

胎猪卵巢发生过程中的组织学变化

成志军 陶勇* 章孝荣

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要 哺乳动物胎儿在出生前, 卵巢发生经历了众多连续的组织学变化, 主要包括原生殖细胞的增殖、分化, 原始卵巢和性索形成, 卵原细胞的增殖、分化和凋亡, 以及原始卵泡的形成、发育和闭锁等。卵巢发生是生殖活动中最初的也是重要的生理事件, 认识这一过程具有特殊的意义。此前, 关于猪胎儿期卵巢发育已经有零星的报道, 但对于卵巢发生过程中的组织学变化尚缺乏连贯和系统的描述。现结合已有的研究报道, 对猪卵巢发生过程中的组织学变化进行了全面的总结, 为相关研究工作提供一定的参考。

关键词 猪; 胎儿; 卵巢发生; 组织学

卵巢发生是胎儿阶段器官发生的重要组成部分, 是向雌性方向发育和获得个体生殖能力的基础。认识这一过程中的组织学变化有助于加深对性别分化(sex differentiation)和生殖功能的理解。猪作为一种家畜在生产上和作为一种模式动物在研究领域得到了很大的重视。理解猪的卵巢发生过程对于畜牧业生产和人类生殖医学具有特殊的意义。卵巢的组织学研究在人和多种动物都有报道^[1-3], 其中在人的研究尤为清楚。有关猪胎儿卵巢组织学方面的研究从上世纪六七十年代已经开始^[4-7]。如 Black 等^[4]最先研究了胎儿阶段生殖细胞的增殖、分化。Bielańska-Osuchowska^[5]在猪胎儿性腺发育、卵巢卵子发生(oogenesis)的形态学变化、卵原细胞(oogonium)和卵母细胞退化(degeneration)等方面进行了较为详细的研究。Pelliniemi^[6,7]则更多研究了胎猪卵巢发育中生殖嵴(genital ridge)和性腺的超微结构的变化, 近年来更多的研究集中在胎猪卵巢中特定蛋白的表达定位方面^[8,9]。但关于猪卵巢发生过程中的组织学变化, 至今未见系统的描述。本文结合已有的研究报道, 对猪卵巢发生这一过程的组织学变化, 从生殖嵴产生和卵巢形成、性索(sex cord)的发生和变化、生殖细胞的变化、原始卵泡的形成等4个方面进行了综述。

1 生殖嵴产生和卵巢形成

在哺乳动物, 早期胚胎背系膜根部两侧, 中肾的腹内侧脏壁中胚层表面上皮增厚, 其深层间充质增生, 使之向体腔内突出, 形成纵行隆起, 称为生殖嵴或生

殖腺嵴(gonadal ridge)。生殖嵴为生殖腺原基, 由原生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)、体腔上皮(coelomic epithelial)和间充质成分(mesenchyme element)构成。随着胚胎发育的进行, 生殖嵴向体腔突出, 生殖嵴的中部膨大形成生殖腺。生殖嵴的一小部分仍与中肾联系着, 这小部分最终演变成卵巢系膜或睾丸系膜^[10]。胚胎发生性别分化后, 生殖腺在雌性成为原始的卵巢。

根据对猪胚胎日龄的分期, 妊娠1~34.5天为胚胎期, 妊娠36~50天为胎儿前期, 51~89天为胎儿中期, 89天到出生时为胎儿后期。猪胚妊娠21天时生殖嵴由表面上皮、原始性索(primitive cord)和间充质三种组织构成, 此时生殖嵴在超微水平上已处于性别分化时期^[11], 但从组织学和超微结构上却不能区分胚胎的性别。妊娠26、27天时猪胚睾丸索和白膜(tunica albuginea)的出现, 显示了生殖腺向睾丸分化的早期特征^[4,6]。这时判断胚胎性别, 显微镜下见到睾丸白膜的是雄性, 无白膜者为雌性。哺乳动物卵巢组织的分化时间较晚, 发育也相对睾丸慢, 妊娠30天时, 胎猪卵巢的特征仍不明显, 形态上继续表现为未分化的性腺^[10]。根据本实验室的研究, 猪胚胎在妊娠33天时见到明显的雌性特征的髓质索。妊娠40天时, 胎猪卵巢上的卵原细胞开始进入第一次减数分裂前期, 成为初级卵母细胞(primary oocyte), 此时性腺完全分化为卵巢^[4]。本实验室研究还发现, 胎猪卵

收稿日期: 2007-12-14 接受日期: 2008-02-22

国家自然科学基金(No. 30600432)和安徽省优秀青年科技基金(No. 06041081)资助

* 通讯作者。Tel: 0551-5782488, E-mail: apieceofgrass@163.com

巢表面生殖上皮早期由多层细胞构成, 以后减少为1~2层, 妊娠54天时表现为单层。胎猪卵巢形成初, 皮质与髓质界限不清楚。有研究者根据胎猪体长来观察卵巢发生时的组织学变化, 发现胎猪长50 mm时, 其卵巢皮质和髓质明显可分^[9]。卵巢髓质是卵巢中血管集中分布的地方, 在原始卵泡形成后, 其血管变粗和分支。

2 性索的发生和变化

哺乳动物卵巢发生过程中的一个显著特点是生殖腺索(gonadal cord), 即性索的发生和变化。对于性索的细胞起源以及发育去向等问题到目前仍存在争议^[12]。一般认为, 体腔上皮先后两次形成细胞索, 即原始性索(primordial sex cord)和次级性索(secondary sex cord)。原始性索也称初级性索(primary sex cord)、第一性索或髓质索等, 是表面上皮向位于其深层的间充质内增生而形成的指状上皮索。原始性索在生殖嵴形成后产生, 在性别分化后伸入髓质内形成卵巢网(retē ovarii)遗迹, 并逐渐退化消失。卵巢网存在的时间不长, 不到10天即基本退化^[13]。取而代之的是由复层体腔上皮增生形成的新指状结构, 为次级性索, 也称为第二性索或皮质索(cortical cord)。随着皮质索发育, 卵原细胞进入皮质索内。皮质索在消失前发生断裂, 产生许多孤立的细胞团, 形成原始卵泡。在人的研究结果显示, 胚胎第5周后, 初级性索形成, 约在第7周PGCs进入初级性索内, 第10周后, 初级性索向深部生长, 形成不完善的卵巢网, 随后, 初级性索与卵巢网都退化, 被血管和基质所替代, 成为卵巢髓质。同时, 生殖腺表面上皮形成次级性索。约在第16周时, 皮质索断裂成许多孤立的细胞团, 产生原始卵泡。

Pelliniemi^[14]报道猪胚胎妊娠21天的生殖嵴中见到原始性索。此前对于猪的性索发生和变化尚不清楚, 根据我们实验观察, 妊娠33天的猪胚胎卵巢可见到髓质索结构, 妊娠46天时胎儿髓质索断裂成片段, 并在妊娠54天前完全消失。同时, 妊娠54天皮质浅层已出现次级性索, 次级性索产生的细胞群不断扩大。妊娠61天时, 皮质索断裂, 形成的细胞群沿皮质、髓质方向由不规则状过渡到圆形, 且细胞群中生殖细胞的数量逐渐减少, 接近髓质处能见到大量卵泡样结构。

3 生殖细胞的变化

3.1 PGCs 产生

构成哺乳动物卵巢的细胞基本有生殖细胞和体细胞两类, 两者在卵巢发生发育过程中关系密不可分。在哺乳动物, 包括猪的胚胎早期, 生殖细胞与体细胞分离形成PGCs, PGCs从卵黄囊迁移到体腔上皮之下, 并迁入生殖嵴, 分布在表面生殖上皮之下和原始性索中。PGCs在迁移过程中和定植生殖嵴后都进行着细胞的增殖。在性别分化后PGCs成为卵原细胞或精原细胞。与其他哺乳动物一样, 猪的PGCs大而圆, 胞核圆或椭圆形, 偏位于细胞一侧, 染色质分布均匀, 有1~2个核仁。由于PGCs的高尔基复合体及细胞周缘部位具有较强的碱性磷酸酶活性, 过碘酸雪夫反应(PAS)呈强阳性, 可与其他细胞区别开。有报道称胎猪PGCs的增殖从妊娠第13天已经开始^[14], 而此时胚胎的卵黄囊尚未完全形成。胎猪妊娠18天时, 猪胚中肾边缘可观察到PGCs^[4]。

3.2 卵原细胞增殖、分化

卵原细胞是PGCs发育分化的继续, 卵原细胞和PGCs在超微结构上没有明显差别^[15]。卵原细胞阶段是有丝分裂活动最活跃的时期, 这个时期较短, 并与第一次减数分裂前期相连续和重叠, 导致此时卵巢中卵原细胞发育的同步化参差不齐, 有些已经完成有丝分裂进入减数分裂, 有些还处在有丝分裂阶段^[10], 形成了胎儿卵巢中卵原细胞和卵母细胞共存现象。卵原细胞的增殖, 最先开始于和髓质相邻皮质区的卵原细胞群, 卵原细胞一边增殖一边向卵巢皮质迁移, 大约在第二代卵原细胞时扩展到整个皮质部, 并被性索细胞包裹^[16]。猪卵原细胞有丝分裂活性高峰, 在妊娠的40~50天之间, 其数目从20天的5000个, 到50天110万个, 50天后明显下降, 90天时急剧减少, 到妊娠100天时只有少量的卵原细胞存在, 此时的卵原细胞有丝分裂基本停止, 标志了卵子发生的结束^[4]。而卵原细胞有丝分裂完全停止, 要到生后的7天^[14]。Black等^[4]认为, 猪的生殖细胞库(germ cell stock)几乎全部由妊娠50~90天时的卵原细胞有丝分裂形成, 其中妊娠70天时的有丝分裂是主要来源。

卵原细胞数量的减少缘于减数分裂的启动和卵原细胞自身的凋亡、退化。卵原细胞迁移到卵巢皮质, 被性索细胞包裹后停止有丝分裂进入减数分裂。一般来说, 卵原细胞一旦进入减数分裂, 就需要与性索细胞分化出来的原始颗粒细胞相互作用形成原始卵泡, 为其进一步的生长发育提供营养。如果这个过程不能顺利完成, 将引起卵原细胞的退化^[16]。报

表1 猪生殖细胞的测量^[4]

细胞阶段	细胞直径(μm)	细胞体积(μm^3)	细胞核直径(μm)	细胞核体积(μm^3)
卵原细胞	13	1 111	9	409
细线期卵母细胞	18	2 954	10	549
偶线期卵母细胞	16	2 261	11	630
粗线期卵母细胞	16	2 227	8	231
原始卵泡中双线期卵母细胞	27	9 824	16	2 010

道猪胎儿卵原细胞在妊娠 40 天启动减数分裂, 50 天时处于高峰期。50 天以后减数分裂呈下降趋势, 但一直持续到生后 35 天。当减数分裂进行到第一次减数分裂前期时, 阻滞在了双线期或偶线期成为初级卵母细胞。妊娠 90 天的胎猪, 有一半以上的生殖细胞处于双线期, 到生后 10 天, 95% 的生殖细胞处于双线期, 生后 20 天时, 处于双线期的生殖细胞占 99%^[4]。有关猪卵原细胞到第一次减数分裂前期双线期的的大小变化见表 1。

3.3 生殖细胞退化

哺乳动物胎儿时期卵原细胞和初级卵母细胞共存阶段, 生殖细胞发生了大量退化, 其形态学表现为间期染色质或有丝分裂细胞核的变化, 包括核膨胀、染色体异位、核固缩等。当卵母细胞进入第一次减数分裂前期时经历了大量退化。卵母细胞退化多以集群出现, 这与细胞间桥有关。细胞间桥不仅使卵子发生同步也使退化同步。退化的生殖细胞被从性索细胞和中肾分化而来的巨噬细胞吞噬, 并作为营养物质被其他卵母细胞重新利用。已有许多实验证明, 卵母细胞的退化、死亡、丢失等, 大都是细胞凋亡引起的^[17]。此外, 胎儿卵巢发生过程中除了生殖细胞凋亡之外, 还存在卵泡细胞和其他间质细胞的凋亡。在水牛胎儿, 这些凋亡的细胞均匀而弥漫性地分布于卵巢的皮质部与髓质部, 其中在皮质与髓质的交界区域分布较多^[18]。

Black 等^[4]研究胎猪卵巢时认为, 妊娠 50 天时进入减数分裂的卵母细胞几乎都经历退化。Bielańska-Osuchowska^[5]发现, 胎猪卵母细胞在形成卵簇(egg cluster)后退化加强, 生殖细胞在卵巢中退化以一定次序出现, 并观察到卵巢发育过程中出现三次退化峰。1: 形态学上已分化卵巢的中间期和有丝分裂期卵原细胞退化; 2: 尚未进入减数分裂前期的卵母细胞大规模退化; 3: 减数分裂前期卵母细胞退化。3 次退化峰发生相互交叠。

4 原始卵泡的形成

4.1 生殖细胞群变化

伴随性索的变化, 哺乳动物早期胎儿卵巢能见到生殖细胞的集合, 如巢(nest)、团或群(group)、簇(cluster)、囊(cyst), 以及共质体样(synplasma-like)、合胞体样(syncytium-like)等特征性结构^[1,3,19]。卵巢发育由胚胎期进行到胎儿前期时, 皮质中巢状结构数量增多, 体积增大, 细胞间界限不明显, 形成共质体样卵原细胞团。房秀等^[3]通过观察胎牛组织, 认为共质体阶段是卵原细胞的最早阶段。曹贵方^[20]发现共质体细胞间有细胞间桥相通, 认为共质体中细胞变化是同步的。妊娠 55 天蒙古绵羊胎儿, 卵巢皮质浅层的卵原细胞仍处于巢状结构中, 皮质深层中出现合胞体样卵母细胞群。细胞群之间由梭形基质细胞相隔, 其内部的生殖细胞间界限明显, 开始进入减数分裂前期相^[19]。当胎儿卵巢中皮质索断裂时, 产生许多由卵原细胞和处于第一次减数分裂前期的初级卵母细胞构成的细胞团, 细胞团经进一步演变成为原始卵泡。

实验发现, 生殖细胞的上述形式在胎猪卵巢上呈现如下的时空特性: 时间上, 早期卵原细胞增殖主要以卵原细胞巢和共质体形式存在, 卵原细胞大量增殖后进入减数分裂前期卵母细胞阶段, 主要含合胞体样细胞群, 胎儿进入中期后卵巢中出现大量的原始卵泡; 空间上, 从皮质向髓质, 依次分布卵原细胞, 卵原细胞巢、共质体样卵原细胞团, 皮质深层与髓质相邻处分布合胞体样卵母细胞群和卵泡, 各形式所占的比例随着卵巢发育发生规律性变化(待发表)。阿拉达尔等^[19]把绵羊胎儿卵巢发育过程中的这些变化看作卵原细胞向卵母细胞再向原始卵泡发育的渐进过程。

4.2 卵泡细胞产生

卵泡细胞(或颗粒细胞), 是卵巢内体细胞上皮成分。关于哺乳动物卵泡细胞的起源问题至今尚不明确^[2]。O'Rahilla 等^[21]认为构成卵泡细胞的体细胞可能起源于卵巢网(中肾来源)和体腔上皮。来源于中肾的上皮细胞又称为暗细胞(dark cell), 来源于体腔上皮的细胞又称为明细胞(light cell)。哺乳动物(包括猪)胎儿卵巢发育到一定阶段时, 产生次级性索, 性

索细胞与其包裹的生殖细胞最终断裂成为一个个卵泡, 性索细胞也从前卵泡细胞转变为卵泡细胞。

哺乳动物卵母细胞生长和卵泡细胞密切相关。卵泡细胞通过间隙连接和卵母细胞建立联系, 并以旁分泌调节卵母细胞生长、维持其减数分裂阻滞、诱导成熟以及引起凋亡等。同样的, 卵母细胞也以旁分泌调节卵泡细胞发育。因此, 哺乳动物卵泡细胞与卵母细胞间调节关系是双向的^[22]。而卵泡细胞似乎是卵母细胞命运关键决定者, 实验表明, 围有一层卵泡细胞的卵母细胞进入双线期并存活成为原始卵泡, 而没有卵泡细胞包裹的卵母细胞进入终变期后发生死亡^[23]。

4.3 原始卵泡形成

哺乳动物的原始卵泡的形成时间因动物品种不同而异, 灵长类和反刍动物其活动多在胎儿期进行, 啮齿类动物则于新生儿的早期阶段^[24]。Bielańska-Osuchowska^[15]报道在妊娠第 56 天猪胎儿卵巢皮质深层, 相邻髓质的地方观察到原始卵泡的形成。他还依据卵泡细胞的形状, 将猪原始卵泡划分为 3 个时期, 最早的围绕一些分散的前卵泡细胞; 后来卵泡细胞不规则, 形成单层; 最后原始卵泡由单层立方细胞包裹。但 Bielańska-Osuchowska 描述的猪原始卵泡中似乎是单个卵母细胞。然而猪的原始卵泡属多卵卵泡, 一个卵泡中可看到 2~6 个初级卵母细胞。我们还不清楚猪原始卵泡如何从多卵发育到只含有单卵。推测可能是梭形细胞对卵母细胞的穿入包裹, 多卵卵泡继续分割形成单卵原始卵泡。或多卵细胞团内部分卵母细胞发生凋亡所致。

原始卵泡的形成和发育直接影响到雌性整个生育阶段的可用卵泡数量, 是影响雌性生殖能力的重要方面。大量的原始卵泡形成后聚集在卵巢皮质部位, 形成原始卵泡库 (primordial follicle stock)。猪原始卵泡库中的原始卵泡数量约 42 万个。哺乳动物的原始卵泡形成后基本停止发育, 要到初情期后在促性腺激素的作用下才继续发育。例如, 猪原始卵泡发育到有腔阶段需要长达 84 天^[25]。

4.4 卵泡闭锁

与其他哺乳动物一样, 猪卵泡的闭锁早在胎儿时期卵泡形成时即已开始, 出生前后达到高峰, 到出生时丢失绝大部分卵泡。出生后, 绝大部分卵泡在不同发育阶段相继退化, 仅有少数将来达到成熟, 排卵。原始卵泡闭锁在形态上出现一系列变化, 即卵母细胞先出现退行性变化, 此时卵泡细胞仍然健康, 卵母细

胞皱缩, 核偏于一侧, 染色质成块状, 固缩, 细胞随后自溶被巨噬细胞吞噬。研究表明, 细胞凋亡是卵泡闭锁的根本机制^[26]。发育早期的卵泡 (原始卵泡, 初级卵泡) 闭锁主要是由卵母细胞凋亡引起的, 而在发育后期, 起主导作用的可能是颗粒细胞或膜细胞凋亡^[27]。

5 小结

哺乳动物卵巢发生过程中经历了一系列重要的组织学变化, 先是胚胎生殖嵴产生, 生殖嵴一部分发展成性腺, 胚胎后期性腺分化成为卵巢, 卵巢在形成前后两次产生性索, 伴随性索的变化, 生殖细胞从 PGCs 经卵原细胞增殖、分化形成初级卵母细胞, 并与围绕在周围的颗粒细胞形成原始卵泡, 整个过程还伴随着细胞凋亡和卵泡闭锁。从总体上看, 猪卵巢发生的这一过程和其他哺乳动物相似, 但在具体的发生时间和组织学方面, 也有许多差异和特点。到目前为止, 许多动物卵巢发生的这些变化已大致清楚, 但对于胎猪卵巢性索的细胞产生以及发育去向, 卵泡细胞的来源, 原始卵泡闭锁等问题, 需要作进一步的研究工作。全面了解胎猪卵巢发生中这些重要过程, 可为今后从分子水平研究有关现象提供组织学上的支持。

参考文献(References)

- [1] Motta PM *et al.* *Hum Reprod Update*, 1997, 3: 281
- [2] Davies J *et al.* *J Histochem Cytochem*, 1957, 5: 584
- [3] 房秀等. *兽医大学学报*, 1992, 12: 136
- [4] Black JL *et al.* *Anat Rec*, 1968, 161: 45
- [5] Bielańska-Osuchowska Z. *Z Anat EntwicklungsGesch*, 1973, 142: 37
- [6] Pelliniemi LJ. *Am J Anat*, 1975, 144: 89
- [7] Pelliniemi LJ. *Tissue Cell*, 1976, 8: 163
- [8] Garrett WM *et al.* *Reprod Fertil Dev*, 1999, 11: 463
- [9] Quinn RL *et al.* *J Anat*, 2004, 205: 15
- [10] 秦鹏春等. *哺乳动物胚胎学*, 北京: 科学出版社, 2001, 285
- [11] Pelliniemi LJ. *Anat Embryol*, 1975, 147: 19
- [12] 刘军等. *解剖科学进展*, 1995, 1: 209
- [13] 钱菊汾. *家畜胚胎学*, 香港: 中国科学文化出版社, 2003, 166
- [14] Hunter MG. *Rev Reprod*, 2000, 5: 122
- [15] Bielańska-Osuchowska Z. *Reprod Biol*, 2006, 6: 161
- [16] 杨增明等. *生殖生物学*, 北京: 科学出版社, 2005: 74
- [17] 杨晓菁等. *动物学杂志*, 2004, 39: 101
- [18] 何宝祥等. *畜牧兽医学报*, 2006, 37: 23
- [19] 阿拉达尔等. *西北农林科技大学学报*, 2007, 35: 11
- [20] 曹贵方. *山羊体形和卵巢发生及卵泡组织化学的研究*, 西北农业大学 1998 届攻读博士学位研究生学位论文(毕业)论文, 1998, 45
- [21] O'Rahilla R *et al.* (eds.) *Human Embryology and Teratology*, New York: Wiley-Liss, Inc., 1992, 207

- [22] Buccione R *et al. Biol Reprod*, 1990, **43**: 543
[23] Suh CS *et al. Rev Endocr Metab Disord*, 2002, **3**: 5
[24] 刘素娟. *黄牛杂志*, 1995, **21**: 64
[25] Morbeck DE *et al. Biol Reprod*, 1992, **47**: 485
[26] Tilly JL *et al. Endocrinology*, 1991, **129**: 2799
[27] Perez GI *et al. Nature*, 2000, **403**: 500

Histological Change during Fetal Pig Ovarigenesis

Zhi-Jun Cheng, Yong Tao*, Xiao-Yong Zhang

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract Ovarigenesis is the first but one of the most important events in mammalian reproduction, and it is almost accomplished for offspring before delivery. Generally, it consists of quite a few physiological activities, such as primordial germ cells (PGCs) proliferation and differentiation, primordial ovary and sex cord formation, oogonia proliferation, differentiation and apoptosis, and primordial follicle formation, development and atresia. Deep understanding in porcine ovarigenesis is of the great importance in livestock reproduction and even human reproductive clinics. By now, only a few reports about fetal pig ovary development have been seen, but systematic realization for porcine ovarigenesis is still needed. Based on the previous studies, this review focuses on the histological change during porcine ovarigenesis.

Key words pig; fetus; ovarigenesis; histology

Received: December 14, 2007 Accepted: February 22, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30600432) and the Anhui Distinguished Youth Sci-Tech Project (No.06041081)

*Corresponding author. Tel: 86-551-5782488, E-mail: apieceofgrass@163.com