

THE INFLUENCE OF GFR α 1 INHIBITION ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF SPERMATOGENIC CELLS

J. MAO¹, P. LIU¹, W. HAN¹,
R. MO², S. GUO², J. SUN¹

¹ Seventh People's Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Department of Andrology, Shanghai 200137

² Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Graduate School Shanghai 200137, China

E-mail: shun31316jit@163.com

The role of the GFR α 1 receptor in the regulation of cell differentiation and spermatogenesis is poorly investigated. The influence of GFR α 1 on the apoptosis and proliferation of spermatogenic cells are not fully elucidated. In this study, GC-1 spg cells were cultured and then assigned to a control cell (control group) transfected with empty adenovirus AdH1-siRNA and an inhibited cells (inhibited group) with GFR α 1 interfering adenovirus (AdH1-siRNA/GFR α 1). The GFR α 1 inhibition was determined by employing western blot and qRT-PCR analysis. Furthermore, we used CCK8 for determining the proliferation of the GFR α 1 interfering adenovirus (AdH1-siRNA/GFR α 1). Transfected cells, employing flow cytometry and Caspase 3, Bax and Bcl-2 expression analysis to determine their apoptosis. This study demonstrated that after transfection, the inhibited cells presented lower proliferation and invasion and higher apoptosis. According to these findings, the inhibition of GFR α 1 might reduce spermatogenesis and remarkably affect spermatogenic cells proliferation.

Key words: GFR α 1; spermatogenic cell; apoptosis; GC-1 spg cells, cells proliferation.

ВПЛИВ ІНГІБУВАННЯ GFR α 1 НА ПРОЛІФЕРАЦІЮ І АПОПТОЗ СПЕРМАТОГЕННИХ КЛІТИН

Роль рецептора GFR α 1 у регуляції диференціювання клітин та сперматогенезу досліджена недостатньо. Вплив GFR α 1 на апоптоз і проліферацію сперматогенних клітин не висвітлений повністю. У цьому дослідженні були вирощені клітини GC-1 spg з подальшим розподілом на контрольні клітини (контрольну групу), трансфіковані порожнім аденовірусом AdH1-siRNA, інгібовані клітини (група інгібування) з GFR α 1 інтерферуючим аденовірусом (AdH1-siRNA/GFR α 1). Інгібування GFR α 1 визначали за допомогою Вестерн-блоту і кількісної ПЛР у реальному часі. Крім того, ми використали CCK8

© J. MAO, P. LIU, W. HAN, R. MO, S. GUO, J. SUN, 2022

для визначення проліферації GFR α 1 інтерферуючого аденовірусу (AdH1-siRNA/GFR α 1). Трансфіковані клітини були досліджені за допомогою проточної цитометрії та аналізу експресії Caspase 3, Bax та Bcl-2 для встановлення їхнього апоптозу. Це дослідження продемонструвало, що після трансфікування інгібовані клітини показали нижчий рівень проліферації та інвазії, але вищий рівень апоптозу. Згідно з цими результатами інгібування GFR α 1 може знизити сперматогенез і мати значний вплив на проліферацію сперматогенних клітин.

Ключові слова: GFR α 1; сперматогенна клітина, апоптоз; клітини GC-1 spg, проліферація клітин.

REFERENCES

- Ayanlaja AA, Zhang B, Ji G, Gao Y, Wang J, Kanwore K, Gao D (2018) The reversible effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the human brain. In: Seminars in cancer biology. Elsevier, pp 212–222.
- Bonafina A, Trincherio MF, Rios AS, Bekinschtein P, Schinder AF, Paratcha G, Ledda F (2019) GDNF and GFR α 1 are required for proper integration of adult-born hippocampal neurons. Cell reports 29: 4308–4319. e4304.
- Chen AC, Eisch AJ, Sakai N, Takahashi M, Nestler EJ, Duman RS (2001) Regulation of GFR α 1 and GFR α 2 mRNAs in rat brain by electroconvulsive seizure. Synapse 39:42–50. [https://doi.org/10.1002/1098-2396\(20010101\)39:1<42::Aid-syn6>3.0.Co;2-#](https://doi.org/10.1002/1098-2396(20010101)39:1<42::Aid-syn6>3.0.Co;2-#).
- Cheng P, Zhang X-S (2017) TDP-43 in male infertility: Progress in studies Zhonghua nan ke xue=. Nat J Andrology 23:942–945.
- Crowley LC, Waterhouse NJ (2016) Detecting cleaved caspase-3 in apoptotic cells by flow cytometry. Cold Spring Harbor Protocols 2016:pdb. prot087312.
- Dong L et al (2019) Xeno-free propagation of spermatogonial stem cells from infant boys. Inter J Mol Sci 20:5390.
- Fainberg J, Kashanian JA (2019) Recent advances in understanding and managing male infertility. F1000Research 8.
- Fan J, Yu S, Cui Y, Xu G, Wang L, Pan Y, He H (2017) Bcl-2/Bax protein and mRNA expression in yak (*Bos grunniens*) placentomes. Theriogenology 104:23–29.
- Garbuzov A, Pech MF, Hasegawa K, Sukhwani M, Zhang RJ, Orwig KE, Artandi SE (2018) Purification of GFR α 1+ and GFR α 1-spermatogonial stem cells reveals a niche-dependent mechanism for fate determination. Stem cell reports 10:553–567.
- Guerri G et al (2019) Non-syndromic monogenic female infertility Acta Bio Medica: Atenei Parmensis 90:68.

- Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R, of Reproduction MB, Group DR (2017) Semen proteomics and male infertility. *J Proteomics* 162:125–134.
- Kawai K, Takahashi M (2020) Intracellular RET signaling pathways activated by GDNF. *Cell and Tissue Research* 1–11.
- Krausz C, Riera-Escamilla A (2018) Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology* 15:369–384.
- La HM et al. (2018) GILZ-dependent modulation of mTORC1 regulates spermatogonial maintenance. *Development* 145:dev165324.
- Leaver RB (2016) Male infertility: an overview of causes and treatment options. *British J Nursing* 25:S35–S40.
- Lossi L, Castagna C, Merighi A (2018) Caspase-3 mediated cell death in the normal development of the mammalian cerebellum. *Inter J Mol Sci* 19:3999.
- Lotti F, Maggi M (2018) Sexual dysfunction and male infertility. *Nature Rev Urol* 15:287–307.
- Luján S et al. (2019) Sperm DNA methylation epimutation biomarkers for male infertility and FSH therapeutic responsiveness. *Scientific Rep* 9:1–12.
- McAninch D, Mäkelä J-A, La HM, Hughes JN, Lovell-Badge R, Hobbs RM, Thomas PQ (2020) SOX3 promotes generation of committed spermatogonia in postnatal mouse testes. *Scientific Rep* 10:1–13.
- Oud MS, Volozonoka L, Smits RM, Vissers LE, Ramos L, Veltman JA (2019) A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Hum Reprod* 34:932–941.
- Peca-Blanco A, García-Sáez AJ (2018) Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J* 285:416–431.
- Punjani N, Lamb DJ (2020) Male infertility and genitourinary birth defects: there is more than meets the eye. *Fertild Steril* 114:209–218.
- Tao L et al (2019) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mediates hepatic stellate cell activation via ALK5/Smad signalling. *Gut* 68:2214–2227.
- Xu Q, Fan W, Ye S-F, Cong Y-B, Qin W, Chen S-Y, Cai J (2016) Cistanche tubulosa protects dopaminergic neurons through regulation of apoptosis and glial cell-derived neurotrophic factor: in vivo and in vitro. *Frontiers in aging neuroscience* 8:295.
- Yi S, Kim J, Lee SY (2020) GDNF secreted by pre-osteoclasts induces migration of bone marrow mesenchymal stem cells and stimulates osteogenesis. *BMB reports* 53:646.
- Yun D et al. (2020) Induction of GDNF and GFR α -1 Following AAV1-Rheb (S16H) Administration in the Hippocampus in vivo. *Experim Neurobiol* 29:164.

Received July 16, 2021

Received September 08, 2021

Accepted September 18, 2022