

论著·基础研究

沉默 *Ttf1* 对神经元细胞及雌性大鼠弓状核内 *Kiss1* 和 *GnRH* 基因表达的影响

臧少莲, 尹小琴, 吕拥芬, 许丽雅, 郭 盛, 李 嫔

上海交通大学附属儿童医院, 上海市儿童医院内分泌科, 上海 200333

[摘要] **目的**·探讨抑制神经元细胞和雌性大鼠下丘脑弓状核中甲状腺转录因子 1 (thyroid transcription factor 1, *Ttf1*) 基因的表达对亲吻素 (*Kiss1*) 和促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, *GnRH*) 基因表达的影响。**方法**·针对大鼠 *Ttf1* 基因的 mRNA 序列分别设计 3 对特异性的干扰序列 (TTF1-shRNA1、TTF1-shRNA2、TTF1-shRNA3), 包装成慢病毒质粒。以神经元细胞 ND7-23 为体外模型, 采用 real-time PCR 及 Western blotting 技术筛选干扰效率最高的慢病毒质粒 (LV-TTF1-shRNA), 转染 72 h 后检测 *Kiss1* 和 *GnRH* 基因的表达。将 LV-TTF1-shRNA 和空载质粒注射到 21 日龄雌性大鼠的下丘脑弓状核内, 分别在幼年期 (25 日龄)、青春发育早期 (35 日龄)、成年期 (42 日龄) 检测弓状核内 *Kiss1* 和 *GnRH* 基因的表达变化并观察雌鼠的阴门开放时间。**结果**·慢病毒质粒转染 ND7-23 细胞 72 h 后, LV-TTF1-shRNA2 组、LV-TTF1-shRNA3 组的 *Ttf1* mRNA 及蛋白表达均显著减少 (均 $P<0.05$), 其中 LV-TTF1-shRNA3 干扰效果最佳。采用 LV-TTF1-shRNA3 抑制 ND7-23 细胞中 *Ttf1* 表达后, *Kiss1* 和 *GnRH* 基因的 mRNA 表达均显著降低 (均 $P<0.05$)。雌鼠弓状核内双侧显微注射 LV-TTF1-shRNA3 后, 25 日龄、35 日龄、42 日龄大鼠弓状核 *Kiss1* 和 *GnRH* 的 mRNA 均显著降低 (均 $P<0.05$), 35 日龄和 42 日龄时 KISS1 蛋白水平明显降低, 且雌鼠阴门开放时间延迟。**结论**·在细胞水平和雌性大鼠弓状核内抑制 *Ttf1* 基因表达均使得 *Kiss1* 和 *GnRH* 基因表达显著下调, 也导致雌鼠阴门开放时间明显延迟。

[关键词] 甲状腺转录因子 1; 亲吻素基因; 促性腺激素释放激素; RNA 干扰; 慢病毒载体; 青春期发育

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.11.002 **[中图分类号]** R725.8 **[文献标志码]** A

Effects of silenced *Ttf1* on genes expression of *Kiss1* and *GnRH* in neuronal cells and arcuate nucleus of female rats

ZANG Shao-lian, YIN Xiao-qin, LÜ Yong-fen, XU Li-ya, GUO Sheng, LI Pin

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

[Abstract] **Objective**·To explore the effects of inhibiting thyroid transcription factor 1 (*Ttf1*) expression on *Kiss1* and gonadotropin-releasing hormone (*GnRH*) expressions in neuronal cells and hypothalamic arcuate nucleus (ARC) of female rats. **Methods**·Three shRNAs (TTF1-shRNA1, TTF1-shRNA2, and TTF1-shRNA3) interference sequences were designed for rat *Ttf1* gene and were constructed into lentiviral vectors. The efficiency of LV-TTF1-shRNA was detected by real-time PCR and Western blotting in neuronal cell line ND7-23. And the expressions of *Kiss1* and *GnRH* were tested 72 h after transfection. Moreover, LV-TTF1-shRNA or the blank lentiviral vector was injected into 21-day female rats' ARC. *Kiss1* and *GnRH* expressions were detected at the juvenile (25-day), early puberty (35-day) and adult (42-day) stages. Meanwhile, vaginal opening time of the rats was recorded. **Results**·Seventy-two hours after lentivirus transfection in ND7-23 cells, the mRNA and protein expressions of *Ttf1* decreased significantly in LV-TTF1-shRNA2 group and LV-TTF1-shRNA3 group (all $P<0.05$), particularly in LV-TTF1-shRNA3 group. The expressions of *Kiss1* and *GnRH* mRNA reduced significantly after LV-TTF1-shRNA3 being transfected in ND7-23 cells (both $P<0.05$). After injection of LV-TTF1-shRNA3 in female rats' ARC, mRNA abundance of *Kiss1* and *GnRH* showed evident reduction at 25-day, 35-day and 42-day stages (all $P<0.05$). And KISS1 protein reduced significantly at 35-day and 42-day stages. Female rats transfected with LV-TTF1-shRNA3 showed delayed vaginal opening. **Conclusion**·Inhibition of *Ttf1* gene expression not only significantly reduces the expression of *Kiss1* and *GnRH* in neuronal cells and female rats' ARC, but also causes female rats vaginal opening delay.

[Key words] thyroid transcription factor 1 (TTF1); *Kiss1* gene; gonadotropin-releasing hormone (GnRH); RNA interference (RNAi); lentiviral vector; puberty

[基金项目] 国家自然科学基金 (81871131); 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); 上海市儿童医院院级面上项目 (2016YMS003); 上海市卫生和计划生育委员会面上项目 (201640140)。

[作者简介] 臧少莲 (1994—), 女, 硕士生; 电子邮箱: shaolianz@163.com。

[通信作者] 李 嫔, 电子邮箱: lipin21@126.com。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81871131); Medical Engineering Cross Research Fund of Shanghai Jiao Tong University (YG2015MS39); Jin Lei Pediatric Endocrinology Growth Research Fund for Young Physicians (PEGRF201506002); General Project of Shanghai Children's Hospital (2016YMS003); General Program of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (201640140)。

[Corresponding Author] LI Pin, E-mail: lipin21@126.com。



青春期是生长和发育的关键时期,该阶段的正常发育依赖于正常的神经内分泌功能。下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴调控人类的青春期发育和生殖功能,并且由兴奋性和抑制性因子组成的复杂网络严格调控,在胚胎期和婴幼儿早期阶段激活,在儿童期受到抑制,青春期开始时被重新激活并达到高潮^[1]。促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)神经元的调控机制非常复杂,迄今为止关于青春期起始 GnRH 神经元被激活的具体机制尚不清楚。亲吻素(KISS1)是 *Kiss1* 基因编码产生的一种肽类激素,已有研究证实, KISS1 蛋白与 G 蛋白偶联受体 54 (G-protein-coupled receptor 54, GPR54) 是调节 GnRH 神经元活性和青春期发育的关键调节因子^[2],主要分布在下丘脑的前腹侧室旁核(anteroventral periventricular, AVPV)和弓状核(arcuate nucleus, ARC)^[3]。雌激素是调节雌鼠下丘脑 *Kiss1* 表达的关键因子,在 AVPV 中它通过激活表达 KISS1 神经元上的雌激素受体 α (estrogen receptor α , ER α),正反馈促进 GnRH 神经元分泌黄体生成素(luteinizing hormone, LH),刺激排卵;而在 ARC 中,雌激素则通过负反馈抑制 KISS1 的释放。ARC 和 AVPV 共同作用产生 LH 的脉冲式释放,形成稳定的生殖周期^[4-5]。

甲状腺转录因子 1 (thyroid transcription factor 1, TTF1), 又称为 NK2 相关的同源转录因子 1 (NK2-related homeobox transcription factor 1, Nkx2-1) 或甲状腺特异性增强子结合蛋白 (thyroid-specific enhancer-binding protein, T/ebp), 主要在前脑、垂体、肺和甲状腺等器官中表达^[6]。Sandberg 等^[7]研究发现 TTF1 可以通过直接结合靶基因附近的调控元件而充当转录激活因子和抑制因子的角色。近年的研究^[8]表明, TTF1 可能是 *Kiss1* 上游的调控因子,通过直接调节 *Kiss1* 的表达参与青春性发育的调控。

敲除或敲低相关宿主基因对于研究细胞内关键分子的作用机制至关重要。慢病毒载体可以有效转导细胞,并稳定整合到宿主基因组中并长期表达,是长期基因传递的良好载体,因此慢病毒载体介导的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 仍然被广泛使用^[9]。为进一步证明 TTF1 与青春期发育之间的关系,本研究设计并合成针对大鼠 *Ttf1* 基因的干扰序列,构建有效慢病毒载体。在体外细胞水平测定慢病毒干扰效率后,进一步在体内利用脑立体定位技术将 LV-TTF1-shRNA 原位注射至雌性大鼠下丘脑 ARC 中,靶向敲低 ARC 内 *Ttf1* 的表达,观察青春性发育过程的变化以及对 *Kiss1* 和 *GnRH* 基因表达的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象及实验材料

1.1.1 实验动物及细胞 3 周龄的健康清洁级雌性 Sprague-Dawley 大鼠 (50 ~ 60 g) 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供 [生产许可证号为 SCXK (沪) 2017-0005], 随机分为 ARC 慢病毒注射组和 ARC 病毒对照组, 每组 30 只。利用脑立体定位仪在大鼠 ARC 内进行双侧显微注射。实验大鼠饲养于上海交通大学附属第六人民医院动物科学部 [动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2016-0020], 饲养条件为自然光照, 平均温度 (21 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (55 \pm 10)%, 12 h 明暗周期, 大鼠自由摄食饮水。

人胚肾细胞 293T 为贴壁依赖型上皮样细胞, 神经母细胞 ND7-23 为贴壁神经元细胞, 2 株细胞均购自中国科学院细胞库; 常规培养使用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 培养液 (含 4.0 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

1.1.2 主要试剂及仪器 内切酶、 T_4 DNA 连接酶 (1 U/ μL)、DNA 标志物 GeneRuler DNA Ladder、RNA 酶抑制剂 (Fermentas, 加拿大), TRIzol 试剂、反转录酶、DNA 聚合酶、dNTPs、转染试剂 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国), 凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒 (Axygen, 美国), 包装质粒、空病毒载体 PDS019_pL_shRNA_F (上海诺百生物科技有限公司), DMEM、Opti-MEM、0.25% 胰蛋白酶、FBS (Gibco, 美国), 氯仿、异丙醇、无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司), DEPC 水、3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (上海翊圣生物科技有限公司), 反转录试剂盒及实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 试剂盒 (TaKaRa, 日本), 蛋白裂解液、ECL 发光试剂盒 (ThermoFisher, 美国), TTF1 抗体、KISS1 抗体 (Abcam, 英国), 辣根过氧化物酶标记二抗 (Jackson, 美国), Western blotting 抗体快速剥离缓冲液 (上海雅酶生物科技有限公司), 戊巴比妥钠 (Sigma, 美国)。

10 μL 微量注射器 (上海高鸽工贸有限公司), 低温高速离心机 (Eppendorf, 德国), 荧光显微镜 (Leica, 德国), 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士), 紫外分光光度计 (ThermoFisher, 美国), ChemoScope 3500 化学发光成像仪 (上海勤翔科学仪器有限公司)。DNA 测序和引物合成由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 LV-TTF1-shRNA 慢病毒载体的构建 对 *Ttf1* 基因序列 (NM_013093.1) 进行分析, 检查基因内部有无特别复杂的二级结构和重复序列。然后采用 Invitrogen 公司提供的在线设计工具 (www.invitrogen.com/rnai) 针对大鼠

的 *Ttf1* 基因设计 3 对 shRNA 引物序列 (表 1)。在序列的 5' 端添加限制性酶切位点及 Kozak 序列 GCCACC, 在序列的 3' 端添加限制性酶切位点。将 shRNA 引物混合溶液于 95 °C 加热 5 min, 72 °C 退火 5 min 后利用 DNA 连接酶连接入空载体 PDS019_pL_shRNA_F 中。

表 1 针对大鼠 *Ttf1* 基因设计的 3 对 shRNA oligo 序列及阴性对照序列
Tab 1 Sequences of shRNAs oligo targeting rat *Ttf1* and negative control

Primer	Sequence (5' → 3')
TTF1-shRNA1-F	CACCGCATGAATATGAGCGGCATGGCGAACCATGCCGCTCATATTCATGC
TTF1-shRNA1-R	AAAAGCATGAATATGAGCGGCATGGTTCGCCATGCCGCTCATATTCATGC
TTF1-shRNA2-F	CACCGCATCTGGCCAGCATGATTCACGAATGAATCATGCTGGCCAGATGC
TTF1-shRNA2-R	AAAAGCATCTGGCCAGCATGATTCATTCGTGAATCATGCTGGCCAGATGC
TTF1-shRNA3-F	CACCGGAGGAAAGCTACAAGAAAGTCGAAACTTTCTTGAGCTTTCCTCC
TTF1-shRNA3-R	AAAAGGAGGAAAGCTACAAGAAAGTTTCGACTTTCTTGAGCTTTCCTCC
Negative control	CTAAGGTTAAGTCGCCCTCGC

1.2.2 慢病毒质粒的包装 取对数生长期且细胞状态良好的 293T 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化后吹打形成单细胞悬液, 按照 6×10^6 个细胞数接种到 10 cm 的培养皿中, 次日将细胞完全培养液换成 5 mL Opti-MEM 培养液。将 9 μ g 包装质粒和 3 μ g 慢病毒质粒加入 1.5 mL Opti-MEM 培养液中充分混匀; 同时取 36 μ L Lipofectamine 2000 加入另外的 1.5 mL Opti-MEM 培养液中, 混匀后室温放置 20 min。将这 2 种液体混合后加入细胞培养皿中, 轻轻混匀, 置于细胞培养箱中孵育 6 h 后, 换成完全培养液 (含 10%FBS), 继续培养 48 h 后收集细胞培养液, $1\,000 \times g$ 离心 10 min, 并用孔径 0.45 μ m 的滤器进行过滤。将过滤后的病毒原液 $50\,000 \times g$ 超速离心 2 h, 移去上清液, 加入 1 mL DMEM 培养液进行重悬, 并利用荧光法测定病毒滴度, 然后按需分装至小管, 置于 -80 °C 冰箱中保存备用。

1.2.3 LV-TTF1-shRNA 慢病毒转染 ND7-23 细胞 将 ND7-23 细胞培养于含 10%FBS 的 DMEM 培养液中。梯度稀释病毒原液后转染 ND7-23 细胞, 利用荧光显微镜观察不同病毒稀释度转染 ND7-23 细胞后的增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 表达比例, 从而确定慢病毒最佳转染浓度。将细胞分成空白对照组、阴性对照组 (NC 组)、LV-TTF1-shRNA1 组、LV-TTF1-shRNA2 组、LV-TTF1-shRNA3 组进行慢病毒转染, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h, 弃病毒液, 加入完全培养液, 继续培养 48 h, 收集细胞沉淀用于 qPCR 和

Western blotting 检测慢病毒的干扰效率。

1.2.4 下丘脑核团内双侧显微注射 根据本课题组前期研究^[10-11], 在大鼠 21 日龄进行手术可使 LV-TTF1-shRNA 在青春期开始前达到最大表达量。将 21 日龄雌性大鼠用 1% 戊巴比妥钠 (0.5 mL/100 g) 深度麻醉后, 置于脑立体定位仪上, 切开皮肤和骨膜以暴露前囟点。采用 10 μ L 微量注射器进行显微注射, 并在其尖端再连接一段玻璃毛细管, 以减小对大鼠脑部的损伤。将 3 μ L LV-TTF1-shRNA3 慢病毒质粒 (1.2×10^9 TU/mL, LV 组) 或 LV-EGFP (即空病毒载体 PDS019_pL_shRNA_F, NC 组) 显微注射到大鼠 ARC 中。注射后, 将针头保留在原处 5 ~ 10 min, 然后在 1 min 内缓慢取出, 在对侧核重复该操作。实验过程中, 参考 Paxinos 等^[12] 的脑图谱和前期研究结果^[13-14], 确定 ARC 的立体坐标 (外侧 0.4 mm, 前囟后 1.6 mm, 硬脑膜下 9.6 mm)。术后于每日上午 9:00—9:30 观察大鼠阴门开启情况。然后分别在大鼠幼年期 (25 日龄)、青春发育早期 (35 日龄)、成年期 (42 日龄) 腹腔注射过量的戊巴比妥钠实施安乐死, 断头取脑, 迅速分离 ARC 核团, 并保存于液氮中, 用于测定 RNA 和蛋白的表达。

1.2.5 qPCR 检测 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 利用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。每个样本取 1 μ g RNA 进行反转录 (42 °C 30 min, 85 °C 10 min)。qPCR 反应条件为 95 °C, 3 min 变性; 95 °C 10 s、60 °C 30 s, 45 个循环。以 β 肌动蛋白 (β -actin) 基因作为内参基因。各基因引物序列见表 2。

表 2 qPCR 引物
Tab 2 Primers used for qPCR

Gene	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	Length/bp
<i>Kiss1</i>	AGCTGCTGCTTCTCCTCTGT	AGGCTTGCTCTCTGCATACC	152
<i>Ttfl</i>	GGACGTGAGCAAGAACATGG	GCCGACAGGTACTTCTGCTG	123
<i>GnRH</i>	CCGCTGTTGTTCTGTTGACTGTG	GGGGTTCTGCCATTTGATCCTC	150
β-actin	TGCCGCATCCTCTTCCT	GGTCTTTACGGATGTCAACG	191

1.2.6 Western blotting 检测 利用含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液提取细胞或组织中的蛋白质，BCA 法测定各组蛋白质浓度，加热变性处理后进行 Western blotting 检测。10%（用于 TTF1）或 12%（用于 KISS1）SDS-PAGE 进行半干电泳后转移至 PVDF 膜，转膜条件为 200 mA、70 min。5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后加入抗 TTF1 抗体（1:500）、抗 KISS1 抗体（1:400）或抗 GAPDH 抗体（1:10 000），4 ℃ 振荡过夜；再加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1:10 000），室温孵育 1 h。用 ECL 发光试剂盒进行化学发光检测，经显影处理后，胶片用凝胶成像分析系统拍照。

1.3 统计学方法

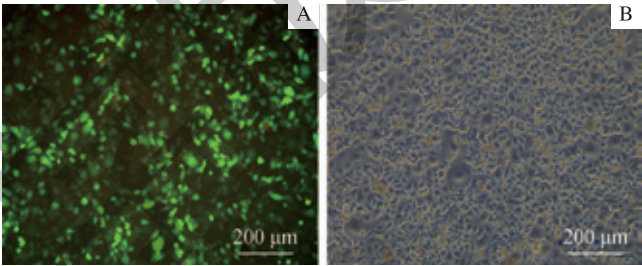
采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析，GraphPad Prism 8.0.1 软件作图。多组间均数比较采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），并采用 *LSD* 检验进行两两比较。*P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

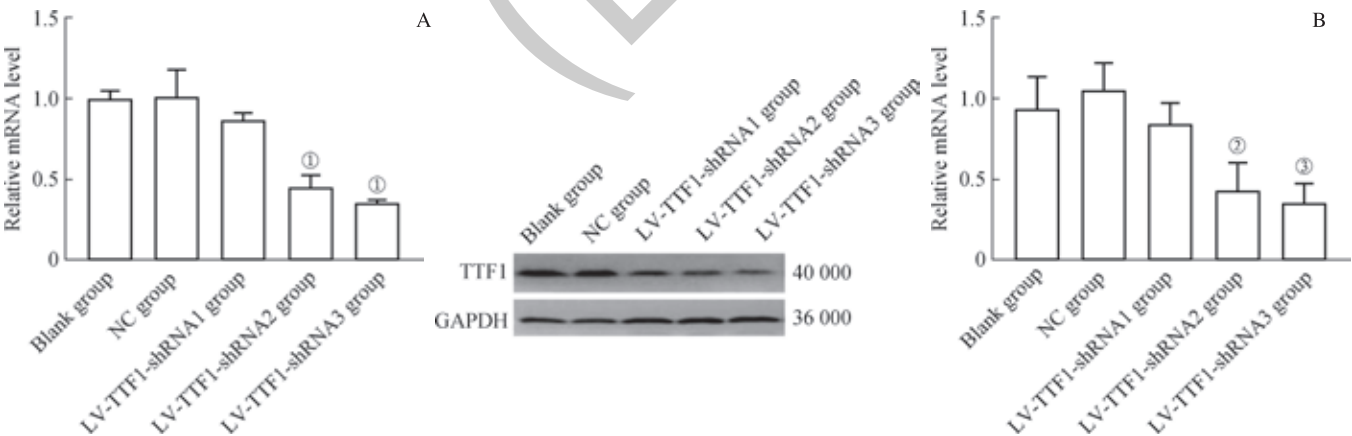
2.1 慢病毒侵染 ND7-23 细胞后 TTF1 的表达

慢病毒转染 ND7-23 细胞 72 h 后，在荧光显微镜下

可见 EGFP 表达（图 1），证明转染成功。qPCR 结果（图 2A）显示，NC 组与空白对照组相比，*Ttfl* mRNA 表达差异无统计学意义。与 NC 组相比，LV-TTF1-shRNA2 组和 LV-TTF1-shRNA3 组 *Ttfl* mRNA 表达量显著下降（均 *P* = 0.000），TTF1-shRNA2 和 TTF1-shRNA3 的干扰效率分别为 54.54% 和 64.24%。Western blotting 结果（图 2B）显示：NC 组与空白对照组相比，TTF1 蛋白表达量差异无统计学意义；与 NC 组相比，LV-TTF1-shRNA2 组和 LV-TTF1-shRNA3 组 TTF1 蛋白表达显著降低（均 *P* < 0.05），与 PCR 结果一致。根据对 *Ttfl* mRNA 和蛋白表达的抑制率，选择干扰效率最佳的 TTF1-shRNA3 构建慢病毒载体并包装病毒，用于后续的动物体内下丘脑 ARC 核团的注射。



Note: A. EGFP observed under immunofluorescence microscopy. B. Corresponding cell picture under optical microscope.
图 1 LV-TTF1-shRNA 慢病毒质粒转染 ND7-23 细胞（×100）
Fig 1 Transfection of ND7-23 cells with LV-TTF1-shRNA plasmid (×100)



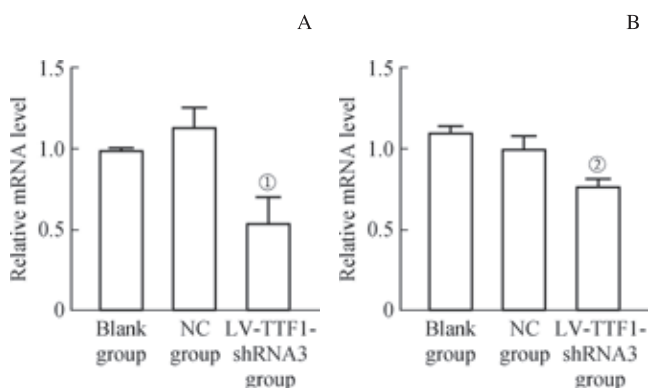
Note: A. The mRNA levels of *Ttfl* detected by qPCR (*n* = 3). B. The protein levels of TTF1 detected by Western blotting (*n* = 3). ① *P* = 0.000, ② *P* = 0.020, ③ *P* = 0.011, compared with NC group.
图 2 慢病毒质粒转染 ND7-23 细胞 72 h 后 *Ttfl* mRNA 和蛋白的表达量
Fig 2 Expressions of *Ttfl* mRNA and protein 72 h after transfection of lentiviral plasmids in ND7-23 cells

2.2 LV-TTF1-shRNA3 慢病毒质粒侵染 ND7-23 细胞后 *Kiss1* 和 *GnRH* 的表达

LV-TTF1-shRNA3 慢病毒质粒转染 ND7-23 细胞 72 h 后, qPCR 结果 (图 3) 显示: NC 组与空白对照组比较, *Kiss1* 和 *GnRH* mRNA 表达差异无统计学意义; 与 NC 组相比, LV-TTF1-shRNA3 组的 *Kiss1* 和 *GnRH* mRNA 表达显著降低 (均 $P<0.05$)。

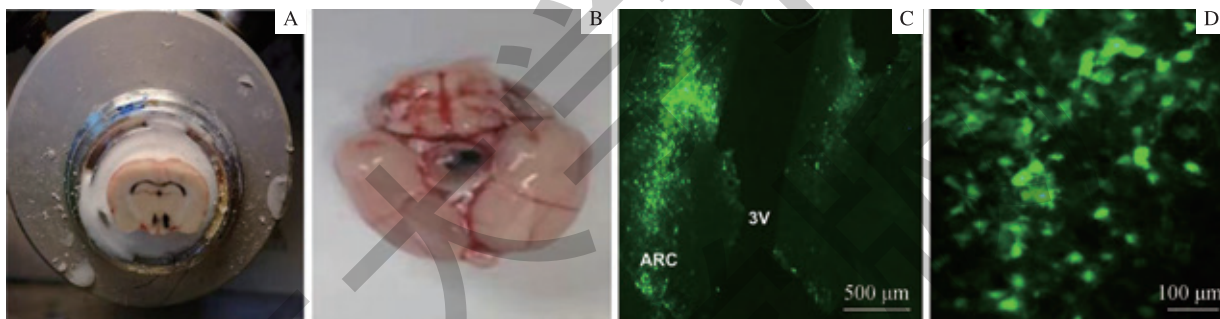
2.3 慢病毒质粒在大鼠 ARC 核团的原位注射

参考 Paxinos 等^[12] 的脑图谱, 利用脑立体定位注射仪, 先通过注射蓝墨水确定 ARC 核团位置 (图 4A、B), 然后在双侧 ARC 内显微注射 LV-EGFP。雌鼠 25 日龄时通过荧光显微镜在 ARC 内观察到高密度表达 EGFP 的细胞 (图 4C、D), 在注射通道中也观察到一些少量的 EGFP 表达。



Note: A. *Kiss1* mRNA ($n=3$). B. *GnRH* mRNA ($n=3$). ^① $P=0.001$, ^② $P=0.009$, compared with NC group.

图 3 LV-TTF1-shRNA3 转染 ND7-23 细胞 72 h 后 *Kiss1* 和 *GnRH* mRNA 的表达
Fig 3 mRNA expressions of *Kiss1* and *GnRH* in ND7-23 cells 72 h after LV-TTF1-shRNA3 transfection



Note: A. Frozen section of the brain after injection of blue ink into ARC. B. Traces of ink observed from the ventral side of brain. C. EGFP expression in ARC after injection of LV-EGFP observed under fluorescence microscope ($\times 50$). D. EGFP-expressing cells in ARC observed under fluorescence microscope ($\times 200$). 3V—the third ventricle.

图 4 LV-EGFP 在大鼠下丘脑 ARC 内的定位及表达

Fig 4 Location and expression of LV-EGFP in the ARC in hypothalamus after LV-EGFP injection in the rats

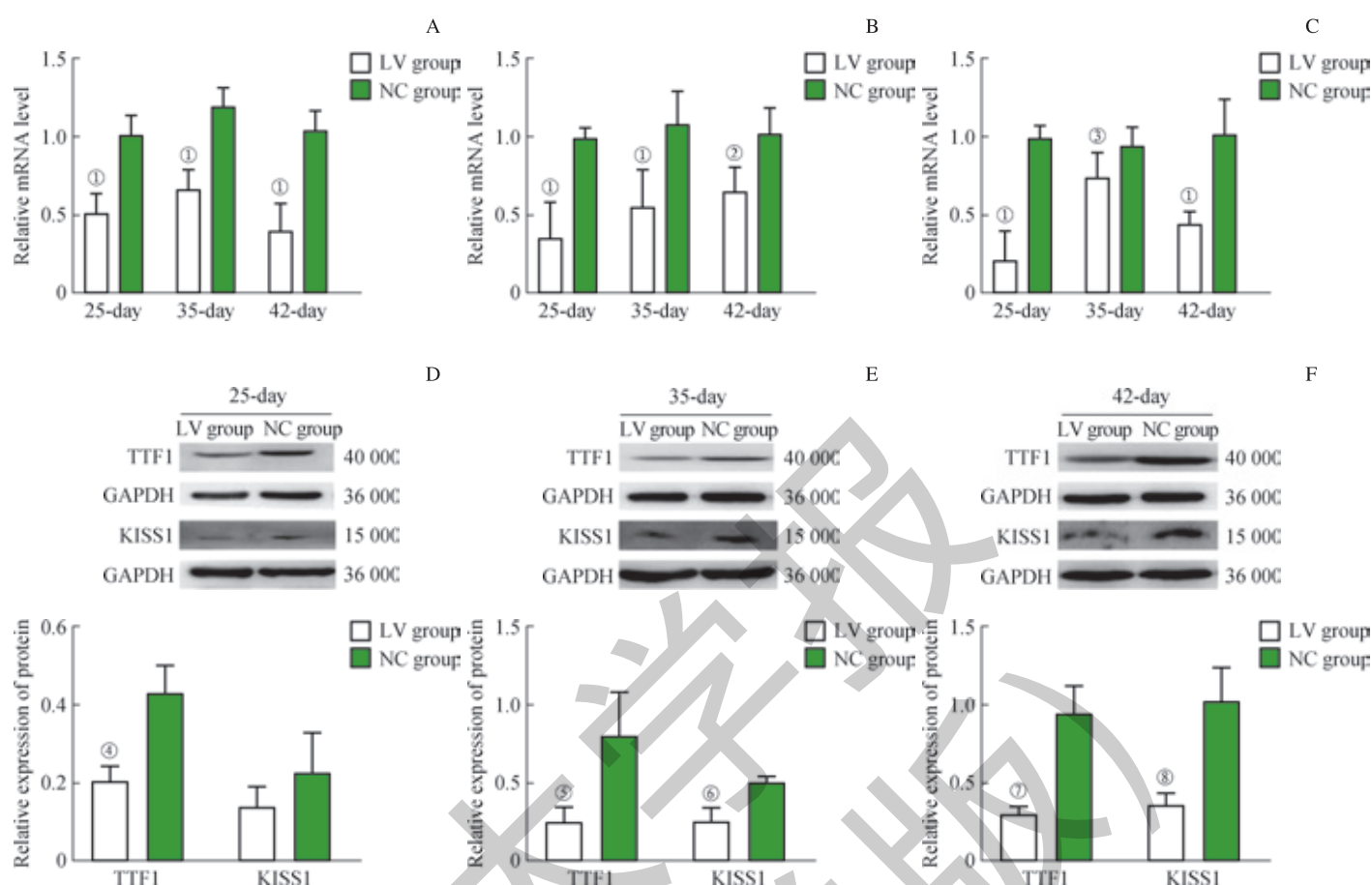
2.4 大鼠 ARC 内注射 LV-TTF1-shRNA3 后对 *Kiss1* 和 *GnRH* 基因表达的影响

对 21 日龄的雌性大鼠 ARC 核团原位注射 LV-TTF1-shRNA3 或 LV-EGFP 后, 分别于 25 日龄、35 日龄、42 日龄处死大鼠, 分离 ARC 核团。通过 qPCR 检测大鼠 ARC 中 *Tf1*、*Kiss1*、*GnRH* mRNA 的表达。*Tf1* mRNA 在 ARC 中显著降低 (均 $P=0.000$, 图 5A), *Kiss1* 和 *GnRH* mRNA 也显著降低 (均 $P<0.05$, 图 5B、C)。Western

blotting 结果与 qPCR 结果一致, 在 3 个不同发育阶段, LV 组的 TTF1 蛋白表达显著降低, 与 NC 组相比, 35 日龄和 42 日龄时, LV 组 KISS1 蛋白表达显著下降 (均 $P<0.05$, 图 5D~F)。

2.5 大鼠 ARC 内注射 LV-TTF1-shRNA3 后对性发育的影响

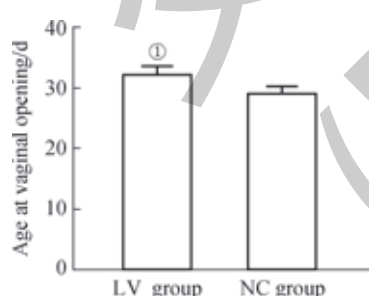
21 日龄雌性大鼠 ARC 内注射 LV-TTF1-shRNA3 后, 阴门开启时间较 NC 组明显延迟 ($P=0.000$, 图 6)。



Note: A–C. mRNA levels of *Ttf1* (A), *Kiss1* (B) and *GnRH* (C) in the ARC detected by qPCR ($n=6$). D–F. Protein levels of TTF1 and KISS1 in the ARC detected by Western blotting at 25-day (D), 35-day (E) and 42-day (F) stages ($n=3$). ① $P=0.000$, ② $P=0.001$, ③ $P=0.024$, ④ $P=0.046$, ⑤ $P=0.032$, ⑥ $P=0.011$, ⑦ $P=0.029$, ⑧ $P=0.044$, compared with NC group.

图5 ARC内注射LV-TTF1-shRNA3后对Kiss1和GnRH表达的影响

Fig 5 Effect of intra-ARC LV-TTF1-shRNA3 administration on the expressions of *Kiss1* and *GnRH*



Note: ① $P=0.000$, compared with NC group.

图6 ARC内注射LV-TTF1-shRNA3后对雌性大鼠青春期发育的影响 ($n=7$)

Fig 6 Effect of intra-ARC LV-TTF1-shRNA3 administration on female rat puberty ($n=7$)

3 讨论

2001年, Lee等^[15]研究发现, 中枢性性早熟会使得下丘脑病变部位附近的神经元TTF1表达量增加。先前, Kimura等^[6]就发现, 携带*Ttf1*基因失活突变的小鼠下丘脑腹内侧核和背侧核发育停滞, 第三脑室腹侧发生融合, 缺乏弓状核。在哺乳动物青春期启动之前, 下丘脑中*Ttf1*

mRNA的表达会随着发育逐渐增加^[15]。Kim等^[16]的研究发现, 大鼠在26~27日龄, 即青春期启动之前, TTF1的表达会达到一个明显的峰值。这些研究结果表明TTF1不仅参与哺乳动物的青春期发育, 还与下丘脑神经核团的发育密不可分, 更加支持了TTF1是由中枢控制青春期启动的重要成分。

本研究使用的ND7-23细胞能够表达内源性TTF1, 是研究TTF1调控*Kiss1*的良好体外模型。体外实验证实, 在ND7-23细胞内下调*Ttf1*可以降低细胞内*Kiss1*和*GnRH*基因的表达。进而通过脑立体定位仪将LV-TTF1-shRNA慢病毒质粒原位注射到21日龄雌性大鼠下丘脑ARC内, 在青春期启动之前特异性干扰核团内*Ttf1*的表达, 观察其对雌鼠青春期发育的影响。手术完成4d后, 通过冰冻切片, 可以明显观察到ARC内有EGFP表达。脑立体定位注射将慢病毒质粒传递到细胞或哺乳动物体内, 可使得目的片段在特定位置稳定并持续地表达; 并且TTF1-shRNA可以在雌鼠青春期内持续发挥干扰作用, 且

抑制 *Ttf1* 表达后, 不仅使得 *Kiss1* 和 *GnRH* 基因表达显著下调, 而且也导致雌鼠阴门开放时间明显延迟。虽然前期有研究者使用 Cre/Loxp 技术构建小鼠分化神经元内的 *Ttf1* 基因敲除动物模型^[17], 小鼠也出现了青春发育延迟, 但是 Cre/Loxp 技术时间和价格成本较高, 且胚胎期小鼠不易存活。因此我们通过脑立体定位注射慢病毒来研究 *Ttf1* 对雌鼠青春发育的影响及其分子机制, 与体外实验结果一

致, 这也表明利用慢病毒载体持续沉默靶基因是一种研究影响青春发育因素的有效方法。

综上所述, 抑制下丘脑 ARC 中 *Ttf1* 的表达可以引起启动 HPG 轴 *Kiss1* 的表达减少和 *GnRH* mRNA 的降低, 从而延迟雌鼠阴门开放时间。TTF1 在青春发育过程中起着重要的作用, 本研究可能为儿童性早熟的治疗提供新的理论依据。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016, 4(3): 254-264.
- [2] Cortés ME, Carrera B, Rioseco H, et al. The role of kisspeptin in the onset of puberty and in the ovulatory mechanism: a mini-review[J]. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 2015, 28(5): 286-291.
- [3] Smith JT. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe[J]. *Brain Res Rev*, 2008, 57(2): 288-298.
- [4] Clarkson J. Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2013, 34(2): 120-131.
- [5] Wang LH, Vanacker C, Burger LL, et al. Genetic dissection of the different roles of hypothalamic kisspeptin neurons in regulating female reproduction[J]. *ELife*, 2019, 8: e43999.
- [6] 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.
- [7] Sandberg M, Flandin P, Silberberg S, et al. Transcriptional networks controlled by NKX2-1 in the development of forebrain GABAergic neurons[J]. *Neuron*, 2016, 91(6): 1260-1275.
- [8] 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.
- [9] Huang H, Zhang CY, Wang B, et al. Transduction with lentiviral vectors altered the expression profile of host microRNAs[J]. *J Virol*, 2018, 92(18): e00503-e00518.
- [10] Zhou SS, Li P. Effects of NELL2 on the regulation of GnRH expression and puberty in female rats[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(3): 6672-6682.
- [11] Li CX, Li P. Enhanced at puberty-1 (Eap1) expression critically regulates the onset of puberty independent of hypothalamic Kiss1 expression[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(4): 1402-1412.
- [12] Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates[J]. *J Neurosci Methods*, 1980, 3(2): 129-149.
- [13] Bian J, Bai XM, Zhao YL, et al. Lentiviral vector-mediated knockdown of *Lrb* in the arcuate nucleus promotes diet-induced obesity in rats[J]. *J Mol Endocrinol*, 2013, 51(1): 27-35.
- [14] Hu MH, Li XF, McCausland B, et al. Relative importance of the arcuate and anteroventral periventricular kisspeptin neurons in control of puberty and reproductive function in female rats[J]. *Endocrinology*, 2015, 156(7): 2619-2631.
- [15] Lee BJ, Cho GJ, Norgren RB Jr, 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.
- [16] Kim HJ, Sohn HJ, Ha M, et al. Prepubertal chronic ethanol administration alters TTF-1 and Oct-2 expression in the hypothalamus of female rats[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2005, 136(1/2): 262-266.
- [17] 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.

[收稿日期] 2019-12-09

[本文编辑] 瞿麟平