

生殖细胞特异性转录因子 SOHLH1 敲除雌鼠 在卵巢发育中的作用

闫爱琴

(张掖市第二人民医院 甘肃 张掖 734000)

【摘要】卵巢早衰 (Premature ovarian failure, POF) 是女性 40 岁前由于卵巢内卵泡耗竭或损伤而发生的卵巢功能提前衰竭, 生殖器官提前萎缩, 性功能减退与性能力下降, 丧失生育能力, 卵母细胞发育障碍是其最显著的特征。Sohlh1 为具有螺旋—环—螺旋结构域的生殖细胞特异表达的转录因子, Sohlh1 敲除后会导致雌鼠不孕且卵巢体积严重减少, 且其多个下游基因在 POF 患者中发生突变, 因此将 SOHLH1 作为 POF 的候选基因。为揭示 Sohlh1 敲除小鼠卵巢生殖细胞凋亡及血管发生异常的分子机理, 研究通过对 Sohlh1(-/-) 小鼠胚胎发育不同阶段及出生后不久卵巢的异常表达基因进行功能分析, 进而揭示 Sohlh1 在卵子发生及女性不孕中的作用。

【关键词】SOHLH1; 生殖细胞特异性转录因子; 雌鼠; 卵巢发育; POF; 分子机理

Role of germ cell specific transcription factor SOHLH1 knockout in ovarian development in female mice

Aiqin Yan

(Zhangye Second People's Hospital, Zhangye, Gansu, 734000)

[Abstract] Premature ovarian failure (POF) is a premature ovarian failure, reproductive organ atrophy, sexual dysfunction and decreased sexual ability, loss of fertility due to ovarian follicle depletion or damage in female before 40 years of age. Oocyte development disorder is its most significant characteristics. Sohlh1 is a transcription factor specifically expressed by germ cells with helix-loop-helix domain. The knockout of Sohlh1 can cause infertility and severe reduction of ovarian volume in female mice, and several downstream genes of SOHLH1 are mutated in POF patients, so Sohlh1 is selected as a candidate gene for POF. In order to reveal the molecular mechanism of ovarian germ cell apoptosis and abnormal angiogenesis in Sohlh1 knockout mice, the functional analysis of the abnormal expression genes in the ovaries of Sohlh1(-/-) mice at different stages of embryonic development and shortly after birth was conducted, so as to reveal the role of Sohlh1 in ovulation and female infertility.

[Key words] SOHLH1; Germ cell specific transcription factors; Female mice; Ovarian development; POF; Molecular mechanism

引言

卵巢早衰 (Premature ovarian failure, POF) 是女性在 40 岁之前卵巢丧失正常功能, 其中卵母细胞发育障碍是其最显著的特征^[1]。在继发闭经的妇女中, POF 占 4%~18%; POF 在 40 岁前的女性中发病率约 1%, 是引起不孕的重要原因^[2]。目前 POF 病因从临床上主要包括遗传因素、免疫因素、酶缺陷等, 其中遗传因素被认为是导致 POF 的重要因素, 包括常染色体基因突变、X 染色体基因突变等。在遗传因素中, 大量研究证实 POF 患者的多个生殖细胞特异基因发生突变, 例如 NOBOX、FIGLA、GDF9、POU5F1^[3]。为揭示 POF 的发病机制, 研究通过 PGCs 凋亡发生的时间点筛查、不同时间点卵巢的高通量的表达差异基因筛查、证实特异基因调控关系及基因功能验证, 系统阐释 Sohlh1 缺

失导致新生卵巢原始卵泡池储备下降的分子机理。研究旨在揭示 Sohlh1(-/-) 小鼠卵巢生殖细胞凋亡及血管发生异常的分子机理, 以揭示其在卵泡发生及女性不孕中的作用和意义。研究的创新点有以下两个方面, 一是首次提出 Sohlh1 基因缺失可导致卵巢血管发生异常的观点, 同时通过科学设定小鼠卵巢血管开始形成的时间范围及系统筛查不同时间点来揭示卵巢血管形成的准确时间。二是通过筛查 PGCs 凋亡发生的时间点和不同时间点卵巢的差异表达基因。

1 主要实验方法

1.1 动物模型的制备与透射电镜观察

根据以往的研究, Sohlh1 被列为 POF 的候选基因, 其具有螺旋—环—螺旋结构域, 位于小鼠的第 2 号染色体及人的第 9 号染色体上^[4]。在雌鼠的卵巢

中, *Sohlhl1* 的 mRNA 最早出现于胚胎期的第 13.5 天, 其蛋白具有螺旋—环—螺旋结构域, 且只在原始生殖细胞 (Primordial Germ Cells, PGCs)、原始卵泡 (Primordial Follicle, PF) 和初级卵泡 (Primary Follicles, PrF) 的卵母细胞中表达, 而在次级卵泡及此后阶段卵泡中彻底消失。PGCs 形成于胚胎期的 6.5~7.5 天, 在胚胎期的 7.5~9.5 天迁移至生殖脊, 到胚胎期的 9.5~13.5 天进行有丝分裂, 于胚胎期 13.5 天开始减数分裂 I, 出生时停滞于减数分裂 I 前期的双线期, 并在出生后的 5 天内形成原始卵泡池。成年 *Sohlhl1*(-/-) 雌鼠不孕, 卵巢体积严重减小, 仅为野生型 (WT) 卵巢的 1/10。Sohlhl1(-/-) 小鼠出生后不久, 卵巢卵泡池中储备的 PF 数量严重减少, 且向初级卵泡发育障碍导致卵泡闭锁, 卵泡迅速丢失, 3w 卵巢中已无生殖细胞存在。在新生 *Sohlhl1*(-/-) 卵巢中, 与 POF 相关的 *Gdf9*、*Nobox*、*Figla*、*Pou5f1* 等基因均显著下调。研究通过同源打靶的方式敲除雌鼠的 *Sohlhl1* 的 1-3 外显子, 使 *Sohlhl1* 蛋白的 bHLH 结构域缺失。根据前期研究准备, 推测 *Sohlhl1* 缺失导致小鼠出生后不久卵巢卵泡池耗竭通过两个阶段完成, 一个阶段是 *Sohlhl1* 缺失导致 PGCs 大量凋亡, 导致小鼠出生后 5 天内形成的卵巢卵泡池储备的原始卵泡数量大幅下降。另一个阶段是可以形成少量原始卵泡, 但 *Sohlhl1*(-/-) 雌鼠出生后不久卵巢血管发生异常, 导致卵泡闭锁, 卵泡池耗竭, 具体内容见图 1。

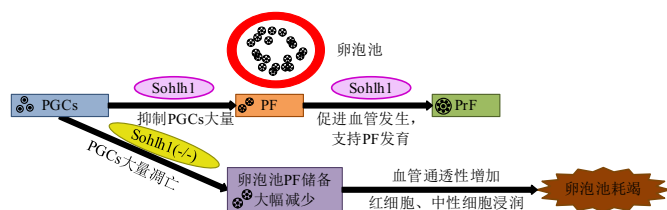


图 1 *Sohlhl1*(-/-) 卵巢卵泡池耗竭原理

在前期的工作中, 研究通过透射电镜观察发现, *Sohlhl1*(-/-) 卵巢充血、红细胞和中性粒细胞浸润于卵巢间质及 PGCs 细胞大量凋亡均发生于出生前后 (7d), 成年后 *Sohlhl1*(-/-) 卵巢无卵母细胞且卵巢充血现象消失。此外在 7dpm 小鼠卵巢中已经观察到毛细血管结构, 因此研究将 13.5dpc 设置为观察时间范围的起点, 将 10dpm 设置为观察时间点的终点。实验需手术摘取 8w WT、*Sohlhl1*(-/-) 雌鼠的卵巢, 放置在 Bouin's 固定液中固定, 然后通过水洗、乙醇脱水等步骤, 就可在透射电镜下观察卵巢组织结构。在 13.5dpc~10dpm 的时间范围内, 每间隔 2d 设立 1 个观

察时间点 (13.5dpc、15.5dpc、17.5dpc、19.5dpc、出生、2d、4d、6d、8d、10d)。在每个时间点, 统计 PGCs 数量, 利用 TUNEL 细胞凋亡检测统计 PGCs 凋亡指数 (凋亡指数 = TUNEL 染色阳性 PGCs 数 / 总观察 PGCs 数)。然后利用红细胞、中性粒细胞的表面蛋白及血管内皮细胞间的连接蛋白 Cd31 抗体染色后进行免疫荧光观察。最后获得血管及血细胞在卵巢内的分布图像, 根据血管与血细胞位置的重合情况, 判断血管的通透性 (若通透性提高, 血细胞浸润于卵巢间质中, 荧光在卵巢内呈弥散分布; 若通透性正常, 血细胞局限于血管中, 荧光在卵巢内标示出血管位置, 应呈“树枝状”分布)^[5]。

1.2 *Sohlhl1* 下游参与 PGCs 凋亡及血管发生相关基因的实验

探究基因 *Sohlhl1* 下游参与 PGCs 凋亡及血管发生相关基因的功能的实验有以下四个, 一是利用体外培养 PGCs 细胞, RNA 干扰 PGCs 凋亡相关基因后, 利用 TUNEL 染色观察 PGCs 细胞的凋亡率。二是利用胎鼠卵巢一中肾复合体组织培养, RNA 干扰及培养基中加入抗体, 分别在 mRNA 水平和蛋白水平干扰血管发生的相关基因的表达, Cd31 抗体免疫荧光后观察卵巢血管通透性。三是血管内皮细胞体外培养, RNA 干扰及培养液中加入抗体, 显微镜下观察体外培养的血管内皮细胞间的聚合情况, 判断目的基因与血管通透性间的关系。四是怀孕母鼠从见阴道栓开始, 通过尾静脉注射血管发生基因的抗体, 通过血液循环中和卵巢中的血管发生基因, H.E 染色血管计数统计, Cd31 抗体免疫荧光, 观察对出生 0d 和 7d 仔鼠卵巢血管的影响。

1.3 CHIP 与 EMSA 法筛选与确定 *Sohlhl1* 直接调控的凋亡及血管发生相关基因

研究利用染色质免疫沉淀技术 (Chromatin Immunoprecipitation Technique, ChIP) 初步筛选 *Sohlhl1* 直接调控的凋亡及血管发生相关基因, 再分别利用凝胶迁移实验 (Gel Migration Experiment, EMSA) 和双荧光素报告基因技术验证 ChIP 获得的 *Sohlhl1* 直接调控的凋亡及血管发生相关基因。最后探讨 *Sohlhl1* 缺失导致卵巢血管发生异常的机制, 对揭示 POF 临床病因、早期诊断和治疗提供新思路和新靶点。

1.4 基因芯片检测

研究通过选取上述实验获得的 PGCs 凋亡及血管发生异常的时间点, 利用表达谱基因芯片高通量筛查 *Sohlhl1* 基因敲除小鼠卵巢差异表达基因, 利用生物信息学软件将差异表达基因按照基因功能聚类, 对凋亡

及血管发生相关的差异表达基因进行 Real-time PCR 验证。研究使用 Trizol 提取 6 只 8w *Sohlh1*(-/-) 雌鼠的卵巢组织 RNA, 使用小鼠表达谱基因芯片筛查获取差异性基因。

2 实验结果

基因 *SOHLH1* 敲除雌鼠胚胎期 13.5d~ 出生后 7d 卵巢形态与组织学的观察结果, 成年 *Sohlh1*(-/-) 雌鼠卵巢体积严重减小, 无卵泡结构, 卵泡发育受阻。在成年 *Sohlh1*(-/-) 雌鼠卵巢中, *FSHR* 并未表达缺失。成年 *Sohlh1*(-/-) 雌鼠卵巢中布满棕色的凋亡细胞。其次是透射电镜 7d *Sohlh1*(-/-) 卵巢的观察结果, PGCs 细胞核染色质聚集形成浓缩的染色质块, 大量凋亡; 红细胞及中性粒细胞在卵巢间质和原始卵泡中呈弥散性浸润, 提示卵巢血管发生异常, 导致血管通透性升高, 提示 *Sohlh1* 与卵巢血管发生有密切关系。上述结果表明基因 *SOHLH1* 却时候会造成成年雌鼠卵巢细胞广泛且大量的凋亡, 卵母细胞中线粒体结构受到损失, 进而导致卵泡发育受到阻碍, 造成 *Sohlh1*(-/-) 不孕。然后是基因 *SOHLH1* 敲除雌鼠卵巢的筛查的差异表达基因的结果, 基因 *SOHLH1* 敲除雌鼠缺失会造成 2788 个基因表达产生差异, 在进一步的聚类分析后发现全部基因中包括 15 种 TGF- β 信号通路的相关基因、67 种配子发生与生殖细胞特异相关基因以及 86 种凋亡相关基因。此外成年小鼠卵巢细胞大量凋亡; 7d *Sohlh1*(-/-) 卵巢严重充血, 但成年后卵巢充血消失。在双荧光素酶报告基因的实验结果中, 转录因子 *Sohlh1* 可显著上调 *Kit* 启动子转录活性。新生小鼠卵巢血管由内皮祖细胞组装而成, *Kit* 与其配体 (*Kitl*) 在血管发展中也具有重要作用, 分别位于不同内皮祖细胞表面的 *Kit* 和 *Kitl* 将内皮祖细胞“锚定”在一起。

最后在 CHIP 结果中, 成年雌鼠卵巢, 转录因子 *Yin-Yang1* (*Yy1*) 结合于 *Sohlh1* 转录起始位点上游 -2087bly~-2079bp(GACCATCAC) 区域, 证明在体内 *Yy1* 与 *Sohlh1* 启动子特异结合; 证实 *Sohlh1* 结合于雌鼠卵巢 *Nlrp5* 启动子上的 -1146 ~ -1141bp(CACGTG); *Nlrp14* 启动子上的 -417 ~ -412bp(CAGCTG) 等位点的 E-Box。上述结果显示, 研究通过 CHIP 实验确定了 *SOHLH1* 蛋白与 *c-Kit* 启动子直接结合, 然后通过双荧光素酶报告基因验证染色质免疫沉淀 (ChIP) 实验获得的 *SOHLH1* 蛋白结合位点。此外得到的基因 *SOHLH1* 敲除雌鼠卵巢生殖细胞凋亡及血管发生异常的分子机

理如下, 卵巢功能与血管发生密切相关, 临床 POF 患者卵巢间质部血管网生成减少, 卵巢体积减小且纤维化, 血管纤细或无血管结构。小鼠卵巢血管由来源于中肾的血管内皮细胞组合而成, 但在胚胎期 13.5 天时卵巢内尚未形成血管; 小鼠卵巢淋巴管形成于出后的第 10 天, 这与 *Sohlh1* 的表达时间相吻合。在新生小鼠的精原细胞中, *Sohlh1* 可与其同家族成员 (*Sohlh2*) 形成异源二聚体, 直接调控 *Kit* 转录。

3 结论

针对目前雌鼠卵巢血管具体形成时间不清楚的问题, 以及 *Sohlh1* 缺失导致卵巢血管发生异常的分子机理不明晰的问题, 研究运用相关分子生物学技术探索其分子机理。研究结果显示, 在雌鼠卵巢中, 转录因子 *SOHLH1* 直接调控 *c-Kit*。此外卵巢功能与血管发生密切相小鼠卵巢血管由来源于中肾的血管内皮细胞组合而成, 但在胚胎期 13.5 天时卵巢内尚未形成血管; 小鼠卵巢淋巴管形成于出后的第 10 天, 进而揭示了 *Sohlh1*(-/-) 小鼠卵巢血管发生异常的时间点和分子机理。研究可通过结果明确 *SOHLH1* 对 *c-Kit* 的直接调控作用, 对揭示 POF 临床病因、早期诊断和治疗提供新思路和新靶点。

参考文献:

- [1] 焦雪. 染色体核型及转录因子 *SOHLH2*、*NR5A1* 在卵巢早衰发病机制中的作用研究 [D]. 山东: 山东大学, 2014.
- [2] 刘霞, 周凡茹, 谈秀娟, 等. 从卵巢血管形成论活血法治疗卵巢早衰的机制 [J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(4):504-507.
- [3] 占雷, 吴志南, 宋晓雪, 等. 全外显子组测序研究卵巢早衰特异性变异关联的生物学过程 [J]. 中华生殖与避孕杂志, 2020, 40(5):400-406.
- [4] 乔延召, 刘国乾, 陶剑, 等. 生殖细胞特异性基因 *SOHLH1* 与 *SOHLH2* 的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2020, 56(2):7-11.
- [5] Keller S B, Averkiou M A. The Role of Ultrasound in Modulating Interstitial Fluid Pressure in Solid Tumors for Improved Drug Delivery[J]. Bioconjugate chemistry, 2022, 33(6):1049-1056.

X 项目名称: *Sohlh1* 基因敲除鼠卵巢血管发生异常的分子机制研究。

项目编号: 21JR1RG312。