

论著·基础研究

TTF1 在雌鼠下丘脑的分布及其与 KiSS1 和 GnRH 表达的关系

甄 妮, 吕拥芬, 李 嫔

上海交通大学附属儿童医院 上海市儿童医院内分泌遗传代谢科, 上海 200333

[摘要] **目的**·探讨 TTF1 (thyroid transcription factor-1) 在雌性 SD 大鼠青春发育前后下丘脑中表达的变化、分布及其与 KiSS1、GnRH (gonadotropin-releasing hormone) 表达的关系。**方法**·SD 雌鼠按性发育阶段分为幼年组 (JUV 组)、性发育早期组 (EP 组)、性成熟组 (AD 组); 组织免疫荧光染色检测 TTF1、KiSS1、GnRH 免疫反应阳性细胞在下丘脑的分布及相对位置关系; real-time PCR 技术检测各组下丘脑、前腹侧室周核 (AVPV) 及弓状核 (ARC) 中 *KiSS1*、*GnRH*、*TTF1* mRNA 表达, Western blotting 技术检测 KiSS1、TTF1 蛋白在下丘脑的表达水平。**结果**·TTF1 在雌鼠下丘脑 AVPV、ARC、正中隆突 (ME) 有较密集表达。GnRH、KiSS1 与 TTF1 在 ARC 及 ME 存在共同染色区域。在下丘脑, *TTF1* mRNA 表达趋势显示为先略有下降后显著升高; 在 AVPV、ARC 核团中, *TTF1* mRNA 表达皆呈上升趋势。*GnRH* mRNA 的表达水平随青春发育持续上升, 在 AD 期达高峰; *KiSS1* mRNA 表达先于 *GnRH* mRNA, 在 EP 期达高峰, AD 期维持高水平。在下丘脑, EP 期 TTF1 蛋白表达下降, 在 AD 期达到高峰, KiSS1 蛋白表达呈持续上升趋势, 与 mRNA 表达趋势一致。**结论**·核蛋白 TTF1 主要分布于下丘脑 AVPV、ARC、ME, GnRH、KiSS1 与其在 ARC 及 ME 有共同表达区域。随着青春发育, 在 mRNA 水平上, *KiSS1* 先于 *GnRH* 在 EP 达峰值, *TTF1* 表达呈升高趋势, 在 AD 达到高峰, 与 *KiSS1*、*GnRH* 表达趋势一致。蛋白水平上, KiSS1 表达与 mRNA 整体升高趋势相同, TTF1 表达呈升高趋势, 在 AD 达到峰值。

[关键词] 青春发育; TTF1; KiSS1; 促性腺激素释放激素; 下丘脑-垂体-性腺轴

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.06.003 **[中图分类号]** R725.8 **[文献标志码]** A

Expression of TTF1 in hypothalamus of female rats and its relationship with GnRH and KiSS1

ZHEN Ni, LÜ Yong-fen, LI Pin

Department of Endocrinology and Genetic Metabolism, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200333, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the changes and distribution of thyroid transcription factor-1 (TTF1) expression around the puberty and to explore the position relationship among gonadotropin-releasing hormone (GnRH), KiSS1 and TTF1 expression in the hypothalamus of female SD rats. **Methods**·Female SD rats were divided into three groups: juvenile (JUV), early puberty (EP), and adult (AD). Tissue immunofluorescence staining was used to detect the expression of TTF1, KiSS1 and GnRH immunoreactive cells in the hypothalamus and the relative position among them. Real-time PCR was used to measure the expression of *KiSS1*, *GnRH*, *TTF1* on mRNA levels in the hypothalamus, anteroventral periventricular nucleus (AVPV), and arcuate nucleus (ARC) respectively. Western blotting was performed to detect the changes in protein level of KiSS1 and TTF1. **Results**·TTF1 was densely expressed in hypothalamus nucleus AVPV, ARC and median eminence (ME) of female rats. GnRH, KiSS1 and TTF1 were adjacently expressed in ARC and ME. The mRNA level of *TTF1* in the hypothalamus showed an upward trend after a slight decrease, while in AVPV and ARC tended to be consistent and showed an upward trend. The *GnRH* mRNA expression levels were significantly increased and reached the peak at AD. The mRNA expression levels of *KiSS1* showed a sharp rise which was prior to the peak expression of *GnRH* mRNA at EP and then sustained the high level until AD. The protein expression level of TTF1 reached the peak at AD and the KiSS1 expression showed a sustained growth. Both of them showed an upward trend and basically consistent with the mRNA expression trend. **Conclusion**·Neuronal nuclei protein TTF1 mainly expressed in the nuclei AVPV, ARC, and ME of female rat hypothalamus. It was prominent in cells of ARC and ME which were localized GnRH, KiSS1, TTF1 positive neural cells. During the development of puberty onset, *KiSS1* mRNA preceded *GnRH* mRNA to reach the peak at EP. The expression of *TTF1* mRNA increased and reached a peak at AD, which was consistent with the overall increase of KiSS1 and GnRH expression. Protein expression of KiSS1 showed a corresponding upward trend together with their mRNA expression. TTF1 protein expression increased and peaked in AD.

[Key words] puberty; TTF1; KiSS1; gonadotropin-releasing hormone; hypothalamus-pituitary-gonadal

儿童性早熟是儿科常见的内分泌疾病, 发病率仅次于肥胖症, 占小儿内分泌疾病的第二位。性早熟主要由于下丘脑-垂体-性腺轴 (hypothalamus-pituitary-gonadal, HPG) 提前启动, 可引起成年后矮身材, 导致生殖系统肿瘤、乳腺肿瘤、代谢性疾病, 以及异常性行为、青春期行为叛逆等生理和心理相关问题。因此, 性早熟以及由此可

[基金项目] 国家自然科学基金 (81370686); 上海交通大学医工交叉基金 (YG2015MS39); 金磊儿科内分泌中青年医师成长科研基金 (PEGRF201506002) (National Natural Science Foundation of China, 81370686; Medical Engineering Cross Research Fund of Shanghai Jiao Tong University, YG2015MS39; Jin Lei Pediatric Endocrinology Growth Research Fund for Young Physicians, PEGRF201506002)。

[作者简介] 甄 妮 (1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: qiaozhouziheng@163.com。

[通信作者] 李 嫔, 电子信箱: lipin21@126.com。



能诱发的一系列心理、行为、社会问题值得社会各界的重视, 有关性早熟发生的分子机制亟待阐明。

青春启动和正常生殖功能的调控是一个复杂的网络结构, 受到遗传、营养、疾病、精神、心理及内分泌激素等多种因素的影响, HPG 轴在青春启动调控中占首要地位。下丘脑促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 神经元活化分泌 GnRH, 作用于垂体, 进而分泌卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 作用于靶器官, 诱发青春启动、生殖系统的发育。其中 GnRH 神经元的激活在青春期中发挥着重要作用。*KiSS1*/GPR54 (*KiSS1*/G-protein coupled receptor 54) 信号系统在 HPG 轴的启动机制中发挥了极为关键的作用^[1]。基因 *KiSS1* 表达产物 Kisspeptins 通过与 GnRH 神经元表达的 *KiSS1* 受体即 GPR54 结合传递信号, 可促进 GnRH 释放, 启动 HPG 轴^[2], 促发青春启动。

性发育的开始由整个基因网络共同调控完成, 但有关 *KiSS1* 及 *GnRH* 基因表达调控的分子机制尚不明确。有研究^[3]表明, 基因 *TTF1* (thyroid transcription factor-1) 可能参与 *KiSS1* 表达调控。该研究利用高通量基因芯片技术, 检测大鼠和恒河猴下丘脑调控青春发育的基因网络。在调控青春发育的诸多转录因子 (*TTF1*、*YY1*、*CUTL1*、*p53* 等) 中, 各个基因发挥着不同的调控作用, 可能影响 GnRH 表达和青春发育启动。

基因 *TTF1* 又称 *Nkx2-1*, 主要表达于肺、甲状腺、脑的部分区域, 与间脑和下丘脑胚胎发育有关, 在青春期表达量增加; 其编码蛋白质可反式激活 *GnRH* 基因, 并参与刺激或抑制性调控 GnRH 神经网络的表达^[4-5]。有研究根据该基因的转录活性及相关转录因子表达之间的关系, 推测该基因作为上游基因, 与青春期 GnRH 表达调控有关^[6]。有研究^[7]认为 *TTF1* 的表达量与生殖系统肿瘤罹患风险相关, 可作为相关疾病的肿瘤标志物应用于临床诊断。

在中枢神经系统, 下丘脑弓状核 (arcuate nucleus, ARC) 及前腹侧室周核 (anteroventral periventricular nucleus, AVPV) 分布的 *KiSS1* mRNA 表达阳性的神经元功能与性发育有关。ARC 核团 *KiSS1* mRNA 表达水平受外周雌激素——雌二醇 (estradiol, E_2) 和雄激素——睾酮 (testosterone, T) 的负反馈调节, AVPV 核团 *KiSS1* mRNA 表达水平受外周 E_2 、T 的正反馈调节^[8]。研究发现, 摘除卵巢后大鼠 AVPV 表达 *KiSS1* 基因的神经元数量明显减少, 而给予激素替代治疗后, *KiSS1* 基因的低表达可以恢复。

本研究探究在青春发育前后雌性 SD 大鼠下丘脑

ARC、AVPV 核团中 *TTF1*、*KiSS1*、*GnRH* mRNA 动态表达水平, 以及相对表达位置及共表达情况, 并根据相关研究结果初步推测三者之间相互调控的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 雌性 SD 大鼠 (SPF 级) 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2017-0005, 动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2016-0020。动物饲养环境室温为 $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度为 $(55 \pm 10)\%$, 12 h 昼夜交替, 自由饮食。

SD 雌鼠共 93 只, 按性发育的阶段分为 3 组, 分别为幼年组 (25 日龄, juvenile, 简称 JUV)、性发育早期组 (35 日龄, early puberty, 简称 EP)、性成熟组 (42 日龄, adult, 简称 AD), 每组 31 只, 其中 12 只用于检测全下丘脑组织总 mRNA 水平, 12 只用于检测下丘脑 ARC 和 AVPV 组织的总 mRNA 水平, 4 只用于 Western blotting 检测全下丘脑蛋白表达水平, 3 只用于组织免疫荧光技术检测相应基因的表达位置。

1.1.2 试剂与仪器 苯巴比妥钠 (Sigma), 4% 多聚甲醛 (Biosharp), TRIzol (Invitrogen), 反转录试剂盒 (TAKARA), 荧光定量试剂盒 (TAKARA), 蛋白裂解液 (Thermo Fisher), GnRH 抗体 (Novus), *KiSS1* 抗体 (Millipore, Abcam), *TTF1* 抗体 (Abcam, CST), 荧光二抗 (Thermo Fisher), 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记二抗 (Jackson), 引物 (上海生工)。紫外分光光度仪 (Thermo Fisher), 酶标仪 (Thermo Fisher), 荧光显微镜 (Leica), 共聚焦显微镜 (Zeiss), 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche), 紫外分光光度计 (Thermo Fisher), ChemiScope3500 化学发光成像仪 (CLINX), 冰冻切片机 (Leica), 低温高速离心机 (Eppendorf) 等。

1.1.3 取材与样本处理 所有样本采集于 8:00—10:00, 动物腹腔注射 3% 本巴比妥钠 (每 100 g 体质量 0.4 mg), 麻醉后心脏灌注生理盐水, 待无明显血水流出时, 换成 4% 多聚甲醛溶液继续灌注; 解剖取脑组织, 4% 多聚甲醛 4°C 过夜, 蔗糖梯度脱水, 用于冰冻切片的制作。用于总 mRNA 和总蛋白提取的组织, 在生理盐水灌注至无明显血水流出时, 直接解剖采集组织, 液氮速冻。用于 AVPV (前囟 $0.12 \sim -0.12\text{ mm}$) 和 ARC (前囟 $-1.72 \sim -4.36\text{ mm}$) 总 mRNA 提取的组织, 则将脑组织摘除后修剪制作成冰冻切片标本, 在冰冻切片机中分别定位, 在显微镜下切取相应核团, 再液氮速冻。



1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取与 real-time PCR 将组织研磨并按说明书提取总 mRNA，反转录为 cDNA，反应条件为 37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s。以 β-actin 为内参基因，real-

time PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 10 min，95 ℃ 变性 10 s，60 ℃ 退火 30 s，45 个循环，95 ℃ 10 s，65 ℃ 60 s，97 ℃ 1 s；每个样本设 3 个复孔。各基因引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列
Tab 1 Primers for real-time PCR

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')	产物长度 /bp
GnRH	CCGCTGTTGTTCTGTTGACTGTG	GGGGTTCTGCCATTGTGATCCTC	150
KiSS1	AGCTGCTGCTTCTCCTCTGT	AGGCTTGCTCTCTGCATACC	152
TTF1	GGACGTGAGCAAGAACATGG	GCCGACAGGTACTTCTGCTG	123
β-actin	TGCCGCATCCTCTTCCTC	GGTCTTTACGGATGTCAACG	191

1.2.2 冰冻切片的制作 将脑组织用 OCT 包埋，固定于冰冻切片机样本头，分别定位核团 AVPV、ARC，以每张切片 25 μm 厚度切取冠状切面连续切片，连续贴片，贴片干燥后 -20 ℃ 储存。

1.2.3 组织免疫荧光染色 冰冻切片置于空气中干燥 2 h，磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 漂洗，37 ℃ 封闭 1 h 后，滴加一抗 4 ℃ 过夜，PBS 漂洗后滴加荧光二抗 37 ℃ 孵育 2 h，漂洗后染核再漂洗。滴加防淬灭封片剂封片。每次实验设立阴性对照。其中一抗分别为 anti-KiSS1 (Millipore, 1:1 000)、anti-TTF1 (CST, 1:50)、anti-GnRH (Novus, 1:200)，荧光二抗为 Alexa Flour 488/568 (1:1 000)。

1.2.4 图像处理 基因 *GnRH*、*KiSS1*、*TTF1* 阳性细胞图像由荧光显微镜、共聚焦显微镜拍摄，用于阳性细胞表达情况及其分布的分析。

1.2.5 蛋白的提取与 Western blotting 检测 组织研磨并提取总蛋白，BCA 法测蛋白浓度，行 Western blotting 检测 (上样量 30 μg)。经 SDS-PAGE 电泳后，半干转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。5%BSA 室温封闭 2 h，一抗 (anti-Kisspeptin 抗体, Abcam, 1:500; anti-TTF1 抗体, Abcam, 1:500; anti-GAPDH, CST, 1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜，TBST 漂洗加入二抗室温孵育 2 h (HRP 标记, Jackson, 1:5 000)，漂洗后 ECL 发光液处理后拍照，采用 ImageJ 软件进行图像处理分析。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，并采用 LSD 检验行两两比较， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TTF1 神经元在雌性 SD 大鼠下丘脑的分布

组织免疫荧光染色示 TTF1 蛋白表达于细胞核，主要分布在 AVPV、ARC 区域。已知大鼠 KiSS1 神经元主要分布在下丘脑视前核 (preoptic area, POA)、AVPV、室周核以及 ARC 等部位，轴突形成的纤维束可作用于 GnRH 神经元胞体发挥作用，而 GnRH 神经元细胞体主要分布于下丘脑视前核，轴突向腹侧延伸可经正中隆突 (median eminence, ME) 向下至垂体。如图 1 所示 TTF1 集中表达于 AVPV 核、ARC 核、ME、第三脑室室周细胞。

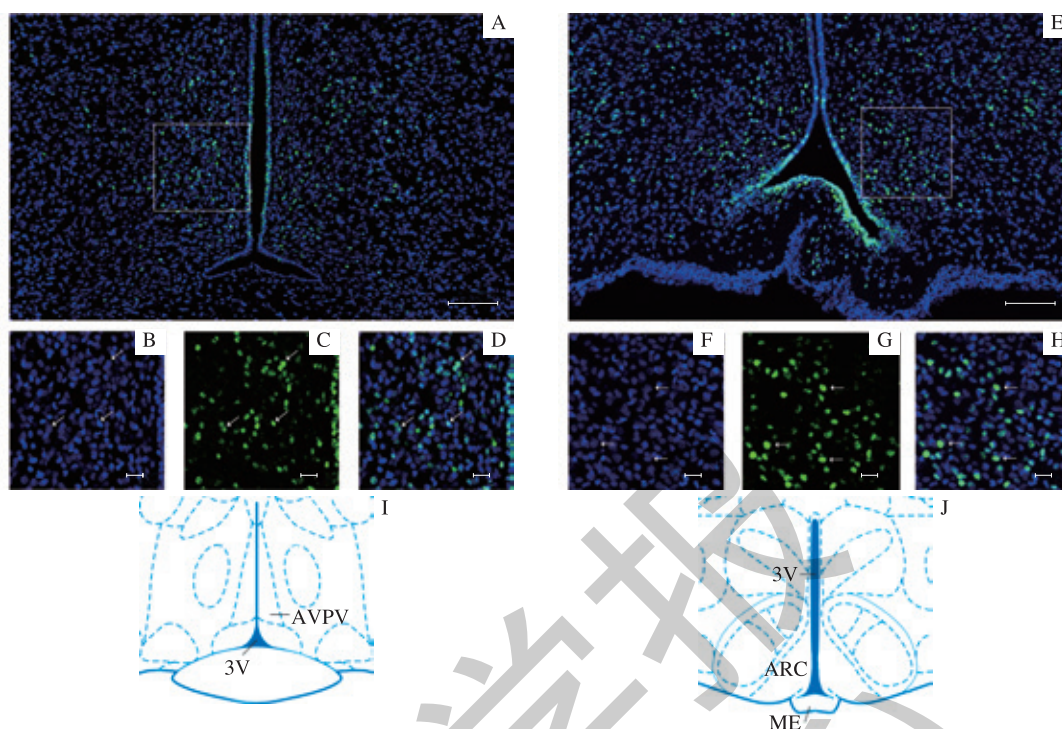
2.2 TTF1、KiSS1、GnRH 在雌性 SD 大鼠下丘脑的表达

连续相邻 2 张切片分别进行 TTF1 与 GnRH、KiSS1 与 GnRH 共染，结果如图 2 所示：在 ARC 下部及 ME，TTF1 细胞与 GnRH 细胞表达位置部分重叠相邻；在 ARC 和 ME，KiSS1 细胞与 GnRH 细胞位置重叠，而 TTF1 与 KiSS1 表达部位基本相同；在 ARC、ME 区域 TTF1、KiSS1、GnRH 有大量表达。

2.3 各组雌性 SD 大鼠不同部位 TTF1 mRNA 表达的变化

分别检测 JUV 组、EP 组、AD 组下丘脑 *TTF1* mRNA 表达水平，结果显示 AD 组与 JUV 组、EP 组间差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, $n = 12$)。随着青春启动，可见 TTF1 表达趋势在下丘脑显示为先略有下降 (无统计学意义) 后显著升高 (表 2，图 3)。

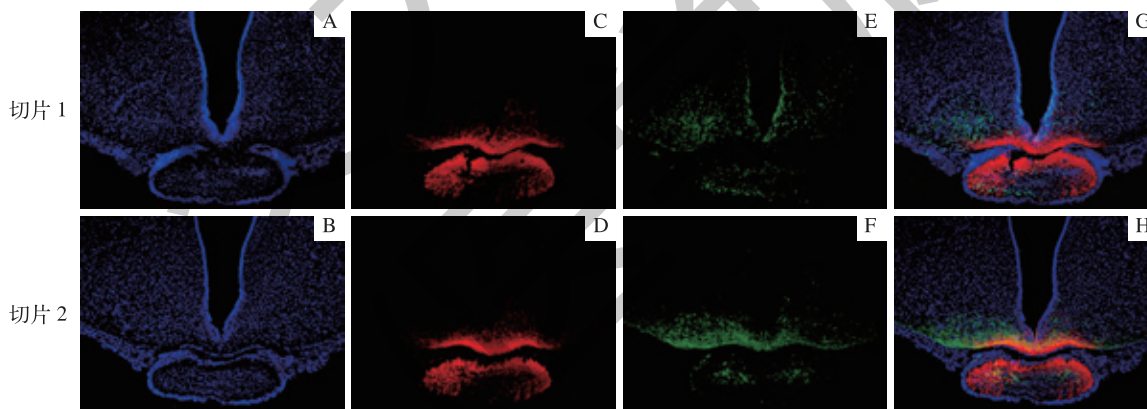
将核团 AVPV、ARC 解剖结构分离，分别检测基因 *TTF1* mRNA 表达水平，结果显示在 AVPV、ARC 核团中，*TTF1* mRNA 表达皆呈上升趋势；AD 组与 JUV 组、EP 组比较，差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 2，图 3)。



注: A. 低倍镜下 AVPV 核团中 TTF1 (绿色荧光) 与细胞核标记 DAPI (蓝色荧光) 共染分布情况, TTF1 主要分布在 AVPV 核及第三脑室室周细胞; B、C. 分别为图 A 框内视野高倍镜下 DAPI、TTF1 表达; D. 图 A 框内视野高倍镜下 TTF1 表达于细胞核内; E. 低倍镜下 ARC 核团中 TTF1 (绿色荧光) 与细胞核标记 DAPI (蓝色荧光) 共染分布情况, TTF1 主要分布于 ARC 核、ME、第三脑室室周细胞; F、G. 分别为图 E 框内视野高倍镜下 DAPI、TTF1 表达; H. 图 E 框内视野高倍镜下 TTF1 表达于细胞核内, 箭头所示为 TTF1 与细胞核相对位置关系; I. AVPV 核模式图; J. ARC 核模式图。A、E. 标尺 = 100 μm ; B-D、F-H. 标尺 = 20 μm 。

图 1 TTF1 在核团 AVPV、ARC 的表达分布情况

Fig 1 Location of TTF1 in AVPV and ARC nucleus



注: A、C、E、G. 切片 1 下丘脑 ARC 核中细胞核标记 DAPI (蓝色荧光)、GnRH (红色荧光) 及 TTF1 (绿色荧光) 表达情况; B、D、F、H. 切片 2 下丘脑 ARC 核中细胞核标记 DAPI (蓝色荧光)、GnRH (红色荧光) 及 KiSS1 (绿色荧光) 表达情况。

图 2 ARC 连续切片 GnRH、KiSS1、TTF1 表达情况 ($\times 100$)

Fig 2 Expression of GnRH, KiSS1 and TTF1 in continuous sections of ARC ($\times 100$)

2.4 不同性发育时期雌性 SD 大鼠下丘脑、AVPV、ARC 部位 GnRH、KiSS1 mRNA 表达的变化

在下丘脑, *GnRH* mRNA 表达随青春发育呈上升趋势, 其中 AD 组明显高于 JUV 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 AVPV, 3 组间 *GnRH* mRNA 表达两两比较, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 随着青春发育, *GnRH* mRNA 在 AVPV 的表达急剧增高。在 ARC, EP 组和 AD 组 *GnRH* mRNA 的表达量与 JUV 组相比, 差异均

具有统计学意义 (均 $P < 0.01$); 随着青春发育, 其表达水平呈持续上升 (表 2, 图 3)。

KiSS1 mRNA 在下丘脑、AVPV、ARC 的表达水平整体呈上升趋势, AD 组与 JUV 组和 EP 组比较, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。随着青春发育, AVPV 和 ARC 中 *KiSS1* mRNA 表达在 EP 期即达到峰值, 在 AD 期维持在较高水平; EP 组和 AD 组与 JUV 组比较, 差异均具有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (表 2, 图 3)。

表 2 各组大鼠下丘脑、AVPV、ARC 部位 *GnRH*、*KiSS1* 和 *TTF1* mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Tab 2 Comparison of mRNA expression of *GnRH*, *KiSS1* and *TTF1* in hypothalamus, AVPV and ARC ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	下丘脑			AVPV			ARC		
	<i>GnRH</i>	<i>KiSS1</i>	<i>TTF1</i>	<i>GnRH</i>	<i>KiSS1</i>	<i>TTF1</i>	<i>GnRH</i>	<i>KiSS1</i>	<i>TTF1</i>
JUV 组	0.925±0.375	1.060±0.377	1.120±0.632	1.061±0.409	1.024±0.241	1.012±0.162	0.872±0.318	1.056±0.345	1.372±0.817
EP 组	1.148±0.762	1.161±0.583	0.947±0.573	3.196±1.042 ^①	2.261±0.563 ^①	1.018±0.184	1.399±0.241 ^①	2.449±1.096 ^①	1.901±0.668
AD 组	1.512±0.630 ^①	1.576±0.447 ^{②③}	2.186±0.714 ^④	6.577±2.784 ^⑤	2.261±0.664 ^⑥	1.727±0.460 ^⑥	1.564±0.379 ^⑥	2.212±0.618 ^⑥	2.881±0.954 ^{⑥⑦}
<i>F</i> 值	2.518	3.958	13.108	30.938	22.488	22.417	15.478	11.750	10.435
<i>P</i> 值	0.097	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ^① $P=0.035$, ^② $P=0.012$, ^③ $P=0.005$, ^④ $P=0.000$, ^⑤ $P=0.001$, 与 JUV 组比较; ^⑥ $P=0.000$ 与 JUV 组、EP 组分别比较; ^⑦ $P=0.040$, ^⑧ $P=0.006$ 与 EP 组比较。

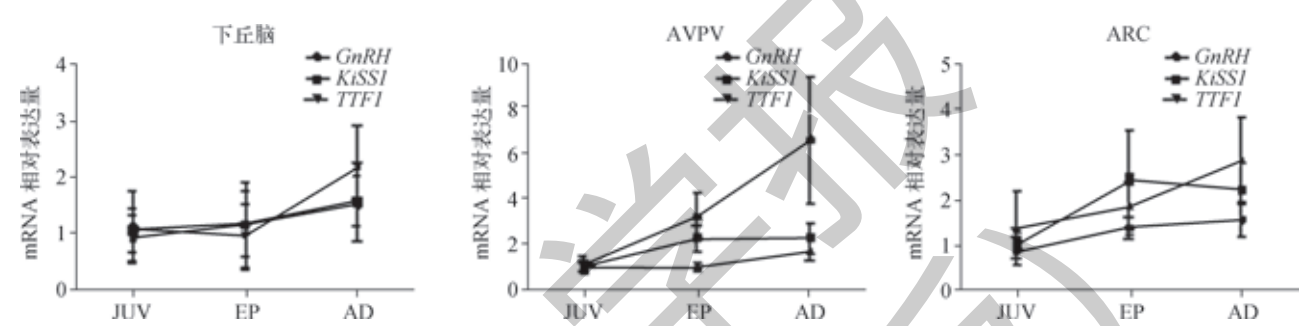


图 3 各组 SD 雌鼠下丘脑、AVPV、ARC 中 *GnRH*、*KiSS1* 和 *TTF1* mRNA 表达水平
Fig 3 mRNA expression levels of *GnRH*, *KiSS1* and *TTF1* in hypothalamus, AVPV and ARC of female SD rats

2.5 不同的性发育时期 SD 雌鼠下丘脑 *KiSS1*、*TTF1* 蛋白表达的变化

Western blotting 检测结果 (表 3) 显示: *KiSS1* 蛋白表达水平在 JUV 组、EP 组、AD 组呈现逐渐增高的趋势, 其中 AD 组与 JUV 组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。EP 组与 JUV 组比较, *TTF1* 蛋白表达水平显著降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), AD 组则明显高于 EP 组 ($P<0.01$)。 *TTF1* 蛋白在 JUV 期表达较高, 到 EP 期表达相对下降, 随着青春发育, 在 AD 期达到高峰, 从 EP 期到 AD 期的表达趋势与 *KiSS1* 蛋白一致 (图 4)。

表 3 各组 SD 雌鼠下丘脑 *KiSS1*、*TTF1* 蛋白表达 ($n=4$)
Tab 3 Protein expression of *KiSS1* and *TTF1* in hypothalamus of female SD rats ($n=4$)

组别	<i>KiSS1</i>	<i>TTF1</i>
JUV 组	1.072±0.093	1.078±0.149
EP 组	1.617±0.350	0.751±0.094 ^①
AD 组	1.986±0.649 ^②	1.174±0.115 ^③
<i>F</i> 值	3.446	10.015
<i>P</i> 值	0.101	0.012

注: ^① $P=0.040$, ^② $P=0.016$, 与 JUV 组比较; ^③ $P=0.005$, 与 EP 组比较。

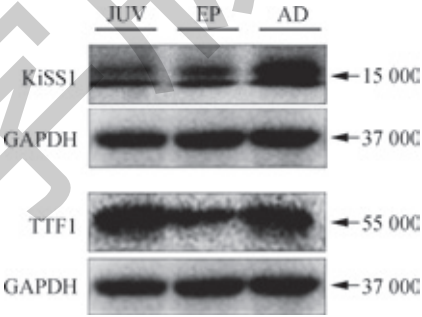


图 4 各组 SD 雌鼠下丘脑 *KiSS1*、*TTF1* 蛋白表达
Fig 4 Protein expression of *KiSS1* and *TTF1* in hypothalamus of female SD rats

3 讨论

下丘脑神经内分泌细胞产生释放的 *GnRH*, 可作用于 HPG 轴进而诱发青春启动。 *KiSS1* 是在青春发育过程中起到“守门” (gatekeeper) 作用的重要因子, 其产物肽 Kisspeptin (由 154 个氨基酸组成), 是同一前体不同水解过程的产物^[9]。 Kisspeptin 能进一步水解成 Kisspeptin-54、14、13、10 等, 统称为 Kisspeptins。 Kisspeptin 可通过与 *GnRH* 神经元表达的 GPR-54 结合传递信号, 促进 *GnRH* 释放, 进而启动 HPG 轴, 促进青春期的启动^[2]。随着下丘脑性发育调控基因网络的完善, 青春启动的机制研究也在不断丰富。已发现下丘脑上游多个基因可能通过调控

KISS1, 进一步调控性发育及性启动, 但是确切机制还需进一步证实。

基因 *TTF1* 为一同源异形盒基因, 位于 14q13.3, 是 NKX 同源基因家族成员, 有 3 个外显子和 2 个内含子, 包含多个结构域, 分别在 N 端和 C 端各有一个具有转录活性的结构域, 可与 DNA 结合发挥作用^[10], 主要表达于肺、甲状腺、脑等部位, 与发育及生理功能相关^[11]。该基因与间脑、下丘脑、延髓腹侧前脑胚胎发育关系密切^[12]。基因 *TTF1* 敲除后会严重影响苍白球、下丘脑的发育^[13-15]。出生后 *TTF1* 可表达于下丘脑和视前区的部分胶质和神经元细胞, 视前区分布着 GnRH 神经元, 通过调控 GnRH 的表达进而调控生殖系统^[4]。有研究显示在 AVPV、ARC、ME 等部位表达的 *TTF1*, 可通过跨膜突触作用于 GnRH 神经元发挥抑制作用。*TTF1* 与 GnRH 表达昼夜节律的调控有关^[16], 参与雄激素受体对 GnRH 的表达调控^[17]。组织免疫荧光染色结果显示 *TTF1* 表达于细胞核, 多分布在下丘脑 AVPV 核、ARC 核、ME 以及第三脑室室周细胞, 对连续相邻切片行 *TTF1* 与 GnRH、KiSS1 与 GnRH 荧光双染实验, 可见 *TTF1*、KiSS1、GnRH 在 ARC 核与 ME 交界处有表达部位的重叠, *TTF1*、KiSS1 在 ARC 核表达部位基本重叠, 说明了三者表达部位的相对关系。已知 ME 为 GnRH 神经元轴突收敛释放 GnRH 连接下丘脑和垂体的门户系统的最后共同通路^[18]。KiSS1 通过 GPR54 系统作用于 GnRH 神经元促进 GnRH 表达释放, 三者在此位置的重合可能与生物的生殖功能的调控有关。研究^[4]发现在青春发育期的雌性大鼠下丘脑中, *TTF1* 可持续表达于 KiSS1 神经元。曾有研究发现 *TTF1* 基因的沉默或缺失可延迟青春期的正常启动^[18]; 其后, 又有学者利用外源性表达 *TTF1* 的 GT1-7 细胞进行研究, 推测 *TTF1* 可能参与调控神经元分化、发育以及性发育有关基因的表达^[19]。*TTF1* 与 Kisspeptin 神经元分化相关^[20], 可被招募至 KiSS1、EAP1 (Enhanced at Puberty 1) 启动子区进而参与两者的转录调控^[21-22]。*TTF1* 与雌激素受体 (ER α) 介导的性别特异性运动有关^[23], 作为转录因子参与 *SRY* 基因在先天性巨结肠病性别二项性的调控^[24]。2013 年, 日本一项 GWAS 研究显示 *TTF1* 基因相邻序列的多态性变化与月经来潮过早有关^[25]。然而, 巴西一项针对 133 例中枢性性发育异常患者系列基因测序未检出基因 *TTF1* 的突变或多态性^[26]。有关基因 *TTF1* 及其所参与的基因网络与青春启动之间的关系并不明确。

本实验针对雌性 SD 大鼠, 选取幼年期、性发育早期、性成熟期 3 个时间点, 对其青春发育的过程进行研究。Real-time PCR 检测 *GnRH*、*KiSS1*、*TTF1* mRNA 水

平, 结果显示下丘脑 GnRH 表达水平持续上升, 在性成熟期达到峰值, 在 AVPV、ARC 核团中也有着同样的升高趋势; 其中, 在 AVPV 核的 *GnRH* mRNA 表达最为明显, 呈现急剧上升, 且 3 组间两两比较皆有显著差异。本实验结果提示, AVPV 核团可能与青春启动有密切关系。*KiSS1* mRNA 表达在全下丘脑中呈持续上升趋势, 在性成熟期达到最高, 这与 Western blotting 检测全下丘脑 KiSS1 蛋白表达的结果一致。然而, 在 AVPV、ARC 核团中, *KiSS1* mRNA 表达在性发育早期达到峰值, 这一高水平表达一直持续至性成熟期; 其中在不同核团中及全下丘脑中峰值出现了时间的差异, 在全下丘脑中有相对的延迟。已知 AVPV、ARC 核团是机体生殖内分泌系统调控中枢的重要核团, 在雌激素的作用下发挥着关键作用。因而, 在这 2 个核团中 KiSS1 表达的峰值在性发育早期出现, 能够相对准确地反映其特定部位表达水平的变化时间。在本实验中, 因下丘脑组织由多种类型、功能相互关联又存在差异的细胞、核团组成, 欲研究特定部位核团某些基因表达调控的关系, 则对取材提出了较高的要求; 加之组织体积质量较小, 增加了取材的难度, 本实验利用冰冻切片机和显微镜定位取材, 为特定核团中转录因子表达水平的检测提供了相对准确的方法。在 AVPV 和 ARC 核团中, *KiSS1* mRNA 在性发育早期出现峰值并持续高表达, *GnRH* mRNA 表达持续升高至性成熟期达高峰, 证实 KiSS1 是 GnRH 激活表达的“触发器”。KiSS1 在性发育早期启动分泌达高峰, 进而激活 GnRH 的合成分泌, 促进青春启动。

TTF1 mRNA 在下丘脑、AVPV、ARC 表达趋势基本一致, 整体呈上升趋势, 在性成熟期达较高水平, 与 GnRH、KiSS1 表达趋势一致。其中, 在全下丘脑, *TTF1* mRNA 表达在性发育早期略有下降 (无统计学意义), 之后显著升高, 在性成熟期达到高峰, 与 Western blotting 检测的下丘脑 *TTF1* 蛋白表达水平变化相一致。*TTF1* 蛋白水平在性发育早期到性成熟期的表达趋势与 KiSS1 表达趋势一致, 但在性发育早期出现一表达低谷。这一现象的出现可能与以下 3 个因素有关。第一, mRNA 的转录与蛋白的翻译可能存在时间和空间差异, 在同一时间两者可能出现表达水平不一致的情况, 也可能与相关信号通路调控有关, 因此在 *TTF1* mRNA 水平上并未检测到有统计学意义的下降。第二, 基因 *TTF1* 在胚胎期和个体发育早期有大量表达, 可能与其对胚胎期内侧基底节下丘脑 (medial basal hypothalamus, MBH) 形成和发育有重要作用有关。第三, 实验中, 各基因检测样本取材于下丘脑、AVPV 和 ARC, 可对特定核团进行检测, 而蛋白表达水平检测的样本取材受总蛋白量的限制, 仅检测了全下丘脑 *TTF1*、

KiSS1 表达。幼年期到性发育早期, 下丘脑 *TTF* mRNA 有一轻微的下陷趋势, 后上升达高峰, 在 AVPV、ARC 中 *TTF1* mRNA 表达呈持续上升趋势, 在性成熟期达高峰。在下丘脑, *TTF1* 蛋白表达先下降, 后显著上升, 取材为包括 AVPV 和 ARC 在内的多个核团的总和。*TTF1* 蛋白在幼年期表达水平较高, 可能与除 AVPV、ARC 外其他下丘脑核团表达相关。

此前, 有科学家研究基因 *TTF1* 突变可导致因基底节受损而出现的神经系统症状, 仅携带一个 *TTF1* 等位基因的小鼠可出现类似症状^[27-28]。此后, 有研究^[13] 尝试利用基因敲除技术获得 *TTF1*-KO (Knock out) 小鼠, 研究该基因在生殖系统的功能, 但 *TTF1*-KO 小鼠无法存活, 因此无法使用 *TTF1*-KO 小鼠研究基因 *TTF1* 对青春启动的影响。有研究^[18] 使用 Cre-loxP 技术, 构建 *Ttf1*^{SynCre} KO 小鼠, 得到成活的 *TTF1* 基因敲除小鼠进而行相应研究, 但无法

对特定核团的 *TTF1* 基因进行敲除研究其功能。本实验后续可设计针对 *TTF1* mRNA 的 shRNA 在特定核团干扰 *TTF1* mRNA 表达, 进而研究在体水平上特定部位 *TTF1* 表达下调的情况下青春发育相关转录因子表达的变化以及青春启动相关指标。

综上所述, 本研究结果显示, 基因 *TTF1* 表达水平在青春发育过程中整体呈现上升的趋势, 在解剖学上与 GnRH 细胞轴突在正中隆突区域相临近。现有研究和本实验的结果表明 *TTF1* 的表达与 KiSS1、GnRH 调控 HPG 轴有关, 可能与 KiSS1/GPR54 信号系统对青春启动调控有关。本研究丰富了青春启动相关转录因子调控系统的理论, 为探究儿童性早熟发生机制、寻找潜在预防及治疗儿童性早熟的药物或治疗靶点提供依据。后续可进一步研究 *TTF1* 对 GnRH、KiSS1 表达调控的作用和影响, 深入研究青春启动的基因信号网络。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Vogel G. A powerful first KiSS-1[J]. Science, 2005, 309 (5734): 551-552.
- [2] d'Anglemont de Tassigny X, Colledge WH. The role of kisspeptin signaling in reproduction[J]. Physiology (Bethesda), 2010, 25(4): 207-217.
- [3] Roth CL, Mastronardi C, Lomniczi A, et al. Expression of a tumor-related gene network increases in the mammalian hypothalamus at the time of female puberty[J]. Endocrinology, 2007, 148(11): 5147-5161.
- [4] Lee BJ, Cho GJ, Jr NR, et al. TTF-1, a homeodomain gene required for diencephalic morphogenesis, is postnatally expressed in the neuroendocrine brain in a developmentally regulated and cell-specific fashion[J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17(1): 107-126.
- [5] Heger S, Mastronardi C, Dissen GA, et al. Enhanced at puberty 1 (EAP1) is a new transcriptional regulator of the female neuroendocrine reproductive axis[J]. J Clin Invest, 2007, 117(8): 2145-2154.
- [6] Ojeda SR, Dubay C, Lomniczi AG, et al. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 324(1-2): 3-11.
- [7] Sullivan PS, Maresh EL, Seligson DB, et al. Expression of thyroid transcription factor-1 in normal endometrium is associated with risk of endometrial cancer development[J]. Mod Pathol, 2012, 25(8): 1140-1148.
- [8] Alexander SK, Donald KC, Robert AS. Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction[J]. Trends Neurosci, 2007, 30(10): 504-511.
- [9] Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54[J]. J Biol Chem, 2001, 276(37): 34631-34636.
- [10] Zhang LP, Ma BY, Han FX, et al. Molecular characterization and functional analysis of sheep thyroid transcription factor-1[J]. Genet Mol Res, 2012, 11 (3): 2585-2597.
- [11] Rankin SA, McCracken KW, Luedeker DM, et al. Timing is everything: Reiterative Wnt, BMP and RA signaling regulate developmental competence during endoderm organogenesis[J]. Dev Biol, 2018, 434(1): 121-132.
- [12] Manoli M, Driever W. nkx2.1 and nkx2.4 genes function partially redundant during development of the zebrafish hypothalamus, preoptic region, and pallidum[J]. Front Neuroanat, 2014, 8: 145.
- [13] Kimura S, Hara Y, Pineau T, et al. The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary[J]. Genes Dev, 1996, 10(1): 60-69.
- [14] Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, et al. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon[J]. Development, 1998, 125(23): 4835-4840.
- [15] Marín O, Baker J, Puelles L, et al. Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections[J]. Development (Cambridge, England), 2002, 129(3): 761-773.
- [16] Matagne V, Kim JG, Ryu BJ, et al. TTF1, a homeodomain containing transcription factor, contributes to regulating periodic oscillations in GnRH gene expression[J]. J Neuroendocrinol, 2012, 24(6): 916-929.
- [17] Brayman MJ, Pepa PA, Berdy SE, et al. Androgen receptor repression of GnRH gene transcription[J]. Mol Endocrinol, 2012, 26(1): 2-13.
- [18] Mastronardi C, Smiley GG, Raber J, et al. Deletion of the Ttf1 gene in differentiated neurons disrupts female reproduction without impairing basal ganglia function[J]. J Neurosci, 2006, 26(51): 13167-13179.
- [19] Provenzano C, Pascucci B, Lupari E, et al. Large scale analysis of transcription factor TTF-1/NKX2.1 target genes in GnRH secreting cell line GT1-7[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 323(2): 215-223.
- [20] Biehl MJ and Raetzman LT. Rbpj-κ mediated Notch signaling plays a critical role in development of hypothalamic Kisspeptin neurons[J]. Dev Biol, 2015, 406(2): 235-246.
- [21] Mueller JK, Dietzel A, Lomniczi A, et al. Transcriptional regulation of the human KiSS1 gene[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 342(1-2): 8-19.
- [22] Mueller JK, Koch I, Lomniczi A, et al. Transcription of the human EAP1 gene is regulated by upstream components of a puberty-controlling Tumor Suppressor Gene network[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 351(2): 184-189.
- [23] Correa S, Newstrom D, Warne J, et al. An estrogen-responsive module in the ventromedial hypothalamus selectively drives sex-specific activity in females[J]. Cell Rep, 2015, 10(1): 62-74.
- [24] Li Y, Kido T, Garciabarcelo MM, et al. SRY interference of normal regulation of the RET gene suggests a potential role of the Y-chromosome gene in sexual dimorphism in Hirschsprung disease[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(3): 685-697.
- [25] Tanikawa C, Okada Y, Takahashi A, et al. Correction: genome wide association study of age at menarche in the Japanese population[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63821.
- [26] Cukier P, Wright H, Rulfs T, et al. Molecular and gene network analysis of thyroid transcription factor 1 (TTF1) and enhanced at puberty (EAP1) genes in patients with GnRH-dependent pubertal disorders[J]. Horm Res Paediatr, 2013, 80(4): 257-266.
- [27] Krude H, Schütz B, Biebermann H, et al. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency[J]. J Clin Invest, 2002, 109(4): 475-480.
- [28] Pohlenz J, Dumitrescu A, Zundel D, et al. Partial deficiency of Thyroid transcription factor 1 produces predominantly neurological defects in humans and mice[J]. J Clin Invest, 2002, 109(4): 469-473.

[收稿日期] 2018-02-23

[本文编辑] 吴 洋

