

组织工程与细胞培养

人卵母细胞样细胞体内分化模型的建立

俞晓丽^{1,2}, 王宁¹, 马洋洋¹, 万千惠¹, 秦明鸣¹, 王华岩¹

1 西北农林科技大学动物医学院 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100

2 宁夏医科大学人体解剖学与组织胚胎学系 生育力保持教育部重点实验室 宁夏生殖与遗传重点实验室, 宁夏 银川 750004

俞晓丽, 王宁, 马洋洋, 等. 人卵母细胞样细胞体内分化模型的建立. 生物工程学报, 2015, 31(3): 394–402.

Yu XL, Wang N, Ma YY, et al. Generation of human oocyte-like cell differentiation *in vivo*. Chin J Biotech, 2015, 31(3): 394–402.

摘要: 干细胞通过诱导培养, 在体外能够分化为卵母细胞样细胞 (Oocyte-like cell, OLC), 将其置于体内环境能够有效地改善 OLC 的质量和发育能力。通过检测猪卵泡液中激素和 Bmp 15 蛋白的含量, 选取了中等卵泡的卵泡液对人羊水干细胞进行体外诱导培养, 10 d 后, 经实时定量 PCR 检测发现, 早期生殖细胞样细胞团高表达生殖基因 *oct4* 和重新甲基化转移酶基因 *dnmt3b*。将这些细胞团用猪卵泡膜包裹后形成移植物, 移植到小鼠肾被膜下。1 个月后取出移植物, 发现移植物内的细胞在形态上, 不仅与正常的卵母细胞极为相似, 而且还表达生殖细胞和卵母细胞特异标记基因 (*oct4*、*nanog*、*stella*、*ifitm3*、*dazl*、*nanos3*、*bmp15* 和 *gdf9*)。证明技术体系能够有效改善 OLC 的形成和发育能力。

关键词: 人羊水干细胞, 卵母细胞样细胞, 骨形成蛋白 15, 卵泡液, 分化

Received: June 6, 2014; **Accepted:** October 28, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31371505), Scientific Research Project of Ningxia Medical University (XT201412).

Corresponding author: Huayan Wang. Tel: +86-29-87080069; E-mail: hhwang101@163.com

国家自然科学基金 (No. 31371505), 宁夏医科大学校级项目 (XT201412) 资助。

网络出版时间: 2015-01-13

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150113.1353.001.html>

Generation of human oocyte-like cell differentiation *in vivo*

Xiaoli Yu^{1,2}, Ning Wang¹, Yangyang Ma¹, Qianhui Wan¹, Mingming Qin¹,
and Huayan Wang¹

¹ Shaanxi Center of Stem Cells Engineering and Technology, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

² Key Laboratory of Fertility Preservation and Maintenance, Ministry of Education, Key Laboratory of Reproduction and Genetics in Ningxia, Department of Histology and Embryology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia, China

Abstract: Oocyte-like cells (OLC) can be generated by stem cells after the induction and differentiation *in vitro*, and matured when transplanted *in vivo* to improve the development potential. Human amniotic fluid stem cells (hAFSC) were cultured for 10 days in porcine follicle fluid (pFF) that was extracted from the medium follicle with high levels of hormones and Bmp 15 protein. After the induction, the cell aggregates showed the germ cell-like cells and produced the germ cell marker *oct4*, and triggered epigenetic changes with high expression of methylation transferase gene *dnmt3b*. The cell aggregates were packaged into porcine theca folliculi to form grafts, which were then transplanted into mouse renal capsule. After one month of transplantation, the morphology of OLC from a graft was not only similar to oocytes, but also expressed the germ cells markers (*oct4*, *nanog*, *stella*, *ifitm3*, *dazl*, *nanos3*, *bmp15*, and *gdf9*). The results demonstrate that the *in vivo* differentiation model was useful for OLC development.

Keywords: human amniotic fluid stem cell, oocyte-like cell, Bmp15, follicle fluid, differentiation

哺乳动物雌性生殖细胞在胎儿发育早期, 仅能产生一定数目的卵母细胞, 出生后这些有限的卵母细胞随着年龄的增加逐渐减少。2003年, Hubner 等^[1]将小鼠胚胎干细胞 (Embryonic stem cell, ESC) 在体外通过诱导培养产生出卵母细胞样细胞 (Oocyte-like cell, OLC), 甚至形成孤雌胚胎。同年, Toyooka 等^[2]证实将 Vasa 阳性的 ESCs 细胞与性腺细胞共同移植到睾丸被膜下, 6–8 周后发现标记的 ESC 细胞参与形成了睾丸曲精小管和成熟精子。这些研究证实 ESC 细胞在体外诱导条件下, 能够分化为生殖细胞。之后, 成体干细胞向卵母细胞的诱导分化研究也取得了进展。2006 年, Dyce 等^[3]采用在培养基中添加猪卵泡液 (Porcine follicle fluid, pFF) 的方法, 将猪皮肤干细胞诱导分化为 OLC 细胞, 这些 OLC 细胞在体外具备自发分化为孤雌胚

胎的能力。其他研究小组, 也证实了不同来源的干细胞通过体外诱导能够分化为卵母细胞^[4–7]。尽管如此, 这些体外分化的卵母细胞的质量和发育能力仍然存在诸多不足: 包括胞质不匀、透明带结构不完整、难以实现减数分裂等^[8–10]。

近期的研究结果表明, 小鼠胚胎干细胞或诱导多能干细胞在体外分化为早期雌性生殖细胞样细胞后, 通过与生殖腺体细胞重组并移植到去除卵母细胞的卵泡中, 可以正常发育为具有受精能力的卵母细胞。而且, 这些细胞具有生殖系嵌合能力^[11]。这些结果表明, 体内环境对体外诱导的雌性生殖样细胞进一步分化为卵母细胞起着不可替代的作用。体外注射一定剂量的白消安, 能够暂时性地抑制小鼠生殖细胞的发生, 但对原始生殖细胞影响较小。同时, 还能引起雌激素水平下降、动情期减少等生理

现象。而撤去该药物后,即可恢复正常的卵母细胞发生能力^[12-14]。因此,通过体外注射白消安,可以建立小鼠生殖细胞退化模型,从而为进一步研究生殖细胞的形成和分化奠定基础。本研究室在前期研究中证明,人羊水干细胞 (Human amniotic fluid stem cell, hAFSC) 在含有 pFF 的培养条件下,能够定向诱导分化为 OLC 细胞,但是,获得的人 OLC 细胞发育仍然不完全^[7]。因此,本研究拟探索通过肾被膜移植实验,将体外诱导 10 d 的 hAFSC 细胞包被在猪卵泡膜内,然后移植到小鼠肾被膜下,拟寻找出适合于雌性生殖细胞样细胞进一步发育为卵母细胞的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、质粒 pBMP15-EGFP 和人羊水干细胞系 hAFSC-070607 株由陕西省干细胞工程技术研究中心保存。人卵丘卵母细胞复合体 (Cumulus oocyte complexes, COCs) 由陕西妇幼保健院提供。猪卵巢收集于陕西万盛肉类加工有限公司屠宰场。ICR 品系小鼠购自陕西省西安交通大学医学院动物中心。用于移植实验的小鼠年龄均在 10–20 周龄。

1.2 试剂和耗材

总 RNA 提取试剂盒、基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、多聚赖氨酸处理载玻片等常规试剂,均购自天根生化科技公司;DNA marker 购自 BioLabs 公司;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、反转录试剂盒和 Taq 聚合酶均购自 Thermo 公司;Opti-MEM、 α -MEM 和 M199 培养基均购自 Life technology 公司;促卵泡激素 (FSH)、孕马血清促性腺激素 (PMSG)、人绒毛膜促性腺激素 (HCG) 均购

自 Sigma 公司;非必需氨基酸 (NEAA)、 β -巯基乙醇 (β -ME)、Lipofectamine 2 000、胎牛血清 (FBS)、表皮生长因子 (EGF) 均购自 Gibco 公司。兔抗 Bmp15 抗体和羊抗兔 Cy3 二抗均购自 Abcam 公司;PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 猪卵泡液的收集

从屠宰场收集猪卵巢,32–38 °C 保存在含有青、链霉素的生理盐水中,2 h 内运回实验室。抽吸法采集卵巢卵母细胞,用加青霉素、链霉素的生理盐水冲洗卵巢 3–5 次,分别从小卵泡 (<3 mm),中等卵泡 (3–6 mm) 和大卵泡 (>6 mm) 中抽取卵泡液 (图 1A 和 B,箭头所示),置于 15 mL 离心管中,2 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,65 °C 灭活 30 min 后,分别用 0.45 μ m 和 0.22 μ m 的滤膜进行过滤两次。分装 (5 mL/支) 后贮存于–80 °C 备用。

1.3.2 Western blotting 检测 Bmp15 蛋白表达

将卵泡液离心取上清,稀释 5 倍后,以 3 : 1 加入 4 \times SDS-PAGE 上样缓冲液,95 °C 处理 5 min,经 10% SDS-PAGE 电泳分离,然后通过半干法将蛋白转至硝酸纤维素 (Nitrocellulose, NC) 膜上。NC 膜用 10% 脱脂奶粉于 37 °C 封闭 1 h,用 TBS-T 清洗 2 遍,将 NC 膜置于含兔抗 Bmp15 抗体的 TBS-T 液中 4 °C 孵育过夜。用 TBS-T 清洗 3 遍,再将 NC 膜置于含羊抗兔 Cy3 二抗 TBS-T 中 37 °C 孵育 1 h。用 TBS-T 清洗 3 遍,通过 ECL 发光液进行显影曝光。

1.3.3 放射免疫分析法检测 pFF 中激素含量

随机抽取 3–6 mm 和 >6 mm 卵泡中的卵泡液各 3 份,离心后收集上清,采用放射免疫分析方法检测样本中激素的含量 (由杨凌示范区

医院检测中心完成)。

1.3.4 体外诱导产生 OLC 细胞

体外诱导产生 OLC 细胞的详细实验方法见本研究室发表的文章^[7], 简述如下: 将第 10 代的 hAFSCs-070607, 用 0.05% 胰酶消化成单细胞后, 制成 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 分别按照 $1 \times 10^4/6$ 孔板和 $1 \times 10^3/12$ 孔板的细胞量接种, 37°C 、5% CO_2 培养, 待 12 h 细胞贴壁后, 更换为生殖细胞培养基 (含 5% pFF), 培养约 10 d 后, 收集上清中的细胞集落置于卵母细胞生长培养基, 继续培养约 7 d 左右, 每两天更换 1 次培养基, 随时观察细胞形态的变化, 并及时拍照。

1.3.5 生殖细胞特异性基因的检测

分别收集未诱导组 (0 d)、体外诱导组 (10 d) 和体内诱导组 (4 周) 的细胞, 提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 用 PCR 方法鉴定以上 3 组来源细胞中生殖细胞特异基因的表达情况, 所有引物见表 1。

表 1 PCR 引物

Table 1 PCR Primers

Gene	Sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>oct4</i>	CGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCT CAAGGGCCGCAGCTTACACATGTT	247
<i>nanog</i>	GCGCGGTCTTGCTCACTGC GCCTCCCAATCCCAAACAATACGA	301
<i>stella</i>	CTCAAATCTCCTCCGAGACG GTACGAACTCCGCCAGTAA	238
<i>ifitm3</i>	AACCTTCTTCTCTCCTGTCAAC CATGAGGATGCCAGAATCA	334
<i>dazl</i>	ATGAAAGATAAAACCAACCAACC TGTTGACAGCCTGGTCCACTGA	394
<i>nanos3</i>	GGGAAAGAGGGTCTCTGAAAC TGTGTCTTCGCCTTGTCAG	416
<i>bmp15</i>	CTGCGGTACATGCTGGAG GTCCTCGGTTTGGTCTGAGA	300
<i>gdf9</i>	ATTACTACCGTTGAACACTTAC ACAGGATAGGCAGACAGAC	467
<i>gapdh</i>	ACAACTTTGGTATCGTGGA AAATTCGTTGTCATACCAGG	458

1.3.6 检测 *bmp15* 基因的表达情况

人的 pBMP15-EGFP 报告载体由本实验室构建^[15]。将该报告载体经脂质体法, 转染诱导 10 d 的 hAFSCs。转染前用 5% FBS 的培养液对细胞进行饥饿处理, 取 $0.8 \mu\text{g}$ pBMP15-EGFP 与 $50 \mu\text{L}$ 无血清稀释液 Opti-MEM 混合, $2 \mu\text{L}$ 脂质体与 $50 \mu\text{L}$ Opti-MEM 混合; 5 min 后, 将上述两种混合物混合 (总体积 $100 \mu\text{L}$), 加入含有适量新鲜培养液的细胞中, 37°C 、5% CO_2 中培养, 4–6 h 后更换含 10% FBS 的新鲜培养液; 转染 24 h 后, 用荧光显微镜观察 EGFP 阳性细胞。

1.3.7 建立小鼠生殖细胞发生缺损模型

取体重大于 15 g 的 ICR 雌性小鼠, 白消安按 40 mg/kg 的剂量腹腔注射, 建立小鼠雌性生殖细胞退化模型。正常饲养 1 个月后, 用于生殖细胞体内移植实验。

1.3.8 体内移植实验

猪卵泡膜生物材料的制备: 从猪卵巢上剥离出 8 mm 左右的卵泡, 在体视显微镜下用玻璃针将其刺破, 挤压出卵泡内的卵母细胞和颗粒细胞, 并用 PBS 冲洗, 将细胞及膜碎片等全部冲洗干净, 得到仅由卵泡膜组成的空囊。用 4% 的多聚甲醛将其于室温固定 30 min, 反复冲洗若干次后, 放入含有 PBS 的离心管中备用 (保证无菌操作)。

细胞包被: 用 0.05% 的胰酶将诱导 10 d 的 hAFSC 细胞消化成单细胞, PBS 洗涤两次后, 离心去除上清, 用口吸管将细胞移入已准备好的卵泡膜中, 然后用酒精灯加热的镊子将卵泡膜的口封住, 将其移入 PBS 中备用。

肾背囊移植: 将备用小鼠用 4% 戊巴比妥钠液腹腔注射进行麻醉, 剂量为 50 mg/kg 。将小鼠取右侧卧位, 切开左背侧部皮肤至腹膜暴露

肾脏,用纱布保护肾脏并起固定作用,用眼科镊夹起肾包膜,将移植物塞入肾被膜下,并将肾脏复位,分层缝合切口,对小鼠保温复苏后正常饲养。

1.3.9 免疫组织化学检测

术后1个月,将移植物取出,用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,用常规方法制作2 μ m石蜡切片,并进行免疫荧光染色。经5% BSA室温封闭30 min;加入兔抗Bmp15一抗,4 $^{\circ}$ C过夜;PBS洗3 \times 5 min;然后用羊抗兔二抗,37 $^{\circ}$ C孵育30 min;PBS洗片3次,5 min;加入DAPI染核1 min;PBS洗片3次,5 min;最后用中性树脂胶封片,在荧光显微镜下观察照相。

1.4 数据处理及统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,显著性差异用SPSS 11.5 软件进行分析。 $*P < 0.05$ 为显著, $**P < 0.01$ 为极显著。

2 结果

2.1 猪卵泡液的测定

收集不同直径卵泡内的卵泡液(图1A和1B),采用Western blotting的方法检测卵泡液中Bmp15蛋白的含量,结果如图1C和1D所示,3–6 mm卵泡中的Bmp15蛋白表达量要略高于<3 mm和>6 mm卵泡。

通过放射免疫分析,检测3–6 mm和>6 mm卵泡中生殖激素的水平(表2),结果发现由卵巢颗粒细胞和卵泡膜细胞分泌的雌二醇含量在3–6 mm卵泡中的含量远远高于>6 mm卵泡(排卵高峰期E2的范围在100–500 pg/mL),说明该时期的卵巢正处于排卵高峰期。促卵泡素(FSH)和促黄体生成素(LH)皆由脑垂体产生,从检

测结果可知,3–6 mm卵泡中的卵母细胞处于卵泡期(FSH: 3.5–10 mIU/mL)和>6 mm卵泡中的卵母细胞处于排卵期(FSH: 5.7–22.3 mIU/mL);

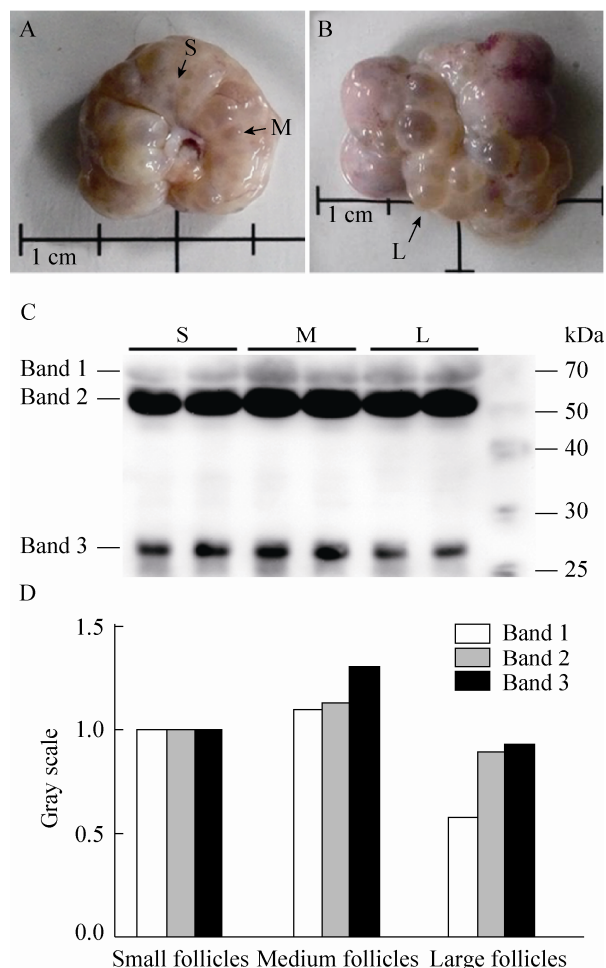


图1 猪卵泡液的收集及Bmp15蛋白的检测和灰度值分析

Fig. 1 Collection of pFF and Western blotting analysis of Bmp15 protein in pFF. S: small (<3 mm) follicles, M: medium (3–6 mm) follicles, L: large (>6 mm) follicles; band 1: uncleaved promature protein (65 kDa); band 2: the cleaved proregion (55 kDa); band 3: the mature protein (25 kDa). Porcine ovarian follicle (A and B) and relative Bmp15 level in pFF by Western blotting (C), Gray scale of Bmp15 protein in each group (D).

而这两种类型卵泡的 LH 的含量均在卵泡期的正常范围内 (6.9–166 mIU/mL); 垂体泌乳素 (PRL) 和睾酮 (P) 的含量则在成年个体的正常范围内, 分别为 5–120 μ IU/mL 和 5–1 460 ng/d。

2.2 体外诱导 OLC 细胞的形成

将第 10 代 hAFSC-070607 (图 2A) 进行生殖细胞定向诱导培养。当诱导 10 d 后, 细胞由

成纤维样单层逐渐转变为圆形细胞, 部分细胞呈现集落样成长 (图 2B)。诱导 20 d 时, 形成了类似原始生殖细胞组成的细胞集落 (图 2C), 而且部分集落样结构, 随着细胞诱导培养时间的延长悬浮于培养液中。通过实时定量 PCR 检测发现, 这些细胞集落表达 *oct4* 的水平与正常的 COCs 相当。重新甲基化转移酶 *dnmt3b* 基因

表 2 卵泡液中生殖激素的含量

Table 2 The level of hormone in porcine follicle fluid

Follicle	E2 (pg/mL)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	PRL (μ IU/mL)	T (ng/dl)
3–6 mm follicle	485.18 \pm 182.01	9.43 \pm 3.11	10.89 \pm 0.26	161.96 \pm 10.58	1106.94 \pm 80.33
>6 mm follicle	42.61 \pm 10.90	14.23 \pm 0.54	16.25 \pm 0.44	36.08 \pm 5.37	60.41 \pm 18.52

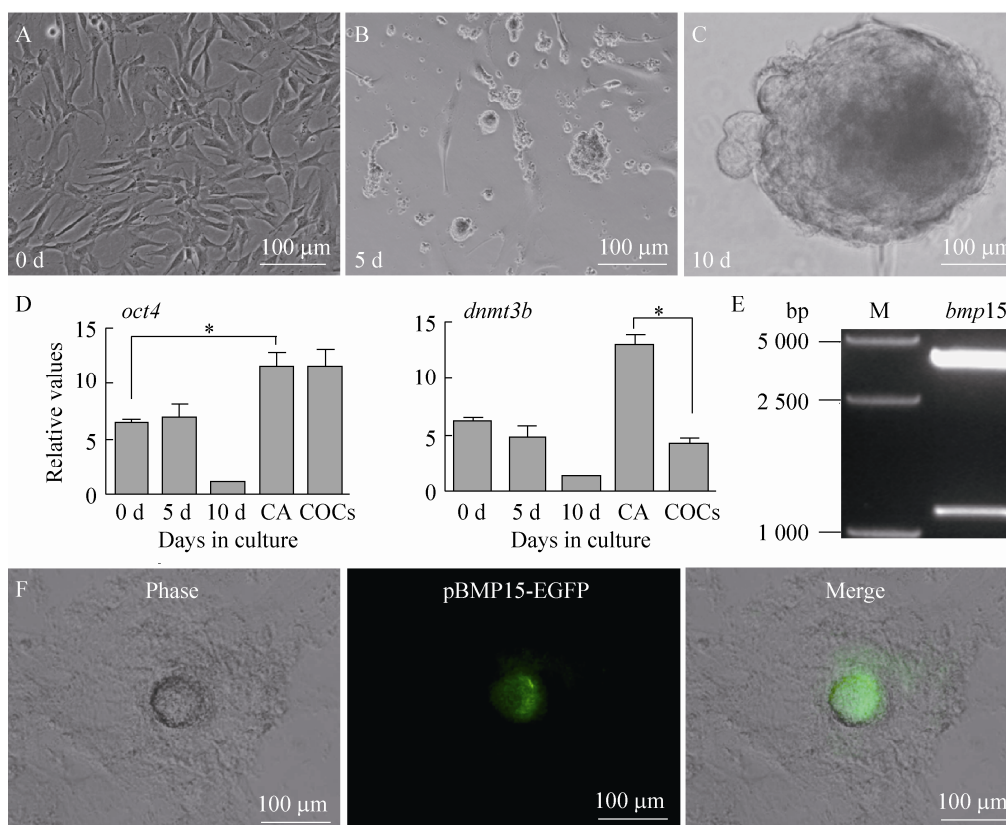


图 2 诱导 OLC 细胞的形成

Fig. 2 Induction of oocyte-like cells. (A–C) The morphologies of hAFSC during differentiation at different time points (0 d, 5 d, and 10 d). (D) The expression of *oct4* and *dnmt3b* during hAFSCs differentiation. Floating cell aggregates (CA) were collected after 15 days of differentiation, COCs were donated from IVF patients (* P <0.05, ** P <0.001, n =3). (E) Restriction enzyme digestion analysis of pBMP15-EGFP with *Bam*H I and *Xho* I. (F) Transfection of pBMP15-EGFP vector into hAFSC at the differentiation of day 10.

的表达检测显示, hAFSC 向生殖细胞定向诱导过程中发生了去甲基化又重新甲基化的过程, 该基因的表达量在细胞集落中显著高于 COCs (图 2D)。通过 *Bam*H I 和 *Xho* I 对 pBMP15-EGFP 启动子报告载体的质粒进行了双酶切鉴定, 确认载体携带报告片段 (图 2E)。采用瞬时转染的方法, 将 pBMP15-EGFP 报告载体转染到诱导 10 d 的 hAFSC 中, 结果发现圆形细胞表达绿色荧光蛋白。表明该圆形细胞是诱导分化后获得的 OLC 细胞 (图 2F)。

2.3 OLC 细胞体内发育

为了验证诱导后 hAFSC 细胞在体内是否具备卵子发生的能力, 将诱导 10 d 的 hAFSC 包裹

在猪卵泡膜里形成移植体 (图 3A), 将其移植到小鼠肾背膜下 (图 3B)。1 个月后取出, 发现移植体的体积有所增大 (图 3C, 箭头所示)。将其部分移植体取出培养, 经 DAPI 染色后, 发现有部分细胞已发生凋亡, 只有少数类似卵母细胞的细胞具有较大的细胞核, 但没有明显的透明带 (图 3D, 箭头所示)。同时, 将剩余移植体固定后, 经切片染色后, 发现有卵母细胞特异性标记蛋白 Bmp15 的表达。结果显示, 移植体内存在 OLC 细胞 (图 3E)。

2.4 OLC 细胞的分子检测

对体内外产生的生殖细胞进行了 RT-PCR 检测, 未诱导组 hAFSC 细胞 (0 d), 除了表达多能性相关的基因 *oct4* 和 *nanog* 之外, 还表

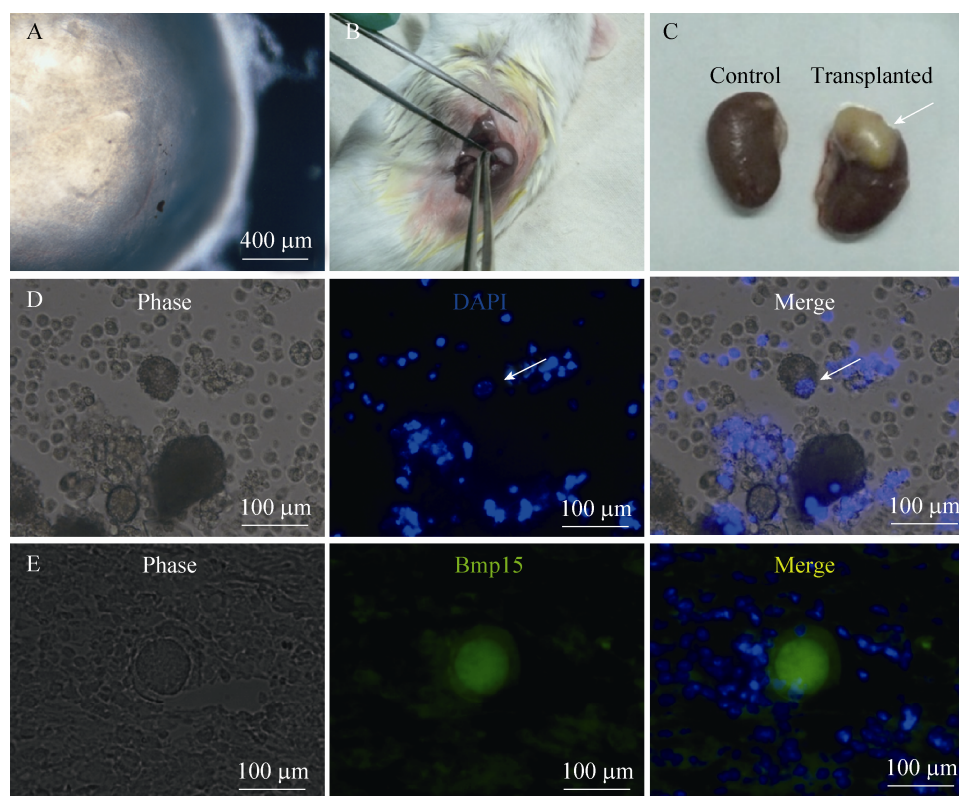


图 3 OLC 细胞的体内发育

Fig. 3 Development of oocyte-like cells. (A) Theca folliculi. (B) Transplant the differentiated hAFSC into renal capsule. (C) The arrow indicated the graft after one month (Transplanted). (D) The cells and nuclear staining from graft, arrows showed large nuclei. (E) Sections stained by anti-Bmp15 from graft.

达部分早期的生殖细胞的基因：*stella*、*ifitm3* 和 *dazl*，包括卵母细胞特异的基因 *gdf9*。体外诱导 10 d 组 (10 d) 和体内移植发育 4 周组 (4 weeks) 的细胞除了表达以上基因外，还表达生殖细胞特异标记基因 *nanos3* 和 *bmp15* (图 4)。

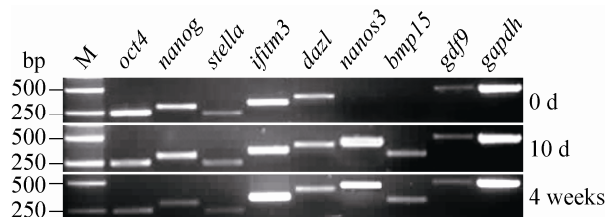


图 4 RT-PCR 检测生殖细胞相关基因的表达

Fig. 4 RT-PCR showed the expression of germ cell specific genes. M: DNA marker DL 2 000; 0 d: hAFSC; 10 d: induced hAFSC at 10 days *in vitro*; 4 weeks: the graft after 4 weeks *in vivo*.

3 讨论

雌性生殖细胞的产生是发育生物学研究中的热点之一，尤其是人类的生殖细胞。在之前的报道中，虽然已经初步掌握了从人羊水干细胞中诱导产生雌性生殖细胞的方法，但仍然有许多研究难点未突破^[7]。通过本研究，解决了以下几个问题：首先，通过对 pFF 的进一步检测发现，由卵母细胞分泌的 Bmp15 蛋白在卵泡液中的含量很高，尤其是在 3–6 mm 的卵泡中。该蛋白不仅在早期卵泡的生长、分化和排卵过程中发挥着重要作用，而且还能有效抑制黄体化^[16]。通过激素水平的检测证明，虽然 FSH 等激素的含量在 3–6 mm 和 >6 mm 的卵泡中的含量相当 (睾酮 T 除外)，3–6 mm 的卵泡中的 E2 水平远高于 >6 mm 的卵泡，而 E2 在促进卵泡的生长和成熟发挥着极为重要的作用^[17]。

其次，通过对 hAFSC 细胞的诱导，不仅发现细胞形态发生了显著变化，而且，通过 *oct4* 基因的表达模式表明，在诱导过程中，hAFSC 细胞首先经历了分化过程 (0–10 d)；诱导后期，由生殖

细胞组成的细胞集落出现时，该基因的表达显著上调，证实 *oct4* 基因在生殖细胞形成的过程中的重要性^[18]。在早期生殖细胞形成过程中，重新甲基化酶基因 *dnmt3b* 不仅影响着卵母细胞的形成，敲除该基因对胚胎的发育也是致命的^[19–20]。对细胞集落进行测定时，*dnmt3b* 同样呈现高表达，表明在诱导生殖细胞形成过程中基因组发生了重新甲基化过程。同时，通过 *bmp15* 报告载体，证明在诱导第 10 天，早期雌性生殖细胞已形成。证实该阶段的雌性生殖细胞样细胞可以用于体内移植。

再次，通过体内移植实验，我们得出以下结论：第一，猪卵泡膜可以作为包裹细胞的生物膜材料，这种由卵泡内膜细胞基质组成的囊状膜，不仅可以容纳被诱导的细胞，而且移植后能保持良好的通透性，使细胞与体内营养物质进行有效交换；第二，在移植前后，通过对移植物体积的对比，发现移植物的体积略有增大。说明诱导后的 hAFSC 细胞在该环境下，具备一定的增殖能力。证明雌性生殖细胞退化模型对诱导后细胞的正常发育影响较小。同时，移植中卵母细胞样细胞的产生，说明在该模型中，诱导后的 hAFSC 细胞具备一定的卵母细胞发生能力。有研究证明，该模型有利于被移植细胞的生长和发育^[21]；第三，通过对体内移植细胞的检测发现，在 OLC 细胞中有 *bmp15* 的表达。*bmp15* 与 *gdf9* 相比，其组织特异性更强，只能在卵泡发育各阶段中卵母细胞中表达。过表达该基因能促进卵泡的生长^[22]，而且，*bmp15* 基因的激活与 OLC 细胞的形成密切相关^[15]。*nanos3* 基因在人卵母细胞的整个发育阶段表达，在有丝分裂和减数分裂阶段，*nanos3* 蛋白与染色体 DNA 共定位。降低该蛋白的表达不仅导致生殖细胞数目的减少，而且影响其他生殖细胞基因的表达和减数分裂的启动^[23]。因此，该基因对生殖细胞的形成起着十分重要的作用。本研究

中经体内移植得到的 OLC 细胞表达该基因, 进一步证实了其生殖细胞的属性。

综上所述, 本研究证明人羊水干细胞在体外诱导培养条件下, 具有分化为 OLC 细胞的潜能。通过小鼠肾背囊移植实验, 初步形成了雌性生殖细胞样细胞体内发育与分化为卵母细胞的新方法。为进一步研究人雌性生殖细胞的形成与分化奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, 2003, 300(5623): 1251–1256.
- [2] Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, et al. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20): 11457–11462.
- [3] Dyce PW, Wen L, Li J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(4): 384–390.
- [4] Park BW, Pan B, Toms D, et al. Ovarian cell-like cells from skin stem cells restored estradiol production and estrus cycling in ovariectomized mice. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(14): 1647–1658.
- [5] Dyce PW, Shen W, Huynh E, et al. Analysis of oocyte-like cells differentiated from porcine fetal skin-derived stem cells. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(5): 809–819.
- [6] Linher K, Dyce P, Li J. Primordial germ cell-like cells differentiated *in vitro* from skin-derived stem cells. *PLoS ONE*, 2009, 4(12): e8263.
- [7] Yu X, Wang N, Qiang R, et al. Human amniotic fluid stem cells possess the potential to differentiate into primordial follicle oocytes *in vitro*. *Biol Reprod*, 2014, 90(4): 73.
- [8] Lan CW, Chen MJ, Jan PS, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into functional ovarian granulosa-like cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(9): 3713–3723.
- [9] Qing T, Shi Y, Qin H, et al. Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. *Differentiation*, 2007, 75(10): 902–911.
- [10] Cao H, Yang P, Pu Y, et al. Characterization of bovine induced pluripotent stem cells by lentiviral transduction of reprogramming factor fusion proteins. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(4): 498–511.
- [11] Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, et al. Offspring from oocytes derived from *in vitro* primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, 2012, 338(6109): 971–975.
- [12] Li CX, Wang FY, Li YY, et al. Establishment of mouse model of premature ovarian failure. *J Third Mil Med Univ*, 2008, 30(6): 506–509 (in Chinese). 李彩霞, 王凤英, 李玉艳, 等. 小鼠卵巢早衰动物模型的构建. 第三军医大学学报, 2008, 30(6): 506–509.
- [13] Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 2005, 122(2): 303–315.
- [14] Pelloux MC, Picon R, Gangnerau MN, et al. Effects of busulfan on ovarian folliculogenesis, steroidogenesis and anti-mullerian activity of rat neonates. *Acta Endocrinol*, 1988, 118(2): 218–226.
- [15] Cheng X, Chen S, Yu X, et al. BMP15 gene is activated during human amniotic fluid stem cell differentiation into oocyte-like cells. *DNA Cell Biol*, 2012, 31(7): 1198–1204.
- [16] Chuang CY, Lin KI, Hsiao M, et al. Meiotic competent human germ cell-like cells derived from human embryonic stem cells induced by BMP4/WNT3A signaling and OCT4/EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) selection. *J Biol Chem*, 2012, 287(18): 14389–14401.
- [17] Britt KL, Saunders PK, McPherson SJ, et al. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod*, 2004, 71(5): 1712–1723.
- [18] Zuccotti M, Merico V, Belli M, et al. OCT4 and the acquisition of oocyte developmental competence during folliculogenesis. *Int J Dev Biol*, 2012, 56(10/12): 853–858.
- [19] Bestor TH, Bourc'his D. Transposon silencing and imprint establishment in mammalian germ cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2004, 69: 381–387.
- [20] Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999, 99(3): 247–257.
- [21] Niu Z, Hu Y, Chu Z, et al. Germ-like cell differentiation from induced pluripotent stem cells (iPSCs). *Cell Biochem Funct*, 2013, 31(1): 12–19.
- [22] McMahon HE, Hashimoto O, Mellon PL, et al. Oocyte-specific overexpression of mouse bone morphogenetic protein-15 leads to accelerated folliculogenesis and an early onset of acyclicity in transgenic mice. *Endocrinology*, 2008, 149(6): 2807–2815.
- [23] Julaton VTA, Pera RAR. NANOS3 function in human germ cell development. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(11): 2238–2250.

(本文责编 郝丽芳)