

# 涡虫生殖生物学研究进展

石长应 张合彩 陈广文\*

河南师范大学生命科学学院 新乡 453007

**摘要:** 涡虫由于具有极强的再生能力而成为发育生物学及再生生物学研究的模式生物。此外,其在有性生殖方面所表现出来的独特性也备受人们关注。目前,涡虫生殖生物学研究领域主要围绕两个热点问题开展工作:1. 无性生殖向有性生殖转化的诱因及机制的探讨;2. 生殖相关基因的克隆、表达及功能分析。有关生殖转化机制方面的研究主要集中在涡虫的性化相关事件以及性化物质的本质探索;截至目前已克隆并对其表达和功能进行探讨的涡虫生殖相关基因主要有 *DjPTK1*、*vasa-like* 基因、*DeY1*、*Dryg*、*nanos* 相关基因以及 *Drpiwi-1* 等。此外,本文也对有关涡虫生殖生物学方面存在的问题及未来该领域的发展趋势进行了总结和展望。

**关键词:** 涡虫;生殖;机制;基因

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2013)06-971-08

## Review on Planarian Reproductive Biology

SHI Chang-Ying ZHANG He-Cai CHEN Guang-Wen\*

*College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China*

**Abstract:** Due to its powerful regeneration capability, planarian has become the model organism of developmental biology and regenerative biology. Furthermore, planarian also shows unique reproductive characteristics and draws more and more attention. Recently, researches on planarian reproductive biology are mainly focusing on two aspects: 1. mechanism of asexual to sexual reproduction switch; 2. cloning, expression and function analysis of reproduction-related genes. As for the mechanism of reproduction switch, works mainly include the discovery of sexualization of planarian, the seasonal change of sexualization, the downstream events after sexualization, and the exploration of sex-inducing substance. Till now, the reproduction-related genes *DjPTK1*, *vasa-like* genes (*DjvlgA/DjvlgB*), *DeY1*, *Dryg*, *nanos*-related genes (*Djnos/Smednos/Dr-nanos*) and *Drpiwi-1* have been cloned, and their expression patterns and functions have been explored. Furthermore, the problem and future tendency in planarian reproductive biology have also been summarized.

**Key words:** Planarian; Reproduction; Mechanism; Gene

涡虫隶属于扁形动物门(Platyhelminthes)涡虫纲(Turbellaria),是一类较为原始的两侧对称、三胚层动物,与软体动物、环节动物等同属于冠轮动物(Lophotrochozoa)(Carranza et al. 1997, Adoutte et al. 2000)。数百年来涡虫强大的再生能力一直吸引着众多科学家的兴趣,因而成为再生生物学、发育生物学研究的理想模型(Saló 2006, Wagner et al. 2011, Baguñà

**基金项目** 国家自然科学基金项目(No. 31170357, 30870368, 30670247, 30170119),教育部博士点基金项目(No. 200804760003),河南省高校创新人才基金项目(No. 2005126)、杰出青年科学基金项目(No. 0312001100)、自然科学基金项目(No. 122300410141),河南师范大学青年骨干教师基金项目(No. 521);

\* 通讯作者, E-mail: chengw0183@sina.com;

**第一作者介绍** 石长应,男,讲师;研究方向:动物资源与保护;E-mail: shichangying2002@163.com。

收稿日期:2013-05-03,修回日期:2013-07-26

2012)。除了其强大的再生能力,涡虫在生殖方面也表现出独特性,即能够性化 (sexualize, 从无性状态转化为有性状态) 或去性化 (desexualize, 从有性状态转化为无性状态) (Kenk 1937)。根据生殖模式,涡虫可分为 3 类: 无性族 (asexual race)、有性族 (sexual race) 和生理族 (physiological race) (Jenkins 1967)。无性族涡虫没有性器官,通过分裂产生新个体,进行专性无性生殖;有性族涡虫有雌雄同体的性器官,通过异体受精、产卵、孵化出新个体,该类涡虫行专性有性生殖;对于生理族涡虫则能够根据季节或外界环境的变化在无性生殖和有性生殖之间进行转换 (Hoshi et al. 2003)。涡虫生殖生物学的研究迄今已有百余年的历史,早期的研究主要是通过裸眼及显微镜观察和组织切片制作等方法对涡虫的生殖类型、有性涡虫生殖系统的组成和结构、产卵及早期胚胎发育进行研究 (王晓安 1998, 于梅 2008)。近年来,随着分子克隆 (molecular clone)、原位杂交 (in situ hybridization, ISH)、RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)、流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 等生物技术的发展,涡虫生殖生物学已由现象描述和组织器官水平深入到机理研究和分子水平。目前,涡虫生殖生物学研究主要集中在两个领域: 1. 无性生殖向有性生殖转化的机制研究; 2. 生殖相关基因的克隆、表达及功能分析。

## 1 无性生殖向有性生殖转化的机制

前已述及涡虫根据其生殖模式可分为无性族、有性族和生理族。关于涡虫无性个体向有性个体的转化或者说无性生殖向有性生殖转化的机制一直是涡虫研究者深感兴趣的一个问题。

**1.1 涡虫性化的发现** Kobayashi 等 (1999) 发现,以性成熟涡虫 *Bdellocephala brunnea* (枝肠涡虫科 Dendrocoelidae 蛭头属) 为食物饲喂专性无性生殖的无性系琉球三角涡虫 (*Dugesia ryukyuensis*) 可以定向诱导后者产生完全的性器官,并最终通过交配产卵,孵出新个体。通过组织学研究, Kobayashi 把涡虫的性化过程分为

5 个时期: I 期卵巢发育到足够大小,从外观可见; II 期卵母细胞出现; III 期原始精巢出现; IV 期生殖孔打开,卵黄腺原基发育,精母细胞出现; V 期成熟的精子和卵黄腺形成。如果在性化的 I、II 期停止饲喂有性涡虫 *B. brunnea*, 则返回无性状态; 而如在 III 期之后停止饲喂,于卵巢后切割的身体后段则最终发育成有性个体。基于此,作者得出结论,在涡虫性化过程的 II、III 时期之间存在着该过程的“不可逆转点 (point-of-no-return)”。专性无性生殖的涡虫通过饲喂性成熟的异种有性涡虫而被完全性化,转而进行有性生殖,显然这种被食用的有性涡虫体内含有某种性化物质 (sexualizing substance)。Kobayashi 等 (2002a) 对该问题进一步研究发现,无性涡虫通过饲喂有性涡虫被性化之后,自身即能产生足够的性化物质维持其有性状态。如果对已性化的涡虫进行切割,则带有性器官的身体后段再生成有性个体,而没有性器官的头段再生体则返回无性状态。这也正印证了 Sakurai (1981) 性成熟涡虫的头段缺乏完全性化所必需的某种性化物质的观点。所有这些结果足以说明不含性器官的体段缺乏足够量的性化物质,涡虫的性化状态是靠其体内的性化物质来维持的。

**1.2 性化的季节变化** 利用上述涡虫性化系统对琉球三角涡虫无性个体连续两年的饲喂实验表明,无性涡虫的性化因季节而异。在夏季尽管其卵巢已发育,但涡虫并未完全性化,一旦饲喂停止,发育着的卵巢就会退化消失;而在冬季通过饲喂能产生完全的性器官,即便在“不可逆转点”之后停止饲喂,性器官仍可继续发育直至成熟。上述结果表明不同季节涡虫性化情况的巨大差异是由于用作食物的有性涡虫 *B. brunnea* 体内的性化物质的质和量以及无性涡虫对性化物质的敏感程度因季节而异所致 (Kobayashi et al. 2002b)。

**1.3 性化后的下游事件** 无性涡虫在获得性化后立即停止分裂生殖,这表明用作食物的有性涡虫体内所含的性化物质诱导的下游机制是分裂停止的原因。通过去头切割实验发现,涡

虫性化后如果没有完全性成熟则去头后仍可触发分裂,而完全性化的涡虫即使去头也不再进行分裂生殖。该结果提示涡虫性化后分裂的停止至少由两套机制控制:其一与头部系统相关,另外还有一套独立于头部的控制机制(Kobayashi et al. 2002c)。

利用琉球三角涡虫无性系的饲喂性化实验模型,Hoshi 等(2003)让性化后的获得性有性体进行随机交配产生 F1 代种群,在 F1 中存在有性个体和无性个体,且二者的比例为 2:1。对 F1 有性体进行切割再生实验,无论其身体哪个部位的再生体都是有性的;而由饲喂实验得到的获得性有性体的切割再生实验表明,不含性器官的头段再生体是无性的,其他部分的再生体才是有性的。基于此 Hoshi 等得出结论:获得性有性体(acquired sexuals, AqS)的全能干细胞 neoblast 仍然是“无性的”,所以虫体还需要外源的性化物质才能分化出性器官和配子。但是,先天有性体(innate sexuals, InS)的一些 neoblast 是“有性的”,所以不需要外在性化物质就能分化出性器官和配子。2012 年,Nodono 等验证了 Hoshi 等的切割再生实验,并进行了 neoblast 细胞的移植实验。发现把先天有性体(InS)的 neoblast 移植到无性体内(asexuals, AS),则该无性体转化为有性体,而如果移植的是获得性有性体(AqS)的 neoblast 细胞,则无性体不能被性化。这表明在涡虫体内有一个生殖模式的 neoblast 自主决定机制。

**1.4 性化物质的研究** 引起动物由无性生殖向有性生殖转变的性诱导物质一直为众多科学家所关注。原生动物团藻(*Volvox carteri*),热击能使其产生性诱导物质,即一种分子量为 27.5 ~ 30 ku 的糖蛋白(Starr et al. 1974, Kirk et al. 1986)。这种蛋白能使其无性生殖细胞经过胚胎发育的重组模式产生依赖于有性生殖的配子(Sumper et al. 1993)。但是这种有性诱导效应的糖蛋白在后生动物中尚未见报道。

涡虫性诱导物质(sex-inducing substance)的存在最早由 Grasso 和 Benazzi 在 1973 年证实。1975 年,Grasso 等发现把有性涡虫的匀浆

液离心后其下层的沉淀物有性诱导活性,而上层的胞浆部分则没有。自此,关于性诱导物质的分离再没有更深入的探索。直到 2011 年,Kobayashi 和 Hoshi 把饲喂性化后的有性涡虫匀浆、离心,试图分离出这种神奇的性诱导物质。他们有了新发现:不但下层的沉淀物有性诱导效应,而且上层水溶性的胞浆部分也能使无性体性化,具有性诱导效应。其研究还表明该亲水性的性诱导物质是一种具木瓜蛋白酶抗性且分子量小于 500 的小分子化合物,而且上清部分还有分子量大于 5 000 的性诱导增强剂存在。基于此,他们得出结论:上清部分有亲水性的性诱导物质和性诱导增强剂存在,沉淀部分有疏水性的性诱导物质存在。无性涡虫的性化是由这些物质的复合效应共同触发的。Miyashita 等(2011)以有性琉球三角涡虫为实验动物,进行切割再生实验。发现对照组再生体均为有性,而用一定浓度的 17 $\beta$ -雌二醇或双酚 A 处理,则再生体尽管发育为有性,但雌性生殖系统的重要器官卵巢未见发育。表明涡虫体内的类固醇激素系统在其性器官的形成和成熟发育过程中起着重要作用。由此可见,有性涡虫体内的性诱导物质或性化物质应该是多种具有性诱导效应的化学物质的总称;激素对涡虫性器官的形成和发育也起着非常重要的作用。

## 2 生殖相关基因的克隆、表达及功能分析

目前已克隆并对其表达和功能进行研究的生殖相关基因主要有 *DjPTK1*、*vasa-like* 基因、*DeY1*、*Dryg*、*nanos* 相关基因以及 *Drpiwi-1* 等(表 1)。

**2.1 *DjPTK1*** *DjPTK1* (Ogawa et al. 1998) 是从日本三角涡虫克隆的一个基因,其编码蛋白 *DjPTK1* 为一种受体酪氨酸激酶,属于 FGFR/PDGF 蛋白家族。整体原位杂交(whole-mount in situ hybridization, WISH)表明,该基因特异性地在有性涡虫的精巢和卵巢表达,但在无性涡虫未见表达。切片原位杂交对该基因表达的更

表 1 涡虫生殖相关基因  
Reproduction-related genes in planarian

基因 Gene	来源涡虫物种 Resource species	研究技术与手段 Technique and method	表达定位 Expression location	功能 Function	参考文献 References
<i>DjPTK1</i>	日本三角涡虫 <i>Dugesia japonica</i>	整体原位杂交、切片原位杂交	性成熟涡虫的精巢和卵巢,正在性化涡虫的腹侧实质组织细胞	在涡虫生殖细胞分化早期和生殖细胞成熟过程中起作用	Ogawa et al. 1998
<i>DjnlgA/DjnlgB</i>	日本三角涡虫 <i>D. japonica</i>	整体原位杂交、切片原位杂交、切割再生、X-光辐照等	精巢、卵巢 ( <i>DjnlgA/DjnlgB</i> ); 实质组织细胞、再生芽基及近芽基区 ( <i>DjnlgA</i> )	参与涡虫生殖发育、生殖细胞分化调控; <i>DjnlgA</i> 是涡虫 neoblast 细胞的分子标记,其表达产物是 neoblast 细胞中拟染色体的组成成分,参与涡虫再生、细胞分化等	宇文延青等 2012, Shibata et al. 1999, Solana et al. 2009
<i>DeY1</i>	<i>D. etrusca</i> (三角涡虫科 Dugesidae)	整体原位杂交、切片原位杂交	精巢(精原细胞、精母细胞及精细胞)	参与涡虫雄性生殖细胞发育而与涡虫再生无关	Salvettri et al. 2002
<i>Dryg</i>	琉球三角涡虫 <i>D. ryukyuensis</i>	整体原位杂交、切片原位杂交、涡虫性化实验、切割再生	卵巢	与卵黄腺形成有关,可作为卵黄腺的分子标记	Hase et al. 2003
<i>Djnos</i>	日本三角涡虫 <i>D. japonica</i>	整体原位杂交、切片原位杂交、免疫组化、X-光辐照、BrdU 标记及电镜技术	有性涡虫卵巢、精巢周围的卵原细胞和精原细胞;无性涡虫干细胞	参与生殖细胞形成,其 mRNA 是拟染色体的成分之一	Sato et al. 2006
<i>Snednos</i>	地中海涡虫 <i>Schmidtea mediterranea</i>	整体原位杂交、荧光原位杂交、冰冻及石蜡切片、免疫组化、 <sup>125</sup> I-射线辐照、RNAi; 共聚焦显微镜技术等	生殖系细胞和眼前体细胞	参与有性及无性涡虫生殖细胞的发育、再生及保持;作为转录调节子和细胞分化抑制子;在涡虫发育和再生过程中控制前体细胞数量	Handberg-Thorsager et al. 2007, Wang et al. 2007
<i>Dr-nanos</i>	琉球三角涡虫 <i>D. ryukyuensis</i>	原位杂交、涡虫性化实验、RNA 干扰、X-光辐照、电镜技术	有性涡虫卵巢、精巢周围的卵原细胞和精原细胞;无性涡虫干细胞	对于涡虫卵巢和精巢中生殖细胞的发育至关重要,且可能对早期生殖细胞特化起作用,但对雌性器官,如卵黄腺、交配器等没有功能	Nakagawa et al. 2012a
<i>Drpiwi-1</i>	琉球三角涡虫 <i>D. ryukyuensis</i>	整体原位杂交、切片原位杂交、X-光辐照、RNAi、Western-blot、免疫组化	干细胞、生殖细胞	生殖细胞发育必需	Nakagawa et al. 2012b

精确定位,其只在精巢相对较外层的精原细胞、精母细胞表达,而于精巢较内层的精细胞和成熟精子不表达。该基因在处于性化过程的涡虫腹侧实质组织也有表达,这些阳性细胞似乎是随着涡虫的性化过程通过肠间隙从腹侧迁移到背侧,然后分化为精原细胞和精母细胞。所有这些结果表明,*DjPTK1* 应该在涡虫生殖细胞分化早期和生殖细胞成熟过程中起作用。

**2.2 *vasa-like* 基因 *DjvlgA/DjvlgB*** *DjvlgA/DjvlgB* 克隆于日本三角涡虫,是一类 *vasa-like* 基因,其编码蛋白为具有 DEAD-box 蛋白家族全部 8 个 DEAD-box 结构域的 RNA 解旋酶 (Solana et al. 2009)。Shibata 等(1999)利用整体原位杂交、切片原位杂交以及 X-光辐照等技术研究了这两个基因的表达和功能。*DjvlgA* 和 *DjvlgB* 在有性涡虫的精巢及卵巢均有表达。二者在卵巢的表达模式类似,均表达于卵母细胞。在精巢的表达模式不同:*DjvlgA* 表达于精巢相对外层的精原细胞、精母细胞和精细胞,而处于精巢内部的精子中未见表达;*DjvlgB* 仅在精母细胞中表达,说明这两个基因在涡虫生殖发育中起不同的作用。此外,实验还表明 *DjvlgA* 在无性涡虫实质组织也有表达。对于切割再生涡虫,*DjvlgA* 主要表达于再生组织未分化或正在分化的细胞,而 X-光辐照后的涡虫其 *DjvlgA* 表达细胞急剧减少。所有这些结果表明,*DjvlgA* 除了在生殖细胞表达,还表达于涡虫的成体干细胞 neoblast,因而 *DjvlgA* 可作为 neoblast 细胞的一个分子标记(宇文延青等 2012)。

**2.3 *DeY1*** *DeY1* 克隆于三角涡虫科 Dugesidae 三角涡虫属的 *D. etrusca*,其编码蛋白 *DeY1* 是一种 Y-box 结合蛋白,具有该蛋白家族的标志结构域——冷休克结构域(cold shock domain, CSD) (Salveti et al. 2002)。Y-box 结合蛋白家族成员是一类高度保守的顺式作用元件,广泛存在于原核及真核生物细胞中。它是一种多功能蛋白,与转录调节、翻译调控、mRNA 选择性剪接、DNA 修复、细胞增殖和再生等有关。Y-box 结合蛋白的氨基酸序列包含 3 个结构域:氨基酸 N 末端,亲水结构域 C 末端

以及冷休克结构域,保守的冷休克结构域决定了 Y-box 结合蛋白的大部分功能(张玮玮等 2006)。

Salveti 等(2002)通过整体原位杂交实验发现该基因表达于性成熟涡虫的精巢,而在未性成熟个体及无性个体均无表达。切片原位杂交实验对 *DeY1* 的表达进行了细胞定位,其主要在精巢相对较外侧的精原细胞、精母细胞及精细胞中表达,而在成熟精子及雌性生殖细胞中均无表达。切割再生涡虫体段的原位杂交表明,该基因在涡虫再生过程中不活化,其表达模式与在未切割完整涡虫中的表达模式相同,这说明 *DeY1* 基因与涡虫雄性生殖细胞发育有关而与涡虫再生无关,因而 *DeY1* 可作为雄性生殖细胞的分子标记。免疫组化技术对 *DeY1* 蛋白进行了更精确的亚细胞定位,发现 *DeY1* 的表达蛋白位于精原细胞的细胞核、精母细胞的细胞核和细胞质以及精细胞的细胞质,而在成熟精子中未见表达。

**2.4 *Dryg*** *Dryg* 克隆于琉球三角涡虫,其 cDNA 全长 2 039 bp。Hase 等(2003)通过整体及切片原位杂交对无性涡虫、正在性化涡虫以及性化后的完整及切割再生涡虫进行了一系列实验,发现 *Dryg* 仅表达于性化涡虫的卵黄腺。所以 *Dryg* 可作为卵黄腺的分子标记研究涡虫性化过程以及有性涡虫切割再生过程中卵黄腺的形成。

**2.5 *Nanos* 相关基因** *nanos* 基因的功能最初是在果蝇(*Drosophila melanogaster*)胚胎发育的体轴建立中发现的(Lehmann et al. 1991)。进一步的研究表明,作为生殖质重要组成部分之一的果蝇 *nanos* 对于原始生殖细胞的决定及迁移起着关键作用,合子表达的 *Nanos* 对于幼虫维持生殖细胞的正常发育是必不可少的(Hayashi et al. 2004, Kadyrova et al. 2007)。后来,在线虫(*Caenorhabditis elegans*) (Subramaniam et al. 1999)、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*) (Mosquera et al. 1993)、斑马鱼(*Danio rerio*) (Köprunner et al. 2001)、小鼠(*Mus musculus*) (Tsuda et al. 2003, Suzuki et al. 2007)等多个物

种都发现有果蝇 *nanos* 基因同源物存在。涡虫类群中已克隆研究的 *nanos* 相关基因截至目前主要有 *Djnos* (Sato et al. 2006)、*Smednos* (*Smed-nanos*) (Handberg-Thorsager et al. 2007, Wang et al. 2007) 以及 *Dr-nanos* (Nakagawa et al. 2012a)。

**2.5.1 *Djnos*** *Djnos* 克隆于日本三角涡虫。整体与切片原位杂交表明该基因在有性涡虫主要表达于卵巢和精巢,且只在卵巢、精巢周边的卵原细胞和精原细胞表达,而在靠内侧的其他性细胞不表达。该基因在无性涡虫表达于类似有性涡虫精巢的部位。结合切片原位杂交、免疫组化、X-光辐照、BrdU (5-溴脱氧尿嘧啶核苷) 标记及电镜观察结果,推测无性涡虫体内的 *Djnos* 阳性细胞是其生殖干细胞 (germline stem cell), 为涡虫成体干细胞 neoblast 的一个亚群,在性化过程中分化为卵母细胞和精母细胞 (Sato et al. 2006)。

**2.5.2 *Smednos* (或 *Smed-nanos*)** *Smednos* 基因由 Handberg-Thorsager 等 (2007) 克隆于地中海涡虫,其编码蛋白是一种锌指蛋白。Handberg-Thorsager 等 (2007) 通过原位杂交、冰冻及石蜡切片、免疫组化、r-射线辐照等技术对该基因的表达进行研究。该基因主要表达在有性涡虫卵巢、精巢较外层的卵原细胞和精原细胞,在无性涡虫原始生殖细胞、切割再生涡虫原始生殖细胞和再生组织细胞以及涡虫胚胎发育和再生时期的眼前体细胞 (eye precursor cells) 中均有表达。推测其功能可能与生殖细胞形成有关;另外,作为转录调节子和细胞分化抑制子,在涡虫发育和再生过程中通过抑制前体细胞分化以控制前体细胞数量。巧合的是,Wang 等 (2007) 同时也在该种涡虫克隆到该基因,并将其命名为 *Smed-nanos*。借助 RNA 干扰 (RNAi)、荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 以及共聚焦显微镜等技术,Wang 等对该基因的功能进行了更深入的研究。发现 *Smed-nanos* 在有性和无性涡虫中都有表达,参与生殖细胞的发育、再生和保持。

**2.5.3 *Dr-nanos*** Nakagawa 等 (2012a) 在琉球

三角涡虫中克隆得到 *Dr-nanos* 基因,并利用原位杂交、RNA 干扰、X-光辐照等技术研究了该基因的功能。*Dr-nanos* 在无性涡虫的卵巢原基细胞有表达,且随着无性涡虫的性化进程该表达信号增强,并最终定位在卵巢和精巢的早期生殖细胞。对于 X-光辐照后的涡虫,其 *Dr-nanos* 的表达大幅度降低,这表明 *Dr-nanos* 阳性细胞应属于干细胞亚群细胞,尤其是生殖干细胞 (germ stem cell, GSC)。利用 RNAi 技术敲除处于性化过程的涡虫 *Dr-nanos* 基因,发现其卵巢中卵原细胞数目减少并且精巢败育。所有这些结果说明 *Dr-nanos* 对于涡虫卵巢和精巢中生殖细胞的发育至关重要,且可能对早期生殖细胞特化起作用,但对体性器官 (somatic sexual organs), 如卵黄腺、交配器等没有作用。

**2.6 *Drpiwi-1*** Argonaute 家族蛋白都具有两个典型的结构域 PAZ 和 PIWI。该家族蛋白在从酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 到人 (*Homo sapiens*) 的许多物种中高度保守,在非编码小 RNA 介导的基因沉默事件中起重要作用 (Peters et al. 2007, Hutvagner et al. 2008)。该蛋白家族可分成 AGO 和 PIWI 两个亚家族,PIWI 蛋白主要在生殖细胞中表达 (Farazi et al. 2008),调控多种生物的生殖干细胞自我更新、生殖细胞发育以及配子发生等过程 (Thomson et al. 2009)。

Nakagawa 等 (2012b) 在琉球三角涡虫中克隆获得 4 个 *piwi* 基因,分别命名为 *Drpiwi-1*、*Drpiwi-2*、*Drpiwi-3*、*Drpiwi-4*。通过整体原位杂交、切片原位杂交、X-光辐照、RNAi、Western-blot、免疫组化等技术对这 4 个基因的表达与功能进行了研究。这 4 个基因在涡虫干细胞中均有表达,但只有 *Drpiwi-1* 表达于有性涡虫的生殖细胞,*Drpiwi-1* (RNAi) 沉默的正在性化涡虫的精巢和卵巢败育,但是体性器官,如卵黄腺、交配器等不受影响。因此,作者得出 *Drpiwi-1* 对生殖细胞发育必须的结论。免疫组化实验对 *Drpiwi-1* 蛋白进行了细胞定位,发现该蛋白主要位于干细胞和生殖细胞的细胞质,可能参与调控某些基因的表达。

### 3 结语及展望

无性涡虫的性化与其分裂生殖的停止相偶联, 而其核型似乎也受某种不为人知的机制调控。迄今为止, 包括经典繁殖实验、再生实验、遗传学实验以及核型、生物化学和分子生物学分析等多个领域在内的整合生物学方法也并未完美揭示调控涡虫有性生殖和分裂生殖的复杂机制。因此未来涡虫生殖生物学研究仍然是围绕涡虫的性化机制及生殖相关基因的功能研究两条主线展开。相信随着生物学技术的不断进步和研究的不断深入, 更多与有性生殖相关的基因被克隆, 其功能被更准确地解读, 性化物质的探究更趋近本质, 涡虫性化机理和有性生殖机制势必会得到很好的阐释。

### 参 考 文 献

Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, et al. 2000. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9): 4453–4456.

Baguñà J. 2012. The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(1/3): 19–37.

Carranza S, Baguñà J, Riutort M. 1997. Are the platyhelminthes a monophyletic primitive group? An assessment using 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 14(5): 485–497.

Farazi T A, Juranek S A, Tuschl T. 2008. The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*, 135(7): 1201–1214.

Grasso M, Benazzi M. 1973. Genetic and physiologic control of fissioning and sexuality in planarians. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 30(2): 317–328.

Grasso M, Montanaro L, Quaglia A. 1975. Studies on the role of neurosecretion in the induction of sexuality in a planarian agamic strain. *Journal of Ultrastructure Research*, 52(3): 404–408.

Handberg-Thorsager M, Saló E. 2007. The planarian *nanos*-like gene *Smednos* is expressed in germline and eye precursor cells during development and regeneration. *Development Genes and Evolution*, 217(5): 403–411.

Hase S, Kobayashi K, Koyanagi R, et al. 2003. Transcriptional pattern of a novel gene, expressed specifically after the point-

of-no-return during sexualization, in planaria. *Development Genes and Evolution*, 212(12): 585–592.

Hayashi Y, Hayashi M, Kobayashi S. 2004. Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germ line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28): 10338–10342.

Hoshi M, Kobayashi K, Arioka S, et al. 2003. Switch from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyensis*. *Integrative and Comparative Biology*, 43(2): 242–246.

Hutvagner G, Simard M J. 2008. Argonaute proteins; key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1): 22–32.

Jenkins M M. 1967. Aspects of planarian biology and behavior// Corning W C, Ratner S C. *Chemistry of Learning: Invertebrate Research*. New York; Plenum Press, 117–143.

Kadyrova L Y, Habara Y, Lee T H, et al. 2007. Translational control of maternal *Cyclin B* mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development*, 134(8): 1519–1527.

Kenk R. 1937. Sexual and asexual reproduction in *Euplanaria tigrina* (Girard). *Biological Bulletin*, 73(2): 280–294.

Kirk D L, Kirk M M. 1986. Heat shock elicits production of sexual inducer in *Volvox*. *Science*, 231(4733): 51–54.

Kobayashi K, Arioka S, Hase S, et al. 2002a. Signification of the sexualizing substance produced by the sexualized planarians. *Zoological Science*, 19(6): 667–672.

Kobayashi K, Arioka S, Hoshi M. 2002b. Seasonal changes in the sexualization of the planarian *Dugesia ryukyensis*. *Zoological Science*, 19(11): 1267–1278.

Kobayashi K, Hoshi M. 2002c. Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyensis*; change of the fissiparous capacity along with the sexualizing process. *Zoological Science*, 19(6): 661–666.

Kobayashi K, Hoshi M. 2011. Sexual-inducing effect of a hydrophilic fraction on reproductive switching in the planarian *Dugesia ryukyensis* (Seriata, Tricladida). *Frontiers in Zoology*, 8: 23.

Kobayashi K, Koyanagi R, Matsumoto M, et al. 1999. Switching from asexual to sexual reproduction in the planarian *Dugesia ryukyensis*; bioassay system and basic description of sexualizing process. *Zoological Science*, 16(2): 291–298.

Köprunner M, Thisse C, Thisse B, et al. 2001. A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes and Development*, 15(21): 2877–2885.

Lehmann R, Nüsslein-Volhard C. 1991. The maternal gene *nanos* has a central role in posterior pattern formation of the

- Drosophila* embryo. Development, 112(3): 679–691.
- Miyashita H, Nakagawa H, Kobayashi K, et al. 2011. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and bisphenol A on the formation of reproductive organs in planarians. Biological Bulletin, 220(1): 47–56.
- Mosquera L, Forristall C, Zhou Y, et al. 1993. A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain. Development, 117(1): 377–386.
- Nakagawa H, Ishizu H, Chinone A, et al. 2012a. The *Dr-nanos* gene is essential for germ cell specification in the planarian *Dugesia ryukyuensis*. The International Journal of Developmental Biology, 56(1/3): 165–171.
- Nakagawa H, Ishizu H, Hasegawa R, et al. 2012b. *Drpivi-1* is essential for germline cell formation during sexualization of the planarian *Dugesia ryukyuensis*. Developmental Biology, 361(1): 167–176.
- Nodono H, Ishino Y, Hoshi M, et al. 2012. Stem cells from innate sexual but not acquired sexual planarians have the capability to form a sexual individual. Molecular Reproduction and Development, 79(11): 757–766.
- Ogawa K, Wakayama A, Kunisada T, et al. 1998. Identification of a receptor tyrosine kinase involved in germ cell differentiation in planarians. Biochemical and Biophysical Research Communication, 248(1): 204–209.
- Peters L, Meister G. 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. Molecular Cell, 26(5): 611–623.
- Sakurai T. 1981. Sexual induction by feeding in an asexual strain of the freshwater planarian, *Dugesia japonica japonica*. Annotationes Zoologicae Japonenses, 54(2): 103–112.
- Saló E. 2006. The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). BioEssays, 28(5): 546–559.
- Salvetti A, Lena A, Rossi L, et al. 2002. Characterization of *DeY1*, a novel Y-box gene specifically expressed in differentiating male germ cells of planarians. Gene Expression Patterns, 2(3/4): 195–200.
- Sato K, Shibata N, Orii H, et al. 2006. Identification and origin of the germline stem cells as revealed by the expression of *nanos*-related gene in planarians. Development, Growth and Differentiation, 48(9): 615–628.
- Shibata N, Umesono Y, Orii H, et al. 1999. Expression of *vasa* (*vas*)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians. Developmental Biology, 206(1): 73–87.
- Solana J, Romero R. 2009. *SpolvgA* is a DDX3/PL10-related DEAD-box RNA helicase expressed in blastomeres and embryonic cells in planarian embryonic development. International Journal of Biological Sciences, 5(1): 64–73.
- Starr R C, Jaenicke L. 1974. Purification and characterization of the hormone initiating sexual morphogenesis in *Volvox carteri f. nagariensis* Iyengar. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 71(4): 1050–1054.
- Subramaniam K, Seydoux G. 1999. *nos-1* and *nos-2*, two genes related to *Drosophila nanos*, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. Development, 126(21): 4861–4871.
- Sumper M, Berg E, Wenzl S, et al. 1993. How a sex pheromone might act at a concentration below 10<sup>-16</sup> M. EMBO Journal, 12(3): 831–836.
- Suzuki A, Tsuda M, Saga Y. 2007. Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. Development, 134(1): 77–83.
- Thomson T, Lin H F. 2009. The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 25: 355–376.
- Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, et al. 2003. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. Science, 301(5637): 1239–1241.
- Wagner D E, Wang I E, Reddien P W. 2011. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. Science, 332(6031): 811–816.
- Wang Y Y, Zayas R M, Guo T X, et al. 2007. *nanos* function is essential for development and regeneration of planarian germ cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(14): 5901–5906.
- 王晓安. 1998. 平角涡虫早期胚胎发育的观察. 生物学通报, 33(2): 39–40.
- 于梅. 2008. 涡虫有性生殖的研究进展. 生命科学仪器, 6(7): 34–37.
- 宇文延青, 司晓慧, 陈广文. 2012. 涡虫成体干细胞研究进展. 安徽大学学报: 自然科学版, 36(2): 103–108.
- 张玮玮, 黄惠芳, 李庆伟, 等. 2006. Y-box 结合蛋白功能及对肿瘤发生的影响. 遗传, 28(9): 1153–1160.