

刘宸,李超,方梦蝶,等. 睾丸中 BORIS 的表达和功能研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(7): 135-139.
Liu C, Li C, Fang MD, et al. BORIS expression and function in testis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(7): 135-139.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.07.020

睾丸中 BORIS 的表达和功能研究进展

刘宸,李超,方梦蝶,任娟,徐昊,王孝举,张衍梅*

(浙江省医学科学院分子医学中心,杭州 310012)

【摘要】 印记位点调节物兄弟因子 BORIS,在脊椎动物的进化过程中从羊膜动物开始出现。人正常生理状态下,该蛋白仅在男性睾丸中高表达。雄性小鼠中 BORIS 的表达时序与精子发生时序高度一致,BORIS 基因敲除小鼠雄性不育,而雌性生长发育正常。BORIS 诱导生殖细胞中特定基因的表达,在精子发生中起重要作用。BORIS 在正常生理条件下特异性地调控精子发生。本文在综述近年来 BORIS 转基因小鼠、BORIS 基因敲除小鼠、睾丸中 BORIS 的表达和机制研究的基础上,总结了 BORIS 的表达定位、BORIS 对精子发生的作用机制、BORIS 功能研究和靶向药物研究,为针对 BORIS 的分子靶向治疗提供新的参考依据。

【关键词】 BORIS;CTCF;精子发生;雄性不育;分子靶向治疗;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 07-0135-05

BORIS expression and function in testis

LIU Chen, LI Chao, FANG Mengdie, REN Juan, XU Hao, WANG Xiaojun, ZHANG Yanmei*
(Center for Molecular Medicine, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310012, China)

【Abstract】 BORIS (brother of the regulator of imprinted sites) was first expressed in amniotes during the evolution of vertebrates. Under human physiological conditions, this protein is highly expressed in male testes only. The expression sequence of BORIS in male mice is highly consistent with the sequence of spermatogenesis. Male BORIS knockout mice are sterile, while females are normal. BORIS induces the expression of specific genes in germ cells and has an important role in spermatogenesis, specifically regulating spermatogenesis under normal physiological conditions. Referring to recent studies of BORIS transgenic mice, BORIS knockout mice, and BORIS expression in testis, this review summarizes the expression and localization of BORIS in testis, the mechanism of BORIS in spermatogenesis, and the functional research and drug screening of BORIS, providing a new reference for molecular targeted therapy.

【Keywords】 BORIS; CTCF; spermatogenesis; male infertility; molecular targeted therapy; mice

印记位点调节物兄弟因子 (the brother of the regular of imprinted sites, BORIS), 是调控细胞核三维空间结构的因子 CTCF (CCCTC binding factor) 的唯一同源因子。BORIS 在生理状态下仅在健康人体睾丸中正常表达,但在多种癌症中发现 BORIS 在除睾丸外的癌组织中异常表达^[1],且 BORIS 高表达的

癌症患者的生存期相对较短,因此,BORIS 是潜在的肿瘤治疗靶标^[2-3]。BORIS 在男性的睾丸中参与精子发生^[4],而女性体内几乎检测不到 BORIS。虽然 BORIS 敲除小鼠未发现生命周期和生存状态改变,在雌性表型和繁育能力均正常的情况下,BORIS 缺失导致雄性不育的问题仍将严重破坏种群繁衍。

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (31871393); 浙江省自然科学基金 (LQY18H300001, LQ18C070002); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2019RC030)。

【作者简介】 刘宸 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 转化分子医学。E-mail: sirius_lc@163.com

【通信作者】 张衍梅 (1981—), 女, 副研究员, 研究方向: 分子医学。E-mail: yanmeizhang81@yahoo.com

本文综述了 BORIS 在正常睾丸中的表达, BORIS 基因敲除小鼠和转基因鼠的胚胎发育研究, BORIS 在睾丸中功能的研究, 对精子发生的调控作用, 以及细胞质定位 BORIS 的功能研究进展和影响 BORIS 通路的相关药物。我们希望在理解正常组织中在生理状态下 BORIS 的表达和功能的基础上更深入地解析和挖掘 BORIS 在癌细胞中的作用机制, 以及在此基础上筛选提高男性生育能力且无诱发癌症风险的生物活性药物。

1 BORIS 在健康睾丸中特异性高表达

BORIS 在健康雄性小鼠睾丸中高表达, 但并非在胚胎睾丸发育初始就表达, 为了验证其表达时序, Jelinic 等^[5]利用免疫组化实验检测了小鼠胚胎中 BORIS 的表达时序。研究发现在胚胎发育 13.5 dpc (交配后天数) 时未检测到 BORIS, 但在 14.5 dpc 胚胎的有丝分裂停滞的生殖细胞中观察到 BORIS 蛋白表达, 17.5 dpc 时位于生精小管中心的生殖细胞有 BORIS 的表达。而小鼠成熟精子中未发现有 BORIS^[6]。与在机体内普遍表达的 CTCF 不同, BORIS 在生理条件下仅在雄性睾丸中高表达。Loukinov 等^[7]于 2002 年发现 CTCF 和 BORIS 在睾丸中的分布存在是互斥的。精原细胞经过初级精母细胞, 次级精母细胞, 最后发育为精子细胞。Sleutels 等^[6]以正常成年小鼠睾丸为实验材料, 他们分离出了完整的曲细精管, 发现 CTCF 在曲细精管精子发生的任何时期表达, 而 BORIS 仅在晚期精母细胞和线性前期的精原细胞中有表达, 且在精母细胞中 BORIS 在细胞质中的含量比细胞核更加丰富。但也有报道阐述在圆形精子中检测到了 BORIS 的 mRNA 的表达^[8]。上述各项研究均指示 BORIS 在生精小管中的精母精原细胞区表达。

在健康小鼠中 BORIS 在精子发生阶段才开始出现, 并可能进一步影响精原和精母细胞的发育, 但随着精子的成熟 BORIS 的表达消失。因此 BORIS 的表达时序与精子发生时序高度一致, 这提示 BORIS 的表达和功能在健康雄性小鼠中有调控精子发生的专一性。

2 BORIS 的正常表达维持胚胎发育

BORIS 在胚胎发育中的具有重要作用。Sleutels 等^[6]于 2012 年构建了 BORIS 基因敲除小鼠, 繁殖出杂合子 BORIS *del/+* 和纯合子 BORIS *del/del*

del 小鼠。基因敲除后的小鼠无任何表型及行为异常。实验证明, 无论纯合子还是杂合子均对雌性小鼠无生育影响。而在雄性小鼠中, 杂合子小鼠正常发育, 小鼠依然有预期生育率。而纯合子小鼠的生育率明显降低。称重 90 日龄的 BORIS 基因敲除小鼠的睾丸的重量, 纯合子的睾丸平均重量显著低于杂合子小鼠的睾丸, 且精子含量显著降低, 仅为杂合子的 15%^[6]。上述研究表明, BORIS 基因缺失影响雄性动物的生育能力, 但不影响雌性动物的生长发育、生殖及哺育后代的能力。

BORIS 的异常表达影响胚胎的正常生长发育。Sati 等^[9]构建了 BORIS 转基因小鼠, 并对新生转基因小鼠与野生型小鼠进行 BORIS 的表达对比。以 qRT-PCR 的方式检测肝、肺、肾、脑、眼和皮肤组织, 野生型小鼠中未发现 BORIS 表达, 而转基因小鼠的上述器官中均有不同程度的表达, 以肺和皮肤组织表达量最高。研究表明 BORIS 转基因小鼠出现了生长迟缓、眼睛畸形、多器官病变、血管缺陷和新生儿死亡等现象。该研究证明在胚胎早期发育时期出现 BORIS 的表达将显著影响机体的生长发育。

综合 BORIS 在健康小鼠睾丸发育时序中的表达以及 BORIS 敲除、转基因对小鼠的影响, BORIS 可能仅在健康哺乳动物睾丸发育过程中特异表达, 并专一调控精子发生。BORIS 的缺失虽然不影响动物个体的生命周期和生存状态, 但极大降低雄性动物的生育能力, 从而影响其种群的繁殖能力。

3 睾丸中 BORIS 通过竞争抑制调控精子发生

BORIS 与其旁系同源蛋白 CTCF 的位于中部的氨基酸序列为锌指结构区, 11 个高度同源的锌指区域使得二者识别相同的 DNA 簇。但 BORIS 和 CTCF 的氨基和羧基端差异较大, 差异区域占据各自蛋白质氨基酸序列全长近三分之二的区域^[7]。BORIS 的氨基和羧基端可能与不同配体相互作用竞争 CTCF 的结合位点^[10]。研究表明 BORIS 与 CTCF 不同, BORIS 识别 DNA 时并不依赖 DNA 甲基化的程度^[11]。对基因的表达调控研究发现, BORIS 激活基因表达, 而 CTCF 抑制基因表达^[12]。这些结果表明, CTCF 通常为抑制因子抑制基因转录, 而 BORIS 是激活因子促进基因转录^[12]。

在分离的野生型小鼠睾丸细胞中利用 BORIS 和 CTCF 的抗体进行染色质免疫共沉淀 (ChIP), 结果显示 BORIS 与 *Stra8* 和 *Prss50* 的启动子优先结

合,而 CTCF 与 *Vps18* 优先结合,该结果表明 BORIS 在睾丸中拥有和 CTCF 不同的功能^[6]。*Stra8* 在 B 精原细胞发育至线性前期精母细胞瞬时表达,*Stra8* 的瞬时表达对于视黄酸诱导的减数分裂必需^[13-14]。免疫组化结果显示 BORIS 的表达时序类似 *Stra8*,胚胎干细胞中 BORIS 的过表达研究显示 GFP-BORIS 在特定位点结合且诱导睾丸特异性基因表达^[6]。ChIP 研究显示 GFP-BORIS 与 *Gal3st1*, *Stra8* 和 *Prss50* 的启动子结合,调控并诱导上述基因的表达^[6],其中 *Gal3st1* 对精子发生必需^[8]。上述研究均表明睾丸中表达的 BORIS 与精子发生密切相关。

4 BORIS 与睾丸特异性转录调节因子共同调控睾丸发育

BORIS 缺失小鼠会因睾丸变小、配子产生延迟而导致生育能力降低,研究发现受 BORIS 调控的 *Stra8* 和 *Prss50* 等基因调控下游基因的表达影响精子发生^[6,15],因此 BORIS 可能通过睾丸特异性转录因子级联影响睾丸的发育。Pugacheva 等^[16]通过 ChIP 对小鼠睾丸中 BORIS 和 CTCF 的结合位点进行分析,发现存在 2 类 CTCF 家族因子结合位点: 1xCTSes(单一 motif)和 2xCTSes(重复 motif)。其中 CTCF 结合 1xCTSes,而 BORIS 结合 2xCTSes 或 BORIS 和 CTCF 共同结合 2xCTSes。相比于 CTCF 的结合位点 1xCTSes, BORIS 的结合位点 2xCTSes 可富集更多的转录相关因子 RNAP II, H3K27ac 和 H3K4me3^[16],表明 BORIS 更易富集转录因子、参与转录调控。

研究发现睾丸特异性转录调节因子(testis-specific transcriptional regulators, TSTRs)富集在 BORIS 在基因组上的结合位点,调控睾丸发育。通过 ChIP 分析数个 TSTR(*A-myb*, *Brd4*, *Dmrt1*, *Dmrt6*, *Taf7l*, *Rfx2*, *Trim33*)与 1xCTSes 或 2xCTSes 两类结合位点的相互作用,发现 TSTR 于 13.4% 的 BORIS 和 CTCF 共同的结合位点富集,于 44.2% 的 BORIS 单独结合位点富集,而 CTCF 单独结合位点几乎没有 TSTR 的富集^[16]。在已确定的位点中,只有那些与 TSTR 相结合的 BORIS 结合位点才与成熟精子中鱼精蛋白的组蛋白保留区紧密相连^[17]。精子中 TSTR 相关的 BORIS 结合位点,可通过促进精子中的高水平转录以及组织精子染色质来促进组蛋白在精子中的保留。组蛋白与精子分化为单倍体密切相关^[18],由此可知, TSTR 与 BORIS 在基因组上结合位点的相互作用对精子发生有重要影响。

5 细胞质定位 BORIS 的功能及机制

在精子发生过程中,精原细胞的干细胞性特征和精母细胞的正常生长发育是非常关键的。已有研究表明 BORIS 和细胞凋亡、细胞周期、干细胞调节相关^[1]。Zhang 等^[19]研究发现细胞质定位的 BORIS 有明确的抑制细胞凋亡的功能。通过删除中部锌指结构域,构建了细胞质定位的 BORIS (BORIS-ZFdel),发现 BORIS-ZFdel 阻止细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质,同时 caspase3/7 活性减弱,确证了细胞质定位的 BORIS 有抑制细胞凋亡的功能。

此外, BORIS 调控细胞有丝分裂的细胞周期^[20]。和其他细胞周期调节因子相似, BORIS 的过量表达影响了细胞周期的正常进行^[21], BORIS 调控细胞周期标志因子 PCNA and Cyclin A 的表达, BORIS 的过度表达引起细胞在 S 期的积累、细胞增大和多倍体细胞的出现,导致有丝分裂失败。BORIS 需要被进一步降解以利于细胞周期的顺利进行。去甲基化作用显著提高 BORIS 的表达量,因此 BORIS 在癌症中被激活^[22],去甲基酶脂肪团和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity-associated protein, FTO)基因敲除的小鼠出现小鼠精原细胞中染色体不稳定,以及将细胞阻滞于 G2/M 期^[23],睾丸中由于去甲基化程度影响的 BORIS 的表达水平可能调控精母精原细胞有丝分裂的细胞周期,进而影响精子发生^[23-24]。

BORIS 亦参与调节干细胞。已有研究表明 BORIS 在癌症干细胞中表达,与特定的干细胞标记呈正相关(如 hTERT 端粒酶基因),因此被认定为是干细胞标记物的正向调节剂,并在维持干细胞中发挥作用^[1]。BORIS 沉默后,干细胞标记因子如 ALDH1、NANOG、OCT4、SOX2 和 ABCG2 普遍下调, BORIS 可能通过诱导 hTERT 端粒酶表达,使干细胞获得自我更新和永生的能力^[25]。

6 基于 BORIS 为靶点的药物研究

Fang 等^[26]利用 BORIS 表达干扰的 microarray 表达谱比对 CMap 数据库,从 1309 种药物处理 6 种细胞获得的 microarray 表达谱中比对获得了与 BORIS 表达干扰处理相似的药物苍术苷。*SEMA3A*、*XRCC4* 和 *PPLL6* 基因在苍术苷处理和 BORIS 表达干扰处理下表达均升高。苍术苷是苍耳子提取物,

研究表明苍术苷作用于线粒体^[27],导致线粒体通透性增强,提示 BORIS 可能作用在线粒体相关信号通路上。有研究证明,苍术苷有促进大鼠精子早期凋亡现象,且在苍术苷作用下,精子线粒体会出现融合、外膜破损、通透性增加和基质丢失等情况^[27],BORIS 敲除小鼠中也发现精原精母细胞大量凋亡的现象。BORIS 出现在精子发生早期,在细胞中起到抑制凋亡和促进增殖的作用。在早期精子中,苍术苷可能抑制 BORIS 的功能,导致大鼠精子出现了早期凋亡。

7 结语和展望

以往研究发现位于 Y 染色体的 *Usp9y*, X 染色体的 *Usp26*, 及常染色体的 *Sox30* 等都有调控精子发生的作用^[28-30],但特殊的是 BORIS 在生理状况下仅在人体睾丸中表达,且是调控精子发生的关键因子之一,但目前缺乏与男性不育症的相关研究。BORIS 基因敲除仅影响成年雄性的生育能力,但对幼龄和雌性个体无任何影响(包括行为、表型、生存周期和繁育能力),BORIS 失调将严重影响男性的生育能力进而影响种群的繁育^[6]。BORIS 参与精子发生并对男性生育起重要作用,对于少精或精子发育异常的男性患者可考虑应用激活 BORIS 的治疗方法。此外,BORIS 在除睾丸外的其他器官中表达会导致胚胎发育异常和致死,而 BORIS 也被发现与多种肿瘤发生、耐药和癌症患者预后相关^[31-32]。因此 BORIS 也是潜在的抗肿瘤作用靶点。由于目前世界范围内并未筛选出直接靶向 BORIS 的抗肿瘤生物活性抑制剂,考虑到 BORIS 在精子发生中的重要作用,靶向 BORIS 的肿瘤治疗药物的筛选应建立以精母精原细胞为对照的并行的肿瘤细胞药物筛选模型,以甄别有效抑制肿瘤且保护男性生育能力的 BORIS 靶向药物。综上所述,BORIS 与雄性哺乳动物的精子发生密切相关,对 BORIS 在睾丸中的功能研究将解析其作用机制,为靶向 BORIS 的药物筛选,建立保护 BORIS 活性的方法奠定基础。

参考文献:

- [1] Soltanian S, Dehghani H. BORIS: a key regulator of cancer stemness [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 154.
- [2] Loukinov D. Targeting CTCFL/BORIS for the immunotherapy of cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2018, 67(12): 1955-1965.
- [3] Asano T, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11223-11237.
- [4] Jones TA, Ogunkolade BW, Szary J, et al. Widespread expression of BORIS/CTCF in normal and cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22399.
- [5] Jelinic P, Stehle JC, Shaw P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(11): e355.
- [6] Sleutels F, Souchit W, Bartkuhn M, et al. The male germ cell gene regulator CTCFL is functionally different from CTCF and binds CTCF-like consensus sites in a nucleosome composition-dependent manner [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2012, 5(1): 8.
- [7] Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, et al. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(10): 6806-6811.
- [8] Suzuki T, Kosaka-Suzuki N, Pack S, et al. Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS [J]. *Mol Cell Biol*, 2010, 30(10): 2473-2484.
- [9] Sati L, Zeiss C, Yekkala K, et al. Expression of the CTCFL gene during mouse embryogenesis causes growth retardation, postnatal lethality, and dysregulation of the transforming growth factor beta pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(19): 3436-3445.
- [10] Nishana M, Ha C, Rodriguez-Hernandez J, et al. Defining the relative and combined contribution of CTCF and CTCFL to genomic regulation [J]. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 108.
- [11] Nguyen P, Cui H, Bisht KS, et al. CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14): 5546-5551.
- [12] Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, et al. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(17): 7763-7774.
- [13] Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, et al. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(39): 14976-14980.
- [14] Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, et al. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation [J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(19): 3233-3242.
- [15] D'Arcy V, Abdullaev ZK, Pore N, et al. The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(20): 5978-5986.
- [16] Pugacheva EM, Rivero-Hinojosa S, Espinoza CA, et al.

- Comparative analyses of CTCF and BORIS occupancies uncover two distinct classes of CTCF binding genomic regions [J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 161.
- [17] Rivero-Hinojosa S, Kang S, Lobanenko VV, et al. Testis-specific transcriptional regulators selectively occupy BORIS-bound CTCF target regions in mouse male germ cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41279.
- [18] Erkek S, Hisano M, Liang CY, et al. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(7): 868–875.
- [19] Zhang Y, Fang M, Song Y, et al. Brother of Regulator of Imprinted Sites (BORIS) suppresses apoptosis in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40786.
- [20] Rosa-Garrido M, Ceballos L, Alonso-Lecue P, et al. A cell cycle role for the epigenetic factor CTCF-L/BORIS [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39371.
- [21] Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 221–234.
- [22] Link PA, Zhang W, Odunsi K, et al. BORIS/CTCF mRNA isoform expression and epigenetic regulation in epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer Immun*, 2013, 13: 6.
- [23] Huang T, Gao Q, Feng T, et al. FTO knockout causes chromosome instability and G2/M arrest in mouse GC-1 cells [J]. *Front Genet*, 2019, 9: 732.
- [24] He J, Huang Y, Liu Z, et al. Hypomethylation of BORIS is a promising prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma [J]. *Gene*, 2017, 629: 29–34.
- [25] Alberti L, Losi L, Leyvraz S, et al. Different effects of BORIS/CTCF on stemness gene expression, sphere formation and cell survival in epithelial cancer stem cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132977.
- [26] Fang M, Song Y, Ren J, et al. Atractyloside mimics BORIS knockdown to induce DNA damage in colorectal cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(7): 3286–3293.
- [27] 李莉, 吴德玲, 戴宁, 等. 苍术苷体外对大鼠精子线粒体膜电位及凋亡的影响 [J]. *中国药理学与临床*, 2019, 35(5): 25–30.
- [28] Li H, Liang Z, Yang J, et al. DAZL is a master translational regulator of murine spermatogenesis [J]. *Natl Sci Rev*, 2019, 6(3): 455–468.
- [29] Sakai K, Ito C, Wakabayashi M, et al. Usp26 mutation in mice leads to defective spermatogenesis depending on genetic background [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13757.
- [30] 齐婉婧, 孙奇, 李媛, 等. 小鼠生殖细胞特异性转录因子 SOHLH1 调控 Sox30 基因表达的机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(7): 36–41.
- [31] Dougherty CJ, Ichim TE, Liu L, et al. Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 370(1): 109–112.
- [32] Debruyne DN, Dries R, Sengupta S, et al. BORIS promotes chromatin regulatory interactions in treatment-resistant cancer cells [J]. *Nature*, 2019, 572(7771): 676–680.

[收稿日期] 2020-09-15