

山羊生殖细胞特异报告载体 pVASA-EGFP 的构建及表达

颜光耀*, 李佩真*, 任才芳, 王锋, 张艳丽

南京农业大学动物科技学院 江苏省家畜胚胎工程实验室, 江苏 南京 210095

颜光耀, 李佩真, 任才芳, 等. 山羊生殖细胞特异报告载体 pVASA-EGFP 的构建及表达. 生物工程学报, 2015, 31(9): 1313-1324.

Yan GY, Li PZ, Ren CF, et al. Construction of goat germ cell specific reporting system pVASA-EGFP. Chin J Biotech, 2015, 31(9): 1313-1324.

摘 要: 为监测成体干细胞向生殖细胞分化的过程, 分析生殖细胞特异性 DEAD-box 家族 ATP 依赖 RNA 解旋酶 *vasa* 在不同日龄山羊睾丸组织中的表达情况并构建山羊生殖细胞特异性报告载体 pVASA-EGFP。通过免疫荧光及 RT-PCR 法监测 *vasa* 的表达情况, 利用分子技术构建报告载体 pVASA-EGFP, 脂质体法转染山羊骨髓间充质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSCs), 经过视黄酸 (Retinoic acid, RA) 诱导后, 观察绿色荧光蛋白表达情况以鉴定该报告载体的有效性。免疫荧光结果显示, *Vasa* 在性成熟不同阶段的山羊睾丸组织中均有表达, RT-PCR 结果表明 *vasa* 基因在 3 月龄、10 月龄山羊睾丸组织中显著高于 10 日龄组。测序及酶切鉴定结果表明, 扩增的 *vasa* 基因启动子片段成功连至 N1 载体, 转染 BMSCs 后经 4 d 的 RA 诱导, 发现有绿色荧光蛋白表达, 表明成功构建了山羊 *vasa* 基因启动子调控的报告载体 pVASA-EGFP。以上结果表明, *vasa* 基因在不同日龄山羊睾丸组织中均有表达, 所构建的山羊生殖细胞特异性报告载体 pVASA-EGFP 具有示踪山羊成体干细胞向生殖细胞分化过程的能力, 为下一步监测山羊 BMSCs 向生殖细胞分化的过程提供了鉴定和筛选方法。

关键词: DEAD-box 家族 ATP 依赖 RNA 解旋酶, 启动子, 生殖细胞, 视黄酸, 骨髓间充质干细胞, 山羊

Received: December 15, 2014; **Accepted:** April 15, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31201802), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. KYZ201211), PhD Program Foundation of the Ministry of Education of China (No. 20120097120038).

Corresponding authors: Feng Wang. Tel: +86-25-84395381; E-mail: caeet@njau.edu.cn

Yanli Zhang. Tel: +86-25-84395381; E-mail: zhangyanli@njau.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (No. 31201802), 中央高校基本科研基金 (No. KYZ201211), 国家教育部博士点基金 (No. 20120097120038) 资助。

网络出版时间: 2015-05-25

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150525.1038.001.html>

Construction of goat germ cell specific reporting system pVASA-EGFP

Guangyao Yan*, Peizhen Li*, Caifang Ren, Feng Wang, and Yanli Zhang

Jiangsu Livestock Embryo Engineering Laboratory, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: To monitor the trans-differentiation from adult stem cells to germ cells, we analyzed the *vasa* expression of goat testicular tissues in different ages and constructed the germ cell specific reporting vector pVASA-EGFP. The expression of *vasa* was verified by RT-PCR and immunofluorescence. The vector pVASA-EGFP was constructed by molecular technology, then transfected into goat bone mesenchymal stem cells (BMSCs) by Lipofectamine 2000. Moreover, we observed the expression of the vector through green fluorescent protein (GFP). Immunofluorescence results show that Vasa was expressed in all groups of goat testicular tissues, RT-PCR results show that the levels of *vasa* mRNA in 3-month group and 10-month group were significantly higher than that in 10-day group. Sequencing and restriction enzyme results show that the vector was successfully constructed. After transfection and RA treatment, GFP expression was observed, which proved the validity of our reporting system. All the results proved that *vasa* was expressed in different ages in goat testicular tissues, and the vector pVASA-EGFP is efficient in monitoring the trans-differentiation *in vitro*, which paves the way for further characterization and screening of the trans-differentiation of goat BMSCs.

Keywords: DEAD-box protein family of RNA helicases, promoter, germ cell, retinoic acid, bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), goat

vasa 基因是 DEAD-box 基因家族的重要成员之一^[1], DEAD-box 基因家族存在于从细菌到哺乳动物的许多物种中, 因其具有高度保守 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 序列而得名。该蛋白在细胞、RNA 代谢中具有重要作用, 参与 RNA 代谢几乎所有的过程, 包括转录调控、mRNA 前体的剪接、核糖体组装、核内 mRNA 运输、翻译起始调控等。在绝大多数物种中, *vasa* 基因仅限在生殖细胞系中特异性表达, Vasa 蛋白对于生殖细胞的形成和卵子极性的建立以及某些发育基因的 mRNA 转录调控都具有重要作用, 因此作为一种分子标记物广泛用于研究配子发生和原始生殖细胞 (Primordial germ cells, PGCs) 起源、迁移、分化等方面^[2-4]。

随着干细胞的研究手段日益成熟, 科学家逐渐利用胚胎干细胞和成体干细胞作为体外的

模型, 通过各种诱导方式, 从体外获得了生殖细胞, 从而间接研究生殖细胞的发生、迁移和成熟等各个过程^[5-9]。但是通过干细胞体外诱导得到的生殖细胞, 较难分离纯化。2009 年, Kee 等^[10]首次构建 *vasa* 基因启动子驱动绿色荧光蛋白 (GFP) 表达的载体 (pVASA-GFP), 将其转染人胚胎干细胞 (Human embryonic stem cells, hESC) 后通过诱导, 分选出绿色荧光阳性细胞——PGCs, 此方法为研究其他物种生殖细胞的发生过程提供了思路。

骨髓间充质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 是一种最为广泛运用的成体干细胞, 具有易分离纯化、易鉴定、体外培养方便等特点, 并且避免了胚胎干细胞 (Embryonic stem cells, ESCs) 所涉及的伦理道德等问题^[11]。因此 BMSCs 是体外研究生殖细胞的理想模型

之一。

本试验首先验证了 *vasa* 基因在不同日龄山羊睾丸组织中的表达, 然后进一步构建了 *vasa* 基因启动子驱动 EGFP 表达的载体 pVASA-EGFP, 将其转染经视黄酸 (Retinoic acid, RA) 诱导处理的山羊 BMSCs, 观察绿色荧光蛋白的表达, 从而验证载体的有效性。本试验初步建立了体外成体干细胞向生殖细胞分化的模型, 并且通过构建生殖细胞特异的报告载体, 为后期分离和纯化转分化得到的生殖细胞提供很好的途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

山羊睾丸组织由江苏金盛山羊繁育技术发展有限公司提供。载体 pEGFP-N1、大肠杆菌 DH5 α 均为南京农业大学动物胚胎工程技术中心保存。LA *Taq* 酶、pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶、DNA 标准品和各种限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。DNA 凝胶回收试剂盒和小量质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司。无内毒素质粒提取试剂盒购自 Omega 公司。细胞 RNA 提取试剂盒购自天根公司。细胞基本培养基 (L-DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、青霉素、链霉素均购自 Gibco 公司。Trizol 试剂、反转录试剂和 Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司。引物合成和基因测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 方 法

1.2.1 免疫荧光定位不同日龄山羊睾丸组织中 Vasa 表达

取 10 日龄、3 月龄和 10 月龄的山羊睾丸组织, 经 4% 多聚甲醛固定后进行石蜡包埋: 70%、

85%、95% 乙醇系列脱水, 各 1 h, 然后 100% 无水乙醇脱水 3 次, 每次 2 h; 经 50% 乙醇和 50% 二甲苯混合液处理 30 min 后, 二甲苯透明 2 次, 每次 30 min; 经 50% 二甲苯和 50% 石蜡混合液处理 30 min 后, 放入石蜡中过夜处理; 包埋后, 对修好的蜡块进行切片, 厚度为 5 μ m。山羊睾丸组织石蜡切片经常规的二甲苯脱蜡及乙醇系列水化后, 用 3% 甲醇-H₂O₂ 处理 1 h 以消除内源性过氧化物酶, 再经柠檬酸三钠 (pH 6.0) 100 $^{\circ}$ C 抗原热修复处理 1 h 后, PBS 冲洗 3 次, 10% BSA 室温封闭 1 h; 特异性抗体 Vasa (ab13840, 工作浓度 1:300) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次后, 二抗为 FITC 标记的羊抗兔多克隆抗体, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h, 用 PBS 洗净后, 经 DAPI 核染, 封片观察。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 *vasa* 在不同日龄山羊睾丸组织中的表达特异性

用 Trizol 试剂提取 10 日龄、3 月龄和 10 月龄山羊睾丸总 RNA, 再反转录成 cDNA, 以此为模板, 山羊 *gapdh* 引物作为内参, 进行荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR) 检测 *vasa* 的表达, 引物见表 1。按照试剂盒 (TaKaRa 公司) 的要求在冰上进行如下体系混合 (20 μ L 体系): H₂O 6.8 μ L, 引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, 模板 2 μ L, ROX Reference Dye 0.4 μ L, SYBR Premix Ex *Taq* 10 μ L, 混匀离心后在荧光定量 PCR 仪 (Stepone plus, 美国 ABI 公司) 上反应检测, 反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 31 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环, 反应结束绘制熔解曲线。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 *vasa* 基因在不同日龄山羊睾丸组织中的 mRNA 表达进行相对定量分析。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Quantitative real-time PCR primer sequences

| Primer name | Primer sequence (5'-3') | Size (bp) |
|------------------|-------------------------|-----------|
| 5'- <i>gapdh</i> | AACGTGTCCGTTGTGGATCT | 157 |
| 3'- <i>gapdh</i> | GAGTGTGCTGTTGAAGTCG | |
| 5'- <i>vasa</i> | CCTCCTCCACCTGAAGATGA | 199 |
| 3'- <i>vasa</i> | CCATCAAATCTCGTCCTCCT | |
| 5'- <i>oct4</i> | GAGGCTTTGCAGCTCAGTTT | 179 |
| 3'- <i>oct4</i> | CTCTCCAGGTTGCCTCTCAC | |

1.2.3 *vasa* 基因的扩增与克隆

根据已发表的牛 *vasa* 非编码区序列 (GenBank Accession No. NR_103807.1), 设计合成引物, 上下游引物 (*vasa*-F/R): 5'-GGATTAATCAGGAAAGGCGAAGGAG-3'/5'-GCGTCTGACATAACCATCAGGTGGAGAA-3' (下划线分别为 *Ase* I 和 *Sal* I 酶切位点)。利用 TIANGEN 试剂盒方法提取 10 月龄山羊睾丸基因组 DNA, 以 *vasa*-F 和 *vasa*-R 为引物在普通 PCR 仪上进行反应 (VERITI PCR, 美国 ABI 公司)。反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。预期 PCR 产物长度应为 1 044 bp。

1.2.4 pMD-VASA 载体构建与测序

PCR 产物经快速回收和 pMD19-T 载体在 T4 DNA 连接酶作用下于 16 °C 连接。将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 菌液与 IPTG 和 X-gal 按比例混匀后涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平皿上, 37 °C 培养过夜。挑取大小均匀的白斑菌落, 按照质粒抽提试剂盒说明书小量提取质粒, 经 *Ase* I 与 *Sal* I 双酶切鉴定, 将获得的阳性克隆质粒 (命名为 pMD-VASA) 送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.5 pVASA-EGFP 报告载体的构建

将载体质粒 pEGFP-N1 和测序正确的质粒 pMD-VASA 分别用内切酶 *Ase* I 与 *Sal* I 进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 回收质粒载体和 *vasa* 基因片段, T4 DNA 连接酶连接过夜, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 经含氨苄青霉素的 LB 平皿培养筛选克隆、提取质粒后, 用 *Ase* I 与 *Sal* I 双酶切鉴定, 再送公司测序。测序正确的菌株于 37 °C 扩培, 利用无内毒素质粒抽提试剂盒提取重组质粒, 命名为 pVASA-EGFP, 测定其核酸浓度备用。

1.2.6 山羊 BMSCs 的分离培养与体外 RA 诱导

将 1 月龄海门山羊快速放血致死, 无菌条件下取股骨和胫骨, 剔除附着的肌肉组织, 置体积分数为 75% 乙醇中浸泡 10 min。用灭菌钢钳剪除两侧骨髓端, 再用 L-DMEM 培养基反复冲洗骨髓腔, 收集骨髓液于无菌离心管中, 1 000 r/min 离心 20 min, 取沉淀, 用含有 20% 胎牛血清的 L-DMEM 培养液重悬, 轻轻吹打成单细胞悬液。将 5 mL 细胞悬液接种于 25 cm² 底面积的培养瓶中, 置于 37 °C、5% (体积分数) CO₂ 培养箱内培养, 3 d 后更换培养液, 倒置显微镜下观察细胞形态。待原代细胞接近 90% 融合时, 用胰酶消化, 按 1:3 传代, 一部分继续培养, 另一部分置于液氮中保存备用。取第 3 代 BMSCs, 按 2 \times 10⁴ 个/mL 的细胞密度分别接种于 24 孔培养板中, 对其用浓度为 10 μ mol/L 的 RA 进行体外诱导。

1.2.7 RA 诱导后 BMSCs 中 *vasa* 基因表达水平的检测

对 RA 诱导 4 d 后的 BMSCs 进行 RT-PCR、免疫荧光检测。用 Trizol 试剂提取 RA 处理 4 d 后的山羊 BMSCs 总 RNA, 再反转录成 cDNA

第一链,加入 *vasa* 引物,以山羊 *gapdh* 引物作为内参,进行 PCR 扩增,引物见表 1。反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,63 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 30 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统观察结果。

对 RA 诱导 4 d 后的 BMSCs 进行免疫荧光检测。第 3 代经 RA 处理 4 d 的山羊 BMSCs 以 1×10^4 个/mL 接种 24 孔板,待细胞 95% 融合后,以 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1 mol/L PBS 洗 3 遍,用含 0.25% Triton-X-100 的 PBS 孵育细胞 30 min,PBS 洗涤 3 遍后,经 5% BSA 封闭 1 h,以免源 *Vasa* 多克隆抗体 (ab13840, Abcam) 常温孵育 1 h,用 PBS 洗涤 5 次,每次 5 min。二抗为 FITC 标记的羊抗兔的多克隆抗体,常温下孵育 1 h,PBS 洗涤 5 次,每次 5 min。Olympus FluoViewTM 500 激光共聚焦显微镜观察、拍照并计数。

1.2.8 RA 诱导后 BMSCs 细胞周期测定

取 RA 诱导 4 d 的第 3 代 BMSCs,调整细胞含量为 5.0×10^6 /mL,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 PBS 洗 1 遍,离心得到细胞团,加入 1 mL DNA 染色液,涡旋混合 5–10 s,室温避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.9 重组质粒 pVASA-EGFP 导入山羊 BMSCs 中并进行 RA 诱导

转染前 2 d,将 BMSCs 接种至 6 孔板中,培养液为含 15% 胎牛血清,不含青霉素、链霉素的 L-DMEM。当细胞汇合 80%–90% 时,按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书的方法将重组质粒 pVASA-EGFP 转染山羊 BMSCs。转染 6 h 后将培养液换为含 15% 胎牛血清和青霉素、链霉素各 100 U/mL 的 L-DMEM。转染 24 h 后

行 RA (浓度为 10^{-6} mol/L) 诱导。

2 结果与分析

2.1 不同山羊睾丸组织中 *Vasa* 蛋白定位及 *vasa* 基因 mRNA 水平表达

本试验对于不同日龄山羊睾丸组织进行了组织的免疫荧光。发现 *Vasa* 在不同日龄睾丸组织中均有表达,在 10 日龄和 3 月龄的山羊睾丸组织中,*Vasa* 主要在支持细胞和初级精母细胞中表达 (图 1A 和 1B)。在 10 月龄的山羊睾丸组织中,*Vasa* 在初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和支持细胞中均有明显表达 (图 1C)。

本试验进一步对 *vasa* 基因在不同日龄山羊睾丸组织进行 mRNA 水平的荧光定量 RT-PCR 检测。发现性成熟的山羊睾丸 (3 月龄、10 月龄) 中 *vasa* 的 mRNA 水平表达量相对 10 日龄显著升高 ($P > 0.05$, 图 2),表明 *vasa* 在不同性成熟阶段山羊睾丸组织中表达的特异性。

2.2 山羊 *vasa* 基因启动子片段的扩增及序列分析

以山羊基因组 DNA 为模板,PCR 扩增后,产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,显示为单一条带,大小约为 1.0 kb,与预期大小 (1 044 bp) 基本一致 (图 3A),切胶回收并送公司测序。克隆片段测序结果和 NCBI 上牛的 *vasa* 序列比对,同源性为 99%。将 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上,获得重组质粒 pMD-VASA,用 *Ase* I 与 *Sal* I 对其进行双酶切鉴定,双酶切后片段大小分别为 2 692 bp 和 1 044 bp,与预期结果相符 (图 3B)。

2.3 pVASA-EGFP 重组质粒的构建与鉴定

将扩增的 *vasa* 基因序列 (图 3A) 和切掉 CMV 启动子的 pEGFP-N1 部分载体 4.1 kb

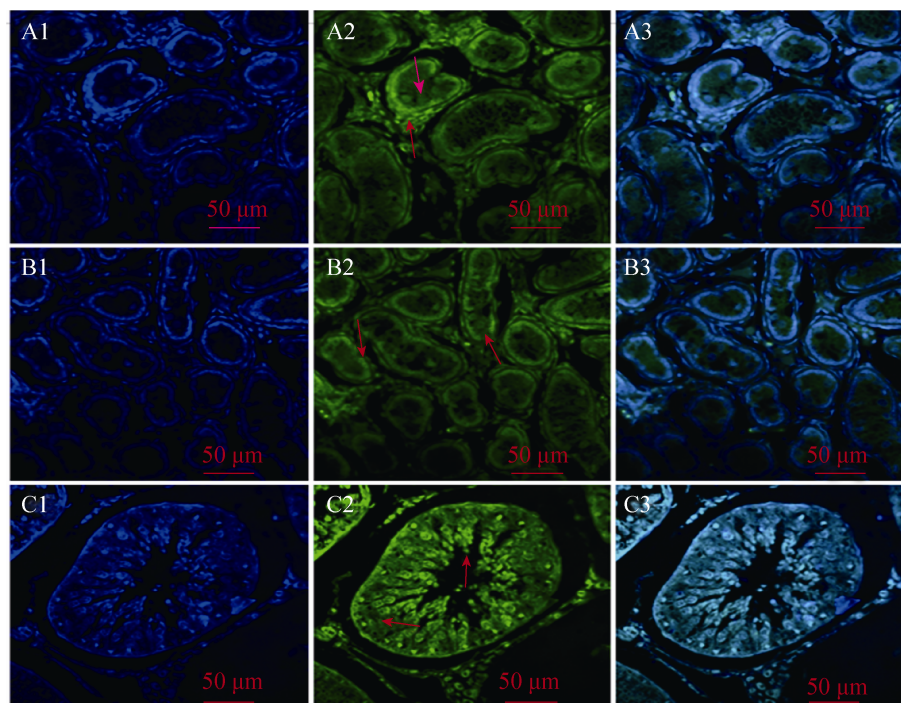


图 1 免疫荧光检测 Vasa 在不同日龄山羊睾丸组织中的表达

Fig. 1 The immune-histofluorescence of Vasa in the testicle of goats with different ages. (A) Testicle of 10 days old goats. (B) Testicle of 3 months old goats. (C) Testicle of 10 months old goats. 1: nucleus staining with DAPI; 2: Vasa fluorescence staining; 3: the merged.

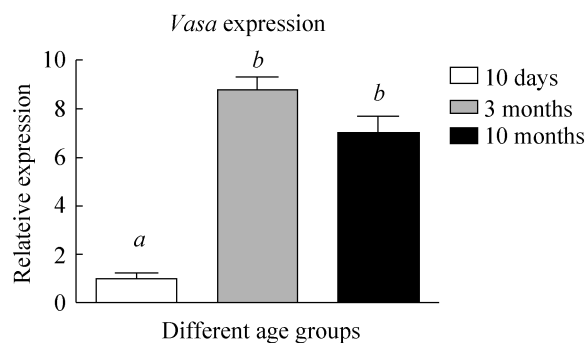


图 2 Vasa 在不同日龄山羊睾丸组织中的 mRNA 表达水平

Fig. 2 The mRNA level of *vasa* in the testis of goats with different ages. a,b without a common superscript means significantly different ($P < 0.05$).

(图 3B,泳道 3、4) 连接。重组质粒 pVASA-EGFP (图 3C) 分别经 *Ase I* 与 *Sal I* 双酶切。结果表明, 所插入的基因大小和方向均正确, 双酶切后得到

4.1 kb 和 1 044 bp 的条带, 说明 pVASA-EGFP 重组质粒构建成功 (图 4A)。

2.4 山羊 BMSCs 的诱导和诱导后细胞的鉴定

对第 3 代山羊 BMSCs 添加 RA (10^{-6} mol/L) 进行体外诱导, 诱导 4 d 后的细胞进行形态学观察、RT-PCR、免疫荧光分析。结果表明, 细胞变圆变大, 核质比升高 (图 5), *vasa*、*dazl* 和 *scp3* 基因表达升高 (图 4B), Vasa 蛋白的表达水平升高 (图 6)。这些结果表明 BMSCs 已经开始表达生殖细胞特异的基因, 间接说明体外转分化的开始。另外, 本试验还对 RA 诱导前后的细胞进行细胞周期分析, 发现诱导前的山羊 BMSCs G1 期的含量在 85% (图 7A), 而 G2 期的细胞含量减少至 79% (图 7B)。

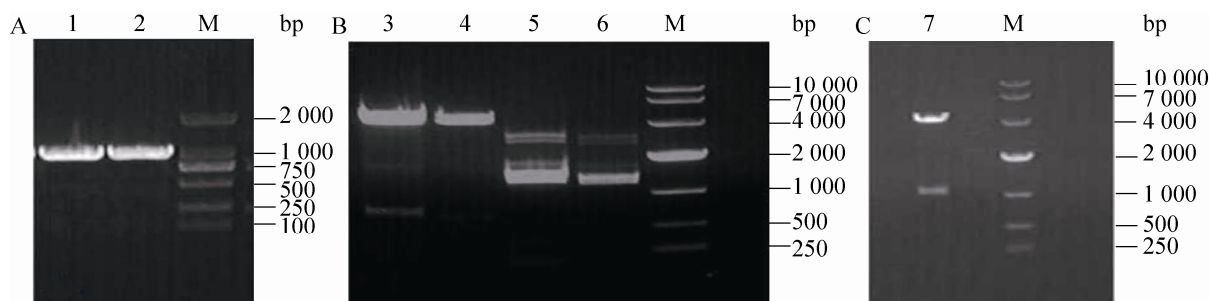


图 3 载体构建电泳图

Fig. 3 Electrophoresis images of vector construction. (A) 1, 2: RT-PCR product of *vasa* promoter. (B) 3, 4: identification of pEGFP-N1 plasmid using restriction endonuclease digestion; 5, 6: identification of pMD-VASA plasmid using restriction endonuclease digestion. (C) 7: identification of pVASA-EGFP using restriction endonuclease digestion.

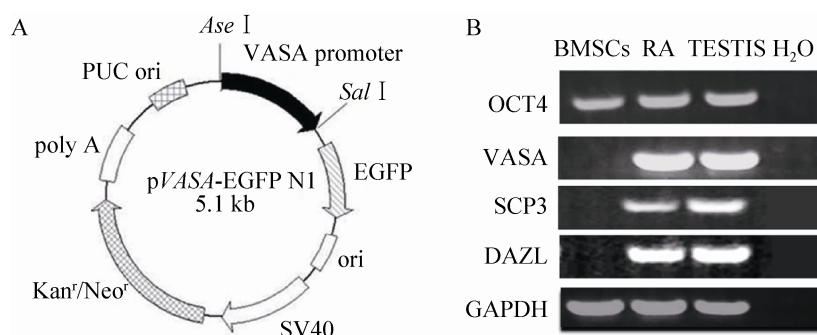


图 4 载体图谱和 RA 诱导的 PCR 鉴定

Fig. 4 Vector map and the PCR analysis of RA induction. (A) The plasmid profile of pVASA-EGFP. (B) RT-PCR results of *oct4*, *vasa*, *scp3*, *dazl* and *gapdh* expression in BMSCs before and after RA treatment. The testis served as a positive control, H₂O served as a negative control.

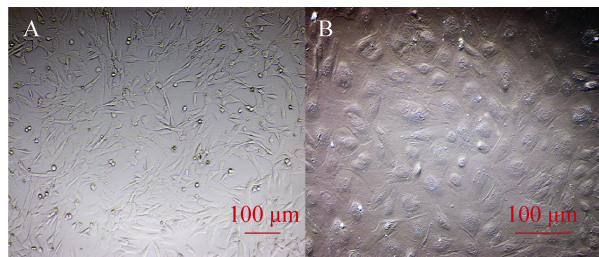


图 5 RA 处理前后细胞的形态图

Fig. 5 Morphology images of before and after RA induction. (A) The morphology of goat BMSCs passage third generation. (B) The morphology of the goat BMSCs treated with RA after 4 days.

2.5 pVASA-EGFP 重组质粒的转染及诱导后观察

将验证正确的重组质粒 pVASA-EGFP 转染山羊 BMSCs, 转染后 24 h, 进行 RA 的体外诱导。诱导 3 d 后, 在荧光显微镜下可观察到山羊 BMSCs 表达绿色荧光蛋白 (图 8), 进一步验证了所构建报告载体的正确性。试验将山羊成纤维细胞作为阴性对照, RA 诱导后, 没有观察到绿色荧光蛋白的表达。

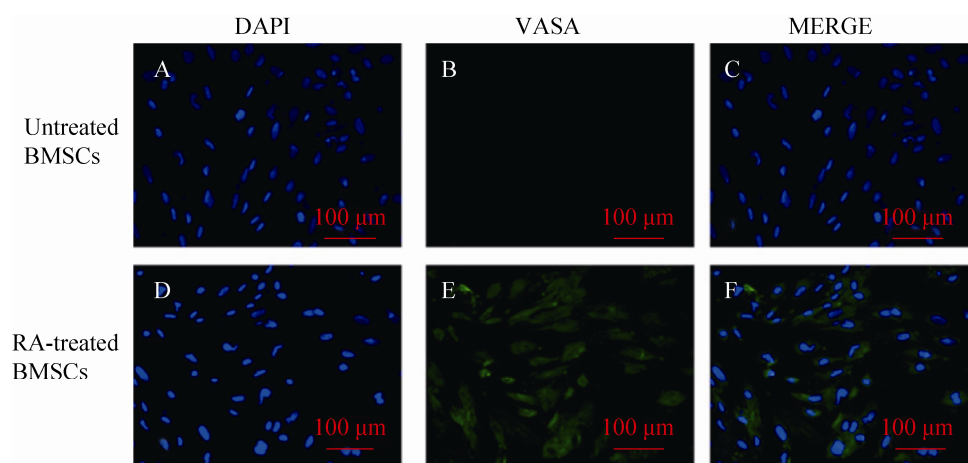


图 6 免疫荧光检测 Vasa 在经 RA 处理前后的 BMSCs 中的表达

Fig. 6 The immunofluorescence analysis of Vasa expression in BMSCs before and after RA treatment. (A, D) DAPI staining of BMSCs before and after RA treatment. (B and E) Immunofluorescence analysis of Vasa expression in BMSCs before and after RA treatment. (C, and F) Merged pictures of BMSCs before and after RA treatment.

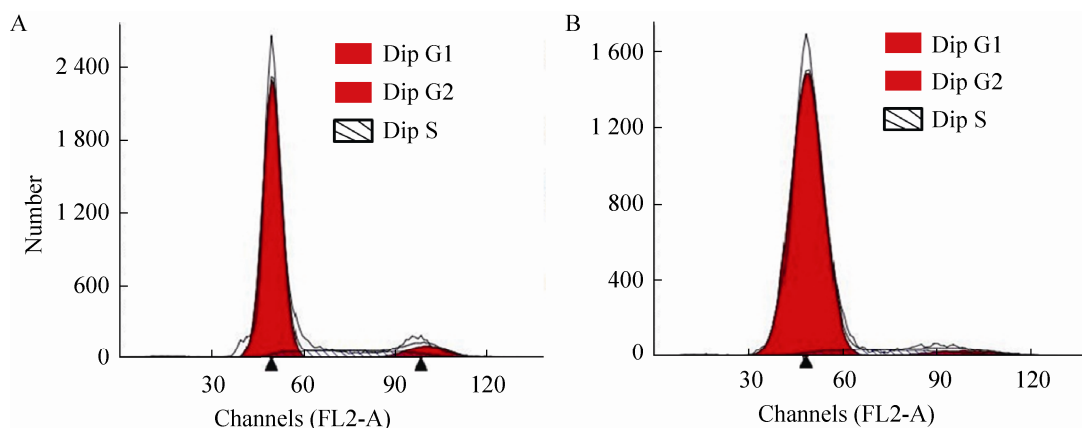


图 7 RA 处理前后 BMSCs 细胞周期变化

Fig. 7 The cell cycle of the gBMSCs before (A) and after (B) the RA treatment.

3 讨论

BMSCs 是一群存在于骨髓中具有不断增殖和自我更新能力的成体干细胞，在多个物种中的研究都已经证明了该类干细胞具有体外分化为 3 个胚层诸多细胞类型的能力，可见 BMSCs 在分化潜能上几乎可以与 ESCs 相媲美。而且与

ES 细胞相比，BMSCs 具有取材方便、体外易培养、增殖快和免疫原性低等优点。BMSCs 这些独特的生物学特性使其可作为生殖细胞发育分化、基因表达调控的理想研究模型和种子细胞。因此，本试验在山羊 BMSCs 的基础上，构建早期生殖细胞报告系统，对后续转分化试验提供平台。

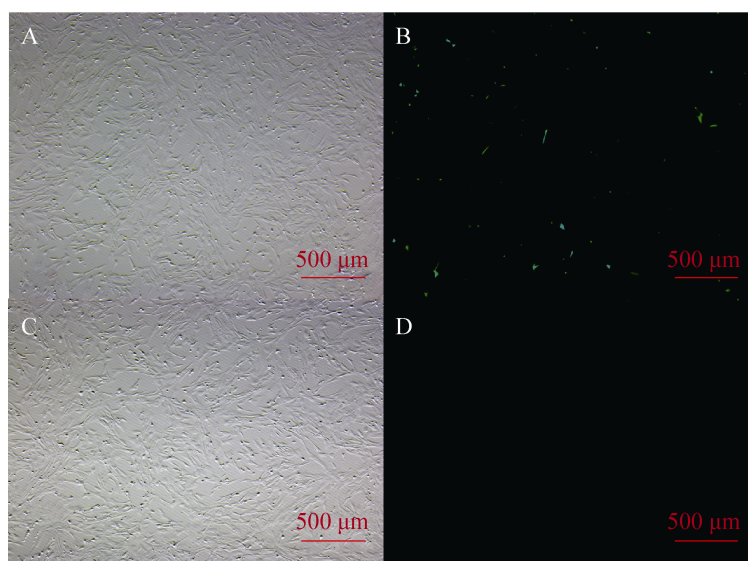


图 8 山羊 BMSCs 转染 pVASA-EGFP 报告载体并经 RA 诱导 3 d 后绿色荧光蛋白表达情况

Fig. 8 The GFP expression in the goat BMSCs that were transfected with plasmid pVASA-EGFP reporter system and treated with RA for 3 days. (A) The bright field of the cells and (B) the GFP image of the cells. Goat fibroblasts were transfected with plasmid pVASA-EGFP reporter system and treated with RA for 3 days, (C) the bright field of the cells and (D) the GFP image of the cells.

在绝大多数物种中, *vasa* 基因是生殖细胞系的标记分子, 这一特点引起了人们对其功能探索的兴趣。早在上世纪 80 年代, 通过对果蝇 *vasa* 基因的研究发现: Vasa 蛋白是生殖细胞的重要组成部分, *vasa* 基因在所有发育时期的生殖细胞中表达, 其在生殖细胞分化过程中发挥重要的作用; 雌性 *vasa* 基因的突变体可以导致卵子发生缺陷, 产生的卵子虽然能够受精, 但由该受精卵发育的胚胎缺少生殖细胞。因此, *vasa* 基因不仅在果蝇成体配子发生过程中是必需的, 在胚胎发生过程中对生殖细胞的分化也是至关重要的^[12]。在小鼠的研究中发现: 雄性个体 *vasa* 基因突变将致使生殖细胞因不能完成减数分裂而凋亡, 最后导致精子无法生成, 而且性腺中 PGCs 的增殖活性显著下降。在本试验中通过对性成熟前后不同阶段的山羊睾丸组织

进行 mRNA 和蛋白水平的检测, 亦可发现在性成熟后 *vasa* 的表达水平显著上升, 可见 *vasa* 基因对生殖细胞的增殖和分化都具有重要作用^[13-14]。

vasa 基因在多数物种间具有高度保守的特性, 且其表达在生殖细胞中具有特异性, 因此, 国内外已有实验室利用 *vasa* 基因进行报告载体的构建, 并用其进行生殖细胞的示踪和研究。2006 年, Okutsu 等^[15]通过克隆虹鳟鱼的 *vasa* 基因启动子区域, 将其和 *egfp* 基因片段相连。通过转基因的方法, 该试验团队分离出了大量的虹鳟鱼的原始生殖细胞。Tsunekawa 等^[16]克隆了鸡的 *vasa* 同源基因 (Chicken VASA homolog, CVH), 构建 *cvh* 的特异启动子, 成功对鸡的原始生殖细胞进行了定位, 为研究鸡 PGCs 的发生机理和迁移过程提供方法和途径。利用类似的方法, 2008 年, Fan 等^[17]通过将斑马鱼的 *vasa*

基因启动子和 *rfp* (红色荧光蛋白) 基因相连, 利用转基因的方法筛选得到原始生殖细胞。此前 *vasa* 基因的研究和应用大多集中于两栖动物中, 2009 年, Kee 等^[10]首次构建了携带绿色荧光蛋白报告基因和生殖细胞特异性基因 *vasa* (VASA-GFP) 的重组质粒, 经慢病毒载体转染 hESC, 通过诱导, 分选表达 *vasa* 基因的早期生殖细胞。

RA 是维生素 A (VA) 的生物活性代谢物, 很多研究表明 RA 是在哺乳动物减数分裂的起始阶段发挥重要作用^[18]。近年来, 许多学者将 RA 作为小鼠性腺减数分裂诱导因子, 在雌性小鼠上, RA 启动受精 12.5 d 的 PGCs 发生减数分裂进行生殖细胞的发育分化; 在雄性小鼠中, 由支持细胞前体产生的 CYP26b1 阻止了胎儿期雄性性腺的减数分裂。RA 对雄性生育是必需的, 在 VA 缺乏症的小鼠睾丸曲细精管内仅能观察到未分化的精原细胞 (As、Apr、Aal 型精原细胞), 注射 RA 或视黄醇 24–48 h 后, 可以观察到停滞的 Aal 型精原细胞重新进入细胞周期分化为 A1 型精原细胞。大量试验证明, 长期用 RA 或视黄醇代替 VA 来饲养 VA 缺乏的小鼠或大鼠, 会促使一些精子细胞的发生。鉴于 RA 对生殖细胞不可或缺的作用和生殖细胞体内难以获取的特性, 有实验室已经通过 RA 在体外对 ES 细胞进行诱导, 体外诱导获取生殖细胞, 从而研究生殖细胞的发生过程。Kerkis 等^[19]用 RA 诱导雄鼠的 ESC, 经类胚体 (Embryonic body, EB) 分化为精子和卵子, 细胞表达生殖细胞特异性标记, 将诱导的精卵共培养能形成受精卵并最终发育为桑葚胚、胚泡样结构。虽然 ES 细胞已逐渐成为体外研究生殖细胞的很好的模型, 但 ES 细胞由于伦理道德等问题的限制, 研

究者已经尝试在成体干细胞上进行进一步的探索。2006 年, Nayernia 等^[20]通过 RA 在体外对小鼠的骨髓间充质干细胞进行诱导, 和本文异曲同工之处在于报告载体的运用。该小组通过 *stra8* 驱动 *egfp* 的报告载体筛选表达绿色荧光蛋白的细胞, 即体外获得的生殖样细胞。通过分选, 将体外诱导后的生殖样细胞进行纯化并鉴定。通过 PCR 和免疫荧光发现 RA 诱导后的细胞表达原始生殖细胞和精原干细胞的表面标记 *fragilis*、*stella*、*rnf17*、*mvh*、*oct4*、*rbm*、*c-kit*、*tex18*、*stra8*、*piwil2*、*dazl*、*hsp90a*、*b1*- 和 *a6-integrins*, 但是并没有通过 RA 诱导在体外得到减数分裂后期的生殖细胞。2009 年, Hua 等^[5]报道人类的 BMSCs 在体外通过 RA 和睾酮的诱导, 也可以使诱导后的细胞表达减数分裂前期和后期的几乎所有分子标记。除了骨髓间充质干细胞, 科学家发现人脐带中也可以分离得到成体干细胞。Huang 等^[21]证实, 人脐带间质干细胞 (Human umbilical cord mesenchymal stem cells, HUMSCs) 在全反式维甲酸、睾酮及睾丸细胞条件培养基下诱导分化为生殖细胞, HUMSCs 形成的“蝌蚪样”细胞显示生殖细胞特异标记物 Oct4 (*pouf5*)、C-kit、CD49 (*falpha-6*)、Stella (DDPA3) 和 Vasa 等蛋白表达。

本试验首先检测了 *vasa* 基因在山羊体内的表达情况。结果表明 *vasa* 基因在不同日龄的山羊睾丸组织中均有表达, 且主要分布在精原细胞、精母细胞以及减数分裂后的精子细胞中。荧光定量 PCR 说明, *vasa* 在性成熟睾丸组织中的表达较高。这些结果和之前报道相一致^[2]。且有报道也表明, 敲除 *vasa* 会影响生殖细胞的发育^[8]。这些结果提示: *vasa* 基因在生殖细胞体内生长发育过程中可能起着重要的作用。另外,

本试验还初步建立了山羊 BMSCs 向早期生殖细胞分化的体外模型。通过 RA 的体外诱导,细胞形态产生了变化,且表达了 *vasa*、*scp3* 和 *dazl* 等生殖细胞特异的分子标记。这些结果间接说明:RA 能够在体外诱导山羊 BMSCs 向早期生殖细胞分化。

我们将构建的 pVASA-GFP 生殖细胞报告载体转染经 RA 诱导处理的山羊 BMSCs 后,可以观察到荧光的表达,但是荧光强度和阳性率不高,这可能是因为荧光表达验证是在 RA 体外诱导 4 d 后观察的,且载体是瞬时转染。因此如果进一步优化 RA 体外诱导时间或进行载体稳定转染,可能可以提高绿色荧光的表达。另外,由于没有完整地克隆出山羊 *vasa* 基因启动子全部序列,有可能在未克隆的 5'非编码区域存在其他重要的启动子元件,这些元件可能为成功启动后续基因表达有着重要作用。但本试验中绿色荧光的顺利表达说明报告载体的正确性。

从体外分化得到生殖细胞样细胞已成为研究生殖细胞发育机制的新方法,目前已有文献报道从胚胎干细胞和诱导多能干细胞分化得到减数分裂后期的生殖细胞,但是目前还没有报道成体干细胞直接体外分化得到单倍体生殖细胞。本试验成功构建的山羊生殖细胞特异报告载体 pVASA-EGFP,为下一步体外诱导山羊 BMSCs 分化为生殖细胞提供了很好的鉴定和纯化的平台。

REFERENCES

- [1] Cordin O, Banroques J, Tanner NK, et al. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 2006, 367(2006): 17–37.
- [2] Rocak S, Linder P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(3): 232–241.
- [3] Fabioux C, Pouvreau S, Roux FL, et al. The oyster VASA-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(4): 897–904.
- [4] Xu H, Gui J, Hong Y. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Dev Dyn*, 2005, 233(3): 872–882.
- [5] Hua J, Pan S, Yang C, et al. Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reprod Biomed Online*, 2009, 19(1): 99–105.
- [6] Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 2011, 146(4): 519–532.
- [7] Yu Z, Ji P, Cao J, et al. Dazl promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1(2): 93–103.
- [8] Medrano J V, Ramathal C, Nguyen H N, et al. Divergent RNA-binding proteins, DAZL and VASA, induce meiotic progression in human germ cells derived *in vitro*. *Stem Cells*, 2012, 30(3):441–451.
- [9] Hu X, Lu H, Cao S, et al. Stem cells derived from human first-trimester umbilical cord have the potential to differentiate into oocyte-like cells *in vitro*. *Int J Mol Med*, 2015, 35 (5): 1219–1229.
- [10] Kee K, Angeles VT, Flores M, et al. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature*, 2009, 462(7270): 222–225.
- [11] Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*, 2004, 22(4): 487–500.
- [12] Liu N, Han H, Lasko P. Vasa promotes *Drosophila* germline stem cell differentiation by activating mei-P26 translation by directly interacting with a

- (U)-rich motif in its 3' UTR. *Genes Dev*, 2009, 23(23): 2742–27523.
- [13] Onohara Y, Fujiwara T, Yasukochi T, et al. Localization of mouse vasa homolog protein in chromatoid body and related nuage structures of mammalian spermatogenic cells during spermatogenesis. *Histochem Cell Biol*, 2010, 133(6): 627–639.
- [14] Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, et al. The mouse homolog of *Drosophila vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes Dev*, 2000, 14(7): 841–853.
- [15] Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, et al. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2725–2729.
- [16] Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, et al. Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 2000, 127(12): 2741–2750.
- [17] Fan L, Moon J, Wong TT, et al. Zebrafish primordial germ cell cultures derived from *vasa::RFP* transgenic embryos. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(3): 585–597.
- [18] Koubova J, Menke DB, Zhou Q, et al. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2474–2479.
- [19] Kerkis A, Fonseca SAS, Serafim RC, et al. *In vitro* differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(4): 535–548.
- [20] Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, et al. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest*, 2006, 86(7): 654–663.
- [21] Huang P, Lin LM, Wu XY, et al. Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into germ-like cells *in vitro*. *J Cell Biochem*, 2010, 109(4): 747–754.

(本文责编 陈宏宇)