

## 鸟类的原生殖细胞

张 天 萌

(山东大学生物学系 济南, 250100)

脊椎动物的生殖细胞在胚胎发育过程中是怎样形成的, 大体上有两种情况: 一类是生殖细胞在胚胎发育到一定的时期, 由于诱导作用从一些卵裂球分化来的, 这就是渐成的意见; 另一种是从胚胎发育一开始就与体细胞分开, 它由含有一种特殊细胞质——生殖质的卵裂球形成的, 这就是预成的意见。人们把这种处于未分化性腺之前的生殖细胞称为原生殖细胞 (primordial germ cell)。

两栖类中的有尾类和无尾类恰好是分别说明上述两种情况最好的例证。前者的原生殖细胞是胚胎发育到桑椹-囊胚期由内胚层诱导其上的外胚层在边缘带形成中胚层时产生的<sup>[1]</sup>, 在其随后的发育中于原生殖细胞内找到类似生殖质一类的电子致密小体<sup>[2]</sup>; 后者在卵的植物极皮层下区有一种生殖质, 将来含有生殖质的卵裂球就成为原生殖细胞, 作者已于1987年对此作了综述<sup>[3]</sup>, 在此不再赘述。

本文主要是探讨鸟类原生殖细胞是怎样发生的, 它属于哪种情况。

## 一、原生殖细胞的形态

鸟类原生殖细胞与其他脊椎动物的一样以其较大的体积与体细胞能明显地区别开。它是圆形或椭圆形, 直径15—20  $\mu\text{m}$ , 细胞核偏于细胞一端, 直径6—10  $\mu\text{m}$ 。在早期位于内、外胚层之间或随后进入血液循环时, 它常呈圆形; 当它在组织或未分化性腺中常有伪足<sup>[4]</sup>, 因此在不同时期其形状略有不同。由于原生殖细胞有大量糖元, 所以用PAS方法即可识别。当然PAS反应并非仅为原生殖细胞所特有, 还必须结合其它特点, 如细胞较大等。糖元含量随着发育日趋增加, 只有到迁移时才逐渐下

降。此外, 糖元的分布还有地区性的变化, 早期分布均匀, 后期呈半球状集中于子细胞的一端。而卵黄和脂滴含量则随胚胎发育逐渐减少。

细胞质内有大量细胞器, 线粒体主要分布于核周, 粗面内质网的囊腔中常呈不同程度的扩张状态, 内有中等电子密度的蛋白样物质, 有发达的高尔基复合体、多聚核糖体和各级溶酶体。在原生殖细胞进入运动之前细胞质内有大量的微管和成束的微丝, 它们主要分布于质膜附近, 这就奠定了它具有运动能力的结构基础<sup>[5]</sup>。此外, 在胚胎发育第10期(Hamburger and Hamilton, 1951年制定的孵育分期), 位于生殖新月区(图1)的原生殖细胞常呈灶状集聚, 相邻的原生殖细胞有桥粒样结构, 可能与同步成熟有关<sup>[5]</sup>。

在细胞核内缘有少量异染色质, 常染色质则为均匀分布。有1—2个核仁, 光镜观察核仁为实线条状, 嗜派洛宁染色。电镜表明核仁为电子致密块状结构。如以RNA酶处理, 核仁则不着色, 这在所有时期的核仁都是如此, 这也是原生殖细胞一个特点。根据嗜派洛宁染色和RNA酶处理后不着色的结果表明核仁成分为核糖核酸, 但它能否表示是真正的核仁尚待进一步研究<sup>[4]</sup>。

根据文献报道<sup>[6,7]</sup>, 在鸟类原生殖细胞中还没有找到生殖质一类的物质。最近刘荣秀报道孵育36小时(10期)位于生殖新月区的原生殖细胞, 其细胞核内、核膜间及胞质有一种圆形的电子致密颗粒(电子较密小体)。这些颗粒由点状电子致密点构成, 埋于特别细的盘曲成海绵状纤维之中, 其间充满基质, 结构和其它动物

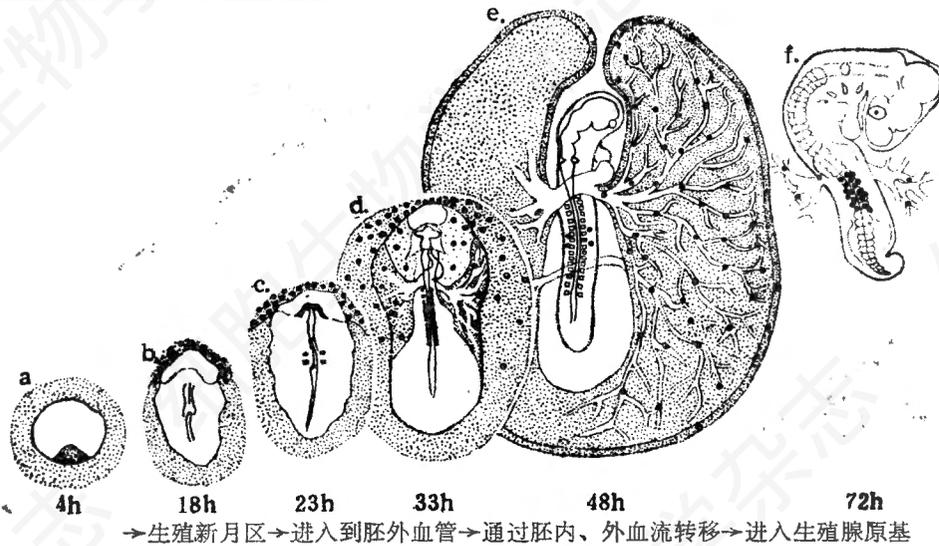


图1 示鸟类原生殖细胞的迁移

- a. 原条形成前, b 和 c. 原生殖细胞分别集中于头突和头褶期前端的生殖新月区, d. 原生殖细胞进入中胚层血岛并通过血液循环转移, e. 原生殖细胞通过血管系统进入生殖腺原基附近, f. 继续进入生殖腺原基<sup>[6]</sup>。

的生殖颗粒极为相似<sup>[5]</sup>。它是由核内产生, 进入核周池, 借核膜破裂方式进入细胞质的。这与无尾类的情况十分相似<sup>[8]</sup>。

## 二、原生殖细胞的发生与迁移的途径和机制

Nieuwkoop 和 Sutasurya(1979)专著中指出鸟类原生殖细胞来自胚胎早期的初级下胚层<sup>[6]</sup>。根据近十年来的工作证明它不是来自下胚层而是来自上胚层的。Eyal-Giladi 等(1981)将XII期(罗马字代表胚胎取自产卵前的, 分期是按照 Eyal-Giladi 等 1976 年制定的分期表)鸡和鹌鹑胚盘上、下胚层作嵌合胚胎, 体外培养, 当孵育到7—8期, 用 Feulgen 染核异染色质作标记, 证明原生殖细胞来自上胚层<sup>[9]</sup>。Sutasurya 等(1983)通过分别培养XII期—4期鸡胚上、下胚层证明在原条形成时原生殖细胞自上胚层逐步移向下胚层的, 在4期时还有许多原生殖细胞仍位于上胚层中<sup>[10]</sup>, 到6期时其数目就相当少了。以后, Urven 等(1988)利用一种抗小鼠胚胎肿瘤细胞单抗 EMA-1 标记, 通过免疫组化方法证明鸡胚原生殖细胞来自上胚层。这种标记方法比人们常用的PAS作为

鉴定方法在时间上要早得多, 并且更可靠, 这种标记一直可保持到配子发生前<sup>[11]</sup>。最近, Loveless 等(1990)以一种低聚糖抗原 FC 10·2 作标记也证明鸡胚原生殖细胞是来自上胚层的<sup>[12]</sup>。

至于原生殖细胞来自上胚层的那一部分, Ginsberg 和 Eyal-Giladi(1987)将X—XII期胚盘透明区的中央盘、边缘带和暗区进行分割培养, 结果表明鸡胚原生殖细胞主要来自胚盘透明区的中央盘, 并证明早在X期就已决定。他们还统计了各个胚盘所含的原生殖细胞数量各不相同的, 约为150—300个<sup>[13]</sup>。当然不同的鸟类未孵育前原生殖细胞在透明区分布的位置略有不同, 鸭分布不规律, 鹌鹑则位于胚盘的前半部<sup>[14]</sup>。

即使目前已证实鸡胚原生殖细胞早期在X期业已决定, 并且又在10期发现有生殖质, 但鸟类的原生殖细胞是否与有尾两栖类一样是受到下胚层的诱导而产生, 尔后在其发育过程中也产生生殖质属于渐成类那种情况; 或是由于人们迄今还未能找到生殖质而完全排除与无尾两栖类属于预成类那种可能性? 这是

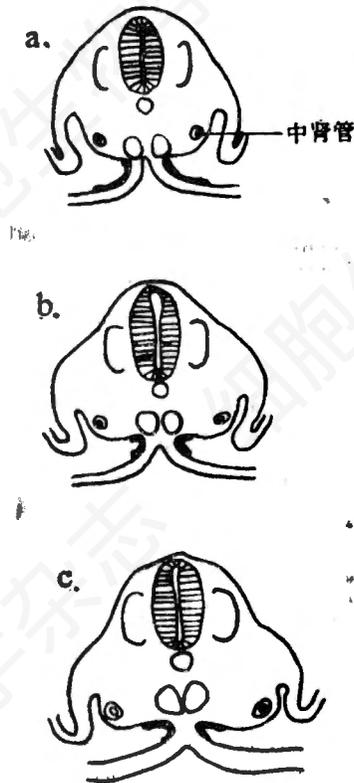


图2 鸡胚加厚的体腔上皮(粗线)部位的改变<sup>[15]</sup>

- a. st.16 脏壁中层两侧加厚
- b. st.17 加厚部位移向体腔角
- c. st.18 加厚上皮达到靠近预定生殖腺区(在体腔角和中肾之间)

需要人们去探索研究的。

当原生殖细胞从上胚层移到下胚层后,由于下胚层的形态发生运动将它带到生殖新月区内。在4—8期原生殖细胞从生殖新月区的内胚层脱离开,位于内、外胚层之间。当10期胚外中胚层侵入生殖新月区并开始形成血岛时,它就进入血管内(图1)。此时胚胎前端已形成血管网,在12期可于胚外血管中找到原生殖细胞,13期胚胎开始心跳和血液循环<sup>[6]</sup>。15期原生殖细胞在卵黄动脉后1.2mm处进入相当加厚的脏壁中层体腔上皮,并入原生殖细胞的加厚上皮向将来生殖腺方向移动,16期后通过体腔角向体壁中层方向移动,最后到18期以加厚上皮位于体腔角和中肾之间即将来生殖腺处(图2)。这表示开始并入原生殖细胞加厚的脏壁中层上皮成为生殖腺表面的上皮<sup>[16]</sup>。约在孵

育三天形成未分化性腺。

根据 Nakamura 等(1988)统计在正常发育情况下,约有20%原生殖细胞不进入生殖腺而到达别的组织中;其中90%是进入头部神经管四周的间叶组织,这也许与头部微血管网发育早,也较发达以及血流较慢,导致“误入歧途”的<sup>[16]</sup>。

为了探索原生殖细胞迁移的原因, Simon 将带有生殖新月区胚盘前半部侧连于带有生殖腺原基胚胎的后半部,结果前者的原生殖细胞通过血液循环进入后者的生殖腺原基;如将去除生殖新月区的胚盘同正常胚盘作连体,结果两个胚胎的生殖腺中均有原生殖细胞。这表明了原生殖细胞是通过血液循环从胚外进入胚内生生殖腺的<sup>[6]</sup>,并认为可能是生殖腺上皮产生一种物质吸引原生殖细胞。为了证实后一种情况, Fujimoto 等(1984)将两天到两天半胚胎的原生殖细胞和同期生殖嵴原基一起培养,发现原生殖细胞向生殖嵴迁移,最终到达生殖嵴原基<sup>[17]</sup>。Kawana 等(1986)进一步将原生殖细胞与同期几种原基(神经管、心脏、尿囊、肝和生殖嵴)作等距离共培养,证明原生殖细胞向生殖嵴原基作定向移动,表明生殖嵴确具一种吸引原生殖细胞的能力<sup>[18]</sup>。如将原生殖细胞培养于缺乏生殖嵴原基的胶原蛋白培养基上,它就不运动;如带有生殖嵴原基就能产生伪足<sup>[19]</sup>。这种生殖腺原基具有长距离吸引原生殖细胞的能力。最近在哺乳类方面也得到了证明,同时还发现在培养基中有生殖嵴可使体外培养的原生殖细胞在培养物中消失的时间延长<sup>[20]</sup>。Rogulska(1971)将小鼠后肠(产生原生殖细胞的部位)移到鸡胚生殖腺区,发现鸡胚生殖腺上皮也可以吸引小鼠的原生殖细胞,表明这种吸引能力还没有物种的区别<sup>[21]</sup>。

至于生殖腺原基分泌什么物质吸引原生殖细胞的迁移, Swartz(1975)认为是一种类固醇物质,其根据是他将一种雄激素或雌激素注入孵育33小时鸡胚,由于激素的干扰,所以在检查孵育到5天的鸡胚生殖腺时发现其中原生殖

细胞数大为减少<sup>[22]</sup>。可惜这种意见还没有得到更多学者的证实。

原生殖细胞本身具有变形运动的能力,如将14—16期的原生殖细胞培养于有鸡胚背系膜的培养基上,其运动速度平均为26  $\mu\text{m}/\text{h}$ ,最大可达58  $\mu\text{m}/\text{h}$ ,其迁移方向是由下面的间叶细胞长轴的方向决定<sup>[23]</sup>。这与无尾两栖类和哺乳类的情况十分相似。在体内 Ando 和 Fujimoto(1983)找到了原生殖细胞正通过微血管内皮间隙进入胚内脏壁中层之间的图象,这些原生殖细胞先粘附在血管内表面,然后产生一个膨大的伪足状突起通过血管壁内皮的缝隙进入到脏壁中层的<sup>[24]</sup>。

最近 Nakamura 等(1990)将10期胚胎后部1/3切去,当孵育到18期,集中于胚体的原生殖细胞有90%位于头部神经管四周,他们认为由于缺乏生殖腺,头部血管内皮和间叶细胞可能对在血液循环中的原生殖细胞有一种亲和能力,导致它们集中于头部<sup>[25]</sup>。

所有羊膜动物的原生殖细胞最终一定要集中并通过肠背系膜而到达生殖腺原基的,而它在胚体组织间的迁移与细胞外基质密切相关。最近, Urven 等(1989)将抗片层蛋白(laminin)、纤连蛋白(fibronectin)、硫酸软骨素、蛋白多糖和胶原蛋白IV标记细胞外基质证明原生殖细胞的迁移与这些基质在时、空上的出现密切相关<sup>[26]</sup>。这种时、空关系在无尾两栖类<sup>[27]</sup>和哺乳类<sup>[27]</sup>均已得到证实。

### 三、原生殖细胞的分化

无论由生殖质决定还是由诱导而形成的原生殖细胞,它们都是在通过一定的迁移途径到达生殖腺的过程中实现其分化的。因此许多学者通过异位移植的原生殖细胞来研究决定了的细胞是否一定按其原定方向分化为生殖细胞。

Nakamura 等虽在鸡胚正常发育或切去生殖腺原基的实验中都发现有许多原生殖细胞进入胚胎头部神经管四周的间叶细胞,由于他们没有进一步研究其后来的命运,所以还不了解其分化情况<sup>[18,25]</sup>。

但是,人们在无尾两栖类已取得许多结果。Wylie 等(1985)将爪蟾45期胚胎的、处于迁移中的原生殖细胞标记后注入囊胚后期(9期)的囊胚腔中,结果它可分化为三个胚层的细胞,表明了原生殖细胞的分化是由其最终所处的部位决定,也表明它是一种多潜能细胞<sup>[28]</sup>。移核实验也证明原生殖细胞核的多潜能性比同期其它体细胞大得多<sup>[29]</sup>。Cleine(1986)将爪蟾受精卵倒置后发现所发育的胚胎许多原生殖细胞位于前肠,这些异位的原生殖细胞则分化为食道或肠的上皮细胞<sup>[30]</sup>。Ikenishi 和 Tsuzaki(1988)将<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶标记的原生殖细胞移植到神经胚内胚层的前半部和后半部,结果前者的原生殖细胞由于无法迁移到生殖腺,以后就分化为食道、胃和肠的上皮,只有后者可迁移到生殖腺而分化为生殖细胞。因此,他们认为对于原生殖细胞的分化,内胚层特定的部位是一个必不可少的条件<sup>[31]</sup>。这种受到不同于原来外界环境的影响而向不同于原来的方向进行分化的转向决定(trans-determination),原生殖细胞可能是一种很好的研究对象。

### 四、一个值得注意的问题

Wentworth 等(1989)提出将鸟类原生殖细胞作为一种有用的基因转移工具。他用采用紫外线照射早期鸡胚的生殖新月区或以二甲磺酸丁酯(busulfan)注入鸡胚杀死原生殖细胞以及用雄鸡和雌鹌鹑交配的方法获得不育的胚胎,然后将所需研究的原生殖细胞注入不育胚胎来研究其发育和子代的情况。他们将显性的野生鹌鹑的原生殖细胞作为施主注入不育的隐性白羽鹌鹑胚胎受体中,得到两个白色雌性和一个白色雄性子代,然后分别再与隐性白羽鹌鹑交配,结果在其子代中获得了白羽的和体披野生型羽毛的杂合性子代<sup>[32]</sup>。Petitte 等(1990)将芦花洛克鸡胚X期胚盘(此期胚盘为一单层上胚层,由它产生胚胎所有的组织其中包括原生殖细胞)注入白来杭鸡胚的胚下腔,53个实验中获得6个羽毛表现型为嵌合体胚胎,其中一个孵化为雄性,他们把它与芦花洛克母鸡交

配, 其目的为测定施主细胞并入宿主睾丸中达到何种程度, 在获得 719 个后代中有两个表现型为芦花洛克, 表明施主细胞中的原生殖细胞已进入宿主胚胎的睾丸中, 从其血液和精子 DNA 指纹图象 (fingerprint) 来看不同于来杭鸡。从嵌合体血液 DNA 指纹图象来看仅为芦花洛克所有。因此, 实验结果表明分离芦花洛克 X 期胚盘细胞提供了来自神经嵴的色素细胞、红血球和生殖细胞。所以他们认为这种移植胚盘细胞技术可能有助于禽类转基因以及通过体外培养建立多潜能干细胞的研究<sup>[33]</sup>。

### 摘 要

鸟类原生殖细胞是由胚盘的上胚层细胞形成的, 它以较大的体积和大量的糖元极易与体细胞区别开。如同其它脊椎动物一样, 鸡的原生殖细胞内也有类似生殖质的生殖颗粒。鸟类原生殖细胞具有运动的能力, 其迁移方向与生殖腺原基吸引能力有关, 与胚体内细胞外基质的合成在时、空上有密切的关系。它是一种研究转向决定和转基因研究的一个较为理想的实验材料。

### 参 考 文 献

- [1] Sutasurya, L. A. and Nieuwkoop, P. D., 1971, Wilhelm Arch. Entwicklunsmech. Organismen, 166: 189.
- [2] Ikenishi, K. and Nieuwkoop, P. D. 1978 Dev. Growth Diff. 20: 1.
- [3] 张天荫, 1987, 细胞生物学杂志 4: 145.
- [4] Fujimoto, T. 1976, Anat. Rec. 185: 139.
- [5] 刘荣秀, 1990, 动物学报, 36: 114.
- [6] Nieuwkoop, P. D. and Sutasurya, L. A. 1979, Primordial germ cells in the Chordates. Cambridge Uni. Press.
- [7] 张天荫, 1987, 原生殖细胞 (丁汉波等主编《发育生物学》), 高等教育出版社, 13—38.
- [8] Holwill, S. et al., 1987, Development, 100: 735.
- [9] Eyal-Giladi, H. et al., 1981, J. Embryo. Exp. Morph. 65: 139.

- [10] Sutasurya, L. A. 1983, Dev. Growth Diff. 25: 568.
- [11] Urven, L. E. et al., 1988, Development, 103: 299.
- [12] Loveless, W. et al., 1990, Development, 108: 97.
- [13] Ginsberg, M. and Eyal-Giladi, H. 1986, J. Embryo. Exp. Morph., 95: 53.
- [14] Cuminge, D. and Dubios, R., 1989, Arch. Biol. (Bruxelles) 100: 207.
- [15] Ukeshima, A. et al., 1987, Anat. Rec. 219: 311.
- [16] Nakamura, et al., 1988, Anat. Rec. 220: 90.
- [17] Fujimoto, T. et al., 1984, Dev. Growth Diff. 26: 362.
- [18] Kawana, T. et al., 1986, Anat. Rec., 215: 403.
- [19] Kawana, T. et al., 1987, Anat. Rec. 219: 164.
- [20] Godin, I. et al., 1990, Development, 108: 357.
- [21] Rogulska, T. et al., 1971, J. Embryo. Exp. Morph. 25: 155.
- [22] Swartz, W. J. 1975, Am. J. Anat., 142: 499.
- [23] Kawana, T. and Fujimoto, T. 1984, Anat. Rec. 209: 337.
- [24] Ando, Y. and Fujimoto, T. 1983, Dev. Growth Diff. 25: 345.
- [25] Nakamura, M. et al., 1991, Anat. Rec., 229: 109.
- [26] Urven, E. et al., 1989, Anat. Rec., 224: 14.
- [27] Fujimoto, T. et al., 1983, Dev. Growth Diff., 25: 407.
- [28] Wylie, C. et al., 1983, Dev. Biol., 112: 66.
- [29] Smith, L. D. 1965, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 54: 101.
- [30] Cleine, J. H. 1986, J. Embryo. Exp. Morph. 94: 83.
- [31] Ikenishi, K. and Tsuzaki, Y. 1988, Development, 102: 527.
- [32] Wentworth, B. C. et al., 1989, Poultry Sci., 68: 799.
- [33] Petite, J. N. et al., 1990, Development, 108: 185.