

无尾两栖类的原生殖细胞

张 天 荫

(山东大学生物学系)

Bounoure (1939) 首先在林蛙 (*Rana temporaria*) 提出胚胎的生殖细胞在发育早期就从体细胞分离出来,并以实验证实了他的观点。他认为生殖细胞是由一种特殊的细胞质称为生殖质(germinal cytoplasm)所决定的。这种生殖质开始位于受精卵植物极的皮层下区(subcortical region),如以紫外线照射受精卵的植物极,所发育的蝌蚪生殖腺中生殖细胞数明显减少,有的可减少90%。随后,许多学者采用不同的实验方法在不同种无尾两栖类中都证实了生殖质与生殖细胞两者的关系,提出了生殖质是生殖细胞的“决定子”的意见。

一般,人们把原肠胚时含有生殖质的细胞称为原生殖细胞(primitive germ cell),而在这以前的则称为预定原生殖细胞。主要是根据在原肠胚时这些预定原生殖细胞的生殖质从靠近细胞的表面处进到细胞的里面,在核旁形成一帽状或环状结构,随着细胞分裂生殖质被分到二个子细胞中,表明了克隆分裂(clonal division)的开始。许多学者把生殖质的移位和克隆分裂的开始作为预定原生殖细胞分化,而改称为原生殖细胞^[1]。

一、原生殖细胞和生殖质的形态特点

从卵裂到囊胚,预定原生殖细胞位于胚胎植物半球的1/3处,原肠胚时则位于原肠腔的底部内胚层中,以后位于胚胎后部内胚层中央(图1)。这些原生殖细胞在形态上与周围的体细胞有明显的区别,细胞较大,直径达10—20 μm ,呈圆形、卵圆形或梨形,有清晰的细胞界限。核很大,直径为6—10 μm ,圆形、卵圆形或叶状,有明显的核膜。染色质均匀分布

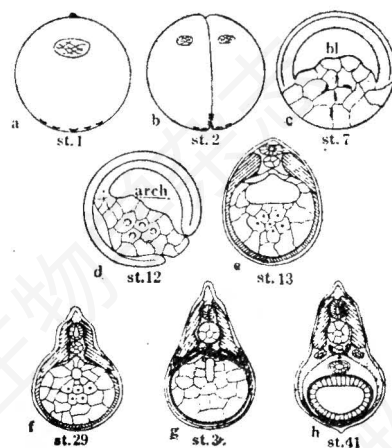


图 1 无尾两栖类生殖质的命运和原生殖细胞迁移的图解^[1]

a. 受精未分裂卵时生殖质位于植物极附近呈小斑状; b. 二细胞时,生殖质开始沿分裂沟向上移动; c. 囊胚早期含有生殖质的内胚层分裂球由于原肠前作用(pregastrulation)向内移位; d. 由于原肠作用内胚层细胞进一步移位,同时生殖质移向核旁四周; e. 和 f. 尾芽期原生殖细胞的位置; g. 幼虫早期原生殖细胞向背部迁移; h. 原生殖细胞通过背系膜向生殖嵴迁移。

arch. 原肠腔; bl. 囊胚腔; st1-st41. 发育时期

于核质中,所以染色后常呈透明状。有1—2个核仁。常有叶状伪足和丝状伪足,在迁移期尤为明显。当然原生殖细胞最主要的特点是有生殖质。

无尾类的生殖质是一种有明显界限的结构,虽然它不被膜所包围。生殖质为直径5—12 μm 的小斑,是由许多线粒体、一些蛋白质结晶及生殖颗粒(电子致密小体)所组成(图2)。这些生殖颗粒是由许多小的电子致密点埋于相当细的纤维基质中。它们常与线粒体膜连接或与核膜相连。生殖质也可包括一些色素

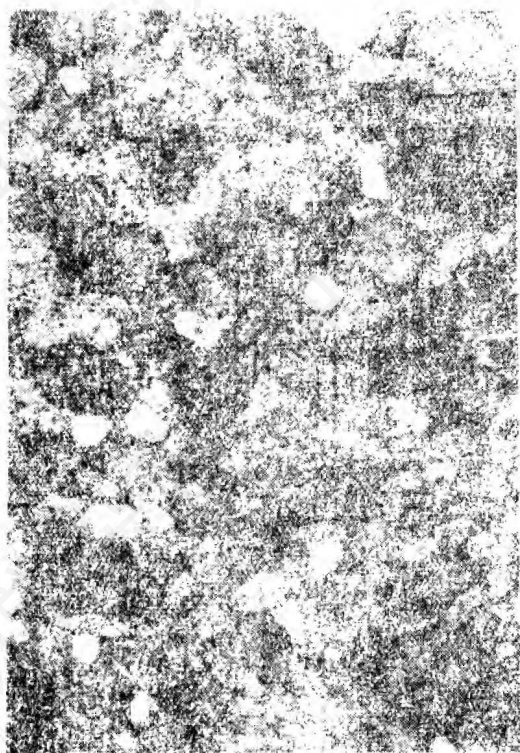


图2 豹蛙生殖质的亚微结构^[3]

DB. 电子致密小体(短指针), 有一部分作为线粒体间的粘合物(图左上角长指针)

G. 细胞基质中一些膜成分和糖元

颗粒、糖元、少量脂滴和小卵黄小板。

生殖质的大小和形态常随胚胎发育而改变。在成熟的卵母细胞, 生殖颗粒在线粒体团中位于植物极皮层下区。受精卵生殖颗粒直径为 $0.2-0.3\mu\text{m}$, 到囊胚时增大到 $0.4-0.5\mu\text{m}$, 这是由于电子致密点发生密集融合而使生殖颗粒增大。在胚胎发育早期, 生殖质还与核糖体相连, 并随发育核糖体数逐渐增加^{[2][3]}。原肠胚时生殖颗粒逐渐减少, 内部结构日显疏松, 到尾芽期时在生殖颗粒内可辨认出线状结构, 故又称为不规则线状小体, 到蝌蚪期则又成为颗粒结构^[4]。体外培养预定原生生殖细胞, 其生殖质的变化与体内的情况一样^[5]。

二、生殖质和原生生殖细胞的关系

为了证实原生生殖细胞的形成是由生殖质决

定的, 许多学者采用了不同的实验方法来证实两者的关系。

1. 手术切除 根据生殖质的部位采用微吸管吸去或在植物极作X状的切除, 结果都导致蝌蚪原生生殖细胞数量明显的减少或不育。Buehr 和 Blackler(1970)证实了手术后流出的细胞质中生殖质的数量与蝌蚪中原生殖细胞数量有直接的关系^[6]。

2. 照射 首先 Bounoure 以紫外线照射林蛙受精卵的植物极发现了生殖质与原生生殖细胞的关系。随后 Padoa 在蛙 (*R. esculenta*) 证明了不同发育阶段对紫外线的敏感性不同, 在第一次卵裂前后生殖质对紫外线最敏感, 这种敏感性随胚胎发育而下降。这是由于随卵裂的进行生殖质从细胞的表面向里面移动的结果。因此到囊胚期紫外线照射已不再发生效应。Tanabe 和 Kotani (1974) 对不同卵裂期生殖质离卵表面的距离作了统计, 证明 Padoa 的意见是正确的^[7]。当然不同种动物即使同一种动物不同个体所产的卵对紫外线的敏感性也有所不同, 这是由于不同卵之间皮层区域色素颗粒的数量和分布不同造成的, 而不是生殖质本身的差异^{[8][9]}。

为了验证紫外线的不同剂量对不同发育时期的作用, Smith (1966)在豹蛙用不同剂量的射线照射不同发育时期卵的植物极, 发现胚胎原生生殖细胞的数量与照射的时期和所用的剂量密切相关, 照射的剂量愈大, 照射的时期愈早, 原生生殖细胞的数量就愈少^[8]。这种结果在蛙 (*R. chensinensis*) 和爪蟾中亦得到了佐证。

为了进一步证实生殖质与原生生殖细胞的关系, Smith(1966)以相同剂量的紫外线照射同一发育时期的动物极, 结果对原生生殖细胞没有影响。如将动物极的细胞质注入照射植物极的卵中, 胚胎仍为不育; 但将正常卵植物极的细胞质注入照射植物极的卵中, 部分胚胎恢复了原生生殖细胞^[8]。Wakahara(1977)以植物半球的匀浆注入紫外线照射植物极的卵中也得到了相同的结果。他在分析这些匀浆时指出原生生殖细

胞数量与注入匀浆中的类似生殖质致密颗粒的数量有直接的关系^[10]。

紫外线照射影响原生生殖细胞形成的原因是因为生殖质中的颗粒发生破碎以及与生殖颗粒相连的线粒体发生膨胀和泡状化,所以维持卵的生殖质的正常结构是形成原生生殖细胞的一个必要条件^[11]。另一原因是生殖质主要成分是RNA,而照射的紫外线波长以254 nm最有效^[8],导致核酸中的嘧啶形成二聚体而失去其生物活性。

3. 倒置 用阻止刚受精的爪蟾卵发生胚体转动或将卵倒置90°或180°后受精,并将其强制维持这种倒置位置的方法来研究所发育的胚胎中原生殖细胞的情况,发现蝌蚪中的生殖细胞数很少或完全缺乏^[12,13]。各实验组之间变幅较大,这与倒置后卵内物质重新分布的程度有直接关系。变化不大的,原生生殖细胞数较多;改变明显的,几乎完全没有原生生殖细胞。切片检查表明生殖质有的位于原来的植物极,有的位于囊胚表面细胞的边缘,有的甚至找不到。因此,他们认为维持大的卵黄小板和生殖质之间的空间关系可能对于原生生殖细胞的发育是必需的,而倒置发育的胚胎物质发生重新分布打乱了这种空间关系。

最近Jurand和Dixon(1986)以电镜检查倒置发育到8细胞时的生殖质结构,发现生殖质中的生殖颗粒的空间结构以及它所附着的线粒体的关系都发生了改变^[14]。因此,他们也认为原生生殖细胞能否正常发生是与生殖质的正常空间结构以及与线粒体的正常联系有密切的关系。

但是Cleine等(1985, 1986)认为倒置发育的胚胎缺乏生殖细胞是由于原生生殖细胞不能位于正常的胚胎后部内胚层中,而位于前部的内胚层,这些异位的原生生殖细胞不能迁移到生殖嵴,而造成胚胎生殖腺内生生殖细胞数量明显减少或完全缺乏。如果将此部内胚层移到后部,生殖腺中的生殖细胞则明显增加^[15,16]。

4. 延缓受精 如将爪蟾卵保持在一种使

卵延缓受精的溶液中,结果在延缓受精25小时的21个蝌蚪中有14个没有原生生殖细胞,2个胚胎只有一个原生生殖细胞^[17]。这是由于延缓受精影响了生殖质结构的完整性以及在正常发生时生殖质所在的皮层下区细胞质被破坏而造成的。

由此可见,用手术和照射去除或破坏生殖质,或以倒置或延缓受精的方法破坏生殖质的正常空间结构和与线粒体的关系等方法均导致了原生生殖细胞数量明显的减少,甚至完全没有。

三、原生生殖细胞的迁移

囊胚时原生生殖细胞位于植物半球1/3处,原肠作用结束时则位于原肠腔的底部,这过程大约由于原肠作用的形态发生运动而被动地移位。在随后的发育直到尾芽早期,原生生殖细胞一直位于胚胎后部内胚层的中央。根据Kamimura等(1976)的观察爪蟾尾芽期(第31期)的原生殖细胞开始向内胚层两侧迁移,到第33-36期原生生殖细胞逐步向消化道背部集中,到第40期都位于消化道背部。此时体腔和背系膜尚未形成。到第41期有的原生生殖细胞仍位于消化道背部,有的则位于消化道背部和背系膜交界处以及背系膜根部。第43期原生生殖细胞位于背系膜和成对的生殖嵴中,到第46期几乎所有的原生生殖细胞都位于生殖嵴中^[18]。在这段发育时期,原生生殖细胞是自主迁移,以变形运动方式进行的。组织培养证明原生生殖细胞的变形运动最大的距离每小时可达150 μm ^[19]。Kamimura等(1980)指出在迁移时原生生殖细胞呈多态,四周的间隙很大,并在间隙中可见原生生殖细胞的突起,此时生殖质靠近核,在该处有线粒体和其它细胞器,并且线粒体的体积较四周体细胞的大,表明细胞处于积极的代谢活动时期^[20]。Delbos等(1982)发现位于消化道背部和背系膜中的原生生殖细胞的伪足可长达5—30 μm ^[21]。

原生生殖细胞从背系膜迁移到两侧生殖嵴

过程中可依其较大的体积,大而多叶的核与背系膜的脏壁中胚层上皮区分开。原生殖细胞向体腔突出的一面其外有体腔上皮形成的薄细胞质层覆盖。在系膜中原生殖细胞表面有突起,这些突起与周围的上皮细胞没有细胞连接,可能有助于原生殖细胞的迁移运动。当原生殖细胞从背系膜向两侧迁移时,位于背系膜根部两侧的脏壁中胚层细胞从很薄的扁平上皮变为立方形上皮,分化为特化的纵向排列的细胞带,位于系膜两旁,这就是生殖嵴。组成此嵴的上皮可称为生殖腺上皮。原生殖细胞就迁移到此生殖腺上皮的下面^[22]。

Heasman 和 Wylie(1981)进一步研究证明无论在系膜或在背壁上皮(形成生殖嵴的)中的原生殖细胞其排列方向均由所在部位的上皮排列方向决定,两者的方向是一致的^[23]。这说明了原生殖细胞的运动方向是由上皮细胞的方向指导的^[24]。

在原生殖细胞迁移途径中,在上皮细胞表面有一些小囊结构,它可能与分泌糖蛋白有关。因为在原生殖细胞和上皮之间有一种糖蛋白组成的基质^[23], Heasman 等(1981)证明它是纤连蛋白(fibronectin),是由背系膜合成的,原生殖细胞不能合成^[25]。这种纤连蛋白还与神经嵴细胞迁移密切相关,所以在胚胎发生过程中细胞迁移之时和迁移之处都发现有纤连蛋白的存在^[26]。

原生殖细胞具有变形运动的能力,在鸟类和哺乳类胚胎中也得到相同的结果,同时也发现原生殖细胞在迁移时系膜中富有纤连蛋白^[27]。

原生殖细胞的迁移除本身具有变形运动的作用外,胚胎背部中胚层组织对原生殖细胞还具有有一种吸引能力,促使其向胚胎背部迁移,其中以体节的吸引能力最强,中肾管和脊索较弱。如去除这些背部中胚层,原生殖细胞永远留在背系膜根部。Giorgi(1974)证实背部中胚层的吸引能力只局限于胚胎的尾部地区^[28]。此外,还有学者提出生殖嵴对原生殖细胞也具有

吸引能力。这点在鸡胚已得到确实的证据, Kuwana 等(1986)以不同发育时期的生殖嵴和不同器官原基分别与原生殖细胞一起培养,发现原生殖细胞只向生殖嵴方向迁移,说明生殖嵴能释放出一种物质吸引原生殖细胞,并且早期生殖嵴(第13期,原生殖细胞尚未进入)的吸引能力大于晚期的生殖嵴(第22期,原生殖细胞已进入)^[29]。

综上所述,无尾类生殖细胞的发生与生殖质密切相关,近四十年来不同学者以不同的实验方法都证实了这点。同时对生殖质的形态结构,原生殖细胞发生、迁移过程和迁移因素以及与其它器官之间的相互关系都得到了一些初步结果。但是原生殖细胞的决定是否不可逆的?最近 Wylie 等(1985)证明处于分化中的原生殖细胞其发育能力是多潜能的,在新的环境或异位情况下可分化为其它胚层的细胞。他们将处于迁移时期(第45期)的原生殖细胞标记后注入囊胚晚期的囊胚腔中,标记的原生殖细胞可分化三个胚层各种器官的细胞,没有一个参与宿主胚胎的生殖细胞系^[30]。此外,倒置发育的胚胎其异位的原生殖细胞可分化为食道或肠上皮^[16],这些结果都表明了原生殖细胞位于新的环境或异位都可分化为别的细胞,生殖质似乎失去了它的决定作用。因此,生殖质在生殖细胞的决定以及周围环境因素在这过程中究竟起什么作用是值得深入研究和探讨的。

摘 要

本文主要讨论了无尾两栖类生殖质与原生殖细胞的关系,实验证明原生殖细胞是由生殖质决定的,如果生殖质受到破坏或其正常的空间结构受到干扰,就不能形成原生殖细胞。在胚胎发育早期原生殖细胞由于形态发生运动而位于原肠腔底部,在随后的发育中由于原生殖细胞的主动运动而迁移到生殖嵴。异位的原生殖细胞可分化为其它胚层的细胞,因此生殖质在原生殖细胞分化中的确切作用值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] Nieuwkoop, P. D. and L. A. Sutasurya, 1979, Primordial germ cells in the choroides. Cambridge Uni. Press.
- [2] William, M. A. and L. D. Smith, 1971, *Dev. Biol.*, 25: 568.
- [3] Mahowald, A. P. and S. Hennen, 1971, *Dev. Biol.*, 24: 37.
- [4] Ikenishi, K. and M. Kotani, 1975, *Dev. Growth Diff.*, 17: 101.
- [5] Ikenishi, K., 1982, *Ibid.*, 24: 205.
- [6] Buehr, M. and A. W. Blackler, 1970, *J. Embry Exp. Morph.*, 23: 375.
- [7] Tanabe, K. and M. Kotani, 1974, *J. Embry. Exp. Morph.*, 31: 89.
- [8] Smith, L. D., 1966, *Dev. Biol.*, 14: 330.
- [9] Blackler, A. W., 1970, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 5: 71.
- [10] Wakahara, M., 1977, *J. Embry. Exp. Morph.*, 39: 221.
- [11] Ijiri, K. I., 1977, *Dev. Biol.*, 55: 206.
- [12] Neff, A. W. et al., 1983, *Ibid.*, 97: 103.
- [13] Wakahara, M. et al., 1984, *Diff.*, 26: 203.
- [14] Jurand, A. and K. E. Dixon 1986, *J. Exp. Zool.*, 237: 73.
- [15] Cleine, J. H. and K. E. Dixon 1985, *J. Embry. Exp. Morph.*, 90: 79.
- [16] Cleine, J. H., 1986, *Ibid.*, 94: 83.
- [17] Wakahara, M. et al., 1984, *Gamete Res.*, 9: 361.
- [18] Kamimura, M. et al., 1976, *J. Embry. Exp. Morph.*, 36: 197.
- [19] Wylie, C. C. and T. B. Roose 1976, *J. Embry. Exp. Morph.*, 35: 149.
- [20] Kamimura, M. et al., 1980, *Ibid.*, 59: 1.
- [21] Delbos, M. et al., 1982, *J. Morph.*, 171: 355.
- [22] Wylie, C. C. et al., 1976, *J. Embry. Exp. Morph.*, 35: 139.
- [23] Heasman, J. and C. C. Wylie, 1981, *Proc. R. Soc. Lond.*, B 213: 41.
- [24] Wylie, C. C., 1980, *Bioscience.*, 30: 27.
- [25] Heasman, J. et al., 1981 *Cell.*, 27: 437.
- [26] Sanders, E. J., 1986, *Progr. Histochem. Cytochem.*, 16/3: 1-55.
- [27] Fujimoto, T. et al., 1984, *Dev. Growth Diff.*, 26: 362.
- [28] Giorgi, P. P., 1974, *J. Embry. Exp. Morph.*, 31: 75.
- [29] Kuwana, T. et al., 1986, *Anat. Rec.*, 215: 403.
- [30] Wylie, et al., 1985, *Dev. Biol.*, 112: 66.

脂质体作为植物细胞工程载体研究的现状*

甘 苏 生

(华东师范大学生物系)

近年来,植物分子生物学有了迅速发展,相继已建立起了适用于植物细胞的一系列载体系统,如以Ti质粒为基础的单、双质粒系统;以花椰菜花叶病毒(CaMV)为主的植物病毒载体系统;以及脂质体载体系统等。前两者已有综述^[1-3],本文仅就脂质体载体系统及其在植物细胞修饰、遗传修饰研究中的现状作一综合介绍。

一、脂质体载体系统

由于对原生质体加以细胞修饰和遗传修饰

时没有细胞壁的限制,近年来将核酸分子(DNA、RNA)和细胞器等直接引入原生质体的实验越来越多,已成为植物细胞工程研究的一个重要方面。然而,原生质体常常向培养基中分泌核酸水解酶等而使其中的核酸物质在进入原生质体之前就被分解,因此就很有必要建立核酸分子的保护系统。植物细胞工程学家自

* 本文得到颜季琼教授、沈曾佑、张志良副教授的指导,周苹、黄祥辉同志提出宝贵意见,谨致谢意。