

泌尿生殖医学

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002602

地西洋结合抑制因子调控胎盘滋养细胞合成类固醇激素基因的表达

黄成渝, 张 雪, 段福梅, 徐增伟, 刘太行, 陈雪梅, 丁裕斌
(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖与发育国际合作联合实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨地西洋结合抑制因子(diazepam binding inhibitor, DBI)是否参与胎盘滋养细胞合成类固醇激素基因表达的调控。**方法:**收集自然流产以及正常孕 6~8 周绒毛组织, Western blot 比较 2 组样本 DBI 蛋白的表达, 免疫组织化学分析 DBI 在绒毛组织中的表达和定位。利用 siRNA 分别敲低 DBI 表达并采用 Forskolin FSK 诱导 BeWo 滋养细胞合体化, 免疫荧光检测 DBI 的蛋白表达, RT-qPCR 检测激素合成酶的表达水平, EdU 试剂盒检测细胞增殖能力。**结果:**自然流产绒毛中的 DBI 较正常组呈现下调表达; FSK 可诱导 DBI 及激素合成酶 P450_{scc}、HSD3 β 1 和 CYP19A1 上调表达; 而敲低 DBI 不仅可以抑制合体化进程, 同时也抑制激素合成酶的表达。**结论:**DBI 可能通过调控 P450_{scc} 介导滋养细胞类固醇激素合成功能, 进而参与胎盘发育。**【关键词】**滋养细胞; 激素合成; 增殖; 自然流产

【中图分类号】R714.21

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-03-24

Diazepam binding inhibitor regulates the expression of steroid hormone synthesis genes in placental trophoblast cells

Huang Chengyu, Zhang Xue, Duan Fumei, Xu Zengwei, Liu Taihang, Chen Xuemei, Ding Yubin
(Joint International Research Laboratory of Reproduction & Development School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the involvement of diazepam binding inhibitor (DBI) in the regulation of anabolic steroid hormone gene expression in trophoblast cells. **Methods:** Villous tissues, from the 6th to the 8th week of gestation, were obtained from normal pregnancy and spontaneous abortion. Immunohistochemistry was used to determine the protein expression and localization of DBI in the tissues while Western blot was used to compare the protein expression of DBI between the two groups. Immunofluorescence was used to determine the protein expression of DBI in BeWo cells. Fusion of BeWo cells was induced with forskolin, and siRNA-mediated knockdown of DBI was used to determine the effect of DBI on the expression of the anabolic hormones. The mRNA expression of hormone synthase was detected by RT-qPCR, and the proliferation ability of the BeWo cells was determined by the EdU kit. **Results:** The expression of DBI in the spontaneous abortion villous tissues was lower than that in the normal group. Forskolin treatment induced the expression of DBI, while DBI knockdown inhibited the expression of P450_{scc}, HSD3 β 1 and CYP19A1, and upregulated hormone synthetase. Also, the number of proliferating si-DBI BeWo cells was decreased. **Conclusion:** DBI may affect trophoblast anabolic hormone gene expression by regulating P450_{scc}. This suggests that downregulation of DBI in the placenta might associate spontaneous abortion.

【Key words】 trophoblast cells; hormone synthesis; proliferation; spontaneous abortion

人胎盘是妊娠时期一种独特的临时性内分泌

作者介绍: 黄成渝, Email: 757063836@qq.com,

研究方向: 胎盘早期发育与疾病。

通信作者: 丁裕斌, Email: dingyb@cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆市委基础科学与前沿技术研究资助项目 (编号: cstc2018jcyjAX0533, cstc2018jcyjAX0309)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200707.2013.022.html>
(2020-07-09)

器官, 主要分泌雌激素、孕激素和绒毛膜促性腺素等激素, 对母体正常妊娠的维持和胎儿生长具有重要作用。胎盘的结构和功能单元是绒毛膜绒毛, 由细胞滋养细胞 (cytotrophoblasts, CTB)、合体滋养细胞 (syncytiotrophoblasts, STB) 和绒毛外滋养细胞 (extravillous trophoblast, EVT) 组成。其中, STB 来源于绒毛状细胞滋养层的聚集和融合, 肩负胎盘的主要内分

泌功能。

地西洋结合抑制因子(diazepam binding inhibitor, DBI)又名酰基辅酶 A 结合蛋白(acyl-CoA-binding protein, ACBP),是负责转运脂酰辅酶 A 的胞内脂质结合蛋白^[1]。DBI 在真核细胞中高度保守,表达于各种细胞类型,是一个具有管家基因性质的因子^[2]。DBI 除了可以存在于细胞质,也可在细胞核表达。这表明其可能参与调节脂酰 CoA 依赖性的核蛋白及转录因子的表达。DBI 能够高亲和结合中链和长链(C14~C22)酰基辅酶 A^[3-4],并参与调节酰基辅酶 A 的转运和代谢,一方面可以从膜双层中提取酰基辅酶 A 酯,进而靶向运输提取的酰基辅酶 A 酯用于磷脂、甘油酯和胆固醇酯的合成^[5];另一方面可以参与类固醇生物合成的调节^[6-7]。DBI 在类固醇生成细胞如肾上腺皮质、前列腺细胞和神经胶质等细胞中高度富集和表达。在脑中,DBI 及其 2 种主要加工产物三齿酸四肽和十八烷神经肽在神经元中分布不均匀,DBI 最高浓度存在于下丘脑、杏仁核、小脑、丘脑、海马和皮质的离散区域。DBI 也存在于特殊的胶质细胞(星形胶质细胞和 Bergmann 胶质细胞)和周围组织中。在周围组织中,DBI 的最高浓度存在于肾上腺皮质球状带和束状带细胞及睾丸间质细胞中^[8]。Papadopoulos V 等^[9]利用 2 个用于线粒体类固醇生成的常见细胞模型——Y-1 肾上腺皮质和 MA-10 细胞系研究发现,这 2 种细胞系中均含有 DBI 及 DBI 加工产物(三齿酸四肽和十八烷神经肽)。大鼠脑中纯化的 DBI 添加到 Y-1 和 MA-10 细胞系,线粒体中孕烯醇酮形成以剂量效应方式增加。三齿酸四肽用类似于 DBI 的方式,剂量依赖性地刺激线粒体类固醇合成^[10]。Garnier M 等^[11]敲低 R2C 睾丸间质细胞的 DBI 后,该细胞不能生成类固醇,这揭示 DBI 不仅在促激素作用下能刺激快速类固醇的合成,在细胞持续性合成类固醇激素中也发挥重要作用。

本研究检测了 DBI 在正常妊娠早孕绒毛及自然流产绒毛中的表达模式,并以滋养细胞 BeWo 细胞系为模型,研究 DBI 对滋养细胞合成类固醇激素基因表达的影响及对滋养细胞增殖能力的影响,初步揭示了 DBI 在调控胎盘滋养细胞功能中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人胎盘绒毛膜癌细胞 BeWo 细胞系由中

院动物所王雁玲教授惠赠。

1.1.2 临床标本 选取 2018 年 10 月至 2019 年 9 月于重庆医科大学附属第一医院手术的 15 例自然流产患者,孕 6~8 周自愿终止妊娠妇女 15 例,人工流产手术 30 min 内收集绒毛组织。该研究得到重庆医科大学生物医学研究伦理委员会批准,所有患者来源的组织样品均获得知情同意书,在诊断时从自然流产妇女中获得了同意。自然流产纳入标准:根据人民卫生出版社出版的《妇产科手册》诊断标准纳入样本。排除标准:合并各种内科或外科合并症,包括糖尿病、高血压、肾炎、心脏病、贫血、肝炎、妊娠期胆汁淤积症、性传播疾病,以及其他内科或外科疾病。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞处理及分组 复苏人绒毛膜癌细胞 BeWo,解冻后置于含体积分数为 10% 的胎牛血清(PAN Sera,德国)、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素(碧云天 C0222,中国)和 20 mmol/L HEPES(Sigma,美国)的 F12K 培养基(博士德 PYG0036,美国)中孵育培养,调整细胞数后接种于 50 mL 培养瓶,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中。待细胞生长融合率达 80%~90% 时使用胰酶消化传代。调整细胞密度分别接种至孔板中孵育,待密度达 70% 时,使用吉玛基因合成的 siRNA 配合全式金公司 EL 转染试剂(FT201)并按照该公司提供的说明书进行 siRNA 转染,siRNA 工作浓度为 80 nmol/L,6 h 后换液。诱导合体化组用含 25 μmol/L Forskolin(sigma f6886;FSK)的完全培养基培养 72 h,每 36 h 更换 1 次培养基。分组:NC(阴性对照)组、DBI siRNA 敲低组、FSK 诱导合体化组、FSK & siRNA 联合处理组。

1.2.2 免疫组织化学 根据免疫组织化学试剂盒(Zhongshan Bio-sciences,中国)说明书进行操作:将 5 μm 石蜡切片经二甲苯脱蜡处理,酒精梯度水化,用枸橼酸盐缓冲液微波炉抗原热修复,3% H₂O₂ 室温孵育;封闭液 37 °C 水浴封闭后滴加稀释比例为 1:150 的 DBI 一抗(Abelonel A13293、博士德 A01267),4 °C 过夜;第 2 天滴加生物素标记的二抗,滴加辣根过氧化物酶标记的抗体,DAB 显色,待显示为棕色时,自来水冲洗终止反应,苏木精复染,梯度脱水后用二甲苯透明,中性树脂(Solarbio,美国)封片后使用奥林巴斯显微镜进行图像采集。

1.2.3 细胞免疫荧光 通过免疫荧光染色确定 DBI 和 E-cadherin 在 BeWo 细胞中的表达强度和模式。经过不同处理后,将细胞在室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 min,用 0.1% TritonX-100 通透液通透 10 min,5% BSA(博士德 AR014)封闭液 37 °C 水浴封闭 1 h,将细胞与兔抗人一抗 DBI(1:200 博士德 A01267)和 E-cadherin(1:200 CST,美国)一起 4 °C 过夜孵育,次日用山羊抗兔(ABKINE A23320)、山羊抗鼠二抗标记(ABKINE A23310),用 DAPI 标记核,通过荧光显微镜使细胞成像,采集图像。使用 Image J 软件对每组 3 个孔中的 4 个随机视野进行统计。

1.2.4 Western blot 通过蛋白裂解液对组织标本与细胞标本中的蛋白质进行提取,用上样缓冲液进行高温变性。预先配制聚丙烯酰胺凝胶,将变性的蛋白标本加入其中,电泳、转膜

和抗体孵育。以 β -actin(博士德 BM5180)、DBI(Abcclonel A13293)为孵育的一抗。将一抗洗去后,孵育二抗,采用通用型 ECL 化学发光显影试剂盒(新赛美 P10300)进行显影,获取蛋白条带,依据条带灰度值以 β -actin 为内参对蛋白含量进行定量分析。

1.2.5 RNA 提取及 RT-qPCR 参照 RNAiso Plus(Takara, 日本)RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA 并测定浓度;参考 PrimeScript™ RT Master Mix(逆转录试剂盒)将 RNA 逆转录成 cDNA,产物置于 -20°C 冰箱冻存备用。使用如表 1 呈现的 RT-qPCR 引物序列,利用 SYBR 试剂盒(全式金,中国)在 BIO-RAD iQ5 荧光实时定量 PCR 仪上进行反应。每组实验至少重复 3 次,以 GAPDH 作为内参。

表 1 定量引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	$T_m/^{\circ}\text{C}$
DBI	上游引物 GTGGCGACATAAAATACAGAACG	60
	下游引物 CTCATTCCAGGCATCCCACTT	
CYP11A1	上游引物 GGTGACAATGGCTGGCTAAAC	60
	下游引物 TGGGTCTCTGGTAATACTGGTGATA	
HSD3 β 1	上游引物 AGTACGTCCACTCTTCTGTCCA	60
	下游引物 TTCTCCTTCACCAAGAGGCG	
CYP19A1	上游引物 GGACCCCTCATCTCCCACG	60
	下游引物 CCCAAGTTTGCTGCCGAAT	
β -hCG	上游引物 GTGAACCCCGTGGTCTCCTA	60
	下游引物 GGTCACTACAGGTCAAGGGG	
GCM1	上游引物 GCCAAGCAAGAGCAGCAAA	60
	下游引物 TCATCTCAAAGGACACAGGTTCA	
TSPO	上游引物 TTCACAGAGAAGGCTGTGGTTC	60
	下游引物 GCCATACGCAGTAGTTGAGTGT	
GAPDH	上游引物 AGATCATCAGCAATGCCTCCT	60
	下游引物 TGCTCATGAGTCCTTCCACG	

1.2.6 EdU 标记实验 细胞按照适合密度接种到 24 孔板中,经处理后,按照 EdU-488 细胞增殖检测试剂盒(碧云天 C0071S)说明书进行操作,每孔加入 500 μL $2\times$ 工作液, 37°C 孵育 2 h, PBS 清洗 3 次,每次 5 min;每孔加 500 μL 4%多聚甲醛固定 30 min,用 0.5% TritonX-100 通透液通透 10 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min;5%BSA 封闭液室温封闭 30 min,每孔加入 200 μL Azide 染色工作液,避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min;再每孔加入 1 min;再每孔加入 Hoechst 33342 溶液 1 mL,室温避光染色 10 min, PBS 清洗 3 次,每次 5 min;通过荧光显微镜观察拍照。

1.3 统计学处理

将数据录入 GraphPad Prism6 统计学软件进行分析,实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,每个实验至少使用 3 个独立样本,并进行至少 3 次重复。多组比较采用单因素方差分析,2 组的组间比较采用独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

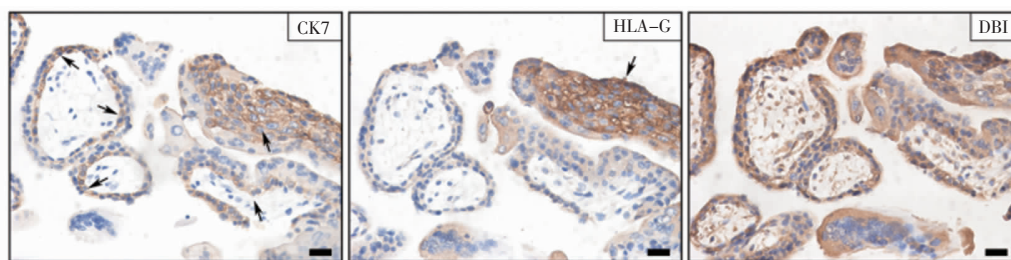
2 结果

2.1 早孕绒毛组织中 DBI 的表达模式

对 6~8 周的早孕胎盘绒毛组织进行连续切片并进行免疫组化染色,用 CK7 标记 CTB,外侧无 CK7 阳性标记者为 STB,HLA-G 标记 EVT,阳性标记细胞如图 1A 箭头所示。结果显示,DBI 在 CTB 层和 STB 层中均有表达,并在 EVT 中高表达(图 1A)。免疫荧光结果与组化分析结果一致,DBI 在绒毛滋养细胞中高表达(图 1B)。

2.2 滋养细胞系中 DBI 的表达模式

利用 cAMP 信号通路激活剂 FSK 诱导 BeWo 细胞系 72 h



A. IHC 分析正常绒毛组织 DBI 的表达



B. IF 分析正常绒毛组织 DBI 的表达

注:CK7 为 CTB marker,HLA-G 为 EVT marker;红色表示 DBI 阳性信号,蓝色为 DAPI 染色核细胞;标尺=50 μm

图 1 早孕绒毛胎盘组织中 DBI 的表达

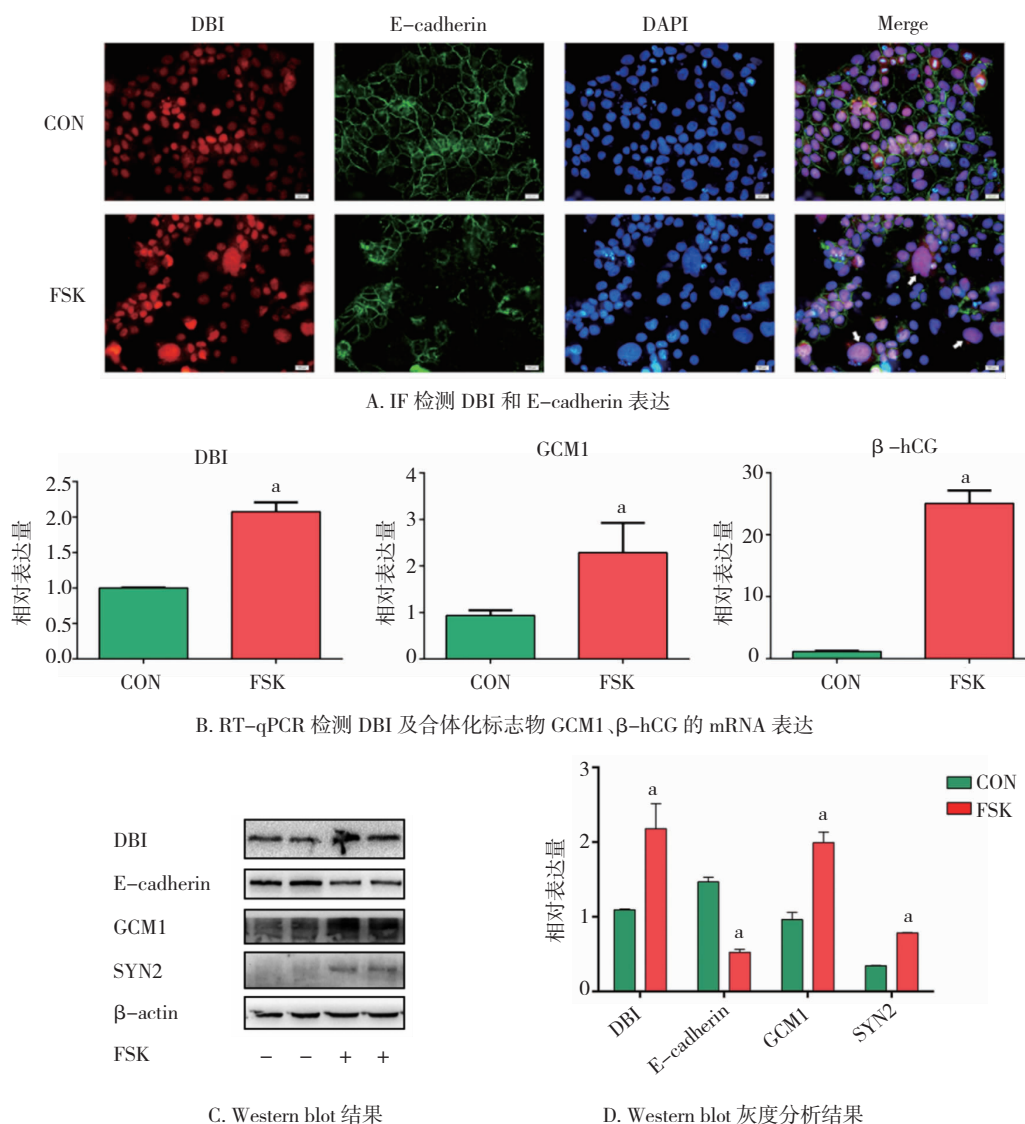
后获得合体滋养细胞,免疫荧光标记 E-cadherin,结果显示其在诱导组表达降低,且诱导组细胞核出现如图 2A 箭头所示的聚集成簇现象。RT-qPCR 检测滋养细胞合体化标志物 GCM1、 β -hCG mRNA 水平表达(GCM1: 0.937 ± 0.064 , 2.287 ± 0.369 , $t=3.601$, $P=0.023$; β -hCG: 1.126 ± 0.087 , 25.050 ± 1.187 , $t=20.114$, $P=0.000$) (图 2B), Western blot 检测 SYN2、GCM1 蛋白水平表达(SYN2: 0.346 ± 0.003 , 0.785 ± 0.005 , $t=72.383$, $P=0.000$; GCM1: 0.963 ± 0.068 , 1.993 ± 0.102 , $t=8.410$, $P=0.014$), 结果显示均明显升高,提示诱导合体化成功(图 2C)。诱导合体化后 DBI mRNA 和蛋白水平(mRNA: 1.000 ± 0.005 , 2.078 ± 0.075 , $t=14.252$, $P=0.000$; 蛋白: 1.096 ± 0.008 , 2.180 ± 0.237 , $t=4.577$, $P=0.045$)均升高(图 2B、C),表明 DBI 的表达伴随合体化进程升高。

2.3 DBI 对滋养细胞激素合成的影响

在 BeWo 细胞中利用 siRNA 靶向敲低 DBI 的表达,RT-

qPCR 和 Western blot 结果显示 siRNA 敲低组细胞 DBI 的 mRNA 和蛋白水平均下调(图 3A、B、C)(mRNA: 1.000 ± 0.005 , 0.336 ± 0.038 , $t=17.413$, $P=0.000$; 蛋白: 1.785 ± 0.094 , 0.527 ± 0.035 , $t=12.563$, $P=0.000$);免疫荧光结果图中可见 DBI 阳性细胞明显减少(图 3D),提示在 BeWo 细胞中成功干扰 DBI 的表达。

为了探索 DBI 对类固醇激素分泌的影响,按以下分组处理 BeWo 细胞:对照 siNC 组、siDBI 敲低 DBI 组、FSK 诱导合体化组以及 siDBI-FSK 联合处理组。RT-qPCR 检测 DBI、 β -hCG 及类固醇激素剪切酶(CYP11A1、HSD3 β 1、CYP19A1)的表达。结果显示,在诱导合体化组中,DBI、剪切酶的表达呈增加趋势,DBI 的敲低减少了类固醇激素剪切酶的表达(DBI: 1.000 ± 0.006 , 0.317 ± 0.013 , 2.078 ± 0.075 , 1.217 ± 0.009 ; β -hCG: 1.000 ± 0.021 , 0.472 ± 0.046 , 29.782 ± 0.033 , 19.791 ± 0.023 ; CYP11A1: 1.000 ± 0.058 , 0.265 ± 0.016 , $8.643 \pm$



注:绿色荧光标记 E-cadherin,红色荧光标记 DBI;标尺=20 μ m;a 表示 $P<0.05$

图 2 在 FSK 诱导 BeWo 细胞建立合体化细胞模型中检测 DBI 表达

0.153, 5.778 ± 0.312; HSD3β1: 1.000 ± 0.063, 0.683 ± 0.042, 7.217 ± 0.474, 2.837 ± 0.159; CYP19A1: 1.000 ± 0.058, 0.265 ± 0.016, 8.643 ± 0.153, 5.778 ± 0.312)(图 4)。DBI 可能参与调控 CYP11A1 及 HSD3β1 等限速酶, 与线粒体内膜孕烯醇酮的产生有关。

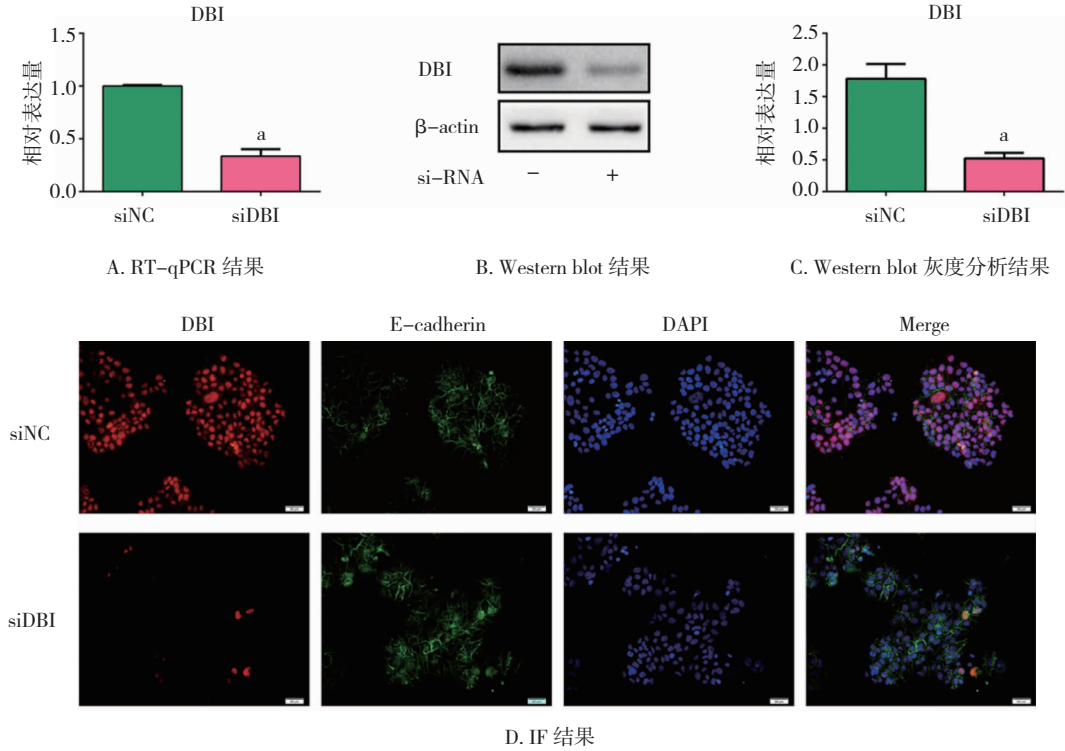
2.4 DBI 影响滋养细胞增殖能力

通过 EdU 实验分析 DBI 对 BeWo 细胞增殖能力的影

响, 结果显示在 siRNA 敲低组和 FSK 诱导组, 阳性(绿色荧光)比例明显低于对照组, 且具有统计学差异(0.645 ± 0.019; 0.526 ± 0.026; 0.358 ± 0.009; 0.295 ± 0.012)(图 5)。

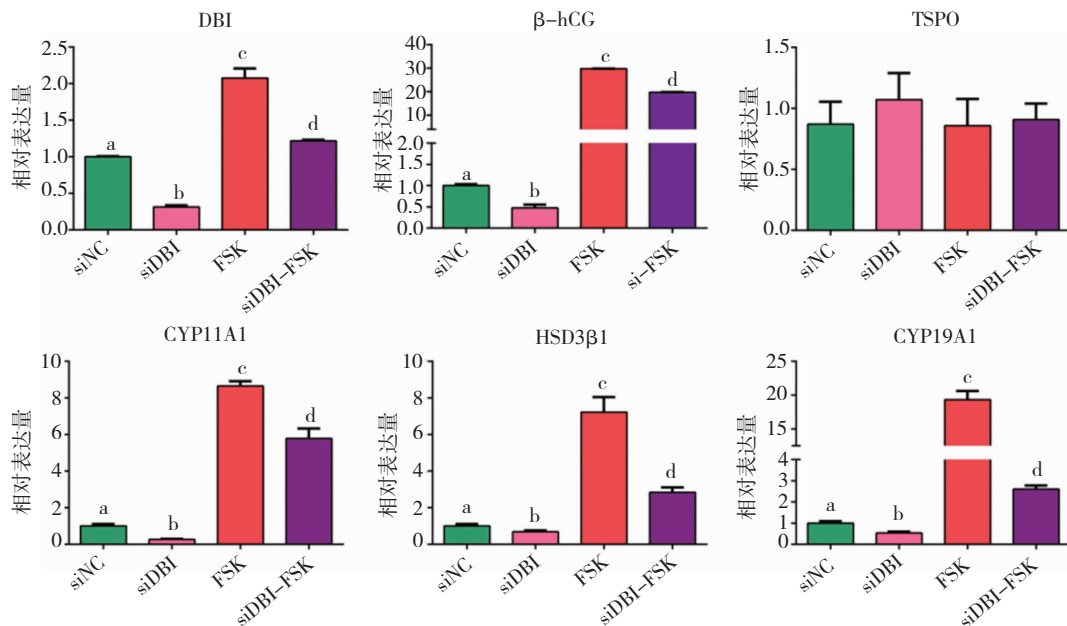
2.5 DBI 在自然流产和正常妊娠绒毛组织中的对比

利用自然流产病例绒毛组织和对照组比较 DBI 的表达差异, Western blot 结果显示自然流产组 DBI 表达量低于对照组(0.496 ± 0.030; 1.020 ± 0.055, $t=8.337$, $P=0.001$)(图 6)。



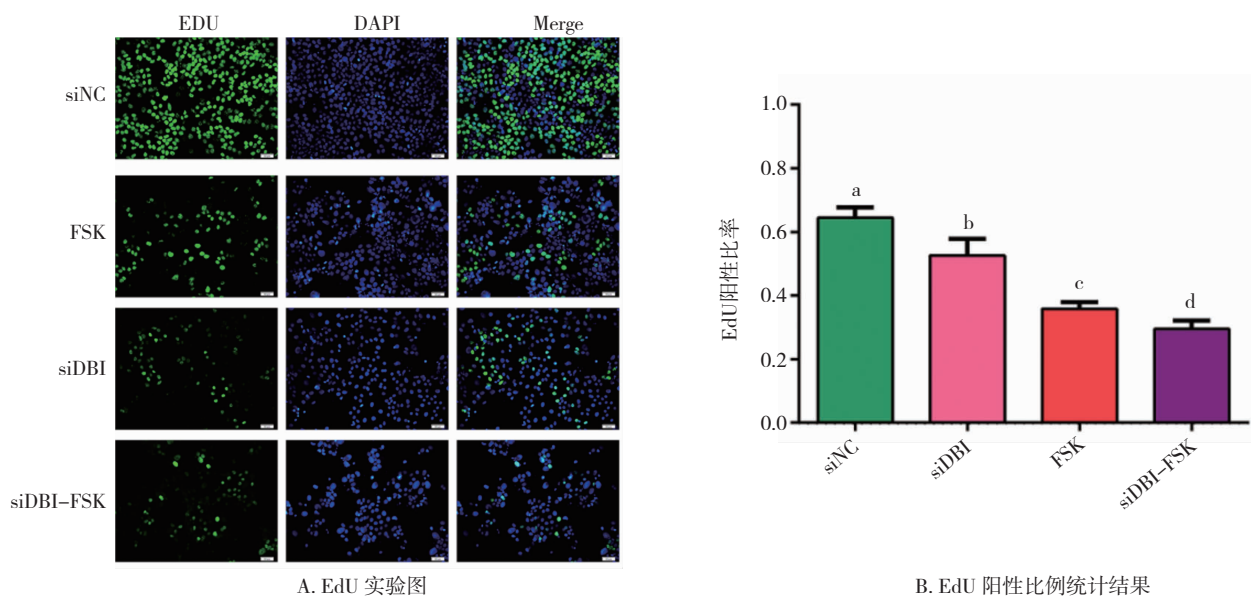
注: 标尺=50 μm; a 表示 $P < 0.0001$

图 3 DBI 敲低验证



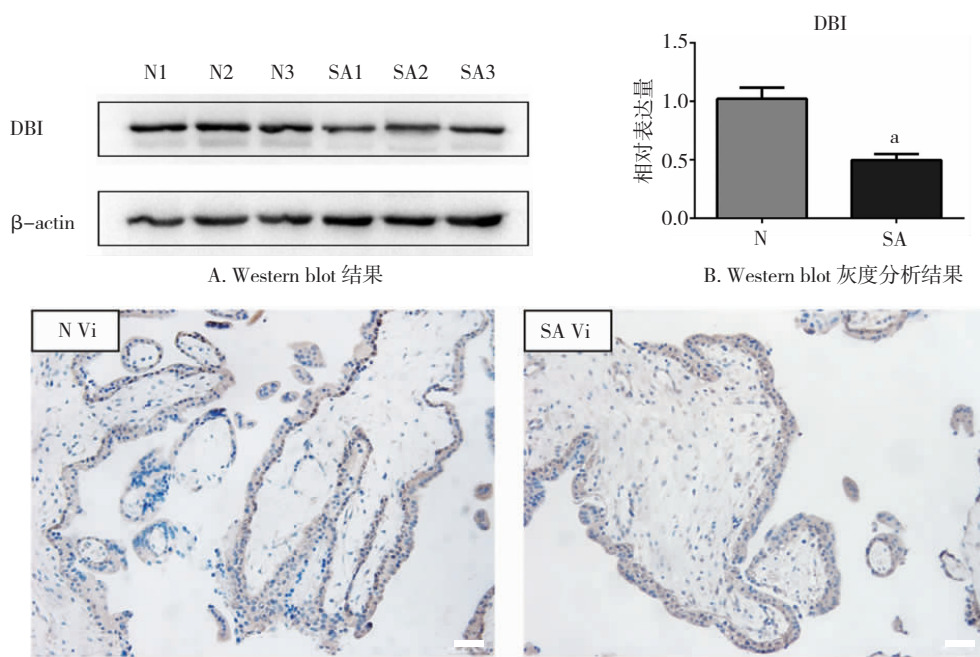
注: 图示为 RT-qPCR 结果; 不同小写字母标记组之间有统计学差异 ($P < 0.05$)

图 4 DBI 对滋养细胞合成激素的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注:标尺=50 μm ;不同小写字母标记组之间有统计学差异($P<0.05$)

图 5 EdU 检测 DBI 敲低后对滋养细胞增殖能力的影响



注:N 指正常妊娠,SA 指自然流产;标尺=50 μm ;a 表示 $P=0.001$

图 6 DBI 在自然流产和正常妊娠绒毛组织中的对比

3 讨论

本研究探究了 DBI 在不同滋养细胞中的表达和分布,提示其可能具有参与调控滋养细胞的功能。进一步采用体外诱导合体化模型结果显示,DBI 在 STB 中表达较 CTB 中高,而 siRNA 敲低 DBI 的表达则能够抑制 STB 的形成,表明 DBI 参与调控滋养

细胞的合体化进程。EdU 检测结果显示,DBI 敲低表达能抑制 BeWo 细胞增殖,进一步揭示 DBI 在调控滋养细胞生长中的功能。

已有研究显示,DBI 参与类固醇生物合成的调节^[6-7]。DBI 在类固醇生成细胞如肾上腺皮质、前列腺细胞、神经胶质及睾丸间质细胞等细胞中高度富集和表达^[8]。Garnier M 等^[11]发现,敲低 DBI 可抑制 R2C 睾丸间质细胞生成类固醇,这揭示了 DBI 不仅

在促激素作用下能刺激快速类固醇的合成,在细胞持续性合成类固醇激素中也发挥重要作用。由于胎盘合成类固醇激素依赖母体和胎儿来源的胆固醇,孕酮在黄体化、维持妊娠中起作用,并且在皮质类固醇和雄激素的合成中起中介作用。本研究利用 BeWo 细胞作为胎盘滋养细胞模型,探索 DBI 在滋养细胞中调控合成类固醇激素表达中的作用。诱导细胞合体化后,DBI 表达的升高也伴随类固醇激素分泌的增加。敲低 DBI 表达后,类固醇激素合成酶,如 CYP11A1、HSD3 β 1、CYP19A1 的表达受到抑制,类固醇激素的分泌也受到抑制。

TSPO 在类固醇形成中起重要作用,其与胆固醇结合的亲和力高,并参与调节胆固醇进入线粒体^[12-13]。TSPO 是一种线粒体外膜蛋白,在与胆固醇识别及相互作用的氨基酸共识识别部位结合胆固醇^[14-15]。 β -hCG 等促激素可通过改变 TSPO 构象,提高其与 DBI 的相互作用,进而启动类固醇合成^[10]。 β -hCG 是胎盘 STB 分泌的重要激素之一,在妊娠启动和维持中发挥重要作用。这提示 DBI 和激素的合成存在正反馈链。DBI 促进类固醇合成的另一条途径是非依赖 TSPO 的,因为 DBI 能够直接促进线粒体内膜孕烯醇酮的产生^[16]。本实验利用 siRNA 干扰 DBI 或者利用 FSK 诱导合体化刺激 DBI 表达后,观察到 CYP11A1、HSD3S1 及 CYP19A1 伴随 DBI 表达的变化呈现降低或升高的趋势,但是 TSPO 却并没有发生变化,提示 DBI 调控甾体激素的表达是不依赖 TSPO 的。

本研究发现,DBI 在自然流产患者的绒毛组织较正常绒毛组织中的表达更低,进一步提示 DBI 的高量表达可能在维持妊娠中发挥重要作用。现已证实, β -hCG 在升高过后过早下降与自然流产相关^[17]。本研究的体外实验结果也显示敲低 DBI 抑制 β -hCG 的表达,提示自然流产可能和胎盘中的 DBI 低水平有关,但有待进一步大样本实验的证实。综上,本研究初步提示 DBI 可能参与调控滋养细胞的功能,且可能与自然流产发生相关。

参 考 文 献

[1] Guidotti A, Forchetti C, Corda M, et al. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80(11): 3531-3535.

[2] Neess D, Küllerich P, Sandberg MB, et al. ACBP--a PPAR and SREBP modulated housekeeping gene[J]. Mol Cell Biochem, 2006, 284(1-2): 149-157.

[3] Rosendal J, Erthjerg P, Kunsend J. Characterization of ligand bind-

ing to acyl-CoA-binding protein[J]. Biochem J, 1993, 290(Pt2): 321-326.

[4] Mandrioli R, Magnani GC, Ugolotti U, et al. Lymphography in malignant lymphomas. Anatomico-radiological correlations[J]. Ateneo Parmense Acta Biomed, 1978, 49(1): 51-60.

[5] Chao H, Zhou M, McIntosh A, et al. ACBP and cholesterol differentially alter fatty acyl CoA utilization by microsomal ACAT[J]. J Lipid Res, 2003, 44(1): 72-83.

[6] Smith GVS, Smith OW. The urinary excretion of estrogenic and gonadotropic hormones during menstrual cycles, the period of conception and early pregnancy[J]. N Engl J Med, 1936, 215: 90814.

[7] Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, et al. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(13): 4897-4901.

[8] Cavallaro S, Korneyev A, Guidotti A, et al. Diazepam-binding inhibitor (DBI)-processing products, acting at the mitochondrial DBI receptor, mediate adrenocorticotrophic hormone-induced steroidogenesis in rat adrenal gland[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(22): 10598-10602.

[9] Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE. The role of diazepam binding inhibitor and its processing products at mitochondrial benzodiazepine receptors: regulation of steroid biosynthesis[J]. Neuropharmacology, 1991, 30(12B): 1417-1423.

[10] Costa E, Guidotti A. Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions[J]. Life Sci, 1991, 49(5): 325-344.

[11] Garnier M, Boujrad N, Ogwuegbu SO, et al. The polypeptide diazepam-binding inhibitor and a higher affinity mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor sustain constitutive steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line[J]. J Biol Chem, 1994, 269(35): 22105-22112.

[12] Culty M, Li H, Boujrad N, et al. *In vitro* studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999, 69(1-6): 123-130.

[13] Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, et al. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis[J]. Steroids, 1997, 62(1): 21-28.

[14] Jamin N, Neumann J, Ostuni M, et al. Characterization of the cholesterol recognition amino acid consensus sequence of the peripheral-type benzodiazepine receptor[J]. Mol Endocrinol, 2005, 19(3): 588-594.

[15] Rone MB, Midzak AS, Issop L, et al. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones[J]. Mol Endocrinol, 2012, 26(11): 1868-1882.

[16] Zirkin BR, Papadopoulos V. Leydig cells: formation, function, and regulation[J]. Biol Reprod, 2018, 99(1): 101-111.

[17] Browne JSL, Henry JS, Venning EH. The significance of endocrine assays in threatened and habitual abortion[J]. Am J Obstet Gynecol, 1939, 38(6): 927-955.

(责任编辑:冉明会)