

小鼠,比如 TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1) 和 TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2) 突变引起的 mTOR 信号增强激活 rps6 和 4EBP1 信号并促进蛋白质翻译,导致原始卵泡的过度激活<sup>[25]</sup>。在卵母细胞发育过程中,卵母细胞减数分裂成熟包括翻译的激活和蛋白质合成的增加,这与 mTORC1 信号转导有密切关系。mTORC1 依赖 rps6 和 4EBP1 参与蛋白质合成。rps6 为 mRNA 翻译做准备的决定信号,4EBP1 有助于整体 CAP (catabolic activative protein) 蛋白依赖性翻译。尽管这两个信号都在 mTORC1 的下游,但它们在物种中表现出不同的表达。此外,Rapa 也显示出不同的效果。在东北林蛙的卵母细胞中,rps6 活性在孕酮刺激后增加,Rapa 以剂量依赖性方式阻断孕酮诱导的卵母细胞生发泡破裂。在哺乳动物卵母细胞中,牛、猪和鼠模型中显示 4EBP1 在减数分裂成熟过程中逐渐磷酸化。在小鼠卵母细胞中,包含 Rapa 和 eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) 抗体的 mTOR-4EBP1-eIF4E 抑制剂不阻断减数分裂进程,但导致纺锤体形态和染色体排列异常,进而导致染色体非整倍性。这表明 mTOR 信号的中断下调参与纺锤体组装和染色体排列的特定 mRNA 的翻译<sup>[20,26]</sup>。然而,目前还没有关于 Rapa 对肥胖小鼠卵巢功能的研究。本研究用是否加 Rapa 处理 HF 肥胖小鼠模型以研究其对排卵功能和卵母细胞质量的影响。通过 Western blot 检测发现,Rapa 通过降低 P-rps6 和 P-4EBP1,抑制 mTOR 通路而有利于卵泡储备,两组小鼠卵巢超排后卵母细胞数目的比较,发现其对 HF 肥胖小鼠排卵有改善的趋势,但卵母细胞纺锤体染色结果显示,未发现 Rapa 对卵母细胞质量产生明显影响。下面可进一步做卵子的体外受精实验,比较受精率、卵裂率及可移植胚胎率等以完善卵母细胞质量的检测,还可以检测 Rapa 对肥胖小鼠生育力的影响。

综上所述,本研究通过 Rapa 处理 HF 肥胖小鼠模型,发现其对肥胖小鼠排卵有积极影响,但对卵母细胞质量的改善尚不明显,这为后续研究肥胖小鼠生殖力奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] MACHTINGER R, COMBELLES C M, MISSMER S A, et al. The association between severe obesity and characteristics of failed fertilized oocytes [J]. Hum Reprod, 2012, 27 (11): 3198-3207
- [2] LEARY C, LEESE H J, STURMEY R G. Human embryos

from overweight and obese women display phenotypic and metabolic abnormalities [J]. Hum Reprod, 2015, 30(1): 122-132

- [3] SOHRABI M, ROUSHANDEH A M, ALIZADEH Z, et al. Effect of a high fat diet on ovary morphology, *in vitro* development, *in vitro* fertilisation rate and oocyte quality in mice [J]. Singapore Med J, 2015, 56(10): 573-579
- [4] REYNOLDS K A, BOUDOURES A L, CHI M M, et al. Adverse effects of obesity and/or high-fat diet on oocyte quality and metabolism are not reversible with resumption of regular diet in mice [J]. Reprod Fertil Dev, 2015, 27(4): 716-724
- [5] SABEN J L, BOUDOURES A L, ASGHAR Z, et al. Maternal metabolic syndrome programs mitochondrial dysfunction via germline changes across three generations [J]. Cell Rep, 2016, 16(1): 1-8
- [6] KONG Q Q, WANG J, XIAO B, et al. Cumulus cell-released tumor necrosis factor (TNF) -  $\alpha$  promotes post-ovulatory aging of mouse oocytes [J]. Aging, 2018, 10(7): 1745-1757
- [7] MAO Z, ZHANG W. Role of mTOR in glucose and lipid metabolism [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): 2043
- [8] SENGUPTA S, PETERSON T R, LAPLANTE M, et al. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing [J]. Nature, 2010, 468 (7327): 1100-1104
- [9] PERL A. mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging [J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1346(1): 33-44
- [10] ZHANG X M, LI L, XU J J, et al. Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression [J]. Gene, 2013, 523(1): 82-87
- [11] DOU X W, SUN Y, LI J Z, et al. Short-term rapamycin treatment increases ovarian lifespan in young and middle-aged female mice [J]. Aging Cell, 2017, 16(4): 825-836
- [12] 张媛媛, 张日华, 薛一. 肥胖与雌激素的相互关系及其对子宫的作用研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2013, 33(8): 1060-1065
- [13] BROUGHTON D E, MOLEY K H. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact [J]. Fertil Steril, 2017, 107(4): 4840-4847
- [14] GOLDSAMMLER M, MERHI Z, BUYUK E. Role of hormonal and inflammatory alterations in obesity-related reproductive dysfunction at the level of the hypothalamic-pituitary-ovarian [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2018, 16 (1): 45

(下转第 1262 页)

· 基础研究 ·

# 人胚胎干细胞向下丘脑神经祖细胞的诱导分化受高雄激素影响

李真真,覃莲菊,宁 松,崔毓桂,马 翔\*,刘嘉茵\*

南京医科大学第一附属医院临床生殖医学中心,生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 210029

**[摘要]** 目的:研究体外诱导人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)向下丘脑神经祖细胞分化,并以此为细胞模型,观察不同浓度雄激素对下丘脑神经祖细胞分化的影响。方法:鉴定 hESC 细胞株 CCRM22,体外诱导 CCRM22 向下丘脑神经祖细胞分化,对其进行初步的细胞生物学鉴定;在分化培养基中添加  $1 \times 10^{-8}$  mol/L、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L 睾酮(以无水乙醇为助溶剂对照),收集不同分化时期细胞,比较分化效率;利用 RT-qPCR、流式细胞术、免疫荧光检测等方法鉴定分化细胞,并检测生殖功能调控相关基因的表达。结果:CCRM22 分化为下丘脑神经祖细胞的效率超过 85%,但睾酮处理降低其分化效率;分化细胞表达神经细胞标志物 NESTIN 以及下丘脑神经祖细胞特异性标志物 NKX2.1,同时表达 KISS1 和雄激素受体(androgen receptor, AR),且 AR 的表达水平与睾酮浓度呈正相关。结论:成功诱导 hESC 分化形成下丘脑神经祖细胞,高浓度睾酮处理抑制 hESC 向下丘脑神经祖细胞分化,该细胞模型可应用于后续体外研究多囊卵巢综合征女性孕早期高雄激素环境对后代下丘脑神经细胞分化和发育的影响。

**[关键词]** 多囊卵巢综合征;高雄激素;人胚胎干细胞;诱导分化;下丘脑神经祖细胞

**[中图分类号]** R338

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2020)09-1252-11

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200903

## Effects of hyperandrogen on human embryonic stem cells induced to differentiate into hypothalamic neural progenitors

LI Zhenzhen, QIN Lianju, NING Song, CUI Yuguai, MA Xiang\*, LIU Jiayin\*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Clinical Center of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**[Abstract]** **Objective:** In this study, human embryonic stem cells (hESCs) were induced to differentiate into hypothalamic neural progenitor cells *in vitro*, and the effects of different concentrations of androgen on the differentiation of hypothalamic neural progenitor cells were compared. **Methods:** The quality of human embryonic stem cell line CCRM22 was identified, CCRM22 was induced to differentiate into hypothalamic neural progenitor cells *in vitro*, then  $1 \times 10^{-8}$  mol/L and  $1 \times 10^{-7}$  mol/L testosterone were added to the differentiation medium (anhydrous ethanol as cosolvent control). The differentiated cells were collected at different stages of differentiation, and the differentiation efficiency was compared. The differentiated cells were identified by RT-qPCR, flow cytometry and immunofluorescence, and the expression of genes related to reproductive function regulation was detected. **Results:** The differentiation efficiency of CCRM22 into hypothalamic neural progenitor cells was more than 85%, but testosterone treatment decreased its differentiation efficiency; differentiated cells expressed nerve cell marker NESTIN and hypothalamic neural progenitor cell specific marker NKX2.1, expressed both KISS1 and androgen receptor (AR), and the expression of AR was positively correlated with testosterone concentration. **Conclusion:** Human embryonic stem cells were successfully induced into hypothalamic neural progenitor cells. High concentration of testosterone inhibited the differentiation of hESCs into hypothalamic neural progenitor cells. This cell model can be used to study the effects of hyperandrogenic environment in early pregnancy on hypothalamic nerve cell differentiation and development of offspring in women with polycystic ovary syndrome *in vitro*.

**[Key words]** polycystic ovary syndrome; hyperandrogen; human embryonic stem cells; induced differentiation; hypothalamic neural progenitors

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(09): 1252-1262]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81571403, 81671447)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: sxmaxiang@126.com; jyliu\_nj@126.com

高雄激素血症是多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)女性的最常见临床特征之一。PCOS女性自然妊娠或者助孕妊娠,孕期高雄激素(尤其孕早期高雄激素环境)对子代中枢神经系统发育和功能有长远影响,并可能导致子代成年后的神经内分泌功能紊乱,引起一系列的生殖和代谢疾病,即胎源性疾病。PCOS也是一种胎源性疾病。因为胎儿期哺乳动物大脑的神经分化发育对雄激素高度敏感<sup>[1]</sup>,胎儿时期宫内雄激素暴露以及由遗传、代谢和环境因素共同作用导致的青春期前高雄激素状态,都会诱发子代PCOS样表型的发生,影响成年后的生殖健康<sup>[2-4]</sup>。研究表明,宫内高雄激素暴露可改变胎儿中枢系统的神经电生理,影响神经元之间的突触传递和功能关系,并作用于下丘脑神经细胞中调控生殖与代谢功能的相关位点,使下丘脑—垂体—性腺轴的反馈调节发生紊乱<sup>[5]</sup>,最终导致PCOS,并发生一系列的代谢功能障碍,而具体机制依然不清。母体孕早期高雄激素环境可能干扰胎儿下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH),影响神经元分化形成和发育。选择合适的研究模型,是此类研究的一个难题。

人胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)具有体外增殖及多向分化潜能,经体外诱导和培养可分化为三胚层来源的所有细胞类型<sup>[6]</sup>,也可能分化形成下丘脑神经祖细胞(hypothalamic neuronal progenitors, HNP)和下丘脑神经细胞<sup>[7-8]</sup>。课题组前期已经在体外成功定向诱导hESC分化为下丘脑神经细胞<sup>[9]</sup>,在此基础上本研究体外诱导hESC分化为HNP,并模拟PCOS患者孕早期宫内高雄激素的环境,初步探讨高雄激素暴露对早期HNP分化和发育的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

hESC细胞株CCRM22来源于本单位干细胞临床研究中心的干细胞库。hESC的日常培养及HNP的定向分化所需主要试剂包括:DMEM/F12、Knock-out DMEM、血清替代物、Glutamax、B27、N2添加物(ThermoFisher公司,美国);人胚胎干细胞无饲养层维持培养基(mTeSR™1 cGMP)(Stem Cell公司,加拿大);Y-27632、LDN-193189(Selleckchem公司,美国);SB 431542、Purmorphamine(Stemgent公司,美国);SHH(R&D公司,美国);DAPT(TOCRIS公司,美国)。

### 1.2 方法

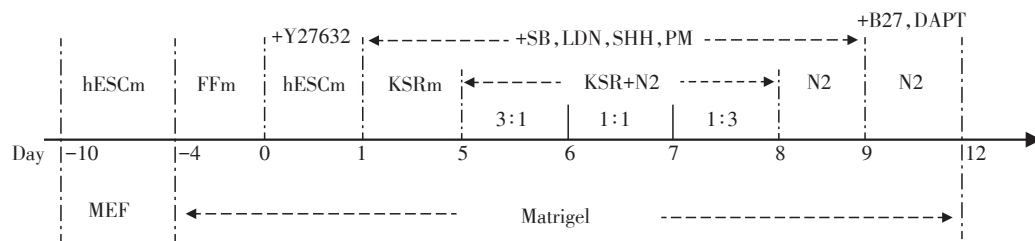
#### 1.2.1 HNP的体外诱导分化

CCRM22经历饲养层系统上的扩增,无饲养层系统的纯化,P30基质胶上的定向分化3个阶段,可以于诱导第12天收获HNP(图1)。①在以小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEF)为饲养层的体系中使用hESC完全培养基<sup>[13]</sup>,每日换液进行扩增。②在无饲养层体系中进行纯化:hESC细胞密度接近90%后进行Matrigel的铺板包被,孵育2~4 h;加入Collagenase IV-Dispase混合液(体积比1:1),放入培养箱孵育40 min;镜下观察到克隆与MEF分离后,用移液枪收集脱落的克隆至15 mL离心管内使其自然沉降;弃去上层废液,加入2~3 mL预热的hESC培养基洗涤3次并轻轻吹打30次分散较大的克隆团块;按照1:3的传代比例,接种至新6孔板,使用纯化培养基培养4 d。细胞逐渐长至汇合后,加入胰酶0.25% Trypsin-EDTA 1 mL/孔(6孔板)使hESC消化为单细胞,放入培养箱中孵育3 min;加入适量KSR培养基中和胰酶,800 r/min离心4 min;使用细胞计数板进行计数后按照 $1 \times 10^6$ 个/孔的密度重新接种,使用KSR培养基(含bFGF 10 ng/mL)并加入ROCK抑制剂Y27632(10  $\mu$ mol/L)促进细胞贴壁。镜下观察细胞密度长至95%时,开始定向诱导,以开始诱导神经分化记为第1天(Day1)。③添加分化因子进行体外定向诱导:于1~12 d(Day1~Day12)每日在新鲜培养基中加入4种分化因子2  $\mu$ mol/L PM、10  $\mu$ mol/L SB431542、2.5  $\mu$ mol/L LDN193189以及100 ng/mL SHH。第1~4天:使用KSR培养基,每天新鲜换液;第5天:将KSR培养基和N2培养基按3:1比例配制;第6天:将KSR培养基和N2培养基按1:1比例配制;第7天:将KSR培养基和N2培养基按1:3比例配制;第8天:使用N2培养基培养24 h;第9~12天:在培养基中加入新鲜2% B27和10  $\mu$ mol/L DAPT,每天更换新鲜培养基。在诱导分化第12天(Day12)收取HNP。

#### 1.2.2 雄激素处理

诱导hESC向神经祖细胞分化的同时,分别加入睾酮0 mol/L(空白对照组)、 $1 \times 10^{-8}$  mol/L(低浓度睾酮组)、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L(高浓度睾酮组)及无水乙醇(anhydrous ethanol, AE, 溶剂对照组)。浓度设计基于胚胎早期胎儿性腺未发育时血清雄激素浓度与母体血清雄激素浓度无差异,而早孕期正常女性与PCOS患者的血清雄激素浓度存在差异<sup>[10]</sup>。在hESC体外诱导分化的第0、12天分别收取细胞,进行形态





hESC在饲养层上扩增6 d,纯化阶段在基质胶上培育4 d,消化成单细胞后再转移至分化体系中定向诱导12 d即可收获HNP。

图1 CCRM2体外定向分化为HNP的流程示意图

Figure 1 Flow chart of differentiation of CCRM2 into HNP *in vitro*

学观察、流式细胞仪检测、RT-qPCR分析以及免疫细胞化学检测。

### 1.2.3 RT-qPCR分析hESC及HNP特异基因表达

收取Day0、Day12的细胞样本,TRIzol法处理后提取总RNA后逆转录为cDNA。使用Prime Script

RT试剂盒(TaKaRa公司,日本)进行qPCR。用ABI Step One Plus 序列检测和软件分析系统(Applied Biosystems公司,美国)得到循环数Ct值。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的换算分析数据。样本以 $\beta$ -actin作为内参,重复3次实验。结果表示为相对表达量,引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 Primer sequences used for real-time PCR

| 基因             | 引物序列(5'→3')               |                         | 目的片段长度(bp) |
|----------------|---------------------------|-------------------------|------------|
|                | 上游                        | 下游                      |            |
| OCT4           | GCGACTATGCACAACGAGAG      | AGGCACCTCAGTTTGAATGC    | 222        |
| NANOG          | ACAACTGGCCGAAGAATAGCA     | GGTCCCAGTCGGGTTCAC      | 246        |
| NKX2.1         | CGCATCCAATCTCAAGGAAT      | CAGAGTGTGCCCAGAGTGAA    | 175        |
| NESTIN         | GGCGCACCTCAAGATGTCC       | CTTGGGGTCCTGAAAGCTG     | 127        |
| FOXG1          | CCTACAGCTCCGTGTGACTC      | TTGAGGGAGTAGGTCCAGA     | 190        |
| SOX11          | TAAATGTAGTAAGGCAGGTCCAAGC | CAGAATATAACTCCGCCGTCTG  | 133        |
| MASH1          | TTGCACTCCAATCATTCACG      | GCTGTGCGTGTAGAGGTGA     | 150        |
| KISS1          | AGCAGCTAGAATCCCTGGG       | AGGCCGAAGGAGTTCCAGT     | 250        |
| AR             | CCTGGCTTCCGCAACTTACAC     | GGACTTGTGCATGCGGTACTC   | 102        |
| $\beta$ -actin | GCCAGCTCACCATGGATCAT      | CAAACATGATCTGGGTCATCTTC | 384        |

OCT4、NANOG:干细胞多能性标志基因;NKX2.1:又称TTF1,甲状腺转录因子-1,神经祖细胞标志基因;NESTIN:巢蛋白,神经干细胞标志基因;FOXG1:端脑标志基因;SOX1:神经干细胞标志物;MASH1:神经元分化转录因子;KISS1:转移抑制因子;AR:雄激素受体(androgen receptor); $\beta$ -actin: $\beta$ -肌动蛋白,内参基因。

### 1.2.4 流式细胞术分析hESC及HNP的特异基因表达

细胞样本用胰酶消化为单细胞后,用Fixation Buffer(Biolegend公司,美国)避光固定30~60 min;使用Permeabilization Wash Buffer破膜2次(标记细胞表面抗体无需破膜,使用PBS代替);重悬细胞后加入一抗,避光孵育30 min以上;洗涤后加入二抗,避光孵育30 min以上;洗涤二抗后使用0.1%BSA重悬细胞,流式细胞仪检测。共分析3个代次(P28~30)。所用一抗包括兔多克隆抗体OCT4(1:33)、兔多克隆抗体NANOG(1:33)、小鼠单克隆抗体SSEA4(1:33)、小鼠单克隆抗体TRA-160(1:33)、兔单克隆抗体TTF1(1:33)、小鼠单克隆抗体NESTIN(1:33)、兔单克隆抗体AR(1:33)(Abcam公司,美国);所用

二抗包括山羊抗兔二抗(1:100)、山羊抗小鼠二抗(1:100)(ThermoFisher公司,美国)。

### 1.2.5 免疫荧光检测

使用间接荧光抗体法将小圆片加PBS洗5 min,再用4%多聚甲醛室温固定20~30 min,PBS洗3遍,每次5 min;标记细胞核抗体使用0.4% Triton X-100冰上破膜10 min,PBS洗3遍,每次5 min;标记细胞表面抗体无需破膜。加入1 mL 5%BSA,37℃恒温箱内封闭30 min;孵育一抗4℃过夜,次日PBS洗3遍,每次5 min。避光室温孵育二抗1 h,PBS洗3遍,每次5 min;加入DAPI Fluoromount-G封片剂,荧光倒置显微镜拍照。所用一抗包括兔多克隆抗体OCT4(1:200)、兔多克隆抗体NANOG(1:200)、小鼠



单克隆抗体 SSEA4(1:200)、小鼠单克隆抗体 TRA-160(1:200)、兔单克隆抗体 TTF1(1:100)、小鼠单克隆抗体 NESTIN(1:100)、兔单克隆抗体 AR(1:50)、兔多克隆抗体 MASH1(1:200)、山羊多克隆抗体 SOX1(1:200)、小鼠单克隆抗体 KISS1(1:50)(Abcam 公司,美国);所用二抗包括驴抗山羊二抗(1:500)、山羊抗兔二抗(1:500)、山羊抗小鼠二抗(1:500)(Thermofisher 公司,美国)。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.0a 进行统计分析并作图。计量资料采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组内比较采用重复测量数据的方差分析,两组间比较采用 *t* 检验分析,多组组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hESC 细胞株 CCRM22 的鉴定

MEF 上培养的 CCRM22 呈典型的 hESC 生长特征:克隆样生长,克隆内细胞排列紧密;克隆边缘光

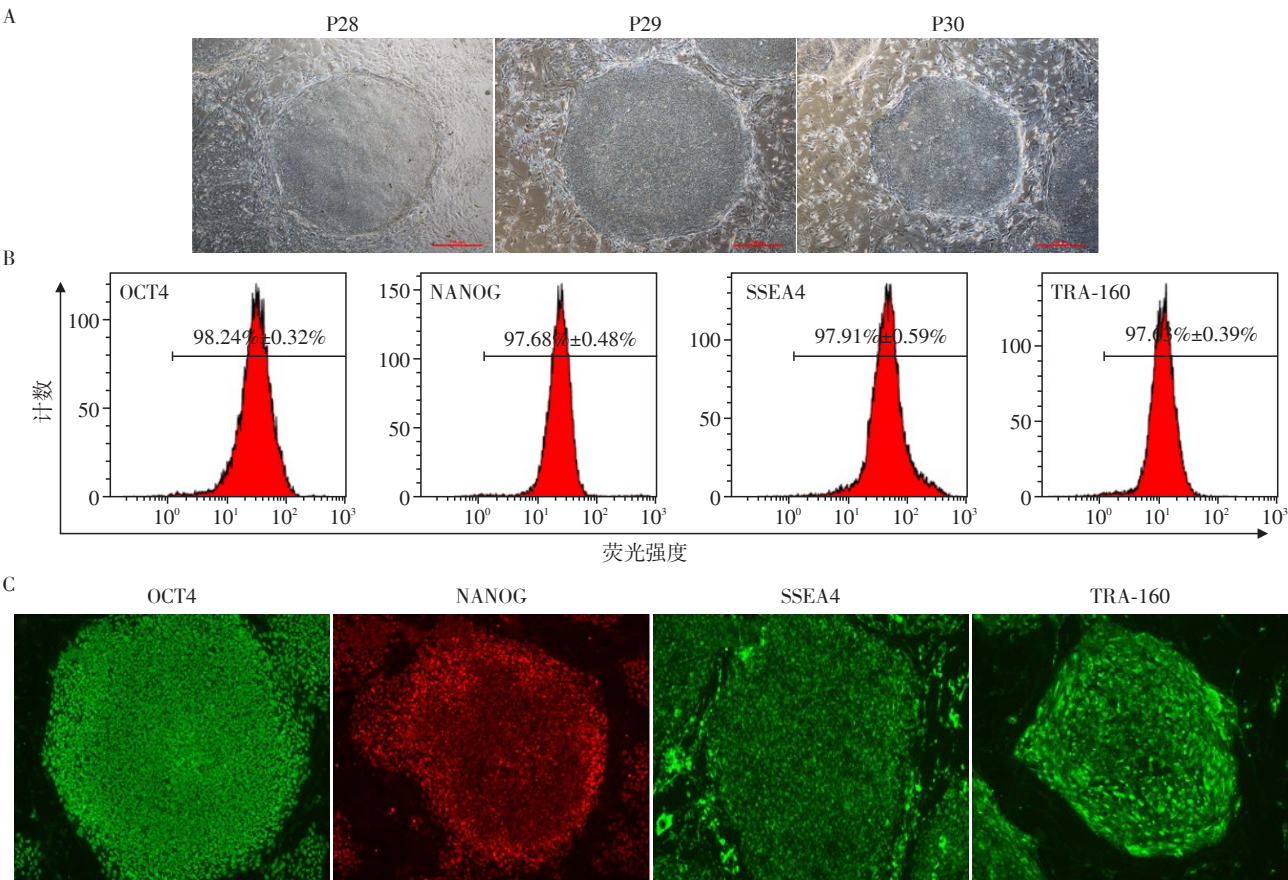
滑,边界明显,核大而清,伴高核质比(图 2A);流式细胞术结果显示 CCRM22 高水平表达干细胞多能性标志物。多能性标志物的阳性率均大于 97%(图 2B);免疫荧光结果显示,多能性标志物在所有细胞中高水平表达(图 2C),表明 CCRM22 具有典型 hESC 的特征。

2.2 诱导 CCRM22 向 HNP 分化

在 MEF 中扩增的第 1 阶段,CCRM22 呈类圆形克隆样生长(图 3A)。在无饲养层系统中培养的第 2 阶段,离散的纯化 hESC 最初呈小的克隆团块(图 3B),在 3~4 d 内即长至汇合,密度达到 90% 以上(图 3E)。在诱导分化前,重新消化为单细胞的 CCRM22 接种于基质胶包被的新培养板,贴壁后细胞形态均一、伴高核质比(图 3F)。分化过程中不同时期的细胞增殖迅速,呈现大片重叠状的形态(图 3H)。分化至第 12 天时,收获 HNP(图 3I)。

2.3 hESC 多能性标志物和 HNP 特异标志物的表达

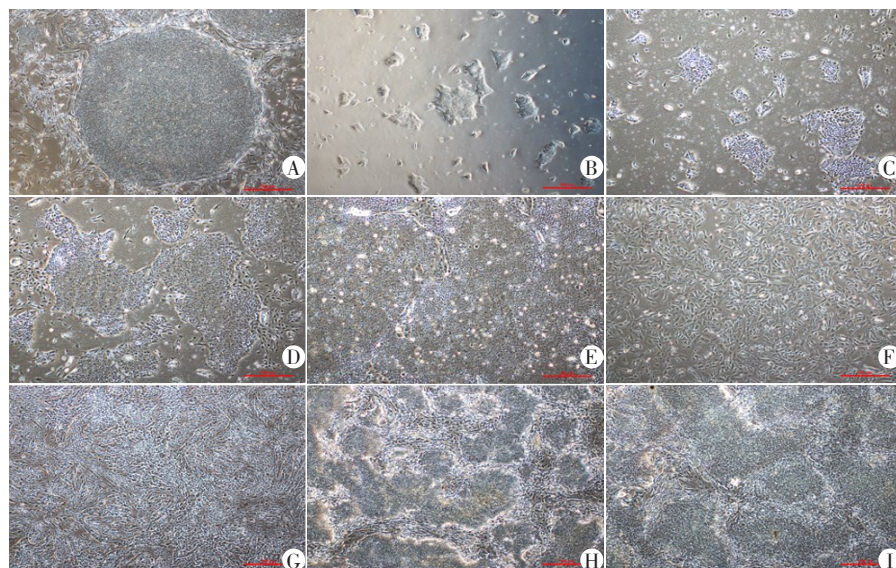
分别收集诱导分化前 Day0 和分化至 HNP (Day12)的细胞样本,通过基因表达情况鉴定细胞



A:CCRM22的形态学影像呈典型的hESC特征:类圆形克隆样生长。图示P28~30 3个不同代次。标尺=500 mm。B:流式细胞术检测P28~30共3个代次的细胞,显示CCRM22表达多能性标志物,阳性率均>97%。C:免疫荧光结果显示,多能性标志物在细胞中高水平表达(×40)。

图2 人胚胎干细胞株CCRM22的特性鉴定

Figure 2 Identification of human embryonic stem cell line of CCRM22



显微镜下CCRM22在不同分化时期的形态学影像。A:MEF上扩增CCRM22至第6天时的形态;B~E:FFm纯化体系的第1天(B)、第2天(C)、第3天(D)、第4天(E),开始纯化时小块状克隆的形态(B)、纯化结束后的细胞密度(E);F:开启分化前1 d核质比极高的细胞形态(Day0);G: Day2分化初期的细胞形态;H:Day7分化中期的细胞形态;I:分化Day12的细胞形态。标尺=500 μm。

图3 体外CCRM22定向分化为HNP不同时期的细胞形态

Figure 3 Cell morphology in differentiation of hypothalamic neuronal progenitors from CCRM22 *in vitro*

类型。结果显示(图4A),与未分化的Day0细胞相比,Day12时干细胞多能性标志基因OCT4( $P < 0.01$ )和NANOG( $P < 0.001$ )表达水平显著降低,NKX2.1( $P < 0.05$ )、NESTIN( $P < 0.05$ )、MASH1( $P < 0.01$ )和SOX1( $P < 0.001$ )显著上调,端脑神经元标志基因FOXG1( $P < 0.05$ )降低。Day12时细胞显著表达生殖功能相关基因KLSS1和AR,均较Day0显著上调( $P < 0.05$ )。

流式细胞学检测结果显示(图4B),诱导分化至Day12时,干细胞多能性标志物均呈弱阳性,神经细胞标志物NESTIN的阳性率为 $(94.96 \pm 3.72)\%$ ,同时HNP标志物NKX2.1的阳性率为 $(85.37 \pm 4.32)\%$ 。免疫荧光结果显示此时细胞高水平表达HNP标志物NKX2.1以及神经细胞标志物NESTIN、SOX1、MASH1(图4C)。

#### 2.4 高雄激素处理抑制hESC向HNP分化

纯化后的hESC用0.25%胰酶消化为单细胞后接种于新培养皿诱导分化,并添加不同浓度的睾酮。分化早期(第4天之前)细胞伴高核质比;分化中期(第5~8天)至第12天,快速增殖的细胞显示积聚重叠状;同一分化阶段,各处理组之间细胞形态无明显差异(图5)。

#### 2.5 高雄激素对HNP特异基因表达的影响

分化至Day12,与低浓度睾酮组相比,高浓度睾酮组中NANOG的表达呈下降趋势(图6)。睾酮处

理组HNP标志物NKX2.1均较对照组有下降趋势。此外,睾酮处理组的神经细胞标志物SOX1表达量较对照组显著下降( $P$ 均 $< 0.01$ ),但下降幅度与浓度梯度不呈现明显相关性。高浓度睾酮组端脑标志物FOXG1微弱上调,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

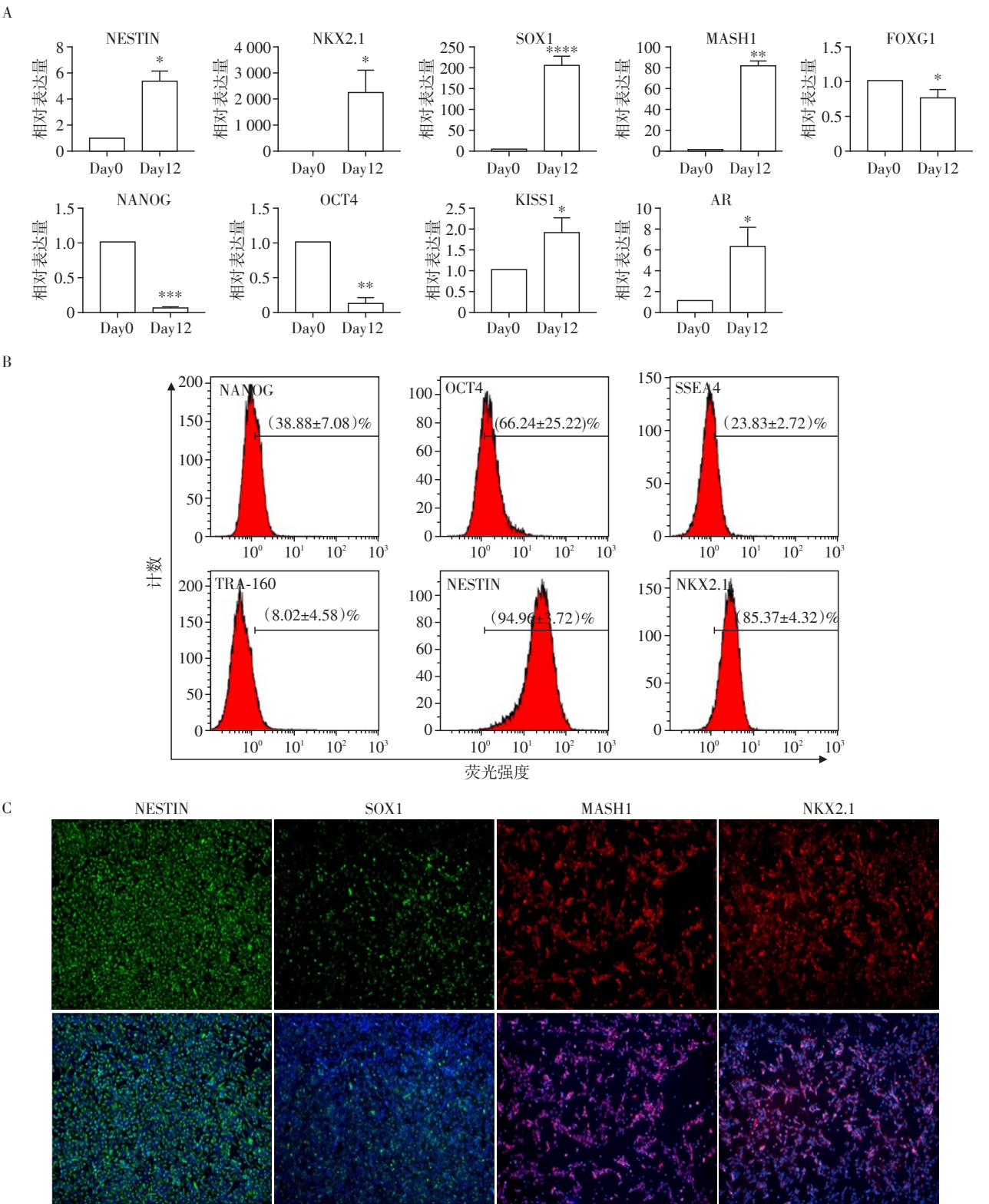
流式细胞学结果显示(图7),分化至Day12,睾酮处理组HNP标志物NKX2.1表达水平呈下降趋势,且在高浓度睾酮组中NKX2.1下调最为明显;各组神经细胞标志物NESTIN的表达均为强阳性,睾酮处理组较对照组呈现下调趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

免疫荧光检测结果显示(图8),分化至Day12,细胞表达HNP标志物。其中SOX1和NKX2.1的表达随着睾酮浓度升高呈下调趋势,高浓度睾酮组下调更明显,与RT-qPCR和流式细胞学结果相一致。

#### 2.6 高雄激素对生殖功能相关基因表达的影响

分化至Day12,睾酮处理组AR的表达水平呈升高趋势,且高浓度睾酮组大于低浓度睾酮组(图9A,但差异无统计学意义, $P > 0.05$ ),睾酮处理降低了KISS1的表达( $P < 0.001$ )。流式细胞结果显示,随着睾酮浓度的升高,AR的表达呈显著上升趋势(图9B),与空白对照组相比表达量提高约40%,与溶剂对照组相比表达量提高约22%;免疫细胞化学结果与以上结果相似,AR表达水平随睾酮浓度的升高



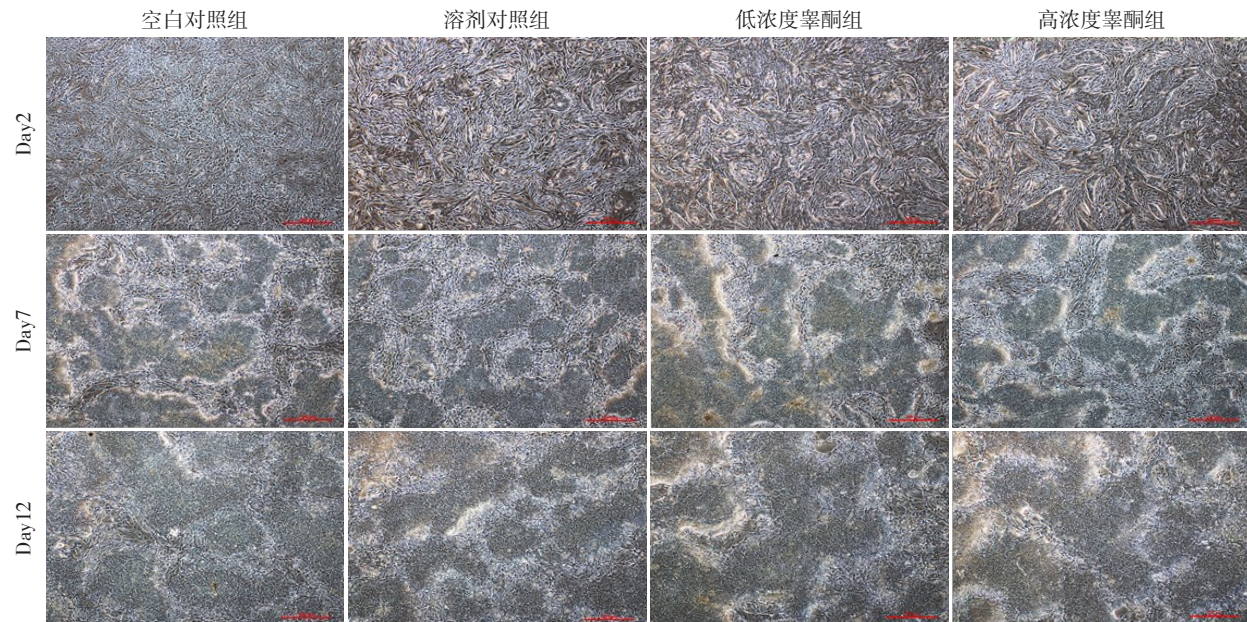


A: RT-qPCR 检测结果表明,诱导分化Day12时,多能性标志基因 OCT4、NANOG 表达显著下调;神经细胞标志基因 NESTIN、MASH1、SOX1 表达显著上调;HNP 特异性标志基因 NKX2.1 表达显著上调;端脑类型神经细胞标志基因 FOXG1 表达下调;生殖功能相关基因 KISS1 和 AR 表达上调。与 Day0 比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.0001$ 。B: 流式细胞学检测结果显示,HNP 的 NESTIN、NKX2.1 的阳性细胞率分别为 $(94.96 \pm 3.72)\%$ 、 $(85.37 \pm 4.32)\%$ ;多能性标志物 NANOG、OCT4、SSEA4、TRA-160 的阳性细胞率分别为 $(38.88 \pm 7.08)\%$ 、 $(66.24 \pm 25.22)\%$ 、 $(23.83 \pm 2.72)\%$ 、 $(8.02 \pm 4.58)\%$ 。C: 免疫荧光结果显示,诱导分化Day12时表达 HNP 标志物 NKX2.1 以及神经细胞标志物 NESTIN、SOX1、MASH1( $\times 40$ )。

图4 CCRM22诱导分化至第12天时HNP的鉴定

Figure 4 Identification of hypothalamic neuronal progenitors differentiated from CCRM22 at day 12

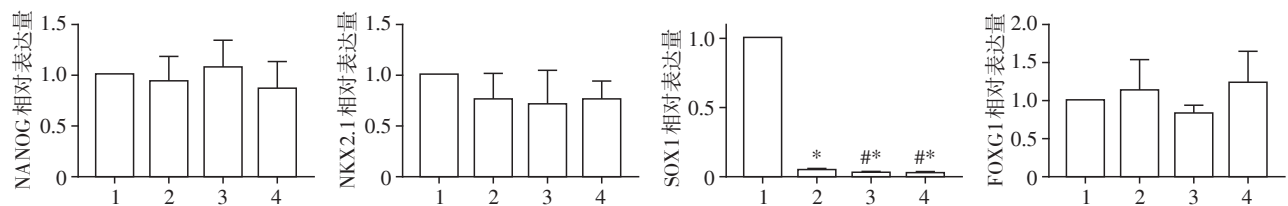




同一分化时期,各组细胞在形态学上无显著差异。标尺=500 mm。

图5 各组细胞形态学影像

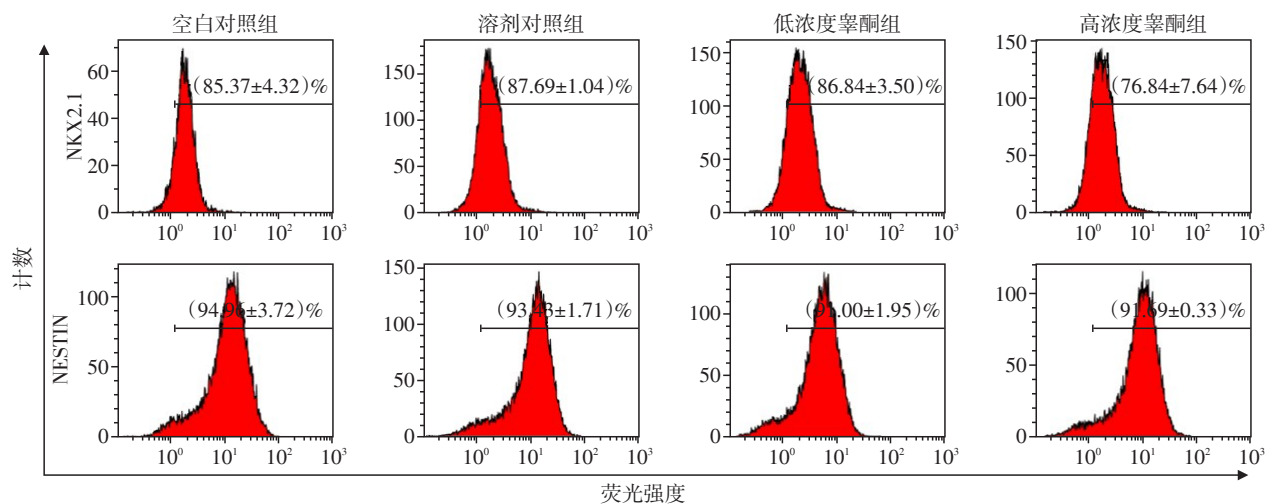
Figure 5 Cell morphological images of each group



RT-qPCR 检测结果表明,分化至 Day12,各组干细胞多能性标志物 NANOG 表达量无显著差异;神经祖细胞标志物 NKX2.1 均较对照组有下降趋势;神经细胞标志物 SOX1 表达量均较对照组显著下降;端脑标志物 FOXG1 在高浓度组微弱上调。1:空白对照组;2:溶剂对照组;3:低浓度唑酮组;4:高浓度唑酮组。与空白对照组比较, $^*P < 0.0001$ ;与溶剂对照组比较, $^*P < 0.05$ 。

图6 各组特异基因的表达情况

Figure 6 Expression of specific genes in each group



HNP 标志物 NKX2.1 表达水平随着唑酮浓度的升高呈下降趋势,且在高浓度处理组中 NKX2.1 表达下调最为明显;神经细胞标志物 NESTIN 在各组之间的表达无显著差异。

图7 流式细胞术检测 HNP 标志物的表达

Figure 7 Expression of HNP markers detected by flow cytometry



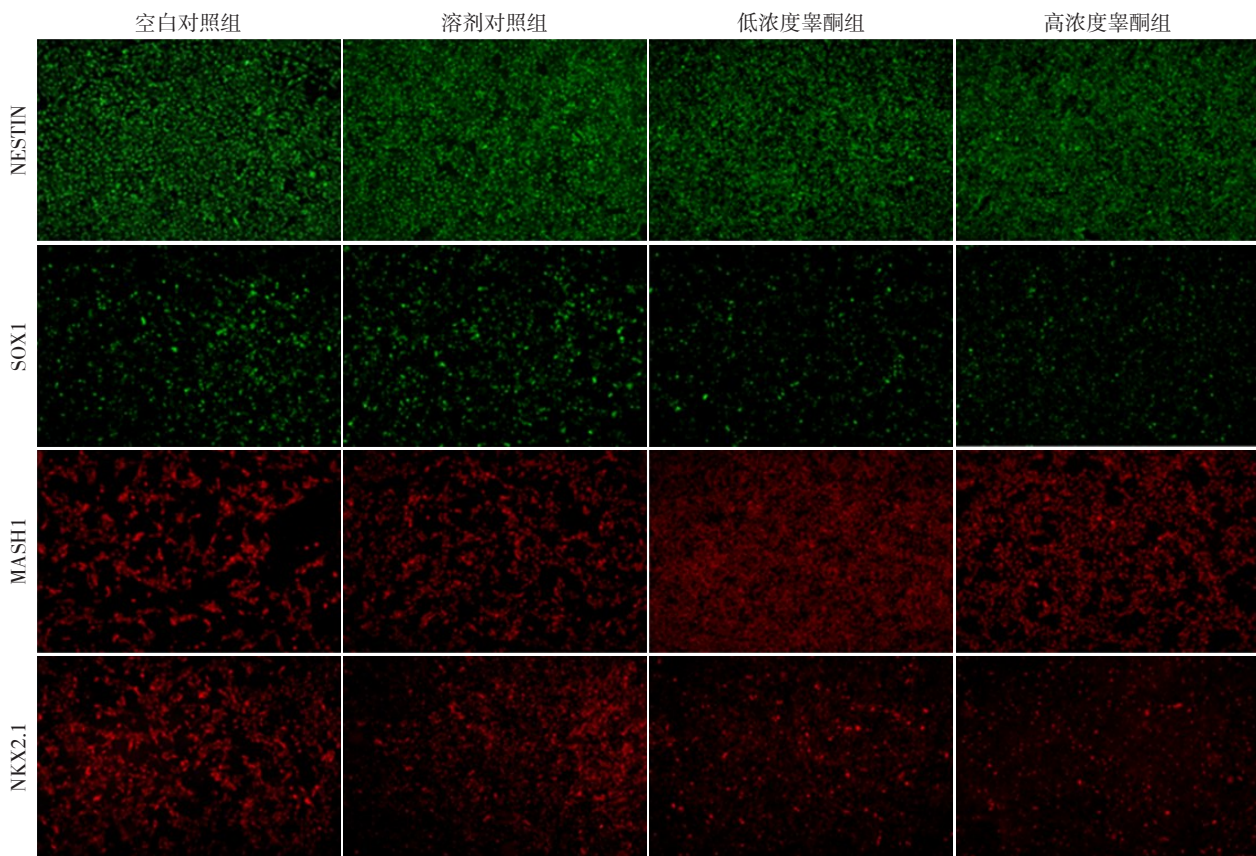


图8 免疫荧光法检测HNP标志物的表达(×40)  
Figure 8 Expressions of HNP markers detected by immunofluorescence(×40)

而显著增加(图9C)。

3 讨论

胚胎期哺乳动物大脑的神经细胞分化与发育对雄激素高度敏感。大脑中雄激素有3种作用方式,睾酮可能通过与AR结合直接发挥作用,也可以通过芳香化酶转化为雌二醇与雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合发挥作用;还能通过5α-还原酶转化为双氢睾酮(dihydrotestosterone, DHT),与AR结合发挥作用<sup>[11]</sup>。但雄激素对胚胎时期细胞分化发育的作用,尤其是胚胎发育早期的作用及其机制仍不清楚。在胎儿发育过程中,除性别相关遗传物质(X、Y染色体)的关键性作用,性腺分化形成后所分泌的类固醇激素会影响大脑的性别二态性分化<sup>[12-13]</sup>。研究发现,男性和女性神经回路的差异主要是数量问题,包括神经元数量、树突棘密度、递质数量等,男性和女性在相同区域表现相同的连接回路,但强度不同<sup>[14]</sup>。

在人类妊娠期母体,妊娠黄体分泌高剂量孕酮参与维持妊娠,但卵泡发育停滞或退化,卵巢基本不分泌雄激素,所以在性腺(睾丸或卵巢)分化形成

之前,母体内、宫内环境中的雄激素水平都低。如果是男性(46, XY)胚胎,第7周开始原始未分化性腺向睾丸分化,且随着睾丸分化形成并分泌雄激素睾酮(从第8周开始分泌睾酮,在第11~17周达到高峰),高雄激素促进男性胎儿内外生殖器官分化形成。即便是男性胚胎,孕第8周之前也是处于低雄激素的宫内环境<sup>[15]</sup>。如果是女性(46, XX)胚胎,因为没有Y染色体、缺乏睾丸决定因子的作用,卵巢分化始于第13周、持续到16周后才完成卵巢器官的分化形成,不分泌雄激素。所以女(雌)性胚胎在孕期,尤其在孕早期,不会暴露于高雄激素的宫内环境。

高雄激素血症是PCOS典型的临床特征之一。PCOS自然妊娠或者助孕妊娠,卵巢仍可能分泌较多雄激素,PCOS女性孕早期母体血清雄激素水平高于非PCOS女性,导致胎儿孕早期的高雄激素暴露。一项研究使用宫内高雄激素暴露(prenatally androgenized, PNA)动物模型,观察到生后子代的神经电生理和神经内分泌变化<sup>[16]</sup>。神经元电生理检测结果显示, PNA小鼠GnRH神经元突触后电流的发射频率明显增高,反映出此类模型存在下丘脑GnRH神经元活性的增强。对PNA动物的研究证

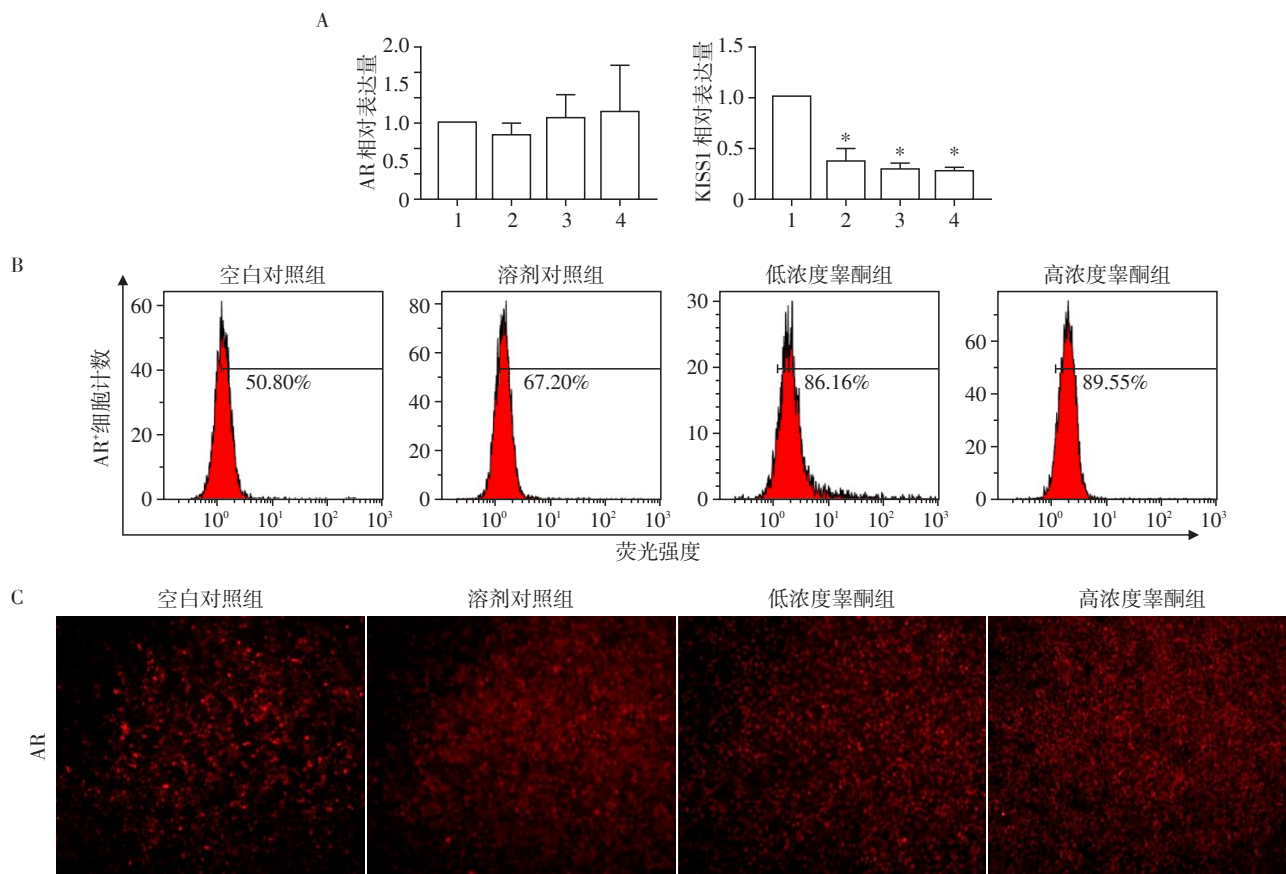


图9 高雄激素对生殖功能相关基因表达的影响  
A: RT-qPCR 检测结果表明,分化至 Day12, AR 的表达水平与睾酮浓度有关;高雄激素降低 KISS1 的表达,低浓度睾酮组、高浓度睾酮组中 KISS1 的表达水平较空白对照组显著降低。1:空白对照组;2:溶剂对照组;3:低浓度睾酮组;4:高浓度睾酮组。与空白对照组比较,\* $P < 0.001$ 。B: 流式细胞术检测结果。随着睾酮浓度的升高,AR 的表达显著上升;C:免疫荧光结果显示 AR 表达水平随睾酮浓度的升高而显著增加( $\times 40$ )。

图9 高雄激素对生殖功能相关基因表达的影响  
Figure 9 Effects of testosterone on expression of reproductive function related genes

明,GnRH神经元的某些上游神经元可能是高雄激素暴露导致神经电生理活动发生改变,从而影响了其正常的生理功能,进而使GnRH神经元的突触输入量或某些连接发生改变。据报道,雄激素可能通过下丘脑ARC核团的KISS1神经元或其上游神经元的作用,调节KISS1神经元与阿片促黑皮质素原和刺鼠相关肽神经元之间的通路<sup>[17]</sup>。这些证据也进一步提示了为何PCOS患者的雌性后代更有可能并发代谢相关症状。而其他PNA模型发现,阻断AR可逆转PNA动物的相关中枢症状<sup>[18]</sup>,表明宫内环境的高雄激素可通过AR介导改变上游神经网络向GnRH神经元的突触传递和输入,并且导致性激素负反馈系统受损,使GnRH神经元呈现出过度活跃,从而影响成年期女性正常的生殖功能。

因为缺少合适的体外细胞模型,对于女性胚胎宫内高雄激素暴露对其下丘脑GnRH神经元和HNP分化和功能发育影响的研究很少。本研究利用体外诱导hESC向HNP分化,建立细胞模型。获得的

HNP中,干细胞多能性标志基因OCT4和NANOG表达水平显著降低,HNP标志基因NKX2.1、NESTIN、MASH1和SOX1显著上调;端脑神经元标志基因FOXG1降低,特别是在蛋白水平上表达生殖功能调控相关基因KISS1以及参与雄激素应答的AR。流式细胞学检测HNP标志物NKX2.1,显示HNP阳性率为85.37%。相比在体的复杂环境,体外培养系统可以直接检测化学物质或药物对神经元功能的影响。本研究建立了该模型,为后续探讨宫内高雄激素暴露对胚胎发育的影响和研究胎源性疾病提供了研究工具。

本研究发现雄激素抑制hESC向HNP分化,提示宫内高雄激素暴露对胚胎早期神经元分化发育存在不利影响,需要在后续研究中阐明此现象的可能机制。到目前为止,还没有证据表明胚胎早期发生性腺类固醇激素依赖的下丘脑神经细胞凋亡。但细胞凋亡是早期大脑发育中的一种普遍现象<sup>[19-20]</sup>。研究表明,睾酮会增加围产期大鼠前腹侧室旁核细胞



的凋亡发生率<sup>[21-22]</sup>,提示性腺类固醇激素具有通过诱导或阻止细胞凋亡来控制脊椎动物大脑性别分化的作用,其机制是通过PI3K/AKT通路<sup>[23]</sup>。性腺类固醇增加了AR mRNA的表达<sup>[24]</sup>,提示脊椎动物脑细胞凋亡依赖性的性别分化可能是由PI3K/AKT信号通路介导。利用HNP分化模型,发现高雄激素抑制HNP分化和发育,可能通过上调AR表达和下调KISS1表达的相关机制。PCOS在代际间传播的另一种可能机制,是宫内高雄激素环境通过使子代表观遗传标记发生改变从而影响其成年后的表型。PCOS的发育源性学说指出,在发育早期,特别是在宫内环境中,不利的影响可能导致永久性的生理和代谢异常,从而导致成年后患多种疾病的风险增加<sup>[25]</sup>。基因表达的表观遗传异常调节很可能在胎源性疾病的发病机制中发挥关键作用<sup>[26-27]</sup>。某些表型异常及其跨代遗传依赖于宫内刺激诱导的表观遗传修饰<sup>[28]</sup>。宫内暴露于过量雄激素可能会导致成人PCOS表型,并通过特定的表观遗传修饰传给下一代。

综上所述,本研究成功诱导hESC分化形成HNP,高浓度雄激素处理抑制hESC向HNP分化;该实验模型为体外研究PCOS女性孕早期高雄激素环境对后代下丘脑神经细胞分化和发育的影响提供了研究工具。

#### [参考文献]

- [1] MORFORD J, MAUVAIS-JARVIS F. Sex differences in the effects of androgens acting in the central nervous system on metabolism[J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2016, 18(4):415-424
- [2] FRANK S. Animal models and the developmental origins of polycystic ovary syndrome increasing evidence for the role of androgens in programming reproductive and metabolic dysfunction [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(6):2536-2538
- [3] NORBERT G, DAVID H B. Dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in diminished ovarian reserve (DOR)[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 9:67-79
- [4] FAROOKHI R. Effects of aromatizable and nonaromatizable androgen treatments on luteinizing hormone receptors and ovulation induction in immature rats [J]. *Biol Reprod*, 1985, 33(2):363-369
- [5] ARNOLD A P. A general theory of sexual differentiation. [J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(1-2):291-300
- [6] TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors[J]. *Cell*, 2007, 131(5):861-872

- [7] WANG L, MEECE K, WILLIAMS D J, et al. Differentiation of hypothalamic-like neurons from human pluripotent stem cells[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(2):796-808
- [8] WANG L, EGLI D, LEIBEL R L. Efficient generation of hypothalamic neurons from human pluripotent stem cells [J]. *Curr Protoc Hum Genet*, 2016, 90:2151-21514
- [9] 徐瑜辰,覃莲菊,宁松,等. 高效诱导人胚胎干细胞分化为表达生殖功能调控相关基因的下丘脑神经细胞 [J]. *生殖医学杂志*, 2019, 28(8):920-930
- [10] SIR-PETERMANN T, MALIQUEO M, ANGEL B, et al. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(10):2573-2579
- [11] MORFORD J, SHENG W, FRANCK M J. The impact of androgen actions in neurons on metabolic health and disease[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 465:92-102
- [12] MCEWEN B S. Neural gonadal steroid actions [J]. *Science*, 1981, 211(4488):1303-1311
- [13] BALL G F, BALTHAZART J. Hormonal regulation of brain circuits mediating male sexual behavior in birds [J]. *Physiol Behav*, 2004, 83(2):329-346
- [14] SIMERLY R B. Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain [J]. *Annu Rev Neu - rosci*, 2002, 25(1):507-536
- [15] BERG T, SILVEIRA M A, MOENTER S M. Prepubertal development of GABAergic transmission to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and postsynaptic response are altered by prenatal androgenization [J]. *J Neurosci*, 2018, 38(9):2283-2293
- [16] NESTOR C C, QIU J, PADILLAS L, et al. Neurons reveals a steroid - dependent glutamatergic input to POMC and AgRP neurons in male mice[J]. *Mol Endocrinol*, 2016, 30(6):630-644
- [17] SILVA M S, PRESCOTT M, CAMPBELL R E. Ontogeny and reversal of brain circuit abnormalities in a preclinical model of PCOS[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(7):e99405
- [18] ZOGRAB M. Studies of gonadal sex differentiation [J]. *Organogenesis*, 2016, 12(1):42-51
- [19] DAVIES A M. Neurotrophic factors. switching neurotroph independence[J]. *Current Biol*, 1994, 4(3):273-276
- [20] OPPENHEIM R W. Cell death during development of the nervous system [J]. *Ann Rev Neurosci*, 1991, 14:453-501
- [21] CHUNG W C, SWAAB D F, De VRIES G J. Apoptosis during sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat brain [J]. *J Neurobiol*, 2000, 43(3):234-243

- [22] DAVIS E C, POPPER P, GORSKI R A. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area[J]. Brain Res, 1996, 734(1-2):10-18
- [23] 杨 芬,唐晓燕,吴 鹏,等. PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235 体内外对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(5):569-576
- [24] MANIN M, BARON S, GOOSSENS K, et al. Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells[J]. J Biochem, 2002, 366(Pt 3):729-736
- [25] DE BOO H A, HARDING J E. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis[J]. J Obstet Gynaecol, 2006, 46(1):4-14
- [26] SIMMONS R. Developmental origins of adult metabolic disease[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2006, 35(1):193-204
- [27] DRAKE A J, WALKER B R, SECKL J R. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Compar Physiol, 2005, 288(1):34-38
- [28] WATERLAND R A, JIRTLE R L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases[J]. Nutrition, 2004, 20(1):63-68
- [收稿日期] 2020-05-11

(上接第1251页)

- [15] HOHOS N M, SKAZNIK-WIKIEL M E. High-fat diet and female fertility[J]. Endocrinology, 2017, 158(8):2407-2419
- [16] BOU NEMER L, SHI H, CARR B R, et al. Effect of body weight on metabolic hormones and fatty acid metabolism in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization: a pilot study[J]. Eprod Sci, 2019, 26(3):404-411
- [17] BUYUK E, ASEMOTA O A, MERHI Z, et al. Serum and follicular fluid monocyte chemotactic protein-1 levels are elevated in obese women and are associated with poorer clinical pregnancy rate after *in vitro* fertilization: a pilot study[J]. Fertil Steril, 2017, 107(3):632-640
- [18] JUNGHEIM E S, SCHOELLER E L, MARQUARD K L, et al. Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring[J]. Endocrinology, 2010, 151(8):4039-4046
- [19] WALDNER M, FANTUS D, SOLARI M, et al. New perspectives on mTOR inhibitors (rapamycin, rapalogs and TORKinibs) in transplantation[J]. Br J Clin Pharmacol, 2016, 82(5):1158-1170
- [20] BLENIS J. TOR, the gateway to cellular metabolism, cell growth, and disease[J]. Cell, 2017, 171(1):10-13
- [21] WANG Y, HE Z, LI X. Chronic rapamycin treatment improved metabolic phenotype but inhibited adipose tissue browning in high-fat diet-fed C57BL/6J mice[J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(9):1352-1360
- [22] HAN J, WANG Y. mTORC1 signaling in hepatic lipid metabolism[J]. Protein Cell, 2018, 9(2):145-151
- [23] LIU W, ZHANG C, WANG L. Successful reversal of ovarian hyperstimulation syndrome in a mouse model by rapamycin, an mTOR pathway inhibitor[J]. Mol Hum Reprod, 2019, 25(8):445-457
- [24] SUN X, SU Y, HE Y. New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators[J]. Cell Cycle, 2015, 14(5):721-31
- [25] MENSAH L B, GOBERDHAN D C I, WILSON C. mTORC1 signalling mediates PI3K-dependent large lipid droplet accumulation in Drosophila ovarian nurse cells[J]. Biol Open, 2017, 6(5):563-570
- [26] GUO Z X, YU Q. Role of mTOR signaling in female reproduction[J]. Front Endocrinol, 2019, 10(3):692-701
- [收稿日期] 2019-09-10