

小鼠原始生殖细胞迁移过程中 H2A.Z 的表达

时小艳¹, 吴宝江², 于建宁³, 马雪山⁴, 刘红林^{5*}

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

摘要: 小鼠原始生殖细胞 (PGCs) 迁移、增殖、性别分化都受着基因组和 DNA 表观遗传修饰的调控, H2A.Z 与转录激活有关, 可能与表观遗传修饰存在联系, 通过 PGCs 单细胞及组织石蜡切片的免疫荧光方法进行研究。结果表明, PGCs 在迁移过程中, 8.5 dpc 时 PGCs 中不存在 H2A.Z; 迁移至生殖嵴时 H2A.Z 主要集中于细胞核, 11.5 dpc 整个 PGCs 细胞核和细胞质都存在; 13.5 dpc 雌性的卵母细胞中 H2A.Z 主要集中于细胞质, 而精原细胞中 H2A.Z 偏向集中于细胞核。综合基因组和 DNA 表观遗传修饰分析, H2A.Z 的表达与其有密不可分的联系。

关键词: 小鼠原始生殖细胞 (PGCs); 单细胞; 石蜡切片; H2A.Z; 免疫荧光

中图分类号: S813; S865.13

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)03-0422-04

Mouse primordial germ cells (PGCs) expression of H2A.Z during migration

SHI Xiao-yan¹, WU Bao-jiang², YU Jian-ning³, MA Xue-shan⁴, LIU Hong-lin⁵

(1. Department of Medical and Health Management, Jiangsu Food Science College, Huai'an 223003;

2. Inner Mongolia Saikexing Reproductive Biotechnology Co. Ltd, Helingeer 011517;

3. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Institute of Animal Husbandry in Jiangsu Province, Nanjing 210014;

4. Chinese Academy of Sciences, Institute of Animal, Beijing 100101;

5. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: Migration, proliferation and sex differentiation of mouse primordial germ cells (PGCs) is affected by the regulation of the genome and DNA epigenetic modification. H2A.Z is related to the transcription activation, whether there is a link with the epigenetic modification has not been involved. In this paper, PGCs single cell and tissue paraffin sections of immunofluorescence methods were used, and the results showed that during PGCs migration, H2A.Z did not exist in 8.5 dpc PGCs; with PGCs migration to the genital ridge, H2A.Z was mainly concentrated in the nucleus; H2A.Z was full of nucleus and cytoplasm in 11.5 dpc PGCs; H2A.Z was mainly in the cytoplasm in 13.5 dpc female oocytes, and H2A.Z tended to concentrate in the nucleus in spermatogonia. Therefore, the expression of H2A.Z is relevant to genomics and DNA epigenetic modification.

Key words: mouse primordial germ cells (PGCs); single cell; paraffin section; H2A.Z; immunofluorescence

小鼠原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 最早在 6.0 dpc (days post coitum 配后天数) 由胚胎外胚层细胞分化得来^[1]。随后从原条的后端, 随着后肠的内卷被带入胚胎内部, 到达后肠内胚层。在约 10.5~12.5 dpc PGCs 离开后肠内胚层, 沿背肠系膜迁移, 最终进入生殖嵴。到 13.5 dpc 时 PGCs 可通过生殖嵴外观形态区分性别。H2A.Z 是进化保守的组蛋白变体, 参与转录调节、抗沉默、沉默

和基因组稳定性^[2]。H2A 分布广泛, 对基因表达调控、基因组稳定和染色质重构起重要的作用^[3]。目前, 仅从 DNA 印记及组蛋白表观遗传修饰的角度还不能对小鼠 PGCs 在 8.5~13.5 dpc 胚胎中的迁移、增殖、性别分化等行为进行很好的解释。本研究通过石蜡切片免疫荧光和单细胞免疫荧光 2 种方式, 对鼠胚发育过程中组蛋白 H2A 变体 H2A.Z 在 8.5~13.5 dpc PGCs 中的分布进行了研究, 试图结合 DNA

收稿日期: 2013-01-23

作者简介: 时小艳, 女, 讲师。E-mail: shxy-05@163.com

* 通信作者: 刘红林, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: liuhonglin@263.net

印记及组蛋白的表观遗传修饰的研究结果, 进一步深入分析 H2A.Z 在 PGCs 在鼠胚发育过程中的作用。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

试验动物为 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、离心机等。TritonX-100、EDTA-Na 均购自 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, 均为国产。PGCs 一抗, 购自 Abcam 公司、PGCs 二抗, 购自 Sigma 公司、H2A.Z 一抗, 购自 Abcam 公司、H2A 变体二抗, 购自 Sigma 公司、DAPI, 购自 Sigma 公司。

1.3 含 PGCs 组织样的获得

将小鼠腹腔注射 PMSG、hCG 后, 合笼。第 2 天上午 8:00 前见栓母鼠选出分笼饲养, 记为孕 0.5 dpc。将培养 8.5 dpc、10.5 dpc、11.5 dpc 和 13.5 dpc 的孕鼠用颈椎脱臼法致死, 打开子宫并分离胚胎, 置于无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 液培养皿中, 在 PBS 液中采集胚胎组织样。8.5 dpc 胚胎采集后 1/3 部分; 10.5 dpc 胚胎采集背肠系膜部; 11.5 dpc 胚胎采集中肾和生殖嵴, 13.5 dpc (♀) 和 13.5 dpc (♂) 胚胎采集生殖嵴。

1.4 单细胞的获得

将 3~5 个含有 PGCs 的组织样放入 200 mL 胰酶溶液滴中, 37℃ 消化 15 min, 然后加入含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 终止消化, 1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 用吸水纸吸去上清液。加入 3.7% 多聚甲醛固定液固定 30 min。

1.5 石蜡切片的制作

将采集含有 PGCs 的鼠胚组织置于 3.7% 多聚甲醛固定液中固定。然后, 将组织样放入酒精中洗涤脱水, 脱水完全后, 进行透明处理, 再将组织样包埋, 蜡块经修整后供作切片。切片贴片后于普通温箱中放置过夜。然后取已干燥的切片脱蜡 2 次, 依次放入 100%、90%、70% 及 50% 酒精和蒸馏水中冲洗。将石蜡切片高火热修复, 自然冷凉; 流水冲洗; 放入 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{H}_2\text{O}_2}:V_{\text{PBS}} = 9:1:90$ 溶液中浸泡, PBS 清洗 3 次。

1.6 单细胞切片和组织切片的免疫荧光染色

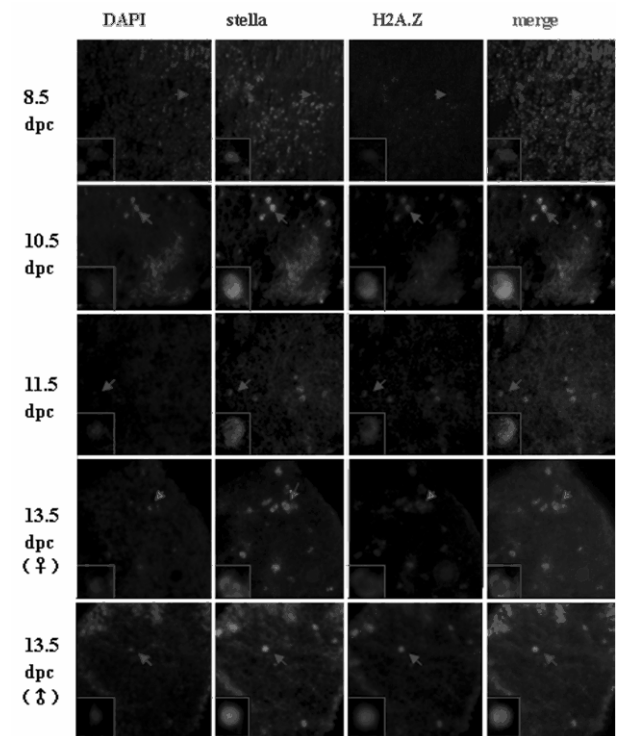
将切片用含 0.1% BSA 的 PBS 溶液清洗 2 次,

然后滴加 0.5% 的 TritonX-100 处理 10 min, 再用 PBS 清洗 1 次, 用含 0.05% Tween-20 的 PBS/BSA 处理 30 min; 加抗组蛋白 H2A.Z 一抗孵育 1 h; PBS 清洗 2 次后加二抗孵育 1 h; PBS 清洗 2 次后加 stella 抗体 (PGCs 抗体) 孵育 1 h; PBS 再清洗 2 次后加标记 stella 二抗 FITC 孵育 1 h; PBS 清洗 2 次后加 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DAPI 处理 20 min。最后将切片置于荧光显微镜下观察、照相。

2 结果与分析

2.1 不同日龄鼠胚含有 PGCs 组织切片免疫荧光结果

由图 1 石蜡切片免疫荧光结果表明, 8.5 dpc 整个 PGCs 中不存在 H2A.Z; 10.5 dpc 主要集中于细胞核, 细胞质中也有弥散分布; 11.5 dpc 整个 PGCs 细胞核和细胞质都存在; 13.5 dpc, 雌性的卵母细胞中 H2A.Z 主要集中于细胞质, 而精原细胞中 H2A.Z 偏向集中于细胞核。



DAPI—DNA; stella—PGCs; H2AX stained by cy3-conjugated secondary antibody; the enlarge picture in left bottom is corresponding to the original image in which the arrow points; original map ($\times 400$); enlarged scale ($\times 1\ 000$)

DAPI—DNA; stella—PGCs; cy3 所连二抗的 H2A.Z; 左下角放大图为原图箭头所指; 整图 ($\times 400$); 放大图 ($\times 1\ 000$)

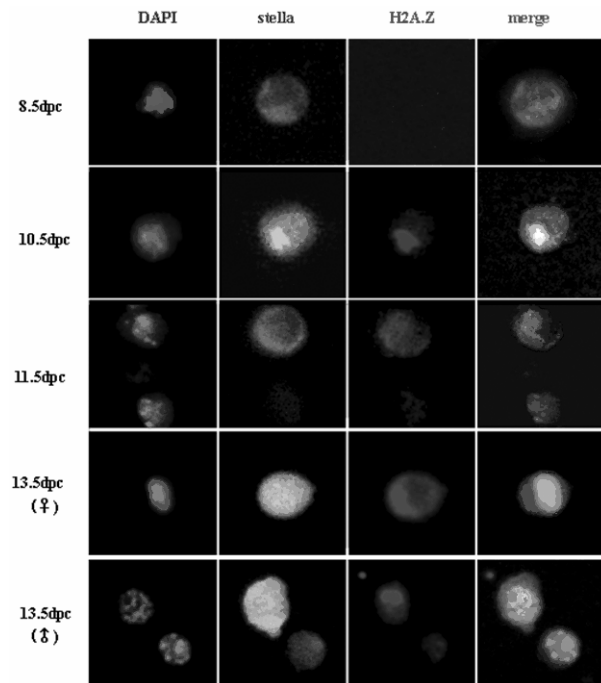
图 1 H2A.Z 在含有 PGCs 组织石蜡切片上的分布

Figure 1 Distribution of H2A.Z in a paraffin section containing PGCs

2.2 不同日龄鼠胚 PGCs 单细胞免疫荧光结果

8.5 dpc 整个 PGCs 中不存在 H2A.Z; 10.5 dpc

主要集中于细胞核，细胞质呈弥散分布；11.5 dpc 整个 PGCs 中都存在；13.5 dpc(♀)H2A.Z 主要集中于细胞质，精原细胞偏向集中于细胞核，如图 2 所示。



DAPI—DNA; stella—PGCs; cy3 所连二抗的 H2A.Z; (×400)DAPI—DNA; stella—PGCs; H2AX stained by cy3-conjugated secondary antibody; (×400).

图 2 H2A.Z 在单细胞 PGCs 中的分布
Figure 2 Distribution of H2A.Z in PGCs

3 讨论

由 2 组免疫荧光试验结果可以看出，8.5 dpc，整个 PGCs 中不存在 H2A.Z；10.5 dpc，主要集中于细胞核，细胞质中也有弥散分布；11.5 dpc，整个 PGCs 细胞核和细胞质都存在；13.5 dpc，发生性别分化，发育为雌性的卵母细胞中 H2A.Z 主要集中于细胞质，而发育为雄性的精原细胞中 H2A.Z 偏向集中于细胞核。

PGCs 在 7.5 dpc~10.5 dpc 从原条的后端，随着后肠的内卷被带入胚胎内部，到达后肠内胚层，在此过程中 PGCs 大量繁殖。8.5 dpc 时大部分 PGCs 位于尿囊蒂和原条尾端的卵黄囊脏层，即后肠开口的边缘并与其结合处。从表观遗传学角度分析，8.5 dpc 左右，PGCs 中广泛存在两种在常染色体区抑制性质的表观修饰—DNA 胞嘧啶的甲基化和 H3K9me2，此时转录水平很低；有研究表明，H2A.Z 和 DNA 甲基化之间存在特殊的关系^[4-5]。DNA 甲基

化抑制转录活性^[6]，动植物 ATP 依赖性染色质重构复合物和组蛋白共价修饰都调节 DNA 甲基化^[6]，但对组蛋白变体调节 DNA 甲基化的作用机制的了解不是很清楚。在 2012 年 Valdés-Mora 研究发现，DNA 甲基化和基因组中的 H2A.Z 之间存在高度负相关^[7]，这也正好吻合在 8.5 dpc 研究发现 H2A.Z 在 PGCs 中不表达的结果。在 8.5 dpc 之后，PGCs 中 DNA 胞嘧啶的甲基化和 H3K9me2 在基因组上广泛擦除，抑制作用降低。此时，H2A.Z 在细胞质中开始合成，很快合成的 H2A.Z 转移至细胞核，发挥其作用，同时细胞质中还在不断合成，正如我们观察到的 10.5 dpc PGCs 中细胞质和细胞核中都存在 H2A.Z。在细胞核中 H2A.Z 首先定位于臂间异染色质区域，而 H2A 在臂间异染色质区域缺失，所以认为，H2A.Z 是臂间异染色质的重要标志^[8]。臂间异染色质对染色体分离和胞质分裂起重要作用。首先，臂间异染色质的紧密结构特征阻止染色体分离过程^[8]；其次，臂间异染色质作用于很多染色体结合蛋白，包括染色体内聚力、染色体分离、胞质分裂相关蛋白^[9]和 INCENP^[10]。因此，可以解释为在 8.5~10.5 dpc PGCs 中细胞大量繁殖可能有 H2A.Z 的参与。

对 SWI/SNF 家族成员 Swr1 的研究发现，纯化的 Swr1 中含有 H2A.Z^[11-12]。由于 H2A.Z 和 Swr1 在染色体上共定位，当敲除 Swr1 使 H2A.Z 在染色体中的分布显著减少^[11]，所以 Swr1 对 H2A.Z 的沉积起着重要的作用。Swr1 复合物可能使 H2A 改变为 H2A.Z，维持染色质重构因子的活性来促进转录。因此，在以后的研究中还可以通过测定在 PGCs 中 Swr1 的表达更加准确的印证 H2A.Z 的表达量。

在性别分化上 H2A.Z 是否也起到一定作用呢？以前研究已经证实 MacroH2A 在失活的 X 染色体中富集，那么在同一个核小体中是否可以共存不同类型的组蛋白 H2A 呢？研究表明，MacroH2A 和 H2A.Z 不能共定位，这些组蛋白变体不能够在同一个核小体中装配，可能受到其他机制的调控，比如特异性分子伴侣的伴随^[13]。MacroH2A 在 13.5 dpc 精原细胞和卵母细胞的分布状态情况也正好印证了这一结论（待发表）。组蛋白变体 H2A.Z 真正的功能是什么？现在还不清楚，相信对组蛋白变体 H2A.Z 的研究最终一定能在细胞生物学领域发挥巨大作用。

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, 68:1-4.
- [2] Light W H, Brickner D G, Brand V R, et al. Interaction of a DNA zip code with the nuclear pore complex promotes H2A.Z incorporation and INO1 transcriptional memory[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(1): 112-125.
- [3] Billon P, Côté J. Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819(3/4): 290-302.
- [4] Zilberman D, Coleman-Derr D, Ballinger T, et al. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks[J]. *Nature*, 2008, 456(7218): 125-129.
- [5] Conerly M L, Teves S S, Diolaiti D, et al. Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis[J]. *Genome Res*, 2010, 20(10): 1383-1390.
- [6] Cokus S J, Feng S, Zhang X, et al. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning[J]. *Nature*, 2008, 452(7184): 215-219.
- [7] Valdés-Mora F, Song J Z, Statham A L, et al. Acetylation of H2A.Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer[J]. *Genome Res*, 2012, 22(2): 307-321.
- [8] Rieder C L, Salmon E D. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis[J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(8): 310-318.
- [9] Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, et al. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 4(1): 89-93.
- [10] Adams R R, Carmena M, Earnshaw W C. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis[J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11(2): 49-54.
- [11] Mizuguchi G, Shen X, Landry J, et al. ATP driven exchange of histone H2A.Z variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex[J]. *Science*, 2004, 303(5656): 343-348.
- [12] Goldman J A, Garlick J D, Kingston R E. Chromatin remodeling by imitation switch (ISWI) class ATP-dependent remodelers is stimulated by histone variant H2A.Z[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(7): 4645-4651.
- [13] Suto R K, Clarkson M J, Tremethick D J, et al. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z[J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(12): 1121-1124.