

H-Y 抗原在性分化中的作用*

桂建芳

(武汉大学生物系)

1955年, Eichwald 和 Silmsner^[1] 在高度纯化的小鼠之间进行皮肤移植时发现, 在同性个体之间互相移植, 或将雌性个体的皮肤移植到雄性个体上, 均不发生排斥反应, 表现为相容; 但是当将雄性个体的皮肤移植到雌性个体时, 发生排斥反应, 表现为不相容。因此他们推测在雄性个体的皮肤细胞的表面具有一种雌性个体所没有的特殊物质, 从而引起雌性个体产生免疫排斥反应。鉴于控制小鼠组织相容性抗原表达的基因已命名为 H-1, H-2, H-3, …… , 所以他们称这种物质为组织相容性-Y 抗原 (histocompatibility-Y antigen), 简称 H-Y 抗原。这一发现, 为后来的 H-Y 抗原研究奠定了基础。1971年, Goldberg 等^[2] 在接受雄组织移植的纯系雌性小鼠的血清中, 发现了 H-Y 抗体, 这种抗体在兔补体存在下, 对鼠精子有细胞毒性作用。根据这一特性, 如果某种细胞表面具有 H-Y 抗原, 这种细胞就可吸收 H-Y 抗体, 经过细胞吸收的抗血清中的抗体浓度就会减少, 因而对精子的细胞毒性就会降低, 所以失去或减弱杀死精子的能力。如待检细胞表面无 H-Y 抗原, 则抗血清中的 H-Y 抗体不被吸收, 抗血清仍具有细胞毒性。利用这一特性, 将用待检细胞吸收过的 H-Y 抗血清与小鼠精子和兔补体混合, 并用台酚蓝染色, 借精子死伤(即台酚兰着色)的比例来判断待检细胞表面有无 H-Y 抗原。随后研究者们用小鼠尾部的表皮细胞, 8 细胞期的小鼠胚胎, Raji 细胞和大鼠睾丸的 Leydig 细胞代替小鼠精子, 也获得了满意的结果^[3]。进而, 人们利用抗原-抗体特异性结合的原理, 又相继出现了混合血吸附杂交抗体试验 (mixed hemadsorption hybrid antibody test, 即 MHA·HA test);

应用产生 A 蛋白的金黄色葡萄球菌 (SA) 与抗体结合的特性, 而发展成为以金黄色葡萄球菌作为标志的简单检测技术; 还有用溶血为标志检测 H-Y 抗原的方法以及用细胞离散-重组织 (dissociation-reorganization) 等技术^[4]。特别是改用高度自交系的雄性小鼠的脾和淋巴结细胞连续数次腹腔免疫而制备 H-Y 抗血清, 以及用近交系大鼠的雄鼠细胞免疫雌鼠制备 H-Y 抗血清, 使得 H-Y 抗原的研究能够广泛展开。

H-Y 抗原的进化保守性

在已报道过的小鼠、豚鼠、兔、猪、牛和人等哺乳动物^[5]中, 其正常的雄性个体都为 H-Y⁺, 雌性个体都为 H-Y⁻。Fellows 等^[6]研究了人类不同的淋巴细胞株, 在 10 个不同的女性淋巴细胞株中没有发现一个 H-Y⁺; 在 12 个男性淋巴细胞株中, 有 10 个为 H-Y⁺, 另有两个为例外, 其中 Ramos 细胞株缺少 Y 染色体, Daudi 细胞是从男性 Burkitt 淋巴瘤细胞培养建株的, 具有 Y 染色体, 但同时缺少 HLA (human Leucocyte Antigen, 人类白细胞抗原) 和 β_2 -m (beta-2-microglobulin β_2 -微球蛋白)。就是那些性腺性别与染色体性别不相符的个体, H-Y 抗原与睾丸决定基因之间的一致性也是明显的(表 1)。不管染色体的决定型如何, 只要有 H-Y 抗原存在, 就表现为雄性; 而 H-Y 抗原阴性的个体, 则常表现为雌性。现在普遍认为, 在哺乳动物中, H-Y 抗原可能是决定睾丸基因的直接产物^[8], 决定着性腺向雄性发育。

* 在本文写作过程中, 受到余先觉教授、周瞰副教授的鼓励和帮助, 特此致谢。

表 1 H-Y 抗原与性腺性别的关系^[7]

染色体性别	性腺性别	H-Y 表现	资料来源
XX 小鼠	♂	+	Bennett 等(1977)
XY 林旅鼠	♀	-	Wachtel 等(1976)
XY 林旅鼠	♂	+	Wachtel 等(1976)
XX(Ser)小鼠	♂	+	Cattanach 等(1971)
XX 人	♂	+	Chapelle(1972)
XO 鼯形田鼠	♂	+	Nagai 和 Ohno (1977)
XO 鼯形田鼠	♀	-	Nagai 和 Ohno (1977)

鸟类的性染色体决定机制与哺乳动物不同,为 ZZ/ZW 型,即雌性个体为异配性别。细胞毒性试验和 MHA·HA 试验证明鸡和鹌^[9]的雌性个体是 H-Y⁺, 雄性个体为 H-Y⁻。用雌性激素处理鹌^[9]和鸡^[10]的 H-Y 抗原阴性的同配性别的原始性腺,诱导产生了 H-Y 抗原,形成了卵睾体。离散一重组织试验证明,将刚孵化的小鸡睾丸细胞和新生小鼠的睾丸细胞混合,经过旋转培养,重新形成了卵睾体;将鸡的睾丸细胞在人男性 Burkitt 淋巴瘤 Daudi 细胞悬浮液中培养,同样获得了卵睾体^[11]。这与早期将胚胎性的牛和鸡卵巢器官混合培养导致形成了卵睾体相类似。这个试验现在可以解释成鸡卵巢细胞分泌的 H-Y 抗原诱导未分化的牛卵巢形成了睾丸组织,是上述试验结果的逆过程。这些结果可能与 freemartin 卵睾体形成^[12]的机制相同。它们充分说明,鸟类的 H-Y 抗原不但与哺乳动物在结构上相似,而且在功能上也相似,都是初始决定异配性别性腺的形成。

爬行类的性染色体决定机制不一,既具有 XX/XY 型的物种,又具有 ZZ/ZW 型的物种。Engel 等^[13]用细胞毒性试验的方法,检测了属于 5 个科的 14 种龟的睾丸细胞、脾细胞、肾细胞和心脏细胞,发现 13 种雌性个体为 H-Y⁺,其性染色体的决定型为 ZZ/ZW; 仅仅乌龟性染(Chinemys reevesi)的雄性个体为 H-Y⁺,其

染色体决定机制为 XX/XY。这里又可见到用 H-Y 抗原检测的结果与用细胞遗传学的核型分析和显带方法所得出的结果相符。

从已作过细胞毒性试验的无尾目和有尾目的 7 种动物^[14]的结果可以看出,两栖动物的异配性别个体的脾、肾、肝和性腺细胞与哺乳动物的 H-Y 抗体同样具有免疫交叉反应,吸收 H-Y 抗体,降低 H-Y 抗血清的细胞毒性。当性染色体核型为 ZZ/ZW 时,雌性个体为 H-Y⁺,当核型为 XX/XY 时,雄性个体为 H-Y⁺,H-Y 抗原的表现始终与异配性别相关联。

鱼类的性染色体很少见有报道。一般认为鱼类的性决定机制是非常原始的,性染色体和常染色体难以区别。已报道的有 XX/XY、XX/XO 和 ZZ/ZW 以及多倍性性染色体。高度纯化的剑尾鱼(*Xiphophorus maculatus*)种群内鳞片移植,第一次发现了鱼类雄性特殊的组织相容性抗原的存在。用细胞毒性试验和用金黄色葡萄球菌作为标志形成玫瑰花环的方法测出剑尾鱼和虹虫将(*Lebistes reticulatus*)^[15-17]的雄性个体为 H-Y⁺,雌性个体为 H-Y⁻,性决定机制为 XX/XY 型;欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)的雌性个体为 H-Y⁺,雄性个体为 H-Y⁻,为 ZZ/ZW 型性决定机制^[18],与用 C 带和荧光染色方法所作出的结果相同。

值得注意的是,在无脊椎动物中也找到了 H-Y 抗原,并且也与异配性别相关^[19]。海虾(*Homarus americanus*)雄性个体的血细胞为 H-Y⁺;甲虫(*Passalus cornutus*)的睾丸细胞是 H-Y⁺;两种直翅目昆虫(*Leucophaea maderae* 和 *Diploptera punctata*)的卵巢细胞可特异性地吸收 H-Y 抗体。这说明 H-Y 抗原也参与了无脊椎动物的性决定。应特别指出的是,有人在植物中也发现了类似于 H-Y 抗原的决定性别的抗原^[20]。

综上所述,高度纯化的自交系小鼠制备的 H-Y 抗血清,与哺乳动物、鸟类、爬行类、两栖类和鱼类、甚至无脊椎动物的异配性别的个

体具有广泛的免疫交叉反应,并能相互作用。说明H-Y抗原在脊椎动物进化期间是一个具有高度保守性的基因的产物,从低等动物到鱼类、两栖类、爬行类、鸟类、哺乳类直至人类,在结构和功能上变化不大。

H-Y 抗原决定性分化的遗传机理

性别分化是一种复杂的现象,迄今为止还没有一套完整的令人信服的学说。在性别决定的遗传机理方面,除了基因平衡学说、染色体遗传学说、基因学说外,发展最快、而又被人们广为接受的还有H-Y抗原决定性别的学说。在性分化的遗传机理方面,H-Y抗原能使未分化性腺组织发育成睾丸的学说比特异生长学说和激素学说更有证据,更有说服力^[7]。

1. H-Y 抗原的基因定位

关于H-Y抗原基因定位争论颇大,一般认为,Koo等提出的H-Y抗原基因定位于Y染色体短臂上,是证据最充分的假说。例如:

(1) 正常哺乳动物的雄性个体(XY)都普遍存在H-Y抗原,而雌性(XX)没有。

(2) H-Y抗原存在于XXY雄鼠中,而在XO雌鼠中不存在^[21]。

(3) X^{lm}/Y间性小鼠,H-Y抗原为阳性,它具有雌性化的睾丸^[22]。

(4) 47XYY及48XXYY男性的H-Y抗原是正常男性的2倍。

(5) Ramos细胞株由于缺少Y染色体而没有H-Y抗原^[9]。

(6) Koo等用C带法和Q带法确定的17例Y染色体结构异常的人中,发现H-Y抗原基因除一例定位于Y染色体的长臂上之外,其余16例都位于Y染色体的短臂上^[23]。

(7) Rary等报道,46,x,i(Yq)核型[Y长臂等臂染色体(isochromosome),短臂缺失]的人成纤维细胞的H-Y抗原为阴性,而46,X,i(Yp)(Y短臂等臂染色体,长臂缺失)的人成纤维细胞其H-Y抗原的含量是正常人的2倍,进一步证明H-Y抗原基因定位于Y短臂

上^[24]。

有关H-Y抗原基因定位还有Wolf等提出的定位于常染色体上的假说以及Ohno和Wachtel等提出的定位于X染色体上并为Y染色体定位的活化因子所诱导的假说^[25]。顺便指出的是,在除哺乳动物以外的其它脊椎动物中,H-Y抗原的基因定位还缺少证据。

2. H-Y 抗原的功能

在哺乳动物中,只要是H-Y抗原阳性的个体,性腺就向雄性分化。体外离散一重组织技术更加明显地证实了H-Y抗原决定睾丸发育的机能。例如,将睾丸细胞的H-Y抗原除去,经旋转培养后,形成了卵泡状结构^[26];把H-Y⁺/H-Y⁻镶嵌的卵睾体分离开,分别培养,从睾丸部分检测出H-Y抗原,而卵巢部分没有H-Y抗原;将从新生鼠分离的卵巢细

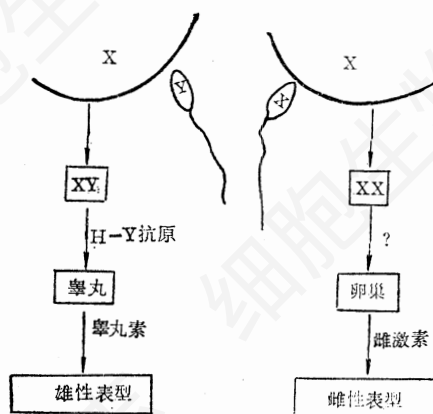


图1 哺乳动物性决定的连续过程^[30]

胞在含有H-Y抗原的培养基中培养,XX卵巢细胞组成了含有卵原细胞的睾丸管状结构^[27];未分化的小牛XX雌性性腺在外加H-Y抗原的诱导下,体外培养发育成睾丸结构^[28];更为精确的是将离散的新生鼠的雄性性腺细胞和雌性细胞以不同的比例混合,发现20%雄性性腺细胞足以诱导卵巢细胞形成睾丸管状结构^[4],并且这已为原位杂交的方法所证实^[29]。据此有人将哺乳动物的性决定连续步骤以简图表示(图1)。

应当提出的是,新近的研究表明,在游离

的 H-Y 抗原存在下, 虽然能使未分化的卵巢形成一些睾丸管状结构, 但用组织学技术、放射免疫方法和生物学方法都不能检测出睾丸素和 Mullerian 抑制物质(MIS)^[31]。这说明 H-Y 抗原决定睾丸分化的功能尚未直接找到生物学上的证据, 看来这是一个有待探讨的疑点。

鸟类以及其它 ZZ/ZW 型的动物, H-Y 抗原诱导卵巢的分化(图 2)。相同的是, 无论是 XX/XY 型还是 ZZ/ZW 型, H-Y 抗原都是诱导异配性别的分化。

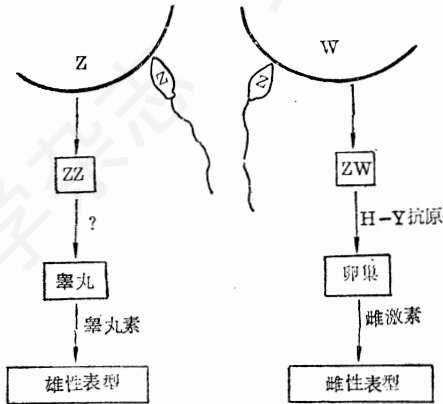


图 2 ZZ/ZW 型动物性决定的连续过程

3 H-Y 抗原的存在状态

H-Y 抗原早在哺乳动物雄性胚胎发育的 8 细胞期就开始产生, 随后在所有的组织中出现。在不同的组织中, H-Y 抗原的表达、分泌和结合的状态不同(表 2)。这些资料表明,

表 2 H-Y 抗原的表达、分泌和结合

组 织	表达	分泌	结合	
同配性腺	-	-	+	
异配性腺	Leydig 细胞	+	-	+
	Sertoli 细胞	+	+	+
	二倍体配子细胞	-	-	?
	单倍体配子细胞	+	-	-
同配非性腺*	-	-	-	
异配非性腺*	+	-	-	
(特例 Daudi 细胞)	-	+	-	

*脑、表皮、肾、肝、脾、心脏等

H-Y 抗原至少以三种状态存在。

(1) 结合于雄性细胞的质膜上。

如前所述, 细胞水平上研究移植免疫产生 H-Y 抗体, 利用的就是 H-Y 抗原存在于细胞膜上的这一特性。在异配动物的非性腺细胞上检测出 H-Y⁺, 更直接地显示出 H-Y 抗原存在于细胞膜上。试验结果证明, 非性腺组织细胞上的 H-Y 抗原可能是与 β_2 -m 和 HLA 相互以物理结合的形式存在于细胞膜上^[32]。这种结合状态的 H-Y 抗原不能发挥它的作用, 这已为 H-Y⁺ 的非性腺细胞在混合培养中不能诱导睾丸形成的结果所证实^[29]。

(2) 游离于细胞间液中

Daudi 细胞为 H-Y⁻, 但它的细胞提取液可诱导未分化的卵巢细胞重新形成睾丸组织^[27]。实验表明, 异配性别的某些性腺细胞(如 Sertoli 细胞)可以分泌游离的 H-Y 抗原。Ohno^[33]在解释与雄牛孪生的 freemartin 的性腺雄性化的机制时, 认为 freemartin 的形成是因为雄牛性腺分泌的游离 H-Y 抗原通过血管扩散到雌牛的性腺中, 与性腺细胞的受体结合而诱导的结果。

(3) 与性腺细胞中的受体结合

H-Y 抗原诱导性腺分化和体外离散一重组织试验都证实了这一点, 只有与性腺细胞中的受体结合, H-Y 抗原才能行使异配性别诱导者的功能。除了上面已陈述的试验结果外, 还有很多证据。例如, 从成鼠睾丸细胞中分离的 H-Y 抗原, 可以结合到成年狗的卵巢细胞上; 卵巢细胞悬液能够抑止睾丸细胞形成睾丸并且胎儿卵巢能够抑止 H-Y 抗原与卵巢细胞结合^[34], 这只能用卵巢细胞同样具有 H-Y 抗原受体, 与睾丸细胞或卵巢细胞争夺 H-Y 抗原来解释。哺乳动物细胞分泌的 H-Y 抗原能够诱导鸟类未分化的性腺形成卵巢结构, 说明鸟类的性腺细胞膜上具有与哺乳类相同的 H-Y 抗原受体。顺便指出的是, 用卵巢性腺体细胞或睾丸性腺体细胞与精子和卵子混合培养的结果证明配子不影响性腺体细胞重新形成组织的

类型。

综上所述, H-Y 抗原由性腺细胞所分泌, 游离于细胞间质中, 与性腺细胞的受体结合, 发生效应, 进而导致性腺向异配性别分化。这就是 H-Y 抗原以类似激素作用的方式, 发挥其导致性别分化的假说^[33], 并不是以细胞与细胞间的接触而发挥作用。

H-Y 抗原的研究展望

近两年来, H-Y 抗原的研究已广泛地扩展到所有的脊椎动物, 甚至无脊椎动物。当前的研究动向主要有以下几个方面。

1. 作为检测异配性别的一种工具

在爬行类、两栖类、鱼类中, 即使在同一科, 同一个属, 性染色体的决定机制也不一定相同。核型分析和显带方法虽曾广泛地应用于这些动物, 但对于那些性染色体差异不大的动物仍未解决问题。特别是鱼类, 利用核型分析的方法还很少找到形态异形的性染色体, 显带方法又存在很大的困难。Ohno 认为, 鱼类的性别决定机制是原始的, 可能没有形态异形的性染色体分化出来。但龟类的性反转试验已经证明有性染色体存在, 只是难以找到细胞遗传学方面的直接证据。因此, 对于那些没有异形性染色体的物种和那些还没有作性反转试验的物种, 可以利用 H-Y 抗原与异配性别相关联的特性来估计性染色体的决定机制。

2. 研究性别异常的遗传机理

前一阶段, H-Y 抗原研究广泛应用于医学遗传学。研究者用 H-Y 抗原存在与否来探讨性别异常的遗传机理。在人类, 通过对 XX 男性、XX 真两性畸形、XX 纯性腺发育不良、Turner 综合征以及性反转等病例的 H-Y 抗原的研究, 对发病机理提出了合理的解释。在动物方面, 通过对 XX 雌性小鼠、XY 雌性林旅鼠、XX(Ser) 雄性小鼠、XO 雄性鼯形田鼠和 XO 雌性鼯形田鼠以及与雄牛孪生的雌牛 freemartin 等异常动物进行的 H-Y 抗原检测和实验, 揭示出这些异常个体的遗传实质。但

是这方面的证据还不足, 且推论和解释比较零乱, 规律性还不够明确。可喜的是, 新的资料不断出现, 发展是快速的。要想对这些异常现象求得更合理的科学解释, 这就需要对 H-Y 抗原如何决定性腺分化的机理作进一步的探讨。体外离散——重组织试验将是一个行之有效的办法。

3. H-Y 抗原实验技术的改进

Daudi 细胞分泌的 H-Y 抗原的分子量用 SDS 凝胶电泳测得为 18,000 道尔顿。H-Y 抗原是一种糖蛋白, 其血清学决定因素是糖^[36]。要想进一步研究 H-Y 抗原, 必须进一步研究 H-Y 抗原的分子结构和组成, 因而必须分离和纯化, 为此还必须首先建立简单、快速灵敏的免疫检测技术以鉴定 H-Y 抗原。但是, 目前制备 H-Y 抗体还仅限于小鼠和大鼠, 并要求是高度自交化的纯系, 而且制备的 H-Y 抗体效价还不很高, 因而需要采用细胞工程的最新技术之一——淋巴细胞杂交瘤的方法产生抗 H-Y 抗原的单克隆抗体, 这一技术已见有应用, 预测将会带来更大的突破。

4. H-Y 抗原与性激素的关系

H-Y 抗原能诱导性腺的分化, 性激素可以导致性反转。但是, H-Y 抗原与性激素又是如何联系的呢? 新近的一项研究提出了一个令人深思的问题。在爬行类池龟属中, 有一种龟 (*Emys orbicularis*) 的性腺分化对温度非常敏感, 当它的卵子在 25—26°C 下发育时, 产生 100% 表型为雄性的子龟; 当它的卵子在 30—30.5°C 下发育时, 产生 100% 表型为雌性的子龟; 而当卵子在 28.5—29°C 下发育时, 产生的子龟大部分为雌性, 小部分为雄性和间性。H-Y 抗原检测表明, 在自然条件下产生的成体中, 雌体的血细胞和性腺细胞都是 H-Y⁺, 而雄体为 H-Y⁻, 其性别决定机制为 ZZ/ZW 型。但在经不同温度条件下发育的三组子龟中, 一些个体的血细胞为 H-Y⁺, 另一些个体的血细胞为 H-Y⁻, 与性别的表型无对应关系。有趣的是, 性腺细胞的 H-Y 抗原表

型与性别的表型具有严密的一致性。研究者从他们的研究结果认为池龟卵巢细胞上H-Y抗原的存在与卵巢结构紧密相关，H-Y抗原的存在可能是卵巢分化的结果而不是卵巢分化的原因^[37]。这一推论当然与H-Y抗原诱导异配性别分化的看法有矛盾，然而，如果将这些结果与在两栖类和鸟类^[9,10]中用性激素进行的性反转试验所得的结果联系起来加以比较，不难发现它们之间的一致性。在这些ZZ/ZW机制的动物中，用雌激素处理这些物种的胚胎或幼体，可以导致部分或完全的性反转，并在性腺中产生了H-Y抗原。对于池龟来说，温度可能影响了性激素的合成。然后再影响了性腺的性别分化和H-Y抗原的表达。这些试验说明性激素可以调节H-Y抗原的合成。然而，许多证据表明H-Y抗原的表达与性激素无直接关系^[25]。因此进一步澄清H-Y抗原与性激素的关系，明确它们合成的时序和基因表达的启动控制(可能是一种反馈作用)，这将是一个引人入胜的重大课题。

参 考 文 献

- [1] Eichwald, E. and Silmsker, C. 1955《*Transplant. Bull.*》2: 148-159.
- [2] Goldberg, E. H. et al., 1971 *Nature* 232: 478-480.
- [3] 田国才. 1982. 国外医学, 遗传学分册, 第四卷第五期: 225-235.
- [4] Urban, E. et al., 1981 *Differentiation* 18: 161-168.
- [5] Wachtel, S. S. et al., 1974 *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 1215-1218.
- [6] Fellows, M. et al., 1978 *J. Exp. Med.* 148: 58-70.
- [7] 蒋耀青, 生物科学动态, 1981年第二期: 1-7.
- [8] Wachtel, S. S. et al., 1975 *Nature* 257: 235-236.
- [9] Müller, U. et al., 1980 *Differentiation* 16: 129-133.
- [10] Müller, U. et al., 1979 *Nature* 280: 142-144.
- [11] Zenzes, M. T. et al., 1980 *Differentiation* 17: 121-126.
- [12] Wachtel, S. S. et al., 1980 *Cell* 21: 917-926.
- [13] Engel, W. et al., 1981 *Differentiation* 20: 152-156.
- [14] Engel, W. et al., 1981 *Cytogenet. Cell Genet.* 30: 130-136.
- [15] Shaler, A. et al., 1980 *Differentiation* 16: 81-83.
- [16] Müller, U. et al., 1979 *Differentiation* 14: 185-187.
- [17] Pechan, P. et al., 1979 *Differentiation* 14: 189-192.
- [18] Wiberg, U., 1982 *Differentiation* 21: 206-208.
- [19] Shaler, A. et al., 1980 *Differentiation* 16: 77-80.
- [20] Clarke, A. et al., 1977 *Nature* 265: 161-163.
- [21] Celuda, F. et al., 1963 *Genetics* 48: 139-151.
- [22] Bennett, D. et al., 1975 *Nature* 257: 236-238.
- [23] Koo, G. C. et al., 1977 *Science* 198: 940-942.
- [24] Rary, J. M. et al., 1979 *J. Hered.* 70: 78-80.
- [25] 王舸, 1983, 自然杂志, 第六卷二期: 95-102.
- [26] Ohno, S. et al., 1978 *Cytogenet. Cell Genet.* 20: 351-364.
- [27] Zenzes, M. T. et al., 1978 *Hum. Genet.* 44: 333-338.
- [28] Nagai, Y. et al., 1979 *Differentiation* 13: 155-164.
- [29] Müller, U. et al., 1982 *Differentiation* 22: 136-138.
- [30] Hall, J. L. et al., 1980 *Mol. and Cellu. Biochem.* 33: 49-66.
- [31] Benhaim, A. et al., 1982 *Differentiation* 22: 53-58.
- [32] Müller, U. et al., 1979 *Cell* 17: 331-335.
- [33] Ohno, S. et al., 1976 *Nature* 261: 597-598.
- [34] Zenzes, M. T., 1980 *Differentiation* 16: 193-198.
- [35] Zenzes, M. T., 1981 *Differentiation* 18: 169-173.
- [36] Shapiro, M. et al., 1981 *Nature* 290: 503-505.
- [37] Zaborski, P. et al., 1982 *Differentiation* 22: 73-78.