

原生殖细胞与转基因家禽

孙梅* 刘红林 陈杰**

(南京农业大学动物科技学院 南京 210095)

原生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)是动物生殖细胞的原始祖先细胞。在雄性动物, PGCs 分裂形成精原细胞干细胞的前体——性原细胞, 而后附着在生精细胞上皮上进入精子发生过程; 在雌性动物, PGCs 分裂形成卵原细胞, 而后进入减数分裂期。对于 PGCs 的研究开始于 20 世纪 60 年代, 随着 PGCs 的分离和体外培养技术的发展, PGCs 作为载体应用于动物转基因的时机逐渐成熟。本文拟就 PGCs 的产生、移植和在家禽转基因上的应用等几方面作一综述。

一、原生殖细胞的产生

1. PGCs 的形态

鸟类的原生殖细胞呈圆形, 直径 15 - 20 μm , 细胞核偏于细胞一端, 直径 6 - 10 μm , 在不同时期其形状略有不同, 早期位于内外胚层之间和随后进入血液循环时, 呈圆形; 在胚胎或未分化性腺中常有伪足。PGCs 含有大量糖元, 可用 PAS 识别。PGCs 的细胞质内有大量细胞器, 如发达的粗面内质网、高尔基体、多聚核糖体和各级溶酶体, 线粒体主要分布在核的四周。细胞核内缘有少量异染色质, 常染色质则分布均匀。据报道, 在孵育 36 小时的鸡胚中, 位于生殖新月区 PGCs 的细胞核内, 核周池及靠近核的细胞质内存在一种特殊颗粒(即电子致密小体), 它自核内产生, 进入核周池并借核膜破裂的方式进入细胞质。其结构与其他动物的生殖颗粒极为相似^[1], 因而可能是鸡 PGCs 的生殖颗粒, 并且由该颗粒在胞质中聚集所构成的特殊高电子致密区可能就是生殖质(germ plasm)。从而从形态学上提供了鸟类具有生殖质的证据。

2. PGCs 的产生

鸡胚的发育目前分为两个时期: 其一是 Eyal-Giladi 和 Kochav(1976)根据鸡胚在体内的发育, 可细分为 14 期, 以罗马数字 I - XIV 表示(表 1)^[2]; 其二是 Humburger 和 Hamilton(1951)根据受精卵从产出至仔鸡出雏, 将鸡胚的发育又细分为 46 周, 以阿拉伯数字 1 - 46 表示。

表 1 鸡胚正常发育时期表(产卵前从 X - XIV 期)

X	子宫内 20 小时	明区、暗区界线明显(PGCs 存在)
XI	即将产出或刚产出的鸡卵	下胚层开始形成
XII	已产出的鸡卵	下胚层向前推进并仅在上胚层后半部(原条期)
XIII	起始孵育	下胚层完全形成
XIV	孵育 6 - 7 小时	原条早期

鸟类的生殖细胞来自于上胚层^[3]。在鸡胚, PGCs 主要来自胚盘透明区的中央盘(约有 150 - 300 个), 并早在 X 期就已确定。之后 PGCs 渐从上胚层移至下胚层, 随下胚层的形态运动移至生殖新月区内。PGCs 从生殖新月区的内胚层脱离, 位于内、外胚层之间, 当 10 期胚外中胚侵入新月区形成血岛分化为血管时, PGCs 随之进入血管。15 期时 PGCs 在脐肠系膜动脉后穿过血管内皮缝隙进入由加厚的脏壁中层形成的生殖嵴内, 组成未分化性腺。随后分化为精子或卵子(30 期鸡胚)。

在胚早期发育阶段 PGCs 的来源上, 研究者多使用 PAS 染色方法来鉴定 PGCs 的存在, 有两点疑问: 一是鸟类生殖细胞何时与体细胞分化; 二是 PGCs 是否以分散形式产生于下胚层, 或者说它们是否被限定于一个特定区域内。这两个问题的回答不仅有助于阐述包括鸟类生殖系分化在内的分子和细胞机制, 还有助于发展鸟类转基因的相关方法。为此, 1996 年, Karagenic 等开展了一系列结合免疫组化的体外培养实验, 用抗特异性胚胎抗原 1 (SSEA-1) 检测在卵黄膜中培养的 VII 至 IX 期的整个胚和部分胚, 结果表明: 明区的形成和 PGCs 的产生有直接关系, 并且 PGCs 只产生于明区完全形成时的区域, 而不产生于这一过程尚未发生的时期^[4]。

二、PGCs 的体外培养

1. PGCs 的获取

获取 PGCs 通常有三种途径: 一是从 5 期胚的

* 现工作单位: 南京市第二医院肝病研究室, 邮编 210003。 ** 联系人。

生殖新月区提取;二是从 17 期胚的血液中提取;三是从生殖腺中提取。这三种胚源中 PGCs 的含量分别为 2%、0.003% 和 1.5%^[1]。据研究,10 期胚中生殖新月区的 PGCs 含量最高,为 150-250 个。但是由于难以避免的上下胚层以及卵黄的污染,使该阶段 PGCs 的分离纯化非常困难^[2]。

2. PGCs 体外培养的影响因素

胚的发育时期、培养系统中的辅助细胞等因素影响 PGCs 的生长。Bellin 等^[6]认为,PGCs 在蛋白多糖硫酸软骨素 ABC(0.5mg/ml)存在下生长良好。Wentworth 等^[2]发现鸡胚成纤维细胞(CEF)不能促进 PGCs 的生长,原因是大量的成纤维细胞的存在增加了 PGCs 的培养难度。PGCs 的培养液中可以不加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ,但 PGCs 的分离时期对培养的成功与否非常重要。另外,一些生长因子也影响着 PGCs 的体外培养,肥大细胞生长因子(MGF 或 SCF)和分化抑制因子(DIA 或 LIF)可协同促进 PGCs 的体外生长,在某些情况下也促进其增殖。

三、PGCs 的移植及转基因

1. 获取不孕受体胚

为提高 PGCs 移植的成功率,最好对受体胚进行不育处理,然后将所需研究的原生殖细胞或早期胚胎(上胚层)注入不育胚胎来研究其发育和子代的情况。处理方法通常有以下几种:a. 以手术方法将 4 期鸡胚生殖新月区切除,但这种方法极易造成胚胎在孵化前死亡;b. 利用紫外线照射生殖新区;c. 注射二甲磺酸丁酯(Busulfan);d. 雄鸡和雌鹌鹑交配。

2. PGCs 的移植

大量研究表明,生殖嵴的 PGCs(gPGCs)是转基因的良好载体。Chang 等^[7]研究发现,鸡胚中来自于生殖嵴的 PGCs(gPGCs,27 期)体外培养 5 天后也可以转入同一时期受体胚,并且,培养的 gPGCs 能够在受体胚中分化为生殖细胞。由此,研究者认为如果能够将外源 DNA 转入 gPGCs 中,则可能会迅速推进转基因的研究进展。1998 年,Dong K. Jong 等^[14]将培养 3.5-5.5 天的鸡 gPGCs 和未培养的鸡 gPGCs 分别转入受体胚(13-15 期)中,比较两者获得的嵌合体(毛色判定)的几率,结果发现前者获得嵌合体的几率明显高于后者。其原因可能是 PGCs 经培养后,存活下来的 PGCs 是生命力旺盛的干细胞。

3. PGCs 生殖系嵌合体及转基因

将分离出的 PGCs 转入受体胚,可获得能产生

具有供体源后代的生殖系嵌合体,在这一过程中,如果将外源基因转入供体的 PGCs,则可获得转基因鸟类。转基因研究中,关键在于基因能否进行同源重组。研究表明,在 PGCs 作为载体进行转基因时,PGCs 在分化过程中基因可发生同源重组(见图 1)^[4]。图 1 表示出了利用同源重组原理建立转基因鸡的过程,主要由三个关键技术组成:嵌合体的生产、基因的同源重组和外源基因的定点整合。然而,由于鸡的早期发育和繁殖的原因,有两个方面还需改进:一是产生生殖系嵌合体的能力;二是能够进行同源重组序列的测定。

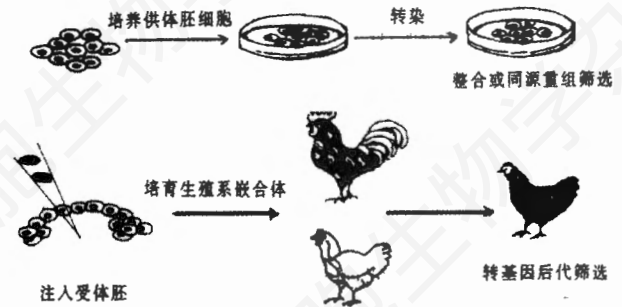


图 1 利用 PGCs 进行转基因的过程

图 1 表示经基因打靶改造的 PGCs 产生转基因鸡的过程。PGCs 或其前体即胚胎干细胞(ES 细胞)在抑制分化条件下分离培养,经基因转染等操作后注入受体胚,育成生殖系嵌合体,进一步筛选转基因鸡后代,从而得到转基因鸡。

目前,许多实验室常使用来自 X 期胚的 PGCs 获得生殖系嵌合体。Wentworth 等^[2]将显性的野生鹌鹑的 PGCs 注入不孕的隐性白羽鹌鹑胚胎(同一时期)中,得到了两个白羽雌性和一个白羽雄性后代,随后分别与隐性白羽鹌鹑交配,结果在其子代中获得了白羽和野生型羽的杂合性后代。Petitte 等^[4]以白来航鸡作为受体,移植芦花洛克鸡胚 X 期的 PGCs,结果发现供体芦花洛克鸡 PGCs 为后代提供了来自神经嵴的色素细胞、红细胞和生殖细胞。另外,受体胚和外源生殖细胞的获取和培养技术的提高也促进了整个鸟类转基因的发展。例如 Kanihira 等^[9]用透气的 Taflon 膜辅助一些必要的营养成分来培育鹌鹑胚,孵化率达到了 43%,可见这种人工的蛋壳也是可以应用的。

四、外源基因转入和表达

将外源基因转入 PGCs 中,通常有两种方法:

(1)将外源基因直接注入分离出的 PGCs 进行体外转移,在这一过程中,发生体外同源重组;(2)将外源基因注入胚盘中(内含 PGCs)进行体内转移。外源基因转入 PGCs 后,在发育的鸟类胚的血液中的 PGCs 中可以检测到,也可以在胚组织或胚外组织中检测到。Inada 等^[11]将一个标记基因(β -actin-LacZ/MiwZ)分别显微注射入 X 期鸡胚和静注催产素后的鸡卵(IV - VI 期)的胚盘中,经孵育至 VII 期,在此期间 PGCs 离开生殖新月区,通过血液到达生殖嵴,分别检测胚、胚外组织和血液中的 MiwZ DNA 的表达,结果都得到了充分的表达,并且在胚外组织中表达更多。另外,有人发现 MiwZ 基因也可以整合到鸡胚的生殖嵴中,获得具有外源基因的后代^[12]。Eguma 等^[8]也将 MiwZ DNA 显微转入不同时期供体(鸡胚)的生殖新月区中,发现使用早期的胚,外源基因的表达较高。用 PCR 和 X-gal 分析,前者检测率为 80% 以上,其原因可能为两种方法的分析产物不同,前者为 DNA,而后者为蛋白质。李赞东等^[13]将质粒 pMiwZ(含 LacZ 基因)注入鸡囊胚期胚盘中,培养一定阶段后进行 X-gal 检测,发现 24 小时胚中阳性个体为 50% (其中生殖新月部位占 30%),52 小时胚中阳性个体为 50%,并在 52 小时胚和 5 日龄胚的生殖腺中观察到转染的 PGCs,由此证明囊胚期注射外源基因可以获得转染的生殖细胞并传给下一代。

五、转基因家禽的研究前景

目前,家禽转基因的研究发展很快,除 PGCs 移植方法外,还有基因显微注射法、逆转录病毒感染法和精子载体法等。与后几种方法相比,利用 PGCs 进行转基因具有以下优点:(1)可以实现外源基因的定点整合,从而避免了随机整合造成的整合率低、整合不表达或异常表达的弊端;(2)技术可操作性强,可以大量制备。因此,该技术更加适用于转基因家禽的研究。并且在各种技术飞速发展的今天,PGCs 介导转基因家禽还具有广阔的应用前景。

首先,转基因家禽可作为生物反应器,生产珍贵的医用蛋白质。目前在哺乳动物上,利用乳腺作为生物反应器生产珍贵医用蛋白质已有不少成功的报道,与此相比,在禽类上该领域发展相对滞后,而家禽具有个体小、世代间隔短、维持种群容易、生产力高等特点,所以作为转基因的对象,家禽具有独特的优越性和光明的前景。

其次,这种转基因技术可应用于地方鸡种的保

种研究,建立利用冷冻细胞制作嵌合体的保种技术。目前在我国畜牧生产中,保种的唯一方法仍是采用畜群保种,在 PGCs 介导转基因技术中,制作嵌合体的方法则为实现鸡的超低温保种提供了可能。

另外,转基因家禽也可以作为研究癌发生、遗传病和基因治疗的动物模型。例如目前报道最多的是禽类劳氏肉瘤病毒(ALV)和网状内皮组织增生病毒(REV)的转基因研究,为人类癌症的研究提供了动物模型。

摘 要

鸟类的原生殖细胞来自于上胚层胚盘透明区的中央盘处,分离出的 PGCs 可以被转至受体胚中,可以获得由供体胚 PGCs 和受体胚 PGCs 组成的生殖系嵌合体。在这一过程中,如果将外源基因转入供体 PGCs,受体胚后代则成为转基因鸟类。利用禽类 PGCs 作为转基因的载体,来生产嵌合体胚胎和子代为目的研究禽类转基因的一种较为理想的方法。

参 考 文 献

- [1] 刘荣秀,1990,动物学报,36(2):114-117.
- [2] Wentworth, B. C. et al., 1989, *Poultry science*, 69: 999-1010.
- [3] Eyal-Giladi H., Ginsburg M. and Fabarov A., 1981, *J. Embryo. Exper. Morph.*, 65:139-147.
- [4] Petite. J. N. et al., 1997, *Poultry science*, 76: 1084-1092.
- [5] Karagenic. L. et al., 1996, *Dev. Genet. In press.*, 19: 290-301.
- [6] Bellin. ME. et al., 1985, *Biol. of Reprod.*, 32(Supple. 1): 72. (Abstr.).
- [7] Chang il-kuk. et al., 1997, *Cell Biology International*, 21(8):495-499.
- [8] Eguma K, Isoh. et al., 1999, *Asian-Aus. J. Anim. Sci.*, 12(4):520-524.
- [9] Kanihira M, Oguchis. et al., 1998, *Dev. Growth. Differ.*, 40(4):449-455.
- [10] Pain B. M. E. Clark, M. Shen. et al., 1996, *Development*, 122:2339-2348.
- [11] Inada S., Hattori M. and Fujihara N., 1997, *Reprod. Nutr. Dev.*, 37(1):13-20.
- [12] Ebara F., Hattori M. and Fujihara N. 1998, Proc. 6th Asian Pac. Poult. Cong., Nagoya, 464-465.
- [13] 李赞东、李海昌等,第三届全国转基因动物学术讨论会论文集(北京,1996,11).
- [14] Dong K et al., 1998, *Processdings. Contributed Papers, Vol II*:668-669.