

鹌鹑早期原始生殖细胞迁移和聚集规律的研究

常国斌¹, 程旭梅¹, 李碧春¹, 刘向萍²,

秦玉蓉¹, 陈蓉¹, 陈国宏^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 中国农业科学院家禽研究所, 扬州 225003)

摘要: 本研究旨在观察鹌鹑早期原始生殖细胞的迁移和聚集规律, 为分离 PGCs, 并将其应用于转基因技术提供依据。运用 QH1 单抗标记特异性的识别鹌鹑的 PGCs, 检测早期各个阶段 PGCs 的分布和数量。研究表明: 鹌鹑的原始生殖细胞(PGCs)起源于胚盘暗区, 而后逐渐迁移至明区、生殖新月区。孵化 27 h, 已有少量 PGCs 分布于明区的血管中。到孵化 36 h 时, 有大量的 PGCs 聚集在明区血管网中, 左右两侧都有。孵化 45 h 时, 从头部到脐肠系膜 PGCs 均有散在和聚团分布, 并主要聚集在头部间质质的血管中。PGCs 在各个时期的数量存在差异, 有 2 个增殖高峰期, 即原条期(孵化 6 h)和十体节期(孵化 36 h)。QH1 单抗可鉴定早至未孵化期的鹌鹑原始生殖细胞, PGCs 在早期胚盘中是随机散在分布的, 而且具有 2 个增殖高峰期。

关键词: 鹌鹑; 原始生殖细胞; 迁移; 聚集

中图分类号: S839; Q344

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)04-0505-06

Migration and Accumulation of Primordial Germ Cells in the Quail Earlier Embryo

CHANG Guo-bin¹, CHENG Xu-mei¹, LI Bi-chun¹, LIU Xiang-ping²,

QIN Yu-rong¹, CHEN Rong¹, CHEN Guo-hong^{1*}

(1. College of Animal Science & Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003, China)

Abstract: This paper was conducted to study the migration and accumulation of primordial germ cells (PGCs) in the quail earlier embryo, aiming to provide the base of transgenic technique. The distribution and amount of PGCs at different stages were identified specially by the monoclonal antibody, QH1. The results showed that quail PGCs originated from the area opaca of unincubated blastoderm, and then transferred to area pellucida and the germinal crescent area. About 27 h post-incubation, a few PGCs first appeared in blood vessels of the area pellucida, where a great lot of PGCs accumulated at 36 h post-incubation. Subsequently, the single and mass PGCs were found from the head to omphalo mesenteric and mainly settled down the mesenchymal blood vessels of head. The PGCs amount at different stages were different, and had two periods of maximum in whole stages, namely, primitive streak(6 h post-incubation) and tenth somite (36 h post-incubation). The results indicated that QH1 could identify the PGCs in the quail earlier unincubated embryo, where the PGCs distributed randomly, and there founded two periods of maximum proliferation in whole stages.

Key words: quail; primordial germ cells; migration; accumulation

对大多数脊椎动物而言, 由于没有标记物能够 特异性的识别其原始生殖细胞 (Primordial germ

收稿日期: 2009-02-24

基金项目: 国家自然科学基金(30700564; 30972088); 江苏省自然科学基金(BK2009190)

作者简介: 常国斌(1975-), 男, 江苏泰兴人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物资源和分子遗传研究, Tel: 0514-87979034, E-mail: gbchang@yzu.edu.cn

* 通讯作者: 陈国宏, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

cells, PGCs), 所以它们的起源和分布情况是未知的。在鸟类中, 最早鉴别生殖细胞的是 Ginsburg 和 Eyal-Giladi^[1], 通过细胞含有糖原颗粒可以鉴别鸡胚原条期胚盘中的生殖细胞。然而在鹌鹑上这样的标记物并未见报道, 由于鹌鹑的 PGCs 不含有糖原颗粒, 所以能够鉴定鸡胚 PGCs 的方法不能用于鉴定鹌鹑 PGCs。Pardanaud 等^[2-3]在对鹌鹑早期胚胎血管发生树进化规律的研究中, 意外发现 QH1 单抗能够结合鹌鹑的 PGCs, 但其特异性和结合效率未得到进一步证实。目前, 普遍认为鸟类 PGCs 起源于 X 期的胚盘上胚层, IV 期时经下胚层迁移到原条期的生殖新月部位^[1,4]。X 期时进入刚刚形成的胚胎血管系统, 随血液循环至生殖原基附近, 穿过毛细血管壁到达生殖原基定居, 并分化成精子或卵子^[5]。相关鸡胚 PGCs 的起源、迁移和定居规律的研究国内外都有报道, 而鹌鹑这方面的研究国内报道较少。鹌鹑胚胎发育期短, 相对于鸡胚操作存在其优越性, 作为一种重要的实验动物模型, 若能对其发生发育的机理了解得更透彻, 将为今后禽类转基因常规技术的进步以及家禽市场上的商业化应用提供必要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鹌鹑种蛋由江苏省姜堰市种鹑厂提供。

1.2 试剂

QH1 单抗购自 Developmental Studies Hybridoma Bank (DHSB); 荧光素标记的羊抗鼠二抗购自 Rockland。

1.3 方法

将新鲜种蛋放入孵化箱(无锡设备厂鸣凤 4820 型)内孵化, 孵化温度为 38 ℃, 相对湿度为 60%。分别取孵化 0~45 h 的胚盘, 未孵化期以及孵化 12 h 的胚盘按照 Eyal-Giladi 等^[6]的分期标准, 孵化 12 h 以后按照 Hamburger 等^[7]的分期标准。每期取 6 枚左右, 用于整体装片免疫组化方法染色。

1.3.1 胚盘取出 用眼科镊子轻轻敲击其钝端, 去掉蛋壳和壳膜, 使其成直径 1~2 cm 的圆孔, 暴露出卵黄及胚盘, 顺着胚盘的边缘将胚盘剪下, 放入盛有温热 PBS(38 ℃, pH7.4)的培养皿中漂洗, 轻轻晃动培养皿, 使卵黄和卵黄膜从胚盘上脱离下来, 去除卵黄和卵黄膜。再加入新的温热 PBS, 漂洗胚盘, 依此重复 3 次。最终将漂洗干净的胚盘移入

4%多聚甲醛固定液中, 于 4 ℃固定 2~3 h。

1.3.2 整体装片染色 将固定好的胚盘于室温条件下 PBS 漂洗 2 遍, 加封闭液于 4 ℃过夜封闭, 取出后于室温中放置 45 min, 去除封闭液。加 1:100 稀释的 QH1 单抗于 4 ℃过夜处理, 取出后室温放置 45 min, 去除 QH1 抗体, 然后 4 ℃PBS 漂洗 3 遍, 每次 5 min。滴加适量的 1:200 稀释的荧光素标记羊抗鼠二抗, 4 ℃避光过夜处理, 取出晾干后, 加甘油缓冲液, 封片, 荧光显微镜检查。

2 结果

2.1 各期中 PGCs 的迁移、聚集及分布

试验所检测的各期, 在胚盘明区部位都能观察到由 QH1 单抗标记的发绿色荧光的细胞。明区是胚外区, 位于中胚层两对称角间的头部区域, 不包括中胚层和血管。它属于生殖新月区的一部分, 是早期胚胎 PGCs 主要聚集区。PGCs 的特征显现为: 细胞大(大小在 12~25 μm 不等), 有时呈圆形, 有时呈卵形, 并且有时有伪足。观察从未孵化期到孵化 45 h 的鹌鹑胚盘, 45 h 以后的时期中, 内皮系统的分化会干扰 PGCs 的观察。

2.1.1 未孵化期胚盘(stages X-XI, EG&K)

在少量的样本中可以观察到 PGCs。它们几乎都分布在暗区, 紧靠与明区的交接区。它们通常分离、单独存在或者有时两两相连。这时, 内胚层不是以一个完整的胚层存在, 而是以分离的内胚层细胞簇的形式分布在胚盘的后部, 这些细胞通常在取样时丢失。取样后一般只能够得到外胚层。

2.1.2 孵化 6 h 的胚盘(stages XII-XIII, EG&K)

显示荧光的 PGCs 有时三、四个聚集, 并且大多数位于明区图 1、图 2。PGCs 散在分布于整个胚盘, 明暗交界区分布较多, 单个细胞大而圆。如箭头所示。

2.1.3 孵化 18 h 的胚盘(原条期) 明暗交界的地方变厚, 明区中央已经形成一条圆柱状的原条, 长度接近于明区的全长, 在原条前端明区中有大量的 PGCs。

2.1.4 孵化 19 h 的胚盘(头突期) PGCs 还是以集团或散在形式出现, 有时会多到 9 个聚在一起。它们分布在整个明区, 仅有少量在暗区, 主要分布在头前侧部近暗区的明区生殖新月区。见图 3、图 4, 图中 PGCs 集中分布于生殖新月区, 如箭头所示。

2.1.5 孵化 23 h 的胚盘(三体节期) QH1 阳

性细胞数明显增多, 大多数 PGCs 观察到位于胚盘的前半区域, 仅有一些分离的细胞群在尾部区域, 位于前半区域的细胞仍主要集中在生殖新月区。见图 5、图 6, 图中 PGCs 大量分布在头部, 仅有少量在尾部区域。箭头所指为 PGCs 所在位置。

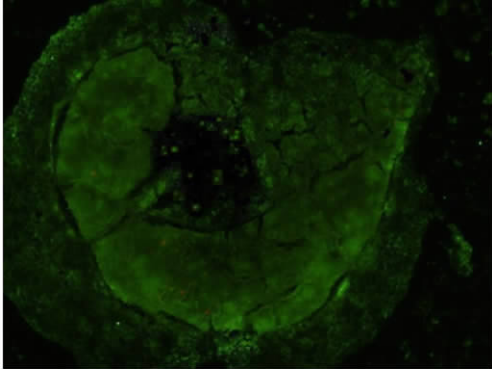


图 1 孵化 6 h 的鹤鹑胚盘整体染色观察 (40×)

Fig. 1 The observation of the whole embryo at 6 h post-incubation (40×)

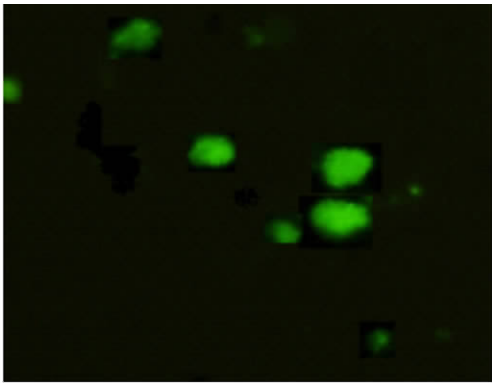


图 2 孵化 6 h 的鹤鹑胚盘局部放大观察 (400×)

Fig. 2 The local enlargement observation of the embryo at 6 h post-incubation (400×)

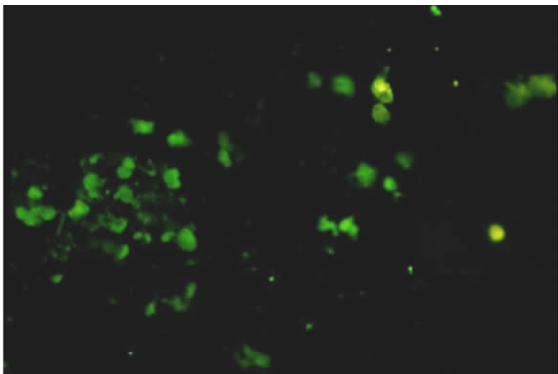


图 6 孵化 23 h 的鹤鹑胚盘局部放大观察 (400×)

Fig. 6 The local enlargement observation of the embryo at 23 h post-incubation (400×)

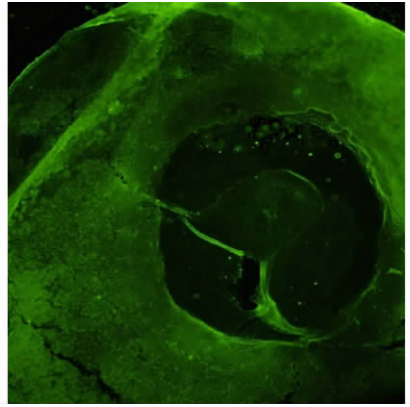


图 3 孵化 19 h 的鹤鹑胚盘整体染色观察 (40×)

Fig. 3 The observation of the whole embryo at 19 h post-incubation (40×)

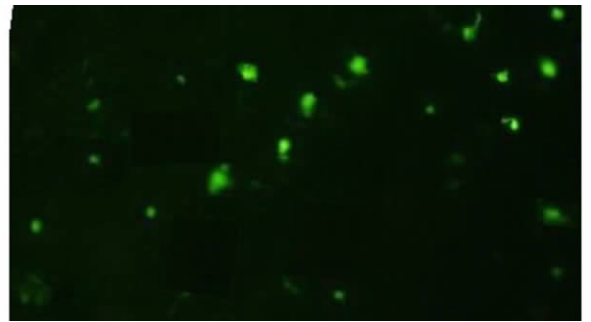


图 4 孵化 19 h 的鹤鹑胚盘局部放大观察 (400×)

Fig. 4 The local enlargement observation of the embryo at 19 h post-incubation (400×)

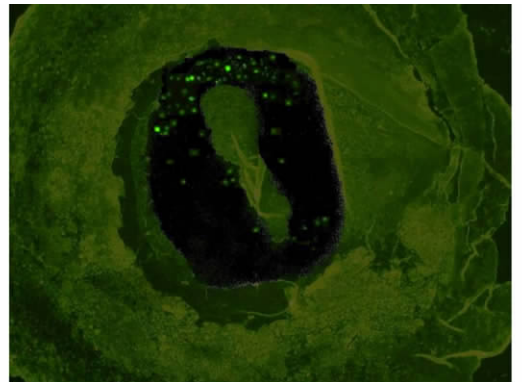


图 5 孵化 23 h 的鹤鹑胚盘整体染色观察 (40×)

Fig. 5 The observation of the whole embryo at 23 h post-incubation (40×)

2.1.6 孵化 27 h 的胚盘(七体节期) PGCs 群分布较为稀疏, 已有少量细胞分布于明区的血管中。见图 7、图 8。箭头所指为 PGCs 所在位置。

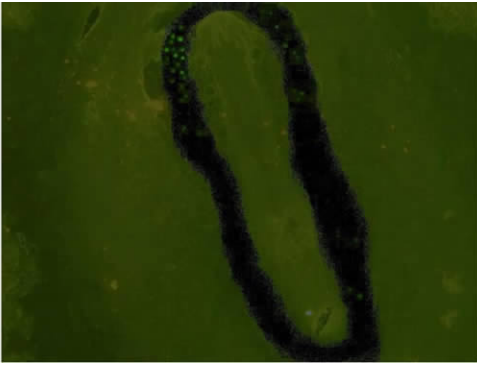


图 7 孵化 27 h 的鹌鹑胚盘整体染色观察 (40×)

Fig. 7 The observation of the whole embryo at 27 h post-incubation (40×)

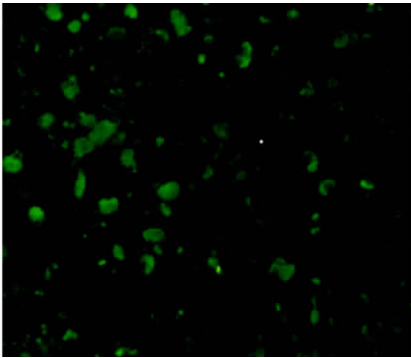


图 8 孵化 27 h 的鹌鹑胚盘局部放大观察 (400×)

Fig. 8 The local enlargement observation of the embryo at 27 h post-incubation (400×)

2.1.7 孵化 36 h 的胚盘(十体节期) 在胚体近心脏的两侧形成了左右脐肠系膜,并在明区中形成毛细血管网。暗区中的血岛已经扩展到整个暗区,与明区中的毛细血管网相连。大量的 PGCs 主要聚集在胚体外的明区血管中。见图 9。此期 PGCs 在头部左右两侧明区血管中分布最多。如箭头所示。

2.1.8 孵化 45 h 的胚盘(十八体节期) 此时,心脏已经分化为心房和心室,心脏突出于胚体外。PGCs 散在分布于胚体头部前侧的明区,和靠近胚体中部、尾部的明区中。并且在胚体头部间充质血管中也有大量 PGCs 的分布。有报道认为此后 PGCs 经由血液循环系统分布于胚体中各处。见图 10,图中从头部到脐肠系膜 PGCs 均有散在分布,主要集中于头部间充质区域,如箭头所示。

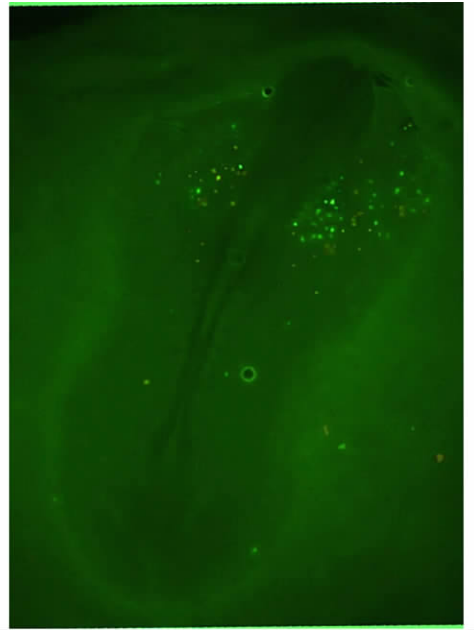


图 9 孵化 36 h 的鹌鹑胚盘整体染色观察 (40×)

Fig. 9 The observation of the whole embryo at 36 h post-incubation (40×)

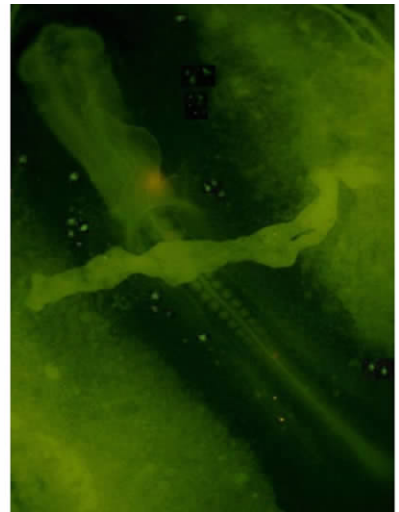


图 10 孵化 45 h 鹌鹑胚盘整体染色观察 (40×)

Fig. 10 The observation of the whole embryo at 45 h post-incubation (40×)

2.2 各期 PGCs 的分布数量的变化

各期鹌鹑胚盘中的 PGCs 数量见表 1。

表 1 各期鹌鹑胚盘中的 PGCs 数

Table 1 The PGCs amounts at different stages of quail embryo

分期 Stage	孵化时间/h Incubation time	样本数 Number	PGCs 数目 PGCs amounts	平均数 Mean
X-XI EG K ^a	0	6	未检测到 Not determined	
XII-XIII ^a 原条期 Primitive streak	6	5	11;9;21;13;10	12.8±4.82 ^a
头突期 Head process stage	18	3	114;109;97	106.7±8.74 ^b
三体节期 Third somite	19	6	101;112;73;89;123;77	95.8±19.74 ^b
七体节期 Seventh somite	23	5	183;154;121;179;104	148.2±34.95 ^{bc}
十体节期 Tenth somite	27	3	172;165;184	173.7±9.61 ^c
十八体节期 Eighteenth somite	36	7	202;191;168;231;206;187;211	199.4±19.97 ^c
	45	4	131;136;129;101	124.2±15.78 ^b

同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$); *. 分期按照文献[6];其余分期按照文献[7]

Different letters in the same column indicate significant difference($P < 0.05$); *. The stages are classified according to reference [6], other stages are classified according to reference [7]

3 讨论

以前诸多对早期 PGCs 迁移规律的报道表明: 原条期它们主要分布在胚盘头部区域, 即生殖新月区。研究报道在鸡、鸭、火鸡、山鹑、鹌鹑胚中都观察到了这一生殖新月区^[8], 它覆盖了整个胚盘头部区域的 2/3。由于特异性标记抗体的缺失, 以前不能观察到原条期以前鹌鹑胚盘的 PGCs 的分布情况。采用 QH1 单抗特异性的标记能实现并观察到早至未孵化时期的 PGCs。尽管卵黄或胚盘的背景色的干扰很强, 但仍能分辨出, PGCs 首先出现在靠近明暗交界区的暗区, 然后在第 XII-XIII EG K 期分布在明区, HH 第 II-III 期主要分布在明区, 并多数在胚盘头部区域。对于迁移到生殖新月区之前的鹌鹑胚 PGCs 的分布一直以来都存在争议。Andries 等^[8]预测未孵化期大多数 PGCs 分布在平行于胚尾区域的地方。本文研究结果支持 Fargeix 的观点, 在二体节期以后, PGCs 主要分散于头部区域, 包括暗区, 范围超越了生殖新月区。

另一个值得探讨的问题是 PGCs 在生殖部位是否有不对称分布性。鸟类左侧性腺通常比右侧性腺含有更多的 PGCs, 这一特性由 Didier 等在多个物种中得以证实^[9]。例如在 HH 第 25~26 期, 鸡左右两侧 PGCs 的分布比例为 80/20, 鹌鹑为 70/30, 鸭为 60/40。然而, 这一分布不对称性在孵化第 3 天时并不明显, 并且在鸡和鸭的不同品系也存在较大差异。Van Limborgh 等^[10]报道了自来航鸡的母鸡比公鸡存在更大的分布不对称性差异。要理解这一现象, 学术界提出了很多种解释, 例如: Van Limborgh 等^[10]提出的胚胎右旋转论; Van Limborgh 等^[11]提出的性腺中相邻体细胞对生殖细胞的诱引;

David 等^[12]提出的性腺外未知因子的影响。一些研究者在生殖新月区时即发现了 PGCs 有分布上的不对称性, 如 Clawson 和 Domm 对鸡的研究^[13]。我们的试验中并未发现这种分布的不对称, PGCs 在整个胚盘中是随机散在分布的。

一般而言, 在胚胎的各个时期检测到的 PGCs 数目存在较大差异。Clawson 等^[13]在对鸡的研究中, 发现原条早期到四体节期期间没有明显的增殖; 而在七体节期时有明显的增殖。有学者在鸡和鹌鹑胚盘中发现了原条期到七体节期之间, PGCs 有明显增殖^[13]。李碧春等^[14] PGCs 聚集的高峰期出现在孵化的第 V、XI、XIII、XIV 期。李赞东等^[15]发现荧光标记的鸡 PGCs 在微注射 48 h 后移动到胚胎生殖原基附近聚集。叶荣忠等^[16]认为鸭胚胎血液中 PGCs 数量的高峰期在第十六期。本文对鹌鹑的研究中发现, 未孵化期到原条期, 以及原条期到十体节期间 PGCs 数都有显著的增加。因此可以认为鹌鹑胚胎的原条期以及十体节期是 PGCs 的增殖时期。

4 结论

本研究结果表明, QH1 单抗可鉴定早至未孵化期的鹌鹑原始生殖细胞, 鹌鹑的原始生殖细胞 (PGCs) 起源于胚盘暗区, 而后逐渐迁移至明区、生殖新月区。孵化 45 h 时, 从头部到脐肠系膜 PGCs 均有散在和聚团分布, 并主要聚集在头部间充质的血管中。PGCs 在各个时期的数量存在差异, 有两个增殖高峰期, 即原条期(孵化 6 h)和十体节期(孵化 36 h)。

参考文献:

[1] GINSBURG M, EYAL-GILADI H. Temporal and

- spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo[J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1986,95(1): 53-71.
- [2] PARDANAUD L, ALTMANN C, KITOS P, et al. Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells[J]. *Development*, 1987,100(2): 339-349.
- [3] PARDANAUD L, BUCK C A, DIETERLEN-LIÈVRE F. Early germ cell segregation and distribution in the quail blastodisc[J]. *Cell Differ*, 1987,22(1): 47-59.
- [4] EYAL G H, GINSBURG M, FARBAROV A. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin[J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1981,65(1): 139-147.
- [5] FUJIMOTO T, UKESHIMA A, KIYOFUJI R. The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo[J]. *Anat Rec*, 1976, 185(2): 139-154.
- [6] EYAL-GILADI H, KOCHAV S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology[J]. *Dev Biol*, 1976,49(2): 321-337.
- [7] HAMBURGER V, HAMILTON H L. A series of normal stages in the development of the chick embryo [J]. *J Morphol*, 1951, 88(1): 49-92.
- [8] ANDRIES L, VANROELEN C, VANHOOF J, et al. Inhibition of cell spreading on the band of extracellular fibres in early chick and quail embryos[J]. *J Cell Sci*, 1985,74(1): 37-50.
- [9] DIDIER E, FARGEIX N. Aspects quantitatifs du peuplement des gonads par les cellules germinales chez embryon de Caille(*Coturnix coturnix japonica*) [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1976,3637-3648.
- [10] VAN LIMBORGH J, VAN FAASEN F. The asymmetry of the gonads in duck embryos experimentally turned on their right side[J]. *Acta Morphol Neerl Scand*, 1960,3: 79-91.
- [11] VAN LIMBORGH J. Transplantation of gonadal primordial in 26 to 38 somite stage duck embryos[J]. *Acta Morphol Neerl Scand*, 1962,5: 167-181.
- [12] DAVID D. Germ embryo populations of chicken and quail eggs after treatment with DDT [J]. *Wilhelm Roux's Arch*, 1975, 178:215-223.
- [13] CLAWSON R C, DOMM L V. Origin and early migration of PGC in the chick embryo. A study of the stages primitive streak to nine somites [J]. *Am J Anat*, 1969,125(1): 87-111.
- [14] 李碧春,陈国宏,李厚达,等. 鸡原始生殖细胞迁移和聚集规律的研究[J]. 江苏农业研究,2000,21(2):1-6.
- [15] 李赞东,李相芝,赵东风,等. 禽类原始生殖细胞的迁移能力[J]. 动物学报,2003,49(6):868-872.
- [16] 叶荣忠,张彦定,高建民,等. 鸭胚胎血液中 PGCs 数量及其外源 DNA 的体内转染[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2002,41(5):624-628.