



视黄酸信号通路在青鳉精原干细胞体外增殖与分化中的作用

王园^{1,2}, 李名友^{3*}, 白孝明¹, 屈锡梅¹,
罗玉冰¹, 王德寿^{1*}, 魏静^{1*}

(1. 西南大学生命科学学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. 贵州宏财聚农投资有限责任公司, 贵州 六盘水 553500;

3. 上海海洋大学水产与生命学院, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要: 为探究视黄酸 (RA) 在鱼类精原干细胞 (SSC) 增殖与分化中的作用, 实验首先以三色荧光报告载体 pGRY [延伸因子 1 α 启动子驱动组蛋白 H2B-绿色荧光融合蛋白、减数分裂联合复合体蛋白 3 (Scp3) 启动子驱动嘌呤霉素红色荧光融合蛋白、精蛋白启动子驱动黄色荧光蛋白] 转染青鳉精原干细胞系 SG3, 获得稳转细胞 SG3-pGRY, 然后分别在 2D 与 3D 培养条件下检测 RA 信号对其增殖与分化的影响。结果显示, 稳转细胞 SG3-pGRY 的红色荧光可监测细胞内源性 Scp3 的表达, 且细胞仍保持干性及分化潜能, 表明其可用于监测细胞分化状态。在 2D 培养条件下, 即在细胞培养板中待细胞生长密度约 90% 就进行传代培养, RA 可显著抑制细胞增殖, 其受体 α 、 β 、 γ 泛抑制剂 BMS493 可促进细胞增殖。第 48 小时, RA 处理可下调细胞多能性相关基因 *pou5f3*、*klf4* 表达, 上调减数分裂相关基因 *dazl* 表达, 但对其他减数分裂相关基因如 *scp3* 表达无明显影响。第 8 天, 处理组及对照组均未能观察到红色荧光, 这与已有报道 RA 处理体外培养小鼠 SSC 可显著促进 Scp3 表达, 并进入减数分裂 I 期偶线期的研究结果明显不同。在 3D 培养条件下, 即用 96 孔球形低吸附微量培养板进行培养, 48 h 后细胞成球状体聚集生长, RA、BMS493 处理组、对照组在 48 h 后均观察到明显红色荧光, 减数分裂相关基因表达与 2D 相比显著上调。第 8 与第 34 天, RA 处理组减数分裂相关基因表达均显著高于对照组, 而 BMS493 处理组低于对照组。研究表明, RA 信号可抑制 SG3 增殖, 促进其分化, 但不是诱导细胞发生减数分裂的关键分子。本研究不仅为鱼类 SSC 分化相关研究提供了良好研究模型, 而且促进了对于 RA 信号在鱼类 SSC 增殖与分化中作用的深入认识。

关键词: 青鳉; 视黄酸; 精原干细胞; 增殖; 分化; 减数分裂

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

精原干细胞 (spermatogonial stem cells, SSC) 是一群由原始生殖细胞发育而来的生殖干细胞, 其能不断自我更新以维持数量恒定, 又能逐级分化, 精原细胞经分化后进入减数分裂, 产生精子^[1]。

SSC 增殖与分化的影响因素及其调控机制, 一直以来是学术界的关注重点。

对哺乳类的大量研究证实, 视黄酸 (retinoic acid, RA) 是介导生殖细胞减数分裂起始的关键分

收稿日期: 2021-08-13 修回日期: 2021-09-14

资助项目: 国家自然科学基金 (31972776, 3217210240); 重庆市自然科学基金 (cstc2020jcyj-msxmX1045)

第一作者: 王园 (照片), 从事鱼类干细胞研究, E-mail: 2412109705@qq.com

通信作者: 李名友, 从事鱼类生殖相关研究, E-mail: myli@shou.edu.cn;

王德寿, 从事鱼类性别决定与分化研究, E-mail: wdeshou@swu.edu.cn;

魏静, 从事鱼类生殖生理与干细胞研究, E-mail: lalsos@swu.edu.cn



子^[2-5]。Wang 等^[6]报道 RA 处理小鼠 (*Mus musculus*) 体外培养 SSC, 可直接诱导其启动减数分裂, 高表达联会复合体蛋白 3 (synaptonemal complex protein 3, Scp3), 并进行到减数分裂 I 前期的偶线期。在鱼类中, 已有研究表明, RA 在精巢分化发育特别是减数分裂起始过程中具有重要作用^[7-9]。然而, RA 在鱼类 SSC 增殖与分化中的作用如何, 其能否直接介导 SSC 发生减数分裂, 目前未见报道。

青鳉 (*Oryzias latipes*) 属颌针鱼目 (Belontiiformes) 异鳞科 (Adrianichthyidae)。Hong 等^[10]用成年青鳉精巢组织成功建立了世界上首个鱼类精原干细胞系 SG3, 其在体外能持续稳定增殖, 并能分化产生精子, 为开展鱼类 SSC 相关研究提供了极好的研究模型。三色荧光报告载体 pGRY, 其由延伸因子 1 α (elongation factor 1-alpha, *ef1 α*) 启动子驱动组蛋白 H2B-绿色荧光蛋白 H2B-GFP、*scp3* 启动子驱动嘌呤霉素红色荧光蛋白 puoro-RFP、

精蛋白启动子驱动黄色荧光蛋白 YFP, 可被用于监测细胞减数分裂与精子的发生 (图 1-a, b)^[11]。本研究采用 pGRY 转染 SG3, 获得稳转细胞 SG3-pGRY, 然后通过 RA 及其受体 (retinoic acid receptor, Rar) α 、 β 、 γ 泛抑制剂处理, 通过观察红色荧光监测细胞是否发生了减数分裂, 探究 RA 信号通路对鱼类 SSC 体外增殖与分化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的青鳉由新加坡国立大学引入, 现培养于西南大学淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室。成鱼培养在 28 °C 循环水系统, 光照周期为 14 h 光照, 10 h 黑暗。青鳉 SG3 细胞系由新加坡国立大学提供。本研究获得了西南大学实验动物伦理审查委员会批准, 实验过程中操作

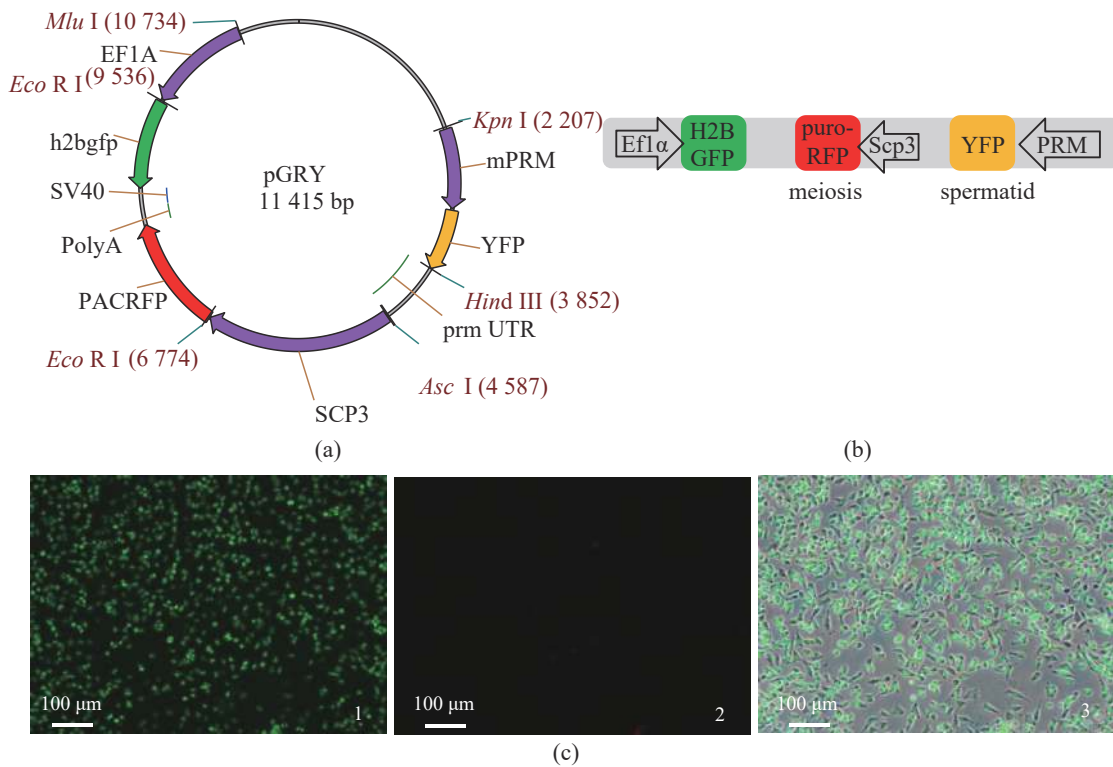


图 1 稳转细胞株 SG3-pGRY 的建立

(a) 和 (b) 三报告质粒 pGRY 结构示意图。pGRY 质粒中 *ef1 α* 启动子驱动组蛋白 2B-绿色荧光蛋白 (H2B-GFP) 表达, 可以监测报告质粒; *scp3* 启动子驱动嘌呤霉素-红色荧光蛋白 (Puro-RFP) 表达, 可以监测减数分裂的发生; 鱼精蛋白启动子驱动黄色荧光蛋白 (YFP) 表达, 可以监测精子发生。(c) 稳转细胞株 SG3-pGRY 显微观察。(c-1) GFP, (c-2) RFP, (c-3) 是 GFP、RFP 和明视野图的共定位。标尺为 100 μ m。

Fig. 1 Establishment of a stable transgenic cell line SG3-pGRY

(a) (b) Schematic illustration of pGRY. The promoter of *ef1 α* drives the expression of histone 2B and green fluorescent protein (H2B-GFP), which can monitor plasmid existence. The promoter of *scp3* drives the expression of puromycin and red fluorescent protein (puro-RFP), which can monitor the initiation of meiosis. The promoter of protamine drives the expression of yellow fluorescent protein (YFP), which can monitor spermatogenesis. (c) The observation of SG3-pGRY. (c-1) GFP, (c-2) RFP, (c-3) was the merged image of the bright field, GFP and RFP observations of the cells. Scale bar was 100 μ m.

人员严格遵守西南大学实验动物管理和使用伦理规范, 并按照西南大学实验动物伦理审查委员会制定的规章制度执行。

转染试剂 TransIT-X2[®] Dynamic Delivery System 购自 Mirusbio 公司 (美国), DMEM 培养基、亚硒酸钠、丙酮酸钠、青-链霉素、非必需氨基酸、谷氨酰胺、胎牛血清、 β -巯基乙醇购自 Gibco 公司 (美国), Hepes、白消安、RA、BMS493 (Rar 泛抑制剂) 均购自 Sigma 公司 (美国), 多克隆抗体 Scp3 购自 Abcam 公司 (英国), 二抗 (山羊抗兔

IgG) 购自 CST 公司 (美国), 苏木精-伊红 (H.E) 染色试剂盒购自 Solarbio 公司 (北京), 细胞增殖检测试剂 MTS (CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay) 购自 Promega 公司 (美国), RNA 提取试剂 RNAiso Plus、第一链 cDNA 合成试剂盒、 $2\times$ Taq Mix 酶、DNase I、Real Time PCR 试剂盒均购自 TaKaRa (日本), 无内毒素质粒大提试剂盒购自 TIANGEN (北京)。

实验所用引物名称及序列见表 1, 引物合成及测序均由华大基因完成。

表 1 本研究所用引物信息

Tab. 1 Sequence information of the primers used in this study

引物名称 primers name	正向引物(5'→3') forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') reverse primer (5'→3')
<i>Ol pou5f3</i>	AGCGACTCTGAGGAGGAGAAC	CGGCAAATTGTTGTCTGGCT
<i>Olklf4</i>	CCATGCAGTACCCAGAGGC	GTGCGGTGATGTGCTTTCAG
<i>Oldazl</i>	CTGCAAAGGATACGGGTTCGT	ACAAAGCCAGGCGGAATAGA
<i>Olkit</i>	TCTCTCTGGGAAATAGCCCGT	AAGGCTCTCAAAGGGTCA
<i>Olscp3</i>	GAATGTGCTGCTGGGAATGAG	AGAACTGCTGCGTTGTCTTC
<i>Olspo11</i>	ACGCCACAAAGAGAGATGTGTAT	GTCGATTCTGGTGCCGCTCTT
<i>Olrec8a</i>	AACCTGTGGGGCCATTTTGGA	GTCTTTTACAGCGCAGCAGG
<i>Olrec8b</i>	CGATTTGGCTGTTGCCACA	CACCACCACGCCATACTGAA
<i>Olprm</i>	AGGCCTCTCTCCCGC	TGCGACGGCCAACCTCTTC
<i>actb</i>	GGCATCACACCTTCTACAACGA	ACGCTCTGTCAGGATCTTCA

1.2 实验方法

细胞的 2D 与 3D 培养 ESM2 培养 SG3 细胞于 0.1% 明胶包被的细胞培养板^[10], 待细胞生长密度约 90% 时进行传代培养, 此即为细胞的 2D 培养。用表面涂层低吸附、底部为球形的微量细胞培养板培养细胞, 每孔细胞接种量约 2 000 个细胞, 24 h 后细胞呈聚集球状生长, 此即为细胞的 3D 培养。

pGRY 稳转细胞构建 用 TransIT-X2[®] Dynamic Delivery System 转染 pGRY 至 SG3 细胞, 3 d 后加入嘌呤霉素进行加压筛选, 待生长稳定后将细胞进行克隆化培养, 得到 GFP 阳性细胞, 继续传代 3~5 次, 撤去培养基中的嘌呤霉素并进行镜检观察, 最后获得稳转细胞 pGRY-SG3。

碱性磷酸酶 (ALP) 染色 培养细胞经 1:1 甲醇/丙酮固定, 加入 NBT/BCIP 染色液后按说明书进行显色, 之后显微观察。

免疫荧光染色 常规方法对青鳞精巢组织

用 Scp3 一抗 (1:200, 体积比) 4 °C 孵育过夜, Alexa Fluor[®] 594 标记的二抗 (1:1 000, 体积比) 37 °C 孵育 1 h, 最后 DAPI 复染。pGRY-SG3 培养细胞先用低渗液 (30 mmol/L Tris、50 mmol/L 蔗糖、17 mmol/L 柠檬酸钠、5 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L DTT、0.5 mmol/L PMSF, pH 值 8.2) 处理 30 min, 1% 多聚甲醛固定, Scp3 抗体 (1:200, 体积比) 4 °C 孵育过夜, Alexa Fluor[®] 405 标记的二抗 (1:1 000, 体积比) 37 °C 孵育 1 h, 在共聚焦显微镜 (FV3000, 奥林巴斯) 下进行观察。

受体鱼处理及细胞移植 挑选体重相近、8 月龄左右雄性青鳞 30 尾, 饲养于 28 °C 水温, 每天梯度升温 2 °C, 直至 35 °C, 35 °C 继续饲养 1 周; 然后腹腔注射白消安 (80 mg/kg 体重), 35 °C 水温饲养, 2 周后取性腺, H.E 染色观察内源性生殖细胞消除情况; 约 10⁵ 个 SG3-pGRY 细胞通过生殖孔显微注射, 将其移植到白消安处理后的雄性青鳞精巢, 并梯度降温至 28 °C 水温,

在移植后不同时间取精巢组织, 固定、切片, 之后进行 DAPI 染色, 显微观察。

细胞增殖活性检测 在 ESM2 培养的 SG3 中分别加入 12.5 $\mu\text{mol/L}$ RA 与 10 $\mu\text{mol/L}$ BMS493, 同时加入相应体积溶剂 DMSO 作为对照。分别在加入的第 0、48 和 72 h 用 MTS 检测细胞 OD₄₉₀ 吸光值, 每个条件至少重复 3 次, 具体方法按照产品说明书进行。细胞的增殖活性以相对吸光度值表示, 相对吸光度值越大, 表示细胞浓度越大, 增殖活性越大。相对吸光度值=细胞在不同时间点 OD₄₉₀ 吸光值/细胞在相同处理条件下 0 h 的 OD₄₉₀ 吸光值。

实时定量 RT-PCR (qRT-PCR) 样品用 RNAiso Plus 提取 RNA, 用 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa) 逆转录为 cDNA 作为模板。所用 PCR 引物(表 1)跨内含子, 同时 PCR 产物凝胶电泳检测为单一条带的用于本研究。用 qRT-PCR 试剂盒 (TaKaRa) 检测样品不同基因的 mRNA 表达量。以 $\beta\text{-actin}$ 作为内参基因, 目的基因的相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta C}$ 计算。

1.3 数据分析

采用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行单因素

方差分析, $P < 0.05$ 表示与对照组差异显著。

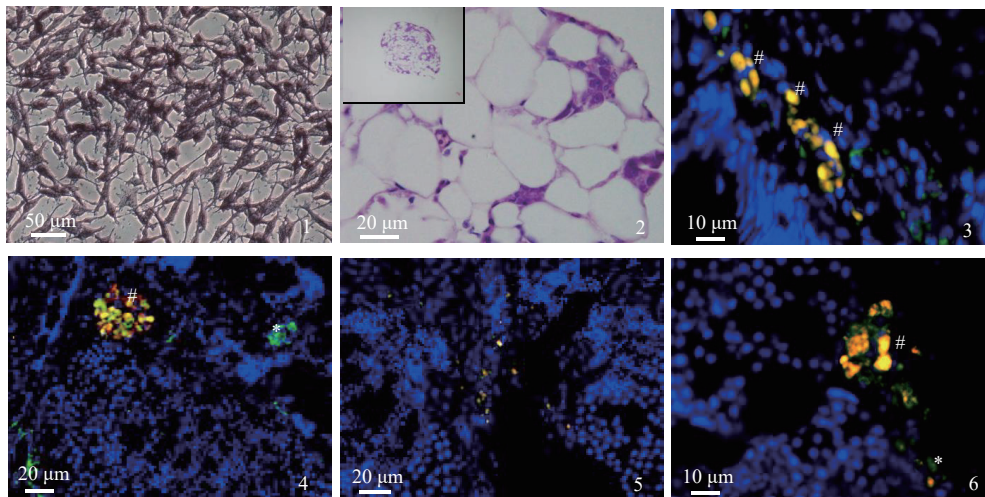
2 结果

2.1 稳转细胞的获得

pGRY 转染 SG3, 经 1 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素筛选, 单克隆化培养, 获得了稳转细胞 SG3-pGRY。该细胞稳定表达绿色荧光蛋白, 但未见红色荧光与黄色荧光蛋白的表达(图 1)。

2.2 稳转细胞干性及分化潜能

ALP 活性通常作为检测细胞干性的重要指标^[10, 12]。SG3-pGRY 经 ALP 染色, 结果显示, 其具有明显 ALP 活性, 与 SG3 转染前的染色强度相当, 提示细胞仍保持其干性(图版 I -1)。为进一步检测 SG3-pGRY 分化潜能, 通过生殖孔显微注射, 将细胞移植到白消安处理后的受体鱼精巢, 移植后不同时间荧光显微观察供体细胞的定植及分化情况。H.E 检测白消安处理鱼体精巢组织($n=5$), 发现所有受检鱼精巢组织内源性生殖细胞大部分已消除(图版 I -2)。移植后不同时间荧光显微检测发现, 25 尾受体鱼中有 23 尾精巢组织都发现有供体细胞(绿色荧光)定植, 定植成功率达 90% 以上。移植后 10 d, 在生精小管壁周围发



图版 I SG3-pGRY 的 ALP 活性与体内分化潜能

1. ALP 活性, 2-6. 体内分化潜能。2. 白消安处理青鳉, H.E 染色观察处理鱼精巢组织, 可见内源性生殖细胞被大量消除; 将 SG3-pGRY (绿色) 经生殖孔显微注射到白消安处理实验鱼精巢, 分别在移植后 10 d (3)、30 d (4)、44 d (5) 和 70 d (6) 用荧光显微镜观察供体细胞在精巢组织中的定植及红色荧光的表达情况, 图为样品 GFP、RFP 和 DAPI 观察图的共定位。* 未表达 RFP 的供体细胞, # 表达 RFP 的供体细胞。

Plate I ALP activity and differentiation potential *in vivo* of SG3-pGRY

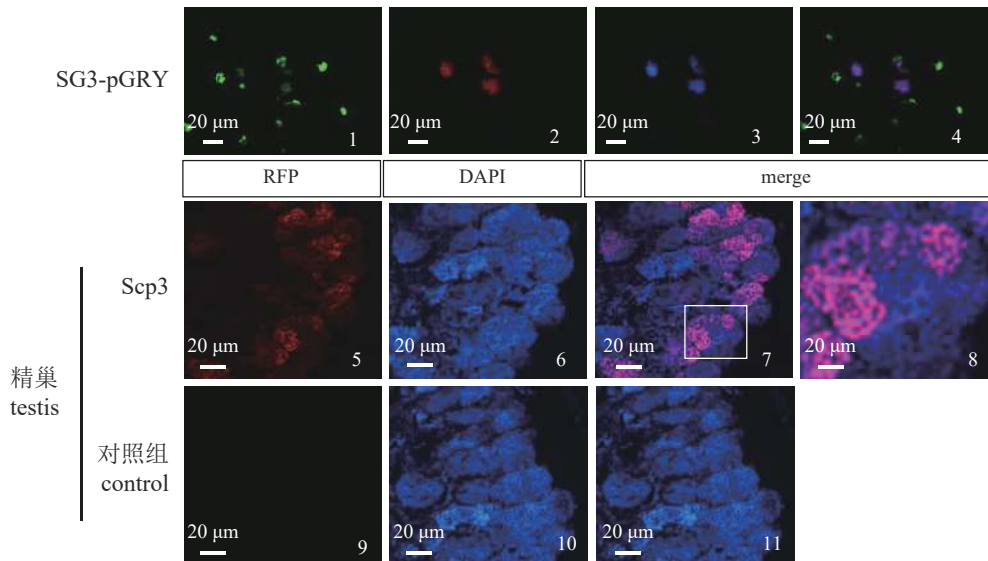
1. ALP activity, 2-6. differentiation potential *in vivo*. 2. a large number of endogenous germ cells in testis were lost after busulfan treatment by H.E staining observation. The donor cells of SG3-pGRY were transplanted into *O. latipes* testis after busulfan treatment after 10 d (3), 30 d (4), 44 d (5), 70 d (6), the colonization and RFP expression of donor cells in testis were observed by fluorescence microscope. The pictures show the merged images of GFP, RFP and DAPI observation of the sample tissues. * donor cells that do not express RFP, # donor cells that express RFP.

现供体细胞出现红色荧光(图版 I -3), 提示供体细胞表达 Scp3, 发生了减数分裂。移植后 30、44 和 70 d, 仍可见部分绿色荧光阳性的供体细胞无红色荧光的表达(图版 I -4, 6), 提示供体细胞可在受体鱼精巢定植并维持未分化状态, 同时可观察到部分体积明显减小的红色荧光阳性细胞(图版 I -5), 提示供体细胞可能分化至减数分裂后期。综上, 稳转细胞仍然保持了 SSC 干性及分化潜能。

2.3 稳转细胞红色荧光可监测细胞内源性 Scp3

Scp3 通常被用作减数分裂特有标志分子。为

了检测 SG3-pGRY 稳转细胞中红色荧光能否监测细胞内源性 Scp3 的表达, 实验参考 Hong 等^[10]报道诱导细胞分化, 同时用 Scp3 抗体进行染色。结果显示, 诱导分化细胞可观察到红色荧光, 并且其与细胞内源性 Scp3 的免疫染色阳性信号(蓝色)共定位(图版 II)。表明稳转细胞红色荧光可以真实监测细胞内源性 Scp3 的表达。此外, 青鳉精巢组织免疫荧光染色结果显示, Scp3 分子表达于精母细胞(图版 II), 进一步证实了所用 Scp3 抗体的特异性及 Scp3 作为减数分裂标志分子的可行性。



图版 II SG3-pGRY 红色荧光可以监测内源性 Scp3 的表达

1-4. SG3-pGRY 内源性 Scp3 的免疫荧光染色观察。1. GFP, 2. RFP, 3. 细胞用抗 Scp3 一抗与蓝色荧光 (Alexa Fluor® 405) 标记的二抗进行免疫荧光染色后观察, 4. 1-3 的共定位; 5-7. 青鳉精巢组织 Scp3 的免疫荧光染色观察。8. 图 7 中内框所示区域的放大图。对照组 (7-11) 一抗为正常兔血清。

Plate II Red fluorescence in SG3-pGRY can monitor the expression of endogenous Scp3

1-4. immunofluorescence staining of Scp3 in SG3-pGRY and fluorescence microscopic observation. 1. GFP, 2. RFP, 3. Alexa Fluor® 405 observation after the cells were sequentially stained by anti Scp3 primary antibody and AlexaFluor® 405-conjugated secondary antibody, 4. the merged image of 1-3; 5-7. immunofluorescence staining of Scp3 in *O. latipes* testicular sections. 8. an enlarged view of the area shown in the inner box in 7. The primary antibody in the control group (7-11) was the normal rabbit serum.

2.4 RA 信号对细胞增殖的影响

在 2D 条件下培养 SG3, MTS 检测 RA (12.5 μmol/L) 及其受体泛抑制剂 BMS493 (10 μmol/L) 对其增殖活性的影响, 同时以溶剂 DMSO 为对照。结果显示, 在处理后的第 48 和 72 小时, RA 显著抑制细胞增殖 ($P < 0.05$)。在处理后的第 72 小时, BMS493 显著促进细胞增殖 ($P < 0.05$) (图 2)。表明 RA 信号可抑制细胞的增殖活性。

2.5 在 2D 培养条件下 RA 信号对细胞分化的影响

在 2D 培养条件下, RA 处理 SG3-pGRY 细胞,

qRT-PCR 检测细胞多能性与分化相关基因的表达, 并通过显微观察红色荧光, 以研究 RA 信号对细胞分化的影响。结果显示, RA 处理后直到第 8 天, 处理组及对照组均未能观察到红色荧光的表达, 表明细胞没有内源性 Scp3 的表达(图版 III)。RA 处理 48 h 后, 可见多能性相关基因 *pou5f3*、*klf4* 表达下调 ($P < 0.05$), 分化相关基因 *dazl* (deleted in azoospermia like) 表达上调 ($P < 0.05$), 但对其他分化相关基因 *scp3*、*c-kit*、*spo11*、*rec8a* 和 *rec8b* 表达无明显影响 ($P > 0.05$) (图 3)。表明在 2D 培养条件下, RA 可促进 SG3 细胞分化, 但并不能诱导

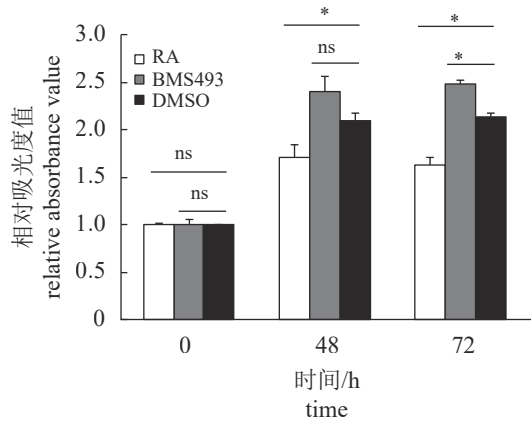


图2 RA及其受体泛抑制剂BMS493对SG3增殖的影响

相对吸光度值=细胞在不同时间点 OD₄₉₀ 吸光值/细胞在相同处理条件下 0 h 的 OD₄₉₀ 吸光值 (n=3)。*。二者有显著差异 (P<0.05), ns. 二者无显著差异 (P>0.05), 下同。

Fig. 2 Effect of RA and BMS493 on the proliferation of SG3

The relative absorbance value equals the OD₄₉₀ absorbance value of cells at different time points / OD₄₉₀ absorbance value of cells at 0 h under the same treatment conditions (n=3). *. significant difference at P<0.05; ns. no significant difference (P>0.05), the same below.

其 Scp3 的表达, 介导减数分裂的发生。该结果与 RA 处理小鼠 2D 条件下培养的 SSC 可显著诱导 Scp3 表达明显不同。

2.6 在 3D 培养条件下 RA 信号对细胞分化的影响

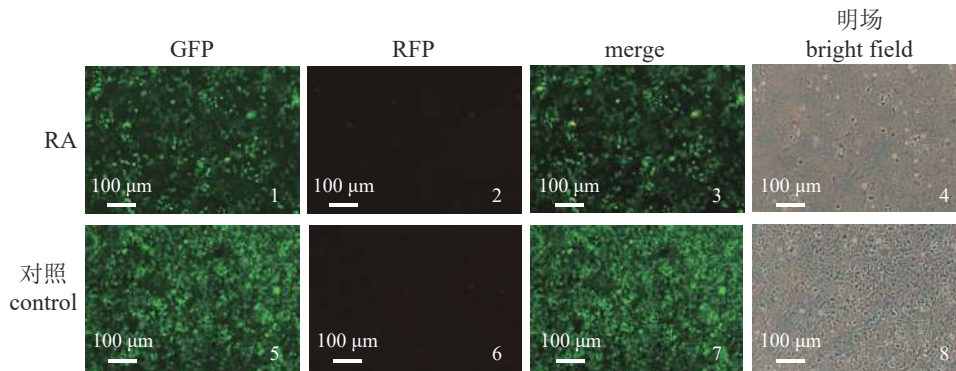
在 3D 培养条件下, 用 RA、BMS493 处理培养细胞, 以溶剂 DMSO 为对照, 用上述 2D 培养条件下的相同方法探究 RA 信号对细胞分化的影响。结果显示, 第 48 小时细胞聚集成团, 呈球

状生长, 实验组与对照组均观察到明显红色荧光(图版 IV)。与此同时, 3D 条件下不同处理组减数分裂相关基因 *scp3*、*spo11* 和 *rec8b* 的表达水平均高于 2D 培养条件, 在 3D 条件下, RA 处理组减数分裂相关基因高于相同条件下的对照组, 而其受体抑制剂 BMS493 处理组低于相同条件下的对照组(图 4)。表明在 3D 培养条件下, RA 信号可促进细胞发生分化, 但其并不是介导细胞减数分裂发生的关键因素。

3 讨论

本研究以青鳞 SG3 细胞系为模型, 构建了能监测细胞内源性 Scp3 表达的稳转细胞, 该细胞具有明显 ALP 活性, 细胞移植后能成功定植受体鱼精巢, 并发生减数分裂, 表明其仍保持了 SSC 干性及分化潜能。另一方面, 通过在 2D 及 3D 培养条件下的进一步研究, 发现 RA 信号可抑制 SG3 增殖, 促进其分化, 但并不是介导细胞发生减数分裂的关键因素。本研究不仅为鱼类 SSC 增殖与分化的进一步探索提供了良好模型, 同时有助于深入了解 RA 信号在鱼类 SSC 增殖与分化中作用。

对哺乳类的大量研究证实, RA 是介导减数分裂起始的关键因子, 其可通过诱导 Stra8 的表达介导减数分裂的起始^[3, 6, 13]。因此, 不少学者以 Stra8 的表达与否作为哺乳类生殖细胞减数分裂起始的标志^[3, 13-14]。在鱼类中, 本实验室已有研究表明, RA 在南方鲇 (*Silurus meridionalis*)、尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 减数分裂起始过程中具有重要作用, 同时发现 Stra8 仅存在于部分鱼类如南方鲇体内, 在多种鱼类如青鳞、尼罗罗非鱼、



图版 III 在 2D 培养条件下 RA 信号处理 SG3-pGRY 细胞 8 d 后的显微观察

对照为 RA 溶剂 DMSO 处理。

Plate III Microscopic observation of SG3-pGRY treated with RA signal for 8 days under 2D culture conditions

The control cells were treated with RA solvent DMSO.

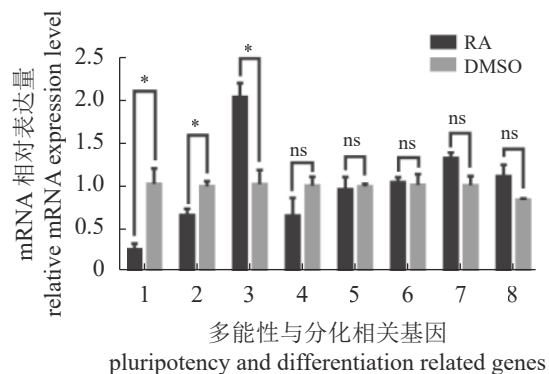
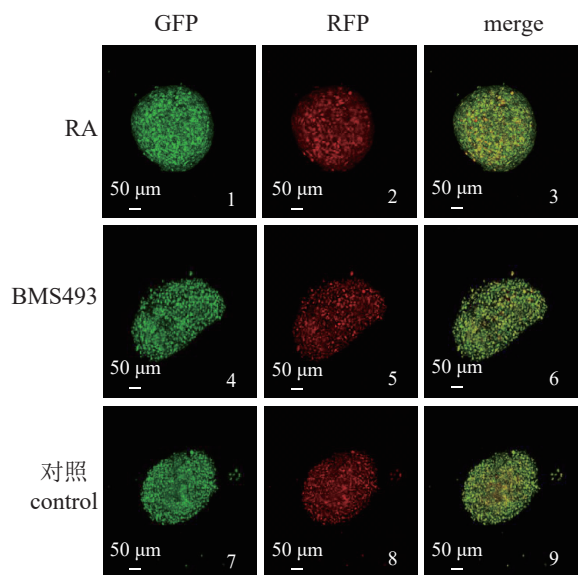


图3 在2D培养条件下RA信号处理对SG3-pGRY细胞多能性与分化相关基因表达影响

Fig. 3 Effects of RA signal treatment on pluripotency and differentiation related gene expression of SG3-pGRY under 2D culture conditions

1. *pou5f3*, 2. *klf4*, 3. *dazl*, 4. *ckit*, 5. *scp3*, 6. *spo11*, 7. *rec8a*, 8. *rec8b*.



图版IV 在3D培养条件下RA信号处理SG3-pGRY细胞48h荧光显微观察

Plate IV Fluorescence microscopic observation of SG3-pGRY treated with RA signal for 48 h under 3D culture conditions

斑马鱼 (*Danio rerio*) 体内并未见 *Stra8* 同源物^[7-8]。因此, 在鱼类中, 目前尚缺乏监测减数分裂起始的标志分子。

Scp3 是减数分裂联会复合物组成蛋白, 特异性表达于减数分裂期的生殖细胞, 通常作为减数分裂期生殖细胞特异性标志分子。本研究也发现, *Scp3* 在青鳉精巢中同样特异性表达于减数分裂时期的生殖细胞。因此, 本研究以 *Scp3* 表达与否来监测 SG3 是否已经发生了减数分裂。此外, 实验

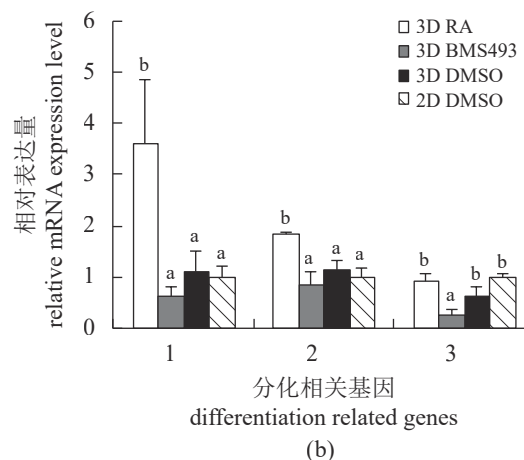
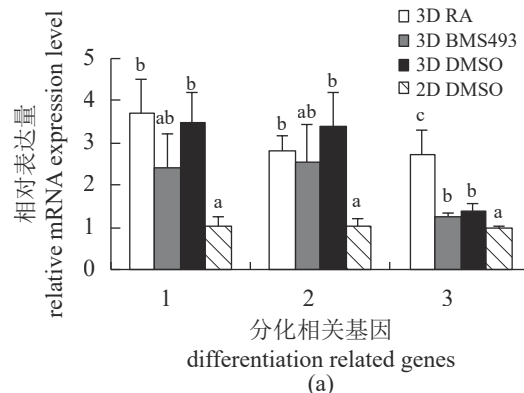


图4 在3D培养条件下RA信号处理48h(a)和34d(b)对SG3-pGRY细胞分化相关基因表达影响

1. *scp3*, 2. *spo11*, 3. *rec8b*。同组中不同小写字母表示有显著差异 ($P<0.05$)。

Fig. 4 Effects of RA signal treatment on the differentiation related gene expression of SG3-pGRY for 48 h (a) and 34 d (b) under 3D culture conditions

1. *scp3*, 2. *spo11*, 3. *rec8b*. Different lowercase letters represent significant difference at $P<0.05$.

采用 qRT-PCR 检测了多能性相关分子 *pou5f3* 和 *klf4* 以及分化相关分子 *dazl*、*c-kit*、*scp3*、*spo11* 及 *rec8* 的表达水平, 以反映细胞的分化状态。已有研究表明, *pou5f3* 和 *klf4* 高表达于精原细胞, 并且其表达水平与细胞分化状态呈负相关^[15-17]。*Dazl* 广泛存在于脊椎动物两性生殖细胞, 在减数分裂过程中具有重要作用^[18-21]。研究报道, 小鼠 *Dazl* 缺失可引起生殖细胞发育停滞, 不能进入减数分裂, 性腺中缺少各级生殖细胞, 导致不育^[22]。*C-kit* 主要表达于分化精原细胞^[23-25], *Spo11* 及减数分裂重组蛋白 8 (recombination protein 8, *Rec8*) 与 *Scp3* 相似, 均是减数分裂复合物的蛋白成分^[26-27]。本研究发现, RA 处理可抑制细胞增殖, 下调多能性相关分子表达, 上调分化相关分子表达。综上,

RA 信号可抑制 SG3 增殖, 促进其分化。

近年来, 基于细胞球、中空纤维、生物支架、微载体等的 3D 培养技术逐渐被广泛应用于干细胞研究^[28]。3D 培养可以更好地模拟细胞体内生长微环境, 并且通过与特定生物材料相结合, 应用于体外类器官形成的研究^[28]。相较于 2D 培养技术, 3D 培养细胞受到的重力、收缩力、表面张力等不同, 从而导致细胞骨架排列、黏附分子表达等发生变化。本研究采用低吸附球形细胞培养板进行了 SG3 的 3D 培养, 细胞在 48 h 聚集成团, 形成球状体。在 2D 培养条件下, 发现 RA 处理未能诱导 SG3 红色荧光的表达, 但在 3D 条件下, 无论有无 RA 处理, 均观察到明显红色荧光。提示, 2D 与 3D 培养方式的改变是导致 SG3 减数分裂发生的关键因素。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Chen Z, Hong F, Wang Z Y, *et al.* Spermatogonial stem cells are a promising and pluripotent cell source for regenerative medicine[J]. *American Journal of Translational Research*, 2020, 12(11): 7048-7059.
- [2] Mu X Y, Wen J, Guo M, *et al.* Retinoic acid derived from the fetal ovary initiates meiosis in mouse germ cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2013, 228(3): 627-639.
- [3] Hogarth C A, Griswold M D. Retinoic acid regulation of male meiosis[J]. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 2013, 20(3): 217-223.
- [4] Griswold M D, Hogarth C A, Bowles J, *et al.* Initiating meiosis: the case for retinoic acid[J]. *Biology of Reproduction*, 2012, 86(2): 35.
- [5] Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals[J]. *Development*, 2007, 134(19): 3401-3411.
- [6] Wang S, Wang X X, Ma L F, *et al.* Retinoic acid is sufficient for the *in vitro* induction of mouse spermatocytes[J]. *Stem Cell Reports*, 2016, 7(1): 80-94.
- [7] Li M H, Feng R J, Ma H, *et al.* Retinoic acid triggers meiosis initiation via *stra8*-dependent pathway in Southern catfish, *Silurus meridionalis*[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2016, 232: 191-198.
- [8] Feng R J, Fang L L, Cheng Y Y, *et al.* Retinoic acid homeostasis through *aldh1a2* and *cyp26a1* mediates meiotic entry in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10131.
- [9] Adolphi M C, Herpin A, Regensburger M, *et al.* Retinoic acid and meiosis induction in adult versus embryonic gonads of medaka[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34281.
- [10] Hong Y H, Liu T M, Zhao H B, *et al.* Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(21): 8011-8016.
- [11] Guan G J, Sun K Q, Zhang X, *et al.* Developmental tracing of oocyte development in gonadal soma-derived factor deficiency medaka (*Oryzias latipes*) using a transgenic approach[J]. *Mechanisms of Development*, 2017, 143: 53-61.
- [12] Fan Z H, Liu L Y, Huang X H, *et al.* Establishment and growth responses of Nile tilapia embryonic stem-like cell lines under feeder-free condition[J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2017, 59(2): 83-93.
- [13] Feng C W, Bowles J, Koopman P. Control of mammalian germ cell entry into meiosis[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 382(1): 488-497.
- [14] Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, *et al.* STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation[J]. *Journal of Cell Science*, 2008, 121(Pt 19): 3233-3242.
- [15] Sánchez-Sánchez A V, Camp E, García-España A, *et al.* Medaka Oct4 is expressed during early embryo development, and in primordial germ cells and adult gonads[J]. *Developmental Dynamics*, 2010, 239(2): 672-679.
- [16] Huang X H, Zhao Y, Liu L Y, *et al.* Characterization of the POU5F1 homologue in Nile tilapia: from expression pattern to biological activity[J]. *Stem Cells and Development*, 2016, 25(18): 1386-1395.
- [17] Wang D K, Manali D, Wang T S, *et al.* Identification of pluripotency genes in the fish medaka[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2011, 7(4): 440-451.
- [18] Niu Z W, Hu Y, Liao M Z, *et al.* Conservation and function of Dazl in promoting the meiosis of goat male germline stem cells[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(5): 2697-2707.
- [19] Park B W, Shen W, Linher-Melville K, *et al.* Deleted in

- azoospermia-like enhances in vitro derived porcine germ cell formation and meiosis[J]. *Stem Cells and Development*, 2013, 22(6): 939-950.
- [20] Li M Y, Shen Q, Xu H Y, *et al.* Differential conservation and divergence of fertility genes *boule* and *dazl* in the rainbow trout[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15910.
- [21] Venables J P, Ruggiu M, Cooke H J. The RNA-binding specificity of the mouse *Dazl* protein[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(12): 2479-2483.
- [22] Slee R, Grimes B, Speed R M, *et al.* A human *DAZ* transgene confers partial rescue of the mouse *Dazl* null phenotype[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(14): 8040-8045.
- [23] Zhang L, Tang J J, Haines C J, *et al.* *c-kit* expression profile and regulatory factors during spermatogonial stem cell differentiation[J]. *BMC Developmental Biology*, 2013, 13: 38.
- [24] Schrans-Stassen B H G J, van de Kant H J G, de Rooij D G, *et al.* Differential expression of *c-kit* in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(12): 5894-5900.
- [25] Zhang L, Tang J J, Haines C J, *et al.* *c-kit* and its related genes in spermatogonial differentiation[J]. *Spermatogenesis*, 2011, 1(3): 186-194.
- [26] Luo Y B, Wang J, Bai X M, *et al.* Differential expression patterns of the two paralogous *Rec8* from Nile tilapia and their responsiveness to retinoic acid signaling[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 2021, 253: 110563.
- [27] Keeney S, Giroux C N, Kleckner N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by *Spo11*, a member of a widely conserved protein family[J]. *Cell*, 1997, 88(3): 375-384.
- [28] 冯春, 李俊良, 李鹏飞, 等. 三维培养技术在间充质干细胞临床转化应用中的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(8): 1692-1699.
- Feng C, Li J L, Li P F, *et al.* Research progress of three-dimensional culture technology in clinical transformation of mesenchymal stem cells[J]. *Chinese Journal of Cell Biology* 2021, 43(8): 1692-1699 (in Chinese).

Role of retinoic acid signaling in the proliferation and differentiation of medaka (*Oryzias latipes*) spermatogonial stem cells *in vitro*

WANG Yuan^{1,2}, LI Mingyou^{3*}, BAI Xiaoming¹, QU Ximei¹,
LUO Yubing¹, WANG Deshou^{1*}, WEI Jing^{1*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education,
School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Guizhou Hongcai Junong Investment Co., Ltd., Liupanshui 553500, China;

3. Freshwater Aquaculture and Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Studies have shown in mammals that retinoic acid (RA) is a key molecule mediating the initiation of meiosis, and can directly induce meiosis in cultured spermatogonial stem cells (SSCs) and express meiosis specific molecule Scp3. However, although studies have shown that RA plays an important role in testis differentiation and development and meiosis initiation in fish, its role in SSC proliferation and differentiation and whether it can directly mediate SSC meiosis remain unclear. In this study, the three-fluorescence reported plasmid pGRY, which contains three promoters, i.e., elongation factor 1 α (*ef1 α*) promoter driven histone H2B-green fluorescent protein (H2B-GFP), *scp3* promoter driven puromycin-red fluorescent protein (puro-RFP), and *protamine* promoter driven yellow fluorescent protein (YFP), was used to transfect SG3 to obtain stable cell line SG3-pGRY. Then the effect of RA signal on the proliferation and differentiation of SG3-pGRY was investigated. The red fluorescence of SG3-pGRY could indeed reflect the expression of endogenous Scp3. Moreover, the SG3-pGRY retained stem property such as strong alkaline phosphatase activity and differentiation potential, indicating that it can be used to monitor the state of cell differentiation. With the condition of 2D culture, that is to say, the cells are sub-cultured when the cell growth density is about 90% in the cell culture plate, RA could inhibit cell proliferation, while Rar (α , β and γ) pan-antagonist BMS493 could promote cell proliferation. Furthermore, the results of real-time PCR showed that RA could significantly down-regulate the expression of pluripotency related genes *pou5f3* and *klf4* and had no significant effect on the expression of differentiated related genes including *ckit*, *scp3*, *spo11*, *rec8a*, *rec8b* except *dazl*. With the condition of 3D, obvious red fluorescence was observed in RA, BMS493 and control group after 48 h incubation. Compared with 2D conditions, the expressions of differentiation related genes were up-regulated compared with those in 2D culture for 48 h. In addition, the expressions of differentiation related genes in RA group were higher than the control group, whilst the BMS493 group was lower than control group. Taken together, RA signal could inhibit the proliferation and promote the differentiation of SSCs, but it is not essential to induce cell meiosis. This study not only provides a good research model for the study of fish SSC differentiation, but also promotes our in-depth understanding of the role of RA signal in fish SSC proliferation and differentiation.

Key words: *Oryzias latipes*; retinoic acid; spermatogonial stem cell; proliferation; differentiation; meiosis

Corresponding authors: LI Mingyou. E-mail: myli@shou.edu.cn;

WANG Deshou. E-mail: wdeshou@swu.edu.cn;

WEI Jing. E-mail: lalsos@swu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31972776, 3217210240); Natural Science Foundation of Chongqing Municipality (cstc2020jcyj-msxmX1045)