

## 电子呼吸链对早期雌性生殖细胞发育的影响

朱佳伟,沈 聪,刘媛媛,李 红\*

南京医科大学附属苏州医院生殖与遗传中心,江苏 苏州 215002

**[摘要]** 目的:观察阻断电子呼吸链对早期雌性生殖细胞发育的影响。方法:取12.0 dpc(days postcoitum,交配后天数)雌性小鼠生殖嵴进行体外培养,经抗霉素A(antimycin A,AMA)作用后运用免疫荧光技术分别检测正常组、对照组以及实验组生殖细胞相关的分子标记物:DDX4(DEAD Asp-Glu-Ala-Asp box polypeptide 4)、 $\gamma$ -H2AX(the phosphorylated form of Histone H2AX)、OCT4(POU domain, class 5, transcription factor 1)及STRA8(stimulated by retinoic acid gene 8)的表达,试剂盒检测ATP和ROS含量,观察阻断电子呼吸链对早期雌性生殖细胞发育的影响。结果:AMA作用后雌性生殖嵴发育明显阻滞。进一步研究提示AMA处理后导致三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)明显下降而活性氧(reactive oxygen species,ROS)显著增加,从而可能导致减数分裂起始异常。结论:电子呼吸链与雌性小鼠生殖嵴的发育关系密切。

**[关键词]** 电子呼吸链;生殖嵴;减数分裂

**[中图分类号]** R329.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2018)08-1064-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20180810

## Effect of electronic respiratory chain on the development of early female germ cells

Zhu Jiawei, Shen Cong, Liu Yuanyuan, Li Hong\*

Center for Reproduction and Genetics, Suzhou Hospital Affiliated to NMU, Suzhou 215002, China

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of blocking electronic respiratory chain on the development of early female germ cells. **Methods:** We labeled normal, control and treatment group with germ cells associated markers: DDX4 (DEAD Asp-Glu-Ala-Asp box polypeptide 4),  $\gamma$ -H2AX (the phosphorylated form of Histone H2AX), OCT4 (POU domain, class 5, transcription factor 1) and STRA8 (stimulated by retinoic acid gene 8) to assay the effects of the early female germ cells after blocking the electron respiratory chain by antimycin A (AMA). **Results:** 12.0 dpc (days postcoitum) female mice gonads were cultured *in vitro*, and we found aberrant gonadogenesis after treatment with AMA, showing obviously decreased ATP (adenosine triphosphate) and increased ROS (reactive oxygen species), thus, leading to the abnormal meiosis initiation. **Conclusion:** The electron respiratory chain was highly linked with the gonads development in female mice.

**[Key words]** electron respiratory chain; gonads; meiosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08): 1064-1069]

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)通过减数分裂分化成雌雄配子是包括人类在内的真核生物最根本的生命现象之一。在小鼠中,PGCs在10~11 dpc(days postcoitum,交配后天数)迁移到生殖嵴并大量增殖。对于雌性而言,PGCs从13.5

dpc开始陆续进入减数分裂,经历细线期(leptotene)、偶线期(zygotene)、粗线期(pachytene)和双线期(diplotene),最终阻滞在网线期(diakinesis)。而雄性PGCs则是在13.5 dpc后进入有丝分裂阻滞,直到出生后才恢复有丝分裂<sup>[1-3]</sup>。目前,虽然对于生殖嵴早期发育调控已有较多研究,但是精确机制仍需阐明<sup>[4]</sup>。在前期工作中,通过蛋白质组学平台成功构建了小鼠雌、雄生殖嵴定量差异蛋白谱,并且后期的实验提示线粒体电子呼吸链的稳态对于雌性生殖嵴睾丸索的形成至关重要,而其对于雌性生殖

**[基金项目]** 苏州市临床医学专家团队引进(SZYJTD201708);苏州市男性生殖研究重点实验室(SZS201718)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: hongliszivf@163.com

嵴的影响却未见报道<sup>[5]</sup>。线粒体通过氧化磷酸化(OXPHOS)为真核细胞提供能量,为非增殖的细胞提供大部分细胞内所需的能量——三磷酸腺苷(ATP)。氧化磷酸化过程由线粒体呼吸链5种不同的复合物完成,线粒体呼吸链复合物I~V。已有研究表明线粒体除了是细胞有氧呼吸和供能的场所,同时也是细胞中产生活性氧(ROS)的一个重要部位,ROS在启动和调节细胞周期的过程中扮演着重要的角色<sup>[6]</sup>。本文旨在探讨线粒体电子呼吸链与早期雌性生殖细胞发育的联系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

CD1小鼠(南京医科大学动物实验中心),所有动物实验得到南京医科大学动物伦理委员会授权通过。饲养的环境维持在20~22℃,12 h/12 h昼夜周期,50%~70%湿度的环境下。交配后次日上午阴道见栓记为0.5 d。收集12.0 dpc雌性小鼠生殖嵴做后续实验。

抗DDX4抗体(Abcam公司,美国),抗OCT4抗体(Santa Cruz公司,美国),抗 $\gamma$ -H2AX抗体、抗STRA8抗体(Abcam公司,美国)。Alexa Fluor系列的荧光二抗(Invitrogen公司,美国)。抗霉素A(AMA, Sigma公司,美国),ATP测定试剂盒(S0026,上海碧云天公司),ROS测定试剂盒(GMS10016.3 V.A, Genmed公司,美国)。RM2235切片(Leica公司,德国);LSM510激光共聚焦显微镜(蔡司公司,德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 组织培养

新鲜取下的12.0 dpc雌性生殖嵴在铺着2%琼脂的小室中放置,于含有DMEM-F12/ $\alpha$ -MEM,10%胎牛血清的基础培养液中培养。培养箱条件是37℃恒温,5% CO<sub>2</sub>。

#### 1.2.2 实验分组

体外培养的雌性生殖嵴分别设正常组、对照组和实验组。其中正常组是基础培养液,对照组是添加DMSO后的基础培养液(AMA用DMSO溶解),实验组是添加10  $\mu$ mol/L AMA后的基础培养液。为观察AMA作用对原始卵泡生成影响,12.0 dpc雌性生殖嵴在10  $\mu$ mol/L AMA作用48 h后移至基础培养液培养至3 dpp(days postpartum,出生后天数);为观察AMA作用对减数分裂的影响,12.0 dpc雌性生殖嵴在10  $\mu$ mol/L AMA作用48 h后移至基础培养液培养至14.5 dpc。每次实验各组中12.0 dpc雌性生殖嵴

为6个,实验共重复3次,每次实验处死12.0 dpc的孕鼠2只。

#### 1.2.3 样本制备

培养后的组织经4% PFA固定过夜,经50%、70%、80%、90%、100%梯度酒精脱水,常规石蜡包埋。切片厚度为5  $\mu$ m,65℃温箱烤干过夜后室温保存。

#### 1.2.4 免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色

组织经100%、90%、80%、70%梯度酒精脱水后采用酸性抗原修复。1%BSA室温封闭2 h后加一抗,其中DDX4稀释比例(1:400),OCT4稀释比例(1:500), $\gamma$ -H2AX稀释比例(1:500),STRA8稀释比例(1:200),4℃过夜。次日经PBS洗涤后加荧光标记的二抗(1:1 000)室温孵育1 h。甘油封片,避光保存,拍照。

#### 1.2.5 ATP含量测定

使用ATP检测试剂盒测量各组的ATP水平。先将正常组、对照组、实验组中的组织分别加入20  $\mu$ L裂解液,然后用匀浆器进行匀浆裂解组织,裂解后4℃12 000 g离心5 min,取上清,用于后续的测定。标准品设0.1、1.0、10.0和100.0  $\mu$ mol/L这4个浓度以制备标准曲线。加50  $\mu$ L ATP检测工作液到检测管中,每组设3个复孔。在各组检测管内加上5  $\mu$ L样品,迅速混匀,间隔2 s后,立即用荧光分光光度计测定相对发光单位(relative light unit, RLU)值。根据标准曲线计算样品中的ATP浓度。

#### 1.2.6 ROS含量测定

使用ROS检测试剂盒测量各组的ROS水平。将正常组、对照组、实验组中的组织分别放入预冷的4个1.5 mL EP管内,加入500  $\mu$ L清理液(Reagent A)浸泡15 s,取出组织放入24孔板内,加入500  $\mu$ L含有染色液(Reagent B)和稀释液(Reagent C)的染色工作液,放入37℃培养箱避光孵育20 min后用荧光分光光度计检测,根据读数将各组RFU减去内参RFU得出各组实际RFU,即对应的ROS含量。

### 1.3 统计学方法

数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间无数比较采用单因素方差分析,采用SPSS13.0软件进行统计分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AMA作用后影响原始卵泡生成

AMA是经典的电子呼吸链复合物III的抑制剂<sup>[7-8]</sup>。12.0 dpc雌性生殖嵴在10  $\mu$ mol/L AMA作

用48 h后移至基础培养液培养至3 dpp,运用免疫荧光技术,通过标记 DDX4(生殖细胞标志物)发现实验组中原始卵泡数目明显减少,几乎不存在(图1)。

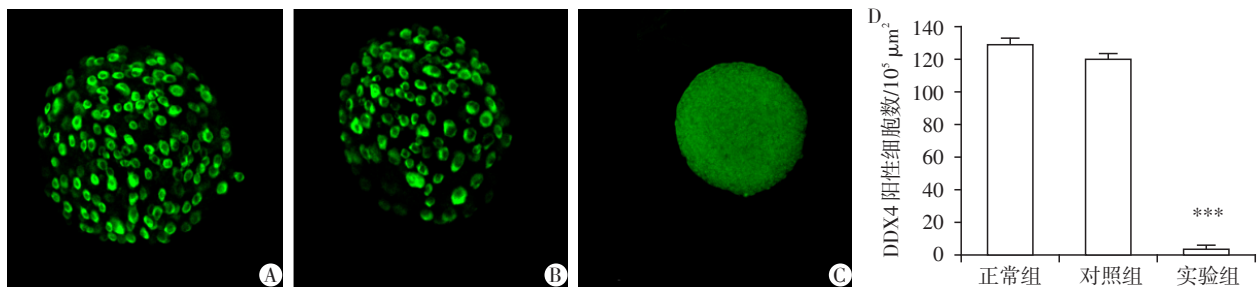
### 2.2 AMA作用后阻滞减数分裂

由于12.0 dpc 雌性生殖嵴在10  $\mu\text{mol/L}$  AMA作用48 h后移至基础培养液培养至3 dpp几乎不存在生殖细胞,为了进一步探究表型最早出现的时间点,我们将12.0 dpc 雌性生殖嵴在10  $\mu\text{mol/L}$  AMA作用48 h

后移至基础培养液培养至14.5 dpc 收样,免疫荧光显示实验组相对于正常组和对照组 DDX4 阳性细胞数目无明显变化,但 $\gamma\text{H2AX}$ (减数分裂中生殖细胞DNA断裂的标志物)阳性细胞几乎不存在。这一结果提示AMA处理后减数分裂的进程被阻断。

### 2.3 线粒体电子呼吸链阻断

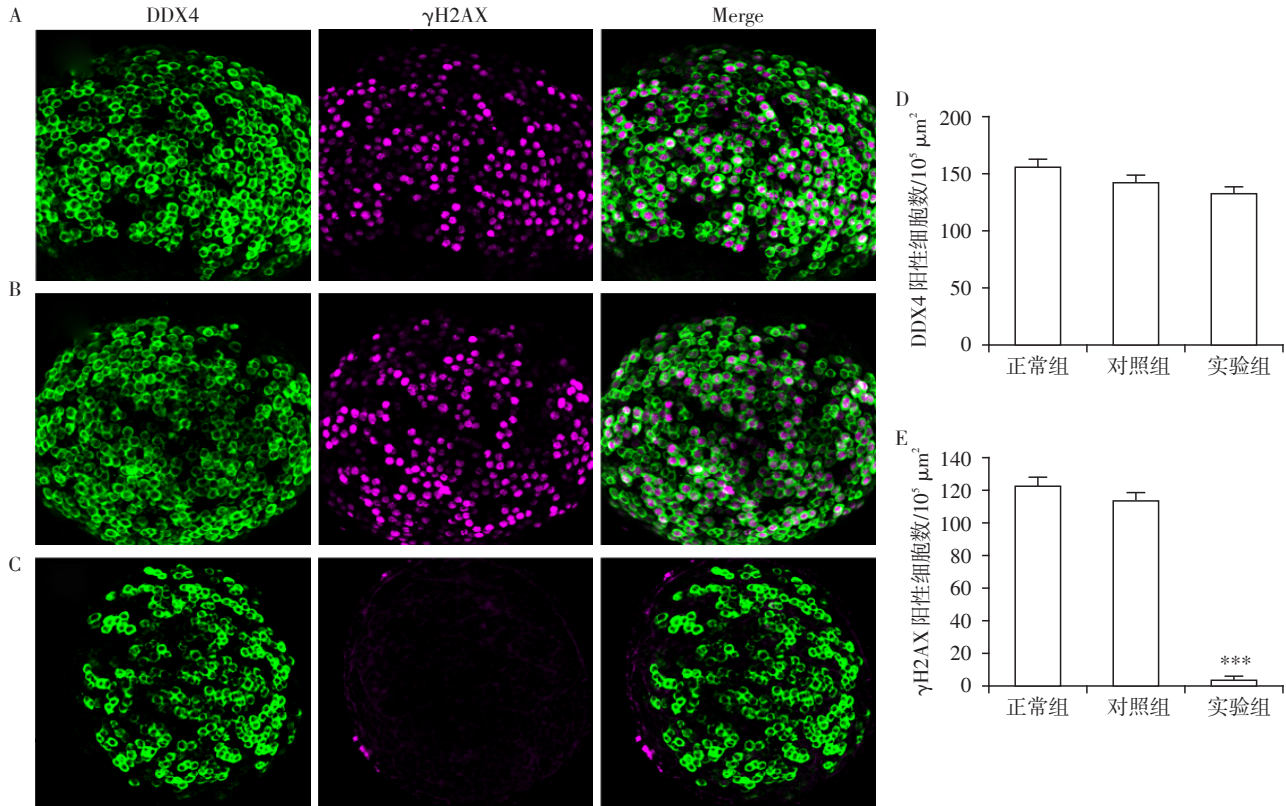
文献已证实电子呼吸链被AMA阻断后会导致ATP水平下降和ROS水平上升<sup>[9]</sup>。分别检测ATP及ROS水平,结果发现AMA处理后导致雌性生殖嵴中



A: 正常组的DDX4荧光;B:对照组的DDX4荧光;C:实验组的DDX4荧光;D:各组DDX4阳性细胞计数,与正常组比较,\*\*\* $P < 0.001$ , $n=8$ 。

图1 免疫荧光检测各组中DDX4表达量( $\times 10$ )

Figure 1 Representative images of IF staining of DDX4 from each group( $\times 10$ )



A: 正常组的DDX4和 $\gamma\text{-H2AX}$ 荧光共染;B:对照组的DDX4和 $\gamma\text{-H2AX}$ 荧光共染;C:实验组的DDX4和 $\gamma\text{-H2AX}$ 荧光共染;D:各组DDX4阳性细胞计数;E:各组 $\gamma\text{-H2AX}$ 阳性细胞计数,与正常组比较,\*\*\* $P < 0.001$ , $n=6$ 。

图2 免疫荧光检测各组中DDX4和 $\gamma\text{-H2AX}$ 表达情况( $\times 20$ )

Figure 2 Representative images of IF co-staining of DDX4 and  $\gamma\text{-H2AX}$  from each group( $\times 20$ )

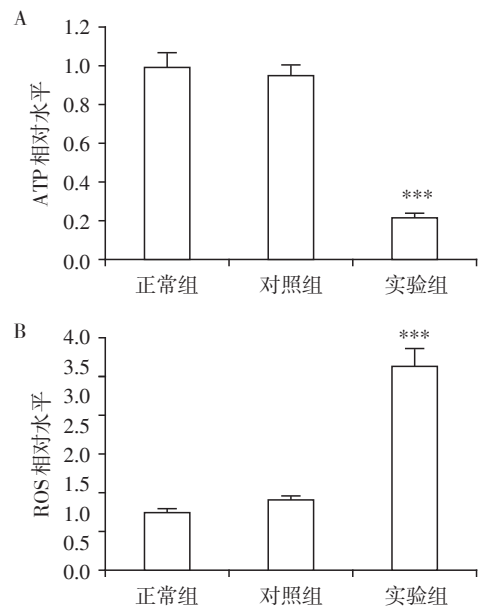
ATP含量明显下降(图3A),而ROS含量显著增加(图3B)。

#### 2.4 AMA作用后培养至14.5 dpc 不影响PGCs

进一步设想是否生殖细胞阻滞在PGCs时期才导致不表达生殖细胞减数分裂的标志物。通过免疫荧光检测PGCs的标志物OCT4,我们发现,同正常组和对照组相一致,实验组中OCT4阳性细胞此时几乎不存在,经统计有且仅有2~3个生殖细胞仍表达OCT4,与正常组和对照组无统计学差异(图4)。据此推测AMA处理后的生殖细胞经历了PGCs阶段。

#### 2.5 AMA作用后培养至14.5 dpc 影响减数分裂进程

以上结果说明AMA处理的生殖细胞跨过了PGCs有丝分裂阶段,却尚未到达减数分裂的DNA断裂阶段,因此提出假设:AMA处理的细胞阻滞在了减数分裂起始阶段。为了验证这一假设,标记了减数分裂起始的经典标志物,STRA8。实验结果提示,实验组相对于正常组和对照组中DDX4阳性细胞数目无明显变化,且STRA8阳性细胞数目也无明显改变(图5)。这一结果说明实验组能启动减数分裂,结合上述结果实验组无法到达减数

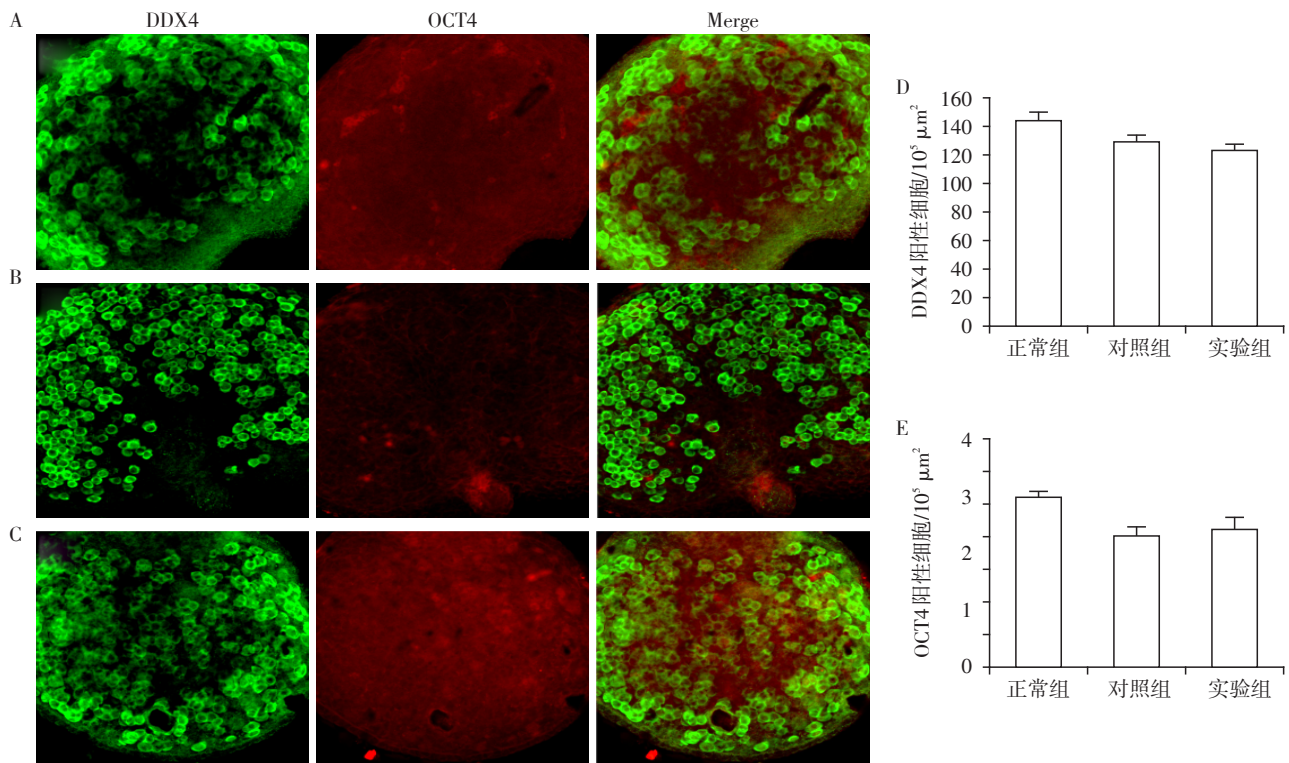


与正常组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=6$ 。

图3 ATP(A)和ROS(B)在各组中的相对水平

Figure 3 Relative ATP (A) and ROS (B) levels from each group

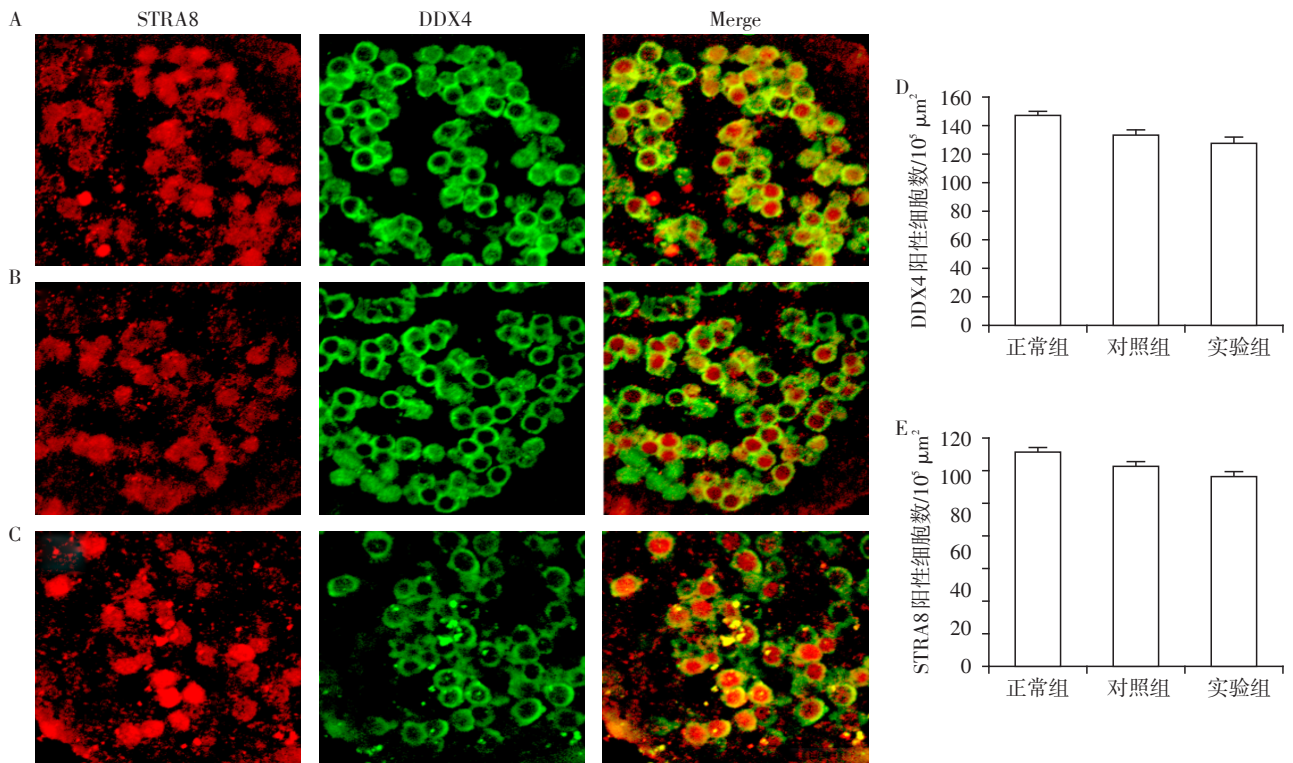
分裂的DNA断裂阶段。这一结果支持了我们这一假说。



A: 正常组的DDX4和OCT4荧光共染; B: 对照组的DDX4和OCT4荧光共染; C: 实验组的DDX4和OCT4荧光共染; D: 各组DDX4阳性细胞计数; E: 各组OCT4阳性细胞计数( $n=6$ )。

图4 免疫荧光检测各组中DDX4和OCT4表达情况 DDX4和荧光共染( $\times 30$ )

Figure 4 IF co-staining of DDX4 and OCT4 from each group ( $\times 30$ )



A: 正常组的 DDX4 和 STRA8 荧光共染; B: 对照组的 DDX4 和 STRA8 荧光共染; C: 实验组的 DDX4 和 STRA8 荧光共染; D: 各组 DDX4 阳性细胞计数; E: 各组 STRA8 阳性细胞计数 (n=6)。

图5 免疫荧光检测各组中 DDX4 和 STRA8 表达情况 (×40)

Figure 5 Representative images of IF co-staining of DDX4 and STRA8 from each group (×40)

### 3 讨论

一般认为,雌性生殖嵴发育至约 13.5 dpc,由中肾产生的视黄酸(retinoic acid, RA)通过旁分泌到达相邻的生殖嵴并启动下游 STRA8(stimulated by retinoic acid gene 8)的表达<sup>[10]</sup>。而 STRA8 已经是经典的作为生殖细胞进入减数分裂的检查点。在 STRA8 敲除小鼠的卵巢中只有减数分裂前卵原细胞,同时分析卵原细胞 DNA 成分发现只有二倍体,没有四倍体生殖细胞,说明在 STRA8 敲除情况下雌性生殖细胞无法完成减数分裂前 DNA 复制,减数分裂启动受到抑制<sup>[11]</sup>, STRA8 是生殖细胞启动减数分裂的重要标志。在第一次减数分裂前期中, DNA 双链程序性的断裂(double-strand breaks, DSBs)是减数分裂的显著特征。在减数分裂早期,双链断裂依赖于减数分裂专属蛋白 SPO11(sporulation protein, meiosis-specific, SPO11 homolog)的调控<sup>[12]</sup>。在双链断裂形成后,多种因子[如 DMC1(dosage suppressor of mck1 homolog, meiosis-specific homologous recombination)、MLH1(mutl homolog 1)、MSH4(muts homo-

log 4)、 $\gamma$ -H2AX]参与到后续修复与重组中<sup>[13-14]</sup>。

本研究发现电子呼吸链发生故障后,生殖细胞能启动减数分裂但又阻滞在了减数分裂的起始阶段,由于此时并未表达 $\gamma$ -H2AX,我们推测还未发生 DNA 的断裂,而出现这一表型的原因可能是 AMA 阻滞电子呼吸链导致 ATP 的减少和 ROS 的增加所致。

已有文献报道,环境条件(如营养和氧压力水平)能调控细胞周期,ATP 生成的明显受损或是 ROS 水平的显著升高都会引起细胞周期的阻滞<sup>[15-17]</sup>。当酵母细胞在减数分裂的不同阶段有不同的代谢营养需求,在醋酸盐产孢媒介中,二倍体酿酒酵母进入减数分裂。产孢过程的早期阶段需要 ATP 产生的最大化,中后期阶段需要 ATP 产生的最小化<sup>[18]</sup>。本研究提示电子传递链被阻断后,ATP 水平下降,减数分裂起始被抑制。同时也有文献证明高 ROS 水平会导致细胞周期的阻滞<sup>[19]</sup>,不同含量的 ROS 对细胞周期的影响不同,只有当 ROS 水平合适时,细胞周期正常进行,随着 ROS 含量增加对细胞周期调控产生负作用。在本次研究中发现 ROS 升高会导致减数分裂起始的进程受到抑制。这可能是由于电

子呼吸链阻断后 ATP 产生下降和 ROS 异常增加引起了一系列细胞周期调控因子的表达改变导致的,但其具体的机制还有待于进一步深入的研究阐明。

综上所述,在电子呼吸链发生障碍时,雌性生殖细胞减数分裂的起始受到阻滞,并且该细胞周期的阻滞可能受到 ATP 及 ROS 的调控。

#### [参考文献]

- [1] Rossitto M, Philibert P, Poulat F, et al. Molecular events and signalling pathways of male germ cell differentiation in mouse[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 45(1): 84-93
- [2] Hickford DE, Wong SFL, Frankenberg SR, et al. Expression of STRA8 is conserved in therian mammals but expression of CYP26B1 differs between marsupials and mice [J]. *Biol Reprod*, 2017, 97(2): 217-229
- [3] Endo T, Romer KA, Anderson EL, et al. Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(18): E2347-E2356
- [4] Wang C, Zhou B, Xia G. Mechanisms controlling germline cyst breakdown and primordial follicle formation [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(14): 2547-2566
- [5] Zheng B, Zhao D, Zhang P, et al. Quantitative proteomics reveals the essential roles of STIM1 in the testicular cord formation in mouse testis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14(10): 2682-2691
- [6] Shen C, Li M, Zhang P, et al. A comparative proteome profile of female mouse gonads suggests a tight link between the electron transport chain and meiosis initiation [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2018, 17(1): 31-42
- [7] Lanju X, Jing X, Shichang L, et al. Induction of apoptosis by antimycin A in differentiated PC12 cell line [J]. *J Appl Toxicol*, 2014, 34(6): 651-657
- [8] Choi EM. Protective effect of diazoxide against antimycin A - induced mitochondrial dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(8): 1603-1608
- [9] Ma X, Jin M, Cai Y et al. Mitochondrial electron transport chain complex III is required for antimycin A to inhibit autophagy [J]. *Chem Biol*, 2011, 18(11): 1474-1481
- [10] Li H, Clagett-Dame M. Vitamin A deficiency blocks the initiation of meiosis of germ cells in the developing rat ovary in vivo [J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(5): 996-1001
- [11] Koubova J, Hu YC, Bhattacharyya T, et al. Retinoic acid activates two pathways required for meiosis in mice [J]. *PLoS Genet* 2014, 10(8): e1004541
- [12] Buhler C, Borde V, Lichten M. Mapping meiotic single-strand DNA reveals a new landscape of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *PLoS Biol*, 2007, 5(12): e324
- [13] Boateng K, Bellani A, Gregoret MA IV, et al. Homologous pairing preceding SPO11-mediated double-strand breaks in mice [J]. *Dev Cell*, 2013, 24(2): 196-205
- [14] Neyton S, Lespinasse F, Moens PB, et al. Association between MSH4 (MutS homologue 4) and the DNA strand-exchange RAD51 and DMC1 proteins during mammalian meiosis [J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(12): 917-924
- [15] Chen J, Cui X, Jia S, et al. Disruption of dmc1 produces abnormal sperm in medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30912
- [16] Al-Asmari AK, Riyasdeen A, Islam M. Scorpion venom causes apoptosis by increasing reactive oxygen species and cell cycle arrest in MDA-MB-231 and HCT-8 cancer cell lines [J]. *J Evid Based Integr Med*, 2018, 23: 2156587217751796
- [17] Hao C, Zhang X, Zhang H, et al. Sugirol (12 $\alpha$ -hydroxyabieta-8, 11, 13-trien-7-one) targets human pancreatic carcinoma cells (Mia-PaCa2) by inducing apoptosis, G2/M cell cycle arrest, ROS production and inhibition of cancer cell migration [J]. *J BUON*, 2018, 23(1): 205-210
- [18] Du X, Fu X, Yao K, et al. Bcl-2 delays cell cycle through mitochondrial ATP and ROS [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(7): 707-713
- [19] Pandey AN, Tripathi A, Premkumar KV, et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(3): 521-528

[收稿日期] 2017-11-13