



華東師範大學

East China Normal University

硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION

论文题目: ADAMTS18 缺失对雄性
小鼠生殖系统的影响

院 系: 生命科学学院

专 业: 神经生物学

研究方向: 发育与疾病

指导教师: 张巍 研究员

学位申请人: 林晓田

2021 年 5 月

Dissertation for master degree in 2021

University code: 10269

Student ID:51181300053

East China Normal University

Title: The Role of ADAMTS18 in the
Development of Male Reproductive System in Mice

Academy: School of Life Sciences

Major: Neurobiology

Research direction: Development and Disease

Mentor: Prof. Wei Zhang

Candidate: Xiaotian Lin

May, 2021

华东师范大学学位论文原创性声明

郑重声明：本人呈交的学位论文《ADAMTS18 缺失对雄性小鼠生殖系统的影响》，是在华东师范大学攻读硕士/博士（请勾选）学位期间，在导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确说明并表示谢意。

作者签名：林晓田

日期：2021年5月19日

华东师范大学学位论文著作权使用声明

《ADAMTS18 缺失对雄性小鼠生殖系统的影响》系本人在华东师范大学攻读学位期间在导师指导下完成的硕士/博士（请勾选）学位论文，本论文的著作权归本人所有。本人同意华东师范大学根据相关规定保留和使用此学位论文，并向主管部门和学校指定的相关机构送交学位论文的印刷版和电子版；允许学位论文进入华东师范大学图书馆及数据库被查阅、借阅；同意学校将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于（请勾选）

1. 经华东师范大学相关部门审查核定的“内部”或“涉密”学位论文*，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

导师签名



本人签名



2021年5月19日

* “涉密”学位论文应是已经华东师范大学学位评定委员会办公室或保密委员会审定过的学位论文（需附获批的《华东师范大学研究生申请学位论文“涉密”审批表》方为有效），未经上述部门审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权）。

林晓田 硕士学位论文答辩委员会成员名单

姓名	职称	单位	备注
赵政	研究员	华东师范大学	主席
潘逸萱	副研究员	华东师范大学	
何桂梅	副研究员	华东师范大学	

摘要

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type I motifs) 是分泌型的金属蛋白酶。它们通过改变细胞外基质,在不同的形态发生过程中起着至关重要的作用。ADAMTS18 是 ADAMTS 家族中的一个“孤儿”蛋白,人们对它的功能和底物尚不清楚。本课题组在先前的研究中构建了 *Adamts18* 基因敲除 (*Adamts18^{-/-}*) 小鼠模型。在繁育过程中发现无论雌雄, *Adamts18^{-/-}* 小鼠相比于野生型小鼠 (*Adamts18^{+/+}*) 生育能力下降。为此,我们对 *Adamts18^{-/-}* 小鼠在生殖系统的表型进行分析,课题组另一研究显示,部分 *Adamts18^{-/-}* 雌性小鼠有阴道闭锁和不育的表型。本课题对 ADAMTS18 在雄性小鼠生殖系统发育中的作用展开研究。

研究方法:采用 qRT-PCR 的方法测定了雄性生殖系统不同发育阶段的细胞中 *Adamts18* mRNA 水平。采用 RNA 原位杂交技术对 1 周龄雄性小鼠包皮腺中 *Adamts18* mRNA 的起源细胞进行了鉴定。在胚胎 E14.5 天时,对 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 雄性胚胎的泌尿生殖窦体外培养 96 小时,每 48 小时拍摄一次,观察 ADAMTS18 缺失对胚胎包皮腺发育的影响。为探讨 ADAMTS18 影响包皮腺形态发生的机制,采用 qRT-PCR 检测 2 周龄雄性小鼠包皮腺中关键 ECMs 的表达。通过 Masson 三色染色法鉴别 7 月龄和 10 月龄的 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠包皮腺纤维化和角质化鳞状细胞层,通过解剖和组织学检查 ADAMTS18 缺失对小鼠包皮腺、前列腺和睾丸形态发生的影响。从 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠附睾中采集精子,并测量精子尾段长度。计算 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠附睾中异常精子的百分比,包括折叠头、重复尾、发夹环、无定形、折叠尾、断尾、锤头和无头的精子。

研究结果: *Adamts18* mRNA 在发育中的包皮腺腺泡基底细胞中高表达。*Adamts18* 基因敲除 (*Adamts18^{-/-}*) 的雄性小鼠包皮腺发育形态异常,表现为包皮腺尺寸较小、轮廓锐利,这种包皮腺畸形与 *Lama1*、*Lama3* 和 *Lama5* 的表达降低有关。在 *Adamts18^{-/-}* 小鼠中,包皮腺形态发育异常导致包皮腺导管囊性扩张、

细胞角化和间质纤维化的发生率增加。ADAMTS18 缺失对前列腺的分支形态、分支数量影响不大。*Adamts18^{-/-}*小鼠睾丸的形态、相对重量、大小以及精子的形态与 *Adamts18^{+/+}*小鼠睾丸也未发现明显区别。这些结果表明，ADAMTS18 是雄性小鼠包皮腺正常形态发育所必需的。

本研究首次证明在小鼠雄性生殖系统发育过程中，ADAMTS18 调节包皮腺的形态发育，缺失 ADAMTS18 的小鼠表现出包皮腺形态发育异常，导致包皮腺囊性扩张和间质纤维化的发生率增加。

关键词： *Adamts18*，雄性生殖系统，形态发育，包皮腺，细胞外基质

ABSTRACT

ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type I motifs) are secreted metalloproteinases. They play crucial roles in diverse morphogenesis processes by modifying extracellular matrix. ADAMTS18 an orphan ADAMTS, is less understood with regard to its functions and substrate profiles. We have previously developed an *Adamts18* knockout (*Adamts18^{-/-}*) mouse model. It was shown that the fertility of *Adamts18^{-/-}* mice (both male and female) was reduced compared to wild-type mice (*Adamts18^{+/+}*) during breeding. Another study in our group shows that some female *Adamts18^{-/-}* mice exhibit vaginal atresia and are infertile. In this study, the role of ADAMTS18 in the development of the reproductive system in male mice was investigated.

Methods: *Adamts18* mRNA levels in cells of different developmental stages of male reproductive system were determined by qRT-PCR. RNA in situ hybridization was used to reveal the origin cells of *Adamts18* mRNA in preputial gland (PG) of 1-week-old male mice. The genital tubercles of both *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* male embryos at E14.5 were in vitro cultured and examined every 48 h for 96 h. To investigate the underlying mechanisms by which *ADAMTS18* affects the morphogenesis of preputial gland, the expression of major ECMs in preputial glands of 2 weeks old male mice was examined. Masson's trichrome staining was used to show the fibrosis and keratinized squamous cell layer of 7 and 10 months old *Adamts18^{-/-}* and *Adamts18^{+/+}* mice preputial glands. The effect of ADAMTS18 on mouse preputial glands, prostate and testes morphogenesis was examined by anatomy and histology. Tail lengths of sperms which were collected from the epididymis of *Adamts18^{-/-}* and *Adamts18^{+/+}* mice were measured. The percentage of abnormal sperms, including those with folded head, duplicated tail, hairpin loop, amorphous,

folded tail, broken tail, hammerhead, and headless were calculated.

Results: *Adamts18* mRNA was found to be highly expressed in basal cells of developing preputial gland. Male mice lacking *Adamts18* (*Adamts18*^{-/-}) exhibit abnormal PG morphogenesis, including reduced size and sharp outline. This PG malformation is associated with reduced expression of *Lama1*, *Lama3*, and *Lama5*. Abnormal PG morphogenesis in *Adamts18*^{-/-} mice results in increased incidence of PG cystic dilatation, cellular keratinization, and stroma fibrosis. There was no difference in branching morphogenesis and in the number of branches in prostate. The testes and sperm of adult *Adamts18*^{-/-} mice exhibited similar morphologic features to those of *Adamts18*^{+/+} mice. These results indicate that ADAMTS18 is required for normal morphogenesis of the preputial gland in male mice.

This study demonstrated for the first time that ADAMTS18 regulates the morphogenesis of preputial gland during the development of male reproductive system in mice. In summary, we investigated the role of ADAMTS18 in the development of the male reproductive system and found that mice lacking ADAMTS18 exhibit abnormal preputial gland morphogenesis and increased incidence of preputial gland cystic dilatation and fibrosis.

Key words: *Adamts18*, male reproductive system, morphogenesis processes, preputial gland, extracellular matrix

目录

摘要.....	IV
ABSTRACT.....	VI
插图和附表清单.....	XI
缩略词.....	XI
1 前言.....	1
1.1 ADAMTS 简介.....	1
1.1.1 ADAMTS 家族.....	1
1.1.2 ADAMTS 与生殖系统.....	2
1.1.3 ADAMTS 与器官形态发育.....	2
1.2 小鼠雄性生殖系统.....	3
1.2.1 小鼠雄性生殖系统简介.....	3
1.2.2 小鼠包皮腺简介.....	4
1.2.3 小鼠包皮腺的扩张和萎缩.....	5
1.2.4 小鼠精囊和前列腺的分支.....	6
1.2.5 小鼠睾丸与精子.....	7
1.3 研究目的及意义.....	7
2 实验材料.....	9
2.1 实验动物.....	9
2.2 实验仪器.....	9
2.3 实验试剂.....	10
2.4 实验耗材.....	12
2.5 常用试剂配方.....	13

3 实验方法.....	15
3.1 小鼠的饲养条件.....	15
3.2 小鼠的繁殖方法.....	15
3.3 基因型鉴定.....	15
3.3.1 抽提鼠尾和脚趾 DNA.....	15
3.3.2 PCR.....	17
3.3.3 琼脂糖凝胶核酸电泳.....	18
3.3.4 基因型判断.....	19
3.4 原位杂交.....	20
3.5 qRT-PCR.....	23
3.6 石蜡组织制备.....	25
3.7 石蜡组织切片.....	26
3.8 苏木素-伊红染色 (H&E)	27
3.9 Masson 三色染色.....	27
3.10 制作精子涂片.....	27
3.11 胚胎泌尿生殖窦体外培养.....	28
3.12 前列腺分支计数.....	29
3.13 统计学方法.....	29
4 实验结果.....	30
4.1 <i>Adamts18</i> mRNA 在雄性生殖系统中的表达.....	30
4.1.1 <i>Adamts18</i> mRNA 在 小鼠雄性生殖系统中的表达.....	30
4.1.2 <i>Adamts18</i> mRNA 在 小鼠包皮腺的空间表达.....	31
4.2 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 雄性小鼠包皮腺发育异常.....	33
4.2.1 ADAMTS18 缺失对胚胎的泌尿生殖窦形态发育影响较小.....	33
4.2.2 ADAMTS18 缺失导致包皮腺早期形态发育不良.....	35
4.2.3 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 包皮腺 <i>Lama1</i> 、 <i>Lama3</i> 和 <i>Lama5</i> mRNA 表达水平降低.....	36

4.3 ADAMTS18 缺失加速小鼠包皮腺老化.....	37
4.3.1 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 雄性小鼠包皮腺出现囊性扩张.....	37
4.3.2 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 老龄小鼠包皮腺纤维化更严重、导管鳞状上皮更厚...	38
4.4 ADAMTS18 缺失对前列腺发育无明显影响.....	39
4.4.1 ADAMTS18 缺失对 2 月龄小鼠前列腺分支的影响较小.....	39
4.4.2 ADAMTS18 缺失对 10 月龄小鼠前列腺管腔无明显影响.....	40
4.5 ADAMTS18 缺失对睾丸发育无明显影响.....	42
4.5.1 ADAMTS18 缺失对小鼠睾丸形态和重量无明显影响.....	42
4.5.2 ADAMTS18 缺失对生精小管截面的细胞数无明显影响.....	43
4.5.3 ADAMTS18 缺失对精子形态影响较小.....	44
5 讨论与展望.....	46
6 结论.....	50
参考文献.....	51
附录.....	58
在学期间科研成果.....	59
致谢.....	60

插图和附表清单

图 1. ADAMTS 蛋白酶的结构域 ^[2]	1
图 2. 小鼠雄性生殖系统示意图 ^[25]	4
图 3. 研究技术路线示意图.....	8
图 4. 实验时间点.....	8
图 5. 引物扩增片段示意图和基因型鉴定电泳示意图.....	20
图 6. 雄性生殖系统中 <i>Adamts18</i> mRNA 的表达.....	30
图 7. <i>Adamts18</i> mRNA 在包皮腺中的表达.....	32
图 8. 体外培养泌尿生殖窦.....	34
图 9. 2 周龄的 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 小鼠包皮腺.....	35
图 10. qRT-PCR 测定 <i>Fnl</i> 、 <i>Fbn1</i> 、 <i>Col4a1</i> 、 <i>Lama1</i> 、 <i>Lama3</i> 、 <i>Lama5</i> 、 <i>Lambl</i> 和 <i>Lamc1</i> mRNA 的相对表达水平.....	36
图 11. 老年 <i>Adamts18</i> ^{+/+} 和 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 雄鼠包皮腺.....	37
图 12. 7 和 10 月龄小鼠包皮腺 Masson 染色结果.....	38
图 13. 2 月龄 <i>Adamts18</i> ^{+/+} 和 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 小鼠前列腺分支.....	40
图 14. 10 月龄 <i>Adamts18</i> ^{+/+} 和 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 小鼠前列腺切片的苏木精-伊红 (H&E) 染色.....	41
图 15. 7 月龄和 10 月龄 <i>Adamts18</i> ^{+/+} 和 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 小鼠睾丸的形态和重量.....	42
图 16. <i>Adamts18</i> ^{+/+} 和 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 小鼠睾丸和生精小管截面.....	43
图 17. <i>Adamts18</i> ^{+/+} 和 <i>Adamts18</i> ^{-/-} 小鼠精子形态.....	44

缩略词

Abbreviation

英文缩写	英文全称	中文全称
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type I motifs	含I型血小板结合蛋白基 序的解整合素金属蛋白酶
AP	vanterior prostate	前列腺前侧
BPH	benign prostatic hyperplasia	良性前列腺增生
<i>Col4a1</i>	Collagen type IV alpha 1	IV型胶原 α 1
CVF	collagen volume fraction	胶原容积分数
ddH ₂ O	Double distilled water	双蒸水
DEPC	diethypyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
DP	dorsal prostate	前列腺背侧
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	杜氏磷酸缓冲液
ECM	Extracellular matrix	细胞外基质
EDTA	Ethylene diamine teracetic acid	乙二胺四乙酸
<i>Fbn1</i>	Fibrillin-1	原纤维蛋白-1
<i>Fnl</i>	Fibronectin 1	纤粘蛋白 1
<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	磷酸甘油醛脱氢酶
<i>Gnrhr</i>	Gonadotropin Releasing Hormone Receptor	促性腺激素释放激素受体
H&E	Hematoxylin eosin	苏木素-伊红染色
IHC	Imunehistochemistry	免疫组织化学
ISH	<i>in situ</i> hybridization	原位杂交技术

<i>Kiss1r</i>	kisspeptin-1	吻素受体
<i>Lama1</i>	Laminin Alpha 1	层粘连蛋白 α 1
<i>Lama3</i>	Laminin Alpha 3	层粘连蛋白 α 3
<i>Lama5</i>	Laminin Alpha 5	层粘连蛋白 α 5
<i>Lamb1</i>	Laminin Subunit Beta 1	层粘连蛋白 β 1
<i>Lamc1</i>	Laminin Subunit Gamma 1	层粘连蛋白 γ 1
LP	lateral prostate	前列腺外侧
MMP	matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
OD	optical density	光学密度值
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PG	Preputial gland	包皮腺
<i>qRT-PCR</i>	Quantitative Real-Time-PCR	实时荧光定量 PCR
<i>Shh</i>	sonic hedgehog	音猬因子
TAE	Tris Acetate EDTA buffer	三羟甲基氨基甲烷乙酰盐乙二 胺四乙酸缓冲液
T_m	melting temperature	熔解温度
Tris	Tris aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
VP	ventral prostate	前列腺腹侧
vWF	von-Willebrand Factor	血管假性血友病因子
ns	not significant	不显著

1 前言

1.1 ADAMTS 简介

1.1.1 ADAMTS 家族

含 I 型血小板反应蛋白域的解整合素金属蛋白酶 ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin type I motifs) 是一类多结构域的分泌型的锌离子金属蛋白酶, 从 1997 年至今^[1], 在人类中发现了 19 个 ADAMTS 家族成员^[2]。

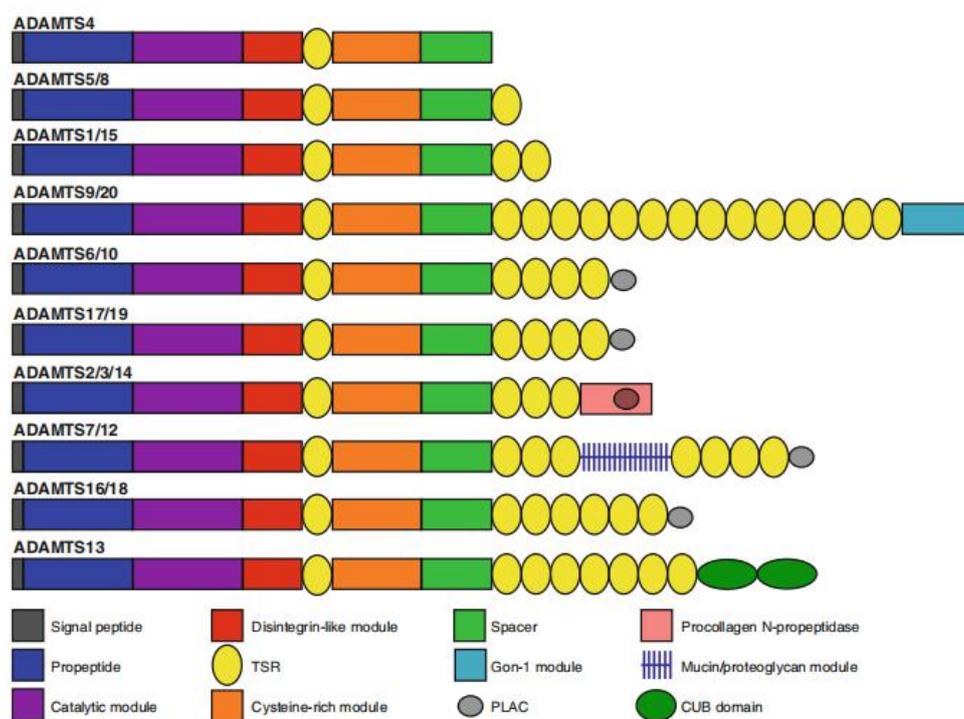


图 1. ADAMTS 蛋白酶的结构域^[2]

Figure 1. Domain structure of ADAMTS proteases^[2]

ADAMTS 不仅与炎症、肿瘤的发生有关, 还参与器官的形态发育。例如, 敲除 *Adamts1* 致使新生小鼠肾脏畸形和肾上腺和脂肪组织缺陷^[3], 胚胎小鼠发育中的肺、胰腺、肾以及神经元均可检测到富集的 ADAMTS1 基因转录本^[4]。

ADAMTS18 是 ADAMTS 家族的一个“孤儿”蛋白, 有数据显示人类的

ADAMTS18 突变与各种恶性肿瘤^[5]、眼睛疾病^[6]、骨量减少^[7]和脑白质^[8]完整性下降有关，但目前人们对它的功能和底物认识不太完全。

1.1.2 ADAMTS 与生殖系统

在雌性生殖系统发育中，ADAMTS 家族各成员的作用已被广泛记录^[9]，研究表明，*Adamts18* 是小鼠乳腺导管发育所必需的^[10]。*Adamts18* 缺失还会导致 C57Bl6/Ola 品系基因敲除的小鼠雌性生殖道发育不良^[11]。

ADAMTS 在雄性生殖系统发育中的作用记录非常少，目前仅 ADAMTS-2 和 *Adamts16* 有相关记载。

ADAMTS-2 的无活性等位基因纯合子可育雌鼠与同基因型雄鼠交配，观察到雌鼠既无阴道栓或也不怀孕，表明 ADAMTS-2 缺乏的雄性纯合小鼠是不育的。病理切片进一步显示 ADAMTS-2 的无活性等位基因纯合子雄鼠精子较少，说明 ADAMTS-2 参与了精子的发生^[12]。

Adamts16 基因突变导致雄性大鼠不育和隐睾，表现为纯合突变的雄性大鼠的睾丸明显小于对照组，睾丸内生精小管生殖细胞减少，不产生精子^[13]。*Adamts16* 缺失的小鼠雄性胚胎睾丸正常发育，但成年后小鼠睾丸重量减少^[14]。

本课题组在先前的研究中构建了 *Adamts18* 基因敲除 (*Adamts18^{-/-}*) 小鼠模型^[15]。在繁育过程中发现无论雌雄，*Adamts18^{-/-}* 小鼠相比于野生型小鼠 (*Adamts18^{+/+}*) 生育能力下降，为此，我们对 *Adamts18^{-/-}* 小鼠在生殖系统的表型进行分析，课题组另一研究显示，部分 *Adamts18^{-/-}* 雌性小鼠有阴道闭锁和不育的表型^[16]，但 ADAMTS18 在雄性生殖系统发育中的作用尚不清楚，这也正是本课题要研究的内容。

1.1.3 ADAMTS 与器官形态发育

ADAMTS 可以通过改变细胞外基质 (ECM) 在不同的形态发生中起关键作用。如 1.1.2 小节所述，ADAMTS18 与器官形态发育的关系也在其对生殖系统的影响中有所体现。

近年来,部分研究逐渐揭示了 ADAMTS18 与器官分支形成有关。在肺、肾和唾液腺形成中的分支尖端检测到富集表达的 *Adamts18*^[17],分别对这些器官的大小、形态和结构产生了不同的影响^[18]。本课题组先前的研究首次证实了 ADAMTS18 可通过改变原纤蛋白代谢来调控早期肺脏支气管发育^[19]。

ECM (Extracellular matrix) 的重塑可以通过保持结构完整性和调节各种细胞过程来控制器官分支^[20]。ECM 的纤维结构蛋白包括纤维连接蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白和层粘连蛋白,还包括糖蛋白和蛋白聚糖^[21],这些组分是典型导管形态发生所必须的,它们创造了宽松且稳定的微环境来引导组织的扩张。例如乳腺和下颌下腺,在胚胎发育时形成,通过上皮重复形成分裂和芽,侵入周围的 ECM,随着个体发育,腺体的成分和分布出现变化,实现分支过程^[20]。

而在雄性小鼠生殖系统中,前列腺和精囊均属于分支性的器官,前列腺形态分支是高度依赖于 ECM 的组成和组织的发育过程^[22]。有研究表明,ECM 蛋白 tenascin-C 的缺失导致前列腺的导管形态异常^[23],基质金属蛋白酶 MMP2 的缺失也使得前列腺的腹侧叶和上皮组织整体缩小^[24]。

1.2 小鼠雄性生殖系统

1.2.1 小鼠雄性生殖系统简介

雄性生殖系统由成对的睾丸、传出导管、附睾和输精管以及副性腺——精囊、前列腺、尿道球腺、壶腹腺、包皮腺,尿道和阴茎组成。其中壶腹腺和包皮腺是小鼠、大鼠等啮齿类动物特有的^[25]。睾丸是雄性性腺,具有分泌雄激素和产生精子的功能。附睾是精子的积累、成熟和储存的部位。输精管可将精子从附睾尾部传导到尿道。阴茎是雄鼠的交配器官,由阴茎体、龟头组成。

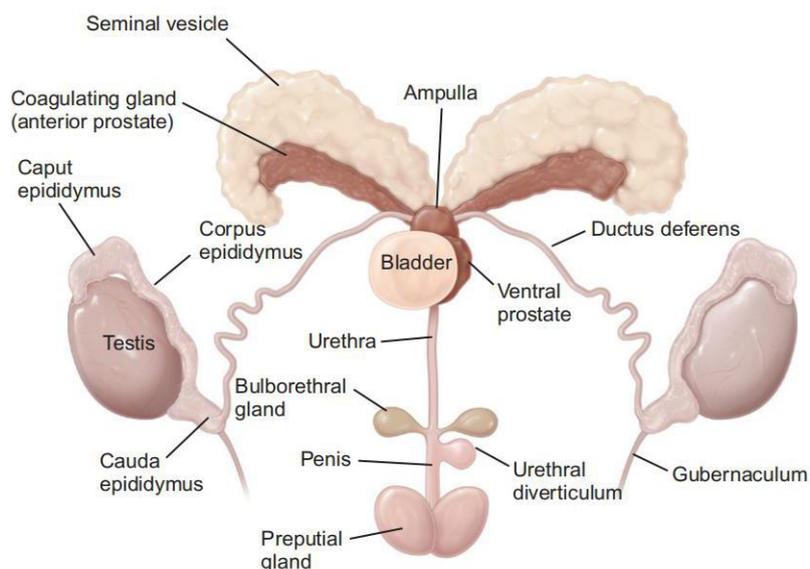


图 2. 小鼠雄性生殖系统示意图^[25]。Seminal vesicle: 储精囊, Ampulla: 壶腹腺, Bladder: 膀胱, Anterior prostate: 前列腺前侧, Ductus deferens: 输精管, Caput epididymus: 附睾头, Corpus epididymus: 附睾体, Cauda epididymus: 附睾尾, Ventral prostate: 前列腺腹叶; Urethra: 尿道, Bulbourethral gland: 尿道球腺, Urethral diverticulum: 尿道憩室, Penis: 阴茎, Preputial gland: 包皮腺, Ductus deferens: 输精管, Testis: 睾丸。

1.2.2 小鼠包皮腺简介

在大鼠、小鼠、兔子、树鼯、豚鼠和仓鼠中发现的包皮腺是雄性和雌性泌尿生殖区尾端的一种腺体,在雌性小鼠中也称为阴蒂腺^[26]。包皮腺能够产生信息素或信息素样物质,这些物质可能影响性行为的各个方面,包括识别、吸引、唤醒、发情启动、主导和顺从的社会行为以及领土标记^[27],同时,包皮腺的分泌物有润滑、保湿、抗菌和抗真菌等多种功能。

人类是否有包皮腺仍存在争议,有学者认为阴囊皮肤上有许多皮脂腺,这与啮齿类动物的包皮腺在组织学和功能上可能有相似之处^[28]。*Mab21ll* 基因敲除小鼠有眼部发育和包皮腺缺陷,而临床病例 *MAB21L1* 基因自发性突变综合征患者也出现眼睛异常、阴囊发育不全,两者表型有极大的相似性^[29]。

分离胚胎包皮腺或泌尿生殖窦进行体外培养常用于观察包皮腺生长发育^{[26][31][32]}，胚胎 13.5 天时，小鼠的生殖嵴和生殖结节交界处的上皮向下生长发育成包皮腺，此时在 *ShhGFPcre* 报告基因小鼠中，表达 *ShhGFPcre* 的外胚层的焦点开始向包皮间充质内陷^[30]。

小鼠包皮腺在 2 周龄时不容易观察到，但在性成熟过程中包皮腺体型迅速增加，2 周龄时双侧包皮腺平均重量为不少于 15 mg，随后迅速增长，在 3 月龄时平均重量为 60~75 mg，该重量维持稳定直到 12 月龄，而到了 18 月龄时，腺体的重量降至 25 mg 左右^[33]。

成年雄性小鼠包皮腺相比雌性小鼠的阴蒂腺更大，呈扁平、棕黄色，位于尾侧阴茎附近的皮下组织。包皮腺的导管与其他特殊皮脂腺的形态略有不同，包皮腺有一个大的中央导管贯穿整个腺体，许多短的侧导管延伸至中央导管。导管内衬分层鳞状上皮，并常常因过多累积的分泌物而扩张。血液、淋巴管和神经纤维分布在结缔组织间质中，将围绕于侧导管周围的腺泡彼此隔开^{[25][33]}。

包皮腺的腺泡由一层不完整的扁平基底细胞（干细胞）围绕着成熟程度不同的腺泡细胞组成。腺泡细胞是全浆分泌型的，分泌的颗粒是膜结合的，成熟的腺泡细胞会退化和解体，最后成为分泌产物的一部分。有学者将腺泡活动划分为五个阶段^[34]，第一阶段小的上皮芽缓慢伸入较大的实质组成成分中。第二阶段小上皮芽形成较大的圆上皮腺泡，包括小的外周细胞以及中间肥大的细胞。第三阶段腺泡细胞变得更大，包含着泡状的细胞，其细胞质中富含大量的脂肪物质。第四阶段不同腺泡组合成巨大腺泡，由大量肥大的脂肪细胞组成，而中心部分的细胞出现破裂退化。第五阶段的腺泡细胞处于不同退化阶段，空腔区域充满了细胞碎片。本实验在描述腺泡的成熟程度时以此作为参照，type II型腺泡指的是第二阶段的腺泡。

1.2.3 小鼠包皮腺的扩张和萎缩

炎症是包皮腺最常见的非肿瘤性病变，在老年大鼠，特别是雄性大鼠中，炎症更为频繁和严重，大多数 2 岁的大鼠的包皮腺有局灶性、弥漫性或慢性活动性

炎症^[27]。

衰老大鼠包皮腺体最常见的自发性病变是腺泡萎缩,使得单个腺泡细胞的细胞质减少,萎缩可以发展到完全缺乏皮脂腺细胞,只剩下基质。此外,萎缩包皮腺可能含有少量的黄褐色颗粒色素(脂褐素),导管有不同程度的基质纤维化和扩张^[27]。

不同品系小鼠的包皮腺导管扩张的发生率不同,有报道显示 B6C3F1 的小鼠导管扩张发生率为 62%而 CD-1 小鼠为 29%^[33]。包皮腺导管扩张诊断:对导管扩张的包皮腺进行组织学分析,组织主要由较大的多位点的囊肿组成,囊肿周围排列有扁平的上皮细胞,囊肿内充满角质碎片;包皮腺表现出萎缩,囊肿壁内偶见良性皮脂腺上皮细胞巢;包皮腺的导管扩大,其中含有角蛋白。

1.2.4 小鼠精囊和前列腺的分支

精囊和前列腺是大多数哺乳动物中雄性生殖道的外分泌腺^[35],在 小鼠中,前列腺的前叶(凝固腺)双侧附着在精囊上。精囊、前列腺和尿道球腺的联合分泌物形成交配塞,防止精液倒流,提高受精几率^[25]。

分支形态发生是这两个器官发育的关键特征之一^[22]。小鼠精囊的分支较为简单,出生后的精囊初始管形成延伸的横向分支,常有二级分支^[36]。前列腺从小鼠胚胎的第 16.5 天开始萌出上皮芽,发生形态分支,随后,前列腺的导管进一步发育,分支过程持续到小鼠出生后的第 15 天^[37]。

精囊和前列腺的分支在小鼠出生后两周基本完成^[38],不同的是,在小鼠去势后,随着雄激素的补充,前列腺呈现出显著的再生能力^[39]。在青春期,多能基底细胞聚集在前列腺的远端尖端,这也是去势后雄性激素诱导再生生长期间细胞增殖的主要部位^{[39][40]}。选择性敲除小鼠基质成纤维细胞和平滑肌细胞中雄激素受体(AR),发现与野生型对照相比,前列腺前叶的大小显著减小,进一步解剖发现小鼠前列腺前叶上皮增殖和凋亡减少^[41]。

良性前列腺增生(BPH)大多发生在老年男性身上,是尿道周围与前列腺之间过渡区的一种扩张,该区域含有前列腺的祖细胞,有学者根据细胞和解剖学研

究，提出前列腺的控制再生能力也可能与雄激素不敏感的祖细胞有关^[39]。

小鼠前列腺分支结构特征复杂^[38]，大致分为前、背、腹和侧四个不同的叶，背叶和侧叶有时被归为背外侧叶。

前列腺前侧：衬立方状到柱状上皮排列，呈乳头状。管腔富有嗜酸性分泌物，每个腺泡周围存在明显的平滑肌。

前列腺背侧：衬柱状上皮，有中度程度的折叠，含有颗粒状嗜酸性分泌物的细胞质。单个腺体被致密的纤维基质包围，周围结缔组织较为松散。

前列腺外侧：多由立方形至低柱状上皮排列，折叠较为稀疏。细胞质含有无固定形状的、颗粒性的嗜酸性分泌物，周围同样有较为松散的结缔组织。

前列腺腹侧：由多数立方上皮排列，有稀疏的折叠和局灶性的绒簇；管腔含有浆液性分泌物，为均质白色^{[25][38]}。

1.2.5 小鼠睾丸与精子

睾丸能够产生精子和分泌雄性激素，是雄性重要的生殖腺，小鼠睾丸重量与小鼠体重的比值是评价睾丸形态的指数之一^{[42][43]}。

小鼠睾丸切片中可以观察到小鼠的体细胞、间质细胞、生殖细胞以及精细胞在生精小管中分层排列^[25]，生精小管的直径常用于观察睾丸的发育。

精子的形态和功能也是生殖能力的体现，在大鼠生殖能力的研究中，发现合成类固醇激素对精子数量和质量有影响，其中异常精子、无头精子、无尾精子和卷尾精子的百分比显著增加，从而可能损害生育^[44]。

1.3 研究目的及意义

ADAMTS 是分泌型的细胞外基质金属蛋白酶，通过修饰细胞外基质，参与多种器官的形态发育。课题组在先前的研究中构建了 *Adamts18* 基因敲除 (*Adamts18^{-/-}*) 小鼠模型。在繁育过程中发现无论雌雄，*Adamts18^{-/-}* 小鼠相比于野生型 (*Adamts18^{+/+}*) 小鼠生育能力下降。为此，对 *Adamts18^{-/-}* 小鼠在生殖系统的表型进行分析，课题组另一部分研究显示部分 *Adamts18^{-/-}* 雌性小鼠有阴道闭锁

和不育的表型。但 ADAMTS18 在雄性生殖系统发育中的作用尚不清楚，本课题对 ADAMTS18 在雄性小鼠生殖系统发育中的作用展开研究。

本研究将检测 1~5 周龄 *Adamts18*^{+/+} 小鼠雄性生殖系统中阴茎、睾丸、附睾、储精囊、前列腺、包皮腺和输精管中的 *Adamts18* mRNA 表达情况，并聚焦 *Adamts18* mRNA 高表达的器官，对比这些器官在 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠雄性生殖系统中的形态和病理差异，对 ADAMTS18 在小鼠雄性生殖系统各器官发育过程中的影响和分子机制进行初步探索，为 ADAMTS18 在雄性生殖系统发育中潜在的功能提供相应的依据。



图 3. 研究技术路线示意图

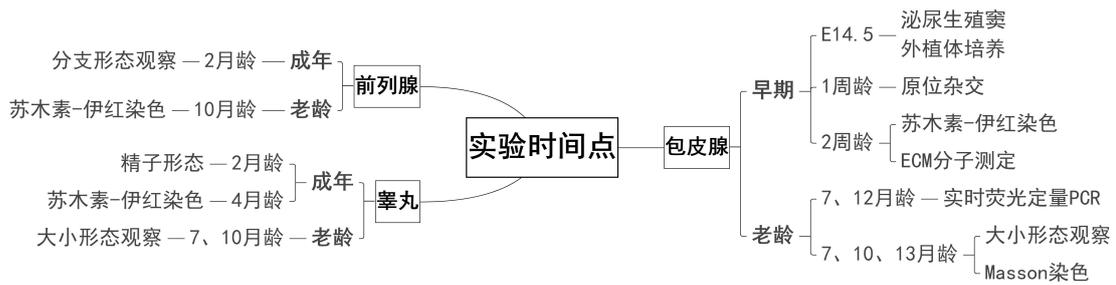


图 4. 实验时间点

2 实验材料

2.1 实验动物

本研究涉及的所有动物实验，包括小鼠的饲养、繁殖、鉴定、取材等，均按照华东师范大学动物伦理委员会和动物饲养与使用委员会的相关规定开展，达到动物伦理的要求，保证动物福利，实验伦理审查编号：m20160308。例如，为了减少动物的痛苦，尽量在最短的时间内结束动物的生命，对于出生后 2 周龄的小鼠，使用腹腔注射麻醉剂的方式处死，大于 3 周龄的小鼠则用脊椎脱臼的方法。所有的小鼠均为 SPF 级动物，规范饲养于华东师范大学脑功能基因组学研究所专门的屏障系统中。系统内给予 12 小时的持续光照和 12 小时的持续黑暗，如此交替循环，同时，常年维持稳定的温度（22℃）和相对湿度（55%），提供足够的水和饲料保证小鼠自由饮食。

实验室先前通过胚胎干细胞打靶构建的 *Adamts18^{-/-}* 小鼠是本研究的主要观察和实验对象。*Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠均来源于 *Adamts18^{+/+}* 雌性和雄性的交配，结果符合孟德尔遗传规律。

2.2 实验仪器

仪器名称	品牌	型号/规格
50 L 立式高压灭菌器	上海申安	LDZX-50KBS
小型低温高速离心机	德国 Eppendorf (艾本德)	5415R
4℃/-20℃电冰箱	中国 Haier (海尔)	BCD-219D
-86℃立式超低温冰箱	美国 Thermo (赛默飞世尔)	Forma 905-ULTS
电热恒温水槽	上海精宏	DK-8D
涡旋混合器	美国 Scientific Industries	Votex-Genie 2 G560E
恒温磁力搅拌器	上海司乐仪器	81-2 型

梯度 PCR 仪	美国 Bio-Rad (伯乐)	T100
水平电泳槽	美国 Bio-Rad (伯乐)	Sub-Cell GT
制冰机	日本 PHCbi (普和希)	SIM-F140AY65-PC
微波炉	中国格兰仕 (Galanz)	P70D23N1P-G5 (W0)
多功能成像仪	德国 Analytik Jena (耶拿)	UVP Chemstudio touch
多样品组织匀浆机	上海净信	Tissuelyser-24
多功能微孔盘分析仪	美国 Molecular Devices (美谷分子仪器)	SpectraMax®iD3
酶标仪	美国 BioTek (伯腾)	Epoch
荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad (伯乐)	CFX96 Touch
一体式石蜡包埋机	德国 Leica (徕卡)	EG1160
轮转切片机	德国 Leica (徕卡)	RM2235
电热恒温干燥箱	上海一恒仪器	DHG-9075A
体视显微镜	香港 Motic (麦克奥迪)	Motic K
倒置荧光显微镜	德国 Leica (徕卡)	DMI3000
微量移液器	德国 Eppendorf (艾本德)	2.5 μ l、10 μ l、20 μ l、 100 μ l、1000 μ l
HybEZ™ 杂交系统	美国 ACD	310013
电子天平	美国 DENVER (丹佛)	T-2002
倒置显微镜	广州明美 (Mshot)	MI11
电子分析天平	德国 Sartorius (赛多利斯)	BS124S
超净台	苏净安泰 (Airtech)	SW-CJ-2FD
10 mL 移液器	德国 Matrix	73261

2.3 实验试剂

试剂名称	品牌厂家
RNAscope 2.5 HD Reagent Kit-Red	美国 ACD

RNAscope [®] 探针	美国 ACD
总 RNA 提取试剂盒（离心柱型）	天根生物科技有限公司
无水乙醇、95%乙醇	上海润捷化学
鉴定基因型用引物（P1, P2, P3）	生工生物工程有限公司
Proteinase K	德国默克 Merck
苏木素-伊红染色试剂盒(H&E staining)	索莱宝科技有限公司
DEPC 水	碧云天生物科技有限公司
氯化钠 (NaCl)	上海润捷化学
二甲苯	江苏强盛化学
十二水合磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	国药化学
氯化钾 (KCl)	上海润捷化学
琼脂糖	西班牙 BIOWEST
甲醛溶液	江苏强盛化学
逆转录预混液 (for qPCR)	翌圣生物科技有限公司
水杨酸甲酯	国药化学
鳞片状切片石蜡	德国 Leica (徕卡)
YeaRed 核酸染料	翌圣生物科技有限公司
100 bp Ladder DNA Marker	北京博奥龙免疫技术有限公司
50 × TAE (500 ml)	碧云天生物科技有限公司
实时定量 PCR 预混液	翌圣生物科技有限公司
中性树脂	碧云天生物科技有限公司
α-氯醛糖	国药化学
柠檬酸钠-EDTA 抗原修复液	碧云天生物科技有限公司
乌拉坦	国药化学
改良 Masson 三色染色液	索莱宝科技有限公司
硼砂	国药化学

磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	国药化学
无水甲醇	上海润捷化学
细胞培养基及缓冲液	澳洲 Gibco
青链霉素双抗	美国 Scancell

2.4 实验耗材

耗材名称	生产企业
无粉乳胶手套	海门市扬子医疗器械有限公司
封口膜	美国 Parafilm
眼科剪	星海精品手术器械
锥形瓶 (200 ml/100 ml)	上海晖创化学仪器有限公司
眼科直镊、弯镊	碧云天生物科技有限公司
培养皿 (10 cm/6 cm)	美国 BD-FALCON
离心管 (0.2 ml/0.6 ml/1.5 ml)	碧云天生物科技有限公司
移液管 (10 ml)	美国 BD-FALCON
枪头 (10 μl/100 μl/1000 μl)	越夷生物
组织包埋框	江苏世泰实验器材有限公司
DNase/RNase Free 离心管 (0.2 ml/0.6 ml/1.5 ml)	美国 Axygen
组织包埋模具	德国 Leica
DNase/RNase Free 枪头 (10 μl/100 μl/1000 μl)	美国 Axygen
载玻片	江苏世泰实验器材有限公司
离心管 (15 ml/50 ml)	美国 BD-FALCON
Superfrost Plus 防脱载玻片	美国 Thermo Fisher Scientific

PCR 八联管&8 联光学盖	越夷生物
盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司
医用棉球	宏隆医疗
Φ13 mm 聚碳酸酯膜	英国 Whatman (沃特曼)
纱布	宏隆医疗
无菌注射器 (1 ml/2 ml/5 ml)	上海康德莱企
称量纸	新华纸业
医用口罩	海门市唯尔诺实验器材有限公司
无尘纸	美国 Kimwipes (金佰利) 公司

2.5 常用试剂配方

1. 1 L 的 4%中性甲醛

- (1) 开启通风橱的排气扇。
- (2) 在通风橱中，用 100 ml 的量筒量取 100 ml 的甲醛溶液，倒入 1000 ml 的玻璃容量瓶中。
- (3) 在玻璃容量瓶中加入 1 × PBS 定容至 1000 ml。
- (4) 配制好的 4%甲醛溶液倒入 1 L 的试剂瓶中。
- (5) 如果试剂瓶是透明玻璃材质，则用锡箔纸包裹住试剂瓶透明部分，避光储存。
- (6) 新配制的 4%甲醛溶液在 1 周内使用，以保证固定效果。

2. 鼠尾裂解液 (400 ml)

1M Tris HCl	8 ml
500 mM EDTA	4 ml
NaCl	9.36 g
SDS	4 g
ddH ₂ O	定容至 400 ml

3. 生理盐水 (400 ml)

NaCl	3.6 g
ddH ₂ O	定容至 400 ml

4. 10 × PBS 缓冲液 (800 ml)

NaCl	64.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	29.04 g
KH ₂ PO ₄	1.92 g
KCl	1.6 g
ddH ₂ O	定容至 800 ml

称量以上固体加入 1 L 烧杯中，于 600 ml 的 ddH₂O 中溶解，可借助磁力器搅拌仪器加快溶解速度，待溶液澄清时再用 dd H₂O 定容至 800 ml。

5. 1 × PBS 缓冲液 (800 ml)

10 × PBS	80 ml
ddH ₂ O	定容至 800 ml

3 实验方法

3.1 小鼠的饲养条件

所有的小鼠均为 SPF 级动物，规范饲养于华东师范大学脑功能基因组学研究所专门的屏障系统中。系统内给予 12 小时的持续光照和 12 小时的持续黑暗，如此交替循环，同时，常年维持稳定的温度（22℃）和相对湿度（55%），提供足够的水和饲料保证小鼠自由饮食。定期更换和清洗小鼠笼子，每个笼中不超过 5 只小鼠，保证良好的生活环境。

3.2 小鼠的繁殖方法

根据小鼠夜间交配的习性，在动物房熄灯前 1~2 小时将 2 只成年 *Adamts18^{+/-}* 雌小鼠和 1 只成年 *Adamts18^{+/-}* 雄小鼠放入同一笼中，隔日上午 7~8 时检查雌性小鼠阴道，无论雌性小鼠是否见栓，都将其与雄鼠分笼，若需后续交配，在当日动物房熄灯前 1~2 小时再合笼。

有交配栓的雌小鼠则定为已怀孕 0.5 天（E0.5），并将其饲养于专门的笼中，不再与雄鼠接触；无交配栓的雌小鼠则可用于后续交配。定期监测怀孕雌鼠的体重，若怀孕十天后体重增加，则可让其自然分娩或在怀孕第 14.5 天取胚胎雄性小鼠的泌尿生殖窦进行体外培养。

称量怀孕雌鼠体重时应动作尽量轻柔，保证其不受惊吓和刺激，避免雌鼠分娩后食仔。雌鼠哺乳期大约需要 3 周，哺乳期结束时小鼠性别可以通过观察性腺分辨，此时应将小鼠按性别分笼。分笼时应注意，小鼠体型较小，因此采用增加垫料及在垫料中放置少量的饲料的方法，防止小鼠因吃不到食物而饿死。

3.3 基因型鉴定

3.3.1 抽提鼠尾和脚趾 DNA

1. 为了保证鉴定结果的准确性，在取材或给小鼠剪脚趾编号前，要准备好足够的酒精棉球用来擦拭剪刀，防止小鼠组织或血液残留于剪刀上污染其他组织。

2. 对于需要鉴定基因型的胚胎小鼠，应在实验的同时留下其尾部；对于出生后需要鉴定基因型的小鼠，可在给小鼠剪脚趾编号的过程中，用灭菌的 1.5 ml 离心管同时收集剪下的脚趾和一小段尾巴（约 0.5 cm）。

3. 收集好的脚趾和尾部组织应冻存在 -20°C 冰箱中，防止组织降解。

4. 每个含有小鼠组织的 EP 管需要 500 ml 的鼠尾消化液，因此按蛋白酶 K 和鼠尾裂解液 1:25 的量配制鼠尾消化液。例如，有 10 只小鼠需要鉴定，则在 15 ml 的离心管中加入 200 μl 的蛋白酶 K 和 5 ml 的鼠尾裂解液，盖紧离心管盖子后上下颠倒混匀。

5. 在每管组织中加入 500 ml 的鼠尾消化液后，盖上盖子将离心管按编号依次插入泡沫板中，放置于 56°C 的水浴锅中过夜消化。为了防止组织粘在离心管壁上而消化不完全，放置组织的离心管应在 4°C 预冷的高速离心机中 12000 rpm 离心 1 min； 56°C 水浴会使离心管盖的字模糊或脱落，因此可以用手机拍摄离心管顺序保留数据；基因型鉴定需要过夜消化组织，所以应根据实验安排提前进行，建议至少提前两天。

6. 观察离心管中组织的消化情况，摇晃离心管，若管中只残余少量骨头，可以进行下一步实验；若残余组织较多，则振荡后或再加入适量消化液继续消化数小时。水浴过夜后离心管盖子容易被胀开，振荡摇晃前应盖紧盖子，防止消化液漏出。

7. 用纸擦干离心管外侧的水分，振荡混匀，放入离心机中，12000 rpm，常温离心 10 min。此时准备一套新的 1.5 ml 离心管，按顺序编号。

8. 离心后用移液枪缓慢吸取 200 μl 的上清，转移到已准备好的干净的离心管中，各加入预冷（ -20°C ）的无水乙醇 1 ml，盖紧离心管盖，温和地上下颠倒 3~5 次，此时离心管中会出现絮状 DNA 沉淀。若样品数量太多，可以一次性加好无水乙醇，盖紧离心管盖后再覆盖一个大小相当的离心管架，呈夹心状，手指

上下同时压住两块离心管架，即可批量颠倒。12000 rpm，4°C离心 5 min。离心时离心管方向统一则离心后沉淀位置也相对统一，更方便 DNA 溶解操作。

9. 离心后，可以看到远离离心机圆心方向的离心管壁上出现少量白色沉淀，当 DNA 含量较少时白色沉淀不易观察到，仍可继续下一步实验。倒掉离心管中的上清，加入预冷（-20°C）的 70%的乙醇，12000 rpm，4°C离心 2 min。

10. 重复操作 1 遍步骤 9。

11. 离心后，用再离心管壁上用记号笔圈出白色沉淀的位置，倒掉上清，倒置离心管，用吸水纸蘸干多余的液体。盖上离心管盖，将离心管放入离心机中，短时离心 8 s。

12. 用移液枪吸除离心管中的液体，操作样品应更换新的枪头，避免交叉污染。

13. 在离心管中加入 50~100 μ l 的 DEPC 水，用移液枪吸取加入的水，枪头贴着 DNA 标记处的离心管壁吹打出，并同时向下将液体带入管底，重复该操作 10 次左右，使管壁上的 DNA 完全溶解。

14. DNA 溶液鉴定前短期储存于 4°C冰箱，长期储存于-20°C。

3.3.2 PCR

1. 设计引物，由上海生工合成以下引物序列：

Adamts18 引物 1: 5'-GGTGTTGGTTGGTATAGCTGAGCTGGAAA-3'

Adamts18 引物 2: 5'-TCTGCTGGAAGAAGAACCTGTAAGTGGAA-3'

Adamts18 引物 3: 5'-TTTCCTCCTTCCTTTGCTGCCTTGTCTG-3'

2. 配制引物工作液和贮存液

将 *Adamts18* 的三种引物冻干粉原管放入离心机中，12000 rpm，常温离心 1 min。引物原管标签标注了引物的 T_m 值、OD 值及配制方法等，根据标注，在原管中加入相应量的 DEPC 水得到 100 nM 的引物贮存液，保存于-20°C冰箱，配制 PCR 体系时，取适量的贮存液用 DEPC 水稀释 10 倍，得到 10 nM 的工作液。贮存液和工作液均应标明浓度和日期，冻融过的贮存液和工作液不可混合使用。

3. 配制基因型鉴定的反应体系 (15 μl)

在冰上融解混匀引物工作液、模板 DNA 和 Master Mix (2 \times), 离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 瞬时离心 6~8 s, 配制 3 引物预混液, 体系如下:

Master Mix (2 \times)	7.5 μl
P1	0.6 μl
P2	0.6 μl
P3	0.6 μl
加 DEPC 水至	13 μl

配制 2 引物预混液, 体系如下:

Master Mix (2 \times)	7.5 μl
P1	0.6 μl
P2	0.6 μl
加 DEPC 水至	13 μl

根据样品数量配制好预混液, 混匀离心后, 于冰上分装至每个 PCR 离心管中, 再依次加入 2 μl 的模板 DNA 吹打混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 短时离心 6~8 s。根据 Master Mix (2 \times) 说明书设定 PCR 仪程序, 即可进行 PCR 反应。PCR 仪中的 PCR 管尽量紧凑摆放, 使样品受热均匀。

3.3.3 琼脂糖凝胶核酸电泳

1. 安装凝胶制胶器

凝胶制胶器由模具和底座两部分组成, 模具是一个半开放的矩形亚克力板, 未开放的两侧有加高的拦板, 拦板上有与对侧拦板平行的齿状缺刻, 用于放置梳子。安装时, 将亚克力槽底部贴合放置于底座上, 无拦板的一侧紧靠底座上附带的固定型拦板, 将另一侧用底座上的活动型拦板堵住并将其螺丝拴紧, 这样就形成了一个四面封闭的凹槽。

2. 配制 1.8%的琼脂糖凝胶

- (1) 称取 1.8 g 的琼脂糖，加入 100 ml 的 $1 \times$ TAE 中，在 250 ml 的锥形瓶中摇晃混匀，防止琼脂糖在后续的加热过程中贴底烧焦。
- (2) 将锥形瓶放入微波炉中，高火加热，在加热过程中时常拿出来摇晃混匀，使琼脂糖散开，更快速地溶解。沸腾琼脂糖 2~3 次，直到锥形瓶中无肉眼可见的透明颗粒。
- (3) 放置于室温稍加降温之后，加入 $1 \times$ 的 YeaRed 核酸染料摇晃混匀后，倒入安装好的制胶器中并插好梳子，在室温冷却 1 h，或在 4°C 时冷却 30 min。
- (4) 从制胶器中取出凝固好的琼脂糖胶，放入电泳槽中，垂直拔出梳子，使槽内 TAE 没过凝胶，排出上样孔的空气。
- (5) 等待 PCR 仪程序完成后，取出样品，放置于 4°C 冰箱中稍加冷却，减少 PCR 气溶胶污染空气和移液枪。
- (6) 将冷却的样品加入凝胶上样孔中，3 引物样品和 2 引物样品加样时上下对应，加入 $8 \mu\text{l}$ 的 DNA Ladder 连接电泳仪和电泳槽
- (7) 开启电泳仪电源，电泳程序设置为电压恒定 150 V，时间 50 min。

3.3.4 基因型判断

本实验 *Adamts18*^{+/-} 雌雄小鼠交配时会产下 3 种基因型的小鼠，分别是 *Adamts18*^{+/-} (HT)、*Adamts18*^{+/+} (WT) 和 *Adamts18*^{-/-} (KO)，通过引物 P1、P2 和 P3 三种引物的扩增片段来鉴别。根据 *Adamts18*^{+/+} 小鼠基因打靶示意图(图 1) 可以看到，*Adamts18*^{-/-} 的 E5 和 E6 外显子之间的片段被敲除，设置在该片段内的下游引物 P2 结合位点也随之消失。因此，上游引物 P1 与下游引物 P2、P3 可以扩增出 3 种大小不同的基因片段。(a) *Adamts18*^{+/+} 小鼠基因中存在 P1、P2 和 P3 结合位点，因此 3 引物可以扩增出 P1-P2 位点之间的 404 bp 的片段和 P1-P3 位点之间 1192 bp 的片段，其中，受到扩增时间的限制，1192 bp 的片段无法得到；2 引物可以扩增出 P1-P2 位点之间的 404 bp 片段。(b) *Adamts18*^{-/-} 小鼠基因

中只存在 P1 和 P3 引物结合位点,而基因敲除又使得 P1-P3 之间的可扩增的核酸变少,因此 3 引物只能扩增出 P1-P3 位点之间的 272 bp 片段; 2 引物不能扩增到任何片段。(c) *Adamts18*^{+/-}小鼠同源染色体中的一条与 *Adamts18*^{+/+}相同,另一条与 *Adamts18*^{-/-}相同,因此 3 引物既可以扩增出 P1-P2 位点之间的 404 bp 片段,也可以扩增出 P1-P3 位点之间的 272 bp; 2 引物可以扩增出 P1-P2 位点之间的 404 bp 片段。根据这些特点,使用 3 引物可以鉴别出基因型,为了得到更准确的结果,对 DNA 单独扩增 2 引物片段辅助判断。

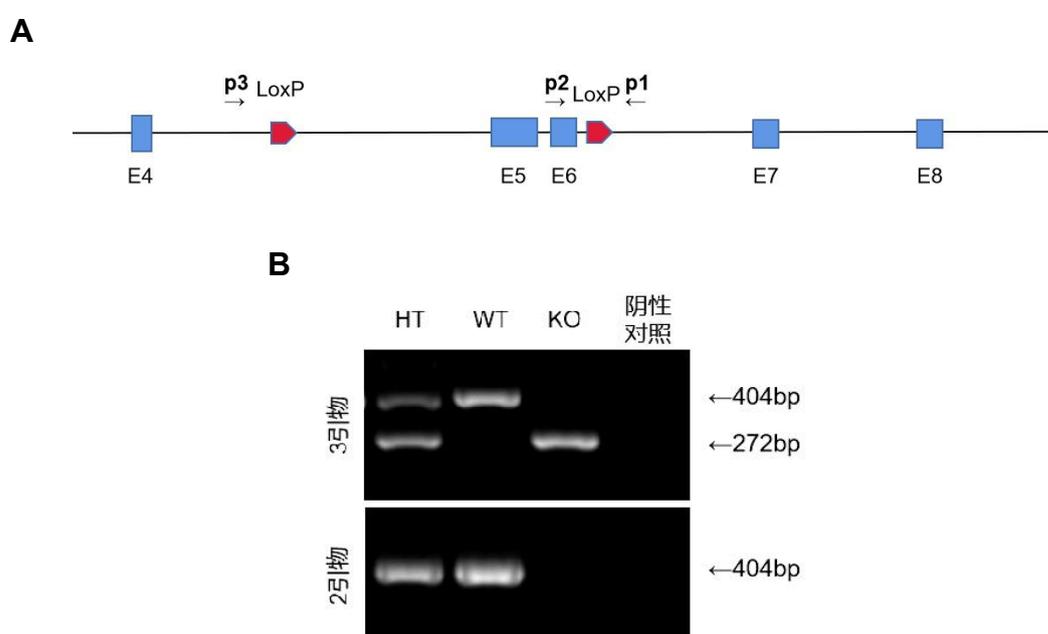


图 5. 引物扩增片段示意图和基因型鉴定电泳示意图。(A) 引物扩增片段示意图。(B) 基因型鉴定电泳示意图。

Figure 5. Schematic diagram of primer amplified fragments and genotyping. (A) Schematic diagram of primer amplified fragments. (B) Schematic diagram of genotyping.

3.4 原位杂交

(1) 将一张 5 μm 厚的石蜡切片在 46°C 水浴锅中展平, 贴附于 SUPERFROST

- Plus 的载玻片可标记面的中部，放置于通风处 12 h。
- (2) 片子放置于烘箱中烘烤，60°C，1 h；室温冷却，5 min。
 - (3) 片子脱蜡：二甲苯中浸泡 5 min，换至新鲜二甲苯中二次浸泡，5 min；无水乙醇中浸泡 1 min，换至新鲜无水乙醇中二次浸泡，1 min；整个脱蜡过程需要频繁地上下抽提片子，使脱蜡彻底。
 - (4) 片子置于室温通风处晾干 5 min；开启杂交炉，40°C 加湿平衡。
 - (5) 将一瓶 (70 ml) 的 10 × 靶标修复液加蒸馏水稀释成 1 × 工作液，取 250 ml 加入染缸，盖上盖子，放置于水浴锅中加热至 100 摄氏度，维持沸腾状态，注意用温度计监测水浴锅温度，修复液的温度将影响实验结果。
 - (6) 片子上的加 20 μ l 的双氧水覆盖组织，室温孵育 10 min。
 - (7) 将载玻片上的双氧水轻轻甩干，放置于载玻片架上，浸没于蒸馏水中并上下抽动玻片架 5~10 次，更换蒸馏水二次清洗。
 - (8) 将载玻片放置于已经处于沸腾状态的靶标修复液中，保持 100°C 修复 15 min，注意靶标修复液总沸腾时间不超过 30 min；修复后将玻片浸没于蒸馏水中，上下抽动 5 次使玻片冷却，再转移至无水乙醇中，上下抽动 5 次，取出玻片置于室温中干燥。
 - (9) 用阻水笔在组织切片周围画疏水圈，即使组织较小，疏水圈也应该有一定大小，室温干燥约 1 min。
 - (10) 将组织切片按顺序放置于水平切片架的切片槽内，按紧卡扣。
 - (11) 在阻水圈内滴加蛋白酶 Plus 完全覆盖组织切片，整个切片架放进湿盒中孵育，40°C，30 min；孵育后轻轻甩动载玻片架，除去表面液体，浸没在盛有蒸馏水的清洗槽中，晃动清洗槽 5 次，更换新鲜蒸馏水二次清洗。
 - (12) 将 1 瓶 50 × 的清洗缓冲液 (60 ml) 用蒸馏水稀释至 1 ×，也可准备好后续实验使用的 50% 苏木素染色液、新鲜二甲苯等。
 - (13) 从 4°C 冰箱中取出 RNA scope 2.5 HD Amp1-6 试剂盒，放置于室温平衡，靶标和对照探针则放置于 40°C 烘箱中平衡，用之前需涡旋混匀。此步骤之后切勿使切片变干。

- (14)根据实验，在阻水圈内滴加相应的靶标或对照探针完全覆盖组织切片，在 40℃杂交炉中孵育 2 h。孵育完成后，孵育后轻轻甩动载玻片架，除去表面液体，浸没在盛有 1×清洗缓冲液（500 ml）的清洗槽中，在摇床上清洗 2 min，更换新鲜 1×清洗缓冲液二次清洗。
- (15)按顺序孵育及清洗 Amp1-Amp6，操作方法见步骤（11），孵育条件如下：

试剂	温度（℃）	时间（min）
Amp1	40	30
Amp2	40	15
Amp3	40	30
Amp4	40	15
Amp5	室温	30
Amp6	室温	15

短时离心 RED-B，在信号检测前 5 min 与 RED-A 以 1:60 的比例避光配成信号检测液。

- (16)轻轻甩动载玻片架，除去表面液体，在阻水圈内滴加信号检测液，完全覆盖组织切片，在湿盒中室温孵育 10 min。孵育后轻轻甩动载玻片架，除去表面液体，浸没在盛有自来水（500 ml）的清洗槽中，在摇床上清洗 2 min，更换新鲜自来水二次清洗。
- (17)轻轻甩动载玻片架，除去表面液体，在组织切片中滴加 50%苏木素染色液，室温孵育 2 min 后，在自来水中返蓝，在显微镜下观察，直至组织变成蓝色。
- (18)由于信号检测液的底物对酒精敏感，所以使用无酒精干燥法，将载玻片放置于 60℃烘箱内，使组织切片干燥后放置于室温中稍加冷却。
- (19)将切片用二甲苯润湿后，滴加中性树脂封片剂，盖上盖玻片封片。依次对每个组织切片进行此操作后，放置于通风橱中过夜风干。

- (20)在显微镜中明场观察组织切片，阳性信号点为红色，每 10 个细胞有 1 个着色点即视为阳性点。

3.5 qRT-PCR

1. 提取 RNA

- (1) 本实验使用天根动物组织总 RNA 提取试剂盒。取 20 mg 组织加入研磨管，短暂离心 8 s，使组织进入离心管底，放进预冷的磁珠，加入 300 μ l 的裂解液，在电动匀浆器中 60 Hz，匀浆 1~2 min；随后向匀浆溶液中加入 590 μ l RNase-Free 水和 10 μ l 蛋白酶 K，混匀后放置于 56 $^{\circ}$ C 的烘箱中孵育 15 min。
- (2) 12000 rpm，离心 2 min，取上清至一个新的离心管中，加入 1/2 上清体积的无水乙醇，上下颠倒混匀。
- (3) 将吸附柱套在收集管中，在吸附柱中心点温和加入上一步骤的溶液和沉淀，12000 rpm 离心 1 min，弃废液。
- (4) 将吸附柱套回收集管中，在吸附柱中心点温和加入 350 μ l 的 RW1，12000 rpm 离心 1 min，弃废液。
- (5) 将 10 μ l 的 DNaseI 储存液用 70 μ l 的 RDD 稀释混匀。
- (6) 向吸附柱中心点加入 DNaseI 工作液 80 μ l，室温放置 15 min 后，再加入 350 μ l 的 RW1，12000 rpm 离心 1 min，弃废液。
- (7) 将吸附柱套在收集管中，在吸附柱中心点温和加入 500 μ l 的 RW（用前按说明加入乙醇），室温放置 2 min，12000 rpm 离心 1 min，弃废液。
- (8) 重复步骤（7）
- (9) 将吸附柱套在收集管中，不加溶液，12000 rpm 空管离心 2 min，弃废液。室温放置 5 min 晾干残余溶液。
- (10) 将收集管替换一个新的 RNase-Free 离心管，在吸附柱的中心滴加 30 μ l 的 DEPC 水，室温浸泡 2 min，12000 rpm 离心 2 min。
- (11) 将离心管中收集的 RNA 溶液重新加入吸附柱中，室温浸泡 2 min，12000

rpm 离心 2 min, 得到 RNA 溶液。

2. 合成 cDNA 第一链

本实验使用含有 gDNA 去除步骤的 cDNA 第一链合成试剂盒。

(1) 在 RNase free 离心管配制去除基因组 DNA 溶液

DEPC 水	至 10 μ l
5 \times gDNA digester Buffer	2 μ l
gDNA digester	1 μ l
总 RNA	1 ng

吹打混匀, 短时离心 6 s 后, 置于 PCR 仪中 42 $^{\circ}$ C 孵育 2 min。

(1) 配制逆转录反应溶液 (20 μ l 体系)

去除基因组 DNA 溶液	10 μ l
2 \times Hifair [®] II SuperMix plus	10 μ l

吹打混匀, 短时离心 6 s 后, 置于 PCR 仪中设置如下程序:

25 $^{\circ}$ C	5 min
42 $^{\circ}$ C	30 min
85 $^{\circ}$ C	5 min

反应产物放置于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融。

3. 配制 qRT-PCR 反应溶液

Hieff [®] qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox)	10 μ l
上下游引物 (10 μ M)	各 0.4 μ l
cDNA	1 μ l
DEPC 水	至 20 μ l

配制时,上下游引物(引物见附录表 1)和 Master Mix、cDNA 和模板 DEPC 水可以先根据样品数量各自混合混匀离心之后再分装至相应的八联管中,可以保证体系的均一性。

4. qRT-PCR 反应

样品加入八连管后, 盖上盖子, 用离心机短时离心后, 置于 CFX96 仪器中设置如下反应程序:

步骤	温度	时间	循环次数
预变性	95°C	5 min	1
变性	95°C	1 sec	40
退火/延伸	60°C	30 sec	
熔解曲线阶段		仪器默认设置	

3.6 石蜡组织制备

1. 解剖小鼠: 取出后的组织立即放置于 4°C 预冷的 PBS 中, 摘除多余的脂肪等不需要的组织, 洗去解剖时粘上的毛发, 立即浸入 10 倍组织体积的 4% 甲醛中, 固定时间为 24 h。

2. 将组织从 4% 甲醛中取出, 放置在标记好的组织包埋框中, 再在脱水前浸泡于新鲜的蒸馏水中 10 min, 洗净固定液。接下来的步骤中, 组织一直放置于包埋框中不要取出。

3. 组织脱水

(1) 将包埋框浸没于 50% 的酒精中, 30 min; 每 15 min 更一次换新鲜的 50% 酒精。

(2) 转移包埋框于 70% 的酒精中, 浸泡 45 min; 每 15 min 更一次换新鲜的 70% 酒精。

(3) 转移包埋框于 80% 的酒精中, 浸泡 20 min; 每 10 min 更一次换新鲜的 80% 酒精。

(4) 转移包埋框于 90%的酒精中, 浸泡 10 min; 每 5 min 更一次换新鲜的 90% 酒精。

(5) 转移包埋框于 95%的酒精中, 浸泡 10 min; 每 5 min 更一次换新鲜的 95% 酒精。

(6) 转移包埋框于 100%的酒精中, 浸泡 10 min; 每 5 min 更一次换新鲜的 100%酒精。

4. 组织透明: 组织在水杨酸甲酯中透明过夜, 此时可将石蜡缸放入 60°C烘箱中融化; 透蜡前组织转移至二甲苯中再透明 5 min, 打开包埋框检查组织, 若透明完全则盖上盖子, 进行下一步透蜡。

5. 将包埋框放入已经熔化的石蜡缸中, 60°C透蜡 1 h。此时提前打开包埋机运行至设定温度, 即蜡缸 65°C、蜡嘴 65°C, 标本储存器 60°C、工作台面 60°C以及冷却台-5°C。

6. 将包埋框转移到纯度较高的石蜡缸中, 60°C二次透蜡 1 h。

7. 组织包埋: 透蜡后将组织包埋框转移至包埋机的标本盒储存器, 打开包埋框, 弃去上方盖子。用模具从蜡嘴下方接纯净的石蜡, 根据实验需要将组织按照一定的方向摆放于石蜡中, 模具盖上包埋框, 转移至冷却台中冷却约 15 min, 将模具与成型的石蜡剥离, 得到石蜡包埋的组织。

3.7 石蜡组织切片

1. 准备 42°C的水浴锅, 用于展平组织切片。

2. 调整切片机的刀片倾角 (5°), 旋转切片机指针到 5 μm 。

3. 切片时右摇转切片机手轮, 左手先按住刻度双倍按钮切片, 密切观察切出的蜡带是否笔直, 随时调整蜡块的角度, 在接近目的组织结构时, 放开刻度双倍按钮, 恢复原来设置的刻度正式切片。

4. 切片在 60°C的烘箱中烤干。

3.8 苏木素-伊红染色 (H&E)

1. 石蜡切片脱水（同原位杂交）。
2. 苏木素染色，自来水返蓝（同原位杂交）。
3. 伊红染色 15 s，自来水冲洗除去未结合染料。
4. 烘干片子，封片（同原位杂交）。

3.9 Masson 三色染色

1. 组织石蜡切片浸泡于媒染液中，60°C作用 1 h，自来水冲洗 10 min。
2. 天青石蓝滴染于组织上孵育 3 min，蒸馏水清洗 15 s，更换新鲜的蒸馏水二次清洗。
3. Mayer 苏木素滴染于组织上孵育 3 min，蒸馏水清洗 15 s，更换新鲜的蒸馏水二次清洗。
4. 用酸性乙醇滴于组织上分化染色液，待组织变红，则水洗 10 min 终止分化。
5. 丽春红品红滴染于组织上孵育 3 min，蒸馏水清洗 15 s，更换新鲜的蒸馏水二次清洗。
6. 磷钼酸溶液滴于组织上孵育 10 min，轻敲片子除去多余溶液。
7. 滴加苯胺蓝于组织上孵育 5 min，用弱酸溶液先洗去多余溶液后，再滴加弱酸溶液孵育 2 min。
8. 干燥后封片（参照原位杂交步骤）。

3.10 制作精子涂片

1. 用剪刀在小鼠腹部靠近阴茎的位置剪开一个小口，左右手各持一把镊子，夹住小鼠体内靠近开口双侧明显的脂肪组织往外拉，可以将小鼠脂肪连带的睾丸、输精管、附睾一并拉出，小鼠的附睾连接睾丸与输精管，附着于睾丸上。
2. 剪下附睾，将附睾周围多余的组织去除。

3. 在 6 cm 皿中加入 5 ml 的生理盐水, 将附睾放入其中, 用精细的显微剪刀剪附睾 3~5 次, 再用镊子将附睾中的精子挤出。
4. 轻轻晃动 6 cm 皿, 使精子从附睾中流出并在生理盐水中散开。
5. 将 6 cm 皿中包含精子的生理盐水用移液枪转移至已经铺好无尘纸(两层)的玻璃漏斗中, 过滤后的液体储存于 5 ml 的离心管。
6. 离心管中的液体用移液枪重悬后, 取约 200 μ l 滴加于载玻片的一侧, 放平枪头, 将液体在载玻片上抹匀, 放置于 55°C 的烘箱中烤干。
7. 在精子附着的部分, 滴加无水甲醇固定 5 min 以上, 于通风橱中自然晾干。
8. 使用高浓度的伊红染液将精子染色 30~40 min, 随后用自来水冲洗 10 min。
9. 可选: 从步骤 8 开始, 使用 H&E 染色方法。

3.11 胚胎泌尿生殖窦体外培养

1. *Adamts18^{+/-}* 雌性小鼠与 *Adamts18^{+/-}* 雄性小鼠交配见栓后第 14.5 天, 将孕鼠脱颈处死后, 浸泡于医用酒精中。在细胞房的无菌条件下, 纸巾擦拭雌性小鼠身上残留的酒精, 取出雌性怀孕小鼠的子宫。
2. 将分离后的子宫放置于预冷的 DPBS 中清洗, 分离子宫壁, 得到胚胎。
3. 将分离后的子宫放置于新的预冷的 DPBS 中, 解剖胚胎查看胚胎小鼠的生殖器官, 仅留下雄性小鼠。
4. 用精细的显微镜剪刀剪下雄性胚胎小鼠位于尾部附近的泌尿生殖窦, 将泌尿生殖窦转移至新的预冷的 DPBS 中。
5. 准备 6 孔板, 每孔加入 2 ml 含 100 U/ml 青链霉素双抗以及 0.1 mg/ml 的抗坏血酸的细胞培养基 DMEM, 将微孔膜轻轻放置于液面上, 使其漂浮, 微孔膜两面的粗糙度不同, 光滑的一面朝下。
6. 用镊子尖端夹起泌尿生殖窦, 放置于微孔膜上, 泌尿生殖窦的背表面向上。
7. 在二氧化碳 (5%) 丰富的环境中培养泌尿生殖窦, 温度设置为 37°C, 定时观察拍照。

3.12 前列腺分支计数

1. 将雄性小鼠解剖后，连带膀胱取出附近的组织，放置于预冷的 DPBS 中。
2. 打开显微镜解剖台下的光源，将磨砂的透光玻璃板放置于解剖台上，可以看见前列腺各侧叶的分支，沿着分支近端单独分离出前列腺。
3. 将前列腺放置于 1 mg/ml 的胰酶 DPBS 溶液中，37°C 孵育 30 min。
4. 吸除孵育液终止消化，在体视显微镜下观察统计前列腺各叶的分支数量。

3.13 统计学方法

本研究中所有实验结果中的数据以平均值±标准误或平均值±标准差的方式进行递呈。处理数据所用的统计学方法主要为双尾非配对的 student t 检验（two-tailed unpaired student's *t*-test）。当 $p < 0.05$ 时，认为结果是具有统计学差异的。

4 实验结果

4.1 *Adamts18* mRNA 在雄性生殖系统中的表达

Adamts18 mRNA 在小鼠雄性生殖系统中的表达时相和细胞来源仍不清楚，其表达量是否会随着生殖系统的发育而发生动态改变也未知。为了探究 ADAMTS18 与雄性生殖系统发育的关系，我们通过 *qRT-PCR* 和 ISH 的方法，以 C57BL/6/129Sv 背景野生型小鼠为研究对象，对不同发育时期小鼠雄性生殖系统内 *Adamts18* mRNA 的分布及表达模式进行了探究。

4.1.1 *Adamts18* mRNA 在小鼠雄性生殖系统中的表达

本实验使用 *qRT-PCR* 检测不同发育时期雄性生殖系统中细胞的 *Adamts18* mRNA 表达水平。我们收集了 1~5 周龄 *Adamts18*^{+/+} 小鼠不同时期雄性生殖系统中的组织，包括包皮腺、前列腺、睾丸、附睾、输精管、储精囊和阴茎。其中，也检测了 7 月（28 周）龄和 12 月（48 周）龄的雄性小鼠包皮腺。

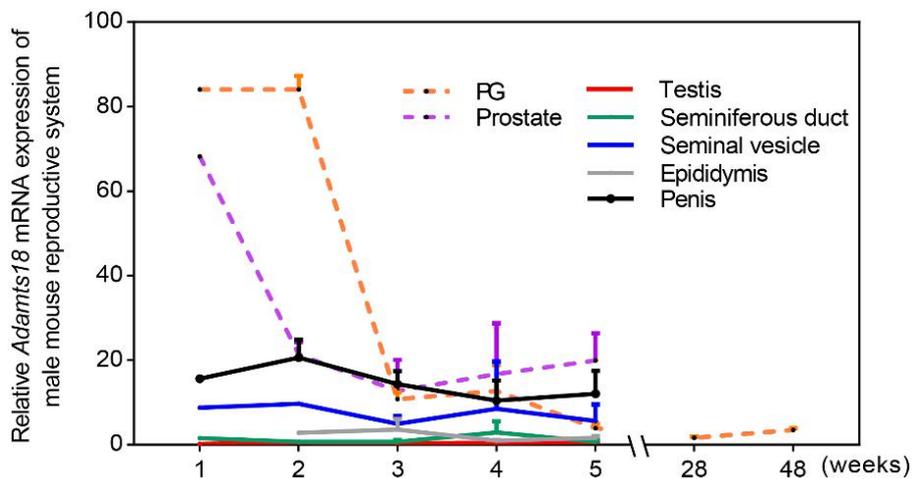


图 6. 雄性生殖系统中 *Adamts18* mRNA 的表达。1~5 周龄雄性小鼠生殖系统各器官 *Adamts18* mRNA 的 *qRT-PCR* 分析 (n=3/时间点)；7 月（28 周）和 12 月（48 周）龄小鼠包皮腺中 *Adamts18* mRNA 的表达水平。橙色、紫色、红色、绿

色、蓝色、灰色和黑色曲线分别是包皮腺、前列腺、睾丸、生精管、精囊、附睾和阴茎 *Adamts18* mRNA 表达水平。*Adamts18* mRNA 的相对表达量采用 $\Delta\Delta C_t$ 法，以管家基因 *Gapdh* 为参照归一化。

Figure 6. Temporal expression of *Adamts18* mRNA in male reproductive system. *qRT-PCR* analysis of *Adamts18* mRNA in various organs of the reproductive system of 1 to 5 weeks old male mice ($n = 3/\text{time point}$). The presence of *Adamts18* mRNA in the preputial gland (PG) of 7 and 12 months old mice was also determined. Curves representing *Adamts18* mRNA levels in PG, prostate, testis, seminiferous duct, seminal vesicle, epididymis and penis are in orange, purple, red, green, blue, gray, and black, respectively. The relative quantity of *Adamts18* mRNA was normalized to that of the housekeeping gene *Gapdh* using the $\Delta\Delta C_t$ method.

因早期组织量比较少，故每个时间点取三只小鼠的相同的组织等量混为一个样本。结果显示，*Adamts18* mRNA 在 1~2 周龄包皮腺和前列腺的组织中表达水平较高，而在 3~5 周龄的包皮腺和前列腺表达显著降低，此外，7、12 月龄的包皮腺中几乎不表达 *Adamts18*。1~5 周龄雄性小鼠生殖系统中的阴茎、输精管、储精囊和睾丸中的 *Adamts18* mRNA 表达非常低；2~5 周龄雄性小鼠附睾中的 *Adamts18* mRNA 表达也非常低。

4.1.2 *Adamts18* mRNA 在小鼠包皮腺的空间表达

为了研究 *Adamts18* mRNA 表达的细胞来源、细胞类型及分布特点，我们根据 *qRT-PCR* 的结果选取了 *Adamts18* mRNA 表达较高的 1 周龄野生型小鼠包皮腺组织，对包皮腺的冠状切面和截断切面用 *Adamts18* mRNA 序列特异的寡核苷酸探针来检测 *Adamts18* mRNA 的表达。

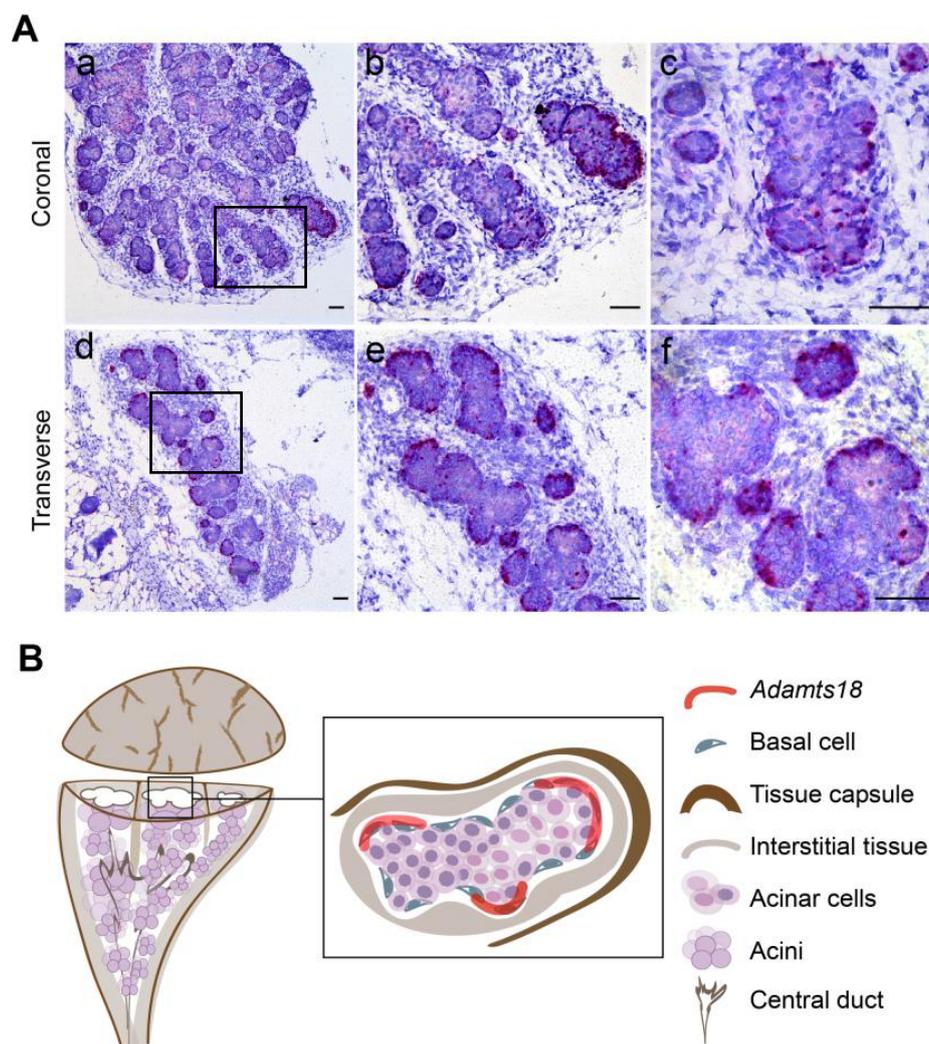


图 7. *Adamts18* mRNA 在包皮腺中的表达。(A) 1 周龄野生型雄性小鼠包皮腺的 *Adamts18* mRNA 原位杂交 (ISH) 结果。a-c: 包皮腺冠状切面, b-c 为 a 图黑框部分不同倍数的放大 (200 \times , 400 \times); d-f: 包皮腺截断切面, e-f 为 d 图黑框部分的高倍镜视野 (200 \times , 400 \times)。ISH 阳性信号在细胞中表现为粉红色点。比例尺: 50 μm 。(B) 包皮腺的结构和 ISH 结果模式图。矩形方框区域放大描绘了 *Adamts18* mRNA 在包皮腺腺泡基底细胞中的定位。

Figure 7. The presence of *Adamts18* mRNA in PGs. (A) In situ hybridization (ISH) of *Adamts18* mRNA in cells of preputial gland of 1 week old wild-type male mice. a-c: consecutive coronal sections of PGs. b-c: higher magnification of a (200 \times , 400 \times). d-f: consecutive transverse sections of PGs. e-f: higher magnification of d (200 \times , 400 \times). ISH-positive signals are shown as pink dots in cells. Scale bar, 50 μm . (B) Cartoon

picture illustrating the structure of the preputial gland and ISH results. The boxed area is enlarged to show the presence of *Adamts18* mRNA in the basal cells of acini.

结果显示：1 周龄小鼠包皮腺检测到 *Adamts18* mRNA 的阳性信号，与 qRT-PCR 的结果相符。冠状切面的 ISH 阳性信号点分布在包皮腺腺泡最外层的细胞上，该层细胞与间质组织相邻，靠近结缔组织被膜，鉴定为腺泡基底细胞。横断切面进一步确定了靠近包皮腺小叶间隙方位的基底细胞也表达 *Adamts18* mRNA。模式图构建了包皮腺的结构，包括包皮腺的结缔组织被膜、间质组织、导管。模式图中的矢状切面放大图显示了包皮腺的基底细胞和不同成熟程度的腺泡细胞，红色部分表示原位杂交结果中 *Adamts18* mRNA 的定位，表明 *Adamts18* mRNA 在包皮腺中的表达细胞来源是基底细胞。

4.2 *Adamts18*^{-/-}雄性小鼠包皮腺发育异常

Adamts18 mRNA 在小鼠包皮腺发育早期表达，提示 ADAMTS18 可能与包皮腺的发育相关。因此，我们通过体外培养泌尿生殖窦组织，观察 ADAMTS18 缺失对小鼠泌尿生殖窦影响；并在组织学水平上观察小鼠包皮腺，研究 ADAMTS18 缺失小鼠的包皮腺与正常小鼠是否有差异。

4.2.1 ADAMTS18 缺失对胚胎的泌尿生殖窦形态发育影响较小

取 *Adamts18*^{+/+}和 *Adamts18*^{-/-}雄性小鼠 E14.5 的胚胎的泌尿生殖窦进行体外培养，以观察包皮腺在胚胎时期形态是否有区别，共培养了 96 小时，每 48 小时观察一次。

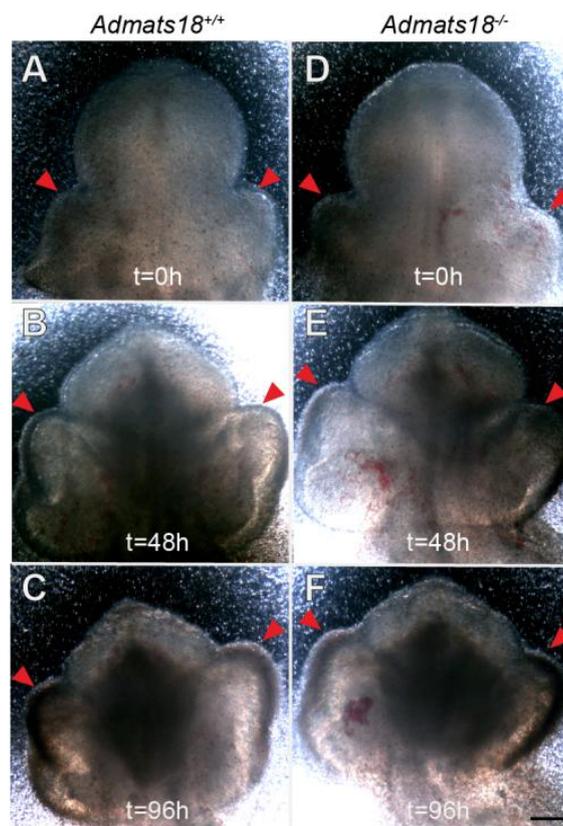


图 8. 体外培养泌尿生殖窦。从 E14.5 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 雄性胚胎中解剖的泌尿生殖窦，体外培养 96 小时。（A-C）*Adamts18^{+/+}* 雄性胚胎的泌尿生殖窦。（D-F）*Adamts18^{-/-}* 雄性胚胎的泌尿生殖窦。红色箭头标记包皮腺的位置。比例尺：50 μm 。

Figure 8. E14.5 genital tubercle in vitro culture. Genital tubercle was dissected from E14.5 *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* male embryos and cultured in vitro for 96 hours. (A-C) Genital tubercle of *Adamts18^{+/+}* male embryos. (D-F) Genital tubercle of *Adamts18^{-/-}* male embryos. Locations of preputial glands are marked with red arrowheads. Scale bar, 50 μm .

结果显示 E14.5 体外培养的 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 雄性胚胎泌尿生殖窦外植体在 0 h、48 h 和 96 h 时，其膨出部分（包皮膨大）的形态和大小均相似，没有明显的区别，红色箭头所指向的包皮腺发育位点也未观察到形态和大小的变化，提示 ADAMTS18 缺失对胚胎时期泌尿生殖窦上的包皮膨大无明显影响。

4.2.2 ADAMTS18 缺失导致包皮腺早期形态发育不良

根据 *qRT-PCR* 结果的提示，小鼠包皮腺在 1~2 周龄时可能受 ADAMTS18 缺失的影响。相比 1 周龄小鼠包皮腺，2 周龄时包皮腺更大，更容易观察，并且细胞类型更为丰富，因此，为了探究这一时期小鼠包皮腺的组织结构，我们将 2 周龄的小鼠包皮腺组织切片做了 H&E 染色。染色中，不容易被伊红染色的腺泡包含较为成熟的腺泡细胞，细胞质较少，细胞中充满了脂质；伊红着色较深、较小、较圆的细胞，为未成熟的 II 型腺泡。根据细胞的染色情况可以判断腺泡的成熟度。

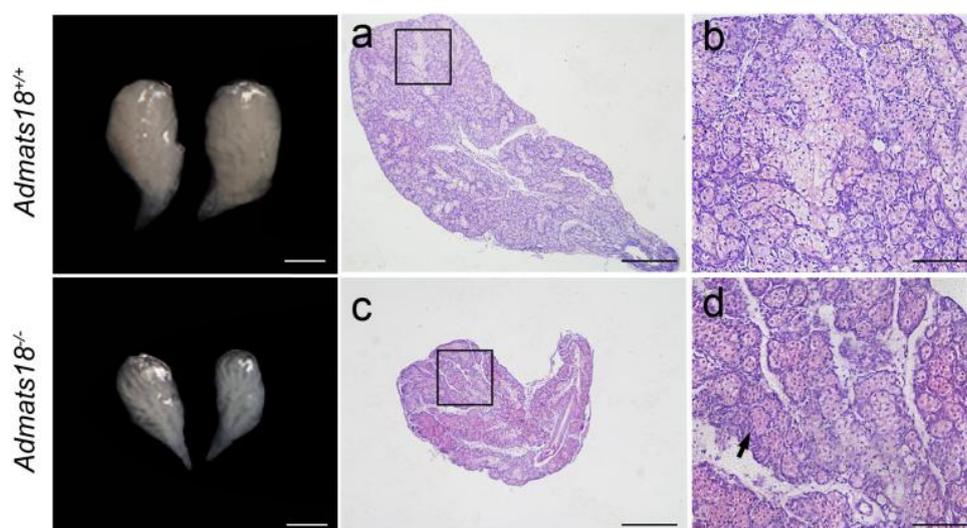


图 9. 2 周龄的 *Adamts18^{-/-}* 小鼠包皮腺。左：包皮腺宏观形态。右：苏木精-伊红（H&E）染色包皮腺切片。*Adamts18^{-/-}* 包皮腺的未成熟的 II 型腺泡用黑色箭头表示。b 和 d 分别放大显示了腺泡细胞 a 和 c 中的矩形区域。比例尺：100 μm (b, d) 和 500 μm (a, c)。

Figure 9. Representative images of the preputial gland in 2-week-old *Adamts18^{-/-}* mice. Left panels: gross preputial gland morphology. Right panels: hematoxylin-eosin (H&E)-stained PG sections. *Adamts18^{-/-}* PGs are loaded with immature type II acini. (indicated with a black arrow) The boxed area in both a and c is magnified to show acinar cells (b and d). Scale bar, 100 μm (b, d) and 500 μm (a, c).

在 2 周龄时 *Adamts18^{+/+}* 包皮腺呈黄褐色，形状浑厚饱满，而 *Adamts18^{-/-}* 雄性

小鼠的包皮腺比 *Adamts18^{+/+}* 包皮腺较小，且尾部更锐利，整体色泽更亮、更透明。组织学分析表明 2 周龄 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 包皮腺均可见腺泡外围苏木素着色集中的基底细胞、伊红着色较浅的未成熟的腺泡细胞（type II）以及伊红几乎不着色的成熟的腺泡细胞。*Adamts18^{-/-}* 包皮腺相比于 *Adamts18^{+/+}* 包皮腺充满了不成熟的 type II 腺泡，而苍白、泡沫状的成熟腺泡细胞相对较少。综上所述，*Adamts18^{-/-}* 雄性小鼠出生后包皮腺早期形态发育不良。

4.2.3 *Adamts18^{-/-}* 包皮腺 *Lama1*、*Lama3* 和 *Lama5* mRNA 表达水平降低

为了探究 ADAMTS18 影响包皮腺形态发育的潜在分子机制，本实验使用 qRT-PCR 方法，对 2 周龄包皮腺中的细胞外基质的关键性分子 *Fn1*、*Fbn1*、*Col4a1*、*Lama1*、*Lama3*、*Lama5*、*Lamb1* 和 *Lamc1* 进行基因表达定量分析，以管家基因 *Gapdh* 为参照进行归一化。

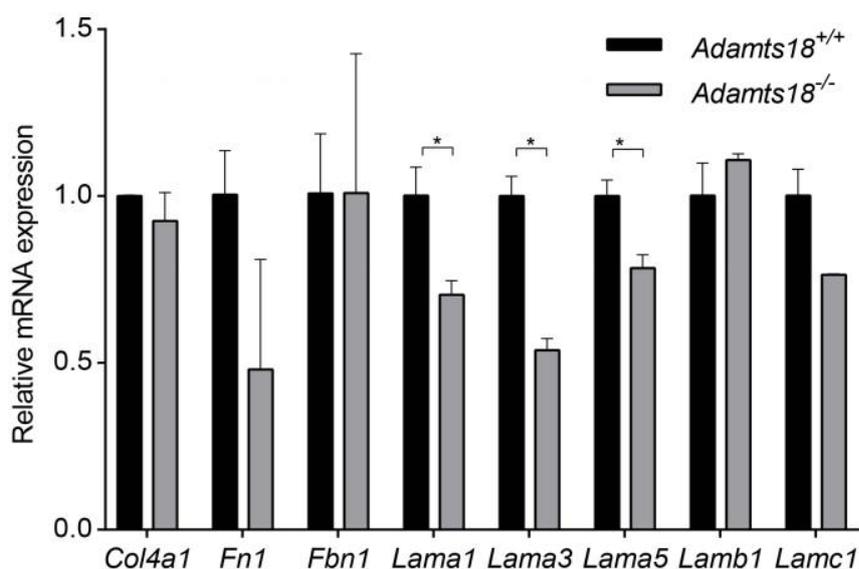


图 10. qRT-PCR 测定 *Fn1*、*Fbn1*、*Col4a1*、*Lama1*、*Lama3*、*Lama5*、*Lamb1* 和 *Lamc1* mRNA 的相对表达水平。n = 3/时间点，数据以均值±SEM 表示。**p* < 0.05.

Figure 10. Relative mRNA levels of *Fn1*, *Fbn1*, *Col4a1*, *Lama1*, *Lama3*, *Lama5*, *Lamb1* and *Lamc1* determined by qRT-PCR. n = 3/time point, data are presented as mean ± SEM. **p* < 0.05.

相比于 *Adamts18^{+/+}* 小鼠, *Adamts18^{-/-}* 小鼠包皮腺中 *Lama1*、*Lama3* 和 *Lama5* mRNA 的表达水平明显降低, 差异具有统计意义。 *Fn1*, *Fbn1*, *Col4a1*, *Lamb1*, *Lamc1* 则在 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 包皮腺之间的表达水平没有明显区别。因此, *Adamts18* 敲除可以导致小鼠包皮腺中 *Lama1*、*Lama3* 和 *Lama5* mRNA 表达水平降低。

4.3 ADAMTS18 缺失加速小鼠包皮腺老化

为了探究 *Adamts18^{-/-}* 小鼠出生后包皮腺早期发育不良是否会有继发性的病变, 我们观察了 7 个月、10 个月和 13 个月这三个年龄小鼠的包皮腺, 分析了包皮腺的外观、大小、重量和组织结构。

4.3.1 *Adamts18^{-/-}* 雄性小鼠包皮腺出现囊性扩张

包皮腺若扩张导管充满腺体分泌物, 伴或不伴上皮性肥大或增生, 管腔角质充满与炎症相关的细胞碎片, 则诊断为囊性扩张。

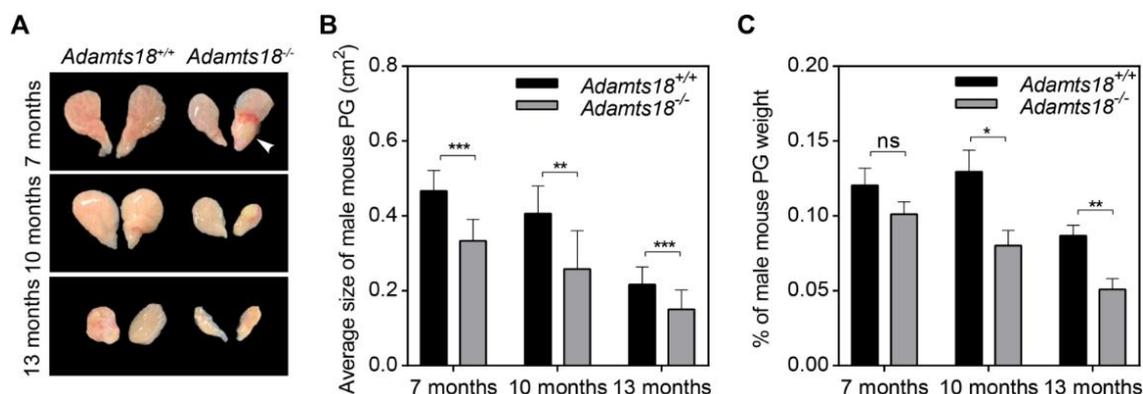


图 11. 老年 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 雄鼠包皮腺。(A) 7、10 和 13 个月大的 *c* 小鼠的包皮腺形态。白色箭头标记包皮腺中的囊性扩张部分。(B) 7 个月、10 个月和 13 个月的老龄雄鼠 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 包皮腺的最大截面积(cm²)。 (C) 10 和 13 个月大小鼠包皮腺重量与体重之比 (%) (n = 5)。

Figure 11. PGs of aged *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* male mice. (A) Representative images of *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* PGs in 7, 10, and 13 months old mice. Cystic

dilatation in PGs is marked by white arrows in the images. (B) Average PG size (cm^2) in 7, 10, and 13 months old *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* mice ($n = 5$). (C) Preputial gland weight to body weight ratio (%) of 7, 10, and 13 months old mice ($n = 5$).

囊性扩张在 7 月龄的 *Adamts18^{-/-}* 雄性小鼠包皮腺中已经发生，说明 *Adamts18^{-/-}* 雄性小鼠在老龄时包皮腺较早出现囊性扩张，有老化的迹象。包皮腺大小和重量的测量结果显示，随着年龄的增长，7~13 月龄 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 雄性小鼠包皮腺与同基因型相比，包皮腺最大截面积都出现了下降趋势。*Adamts18^{-/-}* 雄性小鼠包皮腺在 7、10 和 13 月龄时腺体最大截面积与 *Adamts18^{+/+}* 小鼠相比显著减少，差异具有统计学意义。*Adamts18^{-/-}* 雄性小鼠包皮腺在 10 和 13 月龄时和 *Adamts18^{+/+}* 小鼠相比包皮腺重量占体重比显著降低，差异具有统计学意义，而在 7 月龄时差异较小。

4.3.2 *Adamts18^{-/-}* 老龄小鼠包皮腺纤维化更严重、导管鳞状上皮更厚

CVF 纤维容积分数常用于对 Masson 染色进行分析，通过计算蓝色的（胶原纤维）面积和组织切片总面积的百分比，来体现组织纤维化的程度。

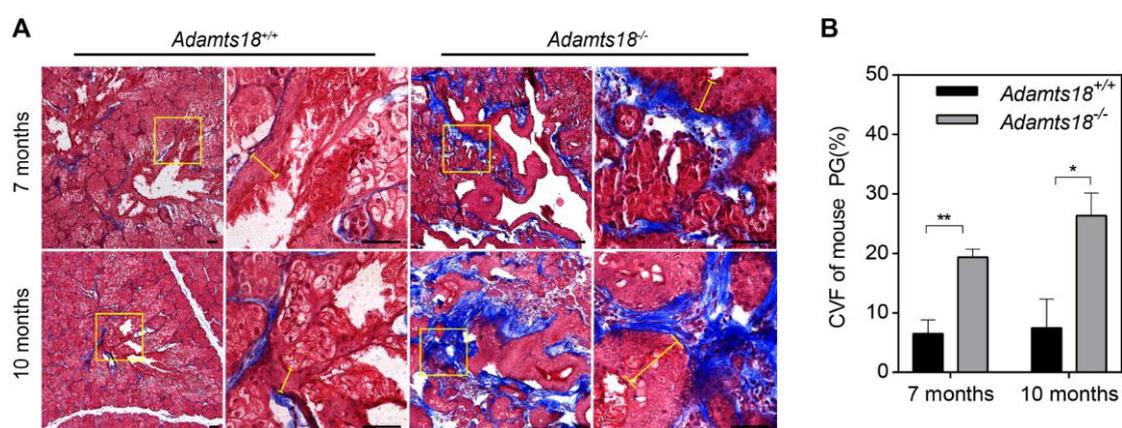


图 12. 7 和 10 月龄小鼠包皮腺 Masson 染色结果。(A) Masson 三色染色 7 月龄和 10 月龄的 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠包皮腺石蜡切片。比例尺: 50 μm 。矩形区域表示纤维化，黄线表示角化鳞状细胞层。(B) 小鼠包皮腺的胶原容积分数

数 ($n = 5$)。结果表示为均值 \pm SD ($n = 5$)，* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；student t 检验。

Figure 12. Masson's trichrome-stained PG sections of 7 and 10 months old *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* mice. (A) Histology of Masson's trichrome-stained PG sections of 7 and 10 months old *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* mice. Scale bar, 50 μ m. (B) Yellow line, keratinized squamous cell layer; boxed area, fibrosis. CVF, collagen volume fraction of mouse PG ($n = 5$). Results are expressed as mean \pm SD ($n = 5$), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; Student's t -test.

结果表明 7 月龄和 10 月龄的 *Adamts18^{+/+}* 包皮腺导管角化鳞状细胞层较薄，胶原纤维也比较少，10 月龄时组织上纤维化面积相较于 7 月龄有加重的趋势，说明纤维化可能是包皮腺老化的一个现象。7 月龄和 10 月龄的 *Adamts18^{-/-}* 与 *Adamts18^{+/+}* 相比，胶原容积分数显著上升，差异具有统计学意义，表明纤维化更严重，同时，随着年龄的增加，观察到导管鳞状上皮更厚。综上，ADAMTS18 缺失可能导致老龄小鼠包皮腺纤维化加重和导管鳞状上皮增厚。

4.4 ADAMTS18 缺失对前列腺发育无明显影响

在 1~2 周龄时， q RT-PCR 检测到 *Adamts18* mRNA 在前列腺高表达，由于 ADAMTS18 与器官的分支相关，因此本研究同时检查了 ADAMTS18 缺失对小鼠前列腺分支的影响。

4.4.1 ADAMTS18 缺失对 2 月龄小鼠前列腺分支的影响较小

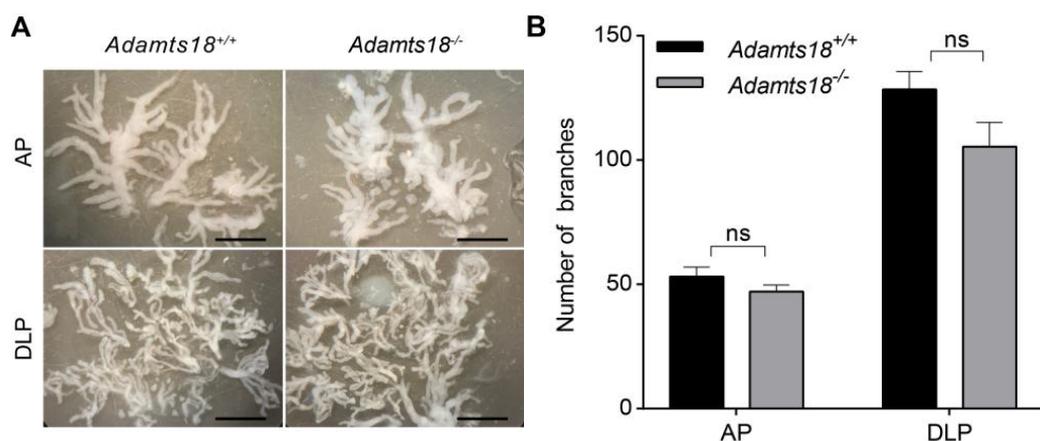


图 13. 2 月龄 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠前列腺分支。(A) 2 月龄 *Adamts18^{-/-}* 和 *Adamts18^{+/+}* 小鼠前 (AP) 和背外侧 (DLP) 叶前列腺分支的图像, 比例尺: 2 mm。(B) 前列腺分支的定量。结果表示为均值 \pm SEM ($n = 6$ /组; student t 检验)。

Figure 13. Prostate branching of 2 months old *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* mice.

(A) Representative images of prostate branching in anterior (AP) and dorsolateral (DLP) lobes of 2 months old *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* mice. Scale bars, 2 mm. (B) Quantification of prostate branches. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$ /group; Student's *t*-test).

对比 2 月龄 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠前列腺前侧 (AP) 和背外侧 (DLP) 叶的分支形态未观察到显著区别。经统计, 前列腺前侧 (AP) 和背外侧 (DLP) 叶的分支数量也无统计意义差异。因此, *ADAMTS18* 缺失对 2 月龄小鼠前列腺叶分支形态和分支数量影响较小。

4.4.2 ADAMTS18 缺失对 10 月龄小鼠前列腺管腔无明显影响

通过前列腺石蜡切片的 H&E 染色, 对前列腺结构进行观察。前列腺管腔内的嗜酸性物质能被伊红着色, 管腔的柱状上皮细胞核能被苏木素着色, 由此来观察判断前列腺的管腔折叠情况和柱状上皮的排列。

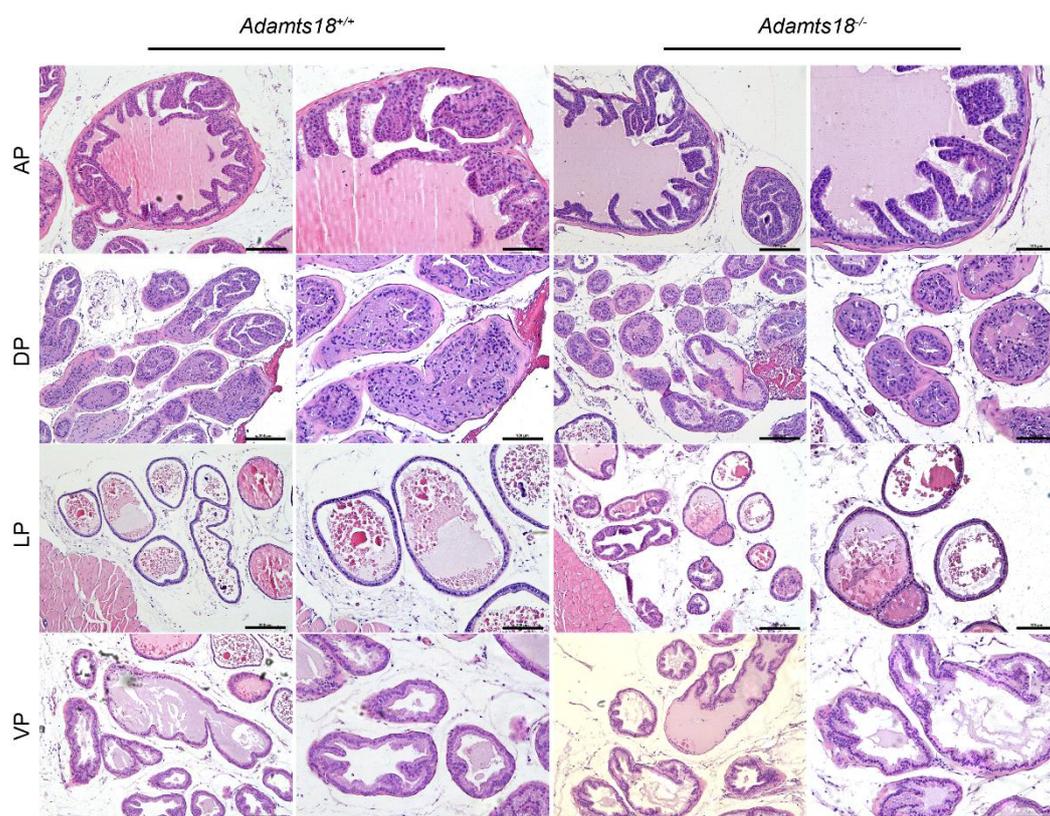


图 14. 10 月龄 *Adamts18*^{+/+}和 *Adamts18*^{-/-}小鼠前列腺切片的苏木精-伊红 (H&E) 染色。AP, 前列腺前侧; DP, 前列腺背侧; LP, 前列腺外侧; VP, 前列腺腹侧。比例尺: 200 μm (第一和第三列图像) 和 100 μm (第二和第四列图像)。

Figure 14. Representative images of hematoxylin-eosin (H&E)-stained prostate sections of 10 months old *Adamts18*^{+/+} and *Adamts18*^{-/-} mice. AP, anterior prostate. DP, dorsal prostate. LP, lateral prostate. VP, ventral prostate. Scale bar, 200 μm (for the first and third column images) and 100 μm (for the second and fourth column images).

10 月龄的 *Adamts18*^{+/+}和 *Adamts18*^{-/-}小鼠前列腺的组织学检查显示, 前列腺前侧叶管腔内壁乳头状生长的立方状及柱状上皮排列相似, 管腔内均充满嗜酸性物质; 前列腺背侧叶和外侧叶的管腔内壁柱状上皮形成同等程度的折叠, 周围包裹的结缔组织松散程度也未观察到明显区别; 前列腺腹侧叶立方上皮排列折叠有相似稀疏程度和绒簇, 腔内均含丰富的苍白、浆液性分泌物。ADAMTS18 缺失后, 10 月龄小鼠前列腺叶的管腔形态 (折叠程度)、细胞排列分层及胞外结缔

组织厚度与 *Adamts18*^{+/+} 小鼠相比未观察到明显差异，因此，ADAMTS18 缺失对 10 月龄小鼠前列腺形态发育影响较小。

4.5 ADAMTS18 缺失对睾丸发育无明显影响

由于睾丸是小鼠生殖系统中重要的生殖器官，也是在 ADAMTS 其他家族成员雄性生殖系统研究工作中的重点观察器官，*qRT-PCR* 结果未显示 *Adamts18* mRNA 在出生后的睾丸表达，尽管如此，*Adamts18* 全身敲除是否影响睾丸发育仍然值得探究。因此本实验对比了 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠睾丸的形态和精子形态。

4.5.1 ADAMTS18 缺失对小鼠睾丸形态和重量无明显影响

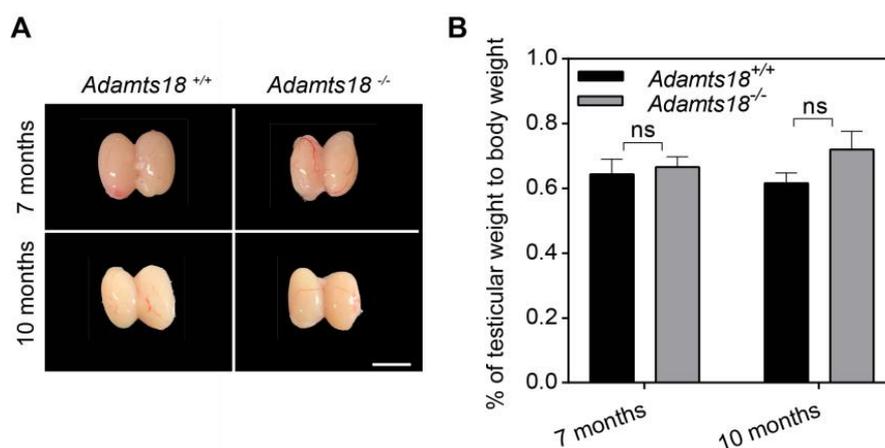


图 15. 7 月龄和 10 月龄 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠睾丸的形态和重量。

(A) 7 月龄和 10 月龄的 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠睾丸图像。比例尺: 5 mm。

(B) 7 月龄和 10 月龄小鼠睾丸重量与体重之比 (%) ($n \geq 3$ /时间点)。结果表示为均值 \pm SEM (student *t* 检验)。

Figure 15. Testis weight and morphology of 7 and 10 months old *Adamts18*^{+/+} and *Adamts18*^{-/-} mice. (A) Representative images of the testes of 7 and 10 months old *Adamts18*^{+/+} and *Adamts18*^{-/-} mice. Scale bar, 5 mm. (B) Testis weight to body weight ratio (%) of 7 and 10 months old mice ($n \geq 3$ /time point). Results are expressed as mean \pm SEM (Student's *t*-test).

成年 *Adamts18*^{-/-} 小鼠的睾丸与 *Adamts18*^{+/+} 小鼠睾丸的大小和其他形态特征无明显差异。统计结果表明 7 和 10 个月的 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠睾丸重量与体重的比值无统计意义差异，比值范围在 60%~80%。说明 ADAMTS18 缺失对小鼠睾丸形态和重量无明显影响。

4.5.2 ADAMTS18 缺失对生精小管截面的细胞数无明显影响

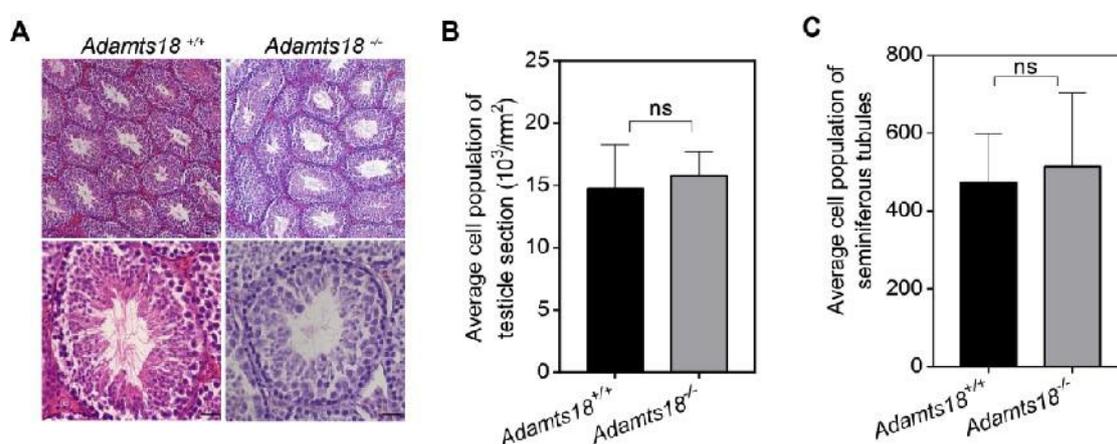


图 16. *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠睾丸和生精小管截面。(A) 4 月龄 *Adamts18*^{-/-} 和 *Adamts18*^{+/+} 小鼠睾丸和生精小管截面苏木精-伊红 (H&E) 染色。比例尺: 50 μm 。(B) 睾丸截面细胞数量 ($n = 6$)。(C) 生精小管截面细胞数量 ($n = 6$)。结果表示为均值 \pm SEM (student t 检验)。

Figure 16. Cross sections of testis and seminiferous tubule of 4 months old *Adamts18*^{+/+} and *Adamts18*^{-/-} mice. (A) Representative images of hematoxylin-eosin (H&E)-stained cross sections of testis and seminiferous tubule of 4 months old *Adamts18*^{+/+} and *Adamts18*^{-/-} mice. Scale bar, 50 μm . (B) Average cell population of testicle sections ($n = 6$). (C) Average cell population of seminiferous tubule ($n = 6$). Results are expressed as mean \pm SEM (Student's *t*-test).

H&E 染色表明 4 月龄 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠睾丸切面中生精小管的数目和面积没有明显区别，每个生精小管的结构也基本相似。统计结果显示 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 雄性小鼠睾丸整体的平均细胞数和生精小管截面的细胞数无统计学意义差异。因此，ADAMTS18 缺失对生精小管截面的细胞数影响较小。

4.5.3 ADAMTS18 缺失对精子形态影响较小

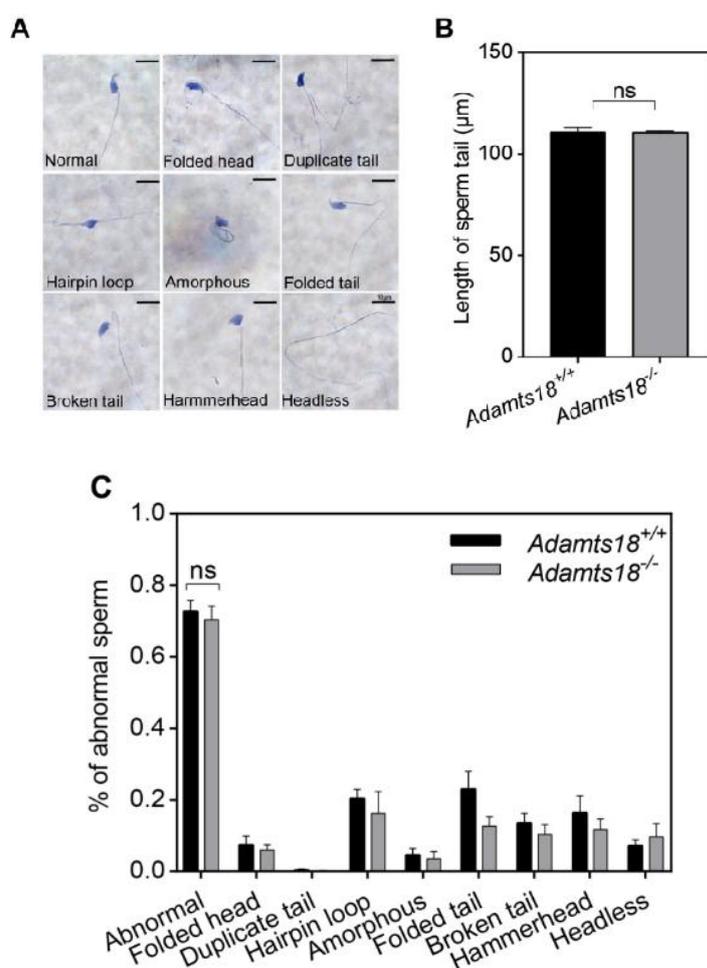


图 17. *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠精子形态。(A) 八种畸形精子的形态。(B) *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠附睾精子的平均尾部长度的 (n = 5)。比例尺: 10 μm 。(C) 八种畸形精子的百分比，包括折头、双尾、发夹、无定形、折尾、断尾、锤头和无头 (n = 5)。结果为均值 \pm SEM。

Figure 17. *Adamts18*^{+/+} and *Adamts18*^{-/-} mice sperm morphology. (A)

Representative images of eight kinds of abnormal sperms. (B) Average tail length of sperms from the epididymis of *Adamts18^{+/+}* and *Adamts18^{-/-}* mice (n = 5). Scale bar, 10 μm . (C) Percentages of eight kinds of abnormal sperms, including folded head, duplicated tail, hairpin loop, amorphous, folded tail, broken tail, hammerhead, and headless(n = 5). Results are expressed as mean \pm SEM.

从 *Adamts18^{+/+}* 和 *Adamts18^{-/-}* 小鼠附睾收集精子中，对比正常形态的精子尾部，测量其长度，统计结果显示尾部长度几乎相同，大约为 100 μm 。统计形态异常精子的数量，总畸形精子占精子总数的百分比均约为 70%。统计畸形精子，包括折叠头、重复尾、发夹环、无定形、折叠尾、断尾、锤头或无头精子，计算每一种形态的数量占总精子数的比例，也未发现其中任意一种畸形精子在比率上有明显差别。因此，ADAMTS18 缺失可能对精子形态影响较小。

5 讨论与展望

包皮腺是大鼠、小鼠、仓鼠、鼯鼠和豚鼠的附属性腺，包皮腺的分泌液具有润滑、保湿、社会等级划分和抗真菌等多种功能。本研究中，我们首次证明 ADAMTS18 在小鼠雄性生殖系统发育过程中参与包皮腺的形态发生（图 4）。成年的 *Adamts18*^{-/-} 雄性小鼠的包皮腺相比于 *Adamts18*^{+/+} 雄性小鼠的包皮腺更容易发生囊性扩张和间质纤维化。由于 *Adamts18* mRNA 不在成年的包皮腺中表达，所以 *Adamts18*^{-/-} 雄性小鼠的这些缺陷可能是发育异常的包皮腺的继发性病变。

层粘连蛋白是由 α 、 β 和 γ 链组成的异三聚体糖蛋白。 α 链被认为是层粘连蛋白功能的主要决定因素，因为 α 链具备与层粘连蛋白受体 C 端连接的层粘连蛋白球状结构域^[45]，有学者认为，拥有 $\alpha 5$ 链的层粘连蛋白亚型 Laminin Alpha 5 (LAMA5) 在器官发生过程中起着增强基底膜的结构完整性的作用^[46]。在一项层粘连蛋白在大鼠垂体的原位杂交实验中，含有 $\alpha 5$ 链的层粘连蛋白亚型似乎在腺体发育中起着重要作用，因为层粘连蛋白 $\alpha 5$ 链是第一条由腺体表达的 α 链^[47]。ADAMTS18 是分泌型金属蛋白酶，在细胞外基质的组装和降解中起着重要作用。在细胞外基质中，胶原蛋白和弹性蛋白形成的不溶性交联的超结构，能够抵抗拉伸力并赋予组织弹性。纤维连接蛋白和层粘连蛋白等糖蛋白聚合成多聚体，它们与其他超结构、生长因子、细胞因子和细胞表面受体相互作用，在细胞和 ECM 之间提供连接^[48]。小鼠基因敲除研究表明，大多数层粘连蛋白链是发育所必需的。角质形成细胞基底膜中的 LAMA5 在表皮-真皮相互沟通中有重要作用。层粘连蛋白 $\alpha 5$ 广泛表达于成熟小鼠表皮基底膜中，其在该部位的缺乏 (*Lama5*^{ker5} 小鼠) 导致基底角质形成细胞过度增殖和毛囊发育延迟^[49]。我们在之前的研究中观察到，*Adamts18*^{-/-} 小鼠脂肪组织 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) 和胚胎脑 ($\alpha 5$ 和 $\beta 1$) 中层粘连蛋白转录的改变对早期脂肪细胞分化^[50] 和神经形成^[51] 产生不利影响。本研究发现 *Adamts18*^{-/-} 小鼠包皮腺 *Lama1*，*Lama3* 和 *Lama5* mRNA 表达水平降低，这可能是由于

ADAMTS18 的缺失导致正常情况下受 ADAMTS18 切割的某些 ECM 成分发生改变,从而改变结构刚度和机械信号,导致层粘连蛋白等基因表达异常,进而导致包皮腺发育不良。关于 ADAMTS18 缺失影响包皮腺发育的具体机制,还需要进一步的研究。

在检测 2 周龄的包皮腺组织细胞外基质的关键性分子时,使用了 qRT-PCR 分析了基因表达的差异得到了 *Lama1*, *Lama3* 和 *Lama5* mRNA 表达水平降低的结果但是关于这些分子的蛋白水平表达量的差异以及在组织上的定位还需要进一步实验探究。Morio Azuma 等人曾经使用 LAMA5 抗体对发育中的胚胎垂体进行定位,发现在胚胎和成年腺体组织中 LAMA5 的定位不同,随着年龄的增长,表达量也不同^[52]。在对本课题中细胞外基质与包皮腺发育的关系进行深入探究时,可以使用 LAMA1, LAMA3 和 LAMA5 抗体,通过组织免疫荧光或免疫组织化学的方法对 *Adamts18*^{+/+}和 *Adamts18*^{-/-}小鼠包皮腺切片进行检测,再通过统计分析荧光面积、荧光位点或荧光强度的差异。

ADAMTS16 在系统发育中与 ADAMTS18 关系较近,氨基酸序列比对显示 ADAMTS16 和 ADAMTS18 之间的总体同源性和催化结构域的同源性分别为 57% 和 85%,锌结合基序 (HESGHNFGMIHD) 的同源性为 100%^[53]。在肾脏,上皮 *Adamts16* 与 *Adamts18* 的表达在分支尖端重叠,但 *Adamts16* 敲除并不增强 ADAMTS18 缺失的肾脏表型。关于 *Adamts16* 的缺失是否在包皮腺的发育过程中起作用目前尚无报道。最近, Livermore 等人通过 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑构建了一个 *Adamts16* 突变小鼠,发现成年突变小鼠的睾丸比野生型小鼠的睾丸更小^[14]。而本实验在 *Adamts18*^{-/-}雄性小鼠中没有发现这种缺陷(图 11, 图 12, 图 13),很可能 ADAMTS18 和 ADAMTS16 在小鼠雄性生殖系统的发育中起着不同的作用。

ADAMTS18 曾经在人类胎儿的前列腺被检测到^[55],本研究中 *Adamts18* mRNA 虽然在小鼠前列腺表达,但 ADAMTS18 缺失对小鼠前列腺发育无明显影响(图 9, 图 10)。

小鼠出生后 1~20 天是包皮腺细胞发育和增殖的重要阶段,在这个时期包皮

腺受血浆中睾酮的影响较小^[56]。过去的研究认为，小鼠雄性包皮腺和雌性阴蒂腺的发育取决于动物体内激素的水平^{[57][58][59]}。在本研究中，出生后的小鼠在5周龄之前就已经出现包皮腺发育不良的情况，同时，如前文所述，其他受激素水平调控的发育器官，例如前列腺，在 *Adamts18* 敲除小鼠没有显示出与野生型小鼠有明显差异，另外，在本研究中，*Adamts18* 基因敲除小鼠的睾酮分泌器官——睾丸也未出现发育不良。提示 ADAMTS18 调控小鼠包皮腺的发育可能不依赖于激素水平，关于这一点，在本研究的基础上还应再检测 *Adamts18*^{-/-} 小鼠的睾酮水平加以判断。

有报道表示，小鼠在感染肥头绦虫 (*Taenia crassiceps*) 后出现了包皮腺萎缩，在感染过程中还出现基底、中间和成熟的腺泡细胞层明显减少，腺体被导管系统和纤维结构占据，以及淋巴细胞浸润^[59]。研究人员认为，这种包皮腺组织损伤与腺体中免疫细胞的炎症和浸润有关，萎缩是腺泡组织结构紊乱的结果。在本研究中，成年的 *Adamts18*^{-/-} 雄性小鼠的包皮腺更早出现了炎性细胞浸润，容易发生囊性扩张、间质纤维化。成年后的包皮腺没有检测到 *Adamts18 mRNA* 的表达，课题组多年研究也并未发现 *Adamts18* 基因敲除小鼠有免疫缺陷和全身炎症因子水平升高的表型，因此，成年 *Adamts18*^{-/-} 雄性小鼠的包皮腺表型，可能是由于发育异常的包皮腺更容易受到损伤从而导致的继发性病变。

在本实验中，包皮腺的 type II 型细胞在石蜡切片中较难识别，处于该阶段的腺泡表现出腺泡细胞较小，细胞中的脂质较少，与 H&E 染色中发白、膨大的成熟腺泡细胞形成对比。本实验使用的是石蜡切片，石蜡切片在脱蜡、脱水和封片等处理的过程中将接触多种有机试剂，易使腺泡上的脂质脱落。在进一步实验中，可以制作包皮腺的冰冻切片，冰冻切片处理过程接触的有机溶剂较少，可以最大程度地保留细胞中的脂质，使用其他标记方法，例如油红 O 染色法是能够对脂肪和类脂进行染色的方法，也常用于表示腺体中脂质的变化^[60]，此方法的优点是可将成熟的细胞分泌的脂质染成红色或橙色，易于观察细胞中脂质含量，进而可以量化染色较浅的 type II 型细胞占包皮腺切片中细胞总量的比例，或者比较 *Adamts18*^{+/+} 和 *Adamts18*^{-/-} 小鼠包皮腺切片中染色部分的面积占切片面积的比例，

使得对 type II 腺泡细胞的指示更加直观。

在其他领域的研究中所产生的新的小鼠品系中,研究人员经常意外地发现包皮腺的异常表型。目前已经报道的有 *Gnrhr*、*Kiss1r*、*Mab21ll1*、*Kiss1* 缺失会导致包皮腺体型减小或萎缩, *Cebpa/Cebpb*、*Uaca*、*Ctnnb1* 缺失会导致包皮腺组织生化改变^[61], 如角化严重等, 与本研究结果部分相似, 是否有相似的分子机制或信号通路仍然有待研究。睑板腺也是一种特化的皮脂腺^[62], 睑板腺有随着年龄增长老化的现象, 其最常见致病机制包括导管上皮高度角化, 导致腺孔阻塞、腺体停滞、囊性扩张和萎缩^{[63][64]}。在涉及调节睑板腺细胞分化和更新的机制方面, Hwang HS 等人却提出的新的观点, 即萎缩可能一方面是由于睑板腺中腺泡细胞的来源(干细胞)是有限的, 另一方面, 由环境应激介导的衰老和干细胞衰竭的替代途径也可能在睑板腺分泌改变的发展进程中发挥重要作用, 可能直接影响睑板腺细胞质量、脂质合成和腺泡萎缩^[64]。

啮齿动物没有发育出视觉相关的次级性特征(装饰、着色), 而来自包皮腺或阴蒂腺的嗅觉线索在识别和选择潜在配偶方面很重要^[65]。在一项包皮腺的重量与小鼠社会等级相关性的研究中, 占主导地位的小鼠包皮腺相对于弱势地位小鼠包皮腺重量增加, 本研究中, 基因敲除小鼠包皮腺的萎缩是否影响雄性小鼠的社会等级或种间识别还有待探索。在社会等级实验中, 多只雄性小鼠同笼饲养会促使优势小鼠包皮腺的重量增加, 这种重量增加不受笼中雌鼠存在的影响^[66], 因此可以按照社会等级评估方法^[67], 对 *ADAMTS18* 缺失是否影响小鼠社会等级进行研究。由于 *ADAMTS18* 的缺失导致小鼠包皮腺发育不良, 因此预期结果包皮腺的结构可能限制小鼠信息素的分泌, 影响与雌性小鼠的交配频率, 进而影响后代出生数量, 这可能是雄性 *Adamts18* 基因敲除小鼠生育力下降的重要影响因素。

6 结论

1. *Adamts18* mRNA 在小鼠雄性生殖系统的包皮腺和前列腺发育早期表达。
2. ADAMTS18 缺失导致雄性小鼠包皮腺早期形态发育不良。
3. ADAMTS18 缺失导致雄性小鼠包皮腺 *Lama1*、*Lama3* 和 *Lama5* mRNA 表达水平降低。
4. ADAMTS18 缺失导致雄性小鼠包皮腺出现囊性扩张。
5. ADAMTS18 缺失导致老龄雄性小鼠包皮腺纤维化更严重、导管鳞状上皮更厚。
6. ADAMTS18 对前列腺的分支发育影响较小。
7. ADAMTS18 对睾丸的形态、重量、生精小管截面、精子形态影响较小。

参考文献

- [1]Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. J BIOL CHEM. 1997;272(1):556-562.
- [2]Apte SS. ADAMTS Proteins: Concepts, Challenges, and Prospects. Methods Mol Biol. 2020;2043:1-12.
- [3]Mittaz L, Russell DL, Wilson T, Brasted M, Tkalcevic J, Salamonsen LA. Adamts-1 is essential for the development and function of the urogenital system. BIOL REPROD. 2004;70(4):1096-1105.
- [4]Thai SN, Iruela-Arispe ML. Expression of ADAMTS1 during murine development. Mech Dev. 2002;115(1-2):181-185.
- [5]Jin H, Wang X, Ying J, Wong AH, Li H, Lee KY. Epigenetic identification of ADAMTS18 as a novel 16q23.1 tumor suppressor frequently silenced in esophageal, nasopharyngeal and multiple other carcinomas. ONCOGENE. 2007;26(53):7490-7498.
- [6]Aldahmesh MA, Khan AO, Mohamed JY, Alkuraya H, Ahmed H, Bobis S. Identification of ADAMTS18 as a gene mutated in Knobloch syndrome. J MED GENET. 2011;48(9):597-601.
- [7]Xiong DH, Liu XG, Guo YF, Tan LJ, Wang L, Sha BY. Genome-wide association and follow-up replication studies identified ADAMTS18 and TGFBR3 as bone mass candidate genes in different ethnic groups. AM J HUM GENET. 2009;84(3):388-398.
- [8]Lopez LM, Bastin ME, Maniega SM, Penke L, Davies G, Christoforou A. A genome-wide search for genetic influences and biological pathways related to the brain's white matter integrity. NEUROBIOL AGING. 2012;33(8):1841-1847.

- [9]Demircan K, Comertoglu I, Akyol S, Yigitoglu BN, Sarikaya E. A new biological marker candidate in female reproductive system diseases: Matrix metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS). *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2014;15(4):250-255.
- [10]Ataca D, Aouad P, Constantin C, Laszlo C, Beleut M, Shamseddin M. The secreted protease Adamts18 links hormone action to activation of the mammary stem cell niche. *NAT COMMUN.* 2020;11(1):1571.
- [11]Ataca D, Caikovski M, Piersigilli A, Moulin A, Benarafa C, Earp SE. Adamts18 deletion results in distinct developmental defects and provides a model for congenital disorders of lens, lung, and female reproductive tract development. *BIOL OPEN.* 2016;5(11):1585-1594.
- [12]Li SW, Arita M, Fertala A, Bao Y, Kopen GC, Langsjo TK. Transgenic mice with inactive alleles for procollagen N-proteinase (ADAMTS-2) develop fragile skin and male sterility. *BIOCHEM J.* 2001;355(Pt 2):271-278.
- [13]Abdul-Majeed S, Mell B, Nauli SM, Joe B. Cryptorchidism and infertility in rats with targeted disruption of the Adamts16 locus. *PLOS ONE.* 2014;9(7):e100967.
- [14]Livermore C, Warr N, Chalon N, Siggers P, Mianne J, Codner G. Male mice lacking ADAMTS-16 are fertile but exhibit testes of reduced weight. *Sci Rep.* 2019;9(1):17195.
- [15]Lu T, Dang S, Zhu R, Wang Y, Nie Z, Hong T. Adamts18 deficiency promotes colon carcinogenesis by enhancing beta-catenin and p38MAPK/ERK1/2 signaling in the mouse model of AOM/DSS-induced colitis-associated colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(12):18979-18990.
- [16]王彩云. ADAMTS18 在 小 鼠 雌 性 生 殖 系 统 发 育 中 的 作 用: 华 东 师 范 大 学; 2020. 82 p.
- [17]Rutledge EA, Benazet JD, McMahon AP. Cellular heterogeneity in the ureteric progenitor niche and distinct profiles of branching morphogenesis in organ

- development. *DEVELOPMENT*. 2017;144(17):3177-3188.
- [18]Rutledge EA, Parvez RK, Short KM, Smyth IM, McMahon AP. Morphogenesis of the kidney and lung requires branch-tip directed activity of the Adamts18 metalloprotease. *DEV BIOL*. 2019;454(2):156-169.
- [19]Lu T, Lin X, Pan YH, Yang N, Ye S, Zhang Q. ADAMTS18 Deficiency Leads to Pulmonary Hypoplasia and Bronchial Microfibril Accumulation. *iScience*. 2020;23(9):101472.
- [20]Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-801.
- [21]Caldeira J, Sousa A, Sousa DM, Barros D. 2 - Extracellular matrix constitution and function for tissue regeneration and repair. In: Barbosa M A; Martins M C L, ^editors, *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair*: Woodhead Publishing; 2018. p. 29-72.
- [22]Thomson AA, Marker PC. Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. *DIFFERENTIATION*. 2006;74(7):382-392.
- [23]Ishii K, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Sugimura Y. Role of stromal tenascin-C in mouse prostatic development and epithelial cell differentiation. *DEV BIOL*. 2008;324(2):310-319.
- [24]Bruni-Cardoso A, Lynch CC, Rosa-Ribeiro R, Matrisian LM, Carvalho HF. MMP-2 contributes to the development of the mouse ventral prostate by impacting epithelial growth and morphogenesis. *Dev Dyn*. 2010;239(9):2386-2392.
- [25]Knoblauch SE, True L, Tretiakova M, Hukkanen RR. 18 - Male Reproductive System. In: Treuting P M; Dintzis S M; Montine K S, ^editors, *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2018. p. 335-363.
- [26]Cunha GR. Hormonal influences on the morphogenesis of the preputial gland of embryonic mice. *ANAT REC*. 1975;181(1):35-53.
- [27]Yoshizawa K. Specialized Sebaceous Glands—Zymbal's Gland, Preputial Gland,

Clitoral Gland, and Perianal Gland; 2018. 347-365 p.

[28]Thiboutot D, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z, Clawson G. The melanocortin 5 receptor is expressed in human sebaceous glands and rat preputial cells. *J INVEST DERMATOL*. 2000;115(4):614-619.

[29]Bruel AL, Masurel-Paulet A, Riviere JB, Duffourd Y, Lehalle D, Bensignor C. Autosomal recessive truncating MAB21L1 mutation associated with a syndromic scrotal agenesis. *CLIN GENET*. 2017;91(2):333-338.

[30]Seifert AW, Harfe BD, Cohn MJ. Cell lineage analysis demonstrates an endodermal origin of the distal urethra and perineum. *DEV BIOL*. 2008;318(1):143-152.

[31]Haraguchi R, Suzuki K, Murakami R, Sakai M, Kamikawa M, Kengaku M. Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation. *DEVELOPMENT*. 2000;127(11):2471-2479.

[32]Krinke GJ. Diagnosis | Preputial gland ectasia and atrophy. 2011.

[33]MONTAGNA W, NOBACK CR. The histology of the preputial gland of the rat. *ANAT REC*. 1946;96:41-54.

[34]Price D. The accessory reproductive glands of mammals. Sex and internal secretions. 1961;1:366-448.

[35]Thomson AA, Marker PC. Branching morphogenesis in the prostate gland and seminal vesicles. *DIFFERENTIATION*. 2006;74(7):382-392.

[36]Hayward SW, Baskin LS, Haughney PC, Foster BA, Cunha AR, Dahiya R. Stromal development in the ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle of the rat. *Acta Anat (Basel)*. 1996;155(2):94-103.

[37]Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA, Bigsby RM, Brody JR. Whole-mount autoradiography study of DNA synthetic activity during postnatal development and androgen-induced regeneration in the mouse prostate. *BIOL REPROD*.

1986;34(5):985-995.

[38]Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *BIOL REPROD*. 1986;34(5):961-971.

[39]Ousset M, Van Keymeulen A, Bouvencourt G, Sharma N, Achouri Y, Simons BD. Multipotent and unipotent progenitors contribute to prostate postnatal development. *NAT CELL BIOL*. 2012;14(11):1131-1138.

[40]Tika E, Ousset M, Dannau A, Blanpain C. Spatiotemporal regulation of multipotency during prostate development. *DEVELOPMENT*. 2019;146(20).

[41]Lai KP, Yamashita S, Vitkus S, Shyr CR, Yeh S, Chang C. Suppressed prostate epithelial development with impaired branching morphogenesis in mice lacking stromal fibromuscular androgen receptor. *MOL ENDOCRINOL*. 2012;26(1):52-66.

[42]Govero J, Esakky P, Scheaffer SM, Fernandez E, Drury A, Platt DJ. Zika virus infection damages the testes in mice. *NATURE*. 2016;540(7633):438-442.

[43]Ge L, Wei LH, Du CQ, Song GH, Xue YZ, Shi HS. Hydrogen-rich saline attenuates spinal cord hemisection-induced testicular injury in rats. *Oncotarget*. 2017;8(26):42314-42331.

[44]Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992;305(6854):609-613.

[45]Bronson FH, Marsden HM. The preputial gland as an indicator of social dominance in male mice. *Behav Biol*. 1973;9(5):625-628.

[46]Fan Z, Zhu H, Zhou T, Wang S, Wu Y, Hu H. Author Correction: Using the tube test to measure social hierarchy in mice. *NAT PROTOC*. 2019;14(8):2595.

[47]Ibrahim OM, Dogru M, Matsumoto Y, Igarashi A, Kojima T, Wakamatsu TH. Oxidative stress induced age dependent meibomian gland dysfunction in Cu, Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice. *PLOS ONE*. 2014;9(7):e99328.

[48]Extracellular Matrix (ECM) Molecules. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. 2015:25-45.

- [49]Wegner J, Loser K, Apsite G, Nischt R, Eckes B. Krieg T. Laminin alpha5 in the keratinocyte basement membrane is required for epidermal-dermal intercommunication. *MATRIX BIOL.* 2016;56:24-41.
- [50]Zhu R, Cheng M, Lu T, Yang N, Ye S. Pan YH. A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 18 Deficiency Leads to Visceral Adiposity and Associated Metabolic Syndrome in Mice. *AM J PATHOL.* 2018;188(2):461-473.
- [51]Zhu R, Pan YH, Sun L, Zhang T, Wang C. Ye S. ADAMTS18 Deficiency Affects Neuronal Morphogenesis and Reduces the Levels of Depression-like Behaviors in Mice. *NEUROSCIENCE.* 2019;399:53-64.
- [52]Azuma M, Tsukada T, Inagaki T, Casmad F, Jindatip D. Tofrizal A. Immunohistochemical Study of the Laminin alpha5 Chain and Its Specific Receptor, Basal Cell Adhesion Molecule (BCAM), in both Fetal and Adult Rat Pituitary Glands. *Acta Histochem Cytochem.* 2018;51(5):145-152.
- [53]Porter S, Clark IM, Kevorkian L. Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *BIOCHEM J.* 2005;386(Pt 1):15-27.
- [54]Rutledge EA, Parvez RK, Short KM, Smyth IM. McMahon AP. Morphogenesis of the kidney and lung requires branch-tip directed activity of the Adamts18 metalloprotease. *DEV BIOL.* 2019;454(2):156-169.
- [55]Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V. Lopez-Otin C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *GENE.* 2002;283(1-2):49-62.
- [56]Jean-Faucher C, Berger M, de Turckheim M, Veyssiere G. Jean C. Testosterone and dihydrotestosterone levels in the epididymis, vas deferens and preputial gland of mice during sexual maturation. *Int J Androl.* 1985;8(1):44-57.
- [57]Rudali G, Roudier R. Vives C. The preputial gland of the male mouse. *Pathol Biol*

(Paris). 1974;22(10):895-899.

[58]Mesquita-Guimaraes J. Coimbra A. The effect of sexual hormones on the lipid and proteinaceous secretion of the rat preputial sebaceous gland. ARCH DERMATOL RES. 1981;270(3):325-331.

[59]Groot MJ. den Hartog JM. Histological changes in the genital tract of female veal calves implanted with naturally occurring anabolic steroids. Zentralbl Veterinarmed A. 1990;37(10):775-786.

[60]Jester JV, Nicolaides N. Smith RE. Meibomian gland studies: histologic and ultrastructural investigations. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1981;20(4):537-547.

[61]Ehrmann C. Schneider MR. Genetically modified laboratory mice with sebaceous glands abnormalities. CELL MOL LIFE SCI. 2016;73(24):4623-4642.

[62]Foulks GN. Bron AJ. Meibomian gland dysfunction: a clinical scheme for description, diagnosis, classification, and grading. OCUL SURF. 2003;1(3):107-126.

[63]Knop E, Knop N, Millar T, Obata H. Sullivan DA. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(4):1938-1978.

[64]Hwang HS, Parfitt GJ, Brown DJ. Jester JV. Meibocyte differentiation and renewal: Insights into novel mechanisms of meibomian gland dysfunction (MGD). EXP EYE RES. 2017;163:37-45.

[65]Caroom D. Bronson FH. Responsiveness of female mice to preputial attractant: effects of sexual experience and ovarian hormones. PHYSIOL BEHAV. 1971;7(5):659-662.

[66]Bronson FH. Marsden HM. The preputial gland as an indicator of social dominance in male mice. Behav Biol. 1973;9(5):625-628.

[67]Fan Z, Zhu H, Zhou T, Wang S, Wu Y. Hu H. Using the tube test to measure social hierarchy in mice. NAT PROTOC. 2019;14(3):819-831.

附录

表 1. *qRT-PCR* 引物

Genes	Primers
<i>Adamts18</i>	Forward: 5' CCTCAAGTTGTCTGCTCCATCA 3'
	Reverse: 5' GCTGAAGAAATCCACGCAAGA 3'
<i>Fbn1</i>	Forward: 5' GCCAGAAAGGGTACATCGG 3'
	Reverse: 5' ACACACCTCCCTCCGTT 3'
<i>Col4a1</i>	Forward: 5' AAGAGAAGACAGGACCAATGAA 3'
	Reverse: 5' TTCTGTCCAACCTCACCTGTCAA 3'
<i>Lama1</i>	Forward: 5' GCTATCCTGCCCACATCAAAC 3'
	Reverse: 5' CAAGGACTGCACTTGTGAGC 3'
<i>Lama3</i>	Forward: 5' CTCCAATGACCTCAGTCCAGAA 3'
	Reverse: 5' TCTCAGAACGATGCGGAACA 3'
<i>Lama5</i>	Forward: 5' TTGGAGAATGGCGAGATTGTG 3'
	Reverse: 5' CGAAGTAACGGTGAGTAGGAGA 3'
<i>Lamb1</i>	Forward: 5' TCTGTGAACCATGTACCTGTGA 3'
	Reverse: 5' GACACTGACCAGCAATGAGAC 3'
<i>Lamc1</i>	Forward: 5' TGCCGCCAATGTGTCAATC 3'
	Reverse: 5' TGCCACTCGTACAATGTCATC 3'
<i>Fn1</i>	Forward: 5' AAGAGAAGACAGGACCAATGAA 3'
	Forward: 5' TTGAGAGCATAGACACTGACTT 3'
<i>Gapdh</i>	Forward: 5' GTGGAGTCATACTGGAACATGTAG 3'
	Reverse: 5' AATGGTGAAGGTCCGGTGTG 3'

在学期间科研成果

T. Lu T, Lin X, Pan YH, Yang N, Ye S, Zhang Q, Wang C, Zhu R, Zhang T, Wisniewski TM, Cao Z, Ding BS, Dang S, Zhang W. ADAMTS18 Deficiency Leads to Pulmonary Hypoplasia and Bronchial Microfibril Accumulation. *iScience*. 2020 Aug 20;23(9):101472. doi: 10.1016/j.isci.2020.101472. Epub ahead of print. PMID: 32882513; PMCID: PMC7476315.

致谢

在华师大学习的这三年时光，是我人生中非常有意义的一段经历。

这段经历中，我尤其要感谢张巍老师。张老师永远会在我遇到困难的时候出现，帮助我、鼓励我。这样的鼓励不仅仅来自加油打气的话语，还在于张老师对待问题总能有不同的观点，更在于及时总结问题和积极面对问题的习惯对我们的潜移默化。

感谢党素英老师和潘逸萱老师，总是耐心为我们解答陌生领域的问题；感谢洪涛老师，非常关注我们的安全与身心健康；感谢在各方面给予我们非常多帮助的高虹老师，孟军老师，杨拼老师，王丽娜老师。

此外，还要感谢实验室的陆甜甜师姐和朱锐师兄，他们聪明、智慧、温柔和稳重，是我学习的榜样，也塑造了实验室的互帮互助的良好氛围；感谢杨宁师姐和叶帅师兄，不仅专业知识扎实，而且给我的生活带了不一样的乐趣和色彩；还有王彩云师姐和张天豪师兄的细致与踏实，聂佳慧师姐、王丽雅、吴陶菁、王敏、孙敏师妹的帮助和陪伴；感谢同窗们的日常支援，特别是张祺，还有我的室友陈银和汪晓荷，走上不同的人生道路后，希望我们还能常常相聚。

和这么多优秀又可爱的人在一起度过三年学习时光，他们身上的优秀品质，永远值得我学习。

最后，感谢父母的支持与鼓励，在我学习期间包容我的情绪，他们以身作则坚强应对生活的坎坷，今后我也会带着这份勇敢，继续向前走。



硕士学位论文

MASTER'S DISSERTATION