

发育生物学

(下册)

北京师范大学
生物系
资料室

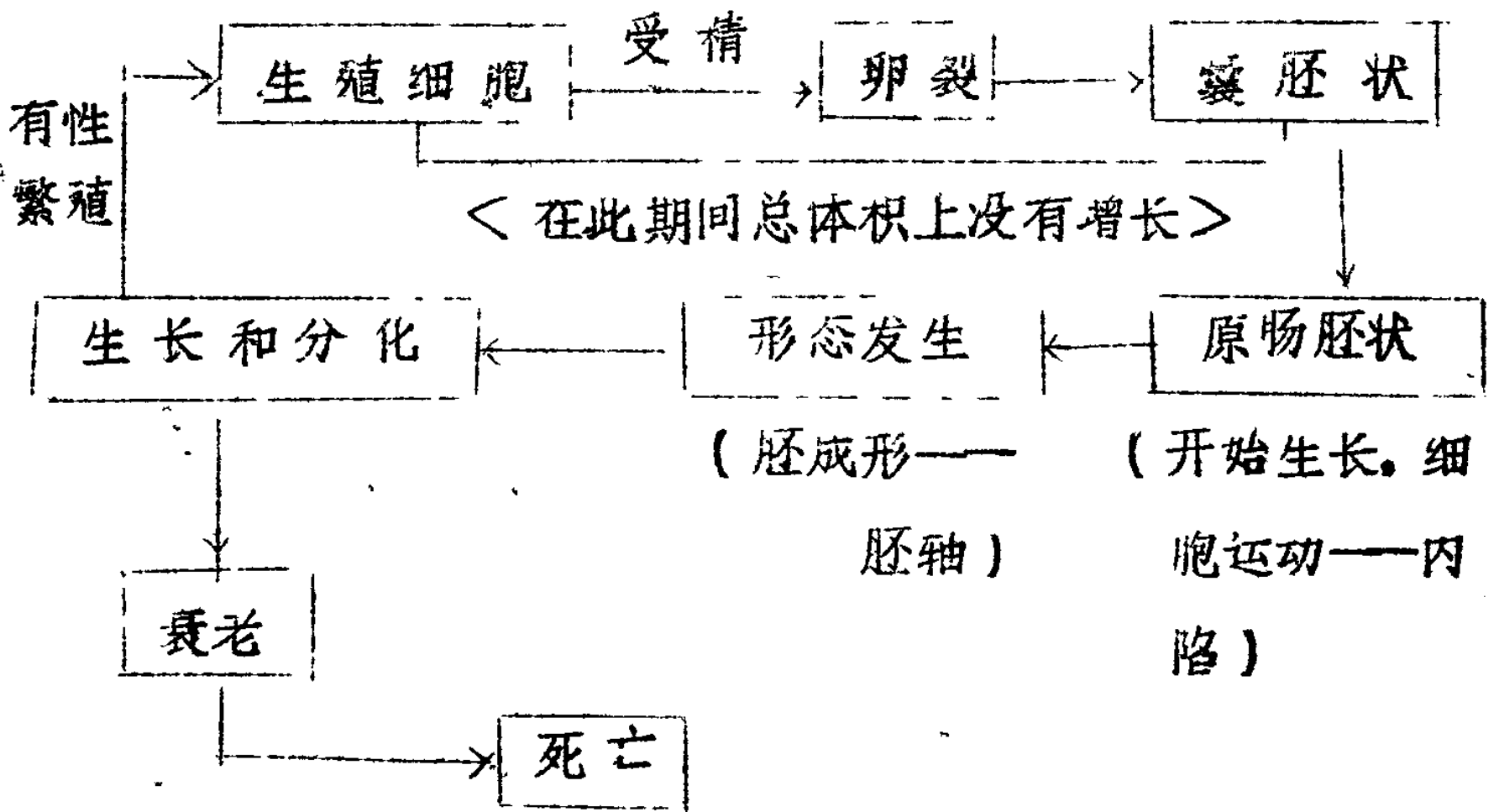
一九八〇年八月

985/1

生殖细胞的分化

北京师范大学
81-生物系
资料室
李双光

发育周期:

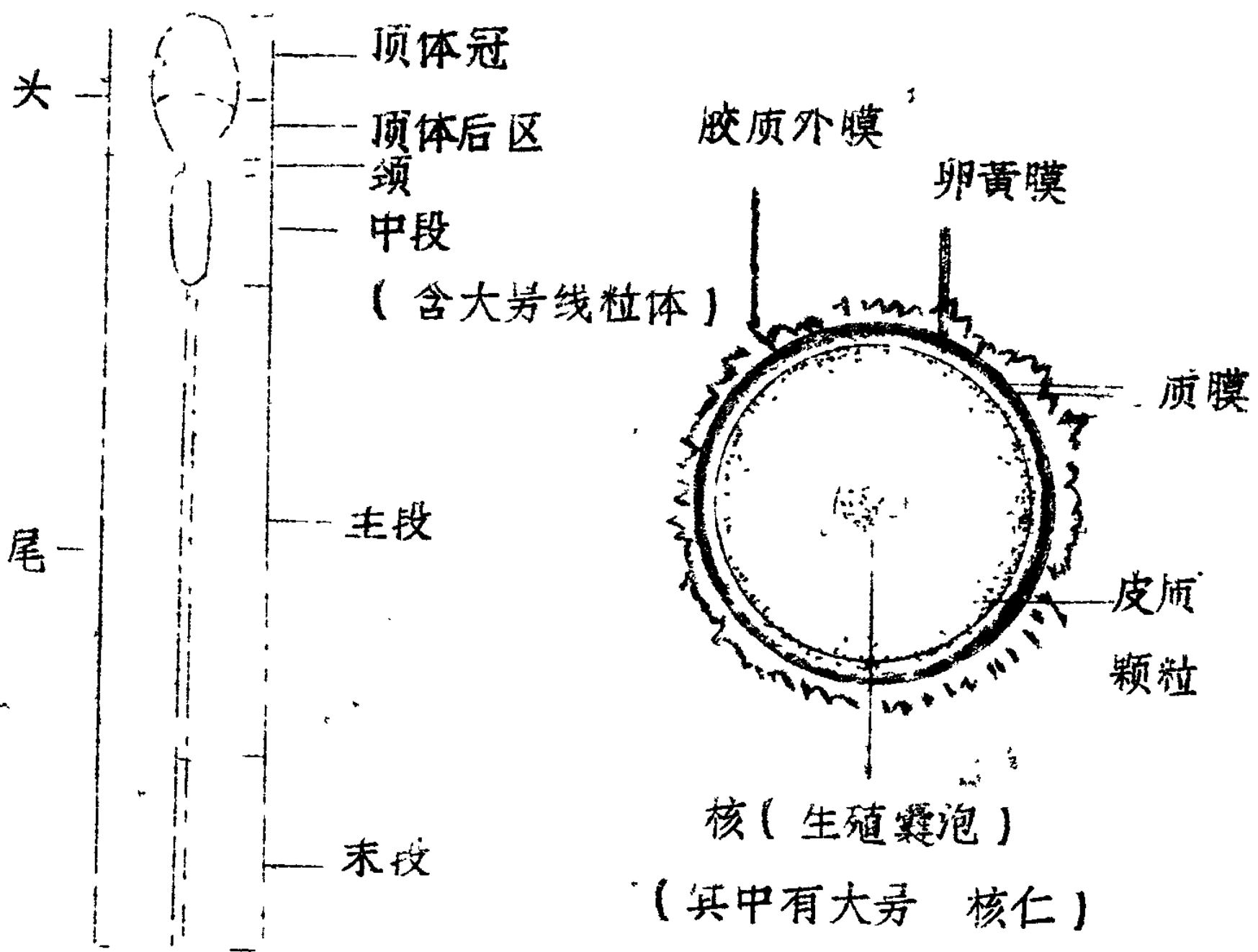


生殖细胞:

精子和卵是雌雄生殖细胞。它们都是单倍体(1N), 具有体细胞一半的DNA量。精子体积小, 没有细胞质; 卵大, 有细胞质——卵黄。

不同种属动物的生殖细胞在形态上不尽相同, 但是它们的原始生殖细胞(primordial germ cell)在形态上都一样。

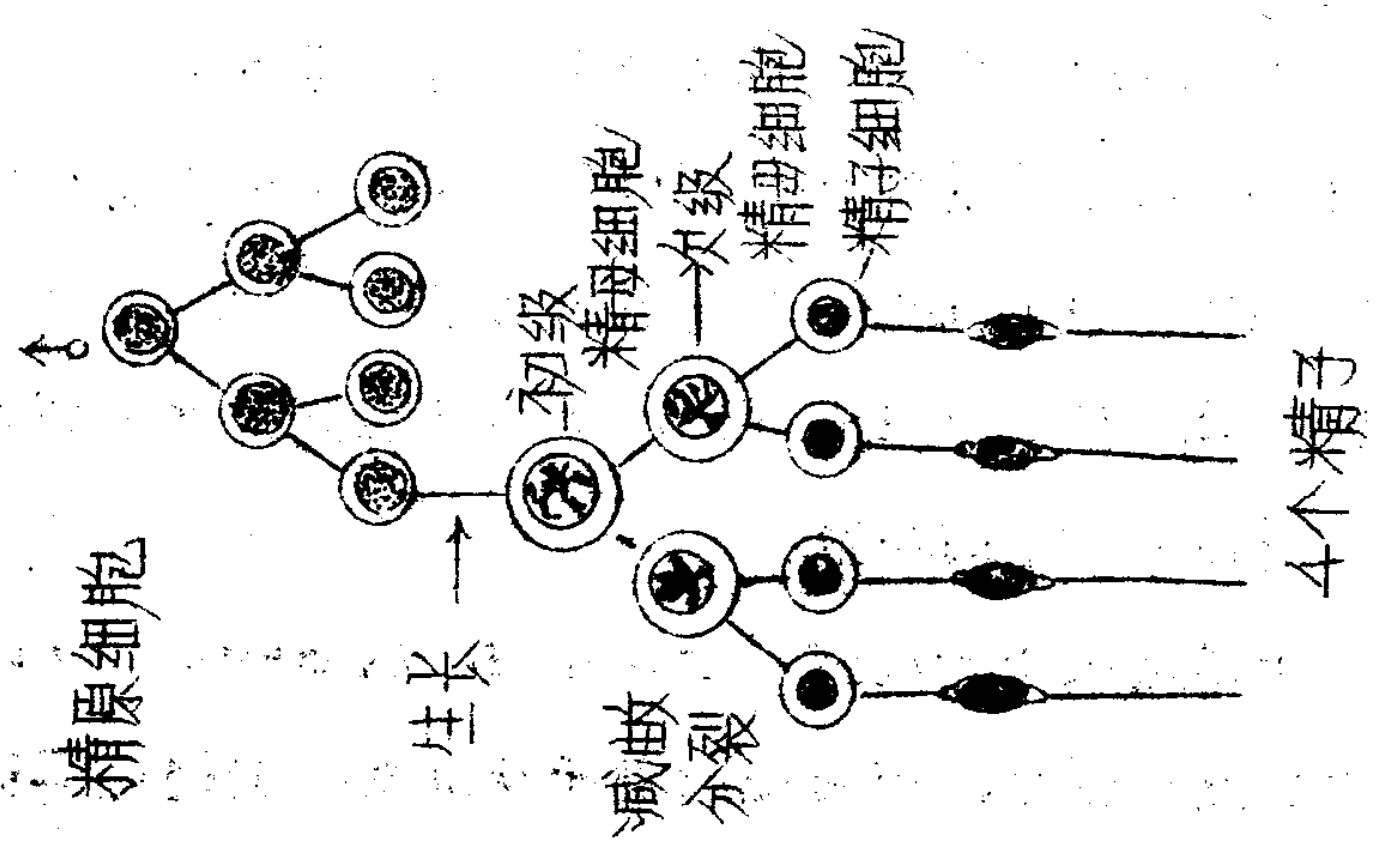
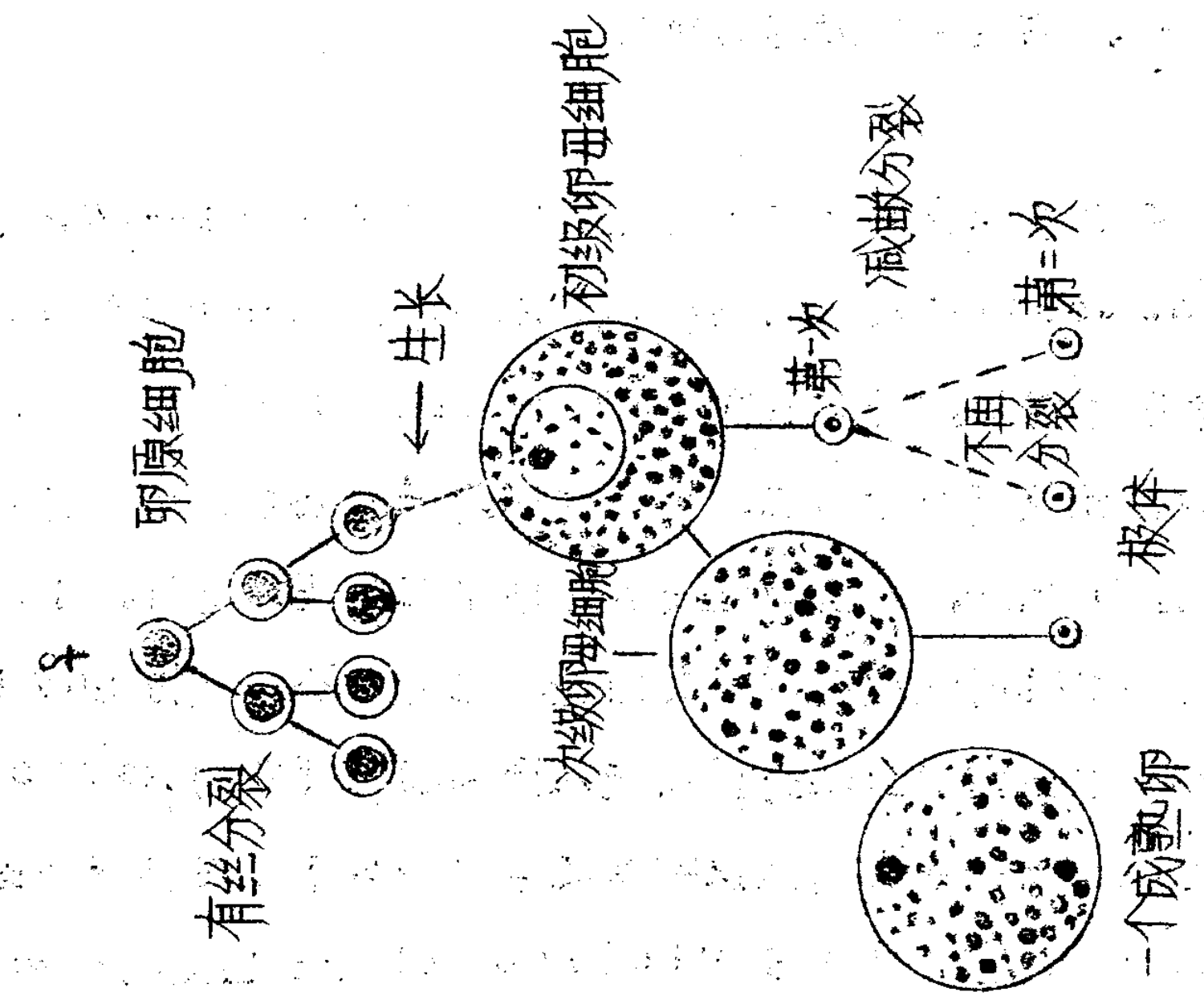
昆虫生殖细胞的生长是受生殖质(germ plasma)控制的。如果将pole cell移植到胚胎的其它地方, 它们就不能发育成生殖腺(gonad); 反过来, 若将其它部位的细胞移植到pole cell原先所在处时, 这些细胞就会发育成性腺。将胚



胎的生殖质除去。长成的个体就不会有性器官。这是因为在生殖质中存在一种因子，可以控制细胞的分裂方式，决定生殖细胞的分化。目前还没有确定这种因子是什么物质，大多数人认为是 RNP (ribonucleo protein)，是电镜观察做出的结论。

男性和女性生殖细胞的分化很不相同，男性生殖细胞的分化是连续进行而且无周期性的，女性则是不连续而且有周期性。一个精原细胞最终产生4个成熟精子，一个卵原细胞只能产生一个有功能的卵子。下图给出两性生殖细胞的分化过程：

在男性睾丸的曲细精管中有一种很重要的细胞，叫做 Sertoli cell，这种细胞个很大，与精子细胞相连着。Sertoli cell 的作用：做 testosterone receptor



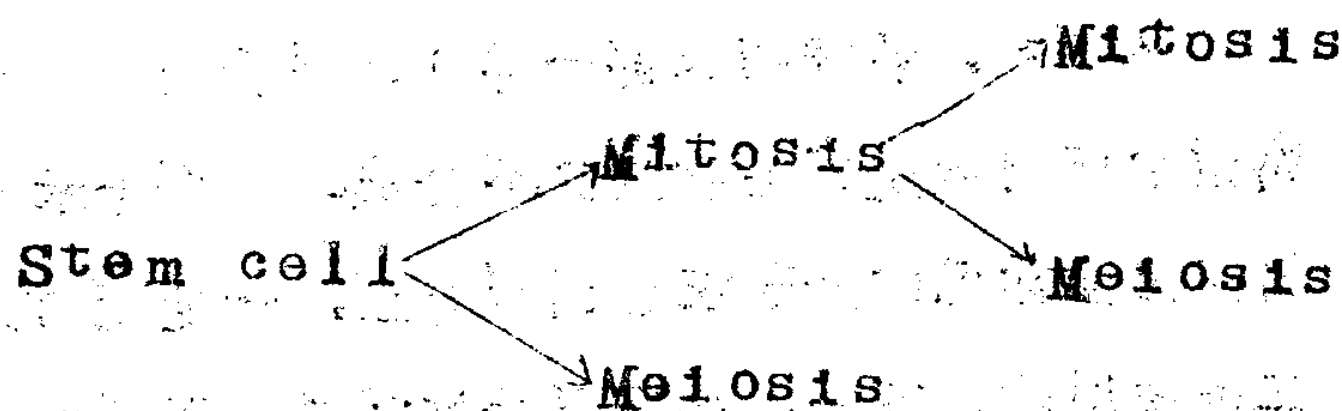
但 receptor 是在细胞外, Sertoli, cell 作用可能是帮助精子分化。但还未证实。

一、雄性生殖细胞的分化

在男性睾丸的曲细精管之间有一种细胞, 可分泌睾固酮 (Testosterone)。这种细胞是以德国解剖学家 Leydig 的名字命名的, 叫做 Leydig cell。如果没有 Leydig 氏细胞, 就没有精子形成, 这就是说, 睾固酮对精子的发生起调控作用。(此外, 睾固酮还促进男性第二性征的发育。) 对于睾固酮的作用机制还没有确定的结论, 因为还不知道由 Leydig cell 生出的睾固酮是直接进入到曲细精管中的 Sertoli 细胞 (此细胞以一意大利组织学家之名而命名) 之内抑或在此细胞之外起作用。在睾丸里 Sertoli cell 外面已发现有睾固酮的受体, 及受体与激素结合的复合物, 诱导精子生成。但至目前尚未肯定此复合物到底是在细胞内还是在细胞外起作用。

在美国, 已开始进行 Sertoli 细胞, 生殖细胞 (目前只有 Salmon 鱼一种)、Leydig 细胞的体外培养, 相信将此三个系统结合起来, 对由精原细胞到精子的过程能进行很好的研究, 以了解清楚其中控制的环节。

细胞分化是从第一次减数分裂开始, 从 Stem cell (干细胞) 到成熟的精子, 中间要经过许多阶段, 关键是二次减数分裂。若 Stem cell 进行有丝分裂, 其结果表现为 Stem cell 的增殖。这就是说, Stem cell 有两条路可走, 如下图:



就此可以提出以下几个问题：(1)在精子生成过程中，细胞质的去除、尾巴形成的机制如何？是否自我装配的结果？(2) Stem cell 进行减数分裂还是有丝分裂由什么因素决定，Test-Rec: complex 可以刺激精子生成，若假设复合物是在 Sertoli cell 表面上，则与 Sertoli cell 相接触的 Stem cell 就会进行减数分裂，其他的 Stem cell 就进行有丝分裂，可是在无 Sertoli 的系统里，也能找到这种复合物，到底二者的接触与减数分裂有否关系？Sertoli cell 和 Germ cell 的联系是否重要？这还是个难题。Stem cell 一旦开始减数分裂，就不再需要激素而能继续分化，直到成为成熟的精子。

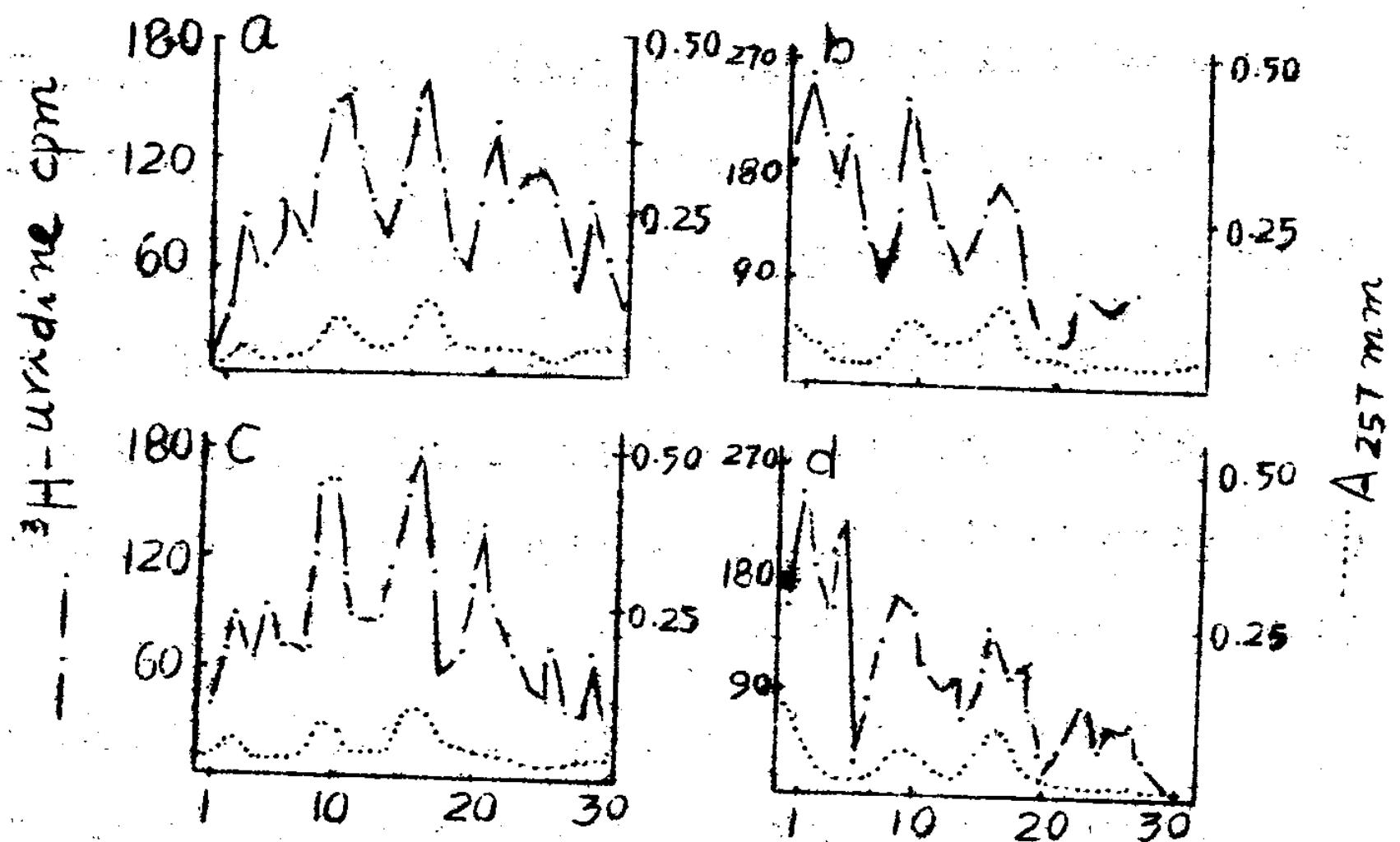
随便找哪一个系统，细胞在分化之前都要通过增殖阶段 (Proliferation)，例如 Stem cell, Imaginal Disc。过去认为细胞分裂则不会分化，这是错误的。

一般精子的结构如大家所熟知，但精子的形态则不尽相同。

成熟精子几乎无细胞质，所以由圆形的精细胞到成熟的精子要排除细胞质，也就是蛋白质不合成。大家知道，在具有不同分化特性的细胞中，都有与其功能有关的特殊蛋白，那么精细胞中被除去的是什么呢？如果被去除的是与功能有关的特殊分子 (叫做 Luxury molecules)，精子的产生就成为不可能。若除去的是与结构有关的那些分子 (House Keeping mole-

cules, 各种细胞都一样), 则长成的精子一定很小。要研究精子中到底是哪些种蛋白不合成, 最好是采用同位素标记法: 将同位素标记的分子注射到睪丸里, 一是进行细胞的放射自显影, 二是使用物理方法, 如密度梯度沉降、电泳等, 进行细胞组分的分离, 然后在细胞分化的不同时期进行测定, 确定是哪些RNA或蛋白被标记。

下面一个实验给出生殖细胞在发育不同阶段RNA合成的情况如下图:

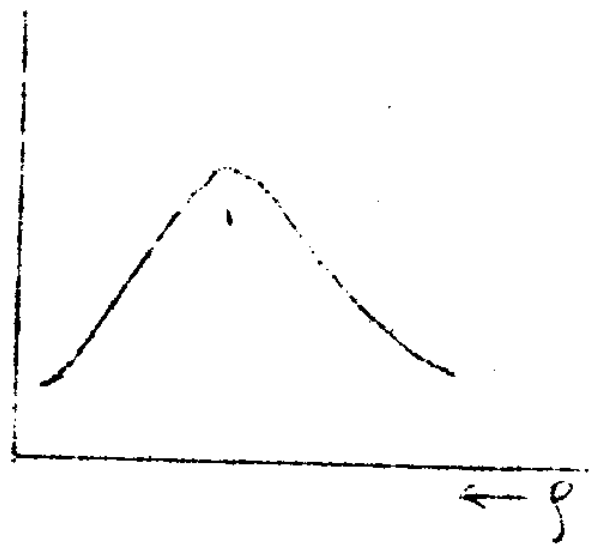


碎片数目

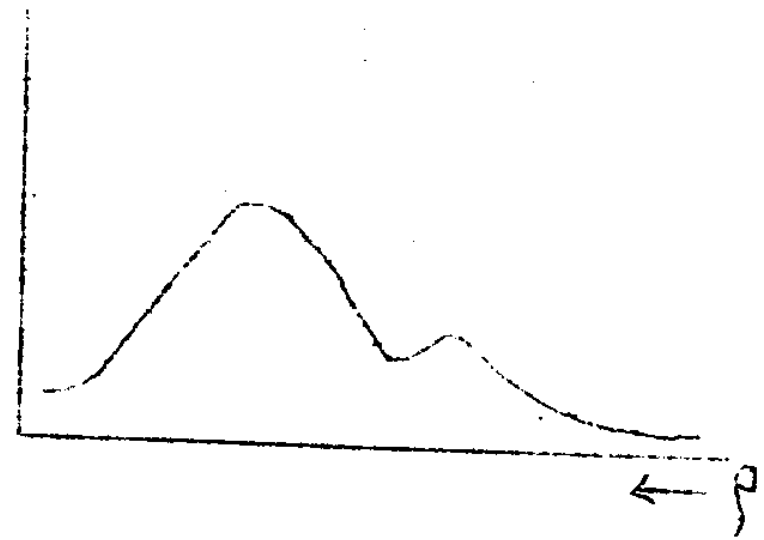
- a: 双线中期精母细胞
 - b: 双线晚期精母细胞
 - c: 圆精子细胞 (#1)
 - d: 圆精子细胞 (#8)
- 加入 ^3H -u 3 小时
- 加入 ^3H -u 3 小时,
- 再换成普通 5 小时。

可以看到不同分子大小的RNA是有改变的。

从百合花花药(Lily anther花中带花粉的部分)里取出花粉(Pollen)的DNA,进行CsCl梯度离心,并与花的其他细胞(体细胞)DNA进行比较,如下图:



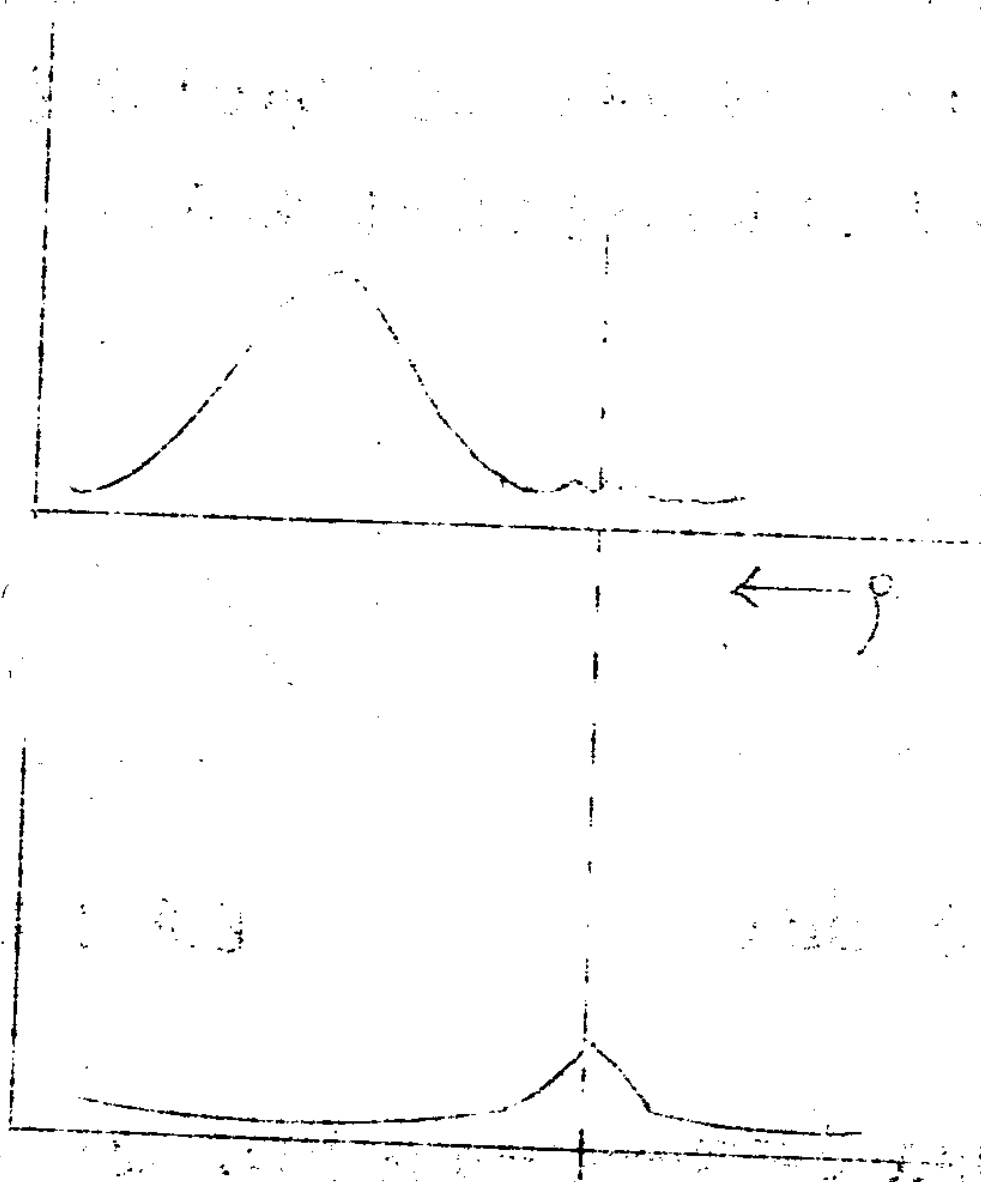
体细胞 DNA



花粉 DNA

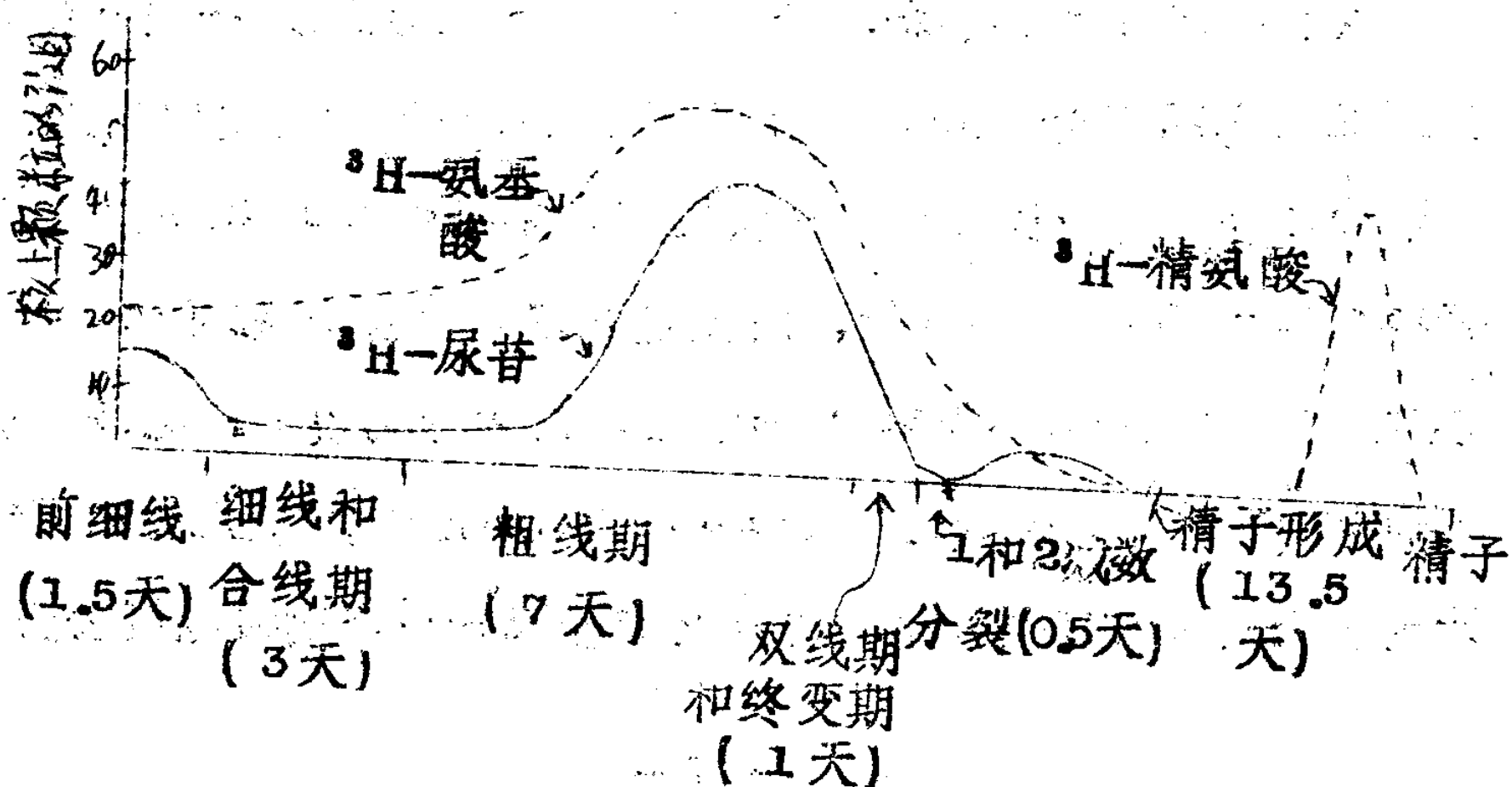
在花粉DNA图中有一大一小两个峰,而体细胞DNA只有一个峰。许多人对病毒DNA进行分析,都发现在主体DNA旁边有一些很小的峰(称为Satellite DNA)。有个日本人将每次实验的satellite卫星DNA收集起来,进行同样的实验过程,结果如下图,图见下页

人们将这种与主峰DNA不同者叫做卫星DNA。一些研究表明,卫星DNA的合成是在S末期,而且只在生殖细胞中得到表达(如百合花花粉DNA),所以又称为Meiotic DNA。如果Meiotic DNA发生突变,则生殖能力会受到影响。Meiotic DNA经转录生成Meiotic mRNA,后者作为模板,翻译出Meiotic protein。Meiotic DNA小于总DNA的1%,产生出来的蛋白质也很小,所以它的合成并不影响细胞质去除的



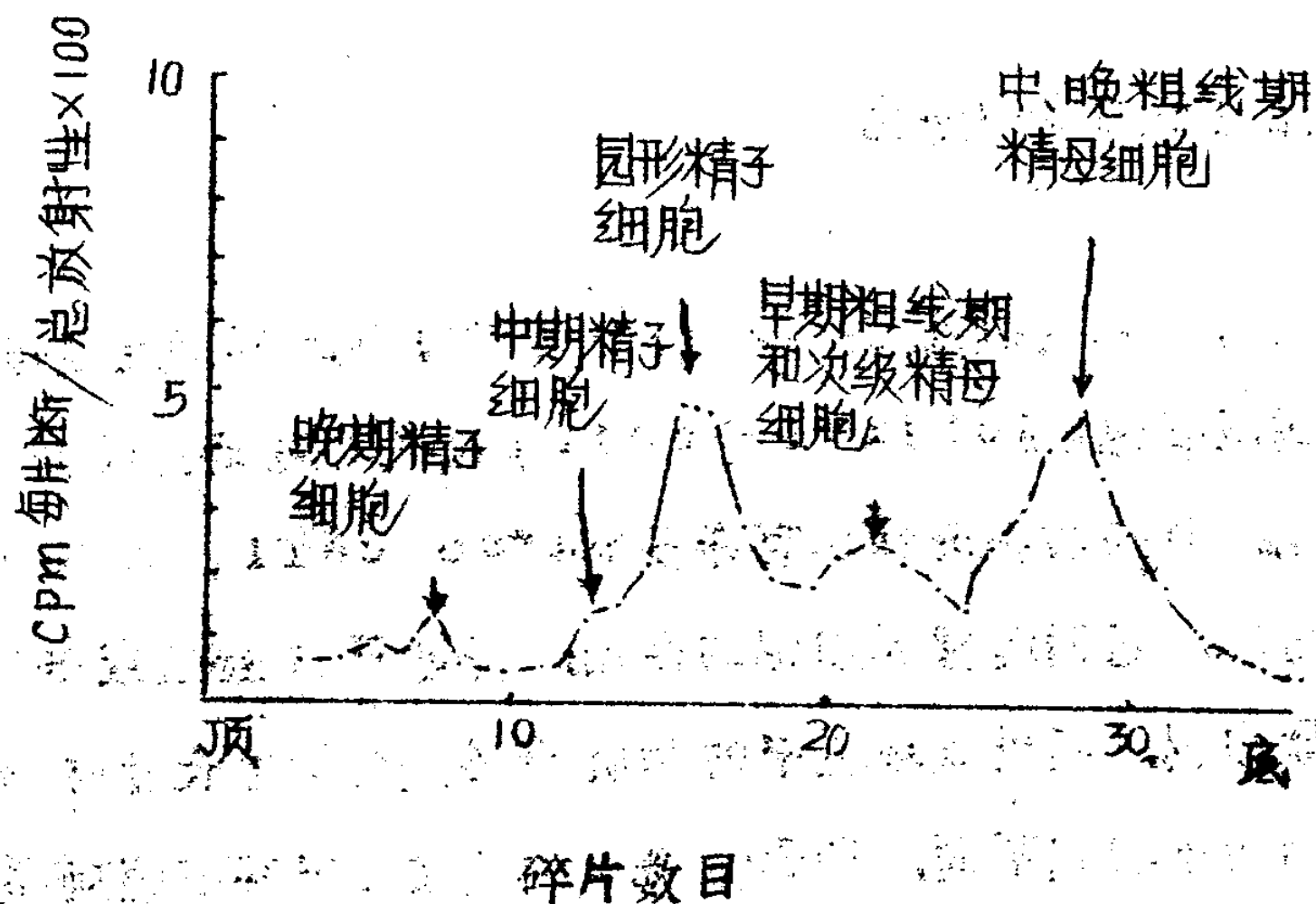
效果。有人认为 Meiotic DNA 的表达是随机的，就是说，干细胞是进行有丝分裂还是进行减数分裂并无一定的根据。可是事实证明细胞分化是很有规律的，因此这种理论很难被接受。

下图给出减数分裂和减数分裂后细胞的 RNA 合成及氨基酸掺入蛋白质的情况：



RNA的合成一直延续到细胞开始减数分裂，即精子生成的第二个阶段，以粗线期合成最多。在此期氨基酸掺入核蛋白的另也最多。唯独精氨酸特殊，它在RNA合成已经停止，精子即将成熟的时候才掺入核蛋白。组蛋白是碱性蛋白，其各碱性氨基酸的含另，在体细胞与在精细胞有所不同，对体细胞蛋白，赖氨酸大于精氨酸，对精子组蛋白则相反，精氨酸大于赖氨酸。其它成份，如不含色氨酸，则富含组氨酸等没有明显的不同。过去有理论认为，精子核组蛋白中的Arg，控制性细胞特异基因的表达，可是这条氨基酸掺入曲线推翻了这个理论，因为，若组蛋白中的Arg，控制特异基因的表达，那末，Arg的掺入应在RNA合成之前，而不应在其后。因此，只能假设Arg是基因表达的产物。

现在再来看看经X射线处理过的小鼠生殖细胞在不同时期合成RNA的情况：



横坐标是 Ficol1 的梯度分布，纵坐标是各组分的 cPm 占总放射性的百分数。

从上面分析 RNA 的实验得到的结果，可以证明在生殖细胞分化的不同阶段，基因的表达是不相同的，某一阶段开放的基因，在另一阶段可能关闭，即使在细胞质除去的过程中，也不是所有基因都关闭。分析蛋白质中也可得到以上结论，下图就是将不同阶段细胞蛋白质进行分离比较的情况，图见下页

标有字母的地方是在不同阶段细胞中含身发生改变的蛋白。另有一种方法是在蛋白质图谱上找出一些已知蛋白，做它们之间的连线，其结果将所有蛋白划分在若干个小时的区域内，以这些小区域为单位进行比较，结果会更准确些。

蛋白质分离的方法很多，如 SDS 电泳—等电聚焦密度梯度离心等等，对蛋白质本身往往进行同位素或荧光标记。

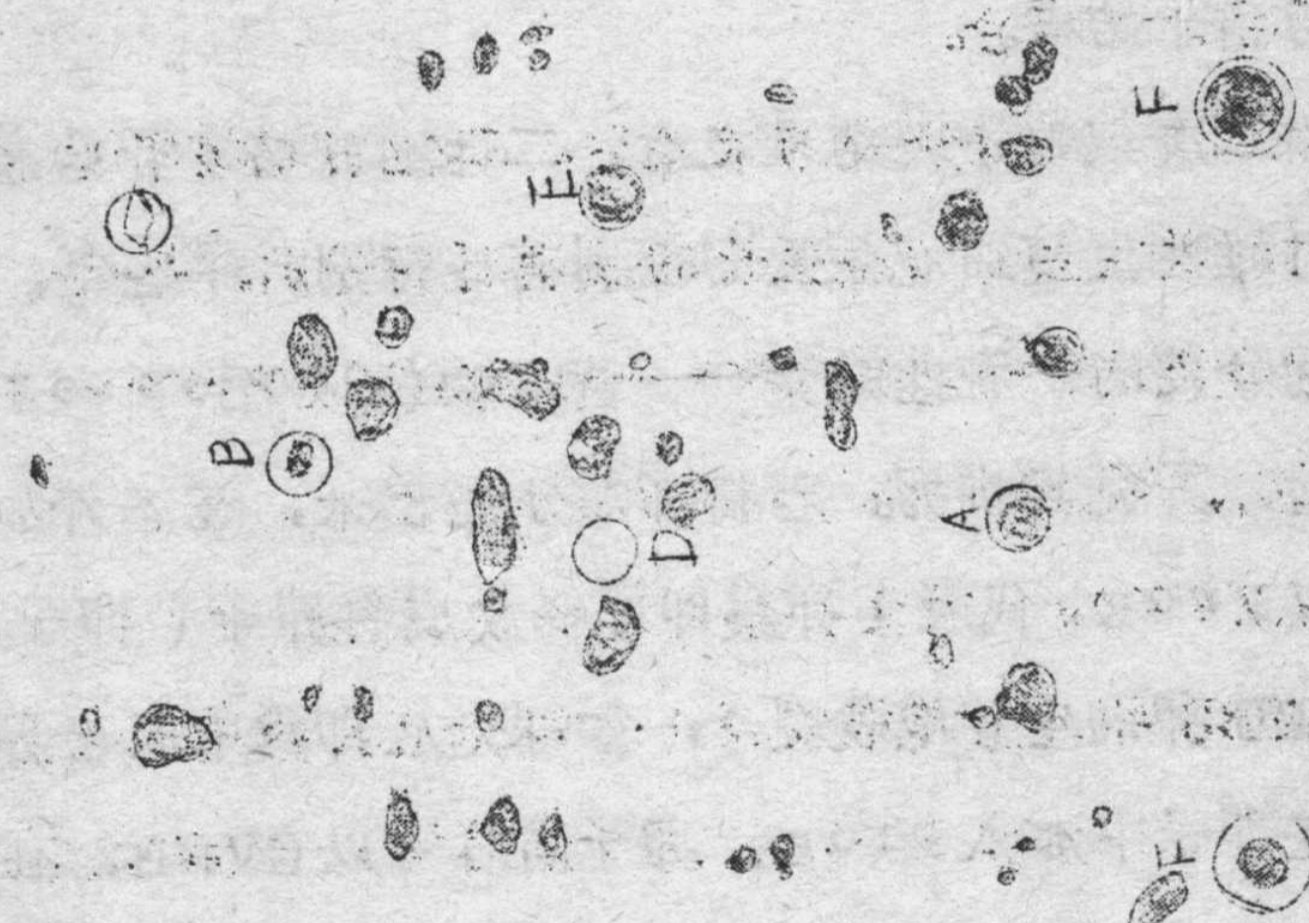
二、雌性生殖细胞的分化

哺乳类动物的生殖细胞位于卵巢 (ovary) 内，其特点是每一个由许多滤泡细胞 (Follicle cell) 组成的间隔里只含有一个卵母细胞。有些动物的卵巢有许多 nurse cell，这些细胞彼此是连通的，它们起营养细胞的作用，将自己的 RNA 或蛋白质输送给卵母细胞，或吸收环境中的物质转移给处于生长阶段的卵母细胞。和精子细胞不同，卵母细胞在分化过程中其细胞质不是减少而是增加，主要是 Nurse 细胞供给的，当然也不排除卵母细胞本身基因的作用。不管这些大分子 (RNA, 蛋白质) 的来

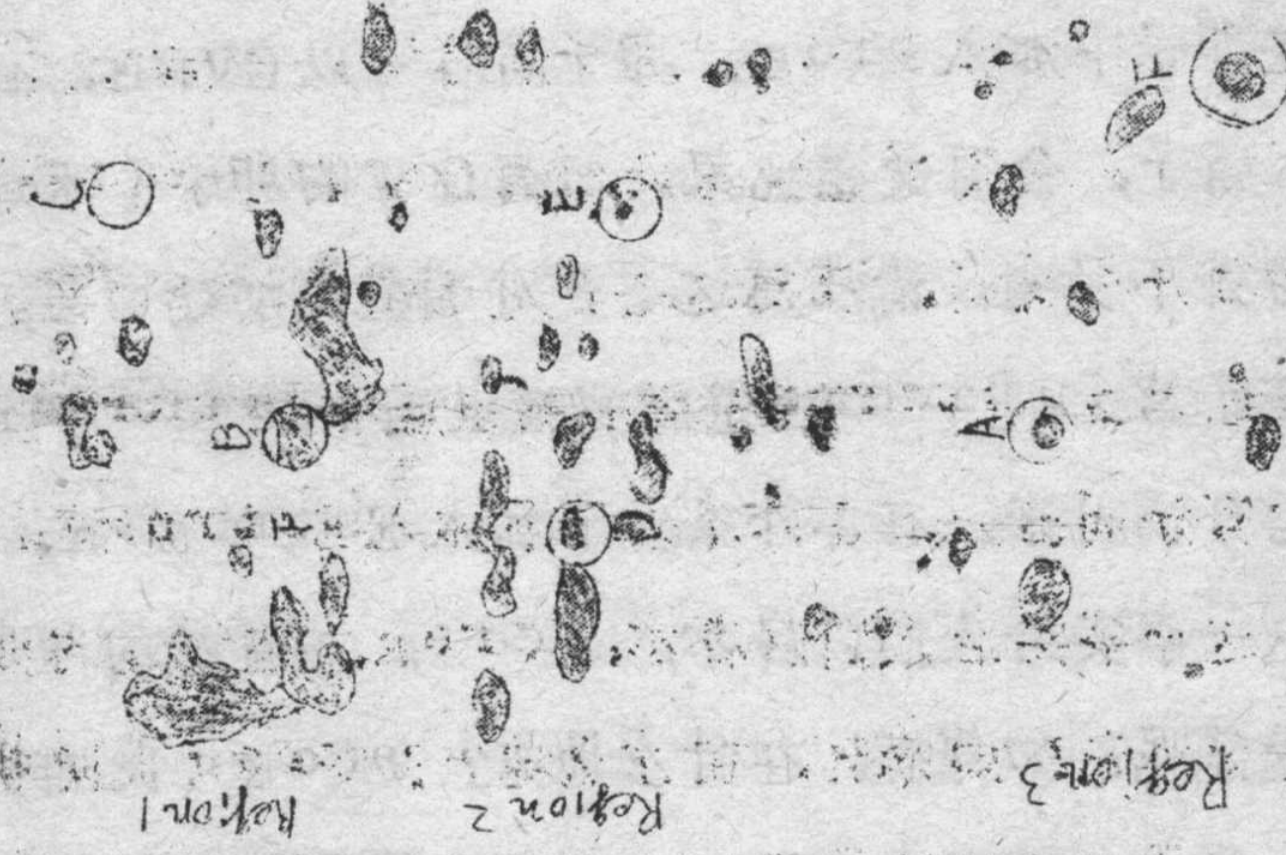
中期精子细胞



圆的精子细胞



中晚期线期精母细胞



源如何。需要强调的是它们都是母源的 (maternal)，所以这些 RNA 被叫做 maternal RNA 或 stored RNA。它们在卵母细胞中较为稳定，寿命长。

卵子的分化是不连续的。卵母细胞在双线期 (4N) 往往要静止许多年。前面提到过这是与雄性生殖细胞分化的不同点之一。

请看下图：

不同种动物出生时以及精子进入卵时，其卵母细胞的分化、成熟程度并不完全相同。例如狗、狐的卵母细胞在与精子结合以后才开始第一次减数分裂，而大多数哺乳类动物在第一次减数分裂之后才与精子结合。

只有第二次减数分裂结束之后，二性细胞核才开始靠近。

激素对雌性生殖细胞生长的控制有些特别。早些年，人们将哺乳类动物分泌的一种性激素——黄体酮 (Progesterone) 给青蛙注射，可促其排卵。若将卵巢分离出来，在体外加入黄体酮 (以后以 prog. 代表) 卵巢即可释放成熟卵子 (卵子成熟的标志是 GVBD 卵的生殖泡破裂)；如果先从卵巢中取出卵子 (有 GV)，在卵子中加入 prog.，卵子同样可以 GVBD。在这样的卵子中加入精子，会有受精现象，而有 GV 的卵子 (未成熟卵) 加入精子后并不受精。请注意这不是对哺乳类动物而言。

已知在子宫 (uterus) 壁细胞核里有 (Estrogen) 的受体。将子宫分离出来，在体外条件下加入 Estrogen，细胞就会分裂。这一事实给人们以启示：prog. 在青蛙的卵母细胞里是否也有受体呢？如果有，在什么地方？prog 促排卵的事实早已知道，假设 BVBD 是 prog. 与 GV 相互作用的结果。将 prog 直接注射进卵母细胞应该出现 GVBD，可细胞并没有 GVBD。

有丝分裂增殖
移向生殖嵴

出生—兔, 貂, 水貂, 田鼠, 仓鼠

最后的间期
DNA合成
减数分裂前期开始

出生—大多哺乳类

卵母细胞的生长和卵泡

青春期

卵泡的成熟

排卵—狗, 狐

第一次减数分裂开始

精子进入—狗, 狐

第一个极体排出

排卵—大多哺乳类

精子进入—大多哺乳类

第二次减数分裂

受精和第二个极体产生

生殖细胞
状态

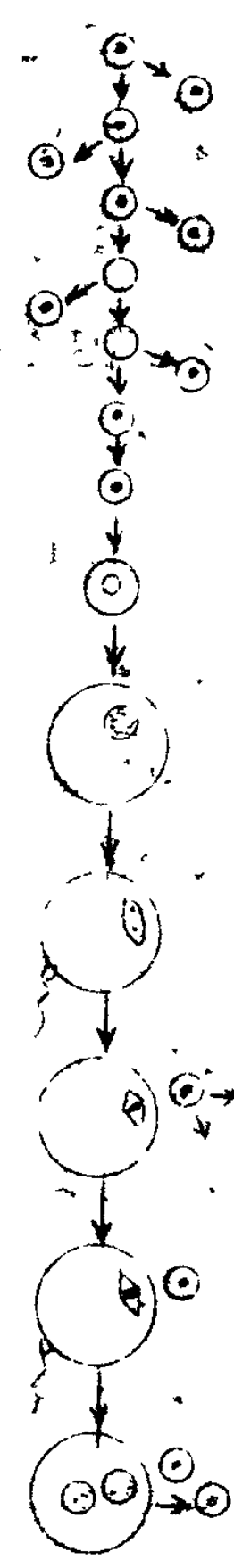
原始生殖细胞

卵原细胞

初级
卵母细胞

次级卵
母细胞

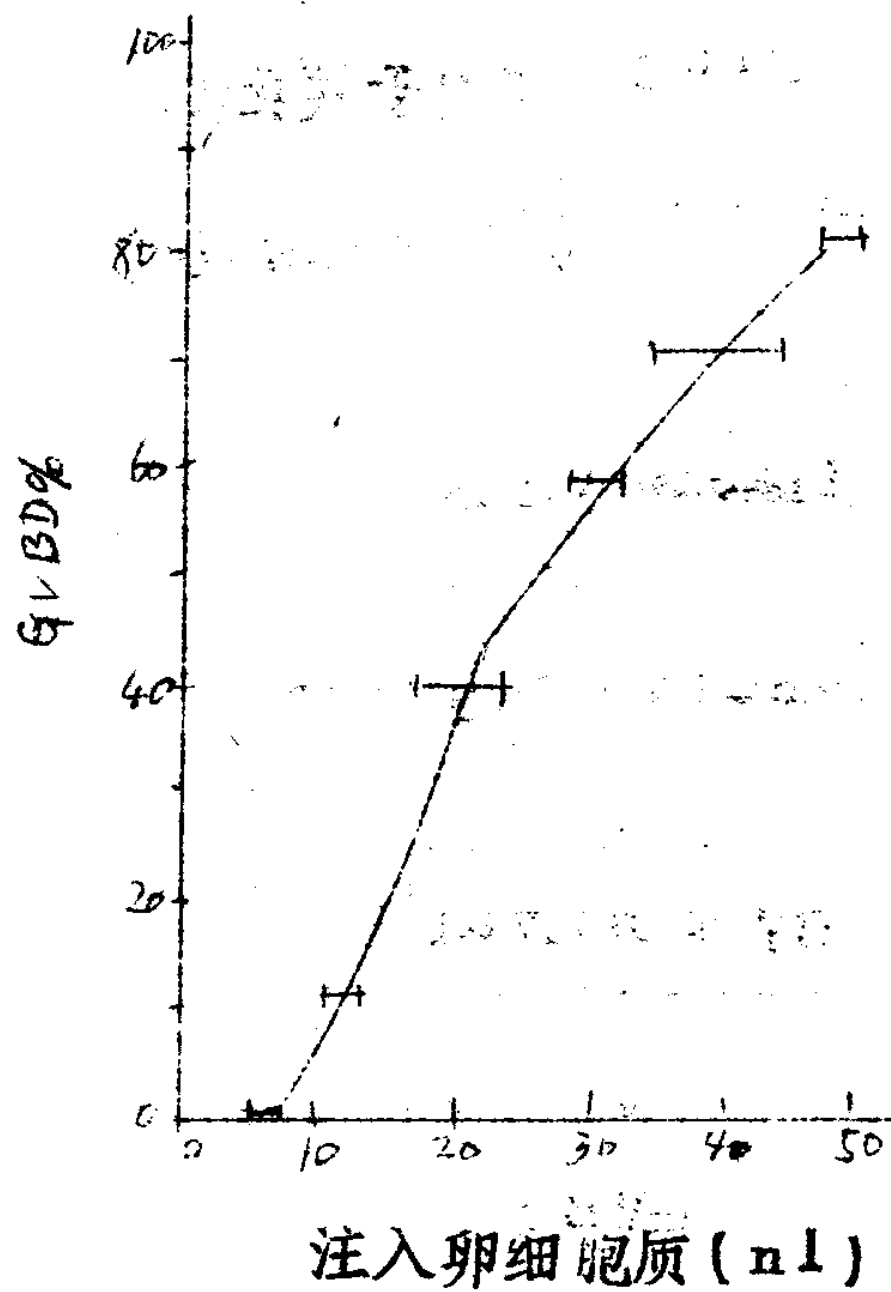
受精卵



说明 prog 和细胞内部物质（包括核）没有作用，也说明了 prog 促 GVBD 并不需要进到细胞里面去。于是又有假设，prog 是与细胞膜起作用，有几种可能性（即作用机制）：1 prog 与细胞膜作用后，变成另一种有活力的代谢物进入细胞而起作用；2. prog 诱导细胞表面发生变化，导致细胞内的第三者与 GV 作用。人们想象这个因子是 Cytoplasmic maturation factor 简称 CMF。为证实以上假设，将 prog 用同位素标记，再加入卵子中，若假设 1 正确，则在细胞内应找到带有标记的 prog 的代谢物，但 ARG（放射自显影）的结果表明细胞内并没有 prog 的任何其它形式。如何证实第二种假设即 CMF 的存在呢？将经 prog 作用过（已经 GVBD）的卵母细胞质注射到另一未成熟的卵母细胞内，若细胞质含有 CMF 则应该有：1. 接受细胞质的细胞 GVBD；2. 细胞成熟的速度随注入细胞质量增加而加快。下图表示的实验结果是注射量与 GVBD 百分数的关系，事实证明 CMF 是确实存在的。接踵而来的问题是：

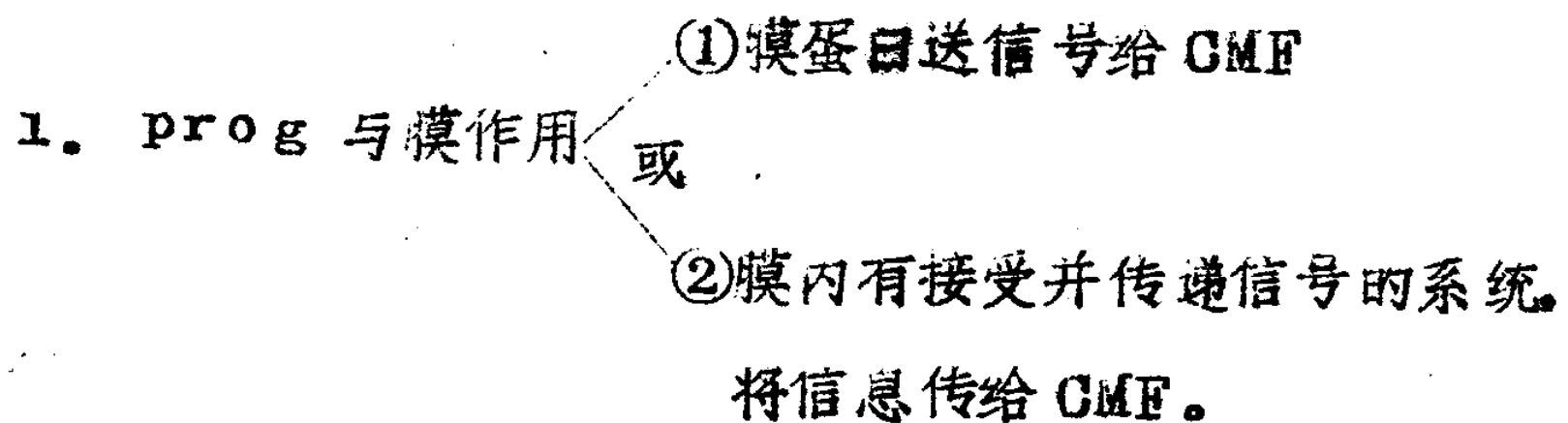
1. CMF 与核膜作用，分解核膜？
2. CMF 与 DNA 或染色体蛋白作用？
3. GVBD 对于减数分裂是否必须？

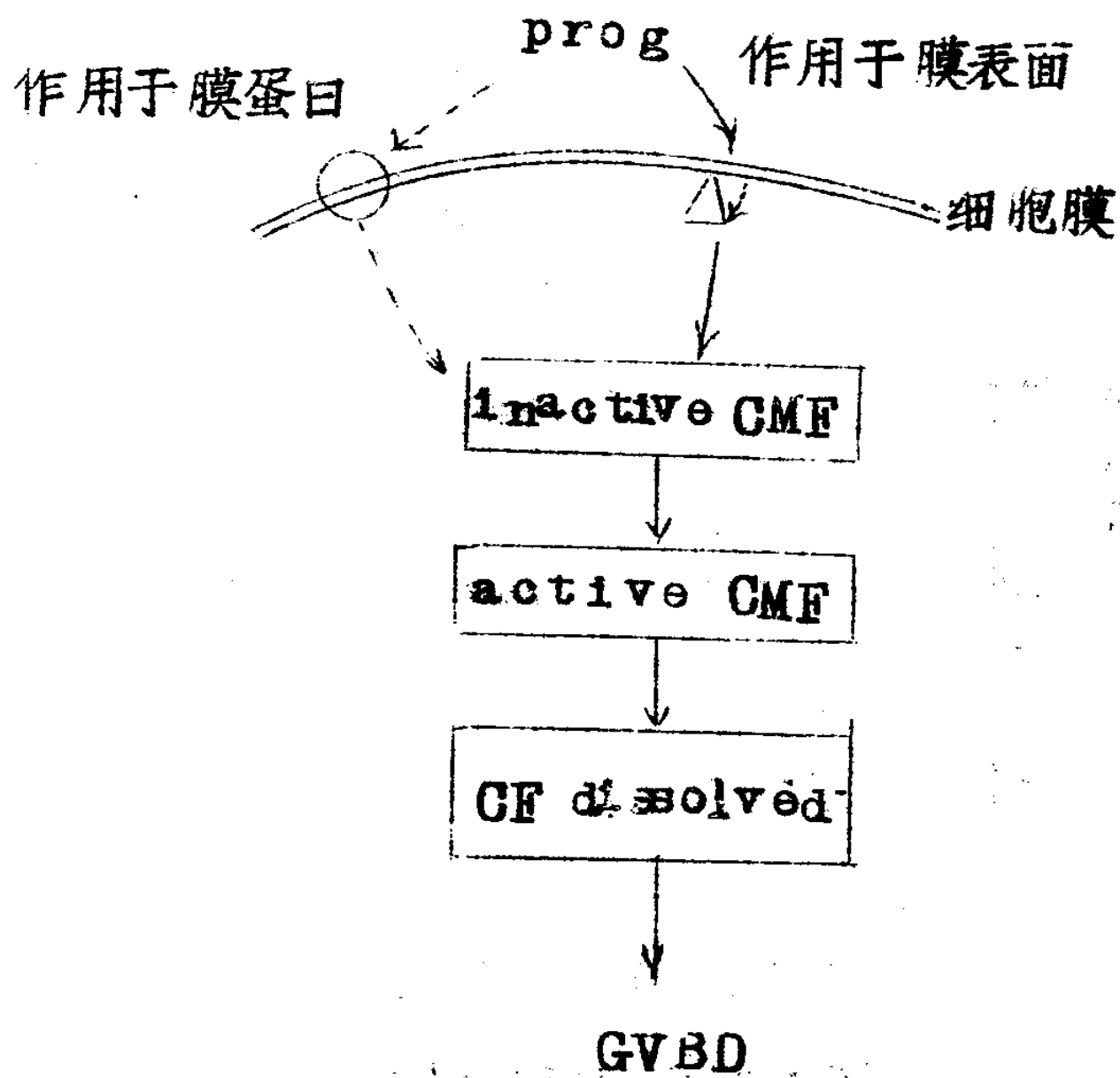
对于哺乳类动物，不成熟的卵直到其长成熟，在卵巢里可呆一年之久，开始有人认为是 prog 的缺乏，这个说法被否定了，在这期间不能说 prog 对其细胞膜没有作用或细胞膜未分化，对 prog，无反应。不过目前对于膜的分化尚不清楚。在未成熟的卵母细胞内是否存在与 prog 相抗衡的因子，抑制 GVBD？有实验如下：将一未成熟卵的细胞质注入另一未成熟卵内，同时在周围解质中加 prog。若细胞出现 GVBD，说明细胞质中不存在



抑制因素；但实验给出相反的结果：卵不发生GVBD。（依赖于细胞质的注入量）。这就证实了细胞质内确实存在一种因子（Cytostatic Factor）其作用与CME相反。它在细胞内的存在可以保持GV的结构。

下面这个模式给出CME，CF，prog之间的关系和作用机制的假设。





2. CME 被激活。其结果是 CF 分解

3. GV 失去 CF 的保护 GVBD

在此模式中 CME 并不直接与 GV 作用。

受精过程很迅速。一旦受精，首先发生生物化学方面的改变。

有实验证明受精卵与未受精卵的蛋白质成分有所不同。

北京大学 盖晓霞整理