

- 高等医学院校改革创新教材
- 供临床医学等专业用

人体发生发育学

主 编◎余 鸿



THE HISTORY OF THE

1840-1850

The history of the United States from 1840 to 1850 is a period of significant change and development. This era is characterized by the expansion of territorial acquisition, the growth of the industrial revolution, and the deepening of sectional tensions between the North and the South. The period begins with the acquisition of the Oregon Territory and the Texas Annexation, leading to the Mexican-American War. The war results in the acquisition of the Mexican Cession, which includes California, New Mexico, and Arizona. The industrial revolution is in full swing, with the invention of the steam locomotive and the cotton gin. The North is becoming increasingly industrialized, while the South remains a slave-based agricultural economy. The period ends with the Compromise of 1850, which temporarily resolves the sectional tensions over the issue of slavery in the newly acquired territories.

THE HISTORY OF THE

高等医学院校改革创新教材
供临床医学等专业用

人体发生发育学

主 编 余 鸿

副主编 吴绍华 郭 勇 程基焱

编 委 (以姓氏笔画为序)

王巧稚 王特为 甘彦峰 伍丽娜

刘国红 邹礼乐 吴绍华 余 鸿

杨小红 赵宏贤 钟小明 郭 勇

徐富翠 黄吉春 曹 坤 梅欣明

韩 艺 彭 柯 程基焱

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

人体发生发育学/余鸿主编. —北京:人民卫生出版社,
2009.2

ISBN 978-7-117-11182-9

I. 人… II. 余… III. 发育-人体生理学
IV. R339.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 000660 号

人体发生发育学

主 编:余 鸿

出版发行:人民卫生出版社(中继线 010-67616688)

地 址:北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编:100078

网 址:<http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线:010-67605754 010-65264830

印 刷:三河市富华印刷包装有限公司

经 销:新华书店

开 本:787×1092 1/16 印张:16.5

字 数:391 千字

版 次:2009 年 2 月第 1 版 2009 年 2 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号:ISBN 978-7-117-11182-9/R·11183

定 价:28.00 元

版权所有,侵权必究,打击盗版举报电话:010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

内 容 简 介

本书是编者在参考了国内外现有的相关教材和参考书的基础之上,为适应高等医学教育事业的发展,结合国内部分医学院校开设《人体发生发育学》课程的实际情况,组织部分有多年教学经验的教师编写的。

本书主要介绍人体在胚胎期的发生,同时简要介绍出生后的人体发育。全书分四篇,共 26 章,其主要特点在于:①侧重于人体发生发育与临床医学的联系;②强调该领域的新进展;③本书以专题形式简要介绍了与该学科相关的几个可能存在有争议的研究热点问题,供大家参考和讨论。

本书可供高等医药院校学生使用,也可作为相关学科教师、临床医生和科技工作者阅读参考。

前 言

为适应高等医学教育事业的发展,结合国内部分医学院校开设《人体发生发育学》课程的实际情况,编委会组织了部分有多年《人体发生发育学》教学经验的教师编写了这本书,希望能对该领域感兴趣的广大同行和同学提供些许帮助。

人体发生发育学是组织胚胎学、解剖学、细胞生物学、遗传学、分子生物学、儿科学、儿童保健学、儿童精神医学、老年医学、心理学等学科相互渗透而发展建立起来的一门交叉学科,应用各个学科中的先进理论和技术来探讨人体发生发育中的问题。医学生通过《人体发生发育学》的学习,可了解人生命的开始和人体发生过程中的许多重要变化,掌握人体各种器官、结构之间的正常关系及其先天性畸形的形成以及个体各个发育阶段所呈现的独特性,并可进一步解释生命过程中的许多生理、心理、病理和异常现象,尤其是目前尚不能解决的肿瘤、衰老、某些精神疾病和畸形等问题,从而寻找解决这些问题的途径和方法。

由于篇幅所限,本书主要介绍出生前的人体发生,尤其是关于胚胎期的发生。同时简要介绍出生后的人体发育,并以专题形式介绍该学科相关研究热点。该书共分为四篇,二十六章,其主要特点在于:①侧重于人体发生发育与临床医学的联系;②强调该领域的新进展;③本书以专题形式简要介绍了与该学科相关的几个可能存在有争议的研究热点问题,供大家参考和讨论。

在编写过程中,编者主要参考了国内外现有的相关教材和参考书,也利用网络资源获取了一些相关资料和信息。该书的出版,是建立在广大在该领域做出贡献的先驱们的成就之上,在此对这些学者们表示衷心感谢。

由于时间仓促和编者水平有限,各位编者是在繁忙的教学和科研工作中挤出时间来完成编写任务,书中难免有不妥甚至错误之处,恳请广大同行及师生提出宝贵意见,以提高编者的水平及本书的价值,以及以后再版的质量。

编 者

2008年4月

目 录

第一篇 生殖细胞、遗传基础及细胞周期

第一章 绪论	1
一、人体发生发育学研究内容	1
二、人体发生发育的各个时期	1
三、人体发生发育学发展简史	2
四、人体发生发育学的主要研究方法	5
五、研究人体发生发育学的重要意义	10
六、人体发生发育学热点领域简介	12
第二章 生殖细胞的发育	13
一、减数分裂	13
二、女性配子发生及调控	16
三、男性配子发生及调控	18
四、精子发生与卵子发生的比较	22
第三章 发育的遗传基础	24
一、染色体的分子组成	24
二、真核基因的分子结构特征	26
三、基因复制和基因表达	26
四、基因突变	29
五、基因组相同和基因差异表达	31
六、遗传的基本形式	31
第四章 细胞周期及其调控	32
一、细胞周期概述	32
二、细胞周期调控系统	33
三、生长因子对细胞增殖的影响	36
四、细胞周期与疾病	36

第二篇 人 胚 发 生

第五章 受精、卵裂与胚泡形成	37
一、受精	37
二、卵裂	40

三、胚泡形成	41
四、植入	41
五、与临床的关系	43
第六章 胚盘形成、柱形胚体的建立与胚层分化	44
一、二胚层胚盘及其附属结构(受精后第2周)	44
二、三胚层胚盘及其附属结构(受精后第3周)	45
三、柱形胚体的建立	46
四、三胚层的分化	48
五、胚胎各期外形特征和胚胎龄的推算	51
六、与临床的联系	52
第七章 胎膜和胎盘	54
一、绒毛膜	54
二、卵黄囊	56
三、羊膜囊	56
四、尿囊	57
五、脐带	57
六、胎盘	58
第八章 孪生、多胎与联体双胎	62
一、孪生	62
二、多胎	66
三、联体双胎	67
第九章 畸形学概论	72
一、先天畸形的发生概况和分类	72
二、先天畸形的发生原因	74
三、胚胎的致畸敏感期	76
四、先天畸形的预防、宫内诊断和宫内治疗	77
第十章 胚胎发育机制	80
一、细胞生长	80
二、细胞分化的决定与细胞分化	81
三、胚胎诱导	84
四、形态发生及细胞行为	86
五、胚胎场现象	90
第十一章 心血管系统的发生	92
一、原始心血管系统的建立	92

二、心脏的发生	93
三、弓动脉的演变	99
四、胎儿血液循环和出生后血液循环的变化	100
五、与临床的联系	100
第十二章 颜面和颈的发生	104
一、鳃器的发生	104
二、颜面的形成	105
三、腭的发生与口腔、鼻腔的分隔	107
四、舌的发生	107
五、牙的发生	109
六、颈的形成	110
七、与临床的联系	110
第十三章 消化系统和呼吸系统的发生	112
一、消化系统的发生	112
二、呼吸系统的发生	119
第十四章 泌尿系统和生殖系统的发生	122
一、泌尿系统的发生	122
二、生殖系统的发生	126
第十五章 神经系统、眼和耳的发生	132
一、神经系统的发生	132
二、眼和耳的发生	138
第十六章 内分泌腺的发生	147
一、垂体的发生	147
二、松果体的发生	148
三、甲状腺和甲状旁腺的发生	149
四、肾上腺的发生	151
第十七章 骨和四肢的发生	153
一、骨的发生	153
二、四肢的发生	158
第十八章 免疫系统和体腔系膜的发生	160
一、免疫系统的发生	160
二、体腔与系膜的发生	172

第三篇 人体生后发育

第十九章 出生后生长与发育	183
一、出生后生长	183
二、出生后发育	185
第二十章 衰老与死亡	190
一、衰老	190
二、死亡	198
第二十一章 人体生物节奏	202
一、时间生物学的基础	202
二、生物节奏	203
三、时间病理学	203
四、时间治疗法	204
五、季节节奏	205
六、儿童的生物节奏	206
七、工作节奏	206
八、睡眠节奏	207

第四篇 干细胞与辅助生殖技术

第二十二章 干细胞概论	209
一、干细胞的概念	210
二、干细胞的分类	210
三、干细胞的生物学特性	210
四、干细胞的鉴别	211
五、干细胞的分化及调控	212
六、干细胞研究的应用前景	213
七、干细胞研究面临的问题	215
第二十三章 辅助生殖技术的发展简史	218
一、受精及其辅助技术的研究和发展	218
二、精子的保存技术	221
三、中国辅助生殖技术的发展	222
四、近年来辅助生殖技术的主要进展	222
第二十四章 不育不孕症	225
一、女性不孕症	225
二、男性不育症	228

第二十五章 辅助生殖技术的临床应用·····	234
一、人工授精·····	234
二、体外受精-胚胎移植技术(俗称试管婴儿)·····	236
三、IVF-ET 衍生技术·····	239
第二十六章 克隆技术概论·····	244
一、克隆的概念·····	244
二、克隆简介·····	244
三、人体的克隆·····	246
四、克隆人的主要社会问题·····	246
五、克隆技术的应用前景·····	247
六、克隆技术大事记·····	248
七、中国克隆发展史·····	251

第一篇 生殖细胞、遗传基础及细胞周期

第一章 绪 论

一、人体发生发育学研究内容

人体形成发展过程是从精卵结合(受精)开始一直到个体死亡的连续过程。这是由单个细胞即合子(受精卵),演变成一个多细胞人体的生长和分化的过程。人体发生发展的大多数变化是在胚胎期和胎儿期出现的,但也有些重要的变化是到婴儿期、儿童期、青年期乃至成年期才出现。

研究人体从胚胎发生、出生后的生长发育至衰老死亡的整个生命过程中所发生的形态、生理及心理机能变化规律的科学,在有些教科书中被称为人体发生学或人体发育学。人的一生实际上可以分为两个发展阶段,即出生前在母体内生长发育阶段和出生后生长发育至衰老死亡阶段。前者关注人体的形成与发生,即通常意义上的胚胎学所探讨的内容,研究个体生前事件,主要涉及胚胎发育的遗传物质基础及其机制,生命的启动,单细胞如何发育为成体;而后者关注个体形成后的生长与发育,侧重于个体生后事件,研究人体生后发育各阶段特点和规律,是自然科学与社会科学相互渗透、结合的学科。人体发育除了躯体器官外更重要的是运动发育、感知觉发育及智力发育等诸方面内容,从这个角度说,把研究人生前(人体发生)和生后(人体发育)生命全过程的科学称为人体发生发育学似乎更为妥当,即人体发生学与人体发育学合称人体发生发育学。

人体发生发育学是组织胚胎学、解剖学、细胞生物学、遗传学、分子生物学、儿科学、儿童保健学、儿童精神医学、老年医学、心理学等学科相互渗透而发展建立起来的一门交叉学科,应用各个学科中的先进理论和技术来探讨人体发生发育中的问题,尤其是干细胞概念及新理论的不断涌现、分子生物学技术的发展、转基因动物和“克隆”技术的诞生,为这门学科不断注入新鲜血液。在自然界中,发生发育过程尤其是人体的发生与发育过程可以说是最令人着迷的过程之一。人体发生发育学家就是对人体的形成与塑造过程中的各个方面进行研究。科学家将人一生中以时间推移所发生的事件与其所导致的形态与功能的变化联系起来。由于该学科具有动态的一面,强调了变化,因而赋予了该学科极大的魅力,同时也使其成为一门极具挑战性的学科。

由于篇幅限制,本书主要介绍出生前的人体发生,尤其是关于胚胎期的发生,同时简要介绍出生后的人体发育,并以专题形式介绍该学科相关研究热点。

二、人体发生发育的各个时期

如前所述,一般将人体的发生发育分为两个阶段:出生前期与出生后期。这里要注意

的是:人的诞生只不过是人体发生环境的明显变化,人体发生本身并不因诞生而停止。出生后,不只是身体长大,而且还有重要的发生发育上的变化,例如牙的发生,男性睾丸的发育、女性卵泡的发育等。身体结构的发育变化大多数在 25 岁左右时完成,有些结构的发育变化则贯穿人的一生。

(一) 出生前期

人胚胎在母体子宫中发育经历 38 周(约 266 天),可分为三个时期,这里要注意的是:在人体胚胎发生中,最显著的进展是出现在受精后前 8 周内。

1. 胚前期 从受精到第 2 周末二胚层出现为胚前期(pre-embryonic period)。

2. 胚期 从第 3 周至第 8 周末为胚期(embryonic period),于此期末,胚(embryo)的各器官、系统与外形发育初具雏形。

3. 胎期 从第 9 周至出生为胎期(fetal period),此期内的胎儿(fetus)逐渐长大,各器官、系统继续发育成形,部分器官出现一定的功能活动。此外,从第 26 周胎儿至出生后 4 周的新生儿发育阶段被称为围生期(perinatal stage)。此时期的母体与胎儿及新生儿的保健医学称围生医学。

(二) 出生后期

1. 婴儿期 指出生后大约 1 年内的时期。出生后头两个月常称作新生儿期。当人体由子宫内生活过渡为子宫外生活时,人体的结构功能,尤其是在心血管系统和呼吸系统需要逐渐的变化。在婴儿期,整个身体的生长是非常快的,身高约增加 50%,体重约增加 3 倍。

2. 儿童期 指从出生后大约第 15 个月到 12 至 13 岁。该期又可分为幼儿期(1~3 岁)、学龄前期(3~6 岁)、学龄期(6~青春期前)三期。在这时期,长出乳牙,尔后又换成恒牙。在儿童期的前期,骨化活跃进行。随着儿童长大,生长速度减慢。在接近青春时期,生长又显著增快,称作青春期前的猛长。

3. 青春期 这是第二性征开始发育的时期。女孩在 12~15 岁之间;男孩在 13~16 岁之间。

4. 成人期 18 岁后步入成人期,又可分为青年期(18~25 岁)、成年期(25~60 岁)、老年期(60 岁以后)。

青年期:在这期间,从出现性成熟的迹象开始到体质上的、精神上的乃至情绪上的成熟为止。这时身体生长速度减慢,但有些结构,如女性乳房的生长则增快。

成年期:骨化与身体的生长实质上已完成,以后身体的发育变为缓慢。

老年期:生理心理功能全面衰退,社会功能减弱,而后个体衰老死亡,生命终结。

三、人体发生发育学发展简史

对于人体发生发育学发展简史可以从两个方面进行介绍,即人体发生学(胚胎学)发展简史和人体发育学(生后发育)发展简史。

(一) 人体发生学发展简史

古希腊学者 Aristotle(公元前 384~322)最早对胚胎发育进行过观察,他推测人胚胎来源于血与精液的混合,并对鸡胚的发育做过一些较为正确的描述。1651 年,英国学者哈维(W. Harvey 1578~1658)发表《论动物的生殖》,记述了多种鸟类与哺乳动物胚胎的

生长发育,提出“一切生命皆来自卵”的假设。显微镜问世后,荷兰学者 Leeuwenhoek (1632~1723)与 Graaf(1641~1673)分别发现精子与卵泡,意大利学者 Malpighi(1628~1694)观察到鸡胚的体节、神经管与卵黄血管,他们主张“预成论”学说,认为在精子或卵内存在初具成体形状的幼小胚胎,它逐渐发育长大为成体。18世纪中叶,德国学者 Wolff (1733~1794)指出,早期胚胎中没有预先存在的结构,胚胎和器官是经历了由简单到复杂的渐变过程而形成的,因而提出了“渐成论”。1828年,爱沙尼亚学者 Baer(1792~1876)发表《论动物的进化》一书,报告了多种哺乳动物及人卵的发现;他观察到人和各种脊椎动物的早期胚胎极为相似,随着发育的进行才逐渐出现纲、目、科、属、种的特征(此规律被称为 Baer 定律)。他认为,不同动物胚胎的比较比成体的比较能更清晰地证明动物间的亲缘关系。Baer 的研究成果彻底否定了“预成论”,并创立了比较胚胎学。1855年,德国学者 Remark(1815~1865)根据 Wolff 与 Baer 的一些报告及自己的观察,提出胚胎发育的三胚层学说,这是描述胚胎学起始的重要标志。1859年,英国学者达尔文(C. R. Darwin, 1809~1882)在《物种起源》中对 Baer 定律给予强有力的支持,指出不同动物胚胎早期的相似表明物种起源的共同性,后期的相异则是由于各种动物所处外界环境的不同所引起。至19世纪60年代,德国学者 Müller(1821~1897)与 Haeckel(1834~1919)进一步提出“个体发生是种系发生的重演”的学说,简称“重演律”。这一学说大体上是事实,但由于胚胎发育期短暂,不可能重演全部祖先的进化过程,如哺乳动物胚中可见一类似鱼的鳃裂,但未发展为鳃。

自19世纪末,人们开始探讨胚胎发育的机制。德国学者 Spemann(1869~1941)应用显微操作技术对两栖动物胚进行了分离、切割、移植、重组等实验。如移植的视杯可导致体表外胚层形成晶状体;移植原口背唇至另一胚胎,使之产生了第二胚胎等。根据这些结果,Spemann 提出了诱导学说,认为胚胎的某些组织(诱导者)能对邻近的组织(反应者)的分化起诱导作用。这些实验与理论奠定了实验胚胎学。其他著名学说还有细胞分化决定、胚区定位、胚胎场与梯度等。为了探索诱导物的性质,一些学者应用化学与生物化学技术研究胚胎发育过程中细胞与组织内的化学物质变化、新陈代谢特点、能量消长等变化,以及它们与胚胎形态演变的关系。英国学者 Needham(又名李约瑟,1900~)总结了这方面的研究成果,于1931年发表《化学胚胎学》一书。

本世纪50年代,随着DNA结构的阐明和中心法则的确立,诞生了分子生物学。人们开始用分子生物学的观点和方法研究胚胎发生过程中遗传基因表达的时空顺序和调控机制,遂形成分子胚胎学。分子胚胎学与实验胚胎学、细胞生物学、分子遗传学等学科互相渗透发展建立了发育生物学(Developmental Biology),主要研究胚胎发育的遗传物质基础、胚胎细胞、组织的分子构成和生理生化及形态表型如何以遗传为基础进行演变,来源于亲代的基因库如何在发育过程中按一定时空顺序予以表达,基因型和表型间的因果关系等。发育生物学已成为现代生命科学的重要基础学科。

我国的胚胎学研究是于本世纪20年代开始的。朱洗(1899~1962)、童第周(1902~1979)、张汇泉(1899~1986)等学者在胚胎学的研究与教学中均卓有贡献。朱洗对受精的研究,童第周对卵质与核的关系、胚胎轴性、胚层间相互作用的研究,张汇泉对畸形学的研究,都开创和推动了我国胚胎学的发展。

(二) 人体发育学发展简史

人体发育学是在发育心理学与发育行为学的基础上发展起来的,追溯人体发育学历史,必然要涉及发育心理学与发育行为学的历史。

对人类行为的观察同样可追溯到古希腊时代,当时的人们就发现,人类的发育是一个连续的过程,但是却呈现明显的差异性。亚里士多德就曾指出“生长期长的动物,其寿命也长”。文艺复兴后的一些西方人文主义学者如 John Amos Comenius, Rousseau 等提出了尊重儿童、了解儿童的新教育思想,奠定了儿童心理学最初的思想基础。英国的 John Locke 提出的“白板学说”,法国的 Rousseau 的发育理论对于现代的学习理论均产生了重大的影响。

真正意义上的儿童发育和行为研究始于 19 世纪 70 年代,达尔文(Darwin)的进化理论直接推动了儿童发育的研究。达尔文于 1871 年发表的《一个婴儿的传记》,详细描述了他对自己孩子出生第 1 个月的行为观察,客观的记录描述了新生儿行为,对推动儿童生长发育的研究具有重要影响,因此,达尔文被誉为是发育与行为儿科学的奠基者。19 世纪后叶,德国科学家 W. Preyer 同样对自己的孩子从出生到 3 岁每天进行系统观察,以此为材料,于 1882 年整理出版了《儿童心理》,被公认为一部科学系统的儿童心理学著作。美国的 Stanley Hall 将实验法引入儿童心理学领域,他采用的研究方法以及提出的发育理论,极大地推动了美国儿童心理学的发展。

20 世纪以来,有关心理或心理社会发育的研究层出不穷,学派林立,如精神分析学派、行为主义学派、人格主义学派等。二战后,研究不断进展与创新,不仅涉及儿童早期发育,而且广泛探讨人生观过程。这些研究主要包括五个方面:①动物研究:将儿童发育与动物发育进行对比,20 世纪末该方面的研究已经拓展到描述人类的社会性行为;②儿童学习研究:如 Herbert Spencer 提出的环境决定论,巴甫洛夫的条件反射理论,Skinner 的操作性条件反射理论等;③儿童智力测试研究:Galton 最早将智力测试用于证实天才的遗传性,以后法国的 Binet、美国的 Gesell、Terman 等相继发明了一系列测试方法,用以反映儿童的智力、学习和个性等。Gesell 建立了发育诊断学,他的研究成果目前仍然被广泛用于临床工作中;④儿童精神分析的研究:代表学说有 Freud 的精神分析理论,认为人体的发育与人格的发育相关;Erikson 修正了 Freud 的理论,将该理论的性心理阶段扩展为一生的心理发育,将精神发育阶段延伸至老年,详细描述了人的一生人格发育的八个阶段;⑤儿童认知的研究:认知研究的代表人物是瑞士的皮亚杰,他提出了认知的起源、思维的结构和机制发展存在四个阶段,解释儿童认知的特点。他的理论指导着后人对儿童认知发育的理解。现代儿童心理学呈现出一派繁荣景象。

20 世纪二三十年代,儿童发育和行为研究被看做是精神学科的范畴,但儿科医生已经意识到应将这些知识和技能整合到儿科学中。20 世纪 60 年代,儿科与儿童精神科的团队服务得以迅速发展。70 年代,美国儿科住院医师继续教育中增加了儿童发育与行为的培训,培训方案中设置了发育与行为课程。80 年代以后,人体发育学的研究更为深入和广泛,世界范围内越来越多的人关注与研究人体发育学。

我国人体发育学研究最早可追溯到中国的古代,但尚未作为一门独立的学科在中国出现。20 世纪以来,越来越多的中国学者开始关注并逐渐深入研究儿童的发育与行为。20 世纪初,艾华,陈大齐开始翻译介绍西方儿童心理学著作。陈鹤琴 1919 年留学回国

后,在南京讲授儿童心理学课程,他的《儿童心理之研究》是中国第一部儿童心理学教科书。他还长期观察了自己的孩子,可谓中国较早的、比较系统的儿童心理研究工作。30年代,黄翼著有《儿童心理学》、《神仙故事与儿童心理》等著作。他还进行了儿童语言发育与儿童性格评定等研究。50年代,我国学者着重探讨了儿童心理学研究的理论方面的问题。60年代,我国的实验研究工作广泛开展,实验对象多集中在幼儿和童年期,研究课题以认知发育为主。70年代,一些学者开始重视对方法学的研究。80~90年代,我国开展了发育量表的研究,成立了发育与行为研究会,举办各类培训班和各类全国性学术会议。21世纪以来,人体发育学的研究进入了一个新的阶段,在儿童心理学与康复医学领域中,积极开展研究。2004年,我国成立了中国康复医学会儿童康复专业委员会,各地纷纷开展儿童康复医疗工作,出现了前所未有的新局面。

四、人体发生发育学的主要研究方法

人体发生发育学是一门实验性很强的学科,很多重要的发育理论和发育模型都是在大量实验结果的基础上建立起来的。其中涉及各种各样的研究技术和方法,既有传统的胚胎学、细胞学、发育评定方法,又有新发展的分子生物学方法。这里仅就人体发生发育学研究中的几种常用的和主要的研究方法简介如下:

(一) 活体标本的直接观察

直接观察,特别是活体胚胎的直接观察可提供一个良好的胚胎全貌及其在发育过程中的动态变化。观察生活细胞的结构和变化需用相差显微镜。如果应用活体染料则可对某些特殊细胞和细胞群的迁移进行追踪观察。显微电镜照相术对整个胚胎或细胞群发育的研究是一有效工具。其方法是将活体标本通过显微镜摄成电影,经放映可显示发育过程的一系列变化,如卵裂和神经纤维生长的缩时电影片,胚泡从透明带里孵出的缩时电影片。

(二) 制片标本的观察

当需要研究发育过程某一阶段或某种情况时,则可将标本固定制片进行观察,胚胎切片常需制作连续切片以观察结构之间的相关性。目前,石蜡切片仍为研究胚胎的经典方法。19世纪,胚胎学家已利用整体胚胎所作的连续切片进行重建,以了解整个胚胎内部的立体结构。

扫描电子显微镜可显示整个胚胎或胚胎部分结构(细胞、组织或器官)的表面形态立体形态。近些年来透射电子显微镜已应用于观察胚胎的超微结构。

(三) 胚胎免疫组织化学技术

免疫组织化学(immunohistochemistry)是应用抗原抗体结合原理,检测组织细胞内多肽、蛋白质等大分子物质的分布。这种方法的特异性强,敏感度高,近年来发展迅速,应用广泛,成为胚胎学科的重要研究手段。尤其是单克隆抗体技术的成功以及标记技术的不断改进和灵敏度的提高,使此项技术的进展日新月异,在研究中广泛得到应用。胚胎的多肽和蛋白质种类很多,具有抗原性。从被免疫动物的血清中提出抗体,以荧光素、酶或铁蛋白等标记,再用这种标记抗体处理组织切片或细胞,标记抗体即与细胞内相应蛋白质(抗原)发生特异性结合,通过一般光学显微镜、荧光显微镜、电镜观察,即可检测蛋白质合成的部位与分布。

标记抗体与抗原结合方式有两种。一是直接法,即如上述用标记抗体与样品中的抗原直接结合。这种方法操作简便,但灵敏度不够满意。另一种是间接法,是将分离的抗体或抗血清(第一抗体)作为抗原给另一种动物,制备出该抗体(抗原)的抗体(第二抗体),再用标记物标记第二抗体,然后用第一抗体和第二抗体先后处理样品,最终形成抗原-第一抗体-标记第二抗体复合物。间接法的灵敏度比直接法更高。

(四) 胚胎原位杂交

1. 全胚原位杂交 全胚原位杂交(whole embryo in site hybridization)是广泛用于胚胎发育调控基因表达研究的一种技术。近年来该技术发展较快,不仅可以检测到较弱的杂交信号,而且可以多色杂交,检测多个基因的表达情况。

全胚原位杂交的基本原理是用各种标记物标记与体内特定 mRNA 互补的 RNA 分子(反义 RNA),以它们作为探针与动物的整体胚胎进行原位杂交,然后用相应的抗体来检测特异探针的分布情况。

全胚原位杂交有单色与双色全胚原位杂交两种,两者探针的制备、胚胎的固定杂交及洗脱方法步骤相同,只是检测方法有所不同。前者只用一种标记物标记探针,与胚胎杂交,然后对探针用相应的抗体进行检测;后者用 2 种不同的标记物(如 DIG-11-DUTP、生物素-11-dUTP 等)分别标记两个探针,同时与胚胎杂交,然后对两个探针分别用相应的抗体进行检测。

2. 胚胎组织切片原位杂交 原位杂交是研究胚胎基因表达的常用方法。虽然全胚原位杂交简单易行,但在许多情况下该方法还达不到研究的要求,因而需要在胚胎的组织切片上进行杂交,在胚胎的组织切片进行原位杂交的有利因素在于不存在探针不能渗入到胚胎内部的问题。

(五) 发育基因的启动子分析

启动子调控作用分析是研究胚胎发育基因功能的一种重要方法,特别在研究基因时空表达的分子机制方面,更是有突出的作用。通常,启动子分析包括基因特异调控序列、启动子和增强子元件的鉴别,它们都是基因转录活性的重要调控单元。启动子分析的第一步是将一系列大小不同的启动子的片段克隆到含有报告基因的载体中,然后通过比较这一缺失系列中启动子的活性,找到启动子中具有调控能力的序列。随后,将被鉴定出来的调控序列分为更小的片段,并且克隆到含有异源活性启动子和报告基因的载体中,再次比较缺失系列启动子的活性,以确定调控序列中的最关键序列。最后,可通过野生型启动子中单个碱基的点突变,进一步确定基因的关键调控元件。

有多种方法可用于体内启动子分析,如转基因动物、显微注射等,在不同的动物中可选用不同的方法,但比较而言,转基因动物法较为费时,而且需要一些特殊条件,而显微注射法较为简单。

(六) 基因表达的核糖核酸酶保护分析

核糖核酸酶保护实验是定量分析基因转录水平的常用方法之一,它对 mRNA 的分析具有灵敏度高(比 Northern 杂交和斑点杂交灵敏 8~10 倍)、特异性强的特点。另外,核糖核酸酶保护实验还可用于转录起始位点的确定、内含子/外显子边界的确定、选择性剪接分析以及确定转入到胚胎中的核酸降解率等方面的研究。

核糖核酸酶保护实验的基本原理是,将待分析的目标 DNA 序列作为模板,用反转录