

H2A. X 在不同时期小鼠原始生殖细胞核质区分布

时小艳¹, 马雪山², 吴宝江³, 于建宁⁴, 刘红林^{5*}

(1. 江苏食品职业技术学院 医药与健康管理体系, 江苏 淮安 223003; 2. 中国科学院 动物研究所, 北京 100101;
3. 内蒙古赛科星繁育生物技术股份有限公司, 内蒙古 和林格尔 011517; 4. 江苏省农业科学院 畜牧研究所, 江苏 南京 210014;
5. 南京农业大学 动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 以小鼠为研究对象, 研究 H2A. X 在不同时期原始生殖细胞(PGCs)核质区的分布。结果表明: PGCs 在迁移过程中, 8.5、10.5、11.5 dpc 时 H2A. X 在 PGCs 细胞核和细胞质中呈弥散分布; 13.5 dpc 时 H2A. X 在 PGCs 细胞核和细胞质中均有分布, 但雌性小鼠 PGCs 中 H2A. X 主要集中于细胞核, 而雄性主要集中于细胞质。结果提示 H2A. X 在 PGCs 中的表达可能与其性别分化后精原细胞和卵母细胞的细胞周期维持密不可分。

关键词: 小鼠; 原始生殖细胞; 单细胞; H2A. X; 分布

中图分类号: S 814.6

文献标志码: A

文章编号: 1671-4652(2014)03-0024-05

Mouse primordial germ cells expression of H2A. Z during migration

SHI Xiaoyan¹, MA Xueshan², WU Baojiang³, YU Jianning⁴, LIU Honglin⁵

(1. Dept of Med and Health Manag, Jiangsu Food Sci Coll, Huaian 223003, China;
2. Inst of Anim, Chinese Acad of Sci, Beijing 100101, China;
3. Inner Mongolia Saikexing Reprod Biotech Co, Ltd, Helingeer 011517, China;
4. Inst of Anim Sci, Jiangsu Acad of Agric Sci, Nanjing 210014, China;
5. Coll of Anim Sci and Tech, Nanjing Agric Univ, Nanjing 210095, China)

ABSTRACT: Mice primitive germ cells (PGCs) migration, proliferation, sex differentiation is regulated by the genome and DNA epigenetic modifications, and H2A. X is associated with DNA repair. This study aimed to explore H2A. X expression during the PGC migration process, and its relation with epigenetic modifications. Results indicated that through the PGCs single cell and the organization paraffin section immunity fluorescence method, during the migration process, with 8.5, 10.5, 11.5 dpc, H2A. X was diffusely distributed in the PGCs nucleus and cytoplasm; with 13.5 dpc, H2A. X was present in the nucleus and cytoplasm of PGCs. The female H2A. X PGCs were mainly in the nucleus, while the male were mainly concentrated in the cytoplasm. Expression, H2A. X expression in PGCs cells may be related to sex differentiation of spermatogonia and oocytes is closely related to cell cycle maintenance.

KEY WORDS: mouse; primordial germ cells; single cell; H2A. X; distribution

小鼠原始生殖细胞(PGCs)最早在 6.0 dpc (days post coitum, 配后天数) 时由胚胎外胚层细胞分化而来^[1-2]。7.5~9.0 dpc 时 PGCs 由原条后端、随后肠内卷而被带入胚胎内部, 到达后肠内胚层。8.5 dpc 时大部分 PGCs 位于尿囊蒂和原条尾端的卵黄囊脏层, 即后肠开口边缘的两者结合处。9.5 dpc 时, 少量 PGCs 位于卵黄囊和尿囊底部, 大部分埋藏于后肠中。10.5~12.5 dpc 时 PGCs 离开后肠内胚层, 沿背肠系膜迁移, 最终进入生殖嵴。到达生殖嵴的 PGCs 在性腺分化前与体细胞一样, 进行有丝分裂增殖, 13.5 dpc 时 PGCs 可通过生殖嵴外观形态区分性别。

组蛋白变体 H2A. X 具有独特的 C 端氨基酸序列, 该序列包含 1 个保守的丝氨酸残基。H2A. X 是

收稿日期: 2013-01-26

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(973-2007CB947403)

作者简介: 时小艳(1980—), 女, 内蒙古通辽人, 江苏食品职业技术学院讲师、硕士, 主要从事动物遗传育种研究。

* 通信作者, E-mail: liuhonglin@263.net

DNA 出现断裂时替代 H2A 的变体,它对 DNA 修复具有重要作用。在许多细胞生物学过程中, DNA 断裂可引起 H2A.X 转录后磷酸化修饰,这些过程包括 DNA 双链断裂修复、配子减数分裂联会时复合体中染色体交换与重组、免疫球蛋白发生过程中细胞凋亡时 DNA 降解、V(D)J 剪切、分类转换重组^[3]。此外, H2A.X 高磷酸化也是细胞凋亡的特征之一^[4]。H2A.X 丢失会提高染色体重组和致癌概率。本试验采用石蜡切片免疫荧光和单细胞免疫荧光 2 种方法,对鼠胚发育过程中组蛋白 H2A 变体 H2A.X 在 8.5、10.5、11.5、13.5 dpc 时 PGCs 中的分布进行研究,并结合该过程中迁移繁殖情况,分析 H2A.X 在 PGCs 发育过程中的作用。

1 材料与方 法

1.1 供试动物

供试动物为 6~8 周龄昆明小鼠,体重 20~30 g,购自南京青农山实验动物中心。

1.2 主要仪器设备及试剂

实体显微镜、低温冰箱、石蜡切片机、离心机、离心管、培养皿、移液器及枪头、眼科镊子、一次性 1 mL 注射器、眼科剪刀、大剪刀等。

NaCl、Na₂HPO₄、MgCl₂、KCl、KH₂PO₄、NaHCO₃、NaOH、TritonX-100、EDTA-Na (美国 Sigma 公司);孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、Tween-20、无水乙醇、二甲苯、枸橼酸钠、石蜡、多聚甲醛(国产分析纯)。一抗 stella (兔抗小鼠,英国 Abcam 公司),二抗 FITC 标记(山羊抗兔,美国 Sigma 公司);一抗 H2A.X (兔抗小鼠,英国 Abcam 公司),二抗 CY3 标记(山羊抗兔,美国 Sigma 公司);DAPI (美国 Sigma 公司)。

1.3 试验方法

1) 小鼠超数排卵:选择成熟、健康的雌性小鼠,于首日下午 4:00~5:00 腹腔注射 10 U PMSG,第 3 天下午 4:00~5:00 腹腔注射 10 U hCG 后,与同品系小鼠合笼[雌雄比例为(1~2):1]。第 4 天上午 8:00 前检查有无阴栓出现,有阴栓母鼠记为孕 0.5 dpc。将阴栓母鼠选出分笼饲养。

2) PGCs 组织样获得:将培养到期的孕鼠用颈椎脱臼法致死,用 75%乙醇棉球对腹部皮肤进行消毒,打开腹腔,暴露妊娠子宫,剪断子宫颈与宫管结合部输卵管,分离子宫,细心打开子宫并分离胚胎,置于无 Ca²⁺、Mg²⁺的 PBS 液培养皿中,在 PBS 液中采集胚胎组织样。8.5 dpc 时采集胚胎后 1/3 部分,10.5 dpc 时采集胚胎背肠系膜部,11.5 dpc 时采集胚胎中肾和生殖嵴,13.5 (♀)和 13.5 (♂) dpc 时采集胚胎生殖嵴。

3) 单细胞获得:将 3~5 个 PGCs 组织样放入 200 mL 胰酶溶液中,37 °C 消化;每隔 5 min 用 1 mL 注射器轻轻吹打数次,消化 15 min,加入等量含 Ca²⁺、Mg²⁺的 PBS 液终止消化,吹打均匀后移入 1.5 mL 离心管,1 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,用吸水纸吸去上清液。加入 50 mL 3.7%多聚甲醛固定液,固定 30 min。将固定好的 PGCs 溶液 1 500 r·min⁻¹ 离心 15 min,用吸水纸吸去上清液,将底部含大量细胞的溶液用移液枪吸取,滴在处理过的载玻片中央,室温干燥(约 20 min),加凡士林用盖玻片封片。

4) 石蜡切片制作:将 PGCs 组织样置于 3.7%多聚甲醛固定液中固定 12~16 h。固定结束后,将组织样放入 70%乙醇中洗涤 1 h,分别用 85%、95%和 100%乙醇逐级脱水,各级脱水时间均为 40 min,100%乙醇重复脱水 3 次。脱水完全后,将组织样置于无水乙醇和二甲苯混合液(体积比为 1:1)中 30~45 min,然后转入二甲苯溶液中至组织样透明(15~30 min)。将透明组织样放入融化的石蜡液与二甲苯混合液(体积比为 1:1)中 30 min,再放入纯蜡 1 h。将包埋好的蜡块经修整后用于制作切片。切片厚度为 5 μm,将其展片在预先清洗干净并用 0.25%明胶包被的毛玻片上,置于普通温箱中过夜。取已干燥的切片放入二甲苯中脱蜡 5 min,脱蜡 2 次后,依次置于 100%、90%、70%和 50%乙醇中各 1~2 min;用蒸馏水冲洗 3~5 min。将石蜡切片置于 0.01 mol·L⁻¹枸橼酸钠中,高火热修复 15 min,自然冷却 40 min;流水冲洗 2 min;放入甲醇-H₂O₂-PBS(体积比为 9:1:90)溶液中 1 h, PBS 液清洗

3 次,热修复结束。

5) 单细胞和组织切片免疫荧光染色: 将切片用含 0.1% BSA 的 PBS 液清洗 2 次,滴加 0.5% 的 TritonX-100 处理 10 min, 再用 PBS 液清洗 1 次,用含 0.05% Tween-20 的 PBS/BSA 液处理 30 min; 加抗组蛋白 H2A.X 一抗孵育 1 h; PBS 液清洗 2 次后加二抗孵育 1 h; PBS 液清洗 2 次后加 stella 抗体(PGCs 抗体)孵育 1 h; PBS 液清洗 2 次后加标记 stella 二抗 FITC 孵育 1 h; 用 PBS 液清洗 2 次后加 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 DAPI 处理 20 min; 最后将切片置于荧光显微镜下观察、拍照。

2 结果与分析

2.1 不同时期鼠胚 PGCs 组织切片免疫荧光结果

由图 1 可见, 8.5、10.5、11.5 dpc 时 H2A.X 在 PGCs 细胞核和细胞质中呈弥散分布; 13.5 dpc 时 H2A.X 在整个 PGCs 中均存在, 雌性主要集中于细胞核, 而雄性主要集中于细胞质。

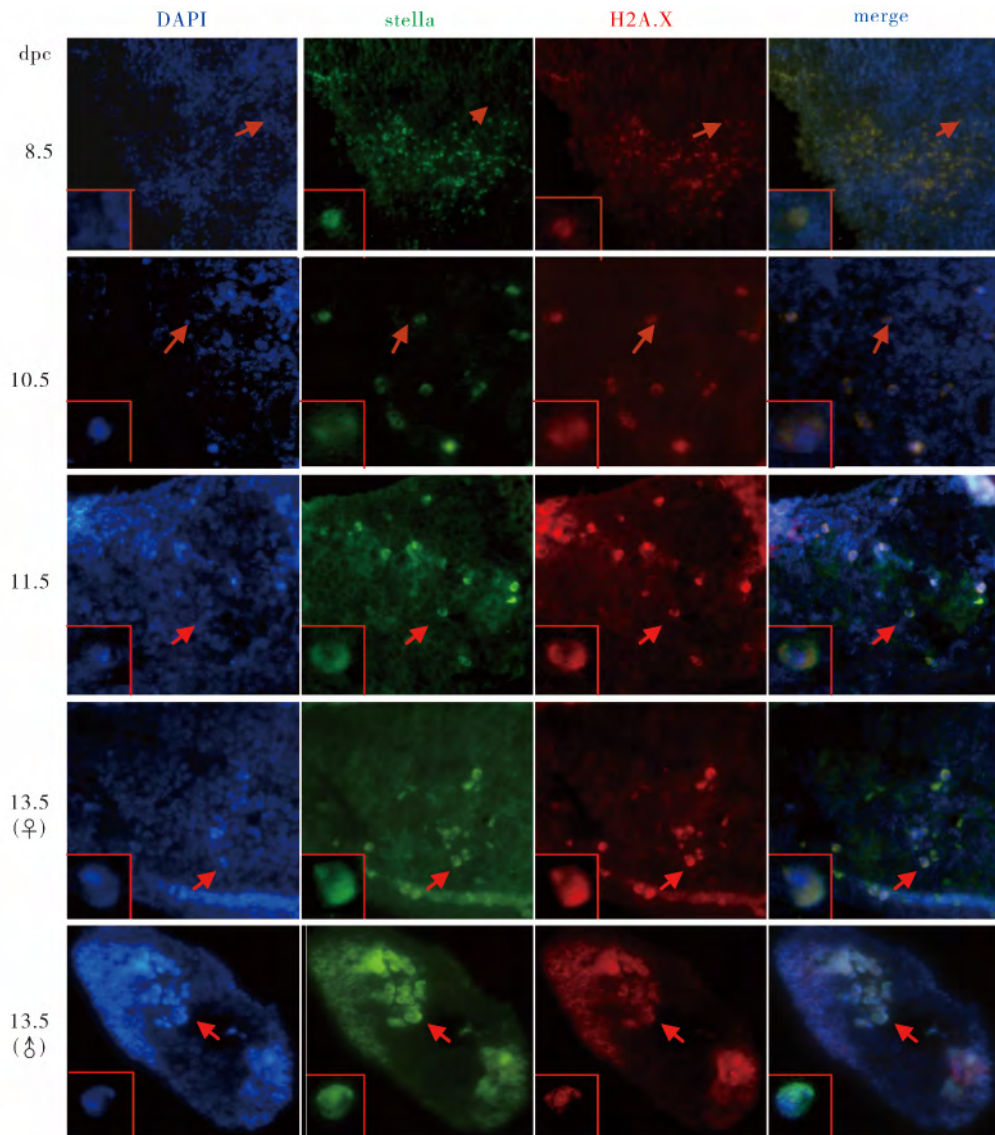


图 1 H2A.X 在不同时期 PGCs 组织切片上的分布 ($\times 400$)

Fig. 1 H2A.X distribution in paraffin PGCs tissue ($\times 400$)

蓝: DAPI 示 DNA; 绿: stella 示 PGCs; 红: cy3 所连二抗的 H2A.X

2.2 不同时期鼠胚 PGCs 单细胞免疫荧光结果

单细胞免疫荧光结果(图 2)与石蜡切片免疫荧光结果相同, 8.5、10.5、11.5 dpc 时 H2A.X 在

PGCs 细胞核和细胞质中呈弥散分布; 13.5 dpc 时 H2A.X 在整个 PGCs 中均存在, 雌性主要集中于细胞核, 而雄性主要集中于细胞质。

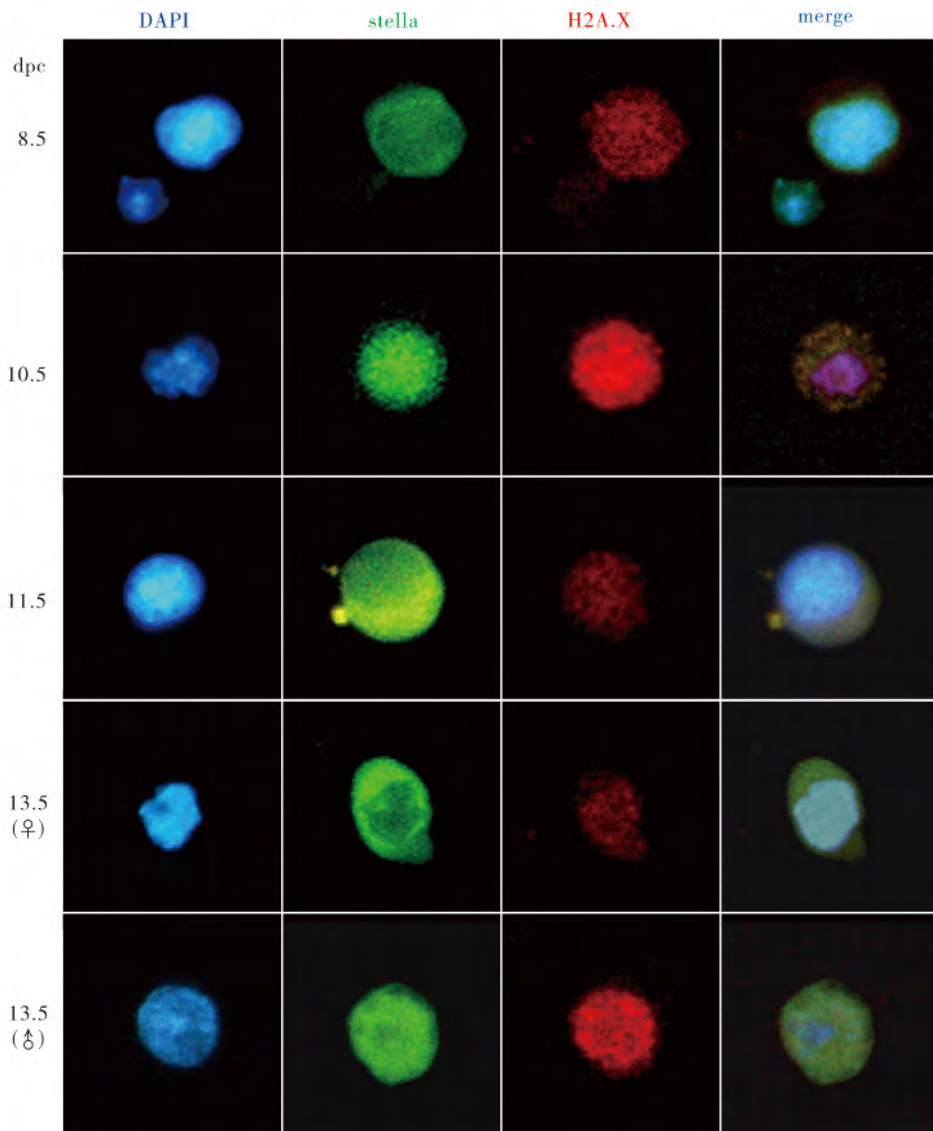


图 2 H2A.X 在不同时期单细胞 PGCs 中的分布 ($\times 400$)

Fig. 2 Distribution of H2AX in PGCs ($\times 400$)

蓝: DAPI 示 DNA; 绿: stella 示 PGCs; 红: cy3 所连二抗的 H2A.X

3 讨论

本研究中, 两组免疫荧光结果显示, 8.5~11.5 dpc 时 H2A.X 在 PGCs 细胞核和细胞质中呈弥散分布; 13.5 dpc 时 H2A.X 在 PGCs 细胞核和细胞质中均存在, 不同的是雌性 PGCs 中 H2A.X 主要集中于细胞核, 而雄性主要集中于细胞质。13.5 dpc 时 PGCs 性别分化完成, 分别进行卵母细胞和精原细胞的发育途径。

电离辐射将 γ -磷酸化的 H2A.X 连接到双链断裂的 DNA 上^[5], 结果发现大量的染色质参与 DNA 双链断裂, 因此 DNA 损伤后明显反应就是 γ -H2A.X 的形成。 γ -H2A.X 形成后吸引更多的修复因子参与 DNA 损伤修复。 γ -H2A.X 与断裂位点密切相关, 能起到基因组监视器的作用。本试验结果显示, 13.5 dpc 时雌性 PGCs 中 H2A.X 主要集中于细胞核, 可能是 H2A.X 已磷酸化, 在 PGCs 核内监测着 DNA 的损伤, 并对其及时修复, 也可能是表达出来以无生物活性形式存在。这有待于对

mRNA 转录水平及磷酸化活性形式单抗检测进行深入研究。

基因组不稳定常继发不精确修复或细胞周期关卡缺陷所致的染色体断裂、易位。酵母中 γ -H2A. X 在正常生长条件下能促进基因组的稳定,异常时引发各种 DNA 修复背景下酵母生长速率进一步降低。 γ -H2A. X 的功能可能在进化上是保守的,因为 H2A. X^{-/-}小鼠细胞表现出断裂增多^[6]。Celeste 等^[7]研究发现, H2A. X^{-/-}小鼠成纤维细胞染色体畸变比野生型细胞更高,电离辐射在 H2A. X^{-/-}细胞诱导出更多的断裂、碎片和改变,细胞存活率更低。综合前人研究成果,作者能更好地解释本试验结果。

Fernandez-Capetillo 等^[8]研究发现, H2A. X 对于高剂量 γ -射线的关卡应答是必不可少的,暴露于低剂量射线产生少量双链断裂(DBS)的 H2A. X^{-/-}细胞不能正确停止在 G2 期而进入有丝分裂期。这恰好与本试验 13.5 dpc 时雄性 PGCs 中 H2A. X 在细胞质中也有少量弥散分布的结果相吻合。Fernandez-Capetillo 等^[8]研究还发现, H2A. X^{-/-}精原细胞的 Y 染色体不能浓缩形成一个性小体,也不能启动减数分裂的性染色体失活,使 X、Y 染色体配对出现严重缺陷。减数分裂重组发生于第 1 次减数分裂的前期,由 Spo11 转酯酶介导的 DSB 所触发^[9]。Mahadevaiah 等^[10]在分析小鼠精原细胞 γ -H2A. X 的分布时发现,在细线期到偶线期的过渡期,所有染色体上均有与减数分裂 DSB 有关的 Spo11 依赖的 γ -H2A. X 形成,在此后的粗线期,只有 X、Y 染色体但不是常染色体上有 γ -H2A. X 覆盖。因此,13.5 dpc 时雄性 PGCs 中 H2A. X 是否于小鼠出生时启动细胞周期后转入细胞核内,尚有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Tres L L, Rosselot C, Kierszenbaum A L. Primordial germ cells: what does it take to be alive [J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 68(1): 1-4.
- [2] 李碧春, 陈国宏, 赵东伟, 等. 鸡胚 PGCs 迁移与性腺发育关系的研究 [J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2002, 23(1): 18-22, 26.
- [3] Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodeling and epigenetic features of germ cells [J]. *Nature*, 2005, 434(7033): 583-589.
- [4] Talasz H, Helliger W, Sarg B, et al. Hyperphosphorylation of histone H2A. X and dephosphorylation of histone H1 subtypes in the course of apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(1): 27-39.
- [5] Jakob B, Splinter J, Conrad S, et al. DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2A. X phosphorylation and relocation to euchromatin [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(15): 6489-6499.
- [6] Nakamura T M, Du L L, Redon C, et al. Histone H2A phosphorylation controls Crb2 recruitment at DNA breaks, maintains checkpoint arrest and influences DNA repair in fission yeast [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(14): 6215-6230.
- [7] Celeste A, Petemen S, Romanienko P J, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2A. X [J]. *Science*, 2002, 296(5569): 922-927.
- [8] Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah S K, Celeste A, et al. H2A. X is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis [J]. *Dev Cell*, 2003, 4(4): 497-508.
- [9] Hunter N, Klekner N. The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination [J]. *Cell*, 2001, 106(1): 59-70.
- [10] Mahadevaiah S K, Tumer J M, Baudat F, et al. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis [J]. *Nat Genet*, 2001, 27(3): 271-276.

(责任编辑 张立元)