论著

文章编号:1000-5404(2005)08-0716-04

人原始生殖细胞的迁移及表面标志物变化的实验研究

刘永刚,陈地龙,李芳菲,王莎莉,王亚平 (重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨人胚胎原始生殖细胞向生殖嵴迁移及其细胞标志物改变。**方法** 人胚生殖嵴或生殖腺经石蜡切片;HE染色,光镜观察;免疫组化方法检测阶段特异性胚胎抗原SSEA-4和SSEA-1的表达;钙-钴法检测碱性磷酸酶(AP)活性;RT-PCR检测4.5、7、9、11周人胚胎生殖嵴中转录因子Oct-4的表达。**结果** 人胚胎第4.5周生殖嵴未见有碱性磷酸酶、阶段特异性胚胎抗原SSEA-4、SSEA-1阳性细胞,且不表达转录因子Oct-4;第5~11周胚胎生殖嵴中持续存在碱性磷酸酶、阶段特异性胚胎抗原SSEA-4、SSEA-1阳性细胞,且表达转录因子Oct-4;第12周胚胎生殖嵴中阶段特异性胚胎抗原SSEA-4、SSEA-1阳性细胞数量明显减少,但存在碱性磷酸酶阳性细胞。**结论** 人胚胎原始生殖细胞自第5周后开始迁移至生殖嵴,直至第11周后完全分化,其形态学特征为碱性磷酸酶、阶段特异性胚胎抗原SSEA-4、SSEA-1阳性,且表达转录因子Oct-4。

关键词: 原始生殖细胞;生殖嵴;人

中图法分类号: R321.1; R329.1 **文献标识码:** A

Experimental study on migration of human primordial germ cells and changes of cell surface markers

LIU Youg-gang, CHEN Di-long, LI Fang-fei, WANG Sha-li, WANG Ya-ping (Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the migration of human primordial germ cells and changes of cell surface markers. **Methods** The gonadal ridges from 4.5 to 12-week human embryos were embedded with paraffine and sliced, stainded with HE and observed by light microscope. The slices of gonadal ridges were analyzed for the expression of alkaline phosphatase and immunologic markers (SSEA-1, SSEA-4) that were used routinely to characterize embryonic germ cells. The expression of transcriptional factor Oct-4 was detected by RT-PCR. **Results** There were no primordial germ cells in gonadal ridges in 4-week human embryos. The cell surface markers analyzed showed that the gonadal ridges possessed high levels of AP activity, were stained strongly for SSEA-4, SSEA-1 and expressed the transcriptional factor Oct-4 highly from 5 to 11-week embryos. **Conclusion** It is at the end of 5 week after fertilization that primordial germ cells migrate to gonadal ridges in human embryos. The primordial germ cells finish differentiation till 11 weeks after fertilization.

Key words: primordial germ cells; gonadal ridges; human

原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是胚胎发育过程中最早出现生殖细胞。在人胚第3~4周,在靠近尿囊根部的卵黄囊内胚层发生PGCs,第5~6周时PGCs沿后肠的背系膜向生殖嵴迁移,因此5~9周的生殖嵴是分离、培养并建立人胚胎生殖细胞系的重要组织材料。对于PGCs的形态学表面标志(如SSEA-1,SSEA-4抗原)和精确迁移的机制不甚清楚。阶段特异性胚胎抗原SSEA-1是一种胚胎聚糖,而阶段特异性胚胎抗原SSEA-3、SSEA-4是球性系列糖脂抗原,与SSEA-1相比是不同类型的抗原。目前,通常利用SSEA系列抗原来检测胚胎干细胞和胚胎生殖细胞的表面标志[1]。迄今为止很少报道用SSEA系列抗原研究PGCs的表面标志。本实验拟采用石蜡切片技术,酶组织化学检测碱性磷酸酶活性,免疫组化检测阶段特异性胚胎系列抗原表达,RT-PCR检测转录因子Oct-4的表达等方法研究4.5~12周人胚胎生殖嵴的组织结构以及在迁移中的原始生殖细胞形态学特征及变化。旨在为

基金项目:国家教育部重点科技项目(01109);重庆医科大学科研创新基金(CX200102);重庆医科大学科研启动基金(QP200203)
Supported by the Key Sci & Tech Research Project of Ministry of Education of China (01109), the Research Foundation for Innovative Projects of Chongqing Medical University (CX200102) and the Starting Funds of Chongqing Medical University (QP200203)

作者简介:刘永刚(1973-),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事干细胞生物学领域方面的研究,电话:(023)68485087
通讯作者:王亚平,电话:(023)68485968

收稿日期:2004-09-30;修回日期:2004-11-20

认识人 PGCs 生物学特征和以生殖嵴为材料获取人胚胎生殖细胞奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂　　抗 SSEA-1、SSEA-4 单克隆抗体、由美国芝加哥大学 Dr. Bruce Lahn 提供；UltrasensitiveTM S-P 试剂盒购自迈新公司；DAB 显色试剂盒购自中山公司；DEPC 和 Trizol 购自鼎国生物公司，逆转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTP 混合物和 DNA 聚合酶购自 TakaR 生物有限公司。

1.1.2　人工流产胚胎　　征得孕妇的同意，收集 4.5～15 周人工流产胚胎。胚胎龄的计算以临床末次月经减去 15 d 结合胚胎发育的外部特征推算胎龄。

1.2　方法

1.2.1　实验分组　　将所收集人工流产胚胎分成 5 组，胚胎龄为 4.5 周为第 1 组，5～7 周为第 2 组，8～9 周为第 3 组，10～11 周为第 4 组，12 周为第 5 组，其中第 4.5 周和 12 周人胚胎例数为 2 例，其余每组例数为 5 例。

1.2.2　取材与固定　　5 周及以前的整胚直接用 4% 多聚甲醛固定，6 周后胚胎在解剖显微镜下直接切取生殖嵴固定，固定时间为 24 h 以内，蒸馏水冲洗 3 次，开始梯度脱水，透明，浸蜡，包埋。对 5 周前胚胎进行连续切片，经 HE 染色通过光镜对生殖嵴进行定位及形态观察。对 6 周后取胚胎生殖嵴切片后经 HE 染色，光镜观察生殖嵴形态学特征。

1.2.3　生殖嵴碱性磷酸酶活性检测　　取生殖嵴进行冰冻切片，冷丙酮固定 10 min，蒸馏水洗 3 次，采用常规钙钴法检测生殖嵴表达碱性磷酸酶活性。设不含 β-甘油磷酸钠的孵育液组为阴性对照组，小鼠肾脏冰冻切片为阳性对照组。

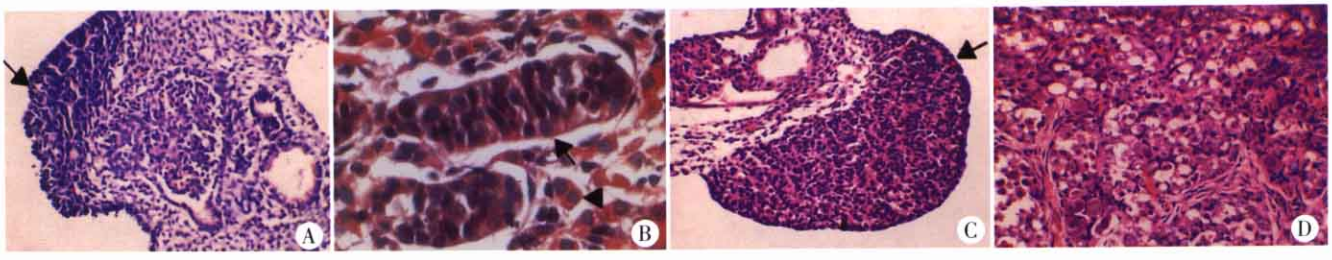
1.2.4　生殖嵴阶段特异性胚胎抗原检测　　石蜡切片常规脱蜡入水，热修复抗原，按免疫组化 SABC 法检测细胞表面抗原 SSEA-1 和 SSEA-4（一抗工作浓度为 1∶50），设不加一抗组为阴性对照组。

1.2.5　逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）检测转录因子 Oct-4 的表达　　Trizol 一步法提取 5、7、9 周和 11 周生殖嵴总 RNA，RT 合成 cDNA，以 β-actin 作内参照行 PCR 反应。Oct-4 引物序列为：上游 5′-CCCAAGCTTGGGAACGACCATCTGCCGCTTTGAG-3′ 和下游 5′-CCGGAATTCCGGCCCCCTGTCCCCCATTCCTA-3′，其扩增片段为 574 bp。Actin 引物序列为：上游 5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′ 和下游 5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3′，其扩增片段为 300 bp。PCR 循环参数为：①预变性：94 ℃ 5 min；②94 ℃变性 30 s，58 ℃复性 30 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；72 ℃继续延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的含 0.5% 溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳后，在多向分析凝胶成像系统中扫描，并进行分析。

2　结果

2.1　胚胎生殖嵴光学显微镜观察

4.5 周人胚胎生殖嵴经石蜡切片、HE 染色、光镜观察为腹后壁近中线对称分布隆起，中肾嵴与生殖嵴间有浅沟，生殖嵴表面上皮向间充质增生形成细胞增厚区，细胞排列紧密，核浆比大，部分排列成条索状，如图 1A。第 5～7 周时生殖嵴与中肾嵴纵沟明显，生殖嵴逐渐与中肾嵴分离，生殖嵴外形呈长椭圆形，生殖嵴近中线侧平滑，中肾嵴侧微凹，HE 染色观察，初级性索更为明显，部分与表面上皮分离，形成次级性索，细胞排列紧密，部分次级性索间可见少量的睾丸间质细胞，如图 1C。人胚第 8～9 周在解剖显微镜下观察生殖腺，成卵圆形小体样，体积增大，HE 染色，生殖腺表面上皮增厚，实质中次级性索十分发达，数量多，次级性索中细胞排列紧密，在次级性索中可见少量体积大细胞，细胞核染色浅，类似初级精母细胞，次级性索间可见大量细胞质嗜酸性体积大细胞，为睾丸间质细胞，还有少量间充质细胞，如图 1B。人胚第 10～11 周生殖腺体积进一步增大，光学显微镜下形态同第 8～9 周。第 12 周生殖腺，男性同 11 周，女性生殖腺中可见生殖细胞排列成团，部分生殖细胞周围出现梭形的卵泡细胞，如图 1D。



A: 4.5 weeks; B: 8 weeks; C: 6 weeks; D: 12 weeks : gonadal ridges; ↑: Gonadal ridges; ▲: Interstitial cells

图 1　人胚胎第 4.5～12 周生殖嵴切片　（HE × 100）

Fig 1　Gonadal ridges of human embryos at 4.5 – 12 weeks　（HE × 100）

2.2　胚胎生殖嵴碱性磷酸酶检测

第 4.5 周人胚胎生殖嵴经碱性磷酸酶染色，未见阳性细胞，第 5～6 周逐渐出现碱性磷酸酶染色阳性细胞并持续存在，第 12 周胚胎后生殖腺中仍然有碱性磷酸酶阳性细胞存在，阳性细胞主要分布于次级性索中，细胞质中可见棕黑色颗粒物，细胞核未着色，如图 2。

2.3　阶段特异性胚胎抗原 SSEA-1 和 SSEA-4 的表达

阶段特异性胚胎抗原 SSEA-1 和 SSEA-4 经免疫组化染色，

在第4.5周人胚胎生殖嵴中未见阳性细胞，在中肾嵴的中肾小管中可见SSEA-1、SSEA-4阳性细胞，如图3A。第6～10周人胚胎生殖嵴或生殖腺中持续可见SSEA-1、SSEA-1阳性细胞，如图3B。在生殖嵴和中肾嵴的连接处或者是生殖嵴与后腹壁连接的间充质中可见单个或成群SSEA-4、SSEA-1阳性细胞，如图3D。SSEA-4和SSEA-1阳性细胞的形态为细胞体积大，细胞核略偏位。在部分第5～11周胚胎生殖嵴血管中可见SSEA-4、SSEA-1阳性细胞，如图3C。在第12周及以后人胚胎生殖腺中表达抗原SSEA-4、SSEA-1细胞明显减少甚至消失。

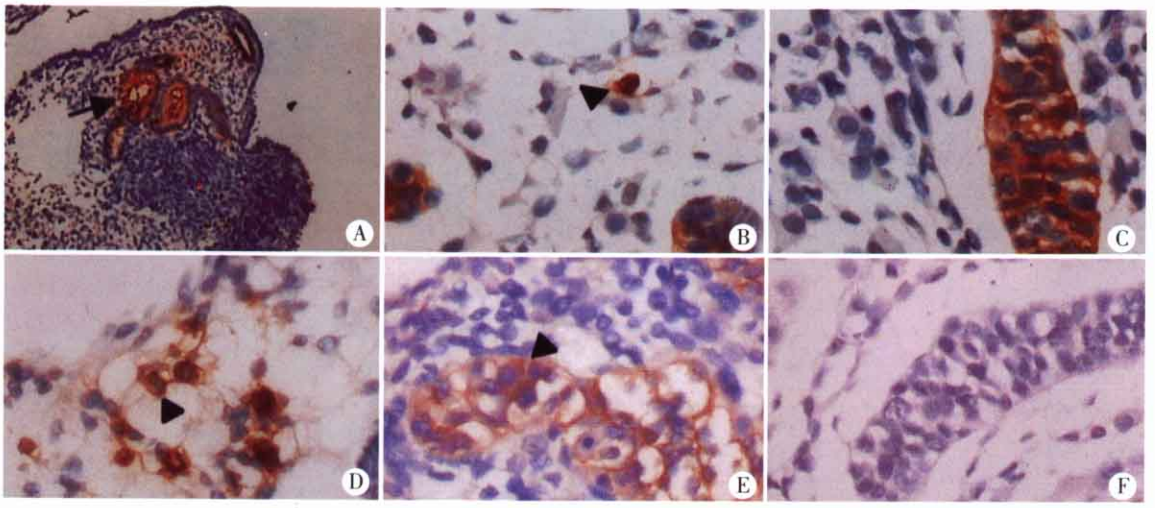
2.4 转录因子Oct-4的表达

人胚胎第5～11周生殖嵴经过RT-PCR方法检测转录因子Oct-4 mRNA的PCR产物的电泳结果如图4所示：第6泳道在300 bp处扩增出了内参照β-actin的片段，第2～5泳道在574 bp处扩增出了Oct-4的基因片段。结果说明，人胚胎第5～11周生殖嵴或生殖腺中存在未分化干细胞。



图2 人胚胎约第9周生殖嵴碱性磷酸酶阳性细胞 （AP×200）

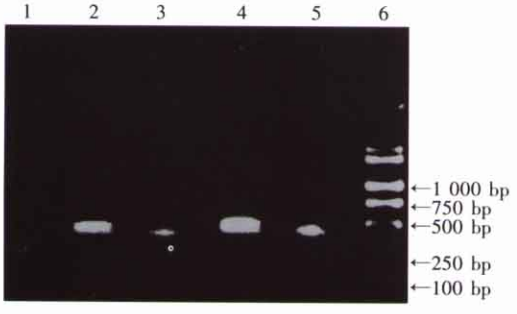
Fig 2 Gonadal ridges of human embryos with strong AP activity at 9 weeks （AP×200）



A: Positive expression cells of SSEA-4 in gonadal ridges of 4.5-week human embryos (S-P×100); B: Positive expression cells of SSEA-4 in gonadal ridges of 8-week human embryos (S-P×400); C: Positive expression cells of SSEA-4 in blood vessel of 8-week human embryos (S-P×400); D: Positive expression cells of SSEA-4 in mesenteris of 7-week human embryos (S-P×400); E: Positive expression cells of SSEA-1 in gonadal ridges of 7-week human embryos(S-P×400); F: Negative control of 8-week human embryos(S-P×400); ↑: Renal tubule; ▲: Positive cells

图3 人胚胎第4.5～12周生殖嵴SSEA-1、SSEA-4抗原表达

Fig 3 Expression of immunologic markers SSEA-1, SSEA-4 of 4.5－12-week human embryo



1: β-actin; 2－5: Oct-4; 6: Marker

图4 5～11周人胚生殖嵴转录因子Oct-4表达

Fig 4 RT-PCR products of Oct-4 mRNA from 5－11-week gonadal ridges of human embryos

3 讨论

胚胎原始细胞起源于近尿囊基部的卵黄囊内胚层细胞，胚胎3～4周沿后肠背侧系膜向生殖嵴迁移，约第5周开始到达生殖嵴，本实验采用HE染色、光镜观测、碱性磷酸酶组化染色、检测胚胎阶段特异性胚胎抗原和检测生殖嵴发育过程中转录因子Oct-4的表达，研究胚胎生殖细胞的迁移和其多种表面抗原表达的变化。观察胚胎生殖细胞的迁移和增殖、分化的过程，目的是为原始生殖细胞的发育提供理论和形态学的实验数据，同时为从原始生殖细胞获得胚胎生殖细胞并建立胚胎生殖细胞系提供依据和方法。

人胚胎第4.5周生殖嵴形态上呈现出细胞增厚区，细胞排列成条索状，与表面上皮相连，通过碱性磷

酸酶组化染色、免疫组化检测 SSEA-1、SSEA-4 抗原的表达和检测转录因子 Oct-4 的表达，结果表明人胚胎第 4.5 周生殖嵴中没有 SSEA-1、SSEA-4 阳性细胞和碱性磷酸酶阳性细胞，证明 PGCs 在此时期尚未迁移到生殖嵴中。人胚胎第 5 周后至第 11 周生殖嵴中出现持续 SSEA-1、SSEA-4 阳性细胞，同时这些细胞呈碱性磷酸酶阳性且转录因子 Oct-4 高表达。表明自第 5 周后开始有 PGCs 迁移至生殖嵴且在此期内胚胎生殖嵴或生殖腺中持续存在未分化 PGCs。人胚胎 12 周后生殖腺中仍然存在碱性磷酸酶阳性细胞而这些细胞不表达 SSEA-1、SSEA-4 抗原，说明此两种表面标志物表达不一致，提示人胚胎第 12 周开始生殖腺中 PGCs 大量分化。

另外，在胚胎第 4.5 周时检测生殖嵴阶段特异性胚胎抗原 SSEA-1 和 SSEA-4，未见阳性细胞，而中肾嵴中的中肾小管呈阳性，此现象可能提示，在早期胚胎的中肾小管上皮本身就表达阶段特异性胚胎抗原，或有可能在 PGCs 向生殖嵴迁移的过程中有部分 PGCs 迁移到了中肾小管，因为中肾小管的微环境不适合原始生殖细胞的生长、发育，而最终走向凋亡，此种假设还需进一步实验证实。在观察部分 5～11 周胚胎生殖嵴的阶段特异性胚胎抗原 SSEA-4 和 SSEA-1 的表达时，还发现部分血管中有阶段特异性胚胎抗原表达阳性的细胞，迄今少有国内外文献报道。如果此现象具有普遍性，那么可能早期胚胎血液中也存在阶段特异性胚胎抗原阳性细胞。提示 PGCs 的迁移路径可能有两条：①沿后肠背侧系膜迁移；②也可以通过血液进行迁移，或者是迁移到生殖嵴中的 PGCs 进又入血管。以上假设需要进一步实验证实。

总之，通过上述实验证实 PGCs 在人胚胎第 5 周前尚没有迁移至生殖嵴，而在后肠背侧系膜间充质中，此时不宜取胚胎生殖嵴培养胚胎生殖细胞，在胚胎第 5～11 周胚胎生殖嵴中已经迁移了大量的原始生殖细胞，并且 PGCs 也在此期未分化增殖，数量多，是用于培养胚胎生殖细胞的最好时间。而第 12 周后生殖腺的阶段特异性胚胎抗原表达下降，Oct-4 不表达，证明 PGCs 已经大部分分化为精原细胞或卵原细胞，此期生殖腺已经不能用于培养胚胎生殖细胞。

参考文献：

[1] Shamblott M J, Axelman H, Wang S, *et al*. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(23): 13726－13731.

[2] Goto T, Adjaye J, Rodeck C H, *et al*. Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis[J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(9): 851－860.

[3] Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyutta M. *et al*. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. [J] Anat Rec, 1977, 188(3): 315－330.

[4] Satoh M, *et al* Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos[J]. J Anat, 1991, 177: 85－107.

（编辑　薛国文）

（上接 715 页）

HBsAg＋，12 份抗 HCV＋，6 份抗 TP＋，75 例 ALT 超过 25 个赖氏单位、抗 HIV 全部阴性。不合格率分别为：0.65%、0.23%、0.07%、1.43%、0.0%，以 ALT 单项不合格报废率为最高，总不合格率为 2.38%。75 例 ALT 单项不合格标本中，26－40 U 的 45 例，41－100 U 的 20 例，100 U 以上的为 10 例，HBV-DNA 实时荧光定量阳性检出率分别为 0.0%（0/75）、1.30%（1/75）、2.7%（2/75），检出总阳性率为 4.0%（3/75）。上述各组阳性检出率分别为：0.0%、5.0%、20.0%，以 ALT 100 U 以上的检出为最高，40－100 U 的次之。

3　讨论

本研究结果显示，献血员 HBsAg、抗 HCV、抗 HIV、抗 TP、ALT 的单项与总的报废率都远远低于地方血站的文献报道[1]，但单项 ALT 升高不合格报废率仍为最高，达 1.43%。

ALT 是一项非特异性试验，但可以鉴别出多数输血相关肝炎携带者。在我国的《血站基本标准》中规定，供血者必须检测 ALT。但在国外，关于 ALT 在血液筛检中的利弊存在许多不同看法和争论[2]。本试验结果表明，献血员筛查时，除 ALT 单项升高外，其它指标正常，但采用灵敏度高、特异好的 Real Time Q-PCR 技术进行 HBV-DNA 测定，阳性率达 4.0%，说明在献血员筛查时，ALT 作为筛查项目很有必要。ALT 升高除乙肝外还常见于各种病毒性肝炎，如丙肝、丁肝、庚肝等。仅管用 PCR 检测 HBV-DNA 阴性也不可能排除其他病毒性肝炎。如果将 ALT＞25 U，而 HBV-DNA 阴性的血液输给病人，既加大了风险系数，也不能达到安全输血的目的。采用 PCR 技术检测只能降低输血风险，但不能做为评判输血是否安全的指标。

乙肝病毒变异时，并不影响 HBV 复制与传播[3]，对肝细胞同样有损害，常规的 ELISA 不易检测。目前 HBsAg ELISA 试剂盒多为一步法，如果标本中 HBsAg 含量很高时，很容易产生 HOOK 效应（即钩状效应），出现假阴性结果[4]。因此，在献血员筛检时，如果 ALT 单项升高，作者认为最好用二步法试剂进行复检，以便降低输血风险。总之，在实际工作中，要严格执行国家关于血液检测标准，凡是 ALT＞25 U 的血液一定要报废，才能真正达到输血安全。

关键词：献血员；筛检；PCR；HBV-DNA

中图法分类号：R457　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 袁克宇，刘　泳，蔡红军. 无偿献血血液报废原因及有效监控探讨[J]. 临床输血与检验杂志，2002，4(1)：42.

[2] Legler T J, Maas J H, Blaschke V, *et al*. RHD genotyping in weak D phenotypes by multiple polymerase chain reactions [J]. Transfusion, 1998, 38(5): 434－440.

[3] Brunetto M R, Stemler M, Bonino F, *et al*. A New hepatitis B virus strain in patients with severe anti-HBe positive chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 1990, 10(2): 258－261.

[4] 单桂秋，李秋生，肖韶英. 检测乙型肝炎表面抗原的一步法试剂的钩状效应分析[J]. 中华医学检验杂志，2002，25(2)：107－108.

（编辑　薛国文）