

ANKRD49 通过上调 Bcl-xL 的表达抑制 UV 诱导 GC-1 细胞的凋亡

白欣艳¹ 温丽敏¹ 王玉晶¹ 王海龙^{2*} 解军¹ 郭睿^{1*}

(1 山西医科大学生物化学与分子生物学教研室 太原 030001 2 山西医科大学寄生虫学教研室 太原 030001)

摘要 目的:利用稳定过表达 Ankyrin repeat domain 49(ANKRD49)的 GC-1(小鼠精原细胞)细胞模型,探讨 ANKRD49 过表达对 GC-1 细胞凋亡的影响。方法:40 J/m² 紫外线(UV)刺激 GC-1 细胞 2 min 诱导凋亡,分别利用流式细胞术、Hoechst33258 染色和免疫印迹技术检测过表达 ANKRD49 对 GC-1 细胞线粒体膜电位、核浓缩情况和凋亡相关蛋白多聚 ADP 核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)、Cleaved-Caspase-3、Bcl-xL 和 Bax 的表达变化,以反映 ANKRD49 对 GC-1 细胞凋亡的影响。结果:流式细胞术检测结果表明稳定过表达 ANKRD49 的 GC-1 细胞线粒体膜电位下降率和细胞凋亡率均明显低于空载体组和裸细胞组($P < 0.05$)。Hoechst33258 染色结果显示 ANKRD49 稳定过表达组细胞的凋亡百分比明显低于其它组($P < 0.05$)。Western blotting 检测结果显示 ANKRD49 稳定过表达组 Cleaved-PARP、Cleaved-Caspase-3 蛋白的表达水平明显低于对照组,而 Bcl-xL 蛋白表达水平明显高于对照组($P < 0.05$)。结论:ANKRD49 过表达可抑制 UV 诱导的 GC-1 细胞凋亡,其作用可能是直接或间接通过促进 Bcl-xL 的表达而实现的。

关键词 ANKRD49 GC-1 细胞 细胞凋亡 Bcl-xL

中图分类号 Q789

Ankyrin repeat domain 49 (ANKRD49)是具有 4 个 ankyrin 重复序列结构域的蛋白质,而 ankyrin 重复序列结构域通过介导蛋白质与蛋白质的相互作用广泛参与转录调控、细胞周期、细胞凋亡、细胞骨架完整性、细胞机械感受和内存作用等细胞生命活动过程^[1]。Hsu 等^[2]利用 RNA 芯片技术发现 ANKRD49 在非侵袭性非小细胞肺癌细胞中高表达,在侵袭性肺癌细胞中低表达;另有 Christensen 等^[3]曾报道 ANKRD49 基因在抑郁症大鼠模型的大脑外侧缰核区呈低水平表达。但截至目前 ANKRD49 确切的生物学功能尚未引起广大研究者的关注,也未见有相关研究结果发表。

课题组前期研究发现 ANKRD49 在小鼠睾丸组织高表达,进而成功构建了稳定过表达 ANKRD49 的 GC-1 细胞模型,进一步研究表明该基因可以通过促进细胞自噬来提高 GC-1 细胞的生存能力^[4]。自噬和凋亡在

细胞的生存和死亡中可以相互促进或相互拮抗,虽然二者在代谢途径和形态学方面有着显著的区别,但它们的信号通路却有着千丝万缕的联系^[5]。ANKRD49 是否也参与了 GC-1 细胞凋亡过程呢?为了继续探讨 ANKRD49 在睾丸组织表达的意义,本研究利用稳定过表达 ANKRD49 的 GC-1 细胞模型初步检测该基因对 GC-1 细胞凋亡的影响及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

BALB/c 雄性小鼠,8 周龄,体重 20 ~ 25 g,均由山西医科大学实验动物中心提供,合格证号为:SCXK(晋)2009-0001;质粒 PMSCVpuro 购自 Clontech 公司;限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Xho* I 购自 TaKaRa 公司;Trizol Reagent、UltraSYBR Two Step RT-qPCR Kit 试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;Lipofectamine 2000 Transfection Reagent 购自 Invitrogen 公司;嘌呤霉素购自

收稿日期:2016-10-25 修回日期:2016-11-21

* 通讯作者,电子信箱:guorui@pumc.aliyun.com;longwty@163.com

SIGMA公司;GC-1细胞株由中国协和医科大学基础医学研究所王琳芳教授课题组惠赠;稳定过表达ANKRD49的GC-1细胞(GC-1/ANKRD49-flag)及转染空载体的GC-1细胞(GC-1/NC)由本实验室建立并保存;线粒体膜电位试剂盒、细胞凋亡-Hoechst染色试剂盒购自碧云天公司;兔抗ANKRD49多克隆抗体购自Abcam公司;小鼠抗Flag单克隆抗体、兔抗PARP单克隆抗体、兔抗Cleaved-Caspase-3单克隆抗体、兔抗Bcl-xL单克隆抗体及兔抗Bax多克隆抗体均购自Cell Signaling Technology公司;小鼠抗GAPDH单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠、山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥有限公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 ANKRD49过表达质粒的构建以及稳定转染细胞系的建立

通过NCBI数据库检索,获取ANKRD49编码区域序列并设计引物,上游为5'-GGAAGATCTGCCACCATG GAAAAAGAAAAAGGAAATGATG-3',下游为5'-CCGCT CGAGTTACTTGTATCGTCGTCCTTGTAGTCAGACTGA GGTGAAGAATTTGTAC-3',划线部分为Flag-tag序列。利用Trizol试剂提取8周龄成年雄性小鼠睾丸组织总RNA,定量后取4 μ l进行逆转录,以合成的cDNA为模板进行PCR扩增。在Bgl II和Xho I位点通过分子克隆技术将PCR扩增产物与PMSCVpuro质粒连接构建真核表达重组质粒,送中美泰和测序,对DNA测序结果进行Blast比对,插入片段序列与Genbank中ANKRD49编码序列一致,即成功构建了ANKRD49过表达重组质粒。然后分别将2.5 μ g重组质粒PMSCVpuro-ANKRD49-flag和PMSCVpuro在Lipofectamine 2000介导下转染GC-1细胞,置于培养箱中继续培养,48 h后加嘌呤霉素(2 μ g/ml)开始筛选,约经过3周加压筛选后获得阳性克隆,即为稳定转染细胞系。

1.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blotting检测稳定转染GC-1细胞系ANKRD49的表达

根据ANKRD49基因的ORF序列设计实时荧光定量PCR引物,上游为5'-ACACCTGATTCCCACTGG-3',下游为5'-GCACTGTAGCAAGCCGAT-3',小鼠GAPDH内参基因上游引物为5'-TGAGTACGTCGTGGAGTCCA-3',下游为5'-TAGACTCCACGACATACTCA-3'。用Trizol试剂提取各组细胞总RNA并反转录成单链

cDNA,以此为模板,运用UltraSYBR Two Step RT-qPCR Kit试剂盒进行扩增反应,利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量。同时用RIPA裂解液于冰上裂解各组细胞提取总蛋白,取30 μ g样品经12% SDS-PAGE凝胶电泳分离,转移至PVDF膜上,5%的脱脂奶粉封闭1 h后,分别以小鼠抗GAPDH单克隆抗体(1:1 000)、小鼠抗Flag单克隆抗体(1:1 000)及兔抗ANKRD49多克隆抗体(1:1 000)为一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,以山羊抗小鼠HRP-IgG(1:5 000)及山羊抗兔HRP-IgG(1:5 000)为二抗,室温孵育1 h,经ECL化学发光液显色,用BIO-RAD凝胶成像仪分析结果。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

实验分为3组:pMSCVpuro-ANKRD49-flag稳定转染组、pMSCVpuro空载体转染组和未转染裸细胞组。3组细胞均接种于6孔板中,24 h后将各组细胞培养基弃掉,用40 J/m² UV(波长254 nm)刺激细胞2 min,然后加入新鲜培养基,在培养箱中继续孵育6 h。用不含EDTA的胰酶将细胞消化成单细胞悬液,1 000r/min离心4 min收集细胞,PBS洗两次,离心后弃上清,加入150 μ l Binding buffer重悬细胞,然后加入10 μ l AnnexinV-FITC和碘化丙啶(PI)双染抗体,混匀后避光染色20 min,各管再加入200 μ l Binding buffer,流式细胞仪检测细胞凋亡率,实验重复3次。

1.5 流式细胞术检测细胞线粒体膜电位

将各组细胞接种于6孔板中,24 h后将各组细胞培养基移去,采用相同的UV条件刺激细胞,然后按照1.4中描述的方法和步骤离心、收集细胞,重悬于0.5 ml细胞培养液中,加入0.5 ml JC-1染色工作液,充分混匀,37 $^{\circ}$ C孵育20 min。孵育结束后,1 000r/min离心4 min收集各组细胞,弃掉上清,JC-1染色缓冲液(1 \times)洗涤细胞2次,最终用100 μ l的JC-1染色缓冲液重悬细胞,并加入200 μ l Binding buffer,流式细胞仪检测各组细胞的线粒体膜电位变化,实验重复3次。

1.6 Hoechst-33258染色检测细胞凋亡情况

将GC-1细胞(分组同上)接种于铺有盖玻片的6孔板中,24 h后将各组细胞培养基移去,采用相同的UV条件刺激各组细胞,在培养箱中继续培养6 h后吸尽培养液,加入0.5 ml固定液,固定10 min,PBS洗2次,加入0.5 ml Hoechst染色液,染色5 min后弃去染色液,PBS洗2次,滴加抗荧光猝灭封片液于载玻片上,盖玻片细胞面充分接触封片液,荧光显微镜下观察各组细胞的细胞核变化情况,随机选取视野并计数细胞总

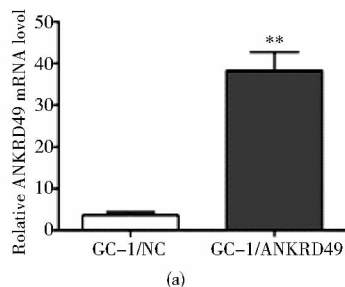
数以及核浓缩的细胞数,每组计数5个视野,最后计算凋亡百分比。凋亡百分比 = 核浓缩细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$,实验重复3次。

1.7 Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白

采用相同的UV条件刺激各组细胞后,用RIPA裂解液于冰上裂解并提取总蛋白,取30 μg 样品分别经12%和10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h后,分别以鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(1:1 000)、兔抗 PARP 单克隆抗体(1:1 000)、兔抗 Cleaved-Caspase-3 单克隆抗体(1:1 000)、兔抗 Bcl-xL 单克隆抗体(1:1 000)及兔抗 Bax 单克隆抗体(1:1 000)为一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,次日经TBST洗涤后分别以山羊抗鼠 HRP-IgG(1:5 000)和山羊抗兔 HRP-IgG(1:5 000)为二抗,室温孵育1 h,经ECL化学发光液显色,用BIO-RAD凝胶成像仪分析结果。

1.8 统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示,组间



比较采用单因素方差分析,采用 GraphPadPrism5.0 统计软件进行分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 qRT-PCR 和 Western blotting 检测稳定转染 GC-1 细胞中 ANKRD49 的表达

qRT-PCR 检测结果显示,稳定转染 PMSCVpuro-ANKRD49-flag 的 GC-1 细胞和转染 PMSCVpuro 空载体的 GC-1 细胞均有 ANKRD49 mRNA 表达,但过表达组 ANKRD49 mRNA 的表达水平显著高于转染空载体组,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1a)。分别以小鼠抗 Flag 单克隆抗体和兔抗 ANKRD49 多克隆抗体为一抗进行 Western blotting 检测,结果显示稳定转染 PMSCVpuro-ANKRD49-flag 的 GC-1 细胞均有相应的蛋白表达,而转染空载体组未见表达(图 1b)。根据图 1 结果可判定 ANKRD49 稳定过表达细胞模型建立成功。

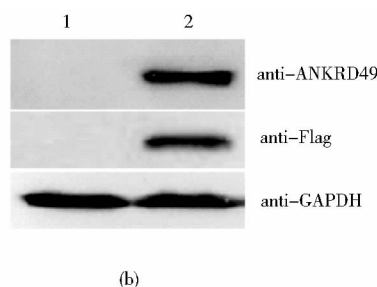


图 1 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 PMSCVpuro-ANKRD49-flag 在 GC-1 细胞中的表达

Fig. 1 Expression of PMSCVpuro-ANKRD49-flag in GC-1 cells by qPCR-PCR and Western blotting analysis

(a) The mRNA expression level of ANKRD49 in GC-1 stable cells by qRT-PCR analysis (b) Protein expression level of ANKRD49 in GC-1 stable cells by Western blotting analysis 1:GC-1/NC; 2:GC-1/ANKRD49-flag ** $P < 0.01$ compared to GC-1/NC group

2.2 过表达 ANKRD49 对 UV 诱导 GC-1 细胞凋亡的影响

2.2.1 流式细胞术检测细胞凋亡率 流式细胞术结果显示过表达 ANKRD49 组细胞的早期凋亡率为 $2.71\% \pm 0.50\%$,明显低于空质粒组 $11.66\% \pm 1.01\%$ 和裸细胞组 $11.31\% \pm 1.74\%$,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2)。

2.2.2 Hoechst33258 荧光染色检测细胞凋亡形态 倒置显微镜观察 UV 照射后 3 组细胞的形态变化,镜下可见,过表达 ANKRD49 组细胞贴壁生长旺盛,细胞间连接相对紧密,包膜较清晰,胞质饱满,而空质粒组和裸细胞组细胞间隙增宽,细胞膜皱缩,胞质减少,部分细胞失去贴壁性而漂浮起来(图 3a)。进一步 Hoechst 染

色可见凋亡细胞的细胞核呈波纹状或皱缩状态,并可见细胞核因浓缩致密而呈强蓝色荧光染色(图 3b 和 3c)。经计算,过表达 ANKRD49 组细胞的凋亡百分比为 $(0.03 \pm 0.01) \times 100\%$,明显低于空质粒组 $(0.23 \pm 0.05) \times 100\%$ 和裸细胞组 $(0.25 \pm 0.04) \times 100\%$,差异具有统计学意义(图 3d, $P < 0.01$)。

2.2.3 流式细胞术检测线粒体膜电位变化 进一步利用流式细胞术检测各组细胞线粒体膜电位的变化,结果显示过表达 ANKRD49 组细胞的线粒体膜电位下降了 $11.51\% \pm 1.53\%$,明显低于空质粒组和裸细胞组 $(30.54\% \pm 2.42\%$ 和 $28.99\% \pm 1.61\%)$,且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4)。

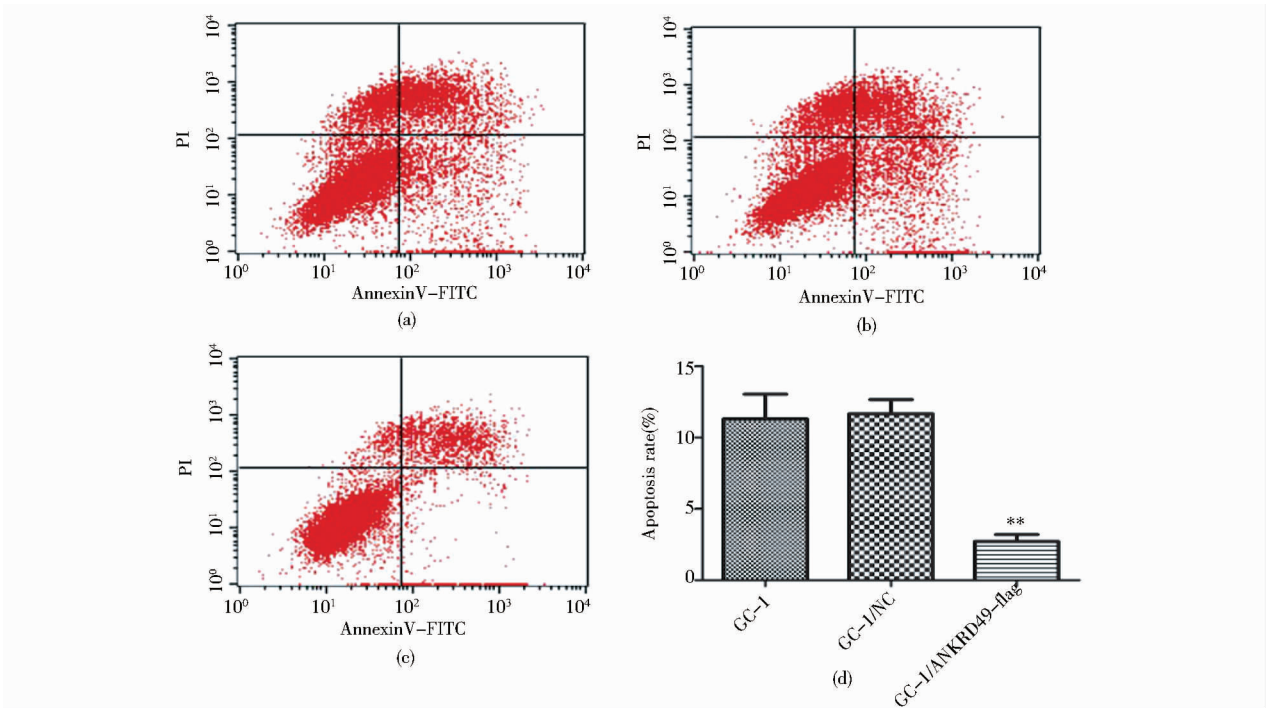


图2 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况

Fig.2 The apoptosis rate of GC-1 cells was detected by flow cytometry

(a) GC-1 (b) GC-1/NC (c) GC-1/ANKRD49-flag (d) The schematic of apoptosis rate of GC-1 cells in three groups ** $P < 0.01$ compared to GC-1 group and GC-1/NC group

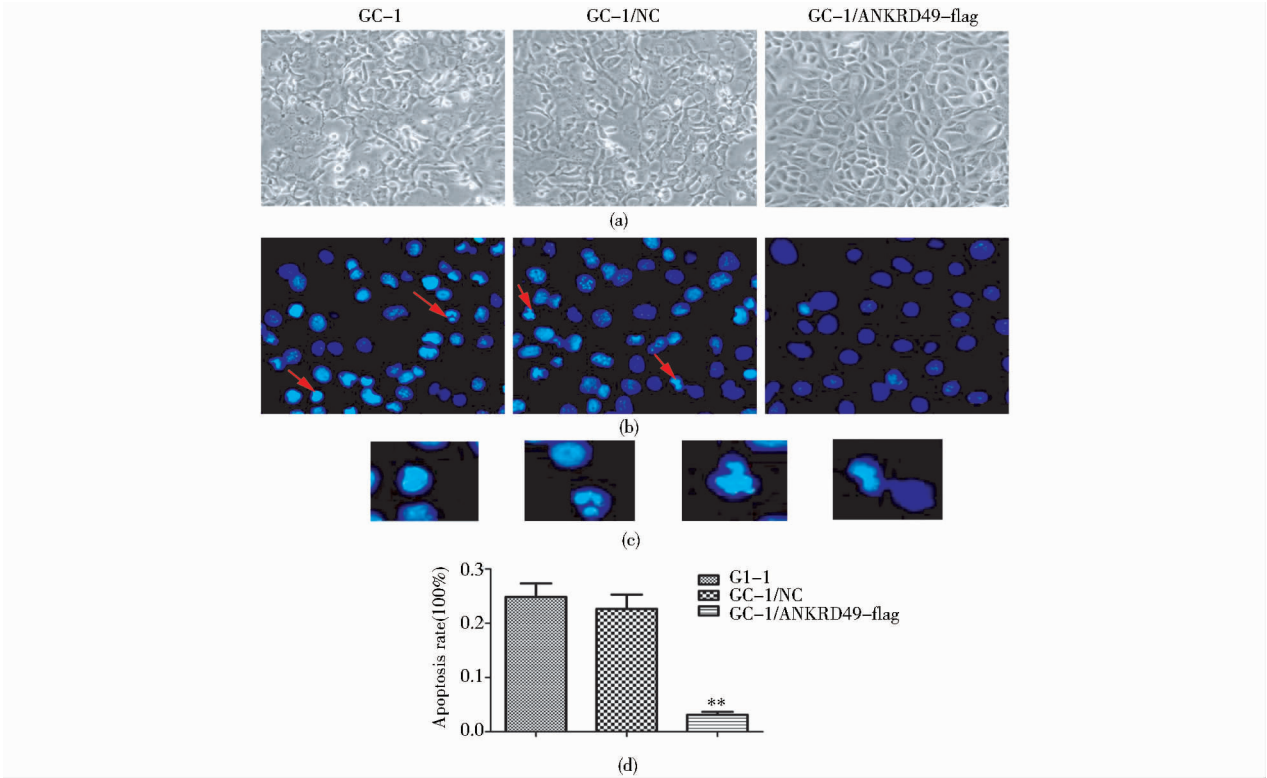


图3 Hoechst33258 染色检测各组细胞凋亡

Fig.3 The apoptosis rate of GC-1 cells with hoechst33258 staining

(a) Morphological changes of GC-1 cells were observed by inverted microscope (b) The apoptosis of GC-1 cells by Hoechst33258 staining (× 200) (c) The apoptosis of GC-1 cells by Hoechst33258 staining (× 400) (d) The schematic of apoptosis rate of GC-1 cells in three groups ** $P < 0.01$ compared to GC-1 group and GC-1/NC group

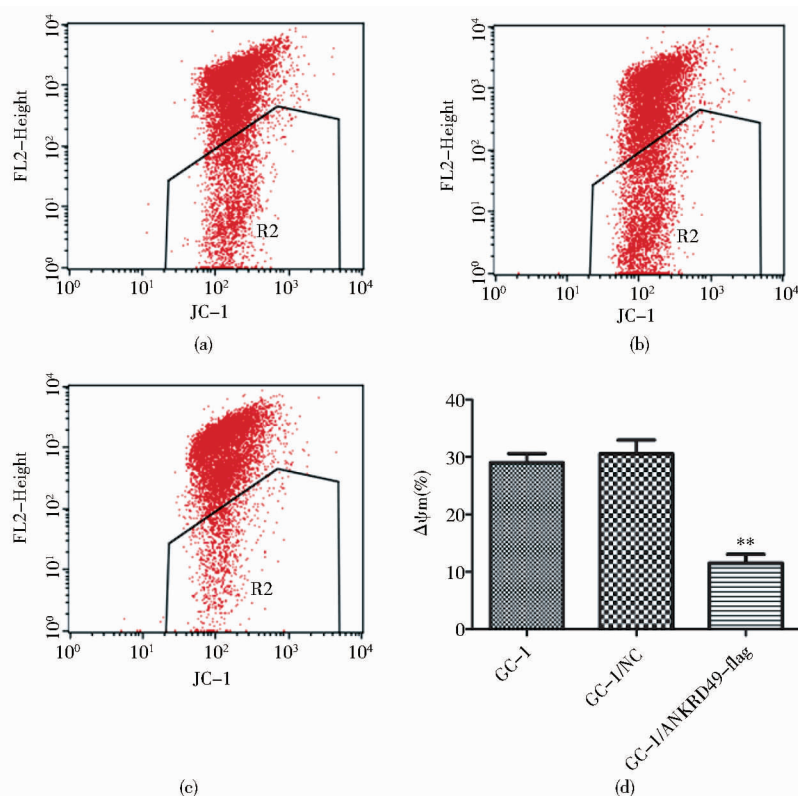


图4 流式细胞术检测各组线粒体膜电位的变化

Fig. 4 The mitochondrial membrane potential of GC-1 cells was detected by flow cytometry

(a) GC-1 (b) GC-1/NC (c) GC-1/ANKRD49-flag (d) The schematic of mitochondrial membrane potential of GC-1 cells in three groups

** $P < 0.01$ compared to GC-1 group and GC-1/NC group

2.2.4 Western blotting 检测 Cleaved-Caspase-3 和 PARP 的表达 Western blotting 结果显示,与空质粒组和裸细胞组相比,过表达 ANKRD49 组 GC-1 细胞中 Cleaved-Caspase-3 的表达水平显著降低(图 5), PARP 的剪切带 85kDa 的蛋白条带显著减弱(图 6)。经图像分析和统计学比较,均具有显著性差异($P < 0.01$)。

2.3 过表达 ANKRD49 对 UV 诱导 GC-1 细胞内 Bcl-xL 和 Bax 的影响

为进一步研究 ANKRD49 参与 GC-1 细胞凋亡的可能机制,通过 Western blotting 检测了 UV 诱导各组细胞内 Bcl-xL 和 Bax 的变化。结果显示,与空质粒组和裸细胞组相比,过表达 ANKRD49 组的 GC-1 细胞内 Bcl-xL 蛋白的表达水平显著高于其它两组($P < 0.05$,图 7),而 Bax 蛋白的表达则无显著差异(图 8)。

3 讨论

细胞凋亡是在基因调控下发生的细胞不可逆的死亡过程,是维持体内细胞数量动态平衡、生物体内环境

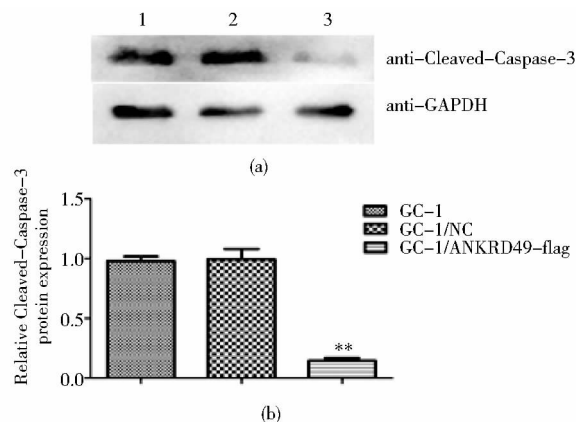


图5 Western blotting 检测 Cleaved-Caspase-3 在各组细胞中的表达

Fig. 5 The expression of Cleaved-Caspase-3 in GC-1 cells was detected by Western blotting

(a) 1: GC-1; 2: GC-1/NC; 3: GC-1/ANKRD49-flag (b) The schematic of relative expression of Cleaved-Caspase3 of GC-1 cells in three groups ** $P < 0.01$ compared to GC-1 group and GC-1/NC group

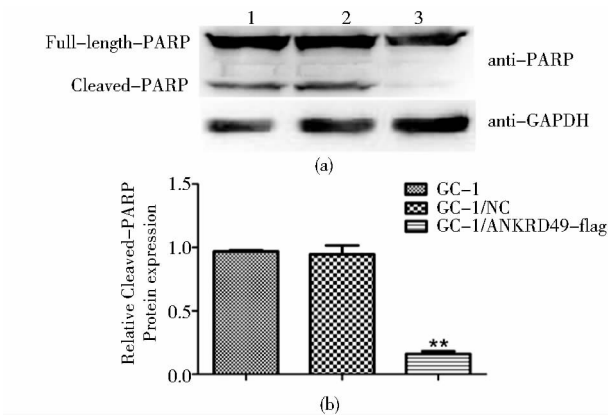


图 6 Western blotting 检测 PARP 在各组细胞中的表达

Fig. 6 The expression of PARP in GC-1 cells was detected by Western blotting

(a) 1: GC-1; 2: GC-1/NC; 3: GC-1/ANKRD49-flag (b) The schematic of relative expression of Cleaved-PARP of GC-1 cells in three groups ** $P < 0.01$ compared to GC-1 group and GC-1/NC group

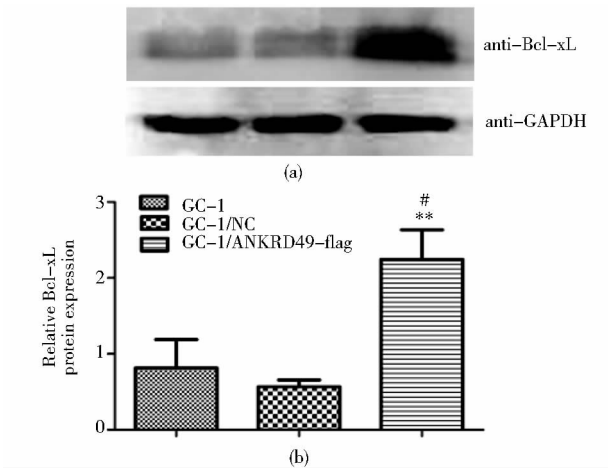


图 7 Western blotting 检测 Bcl-xL 在各组细胞中的表达

Fig. 7 The expression of Bcl-xL in GC-1 cells was detected by Western blotting

(a) 1: GC-1; 2: GC-1/NC; 3: GC-1/ANKRD49-flag (b) The schematic of relative expression of Bcl-xL of GC-1 cells in three groups # $P < 0.05$ compared to GC-1 group ** $P < 0.01$ compared to GC-1/NC group

稳定的重要机制。生殖生物学者们早已发现细胞凋亡在精子发生过程中也扮演着十分重要的角色,研究表明成年动物大约 75% 的精原细胞会发生凋亡,处于减数分裂期的精母细胞甚至已经分化的精子细胞也可能发生凋亡^[6]。这些凋亡常常是清除损伤生精细胞

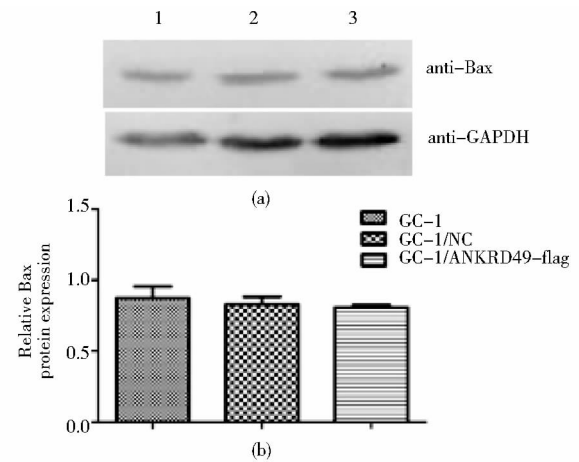


图 8 Western blotting 检测 Bax 在各组细胞中的表达

Fig. 8 The expression of Bax in GC-1 cells was detected by Western blotting

(a) 1: GC-1; 2: GC-1/NC; 3: GC-1/ANKRD49-flag (b) The schematic of relative expression of Bax of GC-1 cells in three groups

的必要手段,以保证精子生成的数量和质量^[7]。但生精细胞凋亡过度,又会造成睾丸内生精障碍^[8,9],严重者常常导致男性不育发生。

课题组前期研究发现 ANKRD49 在小鼠睾丸组织中高表达,但其意义不明。本文利用稳定过表达 ANKRD49 的 GC-1 细胞模型检测了该基因与细胞凋亡的关系。首先利用流式细胞术进行 AnnexinV-FITC/PI 双染及线粒体膜电位检测,从检测结果明显看到过表达 ANKRD49 的 GC-1 细胞凋亡发生率和线粒体膜电位下降幅度均低于空质粒组和裸细胞组。继而应用 Hoechst33258 染色从形态学角度再次观察到过表达 ANKRD49 的 GC-1 细胞出现核浓缩情况较对照组明显减少,可以初步判断过表达 ANKRD49 与细胞凋亡减少有关。Caspase-3 活化和 PARP 的切割常常被认为是细胞早期凋亡发生的标志事件^[10]。利用 Western blotting 证实过表达 ANKRD49 的 GC-1 细胞中 Cleaved-PARP 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白的表达水平显著低于对照组,这一结果表明过表达 ANKRD49 能够使 GC-1 细胞凋亡受到抑制。

众所周知,Bcl-2 基因家族是调控细胞凋亡的重要基因,同样也是生精细胞凋亡过程的主要调节因素^[11-12],该家族可分为促凋亡基因 Bax、Bcl-XS 等和抑制凋亡基因 Bcl-2、Bcl-xL 等。当细胞凋亡激活基因被抑制或凋亡抑制基因被激活,则细胞凋亡受到抑制。

许多实验证明, Bcl-xL 以及 Bax 广泛参与生精细胞凋亡的调节, 如在维生素 D 缺乏引起幼年小鼠生精细胞凋亡的研究中, 发现 Bcl-xL 表达显著下调^[13], 而在研究姜黄素减弱大鼠睾丸组织凋亡的论文中, 作者发现 Bcl-xL 的表达显著上调^[14]。也有研究发现 Bax 基因敲除小鼠的生精细胞凋亡率明显下降^[15]。由此可见, 充分认识 Bcl-xL 和 Bax 的表达变化对于了解生精细胞凋亡及其可能机制具有重要意义。进一步应用 Western blotting 检测了凋亡抑制蛋白 Bcl-xL 和凋亡促进蛋白 Bax 的表达情况, 发现过表达 ANKRD49 的 GC-1 细胞内 Bcl-xL 蛋白表达水平明显高于对照组, 而 Bax 蛋白的表达未见明显变化。因此推测: ANKRD49 抑制 GC-1 细胞发生凋亡可能与 Bcl-xL 蛋白大量表达有关。有研究表明 Bcl-xL 基因启动子区存在转录因子 NF- κ B 的特异结合位点, 可以接受 NF- κ B 的调节, 从而启动基因的转录, 进一步参与细胞凋亡的抑制过程^[16]。课题组前期已经证实 ANKRD49 可以通过 NF- κ B 信号通路促进血清饥饿诱导的 GC-1 发生自噬, 提示 ANKRD49 在精原细胞内能够激活 NF- κ B 信号通路^[4]。因此, ANKRD49 有可能通过 NF- κ B 信号通路上调 Bcl-xL 基因表达, 从而发挥抑制 GC-1 细胞凋亡的作用。但这一过程的确切分子机理仍需加以实验验证。基因过表达技术和基因抑制是研究基因功能的常用策略, 也是目前基因治疗的常用方法, 而基因抑制对基因功能的研究更具有说服力。前期课题组运用 RNA 干扰技术研究 ANKRD49 基因抑制情况下对血清饥饿诱导 GC-1 细胞自噬的影响, 发现 ANKRD49 基因抑制后, 血清饥饿诱导的 GC-1 细胞自噬减弱^[4]。本实验验证了 ANKRD49 过表达可以抑制 UV 诱导的 GC-1 凋亡, 但 ANKRD49 基因抑制后对 UV 诱导 GC-1 细胞凋亡的影响还未做研究, 我们会在后续的实验中采用 RNA 干扰技术进一步研究 ANKRD49 的确切生物功能, 从而为人类诊断和治疗由睾丸基因异常引起的男性不育提供科学依据。

参考文献

- [1] Tee J M, Peppelenbosch M P. Anchoring skeletal muscle development and disease: the role of ankyrin repeat domain containing proteins in muscle physiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 45(4): 318-330.
- [2] Hsu Y C, Yuan S, Chen H Y, et al. A four-gene signature from NCI-60 cell line for survival prediction in non-small cell lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(23): 7309-7315.
- [3] Christensen T, Jensen L, Bouzinova E V, et al. Molecular profiling of the lateral habenula in a rat model of depression. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80666.
- [4] Wang H L, Fan S S, Pang M, et al. The ankyrin repeat domain 49 (ANKRD49) augments autophagy of serum-starved GC-1 cells through the NF- κ B pathway. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0128551.
- [5] Oral O, Akkoc Y, Bayraktar O, et al. Physiological and pathological significance of the molecular cross-talk between autophagy and apoptosis. *Histol Histopathol*, 2016, 31(5): 479-498.
- [6] Aitken R J, Findlay J K, Hutt K J, et al. Apoptosis in the germ line. *Reproduction*, 2011, 141(2): 139-150.
- [7] Shukla K K, Mahdi A A, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012, 4: 746-754.
- [8] Xu Y R, Dong H S, Yang W X. Regulators in the apoptotic pathway during spermatogenesis: Killers or Guards Gene, 2016, 582(2): 97-111.
- [9] Ghasemzadeh J, Talebi A R, Khalili M A, et al. Sperm parameters, protamine deficiency, and apoptosis in total globozoospermia. *Iran J Reprod Med*, 2015, 13(8): 495-502.
- [10] Agarwal A, Mahfouz R Z, Sharma R K, et al. Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7: 143.
- [11] Fotios Dimitriadis, Chara Tsiampali, Chaliasos N, et al. The Sertoli cell as the orchestra conductor of spermatogenesis: spermatogenic cells dance to the tune of testosterone. *Hormones (Athens)*, 2015, 14(4): 479-503.
- [12] Print C G, Loveland K L. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays*, 2000, 22(5): 423-430.
- [13] Sun W, Chen L, Zhang W, et al. Active vitamin D deficiency mediated by extracellular calcium and phosphorus results in male infertility in young mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 308(1): 51-62.
- [14] Mu Y, Yan W J, Yin T L, et al. Curcumin ameliorates highfat diet-induced spermatogenesis dysfunction. *Mol Med Rep*, 2016, 14(4): 3588-3594.
- [15] Xu G, Vogel K S, McMahan C A, et al. BAX and tumor suppressor TRP53 are important in regulating mutagenesis in spermatogenic cells in mice. *Biol Reprod*, 2010, 83(6): 979-987.
- [16] Chen C, Edelstein L C, Gélinas C. The RelNF- κ B family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*, 2000, 20(8): 2687-2695.

ANKRD49 Inhibits UV-induced Apoptosis of GC-1 Cells by Up-regulating Bcl-xL

BAI Xin-yan¹ WEN Li-min¹ WANG Yu-jing¹ WANG Hai-long² XIE Jun¹ GUO Rui¹

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

(2 Department of Parasitology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract Objective: To study the effects of ANKRD49 on ultraviolet light (UV)-induced apoptosis of GC-1 cells. Methods: Apoptosis of GC-1 cells was induced by 40 J/m² UV for 2 minutes. The effect of ANKRD49 on mitochondrial membrane potential and nuclear condensation of GC-1 cells was detected by flow cytometry and Hoechst33258 staining, respectively. The levels of PARP, Cleaved-Caspase-3, Bcl-xL and Bax were measured by Western blotting. Results: The results of flow cytometry showed that the rates of decline of mitochondrial membrane potential and apoptosis in ANKRD49 transfected group were significantly lower than those in other groups ($P < 0.05$). Hoechst33258 staining results demonstrated that the percentage of apoptosis in ANKRD49 transfected group was significantly lower than that in other groups ($P < 0.05$). Western blotting results showed that the expression of Cleaved-PARP and Cleaved-Caspase-3 protein in ANKRD49 over-expressed group was significantly lower than that in other tested groups ($P < 0.05$), while the expression of Bcl-xL protein was significantly higher in ANKRD49 over-expressed group than that in control groups. Conclusion: Overexpression of ANKRD49 could inhibit the apoptosis of GC-1 cells via up-regulating Bcl-xL expression.

Key words ANKRD49 GC-1 cells Cell apoptosis Bcl-xL