小鼠原生殖细胞的研究进展

匡 颖 翟玉梅
（山东大学生命科学院发育生物研究所 济南 250100）

关键词 小鼠 原生殖细胞 迁移 增殖

在动物的整个生命周期中，生殖细胞提供了各代间的连续性。对于多数动物来说，其生殖细胞不是在生殖腺中产生的，其前身原生殖细胞（Primordial Germ Cell 简称 PGC）是迁移到正在发育着的生殖腺中的。近年来，由于 PGC 体外培养技术的不断完善，PGC 的起源问题已越来越受到各国学者的重视，但目前我国在这方面所做的工作还很少，本文综合国内、外最新资料对小鼠 PGC 迁移和增殖的机制作一简单介绍。

1 小鼠 PGC 的迁移

关于小鼠 PGC 的起源，许多年来各国学者观点各异，主要有内胚层、中胚层、外胚层三种观点。根据最近 Ginsburg 和他同事的研究，小鼠 PGC 在交配 7 天（原肠中期）时，位于胚胎的后部胚外中胚层，如果将这一区域去掉，发育出的胚胎将没有生殖细胞。目前这种观点已被普遍接受，至于这一时期以前的情况还有待于进一步研究。原肠中期的 PGC 为 8 个大的嗜碱性磷酸酶的细胞，以后逐渐迁移到胚内，首先进入胚内中胚层，再经由尿囊到达内胚层，交配后 8 天位于后肠内胚层和尿囊基部，然后再迁移到相邻的卵黄囊，此时 PGC 已分成两部分，通过后肠经背肠系膜分别迁移到左、右两侧的生殖嵴。据报道多数 PGC 在交配后 10 天到达生殖嵴[1]。此后便失去迁移能力，并停滞在有丝分裂期（精巢）或减数分裂期（卵巢）。这一迁移路线已在不同种类的小鼠中得到证实。

小鼠 PGC 的迁移受多种因子影响，机制尚不十分清楚。目前较为一致的观点是，在后肠形成以前，PGC 的迁移主要是通过形态发生运动被动地进行的，而由后肠到生殖嵴则是一个主动迁移的过程。这种迁移似乎与其迁移过程中所经过的细胞密切相关，它可以通过变形运动，伸出线状的伪足来越过下面的单个甚至多个细胞层[2]。这种变形运动是有方向性的，并严格按照上述路线进行。目前的体外实验说明，纤连蛋白——一种具有粘附性的、存在于细胞外基质中的糖蛋白，在 PGC 迁移过程中具有非常重要的作用。在粘附实验中，看到 PGC 与纤连蛋白一经粘附，便开始迁出后肠，而且当迁移结束时这种粘附作用便减弱。通过双重标记的原位杂交和组织学实验说明迁移中的 PGC 中不含有纤连蛋白 mRNA，不能合成和分泌纤连蛋白，这种蛋白由背肠系膜细胞的内质网合成，在生殖嵴中含量很少，故 PGC 到达生殖嵴后便不再迁移[3]。

小鼠胚胎生殖嵴对 PGC 具有趋化作用，能产生一种可扩散的转移生长因子（Transforming Growth Factor β_1 简称 TGF-β_1），这种 TGF-β_1 介导的趋化作用有可能通过两种方式进行：一种是 PGC 带有这种生长因子的受体，沿着该生长因子的浓度梯度进行迁移；另一种是 TGF-β_1 通过提高 mRNA 水平来增加纤连蛋白的分泌，从而决定 PGC 的迁移方向和迁移速度[4,5]。一般认为第一种方式较为可靠。

2 小鼠 PGC 的增殖

小鼠 PGC 在整个迁移过程中和到达生殖嵴后两天内均活跃地增殖，数目由原来的不到

第一作者介绍：匡 颖，女，32 岁，讲师，硕士；
收稿日期：1997-04-30，修回日期：1997-09-29

100 个增加到大约 25 000 个[1,6]。

2.1 一些生长因子对 PGC 数量的影响 某些生长因子，如干细胞因子(Stem Cell Factor，简称 SCF)、白血病抑制因子(Leukemia Inhibitory Factor 简称 LIF 和成纤维细胞生长因子(basic Fibroblast Growth Factor 简称 bFGF)，对于培养中的 PGC 的存活和增殖是必需的，不仅可以使其数量增加，而且很可能与小鼠 PGC 在体内或体外的分化有关。实验证明，这些因子是由 PGC 迁移过程中所经过的细胞产生的，存在于其细胞膜上[7~11]，对它们的活性很重要。例如 SCF 是小鼠 Steel(sl)基因的产物，而且也是 w 基因编码的 c-kit 原癌基因(酪氨酸激酶)的配体[12]，w 和 sl 突变鼠的不育性说明了 SCF 对 PGC 生存和体内增殖的重要性。当小鼠 Steel-Dickie(sl^1)等位基因纯合体时，虽能制造 SCF，但它不能结合到细胞膜上，使得生殖细胞的数量明显减少。研究发现 c-kit 受体被 PGC 表达，而 SCF 被周围的体细胞或体外培养时的滋养层细胞表达[13]。

通过对各种类型细胞的研究表明，SCF 和 bFGF 的作用是通过具有内在的酪氨酸激酶活性的受体来完成的，而 LIF 的作用是通过低亲和性的 LIF 受体和糖蛋白 gp130(一种分子量为 130kd 的细胞膜糖蛋白)的杂二聚化的传递、两个亚基和各种胞质蛋白的酪氨酸磷酸化来完成的[14,15]。近年来的研究表明，这些因子均不能直接启动 PGC 的增殖。SCF 和 LIF 都是通过阻止 PGC 的程序性死亡，来增加其数量的[16]。

TNF-α(Tumor Necrosis Factor-α)也能激活 PGC 的增殖，且这种增殖效应在迁移前和迁移早期是专一性的，对于迁移后期的 PGC 则无影响[17]。白介素 4(Interleukin-4 简称 IL-4)对 PGC 的数量也有影响，它是小鼠 PGC 体外培养的正调因子，这种调节作用是依浓度而变化的，在 1～100ng/ml 范围内激活作用明显。通过反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)及和酶联免疫吸附法(ELISA)技术发现 IL-4 存在于体内增殖着的 PGC 中，其受体在含有 PGC 的组织中表达，故 IL-4 也是 PGC 体内生存的一个重要因子，其作用也是通过抑制 PGC 的程序性死亡来实现的[18]。但目前关于 IL-4 体内来源还未见报道。

体外实验还发现，对 PGC 有趋化作用的 TGF-β_1 对 PGC 的数量有负调作用[5]，这种调节作用是依浓度变化的。现在还不知道生殖嵴所能释放的 TGF-β_1 的确切数量，Godin 等认为如果体内生殖嵴释放的 TGF-β_1 仅是为了用于趋化作用，则它必须低于抑制增殖所需的浓度。

2.2 直接激活 PGC 增殖的机制 对于 PGC 的增殖，除了以上这些生长因子介导的机制以外，环化腺苷酸(cAMP)、视黄酸(Retinoic Acid 简称 RA)和糖蛋白 gp130 蛋白所介导的信号传递系统也在其中发挥了重要作用。

(1) cAMP 介导的信号传递 1993 年 De Felici 首次报道了 cAMP 在小鼠 PGC 增殖方面的重要作用，同时也发现了一些自然发生的复合物，如促卵泡激素、前列腺素 E_2 和 F_{22}、促肾上腺皮脂激素等，虽可导致细胞的 cAMP 升高，但并不能激活 PGC 的增殖[19]。

目前所知，PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) 和 FPSK (forskolin)均可激活体外培养的 PGC 的增殖，并且这种激活作用是由依赖于 cAMP 的蛋白激酶介导的[20]，其中 PACAP 是垂体分泌的具有腺苷酸环化酶激活作用的两种神经肽(PACAP－27 和 PACAP－38)，这种神经肽有两种高亲和性的受体(Ⅰ型和Ⅱ型)。小鼠 PGC 和性腺体细胞表达专一性的Ⅰ型受体，通过免疫染色显示 PACAP 可在生殖嵴中出现，且多数分布于 PGC 的表面，与受体结合后会引起胞内 cAMP 的升高，进而促进 PGC 的增殖。现在一般认为 PACAP 是 PGC 的直接激活因子，但也并不排除其通过滋养层细胞(体外)或性腺体细胞(体内)而起作用的可能性。目前，体内 PACAP 的来源还不清楚。

(2) RA 介导的信号传递 RA 是最具生物活性的维生素 A 的代谢产物，对各种类型细胞的生长和分化均有重要作用。Koshimizu 等

人研究了 RA 对体外培养的 PGC 的影响，当培养基中加入 RA 时会使迁移中的 PGC 显著增殖，同时也可抑制迁移后的 PGC 的减少。体外实验还发现，当无滋养层细胞时，RA 也能促进 PGC 的存活，使其保持高的有丝分裂活性，表明 RA 直接作用于 PGC，且对其发育有决定作用[21]。RA 对于 PGC 的作用与 FRSK 非常类似，也能提高胞内 cAMP 的水平，激活依赖于 cAMP 的蛋白激酶(PKA)，从而影响 PGC 的生长，此外 RA 也能解除 PKA 抑制因子对 PGC 生长的抑制作用。进一步研究 PGC 中 RA 介导的信号，将有助于了解生殖细胞的性别分化。

(3) qp130 介导的信号传递　已知道 LIF 是影响小鼠 PGC 生存的一个因子，但 LIF 与 LIF 受体的单独结合不影响 PGC 的生长。LIF 受体复合物包括一个 LIF 结合亚基和一个非结合的信号传递者 qp130，qp130 与受体复合物的形成有关，参与蛋白质的磷酸化，也参与一些与 LIF 相关的细胞因子的信号传递。

LIF 诱导的信号专一性地依赖于 gp130，目前的体外实验发现，能激活 qp130 介导的胞内信号传递细胞因子可代替 LIF 来激活 PGC 的增殖，如制瘤素 M (Oncostatin M 简称 OSM)、IL－11 等；而且依赖于 LIF 或其相关因子的信号传递可由 gp130 单独启动，若通过中和抗体使 gp130 失活，则体外培养的迁移后的 PGC 将失去生存能力。说明 gp130 介导信号传递对迁移后的 PGC 必不可少，由于抑制了它的程序性死亡[22]。

3 结束语

目前已知 SCF 可促进体外培养的 PGC 的增殖，若再向该系统中加入一种附加有丝分裂调节因子，如 bFGF，PGC 将继续增殖、产生一种多功能的胚胎干细胞，其具有类似于内细胞团的特性，不仅能分裂而且可以发育为更广泛的组织、甚至能产生正常有功能的生殖细胞，通过它来模拟早期哺乳动物的发育，PGC 必将有着广阔的研究前景。

综上所述，小鼠 PGC 的起源、迁移、增殖和分化是一个十分复杂的过程，是多因子共同作用的结果，目前的研究还不够成熟，有许多问题尚需要进行深入探讨。

参 考 文 献

1 Ginsburg, M., M. H. L. Snow, A. Mclaren. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 1990, 110: 521～528

2 Donovan, P. J., D. Stott, L. A. Cairns. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell*, 1986, 44: 831～838

3 Ffrench-Constant, C., A. Hollingsworth, J. Heasman. Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration. *Development*, 1991, 113: 1365～1373

4 Godin, I., C. C. Wylie, J. Heasman. Genital ridges exert long-range effect on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development*, 1990, 108: 357～363

5 Godin, I., C. C. Wylie. TGF-β_1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development*, 1991, 113: 1451～1457

6 Tam, P. P. L., M. H. L. Snow. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1981, 64: 133～147

7 Dolci, S., D. E. Williams, M. K. Ernst. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*, 1991, 352: 809～811

8 Dolci, S., M. Pesce, M. De Felici. Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor and cAMP on in vitro proliferation of mouse primordial germ cells. *Mol Reprod. Dev.*, 1993, 35: 134～139

9 De Felici, M., S. Dolci. Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feed layers. *Dev. Biol*, 1991, 147: 281～284

10 De Felici, M., M. Pesce. Growth factors in mouse primordial germ cell migration and proliferation. *Prog. Growth Factor Res.*, 1994, 5: 135～145

11 Cheng, L., D. P. Gearing, L. S. White. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. *Development*, 1994, 120: 3145～3151

12 Witte, O. N. Steel locus defines new multipotent growth factor. *Cell*, 1990, 63: 5～6

13 Matsui, Y., K. M. Zsebo, B. L. Hogan. Embryonic expression of haematopoetic growth factor encoded by the Sl lo-

cus and the ligand for c-kit. *Nature*, 1990, **347**:667～669

14 Besmer, P. The kit ligand encoded at the murine Steel locus: a pleiotropic grwoth and differentiation factor. *Curr. Opin. Cell Biol*, 1991, **3**:939～946

15 Hirano, T., T. Matsuda, K. Nakajima. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin-6 related cytokine subfamily. *Stem Cell*, 1994, **12**:262～267

16 Pesce, M. M. G. Farrace, S. Dolci. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death. *Development*, 1993, **118**:1089～1094

17 Kawase, E., H. Yamamoto, K. Hashimoto. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Dev. Biol.*, 1994, **161**:91～95

18 Julie, E. K., H. Janet, C. W. Chris. The role of interleukin-4 in the regulation of mouse primordial germ cell numbers. *Dev. Biol.*, 1996, **174**:14～21

19 De Felici, M., S. Dolci, M. Pesce. Proliferation of mouse primordial germ cells in vitro: a key role for cAMP. *Dev. Biol.*, 1993, **157**:277～280

20 Pesce, M., R. Canipari, G. L. Ferri. PACAP stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse primordial germ cells. *Development*, 1996, **122**:215～221

21 Koshimizu, U., M. Watanabe, N. Na Katsuji. Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells in vitro. *Dev. Biol.*, 1995, **168**:683～685

22 Koshimizu, U., T. Taga, M. Watanabe. Functional requirement of gp130－mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cell in vitro and derivation of embryonic germ (EG) cells. *Development*, 1996, **122**:1235～1242