



论文

维甲酸直接诱导鸡原始生殖细胞启动并完成减数分裂

葛楚天^{①②}, 邹文贤^①, 王伟^①, 李彩燕^①, 高有领^①, 钱国英^{①*}^① 浙江万里学院生物与环境学院, 宁波 315100;^② 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058

* 联系人, E-mail: qiangy@zww.edu.cn

收稿日期: 2011-10-19; 接受日期: 2011-11-12

国家重点基础研究发展计划前期专项(批准号: 2011CB111513)、国家自然科学基金(批准号: 31101884)和浙江省科技厅创新团队项目(批准号: 2011R09031-03)资助

doi: 10.1360/052011-720

摘要 维甲酸(RA)在胚胎期生殖细胞启动减数分裂过程中发挥重要的调控作用, 但 RA 与性腺细胞的作用机制及其能否诱导生殖细胞完成整个减数分裂生成配子的问题尚不清楚. 本文以鸡原始生殖细胞体外无饲养层培养体系为模型, 避开性腺体细胞的影响, 研究 RA 诱导 PGC 进入减数分裂的作用机理. 研究发现, 在无体细胞的情况下, RA 显著上调鸡胚 PGC 中 STRA8, SYCP3 和 DMC1 的 mRNA 和蛋白表达水平, 从而促进其进入减数分裂; 同时, 流式细胞分析和吉姆萨染色结果表明, RA 能使鸡胚 PGC 经历各个减数分裂时期, 最终生成 36.5%~58.4% 单倍体生殖细胞; 此外, 本实验还对雌性和雄性 PGC 对 RA 的应答能力进行了研究, 发现两者对 RA 的敏感程度相似. 综上所述, RA 能直接诱导 PGC 启动并完成整个减数分裂过程, 生成单倍体生殖细胞, 无需体细胞或其他因子的介导. 这为临床上治疗不孕不育及配子形成的机理研究提供了基础.

关键词原始生殖细胞
鸡胚
维甲酸
减数分裂

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是精子和卵子始祖细胞^[1]. 脊椎动物 PGC 起源于胚盘上胚层, 形成以后迅速增殖并向生殖原基迁移定居. 性腺分化开始后, 雌性 PGC 停止增殖, 进入第一次减数分裂期, 而雄性 PGC 则停滞于有丝分裂 G0/G1 期^[2,3]. 胚胎生殖细胞的这种分化差异取决于性腺体细胞的性别表型而非生殖细胞的染色体性别^[4,5]. 最近研究发现, 由中肾细胞分泌的维甲酸(retinoic acid, RA)在胚胎期生殖细胞进入减数分裂过程中扮演重

要的调控角色. 在小鼠胚胎卵巢中, RA 含量丰富, 诱导减数分裂启动基因 STRA8 的表达, 进而促进 PGC 进入减数分裂^[6-8]. 而在胚胎睾丸中, RA 被睾丸体细胞表达的 RA 代谢酶 Cyp26b1 降解, 使 PGC 逃避 RA 信号的刺激从而抑制减数分裂的启动, 等到性成熟时 Cyp26b1 的表达急剧下降, RA 信号才开始启动减数分裂^[6-8]. 此外, 向体外小鼠胚胎睾丸组织培养体系中添加 RA, 发现外源性 RA 能弥补被降解的内源性 RA, 刺激 XY 生殖细胞进入减数分裂期^[6,7].

RA 虽然已经被证实是一种有效的减数分裂诱导剂, 但它与性腺细胞的作用机制尚不清楚. RA 主要通过与其受体 RARs 和 RXRs 结合而发挥作用^[9], 虽然胚胎期生殖细胞表达 RA 受体, 但是这些受体亦存在于此时期的性腺体细胞上^[6,10,11], 所以以往体内或性腺组织培养模型都不能解释 RA 是直接作用于生殖细胞, 还是先与体细胞作用, 再由体细胞把次级信号传递给生殖细胞, 最终诱导其启动减数分裂. 为了探究 RA 信号的调控机制, 本文以鸡胚 PGC 无体细胞饲养层培养体系为模型, 避免体细胞的影响, 研究外源性 RA 能否直接作用于 PGC, 从而诱导其进入减数分裂.

1 材料与方法

1.1 主要材料及设备

全反式维甲酸(all-*trans* RA)、非必需氨基酸、谷氨酰胺、碘化丙啶(PI)、吉姆萨染料均购自 Sigma 公司; 小鼠干细胞因子(SCF)、人碱性成纤维生长因子(bFGF)、白血病抑制因子(LIF)及干细胞级胎牛血清购自 Stem Cell Tech 公司; KO-BRL-CM、鸡血清、KO-DMEM 培养基、 β -巯基乙醇、RNase A 及 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; 1 $\times$ iQTM SYBR Green Supermix 购自 Bio-Rad 公司; 反转录试剂盒, DNase 购自 Promega 公司; 兔抗 STRA8 及 SYCP3 多克隆一抗购自 Novus Biologicals 公司; 兔抗 vasa 多克隆抗体购自 Abcam 公司; 羊抗兔 IgG-FITC 及 HRP 二抗及 RIPA 细胞裂解液购自 Santa Cruz 公司.

倒置相差荧光显微镜(Olympus $\times$ 81), 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad iCycler), 细胞流式仪(Beckman), CO₂ 培养箱(NAPCO).

1.2 鸡胚 PGC 的分离及培养

在体视显微镜(Olympus SZX7)下用自制的玻璃针吸取孵化 53 h 鸡胚血液, 每枚鸡胚取 5 μ L 血液置于 100 μ L 3.8%(重量/体积)柠檬酸钠缓冲液中, 剩余的组织按照 Petite 和 Kegelmeyer^[12]的方法进行性别鉴定. 将 900 μ L ACK 裂解液(50 mmol/L NH₄Cl, 1 mmol/L KHCO₃, 0.001 mmol/L EDTA)加入到 100 μ L 血液样品中, 轻轻敲打均匀后置于冰上 30 min. 在 4 $^{\circ}$ C 下, 以 2000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀重新溶于 ACK 裂解液, 置于冰上 15 min 后, 以 2000 r/min 离心 10 min. 收集细胞沉淀于 PBS 中漂洗 2 次, 得到初步

纯化的 PGC 悬液. 将纯化后的单枚鸡胚 PGC 悬液接种于 96 孔鸡胚成纤维细胞饲养层上, 并以 40% KO-BRL-CM, 7.5% 胎牛血清, 2.5% 鸡血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 1 $\times$ GS 核苷, 1 $\times$ 非必需氨基酸, 0.1 mmol/L β -巯基乙醇, 6 ng/mL SCF, 4 ng/mL bFGF 和 10 ng/mL LIF 为完全培养液, 置 38.5 $^{\circ}$ C、含 5%CO₂ 的培养箱中进行原代培养. 原代培养 5 天后, 收集培养液以 1000 r/min 速度离心 8 min, 调整细胞密度, 重新溶于新培养液置于 24 孔新饲养层上进行传代培养. 经过 5 代培养后, 撤掉饲养层, 进行 6 孔无饲养层建系培养. 经过长期体外扩增培养, 获得 WL1529 雄性 PGC 细胞系(P135)和 WL12-425 雌性 PGC 细胞系(P150).

将 5 $\times$ 10⁴ 个/mL 的 WL1529 或 WL12-425 PGC 细胞悬液接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L, 在不含血清的完全培养液中添加不同浓度的全反式维甲酸(all-*trans* RA, 0, 1, 2 和 4 μ mol/L), 分别继续培养 0, 24, 48 和 72 h 后, 收集细胞用于 qPCR, Western blot, 免疫荧光染色及流式分析.

1.3 性腺培养

从孵化 5 天的 27 期鸡胚中肾上将性腺剥离下来, 收集胚体血液用于性别鉴定. 每对雌雄性腺单独培养在 48 孔培养板中, 添加完全培养液(见 1.2 小节)培养 12 h 后, 撤掉血清添加 1 μ mol/L all-*trans* RA 继续培养. 48 h 后, 收集性腺用于 RNA 提取和 qPCR 分析.

1.4 RNA 提取和 real-time RT-PCR

从经过 RA 处理的 PGC 和性腺组织中提取 RNA 用于 real-time RT-PCR. 在 ImPro-II 逆转录酶和 oligo(dT)引物作用下合成 cDNA. 以合成的 cDNA 为模板按照下列参数进行 PCR 扩增: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s; 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 循环 50 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min. 引物设计按照基因的 GenBank 登录号、采用 Primer 5.0 软件设计引物. 所用引物如表 1 所示.

1.5 Western blot 分析

收集经处理后的 PGC(约 1 $\times$ 10⁶ 个), 加入 RIPA 细胞裂解液冰上作用 0.5 h, 反复冻融, 4 $^{\circ}$ C 离心后收集上清, 加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液并煮沸使蛋白变性. 将蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜, 再通过脱脂牛奶封闭、标记一抗(1:1000)和羊抗兔二抗

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	扩增片段长度(bp)
STRA8	F: 5'-GTGAGGGACAGTGGAGGTAA-3' R: 5'-CAGAAATGCCGCTTGTAAT-3'	166
POU5F1	F: 5'-GTTGTCCGGGTCTGGTTCT-3' R: 5'-GTGGAAGGTGGCATGTAGAC-3'	189
NANOG	F: 5'-CAGCAGACCTCTCCTTGACC-3' R: 5'-CAGCAGACCTCTCCTTGACC-3'	187
DMC1	F: 5'-AGATGACAAGACGAGCACT-3' R: 5'-CAATCCCACCACCCAGAA-3'	195
DAZL	F: 5'-CTGGGGAGCAAAGAACT ACG-3' R: 5'-CAAAGGTGTTCTCA GACGGT-3'	213
SYCP3	F: 5'-CTGTATTTCAGCAGTGGGATG-3' R: 5'-TGCGAAGTTCATTTTGTGC-3'	225
RS17	F: 5'-ACA CCCGTCTGGGCAACGT-3' R: 5'-CCCGCTGGATGCGCTTCATCA-3'	171

(1:5000)等步骤,最后显影出目的蛋白条带.以β-actin 蛋白作为内参对照.

1.6 免疫荧光染色

收集处理后的 PGC,用 PBS 洗 10 min (5 min×2),置于 4%多聚甲醛固定 30 min;将细胞悬液转移到预先处理的玻片上,自然晾干;滴加 5%山羊血清封闭液,室温 30 min,吸去多余液体,不洗;分别滴加鼠抗 SSEA-1,EMA-1,VASA 和兔抗 STRA8(一抗,1:500),4℃过夜,PBS 洗 5 min×3;滴加荧光素(FITC,PE)标记的羊抗鼠 IgM 或羊抗兔 IgG(二抗,1:1000),37℃避光孵育 30 min,PBS 洗 5 min×3;添加 DAPI 染液(300 nmol/L),在 37℃避光条件下孵育 5 min,PBS 洗 5 min×2.将抗荧光淬灭封片液滴于载玻片上,封片观察,荧光显微镜拍照.

1.7 吉姆萨染色

经过 RA 处理后,收集 PGC(约 1×10⁶个),400 r/min 离心 5 min;将 PGC 沉淀重悬于 0.56%KCl 溶液中,30 min;离心,在甲醇:冰醋酸(3:1)中于 4℃孵育 10 min;将细胞悬液转移到玻片上,自然干燥;将 5%吉姆萨溶液浸没玻片,20~30 min;用蒸馏水漂洗 3 次,封片干燥.

1.8 流式分析

经过处理后,收集 PGC(约 1×10⁶个),400 r/min 离心 5 min,PBS 洗 2 次;向 1 mL 细胞悬液中加入 4 mL 的-20℃纯乙醇,并在漩涡器上高速搅拌混匀;在-20℃下固定 30 min 后,离心,在 PBS 中洗 3 次;向 PGC 悬液中添加 100 μg/mL RNase A,37℃,孵育 20

min;加入 PI 染色液,在暗室中放置 15 min 后上流式仪分析.

1.9 数据分析

所得数据采用 SAS(6.12 版本)软件中 GLM 过程进行方差分析和 Duncan 氏多重比较,检验误差为 5%和 1%水平.

2 结果

2.1 鸡血液 PGC 的培养及鉴定

对鸡胚 PGC 进行分离和多次传代培养后发现,鸡胚血液 PGC 体积明显比红细胞大,直径约 17~20 μm,胞质内富含糖原颗粒,呈单个悬浮生长(图 1(A)~(D)).经过 100 多代传代培养后,对鸡胚血液 PGC 进行一系列染色鉴定.PGC 的细胞内分布有大量的糖原颗粒,所以 PGC 可以进行细胞糖原染色(PAS),如图 1(E)所示,PGC 胞质呈紫红色 PAS 染色阳性反应.干细胞标记物 SSEA-1 及生殖细胞特异性分子标记 EMA-1,VASA 的免疫荧光染色结果显示,150 代 PGC 细胞呈 SSEA-1,EMA-1 及 VASA 免疫染色反应阳性,其中 SSEA-1 和 EMA-1 主要分布在 PGC 细胞膜上(图 1(F)和(G)),而 VASA 则着色于整个胞质(图 1(H)).这表明经过长期的体外培养后,鸡血液 PGC 仍能维持其干细胞特性及生殖细胞特性.

2.2 RA 在体外诱导 27 期性腺进入减数分裂

STRA8 是 RA 的目标基因,它的上调在生殖细胞从有丝分裂向减数分裂转换过程中是必需的^[13~15].为了研究 RA 对鸡胚性腺分化的影响,将整个 27 期

鸡胚性腺进行体外培养同时添加 RA, 检测 *STRA8* mRNA 表达水平的变化. 在所有的 real-time RT-PCR 实验中, *DAZL* 被选作参照基因用于指示生殖细胞. 如图 2 所示, 经过 1 $\mu\text{mol/L}$ all-*trans* RA 处理 48 h 后, 雄性性腺和雌性性腺中 *STRA8* 的 mRNA 水平分别上调 12.4 和 11.2 倍. 同时, 减数分裂期特异性基因 *SYCP3* 和 *DMC1* 的 mRNA 水平也相应上调了 5.6~9.7 倍. 因此可推测, 外源性 RA 能刺激鸡胚胎期生殖细胞启动减数分裂.

2.3 RA 直接上调 PGC 中减数分裂相关基因的表达

首先研究体外长期培养的雌性和雄性 PGC 的分

化状态, 图 3 显示, WL1529 雄性 PGC 和 WL12-425 雌性 PGC 中 *STRA8*, *SYCP3* 和 *DMC1* 基因的 mRNA 表达量显著低于成年鸡卵巢组织, 维持极低水平; 同时, 干细胞多能性基因 *POU5F1* 和 *NANOG* 则显著高于成年鸡卵巢组织, 说明经过体外长期培养后, 雌雄 PGC 仍维持未分化状态.

为了研究 RA 能否直接作用于 PGC 上诱导其分化进入减数分裂, 通过检测减数分裂特异性基因和干细胞多能性基因的表达情况来判断 PGC 是否进入减数分裂期. 本实验中, 在无饲养层条件下, 雄性 PGC 和雌性 PGC 经 1~4 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理 3 天. 图 4 显示, 1~4 $\mu\text{mol/L}$ RA 显著上调雌雄 PGC 中 *STRA8* 基

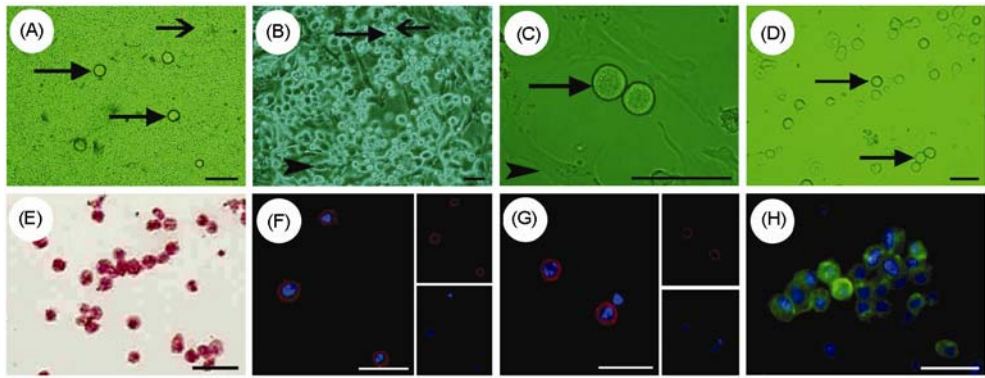


图 1 鸡胚血液 PGC 体外培养的形态学观察及分子鉴定

(A) 刚从 53 h 鸡胚中分离的全血细胞分布; (B) 原代培养 5 天的 PGC; (C) 40 $\times$ 相差显微镜下 PGC 形态图; (D) 无饲养层传代培养的 PGC 形态; (E) PGC 呈 PAS 染色阳性; (F)~(H) PGC 的 SSEA-1(F), EMA-1(G)及 VASA(H)免疫荧光染色鉴定. 标尺: 50 μm . $\rightarrow$ 示 PGC; $\rightarrow$ 示红细胞; $\blacktriangleright$ 示成纤维细胞

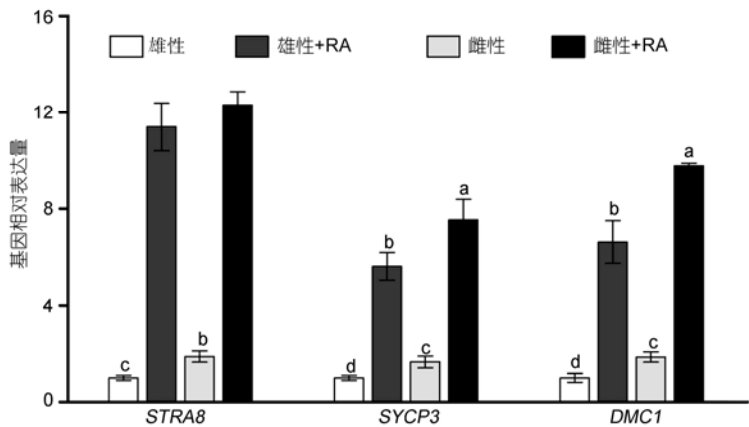


图 2 RA 对 27 期鸡胚性腺中减数分裂相关基因表达的影响

将 27 期(孵化 5 天)性腺添加 1 $\mu\text{mol/L}$ RA 在体外培养 2 天后, 提取 RNA 用于 real-time RT-PCR 检测 *STRA8*, *SYCP3*, *DMC1* mRNA 表达水平的变化, *DAZL* 用作内参基因, 不同字母示统计学上差异显著($P < 0.05$)

因的表达; 其中在雄性 PGC 上, 1~2 $\mu\text{mol/L}$ RA 达到最大刺激效果(上调 13.5 倍), 而在雌性 PGC 上达到最大刺激效果的 RA 浓度为 2~4 $\mu\text{mol/L}$ RA(上调 13.8 倍). 在不同处理时间点上, 2 $\mu\text{mol/L}$ RA 以时间依赖方式显著上调雄性和雌性 PGC 中 *STRA8*, *SYCP3* 和 *DMC1* 的表达, 同时急剧下调 *POU5F1* 和 *NANOG* 的表达(图 5), 提示 RA 能直接作用于 PGC 上, 促进其启动减数分裂, 并且雄性 PGC 和雌性 PGC 对 RA 的敏感性相近.

2.4 RA 直接诱导 PGC 中 *STRA8* 和 *SYCP3* 蛋白的表达

为了进一步验证 RA 能促进 PGC 进入减数分裂, 通过 Western blot 和免疫荧光细胞化学检测 *STRA8*

和 *SYCP3* 蛋白的表达情况. 图 6(A)显示, 雌雄 PGC 经过 RA 处理后, *STRA8* 和 *SYCP3* 的蛋白表达显著增加. 对 PGC 进行 *STRA8* 免疫荧光染色后, 发现经过 RA 处理后, *STRA8* 蛋白开始在细胞核上高度表达(图 6(B)).

2.5 RA 诱导 PGC 完成减数分裂形成单倍体生殖细胞

PGC 经 1 $\mu\text{mol/L}$ RA 处理 4 天后进行细胞流式分析. 结果显示, 雄性 PGC 对照组中仅有 2.6% 细胞处于单倍体期(1N), RA 处理组中则有 36.5% 的单倍体期细胞. 而雌性 PGC 对照组中有 10.2% 的细胞开始进入单倍体期, 经过 RA 处理后单倍体细胞急剧上升至 58.4%(图 7). 吉姆萨染色表明, 进入减数分裂期的

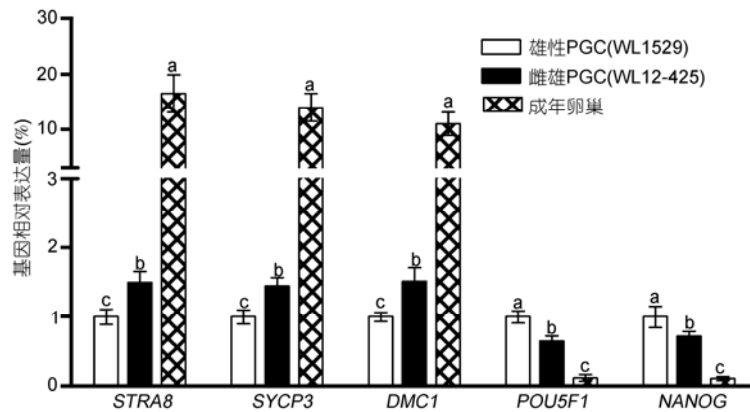


图 3 雄性和雌性 PGC 中减数分裂相关基因和干细胞多能性基因表达量的比较

经过体外长期培养后, 提取 WL1529 雄性 PGC(135 代)和 WL12-425 雌性 PGC(150 代)的 RNA 用于 Real-time RT-PCR 检测 *STRA8*, *SYCP3*, *DMC1*, *POU5F1* 和 *NANOG* mRNA 表达水平的变化, *DAZL* 用于内参基因, 不同字母示统计学上差异显著($P < 0.05$)

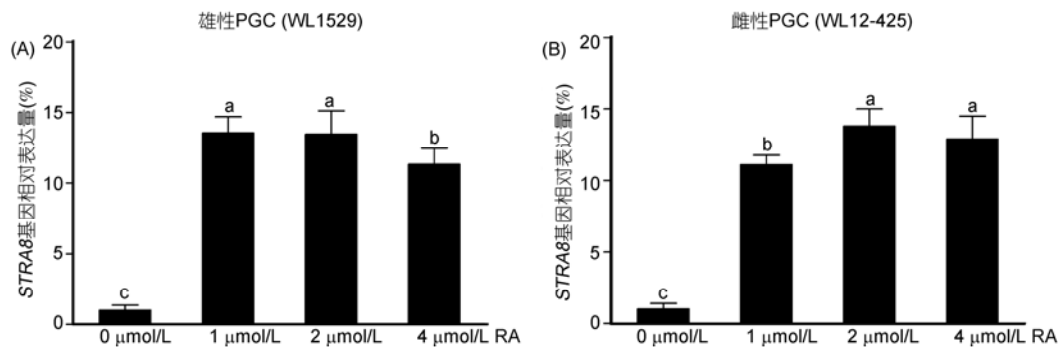


图 4 不同浓度维甲酸对雄性和雌性 PGC 中 *STRA8* 基因表达的影响

(A) WL1529 雄性 PGC 培养基中添加 0~4 $\mu\text{mol/L}$ RA 培养 3 天后 *STRA8* mRNA 表达水平的变化; (B) WL12-425 雌性 PGC 培养基中添加 0~4 $\mu\text{mol/L}$ RA 培养 3 天后 *STRA8* mRNA 表达水平的变化. *RS17* 作为内参基因, 不同字母示统计学上差异显著($P < 0.05$)

细胞在细线期、偶线期、粗线期及双线期都有分布(图 8 和表 2)。以上结果表明, RA 能促使雌雄 PGC 完成整个减数分裂过程, 最终形成单倍体的精子细胞和卵子细胞。

3 讨论

众多研究已证实, RA 作为一种减数分裂诱导因子在胚胎生殖细胞分化过程中扮演重要的调控角色,

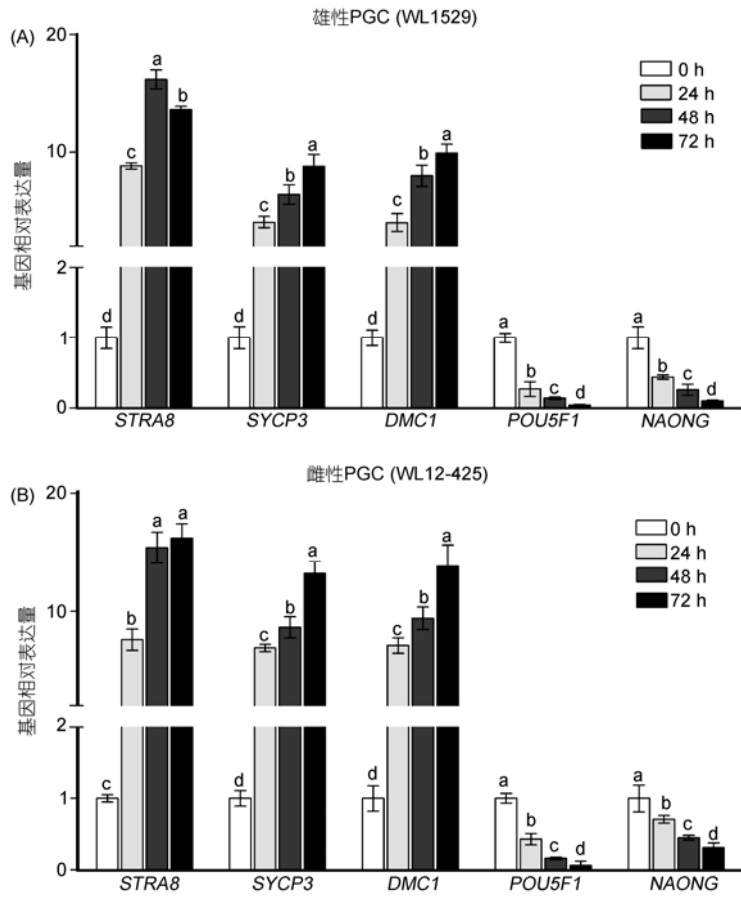


图 5 RA 对雄性和雌性 PGC 启动减数分裂的影响

(A) WL1529 雄性 PGC 培养基中添加 2 $\mu\text{mol/L}$ RA 在体外培养 0~3 天后 *STRA8*, *SYCP3*, *DMC1*, *POU5F1* 和 *NANOG* mRNA 表达水平的变化; (B) WL12-425 雌性 PGC 培养基中添加 2 $\mu\text{mol/L}$ RA 在体外培养 0~3 天后 *STRA8*, *SYCP3*, *DMC1*, *POU5F1* 和 *NANOG* mRNA 表达水平的变化. *RS17* 用作内参基因, 不同字母示统计学上差异显著 ($P < 0.05$)

表 2 雌雄 PGC 经过 RA 处理 4 天后进入减数分裂不同时期的细胞比例^{a)}

分裂时期	雄性 PGC		雌性 PGC	
	-RA	+RA	-RA	+RA
分裂间期	85.0±8.2	12.9±2.9	51.4±5.5	2.1±2.1
前细线期	5.4±1.5	11.6±3.7	15.0±3.2	3.2±0.2
细线期	2.0±0.5	8.5±1.7	9.5±2.1	4.0±0.8
偶线期	1.1±0.5	10.4±1.2	4.5±1.2	12.1±1.7
粗线期	2.1±0.2	11.0±2.4	5.0±1.0	10.2±1.0
双线期	1.8±0.3	9.1±1.1	4.4±0.6	10.0±1.5
单倍体期(1N)	2.6±0.4	36.5±5.0	10.2±2.0	58.4±6.5

a) 数字代表 $\bar{x} \pm \text{SE}$. 每次实验所用的 PGC 数量在 200 个细胞以上

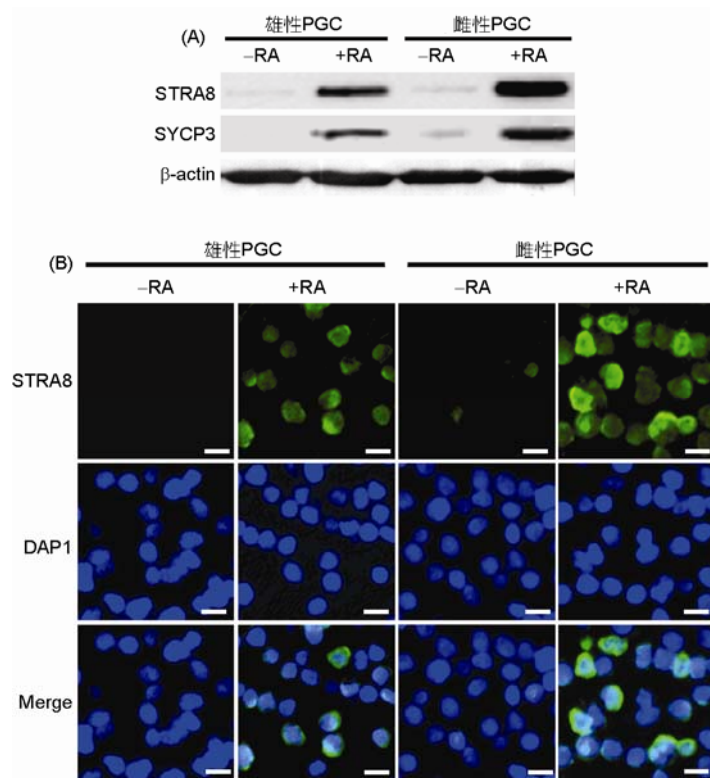


图6 RA对STRA8和SYCP3蛋白表达的影响

将WL1529雄性PGC和WL12-425雌性PGC添加2 μ mol/L RA在体外培养3天后,收集细胞进行蛋白。(A) STRA8和SYCP3的Western blot分析;(B) STRA8细胞免疫荧光染色。标尺:10 μ m

但是并没有清楚阐明RA是直接作用于生殖细胞还是通过性腺体细胞调控,这是因为先前的研究主要是在动物体内或体外整体性腺培养模型上进行的^[6-8]。本实验室成功地分离了鸡雌雄血液PGC,在体外对其进行长期无饲养层培养,发现其仍维持干细胞特性和生殖细胞特性,这为研究各种因子对生殖细胞的调控作用提供了有效的实验模型。

通过27期鸡胚性腺体外单独培养系统,本研究发现,外源性RA能促进未分化的雌性和雄性性腺进入减数分裂。这说明RA在鸟类生殖细胞启动减数分裂过程中有着与哺乳动物相同的调控作用,与Smith等人^[16]的研究报道相印证。至于RA的作用机制,本文利用鸡血液PGC体外无饲养层培养模型研究发现,RA能直接作用于PGC上,刺激其启动并进入减数分裂,并且这个诱导作用无需性腺体细胞的介导。最近,Zhou等人^[17]和Ohta等人^[18]研究发现,在没有体细胞存在的情况下,RA能直接上调STRA8和KIT基因表达,促进未分化的小鼠精原细胞进入减数分裂,但对

已分化的精原细胞不起作用。结合本实验的结果,说明RA确实能直接诱导未分化的生殖细胞进入减数分裂。此前的研究大都集中在RA能否启动减数分裂,尚未见其能诱导完成减数分裂的报道。本实验意外地发现,鸡胚PGC在经过RA处理4天后,历经各个减数分裂时期,最后可生成高达58.4%的单倍体生殖细胞。这表明,RA不但能启动减数分裂还能促使PGC完成整个过程并生成配子。在临床上,将为利用精原干细胞在体外诱导分化形成功能性配子用于治疗不孕不育的设想提供理论依据。此外,通过比较雌性和雄性PGC对RA的应答能力,发现两者对RA的敏感程度相似,STRA8基因的上调程度和单倍体细胞的产生率都相差不大。先前研究发现,STRA8基因在胚胎卵巢生殖细胞进入减数分裂前的一瞬间开始表达,STRA8缺陷型小鼠的性腺中并未出现减数分裂,证明STRA8基因在生殖细胞启动减数分裂过程中必不可少^[13-15]。由此推测,在动物体内雄雌生殖细胞启动减数分裂的生理时间虽然不同,但二者的启动

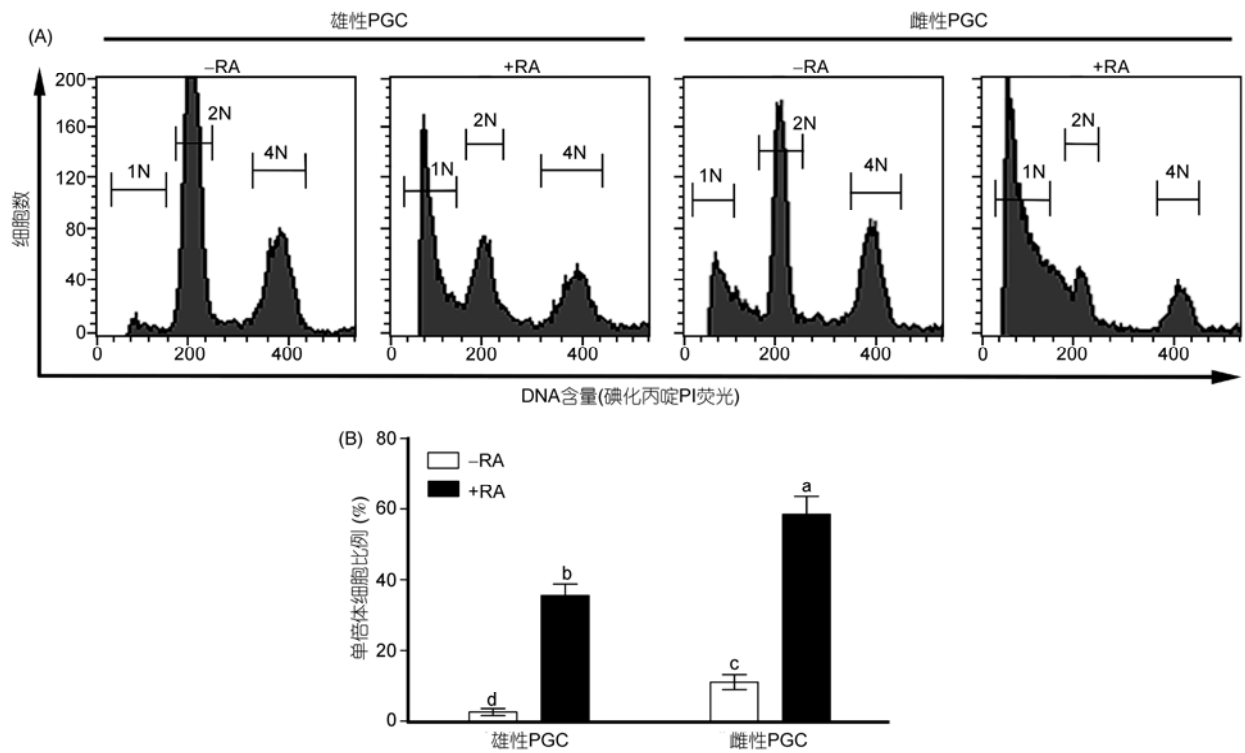


图7 RA对雌雄PGC分化形成单倍体细胞的影响

(A) 添加 $2\text{ }\mu\text{mol/L}$ RA 培养4天后,对WL1529雄性PGC和WL12-425雌性PGC进行PI染色及流式图谱分析;(B)对单倍体细胞数进行统计,不同字母示统计学差异显著($P<0.05$)

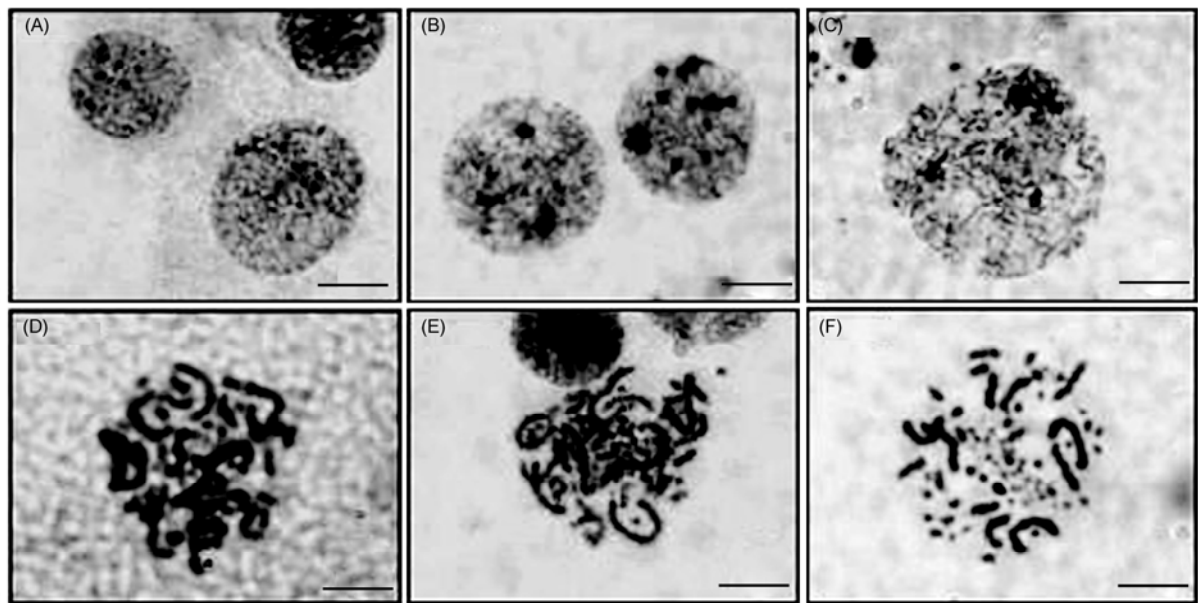


图8 减数分裂不同时期的吉姆萨染色鉴定

(A) 有丝分裂期;(B) 前细线期;(C) 细线期;(D) 偶线期;(E) 粗线期;(F) 双线期. 标尺: $5\text{ }\mu\text{m}$

机制可能相同, 都是通过 RA 诱导 *STRA8* 的表达来完成的。

综上所述, 本实验利用鸡 PGC 体外单独培养模型, 发现 RA 能直接作用于 PGC 上, 启动并完成整个

减数分裂过程产生单倍体生殖细胞, 无需体细胞的介导。而且雌雄 PGC 对 RA 的应答能力相同。至于 RA 诱导生成的单倍体生殖细胞是否具有受精能力有待进一步研究。

参考文献

- Hayashi K, de Sousa Lopes S M, Surani M A. Germ cell specification in mice. *Science*, 2007, 316: 394–396
- Speed R M. Meiosis in the fetal mouse ovary. I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. *Chromosoma*, 1982, 85: 427–437
- McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol*, 1984, 38: 7–23
- Ford C E, Evans E P, Burtenshaw M D, et al. A functional ‘sex-reversed’ oocyte in the mouse. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1975, 190: 187–197
- Palmer S J, Burgoyne P S. *In situ* analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development*, 1991, 112: 265–268
- Bowles J, Knight D, Smith C, et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*, 2006, 312: 596–600
- Koubova J, Mencke D B, Zhou Q, et al. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2474–2479
- Trautmann E, Guerquin M J, Duquenne C, et al. Retinoic acid prevents germ cell mitotic arrest in mouse fetal testes. *Cell Cycle*, 2008, 7: 656–664
- Mark M, Ghyselinck N B, Chambon P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006, 46: 451–480
- Boulogne B, Levacher C, Durand P, et al. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors in the rat testis during fetal and postnatal development: immunolocalization and implication in the control of the number of gonocytes. *Biol Reprod*, 1999, 61: 1548–1557
- Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, et al. Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology*, 2006, 147: 96–110
- Petitte J N, Kegelmeyer A E. Rapid sex determination of chick embryos using the polymerase chain reaction. *Anim Biotechnol*, 1995, 6: 119–130
- Baltus A E, Menke D B, Hu Y C, et al. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet*, 2006, 38: 1430–1434
- Anderson E L, Baltus A E, Roepers-Gajadien H L, et al. *Stras8* and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 14976–14980
- Mark M, Jacobs H, Oulad-Abdelghani M, et al. *STRA8*-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J Cell Sci*, 2008, 121: 3233–3242
- Smith C A, Roeszler K N, Bowles J, et al. Onset of meiosis in the chicken embryo: evidence of a role for retinoic acid. *BMC Dev Biol*, 2008, 8: 85
- Zhou Q, Li Y, Nie R, et al. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (*Stras8*) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid *in vitro*. *Biol Reprod*, 2008, 78: 537–545
- Ohta K, Lin Y, Hogg N, et al. Direct effects of retinoic acid on entry of fetal germ cells into meiosis in mice. *Biol Reprod*, 2010, 83: 1056–1063

Retinoic Acid Directly Regulates the Initiation and Completion of Meiosis in Chicken Primordial Germ Cells

GE ChuTian^{1,2}, ZHOU WenXian¹, WANG Wei¹, LI CaiYan¹, GAO YouLing¹ & QIAN GuoYing¹

1 College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2 Department of Veterinary Medicine, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Retinoic acid (RA) plays a key role in regulating meiotic initiation in fetal germ cells; however, it is not clear how RA interacts with gonadal cells and whether RA possesses the ability to induce germ cells to complete meiosis. In this study, we utilized purified chicken primordial germ cells (PGCs) culture system to investigate the direct effects of RA on entry of PGCs into meiosis, while excluding any effects from gonadal somatic cells. Results showed that RA significantly upregulated the mRNA and protein expression levels of STRA8, SYCP3 and DMC1 in chicken PGCs, thereby inducing entry of PGC into meiosis. Meanwhile, we found that RA is able to induce PGC to undergo all stages of meiotic phase, eventually leading to haploid cell formation, which was determined by giemsa stain and FACS analysis. Furthermore, our work revealed that the sensitivities of male and female PGCs in response to RA are quite similar. In conclusion, RA directly induces PGC to initiate and complete meiosis to produce haploid cells, which do not need the involvement of gonadal somatic cells or other factors. This work provides a platform for clinical application of infertility, as well as mechanistic understanding of gametogenesis.

primordial germ cells, chicken embryo, retinoic acid, meiosis

doi: 10.1360/052011-720