



# Rab13 通过影响 PKA 活性调节 occludin 及 F-actin 在大鼠血睾屏障的分布

宿文辉, 贾晓宇, 孟晓娜

(中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 沈阳 110122)

**【摘要】** **目的** 探讨 Rab13-PKA 通路对大鼠血睾屏障功能的调节。**方法** 首先构建靶向大鼠 Rab13 的 shRNA 载体, 通过大鼠睾丸内注射转染 Rab13 shRNA, Western 印迹检测 Rab13 体内沉默效果及沉默后 BTB 相关连接蛋白表达改变, 放射自显影检测睾丸组织内 PKA 活性变化, 睾丸组织冰冻切片免疫荧光染色及鬼笔环肽染色分别观察 occludin 及肌动蛋白丝在生精上皮的分布。**结果** Rab13 shRNA 睾丸内转染后 Rab13 表达量与对照 shRNA 转染相比下降约 70% ( $P < 0.01$ ), 而 BTB 相关连接蛋白表达无变化; Rab13 沉默后 PKA 活性与对照组相比有明显升高 ( $P < 0.01$ ); 免疫荧光结果表明, Rab13 沉默后 occludin 在 VIII 期生精上皮的分布显著高于对照组, 而在其他期生精上皮中则无显著变化; 鬼笔环肽染色显示 Rab13 沉默后 F-actin 在 BTB 处的分布明显增强; 此外, occludin 及 F-actin 的分布变化可被 PKA 抑制剂 H89 所拮抗。**结论** Rab13 可通过影响 PKA 活性调节大鼠 BTB 紧密连接蛋白 occludin 及 F-actin 的分布, 从而参与调节 BTB 功能。

**【关键词】** Rab13; 血睾屏障; 蛋白激酶 A

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0359-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.006

## Rab13 regulates the distribution of occludin and F-actin at the blood-testis barrier via PKA activity in rats

SU Wen-hui, JIA Xiao-yu, MENG Xiao-na,

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine,  
China Medical University, Shenyang 110122, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the regulation of blood-testis barrier by Rab13-PKA pathway in rats. **Method** First, shRNA vector targeting at Rab13 was constructed and then the Rab13 shRNA was transfected into the rat testis by injection. Western blot was used to detect the knock-down effect of Rab13 and the expression of blood-testis barrier (BTB) constituent proteins. PKA activity was detected by autoradiography and scintillation counting. Further, immunofluorescence analysis and phalloidin staining were applied to observe the distribution of occludin and F-actin, respectively. **Results** The expression level of Rab13 in the testis was reduced by approximately 70% after transfection of Rab13 shRNA as compared with the non-targeted control group ( $P < 0.01$ ), while the expression of BTB constituent proteins remained unchanged. PKA activity was significantly increased after Rab13 RNAi transfection ( $P < 0.01$ ). The distribution of occludin at BTB was remarkably increased after Rab13 RNAi silencing around stage VIII but not at other stages of the seminiferous epithelial cycle. The assembly of F-actin at BTB was also intensified in Rab13-silenced testis. Both the changes of distribution of occludin and F-actin induced by Rab13 shRNA were found to be antagonized by the PKA specific inhibitor H89. **Conclusions** Rab13 can modulate the distribution of occludin and F-actin at the blood-testis barrier in rats by regulating PKA activity, which may participate in the regulation of BTB function.

[基金项目] 国家自然科学基金项目(批准号:81100462,81370756)。

[作者简介] 宿文辉(1979-),女,博士,研究方向:哺乳动物血睾屏障功能及精子发生的分子机制。Email: whsu@mail.cmu.edu.cn

**【Key words】** Rab13; Blood-testis barrier; Protein kinase A; Rats

血睾屏障(blood-testis barrier, BTB)位于生精上皮近基底膜处相邻支持细胞(Sertoli cell, SC)间,作为免疫屏障,BTB将生精细胞减数分裂及减数分裂后的发育过程同体循环相分隔,使这些过程在相对独立的近腔小室中进行<sup>[1,2]</sup>。BTB是哺乳动物体内最为严密的血-组织屏障之一,这有赖于支持细胞间的紧密连接(tight junction, TJ)、TJ附近的基底特化粘着链接(basal ectoplasmic specialization, basal ES)以及位于内质网与支持细胞膜间的肌动蛋白束(filamentous actin, F-actin)骨架<sup>[1,2]</sup>。在生精细胞穿越BTB进入近腔小室进一步发育的过程中,构成BTB的细胞连接复合体及肌动蛋白骨架必须经历解聚及重建的动态过程<sup>[3]</sup>,体内许多细胞因子和激素,如TNF $\alpha$ <sup>[4]</sup>、TGF- $\beta$ <sup>[5]</sup>、NO<sup>[6]</sup>、睾酮<sup>[2]</sup>等,就是通过调节该过程影响BTB的屏障功能。

Rab GTPase属于Ras超家族,主要参与胞内各种细胞期间的蛋白质转运及内吞、胞吐等过程<sup>[7]</sup>。在前期研究中,我们验证了Rab13 GTPase在大鼠睾丸内的表达分布随生精上皮周期的变化而变化<sup>[8]</sup>,并发现Rab13可通过影响蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)的活性调节体外培养Sertoli细胞通透性<sup>[9]</sup>。本研究采用睾丸内shRNA注射转染沉默Rab13的表达,进一步在大鼠体内验证Rab13-PKA途径对BTB功能的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂及动物

10只清洁级雄性Sprague-Dawley大鼠,体重300g左右,由中国医科大学实验动物部提供[SCXK(辽)2008-0005]。

BLOCK-iT U6 RNAi Entry载体购自Invitrogen公司,无内毒素超纯质粒纯化试剂盒购自Qiagen公司,TransIT<sup>®</sup> EE Hydrodynamic Delivery Solution为Mirus公司产品;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物试剂公司,ECL显色试剂盒购自Thermo公司,PVDF膜为Millipore公司产品;[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP购自北京福瑞生物科技有限公司,PKA底物肯普肽购自Enzo Biochem公司,PKA抑制剂H89购自Selleck公司;兔抗Rab13抗体购自Abcam公司;兔抗occludin、兔抗ZO-1、小鼠抗 $\beta$ -catenin抗体、CY3标记-驴抗兔IgG购自Invitrogen;兔抗N-cadherin、山羊抗 $\beta$ -actin抗体、牛抗兔、牛抗小鼠、牛抗山羊IgG均购

自Santa Cruz公司;罗丹明-鬼笔环肽购自Sigma公司,Prolong Gold Antifade封片剂购自Invitrogen;其他常规试剂均为Sigma公司产品。

### 1.2 大鼠睾丸内shRNA转染沉默Rab13表达

根据本实验室已有Rab13 siRNA干扰序列<sup>[9]</sup>,采用BLOCK-iT RNAi Designer(Invitrogen)设计大鼠Rab13 shRNA(上游序列:5'-GAUGUAAAGUGCU-GUUGAAGtt-3',下游序列:5'-CUUCAACAGCACU-UACAUCtt-3')及阴性对照Ctrl shRNA(上游序列:5'-AGGAGAUGUGAUUUGGCUtt-3',下游序列:5'-AGCCAAUAUCACAUCUCCUtt-3'),均克隆入BLOCK-iT U6 RNAi Entry载体,无内毒素质粒纯化试剂盒纯化。睾丸内注射前,用TransIT<sup>®</sup> EE Hydrodynamic Delivery Solution稀释shRNA载体,消毒大鼠睾丸外皮肤,28号针头量取稀释的shRNA载体溶液于睾丸尾侧端点处注射(125  $\mu$ L/睾丸,含8  $\mu$ g shRNA载体),同一大鼠两侧睾丸分别注射Rab13 shRNA载体溶液(或含30  $\mu$ mol/L PKA抑制剂H89的Rab13 shRNA载体溶液)及Ctrl shRNA载体溶液。24 h后(day 2),对同一大鼠进行等量shRNA载体注射。于不同时间(day 3、day 4、day 5)处死大鼠,所取睾丸均液氮冷冻后存储于-80 $^{\circ}$ C。

### 1.3 Western印迹

按睾丸尾侧针孔切取shRNA载体溶液注射点周围5 mm范围内组织,NP-40裂解液(50 mmol/L Tris,150 mmol/L NaCl,10%甘油,2 mmol/L EGTA,1% Nonidet P-40,pH 8.0)冰上融化,剪碎组织块,匀浆离心后提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,制备睾丸组织蛋白样品。各组蛋白经SDS-PAGE电泳后转印至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭,依次经一抗(Rab13-1:500,occludin-1:1000,ZO-1-1:1000,N-cadherin-1:500, $\beta$ -catenin-1:1000, $\beta$ -actin-1:500)、二抗孵育(1:3000),ECL显色, $\beta$ -actin作为蛋白内参照。

### 1.4 同位素掺入法测定PKA激酶活性

放射自显影以肯普肽为底物测定PKA活性:上述睾丸组织裂解液稀释至0.5 g/L,取7.5  $\mu$ g蛋白裂解液加入50  $\mu$ L PKA反应液(54 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸盐,14.5 mmol/L对硝基苯磷酸盐,24 mmol/L吗啉代丙烷磺酸,14.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,14.5 mmol/L乙撑双四乙酸,0.12 mmol/L乙二胺四乙酸,1 mmol/L二硫苏糖醇,75  $\mu$ mol/L酪氨酸蛋白酶抑制

剂, 10  $\mu\text{mol/L}$  ML-9, 1 g/L 肯普肽, 1 mg/L 蛋白酶抑制剂, pH 7.2), 混匀后加入 50  $\mu\text{Ci/mL}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min, 加入等量样品缓冲液终止反应, SDS-PAGE 分离肯普肽, 晾干后放射自显影, 凝胶分析系统读取肯普肽相应自显影带, 代表 PKA 活性。

同时通过同位素液闪计数验证肯普肽的磷酸化程度: 取 5  $\mu\text{L}$  上述裂解液加入 25  $\mu\text{L}$  PKA 反应液, 混匀后加入 25  $\mu\text{L}$  20  $\mu\text{Ci/mL}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP, 于 30 $^{\circ}\text{C}$  水浴 7 min, 各处理组取 25  $\mu\text{L}$  反应液滴与 Whatman p81 滤纸, 5% 磷酸溶液终止反应, 充分清洗后使用 Beckman 液闪计数器读取滤纸  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$  含量, 以反映肯普肽的磷酸化程度。

### 1.5 睾丸组织免疫荧光染色检测 occludin 在大鼠生精上皮的分布

液氮中取出 day 5 处死的大鼠睾丸, 于 -22 $^{\circ}\text{C}$  冰冻切片 (7  $\mu\text{m}$ ), 展开切片平铺于载玻片上, 4% 多聚甲醛室温固定 10 min。0.1% Triton-100 通透处理 4 min 后, 用 5% BSA 封闭 30 min, 兔抗 occludin 抗体 (1:100, 1% BSA 稀释) 于 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, CY3 标记驴抗兔 IgG (1:150, 1% BSA 稀释) 室温孵育 1 h, Prolong Gold Antifade 封片剂 (含 DAPI) 封片, Olympus BX60 荧光显微镜下观察记录结果。每次实

验 (共 3 次) 均在注射点周围 5 mm 范围内随机选取 50 个小管进行观察。

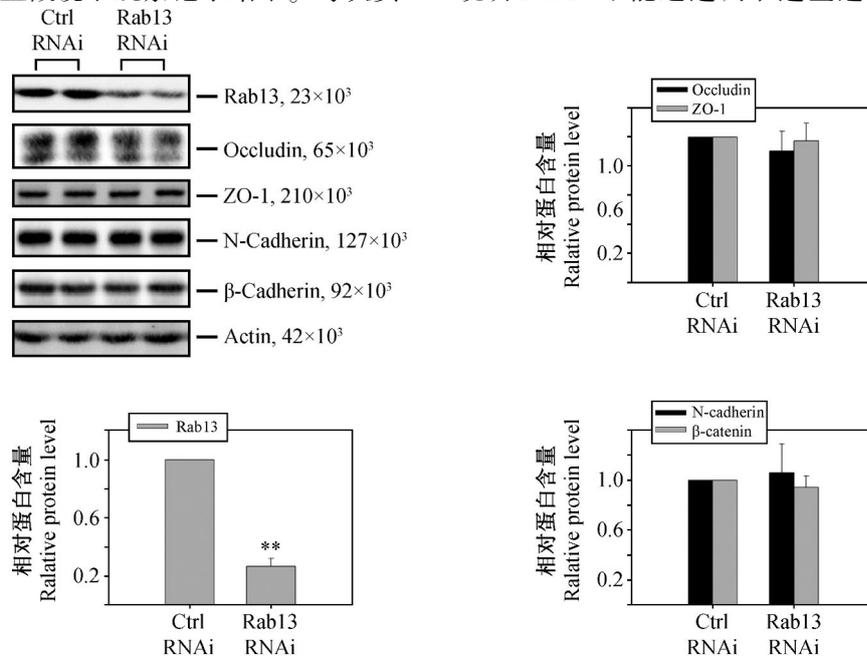
### 1.6 睾丸组织鬼笔环肽染色检测 F-actin 在大鼠生精上皮的分布

如上述方法制作冰冻切片, 经固定、通透处理后, 使用罗丹明标记的鬼笔环肽 (1:200, 1% BSA 稀释) 室温孵育 1 h, Prolong Gold Antifade 封片剂 (含 DAPI) 封片, Olympus BX60 荧光显微镜下观察记录结果。

## 2 结果

### 2.1 大鼠睾丸内 Rab13 沉默效果及其对 BTB 相关连接蛋白表达量的影响

为研究 Rab13 对大鼠 BTB 功能的影响, 本研究采用睾丸内 shRNA 转染以实现在睾丸组织局部 Rab13 的沉默。通过将 Rab13 shRNA 载体及转染试剂注射入大鼠睾丸实质, 选取注射点周围组织进行 Western 印迹分析, 发现与对照 RNAi 组相比, Rab13 RNAi 组 Rab13 的表达量显著下降 (约 70% 左右), 说明该方法可以干扰睾丸内 Rab13 的表达 (图 1)。同时, BTB 相关连接蛋白 occludin、ZO-1、N-cadherin 及  $\beta\text{-catenin}$  的表达量在 Rab13 沉默前后并无改变, 说明 Rab13 不能通过调节这些连接蛋白的表达影



注: \*\*  $P < 0.01$ , 与对照 RNA 干扰组比较。

图 1 Western 印迹检测 Rab13 睾丸内沉默后 BTB 主要连接蛋白表达水平

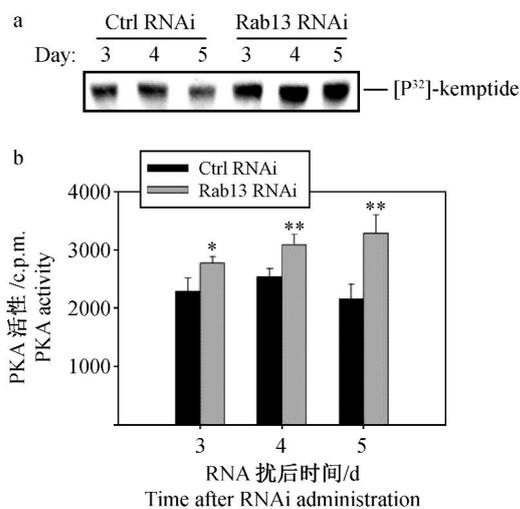
Note. \*\*  $P < 0.01$ , compared with the Ctrl RNAi group.

Fig. 1 Western blot analysis of the junction proteins of BTB after Rab13 RNAi silencing in the testis

响 BTB 功能,亦表明本研究所用 Rab13 shRNA 无靶外效应(图 1)。

## 2.2 Rab13 睾丸内沉默引起 PKA 活性升高

经连续 2 d 在大鼠睾丸内注射 shRNA 载体后,于第 3、4、5 天分别处死动物取睾丸组织,通过同位素掺入法以肯普肽为底物检测 PKA 活性。放射自显影(图 2, a)及液闪计数(图 2, b)结果均显示 Rab13 沉默后睾丸组织内 PKA 活性明显升高,该结果与本实验室体外 Sertoli 细胞中研究结果相一致<sup>[9]</sup>,说明 Rab13 可能通过调节 PKA 活性影响 BTB 功能。



注:放射自显影(a)与液闪计数(b)测定 PKA 活性, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , 与对照 RNA 干扰组比较。

图 2 同位素掺入实验测定 Rab13 沉默后睾丸组织 PKA 活性变化

Note. Autoradiography (a) and scintillation counting (b) to detect PKA activity, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with the Ctrl RNAi group.

Fig. 2 Autoradiographic experiment to determine the PKA activity in the testis after Rab13 silencing

## 2.3 Rab13 通过 PKA 调节紧密连接蛋白 occludin 在大鼠 BTB 的分布

为明确 Rab13 对 BTB 的调节机制,本研究采用免疫荧光染色检测了 BTB 紧密连接蛋白 occludin 在 Rab13 沉默后的分布变化。根据 occludin 在正常大鼠的生精上皮周期依赖性的表达规律,即在 VIII 期生精上皮中表达量显著下降<sup>[10]</sup>,我们观察了 Rab13 沉默后不同期别生精上皮中 occludin 的表达分布。结果发现在 VII-VIII 期生精上皮中, Rab13 RNAi 组 occludin 在 BTB 处的分布明显高于对照组(图 3, a vs. b),而在其他期别的生精上皮中 occlu-

din 的分布与对照组相比并无显著改变(图 3, d vs. e)。我们同时观察到,如在沉默 Rab13 的同时使用 H89 抑制 PKA 的活性,则 occludin 在任何期别生精上皮中的分布均无明显变化(图 3, a vs. c, d vs. f)。这些结果表明, Rab13 可能通过调节 PKA 的活性影响大鼠 VIII 期生精上皮 BTB 的动态变化,进而影响前细线期精母细胞进入近腔小室进一步分化发育。

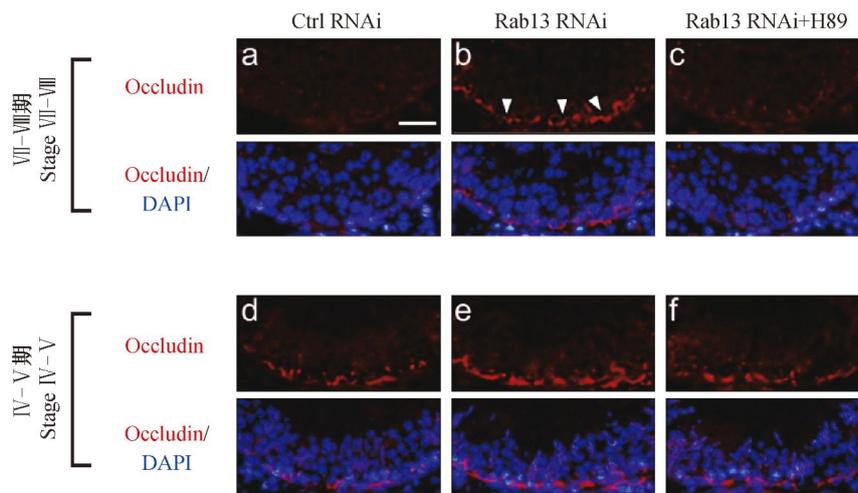
## 2.4 Rab13 通过 PKA 调节肌动蛋白骨架在大鼠 BTB 的分布

本实验室前期研究表明 Rab13 可以通过 PKA 影响体外培养 Sertoli 细胞 F-actin 的排布<sup>[9]</sup>,因此本研究中采用鬼笔环肽染色检测了 Rab13 沉默后大鼠 BTB 中 F-actin 骨架的变化。结果发现, Rab13 沉默后 F-actin 在 BTB 处的分布更为集中(图 4, a vs. b),而 PKA 抑制剂 H89 可拮抗此效应(图 4, a vs. c)。该结果与体外研究结果相一致,提示 Rab13-PKA 途径可通过影响 F-actin 骨架调节大鼠 BTB 功能。

## 3 讨论

生精小管是哺乳动物睾丸的基本功能单位,精子发生是生精小管上皮内复杂的生物学过程,这一过程受到下丘脑-垂体-睾丸轴的严密调控<sup>[11]</sup>。在组织结构上,血睾屏障(BTB)将生精上皮分为两部分,即基底小室与近腔小室,这种特征使精母细胞的减数分裂以及随后的各级生精细胞发育可以在相对独立的近腔小室内进行,与体循环相分隔。BTB 组成了一道天然的免疫屏障,可将大部分生精细胞的自身抗原与免疫系统隔离,避免了自身免疫反应的发生<sup>[12]</sup>。然而,在整个生精上皮周期中, BTB 并不是一直保持关闭状态的,比如在大鼠 VIII 期生精上皮,需要重建 BTB 以使存在于基底小室内的前细线期精母细胞跨越 BTB 进入近腔小室内继续发育<sup>[13]</sup>。研究发现,此过程包括移行精母细胞后方“新”BTB 的形成及其前方“旧”BTB 的分解,且必须受到严密的调控以保证生殖细胞的穿越,同时避免免疫细胞或分子的通过<sup>[14]</sup>。因此, BTB 的“开关”对血睾屏障功能的维持至关重要。

生精上皮内各种细胞连接的有序分解与重建受到体内多种因素的调节,如细胞因子<sup>[15]</sup>(TNF $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 3)、睾酮<sup>[15]</sup>、肌动蛋白调节蛋白(Eps8<sup>[16]</sup>、Arp2/3<sup>[17]</sup>、drebrin E<sup>[18]</sup>、filamin A<sup>[19]</sup>)、蛋白酪氨酸激酶(c-Yes<sup>[20]</sup>、FAK<sup>[21]</sup>)等,这些因素主要通过间接或直接调节连接蛋白的胞内转运或细胞连接处肌动



注: VII-VIII 期(a-c)与 IV-V 期(d-f)生精上皮中 occludin 的分布。

图 3 免疫荧光检测 Rab13 沉默后 occludin 在大鼠 BTB 的分布 (bar = 50 μm)

Note. Stage VII-VIII (a-c) and stage IV-V (d-f) seminiferous epithelium.

Fig. 3 Immunofluorescence analysis to detect the occludin distribution at BTB after Rab13 RNAi silencing in the rat testis

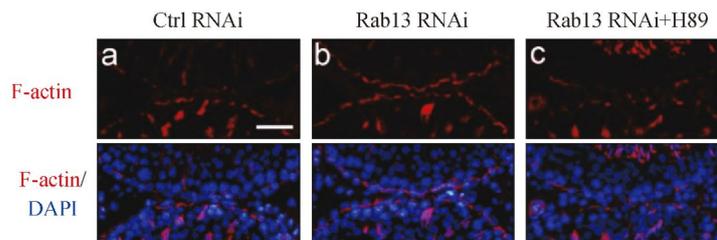


图 4 罗丹明-鬼笔环肽染色检测 Rab13 沉默后 F-actin 在大鼠 BTB 的分布 (bar = 50 μm)

Fig. 4 Rhodamine-conjugated phalloidin staining to detect the F-actin distribution at BTB after Rab13

RNAi silencing in the rat testis

蛋白丝的排布发挥作用。Rab GTPase 是一族相对分子质量为  $(20 \sim 30) \times 10^3$  的 GTP 结合蛋白, 在研究上皮细胞紧密连接的过程中, 人们发现了多种 Rab GTPase 在连接复合体中的定位, 并发现有多种 Rab GTPase 参与调节紧密连接功能变化<sup>[7]</sup>。我们在前期研究中已验证了 Rab13 在大鼠生精上皮中的表达<sup>[8]</sup>, 并采用原代培养的大鼠 Sertoli 细胞, 发现睾酮增强体外 BTB 屏障功能的过程伴有 Rab13 的表达下调和 PKA 活性的升高。在培养 SC 中采用 siRNA 沉默 Rab13 的表达后, 可显著增强体外 BTB 屏障功能, 形态学结果表明 Rab13 对 SC 功能的影响可能是通过改变肌动蛋白骨架及紧密连接蛋白 occludin 在细胞连接处的分布<sup>[9]</sup>。

基于上述体外研究结果, 本研究旨在在大鼠体内验证 Rab13 对 BTB 功能的影响。目前, 已有多篇文献报道 shRNA 睾丸内注射转染在 BTB 功能研究上的应用, 通过在大鼠睾丸一端将转染试剂与 shR-

NA 载体注射入睾丸实质, 实现在睾丸局部沉默靶基因表达的目的<sup>[16, 19, 22]</sup>。我们根据已证明有效的 Rab13 siRNA 序列<sup>[9]</sup>, 构建 shRNA 表达载体, 睾丸内转染后发现 Rab13 蛋白水平与对照组相比下降约 70%。此外, 与体外实验结果一致, Rab13 沉默后睾丸组织裂解液中 PKA 活性与对照组相比亦有明显下降, 提示 Rab13 可能通过影响 PKA 活性调节 BTB 功能。

相邻支持细胞间的紧密连接(TJ)是赋予 BTB 屏障功能最重要的细胞连接结构, occludin、claudins 和 JAMs 三种跨膜蛋白以及 ZO-1、ZO-2 等周边蛋白在调节 BTB 的有序开放中发挥了重要作用, 它们既作为 TJ 的结构成分, 又发挥着信号转导的功能。其中, occludin 在 BTB 的表达具有典型的生精上皮周期依赖性, 即在大鼠 VIII-XI 期生精上皮中, occludin 的表达显著低于其他期别, 这种表达模式有助于协调该阶段 BTB 的重建及前细线期精母细胞通过

Sertoli 细胞间的紧密连接进入近腔小室<sup>[10]</sup>。在对睾丸内 Rab13 的表达进行干扰后,我们进一步采用免疫荧光检测了 occludin 在生精上皮的分布,结果发现在 VIII 期生精上皮中 occludin 在 BTB 的分布显著高于对照组,而在其他期别生精上皮 occludin 的分布并无明显变化。在大鼠睾丸, VIII 期生精上皮所占比例仅为 7% ~ 10%<sup>[23]</sup>,因此我们在 Western 印迹中并未检测到 Rab13 沉默后睾丸组织总体 occludin 水平有显著变化。此外, Rab13 沉默后生精上皮近基底部的 F-actin 分布也有明显增多,该变化可能有助于“加固”Sertoli 细胞间的连接结构。据此,我们推测 Rab13-PKA 途径可以通过影响 occludin 和 F-actin 骨架参与大鼠 BTB 的周期性重建,进而调节生精细胞在生精上皮内的发育过程。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implication in male contraception [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(1): 16 – 64.
- [ 2 ] Cheng CY, Mruk DD. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2010, 6(7): 380 – 395.
- [ 3 ] Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of the apical junctional complex; mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers [J]. *BioEssays*, 2005, 27(4): 356 – 365.
- [ 4 ] Xia W, Wong EW, Mruk DD, et al. TGF-beta3 and TNF-alpha perturb blood-testis barrier (BTB) dynamics by accelerating the clathrin-mediated endocytosis of integral membrane proteins: a new concept of BTB regulation during spermatogenesis [J]. *Dev Biol*, 2009, 327(1): 48 – 61.
- [ 5 ] Wong EW, Mruk DD, Lee WM, et al. Regulation of blood-testis barrier dynamics by TGF-β3 is a Cdc42-dependent protein trafficking event [J]. *PNAS*, 2010, 107(25): 11399 – 11404.
- [ 6 ] Lee NP, Cheng CY. Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2008, 636: 172 – 185.
- [ 7 ] Dolores DM, Ann SN, Anne M, et al. Crosstalk between Rab GTPases and cell junctions [J]. *Contraception*, 2005, 72(4): 280 – 290.
- [ 8 ] 宿文辉, 张天彪, 张丽雁, 等. Rab13 GTPase 在大鼠睾丸中的表达及其与生精上皮周期的关系 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(5): 402 – 405.
- [ 9 ] Su WH, Liu XC. Rab13 regulates Sertoli cell permeability barrier dynamics through protein kinase A [J]. *J Mol Endocrinol*, 2013, 50(3): 305 – 318.
- [ 10 ] Li MW, Xia W, Mruk DD, et al. TNF-α reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes [J]. *J Endocrinol*, 2006, 190(2): 313 – 329.
- [ 11 ] Winters SJ, Moore JP. Paracrine control of gonadotrophs [J]. *Semin Reprod Med*, 2007, 25(5): 379 – 387.
- [ 12 ] Meinhardt A, Hedger MP. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 335(1): 60 – 68.
- [ 13 ] Russell L. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis [J]. *Am J Anat*, 1977, 148(3): 313 – 328.
- [ 14 ] Smith BE, Braun RE. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions [J]. *Science*, 2012, 338(6108): 798 – 802.
- [ 15 ] Yan HH, Mruk DD, Lee WM, et al. Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells [J]. *FASEB J*, 2008, 22(6): 1945 – 1959.
- [ 16 ] Lie PP, Mruk DD, Lee WM, et al. Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) is a novel regulator of cell adhesion and the blood-testis barrier integrity in the seminiferous epithelium [J]. *FASEB J*, 2009, 23(8): 2555 – 2567.
- [ 17 ] Lie PP, Chang AY, Mruk DD, et al. Restricted Arp3 expression in the testis prevents blood-testis barrier disruption during junction restructuring at spermatogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(25): 11411 – 11416.
- [ 18 ] Li MW, Xiao X, Mruk DD, et al. Actin-binding protein drebrin E is involved in junction dynamics during spermatogenesis [J]. *Spermatogenesis*, 2011, 1(2): 123 – 136.
- [ 19 ] Su WH, Mruk DD, Lie PP, et al. Filamin A is a regulator of blood-testis barrier assembly during postnatal development in the rat testis [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(10): 5023 – 5035.
- [ 20 ] Xiao X, Mruk DD, Cheng CY. c-Yes regulates cell adhesion at the apical ectoplasmic specialization-blood-testis barrier axis via its effects on protein recruitment and distribution [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304(2): 145 – 159.
- [ 21 ] Lie PP, Mruk DD, Mok KW, et al. Focal adhesion kinase-Tyr407 and -Tyr397 exhibit antagonistic effects on blood-testis barrier dynamics in the rat [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(31): 12562 – 12567.
- [ 22 ] Mok KW, Mruk DD, Silvestrini B, et al. rpS6 regulates blood-testis barrier dynamics by affecting F-actin organization and protein recruitment [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(10): 5036 – 5048.
- [ 23 ] Hess RA, Schaeffer DJ, Eroschenko VP, et al. Frequency of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat [J]. *Biol Reprod*, 1990, 43(3): 517 – 524.