

禽类原始生殖细胞的迁移能力*

李赞东* 李相芝 赵东风 Takashi KUWANA

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

(National Institute for Minamata Disease, Kumamoto 867-0008, Japan)

Migration of avian primordial germ cells*

LI Zan-Dong** LI Xiang-Zhi ZHAO Dong-Feng Takashi KUWANA

(College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(National Institute for Minamata Disease, Kumamoto 867-0008, Japan)

Abstract Blood samples were collected from chicken embryos at stage 11~15, and labeled with fluorescent dye PKH26. Primordial germ cells (PGCs) were then isolated from blood samples by nycodenz density gradient centrifugation. After PGCs were labeled and isolated, about 200 PGCs in one microliter were injected into the subgerminal cavity of quail blastoderm at stage . After 48 hours incubation, chicken PGCs were identified by fluorescent microscopy. Red fluorescence emitted from PKH26 labeled chicken PGCs was observed in the head, the heart and the developing gonadal anlage of quail embryos. The result suggests that chicken PGCs still keep migration ability after 56 hours [*Acta Zoologica Sinica* 49 (6): 868-872, 2003].

Key words Chicken, Quail, Primordial germ cells (PGCs), Gonadal anlage, Fluorescent dye
关键词 鸡 鹌鹑 原始生殖细胞 生殖原基 荧光色素

鸟类原始生殖细胞 (Primordial germ cells, PGCs) 起源于 期的胚盘上胚层 (Eyal-Giladi *et al.*, 1981), 4 期时经下胚层移动到原条期的生殖新月部位 (Eyal-Giladi *et al.*, 1981; Ginsburg *et al.*, 1986, 1987; Urven *et al.*, 1989)。10 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 (Mayer, 1964; Fujimoto *et al.*, 1976; Nieuwkoop *et al.*, 1979; Nakamura *et al.*, 1988; Kuwana, 1993)。鸟类 PGCs 具有独特的迁移路线, 使得研究者可以在适当的时期, 方便地分离 PGCs, 并可通过种间或种内相互移植来制备性系嵌合体。由于 PGCs 是精子或卵子的祖先细胞, 从而有可能成为转基因研究的重要载体, Allioli *et al.* (1994)、Naito *et al.* (1994)、Ebara *et al.* (2000) 以 PGCs 作为载体进行了转基因研究的尝试。Kuwana *et al.* (1999) 提出 PGCs 在生殖原基

聚集可能与异常发达的毛细血管网的捕捉有关, 并且这种毛细血管网有可能与 PGCs 在左右侧性腺分布不对称有关 (Dubois *et al.*, 1978)。研究表明, 鸡、小鼠、非洲爪蟾的 PGCs 具有活泼的迁移能力 (Kuwana *et al.*, 1986; Godin *et al.*, 1990, 1991), 鸡的生殖原基对小鼠及非洲爪蟾的 PGCs 具有积极的诱引作用, 这种作用可能是超越物种界限的共同模式 (Rogulska *et al.*, 1971; England *et al.*, 1986)。本实验以鸡 PGCs 为供体, 以鹌鹑 (*Contrunix ponica*) 胚胎为受体, 研究了 PGCs 的迁移能力及在受体胚胎中异种 PGCs 的分布情况, 为制备种间性系嵌合体, 挽救濒危鸟类及转基因研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

60 枚白来亨鸡种蛋购自大分县荒卷养鸡场

2003-04-28 收稿, 2003-07-29 修回

* 国家自然科学基金 (No. 39980030) 资助项目、国家“863”计划 (No. 2001AA213131) 资助项目 [This research was funded by a grant from National Natural Science Foundation (No. 39980030)]

** 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: lzdcrc@cau.edu.cn

第一作者简介 李赞东, 女, 45, 教授。研究方向: 禽类胚胎和遗传工程。

© 2003 动物学报 *Acta Zoologica Sinica*

(Aramaki Chicken Farm, Oita, Japan), 鹌鹑种蛋购自爱知县丰桥东海有机株式会社 (Toukai Company, Aichi, Japan)。

1.2 试剂

Nycodenz 购自 Nycomed Pharma AS (Asker, Norway), PKH26 荧光试剂购自 Zynaxis (Malvern, cell Science, Inc, PA, USA) KAV-1 细胞培养液参照 Kuwana *et al.* (1996) 的方法配制。

1.3 方法

1.3.1 鸡胚血液的采集 新鲜的白来亨鸡种蛋用 70% 的酒精擦拭消毒后在 38.5 °C, 60% ~ 70% 的相对湿度, 90 度/60 分的转蛋条件下培养 56 h 左右, 使胚胎发育至 14 期左右, 然后用微玻璃针由胚胎血管中抽取含有 PGCs 的血液, 悬浮于不含血清的 DMEM 培养液中。

1.3.2 鸡胚血液中细胞的荧光色素标记 鸡胚血液中细胞的荧光色素标记参照厂家提供的方法进行, 简要步骤如下: 将上述采取的血液细胞计数, 根据细胞数确定 PKH26 原液和 Diluent C 溶液的用量, 并将 PKH26 原液用 Diluent C 溶液稀释至 4×10^{-6} mol/L 备用。血液样品经 400 r/min 离心 5 min 后, 弃去上清, 用 Diluent C 溶液悬浮细胞后, 加入等量的 4×10^{-6} mol/L PKH26 溶液标记细胞。3 min 后, 加入血清培养 1 min 以终止反应。再加入 KAV-1 溶液, 400 r/min 离心 10 min。细胞沉淀移至另一新试管中, 加入 KAV-1 溶液, 400 r/min 离心 5 min 后弃去上清, 重复此步骤 3 次以清洗细胞。在荧光显微镜下 (Nikon Diaphot300, Nikon Instec Co. Ltd., Kanagawa, Japan) 确认细胞的标记率及荧光强度。

1.3.3 鸡 PGCs 的纯化 将上述经 PKH26 标记的鸡胚血液沉淀中加入 1 ml 8% 的 Nycodenz 溶液以悬浮细胞。在 6 ml 试管中加入 1 ml 12% 的 Nycodenz 溶液, 将细胞悬液加于此溶液上方, 其上再

加入 200 μ l 2% 的 Nycodenz 溶液, 800 r/min 离心 20 min。在 8% 和 12% 的 Nycodenz 液面交界处吸取 600 μ l 细胞悬浮液。在 600 μ l 细胞悬浮液中加 KAV-1 至 1.4 ml, 1 200 r/min 离心 6 min 后, 弃去上清。沉淀中加入 200 μ l 8% 的 Nycodenz 溶液, 悬浮细胞。在 1.5 ml 试管中加入 600 μ l 14% 的 Nycodenz 溶液, 在其上方重叠 300 μ l 10% 的 Nycodenz 溶液, 再将细胞悬液重叠于上方, 800 r/min 离心 10 min。回收 8% 和 10% 的 Nycodenz 溶液层加 KAV-1 至 1.4 ml, 调整 PGCs 数为 50 ~ 100 细胞/ μ l (Zhao *et al.*, 2003)。

1.3.4 PGCs 的种间移植及检测 在鹌鹑种蛋的赤道部附近打开一个小孔, 露出胚盘。用微注射法把 50 ~ 100 个 PKH26 标记的白来亨鸡 PGCs 导入鹌鹑胚盘中央区域, 密封切口后在 38.5 °C, 60% ~ 70% 的相对湿度, 90 度/60 分的转蛋条件下培养 48 h 左右。然后从卵黄切下全部胚胎放入 PBS (-) 溶液中, 在荧光显微镜 (Nikon, Tokyo, Japan) 下观察 PGCs 的存在部位及数量。

2 结果

实验分为 A、B 两组进行, 分别使用了 25 枚和 28 枚种蛋。两组实验共入孵 53 枚白来亨鸡种蛋, 培养 56 h 后的生存率为 91% (48/53), 发育不良或发育停止的胚胎为 9% (5/53), 发育到 13、14 期 (血液中 PGCs 达到峰值的时期) 的胚胎占 50% (27/53) 左右 (表 1)。

由表 2 可以看出 PKH26 标记的鸡 PGCs 微注射到鹌鹑胚盘后的嵌合体胚胎培养 48 h 后的实验组 A 和 B 的总生存率为 77% (10/13), 注射 PKH26 标记的红血球的对照组 A 和 B 的总生存率为 64% (9/14); 在实验组存活胚胎中检测到 PKH26 标记的 PGCs 的个体所占比例是 70% (7/10), 对照组检测到 PKH26 标记的红血球的个

表 1 供体鸡胚的发育情况

Table 1 Developmental stage of donor chicken embryos

组别 Group (n)	11 期胚胎数 Number of embryos at stage 11	12 期胚胎数 Number of embryos at stage 12	13 期胚胎数 Number of embryos at stage 13	14 期胚胎数 Number of embryos at stage 14	15 期胚胎数 Number of embryos at stage 15	发育不良的胚胎数 Number of hypog- enetic embryos
(25)	4	4	5	5	2	4
(28)	1	4	6	11	5	1
总数 (Total) (53)	5	8	11	16	7	5

表 2 PKH26 标记的鸡 PGCs 在孵化 48 h 的鹌鹑胚胎体内的分布

Table 2 The distribution of PKH26 labeled chicken primordial germ cells in the quail embryos after 48-hour incubation

组别 Group	微注射的 鹌鹑种蛋数 Number of microinjected eggs of quail	发育 48 h 后受体 胚胎的生存率 Viability of the recipient embryos after 48 h incubation	受体胚胎中 PKH26 荧光阳性率 Positive rate of PKH26 fluorescence in the recipient embryos	鸡 PGCs 及红血球在各鹌鹑 受体中的分布位置 Localizations of chicken PGCs in different recipient quail embryos after 48 h incubation
对照 (Control)	8	50 % (4/8)	50 % (2/4)	1. 卵黄动脉附近 (Near the vitelline artery) 2. 头部与心脏之间 (Between the head and the heart)
对照 (Control)	6	83 % (5/6)	40 % (2/5)	1. 头部 (Head) 2. 脊椎的两侧 (Two sides of the spine)
实验 (The treated)	8	63 % (5/8)	80 % (4/5)	1. 游离细胞 (Free cells) 2. 游离细胞 (Free cells) 3. 头部 2、3 个细胞块 (Two or three cell masses in the head) 4. 心脏背侧 (Back of the heart)
实验 (The treated)	5	100 % (5/5)	60 % (3/5)	1. 头部 (Head) 2. 头部、心脏、中肾腹侧及生殖原基附近 (Head, heart, ventral mesonephros and about the gonadal anlage)

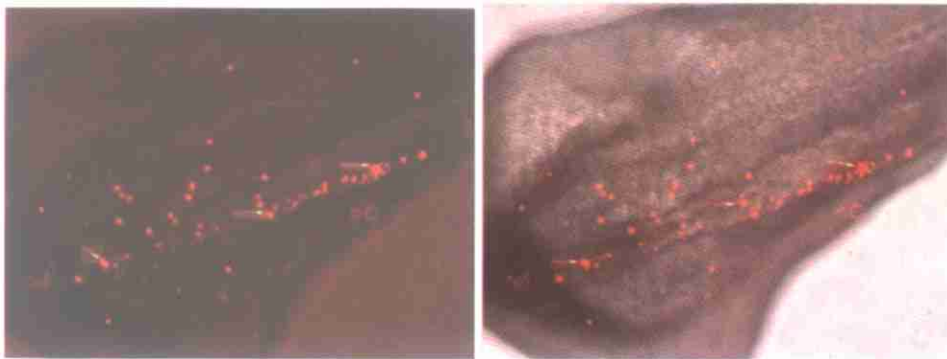


图 1 PKH26 标记的鸡 PGCs 在孵化 48 h 的鹌鹑胚胎生殖原基附近的分布情况 (实验组)

Fig. 1 Distribution of chicken PGCs labeled with PKH26 around the gonadal anlage of a quail embryo after 48 h incubation

左 (Left): 暗场 (Dark field) 右 (Right): 明场 (Bright field)

体所占比例是 44.4 % (4/9)。实验组 PKH26 标记的 PGCs 分布在头部、心脏及生殖原基附近 (表 2 图 1), 而对照组 PKH26 标记的红血球大部分在头部 (图 2, 左) 出现, 只有一例在脊椎的上半部分出现 (图 2, 右)。

3 讨论

禽类 PGCs 由上胚层经过生殖新月区及血液循环移至生殖原基的迁移路线分为组织间移动和随血

流移动两个部分。一般认为 PGCs 的迁移路线由化学和物理两个因素决定。化学因素主要是由于生殖原基分泌一种物质 (可能是类固醇类物质) 吸引 PGCs 迁移 (Swartz *et al.*, 1972)。PGCs 迁移的物理因素是其本身具有变形运动的能力。鸡的 PGCs 含有大量糖原颗粒, 并有伪足, 可进行阿米巴运动, 并且 PGCs 在迁移的不同时期其形态、大小及内容物略有不同。PGCs 处于上胚层时其形态特征与其它细胞无法区分, 而处于生殖新月区时细胞呈



图2 PKH26 标记的鸡红血球在孵化 48 h 的鹌鹑胚胎中的分布情况 (对照组)

Fig. 2 Distribution of chicken red blood cells labeled with PKH26 in the quail embryos after 48 h incubation (Control)

红色荧光分别出现在胚胎 (左) 头部与心脏之间 (右) 脊椎的两侧 [Red fluorescence can be observed in the quail embryos (left) between the head and the heart and (right) in the two sides of the spine]

圆形或卵圆形, 直径约为 $12 \sim 20 \mu\text{m}$, 细胞内含有大量卵黄颗粒、核糖体和线粒体。进入血液循环后 PGCs 呈球形, 直径约为 $9 \sim 16 \mu\text{m}$, 细胞表面有少量微绒毛, 卵黄颗粒减少, 脂滴和糖原颗粒增多。进入生殖原基后, PGCs 拉长, 具有伪足, 直径约为 $10 \sim 25 \mu\text{m}$, 糖原颗粒数量剧减, 高尔基复合体和内质网发达。卵黄和糖原颗粒的减少说明 PGCs 在迁移过程中是消耗能量的 (Urven *et al.*, 1989; Swartz, 1982)。本实验用无细胞毒性且对细胞增殖无影响的 PKH26 荧光色素 (Messina *et al.*, 1992), 标记鸡血液中的 PGCs 并微注射到鹌鹑胚盘中, 发现荧光标记的鸡 PGCs 在微注射 48 h 后移动到鹌鹑胚胎生殖原基附近聚集 (图 1) 此结果表明鸡 PGCs 在鹌鹑胚胎中仍然具有正常的迁移能力, 鹌鹑胚胎的生殖原基对鸡 PGCs 具有诱引 (趋化) 作用。Rogulska *et al.* (1971) 和 England *et al.* (1986) 报道, 早期鸡胚不仅对鸟类的 PGCs 有诱引作用, 还对小鼠及非洲爪蟾的 PGCs 也有诱引作用。Li *et al.* (2002) 通过微注射法移植鸡胚盘细胞制备了麻鸭-鸡嵌合体, 其中一只雄性嵌合体经后代检测证明为性系嵌合体, 表明麻鸭生殖原基对鸡的 PGCs 也有诱引作用。本实验的重要意义在于使用荧光标记的 PGCs 细胞作为供体在活体中跟踪检测了由胚盘经过血液循环到达生殖原基的迁移过程, 为生殖原基对 PGCs 的诱引作用可能存在一种超越物种界限的共同模式这一理论, 在细胞水平上提供了有力的证据。

另外, 由于 PGCs 是取自孵化 56 h 后的鸡胚血管中, 经分离纯化后注射到未孵化的鹌鹑种蛋胚盘

中, 从而再一次经历组织间迁移和血液循环到达鹌鹑的生殖原基, 因此 PGCs 的生理年龄倒退了 56 h。由于作为受体的未孵化种蛋可以大量获得, 无需供体与受体生理年龄的同步化, 与将胚胎血液 PGCs 相互移植的操作技术相比, 步骤相对简便快捷。因此利用 PGCs 这种在受体胚胎中能够重新正确定位的特性将可以极大的提高嵌合体法转基因的研究效率。

参考文献 (References)

- Allioli, N., J. L. Thomas, Y. Chebloune, V. M. Nigon, G. Verdier and C. Legras 1994 Use of retroviral vectors to introduce and express the beta-galactosidase maker gene in cultured chicken primordial germ cells. *Dev. Biol.* **165**: 30 ~ 37.
- Dubois, R. and D. Cuminge 1978 Statistical study of the primary asymmetry in primordial germ cells distribution in the chick embryo. *CR. Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D.* **286**: 1 613 ~ 1 616.
- England, M. A., A. P. Swan and P. Dane 1986 The migration of amphibian primordial germ cells in the chick embryo. *Scan. Electron. Microsc.* **Pt 3**: 1 175 ~ 1 182.
- Ebara, F. and N. Fujihara 2000 *In vitro* gene transfer into chicken embryos via primordial germ cells using green fluorescent protein as a marker. *J. Reprod. Dev.* **46**: 79 ~ 83.
- Eyal-Giladi, H., M. Ginsburg and A. Farbarov 1981 Avian primordial germ cell are of epiblastic origin. *J. Embryol. Exp. Morph.* **65**: 139 ~ 147.
- Fujimoto, T., A. Ukeshima and R. Kiyofuji 1976 The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in chick embryo. *Anat. Rec.* **185**: 139 ~ 154.
- Ginsburg, M. and H. Eyal-giladi 1986 Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J. Embryo. Exp.*

- Morph.* **95**: 53 ~ 71.
- Ginsburg, M. and H. Eyal-giladi 1987 Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development* **101**: 209 ~ 219.
- Godin, I. and C. Wylie 1990 Genital ridges long-range on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* **108**: 357 ~ 363.
- Godin, I. and C. Wylie 1991 TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* **113**: 1 451 ~ 1 457.
- Kuwana, T., H. Maeda-Suga and T. Fujimoto 1986 Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage *in vitro*. *Anat. Rec.* **215**: 403 ~ 406.
- Kuwana, T. 1993 Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Develop. Growth and Differen.* **35**: 237 ~ 243.
- Kuwana, T., K. Hashimoto, A. Nakanishi, Y. Yasuda, A. Tajima and M. Naito 1996 Long-term culture of avian embryonic cells *in vitro*. *Int. J. Dev. Biol.* **40**: 1 061 ~ 1 064.
- Kuwana, T. and T. Rogulska 1999 Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage. *Cell. Mol. Biol.* **45**: 725 ~ 736.
- Li, Z. D., C. H. Liu, J. S. Huang, J. Sha, H. Wei, M. J. Sun, C. Zhao, S. H. Jiang and H. Kagami 2002 Preparation of interspecies chicken (*Gallus Domesticus*) / duck (*Anas Domesticus*) chimeras. *Acta Zool. Sin.* **48** (4): 543 ~ 548. [李赞东, 刘春海, 黄劲松, 沙金, 危华, 孙明军, 赵晨, 姜盛花, Hiroshi Kagami 2002 鸡鸭异种间嵌合体的制备. **48** (4): 543 ~ 548.]
- Mayer, D. B. 1964 The migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Dev. Biol.* **10**: 154 ~ 190.
- Messina, L. M., R. M. Podrazik, T. A. Whitehill, D. Ekhterae, T. E. Brothers, J. M. Wilson, W. E. Burkel and J. C. Stanley 1992 Adhesion and incorporation of lacZ transduced endothelial cells into the intact capillary wall in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 12 018 ~ 12 022.
- Nieuwkoop, P. D. and L. A. Sutasurya 1979 Primordial Germ Dells in the Chordates. London: Cambridge University Press, 91.
- Nakamura, M., T. Kuwana, T. Miyama and T. Fujimoto 1988 Extragonadal distribution of primordial germ cells in the early chick embryo. *Anat. Rec.* **222**: 90 ~ 94.
- Naito, M., A. Tajima, Y. Yasuda and T. Kuwana 1994 Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* **39**: 153 ~ 161.
- Rogulska, T., W. Ozdzinski and A. Koma 1971 Behaviour of mouse primordial germ cells in the chick embryo. *J. Embryo. Exp. Morphol.* **25**: 155 ~ 164.
- Swartz, W. J. and L. V. Domm 1972 Study on the division of primordial germ cells in the early chick embryos. *Am. J. Anat.* **135**: 51 ~ 70.
- Swartz, W. J. 1982 Acid and alkaline phosphatase activity in migrating primordial germ cells of the early embryo. *Anat. Rec.* **202**: 375 ~ 385.
- Urven, L. E., U. K. Abbott and C. A. Erickson 1989 Distribution of extracellular matrix in the migratory pathway of avian primordial germ cells. *Anat. Rec.* **224**: 14 ~ 21.
- Zhao, D. F. and T. Kuwana 2003 Purification of avian circulating primordial germ cells by nyodenz density gradient centrifugation. *Brit. Poult. Sci.* **44**: 1 ~ 6.