

对诱导因子的探索

牛 满 江

(中国科学院发育生物学研究所、美国费城 Temple 大学生物系)

受精卵经卵裂、囊胚期而到原肠期。近来很多发育生物学家对囊胚期在发育过程中的功能特感兴趣。一般认为,囊胚中期细胞具有化学的分化^[1-6]。原肠期开始有形态上的分化,背唇(Spemann的组织者)诱导外胚层形成脑、脊索及肌细胞等;中胚层和内胚层分区,自主分化产生体内各器官。是什么物质诱导发育过程产生如此复杂的变化呢?让我们步步深入地探讨这个问题。

我们知道,蛙卵受精后出现灰色新月区,它具有诱导功能^[7-10]及自主分化的生殖质^[11-14],果蝇受精卵中有极颗粒^[15],美西螈受精卵中有弥补致死基因的产物^[16],海鞘受精卵中有黄色月区和灰色月区^[17,18],角贝卵裂时出现极叶^[19]等,这些部位各含有器官形成物质,其中有功能的成分,就是器官形成因子,简称分化因子。受精卵中的诱导物质及分化因子分布的区域不同,且均不受细胞核的控制^[20],但它们具有组成染色体的特殊功能^[21,22]。例如,带有“0”致死基因的美西螈卵,受精后由于缺乏正常基因产物,二、三天后即死亡。若将正常受精卵质注入带有致死基因的受精卵,胚胎就能活下去^[1,16];给带有致死基因的果蝇卵注射正常卵质后,也能使胚胎发育正常^[23,24]。我们曾用白色爪蟾精子与正常黑色爪蟾卵受精,再用紫外线照射卵核,如此所得白核黑质卵的胚胎产生大量黑色素细胞^[25],与白色卵发育的胚胎比较,差异特别显著。若与黑色卵发育的胚胎比较,初期差别小,而后差别越来越大。

灰色新月区含有RNA^[26],紫外线(254 mM)照射未受精卵腹部,受精后灰色新月不出现^[27,28],若照射受精后形成的灰色新月区,

胚胎发育不正常,其前脑消失^[8,29-34]。这两项实验结果表明,灰色新月区中所含诱导物质不在皮层,而在卵的外质层^[36]。蛙卵中的生殖质和果蝇卵中的极颗粒对紫外线敏感,照射后发育的蝌蚪没有生殖细胞或生殖细胞减少^[35,37];而果蝇则不产生极细胞^[38,39],若注入RNA到照射过的极颗粒区,形成极细胞的能力就恢复^[40,41]。这里注射RNA所表现的功能,与将mRNA分别注入金鱼受精卵^[42]及爪蟾卵裂初期动物极细胞^[43]所呈现的功能大致相似,都参与自主分化^[44]。与此相对的细胞分化是依赖分化。感受态细胞,如原肠期的外胚层,接受诱导物质后发育成神经组织、体中轴器官或特殊组织。如果仅从卵中生殖质及灰色新月区中的物质对紫外线的敏感性来看,二者中有功能的成分很可能是RNA。昆虫卵前部具有形成头部的因子^[130,131],斯氏摇蚊卵前部紫外线照射^[124]及RNase处理后^[125],分别产生双腹无头胚胎,这样结果表明卵中含有形成头部的因子是RNA。

Spemann用结扎方法将受精卵分为两半,结果是含有灰色新月区的一半,发育正常,无灰色新月区的一半,最终死亡。若改变结扎方向,将灰色新月区分到左右各半,每半边均能发育成个体。若将八细胞中含有灰色新月区的部分移植到另一胚胎的腹面,它诱导外胚层形成一个次级胚胎^[9,10],这与Spemann及Mangold移植原肠期的背唇(Spemann的组织者)到另一个原肠胚的囊胚腔中所得结果相同(图版I图1),即均能获得初级诱导的产物^[45]。这两个实验结果说明灰色新月区及背唇中的诱导物质是一样的。从图1中可以看出背唇诱导次级胚胎的中轴器官是背唇自主分化

(脊索、体节)及由它诱导外胚层所产生的组织(脊索、脑、体节及肾管)的镶嵌体。Hamburger及Holtfreter^[46]将诱导形成组织的来源分为两类:(甲)同化诱导,也称同源诱导,如脊索诱导外胚层形成脊索,体节诱导外胚层形成体节(乙)补充诱导,也称异源诱导,如脊索诱导外胚层形成中枢神经系统。有关脊索在发育中的双重功能,有待详述。

以爪蟾受精卵为例,其中灰色新月区中的物质、生殖质、Vg1 mRNA、修补白色素细胞基因物质^[25]等的分布,将以精子进卵处作为腹面,沿卵的黑白色交界(下赤道区)把卵分为动植物两极,中间是背腹中轴,前背部是灰色新月区,这样就象征着原肠期三胚层的位置^[47]。与灰色新月形成的同时,卵内其他具有发育功能的物质也在分离,卵裂期间分别分配到不同的分裂球中^[48,49],有的具有生殖质,有的带有灰色新月区中的物质,有的含有修补白色基因的物质等。追踪灰色新月区中具有诱导功能的物质,经2-4-8-16-32细胞期及囊胚期,都在下赤道(中胚层)的前背部^[50-60]。具有生殖质的细胞在植物极,Vg1 RNA也在植物极^[61],其他有功能的物质分布情况尚无报道,一般地说,具有发育为中胚层器官的分布在中胚层或靠近中胚层区,具有分化为内胚层器官的分布到植物极。中胚和内胚的界限难以划分,性腺是中胚层的产物,产生性腺的因子,生殖质在植物极。囊胚期的中胚层虽有自主分化为肌细胞的能力^[62,63],但需要发育过程中细胞之间相互影响,到原肠期才建立预定器官形成区、脊索、体节、心脏、肾脏、侧板和血球等。

灰色新月区所含诱导物质随卵裂、经囊胚传到原肠的背唇,每发育期都在中胚层的前背部。有实验表明囊胚期的中胚层是植物极诱导动物细胞形成的^[64-67]。如此就忽视受精卵内具有自主分化^[11,13-17,19,23-25,42-44]及改变遗传性的物质^[1,15,25-25,40-44,125]。

当卵发育到原肠期,背唇内折沿外胚层向前延伸,诱导外胚层形成胚胎的中轴器官,即

脑、脊索、体节、肾管。因此,研究背唇中的诱导物质,最好分析背唇生长出来的细胞。我们采用悬滴培养法,把取下的一小块背唇放在Niu-Twitty培养液的悬滴中培养,一周后,背唇长出肌细胞、脊索、神经细胞及间充质等。这些生长分化中的细胞能分泌物质到培养液,若用这种培养液培养10—20个外胚层细胞,7—10天后,它们生长、分化为神经细胞(图版I图2),或者发育为神经脊的产物,即神经细胞与纤维,色素细胞、间充质等^[68]。神经脊是微弱神经诱导的产物^[69]。这项实验表明,从背唇分化出来的各种细胞,分别分泌产物,混合的产物(诱导者)诱导外胚层细胞生长、分化为神经诱导的产物。又如,培养尾部神经板^[70],12—16天后分化为肌细胞,这时植入10—20个外胚层细胞,让其还离肌细胞,被植入的这些外胚层细胞10天后发育为肌细胞(图版I图3),这是组织培养中获得的同源诱导,表明成肌细胞分化进程中渗透物质带有信息,能诱导外胚层增殖,分化为同样的成肌细胞。有人把同源诱导现象与同源箱基因表达相比^[127],这不合实际,因为同源诱导组织与所诱导形成的是同样组织;同源箱基因的表达有区域性,它的多方面功能很像原致癌基因^[128],拿Int-1基因产物,蛋白质及RNA为例,分别注入爪蟾囊胚的囊胚腔,注入蛋白质的对发育的功能不显著,注射RNA的发育正常,绝大多数产生双头胚胎^[129]。这又是一个例子表明RNA具有形成器官的功能。

上述培养背唇或尾部神经板的培养液中含有诱导物质,透析表明,它是大分子化合物,可用酒精沉淀下来,紫外光谱测定结果,它是核糖核蛋白体,1956年本文作者用RNase及胰蛋白酶分别处理,初步证明其中诱导因子是核糖核酸^[70]。后来又从牛胸腺提取核糖核蛋白体^[71]。分别用胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶处理,发现蛋白质的成份减少26—60%,诱导功能消失,消减功能的主因是外加酶有损外胚层细胞功能,不因蛋白质的减少。若用RNase处

理后, RNA 含量减低 40—70%, 功能相应减少, 如果再加 RNA 使其含量恢复到原来水平, 诱导功能也恢复到原来程度。纯化的胸腺 RNA 能诱导美国加州蝶螈外胚层分化为似胸腺体^[71]。肾脏 mRNA 则诱导肾小管的形成^[72](图版 I 图 4)。

RNA 不只对外胚层细胞起诱导作用, 对小白鼠的腹水癌细胞也有影响。荧光自显影法及化学分析表明用肝 H³-RNA 处理的癌细胞, H³-RNA 完整地进入细胞核^[73], 测定它们合成蛋白质的种类, 其中有新合成的白蛋白^[74]及色氨酸加氧酶^[75], 这两种皆是肝脏特有的蛋白质。如果注射肝脏 mRNA 到已去卵巢的小白鼠退化的输卵管中, 它诱导输卵管壁细胞合成白蛋白^[76]。输卵管 mRNA 能像雌激素样的促使退化的输卵管恢复正常形态^[77, 78]。

mRNA 是诱导物质已如上述, 什么 mRNA 具有像背唇那样能诱导次级胚胎形成的功能呢? 我们从鸡的心脏及睾丸提纯 mRNAs, 分别处理体外培养发育到第四期的鸡胚盘, 对照组用生理盐水处理, 24 小时后, 对照组发育正常, 而用心脏 mRNA 处理的胚胎中脑、眼发育不正常, 心脏特别发达, 缺少体节^[79](图版 I 图 5)。用睾丸 mRNA 处理的胚盘, 上部有个正常胚胎, 胚胎下部有个小的第二个体出现^[80](图版 I 图 6, b)。若把孵育到第四期胚盘横切, 分为上下两部, 分别用睾丸 mRNA 处理, 24 小时后, 上部发育的有主头及附头(图版 I 图 6, c), 附头相当于背唇所诱导的次级胚胎; 下部发育为似脑的神经组织。以上实验首次表明生殖器官与非生殖器官 mRNAs 对发育的影响有不同的特异功能。

心脏 mRNA 能加强鸡胚盘心脏的发育, 它是否也能诱导心脏的产生呢? 我们采用上面所用的胚盘下部, 分别用心脏及脑 mRNA 处理, 所得结果是用心脑 mRNA 处理后, 得到管状心脏^[81, 82](图版 II 图 7, a) 或跳动的一圈肌细胞^[83, 84](图版 II 图 7, b, c)。电镜下心肌中有肌纤维、糖元等, 心肌跳动的次数与体外

培养的心脏相同。心肌细胞也具有乙酰胆碱酯酶^[85], 也有心肌样地电刺激反应^[86, 87]。用脑 mRNA 处理后, 得到神经组织(图版 II 图 7, d), 由此可见不同器官提取的 mRNA 分别诱导不同器官的形成^[88-91]。

从心脏多聚核糖体 RNA 分离的 7S RNA, 具有同 mRNA 样的诱导功能, 但无转译蛋白质的能力(总述)^[92], 因此它诱导的机理就与 mRNA 不同。Siddiqui 实验室对 7S RNA 诱导作用的机理特感兴趣, 因为它可能像小分子群的强化因子、启动子等, 对结构基因的作用, 插入 DNA 的顺序结构(互相交插的重复顺序及结构基因^[93])中有重复顺序。从 HeLa 细胞系提出的小分子 7SRNA, 可与人 DNA 结构中的重复顺序杂交^[94], 但是鸡心脏提出的小分子 7SRNA 与 DNA 的重复顺序的关系尚待进一步的研究^[92]。

为证明脊索的特殊功能, 我们从第五期鸡胚盘取出头突(脊索), 从中分离并纯化 RNA, 用它来处理切除头突的鸡胚盘, 对照组用生理盐水处理^[95]。培养 24 小时后, 对照组的胚胎, 前后两脑畸形, 或缺少, 也没有眼及脊索。用脊索 RNA 处理的胚胎, 脑正常, 也有脊索, 有的重复(图版 II 图 8, b), 有的加大(图版 II 图 8, c)。用脑 RNA 处理切除头突的胚盘, 脑发育正常, 有的重复(图版 II 图 8, d), 但缺脊索。这些实验表明脊索 RNA 的功能有二, 即诱导脊索的形成及诱导脑的产生。

有些胚胎学家采用植入法或夹层法, 用胚胎或动物器官(死的、活的、或提取的物质)研究它们对外胚层的诱导。J. Holtfreter 早在 1933—1934 年就开始这类工作。40 年代左右, 中国的庄孝德及芬兰的 S. Toivonen 分别用动物器官研究前脑、后脑及躯尾诱导, 随后各国胚胎学家相继工作, 近年来着重研究神经诱导及中胚层诱导两类。50 年代前后, Toivonen 及 Kuusi 用石油醚提取天竺鼠肝及肾脏中物质, 发现肝中的能诱导前脑, 肾中的提取物诱导躯尾器官^[96]。若用胰及胃蛋白酶处理后, 诱导功

能消失。RNase 处理后, 诱导功能一般消失, 但少数情况下仍存在。1956年 H. Tiedemann 从 9—13 天的鸡胚胎中, 用剧烈的化学方法提取一种蛋白质, 分子量大约 25,000, 电泳后得出一条带。将不溶解的小块蛋白质, 植入原肠胚腔中^[97], 产生躯尾诱导的器官(图版 II 图 9), 与晚期背唇所诱导的相同。T. Yamada 及 Y. Hayashi 也从肝、肾及骨髓提取核糖核蛋白体, 用夹层法作实验, 发现从肝提取的物质能诱导前脑, 从骨髓提取的物质能诱导产生躯尾。Hayashi 发现核糖核蛋白体经胰及胃蛋白酶分别处理后, 蛋白质含量大大减少, 也失去诱导能力(但未说明功能的消失与加进的蛋白酶有无关系)。经 RNase 处理后, 仍有诱导能力(未提有无残留的 RNA), 根据这些实验认为核糖核蛋白体中的诱导者是蛋白质^[98]。本文作者曾分析纯化的核糖核蛋白体, 经 RNase 处理后, 至少仍有 5% 以上的 RNA^[71]。我们知道流行病毒的成份, 99% 是蛋白质, DNA 只有 1%; 烟草病毒的蛋白含量是 94%, RNA 6%, 但二者的病源是核酸, 不是蛋白质引起的。虽然如此, 仍有发育生物学家认为蛋白质是诱导物质, 原因有二: (甲) 根据 Toivonen, Tiedemann, Yamada 等实验结果及(乙) 近年发现有些生长因子, 如成纤维细胞生长因子(简称 FGF^[99-102]), 转化生长因子(简称 TGF^[103-106]) 等属于调节基因转录的因子^[107-109], 能分别诱导爪蟾囊胚的动物极细胞发育为中胚层, 若将哺乳动物中提纯的 TGF- B_2 及 FGF 混合, 诱导功能大大增强^[110]。Kimelman 等认为爪蟾卵中 FGF(蛋白质)是自然的诱导物质^[99], 但照 Slack 及 Isaacs 所定标准, FGF 不合乎自然诱导物质的条件^[101], 重要原因是注射 FGF 到囊胚腔中后, 胚胎的发育变为不正常, 推迟原肠期的进展, 增生异位肌细胞, 制止血球及心脏的形成^[111]。

Smith 培养爪蟾 XTC 及 XL 两细胞系, 发现其细胞渗出液中有中胚层诱导因子(XTC-MIF), 能诱导囊胚期的动物极细胞分化为中

胚层的各样器官: 脑、脊索、肌细胞、肾管、充间质及色素细胞^[112](图版 II 图 10)。这个诱导因子不被透析, 分子量为 235,000, 抗热, 热处理后功能倍增, 胰蛋白酶处理后功能消失。对酶处理后的样品加与酶等量大豆蛋白质抑制剂, 再看诱导效率, 才能决定蛋白酶处理后功能的消失是因蛋白质含量减少? 还是由于外加酶对反应细胞的副作用而减少? 奇怪的是对这类问题未加考虑, 就认定 XTC 细胞所分泌的诱导物质是蛋白质^[112]。后来又把它进一步纯化^[113], 测定对囊胚动物极的诱导功能, 包括注射进囊胚腔后对发育的影响: 生长迟缓, 增生异位肌细胞, 中轴尾部分叉等, 与注射 FGF 后所获结果大同小异^[114], 因此又把从爪蟾提取的 FGF(XbFGF)及纯化的 XTC-MIF(TGF- β 的一种)的诱导功能作了比较^[115]。Cooke 及 Smith 提出胚胎中胚层的形成是由两种诱导物质: XTC-MIF 及 XbFGF 共同作用的结果, 前者是中胚层前背部的诱导者, 后者是中胚层后腹部的诱导者^[116]。为证明这种诱导形成的中胚层具有组织者的资格, 注射 XTC-MIF 入囊胚的囊胚腔中, 30 分钟后, 从顶部切出小块(约 200 个细胞), 移植入另外一个囊胚下赤道区(中胚层)的腹部, 即产生一个新个体^[111, 114], 利用这种研究, Cooke 深入实验, 结果使他认为 Smith 的蛋白质相当于 Spemann 背唇中的诱导物质^[117]。与此相反的, 50 年代培养蝶螈背唇所得的诱导物质是核糖核蛋白体, 其中有功能的成份是核糖核酸^[68, 76-72]。

从动物组织中所提取的, 以及从培养 XTC 系细胞所得培养液中的诱导物质, 经 Toivonen, Tiedemann, Yamada, Smith 等研究, 认为是蛋白质。这些不同来源的蛋白质, 都可诱导外胚层细胞分化成为中胚层的各种不同器官, 但未有实验说明蛋白质在正常卵发育中的功能: 诱导作用或自主分化。诱导是前边说过的 mRNA 或者蛋白质能刺激外胚层细胞引起生长与分化, 自主分化是卵裂细胞中含有器官形成物质, 如受精卵中的生殖质, 经卵裂而分入一

些细胞, 主动地要这些细胞形成性腺。

80年代发育生物学家的研究, 都沿以调节基因的方向, 分析生长与分化, 卵裂期的染色体由细胞质控制, 细胞质内什么物质? 灰色新月中什么物质? 生殖质中什么物质? 为解答这些问题所做实验不同, 结论要同样能解释正常卵发育中器官的形成。譬如爪蟾卵及胚胎中含有FGF一类蛋白质, 它能诱导体外培养囊胚的动物极形成中胚层, 但注射到囊胚腔后所发育的胚胎, 根本不像FGF在体外培养时所诱导形成的器官, 所以它不是自然诱导物质。XTC-MIF来自爪蟾的细胞系, 具有诱导中胚层器官形成的功能, 与FGF一样地不是自然诱导物质。前边谈到诱导物质及自主分化物质, 皆是mRNA。本文作者认为mRNA(储存受精卵内)才是真正的诱导-自主分化物质, 这是因为, 它不仅在离体的条件下具有诱导作用, 而且在卵的正常发育中也可证明。现以兔血红蛋白mRNA为例, 加以论述:

表 逆转录酶催化cDNA合成的必需品

反应系	平均 CPM 数	标准离差	阻化%
全	4263	±239	0
-dCTP	1097	±94	74
-dATP	1325	±85	69
-dGTP	931	±135	78
-MgCl ₂	2256	±115	47
-Fe ⁺⁺⁺	749	±100	82
+RNA-A, 10 ug, 100°C, 10分钟	1022	±89	75
+mRNA先与上述培育	62	±8	100
+放线菌素D, 10 ug	4202	±174	0

注射兔血红蛋白mRNA到金鱼的受精卵, 它一方面转译血红蛋白^[118], 另一方面合成cDNA^[119, 120]。两种产物中哪个直接参与红血球的形成呢? Gurdon等研究外源兔血红蛋白mRNA转录产物、血红蛋白的分布, 发现在尾芽期的各组织中都可见到: 没有集中在某一区的现象。为了讨论cDNA与红血球形成的关系, 首先得弄清血红蛋白mRNA在受精卵中

能否转录cDNA的问题, 而卵中是否有逆转录酶(简称RT)则是前提。Beljanski等已从鱼卵中提取到RT, 其特点是需要三价铁离子的激活^[121](表), 为证明卵细胞内合成cDNA, 可采用去核金鱼卵和去核后化学药品激活的海胆卵进行实验。图版II图11是去核金鱼卵, 注射H³-胸苷2—4小时后, 切片经脱氧核糖核酸酶处理与不处理的放射自显影照片, 从处理组(图版II图11, b)照片上可清楚看到银颗粒的大量减少, 这表明新合成DNA的存在。另外, 从注射兔血红蛋白mRNA的去核鱼卵, 培育3—4小时后提取的DNA, 再与p³²标记的兔DNA作探针杂交^[122], 结果表明, DNA中含有兔血红蛋白基因的同位序列(图版II图12), 这种结果在去核的海胆卵中所合成的DNA可与p³²标记的组蛋白基因做分子杂交, 也得到了证实^[123]。那么, 注射到受精卵的外源mRNA转录的cDNA是不是像劳斯氏肉瘤病毒进入肌细胞, 插入染色体呢? 我们从注射过mRNA的鱼卵发育到成鱼时提取DNA, 对照组用正常鱼DNA, 经内切酶处理, 然后用兔血红蛋白基因作探针, 分别做分子杂交^[122], 结果表明, 注射mRNA的鱼, 其DNA中含有兔血红蛋白基因同源序列(图版III图13)。假若把以兔血红蛋白mRNA合成的H³-cDNA注入受精卵, 囊胚期时再注射秋水仙素(5 ug/ml)到10—20个囊胚腔中, 对照组注射生理盐水, 2—4小时后固定, 分别做放射自显影^[122], 结果表明, 这些H³-cDNA插入到染色体中(图版III图14)。注射鱼成熟后, 兔mRNA转录的cDNA表达只限于鱼的红血球, 它含有兔血红蛋白(图版III图15, a), 其乳酸脱氢酶呈现鱼及兔的杂交型(图版III图15, b)。

综上所述, 本文作者认为, 胚胎诱导的研究, 经历一段十分复杂的过程。对此, 许多发育生物学家已做了大量的探索工作, 在围绕什么是诱导物质和自主分化物质的问题上, 归纳起来有两种不同的看法。一种认为, 蛋白质是诱导物质, 持这种见解的人, 确实观察到许多表明

蛋白质具有诱导作用的现象,但缺乏证明蛋白质在卵的正常发育中具有诱导作用和自主分化的功能。另一种见解是,认为核糖核酸是发育过程中诱导和自主分化的物质,它以丰富的实验结果证明,信使核糖核酸不仅在离体情况下具有诱导各器官形成的功能,而且在受精卵插进RT合成cDNA,像有活性的假基因一样,中与囊胚中期细胞的染色体^[126],把外源基因的特异功能表现于产物。

图版说明

图版 I

1. 移植一块背唇到另一原肠胚(a, b), 移植块的自体分化与诱导(c, d)。c, 来自移植块的组织用深色表示, 被诱导产组织用浅色表示。

Primordia of Notochord 脊索, Somites 肌节, Entoderm 内胚层原基

2. 条件培养液中, 外胚层细胞分化出来的神经组织, 神经元具有放射神经纤维。

3. (a) 上左边, 悬滴法培养蝶螈尾部神经板(P-MP)及长出的成肌细胞; 右边, 12天后把10—20个蝶螈外胚层细胞放进悬滴液中所分化的成肌细胞(引进外胚层细胞23天后的照片)。(b) 培养蝶螈PMP 14天后, 引进外胚层细胞所发育的成肌细胞(引进外胚层细胞25天后的放大照片)。

4. 用脊髓抽出物处理外胚层细胞后, 再用肾RNA处理所诱导形成的外植体的横切片, T, 原肾管, ME, 间质。

5. (a, b), 用心脏mRNA体外处理培养第四期鸡胚盘; 22小时后所发育的两个胚胎。c, 没有处理的对照。H, 心脏; OP₁ 眼球; S, 体节。

6. (a) 体外培养第四期鸡胚盘, 19小时后的正常胚胎; (b) 睾丸mRNA(60 O. D./ml)处理, 24小时后的胚胎, 第二个体(次级胚胎)在中轴的直下端; (c) 同样mRNA处理第四期鸡胚盘上部所产生的双头胚胎(1°及2°分别是初级及次级胚胎)。

图版 II

7. (a) 从亨森氏结下0.6 mm横切16小时鸡胚盘, 用鸡心脏mRNA处理下部, 培养五天后, 经管状

心脏的横切片。(b) 经跳动的海绵状的心肌细胞切片; 心跳次数每分钟25—30。(c) 密集的心肌细胞; (d), 脑mRNA处理后的横切片。E, 内心膜; EM, 心外肌膜; H, 管状心; M, 心成肌细胞; NT, 神经管; P, 神经板; Me, 间充质。

8. 第五期鸡胚盘体外发育24小时后, 脑之横切片。(a) 正常脊索, N. B-D 鸡胚盘的头突都已切除, (b) 用0.5 mg/ml的N-RNA处理, 培养24小时后, 头部的横切片, 具有正常脑及两个脊索, N. (c) 具有一个加大的脊索, N. (d) 用0.5 mg/ml的B-RNA处理, 培养24小时后, 头部横切片, BV, 双脑, 但无脊索。

9. Tiedemann从9—13天鸡胚胎提取的蛋白质, 不溶解的小块, 植入原肠胚的囊胚腔中, 诱导形成次级胚胎的横切片。M. i, 诱导的肌肉; N. i, 诱导的脊索; P. i, 诱导的原肾管。

10. Smith XTC 条件培养液, 诱导囊胚期动物极细胞所产生外植体的横切片。(a) 外植体中有脊索(Not), 肌肉(Mus), 肾(Kid), 间充质(MES)及间皮(Meso)。(b) 外植体中有大量脊索(Not), 神经表皮(Neur)及黑色细胞(Mel)。

11. 注射³H胸苷到金鱼受精卵, 30—60分钟后固定切片的放射自显影照片。(a) 表示银颗粒分布于受精卵的细胞质中及(b)经DNase消化后的照片, 银颗粒大量减少。

图版 III

12. 用兔³²P-DNA(10⁸ cpm/μg)体探针, 分别与注射兔血红蛋白mRNA的及未注射(N)的去核金鱼卵中DNA杂交(浓度X, 2X及3X)。前者在23.5及9.7 Kb间具有杂交带, 后者无带。N, 10—15 μg; X, 5—10 μg; 2X, 10—20 μg及3X, 15—30 μg; R, 注射mRNA的成熟鱼中DNA(5 μg);

13. ³H兔血红蛋白基因与内切酶(Pst 1)所消化的从注射mRNA成鱼DNA杂交。M, 标记; GiPs, 内切酶消化后DNA的片段; P, pRcB(阳性对照)。

14. 注射³H兔血红蛋白cDNA到金鱼受精卵, 发育到囊胚期, 一批注射秋水仙素5 μg/ml一批注射生理盐水, 2—3小时后, 固定切片后作放射自显影片, (a) 注射生理食盐水或不注射的囊胚的照片, 银颗粒在细胞核内。(b) 注射过秋水仙素的囊胚照片, 银颗粒在分裂中期的染色体上。

15. (a) 欧氏琼脂扩散测验, 两个中间孔装抗兔

血红蛋白血清,四角装组织或细胞提出蛋白。右上角及左下角装注射兔血红蛋白 mRNA 鱼的血红蛋白,出现沉淀带,其他三孔装未注射鱼的血红蛋白,注射肝蛋白及兔血红蛋白 mRNA。(b) 乳酸脱氢酶图谱: GC, 从正常金鱼的红细胞。E, 从注射兔血红蛋白 mRNA 鱼的红细胞。RC, 从兔红细胞。注射兔血红蛋白 mRNA 鱼的红细胞具有鱼兔杂交型的乳酸脱氢酶。

参 考 文 献

- [1] Brothers, A. J., 1976, *Nature*, 260: 112-115.
- [2] Etkin, L. D. and S. Balcells., 1985, *Develop. Biol.*, 108: 173-184.
- [3] Gurdon, J. B. et al., 1985, *Cell*, 41: 913-922.
- [4] Krieger, P. A. et al., 1989, *Develop. Biol.*, 133: 93-100.
- [5] Newport, J. and M. Kirschner., 1982, *Cell*, 30: 675-686.
- [6] Newport, J. and M. Kirschner., 1982, *Cell*, 30: 687-696.
- [7] Asashama, M., 1980, *Roux's Arch. Develop. Biol.*, 188: 123-126.
- [8] Grant, P. and J. F. Wacaster., 1972, *Develop. Biol.*, 28: 454-471.
- [9] Curtis, A. S. G., 1960, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 8: 163-173.
- [10] Curtis, A. S. G., 1962, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 10: 410-422.
- [11] Blackler, A. W., 1959, *J. Embryol. exp. Morph.*, 6: 491-503.
- [12] Blackler, A. W. and M. Fishberg. 1961, *J. Embryol. exp. Morph.*, 10: 641-651.
- [13] Holwill, S. et al., 1989, *Development*, 100: 735-743.
- [14] Smith, L. D., 1966, *Develop. Biol.*, 14: 330-347.
- [15] Hegner, R. W., 1914, *J. Morph.*, 25: 375-510.
- [16] Briggs, R., 1972, *J. Exp. Zool.*, 181: 271-280.
- [17] Whitaker, J. R., 1973, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 70: 2096-2100.
- [18] Dohmen, R. and N. H. Verdonk., 1979, In "Maternal effects in development", ed by D. R. Newth and M. Bulls, P. 127. Cambridge University Press.
- [19] Clement, A. C. 1952, *J. Exp. Zool.*, 121: 593-625.
- [20] Tiedemann, H., 1966, In "Current topics in developmental Biology" ed by A. A. Mořcona and A. Monroy PP. 85-112. Academic Press
- [21] Blow, J. J. and R. A. Laskey., 1988, *Nature*, 332: 546-548.
- [22] Harland, R. M. and R. A. Laskey., 1980, *Cell*, 21: 761-771.
- [23] Garen, A. and W. Gehring., 1972, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 69: 2982-2985.
- [24] Okada, M. et al., 1974, *Develop. Biol.*, 37: 55-67.
- [25] Yu, H. J. et al., 1987, *Scientia Sinica*, 30: 487-494.
- [26] Brachet, J., 1977, In "Current topics in Developmental Biology" 11: 133-186.
- [27] Manes, M. E. and F. D. Elinson., 1980, *Roux's Arch. Develop. Biol.*, 189: 73-76.
- [28] Vincent, J. P. and J. C. Gerhart., 1987, *Develop. Biol.*, 123: 526-539.
- [29] Malacinski, G. W. et al., 1977, *Develop. Biol.*, 56: 24-39.
- [30] Scharp, S. R. and J. C. Gerhart., 1985, *Develop. Biol.*, 79: 181-198.
- [31] Youn, B. W. and G. W. Malacinski., 1981, *Develop. Biol.*, 83: 339-352.
- [32] Gimlich, R., 1985, *J. Embryol. exp. Morph.*, 89: supplement, PP. 89-111.
- [33] Cooke, J. and J. C. Smith., 1987, *Development*, 99: 197-210.
- [34] Elinson, R. P. and P. Pasceri., 1989, *Development*, 106: 511-518.
- [35] Smith, L. D., 1966, *Develop. Biol.*, 14: 330-347.
- [36] Gerhart, J. et al., 1981, *Nature*, 292: 511-516.
- [37] Tanabe, K. and M. Kotani., 1974, *J. Embryol. exp. Morph.*, 31: 89-98.
- [38] Okada, M. et al., 1974, *Develop. Biol.*, 37: 43-54.
- [39] Warn, R., 1975, *J. Eubryol. exp. Morph.*, 33: 1003-1011.
- [40] Togashi, S. et al., 1986, *Develop. Biol.*, 118: 352-360.
- [41] Kobayashi, S. and M. Okada., 1989, *Development*, 107: 735-742.
- [42] Tung, T. C. and M. C. Niu., 1973, *Scientia Sinica*, 16: 377-384.
- [43] Woodland, H. R. and E. A. Jones., 1987, *Development*, 101: 925-930.
- [44] Niu, L. C. et al., 1981, In "The Role of RNA in Development and Reproduc-

- tion" ed. by M. C. Niu and H. H. Zhuang pp. 407-414. Science Press, Beijing and van Nostrand Reinhard, New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne.
- [45] Balinsky, B. I., 1981, In "An Introduction To Embryology" PP. 262-271. Saunders college publishing co., Philadelphia
- [46] Hamburger, V. and J. Holtfreter. 1955, In "Analysis of Development", ed. by Willier, Weiss & Hamburger, 230-296.
- [47] Yisraeli, J. K. et al., 1989, *Development*, 1989, Supplement, PP. 31-36.
- [48] Greeman, G. (1976), *Develop. Biol.*, 49: 143-177.
- [49] Wessells, N. K., (1977, Tissue interactions and development. W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA.
- [50] Cooke, J. and J. A. Webber., 1985, *J. Embryol. exp. Morph.*, 88: 85-112.
- [51] Dale, L. and J. M. W. Slack., 1987, *Development*, 99: 527-551.
- [52] Elinson, R. P. and K. R. Kao., 1989, *Develop., Growth and Diff.*, 31: 423-430.
- [53] Gehart, J. C., 1987, *Am. Zool.*, 27: 593-605.
- [54] Gimlich, R. L., 1985, *J. Embryol. exp. Morph.*, 89 (suppl), 89-111.
- [55] Gurdon, J. B. et al., 1985, *J. Embryol. exp. Morph.*, 89 (Suppl), pp. 125-136.
- [56] Kao, K. R. and R. P. Elinson., 1988, *Develop. Biol.*, 132: 81-90.
- [57] Masho, R., 1988, *Develop., Growth and Diff.*, 30: 347-359.
- [58] Moody, S. A., 1987, *Develop. Biol.*, 119: 560-578.
- [59] Moody, S. A., 1987, *Develop. Biol.*, 122: 300-319.
- [60] Takasaki, H., 1987, *Develop., Growth and diff.*, 29: 141-152.
- [61] Yisraeli, J. and D. Melton., 1988, *Nature*, 336: 592-595.
- [62] Dale, L. and J. M. W. Slack., 1987, *Development*, 100: 279-295.
- [63] Gurdon, J. B. et al., 1989, *Trends in Genetics*, 5: 51-56.
- [64] Nieuwkoop, P. D., 1969, *Roux's Arch.*, 162: 341-373.
- [65] Nakamura, O. et al., 1970, *Proc. Japan Acad.*, 47: 313-318.
- [66] Nieuwkoop, P. D. and G. A. Ubbels., 1972, *Roux's Zrch. Entwmech. Org.* 185-199.
- [67] Boterenbrood, E. C. and P. D. Nieuwkoop., 1973, *Roux's Arch. Develop. Biol.*, 173: 319-332.
- [68] Niu, M. C. and V. C. Twitty 1953, *Proc Nat'l Acad. Sci.*, 39: 895-889.
- [69] Sala, M., 1955, *Proc. Acad. Sci., Amsterdam, Series C*, 58: 635-647.
- [70] Niu, M. C., 1956, In Rudnick, D. (ed) "Cellular mechanisms in differentiation and growth", pp. 155-171. Princeton University Press.
- [71] Niu, M. C., 1958, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 44: 1264-1274.
- [72] Niu, M. C. and N. Sasaki., 1971, *Exp. Cell Res.*, 64: 57-64.
- [73] Niu, M. C. et al., 1968, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 128: 550-555.
- [74] Niu, M. C. et al., 1961, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 47: 1689-1700.
- [75] Niu, M. C. et al., 1962, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 48: 1964-1969.
- [76] Yang, S. F. and M. C. Niu., 1977, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 74: 1894-1898.
- [77] Mansour, A. M. and M. C. Niu., 1965, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 53: 764-770.
- [78] Yang, S. F. and C. Y. Hsu., 1970, *Proc. Soc. exp. Biol. Medicine*, 133: 485-489.
- [79] Niu, M. C. and L. Mulherkar., 1970, *J. Embryol. Exp. Morpho.*, 24: 33-42.
- [80] Lee, H. Y. and M. C. Niu., 1973, In "The Role of RNA in Development and Reproduction" ed. by M. C. Niu & S. J. Segal. pp. 137-154. North Holland/American Elsevier, Amsterdam and New York,
- [81] Niu, M. C. and A. K. Deshpande., 1973, *J. Embryol. Exp. Morph.*, 29: 485-501.
- [82] Deshpande, A. K. et al., (1973), In "The Role of RNA in Development and Reproduction" ed. by M. C. Niu and S. J. Segal. pp. 229-246. American Elsevier Publishing co., Amsterdam and New York,
- [83] Deshpande, A. K. and M. A. Q. Siddiqui., 1977, *Develop. Biol.*, 58: 230-247.
- [84] Deshpande, A. K. et al., 1977, *J Biol. Chem.*, 252: 6521-6527.

- [85] Deshpande, A. K. and M. A. Q. Siddiqui., 1978, *Differentiation*, 10: 133-137.
- [86] McLean, M. J. et al., *Science*, 191: 297-299.
- [87] Sperelakis, N. et al., 1981, In "The Role of RNA in Development and Reproduction" ed. by M. C. Niu and H. H. Zhuang, pp. 730-771. Science Press, Beijing and van Nostrand Reinhard, New York, Cincinnati, Toronto, London and Melbourne.
- [88] Sanyal, S. and M. C. Niu., 1966, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 55: 743-750.
- [89] Noto, T. and M. L. N. Shiotsuki., 1973, *Develop., Growth & Diff.*, 15: 329-335.
- [90] Niu, M. C. and A. Leikola., 1968, *Biol. Bull.*, 135: 200-207.
- [91] Ranzi, S. and F. De Bernardi., 1983, In "Control of embryonic gene expression", ed. by M. A. Q. Siddiqui pp. 115-166. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- [92] Siddiqui, M. A. Q., 1983, In "Control of embryonic gene expression", ed. by M. A. Q. Siddiqui. pp. 255-279. CRC Press.
- [93] Weiner, A. M., 1980, *Cell*, 22: 209-218.
- [94] Davidson, E. H., 1976, *Gene activity in early development*, 2nd ed., Academic Press, New York, San Francisco and London.
- [95] Hillman, N. and M. C. Niu., 1963, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 50: 486-493.
- [96] Saxen, L. and S. Toivonen., 1962, *Primary embryonic induction*, Logos Press & Academic Press.
- [97] Tiedemann, H. and H. Tiedemann., 1956, *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, 314: 156-176.
- [98] Yamada, T., 1958, In "A symposium on chemical basis of development" ed. by W. McElroy & B. Glass. pp. 217-238. John Hopkins Univ. Press.
- [99] Kimelman, D. et al., 1988, *Science*, 242: 1052-1056.
- [100] Slack, J. M. W. et al., 1987, *Nature*, 326: 197-200.
- [101] Slack, J. M. W. and A. V. Isaacs., 1989, *Development*, 105: 147-153.
- [102] Slack, J. M. W. et al., 1989, *Development*, 1989 supplement, pp. 141-148.
- [103] Dale, L. et al., 1989, *EMBO J.*, 8: 1057-1065.
- [104] Rizzino, A., 1988, *Develop. Biol.*, 130: 411-422.
- [105] Rosa, F. et al., 1988, *Science*, 239: 783-785.
- [106] Tannahill, D. and D. A. Melton., 1989, *Development*, 106: 775-785.
- [107] Godsave, S. F. et al., 1988, *Development*, 102: 555-566.
- [108] Gillespie, L. L. et al., 1989, *Development*, 106: 203-208.
- [109] Wright, C. V. E. et al., 1989, *Trends Biochem. Sci.*, 14: 52-56.
- [110] Kimelman D. and M. Kirschner., 1987, *Cell*, 51: 869-877.
- [111] Cooke, J. et al., 1987, *Development*, 101: 893-908.
- [112] Smith, J. C., 1987, *Development*, 99: 3-14.
- [113] Smith, J. C. et al., 1988, *Development*, 103: 591-600.
- [114] Cooke, J. and J. C. Smith., 1989, *Develop. Biol.*, 131: 383-400.
- [115] Green, J. B. A. et al., 1990, *Development* 108: 173-183.
- [116] Smith, J. C. et al., 1989, *Development*, 1989, Supplement, pp. 149-159.
- [117] Cooke J., 1989, *Development*, 107: 229-241.
- [118] Gurdon, J. B. et al., 1974, *Develop. Biol.*, 39: 125-133.
- [119] Niu, M. C., 1985, *Cell differentiation*, 16 (suppl): 40 S.
- [120] Niu, M. C., 1986, *J. Shandong Univ.*, 21: 100-108.
- [121] Beljanski, M. et al., 1988, *Cell. Mol. Biol.*, 34: 17-25.
- [122] Niu, M. C. et al., 1989, *Cell. Mol. Biol.*, 35: 333-345.
- [123] Fu Ming-hua, 1987, Synthesis of histone cDNA in sea urchin eggs. A thesis submitted to the Faculty of Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, for partial fulfillment of the requirement for a Master Degree.
- [124] Kalthoff, K., 1971 *Roux's Arch Entw-mech. org.*, 168: 63-84.
- [125] Kandler-Sanger, I. and K. Kalthoff., 1976, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 73: 3739-3743.
- [126] Weiner, A. M. et al., 1986, *Ann. Rev.*

- Biochem.*, 55: 631-661.
- [127] De Roberts, E. M. et al., 1989, *Cell*, 57: 189-191.
- [128] Mohun, T. J. et al., 1989, *Development*, 107: 835-846.
- [129] McMahon, A. P. and R. T. Moon., 1989, *Cell*, 58: 1075-1084.
- [130] Berleth, T. et al., 1988, *EMBO J.*, 7: 1749-1756.
- [131] Manseau, L. J. and T. Schupbach. 1989, *Trends in Genetics*, 5: 400-405.

哺乳动物早期胚胎细胞的极性与分化

韩贻仁

(山东大学生物系)

极性是动物细胞较普遍存在的属性。哺乳动物早期胚胎在发育过程中,细胞亦发生明显的极性变化,这种变化称为极化(polarization)。分裂球极化一词最早是在1977年由Ducibella^[1]提出来的,系指细胞在原位产生极性。后来逐渐演变成指细胞持续接触出现的变化,分散成单个细胞后仍保持着的极性。哺乳动物早期胚胎细胞的极性主要表现为细胞表面不同部位的形态和成分的差异,细胞器和细胞质物质的定向不均匀分布,以及代谢强度的轴性差异等^[2]。本文拟就高等哺乳动物特别是小鼠的早期胚胎细胞的极性变化与分化的研究进展做初步讨论。

一、8-细胞阶段以前细胞出现不稳定的极性

实验证明,许多种动物的受精卵通过有丝分裂产生的细胞后代,由于彼此继承了不同性质的细胞质而向着不同方向分化,表现出了细胞质对细胞分化的决定作用和对分化程序的调节作用。哺乳动物胚胎细胞的分化是否亦如此?近十几年来发育生物学家做了大量研究。

哺乳动物的卵子为均黄卵,物质分布比较均匀,在猪卵中虽有差异,也只是显示出少量滋养物(deutoplasm)分散在细胞质外质中,故哺乳动物卵内的物质在形态上未表现出轴性分

布,卵无明显的极性。然而,通常大家把产生极体的部位定为动物极,对面定为植物极。二者之间构成了假想的动植物极卵轴^[3]。尽管如此,根据对一些指标的测定表明,卵子质膜和细胞质成分还是存在着一定的区域差异。

迄今被作为早期胚胎细胞极化的主要指标有细胞表面微绒毛、Con A 结合部位、溶酶体、笼形蛋白(clathrin)和细胞骨架分布,以及用活体染色显示出的线粒体动态定位^[4]。在电镜下可以看出,刚排出的卵母细胞,在减数分裂纺锤体邻近的质膜上有一无 Con A 结合部位区,此区无微绒毛,质膜下方无皮质颗粒^[5],其面积约占细胞表面的20%,精子不在此区内入卵。受精时在受精锥处形成了第二个无 Con A 结合部位区。在无 Con A 结合部位区的质膜下方集中有丰富的肌动蛋白^[6]。随着雌、雄原核向卵中央汇合,肌动蛋白丝的分布逐渐均匀,无 Con A 结合部位区也逐渐消失。

第一次卵裂时装配成的纺锤体与“假想的”动植物极卵轴垂直,故第一次卵裂面与卵轴方向一致。根据许多学者和我们的观察,小鼠受精卵的第一次卵裂面总是发生在邻近极体排出的部位^[7](图1)。由此可见,第一次卵裂面的方

文中示意图系由朱和平同志协助绘制,特致衷心谢意。