

网络出版时间: 2022-09-15 07:56 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220913.1746.011.html>

EFHD2 蛋白的缺失对小鼠 Sertoli 细胞紧密连接蛋白的影响

叶晓林¹, 胥国麟¹, 钱体军², 秦凤², 王云涛¹, 程煜航³, 赵文珍¹

摘要 目的 研究 EF-手域蛋白 D2 (EFHD2) 在小鼠睾丸内的定位及表达, 及 EFHD2 蛋白在 Sertoli 细胞中的缺失对紧密连接蛋白组分 Occludin 的影响。方法 取成年小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑及睾丸组织提取总 RNA 和蛋白质, 运用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 EFHD2 在各器官组织中 mRNA 和蛋白质水平的差异性; 运用免疫荧光和免疫组化技术, 检测 EFHD2 在睾丸组织中的定位和表达。运用 siRNA 干扰技术降低 Sertoli 细胞中 EFHD2 来检测 Occludin 蛋白的表达。结果 qRT-PCR 显示 EFHD2 在睾丸中表达量最高; Western blot 结果显示在睾丸组织中表达水平较高; 间接免疫荧光和免疫组化结果显示该蛋白主要分布在 Sertoli 细胞内, 与细胞骨架波形蛋白具有共定位, 即明确该蛋白表达在

Sertoli 细胞。EFHD2 蛋白表达降低后, Occludin 蛋白表达也减少。结论 EFHD2 蛋白在睾丸组织中表达量相对较高, 主要分布于睾丸 Sertoli 细胞中, 与波形蛋白共定位, 且能影响紧密连接蛋白 Occludin 的正常表达。提示 EFHD2 能促进和维持 Sertoli 细胞的细胞连接结构, 为精子发生提供一个稳定的微环境。

关键词 EF-手域蛋白 D2; 睾丸; Sertoli 细胞; Occludin 蛋白; 波形蛋白; 精子发生

中图分类号 R 321.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1744-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.011

2022-06-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82160280); 云南省科技厅科技计划项目(编号: 202101BA070001-041、202101BA070001-108、202001BA070001-084)

作者单位: 大理大学基础医学院¹ 组织学与胚胎学教研室、² 病原与媒介生物研究所, 大理 671000

³ 大理大学 2018 级临床医学专业, 大理 671000

作者简介: 叶晓林 男 硕士研究生;
赵文珍, 女 教授 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zwz6565@qq.com

EFHD2 属于 EF-手域家族成员, 是一个 26.8 ku 大小的高度保守的蛋白质, 由一个低复杂性的带有丙氨酸延伸的 N-末端区域、一个功能性 SH3 结合基序、两个功能性 EF-手结构域和一个 C-末端螺旋结构域组成。研究显示其功能为一种调节因子, 能够调节肌动蛋白构成细胞骨架, 参与成核作用, 同时调节细胞的扩散和迁移^[1-2], 还参与内吞和囊泡运输^[3-4]。目前 EFHD2 在神经系统疾病和肿瘤细胞迁移方面的研究较多, 主要是涉及信号传导及细胞

were used to treat SH-SY5Y cells for 24 h, and then Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to screen the proliferation ability of SH-SY5Y cells; SH-SY5Y cells were treated with NaF and different concentrations of 2-BFI (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 μmol/L) for 24 h, and the proliferation ability of SH-SY5Y cells was detected by CCK-8 assay. The transmission electron microscope was used to observe the mitochondrial morphology, the mitochondrial function was detected by ATP detection kit and Mito-Tracker Red CMXRos kit, cell apoptosis was detected by TUNEL staining, and the expressions of Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 protein were detected by Western blot. **Results** The cell survival rate of SH-SY5Y gradually decreased with the increase of NaF concentration. The selected NaF was 2.0 mmol/L. 2-BFI treatment for 24 h could improve the cell survival rate. At 10 mmol/L, the cell survival rate was higher (99.169%), and 10 mmol/L was selected as the 2-BFI follow-up experimental concentration. Compared with the control group, the mitochondrial morphology of the NaF group changed, ATP levels and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) decreased, the apoptosis rate increased, Bcl-2 protein content decreased, expression of Bax and cleaved caspase-3 protein increased. Compared with Group NaF, 2-BFI administration improved mitochondria morphology, increased ATP levels and $\Delta\psi_m$, reduced cell apoptosis rate, increased Bcl-2 protein content, and reduced Bax, cleaved caspase-3 protein expression. **Conclusion** 2-BFI can improve mitochondrial morphology and function, reduce cell apoptosis, and play neuroprotective role in fluorosis SH-SY5Y cells.

Key words fluorosis; 2-BFI; SH-SY5Y; mitochondria apoptosis

骨架蛋白相关。推测 EFHD2 能够调节肌动蛋白的捆绑影响细胞骨架,参与的细胞内吞和囊泡运输为 Sertoli 细胞的细胞连接的清除和形成提供协助。该研究主要探讨 EFHD2 蛋白的缺失对 Sertoli 细胞连接蛋白成分的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器 荧光显微镜(BX53 ,日本奥林巴斯公司) ,Bio-Rad 成像系统(Bio-Rad XR ,伯乐生命医学产品上海有限公司) ,实时荧光定量 PCR 仪(Stepone Plus ,美国应用生物系统公司) ,伯乐垂直电泳转印系统(Bio-Rad PowerPac™ 基础电泳仪电源 1645050 、小型垂直电泳转印槽 ,伯乐生命医学产品上海有限公司) 。

1.2 主要试剂 艾博抗(上海) 贸易有限公司: Anti-EFHD2 抗体(ab106667) ,Anti-Vimentin 抗体(ab8978) ,Anti-Occludin 抗体(ab167161) ,辣根过氧化物酶标记(HRP) 的山羊抗兔 IgG 二抗(ab6728) ,Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG (ab150113) ,Alexa Fluor594 标记的山羊抗鼠 IgG (ab150116) 。 Biosharp 兰杰柯科技有限公司: PBS 缓冲液(BL601A) 、TBS 缓冲液(BL602A) 。翌圣生物科技(上海) 股份有限公司: Hieff qPCR SYBR Green Master Mix(11202ES08) 、Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (11139ES10) 、碘化丙啶(40711ES10) 。 TRIzol 试剂(15596026) 、Lipofectamine™ 2000 转染试剂(美国赛默飞世尔科技公司) 。 RIPA 组织裂解液(P0013B ,上海碧云天生物技术有限公司) 。 Anti-β-actin 抗体(#4970 ,赛信通上海生物试剂有限公司) 。

1.3 实验动物及细胞 15 只 SPF 级 c57 雄鼠 ,10 周龄 ,体质量(20 ± 2) g ,购自大理大学实验动物中心。于温度 22 ~ 26 ℃ 、湿度 40% ~ 60% 环境中饲养 ,自由饮食、饮水。 TM4 细胞即正常小鼠 Sertoli 细胞 赠予上海交通大学刘悦老师。

1.4 方法

1.4.1 引物设计 运用 Oligo 7 软件设计 qRT-PCR 所需引物 ,引物序列见表 1 。 EFHD2 的 siRNA 由生工生物工程(上海) 股份有限公司代设计 ,序列见表 2 ,并且引物也一并由该公司合成。

1.4.2 qRT-PCR 检测 EFHD2 在各器官组织中 mRNA 水平的表达 分别取 5 只小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸等组织 ,用手持均质器研磨组织 ,采用 TRIzol 法提取各组织总 RNA ,反转录成 cDNA ,并对

表 1 qRT-PCR 涉及引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
β-actin	F: AGCCATGTACGTAGCCATCC R: GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA
EFHD2	F: CAGGGATGGCTTCATCGACC R: CACCTCCTGGATCATACTCTTGA
GAPDH	F: TGAGGTCATGAAGGGTCGT R: CCTCGTCCCGTAGACAAATG

表 2 siRNA 干扰序列

引物名称	引物序列(5'-3')
mEFHD2-731	F: GCAGCGGAAAGCGGGCUUUATT R: UUAAAGGCCGUUUCGGCUGCTT
mEFHD2-474	F: GACGAGGAUUUCGACAGCAAATT R: UUUGCUGUCGAAUCCUCGUU
mEFHD2-308	F: GUUCAAGGAGUUCUCCAGGAATT R: UUCCUGGAGAACUCCUUGAACTT

产物 cDNA 在实时荧光定量 PCR 仪上进行定量扩增 ,每种组织为 EFHD2 及内参 β-actin 各重复 3 次。并对 qPCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析实验数据 ,计算 mRNA 表达水平。

1.4.3 Western blot 法检测 EFHD2 在各组织中的蛋白表达水平 分别取 5 只小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸、卵巢等组织 ,各取 50 mg 加入 1 ml RIPA 裂解液 ,用玻璃研磨器研磨组织 ,抽提蛋白。经 SDS-PAGE 电泳、转膜、 5% BSA 封闭 2 h ,孵育一抗(1 : 1 000 4 ℃ 过夜) ,TBST 洗膜 10 min / 次 ,重复 3 次 孵育二抗(1 : 20 000 室温 1 h) ,使用 ECL 化学发光试剂发光 ,Bio-Rad 成像系统拍照。使用 Image J 进行灰度分析 ,对灰度值进行统计学分析。

1.4.4 免疫酶检测 EFHD2 在睾丸组织的表达 取 5 只小鼠睾丸组织经 Bouin's 液固定、石蜡包埋、切片、抗原修复、 0.1% Triton X-100 打孔、 5% BSA 封闭 ,一抗(1 : 500) 4 ℃ 孵育过夜 ,二抗(1 : 1 000) 孵育 1 h ,DAB 试剂显色 ,苏木精复染 ,光镜观察 EFHD2 在睾丸中的定位和分布情况 ,并且拍照。

1.4.5 间接免疫荧光检测 EFHD2 在睾丸组织中与 Vimentin 共定位情况 取新鲜睾丸组织进行冰冻切片。丙酮固定 15 min 0.5% Triton X-100 打孔 ,5% BSA 封闭 ,一部分切片一抗(1 : 500) 4 ℃ 过夜。二抗(1 : 1 000) 孵育 2 h ,PI 染色荧光显微镜下观察该蛋白在睾丸组织中的分布并且拍照。另一部分切片进行 Anti-EFHD2 抗体和 Anti-Vimentin 抗体双染色 ,镜下观察 EFHD2 和 Vimentin 共定位情况。

1.4.6 脂质体转染法递送 siRNA 进入 TM4 细胞 TM4 细胞接种于 6 孔板。设置 5 个组 ,空白对照

组、阴性对照组、3个干扰序列组。待细胞融合度到40%时,使用 LipofectamineTM 2000 试剂转染 siRNA, siRNA 终浓度为 30 nmol/L。转染 24 h 时, 使用 TR-Izol 试剂提取细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA。48 h 时使用 RIPA 裂解液提取蛋白。

1.4.7 qRT-PCR 检测干扰后各组 EFHD2 相对表达量 提取各组细胞的总 RNA 后,逆转录成 cDNA, 接着进行 qPCR。随后,运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析实验数据,计算 mRNA 表达水平。

1.4.8 Western blot 检测 siRNA 干扰 TM4 细胞 48 h 的 EFHD2 和 Occludin 的相对表达量 提取后的细胞蛋白 经 SDS-PAGE 电泳、转膜、5% BSA 封闭 2 h, 孵育一抗(1:1 000, 4 °C 过夜), TBST 洗膜 10 min/ 次, 重复 3 次, 孵育二抗(1:20 000, 室温 1 h), ECL 化学发光试剂发光,Bio-Rad 成像系统拍照。用 Image J 进行灰度分析, 对灰度值进行统计学分析。

1.5 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9 软件进行数据分析,两组之间运用 t 检验,结果值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EFHD2 在各器官组织中相对表达量 结果显示: EFHD2 在小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑和睾丸等器官组织中均有不同程度的表达, 肝和脑中表达量较其他组织高, 在睾丸中最高(图 1A), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。对 qPCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果说明 qPCR 扩增具有特异性(图 1B)。

2.2 EFHD2 蛋白在各器官组织中相对表达量 实验结果显示: EFHD2 蛋白在小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑和睾丸组织中均有表达, 在肝脏、脑和睾丸组织中表达量较高(图 2)。

2.3 免疫组化结果显示 EFHD2 在 Sertoli 细胞中定位情况 用免疫组化技术检测 EFHD2 蛋白在睾丸组织中的分布情况,结果显示: Sertoli 细胞的胞质周边着色较深,而生精细胞和睾丸间质细胞着色较浅。这表明 EFHD2 蛋白主要分布于 Sertoli 细胞(图 3)。

2.4 EFHD2 在睾丸组织中与 Vimentin 共定位情况 对小鼠睾丸组织进一步进行间接免疫荧光检测,结果和免疫酶标记的检测结果一致, 荧光在 Sertoli 细胞中着色较深, EFHD2 蛋白主要分布于 Sertoli 细胞。此外,还采取了与 Vimentin 免疫荧光共定位检测,结果显示: EFHD2 和 Vimentin(Sertoli 细胞特异性蛋白)在 Sertoli 细胞中荧光染色重叠,验证

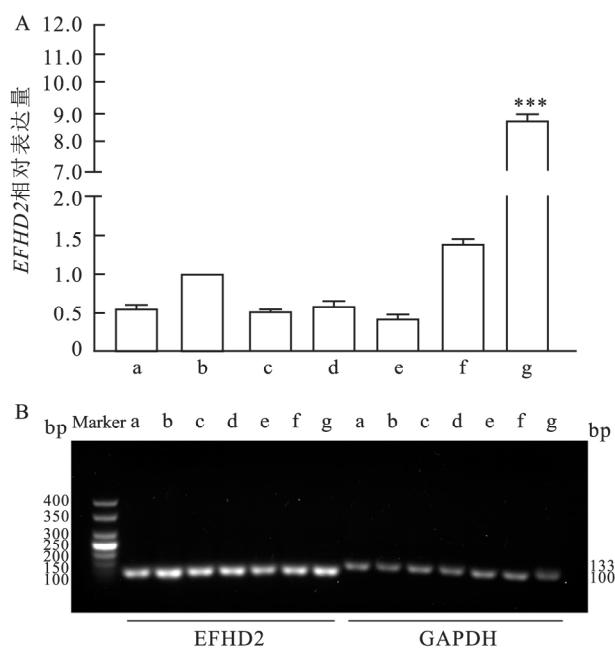


图 1 小鼠各组织中 EFHD2 的相对表达量(A)
与 qPCR 后电泳结果(B)
a: 心; b: 肝; c: 脾; d: 肺; e: 肾; f: 脑; g: 睾丸; EFHD2: 100 bp;
GAPDH: 133 bp; 与肝脏组织比较: *** $P < 0.001$

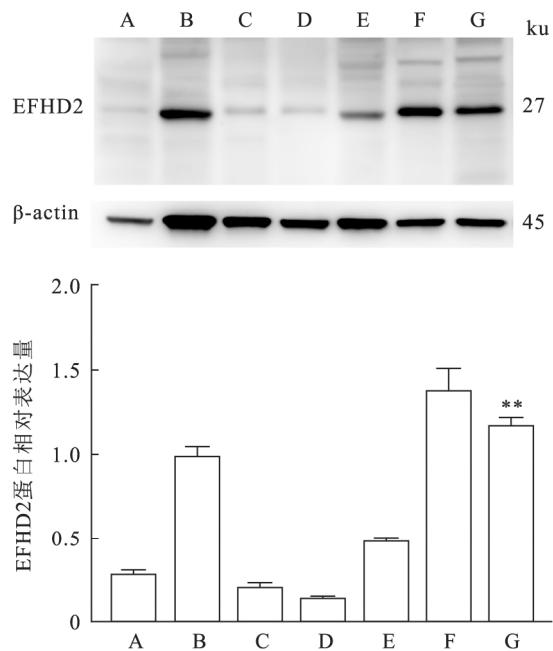


图 2 Western blot 法检测各器官组织中 EFHD2 蛋白的表达
A: 心; B: 肝; C: 脾; D: 肺; E: 肾; F: 脑; G: 睾丸; 与肝组织比较: ** $P < 0.01$

EFHD2 确实是在 Sertoli 细胞表达的(图 4)。

2.5 siRNA 干扰 TM4 细胞 24 h 后 EFHD2 的相对表达量 在进行干扰后 6 h, 对携带绿色荧光蛋白(GFP)的阴性对照序列进行转染效率观察(图 5), 可以观察到已成功将 siRNA 转染进 TM4 细胞。对

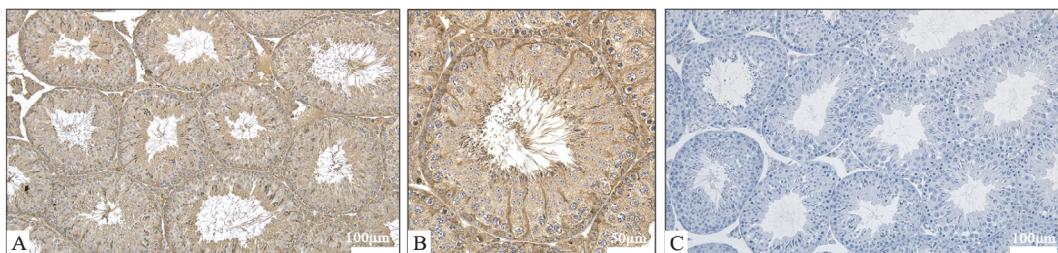


图3 免疫酶技术检测 EFHD2 在小鼠睾丸中的定位情况

A、B: EFHD2 在小鼠睾丸中的定位; C: 不加一抗的对照组; A、C: ×200; B: ×400

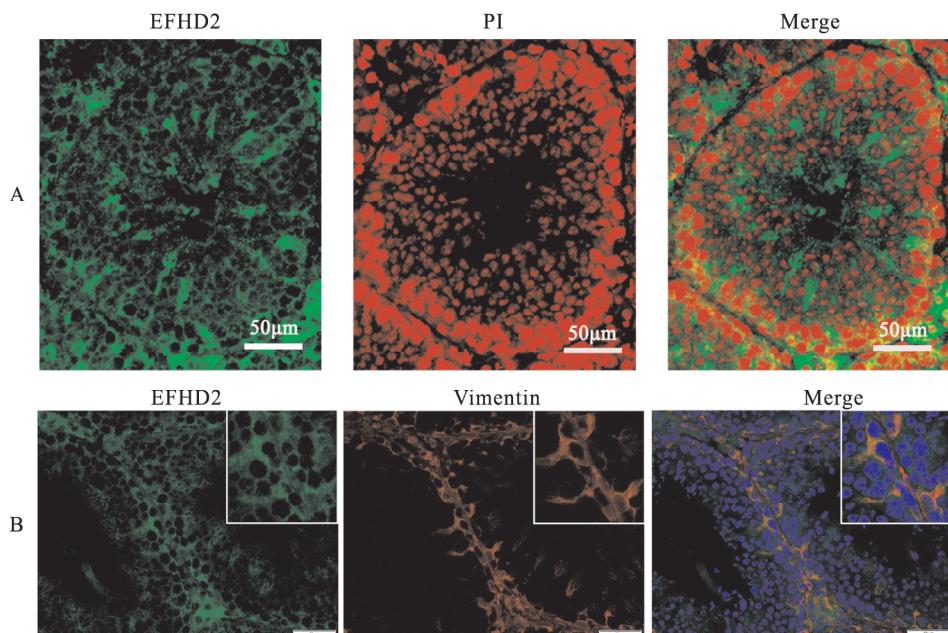


图4 间接免疫荧光技术检测结果

A: EFHD2 在小鼠睾丸中的表达情况 ×400; B: EFHD2 和 Vimentin 在小鼠睾丸中共定位情况 ×400

qRT-PCR 检测结果进行统计学分析,结果显示(图 5B),空白对照组和阴性对照组 EFHD2 相对表达量相近,两组比较差异无统计学意义。mEFHD2-308 与阴性对照组比较表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 siRNA 干扰 TM4 细胞 48 h 后 EFHD2 和 Occludin 的相对表达量 Western blot 结果显示(图 6),mEFHD2-308 的 EFHD2 蛋白表达量较其他组下降较明显,差异有统计学意义($P < 0.0001$)。进一步检测紧密连接蛋白成分 Occludin 的相对表达量,空白对照组和阴性对照组差异无统计学意义;同样是 mEFHD2-308 的下降较其他组明显,差异有统计学意义($P < 0.0001$)。

3 讨论

Sertoli 细胞与生精细胞有着各种细胞连接,通

过各种细胞连接来调节生精细胞的各种状态 Sertoli 细胞底部和基膜相连,构成血睾屏障(blood-testis barrier,BTB)的一部分。BTB 的完整为精子发生提供一个稳定的微环境,血睾屏障的不完整将会影响精子的发生^[5]。细胞连接中的紧密连接、锚定连接和桥粒连接是 BTB 的主要组成成分^[6]。并且,细胞连接周期性的清除和形成是生精细胞向生精小管管腔运动的基础^[7]。细胞连接的清除可以让生精细胞分裂和向管腔运动。细胞连接形成后,生精细胞接收 Sertoli 细胞提供的营养物质进行物质合成,为下一个细胞周期做准备。Sertoli 细胞的稳态是正常生精的基础。Sertoli 细胞的细胞连接调控涉及多个方面。其中细胞骨架成分,如微丝、微管、中间丝及其相关的波形蛋白(Vimentin)等多种蛋白,可通过支持、黏附、信号传导等方式促进和维持 SC 的连接结构^[8-9]。细胞连接结构的清除和形成依赖支持细胞

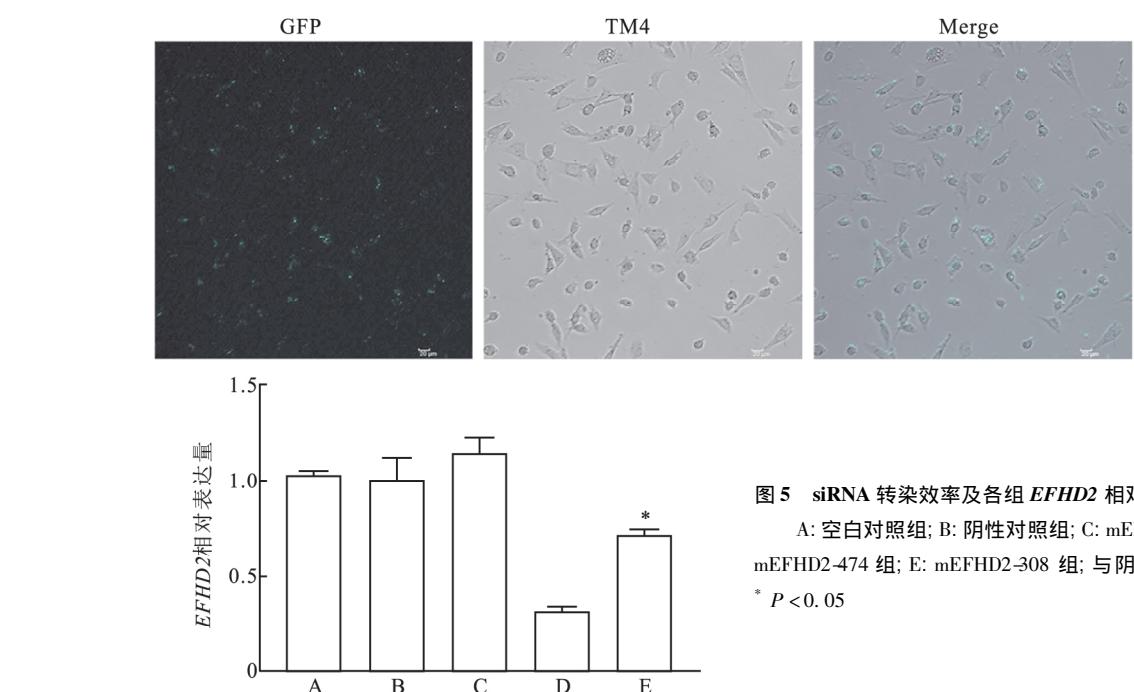


图 5 siRNA 转染效率及各组 EFHD2 相对表达量 $\times 100$
A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: mEFHD2-731 组; D:
mEFHD2-474 组; E: mEFHD2-308 组; 与阴性对照组比较:
 $* P < 0.05$

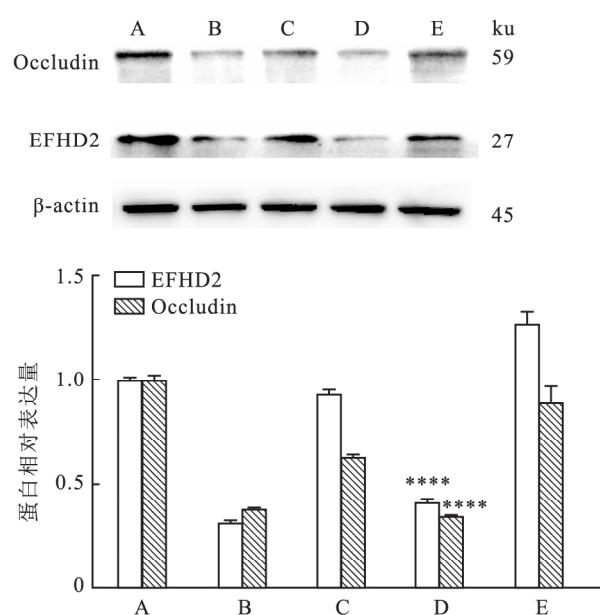


图 6 Western blot 法检测 siRNA 干扰 48 h 后各组 EFHD2 和 Occludin 的表达

A: 阴性对照组; B: mEFHD2-731 组; C: mEFHD2-474 组; D:
mEFHD2-308 组; E: 空白对照组; 与阴性对照组比较: **** $P <$
0.0001

的内吞和囊泡运输,Sertoli 细胞连接的清除和形成还依赖于细胞内吞作用和囊泡运输过程,如通过细胞内吞作用清除细胞连接处的连接蛋白可破坏细胞连接结构;而连接蛋白随着囊泡运输重新与细胞膜融合可在该处形成新的细胞连接。而内吞和囊泡运

输需要细胞骨架蛋白的参与^[10-11]。

紧密连接是构成血睾屏障的主要结构之一,而紧密连接有好几种蛋白构成,有 Occludin、ZO-1、Claudin 等成分^[12]。研究^[13]显示,敲除 Occludin 的小鼠出现了不同程度的生精障碍。

结合 Sertoli 细胞连接需要周期性的清除和形成来维持正常的生精过程。推测 EFHD2 参与 Sertoli 细胞连接的周期性清除和生成。EFHD2 对 Sertoli 细胞内肌动蛋白和骨架蛋白的调节影响了 Sertoli 细胞的细胞连接的周期性开放,从而影响生精细胞的发育。EFHD2 的正常存在对正常生精环境的维持起到了不可或缺的作用。因此本研究观察 EFHD2 在睾丸中的表达和定位,实验结果验证了推测,EFHD2 蛋白在睾丸中表达水平较一般组织要高,且定位在支持细胞(与 Sertoli 细胞特异性蛋白 Vimentin 定位一致)。接着成功地进行了 TM4 细胞的 siRNA 干扰,检测 Occludin 蛋白和 EFHD2 蛋白一样呈下降趋势,验证了在细胞层面,EFHD2 和 Occludin 的合成是有关联的。Occludin 作为 BTB 和紧密连接的蛋白成分,BTB 和紧密连接对精子的发生又十分的重要,那么 Occludin 在 Sertoli 细胞的表达减少将会影响精子的发生。本研究明确了 EFHD2 在小鼠睾丸中的定位及对细胞紧密连接蛋白 Occludin 形成的影响,阐明了 EFHD2 蛋白维持 Sertoli 细胞的稳态起到了重要作用,为继续研究 EFHD2 在睾丸中的作用奠定了基础。

参考文献

- [1] Mun S A ,Park J ,Park K R , et al. Structural and biochemical characterization of EFhd1/Swiprosin-2 , an actin-binding protein in mitochondria[J]. *Front Cell Dev Biol* ,2020 ,8: 628222.
- [2] Regensburger M ,Prots I ,Reimer D , et al. Impact of Swiprosin-1 / EFHD2 on adult hippocampal neurogenesis [J]. *Stem Cell Reports* ,2018 ,10: 347 – 55.
- [3] Tu Y ,Zhang L ,Tong L , et al. EFHD2/swiprosin-1 regulates LPS-induced macrophage recruitment via enhancing actin polymerization and cell migration[J]. *Int Immunopharmacol* ,2018 ,55: 263 – 71.
- [4] Soliman A S ,Umstead A ,Grabinski T , et al. EFhd2 brain interactome reveals its association with different cellular and molecular processes[J]. *J Neurochem* ,2021 ,159: 992 – 1007.
- [5] Chung N P ,Cheng C Y. Is cadmium chloride-induced inter-Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable *in vitro* model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? [J]. *Endocrinology* ,2001 ,142(5): 1878 – 88.
- [6] Wu X ,Gao S ,Wang L , et al. Role of laminin and collagen chains in human spermatogenesis – insights from studies in rodents and scRNA-Seq transcriptome profiling [J]. *Semin Cell Dev Biol* ,2022 ,121: 125 – 32.
- [7] Gungor-Orduer N E ,Tang E I ,Celik-Ozenci C , et al. Ezrin is an actin binding protein that regulates Sertoli cell and spermatid adhesion during spermatogenesis [J]. *Endocrinology* ,2014 ,155: 3981 – 95.
- [8] Mok K W ,Mrak D D ,Lee W M , et al. Rictor/mTORC2 regulates blood-testis barrier dynamics via its effects on gap junction communications and actin filament network [J]. *FASEB J* ,2013 ,27(3): 1137 – 52.
- [9] Vogl A W ,Vaid K S ,Guttmann J A. The Sertoli cell cytoskeleton [J]. *Adv Exp Med Biol* ,2008 ,636: 186 – 211.
- [10] Smith L B ,Milne L ,Nelson N , et al. KATNAL1 regulation of Sertoli cell microtubule dynamics is essential for spermiogenesis and male fertility [J]. *PLoS Genet* ,2012 ,8: e1002697.
- [11] Giricz Z ,Makkos A ,Schreckenberg R , et al. Swiprosin-1 /EFHD-2 expression in cardiac remodeling and post-infarct repair: Effect of ischemic conditioning [J]. *Int J Mol Sci* ,2020 ,21(9): 3359.
- [12] Jauregi-Miguel A. The tight junction and the epithelial barrier in coeliac disease [J]. *Int Rev Cell Mol Biol* ,2021 ,358: 105 – 32.
- [13] Morrow C M K ,Mrak D ,Cheng C Y , et al. Claudin and occludin expression and function in the seminiferous epithelium [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* ,2010 ,365(1546): 1679 – 96.

Effects of EFHD2 protein deletion on tight junction proteins in mouse Sertoli cells

Ye Xiaolin¹ ,Xu Guolin¹ ,Qian Tijun² ,Qin Feng² ,Wang Yuntao¹ ,Cheng Yuhang³ ,Zhao Wenzhen¹

(¹*Dept of Histology and Embryology* ,²*Institute of Pathogens and Vectors School of Basic Medical Sciences* ,
Dali University Dali 671000; ³*Grade 2018 Clinical Medicine Major of Dali University Dali 671000*)

Abstract Objective To study the effect of EFHD2 protein deletion in Sertoli cells on Occludin , a component of tight junction protein and the localization and expression of EF-hand domain family member D2 (EFHD2) in mouse testis. **Methods** Total RNA and protein were extracted from adult mice's heart , liver , spleen , lung , kidney , brain and testis tissues. The mRNA and protein levels of EFHD2 in each organ tissue were detected by qRT-PCR and Western blot. Immunofluorescence and immunohistochemistry detected the localization and expression of EF-HD2 in testicular tissues. SiRNA interference was used to reduce *EFHD2* in Sertoli cells to detect Occludin protein expression. **Results** qRT-PCR showed that the expression of *EFHD2* was the highest in the testis. Western blot results showed that the expression level increased in testis tissue. Indirect immunofluorescence and immunohistochemistry results showed that the protein was mainly distributed in Sertoli cells and co-localized with cytoskeletal Vimentin , indicating that the protein was expressed in Sertoli cells. After the decrease of EFHD2 protein expression , Occludin protein expression also decreased. **Conclusion** The expression of *EFHD2* protein in the testis is relatively high , mainly distributed in Sertoli cells of the testis , co-localized with Vimentin , and can affect the normal expression of tight junction protein Occludin. It is suggested that EFHD2 can promote and maintain the junction structure of Sertoli cells and provide a stable microenvironment for spermatogenesis.

Key words EF-hand domain 2; testis; Sertoli cell; Occludin; Vimentin; spermatogenesis