

生殖生物学

杨增明 孙青原 夏国良 主编

国家杰出青年科学基金 资助
“973”——生殖健康的基础研究

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书综合国内外在生殖生物学领域的研究论文和著作，介绍生殖生物学的发展历史、生殖细胞的发育及成熟、受精机理、胚胎发育及胚胎着床、妊娠识别、胎盘的形成和分娩的机理、性别决定及控制、生殖缺陷及辅助生殖技术、生殖免疫等方面的基本知识和概念，国内外的最新研究成果和动态，现代生殖生物学实验技术以及生殖生物学在生物学、医学、农业中的应用和前景。本书以小鼠、人和家畜为主，既介绍哺乳动物生殖的共性，又具体阐述各类动物的特性。

本书可作为高等院校的高年级学生、研究生、教师以及相关的科研院所从事生殖生物学、动物胚胎学、动物遗传育种学、发育生物学、妇产科学、野生动物研究的研究人员的参考书，也可作为大学本科生的教材用书。

图书在版编目(CIP)数据

生殖生物学/ 杨增明，孙青原，夏国良主编 .—北京：科学出版社，2005
ISBN 7-03-013761-2

I . 生… II . ①杨…②孙…③夏… III. 生殖-生物学 IV .Q492

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 077793 号

责任编辑：霍春雁 贾学文/ 责任校对：包志虹
责任印制：钱玉芬/ 封面设计：陈 敬

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 1 月第 一 版 开本：787×1092 1/ 16
2005 年 1 月第一次印刷 印张：41 1/ 4
印数：1—2 500 字数：950 000

定价：86.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换 〈科印〉)

主编简介



杨增明 1962年8月出生于甘肃省兰州市。1979~1986年在兰州大学攻读学士和硕士学位；1986~1989年在东北农业大学攻读博士学位；1989~1991年在中国科学院动物研究所从事博士后研究；1991~1996年先后在美国北卡罗来纳州立大学、贝勒医学院和堪萨斯大学医学中心从事动物生殖方面的研究。现为东北农业大学教授及博士生导师。2000年被聘为教育部“长江学者奖励计划”特聘教授。研究方向为哺乳动物胚胎发育和胚胎着床。1998年获“国家杰出青年基金”及国家教育部“跨世纪优秀人才培养计划”基金。自1998年以来，先后主持国家自然科学基金重点项目2项、美国避孕药研究与开发项目2项等12项课题。于1994、1997及1998年先后获得3项美国专利。共计发表科研论文110篇，其中35篇发表在SCI源期刊。现为美国 *Biology of Reproduction* 和 *Theriogenology* 等杂志的特邀审稿人，并兼任中国《动物学报》和《动物学杂志》编委。1998年被评为“全国优秀教师”，2002年获“中国青年科技奖”，2003年获“国家留学回国人员成就奖”。现为国务院学位委员会第五届学科评议组成员、全国生殖生物学会副理事长、中国动物学会细胞及分子显微技术学分会副主任委员、美国生殖生物学会会员。



孙青原 1964 年 12 月出生于山东省招远市。现任中国科学院动物研究所研究员、中国科学院研究生院教授、博士生导师。1994 年毕业于东北农业大学，获理学博士学位。1996 年由中国科学院动物研究所博士后出站后留所工作。曾先后在美国、日本和以色列进行过四年的博士后培训。研究方向为卵母细胞减数分裂、受精和早期胚胎发育的基因表达与信号转导和动物克隆机理。发表 SCI 收录论文 100 篇，其中有关影响因子大于 2.0 的 46 篇，在生殖生物学领域最具影响的 *Biology of Reproduction* 上发表 22 篇，影响因子总和 190 被引用 600 余次。受邀为包括 *Biology of Reproduction* 在内的 8 种 SCI 期刊撰写综述。作为副主编编著了由科学出版社出版的《受精生物学》；参编了美国 Humana Press 出版的 *Methods in Molecular Biology: Germ Cells*、《动物发育生物学》和《大百科全书》等著作。是 *Biol Reprod*、*Reproduction*、*Dev Dynam* 等 20 余种国内、外期刊的审稿人和日本动物繁殖学会会志 *J Reprod Dev* 的编委会委员。1999 年获“中国科学院青年科学家奖”，2002 年获国家杰出青年科学基金资助，2003 年获“中国科学院十大杰出青年”称号和“国家留学回国人员成就奖”，2004 年获“中国青年科技奖”和“新世纪百千万人才工程国家级人选”称号。



夏国良 现任中国农业大学生物学院教授、博士生导师。教育部“长江学者奖励计划”特聘教授，“国家杰出青年基金”获得者。1983～1988年师从北京农业大学动物生理生化杨传任教授，攻读硕士和博士学位研究生并从事生殖内分泌学的研究。1991～1994年，公派到丹麦国家教学研究医院（Rigshospitalet）生殖生物学实验室做博士后研究工作，师从国际著名胚胎学家 Anne Grete Byskov 教授。从事胚胎卵巢中卵细胞的发育和调节的研究。1994年回到母校中国农业大学工作，当年破格提升为教授。在回国人员启动基金和国家自然科学基金的资助下，继续研究促性腺激素诱导卵母细胞体外成熟的作用机制。已发表论文 90 余篇，其中在国内外重要的 SCI 源期刊中发表 30 余篇。论文被国外引用 200 余次。此外，还担任《中国农业大学学报》编辑委员会副主任、主编，《中华中西医》杂志常务编委、《动物学杂志》编委、中国农业大学国家“211 工程”项目“畜禽细胞与分子生物学实验室”负责人、中国生殖生物学会副理事长、中国生理学会理事、中国动物学会教学工作委员会委员、中国畜牧兽医学会动物生理生化学会副理事长。

编委会名单

- 主 编

杨增明 (东北农业大学)
孙青原 (中国科学院动物研究所)
夏国良 (中国农业大学)
- 编 委

(按姓氏笔画排序)
刁红录 (东北农业大学)
王松波 (中国农业大学)
文端成 (中国科学院动物研究所)
田文儒 (莱阳农学院)
宁 刚 (中国农业大学)
李文英 (上海计划生育研究所)
杨建鸽 (中国农业大学)
范衡宇 (中国科学院动物研究所)
栾黎明 (东北农业大学)
高尔生 (上海计划生育研究所)
陶 勇 (安徽农业大学)
崔 胜 (中国农业大学)
彭景蟪 (中国科学院动物研究所)
韩代书 (中国医学科学院基础医学研究所)
谭慧宁 (东北农业大学)

序

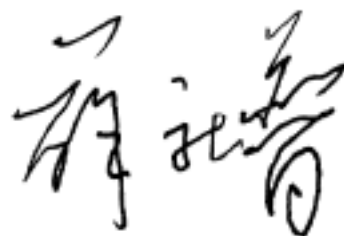
生殖是生物体的基本特征之一，生物通过生殖实现一代到下一代生命的延续。不同生物生殖过程的复杂性差异很大，生殖方式可分为无性生殖和有性生殖两种形式。生殖本身是一个古老的话题，而生殖生物学是用现代生物学手段，研究整个生殖过程的一门学科，是在动物胚胎学、繁殖学、妇产科学、发育生物学及动物生理学等学科的基础上发展起来的一门新兴学科。随着人工授精、体外受精、胚胎移植、细胞核移植，以及很多辅助生殖技术的广泛应用，这门学科在生物学、医学及农业中的地位越来越重要。而且，随着细胞生物学、分子生物学、生物化学、生理学等学科的飞速发展，以及各种现代生物学技术在生殖过程研究中的广泛应用，人们对生殖过程中的各种现象及其分子机制的了解有了长足的进步。

生殖生物学的研究不仅可使我们了解生命繁衍的奥秘，也在多方面使人类自身受益。20 世纪中叶，生殖内分泌基础研究的重大突破，导致了女用口服甾体避孕药的出现；精子获能现象的发现，导致了目前广泛应用于不育症治疗的试管婴儿技术的产生；20 世纪 80 年代，对激素受体研究的重大发现，产生了第二代甾体避孕药。1997 年克隆羊“多莉”的出生，引发了很多深层次的理论问题和人们对该技术应用前景的期望。所有这些突破性研究成果对生殖生物学的发展起到了巨大的推动作用。目前，不孕症的发病率在逐年上升（约为 15%~20%），而且病因也趋向于复杂化，使得辅助生殖技术面临极大的挑战。各种环境因素对生殖过程的不良影响也越来越明显。人们对避孕措施的安全性、可靠性及多样性等方面的要求也越来越高，发展非甾体、无毒无害、无副作用的避孕措施是社会发展的必然要求。随着我国畜牧业的迅速发展，对肉、蛋和奶的需求逐年增加，迫切需要增加奶牛、肉牛、肉羊、猪等的数量，并提高其质量，亟待加速各种辅助生殖技术在畜牧业中的应用。这些需求一方面为生殖生物学研究提出了新的挑战，另一方面也为生殖生物学的发展提供了一个难得的发展机遇。随着多聚酶链反应、基因敲除、基因芯片、蛋白芯片、基因组学、蛋白质组学、细胞分离技术等方面的飞速发展，许多以前未知的生殖现象、生殖过程及生殖功能逐渐被发现和了解，也为生殖生物学提供了更加宽广的发展空间。

目前，国内尚无一本系统介绍生殖生物学领域研究成果和发展动态的

书。该书是国内从事生殖生物学研究的一批学者，综述当前国内外该领域的最新研究进展，并结合自己的研究成果编写的一部全面反映生殖生物学基本概念、基础理论、研究技术、研究成果和发展动态等的综合性教学和科研用书。该书的三位主编均为国家杰出青年科学基金获得者，杨增明博士和夏国良博士现为教育部“长江学者奖励计划”特聘教授，孙青原博士 2003 年获“中国科学院十大杰出青年”称号。

我期望这本书的问世将对我国生殖生物学的发展起到积极的推动作用，并对生殖生物学领域的研究、教学和临床实践等有所裨益。



中国医学科学院教授
中国科学院资深院士

2004 年 4 月 15 日

目 录

序	
第一章 生殖及生殖生物学	1
第二章 生殖器官的结构与功能	8
第一节 雌性生殖器官	8
第二节 雄性生殖器官	17
第三章 精子发生与成熟	26
第一节 精子发生	26
第二节 精子发生的调控机制	45
第三节 精子的成熟与获能	57
第四章 卵泡发育、卵子发生和排卵	73
第一节 卵泡发育和卵子发生	73
第二节 卵子成熟	97
第三节 排卵	115
第四节 黄体的形成和退化	126
第五章 受精	137
第一节 受精研究历史的简单回顾	137
第二节 受精的概述	138
第三节 精子与卵透明带识别和结合的分子基础	144
第四节 精子顶体反应	149
第五节 精子与卵质膜结合和融合的分子基础	153
第六节 卵子激活	158
第七节 精子核去浓缩及雄原核形成	170
第八节 卵子皮质反应及多精受精的阻止	171
第九节 受精过程的中心体遗传	177
第六章 胚胎发育	182
第一节 卵裂	182
第二节 早期胚胎发育过程中的基因表达	187
第三节 基因印迹	196
第四节 细胞分化与胚层形成	199
第五节 子宫胎盘循环的建立	205
第六节 胚胎干细胞	205
第七章 胚胎着床及妊娠识别	213
第一节 胚胎着床	213

第二节	胚胎着床的分子调控	228
第三节	延迟着床	238
第四节	蜕膜化	240
第五节	妊娠识别	245
第六节	宫外孕和葡萄胎	250
第八章	胎膜和胎盘的结构与功能	253
第一节	胎膜	253
第二节	胎盘的类型与结构	260
第三节	胎盘的生理功能	272
第九章	妊娠的维持和妊娠期的生理变化	289
第一节	胎儿的组织性营养与血液性营养	289
第二节	妊娠的维持	292
第三节	妊娠期的生理变化	303
第四节	妊娠诊断	307
第十章	分娩与泌乳	313
第一节	分娩发动和分娩预兆	313
第二节	分娩	320
第三节	乳腺的结构与发育	327
第四节	泌乳的发动和维持	337
第五节	乳汁的排出（排乳）	342
第十一章	性别决定与性腺发育	345
第一节	性别决定	345
第二节	性腺的发育	355
第三节	原始生殖细胞的迁移	359
第四节	不同性别胚胎的发育	362
第十二章	生殖激素	367
第一节	脑部生殖激素	367
第二节	性腺激素	395
第三节	胎盘激素	409
第四节	前列腺素	416
第十三章	性行为及激素调节	424
第一节	控制性行为的神经-内分泌系统	424
第二节	雄性性成熟和性行为	431
第三节	雌性性成熟和性行为	438
第四节	性周期及其影响因素	445
第十四章	生殖缺陷与辅助生殖	458
第一节	生殖缺陷	458
第二节	辅助生殖技术	463

第十五章 生殖免疫·····	500
第一节 配子免疫·····	500
第二节 母胎免疫·····	516
第三节 妊娠期免疫·····	523
第四节 病理妊娠与免疫·····	529
第十六章 动物的无性生殖·····	534
第一节 自然条件下动物的无性生殖·····	534
第二节 人工辅助条件下动物的无性生殖·····	536
第十七章 环境与生殖健康·····	572
第一节 物理因素对生殖健康的影响·····	573
第二节 化学因素对生殖健康的影响·····	577
第三节 生物因素对生殖健康的影响·····	591
第四节 个人行为对生殖健康的影响·····	592
第十八章 现代生殖生物学研究方法与技术简介·····	597
第一节 细胞离体培养和操作·····	597
第二节 基因的克隆、表达检测及功能分析·····	602
第三节 微观形态学技术·····	608
第四节 模式生物·····	613
第五节 研究模型的选择·····	615
中英文索引·····	617

第一章 生殖及生殖生物学

“天地之大德曰生”。生命永远是宇宙中最宝贵的，生命具有无可争辩的意义，是第一本位的。“种”的繁衍生殖自然就具有无与伦比的重要意义。生命的承传、沿袭是人类赖以永恒存在的源泉。宇宙中的一切事物，因为有了生命的存在才显示了自身的价值和意义。每个有生命的个体总会以某种方式繁衍与自己性状相似的后代以延续生命，这就是生殖 (reproduction)。从生理学的角度来看，生殖是一切生物体的基本特征之一，一个个体可以没有生殖而生存，但一个物种的延续则必须依赖于生殖。

生物通过生殖实现亲代与后代个体之间生命的延续。尽管遗传信息决定了后代继承亲代的特征，但遗传是通过生殖而实现的。亲代遗传信息在传递过程中会发生变化，从而使物种在维持稳定的基础上不断进化成为可能。生命的延续本质上是遗传信息的传递。在生物代代繁衍的过程中，遗传和变异与环境的选择相互作用，导致生物的进化。因此，生殖过程本身除了是生物由一代延续到下一代的重要生命现象外，与遗传、进化，甚至生命起源的问题紧密相关。

一、生殖现象的研究历史

Macedonian Aristotle (公元前 384~前 322) 是最早系统从事动物生殖与发育方面研究的学者，首先提出了胚胎是由简单到复杂逐渐形成的观点。1683 年 Antoni van Leeuwenhoek 首次在精液中发现了精子，并提出“精源说”，认为在精子中存在人的雏形，发育只是这个雏形的放大而已。以后 Marcello Malpighi (1628~1694) 和 Jan Swammerdam (1637~1680) 等又提出了“卵源说”，认为在卵子中存在一个人的雏形。此后，Charles Bonnet (1720~1793) 在蚜虫中首次发现了孤雌生殖现象。

Lazzaro Spallanzani (1729~1799) 首次成功地进行了青蛙的人工授精，并发现在缺乏精子穿入时，则卵子发生退化。在进行狗的实验时，他提出只有当卵子和精液共同存在时，才能产生一个新的个体。Caspar Friedrich Wolff (1738~1794) 观察到，从受精卵的卵黄中形成了有形态结构的胚胎。Carl Ernst von Baer (1792~1876) 对几种哺乳动物的卵子进行了比较研究。以后，Ernst Haeckel (1834~1919) 提出了个体发育是系统发育简要重演的观点。

Oscar Hertwig (1849~1922) 和 Richard Hertwig (1850~1937) 兄弟在 Otto Butschli 的研究基础上，进一步对受精现象进行了研究，提出受精的本质是雌雄配子细胞核的融合。并且，Oscar Hertwig 在海胆的卵子中观察到极体以及极体中的细胞核。

1883 年，van Beneden 在蛔虫受精卵的第一次有丝分裂纺锤体上看到四条染色体，其中两条来自父方，两条来自母方，提出父母的染色体通过精卵的融合传给子代。此后，Theodor Boveri (1862~1915) 通过对蛔虫卵的进一步观察，提出了染色体理论，

并通过实验证实了染色体对发育的重要性。20 世纪初, 美国生物学家 McClung (1902) 第一次将 X 染色体和昆虫的性别决定联系起来。Stevens (1905) 及 Edmund Beecher Wilson (1905) 同时将 XX 性染色体与雌性对应, 而 XY 及 XO 与雄性相联系, 并提出一种特异的核成分在性别表型决定中起作用, 即性别由遗传而非环境决定。虽然, 自 1921 年以来, 就已知道男性中具有 X 和 Y 染色体, 而女性中具有两条 X 染色体, 但这些染色体在人性别决定中的作用在 1959 年以前一直不清楚。Jacobs 和 Strong (1959) 以及 Ford 等 (1959) 首次证明, Y 染色体在小鼠和人类的性别决定中起关键作用。

二、生殖过程

生殖是指所有的生物能够产生与它们自己相同或相似的、新的生物个体的能力, 也指单细胞或多细胞的动物或植物自我复制的能力。在各种情况下, 生殖都包括一个基本的过程, 即亲本的原材料或转变为后代, 或变成将发育成后代的细胞。生殖过程中也总是发生遗传物质从亲本到后代的传递, 从而使得后代也能复制它们自己。在不同生物中, 尽管生殖过程所采取的方式和复杂性变化很大, 但都可分为两种基本的生殖方式, 即无性生殖 (asexual reproduction) 和有性生殖 (sexual reproduction)。在无性生殖中, 一个个体可分成两个或两个以上相同或不同的部分, 仅有一个亲本的参与, 生殖过程中没有配子的形成。而在有性生殖过程中, 特化的雄性生殖细胞和雌性生殖细胞发生融合, 形成的合子同时携带有两个亲本的遗传信息。

1. 无性生殖

无性生殖的优点在于可使有益的性状组合持续存在, 不发生改变, 并且不需要经过易受环境因素影响的早期胚胎发育的生长期, 常见于大多数的植物、细菌、原生生物及低等的无脊椎动物中。单细胞生物常以分裂 (fission) 方式或有丝分裂 (mitosis) 方式, 分成两个新的、相同的个体。所形成的细胞可能聚集在一起形成丝状 (如真菌), 也可能成群生长 (如葡萄球菌)。断裂或裂片生殖 (fragmentation) 是指在丝状的生物中, 身体的一部分断裂后, 发育形成一个新的个体。孢子生殖或孢子形成 (sporulation) 为原生动物及许多植物中的一种无性生殖方式; 一个孢子是一个生殖细胞, 不需要受精就能形成一个新的个体。在水螅等一些低等动物和酵母中, 出芽为一种常见的生殖方式; 在身体表面长出一个突起后, 逐渐长大, 并与身体分离后形成一个新的个体。在海绵的内部也可长出小芽, 称为芽球 (gemmule)。

再生是无性生殖的一种特化形式, 海星和蝾螈等动物可通过再生替代受伤或丢失的部分。很多植物通过再生可产生一个完整的个体。分类上越低等的动物, 其完全再生的能力也就越强。到现在为止, 还未见到脊椎动物具有再生完整个体的能力。但通过实验的手段, 已在鱼类、两栖类和哺乳类等脊椎动物中获得了无性生殖的个体。特别需要提到的是, 1997 年首次通过体细胞核移植手段, 获得了无性生殖的哺乳动物——克隆绵羊。

自然条件下的无性生殖包括孤雌生殖和孤雄生殖等。人工辅助无性生殖指在物理或化学因子作用于卵子后的单性生殖, 以及利用细胞核移植技术而进行的动物克隆。

2. 有性生殖

在有性生殖的生物体（高等生物）中含有两大类细胞，一是构成组织和器官并执行各种功能的体细胞（somatic cell），二是携带有特定的遗传信息并具有受精后形成合子能力的生殖细胞（germ cell）。生殖细胞又包括卵子和精子两类。有性生殖周期是体细胞与生殖细胞相互转变的过程。在高等生物的机体中，只有一小部分细胞为生殖细胞，然而它们却是正常生命周期中的一个关键环节。

有性生殖发生在很多的单细胞生物和所有的动物和植物中。除在个别动物中可进行孤雌生殖外，有性生殖是高等的无脊椎动物和所有的脊椎动物自然情况下唯一的一种生殖方式。有性生殖过程中，一种性别的细胞（配子）被另一种性别的细胞（配子）受精后，产生一个新的细胞（合子或受精卵），以后受精卵发育形成一个新的个体。两个结构相同但生理上不同的同形配子（isogamete）的结合，称为同配生殖（isogamy），仅见于低等的水棉属的绿藻（spirogyra）和一些原生动物中。异配生殖（heterogamy）是指两种明显不同的配子的结合，即精子和卵子的结合。许多生物具有特殊的生殖机制来保证受精的进行。在陆生动物中，通过交配进行体内受精，从而提供了一个受精必需的液体环境。

有性生殖的优越性在于来自两个亲本的细胞核融合后，子代可源源不断地继承各种各样的性状组合，从而具有很大的发生变异的空间，对于改进物种本身以及物种的生存具有重要的意义。精卵结合形成的子代在遗传学上互不相同，也不同于各自的亲代，从而保证了物种的多样性。有性生殖产生的后代中随机组合的基因对物种可能有利，也可能不利，但至少会增加少数个体在难以预料和不断变化的环境中存活的机会，从而对物种的延续提供有利的条件。此外，在进行有性生殖的物种中，生命周期中都具有二倍体和单倍体交替的特征。二倍体的物种每一基因都有两份，其中一份在功能上处于备用状态，对各种突变等具有一定的抵御作用。这也可能是高等生物以有性生殖为主的原因。因为即使在细菌等进行无性生殖的生物中，也发生遗传物质的交换。在蚯蚓等雌雄同体（hermaphrodite）的动物中，由于解剖结构的特化或雌雄配子的成熟时间不同，总是避免自体受精的发生。

生殖过程不是一个连续的活动，而是受一些形式和周期的约束。通常，这些形式和周期与环境条件有关，从而使得生殖过程能有效地进行。例如，一些有发情周期的动物仅在一年的一段时间内发情，使得后代能在适宜的环境条件下出生。同样，这些形式和周期也受激素和季节因素的控制，使得生殖过程中的能量消耗得到很好地控制，从而最大限度地提高了后代的生存能力。

三、生殖生物学

生殖是亲代与后代个体之间生命延续的过程。生殖生物学（reproductive biology）是研究整个生殖过程的一门学科，既是发育生物学的一个分支，又是生理学的一个分支，属于一门新的充满活力的、融合了现代生物化学、细胞生物学、内分泌学和分子生物学等学科的交叉学科。过去的几十年中，生殖生物学研究领域取得了许多世人瞩目的

重大突破。例如，对下丘脑 - 垂体 - 性腺内分泌轴系这一重大理论问题的揭示，导致了口服避孕药的诞生；从精子获能和卵子体外成熟等基础研究着手而创立的“试管婴儿”技术，使国内外成千上万的不育夫妇获得了后代；1997 年克隆绵羊“多莉”的诞生，将无疑会对未来人类社会产生深远的影响。生殖生物学已成为生物学中一个活跃的、充满机遇和挑战的重要研究领域。

生殖生物学主要研究性腺发育、配子发生、受精、胚胎发育及着床、性别决定、妊娠维持、胎盘发育和分娩等过程的调控，以及生殖道的恶性肿瘤、异常妊娠、生殖道感染、环境和职业性危害等对生殖的影响等问题。此外，生殖生物学也研究在青春期、泌乳、衰老和妊娠等过程中与生殖相关的内分泌变化，以及性行为的形成和影响因素等。

随着人工授精、体外受精、胞浆内单精子注射 (ICSI)、胚胎移植、细胞核移植，以及很多辅助生殖技术的广泛应用，这门学科在生物学、医学及农业中的地位越来越重要。例如，自 1978 年英国科学家首次成功地获得世界首例试管婴儿至今，全世界已有约 100 万试管婴儿诞生，体外受精和胞浆内单精子注射技术已成为临床上不育症治疗的最主要手段，为许多不育夫妇带来了福音。

最近 20 年来，细胞生物学、分子生物学、生物化学、生理学等学科飞速发展，各种现代生物学技术已广泛渗透到生殖生物学的研究过程中，使得人们对生殖过程中的各种现象及其分子机制的了解有了长足的进步。

四、生殖生物学的相关学科

随着生殖生物学的迅速发展，生殖生物学的研究范围也在逐步扩大，与很多学科间的交叉也变得越来越明显，这里仅简单介绍与生殖生物学相关性很强的一些学科。

1. 动物胚胎学 (embryology)

动物胚胎学是研究动物个体发育过程中形态结构及其生理功能变化的一门科学，实际上是对受精和出生之间动物发育过程的研究。个体发育包括生殖细胞的起源、发生、成熟、受精、卵裂、胚层分化、器官发生，直至发育为新个体，以及幼体的生长、发育、成熟、衰老和死亡。通常也将个体发育的整个过程分为胚前发育、胚胎发育和胚后发育。胚前发育主要研究生殖细胞的起源、单倍体的精子和卵子的发生、形成和成熟。胚胎发育是指从受精到分娩或孵出前的发育过程。胚后发育包括出生或孵出的幼体的生长发育、性成熟、体成熟，以及以后的衰老和死亡。胚胎学一般只研究胚前发育和胚胎发育。

2. 发育生物学 (developmental biology)

发育生物学是在动物胚胎学的基础上，结合细胞生物学、遗传学和分子生物学等学科的发展，而逐渐形成的一门新兴学科。它是应用现代生物学的技术，来研究生物发育本质的科学，主要研究生殖细胞的发生、受精，胚胎发育、生长、衰老和死亡等过程，分析从受精一直到主要胚胎器官形成时动物发育的基本现象及形式，偏重于研究细胞决定及分化的机制，以及形态发生过程中的细胞间相互作用等问题。

3. 动物繁殖学 (animal reproduction or theriogenology)

动物繁殖学主要研究家畜和家禽生殖过程中的形态、生理和功能的变化, 以及调节和控制生殖过程的相关技术。它是畜牧科学的一个重要组成部分, 主要包括家畜和家禽的生殖生理、繁殖技术以及家畜繁殖力的评价和家畜生产的影响因素和管理等。

4. 生殖医学 (reproductive medicine)

生殖医学是一门综合性的新兴学科, 包括范围很广, 涉及生育、不育、节育和出生缺陷等。生殖医学的主要任务是通过常规的诊断和治疗措施, 将现在的各种生殖技术应用于不育病人, 使其产生后代。自 1978 年, 世界上第一例试管婴儿诞生以来, 辅助生殖技术已得到了突飞猛进的发展。在国外及国内, 大量的生殖医学中心或辅助生殖中心相继建立, 为越来越多的不孕症患者解除了痛苦。在提供的服务方面, 也由简单的人工授精及体外受精, 逐渐向胞浆内单精子注射、卵细胞质互换、着床前胚胎的遗传诊断等多方位发展。

5. 产科学 (obstetrics)

产科学主要是研究妊娠、分娩、胎儿出生及出生后事件的一门临床科学, 它的任务是既要保证产生一个健康的后代, 又要确保母体的健康不受损害。可通过超声等手段来判断子宫内的情况, 对母体子宫的大小、妊娠期的长短、胎儿的大小和位置等进行分析, 从而使胎儿顺利产出。在异常情况下, 通过剖腹产手术等来保证胎儿的分娩。

6. 妇科学 (gynecology)

妇科学是主要研究雌性生殖系统各种失调的一门科学。现代妇科学涉及月经失调、绝经、生殖器官的感染性疾病和异常发育、性激素紊乱、良性和恶性肿瘤, 以及各种与避孕相关的问题。由妇科学产生的一门分支学科为生殖医学。与妇科学相应, 也产生了男科学或男性学 (andrology), 主要研究男性生殖器官的各种异常或病变, 以及男性的不孕症等问题。

事实上, 与生殖生物学相关的学科还有很多, 特别是内分泌学、细胞生物学和分子生物学的进展对于阐明生殖过程的机理起了巨大的推动作用。

五、生殖生物学的发展前景

据报道, 不孕症在国外的发病率约为 15% ~ 20%。自从世界上第一例试管婴儿路易斯·布朗 (Louise Brown) 1978 年 7 月 25 日在英国诞生以来, 体外受精、促排卵技术、显微受精、胚胎培养、胚胎冷冻等辅助生殖技术迅速发展, 并不断完善, 已为很多不孕患者解除了痛苦。据估计, 全世界每年大约有 100 000 例试管婴儿出生。自我国的第一例试管婴儿 1988 年出生以来, 辅助生殖技术已在全国的绝大多数地区得到推广。

性和生殖健康是人们生活和幸福的核心内容。生殖健康的主要内容是保证妊娠的正常及安全进行, 使用更安全可靠的避孕措施, 以及防治生殖道的感染等。由于世界人口

及中国人口的猛增，直接危及人的生活环境和生活质量，对自然环境的破坏也在逐年增加。控制人口数量及提高人口质量也是当今世界亟待解决的问题。在生育调节方面，20世纪90年代以前的生殖研究主要是围绕下丘脑-垂体-性腺所构成的生殖轴系，作为发展避孕药的出发点，即通过干扰激素和生殖轴系之间的相互作用。这些避孕方法的主要缺陷是有不良反应。随着社会的发展和生活水平的提高，人们对避孕措施的安全性、可靠性、多样性的要求也越来越高，而且在达到避孕效果的同时也要兼具预防生殖道感染的功能。人们开始认识到，最理想的抗生育靶点应当是在生殖过程中起直接作用的细胞和因子。因此，加强以生育控制为目的的基础研究，寻找生殖细胞的发生、成熟、受精和胚胎着床等生殖过程中可控制的关键环节，以此发展新一代避孕技术，已成为21世纪生殖生物学研究与发展的主要目标。随着生殖生物学基础研究的深入和对生殖相关的重要基因和分子的认识，通过干扰基因表达或表达产物的功能，最终可以有望发展出对其他正常生理功能没有影响或影响很小的避孕药或避孕方法。另外，由于艾滋病等传染病的广泛流行，对于预防生殖道感染的要求也越来越高。现在迫切需要普及生育方面的知识，提供安全及高效的避孕措施，控制生殖相关疾病的传播。

近年来，我国国民经济及畜牧业方面的迅速发展，对提高家畜的繁殖力及加速家畜的品种改良方面提出了更高的要求。在奶牛、肉牛、奶羊和肉羊的繁殖方面，逐渐发展了超数排卵、卵母细胞体外成熟、体外受精、性别鉴定、胚胎分割、克隆、转基因及基因敲除等方面的一系列技术。随着人们对肉、蛋和奶的需求逐年增加，迫切需要增加奶牛、肉牛、肉羊、猪等的数量，并提高其质量。近年来，各种辅助生殖技术已在畜牧业中得到广泛应用，人工输精、体外受精、超数排卵、胚胎移植、性别鉴定及转基因等在逐步完善和推广。特别是最近克隆牛、克隆羊、克隆猪的问世，以及基因敲除家畜的获得，极大地促进了对家畜生殖机理的研究，并加速了各种辅助生殖技术在家畜中的应用，将对促进家畜的品种改良及提高繁殖力方面具有重要的意义。

在野生动物的保护方面，提高野生动物的繁殖力也迫在眉睫。目前，需要了解这些动物的基本生殖过程，通过激素处理、人工授精、体外受精、胚胎分割、性别鉴定、克隆等技术手段，有望在短时间内增加濒危物种的种群数量。在宠物的饲养方面，了解基本的生殖过程，利用现代生殖技术来提高繁殖力及加速品种改良等方面也具有重要的意义。

随着社会和经济的不断发展，人类对大自然的干预日益加剧。废水、废气、废渣、农药、化肥等大量的化学物质通过各种途径排入环境，造成了严重的环境污染。噪声、农药残留、射线等各种环境因素对生殖过程的影响也越来越受到人们的重视。凡是能够影响机体内外环境改变的因素，都将会对生殖健康产生一定程度的影响。目前越来越多的证据表明，许多人工合成的化学物质可干扰人类及野生动物的生长发育，导致人类的不孕不育率、畸胎率和自然流产率上升。

而且，随着社会工业化和现代化的不断发展，人类对野生动物的生存环境不断蚕食，导致大量的野生动物灭绝和濒临灭绝。而由于这些动物的数量有限以及难以接近等原因，对于野生动物基本生殖过程的了解仍很有限。现在也迫切需要利用现有的生殖生物学知识和技术，来促进对野生动物生殖过程的了解，并将现有的辅助生殖技术应用于野生动物，从而延缓或防止野生动物的灭绝，并使一些具有食用和药用价值的动物得到

迅速繁殖。

六、本书的特色

近年来随着多聚酶链反应、基因敲除、转基因、基因芯片、RNA 干涉、细胞分离技术、免疫测定等方面的飞速发展，以及随着基因组和后基因组时代的发展和推动，人们对生殖过程基本调控机制的了解也越来越多。现代分子生物学和细胞生物学理论与技术的发展，极大地推动了生殖生物学研究，使人们对生殖现象的认识深入到细胞和分子水平。从本质上讲，生殖过程是个体生命活动的一部分，与其他生命现象遵循共同的基本规律，如基因的时空特异性表达调控、细胞的增殖、分化和凋亡、细胞之间的信号转导和细胞外基质的相互作用等。但是，生殖过程在生命活动中具有特殊使命，因此也具有生殖细胞发生、性周期、受精、妊娠和分娩等独特现象。

到目前为止，国内尚无一本系统介绍现代生殖生物学研究成果的书。本书将尽最大努力，综合国内外在生殖生物学领域的研究论文和著作，介绍生殖细胞的发育及成熟、受精机理、胚胎发育、胚胎着床、胎盘的形、分娩、性别决定、生殖缺陷、生殖免疫、无性生殖等方面的基本知识和国内外的最新研究动态，并介绍生殖激素、性行为、环境对生殖的影响及现代生殖生物学实验技术。本书将以小鼠、人和家畜为主，既介绍哺乳动物生殖的共性，又具体阐述各类动物的特性，力求从广度、深度和新颖性方面比较系统和全面地介绍生殖生物学的内容。

(杨增明 孙青原 夏国良)

主要参考文献

- 秦鹏春 . 2001 . 哺乳动物胚胎学 . 北京 : 科学出版社
- 张红卫 . 2001 . 发育生物学 . 北京 : 高等教育出版社
- 张忠诚主编 , 梁冠生等编写 . 2000 . 家畜繁殖学 . 北京 : 中国农业出版社
- Müller WA . 1997 . Developmental biology . New York : Springer-Verlag

第二章 生殖器官的结构与功能

第一节 雌性生殖器官

雌性生殖器官包括卵巢 (ovary)、输卵管 (oviduct or uterine tube)、子宫 (uterus)、阴道 (vagina)、前庭 (vestibule)、阴门 (vulva) 和相关腺体。卵子的发生、成熟、运输、受精、妊娠及胎儿的出生等功能均由雌性生殖器官完成。

一、卵 巢

所有哺乳动物的卵巢是成对的，从性腺原基的形成到发育完成均位于肾脏附近。卵巢的大小与动物的年龄和生殖状态有关。多数成年动物的卵巢游离面突向体腔，主要由外层的皮质 (cortex) 和内部的髓质 (medulla) 两部分构成。卵巢的主要功能包括雌性激素的分泌和卵子的产生。

(一) 形态与结构

1. 卵巢的形态与基本结构

多数哺乳动物的卵巢为卵圆形，由皮质和髓质两部分组成 (图 2-1)。皮质主要由卵泡和黄体组成，并覆盖一层低矮的立方上皮细胞；皮质的基质由疏松结缔组织构成；皮

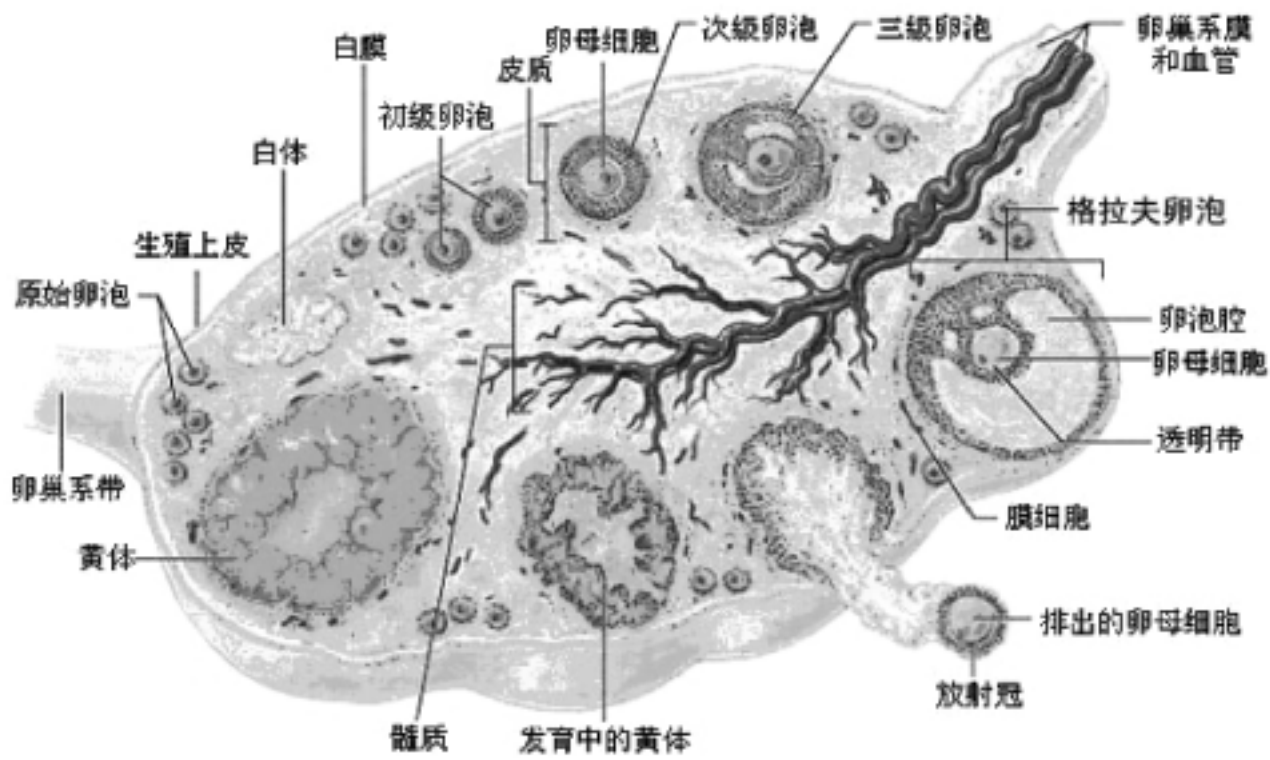


图 2-1 人卵巢的结构模式图

(改绘自 [www .colorado .edu/ epob/ epob4480tsai/ ovary .jpg](http://www.colorado.edu/epob/epob4480tsai/ovary.jpg))

质表面有一层由致密结缔组织构成的白膜。卵巢的髓质主要由疏松的结缔组织和平滑肌组成，富含神经、血管和淋巴管，并与卵巢系膜中的平滑肌相连。卵巢网位于髓质部，是由立方上皮细胞或实质细胞束相连而成的不规则的网络管道，这一结构特点在肉食动物和反刍动物中非常明显。

(1) 卵泡 (ovarian follicle)

根据卵泡的发育时期或生理状态，可将卵泡分为原始卵泡 (primordial follicle)、生长卵泡 (growing follicle) 和成熟卵泡 (mature follicle)。其中生长卵泡要经历三个阶段，即初级卵泡 (primary follicle)、次级卵泡 (secondary follicle) 和三级卵泡 (tertiary follicle) 或格拉夫卵泡 (Graafian follicle)。

(2) 原始卵泡

原始卵泡由一个大而圆的初级卵母细胞 (primary oocyte) 和其周围的扁平上皮细胞 (squamous epithelial cell) 构成。在肉食动物、羊和猪的原始卵泡中，可能有 2~6 个初级卵母细胞，是多卵卵泡 (polyovular follicle)。初级卵母细胞大而呈圆形，核内染色质细小而分散，核仁大而明显。原始卵泡要在性成熟时才开始生长发育。

(3) 初级卵泡

大多数动物的初级卵泡 (图 2-1) 是由一个直径约为 20 μ m 的初级卵母细胞和周围的单层立方卵泡细胞组成。胚胎期和出生后，卵巢中大多数是初级卵泡。各种动物在出生时，单个卵巢中的初级卵泡数从数十万到数百万个不等。但在一生中只有几百个卵泡发育到排卵，大多数都退化。

(4) 次级卵泡

随着卵泡的进一步发育，在卵子周围形成多层卵泡细胞或颗粒细胞。卵母细胞外有一层 3~5 μ m 厚的糖蛋白，称透明带 (zona pellucida)。透明带是由紧贴卵母细胞的颗粒细胞和卵母细胞共同分泌的产物。由多层颗粒细胞和由其包围的初级卵母细胞构成次级卵泡 (图 2-1)。随着卵泡的继续发育，在颗粒细胞间隙有少量的卵泡液出现。

(5) 三级卵泡

三级卵泡又叫有腔卵泡 (antral follicle) (图 2-2 和图 2-3)。三级卵泡的特点是在其中央有一空腔，即卵泡腔。卵泡腔是由次级卵泡的颗粒细胞间隙增大并融合形成的一个

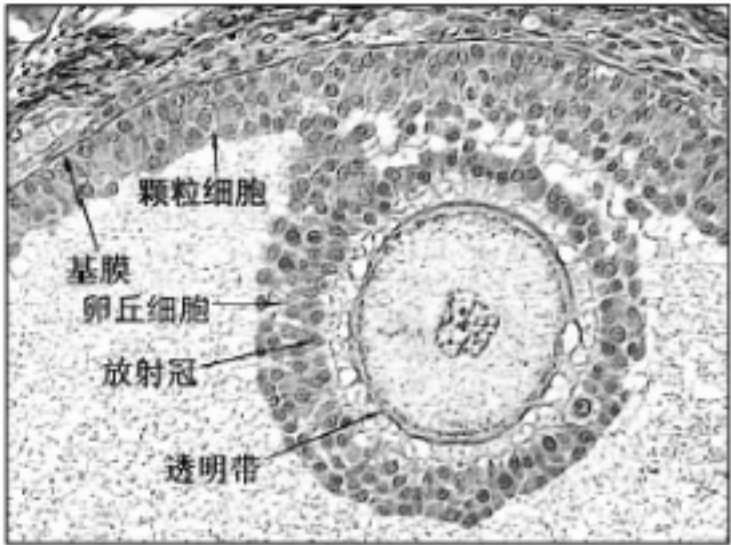


图 2-2 人的格拉夫卵泡

(改绘自 http://home.mc.ntu.edu.tw/~histol/Ffolder_html/Female.html)

较大腔体，其中充满卵泡液。在卵母细胞中央有一球形的细胞核，染色质稀疏呈网状，核仁特别明显。细胞质中的高尔基复合体浓缩，位于细胞膜附近。随着卵泡腔中液体的增多，卵泡腔继续增大，卵母细胞移位远离卵泡中心，通常靠近卵泡的近卵巢中心部，此时称为格拉夫卵泡。在卵母细胞与颗粒细胞层之间形成卵丘 (cumulus oophorus)。在较大的三级卵泡中，紧裹在卵母细胞周围的颗粒细胞形成的呈放射状排列的结构，称放射冠 (corona radiata)。

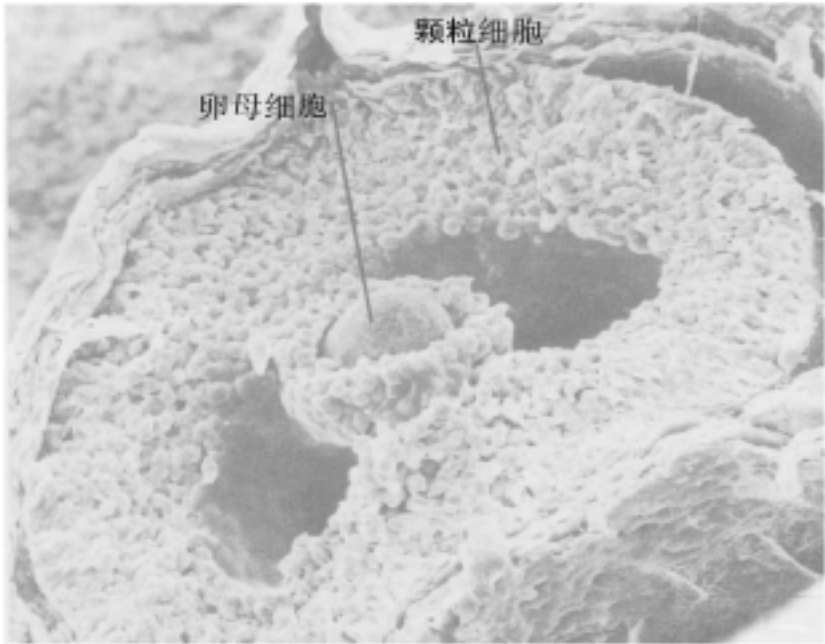


图 2-3 人的有腔卵泡的扫描电镜图 (引自 Mader, 1990)

(6) 成熟卵泡

当卵泡发育到快排卵时，其中的初级卵母细胞恢复并完成第一次减数分裂，排出第一极体 (first polar body)，形成次级卵母细胞。但狗和马在排卵后完成第一次减数分裂。第一次减数分裂完成后接着进行第二次减数分裂，但停滞在分裂的中期，直到受精时才完成第二次分裂，卵母细胞释放出第二极体 (second polar body)。

(7) 闭锁卵泡 (atretic follicle)

动物出生后，卵巢中就有数以百万计的原始卵泡。在个体发育过程中，卵巢内大多数的卵泡不能发育成熟，在发育的不同阶段逐渐退化。初级卵泡退化时，首先是卵母细胞萎缩，进而卵泡细胞离散，结缔组织在卵泡内形成瘢痕。次级卵泡退化时，卵母细胞核偏位、固缩；透明带膨胀、塌陷；颗粒细胞松散并脱落进卵泡腔；卵泡液被吸收，卵泡膜内层细胞增大，呈多角形，被结缔组织分隔成团索状，分散在卵巢基质中并形成间质腺。

(8) 黄体

进入青春期后，卵巢开始排卵。刚排卵后的卵泡腔内由于充满血液和组织液，也称红体 (corpus rubrum)。之后卵泡腔中的血凝块及其组织液被重新吸收。与此同时，颗粒细胞和卵泡膜细胞失去原有的形态特征，并取代红体而变为黄体 (corpus luteum) (图 2-1)。随后，在黄体中出现结缔组织、脂肪、透明样物质 (hyaline-like substance)，细胞体积逐渐减小，最终只在卵巢表面形成一个不易观察到的黄体小疤，即由早期的红棕色变为白色或淡褐色，故称为白体 (corpus albicans)。

黄体属于分泌腺，分泌的孕酮（progesterone）能刺激子宫腺体的分泌功能和乳腺发育。在妊娠期，黄体分泌的孕激素主要是维持动物的妊娠过程。

2. 不同动物卵巢的形态与结构特征

人类的卵巢为扁椭圆形。青春期前，卵巢表面光滑；青春期后开始排卵，表面凸凹不平。成年妇女的卵巢大小约为 $4\text{ cm} \times 3\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ ，重约 5~6 克，呈灰白色；绝经后卵巢变小变硬。卵巢表面无腹膜，由单层立方上皮覆盖，称生发上皮（germinal epithelium），其内有一层纤维组织，称卵巢白膜（tunica albuginea）。白膜内为卵巢实质组织，分为皮质和髓质两部分。皮质在外层，其中有数以万计的原始卵泡及致密结缔组织；髓质在卵巢的中心部分，含有疏松结缔组织和丰富的血管、神经、淋巴管及少量与卵巢悬韧带相连的平滑肌纤维。髓质内无卵泡。人在出生时，卵巢中有 300 000~500 000 个原始卵泡。

马的卵巢呈豆形，平均长约为 7.5cm，厚 2.5cm，表面光滑，覆盖浆膜，借卵巢系膜悬于腰下部、肾后方，其游离缘有一凹陷部叫排卵窝。马卵巢的最外层为髓质，内层为皮质，在排卵小凹处出现生殖上皮。

牛和羊的卵巢为稍扁的椭圆形，羊的较圆、较小，约为 $3.7\text{ cm} \times 2.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ 。一般位于骨盆前口的两侧附近。未产母牛卵巢稍向后移，多在骨盆腔内；经产母牛卵巢位于腹腔内。性成熟后，成熟的卵泡与黄体可突出于卵巢表面。卵巢囊宽大。

猪的卵巢较大呈卵圆形，其所处的位置、形状大小及卵巢系膜的宽度在不同年龄的个体间有很大的差异。性成熟前小母猪的卵巢较小，约为 $0.4\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ ，表面光滑，呈淡红色，位于荐骨岬两侧稍靠后方，由卵巢系膜固定。接近性成熟时，卵巢体积增大，约为 $2\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ ，系膜增宽，卵巢位置稍下垂前移。性成熟后和经产母猪的卵巢更大，长约 3~5cm，表面卵泡和黄体突出而呈结节状。卵巢系膜宽 10~20cm，卵巢位于髂结节前缘约 4cm 的横断面上，一般左侧卵巢在正中矢状面上，右侧卵巢在正中矢状面稍偏右。

狗卵巢皮质中有非常明显的皮质小管。皮质小管的管腔狭小，衬以立方上皮细胞；卵巢的髓质部富含神经、许多大而卷曲的血管和淋巴管；髓质由疏松的结缔组织和平滑肌组成，并与卵巢系膜中平滑肌相连。卵巢网位于髓质部，是由立方上皮细胞或是实质细胞束相连而成的不规则的网络管道。

（二）卵巢的主要功能

卵巢的功能主要包括卵子的产生和生殖激素的分泌。

1. 生殖激素的分泌

卵巢分泌的雌性激素主要有雌激素（estrogen）和孕酮。雌激素主要由存在于颗粒细胞内的芳香化酶作用于卵泡，由卵泡膜细胞产生雄激素，使雄激素芳香化而生成雌激素。孕酮主要由发情后期（metestrus）、间情期（diestrus）、妊娠期的黄体细胞和胎盘产生。雌激素诱导雌性生殖器官的生长、发育以及雌性动物的发情行为。孕酮可刺激子

宫腺的发育及分泌，使子宫内膜处于接受状态；可阻止卵泡的成熟和再次发情，使动物处于妊娠状态。雌激素和孕激素在促进乳腺的发育方面具有协同作用。卵泡的生长、成熟和雌激素分泌是在垂体促性腺激素——卵泡刺激素（FSH）和黄体生成素（LH）的调节下完成的。另外，卵巢雌激素的分泌又可以诱导排卵前 LH 的大量释放，进而引起排卵和黄体的形成。

2. 卵子的形成及其排卵

在雌性性腺形成时，原始生殖细胞已经存在。随着卵巢的发育，形成初级卵母细胞，周围的细胞形成单层扁平的卵泡细胞，并与初级卵母细胞共同构成原始卵泡。出生前，初级卵母细胞进入并停留在第一次减数分裂前期。性成熟接近排卵时，卵母细胞才完成第一次减数分裂，即青春期后卵母细胞才完成第一次减数分裂。随着卵泡的发育成熟，卵泡逐渐向卵巢表面移行并向外突出。当卵泡接近卵巢表面时，该处表层细胞变薄，最后破裂，出现排卵（ovulation）。排出的卵母细胞外包有放射冠，进入输卵管漏斗（infundibulum）。在大多数动物，卵母细胞进入输卵管与精子相遇时放射冠消散。在反刍动物，排卵时放射冠就已丢失。卵子保持受精能力的时间大约是一天。如果未受精，则被分解吸收。大多数动物是一侧卵巢排卵。马的左侧卵巢排卵量为 60%，而牛大约有 60%～65% 的卵是由右侧卵巢排出的。

二、输 卵 管

输卵管是双侧、弯曲的管道，起始于卵巢并延伸到子宫角（uterine horn），由明显的三部分组成：①伞部，是一个较大的漏斗状结构，又称输卵管伞；②壶腹部（ampulla），其管壁较薄，是输卵管伞后部的延伸；③峡部（isthmus）是与子宫相连的一狭窄的管道。输卵管的管壁由黏膜（mucosa）、肌膜（tunica muscularis）和浆膜（tunica serosa）三层构成，是在雌激素及其他因子的作用下由副中肾管发育而成。

（一）组 织 结 构

1. 黏膜

黏膜上皮属于单层柱状或假复层柱状上皮，由有纤毛柱状细胞和无纤毛柱状细胞构成。无纤毛柱状细胞有分泌功能，其分泌物为卵子提供营养；有纤毛细胞通常分布于输卵管起始端和末端。输卵管的固有膜与黏膜下层主要由疏松的结缔组织构成，其中含有许多浆细胞（plasma cell）、肥大细胞（mast cell）和嗜伊红细胞（eosinophil）。壶腹部的黏膜上皮和黏膜下层高度折叠。如牛的壶腹部大约有 40 个纵行折叠，且每一个折叠又有二级和三级折叠。在峡部有 4～8 个大的折叠，但没有二级或三级折叠。

2. 肌层

肌层主要由环行平滑肌组成，但也有少量的纵行肌和斜行肌。在伞部和壶腹部的肌层较薄；在峡部的肌层明显增厚，与子宫环行肌无明显的界限。

3. 浆膜

由疏松结缔组织构成，含丰富的血管和神经。

(二) 功 能

输卵管主要作为卵子、精子 (spermatozoon) 和早期胚胎运行的通道，同时也是生殖细胞停留、吸收营养和受精的部位。

漏斗部围绕卵巢，并由卵巢囊包裹 (马无卵巢囊)。漏斗部的游离缘有指状突 (即伞部)。动物在排卵期，伞部血管充血、肿胀。伞部随平滑肌节律性收缩而在卵巢的表面上部移动。这种结构和功能的变化有利于捕获由卵巢排出的卵母细胞；同时漏斗部上皮细胞的纤毛向子宫方向摆动，能将卵子运送到壶腹部。壶腹部是精子和卵子结合的部位。壶腹部上皮纤毛的运动和平滑肌的收缩共同参与卵子的运动。在峡部肌肉的收缩运动是推动受精卵向子宫方向运动的主要动力。峡部的纤毛运动也有利于受精卵的运动。随着发情周期的变化，峡部肌肉收缩的方向也在发生改变。在卵泡期，逆蠕动收缩将峡部腔内容物送到壶腹部；而在黄体期的分节运动逐渐推动受精卵向子宫方向运动。受精卵通过峡部的时间长短和妊娠时间无关，其通过峡部的时间大约为 4~5 天。

精子在输卵管内除精子自身的运动外，在一定程度上也依赖于输卵管管壁肌肉的收缩和黏膜上皮纤毛的运动。

三、子 宫

子宫 (uterus) 是一个中空的肌质性器官，通常有两个子宫角和一个子宫体；子宫是孕体 (conceptus) 着床 (implantation) 的地方。它是在雌激素的作用下由缪氏管发育来的。在发情 (estrous) 和生殖周期 (reproductive cycles) 中子宫壁经历一系列特定的变化；大多数动物的子宫由子宫角 (cornua uteri)、子宫体 (uterine body)、子宫颈 (cervix uteri) 三部分组成，子宫角与输卵管相连，子宫体与阴道相连的子宫颈连接，整个子宫通过阔韧带附着于盆腔和腹腔壁上，韧带中含有血管和神经，为子宫提供血液和神经支配。

根据子宫形态可将哺乳动物子宫分为：子宫呈一单管状的称单子宫 (uterine simplex)，如人和灵长类的子宫；在子宫体内腔前部无纵隔的称双角子宫 (uterine cervix)，如猪和马的子宫；在子宫体内腔前部有纵隔，并将其分开的叫双分子宫 (uterus bipartitus)，如牛、羊、骆驼等动物的子宫。小鼠和有袋类动物有两个子宫，称为双子宫 (didelphia) 动物，其中有袋类动物的双子宫有两个子宫颈，两个阴道。在个别的牛、羊、猪可发现有两个子宫颈和两个完全分开的子宫角，这种结构并不影响其生殖。

(一) 子宫的形态结构

1. 子宫的形态

子宫是一个肌质性的中腔器官，借助子宫阔韧带附着于腰下部和骨盆腔的侧壁，大

多位于腹腔内，少部分位于骨盆腔内，在直肠与膀胱间。多数家畜的子宫为双子宫，可分为子宫角、子宫体和子宫颈三个部分。子宫的大小、形状、位置和结构因动物的品种、年龄、个体的性周期以及妊娠阶段的不同而有很大的差异。

人的子宫位于骨盆腔中央，呈倒置梨形，前面扁平而后面稍突出。成年子宫重约 50g，长约为 7~8cm，宽约 4~5cm，厚 2~3cm，子宫腔容量约为 5ml。子宫上部较宽，其隆突部为子宫底 (fundus uteri)，子宫底两侧为子宫角。子宫体下方为子宫颈，呈狭窄的圆柱状。

成年牛的子宫角较长，约为 40cm，子宫体短，约为 4cm；而子宫颈较长，约为 10cm。羊的子宫角长，约为 15cm，外形像绵羊角；子宫体长为 2cm；子宫颈长为 4cm。牛和羊的子宫壁较厚且坚韧。

马的子宫呈“Y”形，子宫角稍曲成弓形，背缘凹，腹缘凸出而游离；子宫体长与子宫角长相当，子宫颈后端突入阴道内，有明显的子宫颈阴道部。

猪的子宫角特别长，经产母猪为 12~15cm，子宫体短，约为 5cm。仔猪子宫角细而弯曲，子宫颈长 13cm 左右。子宫颈与阴道无明显的界限，但其形成两个半圆形的黏膜褶，交错排列，使子宫颈管呈狭窄的螺旋形。

2. 子宫的结构

子宫由子宫内膜 (endometrium)、子宫肌层 (myometrium) 和子宫外膜 (perimetrium) 三层构成。

(1) 子宫内膜

子宫内膜位于子宫腔面，由上皮和固有层组成。灵长类、啮齿类、马、犬、猫等动物的上皮为单层柱状上皮，而猪和反刍动物的上皮为单层柱状或假复层上皮。固有膜由富含血管的胚性结缔组织组成。固有膜的浅层有较多的细胞成分，主要为星状细胞。这些细胞借突起互相连接。此外还有巨噬细胞和肥大细胞。固有膜的深层，细胞成分较少，有子宫腺分布。大多数动物的子宫腺为弯曲、分枝管状腺，管状腺的内层是由有绒毛的单层柱状上皮或无绒毛的单层柱状上皮细胞组成。子宫腺的密度因动物的种类、胎次和发情周期的不同而有差异。

人及灵长类固有层的浅层为功能层，深部较薄的为基底层。在月经周期中，功能层发生部分或全部丢失，而基底层在整个生殖周期都存在。当功能层丢失后，可以从深部的基底层得到恢复。

子宫阜 (caruncle) 是反刍动物子宫的一种特殊结构，是位于子宫体和子宫角黏膜上特殊的圆形隆起，富含成纤维细胞和血管。反刍动物的子宫阜部位没有腺体。每侧子宫角有四排子宫阜，每排大约 15 个子宫阜；牛的子宫阜为圆顶状，羊为杯状。子宫阜为胎膜与子宫壁的结合部位。

(2) 子宫肌层

子宫肌层是子宫最厚的一层，它主要由内层环行平滑肌和外层的纵行平滑肌构成。在两层平滑肌之间及平滑肌深部有大量的动脉血管、静脉血管和淋巴管。

(3) 子宫外膜

由疏松的结缔组织组成，其外覆盖腹膜间皮 (peritoneal mesothelium)。这一层也有

平滑肌细胞、血管、淋巴管和神经纤维。

另外，子宫颈是连接阴道和子宫的一个通道，主要由平滑肌、弹力纤维、血管等构成；黏膜下层高度折叠，有二级和三级折叠，母牛子宫颈有四个环行折叠和 15~25 个纵行折叠，每一个折叠都有二级和三级折叠存在，这种折叠可能被错认为腺体结构。大多数动物的子宫腺不会延伸到子宫颈，在子宫颈的腺体是黏液腺。

(二) 功 能

肌层是子宫的三层结构中最厚的一层，在这一层中丰富的血管为子宫提供营养。在妊娠期，子宫肌层中平滑肌细胞的长度逐渐增长，对胎儿的发育和产出都有重要作用。

子宫内膜中有子宫腺，能分泌多种物质，除对胎儿具有重要的营养作用外，对于胚胎着床、妊娠识别和胎儿的存活与发育起着重要的调节作用。在食肉类动物，子宫内膜分泌活性的改变将导致胚胎着床的延迟。在啮齿类，由子宫分泌白血病抑制因子、降钙素等因子，对子宫接受性的建立和胚胎的着床起作用。在猪、牛、马和羊等家畜，子宫内膜的分泌物影响到胎儿存活和胚胎的发育。利用孕酮抑制母羊子宫内膜腺的分化，或由其他疾病引起的子宫内膜的纤维化，均可导致不孕、早期胎儿的死亡或早期流产等。

四、阴 道

(一) 阴道形态与大小

阴道从子宫颈延伸到阴道前庭，是雌性动物的交配器官和胎儿产出的通道。

人的阴道位于骨盆下部的中央，上端包围子宫颈，下端开口于阴道前庭后部，上端较下端宽；前壁与膀胱和尿道相接，后壁与直肠紧贴，前壁长约 7~9cm，后壁长约 10~12cm，平时阴道前后壁相互贴近。阴道黏膜淡红色，并且受性激素的影响而有周期性的变化。牛的阴道长 20~25cm，妊娠母牛阴道可增至 30cm 以上。阴道壁较厚，阴道穹隆呈半环状，仅见于阴道前端的背侧和两侧。牛的阴瓣较不明显，在尿道外口的腹侧有一尿道下憩室。马的阴道长约 15~20cm，阴道穹隆呈环状；母马驹的阴瓣发达，经产的老龄母马的阴瓣常不明显。猪的阴道长约 10~12cm，肌层较厚，直径小；黏膜有皱褶，不形成阴道穹隆。阴瓣为一环形皱褶，阴蒂细长，突出于阴道窝的表面；尿生殖前庭腹侧壁的黏膜形成两对纵皱，前庭许多开口位于纵皱之间。

(二) 组 织 结 构

阴道壁由黏膜层、肌层和外膜 (tunica adventitia) 或浆膜组成。

1. 黏膜

阴道黏膜上皮为一复层扁平上皮，在发情前期和发情期增厚。固有层和黏膜下层 (propria - submucosa) 由疏松结缔组织或致密的不规则的结缔组织组成；阴道后部的

固有层有少量的淋巴结。阴道黏膜受性激素影响而有周期性的变化。绝经后的妇女的阴道黏膜上皮甚薄，皱襞少，伸展性小，易创伤而感染。

2. 肌层

由厚的内环肌层和较薄的外纵行平滑肌组成，内环肌由结缔组织分成束状。

3. 浆膜

浆膜层为疏松的结缔组织，有大量的血管、神经和神经节组成。外部纵行肌可看作是浆膜的一部分。

五、前庭、阴蒂、阴门

(一) 前庭

前庭与阴道以处女膜 (hymen) 为分界；前庭壁上有尿道开口 (orifices of the urethra) 和大小前庭腺。除黏膜深部有较多的淋巴小结外，前庭壁类似于阴道后部，特别是在阴蒂，有更多的上皮下淋巴结存在。发生炎症时可能影响生殖。

前庭大腺体与雄性动物的尿道球腺 (bulbourethral gland) 同源。前庭大腺体是一种复合的管泡黏液腺，位于黏膜层深部，末端的分泌泡含有大的黏液细胞，与腺泡相连的小管内衬柱状黏液细胞和杯状细胞；大管直通前庭，内衬一层厚的复层鳞状上皮细胞，分散或是聚集的淋巴结位于大管周围。在交配时，腺体受压而释放黏液以润滑前庭。前庭小腺体比较小，在大多数动物的前庭黏膜中有散在分布的管状分枝黏液腺，衬以复层扁平上皮细胞。

(二) 阴蒂 (clitoris)

阴蒂位于前庭尾区远端，由阴蒂海绵体、阴蒂头 (glans clitoridis) 和阴蒂包皮 (preputium clitoridis) 组成。阴蒂海绵体与阴茎海绵体的结构相似。阴蒂头与阴茎头 (glans penis) 同源。阴蒂包皮是前庭黏膜的延续，有侧壁和内脏层，内脏层有大量的神经末梢。

(三) 阴门

阴门由大小阴唇构成，并有皮肤覆盖。皮肤上有汗毛 (fine hair)。真皮下有使阴门发生收缩的横纹肌纤维 (striated muscle fiber)，阴门部有丰富的小血管和淋巴管。动物在发情期阴门充血肿胀，局部温度升高。

第二节 雄性生殖器官

雄性动物的生殖器官包括成对睾丸 (testis)、附睾 (epididymis)、输出管 (efferent duct)、尿道 (urethra)、阴茎 (penis)、包皮 (prepuce) 及附性腺 (accessory gland)。附性腺包括精囊腺 (seminal vesicle)、前列腺 (prostate gland) 和尿道球腺 (bulbourethral gland)。雄性动物的生殖系统参与完成精子的发生和成熟，并将精子释放到雌性动物生殖道中。

一、睾丸

睾丸是雄性动物最为重要的生殖器官，主要由曲细精管和间质构成。曲细精管由支持细胞 (sertoli cell) 和各级生精细胞组成，前者对生殖细胞具有支持、保护和营养作用，后者包括精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞和精子，它们分别处于不同的发育阶段。构成睾丸的间质包含有动、静脉血管和睾丸间质细胞 (leydig cell)，血管主要为睾丸提供营养、调节温度和排除代谢产物；睾丸间质细胞分泌雄激素，为精子的发生提供一个合适的激素环境。各种动物睾丸结构模式如图 2-4 所示。

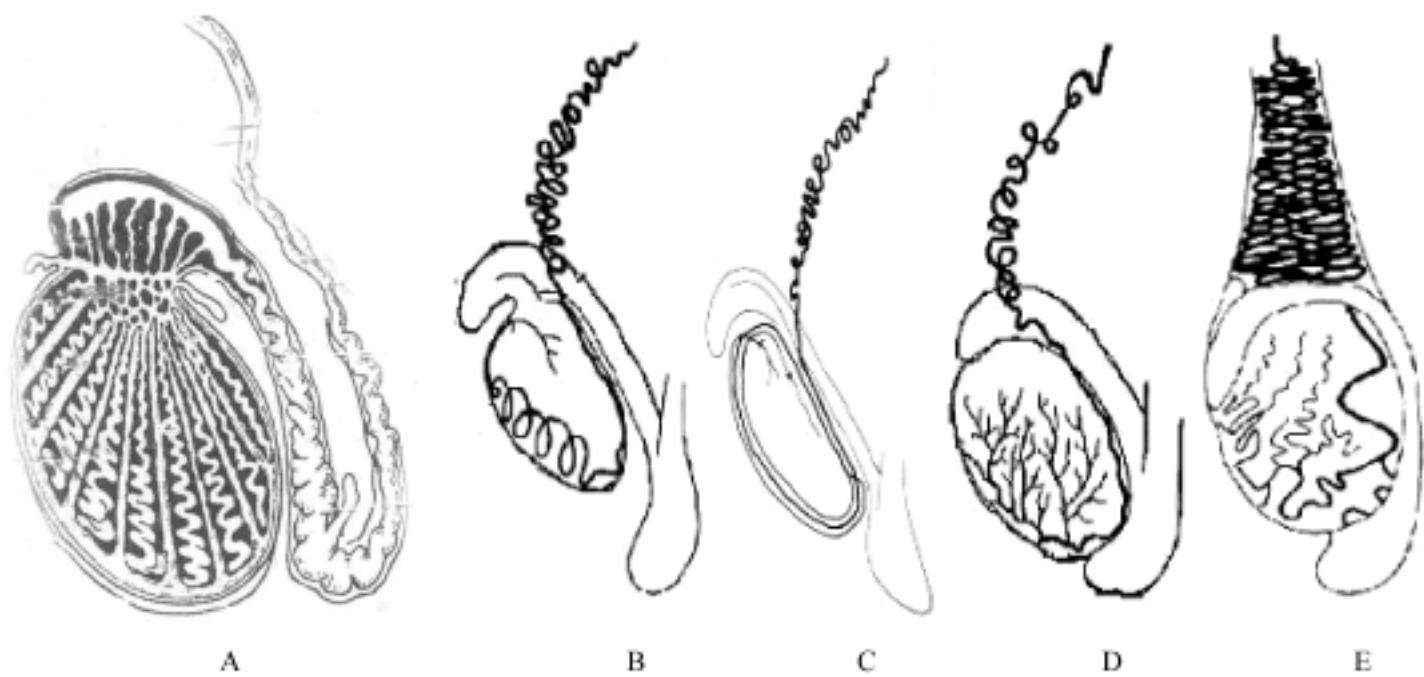


图 2-4 几种动物睾丸和附睾的结构模式图 (引自 Johnson AD, 1970)
A. 人; B. 大鼠; C. 兔子; D. 狗; E. 绵羊

(一) 睾丸的发育

在脊椎动物，卵巢和睾丸都是由相同的原基组织-生殖嵴发育和分化而来。在胚胎发育早期，未分化性腺在形态方面无明显的性别间差异，并具有分化成睾丸或是卵巢的潜能。尽管哺乳动物间睾丸发育的过程各有不同变化，但整个过程可分为四个阶段：胚胎期睾丸的分化发育、发育的睾丸下降到阴囊、胎儿期睾丸的生长发育及青春期前后辜

丸的成熟。下面主要介绍睾丸下降与隐睾及出生后睾丸的发育。

1. 睾丸下降与隐睾

睾丸下降 (descent of the testis) 是指睾丸从其分化形成的部位, 即第 16~24 体节处经腹腔迁移到阴囊的过程。人睾丸的下降有两个明显阶段: 第一阶段是在妊娠第 8~15 周, 发生穿过腹部的相对移位; 第二阶段是腹股沟向阴囊的迁移。下丘脑-垂体-性腺轴 (hypothalamo-pituitary-gonadal axis) 的正常发育是睾丸正常下降所必需的。已证实, 睾丸的下降与 *Ins13* 基因 (insulin-like 3 gene)、雄激素 (androgen)、G-蛋白耦联受体 (G-protein-coupled receptor)、CGRP (calcitonin gene-related peptide) 因子、同源框基因 (homeobox gene) 和雌激素等有关。

各种家畜睾丸下降到阴囊的时间分别为: 马在怀孕 9~11 个月, 牛是在怀孕 3.4~4 个月, 羊为怀孕 80 天, 猪为怀孕 90 天, 骆驼睾丸是在出生时下降, 而狗和猫分别是在出生后 5 天和 2~5 天。猪、马、狗发生隐睾比较普遍, 而在牛、羊和鹿比较少见。人的睾丸最早都在腹腔内, 胎儿发育到第 9 个月时睾丸逐渐从腹腔下降到阴囊里。一般出生时, 90% 左右的男孩睾丸已下降到阴囊; 出生后有些男孩的睾丸继续下降, 1 周岁时有 95%~97% 男孩的睾丸到达阴囊; 只有少数男孩到青春期时, 睾丸才下降到阴囊。

在人和多数高等哺乳动物中, 睾丸的正常功能, 特别是产生精子的功能, 与温度有密切关系。睾丸产生精子要求一个温度低于正常体温的环境。睾丸的正常位置是在腹腔外的阴囊。如果一侧或是双侧睾丸未下降到阴囊而停留在腹腔则称隐睾 (cryptorchidism)。到目前为止, 隐睾发生的机理还不十分清楚。尽管隐睾仍产生雄激素, 但不能产生正常的精子。双侧隐睾的动物无生殖能力。

2. 出生后睾丸的发育

从出生到青春期, 睾丸都处于连续的发育过程, 其中包括睾丸体积逐渐增大和功能的完善。

在灵长类, 幼儿期的睾丸有一个相对较长而变化不明显的时期, 传统认为这是睾丸的静止期。实际上, 从出生后到幼儿早期, 睾丸的体积在短期内快速增大, 这主要是由于支持细胞的快速增殖和生精索的增长。与此同时, 睾丸间质细胞在胎儿出生后又开始增殖、睾酮分泌增多。睾丸的这种活动在幼儿后期逐渐消退, 这与下丘脑-垂体-睾丸轴的调节功能的变化相一致。

青春期开始后, 睾丸在形态和功能方面发生显著的变化: 一是睾丸间质细胞的分泌功能加强, 二是生殖细胞的分化、发育或退化连续发生, 这两方面的变化与成熟精子的生成有关。在这个阶段, 睾丸的快速生长主要表现在曲细精管直径的增大; 支持细胞有丝分裂停止, 但它继续分化形成具有完整结构的睾丸屏障。因此, 睾丸在青春期前的正常发育与成年动物的生育能力有密切关系。

(二) 睾丸的结构

睾丸的组织结构如图 2-5 所示。

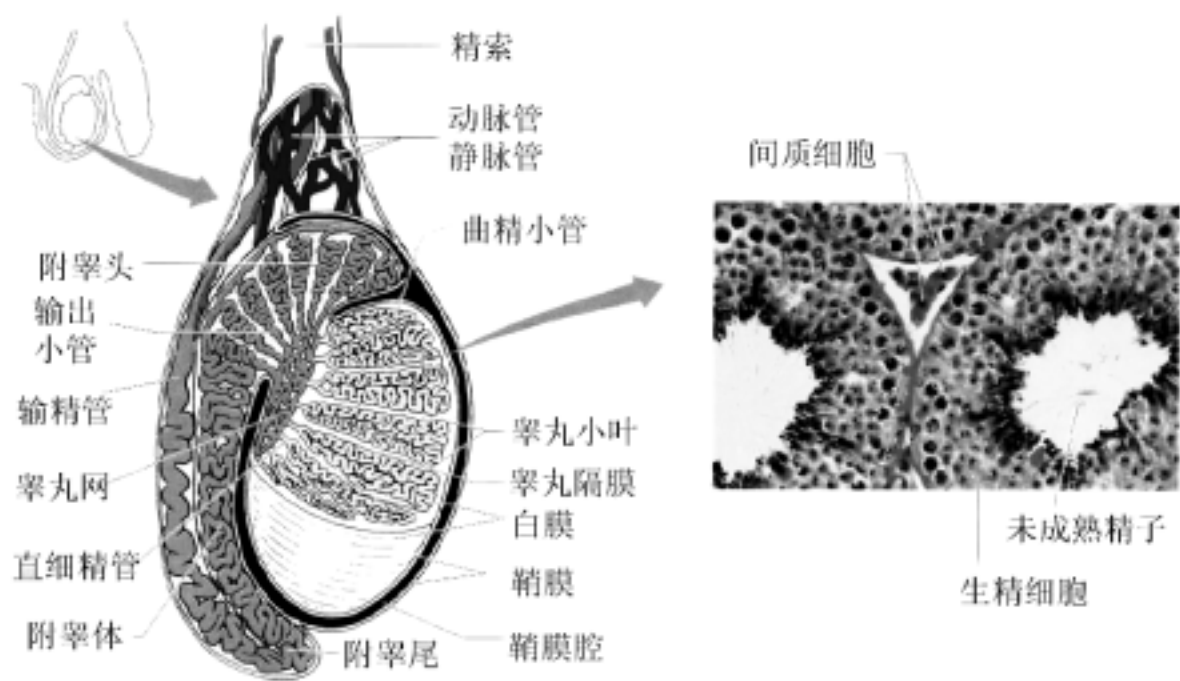


图 2-5 人睾丸与附睾结构 (改绘自 www.vacadsci.org/jsr/testis.jpg.)

1. 鞘膜 (tunica vaginalis)

鞘膜分为壁层 (parietal layer) 和脏层 (visceral layer)。壁层与阴囊紧密相贴，而脏层包裹睾丸表面，由间皮 (mesothelium) 和结缔组织构成，不易与白膜 (tunica albuginea) 分离。

2. 白膜

白膜是一层致密结缔组织囊，主要由胶原纤维 (collagen fiber) 和少许弹性纤维 (elastic fiber) 构成。在成年公马、公猪和绵羊还可见平滑肌细胞。大量分支的动脉血管和静脉血管构成血管层 (vascular layer)。羊和狗的血管层位于白膜的表层，而猪和马的血管层位于白膜的深层。

3. 睾丸隔膜

白膜的结缔组织深入睾丸实质后，将睾丸分成多个小叶 (lobule)，称为睾丸隔膜，其组成成分和白膜相同。睾丸隔膜的结缔组织进入睾丸小叶内称睾丸小梁，与睾丸隔膜相连。猪和狗的睾丸小梁较厚且是完整的隔板，在反刍动物和猫较薄而且不完整。每一小叶内有 1~4 个曲细精管。曲细精管外有基膜。

4. 睾丸纵隔 (mediastinum testis)

在睾丸的中央，隔膜与睾丸的疏松结缔组织相连而形成。在大多数家畜，睾丸纵隔占据睾丸中央位置。

5. 间质细胞 (interstitial cell 或 Leydig cell)

在睾丸的曲细精管间有血管、淋巴管、成纤维细胞、游离单核细胞和间质内分泌细

胞，即睾丸间质细胞。睾丸间质细胞产生睾丸雄激素，但公猪和公马同时也产生大量的雌激素。间质细胞因动物的种类、年龄的不同会有很大的变化。成年公牛的间质细胞约占睾丸体积的 7%，而公猪的间质细胞较多，占整个睾丸体积的 20%~30%，公马的间质细胞也较多。睾丸间质细胞成束状或簇状存在，相邻的睾丸间质细胞由微管和间隙连接相连。在睾丸组织和淋巴中有高浓度的类固醇。睾丸间质细胞的形态不规则，呈多面形、细胞核为椭圆形。所有动物的睾丸间质细胞都含有大量的脂类，滑面内质网上有类固醇脱氢酶 (steroid dehydrogenase)，线粒体数量也增多，内有许多管状嵴，它们参与睾酮的合成。睾酮在细胞内的储存及释放并不引起该细胞形态上的明显变化。

6. 曲细精管 (convoluted seminiferous tubule)

曲细精管为卷曲的、直径为 200~400 μm 的小管，曲细精管上皮主要是由支持细胞和生精细胞所构成。

(1) 支持细胞

该细胞来源于青春期前未分化的性腺支持细胞。这种支持细胞有丝分裂活动强，含有大量的粗面内质网，合成的抗缪勒氏管激素可抑制输卵管、子宫、阴道在雄性个体中的发育。在青春期支持细胞分化并伴有形态改变，最后失去有丝分裂能力。在成年动物中，支持细胞不规则地排列在生精小管基膜上，横切面由 25~30 个支持细胞组成。支持细胞含有脂类物质和糖元，大量的微丝、微管和滑面内质网，细胞顶端表面呈锯齿状。另外，位于基膜上细胞的紧密连接为精原细胞的减数分裂和精子发生提供了相对稳定的内环境，睾丸的这一特殊结构称之为血-睾屏障 (blood-testis barrier)。

支持细胞的功能包括：①营养、支持、保护生精细胞及精子；②吞食退化精子和精子脱落的残体；③参与 FSH 对生殖细胞的调节作用，产生雄激素结合蛋白；④分泌含有钾、肌醇 (inositol)、谷氨酸铁转运蛋白 (glutamate transferrin) 等管腔液成分；⑤分泌抑制素 (inhibin) 等。

(2) 生精细胞 (spermatogenic cell)

生精细胞是指发育过程中处于不同阶段的精细胞，这些细胞位于支持细胞间和该细胞之上。从精原细胞发育到精子的一系列过程称为精子发生 (spermatogenesis)，一般分为三个阶段：精母细胞的发生 (spermatocytogenesis)，即精原细胞 (spermatogonium) 发育为精母细胞 (spermatocyte) 的过程；精母细胞成熟分裂形成单倍体精子细胞 (spermatid)；精子形成 (spermiogenesis)，即精子细胞发生形态变化的过程。(精子发生的具体过程请参阅第三章)

7. 直细精管 (straight testicular tubule)

直细精管较短，可以认为是曲细精管的延续，与睾丸网相连。在马和猪，有些曲细精管终止于睾丸周边，并通过长距离的直细精管与睾丸网相连。在曲细精管的终末段内衬变形的支持细胞，所有的精子必须通过这些变形细胞间的狭缝进入直细精管。曲细精管的终末段的这种结构起到类似阀门的作用，防止睾丸网中的液体逆流到曲细精管而影响精子的发生。直细精管内衬单层扁平或柱状上皮细胞。另外，有大量的巨噬细胞和淋巴细胞，能够吞噬精子。

8. 睾丸网 (rete testis)

睾丸网为直细小管进入睾丸纵隔内分支吻合成网状的管道，管腔内衬单层扁平或柱状上皮细胞，弹性纤维和收缩细胞位于上皮下。大部分睾丸液是由睾丸网产生的。

(三) 睾丸的功能

睾丸的功能主要包括精子的生成和雄性激素的分泌。人的精子从精原细胞开始到成熟大约需要 65~70 天。在绝大多数动物，一般睾丸的生精功能从青春期开始后，可以持续终生。一个初级精母细胞经过减数分裂后产生四个单倍体精子。睾丸产生的雄激素主要促使雄性动物第二性征的出现和生殖功能的维持。

二、附 睾

哺乳动物的附睾是由 8~25 根输出小管和一条长而卷曲的附睾管组成。附睾分为头、体、尾三部分，其外有致密结缔组织所构成的白膜和鞘膜血管层。在公马的白膜层有少量平滑肌散布于整个致密结缔组织中。附睾不仅仅是一个精子运输通道，还是精子浓缩、获得运动能力和受精能力以及储存精子的部位。

(一) 附睾的发育

附睾是由中肾管发育而来的。在中肾退化进程中，除了输出管外的其他中肾小管完全退化，留下一光滑管通过腹膜与睾丸疏松地连接；中度卷曲的输出管逐渐变得高度卷曲，并穿过薄薄的睾丸系膜进入附睾头侧。60 日龄牛胚胎的附睾为一直管，胚胎发育到 80 天时附睾管开始卷曲成环状，这种环状结构再次生长并卷曲，最终形成高度卷曲的附睾管。所有动物的附睾都可分为三个部分，位于睾丸前端的是附睾头，附睾体沿睾丸侧缘发育，在睾丸后端是附睾尾。附睾的这三个部分没有明显的分界线。

(二) 结构与功能

1. 附睾的结构

主要由输出小管 (ductuli efferentes) 和附睾管 (ductus epididymidis) 组成 (图 2-5)。

(1) 输出小管

由 8~25 根输出小管将睾丸网与附睾管连在一起。这些小管聚集在一起并形成具有明显组织界限的小叶。输出小管主要由有纤毛或无纤毛柱状细胞构成，另有淋巴细胞散布于上皮基部。无纤毛细胞上还有微绒毛 (microvilli) 和发育完全的内吞细胞器，它由被膜小泡 (coated vesicle)、微泡内陷膜、微小管 (microcanaliculi) 和吸收空泡 (resorptive vacuole) 组成。

(2) 附睾管

以组织学、组织化学和超微结构为标准,可将附睾管分为六段,但因动物种类不同而有不同的特点。附睾管极度的弯曲和盘绕,其长度因动物的不同而不等,公牛和公猪的附睾管长为40m,而公马为70m。另外,精子完全通过附睾管的时间也因动物的不同而有不同,大多数哺乳动物大约需要10~15天的时间。附睾管衬以假复层上皮细胞,外被少量疏松结缔组织和环行平滑肌纤维,在接近附睾尾时平滑肌数量明显增多。在上皮中有柱状主细胞(principal cell)、小的多角基底细胞、顶细胞(apical cell)和透明细胞(clear cell)。在大多数动物中,还有巨噬细胞(macrophage)和淋巴细胞(lymphocyte)。在附睾头部的主细胞数量常常较其他部位多。柱状细胞的端面有一长的,且有时是分支的微绒毛,在靠近尾部时微绒毛逐渐变短。

2. 附睾的主要功能

(1) 输出小管

构成输出小管的两种细胞的结构特点决定了它的功能主要是运送精子和对小管液重吸收。输出小管的无纤毛细胞上有微绒毛和发育完好的内吞细胞器,有利于对小管液重吸收,从而使管腔中的内环境处于相对的稳定状态,以利于精子的成熟。另外,有纤毛细胞中纤毛的运动可推动精子向附睾管运动,利于精子的成熟与排出。

(2) 附睾管

从睾丸产生的液体大约有90%被输出管和附睾管吸收。睾丸支持细胞产生的雄激素结合蛋白也是在附睾管的起始段被吸收。附睾管的另一功能是精子在附睾中逗留期,使精子发生下列形态和功能上的变化:①完善其运动性;②代谢改变;③胞质膜改变(膜上有在受精时发挥识别能力的分子);④巯基团的结合增加了膜的稳定性;⑤失去胞质中的多余小滴。

三、输 精 管

输精管是附睾管的延续。附睾管在附睾尾部突然弯曲,然后逐渐变直。输精管的初始段位于精索中,腹腔段位于腹膜折叠中。马和反刍动物的输精管与精囊的排出管相连而构成短的射精管,开口于精阜(colliculus seminalis)进入尿道;猪的输精管和精囊排出管分别开口于尿道;肉食动物没有精囊腺,输精管直接与尿道相接。

输精管黏膜上皮为假复层柱状上皮,在该管尾部则变为单一的柱状上皮。固有膜及黏膜下层为疏松结缔组织以及大量的弹性纤维。输精管终末段的固有膜——黏膜层都包含有管泡状腺体。肌层包括内层的内环行肌、外层的纵行肌和少量的斜肌。

输精管是附睾管的延续,主要是将精子从附睾中输出。另外,输精管腺体段的分泌物有利于精子的运动和生存。

四、副 性 腺

大多数动物的副性腺包括精囊腺、前列腺、尿道球腺等。肉食动物缺少精囊腺。

(一) 精 囊 腺

成对的精囊腺属于复合管状腺或管泡状腺。腺上皮是假复层柱状上皮，由高柱状细胞和小而圆的基底细胞组成。叶内小管主要是立方上皮或柱状上皮。黏膜下层富含血管以及精囊腺小叶。

精囊腺的分泌物为白色或黄白色胶状液体，一般占射精量的 25%~30%，富含果糖，具有为精子提供能量和稀释精子的功能。

(二) 前 列 腺

前列腺的数量不定，位于盆腔部的尿道上皮，属于单管腺泡。根据其局部解剖可将前列腺分为致密部（或叫外部）和扩散部（或叫内部）两部分。整个前列腺由富有平滑肌纤维的结缔组织包裹，平滑肌在致密部较多。被膜的结缔组织伸入腺体内形成的肌质小梁，将腺体分隔成多个单独的小叶。

分泌管、分泌泡以及腺体内小管由单一的立方或是柱状上皮细胞组成，有时可见基底细胞。大部分细胞都含有蛋白质分泌颗粒。高柱状细胞具有微绒毛，有时还可见水泡样顶部凸起。

前列腺的分泌物为黏稠的蛋白样分泌物，偏碱性。前列腺分泌物的作用主要是中和精液和刺激精子的运动。

(三) 尿 道 球 腺

成对的尿道球腺位于尿道球状部的背部两侧。尿道球腺外面包有致密的结缔组织，其中含有横纹肌纤维。被膜伸入腺体的实质，将腺体分隔成多个单独的小叶。叶间结缔组织亦含有横纹肌和平滑肌纤维。尿道球腺的分泌部由高柱状上皮细胞构成，有时可见基底细胞。腺管直接开口于集合管或由单一立方上皮组成小管与集合管相连。集合管由单一立方或柱状上皮组成，多个集合管组成较大的腺内导管。

尿道球腺的黏液和蛋白样分泌物在射精时先流出，具有中和尿道内环境、润滑尿道和阴道的作用。

五、尿 道

雄性动物的尿道分为三段，第一段从膀胱起到前列腺的后缘，第二段从前列腺后缘到阴茎的球状部，第三段是阴茎的海绵体部分，即从阴茎球状部到尿道外开口。整个尿道黏膜呈现纵向折叠，但在阴茎勃起或排尿时纵向折叠消失。尿道上皮主要是由单层柱状上皮、复层柱状上皮或立方上皮组成的移行上皮。固有膜和黏膜下层由致密结缔组织、弹性纤维、平滑肌和弥散的淋巴组织组成。尿道的第一段和第二段衬以血管层，所以尿道亦与动物生殖器的勃起（erection）功能有关。

六、阴 茎

阴茎由阴茎海绵体 (corpora cavernosa penis) 和龟头 (glans penis) 组成。

成对的阴茎海绵体在坐骨结节部融合成阴茎体，外被一层致密的结缔组织白膜。该结缔组织膜含有弹性纤维和平滑肌细胞。阴茎内是由完整的结缔组织隔膜分隔的阴茎海绵体。在白膜与小梁间充满海绵状的勃起组织，海绵腔内衬内皮组织，有大量的血管和神经分布。这种结构主要与阴茎的勃起有关。

供应阴茎血液的血管主要是螺旋动脉 (helicine artery)。螺旋动脉管壁的平滑肌细胞的舒张可导致大量血液进入海绵体空腔中。海绵体内血液的增多压迫静脉管壁，使海绵体中流出的血液减少，最终血液充满海绵体导致阴茎的勃起。当螺旋动脉中平滑肌细胞收缩时，动脉血流减少，充血的静脉逐渐恢复到原有的状态。

(崔 胜)

主要参考文献

- Adham IM, Steding G, Thamm T, Bullesbach EE, Schwabe C, Paprotta I, Engel W . 2002 . The overexpression of the *insl3* in female mice causes descent of the ovaries . Mol Endocrinol 16: 244~252
- Bogh IB, Baltsen M, Byskov AG, Greve T . 2001 . Testicular concentration of meiosis-activating sterol is associated with normal testicular descent . Theriogenology 55: 983~992
- Costa WS, Sampaio FJ, Favorito LA, Cardoso LE . 2002 . Testicular migration: remodeling of connective tissue and muscle cells in human gubernaculum testis . J Urol 167: 2171~2176
- Cunningham JG . 2002 . Textbook of veterinary physiology . Third Edition, W . B . Saunder Company, USA
- De Miguel MP, Marino JM, Gonzalez-Peramato P, Nistal M, Regadera J . 2001 . Epididymal growth and differentiation are altered in human cryptorchidism . J Androl 22: 212~225
- Graves JA . 1998 . Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes . J Exp Zool 281: 472~481
- Hamza AF, Elrahim M, Elnagar, Maaty SA, Bassiouny E, Jehannin B . 2001 . Testicular descent: when to interfere? Eur J Pediatr Surg 11: 173~176
- Haqq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA . 1994 . Molecular basis of mammalian sexual determination: activation of Mullerian inhibiting substance gene expression by SRY . Science 266: 1494~1500
- Hutson JM, Albano FR, Paxton G, Sugita Y, Connor R, Clarnette TD, Gray AZ, Watts LM, Farmer PJ, Hasthorpe S . 2000 . In vitro fusion of human inguinal hernia with associated epithelial transformation . Cells Tissues Organs 166: 249~258
- Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R . 1990 . Expression of a candidate sex - determining gene during mouse testis differentiation . Nature 348: 450~452
- Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ . 2002 . INSL3/ Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent . J Biol Chem 277: 31283~31286
- Lim HN, Hughes IA, Hawkins JR . 2001 . Clinical and molecular evidence for the role of androgens and WT1 in testis descent . Mol Cell Endocrinol 185: 43~50
- Lovell - Badge R, Hacker A . 1995 . The molecular genetics of SRY and its role in mammalian sex determination . Philosophical Transactions: Biol Sci 350: 205~214
- Mader SS . 1990 . Biology . Third Edition . Wm . C . Brown Publishers, Dubuque IA .
- Mayr JM, Lawrenz K, Berghold A . 1999 . Undescended testicles: an epidemiological review . Acta Paediatr 88: 1089~

1093

Ramasamy M, Di Pilla N, Yap T, Hrabovszky Z, Farmer PJ, Hutson JM . 2001 . Enlargement of the processus vaginalis during testicular descent in rats . *Pediatr Surg Int* 17: 312~315

Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D . 1998 . Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes . *Nature* 391: 691~695

Toppari J, Kaleva M . 1999 . Malescendus testis . *Horm Res* 51: 261~269

Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I . 2001 . Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice . *Mol Endocrinol* 15: 172~183

第三章 精子发生与成熟

在有性生殖的生物体中，细胞可以分为两大类：体细胞（somatic cell）和生殖细胞（germ cell）。有性生殖周期是体细胞与生殖细胞相互转变的过程。在胚胎发育的早期，部分体细胞可分化为生殖细胞。生殖细胞在分化过程中发生了减数分裂，由二倍体的细胞产生了单倍体细胞：精子和卵子。精、卵通过受精重新形成二倍体的细胞，开始下一轮的生命周期。

在高等生物的机体中，只有一小部分细胞为生殖细胞，然而它们是正常生命周期中的一个关键环节。二倍体细胞在形成单倍体细胞的过程中，发生了减数分裂。其间，同源染色体间 DNA 发生重组，产生的每个单倍体生殖细胞都含有不完全相同的基因组合。因此，精卵结合形成的子代在遗传学上互不相同，并且也不同于他们的亲代，这一生殖模式最大的优点是保持着物种的多样性。

在多数物种中，只有两类生殖细胞：卵子和精子。这两种细胞具有很大的区别，卵子 is 机体中最大的细胞，而精子通常最小。这种结构最适合于所带基因的扩增。卵子是不运动的，但通过提供大量生长发育所需的原料来帮助保存母本基因；与此相反，精子通常有较强的运动能力，为流线形，以适应有效的受精，它通过利用母本资源来扩增父本基因。

精子起源于原始生殖细胞。在胚胎发育的早期，少数细胞形成配子（gamete）的前体，称之为原始生殖细胞（primordial germ cell, PGC）。其后，原始生殖细胞迁移到早期的性腺——生殖嵴（genital ridge），在那里进行一段时间的有丝分裂繁殖，然后部分细胞进入减数分裂，并进一步分化为成熟的配子：精子或卵子。睾丸是精子发生的场所，在这里 PGC 发育为原始精原细胞（primitive spermatogonium），进入精子发生过程，经过减数分裂及一系列形态变化，最后形成特殊形态的完整精子。在曲细精管中形成的精子并没有完全成熟，需要进入附睾，在附睾管运行过程中，吸收多种物质，发生一系列形态、生理和生化方面的变化，完成成熟过程，形成具有一定活力的精子。

第一节 精子发生

精子发生（spermatogenesis）是指精原细胞（spermatogonium）经过一系列的分裂增殖、分化变形，最终形成完整精子（spermatozoon）的过程。这一过程是在雄性生殖腺（睾丸）的曲细精管（seminiferous tubule）中进行的。精子发生可分为三个时期：有丝分裂期、减数分裂期和精子形成期（spermiogenesis）。精子发生是一个特殊的细胞分化过程，在这一过程中发生了许多特殊的事件，如减数分裂、形态变化等。

一、精子发生的场所

(一) 辜 丸

在雄性个体中，生殖嵴发育为雄性生殖腺——辜丸（图 3-1）。辜丸是雄性生殖器官，椭圆形，其背面表层与附辜相连。辜丸是精子发生的场所，附辜为精子成熟的器官。辜丸外由一层囊膜包裹，囊膜为致密坚硬的结缔组织，囊膜向内延伸把辜丸分割为多个分隔间，分隔间充满了弯曲的上皮性管道，称为曲细精管。附辜附着于辜丸的背面，其间有输出小管（ductuli efferentes）相连，在辜丸中产生的完整精子通过输出小管进入附辜，在附辜中成熟，变为成熟的精子排出。

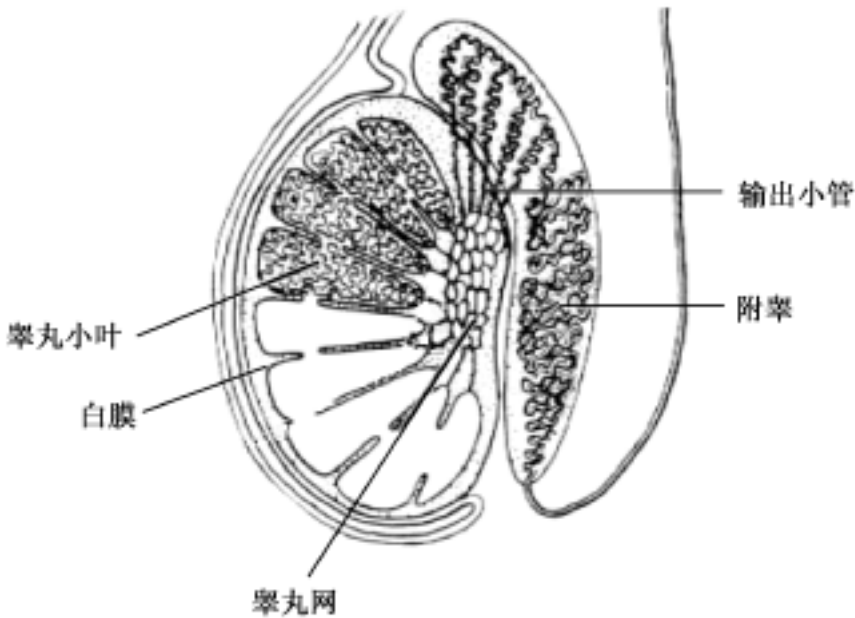


图 3-1 辜丸结构（改绘自 Motta P., 1989）

在胚胎期发育、分化阶段及出生后，辜丸行使两种功能：分泌激素（辜酮及其他类固醇激素，在胚胎期也分泌）以及在成年期产生精子。经过胚胎期及出生后期的一个准备阶段后，精子发生开始于青春期。

(二) 曲 细 精 管

辜丸的实质部分为弯曲的曲细精管。曲细精管周边为一结缔组织薄层，由弹性纤维及一些平滑肌细胞组成。管壁由两类细胞组成：支持细胞（sertoli s cell）及各期的生精细胞（spermatogenic cell）。生精细胞根据它们的发育阶段有规律地排列成多层，这一结构称之为生精上皮（spermatogenic epithelium 或 serminiferous epithelium）。生精细胞包括精原细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、圆形精子细胞及长形精子细胞。它们依序由曲细精管的基底部向管腔排列（图 3-2）。

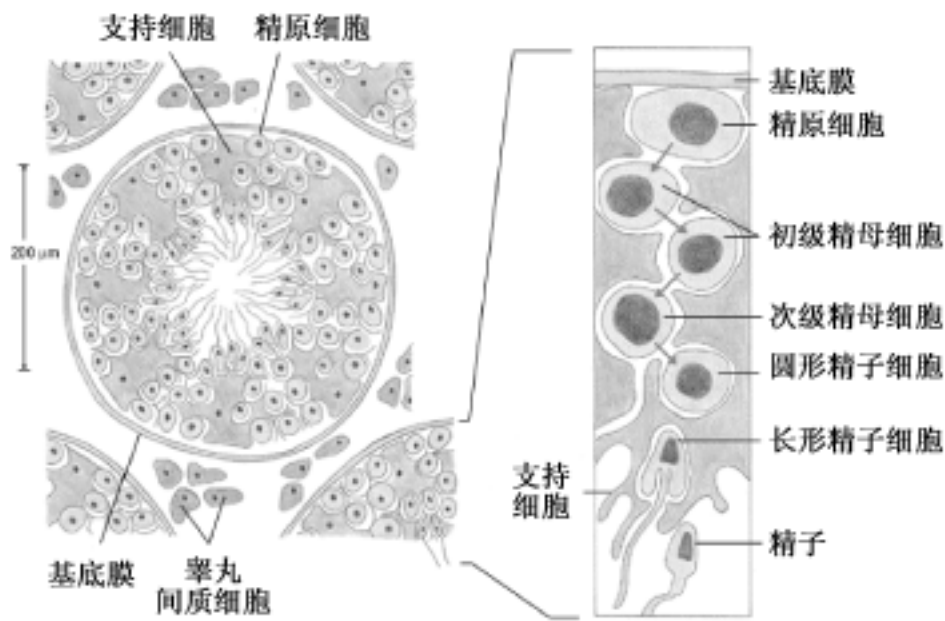


图 3-2 曲细精管结构示意图 (改绘自 Alberts B, 2001)

(三) 生精上皮

生精上皮由支持细胞及不同阶段的生精细胞高度有序排列组成，其组织的复杂性是上皮中独有的，包括非增殖状态的支持细胞及各期生精细胞，从位于基底的精原细胞到管腔部分的精子细胞。支持细胞占成年生精上皮的 25%，生精上皮的基底膜由扁平的肌样细胞、成纤维细胞及胶原纤维组成（图 3-3）。

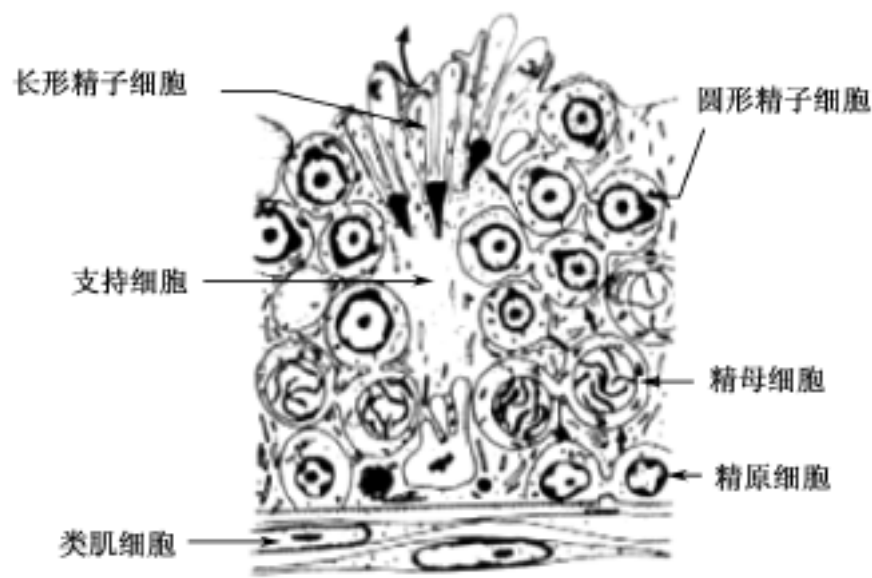


图 3-3 生精上皮的细胞排列示意图 (改绘自 Guraya SS, 1987)

(四) 支持细胞

除了生殖细胞，生精上皮还包含一群支持细胞，它们比生殖细胞大得多，而且形态复杂。它们不再分裂，支持着整个上皮，附着于生精上皮的基层，并穿过生殖细胞间伸向管腔，为精子发生提供了一个合适的环境。在老年的睾丸中存在着多核支持细胞，

表明它们可能在一定情形下恢复了分裂能力，发生了没有进行胞质分裂的有丝分裂，导致形成多核的支持细胞。支持细胞的分布是随机的，数量是恒定的。

如图 3-4 所示，支持细胞有一个多形核，有丰富的细胞质和细胞器，包括丰富细长的线粒体、一个很大的高尔基体、丰富的内质网，一些溶酶体、微丝和微管。在大鼠生精上皮周期的 12~14 期，支持细胞中线粒体的体积增大，同时伴随着大量脂质形成，以及内吞活性明显增多，反映了生精上皮周期中支持细胞对能量需求的变化。已证明在大鼠中支持细胞的内吞活性具有周期性变化的特征。支持细胞的骨架发达，在同一支持细胞中的不同区域，构成细胞骨架的胞质微丝及微管的数量及分布变化很大。微丝主要分布于细胞核周围及细胞基底部。

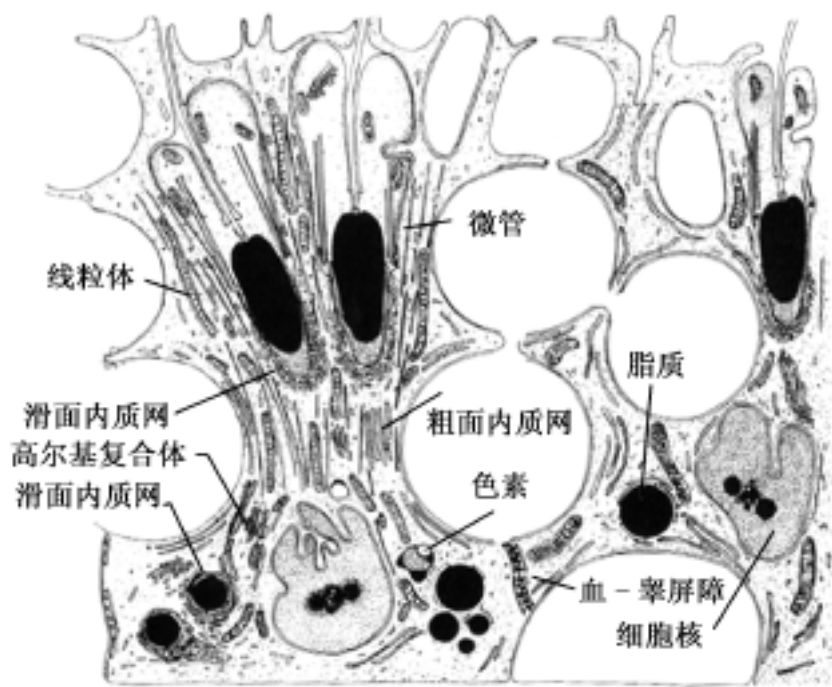


图 3-4 支持细胞的结构示意图 (改绘自 Guraya SS, 1987)

支持细胞间存在着多种形式的连接，其中紧密或闭缩连接 (occluding junction) 是指相邻的支持细胞膜互相融合形成一种特化的连接复合体 (junctional complex)。它是血-睾屏障 (blood-testis barrier) 的结构成分，这一结构把生精上皮分为两个分隔间：基底间 (basal compartment)，为精原细胞和前细线期的精母细胞的场所；血-睾屏障的管腔一侧为中央间 (adluminal compartment)，包含处于减数分裂的精母细胞及精子细胞。血-睾屏障解释了在管液和血浆中化学物质的不同，也是在两个隔间中存在不同基质的结构基础，它在精子发生的特定阶段中起关键作用。它们的重要性还有待研究，然而一般认为，基底间可直接接受血液中的激素，而中央间则通过支持细胞接受激素和营养物质，解释了基底间中的细胞更容易受到激素水平的影响。通过闭缩连接进行的物质运转依赖于物质分子大小和物理性质，对物质的转移具有筛选作用。

二、精子发生过程

精子发生是一个复杂而有规律的细胞分化过程。从精原细胞的分裂增殖、精母细胞的减数分裂到精子细胞变态分化和运行至附睾的成熟过程中，都受到众多基因和激素的

协同调控。精子发生过程可分为三个主要阶段（图 3-5）：

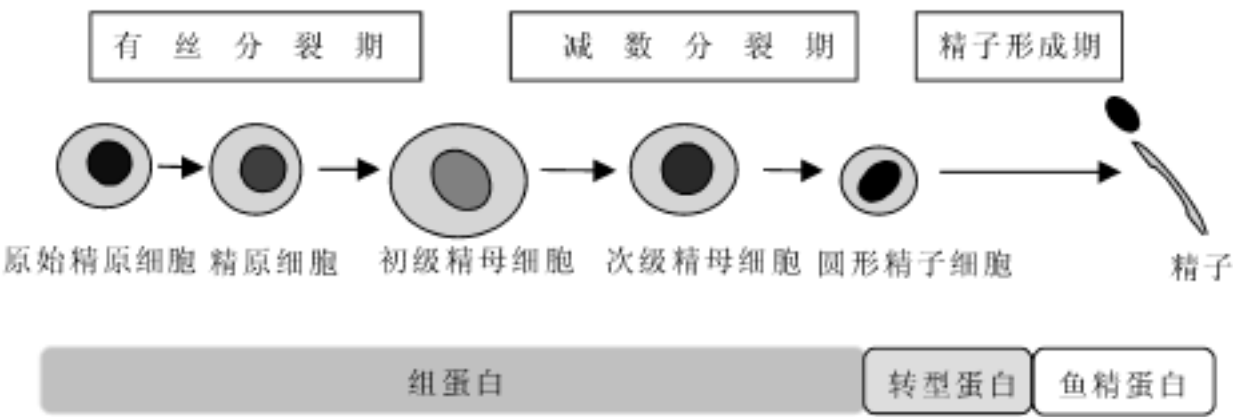


图 3-5 精子发生示意图

(1) 精原细胞的有丝分裂期

精原细胞由原始生殖细胞分化而来，其增殖能力增强，为进入减数分裂做准备。它通过有丝分裂产生两类细胞，一类不进入精子发生周期，继续保持有丝分裂的能力，在下一个周期前一直处于静止状态，称之为“储存的生殖干细胞”；另一类进入精子发生周期，通过分化途径形成精子，称之为“更新的生殖干细胞”。

(2) 精母细胞的减数分裂

进入分化途径的精原细胞发育为初级精母细胞，进行最后一次染色体的复制，为成熟分裂做准备。根据其生长发育顺序及细胞、染色质形态可将初级精母细胞分为前细线期精母细胞、细线期精母细胞、偶线期精母细胞、粗线期精母细胞及双线期精母细胞等几个时相。一个双线期精母细胞发生第一次减数分裂，产生两个次级精母细胞。次级精母细胞的间期很短，不发生染色体复制，很快进行第二次减数分裂，产生单倍体的圆形精子细胞，完成减数分裂。

(3) 精子形成期

精子形成期是精子细胞的分化变态过程，这是精子分化的重要环节。圆形的精子细胞要经过伸长变态的复杂过程，包括细胞核的浓缩变长，顶体的生成，核蛋白的转型，染色质的浓缩包装，核骨架及细胞骨架——中心体（粒）体系的演变，鞭毛、轴丝的发生及尾的成形分化，精子特异性乳酸脱氢酶 LDH - X 的出现等。在此变态过程中，糖原、脂质、蛋白质等代谢产物大量随细胞质排弃，代之以出现的 LDH-X 及六碳糖激酶来适应能量需要。在变态后期核蛋白质出现不断的磷酸化和脱磷酸化，蛋白质 SH—基向 SS—键转变，以精氨酸为主的鱼精蛋白（protamine）替换以组氨酸为主的核组蛋白（histone），使核蛋白和 DNA 紧密结合，以保证精子基因处于浓缩包装和不活跃状态。

原始生殖细胞历经精原细胞、精母细胞、精子细胞和精子，其间发生了减数分裂、组蛋白/ 鱼精蛋白替换、精子变态等特异细胞活动，许多特异性的基因对精子发生过程进行严密的调控。

精子发生过程中的生精细胞可分为以下几个阶段：原始 A 型精原细胞（primitive type A spermatogonium）、A 型精原细胞（type A spermatogonium）、B 型精原细胞（type B spermatogonium）、初级精母细胞（primary spermatocyte）、次级精母细胞（secondary

spermatocyte)、圆形精子细胞 (round spermatid)、浓缩期精子细胞 (condensing spermatid) 及精子 (spermatozoon)。初级精母细胞又分为前细线期精母细胞 (preleptotene spermatocyte)、细线期精母细胞 (leptotene spermatocyte)、偶线期精母细胞 (zygotene spermatocyte) 和粗线期精母细胞 (pachytene spermatocyte)。精子发生过程及各期生精细胞特征参见图 3-6。

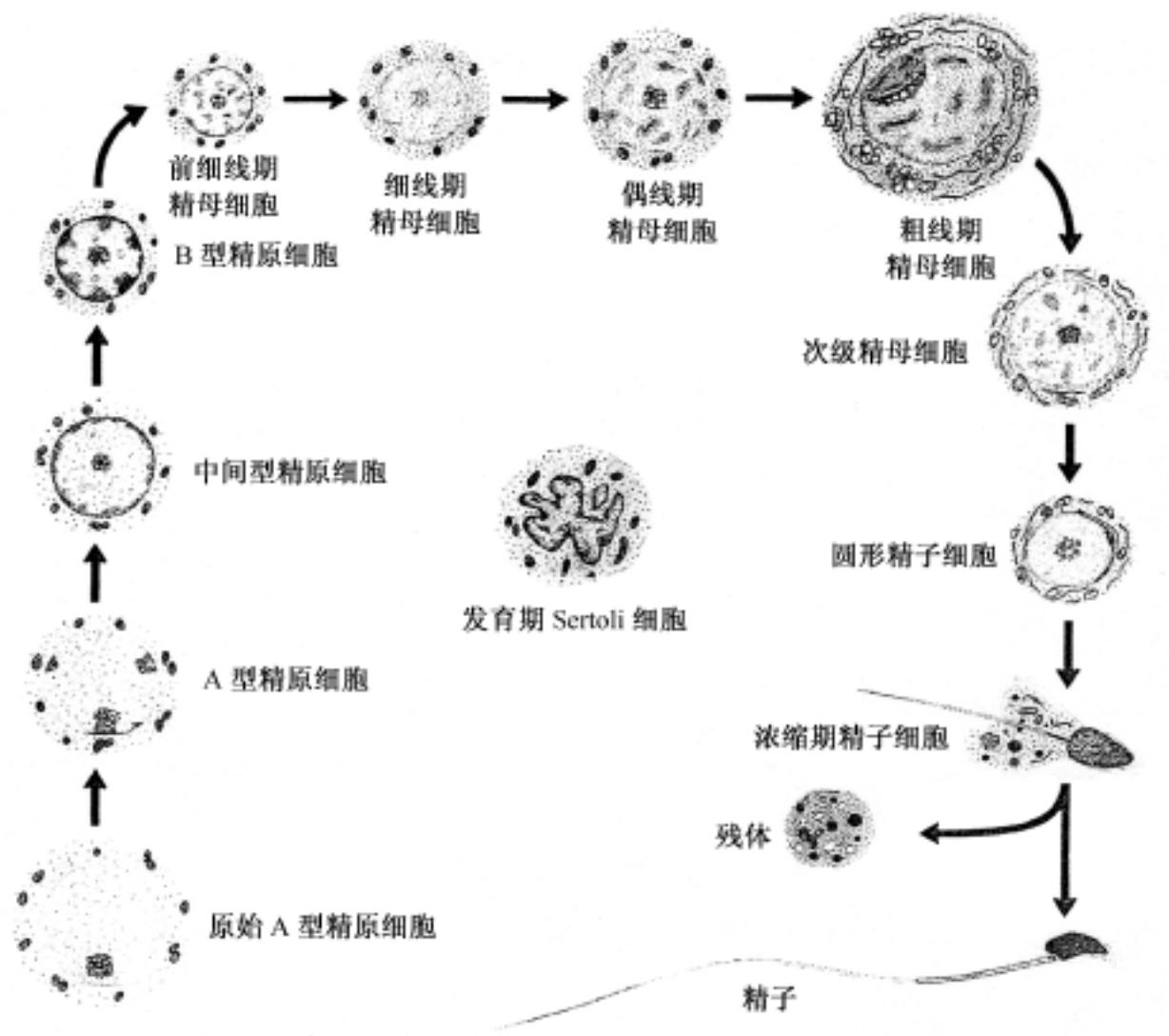


图 3-6 精子发生示意图，示各阶段生精细胞的形态特征 (改绘自 Bellvé AR, 1977)

(一) 有丝分裂期

1. 原始 A 型精原细胞

精子在睾丸中的发生起源于原始的 A 型精原细胞，也被称为精原干细胞 (spermatogonial stem cell)。这类细胞通过有丝分裂进行增殖，所产生的子代细胞可以分为两类：一类仍保持精原干细胞的特征进行有丝分裂，成为长期精子发生的“源泉”；另一类子代细胞则进入分化途径。

2. A 型精原细胞

一部分原始 A 型精原细胞的子代细胞进入分化过程，首先形成 A 型精原细胞。A 型精原细胞的分化也是一个复杂的过程。目前认为至少要经过以下几个阶段，通过 A₁

型、A₂ 型、A₃ 型和 A₄ 型精原细胞形成中间型精原细胞 (intermediate spermatogonium)。

3. B 型精原细胞

这是精原细胞的最后阶段。在此之前，精原细胞都是通过有丝分裂进行增殖。中间型的精原细胞进行最后的有丝分裂，形成 B 型精原细胞，随后停止有丝分裂，由它们发育形成初级精母细胞，进入减数分裂期。

4. 精子发生的同步化现象

精子发生过程中的一个特点是许多生精细胞进行同步化分裂，并且细胞的胞质分裂 (cytokinesis) 不完全，导致子细胞有细胞间桥相连 (图 3-7)，这可能是它们同步分化的基础。

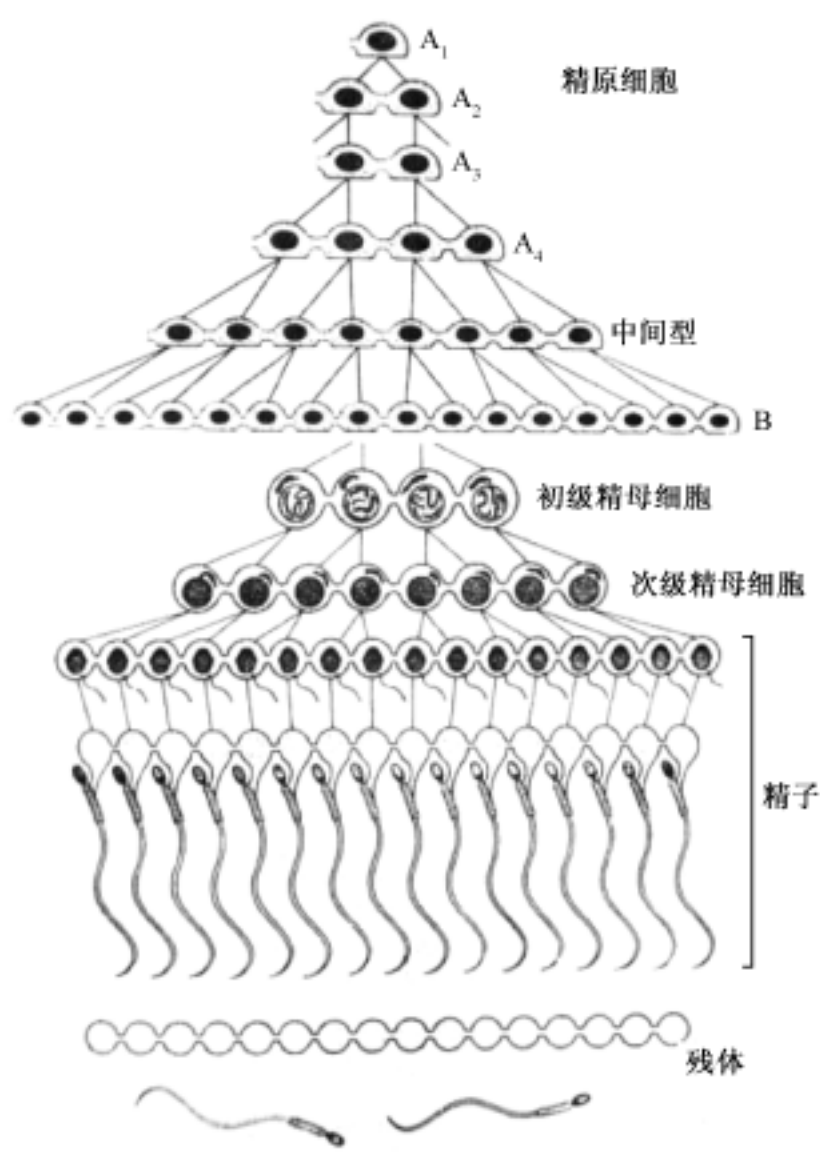


图 3-7 精子发生的同步化现象示意图 (改绘自 Guraya SS, 1987)

(二) 减数分裂期

配子是单倍体的，这种单倍体的细胞必须通过一种特殊的细胞分裂形式——减数分

裂 (meiosis) 产生。减数分裂仅发生于有性生殖细胞发生过程中的某个阶段，其特点是细胞进行连续两次分裂而 DNA 只复制一次，结果产生了只含有单倍体遗传物质的细胞。含有单倍体遗传物质的两性生殖细胞通过受精形成合子，染色体又恢复到体细胞的数目，从而可以维持物种的正常繁衍。因此，减数分裂是生物有性生殖的基础。

在减数分裂过程中同源染色体间 DNA 发生了重组，这就增加了子代发生遗传变异的机会，确保了生物的多样性以更加适应环境的变化，所以减数分裂也是生物进化及生物多样性的基础保证。这些特殊的现象必定受特殊机理的调节。近年来，在这一领域的研究集中于寻找减数分裂的特异蛋白，揭示这一过程中染色体出现的一些特殊事件的机理。

B 型精原细胞有丝分裂停止后，发育为初级精母细胞，并进入减数分裂期。在这期间，细胞进行了两次减数分裂。初级精母细胞经过第一次减数分裂形成次级精母细胞，次级精母细胞经过第二次减数分裂形成单倍体的精子细胞。两次减数分裂之间的间期或长或短，但无 DNA 合成。第一次减数分裂可分为前期 I、中期 I、后期 I 及末期 I，第二次减数分裂可分为前期 II、中期 II、后期 II 和末期 II，减数分裂的过程见图 3-8。

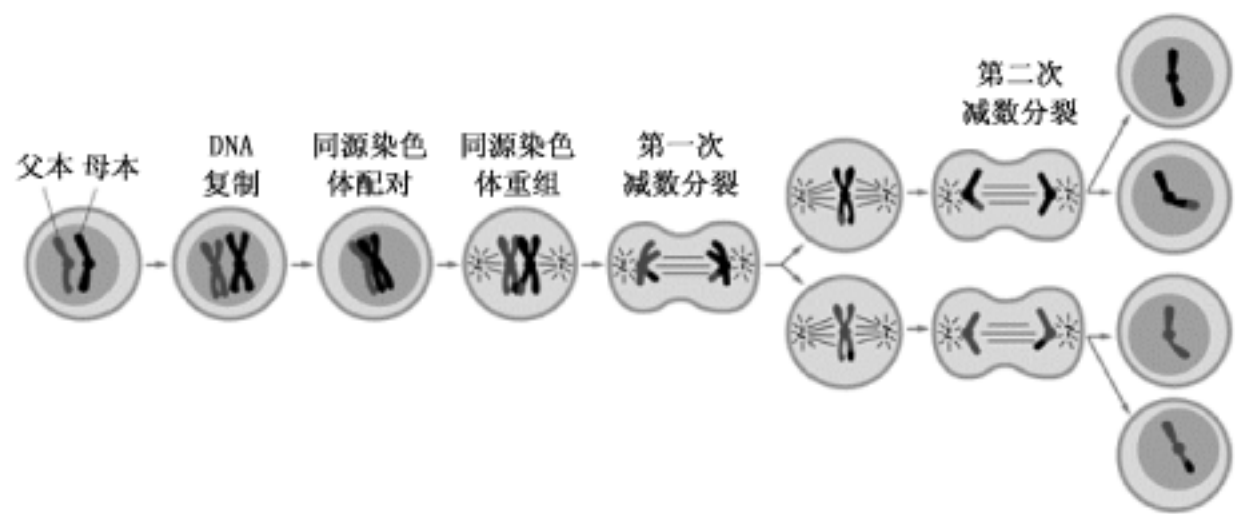


图 3-8 减数分裂示意图 (改绘自 Alberts B, 2001)

1. 初级精母细胞

处于第一次减数分裂期的细胞为初级精母细胞。初级精母细胞随着第一次减数分裂过程中染色质的变化，又可分为前细线期 (preleptotene)、细线期 (leptotene)、偶线期 (zygotene) 及粗线期 (pachytene) 精母细胞。初级精母细胞的体积不断增大，粗线期精母细胞的体积可达到前细线期的两倍以上。第一次减数分裂的时间较长，在人类可长达 22 天，分裂后形成次级精母细胞。

2. 次级精母细胞

由初级精母细胞经第一次减数分裂而来，细胞的体积比初级精母细胞小。细胞及细胞核均为圆形，核内染色质呈细网状，着色较浅，细胞质较少。次级精母细胞存在时间较短，很快完成第二次减数分裂，形成两个精子细胞，所以在切片中很少看到次级精母细胞。

3. 圆形精子细胞

次级精母细胞经过第二次减数分裂后，首先形成圆形精子细胞。由于在第二次减数分裂前没有进行 DNA 复制，所以圆形精子细胞中染色体数目减少一半，成为单倍体细胞。此时细胞核圆形，着色较深。细胞质少，内含丰富的线粒体和高尔基复合体。精子细胞不再分裂，而是进入一个复杂有序的形态演变过程，形成具有头、颈、尾结构的精子，该过程为精子形成期。

(三) 精子形成期 (spermiogenesis)

精母细胞经过两次减数分裂，而 DNA 只复制一次，形成了单倍体的圆形精子细胞，此后细胞不再分裂，而是进入一系列的形态变化，最后形成具有头、颈、尾结构的完整精子 (图 3-9)。在这一过程中细胞形态的变化主要表现在以下 6 个方面。

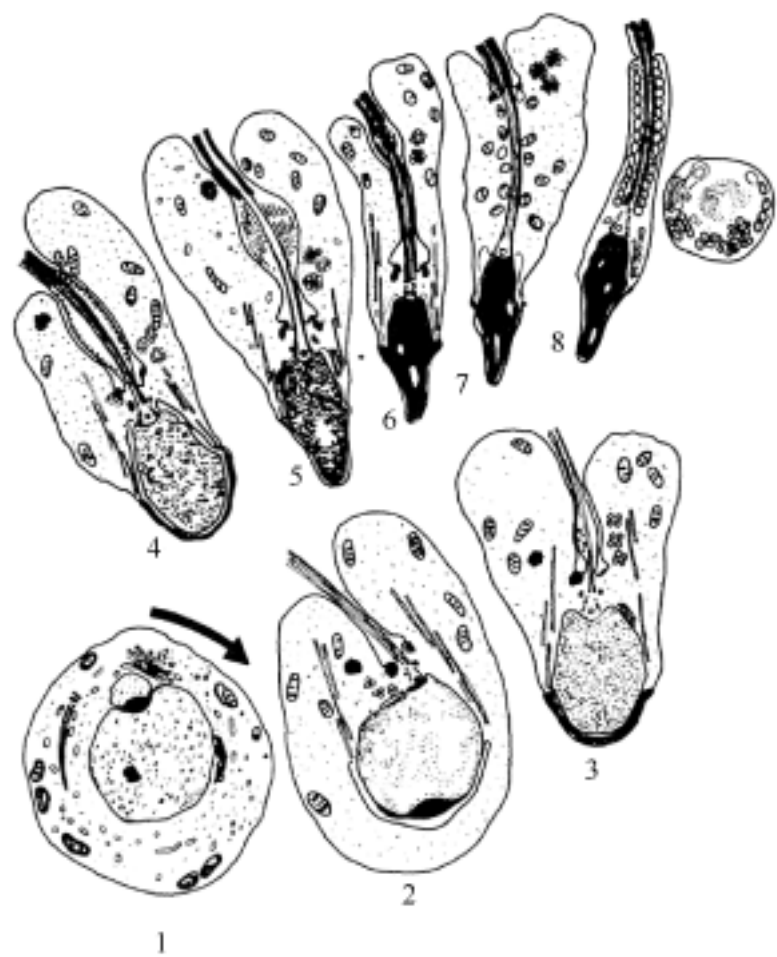


图 3-9 人类精子细胞分化示意图 (改绘自 Holstein AF 和 Schirren C, 1979)
可根据其顶体形成、核浓缩以及尾结构发育分为 8 个阶段。

1. 细胞核的变化

细胞核内染色质浓缩、体积变小、偏向细胞的一极，形成精子的头部。染色质的浓缩主要是由于染色质中的组蛋白 (histone) 被富含精氨酸的鱼精蛋白 (protamine) 取代。这一碱性蛋白中大量的正电荷，吸引着带负电的 DNA 发生集聚。然而这一蛋白质的替换受哪些因素的调节，以及调节细胞核变化的其他因素有待于进一步的了解。

2. 顶体 (acrosome) 的形成

精子顶体是由高尔基复合体形成的。精子细胞的高尔基复合体首先产生许多小液泡。小液泡融合变大, 形成一个大液泡叫顶体囊, 内含一个大的颗粒, 称为顶体颗粒 (acrosomal granule)。然后由于液泡失去液体, 以致液泡壁靠近位于核的前半部, 组成了一双层膜, 称为顶体帽, 内有一个顶体颗粒。此后顶体颗粒物质分散于整个顶体帽中, 这就是顶体, 内含多种水解酶。

3. 线粒体鞘的形成

在精子形成过程中, 精子细胞的线粒体体积变小伸长, 并精确地迁移到中段, 围绕着中央轴丝而形成螺旋状排列的线粒体鞘。物种不同, 线粒体鞘总体构型也有很大差别。淡水无脊椎动物和海洋动物比较简单, 只是由几个长的线粒体组合起来形成的线粒体鞘。而在哺乳类动物中则形成了典型的螺旋状排列的线粒体鞘。

4. 中心粒的迁移

精子形成早期, 两个中心粒移至核的后方, 当核的后端表面形成一个凹时, 一个中心粒恰好位于凹之中, 称为近端中心粒, 它与精子长轴呈横向排列; 另一个称为远端中心粒, 位于近端中心粒的后方, 它的长轴平行于精子长轴, 由它产生精子尾部的中央轴丝。哺乳类动物的远端中心粒, 在颈段发育完成后, 最终消失, 有些哺乳类动物的近端中心粒在精子成形后也会丧失。

5. 精子尾部的形成

中央轴丝是构成鞭毛型精子尾部的基本细胞器, 其外周还有致密的纤维和纤维鞘, 这种粗大的纤维从精子中段起始, 并不完全达到尾的末端。

6. 细胞质的变化

精子细胞的大部分细胞质, 在精子形成过程中成为残体 (residual body) 而被抛弃。当细胞核前端形成顶体时, 细胞质向后方移动, 仅留下一薄层细胞质与质膜覆盖在细胞核上。当尾部的后端生长时, 细胞质的大部分附着在精子中段, 当线粒体围绕着轴丝时, 该处的细胞质和高尔基体成为残余胞质被抛弃, 仅留下一薄层细胞质包围着中断的线粒体。

三、精子发生的特点

(一) 生精上皮周期

一代 (generation) 生殖细胞是指这样一群细胞, 它们在大概相同的时间形成, 然后同步通过生精过程。在一定的曲细精管区域, 两次分化程度相同的细胞群相继出现之间, 有一个明显的时间间隔, 称之为生精上皮周期 (cycle of seminiferous epithelium)。

不同物种的这一周期长短不同，人的为 16 天、公牛和大鼠的为 13 天、羊和兔的为 10 天、小鼠的为 8.6 天。

不同代的生精细胞组成固定的细胞群体组合，由于精子形成期精密而有序的时间步骤，某一期的精子细胞总是与一定分化期的精母细胞和精原细胞相关。对这些细胞群体进一步的观察表明：在曲细精管的任何一个区域，它们以一定的顺序先后出现。这些细胞群体以规律性的间隔重复出现，代表一个生精上皮周期的多个阶段。由于这些期表示一个连续过程的任意亚群，因此一期的结束与下一期开始间的分界常常是不精确的。对一定的哺乳动物种属，细胞群体的数目或周期的阶段依据采取的鉴定标准而不同。

有两种方法常用来鉴定生精小管周期的期相。第一种方法是利用精子细胞核的形态以及在生精上皮的位置。更加成熟的生精细胞成簇排列深深嵌在上皮内，对着支持细胞的核。其后进一步分化的细胞向管腔移动，最终释放到管腔中。在这一分类方法中，多种染色方法被应用：最常用的是苏木素-伊红 (haematoxylin-eosin) 染色法，这一分类方法可把大鼠、公羊、公牛、兔、猪、水貂和猴的生精上皮分为 8 个期。在一些研究中这 8 个期又可以进一步细分。

第二种方法用过碘酸-希夫 (PAS) -苏木素，对生精管进行组织切片染色。可把发育中的顶体系统染成深紫色，利用顶体来区分精子细胞。利用 PAS-苏木素技术，把大鼠中可分为 14 个期，仓鼠与豚鼠分为 13 期，小鼠与猴子分为 12 期。对在人类可以分为 6 期，然而这期间的界限并不十分清楚，常缺少一代或多代生精细胞，或在组织处理过程中细胞易位。此外，一些研究者否认人类存在精子发生波，与猩猩中的现象相似。但是导致这种人类和猩猩精子发生无规律模式的因素还不清楚。

把细胞分为一个周期中的可区分的几个阶段有利于研究生殖细胞的结构与细胞化学变化，研究一些因素（物理或化学因素）对有丝分裂、减数分裂及细胞分化的影响。还可以帮助我们对一些物质在生殖细胞中进行精确定位。

对生精上皮周期不同阶段的确定，是认识精子发生过程中染色体活动及变化的基础。已经观察到在小鼠中，生精上皮周期中 DNA 的合成发生在 7 个阶段，即 8、10、12、2、3、5、7~8 期，主要涉及 A₁、A₂、A₃、A₄、中间型及 B 型精原细胞。在精子发生过程中，DNA 合成有两个高峰期，第一个高峰期在 4~6 期，对应于中间型及 B 型精原细胞的有丝分裂，第二个高峰位于 8~9 期，反映前细线期精母细胞 DNA 的复制。而主要的 RNA 合成发生在精原细胞和粗线期精母细胞。

(二) 生精上皮波

每一个生精细胞群，除了环行对称以外，还表现出沿生精管长轴有序组织排列，在那里产生精子发生“波”，称为生精上皮波 (wave of seminiferous epithelium)。生精上皮周期及生精上皮波是不同的，周期是在生精上皮一个区域，在一定时间内发生的动态的组织学现象；“波”是指在一定时间内细胞群沿生精管有序的分布。换句话说，“波”是空间，而“周期”是时间。

已经报道在多种哺乳动物中存在着生精上皮波。但是在人类却难以证明这一点，因人类睾丸中的细胞组合不规则。在狒狒睾丸中，可把生精小管分为三类。第一类包括只

有单一细胞组合的生精小管段，第二类包括两种或多种细胞群有序的排列，而第三类小管只在人的生精小管中观察到。有关这些在狒狒、猩猩和人类不规则的原因所知甚少。有人认为这种无序可能反映了这些物种生殖能力的退化。但有研究表明，人类生精阶段的排列并不是随机无序的，而是有序地沿管长轴螺旋式排列。

(三) 生精细胞的同步发育

生精上皮的一个特征就是生精细胞的同步发育。人们用电镜观察到发育中的雄性细胞群，如精原细胞、精母细胞、精子细胞，通过细胞间桥连接（图 3-8）。这种间桥是由不完整的胞质分裂所致，这种合胞体构成了它们同步发育的基础。尽管在多种哺乳类中发现这种细胞间桥的现象，然而有关这种间桥相连的确切的细胞数量存在着争论。有研究表明，一组由细胞间桥连接的精子细胞可能有几百个，然而这比理论上的数目要少，可能由于精原细胞和精母细胞的退化所致。合胞体可能作为同步分化的装置起作用。也有人认为除了细胞间桥外，还存在着别的因素参与生殖细胞的同步分化。

四、生精细胞的结构

(一) 精原细胞

精原细胞是精子发生的起点，它紧靠在曲细精管的基底膜上，属于生精干细胞。细胞呈椭圆形或圆形，直径 12 μm ，胞核圆形，染色质着色较深，有 1~2 个核仁。精原细胞经有丝分裂不断增殖，一部分作为贮备干细胞，另一部分进入生长期发育成初级精母细胞。精原细胞的染色体组型，人为 46XY、马为 66XY、猪为 40XY、狗为 78XY。

(二) 初级精母细胞

初级精母细胞，是由精原细胞发育而来，体积增大，最终达到精原细胞体积的二倍，细胞器完备、数目增多，细胞核呈圆形，分裂期时间在人中可长达 22 天左右。分裂后形成次级精母细胞。

(三) 次级精母细胞

由初级精母细胞经第一次减数分裂形成次级精母细胞，位于初级精母细胞近管腔侧，细胞体积比初级精母细胞小。细胞和细胞核均为圆形，核内染色质呈细网状，着色较浅，细胞质较少。次级精母细胞存在时间较短，很快进入第二次减数分裂，形成两个精子细胞，染色体数目减少一半，成为单倍体细胞。由于次级精母细胞存在时间短，所以在切片中较少见。

(四) 精子细胞

次级精母细胞分裂后产生精子细胞，它们靠近管腔。细胞核圆形，着色较深。细胞质少，内含中心粒、线粒体和高尔基复合体等细胞器。精子细胞不再分裂，经过复杂的形态演变后形成精子，该过程为精子形成期。

(五) 精子

精子发生最终形成精子。在睾丸中发育成完整的精子后，还需在附睾中经过一段成熟发育，才达到具有运动能力真正成熟的精子。成熟精子由两个主要部分构成，即头部和尾部。尾部又分成颈段 (neck segment)、中段 (middle piece)、主段 (principal piece) 和末段 (end piece)。人类成熟精子的结构见图 3-10。

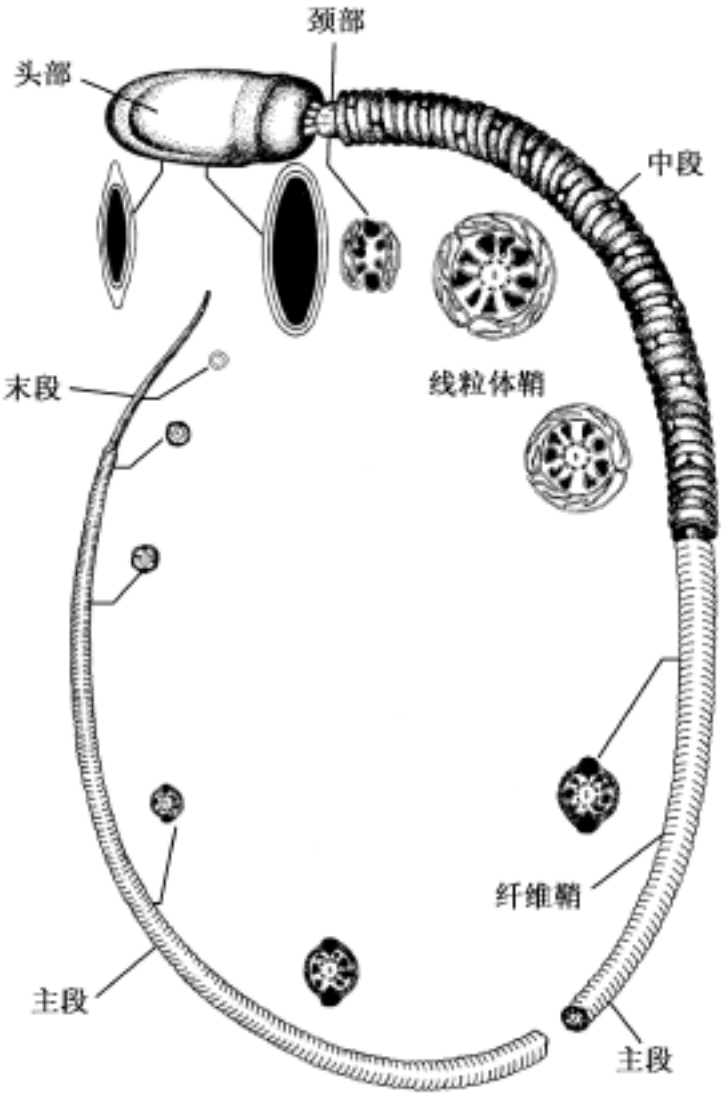


图 3-10 人类精子示意图 (改绘自 Fawcett DW, 1975)

1. 头部

头部的绝大部分，被染色质高度集聚的细胞核所占据，具有几乎不见核孔的双层核被膜。在浓缩的细胞核前端，盖着帽形囊状顶体。顶体后缘的后方，称为头部顶体后区

(图 3-11)。

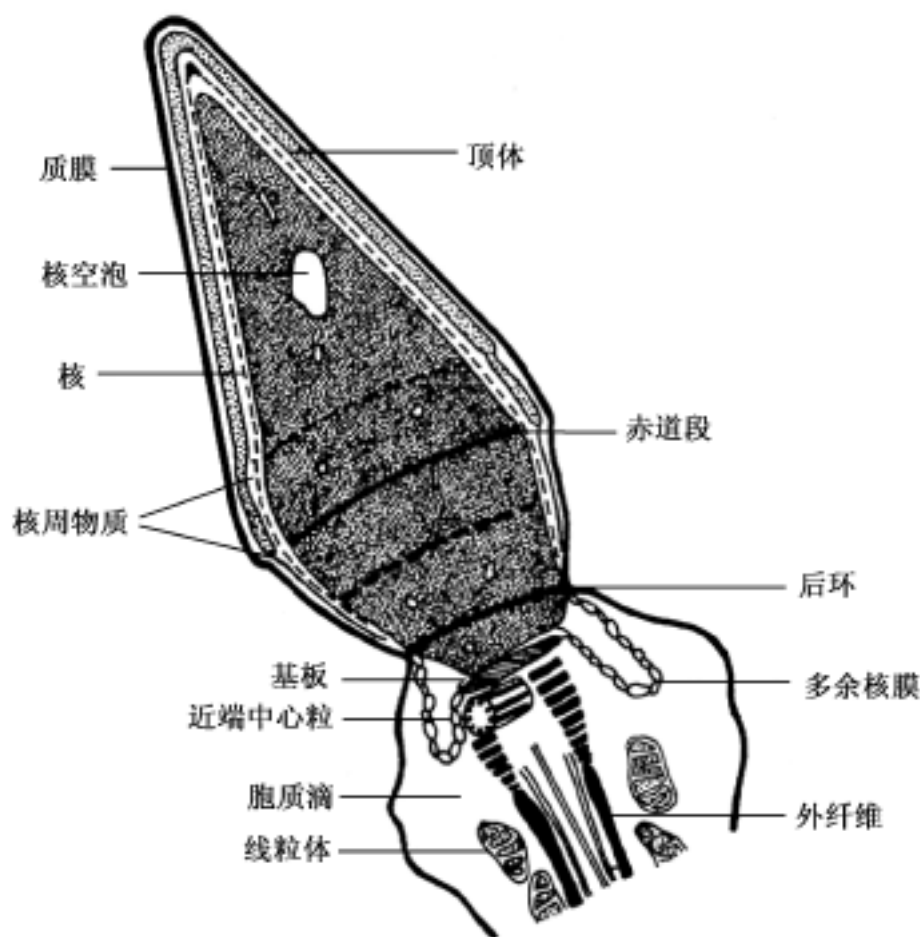


图 3-11 人精子头部的超微结构示意图
(改绘自 Bustos-Obregon E, 1975)

(1) 精子核

精子核的主要特征是其高度浓缩的核物质，由 DNA 和蛋白质组成。精子核体积远小于体细胞的细胞核，一般情况下核的形状与头部的形状一致。核的染色均匀，但在人和猩猩的精子核中出现一些空泡。核是父本遗传物质的携带者，含有单倍体的常染色体及一个性染色体（X 或 Y）。

(2) 顶体

顶体为一层单位膜包裹的囊凹状结构，靠近核膜的单位膜称为顶体内膜，靠近细胞质膜一侧的单位膜叫顶体外膜，顶体内、外膜平行排列，并在顶体后缘彼此相连。顶体腔中具有不定形基质，其中含有透明质酸酶（hyaluronidase）、神经氨酸酶（neuraminidase）、酸性磷酸酶（acid phosphatase）、 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶（ β -N-acetylglucosaminidase）、芳基硫酸酯酶（arylsulfatase）和顶体蛋白（acrosin）等水解酶类。当受精时，精子发生顶体反应，质膜和顶体外膜发生融合，形成囊泡，从而使顶体内酶类释放出来，有利于精子通过卵外的各层结构。

顶体后部的狭窄区，称为赤道段（equatorial segment）。受精时，赤道段基本完整无损，而顶体的其他部位，均在顶体反应中丢失。顶体后区的质膜，是受精时精子首先与卵表面接触和发生融合的位置，所以该部位在功能上非常重要。顶体尾侧细胞质浓缩，特化为一薄层环状致密带，紧贴在细胞质膜的内表面，称为顶体后环（postacrosomal ring）。顶体后环紧贴着质膜，在该环尾缘，核膜和质膜紧密相贴，形成一环状黏合

线，称为核后环 (postnuclear ring)。核后环尾侧，核膜与质膜分开，核膜向下，形成一皱褶，延伸入颈段。在核的后端，有一浅窝，称为植入窝 (implantation fossa)，恰与尾部颈段凸出的小头相嵌。

用电子显微镜观察精子头部时发现，头部质膜外有呈细丝状和颗粒状的糖萼 (glycocalyx)。糖萼较厚，尤其在顶体前缘对应处的质膜外表面最集中。凝集素 (lectin) 可特异性地与糖萼上的多糖链结合。当用外源凝集素处理精子后，便可阻止受精，说明受精时特异性识别卵母细胞，与糖萼的糖链直接相关。

顶体和细胞核决定了精子头部的形状。不同动物的精子，头部形态差异很大。例如，猪、羊、牛精子头部为扁卵圆形，马的精子头部为完整的椭圆形。人和狗的精子头部为梨状，小鼠精子头部为镰刀状。

2. 尾部

尾部颈段最短，通常为圆柱形，起于近端中心粒 (proximal centriole)，止于远端中心粒 (distal centriole)，又称为连接段 (connecting piece)。近端中心粒固着于核底部的浅窝中，为短圆筒形，与精子尾部的长轴呈微斜或垂直，在精子的纵切面中，常呈椭圆或圆形。远端中心粒变为基体 (basal body)，由它产生精子尾部的轴丝。颈段的外面由漏斗状结构包着，漏斗状的扩大部分固着于核的尾端，而另一端则与精子尾部的中段相连。这种漏斗状结构的壁由 9 条粗的纵行纤维组成，它们紧包着中央的腔。这 9 条纤维由致密的和浅色的带间隔组成，以致有横的条纹结构，它向后与尾部中段轴丝外面的纤维带相连。

尾部中段有螺旋状排列的线粒体鞘包绕于外周 (图 3-12)，内有外周致密纤维 (outer dense fiber)，中央为二联体微管组成的轴丝复合体 (axonemal complex)。线粒体鞘自中段起始端环绕轴丝，终止在终环上。不同动物的线粒体鞘，旋绕次数有所不同，牛 70~100 次、灵长目 15 次、啮齿动物可多达 300 次。线粒体是细胞产能细胞器，是精子运动的能量供应者，它们提供的 ATP 可使精子通过生殖管道，运行到输卵管的上方 1/3 处。

轴丝是由两根中心单微管及其周围的 9 组二联微管组成。二联微管由两个亚单位组成，内侧是一个完全的微管，其横切面呈圆形，管壁由 13 根原丝 (protofilament) 组成；另一个亚单位是一个不完全的管，横切面呈 C 形。C 形的开口处连接在圆形的壁上，其管壁仅由 11 根原丝组成，即有 3 根原丝是与圆形管共有的。每个二联微管均有臂样结构与邻近的二联管微管相连 (图 3-12)。原丝由微管蛋白 (tubulin) 组装而成，而臂状结构成分为动力蛋白 (dynein)，具有 ATP 酶活性，可将化学能转换为机械能。导致鞭毛运动的机理尚待探索，现在已知是相邻微管滑动的结果，与肌纤维收缩时肌丝间相互滑动的机理相似。在整个动物界的鞭毛和纤毛中，微管的排列非常相似。轴丝的外周被一圈 9 条外周致密纤维所围绕，每一根致密纤维与其相对的轴丝二联微管平行。在尾部的前半部，纤维是粗大的 (图 3-10)。以后，纤维逐渐变细直到终止区。在哺乳动物的各个物种间，这种致密纤维的长度和粗细有差异。在一些物种中，纤维很粗且伸展接近尾部的全长；而在另一些物种中，纤维则比较细，且仅终止于主段的近端。致密纤维的功能是增强尾部的硬度，其组成和功能机理尚未完全清楚。中段的周边则被一层

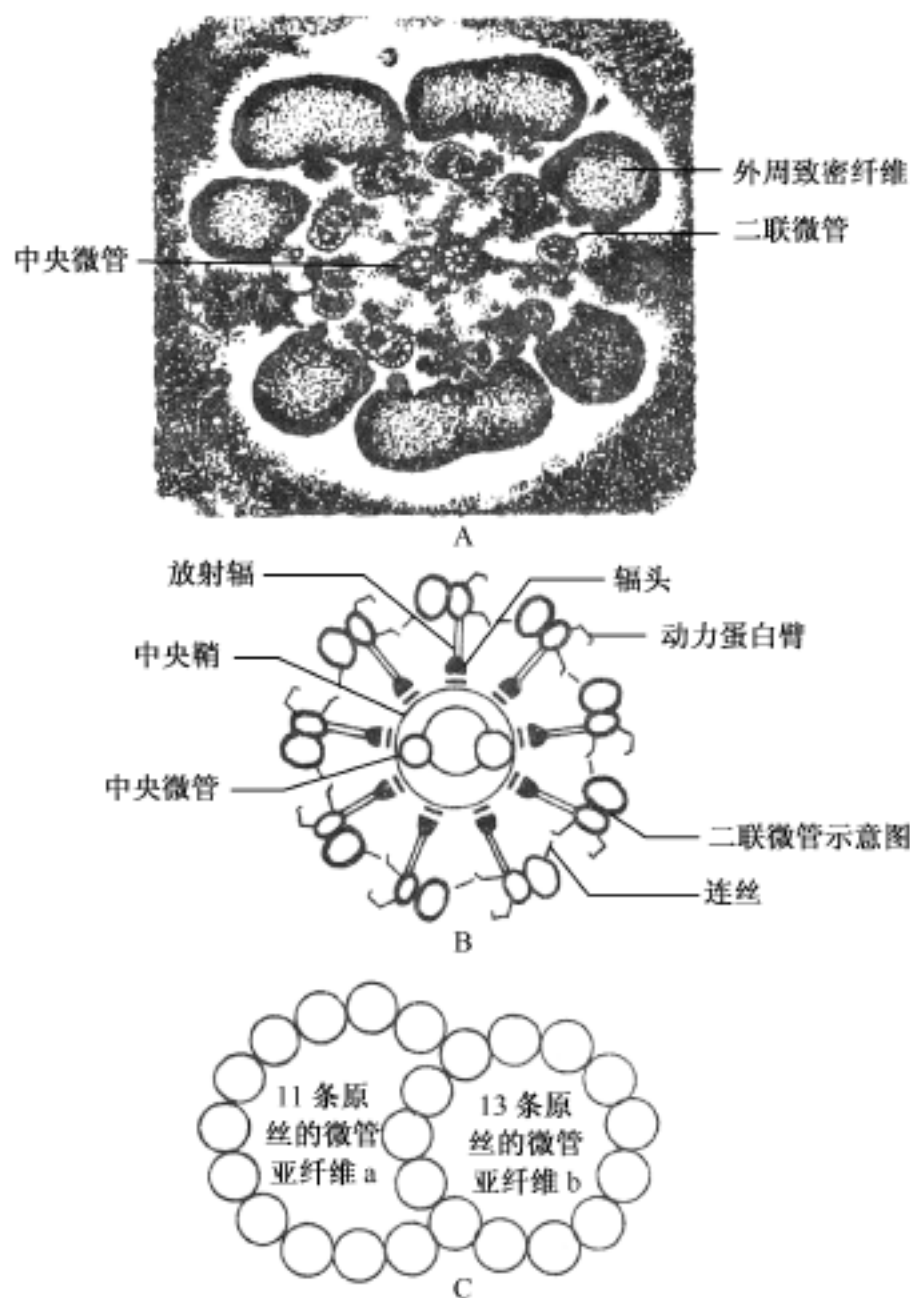


图 3-12 精子尾内部结构示意图 (改绘自秦鹏春, 2001)

A. 尾部横切面电镜图像; B. 中央轴丝的 9 + 2 结构; C. 二联微管的原丝结构

质膜所包绕，终环是由局部质膜反折特化而成，它是中段终止的界限，其功能在于当精子前进时，防止线粒体鞘向尾部移动。

尾部主段是精子尾部的主要部分，其中轴由纵行的轴丝构成。轴丝也是 9 + 2 的微管结构。轴丝的外方包绕一圈 9 条外周致密纤维，再外方则由纤维鞘 (fibrous sheath) 包裹，鞘由 2 条纵行的纤维柱和一系列半圆形的肋柱 (rib column) 组成。这种结构与尾部运动相适应。精子尾部的运动是以背腹轴为对称平面做垂直于此平面的左右摆动。主段的最外方也包有连续的质膜。纤维柱和肋柱随着向尾部末端延伸变得纤细，最终消失在主段的末端。

尾部末端较短，结构比较简单，仅由中央 9 + 2 结构的轴丝和其外周的质膜构成。轴丝在末端的终止方式，因动物不同而略有差异。在有的物种中，9 组二联微管，分别终止于末端的不同平面，有些动物，中央的两条微管先消失。而在灵长类中，9 组二联微管，先分散为 18 条游离微管，然后分别终止于末端。糖萼和刀豆球蛋白 A 受体在尾部的质膜表面也有少量分布。此外，在哺乳动物精子的表面，有血型抗原，包括 A 型

抗原与 B 型抗原。如果这些抗原被血型抗体结合，精子将失去活力。在小鼠精子表面存在的组织相容性抗原，称为 H-2 抗原，人精子表面的这种抗原，称为 HLA 抗原。

五、生精细胞的分离

性成熟的哺乳动物睾丸含有体细胞和不同发育阶段的生精细胞。睾丸细胞组成的复杂性为许多研究带来了不便。为了达到某些研究目的，需要分离纯化各期生精细胞。以下介绍分离小鼠各期生精细胞的方法。

(一) 不同鼠龄睾丸中的细胞组成

从成熟小鼠的睾丸分离的细胞种类是有限的，主要为粗线期的精母细胞、精子细胞

表 3-1 各期生精细胞在不同龄小鼠生精上皮中所占比例

细胞类型	出生后天数								
	6	8	10	12	14	16	18	20	84
原始 A 型精原细胞	16	-	-	-	-	-	-	-	-
A 型精原细胞	-	17	7	7	6	9	3	4	1
B 型精原细胞	-	10	11	8	6	8	7	6	3
前细线期精母细胞	-	-	15	11	9	5	10	7	2
细线期精母细胞	-	-	15	12	13	5	5	9	2
偶线期精母细胞	-	-	-	23	14	7	8	8	2
粗线期精母细胞	-	-	-	-	15	27	36	33	15
次级精母细胞	-	-	-	-	-	-	1	1	1
精子细胞 (1~8 期)	-	-	-	-	-	-	1	4	31
精子细胞 (12~16 期)	-	-	-	-	-	-	-	-	40
支持细胞	84	73	52	39	37	39	29	28	3

及残体。处于发育早期阶段的生精细胞含量较少，难以用重力沉降法分离获得。然而，在幼年小鼠的睾丸中，主要为分化早期的各级生精细胞及支持细胞。出生后，生精细胞的体积迅速减小，原始 A 型精原细胞的直径为 14~12μm，而形成 B 型精原细胞时直径为 8~10μm。不同鼠龄睾丸中的主要细胞组分不同（见表 3-1），选择不同鼠龄的睾丸，有利于分离不同发育阶段的生精细胞。利用这种方法可以成功地从 6 天小鼠中分离原始 A 型精原细胞；从 8 日龄的小鼠中分离出 A 型和 B 型精原细胞；从 17 日龄的小鼠中分离出前细线期 偶线期和粗线期的精母细胞。从青春前期小鼠分离出的生精细胞，结合从成熟小鼠分离出的细胞就可以获得一个完整系列的不同发育阶段的生精细胞。

(二) 生精细胞的分离

1. 单细胞悬液的制备

取所需日龄及数量的雄性小鼠，无菌操作取睾丸，置于 PBS 溶液中，去除包膜及

血管，分离曲细精管，置于离心管中，PBS 洗涤数次。加 5 ml 含 0.5 mg/ml 胶原酶的 PBS，33℃温育 15 min，其间不断震荡并用吸管吹吸数次。静置 4~5 min，待组织和细胞沉降管底后，弃上清。管中加入 5 ml 含 0.5 mg/ml 胰蛋白酶和 1.0 μg/ml DNase I 的 PBS，33℃温育 15 min，吸管轻轻吹打 3 min 直至分散为单个细胞。1 000 r/min 离心 10 min，弃上清，并用 PBS 清洗两次。将细胞沉淀重悬在含 0.5% BSA 的 PBS 中，100 目筛网过滤，制成单细胞悬液并进行细胞计数。

2. 细胞的沉降分离

固定沉降池并保持水平状态，池底下口周围加数十粒硅化玻璃珠。10 ml PBS 及 10 ml 待分离的单细胞悬液按先后从底部下口载入沉降池。用 1640 培养液配制 4% 和 2% 的 BSA 溶液各 250 ml，分别倒入梯度发生器的两个容器中。梯度发生器出液口直接用橡胶软管连接于沉降池的底部尖嘴下口。打开活塞，调整流速，使 BSA 溶液以 15 ml/min 的速度从底部进入沉降池（图 3-13）。最终沉降池内的液体从上而下形成 2%~4% 的 BSA 连续梯度。整个沉降系统 4℃静置 3h，以使细胞按不同大小在 BSA 连续梯度介质中通过自然重力沉降而分层。分层后的细胞溶液从沉降池底部出口用离心管收集，控制流速为 5 ml/min，10 ml 管作为一份。1 000 r/min 离心 10 min，沉淀细胞，细胞重悬于 0.5 ml 含 0.5% BSA 的 1640 培养液中。将各管细胞分别滴片，苏木精-伊红染色，光学显微镜下检测细胞的形态结构特征及均一程度，以确定细胞的类型及纯度。合并同类细胞，计算细胞纯度。

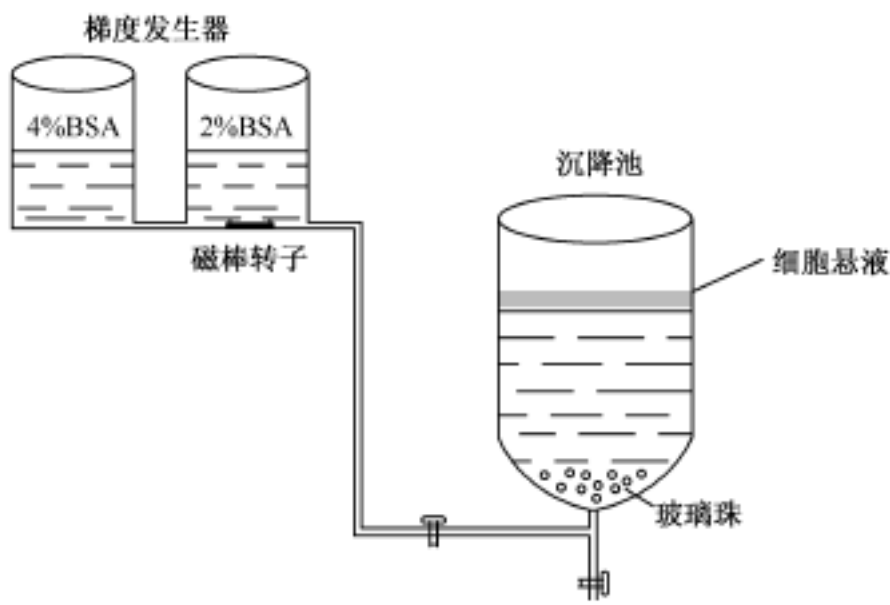


图 3-13 分离生精细胞的重力沉降装置

3. 细胞的贴壁培养及纯化

经沉降分离的生精细胞中常混有少量支持细胞及间质细胞，将此细胞悬液接种到培养瓶中，于 33℃、5% CO₂ 及饱和湿度等条件下培养 6~8 h，支持细胞和间质细胞贴壁而生精细胞不贴壁，可除去支持细胞和间质细胞。

4. 成熟精子的分离

选 12 周龄性成熟雄性小鼠，取附睾，置 PBS 溶液中，除去脂肪。将附睾剪成碎块，加 2~3 ml PBS，移入离心管，涡悬震荡 2 min，4℃静置 2 h。脂滴及体细胞沉降管底，精子悬浮于上清。小心吸取上清，显微镜下观察。管底沉降物中加 2 ml PBS，重复上述步骤一次。上清 3 500 r/min 离心 10 min，收集成熟精子。

(三) 可获得细胞的纯度、数量及特征

1. 青春期前的支持细胞

从 6 日龄小鼠的睾丸中分离，直径在 7.5~8.2 μm ，不规则，多颗粒，核仁紧靠核膜，此时还未出现典型的三分核。每个睾丸可获得的细胞数为 2×10^5 ，细胞纯度超过 99%。

2. 原始 A 型精原细胞

由 6 日龄小鼠睾丸分离。细胞呈球形，直径为 14~16 μm ，细胞核中有 2~3 个核仁。每个睾丸中细胞数为 1.4×10^5 ，分离纯度可达 90% 以上。

3. A 型精原细胞

来自 8 日龄小鼠睾丸。细胞呈球形，直径 12~14 μm ，多个核仁靠近核膜。每个睾丸可获得 1.6×10^5 个 A 型精原细胞，纯度在 91% 以上。

4. B 型精原细胞

从 8 日龄小鼠睾丸中分离。细胞呈球形，直径 8~10 μm ，异染色质靠近核膜。此组分细胞也可能包含中间型的精原细胞。每个睾丸可获得 1.5×10^5 个此阶段的细胞，纯度大于 76%。

5. 前细线期的精母细胞

选择 12 日龄的睾丸。细胞呈球形，直径为 7.6~8.2 μm ，染色质呈细线状。每个睾丸可获得 2.1×10^5 的此期细胞，纯度可大于 94%。

6. 细线期及偶线期精母细胞

选择 12 日龄睾丸。细胞呈球形，直径为 8.2~12 μm ，颗粒状外观，核质比增多，可见加粗的染色质线。可获得的细胞数为 7.3×10^5 ，纯度大于 78%，主要污染为支持细胞。

7. 粗线期精母细胞

从 18 日龄睾丸或成年鼠睾丸中分离。细胞呈球形，直径为 12~18 μm ，很狭窄的细胞质区域，细胞核较大，具有较粗的双价染色体线。每个青春期前的睾丸可获得

7.5×10^5 个细胞，每个成年鼠睾丸中可获得 4.0×10^5 个细胞，纯度大于 90%。

8. 精子细胞 (1~8 期)

取自成熟睾丸。细胞呈球形，直径为 $8 \sim 10 \mu\text{m}$ ，胞质透明。细胞核较小，含同源染色质，核仁位于中央，顶体在核的顶端形成，尾部在酶消化过程中丢失。每个睾丸可获得细胞数 12×10^6 ，纯度大于 94%。

9. 精子细胞 (12~16 期)

来自成年睾丸。细胞不对称，直径为 $7 \sim 8 \mu\text{m}$ ，核偏位，发生浓缩，顶体形成并从胞体伸出。所获细胞数可达每个睾丸 $25 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6$ ，纯度为 54%，主要污染成分为残体及合胞体。

10. 残体/合胞体

来自成熟睾丸。二者呈球形，周边不规则。残体无核，胞质含有小而圆的空泡状结构，数量在每个睾丸中可达 40×10^6 ，纯度大于 89%。

第二节 精子发生的调控机制

精子发生是一个特殊的细胞分化过程，在这一过程中发生了许多特殊的事件。而这些特殊的事件存在着独特的调控机制。已知精子发生过程受多种因素的调节，根据调节途径可分为外源调节因素 (extrinsic regulator) 和内源调节因素 (intrinsic regulator)。外源因素主要包括激素与旁分泌因子的调节；而内源因素是指生精细胞内基因水平的调节。

一、外源调节因素

除了激素与旁分泌因子外，外源调节因素还包括众多的环境因素，由于环境因素的多样性及复杂性，本章不详细论述。这里只介绍认识较为清楚的激素及旁分泌因子对精子发生的调控。

(一) 精子发生的激素调节

睾丸具有产生精子和分泌雄性激素——睾酮 (testosterone) 的双重功能。这些功能依赖于垂体促性腺激素 (gonadotrophin) ——卵泡刺激素 (FSH) 和黄体激素 (LH) 的刺激。经典的下丘脑-垂体-睾丸轴系的内分泌调节对精子发生的启动和维持起着重要作用 (图 3-14)。

下丘脑分泌促性腺激素释放素 (GnRH)，它可以刺激垂体分泌 FSH 和 LH。LH 可刺激睾丸中的间质细胞 (leydig cell) 分泌睾酮，调节精子的发生。FSH 通过与位于支持细胞表面的受体结合，作用于支持细胞促使其分泌雄激素结合蛋白 (androgen bind-

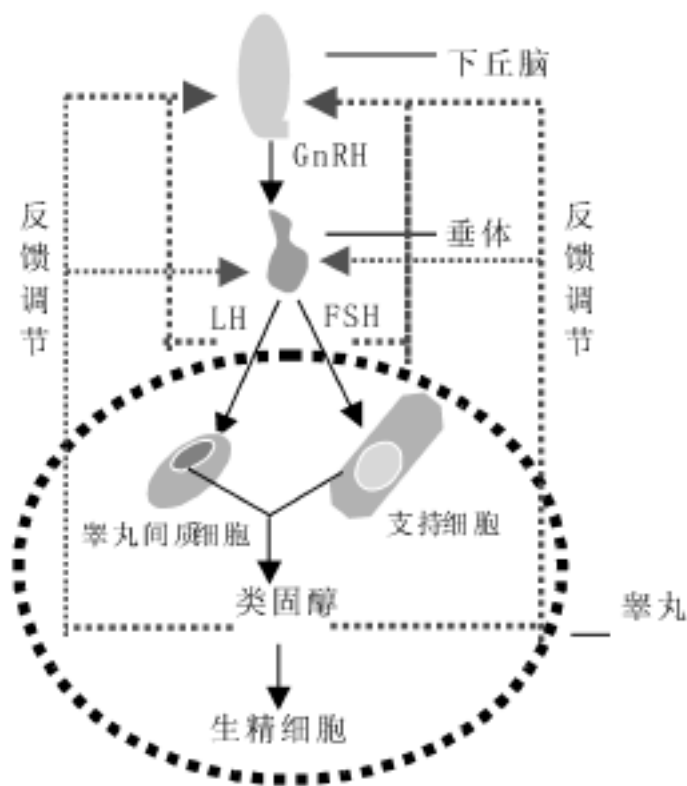


图 3-14 丘脑-垂体-睾丸内分泌作用轴

ing protein, ABP)。FSH 在未成熟的睾丸发育中起着关键作用。睾酮对 FSH 和 LH 的释放有负反馈调节。FSH 与睾酮对青春期人类精子发生的起始以及在成年期维持正常的精子发生水平起重要作用。

1. 睾酮的作用机制

间质细胞合成睾酮并分泌到睾丸间隙液（interstitial fluid）中，然后一部分被选择性地输入到睾丸曲细精管中，与支持细胞合成的 ABP 结合而影响精子发生。在正常情况下，同一个体睾丸间隙液（IF）中的睾酮含量明显高于睾丸静脉血中的睾酮水平，通常前者是后者的 2~4 倍。这可能是由于支持细胞向 IF 中大量分泌 ABP，同时 IF 中也存在着与血清中浓度相似的白蛋白，而 ABP 与白蛋白都可以结合睾酮。

睾酮是通过与其受体结合而发挥调节精子发生的功能，睾酮受体分布在间质细胞、管周细胞和支持细胞的核内，而在生殖细胞中则未检测到，表明睾酮是通过支持细胞或管周样细胞间接作用于生精细胞。临床上睾酮缺乏的患者或雄性激素受体突变的患者表现为原发性无精症。将实验动物的垂体切除、免疫中和 LH、使用抗雄激素受体或用 EDS（ethane dimethane sulfonate）破坏睾丸间质细胞后，可使睾酮作用阻断，导致 VII-VIII 期的生精细胞降解。这种降解作用可以通过使用外源睾酮或 LH 而抑制，说明睾酮并非作用于整个精子发生过程，而仅仅作用于精子发生的某一个或几个时期。

除了雄激素受体及 ABP 介导的睾酮调节精子发生外，有人认为睾酮调节精子发生还可能存在雄激素受体非依赖途径，即睾酮直接作用于生精细胞或支持细胞的表面，改变某些生化过程，如离子通道的开放等，进而影响基因的转录及蛋白质的合成。这也许部分解释为什么机体内的睾酮量远远高于饱和雄性受体所需的量，当然这些都需要进一步地研究证实。

2. FSH 的作用

正常的精子发生除依赖 LH 对间质细胞的作用外，还需要 FSH 对支持细胞的作用。FSH 受体位于支持细胞的膜上，为腺苷酸环化酶信号通路偶联受体，FSH 对支持细胞功能的调控是通过蛋白激酶 A (PKA) 系统完成的。FSH 与受体结合后，激活蛋白激酶，催化蛋白磷酸化，从而调控支持细胞的功能。FSH 可诱导支持细胞分泌多种蛋白，包括 ABP、血纤溶蛋白酶原激活因子、离子载体蛋白、转铁蛋白及一些不明功能的蛋白。研究最多的是 ABP，睾丸中 ABP 的水平与 FSH 处理时间成正比。FSH 还作用于睾丸间质细胞，影响其分裂增殖并诱导其形态和功能的分化。这方面的研究较少。

(二) 精子发生的旁分泌调节

旁分泌调节是指一种细胞所分泌的因子作用于相邻的其他细胞，从而调节细胞的生长、分化及功能，是调节精子发生的重要方式。许多因子参与了睾丸发育及精子的发生，包括多种生长因子、血管紧张素、钙调蛋白、肌动蛋白、促性腺激素结合抑制剂等。

目前已知有许多生长因子以自分泌或旁分泌的方式调节精子发生中的细胞增殖与分化，研究较多的有胰岛素样生长因子 (IGF)、转化生长因子 (TGF)、表皮生长因子 (EGF) 和神经生长因子 (NGF) 等。IGF 对睾丸的生长发育起着重要的作用，IGF-1 可以增加 LH 与睾丸间质细胞的结合能力，从而增强 LH 诱导睾酮的分泌。如果小鼠编码 IGF-1 的基因发生突变，其睾丸体积小于正常小鼠，而且精子发生仅为正常的 18%。此外 IGF-1 还具有刺激减数分裂前生精细胞 DNA 合成的作用。TGF- α 主要在睾丸间质细胞中表达，而在支持细胞及生精细胞中表达较低，TGF 在支持细胞中的过量表达可导致精子发生障碍。在大鼠睾丸中，TGF- β_1 在精母细胞及早期圆形精子细胞中表达，而在长形精子细胞中表达明显下降；在支持细胞中的表达持续整个睾丸发育过程。TGF- β_2 在精母细胞及早期圆形精子细胞中不表达，而在精子形成过程第 V~VI 期开始表达，在未成熟动物睾丸中管周细胞和支持细胞中亦有表达。TGF- β_3 在动物整个发育过程中睾丸的管周细胞和支持细胞中都表达，并且从青春期开始在支持细胞中的表达水平明显增高。TGF- β 在睾丸中有序的时空表达提示其在精子发生过程中起着重要作用。EGF 受体在正常人群支持细胞和生精细胞中弱表达，而在某些睾丸疾病的不育症病例中，EGF 受体呈强表达，提示睾丸中低水平的 EGF 作用有利于维持正常的精子发生。大鼠和小鼠的生精细胞能产生 NGF，NGF 可能与减数分裂启动 DNA 合成有关。另有证据表明，生精细胞产生的 NGF 可调节支持细胞中 ABP mRNA 水平。

除了生长因子外，还有一些重要的旁分泌调节因子。抑制素 (inhibin) 是支持细胞在 FSH 刺激下所产生并分泌的，具有 α 和 β 两个亚基，可抑制精原细胞和早期精母细胞的 DNA 合成。抑制素 β 亚基的同源二聚体则为激活素 (activin)。在未成熟动物生精细胞与支持细胞的共培养实验中，加入激活素能增加精原细胞 DNA 的合成和细胞增生。在大鼠和人的生精小管中有白细胞介素-1 (IL-1)，并且随精子发生的周期性变化而变化，表明可能参与精子发生的调节。维生素 A (V_A) 在精子发生中起着重要作

用，在大鼠中 V_A 的缺乏直接导致精子发生停止。支持细胞中有 V_A 结合蛋白可以聚集 V_A 发挥其生理作用。

二、精子发生的基因表达调控

从分子水平看，精子发生和成熟分化过程是一系列特定基因程序性表达的过程，在精子发生的不同阶段有不同的调节因子调控一些基因按一定的时空顺序进行表达。一个细胞中约存在15 000~20 000个不同的转录本，但在生殖细胞中表达的基因仅有一小部分被证实和报道。精子发生过程中有许多睾丸特异性的基因表达，以产生新的酶类或其他蛋白分子，从而调控精子发生。其中有些基因编码对生精细胞的特异结构或功能起重要作用的蛋白；有些基因的表达呈现发育阶段特异性；有些仅在生精细胞转录和表达。有这些特征的基因被统称为“沙文基因”(Chauvinist gene)，就是因为它们对睾丸组织有特异表达和特殊功能。对精子发生阶段特异性基因表达的研究，以前大多采用RT-PCR及原位杂交等方法，后来采用差减杂交技术，但烦琐且耗时。20世纪90年代建立了DDRT-PCR技术，灵敏度高，所需RNA少，方法简单，但假阳性率较高。现在基因芯片技术的推广及基因敲除技术的应用，为精子发生特异基因的寻找及相关功能的研究提供了更好的方法，而且取得了许多进展。

“沙文基因”大致可以分为三类：①同源基因：仅在生精细胞中表达，但在体细胞中有其同源性的基因及同源性的蛋白表达。它们通常是某些基因家族的成员，比如组蛋白H1t、热休克蛋白HSP70-2和乳酸脱氢酶C等。②特异基因：在生精细胞中表达特异蛋白，体细胞中没有同源物，但也有一部分在体细胞中存在同源结构域或同源序列，如联会复合体蛋白SCP1、过渡蛋白TSP1及TSP2、鱼精蛋白P1及P2。③表达特异转录本的基因：它们在生精细胞中表达的转录本与该基因在体细胞中表达的转录本不同，主要通过选择性的转录起始位点、不同的多聚腺苷酸的聚合信号或位点以及选择性剪切产生不同的外显子等多种方式产生。比如睾丸特异的血管紧张素转换酶、己糖激酶1、囊肿性纤维化跨膜调节子等。这些睾丸中特异表达的基因主要通过调控生精细胞DNA的合成、染色体的变化、基因的转录、转录后的加工、mRNA的翻译以及蛋白的活性及稳定性等诸多方面来调控精子发生。

(一) 精原干细胞和精原细胞增殖分化的基因调控

干细胞因子(SCF)是一种水溶性的膜结合蛋白，kit为一种原癌基因，其表达产物是细胞膜上酪氨酸蛋白激酶(TPK)受体。SCF与生殖细胞表面kit受体相互作用，调控着一系列的信号通路。在胎儿发育期它诱导原始生殖细胞发育，雄性胎儿出生后，它刺激诱导原始生殖细胞开始向尚未分化的性腺转移，同时刺激原始生殖细胞的扩增。有人认为kit基因是精子发生过程中从精原干细胞向精原细胞分化的启动子。当原始生殖细胞转移完成及性腺分化成睾丸后，原始生殖细胞被支持细胞前体包围，封闭在生殖小管中，此小管的微环境暂时阻止生殖细胞进入减数分裂。此阶段支持细胞的有丝分裂活性下降甚至完全停止。支持细胞的数量是睾丸生精小管的长度以及最终产生成熟精子

的数量的限制因子。因此，在同一空间里，支持细胞有丝分裂的停止必然会导致精原细胞对有丝分裂信号的更加敏感及精原细胞有丝分裂能力的提高。一旦精子发生启动，精原细胞的有丝分裂活性就被定时激活。最近研究表明，支持细胞分泌的一种神经胶质源的神经营养因子（glial-derived neurotrophic factor, GDNF）在精原细胞的分化扩增过程中起重要作用。另外，SCF 在精原细胞的分化扩增过程中也起重要作用。

（二）精子发生过程中染色体动力学的基因调控

精母细胞在发生减数分裂前有一段相对较长的时期，约 10~12 天，而且主要是停留在粗线期精母细胞阶段。同源染色体的配对（联会）主要发生在细线期和偶线期初级精母细胞阶段，男性不育患者的睾丸活检常常发现精子发生停滞在初级精母细胞阶段，所以研究发生在此阶段的染色体动力学变化及其相关基因的表达显得更有意义。近年来从多种细胞类型中发现了许多参与细胞分裂染色体动力学变化及 DNA 错配修复的蛋白及其表达基因，其中不少还参与了生殖细胞的减数分裂。如 DNA 错配修复蛋白 MLH1 与减数分裂前的同源染色体联会复合体的形成有关，MLH1 对于雄性和雌性动物的正常生育是必需的，而且在体细胞中有助于维持基因组的稳定性。MSH4 和 MSH5 是两个已被证实的生精细胞特异表达的 DNA 错配修复蛋白，参与减数分裂同源染色体联会。在小鼠中这两个基因的失活会导致精母细胞停滞在粗线期，引起雄性不育。联会复合体蛋白 SCP3 也是一个睾丸特异表达的蛋白，是联会复合体的结构成分之一。SCP3 敲除的雄性小鼠表现为减数分裂前期生精细胞的大量凋亡及小鼠不育，而雌性 SCP3 敲除小鼠表现为可育，这显示出同样是处于减数分裂前期的初级精母细胞和初级卵母细胞的差异，造成此差异的原因可能与初级精母细胞阶段相对较长而初级卵母细胞阶段很短有关。

在精子形成过程中，细胞核延长并浓缩，精子细胞的浓缩核包含紧密的 DNA 以及核蛋白。减数分裂前的核蛋白是体细胞型的核组蛋白，减数分裂之后它先后被过渡蛋白及鱼精蛋白替换而形成精子细胞特异的核蛋白。人类生殖细胞中的这种核蛋白替换不像大鼠及小鼠一样完全，人精子中的染色体包装表现出明显的个体间差异及精子间差异，并且在 DNA-鱼精蛋白复合体中存在数量不等的组蛋白。人精子中存在的组蛋白可能发挥着一定的功能，如对原核中单倍体基因组的重新激活有一定作用等。但是也有可能组蛋白在精子中的存在和数量是低质量精子的一项指标，它或许引起染色质包装疏散，导致精子中基因组的不稳定。

（三）精子发生中某些基因表达的开关调控

初级精母细胞中 X 和 Y 染色体的配对仅限于这两条性染色体上的假常染色体区，这两条性染色体在减数分裂前的大部分时期属于异染色质，形成所谓的“性体（sex body）”。在初级精母细胞中，X 和 Y 染色体之间有大量非配对区，“性体”的形成可能有利于掩饰性染色体的不完全配对，阻止向调控系统发送“联会不完整”的信号。“性体”最早在粗线期早期出现，并表现为性染色体上基因转录失活。与之明显不同，卵巢

中的两条 X 染色体在减数分裂前期均具有转录活性。“性体”中 X 和 Y 染色体的基因转录失活可能对维持正常的精子发生是必要的，也许 X 染色体上某些基因的表达不利于精子发生的顺利进行。减数分裂完成以后，在单倍体圆形精子细胞中 X 和 Y 染色体上的基因转录活性恢复。单倍体精子细胞中基因表达产物在细胞间通过细胞质间桥运输可以使得单倍体细胞具有双倍体细胞的功能。

在体细胞中，X 染色体上的基因 *pgk1* 表达磷酸甘油激酶 PGK1，它在细胞糖酵解过程中起重要作用。但是在初级精母细胞中，随着“性体”的形成和性染色体基因转录活性的抑制，使基因 *pgk1* 沉默。作为功能性的代偿性反应，常染色体上的 *pgk2* 基因得以表达，产生 PGK1 的异构体 PGK2。*pgk2* 基因是一个没有内含子的睾丸特异基因，这属于一种基因功能上的退化。它可能源自 *pgk1* 的成熟 mRNA，在进化过程中通过逆转录病毒被插入到另外一条染色体的 DNA 序列中而形成。通常情况下这种没有内含子的基因退化表现为基因突变和功能丧失。但 *pgk2* 却成了雄性生殖细胞中能量供应的至关重要的一个基因。*pgk2* 的表达与减数分裂同步发生，并在后期精母细胞和减数分裂后的精子细胞中增加。精子细胞和精母细胞中的丙酮酸脱氢酶 E1 的 α 亚基也由一个常染色体基因 *pdha2* 编码，而它在体细胞中是由 X 染色体上基因所编码。类似的例子还有不少。但必须指出的是，X 染色体的基因转录失活并非是启动精子发生中那些无内含子的退化基因开始表达的唯一原因，常染色体之间的反转录转座也对此有开关作用。

另外，生精细胞中也有一些常染色体基因沉默，需要一些生精细胞特异基因的表达来补偿这些沉默基因的功能。比如生精细胞特异的 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDs)、乳酸脱氢酶 (LDH) C4 以及细胞色素 C_T 等。小鼠的 GAPD 基因表达于圆形精子细胞和正在凝集的精子细胞中，而不表达于粗线期精母细胞，提示该基因在减数分裂后表达，在减数分裂后的精子细胞中发挥重要功能，表明生精细胞会表达一些能够最适应精子特殊功能的蛋白异构体。磷酸甘油激酶 PGK、3-磷酸甘油醛脱氢酶 GAPDH、乳酸脱氢酶 LDH、丙酮酸脱氢酶 PDH 以及细胞色素 C 都参与各种体细胞中普遍存在的产能过程，而精子则可能需要这些蛋白的异构体来组装一个可以执行特殊功能的复合体。

(四) 精子发生中基因转录的调控

基因转录是由染色体结构和转录因子所决定。通过一些转基因小鼠模型已经证实，基因的启动子区 (约 300bp) 有效地调节报告基因在生精过程中准确地阶段性表达。比如 *pgk2* 的启动子序列调节该基因在精母细胞和精子细胞中表达；基因 *sp10* 的启动子序列指导该基因在减数分裂完成后的圆形精子细胞中快速表达一种顶体蛋白。还有一些生精细胞特异基因可能通过特殊转录因子的合成来调节其表达，原癌基因 *myb* 家族编码一组 DNA 结合核蛋白，它们作为转录因子控制细胞的生长和分化。A-*myb* 在出生后 10 天小鼠睾丸中表达增加，此时正是初级精母细胞出现的时间。在成年小鼠睾丸中，A-*myb* 在精原细胞和精母细胞的表达水平较高，B-*myb* 在胎儿睾丸生殖母细胞以及早期生精细胞中表达水平较高，在减数分裂细胞中表达下降。这些结果表明，B-*myb* 基因在生精细胞早期增殖中可能起了重要作用，而 A-*myb* 对于减数分裂前期 (初级精母细胞) 的发育很重要。A-*myb* 缺陷的雄鼠精子发生停滞在粗线期精母细胞。另外 c-*myc*、

c-fos、c-jun 等原癌基因也编码转录因子，可能参与了原始生殖细胞的分化和减数分裂的调控。还有一批编码转录因子的基因仅在精子发生过程中表达，如 Hox - 1.4 及 Esx-1 基因。这类基因的按时定量表达可能需要更为复杂的调控机制，包括基因增强子/启动子区、DNA 甲基化、转录因子的表达以及染色体结构的变化等多方面的因素。

(五) 前体 mRNA 剪切及翻译水平的调控

在浓缩的精子细胞核中组蛋白被鱼精蛋白的替换以及染色质的紧密状态使得精子基因组完全失活，但是此阶段也还需要合成一些蛋白，主要是通过特殊的调控机制，使某些 mRNA 在较长时间内保持稳定和活性，从而合成一些必需蛋白。鱼精蛋白基因就是如此，其翻译远落后于转录。未翻译的 mRNA 序列及 RNA 结合蛋白保证了该基因在转录完成若干天后才开始翻译。这种翻译调控机制已经在转基因小鼠模型中得以证实。在缺乏这一翻译调控的转基因小鼠中，鱼精蛋白提前合成并引起细胞核提前浓缩从而导致精子细胞的发育停滞。翻译水平的调控机制也需要特异的 RNA 结合蛋白的作用来启动翻译活性。基因 Tarbp2 编码的蛋白 Prbp 就参与了翻译激活。Tarbp2 基因的破坏会导致鱼精蛋白 mRNA 无法完成翻译。所以，基因 Tarbp2 缺陷的小鼠表现为鱼精蛋白替换过渡蛋白的延迟以及精子细胞后期发育的失败。需要指出的是，RNA 结合蛋白在精子发生早期精原细胞和精母细胞阶段也起重要作用。人 Y 染色体上基因 RBM 缺失可引起男性不育就足以证明这一点。该基因就编码一种 RNA 结合蛋白，在精母细胞中 RBM 蛋白很可能参与睾丸特异的 mRNA 前体剪切的调控。人 Y 染色体上的基因 DAZ 也编码一个 RNA 结合蛋白，它对于男性正常生育是必需的。小鼠基因组中缺乏这一 Y 染色体 DAZ 基因，但在人和小鼠的常染色体上都有一个 DAZ 同源基因，它在小鼠中被称为 Dazl α 基因。将小鼠的这一基因突变后，可使雄性和雌性小鼠的配子发生完全停止。这表明 RNA 结合蛋白的功能多样性，除了在精子发生后期 mRNA 的剪切加工、运输、稳定性及翻译等方面起作用外，还在雄性和雌性配子发生的减数分裂前期起重要作用。

(六) 精子发生中蛋白活性和稳定性的基因调控

在生殖细胞中，蛋白的遍在化作用是一个调节蛋白修饰和降解的重要机制。遍在蛋白质（也叫泛素）是一个仅由 76 个氨基酸组成的小蛋白，虽然小却有着极其重要的功能，在所有细胞类型中都存在，并且在细胞的多种基础代谢过程中都起关键作用。它与细胞底物共价耦联，通过复杂的酶催化途径使底物蛋白降解，把这一过程称为遍在化作用。人有一个 Y 染色体基因 USP9Y（也叫 DFFRY），它编码一个酶蛋白，可以催化泛素化作用。这个基因发生突变会使部分精子发生停滞在精母细胞阶段，而使完成减数分裂的精子细胞很少。在酵母，基因 RAD6 编码一个泛素相关的酶（E2），该基因突变后可有多种表型，包括孢子形成减弱。在哺乳动物中，基因 RAD6 的两个高度保守的同源序列已经被鉴定，包括 X 染色体的 HR6A 基因和常染色体的 HR6B 基因。这两个基因在所有细胞类型中都存在，推测它们在配子形成中起重要作用。在 HR6A 基因敲除的小鼠和 HR6B 基因敲除的小鼠中，体细胞和组织都没有什么明显的表型改变，可能是因

为二者编码的蛋白同源性高 (96% 氨基酸序列同源), 产生功能上的互相补偿。有趣的是, 这两个基因同时敲除的小鼠中, 胚胎在早期就死亡。HR6A 基因敲除的小鼠表现为母体不育 (胚胎发育停止在 2 细胞阶段), 雄性保持生育能力; 相反, HR6B 基因敲除的小鼠主要表现是精子发生减弱及有限的雄性不育。减数分裂及减数分裂后的精子细胞发育都受到影响, 似乎主要是影响了单倍体精子细胞的核浓缩。RAD6 依赖的蛋白遍在化作用的靶蛋白包括组蛋白 H2A 和 H2B, 可能还有其他染色体蛋白。HR6B 依赖的蛋白遍在化作用的靶蛋白可能包括精子发生早期调控基因表达和染色体动力学的蛋白。另外在哺乳动物精子发生中, HR6B 的泛素相关活性可能在精子细胞中鱼精蛋白替换组蛋白的过程中起重要作用。

三、精子发生相关基因

(一) 转录因子基因

目前认为, 生精细胞中同时存在基本转录因子及生精细胞特异性调节因子, 且这两类因子处于一种平衡状态。当精母细胞完成减数分裂进入精子变态期后, 许多必要的减数分裂后基因活化, 这时就需要大量的转录因子生成。如 TATA-结合蛋白 (TATA-binding protein, TBP)、转录因子 2B (transcription factor 2B, TF2B) 在早期圆形精子细胞中的含量远远大于其他任何细胞。生精细胞中, 除了这类基本转录因子的不寻常表达外, 更重要的是存在许多睾丸特异性的转录因子或一些基本转录因子的特异转录本形式。正因为如此, 生精细胞才表现出其他细胞所没有的特性, 发生减数分裂、核蛋白转型、核浓缩、精子变态成形等特殊现象。

1. 3',5' 环腺苷酸 (cAMP)

cAMP 在精子发生的多个阶段均发挥重要作用, 尤其对减数分裂后基因 (如鱼精蛋白基因 Prm 和转型蛋白基因 Tnp) 的活化是必不可少的。许多减数分裂后基因序列中包含 cAMP 应答元件 (cAMP response element, CRE), 接受 cAMP 的调控。在体细胞中, CRE 结合蛋白 (CRE binding protein, CREB) 与相应基因上的 CRE 结合, 被蛋白激酶 A 磷酸化后又激活 CREB 结合蛋白 (CREB binding protein, CBP), 后者具有组蛋白乙酰转移酶活性, 可加速包括转录因子在内的许多靶蛋白活化, 最终作用于靶基因, 调节其转录活性。然而, CREB 在睾丸组织内表达甚微, 而其家族中的另一成员——CRE 调节因子 (cAMP response element modulator, CREM) 则高水平表达, 其 mRNA 在粗线期精母细胞中就已经存在, 但一直到减数分裂后, 其转录产物才通过选择性剪接方式产生睾丸特异性的转录本, 翻译为具有亮氨酸拉链模序的 CREM- τ 蛋白。当 CREM 缺失时, 小鼠的精子变态成形被阻断在早期, 许多减数分裂后基因不能表达。TBP 作为 TATA 盒结合蛋白, 是 RNA 聚合酶 II 起始转录的基本因子, 然而有很多基因缺乏明显的 TATA 元件, 其转录则依赖 TBP 类因子。TBP 相关因子 2 (TBP-related factor 2, Trf2) 即为哺乳类睾丸组织高度表达的一个 TBP 类因子。当 Trf2 突变时, 精原细胞和精母细胞的发育正常, 而圆形精子细胞的发育则被阻断在变形晚期, 而且细胞

凋亡严重。在晚期圆形精子细胞阶段, Trf2 对某些精子变态成形相关基因的转录有调控作用。RNA 聚合酶 II 的功能除需要 TBP 外, 还要有转录因子 II (transcription factor 2A, TFIIA)、TFIIB、TBP 相关蛋白 (TBP-associated protein, TAF_{II}) 等一系列转录因子的存在。近年发现睾丸组织中存在特异形式的 TFIIA 和 TAF_{II} 转录本。TFIIA τ 是一种睾丸特异形式的 TFIIA 亚单位, 在精子变态成形中有特异作用。睾丸特异形式的 TAF_{II} 存在于果蝇中, 已有证据显示其对果蝇的精子发生是必要的。TAF_{IIQ} 则是哺乳类动物睾丸特异表达的 TAF_{II}, 但功能目前还不明确。

上述几个转录因子在生精细胞内的高水平表达预示着它们对精子发生尤其是精子变态相关基因的转录有重要的调节作用。在精子发生后期, 与靶基因 CRE 结合的 CREM 可以被生精细胞特异表达的一种 LIM-only 蛋白 (ACT) 辅因子激活, 与 TFIIA τ 、TAF_{IIQ} 等特异性的转录因子结合, 在 TFIIA τ 的作用下, Trf2 和靶基因上相关区域的结合趋于稳定, 并形成复合物, 又在 TAF_{IIQ} 等众多转录因子的作用下, RNA 聚合酶 II 掺入, 构成有效的转录起始复合物, 特异地起始基因转录。与经典的 CREB 途径不同, CREM 不发生磷酸化, 不通过 CBP 发挥作用。另外, 在生精细胞中, 同时存在 TBP 和 Trf2, 分别调控具有 TATA 盒和无明显 TATA 结构的基因转录。

2. 睾丸-脑 RNA 结合蛋白 (testis brain RNA-binding protein, TB-RBP/ translin)

TB-RBP 在睾丸及脑组织中可以特异地与靶基因 mRNA 结合, 如 Prm1、Prm2、激酶 A 锚定蛋白 4 (A-kinase anchoring protein 4, Akap4) 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-S, Gapds) 等。TB-RBP 通过与特异 mRNA 非翻译区保守元件结合, 增加 mRNA 的稳定性, 参与核浆转运和转录后调节尤其是翻译抑制。大多数靶基因的 mRNA 在其 3' 非翻译区有 TB-RBP 的保守结合序列, 如 Prm2 和 Akap4。AKAP4 是精子纤维鞘的重要组成部分, 可以定向引导蛋白激酶 A 到磷酸化靶位点, 参与由 cAMP 介导的信号转导途径, 调节精子活力。该基因只在减数分裂后的单倍体精子细胞中表达, 如果缺乏会造成精子活力下降而不育。Akap4 与 TB-RBP 及 Ter ATP 酶在核内共同形成 mRNA-TB-RBP-Ter ATP 酶复合物, 并通过核孔进入胞浆, 穿过精子细胞之间的细胞间桥到达纤维鞘, 只有这个复合物解聚后, Akap4 的 mRNA 才能被翻译。Prm2 的 mRNA 同样可以和 TB-RBP 及 Ter ATP 酶形成类似复合物, 储存于圆形精子细胞胞浆中, 受翻译抑制调节, 直到翻译前数天才被释放游离, 翻译成为鱼精蛋白。TB-RBP 还与 Gapds 的 mRNA 构成复合物, 但结合位点却在 5' 非翻译区, 并且 Gapds 是目前被证实的唯一一个在 5' 非翻译区存在 TB-RBP 结合位点的 mRNA。当二者形成 TB-RBP-mRNA 复合物时, 翻译延迟。由此看来, TB-RBP 主要参与 Prm2、Akap4、Gapds 等减数分裂后基因的转录后调节, 对精子变态成形相关基因进行调控, 是精子发生过程必要的转录因子之一。

3. 锌指 (zinc finger, ZF)

ZF 基因家族编码具有锌指模序的转录因子, 广泛调节生长发育相关基因的表达, 其中与精子发生有关的主要有 Zfy 和 Zfp 两类。Zfy-1 和 Zfy-2 位于 Y 染色体短臂, 从减数分裂期开始表达, 在圆形精子细胞中的含量最高。Zfy-1 蛋白是一个具有核定

位信号序列的特异性 DNA 结合蛋白，它与靶基因的一定序列结合，引导靶基因穿过核膜，定位于精子细胞核内。Zfp29 和 Zfp37 具有睾丸组织表达特异性，在圆形精子细胞中大量表达，有可能参与精子发生晚期某些相关基因的转录调节。Zfp35 从粗线期精母细胞阶段上调表达，Zfp38 仅仅在粗线期精母细胞到圆形精子细胞的发育阶段表达，并且是一个较强的转录激活因子，推测该因子可能对精子变态过程中某些基因具有转录激活作用。

4. 热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)

对精子发生起着重要的调节作用。精子发生过程中有 HSP70 - 1、HSP70 - 2、HSC70t 和 HSP86 等热休克蛋白基因的表达，HSP70 - 2、HSC70t 是生精细胞特异表达基因，其中 HSC70t 在减数分裂后表达。HSP70 - 2 基因敲除的雄性小鼠的精子发生被阻断在第一次减数分裂，导致不育，而雌性小鼠正常。免疫共沉淀和体外结合实验显示，HSP70 - 2 在小鼠睾丸中直接与周期蛋白依赖性蛋白激酶 1 (cyclin dependent kinase 1, CDK1) 作用，表明它可能作为分子伴侣参与 CDK1 和细胞周期蛋白 cyclin B1 形成 M 期促进因子 (M-phase promoting factor, MPF) 复合物。

(二) 细胞周期相关基因

细胞周期蛋白及 CDK 与有丝分裂和减数分裂密切相关，有的基因在精子发生过程中表现出阶段特异性表达，可能参与了精子发生过程的调控。就目前所知，与精子发生关系较密切的主要有 Cyclin A1、Cyclin B/ CDK1、Cyclin H/ CDK7 等。Cyclin A1 只在哺乳类动物睾丸的生精细胞中表达，并且仅仅在第一次减数分裂前的精原细胞和正处于第一次减数分裂中的精母细胞中表达，当第一次减数分裂完成后迅即消失。通过基因敲除实验发现，Cyclin A1 敲除的雄性小鼠不育，其精子发生被阻断在第一次减数分裂前，而雌性小鼠正常。进一步的研究表明，Cyclin A1 作用于第一次减数分裂的 G2/ M 转换点，Cyclin A1 与 CDK2 构成的复合物可能通过磷酸化激活 Cdc25 磷酸酶而促进 MPF 的活化，诱导 G2/ M 转换的完成，促进减数分裂。Cyclin H 和 CDK7 在精母细胞核中大量表达，其表达特征与 Cyclin A1 相关激酶 CDK2 相似，Cyclin H 和 CDK7 蛋白在减数分裂期间存在，且二者相互作用形成 Cyclin H/ CDK7 活性复合物，推测其作用可能是激活 CDK2 的蛋白激酶活性，有助于与 Cyclin A1 形成复合物。

(三) 原癌基因

在生精细胞增殖和分化过程中有许多原癌基因的表达，包括 C-kit、c-abl、c-raf、c-mos、c-pim - 1、c-ras、c-fos、c-myc、c-jun、wnt - 1、wnt - 5B、wnt - 6 和 myb 家族等。C-kit 在精原细胞中高表达，它编码的干细胞因子受体通过酪氨酸蛋白激酶活性调控一系列的信号通路，参与精原细胞分化。C-kit 突变后，睾丸中分化的精原细胞显著减少。c-abl 蛋白激酶原癌基因主要在第一次减数分裂的初级精母细胞中表达，编码具有特异酪氨酸激酶活性的蛋白；c-mos 编码一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶，通过信号转导使 Cdc2 磷酸化，调节精原细胞的减数分裂；小鼠精子细胞中的 c-pim - 1 基因编码辜

丸特异的蛋白激酶活性蛋白。c-raf 在有丝分裂活跃的精原细胞和减数分裂前期的初级精母细胞中表达。c-myc、c-fos 和 c-jun 可能是原始生殖细胞分化的重要因子。在 c-myc 转基因鼠中, c-myc 在睾丸中的过度表达可使精子发生停滞在减数分裂期, 初级精母细胞大量凋亡, 引发不育。B 型精原细胞或初级精母细胞中有 c-fos 的表达, 它产生的 Fos 蛋白和 c-jun 编码的 Jun 蛋白形成异二聚体, 对靶基因的 AP-1 位点高度亲和, 参与减数分裂期表达基因的转录调控。myb 家族编码一组 DNA 结合核蛋白, 作为转录因子控制细胞的生长和分化。A-myb 和 B-myb 在精子发生过程中的表达是阶段特异性的, 前者对于减数分裂前期的进一步发育是必要的, 而后者在生精细胞早期增殖中可能有重要作用。

(四) 细胞凋亡相关基因

在哺乳动物的正常精子发生过程中, 存在明显的生精细胞凋亡现象, 这是清除过量或异常生殖细胞的重要途径之一。体内有许多参与细胞凋亡的调节因子, 与精子发生有关的主要有 Bcl-2 家族、Fas/ Fas 配体 (Fas ligand, FasL) 系统、 p^{53} 、SCF/ C-kit 等。Bcl-2 家族包括凋亡诱导因子 Bax、Bak、Bcl-xs、Bad 和 Bok, 以及凋亡抑制因子 Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w 和 Mcl 等。Bax、Bad、Bcl-xl、Bcl-2、Bcl-w 和 Bok 都在啮齿类的睾丸中表达, Bak 在人睾丸中表达。利用基因敲除和转基因小鼠研究发现, Bcl-2 家族在精子发生中有重要作用。Bax 过量表达可诱导细胞凋亡; Bcl-2 过量表达则抑制细胞凋亡, Bax 敲除的小鼠不能产生成熟精子, 曲细精管中有大量不正常的精原细胞累积, 最终导致不育。Bcl-2 和 Bcl-x 表达水平高的小鼠中, 精子发生不正常, 同样引起不育。Fas/ FasL 系统是调控多种细胞凋亡的途径, Fas 和 FasL 结合后被激活, 然后通过胞内肽段的“死亡结构域 (death domain)”激活相关的 Caspases 蛋白激酶级联反应, 引发细胞凋亡。睾丸生精上皮大量表达 FasL, 除定位在支持细胞外, FasL 主要在粗线期精母细胞和精子细胞中表达, Fas 也主要在精母细胞和精子细胞中表达。利用反义 RNA 技术抑制 FasL 的表达后, 生精细胞的凋亡程度显著降低, 说明 Fas/ FasL 系统是调控生精细胞凋亡的关键性因子。 p^{53} 是一个肿瘤抑制蛋白, 用转基因小鼠和原位杂交方法研究发现, p^{53} 在睾丸组织中的含量相当高。 p^{53} 敲除小鼠的精母细胞不能完成减数分裂, 并形成多核巨细胞。 p^{53} 是 Bax 基因的转录激活因子, 因此它的作用机制是通过上调 Bax 的表达来诱发生精细胞的自发性凋亡, 参与精子的质量控制, 减少有缺陷的生精细胞, 保证雄性配子的遗传稳定性。SCF 是 C-kit 受体酪氨酸蛋白激酶的相应配体, 二者结合后, C-kit 被激活, 抑制线粒体膜的去极化, 保持细胞的氧化还原状态, 从而间接抑制 p^{53} 诱导的细胞凋亡, 维持原始生殖细胞及精原细胞的生长和存活。对热压或 11 酸睾酮诱导的生精细胞凋亡的研究发现, Fas/ FasL 系统参与 11 酸睾酮诱导的生精细胞凋亡, 周期蛋白依赖激酶抑制因子 p16 通过抑制精原细胞的有丝分裂阻止精原细胞的增殖, 在热压或 11 酸睾酮诱导的生精细胞凋亡中发挥作用, 而热休克蛋白 HSP70-2 似乎不参与这一过程。TR2 和 TR3 是两个温度敏感的孤儿受体, TR2 主要在精母细胞和圆形精子细胞中表达, TR3 主要在精原细胞和初级精母细胞中表达, 二者可能在生精细胞分化和调节中发挥重要作用。

(五) 核蛋白转型相关基因

精子发生的特征之一是体细胞组蛋白逐渐被睾丸特异的生精细胞组蛋白变异体代替。在精子变态早期, 转型蛋白 (transition protein, TP) 又代替了组蛋白变异体, 然后鱼精蛋白 (protamine) 代替转型蛋白完成精子细胞核蛋白的转换。组蛋白变异体包括: H1t、H1a、TH2A、TH2B 和 TH3。睾丸特异性 H1t 只在粗线期精母细胞中转录, 其上游有一特异的 TE 元件, 供核蛋白因子识别和结合, 接受转录调控, 相应蛋白可结合于 DNA 连接区而影响染色体的结构。TH2A 和 TH2B 在减数分裂前精母细胞中占优势, 基因转录水平达最高, TH2A 和 TH2B 的表达可能与 DNA 的甲基化有关, 从而参与核小体的形成。从小鼠和大鼠圆形精子细胞中, 已得到一个精子细胞特异性组蛋白变异体 ssH2B, 其 mRNA 和编码蛋白只在圆形精子细胞中能够检测到, 具有明显的阶段特异性, 但具体的作用还不明确。TH3 和 H1a 在精原细胞中含量最高, 可能在精原细胞增殖及为减数分裂做准备的早期分化阶段中起作用。TP 编码基因 Tnp 的 mRNA 在圆形精子细胞中合成, 受翻译抑制调控, 7 天后才能在长形精子细胞中检测到相应的蛋白。在 Tnp2 突变小鼠模型中, 精子发生似乎不受影响, 可能 TP2 的重要意义在于维持 MP2 的正常形成, 而不是精子变态和核蛋白转型的直接参与者。

核蛋白转型过程中, 鱼精蛋白的翻译远落后于相应 mRNA 的转录, 这是众多因子在转录后水平上进行调控的结果。转录后调控是精子发生后期相当重要的一种翻译调控方式, 此期 mRNA 的储存和翻译激活对许多精子发生后期特异蛋白及成熟精子表面蛋白来说有着重要意义。实际上, 减数分裂结束后, 早期圆形精子细胞内会立刻出现高水平的基因转录及转录相关蛋白的成倍增加, 诸如 Prm 和 Tnp 等大量基因的 mRNA 已被合成, 但由于较长 poly (A) 尾的存在, 使其以胞浆核蛋白颗粒 (cytoplasmic ribonucleoprotein, mRNP) 的形式先储存起来, 延迟翻译。直到 poly (A) 尾被脱腺苷化变短后, 这些基因才在晚期精子细胞阶段翻译活化。早期圆形精子细胞内 Prm1 的 mRNA 3'非翻译区有一特异的翻译调控元件 TCE, 由 17 个核苷酸序列构成, 是介导 Prm1 翻译抑制的核心区域。小鼠生殖细胞特异的 Y-box 蛋白 (mouse germ cell-specific Y-box protein, MSY) 家族的 MSY2 和 MSY4 按照一定顺序与 TCE 结合, 形成 mRNP 后储存于胞浆中, 一方面保护 Prm1 免于降解, 保持其稳定性和活性, 另一方面起到翻译抑制作用。如果这种机制消失, MP 就会提前合成, 细胞核提前浓缩, 导致精子细胞发育停滞。长形精子细胞中, Prm1 的翻译激活也需要特异的 RNA 结合蛋白, Tarbp2 编码的胞浆双链 RNA 结合蛋白 Prbp (在人则为 TRBP) 可以对处于翻译抑制状态的 Prm1 mRNA 进行调控, 使翻译起始。Tarbp2 在减数分裂后期的生精细胞和圆形精子细胞中表达水平最高。Tarbp2 突变小鼠中, Prm1 和 Prm2 的 mRNA 不能正常起始翻译, 最终导致不育。Prbp 有可能作为一个分子伴侣, 在特定基因的翻译调节过程中发挥作用。

(六) 细胞骨架蛋白

细胞骨架蛋白基因在生精细胞中也阶段特异性表达。小鼠生精细胞中只发现两种胞

浆肌动蛋白： β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白。 γ -肌动蛋白 mRNA 在粗线期精母细胞和早期精子细胞中表达较高，后来下降；而 β -肌动蛋白 mRNA 水平在圆形精子细胞中高于精母细胞和残体。有人认为 β -肌动蛋白和 γ -肌动蛋白不同的表达对于细胞形态变化或线粒体从胞核周围移向胞浆膜和鞭毛轴丝起了重要作用。 α -微管蛋白 mRNA 广泛分布于所有生精细胞中，但是在精子变态过程中其表达量增加。精子发生过程中细胞形态和大小的显著变化提示在睾丸中富含细胞骨架蛋白。肌动蛋白和微管蛋白除了控制正在发育的生精细胞的形态变化外，还在有丝分裂和减数分裂中起重要作用，并对多种睾丸特异结构及精子轴丝的形成非常重要。

(七) 精子发生相关基因的研究展望

生精细胞的发育需要严格的特殊环境。由于缺少体外培养模型，长期制约着精子发生分子机理的研究。但近年来随着生物学技术的快速进展，使得对精子发生相关基因的认识取得了长足的进步。利用差减杂交和差异显示技术，获得了许多与精子发生及成熟相关的基因。通过转基因小鼠及基因敲除小鼠模型的建立，鉴定出了许多调节精子发生的基因，促进了对精子发生分子机理的认识。近来发展起来的基因芯片技术可以高通量地研究基因表达特征及大规模快速克隆新基因。我国科学家利用这一技术在精子发生相关基因的研究中取得了许多开创性的研究结果，为发现更多的精子发生相关基因奠定了坚实的基础。鉴定调节精子发生的关键基因以及阐明其功能是将来研究精子发生分子机理的核心任务，RNA 干扰技术的建立是研究基因功能快速有效的方法，由于其可以选择性沉默特定靶细胞的基因以及可以同时沉默多个基因，将成为研究精子发生基因调控的重要方法。

第三节 精子的成熟与获能

哺乳动物的精子在睾丸可发育为高度分化的完整精子，但它们还不具备运动和使卵受精的能力，需要经过附睾头部、体部和尾部后，才能获得运动及受精的能力。在这一过程中，精子发生了一系列生理生化及形态方面的变化，称之为精子的成熟。但低等脊椎动物（鱼类及两栖类）及非脊椎动物的精子不需要这一过程，一旦离开睾丸，就具备受精能力。

一、精子的成熟

(一) 精子进入附睾

在曲细精管中，生精细胞发育为完整的精子，但此时的精子还不能主动的运动，而是被动地随着由支持细胞分泌的液体流入睾丸网（rete testis），后经输出管，在其鞭毛摆动及平滑肌收缩的作用下进入附睾头部。附睾的实质是一组管道系统，头部系由15~20条睾丸输出小管构成的附睾圆锥，然后会合成一条附睾管，高度盘曲成附睾体和尾

部，最后演变成输精管。管道在附睾头部较细，在附睾尾部变粗，为成熟精子储存的主要部位。

(二) 附睾对精子的浓缩

在曲细精管和睾丸网中，精子在管腔液体中的密度不高，但进入附睾后密度增加。这是由于其中的水分被附睾管上皮细胞吸收的结果。这种水分的吸收还使得附睾中的 K^+ 和谷氨酸的浓度升高，导致附睾的内环境pH值偏酸性(pH 6.48~6.61)。这种酸性环境有利于精子处于一种静息状态，积存能量，可存活几个月。大鼠附睾头部的精子密度为 0.66×10^9 个/ml，而尾部为 1.84×10^9 个/ml。人睾丸产生的精子，约有70%储存于附睾，其中一部分最终被解体吸收，只有少部分随射精排出。

(三) 精子获得受精能力的部位

哺乳动物精子在附睾中获得受精能力的部位因动物种类而异。一般来说，大多数物种的精子到达附睾尾部近侧端时，才完全获得受精能力。但在一些动物(如牛等)最早出现受精能力的精子位于附睾头部，而在另一些动物中(如大鼠)，则在附睾体部远侧端出现具有受精能力的精子。所以精子并不是在同一区域同步获得受精能力。

精子的受精能力是指精子在体内或体外，在自然状态下具有使正常成熟的卵子受精的能力。在实验条件下或经显微注射，可将生理条件下无受精能力的精子转变为具有受精能力的精子。例如，从附睾体部收集的精子只能使3%透明带完整的卵子受精，可见此时只有极少数的精子具有穿透透明带的能力。但如用显微注射技术将此时的精子注射到卵子的胞质中，可使受精率提高到51%。

在一些物种(包括人类)，精子通过附睾获得受精能力可能只是一个时间问题。兔附睾头部的精子通常无受精能力，但通过结扎附睾管，阻止精子向下迁移后，可赋予精子受精能力。在正常附睾头部和体部的人精子并不具备受精能力，只有当它们到达尾部远侧端时才获得这种能力。然而，当将人的附睾以与兔相同的方式结扎阻断后，附睾头部精子有时在体外也可使卵子受精，表明这些物种的精子获得受精能力与所在附睾的位置无关，而只需在附睾中存在一定的时间。

(四) 精子的运动能力

精子在附睾成熟过程中最明显的变化之一是获得运动能力。睾丸内的精子没有或有很弱的运动能力，只有从附睾尾部排除的精子才具有向前运动的能力。睾丸中精子无运动能力部分是由于质膜不成熟所致。如果将这些精子的质膜去除并暴露于ATP、cAMP和 Mg^{2+} 后，它们就能像在附睾尾部成熟的精子一样运动。在附睾成熟过程中，精子质膜发生了一些改变。附睾液中的一些物质，如甘油-3-磷脂酰胆碱和前向运动蛋白、cAMP调节的蛋白激酶以及胞内钙的增加，对精子正常运动功能的获得起着重要的作用。

(五) 精子成熟过程中质膜成分的变化

附睾具有旺盛的液体吸收和分泌功能。附睾分泌液的化学组分和渗透压在不同区域各不相同。这样，精子质膜在直接接触附睾液情况下，穿过附睾不同区域时逐步发生转变。在附睾成熟过程中，精子质膜的脂类发生了明显的物理和化学上的变化。在成熟过程中，精子质膜的膜内蛋白分布的变化似乎反映了膜脂类和膜蛋白的化学转变。附睾具有高速胆固醇合成能力，而且成熟精子可将胆固醇转运入质膜，提示胆固醇是精子成熟过程中转变膜特性的关键分子之一，对精子膜具稳定作用。精子在与卵子相遇前，胆固醇有利于它们在雌性生殖道中经过各种各样不利的微环境。

精子离开睾丸时，其质膜上既有吸附蛋白，又有整合蛋白。在精子成熟过程中，这些固有的蛋白改变了它们在质膜内外的位置；另一些则被转变，被遮蔽，或被来源于附睾的新的蛋白逐步替代。附睾，尤其是头部和体部区域，可分泌一系列蛋白，其中的一些蛋白可与精子紧密结合，或与精子结合后被修饰。因此，膜蛋白的动态改变贯穿于整个雄性生殖道，但最主要的还是在附睾头部和体部。最后，精子在附睾尾部近端获得了受精能力。

附睾成熟过程中，精子表面负电荷逐步增加，并伴随着凝集素结合特性的急剧改变。植物凝集素可与表面的糖基发生特异性结合。例如，Con A 可与葡萄糖或甘露糖结合，WGA 可与 N-乙酰葡萄糖胺结合，RCA 可与半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺结合，因此凝集素已被广泛用做细胞膜的探针。家兔附睾头部的精子极易被 WGA 凝集，而附睾尾部的精子与射出精子被 WGA 凝集的要少得多。这表明精子成熟过程中，精子表面的 N-乙酰葡萄糖胺有所减少或被遮蔽。WGA 受体也有类似改变。用铁蛋白标记的 WGA 进行受体定位时发现，附睾头部精子上的 WGA 受体主要位于顶部和核后区，而附睾尾及射出精子表面的 WGA 受体则分布稀疏。RCA 受体的情况也类似。这些事实表明精子表面成分发生了糖基化作用。这种糖基化作用至少部分是由附睾液中的半乳糖转移酶、唾液酸转移酶以及 α -乳糖样物质介导的。当精子完全达到成熟后，一些表面糖蛋白（包括膜整合蛋白和膜吸附蛋白）位于整个精子头部，而其他蛋白则局限于头部的顶体或顶体后区。一部分糖蛋白和多聚肽类可使精子质膜稳定，以避免其在未成熟前发生顶体反应。另一些蛋白则介导精子与 ZP 相互作用或介导精子与卵的质膜融合。细胞生存所需的膜成分（如 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶）必须一直存在于精子质膜上，但那些稍后行使精子特异功能的蛋白（如那些支持雌性生殖道内精子存活以及那些参与精子与 ZP 和卵质膜相互作用的蛋白）则可能在附睾成熟过程中加到精子质膜上（或转变成活性形式）。值得注意的是，附睾成熟过程中精子质膜特性的转变并不仅仅发生在精子头部，精子尾部质膜上或膜内也可吸附和/或整合若干种特殊糖蛋白和多肽，其中精子尾部的一些表面糖蛋白还可防止精子在成熟前发生超激活运动。

另外一个明显的变化是抗原在顶体外膜的分布，这可能与顶体反应有关。大鼠精子质膜中有 4 种抗原分布，可被 1B6、5B1、1B5 和 2D6 抗体识别，在精子成熟过程中，这些抗原分布发生明显变化。抗体 2D6 可以识别两种抗原，一种在顶体外膜上，另一种在尾部质膜上。在顶体外膜与质膜尚未接触时，顶体外膜上的抗原或移走或被隐蔽起

来，以后在尾部质膜上出现另一种抗原。在附睾内成熟过程中，一些动物的精子顶体发生了明显的形态学变化，顶体基质和酶类的分子结构也发生了改变。

二、精子的获能

精子成熟后虽然具备了运动能力，却没有受精能力，还需要在通过生殖道的过程中经历一系列生理生化变化，才能获得受精能力，这一过程称为精子获能 (sperm capacitation)。张明觉 (M. C. Chang) 博士早年从事哺乳动物体外受精的研究，他用各种方法处理从动物附睾尾部取出的精子或是射出的精子，都不能使之与卵子在体外受精。后来，他发现多种动物的精子在雌性生殖道中运行的时间很短，而排卵后要间隔一定时间才能受精，精子总是要等待卵子。也就是说，人及哺乳动物精子在离开生殖道时，还不能立即与卵子受精。它必须在雌性生殖道内经历一段成熟过程，才能获得受精能力。1951 年张明觉和 Austin 分别发现了这一生理现象。

然而半个多世纪以来，对获能的分子机制尚未完全了解。一般认为获能的主要事件是除去或改变精子质膜的稳定因子或保护物质，使精子质膜对特殊的受精环境非常敏感，尤其是对卵子更为敏感。目前，虽然在体外有能力使各种哺乳动物的精子获能，但在自然情况下，精子获能发生于雌性生殖道内，并受自主神经和激素的调控。

(一) 精子在雌性生殖道内的运动

大多数哺乳动物 (牛、羊、兔和灵长类) 在交配期间精液沉积在阴道前庭部位 (阴道射精型)，而另一些哺乳动物 (猪、马、狗和啮齿类) 在交配时大部分精液直接进入宫腔 (宫腔射精型)，或通过宫颈管进入宫腔。出现这种情况部分可能是由于交配刺激引起宫颈短暂的松弛和阴道的收缩。精液沉积部位的大部分精子不久就从生殖道中被排除，只有一小部分精子成功地迁移到受精部位 (壶腹部或壶腹与峡部连接处)。雌性生殖道往往可阻止形态学上异常的精子抵达受精部位。但并非所有受精的精子在遗传学上都是正常的。

对于宫腔射精型的动物精子，子宫-输卵管连接部位是其上行至壶腹部的主要屏障。子宫-输卵管连接处的多数黏膜皱褶和窄小的官腔只能允许小部分宫腔精子进入输卵管。如在仓鼠中，即使一个较大的精液团块，通过子宫-输卵管连接处时，经过反复收缩和推动，从开始的 $10^8 \sim 10^9$ 宫颈精子到最后只有 0.001% 的精子能成功地进入输卵管。精子一旦通过上述屏障，就很快到达受精部位，等待卵子的到来。现在已经清楚，在排卵开始之前，受精精子一直停留在输卵管峡部的较低部位。换言之，精子上行到壶腹部和卵子下行到壶腹部是同时发生的。为了获得最大受精率，猪在交配后有足够数量的精子滞留于峡部。何时从峡部释放出精子，受排卵时间以及与排卵相关事件的调节。这一点很重要，对正常的胚胎发育是很有利的。这样保证在排卵后不久，输卵管中的卵子可以受精。对于阴道射精型动物，其精子在进入子宫前必须越过高度褶皱并充盈黏液的宫颈。在排卵期，宫颈黏液具有以下作用：①保护精子对抗阴道环境以及阻止阴道白细胞的吞噬；②阻止精液进入子宫；③排斥形态学上异常的精子进入子宫；④保持和储存精

子为其后迁移到生殖道上部起重要作用。进入宫颈黏液（膜）的精子，往往沿着黏液糖蛋白的微结构到达分泌上皮细胞表面。很多精子停留于此，但也有很多精子摆脱上皮细胞，沿着纵向排列的上皮褶皱和浅沟游动。从人宫颈释放的精子可持续数天。精子通过子宫向上运行，最初似乎伴随子宫壁的收缩活动而进行。在牛、羊中，通过子宫-输卵管连接部位的精子往往停留在峡部的较低位置，直到排卵开始。尽管至今未完全确定，但受精前精子的峡部储存可能是哺乳动物的一般规律。宫颈和峡部作为动物精子的储存部位是相当重要的。

受精精子储存在峡部的较低部位，该部位富含肾上腺素受体，其液体还富含卵巢激素。在扫描电镜下观察猪和牛峡部以及子宫-输卵管连接部位时，可见到精子与上皮发生紧密接触。当仓鼠交配后数小时切开输卵管并检查其内含物时，可见精子黏附于黏膜表面，以其头部的吻端前后摇摆，在附着前偶尔做短距离的自由游动。在上皮细胞的腺窝中陷得很深的那些精子，不能用培养基将它们冲洗下来。精子黏附于峡部黏膜上皮并非具有很高的细胞特异性，因为精子也能够黏附于峡部黏膜的其他细胞。有趣的是，精子黏附于上皮细胞的生存时间比在无细胞系统时间明显延长。精子在输卵管细胞上生存的时间要比非输卵管细胞长。峡部管腔环境并非是通常想像的那样，为一个清洁和适宜的场所。例如，仓鼠峡部管腔充盈着上皮细胞碎片和死亡精子。黏附于黏膜褶皱、腺窝和细胞碎片中的精子，通过输卵管壁蠕动将精子来回推动。这些精子相对活动较少，因此它们的生存时间较长，至少仓鼠精子是如此。

结合于峡部的精子的释放机制尚不清楚，似乎与精子头部质膜获能变化有关。精子超激活运动可加速精子从峡部释放，游离的精子从峡部迁移到壶腹部似乎要靠精子自身活力和输卵管上皮的收缩运动。在接近排卵期，靠近卵巢的输卵管收缩运动越来越明显，这种输卵管运动不规则地、定向地将精子向壶腹部输送。所有真兽亚纲哺乳动物的精子在雌性生殖道内的运转方式具有相似性。小动物的大精子（如小鼠精子长 $120\mu\text{m}$ ）和大动物的小精子（如巨鲸精子 $30\sim 60\mu\text{m}$ ）在雌性生殖道内都是以相同方式转运的。

一些无脊椎动物的卵子（或与卵子有关的物质）可从远距离吸引精子。也有一些人认为牛和人也存在着卵子与精子之间的趋化性或趋向性现象（chemotaxis）。在体外，卵泡液对人精子具有明显的趋向性，并认为这种趋向性的存在与受精有关。精子上游速度随卵泡液密度梯度增加而增加，进而获得类似于超激活运动。只有获能的精子才有趋向性。在体内，人精子趋向性很可能吸引获能精子与卵子受精。由此推测，精子趋向性在受精中起一定作用，对临床上治疗男性不育也具有潜在的应用前景。既然卵泡液对人精子具有趋向性，卵泡液中含较高浓度的孕酮，那么孕酮可能是人精子的趋化因子。它们的主要作用是通过激发精子类似于超激活运动，从而起到引起精子聚集的作用。

（二）体内获能（capacitation *in vivo*）

早期的获能研究，采用自然交配或人工授精的方法，以受精率为指标，分析获能的部位、时间及其机制。

1. 获能部位

参与受精的精子在何处开始获能，又在何处完成获能，似乎因种类而有不同。宫腔射精型动物，其精子在峡部较低部位全部或部分完成获能。对于仓鼠，参与受精的精子也储存在峡部中。在排卵后交配，精子的获能速度比在排卵前交配要快得多。完成获能的精子并非同时离开峡部进入壶腹部，少数精子离开峡部会延长一段时间。在猪，这一时期可能需要 2 天或稍长。也许一些精子未获能就死于峡部。

对于阴道射精型动物，当精子进入子宫颈时，获能即开始。在通过子宫颈黏液的过程中，精子除去其表面吸附物质（包括精浆蛋白），加速获能。但是至今仍不了解这些精子和完全获能的精子是否有能力进入输卵管参与受精。在仓鼠中，完全获能的精子不可能有效地从子宫迁移到输卵管，尽管仓鼠的子宫在功能上与兔阴道相似。

2. 雌性生殖道的特征与获能的关系

当家兔精子顺序通过子宫和输卵管时，能非常有效地获能。然而，当精子不上行到输卵管时，在子宫中也完全可以获能。获能也可在输卵管中缓慢地进行。在家兔，阴道内的精子也可在一定程度上获能。在妇女中，通过配子输卵管内移植可获得妊娠（即将精子和卵子移植到输卵管壶腹部），表明人精子并不需要经历从子宫到输卵管壶峡部的过程。此外，宫外孕的卵子可能在腹腔中与精子受精。甚至有一个难以置信的研究表明，精子获能可以在妇女腹腔中进行（Verkuyl, 1988）。以上事实提示，体内的精子获能是没有严格的器官特异性。另一方面，在雌性生殖道内，获能也没有种属特异性，因为一种动物精子能够在其他种类动物的雌性生殖道内获能。雌性生殖道中有一种影响获能的特殊成分——输卵管特异糖蛋白（OGP）对精子获能起直接作用。OGP 存在时，精子获能的比例比其缺乏时高 2 倍，并可增加体外受精率。OGP 可增强获能精子与同源卵子受精能力。此外，获能精子在 OGP 存在时对卵子的穿透率比无 OGP 时高 3 倍。这些结果表明输卵管及其分泌物在调节精子功能中起重要作用。雌性动物准备排卵时，也开始发情，并接受雄性动物的交配。如果雌性动物在发情开始时立即与雄性动物交配，经过宫颈或子宫-输卵管连接部位筛选的精子储存于输卵管峡部的较低部位，与体内的受精部位即输卵管壶腹部相距不远。黏附于峡部上皮细胞的这些精子开始缓慢获能。在排卵时，完全获能的一些精子离开峡部并与刚刚排出的卵子受精，其余精子则在排卵后完成获能，然后这些精子就离开峡部与卵子受精。这样即使最后进入输卵管的卵子比最初进入的多，所有的卵子也都能受精。如果雌性动物在排卵后交配，峡部的精子可加快获能，在输卵管卵子老化前，这些精子就离开峡部与之受精。雌性生殖道控制精子获能的速度以及排放获能精子和卵子的能力（不管交配时间如何），似乎对所有哺乳动物的生殖都是有利的，特别是对那些排卵数量较少而又延迟排卵的哺乳动物，以及那些没有明显发情行为的动物更为有利。

在人类，射出到阴道中的精子首先穿过宫颈黏液，在此过程中它们丢弃一些表面吸附物质。人宫颈黏液可引起精子获能和超激活运动，但不会引起顶体反应（AR），以保留精子功能。然而，在宫颈黏液中获能的精子并不一定能够到达受精部位。

从子宫中只能回收到很少一部分精子，并有嗜中性白细胞浸润，表明子宫仅仅只是

一个通道而不是精子的储存场所。但人子宫内膜在精子成熟过程中也起作用，因它分泌一种 54 kDa 的唾液酸识别蛋白，该蛋白在体外可与获能前精子头部质膜特异结合。另一方面，人精子与培养的人输卵管上皮细胞紧密结合，而且这些上皮细胞可提高人精子的活力和存活率，表明精子与上皮细胞的相互作用可能是精子在输卵管中生存的重要条件。此外，人精子在卵泡液存在下，先用宫颈黏液，然后用输卵管分泌物预先培养，可使精子的超激活运动 (HAM) 率升高而顶体反应率降低。若不用输卵管分泌物预先培养，则超激活运动率低，而顶体反应率高。因此，用人输卵管液预先处理精子，有利于精子活力的维持，延迟顶体反应的发生。虽然在家畜中，精子与输卵管紧密结合同排卵前精子储存池的形成有关，但在人类尚无证据。

对于精子与上皮细胞的相互作用以及输卵管分泌物作用于精子的机制目前尚不完全了解。在仓鼠中，一种唾液酸寡糖链化合物类似于输卵管上皮的“fetuin”，能识别精子表面成分并能介导精子与上皮细胞结合。将预先获能的仓鼠或牛精子输入输卵管内或与输卵管上皮一起孵育时，这些精子与输卵管的结合率明显降低。对于体内精子离开输卵管上皮是否需要精子膜和/或上皮细胞膜发生改变，以及这种膜改变在超激活运动形成中是否起作用尚不清楚。

(三) 体外获能 (capacitation *in vitro*)

体内获能的研究，常常受到某些条件的限制。例如，从雌性生殖道内，特别是输卵管内回收到的精子数量太少，要测定获能精子化学成分的改变非常困难。又如，精子在体内总是与雌性生殖道分泌物接触，而雌性生殖道中存在着影响获能的因子，人们很难控制这种复杂的体内环境，因而给研究精子获能带来极大的困难。为此，亟待发展一种研究获能的体外系统。早期研究精子体外获能通常使用各种动物的体液（如输卵管液、滤泡液和血清）。这些体液的成分相当复杂，很难确定何种成分参与诱发或支持精子获能。自从利用一种特定的化学培养基获得体外受精 (IVF) 成功以来，分析体外精子获能已成为比较容易的事情。体外获能技术可以较好地控制实验条件，并可逐个分析获能及其相关因子。例如，可将精子顺序地暴露于不同成分的培养基中，使精子引起顶体反应，以顶体反应为指标研究精子获能的条件。目前使用的体外受精普通培养基和体外获能培养基是在台氏液和 Krebs-Ringer 氏液基础上添加适当的能量物质，如葡萄糖、乳酸盐、丙酮酸盐和白蛋白等改良而来的。市售的组织培养基 Ham's F10 添加血清也是常用的培养基之一，特别适用于人类的试管婴儿使用。但是，至今尚没有一种适用于所有动物的精子获能和受精的培养基。为了最有效地实现配子的受精功能，各种动物精子和卵子似乎都需要它们自己的特殊环境，因为配子与雌性生殖道的微环境在各种动物不尽相同。

许多研究者最初从事研究体外受精的目的是为了使卵子受精，并不是分析精子获能的机制。虽然这些研究者所获得的资料是很有价值的，但是在解释他们的结论时需要特别小心，至少在精子获能方面是如此。例如，一些研究者推论，一些化合物可完全阻断精子获能，因为当这些化合物存在时，体外受精不能发生。他们的结论并不完全正确，因为获能是受精成功的必要条件，但不是唯一的条件。为了与卵子受精，精子必须要有

很强的活力，还需要具备顶体反应的能力，以及穿过卵子卵丘细胞和透明带，最后与卵膜融合的能力。体外受精成功，表明精子已经获能。但是，体外受精没有成功，并不表示精子没有获能。一些研究者也使用顶体反应作为完成获能的指标，因为精子未经获能不会发生顶体反应。由配体介导（如 ZP）顶体反应的前提是精子必须获能，顶体反应可用来作为评价获能的指标。然而也必须认识到，在某些特殊情况下可通过旁路获能。这些精子可以完全获能，只是顶体反应受到阻断而已。人们期望体外精子 100% 存活和自发地完成获能。事实上，很多精子经历或完成获能前已经死亡。精子衰老和死亡，甚至在体外最有利的条件下也与精子获能同时发生。近年来的研究表明，在体外获能机制的研究中，发展起来的实验手段几乎可达到与体内获能相同的结果。也就是说，体外获能的研究结果可以揭示体内获能的本质。因此，目前关于获能研究的结果绝大部分是从体外获能研究中积累起来的。

精子体外获能受多种因素的影响，首先它是一个温度依赖过程。一般实验室采用的温度为 37~38℃。这一温度对于大多数动物精子体外获能是合适的。过去认为猪和羊卵体外受精相当困难，现在通过 39℃ 预培养精子后与卵子混合，则很容易完成精子获能，或者采用卵子与刚刚射出精子（经洗涤）39℃ 混合培养，也很容易完成受精。这一点小小的温度差异就可使膜脂类的物理状态发生改变。该过程对于精子获能至关重要。另外，pH 是影响获能的重要因素，获能的最适 pH 为 7.4~8.0。低于 pH 6.7 时获能时间大大延长；豚鼠精子在 pH 低于 7.6 时则获能时间需 24h。pH 高于 8.2 时，虽可缩短精子获能时间，但不利于精子生存。渗透压（Osm/ kg H₂O）对精子获能也产生重要影响。低于 270 Osm/ kg H₂O 或高于 343 Osm/ kg H₂O 则影响精子获能进程。最适宜的渗透压为 295~310 Osm/ kg H₂O。

（四）精子获能的异质性

同一个体射出的所有精子并不是同时获能。一些精子获能较快，另一些则较慢，称之为精子获能的异质性（heterogeneity）。这可能是由于：①精子膜结构内在分子的多样性；②附睾尾部精子成熟程度不同；③对影响它们的成熟环境反应性存在着千差万别。精子获能的异质性是阻碍精子功能研究的一道屏障。精子获能的异质性可从静态和动态两方面加以说明。精子群体中往往含有各种各样获能状态的精子，其范围从具有完整反应性的精子到静态的死亡精子，以及处于不同成熟阶段或不同发育阶段的动态精子。此外，个体之间也存在着明显差异。一些雄性动物的精子比同一种类的其他雄性动物更快或更容易获能。换言之，种内个体之间的差异是不容忽视的。

附睾尾部精子和射出的精子两者具有相同的成熟度和受精能力，但是这两类精子在体外并不具有相同的表现特征。比较同一个体的成年雄大鼠附睾尾部和射出精子的体外受精能力时发现，在同样条件下，附睾精子的受精率（平均 59%）比射出精子（平均 21%）高。也有不少报道附睾精子和射出精子两者在体外的受精率是相同的。但一般认为附睾精子的受精能力比射出精子更强。有趣的是，当这些附睾精子与精浆接触后就不能再与卵子受精，表明精浆中存在一种去获能因子。

在精子获能研究中，猫是一类很有趣的动物。从猫附睾尾部收集的新鲜精子，人工

授精后不到 20min 就能穿入猫卵子。大约人工授精后 30min 时, 100% 卵子可被穿入, 这是新鲜附睾精子穿卵的最快记录。现在不知道猫精子是否需要获能, 但发现射出的猫精子不能像附睾精子那样很快地穿入卵子。虽然一些射出精子能在人工授精后 30min 穿卵, 但是最高的穿卵率 (90%) 要在人工授精后 3h 才能达到。因此, 猫精子在射出时与精浆接触, 获能仍需一定时间。射出精子体外获能为何比附睾精子更加困难? 或许射出精子的质膜比附睾精子更加稳定。虽然附睾精子质膜通过对其糖蛋白的吸收和整合, 在一定范围是稳定的, 但它与精浆接触后似乎起着进一步的“稳定”作用。已有证据表明, 一些精浆成分 (如糖蛋白、多肽、去获能因子和纤黏连蛋白) 与射出精子表面结合, 这种结合非常牢固, 以至用普通生理盐水反复洗涤仍不能将精子的这些表面成分除去, 而除去或改变精子表面的包被物很可能是获能的基础。动情期雌性动物的生殖道对附睾精子和射出精子具有相同的获能能力, 说明雌性生殖道具有非常有效地除去或改变精子表面来自附睾和精浆包被物的机制。

(五) 精子获能的可逆性

张明觉 (1958) 最早发现精子获能是一个可逆过程, 获能精子一旦与精浆和附睾液接触, 又可去获能 (decapacitation)。如果把去获能的精子转移到雌性生殖中, 并使之停留一段时间, 精子又可重新获能, 表明精浆和附睾液中存在一种去获能因子 (decapacitation factor)。如用超速离心除去去获能因子, 精子也可重新获得受精能力, 表明去获能因子参与获能的调节。去获能因子是一种糖蛋白大分子, 分子质量在 40~200kDa。有人从牛精浆中分离到一种 Ca^{2+} 转运抑制蛋白 (caltrin), 它可抑制精子 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换机制, 从而抑制精浆中外钙内流。在小鼠附睾中也发现一种去获能因子, 分子质量为 40 kDa, 可附着于精子, 具有抑制 Ca^{2+} 内流的作用。 Zn^{2+} 在精浆中浓度很高, 似乎是精子膜的稳定剂。因此, 也可将 Zn^{2+} 看作是一种去获能因子。精胺在人精浆中含量很高, 但它在哺乳动物生殖过程中的作用尚不完全了解, 特别是对精子获能、顶体反应和受精的作用更不了解。精胺是仓鼠、豚鼠及人精子体外获能的抑制剂, 对获能、顶体反应和受精等环节具有明显的抑制作用。该作用是通过阻断 Ca^{2+} 通道, 抑制钙内流, 使胞内 cAMP 水平降低, 从而导致受精失败。

(六) 精子获能过程中的变化

1. 胞内离子浓度的改变

精子必须保持其膜内外的电荷差, 胞内 K^+ 高于胞外, 而 Na^+ 正好相反。这种电荷差是由 ATP 酶介导的 Na^+/K^+ 交换泵调节。牛精子胞内 K^+ 和 Na^+ 浓度大约分别为 120 mmol/L 和 14 mmol/L。在整个获能过程中, 精子各种元素相对含量成规律性变化, 豚鼠精子在获能培养基 (含 106 mmol/L NaCl、1 mmol/L MgCl_2 、15 mmol/L NaHCO_3 、20 mmol/L 乳酸钠和 0.25 mmol/L 丙酮酸钠) 中培养 2h 后, 其胞内 K^+ 浓度大幅度下降, 从 $3\sim 5\ \mu\text{g}/10^8$ 精子降至 $0.6\ \mu\text{g}/10^8$ 精子; 而 Na^+ 则直线上升, 从 $0.2\sim 0.4\ \mu\text{g}/10^8$ 精子升到 $11\sim 12\ \mu\text{g}/10^8$ 精子。引起胞内 K^+ 和 Na^+ 浓度快速变化之原因是由于

培养基无 K^+ 或至少是缺乏 K^+ ，致使精子中 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶失活，胞内外的离子浓度差促使 K^+ 外流，而 Na^+ 内流。仓鼠精子在普通获能精子培养基中培养 2h 后，其 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶活性显著增加，而胞内 Na^+ 、 K^+ 水平则保持不变。顶体反应期间，胞外 Ca^{2+} 大量内流。目前，对获能时胞内 Ca^{2+} 的动力学知之甚少。一般认为精子头部和尾部区域的胞内 Ca^{2+} 水平很低。因为除了线粒体将 Ca^{2+} 储存进胞内钙库外，精子质膜上还存在着 ATP 酶介导的 Ca^{2+} 泵，即质膜上一种 Na^+ / Ca^{2+} 反转运子和 Ca^{2+} / H^+ 交换系统。豚鼠精子在获能培养的最初 1h，就可摄取 Ca^{2+} ，这是由于 Ca^{2+} 和精子表面松散结合而不是 Ca^{2+} 进入精子造成的。利用选择性 Ca^{2+} 荧光指示剂 quin-2，发现兔精子的胞内游离 Ca^{2+} 水平在体外获能过程中并不发生变化。由于这种物质只能检测群体精子 Ca^{2+} 水平，而不能检测单个精子的 Ca^{2+} 水平，因此推测 Ca^{2+} 浓度可能只在精子不同的局部区域发生了变化。精子获能期间，一些胞外 Ca^{2+} 进入胞内，使胞内 Ca^{2+} 逐步升高，并呈时间依赖关系。利用焦锑酸钾原位沉淀法和枸橼酸捕获法证明，猕猴和大熊猫精子获能过程中， Ca^{2+} 进入顶体区质膜内侧和顶体外膜外侧。豚鼠精子胞内 Ca^{2+} 浓度随获能进程而逐渐增加，获能后维持在一个恒定水平，直到发生顶体反应。在顶体反应开始时， Ca^{2+} 则明显升高，这种变化是通过 Ca^{2+} -ATP 酶/ Na^+ - Ca^{2+} 交换机制调节的。游离 Ca^{2+} 的作用有两个特点：①不同生理阶段所需胞外 Ca^{2+} 的浓度是不同的，例如，获能阶段只需要微摩尔 ($\mu\text{mol/L}$) Ca^{2+} 水平；而顶体反应阶段则需要毫摩尔 (mmol/L) 水平；②不同物种所需 Ca^{2+} 浓度也不尽相同。如小鼠精子获能只需 $90 \mu\text{mol/L}$ ，豚鼠精子则更低 ($10 \mu\text{mol/L}$)，而人类精子则需要毫摩尔水平。

2. 腺苷酸环化酶和 cAMP 的变化

Ca^{2+} 内流和活性氧 (ROS) 的产生是精子获能中最早发生的事件，当精子一进入获能培养液培养时，此过程就被启动。它们可能参与腺苷酸环化酶的激活，此酶在精子获能中起重要作用。实际上，导致胞内 cAMP 浓度升高的物质，如福斯考林 (forskolin，一种腺苷酸环化酶的激活剂)、二丁酰 cAMP (一种可透过细胞膜的 cAMP 类似物)、咖啡因以及异丁基甲基黄嘌呤 (磷酸二酯酶的抑制剂)，均可刺激人精子获能。此外，孕酮也可激发人精子钙内流，引起胞内 cAMP 水平上升和蛋白酪氨酸磷酸化，从而促进获能速率。关于 cAMP 产生及其作用机制的复杂性，从猴精子中可得到阐明。在猴中，咖啡因可增加精子与透明带的结合数量，而二丁酰 cAMP 和咖啡因都可增加胞内 cAMP 含量。但它们可能还有其他作用机制，增加不同部位的 cAMP 浓度以产生不同的作用。小鼠精子在缺 Ca^{2+} 培养基中，添加二丁酰 cAMP 可促进精子获能，说明钙离子内流可直接或间接引起腺苷酸环化酶的激活。而诱发人精子获能的蛋白酪氨酸磷酸化，不能被超氧化物歧化酶抑制，提示胞内 cAMP 浓度的增加是 ROS 生成的下游事件。因此，精子中的 ROS 可能与体细胞一样，也存在着激活腺苷酸环化酶的可能性。腺苷酸环化酶活性的增加引起 cAMP 的增加，从而诱发和维持精子活力，促进精子获能。大部分 cAMP 活性是通过存在于精子中的蛋白激酶 A (PKA) 介导的。在小鼠和人中，PKA 抑制剂 (H89 和 RP-cAMPs) 可阻断精子获能及其有关的蛋白酪氨酸磷酸化，表明 PKA 参与上述过程。

依赖 cAMP 的人精子蛋白磷酸化是其蛋白酪氨酸磷酸化的前提，这种现象通常与

获能相关。人精子可溶性膜蛋白酪氨酸磷酸化发生在四个分子质量区域即 94、46、25 和 12 kDa。它们的重要性因其所处获能状态不同而异。与未获能精子相比，获能精子中 94 kDa 蛋白磷酸化多 30%，而 12kDa 蛋白磷酸化少 12%。从甲醇固定的人精子免疫荧光法观察到，在获能期间，酪氨酸磷酸化蛋白定位于从鞭毛到顶体区域，并发生进行性改变。人精子获能期间，97 kDa、75 kDa 以及 94 kDa 蛋白的酪氨酸磷酸化呈时间依赖性，但并未确定这些蛋白的位置。在获能精子中，p105 和 p81 蛋白酪氨酸磷酸化程度比未获能精子高。这种磷酸化呈时间依赖关系，在获能培养开始后 1h 就明显增加。p105 和 p81 蛋白存在于精子鞭毛纤维鞘上，提示其作用可能与精子活力有关。精子获能期间，蛋白磷酸化程度增加可能是由于激酶的激活和/或磷酸酶的抑制。但这些酶的相关作用目前尚不清楚。人精子含有 1 型和 2B 型的蛋白磷酸酶。1 型和 2A 型蛋白磷酸酶抑制剂（calyculin A 和 okadaic acid）可促进人精子获能，但只有花萼海绵诱癌素（calyculin）A 可导致 p105 和 p81 蛋白酪氨酸磷酸化增加。这些抑制剂可阻断丝/苏氨酸蛋白磷酸化，表明丝/苏氨酸磷酸化蛋白参与（可能通过 cAMP/ PKA 调节）精子获能过程中 p105 和 p81 蛋白酪氨酸磷酸化。丝/苏氨酸蛋白磷酸化参与人精子获能过程，然而还不清楚这种丝/苏氨酸磷酸化蛋白本身及酪氨酸激酶或磷酸酶或是其他调节因子参与酪氨酸磷酸化通路。氧化物、钒酸盐（vanadate）和 H_2O_2 等因子可氧化存在于酪氨酸蛋白磷酸酶活性位点上的半胱氨酸残基，增加人精子的蛋白酪氨酸磷酸化。但是，精子获能和酪氨酸磷酸化之间的关系尚不完全了解。虽然蛋白 cAMP-依赖磷酸化作为共同的中间步骤出现，但可能存在调节人精子活力、获能和蛋白酪氨酸磷酸化的不同通路。考虑到上述机制的多样性和复杂性，不仅是精子获能在受精过程中的重要性，而且这些步骤中存在着信息交流的可能性，因此推测为确保精子获能的成功，可能存在多条通路。换言之，如果主要通路失败了，获能仍能继续进行。

3. 精子头部的变化

真兽亚纲哺乳动物的精子核结构非常稳固，这是由于双硫键（S—S）广泛的交互连接精子核蛋白。整个获能期间一直维持着这种稳定性。虽然人精子核蛋白也是如此，但这种双硫键交互连接不像其他动物那样广泛。射精时，精浆 Zn^{2+} （来源于前列腺）与精子核蛋白的游离—SH 残基结合，导致核蛋白的暂时稳定。在获能期间，核蛋白失去 Zn^{2+} ，使—SH 残基氧化成双硫键从而增加这种稳固性。大多数动物种类的精子顶体结构在获能时并不发生明显变化。猪精子无活性的顶体酶原在子宫液作用下可转变为有活性的顶体酶。在体外实验中，氨基葡聚糖可刺激顶体酶原转化成顶体酶。

4. 质膜变化

由于精子质膜直接暴露于获能环境，因此在获能期间质膜发生了显著的变化。精子表面包被物质的改变和去除是获能的重要过程。BSP 家族的 H 精浆蛋白与膜磷脂酰胆碱结合，可促进肝素引起的精子获能，推测它通过从膜上吸取胆固醇和磷脂以帮助精子获能。小鼠附睾尾部精子的整个顶体质膜上存在着可与单抗 TSC4 特异结合的抗原。这个抗原起源于附睾体部，不能用反复洗涤的方法将它从精子表面去除，但当精子进入卵周隙时此种抗原即消失。在获能期间，该抗原必须被去除或遮蔽。另一种小鼠精子抗原

可特异地与单抗 OGF13 结合,但在附睾精子表面检测不到。当精子体外获能后,则可在其头部质膜上检测到。这种抗原在新鲜附睾精子中被遮蔽,而在获能期间被暴露出来。人精子中还存在 p34H 蛋白。它与附睾液一起分泌,在精子从附睾头到附睾尾的过程中与顶体帽紧密结合,当射精时被遮蔽,而在获能时重新显露,在顶体反应后消失。p34H 的抗体在不影响超激活运动、获能或去透明带仓鼠卵穿入率的情况下,可抑制人精子与透明带的相互作用,表明它可能是精子潜在的透明带受体。此外,在不育男子中,p34H 的数量与同源透明带结合率一样,比可育男子水平低,也表明这一附睾因子在受精中的作用。在获能期间,分布发生改变的抗原还包括人精子表面纤连蛋白样分子、豚鼠精子头部的 T 和 S 抗原以及大鼠精子头部的 37 kDa 蛋白。用免疫荧光法,在未获能的大鼠精子尾部检测到一种 40 kDa 抗原 2Bl。当这些精子获能后,这种抗原仅存在于顶体帽区域,从精子尾部消失。此抗原在获能期间似乎从精子尾部迁移到了头部,但不能排除其他因素的影响,如抗体的特异性和质膜的完整性等。

用子宫液培养羊精子时,可从表面释放 3 种不同的糖基化蛋白,即 65 kDa、41 kDa 和 24 kDa 的蛋白,同时精子从子宫液中吸附一种 16 kDa 蛋白。在输卵管液中,精子从其表面释放 97 kDa 和 41 kDa 蛋白。有趣的是,精子首先暴露于子宫液,然后接触输卵管,精子可从后者吸附多种蛋白(13~190 kDa 蛋白)。虽然子宫可能不是猪精子的获能部位,但精子表面成分的释放以及吸附外界液体组分是体内获能的重要步骤。在生物膜流体镶嵌模型中,蛋白(或糖蛋白)与膜双脂质层以非共价连接,形成了膜的基质。镶嵌蛋白被牢固地包埋在双脂质层中,它们只能通过破坏性的处理才能被除去(如用去污剂处理),而外周蛋白通过静电作用与膜相联系,可加螯合剂提高 pH 或增加电子强度使这些蛋白释放出来。因此,在获能期间精子表面释放的绝大多数蛋白/糖蛋白,都是外周蛋白/糖蛋白。此外,获能过程中精子的凝集素结合特性发生改变也表明,外周糖蛋白和整合糖蛋白的糖类组分在获能期间都发生了改变。获能也与表面负电荷减少有关,它与表面唾液酸基的耦联物的去除或这些化合物的重新分布有关。此外,牛和小鼠中的实验表明,精子膜在获能中呈现超极化。获能精子膜电位的降低是由于 K^+ 通透性增大所致,从而引发顶体反应。

对小鼠精子质膜流动性的研究发现,获能期间精子尾部主段的质膜流动性发生急剧改变。虽然多种膜磷脂的相对含量在获能期间无变化,但各种脂类在膜内外层的分布随获能发生了改变。刚射出的猪精子缺乏磷脂酰肌醇,在雌性生殖道获能过程中合成了此种脂类。在仓鼠精子获能期间出现了磷脂的甲基化,即磷脂酰乙醇胺转变成磷脂酰胆碱。而豚鼠精子胞内磷脂酸转变成心磷脂,然后插入质膜。

位于质膜脂质双层内的胆固醇是维持细胞正常结构和功能所必需的成分,精子质膜胆固醇的丧失是哺乳动物精子获能分子机制的一部分。精子类固醇类变化是早期获能的关键步骤,精子膜胆固醇的丧失可促进膜成分以新的方式重组,进而促进其他获能因子的作用。重组的精子膜很可能产生出更加具有溶源性的精子膜。内部膜蛋白构型或分布发生改变,从而介导其他获能因子的作用。精子膜胆固醇外流可增加膜对胞外 Ca^{2+} 的通透性,导致磷脂酶激活及溶源性物质(如溶血卵磷脂)的积聚,引起顶体反应。精子质膜上膜蛋白的再分布很大程度上由脂类流动性调控,现在对精子质膜上胆固醇在受精中的作用尤其关注。精子质膜上的胆固醇对限制离子渗透性、蛋白嵌入磷脂双层的运动

以及膜的稳定和坚固等都有作用，这样就防止精子获能现象发生。胆固醇硫酸盐存在于人精子质膜上，对于膜的稳定性和坚韧性比胆固醇更好。胆固醇外流和/或重新分布使精子质膜去稳定从而引起精子获能。实际上，洗涤精子与白蛋白或滤泡液或输卵管一起培养，可帮助胆固醇外流以及精子获能。这是因为胆固醇通过调节膜脂的定位、流动性和厚度对生物膜特性产生影响，如改变阴离子和阳离子渗透性。当 filipin（聚乙烯抗生素）与膜上固醇类物质结合时，形成的复合物使膜向高浓度固醇类一边转移，从冰冻蚀刻图像观察，膜的富含胆固醇区域隆起许多小包。覆盖顶体的质膜充满丰富胆固醇。获能后，该区域固醇浓度急剧降低。尽管从精子质膜上去除胆固醇对获能来说非常重要，但是胆固醇与膜磷脂的分离而不是胆固醇从膜上完全去除似乎对获能更为重要。

5. 活性氧的变化

在获能过程中，精子中活性氧（ROS）的产生发生了改变，从而产生不同浓度的超氧化离子。高浓度的 ROS 对人精子具有毒害作用，而较低浓度的 ROS 则有利于精子受精能力的获得。人精子在超氧化系统（黄嘌呤 + 黄嘌呤氧化酶 + 过氧化氢）中比在单一的 Ham's F10 获能培养液产生更高水平的超激活运动和获能，这一作用可被超氧化物歧化酶（SOD）抑制。这一结果表明，外源性超氧化离子可引发人精子超激活运动和获能。滤泡液或脐带血清等可诱发人精子获能，这种作用可被 SOD 抑制。虽然在这些液体中未检测到超氧化离子，但这些液体诱发精子获能与其消除超氧化离子的能力成反比。参与获能的超氧化离子是由精子产生的，是在质膜产生后作用于细胞表面的。精子在 Ham's F10 培养基（添加脐带血清）中获能培养不久即产生超氧化物，在 15~25min 后达到高峰，而精子获能在 6h 后才陆续发生。这些结果表明，超氧化离子的产生是诱发和促进精子获能和超激活运动的早期事件。

ROS 参与人精子获能并不局限于超氧化离子， H_2O_2 也可参与这一过程。外源性加入 $50\ \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 可引起精子超激活运动和精子获能。 H_2O_2 可由精子产生的超氧化离子歧化而成。这样，精子产生的低浓度 ROS 足以引发精子超激活运动和获能。过氧化氢酶可抑制仓鼠精子获能。在小鼠中，用黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶处理精子可增加超激活运动和获能，这种作用可被 SOD 或过氧化氢酶抑制。显然，在这种情况下，超激活运动和获能都需要超氧化离子和 H_2O_2 。

精子获能过程需要氧化物存在。在体内获能中，精子可能不是 ROS 的唯一来源。雌性生殖道存在的细胞和体液也可产生 ROS 或促进精子产生 ROS。关于参与精子获能的 ROS 的靶分子目前还不清楚，可能是可被超氧化离子及 H_2O_2 同时氧化的一类分子，因为这两种 ROS 均可诱发人精子获能。此外，精子获能的可逆性也提示 ROS 靶分子与氧化/还原步骤有关，也可用其他方法调节这一步骤。ROS 可能直接或间接地调节蛋白磷酸化的酶类。人精子获能与 p105 和 p81 这两个蛋白酪氨酸磷酸化的增加有关。精子与 ROS 一起培养时，黄嘌呤 + 黄嘌呤氧化酶、过氧化氢或葡萄糖 + 葡萄糖氧化酶）可导致精子获能，以及 p105 和 p81 蛋白酪氨酸磷酸化的增加。

ROS 产生与清除的平衡对于精子功能非常重要。在一些不育患者的精液标本中，有 18% 的患者（22/120 例）发生自发性超激活运动，尽管他们的精液参数都符合 WHO 制定的标准。有趣的是，这些病人精浆（37%）和精子（40%）中超氧化物清除

水平降低。据此推测，这些病人的精子过早地诱发超氧化物的产生，引起其产生与消除之间的平衡受到破坏，从而精子不能释放纯净的超氧化物，导致精子过早地发生超激活运动。低浓度 NO 也可促进人精子获能，而过氧化氢酶可阻断这种作用。这显示了 H_2O_2 作用有其复杂机制。

上面提到的各种因子，如 Ca^{2+} 内流、ROS 产生、腺苷酸环化酶活性的增加以及蛋白磷酸化作用既参与精子获能过程，也参与诱发顶体反应。因此，精子获能可作为顶体反应的“起始”事件。抑制机制的存在保持了整个系统激活的可逆性，这样可防止精子成熟前发生顶体反应。目前，对于 cAMP 浓度、ROS 产生速率和蛋白磷酸化程度等在获能和顶体反应发生期间各种事件的顺序关系尚未确定。磷脂酶、G 蛋白、磷脂酰肌醇和离子通道等信号转导机制中主要的介导体在精子获能中也起调节作用。

三、精子的超激活

(一) 超激活现象

许多哺乳动物的精子在发生顶体反应之前运动能力加快，称为超激活 (superactivation)。这种现象首先是在仓鼠中发现的。当精子开始接触获能液时，突然开始活跃运动，但以后又相对静止。就在这种相对静止状态时，大多数精子以头对头相聚集，并摆动其尾部。过一段时间后，则又互相离开。这表明当获能时，精子的表面起了变化，较以前运动更为活跃。首先，精子做直线运动，但不久其尾部呈有力的鞭打状，与其头部呈不稳定的“8”字形运动，以飘摇非前进运动，伴以短暂的直线猛烈运动。这两种运动方式共同构成超激活运动的特征。在某些品系的小鼠，是以鞭毛推进活动表示超激活运动的。在大鼠、小鼠、中国仓鼠和猪，是依其周围培养基物理化学特性不同，其运动模式也不一样。虽然现在还不清楚超激活现象是仅存在于哺乳动物某些品种，还是一种普遍的现象，但它逐步地在羊、牛、犬、兔、豚鼠、海豚、人和其他灵长类动物都被发现。多数物种的超激活是受精后在输卵管的壶腹部完成的。

(二) 精子超激活的机制

精子的超激活运动是正常的生理过程。受精前后的大鼠、小鼠、仓鼠、兔、豚鼠、猪和羊的输卵管壶腹部，都可以收集到超激活的精子。在体内获能时，也可以在输卵管峡部的黏膜褶中，检出超激活的精子。由于精子尾部的强烈推动力，可以使其穿过输卵管中的黏液、卵周物质和透明带，然后与卵结合并受精。

有关精子超激活的机制，认识得较少。但已明确 Ca^{2+} 在精子超激活中起着重要作用。据报道，仓鼠精子在无 Ca^{2+} 或 Ca^{2+} 不足的培养液中，根本不能进行超激活运动。如果先在含 Ca^{2+} 培养液中进行了超激活运动，再移到 Ca^{2+} 不足的培养液中，则仍可保持超激活状态，这在小鼠、豚鼠和猪中均有报道。 Ca^{2+} 、腺苷酸环化酶、cAMP、蛋白激酶和蛋白质磷酸化，也是精子开始超激活运动所必需的。在超激活过程中，首先是尾部质膜的构象改变，也出现 Gp 与蛋白激酶。正常的超激活运动是发生在获能完成之

后。在获能过程中或获能后，精子尾部表面失掉覆盖物，而暴露出假定的受体，同时被配体活化，刺激 Gp 后转而活化钙通道，使 Ca^{2+} 暂时流入并刺激腺苷酸环化酶，开始 cAMP 蛋白激酶的串联。活化的 Gp 也可以刺激 Na^+/H^+ 通道，使细胞内 pH 值上升。细胞内 Ca^{2+} 、 H^+ 与 cAMP 的浓度，可调节精子尾部的运动波形，细胞内 Mg^{2+} 的浓度则影响轴丝的硬度，使轴丝动力蛋白相互作用，在线粒体的参与下，导致精子发生超激活运动。

(韩代书)

主要参考文献

- 陈大元, 孙青原, 李光鹏 . 2002 . 受精生物学——受精机制与生殖工程 . 北京: 科学出版社
- 秦鹏春 . 哺乳动物胚胎学 . 北京: 科学出版社 . 2001
- 石其贤, 袁玉英 . 1998 . 精子获能及发展 . 生理科学进展 29 (3): 243~245
- 王一飞, 王春年 . 1991 . 精子的获能 . 《男性学》第 137~149 页, 上海: 上海科学技术出版社
- Alberts B, Johnson A, Lewis J et al . 2002 . Molecular biology of the cell, 4th edition, pp . 1127~1156, Garland Science, NY
- Austin CR, Short RV . 1982 . Reproduction in mammals . Vol 1, Germ cells and fertilization, 2nd edition . Cambridge: Cambridge University Press
- Blobel CP . 2000 . Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation . Rev Reprod 5: 75~83
- Bajpai M, Doncel GF . 2003 . Involvement of tyrosine kinase and cAMP dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility . Reproduction 126: 183~195
- Braun RE . 2000 . Temporal control of protein synthesis during spermatogenesis . Int J Androl 23: 92~94
- Breitbart H . 2003 . Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction . Cell Mol Biol 49: 321~327
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H . 2003 . Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction . Biol Reprod 68: 837~845
- Chang MC . 1951 . Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into Fallopian tubes . Nature 168: 697~698
- Cheng LJ, Li JM, Chen J, Ge YH, Yu ZR, Han DS, Zhou ZM, Sha JH . 2003 . NYD-SP16, a novel gene associated with spermatogenesis of human testis . Biol Reprod 68: 190~198
- Cooper TG, Yeung CH . 2003 . Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet . Microsc Res Tech 61: 28~38
- Cross NL . 2003 . Decrease in order of human sperm lipids during capacitation . Biol Reprod 69: 529~534
- Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F . 2003 . Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation . Microsc Res Tech 61: 7~17
- Eisenbach M, Tur-Kaspa I . 1999 . Do human eggs attract spermatozoa ? Bioassays 21: 203~210
- Eddy EM . 1995 . ' Chauvinist genes ' of male germ cells: gene expression during mouse spermatogenesis . Reprod Fertil Dev 7: 695~704
- Eddy EM . 1998 . Regulation of gene expression during spermatogenesis . Semin Cell Dev Biol 9: 451~457
- Eddy EM . 2002 . Male germ cell gene expression . Recent Progress in Hormone Research 57: 103~128
- Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P . 1999 . CBP-independent activation of CREM and CREB by the LIM-only protein ACT . Nature 398: 165~169
- Gibert SF . 2000 . Developmental biology, 6th edition, pp185~211, Sunderland, MA: Sinauer
- Guo CX, Liu YX . 2000 . Expression and regulation of orphan receptor TR2 mRNA in germ cell apoptosis in the cryptorchid testis of rat and rhesus monkey . Chinese Sci Bull 45: 720~725

- Guraya SS .1987 . Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals . Springer-Verlag
- Hecht NB .1998 . Molecular mechanisms of male germ cell differentiation . BioEssays 20: 555~561
- Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C .2003 . Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa . Curr Pharm Des 9: 419~425
- Holland MK, Nixon B .1998 . The specificity of epididymal secretory proteins . J Reprod Fertil Suppl 53: 197~210
- Jaiswal BS, Tur-Kaspa I, Mashiach S, Eisenbach M .1999 . Human sperm chemotaxis: Is progesterone a chemoattractant ? Biolo Reprod 60: 1314~1319
- Kameshwari DB, Siva AB, Shivaji S .2003 . Inhibition in vitro capacitation of hamster spermatozoa by nitric oxide synthase inhibitors . Cell Mol Biol 49: 421~428
- Leclere P, de Lamirande E, Gagnon I .1997 . Regulation of protein tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives . Free Rad Biol Med 22: 643~656
- Li P, Chan HC, He B, So SC, Chung YW, Shang Q, Zhang YD, Zhang YL .2001 . An antimicrobial peptide gene found in the male reproductive system of rats . Science 291: 1783~1785
- Lin M, Hess R, Aitken RJ .2002 . Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization . Reproduction 124: 107~117
- Luconi M, Baldi E .2003 . How do sperm swim? Molecular mechanisms underlying sperm motility . Cell Mol Biol 49: 357~369
- Ravnik SE, Wolgenmuth DJ .1999 . Regulation of meiosis during mammalian spermatogenesis; the A-type cyclin and their associated cyclin-dependent kinase are differently expressed in germ-cell lineage . Dev Biol 207: 408~418
- Sassone-Corsi P .1997 . Transcriptional checkpoints determining the fate of the male germ cells . Cell 88: 163~166
- Sassone-Corsi P .2002 . Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis . Science 296: 2176~2178
- Saxena DK, Oh-Oka T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Toshimori K .2002 . Behaviour of a sperm surface transmembrane glycoprotein basigin during epididymal maturation and its role in fertilization in mice . Reproduction 123: 435~444
- Temple-Smith PD, Zheng SS, Kadioglu T, Southwick GJ .1998 . Development and use of surgical procedures to bypass selected regions of the mammalian epididymis: effects on sperm maturation . J Reprod Fertil 53 (Suppl): 183~195
- Toshimori K .2003 . Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue . Microsc Res Tech 61: 1~6
- Tulsiani DR, Orgebin-Crist MC, Skudlarek MD .1998 . Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation . J Reprod Fertil 53 (Suppl): 85~97
- Urner F, Sakkas D .2003 . Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa . Reproduction 125: 17~25
- Wolgemuth DJ, Laurion E, Lele KM .2002 . Regulation of the mitotic and meiotic cell cycles in the male germ line . Recent Progress in Hormone Research 57: 75~101
- Zhang D, Penttila TL, Morris PL, Teichmann M, Roeder RG .2001 . Spermatogenesis deficiency in mice lacking the Trf2 gene . Science 292: 1153~1155
- Zhou XC, Wei P, Hu ZY, et al .2002 . Expression of p16^{ink4a} in testis of rhesus monkey during heat stress and testosterone undecanoate induced azoospermia or oligozoospermia . Contraception 65: 251~255
- Yu ZR, Guan JK, Ge YH, et al .2002 . Analysis of gene expression patterns with cDNA microarray during late stage of spermatogenesis in mice . Chinese Sci Bull 47: 1417~1421
- Yu Z, Guo R, Ge Y, Ma J, Guan J, Li S, Sun X, Xue S, Han D .2003 . Gene expression profiles in different stages of mouse spermatogenic cells during spermatogenesis . Biol Reprod 69: 37~47

第四章 卵泡发育、卵子发生和排卵

第一节 卵泡发育和卵子发生

卵子发生 (oogenesis) 是指雌性配子的形成、发育和成熟，包括卵原细胞的增殖、卵母细胞的生长发育和成熟。

一、性腺和配子发育的控制

在胚胎期，卵巢始动发育时，生殖细胞从卵黄囊迁移到生殖嵴。这些原始生殖细胞在性腺的性索中分裂繁殖。性索是在胚胎性腺的皮质区由来源于生殖嵴的体腔上皮（又称为生殖上皮）的细胞增生形成的。卵泡细胞在性索中发育出来并最终分化为包围卵母细胞的颗粒细胞。生殖嵴的实质细胞将最后转变为膜细胞。卵泡的整个结构包括卵母细胞、颗粒细胞和膜细胞。

卵母细胞与最终要分化成为输卵管（来源于副中肾管）的管道没有直接连接。卵母细胞成熟后，卵泡破裂，将卵母细胞从卵巢中排出，这个过程称为排卵。输卵管的末端特化后形成的输卵管伞，对从卵巢排出的卵母细胞有接纳能力。有些动物的卵母细胞通过包围卵巢的卵巢膜 (bursa) 的作用进入输卵管伞，卵巢膜使卵母细胞向卵巢膜的开口与输卵管伞口处移动。

胚胎睾丸的发育与卵巢发育有相似之处，生殖细胞迁移到生殖嵴并在已由体腔上皮细胞内陷形成的性索中分裂增殖。支持细胞从性索中发育而来，而间质细胞是从生殖嵴的实质细胞发育来的。与卵巢发育的主要不同之处是：睾丸中性索内陷，直达胚胎性腺的髓质，在那里与来自中肾（或原肾）的髓索相连。中肾管发育成与曲细精管直接连接的附睾、输精管和尿道。可见，雄性生殖细胞是通过一个密闭的管道系统到达体外。

二、生殖细胞的起源和分化

生殖细胞来源于它的前体——原始生殖细胞 (primordial germ cell, PGC)。这些原始生殖细胞只有经过迁移，进入发育中的生殖腺原基 (genital anlage) ——生殖嵴 (genital ridge) 才能分化为生殖细胞。原始生殖细胞的起源可以追溯到相当早期的胚胎发育阶段。生殖质 (germ plasm) 在胚胎发育过程中会被逐渐分配到一定的细胞中，这些具有生殖质的细胞就将分化为原始生殖细胞。不同动物的原始生殖细胞以不同的方式进入生殖腺原基，在那里进行生殖细胞的分化。

(一) 哺乳动物生殖细胞的迁移

在发育早期，哺乳动物的生殖细胞没有特殊的特征。免疫组化方法显示，小鼠 PGCs 最初来源于原肠期中胚层的外层，于胚胎发育的第 7 天在原条后部的胚外中胚层中约有 8 个 PGCs，这些细胞体积较大，碱性磷酸酶染色呈阳性。如果分离去除或破坏该区域，则胚胎将缺乏生殖细胞；而分离这些细胞进行培养的话，可以发育成大量的 PGCs。在人胚胎第 3 周及小鼠胚胎第 8.5 天，此处即出现低度分化的原始生殖细胞。哺乳动物 PGCs 先在尿囊与后肠交界处附近聚集，以后迁移到卵黄囊附近再分成两群，沿卵黄囊的尾部通过新形成的后肠，然后沿背侧肠系膜向上迁移，分别进入左右两侧生殖嵴。人大约在妊娠（受精后）5~6 周、小鼠在妊娠 13.5 天时，原始生殖细胞迁至未分化的生殖嵴。哺乳动物 PGCs 的迁移与其接触的上皮细胞有关，PGCs 通过伸出的伪足在上皮细胞表面进行阿米巴运动。原始生殖细胞在迁移的过程中也发生增殖，小鼠原始生殖细胞数目在开始迁移时约为 100 个，到达生殖嵴时已达到 4000~5000 个。原始生殖细胞到达生殖嵴后，立即发生形态和生理学的变化，如伪足消失、细胞迅速增殖等（详细内容请参阅第十一章）。

(二) 性别决定了生殖细胞的分化

对于大多数动物来说，迁移进生殖腺原基的原始生殖细胞具有两种发育潜能，这主要由生殖腺内的微环境决定其分化为精子还是卵子。对于雌性哺乳动物，由于缺少 Y 染色体，随着性腺分化为卵巢，该生殖细胞即分化成卵原细胞（oogonium），卵原细胞以有丝分裂的方式进行增殖。卵原细胞边增殖边向卵巢皮质迁移，大约在第二代卵原细胞时到达皮质。随后，卵原细胞开始进入减数分裂，并被次级性索细胞包裹后形成原始卵泡。一般来说卵原细胞一旦进入减数分裂，就需要与性索分化出来的原始颗粒细胞相互作用而形成原始卵泡，为其进一步的生长发育提供营养。如果这个过程不能顺利完成，将引起卵原细胞的退化。卵原细胞进入减数分裂的时间一般是在出生前后。以小鼠为例，妊娠 13 天左右开始有部分卵原细胞进入减数分裂，此时，仍有大量卵原细胞在进行有丝分裂，处于有丝分裂和减数分裂同时进行的时期；大约到妊娠 16 天以后绝大多数处于减数分裂，而有丝分裂逐渐停止，到出生时原始卵泡形成后，卵原细胞的减数分裂进行到双线期和偶线期时，阻滞在第一次减数分裂前期形成初级卵母细胞。处于第一次减数分裂阻滞的卵母细胞在卵泡中随着卵泡的发育、增长而继续生长发育，体积不断变大，直到在排卵前促性腺激素峰的作用下，阻滞的卵母细胞才恢复减数分裂，排出第一极体，然后进入第二次减数分裂并再次阻滞在第二次减数分裂中期（大多数哺乳动物），直到受精后才恢复第二次减数分裂，排出第二极体，形成合子（受精卵）。

三、卵泡的生长和发育

卵泡发育（follicular development）是指卵泡由原始卵泡发育成为初级卵泡、次级卵

泡、三级卵泡和成熟卵泡的生理过程（图 4-1）。

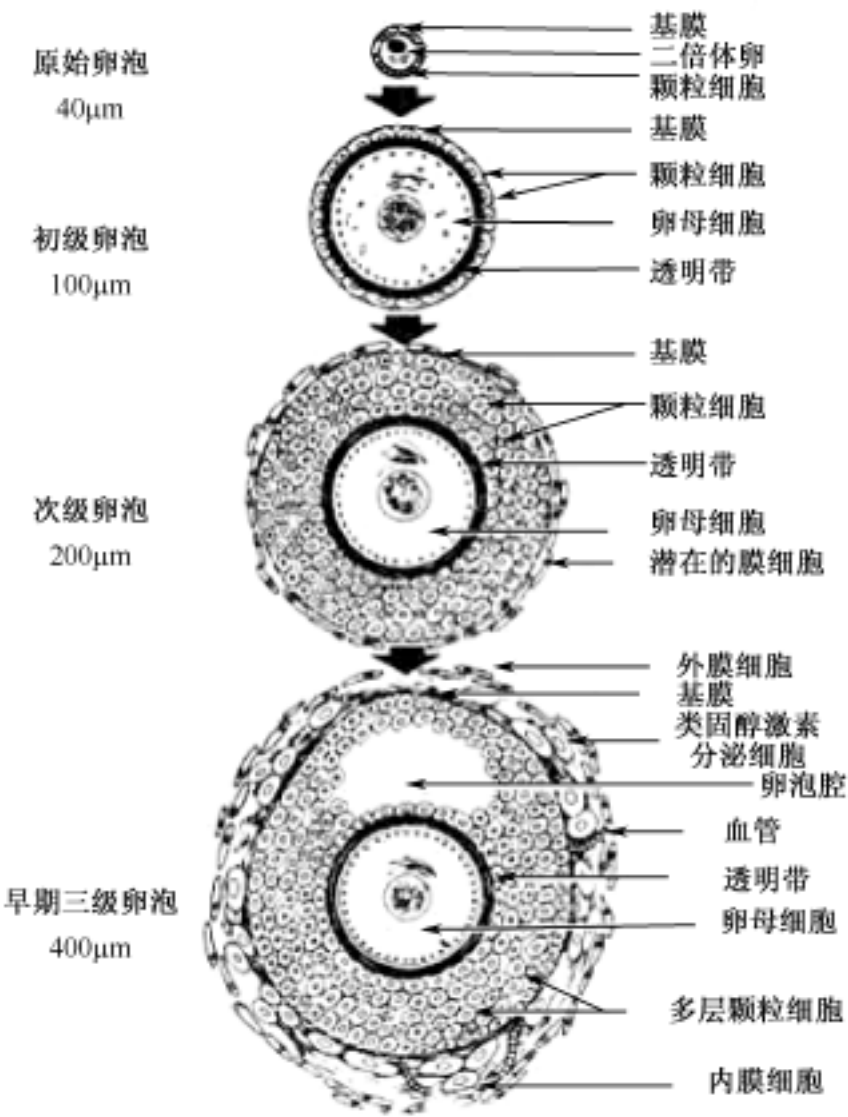


图 4-1 各级卵泡的形态结构示意图（引自 Erickson GF, 1978）

在人胚胎发生过程中，原始生殖细胞产生于中胚层的尿囊，向卵巢迁移，进而增生并分化为原始卵泡。人在初潮前，原始卵泡生长一直受到抑制，有的原始卵泡甚至到更年期还受到抑制。在每个月经周期的开始，有 15~20 个原始卵泡发育成初级卵泡。但在促性腺激素和卵巢激素的作用下，最终只有一个初级卵泡发育为成熟卵泡，其他的卵泡都发生闭锁。成熟卵泡可以在促性腺激素峰的作用下发生排卵，主要是卵母细胞和包围在其周围的卵丘细胞被排出来进入输卵管，而壁层颗粒细胞则还留在卵巢内。壁层颗粒细胞和周围的膜细胞发育成黄体，黄体在 14 天后也发生闭锁。大概几个月之后，这些黄体可以发育为白体。从初级卵泡到最后阶段的黄体，这个发育过程大概需要三个完整的月经周期。

（一）原始卵泡（primordial follicle）

原始卵泡由一个初级卵母细胞和包围在其周围的一层纺锤状原始颗粒细胞组成，单层原始颗粒细胞把卵母细胞和基膜分开。原始卵泡直径约为 20~35μm，种间差异不大。原始卵泡内卵母细胞周围的颗粒细胞数目不等，牛约 24 个、绵羊 28 个、人 13 个、小鼠 10 个，呈极性分布于卵母细胞周围，极端的颗粒细胞则较厚。原始卵泡最初出现

的时间在动物间是不同的，而同一动物的原始卵泡也是逐渐形成的。小鼠在出生前、兔在出生后 10 天、猪出生后 35 天，卵原细胞停止有丝分裂并进入减数分裂，从而转化为卵母细胞，形成原始卵泡。

在人胎儿发育的第七个月，原始卵泡的数量达到最多，大约有 700 万个。在出生前，初级卵母细胞进入最后一轮 DNA 合成，然后被抑制在第一次减数分裂的前期，直到排卵前不久。可见，一个初级卵母细胞处于第一次减数分裂阻滞可长达 12 年之久，有的时间会更长，可达 50 年。其他动物的阻滞时间分别为几十天至几十年不等（根据动物的生殖年限）。

大量的原始卵泡形成后聚集在卵巢皮质部位，形成原始卵泡库。原始卵泡库是卵泡发育的基础，它一旦形成，原始卵泡就逐渐依次离开卵泡库开始生长，贯穿动物的整个生殖周期。原始卵泡库中的原始卵泡数量是固定的，不会因为每次一些卵泡的离开而重新增加，其数量依动物种类的不同而异，出生时小鼠约为 1 万个，人约为 100 万个，家畜约为几百万个；到初情期（人为青春期）时，已降至人约 4 万个、小鼠约 5 000 个、牛约 21 万个及猪约 42 万个。

关于卵泡发育的始动以及卵泡在卵巢中结构性分布的问题，起初科学家认为最先进入减数分裂并形成原始卵泡的卵母细胞最先成熟并最先排卵，而最后进入减数分裂的卵母细胞最后排卵，即“First in, First out and Last in, Last out”学说，但此学说一直没有得到实验的证实。1997 年 Byskov 等人利用小鼠胚胎期卵巢体外培养的技术证明，最先形成的原始卵泡最早启动生长，并向卵巢髓质部迁移，生长卵泡的比例约占 6% 左右，这一点与整体卵巢卵泡发育的情况相似。并证明卵巢中原始卵泡和生长卵泡的分布类型是在胚胎的 12 天左右就已经定型，如果把从 12 天以前的小鼠胚胎中分离的卵巢进行体外培养，则不能形成类似成体卵巢那样的卵泡分布规律，说明卵泡的分布定型可能有其内在机制。但目前尚不清楚在这一关键时期是什么因素启动了这一变化。

（二）初级卵泡（primary follicle）

原始卵泡的生长启动后，卵母细胞周围的原始颗粒细胞会由扁平变为立方或高柱状的颗粒细胞。初级卵泡被定义为多个立方体状的颗粒细胞以单层方式包围一个卵母细胞。初级卵泡阶段的主要发育事件包括 FSH 受体的表达和卵母细胞的生长分化。

1. FSH 受体的表达

在初级卵泡的发育过程中，颗粒细胞上表达 FSH 受体（图 4-2）。在啮齿类动物中，颗粒细胞产生的激活素（activin）可以通过自分泌/旁分泌的机制促进 FSH 受体的表达。因为颗粒细胞表达 FSH 受体发生在腔前卵泡发育阶段，因此就会产生这样的问题：FSH 是否在腔前卵泡的发育中起作用？对于这个基本的问题，答案还不清楚。但是在动物中，血浆中高水平的 FSH 会加速初级卵泡的发育。可见，FSH 的升高就可能影响初级卵泡的发育过程。目前认为，在初级卵泡发育阶段，FSH 不是必需的，换句话说，初级卵泡的发育可能并不需要 FSH 的刺激作用，这一点可以从摘除垂体的动物或灵长类的实验证明，发现即使血液中已经没有了 FSH，但卵巢中仍然存在一些发育的卵泡，

只不过数量较少，且不能最终成熟。然而 FSH 可以促进更多的卵泡发育却是不争的事实。

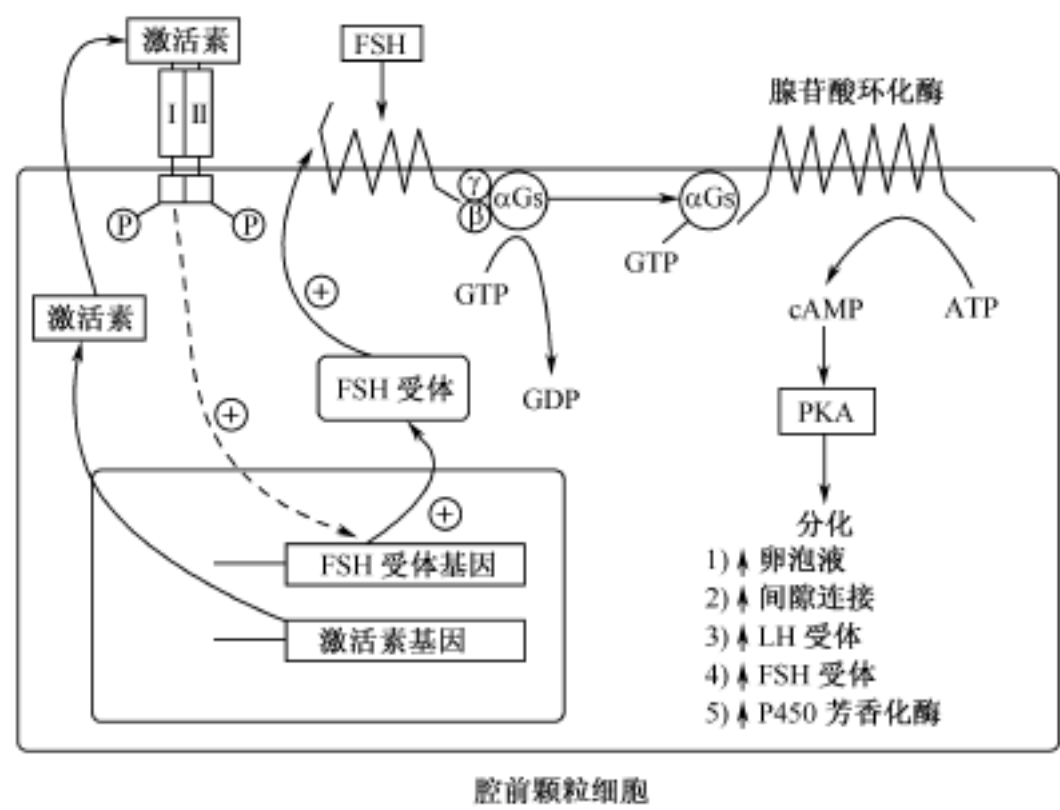


图 4-2 腔前卵泡发生过程中颗粒细胞的早期分化，包括 FSH 受体的表达
(引自 Erickson GF)

动物实验表明，这一过程受到激活素的自分泌/旁分泌调节

目前，对控制卵泡生长始动的因子还不知道。促性腺激素似乎并不控制这一始动过程，因为在垂体摘除的动物，卵泡仍可以发育到腔前卵泡。在一些动物中如牛和马（可能还包括绵羊和山羊）中，发情周期只有很少几个优势卵泡发育（似乎每天只有几个卵泡开始发育）。而在另一些动物，同时会有一组卵泡同时发育（如猪、猫和狗），似乎在黄体期（猪）没有卵泡竞争生长波的趋势，或在排卵前阶段只有一群卵泡发育。这样，这群卵泡的发育可能抑制或限制了原始阶段卵泡的进一步发育。很明显卵泡生长的始动是受基因控制，其发育类型则反映了种间特异性。

2. 卵母细胞的生长和分化

初级卵泡发育过程中伴随着卵母细胞体积的显著变化。在腔前卵泡阶段，卵母细胞的直径可以从 25 μm 增加到 120 μm ，这样大的变化是卵母细胞基因组激活的结果。在小鼠中发现，颗粒细胞产生的 kit 配基可以促进卵母细胞的生长。卵母细胞的一些 mRNAs 被翻译后产生的蛋白也会有助于卵母细胞的生长和分化。如编码透明带蛋白的基因被转录和翻译后，会产生透明带蛋白 ZP1、ZP2 和 ZP3。分泌的透明带蛋白会在接近卵母细胞表面的地方开始发生多聚化，与颗粒细胞分泌的界限物质一起形成最终包围卵子的透明带。透明带的重要作用主要表现在 ZP3 上，它是种属特异性的精子结合分子，对于受精过程中顶体反应的诱发起着重要的作用。其他在生长卵母细胞中表达的重要基因包括生长分化因子-9 (GDF-9) 和骨形态发生蛋白-15 (BMP-15)。其中生长分化因子-9 引起了人们的特别兴趣，因为在啮齿类动物中的研究已经证实，生长分化

因子-9 在促进颗粒细胞增殖和膜细胞发育的过程中起着重要的作用。可见卵母细胞产生的生长因子在调节腔前卵泡发生的过程中起着关键的作用。人的卵母细胞表达高水平的生长分化因子-9 和骨形态发生蛋白-15, 并且生长分化因子-9 可以在体外促进人腔前卵泡的生长。由此可以推断出腔前卵泡的发生很可能被卵母细胞所产生的生长因子所调节。有趣的是, 卵母细胞表达生长分化因子-9 的失调与妇女的多囊卵巢综合征 (PCOS) 也有关系, 其中的关系尚不得而知。

在初级卵泡的发育过程中, 一个重要的事件就是卵母细胞和颗粒细胞间间隙连接的形成。间隙连接是相邻细胞之间的一种可以开或关的通讯连接或电偶联通道 (亦即“门控”通道), 间隙连接通道可因构成其管壁的连接蛋白 (connexin) 构象的变化而发生开闭。当间隙连接通道开放时, 可允许分子质量小于1000 Da 的营养成分 (如单糖、氨基酸等)、离子和参与信号传递的分子 [如 Ca^{2+} 、cAMP 和三磷酸肌醇 (IP_3)] 等, 在相互连接、具有通讯能力的细胞之间进行交换。

卵泡募集后, 卵母细胞就会表达连接蛋白 37 (Cx37), 形成间隙连接。Cx37 基因突变常造成小鼠雌性不育, 其病因是卵泡不能发育成熟, 颗粒细胞在很早阶段就黄体化, 卵母细胞发育不到具有恢复减数分裂能力的状态。可见, 在实验动物中, Cx37 对于卵泡发生和雌性的生育能力是必需的。颗粒细胞和卵母细胞通过 Cx37 连接起来, 并且通过这样的间隙连接物质从颗粒细胞被运送到卵母细胞。这些来源于颗粒细胞的物质对于卵母细胞生长起着调节和营养的作用, 也可能是促进减数分裂恢复的物质。另外, 卵母细胞产生的信号, 也可以通过间隙连接传递给颗粒细胞, 防止颗粒细胞过早分化, 维持颗粒细胞的发育。

(三) 次级卵泡 (secondary follicle)

随着腔前卵泡发生的继续, 卵泡的结构开始发生变化。卵泡结构的主要变化发生在次级卵泡阶段, 包括颗粒细胞数目的不断增多和卵泡膜细胞的形成。从初级卵泡到生长完全的次级卵泡过程, 是一个包括卵母细胞产生的生长因子在内的自分泌/旁分泌调节的过程。

1. 初级卵泡到次级卵泡的转变

次级卵泡的发育开始于第二层颗粒细胞的出现, 这一过程被称为初级到次级卵泡的转变, 包括颗粒细胞从简单的立方上皮到分层的或假分层的柱状上皮的转变。在动物上的实验已经证实, 初级/次级卵泡阶段是卵泡发生过程的关键调节阶段, 如在小鼠和绵羊中, 缺少生长分化因子-9 和骨形态发生蛋白-15 会使卵泡的生长和发育停止在初级卵泡阶段。这说明卵母细胞产生的生长分化因子-9 和骨形态发生蛋白-15 在卵泡从初级向次级的转变过程中起着必不可少的作用, 这种作用可能是通过促进颗粒细胞有丝分裂和影响颗粒细胞的排列方式来实现的。在卵泡募集后, 会在颗粒细胞之间形成大的间隙连接, 连接蛋白 43 (Cx43) 是在颗粒细胞上表达的主要的间隙连接蛋白。Cx43 缺失的小鼠中, 卵泡发生会抑制在从初级卵泡向次级卵泡的转变阶段。这些结果暗示了 Cx43 与生长分化因子-9 和骨形态发生蛋白-15 一样, 在调控次级卵泡形成的过程中起

着必不可少的作用。

2. 膜细胞发育

次级卵泡的发育也表现在膜细胞的发育。在初级卵泡向次级卵泡转变的过程中，有几层基质细胞样的细胞出现在基膜周围。在大鼠的一些基质样细胞中，会表达一种名为骨形态发生蛋白-4的物质，可以作为分化的膜细胞的功能性标记。这一重要的发现也暗示了膜细胞在卵泡发生的很早阶段，即初级卵泡向次级卵泡转变的阶段，就开始了其发育。随着次级卵泡的发育，膜细胞会分成两层：内膜细胞和外膜细胞，内膜细胞分化成膜间质细胞，外膜细胞分化成平滑肌细胞。膜细胞的发育还伴随着许多小血管的生成，这样围绕卵泡的血液就可以把营养物质和促性腺激素运送到正在发育的卵泡，同时把卵泡产生的废物和分泌的物质运送出卵泡。当卵泡发生的腔前阶段结束后，一个完全生长的次级卵泡通常包含5部分截然不同的结构单位：一个被透明带包围的生长完全的卵母细胞、5到8层的颗粒细胞、一层基膜、一层内膜和一层外膜，在内膜中存在着丰富的毛细血管网（图4-3）。

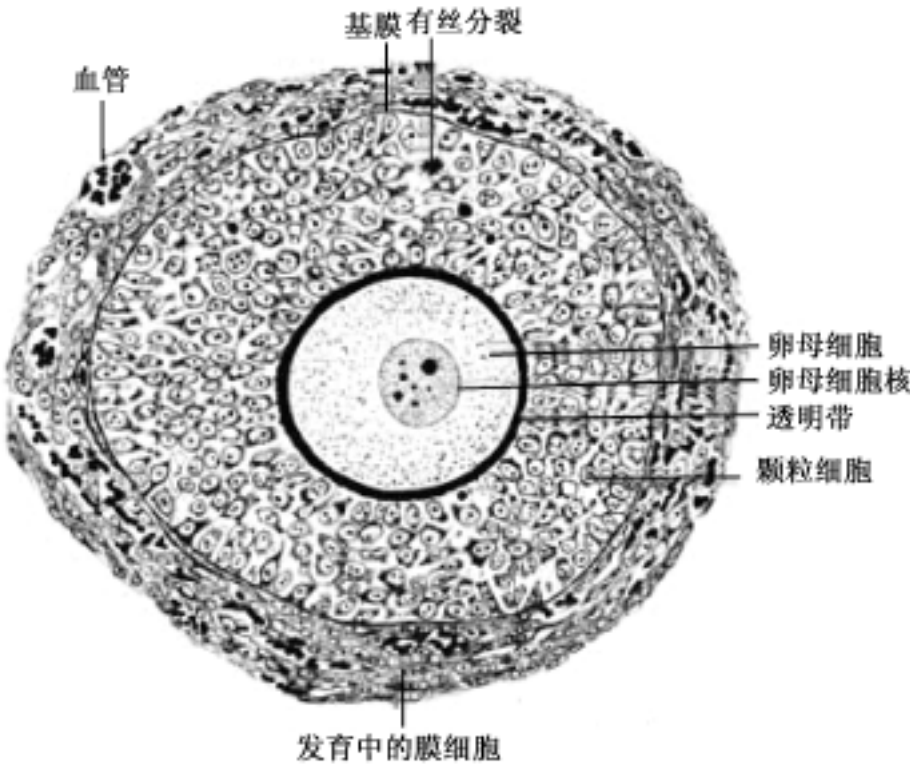


图 4-3 一个典型的次级卵泡（引自 Bloom W, 1975）

包含一个生长完全的、被透明带包围的卵母细胞，5到8层的颗粒细胞，一层基膜，卵泡内膜细胞和外膜细胞以及大量的血管

3. 卵泡体细胞中促性腺激素受体的出现

为了使卵泡发育越过腔前阶段，颗粒细胞和膜细胞开始表达促性腺激素的受体。FSH 和 LH 受体分别在颗粒细胞和膜细胞上表达出来。

促性腺激素受体在颗粒细胞和膜细胞上的出现导致了雌激素合成的细胞间相互作用的形成，即“两激素两细胞”学说。首先膜细胞在 LH 的作用下分泌雄激素（睾酮和雄烯二酮），雄激素通过固有膜到达颗粒细胞，在这里雄激素被转化成雌激素（雌二醇）。同期，颗粒细胞不能合成雌激素形成的前体物质雄激素，而膜细胞合成雌激素的能力很

小。这个概念就是被广泛接受的雌激素合成的两细胞机制。这些雌激素对颗粒细胞有正反馈作用，刺激颗粒细胞的有丝分裂，这样随着卵泡中颗粒细胞在其分泌物的作用下(雌激素)增生而导致卵泡的生长。

(四) 三级卵泡 (tertiary follicle)

次级卵泡进一步发育成为三级卵泡。在这个时期，卵泡细胞分泌的液体进入卵泡细胞和卵母细胞间隙，形成卵泡腔 (图 4-4)。卵泡腔内的液体称为卵泡液，卵泡液是血浆的渗出液，受到卵母细胞和颗粒细胞分泌产物的调节。通过卵泡液这个微环境作为媒介，卵母细胞和颗粒细胞可以接受或释放调节物质。

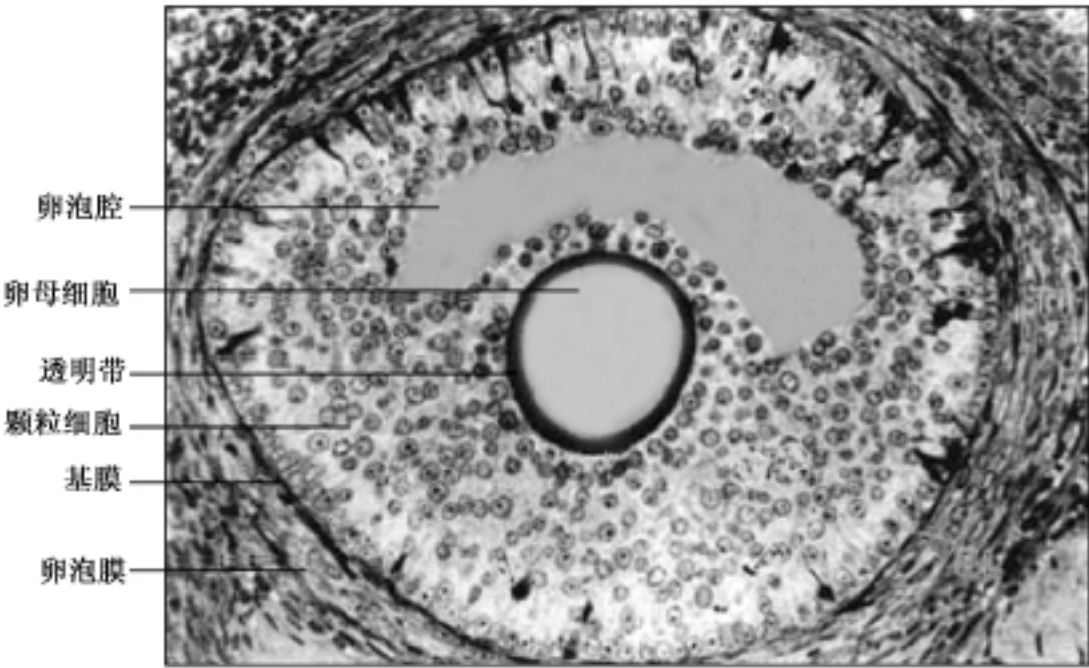


图 4-4 早期有腔卵泡的显微照片，直径大约 0.4mm
(引自 Bloom W 等，1975)

Antrum: 腔; ZP: 透明带; GC: 颗粒细胞; BL: 基膜; TI: 内膜细胞; TE: 外膜细胞; 箭头处示颗粒细胞有丝分裂

随着卵泡液分泌量的增多，卵泡腔进一步扩大，卵母细胞被挤到一边，并被包围在一团颗粒细胞中，形成突于卵泡腔中的半岛，称为卵丘 (cumulus)。其余的颗粒细胞则紧贴在卵泡腔周围，形成卵泡壁层的颗粒细胞层。

卵泡腔形成的早晚与卵泡的发育程度有关。发育快的卵泡，卵泡腔形成的较早，而发育晚的卵泡，卵泡腔的形成就较晚。因此，卵泡腔是否形成以及形成后的大小可以作为评定卵泡发育程度的依据。在实验动物中，有两种卵泡表达的蛋白质对卵泡腔的形成是必需的，分别是颗粒细胞产生的 kit 配基和卵母细胞间隙连接蛋白 Cx37，这两种蛋白缺少任何一种，都不会有卵泡腔形成，这样的雌性也是不育的。通常卵泡腔的大小是与卵泡的大小成比例的。

另外一个重要的机制是随着卵泡的增大和颗粒细胞的增多，雌激素的分泌量增加。雌激素的作用就是随着卵泡的进一步发育促进 FSH 受体的进一步增加。在这种情况下，有腔卵泡对 FSH 变得格外敏感，甚至在 FSH 相对稳定分泌的情况下卵泡也能生长。

(五) 格拉夫卵泡 (Graafian follicle)

格拉夫卵泡是三级卵泡进一步发育至成熟前的卵泡，实际上属于三级卵泡，包括成熟卵泡。这种卵泡扩展达卵巢皮质的整个厚度，甚至突出于卵巢表面。由于格拉夫卵泡的分级较多，且和现在的卵泡分级有所交叉，加上很多关于三级卵泡的知识是按照格拉夫卵泡描述的，故本节对格拉夫卵泡作一单独介绍。

1. 分级

按照格拉夫卵泡的大小，其生长和发育可大概地分为四个阶段。在妇女中，一个优势卵泡都会经历小卵泡 (1~6mm)、中卵泡 (7~11mm)、大卵泡 (12~17mm) 和排卵前卵泡 (18~23mm) 四个阶段。而闭锁的卵泡一般都不能发育超过中卵泡阶段，它们的大小在 1~10mm。其他的格拉夫卵泡的大小会由于年龄和月经周期的不同而有所变化。

2. 结构

形成腔以后，格拉夫卵泡的基本框架已经形成，所有的各种类型的细胞都处在它们的适当的位置，只等待刺激物来引起卵泡的逐渐生长和发育。在人的卵巢中，格拉夫卵泡是由相对大的卵泡组成的不均匀的家族的一员，它们的直径在 0.4~23mm。虽然格拉夫卵泡大小变化很大且会处于月经周期的不同阶段，但是它们的组织结构在本质上是相同的。格拉夫卵泡的大小取决于卵泡腔的大小，而卵泡腔的大小又由卵泡液的量来决定。由于卵泡大小的不同，卵泡液的量一般在 0.02~7ml。卵泡体细胞的增殖也有助于卵泡的增大，在一个优势卵泡中，随着卵泡腔变得充满液体，颗粒细胞和膜细胞也会发生大量的增殖 (高达 100 倍) (图 4-5)。因此，不断增加的卵泡液累积以及卵泡体细胞的不断增殖对于优势卵泡的急剧生长是必不可少的。

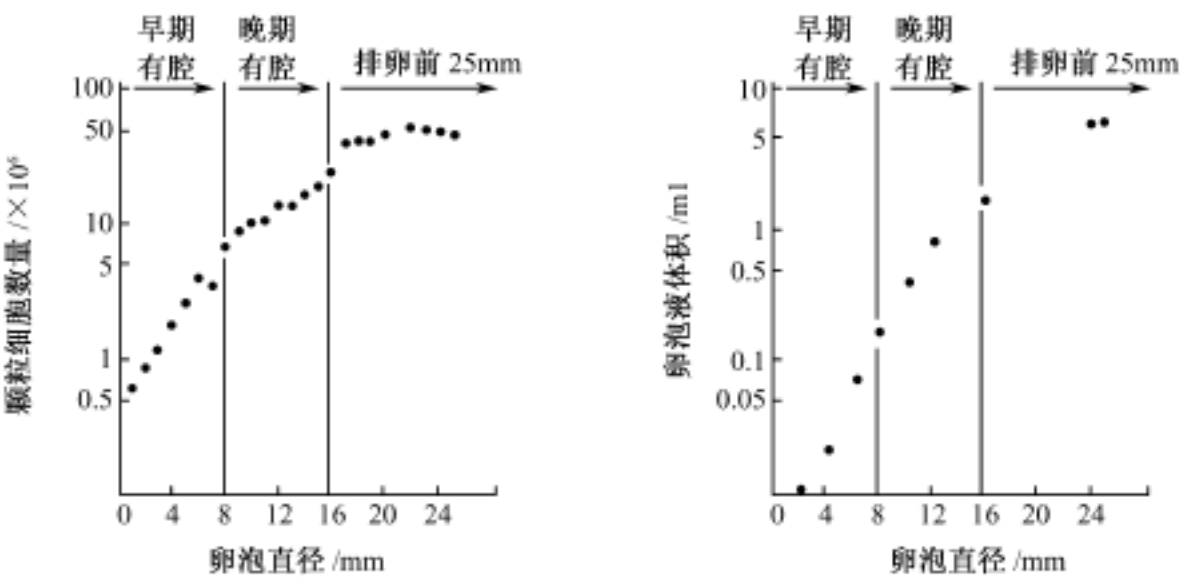


图 4-5 在卵泡发生过程中，人格拉夫卵泡中颗粒细胞数量以及卵泡液体积的变化 (引自 McNatty KP)
人排卵前卵泡的直径约 25mm，包含约 50 000 000 个颗粒细胞和约 7ml 的卵泡液

格拉夫卵泡的外膜细胞由一些同心排列的平滑肌细胞组成，它们受到植物性神经的支配。该神经对于外膜细胞的生理作用还不清楚，可能是在卵泡排卵过程中促进平滑肌细胞收缩而使卵母细胞从卵泡壁的破裂口中排出。

内膜细胞包含一群大的上皮细胞，称为膜间质细胞。这些细胞具有产生类固醇激素活性细胞的典型超微结构特点，如胞质充满了脂滴、滑面内质网和线粒体有管状的嵴。膜间质细胞上有 LH 和胰岛素的受体，在 LH 和胰岛素的刺激下，它们会产生大量的雄激素，主要是雄烯二酮。在格拉夫卵泡的生长过程中，内膜细胞会形成丰富的疏松毛细血管网。

在格拉夫卵泡中，颗粒细胞和卵母细胞形成合胞体 (syncytium)，合胞体的双方都具有恰当的形状和位置。这种空间分布可以把颗粒细胞分成四个亚型：壁层颗粒细胞、腔周围颗粒细胞、卵丘细胞和放射冠细胞。在格拉夫卵泡的发育过程中，所有的颗粒细胞都表达 FSH 受体，但是由于受其位置不同的影响，在 FSH 的刺激下，它们会呈现不同的分化状态。如壁层（膜层）颗粒细胞会表达 P450 芳香化酶和 LH 受体，但是腔周围颗粒细胞、卵丘细胞和放射冠细胞却不表达 P450 芳香化酶和 LH 受体。

格拉夫卵泡中颗粒细胞的分化受到卵母细胞分泌的形态发生素的浓度梯度的调控。在实验动物中的研究已经证明，卵母细胞产生的生长因子可以直接作用于颗粒细胞，抑制其依赖于 FSH 的胞质分化。两个已明确的卵母细胞产生的形态发生素是生长分化因子-9 和骨形态发生蛋白-15，随着格拉夫卵泡的发育，生长分化因子-9 和骨形态发生蛋白-15 会形成浓度梯度信号，来调节颗粒细胞分化成功能不同的细胞类别。

有腔卵泡发育的后期，FSH 和雌激素促使壁层颗粒细胞中产生 LH 受体，而 FSH 受体开始减少。有腔卵泡雌激素分泌的增加导致排卵前促性腺激素峰的出现。这样，在发育的最后阶段，卵泡在 LH 的控制下排卵，然后开始形成黄体。

(六) 成熟卵泡 (mature follicle)

卵泡发育到最大体积时，卵泡壁变薄，卵泡腔内的卵泡液体积增加到最大，这时的卵泡称为成熟卵泡或排卵前卵泡 (preovulatory follicle)。人的排卵前卵泡直径可达 25mm，牛的排卵前卵泡直径可达 10~14mm。多胎动物在一个发情周期内，可有数个至数十个原始卵泡同时发育到成熟卵泡，而单胎动物一般只有一个卵泡发育到成熟卵泡并排卵。

初级卵泡、次级卵泡和三级卵泡有共同的特点——生长发育较快，主要表现在细胞分裂迅速，体积增大明显，但持续的时间较长，通常将这三类卵泡称为生长卵泡。三级卵泡（格拉夫卵泡）和成熟卵泡的共同特点则是都含有卵泡腔，因此被称为有腔卵泡 (antral follicle)。有腔卵泡，特别是那些将要排卵的卵泡发育的特点是，体积变化很大，呈级数增长。该期的变化是绝对依赖于促性腺激素的分泌。各种卵泡的相互关系可由图 4-6 表示。

上述卵泡发育过程的分类方式仅以形态学为标准，忽视了卵泡功能变化的独特性。因为某一个特定时期的卵泡可能涵盖多个与生长和发育相关的非常关键的变化，仅用结构上的分类很容易掩盖这些变化的功能独特性，不利于了解卵泡发育的调节。为了避免

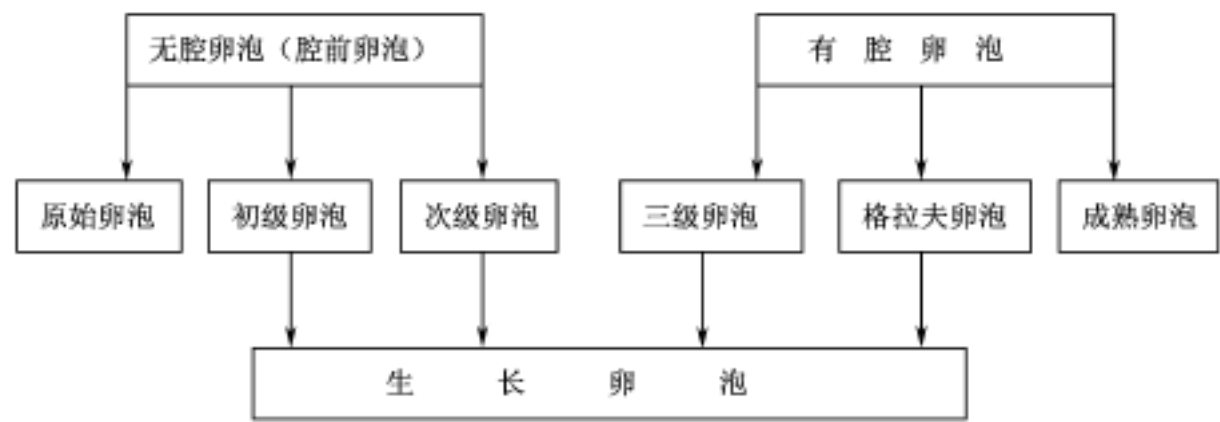


图 4-6 各种类型卵泡的相互关系 (改自郑行等, 1994)

这种分类方式中的种种缺陷, Scramuzzi 等根据卵泡对促性腺激素的依赖性和敏感性提出新的分级模式, 将卵泡分为五级, 即: 静止卵泡 (quiescent follicle) 相当于原始卵泡; 始动生长的卵泡 (committed follicle) 包括腔前卵泡和有腔卵泡; 对促性腺激素有反应的卵泡 (gonadotropin-responsive follicle); 促性腺激素依赖性卵泡 (gonadotropin-dependent follicle) 和排卵卵泡 (ovulatory follicle)。按照这种分类方式所划分的各级卵泡之间的界限不是绝对孤立的, 因为卵泡的生长发育过程是一个连续的过程。如腔前卵泡到有腔卵泡这一阶段也属于对促性腺激素有反应的卵泡, 格拉夫卵泡和排卵卵泡属于促性腺激素依赖性卵泡。

四、卵泡发生和募集

(一) 卵泡发生 (folliculogenesis)

卵泡发生开始于募集一个或多个原始卵泡到生长卵泡库, 终止于排卵或者卵泡闭锁。在人类, 卵泡发生会经历一个很长的过程, 几乎需要一年的时间才能使一个原始卵泡生长发育到排卵阶段。卵泡发生可分为两个阶段, 第一个阶段称为腔前或促性腺激素不依赖的阶段, 这个阶段的特征是卵母细胞的生长和分化。第二个阶段称为有腔或促性腺激素依赖的阶段, 这个阶段的特征是卵泡本身体积的迅速增大 (可达约 25mm)。腔前卵泡阶段由局部产生的生长因子通过自分泌或旁分泌的形式来调节。有腔卵泡阶段既有 FSH 和 LH 的调节, 又有生长因子的调节。对于生长因子的作用, 引起了人们的很大关注, 因为它既可以刺激细胞的增殖, 又可以调节促性腺激素的作用。现在这个领域中所面临的挑战是确定卵巢生长因子通路是如何负向地或正向地调节卵泡发生、排卵和黄体的生成。

卵泡发生的过程起始于卵巢的皮质内, 卵泡发生可以被看作是一个通过细胞增殖和细胞分化来连续获得更高水平组织结构的过程。卵泡发生包括四个主要的发育事件: ①原始卵泡的募集; ②腔前卵泡的发育; ③有腔卵泡的选择和生长; ④卵泡的闭锁。

(二) 卵泡募集 (recruitment)

卵泡从受抑制的原始卵泡进入生长卵泡的过程被称为卵泡募集，或称为原始卵泡到

初级卵泡的转变。人胎儿的一些原始卵泡在它们形成后不久就被募集，启动生长。卵泡募集会一直持续到更年期之后，这时卵巢中的原始卵泡已经被耗尽（图 4-7）。在妇女 30 岁之前，原始卵泡的募集维持在相对恒定的比率。但是当卵巢储备到达一个临界数目（约 25 000）时（此时妇女的年龄在 37.5 ± 1.2 岁），原始卵泡丢失的速率会加快 2 倍（图 4-8）。生育能力也会随着卵巢储备加速丢失而下降。妇女 36 岁之后，血液中 FSH 水平会随着年龄的增大而升高，这可能会引起卵泡募集加速以及生育力的下降。一般来说，血浆中高水平的 FSH 会加速初级卵泡到次级卵泡的转变。

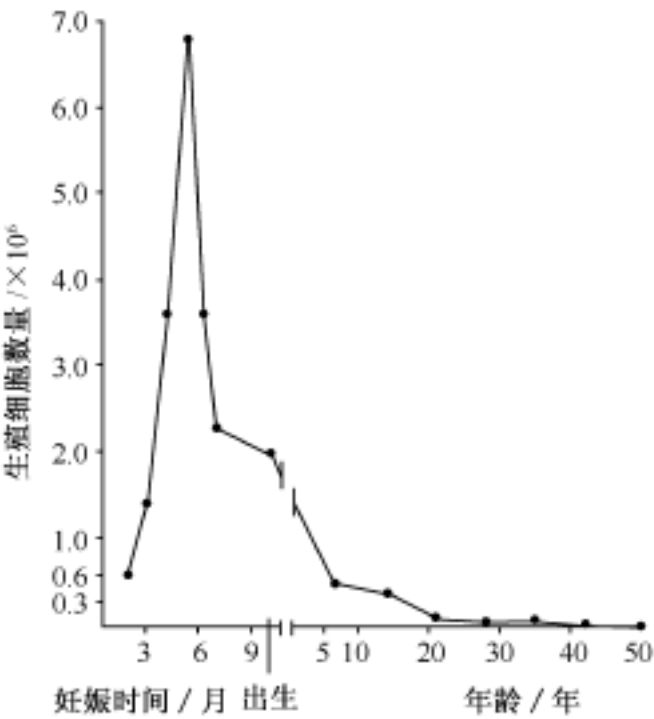


图 4-7 在妇女中，所有的原始卵泡在妊娠的第 6 到第 9 个月形成，在这期间会有大量的卵泡发生凋亡（引自 Baker TG, 1971）
随着卵泡的不断募集，到更年期（约 50 岁）时，只剩下非常少的卵泡

颗粒细胞形状从扁平状变成立方体状以及其有丝分裂能力的获得是卵泡募集的组织学特点，紧接着便是基因的激活和卵母细胞的生长。可见，卵泡体细胞对于卵泡募集起着非常重要的作用。在动物中，卵泡募集

由正向和负向调节因子同时调节。目前所知道的三个卵泡募集的活化剂分别是：颗粒细胞产生的 kit 配基，膜细胞产生的骨形态发生蛋白-7 和血浆中高水平的 FSH。抗缪勒氏管激素（anti-mullerian hormone, AMH）则可以抑制卵泡募集。在啮齿类动物中，kit 配基可以促进卵母细胞的生长，这可能是最早由颗粒细胞产生的因子参与最初激活机制的一部分。此外，Kit 的分泌还可以作为卵母细胞生长的刺激物。尽管卵泡募集在临床上很重要，但现在对于卵泡究竟是怎样募集的还不清楚。

在卵泡形成后，部分原始卵泡脱离原始卵泡库，开始缓慢生长，即所谓的原始卵泡募集的启动（initial recruitment）。在每个发情周期中，当内分泌环境（主要是指促性腺激素分泌情况）发生变化时，能够对这种变化发生应答的已启动募集的（有腔）卵泡开始加快生长。这就是所谓的周期募集（cyclic recruitment）。启动募集和周期募集的区别见表 4-1。Hirshfield 认为，启动募集与周期募集之间存在一个明显的“障碍”。启动募集的卵泡能否参与周期募集的关键在于能否跨越这一障碍，而跨越障碍的决定因素是能否获得对促性腺激素的反应能力。Hirshfield 的研究发现，牛卵泡大规模闭锁多发生于颗粒细胞增殖至 10~13 层时，而牛通常具有 14~15 层颗粒细胞，小鼠的卵泡闭锁大都发生在颗粒细胞增至 8~9 层时，大致也处于倒数第二层颗粒细胞产生时。由此看来，哺乳动物的大规模卵泡闭锁多发生于倒数第二层颗粒细胞产生时。这表明此阶段正是两

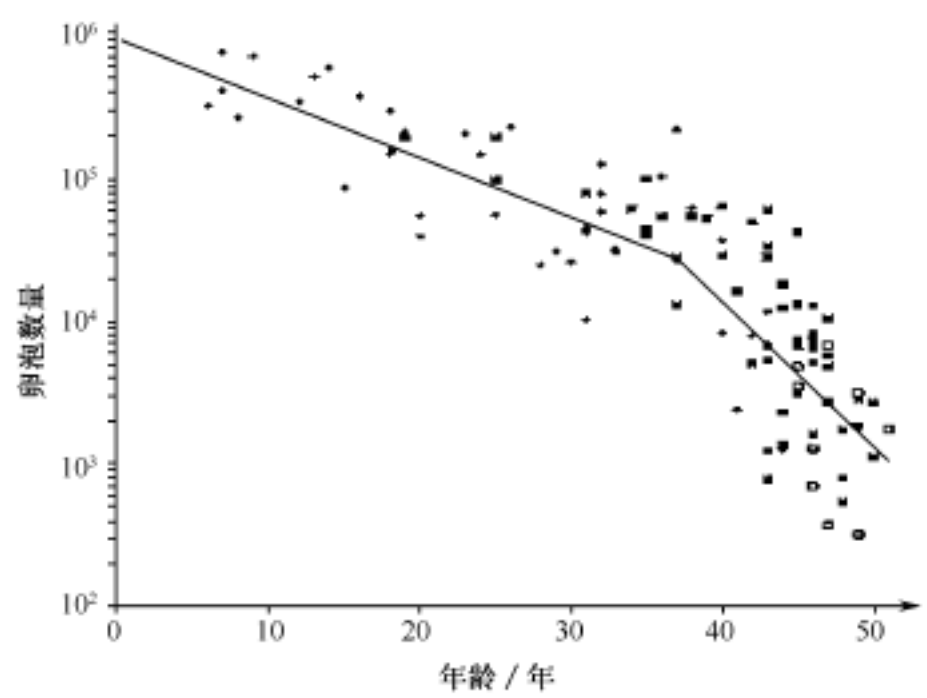


图 4-8 妇女中腔前卵泡数量的减少与年龄呈双指数关系
(引自 Faddy MJ, 1992)

卵泡募集导致腔前卵泡的不断减少，从出生时的约1 000 000减少到 37 岁时的约25 000。在 37 岁时，腔前卵泡的丢失速率增加 2 倍，到更年期（平均年龄 51 岁）时，妇女卵巢中的腔前卵泡的数量仅剩约1 000个

种募集的交界处，如果此时 FSH 升高，就有部分卵泡要参与周期募集。

表 4-1 启动募集和周期募集比较

启动募集		周期募集
卵泡发育阶段	原始卵泡	有腔卵泡
起作用的激素	未定	FSH
未募集卵泡的命运	休眠	凋亡
发生时间	卵泡形成后持续终生	成熟后周期性进行
卵母细胞的状态	开始生长但不能完成 GVBD	完成生长，能够发生 GVBD

卵泡周期募集与启动募集的最大区别在于起始动力的不同。周期募集要以促性腺激素峰作为启动信号，而启动募集时则没有激素的明显变化。启动募集似乎是一种体内自发的过程。但近年来的研究发现，提高 FSH/ LH 的浓度能够增加参与启动募集的原始卵泡数，缩短原始卵泡在库中的停留时间。然而，由于在启动募集期间卵泡尚无 FSH 受体表达，故 FSH 以何种方式起作用还不清楚。Wandji 等发现，切除垂体的动物其原始卵泡依然能够发育到周期募集前。这说明，虽然促性腺激素能促进原始卵泡的发育，但并非起主导作用，卵巢中某些未知的因子才是调节启动募集的关键。近来有人证明，这种未知因子有可能是表皮生长因子（EGF）和抑制素。周期募集需要启动信号的参与才能发生。现在证明这种启动信号是血浆中的 FSH 浓度升高。对牛进行的研究中发现，每个卵泡波前都有一个 FSH 浓度上升的过程。在对其他动物的研究中也发现了类似的现象。这说明 FSH 峰是卵泡波出现的先决条件。摘除动物垂体或破坏 FSH 在体内生理

条件下的分泌波动会导致卵泡不能进行周期募集或周期募集失控。用抑制素降低 FSH 的浓度，可以阻碍卵泡的募集并推迟下一个卵泡波的出现。同样，人为提高 FSH 浓度可使更多的卵泡参与周期募集。但是，为什么参与了启动募集的卵泡并不能都参与周期募集呢？这可能与卵泡生长中 FSH 受体表达的数量有关。表达 FSH 受体多的卵泡，在较低的 FSH 浓度下具有较高的 FSH 利用率，FSH 受体少的卵泡则正好相反。因此，参与启动募集的卵泡由于 FSH 受体表达的分化而导致两种截然不同的命运，即参与周期募集或闭锁（图 4-9）。

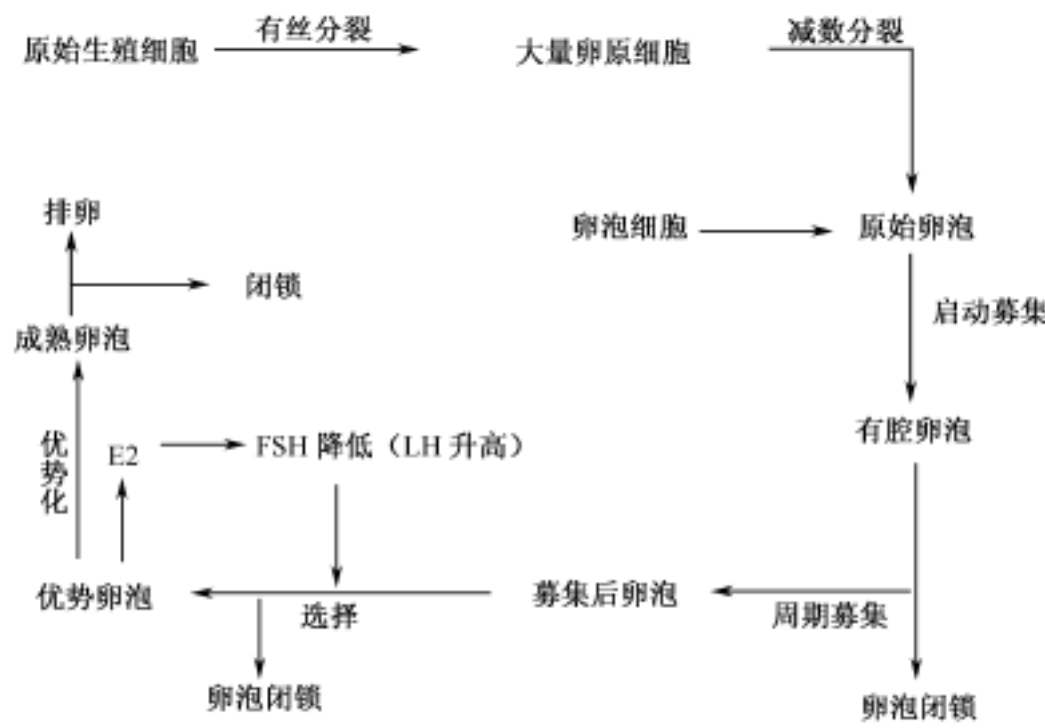


图 4-9 卵泡的启动募集和周期募集（引自吴延光等，2002）

五、卵泡选择和闭锁

（一）卵 泡 选 择

1. 卵泡选择现象

在妇女正常的月经周期中，在黄体期末会从一群三级卵泡中选择一个优势卵泡。在黄体期中期后，一个卵泡波中所有卵泡的颗粒细胞的有丝分裂的速率会急剧升高（2倍），这暗示了黄体退化会以某种方式加强格拉夫卵泡中颗粒细胞的有丝分裂。选择发生的最先特征是，一群卵泡的颗粒细胞以相对快的速率进行增殖，而另一群卵泡的颗粒细胞却以很慢的速率增殖。这种结果大概发生在月经来潮时，之后格拉夫卵泡的发育过程中，颗粒细胞和膜细胞都维持高的有丝分裂速率。随着卵泡期的继续，优势卵泡快速地生长，在1~5天时达到 $6.9\pm0.5\text{ mm}$ ，6~10天时达到 $13.7\pm1.2\text{ mm}$ ，11~14天时达到 $18.8\pm0.5\text{ mm}$ 。而其他的非优势格拉夫卵泡则生长很缓慢。

优势卵泡的发育可以分为三个阶段：①募集期，②选择期，③优势期（图 4-10）。从第1到第4个月经周期，在 FSH 的作用下，会有一批卵泡从未增殖的卵泡库中得到募集。从第5到第7个月经周期，会有一个卵泡从被募集的一批卵泡中选择出来，其他

的卵泡都发生了闭锁。到第 8 个月经周期，这个被选择的卵泡就会发挥它的主导作用来促进其自身的生长，抑制卵巢内其他卵泡的成熟。

在非灵长类的其他大动物（指黄体期与卵泡期重叠的动物），排卵卵泡的选择发生在黄体期。有关黄体期卵泡发育的概念是由早期的科学家 Rajakowski 提出的，他描述了牛发情周期中期的卵泡。利用超声波示波器，可以在牛和马的黄体期鉴定卵泡的生长和退化。在牛的黄体期中只有几个大的优势卵泡生长发育。在某种程度上，卵泡闭锁通常发生在下一个卵泡开始生长之前。第一个优势卵泡的退化大约在黄体期的中期，同时伴随着第二个优势卵泡开始快速生长。不论第二个优势卵泡是否是排卵卵泡或者第三个优势卵泡是否为排卵卵泡，都依赖于黄体退化时卵泡所处的发育时期（图 4-11）。如果第二个优势卵泡在黄体退化时已经开始退化，那么第三个优势卵泡则发育成排卵卵泡。可见排卵卵泡的选择是看在黄体退化开始时哪个卵泡还处于发育阶段。有腔卵泡发育到排卵时的周期在家畜中约为 10 天，在灵长类要稍微长一些。

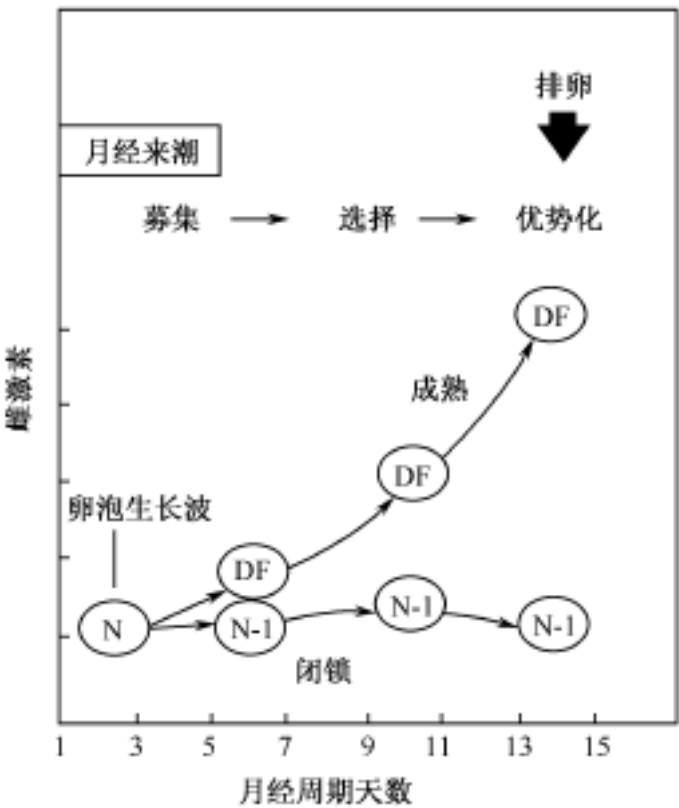


图 4-10 优势卵泡的募集、选择和排卵的时间过程，卵泡波中的其他卵泡都发生闭锁

(引自 Hodgen GD, 1982)

DF: 优势卵泡 (dominant follicle)

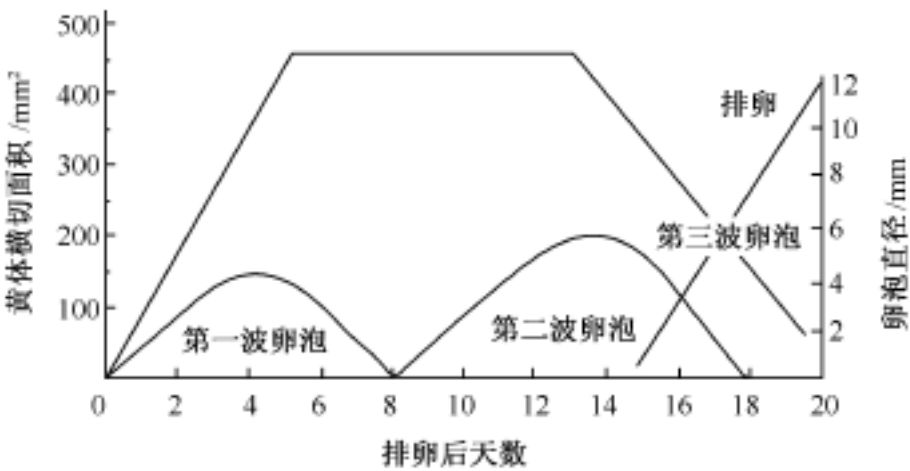


图 4-11 牛卵泡发育与黄体发育的关系 (改自王建辰, 1997)

从超声波学和内分泌研究看，似乎在大家畜中有腔卵泡的最后发育有两个不同的时期。第一期是相对慢的（约 4~5 天），紧接着是第二期，后者是加速生长期（大约也是 4~5 天），直到排卵。卵泡发育的最后生长期能够在黄体期始动，可见这一时期的卵泡始动是在促性腺激素释放（在黄体期）相对慢的波动频率影响下发生的。促性腺激素释放频率的下降是因为孕酮具有抑制促性腺激素分泌波频率的作用。而卵泡的快速生长需要促性腺激素释放波的快速频率出现在快要排卵的第 3 或第 4 天时。这个时间和黄体退

化开始相联系，此时由于孕酮下降而雌激素因卵泡的发育分泌增加，促使促性腺激素分泌的波动频率增加。

2. 卵泡选择的调控

FSH 在卵泡选择和优势卵泡的发育过程中起着必不可少的作用。FSH 调节卵泡选择的基本机制是刺激颗粒细胞上 FSH 受体信号转导通路。尽管 LH 对卵泡选择不是必需的，但是它在调节优势卵泡的形成过程中也起着相当重要的作用，LH 主要是通过促进芳香化酶底物——雄烯二醇的表达来起作用的。想要了解周期中优势卵泡的发育，我们要分别了解颗粒细胞上 FSH 的作用和膜间质细胞上 LH 的作用。

(1) FSH 对颗粒细胞的作用

FSH 受体是一个调节异源三聚体 G 蛋白的跨膜受体超家族的一部分。人的 FSH 受体包括 678 个氨基酸（相对分子质量为 76 465），包括三个结构域：①胞外的 NH_2 末端配基结合结构域，有 6 个潜在的 N 连接的糖基化位点和位于胞外与跨膜结构域交接处的一簇半胱氨酸；②跨膜生成的结构域，由 7 个疏水螺旋组成，可以把受体锚定在质膜上；③胞内- COOH 端结构域，含有很高比例的丝氨酸和苏氨酸残基。其中胞内区域氨基酸的磷酸化在 FSH 受体的脱敏化和下调方面起着重要的作用。

在卵泡期，随着卵泡的生长和颗粒细胞的增多，血清中雌激素的水平也会升高。FSH 受体只存在于颗粒细胞膜上面，在黄体期晚期升高的 FSH 水平会导致颗粒细胞膜上 FSH 受体的增多，并且最终使颗粒细胞分泌的雌激素增加。FSH 受体数目的增加并不是因为每个颗粒细胞上 FSH 受体的数量增加，而是因为颗粒细胞总体数量的增加。在次级卵泡中，每个颗粒细胞膜上大约有 1500 个 FSH 受体，并且卵泡在其后的发育过程中，FSH 受体数目保持相对的恒定。雌激素水平的升高也会增加 FSH 受体的数目，在雌激素存在的情况下，FSH 会促进颗粒细胞上 LH 受体的增加，从而使颗粒细胞能分泌少量的孕酮和 17-羟孕酮，这些分泌的孕酮和 17-羟孕酮又会正反馈于垂体，使垂体增加 LH 的释放。FSH 还可以刺激几个甾类激素生成酶，包括 CYP19、P450 芳香化酶（P450arom）和 3- β -羟基类固醇脱氢酶活性的升高。

FSH 在颗粒细胞中的信号级联如图 4-12 所示。FSH 以很高的活性和它的受体结合，FSH 和受体的结合开始于受体构型的变化，激活 G 蛋白，GTP 会替换和 αGs 亚单位结合的 GDP。此时有活性的 αGs -GTP 会从 G 蛋白复合物上脱离下来，游离的 αGs -GTP 和腺苷酸环化酶（AC）相互作用产生第二信使 cAMP，cAMP 又和 PKA 的调节亚基（R）结合，使 PKA 分离为二聚体的调节亚基和两个游离的催化亚基（C）。催化亚基可以磷酸化 CREB 和 CREM 蛋白中的丝氨酸和苏氨酸残基，这些蛋白被磷酸化之后可以和称为 cAMP 的应答元件的上游 DNA 调节元件结合，从而调节基因的活性。FSH 对颗粒细胞不同基因活性的调控是优势卵泡能够生长发育到排卵前阶段的基础。

颗粒细胞的有丝分裂和持续的快速增殖是处在发育中的优势卵泡的一个特征。在整个卵泡期，颗粒细胞的数目从开始选择时的 1×10^6 增加到排卵前阶段的 50×10^6 。其中，FSH 是颗粒细胞增殖的直接刺激物，另外生长因子也会促进或抑制颗粒细胞的有丝分裂。因此 FSH 可能和生长因子相互作用来调节颗粒细胞的增殖。

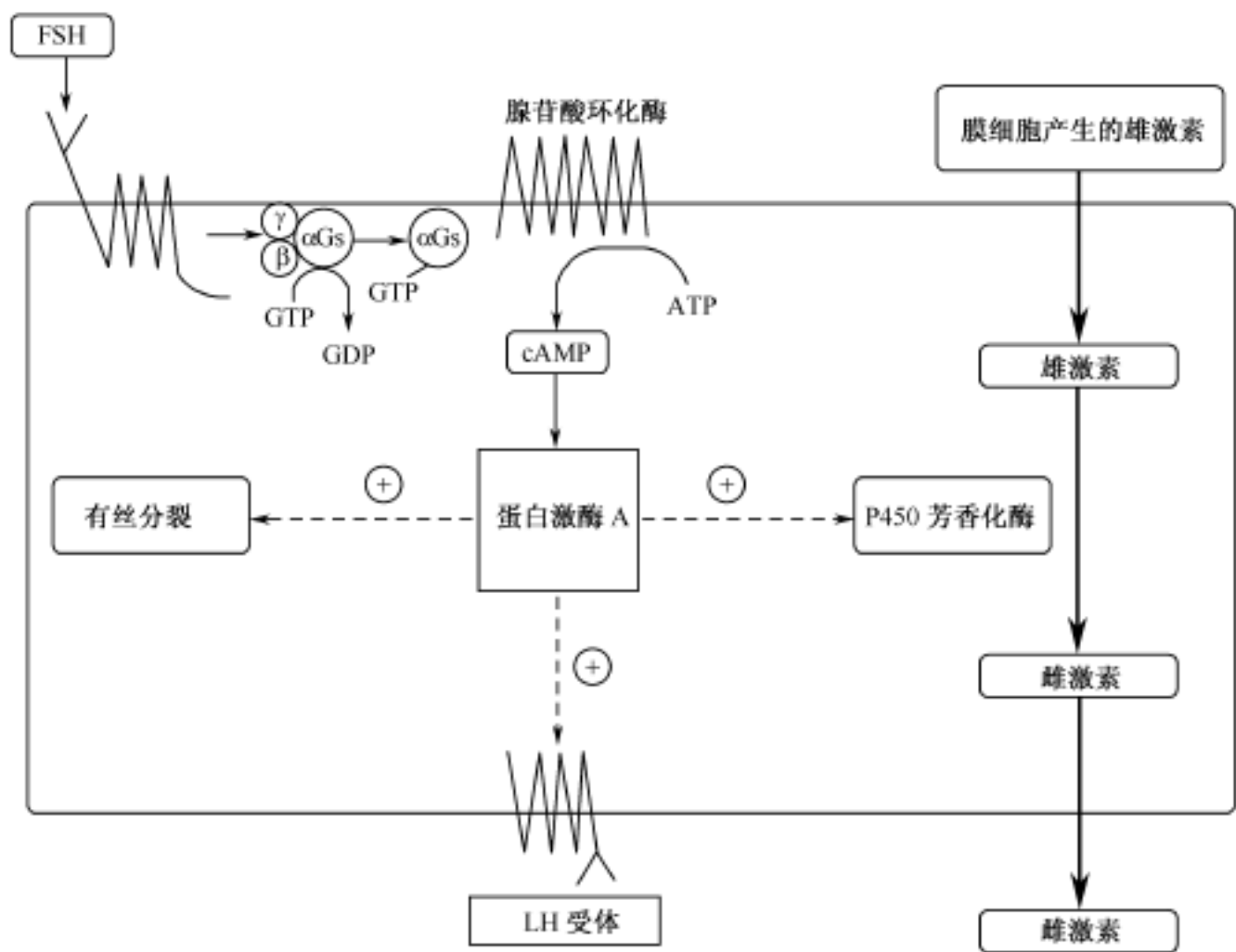


图 4-12 FSH 在优势卵泡颗粒细胞中的信号转导通路 (改自 Erickson GF, 1994)

FSH 和其受体蛋白结合后会导致异源三聚体的 G 蛋白发生构象变化，有活性的 αGs-GTP 会和其效应蛋白腺苷酸环化酶作用，产生 cAMP。产生的 cAMP 和 PKA 结合并激活 PKA，激活的 PKA 会使底物蛋白发生磷酸化，进而刺激编码 P450 芳香化酶和 LH 受体的基因转录，同时激活有丝分裂和卵泡液的形成

(2) 芳香化酶的表达

随着优势卵泡的生长，颗粒细胞获得产生大量雌二醇的能力。FSH 诱导颗粒细胞 P450 芳香化酶的表达是卵泡获得产生雌激素能力的原因。当卵泡达到约 1mm 和处于次级卵泡时，就可以检测到 P450 芳香化酶，而这只发生在优势卵泡上。P450 芳香化酶的活性会不断地升高，在卵泡期最后阶段的排卵前卵泡的颗粒细胞中，P450 芳香化酶的活性已经达到非常高的水平。在从初级卵泡到排卵前卵泡的颗粒细胞中，I 型 17-羟基类固醇脱氢酶 (17-β-HSD) 也有表达。由于 P450 芳香化酶和 17-羟基类固醇脱氢酶的表达，颗粒细胞在转化膜细胞产生的雄烯二醇为雌二醇方面具有很高的活性。在月经周期的第 7 到第 12 天，随着 P450 芳香化酶基因表达水平的不断升高，优势卵泡分泌的雌二醇的量才得以不断增加。

(3) LH 对膜间质细胞的作用

排卵前卵泡要获得对 LH 峰发生反应的能力才能发生排卵，其颗粒细胞上则必须表达 LH 受体。FSH 在诱导颗粒细胞产生 LH 受体的过程中起着重要的作用。与类固醇激素快速合成调节蛋白 (StAR)、P450 侧链裂解酶 (P450scc) 以及 3-羟基类固醇脱氢酶 (3-β-HSD) 相似，LH 受体的表达在卵泡期末期之前也一直受到抑制。在实验动物中的研究表明，卵母细胞产生的抑制因子会抑制 FSH 诱导的颗粒细胞上 LH 受体的表达。

这种现象的解释是，卵母细胞抑制发育中的格拉夫卵泡的颗粒细胞中的 LH 受体的表达，这种抑制一直到排卵前阶段才停止，但对这一抑制因子目前尚不清楚。

和 FSH 受体一样，LH 受体也是一个调节异源三聚体 G 蛋白的跨膜受体超家族的一部分。成熟的 LH 受体包含一个长的胞外 NH₂ 末端配基结合结构域；一个跨膜结构域，包含 7 个疏水螺旋，把 LH 受体和质膜连接在一起；一个胞内 COOH 末端结构域，可以和第三个胞内环 I3 的残基相互作用激活 G 蛋白。胞内 COOH 末端结构域包含潜在的磷酸化位点，可以被蛋白激酶 C (PKC) 磷酸化。已经有一些短型的 LH 受体被鉴定出来，它们缺失跨膜结构域。现在还不知道这种短型 LH 受体是否和 LH 结合。但是，如果它们真能结合的话，就可以影响并进而调节细胞对 LH 的反应。

LH 受体信号转导机制是和 G 蛋白偶联的。和 FSH 的作用信号通路相似，LH 信号通路中的第二信使分子会参与激活通路中的基因，最终会导致雄烯二酮的生物合成。至少存在三种机制可以终止 LH 信号通路。首先，是终止发生在结合的 GTP 被水解成 GDP 时的 G 蛋白信号。GTPase 活性存在于 α Gs 分子本身， α Gs 是一个内在的 GTPase。没有活性的 α Gs-GDP 和复合物再度结合后会终止腺苷酸环化酶的活性。第二，cAMP 可以被环核苷酸磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 降解掉。第三，磷脂酶 A₂ 可以通过对磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸的脱磷酸化来终止底物蛋白的活性。

(4) 雄激素的产生

大概在卵泡腔形成的时候，膜间质细胞开始呈现它们的分化型状态。这一过程包含一系列基因的表达，包括 LH 受体、胰岛素受体、脂蛋白受体 (HDL, LDL)、类固醇激素快速合成调节蛋白、P450 侧链裂解酶、3- β -羟基类固醇脱氢酶和 P450c17 基因。由于这些基因的表达，膜间质细胞开始有能力产生雄烯二酮 (图 4-13)。所有格拉夫卵泡的膜细胞呈现这种分化型状态具有重要的意义，这意味着所有的有腔卵泡都有能力表达雄烯二酮，而在发育中的格拉夫卵泡液中存在高浓度 (约 1ng/ml) 的雄烯二酮也证明了这一点。LH 是膜间质细胞胞质分化最重要的效应器，而胰岛素和脂蛋白可以和 LH 协同作用加强这一过程。

目前，已经鉴定出各种各样的调节配基和生长因子，具有调节哺乳动物膜细胞雄激素产生的能力，包括胰岛素、胰岛素样生长因子 I (IGF-I)、脂蛋白、激活素、抑制素、生长分化因子-9 和骨形态发生蛋白-4 等。除了胰岛素外，其他调节分子的作用还不清楚。具有酪氨酸蛋白激酶活性的胰岛素受体在人的颗粒细胞上表达，而且已经证明胰岛素本身和胰岛素信号转导通路可以刺激雄烯二酮的产生。但重要的是胰岛素还可以和 LH 协同作用来进一步加强雄激素的生物合成。在一些妇女中，高胰岛素血症会导致雄激素过多症，这样的事实也说明了胰岛素功能上的重要性。在啮齿类动物中的观察表明，LDL 和 HDL 可以促进人膜间质细胞类固醇激素的产生，而且可以和 LH 协作进一步增加类固醇激素的产生。目前，对 LDL 和 HDL 促进雄激素产生的生理意义还不清楚，但是值得注意的是，HDL 是目前所知道的能够促进雄激素产生的最有效的刺激因子。激活素和抑制素能够分别抑制和促进体外培养的人膜间质细胞性激素的产生。最近的研究发现，生长分化因子-9 和骨形态发生蛋白-4 可以和培养的人膜细胞相互作用来抑制雄激素的生物合成。对于以上各种配基和因子的作用，到底哪些适合生理和病理的情况还不清楚。

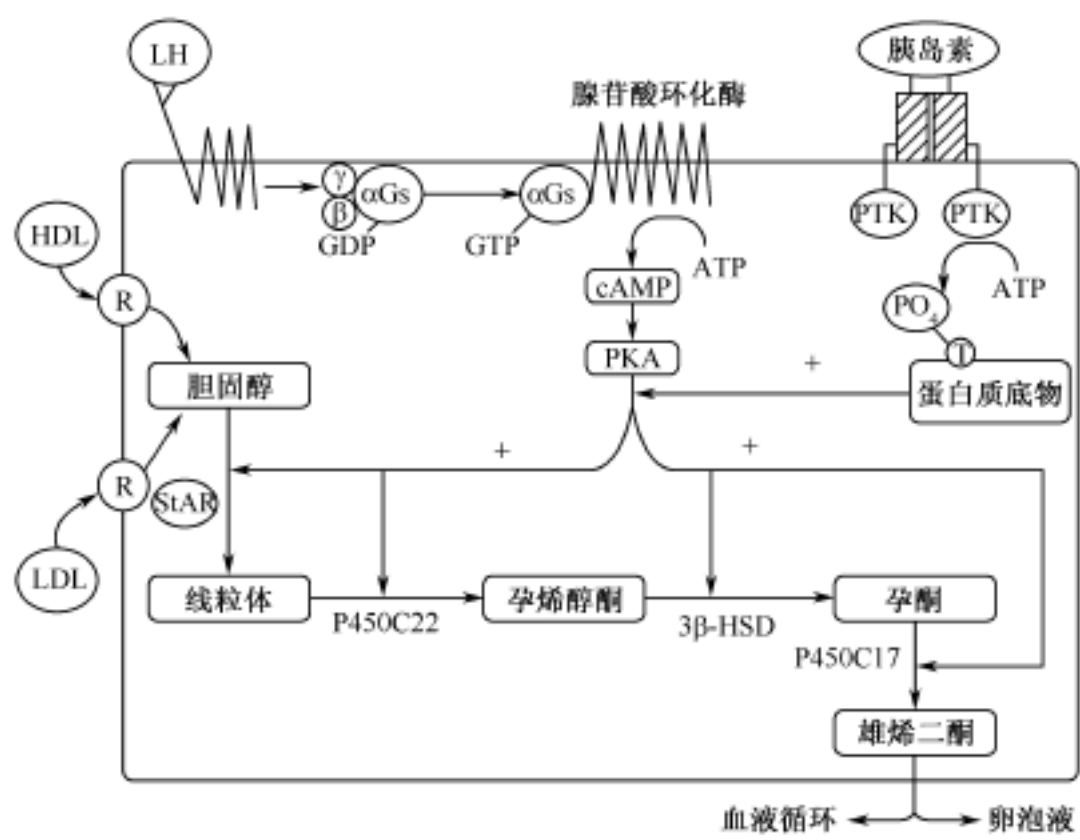


图 4-13 膜间质细胞产生雄激素的调节机制 (引自 Erickson GF, 1993)

雄烯二酮产生的主要调节剂是 LH、胰岛素和脂蛋白，LH 受体/ cAMP/ 蛋白激酶 A (PKA) 信号通路可以诱导雄烯二酮生物合成通路中特定基因的表达，而胰岛素受体/ 蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 信号可以明显地加强这一过程。脂蛋白是膜细胞雄激素合成的激活剂，主要是通过提高细胞内胆固醇的量来起作用的

(5) “两细胞，两促性腺激素”假说

优势卵泡产生雌二醇的生理机制被称为“两细胞，两促性腺激素”假说 (图4-14)。即 LH 被运送到膜间质细胞后会导致雄烯二酮的合成和分泌。雄激素的分泌量也反映出膜细胞中其他调节分子的存在，这些调节分子包括胰岛素、胰岛素样生长因子 I、脂蛋白、激活素和抑制素等。膜细胞产生的雄烯二酮会通过基膜扩散到颗粒细胞中，并在那里积累。而颗粒细胞在 FSH 的刺激下会诱导 P450 芳香化酶的产生，雄烯二酮会被 P450 芳香化酶催化生成雌酮，雌酮又在 17β-羟基类固醇脱氢酶 (17β-HSD) 的作用下转化为雌二醇。

FSH 对优势卵泡的选择，一方面与血清中 FSH 的浓度有关，另一方面与卵泡对 FSH 的敏感性有关。生长中的卵泡如果由于 FSH 分泌量不足或是由于其本身对 FSH 不敏感均会导致卵泡的闭锁。在卵泡发育早期，FSH 水平提高，会诱导一定数量的早期卵泡继续生长发育。从理论上讲，此时 FSH 水平应超过卵泡对 FSH 最敏感的阈值，但也不可过高，这样会导致一些弱敏感性的卵泡也会被刺激生长发育。在中后期，在 FSH 水平下降和卵泡分化导致对 FSH 敏感性差异的共同作用下优势卵泡的数目下降，只有少数优势卵泡获得了对 FSH 敏感的能力，其他的则失去了这种能力。这种卵泡敏感性的分化是内分泌、旁分泌和自分泌几种因素共同作用的结果，卵泡敏感性的分化增强了 FSH 水平下降引起的效果。最敏感的卵泡最终发育成为优势卵泡，其他的则发生闭锁。

卵泡选择的机制包括血浆中 FSH 水平的继发性 (第二次) 升高。在妇女的月经周

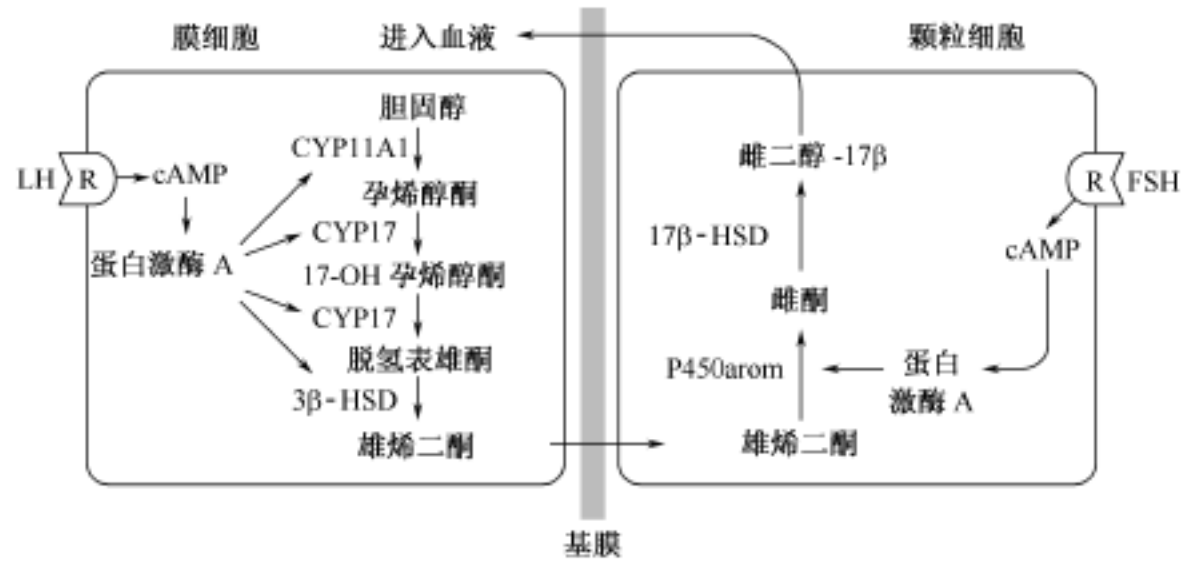


图 4-14 调节雌激素合成的“两细胞，两促性腺激素”假说 (引自 Wilson JD 等, 1998)

期中，FSH 水平的继发性升高开始于血浆中孕酮的水平下降到基础水平的前几天，这个时期处在黄体期的末期。研究表明，孕酮浓度的降低以及黄体产生的抑制素 A 降低是引起 FSH 水平继发性升高和优势卵泡选择的主要因素 (图 4-15)。

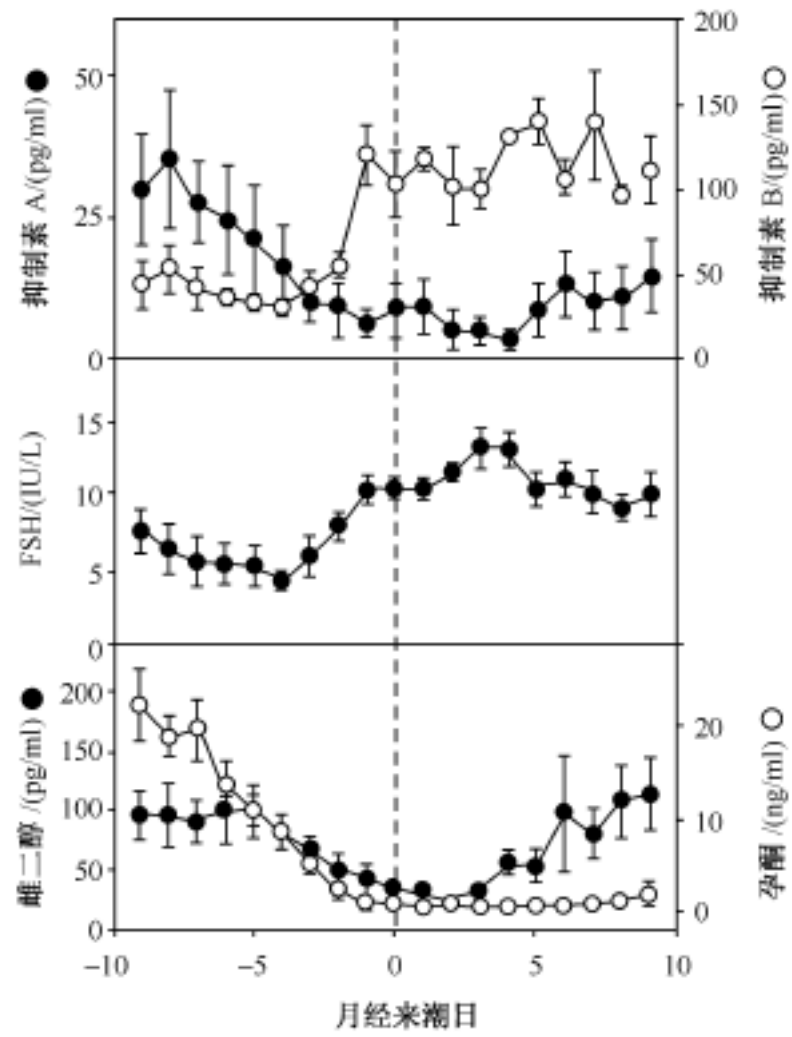


图 4-15 在妇女中，黄体期-卵泡期转变过程中抑制素 A、抑制素 B、FSH、雌二醇和孕酮的水平变化 (引自 Welt CK, 1997)
月经来潮日定为第 0 天

FSH 水平的继发性升高会引起优势卵泡的卵泡液微环境中 FSH 水平的升高。人健

康的优势卵泡液中 FSH 的平均浓度可高达 3.2 mIU/ml (约 143ng/ml)。相反,在非优势卵泡中,卵泡液中 FSH 水平很低或根本就检测不到。FSH 进入卵泡液中,提供了卵泡选择的专一性诱导。但是目前在生殖医学中还有一个重要的问题没有得到解答,那就是一群卵泡如何有能力将高水平的 FSH 浓缩到它们的微环境中。

尽管上述研究在某种程度上揭示了优势卵泡选择的机理,但目前关于优势卵泡如何维持其主导地位的机理仍不十分清楚。但普遍接受的机理或可能的方式之一就是优势卵泡能够分泌抑制其他有腔卵泡发育的物质。其中之一是抑制素(颗粒细胞分泌的肽类激素),抑制素(主要是抑制素 B)可抑制 FSH 的分泌。优势卵泡可以补偿低 FSH 水平并继续发育的原因是它本身已具有比其他卵泡多得多的 FSH 受体。一旦进入快速生长期,则卵泡的发育是不可阻挡的,否则卵泡将死亡。如果快速生长的有腔卵泡没有得到合适的促性腺激素的环境,卵泡就会立刻发生闭锁。闭锁卵泡被炎症细胞侵入,卵泡最终被结缔组织充盈,即卵泡处形成卵巢斑。

(二) 卵泡闭锁 (follicular atresia)

1. 卵泡闭锁的现象

在哺乳动物中,99.9%的卵泡(卵母细胞)都闭锁死亡,这对于维持卵巢内环境的稳定具有重要意义。闭锁的基本特征就是激活卵母细胞和颗粒细胞的凋亡。人卵泡闭锁早在6个月龄的胚胎中就已发生,并在一生中持续进行,结果使卵巢中的卵泡数量大大减少,以致出生时丢失了约80%的卵泡。生育期仅有400个左右卵泡能正常发育、成熟、排卵,其余的卵泡都发生了闭锁。人卵泡闭锁可出现在不同发育时期。原始卵泡闭锁少见,初级卵泡闭锁最多,其形态学特征是:卵母细胞核固缩,染色体及胞质溶解,颗粒细胞层减少,卵泡膜细胞肥大,胞质内出现类脂质、黄素化,并散布在结缔组织中。以后卵母细胞退化,颗粒细胞和卵泡膜细胞演变成纤维体,可被卵泡间质吸收;生化特征是:颗粒细胞产生的雌激素减少,孕酮生成增加,促性腺激素受体数目减少,IGF 结合蛋白表达增强。另外,还可观察到闭锁卵泡中间隙连接蛋白-43 表达下降,以及硫酸糖蛋白 SP22 表达增强等。

有关卵泡闭锁的机理目前还很不清楚,这也是研究的热点之一。现有的大量研究表明,卵泡闭锁是一个非常复杂的过程。在这一过程中有许多激素与因子参与。

2. 卵泡闭锁的调控

(1) 促性腺激素释放激素 (GnRH) 的作用

GnRH 对卵泡的生长发育主要通过两个途径进行调节。一方面 GnRH 与垂体前叶的促性腺激素分泌细胞的细胞膜上的特异性受体结合,通过激活腺苷酸环化酶-cAMP-蛋白酶体系促进 LH 和 FSH 的合成与释放,从而调节卵泡的生长。从这一面来说,GnRH 在卵泡的形成过程中起着促进作用;而另一方面,卵巢上也存在有少量的 GnRH 受体,GnRH 与这些受体结合后,则能抑制卵泡的生长,导致卵泡的闭锁。可见,GnRH 具有促进和抑制卵泡生长发育两方面的作用。给小鼠注射 20mg 的 GnRH 拮抗剂 (GnRH2a) 后,在发情后期阻止了排卵并且使卵泡在排卵前发生闭锁,闭锁率会随注射

GnRH2a 剂量的增加而提高。注射 GnRH2a 后的卵泡分离培养 24 h 时, 雌二醇分泌量和正常发情后期的卵泡相比明显减少, 并具有剂量依赖性。另外, GnRH2a 可协同人绝经期促性腺激素 (HMG) 阻止卵泡的闭锁, 提高卵泡的发育。这主要是通过减少雄激素的积累, 提高雌二醇的量来达到这一目的。

(2) 促性腺激素的作用

实验证实, FSH 能促进卵泡发育、卵泡细胞增生及抑制卵泡的闭锁。大鼠及仓鼠大部分排卵前的卵泡闭锁是促性腺激素分泌不适造成的。在发情前期去除垂体或给予促性腺激素抗体, 发现前者在 48h 内, 后者在 3~4 天内使卵泡发生闭锁。给予外源性促性腺激素可挽救早期的闭锁卵泡, 说明促性腺激素能够抑制卵泡凋亡。促性腺激素抑制凋亡的作用也许是通过降低胰岛素生长因子结合蛋白 (IGFBP) 的产生及刺激 IGF-1 的产生来实现的, 使 IGF-1 的生物利用性增高。在检测卵巢 DNA 片段中, 发现用 FSH 处理垂体切除及垂体未切除的未成熟大鼠, 均可抑制卵泡中颗粒细胞的凋亡。

(3) IGF-1 及其结合蛋白 (IGFBP) 的作用

卵巢产生的 IGF-1 及 IGFBP 在卵泡发育中起重要作用。早期研究证实 IGF-1 受体存在于颗粒细胞内, FSH、GH 可增加体内 IGF-1 水平。IGF-1 能抑制大鼠颗粒细胞的凋亡。存在于卵泡液中由颗粒细胞中合成的 IGFBP, 能结合 IGF-1, 解除 IGF-1 的凋亡抑制作用, 且能决定猪发情期卵泡是排卵还是闭锁。IGF-1 和促性腺激素协同刺激卵泡成熟, 而 IGFBP 则起对抗作用。卵泡的发育和闭锁与 IGFBP 活性有关。IGFBP 的活性依赖于 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 的氯化物, 且能被 EDTA 强烈抑制。正常健康卵泡及闭锁卵泡中, 丝氨酸蛋白酶均参与 IGFBP 的降解。IGFBP-2 mRNA 主要在正常健康卵泡中, 在靠近基底膜的颗粒细胞中比靠近腔及卵母细胞的颗粒细胞中表达要高。IGFBP-4 mRNA 在大、小卵泡中无变化。而 IGFBP-5 mRNA 在大卵泡中的表达要低于小卵泡。在闭锁卵泡中, 颗粒细胞内的 IGFBP-2 mRNA、IGFBP-5 mRNA 表达增强, 而卵泡膜细胞中则是 IGFBP-2 mRNA、IGFBP-4 mRNA 表达增强。早期闭锁卵泡中 IGFBP-2 mRNA、IGFBP-5 mRNA 表达增强, 而无 IGFBP-4 mRNA 表达。晚期闭锁卵泡中, IGFBP-2 mRNA、IGFBP-5 mRNA 表达进一步增强, IGFBP-4 mRNA 亦表达, 且 IGFBP-2 mRNA、IGFBP-5 mRNA 的表达比 IGFBP-4 mRNA 的表达要早。以上结果说明卵泡闭锁时, IGFBP-2 mRNA 在闭锁卵泡液的浓度比正常卵泡高, 且 IGFBP-2 mRNA 浓度与凋亡的颗粒细胞百分数成正相关关系, 这提示在卵泡闭锁过程中 IGFBP-2 mRNA 有一定的调节作用。另外, IGFBP-2 mRNA 在大小卵泡中含量也不一, 在小卵泡中含量高, 且小卵泡闭锁的比率也最大。FSH 在体外能刺激猪 IGF-1 的产生, 阻止 IGFBP 的生成。降低 FSH 浓度会导致 IGF-1 含量及活性均下降, 而 IGFBP 生成增加。IGFBP-2 mRNA 在体内依赖于 FSH 活性, 进一步说明 FSH 参与调节 IGF 系统, 进而参与卵泡的发育与闭锁。

(4) 雄激素和雌激素的作用

大鼠实验证明, 雌激素能促进卵泡的生长及颗粒细胞的分裂与增殖, 而雄激素则刺激颗粒细胞黄体酮的产生及促进腔前和有腔卵泡闭锁。闭锁卵泡的卵泡液中, 雄激素/雌激素的比值升高。分析用雌激素、雄激素处理的大鼠卵巢内 DNA 片段发现, 雌激素能抑制腔前和有腔卵泡颗粒细胞的凋亡, 而对卵泡膜细胞及原始卵泡、初级卵泡的凋亡

无明显作用。雌激素抗闭锁作用可被睾酮抑制。人雄激素受体在健康腔前卵泡和有腔卵泡的表达是排卵前卵泡及黄体中的数倍，说明雄激素能抑制卵泡的成熟。在啮齿动物卵泡凋亡中，均有高水平的 5α -双氢睾酮。可见，性激素的变化可能参与启动卵泡闭锁，且雌激素、雄激素的作用是相互拮抗的。

(5) 生长激素 (GH) 的作用

GH 可以刺激许多种细胞的增生和分化，在颗粒细胞、卵泡内膜细胞、外膜细胞及卵母细胞上都有其受体。GH 在卵泡发育过程中主要起促进卵泡的生长和抗闭锁作用，并抑制其他闭锁因子的作用。用人重组生长激素 (rhGH) 给自然突变的侏儒小鼠注射 14 天后，卵巢重量比注射生理盐水的小鼠有明显的提高，卵泡数也较对照组多，主要是提高了直径 $500\mu\text{m}$ 以上卵泡的数目。颗粒细胞对 5-溴脱氧尿苷 (BrdU) 有高度的亲和性。这些结果表明 rhGH 主要作用于中等大小的卵泡，促进它们的分化，并提高生长卵泡的数目。在导入 GH 基因的小鼠中，GH 的过量表达使卵泡发生闭锁或凋亡的可能性下降。

除了以上因子外，其他一些因子如转化生长因子、表皮生长因子、白介素等都对颗粒细胞的凋亡起着调节作用。因此卵泡闭锁是一个受到多因素调控的极其复杂的细胞死亡过程。尽管进行了许多研究，但是对调控闭锁的生理机制还不很明了。

六、卵泡发生的调控

(一) 促性腺激素的调控

促性腺激素作为下丘脑-垂体-性腺轴激素的中心环节，是卵巢发育的主要信号。它们在雌性生殖周期中起伏变化，推动卵泡一波又一波的发育成熟。促性腺激素的调节作用主要表现为：① FSH 促进颗粒细胞的增殖；② FSH、LH 协同促进卵泡体细胞的分泌，调节卵泡体细胞的旁分泌调控；③ FSH、LH 诱导卵母细胞恢复减数分裂而成熟、排卵；④ LH 诱导颗粒细胞黄体化，促进黄体的形成。

卵泡和卵母细胞的发育进程受促性腺激素的控制，其最后的命运也取决于促性腺激素的功效。促性腺激素调节作用的大小，受促性腺激素的浓度和细胞上促性腺激素受体含量两方面的影响。但具体到对单个卵泡的调节，由于感受到的激素量相同，其特异性的调控则主要由细胞膜上受体含量的变化决定。比如在优势卵泡的选择中，大卵泡一方面产生抑制素降低 FSH 的分泌水平，而另一方面又由于大卵泡中雌激素含量增加，从而上调细胞上 FSH 受体的含量。这样，尽管循环血液中 FSH 水平下降，其他小卵泡由于得不到足够 FSH 刺激而闭锁，但由于大卵泡中有足够 FSH 受体，因此能够获得足够促性腺激素的刺激而继续发育。因此，研究卵泡细胞上促性腺激素受体的出现、消失及量的变化，成为目前研究卵泡发育的激素调节机制的主要方法。一般认为早期的腔前卵泡中无促性腺激素受体的表达，即卵泡生长的启动及早期的生长可能不依赖于促性腺激素。但促性腺激素受体表达的准确时间，即促性腺激素对卵泡产生作用的精确时期并不清楚。一些研究发现，许多动物的促性腺激素受体出现得更早。牛小于 2mm、猪 1~2mm 卵泡的颗粒细胞上已有 FSH 受体，而人、大鼠、绵羊、小鼠单层颗粒细胞包裹的

初级卵泡上就有 FSH 受体 mRNA，甚至小鼠的原始卵泡上也发现了 FSH mRNA 的存在，提示 FSH 对卵泡的启动及卵泡的早期生长可能存在调节。但在小鼠上的研究表明，FSH 受体 mRNA 有一个大的外显子编码跨膜区，9 个小外显子编码细胞外区，这些部分必须全部转录，mRNA 才能完整表达。而在 FSH 受体的基因初始转录中，常有选择性剪切 (alternative splicing) 现象，该剪切常调节 FSH 受体 mRNA 有效长度 (full length) 的完全转录，使其表达晚于细胞外区部分的转录，因此较早期卵泡上表达的 FSH 受体 mRNA 有可能仅是细胞外区部分，不能表达活性的部分。研究 FSH 及 LH 受体出现的准确时期，有助于了解卵泡生长启动的机制，改善和促进体外腔前卵泡卵母细胞的培养成熟，以更好地利用卵母细胞资源，这必将成为生殖生物研究的热点。

前面介绍过，FSH 受体主要存在于壁层颗粒细胞和卵丘细胞上，而 LH 受体主要位于膜细胞及间质细胞，仅在比较大的卵泡颗粒细胞上才有 LH 受体。促性腺激素受体在卵泡的生长和分化中扮演关键的角色，在内外因素的调节下，它在卵泡细胞上含量的变化决定着卵泡的命运。促性腺激素的受体受许多因素的调控，促性腺激素本身及卵泡体细胞的自-旁分泌因子皆能影响它的含量。给未成熟大鼠注射 PMSG 后，卵泡开始发育，卵泡细胞上 FSH 受体 mRNA 水平逐步上升，同时结合 FSH 的能力也逐渐升高；而注射排卵剂量的 hCG 后 6h，FSH 受体 mRNA 及结合 FSH 的能力显著下降；另外，先用重组 FSH 低剂量刺激一段时间后，再注射高剂量的 FSH，可模拟 PMSG 和 hCG 结合注射所致的 FSH 受体含量的变化。这些说明 FSH 对其自身受体既有上调节作用，又有下调节作用。FSH 可刺激体外培养的未成熟大鼠颗粒细胞上 FSH 受体含量的升高，腺苷酸环化酶激动剂 forskolin 及 PKC 激动剂 PMA 可模仿其作用，而 PKC 的抑制剂 H-7 和 bisindolylmaleimide 可阻止其作用，说明 PKA、PKC 信号通路都可能参与 FSH 对其受体的调节。此外，卵泡细胞促性腺激素受体的表达，还受其他激素和卵泡体细胞自-旁分泌因子的共同调节。GnRH、表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 等可拮抗 FSH 上调其受体，但 IGF-I、GH 则可促进 FSH 受体的生成，增强 FSH 的作用。在卵泡的发育中，FSH 和雌激素促进膜细胞上 LH 受体合成，但抑制颗粒细胞上 LH 受体过早的形成，以防止其过早分化而致卵泡闭锁，但孕酮增强颗粒细胞上 LH 受体的产生。

(二) 卵泡内的自-旁分泌调节

卵泡内在的自-旁分泌生长因子和细胞因子，可能对卵泡的早期生长进行着调控。目前在卵巢内已发现大量的自-旁分泌调节因子 (表 4-2)，它们对卵泡及卵母细胞的发育，特别是卵泡的早期发育，都有着重要的调节。这些因子的作用机制很复杂，它们可能介导外部讯号与卵泡体细胞以及卵泡体细胞之间的作用，调节卵泡的生长。雌激素、雄激素、孕酮等激素作为卵泡内主要的调节激素，对其作用研究的较为清楚，它们受促性腺激素的调节，反过来又通过改变细胞上促性腺激素受体的量而影响促性腺激素的作用；同时，这些激素又和其他调节因子相互影响、相互促进，系统地发挥调节作用。一些常见对卵泡发生作用的激素和因子见表 4-3。

表 4-2 卵巢内旁分泌调节因子

α2 巨球蛋白	白细胞介素-1
αN 抑制素肽	白细胞介素-6
激活素	抗缪勒氏管激素
血管紧张素-Ⅱ	神经肽 Y
缓激肽	雌激素
表皮生长因子	催产素
成纤维细胞生长因子	胎盘分泌生长因子
卵泡素或 FSH 抑制蛋白	孕酮
组胺	前列腺素
抑制素	松弛素
胰岛素样生长因子	血管紧张肽原酶
胰岛素样生长因子结合蛋白	P 物质
干扰素 α	β 内啡肽
干扰素 γ	转化生长因子 α
儿茶酚胺	转化生长因子 β
血管肠肽	肿瘤坏死因子 α

表 4-3 一些激素和生长因子对卵泡发生的作用

激素/ 因子种类		对卵泡发生的作用
激素	雌二醇	负反馈抑制 FSH 的分泌，抑制卵泡发育
	雄激素	转化为雌激素而抑制 FSH 分泌，抑制卵泡发育
	抑制素	抑制 FSH 分泌，抑制卵泡发育
生长/ 细胞因子	表皮生长因子（EGF）	引起启动募集
	胰岛素样生长因子（IGF）	促进颗粒细胞增殖分化，有利于卵泡发育
	白介素-1（IL-1）	抑制雄激素合成，诱导排卵
	转化生长因子（TGF）	加强 FSH 的作用，促进颗粒细胞增殖分化
	肿瘤坏死因子（TNF）	抑制颗粒细胞分化和产生孕酮
	成纤维细胞生长因子（FGF）	抑制雌二醇分泌，促进颗粒细胞增殖
	内皮素-1（ET-1）	促进雄激素转化为 E ₂ ，诱导排卵
	肝细胞生长因子（HGF）	刺激颗粒细胞增殖和卵泡成熟

第二节 卵子成熟

一、影响卵母细胞成熟的因素

随着性腺的性别分化为卵巢后，原始生殖细胞分化成卵原细胞，卵原细胞以有丝分

裂的方式进行增殖。卵原细胞边增殖边向卵巢皮质迁移，大约在第二代卵原细胞时到达皮质。随后，卵原细胞开始进入减数分裂并被次级性索细胞包裹后形成原始卵泡，而卵原细胞也停止有丝分裂，进入并阻滞在第一次减数分裂前期形成初级卵母细胞。

伴随卵泡生长的启动，初级卵母细胞开始迅速生长。细胞质内细胞器大量复制增生，RNA 含量成倍增长，大量的蛋白质合成及能量物质积累，为卵母细胞的受精及早期胚胎发育做好准备。到卵母细胞成熟时，卵母细胞体积可增加数倍（小鼠卵母细胞直径变化为 $15 \sim 80\mu\text{m}$ ，人约 $35 \sim 125\mu\text{m}$ ，牛、绵羊、山羊约 $35 \sim 150\mu\text{m}$ ，猪 $30 \sim 130\mu\text{m}$ ）。卵母细胞的生长与卵泡的生长并不平行，小鼠卵母细胞的生长在卵泡腔形成时就已完成，而家畜卵母细胞生长一直持续到生发泡破裂前。

卵母细胞生长到一定体积时，才能够获得恢复减数分裂的能力。此时，卵母细胞处于减数分裂前期的双线期，核很大，染色质高度疏松，外包完整的核膜，称为生发泡 (germinal vesicle)；充分长大的卵母细胞如果脱离卵泡的抑制，能自发恢复减数分裂，生发泡破裂 (GVBD)，进而放出第一极体，然后停滞在第二次减数分裂中期。不同动物的卵母细胞当其脱离卵泡后在体外自发恢复减数分裂的时间不一样，如小鼠在 2h 左右，牛和羊在 8h 左右，猪 18h 左右。

(一) 蛋白质的积累

由于卵母细胞减数分裂停滞的主要目的是使卵母细胞积累足够的物质能量，因此卵母细胞获得恢复减数分裂的能力与物质的积累程度密切相关。在卵母细胞成熟过程中，一个重要的事件是蛋白质的合成，它决定着卵母细胞减数分裂的进程，是发育充分的卵母细胞减数分裂恢复所必需的。如果抑制蛋白质的合成，则充分长大的卵母细胞在体外也不能自发成熟，而且也不能被 FSH、生长激素 (GH)、表皮生长因子等阳性刺激物质诱导成熟。但小鼠与这些动物不同，具有恢复减数分裂能力的卵母细胞体外自发成熟时，减数分裂恢复不需要蛋白质的合成，但是对于 MI 期之后的卵母细胞发育却需要蛋白质的合成。

(二) mRNA 的积累

除了蛋白质合成外，转录水平对卵母细胞减数分裂的恢复也至关重要，卵母细胞中 mRNA 的积累影响着该细胞进一步发育的能力。体外培养的卵母细胞以及发育能力较低的卵母细胞，其多个基因的 polyA 末端长度较短，即 RNA 的合成能力较低。如果抑制 RNA 的表达则可阻止绵羊、牛、兔卵母细胞的体外自发成熟，但不影响小鼠、猪卵母细胞的体外自发成熟，不过却能抑制由 FSH 或 EGF 诱导的卵母细胞成熟，说明卵母细胞的诱导成熟需要 RNA 的表达，以提供新的信号物质。尽管充分长大的卵母细胞的核仁高度致密化，RNA 的合成停止或很低，但已合成的 RNA 的功能表达对于卵母细胞恢复减数分裂可能是重要的。

(三) 能量代谢

能量代谢也是影响卵母细胞成熟的重要因素，卵母细胞成熟过程中糖代谢升高，用戊糖代谢的激动剂可诱导次黄嘌呤抑制的卵母细胞成熟，而用其代谢抑制剂则可阻止由FSH诱导的卵母细胞减数分裂恢复。丙酮酸也能导致无糖培养的卵母细胞恢复减数分裂。一般认为卵母细胞不能利用糖，必须由卵丘细胞将糖转化为丙酮酸后才能被卵母细胞利用，但近来的一些研究发现卵母细胞也能利用糖，只是量较低。体外培养的山羊卵母细胞，成熟早期的代谢为丙酮酸代谢，后期是谷氨酰胺及葡萄糖代谢。糖代谢不仅与卵母细胞的核成熟有关，还决定着细胞质成熟，糖代谢越强的卵母细胞发育率越高。

(四) 卵母细胞直径的变化

卵泡的直径及卵母细胞的大小与卵母细胞能够完成各期发育的能力直接相关。山羊直径0.5mm的卵泡中的卵母细胞能恢复减数分裂，但直到卵泡生长到1~2mm时的卵母细胞才能完成第一次减数分裂中期(MI)，大于3mm时获得完成第二次减数分裂中期(MII)的能力，而大于5mm时卵母细胞才能充分发育到具有受精和胚胎发育的能力。直径为100 μ m的牛和猪的卵母细胞能够恢复减数分裂，但却不能发育到第一次减数分裂中期以后的步骤。而直径为110 μ m的牛卵母细胞和直径为115 μ m的猪卵母细胞可以完成减数分裂并且发育到第二次减数分裂中期。这些结果表明，卵母细胞在发育到最大直径的过程中，卵母细胞首先获得恢复减数分裂的能力，然后才能获得完成第一次减数分裂的能力。因此，卵母细胞只有发育到两种能力都具备的程度，才能获得维持胚胎发育的能力。小有腔卵泡中的卵母细胞，虽然能够恢复减数分裂并排出第一极体，但是其受精率和囊胚发育率往往很低，而取自晚期有腔卵泡中的卵母细胞却具有较高的受精率和囊胚发育率。

在生理条件下，在排卵前促性腺激素峰作用下，卵母细胞减数分裂于排卵前恢复(人：排卵前36~48h；猪：排卵前40h；小鼠、大鼠、兔：排卵前12~15h)。随后，完成第一次减数分裂的卵母细胞再次发生阻滞在第二次减数分裂中期，直至受精时再次恢复减数分裂并排出第二极体。

卵母细胞成熟的标准一般认为是：①生发泡破裂，排出第一极体，停滞于第二次减数分裂中期，达到核成熟；②达到一定体积，细胞质内含有充足的蛋白质、细胞器、RNA、DNA和能量，达到胞质成熟；③卵母细胞膜及透明带发生变化，为接纳精子做好了准备。

卵母细胞发育成可受精卵子的过程中，经历了如下关键步骤：第一次减数分裂的阻滞；卵母细胞生长的启动；第一次减数分裂的恢复和第二次减数分裂的阻滞等调控点。其中，尤以第一次减数分裂的阻滞与恢复，与体外卵母细胞成熟关系密切，影响较大，也是目前卵母细胞体外成熟调控机理研究的重点。

二、卵母细胞减数分裂的阻滞和恢复

(一) 卵母细胞减数分裂的阻滞

卵母细胞生长在卵泡中，它的减数分裂的阻滞首先与卵泡体细胞有关。当卵原细胞迁移到皮质，被次级性索细胞包裹后就停止有丝分裂，进入并阻滞在第一次减数分裂前期，但卵泡体细胞以何种机制阻滞减数分裂的进程并不清楚，可能与卵母细胞内的某些物质合成受阻有关。卵母细胞减数分裂能力的获得与细胞的大小密切相关，只有长到成熟体积的 80% 时，卵母细胞才具有恢复减数分裂的能力，提示减数分裂能力获得前的卵母细胞可能缺失某些物质，尤其是与细胞周期有关的某些蛋白质。近些年的研究表明，卵母细胞中蛋白质的合成及组成与牛、羊、猪及小鼠卵母细胞减数分裂能力的获得密切相关。在研究 MPF 的过程中发现，MPF 的催化亚基 $p34^{cdc2}$ 在卵母细胞减数分裂能力获得前是逐渐积聚的，它的增加与卵母细胞的发育呈正相关，阻止 $p34^{cdc2}$ 的增多则抑制卵母细胞的生长。 $p34^{cdc2}$ 在卵母细胞获得减数分裂能力后迅速增加至阈浓度， $p34^{cdc2}$ 未达到阈浓度的卵母细胞在体外不能自发成熟。因此卵母细胞开始减数分裂后，可能是由于卵泡体细胞某种因素的作用使卵母细胞内细胞周期相关蛋白合成受阻，或合成的速度降低而赶不上卵母细胞增长的速度，达不到活性的阈值，不能催化 G_2 期向 M 期的转变，使卵母细胞停滞于第一次减数分裂前期。随着卵母细胞的生长，这些蛋白逐渐积聚，达到一定水平时具备了催化 G_2 期向 M 期的转变的能力。

获得减数分裂能力后卵母细胞的阻滞与卵泡体细胞的旁分泌调节有关。人们很早就发现从格拉夫卵泡中取出的卵母细胞，在体外的简单培养液中，不依赖激素可自发成熟，而整个卵泡体外培养或用卵泡液体外培养分离的卵母细胞时，则不加激素卵母细胞就不能成熟，说明卵泡环境抑制了减数分裂的进行。体外用壁层颗粒细胞与卵母细胞一起培养，可抑制卵母细胞的自发成熟，膜细胞单层培养也能抑制一起培养的卵母细胞的减数分裂恢复，而且培养颗粒细胞及膜细胞的培养液也具有减数分裂的阻止作用，说明这些细胞可能分泌某种（些）物质来抑制卵母细胞的减数分裂成熟。这些物质可能来自于颗粒细胞，也可能来自于膜细胞。经过大量的研究，已推测至少存在如下几种抑制因子。

1. 卵母细胞成熟抑制因子 (oocyte maturation inhibitor, OMI)

OMI 是 20 世纪 60 年代提出的抑制卵母细胞恢复减数分裂的一种多肽物质。它产生于颗粒细胞，分子质量低于 2000Da，可抗胰蛋白酶的消化，加热、冷冻后解冻及活性炭吸附皆对其无影响。它的活性无种属特异性，猪的颗粒细胞能阻止牛卵母细胞减数分裂的恢复。但是经过 40 多年的研究，仍然没有提纯该物质，实际上，该物质在提纯过程中失去了活性。目前，该研究组已放弃对该物质的进一步纯化。

2. cAMP

众多实验都证明，维持高水平的 cAMP 可抑制卵母细胞的成熟。cAMP 的类似物、

阻止 cAMP 降解的磷酸二酯酶的抑制剂（如 IBMX）、腺苷酸环化酶激活剂（如 forskolin）都能够维持卵母细胞减数分裂的阻滞。另外，cAMP 的拮抗剂 Rp - cAMPS，也能够扭转外源抑制剂及颗粒细胞对小鼠卵母细胞减数分裂的阻滞作用。关于 cAMP 抑制减数分裂成熟的机制，提出了如下假说：FSH 在颗粒细胞上诱导产生的 cAMP，会通过 Cx37 组成的间隙连接扩散到卵母细胞，从而抑制卵母细胞减数分裂的恢复（图 4-16）。Downs 和 Eppig 研究发现，在小鼠和猪卵泡液中存在的次黄嘌呤是抑制卵母细胞成熟的生理性活性物质，该物质通过抑制卵母细胞内磷酸二酯酶的活性使 cAMP 降解减少，从而持续维持卵母细胞内 cAMP 的浓度，进而抑制卵母细胞的成熟。

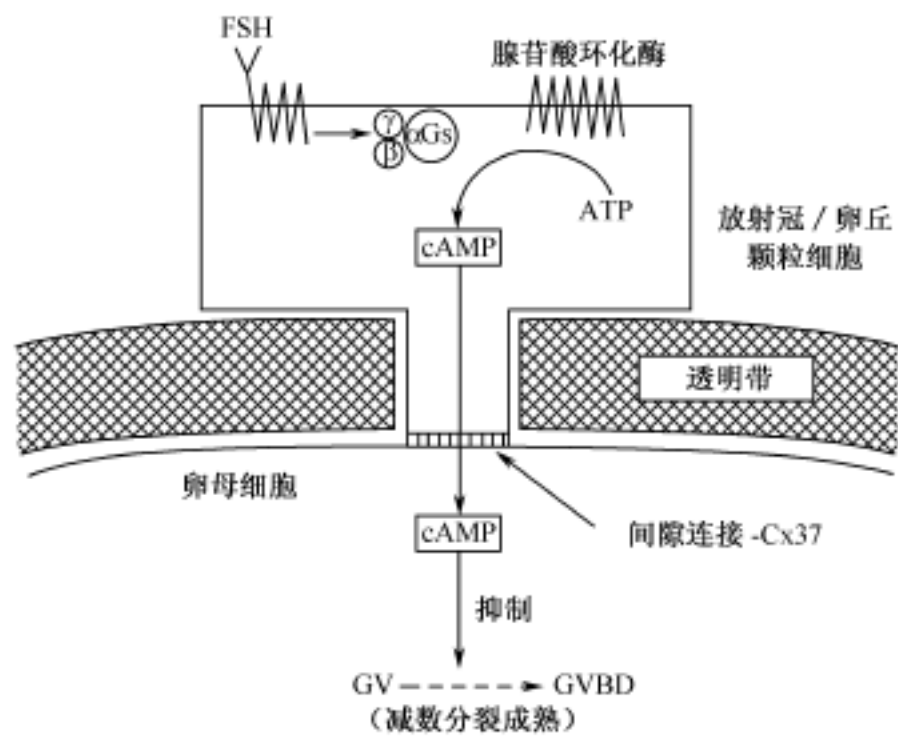


图 4-16 cAMP 抑制生发泡破裂或减数分裂恢复的可能机制
(引自 Erickson GF, 2001)

颗粒细胞中的 FSH 受体信号转导会引起 cAMP 的升高，升高的 cAMP 可以通过连接蛋白 37 (Cx37) 组成的间隙连接扩散到卵母细胞质中，并积累较高的浓度，从而抑制生发泡 (GV) 的破裂

3. 嘌呤

1975 年 Tsafiriri 和 Channing 在猪的卵泡液中得到一种低分子质量的对小鼠卵母细胞减数分裂抑制的成分，后经 Downs 等分析鉴定为次黄嘌呤 (hypoxanthine, HX)。后来，在人、猪、小鼠、大鼠、猴及兔的卵泡液中也相继发现有 HX、腺嘌呤、鸟嘌呤等，它们都能剂量依赖性地阻止卵母细胞的自发成熟，4mmol/L 时抑制效应最大。嘌呤物质抑制卵母细胞减数分裂，都是通过导致卵母细胞内 cAMP 浓度升高实现的，其机制可能通过抑制磷酸二酯酶的活性，阻止了 cAMP 的降解，也可能是腺苷酸环化酶激动剂促进其合成而升高其水平。cAMP 合成需要嘌呤核苷酸作底物，而嘌呤核苷酸的产生除了细胞内的新合成外，还有一个重要的补救途径 (salvage pathway)，该途径可以将次黄嘌呤与鸟嘌呤经次黄嘌呤-鸟嘌呤核转移酶 (HPRT) 转化为 IMP 和 GMP、将腺嘌呤经腺嘌呤核转移酶 (APRT) 转化为 AMP。研究表明，HX 阻滞卵丘包被的卵母

细胞减数分裂恢复时，抑制卵丘细胞的嘌呤核苷酸的新合成，而依赖 HPRT 补救途径将 HX 转化为 cAMP，并且卵母细胞诱导成熟时的 cAMP 短促上升，更需要 HPRT 补救途径的参与；但 HX 对去卵丘卵母细胞的抑制不依赖于 HPRT 补救途径。

4. 黄体化抑制因子

有学者认为卵母细胞可能分泌一种黄体化抑制因子，它防止颗粒细胞提前黄体化，LH 峰的影响可能是阻断这种因子的产生。但目前尚没有直接证据。

(二) 卵母细胞减数分裂的恢复

卵母细胞停滞于第一次减数分裂而生长发育，长至足够大小时获得恢复减数分裂成熟的能力。卵母细胞的减数分裂成熟，是在促性腺激素作用下发生的。促性腺激素在排卵前迅速升高，出现峰值。人 LH 能达到 50~100 IU/L，FSH 达到 10~20 IU/L。由于蛋白质由血液进入卵泡速度较慢，促性腺激素峰出现后 5~6h，才能在卵泡内出现相应的峰。LH 的峰值出现较早，在人要早于 FSH 的峰值 1~2 个 h。虽然确定卵母细胞减数分裂的恢复是由促性腺激素诱导的，但 LH 与 FSH 的精确调控机制并不清楚。一般认为，LH 的峰值是刺激卵母细胞恢复减数分裂的主要因素，体内仅有 LH 峰值而无后续的 FSH 升高仍能诱导卵母细胞成熟排出，体外用纯的 LH 制剂也能导致培养卵泡的卵母细胞生发泡破裂。但另一些实验结果却表明，仅用 FSH 也能诱导卵母细胞恢复减数分裂和排卵，而且 FSH 促进体外培养的被卵丘包被的卵母细胞成熟，但 LH 不能。对 FSH 及 LH 的受体定位分析也发现，LH 受体仅出现于大卵泡的颗粒细胞上，卵母细胞及卵丘细胞上无 LH 受体，但 FSH 受体则存在于包括卵丘细胞在内的所有颗粒细胞上。这些结果说明，FSH 和 LH 对卵母细胞成熟的调控都不是唯一的，它们可能扮演同等重要的角色，只不过是不同的途径在不同的阶段发挥作用，协调完成促卵母细胞成熟及排卵的作用。

牛体外实验显示，FSH 能刺激由颗粒细胞抑制的卵丘包被的卵母细胞恢复减数分裂，但卵泡膜细胞及其处理后的培养液皆能阻止 FSH 的诱导作用，而用 LH 作用后，卵泡膜细胞的这种阻止 FSH 效应的作用被消除。这提示在卵母细胞减数分裂的阻滞和诱导恢复上，可能也存在“两种激素两细胞”调节模式，即颗粒细胞旁分泌抑制卵母细胞的减数分裂，FSH 能作用于卵丘细胞克服它的阻滞，而膜细胞又能抑制 FSH 的诱导作用，保证卵泡发育中由于 FSH 存在而引起卵母细胞的过早成熟，从而使卵母细胞处于减数分裂阻滞状态。LH 峰值的出现则解除了膜细胞的抑制，恢复了 FSH 诱导卵母细胞成熟的作用。卵母细胞恢复减数分裂并不需要整个促性腺激素峰的出现，诱导减数分裂恢复的阈浓度远低于排卵需要的浓度。PMSG 处理的大鼠卵巢，促性腺激素峰出现 5% 时，卵母细胞的生发泡破裂，孕酮的产生即达到最大量，而峰值出现 85% 时仅部分诱导排卵。PMSG 处理后注射 1.4 IU 的 hCG 就能诱导最大程度的生发泡破裂，而排卵则至少需要 4 IU。

由于促性腺激素受体只在卵泡体细胞上，而卵母细胞上没有，促性腺激素的刺激必以卵泡体细胞为介导。但促性腺激素诱导是如何通过卵泡体细胞调节卵母细胞成熟的，

目前不太了解。根据已有的体内外研究结果，推测促性腺激素诱导卵母细胞恢复减数分裂可能通过两条途径：

一是诱导卵丘的扩展使颗粒细胞与卵母细胞的间隙连接中断，使抑制减数分裂的物质（如 cAMP）向卵母细胞的输入中断，恢复了减数分裂。研究表明，卵母细胞成熟时，常需要细胞内 cAMP 水平的下降。卵丘细胞与卵母细胞之间的间隙连接对卵母细胞的发育非常重要，为卵母细胞输送大量物质和能量，也输送抑制减数分裂的物质（如 cAMP）。卵母细胞自发成熟或促性腺激素诱导的成熟都伴有不同程度的卵丘扩展，排卵中期颗粒细胞间的间隙连接减少，卵丘细胞与卵母细胞间的间隙连接则逐渐消失。LH 和 FSH 也能调节间隙连接蛋白 Cx_{43} ，促进它的降解。但体内外研究发现，卵母细胞减数分裂恢复并不需要卵丘完全扩展，卵母细胞成熟中间隙连接的代谢并未减少。卵母细胞成熟也并非都伴有卵母细胞 cAMP 的减少，即 cAMP 输入中断不一定是消除 cAMP 抑制的主要因素。特别是小鼠卵母细胞体外自发成熟过程中，培养一小时即可开始恢复减数分裂，而此时卵丘细胞并没有发生扩展，可见这条通路是否是生理性的还面临挑战。

二是诱导卵丘细胞产生一些刺激因子，克服抑制物质的作用而促使减数分裂的恢复。体外实验证明，FSH、Forskolin 刺激体外培养的卵丘卵母细胞复合体（cumulus oocyte complex, COC）中的卵丘细胞分泌一种减数分裂激活物质（meiosis activating sterols, MAS），以诱导卵母细胞恢复减数分裂。LH 也能刺激绵羊 COC 中的颗粒细胞产生 Ca^{2+} 浓度波动，继而诱发卵母细胞的自发 Ca^{2+} 浓度波动，恢复减数分裂。因此，促性腺激素诱导卵母细胞成熟的关键途径，最有可能的是诱导卵丘细胞产生 MAS、 Ca^{2+} 等阳性刺激物质，该物质诱导卵母细胞的成熟。而且 MAS、 Ca^{2+} 等阳性刺激物质的产生，必须有卵丘细胞与卵母细胞的间隙连接。从生理学角度考虑，上述促性腺激素调节卵母细胞成熟的两条途径并不是互相排斥的。由于卵泡膜细胞产生的减数分裂阻滞物质，是通过间隙连接扩散入壁层颗粒细胞而作用于卵母细胞的，结合前面所提的卵泡内“两细胞，两促性腺激素”调节模式，可以推测，LH 可能作用于颗粒细胞的间隙连接，终止减数分裂阻滞物质的产生，而 FSH 则刺激卵丘细胞产生阳性因子，诱导卵母细胞恢复减数分裂。FSH 和 LH 的作用谁强谁弱，单从卵母细胞成熟角度看，则 FSH 可能是促进卵母细胞成熟的主要刺激因素，因为在体外培养的实验证明只有 FSH 可以诱导卵母细胞克服 HX 等抑制因素的作用而成熟。

除了促性腺激素外，GnRH、生长激素、表皮生长因子和转化生长因子- β （TGF- β ）等激素和因子也显示出诱导卵母细胞恢复减数分裂的能力。

三、卵母细胞成熟过程中的信号转导

哺乳动物卵母细胞的成熟是一个由外界信号诱导产生的细胞周期转换的过程。细胞外信号最终引起细胞内基因转录及蛋白质合成，中间具有复杂的信号转导通路。由于卵母细胞上没有促性腺激素受体，再加上它在减数分裂成熟过程中两次阻滞和恢复的独特性，这就决定了卵母细胞在成熟过程中具有更为复杂的信号转导途径。排卵前促性腺激素峰启动卵母细胞成熟，可能是首先作用于卵泡体细胞，激活卵泡体细胞内的信号，该

信号再激活卵母细胞内的信号转导通路。启动卵母细胞成熟的信号多为膜信号，其转导通常是由激动剂作用于细胞膜上的受体，在 G 蛋白的介导下，引起细胞内第二信使浓度的变化；然后第二信使再作用于不同的靶酶，通过一系列的级联放大反应，最终使某些蛋白质磷酸化来实现对细胞功能的调节。但表皮生长因子等细胞因子调节卵母细胞的信号通路有所不同，可能通过酪氨酸激酶途径。

G 蛋白介导的信号转导，有三种第二信使：cAMP、IP₃、DAG，它们分别激活各自的特异性蛋白激酶-蛋白激酶 A、钙-钙调蛋白-钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (Ca-calmodulin-CaMKII)、蛋白激酶 C，形成三条通路最终调节一系列功能性蛋白的合成或降解，诱导细胞功能的改变。它们可能都参与卵母细胞成熟的调控，只不过在不同发育阶段、不同动物中发挥不同的作用。

(一) cAMP 依赖性的蛋白激酶 A 通路

蛋白激酶 A (PKA) 是真核生物细胞中 cAMP 的主要靶酶，cAMP 的生理作用的发挥就是通过激活蛋白激酶 A 进而使某些特定的蛋白质发生磷酸化来实现的。PKA 在没有 cAMP 存在时，是以无活性的四聚体的形式存在的，由一个二聚体的调节亚基结合着两个催化亚基组成。cAMP 发挥作用时，会与调节亚基结合，使催化亚基释放出来发挥催化活性。

在卵母细胞成熟中，cAMP 被证明是卵泡体细胞产生的阻滞减数分裂的重要成分。卵母细胞的减数分裂恢复，常需要卵母细胞内 cAMP 的降低。而且 cAMP 的角色并不仅仅如此，它作为膜信号转导通路的重要第二信使，可能介导促性腺激素、生长因子等诱导卵母细胞成熟的作用。研究表明，腺苷酸环化酶的抑制剂 DDA 及 PKA 的抑制剂 H-89 能逆转 FSH 的促减数分裂成熟，蛋白激酶 A 的抑制剂 H-89 也可抑制牛卵母细胞的自发成熟。用 forskolin、二丁酰基环腺苷一磷酸 (dibutyryl cAMP, dbcAMP)、腺苷酸环化酶刺激物等作用 1~2h 可诱导小鼠和猪卵丘卵母细胞复合体的 cAMP 的短暂升高，并能诱导卵丘扩展及减数分裂恢复，由其预处理的培养液也能诱导裸卵 (DO) 的成熟，同时伴有卵母细胞内 cAMP 的降低，但是其他哺乳动物卵母细胞成熟时，卵母细胞内并未发现有 cAMP 的降低。这说明可能是 cAMP 在细胞内水平的变化，而不是它的绝对值，在卵母细胞成熟中发挥重要作用。

上述相互矛盾的结果，可能与颗粒细胞及卵母细胞对促性腺激素的反应性及对 cAMP 的合成、代谢调节不同有关。细胞内 cAMP 水平由 cAMP 的合成、降解及排出间的平衡决定，但由于 cAMP 的排出量较少，磷酸二酯酶 (PDE) 的降解可能对细胞内 cAMP 水平起着主要的调节。研究表明，卵巢、颗粒细胞及一些激素对 PDE 的活性具有调节作用。哺乳动物共有 7 种类型的 PDE，其中小鼠、大鼠和人至少有 4 种，但与 cAMP 有关的只有 PDE4 及 PDE3。原位杂交显示，PDE4 mRNA 主要在颗粒细胞上表达，而卵母细胞只表达 PDE3 (cGMP 特异性)。PDE4 抑制剂可诱导培养卵泡中卵母细胞减数分裂恢复，其抑制剂对自发的或培养卵泡中 LH 诱导的卵母细胞成熟无影响；而 PDE3 的抑制剂却可抑制自发的或培养卵泡中 LH 诱导的卵母细胞成熟。这些结果提示，PDE 在颗粒细胞和卵母细胞中有选择的表达和调节调控着 cAMP 的水平和卵母细胞的

成熟。卵母细胞生长过程中一些因素抑制卵母细胞 PDE3 活性, 保持 cAMP 持续的高水平而抑制卵母细胞成熟, 而排卵前促性腺激素可能抑制颗粒细胞的 PDE4 表达导致 cAMP 水平的短暂上升, 进而促进颗粒细胞分泌刺激物质而诱发卵母细胞成熟。另外, 卵母细胞和卵丘细胞中可能存在不同形式的 PKA, 研究发现卵母细胞中存在有 I 型的 PKA, 而卵丘细胞中则有 I 和 II 型两种 PKA。研究表明, II 型的 PKA 与卵母细胞减数分裂的诱导恢复有关, 而 I 型的 PKA 则与卵母细胞成熟的抑制有关。cAMP 与两种 PKA 的亲合力不同, 对 I 型的亲合力要高于 II 型 PKA, 因此低浓度的 cAMP 可能激活 I 型的 PKA 抑制卵母细胞的成熟, 而高浓度的 cAMP 才能激活 II 型的 PKA 并诱发卵母细胞减数分裂的恢复。

(二) 磷脂酰肌醇代谢通路

跨膜信号转导中, 另外一种重要的信号转导通路是磷脂酰肌醇代谢通路。激素和其他活性物质与细胞膜上的 G 蛋白或酪氨酸蛋白激酶相偶连的受体结合后, 可以激活磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 家族中的不同成员, 进而催化 PIP_2 的降解。

有实验证明, PLC 的抑制剂——新霉素 (neomycin) 可以抑制猪及牛卵母细胞体外自发成熟及激素诱导的卵母细胞成熟。这表明, 磷脂酰肌醇代谢通路参与了卵母细胞的自发成熟。由于 PIP_2 降解可以产生二酰基甘油 (diacylglycerol, DAG) 和三磷酸肌醇 (inositol trisphosphate, IP_3), 而 DAG 和 IP_3 可以分别激活 PKC 和动员细胞内钙库中的 Ca^{2+} 。因此, 上述结果提示 PKC 和 Ca^{2+} 可能参与了卵母细胞的成熟分裂。

1. PKC 与卵母细胞成熟

有关 PKC 对卵母细胞作用的研究, 多集中于它对受精之后的调节上, 而对卵母细胞减数分裂成熟的研究较少, 所得结果也很不一致。许多研究认为, 它的激活可抑制小鼠和牛卵母细胞的生发泡破裂, 诱导大鼠卵丘卵母细胞复合体和兔卵泡中的卵母细胞的减数分裂, 而对金黄仓鼠卵母细胞减数分裂成熟无影响。造成这些结果差异很大的原因, 除动物的种类不同外, 实验采用的细胞培养模型也有很大的影响。这些实验多建立在卵母细胞体外自发成熟模型基础上, 不能反映体内促性腺激素克服卵泡抑制环境诱导卵母细胞成熟这一过程。而近来的研究表明, 自发成熟与激素诱导的卵母细胞成熟的机制不同。而且, 许多培养液中添加血清甚至激素, 它们含有较多的未知成分, 对实验的结果都会产生影响。为克服上述影响, Su 等利用次黄嘌呤做抑制剂, 体外无血清培养猪卵母细胞, 对 PKC 的作用进行了研究, 发现 PKC 参与 FSH 启动的猪卵母细胞减数分裂的恢复, 其抑制剂鞘氨醇 (sphingosine) 和星形孢菌素 (staurosporine) 可抑制 FSH 诱导的生发泡破裂, 而低浓度的激动剂乙酸肉豆蔻佛波醇 (phorbol myristate acetate, PMA) 可逆转 HX 的抑制。PKC 的作用可能具有阶段特异性, 不同时期它的调节作用可能不同, 这也将影响实验结果。研究表明, 依据 PMA 的剂量和作用时间, 它可能对小鼠、猪卵母细胞成熟产生不同的影响。这可能是由于 PKC 存在多种亚型, 不同的亚型可能具有不同的生物功能。

2. Ca^{2+} 与卵母细胞成熟

Ca^{2+} 作为细胞内的信使物质, 在细胞周期调控中起着十分重要的作用。 Ca^{2+} 在多种动物的细胞转换期出现释放峰, 其浓度波动 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillation, 钙振荡) 与细胞周期变化密切相关。卵母细胞的成熟及受精也是一种细胞周期转换过程, 也有 Ca^{2+} 浓度波动的调节, 也需要 Ca^{2+} 的作用。研究表明, Ca^{2+} 在卵母细胞内释放有两种形式: 一是受第二信使三磷酸肌醇的激活而释放, 称为 IP_3 诱导的钙离子释放 (IP_3 -induced Ca^{2+} release, IICR), 另外就是 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR)。 Ca^{2+} 主要由细胞内钙库脉冲性释放, 转导外来刺激信号。它可能通过诱导产生阳性因子而调节卵母细胞成熟, 也可能直接作为阳性信号而发挥效应。

关于 Ca^{2+} 在卵母细胞减数分裂恢复成熟过程中的作用, 研究结果纷繁复杂, 甚至相互矛盾, 难以得出统一的结论。一些研究发现, 利用 Ca^{2+} 缺乏的培养液培养大鼠卵丘包被的卵母细胞 (CEO)、牛 CEO、仓鼠裸卵母细胞、猪裸卵母细胞, 对减数分裂无显著影响; 另一些研究却报道缺乏 Ca^{2+} 的培养液和 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 可以明显地部分抑制仓鼠 CEO 中卵母细胞生发泡破裂的发生, 但却能启动大鼠卵泡包裹的卵母细胞的减数分裂。小鼠及仓鼠的卵母细胞在发生生发泡破裂前 Ca^{2+} 浓度升高, 但用 Ca^{2+} 拮抗物处理, 并不能阻止生发泡破裂的发生, 即 Ca^{2+} 浓度波动可能不是生发泡破裂所必需的; 牛和猪的卵母细胞生发泡破裂发生需要 Ca^{2+} 的参与, Ca^{2+} 螯合剂 (BAPTA-AM) 可阻止或延缓自发或 FSH 诱导的减数分裂恢复, 但在不同时期的卵母细胞中未检测到 Ca^{2+} 浓度的波动。Jagiello 等观察到 Ca^{2+} 离子载体 A23187 能够抑制小鼠卵母细胞的减数分裂恢复; 而 Paleos 和 Powers 却观察到有促进作用。而 Tsafiriri 和 Bar-Ami 却报道对大鼠 CEO 无作用。这可能是由于 Ca^{2+} 调节卵母细胞减数分裂恢复的机制较为复杂, 受体内多种因素的影响, 在作用的时间和空间上要求严格, 研究中难以建立一个合适的研究模型, 真实完整的反映生理状况的结果。

在外源 Ca^{2+} 和内源性 Ca^{2+} 对卵母细胞成熟作用的研究中, 常将卵母细胞培养在无 Ca^{2+} 培养液或 Ca^{2+} 螯合剂造成的缺钙条件下进行研究。但其所用培养液多含有血清, 而血清中多少都含有 Ca^{2+} , 这些 Ca^{2+} 必将影响实验结果, 导致对 Ca^{2+} 的作用无法得到一致的认识。最近, 利用体外无血清培养体系, 对 Ca^{2+} 在猪、小鼠 CEO 减数分裂成熟的作用进行了研究, 发现细胞内钙参与猪、小鼠卵母细胞减数分裂成熟, 其螯合剂 BAPTA-AM 阻止 FSH 诱导的 CEO 减数分裂的恢复, 但不影响小鼠卵母细胞的自发成熟。细胞外钙对猪、小鼠卵母细胞减数分裂成熟没有明显的影响。

Ca^{2+} 传递信号的方式主要表现为 Ca^{2+} 浓度波动, 大量的研究对卵母细胞内 Ca^{2+} 浓度波动进行了检测。从卵泡取出的未成熟小鼠生发泡 (GV) 期卵母细胞, 具有一系列自发的 Ca^{2+} 浓度波动 (spontaneous Ca^{2+} oscillation), 一直可持续到生发泡破裂后 2~3h。一些研究还发现用精子刺激 GV 期小鼠卵母细胞, 卵母细胞产生重复的 Ca^{2+} 浓度波动, 而另一些研究却仅见短暂的几个 Ca^{2+} 浓度峰。最近的研究表明, 在自发的 Ca^{2+} 浓度波动停止后, 受精能诱导小鼠生发泡期卵母细胞产生重复的 Ca^{2+} 浓度波动, 该波动幅度远大于自发的 Ca^{2+} 浓度波动, 可持续至受精后数小时。绵羊 GV 期卵母细胞中也发现有自发的 Ca^{2+} 浓度波动, 并且 LH 刺激卵丘卵母细胞复合体也能诱导 Ca^{2+} 浓度

波动的发生。自发的 Ca^{2+} 浓度波动与受精诱导的 Ca^{2+} 浓度波动的调节机制不同,前者受 IICR 的调控,后者的调控则较为复杂,可能不仅仅受 IICR 的调节。关于自发的 Ca^{2+} 浓度波动在卵母细胞成熟中的作用尚不清楚,可能与生发泡破裂无关,因为用二丁酰基 cAMP (dbcAMP) 抑制生发泡破裂并不能阻止卵母细胞自发的 Ca^{2+} 浓度波动。不过小鼠自发的 Ca^{2+} 浓度波动的产生依赖完整的生发泡,而且常常产生于细胞核而终止于细胞质;绵羊、牛的 CEO 受到 LH 刺激后,首先在卵丘细胞产生 Ca^{2+} 浓度波动,而后卵母细胞内才出现,这些结果提示这种 Ca^{2+} 浓度波动可能与信号在细胞核和细胞质间的传递有关。

牛和猪卵母细胞的生发泡破裂可能需要 Ca^{2+} 的参与,细胞内 Ca^{2+} 螯合剂 (BAPTA-AM) 可阻止或延缓自发或 FSH 诱导的卵母细胞减数分裂恢复,但在不同时期的卵母细胞中未检测到 Ca^{2+} 浓度的波动。这可能与牛卵母细胞生发泡期对 Ca^{2+} 通道调节的敏感性极低有关,它可能掩盖了未成熟卵母细胞中 Ca^{2+} 浓度的波动。哺乳动物卵母细胞中存在着两种调节 Ca^{2+} 释放的通道: 1, 4, 5-三磷酸肌醇受体 (IP_3 -受体) 通路和植物碱受体 (ryanodine receptor, RyR) 通路。RyR 通道在牛卵母细胞内含量比 IP_3 -受体通道低 30~100 倍,而且注射植物碱并不能激发 Ca^{2+} 浓度波动,因此它可能在牛卵母细胞 Ca^{2+} 的释放上处于次要位置。 IP_3 -受体在牛和猪的卵母细胞中含量丰富,对卵母细胞的成熟有重要作用。肝素、新霉素、锂离子等 IP_3 -受体的抑制剂,均能阻止减数分裂的恢复和 MPF 及 MAP 的激活。 IP_3 -受体通道的活性与 IP_3 -受体的数目呈正相关,在卵母细胞生长和成熟中 IP_3 -受体逐渐增多,在 GV 期较少,而在成熟时达到最多,由此导致正在成熟的卵母细胞中 Ca^{2+} 释放较少,检测不到 Ca^{2+} 浓度的波动。尽管如此, Ca^{2+} 在卵母细胞的成熟中可能仍起着积极的作用,它对第一极体形成的促进作用正在得到普遍重视。 Ca^{2+} 在较低浓度下发挥的作用,可能是因为卵母细胞及颗粒细胞的放大作用,它们增强了 Ca^{2+} 靶物质对 Ca^{2+} 的敏感性; LH 及生长因子能刺激颗粒细胞产生大量 IP_3 , IP_3 可上调 IP_3 受体量,导致 Ca^{2+} 讯号传播。 Ca^{2+} 的靶物质可能有组蛋白激酶 H1、钙调蛋白 (CaM) 及钙依赖性磷酸化酶等, Ca^{2+} 浓度的升高可激活它们的活性。这些酶能调节细胞内多种蛋白的合成、降解及活性变化,在启动和维持卵母细胞成熟分裂时核的分裂及胞质的变化中,起着非常重要的作用。

在卵母细胞的受精及受精卵的早期发育中, Ca^{2+} 的作用较为清楚。精子刺激卵母细胞后,细胞内 Ca^{2+} 迅速释放,产生连续的浓度波,使 MPF、MAPK 相继失活,启动第二次减数分裂,促进原核形成。卵母细胞迅速发生反应,防止多精进入 (详见第五章)。

3. MAPK 信号转导链

丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 又称细胞外调节激酶 (extracellular regulated kinase, ERK), 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,其完全激活需要在苏氨酸和丝氨酸残基处双重磷酸化,而其中任何一个残基的去磷酸化都会使其失活。MAPK 家族的分子质量在 40~46kDa。许多细胞系中存在两种 MAPK, 即 p42^{ERK2} 和 p44^{ERK1} 。MAPK 的靶蛋白包括胞浆和核中的许多蛋白质,后者可以作为转录的激动剂。MAPK 胞浆中的底物是细胞骨架蛋白、核纤层蛋白、核糖体 S6 激酶和 p90^{rsk} 等。

MAPK 的另外一种底物是髓磷脂碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP), 常用来检测 MAPK 的活性。MAPK 的上游蛋白激酶 (也是丝氨酸/ 苏氨酸激酶), 其分子质量为 45~50 kDa, 被称为 MAPKK (MAP kinase kinase), 该酶被 MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) 通过磷酸化苏氨酸残基而激活。原癌基因的产物, 如 MOS 和 Raf 可能是 MAPKKK 的候选底物。因此, MAPKKK (MOS, Raf)、MAPKK 和 MAPK ($p^{ERK1}44$ 、 $p^{ERK2}42$) 组成了一个信号级联转导通路, 调节细胞周期的转换。

卵母细胞的成熟实际上也是一个细胞周期转换的过程。大量的研究表明, MAPK 级联反应在爪蟾、海星等水生动物的卵母细胞成熟中是必需的, 它接受外来刺激信号 (如孕酮), 逐级转递, 最后通过与 MPF 相互协同, 作用于细胞骨架的蛋白等成分, 调控卵母细胞周期的转换 (图 4-17)。

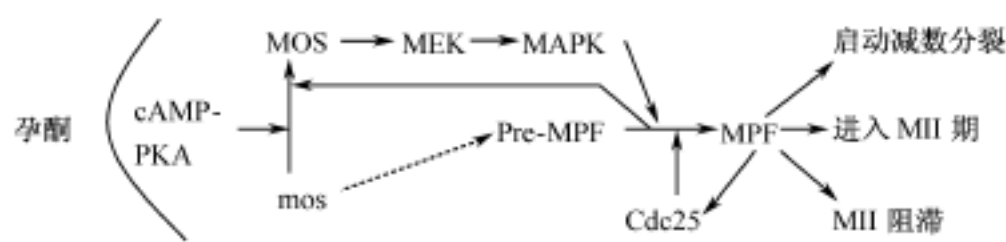


图 4-17 MAPK 级联信号转导在爪蟾卵母细胞成熟中的通路模式
(引自 Sagata 等, 1997)

MOS 蛋白在爪蟾卵母细胞成熟过程中具有三个功能, 首先 MOS 蛋白合成后, 激活 MEK-MAPK 级联反应进而激活 MPF, 同时又直接激活 MPF, 启动第一次减数分裂的恢复; 随后, 在 MI/ MII 的转换中抑制 DNA 的复制; 最后, 作为胞质静止因子 (CSF) 的一部分阻滞第二次减数分裂。MAPK 在生发泡破裂前被激活后, 可能一直处于高活性, 直到受精后才下降。此时, MAPK 的失活与原核的形成有关。可见, MAPK 可激活 MPF, 同时 MPF 又可反馈调节 MAPK 的活性。研究表明, 细胞周期的变化受 MPF 和 MAPK 的双重调控, 两者都影响着细胞周期的转换 (图 4-18)。

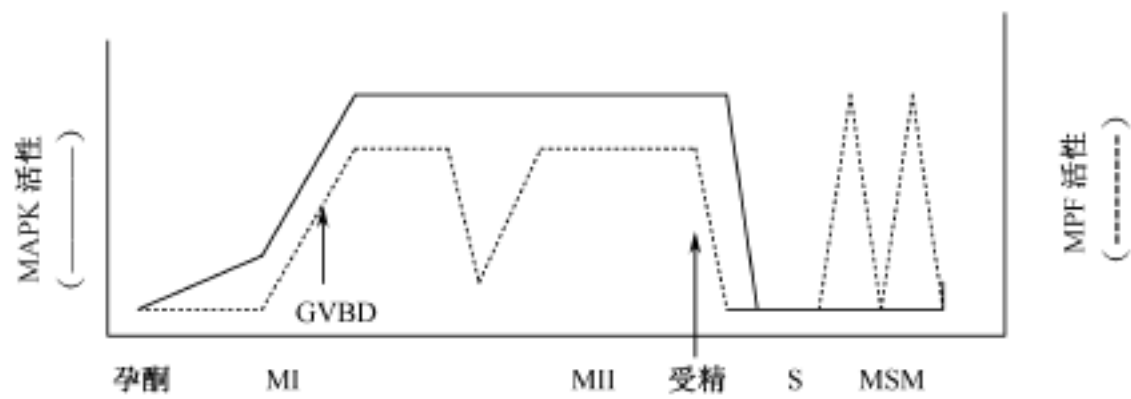


图 4-18 MAPK 和 MPF 在卵母细胞成熟过程中的活性变化
(Sagata 等, 1997)

与鱼及两栖类卵母细胞成熟必须有 MAPK 级联反应的明确结果相比, 在哺乳动物的研究结果较为复杂, 不同的动物所得到的结果多不相同。小鼠卵母细胞成熟时虽也有 cAMP 的降低, 但并不像爪蟾那样诱导蛋白质的合成, 阻断卵母细胞蛋白质的合成也未

阻止 GVBD 的发生。MAPK 的上游激酶 MOS 在生发泡破裂后才开始合成，第二次减数分裂中期前达到高峰。给卵母细胞注射抗 c-mos 敏感寡聚肽，不能阻滞生发泡破裂，说明小鼠卵母细胞减数分裂的启动可能不需要 MAPK 级联反应。由于 c-mos 基因缺失小鼠卵母细胞第一极体的排出迟缓，其表达蛋白 MOS 也可能与极体形成过程有关。MOS 可能参与小鼠卵母细胞第二次减数分裂中期的阻滞，敲除小鼠的 c-mos，可导致卵母细胞第一次减数分裂中期完成后，继续完成第二次减数分裂中期，形成原核，表现为孤雌生殖；卵母细胞内注射抗 c-mos 敏感寡聚肽也能导致孤雌生殖。MAPK 的蛋白合成虽在 GV 期就已开始，但生发泡破裂时 MPF 的活性并不伴有 MAPK 活性，其活性在生发泡破裂后两小时才出现。但研究表明，卵母细胞减数分裂能力的获得包括获得具有激活 MAPK 的能力，即只有具有恢复减数分裂能力的卵母细胞，才能有活性的 MAPK。由于 PKC 的激动剂 PMA 可抑制生发泡破裂及 MAPK 的活性，诱导原核的形成，而 PKC 的抑制剂 calphostin 或 staurosporine 可逆转 PMA 的作用，说明 PKC 可能参与诱导 MAPK 的级联反应。

不过与小鼠不同的是，猪、牛、绵羊、山羊等大动物卵母细胞成熟可能需要 MAPK 级联反应。它们的卵母细胞生发泡破裂都像爪蟾那样需要蛋白质的合成，而阻止卵母细胞蛋白质的合成，不仅抑制了生发泡破裂的发生，还阻止了 MAPK 的激活，这些说明蛋白质所激活的 MAPK 级联反应可能诱导减数分裂的恢复。在牛的卵母细胞，显微注射 MOS 的 mRNA 可以很快激活 MAPK 并且可以加快生发泡破裂发生的进程；而注射对激酶无活性的 MOS 的 mRNA 却不能激活 MAPK。在猪卵母细胞中，MAPKK 只存在于细胞质中，MAPK 在 GV 期也多位于细胞质且无活性，细胞核内没有该酶，仅在生发泡破裂前才能测到有活性的 MAPK，说明 MAPK 级联反应也可能在 GVBD 前携带成熟信号进入核内，诱导 GVBD。Inoue 等将有活性的 MAPK 注射进入猪生发泡期卵母细胞的细胞核内，很快诱导了生发泡破裂，远快于正常生发泡破裂发生的时间。Hacard 等和 Huang 等在爪蟾上也得到了同样结果，这些结果证实生发泡破裂需要 MAPK 的信号转导。另外，Inoue 等还将 MAPK 注射进入猪生发泡期卵母细胞细胞质内，但未能诱导生发泡破裂发生，仅见部分的、平稳的 MAPK 活性升高，推测卵母细胞质的成熟也可能需要 MAPK 级联反应。生发泡期细胞质的某些抑制因子抑制了 MAPK 的活性，而当某种因素诱导 MAPK 进入细胞核导致生发泡破裂后，生发泡破裂发生反过来也促进 MAPK 活性升高，完成细胞质成熟。与其他动物一样，猪、牛卵母细胞 MAPK 的活性在原核形成前消失。对牛卵母细胞第二次减数分裂恢复以后 MAPK 活性的研究发现，MAPK 的失活晚于 MPF 的失活。体外孤雌激活时， Ca^{2+} 载体 A23187 等只能启动 MII 的恢复，但不能诱导原核的形成，加入抑制蛋白合成物质放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 和蛋白丝/苏氨酸激酶的抑制剂 6-DMAP 后，原核可以形成，说明 MPF 失活诱导减数分裂恢复后，仍有蛋白激酶的存在。激酶活性分析显示，MAPK 在 MPF 失活后仍保持高活性，以维持纺锤体的稳定，保证减数分裂的顺利完成，排出极体。此后当染色体浓缩，原核开始形成时 MAPK 失活，导致原核形成。另外，由 MAPK 高活性维持的 MII 以后的短时间细胞周期转换的阻滞，被一些研究者称为 MIII。在爪蟾和小鼠卵母细胞受精中，也发现了同样的现象。

4. 卵母细胞成熟促进因子 (MPF)

卵母细胞成熟的调控属于细胞周期调控的范畴, 因此卵母细胞成熟的调控依赖于与细胞周期有关的特定蛋白质在特定期期内的表达。这些蛋白质中, 成熟促进因子或者 M 期促进因子 (maturation-promoting factor or M-phase promoting factor, MPF) 在哺乳动物卵母细胞成熟过程中起着非常重要的作用。MPF 最早发现于蛙卵中, 因能促进卵母细胞成熟而得名。它与细胞周期有关, 是启动和维持 M 期的因子。MPF 几乎存在于从酵母到人的体细胞的所有真核细胞中, 在进化上高度保守, 功能无种属特异性。MPF 是一种蛋白激酶, 由催化亚基 $p34^{cdc2}$ 和调节亚基细胞周期蛋白 (cyclin) 组成, 催化亚基 $p34^{cdc2}$ 是其主要活性部分, 可使多种蛋白磷酸化, 在细胞周期中只有活性的改变而无量的变化。Cyclin 有多种类型, 其中 Cyclin B 的作用较为常见。Cyclin B 在细胞周期中不断合成和降解, 与 $p34^{cdc2}$ 亚基结合或处于游离状态, 决定 MPF 的激活或失活。它在分裂间期 (G) 开始积累, 至 M 期达到阈浓度时与 $p34^{cdc2}$ 结合, 使 $p34^{cdc2}$ 去磷酸化, 表现出活性, 而在 M 期末与 $p34^{cdc2}$ 分离被降解。MPF 在 M 期异常活跃, 激活 H_1 组蛋白激酶, 催化核纤层蛋白和核仁蛋白磷酸化, 使核纤层解体; 并能调节微管蛋白, 控制细胞动力学变化, 激活一些癌基因, 产生一系列与细胞分裂有关的生物效应, 启动和维持卵母细胞及体细胞的分裂。

卵母细胞开始进行减数分裂的时期, 类似于细胞有丝分裂周期中的 S 期; 卵母细胞减数分裂发生阻滞的时期, 类似于细胞有丝分裂周期中的 G_2 期。而卵母细胞减数分裂恢复的过程, 相当于细胞从 G_2 期向 M 期的转变。MPF 在卵母细胞的成熟及以后的周期转换中的作用, 在爪蟾、海星等动物中了解得较为清楚, 在哺乳动物的研究也已取得很大的进展, 结果与爪蟾等动物的基本相同。体外用 MPF 的特异性抑制剂, 能阻止低等动物及牛卵母细胞减数分裂的恢复。研究表明, MPF 在整个生发泡期几乎没有活性, 在生发泡破裂前后活性升高达到最大, 启动减数分裂, 随后有一个急剧的降低, 以完成 MV MII 的转换; 之后 MPF 活性迅速回升并保持在一个高水平, 将卵母细胞阻滞在第二次减数分裂中期。当受精或孤雌激活诱导 MPF 失去活性时, 卵母细胞第二次减数分裂恢复, 形成原核, 开始受精卵的有丝分裂过程。MPF 阻滞第二次减数分裂的作用不能独立完成, 可能需要胞质静止因子的参与, 阻止胞质静止因子的成分 MOS 蛋白的合成, 可导致第二次减数分裂阻滞失败, 诱导孤雌激活。一般认为, MPF 在卵母细胞减数分裂过程中活性的得失, 主要是通过调节 Cyclin B 蛋白的合成或降解实现的。

卵母细胞在生长发育过程中, 减数分裂一直被阻滞在双线期, 即停留在相当于细胞分裂周期 G_2/M 转换阶段, 在此时期 MPF 的活性受到抑制。研究表明, 未获得减数分裂能力的卵母细胞的 MPF 无活性, 主要是催化亚基 $p34^{cdc2}$ 缺乏所致。 $p34^{cdc2}$ 在卵母细胞生长发育过程中逐渐积聚, 在获得减数分裂能力后迅速增加至阈浓度, 它的增加与卵母细胞的发育呈正相关, 阻止 $p34^{cdc2}$ 的增多则抑制卵母细胞的生长, 未达到 $p34^{cdc2}$ 阈浓度的卵母细胞在体外不能自发成熟。体外成熟的卵母细胞成熟率较低的原因也可能与 MPF 活性有关, 比较马体外培养成熟的卵母细胞与体内成熟的卵母细胞 H_1 激酶的活性发现, 前者明显低于后者。由于生长中的卵母细胞内 cyclin B 蛋白酶浓度一直很高, 抑制卵母细胞成熟的物质也可能通过增强 cyclin B 的降解, 使 cyclin B 达不到阈浓度与

p34^{cdc2}结合来实现其作用。

MPF 的活性受许多因素的影响, 诱导细胞成熟的物质可能通过 Ca^{2+} 及原癌基因 c-mos 参与调节 MPF 活性。c-mos 基因产物 MOS 是一种磷酸化/去磷酸化酶, 并能通过激活 MEK₁ 激活 MAP 激酶, MOS-MEK₁-MAPK 级联共同激活 MPF, 同时 MOS 蛋白也可直接激活 MPF。这条信号转导途径为许多动物卵母细胞启动减数分裂所必需。在受精过程中, 卵母细胞内产生持续的 Ca^{2+} 波, 诱导 MPF 的失活。 Ca^{2+} 能调节多种激酶或磷酸化酶的活性, 可能导致 Cyclin B 蛋白降解失活。体外研究表明, 用蛋白合成的抑制剂放线菌酮和蛋白丝/苏氨酸激酶的抑制剂 6-DMAP 皆可导致卵母细胞 MPF 及 MAPK 的活性下降, 并且能促进乙醇或 Ca^{2+} 载体 A23187 诱导的孤雌生殖。进一步的研究显示, Ca^{2+} 的第一个释放波破坏 Cyclin B 蛋白, 使其失去活性, 随后的释放波启动 Ca^{2+} 依赖的蛋白降解通路, 破坏新合成的 Cyclin B 蛋白。

5. 减数分裂激活甾醇 (Meiosis-Activating Sterol, MAS)

由于 MAPK 和 MPF 通路在调节爪蟾和鱼类卵母细胞成熟过程中的作用已证明是由于促性腺激素刺激颗粒细胞分泌孕酮后启动的通路, 而在哺乳动物中, 促性腺激素刺激的孕酮分泌并不能诱导卵母细胞的成熟。是不是有一种类似孕酮的物质随着动物的进化取代了这一作用, 这引起了人们的极大兴趣。早在 20 世纪 60 年代中期, 丹麦科学家 Byskov 认为卵巢和睾丸可能在初情期时分泌一种物质能够诱导生殖细胞恢复减数分裂。后来发现在人或牛睾丸组织培养液中, 存在能启动小鼠胎儿睾丸生殖细胞减数分裂的物质, 命名为减数分裂诱导物质 (meiosis-inducing substance, MIS)。MIS 无种间特异性, 是激素等外来信号刺激睾丸组织细胞产生的, 具有克服减数分裂抑制物质的效应, 是诱导精原细胞恢复减数分裂的主要阳性刺激因子。后来, 在人排卵前卵泡中也发现了 MIS 的存在, 它在 hCG 刺激后出现, 12~20h 达到最高的水平; 由于它仅出现于可排卵卵泡中, 而不存在于不排卵或闭锁的卵泡内, 且 MIS 的浓度与排出的卵母细胞的受精率相关, 所以推测它与卵母细胞的成熟有关; 或者像在睾丸那样, 受促性腺激素的刺激由颗粒细胞产生, 启动卵母细胞的减数分裂成熟。随后 Byskov 等对 MIS 进行了漫长艰苦的提纯工作, 终于在 1995 年从人卵泡液和牛睾丸组织液中得到了它的纯品, 并确定了这种物质的化学本质。因为它们都是 29~31 个碳的甾醇类物质, 都能诱导体外培养的小鼠卵母细胞减数分裂的恢复, 因此命名为减数分裂激活甾醇 (meiosis-activating sterols, MAS); 其中来自人卵泡液的是 FF-MAS (follicular fluid MAS), 化学结构名称为 4, 4 二甲基 5 α 胆基 8, 14, 24 三烯 3 β 甾醇; 来自牛睾丸组织的为 T-MAS (testis tissue MAS), 化学结构名称为 4, 4 二甲基 5 α 胆基 8, 14, 24 三烯 3 β 甾醇。

根据 Byskov 等的提纯及分析, FF-MAS 和 T-MAS 是胆固醇合成过程中的甾醇类物质, 位于羊毛甾醇和酵母甾醇之间。它们的合成是羊毛甾醇先由 P450 14 α 去甲基酶 (P450 - 14DM) 催化形成 FF-MAS, 再经 Δ -14 甾醇裂解酶催化 FF-MAS 转化为 T-MAS (图 4-19)。MAS 可能是一个约含 29~31 个碳的活性家族, Byskov 等已人工合成了两种 MAS: MAS-414 (4, 4 二甲基胆基 8 烯 3 β 甾醇) 和 MAS-412 (4, 4 二甲基胆基 8, 14 二烯 3 β 甾醇), 它们都能诱导体外培养的小鼠卵母细胞克服抑制因素而恢复减数分裂。成年哺乳动物睾丸中主要含有 T-MAS, 而卵巢中则含有 T-MAS 及其他种

类的 MAS（表 4-4）。

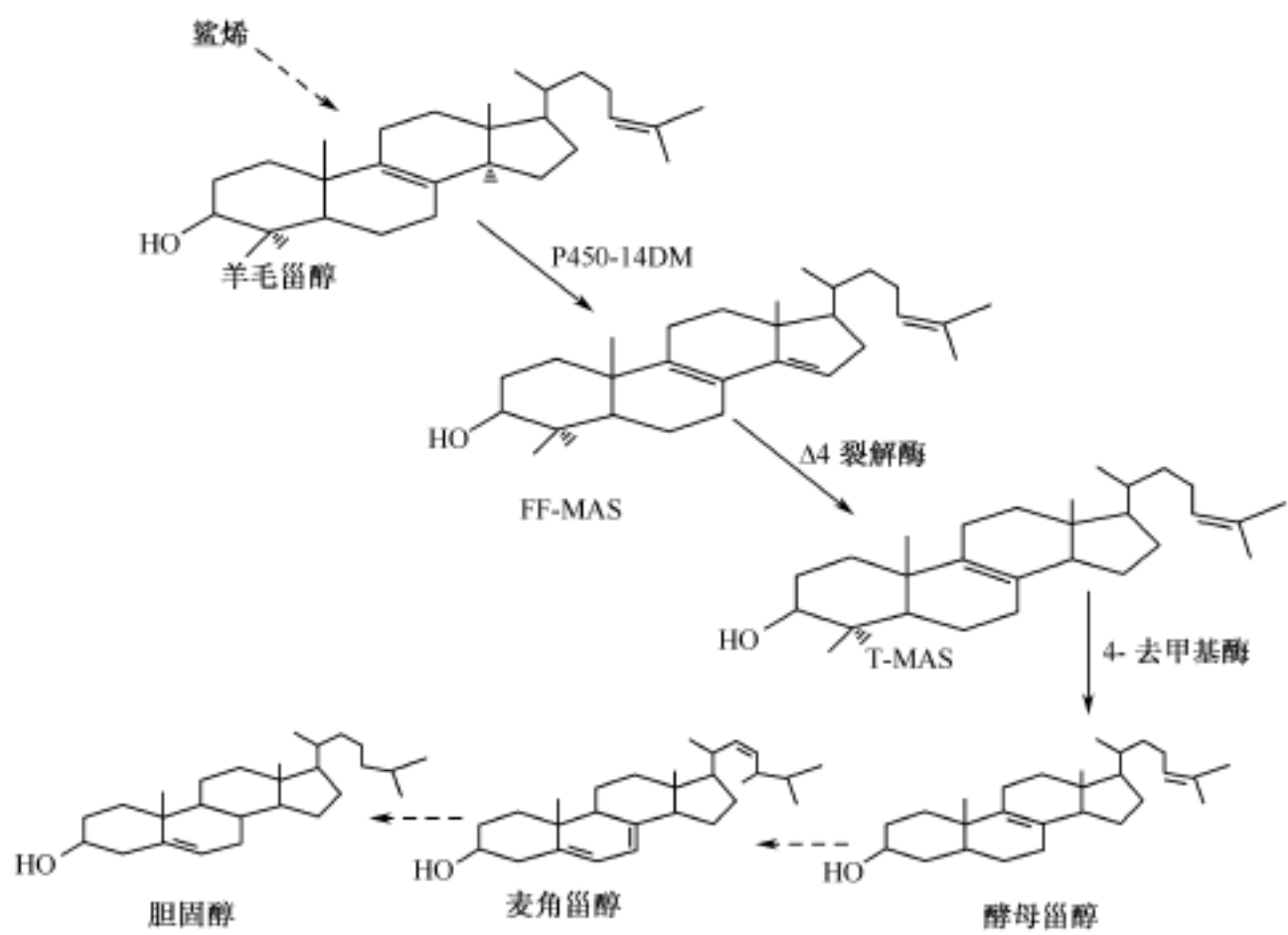


图 4-19 FF-MAS 和 T-MAS 在细胞内的合成及转化路线（引自 Byskov 等，1995）

表 4-4 不同组织及体液中的 MAS 浓度

来源	动物种类	MAS 含量/ ppm ^①
睾丸组织	公牛	> 30
	小鼠	> 30
	种公马（正常）	> 30
	种公马（隐睾）	1~10
睾丸小管	大鼠	> 15
精液	人	< 0.5
精子	人	> 2
卵巢（CG 处理）	小鼠	> 1
卵巢	小鼠	< 0.1
卵泡液	人（排卵前）	1
	马	0.1~0.3
	猪	0.2

FF-MAS 和 T-MAS 在多种哺乳动物（包括人）的排卵前卵泡中积聚（表 4-4）。FF-MAS 在人排卵前卵泡液中的浓度为 1.3μmol/ L，T-MAS 含量约为 FF-MAS 的一半。青春期的 小鼠卵巢中不含 FF-MAS 或含量很低，但用 hCG 刺激后几小时就有 FF-MAS 的积聚。与卵巢不同，睾丸内 FF-MAS 的含量甚微，主要是 T-MAS，在成年牛、马、

^① 注：ppm 为非法定单位，1ppm = 10⁻⁶

人、小鼠、大鼠的睾丸组织及人的精子中含量可达 30ppm，而人精液、马隐睾以及不同哺乳动物的卵泡液中 MAS 的含量较低。

动物生殖细胞减数分裂的阳性启动信号物质似乎都是旁分泌激素，如鱼类和两栖动物的孕酮，已证明是通过旁分泌诱导该类动物生殖细胞减数分裂恢复的阳性刺激因子。在哺乳动物的精子成熟和受精过程中，孕酮也起着促进作用。有意思的是，在哺乳动物卵母细胞成熟过程中，孕酮的作用消失，这可能是在动物进化过程中形成的转变。由于哺乳动物在进化中形成了胎生并哺乳的方式，孕酮的主要作用是维持妊娠，因此它不可能在维持妊娠的同时又促进卵母细胞成熟。MAS 在体外可诱导小鼠卵母细胞的减数分裂恢复，说明 MAS 可能是在进化过程中形成的替代孕酮促进哺乳动物卵母细胞成熟的机制。MAS 可能作为一种特化的旁分泌激素，在哺乳动物的由促性腺激素诱导的卵母细胞减数分裂恢复中扮演着生理性信号物质的角色。

体外实验证明，小鼠卵丘卵母细胞复合体中的卵母细胞经 FSH、Forskolin 或 db-cAMP 刺激 1~2h 后，可产生一种减数分裂促进物质，该物质可扩散于培养液中，能够克服 HX 的抑制而诱导卵母细胞的减数分裂成熟。该物质的产生依赖于卵丘细胞与卵母细胞的紧密结合，具有热稳定性，推测可能是 FF-MAS。促性腺激素刺激后，FF-MAS 和 T-MAS 在小鼠卵巢内可能很快积聚。由于它们都有促减数分裂恢复的作用，在卵巢内可能具有协同作用。但促性腺激素刺激 MAS 在卵巢内积聚的推测，仍缺乏明确的证据。

对于体外培养的在次黄嘌呤抑制下的小鼠卵母细胞， $0.03\sim 3\mu\text{mol/L}$ 的 FF-MAS 和 T-MAS，皆能剂量依赖性地诱导减数分裂恢复，而且同样浓度的 FF-MAS，还能剂量依赖性地克服 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) 或 db-cAMP 对卵母细胞的抑制。而对于体外培养的卵泡，则需高浓度的 FF-MAS ($60\mu\text{mol/L}$) 才能达到 LH 的诱导效果。卵巢内灌注 MAS，也能导致卵母细胞减数分裂的恢复。MAS 诱导减数分裂恢复的信号通路还不清楚，有假设认为可能与受体的调节有关。Grindahl 等 (1998) 推测一种叫 LXR α 的核受体可能介导 MAS 的作用，因为它可被多种甾醇及 FF-MAS 转运激活。但在小鼠的体外实验中，未发现这些甾醇对卵母细胞减数分裂恢复的影响，说明这种受体可能不介导 MAS 的作用。由于霍乱毒素抑制 MAS 刺激的小鼠卵母细胞成熟，而对卵母细胞的自发成熟无影响，表明 G-蛋白有关的受体可能参与 MAS 的作用。MAS 的作用可能需要蛋白的合成，但不涉及 RNA 的转录，因为用蛋白合成抑制剂可阻止 MAS 诱导的小鼠卵母细胞成熟，而 RNA 合成的抑制剂无影响。

由于 MAS 是细胞内胆固醇合成过程中的物质，研究 MAS 内源性合成和积聚的一个有效方法，就是利用能够干扰性腺组织中 MAS 合成或代谢转化的成分（如抗真菌药物酮康唑、氟康唑等），抑制 P450 细胞色素 14 α 脱甲基酶活性，从而抑制羊毛甾醇生成 FF-MAS。体内研究结果表明，大鼠卵巢上有 P450-14DM mRNA 的表达，用 hCG 刺激可使表达增强，同时伴有 MAS 的积聚。Tsafiriri 等 (1998) 发现给小鼠注射酮康唑，可抑制卵子的排出，但不能抑制卵母细胞体外自发成熟。另一种酶的抑制剂 AY9944，也被用来研究 MAS 的积聚和作用。AY9944 是一种 Δ^{-7} 裂解酶（催化胆固醇的上游前体物形成胆固醇）的抑制剂，也能抑制 Δ^{-14} 甾醇裂解酶的活性，从而减低 FF-MAS 向 T-MAS 的转化。实验表明，肝细胞碎片中加入 AY9944，可导致胆固醇合成减少，

FF-MAS 积聚。最近, Leonardsen 等 (2000) 发现 AY9944 剂量依赖性地诱导体外培养的小鼠卵丘包被的卵母细胞恢复减数分裂, 而对裸卵却无影响, 说明 AY9944 的靶位点在卵丘细胞上。他们还分别研究了 AY9944 对胆固醇、T-MAS、FF-MAS、羊毛甾醇从底物鲨烯合成的影响, 也证明 AY9944 诱导 MAS 积聚。但将卵丘细胞与卵母细胞分离后再将它们混合培养, AY9944 却无影响, 这表明卵丘细胞与卵母细胞的相互作用对启动减数分裂的恢复必不可少。这些结果结合以前 FSH 刺激 CEO 的研究结果, 提示 FF-MAS 可能在卵母细胞的调控下, 受促性腺激素的诱导, 由卵丘细胞产生, 并在卵母细胞的减数分裂恢复中扮演重要生理性角色。但是, 这些结果并不足以确认这种推测, 需要进行大量的研究来证明促性腺激素是通过诱导 MAS 产生, 从而诱导卵母细胞的成熟。谢辉蓉等的研究结果证明, FSH 可明显诱导体外培养的小鼠 CEO 中 MAS 的水平在 6~12h 增加, 此时正好是卵母细胞开始恢复减数分裂的时间, 并用卵泡体外培养技术发现 FSH 刺激 6h 后, MAS 的合成酶——CYP51 蛋白含量急剧增加, LH 虽有相似的作用, 但刺激程度远远小于 FSH。这些结果直接证明 FSH 能够直接刺激 MAS 的产生, 进而诱导卵母细胞克服抑制因素而主动成熟, 至少在小鼠是这样。

FSH 及 EGF 都能促进多种动物卵母细胞的体外成熟及胚胎着床率。最近的一项关于 57 例妇女体外受精的随机调查也显示, 受精时培养液中加 FSH 及表皮生长因子, 可促进人胚胎的着床率。令人感兴趣的是, 加 FSH 及 EGF 的细胞培养液中可检测到 FF-MAS, 而不加的培养液中则检测不到。这提示, FSH 及 EGF 的促卵母细胞质和核成熟的作用, 可能是通过促进 MAS 的积聚实现的。这也许符合输卵管中卵子受精及受精卵早期发育的真正机制, 那里含有表皮生长因子、卵泡液里的 FF-MAS 及精子的 T-MAS。一些实验结果也显示, 小鼠卵母细胞培养液中加入 FF-MAS, 可提高受精率; 加入酵母甾醇, 可促进卵母细胞成熟及 2 细胞期胚胎的形成。

对 MAS 在生殖中作用的研究结果, 使 MAS 有可能成为一种理想的避孕药。由于内源性 MAS 的积聚可诱导卵母细胞减数分裂的恢复, 促进成熟、受精及早期胚胎的发育, 阻止 MAS 的积聚就可能导致不育; 如果卵母细胞中存在 MAS 受体, 则用 MAS 拮抗剂可阻止卵母细胞减数分裂的恢复, 从而阻止卵母细胞成熟; 假如 MAS 不仅仅作用于获得减数分裂能力的卵母细胞, 还能诱导未获得减数分裂能力的卵母细胞减数分裂恢复, 则可通过促进 MAS 积聚, 使卵母细胞过早恢复减数分裂而致不育。

6. 一氧化氮对卵母细胞成熟的影响

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是哺乳动物的一种重要信息分子, 有着独特的理化性质和生物学活性。NO 在卵泡生长、排卵、黄体生成和退化等卵巢生理中起着重要的作用, 在卵母细胞成熟方面也有其调节作用。

在室温下, NO 是一种无色的气体, 它在水中的最大溶解性和纯氧相近。由于它没有极性, 所以能自由进出细胞膜。NO 的化学性质活泼, 在生物组织中的半衰期只有 3~5s。在哺乳动物中, NO 是由一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化 L-精氨酸而合成的, 此反应依赖于氧和 NADPH, 生成 NO 和 L-瓜氨酸。根据它们的组织来源和功能属性来分, 一氧化氮合酶 (NOS) 可分为三种不同的类型, 其中神经型 (nNOS) 和内皮型 (eNOS) 是组成型的, 与 NO 持续的基础水平释放有关, 而第三种

则是诱导型的 (iNOS), 和炎症反应有关。nNOS 和 eNOS 的激活需要钙/钙调素的参与, 而 iNOS 的激活则不依赖于钙/钙调素。

Yamachi 在体外灌注兔卵巢模型中发现, 灌注液中加入一氧化氮合酶 (NOS) 的抑制剂 L-NAME 并不影响被灌注卵巢中卵母细胞的减数分裂成熟。随后, Jablonka-Shiariff 等否定了 Yamachi 的实验结果, 发现卵母细胞的成熟也需要 NO, 他们向小鼠体内注射 NOS 的抑制剂 L-NAME, 抑制 NO 的产生后, 发现不仅排出的卵子数量减少, 而且卵子的减数分裂也不正常。紧接着 Jablonka-Shiariff 等报道, 敲除 eNOS 基因的小鼠中, 卵巢重量下降, 卵巢中卵丘-卵母细胞复合体 (CEO) 数目下降, 而且将卵丘卵母细胞复合体在体外培养也发现, 这些卵母细胞很少进入第二次减数分裂, 而大多数停滞于第一次减数分裂或发生细胞凋亡。同时他们还用体外培养野生型小鼠卵母细胞的方法证明, L-NAME 能剂量依赖性地抑制卵母细胞第一极体的排出, L-NAME 虽不能影响正常小鼠卵丘卵母细胞复合体的生发泡破裂, 却能使生发泡破裂的时间推迟。

Kazuo 等在小鼠上的研究不仅证明 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L 的 L-NAME 能剂量依赖性地抑制卵丘卵母细胞复合体减数分裂的恢复, 且此抑制作用能被 NO 供体——硝普钠 (SNP) 所逆转, 但同样浓度的 L-NAME 对裸卵的减数分裂没有影响。他们还证明低浓度 (10^{-7} mol/L) 的硝普钠 (SNP) 而不是高浓度的 SNP, 能显著促进 $300 \mu\text{mol/L}$ dbcAMP 所阻滞的卵丘卵母细胞复合体的体外成熟。

Nakamura 等研究发现, NO 能够抑制卵泡卵母细胞的成熟, 可能是通过 iNOS-NO-(cGMP) 系统起作用的。王松波等研究发现, 高浓度 (1 mmol/L) 的硝普钠能够抑制小鼠卵母细胞体外的自发成熟, 能够延迟发生的时间。最近, Bu 等报道, NO 对卵母细胞的成熟起双重作用, 研究发现一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 和 L-NNA 能够抑制卵丘包被的卵母细胞 (CEO) 第一极体 (PB1) 的释放率, 而对裸卵母细胞没有影响; 低浓度的硝普钠 (10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L) 能够明显地促进 4 mmol/L 次黄嘌呤抑制的 CEO 的成熟, 但对裸卵没有影响; 高浓度的 SNP (1 mmol/L) 能够明显地降低 CEO 自发成熟过程中第一极体释放率, 并且在培养的前期 (前 5h) 能够明显地延迟 CEO 的生发泡破裂。进一步的研究证明, 高浓度的 NO 抑制小鼠卵母细胞自发成熟是通过 cGMP 通路实现的, 而低浓度的 NO 促进 HX 抑制的小鼠卵母细胞恢复减数分裂是通过 cAMP 通路实现的。

目前, 有关 NO 在卵母细胞减数分裂过程中作用的研究还不是很多, 且有些结果相互矛盾。另外, 关于 NO 对卵母细胞成熟影响的作用机制方面的工作还很少, 需要进一步的研究。

第三节 排 卵

所谓排卵 (ovulation), 是指突于卵巢表面的成熟卵泡发生破裂, 包围有卵丘细胞的卵母细胞随卵泡液排出的过程。哺乳动物性成熟以后, 只有少数的原始卵泡生长发育成熟并排卵, 绝大多数卵泡在生长竞争中闭锁、退化。排卵受多种因素的影响, 其中激素和酶起着重要的作用。在人类的月经周期中, 排卵随机发生在两侧的卵巢中, 而灵长类动物的排卵则在两侧的卵巢中交替进行。

一、排 卵 类 型

根据动物卵巢排卵的特点，可以将排卵分为自发排卵 (spontaneous ovulation) 和诱导排卵 (induced ovulation) 两大类。

(一) 自 发 排 卵

动物性成熟以后，按照一定的时间，卵泡发育成熟后会在下丘脑和腺垂体的控制下自发排卵，不需要另外的促排卵刺激。这种排卵类型的动物最多，包括牛、羊、猪、马、犬等家畜以及大多数哺乳动物。根据自发排卵后形成的黄体是否有功能，自发排卵又可以分为两种：

1. 自发排卵后形成功能性黄体

这类动物的发情周期较长，在排卵后自然形成黄体。黄体的生理功能可维持一定的时间，其时间长短决定了发情周期的长短。

2. 自发排卵交配后才形成功能性黄体

鼠类属于这种类型，这类动物的排卵虽然是自发的，但必须经过交配刺激，所形成的黄体才具有内分泌功能，并维持 10~12 天的时间。若交配后并未受孕，动物则出现假妊娠，此时形成的黄体也具有分泌孕酮的能力，并且也能维持 12~14 天。但如果没有交配则黄体期的持续时间只持续 1~2 天，这是因为交配诱导 PRL 的释放。在狗中，标志着间情期 (diestrus) 结束的黄体自发退化也会导致 PRL 水平的升高，引起临床假孕，非妊娠的母狗在此时期能够筑窝、泌乳和饲养其他动物。

自发性排卵的动物，LH 的分泌是周期性的，是由神经和内分泌系统相互作用激发的，不取决于交配的刺激。

(二) 诱 导 排 卵

需要交配才能排卵的动物称为诱发排卵动物或反射性排卵动物，包括兔、猫、雪貂、水貂、骆驼、驼马 (非洲驼) 和羊驼等。交配替代了雌激素作为刺激诱导促性腺激素排卵前峰释放的因素。但是，这些动物在由交配诱导促性腺激素峰释放之前仍需要有升高的雌激素水平。

在没有交配时，诱发排卵的动物中一群发育的卵泡维持成熟状态，几天后开始退化。卵泡生长类型在猫中能够被明显地区分开来，在卵泡生长波之间 (8~9 天) 卵泡发育和退化经历大约 6~7 天。卵泡生长波之间也有一些重叠 (如驼马和羊驼)，或密切重叠 (如兔)。

这类动物在繁殖季节里，卵巢上始终存在发育成熟的卵泡，但必须经过一定的刺激才能发生排卵。按照诱导性刺激的性质不同，又可将诱导排卵分为两种：

1. 交配刺激诱导排卵

见于兔和猫，它们只有在受到交配刺激或机械性刺激子宫（颈）之后才发生排卵。兔子在交配刺激后 30min 左右开始释放 LH，10~12h 后发生排卵。注射 LH、人绒毛膜促性腺激素（hCG）或电刺激后也可诱导排卵。其机理是当子宫颈受到刺激后，通过神经系统反射性地兴奋下丘脑-垂体-卵巢轴，从而引起排卵。这类动物交配前总处于发情状态，交配后会出现怀孕或假孕状态。

2. 精液刺激诱导排卵

见于骆驼和羊驼，它们的排卵机理与兔子不同，因为人工刺激子宫颈并不能引起排卵。而对双峰驼阴道输精则能够引起排卵，用少量的精清也可诱导排卵。Rios 等在羊驼上也获得了类似的结果。双峰驼在配种或人工授精后 3~4h 出现 LH 峰值，30~40h 发生排卵。在阴道内输精液或精清能够引起排卵，可能是因为双峰驼精清中含有 GnRH 类似因子（GnRH-like factor）。这种因子的生物活性及免疫活性与下丘脑 GnRH（10 肽）的抗血清发生交叉反应。该因子只存在于精液中，在促进垂体释放促性腺激素上与 GnRH 有协同作用。

二、排 卵 时 间

各种动物的排卵时间不一致，排卵时间均发生在发情期的后期或发情结束后（表 4-5）。

表 4-5 各种动物的排卵时间

动物种类	排卵时间
马	发情开始后 1~2 天
牛	发情结束后 8~12h
猪	发情开始后 38~42h
绵羊	发情开始后 24~27h
山羊	发情开始后 40h
狗	接受爬跨后 48~60h
小鼠	发情开始后 2~3h
大鼠	发情开始后 8~10h
仓鼠	发情开始后 8~12h
豚鼠	发情开始后 10h
猕猴	月经开始后 11~15 天
人	月经前 14 天左右
猫	交配后 24~30h
兔	交配后 10~12h
水貂	交配后 40~50h
骆驼	交配后 30~48h

三、排 卵 过 程

哺乳动物的排卵过程大致相同，排卵过程主要经历几方面的变化，包括卵母细胞的细胞核和细胞质成熟，卵丘细胞聚合力松散，卵泡外壁变薄和破裂等。

(一) 卵 泡 增 大

动物发情期前，由于促性腺激素的释放，卵泡体积会发生明显的增大。临排卵前的大鼠卵泡的大小要比促性腺激素开始释放时的卵泡增大 0.5 倍，交配后 9h 的卵泡要比交配前的卵泡增大 0.7 倍。排卵前卵泡体积迅速增加，是由于卵泡外膜细胞侵入性水肿和交配 4h 后开始的胶原纤维分离引起的卵泡外膜细胞松散的聚合，使得卵泡的弹性增加而造成的。

临近排卵时，许多酶活性增强。颗粒细胞释放的胶原酶，能和蛋白水解酶共同作用于纤维的蛋白样基质，使胶原纤维束分离。纤维蛋白溶解酶能使卵泡壁弹性增加。

(二) 卵母细胞核成熟

在经历了一长段休止状态后，排卵前卵泡中的卵母细胞开始恢复减数分裂。卵母细胞核或生发泡会发生一系列的变化，包括生发泡的破裂、减数分裂恢复到第二次减数分裂的中期或排出第一极体阶段。减数分裂会被抑制在第二次减数分裂的中期，直到受精后才完成第二次减数分裂，排出第二极体。初级卵母细胞在排卵前 24h 左右恢复中断的减数分裂过程。一般在 LH 峰后 3h 开始减数分裂，于排卵前 1h 结束。对于大多数哺乳动物而言，第一次减数分裂的恢复和完成发生在排卵前，但马和狗卵母细胞第一次减数分裂的完成发生在排卵之后（狗至少是在排卵后 48h）。在这种情况下，精子通常都要在受精之前在输卵管中等待卵母细胞的成熟。因此为了适应这种情况，狗和马的精子要比其他动物的精子寿命长。

减数分裂成熟是排卵过程中的一个重要事件，因为这对于正常受精是必不可少的。

(三) 卵丘细胞聚合力松散

卵丘细胞是由分散在胶状基质中的几层细胞组成的，中间包围着卵母细胞。排卵前卵泡壁的颗粒细胞开始脂肪变性，卵泡液浸入卵丘细胞之间，使卵丘细胞聚合力松散，并与颗粒细胞逐渐分离。只有靠近透明带的卵丘细胞得以保留，环绕卵母细胞形成放射冠。卵丘细胞的分离使卵母细胞从颗粒层释放出来，并游离于充满卵泡液的卵泡腔中。

在减数分裂成熟过程中，卵丘细胞在扩展后会发生黏液化。排卵前 FSH 峰起始了卵丘扩展。卵丘细胞开始发生黏液化的标志是细胞分泌的黏多糖的量急剧增加，这样会导致卵丘细胞的分散和卵母细胞卵丘复合体的急剧膨胀。卵丘扩展具有很重要的生理意义，这对正常的受精是必需的（图 4-20）。

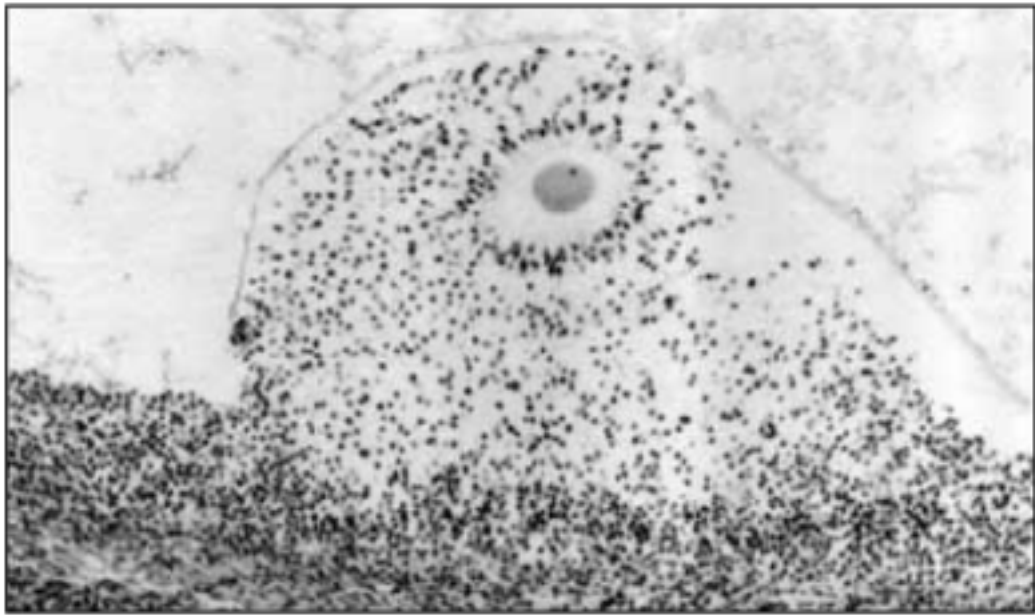


图 4-20 LH/ FSH 对卵丘扩展作用的显微照片 (引自 Testart J 等, 1982)
卵母细胞已经恢复减数分裂, 放射冠从透明带处以放射状向四周扩散, 卵丘细胞由于黏液化作用相互之间失去粘连, 以单独的细胞分散在蛋白多糖基质中

(四) 排卵柱头的形成

随着卵泡的成熟, 卵巢生殖上皮下方发生水肿, 出现了死亡和退化的细胞。白膜下方出现蜕变而成的成纤维细胞。卵巢表面的上皮细胞开始出现局部的溶解, 形成一个破口, 在 FSH 和 LH 峰之后, 破口处的细胞增大, 充满了含有各种蛋白水解酶的溶酶体样空泡。在接近排卵时, 这些细胞开始呈退行性变化, 并释放蛋白酶到细胞外间隙, 使其下面的白膜、卵泡外膜、卵泡内膜、结缔组织的基质溶解、胶原分离并断裂成碎片, 相继崩溃。

在 LH 峰时期, 卵泡出现明显的充血, 甚至波及到预定排卵卵泡的内膜层和外膜层的一部分。卵泡膜毛细血管扩张, 卵泡基底膜出现小孔, 当小孔变大后, 血液便流到细胞外间隙, 形成了广泛的卵泡膜水肿。在临近排卵时, 那些大卵泡的外侧和基部的毛细血管充满了血细胞, 并呈现极度扩展状态。

约于排卵前 2h 时, 颗粒细胞伸出突起, 穿过基底膜, 为排卵后黄体发育时卵泡膜细胞和血管浸入颗粒细胞层奠定基础。当破裂口处细胞变性时, 卵泡内膜和基底膜便从破口处凸出, 形成一个薄薄的半透明的无血管水泡状结构, 突于卵巢表面, 称为排卵柱头 (stigma) (图 4-21 和图 4-22)。

排卵过程中最明显的结构变化就是在卵巢的表面形成排卵柱头。LH 已经被证明直接参与了柱头的形成。作为对 LH 刺激的响应, 卵泡会产生孕酮和前列腺素, 这两种激素对于实验动物卵巢柱头的形成都是必不可少的。支持这一观点的最有力的证据来自于“基因敲除”小鼠的实验, 缺失孕酮受体 (PR) 基因和环氧合酶 (COX) 基因的雌性小鼠不能够排卵, 并且是不育的。PR 基因突变缺失的小鼠可以形成成熟的排卵前卵泡, 卵丘在促性腺激素的作用下也可以发生扩展, 但是却因为不能形成柱头而不能排卵。同样, COX-2 基因敲除后, 雌性小鼠也不能正常排卵, 从而造成不育。优势卵泡不能发

后，又会诱导 COX-2 和前列腺素的产生；前列腺素会和上皮细胞表面的特定受体相互作用，激活一定的信号通路，导致蛋白溶解酶的释放，释放的蛋白溶解酶会降解内在的组织，从而引起卵巢表面的上皮细胞从基膜上分离开来，这样就形成了柱头，进而释放出成熟的卵丘卵母细胞复合体。

四、排 卵 机 理

关于排卵机理的研究已经持续了很长时间，但迄今还不十分清楚。20 世纪 60 年代时，曾有观点认为，排卵是由卵泡液的不断增加，内压升高，致使卵泡膜陆续变薄，加上平滑肌收缩，最终破裂排卵。但这种观点已被否认，在兔和大鼠的成熟卵泡腔内插入毛细微管测定卵泡内压，结果发现排卵前的卵泡内压基本没有发生变化。实际上卵泡破裂排出卵子的过程是一个逐渐流失过程，而不是一个爆破过程。牛、羊、猪等哺乳动物在排卵前数小时卵泡变得很松软，却最终排卵。而发生卵巢囊肿的牛、羊、马等家畜，其卵泡无论从体积大小和内部压力来看，都大大超过了正常的卵泡，但却表现为排卵障碍。

排卵过程受到众多因素的调控，现在已知的因素有多种激素，以及卵巢本身的结构和代谢的变化。

（一）激素对排卵的调控

与排卵有关的激素主要是促性腺激素（FSH 和 LH）以及与垂体促性腺激素活动密切相关的 GnRH 和性腺类固醇激素。

1. LH 的作用

LH 对于卵泡的成熟和排卵均具有重要的作用，不论是自发排卵还是诱发排卵，均与 LH 的分泌有关。血液中 LH 的水平在卵泡期的前期阶段很低，在卵泡期的中期阶段，由于雌激素的正反馈作用，其水平开始升高，在排卵前则形成一个极大的峰值（图 4-23）。如牛的 LH 峰值可高达发情期以外各阶段的 26 倍，而 FSH 的上升比例不过 2~3 倍，由此可见 LH 的变化之大。要使雌激素对 LH 的释放起正反馈作用，雌激素的浓度必须高于 200pg/ml，而且要持续大约 50h。对于妇女的 LH 峰，发生在排卵前 16h 左右，其峰值约为基线水平的 10 倍。在卵泡期的早期阶段，LH 以大约 60~90min 的频率释放，其释放强度相对稳定。而在卵泡期的晚期到排卵前阶段，LH 的释放频率升高，且幅度也可能开始升高。对于大多数妇女来说，LH 释放脉冲幅度是在排卵后开始升高的。

自发排卵的动物中，LH 的作用是周期性的，不取决于交配的刺激，而是由神经内分泌系统的相互作用激发的，因而 LH 常作为一种排卵激素在生产实践中应用。对于诱发排卵的动物，只有在其子宫颈或阴道受到特定的刺激才能激发 LH 峰出现，因而注射一定剂量的 LH 也可以代替交配刺激来达到排卵的目的。

随着排卵的发生，垂体会释放出大量的 LH，结果会造成垂体中 LH 的含量在排卵

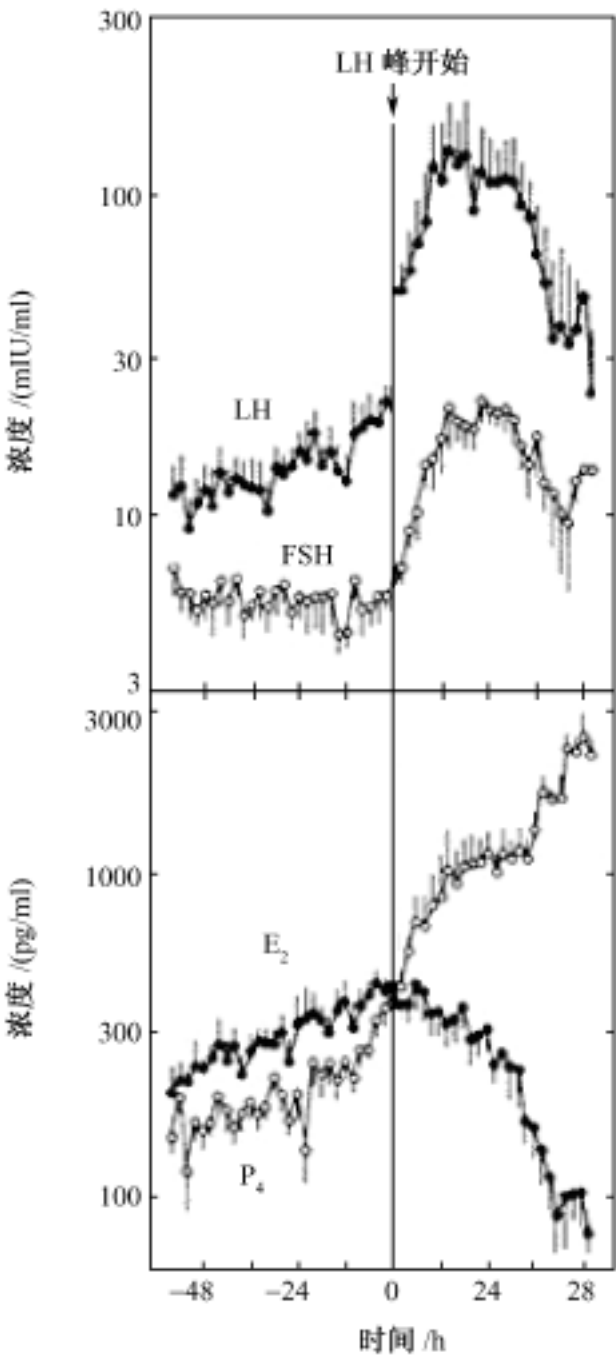


图 4-23 促性腺激素和卵巢类固醇激素在排卵前的变化 (引自 Hoff JD 等, 1983)
LH 峰开始的时间为 0; E₂: 雌激素; P₄: 孕酮

前后发生明显的变化，即在黄体期后期 LH 的量很高，排卵时降低，而后又开始逐渐积累，在黄体期末达到最高值。在排卵时垂体释放的 LH，绵羊的释放占 LH 总量的 54%~68%，牛的为 54%~89%，释放到血液中的 LH 会与卵泡体细胞中的受体结合发挥其调节作用。

LH 峰的出现可以激活卵泡膜中的腺苷酸环化酶，导致 cAMP 的增加，并引起颗粒细胞的黄体化，使卵泡内的孕酮量增加。孕酮可激活卵泡中的一些蛋白分解酶、淀粉酶、胶原酶等，这些酶作用于卵泡壁的胶原，使其张力下降，膨胀性增加，最后引起排卵。

2. FSH 的作用

和血液中 LH 的浓度变化相似，许多动物在排卵时，血液中的 FSH 也会形成一个峰值。由于 FSH 浓度的升高同样是在排卵时，且使用较纯的 FSH 制剂可以引起排卵，因此有人认为 FSH 具有诱导排卵的作用。现在已经证明，FSH 确有诱导排卵的作用。用 LH-β 亚单位抗血清将 FSH 制剂中混杂的 LH 除去后，发现 FSH 也能引起排卵。尽管如此，在大鼠促性腺激素波出现以前，使用 LH 抗血清会阻止排卵，而使用 FSH 抗血清却不能阻止排卵，因此认为正常的排卵是离不开 LH 的。

另外，一定比例的 FSH 和 LH 在排卵上具有协同作用。有实验表明，LH 可以使卵巢上的卵泡全部破裂，而当 LH 和 FSH 配合使用时，只有成熟的卵泡才破裂排卵，说明 FSH 有抑制未成熟卵泡破裂的作用。如果单独使用 LH 促排卵，则需要很大的剂量才能起作用，而将 LH 与 FSH 配合使用时，只需小剂量即可。

3. 前列腺素的作用

当 LH 水平在排卵前激增时，卵泡壁生成的 cAMP 的量会增加，并诱导环氧合酶合成。环氧合酶能够催化卵泡壁的二十碳四烯酸，形成不稳定的环内过氧化物 PGG₂ 和 PGH₂，很快便在异构酶和还原酶的作用下形成稳定的 PGE₂ 和 PGF_{2α}。卵泡壁合成的前列腺素，由于大部分半衰期都很短，所以不能进入卵巢和卵泡液，只能在局部释放，发挥局部作用。

排卵前 PG 的含量增高起到以下几方面的作用：①PGF_{2α}可以使卵泡顶端上皮细胞

内溶酶体增生、破裂，释放出水解酶，水解酶能解离白膜和卵泡外膜细胞，使上皮细胞脱落，形成排卵柱头；②促进卵泡外膜间质内平滑肌样细胞收缩，有助于卵泡破裂。使成熟卵泡周围血管平滑肌收缩及卵泡缺血，促进卵泡破裂；③PGE₂ 促进颗粒细胞内生成纤维蛋白溶酶原激活物，激活纤维蛋白溶酶原，使其转变成纤维蛋白溶酶，而生成的纤维蛋白溶酶又可以使无活性的胶原酶转变成有活性的胶原酶，胶原酶可以使白膜和外膜的胶原纤维解离而发生水肿。

几乎所有的哺乳动物，在 LH 峰之后均伴随着 PGE₂ 和 PGF_{2α} 的升高。PGs 的产生部位主要在颗粒细胞，有少量来自于卵泡膜细胞。当前列腺素的合成受到阻滞时，排卵就会发生障碍，但这对卵母细胞的成熟并没有影响。当内源的前列腺素分泌受阻时，注射 PGF_{2α} 仍可引起排卵。

前列腺素 E 和 F 系列以及羟基花生四烯酸在卵泡液中的浓度都在排卵前达到峰值。前列腺素可以促进蛋白水解酶，而羟基花生四烯酸可以促进血管发生和充血。注射高剂量的前列腺素抑制剂，如氯苯酰甲氧基甲基吡唑乙酸 (indocin) 会阻断前列腺素的合成，从而可以有效地阻止卵泡破裂。这样就会造成未破裂卵泡黄体化综合征 (luteinized unruptured follicle syndrome)，这种综合征在可育和不育的病人中发生的机会是均等的。因此不育的病人应该避免服用前列腺素合成酶抑制剂和 COX-2 的抑制剂，特别是在接近排卵时。

前列腺素和一些蛋白水解酶，如胶原酶、血纤维蛋白溶酶的水平会在 LH 和孕酮的作用下升高。这些酶作用的精确机制还不知道，但蛋白水解酶和前列腺素被激活后却可以消化卵泡壁上的胶原确是不争的事实，从而使卵丘卵母细胞复合体从卵泡中释放出来。前列腺素还可以通过刺激卵巢平滑肌的收缩来促进卵子的释放 (图 4-24)。

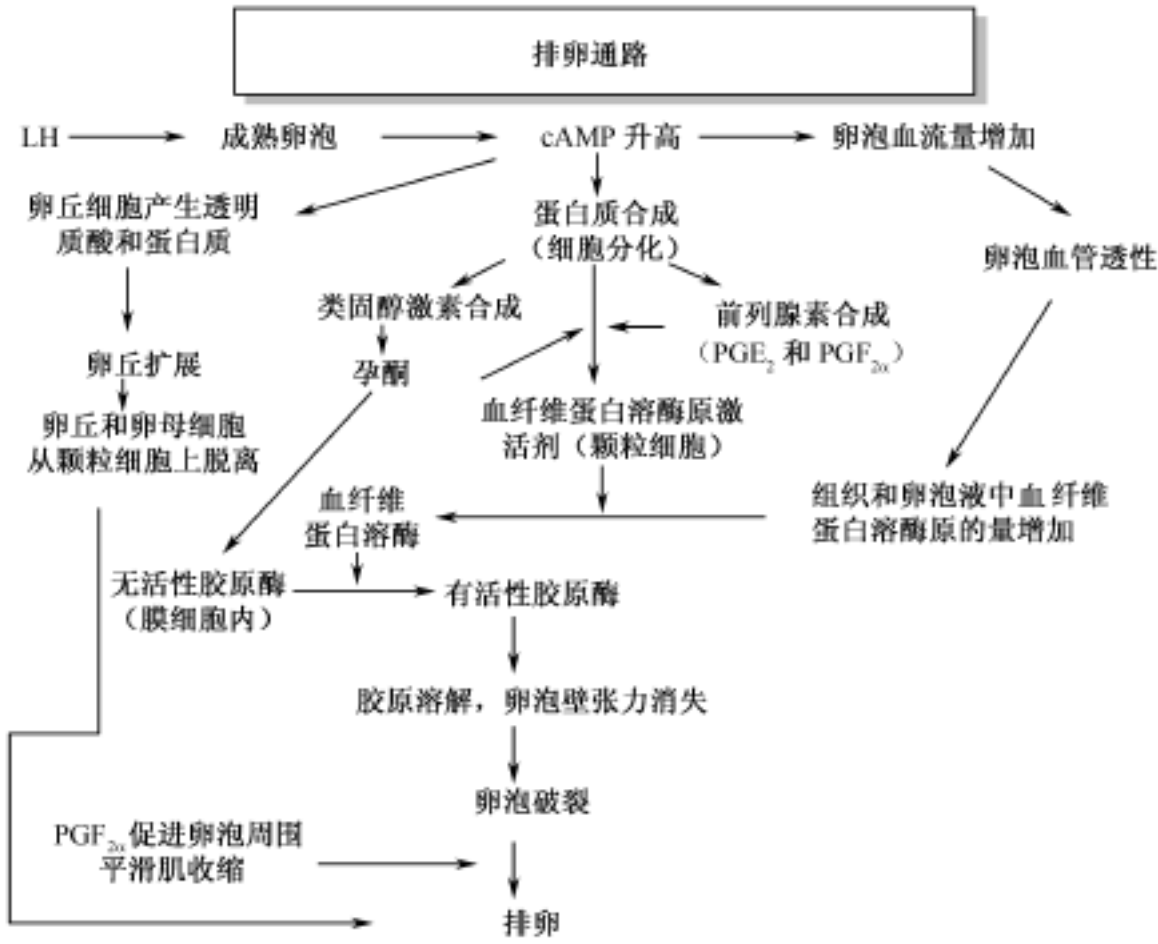


图 4-24 排卵机理示意图 (改自 Hafez ESE, 1987)

4. 孕酮的作用

孕酮的量随着发情周期中黄体的形成而增加，并随着下一次发情前黄体的退化而减少。黄体期孕酮的增加给予中枢神经系统一个负反馈信息，使卵泡在此期间有某种程度的发育。另外，这种信息也会发挥阻止促性腺激素排卵波出现的作用，因而卵泡不能排卵，最终闭锁退化。早期的研究用孕酮受体拮抗剂 RU486 处理大鼠，会使其排卵数目减少，当注射外源性孕酮时，这种抑制效果会被逆转。RU486 可能通过以下几种机制来抑制体内排卵。首先，RU486 可以升高外周血液中雄激素的浓度，从而降低发育中的卵泡对雌激素的反应，使发育的卵泡发生闭锁。另外，RU486 还可以降低 LH 峰，进而影响排卵。在给予能够诱发排卵的促性腺激素的同时，注射孕酮抗血清会抑制排卵，若在 1h 内再注射孕酮，则又能诱发排卵。可见，孕酮在协助 LH 排卵峰促进排卵方面发挥作用。

Pall 等用孕酮受体拮抗剂 Org31710 研究发现，这种抑制剂可以明显抑制大鼠体外灌流卵巢的排卵，而且这种抑制作用跟时间有关。在早期可以抑制排卵，在后期则起不到抑制的作用。这种抑制剂可以明显降低 PGE_2 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的水平以及纤溶酶原激活因子 (PA) 的活性。上述研究结果表明，孕酮可能在排卵过程的起始阶段起着重要的作用。

5. GnRH 的作用

中枢神经系统在决定是否发生排卵和何时排卵方面起着非常重要的作用。排卵是由排卵前 LH 峰引起的，而 LH 分泌则受到 GnRH 分泌到垂体门脉系统特定峰的控制。GnRH 波动峰则是由卵泡分泌到血液循环中的雌二醇的增加引发和支持的。因此 GnRH 的神经内分泌系统的开关，以及所引起的 GnRH 的大量的释放便成为排卵的神经内分泌信号。

6. 雌激素的作用

LH 波出现前 3~4 天，雌激素开始缓慢的上升，LH 峰出现的 12h 前雌激素水平急剧升高，LH 峰出现当天雌激素水平达到最大值，以后迅速下降。由于雌激素在 LH 波出现前升高，因此对排卵波的出现起着直接的引发作用。雌激素的高峰期大致与 LH 峰出现的时间一致，达到高峰后约 5h 浓度下降一半，14h 后已下降到基础水平。

雌激素水平在 LH 达到峰值前不久，其水平急剧下降。这可能是由于 LH 对其受体的下调，或者因为孕酮对雌激素合成的直接抑制作用。雌激素同样参与 FSH 在周期中期的升高。升高的 FSH 会使卵母细胞从卵泡附属物上释放下来，促进血纤维蛋白溶酶原激活，升高颗粒细胞上 LH 受体的数目。引起排卵前卵泡内 LH 水平下降的机制还不清楚，可能是因为雌激素正反馈的缺失，孕酮负反馈作用的增强，或者是垂体 LH 量的减少。

(二) 组织型纤溶酶原激活因子 (tissue-type plasminogen activator, tPA) 对排卵的作用

上述激素对于排卵的作用最终都要通过其激素作用途径导致细胞内蛋白酶系统的活化,使卵泡壁发生裂解而排卵。关于这方面的研究由于篇幅的限制,本节仅介绍纤溶酶系统。PA系统属丝氨酸蛋白水解酶,具有 His、Asp 和 Ser 组成的催化活性中心。纤溶酶是 PA 系统的主要蛋白水解酶,具有广泛的水解酶活性。其前体纤溶酶原是由 790 个氨基酸残基组成的单链糖蛋白,分子质量约 92 kDa。PA 有两种,即组织型 PA (tissue-type PA, tPA) 和尿激酶型 PA (urokinase-type PA, uPA)。PA 有两种抑制因子,分别是 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type-1) 和 PAI-2 (plasminogen activator inhibitor type-2)。激活因子和抑制因子在相同或不同细胞中的表达,表达产物的相互作用共同决定 PA 系统所介导的蛋白水解作用的特异性。tPA、uPA、PAI-1 和 PAI-2 基因在特定细胞中的转录和表达由细胞上的特异受体或“因子”所决定,而 PA 和 PA 抑制因子表达产物(蛋白)分泌出来后,立即与其细胞表面受体或细胞间质或细胞表面结合蛋白结合。这种结合一方面使 PA 的作用发生空间局限化,延长半衰期,另一方面可使它们的作用强度提高 200~400 倍;PA 在细胞间或细胞表面上的局部蛋白水解作用严格受到它们的特异抑制因子的调控和制约。

20 世纪初, Schochet 曾提出蛋白水解酶在降解卵泡壁中起重要作用。然而直到 1975 年, Beer 才通过实验证实, PA 与大鼠排卵有关。进一步研究发现,大鼠卵巢能合成 2 种 PA (tPA 和 uPA) 和 PAI-1, 其中只有 tPA 明显受到激素调节。

给初情前小鼠注射 PMSG 可刺激卵泡生长,再注射 hCG 可诱发排卵。颗粒细胞(GC)中的 tPA 在排卵前达到高峰,在排卵后立即下降,这说明了 GC 中的 tPA 与排卵密切相关。卵泡膜细胞(TC)主要产生 PAI-1, 同样也受促性腺激素调控。在促性腺激素作用下, GC 中的 tPA 和 TC 中的 PAI-1 基因在时间和空间上的协同表达导致 GC 中的 tPA 活性在排卵前达到高峰。在 tPA 峰值前和排卵后, TC 中的 PAI-1 活性会出现 2 个分泌高峰,以局限和阻止排卵前后大量的 tPA 对邻近卵泡可能发生的伤害作用。tPA 和 PAI-1 的协同表达和相互作用使排卵卵泡形成局部蛋白水解,对卵泡的定向局限破裂起重要调控作用。

Tsafriiri 等向大鼠卵巢内局部注射 tPA 抗体或纤溶酶抗体,发现两者都可显著抑制 hCG 诱发的排卵,这证实了 tPA 对大鼠排卵的直接作用。

刘以训等研究了 GnRH 对去垂体大鼠卵巢中 tPA 和 PAI-1 基因表达的影响。他们发现 GnRH 能够像 hCG 一样刺激 GC 和卵细胞 tPA 的表达,并在排卵前达到高峰。hCG 和 GnRH 对诱发大鼠排卵的比较研究表明,两者引发的排卵现象以及 tPA 和 PAI-1 在卵巢中的表达无明显差异,但它们是通过不同的受体途径转导信息的。

刘以训等研究猕猴排卵周期中 tPA 和 PAI-1 的活性发现,当先注射 PMSG 刺激卵泡生长,再注射 hCG 诱发排卵,结果表明, GC 中 tPA 随激素处理时间逐渐上升,在排卵前达到高峰,在排卵后完全消失,而 PAI-1 同样在 tPA 峰值前后出现 2 个高峰,而 uPA 只有在排卵后才突然增加。像大鼠一样, tPA 和 PAI-1 基因在促性腺激素作用下

在卵巢不同细胞中的协同表达是导致灵长类排卵的原因，并据此提出了 tPA 参与排卵的可能机制（图 4-25）。

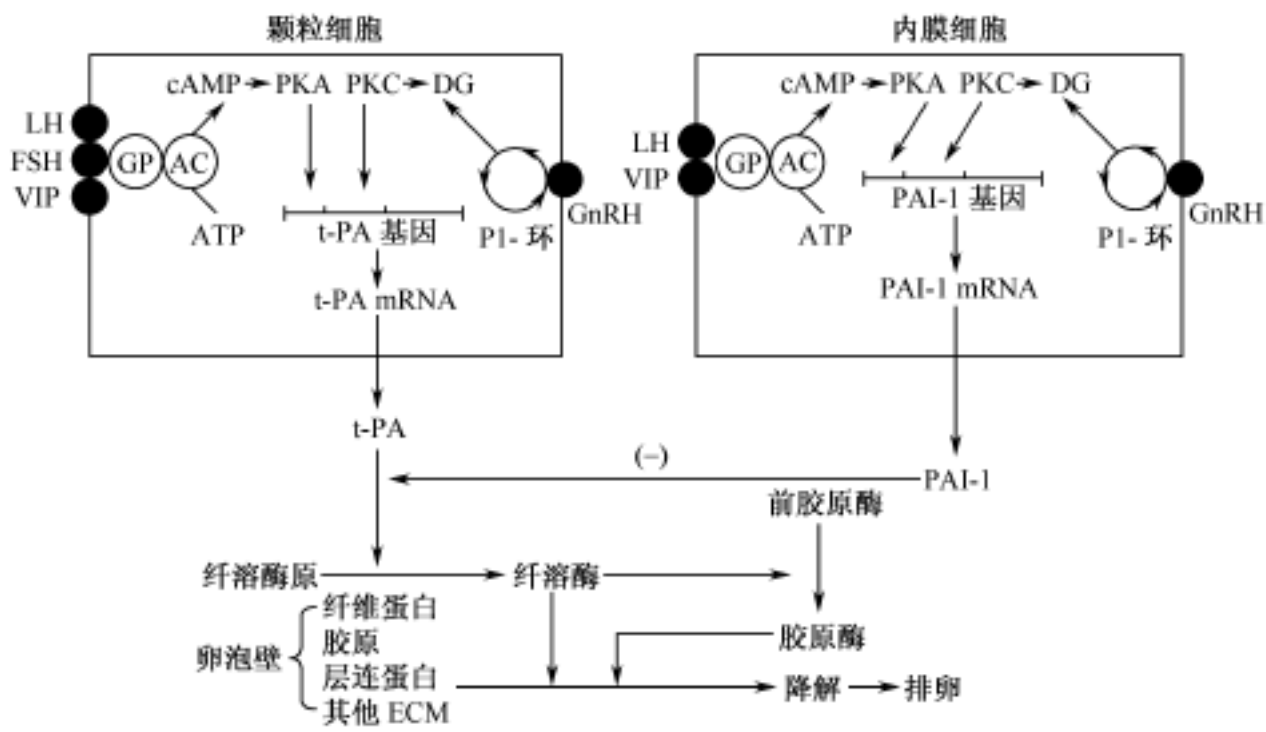


图 4-25 排卵的可能机制（引自刘以训，1999）

GC 上有 LH、FSH、VIP、GnRH 等激素受体，而 TI 上也有 LH、VIP、GnRH 等激素受体、但没有 FSH 受体，在这些激素或者激素信息途径激活因子（如 PKA、PKC 等）作用下，GC 中的 tPA 和 TI 中的 PAI-1 基因被激活，分别表达出 tPA 和 PAI-1 活性蛋白。它们相互作用所产生的蛋白水解导致卵泡破裂，从而引起排卵

(三) 卵泡本身的结构和代谢变化

在卵泡生长的最后阶段，由于优势卵泡对 LH 峰的应答反应，卵泡本身会发生一系列的结构和机能的变化，包括卵巢血流量增加、卵泡外膜发生水肿、卵丘细胞扩散、卵泡顶端胶原纤维解离等，最终导致卵母细胞的释放。

第四节 黄体的形成和退化

排卵之后，颗粒细胞会继续增大，表面变的有空泡，并且开始累积一种称为叶黄素的黄色素。黄体化的颗粒细胞和新形成的泡膜叶黄素细胞以及包围在周围的基质细胞会形成黄体。黄体是一个短暂的内分泌器官，主要分泌孕酮，其主要功能是为受精卵在子宫内膜的着床做准备。颗粒细胞和膜细胞分泌的血管生成因子会引起基膜的溶解和毛细血管向颗粒细胞层的入侵。在排卵后的 8~9 天，也就是大概胚胎着床发生的时间，血管形成会达到峰值，相对应的血清中的孕酮和雌二醇的浓度也达到峰值。中央的空泡会积累血液。黄体的寿命依赖于持续的 LH 分泌。在黄体期末的时候，黄体的功能会下降，除非这时已经妊娠后有人绒毛膜促性腺激素（hCG）的产生。如果没有发生妊娠，黄体会在前列腺素、孕酮和雌二醇的影响下发生黄体退化，形成一个疤痕组织——白体。

一、黄体的形成

(一) 黄体的形成过程

在排卵之后，卵泡壁会发生塌陷皱褶，形成的皱褶会伸入排卵后所遗留下的卵泡腔中。处于颗粒细胞层和内膜细胞层之间的基膜发生崩裂，卵泡膜中的血管也会破裂流血，血流会流入并集聚在卵泡腔内，形成血凝块，称为红体。大多数动物排卵后的出血现象并不严重，但也有少数的动物如猪、马等流血较多，几乎充满了整个卵泡腔。在 LH 排卵峰出现之后，卵泡的膜细胞和颗粒细胞就开始了黄体化变化。在排卵之后，内膜细胞发生增生和肥大，并且向卵泡腔内迁移，形成体积较小的膜性黄体细胞。颗粒细胞发生肥大后，形成体积较大的粒性黄体细胞。形成黄体的细胞有壁层颗粒细胞、内膜细胞、外膜细胞和侵入的血管组织。黄体细胞增殖时的营养最初来源于红体，而后由伸进黄体之间的血管供应。

早期的黄体发育很快，绵羊和牛的黄体在排卵后的第 4 天就可达到最大体积的 50%~60%。早期黄体发育为成熟黄体的时间一般略长于发情周期长短的二分之一。牛、绵羊、猪、马的黄体分别在排卵后的 7~9 天、10 天、6~8 天和 14 天达到成熟，此时体积最大，并能维持数天之久。

黄体的中央可能是血凝块被吸收后留下来的空腔。由于中央空腔不影响黄体组织的体积、血浆孕酮水平、发情周期长度、妊娠的建立和维持，因此带中央空腔的黄体是正常的黄体（图 4-26）。黄体中央空腔的大小和存在时间各不相同，它们受到血凝块的大小、血凝块被吸收的速度和黄体发育的速度等因素的影响。较大的黄体腔可以维持到黄体期的后期，并在黄体溶解过程中消失。

(二) 黄体的组织结构

黄体组织分为实质和间质两部分。间质部分为支持细胞，约占黄体总体积的 20%，其中有血管组织、巨噬细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞等。实质部分即黄体细胞，占黄体体积的近一半。黄体细胞从形态和功能上可分为两个亚群：大黄体细胞和小黄体细胞，大黄体细胞约占 30%，小黄体细胞约占 16%~20%。大黄体细胞来源于卵泡的颗粒细胞，小黄体细胞来源于卵泡的内膜细胞。这两类黄体细胞具有类固醇激素分泌细胞所共有的特征，都含有丰富的滑面内质网和大量的线粒体。大黄体细胞还含有大量的高尔基体、粗面内质网和分泌颗粒等，这些结构和蛋白质分泌有关。小黄体细胞具有高度内折的核结构，胞浆内含有许多脂滴。大小黄体细胞对不同的激素有不同的敏感性，因为它们所含的受体不同。在大黄体细胞上 LH 受体很少，在没有 LH 刺激的条件也分泌孕酮；而小黄体细胞上含的 LH 受体多，只有在 LH 刺激时才能分泌孕酮。大黄体细胞所分泌的孕酮主要构成血浆孕酮的基础水平，而小黄体细胞所分泌的孕酮主要构成血浆孕酮节律性增加的部分。

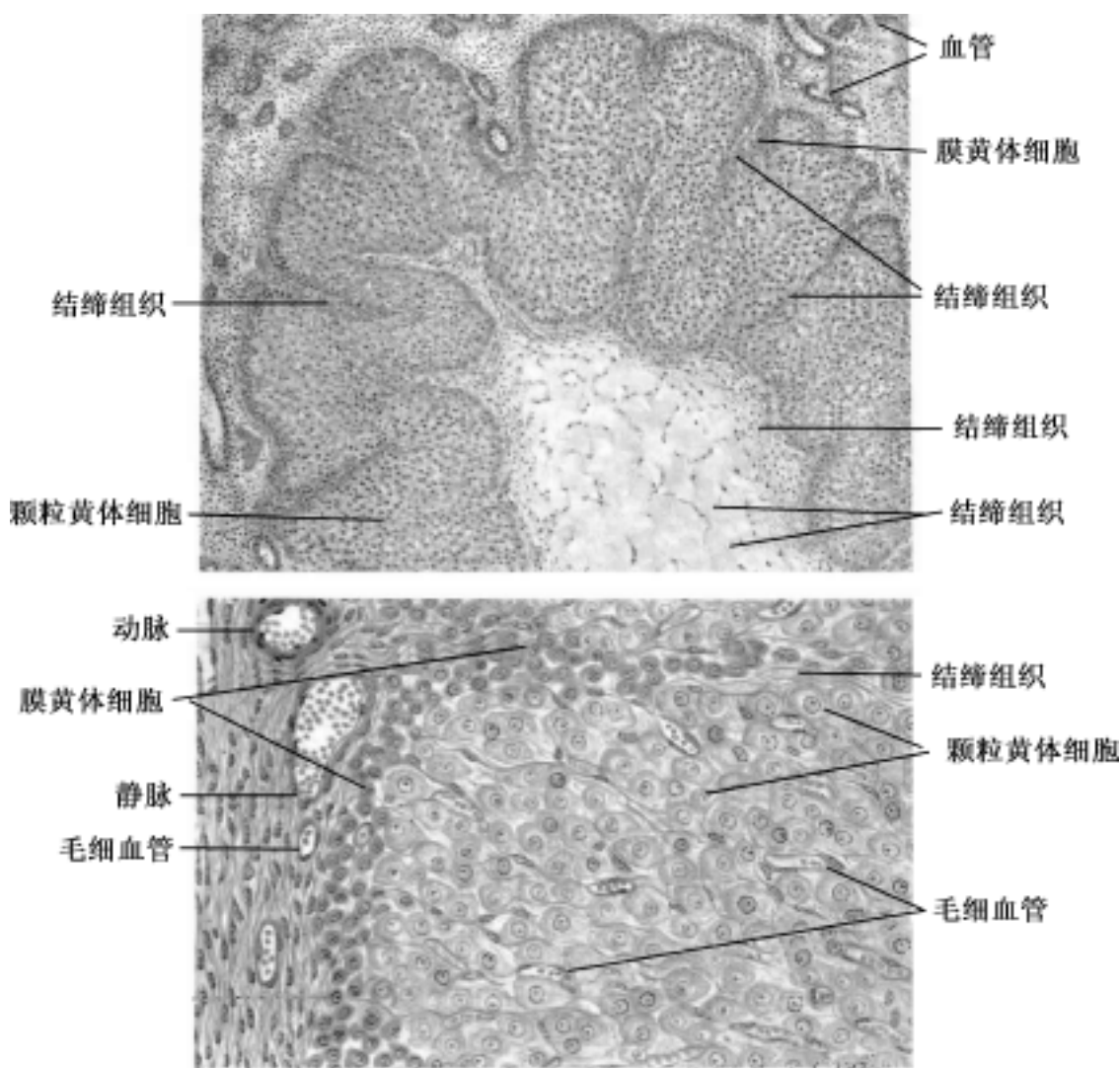


图 4-26 人黄体的显微照片（改绘自 Fiore MSH, 1989）
下图为上图的局部放大

二、黄体分泌类固醇激素的功能

在卵泡期的后期，颗粒细胞会获得产生孕酮的能力，主要原因是 FSH 对颗粒细胞上 LH 受体生成的诱导作用，促进了颗粒细胞的黄体化。当黄体化发生的时候，颗粒细胞会表达大量的类固醇激素快速合成调节蛋白、P450 侧链裂解酶和 3β-羟基类固醇脱氢酶。尽管黄体化的能力是不断增加的，但是在排卵前，这一过程是受到抑制的。在动物中的研究表明，存在于卵泡液中的由卵母细胞产生的黄体化抑制因子抑制了这一过程。黄体化抑制因子可能包括生长分化因子-9、骨形态发生蛋白-6 和骨形态发生蛋白-15。可见，格拉夫卵泡发生黄体化的能力是由 FSH 对颗粒细胞的作用决定的。同时，发生黄体化的能力还受到卵母细胞产生的黄体化抑制因子的抑制作用，这些抑制因子会抑制颗粒细胞中类固醇激素快速合成调节蛋白、P450 侧链裂解酶和 3β-羟基类固醇脱氢酶的表达。

排卵后，颗粒细胞转化为粒性黄体细胞，具有产生类固醇激素细胞的典型超微结构。胞质内含有丰富的滑面内质网，线粒体内有管状的嵴，含有大量的脂滴，其中包括胆固醇酯。在排卵前和排卵后不久，颗粒细胞会表达大量的类固醇激素快速合成调节蛋白、P450 侧链裂解酶、3β-羟基类固醇脱氢酶和 P450 芳香化酶，有很强的产生孕酮和雌二醇的能力。在黄体化过程中，LH 对于维持颗粒细胞产生类固醇激素是必需的。有

证据表明脂蛋白在孕酮产生方面也起着一定的作用。

从内分泌角度看，雌激素在整个月经周期中会发生两次升高和两次降低。第一次升高在卵泡期中期，然后在排卵后急剧下降。第二次升高发生在黄体期中期，而后在月经周期末又下降。雌激素水平第二次升高伴随着血清中孕酮和 17-羟孕酮水平的升高。对卵巢静脉的研究证实，黄体期产生类固醇激素的位点就是黄体。

黄体期类固醇激素分泌的调节机制还不清楚。这种调节可能部分地受到 LH 分泌方式、LH 受体以及调节类固醇激素生成的一些酶（如 3β -HSD、CYP17、CYP19 和侧链裂解酶）的变化的影响。卵泡期形成的颗粒细胞的数目以及可利用的 LDL-胆固醇的量也在黄体期类固醇激素分泌的过程中起着一定的作用。其中大黄体细胞在类固醇激素产生方面比小黄体细胞具有更高的活性，而且受到抑制素、松弛素和催产素等自分泌/旁分泌因子的影响。

在黄体期，孕酮和雌二醇的分泌是交叉的，并且和 LH 分泌的脉冲有密切的关系（图 4-27）。LH 在卵泡期分泌的频率和幅度调节着后面黄体期的功能。降低卵泡期或黄体期 LH 的浓度、脉冲频率或脉冲幅度都可以引起黄体期的缩短。同样，降低卵泡期 FSH 的水平也会引起黄体期的缩短和黄体的变小。其他的促黄体因子诸如催乳素、催

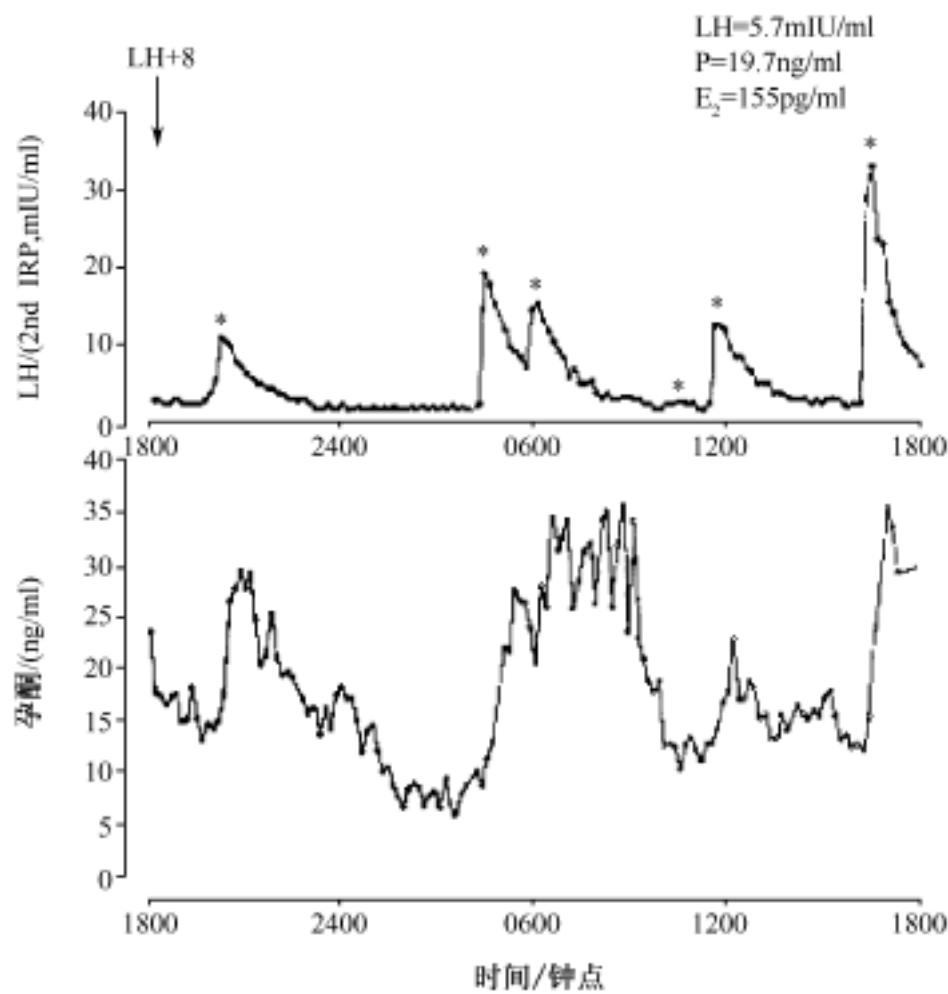


图 4-27 人黄体期 LH（上）和孕酮（下）的插话式分泌，显示 24h 内血清中 LH 和 P 的浓度变化，每 10min 间隔对志愿者的血样进行一次测定，志愿者处于黄体期中期（LH 峰后 8 天）（引自 Filicori M 等，1984）

P：孕酮；E₂：雌二醇；LH + 8：LH 峰后 8 天；* 表示 LH 分泌有明显波动；2nd IRP：2nd International Reference Preparation-human menopausal gonadotropin (mIU/ ml)

产素和松弛素的作用还不十分清楚。

对于大多数动物，LH 是最重要的促黄体激素，不论是在妊娠还是非妊娠，相对慢的 LH 释放波动频率类型可以维持黄体（每 2~3h 一次释放波）。而在啮齿类，PRL 是最重要的促黄体激素，PRL 每天的双相释放类型受交配的始动，这对于啮齿类黄体的维持是重要的。在家畜中，绵羊是目前发现的唯一的一种受 PRL 参与调节黄体的动物。

由于正常的卵泡生成确定了排卵后黄体发育的时期。这样，临床上，特别是兽医临床和动物生产中，人们更重视控制黄体退化的因子，而不是促进黄体的因子。

膜间质细胞也参与黄体形成，变成膜黄体细胞。膜黄体细胞可以和颗粒黄体细胞明显区分开来，因为膜黄体细胞要比颗粒黄体细胞小且染色较黑，它们的直径大约在 15 μ m。膜黄体细胞也具有分泌类固醇激素活性细胞的超微结构。膜黄体细胞可以强烈表达雄激素生物合成过程中的酶，并且能够产生雄烯二酮。由于黄体以特定的模式表达 P450 侧链裂解酶和 P450 芳香化酶，推断合成雌激素的“两细胞，两促性腺激素”机制可能也存在于黄体中。

三、黄体的退化

（一）黄体退化现象

黄体退化首先是以孕酮下降为标志的功能性退化，随后是以黄体组织破坏和清除为标志的结构性退化。开始时血清中孕酮浓度骤降，继而黄体体积缩小。

黄体的功能在排卵后的 9~11 天开始下降。对于黄体如何进行退化的确切机制现在还不十分清楚。雌激素被认为在黄体退化过程起着一定的作用，在一侧卵巢中注射雌二醇会诱导同侧黄体的退化，而对对侧卵巢中的黄体退化却没有作用。但是人黄体细胞上并没有雌激素受体的事实不支持内源性的雌激素在黄体退化中所起的作用。

PGF_{2 α} 在非人灵长类的黄体退化中起着重要的作用。PGF_{2 α} 通过合成内皮素-1 来发挥它的作用，内皮素-1 可以抑制类固醇激素的产生，促进生长因子（GF）和肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）的释放，而生长因子和 TNF α 则可以诱导细胞的凋亡。催产素和抗利尿激素则可以通过自分泌/旁分泌的机制起到促黄体的作用。最后 LH 下调其受体的能力对于终止黄体期也起着一定的作用。并非所有的激素在整个月经周期中都发生明显的波动，雄激素、糖皮质激素以及除 LH 和 FSH 外的其他垂体激素在整个月经周期中只发生极小的波动。由于孕酮 21 位发生羟基化，黄体期血浆中去氧皮质酮的水平会上升。

如果着床没有发生，黄体就会发生退化。人黄体细胞的凋亡明显发生在排卵后的第 8 天。黄体退化的最早征兆是颗粒黄体细胞的皱缩。相反，膜黄体细胞在黄体退化的早期会有选择的活性增加。在月经周期的第 23 天后，在黄体中出现凋亡的细胞，最终黄体中的所有细胞都会发生凋亡，形成一个瘤状的致密结缔组织，称为白体。现在有两个问题需要解答：一个是在黄体退化过程中，类固醇激素生成的停止以及凋亡激活的基本机制是什么？另一个问题是在 hCG 的促黄体过程中，hCG 对周期黄体的挽救使其变成妊娠黄体的基本机制是什么？除了一些非常有限的的数据外，这些基本问题的答案还处于未知状态。

(二) 黄体退化的机理

1. 非妊娠的家畜的黄体退化受 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌的控制

子宫内来源的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 是大多数哺乳动物（特别是家畜和啮齿类动物）的主要溶黄体物质。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 以间断性阵发式的形式分泌，在黄体溶解期间，24h 内一般会发生 4~5 次 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌。血液中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的半衰期很短，因此其在外周血浆中水平的变化不具有生理意义。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 主要作为一种局部合成和发挥作用的激素。在家畜等许多动物中，子宫内分泌的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 是影响黄体退化的主要因素，而兔和灵长类黄体来源的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 是主要的溶黄体物质。

在非妊娠的大家畜中，黄体退化是非常重要的，以便使动物尽早进入下一个生殖周期。而在妊娠动物中，排卵后黄体的生命时期则必须足够长，以便新发育的胚胎能够在子宫中发育到期。在大家畜中，黄体期大约是 14 天（非妊娠情况）。这样，大家畜就可以有一个相对短的间隔进入下一个生殖周期（约 3 周的间隔）。

关于黄体退化到底是如何进行的研究最早是 1923 年 Leo Loeb 进行的，他通过子宫切除研究证明子宫对于黄体退化的重要性。结果发现子宫切除可以延长豚鼠的黄体期，因此他认为子宫一定产生一种物质，该物质可以终止黄体的活动。但这一发现多年没有受到重视，直到在牛、猪和绵羊的子宫切除研究（20 世纪 50 年代）得到了相似的结果后，才产生了子宫控制黄体期的概念，至少在大家畜和豚鼠中如此。

目前已认识到， $\text{PGF}_{2\alpha}$ （20 碳非饱和脂肪酸）是子宫分泌的引起大家畜黄体退化的物质（包括牛、山羊、马、猪和绵羊）。尽管在临床上已经用前列腺素疗法来诱导狗和猫的黄体溶解，以治疗子宫积脓或诱导流产，但还没有证明 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 对猫、狗以及灵长类的黄体退化有明显的生理作用。在家畜中，黄体退化在排卵后 14 天左右受子宫合成和释放的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的始动（可能来源于子宫内膜）。关于 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 如何从子宫中运输到卵巢从而发挥作用的模式，有如下两种看法：①通过局部的逆流循环；②体循环运输。逆流运输包括该物质通过血液循环系统从高浓度的静脉流出支（子宫-卵巢静脉）到达低浓度的区域（卵巢动脉）（图 4-28）。体循环运输包括该物质通过体循环系统的长距离运输。有

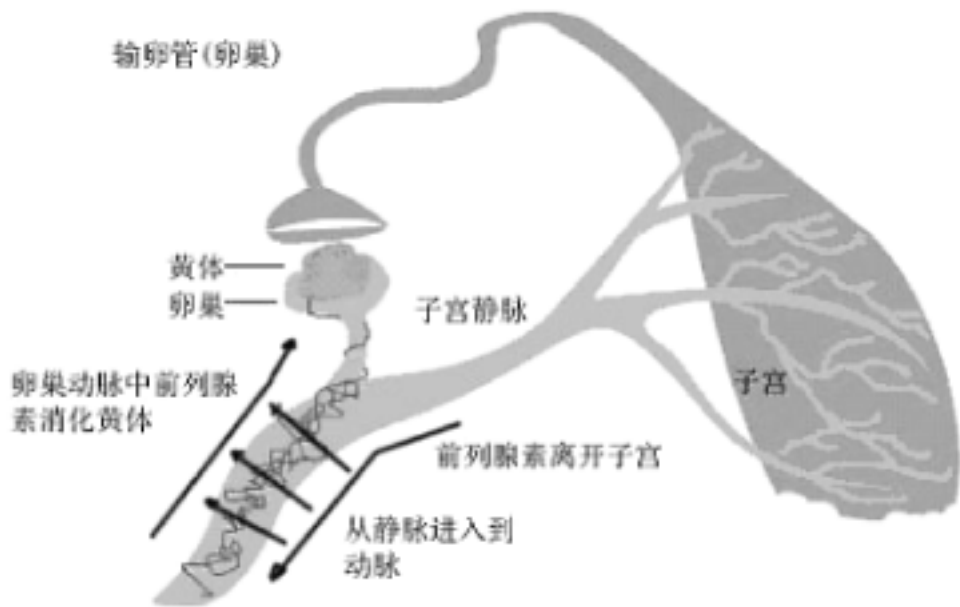


图 4-28 前列腺素的运输 (改自 Baird DT, 1984)

些动物中（母牛和母绵羊） $\text{PGF}_{2\alpha}$ 从一个子宫角合成，只能影响同侧卵巢的黄体生命期。在另一些动物（母猪或母马），一侧子宫角合成的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 足够使两侧卵巢的黄体退化。这种影响可能是由于子宫组织合成的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 量大，以及 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的代谢率不同造成的。由于 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 通过肺循环一次就可以快速代谢多达90%以上的活性，这样就需要通过特殊的运输系统将 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 保存下来以发挥其溶解黄体的作用，或者是大量合成才能满足需要。

$\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成和释放的类型对于其溶黄体效应是很重要的。例如， $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的合成和释放必须是波动性的，大约每隔6h一个波，才能有效地诱导黄体溶解。一般在4h内至少需要4到5个波才能使黄体彻底溶解。如果在黄体完全溶解之前，波动的间隔明显增加（如12h），黄体将会恢复功能，即使其类固醇合成能力有所下降。用抗炎症药物（如消炎痛）抑制 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成或利用 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 抗体均可阻止黄体退化，而用外源性 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 及其类似物则诱导大多数哺乳动物的黄体退化。

尽管诱导黄体溶解的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成的机理还不完全清楚，一个可能的解释是雌激素（来自于一个有腔卵泡）引起 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的合成和释放。对绵羊的研究认为，在 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 波动起始后子宫和卵巢之间发生相互作用，首先 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 影响黄体，使黄体孕酮合成下降和黄体催产素的释放增加，然后催产素与子宫上的受体作用启动另一轮 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成。在孕酮浓度下降到基础水平6~12h之内（即黄体完全溶解）， $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成停止。非妊娠狗和猫似乎不存在这样的系统，其黄体期分别约为70和35天。

目前认为，在反刍类家畜，黄体退化是由黄体分泌的催产素（OT）协同 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ，并在雌激素和孕激素的调节下以旁分泌形式相互作用的结果。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 与其受体结合后可阻止LH与其受体的结合，最后导致黄体失去LH受体。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 还能影响LH受体的聚集能力，而LH受体的聚集对LH信号转导是很重要的。

此外， $\text{PGF}_{2\alpha}$ 在黄体退化中的作用还包括降低黄体血流、减少小黄体细胞数目、抑制类固醇激素合成酶的活性、减少类固醇激素快速合成调节蛋白基因表达、增加环氧合酶基因表达、抑制脂蛋白刺激的类固醇产生、改变膜流动性和释放黄体催产素等。这些作用可能介导 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 在黄体退化中的作用。

$\text{PGF}_{2\alpha}$ 抑制类固醇激素合成的效应是由磷酸肌醇第二信使系统介导的， $\text{PGF}_{2\alpha}$ 通过活化磷脂酶C升高细胞内 Ca^{2+} 浓度，降低孕酮生物合成的关键酶 3β -羟类固醇脱氢酶mRNA的稳定性，从而降低孕酮水平。这可能是黄体功能性退化过程中孕酮水平降低的一个原因。此外，类固醇激素快速合成调节蛋白负责将类固醇激素生物合成的底物（胆固醇）转运给细胞色素P450单链裂解酶，这是类固醇激素生物合成的关键步骤。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 诱导黄体退化时，血清孕酮和类固醇激素快速合成调节蛋白水平也下降，故 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 可能也通过激活蛋白激酶C减少类固醇激素快速合成调节蛋白表达而降低孕酮水平。当血浆中孕酮的水平降到基础值之后，子宫就失去了孕酮的支持作用，子宫的代谢也就发生了改变， $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌活动也就被动性的停止了。

在反刍动物中，催产素由大黄体细胞产生并以分泌颗粒的形式储存于细胞质，在子宫阵发性分泌的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 刺激下脉冲式释放。催产素与子宫内膜催产素受体结合后激活磷酸肌醇-PKC信号系统，促进子宫吸收 Ca^{2+} ，刺激子宫内膜分泌更多的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ，两者形成的正反馈环路使黄体迅速退化。

此外，在大鼠黄体退化中， $\text{PGF}_{2\alpha}$ 还可以促进卵巢一氧化氮合酶活性，产生一氧化氮，而一氧化氮则能促进卵巢中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的产生，两者呈正反馈调节机制。OT也能增加大鼠卵巢组织中一氧化氮合酶活性。可见， $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、一氧化氮和催产素间的相互调节对哺乳动物黄体退化有重要作用。

2. 孕酮的作用

研究发现，在黄体细胞凋亡之前，黄体细胞分泌孕酮的能力下降并逐渐受到抑制，继而黄体细胞发生凋亡。但如果给予外源性的孕酮则可以阻滞黄体细胞凋亡的发生，这提示孕酮水平的下降可能是凋亡发生的启动因素。孕酮的作用与 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 有着不可分割的关系。孕酮作用于子宫内膜，一方面刺激并维持子宫内膜和子宫腺的增长，另一方面对子宫内膜上的孕酮、雌二醇和催产素三种激素的受体水平有下调作用。起初，由于孕酮对子宫雌二醇和催产素受体的抑制，最终抑制了 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌的启动。但由于孕酮对自身受体的下调作用，使得孕酮对 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌启动的抑制随着黄体期的持续而逐渐解除。Gaytan 研究大鼠黄体溶解时发现，发情前期排卵优势卵泡所分泌的少量孕酮可诱导黄体细胞发生凋亡，外源性的孕酮拮抗剂可以阻断凋亡的发生。尽管如此，人们普遍认为孕酮的这些作用并不是黄体溶解的启动作用，而是由于 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 导致孕酮下降后产生的后续作用。

3. 雌二醇的作用

雌二醇对子宫中孕酮、雌二醇和催产素三种激素的受体具有上调作用。在发情周期中，雌激素的合成和分泌呈现一定的波动性，这是由于卵泡是以卵泡波的形式周期性发育起来的。在发情周期中，第一个卵泡波分泌的雌二醇作用于子宫后，使得子宫重新变得对雌二醇和催产素敏感。进而发挥前面介绍的诱导 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌的作用，导致黄体溶解。

4. 雄激素的作用

Goyeneche 等研究发现，大鼠的黄体在整个妊娠期间都表达雄激素受体（AR），雄烯二酮可以抑制黄体的退化，可能是通过抑制凋亡和促进孕酮的产生来起作用的。

5. 催乳素的作用

催乳素（PRL）是鼠类黄体溶解的重要诱导因素。大鼠在排卵后 3~4 天，外周血液中 PRL 浓度会升高形成 PRL 峰，而后大鼠黄体细胞中低聚核小体数目明显增加，出现细胞凋亡。离体实验也证明，PRL 可以诱导黄体细胞凋亡的发生，且作用强度与剂量相关。

6. 卵巢局部因子的调节

在黄体退化和溶解过程中，有大量的巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞参与了此过程。这些细胞一方面通过吞噬凋亡细胞碎片参与黄体内凋亡细胞的清除，另一方面又通

过分泌细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ) 等, 和卵巢局部自身分泌的纤溶酶原激活因子、抑制素 α 亚单位等一起参与黄体细胞凋亡的调节。

前面介绍的有关黄体退化的机制都是介绍周期性黄体溶解的问题, 至于妊娠期黄体溶解的问题请参阅“分娩与泌乳”一章。

需要强调的是, 黄体及时退化是正常的、也是新的发情周期起始的条件, 调节机制非常复杂, 有多种因子参与这一过程, 其机制研究还有待进一步深入。

(夏国良 王松波)

主要参考文献

- 丁峰, 陈士岭. 1999. 卵泡闭锁调控机制研究进展. 国外医学遗传学手册, 22: 88~91
- 范衡宇, 佟超, 陈大元, 孙青原. 2002. MAPK 信号通路在卵母细胞减数分裂中的作用. 科学通报, 47: 650~656
- 侯庆文, 陈光明, 黄永宏. 2001. 卵泡发育的激素调节研究进展. 上海畜牧兽医通讯, 2: 6~7
- 霍立军, 杨增明. 2002. 哺乳动物黄体退化的分子调控. 生殖医学杂志, 11 (3): 185~190
- 李峰, 黄永宏, 张果平. 2001. 卵泡闭锁的研究新进展. 国外畜牧科技, 28: 35~38
- 刘以训, 冯强, 柳建昌等. 1989. 小鼠排卵前后卵巢纤蛋白激活因子活性的变化. 生理学报, 41: 284~290
- 刘以训, 冯强, 邹如金. 1999. 促性腺激素诱发猕猴排卵周期中纤溶酶原激活因子与抑制因子的变化. 生理学报, 43: 472~479
- 刘以训, 彭晓蓉, 刘奎. 1993. GnRH 诱导去垂体大鼠排卵过程中 tPA 和 PAI-1 基因在卵巢中的协同表达. 中国科学 (B 辑), 23 (8): 841~847
- 刘以训. 1995. 纤溶酶激活因子在排卵中功能的研究. 自然科学进展, 5: 410~416
- 刘以训. 1999. 纤溶酶原激活因子和抑制因子在生殖中的作用. 科学通报, 44 (3): 242~252
- 王建辰, 章孝荣. 1997. 动物生殖调控. 合肥: 安徽科技出版社
- 王松波, 夏国良, 卜淑敏, 谢辉蓉, 汪建红, 郭勇. 2003. 一氧化氮供体硝普钠对小鼠卵母细胞体外自发成熟的影响. 中国实验动物学报, 11 (2): 88~91
- 吴延光, 于元松, 谭景和. 2002. 哺乳动物卵泡发育模式及其调控机理. 动物学杂志, 37 (6): 83~87
- 夏国良, 吕忠显. 2000. 促减数分裂甾醇 (MAS) 在辅助生殖生物学中的作用及应用前景. 农业生物技术学报, 8 (1): 7~11
- 张红卫. 2001. 发育生物学. 北京: 高等教育出版社
- 郑行. 1994. 动物生殖生理学. 北京: 北京农业大学出版社
- 中国农业大学主编. 2000. 家畜繁殖学 (第三版). 北京: 中国农业出版社
- Byskov AG, Andersen CY, Nordholm L, Thogersen H, Xia G, Wassmann O, Andersen JV, Guddal E, Roed T. 1995. Chemical structure of sterols that activate oocyte meiosis. Nature 374: 559~562
- Byskov AG, Xia G, Andersen JV. 1997. The cortex-medulla oocyte growth pattern is organized during fetal life: an in-vitro study of the mouse ovary. Mol Hum Reprod 3: 795~800
- Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Ginther OJ. 2002. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. Biol Reprod 66: 120~126
- Bu S, Xia GL, Tao Y, Lei L, Zhou B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. Mol Cell Endocrinol 207: 21~30
- Coticchio G, Fleming S. 1998. Inhibition of phosphoinositide metabolism or chelation of intracellular calcium blocks FSH-induced but not spontaneous meiotic resumption in mouse oocytes. Dev Biol 203: 201~209
- Dixit VD, Parvizi N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. Anim Reprod Sci 65: 1~16
- Downs S. 1995. The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the

- isolated mouse oocyte . Dev Biol 167: 502~512
- Downs S, Hunzicker-Dunn M . 1995 . Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte- cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine monophosphate . Dev Biol 172: 72~85
- Downs SM, Ruan B, Schroepfer J, George J . 2001 . Meiosis-activating sterol and the maturation of isolated mouse oocytes . Biol Reprod 64: 80~89
- Faddy MJ . 2000 . Follicle dynamics during ovarian ageing . Mol Cell Endocrinol 163: 43~48
- Faerge I, Terry B, Kalous J, Wahl P, Lessl M, Ottesen JL, Hyttel P, Gr ndahl C . 2001 . Resumption of meiosis induced by meiosis-activating sterol has a different signal transduction pathway than spontaneous resumption of meiosis in denuded mouse oocytes cultured in vitro . Biol Reprod 65: 1751~1758
- Fiore MSH di . 1989 . Atlas of normal histology . Sixth edition . Lea & Febiger, Philadelphiz .
- Goyeneche AA, Calvo V, Gibori G, Telleria CM . 2002 . Androstenedione interferes in luteal regression by inhibiting apoptosis and stimulating progesterone production . Biol Reprod 66: 1540~1547
- Gr ndahl C, Breinholt J, Wahl P, Murray A, Hansen TH, F rge I, Stidsen CE, Raun K, Hegele-Hartung C . 2003 . Physiology of meiosis-activating sterol: endogenous formation and mode of action . Hum Reprod 18: 122~129
- Gr ndahl C, Lessl M, F rge I, Hegele-Hartung C, Wassermann K, Ottesen JL . 2000 . Meiosis-activating sterol-mediated resumption of meiosis in mouse oocytes in vitro is influenced by protein synthesis inhibition and cholera toxin . Biol Reprod 62: 775~780
- Grudzinskas JG, Yovich JL . 1995 . Gametes: the oocyte . Cambridge University Press
- Hegele-Hartung C, Grützner M, Lessl M, Gr ndahl, C, Ottesen JL, Br nnstr m M . 2001 . Activation of meiotic maturation in rat oocytes after treatment with follicular fluid meiosis-activating sterol In vitro and ex vivo . Biol Reprod 64: 418~424
- Jablonka-Shariff A, Basuray R, Olson LM . 1999 . Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats . J Soc Gynecol Invest 6: 95~101
- Jablonka-Shariff A, Olson LM . 1998 . The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes . Endocrinology 139: 2944~2954
- Jablonka-Shariff A, Olson LM . 2000 . Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro . Mol Reprod Dev 55: 412~421
- Kazuo SK, Naoyuki T, Michiharu HK, Keiko T, Harumi K, Dinara S, Kenichi T, Mutsuo I . 2001 . Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro . Mol Reprod Dev 58: 262~268
- Lee J, Miyano T, Moor RM . 2000 . Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes . Zygote 8: 119~125
- Liu YX, Cajander SB, Ny T, Kristensen P, Hsueh AJ . 1987 . Gonadotropin regulation of tissue type and urokinase type plasminogen activator in rat granulosa and theca-interstitial cells during periovulatory period . Mol Cell Endocrinol 54: 221~229
- Liu YX, Peng XR, Ny T . 1991 . Tissue-specific and time-coordinated hormone regulation of plasminogen-activator-inhibitor type-1 and tissue - type and urokinase type plasminogen activators in the rat ovary duing gonadotropin-induced ovulation . Eur J Biochem 195: 549~555
- Luria A, Tennenbaum T, Sun QY, Rubinstein S, Breitbart H . 2000 . Differential localization of conventional protein kinase C isoforms during mouse oocyte development . Biol Reprod 62: 1564~1570
- Macklon NS, Fauser BC . 1998 . Follicle development during normal menstrual cycle . Maturitas 30: 181~188
- Macklon NS, Fauser BC . 1999 . Aspects of ovarian follicle development throughout life . Horm Res 52: 161~170
- Mori T, Suzuki A, Nishimura T, Kambegawa A . 1977 . Inhibition of ovulation in immature rats by antiprogestosterone anti-serum . J Endocrinol 73: 185~186
- Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H, Kato H . 2002 . Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation . Biol Reprod 67: 1588~1592

- Pall M, Mikuni M, Mitsube K, Brannstrom M . 2000 . Time-dependent ovulation inhibition of a selective progesterone-receptor antagonist (Org 31710) and effects on ovulatory mediators in the in vitro perfused rat ovary . Biol Reprod 63: 1642~1647
- Sun QY, Schatten H, Breitbart H . 1999 . Role of MAPK cascade in mammalian germ cells . Reprod Fertil Dev 11: 443~450
- Tamanini C, Basini G, Grasselli F, Tirelli M . 2003 . Nitric oxide and ovary . J Anim Sci 81 (Suppl . 2): E1~E7
- Tsafriri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh, A, Conti, M . 1996 . Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors . Dev Biol 178: 393~402
- Uilenbroek JTL . 1991 . Hormone concentrations and ovulatory response in rats treated with antiprogestogens . J Endocrinol 129: 423~429
- Vaknin KM, Lazar S, Popliker Malka, Tsafriri A . 2001 . Role of meiosis-activating sterols in rat oocyte maturation: effects of specific inhibitors and changes in the expression of lanosterol 14 α -demethylase during the preovulatory period . Biol Reprod 64: 299~309
- Van der Schoot P, Bakker GH, Klijn JG . 1987 . Effects of the progesterone antagonist RU486 on ovarian activity in the rat . Endocrinology 121: 1375~1382
- Webb R, Marshall F, Swann K, Carroll J . 2002 . Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase A in mammalian Oocytes . Dev Biol 246: 441~454
- Xia G, Byskov AG, Andersen CY . 1994 . Cumulus cells secrete a meiosis-inducing substance by stimulation with forskolin and dibutyric cyclic adenosine monophosphate . Mol Reprod Dev 39: 17~24

第五章 受 精

受精是单倍体的精子和卵子相互结合和融合而形成双倍体合子的过程，是有性生殖生物个体发育的起点。它一方面保证了双亲的遗传作用，另一方面恢复了染色体双倍体数目。同时受精可以把个体发生过程中产生的变异通过生殖细胞遗传下去，保证了物种的多样性，在生物进化上具有重要意义。

第一节 受精研究历史的简单回顾

1875 年和 1876 年，Hertwig 和 Fol 分别在各自独立的研究中首先在海胆中发现了受精现象。Hertwig 发现了海胆精子入卵后雌雄两原核融合的现象，而 Fol 发现了精子接近和穿入卵子以及受精膜形成的过程，至此结束了胚胎学上的“精源学说”和“卵源学说”。1883 年，van Beneden 发表了马副蛔虫受精的细胞生物学研究论文，肯定了在遗传上父母贡献均等的理论，并使精卵作用的研究更为深入。他在马副蛔虫受精卵的第一次有丝分裂纺锤体上看到四条染色体，其中两条来自父方，两条来自母方，提出父母的染色体通过精卵的融合传给子代。此后，H. T. Boveri 在马副蛔虫的研究工作进一步巩固了上述理论，把染色体看作是遗传信息的载体。

20 世纪以来，有关受精的研究转向探讨受精后生理学变化和两性配子结合的机制。在早期的研究中还发现了受精后细胞膜通透性变化、耗氧量增加等现象。1912 年以后，F. R. Lillie 根据在沙蚕和海胆获得的一系列研究结果，提出了精卵相互作用的受精素假说。根据这一假说，卵子分泌称为受精素 (fertilin) 的物质，使精子运动能力加强，并向卵子聚集。20 世纪 40 年代前后，A. Tyler 就受精素的生物学、化学和免疫学特征展开了一系列工作，并进一步强调卵子在成熟过程中分泌的物质对受精有重要意义。与此同时，M. Hartmann 在海胆的研究工作中证实，不仅卵子能分泌受精素 (雌配素)，精子也能排出抗受精素(雄配素)，二者相互作用的程度决定着受精的成功与否。不久以后，在两栖类上发现卵外胶膜在精卵相互作用中发挥重要功能，为两栖类受精所必需。

与海胆和两栖类相比，哺乳动物的受精研究工作起步较晚，一个主要的原因是哺乳动物受精发生在体内，不易进行研究，并且很难得到大量卵子。19 世纪末到 20 世纪中叶，很多人进行过哺乳动物体外受精的实验，并且多位学者声称获得成功。尽管不能排除有少数报道是正确的，但根据目前判断受精发生的知识，例如精子入卵、第二极体排放等标准，其中绝大部分实验可能不是真正实现了体外受精。原因在于很多早期进行哺乳动物体外受精研究的人员采用的是未成熟的卵母细胞。有的学者意识到了这个问题，授精前把卵巢中的卵母细胞培养一段时间。例如，Rock 和 Menkin 于 1944 年就在进行体外授精前把人卵巢卵母细胞预先进行了培养，但由于培养时间太短而没有成功。先前判断体外受精成功的标准是看卵子是否卵裂，而当时还不清楚哺乳动物卵子在体外培养

时很容易发生孤雌活化和碎裂 (fragmentation)。此外，当时很少有人会在 37℃ 下进行体外授精，而多数是在较低的温度下进行。

哺乳动物的体外受精研究真正发展是在 Austin 和美籍华人张明觉于 1951 年发现精子获能 (capacitation) 现象以后。两位科学家几乎同时在大鼠和兔中发现，精子必须在雌性生殖道内滞留一段时间才能获得受精的能力。这一发现导致 20 世纪 50 年代和 60 年代体外受精研究的黄金时期的到来。从精子获能现象发现后大约 20 年，即 70 年代初开始，人们实现了哺乳动物精子的体外获能，使哺乳动物的体外受精更易操作和方便 (精子获能的详细介绍见第三章)。1978 年，Steptone 和 Edwards 利用体外受精技术成功地获得第一例试管婴儿，使体外受精成为造福于人类的技术。此后，发展了胞质内单精注射技术，使少精症和无精症患者可以得到后代。到目前，全世界大约有一百万不育夫妇通过体外受精技术获得了后代，并且体外受精也已应用于畜牧业生产当中。此外，各种动物体外受精技术的建立，便利了哺乳动物受精的基础研究。

第二节 受精的概述

一、受精的基本过程

受精涉及到精卵之间多步骤、多成分的相互作用。就哺乳动物而言，受精发生前精子穿过卵丘细胞后首先与卵子周围的透明带 (zona pellucida, ZP) 识别和结合 (图 5-1)。这种精子与卵子 ZP 之间的初级作用诱发精子头部顶体内容物发生胞吐，这一过程称为顶体反应 (acrosome reaction, AR)。顶体反应后的精子与 ZP 发生次级识别和结合，顶体反应释放的水解酶与精子本身运动协同作用，使精子穿过透明带 (图 5-2)。精子穿过透明带而到达卵周隙后，精子头部赤道段的质膜又与卵质膜发生结合和融合，精子进入卵子 (图 5-3)。受精中精卵相互作用的步骤和过程见图 5-4。哺乳动物卵子受精前一

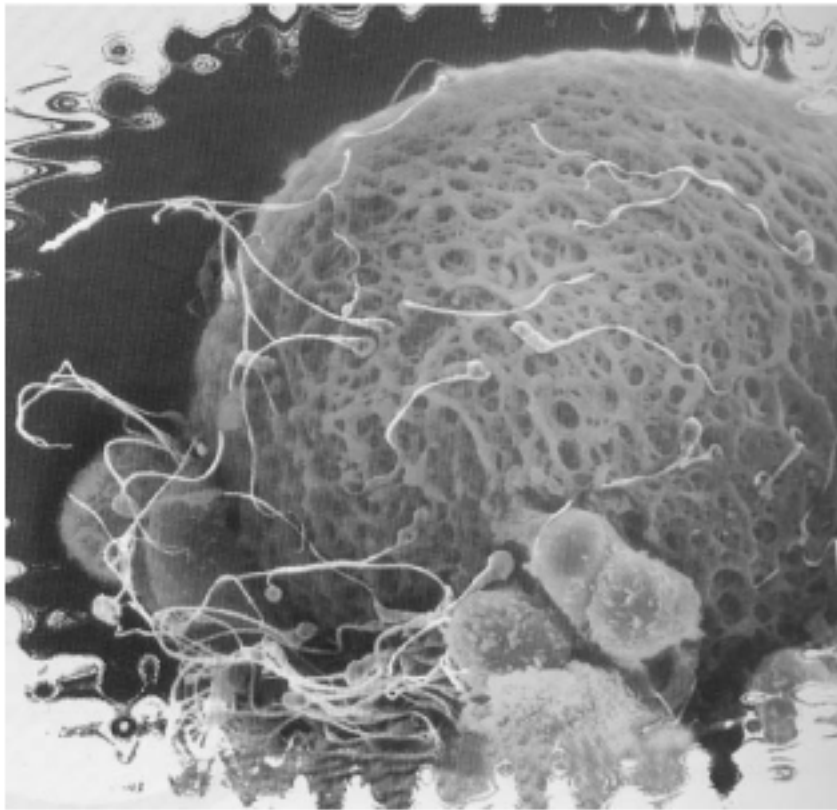


图 5-1 人精子与卵子透明带相互作用扫描电镜图 (Nilsson L 提供)

般停滞在第二次减数分裂的中期 (MII 期)。精子入卵后, 激发卵子使其恢复减数分裂, 并释放第二极体。第二次减数分裂器所处的部位的质膜表面一般没有微绒毛, 精子不能从此处穿入卵子 (图 5-3)。精子入卵引起卵子激活的另一个重要事件是诱发卵子皮质颗粒胞吐, 即皮质反应, 从而阻止多精受精的发生。精子进入卵子后, 尾部很快退化, 浓缩的精子头部染色质去浓缩, 而后形成雄原核; 而卵子的染色体转变成为雌原核。雌雄原核相互靠近, 核膜破裂, 父母双方的遗传物质混合, 启动有丝分裂。受精 (fertilization) 不同于授精 (insemination), 前者是精子入卵并形成合子的过程, 而后者是人为地把精子置于体内生殖道中或体外培养液中, 以达到受精目的的操作。二者的概念不能混淆, 例如, 不能说受精后几个小时形成原核, 而应该说授精后几个小时形成原核。

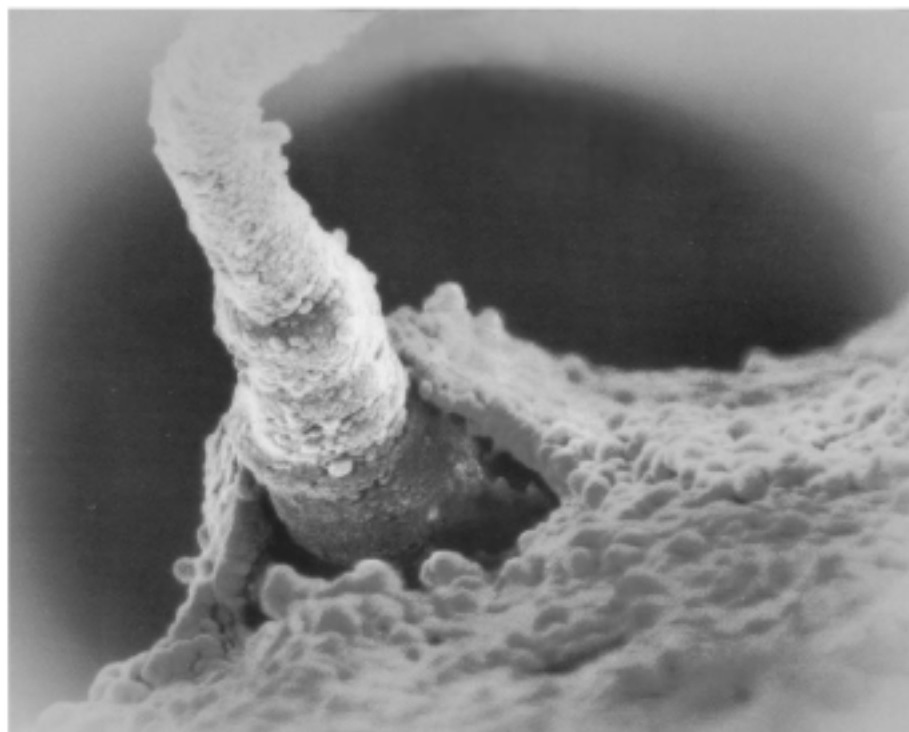


图 5-2 人精子正在穿过卵子透明带扫描电镜图 (Nilsson L 提供)

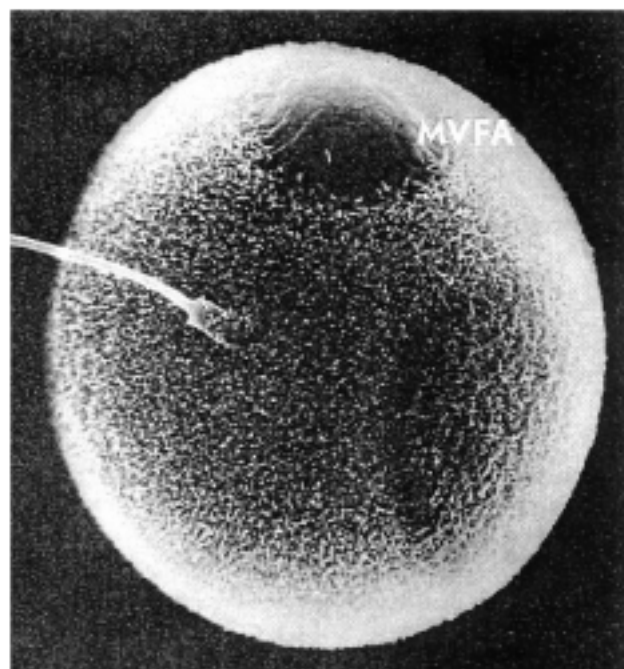


图 5-3 仓鼠精子与卵子融合的扫描电镜图 (引自 Yanagimachi R, 1981)

MVFA, 无微绒毛区域。

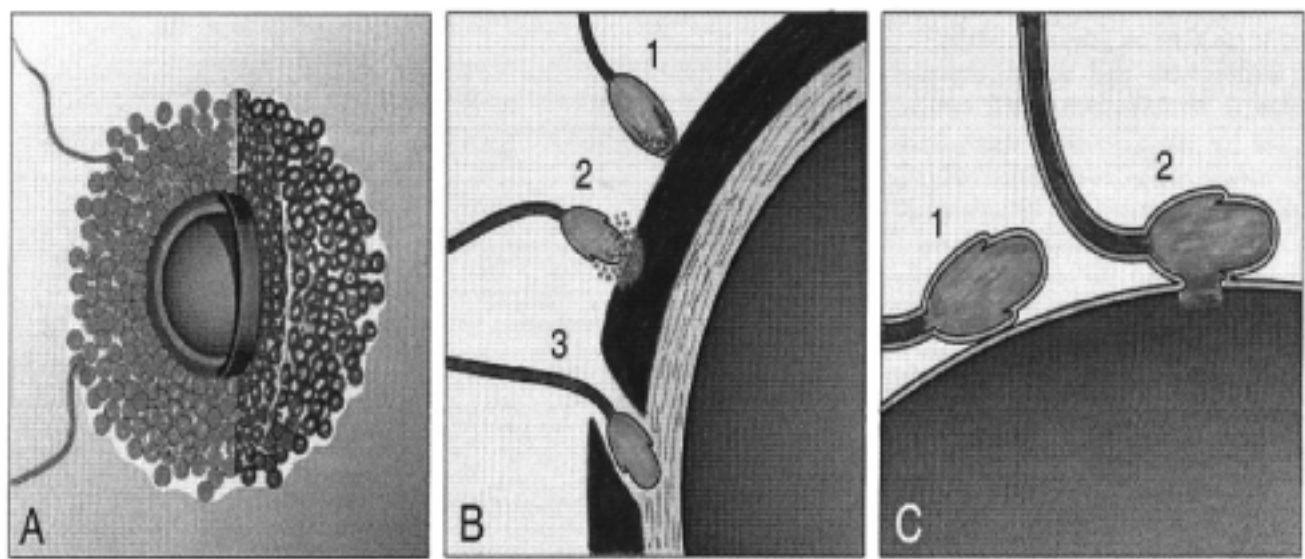


图 5-4 哺乳动物精卵相互作用过程模式图（引自 Prinmakoff P 和 Myles DG, 2002）

A: 精子正穿过卵丘细胞；B1: 精子与卵子透明带结合；B2: 精子发生顶体反应，释放顶体酶；
B3: 精子正在穿过透明带；C1: 精子头部赤道段的质膜与卵子质膜结合；C2: 精卵质膜融合

受精一般发生在排卵后，但也有例外。例如，各种海洋环节动物在排卵前，精子就穿入卵子。不同动物的受精发生在卵母细胞减数分裂的不同阶段，基本上可分为四种类型（图 5-5）：第一种类型，受精发生在生发泡（GV）期，这些动物包括线虫、软体动物、环节动物、甲壳类动物、海滨蛤、海绵、沙蚕、狗和狐等；第二种类型，受精发生在第一次减数分裂中期（MI），在该期受精的动物有某些软体动物、环节动物和昆虫等；第三种类型，受精发生在第二次减数分裂中期（MII），大多数脊椎动物都属于这一类型；第四种类型，受精发生第二次减数分裂完成以后，即原核期，这类动物包括海胆、腔肠动物等。也有例外情况，即有的动物受精发生在第一次或第二次减数分裂后

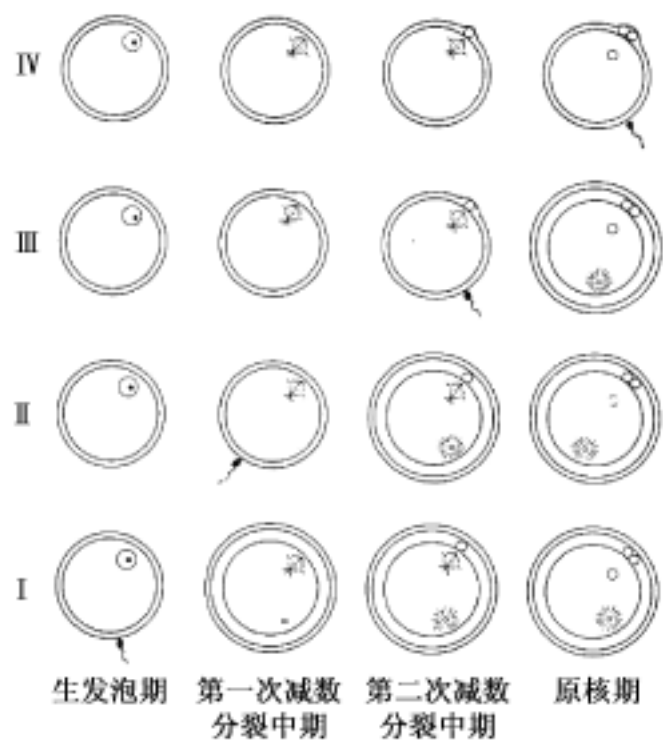


图 5-5 不同动物受精发生于卵子发育的不同阶段
(引自 Longo FJ, 1997)

期。第一、二、三种类型的受精都发生在减数分裂完成前的停滞阶段，精子入卵后，激发减数分裂的恢复。

二、受精方式

(一) 体内受精和体外受精

凡在雌、雄亲体交配时，精子从雄体传递到雌体的生殖道，逐渐抵达受精部位（如输卵管或子宫），在那里精卵相互融合的，称体内受精（*in vivo fertilization*）。凡精子和卵子同时排出体外，在雌体产孔附近或在水中受精的，称体外受精（*in vitro fertilization*）。前者多发生在高等动物如爬行类、鸟类、哺乳类、某些软体动物、昆虫以及某些鱼类和少数两栖类；后者是水生动物的普遍生殖方式，如大多数鱼类和部分两栖类等。将哺乳动物精子和卵子人为取出后，再体外进行受精，亦称体外受精。

(二) 自体受精和异体受精

多数动物是雌、雄异体的，但有些动物是雌、雄同体的，即同一个体既能产生卵子，也能产生精子。在雌雄同体动物中，有些是自体受精的，即同一个体的精子和卵子融合，如绦虫；有些是异体受精，即来自两个不同个体的精子和卵子相结合，如蚯蚓。

(三) 单精受精和多精受精

只有一个精子进入卵子内完成受精的，称单精受精（*monospermy*），如腔肠动物、棘皮动物、环节动物、硬骨鱼、无尾两栖类和胎盘类哺乳动物。如果一个以上精子入卵，通常会导致胚胎发育异常或发育阻滞，最终夭折。昆虫、软体动物、软骨鱼、有尾两栖类和鸟类，在正常生理条件下，受精过程中可有多个精子入卵，卵子中形成多个雄原核，但最终只有一个雄原核与雌原核结合，完成正常的胚胎发育，而其他雄原核在发育中途退化，称生理性多精受精（*polyspermy*）。

三、精卵化学趋化作用

在海洋动物、两栖类和其他非哺乳动物中发现，卵子或其周围的细胞分泌的化学物质可以吸引精子定向运动，到达受精部位，称为化学趋化作用（*chemotaxis*）。在海洋无脊椎动物，这种作用具有明显的种属特异性，即一种海洋生物的化学趋化物质通常只能吸引同种动物的精子，而对其他种属的精子没有趋化作用。精卵趋化作用具有重要的生理意义，它可使大量的精子到达受精部位，这对于体外受精的水生动物特别重要，因为没有这种化学趋化作用，很难想象排到水中的精子和卵子会有机会受精。卵子释放的使精子定向快速地向卵子运动的可溶性信号是一些肽类和有机小分子化合物，如 L-色氨酸、SepSAP 肽和硫酸类固醇等。哺乳动物属于体内受精动物。在受精前，精液射到阴

道或子宫中。要完成受精，精子要通过长距离的运动到达受精部位（输卵管上 1/3 处）。那么，哺乳动物精子和卵子的相遇是偶然的事件，还是像低等动物一样存在精卵之间的通讯联系呢？近年来的研究表明，哺乳动物精子在雌性生殖道运行时，也可能受到卵子或卵泡液中化学物质吸引而到达受精部位。人、小鼠和兔的卵泡液对精子都有趋化作用，但仅对获能精子有作用。哺乳动物的精卵化学趋化作用的生理功能可能与低等动物不同，它的主要作用可能是选择性地使获能精子募集到受精部位。哺乳动物的精卵趋化作用没有种属特异性。例如，兔和人的精子对人、兔、和牛卵泡液的化学趋化物质的反应没有明显差别，这说明哺乳动物并不是通过种属特异性的化学趋化作用来防止异种受精。哺乳动物的精子化学趋化物质还没有被分离出来，但可能属于对热稳定的肽类。有趣的是，在人精子中有独特的嗅觉受体（olfactory receptor），这些受体仅在生精细胞中表达。免疫细胞化学研究显示，嗅觉受体蛋白定位于精子尾部中段。据推测，嗅觉受体的作用是通过化学嗅觉信号通路使精子定向运动。最近有人从分子、细胞和生理水平上对新发现的嗅觉受体 hOR17-4 在受精过程中可能发挥的作用进行了探讨，发现嗅觉受体 hOR17-4 可以控制精子和卵子之间的通讯作用，在人精子趋化运动中具有重要功能。

有证据表明，精子在卵子释放的化学物质作用下定向地向其运动，可能是由精子细胞内 Ca^{2+} 浓度升高引起的。化学趋化物质引起 Ca^{2+} 浓度升高需要外源 Ca^{2+} 及 Ca^{2+} 通道的作用，三磷酸肌醇（ IP_3 ）可以介导 Ca^{2+} 释放。精子中 Ca^{2+} 升高导致其非对称性鞭毛运动，从而产生化学趋化反应。受精后或人工激活卵子以后，卵子对精子的化学趋化作用消失，有关这方面的机理还不清楚。

四、特殊的受精现象

经典的受精概念一般是指一个精子和一个卵子融合（配子配合，syngamy），这一过程涉及到卵子发育激活和配子的细胞核的融合（核配合，karyogamy），最终产生一个合子核（synkaryon）。如果考虑到某些原生动物的受精，这一概念需要进行修正。例如，原生动物存在同型配子的融合（isogamy），来自同一亲本的两个配子细胞核的融合（autogamy）和配子母细胞或个体融合产生配子（gamontogamy）等现象。许多动物如寡毛纲动物、蛛形纲动物、昆虫、有尾两栖类、爬行类和鸟类等，在正常生理条件下，可以有一个以上精子进入卵子。有的动物受精时，不发生配子细胞核的融合。如软体动物、硬骨鱼、真兽类哺乳动物等在受精时，雌原核和雄原核不会发生融合而形成一个合子核，而是雌原核和雄原核相互靠近，二者的核膜打折并相互嵌合，最后雌雄原核核膜破裂，染色体混合而形成第一次有丝分裂的纺锤体。另一个特殊的例子是，海绵动物的附属细胞介导精子进入卵子。动物界最特殊的受精方式发生在一种没有消化管的寄生性无脊椎动物中，这种动物的精子和卵子都包含在其他细胞中，但二者可发生融合。总之，不同动物的生殖细胞结构、受精过程和受精后所发生的生理生化事件等方面均有差异。

五、精卵受精能力的维持

哺乳动物一次射出的精子数量很多，但能到达受精部位的精子数量有限（表 5-1），

离体后的精子生命比较短暂。有的虽还具有活动的能力，但已经丧失了受精能力。精子的活动能力和受精能力是有区别的，一般维持活动能力的时间较维持受精能力的时间长。不同动物精子维持受精能力的时间有很大差别（表 5-2）。有的动物精子进入雌体内，在数月或数年内都有受精能力。例如，鸡精子的受精能力可以保持几周；蜂王精子的受精能力可保持长达 2~3 年；蛇精子的受精能力可维持 3~4 年；蝙蝠在冬季交配，精子在雌体内过冬，直到第二年春天才受精。

卵子排出后，如没有受精，就会发生老化，失去受精能力（表 5-3）。老化卵子受精时，多精受精的发生率增加。

表 5-1 不同哺乳动物射出的精子数量和射精部位 (引自张天荫，1996)

动物	精子数/（×10 ⁶ 个）	部位	在壶腹部精子数/ 个
小鼠	50	子宫	< 100
大鼠	58	子宫	500
兔	280	阴道	250~500
雪貂	—	子宫	18~1 600
豚鼠	80	阴道和子宫	25~50
牛	3000	阴道	少量
羊	1000	阴道	600~700
猪	8000	子宫	1 000
人	280	阴道	200

表 5-2 各种动物精子在输卵管中维持活动能力和受精能力的时间
(引自张天荫，1996，有修改)

动物	活动能力/ h	受精能力/ h	动物	活动能力/ h	受精能力/ h
小鼠	13	6	羊	48	24~48
大鼠	17	14	奶牛	96	24~48
豚鼠	41	21~22	猪	—	24~48
兔	—	28~32；43~50	马	144	144
雪貂	—	36~48；126	蝙蝠	140~156（d）	138~156（d）
狗	268	134（估计）	人	48~60	24~48
鸡	—	数周	蛇	—	3~4 年

表 5-3 各种哺乳动物卵子维持受精能力的时间 (引自张天荫，1996)

动物	时间/ h	动物	时间/ h
兔	6~8	猪	约 20
豚鼠	不多于 20	羊	15~24
大鼠	12~14	乳牛	22~24
小鼠	8~12	马	约 24
金田鼠	5；12	恒河猴	大约少于 24
雪貂	约 36	人	不超过 24

第三节 精子与卵透明带识别和结合的分子基础

低等动物和高等动物生殖细胞的结构和受精过程存在较大的差异。下面主要以哺乳动物为例，阐述受精过程中精子和卵子相互作用的过程及其分子基础。

一、基本概念

大多数哺乳动物的卵子排卵时并没有完成减数分裂，处于第二次减数分裂的中期(MII期)。卵子周围有两层成分包围，其一是透明带(zona pellucida, ZP)，它是生长期的卵母细胞和颗粒细胞分泌的非细胞成分，由ZP1、ZP2和ZP3三种糖蛋白组成；其二是卵丘细胞层，它是由卵丘细胞(cumulus cell)和细胞间富含透明质酸的非细胞成分组成的，卵子周围的卵丘细胞属于体细胞。精卵之间的识别和结合发生在卵子ZP上，与精子结合的卵子ZP表面成分称为精子受体(sperm receptor)；与卵子结合的精子表面成分，称为卵子结合蛋白(egg-binding protein)。因此，精子与卵子间的识别和结合是通过精子表面的卵子结合蛋白与卵子ZP表面的精子受体相互作用而实现的。精子与卵ZP之间的识别又分为初级识别和次级识别。未发生顶体反应的精子与ZP之间首先发生初级识别，它诱发精子顶体反应的发生；顶体反应后的精子与ZP之间发生次级识别，精子穿过ZP。精卵之间的相互作用具有种属特异性。当一种哺乳动物的卵子在体外与另一种哺乳动物的精子相互作用时，精子很少能与透明带结合而穿过透明带。但是，在很多情况下，去掉卵子周围的透明带，异种之间的受精屏障随之消失。例如，人精子在体外不能与仓鼠卵子ZP结合，而当把ZP去掉后，人精子就可穿入仓鼠卵。因此，大多数情况下，透明带是阻止种间受精的主要屏障。

二、卵子透明带表面的精子受体

顶体完整的精子达到ZP表面，首先发生初级识别，这是由ZP表面的初级精子受体与精子质膜表面的初级卵子结合蛋白相互作用而完成的。小鼠卵初级精子受体是一种分子质量为83kDa的糖蛋白，称为mZP3。mZP3与其他两种糖蛋白mZP1(200kDa)和mZP2(120kDa)一同构成透明带。mZP2和mZP3以异二聚体的形式存在，排列成细丝状，细丝间由mZP1连接(图5-6)。透明带中mZP1、mZP2和mZP3之间均以非共价键相互作用。其他哺乳动物的卵子透明带糖蛋白的组成与小鼠卵非常相似，都是由ZP1、ZP2和ZP3三种糖蛋白组成。不同动物卵子ZP的蛋白含量及厚度不同，如小鼠卵ZP仅含4ng蛋白质，而猪卵子透明带蛋白含量高达30ng；有袋类动物卵子ZP厚度小于2μm，而牛卵子的ZP厚可达27μm。有的动物，如小鼠和猪，编码ZP蛋白的基因已被克隆出来；而有的动物，如仓鼠，透明带蛋白已被分离出来，但其相应的DNA序列没有确定。

人们对透明带蛋白的功能进行研究，得出如下结论：①精子与卵子ZP之间的初级识别是由ZP3和精子质膜上的ZP3受体介导的；②精子与ZP3结合诱发顶体反应的发

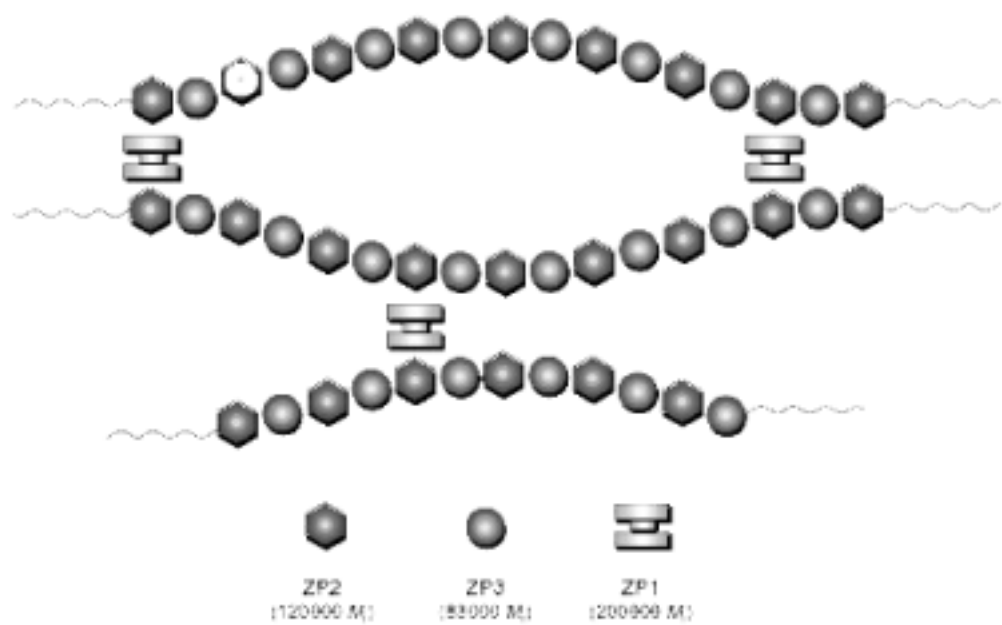


图 5-6 卵子透明带组成模型 (引自 Green DPL, 1997)

生；③发生顶体反应的精子与 ZP2 相互作用，发生次级识别和结合；④ZP1 不与精子直接作用。

(一) 精子与卵子透明带的初级识别和结合 ZP3 的作用

小鼠卵 ZP3 与精子质膜上的特异受体结合后，形成受体-配体复合体，一方面使精子附着在 ZP 上，另一方面激发精子发生顶体反应。有许多证据表明，ZP3 是精子的初级受体。这些证据包括：①纳摩尔浓度的纯化 mZP3 便可抑制精子与卵子的结合，这可能是由于 mZP3 与精子表面的卵子结合蛋白作用，从而阻止精卵识别和结合；②纯化的 mZP3 仅能与顶体完整的精子头部质膜结合；③精子能与共价附着 mZP3 的玻璃珠结合，也能与转入 mZP3 基因后能够分泌 mZP3 的畸胎瘤细胞结合；④纯化的 mZP3 能诱发精子顶体反应；⑤抗猪 ZP3 多肽的抗体能阻止精卵结合；⑥纯化的胚胎 mZP3，尽管与卵子的 mZP3 电泳后不易分辨，但不具备精子受体的功能。受精前，每个精子可与透明带上成千上万个 mZP3 分子结合而发生顶体反应，失去质膜（包括卵子结合蛋白）。透明带下显微授精的研究表明，ZP3 不仅存在于 ZP 外表面，也存在于 ZP 内表面，ZP 内表面的 ZP3 也具有识别精子和诱发顶体反应的功能。实际上，mZP3 中发挥精子受体作用的准确部位是与氧基相连的一族特殊的低聚糖，它们位于多肽羧基末端的一侧。对这些与氧基相连的低聚糖的结构还不清楚，但很明显，某些糖基对精子的结合是必要的。第一种可能是，不同哺乳动物的精子可能识别 ZP3 上的不同低聚糖表位，造成精卵之间的种特异性结合；第二种可能是，在有些情况下，精子识别 ZP 上与氧相连的低聚糖；第三种可能是，精子识别与氮相连的低聚糖。最近的研究表明，mZP3 中与精子结合而诱发顶体反应的最小区域是 21kDa 的羧基末端。至于 ZP3 多肽本身的作用，它可能指导与氧相连的低聚糖的三维构象，从而对精子结合起支配作用。

(二) 精子与透明带的次级识别和结合 ZP2 的作用

顶体反应发生后，精子质膜脱落，精子表面与 ZP3 结合的受体也随之丢失。此时，精子与 ZP 间发生次级识别。ZP 中负责与精子发生次级识别的是 ZP2。mZP2 能与顶体反应后的精子结合。mZP2 的抗体能抑制顶体反应后的精子与 ZP 的次级结合，而对顶体反应前顶体完整的精子与 ZP 间初级识别和结合没有影响。大豆胰蛋白酶的抑制剂与 mZP2 抗体作用相似，也能抑制顶体反应后的精子与卵子结合，提示类胰蛋白酶可能与精卵之间的二级识别和结合有关。猪卵子的 ZP1 (pZP1) 与小鼠卵子的 ZP2 同源。pZP1 能与发生顶体反应的精子和 55kDa 的前顶体素结合，具有次级精子受体的功能。兔和非人灵长类的情况也是如此。

(三) ZP1 的作用

小鼠卵子的 ZP1 主要发挥结构支撑功能，它把 ZP2 和 ZP3 细丝横向连接起来，构成 ZP 三维构象。然而，如上所述，在有些动物中 ZP1 也可能是精子受体，在精卵识别和结合中发挥作用。

三、精子表面的卵子结合蛋白

表 5-4 与透明带作用的卵子结合蛋白

卵子结合蛋白	分子质量/ kDa	动物种类
半乳糖苷转移酶	54	小鼠
ZRK (p95)	95	小鼠、人
sp56	56	小鼠
PH-20	64 (41 + 27) *	豚鼠、猴
前顶体素	52~55	人
sp17	17~26	兔
sp38	38	猪
精子黏合素	12~16	猪
AQN-1		
AQN-3		
AWN		
PSP- I		
PSP- II		
透明带黏合素	105 + 45	猪
p47	47	猪

* PH-20 在顶体反应前为 64kDa，顶体反应后裂解为 41kDa 和 27kDa 两个片段。

卵子 ZP 蛋白作为精子受体，与精子上相应的配体（即卵子结合蛋白）相互作用，有关研究已有很大进展。与卵子 ZP 上初级精子受体和次级精子受体相对应，精子表面的卵子结合蛋白也分为初级卵子结合蛋白和次级卵子结合蛋白。初级卵子结合蛋白位于精子顶体区质膜上，它与卵子 ZP 上的初级精子受体 ZP3 相互作用，诱发顶体反应的发生。次级卵子结合蛋白位于顶体反应后的精子表面，即顶体内膜上，它与次级精子受体 ZP2 相互作用，在精子穿过 ZP 过程中，次级卵子结合蛋白始终使精子与 ZP 结合。参与 ZP 诱发顶体反应的分子可能通过调节其他信号级联分子，如 G 蛋白、酪氨酸激酶或离子通道而发挥作用，因为它们在顶体反应过程中都发生活化。

不同动物中，已有多种不同的精子蛋白被认为参与精卵识别和结合（表 5-4）。

例如，小鼠初级卵子结合蛋白的可能候选者包括 β -1, 4-半乳糖苷转移酶、既是酪氨酸激酶底物又具有酪氨酸激酶活性的分子质量为 95kDa 的 p95 蛋白和凝集素样的分子质量为 56kDa 的 sp56 三种。上述每一种分子都存在于顶体完整的精子中，仅识别 mZP3。此外， β -1, 4-半乳糖苷转移酶和 sp56 还特异识别 mZP3 中与氧原子相连的低聚糖。下面介绍可能参与精卵初级识别和次级识别的主要初级卵子结合蛋白和次级卵子结合蛋白。

(一) 半乳糖苷转移酶

β -1, 4-半乳糖苷转移酶 (GalT) 是最早报道的初级卵子结合蛋白，它能够阻止精卵之间的结合。GalT 定位于精子头的背部和前部。附睾精子中，GalT 被附睾分泌物所遮盖，在精子获能过程中被暴露出来。GalT 抑制物和抗 GalT 抗体都可阻止精子与卵 ZP 之间的结合。GalT 已被证实与 ZP3 特异结合。此外，GalT 在信号传递中也发挥作用。过量表达表面 GalT 的转基因小鼠精子能够结合更多的 ZP3，发生顶体反应的比例也比较高。如果精子表面 GalT 凝集，可激活 G 蛋白。所有这些实验证据都表明， β -1, 4-半乳糖苷转移酶可能是精子上的初级卵子结合蛋白。然而，来自 GalT 基因敲除小鼠的精子在体内仍具有受精能力，对 GalT 的功能提出了疑问。

(二) 透明带受体激酶

另一个初级卵子结合蛋白候选者是一种跨膜受体酪氨酸蛋白激酶，称为透明带受体激酶 (zona receptor kinase, ZRK)，又称 p95。该激酶的酪氨酸磷酸化对受精是非常重要的，如果抑制酪氨酸蛋白激酶的活性，即可阻止顶体反应，从而阻断受精。小鼠和人的精子中都有一种 95kDa 的酪氨酸磷酸化的蛋白质，在精子获能过程中，这种蛋白质含量增加。后来证实，p95 参与精子与透明带的相互作用，这种 95kDa 的蛋白既是酪氨酸激酶的底物，其本身又具有酪氨酸激酶的活性。在 ZP3 激活 ZRK 后引起精子顶体反应的信号通路中，PLC γ 1 和 PI3 激酶可能是通路中关键的成分。

(三) sp56

sp56 是小鼠精子表面的一种分子质量为 56kDa 的蛋白质，它仅存在于顶体完整的精子表面，顶体反应后消失。原位杂交显示，sp56 mRNA 仅在圆形精子细胞中表达。免疫组化研究表明，sp56 多肽仅存在于圆形精子细胞、正在变态的精子细胞和精子中。在成熟精子中，sp56 定位于精子头部背区，它能与卵子的 ZP3 结合，在体外阻止精卵结合。sp56 不仅存在于小鼠精子表面，而且还存在于仓鼠精子表面。因此，就可以理解为什么小鼠和仓鼠的精子都能与小鼠卵 ZP 结合了。人和豚鼠的精子不含 sp56，因此不与小鼠卵 ZP 结合。sp56 是小鼠精子表面卵子结合蛋白的一个主要候选者。

(四) 精子黏合素

精子黏合素 (spermadhesin) 是存在于猪精子中的一族分子质量为 12~16kDa、能与碳水化合物及透明带结合的蛋白质。在精子穿过附睾过程中, AQN-3 和 AWN 通过与脂双层中的磷脂相互作用, 紧密地与精子表面结合。射精时, 精子黏合素在精子头部的顶体区形成保护层, 阻止顶体反应过早发生。精子获能过程中, 大多数精子黏合素分子从精子表面丢失, 但与磷脂紧密结合的精子黏合素保存下来, 并与 ZP 结合。直接免疫荧光显示, AWN 定位于猪精子的顶体帽。狗、牛和马精子中也含有精子黏合素, 马的 AWN 仅与猪的差 3 个氨基酸残基。现在已证明, 精子黏合素 (AWN 和 AQN3) 作为初级卵子结合蛋白, 参与猪精子与卵透明带的种特异性的初级识别。AWN、AQN-1 和 AQN-3 都能和糖蛋白中与氧原子和与氮原子相连的寡聚糖中的 Gal- β (1-3) -GalNAc 和 Gal- β (1-4) -GlcNAc 序列相结合。

(五) PH-20

PH-20 最早于 1983 年在豚鼠精子中发现, 定位于顶体后区的精子表面和顶体内。非还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示其分子质量为 62kDa, 而在还原性电泳条件下, 可分辨出分子质量为 64kDa, 41~48kDa 和 27kDa 的三条带。因此, PH-20 分子质量为 64kDa, 它可被裂解为由二硫键相连的 41~48kDa 和 27kDa 的两个片段。精子成熟过程中, PH-20 位置发生变化。在睾丸精子中, PH-20 均匀分布于整个精子; 在附睾尾精子中, 它迁移到精子顶体后区。当用钙离子载体 A23187 诱导精子发生顶体反应时, PH-20 从精子顶体后区质膜迁移到顶体内膜, 使顶体内膜上 PH-20 增加。PH-20 也存在于其他动物的精子内, 它在进化中是高度保守的。例如小鼠、猴和人的精子内都含 PH-20。不同动物的 PH-20 氨基末端大约 470 个的氨基酸序列是相同的, 而羧基末端的 40 个氨基酸差异很大。PH-20 在受精中发挥两种不同的功能。其一是参与顶体反应后的精子与 ZP 的结合, PH-20 的抗体能抑制精子与卵 ZP 间的次级结合。PH-20 的另一功能是协助精子穿过卵丘。最近证明, PH-20 实际上就是透明质酸酶, 它可分解卵丘细胞间的透明质酸。有人提出, 顶体后区精子表面的 PH-20 参与精子穿过卵丘, 而顶体内 PH-20 参与精子与 ZP 间的次级识别。

(六) 顶体素

传统观点认为, 顶体素 (acrosin) 具有两种功能, 其一是具有胰蛋白酶样的酶活性, 在精子穿过透明带时可以帮助消化透明带; 另一个功能是具有凝集素样的与碳水化合物结合的活性, 它很可能是顶体反应后的精子与卵子 ZP 结合的次级卵子结合蛋白。顶体反应前, 它以前顶体素 (proacrosin) 的形式存在于顶体内膜和顶体外膜上。顶体反应后, 前顶体素分子裂解, 产生具有酶活性的顶体素, 与 mZP2 相互作用。然而, 最近的研究表明, 当用不含顶体素的小鼠精子进行体外受精时, 尽管精子穿过 ZP 的时间

延长，但还是照样可以穿过 ZP 使卵子受精，说明顶体素并不是精子与 ZP 识别和结合所必需的。至少在小鼠，顶体素的作用可能是在顶体反应中，对顶体中和顶体膜上的其他蛋白进行有限的水解或加工。精子膜上的蛋白酶而非顶体内的蛋白酶可能在精子与透明带相互作用中发挥主要作用。

(七) 其 他

猪精子膜成分中含有一种被称为透明带黏合素 (zonaadhesin) 的成分，它能与猪卵子透明带发生种特异性识别。透明带黏合素含有两条分子质量分别为 105kDa 和 45kDa 的、共价结合的肽链。猪卵子整个透明带上都含有能与透明带黏合素结合的位点。猪精子中还有 p47 和 p-选择素可能与精卵初级识别有关。在猪精子表面也检测到 ACR3 蛋白和 β -半乳糖苷转移酶的存在，但他们的功能有待继续研究。有报道表明，尽管 β -半乳糖苷转移酶能与猪 ZP 蛋白结合，但对猪精卵识别和结合并不是必需的。

总之，很多精子蛋白都被证实可与 ZP 作用，但对于某一种动物而言，到底哪一种蛋白是受精所必需的，还没有定论。最近，基因敲除和生化分析表明，精子与透明带间的作用是很复杂的，初级识别和次级识别可能都涉及一种以上的精子蛋白参与。

第四节 精子顶体反应

精子头部前端与卵子透明带接触以后，通过受体-配体的相互作用，顶体外膜与质膜发生融合，释放顶体内的水解酶类，这一胞吐过程称为顶体反应 (acrosome reaction) (图 5-7)。顶体反应释放的水解酶类消化透明带，使精子穿过透明带而到达卵子表面，并使卵子受精。只有获能精子才能与卵子透明带相互作用而发生顶体反应。精子获能过

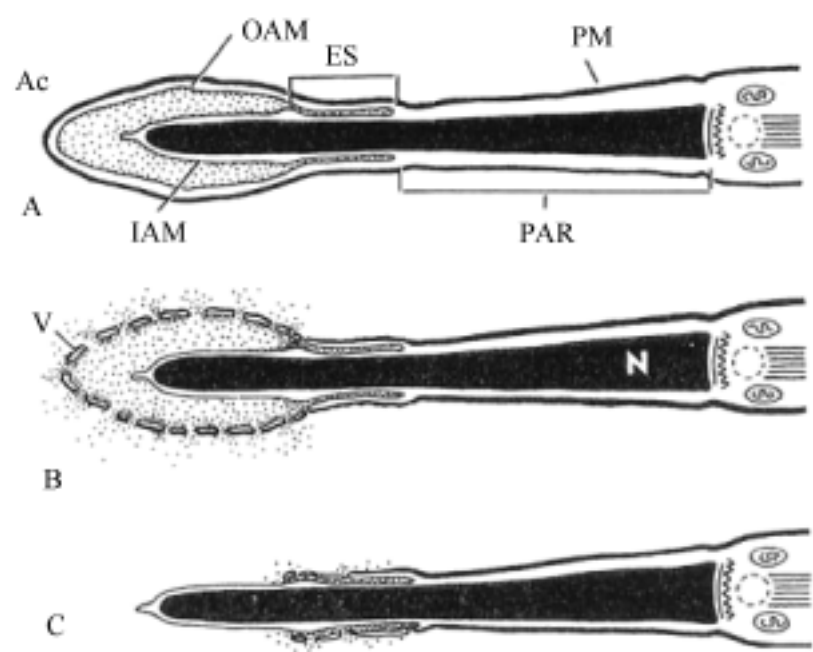


图 5-7 仓鼠精子顶体反应的模式图

A: 顶体反应前; B: 顶体反应过程中质膜 (PM) 与顶体外膜 (OAM) 融合而发生囊泡化;
C: 顶体反应后。Ac: 顶体; PAR: 顶体后区; N: 细胞核; ES: 赤道段; IAM: 顶体内膜; V: 囊泡

程中，发生了一系列的变化，包括膜流动性增加、蛋白酪氨酸磷酸化、胞内 cAMP 浓度升高、表面电荷降低、质膜胆固醇与磷脂的比例下降、游动方式变化等。

除了透明带以外，孕酮也是精子顶体反应的天然诱导物。孕酮可以诱导精子细胞内产生顶体反应所需的信使分子如二酰基甘油（DAG）等。 γ -氨基丁酸（ γ -aminobutyric acid, GABA）与孕酮有相似的作用。孕酮很可能通过作用于精子的 GABA 受体而引发精子的顶体反应。有人提出，在正常生理条件下，孕酮可能与透明带协同作用，引起精子顶体反应的发生。

精子的顶体反应伴随着胞内许多变化，包括 Ca^{2+} 浓度升高和 pH 升高。孕酮诱导的人精子顶体反应发生时，细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高了 7 倍。pH 升高对于人精子顶体反应和 ZP3 诱导的顶体反应是非常重要的，但对孕酮诱导的顶体反应不太重要。在体外，可用溶解的透明带或钙离子载体 A23187 处理诱发获能精子发生顶体反应。精子的顶体反应涉及细胞内复杂的信号转导过程（图 5-8）。

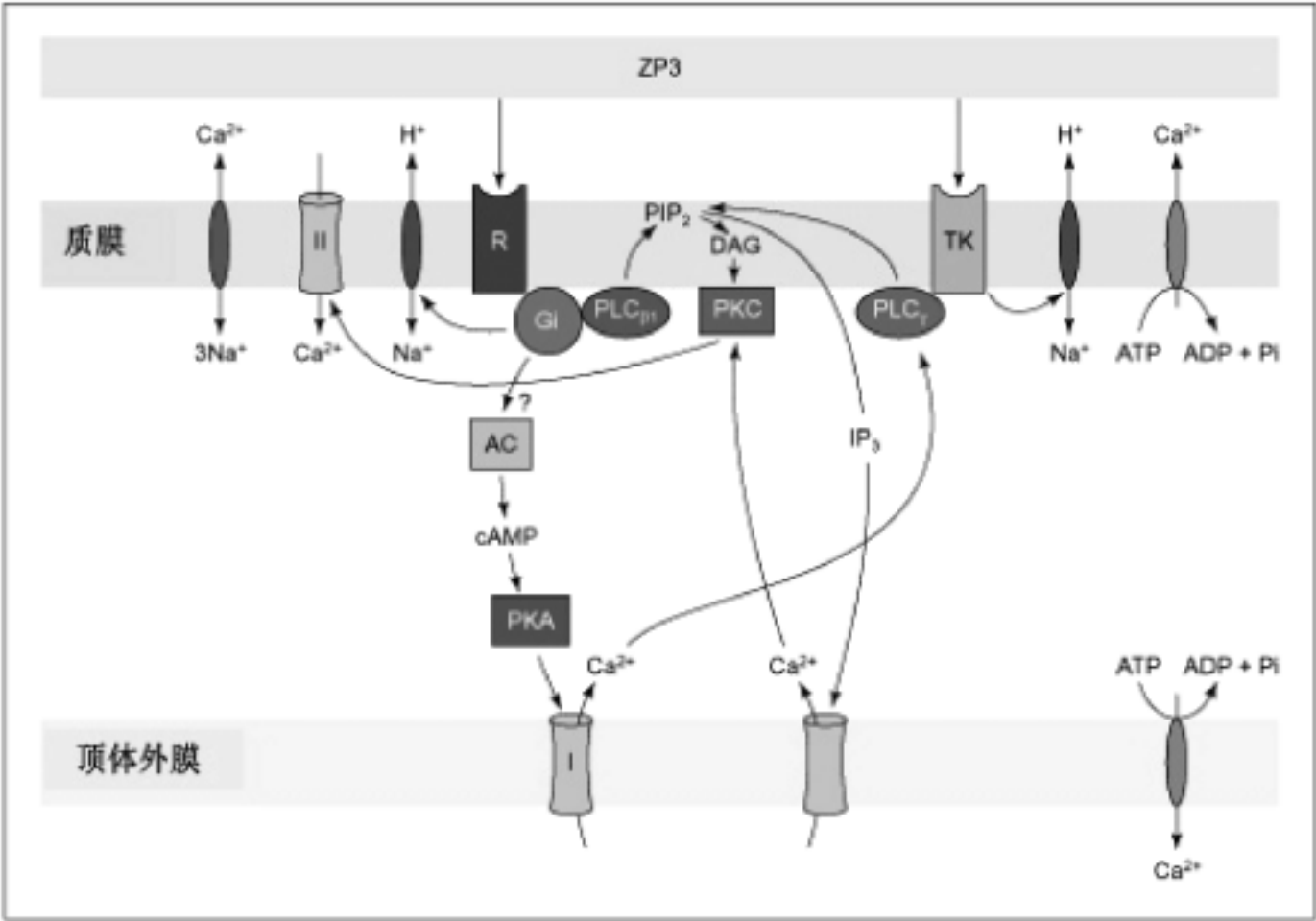


图 5-8 精子顶体反应发生的可能机制（引自 Breitbart H 等，1997）

一、 Ca^{2+} 的作用

毫无疑问，精子顶体反应的发生需胞质内 Ca^{2+} 浓度的升高。钙离子载体 A23187 可有效刺激精子发生顶体反应。精子中没有内质网，利用膜通透性荧光钙探针标记显示，精子的顶体实际上是一个钙库。获能过程中，通过钙泵的作用，顶体内聚集大量的 Ca^{2+} 。例如牛精子获能过程中，精子中 Ca^{2+} 浓度由 $25 \pm 10 \text{ nmol/L}$ 升高到 $160 \pm$

4nmol/L。在精子顶体上已经发现了钙泵的存在。如果获能精子的钙泵受到抑制，胞浆中自由 Ca^{2+} 浓度很快升高。有人提出，获能精子与透明带作用发生顶体反应时，首先激活腺苷酸环化酶，产生 cAMP，活化蛋白激酶 A (PKA)，后者打开顶体外膜的电压依赖性 Ca^{2+} 通道，使顶体内的 Ca^{2+} 释放到胞质中，引起 Ca^{2+} 浓度的小幅度的第一次升高。 Ca^{2+} 浓度的升高激活磷脂酰肌醇信号通路，引起 PKC 激活并迁移到质膜上，打开精子质膜上的电压依赖性 Ca^{2+} 通道，引起第二次 Ca^{2+} 浓度的大幅升高。此外，在小鼠、大鼠、仓鼠和狗的精子顶体上都发现有 IP_3 受体的存在， IP_3 可与 PKA 共同作用，打开顶体外膜上的 Ca^{2+} 通道，在介导顶体 Ca^{2+} 释放中可能发挥重要作用。Rab3A 可以通过促进顶体内 Ca^{2+} 释放而引起顶体反应的发生。当人精子顶体内的 Ca^{2+} 与一种光敏感的螯合剂结合以后，Rab3A 诱导的顶体反应就不能发生。而当采用紫外光把光敏感的螯合剂灭活以后，顶体反应又恢复发生。Rab3A 诱导的顶体反应可被钙泵的抑制剂或对 IP_3 敏感的钙通道阻断剂所抑制。在精子顶体外室的 Ca^{2+} 浓度升高而引发顶体反应的时候，通过 IP_3 敏感的钙通道释放的 Ca^{2+} 对顶体反应是必要的。 Ca^{2+} 浓度的升高，使顶体外膜与质膜之间的 F 肌动蛋白解聚，导致两层膜接触，促进顶体反应的发生。

二、G 蛋白

现已证实，对白喉素敏感的 G 蛋白参与哺乳动物精子的顶体反应。精子与透明带结合后，膜上的 G 蛋白被激活，引发顶体反应。免疫印迹显示，人精子中含有 Gai2、Gai3、Gaq 11 和 Gβ35。间接免疫荧光标记证明，能激活 PLCβ 的 Gaq 11 定位于顶体区，在赤道段聚集最多；Gai2 分布在顶体、中段和尾段；Gai3 定位于核后帽、中段和尾段；Gβ35 在顶体赤道段也有分布。ZP3 能够激活分离精子膜中的 Gi (Gi1 和 Gi2) 蛋白，白喉素能抑制 ZP 引发的顶体反应，而对钙离子载体诱导的顶体反应没有影响，说明 Gi 蛋白在 Ca^{2+} 上游发挥作用。白喉素对孕酮诱导的人精子 Ca^{2+} 变化及顶体反应没有影响，说明不同的生理性诱导物可能通过不同的信号通路引发顶体反应。在精子赤道段还发现了 Go 蛋白的存在。在体细胞，Go 蛋白参与跨膜 Ca^{2+} 运输，而它在精子顶体反应中的作用还不清楚。

三、Rab3A

Rab 蛋白属小 GTPase 的亚家族，在神经细胞和其他分泌细胞的膜融合和细胞胞吐中发挥重要作用。RT-PCR、免疫印迹分析和免疫荧光标记显示，大鼠精子含有 Rab3A，并且 Rab3A 定位于顶体膜上。人精子顶体区也含有 Rab3A。最近的研究表明，Rab3A 效应位点的合成肽能明显激发人精子的顶体反应。重要的是，与 GTP 结合形式的重组 Rab3A 蛋白也激发精子顶体反应，而与 GDP 结合的 Rab3A 和与 GTP 结合的 Rab11 却不能引起人精子顶体反应。有实验证据表明，顶体反应时 Rab3A 的作用依赖于 Ca^{2+} ，在 Ca^{2+} 的作用下，Rab3A 转变成为与 GTP 结合的活性形式。令人不解的是，曾有报道 Rab3A 效应位点的合成肽阻断 A23187 诱导的大鼠精子顶体反应的发生。

四、磷脂酶 C

现已发现, 精子获能过程中, 磷脂酶 $C\gamma$ (PLC) 转移到质膜上。在哺乳动物精子的顶体区还发现了 PLC β 1 的存在。由透明带和孕酮激发获能精子发生顶体反应时, 质膜上的 PLC 被激活, 从而导致二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP₂) 分解, 产生 DAG 和 IP₃。DAG 可激活 PKC。用新霉素抑制 PLC γ , 能阻止顶体反应的发生。在新霉素存在的情况下, 再加入对新霉素不敏感的细菌来源的 PIP₂ 特异的 PLC, 顶体反应又恢复发生。由 PLC 作用产生的 IP₃ 可激发顶体内 Ca^{2+} 的释放, 而 DAG 可提高膜的流动性, 激活 PKC 和 PLA₂。

五、蛋白激酶

(一) 酪氨酸蛋白激酶

精子质膜上含有一种 95kDa 的蛋白质 (p95), 即受体酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK)。RTK 可激活精子的 $Na^+ - H^+$ 交换装置, 提高细胞内 pH, 促进膜的去极化, 打开 Ca^{2+} 通道。孕酮可激发人精子 RTK 的酪氨酸磷酸化, 造成 Ca^{2+} 释放和顶体反应的发生。表皮生长因子受体也是一种酪氨酸蛋白激酶, 参与精子顶体反应的发生。已在牛精子的头部发现表皮生长因子受体的存在。在牛精子获能过程中, 有分子质量为 170kDa 和 140kDa 的两种蛋白发生了酪氨酸磷酸化, 这两种蛋白可能分别是表皮生长因子受体和 PLC- γ 。PLC- γ 酪氨酸磷酸化后, 与质膜的结合能力明显增加。在小鼠精子, PLC- γ 的激活就是通过酪氨酸磷酸化实现的。在小鼠和牛精子中, 已发现获能过程中 cAMP/ PKA 可激发蛋白酪氨酸磷酸化。

(二) cAMP/ 蛋白激酶 A

人精子发生顶体反应时, 腺苷酸环化酶激活, 细胞内 cAMP 浓度升高。cAMP 依赖的蛋白激酶 A (PKA) 抑制剂阻断顶体反应的发生。腺苷酸环化酶的激活可能受酪氨酸激酶和蛋白磷酸化的调节。卵子透明带和孕酮均可激活精子膜上的腺苷酸环化酶, 产生的 cAMP 作用于精子顶体, 使顶体内的 Ca^{2+} 释放, 从而诱导顶体反应的发生, 而这种作用可被 PKA 抑制剂 H89 阻断。这说明精子顶体膜上存在对 cAMP 敏感的 Ca^{2+} 通道。这种 Ca^{2+} 通道可能是电压依赖性 Ca^{2+} 通道。精子获能过程中, cAMP 还能促进酪氨酸磷酸化和脂质成分的重组。

(三) 蛋白激酶 C

采用蛋白激酶 C (PKC) 的激活剂和抑制剂证明, PKC 参与精子顶体反应。已在绵羊和牛精子中发现 PKC 和 PKC 锚定蛋白 RACK 的存在, 并证明 PKC α 和 PKC β 向质膜

的迁移是诱发顶体反应的早期事件。PKC 向质膜的迁移发生得很快 (1min)，并依赖于 Ca^{2+} 。PKC 激活可能有两方面的作用，一方面是激活质膜上的 Ca^{2+} 通道，引起细胞内游离 Ca^{2+} 的升高；另一方面的作用是激活磷脂酶 A2 (PLA2)，产生花生四烯酸 (AA)，产生花生四烯酸再衍生为前列腺素和白三烯 (leukotrienes)。

(四) 丝裂原活化蛋白激酶

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 又名细胞外调节激酶 (extracellular-regulated kinase, ERK)，是一类广泛存在于真核细胞中的 Ser/ Thr 蛋白激酶。在人和牛精子中已发现含有 MAPK 的两种主要成员 ERK1 和 ERK2。在精子获能过程中，Ras/ ERK 途径被激活。用孕酮或钙离子载体 A23187 处理人精子，可引起 ERK1 和 ERK2 的磷酸化和激活。同时，ERK1 和 ERK2 由顶体后区迁移到赤道段。尽管有报道称，MAPK 的上游分子 MEK 的抑制剂 PD 98059 能显著抑制 MAPK 激活，但不影响孕酮诱导的顶体反应的发生。近来也有研究表明，PD 98059 能显著降低孕酮和 A23187 诱导的精子顶体反应。在所有用透明带诱导精子顶体反应的实验中均发现，抑制 MAPK 可阻断顶体反应的发生。至少可以说，MAPK 信号通路不仅参与精子获能的调节，在透明带诱导的精子顶体反应中也具有重要功能。有人提出，MAPK 信号通路可能通过 RTK 的作用，调节 F-肌动蛋白的重新分布，从而参与精子顶体反应的调节。

六、还 原 氧

高剂量的还原氧 (reactive oxygen species, ROS) 对精子是有害的，但最近发现，低剂量的 ROS 可以促进精子获能，而歧化酶可抵消这种作用。精子获能过程中，产生 O_2^- 。 O_2^- 的产生在 12~20min 达到高峰，此后下降。产生的 ROS 可激活腺苷酸环化酶，并促进酪氨酸磷酸化。

七、精 胺

已在绵羊精子中发现了精胺的存在，它定位于精子的顶体区。电子显微镜下观察，发现精胺主要分布于顶体内膜上，在顶体区的质膜上也有分布。 $10\mu\text{mol/L}$ 的精胺诱导精子发生顶体反应，但 mmol/L 水平的精胺反而抑制顶体反应的发生。低浓度的精胺可使精子对 Ca^{2+} 的吸收增加。精胺可能在顶体反应的膜融合中发挥重要作用。在体外， $\mu\text{mol/L}$ 水平的精胺可引起分离的顶体外膜与质膜之间的融合。

第五节 精子与卵质膜结合和融合的分子基础

精子发生顶体反应穿过 ZP 以后，很快到达卵质膜表面，并与卵质膜结合并融合，整个精子 (包括精子尾) 进入卵子。在大多数情况下，首先精子头的尖部与卵子质膜接触，随后精子头侧面附着在卵子质膜上。精子与卵质膜的作用至少涉及两个主要步骤，

即结合和融合。精卵的融合很少发生在卵子第二次减数分裂器存在的区域，因为该区域没有微绒毛，无皮质颗粒，而卵子其他区域表面都有大量的微绒毛存在，且质膜下有皮质颗粒分布。精卵之间的结合可发生在精子膜的任何区域，包括顶体内膜。因此，精卵结合属于非特异性的细胞间相互作用。与精卵结合相比，精卵融合要求比较严格，需一定的温度、pH 和离子条件。精卵结合和融合是两个截然不同的过程，可能涉及不同的分子。生理性结合，即黏附（adhesion）是精卵融合的前提。

在非哺乳类动物和非真兽类哺乳动物中，精子的顶体内膜与卵子质膜融合；而在真兽类（胎盘类）哺乳动物，顶体内膜不能参与融合，参与精卵融合的是精子头部的质膜。最初人们认为，精子顶体后区的质膜与卵子融合，而目前一般认为，精子头部赤道段或其附近的质膜与卵质膜发生融合（图 5-9）。精子的顶体反应对精卵结合并不是绝对必要的，而对精卵融合却是必不可少的。没有发生顶体反应的精子不能与卵质膜融合。这说明，顶体反应不仅对精子穿过 ZP 是必要的，而且在顶体反应过程中，精子质膜蛋白质的迁移和变化还构成了精卵融合的分子基础。值得强调的是，精子运动有助于精子穿过卵丘和透明带，但对精卵质膜的融合而言，并不需要精子运动。精卵质膜融合不像精子与卵子 ZP 作用时具有严格的种特异性。例如，几乎所有动物的精子均可穿入金黄仓鼠的卵子，小鼠的精子可穿入多种动物去 ZP 的卵子。但是，这不等于说哺乳动物的精卵融合完全没有种特异性。应该说，精卵融合还是具有一定的种特异性，而这是由参与融合的蛋白特异性决定的。支持这一观点的例子很多，例如金黄仓鼠的卵子最容易与同种精子融合，小鼠的卵子质膜只允许同种精子穿入，豚鼠的精子更易与同种卵子融合，狗的精子不能与仓鼠卵融合等。

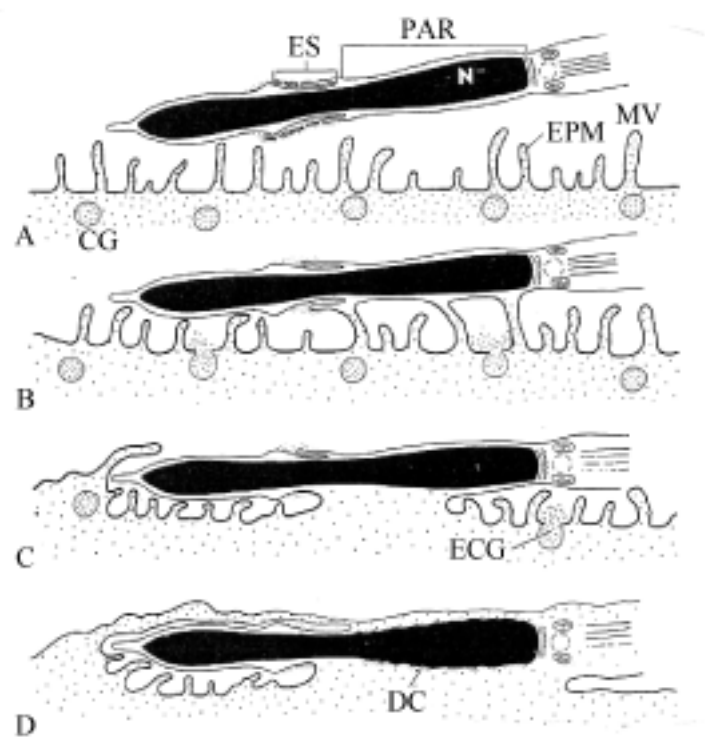


图 5-9 仓鼠精子与卵子质膜（EPM）融合的模式图（引自 Yanagimachi R 等，1970）
A: 精子与卵子微绒毛（MV）接触；B: 微绒毛与精子顶体后区质膜融合；C, D: 精子融入卵子。
ES, 赤道段；CG, 皮质颗粒；ECG, 皮质颗粒胞吐；N, 精子核；DC, 正在去浓缩的染色质

一、卵质膜上参与精卵相互作用的蛋白分子

在体内，精子仅能与卵子微绒毛结合，说明微绒毛在精卵结合和融合中发挥重要作用。卵质膜上的精子受体通常在微绒毛上，但并不是所有情况都这样。卵质膜上的精子受体在卵母细胞成熟过程中出现较早，随着卵母细胞的生长，它与精子融合的能力逐渐增强。到生发泡期，所有动物的卵母细胞均能与精子结合和融合。卵子与精子的融合能力在受精后很快失去，这可能是由于卵子表面精子受体的丢失或修饰所致。下面介绍卵质膜上精子受体的候选蛋白。

(一) 卵子整合素

整合素 (integrin) 是一族与细胞或细胞外基质黏合有关的膜受体。它是跨膜的异二聚体，包括 α 和 β 两个亚基，其中 α 亚基有 16 种， β 亚基有 8 种，两个亚基的分子量分别在 120~128kDa 和 90~110kDa 范围内。 α 亚基与 β 亚基不同的组合构成 20 种以上的整合素分子。所有的整合素亚单位都发生糖基化，并且至少其中某些可磷酸化。整合素不仅与其相应的配体结合，还在调节信号传递机制中发挥重要作用。过去 15 年来，人们普遍接受这样一种假说，即卵子与精子的结合是由整合素与其配体 (ADAM 家族成员的去整合素位点) 相互作用而介导的。有许多研究表明，整合素可能作为精子受体参与精卵融合，其证据有如下几个方面：①作为很多整合素配体的 Arg-Gly-Asp (RGD) 肽可抑制人精子或仓鼠精子与仓鼠卵子的融合；②未受精卵质膜上有整合素表达，这在几种哺乳动物中均已得到证实；③抗整合素单克隆抗体能够阻断小鼠的体外受精；④在被认为是精子融合蛋白的受精素中找到了与整合素结合的去整合素 (disintegrin) 位点。最近的工作表明，在卵子表面表达的整合素中， $\alpha 6 \beta 1$ 可能是介导小鼠精卵结合和融合的精子受体。抗 $\alpha 6 \beta 1$ 的抗体剂量依赖性地阻止精卵结合。此外，能抑制其他整合素而不抑制 $\alpha 6 \beta 1$ 的肽段不影响精卵结合和融合。精子能够与表达 $\alpha 6 \beta 1$ 的转染细胞结合，并且这种结合可被含去整合素位点的肽所抑制。所有这些证据均表明， $\alpha 6 \beta 1$ 整合素可能是小鼠卵子表面的精子受体，在精卵结合和融合中发挥重要作用。在猪，参与精卵结合和融合的整合素可能是 $\alpha 6 \beta 1$ 。然而，最近实验证据否认了 $\alpha 6 \beta 1$ 整合素在精卵融合中的作用。用不含 $\alpha 6 \beta 1$ 整合素亚单位的小鼠卵子进行体外受精，精子结合和受精率均不受影响。采用更接近体内受精条件 (用酸处理去掉透明带) 的分析表明，单克隆抗体 GoH3 并不抑制精卵融合。所得出的结论是， $\alpha 6 \beta 1$ 整合素并非小鼠卵子表面的精子受体。将整合素 α 亚单位的基因敲除，并不减少精卵结合和融合。最近其他报道指出，实际上没有任何一种小鼠卵子膜上的整合素参与了精卵膜之间的融合。因此，到目前为止，整合素参与精卵结合和融合的观点还不令人信服。

(二) CD9

近年来的研究在否定 $\alpha 6 \beta 1$ 整合素在精卵膜之间的融合作用的同时，却发现了与整

合素相关联的另一种膜蛋白 CD9 在精卵融合中的作用。CD9 是一种广泛分布于细胞表面的、与整合素和其他蛋白结合的膜结合蛋白，属于跨膜-4 超家族成员。CD9 在小鼠卵子质膜上表达，主要分布在微绒毛上。在精子与卵子附着处，有大量 CD9 募集。用同源重组方法获得的缺乏 CD9 ($CD9^{-/-}$) 的雌性小鼠可以排卵，但其生殖能力明显下降，不到野生型小鼠的 2%。体外受精实验表明，生育能力的下降与精子和卵子之间的融合失败有关。精子和卵子之间的结合正常发生，而二者之间的融合几乎被完全抑制。而当把精子显微注射到 $CD9^{-/-}$ 卵子中，受精卵可以正常发育。抗 CD9 单克隆抗体可有效阻断精子质膜和卵子质膜之间的融合。这些实验证据表明，CD9 在精卵融合中发挥重要作用。CD9 的作用机制还不清楚，它可能通过自身大的胞外环和其特殊的氨基酸序列而起作用。已有证据表明，CD9 的胞外环可与卵子（不是精子）表面的另一种分子相互作用而发挥其功能。在小鼠卵子表面还发现其他两种与整合素 $\beta 1$ 相关联的跨膜蛋白 CD81 和 CD98，其功能有待进一步研究。

(三) 其他候选分子

小鼠的精子与卵子融合可能需要 GPI (glycosyl phosphatidylinositol) 锚定蛋白，用磷脂酶 C 去掉这种蛋白，尽管精子和卵子可以结合，但不能融合。还有研究表明，依赖 Zn^{2+} 的金属蛋白酶可能参与精卵融合。此外，一种分子质量为 94kDa 的小鼠卵子表面蛋白可能也与配子质膜融合有关，但也有人认为，这种 94kDa 的蛋白或许就是整合素的 β 亚单位。

二、精子中参与膜融合的蛋白分子

(一) 受精素

受精素 (fertilin) 最初是在豚鼠精子中发现的，称为 PH-30，后来改称为受精素。它位于小鼠精子的赤道段和豚鼠精子头后区的质膜上，是精卵膜融合中发挥重要作用的蛋白。与 PH-20 类似，受精素的分布取决于精子成熟阶段。在睾丸精子中，受精素分布于整个头部，而在附睾尾精子中，仅分布于头后区表面。它是一个异二聚体，包含 α 和 β 两个亚基。用 ^{125}I 标记豚鼠精子表面进行免疫沉降，获得的受精素 α 亚基和 β 亚基的分子质量分别为 44kDa 和 60kDa。在受精素的 β 亚基中已发现有去整合素结构域，而在 α 亚基中也发现有融合多肽位点。此外，在受精素 α 的前体中也发现有去整合素结构域，并且受精素 α 、 β 前体中均含金属蛋白酶的结构域。PH-30 的单克隆抗体能抑制精卵融合。所有这些证据都说明，受精素在精卵融合中发挥重要作用。受精素 β (也称为 ADAM2) 参与精子与卵质膜的结合，而受精素 α 或许与精卵膜融合有关，但这一结论需要更多的证据支持。受精素 α 参与精卵膜融合的观点受到了挑战，因为最近的研究表明，受精素 α 基因敲除后的精子仍然可与卵子膜融合。

由于受精素 α 和 β 既含有去整合素结构域，又含有金属蛋白酶结构域，它们作为最早进入的成员，形成了一族被称为 ADAMs 的新蛋白，意思是蛋白分子中含有一个去整

合素和一个金属蛋白酶结构域 (a disintegrin and a metalloprotease domain)。迄今为止, 已发现大约 30 个 ADAM 家族成员。其中受精素 β (ADAM2)、ADAM9、ADAM12、ADAM15 和 ADAM23 这 5 个成员能与整合素 ($\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha 9\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 5$ 和/或 $\alpha 5\beta 1$) 相互作用。随着新成员的增加, 人们发现了许多新功能, 并且证明去整合素结构域和金属蛋白酶结构域以外的位点也可能有功能。除了受精素 β 外, ADAM 家族的其他成员, 如 cyristestin (ADAM3) 参与精卵质膜融合前的结合步骤。Cyristestin 肽甚至能有效地阻止精卵结合。有的 ADAM 家族成员如受精素 α 、ADAM4 和 ADAM5 则对精卵结合作用不大或没有作用。

为了进一步了解 ADAM 家族在精卵结合中的作用, 科学家把受精素 β 或 cyristestin 基因敲除, 或把二者的基因都敲除, 发现基因敲除小鼠的精子与去透明带卵子的结合能力下降了 90%。受精素 β 和 cyristestin 以及二者的抗体均能抑制精卵之间的融合。然而, 出乎预料的是, 受精素 β 和 cyristestin 基因敲除的精子一旦与卵子结合后, 还可以与卵子发生融合。

(二) DE 蛋 白

DE 是一种 32kDa 的蛋白质。大鼠的附睾尾分泌大量的 DE, 大鼠精子在附睾中成熟的过程中, DE 蛋白结合在精子的表面。顶体反应后, DE 迁移到赤道段。抗 DE 的抗体可明显降低卵子的体外受精率。有证据表明, 纯化的大鼠精子 DE 蛋白能抑制精卵融合, 而卵子表面上也有 DE 结合蛋白的存在, 它可能是大鼠精子受体, 参与精卵融合。间接免疫荧光标记显示, DE 蛋白定位于顶体区的背部。在 DE 蛋白存在的情况下, 去透明带的小鼠或大鼠卵子与获能小鼠精子一起孵育时, DE 蛋白剂量依赖性地抑制精子入卵, 但对精卵结合没有影响。在精卵融合区域, 检测到特异的 DE 蛋白结合位点。DE 蛋白没有去整合素的结合位点, 说明它并不是通过去整合素-整合素结合而发挥作用的。上述证据表明, DE 在精卵融合中可能发挥作用。大鼠体内实验也证明了这一点。当用 DE 免疫雄鼠或雌鼠时, 生育率明显下降。最近, 人们也从小鼠精子中发现了 DE 的类似物——富含半胱氨酸的分泌蛋白-1 (CRISP-1) 和附睾蛋白 7, 但这些蛋白在精卵融合中的作用还不清楚。

(三) 其 他

小鼠精子赤道段上有一种叫做赤道素 (equatorin) 的分子, 可能与精卵融合有关。向小鼠输卵管中注射赤道素的单克隆抗体可阻止体内受精的发生。在小鼠精子中分离到一种分子质量为 39kDa 的蛋白质 MSH27。这种定位于精子赤道区的抗原及其抗体可明显降低精卵融合率, 可能参与精卵质膜融合。除此之外, 小鼠精子的 M29、人精子的 MH61、豚鼠精子的 G11 和 M13 等也可能是参与精卵融合的候选分子。

三、结 语

从目前的研究结果看，卵子表面参与精卵结合和融合的最佳候选分子是 CD9 和 GPI 锚定蛋白。没有确凿的证据表明卵子表面的整合素参与了精卵结合和融合。精子表面的 ADAM 家族成员，尤其是受精素 β (ADAM2) 和 cyristestin (ADAM3) 可能参与融合前精子和卵子之间的黏附，但不含这两种蛋白的精子仍然能与卵子融合。

第六节 卵 子 激 活

在大部分脊椎动物中，未受精的卵母细胞被细胞静止因子 (cytostatic factor, CSF) 阻滞在 MII 期。CSF 首先是在两栖类发现的。把 MII 期卵子的细胞质移入 2-细胞胚胎中的一个卵裂球中，注射的卵裂球停滞在 M 期，而没有注射的卵裂球继续分裂。采用细胞融合技术，在小鼠也证实了同一现象。c-mos 基因的产物最早被发现具有 CSF 的活性。精子入卵使“休眠”的卵子复苏，启动一系列生化事件的发生、代谢的变化和减数分裂的完成，最终导致细胞分裂、分化和新的生命个体的诞生。卵子的这种复苏过程被称为卵子激活。卵子激活时，CSF 可能激活后期促进复合体 (anaphase-promoting complex, APC)，引起卵子由 M 期向后期转变。最近证明，APC 的抑制分子 Emi1 可以把未受精卵阻滞在 MII 期，它可能是 CSF 效应的介导因子。需要说明的是，受精前的休眠卵子并非真正处于静止状态，中期纺锤体始终处于聚合/解聚的动态之中，其他许多代谢过程也都十分旺盛。所以有人说，受精前的卵子像一辆停在起跑线上的赛车，它的发动机及其他许多装置均处于待发状态，只要发令枪一响，立即前进。哺乳动物卵子的受精寿命很短，一般为 10h 以内。卵子激活后的主要事件包括细胞质内游离 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的升高、皮质颗粒胞吐和阻止多精受精、减数分裂恢复和第二极体 (PB2) 释放、雌性染色体转化为雌原核、精核去致密并转化为雄原核、雌雄原核内 DNA 复制、雌雄原核在卵子中央部位相互靠近、核膜破裂及染色质混合等。雌雄染色质混合后第一次有丝分裂纺锤体的形成标志着受精结束和胚胎发育的开始。

一、卵子激活后的生理生化变化

精子入卵后，激发卵子发生一系列生理生化变化，这里就几个重要方面进行简单的介绍。

(一) 卵子质膜去极化

采用微电极或离子示踪技术测得，受精时海胆、海星、海虫和两栖类的卵子质膜快速去极化，形成动作电位，启动钙波形成，快速阻止多精受精。哺乳动物卵子受精后的动作电位由反复出现的膜超极化构成。膜电位超极化是否与阻止多精受精有关还不清楚。小鼠卵受精时，多精受精的阻止与膜电位变化无关。兔卵受精时，记录到一个慢速

幅值较大的去极化，有人认为该去极化足以阻止多精受精。

(二) Ca^{2+} 变化

1. 钙波与钙振荡

Ca^{2+} 信号在卵子激活中起着十分重要的作用。各种动物精子穿入卵子后都引起卵子内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高 (图 5-10)。哺乳动物受精时，精子穿入卵子，引起卵子胞质内持续数小时的、反复性的、短暂性的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高，称为 Ca^{2+} 振荡 (Ca^{2+} oscillations) (图 5-11)。 Ca^{2+} 振荡是哺乳动物卵子受精过程中的普遍现象。通常 Ca^{2+} 振荡是在精卵相互作用后的几分钟到十几分钟之内发生的。第一次 Ca^{2+} 升高一般可持续 2 分多钟，第二次和第三次 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高也会持续较长的时间，而以后的每次 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高持续时间大约为 1min。第一次 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的幅值明显高于后来的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高幅值。这些多次重复的 Ca^{2+} 升高的间隔在每个卵子中基本是恒定的。不同种动物卵子中 Ca^{2+} 振荡间隔时间不同，最短的为 1min，最长的可达 1h。一般情况下， Ca^{2+} 振荡持续到受精后原核形成前。受精后 Ca^{2+} 振荡的频率和幅值与进入卵子内精子数量有关，去 ZP 的卵子由于多精受精表现出较高的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高频率。

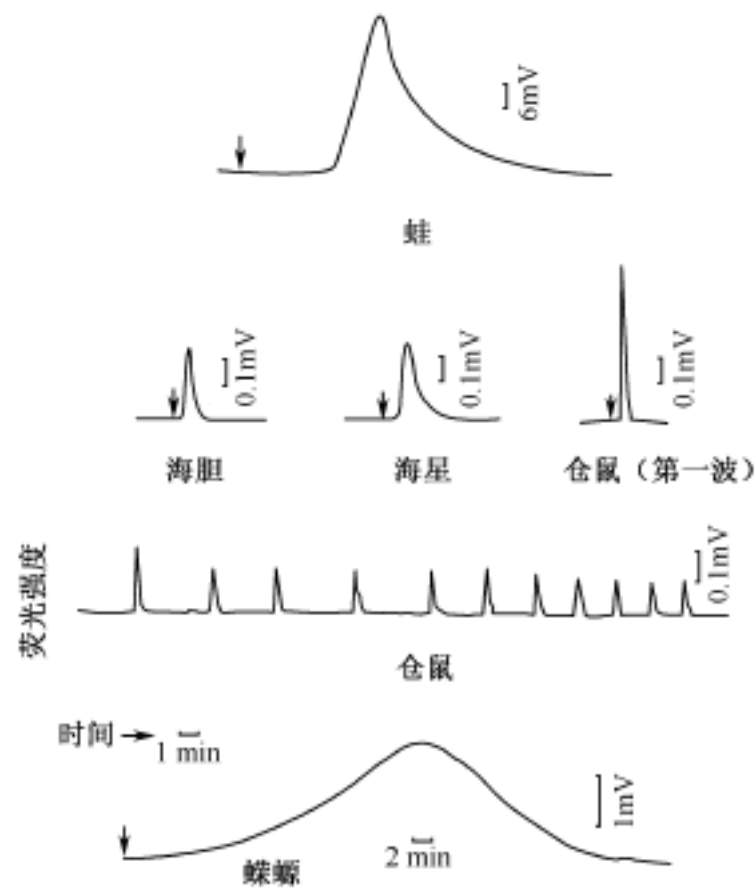


图 5-10 不同动物卵子受精后的 Ca^{2+} 信号 (引自 Tarin JJ 和 Cano A, 2000)

箭头指精子入卵时间； Ca^{2+} 信号一般持续 1 分钟。

Ca^{2+} 振荡是 Ca^{2+} 信号的时间特性，受精后 Ca^{2+} 信号的变化还具有空间分布特性。受精后第一次 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是从精子入卵处发生的，然后以波的形式传遍整个卵子，这种现象称为钙波 (calcium wave)。第二次和第三次 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高也以波的形式传播，

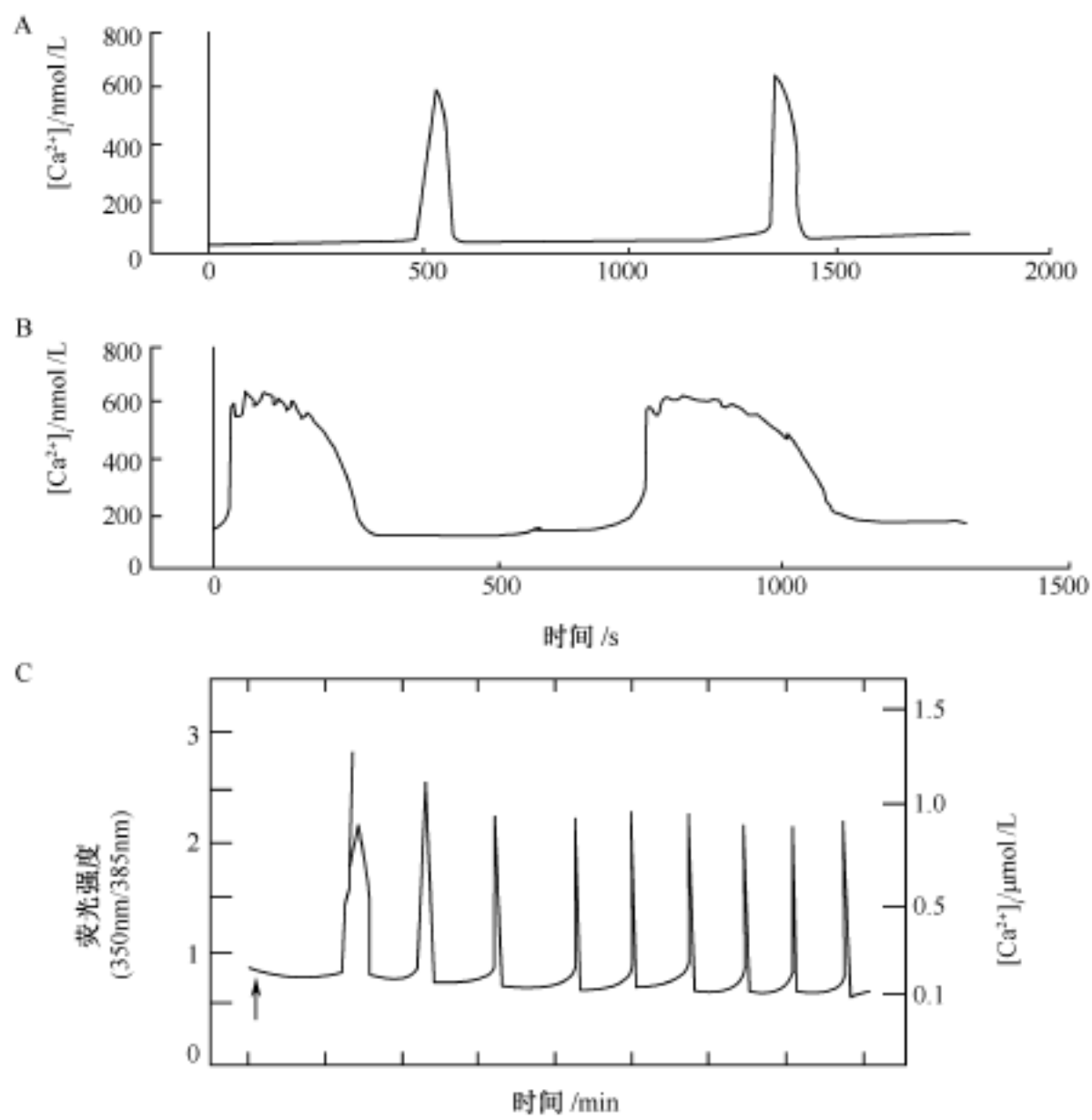


图 5-11 小鼠和猪精子穿入卵子后 Ca^{2+} 振荡 (引自 Kline D 和 Kline J, 1992)

A, B: 猪卵子受精后 Ca^{2+} 振荡图。A: 精子穿入后 1.5h 的记录结果;
B: 精子穿入后 3.0~3.2h 的记录结果 (引自 Sun FZ 等, 1992); C: 小鼠精子穿入卵子后 Ca^{2+} 振荡图。

这两次 $[Ca^{2+}]_i$ 升高虽仍发生于精卵结合处，但发生的区域范围均比第一次大。此后的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的发生都始于整个卵子的大部分区域，并且可以在 1s 之内传遍整个卵子。因此，受精过程的第一次 $[Ca^{2+}]_i$ 升高始于精卵结合处，经过 3~5 次再次升高后，转变为整个卵子同步发生的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高变化。这是哺乳动物卵子受精 Ca^{2+} 变化的特点之一。

2. 细胞内 Ca^{2+} 储存

静息状态的细胞，细胞浆中 $[Ca^{2+}]_i$ 维持在较低的水平，通常为 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ mol/L，而细胞外和胞内钙库 Ca^{2+} 浓度高达 10^{-3} mol/L。当细胞受到外界信号刺激时， $[Ca^{2+}]_i$ 迅速升高 1~100 倍。内质网是细胞内主要的 Ca^{2+} 库，当信号传来时，通过与三磷酸肌醇 (IP₃) 受体或植物碱 (ryanodine) 受体作用，介导 Ca^{2+} 释放到胞质中。这些受体通常定位于内质网。卵子受精时，钙振荡的 Ca^{2+} 来自胞内 Ca^{2+} 库，但胞外 Ca^{2+} 对 Ca^{2+} 振荡的维持是必需的，因为在无 Ca^{2+} 的溶液中受精， Ca^{2+} 振荡只能维持较短时

间。

3. 胞内 Ca^{2+} 信号的产生

(1) IP_3 诱导的 Ca^{2+} 释放 (IP_3 -induced Ca^{2+} release, IICR)

IP_3 诱导的 Ca^{2+} 释放具有“全或无”的特性，即在一定范围内 IP_3 量的增加并不能改变钙库内释放出的钙量，只有 IP_3 的剂量达到某个阈值时，才起作用。 IP_3 诱导 Ca^{2+} 释放是通过作用于内质网上的 IP_3 受体而实现的。 IP_3 与其受体结合后，诱导钙通道打开。在哺乳动物，如金黄地鼠、小鼠、兔和牛等，卵子受精时钙波和钙振荡的产生、传播以及卵子活化都是由 IP_3 介导的。有一种模型认为， IP_3 诱导产生的 Ca^{2+} 作为新的信号刺激 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放 (CICR)，产生钙波；另一种模型认为， IP_3 刺激 Ca^{2+} 释放， Ca^{2+} 反过来又激活磷脂酶 C (PLC)，从而增加 IP_3 的量，使 Ca^{2+} 进一步释放形成钙波。

(2) 植物碱诱导的 Ca^{2+} 释放 (Ryanodine-induced Ca^{2+} release, RyCR)

胞内另一种重要的 Ca^{2+} 通道是植物碱受体 Ca^{2+} 通道。在海胆和小鼠卵子内已检测到植物碱受体的存在。纳摩尔级的植物碱可使通道开放，但毫摩尔级以上的植物碱则使通道关闭。海胆卵子中同时存在 IP_3 敏感钙库和植物碱敏感钙库，所以 IP_3 受体和植物碱受体都对钙波的产生和传播起作用。过去认为哺乳动物卵子钙波以及钙振荡的产生和传播是由 IP_3 / IP_3 受体介导的钙释放引起的，最近在小鼠和牛卵子中也发现了植物碱受体，并证明植物碱或其类似物可激发 Ca^{2+} 释放。

(3) Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放 (Calcium-induced calcium release, CICR)

植物碱受体和 IP_3 受体都会对少量 Ca^{2+} 发生反应，即少量 Ca^{2+} 作用于两种受体后便可触发 IP_3 敏感钙库和植物碱敏感钙库内储存 Ca^{2+} 的释放，具有 CICR 的正反馈效应。正反馈作用可以加强开始阶段的 Ca^{2+} 释放，但是这种效应会随 Ca^{2+} 释放量的增加而被减弱，这是由于大量释放出来的 Ca^{2+} 激活了胞内负反馈效应。

(三) pH 变 化

海胆卵受精后，卵内除 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 发生巨大变化外，pH 也显著升高。海胆卵受精后 pH 从 6.9 上升为 7.3，且维持碱性达 60min。pH 升高具有广泛的作用，包括增加 DNA 复制和转录、增强蛋白质合成和糖原利用、促进精核染色质去浓缩和原核形成等。哺乳动物这方面的报道很少。最近有报道称，小鼠和大鼠卵子受精后，pH 无变化。猪卵子孤雌激活后，pH 明显升高。pH 的升高不依赖于胞内或胞外 Ca^{2+} 的升高，而与钠离子和/或碳酸盐流入卵子有关。然而，透明带下授精后猪卵子中并没有出现 pH 的升高。

(四) 卵子激活过程中的代谢变化

卵子在激活过程中发生明显的生理变化，如氧气的吸收和能量代谢、DNA 的复制、

转录和翻译以及脂代谢等都发生变化。例如，海胆卵受精前糖原富集，但糖代谢中间产物和磷酸己糖水平较低，受精后 6-磷酸葡萄糖水平升高 7 倍，随后耗氧量增加；鱼和两栖类卵子受精后耗氧量没有变化；小鼠卵受精后对核苷酸的吸收率明显增加，且对不同的核苷吸收增加程度不同，受精后对腺苷的吸收率是尿苷的 350 倍，从受精卵到囊胚，腺苷的吸收增加 20 倍，而同一时期尿苷的吸收增加了 300 倍。

(五) 受精后的基因活动变化

受精的发生启动早期胚胎快速的细胞分裂和细胞分化，在这一过程中基因表达发生了变化，新的蛋白质在特定的时间和特定的细胞内合成。新的蛋白质合成或由母源 mRNA 或由合子基因组新转录的 mRNA 指导。

1. DNA 复制

卵子活化后发生的最重要的事件是启动 DNA 复制。受精前的卵子具备了 DNA 复制所需的全部酶系统和四种脱氧核糖核苷酸原料，受精后酶与底物得以接触。小鼠、兔等哺乳动物 DNA 复制发生在雌雄原核彼此靠近的过程中。DNA 的复制同时发生在雌、雄原核中。在多精受精卵中，所有原核同时启动 DNA 复制。

2. RNA 转录

所有动物的早期胚胎都进行活跃的蛋白质合成，但在不同种动物中 mRNA 转录启动的时间是不同的。在蛙类，卵裂期间没有 mRNA 转录，直到原肠胚中期，mRNA 才开始转录。海胆原肠胚以前蛋白质的合成也是依赖于母源 mRNA。而在小鼠，受精后母源 mRNA 很快失去作用，从 2-细胞胚胎开始，蛋白质的合成就由合子基因组指导。把外源基因注射到小鼠受精卵的雄原核中，发现注射的 DNA 在原核中可转录并加工，说明小鼠 1-细胞胚胎即可进行 mRNA 转录。

3. 蛋白合成

卵子在受精前积累了大量供早期胚胎发育所需的 mRNA，受精后这些母源 mRNA 开始翻译。海胆卵受精后蛋白质合成增加 100 倍。爪蟾和小鼠卵子受精后，蛋白质合成量增加不超过 5 倍。受精后不仅蛋白质合成量明显增加，新的蛋白质也开始合成。在小鼠 1-细胞胚胎中，合成未受精卵中合成的主要蛋白，但受精后的蛋白质合成模式与未受精卵中的蛋白质合成模式明显不同。例如，小鼠卵受精后，至少出现了五种新蛋白质。蛋白质的变化也可能是由蛋白质磷酸化和糖基化造成的。

(六) 受精后的蛋白激酶活性变化及其意义

在过去的十余年中，借助于对细胞周期调控研究所取得的成果，再加上生化分析和分子生物学技术与经典胚胎学的结合，人们开始在分子水平上了解受精的信号传递途径。多种蛋白激酶通过磷酸化/去磷酸化的级联活化/灭活，以及对胞内效应靶分子的作用

用，精密调节着受精过程中的细胞周期事件。由于海胆、海星等海洋无脊椎动物和非洲爪蟾等低等脊椎动物的卵母细胞体积较大，数量较多，具有更好的体外可操作性，因此有关受精信号转导的工作首先在这些动物中展开。近年来，在哺乳动物方面也开展了大量工作，下面介绍几种重要的蛋白激酶在受精后的变化及其生物学意义。

1. 成熟促进因子

成熟促进因子 (maturation-promoting factor, MPF) 是各种真核细胞中有丝分裂和减数分裂 G_2/M 转化通用的关键调节因子。MPF 是由 $p34^{cdc2}$ 和细胞周期蛋白 (cyclin) B 组成的异二聚体。 $p34^{cdc2}$ 是由细胞分裂周期 (cell division cycle, CDC) 基因 $cdc2$ (人) 或 $cdc28$ (酵母) 编码的 34kDa 的丝/苏氨酸蛋白激酶，为 MPF 的催化亚基；周期蛋白 B (45kDa) 为 MPF 的调节亚基，在细胞周期进程中被周期性地合成和降解。细胞在 G_2/M 转化前，CDC2 与周期蛋白 B 形成 MPF 聚合体，细胞中的 Wee1 及 Myt1 激酶将 CDC2 的 Thr¹⁴ 和 Tyr¹⁵ 残基磷酸化，使 MPF 以低活性的 MPF 前体形式存在。细胞进入分裂期时，CDC25 将 CDC2 的 Thr14 和 Tyr15 去磷酸化，从而激活 MPF，于是细胞进入 M 期。MPF 被激活后，通过与 CDC25 或 Wee1 及 Myt1 形成的反馈环，进一步被激活。

MPF 活性在卵母细胞减数分裂成熟和受精过程中发生规律性变化 (图 5-12)。MPF 活性在 MII 期卵子中处于激活状态，对维持 MII 期阻滞具有重要作用。CSF 阻止泛素依赖的周期蛋白 B 降解，并因此使 MPF 维持活性状态。在所有已研究过的动物物种中，将卵母细胞从细胞周期的阻滞状态释放出来，并在进化上非常保守的激活物主要是细胞内自由 Ca^{2+} 。 Ca^{2+} 使 CSF 和 MPF 失活并将卵母细胞从中期阻滞状态释放出来，但其机制至今仍不清楚。当停滞在 MII 期的卵子受精或受到孤雌刺激以后，MPF 很快灭活，周期蛋白 B 被降解。例如，小鼠卵受精后 90min，MPF 活性下降到最低。MPF 活性下降可能与减数分裂恢复和第二极体释放有关，而与原核发育没有关系。受精卵原核核膜破裂后，在第一次有丝分裂纺锤体组装时，MPF 又重新被激活，MPF 激活是第一次有丝分裂的前提。早期胚胎卵裂过程中，MPF 周期性地被激活和灭活，即在细胞周

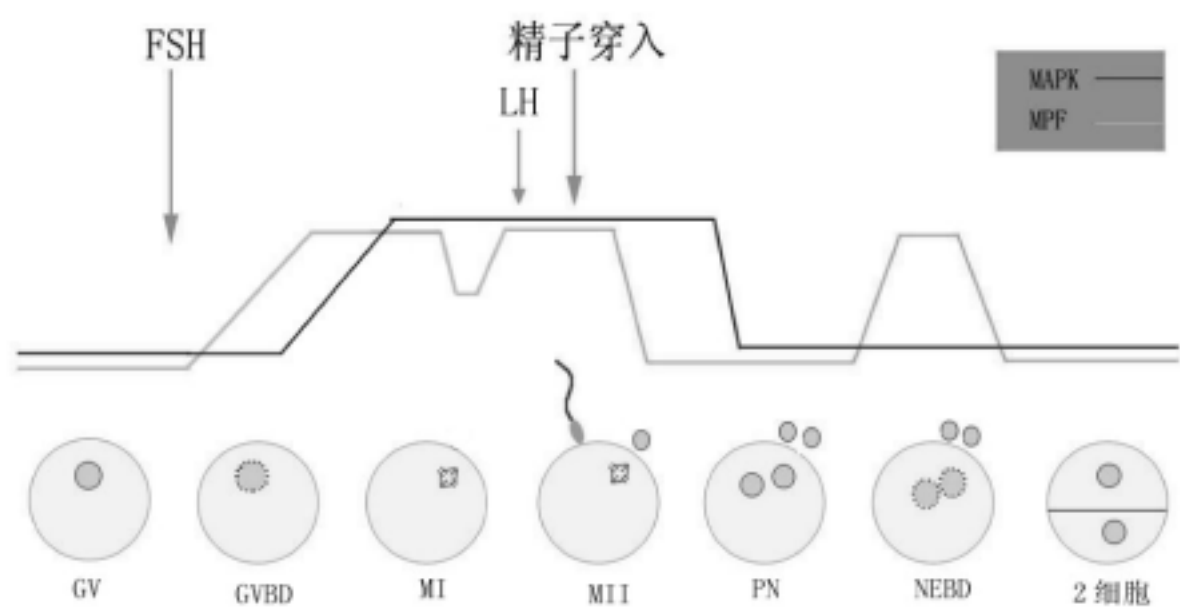


图 5-12 哺乳动物卵母细胞减数分裂和受精过程中 MPF 和 MAPK 活性变化比较

期的间期被灭活，而在中期被激活，从而保证正常的卵裂。

2. 丝裂原活化蛋白激酶

丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）是丝/苏氨酸蛋白激酶，在卵母细胞减数分裂和受精过程中，其活性受蛋白激酶和蛋白磷酸酶的调节。MAPK 激活依赖于 Thr 和 Tyr 两个位点的磷酸化，而其灭活则是在蛋白磷酸酶作用下去磷酸化实现的（图 5-13）。MAPK 的活性受到其上游分子 MAPK 激酶（MAPKK，MEK）的调节。MOS 被证明是 MAPKK 的上游分子，是 MAPKK 激酶（MAPKKK）。在 MAPK 家族中分布最广的是 44kDa（ERK1）和 42kDa（ERK2）两种亚型，它们是卵母细胞减数分裂的重要调节激酶，其活性变化规律与 MPF 不同（图 5-12）。MAPK 的下游作用底物是 S6 激酶，主要是 p90rsk。MAPK 通过使 p90rsk 磷酸化而使其激活。MAPK 级联活性调节在减数分裂和受精过程中发挥重要作用（图 5-13）。

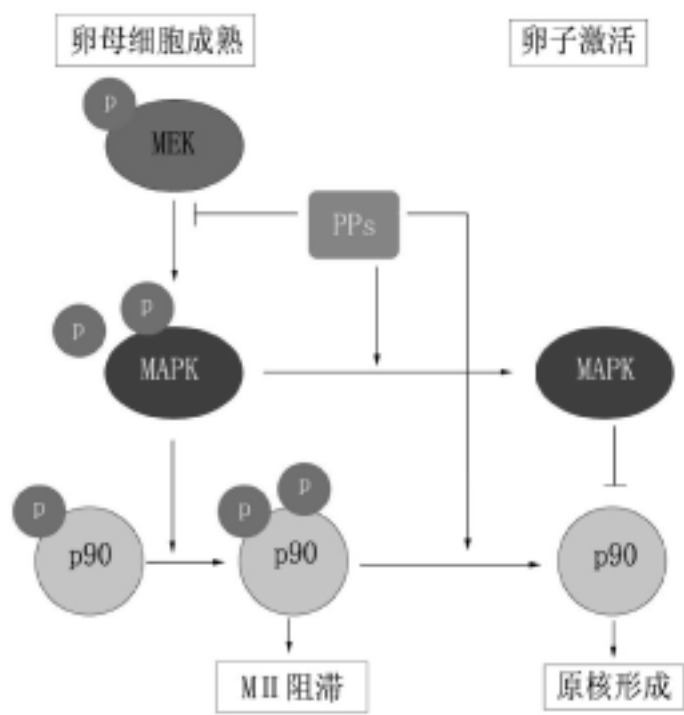


图 5-13 卵母细胞减数分裂和受精过程中 MAPK 级联活性调节

原癌基因 c-mos 基因敲除的小鼠卵母细胞排卵后并不停滞在 MII 期，而是发生自发的孤雌激活。当把小鼠和猪的卵母细胞用 MAPKK 抑制剂处理以后，MAPK 及其下游分子 p90rsk 都发生灭活，导致卵母细胞激活。这说明 MOS/ MAPKK/ MAPK/ p90rsk 信号通路可能在维持 MII 期阻滞中起重要作用。各种动物 MII 期卵子中 MAPK 活性水平很高，受精后 MPF 的活性迅速降低，但 MAPK 活性的降低发生在原核形成稍前或同时，并且在其后的细胞周期中不再出现（图 5-12）。例如，在小鼠，MAPK 活性完全消失发生在授精后 7~8h，而猪卵子受精后 MAPK 活性在 10h 降低。当用多种化学试剂如乙醇、钙离子载体 A23187、蛋白激酶抑制剂 staurosporine、Ro-31-8220 和蛋白合成抑制剂放线菌酮等诱导小鼠卵母细胞孤雌活化时，原核形成之前 MAPK 都迅速失活。显然，MPF 和 MAPK 的失活是通过不同机制实现的，它们在受精中的作用也不同。那么，MAPK 在卵子激活过程中的作用又如何呢？由于 MAPK 活性下降在时间上与原核核膜形成一致，在研究原核发育机制时自然就想到 MAPK 的作用。上述研究结果暗示，

MAPK 可能是抑制核膜形成的一个因素，它的失活是受精后原核核膜组装的前提，这与 MAPK 在减数分裂其他阶段的功能相一致。

当用蛋白磷酸酶 1 和 2A 的抑制剂冈田酸 (okadaic acid) 处理受精后的卵子，可阻止 MAPK 活性下降和原核形成；用冈田酸处理已形成原核的受精卵可导致 MAPK 快速重新激活，同时原核核膜破裂。这些实验为 MAPK 参与原核核膜的破裂和重建的假说提供了证据。在小鼠卵内导入 MEK 基因，可使 MAPK 持续表达，受精后 MPF 活性下降，细胞恢复减数分裂并释放第二极体，但内源性 MAPK 活性保持高水平，原核核膜不能形成。这进一步证实了 MAPK 在原核发育中起重要作用。

MAPK 失活是各种特异性磷酸酶作用的结果，但到目前为止尚未在哺乳动物中发现 MAPK 的特异性磷酸酶，虽然 PP1 和 PP2A 抑制剂冈田酸能阻止 MAPK 失活，但不能以此断定是这两种磷酸酶负责 MAPK 的灭活，可能有某些尚未发现的冈田酸敏感的蛋白磷酸酶在调节 MAPK 活性中发挥关键作用。

最近有人发现，在海胆、海星、蛤等海洋无脊椎动物中，抑制卵母细胞中的 MAPK 活性，会导致受精后精子星体提前形成，所以 MAPK 是在受精后抑制精子星体的发育。猪受精卵中，由精子中心体组装成的大量微管，对于雌雄原核相互靠近发挥重要作用，并且这些微管的聚合是在 MAPK 活性很低的情况下发生的。如果用冈田酸处理已形成原核的受精卵，则在 MAPK 激活和原核消失的同时，精子中心体组装的微管也解聚。这些实验证据表明，MAPK 可能参与受精后精子中心体的功能调节。

3. 蛋白激酶 C

蛋白激酶 C (PKC) 是一类广泛分布在各种真核细胞中的丝/苏氨酸蛋白激酶超家族，共有 11 种亚型，分为 3 大类：①经典型 PKC (classical PKC, cPKC)，包括 α 、 β I、 β II 和 γ 4 种亚型，其活性依赖于 Ca^{2+} 和二酰基甘油 (DAG)；②新型 PKC (novel PKC, nPKC)，包括 δ 、 ϵ 、 θ 、 η 和 μ 5 种亚型，其激活是 DAG 依赖性的，但不需要 Ca^{2+} ；③非典型 PKC (atypical PKC, aPKC) 包括 λ 、 τ 和 ζ 两个亚型。aPKC τ 是人细胞中与小鼠 aPKC λ 相同的蛋白质。aPKC 不受 Ca^{2+} 和 DAG 调节，可被一些脂类第二信使如磷脂酸所活化。近年来发现一些蛋白质分子特异性地与 aPKC 的调节区相结合，调节着 aPKC 的活性状态。所有 PKC 亚型都只具有一条肽链，分子质量 70~90kDa。未活化的 PKC 通常分布在细胞质中，活化后转位到细胞膜上，磷酸化其靶蛋白。在受精过程中，精子通过与卵子表面的精子受体结合，或者向卵胞质中释放一种可溶性精子因子而激活卵子。卵子的活化既包括早期事件，如皮质反应和多精受精的阻止，也包括晚期事件，如减数分裂的恢复和完成及有丝分裂细胞周期的启动。许多研究表明， Ca^{2+} 介导卵子的皮质反应和减数分裂恢复，但是钙信号的靶分子还不十分清楚。目前认为，PKC 可能是卵子活化过程中 Ca^{2+} 的重要下游分子。

近年来，已在小鼠、大鼠和猪的卵子中发现不同亚型 PKC 的存在。在小鼠卵母细胞发现有 PKC α 、 β I、 β II、 γ 、 δ 、 μ 、 ξ 和 λ 的存在；在大鼠卵母细胞发现有 PKC α 、 β 、 ϵ 、 γ 、 δ 、 μ 、 ξ 和 λ 的存在；在猪卵母细胞发现有 PKC α 、 β I 和 γ 的存在；卵母细胞减数分裂成熟和受精过程中，发生 PKC 的转位。例如，在 PKC 激活时，某些 PKC 亚型很快转位到质膜上，某些 PKC 亚型定位于受精卵的原核中。关于 PKC

在受精以后对卵子细胞周期的调节作用，目前存在着许多相互矛盾的报道。有些研究者证明，PKC 的激活剂，如 TPA、PMA、OAG 等，能够诱导小鼠和大鼠卵母细胞发生孤雌激活；但也有人报道，在小鼠、大鼠和地鼠卵母细胞中，PKC 在减数分裂恢复过程中并不起决定性作用。PKC 诱导的卵母细胞孤雌激活可能受到卵龄的影响，当卵母细胞排出第一极体以后，随着卵龄的延长，卵对活化刺激的敏感性逐渐增强，即卵龄越长，越容易被诱导形成原核。而且，PKC 在卵子活化中的作用可能与动物种属和品系有关，不同物种，甚至不同的小鼠品系，对 PKC 激活剂的反应不同。例如，PKC 激活剂 PMA 不能诱导猪卵母细胞发生孤雌活化，中国研究者常用的昆明小鼠对 PKC 激活剂相对不敏感。

有人提出，在哺乳动物卵子中， Ca^{2+} 浓度升高可以通过激活 PKC，进而导致卵子克服 MII 期阻滞。有两类证据支持上述观点：首先，用各种 PKC 激活剂处理小鼠、大鼠和仓鼠卵子，可以在不影响胞内钙离子浓度的情况下诱导卵子向间期转化；其次，在这些动物中，分子结构上不相关的几种 PKC 抑制剂都能抑制由不同孤雌刺激所诱导的孤雌活化。用 PKC 激活剂 OAG 处理小鼠卵子，可以使 MPF 活性迅速降低，卵子向减数分裂后期转变，而此时细胞内 Ca^{2+} 浓度不发生显著变化；正常情况下，钙离子载体 A23187 可以通过增加细胞内游离钙离子浓度来诱导 MPF 降解和卵子的孤雌激活，但是如果抑制了卵子内的 PKC 活性，A23187 虽然仍可导致胞内 Ca^{2+} 浓度升高，但不再能够使 MPF 降解并诱导孤雌活化。这些结果表明，PKC 的激活是诱导小鼠卵子突破 MII 期阻滞的必要条件，并且受精后钙离子释放所引发的 MPF 降解途径是 PKC 依赖性的。目前， Ca^{2+} 通过何种途径大量激活 PKC 还不十分清楚。一种可能是， Ca^{2+} 激活对钙离子浓度敏感的磷脂酶 C，导致生成 DAG，进而激活 PKC；另外，在小鼠卵母细胞中，多功能的钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calmodulin-dependent protein kinase II, CaM KII) 可能参与 Ca^{2+} 引发的 PKC 活化，因为很多证据表明，在小鼠卵母细胞减数分裂过程中，CaM KII 是钙离子的一种直接靶分子。

在非洲爪蟾卵子中，PKC 虽然在卵子活化的多种事件中发挥作用，但却不参与导致 MPF 降解的信号转导过程。所以在小鼠和两栖类的卵母细胞中，PKC 对 MPF 的调节机制可能是不同的，而且，在哺乳动物卵子中，PKC 的激活是否是生理条件下卵子活化所必需的一个步骤，将是一个有待研究的重要问题。

孙青原等研究表明，PKC 和 MAPK 这两种重要的信号分子不但在卵母细胞成熟过程中存在对话，还共同参与对卵子活化的调节。已知 MAPK 是细胞静止因子 (CSF) 的重要成分，维持卵子的 MII 期阻滞。在大鼠和小鼠卵子中都发现，PKC 的激活诱导 MAPK 失活并导致原核形成。在大鼠卵子中，PKC 激活剂 PMA 和 diC8 均能剂量依赖性地诱导 MAPK 失活和原核形成，而且 PKC 激活剂的作用可以被 PKC 抑制剂钙感光蛋白 C 或星形孢菌素所克服。另外，即使在正常的体外受精过程中，上述两种 PKC 抑制剂也能抑制精子诱导的原核形成和 MAPK 失活。这些结果都表明在大鼠受精过程中，精卵结合可能激活 PKC，克服 MII 期阻滞，PKC 再通过某些未知途径，诱导 MAPK 失活，从而使卵子形成原核。

PKC 激活以后是如何导致 MAPK 失活的呢？目前已经知道，丝/苏氨酸蛋白磷酸酶-2A (PP-2A) 能够使 MAPK 及其上游激酶 MEK 去磷酸化而失活，并且已经在小鼠

卵子中检测到 PP-2A 的表达。孙青原等也证明蛋白磷酸酶在猪卵母细胞中参与调节 MAPK 活性, 蛋白磷酸酶活性受到抑制后, 卵母细胞中 MAPK 活性迅速升高。在大鼠和小鼠 MII 期卵子中, PKC 诱导的 MAPK 失活和原核形成可以被 OA 所抑制。这些结果暗示着 PKC 可能通过激活 PP-2A, 导致 MAPK 的去磷酸化, 使卵子形成原核。

PKC 激活的另一个重要功能是激发卵子的皮质反应, 从而阻止多精受精的发生, 这部分内容将在第八节中详细总结。

4. 钙调蛋白依赖蛋白激酶

钙调蛋白依赖蛋白激酶 (calmodulin-dependent protein kinase, CaMK) 是由多种结构相关的丝氨酸/苏氨酸激酶组成的超家族, 包括 CaMKI、CaMKII 和 CaMKIV。CaMKII 是一种广泛表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 被 Ca^{2+} 和钙调蛋白激活, 参与对细胞周期和转录的调节。CaMKII 有 α 、 β 、 γ 和 δ 四种亚型, 分子质量范围从 52kDa (α) 到 58~61kDa (β , γ 和 δ)。两栖类和哺乳动物模型的研究结果表明, CaMKII 依赖的信号途径调节卵母细胞减数分裂的进程。

爪蟾卵母细胞激活后, 可以检测到早期 CaMKII 短暂的激活。当在卵抽提物中添加 Ca^{2+} 后, CaMKII 活性显著增加, 在时间上也早于因周期蛋白 B 降解而导致的 MPF 活性下降。向 MII 阻滞的爪蟾卵母细胞中显微注射持续活化的 CaMKII 能使 MPF 失活, 并触发 MOS 降解。但在未受精的爪蟾卵母细胞中显微注射 CaMKII 抑制肽后, 这些卵母细胞在电刺激后则不能进行周期蛋白 B 降解和 Cdc2 激酶及 CSF 失活; 而没有显微注射 CaMKII 抑制肽的对照组卵母细胞则能够进行周期蛋白 B 降解和 Cdc2 激酶及 CSF 失活。这些结果说明 CaMKII 介导了受精或卵激活后 Ca^{2+} 依赖的 MPF 和 CSF 失活。然而 CaMKII 诱导 MPF 和 CSF 失活的机制仍有待于进一步研究。

与爪蟾卵母细胞及其抽提物中的研究结果类似, 小鼠和猪卵母细胞中 CaMKII 也在细胞内 Ca^{2+} 浓度升高后活性增加。猪卵母细胞经电刺激 15min 后, CaMKII 活性急剧增加, 而 CaMKII 抑制剂 KN-90 抑制卵子的激活。增加细胞内 Ca^{2+} 浓度的处理能导致卵母细胞激活, 这是钙调蛋白和 CaMKII 依赖的过程。钙调蛋白广泛分布于未受精小鼠卵母细胞中, 在靠近卵母细胞外围以及减数分裂纺锤体部位有所增加。卵母细胞受精后钙调蛋白立刻与 CaMKII 形成紧密的联系结构。在卵母细胞转换到后期 II 的时候这种紧密的联系结构消失, 但 CaMKII 仍位于纺锤体上。此外, 在后期 II 到末期 II 之间的时期 CaMKII 定位于纺锤体中区。猪卵母细胞中, CaM 和 CaMKII 都分布于纺锤体上, 电激活后 2h, CaMKII 分布在第二极体排出处的中心体上。

利用激光共聚焦显微技术, 可以观察到 MAPK 和 CaMKII 共同定位于减数分裂的纺锤体上, 暗示这两种分子之间存在非常密切的相互作用。还有一些证据支持这种推测, 如卵母细胞激活后抑制 CaMKII 活性则可减少 MAPK 蛋白量, 并降低 MAPK 活性; 在猪卵母细胞电激活后, 采用 KN-93 抑制 CaMKII 活性, MAPK/ p90rsk 在 15min 后即发生灭活, MAPK/ p90rsk 蛋白量 30min 后即明显下降。因为 CaMKII 活化是受精后的结果, 所以可能对 MAPK 活性的继续维持具有一定作用, 而这两种蛋白激酶在定位上的一致性可能有助于它们的相互作用和调节。受精后 Ca^{2+} 升高, 激活 CaMKII, 可能具有双重作用, 一方面灭活 MPF, 另一方面维持 MAPK 活性, 使减数分裂有序完成

(图 5-14)。

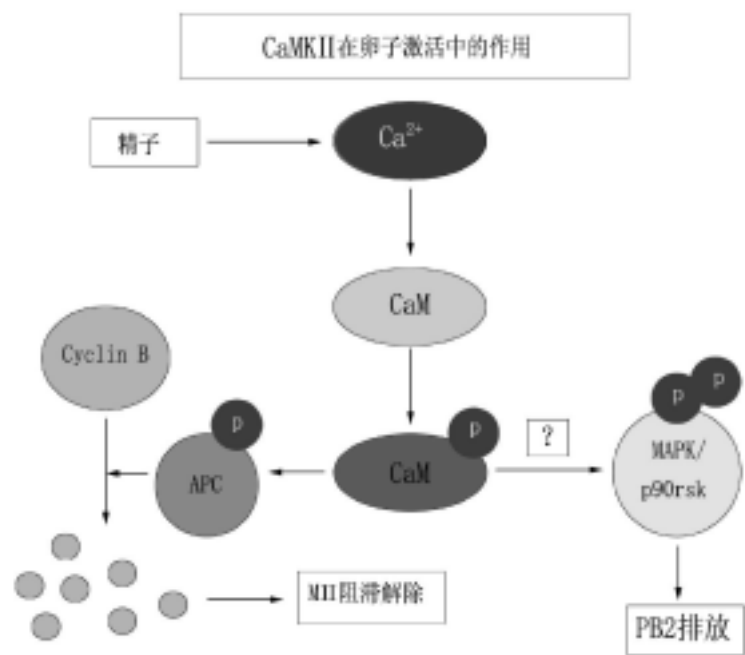


图 5-14 受精后 Ca^{2+} 升高激活 CaMKII 的通路及其作用

此外，CaMKII 活性对卵子中心体复制的每一次启动都是必需的。在阻滞于 S 期的爪蟾卵母细胞抽提物中，中心体复制发生在精子核进入之后，细胞内短暂的 Ca^{2+} 浓度升高是中心体复制启动所必需的。同时，CaMKII 活性的峰值也出现在中心体复制期。向体外中心体复制系统中添加 CaMKII 底物抑制肽后可以抑制中心体复制。

5. 酪氨酸蛋白激酶

酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase, TPK) 是特异性磷酸化蛋白质酪氨酸残基的蛋白激酶，分为两大类，即受体 TPK 和非受体 TPK。在爪蟾卵母细胞中已经发现了 TPK 的 5 个成员：c-Src、c-Yes、Fyn、Lallo 和 Xyk。在大鼠卵母细胞中发现了 Fyn 的存在。在卵子受精一分钟以内，许多蛋白质分子的酪氨酸残基被磷酸化或去磷酸化，而 TPK 专一性抑制剂可以阻止受精引发的卵子活化。

人工合成的 RGDS 四肽可以诱导卵子孤雌活化、酪氨酸残基磷酸化并从质膜转位到胞质中，向卵内显微注射 Xyk 抑制肽会抑制受精和 RGDS 诱导的卵子活化。在注射了 Xyk 抑制肽的卵子中，精子穿卵和减数分裂恢复也被阻断。免疫荧光研究表明 Xyk 只存在于卵皮质中，说明 Xyk 可以在精卵结合点的附近发挥作用。钙离子载体 A23187 也可以诱导爪蟾卵子活化，但在此过程中 Xyk 不被激活；反之，Xyk 抑制肽也不能阻断 A23187 诱导的卵子活化，这进一步表明 Xyk 调节着钙信号上游的卵子活化早期事件。

目前，还没有发现与精子结合并活化胞质 TPK 的卵子表面受体分子。对于精子受体的本质目前有两种推测，可能它本身就是一种 TPK，由精子配体激活，并像许多生长因子受体一样通过受体 TPK/ Src 激酶途径，活化诸如 Xyk 的下游胞质 TPK。目前发现在卵子中表达的受体 TPK 有胰岛素受体、成纤维细胞生长因子受体和 c-Kit。另一种可能是，精子受体本身不具有激酶活性，它像 T/ B 淋巴细胞受体、G-蛋白偶联受体和

整合素受体一样，通过非催化性质的相互作用激活胞质 TPK。RGDS 四氨基酸序列是整合素与其受体识别和结合的关键肽段。在小鼠卵子中发现， $\alpha 6 / \beta 1$ 整合素可能是一种精子受体，RGDS 四肽还能引起爪蟾卵母细胞中 Src 家族 TPK 的活化和转位，因此目前的资料似乎更支持后一种假说。

Src 家族的另一个成员 Fyn 在哺乳动物、两栖动物和棘皮动物的卵子中都有表达。Fyn 被定位在卵皮质和纺锤体微管周围。Fyn 和大多数 Src 家族成员一样，通过 U、SH2 和 SH3 结构域进行与酶功能密切相关的蛋白质-蛋白质相互作用。向海胆卵中注射 Fyn 的抑制肽会延长精卵融合所诱导的 Ca^{2+} 释放的潜伏期，并且使钙振荡的幅度降低，于是卵子不能建立阻止多精受精的屏障，导致多精入卵率增加。磷脂酶 $\text{C}\gamma$ (phospholipase $\text{C}\gamma$, $\text{PLC}\gamma$) 是 TPK 调节卵内 Ca^{2+} 水平的重要靶分子，具有 SH2 结构域，可以被 Src 家族 TPK 结合并活化。在海胆卵中 Fyn 与 $\text{PLC}\gamma$ 形成复合物并活化 $\text{PLC}\gamma$ ，激活磷脂酰肌醇信号通路，引起卵内 Ca^{2+} 释放。

二、精子激活卵子的两个模型

一百多年来，精子是如何激活卵子的问题一直困扰着生殖和发育生物学家，经过反复探索，人们提出了几种假说。目前，两种假说得到绝大多数学者的支持，即受体假说和精子因子假说。

(一) 受体控制假说

该假说源于对体细胞信号转导通路的认识，即精子与卵子质膜表面的受体相互作用，活化的受体激活与之相偶联的 G 蛋白或酪氨酸蛋白激酶，后者进一步激活 PLC，在 PLC 的作用下，产生引起 Ca^{2+} 动员的第二信使 IP_3 ，它与细胞内质网上的 IP_3 受体作用，诱发内源钙的释放，从而激活卵子。根据这一假说，卵子质膜表面应该存在能与精子上某种配体识别和结合的受体，这在上一节中已作了介绍。受体被精子活化后，激活磷脂酰肌醇信号通路。有很多证据支持这一假说，如已在精子质膜上发现了与卵子质膜受体相应的配体；也发现了卵子中存在通过 G 蛋白介导的信号通路。

(二) 精子因子假说

虽然受体控制假说在一定程度上解释了受精时卵子活化的信号转导机制，但有许多实验结果与之矛盾，因此这一假说受到挑战。于是，另一些学者提出精子因子假说。该假说认为：精子胞质中存在某种或某几种可溶性信号分子，在精卵质膜融合或稍后，该信号分子通过融合孔进入卵子胞质中，从而激活卵子内钙释放系统而使卵子活化。支持该假说的有利证据是，把精子直接注射到卵子中，不经过精卵膜的相互作用，也可以引发卵质中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高；另一个证据是，把精子提取物注射入卵子中，可导致持久的 Ca^{2+} 振荡。然而，迄今为止还没有分离到这种假设的可溶性精子因子。在仓鼠精子中发现了一种可溶性的 33kDa 的蛋白，命名为震荡因子 (oscillin)，它定位于精子赤道段，

可激发卵子内 Ca^{2+} 振荡。有人提出震荡因子可能与某个未知的新亚单位作用，而呈现出一种酶的活性。受精过程中，该酶参与的反应可能是 Ca^{2+} 释放的前提条件。但最近的研究基本上否认了震荡因子是精子因子的观点，原因是向卵子中注射重组震荡因子后，不能激活卵子。最近的研究发现，当把小鼠精子的膜去掉，使其不含可溶性精子因子，然后注射到卵子中，照样可激发 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高，而当把精子核周层去掉时， $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高不再出现。因此，精子核周层成分可能含有引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的因子。此外，也有人提出精子赤道素和胞质中 C-kit 也可能是激活卵子的精子因子。最新的研究发现了一种精子特异的 PLC δ ，可引起 Ca^{2+} 振荡。目前的研究表明，精子因子对热和胰蛋白酶敏感，它没有种特异性，但这种因子的生化本质及其激活卵子的信号通路还有待进一步研究。

精卵融合后，引发卵子 Ca^{2+} 释放的精子因子是瞬时释放还是逐渐释放的呢？这一问题的答案还不清楚。精子入卵后， Ca^{2+} 振荡可持续数小时，在大家畜可持续 10h，直到原核形成。研究发现，精子核的 Ca^{2+} 释放因子在受精后数小时仍然存在，原核形成时，部分结合到原核中。把雄原核和雌原核注射到 MII 期卵子中，仍可引起 Ca^{2+} 振荡。 Ca^{2+} 振荡的发生除了需要精子因子外，也需要相应的卵子“母源装置”，这种“母源装置”的性质还不清楚，但它只能一次性发挥作用。

第七节 精子核去浓缩及雄原核形成

在哺乳动物受精过程中精子入卵后，高度浓缩的精核染色质受卵子激发而去浓缩，最终形成雄原核是受精的关键步骤之一。受精后随着精卵质膜融合，精子核直接与卵胞质作用，发生核膜破裂，精子染色质去浓缩；与此同时，卵母细胞恢复减数分裂，排出第二极体。随后在去浓缩的雄染色质周围核膜重建，最后形成雄原核。

受精过程中精子核的去浓缩过程与精子发生精核浓缩化过程相反。哺乳动物圆形精子细胞核的组蛋白完全被精子特有的鱼精蛋白取代后，染色质变得高度浓缩。这种独特的浓缩包装方式保护了精核染色质，使得精子基因组处于无转录活性状态。受精后精子 DNA 要参与胚胎发育，它的染色质必须在卵内去浓缩。精核 DNA 去浓缩的第一步是减少和清除鱼精蛋白上的二硫键。当足够多的二硫键被清除后，精核染色质开始对卵内的去浓缩因子产生反应而发生去浓缩，与此同时鱼精蛋白逐渐被组蛋白取代。组蛋白重新取代鱼精蛋白是精子染色质重激活和原核 DNA 复制的前提。用放射自显影法或免疫荧光法均证明在精核去浓缩过程中鱼精蛋白逐渐移去。一种假说认为受精使鱼精蛋白磷酸化而发生电荷改变，从而使之移去。蛋白激酶抑制剂可阻止入卵后的小鼠精核去浓缩；受精后 1~2.5h，在精核去浓缩的同时，MAPK 活性升高。

处于 GV 期的卵母细胞不能使体外受精或显微注入的精核去浓缩，生发泡破裂 GVBD 后才获得该能力，成熟的 MII 期卵子使精核去浓缩的能力最强。在寻找精核去浓缩因子时，人们发现 GV 期卵母细胞中还原型谷胱甘肽 (GSH) 水平很低，在卵母细胞成熟过程中尤其在 GVBD 之后，GSH 大量合成，至 MII 期达到峰值。在卵母细胞成熟过程中抑制 GSH 合成，卵子使精核去浓缩的能力亦被抑制，说明在卵母细胞成熟过程中，GSH 水平逐渐升高是卵子获得使精核去浓缩能力所必需的，也就是说 GSH 参与

精核去浓缩过程。当然细胞内其他含巯基 (-SH) 的分子也可能参与鱼精蛋白二硫键的清除和精核去浓缩过程。一旦雌原核形成，卵子便失去使精核去浓缩能力，故在原核形成阶段进入的精核不能被去浓缩和重新激活。

原核形成时，内质网可能参与核膜的组建。精子的核膜和其他膜性成分也可能参与雄原核核膜的形成。

第八节 卵子皮质反应及多精受精的阻止

鸟类、鱼类及许多无脊椎动物是多精受精动物。在正常生理条件下，受精过程中可有多数精子入卵，卵子中形成多个雄原核，但最终只有一个雄原核与雌原核结合，完成正常的胚胎发育，而其他雄原核在发育中途退化。胎盘类哺乳动物是单精受精动物，受精时只需一个精子入卵，以保证合子重新恢复二倍体。如果一个以上精子入卵，通常会导致胚胎发育异常或发育阻滞，最终夭折。在人类，尽管有三倍体和四倍体婴儿出生的报道，但是在绝大多数情况下多精受精会导致自然流产。并且，多倍体婴儿通常有严重的缺陷或功能异常。与其他动物相比，猪的多精受精率很高，体内多精受精率可达到 30%~40%，而体外多精受精率可高达 65%。最近的研究表明，猪卵母细胞质具有一定的清除多余精子的能力，多精受精的卵子中有多个雄原核形成，但如果多余的精子不干扰正常的雌雄原核结合，胎儿能发育到期。当有多个雄原核与雌原核结合时，可形成二倍体、三倍体、四倍体胎儿，甚至有的胎儿中既有二倍体细胞，也有四倍体细胞，但生下来的小猪中未发现多倍体现象。绝大多数情况下，哺乳动物受精时，只有一个精子入卵，阻止多精受精的机制主要有两条：一条是雌性生殖道的初步筛选。尽管哺乳动物一次射出的精子数量可达数千万甚至上亿个，但最终通过生殖道达到受精部位的精子数量很少，通常精子数与卵子数比例不超过 10:1，只有那些活力相当好的获能精子才能到达受精部位，如小鼠一次排精大约 5 千万个，但真正到达输卵管受精部位的仅有 100~200 个。另一条是卵子本身具有强烈的阻止多精受精的能力。参与阻止多精受精的是卵子所特有的一种细胞器——皮质颗粒 (cortical granule, CG)。哺乳动物受精时，没有膜电位变化引起的快速阻止多精受精的机制。精子穿入卵子后，卵子皮质颗粒的内容物很快释放到卵周隙中，使透明带硬化；与此同时，精子膜与卵质膜融合，也改变了卵质膜的性质，从而达到阻止多精受精的目的。

一、皮质颗粒

(一) 皮质颗粒的形态及发生

皮质颗粒是大多数脊椎动物和无脊椎动物卵母细胞中的一种小的、圆形的、由膜包裹的细胞器。哺乳动物卵母细胞的皮质颗粒直径一般在 0.2~0.6 μm ，内含不同电子致密度的、均质的内容物。在小鼠、仓鼠及猪的卵母细胞中，有两种不同类型的皮质颗粒，即明粒和暗粒。

在不同动物中，皮质颗粒形成的时间不同。在小鼠及大鼠，皮质颗粒出现在由单层

卵泡细胞包围的初级卵泡卵母细胞中；而牛的皮质颗粒出现在由两层以上卵泡细胞包围的卵母细胞中；人、猴、仓鼠及兔卵母细胞皮质颗粒也是在次级卵泡阶段出现的。以后，随着卵母细胞的生长，皮质颗粒的数量不断增加。关于皮质颗粒的发生，许多研究者认为它来自于高尔基复合体。也有证据表明，皮质颗粒的发生与滑面内质网关系密切。

(二) 皮质颗粒的组成

关于低等动物皮质颗粒组成的资料很多，而哺乳类，由于采集大量的卵母细胞很难，且还未建立起分离皮质颗粒的方法，所以有关皮质颗粒组成的了解还不多，现已证明主要有以下几种成分。

1. 蛋白酶

20 世纪 70 年代的研究表明，当把分离到的小鼠及仓鼠卵透明带与体外受精后或电激活后仓鼠卵的皮质颗粒渗出液一起孵育时，透明带发生了变化，不再接受精子，并且这种作用是非种特异性的。然而，在胰蛋白酶抑制物 P-氨基苯脒或大豆胰蛋白酶抑制剂存在的条件下，透明带的这种变化就不发生了。上述实验说明，类胰蛋白酶是皮质颗粒的组成成分之一。大鼠卵母细胞体外受精或激活后，释放组织型纤溶酶原激活因子 (tPA)，该因子是一种把纤酶溶原转变为纤溶酶的丝氨酸蛋白酶。在含有未受精小鼠卵母细胞的培养液中，也可检测到 tPA 的活性。这表明，tPA 可能是皮质颗粒的组成成分，但这还需进一步用组织化学或细胞化学的方法证实。

2. 卵过氧化物酶

海胆卵母细胞受精后，皮质颗粒胞吐造成的受精膜硬化，参与多精受精的慢速阻止。受精膜的硬化是由皮质颗粒中的卵过氧化物酶作用引起的。在 H_2O_2 存在的条件下，用 3, 3'-二氨基联苯胺进行细胞化学显示表明，卵过氧化物酶也存在于小鼠卵母细胞的皮质颗粒中，并能引起透明带硬化，但目前还不清楚其他哺乳动物卵母细胞的皮质颗粒是否也含这种酶。

3. N-乙酰氨基葡萄糖苷酶

小鼠卵母细胞的皮质颗粒中含 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶。用钙离子载体 A23187 激活卵子时或受精后，分别有 70% 和 90% 的 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶释放出来。卵子激活释放的 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶能破坏透明带上与精子质膜 β -半乳糖苷转移酶的结合位点。

4. 糖基化物质

用钌红定位的方法证明，处于 1-细胞期的大鼠、仓鼠及兔的体内受精卵的卵周隙中均含有阳性反应颗粒。在体外受精的人卵卵周隙中也发现这一现象。

5. 其他成分

仓鼠卵子的皮质颗粒中含有一种 60kDa 的蛋白 CRT (calreticulin)。卵子激活后将

CRT 释放到卵周隙中，参与阻止多精受精。小鼠卵子皮质颗粒中含有一种 75kDa 的蛋白。卵母细胞生长过程中，p75 合成逐渐增加，这与皮质颗粒的形成在时间上是一致的。p75 的合成在卵母细胞体外成熟过程中逐渐减少，成熟卵中合成几乎停止。受精时把精子核直接注入仓鼠卵母细胞中，可激发卵母细胞释放肝素结合胎盘蛋白 (heparin-binding placental protein)，它结合于卵质膜表面，其功能还不清楚。此外，以小鼠皮质颗粒成分作为抗原所产生的抗体能识别一种 32kDa 的蛋白质。

(三) 皮质颗粒的分布及数量

在卵母细胞的生长过程中，皮质颗粒随各种细胞器向皮质区迁移，在皮质区形成“细胞器带”。排卵前在 LH 峰的作用下，细胞核完成成熟，释放出第一极体。与此同时，细胞器向胞质中央迁移，最终形成皮质区“细胞器游离带”，但皮质颗粒不发生内迁，相反向质膜下迁移。沿质膜呈线状排列，这是所有哺乳动物卵母细胞成熟最后阶段的一个共同特征。牛的情况比较特殊，成熟卵母细胞中尽管多数皮质颗粒沿质膜呈线状分布排列，但皮质区也有成团分布的现象。在很多动物，皮质颗粒的分布存在明显的极性，第二次减数分裂纺锤体所在区域的质膜下没有皮质颗粒。受精时，精子不能从该区域入卵。

卵母细胞生长及成熟过程中，皮质颗粒向质膜下迁移的同时，其数量不断增加。未成熟卵母细胞体外受精时，之所以多精受精率高于成熟卵，一方面是由于皮质颗粒不靠近质膜分布，另一方面就是由于皮质颗粒数量不足，从而导致卵母细胞不能有效地阻止多精入卵。老化卵子中的皮质颗粒“过度成熟”，且常发生自发胞吐。受精时尽管皮质颗粒发生胞吐，但排出的皮质颗粒内容物不能有效地阻止多精受精的发生。

二、皮质反应的机理

哺乳动物精子入卵后，激发卵质膜下的皮质颗粒发生胞吐，称为皮质反应 (cortical reaction)。皮质颗粒的胞吐是“爆炸性的”，从精子入卵点开始迅速向四周扩散。可以认为卵母细胞是一种分泌细胞，但它与持续性分泌细胞不同的一点是，其整个生命过程中分泌活动仅发生一次，这一特性非常类似于精子的顶体反应。至于卵子皮质反应的机理，目前主要有两种观点。一种观点认为，皮质反应的发生是一个卵质膜受体介导过程，即精子表面的次级精子结合蛋白（如仓鼠的受精素 PH30、小鼠的 M29、大鼠的 DE、人的 MH61、豚鼠的 G11 和 M13 等）与卵质膜表面的次级精子受体（可能是整合素）结合，通过活化 G 蛋白或酪氨酸蛋白激酶，激活一系列的信号转导系统，诱发皮质反应的发生。另一种观点认为，精子入卵时带入可溶性的卵子激活因子，从而诱发皮质反应的发生。不管诱发皮质反应的最初信号是什么，胞吐涉及细胞内的信号传递系统这一点是肯定的。现已证实，磷脂酰肌醇信号通路在皮质反应中发挥重要作用。首先卵质膜上的 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇在磷脂酶 C 的作用下水解，产生两种第二信使分子，即二酰基甘油 (DAG) 和 1, 4, 5-三磷酸肌醇 (IP₃)。IP₃ 与细胞质中储存 Ca²⁺ 的内质网或钙小体 (calcisome) 上的 IP₃ 受体结合，导致内源性 Ca²⁺ 的释放；同时，DAG 激

活蛋白激酶 C (PKC)，最终导致皮质颗粒膜与卵质膜融合，发生皮质反应（图 5-15）。

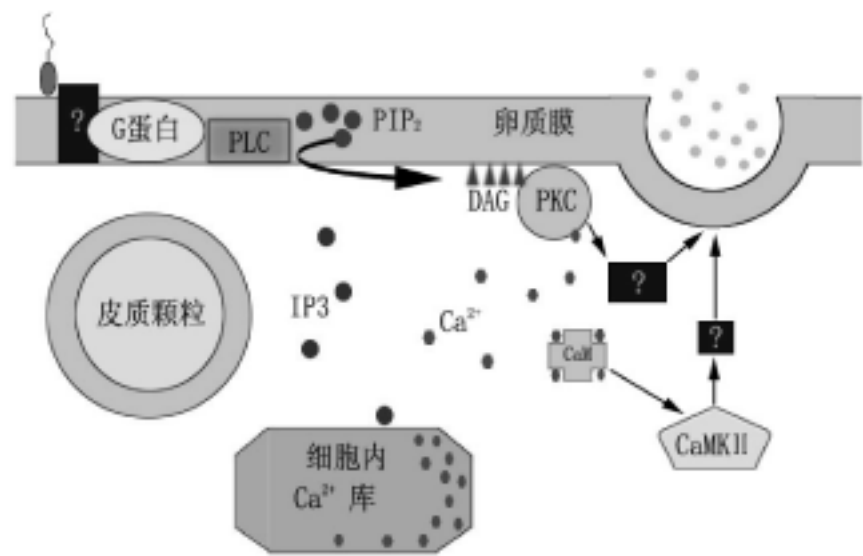


图 5-15 卵子皮质反应信号级联示意图 (引自 Sun QY, 2003)

有许多实验证据支持上述假说。哺乳动物卵子受精后，细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高，现已很明确， $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高诱发皮质反应的发生。如果用 Ca^{2+} 载体 A23187 处理卵子或向卵子胞质中直接注入 Ca^{2+} ，也将激发皮质反应，而 Ca^{2+} 螯合剂能抑制精子诱导的皮质颗粒胞吐。最近在大鼠的研究表明，低浓度的 Ca^{2+} 即可诱导部分皮质颗粒的胞吐，而皮质反应的完全发生则需高浓度的 Ca^{2+} 。有证据表明，钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaMKII) 可能是 Ca^{2+} 诱发皮质反应信号通路中的一个关键分子。卵子激活后，伴随着 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高，CaMKII 迅速激活。CaMKII 抑制物 KN-93 处理小鼠卵子后，再用酒精活化卵子，皮质颗粒胞吐明显减少。

向仓鼠和绵羊卵胞质中注入 IP_3 可诱发内源性 Ca^{2+} 的释放和皮质反应发生。另一方面，向仓鼠卵中注射抗 IP_3 受体的抗体，可以阻止 IP_3 诱导的 Ca^{2+} 释放和皮质反应发生。在小鼠，向卵胞质中注入 IP_3 可导致正常受精后所发生的透明带蛋白 ZP2 向 ZP2f 的转变，并且这种作用可被能与 IP_3 受体结合的 18A10 抗体所拮抗。在仓鼠，由 IP_3 诱导的皮质颗粒胞吐可持续约 5min。另外，在小鼠卵母细胞中还发现有 PLC mRNA 和蛋白的存在。PLC 抑制剂可有效阻断精子引起的卵子激活。

用电镜及激光共聚焦扫描显微镜观察证明，PKC 激活可有效地激发小鼠、大鼠及猪卵子的皮质颗粒胞吐，并引起 ZP2 向 ZP2f 的转变。近年来的研究发现，小鼠、大鼠和猪卵子中均含有不同亚型的 PKC。例如，猪卵子中含有 PKC- α 、 β I 和 γ 。小鼠卵受精后，皮质颗粒胞吐的同时，伴随着 PKC- α 和 β 向卵质膜的迁移。猪卵子受精后，PKC- α 也向卵质膜迁移；向猪卵子中注射 PKC- α 抗体，精子入卵或 PKC 激活后，皮质颗粒胞吐受到抑制，说明 PKC- α 参与了皮质反应。PKC 激活诱发的皮质反应不依赖于 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。

精子激发卵子皮质反应可能是通过 G-蛋白介导的信号通路而实现的。G-蛋白的激活剂 A1F4 诱导小鼠卵子发生皮质反应。用 GTP 类似物 GTP- γ -S 激活 G-蛋白，可引起猪卵子中各种正常受精事件的发生，包括皮质反应。向仓鼠和绵羊卵子中注射 GTP- γ -S

也可引发皮质反应。在小鼠卵子中已检测到 G-蛋白超家族中 Rab3A 的靶分子 Rabbphilin-3A 的 mRNA 和蛋白的存在, 并且向小鼠卵子中注射 Rabbphilin-3A 重组蛋白的 NH₂-或 COOH-末端片段可剂量依赖性地抑制皮质反应的发生。

上述实验证据表明, 受精过程中精子与卵质膜上的受体作用, 通过 G-蛋白介导, 一方面 IP₃ 引起 Ca²⁺ 释放, 另一方面 PKC 激活, 二者共同导致卵母细胞膜与皮质颗粒膜融合, 促使皮质反应发生。

三、卵母细胞皮质反应能力的获得

把精子提取物注射到小鼠 GV 期和 MII 期卵母细胞后, MII 期卵母细胞中 86% 的皮质颗粒发生胞吐, 而 GV 期卵母细胞中只有 1% 的皮质颗粒发生胞吐。GV 期卵母细胞能够被精子穿入, 但精子入卵后皮质颗粒基本上不发生胞吐, 因此不能阻止多精受精的发生。GVBD 后, 卵母细胞逐渐获得发生皮质反应的能力。未成熟卵母细胞不能发生皮质反应, 虽然可能与皮质颗粒数量少和皮质颗粒与质膜距离远有关, 但关键是由于未成熟卵母细胞中还没有建立起皮质反应的机制。受精后或 IP₃ 注射后, 小鼠和仓鼠未成熟卵母细胞中虽然有 Ca²⁺ 的升高, 但升高的水平比成熟卵母细胞要低, ZP2 向 ZP2f 的转变基本上没有发生。这说明未成熟卵母细胞中还没有健全 IP₃ 诱导的 Ca²⁺ 释放机制, 这种机制是在卵母细胞恢复减数分裂后逐渐健全的。[Ca²⁺]_i 升高后引发皮质反应的机制也是在卵母细胞成熟过程中逐步完善的。最近的研究表明, 小鼠卵母细胞成熟过程中, CaMKII 的表达增加 150%, 它的活性增加 110%。

四、皮质反应与多精受精阻止

哺乳动物卵子发生皮质反应后, 可阻止多精受精, 涉及透明带、卵质膜及卵周隙的变化。根据动物种类不同, 多精受精的阻止主要发生在透明带水平上, 或主要发生在卵质膜水平上, 或二者兼有。例如, 仓鼠、牛、绵羊及山羊卵子受精时, 多精受精阻止主要发生在透明带水平上, 质膜几乎不参与; 兔卵子受精时, 卵质膜阻止多精受精, 而不发生透明带反应; 猪卵子受精后, 卵周隙中也常见到有许多精子, 多精受精阻止可能主要发生在卵质膜水平上, 但透明带也发挥一定的作用; 小鼠、大鼠、豚鼠、猫等处于中间类型, 多精受精阻止既需透明带的变化, 又有卵质膜阻断。

(一) 透明带反应

一旦精子与卵子融合, 皮质反应后胞吐到卵周隙中的酶类 (蛋白酶、卵过氧化物酶、N-乙酰氨基葡萄糖苷酶等) 引起透明带糖蛋白发生生化和结构变化, 从而阻止多精入卵, 这称为透明带反应 (zona reaction)。透明带的变化包括, 初级精子受体 ZP3 灭活, 改变其识别精子的正常功能, 游离的精子不能再与透明带结合; 次级精子受体 ZP2 水解, 已与透明带结合或部分穿入透明带的精子不能再穿过透明带。仓鼠的透明带反应从精子附着在卵质膜后 2.5min 开始, 20min 完成; 也有人报道, 仓鼠透明带反应 8min

即可完成。小鼠卵子激活后 5~8min, 便在透明带水平上建立起多精受精阻止的机制。皮质颗粒内容物诱发透明带反应无种属特异性。

(二) 卵质膜反应

许多哺乳动物的卵子受精后, 卵质膜也发生变化, 阻止多精受精的发生, 这一过程称为卵质膜反应 (egg plasma membrane reaction)。如果用去透明带的小鼠卵进行体外受精, 1h 后卵质膜不再与精子结合。去透明带的仓鼠卵激活后, 30~60min 后不再接受精子。兔卵的多精受精阻止主要发生在卵质膜水平上, 猪卵质膜反应在阻止多精受精中也发挥重要作用。卵质膜反应阻止多精受精只是一种现象描述, 对其机理了解的不多。哺乳动物尽管在精卵融合时卵质膜有电位变化, 但没有令人信服的证据表明哺乳动物有依靠电位变化阻止多精受精的机制。

哺乳动物卵子表面有许多微绒毛 (中期纺锤体区域除外), 可能参与卵质膜与精子的融合。在小鼠及仓鼠, 受精后卵质膜表面的微绒毛数量减少, 导致精子受体减少, 这可能与阻止多精受精有关。仓鼠卵激活后几分钟, 质膜上出现一些无微绒毛的区域, 不含微绒毛的区域通常不能与精子融合。小鼠卵受精后, 膜的流动性下降。有人推测, 皮质颗粒胞吐时, 皮质颗粒膜插入卵质膜, 形成新的嵌合膜, 改变了质膜原有的性质, 使其不再接受精子, 但这仍缺乏直接证据。关于皮质颗粒内容物是否参与质膜阻止多精受精, 存在两种明显不同的观点。一种观点认为, 皮质反应发生后, 皮质颗粒的某些成分与卵质膜结合, 可能在阻止多精受精中发挥作用; 另一种观点认为, 质膜阻止多精受精时, 皮质颗粒内容物不起作用。但最近的实验证据表明, 卵皮质颗粒内容物可能在卵质膜阻止多精受精中没有作用, 而受精精子的质膜与卵质膜的融合在卵质膜阻止多精受精中发挥重要作用。经过单精注射的小鼠卵子已发生皮质反应, 再用这些卵子来进行体外受精时, 不能阻止精子入卵。用酒精或 SrCl_2 处理小鼠卵子, 诱发皮质反应发生后, 这些卵子也没有阻止多精受精的能力。在人的卵子中也存在类似现象。精子不能穿入人原核期的受精卵, 但能穿入单精注射的受精卵和孤雌活化卵子。

有许多研究证据表明, 卵子质膜中的整合素和精卵融合有关。有人提出这样一种假说, 即精子与卵质膜上的整合素结合激活卵子, 反馈抑制其他精子再与整合素结合, 参与质膜阻止多精受精, 也有人提出精子入卵后可能使卵质膜上的整合素灭活, 但这些假说还缺乏实验依据支持。

(三) 皮质颗粒膜的形成

近来有人研究了哺乳动物卵子受精后皮质颗粒胞吐造成的卵周隙变化。经钨红染色后电镜观察发现, 小鼠、仓鼠及人等卵子受精后, 皮质颗粒内容物胞吐到卵周隙中, 并形成完整的一层, 称为皮质颗粒膜 (cortical granule envelope, CGE)。仓鼠的皮质颗粒膜中除了含多种糖蛋白外, 还含有两种皮质颗粒来源的多肽 p62 和 p56。皮质颗粒膜的形成可能在卵周隙水平上或卵质膜水平上阻止多精入卵或对精子进行修饰。

总之, 哺乳动物精子入卵后, 卵子发生皮质反应, 释放出皮质颗粒中所含的糖基化

物质、蛋白酶、糖苷酶和卵过氧化物酶等，在透明带、卵质膜和卵周隙三个层次上阻止多精入卵。

第九节 受精过程的中心体遗传

中心体也称微管组织中心。在动物体细胞中，中心体位于靠近核膜的胞质中，在大多数情况下，以星体形式存在。一般情况下，中心体中央含有一对中心粒，周围由无定形物质组成，从无定形物质伸出微管束。中心粒呈圆筒状，长 $0.3\sim 0.7\mu\text{m}$ ，直径 $0.15\sim 0.3\mu\text{m}$ ，两个中心粒相互垂直，每个中心粒由9组三联微管组成。中心体的主要成分是蛋白质。据有关资料报道，中心体内含有DNA和RNA，能进行自我复制。 γ -微管蛋白、中心体蛋白（centrin）、NuMA、中心体周蛋白（pericentrin）等是中心体的特殊组成成分，是中心体复制和微管延伸所必需的。这一部分将主要介绍哺乳动物中心体遗传的研究现状。

从腔肠动物到低等脊椎动物都证实，卵子发生过程中，中心体丢失，在受精时由精子带入中心体，但小鼠的情况有所不同。受精前小鼠卵母细胞中有许多（约16个）非纺锤体微管结构。有研究表明，小鼠MII期卵母细胞中非纺锤体中心体来自卵母细胞减数分裂成熟过程中的中心体。在小鼠成熟精子中，没有发现中心体；精子入卵后，也不形成精子星体结构。这些事实说明，小鼠中心体是母方遗传的。受精后卵子胞质中每个中心体形成一个星体，负责原核的相互靠近。小鼠卵子受精后，中心体的变化及功能见图5-16。

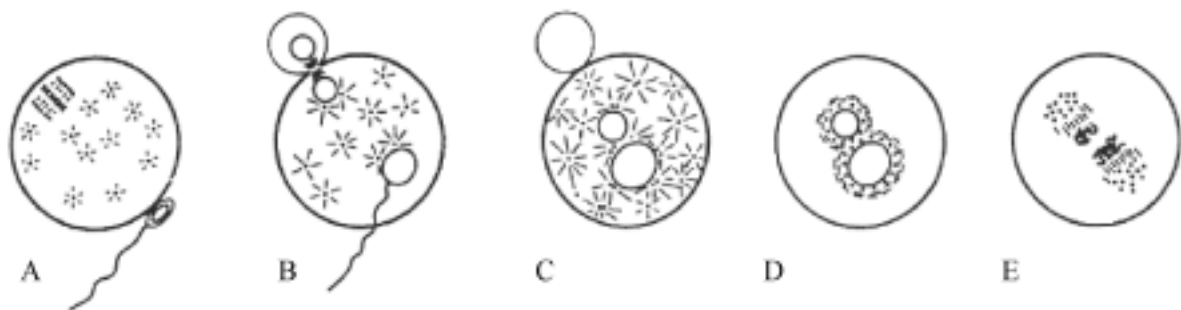


图 5-16 小鼠受精卵中的中心体功能及微管组装（引自 Simerly C 等，1995）

小鼠卵母细胞中心体是母方遗传的理论还可通过以下实验得以证实：①孤雌激活；②多精受精；③微管抑制后的恢复。在第①个实验中，不存在父方贡献中心体的可能性；在第②个实验中，存在父方贡献多个中心体的可能性；在第③个实验中观察在雄性还是雌性染色体周围形成纺锤体，可为判断纺锤体来源提供证据。如果中心体来自母方的学说成立，那么孤雌活化和多精受精卵子应能正常卵裂，在微管抑制后重新恢复时，既应在雌性染色体，也应在雄性染色体周围形成纺锤体。如果小鼠精子贡献中心体，情况则应为，孤雌活化的卵子在第一次卵裂前就不能形成两极纺锤体；多精受精卵子中则应出现多个纺锤体。在上述两种情况中，卵裂后均不能形成2个细胞。微管抑制后再恢复时，仅应在雄性染色质周围形成一个两极有丝分裂器。研究发现，用酒精孤雌活化的小鼠卵子在第一次有丝分裂前，形成两极纺锤体，赤道板部有单倍体染色体排列，卵裂



图 5-17 牛卵子受精后中心体微管
组装 (引自 Navara CS 等, 1994)
● 雄原核 ○ 雌原核 — 微管

后形成 2 个等大的卵裂球。在多精受精卵子中，情况也是如此。在解除微管组织抑制后，也形成正常的两极纺锤体，一极与雌性染色质结合，另一极与雄性染色质结合。可以看出，在未受精小鼠卵子中含有组织微管而形成两极纺锤体的各种必需成分。

然而，大多数动物的情况与小鼠不同（图 5-17）。例如，牛、羊、兔和人卵子胞质中没有微管组织中心。精子进入卵子后，在精子颈部区域形成一个微管星体结构，并随着原核生长及迁移而增大。超微结构观察显示，羊精子入卵后，在形成的两个原核之间，从精子颈部区域的近端中心粒衍生出放射排列的微管，中心粒位于第一次有丝分裂纺锤体的一极。利用电镜观察和抗微管免疫荧光标记等方法证明，兔受精后微管的组织发生在精子头的基部。在灵长类中，人卵子有两个精子穿入时，可有 2/3 分裂形成 3 细胞，这可能是由于形成了三极纺锤体所致。电镜观察显示，单精或双精受精卵中，有丝分裂纺锤体极端均有中心粒存在。牛多精受精卵中，每个穿入精子的头部和尾部间都形成一个星体，可形成多个有丝分裂纺锤体，但未见多极纺锤体。牛和猪卵孤雌激活后，首先胞质中出现无规则排列的微管；卵裂时形成两极有丝分裂纺锤体；随着卵裂进行，两极形成星体，最后产生两个卵裂球。因此，牛和猪卵受精时，父方和母方中心体物质可能均发挥作用。这些观察结果与小鼠的情况不同，说明不同动物卵子中，控制纺锤体形成的机制可能不同。

(孙青原)

主要参考文献

陈大元、孙青原、李光鹏 .2000 . 受精生物学——受精机理与生殖工程 . 北京：科学出版社
秦鹏春 . 2001 . 哺乳动物胚胎学 . 北京：科学出版社
张天荫 . 1996 . 动物胚胎学 . 济南：山东科技出版社
Bahat A, Tur-Kaspa I, Gakamsky A, Giojalas LC, Breitbart H, Eisenbach M. 2003. Thermotaxis of mammalian sperm cells: A potential navigation mechanism in the female genital tract . Nat Med 9: 149~150
Bavister BD. 2002. Early history of in vitro fertilization . Reproduction 124: 181~196
Breitbart H. 2002. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction . Mol Cell Endocrinol 187: 139~144
Breitbart H, Rubinstein S, Lax Y. 1997. Regulatory mechanisms in acrosomal exocytosis . Rev Reprod 2: 165~174
Breitbart H, Naor Z. 1999. Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reraction . Rev Reprod 4: 151~159

- Cohen DJ, Ellerman DA, Cuasnicu PS. 2000. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion . *Biol Reprod* 63: 462~468
- De Blas G, Michaut M, Trevino CL, Tomes CN, Yunes R, Darszon A, Mayorga LS. 2002. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis . *J Biol Chem* 277: 49326~49331
- de Lamirande E, Gagnon C. 2002. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion . *Mol Hum Reprod* 8: 124~135
- du Plessis SS, Page C, Franken DR. 2001. The zona pellucida-induced acrosome reaction of human spermatozoa involves extracellular signal-regulated kinase activation . *Andrologia* 33: 337~342
- Eisenbach M. 1999. Sperm chemotaxis . *Rev Reprod* 4: 56~66
- Eliyahu E, Talmor-Cohen A, Shalgi R. 2002. Signaling through protein kinases during egg activation . *J Reprod Immunol* 53: 161~169
- Evans JP. 2001. Fertilin beta and other ADAMs as integrin ligands: insights into cell adhesion and fertilization . *Bioessays* 23: 628~639
- Fabro G, Rovasio RA, Civalero S, Frenkel A, Caplan SR, Eisenbach M, Giojalas LC. 2002. Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay . *Biol Reprod* 67: 1565~1571
- Fan HY, Tong C, Lian L, Chen DY, Schatten H, Sun QY. 2002. Translocation of classical protein kinase C (cPKC) isoforms in porcine oocytes: implications of PKC involvement in the regulation of nuclear activity and cortical granule exocytosis . *Exp Cell Res* 277: 183~191
- Fan HY, Tong C, Lian L, Li SW, Gao WX, Cheng Y, Chen DY, Schatten H, Sun QY. 2003. Characterization of ribosomal protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization . *Biol Reprod* 68: 968~977
- Fan HY, Huo LJ, Meng XQ, Zhong ZS, Hou Y, Chen DY, Sun QY. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes . *Biol Reprod* 69: 1552~1564
- Fan HY, Sun QY. 2004. Involvement of MAPK cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals . *Biol Reprod* 70: 535~547
- Green DPL. 1997. Three-dimensional structure of the zona-pellucida . *Rev Reprod* 2: 147~256
- He ZY, Brakebusch C, Fassler R, Kreidberg JA, Primakoff P, Myles DG. 2003. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion . *Dev Biol* 254: 226~237
- Honda A, Siruntawineti J, Baba T. 2002. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions . *Hum Reprod Update* 8: 405~412
- Iida H, Yoshinaga Y, Tanaka S, Toshimori K, Mori T. 1999. Identification of Rab3A GTPase as an acrosome-associated small GTP-binding protein in rat sperm . *Dev Biol* 211: 144~155
- Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice . *Nat Genet* 24: 279~282
- Kline D, Kline J. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg . *Dev Biol* 149: 80~89
- Lax Y, Rubinstein S, Breitbart H. 1997. Subcellular distribution of protein kinase C alpha and beta1 in bovine spermatozoa, and their regulation by calcium and phorbol esters . *Biol Reprod* 56: 454~459
- Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice . *Science* 287: 319~321
- Longo FJ. 1997. Fertilization . Chapman & Hall, The University Press, Cambridge
- Lu Q, Smith G, Chen DY, Han ZM, Sun QY. 2002. Activation of protein kinase C induces MAP kinase dephosphorylation and pronucleus formation in rat oocytes . *Biol Reprod* 67: 64~69
- Manandhar G, Toshimori K. 2003. Fate of postacrosomal perinuclear theca recognized by monoclonal antibody MN13 after sperm head microinjection and its role in oocyte activation in mice . *Biol Reprod* 68: 655~663
- Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG. 2000. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin

- $\alpha_6\beta_1$ and is CD9-dependent . J Cell Biol 149: 1289~1296
- Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization . Science 287: 321~324
- Navara CS, First NL, Schatten G. 1994. Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis and nuclear transfer: the role of the sperm aster . Dev Biol 162: 29~40
- Prinmakoff P, Myles DG. 2002. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction . Science 296: 2183~2185
- Reimann JD, Jackson PK. 2002. Em1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs . Nature 416: 850~854
- Roldan ER, Murase T, Shi QX. 1994. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida . Science 266: 1578~1581
- Schuffner AA, Bastiaan HS, Duran HE, Lin ZY, Morshedi M, Franken DR, Oehninger S. 2002. Zona pellucida-induced acrosome reaction in human sperm: dependency on activation of pertussis toxin-sensitive G (i) protein and extracellular calcium, and priming effect of progesterone and follicular fluid . Mol Hum Reprod 8: 722~727
- Shi QX, Yuan YY, Roldan ER. 1997. gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa . Mol Hum Reprod 3: 677~683
- Simerly C, Navara CS, Wu GJ, Schatten G. 1995. Cytoskeletal organization and dynamics in mammalian oocytes during maturation and fertilization . In: Gametes (G Grudzinskas and JL Yovich, eds), Cambridge University Press, pp9954~9994
- Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H. 2003. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis . Science 299: 2054~2058
- Sun F, Giojalas LC, Rovasio RA, Tur-Kaspa I, Sanchez R, Eisenbach M. 2003. Lack of species-specificity in mammalian sperm chemotaxis . Dev Biol 255: 423~427
- Sun QY, Breitbart H and Schatten H. 1999. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells . Reprod Fertil Dev 11: 443~450
- Sun QY, Rubinstein S, Breitbart H. 1999. MAP kinase activity is downregulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg fertilization . Mol Reprod Dev 52: 380~386
- Sun QY, Lai L, Park KW, Kuhholzer B, Prather RS, Schatten H. 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro . Biol Reprod 64: 871~889
- Sun QY, Lai L, Bonk A, Prather RS, Schatten H. 2001. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size and protein synthesis inhibition . Mol Reprod Dev 59: 131~137
- Sun QY, Wu GM, Lai LX, Park KW, Day BN, Prather RS, Schatten H. 2001a. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryos development in vitro . Reproduction 122: 155~163
- Sun QY, Lai LX, Wu GM, Park KW, Day BN, Prather RS, Schatten H. 2001b. Microtubule assembly after treatment of pig oocytes with taxol: correlation with chromosomes, γ -tubulin and MAP kinase . Mol Reprod Dev 60: 481~490
- Sun QY, Wu GM, Lai L, Bonk A, Cabot R, Park K, Day BN, Prather RS, Schatten H. 2002. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphorylation, chromatin behavior, microtubule organization, and cell cycle progression by protein phosphatases during pig oocyte maturation and fertilization in vitro . Biol Reprod 66: 580~588
- Sun QY. 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs . Micro Res Tech 61: 342~348
- Sun QY, Nagai T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization . J Reprod Dev 49: 347~359
- Takahashi Y, Bigler D, Ito Y, White JM. 2001. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. Mol Biol Cell 12: 809~820

- Talbot P, Shur BD, Myles DG. 2003. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol Reprod* 68: 1~9
- Tang TS, Dong JB, Huang XY, Sun FZ. 2000. Ca^{2+} oscillations induced by a cytosolic sperm protein factor are mediated by a maternal machinery that functions only once in mammalian eggs. *Development* 127: 1141~1150
- Tarin JJ, Cano A. 2000. Fertilization in protozoa and metazoan animals. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Tong C, Fan HY, Lian L, Chen DY, Schatten H, Sun QY. 2002. Polo-like kinase is a pivotal regulator of microtubule organization during mouse oocyte maturation, fertilization and early embryonic mitosis. *Biol Reprod* 67: 546~554
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian Fertilization. In Knobil E, Neil JD (eds): *The physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, pp178~317
- Yoshida M, Ishikawa M, Izumi H, De Santis R, Morisawa M. 2003. Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 149~154
- Yoshinaga K, Saxena DK, Oh-oka T, Tanii I, Toshimori K. 2001. Inhibition of mouse fertilization in vivo by intra-oviducal injection of an anti-equatorin monoclonal antibody. *Reproduction* 122: 649~655
- Zhu ZY, Chen DY, Li JS, Lian L, Lei L, Han ZM, Sun QY. 2003. Rotation of MII spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biol Reprod* 68: 934~937

第六章 胚胎发育

精子和卵子相遇后，在受精的同时，也使得卵子得以激活。受精卵中的雌原核和雄原核融合后，细胞质中发生重排，然后进行分裂和分化，从而开始多细胞有机体的形成过程，由一个全能性的细胞逐渐形成能够执行不同功能的各种各样的细胞。此外，由于卵子的体积一般都比体细胞大很多倍，所以通过多次的有丝分裂可将大量的卵细胞质分配到较小的细胞中，使所形成的细胞大小达到体细胞的水平。

第一节 卵 裂

一、卵裂的过程

卵裂 (cleavage) 为动物发育的第一个阶段，受精卵分裂产生很多小的细胞，称为卵裂球 (blastomere)。虽然不同动物中，卵裂的方式变化很大，但大多数动物在经过卵裂后，都形成一个细胞球，称为囊胚 (blastula)，中间为囊胚腔 (blastocoel)。但在昆虫等无脊椎动物中并不形成腔。

除哺乳动物外，很多动物的卵裂是一个迅速且同步的过程。由于没有胚胎的净生长期，分裂速度很快，细胞数目越来越多，但细胞变得越来越小。卵裂最终导致胚胎中卵裂球的大小达到正常体细胞的水平。此外，由于卵裂过程使卵裂球之间产生差异，从而分化为不同的细胞。

体细胞在分裂时经历正常的细胞周期，即 G_1 、S、 G_2 及 M 期，而且在 M 期伴随一迅速的细胞增长期，使子细胞增长到母细胞的水平，然后再分裂。但是，在卵裂的胚胎中，并不通过这一生长期，使卵裂球越分越小，达到体细胞的水平。海胆中，从最初胞质为核体积的 550 倍，减少到最后的 6 倍。

另外，在卵裂中，细胞周期缩短，并无 G_1 及 G_2 期，只有 S 及 M 期，而且 S 及 M 期均较短，这期间 DNA 从多位点上合成，而体细胞中仅在几个位点上合成。爪蟾在第 12 次卵裂后才有 G_1 及 G_2 期，而果蝇则在第 14 及 17 次卵裂时才有 G_1 及 G_2 期。

由于受精卵的基因组处于相对的转录不活跃状态，卵裂是同步的过程，主要依赖于卵细胞质中的母源性物质。通常，即使在抑制转录或去细胞核的情况下，卵裂也能正常进行。在两栖类，直到原肠形成期之前，早期胚胎可以从母体核糖核蛋白体 (RNP) 中得到所有需要的 mRNA，mRNA 从这些微粒体中释放出来后，可用于翻译，并不需要合子基因组指导蛋白质的合成。在细胞质中存在很多拷贝的组蛋白 mRNA 和其他染色体蛋白，并且这些蛋白质可以快速地供给，使染色体的复制在 20~30min 内结束，然后很快凝集形成染色体。

但当母源性基因产物失活后或消耗尽后，发育过程开始依赖于合子的基因转录。在

有些物种中，合子基因一开始表达后，通常都伴有细胞分裂的突然变慢、失去同步化及细胞表型发生改变。将胚胎发育过程中的这一现象称为囊胚中期转换 (midblastula transition, MBT)。以后，细胞周期开始变长，并且细胞的分裂开始不同步。哺乳动物的卵是一例外，卵裂的细胞周期很长。

二、卵裂的方式

典型的动物受精卵是小的圆形细胞，并且沿着垂直轴极化，带极体的一半通常叫做动物半球，另一半球含有丰富卵黄的为植物半球。不同的动物中，受精卵的卵裂方式也不同。卵裂方式主要由三个因素决定：一是核的特定位置，决定特定的卵裂沟位置；二是卵黄的数量，可阻碍细胞浆的移动；三是卵的细胞质，不同的细胞质成分和极性决定卵裂沟的方向。但卵裂的方式主要由卵中的脂肪含量及分布所决定。

大多数动物的卵裂为完全卵裂 (holoblastic cleavage)，胚胎沿着卵裂沟将子细胞彻底分开。而在另一些物种中为不完全卵裂 (meroblastic cleavage)，胚胎并不完全分裂开 (最起码在发育的初期如此)，子细胞之间有细胞质相连续，即不完全卵裂并不产生子细胞，而是产生一多核细胞，叫做多核体。由于第一次卵裂后，所产生的卵裂球在大小上有所差异，所以又将卵裂分为等裂和不等裂。卵裂后，植物半球的卵裂球中卵黄丰富且体积稍大，称为大分裂球 (macromere)；而动物极的卵裂球体积较小，称为小分裂球 (micromere)。将各种动物的卵裂方式可分为以下 6 类。

1. 完全等裂

这些动物的卵为均黄卵，含有极少量的卵黄。受精卵经过完全分裂后得到的卵裂球大小相等，卵裂球呈辐射对称。这种卵裂方式的代表动物为海星和海胆。

2. 完全不均等卵裂

这些动物的卵为极性均黄卵。受精卵分裂后得到大小不等的卵裂球，动物极的分裂球较植物极的小。这种卵裂方式的代表动物为文昌鱼。但另外一些动物的卵为具有中等程度卵黄的极性端黄卵，卵裂后动物极分裂球的体积远远小于植物极。由于植物极半球的卵黄阻滞了胞浆的流动，动物极半球进行同步分裂并且分裂速度快于植物极。这种卵裂方式的代表动物为远古鱼类及两栖类。

3. 盘状卵裂

为不完全分裂的一种，卵裂时子细胞之间的细胞质并不完全分开。首先，在卵表面进行极少量的垂直分裂，随后进行与卵表面平行的分裂。卵裂只在卵表面的一个很小区域内进行。这种卵裂方式的代表动物为现代鱼类、爬行类及鸟类。

4. 旋转卵裂

为完全卵裂的一种类型，为有胎盘哺乳动物中特有的一种卵裂方式 (图 6-1)。第一次卵裂为经裂，将受精卵分为两个相等的卵裂球。第二次卵裂时，一个卵裂球为经

裂，而第二个卵裂球则为纬裂。由于在以后的卵裂过程中，每个卵裂球的卵裂速度不同，可能会出现 3、5、6 及 7 个等不同数目卵裂球的胚胎。哺乳动物的卵裂不仅不同步，而且每次卵裂间隔的时间也很长。

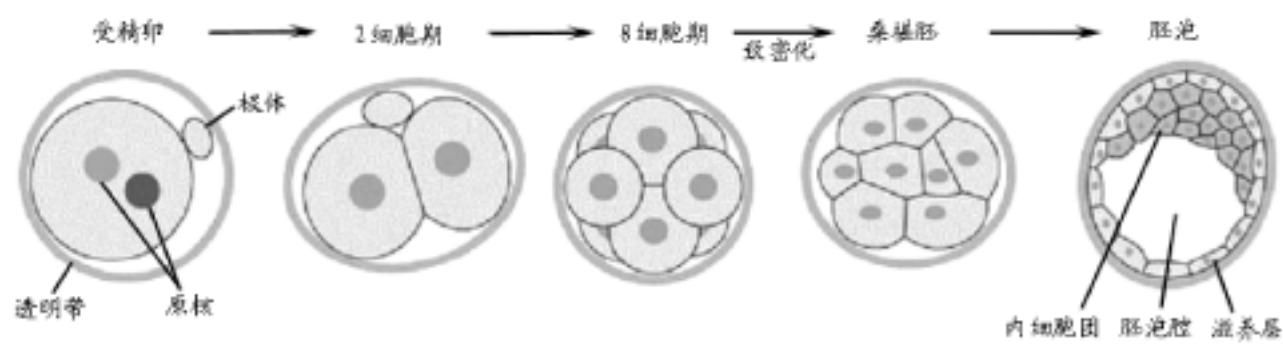


图 6-1 哺乳动物的卵裂过程

5. 表面卵裂

为不完全卵裂的一种。细胞核分裂但细胞质并不分开，之后大多数细胞核迁移到卵表面的细胞质中，表面细胞质在细胞核之间分裂。这些动物的卵为中央黄卵，代表动物为昆虫。

6. 螺旋式卵裂

与辐射型卵裂不同，胚胎的卵裂方向不是与卵轴呈平行或垂直方向进行，每次的卵裂方向之间有一定角度。在分裂到 8 细胞期时，动物极半球的 4 个卵裂球正好位于植物极半球的 4 个卵裂球之间。这种卵裂方式的代表动物为扁虫、线虫、环节动物及软体动物。

三、小鼠与人的卵裂过程

1. 小鼠

小鼠卵裂为旋转式卵裂，卵裂速度很慢。在受精 18h 后合子基因开始转录，24h 后进行第一次卵裂，之后每间隔约 12h 进行一次卵裂。8 细胞期的卵裂球仍具全能性。如果在此期将每个卵裂球分开，它们将会形成 8 个遗传性状同—的小鼠。在过渡到 16 细胞期时，发生致密化 (compaction)。这时胚胎中看不到单个的圆形卵裂球，卵裂球之间最大限度地由 E-钙黏素等细胞黏附分子紧密地连接在一起。致密化发生后，胚胎细胞开始具有极性，内部细胞和外部细胞之间发生了很大的变化。胚胎发育到桑椹胚时，大约具 32 个细胞。以后胚胎的外部细胞开始分泌液体，逐渐出现胚泡腔，标志着胚泡的形成。在胚泡期，第一次出现两个不同的组织，组成胚泡腔壁 的细胞为滋养层细胞 (trophoblast)，而位于一侧且紧贴滋养层的一小团细胞为内细胞团 (inner cell mass, ICM) (图 6-1)。胚胎滋养层将成为胎儿的胚外结构，而内细胞团注定成为胚胎及一部分的胚外结构。胚泡在子宫中自透明带中孵出，并在子宫中着床。

2. 人

人也为旋转卵裂。大约在受精后 30h, 开始第一次卵裂。第一次分裂是将合子以与赤道面呈一定角度, 并与极体呈一线的面分裂。以后的分裂就不同步了。第二次卵裂在受精后 40h 完成, 产生 4 个相等的卵裂球。第三天发育到 6~12 细胞期, 第四天由 16~32 个细胞组成。32 细胞期的胚胎为桑椹胚, 桑椹胚的细胞不仅发育成为胚胎, 还发育成为胎盘以及相关的组织。从 8 细胞阶段开始, 互相结合比较疏松的卵裂球开始扁平, 胚胎显示出内、外极性, 使卵裂球之间最大限度地接触; 之后外层的细胞开始凸起, 而内层细胞开始内陷, 这个重组的过程为致密化, 包括细胞骨架蛋白以及卵裂球黏附性的改变。不同卵裂球之间的黏附也导致胚胎中的细胞发生分离, 一些细胞进入桑椹胚的中心, 而其他细胞则位于胚胎的外表面。一般认为, 位于内部的细胞将发育形成内细胞团, 而外围的细胞则发育形成滋养层。

在发育到第四天时, 桑椹胚开始吸收液体。液体可能最初是在卵裂球间细胞内的空隙中产生的, 在细胞之间聚集。同时, 在外层细胞间形成紧密连接, 液体进入腔内, 主要分布在内层细胞和外层细胞之间。随着胚胎中液体压力的增大, 胚胎形成了腔, 即胚泡阶段。

四、着床前胚胎的极性及分化

与其他动物不一样, 哺乳动物的卵只有很少的卵黄, 营养主要由胎盘供给。从外观上虽不能区分卵的极性, 但分子水平上可以确立极性。瘦素 (leptin)、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 等与极性分布相关的母本蛋白主要在人和小鼠卵的动物极表达。

第一次卵裂为经裂, 将细胞质分为几乎相等的两个半球, 但它们之间存在微小的差异。瘦素和 STAT3 在卵极性轴中的分布与胚胎分裂轴中的分布有大约 20% 的不同。这些蛋白在 2 细胞期的每个子细胞中得以继承, 说明每个 2 和 4 细胞分裂球已具有特定的发育命运。

2 细胞胚胎的第一个卵裂球的分裂也是经裂, 得到的两个子细胞大小完全相等, 并且胚胎轴与卵中的轴完全一致。相比之下, 第二个卵裂球因纺锤体轴旋转产生了横向的卵裂。纺锤体旋转可能标志着产生了其他类型的分化细胞。在胚胎中, 第二个卵裂球进行的水平分裂也会产生不同的子细胞, 各自继承大多数动物极或植物极的细胞质。因此, 控制卵裂的平面可能决定 4 细胞胚胎中每个卵裂球的发育方向。

在小鼠和人的 2 细胞及以后的胚胎中, 瘦素和 STAT3 在动物极有高水平的分布。在以后的发育中, 瘦素和 STAT3 的表达仅限于 4 细胞胚的一个卵裂球中、8 细胞胚的两个卵裂球中以及最后仅存在于滋养层中。滋养层明显地继承了动物极的细胞质, 许多母本蛋白均存在于动物极中。在 4 细胞胚胎中, 其他三个子细胞的命运更加难以确定。带有大部分植物极细胞质的卵裂球推测成为生殖细胞系的前体, 另外两个 4 细胞胚的卵裂球继承了卵母细胞的极性以及种间瘦素和 STAT3 的数量, 可能成为多潜能体细胞的前体, 因为这些蛋白在内细胞团中的表达下降。滋养层的前体细胞可能已经定位在 4 细胞胚胎的一个子细胞中, 甚至可能在 2 细胞胚胎的一个子细胞中。瘦素和 STAT3 为很

好的滋养层的标志分子。

对 hCG β 在人早期胚胎的每个卵裂球中表达的分析表明,在未受精的卵母细胞以及 4 和 5 细胞胚胎中均检测到低水平的 hCG β mRNA 表达,这些可能为潜在的母源性表达。hCG β 的转录水平从 7 细胞阶段逐渐升高,可能与 4 细胞期后胚胎基因组的转录相一致。

五、哺乳动物卵及胚胎轴的形成

未受精的小鼠卵是圆的,具有动物-植物 (A-V) 极轴,动物极是以第二极体的位置为标记的 (图 6-2)。这个轴在胚泡阶段也可以确认 (图 6-2)。小鼠卵沿 A-V 轴极化,动物极位于细胞质帽的中心,没有微绒毛,而卵子其余的部分则覆盖微绒毛。最近的研究显示,胚轴在第一次卵裂或更早时就特化了。第一次卵裂发生的平面接近或穿过 A-V 轴。这个平面也为穿过两个卵裂球的垂直轴。当进行几次细胞分裂形成胚泡后,胚极 (embryonic pole) 以及对胚极 (abembryonic pole) 分布在相同的垂直轴上,第一次卵裂面的一侧为胚极的滋养层,而另一侧则为对胚极的滋养层。2 细胞胚的第一个卵裂球在经历第二次卵裂后形成胚极,而第二个卵裂球则形成对胚极。在胚泡中仍保留 A-V 轴。将胚极和对胚极一分为二的横切面来看,胚泡是椭圆形的 (图 6-2)。

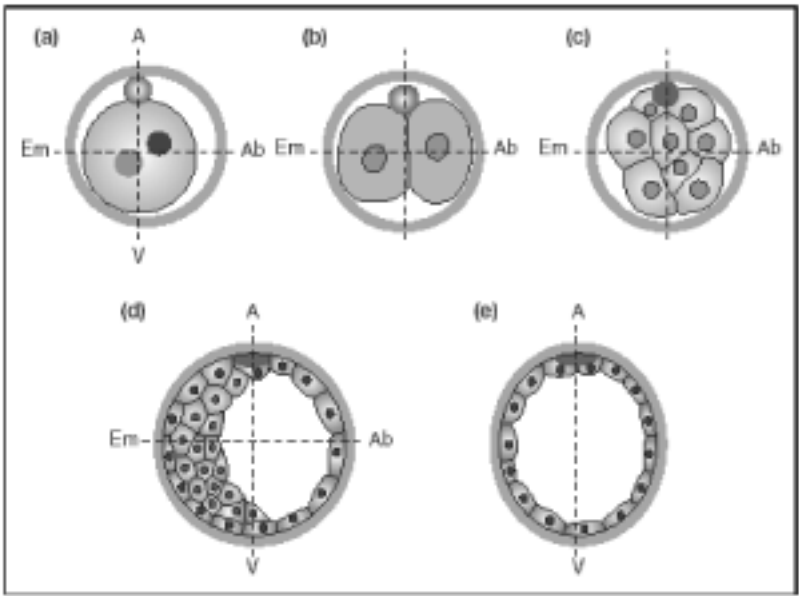


图 6-2 小鼠着床前发育四个阶段的示意图 (引自 Stanton JL, 2003)

第二极体 (灰色) 和动-植物极 (A-V) 轴处于同一方向。(a) 为受精卵,具有两个原核。

以后的胚极-对胚极 (Em-Ab) 轴与 A-V 轴成直角。(b) 为二细胞胚胎,显示 A-V 轴和将来的 Em-Ab 轴。

(c) 为致密化的 16 细胞期胚胎。(d) 为胚泡,显示 A-V 轴和 Em-Ab 轴的交叉平面。第二极体的位置为胚极滋养层和胚泡壁滋养层的分界处。(e) 为图 d 中的胚泡旋转直角后的横切面。从 A-V 轴来看,胚泡是椭圆形的

第一次卵裂产生了两个不同的半球,但这种不同产生的原因还不清楚。排出的成熟卵中特定 mRNAs 或转录因子的不均匀分布可能导致 2 细胞期胚胎中的不同。细胞骨架等成分的不均匀分布也可能引起这种差异。第二次卵裂是不同步的,第一个卵裂半球主要分裂形成胚泡的内细胞团。胚泡腔的形成是卵极性的内在特性所决定的,在 2 细胞阶段就已建立了。因此,胚泡腔的特定位置在发生第一次卵裂之后就确定了。这个微妙的作用对于滋养层及内细胞团的命运有明显的影响。第一次卵裂的平面通过或接近精子融

合的位置。卵表面 80% 的区域覆盖微绒毛，精子可在这些覆盖微绒毛的区域与卵融合。

2 细胞胚的第一个卵裂球的卵裂是经裂，与 A-V 轴平行（图 6-3）。第二个卵裂球的卵裂在同一个平面进行，但是这个平面因为细胞质移动，相对于第一个卵裂球的卵裂发生了旋转，结果形成了一个平面。这时四个四分之一卵裂球的位置像一个四面体。在兔子中，第二个卵裂球分裂时旋转的方向与第一个卵裂球分裂的方向一致。每个四分之一卵裂球具有不同的发育潜能。现在仍不清楚这种旋转为何出现在小鼠和人中，以及这种旋转是否在发育过程中起重要作用。

4 细胞期胚胎分裂形成 8 细胞胚胎。在第三次卵裂后经历致密化以及紧密连接的形成。致密化过程使卵裂球出现了顶部、底部和侧面。虽然 8 细胞期的卵裂球外表看起来相同，但它们并不相同，因为 8 细胞期胚胎中已具有原始的胚极-对胚极轴（Em-Ab）。8 细胞期细胞的分裂在几何学上不同，一些细胞的分裂为侧向分裂，一些细胞的分裂则为辐射分裂。经历侧向分裂的细胞大约为辐射分裂细胞的两倍。在 16 细胞期的胚胎中，位于外层的细胞数与内层细胞数的比例为 2:1。在 32 细胞期，胚泡腔开始在对胚极形成。

在胚泡以后的发育过程中，内细胞团分化成为外胚层和原始内胚层。着床后，位于胚极的滋养层向对胚极扩展形成胚外外胚层，而原始内胚层扩展成为脏壁以及体壁内胚层。外胚层位于脏壁及体壁内胚层之间。由靠近第二极体的那部分内细胞团来的内胚层主要形成卵柱的近端，而由另一端的内细胞团来的细胞则形成卵柱的远端。

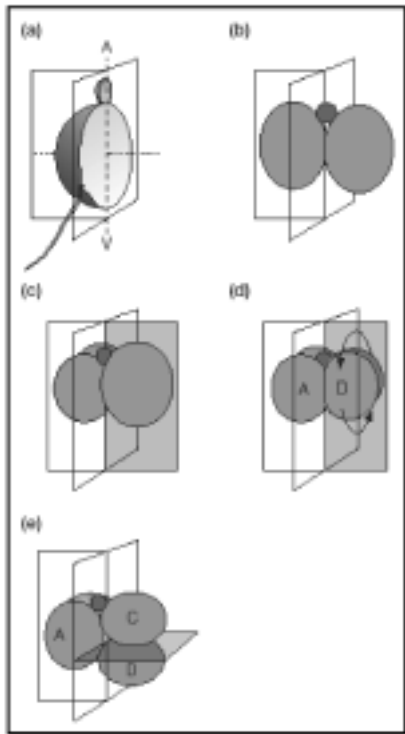


图 6-3 小鼠卵最初两次卵裂的示意图
(引自 Stanton JL, 2003)

(a) 小鼠卵沿第二极体的一个半球切面。切面与 A-V 轴在同一个平面上。以后的胚极-对胚极轴与此平面成直角。精子在卵上的结合部位为第一次卵裂的面。(b) 2 细胞胚胎，显示第二极体与第一次卵裂平面和 A-V 轴接近。(c) 第一个卵裂半球经历卵裂后的位置。(d) 第二个卵裂半球分裂后形成的 4 细胞胚胎。图中保留了原始的卵裂平面。(e) 4 细胞期胚胎，显示第二个卵裂半球卵裂时，在细胞质分裂期间卵裂面发生旋转，正好与旋转前的卵裂面成直角

第二节 早期胚胎发育过程中的基因表达

一、合子的基因激活

在很多动物中，受精后不久，胚胎处于转录的非活性状态，胚胎发育的启动并不需要 RNA 合成。在几个细胞周期后，转录得以恢复并且为胚胎发育所必需。不同动物中的这个细胞周期数是不同的。

在哺乳动物中，合子的基因激活实际上是两个阶段，即辅助阶段（minor phase）和主要阶段（major phase）。因此，早期小鼠胚胎中转录活性可分为三个转变时期：①在 1 细胞晚期，合子基因激活的辅助期开始，仅具有很微弱的转录活性。②在 2 细胞早期

(G₁/S 期) 合成少量的蛋白质, 包括 70kDa 热应激蛋白 (heat-shock protein)、TRCs (transcription-requiring complexes)、U2afbp-rs 剪切因子 (splicing factor) 及翻译起始因子——eIF-4C。在第一次有丝分裂后, 无增强子的启动子的活性受到抑制; 近来发现, 经显微注射进入 1 细胞小鼠胚胎中的原核的报告基因, 可在合子基因激活的辅助阶段转录。然而, 如果没有合适的增强子存在, 报告基因的转录在第一次有丝分裂后就受到抑制。③第二轮 DNA 复制后的 2 细胞晚期, 开始合子基因激活的主要期, 转录和翻译活性增加, 导致蛋白质合成的形式发生巨大变化。

在其他哺乳动物中, 合子基因激活的时间稍晚一些, 发育过程中需要转录的时间也稍迟一些。通常, 合子基因激活的主要期在第 2~3 次卵裂后开始, 兔胚胎在第 4 次卵裂后开始。在兔中, 虽然在 2 细胞期前还未检测到合子的转录产物, 但合子基因激活的辅助期在 1 细胞期结束时就已开始, 与小鼠中相同。

在两栖类和哺乳动物中, 控制合子基因激活的机制是很保守的。在爪蟾中, 合子基因激活的主要期发生在囊胚中期的转换期, 主要依赖于复制基因的抑制因子的浓度。爪蟾卵母细胞中储存的大量的母体组蛋白可能竞争性得到基本的转录装置。在囊胚中期的转换期前, 转录激活因子活性的缺失可能导致转录的不活跃。在小鼠最初的几个细胞周期中, 发生大量染色质重排和核蛋白组成的改变, 这些因素可能控制合子基因激活。

在爪蟾和小鼠的卵母细胞中, 包含大量的功能性的 RNA 聚合酶 II。胚胎发育的启动必须利用母体储存的这种酶。RNA 聚合酶 II 的最大的亚基 (RPB1 亚基) 的磷酸化可能与合子基因激活有关。在体外及体细胞中, 转录过程确实涉及这个亚基羧基端 (carboxy-terminal domain, CTD) 的磷酸化和去磷酸化的周期性变化。在病毒感染、热应激和减数分裂成熟过程中, CTD 的磷酸化也发生变化。在合子基因激活期间, RPB1 亚基磷酸化后, 便转位到细胞核中。

RPB1 亚基的“分室”分布以及 CTD 的磷酸化可能控制哺乳动物胚胎的合子基因激活。在小鼠和兔中, 合子基因激活的时间不同。RNA 聚合酶 II 特性的 4 个主要变化与合子基因激活的辅助期和主要期的转换紧密相关: ①在合子基因激活的辅助期, RPB1 亚基逐渐迁移到细胞核中。②在合子基因激活辅助期开始前的第一个细胞周期, RPB1 亚基是去磷酸化的。③在整个辅助期, RPB1 亚基并未显示转录因子 TFIIH 磷酸化的特点。④在主要期开始时, RPB1 超磷酸化的形式类似于体细胞中。

二、生长因子在早期胚胎发育中的作用

小鼠着床前胚胎中的基因表达, 使得 2 细胞阶段轴的建立以及 8 细胞阶段发生致密化后滋养层和内细胞团的发育成为可能。现在已证实, 在小鼠着床前胚胎中有大约 15 700 个基因表达。研究小鼠着床前胚胎中大量基因的表达, 是理解着床前胚胎发育的一个主要手段。目前研究基因功能的主要方法是通过基因敲除的办法使基因表达沉默, 然后检测这些基因表达沉默后是否会引起表型和功能的异常。到目前为止, 利用基因敲除方法对很多基因的功能已经进行了大量的研究, 其中一些基因敲除后对小鼠的胚胎发育影响很大, 甚至引起胚胎死亡。

着床前的胚胎在生殖道中处于游离状态, 缺乏血液的供应, 而且周围的液体环境在

不断改变。在这期间，胚胎主要依赖于输卵管以及子宫腔的分泌物来供给营养。胚胎的卵裂及细胞分化等均受到雌性生殖道环境的影响。在胚胎发育、胚胎着床和妊娠维持过程中，都涉及母体和胚胎之间的分子对话。

在小鼠和其他物种中，输卵管和着床前胚胎表达一些多肽生长因子及其受体，这些生长因子包括胰岛素、胰岛素样生长因子（IGF）家族、表皮生长因子（EGF）家族、成纤维细胞生长因子（FGF）家族、血小板衍生生长因子（PDGF）家族和肿瘤坏死因子（TNF）家族。生长因子在着床前胚胎发育过程中的表达呈时空特异性变化。转化生长因子β（TGFβ）在小鼠胚胎基因组激活后开始表达，到胚泡期时仅在滋养层细胞上表达。在小鼠胚胎中，TGFα定位在内细胞团上，而其受体——EGF受体主要定位在滋养层细胞的侧面及底部。但不同物种中，早期胚胎中的基因表达形式不同。EGF在人胚胎中表达，但在小鼠和牛胚胎中不表达。IGF-1虽在人胚胎中没有表达，但在小鼠、牛及猪胚胎中均有表达。不同动物的着床前胚胎中，基因表达的形式均有所不同。表 6-1 中列出了人着床前胚胎中一些基因的表达时期。

表 6-1 细胞因子及其受体在人着床前胚胎和生殖道中的表达

细胞因子 或受体	胚胎发育时期及生殖道						参考文献
	1 细胞	2~4 细胞	8 细胞	桑椹胚	胚泡	生殖道	
VEGF	-		+	+	+		Krussel <i>et al</i> . (2000)
VEGFR						+	Moller <i>et al</i> . (2001)
LIF		-	-	-	-		Sharkey <i>et al</i> . (1995)
	+	+	+	+	+		Chen <i>et al</i> . (1999)
						+	Charnock-Jones <i>et al</i> . (1994)
						++	Cullinan <i>et al</i> . (1996)
LIF-R					+		Charnock-Jones <i>et al</i> . (1994)
		-	-	-	+		Sharkey <i>et al</i> . (1995)
	+	+	+	+	+		Chen <i>et al</i> . (1999)
	+	+	+		+		van Eijk <i>et al</i> . (1996)
						++	Cullinan <i>et al</i> . (1996)
TNF-α		-	+	-	-		Sharkey <i>et al</i> . (1995)
			+				Zolti <i>et al</i> . (1991)
TNF-R		+	+	-	-		Sharkey <i>et al</i> . (1995)
GM-CSF						+	Giacomini <i>et al</i> . (1995)
						++	Zhao & Chegini (1999)
PAF		+					Collier <i>et al</i> . (1990)
PAF-R		-	-	-	-		Sharkey <i>et al</i> . (1995)
						++	Ahmed <i>et al</i> . (1998)
IL-1	+	+	+				Zolti <i>et al</i> . (1991)
IL-1β	+	+	+	+	+		De los Santo <i>et al</i> . (1996)

续表

细胞因子 或受体	胚胎发育时期及生殖道						参考文献
	1 细胞	2~4 细胞	8 细胞	桑椹胚	胚泡	生殖道	
IL-1Rt1	+	+	+	-	+		De los Santos <i>et al</i> . (1996)
						+	Simon <i>et al</i> . (1993)
IL-6		-	-	-	+		Sharkey <i>et al</i> . (1995)
	+	+	+				Zolti <i>et al</i> . (1991)
IL-6-R		-	-	-	+		Sharkey <i>et al</i> . (1995)
TGFβR-T1	+	+	-	-	+		Osterlund & Fried (2000)
TGFβ-T2	+	+	-	-	-		Osterlund & Fried (2000)

VEGF：血管生长因子 LIF：白血病抑制因子 TNF：肿瘤坏死因子。
GM-CSF：巨噬细胞集落刺激因子 PAF：血小板激活因子 IL：白介素。
TGFβR-T1：转化生长因子β的Ⅰ型受体。

外源性的生长因子对于着床前胚胎的发育并不是必需的。小鼠或人的胚胎可在补加丙酮酸盐和白蛋白的简单生理溶液中，依靠自身的营养来存活，并发育到胚泡期。但是，对体外发育和体内发育胚胎的详细研究表明，与体内发育的胚胎相比，体外培养的着床前胚胎的发育速度较慢，而且体外发育的小鼠胚泡的凋亡比率是体内发育胚胎的三倍。此外，在体外将几个胚胎在一起培养时，胚胎的发育率比单个胚胎培养时要高，胚胎细胞的凋亡率也比单个培养时要低。这表明胚胎所处的内分泌环境对胚胎的发育起到很关键的作用。人着床前胚胎表达 IGF-1 的受体，但是不表达 IGF-1。在培养液中加入 IGF-1 后，可将胚胎发育到胚泡阶段的比例增加约 25%，并使这些胚泡中内细胞团细胞的数目增加 59%。如在培养液中加入 IGF-1 受体的特异性抗体后，可消除 IGF-1 的作用，表明 IGF-1 是通过 IGF-1 受体在胚胎中起作用的。此外，目前已经对很多种哺乳动物的胚胎在体外进行了培养。在体外培养过程中，补加一些生长因子或细胞因子后，对胚胎的发育及胚泡的孵化等过程都有促进作用。但由于这些方面的研究很多，很难进行详细的介绍。表 6-2 中仅列出了一些主要的细胞因子或生长因子对早期胚胎发育的影响。

表 6-2 生长因子和细胞因子对体外哺乳动物着床前胚胎发育的影响

对胚胎的影响	生长因子	物种	参考文献
胚泡形成 ↑	Insulin	小鼠	Harvey & Kaye (1990)
		牛	Matsui <i>et al</i> . (1995)
	IGF-I	小鼠	Harvey & Kaye (1992a)
		牛	Matsui <i>et al</i> . (1995); Palma <i>et al</i> . (1997)
	IGF-II	小鼠	Harvey & Kaye (1992b)
	CSF-1	小鼠	Pampfer <i>et al</i> . (1991)
	TGF-α	牛	Larson <i>et al</i> . (1992)

续表			
对胚胎的影响	生长因子	物种	参考文献
胚泡形成 ↑	LIF	小鼠	Lavranos <i>et al</i> . (1995)
		羊	Fry <i>et al</i> . (1992)
	GM-CSF	牛	de Moraes & Hansen (1997)
		小鼠	Robertson <i>et al</i> . (2001)
	HB-EGF	大鼠	Tamada <i>et al</i> . (1999)
发育比率 ↑	IGF-II	小鼠	Rappolee <i>et al</i> . (1992)
	CSF-1	小鼠	Bhatnagar <i>et al</i> . (1995)
	PAF	小鼠	Stoddart <i>et al</i> . (1996)
	EGF	小鼠	Brice <i>et al</i> . (1993)
胚泡细胞数目 ↑	IGF-I & -II	小鼠	Rappolee <i>et al</i> . (1992)
	GM-CSF	小鼠	Robertson <i>et al</i> . (2001)
	PAF	小鼠	Ryan <i>et al</i> . (1990b)
特异影响 ICM ↑	Insulin	小鼠	Harvey & Kaye (1990)
	IGF-I	小鼠	Harvey & Kaye (1992a)
	IGF-II	小鼠	Harvey & Kaye (1992b)
特异影响 TE ↑	CSF-1	小鼠	Bhatnagar <i>et al</i> . (1995)
胚泡腔扩展	TGF-α	小鼠	Dardik & Schultz (1991)
	EGF		
胚泡孵出/黏附 ↑	GM-CSF	小鼠	Robertson <i>et al</i> . (2001)
蛋白合成 (TE) ↑	Insulin	小鼠	Harvey & Kaye (1988)
	IGF-II		Rappolee <i>et al</i> . (1992)
	EGF		Wood & Kaye (1989)
蛋白合成 (ICM) ↑	TGF-α	小鼠	Dardik <i>et al</i> . (1992)
内吞作用	Insulin	小鼠	Dunglison <i>et al</i> . (1995)
葡萄糖转运	Insulin	小鼠	Kaye <i>et al</i> . (1992)
	GM-CSF	小鼠	Robertson <i>et al</i> . (2001)
新陈代谢	PAF	小鼠	Ryan <i>et al</i> . (1990a)
基因表达	IGFs	小鼠	Shi <i>et al</i> . (1994)
	TGFs		Babalola & Shultz (1995)
细胞凋亡 ↓	TGF-α	小鼠	Brison & Schultz (1997)
	PAF	小鼠	O’Neill (1998)
	IGF-I	兔子	Herrler <i>et al</i> . (1998)
细胞凋亡 ↑		小鼠	Brison (2000)
	TNF-α	小鼠	Pampfer <i>et al</i> . (1997); Wu <i>et al</i> . (1999)

ICM：内细胞团； TE：滋养外胚层； IGF：胰岛素样生长因子； CSF：集落刺激因子；
HB-EGF：肝素结合样表皮生长因子； LIF：白血病抑制因子； TGF：转化生长因子；
GM-CSF：巨噬细胞集落刺激因子； PAF：血小板刺激因子； EGF：表皮生长因子； TNF：肿瘤坏死因子。

三、Oct-4 在小鼠早期胚胎中的表达

从胚泡期到原条期的发育过程中，将来发育为生殖系的前体细胞就已从体细胞中独立出来。转录因子 Oct-4 只在原始生殖细胞、卵母细胞和体外培养的胚胎干细胞中表达。POU 区域结构蛋白组成了相关转录因子家族，这些蛋白的特点是可结合 POU 区域的 DNA 结合区域。大多数的 POU 蛋白在胚胎形成期间表达，表明可能在发育以及细胞分化中起重要的作用。Oct-4 为 POU 转录因子家族的成员。这个蛋白的序列、基因结构和 POU 基因在染色体上的位置高度保守。小鼠与牛的 Oct-4 蛋白序列约有 81.7% 的同源性，人与小鼠的 Oct-4 蛋白有 87% 的同源性。

已证实，小鼠的成熟卵母细胞中具有 Oct-4 活性，而精子则没有，表明 Oct-4 因子是母性遗传的。母性遗传的 Oct-4 是受精卵中 Oct-4 的惟一来源，以后母性遗传的 Oct-4 减少。直到 4~8 细胞期时，胚胎的 Oct-4 基因才开始转录。桑椹胚和早期胚泡的所有细胞均表达 Oct-4。但在孵化胚泡中，Oct-4 仅在内细胞团中高水平表达，而在滋养层细胞却不表达。在胚胎着床后的卵柱期，仅在原始外胚层中可检测到 Oct-4 的表达。在妊娠第 7~8 天的胚胎中，Oct-4 仅在神经外胚层中表达。到妊娠第 8.5 天时，Oct-4 的表达就已限定在原始生殖细胞中。Oct-4 作为许多基因的转录因子特异地表达于全能性细胞中。Oct-4 基因缺失的小鼠胚胎可发育到胚泡期，但并不能形成全能性的内细胞团，在胚胎着床不久便死亡。在体外，将 Oct-4 的表达水平提高或降低约 30%，可使胚胎干细胞分别分化为内胚层或滋养外胚层。因此，Oct-4 表达的微小变化可能对着床前的早期胚胎发育影响很大。

四、热休克蛋白 (HSP) 与早期胚胎发育

所有的有机体在外界蛋白毒性的压力下 (应激条件)，可以通过合成大量的蛋白来发生反应，所产生的这些蛋白为热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)。在正常的生长和发育过程中，热休克蛋白也有不同水平的表达。热休克蛋白根据分子质量及诱导性不同分为不同的家族。一些热休克蛋白为组成型表达，而其他的热休克蛋白仅在刺激后表达。热休克蛋白与其他蛋白相互作用，在细胞不同部位的功能主要通过多肽精确的折叠和转位来控制。

在胚胎发育过程中，特别是早期胚胎发育时期，基因转录活跃、蛋白质大量合成以及细胞所处的环境在不断变化，细胞对外界的刺激十分敏感。在爪蟾中，HSP70 在囊胚中期表达。在小鼠中，HSP70 在 2 细胞期胚胎中表达，与合子基因组的激活相一致，对于胚胎的发育起到关键性作用。在合子基因组开始激活时，就可观察到热休克蛋白的合成，并且在随后的发育阶段持续表达，与此蛋白的管家特性是相符的，这种保守性对于所有细胞的存活是很关键的。诱导型 HSP70 基因在小鼠着床前胚胎发育过程中的特异性表达有两个特点，一是当合子基因组转录开始时，在缺乏外界刺激条件下，HSP70 基因可自发地表达，二是直到胚泡阶段 HSP70 基因都对外界刺激没有反应。

HSP90 是类固醇激素受体，在两栖类、鸡、果蝇、小鼠及人的胚胎中表达，主要

以同源二聚体形式或与其他蛋白形成复合物定位于细胞膜上,参与胚胎发育过程的信号转导和发育调控。在人中,HSP90在早期胚胎阶段诱导表达,在后期阶段表达降低并达到基础水平。在爪蟾中,HSP90直到囊胚中期阶段才被诱导表达。

HSP30包括HSP30A、HSP30B(一种假基因)、HSP30C和HSP30D。这些基因在爪蟾胚胎中的表达量高,且表达形式复杂。这些蛋白在卵母细胞及胚胎中持续地合成。在应激条件下,热休克蛋白可能参与了胚胎中被损坏蛋白的聚合或错误的折叠。

胚胎发育过程中,热休克基因表达具有阶段和组织特异性。胚胎发育中,合子基因组激活后,最先表达的基因之一是热休克基因。2细胞期的小鼠胚胎自发表达HSP68和HSP70。在爪蟾中,合子基因组表达启动的时间为囊胚中期,此期与HSP70基因的表达启动时间同步。HSP89、HSP70和HSP59在小鼠胚胎的外胚层细胞中高水平表达。正常情况下,胚胎发育的时期不同,被激活的热休克蛋白基因也不同;在胚胎的不同组织中,热休克蛋白的种类和分布亦不完全相同。可见,热休克蛋白基因的自发性表达是受发育调控的。

五、连接蛋白(connexin)与早期胚胎发育

间隙连接在胚胎发育早期就存在,对胚胎的细胞分化、形态发生及生长调控起重要作用。连接蛋白基因的表达和细胞诱导、分化、增殖、细胞程序性死亡及衰老等生物过程的关系十分密切。在早期胚胎中,神经系统和循环系统尚未建立或未发育完善,长距离的信息传递难以进行。要使胚胎中的细胞向各种组织或器官分化,就离不开细胞间化学信息的交换。将连接蛋白的抗体注入非洲爪蟾8细胞期的胚胎中,可以阻断通讯通道,使注射过抗体的胚胎的发育出现明显的区域性形态缺陷现象,如脑和眼发育不良或完全缺失,这些缺陷可能是直接阻断了控制局部分化的信息传递而造成的。间隙连接复合体在小鼠早期胚胎中就已经建立,发生在8细胞期的致密化过程。当间隙连接形成后,由间隙连接建立的细胞间的偶联状态可一直保持到胚胎着床时。

间隙连接是由一对连接小体(connexin)构成的中间有孔道的结构,每个连接小体由6个连接蛋白组成。连接小体两两相对分别整合在两个相邻细胞的质膜中。一般来说,只有相同或相似的连接蛋白形成的连接小体才能在细胞之间建立间隙连接,即一对连接小体中的12个连接蛋白是同一类型的连接蛋白,从而保证了一种组织中的大多数细胞主要与同一类型的细胞建立代谢偶联,阻止不同类型的细胞之间建立代谢偶联。间隙连接的建立可使代谢物(如氨基酸、葡萄糖、核苷酸和维生素等)及第二信使(如cAMP、Ca²⁺等)可在细胞间自由通过。

在哺乳动物中,连接蛋白由很多基因家族的基因编码。由不同连接蛋白组成的间隙连接,在渗透性、生物学特性以及调节特性等方面有所不同,每种类型的通道可能在调节中起到独一无二的作用。连接蛋白43(Cx43)最早在小鼠4细胞期胚胎中表达,并在以后逐步累积。Cx43在4细胞胚胎的细胞质中也表达;到8细胞期发生致密化时,Cx43在细胞质中及间隙连接部位开始表达。在着床前胚胎中,未检测到Cx26、Cx32和Cx46连接蛋白的表达及间隙连接小体的形成。Cx43基因在2细胞期的胚胎中就已转录,但是最初产生的Cx43在细胞内处于悬浮状态。当一个还不清楚的信号与生物钟相

偶联后，可激活 Cx43 并使其组装成为间隙连接。然而，当将 Cx43 基因敲除后，这些缺陷型胚胎仍可正常进行着床前的发育，并可完成整个妊娠过程。这一实验对 Cx43 在胚胎发育过程中的重要性提出了质疑。但最近发现，在着床前胚胎中也表达 Cx30.3、Cx31、Cx31.1、Cx40 和 Cx45 等 5 种连接蛋白。在 Cx43 基因敲除的胚胎中，很可能胚胎利用其他的连接蛋白来保持细胞间的偶联，从而支持发育。细胞间的偶联不依赖于细胞的变平，而需要卵裂球保持致密化状态，从而继续进行发育。另外，在大鼠着床前胚胎中发现 Cx31 与 Cx43 共表达。Cx31 和 Cx43 的转录水平在受精卵中很高，在 2 和 4 细胞期降到最低，其中 Cx31 基本检测不到。Cx43 和 Cx31 mRNA 在致密化的 8 细胞期胚胎重新开始升高。在胚泡中，两种连接蛋白都在滋养层及内细胞团中共表达。Cx31 特异性地在外胎盘锥及胚胎外胚层细胞中表达，而 Cx43 仅限于胚胎本部细胞。这样的分工表达可能是由不同的发育程序导致的。Cx31 似乎在胚胎滋养层的形成过程中作用不大，在着床前的发育中仅作为补偿途径。多种连接蛋白的表达可能为哺乳动物胚胎发生过程中的普遍特征。

牛胚胎在桑椹胚和胚泡期开始表达 Cx43，可能牛胚胎在桑椹胚期才建立起间隙连接方式。而在小鼠中，早在 4 细胞期便能检测到 Cx43 表达，但有功能的间隙连接最早出现在 8 细胞期的致密化阶段。在人的早期胚胎发育中，间隙连接最早出现在 4 细胞阶段，并在以后的发育中逐渐增多。

六、E - 钙黏素与早期胚胎发育

在胚胎发育中，相似细胞的聚集能力对于细胞群体的建立是很重要的。细胞分选的过程代表了形态发生的开始，因为形成的细胞群体将形成组织结构。典型钙黏素参与发育早期这样的细胞运动。在体外培养时，如向每个 2 细胞期胚胎注入 E - 钙黏素的反义 RNA，可使胚胎发生致密化的时间延迟，所以胚胎的致密化延迟是由于 E - 钙黏素基因的表达被反义 RNA 抑制所致。以后又证明，E - 钙黏素介导小鼠胚胎 8 细胞期钙依赖性卵裂球的致密化。E - 钙黏素突变小鼠中，纯合型在胚胎着床前死亡，死亡的原因是由于 E - 钙黏素缺失后导致不能形成滋养外胚层上皮或者胚泡腔。有意思的是，缺失 E - 钙黏素的胚胎的卵裂球之间还可以形成桥粒以及紧密连接。所以，母体 E - 钙黏素对于致密化的起始是足够的，但不能维持进一步的胚胎发育。

七、胚胎的体外发育阻滞

除了一些纯系的小鼠品系和它们的 F1 代的杂交系外，小鼠的 1 细胞胚胎的体外发育均被阻滞在 2 细胞期，此现象称为 2 细胞阻滞 (2-cell block)。以后陆续发现，其他哺乳动物的胚胎在体外培养时也被阻滞在不同的发育阶段，这种现象称为发育阻滞 (developmental block)。发育阻滞是哺乳动物早期胚胎体外培养时遇到的一个普遍问题。不同动物中发生阻滞的时间不同，仓鼠发生在 2~8 细胞期，大鼠在 2~4 细胞期，山羊、绵羊、牛和恒河猴发生在 8~16 细胞期，猪在 4 细胞期，人在 4~8 细胞期。

由于培养液的成分不同，来自不同品系小鼠的胚胎在体外的发育也不同，特别在存

在或缺乏葡萄糖及无机磷酸盐时更是如此。在一些培养条件下，葡萄糖的作用既有刺激性作用，又有抑制性作用。葡萄糖是大多数动物生殖道中存在的一种能源的底物。磷酸盐对于 ATP 的产生是必需的，是细胞活动的基本的能量来源。然而，在培养液中加入葡萄糖和磷酸盐后，对很多动物的胚胎发育是抑制性的，包括啮齿类、家畜及人。在改进的无蛋白的 Tyrode's 液中培养仓鼠胚胎时，如果不加磷酸二氢钠，有 97% 的 2 细胞胚胎可发育到 4 细胞或 4 细胞期以上；但如果加 $0.1 \sim 1.05 \text{ mmol/L}$ 的磷酸盐，则仅有 9%~21% 可发育到 4 细胞期。不论葡萄糖存在与否，磷酸盐对胚胎发育都起抑制作用。但在缺乏磷酸盐时，葡萄糖并不阻滞胚胎发育。当存在磷酸盐时 (0.35 mmol/L)，葡萄糖则抑制胚胎发育。

如果在培养基中加入微摩尔浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 的 EDTA，或用不含磷酸根的培养基进行培养时，1 细胞期的胚胎也可发育通过 2 细胞期。然而，这些培养条件远非生理性的，因为输卵管液中并不具有 EDTA，但却具有磷酸根。

将由朝鲜黑山羊 (*Capra hircus aegagrus*) 超数排卵获得的胚胎在体外培养 6 天，所用培养液为合成的输卵管液培养液，其中补加 BSA 或血清。如果不加谷胱甘肽 (GSH)，所有的培养胚胎均不能发育超过 8~16 细胞期阻滞。加入谷胱甘肽后，对这些胚胎发育到胚泡的能力有明显的促进，但谷胱甘肽的作用很大程度上依赖于培养液中加入的蛋白。当培养液中加入胎牛血清时，谷胱甘肽的作用明显强于加 BSA 或山羊血清的效果，有 91% 的胚胎可发育到胚泡期。已证实谷胱甘肽特异性地作用于 8~16 细胞期的胚胎，从而促进胚胎的发育。

Ham's F-10 培养液通常用于人和动物的体外受精中。用 Ham's F-10 培养液培养，可使 92% 的 CD-1 小鼠的胚胎阻滞在 2-细胞期，但并不使杂交的纯系小鼠 (BDF1) 的胚胎发生阻滞。相反，BWW 是一个改进的 Krebs-Ringer 碳酸氢钠培养液，可支持 CD-1 及 BDF1 系的小鼠胚胎发育到胚泡期。如果在 BWW 液中补加 15% 的 Ham's F-10 培养液，则可使 CD-1 小鼠的胚胎发育受到阻滞。从这两种培养液成分的比较发现， $6 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 的次黄嘌呤与 CD-1 小鼠胚胎的发育阻滞有关。加入 EDTA 可部分 (40%) 解除次黄嘌呤对胚胎发育的阻滞作用。

将从爪蟾卵中提取的 MPF 注射入来自 ICR 小鼠 2 细胞胚胎的一个卵裂球中后，可使这些胚胎的 2 细胞阻滞得以克服。此外，将小鼠的 1 细胞胚胎与分离的小鼠壶腹部共同培养，也可克服小鼠的发育阻滞，但这种效应仅限于第二个细胞周期的 G_2 期。

已证实，阻滞在 2 细胞期的胚胎为四倍体，胚胎在发生阻滞前能整合溴脱氧尿嘧啶，在这些阻滞的胚胎中也未见核膜破裂和染色体凝集的现象。这表明阻滞在 2 细胞期的胚胎是在第二细胞周期的 G_2 期发生阻滞的。

磷酸盐可诱导大鼠的胚胎在 2 细胞晚期发生阻滞。在未发生阻滞的处于 2 细胞期间期的胚胎中，细丝样的微管均匀地分布在细胞质中，并在 M 期时迁移到纺锤体上。在阻滞在 2 细胞期的胚胎中，则形成更粗的纤维性微管，以粗的网状结构存在于细胞质中。在未发生阻滞的 2 细胞期的 M 期，微丝在核周围及质膜下分布。但在发生 2 细胞阻滞的胚胎中，微丝则形成颗粒样结构，分布于细胞质中。这些结果表明，微丝和微管也与大鼠胚胎的发育紧密相关。

通过杂交实验证实，母体遗传来的发育信息可能在控制小鼠胚胎的早期卵裂方面起

重要作用。另外，将非阻滞胚胎的细胞质转移到受阻滞的胚胎中后，也能使这些受阻滞的胚胎恢复在体外的发育能力。有人提出，在很多哺乳动物中，受精卵可在体外早期发育的各个时期发生阻滞。还有人提出，胚胎体外发育的阻滞是与合子基因激活的时间相对应，认为发育阻滞和胚胎的转录活性间存在一定的相互关系。

尽管利用一些办法能够克服胚胎培养时的发育阻滞，但仅有很少的研究试图解释阻滞的遗传机理。由于可通过改变培养环境来克服 2 细胞阻滞，这说明有可能利用确认不同条件培养的胚胎中的差异性表达的基因，来了解发育阻滞的机理。尽管目前有一些关于着床前胚胎中基因表达的报道，但对基因表达和发育阻滞间的相互关系仍不清楚。

第三节 基因印迹

一、基因印迹 (gene imprinting) 的发现

在哺乳动物中，基因印迹的存在最早是通过细胞核移植实验得到证实的。从妊娠小鼠体内获得受精卵后，在雄原核和雌原核融合前，通过显微操作方法将其中一个原核取出后，再将另一个来自精子或卵子的原核注入该受精卵内，结果含有两个雄原核或两个雌原核的胚胎均不能正常发育。如果原有的雄原核被另一雄原核代替后，或者原来胚胎中的雌原核被另一卵子来的雌原核代替后，在新构建的受精卵中具有正常互补的雄性和雌性基因组，此时胚胎能够进行正常的发育。哺乳动物精子和卵子的基因组是不同的。如果受精卵中的遗传物质来自两个雄原核或两个雌原核时，合子不能正常发育。发育缺陷可能是由于某些基因只有来自精子和卵子时才处于活性状态。在人及小鼠中已证实，一个突变基因从一亲本遗传来时引起严重的或致死性缺陷，但从另一亲本遗传来时则不产生这些缺陷。如胰岛素样生长因子-2 (insulin-like growth factor-2, IGF-2) 基因位于第 7 条染色体上，从父本来的此基因在早期胚胎中处于活性状态，而此基因的受体 (IGF-2R) 位于第 17 条染色体上，仅从母本来时才处于活性状态。从父本遗传来的 IGF-2R 缺失的小鼠正常，但同样的缺失从母本来源时，发育则受阻。

利用细胞核移植等技术可建立孤雄生殖 (胚胎只含有父方的基因组) 和孤雌生殖 (胚胎只含有母方基因组) 模型，但所得到的胚胎均不能发育到分娩期。即使有的胚胎能发育到胚胎着床期，但孤雄生殖的胚胎在着床部位仅见到胚外成分 (如胎盘等)，而孤雌生殖的胚胎在着床部位则缺乏胚外成分。从一种自交品系小鼠产生的孤雌生殖胚胎可以发育到胚泡或原肠阶段，然而从其他品系小鼠产生的孤雌生殖的胚胎可能发育到具 40 体节阶段。这也表明母源基因的产物对胚胎的发育尤其重要，而父源基因的产物则是胚外组织正常发育的关键。由于母源和父源基因之间存在功能上的差异，母系和父系配子间平衡的改变必然会导致表型异常和病理变化。

哺乳动物的印迹基因对胚胎的发育也会产生影响。表 6-3 中列出了一些哺乳动物中的基因印迹位点。H19 基因、IGF-2 基因及 IGF-2 受体基因是目前研究最多的印迹基因。H19 基因是母系表达基因，在小鼠的桑椹胚和早期胚泡中不表达，但在晚期胚泡的滋养层中表达。胚胎着床后，H19 基因在许多组织内表达；到出生后，H19 基因的表达减弱。当 H19 基因失活后，雌性胎儿出生时的体重比正常胎儿重 27%。IGF-2 基因是

父系表达基因，在 2 细胞胚胎中就开始表达，并在以后的胚胎发育中广泛表达。将 IGF-2 基因突变后，出生胎儿的体重仅为野生型胎儿的 60 %。IGF-2 受体基因是母源性表达的基因。IGF-2 受体可与 IGF-2 结合后，将 IGF-2 转运到溶酶体中使其溶解，从而维持 IGF-2 在机体内的平衡状态。当将 IGF-2 受体基因敲除后，所产胎儿的体重比正常胎儿重 30 %，这时 IGF-2 的水平也升高，从而导致胎儿在产前死亡。但如将 IGF-2 基因与 IGF-2 受体基因同时敲除，则胎儿不再致死。IGF-2 受体基因敲除后胎儿致死的原因可能是由于 IGF-2 基因过度表达所致。现在发现，H19 基因的母亲表达可以通过抑制母源性染色体的转录来降低 IGF-2 的含量，这可能主要是由于 H19、IGF-2 和 Ins2 基因之间对共享增强子的竞争作用所致。这也表明，通过 H19、IGF-2 和 Ins2 这三种印迹基因之间的相互作用，可精确调节 IGF-2 基因的表达，从而维持胚胎的正常发育。

表 6-3 哺乳动物的一些内源性基因印迹的位点
(引自 Martin CC 1998)

印迹位点	激活的 等位基因	参考文献
IGF2	父本	DeChiara <i>et al</i> ., 1991
IGF-2R	母本	Barlow <i>et al</i> ., 1991
H19	母本	Bartolomei <i>et al</i> ., 1991
Snrpn	父本	Leff <i>et al</i> ., 1992
Ins1 和 2	父本	Giddclings <i>et al</i> ., 1994
U2aflop-rs	父本	Hayashizaki <i>et al</i> ., 1994
Znf127	父本	Nicholls, 1994
Par1	父本	Nicholls, 1994
Par5	父本	Nicholls, 1994
Xist	父本	Kay <i>et al</i> ., 1994
Mas	父本	Villar <i>et al</i> ., 1994
IPW	父本	Wevrick <i>et al</i> ., 1994
WT1	母本	Jinno <i>et al</i> ., 1994
Mash-2	母本	Guillenmot <i>et al</i> ., 1995
P57 (KIP2)	母本	Hatada <i>et al</i> ., 1995
Peg1/ MEST	父本	Kaneko-ishino <i>et al</i> ., 1996
ApoE	父本	Mann <i>et al</i> ., 1995
Pk3	父本	Mann <i>et al</i> ., 1995
Pplcy	父本	Mann <i>et al</i> ., 1995

二、基因印迹与甲基化

现在认为，大多数哺乳动物雄及雌原核的差异涉及其甲基化形式的差异。甲基化与非甲基化 CG 二聚体的分布可用限制性内切酶 HpaII 及 MspI 来分析。这两种酶都切同一位点 (CCGG)，但中间的 C 甲基化时则 HpaII 不能切 DNA，而 MspI 不论甲基化与否都能酶切。因此，一特定细胞类型的 DNA 可用这两种酶的不同切法来进行研究。雌性及雄性哺乳动物的原始生殖细胞 (PGC) 的核为明显的低度甲基化。随着配子的成熟，精子及卵子的基因经历大量的甲基化，似乎在生殖细胞形成期间，以前的信息被抹去。而在减数分裂期间，新的信息被引入基因组中。一个基因的甲基化形式在精子和卵子之间可能不同。这些基因特异性甲基化的不同在胚胎细胞的染色体中也可见到。精子与卵子基因组之间甲基化的不同可能特化一个基因来自母亲还是父亲。这些母本或父本的印迹将另外的信息加到基因组中。

在转 c-myc 基因的小鼠中，当此基因从雄性亲本遗传来时，它特异性地在心脏转录，而在别的组织中不转录。但当从雌性亲本遗传来时，它完全不表达。此基因在卵子成熟期为甲基化的，但在精子形成时则保持低度甲基化。在自雄性遗传此基因的动物中，此基因未甲基化，在心脏中表达。而在从雌性获得此基因的动物中，此基因发生甲基化，并不表达。在雌性及雄性中，甲基化的形式在生殖细胞中被抹去。小鼠从配子来

的甲基化差异在 IGF-2R 及 H19 基因中也可见到。而且，如果把这些基因放在一缺失甲基化 CpG 位点酶的突变鼠中时，转录可在以前不表达的部位表达。

DNA 甲基转移酶 3 样基因 (Dnmt3l) 编码与 Dnmt3a and Dnmt3b 同源的蛋白，但是没有转甲基酶作用，也没有酶活性。虽然 Dnmt3l 缺失的雌鼠可以产生成熟的和功能性的卵母细胞，但在原肠中期阶段，从这些卵母细胞来的胚胎的胎盘发育异常或死亡。对不同染色体上的母源的甲基化基因（如 IGF-2R, Peg1 和 Peg3）的分析表明，Dnmt3l 缺失的卵母细胞不能建立母本特异的甲基化印迹，在后代中未检测到母体所有印迹基因的单一等位基因的表达。这些结果说明，甲基化印迹对于卵母细胞成熟是必需的。Dnmt3l 可能与 DNA 甲基转移酶 Dnmt3 家族相互作用来影响印迹基因。Dnmt3l 可能与 Dnmt3a 或 Dnmt3b 共同作用调节卵母细胞特异性印迹基因的甲基化。Dnmt3a 或 Dnmt3b 缺失的雌鼠也不能建立母本甲基化印迹。而 Dnmt1 在卵母细胞中的失活并不影响甲基化印迹的建立，但是影响着床前胚胎印迹的维持。除了在雌配子中的基因印迹作用外，DNA 甲基化对于精子发生也是必需的。在 Dnmt3a 敲除的小鼠中，睾丸在减数分裂阶段有异常的精母细胞，很少有成熟的精子。在 Dnmt3l 敲除的小鼠中，精子发生停滞在进入减数分裂的时候，导致这些小鼠完全没有成熟的精子。

三、雌性哺乳动物的 X 染色体失活

从果蝇到人类，雌性动物的每个细胞中具两个 X 染色体，而雄性中只有一个。不同于 Y 染色体，X 染色体上具数千种对细胞活性必需的基因。尽管雌性动物中具两倍的 X 染色体数，但雌性及雄性中却具几乎等量的 X 染色体编码的酶，这种平衡称为剂量补偿 (dosage compensation)。

在果蝇中，雌性中两条 X 染色体都具活性，但从雄性来的 X 染色体增强转录，使得雄性的一条 X 染色体产生与雌性两条染色体一样多的产物，这主要是通过特异性的转录因子结合到雄性 X 染色体上的数百个位点来完成的。哺乳动物中，X 染色体的剂量补偿通过失活每一雌性细胞中的一条 X 染色体来完成。这样每一哺乳动物体细胞中，不论雌雄，仅有一条有功能的 X 染色体，此现象称 X 染色体失活 (X chromosome inactivation)。失活的 X 染色体的染色质转化为异染色质 (heterochromatin)，后者在细胞周期的大部分时间都处于凝集状态，在核中的常染色体后复制，这种异染色质称为巴氏小体 (Barr body)，常见于雌性细胞的核膜上。X 染色体失活必须在发育早期发生。在一不具失活 X 染色体的突变个体中，小鼠胚胎每一细胞中两条 X 染色体都表达，结果导致外胚层细胞死亡，中胚层形成缺失，最终使胚胎在妊娠第 10 天左右死亡。

人的 Lesch-Nyhan 综合征是由缺乏 X 染色体连锁的次黄嘌呤核糖转移酶 (hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT) 基因引起的。在 X 染色体上具此突变的男性患此病，但雌性中突变 HPRT 基因的存在可为另一 X 染色体所掩盖，因它携带野生型的等位基因。儿子具此病的母亲被称为携带者，一条 X 染色体上具突变的 HPRT 基因，另一 X 染色体上具野生型基因。X 染色体失活的 Lyon 假说对转录水平的差异性基因失活提供了一很好的解释，但也有几种例外。①X 染色体失活仅适用于体细胞中，而不适用于生殖细胞。在雌性生殖细胞，失活的 X 染色体在细胞进入减数分裂前不久重新激活。

在成熟卵母细胞中，两条 X 染色体都有活性。在每一代，X 染色体失活必须重新确定。②小鼠中最早的 X 染色体失活发生在滋养层细胞中，此处父本来的 X 染色体特异性地失活。③X 染色体的失活并不是贯穿于 X 染色体的整个长度。虽然几乎所有的基因在 X 染色体的长臂上，但 X 染色体短臂上的基因并不发生这种失活。

在原条期，X 染色体失活的发生是随机的，有可能来自父亲的 X 染色体失活，也可能来自母亲的 X 染色体失活。在雌性哺乳动物中，这种失活导致 X 染色体相关的基因在有的细胞中表达，在有的细胞则不表达，形成嵌合体。在小鼠中，X 染色体失活在胚外组织中发生的时间比表胚层中要早。在胚外组织中，父源性的 X 染色体优先失活。

X 染色体失活依赖于染色体上的一个 X 失活中心。如将此中心去掉，则染色体处于活性状态。如果将此中心移植另一染色体上，则可导致这一染色体失活。X 失活中心的 Xist 基因编码一非翻译的 RNA。Xist 基因在失活的 X 染色体上处于活性状态，所编码的 RNA 将整个染色体包裹起来。在配子发生过程中，Xist 基因的启动子发生差异性甲基化。Xist 基因在精子中去甲基化，在卵母细胞中则甲基化。这种形式在胚外组织中一直得以维持，这与胚外组织中父源性 X 染色体的优先失活相一致。但在表胚层中，这种基因印迹可以抹去，X 染色体的甲基化是随机的。

四、基因印迹的作用

许多理论都试图解释基因印迹的起源及优势。Chandra 和 Nanjundiah 提出印迹的及非印迹的同一等位基因可能有不同的显型，对于印迹的修饰可能有多效性，以及印迹可以与其他特性相进化。Holliday 提出基因印迹的功能是，可能阻挡了母本和父本转录物间有害的交流。Barlow 提出基因印迹可能是利用 DNA 甲基化的基因调控作为抵御机制。在卵母细胞中，外来病毒灭活的过程可能也是一些机体本身（母本的）位点的失活引起的。最近，Thomas 认为，印迹作为监督染色体丢失的机制，因此保护了胚胎免于产生癌症以及单倍体或三倍体的胚胎。如果印迹位点在基因组分散，一部分染色体的完全丢失可能会造成等位基因活性的缺失，而产生有害的影响。McGrath 和 Solter 强调由雄原核及雌原核发育来的小鼠胚胎的表型有所不同。由雄原核发育的胚胎发育中具有很少的胚胎本部及大量的滋养层，而雌原核产生的胚胎则可以发育成为良好的胚胎，但具有很少的滋养层。这些雄原核和雌原核显型的胚胎印迹表明，雄性利用印迹作用使母本在胚胎中的输入量最大化。此外，Varmuza 和 Mann 提出，哺乳动物的印迹作用可能是保护雌性免于发生卵巢生殖细胞肿瘤的一个途径，通过印迹作用可以阻止恶性滋养层疾病的发生。

第四节 细胞分化与胚层形成

内细胞团细胞和滋养层细胞最早可在桑椹胚的早期和晚期加以区分。在胚泡中，则形成明显不同的内细胞团和滋养层。胚泡自透明带中孵出后，便开始与子宫内膜相接触，即开始胚胎着床过程。滋养层对于胚泡与子宫的黏附及着床是必需的，以后发育形成胎盘的胚胎部分。内细胞团主要形成胚胎的各种结构以及一些胚外膜结构（见图

6-4)。各种哺乳动物的原肠形成很相似。

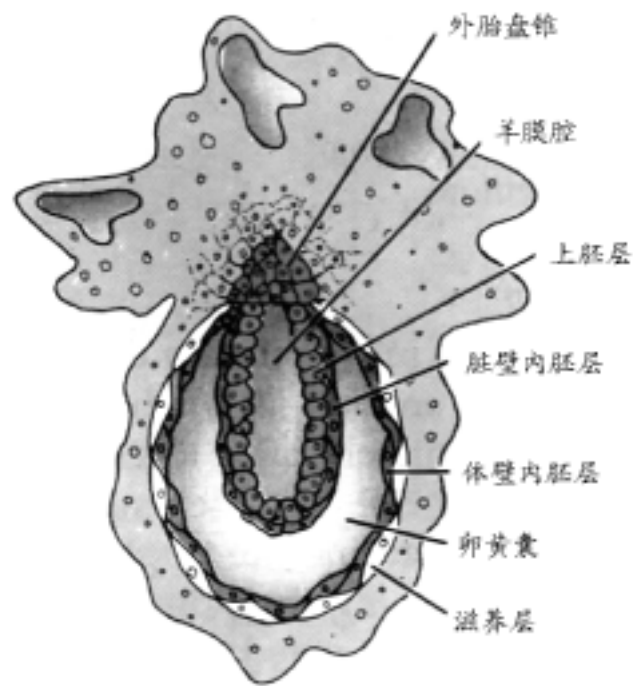


图 6-4 小鼠的卵柱期胚胎的各种结构 (引自 Gilbert SF, 1994)

一、小鼠胚胎的分化

在胚泡形成后，滋养层分为极性滋养层 (polar trophoblast) 和壁滋养层 (mural trophoblast)。极性滋养层为内细胞团外的一层加厚的滋养层，而壁滋养层则为覆盖胚泡腔其他区域的滋养层。在胚胎着床后，极性滋养层继续增殖，而壁滋养层则进行多次 DNA 复制，但并不发生有丝分裂，从而产生滋养层巨细胞 (trophoblast giant cell)。与此同时，内细胞团则分化成上胚层或表胚层 (epiblast)，也称原始外胚层 (primitive ectoderm)，以及下胚层 (hypoblast)，也称初级内胚层 (primitive endoderm)。在小鼠中，上胚层最初是一个倒置的圆屋顶样结构，下胚层紧贴在圆形的顶上。在大约受精后第 6.5 天时，上胚层中的细胞发生死亡，使得上胚层空心化，从而产生原始羊膜腔 (proamniotic cavity)。此期的胚胎也称为卵柱 (egg cylinder) (图 6-4)。下胚层细胞继续增殖和扩展后，紧贴在胚泡腔的内表面，便形成卵黄囊 (yolk sac)。实际上，卵黄囊中并无卵黄，只是因与鸟类和爬行类的卵黄囊同源而得名。卵柱外包的下胚层为脏壁内胚层 (visceral endoderm)，而胚泡腔内表面包的为体壁内胚层。极性滋养层继续增殖后，产生一个帽状结构盖在胚外外胚层上面，称为外胎盘锥 (ectoplacental cone)。此外，极性滋养层也产生更多的巨细胞，迁移到胚胎的周围。这些巨细胞以后被壁滋养层所吸收。此时，胚胎开始准备进行原肠形成过程。

二、人胚胎的分化

在胚泡形成后，灵长类的滋养层并不增殖，也不形成类似小鼠内细胞团上面的外胎盘锥结构。在灵长类中，内细胞团上面的滋养层细胞开始相互融合形成一合胞体的结

构,称为合体滋养层 (syncytiotrophoblast)。当胚泡在着床后埋入子宫内时,合体滋养层细胞在胚泡外扩展,结果使胚泡的外面由一层细胞滋养层细胞 (cytotrophoblast) 包围,这层细胞外又由合体滋养层细胞包围。与小鼠一样,内细胞团也分化为上胚层和下胚层。然而,上胚层并不是圆屋顶样,而是扁平的,下胚层也为扁平的。小鼠中羊膜腔是由细胞死亡后形成的,但人的羊膜腔则是由上胚层进一步分化形成的。上胚层分化为胚胎上胚层及一层羊膜细胞 (amniocyte 或 amnioblast)。胚胎的上胚层形成胚胎本部的结构。羊膜细胞则分泌羊膜液,从而在上胚层上面产生一个新的腔,为羊膜腔。

与小鼠中一样,人下胚层进一步增殖后,向四周迁移,紧贴在胚泡的细胞滋养层的内表面,将原来的胚泡腔完全包围,将由下胚层形成的这层细胞称为胚外体腔膜 (exocoelomic membrane),也称为 Heuser 氏膜 (Heuser's membrane)。由这层所包围的腔称为初级卵黄囊 (primary yolk sac)。当初级卵黄囊形成后,下胚层分泌一种疏松的网状基质,逐渐填充在 Heuser 氏膜和细胞滋养层之间,将这层物质称为胚外网状基质 (extraembryonic reticulum)。有人认为胚外中胚层来源于下胚层,也有人认为来源于上胚层。胚外中胚层形成后分为两层,一层将初级卵黄囊包围,另一层将初级卵黄囊外面的胚泡腔包围。以后,当两层胚外中胚层之间的胚外网状基质分解后,形成一腔,腔中由液体所充满,此腔为绒毛膜腔 (chorionic cavity),也称胚外体腔 (exocoelom) (图 6-5)。当绒毛膜腔扩展时,胚外中胚层通过生长和迁移逐渐将羊膜与细胞滋养层相

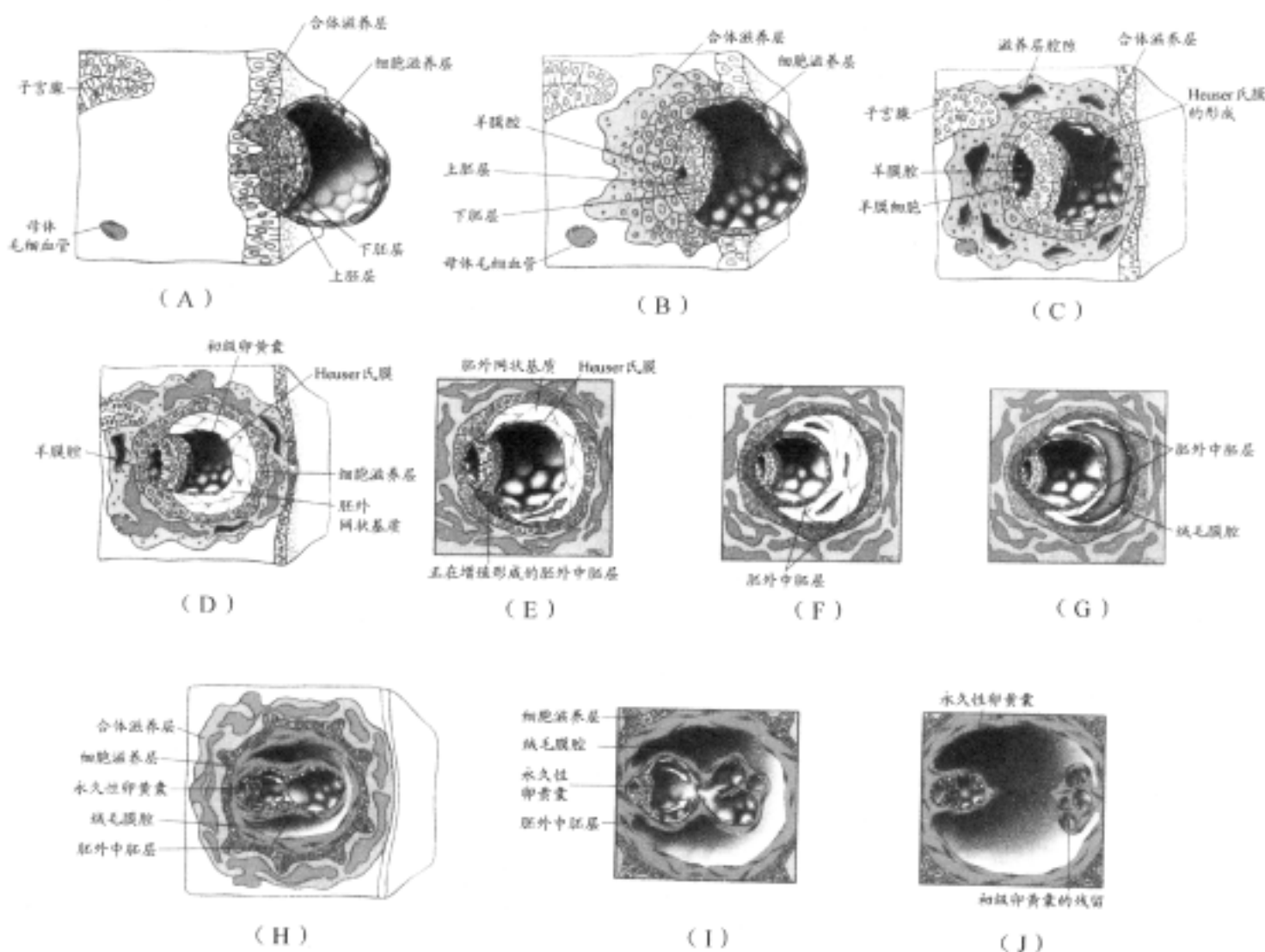


图 6-5 人的着床后胚胎过程 (引自 Larsen WJ, 2002)

分离。到人妊娠第 13 天时，带有背部的羊膜及腹部的卵黄囊的胚盘悬浮在绒毛膜腔中，与细胞滋养层仅由一条粗的中胚层柄相连，将这条中胚层柄称为体蒂（connecting stalk）。体蒂以后形成脐带血管。

当下胚层进一步增殖，并向胚外中胚层的内表面迁移，以取代原来的下胚层细胞。这时将初级卵黄囊逐渐压缩，并使初级卵黄囊向胚胎的对胚极靠近，以后与胚胎分离后变为一些小的胚外体腔泡，并最终退化。在原来的初级卵黄囊处新形成的腔则变为次级卵黄囊（secondary yolk sac）或永久性卵黄囊（definitive yolk sac）（图 6-5）。胚胎在此时开始原肠形成过程。在小鼠中，羊膜和绒毛膜的形成与灵长类不同，主要是靠胚外中胚层的向外生长以及一些外胚层细胞自原羊膜腔中穿过后形成羊膜腔和绒毛膜腔的。

在人妊娠第 4 周，次级卵黄囊为胚胎中的主要结构，在早期具有很多重要的功能。形成卵黄囊外层的胚外中胚层是血细胞生成（hematopoiesis）的主要部位。将产生最初的内皮细胞及血液干细胞的那些细胞自原始外胚层中迁移进入卵黄囊。这些细胞进入卵黄囊循环（vitelline vasculature）后协调发育，形成血岛（blood island）。组成卵黄囊壁的内胚层也产生血清蛋白，因此次级卵黄囊在胚胎的营养代谢方面起一定的作用。此外，卵黄囊也是产生原始生殖细胞的部位。卵黄囊通常在出生前消失。

三、原 肠 形 成

位于胚胎将来的后端处的胚胎上胚层开始形成原条（primitive streak）的过程，标志着胚胎原肠形成的开始。小鼠的上胚层为倒置的圆屋顶样结构，原条在卵柱的一侧形成后，开始向上胚层的底部扩展，并自底部进一步向另一侧扩展，然后在胚胎的头端形成原结。胚胎沿着原条的方向发育，形成前后轴。

人与其他的灵长类中，上胚层为扁平的，原条是在上胚层的表面形成的，并向胚胎前部扩展。在人妊娠第 16 天，靠近原条的上胚层细胞开始增殖，细胞也变扁，细胞之间逐渐失去连接。然后，这些细胞开始沿原条进入上胚层和下胚层之间的区域内。一些上胚层细胞侵入下胚层中，并逐渐取代下胚层细胞，从而形成胚胎的内胚层（endoderm），以后形成肠及肠的衍生物的内表面。原条出现后，胚盘可区分出头尾两端与左右两侧。一些上胚层细胞自原条迁移进入上胚层和新形成的内胚层之间，形成第三个胚层，即胚胎中胚层或称中胚层（mesoderm）。当中胚层和内胚层都形成后，将上胚层称为外胚层（ectoderm）。这时形成具有三个胚层的胚盘。因此，外胚层、中胚层和内胚层均来自于上胚层。

以后，原条头端（原结）的细胞也陷向深层，并在内外胚层之间的中轴线上向头侧生长，形成一条脊索（notochord）。在原条和原结中央出现的沟和凹，分别称为原沟和原凹。随着胚盘的发育，脊索继续发育，而原条则相对缩短，最后消失，这时候三胚层的胚盘增大呈梨形。

四、三胚层分化

1. 外胚层的分化

脊索出现后，诱导其背侧的外胚层增厚呈板状，称神经板 (neural plate)。神经板随着脊索的生长而增长，且头侧宽于尾侧。以后神经板沿其长轴凹陷形成神经沟 (neural groove)，沟两侧的隆起称神经褶。两侧的神神经褶在神经沟中段开始靠拢并愈合，并向头尾延伸，使神经沟封闭为神经管 (neural tube)。神经管位于胚体中轴的外胚层下方，分化为中枢神经系统以及松果体、神经垂体和视网膜。在神经褶愈合的过程中，一些细胞在神经管的背外侧，形成两条纵行的细胞索，称神经嵴，可分化为周围神经系统及肾上腺髓质等。位于胚体外表的外胚层，分化为表皮及附属器官、角膜、腺垂体、口鼻腔和肛门的上皮等。

2. 中胚层的分化

中胚层形成后，在脊索的两侧由内向外依次分为轴旁中胚层、间介中胚层和侧中胚层三个部分。分散存在的中胚层细胞则成为间充质。

(1) 轴旁中胚层

紧邻脊索的中胚层细胞增殖较快，形成纵行的细胞索为轴旁中胚层，后者以后横裂为块状的细胞团，称为体节 (somite)。体节左右成对。

(2) 间介中胚层

位于轴旁中胚层与侧中胚层之间，分化为泌尿和生殖系统的主要器官。

(3) 侧中胚层

为最外侧的中胚层部分，左右侧中胚层在口咽膜的头侧融合为生心区。侧中胚层分为背腹两层，背侧与外胚层相贴，称体壁中胚层，腹侧与内胚层相贴，称为脏壁中胚层。两层之间为原始体腔。体壁中胚层分化为体壁的骨骼、肌肉和结缔组织等，脏壁中胚层包于原始消化管的外面，分化为消化管与呼吸道管壁的肌肉和结缔组织等，原始体腔依次分隔为心包腔、胸膜腔和腹膜腔。

3. 内胚层的分化

在胚体形成的同时，内胚层卷折形成原始消化管。此管头端起自口咽膜，中部借卵黄管与卵黄囊相连，尾端止于泄殖腔膜。原始消化管分化为消化管、消化腺和下呼吸道与肺的上皮，以及中耳、甲状腺、甲状旁腺、胸腺、膀胱、阴道等上皮组织。分散的间充质则分化为身体各处的骨骼、肌肉、结缔组织和血管等。

总之，由胚泡开始分化为各种结构后，通过原肠形成过程发育为外胚层、中胚层和内胚层，并由这三个胚层发育形成身体中的各种组织和器官。由于这些过程比较复杂，不同哺乳动物间的差异也较大，本章中对以后的器官发生过程不再详细介绍。图 6-6 中简要列出了由胚泡分化形成的各种胚层结构，图 6-7 中列出了由胚泡分化的三胚层结构所形成的各种组织和器官。

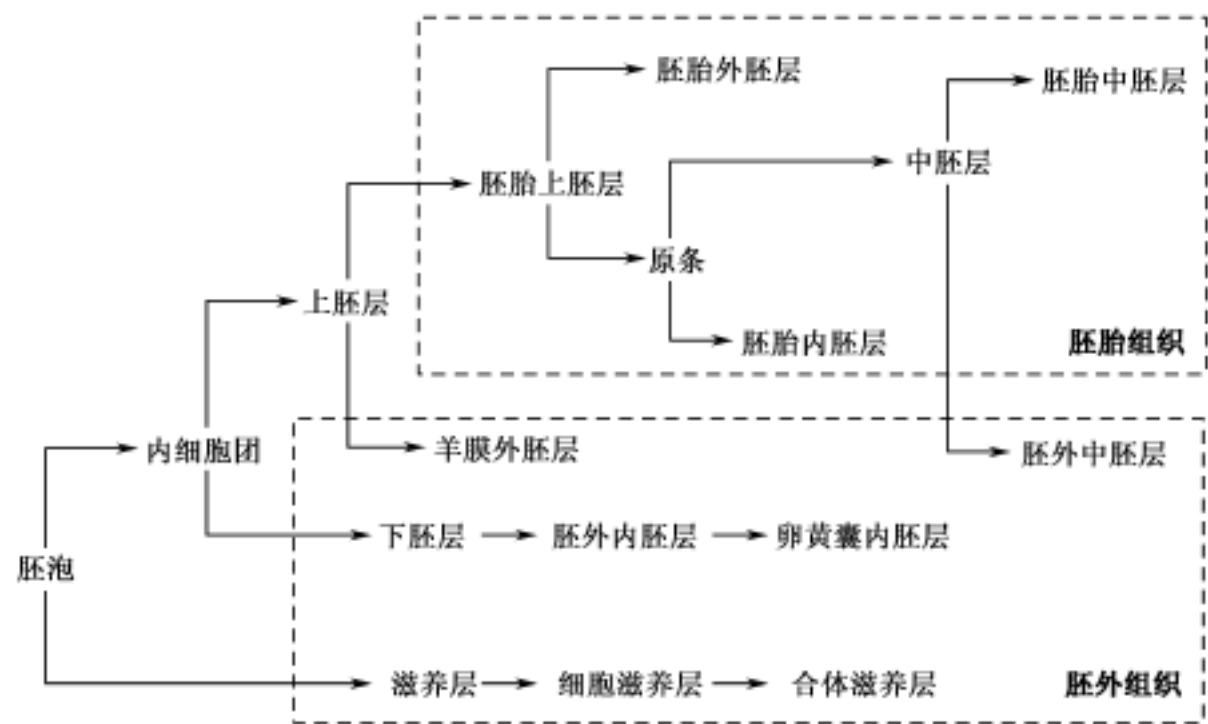


图 6-6 示胚泡分化后形成的各种胚层 (引自 Gilbert SF, 1994)

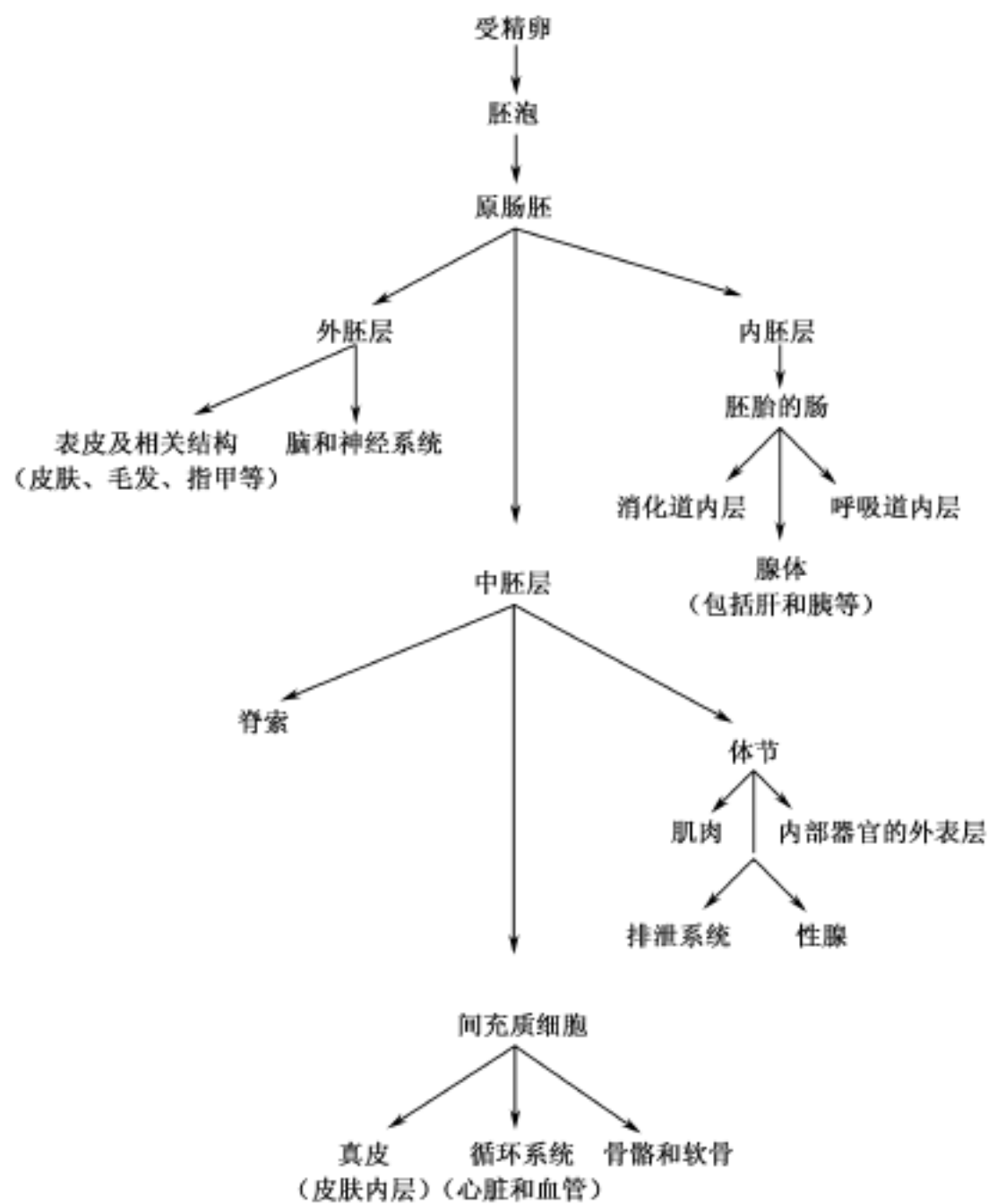


图 6-7 哺乳动物的组织分化和器官形成

第五节 子宫胎盘循环的建立

在人妊娠第 9 天的胚胎中，合体滋养层的一些区域发生空泡化，在合体滋养层中形成一些小泡样结构，称为滋养层腔隙 (trophoblast lacunae)。以后，靠近合体滋养层的母体毛细血管也扩展形成母体血窦 (maternal sinusoids)，并迅速发育后与滋养层腔隙交织在一起。在妊娠第 11~13 天，这种交织进一步发育。细胞滋养层在局部也增殖后，向合体滋养层中央伸入，也使得外面包围的合体滋养层进一步向外生长。这些突起的外层为合体滋养层细胞，中央为细胞滋养层细胞，也使滋养层细胞进一步伸入母体血窦中。将所形成的这种突起称为初级绒毛干 (primary stem villi)。直到妊娠第 16 天，与细胞滋养层相连的胚外中胚层穿入初级绒毛干的中央，使初级绒毛干转化为次级绒毛干 (secondary stem villi)。到妊娠第 3 周结束时，这些伸入绒毛中的胚外中胚层开始产生血管，并与胚胎本部的血管相连，从而建立了功能性的子宫胎盘循环。将具有分化的血管的这种绒毛称为三级绒毛 (tertiary stem villi) (图 6-8)。此时，在母体和胎儿血液间扩散的气体、营养物质及废物等必须穿过 4 层组织，即绒毛的毛细血管内皮、绒毛中央的疏松结缔组织、一层细胞滋养层及一层合体滋养层。但母体血管的内皮并不侵入滋养层腔隙中。

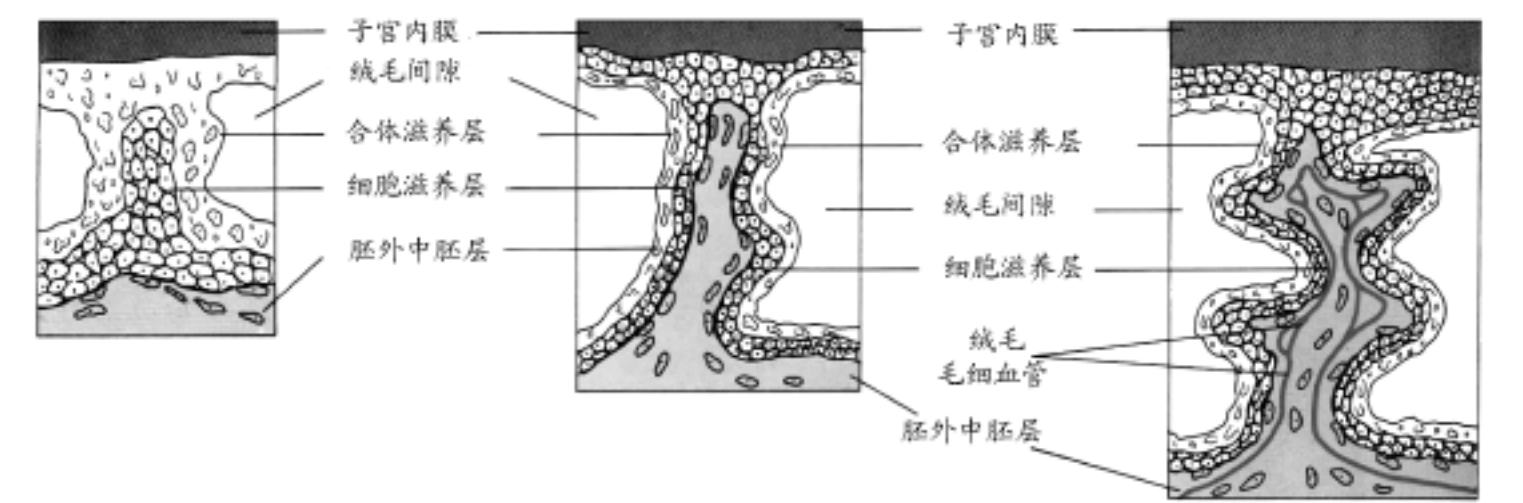


图 6-8 人的初级绒毛、次级绒毛和三级绒毛结构 (引自 Gilbert SF, 1994)
A. 初级绒毛; B. 次级绒毛; C. 三级绒毛

完全形成的三级绒毛由滋养层细胞和具有血管的中胚层组成，将这种结构称为绒毛膜 (chorion)。绒毛膜与子宫壁相融合后，形成胎盘。因此，胎盘是由母体的子宫内壁及胎儿的绒毛膜共同组成的一个结构。

第六节 胚胎干细胞

一、ES 细胞与 EG 细胞

胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES 细胞) 是由哺乳动物早期胚胎内细胞团细胞分离来的，经体外抑制分化培养所获得的具有保持未分化状态和无限增殖能力的细胞

系。ES 细胞系兼有一般培养细胞及胚胎细胞的双重特性，即可以扩增、可进行基因遗传操作选择、冻存与解冻、含有正常的二倍体核型、具有发育的全能性或多能性。由于 ES 细胞可以定向诱导分化为几乎所有种类的细胞，并且可以广泛地应用于嵌合体的制备、克隆动物的生产，并且在人体发育、器官移植、细胞治疗、药物开发和基因遗传修饰等方面都有重要的作用，使得各种哺乳动物 ES 细胞的分离与克隆成为国际上生命科学领域的研究热点之一。

Evans 和 Kaufman 首次于 1981 年用延迟着床的小鼠胚泡建立起未分化的 ES 细胞系。同年 Martin 也用条件培养基分离得到小鼠的 ES 细胞。

现在许多学者都采取与小鼠 ES 细胞相同或相似的方法，用桑椹胚或胚泡分离各种家畜 ES 细胞。但不同动物的早期胚胎在发育速度以及生长行为上存在着差异。因此，小鼠 ES 细胞的分离方法并不完全适用于家畜 ES 细胞的分离与克隆。例如从选择早期胚胎的胚龄上来讲，为了保证早期胚胎中含有全能性细胞，一般小鼠只选 2.5 天桑椹胚或 3 天胚泡，猪则多取 6~10 天胚泡，牛取 6~7 天桑椹胚或 7~8 天胚泡，绵羊取 8~9 天胚泡。而且，由核移植得到的重构胚或体外受精胚也可以获取早期胚胎，用于 ES 细胞的分离。另外，在获取早期胚胎过程中，往往又要经过分离内细胞团、去除透明带和分散卵裂球等处理来提高 ES 细胞的分离效率，其中不同的处理方法对不同动物 ES 细胞的分离工作又有不同的影响。但到目前为止，除小鼠外，在其他物种中所分离得到的 ES 细胞都未能证实具有生殖系嵌合能力。因此，从小鼠以外的其他物种中分离得到的 ES 细胞，均称为类 ES 细胞或 ES 细胞样细胞 (ES-like cell)。图 6-9 为哺乳动物中 ES 细胞分离及培养的一个简单示意图。

除了由早期胚胎可以获得 ES 细胞外，用原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 也可以分离得到 ES 细胞。Matsui 等用附植后小鼠胎儿的 PGCs 传代培养得到碱性磷酸酶和胚胎时期特异性抗原-1 (SSEA-1) 染色均呈阳性，并且可形成类胚体、具有嵌合性的 ES 细胞，从而首次成功地证明了 PGCs 也可以用于 ES 细胞分离。此后，用家畜 PGCs 建立 ES 细胞系有了较大的进展，已经成功地用牛的 PGCs 分离得到类 ES 细胞，用猪的 PGCs 也已分离得到四个类 ES 细胞系。为了与来自内细胞团的 ES 细胞加以区别，将来自原始生殖细胞的胚胎干细胞称为胚胎生殖细胞或 EG 细胞 (embryonic germ cell)。

哺乳动物 PGCs 并非起源于性腺内部，而是形成于原条中胚层，在胚胎发育过程中随原条细胞内卷、下陷等运动而到达卵黄囊背侧的内胚层，并最终沿背肠系膜迁移至生殖嵴。由 PGCs 分离 ES 细胞的原理就是根据其在早期胚胎中的迁移过程而取相应的组织。如牛多取 29~35 天胎儿生殖嵴，而猪一般取 24 天胎儿背肠系膜或 26 天生殖嵴。

二、不同物种的 ES 细胞分离培养

利用 ES 细胞进行基因打靶和转基因可能获得转基因家畜，从而得到生长快、抗病力强、高产的优良品种。因此，对家畜 ES 细胞的研究工作迅速地开展起来。尽管目前已经报道分离得到许多家畜的 ES 细胞，但由于这些 ES 细胞缺乏嵌合能力，特别是生殖系嵌合能力，即无法形成包括生殖系在内的嵌合体。因此，实际上目前只能称之为类

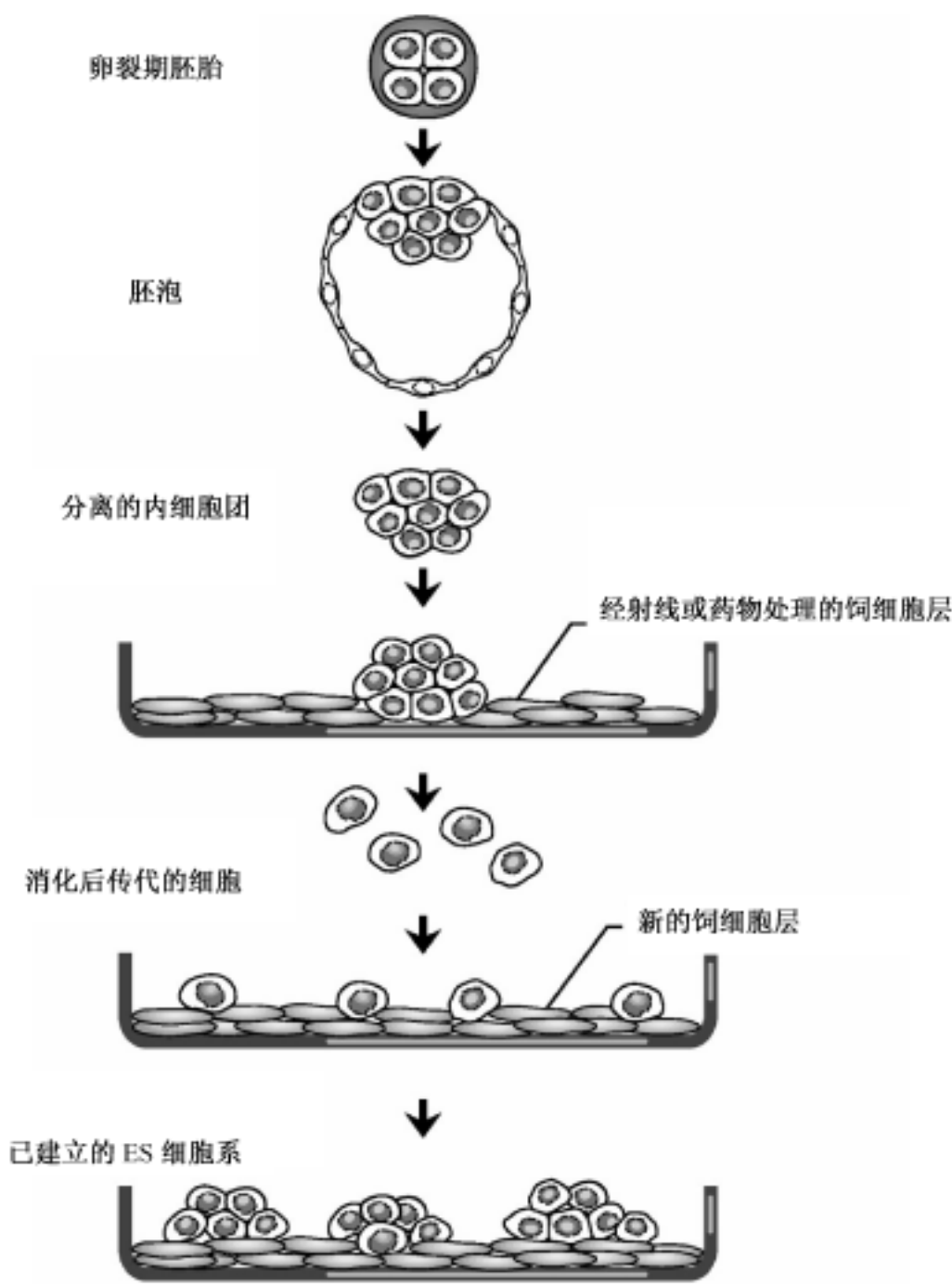


图 6-9 胚胎干细胞的分离及培养过程 (引自 Odorico JS 等, 2001)

ES 细胞。在以前的小鼠 ES 细胞分离培养过程中，如果这些细胞要应用于基因敲除等工作，需要进行长时期的传代培养。但自 1997 年克隆绵羊出生以来，细胞核移植技术获得了突飞猛进的发展，利用核移植技术已得到了基因敲除猪。利用 ES 细胞作为核供体，已在小鼠和牛等动物中得到了克隆动物。这样对所分离得到的 EG 细胞不需要进行长期的传代培养，只需进行几代培养，将所需的基因敲除后，经过体外筛选，即可用细胞核移植的方法获得基因敲除家畜。而且这些细胞也不一定要用嵌合体等方法证实其具有全能性才能应用，因为已有很多实验证明体细胞就可获得克隆动物。下面就已经得到的家畜及人类 ES 细胞（包括猪、兔、绵羊、山羊等）的建立情况及研究状况分别作一简单介绍。

1. 猪的 ES 细胞

在家畜中，对猪的 ES 细胞研究最多。最早曾采用猪胎儿成纤维细胞和子宫上皮细

胞为饲养层来分离猪 ES 细胞，效果并不理想。以后发现，在初期培养猪胚泡时，用猪成纤维细胞饲养层可以促进胚泡的贴壁和内细胞团克隆的形成；而用 STO 细胞作饲养层，猪胚泡可以附着，内细胞团却不增殖，但以后的传代还需要 STO 细胞来进行。与其他动物的 ES 细胞一样，在无饲养层细胞和添加剂的培养基中，猪 ES 细胞可以自发分化。如当将其接种于无黏性的底物上时，它就会形成一细胞聚合体。若将此聚合体接种于基底物上时，细胞能迁移、增殖，形成代表三个胚层的各种细胞。

猪胚胎的胚龄越小，胚胎细胞中所含脂质就越多，对外界温度的变化也就越敏感。因此选取其早期胚胎的时期很关键。研究发现，6~7 日龄胚泡的内细胞团在体外培养时，几乎不能传代就死亡；而用 8~10 日龄胚泡的内细胞团培养时，则胚龄越大，越易分离到 ES 细胞。以后证实，10 日龄胚泡是分离出 ES 细胞的最佳选择，即使是第 9 天的胚泡也不能获得理想的效果。

能否得到有嵌合能力特别是种系嵌合能力的猪 ES 细胞，始终是各国学者所最关心的问题。已经报道获得了可参与嵌合体形成的猪 ES 细胞，并且毛皮嵌合体后代占所产仔猪的 72%，但该 ES 细胞系也无法形成生殖系嵌合体。

随着用 PGCs 分离哺乳动物 ES 细胞方法的成熟，各国学者也纷纷尝试用此法分离猪的 ES 细胞，并取得了一些进展。研究表明，猪 PGCs 在有 STO 饲养层下的条件下，并非一定要添加白血病抑制因子 (LIF)、干细胞因子 (SCF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)，这可能是由于 STO 饲养层或猪 PGCs 自身可以产生足够的细胞生长因子和抑制分化因子。而且，利用由 PGCs 分离到的 EG 细胞已经成功地获得了转基因猪。

2. 牛的 ES 细胞

最初分离牛 ES 细胞时，也采用类似分离小鼠 ES 细胞的技术路线，但因为牛和小鼠的胚胎生长状态和生长要求不同，因此小鼠 ES 细胞的分离方法不完全适用于牛 ES 细胞的分离。根据可能存在的问题，各国学者对各分离条件进行了多角度的探索和尝试。

在胚龄的选择上，用牛胚泡的内细胞团及桑椹胚均分离得到了 ES 细胞，还有人用 8~16 细胞期的致密化前的胚胎也分离得到了 ES 细胞。

有人报道用低密度悬浮培养法来分离牛 ES 细胞。该方法在培养液中加入有硒、胰岛素、转铁蛋白和 5% 的胎牛血清，尽管所得到的 ES 细胞在用于核移植时发育率比较高，但其生长状态与常规培养的 ES 细胞完全不同，而且其增殖速度也不能满足基因操作和冻存的要求。

目前所分离到的牛的 ES 细胞由于均未证实具有生殖系嵌合的能力，只能称为 ES 细胞样细胞。尽管如此，这些 ES 细胞样细胞具有正常的二倍体核型，表达碱性磷酸酶、SSEA-1、STAT3 及 Oct-4 等，其中的一些细胞系甚至可长期进行传代培养，达 150 多代。此外，利用这些 ES 样细胞作为核供体进行细胞核移植，已经成功地得到了克隆牛。

自从第一次由 1~4 月龄的牛胎儿中得到 PGCs 以来，各国学者就纷纷开始利用 PGCs 分离克隆牛 ES 细胞。最初是从 29~30 日龄的牛胎儿生殖嵴中分离得到 PGCs，然后用丝裂霉素 C 处理的同龄牛胎儿成纤维细胞作饲养层，以传统 ES 细胞培养基加以

培养，得到的牛类 ES 细胞经证明具有发育全能性。后来有学者用 PGCs 建立起 18 个 ES 细胞系，经鉴定这些细胞可以形成嵌合体，但还未证实这些细胞能参与生殖系的形成。

3. 绵羊和山羊的 ES 细胞

最初分离绵羊类 ES 细胞的尝试是用羊胚胎成纤维细胞作饲养层，对 7 日龄和 8 日龄绵羊胚泡进行 ES 细胞分离培养，结果只培养出了类内胚层细胞，而无类 ES 细胞出现。改进方法以后，获得了类上皮细胞，算是首次分离绵羊类 ES 细胞成功。

此后，绵羊和山羊类 ES 细胞的分离培养工作有了较大的进展：先是成功地从绵羊中分离得到可传到第四代的类 ES 细胞群落，以后用早期第 1~3 代绵羊类 ES 细胞进行核移植，生出 4 只羔羊。

4. 人 ES 细胞

自 1998 年从人胚胎的内细胞团建立人 ES 细胞系，以及利用流产胎儿生殖嵴中的原始生殖细胞建立 EG 细胞以来，有关人 ES 细胞的研究取得了很大的进展，也越来越受到关注。目前人 ES 细胞来源有三个：人工流产胎儿生殖嵴的原始生殖细胞、人类辅助生殖中心体外受精-胚胎移植后的剩余胚胎，以及通过体细胞核移植技术以无性生殖方法产生的人类胚胎。

人胚胎干细胞（ES 细胞）不仅为生物学家所关注，也颇受医学专家、媒体、政治家、伦理学家等的关注。一方面 ES 细胞在组织修复方面具有很好的临床应用前景，可进行替代性治疗，使很多缺陷性功能得以恢复。另一方面，对这种细胞的应用也争议很大，因为 ES 细胞来自于着床前胚胎。虽然，目前用于 ES 细胞分离的胚胎均来自体外受精过程中多余的胚胎，争论集中在进行治疗性克隆时，需要将病人的体细胞核移植到一去核的卵母细胞中，以便得到与病人相同的 ES 细胞来用于自体移植，以免发生组织排斥反应。

理论上，人 ES 细胞可用于很多方面。一方面可用于研究早期妊娠损失的原因、胚胎老化和大龄妇女的妊娠失败等。另一方面，人 ES 细胞可用于毒理学研究，因为早期胚胎细胞比成年细胞对药物的反应更敏感，可进行新药物的筛选。人 ES 细胞最重要的用途在于移植医学中，可进行细胞替代性治疗，可治疗糖尿病、帕金森氏综合征、中风、关节炎等。对于某些遗传性疾病，还可以对干细胞进行基因修饰。将经过“定向分化”或“基因修饰”后的干细胞进行筛选后，把“合格”的细胞移植给病人。在治疗性克隆中，利用自体 ES 细胞移植可避免了移植后的免疫排斥反应。具体实施方案是：将患者体细胞核转移到去核的 ES 细胞中，获得的重建 ES 细胞系既存在无限增殖和诱导分化能力，还具有同患者完全相同的基因型，采用该细胞系进行移植治疗不会发生免疫排斥。也可将患者的体细胞核移入捐献的去核卵细胞中，自得到的克隆胚泡中分离 ES 细胞系。动物体细胞核移植的成功为人类自体同源移植治疗即治疗性克隆提供了可能。

虽然现在在组织培养和免疫缺陷性小鼠的畸胎瘤中，ES 细胞可分化形成神经细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、胰腺及肝细胞等，但在短期内要使细胞替代治疗得到广泛应用还不可能，也不可能利用 ES 细胞制造出一个完整的器官。

由于得不到足够用于移植的细胞,细胞替代性治疗一直受到很大限制。目前,在几个实验室已经建立了人ES细胞系。在体外维持一年多后,这些细胞仍能保持正常的核型和表型,可为细胞治疗提供很好的细胞来源。目前已有26个人的ES细胞系,虽然其中大多数的细胞系没有进行很好的鉴定,但在很多标志性分子的表达方面都很相似。自不同实验室来的ES细胞系均表达SSEA-4、Tra-1-60和Tra-1-81等表面标志分子。另外,Oct-4等与这些细胞的多潜能有关的标志分子在这些细胞系中均表达。这些细胞也表达高水平的端粒酶(telomerase),并具有永久生长的潜力。为了得到大量可用于细胞替代性治疗的细胞,需要建立一个能长期稳定培养的细胞系。

近年来进行了大量的研究,主要是在培养人ES细胞时避免使用动物细胞,已经取得了三方面的进展:①可在无血清培养条件下使ES细胞得以生长。②可利用人胚胎成纤维细胞、输卵管上皮细胞或包皮成纤维细胞作为ES细胞培养的饲细胞层。③可在Matrigel上用小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)的条件培养基使人ES细胞保持未分化状态。现在也可用20%血清替代物(SR)、转化生长因子 β_1 、LIF及bFGF以及纤粘连蛋白的基质,使人ES细胞得以长期传代培养。

(杨增明 谭慧宁)

主要参考文献

- 童英、尚克刚. 1998. 在小鼠早期胚胎发育和种系中特异表达的转录因子OCT-4. 遗传 20 (2): 35~38
- 熊蕾, 徐存拴. 2000. 热休克蛋白(HSPs)在胚胎发育中的作用研究进展. 生物学杂志 17 (2): 1~3
- 岳占碰, 杨增明. 1999. 哺乳动物基因印迹及其与胚胎发育的关系. 动物学杂志 34 (4): 56~59
- 张建湘, 李桂源, 张小慧. 1999. 胚胎不同器官的细胞连接蛋白基因表达研究. 解剖学报 30 (1): 44~47
- Balinsky BI. 1975. An introduction to embryology. 4th Ed. Saunders, Philadelphia
- Becker DL, Davies CS. 1995. Role of gap junctions in the development of the preimplantation mouse embryo. Microsc Res Tech 31: 364~374
- Bellier S, Chastant S, Adenot P, Vincent M, Renard JP, Bensaude O. 1997. Nuclear translocation and carboxyl-terminal domain phosphorylation of RNA polymerase II delineate the two phases of zygotic gene activation in mammalian embryos. EMBO J 16: 6250~6262
- Boiani M, Eckardt S, Scholer HR, McLaughlin KJ. 2002. Oct-4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. Genes Dev 16: 1209~1219
- Browder LW, Erickson CA, Jeffery WR. 1991. Developmental biology. Third edition. Saunders College Pub, Philadelphia
- Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. 2003. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. Cloning Stem Cells 5: 79~88
- Christians E, Michel E, Renard JP. 1997. Developmental control of heat shock and chaperone gene expression: Hsp 70 genes and heat shock factors during preimplantation phase of mouse development. Cell Mol Life Sci 53: 168~178
- Christians E, Michel E, Adenot P, Mezger V, Rallu M, Morange M, Renard JP. 1997. Evidence for the involvement of mouse heat shock factor 1 in the atypical expression of the HSP70.1 heat shock gene during mouse zygotic genome activation. Mol Cell Biol 17: 778~788
- de Wert G, Mummery C. 2003. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. Hum Reprod 18: 672~682
- Elfring LK, Axton JM, Fenger DD, Page AW, Carminati JL, Orr-Weaver TL. 1997. Drosophila plutonium protein is a specialized cell cycle regulator required at the onset of embryogenesis. Mol Biol Cell 8: 583~593
- Fleming TP, Sheth B, Fesenko I. 2001. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. Front Biosci 6: D1000~1007

- Gilbert, SF. 1997. Developmental biology . Fifth Edition . Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts
- Hall JG. 1990. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases . Am J Hum Genet 46: 857~873
- Hansis C, Edwards RG. 2003. Cell differentiation in the preimplantation human embryo . Reprod Biomed Online 6: 215~220
- Hardy K, Spanos S. 2002. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo . J Endocrinol 172: 221~236
- Hardy K, Warner A, Winston RM, Becker DL. 1996. Expression of intercellular junctions during preimplantation development of the human embryo . Mol Hum Reprod 2: 621~632
- Houghton FD, Barr KJ, Walter G, Gabriel HD, Grummer R, Traub O, Leese HJ, Winterhager E, Kidder GM. 2002. Functional significance of gap junctional coupling in preimplantation development . Biol Reprod 66: 1403~1412
- Hunter T, Pines J. 1994. Cyclins and cancer . II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age . Cell 79: 573~582
- Kalthoff, K . 1996. Analysis of biological development . McGraw-Hill, New York
- Kanzler B, Haas-Assenbaum A, Haas I, Morawiec L, Huber E, Boehm T. 2003. Morpholino oligonucleotide-triggered knockdown reveals a role for maternal E-cadherin during early mouse development . Mech Dev 120: 1423~1432
- Kidder GM, Winterhager E. 2001. Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions . Front Biosci 6: D731~736
- Kirchhof N, Carnwath JW, Lemme E, Anastassiadis K, Scholer H, Niemann H. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species . Biol Reprod 63: 1698~1705
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. 2002. Production of α -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning . Science 295: 1089~1092
- Larsen WJ. 2002. Human embryology . 北京: 人民卫生出版社 (影印版)
- Lee CS, Koo DB, Fang N, Lee Y, Shin ST, Park CS, Lee KK. 2000. Potent and stage-specific action of glutathione on the development of goat early embryos in vitro . Mol Reprod Dev 57: 48~54
- Levy R. 2001. Genetic regulation of preimplantation embryo survival . Int Rev Cytol 210: 1~37
- Li E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development . Nat Rev Genet 3: 662~673
- Loutradis D, John D, Kiessling AA. 1987. Hypoxanthine causes a 2-cell block in random-bred mouse embryos . Biol Reprod 37: 311~316
- Ludwig TE, Squirrell JM, Palmenberg AC, Bavister BD. 2001. Relationship between development, metabolism, and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low levels of phosphate . Biol Reprod 65: 1648~1654
- Matsumoto H, Shoji N, Umezu M, Sato E. 1998. Microtubule and microfilament dynamics in rat embryos during the two-cell block in vitro . J Exp Zool 281: 149~153
- Minami N, Sasaki K, Aizawa A, Miyamoto M, Imai H. 2001. Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display: comparison of culture environments . Biol Reprod 64: 30~35
- Mitalipova M, Beyhan Z, First NL. 2001. Pluripotency of bovine embryonic cell line derived from precompacting embryos . Cloning 3: 59~67
- Nakano H, Kubo H. 2001. Rescue of mouse embryos from 2-cell blocks by microinjection of maturation promoting factor . Fertil Steril 75: 1194~1197
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. 2001. Multiple differentiation from human embryonic stem cell lines . Stem Cells 19: 193~204
- Ohsugi M, Larue L, Schwarz H, Kemler R. 1997. Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin . Dev Biol 185: 261~271
- Ovitt CE, Scholer HR. 1998. The molecular biology of Oct-4 in the early mouse embryo . Mol Hum Reprod 4: 1021~1031
- Rallu M, Loones M, Lallemand Y, Morimoto R, Morange M, Mezger V. 1997. Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis . Proc Natl Acad Sci USA 94: 2392~2397

- Reik W, Collick A, Norris ML, Barton SC, Surani MAH. 1987. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice . *Nature* 328: 248~251
- Saito S, Sawai K, Ugai H, Moriyasu S, Minamihashi A, Yamamoto Y, Hirayama H, Kageyama S, Pan J, Murata T, Kobayashi Y, Obata Y, Yokoyama KK. Y 2003. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells . *Biochem Biophys Res Commun* 309: 104~113
- Sasaki H, Allen ND, Surani MA. 1993. DNA methylation and genomic imprinting in mammals . *EXS* 64: 469~486
- Schini SA, Bavister BD. 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose . *Biol Reprod* 39: 1183~1192
- Scott L, Whittingham DG. 2002. Role of facilitative glucose uptake in the glucose-inorganic phosphate-mediated retardation and inhibition of development in different strains of mouse embryos . *Reproduction* 123: 691~700
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells . *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13726~13731
- Shostak S. 1991. *Embryology* . Harper Collins, New York
- Slack J. 2002. *Essential development biology* . 北京：高等教育出版社（影印版）
- Stanton JA, Macgregor AB, Green DP. 2003. Gene expression in the mouse preimplantation embryo . *Reproduction* 125: 457~468
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts . *Science* 282: 1145~1147
- Torres M, Stoykova A, Huber O. 1997. An alpha-E-catenin gene trap mutation defines its function in preimplantation development . *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 901~906
- Twyman RM. 2002. *Instant notes in developmental biology* . 北京：科学出版社（影印版）
- Muller WA. 1996. *Developmental biology* . 北京：世界知识出版社（影印版）
- Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E. 1998. *Principles of development* . Current Biology, London

第七章 胚胎着床及妊娠识别

第一节 胚胎着床

胚胎着床 (implantation) 也称附植或植入，是指处于活化状态的胚泡与处于接受态的子宫相互作用，最后导致胚胎滋养层与子宫内膜建立紧密联系的过程。子宫对胚胎着床的敏感性可分为接受前期 (pre-receptive)、接受期 (receptive) 和非接受期 (refractory)。子宫处于接受态的时期称为“着床窗口 (implantation window)”，此时子宫环境有利于胚泡着床，但持续时间有限。胚泡的活化状态对着床窗口有很大影响，一般着床窗口对正常胚泡开放的时间比休眠胚泡要长。着床窗口的子宫接受性与胚泡活化状态是两个独立的事件，只有胚胎发育到胚泡阶段和子宫分化到接受态同步进行，胚胎才能正常着床。一般将胚胎着床过程分为定位期 (apposition)、黏附期 (attachment) 及侵入期 (invasion) (图 7-1)。

据估计，在人中，临床的着床率不会高于 30%。这样低的着床率与胚胎和子宫均有关系。一般认为，胚胎在体内着床时，有 30% 的胚泡形态不正常，而且由于这些不正常胚胎与子宫内膜间难以建立对话联系，导致月经来临时有 30% 的妊娠损失发生。在辅助生殖过程中，妊娠损失的比例更高。在目前的体外受精中，尽管受精的成功率很高，但妊娠率一直只有 20%~30%。导致这种低妊娠率的主要原因在于难以判断子宫何时处于接受态，以及如何确认具有着床能力的胚泡。

在着床以前，大多数哺乳动物的胚胎要脱去透明带，但兔和豚鼠的胚胎则在着床以后才脱去透明带。当这些动物的胚泡开始与子宫内膜接触时，滋养层细胞先将透明带的一小部分溶解开，并伸出伪足与子宫上皮接触，然后胚胎的大部分区域侵入子宫内膜，透明带才逐渐被溶解消失。

一、胚胎的迁移和定位

定位 (apposition) 是指滋养层细胞与子宫上皮细胞间的接触逐渐紧密。在小鼠和大鼠胚胎着床的早期，子宫腔闭合后，子宫腔上皮紧包着胚泡。现在认为，子宫腔的闭合一方面涉及子宫腔中液体的吸收，这一过程是内分泌依赖性的；另一方面也涉及子宫内膜的水肿。在小鼠和大鼠，子宫腔的闭合与黏附反应的意义，可能在于有一个稳定的

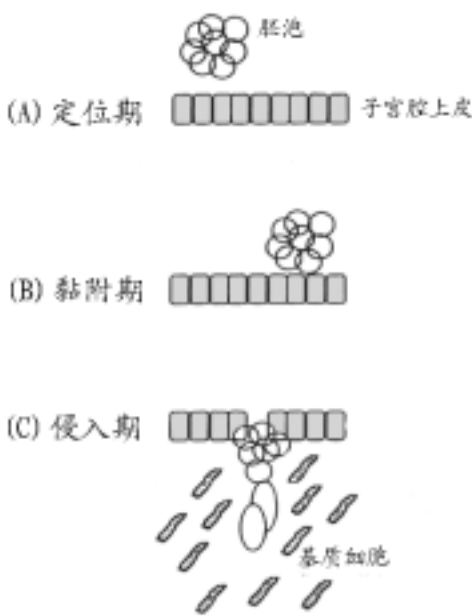


图 7-1 示胚胎着床过程
(引自 Giudice LC, 1999)

时期使子宫和胚胎间能够紧密贴附在一起，胚胎被母体的上皮包围后使得胚胎在子宫中的位置得以固定。在此时期，如轻微冲洗子宫，可将胚胎从子宫中冲出来，并不会对胚胎造成损伤。因此，胚胎在子宫中的早期固定是功能性的，并不涉及子宫和胚胎间的结构联系。以后，胚胎和子宫内膜间的微绒毛逐渐交织在一起，细胞膜间的接触逐渐紧密。此时，微绒毛变得更加短粗，且不规则，类似于大的泡状细胞质突起，在系膜对侧的子宫表面更是如此。子宫腔闭合后使子宫内膜上皮细胞与滋养层细胞更加紧密接触的过程称为黏附反应 (attachment reaction)。在妊娠小鼠，切除卵巢后则子宫腔不发生闭合；注射孕酮后，则可使子宫腔闭合。但如果仅注射孕酮，则子宫腔闭合后，微绒毛仅简单交织在一起，并不能进一步紧密接触。这种状态可用孕酮维持很长时间。正在泌乳的妊娠小鼠及实验诱导的延迟着床动物模型中，也可见到这种状态。当注射雌激素后，则可使子宫上皮与滋养层细胞间微绒毛的简单交织逐渐紧密，类似于黏附反应。

然而，兔胚泡膨大后充满子宫腔，使滋养层细胞与上皮紧密接触，但没有子宫腔的闭合过程。在兔子宫中也未发现子宫腔中液体的吸收。在水貂和恒河猴中，似乎也并不存在典型的子宫腔闭合及对胚泡的包围过程，似乎主要是胚泡膨大后导致滋养层细胞与子宫上皮间的接触。大家畜为表面上皮绒毛型着床，微绒毛的交织更加广泛，虽未观察到伴随微绒毛逐渐减少的典型的黏附反应，但胚胎似乎紧密地固定在子宫内。

胚胎能够在一定的时间和位置黏附到子宫内膜上是一个很复杂的问题。Genbacev 等发现，可结合 L-选择素 (L-selectin) 的糖在接受期的子宫中上调，而此时从透明带中孵出的人胚泡的滋养层细胞开始表达 L-选择素。分离的滋养层细胞能够优先与处于接受期的内膜组织的上皮细胞结合，而不是与非接受期的子宫上皮结合。将聚苯乙烯制备的乳胶珠用可结合 L-选择素的寡聚糖包被后，在模拟血流的切向引力存在下，这些包被的小珠对胎盘绒毛来的滋养层细胞具有很强的亲合性，并与之结合。这表明胚胎表达的 L-选择素与子宫表达的 L-选择素的配基相互作用，可能对于胚胎在子宫中的选择性着床具有很重要的作用。

在卵裂过程中，胚胎由输卵管进入子宫角。牛、马等单胎动物的胚胎由排卵一侧的输卵管向子宫角迁移，在子宫的系膜对侧着床。在小鼠、兔、猪等多胎动物中，由两侧卵巢排卵后，胚胎由两侧输卵管迁移进入两侧子宫角。当排卵数两侧不同时，胚泡可以在子宫角内迁移。胚泡在子宫中调整距离或间隔，可能是受卵巢激素的调节，但也可能是由于子宫物理化学作用的结果。在小鼠、大鼠和兔，胚泡在调整间隔之前，常成团位于子宫内。由于子宫环行肌的蠕动，胚泡分布在子宫的特定部位。用消炎痛 (indomethacin) 处理妊娠第五天的大鼠，可明显延迟胚胎的着床时间，而且与对照组相比，胚胎着床点在子宫中的分布很不均匀。这提示前列腺素可能与胚胎在子宫中的分布有关。胞质型磷脂酶 A2 α (cytosolic phospholipase A2 α , cPLA2 α) 为花生四烯酸产生的主要催化酶，而花生四烯酸又是前列腺素合成的底物。将小鼠 cPLA2 α 基因敲除后，不仅胚胎着床时间延迟，而且胚胎在子宫中也不能均匀分布。但注射 PGE₂ 及 PGI₂ 的类似物后，则可使这种小鼠的胚胎着床时间恢复正常，胚胎也能在子宫中均匀分布。

二、胚胎着床的方式

很明显，除了表面着床（即上皮绒毛胎盘）的种属外，所有的哺乳动物胚胎均穿过子宫上皮及相连的基板（basal lamina），从而与母体建立明确的血管联系。然而，不同动物间着床的方式和时间均相差悬殊。不同动物的着床方式不同，与子宫接触的紧密程度也就不同，从而决定了胎盘的血液循环方式和胎盘屏障的层次。

（一）表面着床（superficial implantation）

猪、绵羊、山羊和牛的胚胎着床方式为表面着床。胚胎的滋养层细胞仅与子宫的腔上皮细胞接触，但并不穿过子宫腔上皮。这些动物中，绝大部分并不形成蜕膜，但在羊和牛，滋养层细胞与子宫腔上皮发生部分融合，在子宫基质细胞中发生一些类似蜕膜化的反应。

（二）侵入性穿入（intrusive penetration）

在采用侵入性方式穿过上皮的动物种类中，胚胎通常具有很强的侵入性，雪貂（ferret）就是一个极好的例子。黏附开始仅在发育的合胞体滋养层细胞的特定区域，即外细胞质垫（ectoplasmic pads）发生。虽然合胞体滋养层细胞斑的大部分区域都贴在上皮细胞的顶部，但仅外细胞质垫倾向于将上皮细胞变为锯齿状，从而确立最初的黏附位点。最初是合胞体滋养层细胞的一个薄的细胞质突起在相邻的上皮细胞间穿过。开始时，这一突起为外细胞质性的，但当膨大及向基板迁移时，外细胞质垫中开始有细胞器存在。虽然滋养层细胞最终包围大量的上皮细胞，并发生细胞死亡和吞噬作用，但在滋养层细胞附近明显有正常的上皮细胞。当滋养层细胞向子宫内膜深层侵入时，这些正常的上皮对于滋养层细胞起到锚定（支撑）作用。这些滋养层细胞突起在基板上停留一段时间后，继续向周围的基质穿入，但并不穿过毛细血管的基板（图 7-2）。在豚鼠和恒河猴中也可见这种侵入性着床。但这些动物间有一些区别。如在恒河猴中，合胞体滋养层细胞的突起在上皮的基板上停留一段时间后，仍可侵入内膜血管的基板，而雪貂中并不侵入血管的基板。

（三）置换式穿入（displacement penetration）

小鼠和大鼠为置换式穿入着床最好的例子。当定位期继续进行时，在附近的基质中首先出现蜕膜化的征兆，在子宫腔上皮层中发生细胞死亡，并有单个或成团的细胞脱落。光镜观察发现，在胚胎和子宫内膜之间的这些细胞偶尔呈现深色的团块状，以前认为可能在胚胎与子宫间有物质转运。然而，用电子显微镜研究发现，这些深色的团块实际上为正在被滋养层细胞所吞噬的死亡的上皮细胞。当滋养层细胞和基板接触时，滋养

层细胞在基板上停留，并伸出突起破坏邻近的细胞，从而扩大与胚胎接触的区域。以后基板被下面蜕膜化细胞的外细胞质突起所破坏，而并不是由滋养层细胞所破坏(图 7-2)。

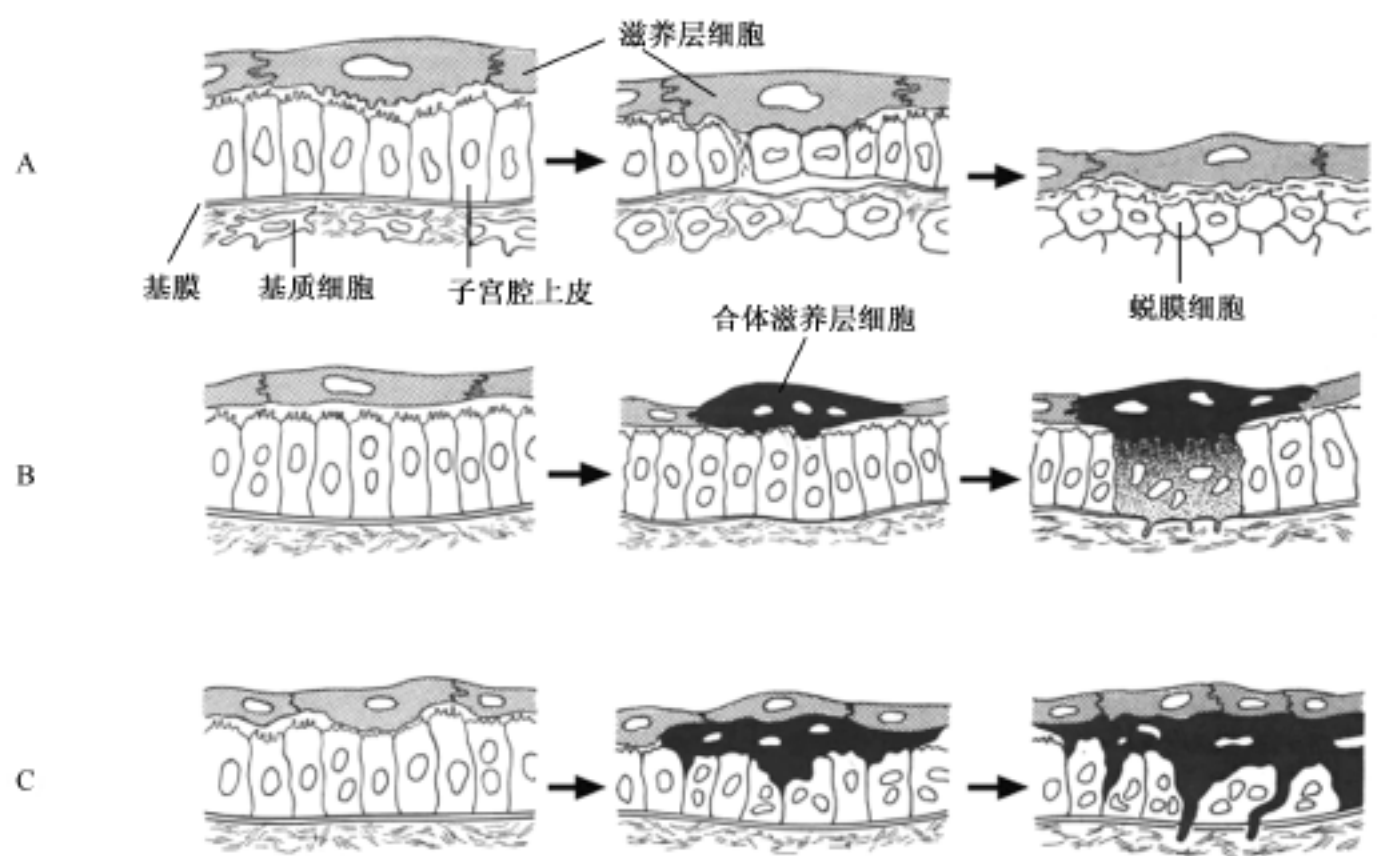


图 7-2 示滋养层细胞穿入子宫腔上皮的三种主要形式 (引自 Denker HW, 1993)

A. 置换式穿入，见于小鼠和大鼠，与人相似；B. 融合式穿入，见于兔；C. 侵入性穿入，见于食肉动物。

(四) 融合式穿入 (fusion penetration)

这一方式的最好例子是兔。首先胚外的合胞体滋养层细胞的合胞体突起 (syncytial knob) 与单个上皮细胞相接触。然后，上皮细胞顶部的细胞膜与滋养层细胞突起的膜相融合。当上皮细胞变为合胞体时，与周围的细胞明显不同，就像延伸到基板处的滋养层细胞的一个钉子 (peg)。此时，这些上皮细胞的核仍保留一段时间，且侧面的细胞膜仍保留与邻近的正常细胞间的连接复合体。可能每个滋养层细胞突起处有一个以上的钉子。以后，这些钉子所在处的基板被穿入后，滋养层细胞突起继续穿入内膜的血管中。然后，上皮细胞间的合胞体向两侧扩展，最终在滋养层突起间的区域内发生融合(图 7-2)。

三、着床的动物模型

表 7-1 中为一些常见动物的胚胎着床时期。由于哺乳动物中着床的方式多种多样，难以逐一进行介绍。在此仅简要介绍啮齿动物、豚鼠、灵长类及家畜的胚胎着床。

表 7-1 各种动物的胚胎着床时间/天 (引自 Sch fer-Somi S, 2003)

动物	胚泡形成的时间	胚胎进入子宫的时间	着床的时间	假孕后黄体退化的时间	妊娠期
小鼠	3	3	4.5	10~12	19~20
大鼠	3	3	6	10~12	21~22
兔	3	3.5	7~8	12	28~31
猫	5~6	4~8	13~14	?	52~69
狗	5~6	8~15	18~21	?	53~71
牛	8~9	3~4	17~20	18~20	277~290
绵羊	6~7	2~4	15~16	16~18	144~152
山羊	6~7	2~4	15~16	?	146~151
猪	5~6	2~2.5	11~14	16~18	112~115
马	8~9	4~10	28~40	20~21	330~345
人	4~5	4~5	7~9	12~14	270~290

(一) 鼠科的啮齿动物

啮齿动物的子宫腔闭合后呈狭缝样，这使失去透明带的胚泡与子宫腔上皮更加紧密地接触。在胚胎着床的定位期，胚泡内细胞团对侧的滋养层细胞首先向子宫腔上皮靠近，并与腔上皮发生黏附（图 7-3）。在定位期，胚泡就在内膜中引发蜕膜反应。以后，

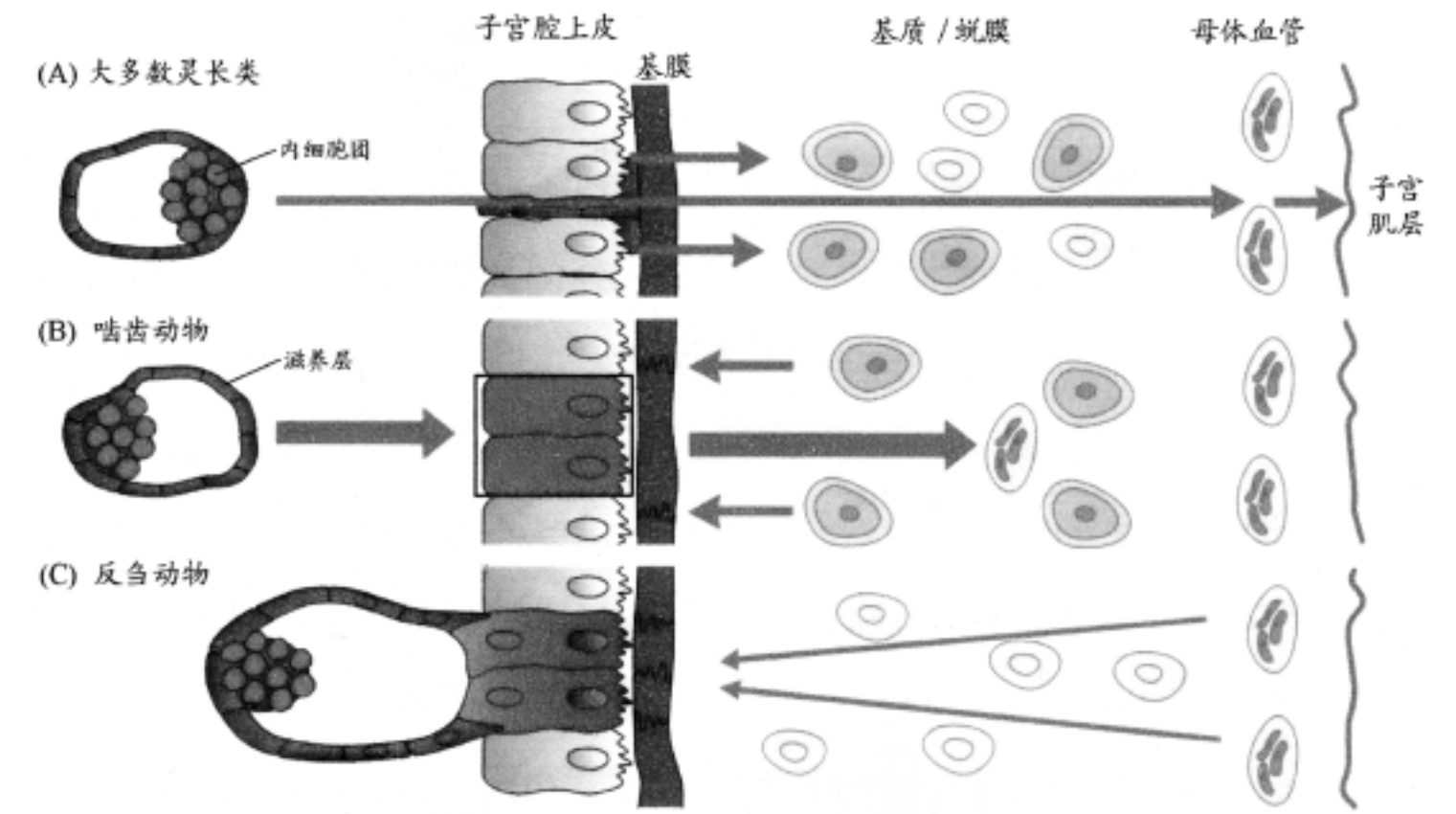


图 7-3 示哺乳动物的着床方式 (引自 Salamonsen LA, 1999)

A. 灵长类，内细胞团侧的滋养层细胞在子宫腔上皮细胞间穿过后，先在基膜上扩展，然后侵入基质中。滋养层细胞可到达基质的深部，靠近内膜中的血管。B. 小鼠和大鼠，内细胞团对侧的滋养层细胞先黏附在子宫腔上皮上，导致着床点处的腔上皮细胞发生细胞凋亡，然后蜕膜细胞穿越基膜。滋养层细胞在内膜中的侵入是受到严格控制的。C. 绵羊，滋养层细胞与子宫腔上皮细胞融合后，形成一合胞体。形成的合胞体可穿越基膜，但并不继续侵入基质中

在初级蜕膜区的上皮细胞经历细胞凋亡，并被胚泡的滋养层细胞所吞噬，从而有利于胚泡的侵入。蜕膜细胞以后穿越残留的子宫腔上皮的基板，并将周围的基质细胞进行重组。形成的蜕膜为胚泡建立一个小室，并使胚泡得以定向，将胚泡外胎盘锥的区域朝向子宫系膜侧。初级蜕膜发生改变后（包括退化等）使血液与滋养层细胞接触更紧密，从而形成卵黄囊胎盘，使胎儿有更大的扩展空间。在滋养层细胞侵入前，已将着床胚泡处的上皮细胞清除掉，并使得胚泡得以定向。在一些啮齿动物（小鼠和大鼠），由于具有延迟着床，即子宫环境控制胚泡的发育，而且胚泡在穿过上皮细胞以前就能诱导蜕膜反应，利用水肿的一些标志分子又可很容易发现着床位点，这为研究子宫内膜和胚泡之间的信号转导方面提供了有用的动物模型。



图 7-4 示小鼠子宫的着床位点
(引自 Reese J 等，2001)

左图为未妊娠的小鼠子宫，右图为妊娠第 5 天的 小鼠子宫，蓝色部位为注射芝加哥蓝后显示的着床部位

在小鼠和大鼠中，胚胎着床后首先出现的可见的变化是胚胎定位处的子宫内膜血管通透性增加。血管通透性增加后，通过静脉注射的大分子蓝色染料（芝加哥蓝、台盼蓝等）可与血液中的白蛋白等形成大分子复合物，从而在着床部位渗出血管，并在此部位积累，便可在子宫的着床部位见到蓝色的条带（图 7-4）。这种血管通透性的增加与胚泡的滋养层细胞和子宫内腔上皮的黏附反应相对应。在小鼠中，黏附反应发生在妊娠第 4 天晚 11~12 时（以见阴道栓的当天为第 1 天）。在此之前，子宫内膜发生水肿及子宫腔闭合，从而使滋养层细胞与子宫腔上皮紧密接触。黏附反应后，在着床部位的子宫腔上皮发生细胞凋亡，而基质细胞经历广泛的增殖及分化后转变为蜕膜细胞（即发生蜕膜化）。

在小鼠胚泡发生黏附反应的时候，子宫的腔上皮与胚泡的滋养层细胞紧密地相对排列，然后在这两种细胞类型之间确立细胞与细胞间的接触。围绕胚胎的子宫上皮细胞经历细胞凋亡，并加速对子宫腔上皮的穿入（penetration）过程。在妊娠第 5 天开始，滋养层细胞侵入腔上皮后，到达位于系膜对侧的基板（basal lamina）处。事实上，邻近的蜕膜细胞首先穿过上皮的基板。初级蜕膜区形成后，在着床小室（implantation chamber）可观察到上皮细胞自基膜上脱落。紧靠着床胚泡的间充质细胞（mesenchymal cell）转变为蜕膜细胞，首先形成一个杯形的初级蜕膜区（primary decidual zone）。初级蜕膜区由 3~5 层紧密排列的细胞组成。这一无血管的区域在着床的胚泡与母体循环之间可作为一半通透性的屏障。尽管小于 45kDa 的分子可自由通过，但大于 45kDa 的分子（如免疫球蛋白）、微生物、免疫反应性细胞等并不能通过。超微结构研究显示，在初级蜕膜区存在的紧密连接并不完整。

(二) 豚 鼠

豚鼠的着床形式与啮齿动物有明显不同。当胚泡仍处于子宫腔内时，胚泡便在内细胞团的对侧形成一个着床锥（implantation cone）。着床锥由合体滋养层细胞构成，可伸

出突起穿越透明带，然后黏附到子宫的腔上皮上。这些突起能在子宫的上皮细胞之间穿过去，且并不在子宫的基板上停留。整个胚泡能够侵入腔上皮下的子宫内膜基质中，并在基质中脱去透明带。只有当胚泡侵入子宫内膜后，子宫内膜才经历类似啮齿动物中的蜕膜化反应。能够直接侵入子宫内膜的这种特性也使豚鼠成为研究穿越上皮的一个很好模型。然而，因其发情周期相对较长，一次仅能得到 3~5 个胚泡，而且在着床开始时很难检测到着床点，所以使用豚鼠作为研究模型也有很多不便。

(三) 兔

兔是研究胚泡黏附到腔上皮顶部的极好例子 (图 7-2)。在兔中，由合体滋养层构成的大量滋养层细胞突起首先黏附到上皮细胞的顶部，然后与上皮细胞融合。虽然细胞顶部的这种融合在其他动物中并不常见，但表明这种顶对顶的细胞黏附可能在着床过程中起重要作用。由于兔在交配后 10h 左右排卵，而且在体外滋养层细胞能够黏附到子宫上皮上，所以兔也是用于研究顶部细胞黏附的很好模型。

表 7-2 家畜的胚胎着床时期 (引自 Hafez ESE, 1987)

动物	黏附开始的时间 (为排卵后的天数)	黏附完成的时间 (为排卵后的天数)	胚胎延伸的长度	胚胎和母体首先 接触的位置	胎盘的类型
牛	28~32	40~45		子宫肉阜 (凸起形)	子叶状胎盘
绵羊	14~16	28~35	10~20cm	子宫肉阜 (凹陷形)	子叶状胎盘
猪	12~13	25~26	可达 1m	子宫的深部凹陷部	分散胎盘
马	35~40	95~105	6~7cm	绒毛膜带 (chorionic girdle)	分散胎盘

(四) 灵 长 类

灵长类的胚泡在呈狭缝样子宫腔的单子宫中着床。虽然从未见到过人胚胎着床的起始过程，但胚泡的内细胞团侧定向于子宫内膜，表明胚泡的定向可能是由靠近内细胞团处的滋养层细胞黏附到子宫上皮引起的。在灵长类动物中，对恒河猴、狨猴及狒狒研究较多。实际上，在胚泡的滋养层细胞黏附到子宫腔上皮以前，内细胞团处的滋养层细胞已融合形成合体滋养层细胞。在恒河猴和狨猴中，合体滋养层细胞通过在子宫上皮细胞间侵入来穿过子宫上皮。当人胚胎完全包在子宫内膜中后，细胞滋养层细胞开始自滋养层壳中伸出，并进一步侵入子宫深层。这一过程开始于胚胎着床后 1 周左右，一直持续进行到妊娠的第 4~6 个月。从组织学的证据来看，在排卵后 12 天时，人胚胎已完全包埋在子宫内膜中。此时，着床点处的基质细胞已显示前蜕膜化反应及水肿。从组织学的角度看，人着床点处的子宫内膜与未妊娠的分泌中期的子宫内膜之间没有差别。

虽然在体外及体内进行了大量的研究，但由于灵长类的繁殖率相对较低，很难在早期确定妊娠与否，而且多为单胎，实际上对灵长类胚胎着床的了解仍很有限。现在认为，人的着床窗口至少应该是从月经周期的第 20 天到 24 天，为 4 天左右。人胚泡着床

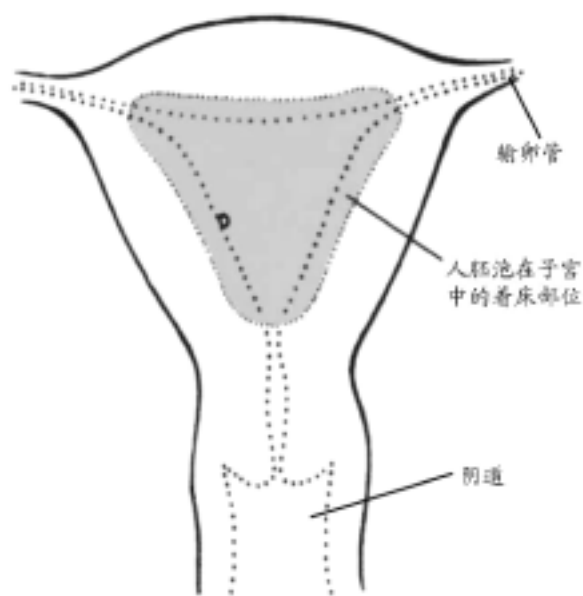


图 7-5 图中灰色区域为人胚泡在子宫中的可能着床位点 (引自 Larsen WJ, 2002)

的正常部位为子宫体或子宫底部，最常见于子宫后壁 (图 7-5)。

(五) 家 畜

各种家畜中，胚胎着床的方式和时间均有所不同 (表 7-2)。与其他动物相比，胚胎在子宫中处于游离状态的时间也较长。

猪的着床为表面着床，滋养层细胞并不穿过子宫上皮细胞。虽然滋养层细胞和子宫腔上皮紧紧地相互交织在一起，胚胎和子宫中发育形成的血管也都内陷进入各自的上皮皱褶内，但子宫腔上皮一直很完整，滋养层细胞并不穿入上皮内，子宫中也不发生蜕膜化。自妊娠第 12 天开始，猪胚胎迅速伸长，到第 16 天时形

成一个约 1m 长的线状结构。经过复杂的折叠和缠绕以后，每个猪胚胎在子宫系膜侧的腔上皮表面占据约 10~20cm 的空间。在妊娠第 13 天，胚胎开始黏附，自胚盘处起始，以后扩展到胚胎的其他部位。但在此之前，靠近胚胎处的子宫腔上皮和上皮下的毛细血管也发生一些局部改变。

在马中，能产生促性腺激素的滋养层细胞 (即子宫内膜杯细胞) 与子宫内膜的关系更近。这些细胞能够通过子宫腔上皮迁移进入子宫基质中。

在牛、绵羊和山羊中，胎盘的大部分均为表面附着式的，但有滋养层双核细胞的形成，这些细胞可与子宫腔上皮细胞融合，在牛中可形成异核体，而在绵羊和山羊中则形成成长的持久的斑。在反刍动物中，胚泡与子宫首先接触的区域为子宫肉阜区 (caruncle)。子宫肉阜是反刍动物的子宫内膜形成的圆形加厚区，有数十个到上百个。羊的子宫肉阜中心凹陷，而牛的子宫肉阜为圆形隆起。在此区有丰富的成纤维细胞和大量的血管，但此区没有子宫腺体及其导管分布。子宫肉阜参与胎盘的形成为胎盘的母体部分。

四、类固醇激素和胚泡的状态对子宫接受态的调控

子宫中的主要细胞类型对于雌激素和孕酮的反应是不同的。在成年小鼠中，雌激素主要刺激子宫上皮细胞的增殖，但基质细胞的增殖则需要孕酮和雌激素协同作用。在早期妊娠的小鼠子宫中，上皮和基质细胞对雌激素和孕酮的反应也很相似。在妊娠第 1 天和第 2 天，排卵前卵巢来的雌激素主要刺激上皮细胞的增殖。在第 3 天，由新形成的黄体来的孕酮则诱导基质细胞的增殖，这种作用可在第 4 天被着床来自卵巢的雌激素进一步加强。在第 4 天，上皮细胞则停止增殖，并开始分化。此时，子宫对胚泡处于接受状态，并保证着床的启动。

同样的情况也可在延迟着床或假孕的子宫中见到。在小鼠妊娠第 4 天的着床前，即

雌激素分泌以前将卵巢切除, 则可导致胚泡处于休眠状态及着床的抑制, 称为延迟着床。这种状态可每天用孕酮处理来维持, 使子宫处于中性状态或接受前期。如果用雌激素处理这种用孕酮致敏的子宫, 则可使处于中性状态的子宫进入接受态。用雌激素处理也能在子宫中激活休眠的胚泡, 使着床启动。在缺乏胚泡时, 接受态的子宫可继续发育进入非接受态。但目前对于雌激素激活休眠的胚泡、刺激子宫的接受性以及启动着床的机制仍不清楚。

胚胎发育和子宫接受态的建立主要是由雌激素和孕酮这两种卵巢激素相互协调进行调节的。尽管来自卵巢的雌激素对于小鼠和大鼠的胚胎着床是绝对必需的, 但对猪、豚鼠、兔及仓鼠的着床则不是必需的。在仓鼠及豚鼠中仅需要孕酮便可诱导着床。来自卵巢的雌激素对于人的胚胎着床是否必需仍不清楚, 但倾向于孕酮对着床起主要作用。

五、滋养层细胞的侵入 (trophoblast invasion)

在胚胎着床和胎盘发生期间, 滋养层细胞黏附后迁移进入子宫内膜基质中, 最后侵入母体血管, 并建立血绒毛膜胎盘。这一过程包括细胞与细胞, 以及细胞与基板之间的相互作用, 并且涉及细胞外基质的降解后细胞的迁移, 以及细胞外基质的重建。已证实细胞黏附直接调节细胞外基质成分的表达。在人滋养层细胞的侵入过程中, 很多蛋白酶在基膜和细胞外基质的降解过程中起很重要的作用。基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 可能是人滋养层细胞有能力降解层黏连蛋白 (laminin) 和胶原 IV 丰富的基膜的主要决定因素。MMP-9 的活性调节至少部分是通过金属蛋白酶的抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 调节的, 特别是 TIMP-3 在人滋养层中的表达很特殊。

尿激酶型纤溶酶原激活因子 (uPA) 可通过直接或间接激活 MMPs 前体 (pro-MMPs) 来增强人滋养层细胞降解细胞外基质的能力。这种酶的活性可能受到来自滋养层或子宫内壁的纤溶酶原激活因子的抑制剂 (PAI) 的控制, 特别是 PAI-1 的控制。低密度脂蛋白的受体相关蛋白可能在调节人滋养层的尿激酶活性方面起着关键的作用。IL-1 β 等细胞因子可能促进这些蛋白酶的协调作用。

特异性的细胞外基质蛋白与其受体——整合素的结合可能也调节着细胞的迁移活性。滋养层细胞的迁移和侵入过程可能与滋养层细胞膜上的特异性整合素的转换有关。对人胚胎着床位点处的细胞滋养层柱的免疫细胞化学检测表明, 锚定绒毛的近侧细胞表达层黏连蛋白的受体—— $\alpha 6 \beta 4$ 整合素。当滋养层细胞侵入时, 这些细胞上调胶原和层黏连蛋白的受体—— $\alpha 1 \beta 1$ 整合素。体外研究表明, 这种整合素与胶原 IV 或层黏连蛋白的结合对于确立这些滋养层细胞的侵入性表型具有明显的促进作用。另外, 在近侧的细胞滋养层细胞柱中的滋养层细胞也表达整合素的 αv 亚单位。已经证明, αv 亚单位可与几种 β 亚单位形成不同的异源二聚体, 后者对同一种细胞外基质配基的黏附具有不同的反应性。体外的功能性研究表明, 亲玻黏连蛋白 (vitronectin) 等配基与 $\alpha v \beta 3$ 结合后, 可介导细胞与基膜 (substratum) 的黏附, 并上调 IV 型胶原酶的表达和活性。另外, $\beta 3$ 整合素亚单位已证实与癌的进行性及转移有关。当基质成分与 αv 和其他亚单位形成的异源二聚体结合后, 不仅促进细胞与基膜的黏附, 也促进细胞的迁移。这些表明, 除 $\alpha 6 \beta 4$ 和 $\alpha 1 \beta 1$ 外, αv 整合素亚单位的介入也可能使滋养层细胞具有迁移性和侵入性。

在锚定绒毛的近侧滋养层细胞主要表达与细胞迁移和侵入有关的整合素，在锚定绒毛中部和远部的细胞则关闭 $\alpha 6 \beta 4$ 整合素的表达，而上调 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素及其配基-纤黏连蛋白的表达。体外研究表明，人滋养层细胞由 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素介导黏附到纤黏连蛋白后，则会抑制侵入，暗示 $\alpha 5 \beta 1$ 的表达及其与纤黏连蛋白的结合可赋予细胞静止或非侵入特性。

六、胚泡的活性状态决定接受态子宫的着床窗口

过去一直认为，处于接受态的子宫中的胚胎着床并不依赖于胚泡的活性状态。但通过在延迟着床子宫中的胚泡移植发现，胚泡的活性状态对于接受态子宫的胚胎着床窗口的开放时间长短方面起重要的作用。如果将处于休眠状态的小鼠胚泡移植入孕酮处理的延迟状态的假孕受体中，只有在给受体注射雌激素后的 1 小时内移植时，胚泡才能着床。然而，当移植妊娠第 4 天的正常胚泡或经雌激素处理后体内激活的胚泡时，即使在给受体注射雌激素后 16 小时移植，胚泡仍能着床。在体外培养时，休眠的胚泡虽然能获得“代谢性激活”，使氧消耗量增加，但这种体外培养的胚泡仍然只能在雌激素处理后的 1 小时内着床。这表明胚胎着床窗口是受到严格调控的，只有当胚胎的激活状态与子宫的接受状态相一致时，胚胎着床窗口才打开。此外，也表明休眠的胚泡虽然可在体外获得代谢性激活，但这些胚胎并不能获得着床的能力。

七、子宫的腔上皮与胚胎着床

所有哺乳动物的胚胎在本质上都具有侵入性，并不需要激素的处理，就能够不加区别地黏附和侵入到很多人工的宫外部位及生物介质中。然而，子宫的腔上皮很特殊，主要作为胚胎侵入的一个屏障。只有当对胚胎信号发生应答，周期性上皮转变为接受态上皮后，子宫腔上皮才可与胚胎的上皮发生黏附性接触。

子宫的腔上皮似乎在调节子宫内膜的“接受性”或“非接受性”方面起关键性作用。如果将子宫上皮去掉，胚胎可进行着床，而不依赖于任何激素控制。处于着床状态的胚泡滋养层细胞如果移植到子宫外的一些部位，可不依赖于宿主的激素状态而向深部侵入，即使在雄性也如此。在正常的体内情况下，猪胚泡的滋养层细胞黏附到子宫上皮上，但从不侵入子宫上皮。但在体外，猪胚泡可黏附到成纤维细胞上。如移植到其他部位，则具有侵入性。在类固醇激素控制下，子宫上皮似乎具有可发育到接受状态的独特特性。在任何激素作用下，输卵管上皮等其他上皮似乎都不能被滋养层细胞所穿透，至少在哺乳动物中是如此。除了在非接受态作为防止滋养层细胞侵入的屏障外，子宫上皮也介导胚胎和子宫间的信号转导。

子宫内膜的上皮表面具有准备着床和防御感染双重功能。防御机制包括作为获得性免疫反应 (adaptive immune response) 的一部分，抗体以 IgA 的形式可穿越上皮，但很大程度上依赖于胎内防御 (innate defence)。子宫腔的分泌物中包含具有抗菌活性的低分子质量的多肽，如防御素 (defensin)、溶菌酶 (lysosyme) 以及一些分泌的白细胞蛋白酶抑制剂，后者具有抗病毒、抗真菌及抗细菌活性。由人子宫内膜上皮细胞分泌的白细胞蛋白酶抑制剂，可能主要在子宫腔的防御中起作用。

子宫内膜的上皮细胞也是前列腺素及内皮素等几种在月经期间起作用的血管活性物质 (vasoactive substance) 的主要来源地。然而, 这些物质在肠等其他黏膜上皮中也可见到, 可能主要作为上皮功能的调节者及促进子宫内膜中螺旋动脉的收缩。

八、胚胎着床的免疫特性

妊娠的确立依赖于子宫中成功的胚胎着床。子宫被认为是一个免疫豁免区 (immunological privileged zone), 半异源 (semiallogenic) 的胚胎尽管具有遗传的不相容性, 但在妊娠过程中并不被具有免疫反应性的母体所排斥, 这与其他组织的移植不同。这可能表明滋养层细胞并不表达组织相容性抗原, 也可能滋养层细胞并不具有免疫原性。但已经发现在滋养层细胞上表达组织相容性抗原, 表明子宫中的正常胚胎发育是受到周围的母体蜕膜所保护。一直认为胚胎是由一个物理性的屏障所保护, 后者使母体建立一种有利于移植的免疫状态, 阻止在母-胎界面处的滋养层细胞表达外源性的组织相容性抗原, 但目前对这种屏障的分子特性仍不清楚。胚胎着床涉及两种上皮组织 (滋养层与子宫腔上皮) 间一系列的细胞与细胞的相互通讯联系。在胚胎着床前, 这两种上皮是两个独立的成分, 由于具有一套连续的连接复合体及细胞黏附分子, 从而使上皮具有极性。在黏附反应开始时, 滋养层细胞和子宫的腔上皮首先在它们的顶部接触, 在此处滋养层细胞变得具有侵入性。在这种相互作用中, 处于接受性的腔上皮和具有侵入性的滋养层均通过它们细胞表面的分子变化来改变它们的功能性程序化。在小鼠中, 滋养层细胞侵入腔上皮时改变了极性和连接复合体。血液绒毛性胎盘发生 (hemochorial) 的侵入性类似于具有高度侵入性的肿瘤, 使正常的滋养层细胞具有假恶性 (pseudomalignant) 的状态。因此, 子宫必须在正常妊娠过程中精确地限制滋养层细胞的侵入。例如, 蜕膜来的 $\alpha 2$ -巨球蛋白 (macroglobin) 是一个很强的金属蛋白酶的抑制剂, 而金属蛋白酶的抑制剂均可限制滋养层侵入。近来发现, 人细胞滋养层细胞和母体蜕膜来的促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 可能通过杀伤激活的 T 细胞, 来促进人早期妊娠的维持和胚胎着床。

九、胚胎着床过程中子宫腔上皮表面的形态学变化

近年来发现, 在胚胎着床过程中, 不仅子宫内膜中一系列胚胎着床相关基因发生了特异性变化, 而且一些细胞表面的结构也伴随着床的进行而发生一系列的变化, 并且这些变化与着床过程紧密相关, 可作为着床的标志性特征。这里就吞饮泡、桥粒、紧密连接、间隙连接及基膜等与胚胎着床紧密相关的形态学结构作一介绍。

1. 吞饮泡 (pinopod)

子宫上皮细胞的质膜对卵巢类固醇激素非常敏感, 并且质膜顶端部分的突起也被作为准备着床和细胞活性等特点的标记。质膜顶端的突起首先在大鼠和小鼠中发现, 由于它们具有胞饮功能, 从而被命名为“吞饮泡”。在一些动物的子宫上皮和甲状腺细胞中, 也发现了和老鼠与小鼠吞饮泡具有不同程度相似性的结构, 这些动物包括兔、牛、仓

鼠、鹿、猪、猴子、骆驼，甚至蜥蜴和人。但在这些动物中，对这一结构的了解不是很清楚。而且从所得到的证据表明，人的这种结构从形态上也许同其他较大的膜突起更相似，但这些突起并不具有胞饮的功能。人们也习惯称之为吞饮泡，其实吞饮泡广义上是指在大多数动物和人中的一些分子事件中起到和大鼠、小鼠的真正吞饮泡的吞饮功能相似作用的结构。

对大鼠和小鼠中的吞饮泡结构的研究很多，用扫描电子显微镜观察，发现它是呈“海葵状”结构，后来又有人观察它的形态为“真菌状”突起或“珊瑚”状突起，一般为几个微米，其中细胞器很少。大鼠和小鼠中的吞饮泡以基部或柄产生于细胞表面，吞饮泡的表面光滑并缺少典型的微绒毛结构。在吞饮泡中也会经常看到一些具有胞饮功能的液泡，它们可以运输内吞的物质进入细胞中，而且大鼠和小鼠中真正吞饮泡的“柄”产生于靠近细胞侧面边缘的质膜顶端。在大鼠中，用专门的超微结构技术研究吞饮泡表明，它们缺少典型的膜包细胞器结构，富含肌动蛋白丝，这些丝状物贯穿吞饮泡的“颈”部，形成一束状物，伸到侧面质膜上，并且与连接复合体相连，参与胞饮功能。

其他动物顶端质膜的吞饮泡结构与大鼠和小鼠相比，存在一些很重要的形态上的区别。其他动物中，这样的结构通常是产生于整个的顶端细胞表面，覆盖所有的顶端细胞质膜，这一特征在人中尤其明显。在兔中，顶端突起并不含有像大鼠吞饮泡中包含的典型液泡结构，在人子宫内膜表面的突起中也缺少典型的液泡结构。

对各种动物中吞饮泡功能的早期推测都着重于强调它的分泌作用，但也有人认为它具有吸收子宫腔中的一些物质的可能性。将一种高电子密度示踪物——铁蛋白导入大鼠子宫腔中，发现这一示踪物被突起吸收，并进入子宫内膜上皮细胞中，这一点很明显地说明这种突起具有胞饮功能。但将铁蛋白示踪物注入到兔子宫腔中，并未发现铁蛋白被这种顶端突起结构吸收。同样，导入牛子宫腔中的辣根过氧化物酶也几乎都不进入到上皮细胞中，即使有辣根过氧化物酶进入到细胞，也不是从细胞表面的顶端突起进入的。

吞饮泡的出现代表了子宫具有接受胚泡着床的状态，这在大鼠和小鼠已被很多研究所证实，而接受态的建立既需要孕酮，又需要雌激素。吞饮泡的发育是单独依靠孕酮的，实际上又被雌激素抑制，高浓度的雌激素阻碍正常吞饮泡的形成。因为在孕酮的单独作用下，吞饮泡出现的频率很高，可能也表示吞饮泡的出现代表一个子宫即将具有接受性而不是已经进入接受状态。

在人子宫内膜中曾观察到吞饮泡的具体形成过程（图 7-6）。在子宫内膜的增殖期，顶端质膜的突起是最小的，细胞边界不明显，微绒毛短而细。在排卵后的第 2 天，顶端质膜突起增大；排卵后第 3 天，微绒毛变长且密，一天之后，微绒毛顶端膨胀；排卵后第 5 天，吞饮泡开始形成，顶端质膜具有明显的突起，微绒毛在数量和长度上都有所下降，逐渐融合或消失，从整个细胞顶端产生光滑而细的突起；在排卵后第 6 天，可见发育完全的吞饮泡，微绒毛完全消失，表面无任何其他物质的膜突出并且膜最大程度的折叠；到排卵后第 7 天，吞饮泡回缩，突起变小，折叠的膜上重新出现了小而浓密的微绒毛；到第 8 天，吞饮泡几乎消失，微绒毛继续生长，而人的着床窗口开放是在排卵后的第 5~7 天。

利用一种薄层人造基底膜可将人子宫内膜上皮细胞和基质细胞进行三维共培养。将体外受精获得的人胚胎培养到胚泡期后，放到子宫内膜三维培养物中，培养 48h 后将三

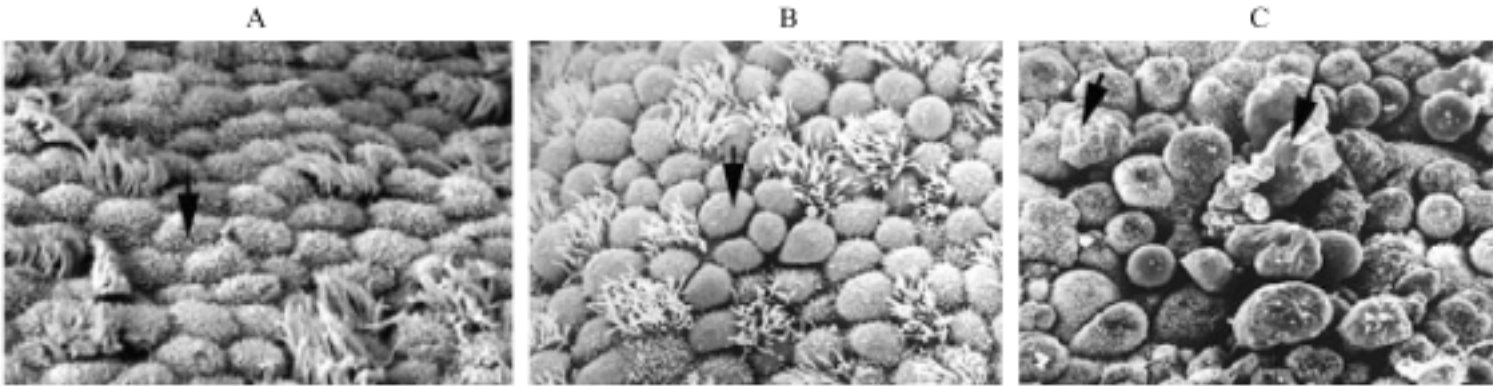


图 7-6 示人子宫内膜表面的吞饮泡(箭头所示)的发育过程(Creus M 等,2002 及 Bentin-Ley U 等,1999)
A. 未发育的吞饮泡; B. 正在发育的吞饮泡; C. 发育完全的吞饮泡

维培养物固定，并进行扫描电子显微镜观察。结果发现，胚泡都黏附于带有吞饮泡的上皮细胞上，而周围细胞却缺乏吞饮泡的形成，而且许多吞饮泡恰巧在胚胎-子宫内膜细胞交界面完全发育或正在发育，并且与滋养外胚层细胞相连。利用透射电子显微镜观察证实，早期胚泡黏附的第一个形态学标志是连接结构的形成，部位是在子宫内膜上皮细胞中的顶端侧面交界处，顶端连接复合体的形成能使胚泡足够稳定地穿过相邻的子宫内膜上皮细胞。当胚泡穿过子宫内膜的单层上皮细胞时，涉及已存在于上皮间的顶端连接复合体和桥粒的解离，然后通过胚泡外层的滋养层细胞参与重新形成这些连接。在顶端质膜处的吞饮泡与滋养层顶端质膜相接近，但还没有发现吞饮泡直接参与滋养层与子宫内膜的相互作用。通过超微结构的研究表明，存在于顶端质膜表面的吞饮泡并不直接参与到胚胎-子宫内膜的相互作用中，吞饮泡的形成伴随有子宫内膜上皮细胞间连接的松动，这也许能使胚泡的黏附和穿入更容易进行。另一种可能是，吞饮泡光滑的质膜能够允许一些对滋养层黏附必需的特异性的受体存在。免疫组化研究显示，子宫内膜上皮细胞确实表达 IL-1 受体 I 型，也有整合素 β_3 亚单位的表达，现在认为这两种因子在着床过程中参与胚胎-子宫内膜相互作用的过程。即使如此，但还未见到有关吞饮泡与一些可能的细胞滋养层受体共表达的报道。

最近，有人将同源盒基因 Hoxa-10 的反义链转染到着床前的小鼠子宫中，可显著降低吞饮泡的数目。而在吞饮泡形成的正常时间之前在子宫中呈组成型表达的 Hoxa-10 则可增加吞饮泡的数目。由此可知，母体的 Hoxa-10 在吞饮泡的发育过程中起着很重要的作用，并且 Hoxa-10 的这种作用很可能有助于子宫内膜对胚泡着床的接受性的建立。

2. 桥粒 (desmosome)

桥粒是一种由多分子组成、直径约 0.5 μ m 的黏着连接，主要的桥粒跨膜糖蛋白是桥粒芯糖蛋白 (desmoglein) 和桥粒芯胶黏蛋白 (desmocollin)。这两种蛋白质以三种不同的同工型存在，桥粒细胞质结构蛋白包括桥粒斑珠蛋白 (plakoglobin) 以及桥板蛋白 (desmoplakin) I 和 II 等。桥板蛋白将桥粒连接到中等纤维细胞骨架上。

胚胎着床时子宫腔上皮发生一些基本的形态学的变化。在小鼠妊娠过程中，妊娠第 1 天子宫内膜腔上皮的顶端侧面连接复合体中存在高密度的桥粒，而在妊娠第 5 天时，桥粒的密度大大下降，桥板蛋白 mRNA 及蛋白质的表达在妊娠第 4~5 天呈现明显的下

降趋势。由此可知,桥粒在小鼠子宫腔上皮中的表达在着床前和围着床期下降,但在近腔上皮的腺上皮中并没有这种改变。桥粒表达的下降使细胞间黏附力下降,胚泡细胞易于侵入上皮细胞间,从而促进胚泡的着床。

在妊娠第 3.5 天的老鼠胚胎滋养外胚层中发现有桥粒的表达,并伴随有上皮极性和囊胚腔的出现,对胚泡的形成也具有十分重要的作用。

当胚泡从子宫腔上皮侧表面穿入后,滋养层细胞与下面的子宫内膜基质连接发生移位,使一些与胚胎相邻的细胞发生凋亡。细胞的死亡可能也是由于细胞黏附减少而引起的,因为细胞-细胞连接能力的下降也许减弱了生存的信号,即桥粒连接的减少可能对于细胞死亡及其他细胞-细胞黏附的改变具有一定的作用。

对其他动物着床过程中子宫内膜上皮细胞间桥粒结构的研究并不是很多,但已有的证据均表明,桥粒在着床过程中有表达下降的趋势。在兔中,发现 I 型桥板蛋白等桥粒的分子结构都发生了一些改变。在人中,着床前的子宫腔上皮细胞膜上桥粒的比例明显下降。

3. 紧密连接 (tight junction)

子宫腔上皮细胞顶端侧面的紧密连接分布的调节具有种属特异性。在着床过程中发生的一些变化也是随不同动物而异的。人、兔和大鼠的子宫内膜上皮中都存在紧密连接,且紧密连接形成的网络的分布以及复合体在上皮细胞侧面膜上的分布在着床过程中都有所改变。在大鼠中,妊娠第 6 天之前,紧密连接由子宫内膜细胞间顶端集中分布的方式变成一种侧面分散分布的方式。

应用冷冻蚀刻技术可见紧密连接呈珠链状,它从连接复合体处沿着侧膜向下延伸。在小鼠中,着床前的这一时期,紧密连接的复杂性也有所增加。这也表明,紧密连接对于着床时分子的跨上皮移动起到一个更好的屏障作用。子宫腔上皮的紧密连接的完整性并没有阻碍人的胚胎着床,并且这一紧密连接对子宫内膜上皮结构完整性的维持起到一定的作用。紧密连接分布的改变,伴随有桥粒表达的下调,也许会产生一种稳定的更有弹性的上皮,并使侵入的胚泡细胞更容易穿过这一上皮。

4. 间隙连接 (gap junction)

间隙连接是动物细胞间最普遍的细胞连接,由 6 个间隙连接蛋白 (connexin, Cx) 亚单位组成的跨膜结构,发挥相邻细胞间物质运输的作用。间隙连接作为一种细胞间直接通讯的连接,在生殖过程中发挥着一定的作用。

在鼠科啮齿类动物和兔中,接受性的子宫内膜缺少间隙连接。在大鼠子宫内膜中,Cx26 和 Cx43 在着床前受孕酮的抑制,并且两种蛋白对雌激素也同样敏感。当胚泡即将着床时,在着床位点相对应的子宫内膜处才诱导表达 Cx。可见,子宫内膜 Cx 表达的抑制作用是不同种类动物的子宫内膜接受性的典型的细胞生物学标志。而且,这种细胞-细胞直接通讯的诱导受阻,很可能是由于即将着床的胚泡产生某种信号而发生的,这也可能是着床的一种前提条件。

通过电子显微镜观察和免疫组织化学的方法,检测非妊娠和妊娠的马和猪子宫内膜中 Cx 的表达,发现在非妊娠和妊娠的子宫内膜基质中均有间隙连接,但在发情周期和

妊娠的任何一个阶段中，均没有检测到子宫内壁上皮中有 Cx26、Cx32 和 Cx43 蛋白。比较而言，Cx43 在子宫内壁上皮的顶侧质膜处的腺体中表达，并且，与紧密连接相关蛋白 ZO-1 共存。用松弛素处理猪后发现，Cx26、Cx32、Cx43 在子宫中的表达显著提高，可见松弛素具有调节 Cx 的作用。在马和猪子宫腔上皮中的间隙连接介导的细胞间通讯的缺乏可能对于胚泡的侵入起到一定的促进作用。

在人着床前 4 细胞期胚胎的相邻细胞膜处，开始出现间隙连接，并且随着胚胎的继续发育，间隙连接也逐渐增加。在正常的滋养层中，滋养外胚层细胞通过高密度的间隙连接相连，而内细胞团则由小而稀少的间隙连接相连，而且在晚期胚泡的滋养外胚层中也会偶尔检测到 Cx26 和 Cx32 组成的间隙连接的表达。这表明间隙连接对胚胎发育及胚泡形成具有重要的作用。

与小鼠和兔子相似，在人的接受性子宫内壁上，也缺少间隙连接的表达。Cx26 在上皮中的表达受抑制，且 Cx43 在基质中的表达也受母体孕酮的抑制。这也表明，间隙连接在人的着床前子宫内壁上缺乏对人胚胎的顺利着床有利，并且也可能是子宫内壁上接受性的一种标志。

5. 基膜 (basement membrane)

基膜是特化的细胞外基质，为一薄而坚韧的网膜，由一些细胞外基质蛋白（层黏连蛋白、IV型胶原等）和糖胺聚糖组成，厚度为 70~100nm。不同组织的基膜的成分也不同，基膜一般不含纤黏连蛋白 (fibronectin)，但胚胎组织、创伤组织等一般都含有这种蛋白。在电镜下观察，基膜分为透明层和致密层，分别贴靠细胞的基底及结缔组织的基质。

基膜不仅作为上皮细胞和内皮细胞附着的铺垫，也包绕在肌细胞、神经鞘细胞及脂肪细胞质膜的周围。在子宫中，基膜起到屏障的作用，限制和调节子宫腔上皮和内膜基质细胞间的大分子的扩散。所以，基膜的厚度也决定了穿过它的一些物质的扩散速度。

对小鼠着床过程中子宫基膜的变化已开展了很深入的研究。通过免疫组化的方法发现，在小鼠妊娠第 5、6 及 7 天的子宫着床位点处，基膜中层黏连蛋白和 IV 型胶原表达减少。这种层黏连蛋白和 IV 型胶原表达的下降可能与靠近基膜的基质细胞蜕膜化有关。虽然，对这一机制并不十分清楚，但子宫腔上皮、蜕膜化和滋养层这三种细胞可能都与基膜的溶解相关。在大鼠中，蜕膜化细胞常含有许多溶酶体酶和蛋白水解酶，这些酶对着床时的子宫完成重建和功能是必不可少的。将妊娠第 6 和 7 天的小鼠子宫蜕膜化细胞在体外培养时，仍会继续合成基膜样基质。在小鼠和大鼠的早期妊娠过程中，蜕膜化细胞中的蛋白水解酶对于子宫腔上皮细胞基底层破坏是有帮助的，并且它的这一作用促进着床时滋养层的侵入。基质和蜕膜化细胞也能改变基膜基质。腔上皮细胞的基膜在排卵后第 6 天时的平均厚度最薄，这也可能是由于基质细胞的作用。在着床过程中，蜕膜化细胞继续分泌基膜样基质，所以基膜的变薄可能是由于酶的降解作用，而非因分泌产物减少的缘故。

6. 上皮斑 (epithelial plaque)

子宫内壁上向分泌期的形态学转变是着床的首要条件。在妊娠的拂拂，母体对妊娠发生的最早的反应是形成上皮斑。这一反应是以子宫腔上皮的肥大，以及在子宫腺顶部聚

集成束的腺上皮细胞的肥大为特征（图 7-7）。妊娠狒狒的上皮斑反应仅限于着床位点处。但在 hCG 处理后的狒狒子宫中，则在整个子宫腔上皮都有上皮斑反应。这可能表明，自胚泡分泌的 hCG 可能仅扩散在周围的区域，从而引起上皮斑反应，而在子宫腔中灌注 hCG 后，则 hCG 的扩散范围更广。此外，在恒河猴中上皮斑反应的发生范围也很广。

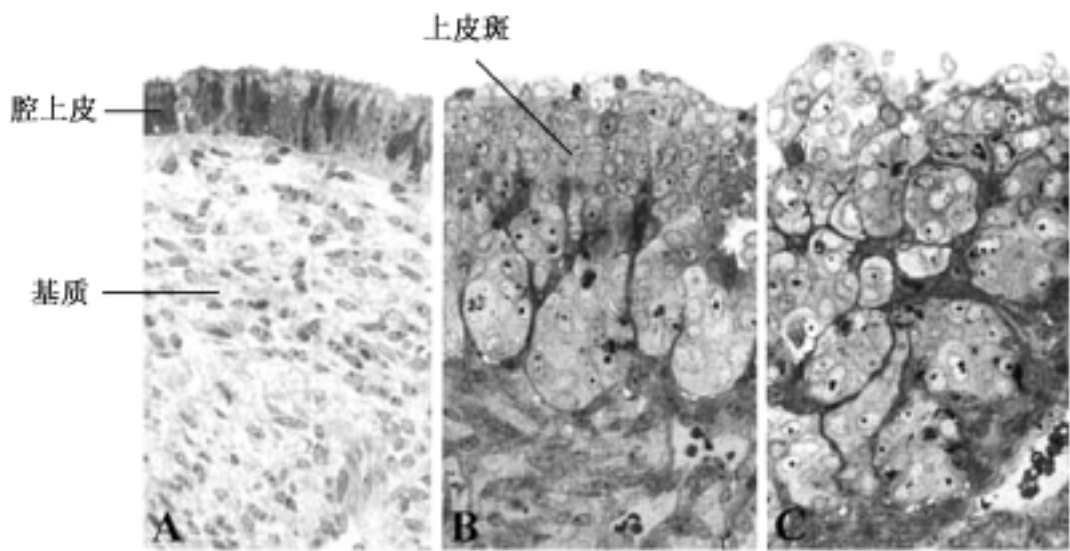


图 7-7 示狒狒子宫中的上皮斑反应,切片先用甲苯胺蓝进行染色 (Jones CJP 和 Fazleabas AT, 2001)
A. 狒狒排卵后 10 天的子宫内膜，具有规则的腔上皮和纺锤体样基质细胞；B. 上皮斑的形成：注射 hCG 后，腔上皮细胞肥大，基质细胞排列更加紧密，从而形成上皮斑；C. 妊娠 15 天的狒狒子宫内膜，其中具有大的上皮斑反应以及基质细胞的蜕膜化

第二节 胚胎着床的分子调控

子宫中的大部分基因都受雌激素的上调，但两性调节素及降钙素等少数基因则在胚胎着床期受到孕酮调节。子宫内膜中存在两套分子：一套分子使内膜处于接受态，如白血病抑制因子、肝素结合样表皮生长因子、降钙素、同源盒基因 *Hoxa-10* 等基因，在胚胎着床期子宫中的表达量显著增加，而且其中一些基因仅在胚胎着床位点处特异性表达；而另一套分子则使内膜抵抗着床，如黏蛋白-1 (Mucin-1) 等，在胚胎着床时受到明显的下调。着床窗口的出现和消失依赖于子宫内膜中一套特定基因时空特异性表达，使胚泡和内膜之间建立分子对话。以下将介绍对在胚胎着床过程中起重要作用的分子。

一、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)

在小鼠子宫内，LIF 主要在子宫腔内膜上皮和腺上皮表达，LIF 的表达有两个明显的峰值，第一个是在发情期，与排卵同时发生；第二个是在妊娠第 4~5 天。此后，子宫内膜腺体逐渐退化并停止表达 LIF。LIF 在假孕母鼠子宫内的表达方式与正常妊娠母鼠一致，说明 LIF 在小鼠子宫内的表达并不依赖于是否存在活胚胎，而是受母体的控制。单独雌激素或雌激素与孕酮共同处理都能上调小鼠子宫内膜中 LIF 的表达，而孕酮单独处理则无明显作用。

用同源重组的方法将小鼠 LIF 基因敲除后，纯合子的雄鼠具有繁殖能力，但雌鼠

却不能产仔。当纯合子雌鼠和雄鼠交配后可以使卵受精，并形成正常的胚泡，但胚泡不能着床，子宫也不能发生蜕膜化。这些胚泡的形态与延迟着床时的胚泡很相似。将这种类型的胚胎移植到野生型假孕小鼠子宫中可以正常着床，并且有明显的蜕膜化反应。但反过来却不能着床。这说明胚泡在 LIF 基因完全敲除的雌鼠子宫内不能着床的原因并不是由于胚泡发育异常，而是由于雌鼠不能表达 LIF 所致。此外，给 LIF 缺陷小鼠体外注射 LIF 能够完全恢复着床。用 LIF 抗体进行子宫角内注射能显著减少小鼠胚胎着床数目。这些结果说明 LIF 对小鼠的胚泡着床是必需的。此外，还发现在胚胎着床过程中，LIF 具有部分雌激素的作用。如果给处于延迟着床的小鼠注射 LIF 后，也能启动胚胎着床过程。

现已证明，LIF 对于人的着床也是非常重要的。在人和恒河猴，LIF 主要表达在月经周期分泌期的子宫内膜上皮，并且在培养不孕妇女的子宫内膜细胞时发现，与正常的妇女相比，其分泌的 LIF 明显减少。在恒河猴实验中，注入抗人重组 LIF 抗体后，排卵率和妊娠率减少，且不能正常生育。在胚胎着床前期给恒河猴子宫腔内注射抗 LIF 抗体后，抗体处理组的妊娠率比对照组明显降低（从 66.7% 降到 22.2%）。这说明 LIF 对恒河猴胚胎着床过程也是必需的。另外，在兔和绵羊等动物胚胎着床前后的子宫中，LIF 的表达均上调（图 7-8），表明 LIF 可能在很多哺乳动物的胚胎着床过程中都起重要作用。

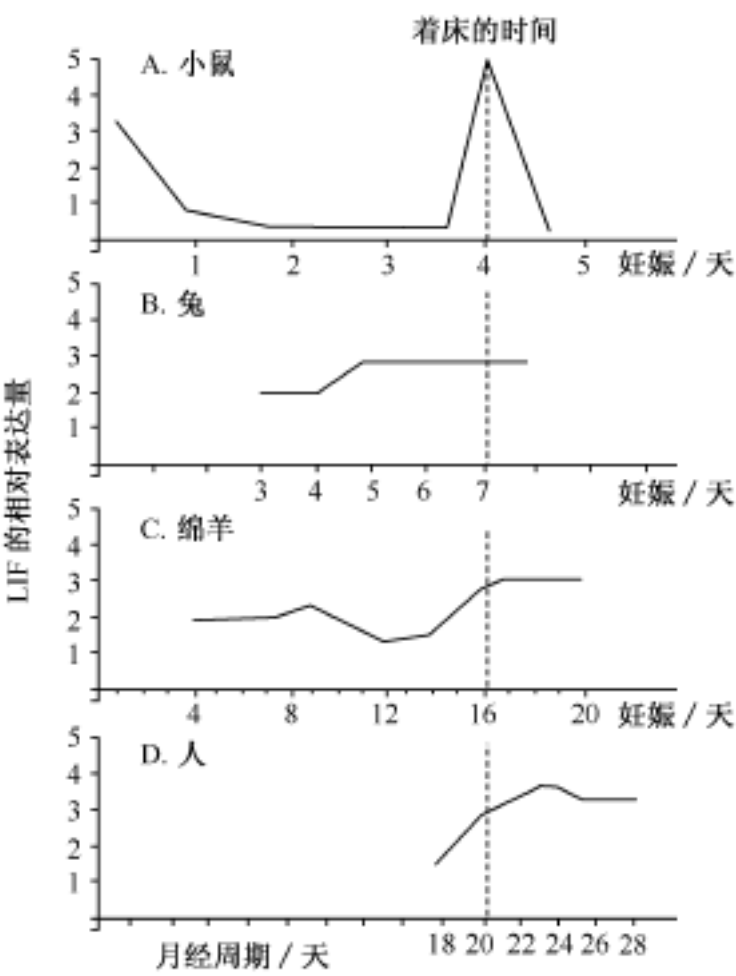


图 7-8 示小鼠、兔、绵羊和人子宫中 LIF 表达的时间与着床的关系
图中的虚线表示可能的着床时间（Vogiagis D 和 Salamonsen LA, 1999）

LIF 主要通过与其靶细胞膜上的受体结合后起作用，LIF 受体与 LIF 以低亲和力结合，当 LIF 受体与信号转导亚单位 gp130 结合后，就能够与 LIF 以高亲和力结合。LIF

与 LIF 受体结合后,诱导受体的二聚化,形成 LIF 受体-gp130 二聚体,从而激活使 STAT3 的酪氨酸磷酸化并行使其生物学功能。将 LIF 受体基因敲除后发现,纯合子的 LIF 受体突变体小鼠胚胎可以发育,但不能产出成活的个体,表现为胎盘发育不全、胎儿营养不良、骨骼及神经系统发育异常以及糖代谢失调等。LIF 受体缺失的纯合子小鼠胚胎虽然不能发育到期,但可以着床。这说明胚胎中的 LIF 受体可能对着床不是必需的。由于一直未得到 LIF 受体基因缺失的成年小鼠,所以无法估计这种小鼠的胚胎着床及其他生殖能力,尚不能确定母源性 LIF 受体在胚胎着床过程中的直接作用。

二、gp130 及 STAT3

gp130 是分子质量约为 130kDa 的糖蛋白,是白介素-6 (IL-6)、LIF、睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor)、抑瘤素 (oncostatin M)、IL-11 和心肌营养因子 (cardiotrophin-1) 等细胞因子的共同受体。在小鼠和人的妊娠期子宫内膜可溶性的 gp130 mRNA 的水平迅速增加。说明 gp130 在人及小鼠的妊娠过程中可能起重要的作用。在小鼠早期妊娠子宫中, gp130 主要表达在子宫发生蜕膜化的区域,并且在妊娠 6~8 天时发生蜕膜化的过程中逐渐增强。这表明 gp130 可能对蜕膜化的发生有重要的作用。在恒河猴, gp130 主要定位在子宫内膜的腺上皮并且在月经周期的 16 和 20 天及早期妊娠的第 5~11 天表达量最高,此时正是胚泡着床的时期。这也表明 gp130 在恒河猴的着床过程中起着重要的作用。但是,将小鼠 gp130 基因敲除后,小鼠胚胎能够正常着床。只是纯合子的 gp130 突变体小鼠胚胎在妊娠第 12.5 天后逐渐死亡,表现为心脏结构和功能异常,以及胎儿严重贫血等。可能同 IL-6 一样, gp130 敲除的小鼠胚胎着床数或者着床后的胚胎的存活数减少。

信号转导及转录活化因子 (STAT) 是一类脱氧核糖核酸结合蛋白,分子质量为 84~113kDa,是 gp130/ Jak/ STAT 信号转导通路重要的下游分子,在许多细胞因子的信号转导中起着重要的作用。在哺乳动物中发现的 STAT 家族成员主要包括 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5 及 STAT6。其中 STAT3 与哺乳动物的着床和蜕膜化有密切的关系。LIF 和 LIFR 共同调节 STAT3 在哺乳动物体内的活性。在胚胎着床期,体内 STAT3 的活性能被 LIF 单独诱导,导致 STAT3 特定地定位在腔上皮细胞的核内。尽管 LIFR 在着床前期持续表达,只有当 LIF 在妊娠第 4 天的腺上皮上高表达,以及 STAT3 活性在妊娠第 4 天特异性表达时,子宫内膜才能呈现接受态。STAT3 敲除的小鼠着床失败,并且缺乏 LIF 的表达。这可能是由于 STAT3 功能的缺失,导致 LIFR 与 gp130^{STAT} 形成的二聚体不能向下游转导信号所致。

已经证明 STAT3 在早期胚胎发育过程中是重要的。对 STAT3 功能的干扰能够导致胚胎死亡。STAT3 基因敲除的小鼠胚胎在早期妊娠 6.5 天开始退化,与正常妊娠过程中的小鼠胚胎相比,检测不到 STAT3 在内脏内皮层的表达。这可能是由于内脏的内皮层发育不全,从而使胚胎的营养不足,导致死亡。最近的研究发现,STAT3 与哺乳动物的着床有密切的关系。通过基因打靶技术,可以删除 gp130 中所有的 STAT 结合位点 (即产生碳末端 gp130^{STAT} “knock in” 小鼠)。通过与正常的野生型小鼠比较,在这种小鼠早期妊娠第 5.5 天时未检测到明显的着床位点,也不能发生正常的蜕膜化反应。

说明这种小鼠不能着床，并且这种小鼠缺乏 IL-6 和 LIF 的表达。尤其是缺乏 LIF 的表达可能是导致着床失败的主要原因。

三、降钙素与 E-钙黏素

降钙素 (calcitonin) 是一种含 32 个氨基酸残基的肽类激素，分子质量为 43kDa。主要由甲状腺滤泡旁 C 细胞合成和分泌，其作用是降低血钙和血磷。降钙素 mRNA 特异性表达于大鼠妊娠第 3~5 天的子宫内膜腺上皮中，与大鼠着床期一致。孕酮能上调降钙素基因表达，而雌激素则抑制孕酮诱导的子宫降钙素的基因表达。在大鼠妊娠第 2 天时，子宫降钙素 mRNA 和蛋白表达升高；在着床前（即妊娠第 4 天）达到峰值；在第 5 天（即着床开始时），其表达下降；到第 6 天（即着床结束时）表达很低或不能检测到。着床前抑制其表达则能破坏大鼠胚胎着床。这些结果说明降钙素在大鼠着床开始时（妊娠第 4 天）由腺体分泌到子宫腔，因此其主要功能可能是以自分泌或旁分泌方式建立允许胚泡着床的子宫接受态。

此外，降钙素 mRNA 及其蛋白质表达于人排卵后的分泌中期（月经周期的第 17~25 天）的子宫内膜腺上皮细胞中，其最大值出现在第 19~21 天，这与着床期一致。而排卵前的增殖期（月经周期第 5~14 天）或分泌后期（月经周期第 26~28 天）子宫内膜中降钙素表达均很低。用孕酮受体拮抗剂 RU-486 处理，能显著降低降钙素表达，说明降钙素在人子宫内膜腺上皮中的表达受孕酮上调。降钙素可能是孕酮调节的人子宫内膜接受态的有效分子标志之一。

孕酮通过其核内受体，在转录水平调节降钙素基因表达。降钙素与胚胎上 G 蛋白偶联的受体结合，激活腺苷酸环化酶，升高细胞内的 Ca^{2+} 浓度（降低环境中的 Ca^{2+} 浓度），促进胚胎细胞分化和调节胚胎黏附力，从而促进着床前胚胎的发育进程。子宫内膜上皮细胞相互形成紧密连接，在培养的上皮细胞中去除 Ca^{2+} 会导致紧密连接松懈。因此，围着床期降钙素的大量表达能显著降低子宫内膜腔 Ca^{2+} 浓度，导致子宫内膜上皮细胞黏附分子和控制极化上皮细胞表型的紧密连接的重新分布或表达，从而使紧密连接屏障开放，有利于滋养层侵入子宫内膜。此外，降钙素可以抑制子宫和输卵管收缩，血管紧张素、催产素可以促进子宫平滑肌细胞 Ca^{2+} 释放，使子宫肌收缩，因此，子宫局部释放的降钙素可以拮抗这种收缩效应，防止着床期间子宫收缩，有利于胚胎着床。

胚胎滋养层中表达的 E-钙黏素 (E-cadherin) 可介导细胞滋养层间的相互作用。滋养层及子宫内膜上皮都存在 E-钙黏素，表明这一黏附分子可能参与胚胎黏附的起始。子宫内膜基质及上皮受到孕酮的作用后进入一个短暂的胚胎着床“窗口期”。可能孕酮也调节子宫 E-钙黏素的浓度。胚泡增殖、分化及侵入到基质时，E-钙黏素表达下降，而 OB-钙黏素表达增加，这表明 OB-钙黏素介导随后的胚泡与子宫内膜间的相互作用。P-钙黏素被认为参与小鼠胚泡与子宫内膜的相互作用，但人类胚泡不表达 P-钙黏素。另外，P-钙黏素缺失时子宫不受影响。因此，P-钙黏素的精确作用尚未确定。妊娠时，一些细胞滋养层深深侵入到蜕膜及子宫肌层，这部分细胞滋养层表达 N-及 K-钙黏素，它们可能与表达 N-钙黏素的子宫内膜细胞相互作用。N-钙黏素基因敲除的小鼠发生着床失败。随后证实 N-钙黏素是胚胎细胞存活的重要的信号分子。同时发现，E-钙黏素

能使因 N-钙黏素基因敲除发育失败的小鼠部分恢复正常发育,说明 E-钙黏素可能具有充当 N-钙黏素替代物的作用。

在妊娠第 4~5 天,小鼠子宫中降钙素表达明显升高的同时,E-钙黏素的表达明显降低。在妊娠第 2 天给小鼠子宫腔内注射外源性的降钙素时,导致妊娠第 3 天子宫中 E-钙黏素的表达显著降低。

四、黏蛋白-1

黏蛋白-1 (mucin 1, MUC-1) 是高度糖基化的大分子,表达于子宫内膜上皮细胞表面,可能与胚胎着床有关。黏蛋白-1 是黏蛋白家族成员之一,它是一种大的上皮细胞表面糖蛋白。它有一个大的、延伸的、高度糖基化的外区,此区包含硫酸角质素链。黏蛋白-1 表达于多种上皮细胞的外表面,对细胞表面维持抗黏附性具有重要作用。黏蛋白-1 可能是通过受体(如整合素和钙黏着蛋白)介导、结合产生的空间立体位阻,从而抑制细胞与细胞之间的黏附作用。

在着床受雌激素刺激的物种中,如小鼠,孕酮抑制黏蛋白-1 表达,所以着床窗口开放时,子宫腔上皮及腺上皮都失去黏蛋白-1,而其他时期黏蛋白-1 表达非常丰富。而在猪中(着床也需要雌激素),黏蛋白-1 却受到孕酮的上调作用,但在黄体中期这一孕酮占绝对优势的时期,子宫腔上皮及腺上皮中黏蛋白-1 的表达也显著降低,其机理仍不清楚。而大鼠黏蛋白-1 蛋白降低只发生在腔上皮,腺上皮则没有降低。小鼠子宫黏蛋白-1 的减少是子宫上皮细胞向功能性接受态转变所必需的,而且,黏蛋白-1 还可以抑制由 E-钙黏着蛋白介导的小鼠滋养层细胞与子宫上皮细胞之间的黏附作用。已证实 E-钙黏着蛋白在黏附中起重要作用。因此,黏蛋白-1 可能是胚胎着床的一个抗性分子,在胚胎着床时必须被去除,使得胚胎附着所必需的配体-受体的相互作用得以实现,其表达下降可能导致子宫接受态的建立。

在着床不需要雌激素刺激的物种如兔和灵长类,黏蛋白-1 的表达受孕酮刺激,因此黏蛋白-1 在接受态子宫内高度表达,这似乎与黏蛋白-1 的抗黏附作用矛盾。但观察发现,兔子宫虽然在妊娠期持续表达黏蛋白-1,但在着床期的胚泡附着点处子宫内腔腔上皮失去黏蛋白-1,非着床位点则表达丰富,而且腔上皮中黏蛋白-1 表达显著减少。狒狒分泌期子宫内腔黏蛋白-1 表达也仅局限于腺上皮,腔上皮中不表达黏蛋白-1。这显然是胚泡产生的信号作用于子宫内腔的结果。虽然黏蛋白-1 在人接受期子宫内腔腔上皮中表达丰富,但硫酸角质素链消失。因此,糖基化结构的改变可能有利于胚胎黏附。某些黏蛋白可能是胚胎着床的特异性亲合素,在着床开始时胚胎与子宫之间的贴附中起作用,随后可导致整合素介导的后期着床过程。

五、两性调节蛋白 (amphiregulin, AR)

AR 是表皮生长因子 (EGF) 家族成员之一,由 84 个氨基酸残基构成,其分泌形式为 N 端丢失 6 个氨基酸残基后形成的由 78 个氨基酸残基构成的多肽。与 EGF 受体结合后,可使 EGF 受体发生自身磷酸化。在小鼠子宫内,AR mRNA 表达呈现着床特异

性。小鼠妊娠第3天, AR在子宫内腔上皮内表达很低, 在妊娠第4天表达出现一个峰值, 且主要集中在胚泡周围的子宫内腔上皮细胞内, 这与胚泡贴附起始阶段一致, 随后下降。给卵巢切除后的小鼠注射孕酮可迅速诱导小鼠子宫内腔上皮细胞表达 AR mRNA, 而注射 RU-486 可阻断孕酮对 AR 表达的诱导, 说明 AR 在小鼠子宫内的表达受孕酮上调。AR 可能通过促进子宫内腔上皮细胞分化从而对胚胎着床过程产生影响。此外, 在小鼠桑椹胚和胚泡细胞内均有 AR mRNA 和蛋白的表达。在小鼠胚胎培养液内添加 AR, 可以加快胚胎发育速度, 增加胚胎的细胞数量, 小鼠着床前胚胎表达的 AR 蛋白可能作为一种自分泌生长因子, 刺激胚胎细胞的增殖和滋养外胚层的分化。

六、同源盒基因

同源盒基因 (homeobox gene, HOX) 是转录调节因子。Hoxa10 及 Hoxa11 对人和小鼠子宫内腔接受态的建立是必需的。Hoxa10 表达于胚胎发生过程中的生殖道和早期妊娠子宫中。在人类月经周期的分泌中期, Hoxa10 及 Hoxa11 在子宫内腔上皮及基质细胞中的表达量剧增, 与“着床窗口”的开放一致。在子宫内腔细胞培养中, 雌激素和孕酮均可上调 Hoxa10 表达, 但孕酮的作用更强, 二者联合作用, 对 Hoxa10 在基质细胞中表达的刺激具有叠加效应, 但对上皮细胞表达的刺激效应不叠加。在雌性小鼠中, Hoxa10 在子宫内腔基质中的表达受雌激素抑制, 而被孕酮刺激, 两者联合作用导致 Hoxa10 表达局限于子宫系膜对侧上皮下基质。孕酮对 Hoxa10 和 Hoxa11 的刺激作用在生理范围内是剂量依赖式的, 可被孕酮受体拮抗剂 RU486 阻断, 表明孕酮受体参与了子宫基质 Hoxa10 表达的正调节。Hoxa10 可能调节子宫内腔基因转录功能。在子宫内腔接受期, Hoxa10 和 Hoxa11 在子宫上皮和基质中的表达模式说明它在调节子宫接受性过程中有重要作用。

Hoxa10 基因敲除雄性和雌性小鼠都是不育的。子宫内腔基质细胞中因 Hoxa-10 功能缺失而导致的缺陷性着床和蜕膜化可能是不育的原因之一。在 Hoxa-10 基因敲除小鼠中, 子宫基质内前列腺素 E 受体 3 和 4 (EP3 和 EP4) 的表达都不正常, 而其他相关基因不受影响。此外, 孕酮对 EP3 和 EP4 的调节也不正常。而孕酮受体、Hoxa-11、c-myc 等孕酮反应基因则受正常调节。这些结果表明, Hoxa10 特异性介导孕酮对子宫内腔基质 EP3 和 EP4 的调节。由于 Hox 基因参与局部细胞增殖, 在 Hoxa10 基因敲除小鼠中, 与雌激素和孕酮反应后的子宫内腔基质细胞增殖都显著减弱, 而上皮细胞增殖正常。这些结果说明 Hoxa-10 参与介导孕酮对子宫内腔基质细胞增殖的促进作用, 但不影响上皮细胞的功能, 因而可能导致着床和蜕膜反应缺陷。

七、组胺

组胺是一种广泛分布的细胞间信号分子。研究表明, 子宫中肥大细胞数目和组胺含量在着床前达到峰值, 着床后开始减少, 所以有人推测组胺可能参与着床时蜕膜反应的起始。组胺合成依赖于组氨酸脱羧酶 (HDC) 活性, 组氨酸脱羧酶是由 53kDa 和 55kDa 两个亚单位组成的二聚体。组胺由组氨酸脱羧酶作用于 L-组氨酸而形成。组氨酸脱羧

酶 mRNA 特异性定位于子宫腔上皮和腺上皮中。妊娠第 4 天表达较高,与着床窗口上皮细胞分化的时间一致,随后在妊娠第 5~8 天的围胚泡着床的腔上皮中表达下降。孕酮是上皮细胞分化所必需的,能上调组氨酸脱羧酶 mRNA 水平,可能组胺通过自分泌形式参与子宫上皮细胞分化,或以旁分泌形式调节基质细胞增殖和血管通透性变化。这些结果说明, HDC 的表达与胚泡着床期密切相关,受孕酮调节,因此它产生的组胺可能在胚泡着床过程中起重要作用。

八、前列腺素家族

前列腺素类包括前列腺素 (prostaglandin, PG) 和凝血 烷 (TX),为含有一个环戊烷和两个脂肪酸侧链的二十碳酸。前列腺素广泛存在于人和动物的各种组织中,通过自分泌或者旁分泌的方式刺激下游的信号分子,在多种生理和病理过程中作为细胞功能的调节物发挥着重要的生物学作用。前列腺素的生物合成前体是细胞膜中的花生四烯酸 (AA)。在磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 的作用下,从膜磷脂中释放花生四烯酸。环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 是由花生四烯酸合成前列腺素的关键酶。COX 催化花生四烯酸转变为 PGH_2 ,再由各种特异性的前列腺素合成酶将 PGH_2 合成相应的前列腺素。前列腺素是哺乳动物体内作用极为广泛的局部激素,影响生殖过程的多个环节。尤其是前列腺素能介导从排卵到分娩等一系列雌性生殖过程。

1. 磷脂酶 A2 (PLA2)

PLA2 能催化细胞膜磷脂转化成 COX 合成前列腺素的原料花生四烯酸,主要有两种形式, cPLA2 (cytosolic PLA2) 和 sPLA2 (secretory PLA2)。PLA2 在人的着床前胚胎中强烈表达。这说明在胚泡发育过程中, PLA2 可能通过提供胚胎发育所需要的前列腺素起重要的作用。已经在多种动物以及人的子宫内发现 PLA2 的表达,暗示 PLA2 可能在着床过程中起重要作用。

cPLA2 基因敲除的雌性小鼠产仔数少,并且经常表现出妊娠失败。已经发现其原因是 cPLA2 基因敲除雌鼠的着床启动时间延迟。当将 cPLA2 基因敲除的小鼠胚胎移植入野生型的假孕小鼠子宫后发现,妊娠过程中仅胎儿胎盘 (feto-placental) 的发育迟缓,而子宫蜕膜化基本正常。与野生型的小鼠相比, cPLA2 基因敲除的小鼠着床位点减少,着床位点血管通透性降低,子宫前列腺素的水平降低,其中 PGI_2 和 PGE_2 的降低尤为明显。当给这些 cPLA2 基因敲除的小鼠注射外源前列腺素后,能显著提高小鼠胎儿胎盘的发育,使之趋于正常发育。在大鼠子宫中, cPLA2 主要在蜕膜和腺上皮细胞中表达。向大鼠子宫内注入 cPLA 的抑制剂 (ATK) 可导致药物依赖性的蜕膜化抑制,人工蜕膜化的结果也证明了这一点。因此, PLA2 通过其提供的花生四烯酸调节前列腺素的合成,在启动着床和蜕膜化的过程中起重要作用。

2. 环氧合酶 (COX)

COX 是合成前列腺素的终端限速酶,与 PLA2 共同调节着生物体内前列腺素的合成,分为 COX-1 (组成型酶) 和 COX-2 (诱导型酶) 两种亚型。在小鼠着床期的子宫

中, COX 呈现时空特异性表达, COX-1 在着床前的妊娠第 4 天的子宫上皮表达, 而 COX-2 在小鼠子宫着床位点周围的基质细胞中表达。已经证实, COX-1 基因敲除的小鼠是可育的, 可以产生正常大小的幼仔, 生殖过程的其他方面也正常, 但却有分娩困难。COX-1 缺失小鼠可育的原因可能是, 由于 COX-2 在围着床期子宫内膜的表达上调对 COX-1 的缺失有一定的补偿作用。Lim 等发现 COX-2 缺失小鼠的排卵、受精、胚胎着床和蜕膜化过程都不正常, 并且正常的野生型胚泡移植后, 也不能在 COX-2 缺失小鼠的子宫中着床。用 COX-2 的抑制剂处理也可以阻止小鼠胚泡着床及蜕膜化过程。同样给大鼠注射 COX 的抑制剂——消炎痛 (indomethacin), 或注射特异性的 COX-2 抑制剂 (celecoxib) 能够剂量依赖性地减少大鼠妊娠的比例, 具有抗着床的作用, 并可显著减弱子宫的蜕膜化。这些结果表明, COX-2 在调节着床和蜕膜化的过程中起着重要的作用。但 Cheng 等 (2003) 报道, 在 COX-2 基因敲除后, 小鼠的胚胎着床和蜕膜化等均正常, 只是发生蜕膜化的时间延迟 1 天左右。最近 Wang 等证实, COX-2 基因敲除后的表型与小鼠的遗传背景有关。C57BL/6J/129 系的小鼠中, COX-2 敲除后确实导致小鼠的排卵、受精、胚胎着床和蜕膜化等过程受阻, COX-1 也不能代偿 COX-2 的功能。但在 CD-1 系小鼠中, 由于 COX-1 可代偿 COX-2 的功能, COX-2 敲除后的小鼠的排卵、受精和胚胎着床均明显改善, 并可妊娠到期, 得到成活的仔鼠。

与正常小鼠相比, 在 LIF 缺失的小鼠子宫中, COX-2 在同一时期的着床胚泡周围的子宫基质细胞内的表达缺失, 但腔上皮中表达正常, 说明 COX-2 的不正常表达可能是 LIF 缺失小鼠中着床和蜕膜化失败的原因。尽管 LIF 缺失小鼠子宫中 COX-2 的表达不正常, 但 COX-2 缺失小鼠子宫中的 LIF 表达却正常。这说明在着床过程中, LIF 可能是 COX-2 的上游信号分子。

3. 前列腺素 I (PGI)

前列腺素在着床期子宫中着床位点的表达水平强弱依次为: $\text{PGI}_2 > \text{PGE}_2 > \text{PGF}_{2\alpha} > \text{TXB}_2$, 而且 PGI_2 在子宫中着床位点的表达水平显著高于非着床位点。将正常的胚泡移植入 COX-2 缺失小鼠的子宫后, 胚胎虽不能着床, 但注入 PGI_2 的类似物——cPGI (carbaprostacycli, cPGI) 或者 L-165041 后, 可以提高小鼠胚泡的着床率。此外, 注入 cPGI 后也可以使蜕膜化得到恢复 (大约 70%)。 PGI_2 主要由 PGI 合成酶 (PGIS) 催化 PGH_2 合成。PGIS 是 P_{450} 家族的一种膜结合型血红蛋白。与非着床位点相比, PGIS mRNA 主要定位在小鼠妊娠第 5 天时着床胚泡的周围, 并且大量聚集在基质的血管系统周围。以后, 随着妊娠的进行而逐步增强。PGIS 蛋白质定位在着床胚泡周围的子宫基质细胞的细胞质和细胞核中, 这与 COX-2 在着床期子宫中的定位一致, 进一步表明, COX-2 来源的 PGI_2 在着床的过程中起重要的作用。由于 PGI_2 及 PGIS 共同定位在血管内皮细胞, PGI_2 活跃地参与血管的形成及功能, 并能改变血管的通透性, PGI_2 可能通过参与着床过程中的血管发生来影响着床过程。

4. 过氧化物酶体增殖因子活化受体 (PPAR)

PPAR 是 PGI 的核受体, 在小鼠中存在 3 种 PPAR 亚型: $\text{PPAR}\alpha$ 、 $\text{PPAR}\delta$ (亦称 β 和 NUC1) 和 $\text{PPAR}\gamma$ 。在小鼠着床前子宫中检测不到 $\text{PPAR}\delta$, 而在着床期胚泡周围的

子宫基质细胞中特异表达，着床启动后则特异地定位在蜕膜上。PPAR δ 基因（但不是 PPAR α 和 γ ）在小鼠子宫基质细胞中以着床特异性方式被活化的胚泡诱导表达，其表达与 COX-2、PGIS 以及 PGI $_2$ 的表达模式非常类似。与非着床位点相比，PPAR δ mRNA 和蛋白主要表达在小鼠和大鼠着床位点胚泡周围的初级蜕膜中，并且随着妊娠的进行逐渐增强。PPARs 必须与 9-顺-视黄酸受体（retinoid X receptor, RXR）形成异源二聚体，然后才能够激活基因转录。不但着床期子宫中表达丰富的 RXR α 和 β ，蜕膜化细胞的细胞核抽提物中也存在 PPAR δ -RXR α 异源二聚体。并且在 COX-2 基因缺陷小鼠子宫中，PPAR δ 和 RXR α 的表达只集中在着床期围绕胚泡的子宫基质细胞中。这些结果表明，子宫中的 PPAR δ 可能介导了 PGI $_2$ 在着床和蜕膜化过程中的作用。

5. 前列腺素 E (PGE) 及 PGE 合成酶 (PGES)

除了 PGI $_2$ 外，PGE $_2$ 是在着床位点表达最丰富的前列腺素。已经证明 PGE $_2$ 在啮齿类动物的着床过程中有重要的作用。用消炎痛抑制前列腺素合成后，大鼠子宫不能正常发生蜕膜化反应，从而导致着床失败。但将外源性 PGE $_2$ 注入大鼠子宫后，可以部分恢复子宫内膜的蜕膜化。PGE $_2$ 在胚泡发育的过程中也有重要的作用，能够诱导小鼠胚泡着床。PGE $_2$ 的表面受体 EP4 在小鼠围着床期子宫的基质细胞中强烈表达。PGE $_2$ 的表面受体 EP2 也在小鼠的胚胎着床位点处特异性表达。虽然，将 PGE $_2$ 注入 COX-2 缺失小鼠中只能恢复一小部分（大约 30%）子宫基质细胞的蜕膜化反应，但用 PGE $_2$ 与 cPGI 共同处理则能够显著促进胚胎和蜕膜的生长，着床前的胚胎也可以致密化，胎盘预形成位点的血管发育以及蜕膜的大小都与野生型小鼠中的情况类似。这可能表明，PGE $_2$ 对于 PGI $_2$ 诱导的蜕膜化起到补充的作用，由二者共同作用来调节子宫基质细胞发生蜕膜化反应。

PGE 合成酶 (PGES) 是 PGE $_2$ 生物合成的终端酶，催化 COX 的产物 PGH $_2$ 转化为 PGE $_2$ 。PGES 有两种存在形式，即膜相关的谷胱甘肽依赖型的 PGES (microsomal PGES, mPGES) 和可溶性谷胱甘肽依赖型的 PGES (cytosolic PGES, cPGES)。mPGES mRNA 与蛋白在胚泡着床位点周围的基质细胞中强表达。与 mPGES 相似，cPGES mRNA 也主要在蜕膜的基质细胞中表达。不同的是，cPGES 蛋白在着床胚泡周围的腔上皮表达。这可能表明，子宫腔上皮合成的 cPGES 与在基质细胞中表达的 mPGES 在胚胎着床过程中具有一个相互补偿作用。mPGES 与 cPGES 蛋白在着床窗口开放期不同定位可能与 COX-1 与 COX-2 相同，因而 COX 与 PGES 二者协同作用在着床期的子宫内膜中产生 PGE $_2$ 。另外，已经证明 COX-1 与 cPGES 共同作用产生瞬时的 PGE $_2$ ，而 mPGES 与 COX-2 相偶连，启动延迟的 PGE $_2$ 合成。因此，COX-1/ cPGES 与 COX-2/ mPGES 来源的 PGE $_2$ 可能在着床和蜕膜化的过程中起作用。

九、雌 激 素

哺乳动物体内的雌激素主要由卵巢和睾丸合成，其合成底物主要是胆固醇和醋酸盐。雌激素受体属于核受体 (nuclear receptor)，包括 ER α 和 ER β 两种亚型，具有类固醇激素核受体超家族的典型结构。雌激素的两种受体作为一种配基诱导性转录因子，在

生殖过程中具有关键作用。

ER α 基因敲除 (α ERKO) 的雌性小鼠多数不育。ER β 基因敲除 (β ERKO) 的雌性小鼠表现为生育率低下和幼仔体形过小。ER α 和 ER β 均敲除的雌性小鼠则是完全不育的。对 α ERKO 和 β ERKO 小鼠子宫表型的分析表明, ER α 是子宫中的主导性 ER。这与上述 ER α 在啮齿类动物和人子宫中的表达情况相一致。 α ERKO 小鼠表现为子宫发育不全、内膜基质缺少应有结构、腺体的分布较为松散、腔上皮和腺上皮细胞呈现为立方形, 以及缺乏高柱形的“雌激素化”的形态。而且, α ERKO 小鼠子宫受雌激素调节的基因的表达量明显减少, 以及细胞的增殖应答能力、对雌激素反应基因的调控能力以及对生长因子的应答能力也都有所下降。然而, β ERKO 雌性小鼠的子宫表现正常, 而且能够经历与卵巢类固醇激素相应的周期性变化, 只是生育能力降低。这些结果均表明, ER α 可能是在小鼠子宫中介导雌激素作用的主要亚型。

雌激素是子宫进入胚胎着床的接受态必不可少的。在小鼠中, 妊娠第 4 天胚胎着床前的雌激素峰是胚胎着床所必需的。如果在着床前 (即妊娠第 4 天早晨) 切除卵巢, 会导致胚泡休眠和对着床的抑制, 使子宫处于延迟着床状态。这种中性状态可以由每天注射孕酮来维持。当再次注射雌激素时, 中性状态的子宫会进入接受状态。

最近发现, 小范围内 (3.0~25.0 ng) 雌激素水平的高低决定着子宫接受态窗口开放时间的长短。低剂量的雌激素可以延长子宫接受态窗口的开放时间, 而相对高剂量的雌激素会令窗口迅速关闭。在高水平雌激素的存在下, 子宫向非接受态的转化会发生得更快一些, 甚至在一些情况下很少或不能够发生着床。实验中还发现, 在高剂量雌激素的刺激下, 胚泡位点处着床特异性基因以及子宫向接受态转化相关基因的表达发生畸变。这些结果可能说明高剂量雌激素所导致的子宫向非接受态的快速转化可能是由于与子宫接受和附着相关的基因不能维持正确表达而造成的。此外, 体外研究也表明, 高水平的雌激素对胚胎着床是有害的, 但其主要原因是对处于分裂阶段的胚胎的直接毒性作用。

妊娠过程中, 子宫内膜的血管生长是胚胎着床和胎儿血液供应系统发育所必需的。雌激素可以通过雌激素受体的介导和可能涉及生长因子产生的未知机制, 促进子宫内膜动脉的生长, 还可以通过促使上皮细胞和成纤维细胞产生血管内皮生长因子 (VEGF) 来诱导子宫内膜的血管生成。此外, 雌激素还可以增加子宫内膜上皮细胞中孕酮受体 (PR) 的表达, 这可能有助于孕酮对妊娠的维持作用。

十、糖

在着床的过程中, 很多寡糖 (oligosaccharide) 在胚胎和子宫的细胞表面表达, 并且随着着床的进行而呈现动态的变化。

在围着床期, 小鼠合成的类肝素硫酸盐 (heparin sulfate) 升高到平时的 4~5 倍。体外实验表明, 类肝素硫酸盐对于着床前小鼠胚胎的黏附和孵出是必不可少的。在人中, 可利用滋养层细胞和子宫上皮细胞之间的相互作用来模拟着床过程, 而类肝素硫酸盐蛋白多糖能促进这两种细胞之间的相互反应。在围着床时期的小鼠胚胎中, 可检测到类肝素硫酸盐蛋白多糖、syndecan 和串珠素 (perlecan) 的表达, 其中 syndecan 定位在

小鼠胚胎滋养层的内表面，而串珠素定位在滋养层的外表面。在延迟着床的小鼠模型中，串珠素的表达也被延迟。用雌激素处理启动着床后，可使串珠素的表达恢复，说明串珠素对于小鼠的胚胎着床可能是必需的。并且，蛋白多糖可能作为一种黏附促进分子在着床过程中起作用。

在着床的接受态期，岩藻糖化乳糖 (lactosaminoglycan) 相关结构的表达明显上调，其中包括 LNF、CD15 及 Le (y)。在胚胎着床过程中，细胞表面 Le (y) 寡糖在胚泡与子宫内膜上皮之间的识别与黏附过程中起重要作用。雌激素和孕酮均可调节 Le (y) 寡糖抗原在子宫内膜的上皮细胞中的表达。体内和体外实验都表明，封闭胚胎或子宫内膜表面的 Le (y) 寡糖可以抑制胚胎的着床，并且此作用具有明确的糖特异性以及时间性。中和胚泡和子宫内膜表面的 Le (y) 寡糖不仅可以阻断母胎之间的识别和黏着，并导致着床失败，而且可以抑制胚泡和子宫内膜中 MMP 及 EGF 受体的表达。这说明 Le (y) 寡糖抗原不仅与母胎间的识别及黏附有关，还可能通过影响着床相关因子，参与胚胎着床的调节过程。

在小鼠中，LNF-I 与 Le (y) 通过介导胚胎-子宫的相互作用来影响着床过程。在小鼠胚胎和子宫上皮细胞中，都能检测到 Le (y) 的表达，并且 Le (y) 可能通过同种分子的相互作用来影响小鼠胚胎的黏附过程。在人的早期妊娠和月经周期的黄体期后期，子宫内膜能够分泌大量的孕酮依赖性糖蛋白 (glycodelin)。狒狒的子宫内膜中合成的肝糖与外周血中 CG 的升高和降低相一致。此外，在狒狒的子宫接受态期，注入 hCG 能够使子宫内膜中肝糖的转录和翻译升高。已证实，肝糖在人的上皮细胞分化过程中起重要作用。在子宫处于接受态期，肝糖可能通过影响上皮的功能来促进子宫上皮与胚胎的相互作用，从而促进胚胎着床过程。

第三节 延迟着床

通常，当胚胎发育到胚泡期时便开始胚胎着床过程。但有些动物在一段时间内，胚泡在子宫中游离，并不立即着床，子宫也处于非接受态，此时即为延迟着床 (delayed implantation) 状态。自然发生的延迟着床为我们提供了一个很好的研究胚胎着床的模型，将有助于更好地研究胚胎着床的调控机制。

延迟着床又称胚胎滞育，可分为两种形式：兼性滞育 (facultative diapause) 和专性滞育 (obligatory diapause)。兼性滞育常发生在有袋动物、小鼠和大鼠的哺乳期。在母兽哺育幼兽时，新的胚胎处于滞育状态，此时胚泡细胞不发生有丝分裂。专性滞育常发生在鼬科动物、熊、海豹、一些蝙蝠以及欧洲獭等动物。处于专性滞育的胚泡有少量的有丝分裂。小鼠胚胎激活后，滋养层的扩展总是伴随着子宫代谢活性的增加。由于在缺少特定的氨基酸、血清因子、葡萄糖和一些离子时，滋养层不会发生扩展，所以子宫可以通过调节其分泌物来控制胚胎的发育。此外，当阻止滋养层扩展时，胚胎的新陈代谢并不减少，这表明滋养层的扩展和胚胎的新陈代谢是分别控制的。

延迟着床也可经实验诱导，例如可通过切除垂体或干扰下丘脑的功能等。在小鼠和大鼠分娩后的发情期内，如发生交配，则自然性的哺乳可诱导受精后发育的胚胎处于延迟着床 (为兼性延迟着床) 状态。这种自然发生的延迟着床在小鼠和大鼠中，随着品系

的不同差异很大，即使在同一品系内不同的个体间也有差别。然而，将幼鼠隔离使哺乳刺激终止后，这些休眠的胚泡便可激活，并发生着床。在有袋类等许多野生动物中，延迟着床是专性的及季节性的。有趣的是，在仓鼠、豚鼠、兔及猪中，并不发生延迟着床。现在还不清楚，灵长类中是否发生延迟着床。虽然，雌激素对于终止孕酮致敏的小鼠和大鼠子宫的延迟是必要的，但其机制仍不清楚。

延迟着床分为三个阶段：①进入延迟着床；②延迟着床的维持；③重新激活。

一、延迟着床现象

延迟着床的启动往往依赖于哺乳刺激、光周期以及营养的利用率等因素。光周期通过对褪黑素的调节影响催乳素的分泌，而褪黑素和催乳素对延迟着床的启动都有促进作用。多数季节性饲养动物都定时分泌催乳素，在春夏浓度最高，秋冬最低。袋鼠类在发情前期结束时分娩，然后进行排卵和受精。当胚胎发育到约 100 个细胞期时，受幼仔吮吮乳汁的刺激而进入延迟着床，此时为分娩后的第 6~8 天。小鼠和大鼠在分娩后的哺乳期也有延迟着床。这是因为，哺乳期的小鼠和大鼠缺乏下丘脑激素释放因子，使垂体分泌 FSH 的过程受到抑制，从而降低了雌激素的水平。所以，缺乏雌激素刺激的胚胎便进入延迟着床状态。

尤氏大袋鼠初次妊娠时，胚胎进入延迟着床的过程由光周期调节，以后则由哺乳刺激来抑制胚胎的发育。在延迟着床阶段，尤氏大袋鼠的胚胎和黄体均不生长；即使没有卵巢激素，胚胎在体内也可存活 11 个月。貂等鼬科动物与有袋目动物进入延迟着床的机制不完全相同。貂在排卵后黄体就退化，孕酮分泌量极低，随即便进入延迟着床。

二、延迟着床的维持和激活

延迟着床维持的时间因物种而异，如獾和小袋鼠为 10~11 个月，而大鼠和小鼠为 4~10 天。在海豹种与种之间这种差异也很明显，长的为 5 个月，短的为 1 个月。澳大利亚海狮的生殖周期为 18 个月，其中 3~5 个月是处于延迟着床状态。西部斑点臭鼬的延迟着床是由于其子宫内部机能尚不健全所致，持续大约 200 天。

1. 延迟着床过程中类固醇激素的作用

澳洲海狮的孕酮水平在延迟着床期间较低，在胚泡激活前开始增加。雌激素在胚泡激活前也有一明显波动，但肌肉注射孕酮、雌激素或雌激素加孕酮均不能诱导激活反应。狗子宫中雌激素与催乳素浓度在延迟着床期间很低，激活后可迅速增加，而孕酮浓度在延迟着床、激活和着床期间则基本保持恒定。西部斑点臭鼬的血浆 LH、催乳素和孕酮浓度在延迟着床期间均相对较低，但在着床前逐渐增加。以上结果显示，延迟着床的激活受类固醇激素的调节，但不同物种的调节机制各不相同。

2. 催乳素对延迟着床过程的影响

催乳素对不同动物的作用也各不相同。南极软毛海豹胚胎的激活反应与是否断奶并

不相关，其催乳素可以同时促进泌乳和激活胚泡。外源性催乳素对貂的胚泡着床有促进作用，但不能直接诱导其着床。并且，催乳素的抑制剂——溴麦角环肽可抑制貂中催乳素受体 mRNA 的增加，表明催乳素对其自身受体有上调作用。在有袋目动物中，注射溴麦角环肽会迅速激活胚泡，这说明催乳素对胚泡的生长有抑制作用。此外，有袋目动物黄体上有催乳素受体，所以催乳素还能抑制黄体的分泌。催乳素的释放受哺乳刺激调控。将乳腺的神经去除 72h 后，由于缺乏催乳素抑制，黄体将重新恢复分泌活性，诱导胚胎终止延迟着床。即使此时再重新开始哺乳，也无法阻止胚胎的激活反应，说明催乳素对延迟着床过程中的泌乳和胚胎激活都起重要作用。

3. 代谢反应的激活

在延迟着床激活过程中，胚泡内部的代谢反应也随着发生一系列的变化。臭鼬胚泡在开始激活的同时，糖原和脂类迅速减少，滋养外胚层和内细胞团中 RNA 与蛋白质合成显著增加。这说明胚泡正以糖原和脂类作为能量来源，重新恢复其内部新陈代谢。小鼠胚泡在接收激活信号的 12h 内，有丝分裂及细胞数量明显增加，此时丙酮酸是胚泡主要的能量来源；16h 以后，葡萄糖取代丙酮酸成为其主要能量来源。去除尤氏大袋鼠的哺乳刺激后第 4 天，其子宫分泌开始增强，第 5 天时胚泡的新陈代谢开始增加，而且其乳汁中糖类的含量明显降低。可见，激活反应的第 5 天是尤氏大袋鼠胚泡新陈代谢的转折点。

4. 生长因子的变化

子宫分泌物中一些对胚胎生长起重要作用的生长因子（如 LIF、IGF、EGF、PDGF、FGF、TGF- β 等）在激活反应中有明显变化。貂子宫中，在延迟着床期间 LIF 浓度较低，在激活反应的前两天有短暂的升高。与此相似，在延迟着床期间臭鼬子宫中 LIF mRNA 的表达水平较低，当胚泡恢复发育时显著升高，并维持高水平直到着床。臭鼬子宫中可检测到两种 LIF 受体 mRNA，它们的浓度随着胚泡的恢复发育而逐渐增加，但在胚泡激活后期，又稍有下降。此外，尤氏大袋鼠胚泡可通过 IGF 的介导，使细胞内葡萄糖浓度增加，从而激发其内部新陈代谢。小鼠胚泡激活时，雌激素在着床位点可诱导产生 HB-EGF 样生长因子。臭鼬胚泡激活前，EGF 与 EGF 受体均显著增加。以上结果显示，许多生长因子在延迟着床期间不存在，但在雌激素激活胚泡的同时迅速产生。因此，胚泡的成功激活需要一个复杂的细胞信号转导网络。

第四节 蜕膜化

妊娠的起始标志着胚胎发育和子宫分化这两个独立过程的成功结合。子宫的分化来自卵巢的雌激素和孕酮严格调控。在排卵后，由于孕酮浓度的升高，子宫内膜的表层（即功能层）发生广泛的重建。这一过程涉及在月经周期的分泌期后期的子宫腺上皮向分泌型转变，以及以后的基质的蜕膜化。在早期妊娠中，基质纤维原细胞分化为蜕膜细胞的过程对于着床和胚胎的存活是必需的。蜕膜持续增大一段时间后，开始变薄，分娩时在胎盘底部作为母体胎盘而遗留下来。在食肉类、啮齿类、灵长类等动物中，由于此

膜在分娩时脱落，故有蜕膜之称。子宫蜕膜化对于母体妊娠的建立和维持是很重要的，蜕膜化是子宫基质细胞形态功能发生变化的一个过程。

一、各种动物的蜕膜化

绵羊和猪均为非侵入性着床，但它们的滋养层细胞侵入子宫壁的程度是不同的。猪为真正的上皮绒毛型 (epitheliochorial) 胎盘，子宫的腔上皮在妊娠过程中一直保持完整，胎儿并不穿过母体组织，胎儿的滋养层细胞只是简单地黏附到顶部的腔上皮表面，与子宫基质细胞不接触。绵羊为合体上皮绒毛型 (synepitheliochorial) 胎盘，腔上皮细胞失去完整形态 (disintegration) 后形成上皮的侵蚀区，滋养层细胞可迁移入此区并与剩余的上皮细胞融合形成合胞体，但并不侵入基质中。在妊娠第 19 天后，胎儿组织与母体的基质并行排列，但并不侵入基质。在绵羊妊娠第 13~35 天的子宫内膜中，可观察到类似于蜕膜化过程的基质细胞的转变。骨桥蛋白 (osteopontin)、结蛋白 (desmin) 及 α 平滑肌肌动蛋白 (α SMA) 等蜕膜化的标志分子均在绵羊的妊娠子宫基质中表达，而在猪中仅有 α 平滑肌肌动蛋白表达。

人大约在月经周期的第 23 天，当孕酮浓度仍然很高时，内膜的基质细胞开始转变为类似于早期蜕膜中的细胞。这一过程起始于螺旋动脉周围的细胞，以后逐渐在内膜中扩散。子宫内膜浅层 2/3 区域的血液供应来自螺旋动脉，而螺旋动脉仅在有月经周期的动物中才有。在这些血管的生长过程中，其螺旋化程度逐渐增加，一直到排卵后第 3 天为止。当妊娠继续进行时，这一过程就变得特别明显。这些蜕膜细胞为圆形，具有肌成纤维细胞 (myofibroblast) 的特征，可分泌催乳素。

二、蜕膜化的形态学特征

子宫内膜对着床胚胎发生应答后，开始发生蜕膜化，导致子宫的重量和大小增加。这种增长并不仅仅是由于子宫基质细胞的增殖和分化，还由于骨髓来的各类细胞在子宫内膜中浸润 (infiltration)，以及血管通透性的增加及组织水肿的发育导致的组织膨胀。因此，在黏附后，胚胎是典型地包围在一个膨大的蜕膜组织中。蜕膜的形成是胚胎着床过程中一个重要的部分。

在人子宫中，一些基质细胞的蜕膜化转化大约发生在月经周期的第 23 天。这一过程起始于子宫内膜功能层上部的螺旋动脉及毛细血管附近。在超微结构上，基质细胞在分化过程中逐渐增大、细胞核变圆、核仁的数目增加及复杂性增加、粗面内质网及高尔基复合体膨大，以及细胞质中糖原和脂滴积累。在蜕膜化的前体细胞表面有很多细胞质突起，可穿越周围的基板。这些突起也能任意向细胞外基质中延伸或使邻近细胞的细胞质成锯齿状。在基质细胞间能见到紧密连接，但见不到真正的桥粒。另外，同一细胞的突起间也能形成间隙连接。

人蜕膜由大蜕膜细胞 (large decidual cells, LDC)、内膜颗粒性细胞 (endometrial granulated cells, eGC) 及小蜕膜细胞构成。大蜕膜细胞为形成蜕膜的主要细胞类型，也决定了蜕膜作为组织的形态特征。在着床前和着床期间，大蜕膜细胞的前体细胞位于

子宫腔上皮的基膜下面。在以后的分化过程中，大蜕膜细胞变为纺锤形。啮齿类的大蜕膜细胞最终形成一个上皮样结构，具有腺体的特性。在人蜕膜中，大蜕膜细胞数量最多，约占人蜕膜的 60%~90%，但在不适宜的情况下，这个比例可下降到 35%。人和大鼠的内膜颗粒细胞具有低水平的自然杀伤（NK）细胞活性及高水平的自然抑制（natural suppressor, NS）活性。自然杀伤和自然抑制特性的结合使内膜颗粒细胞具有免疫调节功能。蜕膜的其他功能包括子宫中炎症的控制及控制滋养层细胞的生长和扩展。在妊娠过程中，蜕膜细胞的生存时间是有限的。

三、蜕膜化的作用

蜕膜化是侵入性着床的灵长类和啮齿类动物所特有的，仅发生在胎盘形成涉及上皮的破坏以及滋养层细胞侵入子宫基质的一些种类。在具有中央和非侵入性着床的动物（包括家畜）中并不存在。大量的证据表明，蜕膜化对于协调滋养层细胞的侵入及胎盘形成是必需的。在具有血绒毛膜胎盘（hemochorial）的各种动物中，蜕膜化的程度似乎与滋养层细胞侵入的程度有关。蜕膜化的子宫内膜似乎也有能力限制滋养层细胞的侵入特性。例如，小鼠的滋养层侵入的程度及持续时间在妊娠或假孕的蜕膜化子宫内膜中较小，而在肾、睾丸、脾、肝和脑等子宫外的位点，以及未妊娠及非蜕膜化的子宫内膜中则较大。而且，由人蜕膜化细胞制备的条件培养基能够抑制 BeWo 绒毛癌细胞（BeWo choriocarcinoma cell）的生长以及滋养层细胞的侵入。

在灵长类和啮齿类动物，当滋养层细胞穿越子宫的腔上皮屏障、并与子宫的基质相接触时，子宫的基质并不具有屏障的作用。然而，胚胎从上皮到基质环境的转变促使基质中发生一系列的反应，即蜕膜化过程。基质细胞分化成上皮样的蜕膜细胞，在胚体的周围形成一个小室，从而可限制滋养层细胞向周围的子宫区域侵入。

此外，在妊娠期间，蜕膜的一个重要功能是作为免疫屏障，以保护胎儿不被母体所排斥。

四、蜕膜化过程的调控

自狒狒实验中得来的结果表明，蜕膜化过程可分为两个阶段。第一阶段是由激素调节的增殖期，以正在分化的成纤维细胞中表达细胞骨架蛋白—— α -平滑肌肌动蛋白为标志，并不依赖于胎儿的存在。这一阶段主要受 CG 和孕酮调节。对胚胎刺激发生应答后，细胞骨架发生重构等变化也许与蜕膜中的整合素和细胞外基质结合有关，而且在 CG 的作用下以及妊娠确立后细胞外基质也发生很大的改变。第二阶段需要胚胎的存在，以 α -平滑肌肌动蛋白的下调及胰岛素样生长因子结合蛋白-1（insulin-like growth factor binding protein, IGFBP-1）的诱导表达为特征。 α -平滑肌肌动蛋白为与细胞骨架相关的重要的丝状蛋白。在狒狒月经周期的基质成纤维细胞中并不表达，但在妊娠期子宫内膜的基质细胞中则表达。 α -平滑肌肌动蛋白的存在与细胞的上皮细胞形态或圆形有关。在早期妊娠中，基质细胞中 α -平滑肌肌动蛋白的表达有一个转换过程。随着 α -平滑肌肌动蛋白的表达消失，在这些细胞中 IGFBP-1 开始表达。已证实，IGFBP-1 可抑制

滋养层细胞的迁移，而 α -平滑肌肌动蛋白可在转录水平抑制 IGFBP-1 的产生。在滋养层黏附以前， α -平滑肌肌动蛋白的诱导表达使得 IGFBP-1 的产生受到抑制，从而有利于滋养层细胞迅速迁移进入母体的子宫内膜中。

蜕膜化反应，包括子宫基质中的成纤维细胞样的间充质细胞分化为上皮样细胞的过程，为灵长类动物子宫内膜中发生的最主要的事件之一。在人月经周期的分泌期，在雌激素、孕酮和松弛素 (relaxin) 等的作用下启动蜕膜化反应，并伴随着催乳素和 IGF-BP-1 等新蛋白的表达。在人中，不论着床发生与否，在月经周期的第 23 天均可观察到基质水肿，并在 3~4 天后，在螺旋动脉附近开始出现前蜕膜化反应，一直扩展到子宫内膜的上部 2/3 的区域。如果发生了着床，则蜕膜化反应一直持续进行，最终形成妊娠蜕膜。相反，狒狒在月经周期中并不经历前蜕膜化反应。但在着床后，基质的成纤维细胞发生广泛的改变，在狒狒和猕猴中形成蜕膜。

尽管在体内孕酮可能是启动因子，但在体外，孕酮必须与一些可升高细胞内 cAMP 的因子共同作用才能有效地诱导蜕膜化。近年来，关于孕酮对蜕膜化诱导的必需性已经受到质疑，因为外周血中孕酮浓度很低的妇女也可正常妊娠。此外，在体外单独升高 cAMP 的浓度时，也可发生蜕膜化。在啮齿类动物，单独用孕酮也可诱导蜕膜化。这表明在妇女中，一些受孕酮和 cAMP 影响的未知因素可能在分泌期的内膜中精心组织，而这些因素与蜕膜化和催乳素产生直接相关。用 IL-1 处理可阻止蜕膜化的发生。IL-1 可降低催乳素的产生，并阻止分化为蜕膜样细胞。但现在还不知道 IL-1 是否与内膜细胞中的腺苷酸环化酶系统相作用。

现在认为，蜕膜化反应的起始需要持续升高的细胞内 cAMP 浓度。PGE₂、松弛素、促肾上腺皮质激素释放因子、LH 和 FSH 等均能结合到子宫内膜基质细胞表面的受体上，可激活偶联的 G 蛋白。处于活性状态的 G 蛋白可以是刺激性的 (G_s)，也可能是抑制性的 (G_i)。刺激性的 G 蛋白可激活腺苷酸环化酶或磷脂酶 C 等，从而产生 cAMP 和 DAG 等重要的第二信使分子。孕酮、cAMP、松弛素 (relaxin)、促性腺激素、糖蛋白激素的 α 亚单位及 PGE₂ 等很多物质均能诱导或促进基质细胞的体外蜕膜化。在分离培养的人子宫基质细胞中，17- β -雌二醇加孕酮能很有效地诱导催乳素的分泌，而催乳素为人蜕膜化的一个主要的标志分子。此外，以前发现在体外蜕膜化过程中 hCG 能诱导细胞内 cAMP 的增加，认为 hCG 能通过增加细胞内 cAMP 的浓度来诱导体外的蜕膜化。而且 hCG 也能促进 17- β -雌二醇加孕酮共同诱导的蜕膜化过程。但近来发现在人子宫内膜中并不存在 LH/CG 的受体。关于 hCG 在蜕膜化过程中的作用有待于进一步证实。

在妊娠过程中，蜕膜化反应一直在进行。蜕膜细胞的大小等特征与蜕膜化反应的标志性分子——催乳素的表达相关。在妊娠期间，不仅蜕膜细胞的大小在增加，蜕膜中表达催乳素 mRNA 的基质细胞的比例也在增加，由妊娠早期的 9.8% 增加到足月妊娠时的 57.8%。这也说明，即使在足月的人蜕膜中仍有一群未分化的基质细胞存在。现在对选择一部分基质细胞发生蜕膜化的机制仍不清楚。自足月蜕膜来的基质成纤维细胞仍有能力在体外经历形态和生化性的分化，一方面表明这些细胞的蜕膜化转变在体内一直受到抑制，另一方面也可能表明在除去蜕膜化刺激后，这些蜕膜细胞有能力进行去分化。

五、实验性诱导蜕膜化

蜕膜化为母体对胚胎发生应答的一个关键环节。这种蜕膜化的转化可由一些刺激诱导发生，可用子宫腔中注射芝麻油等植物油或机械刺激来诱导。尽管实验性诱导的蜕膜组织与正常妊娠过程中的蜕膜在发育的时间及形态上有微小差别，但一般认为是一个好的蜕膜化的实验模型。在妊娠或假孕期间，仅能在很短的一段时间诱导蜕膜反应，而且利用不同刺激时这一时间的长短不同。刺伤或切割子宫等重度损伤刺激可在假孕早期的3~4天的时间内很有效地诱导蜕膜化，而腹腔内注射匹拉噻嗪（pyrathiazine，一种抗组胺药）或子宫腔内灌注不同的化学物质等轻度损伤刺激仅能在几个小时的时间段内诱导蜕膜化。子宫对非创伤性刺激发生最敏感的时间与子宫对胚泡的接受期长短有关。在大鼠和小鼠中已经证实，尽管孕酮本身能够支持创伤刺激后蜕膜的发育，但孕酮致敏2天后用雌激素处理则能使子宫进入类似围着床期的敏感期及以后的钝化期。

六、蜕膜化过程中的标志性分子

1. 催乳素（PRL）及其受体（PRL-R）

1977年首次发现催乳素可由人子宫内膜和蜕膜合成，以后发现催乳素是蜕膜的一个重要标志。在对狒狒的研究中发现，随着胚胎着床的开始，催乳素不仅在正常妊娠蜕膜组织中的表达稳定增加，而且催乳素信号在宫外孕的蜕膜中也表达。这些结果显示催乳素可能通过旁分泌和/或自分泌的机制直接作用于蜕膜细胞。催乳素或催乳素受体基因敲除后，小鼠的生殖率均下降。催乳素在浓度低时可促进子宫内膜的增长，达到一定高的浓度时则会反过来抑制子宫内膜增长。这种双重作用提示催乳素受体在调节催乳素自分泌过程的信号转导中起重要作用。

在妊娠时，子宫经历一系列变化，内膜基质细胞增殖和分化后形成蜕膜并产生催乳素，以适应和保护胚胎。当胚胎开始发育时，随着催乳素受体的消失，大量细胞开始凋亡。催乳素通过与其受体作用，在蜕膜中起到抵抗凋亡的作用。天冬酰胺特异酶切的半胱氨酸蛋白酶3（caspase-3）是细胞凋亡作用因子，在大鼠蜕膜中表达。催乳素可以下调caspase-3 mRNA水平，说明催乳素对大鼠蜕膜的退化及对蜕膜重建具有重要作用。

另外，孕酮和钙离子都促进垂体和蜕膜中催乳素的分泌，而花生四烯酸似乎抑制蜕膜中催乳素PRL的释放。最近证实IGFBP-1可在猪子宫中大量聚集，并具有促进人蜕膜合成和分泌催乳素的功能。

2. 胰岛素样生长因子结合蛋白（IGFBP）

IGFBP在不同物种的蜕膜上都有表达，尤其以IGFBP-1最为显著。大量的蜕膜IGFBP-1与IGF-II相互作用，并促进蛋白酶分泌以调节胚胎滋养层的侵入。

IGFBP-1主要由将要发生蜕膜化的和已经发生蜕膜化的子宫内膜基质细胞在分泌期晚期分泌，并在妊娠蜕膜中分泌。IGF系统在调节子宫内膜增殖及分化上有自分泌和旁分泌的功能。在着床后，胚胎滋养层细胞表达IGF受体和IGF-II。蜕膜表达的IGFBP-1

可能在胚胎-子宫内膜界面具有调节 IGF 的功能。由于 IGFBP-1 在母体蜕膜中的表达占主要地位，与 IGF-II 的结合可能对于母胎界面的交流起重要作用。另外蜕膜中高表达 IGFBP-1 和 TIMP，而胚胎滋养层表达 IGF-II，说明胚胎滋养层可以通过 IGF-II 与蜕膜中的 TIMP-3 和 IGFBP-1 调节胚胎的侵入。

3. 白介素-11 (IL-11)

IL-11 是一种作用范围广泛的细胞因子，通过与 IL-11 受体 (IL-11R α) 和信号转导亚单位 gp130 形成的异二聚体来发挥作用。IL-11R α 在着床前的整个子宫中都有少量表达。在交配后第 5 天，IL-11R α 在邻近腺上皮的基质中表达量最高。IL-11R α 基因突变的雌鼠在着床后蜕膜发育不完全，导致胚胎在第 8 天死亡。另一研究发现，在 IL-11R α 突变小鼠中，因为细胞增殖的减少，只有少量蜕膜形成，以后蜕膜组织逐渐退化，最终胚胎滋养层细胞产生大量巨大细胞，但不能形成绒毛膜胎盘。IL-11R α 基因敲除的雌性小鼠既可以发生蜕膜反应也允许胚胎着床，但是由于发生增殖的细胞数量较少，只产生少量蜕膜，这种变异的蜕膜在尿囊绒毛膜胎盘形成之前便开始降解。胚胎滋养层可以分泌基质金属蛋白酶 (MMP)，而蜕膜细胞则通过分泌金属蛋白酶的抑制因子 (TIMP) 来平衡该酶的活性。IL-11R α 缺失突变的雌性小鼠子宫内膜基质细胞蜕膜化反应异常，而不正常的蜕膜由于不能分泌足够的 TIMP，导致 MMP 的活性异常升高，使胚胎滋养层过度侵入，不正常的蜕膜迅速降解，而来自胚胎的滋养层细胞则形成一个巨大的细胞网络，不能形成正常的绒毛膜胎盘。利用建立的体外蜕膜化系统检测 IL-11 对人子宫内膜基质细胞的作用时发现，IL-11 可以增强蜕膜基质细胞的存活以及保护细胞在胚胎着床和滋养层侵入时不被损坏，同时可促进催乳素的分泌。另外，IL-1 α 也可以激活多重信号通路，从而正调节或负调节 IGFBP-1 在蜕膜中的表达，并对蜕膜发挥作用。

同样，在人的蜕膜过程中，IL-11 也起着重要的作用。在人月经周期中，IL-11 mRNA 和蛋白质主要在子宫内膜的腺上皮细胞、基质细胞、静脉平滑肌细胞及其他细胞中表达，并且随月经周期发生周期性的变化。IL-11 在月经期和增殖期的表达量很低，分泌期开始持续升高，在分泌末期达到最高，尤其是在发生蜕膜化的基质细胞中的表达量较高。在进行人基质细胞培养时，缺乏 IL-11 的培养系统中，基质细胞不能正常发生蜕膜化。在加入 IL-11 之后，蜕膜化恢复正常，因此 IL-11 可能提高基质细胞的发育能力，促使其发生蜕膜化，从而导致妊娠的正常进行。通过比较正常妊娠和无胚妊娠发现，在正常妊娠蜕膜区的 IL-11 mRNA 表达明显高于无胚妊娠蜕膜区。这进一步证明 IL-11 在人的蜕膜化过程中起着重要的作用。

第五节 妊娠识别

对于妊娠期比排卵周期长的动物而言，要建立妊娠，就必须阻滞黄体的正常周期性退化，保护孕酮的持续产生，从而维持子宫内膜功能，保证胚胎的发育、着床、胎盘形成及胎儿的正常发育。但各种动物中，妊娠识别的机制差异很大。

一、灵 长 类

hCG 是分子质量为 36~40kDa 的糖蛋白，生物学和免疫学特性与垂体 LH 很相似。现在认为，hCG 是由胎盘的合体滋养层细胞产生的。在正常妊娠中，很早就可检测到 hCG。一般检测到 hCG 的最早时间为月经周期中 LH 峰后第 9 天，即排卵后第 8 天，也是胚胎着床后第 1 天。因此，在妊娠的很早期便可检测是否妊娠。hCG 的浓度在妊娠第 60~90 天时达到峰值。在早期妊娠期间，每 2~3 天 hCG 的水平增加一倍。以后，hCG 的浓度降低达到一平台期，在以后的妊娠过程中一直保持这一水平。hCG 在早期妊娠中主要是起促黄体作用，使月经黄体转变为妊娠黄体，从而持续产生孕酮，以保证蜕膜的发育，一直到胎盘取代黄体产生孕酮为止（图 7-9）。黄体产生孕酮的功能在人妊娠第 7 周后明显降低。此时经历黄体到胎盘的功能转换期，胎盘和蜕膜开始产生以后妊娠所需的孕酮。在妊娠第 8 周以前切除卵巢会导致流产，而在第 9 周以后切除卵巢则不会导致流产。

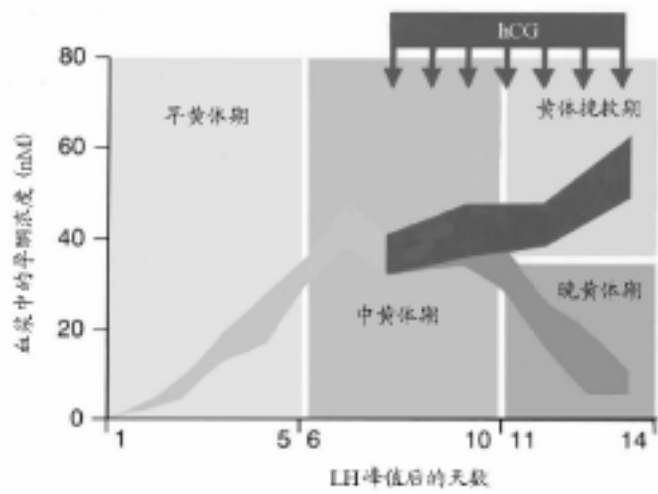


图 7-9 示人的黄体挽救模型（引自 Duncan WC, 2000）

孕酮浓度在早黄体期（即 LH+1 到 LH+5 天）开始增加，到中黄体期（即 LH+6 到 LH+10 天）时达到最高，而到晚黄体期（即 LH+11 到 LH+14 天）开始降低。在 LH 峰后第 7 天每天注射两次 hCG（每次 125IU），可挽救黄体使其不能退化，并能持续分泌孕酮

在人及类人猿中，黄体的溶解可由着床胚胎的滋养层细胞分泌的 CG 来阻止。CG 可能结合到 LH 受体上，刺激孕酮的产生，以阻止 PGF_{2α} 的产生。CG 的作用既是促黄体性的，又是黄体保护性的。在恒河猴等灵长类动物，黄体的维持需要 CG 的分泌不断增加。但如果一直注射 CG 是否能长期维持黄体的功能，现在还不清楚。将 CG 灌注入水貂的子宫腔内，可诱导腔上皮的斑反应、促进上皮下基质成纤维细胞表达 α-平滑肌肌动蛋白、增加腺上皮中 glycodeclin 的表达和分泌。在人的黄体期，将 CG 灌注入子宫腔中，可诱导几种细胞因子和生长因子分泌进入子宫液中。

二、啮 齿 类

在大鼠和小鼠等啮齿动物中，并不产生 CG。成年雌性动物不具有一个完整的发情

周期，也不能发育形成一个完整的黄体期。在啮齿类动物，交配刺激便可诱导黄体的挽救过程。即使在没有受精的情况下，刺激阴道也能起始可延长黄体寿命的激素变化。如用结扎输精管的雄鼠交配或刺激处于接受期的大鼠子宫颈，可在大鼠诱导假孕。假孕大鼠的发情周期在黄体退化前可延长到 12 天。黄体存活的延长主要是由于垂体催乳素峰的刺激所致。催乳素有能力使黄体细胞中的一群 LH 受体处于活性状态，并对黄体细胞具有一定的保护作用，免受 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的作用。如果大鼠妊娠后，一系列由胎盘和蜕膜来的胎盘催乳素 (placental lactogen) 及催乳素样的激素在妊娠中期便能替代垂体催乳素。

啮齿类动物妊娠时的母体识别，需要在早期妊娠期间脑垂体催乳素分泌的半昼夜峰 (semicircadian surge)，后者是形成妊娠黄体所必需的。在啮齿类动物，催乳素分泌的半昼夜峰值是由子宫颈的刺激所诱导的。催乳素分泌的半昼夜峰与发情周期黄体向妊娠黄体的转变有关，妊娠黄体分泌的孕酮足以维持妊娠过程。嘌呤霉素敏感的氨基肽酶 (puromycin-sensitive aminopeptidase) 缺陷的雌性小鼠由于不能形成妊娠黄体而导致不孕。这表明嘌呤霉素敏感的氨基肽酶对于小鼠的母体妊娠识别是必需的。

三、反刍动物

反刍动物 (牛、绵羊和山羊) 为自发性排卵的多次发情动物 (绵羊和山羊为季节性多发情)。表 7-3 中为一些家畜的妊娠识别时间。牛、绵羊和山羊的发情周期分别为 21、17 和 20 天。这三种动物都利用孕体合成的干扰素- τ 作为母体妊娠识别的信号。干扰素- τ 是一类新的 19kDa 的 I 型干扰素，以前被命名为滋养层蛋白-1。

表 7-3 家畜中妊娠识别开始的时间 (引自 Hafer ESE, 1987)

家畜	牛	绵羊	猪	马
妊娠识别开始的时间 天	16~17	12~13	10~12	14~16

干扰素- τ 特异性地在反刍动物的滋养外胚层细胞中表达。用干扰素- τ 基因或由干扰素- τ 启动子构成的重组基因进行转染实验时，只有滋养层来源的细胞能在无病毒诱导的条件下表达干扰素- τ 。

干扰素- τ 的表达具有发育阶段特异性。绵羊胚胎滋养层在妊娠第 8~21 天表达干扰素- τ 。牛在妊娠第 15~24 天，即围着床期，表达干扰素- τ 。山羊胚体在妊娠第 14~20 天表达两种干扰素- τ 。已证实，红鹿及长颈鹿的着床前胚胎也分泌多种干扰素- τ 。此外，干扰素- τ 在体外成熟及受精的胚胎的滋养层中也有表达，说明其表达的诱导似乎由胚胎基因所决定的，独立于母体的子宫环境。但最近发现，胰岛素样生长因子 I 及 II (IGF-I 和 IGF-II)、白细胞介素-3 (IL-3) 等很多来自母体的因子均参与对干扰素- τ 表达的调控。

在反刍动物中，子宫脉冲式分泌 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 引起黄体退化。在绵羊中，如在妊娠第 13 天以前将孕体去掉，则对黄体的生存期没有影响。但在第 13 天或 13 天以后将孕体去掉，则可延长黄体的生存期，并延长发情间期的间隔。随着孕体的形状从球形变为细丝状，孕体开始分泌干扰素- τ 。在绵羊中，在妊娠第 15 天时干扰素- τ 表达量最高。来自

黄体 and 垂体的催产素 (oxytocin) 可引起 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 释放, 从而诱导黄体溶解。在发情期和发情后期, 雌激素的存在可上调子宫腔上皮中催产素和孕酮受体的浓度。在发情间期, 由于黄体的形成, 孕酮的浓度升高, 而雌激素浓度降低。但孕酮也能下调自身的受体浓度, 导致孕酮阻止 (progesterone block) 的终止。当孕体在妊娠第 10~21 天分泌干扰素- τ 时, 可延长孕酮阻止的时间, 并使雌激素和催产素受体表达降低。

干扰素- τ 主要是抑制 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 脉冲式的释放。在绵羊中, 虽然基础水平的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 没有消失, 但 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的代谢物 17-keto-13, 14-dihydro-PGF (PGFM) 的浓度在妊娠期间比发情周期时要高。尽管如此, 在妊娠的动物中, $\text{PGF}_{2\alpha}$ 脉冲式的释放消失了, 使黄体能保持功能状态。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌后溶解黄体的过程需要黄体分泌的催产素与催产素受体作用, 而催产素受体则位于内膜的上皮细胞上。干扰素- τ 主要通过抑制催产素受体的表达来调节 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的释放。

干扰素- τ 可阻止雌激素诱导的催产素受体数量的增加, 抑制 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的脉冲式释放 (图 7-10)。反刍动物的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的脉冲式释放依赖于催产素。催产素主要由大黄体细胞合成并分泌。黄体在子宫内膜尚未对其建立反应之前已开始释放催产素。因此, 催产素诱导的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的脉冲式释放依赖于子宫内膜中催产素受体的存在。催产素受体基因的表达主要受雌激素和孕酮的调节。雌激素可上调催产素受体基因在子宫内膜上皮中的表达, 但孕酮在早黄体期到中黄体期可阻止子宫内膜中催产素受体的合成。在反刍动物的妊娠早期, 胚体分泌的干扰素- τ 以旁分泌的形式作用于子宫内膜的腔上皮和表面的腺上皮, 抑制这些部位中雌激素受体和催产素受体基因的表达。向发情周期第 11~14 天的绵羊子宫内连续注射绵羊的干扰素- τ , 可使第 15 天时子宫内膜中雌激素受体和催产素受体基

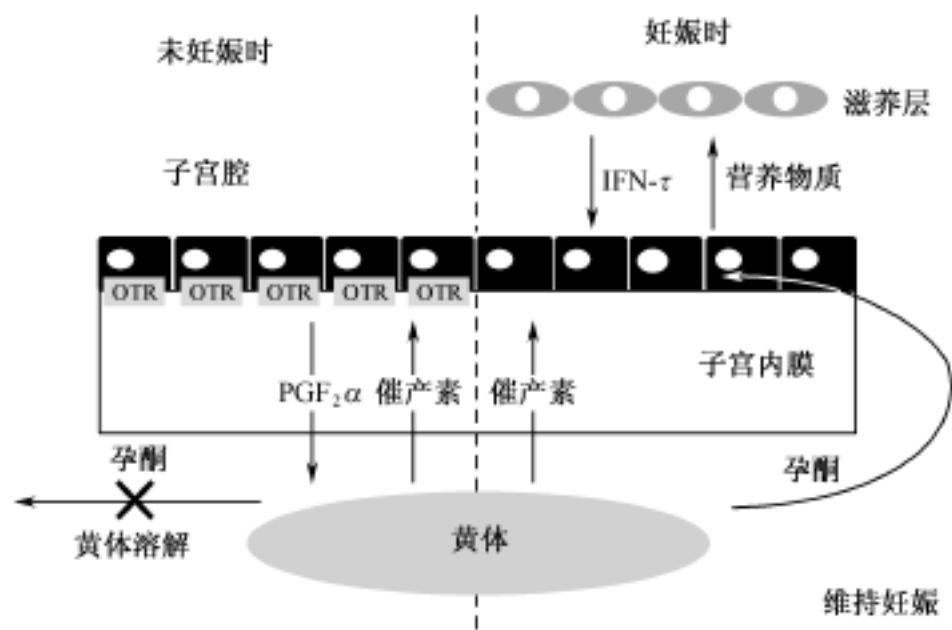


图 7-10 示 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、催产素及干扰素- τ 在反刍动物妊娠维持过程中的作用 (引自 Demmers KJ 等, 2001) 在未妊娠及多次发情的反刍动物中, 子宫分泌的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 导致每次发情周期结束时发生黄体溶解。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的分泌是脉冲式的, 主要由黄体分泌的催产素所驱动。黄体产生的催产素又可刺激 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的分泌, 由此正反馈环产生每一次 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的脉冲式分泌。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌的时间由子宫内膜上皮细胞中催产素受体 (OTR) 的表达启动所决定。在妊娠过程中, 胎儿的滋养层细胞产生的干扰素- τ 分泌进入子宫腔后, 可阻止催产素受体的表达。胚胎滋养层是在一精确的时间范围内分泌干扰素- τ 的, 在胚泡黏附到子宫内膜前开始分泌。通过阻止黄体溶解, 胎儿可保证使子宫内膜处于一个高浓度孕酮的环境中。高浓度的孕酮可维持子宫腺体的分泌活性, 从而供给胚泡生长所需要的营养物质。在子宫内膜和黄体中, 均持续地表达干扰素- τ 和 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的受体

因的转录比对照组低两倍。此外，与发情周期第 15 天相比，妊娠第 15 天的绵羊子宫内膜中雌激素受体和催产素受体的转录也低两倍左右。这表明干扰素- τ 的抗黄体溶解作用主要是通过抑制雌激素受体及催产素受体的基因转录来实现的。在单侧子宫角妊娠的羊中，虽然双侧子宫角均暴露于同样的母体内分泌环境下，但只能在非孕的子宫角内膜中检测到雌激素受体和催产素受体，而在怀孕角中则检测不到。这也说明干扰素- τ 的雌激素受体及催产素受体基因表达的抑制作用是局部的。

PGF_{2 α} 是黄体溶解信号，而 PGE₂ 的作用与 PGF_{2 α} 相拮抗，是一种黄体保护信号。注射 PGE₂ 可保护自然的黄体退化或由外源 PGF_{2 α} 诱导的黄体溶解。反刍动物的子宫内膜特化形成子宫肉阜区 (caruncles)。这些区域富含血管，是胚胎黏附的区域。子宫肉阜之间的区域为肉阜间区。在体外分别培养肉阜区及肉阜间区的上皮细胞及基质细胞时发现，干扰素- τ 能优先增加肉阜区的上皮细胞中的 PGE₂/PGF_{2 α} 比率。而在无胚体存在时，催产素则优先作用于肉阜间区，刺激 PGF_{2 α} 的产生，诱导黄体溶解。

四、猪

猪为多次发情、自发性排卵的多胎动物，发情周期约为 21 天。猪的孕体在大约妊娠第 11 天提供一信号，从而阻止由于黄体退化而导致的孕酮浓度降低。在妊娠第 11 天以前将胚胎冲出后，并不能延长发情间期的间隔，但第 11 天以后将胚胎冲出时，则可延长发情间期的间隔。在妊娠第 11 天时，胚胎发生巨大的变化，自小的球形 (10mm) 变为很长的细管状结构，长度可达 100mm。迅速延伸的孕体可合成和分泌雌激素，对于黄体的功能起到保护性作用。在妊娠第 11~15 天，全身注射或子宫内注射雌激素均可阻止黄体退化。在妊娠第 11~30 天的过程中，雌激素的分泌具有两个时相。孕体产生雌激素的第一个峰值发生在第 12 天。雌激素分泌的第二个持续的时期是在第 15~20 天，这对于延长黄体的功能是必需的。子宫中雌激素受体的表达是与孕体雌激素的分泌相对应的。用免疫细胞化学法证实，雌激素受体仅在发情周期或妊娠第 5~12 天的子宫腺上皮和腔上皮中表达。在具有正常发情周期的猪中，来自子宫内膜的脉冲式的 PGF_{2 α} 释放提供了一个溶黄体信号，可引起黄体退化。因此，在猪中，黄体的调节是子宫依赖性的。

在猪中，正开始延伸的胚胎滋养层细胞释放的雌激素可能是母体妊娠识别的最迟信号。在发情周期的第 11~15 天之间注射大量的雌激素，通常能足以诱导假孕状态，并使这种状态持续几个月。然而，在模拟胎儿产生的雌激素量给子宫腔内注射时，通常只能将发情周期延长几天。在猪中，很可能需要产生别的因子来使妊娠得以继续进行。

五、马

马胚胎不同于猪，并不延伸。马胚胎在妊娠第 12~14 天间形成一个包被的 (encapsulated) 球形结构，此时对于黄体的维持是至关重要的。此时，胚胎一天在整个子宫腔中来回迁移很多次。这种连续的迁移对抑制 PGF_{2 α} 的释放是否关键仍不清楚。已证实，胚胎在子宫腔中的这种移动到妊娠第 15 天时便结束。在黄体期的关键时期，子宫

中胚胎和胎膜的存在可能对抑制子宫内膜中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的合成与黄体溶解是必需的。但在马中，抗黄体溶解的因子既不是猪中的雌激素，也不是牛和绵羊中的干扰素。很有趣的是，马是高等灵长类动物以外能产生 CG 的惟一种动物。但在马中，CG 的产生仅是暂时的，而且是在妊娠已经完全建立后。在此称 CG 实际上是错误的，马的 CG 实际是一种胎盘型的 LH。作为一种侵入的绒毛膜带细胞的产物，CG 最早出现于妊娠第 35 天的母体血液中。马的 CG 可刺激血中孕酮浓度增加，主要是通过刺激另外的卵巢卵泡的黄体化来实现的。但 CG 在马的妊娠过程中是否必需仍无定论。当将驴胚胎移植到母马体内后，由于不能形成子宫内膜杯，也不产生 CG，大多数胚胎在妊娠第 85~100 天之间便流产了。相反，如果将马胚胎移植到驴受体内，则形成大的子宫内膜杯，并能达到足月妊娠。

第六节 宫外孕和葡萄胎

正常时，人胚泡在子宫体或子宫底着床。但胚泡有时也能在输卵管、卵巢表面、肠系膜、子宫阔韧带或在子宫的非正常着床部位着床。这些非正常部位的上皮对着床的胚胎发生应答后，也会在这些部位出现血管形成增加及其他相关的变化，从而使胚泡有能力得以生存，并且开始发育过程。将这种妊娠统称为宫外孕 (ectopic pregnancy)。宫外孕常常威胁到母亲的生命，主要是因为由于胚胎和胎盘的生长，会导致在非正常部位形成的血管破裂，造成大出血。发生宫外孕时常会出现腹部疼痛及阴道出血等症状。在发生宫外孕时，一般需要进行外科手术将发育的胚胎取出。实际上，宫外孕时由于营养供应不足等原因，很容易导致胚胎死亡。

葡萄胎 (hydatidiform mole)，也称水泡状胎块。正常妊娠过程中，内细胞团形成胚胎，滋养层则形成胎盘。但在 0.1%~0.5% 的妊娠中，胎儿完全缺失，胎体 (conceptus) 中仅有胎膜。这种类型的胎体称为完全葡萄胎 (complete hydatidiform mole)。由于缺乏来自胎儿的血管系统，不能把从母体吸收来的液体正常地排泄掉，使完全葡萄胎的胎盘绒毛发生膨胀及泡状化，类似于一串串葡萄。在这类葡萄胎中，没有胚胎。即使有内细胞团形成，可能很早就退化了。葡萄胎常常在妊娠早期就流产了。即使不发生流产，因常发生高血压 (hypertension)、水肿及阴道出血等症状，也很容易被发现。与正常的滋养层组织一样，葡萄胎也能分泌 hCG。葡萄胎或葡萄胎的残留物常导致血中 hCG 的浓度异常升高。在年轻妇女中，发病的几率比大龄妇女要高一些。染色体分析发现，完全葡萄胎的细胞虽为正常的二倍体核型，但所有的染色体均来自父亲。一种可能是，一个缺乏细胞核的卵母细胞被两个精子同时受精 (即双精子受精) 后，两个雄原核可能通过融合形成一个二倍体的细胞核。由这种机制产生的葡萄胎的核型应为 XX 或 XY。另一种可能是，一个缺乏细胞核的卵母细胞被一个精子受精后，所形成的雄原核可能进行一次有丝分裂，但并不发生卵裂，从而形成一个二倍体的细胞核。由这种机制产生的葡萄胎的核型应为 XX 或 YY，但由于 YY 中缺乏 X 染色体上很多关键的基因，因此都不能发育。但从目前的染色体分析来看，绝大部分的完全葡萄胎均为 XX 型。

与完全葡萄胎相反，在不完全葡萄胎 (partial hydatidiform moles) 中通常会发现一些胚胎存在的证据。即使在流产或引产时未发现胚胎的残留物，在葡萄胎的绒毛中也能

见到有核的胚胎性成红细胞 (erythroblast), 这表明胚胎的存在。在很罕见的情况下, 也能引产出异常的胎儿。不完全葡萄胎中, 膨大的绒毛只是成团存在, 高血压 (hypertension)、水肿及阴道出血等症状也较轻, 一般到妊娠第 4~6 个月会发生自发性流产。这种胎体的核型为三倍体 (triploid), 具有两套从父亲来的染色体, 性染色体的核型为 XXX、XXY 或 XYY。这种妊娠可能是由于一个卵母细胞被两个精子受精或被一个异常的二倍体精子受精导致的。

(杨增明)

主要参考文献

- 刁红录, 杨增明. 2002. 钙黏素与哺乳动物生殖. 生殖与避孕 22 (5): 302~305
- 范衡宇, 白玉妍, 杨增明. 2001. 胚胎着床窗口的分子调控. 生物化学与生物物理进展 28 (1): 11~16
- 霍立军, 杨增明. 2003. PGI₂-PPAR δ 信号转导途径与哺乳动物的胚胎着床. 生物化学与生物物理进展 30 (4): 522~526
- 栾黎明, 李世杰, 杨增明. 2003. 家畜胚胎干细胞的分离培养与鉴定. 中国畜牧杂志 39 (2): 48~50
- 秦鹏春. 2001. 哺乳动物胚胎学. 北京: 科学出版社
- 孙童, 杨增明. 2003. 胚胎着床过程中子宫内膜细胞表面吞饮泡及细胞连接的变化. 生殖与避孕 23 (2): 103~107
- 肖丽娟, 杨增明. 2000. 干扰素- τ 及其在母体妊娠识别中的作用. 中国畜牧杂志 36 (4): 49~51
- Bentin-Ley U, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L, Larsen JF, Horn T. 1999. Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. Hum Reprod 14: 515~520
- Bowen JA, Burghardt RC. 2000. Cellular mechanisms of implantation in domestic farm animals. Seminars Cell Dev Biol 11: 93~104
- Carson DD. 2002. The glycobiology of implantation. Frontiers in Bioscience 7: 1535~1544
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. 2000. Embryo implantation. Dev Biol 223: 217~237
- Cheng JG, Stewart CL. 2003. Loss of cyclooxygenase-2 retards decidual growth but does not inhibit embryo implantation or development to term. Biol Reprod 68: 401~404
- Creus M, Ordi J, Fabregues F, Casamitjana R, Ferrer B, Coll E, Vanrell JA, Balasch J. 2002. $\alpha\beta 3$ integrin expression and pinopod formation in normal and out-of-phase endometria of fertile and infertile women. Hum Reprod 17: 2279~2286
- Demmers KJ, Derecka K, Flint A. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy. Reproduction 121: 41~49
- Denker HW. 1993. Implantation: A cell biological paradox. J Exp Zool 266: 541~558
- Ding NZ, Ma XH, Diao HL, Xu LB, Yang ZM. 2003. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta at implantation sites and in decidual cells of rat uterus. Reproduction 125: 817~825
- Duncan WC. 2000. The human corpus luteum: remodeling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. Rev Reprod 5: 12~17
- Fazleabas AT, Donnelly KM, Srinivasan S, Fortman JD, Miller JB. 1999. Modulation of the baboon (*Papio anubis*) uterine endometrium by chorionic gonadotrophin during the period of uterine receptivity. Proc Natl Acad Sci USA 96: 2543~2548
- Giudice LC. 1999. Potential biochemical markers of uterine receptivity. Hum Reprod. 14 (Suppl 2): 3~16
- Goff A. 2002. Embryonic signals and survival. Reprod Domest Anim 37: 133~139
- Hafez ESE. 1987. Reproduction in farm animals. 5th Edition, Lea and Febiger
- Johnson MH, Everitt BJ. 1995. Essential reproduction. Blackwell Science
- Jones CJP, Fazleabas AT. 2001. Ultrastructure of epithelial plaque formation and stromal cell transformation by post-ovula-

- tory chorionic gonadotrophin treatment in the baboon (*Papio anubis*) . Hum Reprod 16: 2680~2690
- Larsen WJ. 2002. Human Embryology . Third edition, 人民卫生出版社/ Health Science Asia, Elsevier Science
- Ni H, Ding NZ, Harper MJK, Yang ZM. 2002. Expression of leukemia inhibitory factor receptor and gp130 in mouse uterus during early pregnancy . Mol Reprod Dev 63: 143~150
- Ni H, Sun T, Ding NZ, Ma XH, Yang ZM. 2002. Differential expression of microsomal pge synthase at the implantation sites and in the decidual cells in mouse uterus . Biol Reprod 67: 351~358
- Paria BC, Song H, Dey SK. 2001. Implantation: molecular basis of embryo-uterine dialogue . Int J Dev Biol 45: 597~605
- Paria BC, Reese J, Das SK, Dey SK. 2002. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges . Science 296: 2185~2188
- Reese J, Das SK, Paria BC, Lim H, Song H, Matsumoto H, Knudtson KL, DuBois RN, Dey SK. 2001. Global Gene expression analysis to identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation . J Boil Chem 276: 44137~44145
- Salamonsen LA. 1999. Role of proteases in implantation . Rev Reprod 4: 11~22
- Sch fer-Somi S. 2003. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review . Anim Reprod Sci 75: 73~94
- Vogiagis D, Salamonsen LA. 1999. The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy . J Endocrinology 160: 181~190
- Wang H, Ma W, Tejada L, Zhang H, Morrow JD, Das SK, Dey SK. 2004. Rescue of female infertility from the loss of cyclooxygenase-2 by compensatory upregulation of cyclooxygenase-1 is a function of genetic make-up . J Biol Chem 279: 10649-10658
- Weitlauf HM. 1994. Biology of Implantation . In: The physiology of reproduction (2nd) . Edited by E . Knobil and J . D . Neill, Raven Press, Ltd ., New York
- Yang ZM, Le SP, Chen DB, Harper MJK. 1994. Temporal and spatial expression of leukemia inhibitory factor in rabbit uterus during early pregnancy . Mol Reprod Dev 38: 148~152
- Yang ZM, Das SK, Wang J, Sugimoto Y, Ichikawa A, Dey SK. 1997. Potential sites of prostaglandin actions in the peri-implantation mouse uterus: Differential expression and regulation of prostaglandin receptor genes . Biol Reprod 56: 368~379
- Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. 1999. Reproductive endocrinology . 4th edition . Harcourt Publishers Limited

第八章 胎膜和胎盘的结构与功能

第一节 胎 膜

胎膜是胚胎生长必不可少的辅助器官，在胚胎发育过程中包围着胚胎。由于高等哺乳动物卵内储存的卵黄物质只够胚胎在着床前发育利用，为保证生长发育，胚胎必须尽快与母体建立联系并从母体获得营养物质。妊娠早期，胚胎悬浮在子宫腔内，当其发育至胚泡阶段开始伸展。在此期间，胎膜开始形成并向外生长。胎膜起着保护胎儿并从母体血液获取营养物质、排除废物和提供水环境的作用。胎膜 (fetal membrane) 统称胚外膜 (extraembryonic membrane)，是由胚胎外的三个基本胚层 (外胚层、中胚层、内胚层) 所形成的，包括卵黄囊、羊膜、尿囊和绒毛膜。

单层的滋养层是最早成为外胚层的细胞层。在胚盘后端外胚层与内胚层之间生出中胚层，并分裂为无血管的体中胚层和有血管的脏中胚层。然后，在猪、兔等动物，胚盘稍为下陷，滋养层和体中胚层 (胚体壁) 沿胚盘周围向胚胎上方形成羊膜襞，逐渐合拢融合，把胚胎包围起来。皱襞分成内外两层，内层为羊膜，外层的表面出现大量微绒毛，成为绒毛膜，绒毛膜包围着整个胚胎和另外三种胎膜——尿膜、羊膜、卵黄囊膜。在体壁向上形成皱襞的时候，内胚层和脏中胚层也向胚盘下方形成皱襞，将原肠分为胚胎体内的原肠和体外的卵黄囊。卵黄囊同绒毛膜融合形成卵黄囊胎盘，在母体子宫的特定位置开始附着，从而发生物质交换。有些哺乳动物胚胎在 1 周龄左右卵黄囊就完全退化，而另一些哺乳动物卵黄囊胎盘则是整个妊娠期营养交换的重要器官。尿囊是从原肠后端 (后肠) 生出的一个盲囊，突出于胚胎之外，同膀胱连接。因此，尿囊液主要是胎儿的尿液，含有丰富的尿素和含氮废物。随着尿囊的极度扩张，延伸到胚外体腔，同绒毛膜融合，形成界限分明的尿膜-绒毛膜胎盘，开始发挥胎盘作用 (图 8-1)。

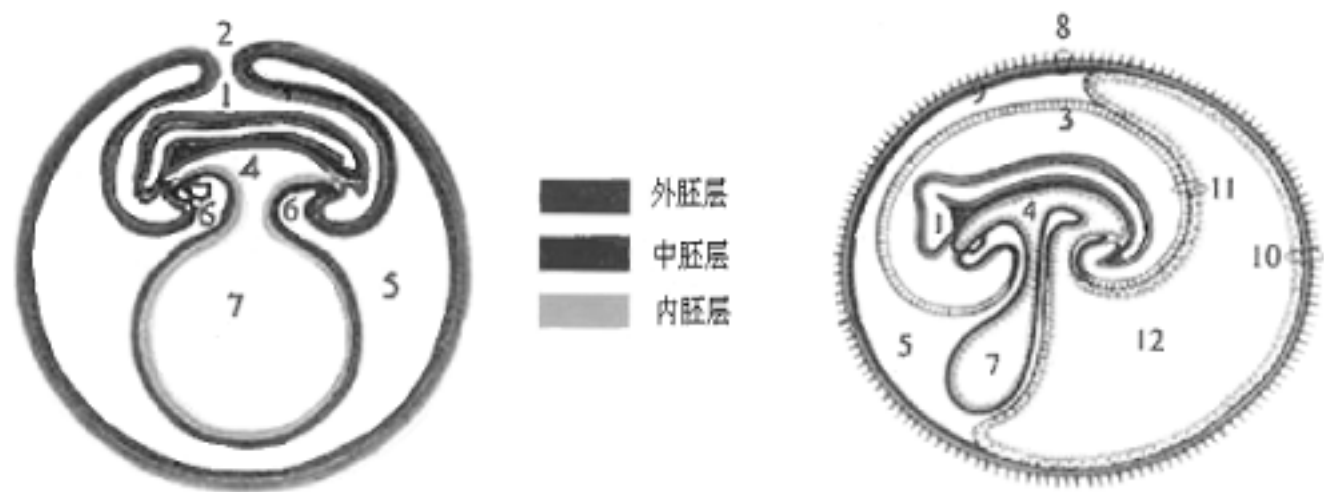


图 8-1 哺乳动物胎膜发育示意图 (引自钱菊汾, 1998)

1. 胚胎; 2. 羊膜褶; 3. 羊膜; 4. 原肠; 5. 胚外体腔; 6. 胚内体腔; 7. 卵黄囊; 8. 绒毛膜; 9. 羊膜腔; 10. 尿囊绒毛膜; 11. 尿囊羊膜; 12. 尿囊

羊膜囊包在整个胚胎外面，为胚胎提供一个充满液体的环境，使胚胎在悬浮状态下生长发育。

总之，胚胎周围由内向外被羊膜囊和绒毛膜囊包着，在二囊之间，根据胚胎发育阶段的不同，存在有卵黄囊和尿囊。

一、卵 黄 囊

哺乳动物的卵子实际上并不含卵黄，但在胚胎发育早期却有一个较大的卵黄囊(yolk sac)，囊壁由内胚层、脏中胚层和滋养层构成。脏中胚层上有稠密的血管网，形成完整的卵黄囊血液循环系统，从子宫中吸取营养，因此，它是此阶段胚胎主要的营养器官。开始时，卵黄囊是由胚盘分出的一层内胚层细胞沿滋养层内壁扩展而来的单层结构，以后在滋养层和内胚层之间出现了胚外中胚层，后者裂开形成胚外体腔。裂开的两层胚外中胚层分别称为脏壁中胚层和体壁中胚层。脏壁中胚层和胚外内胚层结合构成卵黄囊。卵黄囊是由胚外内胚层和胚外脏壁中胚层形成的。

猪的卵黄囊在约 13 日龄时开始形成，位于胚腹侧，其一端超出头部，另一端超出尾部。在卵黄囊相对发育最迅速的时期，其壁上有丰富的血管分布，与子宫壁只隔一薄层的绒毛膜，形成卵黄囊绒毛膜胎盘，可从子宫壁吸收营养。第 17 天的猪胚，尿囊高度发育，卵黄囊迅速退化，卵黄囊绒毛膜胎盘消失，最后形成皱缩的囊，隐没于腹蒂内。

牛胚龄在 8~19 天时，才开始形成卵黄囊，到 22 天时被尿囊所取代，对胚胎营养作用不大。

马的卵黄囊较发达，受精后第三周时体积已经很大，是由无血管的卵黄囊壁和存在于边缘区的卵黄囊绒毛膜胎盘两部分组成。卵黄囊上有丰富的血管并可吸收子宫乳，以营养胎儿。在胚龄 6 周左右，卵黄囊开始退化，由尿囊循环所取代。

小鼠胚胎的卵黄囊较原始。在原肠形成后，卵圆柱向原肠内生长，在妊娠第 5 天时，原肠被压缩成杯状，形成卵黄囊。贴在卵圆柱上的内胚层，称为近侧内胚层。卵黄囊的侧壁内胚层称为远侧内胚层，中间的腔即为卵黄囊腔。内胚层外面即为胚外中胚层。卵圆柱上的近侧内胚层在胚盘头部向胚体内凹，形成了前肠。尾侧以同样的方式形成了后肠。在第 9~9.5 天时，形成血岛并发展成血管网。以后，卵黄囊壁脏层与壁层相贴，卵黄囊腔消失。

人胚胎的卵黄囊形成初期与猪胚形成卵黄囊的方式相同，即是由原肠形成的初级卵黄囊。但当胚胎发育到 13 天左右时，初级卵黄囊外周下部被挤压，分成上下两个囊，背侧保留的一个大腔，改称为次级卵黄囊，腹侧近绒毛膜部分剩余的小腔则称为外体腔囊，后者以后自行退化。由于圆筒状胚体的建立，头、尾两端向下卷，使次级卵黄囊背侧部分形成胚体原始消化管，但以卵黄管与腹侧的次级卵黄囊相通，以后卵黄管闭锁形成卵黄蒂，成为脐带的组成部分，直至变为实心的细胞索。人的卵黄囊虽然也很快退化，但它外表面的胚外脏壁中胚层细胞增殖后形成血岛，并在其中形成造血干细胞。

二、尿 囊

几乎在后肠形成的同时，由后肠末端腹侧出现一个憩室，即形成尿囊。尿囊是由内层的胚外内胚层和外层的胚外脏壁中胚层（合称脏胚壁）所组成。胚龄约 15~16 天的猪胚中，可见与胚体尾部直接相连的尿囊半月形扩大部。随着胚体的发育，尿囊的远端扩大部迅速生长，形成半月形的囊，继之向胚外体腔延伸。当胚龄为 1 个月时，尿囊扩展到整个胚外体腔，并将羊膜囊包住。猪胚尿囊从不延伸到绒毛膜泡的全长，在绒毛膜的两极处，尿囊末端与绒毛膜间留下一个狭小部，以后该膜两端坏死、萎缩而变短。当猪胚发育到第 17 天时，尿囊高度发育，紧贴绒毛膜内壁，共同组成母体与胎儿之间进行物质交换最有效的结构，即尿囊绒毛膜胎盘，它与母体子宫内膜相贴以吸收营养物质和排除废物。当猪胚发育到 1 月龄时，卵黄囊完全退化，尿囊绒毛膜胎盘完全形成。

尿囊早期从背主动脉的大分支获得丰富的血液供应，它在尿囊壁上分支成薄的血管网。当卵黄囊循环发生退行性变化时，尿囊毛细血管丛进一步高度发育，很快即承担胎儿与母体之间全部新陈代谢的功能。尿囊退化后，尿囊的动脉和静脉则保留下来，包在脐带内，改称脐动脉和脐静脉。尿囊内含有大量尿囊液，其性质和成分与羊水类似，其中除无机离子外，还有尿素和肌酸酐（creatinine）。在胎龄为 20 天时，猪胚尿囊液的量很少，在 60~70 天达到高峰（近 500g），到 90 天时下降到不足 100g。尿囊液中，尿素在妊娠 20 天时很少，到 90 天时增加约 6 倍，肌酸酐则增加了近 14 倍。

小鼠胚胎发育到第 7 天时，在羊膜上部的胚外体腔后壁出现由中胚层形成的细胞团，即尿囊原基。小鼠胚胎的尿囊原基是由胚外中胚层形成的多腔隙突，腔隙内含有红细胞，以后形成尿囊血管。因此，尿囊原基仍然形成无内胚层腔的尿囊。以后尿囊迅速生长，经胚外体腔突向绒毛膜，其后绒毛膜与外胎盘锥腔背侧壁相融合，使尿囊成为自原条后端伸向外胎盘锥顶部的一个连续结构，此结构与母体血液循环发生联系，羊膜将此结构围起形成脐带原基。因此，从功能及发生过程来看，小鼠的尿囊虽无内胚层腔，但是仍然与其他高等哺乳动物的尿囊同源。

人胚胎的尿囊很不发达，只是一个进化过程中的痕迹器官。开始形成时，与猪的形成方式相同，但仅形成由内胚层和胚外中胚层组成的小管状腔，远端伸入脐带成为脐尿管，其外面的胚外中胚层与绒毛膜内的胚外中胚层相贴，参与形成以后成为脐带原基的体蒂，外面也由羊膜向腹侧延伸包围着。

三、羊 膜

哺乳动物羊膜的形成有两种形式，一种是起褶式（褶生羊膜），家畜、有袋类、食虫类、兔、狐类等属此类型；另一种是囊腔形成式（裂生羊膜），人和非人灵长类动物、蝙蝠和鼠类的羊膜以这种方式形成。在胚胎发育早期，胚体外围的胚外外胚层和胚外体壁中胚层（合称胚体壁）首先在胚体头部前方向背面折叠，覆盖头部并向尾端延伸，形成羊膜头褶（amniotic head fold）；胚体尾部以同样方式形成羊膜尾褶（amniotic tail fold）；胚体两侧则形成羊膜侧褶（amniotic lateral fold）。猪胚在 12~18 日龄时形成羊

膜和绒毛膜。在 15 日龄时，羊膜头褶、尾褶和侧褶在胚体背侧尾区融合。随着胚体发育，折叠形成的两层褶彼此分开，构成位于内层的羊膜和位于外层的绒毛膜，两膜之间的腔是胚外体腔 (exocoelom)。由于折叠时的胚层位置相互颠倒，因此，构成羊膜的外层是胚外体壁中胚层，内层是胚外外胚层；而构成绒毛膜的外层是胚外外胚层，内层是胚外体壁中胚层 (图 8-2)。

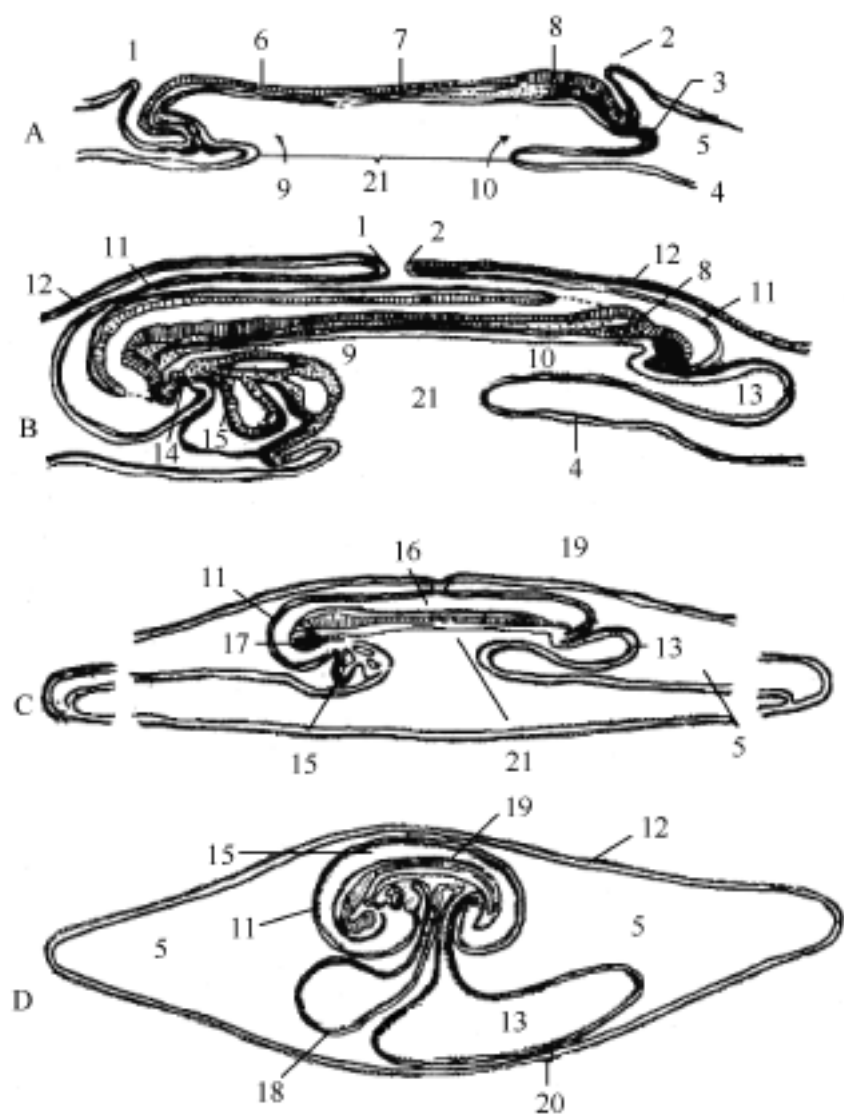


图 8-2 猪胚胎膜形成中纵切面示意图 (引自 Patten EP, 1959)

A. 体节开始形成期; B. 15 对体节期; C. 15~20 对体节期; D. 胚胎 4~6mm 期

1. 羊膜头褶; 2. 羊膜尾褶; 3. 尿囊突; 4. 卵黄囊胚脏层; 5. 胚外体腔; 6. 神经板;
7. 脊索; 8. 原结; 9. 前肠; 10. 后肠; 11. 羊膜; 12. 绒毛膜; 13. 尿囊; 14. 口凹;
15. 心脏; 16. 羊膜腔; 17. 头部; 18. 卵黄囊; 19. 胚体; 20. 尿囊绒毛膜; 21. 原肠
(中肠)

由羊膜围绕胚胎形成的密闭膜囊是羊膜囊 (amniotic vesicle)，由羊膜围成的腔是羊膜腔 (amniotic cavity)。羊膜腔最初位于胚胎的背侧，随着胚体雏形的建立，胚体向背侧隆起，同时羊膜褶向胚体腹侧包绕，最后整个胚胎位于羊膜腔内。羊膜内层系由多边形扁平上皮构成的胚外外胚层上皮，称羊膜上皮，它所分泌的羊水 (amniotic fluid) 充满羊膜腔内，对胚胎形成水环境，保证了相对恒定的温度、化学成分、渗透压和浮力环境，起到保护胎儿的作用。羊膜外层的胚外体壁中胚层可形成平滑肌，能使羊膜有节律地收缩，从而起着调节温度、缓冲外界压力、免受周围组织挤压和防止胚体与羊膜壁黏连等作用，以保证胎儿的正常发育和形态形成。妊娠后期的羊水变得黏稠，分娩时起到

扩张子宫颈，以及冲洗和滑润产道的作用，以利于胎儿娩出。

猪胚羊水量最多的时间是在妊娠第 67 天。据报道，其后则缓慢下降。猪胚羊膜液的主要成分有 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、尿素及肌酸酐等（表 8-1）。

表 8-1 猪妊娠第 34~90 天羊膜液的成分（引自 McCance RA 等，1960）

胎 龄	34 天	41~46 天	55~65 天	67 天	90 天
成分					
Na^+ (mEq L)	125	126	119	117	111
K^+ (mEq L)	21	18.9	9.3	10.0	8.4
Cl^- (mEq L)	103	104	92	94	91
P (mg 100ml)	4.0	4.1	6.5	-	-
尿素 (mg 100ml)	3.0	4.5	4.8	-	-
肌酸酐 (mOml)	-	0.8	0.3	-	-
总渗透压浓度 (mOsm/ L)	296	290	294	273	273
pH	-	-	-	7.2	7.2
平均量 (ml)	-	26	62	163	155
量间隔 (ml)	-	21~31	49~82	110~305	47~320

小鼠的羊膜是裂生羊膜。小鼠内细胞团在发育过程中，下垂长入卵黄囊（相当于其他哺乳动物的原肠）将卵黄囊腔挤成杯状。下垂的内细胞团腹侧由近侧内胚层包围，该圆柱体称为卵圆柱。以后，内细胞团分化为下部的胚胎外胚层与上部的胚外外胚层。发育到第 5 天时，卵圆柱的胚胎外胚层中间裂出腔隙（即前羊膜腔），到第 6 天吋前羊膜腔形成上下长的裂隙，这就形成了卵圆柱的腹侧前羊膜腔、中部的胚外体腔与上部的外胎盘锥腔。其后，因原条形成，卵圆柱头尾明确，在胚胎外胚层与胚外外胚层交界处，中胚层细胞分裂加快，向前羊膜腔内突出，形成了羊膜尾褶。在前羊膜腔的侧壁，以同样方式形成了羊膜侧褶，最后在羊膜尾褶相对的方向形成了羊膜头褶。当胚胎发育到 7.5 天时，三种羊膜褶在中部愈合形成了羊膜，前羊膜腔改称为羊膜腔。在羊膜尾褶内，中胚层裂出胚外体腔而取代早期的胚外体腔（图 8-3）。

人胚胎的羊膜形成方式虽与小鼠胚胎羊膜裂生的方式相似，但是时间更早，速度更快。在胚泡阶段，人胚与其他高等哺乳动物结构没有显著差异。当原肠开始形成时，内细胞团在其下部开始分化出原始内胚层，在其中部即裂生出羊膜腔（图 8-4）。从胚胎的背-腹方向而言，羊膜腔的背侧细胞层即为羊膜，羊膜腔的腹侧壁即是由外胚层及其腹侧的内胚层形成的胚盘。

人胚胎羊膜中的羊水量始终处于动态平衡状态。羊水的来源有两个途径，一是由羊膜上皮分泌，二是来源于胎儿的代谢产物。吸收则是由胎盘和脐带表面的羊膜上皮、胎儿身体表面完成以及由胎儿直接吞服。因此，约 3h，羊水便可更换一次。与猪胚的情况相似，人羊水的量也呈先增后降的趋势。妊娠第 10 周时约为 30ml，20 周时则升至 350ml，36~38 周则可达 1 000~1 500 ml 的高峰，以后则平均每周减少 145ml，但到

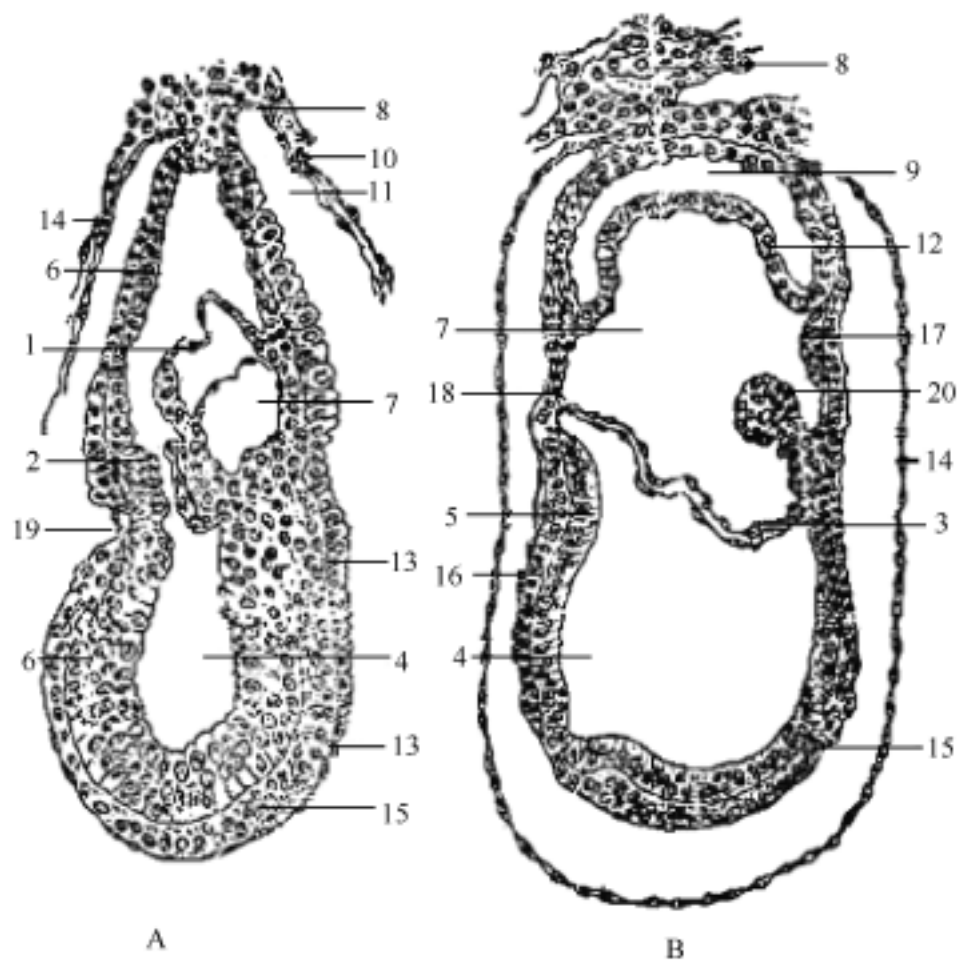


图 8-3 小鼠胚胎的胎膜形成 (引自俞慧珠等, 1985)

A 7 天的卵圆柱纵切; B 7.5 天的胚胎纵切

1. 羊膜尾褶; 2. 羊膜头褶; 3. 羊膜; 4. 羊膜腔; 5. 胚胎外胚层; 6. 胚外外胚层;
7. 胚外体腔; 8. 外胎盘锥; 9. 外胎盘锥腔; 10. Reiche 膜; 11. 卵黄囊腔; 12. 绒毛膜;
13. 近侧内胚层; 14. 远侧内胚层; 15. 原条; 16. 胚内中胚层; 17. 胚外中胚层;
18. 卵黄囊脏层; 19. 前肠; 20. 尿囊

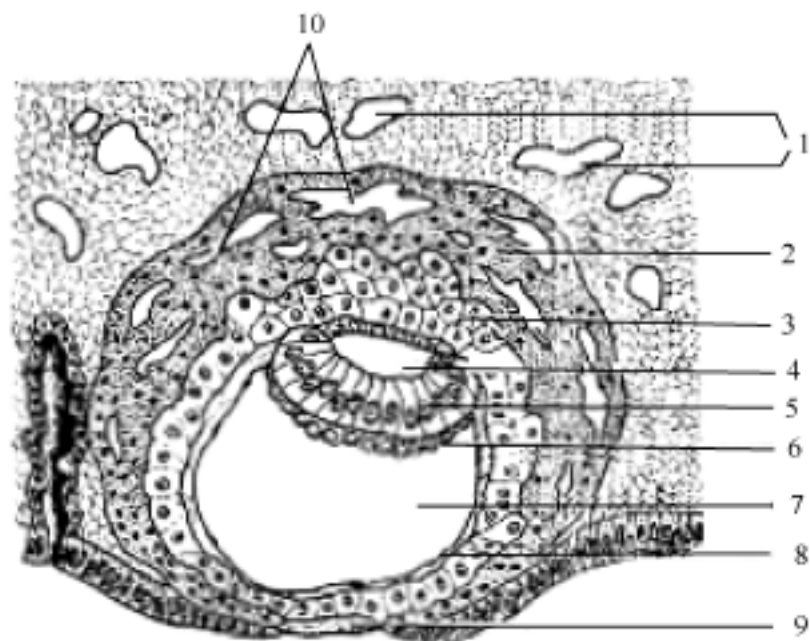


图 8-4 妊娠 9 天时的人胚泡 (引自刘斌等, 1996)

1. 蜕膜血管; 2. 合体滋养层; 3. 细胞滋养层; 4. 羊膜腔; 5. 原始外胚层;
6. 原始内胚层; 7. 外体腔囊; 8. 植入后组织形成的纤维素凝集块; 9. 母体血
窦; 10. 滋养层腔隙

妊娠末期，仍可保持 500~1 000ml。

四、绒毛膜

绒毛膜和羊膜在胚胎发育期间同时形成，二者的胚层结构成分相同，只是胚层的内外排列顺序相互颠倒而已。包围胚胎和其他胚外膜表面的密闭的膜称为绒毛膜。在发生早期，绒毛膜表面光滑，当其与子宫内膜接触后，在膜表面或局部表面形成密集的绒毛，因此称为绒毛膜。在某些哺乳动物，由于尿囊的迅速扩大并与绒毛膜接触，同时与尿囊壁紧密相贴，从而形成尿囊绒毛膜（allantochorion）。

猪胚约在妊娠第 18 天时形成羊膜和绒毛膜。在第 19 天时，绒毛膜与尿囊相贴形成尿囊绒毛膜。

小鼠胚胎在妊娠 7.5 天时，形成羊膜和绒毛膜。绒毛膜是由中胚层和外胚层形成的（图 8-3）。当胚胎发育到第 8 天时，外胎盘锥腔消失，使绒毛膜与外胎盘锥腔背侧壁的胚外外胚层愈合。由于小鼠胚胎的尿囊发育晚且体积小，所以，并不形成尿囊绒毛膜（图 8-3）。

人胚胎的绒毛膜也是由胚外体腔壁的中胚层与滋养外胚层共同形成。在胚胎着床后，滋养外胚层与子宫内膜相融合并在绒毛膜表面形成绒毛（图 8-4）。灵长类的尿囊也不发达，虽然尿囊腔也是由后肠向体蒂延伸而成的，但并不扩大，因而只有尿囊外表面的中胚层与绒毛膜相贴，并在其中形成血管。

五、脐带

脐带（umbilical cord）是由包着卵黄囊残迹的两个胎囊及卵黄管延伸发育而成，是连接胎儿脐部和胎盘之间的索状结构，为胎儿与母体进行物质交换的主要通道（图 8-5）。由于羊膜腔的不断扩大，羊膜褶逐渐向腹部脐区集中并缩窄，遂将卵黄囊柄、尿囊柄以及尿囊的动脉和静脉等包住，形成一条外包羊膜的长索状带。胚胎发育晚期，脐带内的卵黄囊柄和尿囊柄都退化，只剩下两条脐动脉、一条脐静脉（右脐静脉退化）和脐尿管，其间充填着由中胚层发生的胶状结缔组织。胎儿体内的尿液可通过脐带中的尿囊柄储存在尿囊内。由脐动脉、脐静脉及其在胎膜上的分支构成胎儿血液循环的体外部分，脐动脉将胎儿的血液输至胎盘，脐静脉则将胎盘的血液输送至胎儿体内。在脐孔外，马和猪的脐带较长，脐血管包括两根动脉和一根静脉，而且相互扭结在一起；牛和羊的脐带较短，脐血管为两条动脉和两条静脉，它们也互相缠绕，但很疏松，且静脉在脐孔内合为一条。马和猪的脐血管与脐孔组织的联系紧密，产出时脐带断开，其内的动脉残端并不缩至脐孔内。相反，牛和羊的脐血管与脐孔组织联系较松，动脉残端可缩至脐孔内。在脐带末端，动脉和静脉各分为两个主干，沿胎囊小弯向两端分布，分支分布于尿膜-绒毛膜上。脐尿管壁很薄，其上端通入膀胱，下端通入尿膜囊。

马驹脐带长 70~100cm，分为两部分。上半段外面包着羊膜，下半段的外面包着尿膜，此段的上端有脐尿管的开口。犊牛脐带长 30~40cm；羔羊 7~12cm；仔猪脐带长约 25cm；犬和猫脐带强韧且短，长约 10~12cm。分娩时，牛、羊和猪的胎儿通过产道

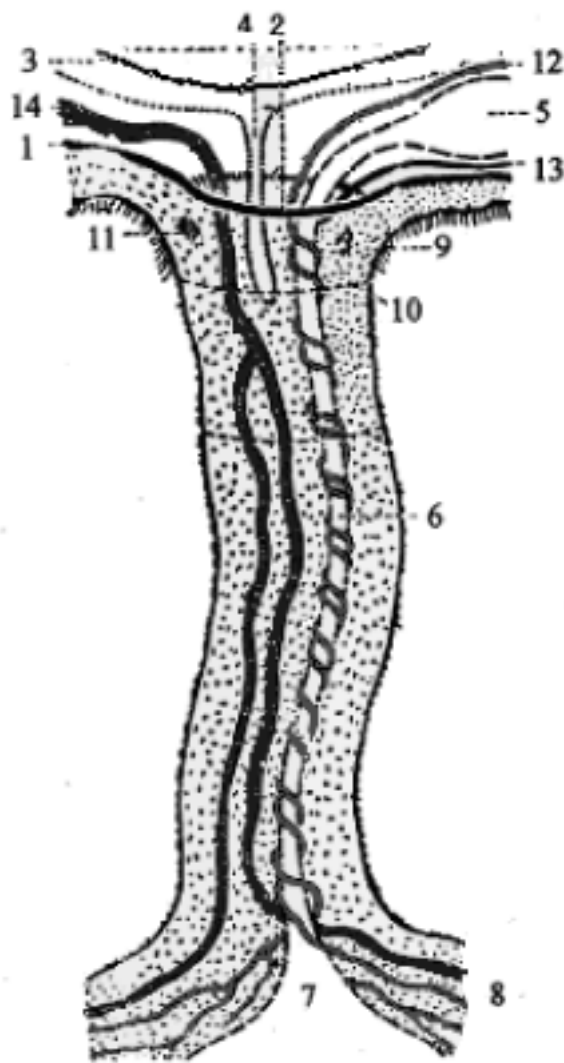


图 8-5 脐带结构模式图 (引自 Michel CC, 1983)

1. 腹壁; 2. 内脐环; 3. 肠管; 4. 卵黄蒂; 5. 膀胱; 6. 尿囊管; 7. 尿囊漏斗; 8. 尿囊绒毛膜; 9. 肚脐表皮; 10. 外脐环; 11. 脐带肌; 12. 左脐动脉; 13. 右脐动脉; 14. 脐静脉

时，脐带即被扯断，而犬、猫和马往往是在胎儿被娩出后，脐带被母体扯断。

人胚胎发育到第 6 周时，由于中肠迅速生长，肠袢可以直接进入卵黄蒂近端的脐腔，形成生理性脐疝，这种现象除高等哺乳动物外，鸟类中也常见到。所以，这也成为动物演化的迹象。人胚发育到第 10 周，肠袢从脐腔缩回，脐腔消失，卵黄蒂与尿囊也相继退化。妊娠足月的人胎儿脐带的长度与胎儿身长一致，约为 40~60cm。

第二节 胎盘的类型与结构

胎生哺乳动物的胎盘是胎儿尿囊绒毛膜与母体子宫内膜相结合部位的总称，是能进行有选择性物质交换的暂时性结构，可分为母体胎盘和胎儿胎盘两部分（图 8-6 和 8-7），总称胎盘（placenta）。家畜的胎盘均不呈盘状，由于沿用人的扁圆盘状胎盘而得名。

根据哺乳动物尿囊绒毛膜上绒毛的分布部位和外部形态的不同，可将胎盘分为弥散型胎盘（diffuse placenta）、子叶型胎盘（cotyledonary placenta）、带状胎盘（zonary placenta）和盘状胎盘（discoid placenta）四种类型（图 8-8）。胎盘内母体与胎儿部分的血

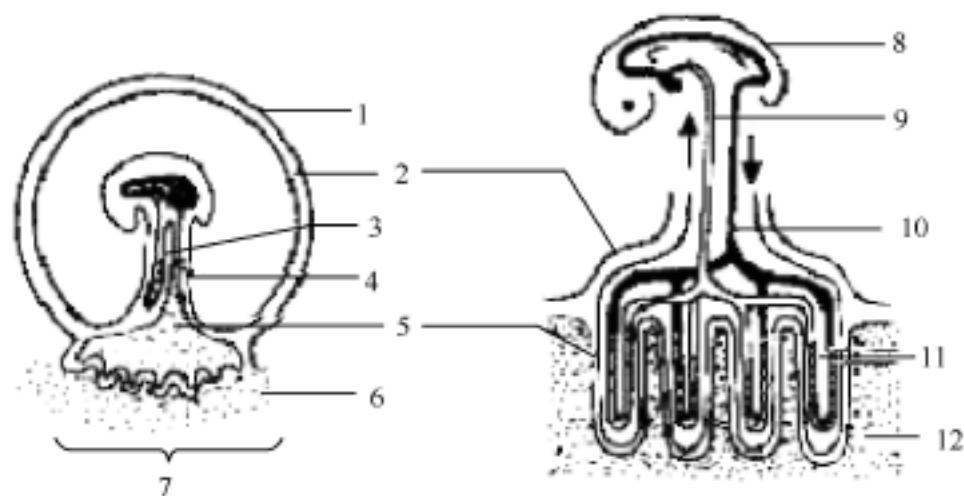


图 8-6 哺乳类动物胎盘结构模式图 (引自 Austgen L, 2000)

1. 绒毛膜; 2. 羊膜; 3. 卵黄囊; 4. 脐带; 5. 尿囊; 6. 子宫壁; 7. 胎盘;
8. 胚胎; 9. 脐静脉; 10. 脐动脉; 11. 物质交换; 12. 母体血液

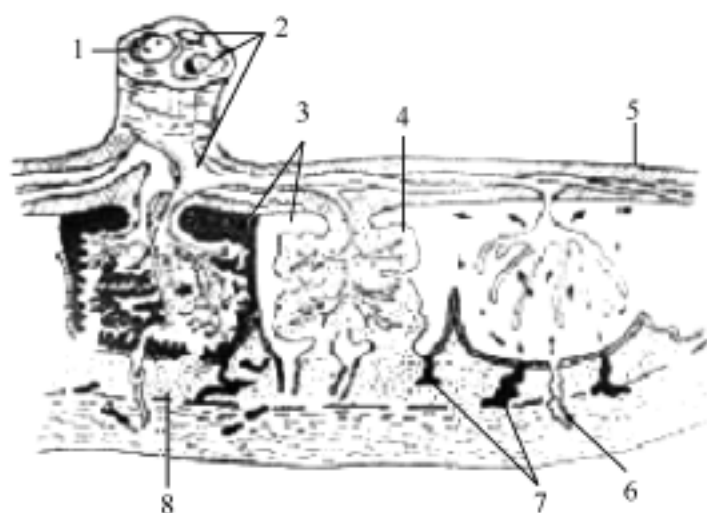


图 8-7 胎盘结构剖面模式图 (引自 Austgen L, 2000)

1. 脐静脉; 2. 脐动脉; 3. 绒毛间隙; 4. 绒毛; 5. 羊膜;
6. 螺旋小动脉; 7. 小静脉; 8. 基蜕膜

液循环是两个独立的体系，二者的血液不相混合，它们之间隔以数层结构（图 8-6 和 8-7），称胎盘屏障（placental barrier）。在胎儿发育早期，胎盘屏障结构（即母体胎盘和胎儿胎盘的组织结构层次）比较完整，以后随着胎儿发育，胎盘结构和功能上的差异逐渐产生。根据母体和胎儿血液之间的组织层次，可将胎盘区分为上皮绒毛膜胎盘（epitheliochorial placenta）、结缔组织绒毛膜胎盘（syndesmochorial placenta）、内皮绒毛膜胎盘（endotheliochorial placenta）和血绒毛膜胎盘（hemochorial placenta）四种类型（见图 8-9）。根据妊娠时胎儿胎盘是否深入子宫内膜、子宫内膜组织被破坏的程度、分娩时母体子宫的出血程度以及子宫内膜组织的脱落程度等，将胎盘分为蜕膜胎盘（deciduate placenta）和非蜕膜胎盘（non-deciduate placenta）两种。分娩时，胎膜与胎盘一起从子宫排出，合称胎衣。

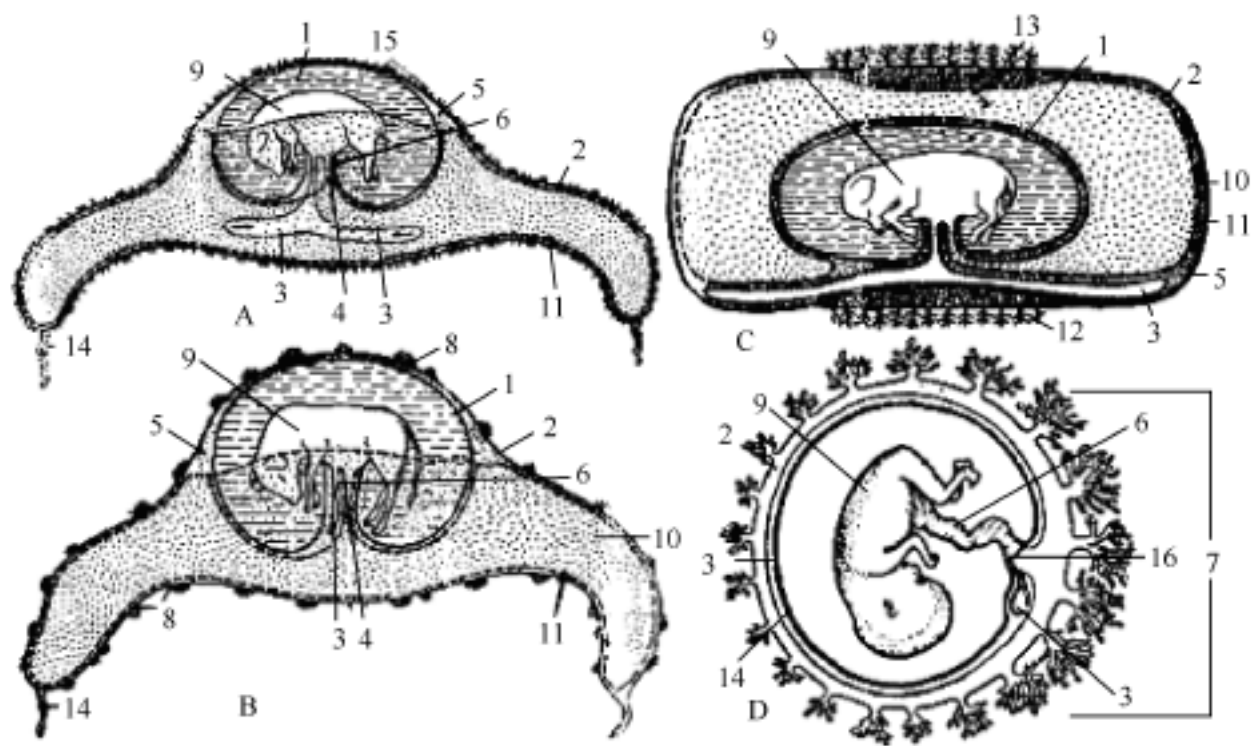


图 8-8 哺乳动物胎盘模式图

A. 弥散型胎盘 (引自 Michel CC, 1983); B. 子叶型胎盘 (引自 Michel CC, 1983); C. 带状胎盘 (引自 Michel CC, 1983); D. 盘状胎盘 (引自 Patten CC, 1953)

1. 羊膜; 2. 绒毛膜; 3. 卵黄囊; 4. 尿囊管; 5. 胚外体腔; 6. 脐带; 7. 盘状胎盘; 8. 子叶; 9. 胎儿; 10. 尿囊; 11. 尿囊绒毛膜; 12. 绒毛环; 13. 环带状胎盘; 14. 退化的绒毛膜端; 15. 晕; 16. 尿囊血管

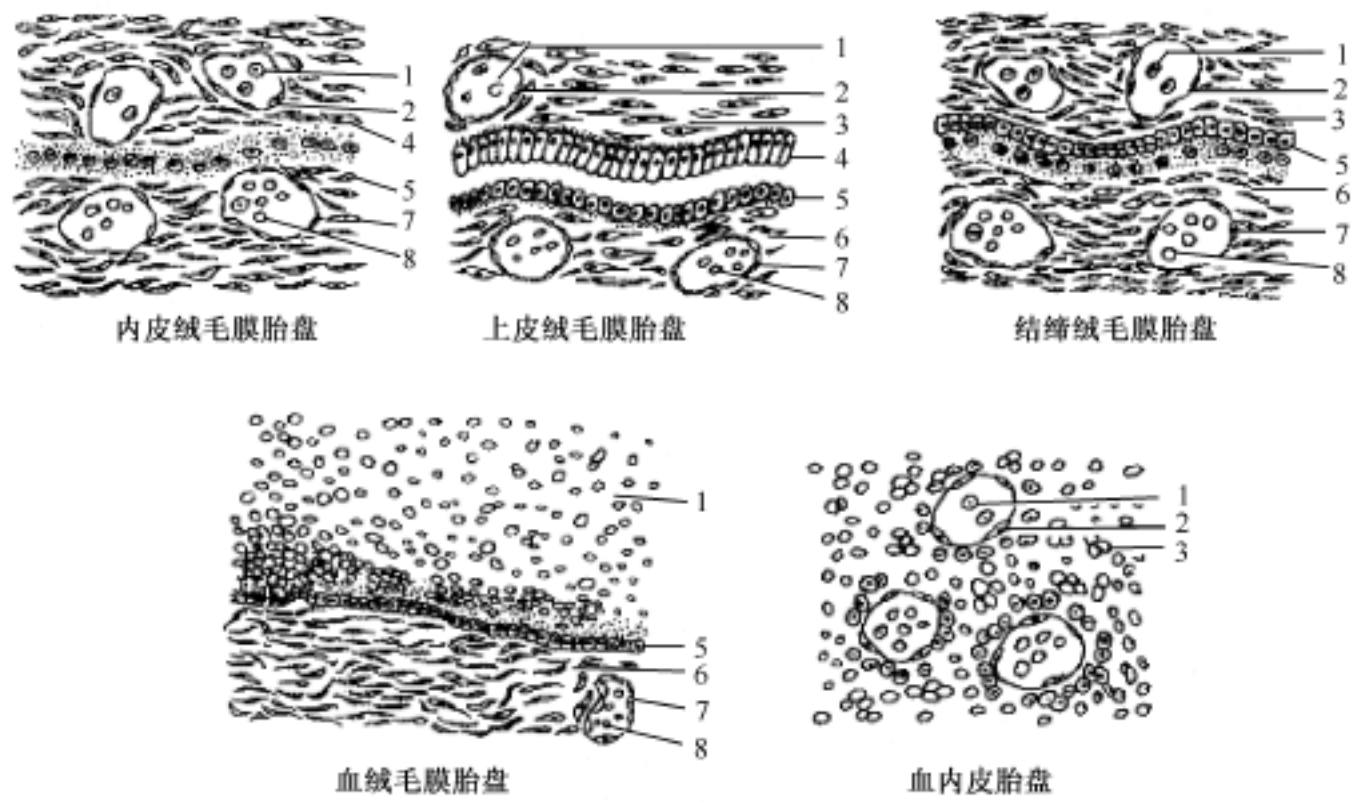


图 8-9 各型胎盘的构造关系 (引自陈北亭, 1999)

1. 母体血液; 2. 母体内皮; 3. 母体结缔组织; 4. 母体上皮; 5. 胎儿上皮; 6. 胎儿结缔组织; 7. 胎儿内皮; 8. 胎儿血液

一、弥散型胎盘 (diffuse placenta)

许多种动物的胎盘是弥散型的，如猪、马、骆驼、鼯鼠、鲸、海豚、袋鼠和鼬。这类胎盘的绒毛膜表面覆盖着绒毛，绒毛伸入到子宫内膜腺窝内，构成一个胎盘单位，或称微子叶，母体与胎儿在此发生物质交换。马和猪的尿膜-绒毛膜都形成许多皱襞，以增大胎盘的面积。

(一) 猪胎盘的结构

猪胎盘属弥散型胎盘、上皮绒毛膜胎盘及非蜕膜胎盘。梭形的绒毛膜囊，除两极和子宫腺开口处外，几乎全部贴附于子宫内膜上，形成初级皱褶。部分初级皱褶嵌入尿囊绒毛膜隐窝中。初级皱褶进一步发育后形成次级皱褶，以增加其与子宫内膜的接触面积。次级皱褶的上皮细胞进一步分化，在褶的不同部位呈现不同形态。位于绒毛膜隐窝基部的高柱状上皮细胞排列成拱门状，贴附于子宫内膜褶顶部的低柱状上皮，其余部分

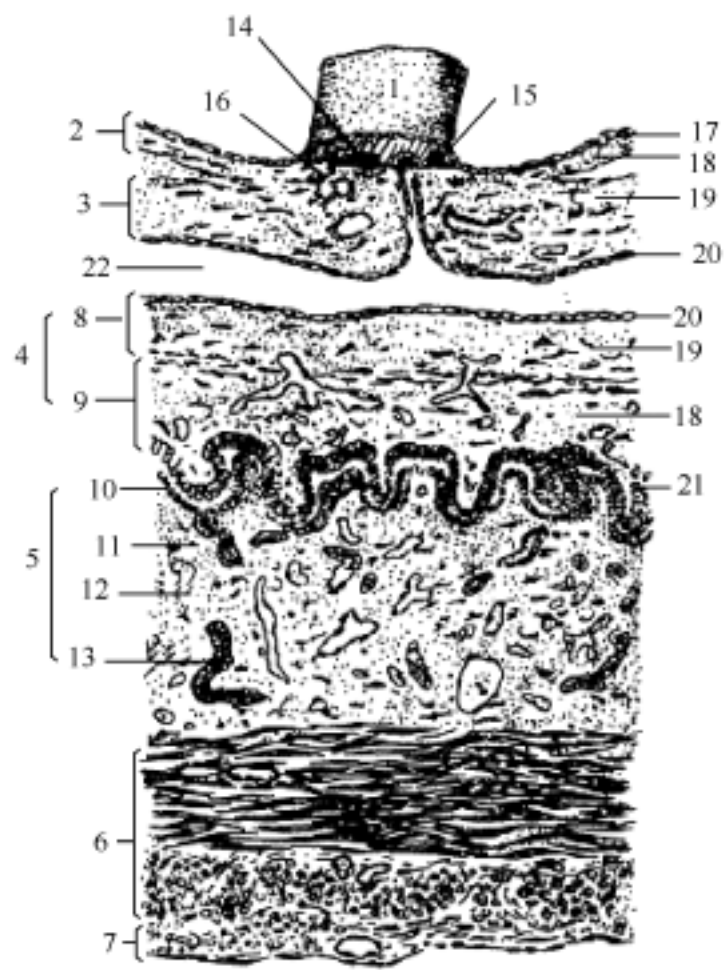


图 8-10 猪胚绒毛膜的构造及其与子宫壁关系的模式图
(改绘自 Patten EP, 1959)

1. 脐带；2. 羊膜；3. 尿囊壁；4. 尿囊绒毛膜；5. 子宫黏膜；6. 子宫肌膜；
7. 子宫外膜；8. 尿囊壁；9. 绒毛膜；10. 子宫上皮；11. 结缔组织；12. 血
管；13. 子宫腺；14. 尿囊静脉；15. 尿囊动脉；16. 卵黄囊残部；17. 胚外外
胚层 (羊膜内层)；18. 壁中胚层；19. 脏壁中胚层；20. 胚外内胚层；21. 滋
养外胚层；22. 尿囊腔

的绒毛膜上皮和子宫内壁上皮均呈立方形或扁平形。构成这种胎盘的层次比较完整，营养物质由母体血液渗透到胎儿血液中或反向渗透时，都要经过母体血管内皮、子宫内壁上皮、绒毛膜上皮、绒毛膜间充质和绒毛膜血管内皮，共6层屏障。随着胎儿发育，胎盘屏障的结构可进一步变薄（图 8-10、图 8-8A 和图 8-9A）。

猪尿囊绒毛膜上的绒毛出现聚集，形成许多小的圆形绒毛晕（areolae）。妊娠 3~7 周时，滋养层上出现许多小斑，并陷于浅窝内，以后小斑上生出绒毛，即成为绒毛晕，绒毛伸至子宫腺开口的凹陷内。猪绒毛和子宫黏膜的联系比马紧密。剖腹取出活胎儿后，马上剥离胎衣会引起出血。胎盘循环停止后 10~30min，联系才变松（图 8-11）。

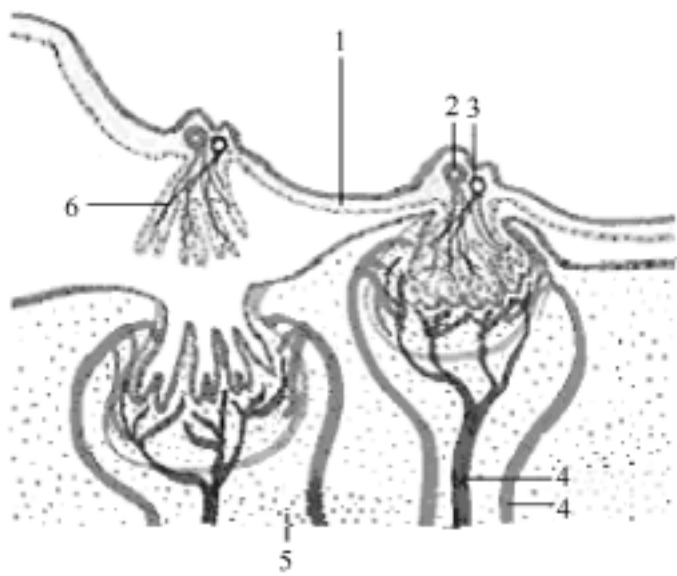


图 8-11 马胎盘的显微结构图（改绘自 Austgen L, 2000）

1. 绒毛膜尿囊；2. 脐带血；3. 胎儿血管；4. 子宫静脉和动脉；5. 子宫内壁上皮；6. 绒毛膜长绒毛

(二) 马胎盘的构造

马胎盘属弥散绒毛型胎盘、上皮绒毛膜胎盘和非蜕膜胎盘。绒毛膜囊大部分表面密生小绒毛簇。马发育完成的绒毛长约 1.5mm，并有分支（图 8-13A）。子宫黏膜上皮向其深部凹陷成蜂窝状排列的隐窝，绒毛嵌入子宫隐窝中，从而构成由绒毛簇和相应子宫隐窝共同形成的微胎盘块（microplacentome）（图 8-11）。微胎盘块之间有子宫腺开口，其分泌物将尿膜-绒毛膜与子宫内壁上皮隔开。每根绒毛均由间充质和血管形成中轴，外覆单层柱状的绒毛膜上皮细胞。妊娠 75~110 天时，胎盘单位遍布于尿膜-绒毛膜囊上。绒毛和腺窝的联系不牢固，因此马妊娠初期的流产较多，但胎衣不下较少见。分娩时偶见一部分尿膜-绒毛膜过早地脱离子宫黏膜，突出于阴门外。如果胎儿排出缓慢，可因缺氧而发生窒息（图 8-8 和图 8-9）。胎儿绒毛膜上皮和子宫内壁上皮都保持比较完整的组织结构，构成上皮绒毛膜胎盘。

母马妊娠至 40 天左右时，在尿囊绒毛膜与退化中的卵黄囊接合处，可见由柱状上皮细胞形成一个环状的绒毛膜带。当环状绒毛膜带上皮的分支绒毛褶附着到子宫内壁上皮后，即侵入子宫内壁上皮并吞噬其上皮，穿过基膜，而后植入于子宫内壁上皮基质中，在妊娠侧的子宫腔内形成环状排列的子宫内壁上皮杯（endometrical cup）。内壁上皮杯细胞体积大、双核，呈多面体形，细胞质内粗面内质网丰富，内质网池膨大并充满絮状物质，其他细胞器不

明显。内膜杯细胞排列紧密，且与未被侵蚀的子宫腺混合在一起，还可见到变性的上皮细胞、淋巴细胞、浆细胞和嗜酸性细胞。内膜杯的血液供应丰富，在杯下存在丰富的淋巴管。子宫内膜杯在妊娠 40 天时达到最大体积，长约 2~10cm，宽约 1~3 cm。妊娠 60 天时，子宫内膜杯开始退化，到 150 天时则坏死后消失。子宫内膜杯分泌黏稠的分泌物，黏附于绒毛膜表面，内含丰富的孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG)。

二、子叶型胎盘 (cotyledonary placenta)

反刍动物 (牛、羊、鹿、骆驼) 的胎盘属子叶型或复合型 (multiplex type) 胎盘。

胎儿绒毛膜表面的绒毛并非均匀分布，而是集成圆丛状 (图 8-13B 和 C)，构成绒毛叶或子叶 (胎儿胎盘，亦称胎儿子叶)。这些块状绒毛丛与子宫内膜上圆形无腺体的子宫肉阜接触，使之发育成为母体胎盘 (亦称母体子叶)。胎儿子叶和母体子宫阜结合形成胎盘突 (placentoma)，成为母体和胎儿发生物质交换的场所。胎盘突的数目在各种动物之间差异很大，牛为 75~120 个，绵羊 80~90 个，山羊多达 120 或更多个，驯鹿只有 6~8 个，长颈鹿却多达 180 个。胎儿子叶上的绒毛同子宫肉阜上的隐窝紧密融合，使之与子宫内膜的腺体直接接触。绒毛与子宫肉阜相接触处，由于绒毛膜上皮侵蚀部分子宫上皮并使之变性，从而使绒毛上皮直接与子宫内膜的结缔组织相接触，构成结缔绒毛膜胎盘。胎盘突的结构较弥散型胎盘复杂。

肉阜之间的子宫内膜叫做肉阜间区，胎儿子叶之间的尿膜-绒毛膜叫做子叶间区。这些区域在正常情况下并不形成胎盘组织。但是，由于某些子宫疾病，或由于胎盘突缺乏，牛的子叶间区可以形成原始胎盘结构，像增大的弥散型胎盘一样，在尿膜-绒毛膜的子宫内膜间区发育，形成异位胎盘 (adventitious placenta) 或称副胎盘 (accessory placenta)。

(一) 牛胎盘的结构

牛胎盘属子叶型胎盘、上皮绒毛膜胎盘和非蜕膜胎盘。在妊娠后期和某些病理情况下，上皮绒毛膜胎盘的某些部位，可形成结缔绒毛膜胎盘。在胚胎着床初期，绒毛膜囊与子宫肉阜相接触处长出绒毛，这些绒毛与子宫肉阜隐窝建立联系，其着床过程从绒毛膜囊的“赤道”处开始，逐渐向周围扩展。随着胎儿发育，原来在子宫肉阜内的绒毛主干逐渐发出更多的分支，插入相对应处的子宫内膜隐窝内。隐窝内的主小隔也同时发出次级小隔或更细的小隔，以容纳主绒毛发出的分支。由上述二者共同构成有柄隆起的结构，即胎盘块。随着胚体发育，胎盘块体积增大约 500 倍，接近分娩时，胎盘块发生轻度的退化 (图 8-12、图 8-8B)。

牛妊娠 15~16 天时，尿膜的体壁中胚层和绒毛膜融合起来，胚胎附近和子宫肉阜接触的尿膜-绒毛膜上发生上皮增生斑，1~1.5 个月时，成为绒毛斑。子宫肉阜表面的上皮也向其结缔组织基质内形成许多腺窝，绒毛伸入其中。至 2 个月末，绒毛增长，腺窝也成为管状。3 个月时，绒毛和腺窝进一步增长并分支，达到子宫肉阜基部。这时子

宫肉阜已发育成为蘑菇状的母体胎盘，头部为长圆形或圆形，上有许多腺窝孔，很像海绵；基部与子宫内膜相连。绒毛斑则发育成为长圆形或盘状胎儿子叶，把母体胎盘包起来，盘中有许多粗而长的绒毛，每一绒毛又有很多分支（图 8-12）。

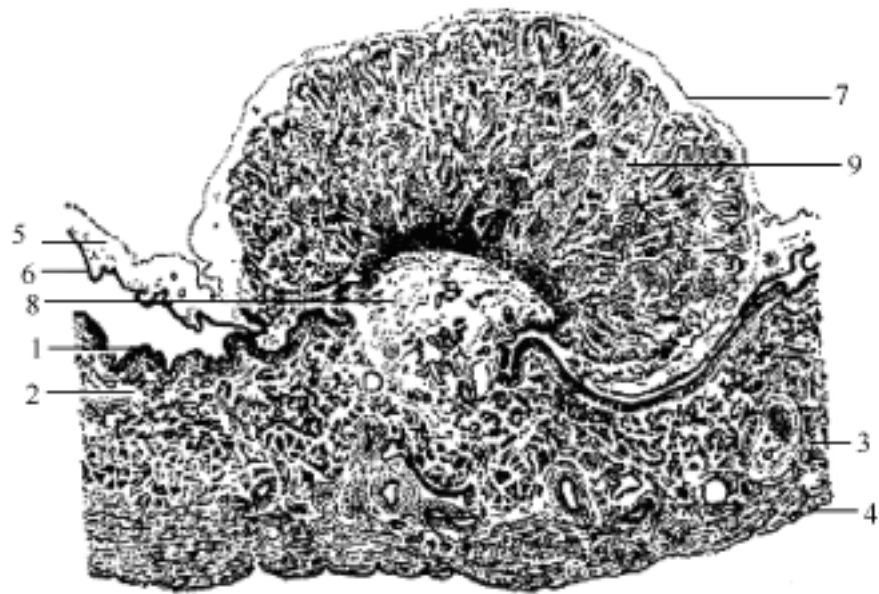


图 8-12 牛妊娠中期胎盘块横切（改绘自 Hansen MD, 1991）

1. 子宫上皮；2. 子宫内膜及子宫腺；3. 子宫肌层；4. 子宫外膜；5. 尿囊绒毛膜；6. 滋养层；7. 内胚层；8. 胎盘块柄；9. 胎盘块

子宫隐窝处的上皮细胞呈立方形或扁平形，核圆形，核仁清晰，其内的粗面内质网排列成不规则的、稀疏的终池，细胞质内有少量线粒体。隐窝上皮中，有一些隐窝巨细胞，其中细胞质较少，细胞顶端有微绒毛。子宫隐窝相邻的上皮细胞间不发生指间相嵌。子宫隐窝上皮细胞的顶端有微绒毛，与胎儿绒毛膜细胞的微绒毛相嵌合。

牛胎盘中不同形态的绒毛膜上皮细胞，如单核柱状细胞、单核不规则形细胞和双核巨细胞。绒毛膜单核细胞顶端有微绒毛，基部有胞饮泡，核呈圆形或不规则形，其核仁较大。细胞质内有稀疏的粗面内质网和散布的游离核蛋白体，线粒体数量较多且体积中等。相邻细胞的质膜间发生指间相嵌。绒毛膜双核巨细胞顶端缺少微绒毛，有 2 个圆形的细胞核，核仁明显，细胞质丰富并分布着稀疏的粗面内质网、大量的游离核蛋白体和高度发达的高尔基复合体，线粒体数量多且体积中等。细胞质中还含有致密小体、多泡体和分泌颗粒。绒毛膜双核巨细胞可分泌绒毛膜促性腺激素。

(二) 羊胎盘的结构

羊的胎盘也属子叶型胎盘、上皮绒毛膜胎盘和非蜕膜胎盘。羊的胎盘形成及其细微结构和牛相似。绵羊的子叶绒毛大约于受精后 20 天形成，胎盘突小而圆，其形状与牛相反。胎盘突的母体部分表面凹陷，呈盂状，将圆的子叶包起来。山羊胎盘突的母体部分表面浅凹，呈圆盘状，子叶呈丘状附着于其凹面上（图 8-13C）。

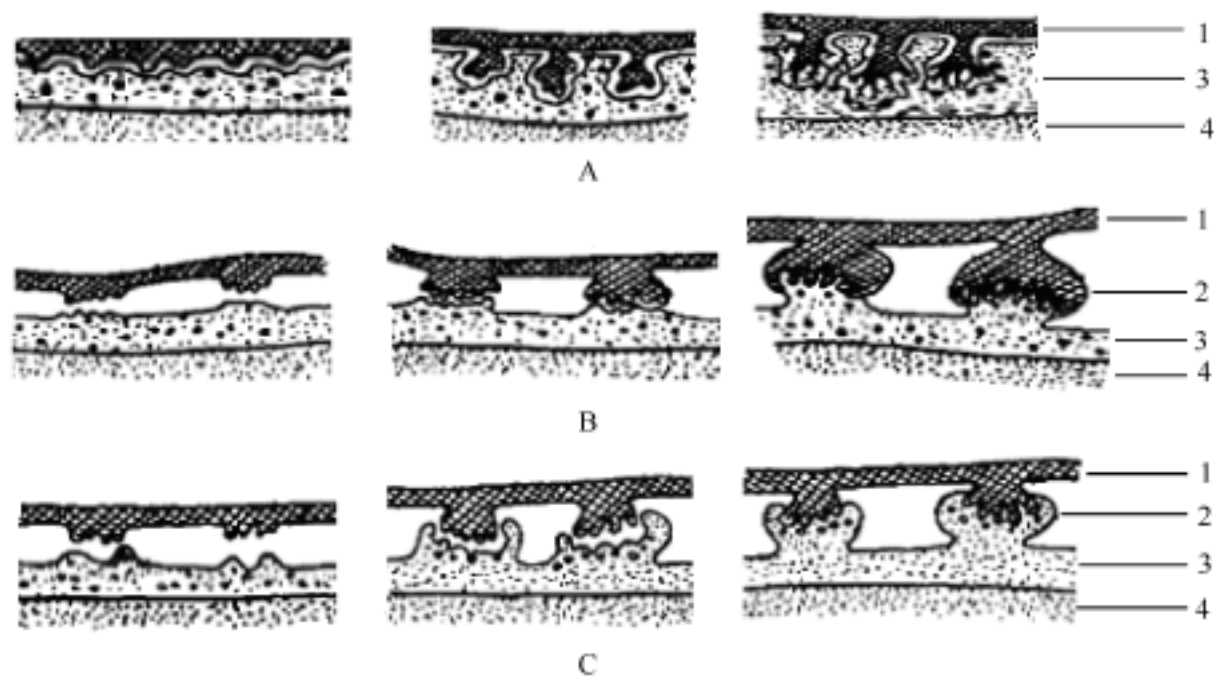


图 8-13 胎膜与子宫的附着关系模式图 (引自赵兴绪, 2002)
A. 弥散型胎盘 (马); B. 子叶型胎盘 (牛); C. 子叶型胎盘 (羊);
1. 绒毛膜-尿膜; 2. 胎盘突; 3. 子宫内膜; 4. 子宫肌层

三、带状胎盘 (zonary placenta)

肉食动物的胎盘都是带状胎盘，其特征是绒毛膜表面的绒毛集中形成一条宽约2.5~7.5cm的绒毛带，环绕在卵圆形的尿膜-绒毛膜囊的中部（即赤道区上），母体的子宫内膜也形成相应的带状胎盘。带状胎盘分为两种：一种是完全的带状胎盘，如犬和猫的胎盘；另一种是不完全的带状胎盘，如熊、海豹、鼬科中的雪貂和水貂的胎盘。完全带状胎盘在妊娠早期是由卵黄囊膜形成有功能的绒毛-卵黄胎盘，以后绒毛膜-尿膜在赤道区生长及发育后，侵入子宫上皮而形成。因此，紧靠着尿囊中胚层细胞的滋养层细胞与母体子宫内膜的毛细血管内皮细胞紧密相贴。卵黄囊为一退化器官，漂浮在尿液内。绒毛膜-尿囊仍然形成一个充满液体的长椭圆形的囊，并带有一个胎盘绒毛膜带。不完全的带状胎盘则为单个或成对的盘状物。

犬和猫的绒毛膜有断断续续分布的细胞绒毛膜和合胞体绒毛膜。细胞绒毛膜的细胞质内含游离核蛋白体和不发达的内质网；合胞体绒毛膜构成胎儿胎盘迷路的主要部分，细胞质内含有发达的粗面内质网、丰富的线粒体和一些致密小体。环带状胎盘的绒毛膜上皮侵蚀及吸收子宫内壁上皮，以致绒毛膜的绒毛与子宫固有膜中的毛细血管相接触，物质渗透只经过子宫血管内皮、绒毛膜上皮、绒毛膜间充质和毛细血管内皮。

带状胎盘绒毛膜上的绒毛相互吻合形成胎盘迷路，该胎盘迷路可分为母体和胎儿两部分。胎儿胎盘迷路是由一些绒毛膜与间充质构成的板状结构，在板内分布着小且壁薄的毛细血管。母体胎盘迷路则由一些较大且壁厚的毛细血管外包绒毛膜细胞所组成。胎盘迷路与子宫内膜之间是海绵连接带（spongy junctional zone），其中含有胎盘迷路的末端部分、母体血管、细胞碎片和子宫腺分泌物。海绵连接带与子宫内膜的腺体带（glandular zone）相连接。胎盘带的内外部分均可发生子宫出血，形成血肿。犬有时出

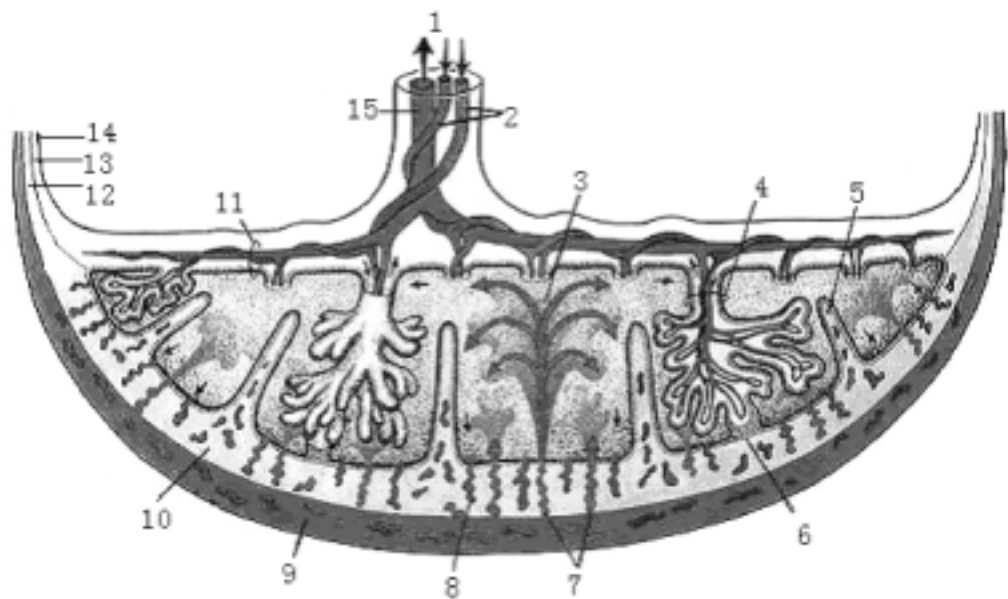


图 8-15 人胎儿胎盘与母体胎盘的结构与血液循环模式图 (引自石玉秀, 1998)

注：箭头示血流方向，红色示富含营养和 O₂ 的血，黑色示含代谢废物和 CO₂ 的血。

1. 胎血循环；2. 脐动脉；3. 绒毛间隙；4. 绒毛干；5. 胎盘隔；6. 细胞滋养层壳；7. 子宫螺旋动脉；8. 子宫静脉；9. 子宫肌层；10. 基蜕膜；11. 丛密绒毛膜；12. 壁蜕膜；13. 平滑绒毛膜；14. 羊膜；15. 脐静脉

总称。绒毛膜在形成胎盘的部分绒毛发展成绒毛树，但是胎盘以外部分绒毛膜的绒毛退化，形成平滑绒毛膜 (smooth chorion)，包在平滑绒毛膜外面的蜕膜部分称为包蜕膜 (capsular decidua)，形成母体胎盘部分的子宫内膜，称为底蜕膜，其余部分的子宫内膜称为壁蜕膜 (decidua vera)。在妊娠后半期，平滑绒毛膜受胎儿与羊膜的推挤，紧靠子宫壁，因而使羊膜、平滑绒毛膜、包蜕膜与壁蜕膜相接触，并使平滑绒毛膜和包蜕膜相融合。

子宫内膜的血管被滋养层细胞侵蚀后形成绒毛间隙即母体血池，各血池的血液可以互通，从而构成了胎盘血液循环的末端。胎儿的脐动脉将缺氧血液输入胎盘。脐动脉进入绒毛前，先在绒毛膜板上分出许多分支，然后再分支成为到主干绒毛的细支，并在绒毛膜树末端形成动脉-毛细血管-静脉血管网，使绒毛浸于母体血池。通过胎盘屏障进行物质交换后，富含 O₂ 与营养物质的血液，经脐静脉的细支进入脐带的脐静脉，最后流回心脏。母体血池的血液是由子宫内膜的螺旋动脉开口流向绒毛膜板，在绒毛间隙中，使血压降低，并将混有胎儿 CO₂、尿素等代谢物质的血液经子宫内膜静脉进入子宫静脉，回到母体的心脏后进行血液循环 (图 8-15)。

五、上皮绒毛膜型胎盘 (epitheliochorial placenta)

上皮绒毛膜型胎盘见于马和猪，子宫上皮细胞和绒毛滋养层细胞接触，二者的表面均有微绒毛彼此融合。此类胎盘在母体血液和胎儿血液之间有 6 层组织 (胎盘屏障)，即子宫血管内皮、结缔组织、内膜上皮、绒毛 (滋养层) 上皮、结缔组织和胎儿血管上皮。

六、结缔组织绒毛膜型胎盘 (syndesmochorial placenta)

此类胎盘只见于反刍动物，母体胎盘表面的内膜上皮可能由于受到绒毛滋养层的吞噬，从妊娠 4 个月起开始变性消失，结缔组织和绒毛基部接触，故称为结缔绒毛膜型。妊娠后半期，整个母体胎盘表面及腺窝开口处失去上皮层，腺窝底部则保留有子宫内膜的上皮，故又称为上皮绒毛膜和结缔组织绒毛膜混合型胎盘，或上皮结缔绒毛膜胎盘。此型胎盘在母体血液和胎儿血液之间，除子宫上皮失去以外，其余 5 种组织均存在。

由于绒毛膜的绒毛和母体胎盘联系紧密，分娩时二者不能立即分离。即使胎儿排出较慢，只要子宫不剧烈收缩，胎盘循环不停滞，胎儿就不会窒息。但是，产后胎衣排出较慢，容易发生胎衣不下。

七、内皮绒毛膜型胎盘 (endotheliochorial placenta)

内皮绒毛膜型胎盘见于犬和猫。母体血液和胎儿血液之间只有子宫血管内皮和绒毛的上皮、结缔组织及胎儿血管内皮共 4 层组织，子宫内膜上皮和结缔组织已消失。

八、血液绒毛膜型 (hemochorial placenta)

此型胎盘见于啮齿类和灵长类动物。胎儿绒毛（包括绒毛上皮、结缔组织和胎儿血管内皮细胞）直接侵入母体血池内，中间没有母体的其他组织隔开。不同动物的血液绒毛膜胎盘有相当大的差异，故可从这一型中进一步分出血液-内皮型 (hemo-endothelial) 和内皮-内皮型 (endothelio-endothelial) 胎盘。

胎盘的形成本先是在受精后第 10 天（人），滋养细胞发育并侵入母体血管，使血流进入细胞间隙，形成绒毛叶腔隙。最初，胎儿通过绒毛细胞膜直接获得营养，交换废物。早在第 11~12 天，绒毛开始在绒毛膜表面形成，并且不断发育分枝形成树枝状结构。当第 19 天胎盘内出现胎儿血管时，通过绒毛可使母体和胎儿进行物质交换。胎盘在妊娠 18~20 周完全形成，并且在整个妊娠期不断生长，到分娩时其重量可达到 500g。

九、蜕膜型胎盘 (decidual placenta)

蜕膜型胎盘又叫结合型胎盘或真胎盘，主要见于啮齿类和灵长类。母体子宫上皮、黏膜下层、蜕膜细胞和胎儿胎盘形成蜕膜，子宫内膜蜕膜化。根据胚胎植入子宫腔的部位，可分三部分：即底蜕膜（在受精卵下面的蜕膜，位于胚胎和子宫壁之间，将来发育成为母体胎盘）、包蜕膜或囊状蜕膜（包围着孕体，使其与子宫腔隔开，将来成为胎膜的一部分）和真蜕膜或周壁蜕膜（覆盖在子宫腔内的蜕膜，除形成底蜕膜部分之外，其余都是真蜕膜）。在人的妊娠早期，胚胎在子宫腔的一侧发育，包蜕膜和真蜕膜中间留有空隙，即原有的子宫腔。从妊娠第 4 周开始，包蜕膜和真蜕膜逐渐靠近，最终黏连融

合，封闭子宫腔。分娩时，蜕膜脱落，子宫内膜赤裸并因血管破裂而有出血。犬、猫的胎盘也属于这一类型，但分娩时丢失的蜕膜组织较少。

十、非蜕膜型胎盘 (nondecidual placenta)

非蜕膜型胎盘又叫半胎盘或并列型胎盘，见于家畜。分娩后胎盘脱落时，子宫内膜组织均不受损，也无出血。近年来有人研究发现，牛分娩后，部分子宫内膜受损并在产后的一周内脱落，在产后的 40 天左右子宫内膜完全修复。反刍动物于分娩后 6~10 天时，子宫肉阜表面“脱皮”而失去上皮。

十一、胎盘血液循环 (blood circulation of placenta)

在妊娠期，胎儿血液循环与母体血液循环是各自独立的，胎儿和母体的血液不直接相通。供应母体胎盘的血液来自子宫动脉，而供应胎儿胎盘的血液来自脐动脉和脐静脉。关于母体胎盘血流和胎儿胎盘血流曾有人提出过多种模式，有反向的，同向的、交叉的，还有母体血先流入血池，再进入胎儿毛细血管的。因动物种类不同，胎盘组织不同，功能亦有差异。

绵羊的子宫动脉和子宫静脉是穿透子宫肉阜和腺窝的中隔层而进入胎盘，母体中隔层的小动脉则在胎儿胎盘的绒毛周围分出许多小分支，形成毛细血管网。毛细血管的血流方向与胎儿胎盘绒毛膜的纵轴平行，胎儿脐动脉和脐静脉的分支垂直穿入绒毛而进入胎盘，其血流方向是交叉的或同时具有相对的两种方向。马在妊娠早期胎盘的表面是光滑的。妊娠 70 天时，由于微绒毛生长发育而变成鹅绒状，绒毛膜上的绒毛丛伸入子宫内膜的相应腺窝内，形成小球形的微子叶结构。马母体胎盘的微子叶血液微循环同绵羊和牛一样，血管丰富，动脉长而直，经过子宫腺体到达内膜，通过子宫内膜上皮深层再分出许多分支，每一分支在子宫腺窝壁中形成致密的血管网，血管网中有一条静脉通过子宫内膜下血管丛输出。胎儿胎盘绒毛膜绒毛的血液来自脐动脉和脐静脉分支，静脉紧挨着动脉，而且毛细血管血流是从绒毛尖端流向基底部，同母体血流方向相反，是反向血流。

人的胎盘从第 12 周起，由于受到母体血液供应主要来源部位的影响，真正的盘状胎盘与以前的胚极区分开，胎盘通过绒毛附着于直接覆盖在螺旋小动脉上的蜕膜（图 8-16）。而其他部位的绒毛逐渐萎缩，到第 16~18 周时完全消失。螺旋小动脉的血液进入绒毛间隙，而母体血液在绒毛网状结构周围循环，并通过它灌注与每根螺旋小动脉相连的 2~3 个静脉窦。胎盘绒毛分成簇称胎盘小叶，每一簇由 1~2 根螺旋小动脉供血。足月时，一个胎盘可分成 10~20 个胎盘小叶。来自母体的营养物质经绒毛间隙，穿过滋养细胞和绒毛的纤维中心，再通过胎儿毛细血管的内皮细胞，最后到达胎儿血循环。而废物的运输方式正好相反。这样完成了母体与胎儿之间的物质交换。由于母体血与胎儿绒毛的或滋养细胞的组织是并列的，所以被称为血液-绒毛膜型胎盘。

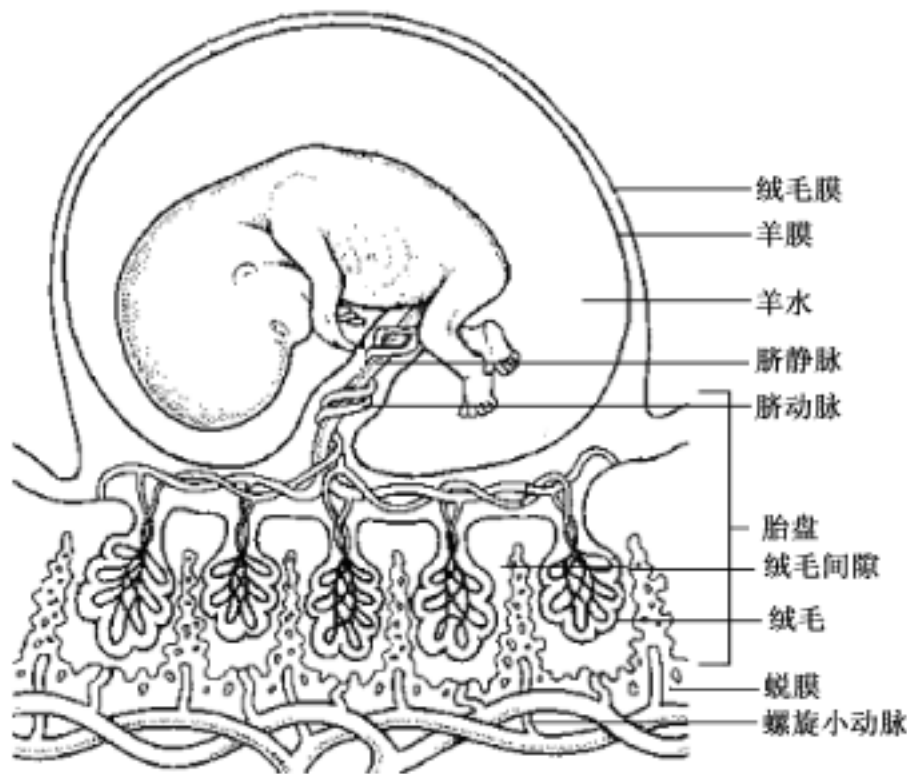


图 8-16 人胎儿和胎盘 (引自默克诊疗手册, 1999)

第三节 胎盘的生理功能

根据胚胎发育所需营养物质的来源及获得方式，可将胚胎营养分三个不同时期。卵裂期胚胎主要利用卵本身的卵黄物质；胚泡期和胚泡着床初期，通过滋养层细胞吸取子宫腔内的子宫腺体分泌物，称组织营养 (histotrophic nutrition)；胚胎着床及胎盘形成后，胎儿通过胎盘的毛细血管获取营养，称血液营养 (hemotrophic nutrition)。血液营养是胚胎营养的主要方式，但组织营养和血液营养在胚胎发育过程中可以同时存在。在整个妊娠期间，胎盘的大小、形态和内部结构处于不断变化之中，胎盘屏障在组织结构上随着胎儿发育而逐渐变薄，是胎盘结构变化的一个标志。

胎盘是维持胎儿生长发育的器官，不仅对胎儿有保护作用，而且具有免疫、代谢、造血、屏障和内分泌功能，并且还担负着胎儿的消化、呼吸和排泄器官的作用 (图 8-17)。

一、胎盘的保护功能

胎盘对胎儿的保护作用是通过固定胎儿和发挥胎盘屏障作用而实现的。上皮绒毛膜胎盘在母体与胎儿之间有广泛的微绒毛镶嵌，为二者细胞间的相互黏着提供了广阔的面积，起着固定胎儿位置的作用。

子宫内膜、绒毛膜上皮细胞和内皮细胞的细胞膜是构成胎盘屏障的主要成分。胎盘屏障中细胞膜的层数是衡量胎盘通透性大小的指标。胎盘虽然可以进行物质交换，但对物质的通过具有严格的选择性。有些物质不能直接通过胎盘进入胎儿体内，这种选择性就是胎盘屏障 (placenta barrier) 作用。母体血液中有毒物质和许多种细菌不能通过胎盘，大分子蛋白质须经酶分解后才能通过。胎盘屏障作用的大小与胎盘类型有关。胎盘

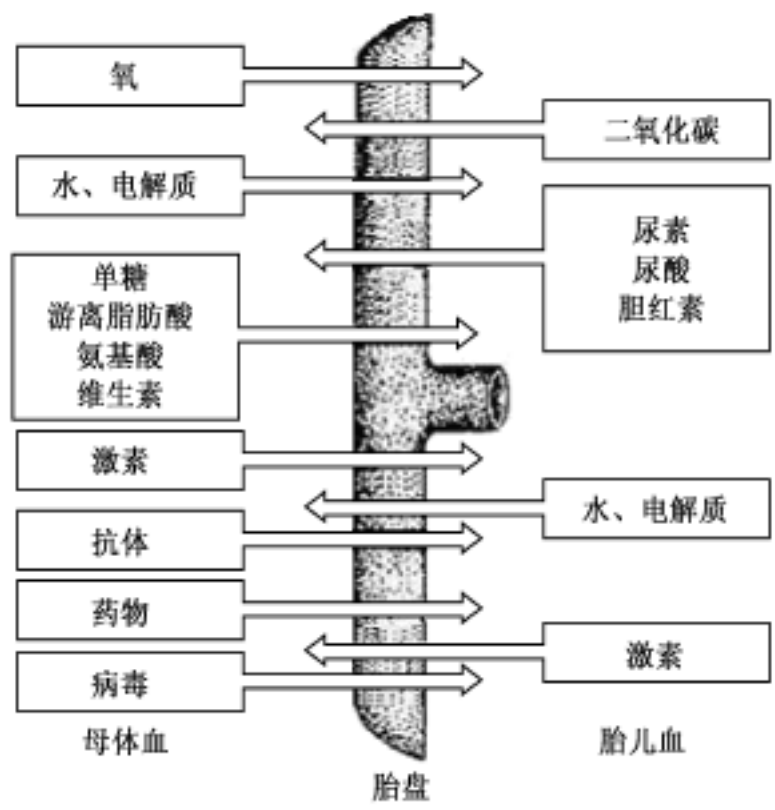


图 8-17 胎儿同母体血液之间的物质交换模式图 (引自成令忠, 1994)

内细胞层次较多的（如有蹄类家畜）比层次较少的（食肉类和灵长类）屏障作用大。

通常情况下，细菌不能通过绒毛进入胎儿血液中。但当某些病原体（如结核杆菌）破坏了胎盘时，病原体可通过绒毛进入胎儿血中。此外，胎盘对细菌的屏障作用随着妊娠期的不同而有所变化。在有蹄类家畜的妊娠后期，细菌可以通过胎盘，如在牛的胎膜、胎盘和胎儿器官中能检测到布氏杆菌。病毒、噬菌体及分子质量小的蛋白质也可通过胎盘进入胎儿。

在抗生素中，青霉素可少量通过胎盘，氯霉素能自由通过，土霉素能通过猪的胎盘，但是不能通过牛的胎盘。乙醚、氯仿、酒精、樟脑、水杨酸、松节油、阿托品、毛果芸香碱、番木鳖碱和砷等药物也可通过胎盘。

有些母体抗体可以通过胎盘，从而使胎儿获得被动免疫（图 8-17）。抗体亦可在出生后通过初乳传递给新生仔畜，或者两种方式均有。在牛、羊、马等家畜，母体的抗体不能透过胎盘，只能通过初乳被动传递免疫。人、猴、豚鼠和家兔等母体的 IgG 可通过胎盘传给胎儿。家兔胎儿早期亦可通过卵黄囊从子宫分泌物中吸收抗体。犬、猫、猪、大鼠和小鼠通过胎盘接受少量抗体，大部分抗体则来自初乳。

二、胎盘的免疫功能

胎盘组织可被看作是一种同种异体移植物，因为胎盘组织中有一部分是来自胎儿，它与母体自身的组织不同。然而，母体对胎盘并不发生类似的同种移植免疫排斥反应。有人将胎盘的滋养层组织移植到另一动物体内后，未发生免疫排斥反应。相反，当移植胚胎组织后，则发生了典型的免疫排斥反应。据此，人们有三种推测，一种观点认为是胎盘滋养层的组织抗原性极微弱，可防止母体的免疫性排斥；另一种见解认为，在滋养

层细胞膜外，覆盖一层带阴性电荷的唾黏蛋白，其对母体的免疫活性细胞构成化学屏障，唾黏蛋白表面的阴性电荷排斥母体淋巴细胞，阻断了绒毛膜抗原与母体淋巴细胞的接触。如果用神经氨酸酶破坏这种唾黏蛋白层，滋养层释放出移植抗原，即发生免疫排斥反应；还有人认为，胎儿淋巴细胞反复进入母体，从而使母体对胚胎产生了免疫耐受性。

近来发现，动物妊娠时黄体或胎盘产生的孕酮，以及人和灵长类动物胎盘分泌的绒毛膜促性腺激素（hCG）都能使母体耐受胎盘组织中来自父本的组织相容性异体抗原，使胎儿不受母体的免疫排斥。

近年来研究还证明，胎儿滋养层细胞不表达经典的人白细胞抗原（HLA）- I 和 II，仅表达一种新的 HLA- I 类抗原，后来将该抗原的基因命名为 HLA-G 位点。HLA-G 代表 HLA 抗原表达在母体和胎儿界面上，但不使母体排斥胎儿，这说明 HLA-G 在母-胎免疫耐受中有重要意义，可以保护带有父本同种异体抗原的胚胎免受母体免疫系统的排斥。HLA-G 还能与 NK 细胞的抑制性受体结合，然后传入抑制信号，阻止 NK 细胞对胚胎的破坏作用，从而使胚胎免受排斥。

胎盘复杂而有序的功能需要周密的调控，细胞因子（Th1 型和 Th2 型）对胎盘功能调控起着重要作用。Th1 型细胞因子主要是促进细胞免疫，Th2 型细胞因子主要参与体液免疫。动物妊娠时，母体 Th2 型细胞因子参与的体液免疫占主导。有人通过体外实验证明，IFN- γ 可抑制滋养层细胞的生长，IFN- γ 与 TNF- α 可协同抑制胚胎与胎儿的生长发育。胎盘组织中 Th1 型细胞因子过多可导致妊娠动物习惯性流产、胎儿宫内生长迟缓及死胎等病理变化。

三、胎盘的造血功能

早在 1974 年就发现，人脐血中含有大量的造血干/祖细胞（HSC/ HPC），并且在早期胎盘中造血干细胞的含量比骨髓中高。经典学说认为，胎儿期造血可分为三个阶段，即中胚叶造血期，肝、脾造血期和骨髓造血期。骨髓是胎儿在妊娠晚期及出生后的主要造血器官。足月胎儿脐血中的造血细胞似乎来源于骨髓。通过对脐血的研究发现，出生前后骨髓的结构并没有发生很大改变，但与脐血相比，新生儿外周血中的 HSC/ HPC 却明显下降。由此推测，胎儿晚期脐血中的 HSC/ HPC 可能来自胎儿胎盘。无论是 CD34⁺ 细胞还是更为原始的 CD34⁺/ CD38⁺ 细胞的含量，均是脐静脉血（由胎盘流入胎儿体内）高于脐动脉血（由胎儿流出到胎盘）。这表明脐静脉血中至少有部分造血干细胞可能来自胎盘绒毛膜。对 6 个月以后的胎盘、脐和母体血中的 CD34⁺ 和 CD38⁺ 细胞研究发现，这两种细胞的数量在胎盘血中最高，其次是脐带血，母体血液中最低，这也说明胎儿的 HSC/ HPC 来源于胎盘；而成熟的粒细胞、红细胞和血小板则来源于胎儿骨髓。对小鼠胎盘造血功能的研究表明，胎盘造血起始于 10 日龄胚胎的绒毛膜，第 14 日龄达高峰，第 18 日龄时消退。此外，在胎盘绒毛膜间质中有核细胞组成的造血岛及 CD34⁺ 细胞，在妊娠 8~10 周间的胎盘绒毛膜中含量最多，以后逐渐减少。上述研究结果表明，在卵黄囊造血逐渐消退而胎儿肝脏或骨髓造血功能尚未形成前，胎盘绒毛膜是造血的重要器官。

四、胎盘的新陈代谢功能

胎盘组织内具有丰富的酶系统，在胎盘中发现了所有的已知酶类。例如，已发现人胎盘中约含 800~1 000 种酶，其中有氧化-还原酶类、转移酶类、水解酶类、异构酶类、溶解酶类及综合酶类等，而且一般活性都极高。因此，胎盘组织具有高度生化活性和广泛的合成与分解代谢功能。胎盘能从乙酸或丙酮酸合成脂肪酸，从乙酸盐合成胆固醇，亦能从简单的基础物质合成核酸及蛋白质；并具有葡萄糖、戊糖磷酸盐、三羧酸循环及电子转移系统。所有这些功能对胎盘的物质交换及激素合成都有重要的作用。

此外，胎盘不同部位含有的成分不同，如细胞滋养层、间质及蜕膜中有糖原存在，而合体滋养层细胞内则没有。合体滋养层和蜕膜细胞内有脂类物质存在，但细胞滋养层内则没有。铁在合体与细胞滋养层内都可检测到，但蜕膜细胞内则检测不到。

胎盘的代谢受许多因素影响，如外源激素及细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 TGF 、 $\text{IFN-}\alpha$ 和 $\text{IFN-}\gamma$ 等。胎盘本身合成的激素也可以对其功能实施调控。

五、胎盘的物质转运功能

绒毛膜的绒毛和微绒毛，增加了胎儿与母体的接触面积，有利于胎儿和母体间的物质交换。由于动物种类不同，胎盘的类型和结构差异很大，转运功能也不一样，而且胎盘的转运功能受许多因素影响，其中包括母体营养水平等。

（一）胎盘转运物质的种属间区别

各种动物胎盘结构间的区别是由于母体和胎儿血液循环间的组织层数和厚度不同。有些动物，绒毛膜尿囊胎盘的滋养层组织是由细胞滋养层组成的，另外一些动物则是由合体滋养层组成的；有的是单层细胞，而有的则是多层细胞。滋养层的微绒毛和基底细胞膜一般被认为是胎盘转运物质的关键因素。已经证明，胎盘中胎儿的毛细血管内皮可阻止兔胎盘转运铁蛋白，限制羊胎盘转运白蛋白和豚鼠胎盘转运辣根过氧化物酶和游离的血红蛋白。

此外，动物间胎盘结构的另一个不同点是，绒毛膜尿囊胎盘中胎儿血管的排列方式，有些动物胎儿的血管在绒毛膜尿囊胎盘内呈屈曲状；有些则形成树枝状或是形成毛细血管网。胎儿血管的排列方式不同是影响动物间胎盘物质转运差异的又一个因素。

除上述差异外，不同种动物母体和胎儿胎盘的血液关系不同，也是影响动物间胎盘物质转运差异的因素。在一些动物，二者是并流的，而在另一些动物是逆流的。这种不同的血液关系，使胎盘通过的物质不同。例如，呼吸气体经胎盘的转运量受血液流向的限制，而不受气体在血流中的溶解度影响。

尽管不同种动物之间胎盘转运物质的机制相同，但不同种动物间每单位重胎盘对某些物质的弥漫性渗透量不同。例如，铁和 IgG 可以通过受体介导转运系统，穿过人滋养层。然而，铁只能经降解的红细胞通过羊的胎盘，IgG 则根本不能经羊胎盘转运。

有些动物，除绒毛膜尿囊胎盘外，绒毛膜的其他区域也参与母体-胎儿的物质交换过程。在灵长类动物，IgA 和其他蛋白质经绒毛膜从母体循环进入羊水；啮齿类动物的卵黄囊胎盘使得胎儿从子宫腔内吸收免疫球蛋白。这一途径也有利于钠、钙和氨基酸的转运。

(二) 选择性的物质转运

胎儿绒毛膜与子宫内膜紧密接触，彼此以半透性膜隔开。有些物质可以自由通过此膜，有些物质须经改变结构才能通过（图 8-17）。半透性膜对某些物质的通透性伴随着孕期的加长而改变。而且，根据被转运物质的性质及胎儿需要，胎盘能采取不同的转运方式。

1. 转运方式

(1) 单纯扩散

物质自高分子浓度区移向低分子浓度区，直至双方取得平衡为止，这种方式称为单纯扩散（simple diffusion）。如 CO_2 、 O_2 、水、电解质等均以这种方式转运。

(2) 易化扩散

如果以分子量计算某些物质的转运率，而转运超过单纯扩散所能达到的速度时，称为易化扩散（facilitated diffusion）。此转运过程是，被转运的物质与细胞膜上的特异性受体结合，通过膜蛋白的变构，以极快的速度，将结合物从膜的一侧带到另一侧。如葡萄糖、氨基酸及大部分水溶性维生素都以易化扩散的方式转运。

(3) 主动转运

主动转运（active transport）是某些物质在胎儿体内的浓度高于母体，但该物质仍能由母体进入胎儿体内，这可能是由于胎盘细胞内酶作用的结果。氨基酸、无机磷酸盐、血清、铁、钙及维生素 B_1 、 B_2 和维生素 C 等都是主动转运的。

(4) 大量转运

大量转运（bulk transport）是使某些可溶于水的物质简单而迅速地通过胎盘的一种转运方式。

(5) 胞饮作用

极少量的大分子物质，如免疫活性物质及免疫过程中重要的球蛋白等借助这种胞饮作用（pinocytosis）转运。

有关胎盘对某些物质有选择性转运的机制并不完全清楚，目前只笼统地认为是通过胎盘的“屏障作用”而实现的。有人认为，围绕着血管的结缔组织（胶原纤维和网状纤维）可能形成严密的屏障，一些物质可以不经改变，从母体血液经过胎盘进入胎儿血液，或者相反；而另一些物质则不能通过，或者经过生物化学改造，变为简单的物质后才能通过。

2. 转运的物质种类

(1) 葡萄糖

D-葡萄糖主要以加速扩散方式转运。在牛、马、羊、猴和人等许多动物，胎儿血

中 D-葡萄糖浓度低于母体，当羊母体动脉血中 D-葡萄糖浓度在生理范围内升高时，D-葡萄糖经胎盘的净转运率迅速升高。当母体血液中 D-葡萄糖浓度超出生理浓度范围时，胎盘转运系统处于饱和状态。

很早人们便知道，羊胎盘对果糖、 α -甲基-D-吡喃-葡萄糖和 L-葡萄糖的渗透性较 D-葡萄糖差，而对其他单糖，如 3-甲基-D-吡喃葡萄糖 (3MeG) 的渗透性较高。随妊娠期增加，羊胎盘内葡萄糖转运器 (glucose transporter) 浓度升高，胎盘转运葡萄糖的能力也加强。但目前还未见有半乳糖经猪胎盘转运的报道。

由于胎盘代谢葡萄糖而使其转运复杂化，有人测定子宫循环中损失的和进入脐带血中的 D-葡萄糖时发现，子宫和胎盘消耗大量的从子宫循环中移出的 D-葡萄糖。因此，在正常条件下，只有进入胎盘组织中的 D-葡萄糖的 28% 被胎盘转运出去。

妊娠中期的母羊中，每个胎儿胎盘净转运葡萄糖的量约是 2mg/min ，而胎盘消耗的葡萄糖约是 8mg/min 。随着妊娠时期增长，胎盘对葡萄糖的净转运量和消耗量都增加，而且胎盘净转运量约从 20% 增加到 30%。然而，羊胎盘净转运 D-葡萄糖的量在妊娠后 30 天内未见增加。

在妊娠末期，胎儿的葡萄糖净转运率为 $4.8 \pm 0.3\text{mg}/(\text{min} \cdot \text{kg})$ 胎儿体重，胎儿葡萄糖的利用率为 $5.6 \pm 0.5\text{mg}/(\text{min} \cdot \text{kg})$ 胎儿体重。研究表明，尽管羊在妊娠期的最后一个月内胎盘对葡萄糖的净转运量不增加，但在饲养良好的临产羊中，葡萄糖经胎盘的转运量完全可以满足胎儿的需要。

(2) 乳酸盐

在人和豚鼠，乳酸盐经胎盘的易化扩散作用进行转运。豚鼠胎盘对 L-乳酸盐的恒态渗透率比 D-乳酸盐高出 3 倍，并且和丙酮酸竞争，但不和 D-葡萄糖竞争。因此，乳酸盐的转运表现为标准的易化转运。然而，有迹象表明，乳酸盐和氢离子间存在协同转运，并且乳酸盐可能是以乳酸的形式经胎盘转运的。

在生理条件下，胎盘每分钟约产生 $150\text{ }\mu\text{mol}$ 的乳酸盐，并释放入脐静脉和子宫静脉。在大鼠，L-丙氨酸是乳酸的前体。乳酸盐从羊胎盘到脐血管的净转运量不受母体动脉血中乳酸盐浓度的影响。从胎盘转运到近分娩期羊胎儿血液中的乳酸盐的量约为 $1.5 \sim 2.0\text{mg}/(\text{min} \cdot \text{kg})$ 胎儿体重。在营养良好的羊胎儿中，乳酸盐的总转化量和利用率大于从胎盘转运到胎儿的量，说明胎儿和胎盘都能合成乳酸盐。这些乳酸盐可以满足胎儿机体的需要。

怀孕中期母羊每个胎盘每分钟产生 $38\text{ }\mu\text{mol}$ 乳酸盐，这比妊娠末期的产生量少，并且几乎全部释放到母体血液中。

(3) 氨基酸

许多种氨基酸以主动转运方式进入胎儿体内。在许多种动物，胎儿体内 α -氨基氮 (α -amino nitrogen) 浓度高于母体。胎盘细胞内氨基酸的浓度高于母体或胎儿血中浓度。羊胎盘对支链氨基酸的利用率比其他氨基酸高，并且在绝食时，这种利用率升高。人滋养层绒毛膜囊对未代谢的 α -氨基丁酸盐的吸收很迅速。

有人曾经认为，胎盘转运氨基酸只是在滋养层细胞质膜的母体面发生的主动转运过程。后来发现，氨基酸是经滋养层细胞质膜的胎儿面渗透到胎儿体内的。有迹象表明，在豚鼠胎盘的胎儿面出现氨基酸载体。豚鼠从母体向胎儿的转运速度比向反方向的转运

要快。

在氨基酸的转运过程中，每组氨基酸之间存在竞争性抑制。豚鼠胎盘中的丝氨酸、胱氨酸和亮氨酸系统起作用，丙氨酸系统不起作用。目前还未在胎盘组织中发现酸性和碱性氨基酸的转运系统。

丙氨酸的氨基酸主动转运系统依赖于电化学钠梯度，膜外浓度高于膜内。这种梯度由位于滋养层基底外质膜的 $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATP}$ 酶活性维持。胎盘可在有氧或厌氧条件下转运氨基酸，但无能量时主动转运停止。当实验性地减少豚鼠和大鼠母体胎盘的血流率时，氨基酸的转运量减少。

妊娠后期的羊中，氨基酸净转运入脐血液的量有几个重要的特点，首先，酸性谷氨酸的净转运量是负值；其次，净转运进脐血中几种中性和碱性氨基酸的量超出了胎儿生长的需要量。最后，胎盘对碱性氨基酸的净转运量是正值，这些氨基酸在母体内的浓度高于胎儿。

人妊娠第 18~21 周时，胎儿脐动脉和脐静脉血中某些氨基酸的浓度显著不同。这表明胎儿至少吸收了甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和组氨酸。与其他氨基酸比较，在人妊娠中期和猴妊娠末期，胎儿血中的半胱氨酸浓度低于母体。

在羊和灵长类，谷氨酸经胎盘转运的过程和豚鼠不同。尽管羊和灵长类胎儿脐静脉血中谷氨酸浓度高于母体，但是在生理浓度时，胎盘不渗透谷氨酸。相反，脐带血中的谷氨酸反转运至胎盘。谷氨酰胺则由胎盘释放入脐带血液中。

(4) 蛋白质和其他大分子物质

除了某一类免疫球蛋白和视黄醇结合蛋白外，灵长类动物经胎盘向胎儿转运放射性碘标记的蛋白质的量很少。研究证明，人胎盘的胎盘通道非常小，不能通过白蛋白，也可阻止许多蛋白质通过。

电镜观察结果表明，胎盘的毛细血管壁限制胎盘转运大的或中等大小的分子，在滋养层的胎儿面即使对微小的过氧化物酶和细胞色素 C 等也形成限制屏障。在绵羊，甚至很小分子质量的蛋白质都不能通过其胎盘。

灵长类和啮齿类动物的胎盘可向胎儿转运大量 IgG。在灵长类，IgG 通过绒毛膜尿囊胎盘，而啮齿类动物则经卵黄囊吸收 IgG 并通过卵黄囊转运。卵黄囊转运自身 IgG 的速度比转运外源性 IgG 快。灵长类和啮齿类动物胎盘转运 IgG 的第一阶段，都是经受体介导的吞噬作用完成的。羊不向胎儿转运 IgG。

绒毛膜尿囊胎盘的微绒毛膜上含有 Fc 受体，并将 IgG 吸收入胎盘组织。电镜观察表明，IgG 被吸收入绒毛的小泡中。在绒毛干血管内皮上存在的 IgG 受体可能对 IgG 穿过内皮转运起重要作用。所有的 IgG 亚类都可通过胎盘，但其他免疫球蛋白则不能，偶尔胎儿体内的 IgG 浓度高于母体。

(5) 脂类

游离脂肪酸可通过灵长类动物、大鼠、兔和豚鼠的血液绒毛膜胎盘，但很少通过绵羊的上皮绒毛膜胎盘。人分娩时，母体内多数脂肪酸的浓度高于胎儿，脐静脉中的高于脐动脉。胎儿体内花生四烯酸的浓度也高于母体。

豚鼠以不同的方式处理来自母体血液的游离脂肪酸和甘油三酯。经转运进入豚鼠胎儿血液的游离脂肪酸，很快在胎儿肝脏酯化成甘油三酯。甘油三酯既不向胎儿转运也不

向母体转运。由于脂蛋白脂酶只出现在胎盘的母体侧，胎盘不能将胎儿血中的甘油三酯转化成游离脂肪酸。

(6) 脂蛋白-胆固醇

血中胆固醇几乎全部由脂蛋白颗粒携带。母体静脉血中脂蛋白-胆固醇总浓度是妊娠末期混合脐带血中的 4 倍。人脐静脉血中总脂蛋白-胆固醇的浓度比脐动脉血中高 80%。人滋养层细胞以渗透及受体介导的方式吸收低密度脂蛋白-胆固醇，但不吸收高密度脂蛋白-胆固醇。

(7) 甘油和甲酮

在人、大鼠和兔中，母体血中甘油浓度高于胎儿。羊脐动脉和脐静脉血中的甘油浓度显著不同。人、大鼠、兔和羊的胎盘可经扩散方式转运甲酮。在羊脐动脉和脐静脉血中 β 羟丁酸的含量也不同，这与母羊饲喂前后动脉血中 β 羟丁酸浓度有关。

(8) 单价阳离子

阳离子钠经血绒毛膜转运和经上皮绒毛膜胎盘转运的转运率和转运机制都不同。羊、豚鼠和人母体自胎儿单向转运钠，直到分娩前才停止。在妊娠中期，猪每克胎盘转运的钠是其最大转运量的 40%，而猫在妊娠同期转运的只有最大值的 5%。其次，不同种动物间，每克胎盘钠的流量有很大不同。鼠的流量比猪高出 300 倍，其他动物处于二者之间。血绒毛膜胎盘至少是非血绒毛膜胎盘钠转运量的 10 倍。

羊母体和胎儿血中钠含量不同。经合体滋养层胎盘被动转运钠必须依赖细胞间横穿滋养层的通道。合体滋养层细胞内钠的浓度低，在胎儿面含有 $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATP 酶}$ ，维持细胞内负电位。

猪胎盘对钠的转运量受胎儿胎盘 β 肾上腺素刺激而增加，并且受刺激后的钠净流量随血流量的增加而增加，并与胎盘的电位差有关。不同动物间这种电位的差异很大。大鼠为 15mV，胎儿是正极；而绵羊胎儿是负极，电位差为 34mV；人分娩前胎儿是负极，电位差为 2.7mV，分娩时电位差为 0。大多数钠穿过猪上皮绒毛膜胎盘，并且受内分泌调节。另一方面，血绒毛膜胎盘经细胞旁通道以单纯扩散方式转运大量钠，少量钠经主动转运完成。

(9) 钾和铷

羊和豚鼠的胎盘对钾的渗透量比钠高 2~3 倍。钾经载体介导转运并被合理控制。首先，钾在胎盘两侧的浓度不同，人和豚鼠胎儿侧高于母体侧，大鼠和羊则有时母体侧高于胎儿侧。钾离子在转运过程中和细胞内钾离子维持平衡。铷从胎儿向胎盘的流量受毒毛旋花苷抑制。此外，人滋养层绒毛在铷的转运过程中伴随钠及氯化物的交换，大鼠胎盘转运钾的过程和母体-胎儿电位差间联系有关。

(10) 阴离子

绵羊和恒河猴的胎盘对氯化物的扩散性稍高于钠。胎盘对氯化物的转运是经自由扩散方式完成的。在人母体微绒毛表面，可发生氯化钠和钾的相互交换。溴化物经绵羊胎盘的扩散量比氯化物多 1.5 倍，比钠多 2.5 倍。在羊和豚鼠，胎盘对溴化物的渗透量较大，这相对缩短了其在母体和胎儿间的平衡时间。人母体血浆中氟化物浓度高于胎儿，由母体向胎儿的扩散量高于由胎儿向母体的扩散量。人胎盘对氟化物的转运是经主动转运方式完成的。碘经胎盘转运是由载体介导的，而且可能是一个主动过程。绵羊母体-

胎儿和胎儿-母体方向扩散的碘量比值通常是不一样的，这说明碘化物是经主动运输转运的。

胎盘含有能代谢甲状腺素的酶，这使得来自甲状腺素的碘，有机会释放入胎盘中。在分娩期，人胎儿血中硫酸盐浓度高于母体。一些硫酸盐以载体介导的方式从胎盘转运，并且通过和碳酸盐或其他离子的交换完成转运过程。

(11) 钙和磷

母体以主动转运方式将钙和磷转运给胎儿。豚鼠、大鼠、绵羊和人分娩期，胎儿血中钙浓度超出母体，其中羊、大鼠和人胎儿游离钙离子浓度也高于母体。豚鼠、人和羊胎儿血中磷酸盐的浓度同样也超出母体。

钙和磷是单向转运的。钙从母体血液单向转运至胎盘的量，低于胎儿转运至胎盘的量。钡、镍 (Ni)、锶 (Sr)、镁和脂类均可阻断钙的运输，但其抑制能力依次下降。因此，在豚鼠母体和胎儿滋养层细胞表面出现钙的主动运输。

钙的主动转运不需要通过胎儿滋养层进行钠-钙交换。当母体钙浓度增加 1 倍时，钙的转运量降低；但是当脐血中钙的浓度在 $0.1 \sim 3 \text{ mmol/L}$ 范围内变动时，母体向胎儿的转运量和净转运量都不变。

羊每天从母体向胎儿转运的钙量为 215 mg/kg 胎儿体重，而胎儿向母体的转运量为每天 12 mg/kg 胎儿体重。猴母体每天向胎儿单向转运钙的量为 391 mg/kg 胎儿体重，而胎儿向母体的转运量为 326 mg/kg 胎儿体重。

一个 60g 重的豚鼠胎儿，从母体单向流入胎盘细胞的磷量为 $0.97 \mu\text{mol/min}$ ，从胎盘细胞单向流入胎儿血流的磷量为 1.0 pmol/min ，除去胎儿向母体的流量则无机磷通过豚鼠胎盘的净流量为 $0.7 \mu\text{mol/min}$ 。这个值和同等大小豚鼠胎儿对无机磷的潴留量相似。尽管人和豚鼠的胎盘都有 Ca^{2+} -ATP 酶，在基底外侧和刷状缘分别有碱性磷酸酶活性，但活体内每种酶的调节对豚鼠胎盘钙和无机磷的转运没有影响。

与对照羊相比，当缺乏降钙素时，由妊娠末期母羊流入胎儿体内的钙增加两倍。 1α -羟基维生素 D_3 可增加钙和磷的流量，而降钙素则可降低从母体流入胎儿的钙量。另外，母体促乳素也能增加钙的流量。

(12) 微量元素

血绒毛膜胎盘转运铁的机理和非血液绒毛膜胎盘不同。在人、恒河猴、大鼠、兔和豚鼠中，铁的转运是逆浓度梯度进行的。在具有血绒毛膜胎盘的动物中，铁以主动转运过程在胎盘蓄积，这种过程需要能量，并且在缺氧时受抑制。在铁的转运过程中，首先是母体血中的铁和母体转铁蛋白 (transferrin) 结合，并与胎盘细胞膜上的特殊转铁蛋白受体相接触。然后，铁进入细胞质并再次与一或多个包括胎盘转铁蛋白和铁蛋白 (ferritin) 在内的小分子质量蛋白紧密结合。铁和蛋白结合后穿过滋养层细胞质，经过基底膜和胎儿毛细血管内皮，释放入胎儿循环，并和胎儿转铁蛋白结合。

大鼠在妊娠第 14~20 天对铁的转运量增加，这可能是转铁蛋白的受体增加以及运输铁的机制完善所致。兔胎盘在妊娠 21 天时吸收铁的量开始增加。豚鼠在妊娠 25 天后，由母体向胎儿转运铁的量增加，妊娠 54 天时达最高值，到妊娠期满后 (65 天) 明显减少。一般来说，胎儿参与控制从胎盘吸收的铁量，但很少参与控制铁的排出过程。

妇女妊娠第 140 天时，每天经胎盘转运铁的量 of $17 \mu\text{mol}$ ，至分娩时增加到每天

90 μmol 。人胎盘在妊娠 100 天前蓄积非血红素铁，并直到妊娠 150 天才达到并维持稳定的浓度，150 天后人胎盘铁含量开始下降。

分娩时，人脐带血中锌总量及蛋白结合锌含量高于母体中相应含量，但母体中游离锌高于胎儿，表明锌是由被动转运进入胎儿体内的。

血绒毛膜胎盘转运铜的机制尚不清楚。妊娠末期脐带血中铜的含量约是母体的 15%，胎儿血清中游离铜的含量也较低，这说明铜是通过被动扩散方式经胎盘转运的。在人妊娠第 28~36 周间，胎儿每天积累铜的量为 80~90 $\mu\text{g/kg}$ 胎儿体重。

(13) 维生素

鼠母体血清中维生素 A 的含量与胎儿相同或微低于胎儿。然而，人、恒河猴和绵羊母体维生素 A 的含量则高于胎儿。妊娠末期绵羊每天由母体向胎儿单向转运的氚标记的维生素 A 为 263 μg ，大约是由胎儿每天向母体转运量 (52 μg) 的 5 倍。这说明维生素 A 经被动扩散通过胎盘，这是脂溶性维生素通常转运的一种方式。

在人、豚鼠和大鼠，维生素 C 经胎盘转运的机制是载体介导的和能量依赖性的。事实上，多数水溶性维生素都以此种方式转运。豚鼠胎儿血中维生素 C 含量稍高于母体。但在人中，维生素 C 的转运过程是需要能量的及钠依赖性的，并需要 Na^+/K^+ -ATP 酶的参与。葡萄糖与维生素 C 竞争共同的载体。

分娩时，人母体血清中三种主要的维生素 D_3 代谢物为 25-羟基维生素 D_3 (25-OHD)、24, 25-二羟基维生素 D_3 (24, 25-OHD) 和 1, 25-二羟基维生素 D_3 (1, 25-OHD)，它们在母体中的浓度均比胎儿体内相应物质的浓度高。而且，胎儿中 25-OHD 和 24, 25-OHD 的浓度与母体相应物质的浓度相关。这说明 25-OHD 和 24, 25-OHD 是经被动扩散作用通过胎盘进入胎儿血液循环的。人和大鼠的胎盘都能将 25-OHD 转化成 1, 25-OHD。由此认为，1, 25-OHD 并非由母体经胎盘转运给胎儿的，而是由胎盘本身产生的，并可以满足胎儿的需要。因为 25-OHD 比 1, 25-OHD 更容易和蛋白质结合，所以与蛋白质结合被认为是影响这两种维生素 D 代谢物转运率的重要因素。

人胎儿血液中维生素 B_{12} 的含量高于母体，说明维生素 B_{12} 是经主动转运方式通过胎盘的。此外，维生素 B_{12} 的转运受镉抑制。现已从人胎盘分离出了维生素 B_{12} 表面膜受体。维生素 E 经胎盘转运的速度较慢，只是 L-葡萄糖的 10%。

胎儿血中维生素 H、维生素 B_1 、维生素 B_6 泛酸盐和烟酸盐的平均水平高于母体。这说明水溶性维生素是经胎盘主动转运的。

3. 气体转运

氧、二氧化碳和一氧化碳以单纯扩散方式通过胎盘。然而，如果考虑到气体与血红蛋白间的相互作用、子宫和脐循环的血流量以及每种气体对其他气体和血红蛋白相互作用的影响，气体的转运机制就显得很复杂。

(1) 一氧化碳

一氧化碳与二氧化碳不同，在子宫静脉和脐静脉末梢的浓度和在动脉中的浓度之比无明显差别。降低母体或胎儿的血流速度，也不会改变二者的浓度。

随着绵羊和豚鼠妊娠的进展，胎盘对一氧化碳的扩散力增加。这种趋势说明随妊娠期增加，胎盘渗透屏障变薄，胎盘表面积也增加。一氧化碳的扩散力随运动量的增加而

降低。

(2) 氧

氧从母体循环到胎儿循环的转运比一氧化碳复杂得多。一氧化碳的转运通常受扩散量限制，而氧的转运受血流速度的限制。因此，母体和胎儿的血流率以及母体和胎儿循环中血红蛋白量及其与氧的亲合力，在决定氧通过胎盘的净流量方面，要比胎盘的表面积及其屏障的厚度更重要。氧经由胎盘的转运受子宫血流量限制。氧从母体向脐带血中的净流量和子宫血流量相关。

因为氧和二氧化碳在水中的弥散系数相似，当这两种气体弥散在水性介质中后，通过胎盘屏障膜的能力相同。每种气体弥散的有效力可由微绒毛间隙和胎儿毛细血管内血浆水分间气体分压的不同来表示。胎盘的母体侧和胎儿侧的氧分压 (PO_2) 不仅取决于血流量和胎盘对气体的转运率，而且还取决于母体和胎儿血中血红蛋白对氧的亲合力。

如果胎儿与成年动物的血红蛋白对氧的亲合力相同，脐静脉血中氧饱和度就更高。脐静脉血中较高的血氧饱和度使胎儿获得足够量的氧，而较低的胎儿端毛细血管氧分压使得胎儿组织氧分压低。组织和末梢毛细血管氧分压低对胎儿正常发育很必要。

绵羊脐静脉氧分压总是低于母体子宫静脉，这说明胎盘血流的同步性。然而，许多试验证明，胎儿与母体的血流模式并非同步进行，而是交叉流动的。在绵羊，胎儿胎盘与母体胎盘的血流是同步流动的，而在兔、豚鼠则是交叉流动的，但在人和恒河猴的胎盘则没表现出交叉流动机制。

胎盘、子宫肌层和子宫内膜都要消耗氧，但消耗的是来自子宫循环的氧，而不是转运到胎儿的氧。子宫和胎盘约消耗妊娠子宫从母体循环摄取氧总量的一半，其余部分作为净流量转运至脐循环。

(3) 二氧化碳

羊胎儿每代谢 1 mol 的氧，约产生 0.94 mol 的二氧化碳，并经胎盘进入母体循环。因为胎儿和母体红细胞中的二氧化碳在碳酸脱氢酶的作用下，可与碳酸氢根离子形成离子平衡，并产生少量的未分解的碳酸和碳酸盐，所以二氧化碳通过胎盘的弥散比氧更复杂。此外，二氧化碳经胎盘的转运可能不仅是气体的弥散，而且还可能是带电荷的碳酸氢根离子 (HCO_3^-) 的弥散。胎儿二氧化碳分压 (PCO_2) 低于母体，表明碳酸根离子不参与二氧化碳经胎盘的净转运。

因为氧和二氧化碳都可与血红蛋白进行可逆性结合，分别形成碳氧血红蛋白 (carboxyhemoglobin) 和氨基酰血红蛋白 (carbaminohemoglobin)，并且每种气体和血红蛋白的结合率受另一种气体结合率的影响，所以一种气体经胎盘的交换可提高另一种气体的交换率。

母体与胎儿毛细血管的血流量和二氧化碳交换率成正相关，也就是说，二者中任一流量的增加或降低都能使二氧化碳交换率升高或降低。事实上，在羊脐静脉血中二氧化碳分压升高的同时，伴随着子宫血流量的急速下降。同样，二氧化碳经胎盘的交换和胎盘对二氧化碳的弥散力无关，而是受血流限制的。

4. 胎儿代谢产物

胎儿将二氧化碳、一氧化碳、尿素、胆红素和胆汁酸盐经胎盘排出 (图 8-17)。胎

儿生长需要消耗氮，但氮代谢后的废物须经子宫排出。除大鼠外，人、豚鼠和绵羊胎儿肝脏都能产生尿素。正常羊胎儿血流中，尿素的浓度约为 0.3mg/ml ，约高出母体值 0.04mg/ml 。通常认为，尿素以限制性弥散方式经胎盘转运，每分钟经胎盘从胎儿向母体约转运 0.5mg 尿素/kg 胎儿重。

5. 水

尽管随妊娠期增加，每单位胎盘和胎儿体内水含量下降，但胎儿每天对水的需求量高于其他任何溶质。尿囊绒毛膜胎盘对水的转运无明显屏障作用，因为胎盘两面的单向转运量都很大，并且经胎盘的净流量几乎可以代表母体向胎儿转运水的总量。在母体血浆和羊膜之间，也有水的双向交换，约完成母体和胎儿水交换的 $1/10$ ，几乎这种流量的 50% 是经非胎儿途径完成的。胎儿经吞咽羊水、产生尿和废液来维持水分平衡。妊娠早期的水分经皮肤排出，而晚期经脐带排出。

在绵羊和灵长类动物，水的单向转运受血流量限制。引起水经胎盘转运的力有渗透力和流体静力。许多研究证明，母体-胎儿或母体-羊膜的水交换过程也受激素控制。

六、胎盘的内分泌功能

虽然胎盘只是一个暂时性的内分泌器官，但它却具有多种内分泌功能，并且可有效地调节胎儿和母体间内分泌平衡。已证实，胎盘能够分泌孕激素 (progestin)、雌激素 (estrogen) 及胎盘促乳素 (placental lactogen, PL)，而且可根据动物种类不同，产生不同的绒毛膜促性腺激素 (chorionic gonadotropin)，如马的绒毛膜促性腺激素 (eCG)、驴的绒毛膜促性腺激素 (dCG) 和绵羊的绒毛膜促性腺激素 (oCG)。此外，人胎盘还可以产生人绒毛膜促性腺激素 (hCG)、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、促黄体素释放激素 (LHRH) 和促甲状腺激素释放激素 (TRH)。

(一) 妊娠早期

在人妊娠第 8 周，初级胎盘开始产生孕激素。在几种动物的着床前胚泡内都含有类固醇。并且，这些胚泡可将孕烯醇酮转化成孕酮，并将雌酮转化成雌二醇。经研究发现，胚泡可以合成类固醇，也可进行雄激素的生物合成及芳香化成雌激素。妊娠早期胚胎能将胆固醇转化成孕烯醇酮，并将脱氢雄烯酮转化成雌激素。

1. 孕马 (驴) 血清促性腺激素

Cole 和 Hart 于 1930 年首次发现在妊娠 40~130 天的母马血液中，含有一种促性腺激素，具有促卵泡素和促黄体素的双重作用。孕马血清促性腺激素 (PMSG，现在称 eCG) 于妊娠 40 天开始在血液中出现，第 60 天时迅速增加到 $50\sim1000\text{IU/ml}$ ，这种浓度可维持 40~65 天，然后逐渐下降，到妊娠第 160~180 天时完全消失。eCG 是由妊娠母马的子宫内膜杯分泌的。子宫内膜杯是由胚胎滋养层带 (trophoblastic girdle) 侵入子宫内膜细胞后形成的。

孕驴和孕羊中 dCG 和 oCG 的分泌量、分泌时间和产生部位与马的相似。

eCG 合成量的多少与子宫内膜杯的发育、退化和消失过程相一致。血中 eCG 含量的多少受许多因素的影响，其中胎儿遗传型是影响 eCG、eCG、oCG 和 hCG 分泌量的重要因素。在研究威尔士矮马的 eCG 和母驴的 dCG 的变化情况时发现，孕马 eCG 出现的最早时间是在妊娠第 37~41 天之间，在妊娠第 97~120 天时逐渐降至检测不到的水平。孕驴中 dCG 的峰值水平较马低，但维持时间较长。dCG 首次出现及消失的时间与 eCG 并无差异。

2. 人绒毛膜促性腺激素

人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 是由人或非人灵长类动物的合体滋养层细胞所分泌的。这种细胞的内质网发育良好，hCG 在粗面内质网的网池内浓度很高。

滋养层具有使 hCG 糖基化的能力。滋养层可能是体内惟一能使 hCG 糖基化的组织，特别是在动物胚胎的生长早期，滋养层组织能使几种蛋白质糖基化。

胎盘合体滋养层细胞的粗面内质网上的核蛋白体可合成 hCG。hCG 由 α 和 β 亚基构成。在细胞合成 α 和 β 亚基时，首先合成独立的前 α 亚基 (前肽由 24 个氨基酸组成) 和前 β 亚基 (前肽由 20 个氨基酸组成)。前 α 亚基和前 β 亚基在细胞内的转运过程中，由酶切去前肽，形成 α 和 β 亚基。在妊娠的大部分时期， α 亚基的合成量比 β 亚基多。这两种亚基的合成速度的差异在于合成两种亚基的 mRNA 的量不同。因为 α 亚基 mRNA 的水平为 β 亚基的 2 倍。一旦 hCG 合成后，便从细胞内迅速释放，只有少量储存在细胞内。

3. 非人灵长类的绒毛膜促性腺激素

目前，已经在猩猩科、猴科、悬猴科、狨科和狐猴科动物的尿和血清中检测到 hCG 类似物的活性。这些在结构和免疫方面非常类似于 hCG 的物质，确实在非人灵长类动物体内存在，并且这些动物 CGs 的分子质量和 hCG 相似。和 hCG 的免疫特性相比较发现，黑猩猩和大猩猩的 CGs 结构和完整的 hCG 及 β -hCG 非常相似。猩猩 CG 的结构除羧基端的 β 亚单位外，也和 β -hCG 非常类似。狒狒和恒河猴 CGs 的结构和 hCG 的区别稍大，特别是在 β 亚单位处。狨 CG 的结构和 hCG 的差别也较明显。

由于较难从非人灵长类动物获取不同时间的血样，只在很少几种动物中对血清中 CG 的含量变化进行了较为详细的测定，且多数是测定尿中的含量变化。在同时测定血清和尿中 CG 变化的动物中 (恒河猴和狨科)，CG 在尿中的含量也可反映出其在血中的含量。

在非人灵长类动物，妊娠时尿中 CGs 的分泌可分为三个基本的模式。类人猿妊娠时，血清和尿中 CG 的分泌形式类似于妇女，其特点是妊娠前 1/3 期含量高，以后尿中 CG 含量降到较低水平，并一直持续到分娩。新世界猴 (悬猴科和狨科) 在妊娠时，尿中 CG 在妊娠中期广泛升高，然后直到分娩才缓慢降低。新世界猴 (猕猴科) 尿中的 CG 在妊娠初期含量高，然后迅速下降，并且直到分娩时都检测不到。

4. 豚鼠绒毛膜促性腺激素

豚鼠的绒毛膜促性腺激素 (gpCG) 分子中含有 2 个非共价结合的亚单位, 分子质量为 59 kDa。gpCG 与 hCG 抗血清有交叉反应, 这说明其结构与人的激素类似。

用生物测定法和 hCG 放射免疫测定法检测妊娠时胎盘分泌 gpCG 的量时发现, 胎盘中此种激素的含量在妊娠第 3 周最高, 以后 2 周内逐渐下降, 此后保持稳定水平。

(二) 妊娠中、后期

1. 孕烯醇酮

有关胎盘组织产生孕烯醇酮的早期研究都表明, 人们可用各种技术将胆固醇转化成孕烯醇酮和孕酮。并且还可将孕烯醇酮转化成孕酮。母体胆固醇是胎盘类固醇的前体, 胆固醇和低密度脂蛋白一起被用于合成类固醇。胎盘中有大量的脱氢酶及异构酶系统, 孕烯醇酮随时可能转化成孕酮。

2. 孕酮

人在妊娠后期, 胎盘每天产生 250~600mg 孕酮。胆固醇的侧链裂解后, 使胆固醇转化成孕烯醇酮, 而孕烯醇酮随时可能转化成孕酮。妊娠狒狒体内抗雌激素 MER-25 可抑制孕酮合成。狒狒在妊娠中末期, 雌激素调节孕酮形成。第 6~9 周的人胎盘可分泌孕酮。妊娠第 56 天时, 血中孕酮水平为 0.3mg/ml, 到 84 天时增加到 0.6mg/ml, 在分娩时下降到 0.1mg/ml。雄烯二酮、脱氢异雄酮或 5 α -双氢睾酮并不影响孕酮合成。

3. 雌激素

进入胎盘的类固醇前体能转化成雌二醇。胎盘从来自胎儿的 16 α -羟基脱氢异雄酮形成雌三醇。母体循环中的雌二醇由来自母体或胎儿肾上腺的脱氢异雄酮形成。这两种脱氢异雄酮到达胎盘后 (牛胎盘本身也产生大量脱氢异雄酮和雄酮) 最大限度地芳香化成雌二醇。胎盘中硫酸酯酶的活性很高, 并且附水解的硫酸盐是硫酸盐-21-皮质酮。进入胎盘的硫酸盐类固醇很快被水解, 所以硫酸盐脱氢异雄酮转化成脱氢异雄酮; 然后脱氢异雄酮被胎盘中丰富的 3 β -羟基类固醇脱氢酶 Δ^5 - Δ^4 -异构酶系统氧化成 Δ^4 -雄烯二酮。并进一步水解成非结合的类固醇, 此类固醇还原成雄烯二酮, 雄烯二酮最终芳香化成雌三醇。在胎盘形成的雌三醇, 大量分泌进入母体。

胎盘形成的孕酮有一少部分转运进入胎儿体内, 而大部分在母体中形成尿孕烷二醇。胎儿体内的孕酮形成 Δ^4 -3-酮类固醇, 其中最重要的是氢化可的松。

由于胎盘中没有 β 葡萄糖醛酸酶, 雌激素葡萄糖苷酸不经水解即自由地经胎盘转运至母体。

4. 胎盘促乳素

目前已从小鼠、大鼠、仓鼠、绵羊、牛、马、兔、猫、猪、犬、人和其他灵长类等 10 多种哺乳动物的胎盘内提纯出了胎盘促乳素 (placental lactogen, PL)。

胎盘合体滋养层能利用前体物质合成 PL, 合成速率随妊娠的进展而加速, 且母体外周血清中 PL 的含量也随妊娠进展而升高。PL 的代谢很快, 大鼠血清中 rPL-I 的半衰期为 19.5min, rPL-II 的半衰期只有 1.2min。在妊娠阶段, 胎儿数量和胎盘重量均可影响血清中 PL 的含量。绵羊胎盘促乳素在妊娠第 11~14 周明显升高, 第 16~19 周时维持在更高水平, 到分娩前降低。在妊娠第 107 天和 138 天的血中, 怀单羔绵羊中 PL 的含量分别为 66ng/ml 和 150ng/ml, 怀双羔的绵羊中分别为 250ng/ml 和 389ng/ml; 在怀 4 羔的绵羊中分别为 301ng/ml 和 423ng/ml。给妊娠母羊静脉注射精氨酸和鸟氨酸, 能促进胎盘分泌 PL。

在妊娠早期, 母体是促使乳腺发育激素的主要来源。在妊娠中后期, 主要是胎盘激素促使乳腺发育。胎盘产生的雌激素、孕酮 (牛除外) 和 PL 均能促进乳腺发育。妊娠绵羊血清中 PL 的升高时期, 正是乳腺小叶-腺泡系统发育最明显时期。山羊妊娠第 16~20 周期间, 血清中 PL 的含量与产后 50 天内的产奶量呈正相关, 怀羔数量与 PL 含量和产奶量也呈正相关。

人的胎盘促乳素 (hPL) 于 1961 年被分离出来, 其化学结构和生理功能与人的生长激素相似, 也是由 191 个氨基酸组成, 是一种非糖基化的蛋白质激素。在妊娠第 6 周时, 可以在母体血液中检测出胎盘促乳素, 于第 36~37 周达到峰值, 并一直维持到分娩。这期间每天可产生 1g 左右, 在血浆中的浓度可高达 10mg/ml。在分娩后 24h 之内即很快消失。hPL 可促进胎儿生长, 使母体乳腺发育, 促进黄体的功能, 也可以促进糖原和蛋白质合成和红细胞生成, 并且可以抑制母体排斥胎儿。

(田文儒)

主要参考文献

- 常才, 张珏华. 1996. 胎儿宫内窘迫时胎儿胎盘血液动力学改变. 中华妇产科杂志 31: 15~17
- 曹泽毅. 1999. 中华妇产科学. 北京: 人民卫生出版社
- 乐杰. 1996. 妇产科学 (第四版). 北京: 人民卫生出版社
- 李光全, 王立贤, 张祥林. 2001. 猪的胎盘效率与繁殖性状的关系. 国外畜牧科技 6: 38~41
- 李美芝, 王蔼明, 乔杰. 2001. 妇科内分泌. 北京: 人民军医出版社
- 刘斌, 高应茂主编. 1996. 人体胚胎学. 北京: 人民卫生出版社出版
- 刘赛欧. 1997. 超声检查Ⅲ级胎盘的亚分级对预测胎盘功能的价值. 现代妇产科进展 4 (6): 353~356
- 卢丽萍, 曲陆荣, 蔡爱露. 1997. 羊水量减少与胎儿动脉血液速度波形的相关性研究. 中华妇产科杂志 32: 309~310
- 陆晖, 闫小梅, 张双全. 2001. 羊胎盘活细胞素微量元素和氨基酸组成分析. 南京师大学报 (自然版) 24 (1): 79~82
- 秦鹏春. 2001. 哺乳动物胚胎学. 北京: 科学出版社
- 沈霞芬. 2000. 家畜组织学与胚胎学 (第三版). 北京: 农业出版社
- 汪仁, 薛少白, 柳惠图主编. 1998. 细胞生物学 (第二版). 北京: 北京师范大学出版社
- 王建辰, 章孝荣. 1998. 动物生殖调控. 合肥: 安徽科技出版社
- 王竹晨. 2000. 妊娠肝内胆汁淤积症患者血硒及胎盘硒水平变化与胎盘组织学改变的关系. 中华妇产科杂志 35 (8): 476~478
- 叶燕萍, 蒋秦萍. 2002. 胎儿脐带绕颈 44 例临床分析. 中华妇产科杂志 37 (2): 110~111
- 余亚萍, 艾林英. 1999. 脐带缠绕 3162 例临床分析. 实用妇产科杂志 15 (3): 131~133

- 张守全, 陈广广, 冯定远. 2002. 母猪胎盘效率对产仔数的影响. 养猪 2: 14~15
- 赵兴绪. 2002. 兽医产科学 (第三版). 北京: 中国农业出版社
- 张天均. 1997. 胎盘激素. 当代医学 (台湾) 24 (9): 708~710
- Arthur GH, Noakes DE and Pearson H. 1996. Veterinary reproduction and obstetrics. 7th Edition WB Saunders Company Limited, London, pp.141~152
- Brown NL, Alvi SA, Elder MG, Bennett PR, Sullivan MHF. 1998. A spontaneous induction of fetal membrane prostaglandin production precedes clinical labour. J Endocrinol 157: R1~R6
- Brown NL, Alvi SA, Elder MG, Bennett PR, Sullivan MHF. 2000. The regulation of prostaglandin output from term intact fetal membranes by anti-inflammatory cytokines. Immunology 99: 124~133
- Craven CM, Morgan T, Ward K. 1998. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. Placenta 19: 241~252
- Chun JY, Han YJ, Ahn KY. 1999. Psx homeobox gene is X-linked and specifically expressed in trophoblast cells of mouse placenta. Dev Dyn 216: 257~266
- De Sousa PA, King T, Harkness L, Young LE, Walker SK. 2001. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. Biol Reprod 65: 23~30
- Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. 1996. Inflammatory cytokine release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. Am J Obstet Gynecol 174: 1855~1861
- Jenkin G, Brooks N, Challis J, McNeilly A, Doberska C. 1992. Oxytocin and prostaglandin interactions in pregnancy and parturition. J Reprod Fertil 45 (Suppl): 97~111
- Hemberger M, Cross JC, Ropers HH, Lehrach H, Fundele R, Himmelbauer H. 2001. UniGene cDNA array-based monitoring of transcriptome changes during mouse placental development. Proc Natl Acad Sci USA 98: 13126~13131
- Kovacs CS, Ho-Pao CL, Hunzelman JL, Lanske B, Fox J, Seidman JG, Seidman CE, Kronenberg HM. 1998. Regulation of murine fetal-placental calcium metabolism by the calcium-sensing receptor. J Clin Invest 101: 2812~2820
- Kovacs CS, Lanske B, Hunzelman JL, Guo J, Karaplis AC, Kronenberg HM. 1996. Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) regulates fetal-placental calcium transport through a receptor distinct from the PTH/PTHrP receptor. Proc Natl Acad Sci USA 93: 15233~15238
- Lewis DF, Barrilleaux PS, Wang Y, Adair CD, Baier J, Kruger T. 2001. Detection of interleukin-6 in maternal plasma predicts neonatal and infectious complications in preterm premature rupture of membranes. Am J Perinatol 18: 387~391
- Li Y, Behringer RR. 1998. Esx1 is an X-chromosome-imprinted regulator of placental development and fetal growth. Nat Genet 20: 309~311
- Loebel D, Huikeshoven H, Cotterill S. 2000. Localization of the DmCdc45 DNA replication factor in the mitotic cycle and during chorion gene amplification. Nucleic Acids Res 28: 3897~3903
- Lyall F, Barber A, Myatt L, Bulmer JN, Robson SC. 2000. Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. FASEB J 14: 208~219
- Millar LK, Stollberg J, DeBuque L, Bryant-Greenwood GD. 2000. Fetal membrane distention: determination of the intrauterine surface area and distention of the fetal membranes preterm and at term. Am J Obstet Gynecol 182: 128~134
- Millar LK, Boesche M, Yamamoto S, Killeen J, DeBuque L, Chen R, Bryant-Greenwood G. 1998. A relaxin-mediated pathway to preterm premature rupture of the fetal membranes that is independent of infection. Am J Obstet Gynecol 179: 126~134
- Newton R, Kuitert LME, Bergmann M, Adcock IA, Barnes PJ. 1997. Biochem Biophys Res Comm 237: 28~32
- Patel FA, Sun K, Challis JRG. 1999. Local modulation by 11β -hydroxysteroid dehydrogenase of glucocorticoid effects on the activity of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in human chorion and placental trophoblast cells. J Clin Endocrinol Metab 84: 395~400
- Roberts AK, Monzon-Bordonaba F, Van Deerlin PG, Holder J, Macones GA, Morgan MA, Strauss JT, Parry S. 1999. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor alpha gene with increased risk of

preterm premature rupture of the fetal membranes . Am J Obstet Gynecol 180: 1297~1302

Shiraishi K, Kaneko T, Hasegawa S, Hirano T. 1997. Development of multicellular complex of the chloride cells in the yolk-sac membrane of tilapia (Oreochromis mossambicus) embryos and larvae in seawater . Cell Tissue Res 288: 583~590

Woods JR Jr, Plessinger MA, Miller RK. 2001. Vitamins C and E: missing links in preventing preterm premature rupture of membranes ? Am J Obstet Gynecol 185: 5~10

第九章 妊娠的维持和妊娠期的生理变化

随着妊娠的进展，子宫逐渐膨大，从而使得胎儿的生长成为可能。但子宫肌层则必须保持一个静止状态，以免胎儿被过早产出。子宫适应妊娠过程的变化大致可分为三个时期，即增殖期、生长期和伸展期，每个时期的长短在不同动物中差异较大。对于妊娠子宫能够发生大幅度增大的机制仍不清楚，但主要为激素调节性的。

子宫内膜的增殖发生在胚泡黏附以前，为子宫内膜在妊娠前的准备期。子宫内膜的这些特征性变化主要是由孕酮等激素来启动的，其中包括血管通透性的增加、子宫腺的生长和旋转，以及子宫腔的白细胞浸润等。子宫的生长起始于胚胎着床后，主要包括子宫肌肉的肥大、结缔组织的大量增加，以及纤维性成分和胶原量的增加。子宫基质成分的变化在子宫对胎儿的适应性变化及子宫复旧的过程中很明显。发生在妊娠子宫中的变化是可逆性的，但不同个体在分娩后的恢复程度是不同的。在子宫的伸展期，子宫的生长减弱，但子宫中的各种成分在不断增加。

卵巢的变化开始于成熟卵泡向黄体的转化。虽然在未妊娠的发情周期中黄体会退化，但在妊娠后则推迟退化。然而，可能由于卵巢中的卵泡处于活性状态，一些牛在妊娠早期可能会出现发情。马在妊娠第 40 到 160 天期间，可能有 10~15 个卵泡发育。这些卵泡黄体化后可形成副黄体（accessory corpora luteum）。在整个妊娠过程中，牛的妊娠黄体一直处于最大的状态。但在马中，主黄体和副黄体均在妊娠第 7 个月时退化。

第一节 胎儿的组织性营养与血液性营养

从进化的角度来讲，最早期的胎盘应该具有吞噬机制，能吞噬和利用子宫分泌物。在所有真兽亚纲的哺乳动物的胎儿发育中，均可见到自组织性营养（hitiotrophic）向血液性营养（haemotrophic）的过渡。

一、胎儿的组织性营养

在着床以前，胚胎的发育先由输卵管的分泌物来维持，以后由子宫内膜来维持。起初可能以乳酸和丙酮酸为主要底物。但自囊胚期开始，对葡萄糖的消耗越来越明显。一旦胚胎着床完成，胎盘循环确立后，血液性营养通常占主要地位。妊娠过程中这种转换发生的时期在不同物种间变化很大，有时这两种途径可能在妊娠过程中都起作用。

不同的生物可利用不同的胎膜来吸收组织性营养。在具有上皮绒毛膜胎盘或内皮绒毛膜胎盘的物种中，尿囊绒毛膜常在子宫腺的开口处分化形成特化的区域。在这些特化的小区，滋养层细胞增殖后发育形成绒毛样的皱折，伸入小区内的分泌物中。滋养层细胞能吞噬这些分泌物，并具有很广谱的酶类可消化这些分泌物。猪的这些小区特别发

达，在妊娠中期约占整个尿囊绒毛膜表面积的 10%，到分娩时降为 4%。这种情况在马、绵羊及牛中也可见到。相反，在具有血绒毛膜胎盘（hemochorial placenta）的物种中，卵黄囊的内胚层上皮（endodermal epithelium）可能行使同样的功能。这种情况在啮齿类动物中最明显。卵黄囊外壁破裂后使大部分上皮直接暴露于子宫腔中。这种结构与尿囊绒毛膜胎盘平行存在，一直到足月妊娠，在器官发生时期作为主要的营养来源，在妊娠后期可运输免疫球蛋白等大分子的蛋白。

现在认为，在人的胚胎发育中，组织性营养的时期特别短暂。首先，在人胚胎发育的早期，由于为间质性着床，使胎儿完全埋在子宫内膜的表层。妊娠第 10 天时，包蜕膜形成后将胎儿封闭起来，无法与子宫腔中的分泌物接触。另外，正在迁移的绒毛外滋养层细胞侵入子宫内膜表层的母体血管网中，在妊娠第 17~20 天时通过正在扩展的绒毛间隙建立循环。最后，次级卵黄囊一直很小，与绒毛膜从未建立联系。因此，传统上认为次级卵黄囊是一个退化性结构，在营养的吸收方面并无作用。

二、人胎盘中母体循环的开始

在着床期间，正在侵入的合体滋养层细胞侵蚀进入子宫内膜表层的毛细血管和静脉网中，可使母体的红细胞进入正在发育的绒毛间隙中。但现在认为，与绒毛间隙的动脉联系及血液循环可能一直到妊娠第 10~12 周时才开始。从形态学的角度来讲，妊娠第 6 周时还未观察到螺旋动脉与绒毛间隙间的联系。到第 8 周时，许多螺旋动脉与绒毛间隙发生直接联系，但每一动脉远端的腔似乎由来自细胞柱或细胞壳的细胞滋养层细胞团所阻塞。此时，虽然存在直径 10~20 μm 的细胞间隙的复杂网络，但可能仅允许母体血液渗入绒毛间隙中。在妊娠第 10 周及以后的标本上，才能见到动脉与绒毛间隙之间直接的开放式联系。近来利用一个多参数的探头检测氧压时也发现，在第 8 周以前的绒毛间隙中仅有微弱的血流，而到 12 周时才完全建立血液循环。直到妊娠第 9 周时，胎儿的营养似乎主要依赖于运输到绒毛间隙的子宫腺体的分泌物，并以自螺旋动脉末端的滋养层柱渗出的母体的血浆蛋白及其他分子作为补充。这些分子可扩散进入胚外体腔，也可由绒毛的滋养层细胞和绒毛膜板运输进入胚外体腔。在胚外体腔中，次级卵黄囊可吸收这些分子，可能是在次级卵黄囊中首先建立胚外循环。

在妊娠的前三个月中，很难估计组织性营养及血液性营养途径对胎儿营养的相对重要性。从形态学的角度讲，在妊娠第 6 周时，尚未建立动脉循环，绒毛间隙中的液体主要来自于子宫的腺体。第 8 周时，血液循环的范围小且不广泛，以具有栓塞的动脉和相连的细胞间网络占主要地位。在妊娠前三个月的末期，次级卵黄囊和胎盘的三分之二便退化了，而且由于羊膜腔的膨大，胚外体腔也逐渐闭合。此时，堵塞子宫-胎盘动脉的滋养层细胞栓塞也逐渐离开原来的位置，使得母体血液可流入绒毛间隙中，并伴有子宫腺体退化。这些主要的结构性转变一方面改变了母体组织和发育胚胎的空间关系，另一方面也改变了胚胎和母体间的物质交换途径。由于这些解剖上的结构特征，在妊娠大部分时间起作用的不同营养途径必须为妊娠三个月内的胎儿服务。到妊娠的前三个月快结束时，子宫腺体的分泌逐渐被血液的渗透所代替，到妊娠第 4~6 月时，则完全由血液循环所代替。

三、次级卵黄囊在早期胎儿营养中的作用

虽然人早期胎盘的滋养层细胞有能力吞噬子宫分泌物，但问题是这些释放的营养物质怎样才能运输到胎儿体内。在妊娠的这个阶段，绒毛的血液供应很不完善，仅有少数的毛细血管位于绒毛中央区的深部。与之相比，次级卵黄囊的血管供应倒很发达。在所有的动物中，卵黄囊的血管供应比尿囊的血管供应要早一些，所以卵黄囊循环 (vitelline circulation) 可能作为气体和营养液交换的初级网络。现在认为在人中也是这样。

尽管早期胎盘绒毛的血液供应很差，但它们的基质中央区却具有一系列充满液体的通道。沿这些通道，绒毛的巨噬细胞或霍夫包尔氏细胞 (Hofbauer cells) 似乎有能力迁移。绒毛通道中的液体能够与体腔中的液体发生紧密接触，有可能发生自由交换。次级卵黄囊漂浮在体腔液中，内层的内胚层和外面间皮的上皮均具有吸收性上皮所具有的特征。因此，由滋养层细胞吸收的营养物很可能经过基质通道进入体腔液中，在体腔液中被卵黄囊上皮所吸收。

在妊娠早期，在体腔液中积累少量的 IgG 和甲状腺素 (T₄)。由于这些分子不能被处于这个时期的胎儿组织所合成，它们可能是母源性的。一旦进入体腔液后，这些蛋白能很容易进入卵黄囊腔中。近来发现，卵黄囊和体腔液中的蛋白质谱型很相似。尽管已证明次级卵黄囊组织不能合成 hCG，但在卵黄囊液中确实存在 hCG。由于在羊膜液中检测不到 hCG，hCG 可能是由卵黄囊循环到达胎儿的，表明卵黄囊的内胚层具有吸收蛋白的能力。利用免疫细胞化学方法也证实，在妊娠第 8 周的卵黄囊外面的间皮层能检测到母体的孕酮依赖性糖蛋白 (glycodelin)，表明来自母体子宫内膜的蛋白能够被卵黄囊所吸收。

假如这条途径有用的话，那么这条途径作用的时间也是有限的，因为在妊娠的前三个月快结束时，体腔便闭合，次级卵黄囊也退化了。有趣的是，这些事件与血液性营养的起始时间相一致。很可能二者之间有一定的协调性，但其机制仍不清楚。

四、组织性营养对早期胎儿的作用

组织性营养可能为胎儿提供了一种有益的保护。一种可能是，母体能够在低氧环境下提供足够量的营养成分，从而减少了将胎儿暴露在高度破坏性的还原氧 (reactive oxygen species) 环境下的可能性。

越来越多的证据表明，反应停 (thalidomide)、苯妥英 (phenytoin) 及乙醇等很多已知的致畸形物质均可通过产生高水平的还原氧来干扰正常的发育过程。已知糖尿病与氧应激升高有关。在实验性动物模型中，可通过抗氧化酶的过表达或服用食品类的抗氧化剂如叔丁基对甲酚 (butylated hydroxytoluene)、维生素 C 和 E 等，来降低发病率高的先天性畸形相关疾病。还原氧怎样干扰发育过程仍不清楚，可能是通过对 DNA 的直接氧化破坏、信号通路的阻止以及由线粒体应激诱导细胞凋亡等。

有氧代谢不可避免地 与还原氧的产生相联系，这主要是由于电子从呼吸链的酶中出来以后变为分子氧的缘故。还原氧产生的量与氧的浓度成正比。在器官发生的关键时

期，将胚胎保持在一个低氧的环境中对正在发育的胚胎是有利的。在非侵入性着床的物种中，情况就是这样。在这些物种中，将胎儿保留在子宫腔中，但胎盘膜的黏附和发育要到受精以后几周才开始。在早期器官发生期间，很多胚胎的代谢主要依赖于无氧糖酵解，而直到器官发生快结束时氧消耗才增加。

人为侵入性的间质性着床。这种着床过早地使母体与胎儿发生紧密接触，在妊娠期为了支持胎儿生长，这无疑将加速必需物质的交换，使早期的胎儿置于可能受到还原氧破坏的环境中。在器官发生完成以前，胎儿主要靠组织性营养，这可能是阻止大量血液通过胎盘的一个好办法。

从以上的证据来看，可将人妊娠过程分为两个明确的但连续的时期。第一时期为妊娠早期，主要为妊娠的前3个月，形态发生、胎盘发生及器官发育等很多关键过程均在此期内完成，对环境中自由基等因素特别敏感。在此期，通过组织性营养在低氧条件下为胚胎提供营养将大大降低受到自由基等破坏的危险性。第二期主要为妊娠期的后6个月，此期主要为胎儿生长，胎儿氧消耗量的增加主要靠血液性营养转换来提供。

已证实，人子宫内膜腺体的功能至少可维持到妊娠第10周，子宫腺体的分泌物可自由迁移到胎盘的绒毛间隙中。胎盘的合体滋养层细胞可吞噬性吸收子宫腺中合成的MUC-1和孕酮依赖性糖蛋白。在贴在胚外体腔处的次级卵黄囊中，也可检测到孕酮依赖性糖蛋白。这表明在绒毛膜绒毛的血管发生之前，卵黄囊可能在营养交换方面就起重要作用。同时也表明，当代谢主要是无氧代谢时，子宫腺可能是器官发生过程中一个重要的营养物质来源。

对胎儿组织来讲，还原氧是一个潜在的致畸因素，已证实它与流产和先兆子痫等很多妊娠异常的病理生理过程有关。在人妊娠的前两个月，胎盘包围着整个妊娠囊 (gestational sac)，绒毛中仅有少数毛细血管，而且主要位于绒毛间充质核心区的中央。此时，滋养层细胞层的厚度为妊娠第二个三个月时期厚度的两倍。胎儿的红细胞为有核的，胚外体腔占据了妊娠囊的大部分空间。在胚外体腔 (ECC) 中没有氧的运输系统，但存在抗氧化性分子，对胚胎可能受到的氧化性损伤提供额外的保护作用。超声和解剖研究也表明，绒毛间的血液循环在大约妊娠第9周时开始于胎盘的边缘部位，直到第12周时，这种循环才变得连续，并扩散到整个胎盘中。这些解剖学的特征提供的间接证据表明，人前3个月妊娠囊的结构可限制胎儿暴露于氧气环境中，这对胎儿的发育是特别必要的。这些结果与胎盘和胎儿的发育是在一个生理性的低氧环境中进行的，以及代谢主要是在无氧环境下进行的概念是一致的。

第二节 妊娠的维持

妊娠的维持首先依赖于神经和激素因子的相互作用。胎盘、胎儿和母体的神经-内分泌之间的相互作用对于胎儿的生长发育以及妊娠的维持是非常重要的。在妊娠期间，母体对激素水平变化的适应直接影响着胎儿和胎盘的发育。妊娠的适应性包括着床和早期妊娠的维持。在母体中发生的一系列适应性变化，使得母体能提供足够的营养来维持胎儿生长发育的需要。

在哺乳动物中，如果着床的胚胎要继续生存，必须向母体发出信号，使母体能够得

知它的存在，即发生妊娠识别过程，从而阻止一些与孕酮相关因子的功能的退缩，并且保证妊娠黄体不发生溶解。黄体是哺乳动物排卵后，在排卵部位由卵泡壁颗粒细胞、膜 - 间质细胞及侵入的血管共同形成的，主要由大黄体细胞和小黄体细胞组成。黄体能分泌孕酮，是哺乳动物生殖功能所必需的内分泌组织，在维持妊娠过程中起着至关重要的作用。但随着胎盘的发育和功能的不断完善，黄体的功能逐渐被胎盘所替代。

妊娠是一个漫长的过程，涉及胚胎、子宫和卵巢之间复杂的相互作用。由于胎盘的建立，使得胚胎与子宫之间既有相互联系，又各自保持一个相对独立的环境。在妊娠过程中，既要保证子宫的不断增大以适应胎儿的发育，又要使子宫处于一个相对静止的环境中。在此过程中，孕酮、雌激素、细胞因子、生长因子等很多因素起着十分重要的调节作用。

一、卵巢和垂体与妊娠维持

一些激素之间的相对平衡对于妊娠的维持和正常进行是必需的。利用切除卵巢、垂体和胎儿（fetectomy）等外科手术，可证明胎儿、促黄体激素以及黄体在妊娠维持中的作用（表 9-1）。除马外，在所有家畜的妊娠过程中，黄体一直存在。在妊娠过程中的任何时候切除牛、山羊和猪的卵巢，都会使妊娠终止。在妊娠的后半期，将马和绵羊的双侧卵巢切除后，并不能导致流产，这是因为这两种动物的胎盘可产生孕酮。在着床前，将山羊的垂体切除会导致妊娠终止；在妊娠第 44 天后切除垂体则会引起流产。绵羊胎儿必须中和或抑制子宫中溶黄体物质的产生和释放。在妊娠前 50 天内，胎儿不能产生促黄体激素来维持妊娠。在妊娠前 50 天内切除垂体，均会导致流产。在妇女中，由于胎盘可产生孕酮和 hCG，在妊娠的很早期切除卵巢或垂体后，对妊娠影响不大。

表 9-1 垂体和卵巢在各种动物妊娠维持中的作用（引自 Johnson MH 和 Everitt BJ, 1995）

动物	妊娠期/ 天	未妊娠时，黄体期的长短/ 天	垂体切除后不影响妊娠的时间/ 天	切除卵巢后不影响妊娠的时间/ 天
人	260~270	12~14	?	40
猕猴	168	12~14	29	21
绵羊	147~150	16~18	50	55
豚鼠	60	16	3	28
大鼠	22	10~12	12	足月
小鼠	20~21	10~12	11	足月
猫	63	30~60	足月?	50
马	330~340	20~21	?	150~200
牛	280~290	20~28	?	足月
狗	61	61	足月?	足月?
猪	115	16~18	足月	足月
兔	31	12	足月	足月
山羊	150	16~18	足月	足月

二、孕酮与妊娠维持

孕酮是一种重要的类固醇激素，由卵巢黄体 and 胎盘的合胞体滋养层分泌，在哺乳动物的妊娠维持过程中起重要作用。在人妊娠的第 6~7 周，黄体功能自然开始下降，正在发育的胎盘开始产生孕酮（见图 9-1）。

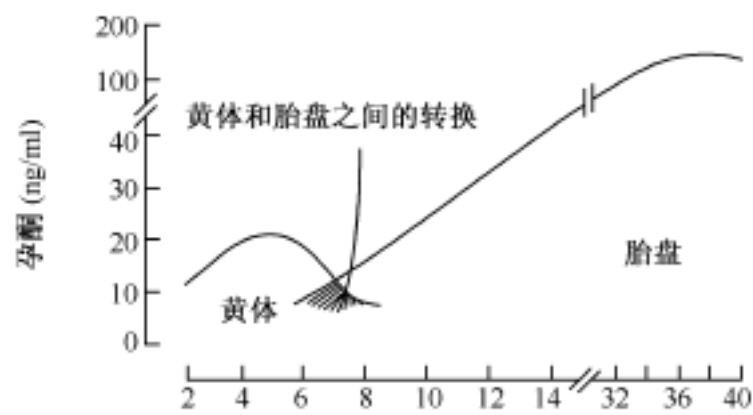


图 9-1 示在人妊娠约第 7~9 周，孕酮由黄体产生逐渐转变为由胎盘产生（引自 Yen SSC 等，1991）

（一）黄体孕酮的功能

黄体产生的主要类固醇激素有孕酮、 17α -孕酮、雌激素以及雄烯二酮。低密度脂蛋白（LDL）是产生孕酮的主要前体。

在不同种动物，妊娠过程中需要黄体分泌的孕酮的时间的长短不一样。在人、恒河猴、豚鼠、绵羊和猫等动物，在妊娠的中期切除卵巢后，并不能导致胎儿流产。但在小鼠、大鼠、牛、兔、猪和山羊等动物，在妊娠期的任何时候将卵巢切除后，均会导致胎儿流产。在人妊娠第 6 周，将黄体切除也会导致流产。但将黄体切除后，单独使用孕酮也能阻止由于黄体切除导致的流产，可使妊娠继续进行。因此，孕酮是早期妊娠维持最重要的类固醇激素。在体外受精时，给无性腺的妇女注射外源性的孕酮，能使第 1~3 个月的妊娠正常进行，即到妊娠第 10 周，此后胎盘形成后便能正常分泌孕酮。临床实验证明，当孕酮浓度低于 10ng/ml 时，会导致大约 80% 的妇女流产。另外，通过注射孕酮的特异性拮抗剂（如 RU486）也可证实孕酮在维持妊娠中的作用。在妊娠的任何时期注射 RU486，都可以扰乱妊娠。并且，将前列腺素与 RU486 共同使用时，能有效地诱导流产。

（二）胎盘孕酮的功能

在妊娠期间，胎盘是孕酮的主要来源。从黄体期到足月妊娠时，母体孕酮的水平升高 6~8 倍。尽管在妊娠早期，即在妊娠的第 6 周之前，维持妊娠所需要的孕酮几乎完全由黄体分泌。但是从妊娠的第 7 周开始，胎盘开始分泌孕酮，到妊娠第 12 周时，胎

盘已成为孕酮的主要来源。胎盘产生的大量孕酮，主要在五个方面对维持妊娠起作用：①能够促进子宫内膜的基质细胞蜕膜化。②抑制雌激素和催产素等对子宫肌层的收缩作用，使子宫静止，从而保证胎儿生活在一个平衡稳定的环境中。③能够抑制前列腺素（尤其是前列腺素 $F_2\alpha$ ）的合成，保持子宫肌层处于静止状态，并且抑制子宫收缩的起始。④能够抑制一些与免疫排斥相关的免疫反应。⑤与 hCG 和蜕膜的皮质醇（cortisol）一样，能够抑制 T 细胞介导的组织感染，以及能够赋予着床的胚胎和正在发育的胎盘免疫能力。在动物模型中，孕酮能够延长移植的人滋养层的存活时间。此外，绒毛间隙中高浓度的孕酮对于阻止由妊娠来的外源性蛋白的细胞免疫排斥方面起重要作用。

（三） 17α -羟基孕酮

与孕酮一样，在妊娠的早期， 17α -羟基孕酮的分泌也经过黄体-胎盘的转移。 17α -羟基孕酮能够反映黄体分泌类固醇激素的水平。与孕酮不同的是，在人的整个妊娠过程中，卵巢一直是 17α -羟基孕酮的主要来源。直到妊娠的第三个三个月，胎盘也开始分泌 17α -羟基孕酮。在人正常月经周期的卵泡期， 17α -羟基孕酮的浓度在 0.5 ng/ml 以下。怀孕后， 17α -羟基孕酮在 LH 达到峰值时升高到约 1 ng/ml 。在以后 4~5 天的时间内，升高到约 $1\sim 2\text{ ng/ml}$ 。然后，开始缓慢的增长， 17α -羟基孕酮浓度的平均值达到正常月经周期黄体期的水平，约为 2 ng/ml ，并且约持续到约第 12 周。到第 32 周时， 17α -羟基孕酮的水平急剧上升，到第 37 周时已达到 7 ng/ml 。在第 32 周时， 17α -羟基孕酮浓度的升高可能与此期胎儿的成熟过程密切相关。

三、雌激素与妊娠维持

在妊娠早期，雌激素主要来源于黄体。在以后的妊娠过程中，雌激素主要由胎盘产生。因此，在人妊娠第 5~6 周，雌激素几乎完全由母体的卵巢产生。在妊娠三个月之后，胎盘成为血液中 17β -雌二醇的主要来源。在妊娠期间，雌激素产生的速率和血液中雌激素的浓度明显增加。在人正常月经周期的卵泡期，雌激素的浓度约为 0.1 ng/ml ，到黄体期达到 0.4 ng/ml 。妊娠后，雌激素的浓度显著增加到约 $6\sim 30\text{ ng/ml}$ 。在妊娠期间，雌激素的浓度上升可能与妊娠维持有关。雌激素在妊娠过程中主要通过以下三种途径起作用。

1. 雌激素调节孕酮的合成

在妊娠期间，有许多因子调节孕酮的合成和分泌。在大鼠和兔等动物的整个妊娠过程中，孕酮主要来源于黄体，雌激素可以调节孕酮的合成和分泌。在培养人胎盘细胞时，加入雌激素的拮抗剂可以减少孕酮的合成，而加入雌激素后则可恢复孕酮的合成，说明雌激素可上调孕酮的合成。在人妊娠第 40 天或狒狒的妊娠第 25 天时，胎盘是孕酮的主要来源。当注入雌激素的拮抗剂后，能够抑制内源性雌激素的功能，从而导致妊娠后期胎盘孕酮的合成减少。此外，雌激素还可以增强子宫内膜上皮细胞中孕酮受体（PR）的表达，可能有助于孕酮对妊娠的维持作用。

2. 雌激素通过调节胎盘的低密度脂蛋白 (LDL) 受体来调节孕酮的合成

孕酮的合成依赖于胎盘滋养层细胞表面的 LDL 受体的表达。在大鼠的黄体及猪的颗粒细胞中, 雌激素具有维持 LDL 受体数量的功能, 从而调节孕酮的合成。在狒狒的妊娠后期, 注射雌激素的拮抗剂能够使孕酮的合成减弱到原来的 51%。另外, 在狒狒妊娠的第 170 天, 胎盘滋养层中 LDL 的浓度也下降了 56%, 表明雌激素可能通过 LDL 途径调节孕酮的生物合成。

3. 雌激素可增加妊娠的血流量

雌激素能增加子宫的血流量, 供给妊娠维持所必需的营养物质。在动物模型中, 用雌激素处理后, 能够显著提高子宫的血流量。妊娠过程中, 子宫内膜的血管生长是胚胎着床和胎儿血液供应系统发育所必需的。雌激素可以通过雌激素受体的介导和可能涉及生长因子产生的未知机制, 促进子宫内膜中动脉的生长。雌激素还可通过促进子宫上皮细胞和成纤维细胞中血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达, 来诱导子宫内膜的血管生成。

四、催乳素 (PRL) 与妊娠维持

PRL 为子宫内膜蜕膜化的一种特异性标志分子。PRL 及 PRL 受体 (PRLR) 在妊娠早期的蜕膜中表达量很高。PRL 可刺激妊娠黄体中 LH/CG 受体的表达, 并促进其自身受体的表达, 还可以与 FSH 和 LH 协同作用, 以优化 cAMP 和孕酮的合成, 说明 PRL 可能通过自分泌/旁分泌机制调节蜕膜局部环境及机体内分泌状态。

在啮齿类动物, PRL 和 PRL 样的激素在妊娠过程中对于妊娠黄体的维持和孕酮的产生有重要的作用。PRL 受体基因敲除的小鼠不育, 其主要原因是在妊娠过程中, 黄体不能正常形成或者黄体功能受到破坏, 使妊娠所必需的孕酮不能正常分泌, 导致妊娠失败。在啮齿类动物的妊娠早期, 垂体的 PRL 在维持黄体功能过程中起作用, 而从妊娠的中期一直到妊娠结束, 由胎盘催乳素 (PL) 通过其受体起作用。

大鼠交配后, 血浆中的 PRL 水平显著上升, 并持续存在至妊娠第 10 天。大鼠妊娠第 8 天时, 血浆 PRL 浓度为 $211.2 \pm 37.8 \text{ ng/ml}$, 第 15 天时为 $1.1 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$, 到第 20 天时为 $7.2 \pm 2.1 \text{ ng/ml}$ 。在大鼠妊娠第 1~3 天, 若皮下注射 1 mg 溴隐亭, 可人为造成大鼠的低 PRL 状态, 结果到妊娠第 9 天时胚胎全部流产。这可能是由于注射溴隐亭后, 使妊娠黄体上的 LH/CG 受体表达下降所致。如在注射溴隐亭的同时也注射外源性 PRL, 则能见到妊娠黄体, 黄体上的 LH/CG 受体表达水平也可恢复到正常的水平, 而且多数大鼠的妊娠也能正常进行。如果妊娠第 10 天以后再注射溴隐亭, 则不会使妊娠终止。因此, PRL 可能只在妊娠的早期有维持妊娠的作用。PRL 作用于妊娠黄体后, 可通过增加 LH/CG 受体基因表达水平或稳定其 mRNA 的转录来增加 LH/CG 受体的表达量, 并促使孕酮的分泌增加, 从而起到维持妊娠的作用。任何内源性或外源性导致 PRL 水平下降的因素都有可能使妊娠黄体中 LH/CG 受体的表达减弱, 从而增大发生流产的可能性。

PRL 通过广泛的补偿作用维持黄体的功能,使黄体能够产生妊娠所需的足够的孕酮。这些补偿作用主要包括:通过增强雌激素受体 α 和 β 的合成,促进雌激素的黄体营养功能;通过促进 LH 受体的表达,发挥其维持黄体功能的作用;另外, PRL 能够通过促进高密度脂蛋白的结合位点以及黄体胆固醇脂酶的活性,加强合成孕酮的底物胆固醇的利用率,从而导致孕酮合成的增加,有利于妊娠的维持。

PRL 以及 PL 通过激活信号转导和转录激活因子 5a/ b (STAT5a/ b) 在维持啮齿类的黄体及其功能方面起作用。另外, PRL 能完全抑制 20- α -羟基类固醇脱氢酶 (20- α -hydroxysteroid dehydrogenase, 20- α -HSD) 的表达,而 20- α -HSD 能够导致孕酮的分解。可见, PRL 在妊娠过程中,对于维持啮齿类黄体的功能以及妊娠所必需的孕酮分泌是非常重要的。

五、促性腺激素释放激素 (GnRH)

在妊娠过程中, GnRH 由胎盘合成及分泌。虽然 GnRH mRNA 在妊娠过程中一直保持在一定的水平上,但 GnRH 蛋白的水平在人妊娠第 2 个三个月时达到最高,并且一直持续到妊娠结束。体内和体外实验均证明, GnRH 能够刺激 hCG/ LH 的分泌,而且 GnRH 的拮抗剂也能阻止 hCG 的产生。GnRH 刺激 hCG 的分泌是剂量依赖的,通过旁分泌行使其功能。培养人的妊娠头三个月的胎盘时,加入 GnRH 只能轻微提高 hCG 的分泌,因为此时 hCG 的合成已经达到峰值。相比之下,培养人妊娠第二个三个月的胎盘时, GnRH 则能剂量依赖性地显著增加 hCG 的分泌。将 GnRH 的类似物注入早期妊娠的大鼠,能够影响大鼠的黄体功能,从而导致大鼠流产,表明 GnRH 可能通过调节 hCG 的分泌来影响妊娠黄体的功能。

妊娠过程中,许多因子对 GnRH 的分泌有促进作用。细胞滋养层能合成抑制素 (inhibin) 和激活素 (activin)。这两种物质可能通过调节 GnRH 的活性,来调节胎盘中 hCG 的分泌。在培养的胎盘细胞中加入抑制素的抗体后,能导致 GnRH 浓度的增加,并使 hCG 的分泌增加,表明抑制素对于 hCG 的分泌可能具有一定的抑制作用。此外,在体外培养的滋养层细胞中,激活素能促进由 GnRH 诱导的 hCG 的分泌。如培养体系中加入 GnRH 的拮抗剂,则引起 hCG 的分泌明显减少。前列腺素 (PGE_2 和 $\text{PGF}_{2\alpha}$) 和肾上腺素 (epinephrine) 也能促进胎盘细胞释放 GnRH,可能通过 cAMP 信号通路来行使功能。

六、人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 与灵长类妊娠维持

hCG 是最早在妊娠妇女的子宫中发现的一种物质,最初被认为是来自于母体的垂体前叶,但以后证实是由胎盘产生的。hCG 是一种糖蛋白激素,分子质量大约 36~40 kDa,由两个亚基构成,具有与 LH 相似的生物学和免疫学特性。hCG 主要定位在胎盘的合体滋养层,而不是细胞滋养层。

在胚胎分裂到 6~8 细胞的阶段,就可以检测到 hCG mRNA 的表达。胚泡一旦着床后,滋养层细胞便开始分泌 hCG。hCG 具有营养黄体 and 维持黄体功能的作用。在人正

常妊娠过程中，可在 LH 峰后第 9 天检测到 hCG。在妊娠第 60~90 天时，hCG 的浓度达到峰值，在妊娠第 10 周时最高可达到 110 000 mIU/ml。到妊娠第 12~16 周时，hCG 的平均水平开始迅速下降。

hCG 的分泌与产生 hCG 的滋养层组织的大小有关。在妊娠第 4~20 周时，hCG 的分泌量与滋养层的宽度有关。在第 20~38 周，hCG 的分泌量与胎盘的重量有关。在妊娠第 3~4 周和第 9~10 周时，hCG 的水平迅速升高，此时正好是未成熟的滋养层绒毛增殖和合体滋养层的扩展时期。hCG 的水平下降与合体滋养层和细胞滋养层的体积减少有关。

在早期妊娠过程中，hCG 具有营养黄体的功能，能够维持月经周期的黄体，并且促进月经期的黄体转变为妊娠黄体。hCG 能维持孕酮的产生，并保证蜕膜的正常发生及维持。这种功能一直维持到胎盘形成后，并能够产生妊娠所必需的孕酮为止。hCG 还能够上调孕酮合成的前体分子——LDL 受体在胎盘中的表达，从而产生维持妊娠必需的孕酮。

除了具有黄体营养的功能之外，hCG 在人妊娠期第 7~9 月期间对于维持子宫静止有重要的作用。体外实验表明，hCG 对人子宫肌层的收缩具有剂量依赖性的抑制作用。在足月分娩及早产的起始期，hCG 受体在人子宫肌层中的表达下调，说明 hCG 对于妊娠子宫肌层的静止具有重要的作用。另外，hCG 能够抑制由 $\text{PGF}_2\alpha$ 诱导的小鼠的分娩，并且这种作用是剂量依赖性的。

在非妊娠妇女的黄体期中期，注射 hCG 能导致黄体的退化，并延迟孕酮水平的上升。在妊娠的妇女或者恒河猴的体内注射抗 hCG β 的抗体，能够中和 CG 的产生，同时导致黄体退化。用恒河猴本身的 CG 免疫恒河猴后，这些猴有正常的 LH 水平和月经周期，但是不能维持妊娠，说明 CG 在维持灵长类的妊娠过程中有重要的作用。

除 GnRH 能够诱导 hCG 的产生外，cAMP 的类似物在体外也能促进 hCG 的分泌。人蜕膜来源的抑制素和催乳素能够抑制足月妊娠的滋养层分泌 hCG，而蜕膜来的激活素能够诱导 hCG 的分泌。

分娩前和分娩期的子宫肌层中需要高度发育的细胞与细胞之间的连接，其中主要为间隙连接。妊娠期的子宫肌层中由于缺乏间隙连接，导致子宫收缩功能的减弱。hCG 可直接降低细胞内钙离子的浓度，能下调子宫肌层中的间隙连接，并可抑制前列腺素类物质的产生。

七、一氧化氮 (NO) 与妊娠维持

与非妊娠的人子宫内膜相比，妊娠前期 (25~34 周) 的子宫内膜含较多的内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 及神经型一氧化氮合酶 (nNOS)，到妊娠足月期时 eNOS 蛋白的浓度比妊娠前期低。在妊娠的绵羊子宫中，nNOS 主要位于子宫肌层，eNOS 主要位于子宫内膜。虽然分娩前 nNOS mRNA 水平下降，但是 nNOS 的酶活性及蛋白量在分娩前并没有下降。由于 nNOS mRNA 水平在分娩前期下降，很可能分娩时 nNOS 蛋白水平下降，表明 nNOS/NO 可能对于维持妊娠是必需的。NO 可能通过抑制分娩必需的基因表达，来维持子宫的静止状态。在大鼠的妊娠子宫中，检测不到 nNOS，但 eNOS

在妊娠过程中持续表达，在妊娠第 13 天呈现峰值，随后下降。诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 是随着妊娠的进展而逐渐增加的，同样也在妊娠第 13 天达到峰值，然后减弱。妊娠大鼠子宫中 iNOS 的表达形式与用氨基胍 (aminoguanidine) 处理的大鼠子宫中一氧化氮合酶的活性变化一致，说明诱导型一氧化氮合酶在维持子宫静态的过程中有重要的作用。将妊娠第 18 天大鼠用 iNOS 抑制剂 (N-iminoethyl-L-lysine, NIL) 及 nNOS 抑制剂 (L-NAME) 处理 24h 后，子宫肌层中的连接蛋白 43 (Cx43)、子宫肌层的催产素受体 (OTR) 及蜕膜处环氧合酶 (COX) 等蛋白的表达均增加。NIL 能使妊娠第 19 天子宫肌层中 Cx43 蛋白的水平显著增加到分娩时的水平，并且 24h 内其 mRNA 的浓度无变化，但对妊娠第 17 天的大鼠则无此效果。注射 L-NAME 后也未见到类似 NIL 处理的效果，说明由子宫 iNOS 产生的内源性 NO 可抑制大鼠妊娠期子宫肌层中 Cx43 的表达，而 Cx43 蛋白是分娩必需的，可抑制子宫壁的舒张，使子宫壁延展性增加，但其确切机制还不清楚。

另外，胎盘可能是妊娠期间 NO 的主要来源。人的绒毛膜滋养层表达 eNOS。在人的合体滋养层和胎盘绒毛血管丛处都能检测到 NOS 的活性。此外，已证实大鼠的胎盘也能够产生 NO。胎盘产生的 NO 能够维持子宫最低的活动状态、减少血管收缩，并且 NO 也可以促进子宫静止。这说明在妊娠维持过程中 NO 可能直接或者间接地起着重要作用。

NO 与孕酮协同作用调节子宫的静止及子宫颈的软硬度。孕酮在维持妊娠期子宫及子宫颈方面起决定性作用，用孕酮拮抗剂处理会导致在足月妊娠前分娩。利用 NOS 抑制剂及 NO 供体已证实，子宫中 NO 的生成量降低会起始分娩。iNOS 在妊娠期子宫中的表达是上调的，而在妊娠期的子宫颈中是下调的。在妊娠期，NO 与孕酮一起抑制子宫收缩，从而维持妊娠。在妊娠晚期，NO 与孕酮一起促进子宫颈的成熟，从而诱导分娩。

母体妊娠期的特征性变化是肾血管扩张、肾小球滤过率增加、血压降低以及子宫的血流量明显增加。在妊娠期，子宫及胎盘的血流量增加 15~20 倍。到第 3 周的三胚层期时，子宫及胎盘的血流量占心输出量的 15%~20%。虽然引起这些变化的机制仍不清楚，但现在认为 NO 是引起这些变化的主要原因之一。在妊娠期的绵羊子宫中，cGMP 的浓度增加了 38 倍。用 L-NAME 处理后，可导致子宫中的 cGMP 水平下降，这表明妊娠子宫中 cGMP 的水平升高可能是 NO 增加所致。此外，将内源性的 NO 激动剂 (如组胺) 注入妊娠绵羊子宫后，子宫的血流量大大增加。在大鼠中，妊娠期肾血管的扩张依赖于 NO 的存在。在妊娠过程中，NO 可引起母体的血管系统扩张，降低血管反应，并参与母体心血管系统对妊娠过程的适应。已证实，NO 是血管内皮细胞的血管松弛因子，具有扩张血管的功能，可降低胎盘血管的阻力，调节胎盘与其他组织器官之间的血流分配。NO 是胎盘与胎儿之间营养物质交换的关键因素，通过扩张脐动脉血管，使胎盘与胎儿之间的血流量增加，为胎儿的生长和妊娠的维持提供必要的营养物质。

八、免疫细胞与妊娠维持

传统上认为，免疫细胞在妊娠过程中具有抑制作用。但近来发现，免疫细胞也具有

维持妊娠的作用。T 细胞和自然杀伤细胞 (NK 细胞) 等免疫细胞在维持妊娠过程中起着很重要的作用。

1. T 细胞与妊娠维持

在哺乳动物妊娠过程中, 子宫内膜中有几种主要的 T 淋巴细胞, 其中包括 $CD4^+$ (CD, cluster of differentiation, 细胞分化簇。CD4 代表细胞分化抗原 4, $CD4^+$ 是 CD4 阳性 T 细胞, 即辅助 T 淋巴细胞) 和 $CD8^+$ (抑制杀伤 T 淋巴细胞) 两种。根据 $CD4^+$ 细胞产生的细胞因子不同, 可分为 Th1 和 Th2 细胞。Th1 细胞能诱导细胞毒 T 细胞, 并能导致流产。Th2 细胞能产生 IL-4、IL-5、IL-6 和 LIF 等。Th2 产生的细胞因子能阻止 Th0 细胞到 Th1 细胞的诱导作用, 从而起到维持妊娠的作用。因此, Th1 与 Th2 比率平衡能调节生殖过程中的免疫反应, 在生殖过程中起着重要的作用。

在小鼠中, 维持妊娠所需要的 IL-4、IL-5 和 IL-6 等细胞因子主要由 Th2 产生, 在人中的情况也是如此。这说明 Th2 细胞在妊娠维持过程中起着重要的作用。在正常妊娠过程中, 外周血和蜕膜中分泌 IL-4 的细胞数目远远大于分泌 IFN- γ 的细胞。然而, 当发生无胚妊娠时, 分泌 IL-4 的细胞与分泌 IFN- γ 的细胞数目明显减少。根据 Th1 和 Th2 分泌的细胞因子判断, 在蜕膜中的 T 细胞主要以 Th2 为主, 表明 Th2 细胞在胚胎着床和维持妊娠过程中起重要作用。与非妊娠的妇女相比, 妊娠第 7~9 月的妇女中 Th1 细胞的数量急剧下降, Th2 细胞的数量在妊娠的头三个月急剧升高, 在第 4~6 月和第 7~9 月较高。与非妊娠的妇女相比, Th1 细胞与 Th2 细胞比率在妊娠的第二个和第三个三个月极低。来源于 Th2 细胞的 IL-4 及 IL-6 等细胞因子, 能够诱导滋养层分泌 hCG。hCG 诱导妊娠黄体产生孕酮后, 可刺激 Th2 细胞分泌细胞因子, 同时抑制 Th1 细胞分泌细胞因子。

同样, 按照产生的细胞因子不同, $CD8^+$ 细胞可分为 Tc1 细胞和 Tc2 细胞。Tc1 细胞能分泌 IL-2 和 IFN γ , Tc2 细胞能分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-13 等。Tc2 细胞与 Th2 细胞一样, 在发生蜕膜化的子宫中增多。通过比较妊娠过程中外周血和蜕膜中的 T 细胞发现, 蜕膜中主要为 Th2 和 Tc2 细胞, 其数量远远大于外周血。

CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule) 是一种主要在 Th2 细胞上表达的因子, 为一具有 7 次跨膜结构的前列腺素 D_2 (PGD_2) 受体, 对于诱导母体的 T 细胞迁移入子宫, 并分泌一些重要的细胞因子方面起重要的作用。在母-胎界面蜕膜处的 Th2 和 Tc2 细胞中, 可检测到 CRTH2 的表达, 而且在此处这两种细胞中 CRTH2 的表达量远远高于外周血中这两种细胞的表达量。蜕膜中的 Th2 和 Tc2 细胞可能通过其产生的细胞因子在胚胎着床和维持妊娠过程中起着重要的作用。

PGD_2 可通过它的双受体 DP 和 CRTH2 来控制 Th1/Th2 平衡和阻止树突细胞的抗原提呈, 从而保证半同种异体的胎儿在母体内的正常发育。激活的杀伤型 T 细胞可以攻击胎儿和胚胎滋养层。在妊娠期, Th2 型细胞因子抑制杀伤型 T 细胞介导的 Th1 型免疫反应, 从而维持妊娠。在妊娠期, Th2 和 Tc2 细胞以 PGD_2 调节的方式聚集于母-胎界面, 并且 Th1 和 Tc1 细胞的数量在蜕膜组织中远远低于外周血液。Th2 和 Tc2 细胞很可能是在妊娠初期的蜕膜反应发生过程中进入子宫内膜的。CRTH2 作为一种趋化分子受体, 选择性地表达于 Th2 和 Tc2 细胞表面, 可以调节妊娠初期蜕膜组织中 PGD_2

依赖性的 Th2 和 Tc2 细胞的迁移。PGD₂ 可由蜕膜组织和胚胎组织释放。在妊娠时期子宫中存在的 PGD₂ 使得 PGD₂ 依赖性的 CRTH2⁺ Th2 和 CRTH2⁺ Tc2 细胞聚集于母-胎界面。这表明位于母-胎界面的 Th2 型免疫反应,可能有助于胎儿在子宫内不被母体的免疫系统排斥,从而维持妊娠。

PGD₂ 不仅使 Th2 和 Tc2 细胞聚集于母-胎界面上,而且也可能通过阻止母体免疫细胞给 T 细胞提呈抗原来维持妊娠。在色氨酸分解酶(吡啶胺-2,3-双加氧酶)(IDO)存在时,杀伤性 T 细胞的活性被抑制,从而保护胚胎不被母体排斥。在胚胎滋养层和蜕膜组织中的巨噬细胞都含有色氨酸分解酶。树突细胞特异地给 T 细胞摄取、加工、存储和呈递抗原,并在体内可以启动所有 T 细胞依赖性反应,包括 CD4⁺ Th 和 CD8⁺ 杀伤性 T 细胞反应、T 细胞依赖性抗体反应。当树突细胞应答感染和发炎反应被激活后,部分细胞由输入淋巴管迁移到区域性的淋巴结。当它们到达淋巴结后,在这一过程中成熟的树突细胞给 T 细胞传递组织得到的抗原特异信号,使其激活并产生免疫反应。在人类蜕膜组织中,也检测到具有免疫刺激潜能的抗原提呈细胞——树突细胞。在人类蜕膜中,PGD₂ 很可能通过抑制树突细胞迁移到淋巴结,从而使得母体的 T 细胞不能识别胎儿抗原,保证胎儿在母体中顺利发育。

2. NK 细胞与妊娠维持

蜕膜中的 CD16⁻ CD56^{bright} NK 细胞有两种作用,一种是 NK 细胞的细胞毒作用,另一种是这些细胞以自分泌和旁分泌形式分泌 LIF、IFN γ 、TNF α 、TGF β 1、TGF β 2、TGF β 3 以及 M-CSF 等与生殖有密切关系的因子。CD16⁻ CD56^{bright} NK 通过分泌的这些细胞因子促进胚胎着床与发育。TGF β 2 是一免疫抑制因子,在子宫内膜局部发挥免疫抑制效应,防止胚胎被母体免疫系统排斥。在子宫蜕膜化时期,CD16⁻ CD56^{bright} NK 细胞数目急剧增加,可能是其分泌的一些细胞因子抑制了细胞毒作用或者直接起作用,从而使妊娠成功。

在子宫 NK 细胞缺陷型小鼠中,蜕膜化和子宫动脉不正常。用包含正常 NK 细胞前体的骨髓处理,能使这种子宫 NK 细胞缺陷型小鼠的 NK 细胞数增加到正常的水平,并且小鼠的蜕膜化和动脉形成也能恢复正常。这说明 NK 细胞在小鼠子宫蜕膜化中起重要的作用,同时也暗示子宫 NK 细胞与妊娠过程中的血管发生紧密相关。在分泌后期的人子宫内膜中, NK 细胞强烈地表达血管内皮生长因子-C 和胎盘生长因子,在分泌晚期表达血管生成素-2。在体外培养中,蜕膜中 NK 细胞的条件培养基能够抑制人脐静脉内皮细胞的细胞凋亡。这进一步表明,子宫 NK 细胞在血管发生及再生的过程中起着重要的作用。

九、降钙素基因相关多肽

降钙素基因相关多肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是一种有效的血管扩张因子。在人、大鼠及小鼠中,CGRP 能够抑制子宫肌层的收缩。在妊娠期间,CGRP 同样能够有效地抑制子宫肌层的收缩,使子宫肌层保持相对静止的状态。在分娩期间,随着子宫肌层活动能力的增强,CGRP 及其受体的表达明显下降,说明 CGRP 在维持妊

娠期子宫静止的过程中起重要的作用。孕酮能够使 CGRP 的结合位点上调。如用孕酮拮抗剂处理后,则可使 CGRP 的结合位点下调,说明 CGRP 调节子宫肌层的收缩与孕酮的浓度有关。在分娩开始时,孕酮浓度下降,导致 CGRP 的结合位点下降。这可能是孕酮调节子宫静止的一个途径。

十、cAMP 及 cGMP 途径

(一) cAMP 途径

在整个妊娠过程中,在大约 95% 的妊娠期内子宫都处于相对静止状态。子宫肌层的收缩最终依赖于细胞内钙离子的浓度和敏感性。细胞膜的离子通道通过控制细胞膜的电压和调节细胞内 Ca^{2+} 的浓度在调节平滑肌的活性过程中有重要的作用。在子宫肌层, Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 以及 Cl^{-} 对于调节膜电压以及细胞内游离 Ca^{2+} 的浓度有直接或者间接的作用。

在许多物种中,有很多抑制剂在妊娠期间能够抑制子宫肌层的活动。当这些抑制剂中的一种或多种功能消失后,则导致分娩。这些抑制剂的消失可以作为分娩的标志。但这些抑制剂的提前消失也可导致早产。甲状旁腺激素相关蛋白 (PTHrP) 是由子宫肌层产生的一种抑制剂,孕酮和转化生长因子 β (TGF β) 能够增强 PTHrP 的转录。PTHrP 受体 mRNA 主要定位在大鼠的子宫肌层组织。PTHrP 可能通过其受体以自分泌或旁分泌的形式来激活 G 蛋白的亚单位 $G_{\alpha s}$, 从而增加细胞内 cAMP 的水平。

松弛素 (relaxin) 主要在人的胎膜、蜕膜以及胎盘中表达,这与松弛素通过旁分泌/自分泌的方式在子宫内起作用有关。松弛素能提高子宫肌层的 cAMP 水平,并且能够通过 cAMP 依赖的蛋白激酶的作用,来抑制催产素诱导的磷酸肌醇的转换。松弛素既能抑制子宫肌层的收缩,又能调节子宫颈中结缔组织的改变。在大鼠和豚鼠模型中,松弛素能够抑制自发的子宫收缩,并降低子宫对催产素的敏感性。因此,松弛素的主要作用可能是周期性的。

β -肾上腺素拮抗剂、松弛素、前列环素等与子宫肌层上的受体结合后,会增强腺苷酸环化酶的活性,导致 cAMP 水平的升高,然后 cAMP 可激活蛋白激酶 A。蛋白激酶 A 能使肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase) 磷酸化,可抑制肌球蛋白轻链激酶与 Ca^{2+} -钙调蛋白的结合能力,也可磷酸化细胞膜上的 Ca^{2+} 结合位点,从而导致细胞内结合性钙的增加及细胞内游离 Ca^{2+} 的浓度降低,使子宫处于相对静止状态。

细胞内的 cAMP 的水平与 G 蛋白偶联受体 (G-protein coupled receptors, GPCRs) 的激活及腺苷酸环化酶的活性有关。在 PGE_2 的刺激下, G 蛋白刺激性 α 亚单位 ($G_{\alpha s}$) 在妊娠子宫肌层中的表达增加,同时刺激腺苷酸环化酶使之活化。在妊娠期间, $G_{\alpha s}$ 水平的升高及由此引起的腺苷酸环化酶的激活能够使细胞内的 cAMP 水平升高,从而使子宫肌层保持相对静止的状态。在妊娠的大鼠和人子宫肌层中均能检测到腺苷酸环化酶的表达,并且 GTP 依赖的腺苷酸环化酶的活性在妊娠过程中升高,在分娩开始时下降,这与 $G_{\alpha s}$ 在子宫肌层中的表达规律一致。在自发性流产的子宫肌层中, $G_{\alpha s}$ 及其相关的腺苷酸环化酶的激活均减弱。

(二) cGMP 途 径

与 cAMP 一样, cGMP 作为信号转导的第二信使, 直接或间接地在维持子宫静止的过程中起着重要的作用。在妊娠动物的子宫中能够检测到较高水平的 cGMP, 在分娩时或者分娩后 cGMP 的水平明显降低。人的羊膜细胞能够分泌脑型促钠排泄肽 (brain natriuretic peptide)。在妊娠期间, 脑型促钠排泄肽在羊膜液中的浓度是体液中的 50 倍。在妊娠第 4~6 个月, 脑型促钠排泄肽能够升高子宫肌层中 cGMP 的水平。但在妊娠第 7~9 月的羊膜液中, 脑型促钠排泄肽的浓度明显下降。这表明脑型促钠排泄肽可能通过 cGMP 信号通路在维持妊娠期子宫静止的过程中起作用。

在妊娠的人和大鼠子宫中, NO 能够抑制子宫收缩。人妊娠期间, 用 NO 的供体——硝普钠 (SNP) 处理能够使子宫肌层中的鸟苷酸环化酶水平升高, 导致子宫肌层中 cGMP 的水平升高。但是, 分娩后子宫肌层中鸟苷酸环化酶的水平却显著降低, 说明鸟苷酸环化酶可能在维持子宫静止的过程中也起一定的作用。

第三节 妊娠期的生理变化

由于胎儿生长发育的需要, 在胎盘激素及神经内分泌等因素的影响下, 妊娠母体体内的很多系统发生了一系列适应性的结构和生理性变化。本节中以人为例, 简要介绍一下妊娠期母体体内发生的生理性变化。

一、生殖系统的变化

(一) 子 宫

1. 子宫体

妊娠后的子宫逐渐增大变软。妊娠早期的子宫呈球形或椭圆形且不对称, 胚胎着床部位的子宫壁明显突出。妊娠第 12 周以后, 增大的子宫逐渐呈均匀对称并超出盆腔, 可在耻骨联合上方触及。子宫腔的容量在未妊娠时约为 5ml, 至妊娠足月时约为 5000ml, 约增加 1000 倍。子宫重量在非妊娠时约 50g, 至妊娠足月时约为 1000g, 增加约 20 倍, 这主要是由于子宫肌细胞肥大, 以及胞浆内充满具有收缩活性的肌动蛋白和肌浆球蛋白所致, 为分娩时子宫阵缩提供物质基础。子宫肌层的厚度在未妊娠时约为 1cm, 于妊娠中期逐渐增厚达 2.0~2.5cm, 至妊娠末期时又逐渐变薄, 在妊娠足月时厚度约为 0.5~1.0cm。

子宫的增大最初是受内分泌激素的影响, 以后的子宫增大则是由于子宫腔内的压力增加所致。子宫各部的增长速度不一。宫底部于妊娠后期增长最快。肌纤维在宫体部最多, 子宫下段次之, 宫颈最少, 以适应分娩时子宫阵缩由宫底部向下递减, 促使胎儿娩出。自妊娠第 12~14 周起, 子宫出现不规则无痛性收缩, 可由腹部检查时触知, 孕妇有时自己也能感觉到。这种收缩的特点为稀发和不对称, 尽管其强度及频率随妊娠进展

而逐渐增加，但宫缩时宫腔内压力不超过 1.3~2.0 kPa，故无疼痛感觉，称布-希二氏妊娠阵缩（Braxton-Hicks contraction）。未妊娠子宫中弯曲的动脉到妊娠足月时已变直，以适应胎盘内绒毛间隙血流量增加的需要。妊娠足月时子宫的血流量约为 500~700ml/min，较未妊娠时增加 4~6 倍，其中 5% 供肌层，10%~15% 供子宫蜕膜层，80%~85% 供胎盘。当子宫收缩时，子宫的血流量明显减少。

2. 子宫峡部

位于子宫体与子宫颈之间最狭窄部位。妊娠后变软，妊娠 12 周以后，子宫峡部逐渐伸展拉长及变薄，扩展成为子宫腔的一部分。

3. 子宫颈

在妊娠早期，子宫颈的黏膜充血及组织水肿，致使外观肥大，呈现蓝紫色并且变软。子宫颈管内的腺体增殖，子宫颈的黏液增多，形成黏液栓，具有保护子宫腔免受外来感染侵袭的作用。黏液栓的形成与孕酮的作用有关。

(二) 卵 巢

妊娠期由于黄体的存在，卵巢较未妊娠时大。并且，卵巢上的黄体由月经黄体转化为妊娠黄体后继续存在。妊娠期的卵巢停止排卵。妊娠黄体于妊娠第 10 周前能产生雌激素及孕酮，以维持妊娠的继续进行。黄体的功能于妊娠第 10 周后逐渐由胎盘取代。到妊娠第 3~4 月时，黄体开始萎缩及退化。

(三) 阴 道

妊娠期阴道的黏膜变软，且充血水肿，呈紫蓝色。此期阴道的皱襞增多，且伸展性增加。阴道的脱落细胞也增加，分泌物增多常呈白色糊状。阴道上皮细胞的糖原含量增加及乳酸含量增多，使阴道分泌物的 pH 值降低，不利于一般致病菌生长，有利于防止感染。

二、乳房的变化

在妊娠早期，乳房开始增大，且充血明显。妊娠期间，胎盘分泌的大量雌激素刺激乳腺腺管的发育，而由胎盘分泌的大量孕酮刺激乳腺腺泡的发育。乳腺的完善发育还需垂体催乳激素、胎盘催乳激素、胰岛素、皮质醇、甲状腺激素等的参与。已证实，在乳腺细胞膜上有垂体催乳激素的受体，细胞质内有雌激素受体和孕酮受体。

三、循环系统的变化

(一) 心脏

妊娠后期因膈肌升高，心脏向左、向上及向前移位，更贴近胸壁，心尖搏动左移，心浊音界稍扩大。心脏的血流量增加及血流速度加快，心脏容量从妊娠早期至妊娠末期约增加了 10%，到妊娠晚期时心率每分钟约增加了 10~15 次。

(二) 血压

在妊娠早期及中期血压偏低，在妊娠晚期血压轻度升高。一般收缩压无变化，舒张压因外周血管扩张、血液稀释及胎盘形成动静脉短路而轻度降低，使静脉压稍升高。

(三) 心输出量

心输出量增加对维持胎儿生长发育极为重要。心排出量约自妊娠第 10 周开始增加，至妊娠第 32 周时达到高峰。左侧卧位测得的心排出量较未妊娠时增加约 30%，每次心排出量平均约为 80ml，此后维持在此水平直至分娩。

四、血液的改变

(一) 血液成分的改变

1. 红细胞

妊娠期的骨髓不断产生红细胞，使网织红细胞轻度增多。由于血液稀释，红细胞数减少，由正常的 $4.2 \times 10^6/\text{L}$ 降为 $3.6 \times 10^6/\text{L}$ 。血红蛋白值则由正常的 130g/L 降到 110g/L 。为适应红细胞数的增加以及胎儿生长和孕妇各器官生理变化的需要，应在妊娠中期及晚期开始补充铁剂，以防血红蛋白值过分降低。

2. 白细胞

从妊娠第 7~8 周开始轻度增加，至妊娠第 30 周达到高峰，约为 $10 \sim 12 \times 10^9/\text{L}$ ，有时最高可达 $15 \times 10^9/\text{L}$ ，其中主要为中性粒细胞增多，淋巴细胞增加不多，而单核细胞和嗜酸粒细胞几乎无改变。

3. 凝血因子

妊娠期血液处于高凝状态。凝血因子 II、V、VII、IX、X、XII 含量增加，仅凝血因子 VIII、XI 降低。血小板数无明显改变。妊娠晚期，凝血时间无明显改变。血浆纤维蛋白原含量比非孕妇女增加，妊娠期纤维蛋白溶酶原显著增加，优球蛋白 (euglobulin) 溶

解时间延长，表明妊娠期间纤溶活性降低。

4. 血浆蛋白

由于血液的稀释，血浆蛋白的含量从妊娠早期开始降低，至妊娠中期时血浆蛋白约为 60~65g/L，其中主要是白蛋白减少，约为 35g/L，以后维持在此水平直至分娩。

五、泌尿系统的变化

由于孕妇及胎儿代谢产物的增多，肾脏负担过重。妊娠期肾脏略增大，肾血浆流量及肾小球滤过率于妊娠早期均增加，以后在整个妊娠期间维持高水平，比非妊娠时约增加 35%，肾小球滤过率约增加 50%。尿素、尿酸、肌酸、肌酐等代谢产物的排泄增多，其血中浓度则低于非妊娠妇女。由于肾小球滤过率增加后，肾小管对葡萄糖的再吸收能力不能相应增加，约有 15% 的孕妇饭后出现糖尿。受孕酮的影响，泌尿系统中平滑肌的张力降低。自妊娠中期，肾盂及输尿管轻度扩张，输尿管增粗及蠕动减弱，使尿流缓慢。

六、消化系统的变化

妊娠期胃肠的平滑肌张力降低，贲门括约肌松弛。胃酸及胃蛋白酶分泌量减少。胃排空时间延长，容易出现上腹部饱满感。肠蠕动减弱。肝脏及肝功能无明显改变。胆囊排空时间延长，胆道平滑肌松弛，胆汁黏稠易淤积，故妊娠期间容易诱发胆石病。

七、内分泌系统的变化

(一) 垂 体

在妊娠早期，由妊娠黄体及以后由胎盘分泌的大量雌激素及孕激素，对下丘脑及腺垂体起到负反馈作用，使促性腺激素分泌减少。因此，妊娠期间卵巢内的卵泡不再发育成熟，也无排卵。

催乳素的分泌从妊娠第 7 周开始增多，并随妊娠的进行，浓度逐渐升高。催乳激素有促进乳腺发育的作用，为产后泌乳做准备。

(二) 甲 状 腺

妊娠期由于腺组织增生和血液循环丰富，使甲状腺呈均匀增大，约比未妊娠时增大 65%。由于受大量雌激素的影响，血液循环中的甲状腺激素虽然增多，但游离的甲状腺激素并未增多。孕妇与胎儿体内的促甲状腺激素均不能通过胎盘，而是各自调节自身甲状腺的功能。

八、新陈代谢的变化

(一) 基础代谢率

在妊娠早期，基础代谢率稍下降，在妊娠中期逐渐增高，至妊娠晚期又升高15%~20%。

(二) 碳水化合物代谢

妊娠期胰岛的功能旺盛，分泌的胰岛素增多，使血液循环中的胰岛素浓度增加，故孕妇空腹血糖值稍低于非孕妇女。在妊娠期间，对胰岛素的需要量增多。在进行糖耐量试验时，血糖增高幅度大且恢复延迟。

(三) 脂肪代谢

妊娠期肠道吸收脂肪能力增强，血脂增高，脂肪能较多积存。由于妊娠期的能量消耗增多，使糖原储备减少。当能量消耗过多时，体内会动用大量的脂肪导致血中的酮体增加，易发生酮血症。

(四) 蛋白质代谢

孕妇对蛋白质的需要量增加，呈正氮平衡状态。孕妇体内储备的氮除供给胎儿生长发育，以及子宫和乳房增大的需要外，还为分娩期消耗做准备。

(五) 矿物质代谢

胎儿生长发育需要大量钙、磷及铁。胎儿骨骼及胎盘的形，需要较多钙。在妊娠末期，胎儿体内的钙和磷绝大部分是在妊娠最后2个月内积累的。至少应于妊娠最后3个月补充维生素D及钙，以提高血钙值。此外，胎儿造血及酶合成均需要较多的铁。

第四节 妊娠诊断

一、人的妊娠诊断

(一) 早期妊娠的症状

1. 停经

生育年龄的已婚妇女，平时月经周期规则，一旦月经期过期10日或10日以上时，

应疑为妊娠。若停经已达 8 周，妊娠的可能性更大。停经是妊娠最早与最重要的征状，但停经不一定就是妊娠，应予以鉴别。哺乳期妇女的月经虽未恢复，仍可能再次妊娠。

2. 早孕反应

约半数妇女于停经 6 周左右出现畏寒、头晕、乏力、嗜睡、流涎、食欲不振、喜食酸物或厌恶油腻、恶心、晨起呕吐等症状，称早孕反应。恶心、晨起呕吐与体内 hCG 增多、胃酸分泌减少以及胃排空时间延长等可能有关。并且，孕妇多有易疲劳、嗜睡的现象。早孕反应多于妊娠第 12 周左右自行消失。

3. 尿频

妊娠妇女在妊娠早期会出现尿频，系增大的前倾子宫在盆腔内压迫膀胱所致。约在妊娠第 12 周以后，当子宫体进入腹腔不再压迫膀胱时，尿频症状自然消失。

4. 乳房的变化

从妊娠第 8 周开始，由于雌激素及孕酮的作用增强，促使乳腺的腺泡及乳腺小叶增生发育，使乳房逐渐增大。孕妇会感觉乳房轻度胀痛及乳头疼痛，初孕妇女比较明显。妊娠期乳头及其周围的皮肤（乳晕）着色加深，乳晕周围有蒙氏结节显现。哺乳期妇女一旦受孕后，乳汁分泌会明显减少。

5. 生殖器官的变化

在妊娠第 6~8 周用阴道窥器检查时，可见阴道壁及宫颈充血，呈紫蓝色。检查发现宫颈变软，子宫峡部极软，感觉宫颈与宫体似不相连，称黑加征。随妊娠的进展，子宫体增大、变软，最初是子宫前后径变宽略饱满，于妊娠第 5~6 周时子宫体呈球形，至妊娠第 8 周时子宫体约为非妊娠子宫体的 2 倍，妊娠第 12 周时约为非妊娠子宫体的 3 倍。当子宫底超出骨盆腔时，可在耻骨联合上方触及。

(二) 妊娠诊断的辅助技术

1. 超声检查

(1) B 超

是检查早期妊娠快速而准确的方法。在增大的子宫轮廓中，可见到来自羊膜囊的圆形光环（妊娠环），妊娠环内为液性暗区（羊水）。最早在妊娠第 5 周时可见到妊娠环。若在妊娠环内见到有节律的胎心搏动和胎动，可确诊为早期妊娠，且为活胎。

(2) 超声多普勒法

用超声多普勒仪，在增大的子宫区内能听到有节律、单一高调的胎心音，胎心率多在 150~160 次/分，可确诊为早期妊娠且为活胎，最早出现在妊娠第 7 周时。此外，还可听到脐带血流音。

2. 妊娠试验

孕妇尿液中含有 hCG，可用免疫学方法进行检测。目前临床上，多采用试纸法进行检测。用此法可协助诊断早期妊娠。

3. 宫颈黏液检查

在早期妊娠阶段，子宫颈黏液的量少质稠。子宫颈黏液涂片干燥后，在光镜下可见到排列成行的椭圆体，但见不到羊齿植物叶状结晶。

二、家畜的妊娠诊断

家畜的早期妊娠诊断是提高家畜繁殖效率和提高畜牧业生产效益的重要技术措施。家畜配种后，能尽早地进行妊娠诊断，对于减少空怀、增加畜产品和有效实施动物生产都是相当重要的。最简单的早孕诊断方法对于畜牧业的发展具有重大的意义。现在应用的方法主要分为临床诊断和实验室诊断。

1. 临床诊断法

现在广泛应用的临床诊断主要包括直肠检查法、阴道检查法以及超声诊断法等。

(1) 直肠诊断法

直肠检查法是对大型家畜常用的、最基本的，也是比较可靠的诊断方法，是通过直肠壁直接接触卵巢、子宫和胎泡的形态变化，来了解妊娠的进程。在妊娠早期，主要以卵巢上黄体的状态、子宫角的形状和紧张程度来判断。将包被胎儿的子宫部分、胎儿、胎膜和胎水总称为胎泡。在胎泡形成以后，便以胎泡的大小来判断。当胎泡下沉入腹后，便以卵巢的位置、子宫颈的紧张度和子宫动脉的妊娠脉搏来判断。在不同的动物中，判断的标准有所差别。

(2) 阴道检查法

母畜妊娠后，阴道发生一些有规律的生理变化。这些变化虽然不能作为妊娠的主要依据，但是，在判断妊娠的过程中可以作为参考。阴道检查法主要用手触摸或者使用内窥镜观察阴道黏膜、黏液和子宫颈口的变化来确定是否妊娠，检测的主要指标包括颜色、黏度以及黏液栓。

(3) 超声诊断法

超声波诊断法是把超声波的物理特点和动物组织结构的声学特征紧密结合的一种物理诊断法。它以高频声波对动物的子宫进行探查，然后将其回波放大后以不同的信号显示出来。在人中，B超已经被广泛的应用。超声波诊断技术最早应用在兽医领域，目前超声波在家畜早期妊娠诊断中的应用相当广泛，应用的超声波诊断仪器主要有A超、B超和多普勒超声3种。奶牛、黄牛、绵羊、山羊、猪、驴等畜种一般在配种后第25~30天左右即可达到较为理想的诊断效果。

2. 实验室诊断法

(1) 免疫学诊断法

雌性动物妊娠后，胚胎、胎盘或者母体的一些组织能够产生一些具有规律性变化的化学物质，如激素或酶类等，通过检测这些物质是否变化来确定动物是否妊娠。现在应用的免疫学诊断法主要包括放射性免疫测定法和酶免疫测定法。

放射性免疫测定法是一种将放射性同位素的测量与免疫反应相结合的微量分析方法，主要应用于检测家畜血浆中的孕酮浓度来判断是否妊娠。确定妊娠动物血浆中的孕酮浓度因家畜的种类、采样以及样品的处理方法不同而不同，一般牛 $\geq 1\text{ng/ml}$ ，羊 $\geq 0.5\text{ng/ml}$ ，猪 $\geq 6\text{ng/ml}$ 。

酶免疫测定法主要应用于乳汁孕酮的测定。现在已经发展到应用诊断试剂盒进行诊断。从其原理上分，主要有三种方法：即酶联免疫吸附测定法、孕酮同质酶免疫测定法以及孕酮乳胶凝集实验法。

(2) 早孕相关性血小板减少诊断法

血小板计数明显地降到正常水平之下的现象叫做血小板减少。早孕相关性血小板减少的原因是因为受精卵或胚胎产生了血小板活化因子（PAF）。血小板明显减少是早孕期间所特有的一种妊娠反应，因此根据血小板是否明显减少就可在数小时至数天内对家畜进行早期妊娠诊断。但由于此法诊断的准确率较低，在生产中很少应用。

(3) 碱性磷酸酶活力测定法

碱性磷酸酶（AKP）广泛分布于动物及人体的各种组织和体液中，随妊娠的进展而增多，在妊娠家畜血液中的活力都比较高。因此，检测血清中碱性磷酸酶活力的变化，有可能成为早期妊娠诊断的一种新方法。

掌握早期妊娠诊断技术，可以充分发挥家畜的繁殖潜力，是提高畜牧业生产效益的有力措施，有着广泛的实践意义。目前，此技术正向着准确、快捷、经济、方便的方向发展，总的趋势是：诊断的准确度和灵敏度向高水平发展，诊断的时间向早期化发展，诊断的地点由实验室向生产现场转移，诊断方式由定量向定性发展。随着诊断方法的日益改进和提高，以及新方法的建立，必将产生出一种理想、高效的早期妊娠诊断方法，更好地为畜牧生产服务。

(杨增明 刁红录)

主要参考文献

中国农业大学主编. 2000. 家畜繁殖学（第三版）. 北京：中国农业出版社

Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. 2001. Nutrition of the human fetus during the first trimester: a review. Placenta 22 (suppl A): S70~S76

Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. 2002. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 87: 2954~2959

Cameron IT, Campbell S. 1998. Nitric oxide in the endometrium. Hum Reprod Update 4: 565~569

Cecim M, Fadden C, Kerr J, Steger RW, Bartke A. 1995. Infertility in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene: disruption of the neuroendocrine control of prolactin secretion during pregnancy. Biol Reprod 52: 1187~1192

- Challis JRG, Matthews SG, Gibb W, Lye SJ. 2000. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev* 21: 514~550
- Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martal J. 2002. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/ Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol* 53: 241~256
- Chwalisz K, Garfield RE. 1998. Role of nitric oxide in the uterus and cervix: implications for the management of labor. *J Perinat Med* 26: 448~457
- Doheny HC, Houlihan DD, Ravikumar N, Smith TJ, Morrison JJ. 2003. Human chorionic gonadotrophin relaxation of human pregnant myometrium and activation of the BKCa channel. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4310~4315
- Escalada J, Cacicedo L, Ortego J, Melian E, Sanchez-Franco F. 1996. Prolactin gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of dopamine and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 137: 631~637
- Friedman SA, Lubarsky SL, Ahokas RA, Nova A, Sibai BM. 1995. Preeclampsia and related disorders: Clinical aspects and relevance of endothelin and nitric oxide. *Clin Perinatol* 22: 343~355
- Gohar J, Mazor M, Leiberman JR. 1996. GnRH in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet* 259: 1~6
- Hansell DJ, Bryant-Greenwood GD, Greenwood FC. 1991. Expression of the human relaxin H1 gene in the decidua, trophoblast, and prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 899~904
- Hansen TR, Austin KJ, Perry DJ, Pru JK, Teixeira MG, Johnson GA. 1999. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *J Reprod Fertil* 54 (Suppl.): 329~339
- Hay DL. 1988. Placental histology and the production of human choriogonadotropin and its subunits in pregnancy. *Brit Obstet Gynecol* 95: 1268~1271
- Henson MG, Pepe GJ, Albrecht ED. 1991. Regulation of placental low-density lipoprotein uptake in baboons by estrogen: dose-dependent effects of the anti-estrogen ethamoxy-triphetol (MER-25). *Biol Reprod* 45: 43~48
- Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. 2003. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus: a review. *Placenta* 24 (Suppl A): S86~93
- Kammerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kampgen E, Dietl J. 2000. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83 (+) dendritic cells. *Am J Pathol* 157: 159~169
- Kurtzman JT, Spinnato JA, Goldsmith LJ, Zimmerman MJ, Klem M, Lei ZM, Rao CV. 1999. Human chorionic gonadotropin exhibits potent inhibition of preterm delivery in a small animal model. *Am J Obstet Gynecol* 181: 853~857
- Li XF, Charnock-Jones, Stephen D, Hiby S, Malik S, Day K, Licence D, Bowen JM, Gardner L, King A, Loke YW, Smith SK. 2001. Angiogenic growth factor messenger ribonucleic acids in uterine natural killer cells. *J Clin Endo Metab* 86: 1823~1834
- Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. 1999. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil* 54 (Suppl.): 317~328
- Maul H, Longo M, Saade GR, Garfield RE. 2003. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Curr Pharm Des* 9: 359~380
- Henson MC. 1998. Pregnancy maintenance and the regulation of placental progesterone biosynthesis in the baboon. *Hum Reprod Update* 4: 389~405
- Michimata T, Tsuda H, Sakai M, Fujimura M, Nagata K, Nakamura M, Saito S. 2002. Accumulation of CRTH2-positive T-helper 2 and T-cytotoxic 2 cells at implantation sites of human decidua in a prostaglandin D (2) -mediated manner. *Mol Hum Reprod* 8: 181~187
- Oon VJ, Johnson MR. 2000. The regulation of the human corpus luteum steroidogenesis: a hypothesis? *Hum Reprod Update* 6: 519~529
- Perrot-Appinat M. 1999. Effect of estrogens on vascular proliferation. *Therapie* 54: 333~337
- Piccinni MP. 2003. Role of immune cells in pregnancy. *Autoimmunity* 36: 1~4
- Price SA, Bernal AL. 2001. Uterine quiescence: the role of cyclic AMP. *Experimental Physiology* 86: 265~272
- Rama S, Rao AJ. 2001. Embryo implantation and GnRH antagonists: the search for the human placental GnRH receptor.

- Hum Reprod 16: 201~205
- Rao CV. 1997. Potential novel roles of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin during early pregnancy in women . Early Pregnancy 3: 1~9
- Ren SG, Braunstein GD. 1992. Human chorionic gonadotropin . Semin Reprod Endocrinol 10: 95~100
- Resnik R. 1983. Endocrine modulation of uterine blood flow in pregnancy . Clin Perinatol 10: 567~573
- Saito S, Tsuda H, Michimata T. 2002. Prostaglandin D2 and reproduction . Am J Reprod Immunol 47: 295~302
- Saito S, Tsukaguchi N, Hasegawa T, Michimata T, Tsuda H, Narita N. 1999. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/ Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells . Am J Reprod Immunol 42: 240~245
- Saito S . 2001. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/ placenta . J Reprod Immunol 52: 15~33
- Saito S. 2000. Cytokine network at the feto-maternal interface . J Reprod Immunol 47: 87~103
- Sanborn BM. 2000. Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium . J Soc Gynecol Investig 7: 4~11
- Sch fer-Somi S . 2003. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review . Anim Reprod Sci 75: 73~94
- Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. 1997. Nitric oxide and pregnancy . Am J Physiol 272: R441~463
- Sladek SM, Westerhausen-Larson A, Roberts JM. 1999. Endogenous nitric oxide suppresses rat myometrial connexin 43 gap junction protein expression during pregnancy . Biol Reprod 61: 8~13
- Slattery MM, Brennan C, O Leary MJ, Morrison JJ. 2001. Human chorionic gonadotrophin inhibition of pregnant human myometrial contractility . BJOG 108: 704~708
- Spencer TE, Bazer FW. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy . Front Biosci 7: d1879~1898
- Stouffer RL. 2003. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis . Hum Reprod Update 9: 99~117
- Telfer JF, Itoh H, Thomson AJ, Norman JE, Nakao K, Campa JS, Poston L, Tribe RM, Magness RR. 2001. Activity and expression of soluble and particulate guanylate cyclases in myometrium from nonpregnant and pregnant women: down-regulation of soluble guanylate cyclase at term . J Clin Endo Metab .86: 5934~5943
- Thota C, Gangula PR, Dong YL, Yallampalli C. 2003. Changes in the expression of calcitonin receptor-like receptor, receptor activity - modifying protein (RAMP) 1, RAMP2, and RAMP3 in rat uterus during pregnancy, labor, and by steroid hormone treatments . Biol Reprod 69: 1432~1437
- Weiner CP, Thompson LP. 1997. Nitric oxide and pregnancy . Semin Perinatol 21: 367~380
- Xiao CW, Murphy BD, Sirois J, Goff AK. 1999. Down-regulation of oxytocin-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase expression by interferon-tau in bovine endometrial cells . Biol Reprod 60: 656~663

第十章 分娩与泌乳

第一节 分娩发动和分娩预兆

当妊娠期满，胎儿发育成熟时，母体将胎儿及其附属物从子宫排出体外，这一生理过程称之为分娩（parturition）。

为了保证动物的正常生殖，防止由生殖而带来的分娩期和产后期疾病，必须熟悉和掌握正常分娩过程及分娩的机理。

一、分娩发动

哺乳动物都有一定的怀孕期，胎儿发育成熟或发育到一定程度时，分娩即自然开始。对这一问题虽然经过长期研究，但迄今其调节机制并不完全清楚。一般认为，分娩的发生不是由某一特殊因素引起的，而是由机械性伸张、激素和神经调节以及胎儿等多种因素相互联系、协调所促成的。20 世纪 60 年代以来提出的理论认为，胎儿的丘脑下部-垂体-肾上腺轴对启动分娩起着重要作用。

（一）胎 儿 因 素

胎儿的丘脑下部-垂体-肾上腺轴，特别是在羊和牛，对于发动分娩起着决定性作用。切除羊胎儿的丘脑下部、垂体或肾上腺，可阻止分娩，使怀孕期延长。在绵羊、山羊和猪中进行的研究说明，胎儿垂体的促肾上腺皮质激素（ACTH）对分娩启动起着主要作用。给切除垂体或肾上腺的胎儿滴注 ACTH 或地塞米松能诱发分娩，而且给怀孕末期的正常胎羔滴注合成的 ACTH 或地塞米松亦能诱发早产。这种结果在马的研究中也得到了证实。

1. 胎儿大脑对分娩的作用

羊的大脑发育快，与分娩发动有密切关系，却不受母体因素的影响。如损伤羊胎儿的垂体，则分娩延迟，因为此时胎儿 ACTH 和皮质醇的产生均受到影响。如果注射 ACTH 或皮质醇，可以引起分娩；而对双胎羔羊之一切除垂体，则被切除者分娩延迟，未切除者分娩正常。

而在人和大鼠的胎儿期，胎儿大脑发育比羊慢。因而人的分娩不受胎儿大脑的影响，而主要是受母体因素的影响。

2. 胎儿肾上腺皮质醇对分娩的作用

ACTH 的靶器官是胎儿的肾上腺皮质。它起初是刺激肾上腺皮质的生长，以后是刺激肾上腺皮质由其他类固醇合成皮质醇，而皮质醇与分娩的启动有密切关系。

在绵羊，胎儿皮质醇启动分娩时的靶器官是胎盘，它能诱导母体胎盘细胞内的溶酶体、线粒体与微粒体合成前列腺素，使黄体机能减退，抑制孕酮的产生；并能促进胎盘产生雌激素，从而破坏雌激素与孕酮的平衡。绵羊血浆中的皮质醇含量随怀孕进程而上升，分娩开始之前增加至最高限度，即由未孕时的 1 ng/ml 增加至 $100\sim 200\text{ ng/ml}$ 。这种升高主要是由于胎儿肾上腺皮质束状带和网状带产生的糖皮质醇的量急剧增加造成的。有证据表明，触发分娩主要归因于糖皮质醇，而非盐皮质醇的作用。胎儿肾上腺皮质分泌皮质醇的生理节奏与分娩的时间密切相关。根据临床调查，产妇的分娩多在午夜零点至凌晨三点启动，而此时也是胎儿肾上腺皮质分泌皮质醇水平最高的时间。

人类无脑儿和死产儿的怀孕期延长，其中都有一个共同的缺陷，就是胎儿缺少肾上腺皮质。

(二) 胎盘的内分泌作用

除了为胚胎代谢提供营养物质和氧外，胎盘的功能还包括内分泌作用。胎盘最重要的功能之一是产生孕酮。在灵长类，这种功能是在妊娠早期建立的。很可能在胚胎着床后 2~3 周内，灵长类的胎盘就能维持妊娠。在家畜中，胎盘分泌能够维持妊娠的孕酮的时间较晚（绵羊一般是在 150 天妊娠期的第 50 天，马在 340 天妊娠期的第 70 天，猫在 65 天妊娠期的第 45 天）。然而，在牛、山羊和猪等家畜中，胎盘不能分泌足够的孕酮来维持妊娠。

与孕酮产生相反，雌激素的产生需要胎儿和胎盘的相互作用。这种相互作用方式在灵长类研究得比较清楚，特别是 Dycfaluszy 的实验发现，灵长类胎盘不能从孕酮产生雌激素，因为胎盘中不含有将孕酮转化为雌激素的酶。这是在进化过程中形成的体系，即胎盘为胎儿供应孕烯醇酮（孕酮的直接前体物），胎儿肾上腺皮质区将孕烯醇酮转化为 C-19 雄激素——脱氢表雄酮。脱氢表雄酮再转运到胎盘，由胎盘将脱氢表雄酮转化成雌激素。在人类，妊娠时的主要雌激素是雌三醇。由于胎儿参与雌三醇的产生，因此胎儿的发育是否正常可以通过母体血浆中雌三醇的浓度来确定。

马的情况与灵长类相似，雌激素的产生也需要胎盘和胎儿的相互作用。根据 Pashen 和 Allen 的结果，在马中由胎儿的性腺替代了灵长类胎儿肾上腺的作用，起着协同合成雌激素的内分泌器官的作用。性腺的间质细胞似乎是这种相互作用的关键细胞。在妊娠后半期，胎儿性腺中该细胞的体积要比母体的大。在其他家畜，妊娠期间雌激素的产生发生在妊娠的较晚时期，可能是由于胎盘中使孕酮转化为雌激素的酶表达产生较晚的原因，而不需要胎儿内分泌器官的直接干预（尽管胎儿可的松对于这种胎盘酶的产生是重要的，特别是在绵羊中）。

在妊娠时胎盘还产生一些蛋白质激素。例如猫、狗和马胎盘分别在妊娠第 20、20 和 70 天时分泌松弛素（relaxin）。该激素除了在胎儿分娩时起软化盆腔生殖道的重要作

用外，它还可能协同孕酮维持妊娠。此外，猪、牛和灵长类的黄体在妊娠期间也可以产生松弛素，在分娩前伴随黄体溶解而释放。

目前在家畜中惟一鉴定出的绒毛膜促性腺激素 (CG) 是马的 CG (equine CG, eCG)，以前被其发现者 Harold Cole 称为孕马血清促性腺激素 (PMSG)。eCG 是由滋养层细胞产生的。该滋养层细胞最初是在绒毛中形成一个带 (chorionic girdle)，在妊娠 35 天左右离开并侵入子宫内膜形成一种细胞联合体，称为子宫内膜杯。eCG 促进妊娠初级黄体分泌孕酮并有助于次级黄体的形成 (通过卵泡的黄体化或排卵形成的)。eCG 对于维持妊娠的必要性还不清楚，因为初级黄体对于妊娠的维持已经足够了。

胎盘催乳素是胎盘产生的另一个蛋白质激素。在灵长类，该激素的产生在 CG 分泌降低时开始增加。在山羊和绵羊中已报道有胎盘催乳素，它们在妊娠后期分泌增加。该激素似乎具有生长激素和催乳素的基本作用。例如，在奶牛中，胎盘催乳素对于乳腺腺泡的发育及确定下一个泌乳期的时期具有重要作用。另外，在妊娠时垂体生产的催乳素增加，它对分娩期间乳腺腺泡的发育很重要。在妊娠后期催乳素分泌的增加是由于雌激素作用于腺垂体所致。

(三) 母体激素的变化

母体激素的变化，可能和启动分娩有关。然而，这些变化在不同的动物之间是有差别的，所以还不能仅靠这些变化来说明分娩的发生。

1. 孕酮

黄体及胎盘产生的孕酮，对于维持妊娠起着极其重要的作用。孕酮能使子宫肌细胞保持静息状态，抑制子宫肌收缩，阻止收缩波的传播，使整个子宫在同一时间内不能作为一个整体发生协调收缩。孕酮在妊娠期间还能对抗雌激素的作用，并能降低子宫对催产素的敏感性，抑制子宫自发性的或由催产素引起的收缩作用。此外，动物试验还证明，孕酮浓度下降伴随有 $\text{PGF}_2\alpha$ 分泌增多。因此孕酮浓度下降，使抑制子宫肌收缩的作用被解除，可能是启动分娩的一个重要诱因。在家畜，母体血液中孕酮浓度下降恰巧发生在分娩之前，这可能是胎儿糖皮质激素刺激子宫合成前列腺素使黄体溶解所致。在山羊，也可能是由于皮质醇的浓度升高，使孕酮的产生受到抑制，从而引起黄体机能减退。但据报道，马的孕酮水平至分娩时并不下降。人类在临近分娩时孕酮水平也没有明显变化。有人报道，足月时子宫静脉血中的孕激素浓度下降。因此，仅仅分析血浆孕酮水平还难以说明其在人类分娩中的作用。新近的研究着重于探索妊娠子宫内，尤其在子宫胎盘水平上是否存在对孕酮的局部调节机制。在人类，分娩发动前是否发生像孕酮撤退一样的特殊的内分泌或代谢变化，目前尚未得到证实。研究分娩的学者正在努力探究灵长类与其他哺乳类动物分娩过程中内分泌生理差异的生物学意义。尽管在分娩前某些内分泌或其他方面的变化有差异，但可以推测，哺乳类动物分娩过程基本的分子生物学变化过程是相似的。找出妊娠妇女与哺乳类动物内分泌的区别点对于寻找分娩发动的原因非常重要。

2. 雌激素

随着妊娠期的增长，在母体产生的雌激素以及胎儿皮质醇增加的影响下，胎盘产生的雌激素逐渐增加，分娩前达到最高峰。绵羊的这种升高一般发生在分娩前 16~24h 之内。据报道，产前 2 天， 17β 雌二醇浓度为 20pg/ml；至产前数小时则突然升高到 880pg/ml。在分娩前，体内雌激素的水平增高而孕酮浓度下降，导致孕酮与雌激素的比值发生变化，使子宫肌对催产素的敏感性增高。但马的雌二醇水平在分娩前即已下降。

雌激素能刺激孕畜子宫肌的生长及肌动球蛋白的合成，提高子宫肌的收缩能力，使其产生规律性收缩，而且能使子宫颈、阴道、外阴及骨盆韧带（包括荐坐韧带、荐髂韧带）变得松软。在分娩时，雌激素能增强子宫肌的自发性收缩，这可能与它能对抗孕酮的抑制作用、刺激催产素受体的发育（使子宫肌对催产素的敏感性增强）和刺激前列腺素的合成及释放有关。

临床内分泌学说认为催产素受体、前列腺素及间隙连接形成三方面的协同作用，是启动和维持人类分娩的关键。雌激素和孕酮正是通过上述环节而发挥其作用的，雌激素是通过增加催产素膜受体，降低子宫肌细胞对刺激反应的阈值，并通过增加其收缩单位而提高对刺激的反应性，从而提高子宫肌细胞的兴奋性。雌激素还通过与孕激素相互作用来刺激前列腺素的合成。另外，雌激素也参与间隙连接的形成，使宫颈成熟。

3. 催产素

催产素是由下丘脑神经细胞分泌的，随后进入垂体后叶。在临产时孕体也能释放催产素。催产素的释放当胎头通过产道时才出现高峰，此时子宫已发生强烈收缩，因而催产素可能不是启动分娩的主要因素。但它能刺激前列腺素的释放，而前列腺素对启动及调节子宫收缩发挥主要作用。

子宫对催产素的敏感性随孕期不同而异。怀孕早期，子宫对大剂量催产素也不发生反应，因为它会受到催产素酶的分解。至怀孕后期，由于降解催产素的酶逐渐消失，仅用少量催产素即可引起子宫强烈收缩。实验证明，到怀孕末期，子宫对催产素的敏感性可增大 20 倍。临产前，孕酮分泌量下降，雌激素增多，可以激发催产素的分泌。根据多年来临床运用催产素进行引产收到的效果，无论是来自胎儿还是母体的催产素，对启动分娩，特别是对维持产程的正常进行，都有一定作用。

4. 前列腺素

实验证明，分娩时羊水中的前列腺素及其代谢物较分娩前明显增多，母体子叶中含量更高，而且比羊水出现要早。母体胎盘不但能合成前列腺素，而且临产前雌激素增多也刺激前列腺素的产生和释放。前列腺素可以直接从母体胎盘渗入子宫肌层，也可由血液循环进入子宫肌而引起收缩反应。前列腺素对分娩所起的作用为，对子宫肌有直接刺激作用，使子宫收缩增强；可溶解黄体，减少孕酮的抑制作用；以及刺激垂体释放催产素。前列腺素引起子宫平滑肌收缩的作用机理尚不清楚，它可能与子宫肌的腺苷酸环化酶系统相互作用，降低 cAMP 的水平，升高 cGMP 的水平，导致子宫肌收缩。

(四) 神 经 系 统

将支配子宫的神经破坏或者用其他方法消除神经系统的影响后，并不能阻止分娩，可见神经系统对分娩并非十分必需。然而，神经系统对于分娩过程还是有调节作用的。胎儿发育成熟后，使子宫容积和张力增加，引起子宫内压力发生变化，对扩张子宫颈发生机械作用。这种作用通过神经纤维传至下丘脑，促使垂体后叶分泌催产素，从而引起子宫收缩，启动分娩。另外，胎儿的前置部分对子宫颈及阴道产生刺激，也能通过神经传导使垂体释放催产素，增强子宫收缩。很多家畜的分娩多半发生在夜间，这时外界光线及干扰减少，中枢神经易于接受来自子宫及产道的冲动信号，这也说明外界因素可通过神经系统对分娩发生作用。特别是马和驴，分娩多半发生在天黑安静的时候，而且以晚上 10~12 点钟最多，但奶山羊白天分娩的较多。

(五) 免疫学因素

胎儿带有父母双方的遗传物质，因而对母体免疫系统来说，胎儿是一种异物或半异物，能引起母体产生排斥作用。在正常妊娠期间，因为有多种因素（如胎盘屏障、免疫细胞表达的细胞因子等）的制约，使得这种排斥作用受到抑制，而且孕酮也能阻止母体发生免疫反应，所以胎儿不会受到母体排斥，妊娠得以维持下去。等到分娩时，由于孕酮浓度急剧下降，胎盘的屏障作用减弱，因而出现在排斥现象而将胎儿排出体外。再者，胎儿仅在发育到一定阶段（大约在完全发育成熟时），当所产生的在免疫学上有保护作用的细胞数量降到最低时，才会使母畜发生免疫学反应，排斥胎儿。

目前认为，分娩主要是由胎儿发动的。但分娩过程的完成乃是一种综合机理。虽然各种家畜分娩的机理可能有所不同，有些因素也可能比另一些因素起有更重要的作用，但分娩的启动很可能是各种因素共同作用的结果。根据这种论点，对分娩启动的机理可以综合解释如下。

在妊娠期间，尽管不断增大的胎儿能够扩张子宫肌肉，但孕酮抑制着子宫肌肉的收缩性。胎儿发育成熟时，它的脑垂体分泌大量促肾上腺皮质激素，使其肾上腺皮质激素的含量增多，引起胎儿分泌大量皮质醇，致使胎儿胎盘分泌大量雌激素。同时，皮质醇也进入母体血液循环系统，刺激胎盘产生雌激素，使母体血浆中游离雌激素的浓度升高，激发子宫产生 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 。前列腺素及糖皮质激素促使妊娠黄体萎缩，并抑制胎盘产生孕酮。孕酮水平下降后，解除了对子宫的抑制作用。前列腺素和雌激素均能刺激子宫肌发生收缩，而且雌激素可进一步促进前列腺素的合成和释放。释放的前列腺素刺激垂体和黄体释放催产素。另外，随着分娩的开始，胎囊及胎儿前置部分对子宫颈及阴道的刺激反射性地使母体垂体后叶释放的催产素增多。在前列腺素和催产素的共同作用下，子宫肌和腹肌发生有节律的强烈收缩，从而将胎儿排出。

必须指出，分娩的发动是有明显种间差异的，上述机理可能适用于绵羊、山羊和牛，但对于大鼠、家兔、恒河猴和人未必适用，这些动物和人分娩发动的具体机理还有待进一步研究。在人类妊娠分娩中没有出现孕酮撤退，近年来的研究发现，孕激素、受

体-孕激素-核反应素黏附减少，则激活的孕激素转录下降，这可能是灵长类分娩发动的新概念。

一般来说，胎儿最后成熟、妊娠结束、产道扩张、子宫收缩的发动、母体行为、乳的生成和排乳能力等过程通常都是由神经内分泌系统来调节的，而且非常协调一致。各种动物的机理之所以有所差异，主要是由于维持妊娠的方式和撤销维持妊娠的机理不同所致。图 10-1 表示的是相关激素参与绵羊胎儿分娩过程中的可能作用机理。

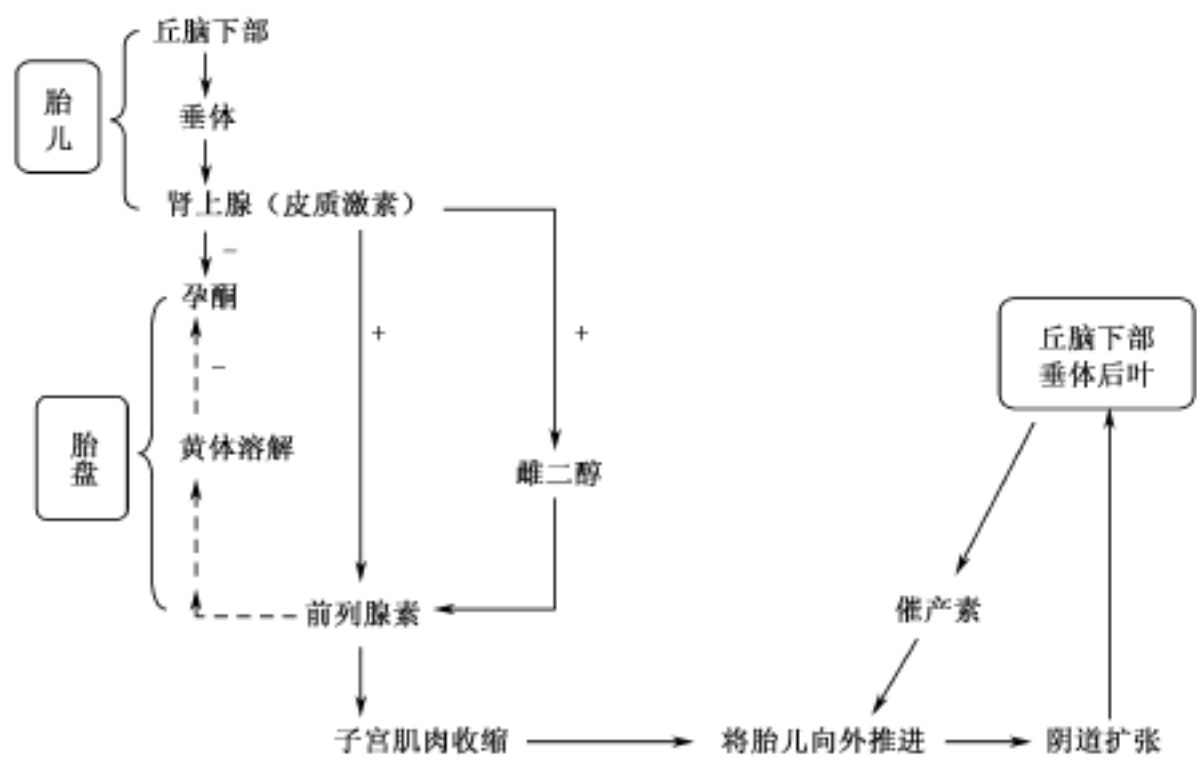


图 10-1 引起绵羊子宫收缩以致分娩的激素机理图解 (引自王建辰，1993)

二、分娩前的体征变化

随着胎儿的发育成熟和分娩期逐渐接近，雌性动物的生殖器官、乳腺及骨盆部会发生一系列的变化，以适应排出胎儿及哺育新生儿的需要。雌性动物的精神状态及全身状况，也有所改变。通常把这些变化称为分娩预兆。从这些预兆，可以预测分娩的时间，以便做好接产的准备工作。

（一）乳 房

乳房在分娩前膨胀增大。奶牛约在产前 10 天左右乳房开始膨大，而马和驴约在产前一个半月到两个月乳房开始膨大，而且乳房底部出现水肿。猪在产前半个月左右乳房基部与腹壁之间也出现明显的界限。

乳房出现上述变化时，距分娩尚远。判断分娩时刻比较可靠的现象是乳头及乳汁的变化。奶牛在产前（经产牛约为 10 天）可自乳头中挤出少量清亮胶样液体或初乳；至产前 2 天内，除乳房极度膨胀及皮肤发红以外，乳头中充满白色初乳，乳头表面被覆一层蜡状物。有的奶牛有漏奶现象，乳汁呈滴或成股流出来；漏奶开始后数小时至一天即

分娩。其他动物在临产前也有类似现象。

乳头及乳汁的变化虽然对估计分娩时刻比较可靠，但受饲养条件的影响很大。在营养不良的母畜，变化不很明显。是否漏奶与乳导管的松紧也有密切关系。因此，不能单独依靠乳头及乳汁做出判断。

(二) 软 产 道

子宫颈在分娩前约 1~2 天开始肿大及松软，原来封闭子宫颈管的黏液软化，流入阴道，有时则滞留于阴门之外，呈半透明索状。这在牛及羊比较明显，猪有时见于产前数小时，马则无此现象。但牛在怀孕后半期，尤其是最后一个月，由于黏液的更新，有时也可以流出阴门之外。因此，单独依靠流出黏液这一点来判断分娩，也可能发生错误。但在子宫颈开始扩张以后，即已进入开口期，分娩必将在数小时内发生（经产牛较快，初产牛较慢）。孕妇在分娩开始前 24~28h，因子宫颈内口附近的胎膜与该处的子宫壁分离，毛细血管破裂而经阴道排出少量血液，又由于宫颈管开始开大，子宫颈管内原有的黏液栓与少量血液相混而排出，称为见红，是分娩即将开始的一个比较可靠的征象。

阴道壁松软，并且变短，这在马和驴特别明显。阴道黏膜潮红，黏液由原来的浓厚、黏稠变为稀薄、滑润。牛的阴唇在分娩前约 1 周开始逐渐柔软及肿胀，增大 2~3 倍，皮肤上的皱襞展平。马及乳山羊的不甚明显，至产前数小时或十余小时才显著增大。猪阴唇的肿大开始于产前 3~5 天。

分娩尚未发动，孕妇常出现不规律宫缩，其特点是收缩力弱，持续时间短，常少于 30 秒，且不规律，强度也不逐渐增加。常在夜间出现，清晨消失。宫颈管不随宫缩而消失及扩张，给予镇静剂能抑制其发生。

(三) 骨 盆 韧 带

骨盆韧带在临近分娩时开始变得松软。初产妇多有上腹轻松感，进食增多，呼吸轻快，系因胎先露（分娩时，胎儿最先进入骨盆入口的部分叫“先露部”）进入骨盆入口，使子宫底下降的缘故。牛的荐坐韧带后缘为软骨样，触诊感硬，外形清楚。至怀孕末期，因为骨盆血管内血量增多，引起静脉淤血后使毛细管壁扩张，血液的液体部分渗出管壁后浸润周围的组织。骨盆韧带从分娩前 1~2 周即开始软化，至产前 12~36h 荐坐韧带后缘变得非常松软，外形消失，尾根两旁只能摸到一堆松软组织，且荐骨两旁组织塌陷。但初产牛的这些变化不明显。奶山羊荐坐韧带的软化也很明显，荐骨两旁各出现一纵沟。在荐坐韧带后缘完全松软之后，分娩即可在不超过一天内发生。马、驴和猪的荐坐韧带后缘虽然也会变得柔软，但因这里的软组织本来即较丰满，所以变化不甚明显。

荐坐韧带软化的同时，荐髂韧带也变柔软，荐骨后端的活动性因而增大。在驴及羊，手握尾根可以上下活动；牛和马则因臀肌肥厚，这种活动性不很明显。

(四) 精神状态

雌性动物在产前还有精神抑郁及徘徊不安等现象。待产动物都有离群寻找安静地方分娩的情况，母驼的离群现象特别突出，有时可以跑出 10~15km。猪在产前 6~12h (有时数天)，有衔草作窝的现象，这在我国猪品种中特别明显。

除以上变化外，母畜临产前食欲不振，排泄量少而次数增多。

乳牛的体温从产前一个月开始发生变化。至产前 7~8 天，可缓慢增高到 39~39.5℃；产前 12h 左右 (有时为 3 天)，则下降 0.4~1.2℃；分娩过程中或产后又恢复到分娩前的体温。但这种变化需作系统观察才能发现。其他动物也有类似体温变化。

总之，上述各种现象，都是分娩即将来临的预兆。但在预测分娩时，不可单独依靠其中某一种变化，而要全面观察，才能作出正确判断。

第二节 分 娩

一、分娩的过程

整个分娩期是从子宫开始出现阵缩起，至胎衣排出为止。分娩是一个连续完整的过程，但为了叙述方便起见，人为地将它分成三个时期，即开口期、产出期及胎衣排出期。

(一) 开口期 (stage of cervical dilatation)

是从子宫开始阵缩起，至子宫颈充分扩大 (牛、羊) 或能充分开张 (马) 为止。这一期一般仅有阵缩，没有努责 (指腹壁肌和膈肌的收缩) 分娩，其表现是食欲减退、轻微不安、时起时卧、尾根抬起、常作排尿姿势，并不时排出少量粪尿，脉搏呼吸也加快。除个别牛、羊偶尔出现努责现象外，开口期中一般均无努责。开口期中雌性动物的表现有种间差异，个体间也不尽相同，经产母畜一般较为安静，有时甚至看不出什么明显的表现。

牛和羊至开口期末，胎膜囊常露出于阴门之外。通常先露出于阴门处或阴门外的是尿膜绒毛膜囊，其中的液体呈褐色。有时则是羊膜绒毛膜囊露出于阴门口外上。产妇产缩时，子宫腔内的压力增高，胎先露部下降，将羊水阻断为前、后两部分，在先露部前面的羊水量不多，约 100ml，称前羊水，形成前羊水的囊称胎胞。当宫缩继续增强时，前羊水囊的压力增加到一定程度，胎膜破裂称破膜。破膜多发生在子宫颈口近全开时。

产前子宫收缩通常是零星的、不协调、次数少、力量弱、持续时间短；开口期时子宫收缩变为协调、有规律的蠕动收缩，并且收缩力加强。产妇产在开口期开始时子宫收缩力弱，间歇期较长，约 5~6min，持续时间较短，约 30s。随着产程进展，间歇渐短，约 2~3min，持续时间渐长，约 50~60s，且强度不断增加。当宫口近开全时，宫缩间歇仅 1min 或稍长，持续时间可达 1min 以上。至开口期末，牛的收缩每小时约 24 次，

产出胎儿之前可以达 24~48 次。

开口期的持续时间，不同动物有所不同。据报道，牛为 0.5~24h，绵羊 3~7h，山羊 4~8h，猪 2~12h。从间歇 5~6min 的规律宫缩开始，到子宫颈口开全。初产妇的子宫颈较紧，扩张较慢，约需 11~12h；经产妇的子宫颈松，扩张较快，约需 6~8h。但因开口期开始的时间不易判定，所以报道的时间出入较大。

(二) 产出期 (stage of fetus expulsion)

是从子宫颈充分扩大，胎囊及胎儿的前置部分进入阴道（牛，羊）或子宫颈已能充分开张，胎囊及胎儿进入盆腔（马，驴），母畜开始努责，至胎儿排出或完全排出（双胎及多胎）为止。在这一期，阵缩和努责共同发生作用。

在产出期，分娩动物的共同临床表现为极度不安。初期时常起卧，前蹄刨地，有时后肢踢腹，回顾腹部，拱背努责。继之，在胎头进入并通过盆腔及其出口时，由于骨盆反射而引起强烈努责；这时脉搏加快，马为 80 次、牛 80~130 次、猪 100~160 次，并且呼吸也加快。产出期中，子宫收缩力强，持续时间长，牛的收缩每小时 24~48 次，几乎是连续不断发生的。

产妇宫口开全后，宫缩紧而强，胎膜往往在此时自然破裂。若胎膜仍未破，进行人工破膜。前羊水流出，先露下降，宫缩较前增强，可持续 1min 以上，间歇 1~2min，先露部降至骨盆出口时压迫盆底组织及直肠，产妇产生便意，肛门渐放松张开，尤其宫缩时更加明显。宫缩时向下用力屏气，腹压增加，协同宫缩迫使胎儿进一步下降。随着产程进展，会阴膨隆并变薄，胎头随宫缩露出阴道口，在间歇期，胎头又缩回阴道内，称拨露。当胎头双顶骨圆凸露于阴道口间歇期不再回缩，称着冠。此后会阴极度扩张，再经 1~2 次宫缩胎头复位和外旋转，前肩后肩胎体相继娩出，随后羊水流尽，子宫迅速缩小，宫底降至平脐。经产妇的产出期，上述临床经过不易截然分开，有时仅需几次宫缩，即可完成胎头娩出。

在产出期，胎儿最宽部分的排出需要时间较长，特别是头部。头部通过盆腔及其出口时，母畜努责最强烈，牛、羊常嚎叫。在头露出阴门以后，产畜往往稍为休息。如为正生，随之继续努责，将胸部排出，然后努责即骤然缓和下来，其余部分也能迅速排出，脐带也被扯断（牛，羊），仅留胎衣在子宫内。这时母畜不再努责，休息片刻后，可起来照顾新生仔畜。

牛、羊和猪的脐带一般都是在胎儿排出时从皮肤脐环之下被扯断。马卧下分娩时则不断，等母马站起或幼驹挣扎时，才被扯断。马和猪的脐血管均断在脐孔之外。牛及羊脐动脉因和脐孔周围的组织联系不紧，扯断后的断端缩回腹腔，并在腹膜外组织内造成少量出血后封闭；脐静脉的断端则留在脐孔外。

从子宫颈口开全到胎儿娩出。初产妇约需 1~2h，经产妇一般数分钟即可完成，但也有长达 1h 者。马产出期的持续时间一般为 10~30min。如产双胎，两胎儿相隔仅数分钟或 10~20min。牛产出期的时间为 3~4 h (0.5~6h)，初产牛较经产牛慢。产双胎时，两胎儿相隔 20~120min。水牛的产出期平均约为 19min。绵羊的产出期约为 1.5 h (15min 至 2.5h)，双胎胎儿的间隔时间为 15min (5~60min)，产出时间因品种不同而

有较大差异。山羊的产出期约 3 h (0.5~4h); 两个胎儿相隔的时间多为 5~15min, 也有的不超过 5min, 超过 15min 者很少。

猪产出期的持续时间根据胎儿数目及其间隔而定, 第一个胎儿排出较慢, 从母猪停止起卧到排出第一个胎儿为 10~60min。胎儿产出的间隔时间, 以我国品种的猪为最短, 平均 2~3min (1~10min); 引进品种平均 10~17min (10~30min), 也有短至 3~8min 或长达 1h 的; 杂种猪介于两者之间, 约 5~15min。胎儿较少或较大时, 间隔时间较长。最后几个胎儿的间隔时间往往比早排出来的胎儿为长。产出期如超过正常时间, 应进行产道检查, 不要久等, 以便及时发现问题及时解决。

除上述情况外, 在胎盘为子叶型的牛和羊的胎儿产出过程中, 胎儿胎盘和母体胎盘的联系仍然紧密, 即使产出的时间较长, 氧的供应仍有保证, 胎儿不至很快死亡。在弥散型胎盘的马和猪, 胎儿胎盘和母体胎盘的联系不紧密, 子宫的强烈收缩易使二者分离开来, 因此胎儿的产出都很快, 否则胎儿可能因缺氧而窒息死亡。

(三) 胎衣排出期 (stage of fetal - membrane expulsion)

是从胎儿排出算起, 到胎衣 (胎膜的总称) 完全排出为止。

胎儿排出之后, 产畜即安静下来。几分钟后, 子宫再次出现阵缩。这时不再努责或偶有轻微努责。阵缩持续的时间长, 牛每次 100~130s; 间歇期也长, 每 1~2min 一次; 力量也减弱。

胎衣排出的机制主要是由于胎儿排出并断脐后, 胎儿胎盘血液大为减少, 绒毛体积缩小; 同时胎儿胎盘的上皮细胞也发生变性 (牛、羊)。此外, 子宫的收缩使母体胎盘排出大量血液, 减轻了子宫黏膜腺窝的张力。据报道, 分娩时这种收缩能从胎儿胎盘中挤出相当于胎儿总血量 20% 左右的血液, 进入正在出生的羔羊体内。产出的胎儿开始吮乳时, 刺激催产素的释出。催产素除了促进排乳以外, 也刺激子宫收缩。因此, 二者间的间隙逐渐扩大, 借露在外面的胎膜的牵引, 绒毛便容易从腺窝中脱落出来。

由于母体胎盘血管在分娩时并没有受到破坏, 因此各种家畜的胎衣脱离时都不出血。

胎衣排出的快慢, 因各种家畜的胎盘组织构造不同而异。马和猪的胎盘属上皮绒毛型, 母体和胎儿的胎盘组织结合比较疏松, 胎衣容易脱落。马的胎衣排出期为 5~90min。猪的胎衣分两次排出, 胎衣排出期平均为 30min (10~60min), 但也有的达 1.5~2h。牛的胎盘属于上皮绒毛膜与结缔组织绒毛膜混合型, 母体与胎儿的胎盘组织结合比较紧密, 同时子叶呈特殊的蘑菇状结构, 子宫收缩不易影响到腺窝。只有当母体胎盘组织的张力减轻时, 胎儿胎盘的绒毛才能脱落下来, 所以历时较长, 发生胎衣不下者也较多。羊的胎盘组织结构虽与牛相同, 但由于胎盘呈盂状 (绵羊) 或盘状 (山羊), 子宫收缩时能够使胎儿胎盘的绒毛受到排挤, 故排出历时较短。产妇从胎儿娩出后到胎盘娩出约需 5~15min, 通常不超过 30min。牛为 2~8h, 最长不超过 12h, 水牛平均为 4~5h, 绵羊为 0.5~4h, 山羊为 0.5~2h。

在胎衣排出过程中, 单胎家畜的子宫收缩是由子宫角前端开始的, 所以胎衣也是先从子宫角前端开始脱离子宫黏膜, 形成内翻, 然后逐渐翻着排出来, 因而尿膜绒毛膜的

内层总是翻在外面。在难产或胎衣排出延迟时，偶尔也有不是翻着排出来的，这是由于胎儿胎盘和母体胎盘先完全脱离，尔后再排出来的结果。

牛羊怀双胎时，胎衣在两个胎儿出生以后排出来。山羊怀多胎时，胎衣在全部胎儿排出后，一起或分次排出来。猪在 30%~40% 的情况下，由于每个子宫角中的胎囊彼此端端黏连，所以胎衣是在两个角中的胎儿排出后，分两次排出，并且也是翻着排出为多。有的怀胎数少的猪，特别是巴克夏猪，常见后一个胎儿把前一个胎儿的胎衣顶出来。这种情况有时几乎可达 50%，也有的猪是胎衣分几次排出来。

在产后维持 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的持续分泌对于胎膜的排出和通过促进子宫肌层收缩而降低子宫的体积是非常重要的。对于家畜来说， $\text{PGF}_{2\alpha}$ 可能是产后短期内降低子宫体积的最重要的因素。这一点可以从下列事实中推断出来，即在产后几小时内，动物表现出阶段性的不安定或疼痛表情，可能是子宫肌肉收缩所致。

二、分娩机理

(一) 胎儿皮质激素（可的松）在分娩时的作用

前面介绍过在妊娠时由于胎儿的生长，子宫会逐渐增大和受到牵张。但在妊娠时期，孕酮的重要作用是维持子宫肌层的静止和促进子宫颈紧密收缩。而在妊娠后期，雌激素开始通过刺激收缩蛋白的产生和细胞间间隙连接（gap junction）的形成而影响子宫肌层，前者可增加子宫的收缩能力，而后者通过增加平滑肌细胞间的联系促进收缩过程。分娩开始阶段的变化发生在真正分娩过程开始的前几周。最后，子宫从静止状态转变为收缩状态，其中最重要的是子宫颈松弛和开放，以便胎儿的产出。

有关分娩最重要的问题是什么因素启动了这一过程？在家畜中胎儿的成熟最终导致分娩过程的始动。负责始动这一过程的关键因素是胎儿的肾上腺皮质，同时下丘脑和腺垂体起着重要的支持作用。破坏绵羊胎儿的垂体前叶后，可导致妊娠期的延长。后来发现，摘除胎儿肾上腺也能得到同样的结果。胎儿可的松〔去氢皮质酮，一种天然糖皮质激素，有明显的盐皮质激素性质，为皮质醇（氢化考的松）的前体和代谢物〕分泌的关键性变化最终导致子宫 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的合成和释放， $\text{PGF}_{2\alpha}$ 促进肌肉收缩和子宫颈的松弛。

胎儿肾上腺皮质的成熟对于分娩的始动是至关重要的。这可能是由于肾上腺皮质逐渐对胎儿促肾上腺皮质激素（ACTH）发生敏感的结果。肾上腺成熟的时间受胎儿遗传的控制。对同一子宫中不同品种绵羊胎儿的研究表明（通过胚胎移植），分娩前可的松产生的时间具有品种特征性。此时，胎儿可的松的重要作用是诱导胎盘中类固醇激素合成通路由孕酮转化为雌激素的酶（17-羟化酶和 C17-20 裂解酶）的产生，最终导致雌激素合成的增加。这一过程在家畜分娩前发生的时间不同，即牛是在分娩前 25~30 天开始，猪是在 7~10 天，绵羊在 2~3 天。雌激素分泌增加的最终结果是引起前列腺素分泌，特别是 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 是启动分娩的关键激素，一旦该激素开始分泌，分娩的真正时相就被激活。有关催产素对分娩始动的作用还不确定，可能一旦分娩过程开始后，催产素协助 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 发挥作用。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的合成据认为是通过增加其前体物（花生四烯酸）的适用性来实现的。花生四烯酸是 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成的主要限速步骤。雌激素通过促进磷脂酶

A (一种细胞膜中的溶酶体酶) 来影响这一体系, 该酶启动磷脂的大量水解并释放出花生四烯酸。这一结果可能是由于雌激素与孕酮比例的增加造成的 (孕酮的作用是稳定溶酶体膜, 而雌激素是破坏溶酶体膜)。最终结果是增加了适合 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成的花生四烯酸。因为 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成后不能储存, $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成的启动后便直接释放。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 对子宫肌层的关键作用是释放细胞内钙离子, 钙离子与肌钙蛋白结合后可促进肌动蛋白和肌球蛋白复合体形成, 并进而起始收缩过程。前列腺素 PGE 和 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 对子宫颈也有重要影响, 使子宫颈松弛和扩张, 允许胎儿的产出。由于 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 对子宫颈细胞内基质的直接作用, 在子宫颈细胞内基质中胶原丢失的同时, 伴随着多聚氨基葡萄糖 (几丁聚糖, chitosan) 的增加, 多聚氨基葡萄糖可影响胶原纤维的聚合。

在有些动物中, 如牛、山羊、狗和猫, $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成和释放启动了黄体的退化 (发生在分娩前 24~36h), 孕酮的完全下降在分娩前 12~24h 完成。尽管在这些动物中, 孕酮的降低对于分娩是必需的, 但必须指出孕酮降低在本质上并不启动分娩, 而是由于 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的释放引起了黄体的溶解和子宫肌肉的收缩。

马与灵长类相似, 分娩过程中孕酮浓度也是维持在一定水平。在这种情况下, $\text{PGF}_{2\alpha}$ 能够克服孕酮对子宫肌层活动的抑制效应。

催产素对于分娩过程也是重要的。雌激素诱导子宫肌层中催产素受体的形成。近来的资料表明, 只有当胎儿进入产道时才会有大量的催产素释放。催产素的释放是通过所谓的 Ferguson 反射发生的。该反射的传入神经是通过脊髓的感觉神经到达下丘脑的神经核; 而传出部分包括神经垂体中催产素的释放并经血液循环到达靶器官。催产素可以协同 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 促进子宫的收缩。

对于分娩准备的一个重要激素是松弛素。最初发现该激素与耻骨联合松弛有关 (通过耻骨间韧带的松弛), 并因此而得名。松弛素引起韧带和相关的围绕在盆腔产道周围的肌肉松弛, 允许胎儿最大限度地扩张产道。牛和猪的黄体是松弛素的产生部位, 分娩前 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的释放引起黄体溶解, 伴随着孕酮产生的降低和已经合成的松弛素的释放。其他家畜中如猫、狗和马, 松弛素的产生部位是胎盘, 在这些动物中, 松弛素明显的分泌开始于妊娠的前期, 在整个分娩过程中维持这一水平。在这些动物中, 松弛素很可能协同孕酮维持妊娠。

(二) 子宫收缩的调控机理

子宫肌的收缩是分娩的主要动力, 其收缩方式为阵缩。起初, 子宫的收缩短暂、不规律、力量不强; 以后则逐渐变得持久、规律而有力。每次阵缩都是由弱到强, 持续一定时间后, 又减弱消失。两次阵缩之间有一间歇。产畜的血液中有乙酰胆碱和催产素, 能够促进子宫肌收缩, 但在产前它们会受到胆碱酯酶和催产素降解酶的作用而被破坏。雌激素能抑制这两种酶的产生。因此, 临产时雌激素增多能使子宫肌对催产素的敏感性增强, 导致子宫的收缩作用加强。又由于乙酰胆碱及催产素的作用受其降解酶的作用而表现为时强时弱, 以及前列腺素的分泌也呈现波动性分泌, 所以子宫的收缩是阵发性的。

子宫平滑肌的收缩能力有别于其他平滑肌。子宫平滑肌的收缩功能是性成熟之后在

雌激素的作用下建立起来的，在整个生殖期都维持其收缩能力。由生长卵泡所产生的雌激素借血液循环到达子宫平滑肌细胞，并靠它与细胞质中雌激素受体的亲和力而通过质膜。雌激素-受体复合物又可进入细胞核参与基因表达的调控，合成功能性的收缩蛋白。这样，性成熟之后，子宫平滑肌胞浆内形成的具有收缩能力的蛋白质为子宫的收缩能力奠定了基础。

这种可收缩蛋白质的增多改变了细胞内环境的晶体渗透压，造成这种细胞的膜电位升高。子宫平滑肌细胞膜电位为 $-50 \sim -60\text{mV}$ ，低于横纹肌细胞的膜电位。因此子宫平滑肌具有易收缩的特点。但在分娩前，子宫平滑肌并不表现出其易收缩的特点，这是由于孕酮的作用抑制了子宫肌的收缩。

子宫平滑肌的收缩是通过膜电位的去极化而引发的。当达到一定的临界值时就会出现动作电位，继而产生兴奋-收缩的偶联。其中， Ca^{2+} 是连接兴奋-收缩偶联作用的关键因素。若这种起到信息传递作用的钙离子浓度不足的话，则子宫肌细胞的收缩变弱。在分娩过程中出现的原发性阵缩无力为缺钙所致，临床上用输液补钙的方法可收到良好的效果。除老龄母牛及患有慢性创伤性网胃炎、胎水过多及多胎妊娠时，其他情况下的原发性阵缩则主要是低血钙所致。

子宫肌收缩的能力在妊娠和分娩过程中主要受很多内分泌因子调控。

1. 孕酮

妊娠期间子宫之所以能保持相对的安静状态，主要有赖于孕酮的作用。在大多数动物，应用孕酮可以减少子宫肌的活动，并延迟分娩。孕酮通过多种机制抑制子宫肌收缩的作用，包括：①使兴奋-收缩脱偶联。②抑制激活剂受体，间接抑制其他“收缩相关蛋白”的合成。③抑制前列腺素的产生。④抑制垂体催产素的释放。虽然孕酮能显著降低平滑肌收缩幅度，但细胞与细胞之间的兴奋性并未受到抑制。与孕酮这些作用相反的是，使子宫收缩减少的抑制剂（如松弛素和前列环素）则对子宫平滑肌自发性收缩具有直接的抑制作用，但不能阻止刺激物对刺激性子宫收缩的应答。

一氧化氮与松弛素和前列环素的作用相似，对子宫收缩刺激物的抑制作用，是通过细胞内的生化途径抑制肌球蛋白轻链激酶的活性，或者通过增加环核苷酸或降低细胞内钙的机制。因此，妊娠期间子宫肌的安静是由于孕酮与子宫收缩刺激物的抑制剂（如松弛素、前列环素和一氧化氮）共同发生抑制作用的结果。

2. 雌激素

雌激素对子宫的作用在许多方面与孕酮相对抗。给妊娠绵羊注射雌激素，可以提高对催产素的敏感性和提前分娩。在未孕羊，雌激素可刺激子宫肌的活动，增加对激活剂的应答和增加收缩的传播，并逆转孕酮对子宫肌的抑制作用达 $12 \sim 24\text{h}$ 。这些作用可能由于通过增加收缩相关蛋白的表达，而使雌激素直接作用于子宫肌层，或者间接通过增加前列腺素的产生和催产素的释放而起作用。临产时孕酮减少或雌激素升高，雌激素/孕酮比值的升高不仅可增加分娩时子宫肌的活动，而且对刺激子宫收缩物质（如前列腺素和催产素）的合成与释放也具有作用。子宫收缩刺激物通过对受体作用的调节途径增加细胞内的钙离子，从而激活子宫的收缩成分。

3. 催产素

无论是否妊娠，子宫内膜上都有催产素受体。有报道，催产素诱发子宫收缩不是直接作用于钙通道，而是通过催产素受体介导胞浆内钙水平升高使子宫收缩。另有报道认为，催产素有双相作用，一是直接作用于催产素受体介导的胞内钙离子增加或是通过电压门控钙通道影响子宫收缩的细胞内生化途径。二是间接通过激活有丝分裂原激活的蛋白激酶，上调 COX-2 基因的表达，以及 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 和 PGE_2 的生成。这两种激素都是强有力的子宫收缩的诱导剂。近来，利用激光共聚焦显微镜监测加入催产素后胞浆内游离钙的含量变化时，发现了恒定的钙振荡规律，并发现当钙波频率小于 6Hz 时，60% 的频率形成是归于 IP_3 敏感钙库，40% 是由于胞外钙通过 L 型钙通道进入；而当钙振荡频率大于 6Hz 时，则是由于植物碱（ryanodine）敏感钙库形成的。

4. 前列腺素

一般认为，前列腺素通过两种独立方式影响子宫收缩，一种使子宫肌细胞内钙离子水平升高，肌球蛋白轻链激酶活化，引起平滑肌收缩；另一种是增加子宫肌细胞间间隙连接的形成，同时发生子宫肌收缩。现认为，在子宫平滑肌细胞的协调收缩中，通过间隙连接的细胞间交流起着重要作用。间隙连接在子宫平滑肌细胞之间提供低阻力通道，使电偶联增加，促进子宫平滑肌的协调性收缩。

应该注意的是，内分泌对子宫肌收缩的调节与酶的活动密切相关。在妊娠期间，由于孕酮水平升高，能够增强催产素酶、胆碱酯酶与组胺酶的活性，使催产素、乙酰胆碱和组织胺失去刺激子宫肌收缩的作用，因而可使子宫保持安静状态。而在分娩期，由于雌激素水平升高，能够抑制催产素酶、胆碱酯酶与组胺酶的活性，因而加强了催产素、乙酰胆碱和组织胺的作用，使子宫肌敏感化，并发生自发性收缩，可促进分娩过程。

另外须值得注意的是，在内分泌调节子宫平滑肌收缩的过程中，子宫平滑肌细胞间隙连接蛋白的变化也是十分重要的。目前认为，细胞间隙连接蛋白（connexin）43（Cx43）在子宫平滑肌细胞间提供的间隙连接通道的开放和关闭，可能在分娩过程中起关键作用。相邻细胞通过间隙连接进行信息和能量物质传递，参与细胞间物质交换的代谢偶联和电信号传递的电偶联，对机体的代谢平衡、内环境的稳定及细胞生长和分化等具有重要意义。间隙连接通道的通透性受到 pH、胞内 Ca^{2+} 浓度、第二信使 cAMP、PKC 等多种因素的调节。

Cx 多基因家族中，Cx43 在子宫平滑肌、心肌细胞中的表达有特异性。在妊娠晚期，尤其临产后，子宫肌细胞中间隙连接蛋白大量形成，间隙连接斑成簇出现，为子宫收缩发动和同步收缩提供了必要条件。

在非孕期和绝经前的正常子宫肌肉组织中 Cx43 水平较低，而足月分娩前和早产时，Cx43 mRNA 和蛋白急剧增加，并受到类固醇激素的调节。Cx43 mRNA 水平升高，使子宫肌肉中 Cx43 蛋白迅速表达，形成间隙连接通道，在电兴奋组织中，其功能是提供控制子宫肌肉细胞间收缩的低电阻通路，使离子容易通过间隙连接的通道，保证子宫肌肉细胞群在代谢和行为上的协调。

Cx43 的表达受到类固醇激素的调节，雌二醇（ E_2 ）、催产素等是子宫肌细胞间隙连

接通道形成的刺激信号，可上调 Cx43 mRNA 和蛋白的表达，诱发子宫收缩。孕酮则通过阻止 Cx43 蛋白从高尔基体装配至肌肉细胞膜上，体现了对通道形成的抑制作用。

第三节 乳腺的结构与发育

新生儿一旦被产出体外，它必须对外界环境做出巨大的生理性调节，主要包括心血管系统和呼吸系统的变化。在胎儿期，血液通过两条通路经过肺脏（除了肺脏组织灌流以外），一是通过卵圆孔通过心室，二是从肺动脉经过导管动脉到达主动脉。在出生时，卵圆孔由于左心室的组织瓣和左心室内压高于右心室而功能性关闭。尽管导管动脉在出生时迅速闭锁，但完全闭锁则需要几个月。导管静脉（在胎儿期起着肝血流支路的作用）的闭合情况也是如此。出生后，新生儿从液体环境迅速转变到气体环境，的确是一个巨大的适应性变化。

除了适应性变化外，新生儿还要不断地从外界摄取营养物质以维持其生长发育，而摄取营养物质则主要依赖于母亲的乳汁。因此，母体乳腺的发育好坏将直接影响新生儿的健康生长。

之所以称某些动物为哺乳动物，是因为这些动物身体表面有毛发覆盖，分娩产出的是胎儿而不是卵（个别动物除外），以及通过乳腺饲喂婴儿。由于哺乳动物能够通过乳腺营养其后代，乳腺在动物产后分泌乳汁的能力就决定了后代的存活。哺乳动物产出的后代远远少于爬行类、两栖类和鸟类，乳腺的存在使哺乳动物非常有效地营养其后代。卵生动物如鱼、爬行类和两栖类动物，需要合适的生活环境来营养其后代，其后代很容易受到自然变化的伤害。新生的哺乳动物在吃奶过程中并不需要牙齿，在分娩时能够以相对成熟的体况产出（尽管此时其上下颌骨尚不成熟，但有助于胎儿头部的产出）。牙齿的发育是与动物对食物（而不是奶水）的需求同步发展的。

乳腺发育及其泌乳活动是哺乳动物最突出的形态生理特征。乳腺是一种衍生的皮肤腺，属外分泌腺，也是哺乳动物具有的特殊腺体，它能够将母体的营养物质供给子代利用。乳腺的功能是泌乳（lactation），此外它还是雌性第二性征的体现。

一、乳腺的结构

乳腺的数目、形状、大小及位置因动物种类不同有很大的差异。除有袋类的雄性没有乳腺外，乳腺一般在哺乳动物的雌、雄两性中都存在，但雄性乳腺常常发育不良，而通常只有雌性乳腺才具有泌乳功能。

乳腺组织大体可以分为具有合成、分泌和排乳功能的实质部分，以及起支持作用的间质部分。

乳腺通常都是成对的结构。在家畜中，不同的动物中乳腺的数量是不同的，如山羊、马和绵羊是 1 对，牛是 2 对，猪是 7~9 对。同样，乳腺的位置在不同的动物也有区别，如灵长类是在胸部，猫、狗和猪是从胸部延伸到腹部，牛、山羊和马是在腹股沟部。在牛、山羊、马和绵羊等家畜中，成对的乳腺是两个密切相触的结构，称为乳房（udder）。如牛中，两对乳腺形成一个乳房。

(一) 实 质

1. 腺泡

腺泡是泌乳的基本单位，可以将血液内的营养物质转变为乳。泌乳期中的腺泡是呈鸭梨形的囊状结构，由单层腺上皮构成。腺泡的数目决定乳腺的泌乳能力；腺泡越多，泌乳能力越强。

腺泡上皮细胞附着在基质上，基质内有毛细血管网，血液供给腺泡合成乳汁所需要的各种营养物质。多个腺泡聚集成腺泡群或小叶（图 10-2），腺泡有开口通向终末乳导管。各小叶间的腺泡并不同时进行泌乳活动，而是彼此轮流分泌。有些腺泡上皮变薄，而腺泡腔内充满分泌物；另一些腺泡上皮较高，细胞内积聚大量分泌物，但腺泡腔狭窄。腺上皮的细胞呈现典型的分泌细胞特点，有丰富的线粒体和粗面内质网，顶端有大量微绒毛，很多种与泌乳相关的酶系都定位于细胞基部或侧面。细胞的基部有皱襞，借以增加表面积，加强细胞与血液间的物质交换。细胞之间的间隙很小，顶部保持紧密连接。

腺泡外表面上有肌上皮细胞，该细胞有树状突起，形成网状结构，称星芒细胞，能在血液催产素的作用下产生收缩，使腺泡内的乳汁进入导管系统（图 10-3）。

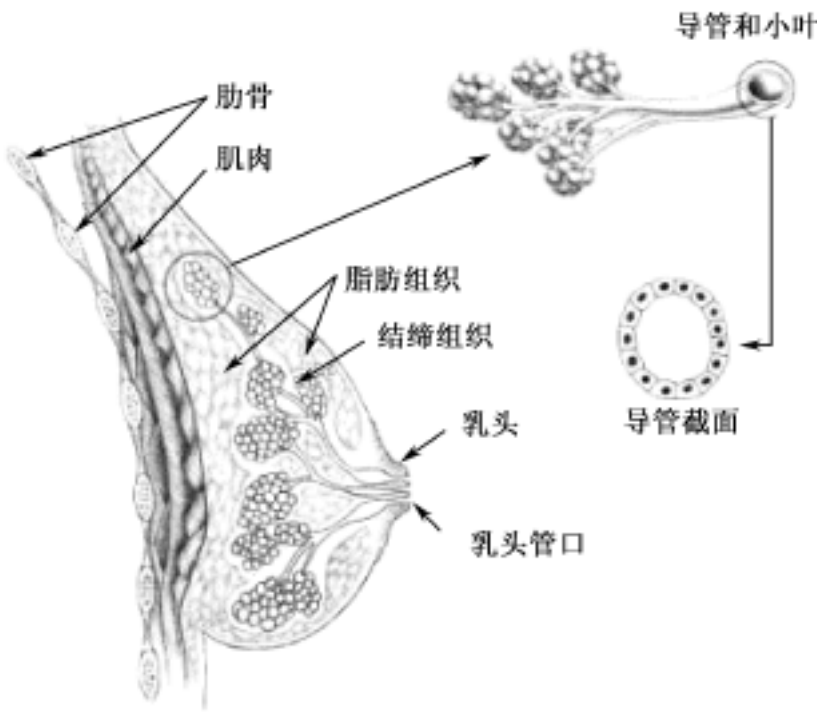


图 10-2 示乳腺组织结构图

2. 导管系统

导管系统是乳腺中乳汁的排出管道系统。它们起始于终末导管，然后通过小叶内腺管向小叶间集乳管开口，集乳管汇合成中等大的乳导管，再汇合成 5~15 条大的乳导管，分别向乳腺乳池开口，腺泡分泌的乳汁最后注入乳池中储存。在乳房基部，乳腺乳池与乳头上的乳头乳池也相通，乳头括约肌在排乳时可使乳池内的乳汁流出体外。

终末导管也由单层上皮细胞构成，有泌乳的功能。上皮细胞表面覆盖着在催乳素作用下能引起收缩的肌上皮细胞。其余的导管系统都衬有双层上皮，外层细胞呈柱形，内

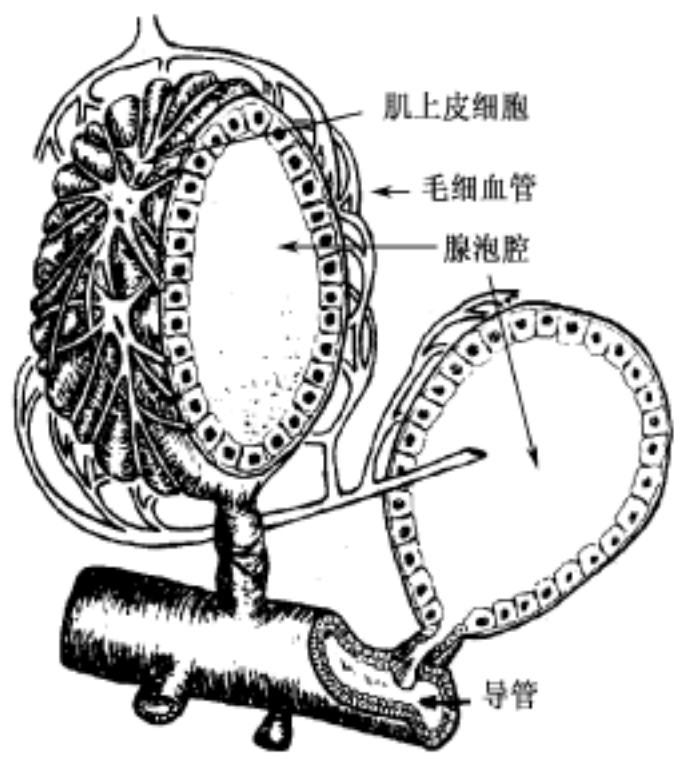


图 10-3 示被血管和肌上皮细胞包围的泌乳乳腺腺泡 (引自 Larson BL, 1985)

层细胞呈立方形。上皮下有一层纵行排列的平滑肌和一层基膜。基膜外面是固有层。乳腺乳池壁的结构与大乳导管基本相同。乳头管衬有复层扁平上皮，与皮肤表面相同。上皮下是纵行和环行排列的平滑肌，肌纤维之间有丰富的弹性结缔组织，其中环行肌构成乳头括约肌。在乳头壁的中部有丰富的纵行血管，充血时能使乳头勃起，因而称为乳头海绵体。

各种动物导管系统的构成及乳头管的数目大不相同。反刍动物牛和羊的乳池发达，乳腺储存空间很大。牛乳导管汇成 8~12 条大乳导管通到腺乳池，只有一个乳头乳池及乳头管开口在外。许多动物的乳导管部分扩大形成乳窦，可以储存乳汁。人约有 12~20 条乳导管通向乳头，每一条都在乳头的基部扩大成乳窦。猪、猫、狗、兔等动物的乳腺没有乳腺乳池和乳头乳池，每个乳头上有两个或多个乳头管，如兔乳导管最后汇集成 6~8 条大乳导管，并均在乳头上有开口通向外界。

3. 乳池

乳池是乳腺中储存乳汁的结构，分上下两部分，上部称为乳腺乳池，下部称为乳头乳池，相互畅通。牛乳腺乳池的容积约为 100~400ml，乳头乳池的容积约为 30~45ml。乳池内表面为光滑有皱褶的黏膜，它在乳腺乳池和乳头乳池交界处形成大的、环状皱褶，将两者分开，称为乳池棚。乳头乳池下端有一通向体外的细管，即乳头管。乳头管向皮肤外的开口称乳头管口（图 10-2），该管口周围有乳头管括约肌，控制乳头管的开放和关闭。

(二) 间 质

间质主要由结缔组织和脂肪组织构成（图 10-2），其中包含有血管、淋巴管、神经

和韧带等组织。

1. 血管

动脉为每侧两条，分别是乳房动脉和会阴动脉。乳房动脉主要来自阴部外动脉，是分布到乳房的主要动脉。如牛的两条阴部外动脉通过腹股沟穿入腹腔后分为两条，一条进入左半个乳房，一条进入右半个乳房，成为乳房动脉。每条动脉进入乳腺以后前后分支，到达前部的为前乳房动脉，到达后部的为后乳房动脉。这些动脉再分支成小动脉到乳腺各实质部分，构成血管网。乳头上的动脉称为乳头动脉。

会阴动脉来自阴部内动脉，分布于后乳区的后上部，与乳房后动脉常有吻合支。会阴动脉也供应乳腺血液。

静脉为每侧三条，即乳静脉（腹皮下静脉）、阴部外静脉和会阴静脉。乳静脉由乳房基底前静脉与乳房前静脉在乳房基底的前缘汇合而成，携带 CO_2 和其他代谢产物的静脉血，在互成网络的小静脉及大静脉中回流。乳静脉沿腹下体壁向前延伸至腹壁的乳井，向上进入腹腔；再向前进入胸腔下部，成为胸内静脉，然后入腔前静脉。初产牛在泌乳前，腹壁皮下乳静脉内的瓣膜朝向后方，阻止其中的静脉血回流。这时，乳腺中静脉回流就不再由瓣膜控制。

阴部外静脉由乳房前静脉和乳房后静脉汇合而成，与阴部外动脉并行，通过腹股沟管进入腹腔，再进入髂外静脉。

会阴静脉分布于后乳区的后上部，经坐骨弓进入盆腔，再通向阴部内静脉。

乳腺有很丰富的血液供应。每一个腺泡都被稠密的毛细血管网包围。乳腺依靠血管系统中的血液带来营养物质、产生乳汁并带走代谢产物。乳腺中的静脉系统比动脉系统发达得多，静脉的总横断面积比动脉大许多倍。血液很缓慢地流过乳腺，为腺泡生成乳汁提供有利条件。因而，充分的血液供应与乳腺的泌乳能力密切相关。一头体重 500kg 的乳牛，每日心输出量总计近 71 000L，经过乳腺的血液量与产乳量的比率为 400:1。如果乳牛的日产乳量为 35L，那么就需要 14 000L 的血液流经乳房，相当于每日心输出量的 $\frac{1}{5}$ 。

2. 淋巴

乳房腺体区域广泛散布着许多小淋巴管，在腺小叶间集成淋巴管，向上进入乳房基底后端上方的乳上淋巴结，再经腹股沟管至深腹股沟淋巴结，或从乳上淋巴结分出淋巴管走向外生殖器和直肠。皮肤和乳头中也有丰富的淋巴网。

3. 神经

乳腺神经主要来自腰神经腹侧支，小部分来自荐神经腹侧支。第二腰神经先与第三腰神经汇合，再与第四腰神经汇合组成腹股沟神经。腹股沟神经通过腹股沟管后，主要分支于乳房的实质部分腺组织、血管以及乳头平滑肌，也分出一些分支分布于乳房中部的皮肤。腹股沟神经在乳头受到刺激后引起腺泡排空的神经体液反射中起重要的作用。

第一腰神经和第二腰神经的腹侧支，分布于乳房前部的皮肤。由第二、三、四荐神经腹侧支合成的会阴神经主干，分布于乳房后部的皮肤。

乳腺内的平滑肌对肾上腺素和去甲肾上腺素都极其敏感。刺激交感神经可使乳腺内的血液循环显著减少，泌乳量也相应下降。这是泌乳母牛受到惊扰时泌乳明显下降的主要原因。但乳腺的腺泡上皮及周围的肌上皮不受神经支配。乳腺各部有各种各样的内、外感受器，其中乳房和乳头皮肤中有丰富的外感受器，而乳腺内的腺泡、血管壁和平滑肌中有丰富的内感受器。所有这些内、外感受器，都在泌乳的反射性调节中起重要作用。

4. 支持结构

乳房一个非常重要的特征是，在进化过程中发育形成了能够支持乳房携带大量乳汁的支持系统。这个系统是由中间悬挂韧带形成的，它位于一对乳腺之间，是由来源于腹部被膜的弹性结缔组织形成的。另外，来源于上耻骨韧带和下耻骨韧带形成的非弹性的侧面悬挂韧带在不同程度上进入乳腺的侧面，形成乳房组织间结缔组织框架的一部分。这样人们就会理解为什么高产奶牛的乳房在哺乳前能够携带 23kg 重量的乳汁了。如果没有这样的支持系统，乳腺组织会由于乳汁重量的压迫而崩解。

乳腺的腺泡和导管系统全部被结缔组织和脂肪形成的衬垫包围。这些组织还穿进腺体内部，把腺体分割成若干小叶。每个小叶一般含有 200 个左右的腺泡。若干小叶又被较厚的结缔组织隔开，形成腺叶。导管系统通常根据它们的位置分为小叶内、小叶间、叶内和叶间导管。动物乳房本身虽不很重，但在泌乳期内带有大量的乳汁和血液后，重量可达 40kg 以上。起悬挂和支持作用的组织有皮肤、韧带和腱。

皮肤对乳腺主要起保护作用，使其不受损伤和不被病菌侵害。结缔组织使皮肤附着于乳房上，并使乳房前部附着于腹壁上。

外侧悬韧带是乳房的主要支持结构之一，起自离乳房上部和后部较远的腱，沿乳房两侧伸展，间断的分布出成片的组织伸至乳腺内，在乳房底部的中线与正中悬韧带连接。

正中悬韧带是乳房的主要支持结构，在乳房重力中心点腹壁强腱处，伸展到两半乳房之间，在基部与外侧悬韧带连接。正中悬韧带由弹性组织构成，在乳房充满乳汁时，由腹壁向外扩张，乳房的容积随之增大。

从正中和外侧悬韧带分出大量纤维板，横穿进腺组织，与其中的结缔组织网络互相连接。这样，在正中悬韧带和两侧的外侧悬韧带之间，就构成多层的吊床式装置，分层支持乳房，使腺组织不会受到乳房本身重量的压力，也不会妨碍乳房内的血液循环。

二、乳腺的发育

(一) 乳腺的发育过程

哺乳动物的乳腺发育始于胎儿期，在青春期前后虽也有不同程度的生长，但大约到妊娠晚期或泌乳早期才达到完全发育状态。胎儿期乳腺的基本结构已经形成，出生后乳导管延伸并穿透基质，这种变化在有些种属可延续到初情期。大多数动物的乳腺发育在妊娠期完成，有少数动物如大鼠、小鼠和兔等则可延续到哺乳早期。泌乳结束后，原有

的乳腺组织逐渐萎缩，分泌细胞消失，但乳腺肌上皮细胞仍然存在。

1. 胚胎期

胚胎乳腺的腺组织由外胚层腹侧面在胚胎早期开始增厚，相继发育成乳带、乳条、乳索、乳冠、乳丘和乳芽。乳芽是各种哺乳动物乳腺发育的主要结构。乳芽开始呈扁豆状，以后变为圆球形和锥形，这是初级乳芽。初级乳芽细胞增殖很快，中心形成一个管道，最后在乳芽近端形成乳腺乳池，远端形成乳头乳池和乳头管。初级乳芽细胞增殖并形成分支，分支称为二级乳芽，形成大导管进入乳腺。早期胚胎皮肤下部长出球果状的乳蕾，乳蕾表层突出部的细胞发生角质化形成乳头。在初级乳芽发育成乳池和乳头管后，乳蕾逐渐消失，下面细胞角质化变成栓塞。犊牛在出生后的二周时，栓塞溶解，使乳头管与外界相通。即将出生时，乳芽上皮细胞迅速增殖，出现乳管，一端开口于皮肤形成乳头，另一端则开始分支成导管。雄性动物的乳腺也可发育到乳芽阶段，此时由于雄性胎儿开始分泌少量的睾酮，导致间充质在乳芽中心聚集，致使乳芽细胞死亡。有的雄性动物如小鼠、大鼠、马等没有乳头，这是因为乳芽细胞死亡以后乳芽上皮细胞从皮肤分离，不能伸到表面形成乳头。有的雄性动物虽有乳头，但间充质破坏了乳芽的生长和发育，乳腺发育终止在原始阶段。

2. 从出生到初情期

从出生到初情期前，乳房发育很平稳，与身体其他部位一样，属于一种比例性的生长。乳腺的进一步发育需要雌激素的作用，这一时期雌激素水平很低，不足以使乳腺导管系统得到良好发育。出生时，乳腺只有很小的腺乳池和极不发达的导管系统。但纤维结缔组织和脂肪组织却发育良好，并具有类似成熟乳腺那样的分叶结构。从出生到初情期，犊牛乳腺的生长速度与身体的生长大致相等。这时，乳房增大主要是由于纤维结缔组织和脂肪增生，腺组织只有导管稍微生长。有人曾对大鼠的乳腺生长进行过精密的定量研究，发现从出生到初情期，乳腺生长大致可区分为两个阶段。第一个阶段是在 23 日龄以前。这时乳腺导管的生长速度与身体生长速度相等，叫等速生长期。第二阶段从 24 日龄开始，导管生长的速度大约为身体生长速度的 3 倍，叫正变速生长期。对小鼠和恒河猴的研究也得到类似的结果。

3. 性成熟后

雌性动物达到性成熟后，乳腺在发情周期中经历生长发育的周期性变化。此时，垂体促性腺激素分泌频率和分泌量的增加，导致卵巢类固醇激素合成与分泌增多。雌激素能刺激乳腺导管系统的广泛增殖，这种作用主要是通过增加细胞膜的通透性和细胞外液的积聚，增加血管和血流速度，促进 DNA 和蛋白质的合成而实现的。雌激素刺激乳腺导管的生长，需要生长激素的协调作用。在每次发情周期的卵泡期，乳腺导管系统迅速生长，并在黄体期开始形成少量发育不全的腺泡。在间情期，乳腺生长停止，导管系统稍微缩小。在一次又一次重复的发情周期中，导管逐渐形成分支复杂的导管系统，乳房体积也明显增大，但一般不形成真正的腺泡。小鼠和大鼠这些性周期较短的动物乳导管逐渐生长，分支增多，但腺泡没有形成。猪、山羊、绵羊、牛和人等性周期较长的动

物，在雌激素、孕激素、催乳素及生长激素的协调作用下，乳导管逐渐加长、变厚、分支增多。导管上皮细胞在发情期呈方形，有分泌物；黄体期呈圆柱形，管腔萎缩。人和反刍动物乳腺的间质和支持组织也增长很快。

乳房内的脂肪-结缔组织衬垫，对于引导腺体的正常生长发育，起着决定性作用。结缔组织对腺体形成的重要性可通过下列实验证明。对腺组织进行离体培养时，如果没有成纤维细胞，只能长成不规则的腺细胞薄层；而当含有成纤维细胞时，就能正常生长，并形成导管和腺泡。用适当的激素处理雄性动物，并不能使它们的乳腺充分发育，其主要原因就是由于公畜乳房中没有发育良好的脂肪-结缔组织衬垫。

4. 妊娠期

当未交配母牛达到 30 月龄左右时，乳腺的主要导管系统已经生长到最大长度。妊娠开始后，导管系统的长度不再明显增加。随着妊娠的发展，孕酮和雌激素的分泌长时期同步增加，乳房生长不断加快。主导管沿着结缔组织衬垫生长，分出许多侧支，开始出现小叶间导管。妊娠第 4~5 月时，小叶已经很明显，没有分泌腔的腺泡和终末乳导管也开始出现。到妊娠第六个月时，坚实的腺泡渐渐出现分泌腔，腺泡和导管的体积不断增大，使腺小叶明显扩大，大部分脂肪衬垫被腺组织取代。同时，乳房内的血管和神经纤维也不断增生。妊娠第 7~9 月时，腺泡进一步增大，腺上皮开始具备分泌功能。同时，小叶间和叶间的结缔组织隔膜都伸长和变薄，在组织结构上接近于泌乳的乳房。初期分泌物呈蜂蜜样，以后分泌能力逐渐加强。产前三周，乳房显著增大，合成乳糖和乳脂所需的酶开始出现。约在产前两天，乳汁合成的能力趋于完善，出现合成高潮，腺泡分泌初乳。

从妊娠大鼠的组织学和细胞学研究发现，乳腺在妊娠期间的生长发育大体上也可区分为两个时期。第一个时期是乳腺增殖期，出现于妊娠前半期或前 $2/3$ 的时期，主要是由于细胞加速分裂，使导管系统分支，同时形成腺小叶和出现腺泡。第二个时期是乳腺增大期，发生于妊娠后期，主要表现为已经形成的腺上皮的生长、腺泡腔充盈以及导管系统积聚分泌物。在增殖期和增大期之间，一般没有明显界限。有些研究报道，牛妊娠期间的乳腺生长发育与大鼠并不完全相同。例如，在妊娠第 8~9 月时，牛乳腺腺泡中可看到很多有丝分裂现象。

5. 泌乳期

到妊娠中后期，乳腺已基本发育成为一个完全分化的成体器官，但乳腺的发育此时并不停止，乳腺上皮细胞一直要分裂到泌乳早期。这段时期主要是乳腺实质和 DNA 的继续增加和乳腺细胞数量的增加。在胰岛素、糖皮质激素、催乳素、生长激素和催产素等作用下，酪蛋白、 α -乳清蛋白、乳糖等乳汁成分大量合成。到分娩并开始泌乳时，乳腺才成为分化和发育完全的成体器官，开始正常的泌乳活动。

6. 干乳期

当泌乳活动从高峰明显下降时，乳腺就开始渐进性的回缩。在泌乳后期和干乳前，乳腺中已经有大部分腺小叶丧失正常功能。在干乳期或仔畜断奶时，乳腺内压增大，细

胞体积逐渐缩小，分泌腔逐渐消失，终末导管萎缩，最后腺小叶退化到只具有少数分支的小管，腺组织被结缔和脂肪组织所代替，乳汁合成停止，乳腺逐渐退化和萎缩。残留乳汁缓慢被吸收。残留的乳汁蓄积物可抑制与合成乳汁有关的酶，或使有关的激素水平下降，促进乳腺的退化。最后泌乳活动完全停止。受激素影响无黄体的大鼠在干乳期全部小叶腺泡系统消失，而性周期长的动物有功能黄体期，一些腺泡的结构仍能保留。

哺乳动物生殖周期中乳腺的功能性分化是至关重要的。以小鼠乳腺的发育作为模型来说明乳腺发育所经历的整个过程。新生小鼠有初级的乳导管系统存在，但生长很缓慢，直到青春期导管的生长才明显加快；在未交配之前雌鼠的导管继续发育形成腺小叶，腺小叶分布于整个乳房的脂肪组织；导管分支和腺泡的生长主要是在妊娠和分娩过程中完成的；腺泡上皮的终末分化是在妊娠结束、分娩和泌乳开始时完成的。在断乳之后腺泡上皮萎缩，乳腺将重塑。几周后小鼠乳腺恢复到成熟未交配时的状态(图 10-4)。

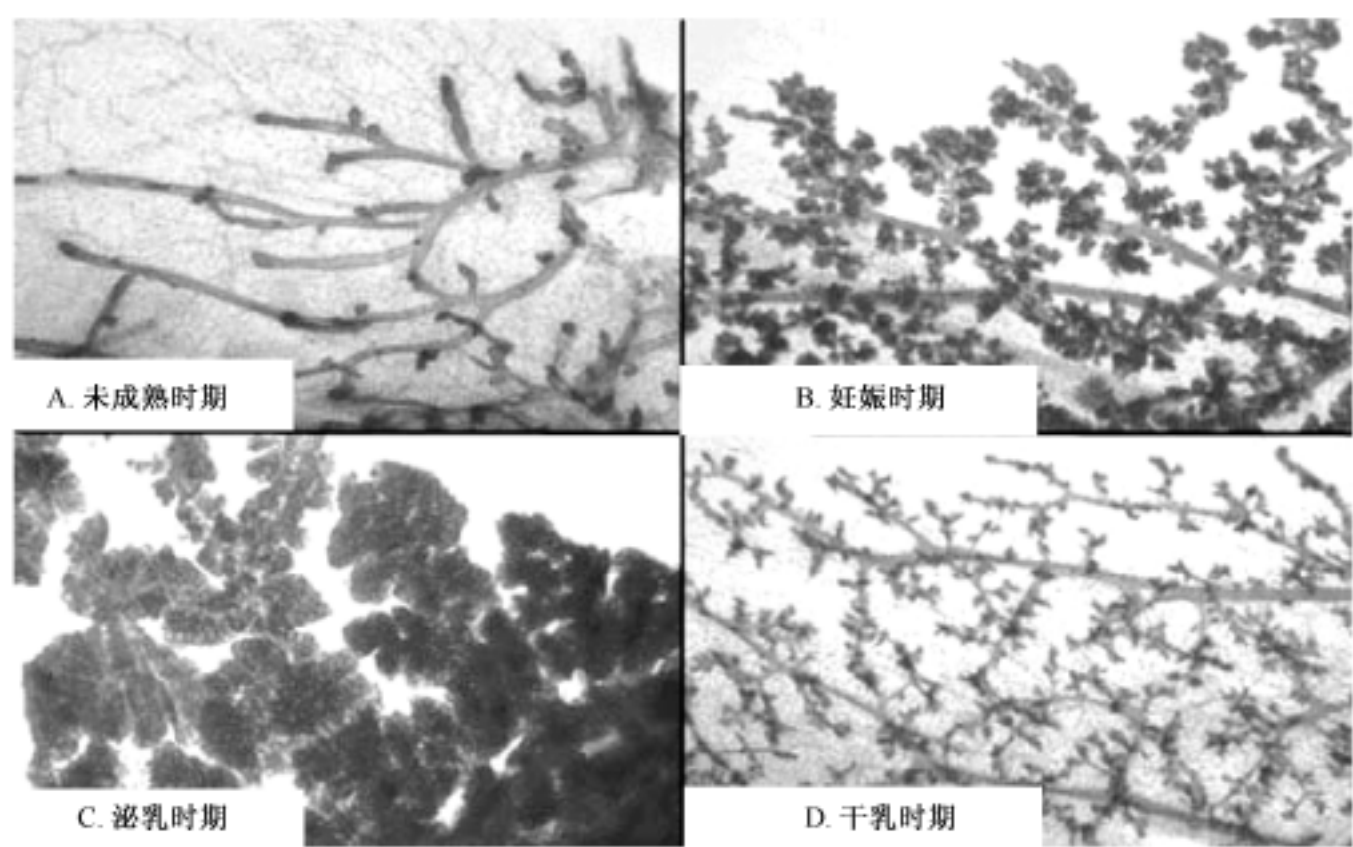


图 10-4 示小鼠生殖周期不同阶段乳腺腺泡和导管系统发育状况 (引自 Hennighausen L, 1998)

A: 未成熟小鼠乳腺; B: 妊娠 16 天小鼠的乳腺; C: 泌乳第 1 天小鼠的乳腺;
D: 断乳 4 周后小鼠的乳腺

(二) 乳腺生长发育的调控

乳腺发育的调控主要受内分泌系统调控，神经系统也参与调节。与乳腺发育有关的激素主要有雌激素、孕酮、生长激素 (GH)、促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和催乳素 (PRL)。在妊娠后期，胎盘催乳素 (PL) 也促进乳腺的发育。此外，甲状腺素 (T₄)、三碘甲腺原氨酸 (T₃)、胰岛素和松弛素等亦参与调节。近年来，越来越多的试验证明，胰岛素样生长因子 (IGF) 也是调节乳腺发育的重要因子。

1. 雌激素、孕酮与乳腺发育

雌激素在乳腺发育中起着关键的作用。它可刺激乳腺导管生长,显著增加乳腺细胞的孕酮受体数目,而后者则是雌激素和孕酮协同作用,促进乳腺小叶腺泡发育的基础。在青春期和妊娠期,雌激素和孕酮能协同刺激乳腺发育。给切除卵巢的大鼠连续 19 天注射 17β -雌二醇 (E_2) 和孕酮,可使乳腺细胞内 DNA 含量增加到接近妊娠第 18~20 天的水平。给未妊娠的山羊和牛注射大剂量的雌激素和孕酮后,可使乳腺小叶腺泡广泛生长,其中雌激素起主要作用,而孕酮只是起加强作用。对奶牛、母羊、猪的研究表明,妊娠期乳腺腺泡的发育与血中雌激素水平的升高有关。在离体或在体实验中,雌二醇和孕酮都能促进牛乳腺腺泡的生长。近年来的一些研究表明,雌激素能明显诱导在体或离体乳腺细胞的孕酮受体数目增加,而孕酮则通过雌激素依赖性的孕酮受体,刺激乳腺上皮细胞中 DNA 的合成。

α -乳球蛋白是乳糖合成酶的成分之一,而催乳素是牛乳腺组织中 α -乳球蛋白的主要调控者之一。雌激素能促进乳腺生长,主要表现在可明显增加性成熟前牛乳腺组织中 α -乳球蛋白的合成,并协同催乳素促进 α -乳球蛋白的分泌。雌激素加强催乳素促进 α -乳球蛋白分泌的机制,可能是与其刺激催乳素受体数目有关,因为雌二醇能增加乳腺中催乳素的结合位点数目。而孕酮在使 α -乳球蛋白分泌增加的同时,却使催乳素的促乳效应减弱,还可减弱雌二醇和催乳素的协同作用。泌乳开始时,孕酮的分泌减少,雌二醇、生长激素、前列腺素 ($PGF_{2\alpha}$) 和胎盘催乳素等的分泌增加。此现象在兔和绵羊中也得到了证实。

2. 催乳素、胎盘催乳素与乳腺发育

大量的研究表明,催乳素在乳腺发育、启动泌乳和维持泌乳中都起着重要的作用,它协同卵巢类固醇激素(雌激素和孕酮)促进乳腺小叶腺泡的生长和上皮细胞的增殖。许多研究者先后用切除垂体或以溴隐亭抑制催乳素分泌的方法证明,垂体催乳素的存在是雌二醇和孕酮促进乳腺发育的重要条件。用激素替代或垂体移植方法,也证明了催乳素促进乳腺发育的作用。在肾上腺、性腺、垂体切除的大鼠中,使用大剂量的催乳素和生长激素,能引起乳腺导管的生长和分叉,以及中等程度的小叶腺泡发育。假孕兔仅用催乳素处理后,就能引起乳腺腺泡分化及高尔基复合体膨大,腺泡腔内出现大量的脂肪球和蛋白质胶粒。分娩前血浆催乳素水平的骤然升高,可促使乳的生成,并激发泌乳。用利血平提高奶山羊血浆催乳素水平,可使空怀奶山羊产奶。而用溴隐亭抑制大鼠、奶牛、山羊和猪血液中的催乳素水平后,可阻止乳腺发育和乳的生成。许多报道表明,随着妊娠过程的发展,催乳素与其受体的结合率增加,且可对其受体数量进行调控。用雌激素和孕酮处理空怀羊,可增加乳腺中催乳素受体。由于许多种动物注射雌激素后均能增加催乳素的分泌,故很难区分催乳素和雌激素的单一作用。张少英等报道,雌激素可直接刺激绵羊垂体前叶细胞分泌催乳素。反刍动物的整个妊娠期(除临产前)中,血中催乳素处于较低水平,尽管这种较低水平的催乳素对乳腺生长发育是必需的,但它并非乳腺发育的限制因素。催乳素促进乳腺发育的机制仍不十分清楚,它可能直接作用于乳腺的催乳素受体,或间接地通过上调雌激素和孕酮受体,或通过调节乳腺组织对其他激

素反应的敏感性。最近的一些研究表明,催乳素如同生长激素一样,能通过诱导肝脏产生一种催乳素协同因子,间接发挥刺激乳腺细胞增生的作用。

有些动物,如大鼠和灵长类,胎盘可作为雌激素、孕酮和垂体样激素的来源。有实验表明,妊娠后期切除垂体并不影响乳腺的充分发育。大鼠胎盘提取物,能刺激切除垂体和卵巢大鼠的乳腺发育。妊娠小鼠和大鼠胎盘催乳素浓度的增加,和胎儿鼠及乳腺的发育呈正相关。胎盘催乳素在妊娠期可作用于乳腺和黄体,且与这两个部位有竞争性结合。妊娠末期,黄体退化,人胎盘催乳素主要作用于乳腺,加速其生长发育。在妊娠期,特别是中、后期,对乳腺发育起重要作用的是胎盘催乳素,并非垂体催乳素。此时的动物处于高催乳素水平,并且胎盘催乳素、垂体催乳素、生长激素有共同的受体结合位点,三者与受体发生竞争性结合。据报道,抑制妊娠绵羊垂体催乳素的分泌对乳腺发育无影响。妊娠绵羊的胎盘催乳素在促进乳腺生长方面能替代或补充垂体催乳素,其他反刍动物中也有类似报道。然而种属之间也有差异,大鼠的胎盘在乳合成方面比垂体催乳素重要。胎盘催乳素影响乳腺发育是否是通过胎盘催乳素与垂体催乳素受体结合尚不清楚。

3. 生长激素、胰岛素样生长因子 (IGF) 与乳腺发育

生长激素除能调节机体生长和组织代谢外,还具有协同雌激素促进乳腺导管生长和加强催乳素促进乳腺腺泡生长的作用。摘除垂体、肾上腺、卵巢的大鼠或小鼠,应用牛生长激素、雌激素和肾上腺皮质激素能刺激乳腺导管生长和次级乳芽形成。体外试验发现,牛生长激素能刺激乳腺上皮细胞大量增殖。这些资料表明,生长激素对乳腺发育具有直接促进作用;另一方面,生长激素能增加乳腺血流量,调节体内营养成分向乳腺集中,间接地促进乳腺发育。有些学者认为,反刍动物的泌乳一旦开始,用溴隐亭抑制催乳素的分泌后,对泌乳无明显影响。给产后3个月的绵羊静脉注射氟哌啶醇,虽能升高血中的催乳素,但产奶量并不增加。目前认为,维持反刍动物泌乳的激素是生长激素。生长激素对奶牛的乳腺发育、乳汁生成和泌乳的维持起重要作用。奶牛应用生长激素后,产奶量明显增加,可能是由于生长激素抑制乳腺纤维蛋白溶酶的产生,从而延缓了乳腺的退化。3~4周龄大鼠的乳腺培养试验表明,高浓度的生长激素能直接作用于乳腺组织,诱使小叶腺泡发育和酪蛋白基因表达。近几年研究表明,生长激素能刺激肝脏产生胰岛素样生长因子 (IGF),作用于乳腺细胞的胰岛素样生长因子受体,促进乳腺发育。许多研究表明,生长激素对乳腺生长的作用受IGF-I调控,即生长激素对乳腺的部分作用是通过IGF-I的介导而实现的。IGF在乳腺发育中起着极其重要的作用,主要表现在以下几个方面:① GH刺激大鼠乳腺内IGF-I mRNA产生,且成年动物乳腺中发现有IGF-I mRNA的存在。② IGF-I mRNA在人乳腺基质中亦被发现,且乳腺细胞中存在IGF-I受体。③ IGF-I强有力的刺激乳腺癌细胞的生长。④ 乳腺上皮细胞产生和分泌IGF-I结合蛋白,后者可能调控IGF-I的活性。⑤在乳腺生长发育方面,2种形式的IGF-I,即IGF-I与des-(1-3) IGF-I(一个缺少了N末端Gly-Pro-Glu三肽的IGF-I类似物,由67个氨基酸组成),当与雌二醇一起被施用于垂体切除的阉割雄鼠时,可替代垂体前叶或生长激素,显著增加大鼠乳腺的终端嫩芽数目,诱导腺泡结构的形成。最近的报道表明,在过度表达des-(1-3) IGF-I的转基因大鼠中,des-(1-3) IGF-I延

缓了泌乳后乳腺的退化，但作用机制目前尚不清楚。

4. 松弛素、胰岛素、甲状腺素、三碘甲状腺原氨酸等与乳腺发育

乳腺发育除上述激素或因子的调控外，还受松弛素、胰岛素、甲状腺素、三碘甲状腺原氨酸等的调控。松弛素能促进离体猪乳腺组织细胞的有丝分裂，对妊娠后期猪乳腺组织生长有促进作用，并可加强诱导的乳腺导管和基质生长发育。最近通过免疫组织化学发现，在豚鼠的乳导管上皮细胞中有松弛素。但妊娠豚鼠的乳腺是否产生松弛素尚不清楚。据报道，用抗大鼠松弛素的单克隆抗体注射妊娠中期、晚期的大鼠，以中和内源性松弛素，可使大鼠乳腺发育严重受阻，产后因乳头发育不良而不能泌乳。低浓度猪松弛素能引起人乳腺 MCF7 癌细胞系增生，高浓度猪松弛素却抑制这些细胞的生长。此外，培养妊娠绵羊的乳腺时，胰岛素有明显的促乳效应。然而，胰岛素受体浓度在妊娠 50 天时最高，随妊娠天数增加而下降，这与牛的实验结果一致。这表明随着细胞的分化，每个细胞的受体数目由于细胞膜的增加而被“稀释”。一般认为，甲状腺素 (T_4) 由甲状腺合成，而三碘甲状腺原氨酸 (T_3) 则主要由甲状腺素 (T_4) 在 5'-甲状腺激素单脱碘化酶的作用下脱碘而成。用牛生长激素处理空怀黑白花牛后，发现产奶量增加的同时，血浆三碘甲状腺原氨酸 (T_3)、甲状腺素 (T_4) 水平升高，且乳腺组织中 5'-甲状腺激素单脱碘化酶的活性增加 2 倍，而肝、肾中 5'-甲状腺激素单脱碘化酶的活性不受影响，认为甲状腺激素增加产奶量的机制可能是甲状腺素 (T_4) 转化为有生物活性的三碘甲状腺原氨酸 (T_3) 的缘故。

5. 乳腺发育的神经调控

神经系统对乳腺发育的调控主要是通过下丘脑分泌的调节性多肽而实现的。至少有下列 4 条神经内分泌轴涉及乳腺发育和泌乳的调控：①下丘脑-垂体-性腺轴。②下丘脑-垂体生长激素或催乳素轴。③下丘脑-垂体-肾上腺轴。④下丘脑-垂体-甲状腺轴。下丘脑调节性多肽神经元的功能除受垂体激素或外周激素的反馈性调节外，还受多种神经递质（如多巴胺，5-羟色胺等）或神经肽（内啡肽、血管活性肠肽等）的调节。由于其调节过程及机理相当复杂，现在仍不清楚。

第四节 泌乳的发动和维持

一、泌乳发动

泌乳发动指乳腺泌乳的开始。反刍动物约在妊娠中期血液孕酮水平仍高时，乳腺腺泡就发生分泌活动，啮齿类在临产前开始分泌乳汁，人和灵长类动物一般在分娩之后开始泌乳。根据对反刍动物的研究，将泌乳的启动分为两个阶段。第一个阶段发生在妊娠后期，这时乳腺开始分泌少量乳汁所特有的成分如酪蛋白和乳糖。第二个阶段是指伴随着分娩的发生，乳腺大量分泌乳汁的起始阶段。这个阶段正是发生在分娩前后孕酮水平下降而催乳素维持高浓度的时候。

泌乳发动是指乳腺器官由非泌乳状态向泌乳状态转变的功能性变化过程，即乳腺上

皮细胞由未分泌状态转变为分泌状态所经历的一系列细胞学变化的过程。这个过程通常出现在妊娠后期和分娩的前后。在这个过程中，乳腺上皮细胞中 RNA 水平明显增高。RNA/ DNA 比值在妊娠后期小于 1，而在泌乳期该比值则超过 2。RNA 与 DNA 比率的增高说明，在分娩前后动物乳腺的泌乳活动变得明显活跃了。泌乳启动实际上依赖于一系列特定激素的调控。实验已经证明，多数处于非泌乳状态的动物（包括非妊娠的动物）乳腺在经过这些激素的刺激之后，在一定程度上都会启动泌乳。

（一）泌乳发动过程的两个阶段

1. 第一阶段：腺泡上皮细胞的变化

这个阶段乳腺腺泡会合成和分泌少量的乳汁。妊娠早、中期的腺泡上皮细胞有较规律的核型、较小的粗面内质网、较小的高尔基体，较少的线粒体。到了妊娠后期，腺泡上皮细胞中的粗面内质网和高尔基体急剧肥大，线粒体增多，核型也变得不规则。在此阶段酶的变化表现为，乙酰辅酶 A 羧化酶、脂肪酸合成酶以及泌乳相关的其他酶的合成增多，同时氨基酸、葡萄糖以及其他合成乳汁所必需物质的摄取转运系统也明显活跃。第一阶段会合成初乳和免疫球蛋白，乳糖的合成则要到第二阶段才开始。第一阶段的长度在各种动物中也各不相同。例如，山羊（妊娠期为 5 个月）的第一阶段开始于产前 3 个月，而大鼠（妊娠期为三个月）的第一阶段仅开始于产前的 30h。

2. 第二阶段：全乳的分泌

泌乳发动的第二阶段通常要比第一个阶段短。在第二阶段中，伴随分娩的临近或发生，血液中孕酮浓度下降，同时催乳素和糖皮质激素浓度的升高，动物乳腺开始分泌全乳。牛泌乳发动的第二阶段开始于分娩前的 0~4 天，一直延续到产后若干天；猪和小鼠的第二阶段一般开始于分娩前不久或分娩时；而人类女性的泌乳发动的第二阶段一般要到产后 2 天才开始，这主要是由于怀孕女性血液中的孕酮浓度要到分娩时才开始下降的缘故。

需要注意的是，在妊娠后期动物乳腺的发育已经具备了泌乳的能力，但全乳的分泌一般在分娩前后才会发生。在人妊娠的最后 3 天，乳腺细胞中实际上有低水平的酪蛋白和 β 乳球蛋白合成，乳脂在细胞和腺泡中积累。然而直到临产时才有少量 α -乳清蛋白的合成。

在泌乳发动第二阶段的起始，即雌性动物分娩时，乳汁量快速增多，同时乳腺从血液中摄取营养物质的代谢过程也明显加强。在几天之内乳腺即从分泌初乳过渡为分泌全乳的状态。

乳糖的合成是泌乳发动的关键步骤。分娩相关的激素变化（孕酮的下降及糖皮质激素和催乳素的升高）诱导了 α -乳清蛋白基因的转录。在乳糖的合成过程中， α -乳清蛋白的 mRNA 是在粗面内质网的核糖体内完成翻译的， α -乳清蛋白与半乳糖基转移酶在高尔基体中发生相互作用，合成乳糖。乳糖的合成使水分渗入高尔基体和分泌小泡，这个过程保证了大量乳汁的分泌，也是泌乳启动第二阶段最典型的标志。与此同时，乳汁其他成分的合成也加快了。

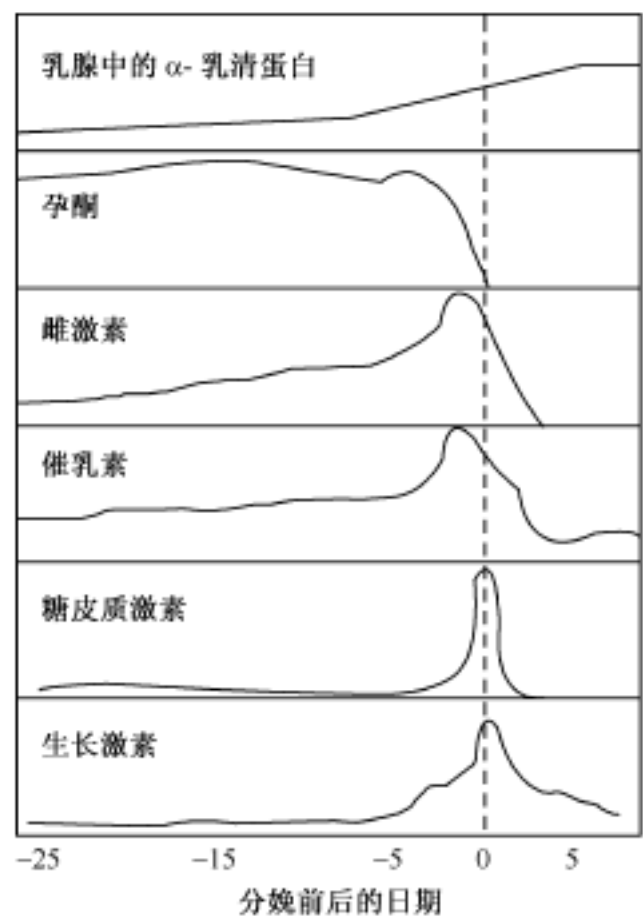


图 10-5 示牛分娩前后泌乳发动相关激素以及 α -乳清蛋白的变化 (引自 Tucker HA, 1994)

(二) 泌乳发动过程中的激素变化

在分娩前后，雌性动物血液中很多激素的浓度发生变化。由于分娩的发生将切断母体和胎儿之间的营养供应通道——脐带，这样新生儿对营养日益增大的需要只能通过乳汁来获得，因此调控分娩和泌乳的内分泌体系就紧密地整合在一起。可以确定有两种类型的激素在这个过程中发生了变化。一类激素对泌乳有抑制作用，在分娩前后其活性降低。另一类激素对泌乳有促进作用，在分娩前后其活性升高。其中一些激素是泌乳发动所特有的（图 10-5）。在分娩前几天孕酮开始下降，雌激素达到峰值，雌激素又进而促进催乳素的分泌。催乳素峰的出现对于整个泌乳的启动过程是非常重要的，特别是对全乳分泌的发动（泌乳发动的第二阶段）更为重要。在分娩前后，还会出现糖皮质激素峰和生长激素峰。

1. 催乳素的作用

在许多哺乳动物的泌乳发动过程中，催乳素都起很重要的作用。在妊娠期间，血液中孕酮、雌二醇、肾上腺类固醇激素和胎盘催乳素的含量较高，但此时很多动物催乳素水平变化不大。分娩时，随着黄体溶解，胎盘膜破裂，类固醇激素减少，特别是孕酮分泌突然减少，催乳素增加，这些可能是生理上发动泌乳的触发因素。

催乳素通过与乳腺分泌细胞上的催乳素受体结合而直接作用于乳腺。在泌乳发动的第一阶段，催乳素受体数目开始增多，然后受体数量基本保持稳定，直到泌乳发动的第

二阶段（分娩前后）时催乳素受体数目再一次增多。催乳素受体数目的变化与泌乳发动的机制非常吻合，可见催乳素在泌乳启动过程中起重要作用。

一般认为，催乳素的刺激作用和乳腺上皮细胞的催乳素受体对催乳素的响应性对于泌乳发动由第一阶段向第二阶段的转变都是很重要的。使用催乳素的抑制剂可以阻止泌乳发动，但血液中催乳素浓度的升高并不一定能刺激乳腺分泌，可见催乳素受体变化对于泌乳发动的重要性。

催乳素可以促进乳蛋白特别是酪蛋白的生物合成。催乳素与其受体的结合首先引发核蛋白体 RNA 和酪蛋白 mRNA 的增多，可见催乳素调控着酪蛋白基因的表达，也许还有其他基因的表达也受催乳素的调控。

2. 孕酮的作用

黄体分泌的孕酮能抑制泌乳的启动。孕酮对于妊娠期刺激小叶腺泡发育有重要作用，同时孕酮是使母畜保持妊娠状态，而不启动分娩和泌乳的重要因子。切除黄体或用其他方法降低孕酮水平，会导致泌乳启动和流产。然而，用切除肾上腺或垂体的方法降低孕酮的水平，并不会导致泌乳的启动。这样看来，孕酮在泌乳发动过程中可能既是一个促进因子也是一个抑制因子，但主要作用还是抑制泌乳的发动。

在妊娠期给母畜注射孕酮会抑制乳糖、 α -乳清蛋白和酪蛋白的合成，孕酮也抑制由催乳素诱导的其他乳成分的合成，孕酮直接作用于乳腺来降低催乳素诱导的 α -乳清蛋白分泌的能力。

孕酮与孕酮受体在乳腺分泌细胞的细胞质中结合，同时也和糖皮质激素竞争糖皮质激素受体。孕酮还能抑制由催乳素诱导的催乳素受体合成的过程，同时减弱糖皮质激素和催乳素的协同作用。正是由于这些作用造成了在整体上孕酮在泌乳启动过程中主要起抑制作用的结果。

3. 雌激素的作用

在泌乳发动的两个阶段中，血清中的雌激素浓度均发生变化。牛产前一个月左右雌激素浓度显著上升，分娩前两天达到峰值，然后迅速下降。雌激素对于乳腺发育良好的许多哺乳动物均有诱导泌乳发动的作用。一般认为，雌激素对于泌乳发动的诱导作用是间接的，因为雌激素是通过促进催乳素以及垂体分泌的其他激素的释放来对泌乳发动产生作用的。雌激素和糖皮质激素一样能刺激乳腺细胞膜上催乳素受体数目的增加，因而在泌乳发动中雌激素与糖皮质激素、催乳素在细胞水平上有协同作用。在小鼠和牛中，雌激素可以直接促进离体培养的乳腺组织合成酪蛋白和乳清蛋白。

4. 糖皮质激素的作用

糖皮质激素在动物泌乳发动过程中也起着十分主要的作用。妊娠母牛用糖皮质激素处理可以启动泌乳，而大部分物种需要联合使用糖皮质激素和催乳素才能有效地发动泌乳。皮质醇能诱导乳腺上皮细胞中粗面内质网和高尔基体发生变化，而这种变化是催乳素诱导乳蛋白合成所必需的。这说明在泌乳启动过程中，催乳素和糖皮质激素的协同是必需的。

5. 胰岛素和生长激素的作用

胰岛素和生长激素对于泌乳发动的作用还不清楚。胰岛素和胰岛素样生长因子(IGF)可能参与葡萄糖的摄取,而葡萄糖是合成乳糖所必需的物质。胰岛素也可能参与乳蛋白基因的表达。生长激素可能通过增加IGFs的分泌间接对泌乳发动产生影响。

6. 泌乳发动过程中其他因子的作用

泌乳发动的第二阶段还要依赖来源于乳腺和身体其他部位的组织因子参与。在子宫和乳腺中合成的前列腺素($\text{PGF}_{2\alpha}$)可抑制泌乳,因此在分娩时母畜机体必须降低它的活性。在临产前若干天,母畜乳腺中的前列腺素的活性受到抑制。分娩之后,新生儿对乳腺的吮吸会使乳汁从乳池中排出,这时乳腺中的前列腺素也会随着乳汁排出。如果新生儿的数量少于母畜乳腺的数量,那么没有被吮吸的乳腺会明显退化,因为乳腺中没有被移除的前列腺素会继续产生抑制泌乳的作用。同时新生儿对母畜乳腺的吮吸也能刺激泌乳发动相关激素的分泌。

二、泌乳的维持

泌乳发动后,乳腺能在相当长的一段时间内持续进行泌乳活动,这就是泌乳的维持阶段。例如,母牛产犊后,乳汁分泌迅速增加,并在4~6周内达到高峰。这种高峰状态保持几个月后,泌乳量又逐渐下降。整个泌乳期可以维持300天左右。在泌乳的维持阶段,乳腺细胞数量和乳产量的变化受激素调节和神经反射的调节。如果乳腺没有频繁的排空动作,即使激素水平很高也不能使泌乳持续下去,这说明泌乳的维持不是单纯由激素调控的。当然单纯的吮吸和挤奶动作也不能维持泌乳,但吮吸动作或乳腺的排空是维持泌乳所必需的。

目前认为,泌乳的维持至少是受一组激素的联合作用,称其为泌乳激素群,其中包括催乳素、生长激素、甲状腺素和糖皮质激素。

1. 催乳素的作用

在不同的动物中,催乳素在泌乳维持过程中的作用存在很大的差异。在一些非反刍动物(如兔子)中,单独使用催乳素处理就可以维持泌乳。例如大鼠在泌乳早期,大量外源性催乳素通过增强乳腺上皮组织代谢促其泌乳。但在大多数非反刍动物和反刍动物中,单独使用催乳素并不能维持乳腺的泌乳,催乳素不过是维持泌乳的激素群中的成分之一。特别是在牛中,催乳素的作用尚不十分明确。抑制牛或羊的催乳素活性对乳产量的影响很小。啮齿类动物的催乳素活性受抑制后,乳产量可下降50%,而兔子则基本停止泌乳。通常认为,是挤奶动作或哺喂行为诱导了催乳素的释放,然而泌乳维持阶段的催乳素波较临产前泌乳启动相关的催乳素波要小。

2. 生长激素的作用

生长激素是泌乳维持所必需的,能协调身体各器官和各生理过程中发生的变化,促

进乳腺中乳糖、蛋白质、脂肪的合成。牛生长激素 (BST) 在美国已经商业化生产并应用于许多奶牛场, 对奶牛奶产量的提高有明显作用。据报道, 可以使奶产量提高 10%~40%。但实验动物应用生长激素不影响乳量。

3. 肾上腺皮质激素的作用

切除肾上腺的家畜不能维持泌乳, 可见完整的肾上腺对于泌乳的维持是必需的。生理水平的糖皮质激素对于泌乳维持起促进作用, 但高剂量的糖皮质激素却抑制泌乳。在大鼠哺乳期中, 生理剂量的肾上腺皮质激素能够通过促进泌乳, 提高新生儿的生长率。

4. 甲状腺素的作用

给泌乳期母牛注射甲状腺素, 可以在短期内 (几个星期) 提高牛奶分泌量。注射甲状腺素超过 7 个星期对牛奶的产量则不再产生影响。乳蛋白质主要为酪蛋白, 酪蛋白碘化即为甲状腺球蛋白。应用甲状腺球蛋白在泌乳早期能提高泌乳量 10%, 在泌乳后期能提高泌乳量约 15%~20%。但这种对泌乳量的促进作用仅能维持 2~4 个月, 随后泌乳量将低于正常水平。因此不能在整个泌乳期给家畜饲喂甲状腺球蛋白, 否则会降低总的产奶量。

5. 卵巢激素的作用

生理剂量的雌激素对维持泌乳有促进作用, 而高剂量的雌激素却对泌乳的维持起抑制作用。雌激素与孕酮协同作用对泌乳维持的抑制作用大于单独使用雌激素。单独使用孕酮对泌乳的维持没有影响, 因为此时乳腺中孕酮的受体已经大大减少。

6. 乳排空对泌乳维持的作用

泌乳的维持主要受激素调控, 但乳的排空等局部因素也是重要因素之一。小鼠、大鼠和兔等动物, 如果在泌乳期中断哺乳, 乳腺将迅速回缩。但在停止哺乳后仍刺激乳头, 乳腺还能保持泌乳功能。母畜的哺乳行为和对母畜的挤奶动作可能触发泌乳维持相关激素的释放, 特别是催乳素的释放。来自乳头的神经冲动能抑制下丘脑中催乳素释放抑制因子的分泌, 引起促肾上腺皮质激素释放因子的释放, 使催乳素和促肾上腺皮质激素分泌增加, 从而诱导乳的分泌。如果乳腺内乳汁大量聚积而不能排出, 会导致乳腺内压增高, 内压的增高会刺激交感神经, 降低乳腺外周的血流量。血流量下降就会导致泌乳相关的激素和泌乳所需的营养物质减少。同时, 腺泡腔内会聚积反馈性泌乳抑制因子 (feedback inhibitor of lactation), 抑制乳汁的进一步合成和分泌。相反, 如果家畜的哺乳活动较频繁则会刺激乳腺的生长和泌乳量的升高。可见, 乳的排空对于维持泌乳也是必需的因素。

第五节 乳汁的排出 (排乳)

为了维持乳汁生成的持续性, 乳汁必须通过吸吮和采奶从乳腺中排出。如果奶牛的乳汁在 16h 之内没有被排出, 则乳汁的生成就会受到抑制。前面已经讲过, 在采奶之前

大部分的乳汁是位于乳导管和腺泡内。如果乳汁排除不畅，则通过吸吮和采奶刺激的乳汁进入乳池的过程就会很慢，排出的奶量就会减少。

乳腺腺泡细胞和导管周围有平滑肌上皮细胞围绕。平滑肌上皮细胞对于催产素特别敏感，在催产素的刺激下能发生收缩。垂体后叶合成并释放的催产素是受包括吸吮乳头和触摸乳头产生的触觉刺激引起的神经内分泌反射性调控的。乳房受到的刺激通过脊索背根感觉神经传递到下丘脑的室旁核和视上核的神经原，在此合成催产素并将其在神经末梢处释放。其他能够引起催产素释放的感觉刺激还包括发生在排乳通路附近的听觉、视觉或嗅觉刺激。很早以前人们就已经开始利用这种刺激通路（Ferguson 反射）来诱使牛提前释放乳汁。采取的做法是让小牛犊吸吮一只乳头，而采奶工人对其他的乳头进行采奶，可增加采奶量。此外还发现，用空管通过阴道吹气刺激子宫颈，从而导致刺激催产素释放，对提高产奶量也是有效的。

当刺激信号到达下丘脑后几秒钟，就会引起催产素的释放，催产素作用到腺泡和导管外周的平滑肌并使其收缩，收缩后对乳腺产生的压力迫使乳汁在很短的时间内（1min 左右）流出。乳头内的压力增加通常在刺激后 1min 就可明显观察到。催产素的释放通常只持续几分钟，一般在乳汁开始流出时，就应该迅速开始采乳，并在几分钟内完成，这一点是很重要的。早期用机械或手工采乳的过程通常是在 4~5min 内完成的。

比较一下引起催产素释放的刺激因素是很有趣的。引起催产素释放的刺激是始动生乳的被动部分，而引起催乳素释放的刺激才直接影响生乳过程。在奶牛中，任何与采乳过程有关的感觉刺激都具有潜在的刺激催产素释放的能力，这是由于乳汁的排出引起了神经内分泌反射，而催乳素的释放只对乳头的触觉刺激敏感。这说明除非乳汁排出很强烈（即乳头刺激强烈）外，此时没有必要再人为地刺激乳汁的生成和排出。

（夏国良 宁 刚）

主要参考文献

- 陈必良，王春梅 .1999. 分娩机制中细胞间隙连接蛋白 Cx43 瞬时表达定位、定量分析及其意义 . 现代妇产科进展 8 (3): 249~251
- 陈北亨，王建辰 .2001. 兽医产科学 . 北京：中国农业出版社
- 何平，孙刚 .2002. 分娩启动分子机制研究的新进展 . 现代妇产科进展 11: 218~220
- 罗霞，徐永萍等 .2001. 胎盘促肾上腺皮质激素释放激素与分娩发动及早产的关系 . 中华妇产科杂志 36: 573~574
- 马文芝 .1995. 母牛的分娩发动机制与应激 . 国外兽医学：畜禽疾病 16 (2): 9~12
- 毛胜勇 .2000. 泌乳奶牛的泌乳调控 . 北京奶业，3 期 1~24 页
- 牛秀敏，倪晓妍 .2000. 白细胞介素-8 和白细胞介素-6 对分娩发动的影响 . 中国实用妇科与产科杂志 16 (1): 32~34
- 宋淑荣 .2003. 分娩动因最新研究进展 . 武警医学院学报 12 (1): 76~77
- 王建辰，章孝荣 .1998. 动物生殖调控 . 合肥：安徽科学技术出版社
- 王建辰 .1993. 家畜生殖内分泌学 . 北京：农业出版社
- 王月影，王艳玲，李和平，靳向阳，高春生 .2002. 动物乳腺发育的调控 . Animal Husbandry & Veterinary Medicine 34 (7): 56~58
- 向寿 .1990. 家畜生理学原理 . 北京：农业出版社
- 中国农业大学主编 .2000. 家畜繁殖学 . 北京：中国农业出版社

张少英 .1990. 泌乳的激素调控 . 国外畜牧学: 草食家畜 1 期 31~33 页

郑行 .1994. 动物生殖生理学 . 北京: 北京农业大学出版社

Bittar EE, Bittar N.1998. Reproductive endocrinology and biology . JAI Press

Casey ML, MacDonald PC.1997. The endocrinology of human parturition . Ann N Y Acad Sci 828: 273

Etherton TD, Bauman DE.1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals . Physiological Reviews 78: 745~761

Hayssen V.1993. Empirical and theoretical constraints on the evolution of lactation . J Dairy Sci 76: 3213~3233

Hennighausen L, Robinson GW.1998. The making of a mouse mammary gland . Genes Dev 12: 449~455

Hennighausen L, Robinson GW, Wagner KU, Liu X.1997. Prolactin signaling in the mammary gland . J Biol Chem 272: 7567~7569

Tucker HA.1994. Lactation and its hormonal control . In: The Physiology of Reproduction, 2nd edition, Raven Press, Ltd ., New York

Wilde CJ, Hurley WL.1996. Animal models for the study of milk secretion . J Mammary Gland Biol 1: 123~134

Wilde CJ, Knight CH.1989. Metabolic adaptations in mammary gland during the declining phase of lactation . J Dairy Sci 72: 1679~1692

Wilde CJ, Hurley WL.1996. Animal models for the study of milk secretion . J Mammary Gland Biol . Neoplasia 1: 123~134

第十一章 性别决定与性腺发育

第一节 性别决定

性别是所有哺乳动物共有的特征之一。亚里士多德 (Macedonian Aristotle) 认为妇女是发育过程中过早停止发育的男人，发育停止是由于母体子宫的低温所致，并且认为男人比女人更完美，其原因是男人具有更多的能量。

在以后的一千多年间，人们一直认为妇女为发育不健全的男性，其生殖器也像男性，只是将里面的部位没有显露出来而已，并且男人的肋骨比女人多一条。Gelen 等首先提出，男人和女人的肋骨数相同。当时，很多人认为性别是由环境因素决定的，如母体的营养状况及动物配种时的风向等。甚至还有人认为，左侧睾丸的精液和右侧睾丸的精液所产生的后代性别不同；同样也认为两侧子宫产生的后代性别也不相同。

1890 年 Geddes 及 Thomson 总结以前的工作，提出父母的身体结构、年龄和营养，以及环境等对性别决定起重要作用，并且认为有利于营养及能量储存的被决定为雌性，而有利于营养及能量利用的为雄性。直到 1900 年孟德尔定律被发现时，人们才逐渐了解到，在许多脊椎动物或非脊椎动物中，个体性别是由其染色体组成决定的。Stevens 及 Wilson 同时将 XX 性染色体与雌性对应，而 XY 及 XO 与雄性相联系，并提出一种特异的核成分在性别表型决定中起作用，即性别是由遗传决定而不是环境决定。1959 年，首次证明 Y 染色体在小鼠和人类的性别决定中起关键作用，于是大家纷纷把目光集中于 Y 染色体上，开始了寻找性别决定基因和探究性别决定机制的漫长历程，也随之产生了各种各样的假说和设想。

性别决定 (sex determination) 是指在胚胎发育早期，由一个尚未分化的性腺发育为睾丸或卵巢的过程。在不同类型的动物中，环境及遗传因子都能对性别决定产生影响。有人称这一过程为初级性别决定 (primary sex determination)，并相应地提出次级性别决定 (secondary sex determination) 的概念，即在睾丸或卵巢所分泌的性激素的影响下，整个生殖系统及性别表型的发育过程。如在雄性哺乳动物个体中，有阴茎 (penis)、精囊腺 (seminal vesicle) 和前列腺 (prostate)，以及与性别相关的个体大小、声带软骨和肌肉系统等；而雌性哺乳动物个体则有阴道 (vagina)、子宫颈 (cervix)、子宫 (uterus)、输卵管 (oviduct) 和乳腺 (mammary gland)，以及与性别相关的个体大小、声带软骨和肌肉系统等。

哺乳动物的胚胎在性别分化过程中，雌性是其默认性别。未分化的性腺原基在没有睾丸决定基因诱导时，具有发育为卵巢的趋势。在人中，缺乏睾丸或者睾丸功能缺陷的胎儿，即使在没有卵巢存在的情况下，副中肾管 (也称缪勒氏管，Müllerian tube) 也会分化为子宫和输卵管。从这个意义上讲，性别决定也可以认为是睾丸的决定。

一、遗传型性别决定

性染色体 (sex chromosome) 是指直接与性别决定有关的染色体, 其余的染色体则统称为常染色体 (autosome)。1891 年, 德国细胞学家 Henking 在半翅目昆虫精母细胞的减数分裂过程中发现了一种特殊的染色体, 这种染色体实际上是一团异染色质。他在进一步研究这些昆虫的减数分裂时发现, 在一半的精子中带有这种特殊的染色质, 而另一半精子则没有这种异染色质。当时他对这团异染色质的作用不了解, 就起名为“X 染色体”和“Y 染色体”, 但并未将这种染色质和性别联系起来。

1902 年美国生物学家 McClung 第一次将 X 染色体和昆虫的性别决定联系起来。后来又有许多细胞学家, 特别是 Wilson, 在许多昆虫中进行了广泛的研究, 并于 1905 年证实, 属于半翅目和直翅目的许多昆虫中, 雌性个体具有两套染色体, 一套染色体叫做常染色体, 另一套是与性别有关的一对同源染色体, 称为性染色体, 即两条 X 染色体; 而雄性个体也有两套染色体, 但只有一条 X 染色体。

遗传型性别决定一般可分为 XY 型和 ZW 型。XY 型为雄性杂合型, 是生物界较为普遍的性别决定类型。哺乳类、一些两栖类、一些鱼类及很多昆虫均属此种类型。雄性个体是异配子性别 (heterogametic sex), 可产生含有 X 或 Y 的两种雄配子, 而雌性个体是同配子性别 (homogametic sex), 只产生含有 X 的一种配子。受精时, X 与 X 结合为 XX, 发育成雌性; X 与 Y 结合为 XY, 发育成雄性, 性比为 1:1。如人类有 23 对染色体 ($2n = 46$), 其中 22 对为常染色体, 1 对是性染色体, 即女性的染色体为 $44 + XX$, 男性的染色体为 $44 + XY$ 。

与 XY 型相似的还有 XO 型, 雌性的性染色体为 XX; 雄性只有 X, 而没有 Y, 不成对。蝗虫、蟋蟀、蟑螂等直翅目昆虫的性别决定属于此种类型。

ZW 型性别决定与 XY 型性别决定相反, 为雌性杂合型。雌性个体含异型性染色体 ZW, 而雄性个体含同型性染色体 ZZ。鸟类、鳞翅目昆虫、一些爬行类、一些两栖类动物的性别决定属于这一类型。如在家蚕中, 雌蚕的染色体为 $27 + ZW$, 雄蚕的染色体为 $27 + ZZ$ 。

二、环境依赖型性别决定

除了遗传型性别决定, 即染色体决定性别的机制外, 还有非染色体决定性别的方式, 其中研究最多的是外部环境因素对性别决定的作用。

(一) 爬行动物的温度依赖型性别决定

爬行动物中的一些龟类和所有的鳄鱼类为温度依赖型性别决定 (temperature dependent sex determination, TSD)。这些物种常常缺乏性染色体, 在发育的一定时期, 受精卵所处的温度使其性别得到决定。微小的温度变化可以引起性别比例发生重大的改变。温度依赖型性别决定多见于一些进化上比较古老的动物中, 因此推测它是生物界早期的

一种性别决定形式，遗传依赖型性别决定可能是由它进化而来的。

1966 年，Charnier 等首先报道爬行动物中的鬣蜥 (*Agama agama*) 的性别决定为温度依赖型。近年来的研究进一步表明，温度依赖型性别决定在爬行类的鳄目、龟鳖目及有鳞目中广泛存在。Ewert 等 (1994) 将爬行动物的温度依赖型性别决定分为三种类型：①低温下产生雄性，高温下产生雌性，称为 M-F (雄-雌) 模式；②低温下产生雌性，高温下产生雄性，称为 F-M (雌-雄) 模式；③在低温和高温下均产生雌性，在中间温度下产生雄性，称为 F-M-F (雌-雄-雌) 模式。当雄性决定因子和雌性决定因子达到平衡时，则产生 1:1 的性别比，此时的温度称为基准温度 (pivotal temperature)。美洲的密西西比鳄是目前广泛研究的一种具温度依赖型性别决定机制的动物。在 30℃ 以下的温度孵育时，密西西比鳄的卵将产生 100% 的雌性，在 35℃ 以上孵育时产生约 90% 的雌性，在中间范围的温度下孵育以产生雄性为主，其中在 33℃ 左右时产生 100% 的雄性。这是典型的 F-M-F 模式，这种模式在具有温度依赖型性别决定机制的物种中比较常见。

雌激素对温度依赖型性别决定的爬行动物的性别决定可产生显著的影响。在爬行类性腺发生过程中，精巢来自性腺原基髓质的发育和皮质的退化；卵巢则来自性腺原基皮质的发育和髓质的退化。雌激素对此过程有重要的调节作用。雌激素对性腺原基的皮质和髓质的发育分别起促进和抑制作用，从而决定性腺向雌性方向发育。Viets 等证明了这一点，他们在爬行动物产生雄性的温度下，用雌激素处理发育中的胚胎，结果观察到卵巢的发生。同样地，在产生雌性的温度下，用雌激素的拮抗剂处理使其体内的雌激素不发挥作用时，或用芳香化酶抑制剂阻断雌激素的合成时，也可诱导胚胎发育为雄性。这表明具有温度依赖型性别决定的爬行动物雌性的发育是被动的。在这些爬行类动物中，在产生雄性的温度下，用雌激素处理正在发育的胚胎，能够使其性别发生逆转的时期，被称为雌激素敏感期。Wibbles 等发现，雌激素敏感期和温度的变化密切相关，它们之间很可能存在着协同效应。例如，在产生雄性的温度范围内，如果温度越接近于基准温度，引起性逆转所需的雌激素的量就越小，说明温度和外源雌激素很可能是通过相同的途径而起作用的。

值得注意的是，睾酮也可诱导卵巢的发生。在产生雌性的温度下，用睾酮并不能诱导爬行动物胚胎发育为雄性，这是由于在爬行动物体内，睾酮可被芳香化 (aromatization) 成为雌二醇。非芳香化的雄性激素，如雄激素双羟基睾酮 (DHT)，则可以诱导胚胎发育为雄性。

许多生物学工作者认为，温度依赖型性别决定和遗传型性别决定很有可能共用一个相同的信号转导通路。对于温度依赖型性别决定的爬行类动物来说，温度是其上游的决定因子，而下游则可能也通过类似哺乳类的 SRY 基因来调控其性别决定。爬行类动物中，已经在常染色体上找到了类似哺乳类动物的 SRY 基因，即 SRY 样基因 (SRY related autosomal, Sra)，但没有发现它们在爬行类动物的性别决定中起作用。爬行类动物常染色体上的 Sra 基因很可能是四足动物中 SRY 的原始表现形式。在哺乳类中，Sra 进化为 SRY，而 Sra 基因在其他四足动物中被保留下来。此外，与哺乳类性别决定有关的所有基因在爬行类动物中均得到克隆，如 DAX1、WT1、SF1、SOX9 和 AMH 等，但它们之间的关系，以及它们对性别决定的作用还不是十分清楚。

(二) 盃和拖鞋样蜗牛的位置依赖型性别决定

盃 (*Bonellia viridis*) 是一种海生的蠕虫，雌虫体形较大，有 5~6cm，形状像豆子，有一个长吻，吻的顶端分叉；雄虫体形很小，没有消化器官，构造简单，体长仅为雌虫的 1/500，像寄生虫一样生活在雌虫的子宫内。盃的幼虫是中性的，无雌雄之分，在海水中自由游动。如果它落在海底，固着在石头上，就发育成雌虫。如果由于某种机会，幼虫落在雌虫的长吻上，然后进入雌性的子宫中，这个幼虫就发育成了雄虫。若将落在雌虫长吻上的幼虫取下，这个幼虫又变成中性的。由此，人们推测，在长吻上可能存在类似激素的物质来影响其性别分化。

拖鞋样蜗牛 (*Crepidula formicata*) 也是位置依赖型性别决定的一个例子。许多拖鞋样蜗牛堆积在一起，形成一个小丘状，在此过程中，它们所处的位置决定它们的性别。年幼的拖鞋样蜗牛是雄性，随着成熟，雄性的生殖系统开始退化，进入不稳定期。如果一个拖鞋样蜗牛与雌性接触，它将变为雌性。如果将它与雌性分开，它又会变成雌性。当大量的雄性拖鞋样蜗牛聚集在一起时，有些雄性会变为雌性。而当这些个体变成雌性后，它们就不能再变回雄性。

环境依赖型性别决定模式有利也有弊。有利的是它不受 1:1 性别比的限制，这对其有性繁殖有好处；不利的是环境的改变有可能只产生一种性别的个体，从而使一个物种灭绝。如“全球变暖效应 (global warming)”很有可能会影响到某些龟类和鳄鱼的性别比例，从而影响到其繁衍生息。

三、性别决定基因——SRY

(一) 睾丸决定因子的发现

哺乳动物的睾丸决定依赖于 Y 染色体的存在。XO 型的小鼠和 XO 型的人并不发育出睾丸组织，而 XXY 型的人和小鼠也并不因为 X 染色体数目多而发育为雌性。这意味着 Y 染色体的存在决定了睾丸的发生，从而也决定了其性别的分化。

自从 1959 年发现 Y 染色体与雄性性别决定有关之后，人们一直在寻找和分离决定性别的基因，并推测 Y 染色体上可能存在着指导睾丸分化的基因，这种基因在人类被命名为睾丸决定因子 (testis-determining factor, TDF)，在小鼠则常称为 Y 染色体上睾丸决定因子 (testis-determining gene on the Y, Tdy)。通过遗传学、生物化学及分子生物学方法，以及利用对突变体的分析和研究，使 TDF 的搜索范围越来越小，从 $3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ kb 减少至编码 80 个氨基酸的约 200 bp。

Jacobs 和 Strong 以及 Ford 等首次证明，人类和小鼠的 Y 染色体上含有 TDF。1966 年，Jacobs 等分析了移位和缺失的人 Y 染色体后得出结论，TDF 位于 Y 染色体的短臂 Yp 上。这是寻找 TDF 过程中的一个重大进展。但遗憾的是，此后的 20 年间，人们一直没有重视这一结果，甚至一度陷入 H-Y 抗原是主要的睾丸诱导物的假说中。

H-Y 抗原最早是 Eichwald 和 Silmsen 在皮肤移植实验中发现的。他们在将雄性动物

皮肤移植给雌性时，发现有排斥现象，而在雄性之间移植时却没有这种排斥。后来发现，这是一种与 Y 染色体共存的、雄性细胞表面特有的组织相容性抗原（histocompatibility antigen），即 H-Y 抗原。抗鼠 H-Y 血清与人、鸟类和两栖类动物均有抗原-抗体交叉反应，说明 H-Y 抗原在进化上比较保守。并且，发生性逆转的 XX 雄性也表达 H-Y 抗原。这些似乎表明 H-Y 抗原与雄性表型是一种因果关系。因此，Wachtel 等提出的 H-Y 抗原是主要睾丸诱导物的假说盛行了 10 余年，人们以为已经找到了位于 Y 染色体上的 TDF。然而，McLaren 发现了一些 XY 小鼠有睾丸，但 H-Y 抗原呈阴性，说明 H-Y 抗原的表达与睾丸的发育不总是相关。另外，也发现了许多 XX 男性中 H-Y 抗原呈阴性。因此，关于 H-Y 抗原决定睾丸分化的观点已被否定了。

在 H-Y 抗原被否定后，人们又将研究重点转移到 Y 染色体短臂上。性逆转的发生是指 XX 男性和 XY 女性，发生率虽分别为 1/20 000 和 1/100 000，但为 TDF 在 Y 染色体短臂上的定位提供了一条方便的捷径。Y 染色体短臂由两个功能区组成，即假常染色体配对区（pseudoautosomal pairing region, PAPR）和 Y 染色体特有区。在减数分裂过程中，由于 X 和 Y 染色体之间在 PAPR 以外的区段上发生了异常交换，导致 Y 染色体上缺失部分片段，而 X 染色体上带有部分 Y 染色体片段，这种性染色体异常的个体常常发生性逆转。在 XX 男性的 X 染色体上，带有来自 Y 染色体的短臂部分，他们的表型为男性，说明其易位的 Y 染色体片段中可能包含睾丸决定序列。用雄性特异的 DNA 探针进行缺失图谱分析显示，TDF 位于 Y 染色体上邻近 PAPR 的 1 区上。以后又证实，位于 1A2 区的一个编码锌指蛋白的基因序列 ZFY（zinc finger protein gene of the Y）就是 TDF。ZFY 是一种高度保守的 DNA 结合蛋白，具有转录调节因子的功能。小鼠 Y 染色体上具有两个 ZFY 同源基因，即 Zfy1 和 Zfy2。然而，在 3 个 XX 男性和一个 XX 兼性患者中，虽然 ZFY 缺失，但 1A1 区却仍然存在。这表明 ZFY 不是 TDF，睾丸决定基因可能是在 1A1 区上。对有袋类动物 ZFY 的遗传学研究也表明，原兽亚纲动物睾丸的形成类似于真兽亚纲动物，同样取决于 Y 染色体的存在，但其 ZFY 基因却位于常染色体，而非 Y 染色体上。此外，小鼠的 Zfy-1 和 Zfy-2 基因只在生殖细胞中表达，在胎儿性腺原基中的体细胞内却没有表达，表明可能与胎儿性腺原基中的体细胞无关。由于体细胞在睾丸分化起着关键性作用，而与生殖细胞无关，以上这些结果均表明 ZFY 并不是 TDF 基因。

1990 年 Sinclair 等利用染色体步移法，在 Y 染色体短臂上找到了一个足以引起雄性化的更小区段。将这一 35kb 的片段克隆后作为探针，分别与不同性别的人、小鼠和牛基因组进行 DNA 杂交，并与兔、猪、虎、猩猩和马等动物的基因组 DNA 杂交，都检测到了雄性特异的带。根据它在染色体上的位置，将其命名为 Y-染色体性别决定区（sex-determining region of Y chromosome），即 SRY。同年，在小鼠中也发现了类似的同源序列，称为 Sry。

（二）SRY 基因

1. SRY 基因的特性

人和小鼠的 SRY/ Sry 基因在 Y 染色体短臂上的位置有所不同，小鼠的 Sry 基因位

于一个至少 17 kb 的倒置重复序列内部, Sry 基因两侧的碱基序列几乎是相同的, 而人的 SRY 基因则位于距假常染色体区界 35 kb 的区段内, 两侧无倒置重复序列。由于人的 SRY 基因紧靠 X 和 Y 染色体发生配对与交换的假常染色体配对区, 人比小鼠更易发生由于染色体的异常互换而造成的性逆转现象。

比较人、兔和小鼠的 SRY/ Sry 基因序列发现, SRY 基因无内含子结构, 转录单位全长约 11 kb。该基因有一多聚腺苷酸位点 (AATAAA) 和两个转录起始位点, 其间是一开读框架 (open-reading frame, ORF), 这一序列高度保守, 属于高移动性 DNA 结合区 (high mobility group box, HMG box)。SRY 编码一个 204 个氨基酸的蛋白, 其中高移动性 DNA 结合区编码 79 个氨基酸。含有高移动性 DNA 结合区的蛋白质是一族具有 DNA 结合特性的 DNA 结合蛋白。SRY 在进化上具有的高度保守性也是指这一区域。不同动物的高移动性 DNA 结合区具有很高的同源性, 但高移动性 DNA 结合区以外的氨基酸序列没有同源性。对 SRY 进行的突变实验表明, 在哺乳动物的进化中高移动性 DNA 结合区是 SRY 蛋白惟一的功能区。当高移动性 DNA 结合区突变或缺失后, 会因失去结合 DNA 的能力而导致性逆转。

在小鼠中发现, Sry 可诱导某些 DNA 弯曲 85 度形成一个类似十字形的结构, 然后与之结合。然而, Sry 可以无序列限制性地与十字形结构的 DNA 结合。当 DNA 弯曲后, 其转录受到影响。在生殖嵴中, SRY 的高移动性 DNA 结合区与睾丸决定途径中的某些 DNA 结合, 改变其转录方式, 从而指导睾丸分化。因此, SRY 蛋白质是作为一种转录调节因子起作用的。

2. SRY 与睾丸分化

小鼠中, Sry 基因在生殖嵴中表达的时间范围很窄, 自妊娠第 10.5 天开始, 在第 11.5 天达到峰值, 第 12.5 天时表达水平下降, 到第 13.5 天后已检测不到 Sry 的表达。这段时间正是在生殖嵴分化之前, 因为小鼠胚胎在第 12.5 天时, 支持细胞迅速增殖, 在雄鼠形成睾丸索, 在雌鼠则发生卵母细胞的减数分裂。在发育过程中, Sry 基因的表达仅限于生殖嵴的体细胞结构中, 但在成年睾丸中也可见到 Sry 的环形非翻译的转录产物。已在另外几种哺乳动物的生殖嵴中检测到 SRY 基因的表达。最早可在猪妊娠第 21 天的 XY 胚胎的未分化生殖嵴中检测到 SRY 基因的表达, 到第 23 天时达到峰值。但一直到妊娠第 52 天时仍可检测到 SRY 的表达。绵羊胚胎中, 最早可在妊娠第 23 天检测到 SRY 表达, 在妊娠第 27~44 天间达到峰值, 但一直到妊娠第 21 周 (即出生时) 仍可检测到 SRY 的转录产物。利用原位杂交发现, 最早可在 XY 人妊娠第 41~44 天的生殖嵴中检测到 SRY 表达, 在第 44 天时达到峰值, 但在妊娠第 18 周的睾丸索中仍可检测到。

睾丸的分化只与体细胞有关, 而与生殖细胞无关。当用二甲磺酸丁二醇二酯 (busulfan) 破坏生殖细胞后, 大鼠胚胎仍能形成正常的睾丸。由此推断, Sry 是在体细胞中表达并诱导睾丸的分化。在雄性胚胎和雌性胚胎构成的嵌合体小鼠中, 嵌合体的性别依赖于支持细胞的数量, 因为几乎所有的支持细胞均含有 Y 染色体, 很可能支持细胞的前体细胞 (pro-Sertoli cell) 控制性别决定。然而, 在成年小鼠睾丸中, Sry 的表达依赖于生殖细胞。XX 雄性小鼠因缺少生殖细胞, 其睾丸中并不表达 Sry。因此, Sry 在

胚胎时期和成年睾丸中可能具有不同的功能。

另外，在小鼠的着床前胚胎中也有 Sry 表达。在小鼠 2 细胞期胚胎和胚泡中，可检测到 Sry 转录产物，而在 4~8 细胞期胚胎和桑椹胚中则无 Sry 表达。所有的雄性胚胎在胚泡腔形成时，均可检测到 Sry 转录。而且，当发育到晚期胚泡时，Sry 的转录水平提高，可达到每个细胞拥有 40~100 个拷贝。这说明着床前小鼠胚胎中已经存在雌雄异型的基因表达形式。较高水平的 Sry 转录可能预示着 Sry 早在性腺分化之前（第 8 天）就对性别决定开始起作用。

3. 转基因小鼠的研究及 XY 女性的 SRY 突变分析

Koopman 等将含有 Sry 基因的 14 kb 的片段注射到 XX 雌性小鼠的受精卵原核中，可使这些胚胎发育成雄性小鼠。转基因小鼠表现出正常的雄性第二性征和交配行为，其睾丸中虽无精原细胞产生，但显示出正常的激素功能。对这一 14 kb 的片段进行序列分析发现，除 Sry 外并不含有其他基因，这表明仅 Sry 基因就可导致小鼠的性逆转。此外，当 Y 染色体上缺失包括 Sry 在内的长 11 kb 的片段时，XY 小鼠表型为雌性，并具有正常的繁殖能力，能将突变的 Y 染色体遗传给后代。这些研究表明，在小鼠中 Sry 是惟一的性别决定基因。

对 41 例 XY 女性的 SRY 编码区进行 PCR 扩增及序列分析后发现，由于 SRY 基因发生突变而造成了性逆转，并且所有这些突变均发生于高移动性 DNA 结合区中，表明高移动性 DNA 结合区在性别决定中起重要作用。

以上事实表明，睾丸决定基因很可能就是 SRY 或 Sry，但目前仍有许多问题需进一步探讨。尽管将 Sry 基因转入 XX 的雌性小鼠胚胎后，所得到的雄性小鼠在其他方面与正常雄鼠一样，但睾丸却比正常的小，而且这种小鼠是不育的，这可能是由于缺少 Y 染色体上的其他基因造成的。另外，在一些 XY 女性中，SRY 基因虽然没有发生突变，但却不能产生睾丸。在小鼠的 4 条常染色体上，还发现一些与 Y 染色体具有很高同源性的 DNA 序列，而且这 4 条常染色体基因可能也参与睾丸的决定。

四、参与性别决定的常染色体和 X 染色体基因

近年发现，X 染色体和常染色体上某些位点的突变也与性逆转有关，表明 SRY 并非决定性别的惟一基因，其他还有一些基因也介入了性别决定过程。

（一）AMH

AMH 为抗 Müllerian 管激素（anti-Müllerian hormone）的缩写，也称为 MIS（Müllerian inhibiting substance）。AMH 为一 560 个氨基酸残基的糖蛋白，由支持细胞产生。当小块的胚胎睾丸或分离的支持细胞与中肾管（也称为 Wolffian 管）及副中肾管一起培养时，副中肾管肥大，但中肾管则无变化。副中肾管肥大是由于细胞死亡，以及管的上皮细胞转变为间充质细胞或者迁移到别的部位所致。副中肾管对此激素仅在很短的时间内起反应。到接近出生时，睾丸停止分泌这种因子。

小鼠的 AMH 基因具一启动子序列，可结合 Sry 蛋白，很可能 Sry 直接激活 AMH 基因的转录。AMH 的主要功能很可能是促进雄性中副中肾管的退化。在人中，AMH 是由胎儿的支持细胞产生的一种糖蛋白，属于 TGF- β 超家族。在性腺发育中，AMH 的主要作用是在人妊娠第 8~10 周的短时期内，引起副中肾管自头到尾的逐级退化。AMH 主要是结合到间充质细胞上表达的 AMH 的 II 型受体，引起副中肾管上皮细胞的凋亡。将 AMH 或 AMH 的 II 型受体基因敲除后，这些小鼠的副中肾管及其衍生结构并不退化，睾丸可完全下降，并能产生有功能的精子。这些动物也具有正常的雄性和雌性生殖道。

(二) SOX9 和 SOX3

利用与 SRY 基因的同源性，已分离到其他含高移动性 DNA 结合区的基因。在分离到的基因中，将高移动性 DNA 结合区内与人 SRY 或小鼠 Sry 的相似性在 60% 以上的基因，称为 SOX (SRY-like HMG box) 基因。

CD 综合征 (campomelic dysplasia) 是一种通常致死的先天性骨骼发育异常综合征，并伴有高频的 46, XY 性反转，说明导致 CD 综合征的基因可能也参与了睾丸的决定和发育。将引起 CD 综合征的基因分离后，根据其结构特点命名为 SOX9。该基因含有两个内含子及一个开读框，能编码 509 个氨基酸残基，与 SRY 基因具有 71% 的同源性，在进化上十分保守。虽然 SRY 基因仅在哺乳动物中表达，但 SOX9 基因在几乎所有的脊椎动物中均存在。尽管有 SRY 基因存在，当 SOX9 基因仅有一个功能性拷贝时，XY 个体常发育成女性。而且，如没有 Y 染色体，但具有一个额外的 SOX9 拷贝时，XX 个体则常发育为男性。SOX9 基因在男性和女性的早期生殖嵴中低水平表达，但在正在发育的卵巢中则停止表达。SRY 基因开始表达后不久，SOX9 基因在正在发育的睾丸中的表达便上调。SOX9 基因在支持细胞中的表达一直持续到成年期。SOX9 的下游靶分子很可能是 AMH 基因。SOX9 能结合到 AMH 的启动子区，可协同激活 AMH 的转录。

目前认为，SOX9 是一个常染色体上与性别分化有关的基因，参与控制睾丸发育。在控制骨骼发育过程中，SOX9 基因才是关键因素。SOX9 基因突变必然导致 CD 综合征的发生。在性别发育过程中，SOX9 基因只是以某种方式，在一定程度上参与控制睾丸的发育。所以，CD 综合征病人可能表现为常染色体性逆转的女性，但 SOX9 基因突变并不总是引发性逆转。

SOX3 位于 X 染色体上，是与人 SRY 和小鼠 Sry 同源性最高的基因，主要在神经系统和胚胎生殖嵴的发育中起作用。在 SOX 家族中，SOX3 最接近于 SRY/Sry，表明它们可能源于一个共同的祖先基因。

(三) WT1

WT1 为威尔氏瘤抑制基因 1 (Wilms tumor suppressor gene 1) 的缩写。人 WT1 基因位于第 17 号染色体，与威尔氏瘤的发生有关。威尔氏瘤是一种由于中肾芽基异常扩增而导致的胚胎肾肿瘤。WT1 可与许多基因的特定的上游序列发生作用，可抑制它们

的转录。这些基因包括许多编码生长因子及其受体的基因。WT1 基因突变后，无法调节某些基因的转录，使病人患 Denys Drash 综合征，产生威尔氏瘤，并发生性逆转及性腺发育异常等。在 WT1 发生突变的杂合体人中，除肾脏异常和产生威尔氏瘤外，在遗传性别为男性的人中发生尿道下裂 (hypospadias) 及隐睾 (cryptorchidism)，而在遗传性别为女性的人中，其性腺由未分化的间充质细胞条组成。在 WT1 基因敲除的小鼠中，尽管原始生殖细胞可进入即将形成性腺的组织中，但生殖嵴正常的增厚过程却不能进行。在小鼠和人的正常胚胎中，WT1 基因在性腺未分化期的生殖嵴中表达的时间早于 SRY 基因的表达。因此，WT1 基因的产物——锌指转录因子 (zinc-finger transcription factor) 可能直接或间接地诱导 SRY 基因的表达。

(四) SF-1

SF-1 为类固醇生成因子 (steroidogenic factor-1) 的缩写。SF-1 为一 DNA 结合蛋白，是孤核受体 (orphan nuclear receptor)，属于转录因子的核激素受体家族。SF-1 最主要的功能是可结合到启动子区，来调节类固醇羟化酶 (steroid hydroxylase enzymes) 的表达。这些酶可催化胆固醇转化为睾酮的过程。SF-1 也参与未分化性腺的发育过程。在雌性或雄性性腺分化以前，SF-1 在小鼠的生殖嵴中表达。将此基因敲除后，所得到的雌性或雄性小鼠没有性腺。

SF-1 可能在睾丸的早期发育中也起作用。当未分化期的性腺开始分化时，可检测到 SF-1 在睾丸中的表达，但在卵巢中不表达。而且，SF-1 可特异性地结合到 AMH 基因的启动子区。由于睾丸中 SF-1 的表达稍晚于 SRY 基因，很可能 SRY 基因激活 SF-1 基因的表达。作为一种转录因子，SF-1 可调节细胞色素 P450 羟化酶 (一种可催化大多数类固醇激素合成的酶) 的组织特异性表达，还可调节肾上腺和性腺中许多基因的表达，如 3β -羟基类固醇脱氢酶、促肾上腺皮质激素受体等基因。SF-1 突变后，会阻碍睾丸和卵巢的形成。对 SF-1 转基因小鼠的研究表明，SF-1 还可调节 AMH 基因的表达。因此，SF-1 可调控雄性表型发育所需的睾酮和 AMH 的合成过程。

当小鼠胚胎的性腺原基开始分化时，SF-1 在雄性胚胎中的表达开始增加，但此时在雌性胚胎中的转录水平却降低，表明持续表达的 SF-1 可能会抑制雌性性别分化。而且，SF-1 基因敲除的小鼠发生由雄性向雌性的性逆转。SF-1 和 WT1 可形成异源二聚体，增强依赖 SF-1 的 AMH 启动子的转录激活作用。

(五) DAX 1

DAX 1 为 dosage sensitive sex-reversal-adrenal hypoplasia congenital-critical region of the X chromosome gene 1 的缩写。在具 46 条染色体的 XY 女性患者中，都有 Y 染色体及整个 SRY 基因，但未发育为男性。这些患者的肾上腺发育不全，而且这些患者都具有 X 染色体短臂的部分重复，由此推测这一区域含有一个剂量敏感性逆转 (dosage sensitive sex reversal, DSS) 基因。目前，已从 DSS 区域中克隆了 DAX1 基因，位于 Xp 区的一个 160 kb 的区域。由于 XY 个体中的两个 DAX1 拷贝导致生殖器官女性化，DAX1

基因很可能在女性的性别决定及卵巢的正常发育过程中起重要作用。另外，DAX1 基因的突变也可解释一些 XX 男性中的性逆转。

DAX1 表达的时相与 SRY 相同，即在小鼠受精后第 11.5 天时表达，且在 XX 和 XY 胚胎的生殖嵴中表达，表明可能参与性别决定。当睾丸发育时，DAX1 的表达明显降低。但当卵巢发育时，DAX1 基因的表达则不变。在正常情况下，雄性个体中 DAX1 基因只有一个拷贝，不足以抑制 SRY 基因的表达。但若有两个活性拷贝时，可导致 SRY 个体发育为女性。在正常的雌性个体中，DAX1 虽然只有一个拷贝，但因无 SRY 基因的抵抗作用，所以使卵巢得以正常分化。此外，DAX1 与 SF-1 也可形成异源二聚体，抑制 SF-1 介导的转录。SF1 也可结合于 DAX1 上游的启动子以诱导 DAX1 的表达，表明 WT1 与 SF-1 和 DAX1 可以协同作用调节睾丸的发生。

总之，性别决定是一个以 SRY 基因为主导的，由多基因参与的、有序协调的过程。除了以上介绍的几种基因外，还有一些基因也参与性别决定过程。表 11-1 中列出了在哺乳动物中已发现与性别决定有关的基因。图 11-1 示性别决定相关基因在性腺及生殖道发育过程中的作用途径。

表 11-1 哺乳动物中已发现的性别决定基因（引自桂建芳、易梅生，2002）		
基因		基因功能
缩写	全称	
SRY (Sry)	sex-determining region of Y chromosome	为哺乳动物睾丸决定因子，启动睾丸的分化，是睾丸发育负调节的抑制子
AMH (MIH)	anti-Müllerian hormone (Müllerian inhibiting substance)	使雄性体内的副中肾管退化，阻止其发育成雌性生殖器官
SOX9	SR Y-like HMG box gene 9	与人睾丸决定有关，突变后可导致产生 46XY 性反转
WT1	Wilms tumor suppressor gene 1	可能在性别分化的早期参与 SRY 的激活
SF-1	steroidogenic factor-1	可能是 AMH 基因的直接调控者，是 AMH 基因激活所必需的，在 Sry 表达之前启动性腺和肾上腺的发育
DAX-1	dosage sensitive sex-reversal-adrenal hypoplasia congenital-critical region of the X chromosome gene 1	决定雌性发育，SRY 仅能抑制其一份剂量
DMRT	double sex and mad-3 related transcription factor 1	决定睾丸分化和精子发生
RBM	RNA binding motif	精子细胞发生
DAZ	deleted in Azooepermia	精子细胞发生
SOX-5	SR Y-like HMG box gene 5	精子细胞发生
SOX-6	SR Y-like HMG box gene 6	精子细胞发生
SOX-17	SR Y-like HMG box gene 17	精子细胞发生

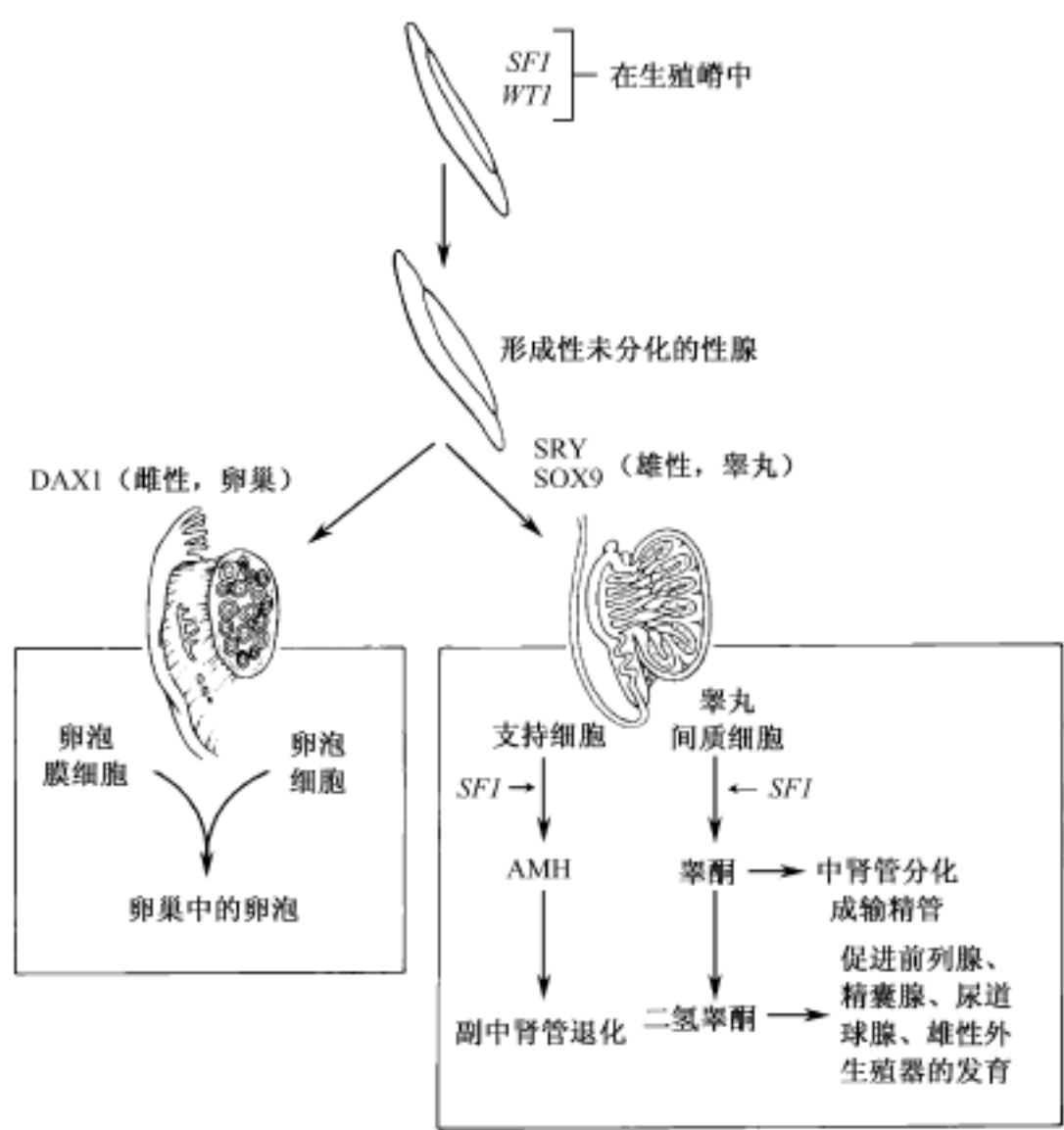


图 11-1 示性别决定相关基因在性腺发育中的作用
(引自 Larsen WJ, 2002)

第二节 性腺的发育

哺乳动物的绝大多数器官原基只能分化为特定类型的器官，如肾原基仅能形成肾，而肝原基仅能形成肝。但性腺原基具有双向分化潜能 (bipotential)。性腺原基在发育过程中有两种选择。在不同的性染色体构成的情况下，既可以发育为卵巢 (ovary)，也可以发育为睾丸 (testis)。在胚胎发育的一个特定时期，哺乳动物的性腺发育首先要经历一个未分化期，此时性腺原基既无雄性又无雌性特征。性腺原基分化的形式决定着性器官的发育及个体性特征的形成。性腺出现在性别分化之后。

在人第 4 周胚胎背壁中线的两侧，即背肠系膜的两侧，各出现一条纵嵴，向腹膜腔突出，即形成尿生殖嵴 (urogenital ridge)。在第 5 周时，两个尿生殖嵴的体腔上皮细胞增厚，中胚层的中部出现一条纵沟，将其分为内、外两部分。其中外侧分化为中肾，内侧部分的间质不断增殖，向腹膜腔突出，形成两条生殖嵴 (genital ridge)，即性腺原基。人胚胎可以保持性未分化状态直至第七周。在性未分化期，生殖嵴上皮增殖成为疏松结缔组织的间充质，这些上皮层形成性索 (sex cord)。在第六周时，性索迁移到性腺的生殖细胞周围。在 XX 及 XY 性腺中，性索都与表面上皮相连。在人妊娠第 6 周末，

男性和女性的生殖系统在外形上仍无差别，而一些细胞水平的微小差异可能已经产生了。在男性和女性中，未来性腺的皮质区和髓质区中均有生殖细胞和性索。完整的中肾管和副中肾管并行排列。生殖系统的两性期 (ambisexual) 或性未分化期 (sex indifferent phase) 自第 6 周末结束，从第 7 周开始分别向男性或女性发展 (图 11-2)。

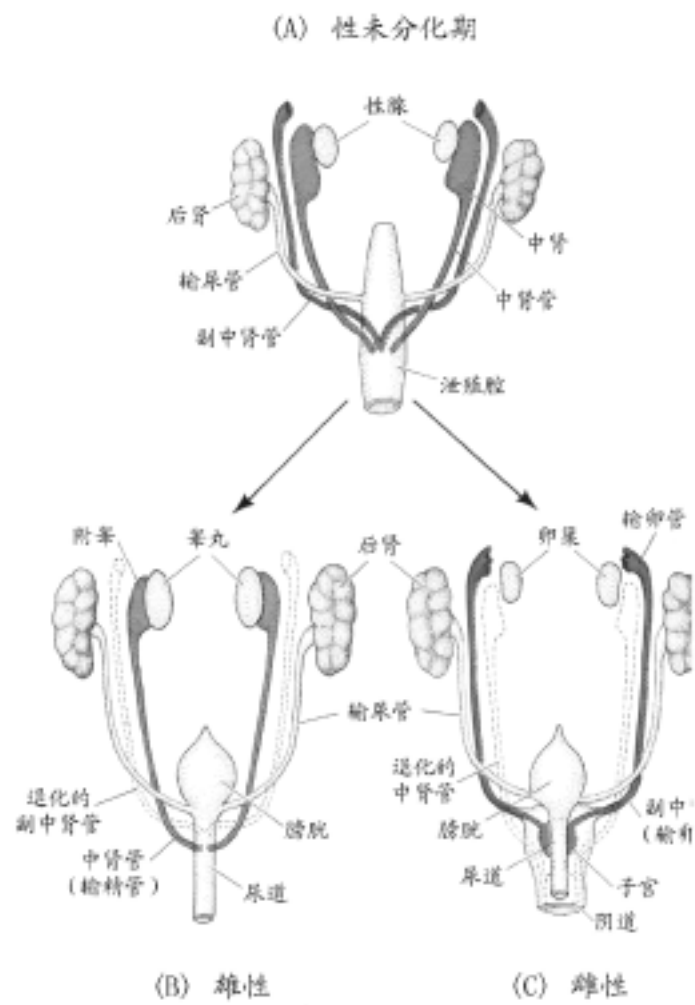


图 11-2 示性腺及生殖管道的发育过程 (引自 Gilbert SF, 1994)
A. 性未分化期；B. 分化为雄性生殖系统；
C. 分化为雌性生殖系统。

性腺的分化发生于原始生殖细胞到达生殖嵴之后，但尚不清楚是到达性腺的原始生殖细胞促进了性腺的分化，还是性腺在分化过程中吸引了原始生殖细胞。当生殖嵴发育达到一定大小时，到达生殖嵴的原始生殖细胞迅速分裂增殖，此时的体细胞组织也相应增殖。以后，主要由中肾内侧的一些细胞分化，构成生殖嵴的原始髓质，而生殖嵴上皮本身则构成了原始皮质。上皮细胞继续向实质内生长构成细胞团索，并携带上皮间的原始生殖细胞一同进入，这些细胞索就是原始性索。此期无性别差异，性腺尚未分化。

雄性生殖系统发育的第一个事件是 SRY 蛋白在性索细胞中精细作用的结果。在 SRY 蛋白的影响之下，位于初级性索髓质区的细胞开始分化成支持细胞 (Sertoli cell)，而位于皮质性索区的细胞则退化。只有当具有 SRY 基因且能产生 SRY 蛋白时，性索细胞才能分化成支持细胞。如果缺乏 SRY 蛋白，性索则分化为卵巢的卵泡。

在人妊娠第 7 周时，正在分化的支持细胞组织形成睾丸索或精索 (testis cord)。在青春期，这些与生殖细胞相连的睾丸索变得空心化，分化形成曲细精管 (seminiferous tubules) 系统。将来的曲细精管远端的睾丸索也发育形成腔，并分化形成一套薄壁的管，称为睾丸网 (rete testis)。在正在发育的性腺中央，这些睾丸网的小管与残留的

5~12个中肾小管相连。这些中肾小管以后变为输精管 (vasa deferentia 或 spermatic duct) (表 11-2)。在妊娠第 7 周时, 睾丸开始变圆, 而且与中肾的接触区域也减小。由于中肾会对正在发育的性腺施加向女性发育的一些影响, 与中肾接触区域的减少对于睾丸的发育很重要。当睾丸继续发育时, 一层称为白膜 (tunica albuginea) 的结缔组织将退化的皮质性索与体腔上皮隔开。

在髓质性索中, 支持细胞的前体细胞与原始生殖细胞的直接接触对于雄性配子的发育起关键性作用。这种细胞间的相互作用在原始生殖细胞到达将来的生殖嵴区不久便建立了, 其作用是抑制原始生殖细胞进行有丝分裂, 并阻止生殖细胞进入减数分裂过程。直到青春期, 生殖细胞才进行有丝分裂, 分化成精原细胞后开始精子发生过程。正当支持细胞的前体细胞对 SRY 蛋白发生应答而进行形态学分化时, 这些细胞开始分泌 AMH。在雄性胚胎中, 支持细胞的前体细胞分泌的 AMH 可使妊娠第 9~10 周的副中肾管迅速退化 (图 11-3)。AMH 主要是与副中肾管周围的间充质细胞上的 AMH 受体相结合。在受体激活后, 间充质-上皮细胞的信号通路诱导了副中肾管的退化。但在成年男性中, 仍可见到小的副中肾管的残留物, 仅剩一个与睾丸相连的小帽状组织, 称为睾丸附件 (appendix testis), 以及前列腺尿道的一个膨大部位, 称前列腺囊或雄性子宫 (utriculus prostaticus)。但在雌性胚胎中, 副中肾管并不退化 (图 11-2)。

在人妊娠第 9 或 10 周, 可能是受到支持细胞的前体细胞分泌的 SRY 蛋白的作用, 生殖嵴中的间充质细胞分化形成睾丸间质细胞 (Leydig cell)。睾丸间质细胞分泌的睾酮可促进中肾管的存活。在发育的早期, 睾酮的分泌是受胎盘来的 hCG 的控制。在以后的发育中, 男性胎儿的垂体促性腺激素开始控制睾酮的分泌。

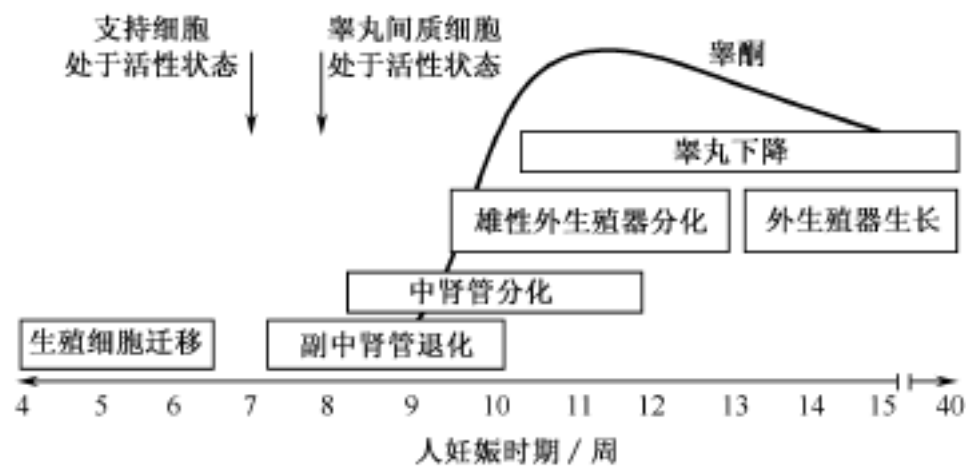


图 11-3 示人男性性别分化过程中的主要阶段 (引自 Hughes IA, 2001)
图中曲线为胎儿血液中的睾酮浓度。支持细胞处于活性状态表示所分泌的 AMH 引起副中肾管的退化。睾丸间质细胞处于活性状态表示所分泌的睾酮诱导男性性别的分化

在妊娠第 8~12 周之间, 最初分泌的睾酮刺激中肾管转变为输精管 (vasa deferentia)。每个中肾管最顶头的部位退化后, 可见到一个残留物, 为附睾附件 (appendix epididymis)。靠近将来睾丸的那部分输精管分化成卷曲的附睾。第 9 周时, 在附睾区的 5~12 根中肾管与将来睾丸网的细胞索相接触。

异性孪生母犊不孕 (freemartin calves) 是由于雌性胎儿与雄性的孪生胎儿共同在子宫中生存导致的。这些母牛虽然具有卵巢, 但与公牛一样缺乏由副中肾管形成的器官,

因此是不孕的。其中最主要的原因是公牛血液中的 AMH 流入雌性胎儿中后，诱导了副中肾管的退化。在罕见的情况下，遗传性别为男性的人也会存在副中肾管。在这些男性中，已证实 AMH 和 AMH 的受体基因发生了突变。这些结果表明，副中肾管的退化是一个主动的过程，而不是副中肾管生长停滞的结果。

如胎儿性别为 XX，则生殖细胞停留在性腺的表面，性索退化而不是增殖。然而，上皮不久就形成一套新的性索，但并不穿入间质深层，只停留在器官的外表，因此也叫皮质性索 (cortical sex cord)。这些性索分离成小团，每一团包围一个生殖细胞。当生殖细胞变成卵母细胞时，周围的上皮性索将分化成卵泡颗粒细胞 (granulosa cell)。卵巢的间充质细胞分化为卵泡膜细胞 (thecal cell)。卵泡颗粒细胞与卵泡膜细胞共同形成卵泡，它们一方面包围卵子，另一方面分泌类固醇激素。在雌性中，副中肾管保持完整，将分化为输卵管、子宫、子宫颈及阴道上部 (表 11-2)。中肾管在无睾酮的情形下退化。

在雌性胚胎中，体细胞来的性索细胞中并不具有一个 Y 染色体或 SRY 区域，不会产生 SRY 蛋白，因此不会分化成支持细胞。在缺乏支持细胞和 SRY 蛋白的情况下，AMH、睾丸间质细胞和睾酮也就不会产生，也不会刺激雄性生殖道及副性结构的发育，使得雌性的发育得以继续。

在遗传性别为女性的人中，初级性索发生退化，生殖嵴的间皮 (mesothelium) 形成次级皮质性索。以后，这些次级皮质性索将原始生殖细胞包围后形成卵巢的卵泡细胞。男性中，在减数分裂开始前，支持细胞的前体细胞一直抑制生殖细胞的发育。在雌性胎儿中，原始生殖细胞分化成卵原细胞 (oogonium)。在与周围的卵泡细胞建立紧密的相互作用之前，这些卵原细胞进入第一次减数分裂，发育为初级卵母细胞。在青春期前，这些卵泡细胞可阻止生殖细胞的进一步发育。在青春期开始后，每个卵母细胞都有可能对促性腺激素发生应答后，启动卵子发生过程。

小鼠的性腺发育大约在交配后第 10 天开始，以前肾或中肾表层加厚成嵴的形式形成生殖嵴，此时尚无性别差异。到第 12 天时，雌雄性别间的差异才表现出来。

因此，哺乳动物 XX 和 XY 性别的胎儿都具有中肾管和副中肾管两套生殖导管和未分化的性腺。在正常的雄性或雌性中，只应含有一套生殖导管，另一套则退化。副中肾管退化是由 XY 胚胎的睾丸支持细胞分泌的 AMH 引起的。随后，睾丸间质细胞分泌的睾酮，可诱导中肾管发育为雄性生殖器官。如没有睾丸，也就没有 AMH 和睾酮，则中肾管退化，但同时形成适宜副中肾管发育的环境，使性腺原基发育为卵巢。由卵巢产生的雌性激素使副中肾管发育为阴道、子宫颈、子宫及输卵管 (图 11-2)。因此，可以认为向雌性发育是人胚胎的基本发育路径。但在雄性，SRY/ Sry 的存在使雄性激素 AMH 和睾酮得以分泌，从而阻止了这一途径，同时启动了睾丸的发育。

AMH 为一同源二聚体，可由胎儿和成体睾丸的支持细胞及出生后胎儿卵巢的颗粒细胞分泌。在小鼠中，AMH 最早在第 12 天胚胎的睾丸和出生后第 6 天小鼠的卵巢中表达。AMH 的表达水平在雄性胎儿发育期间最高，在成年睾丸中则维持低水平。在体外，AMH 可诱导大鼠胎儿的卵巢形成曲细精管状结构。在雌性转基因小鼠的卵巢中，由于持续表达人的 AMH，这些小鼠缺乏生殖细胞，而且性腺中的体细胞也具有曲细精管状结构。

性别分化的遗传基础是 X 和 Y 性染色体，它们决定了雄性和雌性各自的发育路径。但性别发育的后期阶段则不仅仅由性染色体控制，很多常染色体上编码的激素和其他因子也参与其中。

表 11-2 生殖系统的分化与发育（引自 Gilbert SF, 1994）

性腺的类型	睾丸	卵巢
性索	髓质（内层）	皮质（外层）
保留的管	中肾管	副中肾管
管的分化	输精管、附睾、精囊腺	输卵管、子宫、子宫颈、阴道的上部

第三节 原始生殖细胞的迁移

在动物的整个生命周期中，生殖细胞保证了各代之间的连续。在大多数动物中，生殖细胞不是在生殖腺中产生的。原始生殖细胞是在胚胎发育过程中迁移到生殖嵴的。

一、生殖质及原始生殖细胞

在爪蟾中，受精后在卵的植物极形成的生殖质（germ plasm），位于由小的皮层细胞质区域聚集形成的、没有卵黄的小岛内。这些小岛沿微管排列的方向向植物极迁移，在卵裂过程中定位于最靠近植物极的细胞中。如果将微管破坏后，生殖质就不能迁移到植物极，导致所形成的蝌蚪中没有生殖细胞。在原肠形成期间，具有生殖质的这些细胞形成囊胚腔底部的内胚层。但一直到原肠形成后，这些细胞才决定形成生殖细胞。如在原肠形成以前将这些细胞移植到胚胎的其他区域，则这些细胞仍然会形成体细胞。

哺乳动物和鸟类中，在卵裂期的胚胎中没有生殖质。哺乳动物和鸟类的原始生殖细胞来源于原肠期胚胎的表胚层。这些原始生殖细胞的特化过程涉及细胞与细胞之间的相互作用。小鼠中，最早可在受精后第 7 天的胚胎中检测到生殖细胞，它们位于紧靠原条后部的表胚层中。这 8~10 个细胞比周围的细胞要大，而且这些细胞为碱性磷酸酶阳性，所以很容易检测到。如果将这些细胞去除后，所形成的胚胎中就缺乏生殖细胞。对于生殖细胞产生过程中诱导性相互作用的实质仍不了解，但有证据表明，胚外外胚层分泌的骨形态发生蛋白-4（BMP4）是一个重要的决定因素。在 BMP4 基因敲除的小鼠中，没有生殖细胞。而且，在 BMP4 基因的杂合子小鼠中，所形成的生殖细胞的数目也有所减少。BMP4 信号通路可维持转录因子 Oct-4 的表达。Oct-4 起初在整个内细胞团中表达，到原肠形成期间则仅在将形成原始生殖细胞的那些表胚层细胞中表达，以后就仅在生殖细胞中表达。

目前，常用碱性磷酸酶来检测原始生殖细胞。原始生殖细胞的高尔基复合体及细胞膜上碱性磷酸酶呈强阳性，并且在原始生殖细胞迁移途中也持续表达碱性磷酸酶，所以用碱性磷酸酶可以很容易地把原始生殖细胞和它周围的细胞区别开来。

人受精后第 4 周时，原始生殖细胞出现在靠近尿囊的卵黄囊壁的内胚层中，呈圆

形、体积较大、嗜碱性。原始生殖细胞从这里开始以阿米巴运动，沿着背肠系膜向生殖嵴的部位迁移。在第 6 周时，约有 1000 个原始生殖细胞进入生殖嵴中。

关于小鼠原始生殖细胞的起源，普遍认为来源于卵黄囊内胚层，然后由后肠内胚层和尿囊基部向胚胎内迁移，最终经背肠系膜达到两侧生殖嵴（图 11-4）。小鼠胚胎在交配后第 7 天时，发育至原肠中期。此时若将胚胎的胚外中胚层去掉，则发育出的胚胎就没有生殖细胞。原肠中期约有 8 个体积较大的原始生殖细胞，以后这些细胞逐渐向内中胚层迁移，再经尿囊到达内胚层。第 8 天时，原始生殖细胞位于后肠内胚层和尿囊基部，然后再迁移到相邻的卵黄囊，并在卵黄囊后部集中。最后，原始生殖细胞沿后肠迁移至背肠系膜，并在此分为两群，分别迁移到左侧生殖嵴和右侧生殖嵴中。在交配后第 10 天时，大多数原始生殖细胞已经到达生殖嵴。以后，原始生殖细胞便失去迁移能力。到第 13 天时，原始生殖细胞停止迁移。这些原始生殖细胞在睾丸中停滞在有丝分裂期，而在卵巢中则停滞在减数分裂期。没有到达生殖嵴的原始生殖细胞则进入周围的器官，如肾上腺和肾。

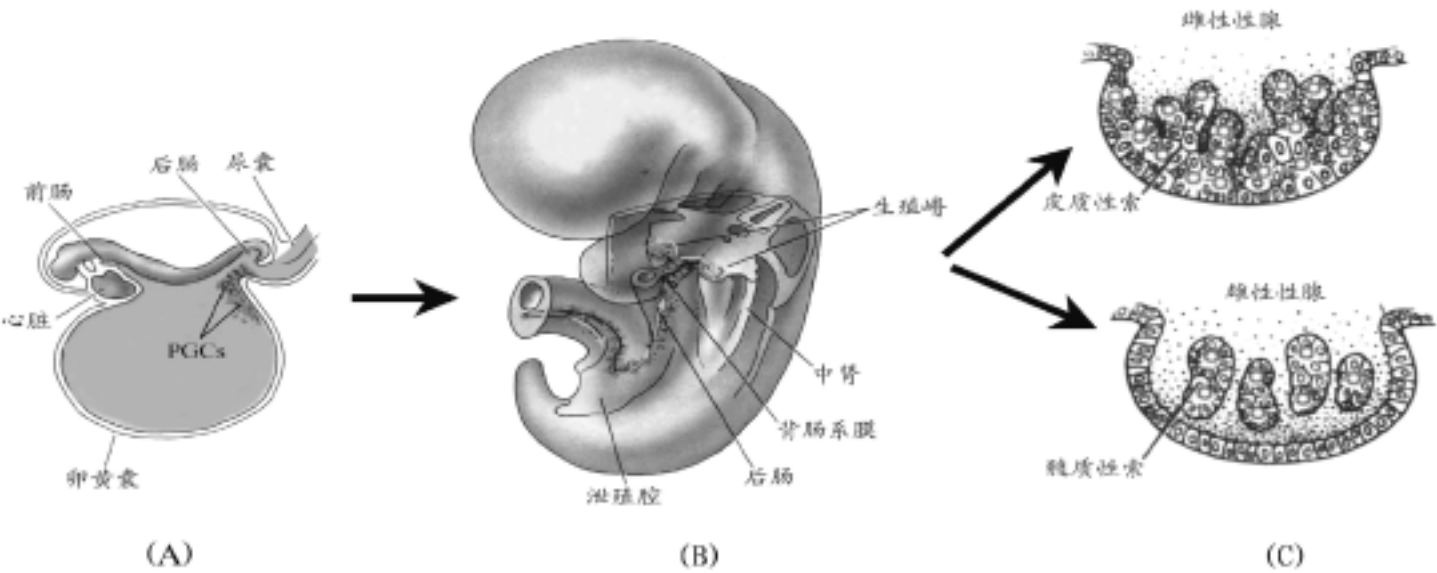


图 11-4 示原始生殖细胞的起源、迁移及增殖过程（改绘自 Larsen WJ, 2002；Gilbert SF, 1994）

A. 原始生殖细胞（PGCs）起源于卵黄囊内胚层；B. 原始生殖细胞自后肠及背肠系膜迁移进入生殖嵴中；C. 原始生殖细胞进入雌性或雄性性腺中。

二、原始生殖细胞在迁移过程中的增殖

小鼠原始生殖细胞在迁移过程中以及到达生殖嵴后两天内，均迅速分裂，数目由原来不到 100 个，快速增加到大约 25 000 个。在迁移过程中，许多生长因子对原始生殖细胞的增殖有调控作用，如干细胞因子（SCF）、白血病抑制因子（LIF）、肿瘤坏死因子 α （TNF α ）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、白介素 4（IL-4）和转化生长因子 β （TGF β ）。这些生长因子不仅可以促进原始生殖细胞数量的增加，而且对小鼠原始生殖细胞在体内和体外的分化有调节作用。这些因子是由原始生殖细胞迁移过程中所经过的细胞产生的。

从小鼠妊娠第 9 天开始，在原始生殖细胞的迁移路线上和生殖嵴内表达 SCF。离体

培养发现, SCF 不能直接启动原始生殖细胞的增殖, 而是通过阻止原始生殖细胞的细胞凋亡来提高其存活力并增加其数量。此外, 在原始生殖细胞迁移过程中, SCF 还有调节黏附作用的功能。

LIF 是胚胎干细胞分化的抑制剂, 与 SCF 结合使用, 可以在体外增加原始生殖细胞的存活。如加入 LIF 的抗体, 会迅速导致培养的原始生殖细胞死亡。

TNF α 也能激活原始生殖细胞的增殖, 但 TNF α 只对迁移前和迁移早期的原始生殖细胞具有增殖效应, 对迁移后期的原始生殖细胞却无影响。而且, 在有 LIF 和 SCF 存在时, TNF α 的效果最明显。

在增殖的原始生殖细胞中均表达 IL-4 及其受体。体外培养时, IL-4 是小鼠原始生殖细胞的正调节因子, 且这种调节作用是浓度依赖性的。

三、原始生殖细胞迁移机制

在后肠形成以前, 原始生殖细胞的迁移是被动进行的, 主要是通过形态发生而运动。由后肠到生殖嵴的迁移则是一个主动迁移的过程。原始生殖细胞伸出伪足, 以阿米巴运动穿越下面的单个或多个细胞层。原始生殖细胞的迁移是一个复杂的过程, 很多因子参与其中。

(一) 趋化性

原始生殖细胞在向生殖嵴的迁移过程中, 受到正在发育的生殖腺产生的一些物质的吸引。在家禽中, 已证实具有这种趋化作用。将供体鸡的原始生殖细胞注入鹌鹑胚胎的血管中后, 供体和受体的原始生殖细胞可同时到达并停留在生殖腺中。如果去除胚胎中的生殖腺区, 原始生殖细胞则会迁移至其他区域, 如脑区神经管周围。在小鼠生殖嵴的体外培养过程中, 也观察到了相似的结果。将第 8.5 天胚胎的原始生殖细胞放入含有第 10.5 天生殖嵴的培养基中, 生殖嵴可通过释放某种趋化因子, 吸引原始生殖细胞进行定向迁移。已证实, 小鼠胚胎的生殖嵴中表达可扩散的转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1), 原始生殖细胞则可能表达 TGF- β_1 的受体。通过某个信号通路重新组织细胞骨架, 使原始生殖细胞发生极化并沿浓度梯度迁移。当在含生殖嵴的培养基中加入很低浓度 (1/1 500) 的 TGF- β_1 抗体时, 就可阻断生殖嵴的这种趋化作用。

(二) 细胞外基质的接触引导

细胞外基质 (ECM) 是由细胞合成并分泌的, 可介导细胞间相互作用的一类大分子物质。ECM 对细胞的生长、分化、活化和迁移等过程有重要的调节作用。已知与原始生殖细胞迁移有关的 ECM 成分有纤黏连蛋白 (fibronectin)、层黏连蛋白 (laminin)、IV 型胶原、硫酸软骨素蛋白多糖和肌腱蛋白 (tenascin-c) 等。在迁移过程中, 原始生殖细胞与纤黏连蛋白黏附后, 便开始迁移出后肠, 而且当迁移结束时, 这种黏附作用便减

弱。纤黏连蛋白由背肠系膜细胞的内质网合成，在生殖嵴中含量很少，故原始生殖细胞到达生殖嵴后不再迁移。原始生殖细胞在发育过程中，逐渐丧失与纤黏连蛋白黏附的能力。因此，在迁移前期为被动迁移，而后期则为主动迁移。纤黏连蛋白对两栖类、鸟类和哺乳类动物的原始生殖细胞迁移均有影响。

以前认为迁移中的原始生殖细胞之间是独立的，但用激光共聚焦显微镜观察证实，迁移过程中的原始生殖细胞相互接触并形成广泛的网络。因此，原始生殖细胞之间接触性的黏附作用对其迁移也能产生重要影响。此外，在电镜下观察发现，在原始生殖细胞表面有一层细纤维衣。迁移过程中，在原始生殖细胞向前伸的丝状伪足表面这层细纤维衣很明显，厚度可达 30 nm，可能在迁移过程中起重要作用。

第四节 不同性别胚胎的发育

哺乳动物卵母细胞的受精过程确定了胚胎的性别，也起始了一系列导致性别分化的事件。出生时，雌性和雄性的数目虽然几乎相等，但雄性通常要比雌性重一些。这种出生时体重的差异与胎儿出生前在性别特异性激素环境下的差异性生长有关。

在体外，对牛、绵羊、小鼠、猪和人等的研究发现，雄性胚胎的发育总要比雌性胚胎快一些，而且到胚泡期时雄性胚胎中的细胞数也要比雌性胚胎多一些。在牛人工授精后 30 小时内卵裂到 2 细胞期的胚胎中，雄性胚胎数要比雌性胚胎多一些。此外，在绵羊、小鼠和人中，Y 染色体连锁的基因表达最早可在 2 细胞期检测到。

一、配子相互作用和性别比例

在发情周期中，授精时间的不同可能会导致后代的性别比例有所不同。用 CD 小鼠实验时，在发情期的早期交配会使雄性胚胎的比例增加，而在发情期的晚期交配则会使雌性胚胎的数目增加。在牛中的情况也很接近。如在发情期的早期进行人工授精，可使后代中的雄性比例明显增加，达到 91.7%。如在发情期的晚期人工授精，则会使雌性的比例明显增加 (92.9%)。但在另一研究中则发现，在发情开始后第 8~10h 进行人工授精时，雄性的比例仅为 53.8%；在发情开始后第 20~25h 进行人工授精，得到的雄性比例也仅为 51.7%。在绵羊中还发现，在排卵前 5 小时进行人工授精，可使出生时母羔的比例明显增加；而在排卵后 5 小时进行人工授精，则使出生时公羔的比例明显增加。

在进行体外受精时，精子和卵母细胞一起孵育的时间对所得胚胎的性别也有影响。将体外成熟 24 小时后的牛卵母细胞随机分为 4 组，与精子一起孵育 6、9、12 或 18 小时。将精子和卵丘细胞洗去后，在含输卵管上皮的共培养系统再把这些卵母细胞继续培养 178 小时。在与精子一起孵育时间短的 (6 小时) 卵母细胞中，卵裂到 2 细胞期的比例明显比其他长时间孵育的组中少，但发育到胚泡期的数目在 4 组中没有区别。另外，在孵育 6 小时的组中，得到的雄性胚胎数明显多于其他组。而且，在绵羊中也得到了同样的结果。在至少 10 次的重复实验中均发现，减少精子和卵母细胞在一起的孵育时间可使雄雌比达到 2:1。这些结果表明，在起初 6 小时的受精过程中，Y 染色体精子比 X

染色体精子具有更大的优越性。

二、性别与胚胎发育速度

在一些动物种类中，雄性和雌性胚胎在体外发育的速度不同，但在体内却相同。将小鼠胚胎在体外培养 24h 后，雄性胚胎的细胞增殖速度要比雌性胚胎快。在具有高浓度葡萄糖的细胞培养系统中，雄性胚胎的发育速度要快。这是由于培养液中的高浓度葡萄糖可加速雄性胚胎的发育，并可减慢雌性胚胎的发育。

三、性别相关的基因表达

由于 X 和 Y 染色体的不同，使得雌性和雄性胚胎中由这些染色体编码的基因数目和基因的拷贝数均不同。在小鼠、人和绵羊的雄性胚胎中，SRY 和锌指蛋白 Y 基因均在 2~8 细胞时期表达。因此，最初认为雄性胚胎的有丝分裂速度较快是由于 Y 染色体上基因的早期表达所致，因为 SRY 基因具有促有丝分裂活性。但当 Sry 基因缺失时，小鼠胚胎中的这种差异性生长仍然存在。而且，具有一个 X 染色体而无 Y 染色体的小鼠胎儿（XO）比具有 XX 染色体的胎儿大，其大小接近于 XY 胎儿，表明 X 染色体上的基因表达水平和拷贝数对早期胚胎的发育具有重要的调节作用。

此外，由于发生剂量补偿（dosage compensation），使得具有 XX 染色体的雌性胚胎中一条 X 染色体失活，从而使其 X 染色体连锁基因的表达量与具有 XY 染色体的雄性胚胎中的表达量相近。X 染色体的失活是一个逐渐的过程，是由受精后 X 失活特异基因（X-inactive specific transcript, XIST）的表达所启动的。尽管小鼠中 XIST 基因早在 4 细胞期开始表达，牛胚胎中 XIST 基因在 8 细胞期开始表达，但失活后 X 染色体的异染色质化要到胚泡期才出现。X 染色体的失活对于正常的胚胎发育是必需的。如果两个 X 染色体在胚胎着床后都处于活性状态，则胚胎发育速度减慢，还会导致胚胎死亡。

在 X 染色体失活及剂量补偿发生前，X 染色体上与代谢紧密相关的基因的过量表达可能导致雌雄胚胎的发育速率有所不同。X 染色体上的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD）及次黄嘌呤磷酸核糖转移酶（hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT）均控制关键的代谢过程。G6PD 和 HPRT 基因均发生 X 染色体失活。在小鼠、牛和人着床前胚胎中，HPRT 的活性增加，但到胚泡期时则下降。利用 RT-PCR 检测单个牛卵母细胞和胚胎中 G6PD 基因的表达时发现，G6PD 基因的表达量在 4 细胞期达到峰值。而且，牛的雌性早期胚泡中表达 G6PD 和 HPRT 的量明显比雄性胚泡中多。在体外生产的牛胚胎中，雌性的桑椹胚和胚泡中表达的 G6PD 量要比雄性的桑椹胚和胚泡中分别多 22% 和 18%。HPRT 基因在雌性桑椹胚和胚泡中的表达量要比雄性的桑椹胚和胚泡中分别多 11% 和 10%。然而，这些表达量的差异仍未达到统计学上差异显著的水平。

另外，ZFY 基因仅在雄性胚胎中表达。XIST 基因仅在雌性胚泡中表达，但雄性的桑椹胚中可检测到低水平的 XIST 表达，其表达量相当于雌性胚泡中表达量的 62%。

在雄性和雌性胚胎中检测到的基因表达水平的差异，可能导致雌性和雄性胚胎的发

育速度不同,但由于一些结果的可靠性仍需验证,很可能其他一些基因在雌性及雄性胚胎的差异性发育中也起重要作用。

(杨增明 栾黎明)

主要参考文献

桂建芳, 易梅生. 2002. 发育生物学. 北京: 科学出版社

徐晋麟, 徐沫. 1998. 哺乳动物性别决定和性反转. 生物化学与生物物理进展 25 (1): 30~36

Ando Y, Fujimoto T. 1983. Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood vascular system prior to migrating to the gonadal anlage. Dev Growth Differ 25: 345~352

Anstrom KK, Tucker RP. 1996. Tenascin-C lines the migratory path-way of avian primordial germ cells and hematopoietic progenitor cell. Dev Dyn 206: 437~440

Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M. 1994. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. Nat Genet 7: 497~501

Behringer RR, Finagold RL. 1994. Mullerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. Cell 79: 415~425

Burgoyne PS, Buehr M, Koopman P. 1988. Cell autonomous action of the testis determining gene: Sertoli cell are exclusively XY in XX-XY chimeric mouse testes. Development 102: 443~450

Cao QP, Gaudette MF, Robinson DH. 1995. Expression of the mouse testis-determining gene Sry in male preimplantation embryos. Mol Reprod Dev 40: 196~204

Capel B, Swain A, Nicolis S. 1993. Circular transcripts of the testis determining gene Sry in adult mouse testis. Cell 73: 1019~1030

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

Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC. 1986. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. Cell 44: 831~838

Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. 1992. SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. EMBO J 11: 4497~506

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

Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves JA. 1992. Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. Nature 359: 531~533

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kowk G, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. Nature 372: 525~530

Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. Development 110: 521~528

Giuli G, Shen WH, Ingraham HA. 1997. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian inhibiting substance in vivo. Development 124: 1799~1807

Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C, Heasman J. 1994. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. Development 120: 135~141

Godin I, Wylie CC. 1991. TGF beta1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. Development 113: 1451~1458

Godin I, Wylie CC, Heasman J. 1990. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and

- direction of migration in culture . Development 108: 357~361
- Gubbay J, Collignon J, Doopman P.1990.A gene mapping to the sex determining region of the mouse Y chromosome is a member of noval family of embryonically expressed genes . Nature 346: 245~250
- Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow P, Lovell-Badge R.1992.Inverted repeat structure of the Sry locus in mice . Proc Natl Acad Sci USA 89: 7953~7957
- Harley VR, Goodfellow PN.1994.The biochemical role of SRY in sex determination . Mol Reprod Dev 39: 184~193
- Hirano T, Matsuda T, Nakajima K.1994.Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin -6 related cytokines super family . Stem Cell, 1994; 12: 262~267
- Hughes IA.2001.Minireview: Sex differentiation . Endocrinology 142: 3281~3287
- Jiang FX, Clark J, Renfree MB . 1997.Ultrastructural characteristics of primordial germ cells and their amoeboid movement to the gonadal ridges in the tammar wallaby . Anat Embryol (Berl) 195: 473~481
- Jimenez R, Burgos M.1998.Mammalian sex determination: joining pieces of the genetic puzzle . BioEssays 20: 696~699
- Jimenez R, Sanchez A, Burgos M.1996.Puzzling out the genetics of mammalian sex determination . Trends Genet 12: 164~171
- Kawase E, Yamamoto H, Hashimoto K, Nakatsuji N.1994.Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture . Dev Biol 161: 91~95
- Keshet E, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF.1991.Embryonic RNA expression patterns of the C-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development . EMBO J 10: 2425~2435
- Kochhar HPS, Peippo J, King WA.2001.Sex related embryo development . Theriogenology 55: 3~14
- Koopman P, Gubbay J, Collignon J.1989.Zfy gene expression, is not compatible with a primary role in mouse sex determination . Nature 342: 940~942
- Koopman P.1995.The molecular biology of SRY and its role in sex determination in mammals . Reprod Fertil Dev 7: 713~722
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N.1991.Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry . Nature 351: 117~121
- Larsen WJ.2002.Human embryology (影印版) . 人民卫生出版社
- Mcelreavey K, Vilain E, Abbas N.1993.A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses an egative regulator of male development . Proc Natl Acad Sci USA 90: 3368~3376
- Merchant H.1975.Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells . An ultrastructural study . Dev Biol 44: 1~21
- Morrish BC, Sinclair AH.2002.Vertebrate sex determination: many means to an end . Reproduction 124: 447~457
- Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA.1998.Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression . Cell 93: 445~454
- Nakamura M, Kunana T, Miyayma Y.1991.Ectopiccolonization of primordial germ cells in chick embryo lacking the gonads . Anat Rec 229: 109~115
- Page DC, Brown L, Chapelle G.1987.Exchange of terminal portion of X-Y chromosomal short arm in human XX males . Nature 328: 437~440
- Palmer MS, Sinclair AH, Berta P.1989.Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor . Nature 342: 937~939
- Pereda J, Motta PM.1991.A unique fibrillar coat on surface of migrating human primordial germ cells . Development 110: 521~527
- Pilon N, Daneau I, Paradis V, Hamel F, Lussier JG, Viger RS, Silversides DW.2003.Porcine SRY promoter is a target for steroidogenic factor 1.Biol Reprod 68: 1098~1106
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ.1992.Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture . Nature 359: 550~551

- Sinclair AH, Foster JW, Spencer JA.1988.Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials . A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif . Nature 336: 780~783
- Stevanovic M, Zuffardi O, Collignon J, Lovell-Badge R, Goodfellow P.1994.The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene . Mamm Genome 5: 640~642
- Twyman RM.2002.Instant notes in developmental biology (影印版) . 科学出版社
- Urven LE, Erickson CA, Abbott UK, McCarrey JR, 1988 .Analysis of germ line development in the chick embryo using an anti-mouse EC cell antibody . Development 103: 299~304
- Wachtel SS.1998.X-linked sex-reversing genes . Cytogenet Cell Genet 80: 222~225
- Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN . 1993.Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY . Nature 364: 713~715
- Zwingman T, Erickson R, Boyer T.1993.Transcription of the sex determining region genes Sry and Zfy in the mouse preimplantation embryo . Proc Natl Acad Sci USA 90: 814~817

第十二章 生殖激素

在生理学中，把直接作用于动物的生殖活动，并以调节生殖过程为主要生理功能的激素叫生殖激素。生殖激素的种类很多，按其来源、分泌器官以及转运机制的不同，可分为五大类：①脑部激素，由脑部各区神经细胞或核团如松果体、下丘脑和垂体等分泌，主要调节脑内和脑外生殖激素的分泌活动；②性腺激素，由睾丸或卵巢分泌，接受脑部激素和其他因素的调节和影响，对生殖细胞的发生和发育、排卵、受精、妊娠和分娩，以及雌性和雄性动物生殖器官的发育等生殖活动都有直接或间接作用；③胎盘激素，由雌性动物胎盘产生，对于维持妊娠和启动分娩等有直接作用；④其他组织器官分泌的激素，指产生于生殖系统外的内分泌组织或器官，对卵泡发育、黄体消退等具有直接作用，主要为前列腺素；⑤外激素，由外分泌腺体（有管腺）所分泌，主要借助空气和水传播而作用于靶器官，主要影响动物的性行为。

在内分泌系统中，下丘脑、垂体和性腺分泌的激素在功能和调节上相互作用，构成一个完整的神经内分泌生殖调节体系，即下丘脑-垂体-性腺轴（hypothalamus-pituitary-gonadal axis, HPG），它在动物生殖活动的调节中起着核心作用。

第一节 脑部生殖激素

脑是神经内分泌激素的主要分泌器官。调节生殖活动的神经内分泌激素主要由下丘脑及其周边组织、间脑、垂体及松果体等神经组织的细胞合成并分泌。神经内分泌学是了解神经调节垂体和其他内分泌组织和器官的机制，以及类固醇或其他内分泌激素作用于神经系统的机制，它是内分泌和神经科学的融合。

内分泌的主要概念是内分泌组织分泌的激素进入血液循环调节靶器官或细胞的功能，而神经科学的概念是单个神经元之间的相互联系形成的神经系统的活动。神经元能够通过它们的生物电特征快速有效地将信息传递到远方，此外，神经元间的联系依赖于信息从一个神经元传递到其他神经细胞、腺体或肌细胞，即通过突触间化学递质的释放。

这两个系统曾经是两个独立的体系。自从认识到下丘脑内特殊的神经元调节着垂体前叶的内分泌细胞，并且通过这种下丘脑-垂体的相互作用，最终调节着整个内分泌系统的功能，从此这两个系统才融合到一起。这种科学上的进步最早源于对鱼神经分泌的研究，发现其下丘脑内的特殊神经元通过释放其激素进入血液而发挥内分泌作用。以后通过 Ernest Scharrer 和他的合作者的研究，最终认识到垂体后叶不是真正的腺体，而是由下丘脑内某些神经元的突触组成的，它们释放激素产物直接进入血液循环。

该系统的进一步扩展是认识到神经元调节垂体前叶也是通过释放递质进入血液完成的。不同的是这些递质并不进入体循环，而是严格限制在与前叶细胞密切联系的特殊化

的循环系统中。这一系统的最终形成，是由于发现了这些神经元释放的递质，在化学组成和作用机理上，与内分泌系统分泌的激素有着很高的同源性。

这样人们才对神经内分泌系统参与机体对情绪变化产生的影响有了认识，同时对内分泌功能对于精神活动的影响也有了理论依据。本节只重点介绍与生殖内分泌有关的神经内分泌知识。

一、下丘脑与垂体的结构和功能

(一) 下 丘 脑

下丘脑位于丘脑的腹侧、间脑的基底部，是下丘脑沟以下的神经组织，被第三脑室下部均分为左右对称的两半，构成第三脑室下部的侧面和底部，其体积约为整个大脑的1/ 300。下丘脑的前端接终板，后部接中脑，解剖结构由视交叉、乳头体、灰白结节和正中隆起等组成。下丘脑内包含许多左右成对的核团，其中与内分泌有关的核团大多在下丘脑的内侧部，可分为三个区：① 前区或称视上区，包括视交叉上核、视上核、室旁核等。② 中区或称结节区，包括正中隆起、弓状核、腹内侧核等。③ 后区或称乳头区，包括背内侧核、乳头体等（图 12-1）。构成这些核团的具有内分泌功能的神经细胞有两种：神经内分泌大细胞和神经内分泌小细胞，前者主要分布在视上核和室旁核，主要分泌催产素和加压素；后者较集中地分布在正中隆起、弓状核、视交叉上核、腹内侧

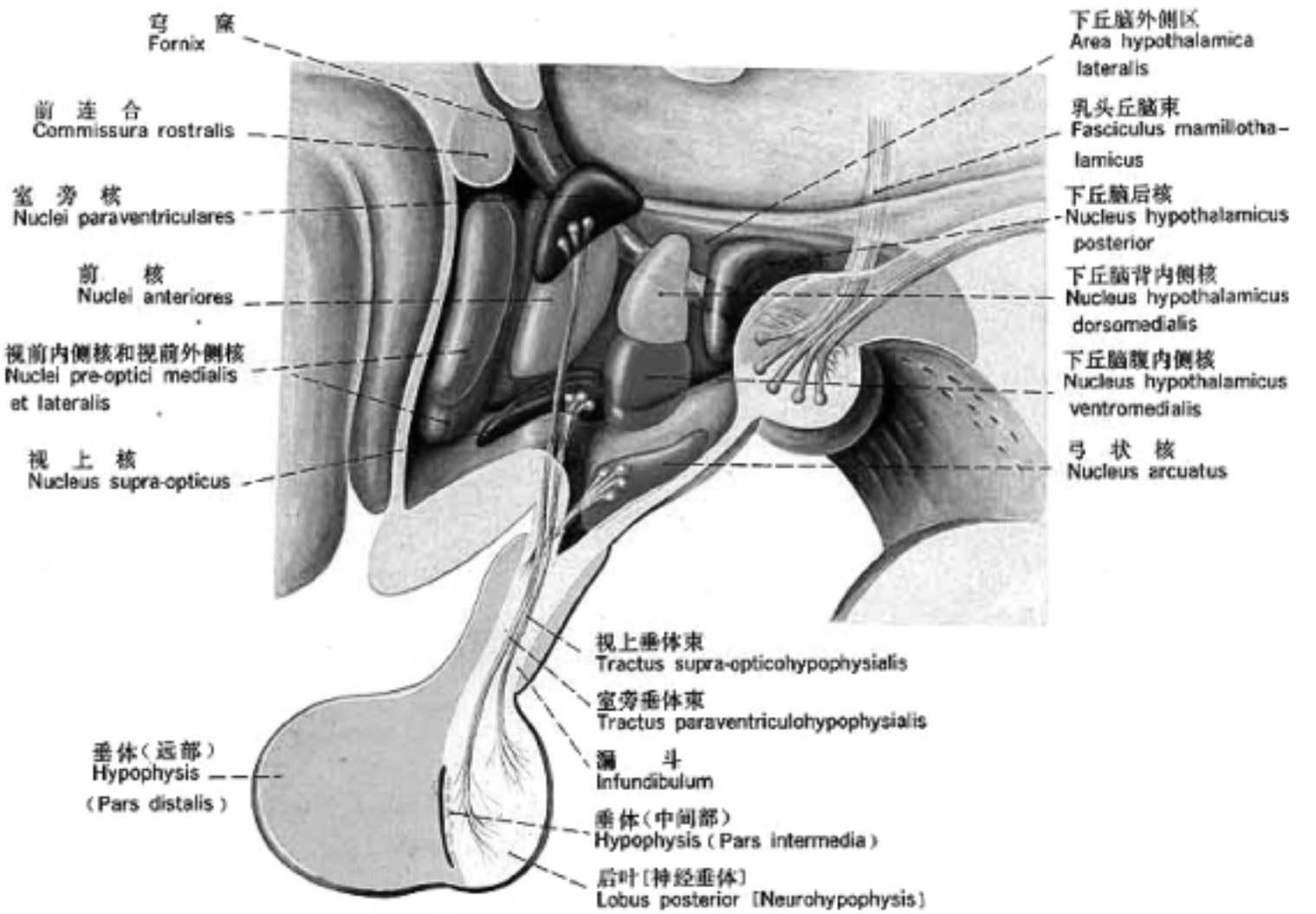


图 12-1 下丘脑内侧区主要神经核团和垂体示意图（引自《系统解剖学图谱》）

核等，分泌各种释放激素，调节腺垂体的功能，因此将这一部分又统称为下丘脑促垂体区。通常，下丘脑前区、视前核和视交叉上核等神经核团分泌的释放激素可调节垂体在排卵前促卵泡激素（FSH）和促黄体激素（LH）的分泌活动，故又将这些区域称为周期分泌中枢。腹中核、弓状核和正中隆起等神经核团分泌的释放激素可调节垂体 FSH 和 LH 的基础性或持续性波动分泌，因此这些区域又称为持续分泌中枢。图 12-1 为下丘脑主要核团的解剖位置。

(二) 垂 体

垂体位于丘脑之下的蝶骨垂体凹内，通过狭窄的垂体柄与下丘脑相连。垂体由两个主要部分组成，即腺垂体（adenohypophysis）和神经垂体（neurohypophysis）。也有人将垂体分为前叶、中间部和后叶三个部分。前叶与腺垂体含意相近，而后叶与神经垂体含意相近，但并不完全等同，中间部则是腺垂体的一部分。腺垂体由远侧部、结节部和中间部组成，神经垂体由神经部和漏斗部组成。漏斗部包括漏斗柄和灰结节的正中隆起，远侧部和结节部合称为垂体前叶（anterior pituitary），神经部和中间部合称为垂体后叶（posterior pituitary）。腺垂体和神经垂体是由不同的胚层发育而来，其中远侧部来自于内胚层（源自于神经颊囊），而中间部和神经部来自于神经外胚层（图 12-2）。

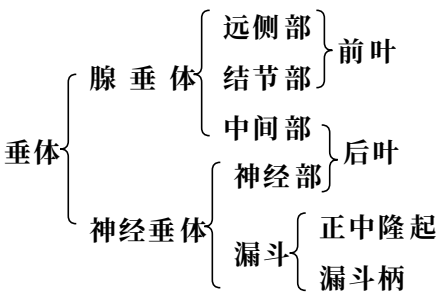


图 12-2 垂体的解剖学结构术语

(三) 下丘脑与垂体的联系

下丘脑虽然没有神经纤维直接进入垂体前叶，但它们之间通过血管（垂体门脉血管）建立了功能上的联系。下丘脑神经元的纤维末梢在正中隆起处大量分布，因此这些神经元合成的激素通过神经纤维末梢分泌到正中隆起，进入下丘脑-垂体门脉血管的毛细血管丛，再经门脉血液循环到达垂体前叶（图 12-3）。例如，促性腺激素释放激素（GnRH）是在正中视前核产生的，多巴胺是在弓状核产生的，这两种物质从下丘脑通过轴突运输到正中隆起，在那里被释放进入门脉系统。垂体后叶可以说是下丘脑的延续部分，它是由下丘脑垂体束的无髓鞘神经末梢与神经胶质细胞分化的神经纤维组成，没有腺体细胞，不能产生激素，只能储存和释放视上核、室旁核分泌的神经激素。

二、下丘脑激素

由下丘脑神经细胞合成并分泌的激素均为多肽类激素，其中对垂体激素的分泌和释

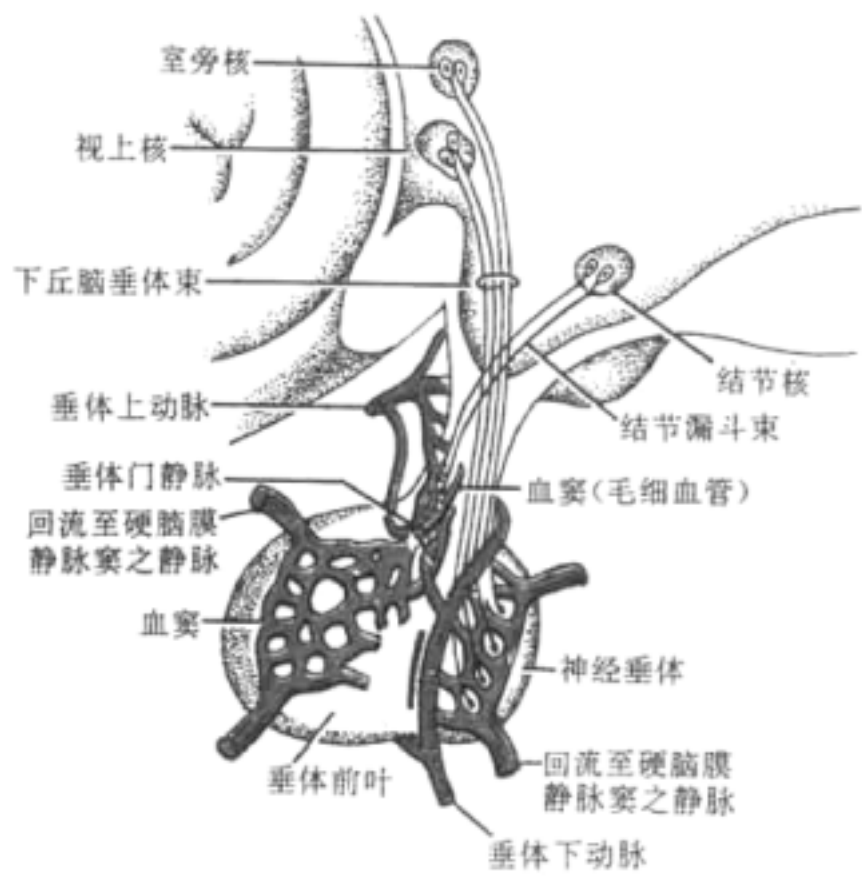


图 12-3 下丘脑与垂体关系示意图 (引自《系统解剖学图谱》)

放活动具有促进作用的称为释放激素或释放因子，而另一些对垂体激素的分泌和释放活动具有抑制作用的称为抑制激素或抑制因子。与生殖相关的下丘脑激素主要有促性腺激素释放激素、催产素、促乳素释放因子和促乳素释放抑制因子等四种。

(一) 促性腺激素释放激素 (gonadotrophin releasing hormone, GnRH)

促性腺激素释放激素最早于 1971 年由 Guillemin 和 Schally 研究组各自独立地从绵羊及猪的下丘脑中分离出来，随后其结构得到进一步研究，现已可人工合成。至今，人们从各种脊椎动物和原索动物中已鉴别出 15 种 GnRH 的分子结构。GnRH 已被证明是下丘脑-垂体-性腺轴的关键信号分子。

1. GnRH 的结构

哺乳类 (猪和羊的下丘脑以及人的胎盘) GnRH (mammalian GnRH, mGnRH) 具有相同的化学结构，是由 9 种不同氨基酸残基组成的十肽 (PGlu·His·Try·Ser·Tyr·Gly·Leu·Arg·Pro·Gly·NH₂，其中 PGlu 为末端带一个磷酸基的谷氨酸)，而禽类、两栖类及鱼类的 GnRH 则具有不同的结构。GnRH 基因内有 3 个内含子和 4 个外显子，由第 2、3 外显子和第 4 外显子的一部分共同编码 GnRH 前体，该前体包含一段 21~23 个氨基酸的信号肽、10 个氨基酸的 GnRH、一个断裂位点 (Gly-Lys-Arg) 和 40~60 个氨基酸的相关肽 (GnRH associated peptide, GAP) (图 12-4)。

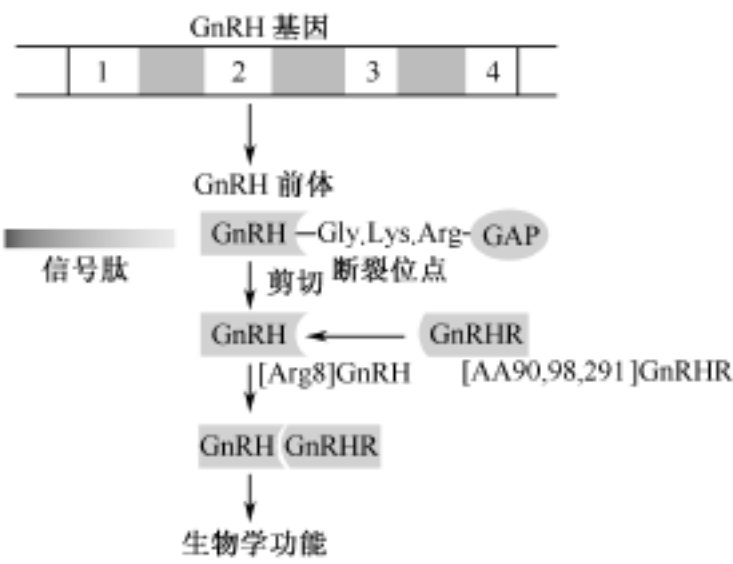


图 12-4 GnRH 基因结构及其与 GnRH 受体 (GnRHR) 相互作用模式示意图 (引自朱睦元等)
GnRH 基因结构中阴影部分为内含子, 1~4 为外显子,
AA: 氨基酸残基。

2. 合成与运输

利用放射免疫和免疫酶标定位技术, 现已基本确定 GnRH 主要由下丘脑视前区、内侧视交叉前区、弓状核等区域或核团中的肽能神经元合成。另外, 在松果体、脊髓液和脑外组织, 包括肠、胃、胰脏、卵巢、输卵管、子宫内膜、胎盘及交感神经节等器官和组织中, 也发现有 GnRH 类似物存在。

GnRH 合成后以颗粒或囊泡的形式储存于细胞内。当神经元受到某种刺激时, 这些 GnRH 或沿轴突输送至正中隆起处释放出来, 通过垂体门脉血液循环进入垂体前叶, 或进入第三脑室的脑脊髓液中, 由正中隆起处的多突室管膜细胞转运至垂体门脉。

3. 下丘脑 GnRH 脉冲的产生

有关这方面的研究较为复杂, 这里只介绍一些下丘脑 GnRH 脉冲产生, 以及控制 GnRH 脉冲性释放的功能性和解剖性证据。

测定恒河猴垂体门静脉血中 GnRH 浓度的实验表明, 它具有独立的脉冲释放类型。GnRH 脉波峰的峰顶与峰谷分别在 400 pg/ml 到 0 pg/ml 之间变化。在人第三脑室脑脊髓液中也有类似的 GnRH 脉冲类型, 但幅度较小。GnRH 分泌到第三脑室表明其他下丘脑释放因子有进入第三脑室的可能, 如 CRF。这可能是由于室管周轴突网络与第三脑室室管膜联系密切的结果。有关 GnRH 在脑脊髓液中的生理意义还不清楚。

一些在恒河猴中进行的实验表明, GnRH 分泌的快速短节律性的释放约为 1 小时一次, 来源于下丘脑内侧基底部 (MBH) 的弓状核附近。可以观察到在垂体门静脉中 GnRH 的脉冲, 电生理多单位活性 (MUA) 和外周 LH 脉冲之间有明显的同步化。可见, MBH 内的昼夜节律变化是控制神经轴突末端 GnRH 在正中隆起处的脉冲释放, 并最终控制垂体促性腺激素脉冲式释放的关键控制器。

在人类, 下丘脑的 GnRH 脉冲释放以及 GnRH 脉冲释放的产生器也已经被间接地

证明。在非人灵长类动物，构成 GnRH 脉冲式释放的产生器位于 MBH，能够起功能性起搏器的作用（不依赖于来自脑其他部位的神经分布）。MBH 的这种自发性的脉冲已得到体外实验的证实。用体外灌流实验曾经观察到，人胎儿 MBH（妊娠 20 到 30 周的 MBH）和成年人 MBH 有单独的 GnRH 脉冲。GnRH 的脉冲周期约为 60min（胎儿 MBH）和 60~100min（成年人 MBH）。这些结果确定了人类和猴一样，下丘脑 GnRH 脉冲产生系统都存在于 MBH。

在摘除卵巢的猴子中，GnRH 脉冲产生器的功能表达可明显的增强。尽管摘除卵巢的猴子的脉冲产生器的频率与处于卵泡期早期的猴子中的频率是相似的，但集团脉冲排放的持续时间在前者中明显降低（从 11min 到 2min）。这种在摘除卵巢的猴子中看到的集团冲动持续期降低的现象可用注射雌激素和鸦片类物质来恢复。可见雌激素和鸦片类物质对于 MBH 的自发冲动产生具有调节作用。

在月经周期的不同时期中，GnRH 脉冲产生器活动的相对变化与在月经周期中观察到的 LH 脉冲从卵泡期到黄体期的变化一样，即从卵泡期的高频低幅变成黄体期的低频高幅。GnRH 脉冲产生的频率在周期的卵泡期的夜晚明显降低，这支持了妇女卵泡期早期在睡眠时 LH 脉冲变慢的事实。当雌激素和孕酮在黄体期晚期开始下降时，GnRH 脉冲产生器的频率变得明显，并持续增加直到卵泡期的头几天，此时达到频率高峰。

GnRH 脉冲产生器是维持生殖整合的基础。然而，有关 GnRH 脉冲产生的细胞学基础还不十分清楚。

4. GnRH 的生物学功能

GnRH 对生殖过程的神经内分泌调控起着中心作用，是性行为的重要介导者，它对下丘脑及其以外的一些神经元有兴奋和抑制两种效应。GnRH 在哺乳动物中含量极低，且不同组织中的 GnRH 具有不同的生物学功能。下丘脑中 GnRH 可调控促性腺激素的释放；胎盘中的 GnRH 可调控人绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropin, hCG）的分泌；肿瘤中的 GnRH 可抑制癌细胞的增殖；消化系统中 GnRH 的功能目前尚不明确。一般认为，GnRH 通过旁分泌/自分泌机制，局部调节血浆促性腺激素以及性类固醇激素的水平，从而改变动物的性行为。因此，GnRH 可在垂体、性腺等多个水平上影响生殖活动过程。

(1) 在垂体水平的功能

在正常生理状态下，GnRH 呈脉冲式释放，故垂体促性腺细胞也呈脉冲式分泌 LH 与 FSH。GnRH 的脉冲式释放可调节 LH/FSH 的比值。当 GnRH 的脉冲频率减慢时，卵巢摘除和下丘脑功能丧失的猴血中 FSH 水平升高，LH 水平下降，这样 LH/FSH 值下降，在人类中也有相似的研究结果。这可能是因为 LH 的半衰期较短（47min），很快被清除，而 FSH 的半衰期较长（240min），从而在血中积累的结果。反之，GnRH 的脉冲频率增加，使 LH/FSH 比值上升。此外，LH 和 FSH 对 GnRH 的促分泌反应有所不同。例如，给大鼠、兔、绵羊等动物快速静脉注射 GnRH 时，主要引起血浆中 LH 水平明显升高，可是当用一定剂量的 GnRH 缓慢注射时，不但使 LH 的水平升高，而且 FSH 水平也明显升高。给人注射人工合成的 GnRH 类似物时发现，注射后 5min 血浆中 LH 水平就升高，25~30min 达到峰值，而 FSH 的反应较缓慢，在 45min 才达到峰值。

一些体外实验亦证实, 垂体细胞受 GnRH 刺激时, LH 分泌量的变化幅度比 FSH 的大。另有研究表明, GnRH 主动免疫引起动物血浆中 LH 水平急剧降低, 而 FSH 只有轻度降低, 从而进一步证实了上述差异的存在, 即在 GnRH 刺激下, 垂体细胞 LH 分泌相应地出现明显脉冲, 而 FSH 分泌则缓慢而持久。

造成这种差异的原因可能有以下两方面: 一是下丘脑 GnRH 神经元受到神经中枢其他部位传入的信息的影响及性腺激素反馈作用, 以不同的脉冲频率释放 GnRH 后作用于垂体, 引起垂体细胞分泌反应的改变。因为一些研究发现, GnRH 以较高脉冲频率 (3 次/h) 释放且作用时间较短时, 主要促进 LH 分泌, 而以较低频率 (1 次/h) 且持续释放时, 则主要引起 FSH 分泌。所以, 在 GnRH 刺激下, 垂体细胞 LH 分泌相应地出现明显的脉冲, 而 FSH 分泌则缓慢而持久。二是性腺分泌的抑制素 (inhibin) 对垂体 FSH 特异性的抑制作用, 可能是引起 FSH 对 GnRH 的促分泌反应不如 LH 明显的一个因素。除了调节促性腺激素的分泌以外, GnRH 对促性腺激素亚单位的 mRNA 表达也有调节作用。在卵巢切除造成的绵羊下丘脑-垂体功能性联系切断 (HPD) 的实验中, 当 HPD 一周后, LH 两个亚单位 LH- α 和 LH- β mRNA 的表达降低到不能检测的水平, 而当用 GnRH 每小时注射一次的方法处理时又能恢复到高水平。在大鼠模型中, 较高的 GnRH 频率诱导 LH 和 FSH 的 α -亚单位 mRNA 表达, 但对 β -亚单位 mRNA 影响极小。生理频率 (大鼠约为每小时 2 次) 的 GnRH 增加可使所有促性腺激素亚单位的 mRNA 表达, 而较低频率 (每 2 小时 1 次) 只选择性地增加 FSH β -mRNA 的表达。

GnRH 与促性腺激素之间的功能联系可被 GnRH 拮抗剂或 GnRH 抗体所中断。在这种实验条件下, 去势所引起的所有亚单位 mRNA 水平升高的趋势可以被抑制。另外, 在人类用 GnRH 拮抗剂封阻 GnRH 受体后, 生物学活性的 LH 和 FSH 含量下降要明显高于免疫学活性的下降, 表明在 GnRH 被阻断后, LH 和 FSH 的加工过程受到了影响。

总之, 高频的 GnRH 刺激 LH- α mRNA 增加, 而不是 LH- β 或 FSH- β mRNA 的增加。低频的 GnRH 选择性地诱导 FSH- β mRNA 增加, 而生理频率的 GnRH 刺激所有亚单位 mRNA 的增加。此外, 适合的 GnRH 频率对于亚单位的糖基化, 连接以及最终形成有生物活性的 LH 和 FSH 分子是必要的。给缺乏内源性 GnRH 引起的促性腺激素功能低下的妇女注射 GnRH (90 分钟 1 次的频率) 可始动卵泡发育、排卵及黄体形成的正常过程。

(2) 在性腺水平的功能

有研究表明, 生殖细胞的发育除受到 HPG 轴神经内分泌调控外, 还受到性腺局部组织细胞之间的相互调节。GnRH 类似物由性腺产生的间接证据有: ① 用受体测定和免疫测定, 能检测到类似 GnRH 的物质; ② 卵巢和睾丸都含有 GnRH 受体; ③ 血液循环中的 GnRH 含量非常低, 甚至检测不出来; ④ GnRH 及其类似物能直接作用于性腺而抑制其生殖活动。GnRH 在体内可能起到调节生殖系统的发育和生殖细胞形成的作用。大剂量的 GnRH 会起到“异相作用”, 即具有抑制性腺而产生抗生育作用。活体内, GnRH 能抑制去垂体大鼠卵巢和子宫的增重, 终止正常妊娠, 而且还能终止去垂体大鼠的妊娠。这说明 GnRH 可能直接作用于卵巢、子宫、胎盘或胚胎上。利用免疫组织化学及图像分析技术发现, 妊娠与非妊娠大鼠的子宫内膜均能表达 GnRH 及其受体。由此推测, GnRH 可能在 GnRH 受体介导下直接参与子宫内膜的功能及妊娠维持的调

节。然而，关于 GnRH 直接调节性腺功能的作用机理和意义，目前仍了解甚少。

5. GnRH 受体与 GnRH 的作用机制

GnRH 对垂体的作用是通过与特异性膜受体结合，启动一系列复杂的连锁反应，最后导致垂体促性腺激素的释放。GnRH 与受体结合后首先引起微聚集作用，激活受体后刺激磷脂酰肌醇 (PI) 水解，使细胞外钙内流，从而激活钙调素 (CaM)，PI 水解生成二酰基甘油 (DAG)，并激活蛋白激酶 C (PKC)。CaM 和 PKC 通过目前尚不明确的机理引起促性腺激素的释放。此外，GnRH 本身对于垂体 GnRH 受体还可产生自我调节。小剂量脉冲释放的 GnRH 可使垂体 GnRH 受体上调 (up-regulation)，当给予大剂量的外源性 GnRH 后，垂体细胞的 GnRH 受体丢失，出现下调 (down-regulation)，这时促性腺激素的水平也减少，这就是临床上应用大剂量 GnRH 激动剂抑制垂体-性腺轴活动，以达到同期发情和同时诱导排卵的作用机理。

研究表明，细胞外钙离子对于由 GnRH 诱导的 GnRH 受体的上调是必要的，但似乎对 GnRH 受体的下调没有必要。可见 GnRH 诱导的 GnRH 受体数量的变化可能是一个复杂的系列事件，包括受体的产生 (合成、暴露和再利用) 和功能性受体的丢失 (降解、内陷化和失活) 等。

近来对大鼠垂体的研究表明，GnRH 可引起促性腺激素分泌细胞中 GnRH 受体合成率的增加 (不依赖于钙离子)。但 GnRH 刺激其受体合成并不依赖于它的剂量，20min 就可产生可辨别的上调作用。大约需要 13~15h 受体数目增加一倍。由于没有观察到 GnRH 剂量与其受体合成间的剂量反应曲线，那么 GnRH 调节的 LH 释放和受体合成可能通过不同的通路，具体机理尚不清楚。

由于 GnRH 对其受体的调节作用以及其对促性腺激素的刺激作用可能存在着不同的通路，而促性腺激素本身又存在着合成和释放两个环节，说明 GnRH 对于 LH 的调节也存在着两个方面，一方面是促进促性腺激素的合成，另一方面是刺激 LH 的释放。研究表明，GnRH 剂量高时趋向于刺激 LH 的释放，而小剂量趋向于促进 LH 的合成。当用小剂量 GnRH [$0.005\mu\text{g}/(\text{m}^2\cdot\text{min})$] 持续灌流垂体 20 小时，GnRH 对 LH 释放的效应在前 4 小时不明显，但在其后的灌流时间内变得明显，并诱导 LH 脉冲幅度的增加。GnRH 小剂量的效应与 LH 释放的始动是在 4 小时后表现出 LH 脉冲幅度的增加，表明内源性 GnRH 在前 4 小时促进了 LH 的合成增加，或很可能是由于 GnRH 受体数目的逐渐增加。这些结果与体外实验的结果相符，即 GnRH 受体数目增加至少需要 4 小时，也说明 GnRH 刺激 LH 合成或刺激 GnRH 受体的合成与刺激 LH 释放的功能可能是通过不同的通路。此外，雌激素等因子在 GnRH 诱导的 GnRH 受体数目增加过程中起着重要作用。

GnRH 受体属 GnRH 结合蛋白偶联体系家族成员，是具有 7 个跨膜结构域的糖蛋白，它有 3 个 N 糖基化位点，但没有一个细胞内的 C 终端区。GnRH 在体内的重要功能必须通过 GnRH 受体来介导，GnRH 受体在 90、98、291 位的酸性氨基酸残基可能和 GnRH 的第 8 位精氨酸相互作用，因而对 GnRH 的活性起重要作用。研究表明，不同种的 GnRH 受体 cDNA 结构具有很强的保守性，大鼠、人、羊的 GnRH 受体基因与人的基本相同，均含有 3 个外显子和 2 个内含子。RNA 印迹、逆转录聚合酶链反应 (RT-

PCR)、原位杂交及受体结合分析表明,在大鼠、猪、牛、羊等哺乳动物中,除 HPG 轴外, GnRH 受体基因在胃肠道、生殖器官、某些肿瘤细胞及外周血单核细胞中也有表达。

6. 影响 GnRH 分泌的因素

(1) 下丘脑调节 GnRH 分泌的两个中枢

雌性动物 GnRH 的分泌呈现明显的周期性变化,而雄性动物则无此种变化。目前认为,两性 GnRH 分泌之所以存在这种差异,是因为在下丘脑存在控制 GnRH 分泌的两个中枢,即紧张中枢 (tonic center) 和周期中枢 (periodic center)。前者主要位于下丘脑的弓状核和腹内侧核,后者位于视交叉上核及内侧视前核。它们的神经突触与下丘脑不同区域的神经分泌细胞相连,控制着这些神经细胞的分泌活动。紧张中枢控制着 GnRH 的经常性分泌,使体内 GnRH 维持一定的基础水平。在雌性动物,这一中枢的活动受神经激素负反馈调节。周期中枢对体内外刺激非常敏感,并且可接受雌激素的正反馈效应。因此在雌性动物,排卵前由于高水平的雌激素的作用,使周期中枢活动增强,导致 GnRH 释放增多而引发排卵前 LH 峰。但在雄性动物,周期中枢因雄激素的抑制而无明显活动, GnRH 分泌主要受紧张中枢的控制。所以雄性动物性活动的周期性变化没有雌性动物明显。

(2) 下丘脑神经递质的传入

形态学研究表明,大部分脑区,特别是皮层、边缘系统以及间脑,都有 GnRH 神经纤维分布到下丘脑,形成突触联系。从其他神经元而来的传入性突触释放多种信号分子如氨基酸、胺类、单胺、可扩散气体 (如 NO) 等,以专一位点 (site specific) 方式,构成“交互对话 (cross talk)”的不同神经元回路和网络,通过递质共存、共释放、共作用来控制下丘脑 GnRH 神经元分泌。生理学研究表明,信号分子对 GnRH 分泌有促进、抑制、促进/抑制双相调节三种作用。在有关促进 GnRH 分泌的信号分子研究中,报道较多的有神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY)、去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)、甘丙肽 (galanin, GAL)、谷氨酸 (glutamate, Glu) 等。目前较公认的抑制中枢 GnRH 分泌的主要信号分子有 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、 β -内啡肽 (β -endorphin, β -END) 等。

A. α -肾上腺素能系统对 GnRH 的调节

大量的证据表明, NE 可能是一种主要的刺激下丘脑 GnRH 神经元的递质。该物质在发情前期的周转率增加。阻断该受体 (α -受体) 后,在大鼠可消除脉冲式的 LH 释放。从脑干上行的两个主要的 NE 通路到达下丘脑区 GnRH 神经元,即蓝斑 (locus ceruleus) NE 系统和延髓 NE 系统。尽管现在有关 NE 神经末端与 GnRH 神经元之间的直接突触还没有被普遍证实。但是,实验结果证明,去甲肾上腺素能的上行纤维与 γ -氨基丁酸能中间神经元有突触联系。NE 刺激 GnRH 神经元是通过抑制 γ -氨基丁酸能中间神经元的紧张性释放 (通过 α -肾上腺素能受体,但不是 β -肾上腺素能受体) 调节的。

在非人灵长类中,也发现有 α -肾上腺素能系统刺激 GnRH 分泌的效应。GnRH 脉冲产生器的活性在卵巢切除的猴子中受到 α -肾上腺素能阻断剂的明显抑制。可是, α -肾上腺素能系统对在月经周期时 GnRH 分泌的作用,特别是在排卵前峰时期的作用,在人

和猴中还没有得到证明。灵长类可能与大鼠不同，将恒河猴 MBH 的传入神经完全阻断后，自发的和雌激素诱导的 LH 峰仍然出现，表明源于 MBH 外的神经信号对于控制 GnRH 分泌不是必需的。

B. 多巴胺能系统对 GnRH 的调节

尽管有大量的实验证明多巴胺对 GnRH 分泌有调节作用，但多巴胺对 GnRH 分泌的调节作用仍有许多方面是矛盾的。根据实验条件的变化，会发生或是刺激的，或是抑制的现象。体外灌流人下丘脑分离的 MBH 以及在卵巢摘除的猴中用电生理方法调节 GnRH 脉冲产生器，可观察到多巴胺对 GnRH 的分泌具有刺激作用，而对于处于周期和绝经期后的妇女以及各种实验条件下的大鼠，却又发现多巴胺具有抑制效应。在人 MBH 中，发现多巴胺能刺激内源性鸦片肽的释放，反过来抑制 GnRH 分泌。考虑到多巴胺能够刺激下丘脑 β -内啡肽释放，而 β -内啡肽又抑制下丘脑多巴胺的周转率和释放，提出了控制 GnRH 分泌的多巴胺和 β -内啡肽的相互作用系统。基于此，给绝经期妇女注射多巴胺激动剂 (bromocriptine) 可以恢复 LH 对纳络酮灌流的反应，表明内源性鸦片肽活性增加了。这说明绝经期后，促性腺激素释放的增加可能是由于神经系统多巴胺和 β -内啡肽系统之间功能性联系中断的结果，其中卵巢分泌的雌激素可能是上述两者之间功能性联系的纽带。

近来，免疫细胞化学和电子显微术研究证明，多巴胺神经元与 GnRH 神经元之间有突触联系。这样，GnRH 神经元活性被多巴胺调节的通路可能有几条。

C. 内源性鸦片肽系统对 GnRH 的调节

实验表明，人和其他实验动物内源性鸦片肽通过抑制下丘脑 GnRH 的分泌，对促性腺激素分泌的神经控制起着关键的作用。给卵巢摘除的猴子一次性注射吗啡可以引起 GnRH 脉冲产生器活动的立刻停止。给妇女注射 β -内啡肽和给分离的人 MBH 体外灌流，同样可以引起 GnRH-LH 脉冲的迅速抑制。

下丘脑鸦片肽系统在 MBH 的弓状核中的神经元网络已得到确定，它与 GnRH 神经元系统有密切联系。鸦片肽能活性与 GnRH 分泌的解剖和功能关系在高雌激素，特别是高雌激素和高孕酮环境中更加明显。观察表明，鸦片肽受体拮抗剂纳络酮诱导 GnRH-LH 脉冲释放频率和幅度的增加，卵巢激素可调节这一效应。进一步实验表明，纳络酮阻断鸦片肽受体后，并不能调节绝经期妇女促性腺激素的分泌。这说明在这一时期，鸦片肽对 GnRH 分泌影响的偶联发生了解离。这种现象可以解释为什么在绝经期的妇女其 LH 脉冲呈高频高幅度以及不受限制的分泌的原因。给性腺功能低下和无性腺妇女或卵巢摘除的猴子顺序注射雌激素和孕酮，可迅速恢复鸦片肽能物质对 GnRH-LH 脉冲活性的抑制作用（类似在卵泡期后期和黄体期中期的情况）。这样，雌激素特别是雌激素与孕酮协同对促性腺激素分泌的负反馈调节机制可能部分是通过鸦片肽对 GnRH 分泌的抑制增加来实现的。

内源性鸦片肽也可能对在卵泡期早期产生的睡眠时 GnRH 脉冲减慢有调节作用，以及对周期中促性腺激素峰的始动有作用。以持续稳定的速率灌流纳络酮 [$30\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$] 可完全改变睡眠时的 LH 脉冲降低，但在卵泡期早期的白天 LH 脉冲特征没有改变。这一结果表明，鸦片肽抑制能力的夜间增加可能造成了 LH 脉冲夜间降低。在初情前的大鼠中观察到下丘脑鸦片肽的结合位点发生昼夜变化，可以说明这种神经内分泌事件的

机理。

在哺乳动物（包括人）中，中期促性腺激素峰受血液中雌激素增加对下丘脑-垂体的正反馈调节始动，并控制 GnRH 神经元的分泌活动。在促性腺激素峰时能够调节 GnRH 神经元活动的许多通路中，下丘脑鸦片肽系统是其中之一。此时，性腺类固醇激素内环境起着重要作用。当鸦片肽受体被持续注射纳络酮所阻断时（人卵泡期后期），LH 和 FSH 脉冲释放急剧增加，同时峰的幅度逐渐增加，该结果与在自发性中期促性腺激素峰始动过程中观察到的结果类似。动物对纳络酮的反应受排卵前雌激素水平调节。目前认为，在周期中期时发生的鸦片肽活性的变化可能是促性腺激素峰始动的神经内分泌事件之一。然而，还不清楚这种变化是否是由于鸦片肽受体敏感性下降或密度下降，还是由于在神经元调节部位鸦片肽浓度降低所致。

(3) 性腺激素对 GnRH 的调节

目前一般认为，GnRH 靶腺体（垂体和性腺）激素对下丘脑 GnRH 分泌可构成各种反馈性调节，如血液中的超短反馈、垂体激素短反馈和性腺激素长反馈。雄性睾酮（testosterone）通过负反馈作用调节 GnRH 和 LH 的分泌。雌性下丘脑 GnRH 主要受到雌激素的调节，其调节分为负反馈和正反馈，机理尚不十分明确。但最近研究证实，睾酮和雌激素均可抑制下丘脑 GnRH 分泌，两者并无直接关系。许多信号分子是性激素的靶分子，性激素通过改变靶分子上作用部位的感受能力促进其合成、储存及释放。因此，性激素在下丘脑调控 GnRH 不同神经通路间“相互对话”中起着“开”或“关”的闸门式作用，这在精确调控不同信号对 GnRH 的作用中是非常重要的。虽然免疫组化和放射自显影未能在 GnRH 神经元上找到性激素受体，但最近发现 GnRH 基因的启动子区域包含一些性腺类固醇激素反应元件，表明性腺类固醇激素对 GnRH 的释放可能有直接作用。通过 G 蛋白偶联受体介导的信号转导途径，GnRH 可以调控促性腺激素分泌细胞的增殖和激素分泌，进而刺激性腺细胞产生类固醇激素，如雌激素和雄激素。雌激素作用于促性腺激素分泌细胞，并与雌激素受体（estrogen receptor, ER）结合，通过雌激素反应元件（estrogen response element, ERE）的作用，抑制靶基因的转录，从而调节 FSH 和 LH 的分泌（图 12-5）。

A. 卵巢类固醇激素对 GnRH 的调节

负反馈调节 很早就知道 LH 和 FSH 的紧张性分泌似乎受经典的负反馈控制。用卵巢摘除的方法破坏正常周期的妇女负反馈通路，导致促性腺激素水平的迅速升高。LH 和 FSH 水平的升高持续 3 周时到达平台期，此时的激素水平是卵巢摘除前的 10 倍。这种由于反馈环路开放造成的促性腺激素分泌增高可被逆转，如给性腺功能低下的妇女注射雌激素可迅速达到反馈环路的闭合效应。在相同的实验条件下，对猴子和其他动物的研究结果也是如此。

在缺乏卵巢反馈时，与正常周期的卵泡期结果比较，促性腺激素水平的升高明显地表现在 LH 和 FSH 峰幅度的增加，而频率没有明显变化。相反，注射雌激素则降低 LH 峰幅度。

但是雌激素的负反馈作用并不是绝对的，而表现出一种时间和剂量依赖性的变化，即由负反馈抑制变成正反馈促进（引起促性腺激素水平升高）。雌激素的这种双向反馈包括它的最初的负反馈抑制效应和以后发展的正反馈促进效应。

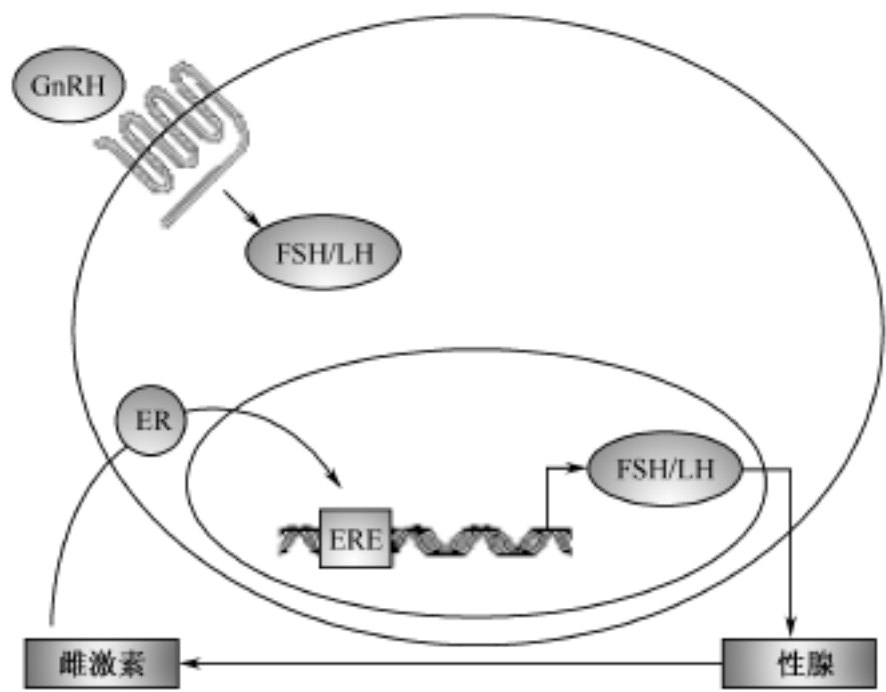


图 12-5 垂体促性腺激素细胞中 GnRH 的调控途径
(引自 Sylvia LA 和 Shereen E, 2002)

给性腺功能低下的妇女和卵巢摘除的猴子注射药理剂量的孕酮，对促性腺激素水平升高几乎没有抑制效应。但是，在月经周期的黄体期或者经过雌激素预处理，孕酮可以降低促性腺激素峰的频率但增加峰的幅度。如前所述，孕酮的这种效应是由于它对下丘脑β-内啡肽的作用调节的，β-内啡肽降低 GnRH 脉冲产生器的频率。因此，在卵巢类固醇激素负反馈作用中，雌激素和孕酮是主要的信号，并具有协同效应。

正反馈调节 促性腺激素排卵前峰的始动是雌激素正反馈作用的结果。通过放射免疫测定法，可以检测到在卵泡后期雌激素在血液循环中水平升高。如给性腺功能低下的妇女注射外源性雌激素（300pg/ ml，约持续 2~3 天），就可诱导一个促性腺激素排卵前峰的产生。而排卵前卵泡分泌的孕酮增加可以增加促性腺激素峰的持续时间和加强雌激素的正反馈作用。尽管在人类，排卵前孕酮分泌对于促性腺激素峰的完全表达是需要的，但孕酮的这种影响在恒河猴中没有得到证明。可见，LH 排卵前峰的时间性不是由下丘脑刺激的，而是由从排卵前卵泡发出的信号控制的。因此，卵巢可能是控制 GnRH-促性腺激素水平调节的发情周期（或月经周期）时间性的生物钟（至少在人类和灵长类如此）。

作用位点（负反馈和正反馈的功能关系） 尽管卵巢雌激素具有负反馈和正反馈这种令人不可思议的能力，但正反馈的产生需要负反馈的存在。毫无疑问，垂体是雌激素的主要作用位点，但是，近来的证据表明，雌激素对下丘脑也有作用。在脑中，雌激素和孕激素受体出现在 MBH 中不同的神经元细胞群。就像在其他靶组织一样，雌激素能够诱导孕酮结合位点以及在 MBH 中神经元中的受体 mRNA 水平增加。使用免疫组织化学、放射性自显影和原位杂交技术，已经定位了能够表达细胞内雌激素和孕酮受体的特异细胞。在弓状核的多巴胺神经元（酪氨酸羟化酶免疫反应神经元）拥有雌激素（约 30%）和孕酮（约 90%）受体。在β-内啡肽神经元中，含有雌激素（约 20%）和孕酮（约 30%）受体。原癌基因 c-fos 在 GnRH 神经元中的表达受雌激素诱导，标志着

细胞的最终活化。弓状核的 GnRH 神经元没有雌激素和孕酮受体。

生理意义 由于卵巢类固醇激素不直接作用于 GnRH 神经元，它们对 GnRH 神经元活动的影响肯定是通过 MBH 中邻近的神经元系统调节的。尽管有许多候选神经元类型，但由于在多巴胺神经元和 β -内啡肽神经元中含有雌激素和孕酮，这就为类固醇激素作为神经调节物质影响神经系统的功能找到了解剖和功能的基础。 β -内啡肽和多巴胺神经元都与 GnRH 神经元有轴突-轴突突触，并具有影响 GnRH 脉冲产生器以及 GnRH 分泌的能力，这样就为雌激素和孕酮反馈作用于 GnRH 神经元的活动奠定了基础。

这种模型的基础是 β -内啡肽能抑制多巴胺和 GnRH 分泌，而多巴胺能够刺激 β -内啡肽和 GnRH 释放。而多巴胺抑制 GnRH 释放是由于刺激了 β -内啡肽活性的原因。由于神经肽的活性比胺类强，持续时间长，因此 β -内啡肽调节的抑制性表达通常占优势。

B. 卵巢抑制素和激活素

目前，性腺抑制素的性质已被确定，并已克隆了多种动物（包括人）的抑制素基因。已发现抑制素蛋白家族具有多种功能。抑制素由两个亚基 a 和 b（来源于不同的基因）组成。尽管 ab 异二聚体抑制素抑制 FSH 分泌，但 bb 同源二聚体刺激 FSH 分泌。最使人有兴趣的是，具有高度保守性的 b-亚单位与转化生长因子- β (TGF- β)、AMH 及其他一些对胚胎中胚层发育（包括毛囊发育）起重要作用的基因是同源的。抑制素蛋白来源于三种激素原，这些激素原含有几个多聚的基础氨基酸残基团（起着裂解和糖基化位点的作用）。具有生物功能的亚基来源于每个前体的终末区，a-亚单位由 134 个氨基酸组成。

一种 FSH 的抑制蛋白（follistatin）的分离和鉴定已经完成。这种蛋白与抑制素的结构不相同，在体外约有 5%~30% 的抑制素活性。近来有证据表明，该蛋白是激活素的结合蛋白。

高纯度的抑制素可抑制体外培养的垂体细胞 FSH 的基础分泌，这一点证明了早期发现的体外培养的颗粒细胞分泌一种抑制素样物质可以选择性抑制 FSH 释放的观察结果。抑制素对 FSH 释放的抑制影响需要几个小时的潜伏期，最大的抑制效应只有到接触抑制素 8~24h 后才能达到。此外，在培养的大鼠垂体细胞中，抑制素也抑制 GnRH 诱导的 GnRH 受体上调。

高度纯化的激活素 A (bAbA) 是一种在体外选择性促进 FSH 分泌的物质。与抑制素相似，激活素对 FSH 释放的刺激作用也不依赖于 GnRH 并需要较长的潜伏期。激活素和抑制素似乎功能性地相互拮抗。抑制素降低 FSH 的自发性产生，并降低低剂量激活素的效应，而高剂量激活素能克服抑制素的效应，最终导致 FSH 分泌受到刺激。高剂量的激活素可完全消除抑制素的效应。进一步研究证明，在大鼠垂体细胞培养中，抑制素可降低 FSH mRNA 的表达水平，72h 后完全不表达，并伴随着 FSH 分泌的平行变化。加入激活素可诱导 FSH mRNA 的表达，伴随着 FSH 分泌增加。在细胞培养中，Follistatin (10~50ng/ml 剂量) 也可明显降低 FSH mRNA 的表达。所有的实验都没有观察到 LH- β 亚单位 mRNA 的变化。有关抑制素和激活素对垂体 FSH 分泌的功能性关系尚不清楚，因为在血液循环中抑制素水平升高时，循环中激活素还没有出现，另外垂体促性腺激素分泌细胞本身也产生抑制素亚单位，搞清它们之间的关系对于阐明促性腺激素的调节具有重要意义。

(4) 松果体激素

哺乳动物体内，松果体分泌抗性腺物质，如褪黑激素 (melatonin, MLT)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 和 8-精氨酸催产素 (vasotocin) 等，经血液循环和脑脊髓液扩散到下丘脑，抑制 GnRH 分泌。有趣的是，除发现上述抑制 GnRH 的活性物质外，在松果体内还发现有 GnRH。有人用放射免疫分析法发现，在新鲜的羊松果体组织中的 GnRH 浓度比下丘脑高 20 倍，因此，推测松果体可能是 GnRH 组成型分泌的另一来源。

(5) 其他因素

由于神经系统的调节是反射性的，刺激各种感觉器官（如视觉、嗅觉、触觉、听觉）产生的信号传入中枢神经系统后，可反射性调节 GnRH 的分泌。总之，GnRH 神经活动是一个非常复杂的生理过程，它受到许多内外因素的影响和调节。

7. 临床应用

临床上 GnRH 常用于治疗雄性动物性欲减弱、精液品质下降、雌性动物卵泡囊肿和排卵异常等症。此外，在母猪或母牛发情配种时或配种后 10 天内注射 GnRH 或其类似物，可以提高配种受胎率。

(二) 催产素 (oxytocin, OT)

催产素是有胎盘哺乳类体内的一种 9 肽神经内分泌激素，主要由下丘脑的催产素神经元合成，沿其轴突运输并储存到垂体后叶，在适当的刺激下以脉冲式释放，对动物体具有多种生理效应。

1. 催产素的结构与功能的关系

催产素的化学结构为含一个二硫键的 9 肽，其活性中心是第二位的酪氨酸及第五位的天冬酰胺，前者的 C=O 与后者的 NH 之间形成氢键，与第九位的甘氨酸形成亲水键。第三位的异亮氨酸与第八位的亮氨酸对催产素的生物活性和作用专一性非常重要。改变第四位和第七位氨基酸残基，可使催产素促子宫收缩的作用更专一。去除第一位游离氨基可以减弱催产素的极性，使其渗透性增强而活性提高。第四位谷氨酰胺改为苏氨酸，可使促子宫收缩活性成倍增加。将第七位脯氨酸残基用噻唑烷基-4-羧酸取代后制成的催产素药物，其促子宫收缩活性为天然激素的两倍。而将第一位的游离氨基改为羟基、第四位谷氨酰胺改成苏氨酸制成的类似物，则其促子宫收缩活性比天然激素高 8 倍。二硫键虽然是稳定催产素分子紧密性的重要因素，但并非为维持生物活性所必需。

2. 催产素产生的部位

以前认为，OT 的产生部位是在下丘脑的室旁核和视上核等核团的神经元，分泌物经下丘脑-视上垂体束传送至神经垂体，经一定的调控机制释放入血液而发挥作用。随着研究的深入，已发现在除下丘脑外的其他神经系统的广泛区域内存在 OT，甚至在一

些外周器官如卵巢、黄体、子宫、胎盘、睾丸、肾上腺、胸腺、胰腺中也有 OT 的分布。

3. 生理功能

催产素受体 (OTR) 与 G 蛋白相偶联, 激活磷脂酶 C, 通过细胞内的磷脂酰肌醇信号系统, 诱导细胞质 Ca^{2+} 浓度升高, 导致子宫在分娩时的强烈收缩。此外催产素还具有广泛的生理功能, 包括在哺乳时使围绕乳腺腺泡的肌上皮细胞收缩, 参与黄体形成和退化, 以及在中枢神经系统中调节母性行为等。这些功能有的可归因于催产素从它的经典生成部位——下丘脑-垂体系统中的合成与释放, 而其他功能则依赖于催产素在外周组织的生成和局部激素-受体间的旁分泌或自分泌相互作用。

(1) 催产素与哺乳动物的分娩

催产素对分娩的起始和维持具有作用。在整个妊娠的中前期和妊娠晚期, 循环血中的高浓度孕酮使子宫平滑肌保持松弛状态。临产前短时间内, 血浆孕酮浓度迅速降低, 子宫中催产素受体表达量显著增加, 子宫收缩能力提高。由于受子宫收缩、宫颈和阴道扩张的刺激, 下丘脑催产素神经元活动增强, 导致其位于垂体后叶内的轴突末梢释放催产素。OT 作用于子宫后, 不但刺激前列腺素的合成, 而且进一步增强子宫收缩, 由此形成一个正反馈环路, 加速分娩过程。

各种哺乳动物分娩起始的机制存在很大种间差异, 虽然催产素在分娩的引发过程中具有作用, 但它是否是始动分娩的关键激素, 目前没有证据。子宫中可能存在能替代它的某些其他机制, 现在比较公认的是胎儿肾上腺皮质激素和子宫前列腺素的分泌可能是始动胎儿分娩的关键。

(2) 催产素与卵泡发育和黄体形成

催产素存在于许多动物的卵巢中。在发情前期用 OT 处理, 会使小鼠卵泡提前成熟、排卵并形成黄体。颗粒细胞产生的 OT 作用于自身产生的 OT 受体, 以自分泌形式调节卵泡发育过程中类固醇激素的分泌。OT 与促性腺激素相互配合, 共同调节围绕卵母细胞的卵丘细胞微环境的功能状态。

(3) 催产素及其受体与有蹄动物黄体退化和妊娠识别

在有蹄类动物, 催产素对黄体退化有重要的调节作用。反刍类家畜黄体退化和妊娠识别是由子宫内膜上皮产生的 $\text{PGF}_2\alpha$ 、黄体分泌的催产素和胚胎分泌的干扰素 τ (interferon τ , $\text{INF}\tau$) 在雌激素和孕酮的调节下以旁分泌相互作用的结果。在绵羊等反刍动物中, OT 由黄体中的大黄体细胞产生并以分泌颗粒的形式储存在细胞质中, 在子宫阵发分泌的 $\text{PGF}_2\alpha$ 刺激下脉冲式释放。OT 又与子宫内膜上的 OT 受体结合。OT 受体通过 G 蛋白活化磷脂酶 C, 激活磷脂酰肌醇-蛋白激酶 C (PKC) 信号系统, 刺激子宫内膜分泌更多的 $\text{PGF}_2\alpha$, 二者形成一个正反馈环路, 使黄体迅速退化。

黄体退化的机制存在相当大的种间差异, 并无证据表明 OT 在啮齿类和其他动物中也发挥和在有蹄类动物同样的作用。

(4) 催产素与哺乳

催产素在射乳反射中发挥重要作用, 它可以在哺乳时使围绕乳腺腺泡的肌上皮细胞收缩, 射出乳汁, 这是一个典型的神经内分泌反射过程。OT 对自身释放具有正反馈效

应，当血中 OT 浓度达到一个阈值时便发生反射性射乳。垂体后叶在吮乳时以几分钟的间隔脉冲式大量释放 OT，此时血中催产素浓度可比基础水平高 10 倍，然后又迅速降解。OT 在哺乳过程中最重要且不能被其他途径所替代的功能，是在吮乳刺激下增加泌乳和排乳。

(5) 催产素的其他功能

OT 产生并作用于脑，可刺激雌性大鼠表现母性行为。另外，催产素在雄性生殖生理中的作用也不容忽视，它在大鼠、人、猪和牛的睾丸中都有局部产生，可参与雄激素合成和曲细精管收缩的局部调节。来自前列腺的 OT 可影响豚鼠、大鼠、人和犬的前列腺收缩，并影响大鼠和犬的前列腺生长。

4. 调节催产素分泌和释放的因素

催产素的分泌和释放受神经因素和体液因素的调节。刺激阴道和乳腺以及异性刺激，都可通过神经传导途径引起催产素的分泌和释放。雌激素对催产素的合成具有促进作用，对催产素的生物学作用具有协同作用。

5. 临床应用

催产素常用于促进分娩，治疗胎衣不下、子宫脱出、子宫出血和子宫内容物（如恶露、子宫积脓或干尸）的排出等。事先用雌激素处理，可增强子宫对催产素的敏感性。

三、垂 体 激 素

垂体中分泌激素的细胞主要分布于腺垂体。现已发现的垂体激素至少有 7 种，与生殖相关的主要有促卵泡激素、促黄体激素及催乳素。

(一) 促卵泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH)

促卵泡激素是由动物垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌的一种糖蛋白类促性腺激素，在动物（包括人类）的生殖过程中起重要作用。

1. FSH 的分子结构

FSH 分子中主要含有 4 类碳水化合物：己糖 (3.90%)、氨基己糖 (2.40%)、岩藻糖 (0.40%) 和唾液酸 (1.40%)，其分子质量在动物间存在种属差异，大致在 30 kDa 左右。FSH 是由两个非共价结合可解离的亚基所组成，称为 α 亚基和 β 亚基。 α 亚基由 92~96 个氨基酸组成（不同哺乳动物有所差异）； β 亚基由 109~115 个氨基酸组成。糖基是以 N-糖苷键的方式连结在 α 和 β 两个亚基各自的区域。在同一物种中， α 亚基是一致的，而 β 亚基是特异的。一般认为 α 亚基负责信号转导作用， β 亚基是功能亚基，参加受体结合。现经研究发现， α 、 β 亚基均参加受体结合与信号转导作用。

FSH- α 亚基基因由 3 个外显子和 3 个内含子组成。在不同物种中， α 亚基的氨基酸序列相对保守。FSH- β 亚基基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成，编码 110 多个氨基酸

的蛋白质。利用合成肽法,发现 β 亚基中与 α 亚基结合的区域为第11~25、51~65、101~110个氨基酸,与其受体的结合区域是第43~53、68~95个氨基酸。

2. 生物学作用

(1) 对雄性动物的作用

FSH对雄性动物的主要作用,是促进生精上皮发育和精子的形成。FSH可促进精细管的生长,促进生精上皮分裂,刺激精原细胞增殖,并在睾酮的协同作用下促进精子形成。此外FSH还可以促进睾丸的Sertoli细胞分泌雌激素和抑制素。

(2) 对雌性动物的作用

FSH对雌性动物的作用,主要是刺激卵泡生长和发育。实验证实,FSH能提高卵泡壁细胞的摄氧量,增加蛋白质合成,并对卵泡内膜细胞分化、颗粒细胞增生和卵泡液的分泌具有促进作用。FSH除对卵泡的生长发育有促进作用外,还可在促黄体素的作用下,刺激卵泡成熟及排卵。此外,FSH还能诱导颗粒细胞合成芳香化酶,催化睾酮转变成雌二醇,进而刺激子宫发育。体外研究证明,FSH可以明显地诱导获得减数分裂能力的卵母细胞恢复第一次减数分裂,促进卵母细胞生发泡的破裂和第一极体的排出。最近的研究表明,FSH可以诱导小鼠卵丘细胞分泌一种能够促进卵母细胞成熟的物质MAS (meiosis activating sterols),该物质可以在体外诱导卵母细胞克服抑制因素而主动恢复减数分裂。该物质已从人的卵泡液中和牛睾丸中提纯并已能人工合成,但它是否是卵母细胞成熟的生理性促进剂还有待于证明。

(3) 与LH的协同作用

在生理条件下,FSH与LH有协同作用。例如,给去垂体动物单独注射FSH时,卵泡并不能达到正常大小,也不分泌雌激素,在这种条件下的阴道、子宫和输卵管保持幼稚状态。给去垂体雄性大鼠单独注射FSH虽可刺激曲细精管发育,但对间质细胞无作用。这表明在生理状态下,LH对FSH的促卵泡发育和排卵作用有协同效应。然而在生产或临床应用中,由于正常动物体内含有LH以及FSH制品中含有大量LH(除FSH基因重组产品外),以致在使用FSH制剂的同时如果再加LH,会反面影响FSH的作用效果。由于以前的大量关于FSH和LH之间的协同作用都是由提纯的激素进行的,因此关于这两种激素之间真正的协同效应还有待于验证。

3. FSH受体及作用机制

FSH的生理功能是通过分布于性腺的特异性FSH受体所介导的。支持细胞(Sertoli cell)和颗粒细胞(granulosa cell)分别是FSH作用于睾丸和卵巢的主要靶细胞。对从牛睾丸中提纯的FSH受体的研究表明,FSH受体是一种由寡聚糖蛋白构成的膜受体,由二硫键连接的4个单体组成。FSH与受体的相互作用部分依赖于膜磷脂的存在,通过膜磷脂稳定蛋白构型和介导信号传递;同时也依赖于二硫键的组合,稳定受体构型。

FSH与卵泡颗粒细胞上的FSH特异受体结合后产生两种作用。一方面活化芳香化酶,另一方面诱导LH受体形成。内膜细胞在LH的作用下提供19碳底物——雄烯二酮或睾酮,这些底物通过基底膜进入颗粒细胞,活化的芳香化酶把它们转变为17- β 雌二醇。而卵泡内膜本身只能产生很少量的雌激素。雌激素协同FSH使颗粒细胞增生、

内膜细胞分化、卵泡液形成及卵泡腔扩大，从而使卵泡生长和发育。此外，FSH 还可以刺激大的有腔卵泡的颗粒细胞分泌抑制素，而后者反过来会抑制垂体 FSH 的分泌，这对于优势卵泡的选择具有重要意义。利用抑制素可以抑制 FSH 的释放，而 FSH 又是卵泡发育和卵母细胞成熟的关键激素。如果给动物注射抑制素的抗体，就可以导致动物内源性 FSH 释放，达到超数排卵的效果，这一点已在小鼠等动物中得到证实。

雄性动物曲细精管内的支持细胞也是 FSH 的靶细胞。FSH 对支持细胞的作用之一，就是刺激分泌一种雄激素结合蛋白 (androgen binding protein, ABP)。这种结合蛋白对睾酮有很强的亲和力，与睾酮结合，借以保持曲细精管腔内睾酮的高水平，从而在曲细精管内对精子发生起作用。FSH 对于包裹在支持细胞中的精子的释放也起作用。

Latham 等发现，在体外培养的与卵母细胞相关的颗粒层细胞 (oocyte-associated granulosa cells, OAGCs) 的分化受 FSH 和胰岛素的影响。培养的 OAGCs 在不添加 FSH 和胰岛素的情况下，不能合成许多蛋白质，最显著的效果是卵丘细胞中蛋白质的合成率与颗粒层内壁细胞相比减少了 1/4，所以卵丘细胞生长的表型被延迟了；若 OAGCs 用 FSH 处理，则蛋白质的合成率至少是卵丘细胞的 2 倍。Ferasin 等运用脑下垂体机能不足的 Snell 侏儒大鼠，在体内使用特定片段肽抗血清能增强羊 FSH 在体内的生物活性。从牛 FSH- β 亚基中选 5 个肽段，其中肽段 A (33~47) 和肽段 B (40~51) 在羊中产生的抗血清能够被¹²⁵I 标记的牛 FSH 所识别。由抗肽段 A、抗肽段 B 产生的抗血清，在 5 天的处理时间内可显著增强其生物活性。肽段 A 和肽段 B 被认为位于受体识别区内，这个部位可能影响与 FSH 有关的表型、结构或功能。起增强作用的抗肽段抗血清通过用肽段 A、肽段 B 免疫动物来取得，可将这些肽段制成疫苗用于增强 FSH 的功能。原癌基因 c-myc 在控制细胞增殖和分化过程中起重要作用。FSH 可以时间、剂量依赖性地诱导 c-myc mRNA 水平的增加。

4. 临床应用

临床上 FSH 主要用于以下六个方面：①用于治疗长期乏情或间情期过长；②用于治疗卵巢静止（但对卵巢幼稚无效）、卵泡发育中途停滞或两侧卵巢交替发育（结合使用 LH 可提高疗效）；③对多卵泡发育，FSH 能促使较大卵泡发育成熟，小卵泡闭锁；④对持久黄体能促使其萎缩，诱发卵巢中新卵泡生长；⑤胚胎移植时，一般与 LH 配合使用对供体作超数排卵处理；⑥对提高公畜精子密度有一定疗效。

(二) 促黄体激素 (luteinizing hormone, LH)

促黄体激素又称间质细胞刺激素 (interstitial cell stimulating hormone, ICSH)，与 FSH 一样，也是由动物垂体前叶嗜碱性细胞合成和分泌的一种糖蛋白类促性腺激素。

1. LH 的分子结构及 LH 受体

LH 的分子结构与 FSH 类似，分子质量大致也在 30kDa 左右，也是由 α 亚基和 β 亚基组成的异二聚体， α 亚基为促性腺激素所共有，而 β 亚基具有激素和种间特异性，是激素的特异亚单位，能与靶器官受体结合。基因分析表明，LH 的 α 亚基基因含有 4 个

外显子及 3 个不同大小的内含子，成熟的 mRNA 约含 730~800 个核苷酸；而 LH 的 β 亚基基因含有 3 个外显子及 2 个内含子，mRNA 约含 700 个核苷酸。

LH 的生理功能是通过分布于性腺细胞膜上的特异性促黄体激素受体所介导的。LH 受体为 G 蛋白偶联型受体，与其他 G 蛋白受体相同，LH 受体亦具有 7 个跨膜区，4 个胞质区以及由 3 个环状区和 N 端组成的细胞外区。研究发现，LH 受体分子质量为 75 kDa，含有 674 个氨基酸残基，其细胞外区中大约有 14 个不完全重复的富含亮氨酸序列，每一个序列大约含有 25 个氨基酸残基，其功能是负责结合 LH，因此该区域具有结合激素、与跨膜区发生反应并介导信号转导的特性；跨膜区具有结合 G 蛋白特性，而胞内区是发生磷酸化作用的部位。

2. 生物学作用

(1) LH 对腔前卵泡的影响

在卵泡发育的整个过程中，LH 发挥着重要的作用，但多数研究集中于后期的卵泡及排卵前期。事实上，LH 在前期卵泡发育中也有重要的作用。Flaw 等通过体内试验发现，LH 很可能对小卵泡的发育有积极影响。越来越多的研究结果表明，对于早期发育阶段的卵泡（从直径 85 μ m 至 150 μ m），在形成有腔卵泡的过程中，LH 的供应是必不可少的。这很可能是因为 LH 会诱导早期膜细胞的分化，从而对以后的卵泡及卵母细胞的发育是关键。利用小鼠胚胎卵巢体外培养技术，Wang 等发现 LH/hCG 可明显促进小卵泡的发育，而 FSH 在这方面的作用尚不明确。

(2) LH 对卵泡优势化的作用

研究发现，LH 在卵泡的选择发育上即卵泡优势化上起重要作用。但目前优势卵泡选择的机制仍不是很清楚，有可能与 FSH 分泌的减少及卵巢自分泌、旁分泌产生的调节因子有关，也有可能是多种因素协同作用的结果。

关于优势卵泡选择的研究在牛、羊等大家畜的研究较多。在大家畜中卵泡的选择发生在黄体期，即在 LH 刺激下黄体分泌孕酮的旺盛期。卵泡呈批次性的发育，但只有那些正在发育的卵泡正好碰到黄体开始溶解时期时，它才能最终发育成优势卵泡。从内分泌学的角度看，卵泡始动发育时正好处于促性腺激素高幅低频的波动性分泌期，而最终能够发育成大卵泡的时相正好与促性腺激素低幅高频的波动性分泌相吻合。目前认为卵泡能否发育成优势卵泡决定于血液中促性腺激素水平、卵泡体细胞中促性腺激素受体的水平以及卵泡体细胞激素本身的分泌水平等多方面因素。具体内容见卵泡发育及卵子发生一章。

(3) LH 诱发排卵

动物的排卵是一个十分复杂的过程，涉及卵泡的破裂及成熟卵母细胞的排出等一系列变化。其中，对排卵起关键作用的激素是 LH。优势卵泡确立以后，卵泡内的雌激素迅速增加，出现了雌二醇（estradiol, E_2 ）峰值，而且升高的 E_2 浓度会促进优势卵泡的生长。随着 E_2 峰值的出现，通过正反馈使 GnRH 刺激垂体释放 LH 的量增加，进而造成排卵前的 LH 脉冲频率增加。而在黄体退化以前， E_2 浓度及 LH 脉冲频率的升高却达不到卵泡期类型（follicular phase-type）频率，从而无法促成卵泡的最终成熟和排卵。因此高浓度的 E_2 和 LH 保证了优势卵泡的后期生长。黄体退化以后，LH 的脉冲频率进

一步升高，经过芳香化酶作用导致排卵前 E_2 浓度也进一步升高。这样在升高的 E_2 浓度和 LH 脉冲频率作用下，LH 开始对颗粒细胞进行调节，导致卵泡壁的终末分化，促使卵泡排卵。可见 LH 对诱发哺乳动物排卵有着重要作用。

(4) LH 在雄性动物中的作用

LH 可刺激睾丸间质细胞合成和分泌睾酮，这对附性腺的发育和精子最后形成起决定作用。

3. 临床应用

临床上 LH 主要用于治疗：①排卵障碍，即成熟卵泡排卵迟缓。②卵泡囊肿。③黄体发育不全引起的早期胚胎死亡，或早期习惯性流产。④母畜情期过短而久配不孕。⑤公畜性欲不强、精液和精子量少、隐睾等。

(三) FSH 与 LH 分泌的特点及调控因素

FSH 与 LH 在许多情况下平行分泌，但其合成、分泌的调控是一个复杂的过程。两种促性腺激素细胞对下丘脑促性腺激素释放激素脉冲分泌的幅度及频率变化具有不同的敏感性，对性腺类固醇激素（雌二醇和孕酮）、非甾体肽抑制素、激活素和卵泡抑素分泌环境具有不同的反馈应答，对垂体内激活素-卵泡抑素旁分泌/自分泌调节具有不同的依赖性，并且对下丘脑兴奋性氨基酸的刺激产生不同的反应，这些都说明这两种激素分泌的“不同步”性。虽然对促性腺激素细胞这种“不同步”分泌的机制尚不明确，但对输入至垂体促性腺激素细胞的不同信号影响着垂体促性腺激素转录、合成、储存方面已有所了解。

1. GnRH 对 FSH 和 LH 的不同调控

体内单独注射 GnRH，可引起血清 FSH、LH 水平升高，但 LH 峰值/基线值比率比 FSH 大，注射 GnRH 拮抗剂后，血中 LH 在几小时内迅速下降，而 FSH 则缓慢下降，下降曲线中有一高水平“平台期”。动态测定大鼠正常性周期中 GnRH、FSH 和 LH 水平发现，LH 易形成脉冲式变化，且常伴随 GnRH 脉冲出现，FSH 可有脉冲变化，但与 LH 脉冲不同步。以上体内、体外实验及自然性周期中的促性腺激素变化提示，垂体 LH/FSH 对 GnRH 的刺激有不同的反应。LH 对 GnRH 脉冲刺激敏感，FSH 则较少受 GnRH 脉冲的影响。这些现象可能是因为 LH 在血循环中的清除较 FSH 快。FSH 可能不依赖于 GnRH 调节，其分泌机制不同于其合成过程。FSH 分泌可能是“固有、内在”的，且很少受 GnRH 调控，垂体局部产生的因子激活素可使 FSH 持续分泌，激活素可能是 FSH 合成与分泌必需的“内在”信号，说明 FSH 的合成与分泌机制很复杂。

2. 调控 FSH/ LH 分泌的其他下丘脑因子

下丘脑肽类物质如甘丙肽、P 物质、神经肽 Y 在体外实验中均能增强 GnRH 促进垂体 LH 和 FSH 分泌的反应，但对 LH 作用比 FSH 强。

3. 性腺激素反馈和垂体内反馈环路

一般来说，促性腺激素分泌的波动性在卵泡期增加，而在黄体期降低。具体表现是，雌激素升高可降低促性腺激素分泌的波幅而增加波的频率，而孕酮含量升高则主要降低促性腺激素分泌波的频率但增加波的幅度。这说明在卵泡期，波的频率增加是由于孕酮的缺失，而波幅的降低是由于雌激素的出现。这种频率增加而波幅下降相结合的特征对于发育中的有腔卵泡最后发育成优势卵泡是非常重要的。

下丘脑和腺垂体对持续升高的雌激素分泌发生的反应是，促使促性腺激素分泌增加，这种关系是正反馈关系。在有腔卵泡最后发育阶段的一天或几天内，雌激素突然持久性地分泌增加，通过增加 GnRH 波动性释放的频率来促进促性腺激素分泌的增加。从本质上讲，促性腺激素波动性释放的频率克服了其代谢清除率。促性腺激素峰的目的是诱导卵泡内的变化，导致卵泡破裂排卵。促性腺激素峰的持续时间相对较短（一般 12~24h），这可能是由于随着卵泡对促性腺激素排卵前峰的反应，卵泡中雌激素的浓度下降。可见这种始动卵泡排卵的特殊生理机制是有反馈性的，因为卵泡能够将自己的成熟状态通过雌激素信号传递给下丘脑和腺垂体，随着卵泡的成熟，雌激素的生成量增加。

在非排卵期，促性腺激素的分泌受卵巢性激素（雌激素和孕酮）的负反馈调节。特别是雌激素能够负反馈抑制促性腺激素的分泌，这是因为在雌激素低浓度时，负反馈机制敏感。在卵巢摘除后，由于雌激素的抑制作用被清除了，促性腺激素浓度大幅度增

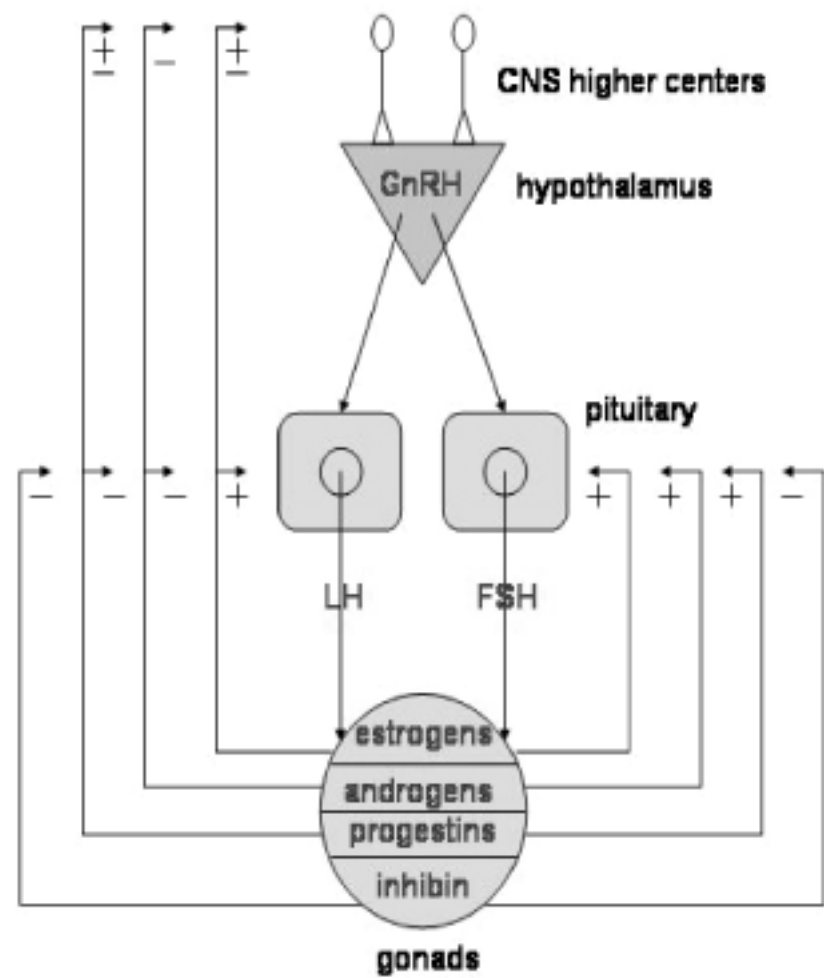


图 12-6 性腺激素对 GnRH、LH 和 FSH 分泌的作用
(引自《HORMONES》)

加。孕酮对促性腺激素波动频率的影响，一般认为发生在下丘脑水平，而雌激素则通过影响垂体和下丘脑两个水平来影响促性腺激素的分泌。尽管这些激素作用的部位有种间差异，但似乎下丘脑中孕酮和雌激素对促性腺激素分泌的负反馈作用的位点是在正中隆起正上方的弓状核。促性腺激素释放的正反馈调节中枢位于下丘脑前部的视前区（图 12-6）。

在雄性动物中，促性腺激素分泌的控制与雌性的相似（图 12-7）。下丘脑 GnRH 的波动性释放影响促性腺激素的波动性分泌。后者反过来引起睾丸中睾酮的波动性分泌。性别之间的一个主要差异是雄性中不存在雌性那样的促性腺激素的正反馈释放。精子在导管系统中不断地生成和排出。这一过程不需要促性腺激素峰的出现。

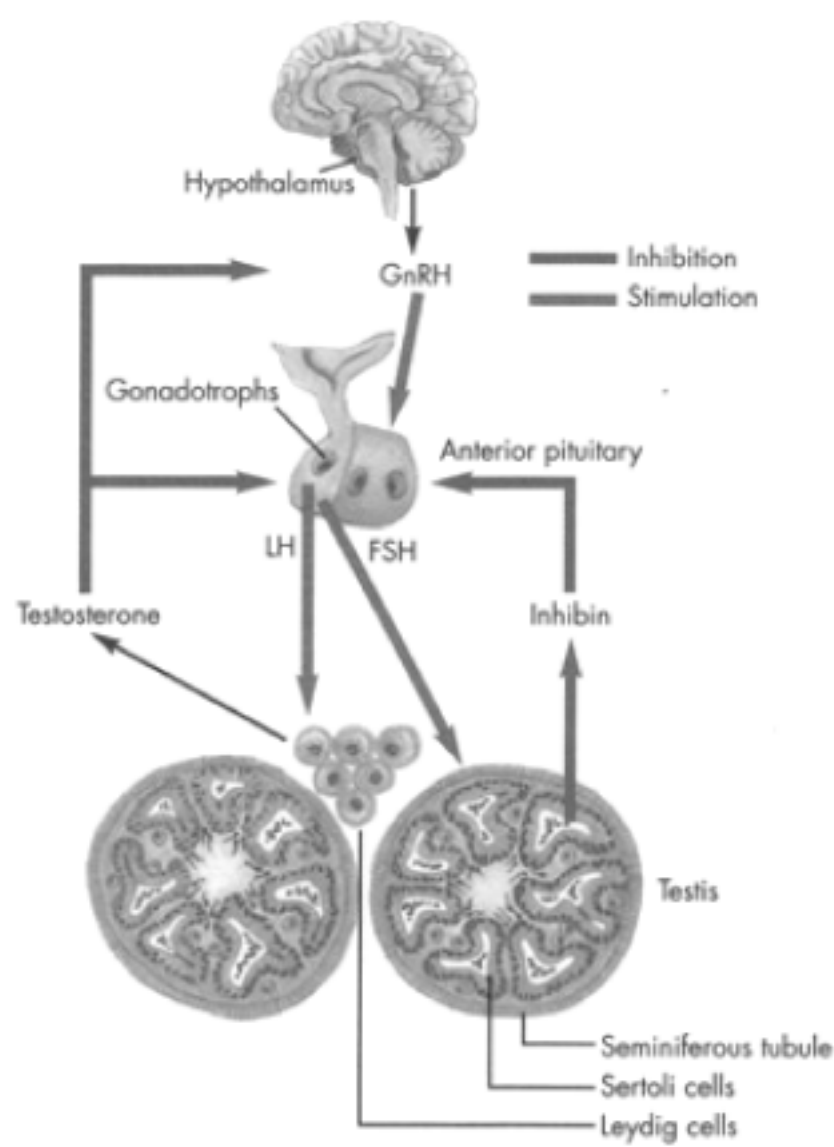


图 12-7 下丘脑-垂体-睾丸轴内分泌调节示意图
(引自 Home Fertility Network)

性甾体激素能较大幅度减少血液中 LH 浓度，但较少抑制 FSH 分泌。而非甾体激素激活素和抑制素的正、负反馈作用仅限于血 FSH、垂体 FSH 及 FSH β 亚单位的 mRNA 水平。抑制素和激活素同属转化生长因子- β (transforming growth hormone- β , TGF- β) 球蛋白超家族成员。抑制素为一个 A 亚单位 (18 kDa) 和一个 BA 或 BB 亚单位 (14 kDa) 通过二硫键连接的异二聚体，而激活素为 2 个 B 亚单位组成的同二聚体，二者均可从卵巢卵泡液中分离出来，在许多动物的卵巢和睾丸中均有抑制素、激活素三种亚单位 mRNA 表达。单侧性腺切除的大鼠，其抑制素下降，血清 FSH 增高而 LH 不

变，提示抑制素下降引起单一 FSH 分泌。卵巢产生的卵泡抑素（不属于 TGF 超家族成员）与激活素结合后抑制激活素本身活性，因而协助抑制素抑制 FSH 的分泌。垂体前叶也有激活素亚单位 mRNA 及卵泡抑素 mRNA 表达，在垂体内发挥局部旁分泌信号作用（和性腺内作用机制一致）。抑制素和激活素均选择性作用于 FSH 的分泌，独立调控着 FSH 的表达及作用。

另外，促性腺激素细胞分泌的激活素及结合蛋白卵泡抑素可通过其受体调节 FSH 分泌，构成垂体内局部反馈环路；亦可通过卵巢颗粒细胞膜激活素受体以旁分泌/自分泌方式改变激活素结合蛋白卵泡抑素的分泌比率来调控 FSH 合成与分泌，而不影响 LH。

因此，垂体局部调节环路中激活素/卵泡抑素与外周性腺雌激素、孕酮、抑制素的长环（loop）反馈信号一起构成调控网络，分别以旁分泌/自分泌、正、负反馈方式共同专一地调控垂体 FSH 的合成与分泌，而不影响 LH 的分泌。

4. 影响 FSH/ LH 不同分泌的其他因子

LH 和 FSH 分泌有性别差异。用纯化抑制素单克隆抗体进行免疫组化研究发现，新生大鼠睾丸中有抑制素 A、BB 亚单位，主要在 Sertoli 细胞表达，Leydig 细胞内亦有少量表达。但成年雄鼠血循环中几乎测不到抑制素，其 FSH 值明显高于成年雌性大鼠。给予成年雄鼠抑制素抗血清，血清 FSH 水平亦不增加。这说明睾酮有降低抑制素而升高 FSH 水平的作用。

研究表明，应激状态时，LH/ FSH 分泌情况不同，FSH 表达与分泌增加，而 LH 分泌往往受到抑制。

季节、光照等环境变化或交配活动等外界刺激可通过神经系统，调节下丘脑 GnRH 的分泌，进而影响促性腺激素的分泌。仓鼠从短（非繁殖期）转到长（繁殖期）的光周期（photoperiod）时，血清 FSH 上升先于 LH 出现，此时出现低频的 GnRH 脉冲。这与 LH 分泌较 FSH 分泌更依赖于 GnRH 刺激的观点不一致。对该现象的解释，一种原因可能是动物在长的光周期情况下，低频的 GnRH 脉冲刺激适于 FSH 的分泌；高频的 GnRH 脉冲刺激则适于 LH 的分泌。另一种原因可能由于抑制素负反馈的选择性下降或激活素旁分泌途径激活所致。因配子的形成较性激素合成需较长时间，故选择性促进 FSH 升高利于配子的优先形成。

（四）催乳素（prolactin, PRL）

催乳素又名促乳素，是垂体前叶嗜酸细胞（在妊娠子宫蜕膜和免疫细胞等也分泌）分泌的一种具有广泛生理功能的肽类激素，通过垂体门脉系统进入血液循环，影响生殖活动的许多环节。有的学者把它称为促性腺激素中的第三种促性腺激素，主要是对哺乳动物的乳腺发育和泌乳起作用，此外对有些动物的黄体维持、性行为的变化起调节作用。

1. PRL 的化学特性

目前已发现，两栖类、硬骨鱼类、哺乳动物都存在 PRL。哺乳动物 PRL 为 199 个（人为 198 个）氨基酸残基组成的单链蛋白质。PRL 分子内有三个二硫键（—S—S—），等电点 pH 为 5.7~5.8 或 6.5（人）。动物种类不同，PRL 分子结构也有差异。

2. PRL 受体类型及作用机制

PRL 与受体结合引起广泛的生物学效应。PRL 受体（PRLR）分布极为广泛，这是 PRL 在体内具广泛的调节作用的基础。PRLR 属于细胞因子受体超家族，在小鼠、大鼠等啮齿类动物，受体类型基本分为长型和短型两大类，均为跨膜蛋白，其细胞外构型相同，而细胞内部分则存在长度和氨基酸序列的差异，提示其分别通过不同的机制引起生物学效应；哺乳动物和禽类 PRL 受体结构的不同之处在于哺乳动物只有 1 个胞外配体结合区，而禽类则具有 2 个重复单位的配体结合区。对人类 PRLR 的研究发现其在作用机制上类似于大鼠等的长型受体，都是通过 JAK-STAT 途径发生作用。在妊娠大鼠的黄体中，PRL 长型和短型受体都有表达，长型受体的表达量要多于短型受体。在以往的研究中，PRL 与长型受体结合后，是通过 Janus 激酶-2（JAK2）或信号转导和转录激活因子 5（STAT5）起作用，而最近的实验研究证实，在大鼠黄体中这两种作用都存在。PRL 与长型受体结合后，导致受体二聚体化，激活与 PRL 关联细胞浆的 JAK2 磷酸化，或使 STAT1/ STAT5 磷酸化，激活的蛋白移位到细胞核内，启动一些目标基因的转录，如 β -酪蛋白、 β -乳球蛋白、 α_2 巨球蛋白、干扰素调节因子-1 等，这些蛋白因子介导 PRL 的促黄体细胞分化和其他作用。

但 JAK-STAT 途径并非 PRL 与受体作用引发效应的惟一途径。1997 年研究人员发现，以酪氨酸激酶抑制剂抑制 JAK2 的活性并不能影响 PRL 对 20 α -羟类固醇脱氢酶基因的调节，提示在大鼠黄体存在其他激酶系统或 PRL 信号转导途径。Duan 于 1996 年在其实验中发现并克隆了一种大鼠卵巢特异性磷酸蛋白——PRAP（PRLR receptor associated protein，催乳素受体相关蛋白）。PRAP 是一种 32kDa 的蛋白，在包括人类在内的多种动物中，主要在卵巢的大黄体细胞上大量表达，PRAP 与 JAK2 不同之处在于 PRAP 只是特异性地与 PRL 短型受体结合，而 JAK2 与两种受体均结合。PRAP 与 PRL 短型受体结合可增加 PRL 与受体的亲和力，关于 PRAP 的具体作用，现尚不明确，推测 PRAP 分子有一个类似于 JAK2 的酪氨酸磷酸化部位，从而介导 PRL 与其短型受体结合后的信号传递过程。

3. 生物学功能

(1) 对乳腺发育及泌乳的作用

PRL 的主要作用是刺激乳腺发育和促进泌乳。PRL 与雌激素和生长激素协同促进乳腺腺管系统增长；与孕酮协同促进乳腺腺泡系统发育；与皮质类固醇一起则可激发和维持完成发育的乳腺泌乳。

(2) 对卵巢功能的调节

在大鼠等啮齿类动物的卵巢上均有 PRLR 的表达。研究表明，PRL 对卵巢生理、

维持妊娠具有直接的调控作用。Yuan 等研究发现, PRL 对表面有生长激素 (GH) 受体表达的大黄体细胞的孕酮生成有促进作用, 表面有 LH 受体表达的小黄体细胞对 PRL 无反应, 且激素之间可产生协同作用, 促进黄体发育, 提高孕酮分泌。相关实验证明, 正常水平的 PRL 对维持啮齿类动物的黄体功能是必需的。在哺乳动物中, 绵羊是目前发现的惟一一种其黄体维持也受 PRL 调节的动物。

(3) 对妊娠维持的影响

以前认为, PRL 仅为子宫内膜蜕膜化的一种特异性标记物, 并不参与内分泌调节或在调节中不起重要作用, 这种观点正在被越来越多的实验结果所动摇。动物实验发现, 在孕早期蜕膜上 PRL 及 PRLR 都有丰富的表达, PRL 可刺激妊娠黄体 LH/CG 受体的表达, 促进自身受体的表达, 可以与 FSH、LH 协同作用优化 cAMP 和孕酮的合成, 提示 PRL 可能通过自分泌/旁分泌机制调节蜕膜局部环境及机体内分泌状态。

(4) 其他方面

PRL 可增强某些动物的繁殖行为, 增强雌性动物的母性, 如禽类的抱窝性, 鸟类的反哺行为等。在家兔, 还与产仔前脱毛和造窝有关。对鸟类, 可促进鸽子的嗉囊发育, 并分泌哺喂雏鸽的嗉囊乳。在雄性个体, 可能具有维持睾酮分泌的作用, 并与雄激素协同, 刺激附性腺的分泌, 以及维持性欲。在人类临床上有一种高催乳素血症的病人, 其性欲降低, 并无生殖能力。

4. 影响 PRL 分泌的因素

尽管催乳素的分泌是波动性分泌, 但其分泌的调节主要是抑制性的。这一概念有下述事实支持。即如果切断垂体柄, 或将垂体移植到其他部位 (如肾囊中), 或将垂体与下丘脑之间的联系切断, 则 PRL 分泌增加。这一现象引起了人们对抑制 PRL 分泌因素的兴趣。现已证明下丘脑腹侧产生的多巴胺是 PRL 分泌的强有力抑制物。其他抑制 PRL 分泌的因素包括 γ -氨基丁酸和促性腺激素释放激素相关肽 (GAP)。多巴胺的激动剂, 如溴隐亭可以用来抑制 PRL 的分泌, 用于治疗高 PRL 血症的病人。对垂体 PRL 分泌有促进作用的因子有促甲状腺激素释放激素 (thyrotropin releasing hormone, TRH)、雌激素及血管活性肠肽 (VIP) 等。最早知道的 PRL 释放因子之一是 TRH, 尽管在垂体 PRL 分泌细胞上发现有 TRH 受体, 但 TRH 和 PRL 分泌之间的生理关系还不清楚。VIP 是另一个强有力的 PRL 分泌的刺激物, 其作用机理是通过抑制下丘脑中多巴胺的合成而促进 PRL 的分泌。另外, 雌激素对 PRL 的分泌也有促进作用, 这是通过降低垂体 PRL 细胞对多巴胺的敏感性和增加 PRL 细胞上 TRH 受体的数量实现的。

对蜕膜 PRL 分泌影响最大的激素为孕酮, 已知增生期的子宫内膜不产生 PRL, 只有从分泌中期开始, 在孕酮的持续刺激下, 内膜 PRL 产量才会持续上升, 孕酮的促 PRL 作用可能是通过激活蜕膜细胞内的腺苷酸环化酶, 进而引起 cAMP 信号传递的级联效应所介导的。另外, 内膜间质细胞产生的非结合性 hCG- α 亚单位亦起协助作用, 而一些免疫因子, 如 IL-2, 则抑制蜕膜 PRL 的合成和分泌。

四、松果体激素

松果体 (pineal body) 是人及动物体内的神经内分泌器官, 源自神经外胚层, 位于间脑顶部, 缰连合与后连合之间, 四叠体上方的凹陷内, 故又名脑上体 (epiphysis cerebri)。通过柄与基部相连, 其顶部朝向后方。第三脑室顶部部分伸入柄内形成松果体隐窝 (pineal recess), 将松果体柄分为上板层与下板层两部分。松果体外包结缔组织软脑膜, 并伸入腺体内构成支架。松果体有丰富的血管, 由左、右脉络膜后动脉分支的微动脉穿入松果体被膜, 行走于结缔组织之中, 然后形成毛细血管网, 经静脉汇集起来穿出被膜构成松果体奇静脉, 最终汇入大脑大静脉。松果体实质由松果体细胞和神经胶质细胞组成, 该腺体直接受颈交感神经支配, 分泌吲哚类和多肽类激素, 其中最重要的是褪黑激素。

(一) 褪黑激素 (melatonin, MLT) 的分布、生物合成及代谢

MLT 是由美国皮肤病学家 Lerner 于 1958 年从肉牛松果体中首次分离得到的一种吲哚类激素。应用 MLT 饲喂两栖类动物, 可使黑色素细胞凝集, 从而使皮肤褪色, 故而得名。它在多个物种的多种组织中广泛存在, 参与生物的昼夜节律和视网膜信号的调节, 以及季节性繁殖哺乳动物的生殖调控等多种生理功能的调节。

MLT 是一种小分子脂溶性物质, 分子质量 232Da, 化学结构是 N-乙酰-5-甲氧色胺。

MLT 存在于脑脊髓液和外围血液中, 其分布以下丘脑含量最高, 中脑、小脑和桥脑次之, 脑端含量最低。从动物全身来说, MLT 储存最多的器官是松果体, 其次是下丘脑、肾上腺、垂体前叶、性腺和生殖器官, 因此它很可能在中枢神经系统和外围组织中均发挥作用。

MLT 主要是由松果体合成的, 其他合成部位还有视网膜、眼眶腔的副泪腺、唾液腺、肠的嗜铬细胞及红细胞。松果体细胞合成 MLT 的过程如下: ①色氨酸在色氨酸羟化酶 (TPH) 的作用下转变成 5-羟基色氨酸; ②5-羟基色氨酸脱羧酶 (5-HT-POC) 催化成 5-羟色氨酸; ③在 5-羟色胺-N-乙酰转移酶 (NAT) 和羟基吲哚氧位甲基转移酶 (HIMOT) 的作用下, 5-羟色胺经 N-乙酰羟色胺转变成褪黑激素 (N-乙酰-5-甲氧基色胺)。在 5-羟色胺 (5-HT) 转变成褪黑激素过程中, 需要 NAT 和 HIMOT 这 2 种酶的作用, 前者使 5-HT 氨基乙酰化, 后者使吲哚环羟基甲基化。在此过程中, 交感神经影响着 NAT 的活力。HIMOT 是全部合成过程中的关键酶。

褪黑激素进入血液循环并经脉络膜浓缩后分泌进入脑脊液, 与血浆蛋白结合的褪黑激素被一些组织摄取, 并在肝脏和其他器官中代谢。

(二) 褪黑激素合成、分泌的节律变化和调节机制

5-羟色胺的浓度白天高, 夜晚低; 而 MLT 浓度白天低, 夜晚高。松果体内吲哚类

物质的转换是由光照周期调控的, MLT 的浓度夜间升高是由 NAT 的活性上升引起的, NAT 是 MLT 合成的一个限速酶。HIMOT 的活性控制夜间 MLT 升高的程度, 该酶在动物松果体中浓度最高。目前所知对于哺乳动物来说, 光照信息是通过下述途径到达松果体的: 光照→视网膜→视交叉→视交叉上核 (SCN) →下丘脑室周区和结节区→经后脑顶盖背侧→脊髓的胸段→脊髓节前交感神经束→颈上神经节→节后交感神经纤维→松果体的实质细胞。节后神经末梢释放的去甲肾上腺素 (NE) 通过渗透方式作用到松果体细胞。可见, 光照对松果体合成 MLT 的调控作用一方面是抑制作用, 即对 NAT 活性的抑制; 另一方面是使松果体节律同环境昼夜节律同步化, 即夜间高于白昼。自然条件下, 午夜 12 时至凌晨 2 时 MLT 合成达到高峰, 随后逐渐减少, 至中午 12 时达到最低点。支配松果体的交感神经末梢分泌的去甲肾上腺素, 作用于松果体腺细胞膜上的 α_1 、 β_1 受体, 导致 N-乙酰转移酶 (NAT) 激活和 MLT 增加。在松果体信息传导过程中, 环核苷酸起着十分重要的作用。cAMP 能诱导激活 NAT, 使 5-羟色胺转变为 MLT 的前体物质——N-乙酰-5-羟色胺, 从而使 MLT 合成增多。

(三) 褪黑激素受体的结构、功能及调控

褪黑激素通过与其高亲和性 G 蛋白偶联受体的结合来发挥其生物学功能。褪黑激素受体 (melatonin receptor), 属于 G 蛋白偶联受体家族, 和其他的 G 蛋白偶联受体一样, 基本结构由 7 个跨膜区构成。第 2 胞质环含有两个蛋白激酶 C 磷酸化的敏感位点, 可能与受体的调控有关; 而 C-端的几个丝氨酸残基也可能是磷酸化的位点。根据 MLT 受体与¹²⁵I-MLT 结合的药理和动力学特性, 可将它们分为高亲和性的 MLT1 型受体和低亲和性的 MLT2 型受体。根据蛋白质同源性, 又可将 MLT1 型受体分为 MLT1a、MLT1b、MLT1c 三种亚型。MLT1a 多分布于下丘脑的上交叉核 (supra chiasmatic nucleus, SCN) 及垂体结节部, 其 N-端含有两个糖基化位点。各种来源的 MLT1a 受体之间氨基酸水平同源性高达 80% 以上。MLT1b 受体基因多在视网膜中表达, 其 N-端含有一个糖基化位点, 与 MLT1a 受体在氨基酸水平的同源性约为 60%。MLT1c 受体与前两种受体相比, C-端多了 66 个氨基酸残基, 氨基酸水平的同源性为 60%, 跨膜区的同源性则高达 77%。目前哺乳动物中尚未发现 MLT1c 型受体, 而对于绵羊等具有明显季节性繁殖特征的动物仅在垂体结节部发现 MLT1a 型受体, 提示垂体结节部可能是褪黑激素繁殖效应的作用位点。

处于不同发育阶段的动物体内, MLT 受体有着不同程度的表达并伴有生理活性的变化。新生鼠脑和垂体中的受体含量较高, 30 天以后就大为降低, 成熟期有所升高, 至老年又有降低。类固醇也可以对 MLT 受体进行调控。在大鼠脑中, 类固醇通过影响 MLT 受体的表达而影响动物对光照周期的敏感性, 并能够降低脑中的 MLT 受体的密度。雌性哺乳动物体内甾类激素水平的周期性波动亦能明显地改变 MLT 受体与配体的结合特性。MLT 受体的密度与 MLT 的血液含量之间存在着类似于下调机制的内在联系, 且 MLT 对其受体的这种调控作用会因为 MLT 的消失而得以恢复。由于 MLT 的合成与分泌受到昼夜节律的调节, 因此, 体内 MLT 受体的密度也会由此而发生规律性的变化。

(四) MLT 的生理功能与作用机制

MLT 可通过下丘脑-垂体-性腺 (HPG) 轴, 在下丘脑水平上调节促性腺激素的分泌, 进而影响生殖系统功能, 也能与卵巢、睾丸及肾上腺细胞上的 β -肾上腺受体结合, 直接调节促性腺激素如 LH、PRL、FSH 等的合成和分泌。

1. 下丘脑

下丘脑作为性腺轴最高级的神经控制中枢, 理应是 MLT 控制动物繁殖的位点。以季节性发情的动物绵羊为例, 在繁殖季节, 下丘脑 GnRH 分泌的高频脉冲诱导的神经内分泌变化导致卵巢排卵的基础性步骤。在不同季节, 下丘脑 GnRH 分泌的脉冲频率是不同的, 这主要是因为日照变化引起 MLT 分泌模式的改变, 从而导致 GnRH 神经元对 E_2 的负反馈敏感性下降。在下丘脑中, 下丘脑前乳头区和室旁核存在褪黑激素受体。

2. 垂体

MLT 可直接抑制仓鼠垂体前叶中 FSH 和 LH 的释放, 表明 MLT 可直接作用于垂体。研究发现, 在一定范围内, MLT 不但可抑制促甲状腺素释放激素 (TRH) 刺激催乳素 (PRL) 基因表达效应, 还可直接抑制垂体前叶细胞中 PRL 基因的表达。

MLT 作用于垂体, 主要是通过调节 E_2 对垂体的负反馈, 来间接影响 FSH 和 LH 的分泌。 E_2 抑制垂体的效果最明显, 能很大程度上减少 GnRH 引起的 LH 分泌。但是, 雌二醇对下丘脑和垂体的抑制作用有两相性。在乏情期, 雌二醇对下丘脑和垂体的抑制作用强; 在发情期, 雌二醇的抑制作用变弱。褪黑激素参与调节雌二醇的两相性反馈调节作用。

3. 性腺

MLT 除了通过下丘脑和垂体间接影响性腺, 还能直接作用于性腺调节生殖。MLT 可直接影响动物的生精过程。体外实验表明, MLT 能改变生精细胞的形态和影响睾丸组织细胞 cAMP 的合成。Shiu 发现 MLT 可能通过与 G 蛋白偶联的受体, 直接影响大鼠附睾的形态和生殖功能。去势后, 附睾内 MLT 受体减少, 补充外源性睾酮可以增加 MLT 受体数量。MLT 处理可以引起前列腺变小和附性腺萎缩。睾酮和雌二醇可以减弱 MLT 对前列腺细胞的抑制作用。

MLT 能改变黄体细胞和卵泡颗粒细胞的细胞形态。MLT 可以调节子宫内膜血管的通透性和子宫内膜的脱落。在鼠乳腺细胞和乳腺肿瘤细胞中都发现有 MLT 受体, 乳腺 MLT 受体随着昼夜时间、日龄、生殖周期、怀孕和泌乳而变化。此外, MLT 可刺激牛和小鼠卵母细胞减数分裂的恢复和成熟。一定剂量的 MLT 对孕酮分泌有抑制作用, MLT 是黄体功能潜在的调节因子。

MLT 对性腺的直接抑制可能是 MLT 与性腺细胞膜上的与腺苷酸环化酶偶联的受体结合, 通过调节环核苷酸的含量对性腺起作用。在睾丸组织的培养液中加入 MLT 可增加 cGMP 的产量。

第二节 性腺激素

由性腺（睾丸和卵巢）产生和分泌的激素统称为性腺激素。卵巢所产生的主要是雌激素、孕酮、松弛素、抑制素和激活素；睾丸所产生的主要是雄激素，以睾酮为主。它们虽然主要分别影响雌性和雄性，但实际上雌雄两性体内均分别存在着浓度不同的雄性激素与雌性激素。此外，这些激素还可以来自胎盘，肾上腺皮质也可产生少量的雌激素、孕酮及睾酮。它们在化学上属环戊烷多氢菲的衍生物，按其化学本质可分为两大类，即性腺类固醇激素和性腺含氮激素。

一、性腺的类固醇类激素

类固醇激素又称为甾体激素，属于脂类化合物，它们的基本结构为“环戊烷多氢菲”核，即甾环，由 A、B、C 和 D 四个环构成，前三个环构成菲，后一个环即环戊烷，因其结构与胆固醇相似，故称为类固醇激素。几种主要性腺激素的化学结构式如图12-8所示。

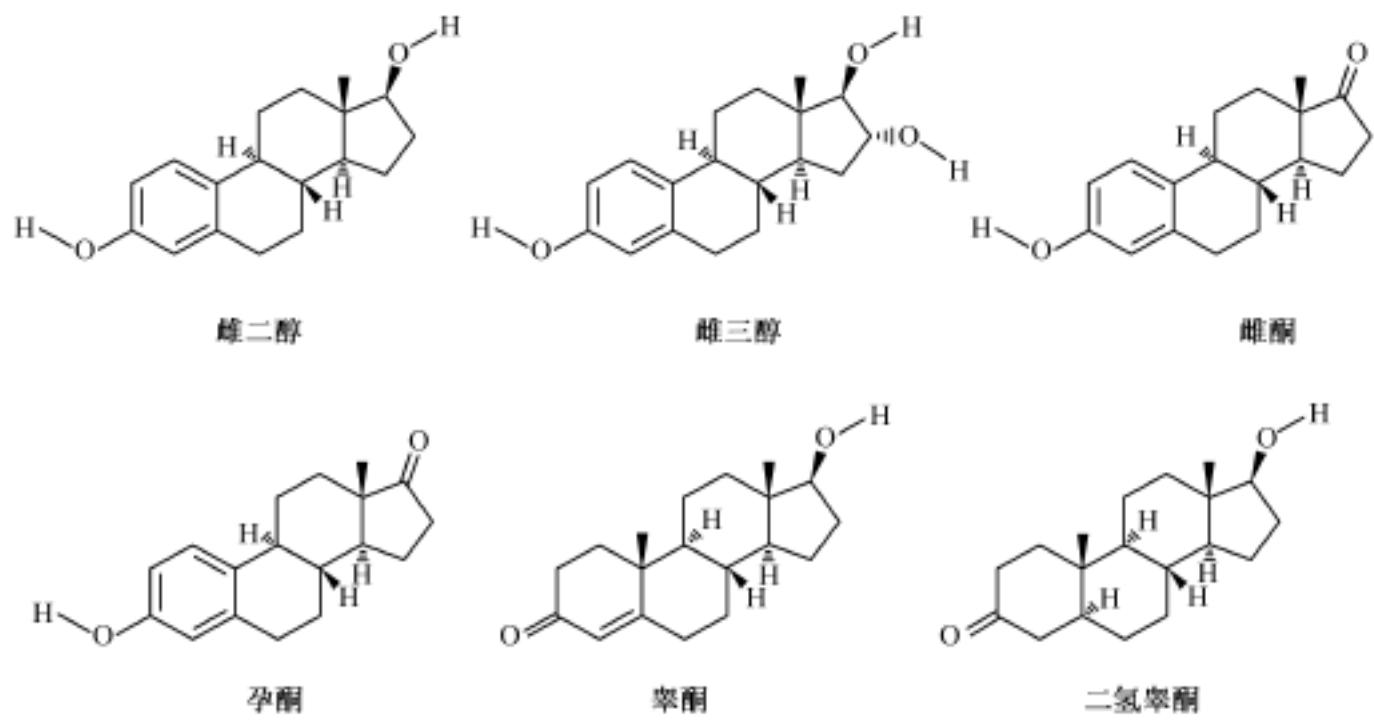


图 12-8 几种主要性腺激素的化学结构式

性腺类固醇类激素的生物合成具有共同的途径，其直接前体都是由胆固醇衍化而成的孕烯醇酮，生成何种最终产物主要取决于腺体组织的细胞类型、酶系和调节因子等，其合成的大致过程如图 12-9 所示。

(一) 雌激素 (estrogen)

雌激素是一类化学结构相似，分子中含有 18 个碳原子的类固醇激素，是与动物繁殖有直接关系的生殖激素。动物体内雌激素主要来源于卵巢中发育卵泡的颗粒细胞，黄

2. 生理作用

(1) 对雌性动物的作用

雌激素在雌性动物各个生长发育阶段都有一定生理效应。在胚胎期，雌激素刺激并维持雌性动物生殖道的发育。如初情期前摘除卵巢，生殖道就不能发育；初情期后摘除卵巢，则生殖道退化。在初情期前，雌激素对下丘脑 GnRH 的分泌有抑制作用，使雌性动物产生并维持第二性征。在初情期，雌激素对下丘脑及垂体的生殖内分泌活动有促进作用。在发情周期，雌激素对卵巢、生殖道和下丘脑及垂体的生理功能都有调节作用，表现在：①刺激卵泡发育。②作用于中枢神经系统，诱导发情行为，可以使雌性动物出现性欲及性兴奋（在绵羊和牛中，还需孕激素的参与）。③刺激子宫和阴道腺上皮增生、角质化，并分泌稀薄黏液，为交配活动做准备。④刺激子宫和阴道平滑肌收缩，促进精子运行，有利于精子与卵子结合。在妊娠期，雌激素刺激乳腺泡和管状系统发育，并对分娩启动具有一定作用。在分娩期间，雌激素与催产素有协同作用，诱导前列腺素的分泌，刺激子宫平滑肌收缩，有利于分娩。在泌乳期间，雌激素与催乳素有协同作用，可促进乳腺发育和乳汁分泌。

(2) 对雄性动物的作用

雌激素对雄性动物的生殖活动主要表现为抑制效应。大剂量雌激素可引起雄性胚胎雌性化，并对雄性第二性征和性行为发育有抑制作用。即使是成年雄性动物，用大剂量雌激素处理也可影响性机能，如精液品质降低，乳腺发育并出现雌性行为特征。对某些动物，雌激素还可以使雄性睾丸萎缩，附性腺退化，精子生成减少，雄性特征消失。

3. 雌激素受体及其作用机制

雌激素通过其受体（estrogen receptor, ER）发挥作用是 Mueller 及其同事于 1957 年在观察雌激素在大鼠子宫内的代谢过程中发现并提出的。1984 年和 1993 年，Gorski 先后揭示了雌激素在细胞核内的作用及其激活雌激素应答基因转录的机制。1996 年第二个雌激素受体（ER β ）的发现使人们对雌激素的作用方式产生了全新的认识。雌激素不仅仅单纯通过 ER α 发挥作用，其发挥作用的过程是一个复杂的信号转导和转录调控过程。

此外，Pietrwo 和 Szego 于 1977 年首次发现质膜上有能对 17- β -雌二醇起快速反应的蛋白，即雌激素膜受体（mER），但该受体的结构和功能都不十分确定。这里主要介绍雌激素核受体 ER α 和 ER β 。

(1) 雌激素受体结构与功能的关系

ER α 和 ER β 都是由三个明显的结构域组成的调节蛋白，氨基端结构域（A/B）是最小的保守区域，该区域存在一个当雌二醇缺乏或选择性雌激素受体调节剂（SERMs）存在时也能激活基因转录的活性功能区（AF-1）。雌激素受体（ERs）的中央控制区包含两个位于调控基因启动子区域并能使之与特异性 DNA 序列结合的锌指基序。在该基序中，ER α 和 ER β 两种亚型的 DNA 结合区域（DBD）是基本相同的。羧基端结构域含有构成受体基本功能的配体结合域（LBD），该配体结合域包含与雌激素类化合物结合的口袋结构、雌激素受体二聚化及与辅调节蛋白交互作用的区域，此外，还包含受雌激

素约束的基因激活与应答功能区 (AF-2)，该配体结合域中氨基酸组成的不同是 ER α 和 ER β 亚型各自具有独特转录作用的关键，使得 ER α 和 ER β 具有不同的调节基因转录的活性，最终发挥不同的临床作用 (图 12-10)。研究发现，ER α 比 ER β 在激活基因转录上作用显著，而 ER β 在抑制基因转录上比 ER α 作用强，因此，推测 ER α 主要是作为基因转录的激动剂，而 ER β 主要是作为基因转录的抑制剂。

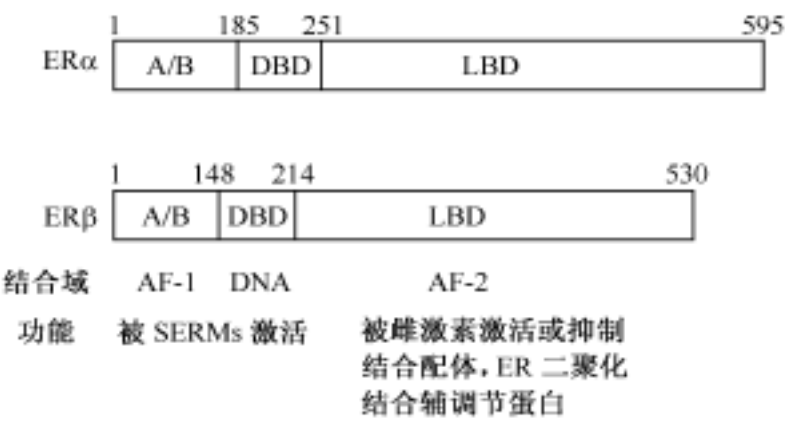


图 12-10 ER α 和 ER β 的结构 (修改自安胜军等)

雌激素受体是核受体超家族中的一种配体依赖的转录因子，可与多种具有某种特殊结构而化学性质表现多样性的物质结合，从而发挥一系列的生理功能。ER 的有效配体要求具有两个被刚性的疏水集团所分隔的羟基集团，且其中具有一个以上的酚羟基。ER 的二级结构包括 12 段 α 螺旋结构 (Helix, H1~H12)，H3、H6、H8、H11、H12 及 H7 和 H8 之间的无规则卷曲形成 ER 与配体结合的口袋，所有配体沿着 H3 和 H11 的方向进入这个口袋。配体与 ER 的结合是通过配体上的羟基与 ER 上特殊氨基酸之间形成氢键，以及配体的疏水区与口袋中的疏水氨基酸之间的疏水作用来完成的，氢键的形成在此过程中起着主要的作用。不同配体在 ER 容纳配体的口袋中占有的空间部位不同，会导致 ER 的构象发生不同的变化，从而使 ER 表现出激活或抑制状态。

(2) 雌激素受体在组织中的分布

在不同生殖器官及同一生殖器官的不同发育阶段，雌激素受体不同亚型的表达存在差别。ER α 和 ER β 在大鼠卵巢中表现出不同的分布，ER β 主要表达在卵泡的颗粒细胞中，但 ER α 在卵泡的颗粒细胞上不表达。子宫的所有主要细胞类型，包括上皮细胞、基质细胞及平滑肌细胞均可见 ER α 和 ER β 表达，但 ER α 的表达占优势。在卵巢发育过程中，雌激素受体的两种亚型的表达存在差异，ER β 的表达量与卵泡的发育及颗粒细胞数目的增多相一致，而在此期间 ER α 的表达则相对恒定。研究表明，ER α 主要在乳腺细胞及雌性生殖器官细胞的增殖和分化过程中起主要作用，ER β 在卵泡发育、骨骼发育和抑制细胞增殖方面发挥作用。

用免疫组织化学技术证明，在睾丸中也存在雌激素受体，并定位于 Leydig 细胞和部分肌样细胞的细胞核，但目前对睾丸中受 ER 调节的基因仍所知甚少。

此外，下丘脑和垂体中也分别存在雌激素受体，这是雌激素反馈调节促性腺激素分泌的基础。

(3) 雌激素的转录调节活性

雌激素受体是一种 DNA 结合蛋白，其信号转导的经典途径为雌激素进入细胞内，

转入细胞核后与其受体 ER α 或 ER β 结合，引起雌激素应答基因的转录激活。雌激素通过雌激素反应元件（estrogen response element, ERE）路径和 AP-1 路径激活或抑制基因转录，其中对前者的研究较为深入。雌激素-受体复合物与 ERE 的结合可使某些基因的转录增强，如可以增强输卵管的卵清蛋白基因转录；也可使一些基因的转录减弱，如可减弱垂体的 GnRH 基因的转录。ERE 路径至少有三个主要部分需要雌激素调节：ERs（ER α 和 ER β ）、靶基因上的启动子元件和辅调节蛋白（图 12-11）。雌二醇与 ER 结合后，引起 ER 构象发生改变，使原来与 ERs 结合的伴侣蛋白游离，暴露 ERs 的二聚化表面和 DNA 结合域（DBD），随后 ER 结合至基因启动子的 ERE 上。雌二醇与 ER 结合后改变了配体结合域（LBD）的构象，使其 AF-2 功能表面暴露，AF-2 表面是 ER 激活基因转录的主要功能区，辅调节蛋白还能支配蛋白乙酰基转移酶的活性，ERs 和辅调节蛋白在 ERE 上形成一个复合物，引起组蛋白乙酰基化结合到 DNA 上，从而改变了染色质的结构，使 ER-辅调节蛋白复合物在 ERE 和靶基因转录起始时被募集的基础转录蛋白之间形成一个桥。ER 本身在调节转录上并不活跃，靶基因转录活性的激活或抑制是通过辅调节蛋白介导的。

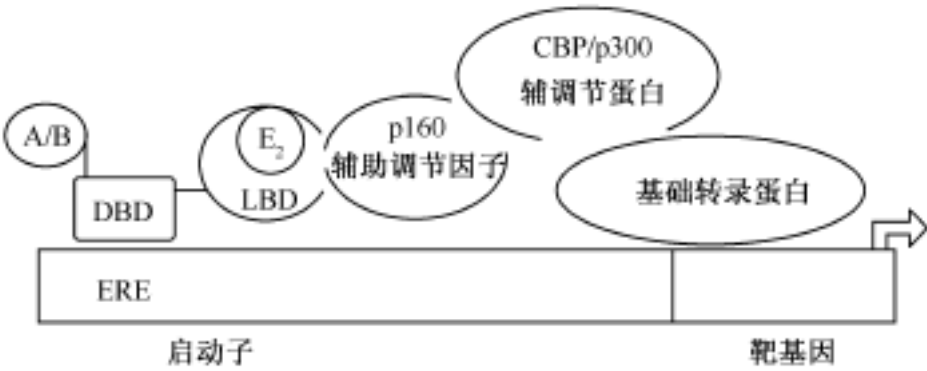


图 12-11 雌激素受体的转录激活机制（ERE 途径）（引自安胜军等）

4. 雌激素的临床应用

在临床上雌激素主要配合其他药物用于诱导发情、人工刺激泌乳、治疗胎盘滞留、人工流产等。尤其在猪中，由于雌激素具有促黄体溶解作用，所以用雌激素处理母猪后配合应用前列腺素，可以诱导母猪同期发情。在其他动物，雌激素单独应用虽可诱导发情，但一般不排卵。因此，用雌激素催情时，必须等到下一个情期才能配种。

（二）雄 激 素

雄激素主要由睾丸间质细胞分泌，肾上腺皮质、卵巢和胎盘也可分泌少量雄激素。雄激素种类很多，但由于动物体内雄激素的生物活性以睾酮最高，所以通常以睾酮为代表。

1. 合成与代谢

睾酮在体内的合成途径见图 12-9。睾酮一般不在体内存留，而很快被利用后分解，其降解产物主要为雄酮，通过尿液和粪便排出体外。在睾酮与雄酮代谢过程中，还衍生

出几种生物活性比睾酮弱的雄激素，即表雄酮 (epiandrosterone)、去氢表雄酮 (dehydroepiandrosterone) 和乙炔基睾酮 (ethinyltestosterone)。

血液中的雄激素约有 98% 与类固醇激素结合球蛋白结合，只有 2% 左右呈游离状态，进入靶细胞。

2. 雄激素的生理效应

雄激素在雄性个体发生、生长发育和生殖功能的各方面都起着必不可少的作用，诸如诱导性分化、第二性征的形成和维持、精子发生的起始和维持、雄性性欲的维持、垂体激素分泌的反馈调节等。在幼年时期阉割雄性动物，则其生殖器官趋于萎缩退化，附性器官消失。此外，雄激素对免疫系统以及其他方面都有广泛的作用。

对于生殖管道系统和外生殖器的发育来说，如果个体为雌性，即发育的性腺为卵巢，则副中肾管发育成输卵管、子宫、子宫颈和阴道，而中肾管退化，引起这两个管道变化的重要因素是睾酮。如果个体为雄性，则睾丸产生的 AMH (抗副中肾管激素) 引起中肾管发育，而副中肾管退化。在性腺外生殖器性别分化过程中， 5α -还原酶的出现对于雄激素的作用是非常重要的，因为睾酮必须在细胞内转化成二氢睾酮才能使组织发生雄性化。

外生殖器的发育是随着性腺发育的方向而发育的。如果个体在基因型 (或遗传型) 上是雌性的，则外生殖器组织折叠 (阴唇) 形成阴门和阴蒂。如果个体为雄性，睾丸的雄激素促进阴茎 (相对于雌性的阴蒂) 和阴囊 (相当于阴唇) 的发育。

个体性别分化的最终完成伴随着下丘脑的性别分化。下丘脑在出生前后接触到雄激素，可以引起下丘脑性中枢雄性化。如果没有雄激素，下丘脑性中枢将发育为周期性性中枢。

在整体情况下，雄激素对雌性动物的作用比较复杂。一方面，雄激素对雌激素有拮抗作用，可抑制雌激素引起的阴道上皮角质化。对于幼年动物，雄激素可引起雌性动物雄性化，表现为阴蒂过度生长，变成阴茎状，尤其在胚胎期给母畜应用雄激素，可使雌性胚胎失去生殖能力。另一方面，雄激素对维持雌性动物的性欲和第二性征的发育具有重要作用。此外，雄激素还通过为雌激素生物合成提供原料，提高雌激素的生物活性。雄激素还有促进红细胞生成和促进骨骼肌增生的作用。

3. 雄激素受体与作用机制

雄激素的生物活性是由其细胞内受体 (核受体) 所介导的。像其他所有甾体激素受体一样，雄激素受体也是一种转录因子，它一旦被雄激素激活便能识别靶因子上专一的 DNA 序列并与之结合，从而调控该基因的转录，继而发挥其调节生殖、免疫和内分泌系统等作用。

(1) 雄激素受体的结构和功能

雄激素受体是类固醇激素受体家族的一个成员，其基因由 8 个外显子组成，编码的雄激素受体是一种核蛋白，由 900 多个氨基酸组成。雄激素受体的基因及蛋白质的结构特征如图 12-12 所示。外显子 1 最大，编码受体的 N 端，N 端的残基最不保守。结构分析表明，N 端结构域与雄激素受体的转录激活有关。这个区域包含两种多聚体——多聚

谷氨酸和多聚脯氨酸。多聚氨基酸结构被认为在转录激活方面起重要作用。外显子 2 和 3 编码雄激素受体的 DNA 结合结构域 (DBD)，该结构域高度保守，由 68 个氨基酸组成，能折叠成两个锌指结构。外显子 4 至 8 编码受体的铰链区和配体结合结构域 (LBD)，该区域起着形成二聚体和结合配体的作用。

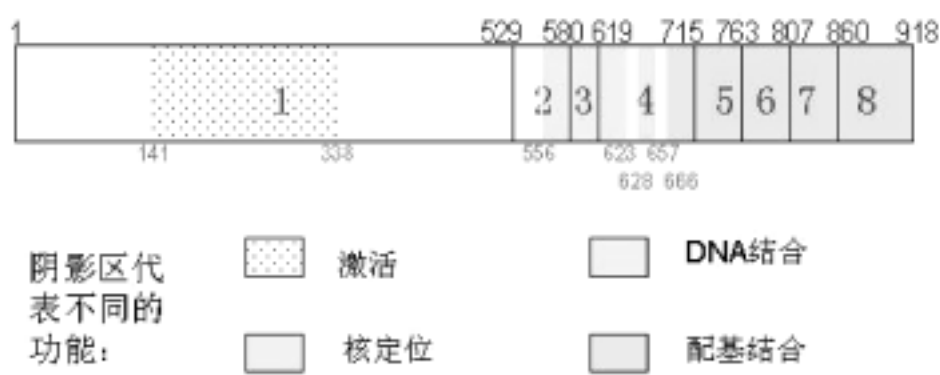


图 12-12 雄激素受体结构功能示意图

(2) 雄激素受体的组织分布

雄激素受体在动物组织中分布很广，除了前列腺、精囊腺、睾丸、附睾等生殖器官外，在中枢神经系统、皮肤、腺体、骨骼、肌肉等组织中均发现了雄激素受体的存在。

(3) 雄激素受体的作用机制及表达调控

雄激素可以和雄激素受体结合并通过一系列受体后机制，将胞外雄激素转移到核内，雄激素与受体复合物可以和 DNA 上的结合位点结合，从而调控特殊的基因表达，继而发挥其调节生殖、免疫和内分泌系统等作用。

雄激素要与胞质或胞核中的雄激素受体相结合才能发挥作用。而雄激素受体与雄激素相互作用的同时也伴随着雄激素受体生理功能的发挥和结构的变化，包括核转运、转录和磷酸化更新。雄激素依靠雄激素受体转运到核，然后与核中的染色质发生作用。有研究表明，雄激素诱导雄激素受体增加是通过增加受体半衰期和合成速度。在类固醇浓度低时，雄激素受体与具有生理活性的雄激素有高的结合亲和力，然而在类固醇浓度高时则会降低它与雄激素受体的亲和力，且雄激素受体的核转运和转录活性也会降低。

雄激素对其自身受体有着多方面的作用，激素可以作用于受体的不同环节，包括调节受体的数量、亲和力、活性及代谢等。内源性睾酮可控制睾丸内雄激素受体的表达，这可能与雄激素能降低雄激素受体的降解速率以及控制雄激素受体蛋白质的生物合成有关。

4. 雄激素的临床应用

雄激素在临床上主要用于治疗公畜性欲不强（如阳痿）和性机能减退。此外，母畜或去势公畜用雄激素处理后，可用作试情动物。

(三) 孕 激 素

孕激素是一类分子中含 21 个碳原子的类固醇激素，在雄性和雌性动物体内均存在，既是雄激素和雌激素生物合成的前体，又是具有独立生理功能的性腺类固醇激素。孕激

素种类很多，动物体内以孕酮（又称黄体酮，progesterone）的生物活性最高，因此，孕激素常以孕酮为代表。除孕酮外，天然孕激素还有孕烯醇酮（pregnenolone）、孕烷二醇（pregnanediol）、脱氧皮质酮（desoxycortisterone）等，它们的生物活性不及孕酮高，但可竞争性结合孕酮受体，所以在体内有时甚至对孕酮起拮抗作用。

1. 来源及在发情周期中的水平

在雌性动物第一次出现发情特征之前以及所有雄性动物中，孕激素主要由卵泡内膜细胞、颗粒细胞或睾丸间质细胞及肾上腺皮质细胞分泌；在雌性动物第一次发情并形成黄体后，孕激素主要由卵巢上的黄体分泌。此外，胎盘也可分泌孕激素。血液中的孕激素与雄激素和雌激素一样，主要与球蛋白结合。在发情周期中，血浆孕酮在卵泡期一直处于低水平。排卵后，在 LH 作用下，颗粒细胞黄体化，孕酮分泌增加。母体一般在排卵后 7~10 天血浆孕酮水平升至最高，并一直维持到周期的第 15 天左右才逐渐下降。

2. 生理功能

在正常母畜体内，孕酮与雌激素共同作用于生殖活动，在很多方面是协同的，或是先后的，或是拮抗的。

(1) 促进生殖道发育

生殖道受到雌激素刺激而开始发育，但只有在经过孕酮的作用后，才能发育得更充分。

(2) 调节发情

少量孕酮与雌激素有协同作用，促进发情的行为表现。大量孕酮具有对下丘脑或垂体前叶的负反馈作用，抑制 FSH 和 LH 的释放而能够抑制发情。因此，血浆孕酮水平的消长，反馈调节影响着性腺的机能。当孕酮水平急剧下降，卵泡即开始发育，引起发情和排卵，所以应用孕酮可以控制发情。大量孕酮还能对抗雌激素的作用，阻止子宫敏感化和抑制发情，所以妊娠期黄体和胎盘分泌的孕酮对妊娠后期产生的雌二醇具有对抗作用。

(3) 维持妊娠、安宫保胎

孕酮在子宫内膜从增殖期转变为分泌期、子宫内膜基质细胞分化为蜕膜细胞及胚泡着床和早孕维持中都有重要作用。子宫分化到能使胚胎着床的状态，主要是雌激素和孕酮共同作用的结果。在每一个发情周期内，子宫内膜在雌激素预先作用下，孕酮促使子宫内膜增厚，刺激子宫腺增长，弯曲增多，分泌功能加强，抑制子宫的自发性活动，降低子宫肌层的兴奋作用（如对前列腺素和催产素的反应）。这些均有利于胚胎的发育和着床，维持正常妊娠，并促使子宫颈口和阴道收缩，子宫颈黏液变黏稠，防止异物侵入，有利于保胎。

(4) 维持乳腺的发育

孕酮能在雌激素刺激乳腺腺管发育的基础上，刺激乳腺腺泡系统的发育，并与雌激素共同维持乳腺的发育。

(5) 对雄性下丘脑-垂体-睾丸轴的反馈抑制作用

在垂体及生殖腺中，均可检测到明显的孕激素受体 mRNA，且呈不同分布特点。

人生精细胞和精子中含有一定数量的孕酮，提示孕激素与精子产生的数量、精子胞膜完整性和染色体稳定性以及受精有关。生理剂量的孕激素可以促进雄激素依赖的雄性性行为，而药理浓度孕激素可以抑制雄性性行为。

(6) 精子顶体反应的激动剂

精子顶体反应是完成受精的一个重要步骤。研究发现，除透明带能引起获能精子顶体反应外，孕酮是顶体反应的另一个天然激动剂。孕酮作用于精子能引起快速 Ca^{2+} 内流和钙依赖的磷酸肌醇水解作用，增强精子蛋白的酪氨酸磷酸化及 Cl^- 外流，最终引发顶体反应。

3. 孕激素受体及作用机制

孕酮发挥生理作用是通过其受体介导的。孕酮受体 (progesterone receptor, PR) 属于类固醇核受体超家族的成员，存在 A、B 两种亚型。1987 年，Misrahi 等克隆出了人 PR 的 cDNA，并由此推算出人 PR 的一级结构。人 PR 由 933 个氨基酸组成，分子质量为 98 868 Da，整个结构分为 3 个区域：N 端是调节区，由 566 个氨基酸组成 (1~566)；中央是 DNA 结合区，由 88 个氨基酸组成 (567~644)；C 端是激素结合区 (ligand-binding-domain, LBD)，由 289 个氨基酸组成 (645~933)。现已发现，PR 的激素结合区与其他同族受体折叠形式非常相似，但二级结构差异很大。

孕酮受体主要分布于子宫和阴道，输卵管中含量极少。它们均位于细胞核内，胞质内为阴性。在卵巢、垂体和大脑中，未见阳性反应细胞。孕酮受体在子宫内膜表面上皮和基质中的含量变化与胚泡着床平行发展。

孕激素通过其自身受体的介导，与靶基因上的孕激素效应元件 (PRE) 结合，在有关反式因子的协同作用下，精密调控靶基因的表达，从而在雌性性器官的发育、妊娠的建立和维持，以及肿瘤发生等过程中起着非常重要的作用。妊娠的建立过程包括受精卵的形成和发育、胚泡着床和子宫内膜的蜕膜反应等诸多环节，受到下丘脑-垂体-卵巢性腺轴激素的精确调控。在这个过程中，孕激素可能是通过调节一些糖蛋白、细胞因子和生长因子的表达，一方面促进胚泡着床，另一方面影响子宫内膜基质细胞的蜕膜化，为着床后的胚胎发育提供良好的环境。如仅在子宫上皮细胞表达的黏蛋白 Muc-1 在着床前受到孕激素的负调控，而仅存在于子宫内膜基质细胞的铁蛋白重链在妊娠初期受到孕激素的正调控。

4. 孕激素的分泌调节

除了 LH 是调节孕酮分泌的直接刺激物外， γ -氨基丁酸作为一种抑制性神经递质，通过下丘脑-垂体-性腺轴系影响垂体和性腺生理机能，从而参与激素的分泌调节。 γ -氨基丁酸对卵巢颗粒细胞孕酮的分泌调节随动情期不同而呈现抑制或促进作用。实验观察到， γ -氨基丁酸引起黄体细胞自由基增多，导致 DNA 断裂，进而孕酮生成量下降。从而提示，自由基与孕酮生成可能存在一定关系，氧自由基增加可使孕酮分泌减少，可能与细胞凋亡有关。 γ -氨基丁酸除对中枢有作用外，对外周卵巢黄体细胞也有调节孕酮分泌的作用，且可影响黄体细胞自由基生成，从而影响孕酮的分泌。此外， γ -氨基丁酸与孕酮协同作用，能明显促进精子的获能，提高精子的体外活动能力。

有实验结果表明, 表皮生长因子对大鼠黄体细胞基础孕酮的生成也有刺激作用。

5. 类固醇激素合成的限速步骤

通过上述介绍, 可见性腺类固醇激素对于机体的众多功能调节起着十分重要的作用。因此, 如何调节类固醇激素的生物合成就显得特别重要。本部分将讨论性腺在受到促性腺激素的作用下, 调节类固醇激素快速合成的过程, 着重强调近来类固醇激素快速合成调节 (steroidogenic acute regulatory, StAR) 蛋白的研究进展。

(1) 类固醇激素生物合成的快速调节

早期对类固醇激素合成的研究证明, 该合成过程的限速步骤是激素诱导的位于线粒体内膜的细胞色素 P450 侧链裂解酶 (P450_{scc}) 活性的增加, 其功能是将胆固醇转化为孕烯醇酮, 现在证明并不是这么回事。因为越来越多的研究证明, 受激素诱导的真正限速步骤是所有类固醇激素的前体物——胆固醇的运输, 即从线粒体的外膜运输到线粒体内膜 P450_{scc} 酶的附近。疏水性的胆固醇扩散通过亲水性的内膜是极其困难的, 因此, 胆固醇从外膜进入到内膜 P450_{scc} 酶中必须通过一种辅助机制进行, 这才是其限速步骤。简单的说, 类固醇激素的总产量是受那些能够有助于胆固醇从外膜进入内膜的因子所控制的。研究发现, 这个调节步骤对于蛋白质合成的抑制剂是极度敏感的, 因此人们认为这种调节物质是蛋白质, 并开始寻找这种假设的调节蛋白。其中的一种就是 StAR 蛋白, 并证明它可能就是惟一的快速调节类固醇激素合成的蛋白质。

(2) StAR 蛋白

StAR 蛋白是由 37 kDa 的家族 (前体物) 和 30 kDa (成熟蛋白) 的线粒体蛋白组成, 最初是在 ACTH 刺激的肾上腺皮质中发现的。1994 年 Clark 等从 MA-10 小鼠睾丸间质细胞瘤中获得了全长 1456bp、编码一个有 284 个氨基酸蛋白质的 cDNA 克隆。用该 cDNA 瞬时转染 MA-10 细胞证明, 该蛋白的表达导致在没有激素刺激下, MA-10 细胞类固醇激素产量显著增加。此外, 用含有编码 37 kDa 蛋白的 cDNA 的质粒转染 COS-1 细胞, 导致胆固醇转化为孕烯醇酮的速率增加数倍。这些结果说明, 37 kDa 蛋白在激素调节的类固醇激素生成中起着直接的作用, 并因此而得名为 StAR 蛋白。

将 StAR 蛋白 C 末端的 10 个氨基酸切掉后, 则导致类固醇合成下降 50%, 当将该末端的 28 个氨基酸去除后, 则导致类固醇合成完全丧失。可见, StAR 蛋白的 C 末端区域对于胆固醇的运输是绝对重要的。尽管 StAR 蛋白作用的机制仍然不清楚, 但现在已逐渐清楚胆固醇的运输需要与线粒体外膜表面的未知蛋白质或因子的相互作用, 并发生变化而导致胆固醇的运输。其中, 寻找能与 StAR 蛋白在线粒体外膜表面相互作用的配体就成为了解 StAR 蛋白功能机制的关键。

(3) StAR 蛋白与磷酸化

促性腺激素刺激类固醇激素合成的主要信号通路是由 cAMP 增加造成的 PKA 激活。从几种动物 StAR 蛋白序列的计算机分析和比较, 发现了两种可能的 PKA/ CaMKII 磷酸化位点和一种 PKC 磷酸化位点。为了确定磷酸化在 StAR 蛋白促进类固醇激素合成中的作用, 人们将小鼠和人的 StAR 蛋白中的 PKA 位点 (可能在第 56/ 57 和 194/ 195 氨基酸) 进行突变。这两个位点都是丝氨酸, 通过定点突变将其换成丙氨酸。两个位点的突变都导致³²P 掺入到 StAR 蛋白的下降, 表明在体内这些位点被磷酸化了。更重要

的是：将 56/ 57 的丝氨酸换成丙氨酸后，用该 StAR 转染 COS-1 细胞则不能促进类固醇的合成。而用 194/ 195 突变的 StAR 转染 COS-1 细胞只能导致 57 % ~ 60 % 的类固醇合成的抑制。这些结果表明，StAR 蛋白在 194/ 195 位置的磷酸化能够显著地增加该蛋白的活性，但并不是负责该蛋白的整个功能。

(4) StAR 基因敲除小鼠

1997 年 Caron 等成功地得到了 StAR 基因敲除小鼠。对这些动物的观察表明，不管其基因型如何，所有的动物具有雌性外生殖器，出生后所有的动物不能正常生长并很快死亡。血清中可的松和醛固酮的浓度下降，而 ACTH 和 CRH 增加，表明肾上腺类固醇生产受到损害，因此丧失了对下丘脑和垂体的负反馈调节作用。对肾上腺的研究结果表明，该肾上腺的髓质正常，但皮质异常，其束状带紊乱。而且，所有的 StAR 基因敲除小鼠的性表型都是反转的，但这些动物的睾丸的大体解剖结构似乎是正常的。相反，该基因敲除小鼠的卵巢与野生型小鼠的卵巢没有可见的区别。在人类 StAR 突变的研究中也得到了相似的情况。StAR 基因敲除小鼠的成功为人们了解 StAR 蛋白在整体内分泌中的作用提供了方法。

6. 孕激素的临床应用

在临床和动物繁殖实践中，孕激素主要用于治疗因黄体机能失调引起的习惯性流产、诱导发情和同期发情。用于诱导发情和同期发情时，孕激素必须连续提供（一般于皮下埋植或用阴道海绵栓）7 天以上。在这种情况下，终止提供孕激素后，母畜即可发情排卵。孕激素用于治疗功能性流产时，使用剂量不宜过大，而且不能突然终止使用。

二、性腺含氮激素

睾丸和卵巢除分泌脂溶性的类固醇激素外，还分泌水溶性的含氮激素。现已清楚知道其化学结构和生物学作用的性腺含氮激素主要有抑制素、激活素、卵泡抑素和松弛素等。

(一) 抑制素、激活素及卵泡抑素

近年来，对下丘脑-垂体-卵巢轴系统调控机理研究的一个突破性进展，就是发现抑制素-激活素-卵泡抑素轴这一调控垂体 FSH-LH 分泌的新家族。激活素 (ACT)、卵泡抑素 (FS)、抑制素 (INH) 都是主要由性腺分泌的糖蛋白激素，20 世纪 20 年代初期人们就已经认识到这些非甾体类性腺激素的存在，但直到 80 年代中期才分离纯化成功。它们主要存在于人、猪、大鼠等哺乳动物的卵泡液中，参与调节垂体 FSH 分泌。抑制素抑制而激活素促进 FSH 分泌，卵泡抑素也抑制 FSH 分泌，但其效力仅为 INH 的 10 % ~ 30 %，因而曾经有人认为卵泡抑素的生理意义可能并不重要。但 90 年代初 Nakamura 等研究发现卵泡抑素是激活素结合蛋白，通过与激活素结合，卵泡抑素参与调节激活素的多种效应。

1. 来源

抑制素主要由雌性动物卵泡颗粒细胞和雄性动物睾丸的支持细胞分泌。利用免疫组织化学法发现,在睾丸以外的其他部位,如附性腺、生殖道、肾上腺皮质、大脑和垂体等部位也具有抑制素阳性部位或 α 、 β 亚单位 mRNA 表达,但上述部位即使产生抑制素也不一定进入循环,而可能通过自分泌或旁分泌的形式发挥作用。

卵泡抑素的 mRNA 在多种组织和器官,例如卵巢、睾丸、垂体、肾上腺、脑皮质、骨髓、心脏、肺、胸腺、骨骼肌、肾、胰等器官中,都有表达,这表明卵泡抑素对不同类型的细胞有广泛的调节作用。

2. 化学性质与结构

抑制素 (INH) 和激活素 (ACT) 属于 TGF- β 超家族成员。INH 由 α 亚基与两个 β 亚基 (即 βA 或 βB) 通过二硫键连接形成两种具有生物学活性的二聚体,即 INHA (α - βA) 和 INHB (α - βB)。 α 、 βA 和 βB 三个亚单位是由不同基因编码产生的三种不同的多肽分子。 β 亚单位 βA 和 βB 相互组合通过二硫键连接形成三种不同形式的具有生物活性的二聚体,即 ACTA (βA - βA)、ACTB (βB - βB) 和 ACTAB (βA - βB)。

牛、猪、羊睾丸液和卵泡液中抑制素结构相似。牛抑制素有两种,分子质量分别为 58 kDa (α 链为 43 kDa, β 链为 15 kDa) 和 31 kDa (α 链为 20 kDa, β 链为 11 kDa)。猪的抑制素也有两种 (抑制素 A 和 B), 两种抑制素的 α 链相同, β 链有差异。各种动物之间 α 链的 85% 氨基酸序列相同; 反刍动物无 β 链结构。

卵泡抑素是由单个基因编码的富含半胱氨酸的单链糖蛋白, 目前发现至少有 32 kDa、35 kDa、39 kDa 三种不同的分子形式。卵泡抑素的基因长约为 6 kb, 含有 6 个外显子和 5 个内含子, 第一个外显子编码一个 29 个氨基酸的片段。所以一个卵泡抑素的前体有 344 个氨基酸, 但最后一个功能区编码的 27 个氨基酸可能会脱去而形成另外一个 317 个氨基酸的前体。这两种前体氨基酸通过修饰信号肽后可形成具有 315 和 288 个氨基酸的成熟卵泡抑素。另外, 315 个氨基酸的成熟肽还可能进一步降解为一个含有 300 个氨基酸的成熟卵泡抑素。对小鼠、猪等动物和人的研究表明, 卵泡抑素的一级结构具有高度保守性。卵泡抑素通过与激活素的 β 亚基相连阻断其与受体的作用, 从而抑制了激活素的生理作用; 卵泡抑素虽然也与抑制素结合, 但其亲和系数较低, 起不到抑制抑制素的作用。

3. 生物学作用及作用机制

(1) 抑制素和激活素的内分泌功能

抑制素和激活素是哺乳动物中调节 FSH 分泌的重要激素。许多研究已经证实, 在牛、绵羊、马、猪、恒河猴、大鼠和仓鼠中, 抑制素可抑制垂体分泌 FSH, 血液中 FSH 水平和抑制素含量呈负相关。

关于抑制素调节 FSH 分泌的机制, 有研究发现, 抑制素可在垂体水平抑制腺垂体 FSH 分泌细胞表达 FSH mRNA。体外垂体细胞培养也发现, 抑制素可直接作用于垂体细胞, 抑制 FSH 的分泌。不过抑制素对 LH 的分泌影响较弱。关于激活素对 FSH 分泌

作用研究发现, 激活素和卵泡抑素可拮抗或抑制抑制素的作用, 在垂体局部调节并促进 FSH 的分泌。

关于抑制素和 FSH 间负反馈调节环路的发生时相不同物种间存在一定差异。绵羊在妊娠第 112~125 天, 胎儿血液循环中的抑制素已经可以抑制自身 FSH 的分泌。对人类的研究也发现, 妊娠中期胎儿循环血液中抑制素已经参与调节 FSH 分泌。而在马和猩猩胎儿发育中却未能观察到类似结果。啮齿类(如大鼠和小鼠)至少在产后 20 天已经建立抑制素和 FSH 间的负反馈调节环路。最近的研究表明, 胚胎期小鼠卵巢中就已经开始表达抑制素亚单位的 mRNA。

(2) 对颗粒细胞和膜-间质细胞的增殖分化及卵泡发育的作用

近年来有越来越多的报道指出, 颗粒细胞所产生的抑制素和激活素对控制卵泡的发育起重要调节作用, 前者被认为是卵泡生存因子, 而后者被认为是促闭锁因子。

许多研究证实, 激活素可调节颗粒细胞的分化, 并且和卵泡的发育阶段相关。体外培养未分化的大鼠颗粒细胞发现, 激活素可促进其表达芳香化酶、FSH 和 LH 受体, 刺激 E_2 和孕酮的分泌, 并且上述作用不依赖于 FSH, 但可被 FSH 增强。同时, 激活素促进颗粒细胞抑制素的基础分泌和 FSH 诱导的分泌, 及其抑制素亚单位的表达。经激活素预处理 24 小时的颗粒细胞对 FSH 和 LH 的反应性也增强。部分分化的颗粒细胞体外培养时, 激活素可促进孕酮的基础分泌, 但却抑制 FSH 诱导的孕酮分泌。而完全分化的颗粒细胞体外培养时, 激活素抑制基础孕酮分泌和 FSH 诱导的分泌。牛不同分化程度的颗粒细胞体外培养也得到类似结果。可见激活素可以自分泌的方式调节颗粒细胞的分化, 其对颗粒细胞的调节作用与颗粒细胞的分化状态即卵泡发育阶段有关。通常认为在腔前卵泡和早期有腔卵泡阶段, 激活素促进颗粒细胞分化, 而在有腔卵泡成熟发育后期, 激活素抑制颗粒细胞黄体化。

研究证实, 抑制素可抑制 FSH 诱导的大鼠和牛颗粒细胞表达芳香化酶, 进而抑制 E_2 的分泌。但也有研究报道认为, 抑制素可促进大鼠颗粒细胞分泌 E_2 。同时许多研究表明, 抑制素参与膜细胞功能的调节, 进而影响优势卵泡的选择。大鼠和人卵泡膜细胞体外培养研究发现, 抑制素可促进 LH 诱导的雄激素分泌。大鼠卵泡体外培养时, 添加抑制素抗血清可显著抑制雄激素的分泌。可见抑制素通过促进雄激素分泌, 间接地增加卵泡雌激素的分泌量, 促进可分泌雌激素的卵泡被优势选择。随着优势卵泡的进一步发育, 卵泡抑素和雌激素分泌增加, 进而降低 FSH 的分泌水平, 使得未被优势化的卵泡成熟发育受阻。在性成熟前小鼠中研究发现, 伴随优势卵泡的选择, 抑制素 3 种亚单位和 P450_{scc} 等类固醇激素合成关键酶的表达显著增强。豚鼠中的相关研究也发现, 卵巢内仅 1~2 个排卵卵泡颗粒细胞能分泌抑制素, 这进一步证实抑制素参与卵泡优势选择过程。

作为激活素的结合蛋白, 卵泡抑素可以中和体外培养的卵巢细胞上激活素的活性, 这种中和活性有赖于卵泡抑素/激活素的比率。在牛中, 卵泡抑素的表达随着卵泡的增大而上升, 排卵前达到高峰。有人推测, 卵泡抑素是通过自分泌和旁分泌的形式来调节颗粒细胞的功能, 导致卵泡的黄体化与闭锁。Singh 等的实验表明, 牛的卵泡抑素在颗粒细胞和黄体细胞上存在阶段性表达。卵泡抑素在卵泡生长中期和排卵前期表达最高。排卵后, 卵泡抑素在正在进行黄体化的细胞上几乎检测不到, 间情早期则又出现, 在间

情期的黄体细胞中卵泡抑素的表达又升高，而黄体退化时其表达又消失。体外的实验也表明，卵泡抑素可以加强由 LH 引起的直径 5~10mm 的卵泡的颗粒细胞中催产素和孕酮的生成，可见卵泡抑素可以促进颗粒细胞的黄体化（孕酮和催产素为黄体化的标志），但在即将排卵的卵泡上则没有这种作用。这些证据表明，卵泡抑素在卵泡的发育和黄体化过程中起着重要的作用。

(3) 对卵母细胞成熟的作用

卵母细胞和卵泡细胞间的相互作用是协同卵泡各种细胞组分成熟发育的重要途径。由于卵丘细胞可表达大量抑制素亚单位，而卵母细胞则表达激活素受体，推测抑制素/激活素对卵母细胞成熟可能有一定作用。大鼠、猴和人类中研究发现，激活素促进卵母细胞恢复减数分裂，而抑制素则抑制卵母细胞的自发成熟。牛卵丘-卵母细胞复合体体外培养发现，游离的抑制素 Pro- α C（全长 α 亚单位前体物的一种）可降低卵母细胞的发育能力，而卵母细胞经抑制素 α 亚单位抗血清处理后发育能力显著提高。成熟卵泡在排卵前 LH 峰的作用下，颗粒细胞抑制素亚单位表达水平显著降低。但灵长类较特殊，猴抑制素 β 亚单位持续表达至排卵后；人类卵泡发育到中期，黄体是抑制素 A 的主要分泌源，推测抑制素/激活素可能参与调节灵长类黄体功能。

Silva 等的实验表明，激活素和卵泡抑素能调节卵母细胞胞质的成熟。在体外培养卵丘细胞包裹的卵母细胞时，添加外源的激活素和卵泡抑素后，激活素可以提高卵母细胞的成熟和受精后发育到囊胚阶段的能力，而外源性的卵泡抑素则很明显地降低了卵母细胞发育至囊胚的能力。在去除卵丘细胞后，培养基中添加外源性的激活素，仍然能提高卵母细胞发育至囊胚的能力，但添加卵泡抑素却不能再降低卵母细胞的发育能力。这说明卵泡抑素的作用与是否存在卵丘细胞密切相关，从而推测，卵泡抑素是通过中和卵丘细胞产生的激活素，而对卵母细胞的成熟和卵泡的发育起作用的。

(4) 参与胎盘 hCG 合成分泌的调节

研究结果表明，卵泡抑素不影响 hCG 的基础分泌及基因表达，但对 GnRH 刺激的 hCG 分泌、hCG α 和 hCG β mRNA 表达有剂量依赖的抑制作用。卵泡抑素的作用可能是通过蛋白激酶 C 第二信使传导系统使转录速率降低而实现的，而不是影响 mRNA 的稳定性。这些结果提示，卵泡抑素作为一种生理性抑制剂，可能参与胎盘 hCG 合成及分泌的调节。

(5) 激活素和抑制素对雄性生殖细胞发育及精子发生的影响

激活素受体类型与 TGF β 受体相似，可分为 I 型受体 (ACTR I) 和 II 型受体 (ACTR II)。已有研究显示，激活素可影响原始生殖细胞 (PGC) 和精原细胞/卵原细胞的发育。胚胎期和新生大鼠睾丸中可表达激活素及其激活素 II 型受体。激活素 I 型受体和 II 型受体在 PGC 中也有表达。激活素可减少体外培养的原始生殖细胞和精原细胞/卵原细胞的数量，这是由于激活素抑制了原始生殖细胞的有丝分裂活性。在体外培养的出生后 3 天大鼠睾丸中加入激活素后，精原细胞的数量可明显上升。原位杂交和免疫组化研究显示，正常大鼠睾丸中含有 ACT β A 亚单位 mRNA 及其编码的蛋白，这表明生殖细胞可能通过产生内源性 ACTA 来调节自身的发育成熟。支持细胞还可产生激活素和抑制素的 β A 亚单位以及抑制素的 β B 亚单位，这些细胞可能对生殖细胞的发育也具有调节作用。由此可见，激活素生物活性的局部调节支持了生殖细胞的协调发育。

血清和精浆中 FSH 的含量与抑制素的浓度之间存在负相关，精液中精子数与抑制素浓度之间亦存在负相关。雄性大白鼠出生前后血清和性腺中的抑制素水平高于性成熟时的水平，而且在发育早期，血清中 FSH 和抑制素浓度之间就存在负相关。研究表明，抑制素除了主要作用于垂体外，还作用于下丘脑和性腺，它与其他睾丸物质如雄激素等相互作用，促使精子的发生。而卵泡抑素在睾丸上可以通过旁分泌的形式调节激活素的生物功能的发挥，从而影响精子的生成活动。

(二) 松 弛 素 (relaxin)

松弛素又称耻骨松弛素，主要由妊娠黄体分泌，一些动物的子宫、胎盘也可分泌少量松弛素。猪、牛等动物的松弛素主要来自黄体，而兔主要来自胎盘。松弛素是一种水溶性多肽，在家畜体内的分泌量随妊娠期而逐渐增长，在妊娠末期的含量达到高峰，分娩后从血液中消失。

1. 化学性质

松弛素是由 α 和 β 两个亚基通过二硫键连接而成的多肽激素，分子中含有 3 个二硫键。迄今，已从猪和鼠等动物中提取、纯化得到松弛素，不同动物的松弛素分子结构略有差异。猪松弛素的 α 亚基含 22 个氨基酸残基， β 亚基含氨基酸残基 26~32 个不等，说明松弛素不是单纯的一种物质，而是一类多肽物质。大鼠及小鼠松弛素与猪松弛素的结构差异明显，但是关键的位置、总的疏水性、非极性、酸性、碱性氨基酸残基非常相似。它们与人的松弛素也各不相同，彼此之间的抗原-抗体交叉反应微弱。

2. 生物学作用

松弛素对哺乳动物的作用远非仅限于对雌性孕期生殖道的影响。在妊娠期其主要作用是影响结缔组织，使耻骨间韧带扩张，抑制子宫肌层的自发性收缩，从而防止未成熟的胎儿流产。在分娩前，松弛素分泌增加，能使产道和子宫颈扩张与柔软，有利于分娩。此外，在雌激素的作用下，松弛素还可促进乳腺发育。

第三节 胎 盘 激 素

母体妊娠期间胎盘可以产生垂体和性腺所分泌的多种激素，这对于维持孕畜的生理需要及平衡起着重要作用。目前所知，在生产中应用价值较大的胎盘促性腺激素主要有两种，即孕马血清促性腺激素和人绒毛膜促性腺激素。

一、孕马血清促性腺激素

目前，在家畜中鉴定出的惟一绒毛膜促性腺激素是马的 CG (eCG)，以前被其发现者 Harold Cole 称做孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)，主要由马属动物胎盘的尿囊绒毛膜细胞产生，其分泌量因妊娠时期、动物种类、个体和

胎儿基因型的不同而有所差异。一般母马于妊娠 37~40 天产生 PMSG, 55~75 天时分泌量达高峰, 以后下降, 120~150 天时消失。已研究证实, 胎儿的遗传型是影响 PMSG 分泌量最突出的因子。驴怀骡分泌量最高, 马怀马次之, 马怀骡再次之, 驴怀驴最低。

(一) PMSG 的化学性质

PMSG 是一种糖蛋白激素, 含糖量约占 41%~45%, 其糖基为中性己糖, 包括半乳糖 (20.2%)、N-乙酰葡萄糖胺 (18.3%)、唾液酸 (9.4%)、甘露糖 (6.2%)、N-乙酰半乳糖胺 (3.6%)、岩藻糖 (2.4%) 等。PMSG 分子中的氨基酸数目, 以脯氨酸最多, 酪氨酸最少。由于 PMSG 分子中含有大量唾液酸和较少的碱性氨基酸 (9.4%), 因而在水溶液中呈酸性, 等电点 pH 为 1.8~2.4。

PMSG 分子质量为 53 kDa, 与其他糖蛋白质激素一样, 由 α 和 β 两个亚基组成。 α 亚基无论分子大小还是糖基比例, 均与 FSH、LH、TSH 和 hCG 类似。 β 亚基分子质量较大, 具有激素特异性, 但只有与 α 亚基结合后才能表现其生物学活性。

PMSG 分子不够稳定, 高温、酸、碱条件以及蛋白质分解酶均可使其丧失生物学活性。此外, 冷冻干燥和反复冻融可降低其生物学活性。

(二) PMSG 的生物学作用及其机制

PMSG 的生物学作用与 FSH 类似, 对雌性动物具有促进卵泡发育、排卵和黄体形成的功能; 对雄性动物具有促进曲细精管发育和性细胞分化的作用。PMSG 能够促进妊娠马属动物初级黄体分泌孕酮, 并有助于刺激卵泡黄体化或排卵黄体的形成。但实际上 eCG 对马属动物妊娠维持的必要性还不清楚, 因为初级黄体对于维持妊娠已经足够了。

PMSG 对下丘脑、垂体和性腺的生殖内分泌机能具有调节作用。研究发现, PMSG 通过促进卵巢分泌雌激素和孕激素, 反馈促进下丘脑分泌 GnRH 和垂体分泌 LH。

PMSG 作用的发挥需要下丘脑和垂体的参与。据报道, 未成熟大鼠用 PMSG 诱导的排卵可被切除垂体、注射药物 (戊巴比妥) 和损伤下丘脑所阻断。

(三) PMSG 的临床应用

PMSG 在临床上的应用与 FSH 类似, 主要用于诱导发情、超数排卵以及单胎动物生多胎, 并可用于治疗卵巢静止、持久黄体等症。与 FSH 相比, 由于 PMSG 的半衰期长 (马 144 h, 兔和大鼠 24~26 h), 在体内消失的速度慢, 因此一次注射与多次注射在体内的效果一致。但是, 由于 PMSG 在体内残留时间长, 易引起卵巢囊肿。囊肿卵巢分泌的类固醇激素水平异常升高, 不利于胚胎发育和着床。为了克服 PMSG 的残留效应, 一般在用 PMSG 诱导发情后, 追加抗 PMSG 抗体, 以中和体内残留的 PMSG, 提高胚胎质量。

二、人绒毛膜促性腺激素

人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 是由人类受孕后胎盘合体滋养层细胞合成的激素, 它从胎盘滋养层通过血循环进入卵巢, 刺激黄体分泌孕酮, 从而维持黄体功能, 使子宫内膜保持适合胚胎着床发育的状态。着床 1 天后的胚泡就能产生 hCG, 在受孕后 60~70 天达到分泌高峰, 以后逐渐降低并维持至分娩, 其主要功能是促进胚泡发育及维持妊娠。hCG 与 TSH (促甲状腺激素)、FSH、LH 等同为糖蛋白激素家族成员。这些激素都具有相同的 α 亚基和各自独特的 β 亚基。 α 亚基与信息传导有关, 而 β 亚基则产生其激素效应。作为抗原, β 亚基比整个 hCG 分子更具有特异性。

(一) hCG 的化学性质与结构

1. hCG 的亚基组成

hCG 属糖蛋白类激素, 其分子质量 38 kDa, 碳水化合物约占其分子质量的 30%, 由一条 α 链和一条 β 链以非共价键结合在一起形成异二聚体结构, 其中 α 链含 92 个氨基酸残基, β 链含 145 个氨基酸残基, 两个亚单位由不同的基因复合体编码, 分别位于染色体 6q21.1~23 和 19q13.3。 α 链与其他糖蛋白激素, 如 FSH、TSH 和 LH 中的 α 链相同, β 链具有特异性, 决定了 hCG 的生物学活性和免疫学特性。受精后 1 周内, 滋养层细胞即产生 hCG 取代 LH 的作用, 刺激黄体产生大量的孕酮, 这对维持妊娠是至关重要的。中和 hCG 的生物学活性能使黄体退化, 孕激素下降, 子宫内膜脱落、出血, 妊娠终止。

2. hCG 的初级结构

hCG α 链中共有两个糖基结合位点: 52Asn 和 78Asn, 都是 N-联糖。hCG β 链中既有 N-联糖又有 O-联糖, 共有 6 个糖基结合位点: 13Asn 和 30Asn (N-联糖), 121Ser、127Ser、132Ser 和 138Ser (O-联糖)。

3. hCG 的高级结构

α 链中含有 10 个 Cys 残基, 形成 5 个链内二硫键 (7-31、10-60、28-82、32-84、59-87); β 链中含有 12 个 Cys 残基, 形成 6 个链内二硫键 (93-100、26-110、23-72、9-57、34-88、38-90), 这些二硫键的存在决定了 hCG 的二级结构。 α 和 β 具有相似的构型, 表现在它们均具有特殊的半胱氨酸结 (cystine-knot motif)。hCG 分子结构中螺旋结构很少, 仅 α 亚单位的 40~50 序列中出现, 较多见的是 β 折叠和无规则卷曲。具有特征性的结构是半胱氨酸结, 它由 3 条二硫键组成: 2 条反向平行的肽链借 2 条二硫键相连成一环状结构, 第 3 条二硫键从环中穿过。结的一侧是双股环状的 β 折叠样结构 (长环), 另一侧是两个 β 发夹样结构。 α 和 β 具有相同的核心结构——半胱氨酸结, 所不同的是 β 链的发夹样结构展得较开, 而 α 链中的长环较大。

糖链部分对 hCG 的结构影响不大，其作用主要体现在蛋白质的亚基之间的聚合、蛋白质结构的稳定性、激素与受体的结合以及蛋白质功能的体现等方面。 α 链中糖链位于分子的末端， $\alpha 52\text{Asn}$ 位于双股肽链长环的末端， $\alpha 78\text{Asn}$ 位 β -发夹的末端，糖链部分与肽链间为数不多的几个氢键相连。 β 链中两个 N-联糖暴露于两个相邻的 β 折叠肽链的表面，相距不超过 7 。惟一既与 α 单位相连又与 β 亚单位相连的是 $\alpha 52\text{Asn}$ 上的 N-联糖，它与 β 亚单位中的 $\beta 59\text{Tyr}$ 、 $\beta 62\text{Val}$ 、 $\beta 64\text{Phe}$ 、 $\beta 83\text{Ala}$ 、 $\beta 97\text{Tyr}$ 相互接触。

借助化学修饰、点突变技术以及人工合成肽的竞争性抑制研究，现已发现大量的氨基酸残基对 hCG 的生物功能的发挥起着重要的作用。 $\beta 93\sim 100$ 对生物活性起决定作用，Cys93 或 Cys100 的点突变可导致 β 亚单位不能与 α 亚单位相连； $\beta 38\sim 57$ 序列在结合 hCG 受体中起关键作用，人工合成的该段肽序列能刺激小鼠甾体物质的产生，强烈抑制受体与完整 hCG 的结合； $\alpha 88\sim 92$ 也在结合受体方面发挥作用，不含 $88\sim 92$ 肽序列的 α 亚单位，虽然能与 β 亚单位结合，产生具有生物活性的 hCG 二聚体，但该杂聚体与受体的结合能力以及产生甾体物质的能力均较低。

4. hCG 的抗原表位

20 世纪 70 年代始进行 hCG 的人类避孕疫苗的研制，促进了对 hCG 的免疫原性的研究。目前认为，hCG 分子中共有约 20 个抗原表位，其中 α 链上 7 个 ($\alpha 1\sim\alpha 7$)， β 链上 9 个 ($\beta 1\sim\beta 9$)，hCG 二聚体上 4 个 ($C1\sim C4$)，大致可分为如下 6 类：① $\beta\text{hCG-CTP}$ 区 ($\beta 8$ 、 $\beta 9$)。② βhCG 、 $\beta\text{hCG-CF}$ 以及 hCG 中共有，免疫原性较高的表位 ($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$)。③ hCG 二聚体表位 ($C1$ 、 $C2$ 、 $C3$ 、 $C4$)。④ βhCG 、 $\beta\text{hCG-CF}$ 共有而 hCG 二聚体中没有 ($\beta 6$ 、 $\beta 7$)。⑤ αhCG 和 hCG 共有的表位 ($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$)。⑥ αhCG 中具有 hCG 异二聚体中不存在的表位 ($\alpha 6$ 、 $\alpha 7$)。当 α 、 β 链游离时，表现 $\alpha 1\sim\alpha 7$ 、 $\beta 1\sim\beta 9$ 16 个表位，两者结合形成二聚体时， $\alpha 6$ 、 $\alpha 7\beta 6$ 、 $\beta 7$ 表位消失，而出现四个构象表位： $C1\sim C4$ ，其中 $C1\sim C3$ 与 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 表位融合在一起。对 hCG 分子抗原表位和结构的深入研究有助于开发一个合适的免疫原以作为避孕疫苗的靶抗原，进一步推动 hCG 避孕疫苗的研制。

(二) 生物学功能及作用机制

1. 对雌性动物的作用

绒毛滋养层细胞能产生大量胚胎发育和维持妊娠所必需的多种激素如 hCG、孕酮及人胎盘催乳素等，其中以 hCG 的作用最为重要。它通过促进卵巢黄体以及胎盘本身产生足够量的孕酮而维持妊娠，同时它还可调节孕酮以外的类固醇激素和前列腺素的合成、糖原降解及基质金属蛋白酶和细胞外基质 (ECM) 的产生等。

近年一些研究表明，hCG 还参与免疫调节，降低淋巴细胞活力，具有免疫抑制作用，被认为是母体对胎儿不产生免疫排斥反应的重要机制之一。研究证明，一定浓度范围的 Th1 型细胞因子 IFN γ 和 Th2 型细胞因子 IL-4 对人绒毛膜组织 hCG 分泌分别有不同程度的抑制作用和促进作用，提示 Th1/ Th2 型细胞因子可能是通过影响 hCG 分泌而

在早期妊娠过程中起免疫调节作用。

可见，在妊娠早期 hCG 是促进子宫内膜以及胎盘增生、维持和保障妊娠的主要激素。

另外，hCG 同 LH 具有相似的生物学功能，除可促使卵巢黄体生成并分泌孕激素外，还具有促进卵泡成熟及排卵的作用。

2. 对雄性动物的作用

hCG 有促进性腺发育的功能，在雄性能使雄性胚胎性腺分化继而对外生殖器的发育起重要作用，此外还有刺激睾丸间质细胞活力，增加雄性激素分泌的功能。

在雄性生殖系统的发育过程中，促性腺激素起着非常重要的作用。已知 hCG 经母体胎盘产生后直接与胎儿睾丸间质细胞膜上的相应受体结合并产生效应。在孕早期，hCG 是促进胎儿睾丸发育的主要因素。在孕中后期，由于胎儿垂体的发育及功能的逐步完善，胎儿垂体 LH 分泌逐步增加，hCG 浓度相应地逐步下降。但后来增加的 LH 仍作用于 hCG 受体，并产生相似的作用，因此 hCG 受体又被称为 LH/ hCG 受体。hCG 和 LH 正是通过这种受体来调控胎儿睾丸分泌雄激素的整个过程。

LH/ hCG 能刺激睾丸间质细胞中睾酮合成增加。在成年小鼠睾丸中，hCG 能在转录水平刺激睾酮生成的基本酶：细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶 (P450_{scc})、细胞色素 P450 17 α -羟化酶 (P450_{c17}) 及 VI 型 3 β -羟甾脱氢酶 (3 β -HSD) 的表达，从而促进睾酮大量分泌，维持正常性功能。

(三) hCG 受体

LH/ CG 受体存在于睾丸间质细胞、卵巢中卵泡内膜细胞和黄体细胞膜上，该激素与细胞膜上相应的受体结合后通过腺苷酸环化酶系统刺激类固醇激素生成，在哺乳动物的胚胎着床、性腺发育及功能调节中均有重要作用。

1. LH/ CG 受体的结构

LH/ CG 受体的结构与 G 蛋白家族偶联的其他受体如促卵泡激素受体 (FSHR)、促甲状腺激素受体 (TSHR)、 β -肾上腺激素受体相似。研究发现，LH/ CG 受体分子质量为 75kDa，含有 674 个氨基酸残基，值得注意的特点是，其结构中大约有 14 个不完全重复的富含亮氨酸序列，每一个序列大约含有 25 个氨基酸残基，此结构的功能尚不十分清楚。C 端部分经过七次折叠跨膜进入细胞内，跨膜区具有 G 蛋白受体家族成员所共同的特点，且与 G 蛋白受体家族的其他成员具有高度同源性，C 端的很短一部分构成受体的胞内微区，胞内微区含有一定数量的丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸残基。这些残基可能是磷酸化位点，在大鼠、猪、人、小鼠中其磷酸化位点不完全一致，而氨基酸序列却有着高度的同源性。该区还可能存在蛋白水解酶的裂解位点，在跨膜区和连接肽氨基酸序列同源程度最高，达 95%，胞外微区 N-末端次之，同源程度低的是胞内区的 C-末端，仅为 56%，6 个糖基化位点及半胱氨酸在这四种动物中是完全相同的。

2. LH/CG 受体的基因结构

LH/CG 受体基因 5' 侧翼区由 1591 个碱基对组成，转录的起始位点在编码起始位点上游 1085 个碱基对处。5' 非编码区非常长，关于 5' 侧翼区有关报道不完全一致，但该区有几个值得注意的特点。第一，该区在起始编码上游没有 TATA 或 CAAT 盒，在起始编码区后的 160 个碱基中 80% 为 G 和 C；第二，介导激素、生长因子和第二信使的转录应答位点也可能存在于 5' 侧翼区；第三，有研究表明，在该区可能存在重复转录起始位点。

3. LH/CG 受体不同结构域与功能的关系

LH/CG 受体的胞外结构域显示出几个有意义的序列特征，其中富含亮氨酸糖蛋白 (LRG) 家族成员的重复结构形成亲水及疏水性的两性螺旋，介导富含亮氨酸糖蛋白与疏水性和亲水性表面发生反应，LH/CG 受体的胞外结构域负责结合 LH 和 hCG，该结构域可能具有结合激素，与跨膜结构域发生反应并介导信号转导的功能。LH/CG 受体胞外微区 N 端的一半对 hCG 具有特异的识别和亲和能力，胞内微区的切除不影响受体与 hCG 的亲合力，胞外微区的三个区域即 21~38 位氨基酸残基段、102~115 位氨基酸残基段、253~272 位的氨基酸残基和胞外连接区 573~583 位的氨基酸残基段可能是激素的结合位点。存在于受体跨膜区和胞外区以及胞内连接区的一些氨基酸残基在 G 蛋白受体超家族中具有高度的保守性，特别是胞内第二个连接区的近膜区的氨基酸残基具有高度的保守性，该区的氨基酸残基突变对 hCG 的结合力没有影响，其他如第一个胞外区、第六个跨膜区的氨基酸突变后，其 hCG 的亲合力亦无改变。

(四) 影响 hCG 分泌的因素

关于早期滋养层细胞中 hCG 的分泌调控十分复杂，其机理仍不完全清楚。

1. GnRH 与 hCG

在体内，GnRH 可调节垂体 LH 的释放，而 hCG 与 LH 在分子结构和功能上非常相似，且滋养层组织能够合成和分泌 GnRH 样物质，同时也表达 GnRH 的受体。Khodr 等曾证明，从分娩后的胎盘绒毛中得到的 GnRH 在免疫学、生理生化和生物学特性方面与下丘脑合成的 GnRH 无异，GnRH 很可能可以调节胎盘 hCG 的分泌。Takagi 最早发现含 GnRH 的下丘脑提取液可刺激离体孵育的胎盘组织释放 hCG；其后 Khodr 等在含 20% 胎牛血清培养液中加入合成的 GnRH，可见 8~10 周龄绒毛组织 hCG 的释放量明显增加。体外培养发现，GnRH 可刺激离体滋养层细胞 hCG 分泌；而单独加入雌三醇或孕酮，对离体培养的滋养层细胞 hCG 分泌无影响；将 GnRH 与雌三醇或孕酮合用，则 GnRH 所刺激的 hCG 分泌被明显抑制，且与合用的雌三醇或孕酮的水平相关。从而提示，GnRH 对胎盘滋养层细胞分泌 hCG 有刺激作用，而这种作用受体内性甾体激素水平的影响。

2. 激活素和抑制素与 hCG

Petraglia 等和 Jameson 等认为, 激活素和抑制素也参与 hCG 合成和释放的调节。据报道, 胎盘可产生激活素和抑制素, 且激活素可加强 GnRH 对胎盘细胞培养物 hCG 释放的刺激作用, 而抑制素则既可降低 hCG 的基础释放, 又能阻断激活素对 GnRH 诱导的 hCG 释放的刺激作用。但这些研究大多是在分娩后获得的胎盘组织进行的, 激活素和抑制素对孕早期胎盘组织 hCG 释放的影响尚有待证实。

3. 自调节机制

还有证据表明, 外源性 hCG 可降低人胎盘组织 hCG 亚单位 mRNA 水平和 hCG 的分泌, 并由此提出了胎盘组织 hCG 生物合成的自调节机制。

4. hCG 和 EGF

EGF 是一种可促使多种上皮细胞及间充质细胞分裂的多肽, 主要由颌下腺分泌。滋养层细胞合成的 EGF 可通过自分泌方式结合 EGFR, 促进滋养层细胞的增殖分化, 并促进其分泌 hCG 等激素, 并影响滋养层细胞的浸润能力。

hCG 和 EGF 协同调节生精过程。小鼠血清中的 EGF 主要来源于颌下腺。颌下腺产生 EGF 后分泌入血或可能随唾液进入消化道, 由胃肠吸收, 通过门脉血管进入体循环。切除颌下腺后血清中 EGF 降至测不出的水平并伴有生精功能减退, 且只有给予 EGF 才能使生精功能恢复至正常水平; 研究结果表明, hCG 增强间质细胞合成 EGF, 也促进其 EGF 受体的表达; 加强 EGF 及 EGF 受体阳性间质细胞的细胞核功能, 恢复颌下腺切除小鼠的生精功能。在睾丸局部, hCG 和 EGF 可能通过以下机制共同参与精子发生过程: ① hCG 通过促进睾丸间质细胞合成睾酮, 后者可增加睾丸 EGF 水平; ② EGF 可反作用于睾丸间质细胞, 增强 hCG 诱导的间质细胞合成睾酮的功能; ③ 睾丸细胞产生的 $TGF\alpha$ 、 $TGF\beta$ 也可调节 hCG 引发的睾酮合成。

5. CRH 与 hCG

CRH (促肾上腺皮质激素释放激素) 是人胎盘组织合成和释放的一种生物活性物质, 研究者在探讨胎盘 CRH 的功能时发现, 外源性 CRH 对 hCG 释放有抑制作用, 内源性 CRH 通过受体介导的机制抑制 hCG 释放, 而且这种抑制作用具有特定的时间依赖性和剂量依赖性, 外源 CRH 的作用可被 CRH 拮抗剂所逆转。CRH 除调节 hCG 的基础分泌外, 对于由 GnRH 诱导的 hCG 分泌亦有抑制作用。鉴于 hCG 几乎没有细胞内储存机制, 其激素分泌量基本反映其生物合成量, 由此可推测, 胎盘 CRH 可能是参与 hCG 合成与分泌调控的一种生理性负调节因子。

(五) hCG 的临床应用

市场上提供的 hCG 主要从孕妇尿和孕妇刮宫液中提取得到, 与垂体促性腺激素相比, 来源广, 生产成本低, 因此是一种相当经济的 LH 代用品。实际上, 由于 hCG 还

具有一定的 FSH 的作用，其临床效果往往优于单纯的 LH。hCG 在动物生产和临床上主要用于：①促进母畜卵泡成熟和排卵；②与 FSH 或 PMSG 结合应用，以提高同期发情和超数排卵效果；③治疗雄性动物的睾丸发育不良、阳痿和雌性动物的排卵延迟、卵泡囊肿，以及因孕酮水平降低所引起的习惯性流产等。值得注意的是，由于 hCG 属大分子蛋白质激素，具有一定的抗原性，多次频繁使用后（尤其是静脉注射），会引起抗体形成，同时还可能产生免疫性的过敏反应，至于此过敏反应是否由个体差异或药物质量所引起还不确定。

第四节 前列腺素

来源于必需脂肪酸的前列腺素、前列环素和白三烯（leukotrienes, LTs）构成了一组多聚不饱和的、羟化的 20 碳脂肪酸——花生酸。从生理学上讲，花生酸是古老的，在非常低的剂量就可在许多组织启动不同的生理功能。从特点上讲，它们是普遍产生的，但也存在组织特异性。

前列腺素是 1933~1934 年分别由英国的 Goldeblatt 和瑞典的 VanEuler 从人类精液和羊精囊腺的提取液中发现的，当时以为这一物质是由前列腺释放的，因而定名为前列腺素（prostaglandin, PG）。现已证明精液中的前列腺素主要来自精囊腺。前列腺素几乎存在于身体各种组织和体液中。生殖系统（如精液、卵巢、睾丸、子宫内膜和子宫分泌物以及脐带和胎盘血管等）、呼吸系统、心血管系统等多种组织均可产生 PG。

一、种类与化学结构

前列腺素是由 Bergstrom 于 1962 年提取出来的，并用经典方法确定了前列腺素的结构，其骨架是为含一个五元环的 20 个碳原子的羧酸。从结构上讲，所有的 PG 都有一个“发卡”构型，由一个环戊烷核与两个侧链构成。它们可能是从前列烷酸演化而来。初级前列腺素有一个 15-羟基团并在 13 位碳元素形成双键。每一个类型的前列腺素用字母定义为 A、B、C、D、E、F、G、H 或 I，表明在环戊烷环上不同的特殊功能基团。字母后的数字表示侧链不饱和的程度，如 PGE_1 ， PGE_2 和 PGE_3 分别表示在侧链上有 1、2 和 3 个双键。在环戊烷环上第九位的立体化学结构变化用希腊字母表示，排在数字后。如 $\text{PGF}_2\alpha$ 的构型表示有一个 9-羟基核团位于戊烷环的下面。 $\text{PGF}_2\beta$ （ $\text{PGF}_2\alpha$ 的无活性异构体）表示 9-羟基团位于环平面的上面。

在这些前列腺素中，以 PGE_2 、 $\text{PGF}_2\alpha$ 两型对生殖的调节作用比较重要。图 12-13 为各型前列腺素的分子结构。

二、前列腺素的生物合成

前列腺素的生成是多途径、多步骤合成的结果，其底物为花生四烯酸（arachidonic acid, AA）。由于细胞外 AA 的浓度很低，绝大多数 AA 结合在磷脂中，因而由磷脂酶 A_2 （phospholipase A_2 , PLA_2 ）催化，从磷脂膜中释放的 AA 多少就成为前列腺素合成

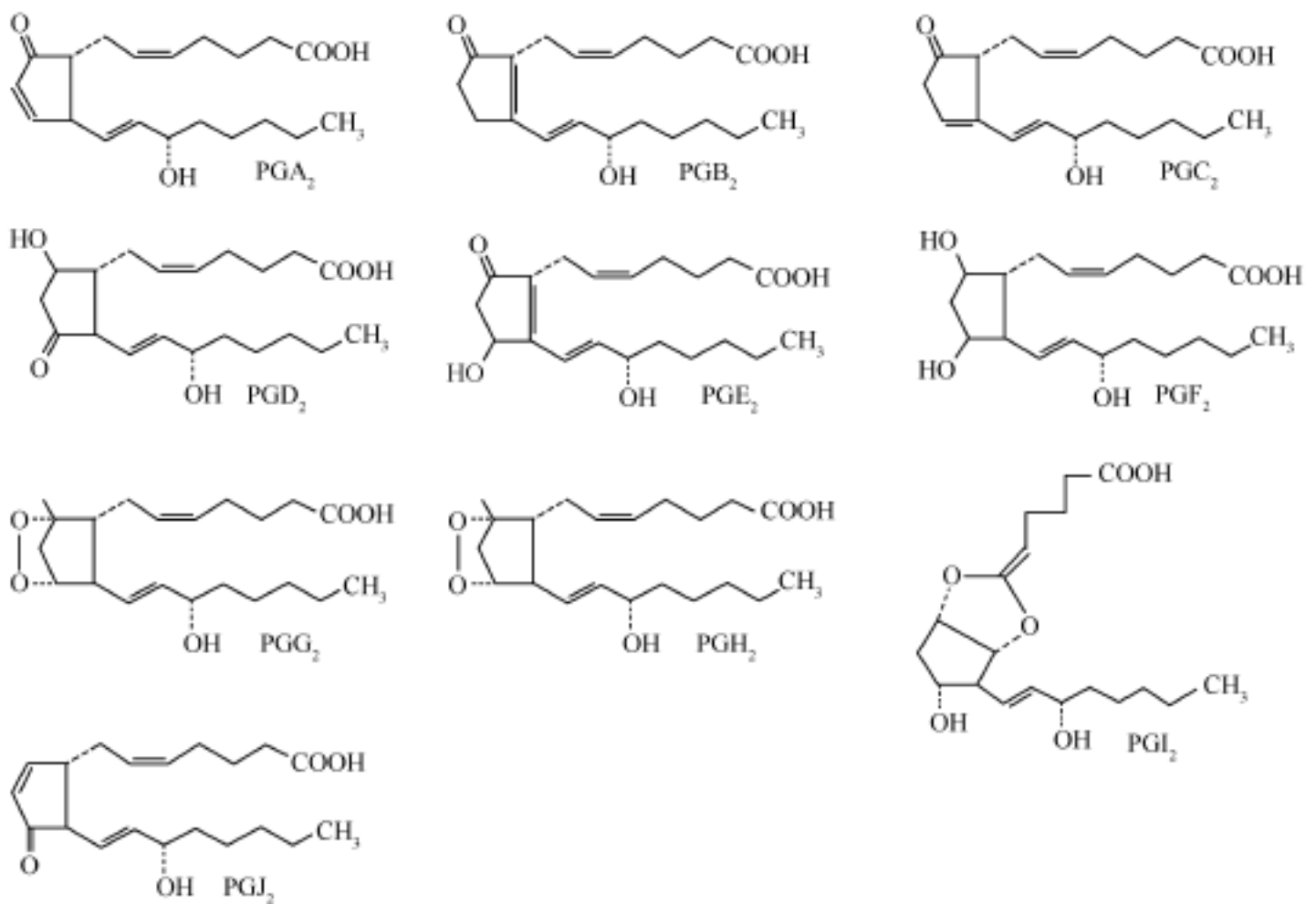


图 12-13 各型前列腺素的分子结构

的限速步骤。AA 首先经前列腺素合酶 (PGHS) -环氧化酶 (cyclooxygenase, COX) 催化, 在 C9 和 C11 加入氧分子生成氢过氧化物 PGG_2 , 然后, PGG_2 经 PGHS -氢过氧化物酶催化生成关键性的中间代谢产物 PGH_2 ; 最后 PGH_2 分三条途径代谢生成一系列有活性的前列腺素: ① 经凝血 烷合成酶 (thromboxane synthase, TXAS) 催化生成凝血 烷 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2), TXA_2 不稳定, 很快代谢为 TXB_2 后入血。② 经前列环素合成酶 (PGIS) 生成前列环素, 再代谢为稳定产物 PGI_2 。③ 经相应的内环氧化异构酶催化生成 PGE_2 、 PGF_2 、 PGD_2 。环氧化酶是由花生四烯酸合成 PG 的限速酶, 有两种同工型: COX-1 为组成型酶, COX-2 为诱导型酶。

前列腺素是一种局部激素, 当细胞受到各种刺激时, 前列腺素在细胞膜内合成, 在其局部发挥作用后迅速在循环中降解, 所以在血液中通常只能找到它们的降解产物。

PG 生物失活的第一个和最重要的步骤是 15-羟基团转化成 15-酮基团。15-羟基前列腺素脱氢酶 (15-OH-PGDH) 催化这一反应, 使其完全失活。一般来说, 15-OH-PGDH 的浓度在肺、胎盘、脾和肾皮质中最高, 在脑、卵巢及睾丸中的浓度相对较低。15-OH-PGDH 的底物包括 PGE 、 PGF 和 PGI 。

PG 降解的下一步是酶催化的 13 位双键的还原。13, 14-PG 还原酶对 15-酮-PG 有高度特异性, 和 15-OH-PGDH 一样, 它也有组织分布特性。随着脱氢酶和还原酶的作用后, 代谢物进行 β -氧化和 ω -氧化, 最后代谢产物从尿液中排出。

三、PG 受体

PG受体是与G蛋白相偶联的跨膜蛋白质，PGE₂、PGF₂α受体分别被称为EP、FP，其中EP又分为EP1、EP2、EP3和EP4四种亚型，它们通过各自不同的第二信使途径介导PG的生理功能，在哺乳动物生殖过程中发挥着关键而复杂的调节作用。卵泡产生的PG是排卵所必需的；PGF₂α参与黄体退化；各种PGE受体在胚胎着床过程中特异性表达；PG在分娩过程中也是必不可少的。

四、PG的生物学作用及其机制

(一) 前列腺素与排卵

哺乳动物的排卵过程非常复杂，卵泡颗粒细胞产生的PG是排卵所必需的。COX-2基因突变后，小鼠不能排卵，而COX-1突变的小鼠排卵不受影响。在牛和马中，排卵前卵泡中检测不到COX-1 mRNA和蛋白质的表达，说明参与排卵过程的PG是由COX-2合成。哺乳动物排卵前，垂体LH大量释放形成排卵前LH峰。LH通过诱导COX-2的表达而参与排卵的调节过程。在不同物种中，LH峰与COX-2开始表达的时间间隔是不同的，如在大鼠、牛和马中分别为2~4h、18h和30h，但COX-2开始表达与排卵的时间间隔是固定的，LH峰在这些物种中都诱导COX-2 mRNA于排卵前10h在卵泡颗粒细胞中大量表达。这说明COX-2是哺乳动物“排卵时钟”的重要控制信号。LH峰诱导卵泡组织表达COX-2并合成PG的作用是由LH受体通过cAMP信号系统介导的。颗粒细胞是卵泡中产生PG的主要部位，而不是卵泡膜细胞。PG生物合成抑制剂能阻止实验动物和非人灵长类的自发排卵及诱发排卵，如COX-2的抑制剂NS 398能降低体内发育和体外培养的大鼠卵泡的排卵率。在兔和狨猴中，这种抑制剂处理使卵母细胞滞留在黄体化的卵泡中。人的月经周期第14天（排卵前）卵泡液中PGF₂α浓度比其他时间要高几倍。关于PG在排卵过程中所起的作用，以前有多种推测，如刺激围绕卵泡的平滑肌收缩，挤压卵泡使之破裂；或增加纤溶酶激活物的活性，激活卵巢组织中的纤溶酶，溶解卵泡壁等等。但近来的研究表明，排卵并不是一个卵泡爆裂的过程，平滑肌收缩不是排卵所必需的，而且PG对组织中纤溶酶的活性也没有影响，所以PG具体是怎样导致排卵尚不清楚。但COX-2作为排卵的决定因素是确定无疑的，PG很可能通过诱发一系列与细胞内第二信使相关的反应使排卵过程顺利进行。

(二) 前列腺素与黄体退化

黄体是哺乳动物排卵后在排卵部位由卵泡壁颗粒细胞、膜-间质细胞及侵入的血管形成的临时性内分泌器官，其主要功能是产生孕酮，使子宫内膜为着床做准备并维持早期妊娠。在动物未受精、未着床或妊娠终止，新的发情周期起始，卵泡继续发育并分泌雌激素，从而导致黄体经历功能和形态上的退化，即黄体退化。在家畜等许多动物中，

子宫内膜分泌的 $\text{PGF}_2\alpha$ 是影响黄体退化的主要因素，而啮齿类、兔和灵长类来源于黄体的 $\text{PGF}_2\alpha$ 是主要的溶黄体物质。在反刍类家畜，黄体退化是由黄体分泌的催产素 (OT) 协同 $\text{PGF}_2\alpha$ ，并在雌激素和孕激素的调节下以旁分泌方式相互作用的结果。 $\text{PGF}_2\alpha$ 在黄体退化中的作用还包括降低黄体血流、减少小黄体细胞数目、抑制类固醇激素合成酶的活性、减少类固醇激素合成快速调节蛋白 (StAR) 基因表达、增加环氧合酶基因表达、抑制脂蛋白刺激的类固醇发生、改变膜流动性和释放黄体 OT 等。这些作用可能介导 $\text{PGF}_2\alpha$ 在黄体退化中的作用。 $\text{PGF}_2\alpha$ 抑制类固醇激素合成的效应是由磷酸肌醇第二信使系统介导的， $\text{PGF}_2\alpha$ 通过活化磷脂酶 C 升高细胞内 Ca^{2+} 浓度，降低孕酮生物合成的关键酶 3β -羟类固醇脱氢酶 (3β -HSD) mRNA 的稳定性，从而降低孕酮水平，抑制孕酮作用。这可能是黄体功能性退化过程中孕酮水平降低的一个原因。此外，StAR 负责将类固醇激素生物合成的底物 (胆固醇) 转运给细胞色素 P450 单链裂解酶 (P450_{scc})，这是类固醇激素生物合成的关键步骤。 $\text{PGF}_2\alpha$ 诱导黄体退化时血清孕酮和 StAR 水平也下降。故 $\text{PGF}_2\alpha$ 也通过激活蛋白激酶 C (PKC)，减少 StAR 表达而降低孕酮水平。

在 $\text{PGF}_2\alpha$ 及其类似物诱导黄体孕酮水平下降之后，还可诱导牛、羊及灵长类等多种动物卵巢黄体中出现大量小片段 DNA。在小鼠、大鼠及羊的卵巢黄体中均存在 $\text{PGF}_2\alpha$ 的高亲和力受体，假孕小鼠卵巢黄体在第 11 和 13 天出现凋亡现象，同时 $\text{PGF}_2\alpha$ 受体 mRNA 的表达也达到峰值，提示 $\text{PGF}_2\alpha$ 受体表达与黄体细胞凋亡密切相关，其介导的细胞内信号直接参与黄体细胞凋亡的调节。 $\text{PGF}_2\alpha$ 诱导黄体细胞凋亡是通过激活磷脂酶 C 而实现的，后者可增加黄体细胞内 Ca^{2+} 浓度，为诱发凋亡所需的 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 依赖性核酸内切酶 (负责将 DNA 裂解成 185bp 的片段) 的活化提供前提。

在反刍动物中，OT 由大黄体细胞产生并以分泌颗粒的形式储存于细胞质，在子宫阵发性分泌的 $\text{PGF}_2\alpha$ 刺激下脉冲式释放。OT 与子宫内膜 OT 受体结合后激活磷酸肌醇-PKC 信号系统，促进子宫吸收 Ca^{2+} ，刺激子宫内膜分泌更多的 $\text{PGF}_2\alpha$ ，两者形成的正反馈环路使黄体迅速退化。在大鼠黄体退化中， $\text{PGF}_2\alpha$ 可以促进卵巢一氧化氮合酶 (NOS) 活性，而一氧化氮 (NO) 也促进卵巢 $\text{PGF}_2\alpha$ 表达，两者呈正反馈调节机制。此外，OT 也能增加大鼠卵巢组织中 NOS 活性。因此， $\text{PGF}_2\alpha$ 、NO 和 OT 间的相互调节对哺乳动物黄体退化有重要作用。

总之，哺乳动物的黄体退化机制具有种属特异性， $\text{PGF}_2\alpha$ 在其中所起的作用也不尽相同。 $\text{PGF}_2\alpha$ 是哺乳动物的主要溶黄体因子，内皮素-1 (ET-1) 可能是其下游分子之一。OT 主要通过 $\text{PGF}_2\alpha$ 之间的正反馈调节参与黄体退化的调控。PRL 和孕酮对黄体有双向调节作用，两者共同作用导致大鼠黄体退化过程中的细胞凋亡。此外，肿瘤坏死因子 α (TNF α)、干扰素- γ (IFN- γ)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、基质金属蛋白酶 (MMPs)、Fas 抗原等多种因子也都参与这一过程的精确调节，在功能性和结构性黄体退化过程中起作用。

(三) 前列腺素与受精

前列腺素存在于各种哺乳动物的精液中，又能够影响平滑肌的收缩性，因而使人们

相信, PG 通过对生殖道平滑肌的一系列效应, 必然会对受精有促进作用。最近的研究表明, PG 参与精子的顶体反应。透明带蛋白 ZP3 和颗粒细胞分泌的孕酮被认为是精子顶体反应的生理刺激物。这两种刺激物所引发的信号转导都导致 Ca^{2+} 从细胞外内流。PGE₁ 专一性地结合于人精子质膜上并诱导细胞内 Ca^{2+} 瞬时增加, 其作用可被毫摩尔浓度的 La^{3+} 、 Gd^{3+} 和 Zn^{2+} 所阻止。精子表面的这种 PGE 受体的药理特性与已克隆的 PG 受体都不相同, 暗示着这可能是一种新型受体。在人精子中, 此受体是通过与 Gq 蛋白偶联而诱导 Ca^{2+} 内流和顶体反应的。在生理浓度下 Zn^{2+} 就能阻止 PGE₁ 诱发的顶体反应。 Zn^{2+} 可能作为精浆中的内源性 Ca^{2+} 通道阻断剂, 防止精子过早被 PGE₁ 激活而发生顶体反应。

此外, PG 在受精过程中的作用可能还有: ① 使睾丸被膜、精囊腺和输精管收缩, 对射精可能有重要作用。② 精液进入阴道后可使子宫颈舒张, 有利于精子通过。③ PG 对子宫肌肉有局部刺激作用, 可能促进精子在雌性生殖道内的运输, 使之迅速到达受精部位。

(四) 前列腺素与胚胎着床

PG 对啮齿类动物子宫中胚泡的均匀分布、着床和蜕膜反应等过程十分重要。PGE₂ 和 PGF₂α 受体基因在小鼠着床前子宫中是时间和空间特异性表达的, 而且子宫中各种 EP 和 FP 的表达由卵巢分泌的雌激素和孕酮调节, 与胚胎的存在与否无关。

EP1 在妊娠第 6~8 天子宫的次级蜕膜带中表达, 可能促进胎盘形成所需的血管发生。

EP2 只在第 4 和第 5 天的子宫内膜上皮中表达, 与着床所需的子宫内膜上皮分化有关。失去上皮的子宫不能对刺激发生反应而发生蜕膜化。所以子宫内膜上皮发出的信号对起始基质细胞的蜕膜化是很重要的。可能 EP2 的活化造成 cAMP 水平升高, 把内膜上皮的信号传递给基质细胞, 使之发生蜕膜化。

EP3 和 FP 在妊娠第 3~5 天的子宫肌层的环形肌中表达。已知平滑肌的收缩受胞质 Ca^{2+} 水平升高所刺激, 而受细胞内 cAMP 水平升高所抑制, 因为 EP3 可抑制腺苷酸环化酶, 而 FP 则可动员细胞内 Ca^{2+} 。所以在妊娠第 3~5 天, 环形肌所表达的 EP3 和 FP 协同作用, 介导子宫肌层收缩, 调整胚泡间隔, 使之在子宫中均匀分布, 有利于以后的发育。EP3 还在第 4 天的子宫系膜侧基质细胞中表达, 此处是血管发生和胎盘形成的预定位点。EP3 可能参与调节胚胎附着反应所需的子宫水肿和子宫腔封闭。EP3 缺失的小鼠不能对各种致热源表现出炎症反应, 说明 PGE₂ 可能通过 EP3 使子宫发生局部炎症反应, 有利于胚胎着床。

EP4 在妊娠第 3~5 天子宫的上皮和基质中表达, 这表明 PGE₂ 可能通过活化 EP4, 升高 cAMP 水平, 参与着床与蜕膜反应。另外 PG 是血管内皮生长因子 (VEGF) 的诱导者, 而后者刺激血管发生和血管通透性增高。缺失 EP4 的小鼠在子宫中并不致死, 但在出生后三天内因血管发生受阻而死亡。PGE₂ 可能通过 EP4 诱导出的 VEGF 使着床点处的血管通透性增高, 为以后的蜕膜反应和胚胎着床做准备。

着床前胚胎可以合成 PGF₂α, 这已在兔、牛、绵羊中证实。第 3 天和第 7 天的兔胚

泡 $\text{PGF}_2\alpha$ 合成量显著增加 (着床发生在第 7 天)。胚胎来源的 $\text{PGF}_2\alpha$ 不参与胚胎间隔调整和胚胎定向, 而是着床的刺激物。在哺乳动物中, 着床点的血管通透性增加是蜕膜反应的先决条件。正处于附着期的第 3 天胚胎迅速合成的 $\text{PGF}_2\alpha$ 被分泌到邻近的子宫内膜, 使之血管通透性增加。

(五) 前列腺素与分娩

哺乳动物分娩是由血浆中孕酮浓度迅速降低而引发的。在妊娠晚期, 循环血中的高浓度孕酮使子宫保持松弛。临产前短时间内, 血浆孕酮浓度迅速降低, 子宫中 OT 受体表达量显著增加, 使子宫收缩能力提高。由于受子宫收缩以及宫颈和阴道扩张的刺激, 下丘脑 OT 神经元活动增强, 释放 OT, OT 作用于子宫, 刺激其合成前列腺素, 进一步增强子宫收缩, 由此形成一个正反馈环路, 加速分娩过程。敲除 $\text{PGF}_2\alpha$ 受体基因的小鼠可以正常发育, 但不能及时分娩。它们表现出正常的发情周期、排卵、受精和着床, 但对外源的 OT 不反应, 因为它们不能被诱导合成催产素受体。野生型小鼠在妊娠第 19~21 天, 血浆孕酮浓度显著降低, 而 FP 基因敲除小鼠孕酮浓度却不降低。这表明 FP 缺失的小鼠不能分娩是由于不能适时抑制黄体中孕酮的生成。如在妊娠第 19 天切除卵巢, 就能使之迅速表达 OT 受体, 娩出胎儿。在妊娠小鼠中, $\text{PGF}_2\alpha$ 作用于黄体细胞的 FP, 导致黄体退化, 启动分娩。COX-1 基因敲除小鼠也不能正常分娩。COX-1 mRNA 在子宫蜕膜中表达, 而且 COX-1 主要合成 $\text{PGF}_2\alpha$ 。COX-1 基因敲除小鼠不能正常分娩是由于黄体退化受阻, 这再一次证明了 $\text{PGF}_2\alpha$ 与黄体退化的密切关系。实际上前列腺素才是真正启动分娩的关键激素, 而孕酮降低只是由于前列腺素的作用而导致黄体溶解后的结果。

总之, 前列腺素参与调节哺乳动物生殖过程的多个环节。作为近距离信号分子, 它具有局部、瞬时、作用灵活多样的特点。多种信号分子通过控制前列腺素合成酶基因的表达, 精确调控 PG 的时空特异性合成。而 PG 又通过其各种受体与不同 G 蛋白相偶联, 调节和协调多种细胞类型中的生化过程, 从而保证了生殖过程的顺利进行。近年来, 多种 PG 受体已被成功克隆, 其分子及基因结构、作用机理和表达调控正在被逐渐阐明, 而各种 PG 受体及 PG 合成酶基因的敲除又为 PG 与生殖过程的关系提供了直接证据。但对 PG 在某些生理过程中的重要性还缺乏足够的认识, 其作用的分子机理也有待深入探索。

实际上与生殖有关的激素远远不止上面介绍的这几类, 但由于篇幅有限, 本章只选择了目前已经明确的、比较重要的激素进行了介绍。关于其他激素对生殖的影响及作用机理, 本书的其他章节会有一定程度的介绍。

(夏国良 杨建鸽)

主要参考文献

- 安胜军, 张永祥. 2002. 雌激素受体亚型及其配体调节基因转录机制的研究. 生理科学进展 33: 309~312
曹少先, 杨利国, 张文伟. 2001. 前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ 溶解黄体机制研究进展. 中国草食动物 3: 41~44

- 范衡宇, 杨增明. 2000. 前列腺素及其受体与哺乳动物的生殖. 生理科学进展 31: 75~78
- 范衡宇, 杨增明. 2001. 催产素及其受体与哺乳动物的生殖. 动物学报 47: 453~458
- 耿建英, 吴建华. 2002. 人绒毛膜促性腺激素的分子结构与其免疫原性研究. 华北煤炭医学院学报 4: 716~718
- 关洪斌, 李庆章. 2002. 卵泡刺激素研究进展. 东北农业大学学报 33: 209~212
- 何为民, 陈奕权, 高学勇, 王世鄂, 周瑞祥. 1999. 人绒毛膜促性腺激素对小鼠睾丸间质细胞的表皮生长因子及其受体的影响. 中国体视学与图像分析 4: 256~261
- 霍立军, 杨增明. 2002. 哺乳动物黄体退化的分子调控. 生殖医学杂志 11: 185~190
- 霍涌玮, 邱曙东, 许拥军, 成少利, 武捷, 王丽蓉, 葛玲. 2002. 人精子质膜孕激素受体研究. 中华男科学 8: 277~280
- 季从亮, 储明星, 陈国宏. 2003. 褪黑激素受体基因的研究进展. 遗传 25: 221~224
- 贾悦. 2001. 孕激素与男性生殖. 中华男科学 7: 117~120
- 蒋尔鹏. 2002. 转化生长因子 β 超家族在雄性生殖细胞发育中的作用. 中华男科学 8: 435~437
- 解芳, 刘峻, 张永莲. 1999. 雄激素受体的作用机制. 生物化学与生物物理进展 26: 131~134
- 李俊杰, 贾青, 田树军. 2003. 雌性哺乳动物 LH 及其受体的研究进展. 黄牛杂志 29: 26~29
- 李昆明. 2001. 催乳素对生殖生理的调控作用. 生殖与避孕 21: 9~14
- 李连瑞, 何良军, 吴静. 2002. 褪黑激素对生殖的调控机理及其在动物繁殖中的作用和应用前景. 畜牧与兽医 19: 11~14
- 李绍华, 熊远著, 邓昌彦. 2001. 雄激素受体基因的研究进展. 国外畜牧科技 28: 33~35
- 李宇. 2001. 黄体生成素和绒毛膜促性腺激素受体的结构和功能. 内江师范学院学报 16: 33~36
- 刘以训. 2002. 卵泡分化排卵和黄体发生的分子基础. 潍坊学院学报 2: 1~12
- 罗莉, 焦中秀, 徐昌芬. 2001. 表皮生长因子对人绒毛膜促性腺激素分泌的影响及其受体在滋养层细胞中的表达. 南京医科大学学报 21: 106~109
- 史凌云, 方子龙, 李洪波, 张志文. 1998. 卵泡抑素对人绒毛膜促性腺激素分泌及基因表达的调控. 科学通报 43: 1754~1760
- 孙斐. 2000. 调控促卵泡激素和促黄体生成素“不同步”分泌的几种机制. 生殖与避孕 20: 67~73
- 唐美仪, 焦丽红, 张崇理. 1999. 促肾上腺皮质激素释放激素对人早期胎盘组织绒毛膜促性腺激素释放的调节作用. 动物学报 45: 323~331
- 王海滨, 李美玲, 夏国良, 吕忠显, 郭勇, 张建超. 2001. 促性腺激素对小鼠胚胎卵巢卵泡体外发育和类固醇激素发生的作用. 中国兽医学报 21: 617~620
- 王海滨, 谢辉蓉, 夏国良. 2002. 哺乳动物卵巢中的抑制素和活化素. 农业生物技术学报 10: 197~202
- 王建辰等. 1997. 动物生殖调控. 合肥: 安徽科技出版社
- 王鲜忠, 李跃民, 张家骅. 2000. 人孕酮受体激素结合区片段在大肠杆菌中的表达条件. 动物医学进展 21: 60~63
- 夏国良, 吕忠显. 2000. 促减数分裂甾醇 (MAS) 在辅助生殖生物学中的作用及应用前景. 农业生物技术学报 8: 7~11
- 杨锦昌, 陈进军. 2003. 抑制素对雄性动物生殖的影响. 动物医学进展 24: 35~36
- 叶丹, 潘建伟, 廖鸣娟, 张志和, 朱睦元. 2003. 促性腺激素释放激素的结构及其生物学功能. 生物化学与生物物理进展 30: 49~53
- 张沅, 朱国璋, 张友端, 张永莲. 1997. RT-PCR 测定大鼠妊娠早期子宫孕激素受体基因的表达. 生物化学与生物物理学报 29: 221~228
- 中国农业大学. 家畜繁殖学 (第三版). 北京: 中国农业出版社 2000
- 诸定寿, 翁静, 许晴, 史小林, 路欣, 梁元晶. 1997. 雌性小鼠生殖系统, 垂体和大脑中孕酮受体的免疫细胞化学研究. 首都医科大学学报 18: 222~224
- 祝辉, 于宁妮, 林敏, 周作民, 沙家豪. 2001. hCG 对成年小鼠睾丸 Leydig 细胞中睾酮生成酶的调节作用. 解剖学报 32: 146~150
- Brydon L, Petit L, Delagrang P, Strosberg AD, Jockers R. 2001. Functional expression of MT2 (Mel1b) melatonin receptors in human PAZ6 adipocyte. Endocrinology 142: 4264~4271

- Calogero AE, Burrello N, Barone N, Palermo I, Grasso U, D Agata R .2000. Effects of progesterone on sperm function: mechanism of action . Hum Reprod 15 (Suppl 1): 28~45
- Dubois EA, Zangbergen MA, Peute J, Goos HJ .2002. Evolutionary development of three GnRH systems in vertebrates . Brain Research Bulletin 57: 413~418
- Latham KE, Bautista FD, Hirao Y, O'Brien MJ, Eppig JJ .1999. Comparison of protein synthesis patterns in mouse cumulus cells and granulosa cells: Effects of follicle-stimulating hormone and insulin on granulosa cell differentiation in vitro . Biol Reprod 61: 482~492
- Liu YX .1999. Regulation of plasminogen activator system in the ovary . Biological signals and Receptors 8: 160~177
- Lovell TM, Gladwell RT, Groome NP, Knight PG .2002. Modulatory effects of gonadotrophins and insulin-like growth factor on the secretion of inhibin A and progesterone by granulosa cells from chicken preovulatory (F1~F3) follicles . Reproduction 123: 291~300
- Meehan T, Schlatt S, O'Brien MK, de Kretser DM, Loveland KL .2000. Regulation of germ cell and Sertoli cell development by activein, follistatin, and FSH . Dev Biol 220: 225~237
- Montaner AD, Mongiat L, Luw-Lantos VA, Warby C, Chewpoy B, Bianchi MS, Libertun C, Rivier JE, Sherwood NM, Somoza GM .2002. Guinea pig gonadotropin-releasing hormone: expression pattern, characterization and biological activity in rodent . Neuroendocrinology 75: 326~338
- Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, Hizaki H, Tuboi K, Katsuyama M, Ichikawa A, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S .1998. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. Nature 395: 281~284

第十三章 性行为及激素调节

动物的行为包括定型行为 (stereotypic behavior) 和学习行为 (learning behavior) 两大类, 前者指具有固定动作模式的行为, 亦称先天行为 (innate behavior) 或本能行为 (instinctive behavior), 包括动物的非条件反射 (unconditioned reflex)、本能行为 (instinct)、动机行为 (motivation behavior) 和节律行为 (rhythm behavior) 等; 后者则是指动物由经验得来的发生适应性改变的行为, 包括条件反射 (conditioned reflex)、模仿行为 (imitation behavior) 和推理学习 (insight) 等。性行为 (sexual behavior) 属于定型行为, 是动物最基本的本能行为, 是两性动物接触中出现的本能反应, 反映了特定基因型的相对竞争能力, 是物种繁衍的前提条件, 因此也是种族生存所必需的。

哺乳动物在长期的进化过程中, 逐渐发展了一整套生理学和神经学的机制, 这些机制保证在个体生命达到相对成熟时, 出现一种独特的、具有繁衍和延续种族的重要生物学意义的行为, 这就是性行为。广义上说, 异性之间导致精子和卵子结合的一切行为都属于性行为, 狭义的性行为则是指初情期后, 在激素、神经刺激 (视觉、嗅觉、听觉和触觉等) 与异性发生联系的基础上所表现出来的特殊行为。两性在性行为上协调配合是完成交配过程的重要保证。

发生性行为的双方通常一方处于选择地位, 另一方则处于被选择的地位, 被选择方在性行为中相对来说比较积极主动。而对后代的能量和物质的投资较大的一方, 处于选择的地位。

性行为是在神经、激素、感官和外激素等多种因素的作用下发动的, 多种因素之间密切联系, 相互促进、相互协调。如激素直接刺激动物的中枢神经系统, 将体液信号转变为性冲动, 共同作用的结果导致交配的成功完成, 从而实现受胎和产仔。

第一节 控制性行为的神经-内分泌系统

一、控制性行为的激素机制

哺乳动物的性行为受激素, 尤其是生殖激素的严格调节。下丘脑-垂体-肾上腺轴 (hypothalamus pituitary adrenal axis, HPAA) 和下丘脑-垂体-性腺轴 (hypothalamus pituitary gonadal axis, HPGA) 是两个十分重要的调节环路。下丘脑-垂体-性腺轴包括雄性动物的下丘脑-垂体-睾丸轴 (hypothalamus pituitary testis axis, HPTA) 和雌性动物的下丘脑-垂体-卵巢轴 (hypothalamus pituitary ovary axis, HPOA)。

(一) 下丘脑-垂体-性腺轴

哺乳动物发育到一定年龄，下丘脑的发育也日臻成熟，在受到外界环境的刺激和体内其他激素的调节下，由神经内分泌细胞核团（主要是 GnRH 神经元核团）开始合成和分泌促性腺激素释放激素 GnRH。在所有的哺乳动物中，GnRH 都是一个重要的调控生殖功能的神经肽物质，其功能十分强大，它通过正中隆起（median eminence）到达垂体前叶，刺激该处的内分泌细胞合成和分泌促性腺激素，如促卵泡激素（FSH）和促黄体激素（LH）。这两种激素进入血液，通过血液循环到达靶器官——性腺（睾丸或卵巢），发挥其生理作用。促性腺激素一方面促进配子（精子或卵母细胞）的生长发育，另一方面又刺激性腺类固醇激素（雄激素、雌激素和孕激素）的合成和释放，而这些类固醇激素可以直接影响家畜的性活动和性行为，如雌二醇可促进生殖道上皮的变化和分泌，促进发情，而持续高水平的孕酮则抑制雌性动物的发情行为，睾酮则对雄性动物的生精机能和性行为产生强有力的调控作用。公绵羊被动免疫 GnRH 后，血清睾酮浓度就会发生变化。另外，促性腺激素和类固醇激素又可以通过反馈调节作用来影响下丘脑 GnRH 的合成和分泌。

(二) 下丘脑-垂体-肾上腺轴

下丘脑合成的促肾上腺皮质激素释放激素（corticotrophin releasing hormone, CRH），能够促进垂体前叶合成和释放促肾上腺皮质激素（adrenocorticotrophic hormone, ACTH），后者又刺激肾上腺合成和释放肾上腺皮质激素（包括糖皮质激素和盐皮质激素）、肾上腺素（epinephrine）和去甲肾上腺素（norepinephrine, NE），此外也有少量的性激素。这些激素一方面直接参与调节动物的性行为，另一方面可以提高动物对逆境的反应性。

下丘脑-垂体-性腺轴和下丘脑-垂体-肾上腺轴不仅精密调节性行为，而且还调节其他生殖行为。从卵母细胞的生长、发育、成熟和排卵，直到受精、胚胎的着床、妊娠和分娩，无不受激素的调节和控制。下丘脑-垂体-性腺轴和下丘脑-垂体-肾上腺轴中的神经内分泌激素，如 GnRH 或 CRH 可以促进仓鼠的生殖行为，提前出现发情表现，缩短母鼠接受交配的时间。

(三) 5-羟色胺系统

5-羟色胺（serotonergic, 5-HT）与动物的性行为也有密切的关系。如 5-HT_{1A} 和 5-HT_{2A} 都能调节性行为。5-HT 受体的活性在调节雄性大鼠的性行为中发挥重要作用，如该受体的活性受到抑制，大鼠的性行为就会受到持续抑制。中枢 5-HT 系统与下丘脑-垂体-肾上腺轴密切相关，几乎所有的 5-HT 神经元都有糖皮质激素的受体表达，而血液中下丘脑-垂体-肾上腺轴的相关激素水平又影响着 5-HT 神经递质，5-HT 反过来又调节血液中下丘脑-垂体-肾上腺轴相关激素的水平。肾上腺皮质酮调节雄性大鼠的性行为

和湿狗抖 (wet dog shake, WDS), 这种行为受 5-HT_{2A} 受体调节。湿狗抖是大鼠的一种特征性的行为, 通常被用来衡量大鼠的交配性能, 它与大鼠的交配能力呈负相关, 皮质酮的持续升高会抑制雄性大鼠的性行为, 增加湿狗抖的频率。一个社群中处于统治地位的雄性大鼠会抑制处于支配地位的其他雄鼠的性行为, 同时后者通过内分泌变化, 使肾上腺增重, 皮质酮水平上升。此外, 5-HT 系统还与下丘脑-垂体-性腺轴相互作用, 这将在后面进一步阐述。

二、控制性行为的神经机制

性行为主要受中枢神经系统的控制, 性腺激素则通过直接地或间接地影响于中枢神经系统而发挥调节性行为的效应。直接的作用通过体液循环抵达脑部实现, 间接的影响是通过性激素对生殖器官以及非生殖器官的形态学变化起作用, 而这些形态学上的变化则导致中枢神经系统对各种感觉的反馈发生改变。

Agmo (1999) 总结了中枢对性行为的调控作用, 如图 13-1 所示。中枢性动机提高了感觉器官的敏感性, 而这种刺激被感知后, 感觉器官又刺激中枢的性动机, 性动机受激动后又反过来进一步提高感觉器官的敏感性 (图 13-1a)。当性刺激达到一定的阈值, 中枢启动一系列的脏器活动, 为性行为做准备 (图 13-1b)。另外, 适宜的环境刺激促进性行为。在两性亲近过程中, 可能还有其他因素激发性的动机, 这些刺激会传递到中枢, 并通过 a 途径加强中枢的性动机 (图 13-1c); 如果亲近行为很好地实现, 并且适宜的各脏器反应也完成, 则交配对象的主要行为模式由条件或非条件实质性反应向执行性反射转变。这些性反射受触觉刺激促进, 如对会阴和下腹区触觉刺激; 如果交配的对象尚没有交配经历, 则这些引发交配行为的刺激会在探索中偶然获得; 如果交配对象已经有性经历, 则条件实质性反应可能会促进触觉刺激的获得, 而这些触觉刺激对于性反射是必需的; 如果性反射确实受到激发, 则性行为会有序地进行下去, 直到射精 (图 13-

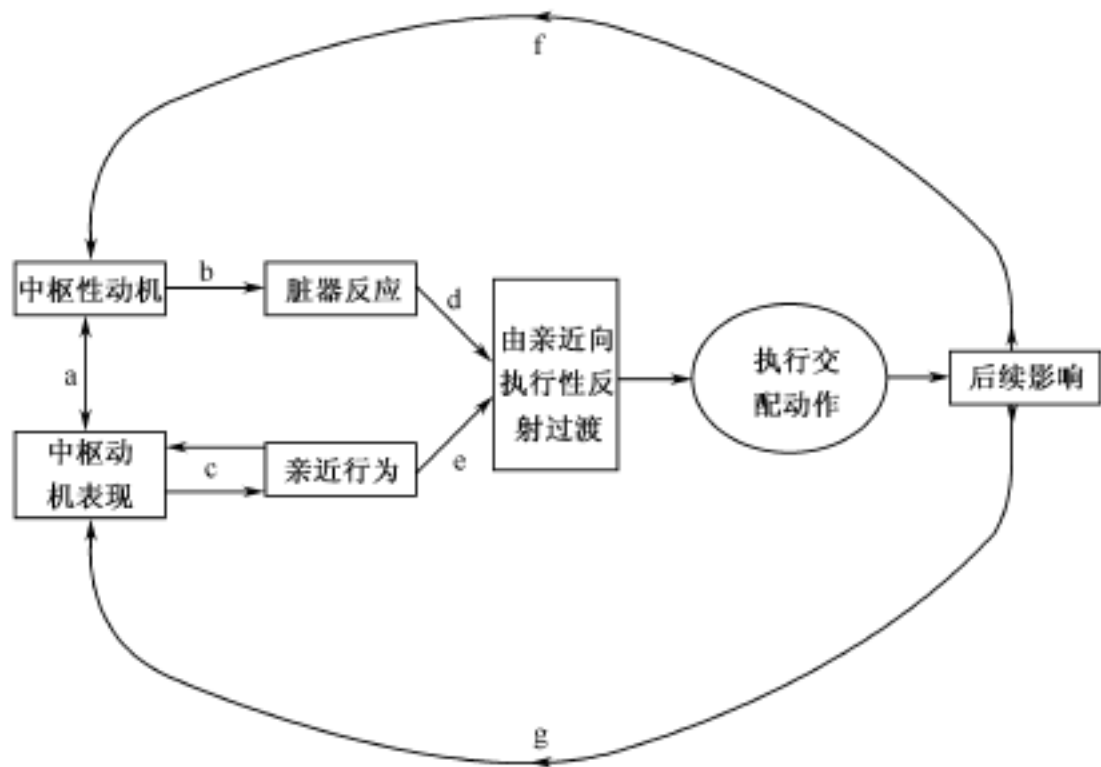


图 13-1 性动机模式图 (引自 Agmo, 1999)

1d 和 e)。射精产生的影响会反馈性地作用于中枢，由此激活一个短暂的性抑制机制(图 13-1f)。同时，射精产生的一系列影响会加强动物掌握其自身与环境状态之间的联系。交配过程中所处的环境状态也被赋予性刺激的特性，作为条件反射的刺激诱导性行为(图 13-1g)。

(一) 中枢神经系统

血液中的性激素(雌激素和雄激素)到达中枢神经，一旦与中枢神经的特定感受器(性中枢)结合，便能使性腺(卵巢和睾丸)以外的其他器官发生性反应。有的性中枢位于下丘脑视前区的某部位，独立于下丘脑-垂体-性腺轴之外。外周血液中的性类固醇激素能够直接作用于中枢神经系统，从而影响动物的性行为。中枢神经系统对性行为的作用已经可以从以下多个方面得到证明。

1. 脑损伤影响性行为

杏仁核和梨状体的损害可导致公猫长期的性欲过度，这提示了脑组织对性行为的作用。从视前区通往中脑和网状结构的路径是实现雄性性行为的必需通路，但并不是雌性性行为所必需的。因此，雄性动物性行为的正常表现需要视前区-下丘脑外侧区域结构的完整。雄性大鼠视前区受损后，交配能力也随之丧失。破坏猫的杏仁核和梨状叶皮层，以及破坏猴的杏仁核和颞叶所形成的脑损伤，将造成性欲异常旺盛，但不能鉴别爬跨对象(如爬跨其他物体)。这种性行为的异常表现，在其他动物也有不同的反映。例如，损伤犬的梨状皮层或损伤大鼠的杏仁核对性行为并不产生显著的影响，破坏大鼠海马背侧和腹侧两个区域只是延长第一次爬跨和插入的时间，而对雄性性行为的其他方面并无影响。有趣的是，切除大鼠海马背侧区也和切除下丘脑背侧区一样因缩短了多次插入和射精之间的时间而加速了交配过程。在雌性动物，将卵巢摘除的羊、豚鼠、猫和大鼠的脑部(从下丘脑外侧至下丘脑中线基部的背侧)损伤后，用雌激素处理并不能诱导它们发情。损伤卵巢摘除的雌性大鼠和豚鼠的下丘脑腹侧周围区域，则可成功地诱导它们发情。这项试验的意义在于，损伤所诱导的发情很可能是通过对脑的一定区域起抑制作用的结果。新皮层在控制雌性动物性行为方面是与雄性不同的。大鼠在切除新皮层后，可以促进脊柱下凹反应，使公鼠更易于插入。大鼠在雌激素处理后再切除新皮层，可以增强发情。这些试验提示，大鼠发情的表现是处于新皮层的控制之下的。

2. 脑内植入性激素可改变性行为

如将少量睾酮植入已去势的雄性动物脑部视叶前区后，可以恢复雄性行为。实际上，睾酮本身并不能起恢复性行为的效应，植入的睾酮是在脑组织中(视前区中)转化为雌激素后才起作用。因为，直接植入雌二醇于去势公鼠的视叶前区也引起雄性行为，而将阻断睾酮转化为雌二醇的抑制剂渗入该区域时，经睾酮处理的去势公鼠将不能表现性行为，但不能制止经雌二醇处理的去势公鼠的性行为，这些试验证据支持了上述的看法，即睾酮的作用是通过转化为雌激素实现的。

性激素对雌性动物也有类似的作用。例如将雌二醇植入卵巢摘除的大鼠和猫的下丘

脑中可诱导发情，但在兔子则应植入于前乳头区才产生效应。虽然大鼠下丘脑外侧对雌激素有反应，但如果植入孕酮的话诱导发情的效应就尤其显著，这时孕酮结合位点局限在脑干和下丘脑外侧部位，说明脑的这些区域也是孕酮被选择性地聚集的部位。

3. 脑组织能够浓集吸收性激素

脑部激素放射自显影技术证明，脑的某些部位可以聚集比其他器官更多的性腺激素。给去势公鼠注入放射性标记的睾酮后，被聚集于脑的边缘系统和下丘脑结构之中。给卵巢摘除的动物注射放射性标记的雌二醇后也被聚集在脑的这些区域中。这些结果证明脑组织有吸收和结合性激素的能力。

4. 电刺激脑部可改变性行为

母兔交配后嗅脑部的脑电图会出现反常变化。电刺激视叶前区内侧和前脑束内侧可以促进雄性大鼠的交配行为，这些试验结果同大鼠脑损伤的研究相一致（如果脑的这些区域损伤的话，则交配行为终止）。视叶前区域发出纤维通过前脑束内侧通往中脑的中脑盖部，电刺激中脑盖部也可以促进雄性动物的交配行为。因此，视叶前区、中脑盖部以及这两者之间的联络路径即前脑束内侧，可以形成雄性性行为重要的调节系统，至少在大鼠是这样。

5. 脑组织中有性激素受体表达

免疫组织化学研究表明，无论是雄性还是雌性动物，下丘脑和垂体中都有雌激素和雄激素受体的表达。用原位杂交在脑组织中可检测到性激素受体 mRNA。这些结果表明，脑组织可能是性激素的靶器官。此外，脑组织的芳香化作用是控制动物性行为的重要机制。

可见，丘脑下部是各种动物雄性性行为的整合中枢，特别是视叶前区-下丘脑外侧区的整合作用，是显示雄性交配行为所必需的。而雌性动物的新皮层对表现性行为不是必需的，事实上新皮层可以主动抑制性行为。嗅球、中隔、杏仁核和海马等边缘系统是调控性行为的更高级中枢，也是控制两性动物情绪状态的主要部位。纹状体系统对于调节感觉协同是重要中枢，而这种协同是交配所必需的。中央边缘和中央皮质系统 (mesolimbic-mesocortical system) 在性行为的准备期发挥重要作用，主要对于性觉醒和性激动，还有可能对性回报，发挥重要作用。相反，垂体某些未确定区域 (incertophylohalamic system) 在完善性行为中起主导作用，如插入准备、勃起。脑干和垂体后叶可能对性反应有特定的抑制作用。

(二) 自主神经系统

除中枢神经系统以外，自主神经系统对雄性动物的勃起和射精具有支配作用。雄性动物的勃起受脊髓荐节的副交感神经的支配，而射精则受交感神经的控制。某些家畜（如猪）和野生动物（如大熊猫和熊）的电刺激采精就是利用了这一机制，用电极直接刺激腰荐部的神经中枢而实现采集精液的目的。

(三) 感官和外激素

激素是体内刺激因素作用于神经系统引发性行为变化的动因，而感官引起的性刺激，则是神经系统对外界刺激的反应。其中嗅觉、视觉、触觉和听觉是起主要作用的感觉器官，而不同动物利用各种感觉器官的能力差异很大，异性的吸引力、识别配偶和促使性觉醒的敏感性也不相同。感觉能力的丧失和减弱，就会影响性行为的发动，如失明的公畜会失去种用价值，失聪的公畜的配种能力也会大大降低。特别是对于无交配经验的雄性动物，其感官伤害所造成的影响是很大的。通常一种感觉受损，另一种感觉会发生代偿性的增强作用，如视力丧失时往往嗅觉或触觉的敏感性会相应增强。

动物对同种异性的气味十分敏感，尤其是对发情期雌性动物的气味。气味多由分泌某种挥发性异臭的腺体产生，对异性的性行为具有很强的刺激作用，通过嗅觉引发和强化异性的性行为。通常把动物的这类由特定腺体分泌并释放到外界环境，能引起同种异性动物特定性行为和生理反应的激素称为性外激素 (sexual pheromone)。外激素通常不是由单一的物质组成，而是一种混合物。外激素可以通过空气传播到很远的地方，吸引异性相互接近和交配。公猪包皮憩室分泌物和颌下腺分泌的唾液中的性外激素，对母猪的发情行为有强烈的刺激作用，而发情母猪尿液和阴道分泌物的气味同样能激发和促进公猪的性行为。成年公羊能很快从羊群中分辨出发情的母羊，就是依靠发情母羊释放出的外激素。麝的包皮腺分泌的麝香，其主要成分是麝香酮，对异性起着很强的诱情作用。发情的犬、猫和狐狸等动物的尿和外阴气味，都对雄性动物性行为有特异的促进作用。除此以外，外激素还可以促进动物的初情期和性成熟提前，诱导乏情雌性动物进入发情状态，缩短发情周期，促进排卵和提高受胎率等功能。

外激素主要来源于动物的皮脂腺、生殖管道和尿道。最早的一些实验表明，在小鼠中雄性气味具有影响生殖行为的作用。有一种现象叫做白化效应 (whitten effect)，即当给雌性小鼠引入一只雄性小鼠 (或给予雄性气味，如添加雄性的敷料)，就可使许多雌性在 3 天内发生同步发情。在这种情况下，外激素的作用是刺激促性腺激素的合成和释放。另外一种效应称为 Bruce effect，即如果给刚怀孕的雌鼠引入一只陌生的雄鼠则会阻断妊娠的持续。陌生雄性气味的影响是阻断催乳素的释放，而催乳素是啮齿类动物黄体形成和妊娠维持的重要激素。可见外激素明显地影响生殖周期。

在性容受性期间，外激素对于雄性吸引雌性动物是非常重要的。雌性的性吸引力也部分来自于在发情时释放的外激素。例如，从发情前期和发情期狗阴道分泌物中分离的对羟基苯甲酸甲酯 (methyl-p-hydroxybenzoate) 对雄性就有作用。当把雄狗引入未发情的母狗中时，这种物质使雄狗对雌狗的肛门生殖器区 (anogenital) 产生强烈的兴趣。雌性也受雄性气味的影响，如发情的母猪接触到雄性的尿液时表现出交配姿势 (rigidity)。雄激素本身可以起着外激素的作用，或者它可以影响肾脏内产生某种物质来影响雌性的性行为。雌性对雄性的注意包括雌性对雄性感觉的刺激变化 (由于雌性生理状态的变化)，而不是由于雄性本身的变化。

雄性划分自己领域的典型方法是用尿液来圈地。一般来说，影响性行为的外激素具有气味掩盖的作用。人类使用的经典外激素就是香水，来自于香猫酮 (civetone)，是一

种从麝香猫中得到的环 17-碳化合物。

白化效应曾被用来调控动物的发情周期。在绵羊繁殖季节开始前，将雄性引入一群雌性中，来保证母羊提前或在繁殖季节开始时进入周期发情。过去曾认为，使用这种方法的效应是短效的，即促性腺激素反应只能在头几天中从那些具有有腔卵泡的母羊中获得。但现已清楚，公羊的介入可以导致较早的卵泡活动。可见，外激素可以代表一些雄性的影响。但近来也有研究表明雄性动物在雌性视觉中的出现和身体接触才是影响促性腺激素分泌和卵巢活动的重要因素。白化效应还被用于影响猪的初情期的发生。在预计初情期（180~200 天）前几周，给雌性小猪引入雄性来使其提前或保证初情期的发生。

此外，来自异性的视觉和听觉刺激，如发情雌性动物的行为、姿态和叫声，都能够诱发和强化雄性动物的性行为。在家畜人工采精的生产实践中，可以利用上述特点，制作与母畜形体大小相似的假台畜，并在上面涂抹发情母畜生殖道分泌物，经过训练的公畜见到假台畜即可产生一系列的性行为，从而顺利完成采精。雄性动物求偶时，通过接触异性会加强双方的性行为，阴茎上更是分布有丰富的神经，接触刺激最终导致射精活动。

感官引起的性刺激对雄性动物性行为的引发和促进作用，实际上也是通过神经和激素调节实现的。

(四) 神经递质

除了生殖激素外，越来越多的实验证明，神经递质（neurotransmitter）也参与动物性行为的调节。神经递质是一类由神经细胞合成的，在神经细胞间传递化学信息的物质，多达几十种，按化学性质分单胺类（如多巴胺、肾上腺素和 5-羟色胺）、胆碱类（如乙酰胆碱）、氨基酸类（如 γ -氨基丁酸、谷氨酸和牛磺酸）和神经肽类（如 β -内啡肽、脑啡肽、胆囊收缩素和 P 物质等）。如去甲肾上腺素受体介导了大鼠下丘脑的信号转导，而卵巢类固醇激素则调节这一过程。哺乳动物大脑中所有产生复合胺的神经元大都位于中脑或后脑区的多个核团中，复合胺神经系统对卵巢类固醇激素具有多种调节作用。表 13-1 和 13-2 列出了主要的神经肽对雄性和雌性动物性行为的作用。

这些神经递质在神经细胞中合成后，以囊泡的形式储存起来，当受到生理性刺激时从神经末梢释放出来，作用于神经细胞的突触后膜或其他靶细胞上的特异受体，从而实现神经细胞之间或神经细胞与其效应器之间的信息传递。在调控性行为的中枢神经递质中，多巴胺是研究得较多的一种。多巴胺对雌性绵羊的性行为有双向调节作用。对大鼠、猴和人的神经药理学、生物化学、生物电学和心理学研究发现，多巴胺通过不同的神经元系统和受体亚型系统在调控性行为的不同方面发挥不同的作用。用 γ -氨基丁酸的拮抗剂灌注大鼠和仓鼠的腹外侧核，能够抑制雌性大鼠和仓鼠的性行为，如脊柱下弯反应，提示 γ -氨基丁酸对于性行为的重要影响。此外，肾上腺素、去甲肾上腺素和 5-羟色胺都是对性行为有重要作用的神经递质。

表 13-1 神经肽在中枢神经水平上对雄性动物性行为的影响（引自 Argiolas, 1999）

神经肽	对交配行为的影响	相关受体	相关的大脑神经区域
ACTH/ MSH peptides	促进	n .a .	HY、MPOA
阿片肽	抑制 *	μ、δ、κ	MPOA、PVN、VTA
催产素	促进	尿型	PVN、MO、pons、SpC
LHRH	促进、抑制、无影响	n .a .	n .a .
CRF	抑制	n .a .	n .a .
NPY	抑制	n .a .	MPOA
Galanin	抑制、促进	n .a .	MPN
CCK8	无影响、促进	n .a .	MPN
P 物质	促进	n .a .	MPN
Neurokinin K	抑制	n .a .	MPOA、BNST
VIP	促进	n .a .	n .a .

* :阿片肽能弱化性行为,但易化性动机。

ACTH/ MSH(adrenocorticotropin/ melanocyte-stimulating hormone):促肾上腺皮质激素/黑色素细胞刺激激素; LHRH(luteinising hormone-releasing hormone):促黄体素释放激素;CRF(corticotropin releasing factor):促肾上腺皮质激素释放因子;NPY(neuropeptide Y):神经肽 Y;CCK8(cholecystokinin 8):胆囊收缩素 8;VIP(vasoactive intestinal peptide):血管活性肠肽;MPOA(medial preoptic area):中央视前区;MPN(sexually dimorphic preoptic nucleus):性双向视前核;PVN(paraventricular nucleus of the hypothalamus):下丘脑室旁核;HY(hypothalamus):下丘脑;VTA(ventral tegmental area):腹外侧区;BNST:bed nucleus of the stria terminalis;MO:medulla oblongata 延髓;SpC(spinal cord):脊索

表 13-2 神经肽在中枢神经水平上对雌性动物性行为的影响(引自 Argiolas, 1999)

神经肽	对交配行为的影响	相关受体	相关的大脑神经区域
ACTH/ MSH peptides	促进	n .a .	MPOA、VHM
阿片肽	抑制	μ、δ、κ	MPOA、VMH、MCG
催产素	促进	尿型	MPOA、VMH
LHRH	促进	n .a .	n .a .
CRF	抑制	n .a .	n .a .
NPY	抑制	n .a .	MPOA
Galanin	抑制,促进	n .a .	MPN
CCK8	无影响,促进	n .a .	MPN
P 物质	促进	n .a .	MCG

注:VMH(ventromedial nucleus of the hypothalamus):下丘脑腹正中核;MCG(mesencephalic central gray):中脑中央灰质

第二节 雄性性成熟和性行为

一、雄性性成熟

(一) 初情期 (puberty)

雄性动物出生后，随着性腺的生长发育，开始逐渐表现出性行为，如爬跨同性或异性。早期的这些行为虽然具有性行为的特征，但性行为的序列尚不完整，只有到表现出

完整的性行为序列，并排出具有受精能力的精子，才达到初情期。动物发育到初情期，就初步获得了生殖能力。初情期是雄性动物生殖器官和身体发育最为迅速的生理阶段。

(二) 性成熟 (sexual maturity)

性成熟时生殖系统已经完全发育成熟，具备了生殖能力，此时交配可以使异性受孕，但机体其他部位的发育仍未成熟，仍不宜配种。初情期前接触酒精环境会使雄性大鼠的性行为提前开始。

(三) 体 成 熟

到体成熟时，动物生殖系统和其他系统的发育都基本成熟，具备了成年动物固有的外貌特征，体重约达到成年体重的 70%。所以，生产上有时又把体成熟称为初配年龄。如果在初情期之前去势，动物的生殖器官发育就会停止，第二性征不会出现，也不表现性行为。如果在性成熟后去势，生殖器官逐渐萎缩，第二性征在持续一段时间后消失。如果去势后用同种性别的性激素处理，则可使性器官继续发育并出现性行为，说明性激素对生殖器官和性行为起着维持和支配作用。表 13-3 列出了几种动物初情期、性成熟和体成熟的时间。

(四) 生殖机能停止期

动物到一定年龄后，便不再产生具有受精能力的精子和表现出性行为，即到达生殖机能停止期。实际上，动物在生殖机能停止之前，要经历相当长时间的衰退过程，因此种用的动物常常在停止期到来之前就不宜再作种用。

表 13-3 几种雄性动物初情期、性成熟和体成熟时间

动物	性成熟	体成熟
牛	10~18 月龄	2~3 岁
水牛	18~30 月龄	3~4 岁
马	18~24 月龄	3~4 岁
驴	18~30 月龄	3~4 岁
骆驼	24~36 月龄	5~6 岁
猪	3~6 月龄	9~12 月龄
绵羊	5~8 月龄	12~15 月龄
山羊	5~8 月龄	12~15 月龄
家兔	3~4 月龄	6~8 月龄
水貂	5~6 月龄	10~12 月龄

二、雄性性行为的表现

性行为包括由一系列固定动物模式按程序所组成的行为组合，包括性觉醒 (sexual arousal)、求偶 (courtship)、勃起 (erection)、爬跨 (mounting)、插入 (intromission)、冲插 (thrusting)、关塞 (lock)、射精 (ejaculation) 和性失效等。并不是每一种动物都要经历上述各个阶段，但对于一个特定的物种来说，性行为的模式是固定的。不会因交配环境和经验等变化而发生根本变化，并严格按一定的顺序表现出来，不能前后颠倒，也不能省略或超越，因此叫性行为链 (sexual behavior chain)，也称性行为序列 (paced sexual behavior sequence)。雄性动物正常的性行为序列是顺利完成交配和采精的必要条件。对于初次参加配种或采精的雄性动物，有时会出现越过某阶段或次序颠倒等不正常的性行为序列，如常见的公畜阴茎尚未勃起就已爬跨，或阴茎未插入阴道就已射精的现象，都无法完成交配和射精。猪和马性行为序列表现和完成交配的时间较长，而牛和羊要短得多。性行为序列中每一个阶段都有一定的刺激和反应，每一步反应又构成对下一步的刺激，如此下去，最后导致射精。

性激动 (sexual motivation)、性倾向 (sexual partner preference) 和性表现 (sexual performance) 代表了性行为的三个方面，每一个方面对于该物种的繁衍都至关重要。雄性性行为表现为威胁行为 (threat behavior)、挑战行为 (challenge behavior)、领域行为 (territory behavior)、性嗅反射行为 (olfactory reflex behavior)、触推行为 (touch behavior) 和照管行为 (caring behavior) 等。不同动物的性行为具体表现不尽相同。

决定性行为发生的事件是性激动。多数雄性动物在交配前会嗅闻和触推雌性头部、体壁和生殖道，并嗅闻雌性排出的尿液。嗅闻或吸吮雌性会阴和尿液后抬头、伸颈、上唇卷起，借此努力将其中的化学敏感信息吸入，位于犁鼻软骨和脑部的嗅觉系统对此加以分辨，以判断雌性的发情状态。雄性自体会有发声和排尿表现，表 13-4 列出了几种动物主要的性行为表现。

在一系列的雄性性行为中，求偶行为最为复杂多样。求偶行为是一种信息交流，也属于通讯的范畴，可能是翩翩起舞，娓娓动听，香气诱人。求偶有助于动物之间的相互识别，包括种类、性别和生理状态的辨认。通过交换信息，降低双方初遇时可能的攻击性倾向，从而促使双方相互配合，找到性器官，准备进行交配。求偶行为具有吸引异性、防止异种间杂交、激发异性的性欲望和选择最理想的配偶等作用。

公鹿在配种季节到来时，会寻找一个幽静偏僻的地方，踩踏出一块圆形平坦的小区，借此吸引或等待母鹿前来与之交配。有些动物的雄性个体在求偶时向雌性个体奉献一点食物，为雌性个体在最需要营养、准备产卵和产仔时提供额外的食物来源，也可诱发异性的性反应、减少逃跑和降低攻击反应。群体中的雄性动物在求偶季节常为争夺性伴侣而发生攻击行为 (aggressive behavior)，获胜的雄性就有更多的机会与雌性交配，这有利于物种的生存和进化。

表 13-4 几种动物性行为表现

行为	牛	绵羊	山羊	猪	马
嗅闻	嗅闻母牛生殖器官、尿和头部	嗅闻母羊生殖器官、尿和头部	嗅闻母羊生殖器官、尿和头部	嗅闻母猪生殖器官、尿和头部	嗅闻母马生殖器官、尿和头部
性嗅反应	抬头，伸颈，上唇嘬起，“叭哒嘴”持续 10～30 秒	抬头，伸颈，上唇嘬起，“叭哒嘴”持续 10～30 秒	抬头，伸颈，上唇嘬起，“叭哒嘴”持续 10～30 秒	无	类似牛羊
排尿	无	无	性兴奋时频频排出少量尿于前肢	性兴奋时节奏性排尿	用尿标记母马曾用尿处
发声	无	两性接近时，发出求偶的咕噜声	两性接近时，发出求偶的咕噜声	有求偶的咕噜声	性兴奋性嘶鸣
对母畜触觉刺激	舔母畜的生殖器	舔母畜的生殖器	舔母畜的生殖器	以鼻拱母猪的肋部	舔母马身体，咬背和颈
求偶姿势	头压置于母牛的背部	“轻推”，头转向一侧，前肢动作	“轻推”，头转向一侧，前肢动作		
交配姿势	头压在母牛背上，射精时有“冲跳”	射精时头向后急速转动	射精时头向后急速转动	射精时不动，阴囊和肛门节奏性收缩	咬母马的颈部
交配后反应	无	伸展头和颈	伸展头和颈	无	无

雄性大熊猫到了生殖季节（3～5 月份），食量下降，不时发出高而尖的咩叫声；喜欢仰卧暴露生殖器，包皮中显示出湿润的圆锥状紫红色龟头；喜欢在泥泞中或浅水洼流里滚爬，拔草揉身；活动量大增，无目的疾行或奔跑；呆坐目视前方，张嘴呼吸喘气；跟踪嗅舔雌兽尿迹。当雌性发情进入高潮期时，雌雄彼此相互接近。大熊猫多在早晨、黄昏或夜间交配，交配姿势以坐抱式为主，雄兽前肢抱住雌兽的肩胛部，两后肢夹住其臀部，前肢用力向后拉抱，当阴茎插入阴道后即转为坐抱姿势交配；也有少数取站立式交配姿势，雄兽前肢撑在雌兽的背部，两后肢夹住其荐臀部进行交配；极少数用蛇交尾式，在雄兽爬跨过程中，雌雄兽先后侧身滚躺地面，阴部相互配合。

黑熊交配时，开始是公熊接近母熊，等母熊允许时才能交配。公熊爬上母熊后，腰部不断抽动，抬起一只脚，阴茎插入后有短暂的静止状态，然后公熊的后躯特别是后肢呈痉挛样抽动，抽动 2～5s 后间歇 1min 左右再抽动，重复 20～30 次。公熊交配过程为爬跨、弓腰、咬颈、后躯痉挛、抽动、射精和性交结束。公熊在整个繁殖期内由母熊随时引发交配，而母熊则在发情期内才可交配。

哺乳动物性行为的结果是雄性动物将精液成功地排到雌性的生殖道中。不同动物的射精类型、射精时的表现、射精持续的时间和精液量都会有一定的差异。射精的类型有两种，一种是以牛和羊为代表的阴道射精型，雄性动物交配时将精液排到子宫颈口附近或子宫颈口内；另一种是以马和猪为代表的子宫射精型，精液直接排到子宫颈内或子宫深处。牛和羊的射精持续时间相对较短，阴茎插入阴道感受到温度和压力后，即以臀部用力前冲，随即开始射精，射精一般只持续几秒钟的时间，精液量也较少，牛一般 2～

5ml, 羊 0.5~1.5ml。羊射精后短时间内不再爬跨射精, 而牛则能连续爬跨并射精几次。公猪交配时, 开始只伸出部分阴茎, 当阴茎伸入阴门后才充分脱离包皮而完全插入。由于射精量大 (200~500ml), 而且是分段射精, 故射精持续时间较长, 约 5~10min, 有的甚至长达 15~20min。公猪在射精时肛门括约肌同时收缩, 尾巴竖起, 甚至后肢离地。公马阴茎插入阴道后需几次抽动, 使阴茎充血变硬才能最深程度地插入, 交配射精持续时间为 30~40s 左右, 有的重型马品种则长达 1min 以上。公犬的阴茎骨在不完全勃起的情况下插入母犬阴道, 由于母犬阴道括约肌的收缩压迫阴茎背侧静脉, 同时阴茎充分勃起且龟头膨大, 直径增大 2~3 倍, 可达 4~6 cm 以上, 导致阴茎锁结, 使其较长时间不能脱出。一般来说, 雄性动物射精完毕后便从雌性动物上爬下来, 对雌性表现冷淡, 一时不会再有性欲。公家兔完成射精后, 从母兔身上滚下并发出叫声。

三、雄性性行为的激素调节

在研究哺乳动物的性行为时, 通常用大鼠作为动物模式, 因此对其性行为研究的最为透彻。

(一) 中枢神经的调控作用

下丘脑正中视前区 (medial preoptic area, MPOA) 是调节动物性行为的重要神经中枢, 在许多动物的 MPOA 中都发现了高水平的雄激素受体的表达。破坏 MPOA 会严重损伤性行为, MPOA 中的蛋白质合成是性行为表现所必需的。如向雄性大鼠的 MPOA 灌注蛋白质合成抑制剂——茴香霉素, 能抑制大鼠的性行为表现和求偶发声 (vocalization), 但不影响大鼠的性倾向和性嗅标记 (scent marking)。同样, 灌注放线菌酮 (cycloheximide, CHX), 也会抑制性行为, 但如注射到其他部位则没有抑制作用。这说明 MPOA 中蛋白质的合成对于雄性大鼠的性行为表现是必需的。MPOA 中有性腺类固醇激素的受体, 它们组成的神经通路是交配行为的基础。大鼠睾丸摘除后, 性行为表现逐渐减弱。睾丸摘除后 6h, 雄激素受体含量降至去势后的最低水平, 说明持续存在的雄激素受体对于雄性性行为 and 蛋白质的合成可能是必需的。将睾酮直接灌入 MPOA 中, 能够恢复去势动物的性行为, 进一步说明 MPOA 中雄激素受体的作用是至关重要的。阻断 MPOA 的雄激素受体, 就会抑制雄性性行为的恢复。如果在注射睾酮的同时向大鼠 MPOA 中注射芳香化酶的抑制剂, 会损害去势大鼠的爬跨行为, 而单独注射睾酮或雌二醇的去势大鼠则照常爬跨交配。此外, MPOA 中的雌激素也能促进雄性大鼠的交配行为。如试情时不让雄性动物接触雌性, 雄性阴茎也能勃起, 为即将可能发生的交配行为做准备, 即非接触性勃起 (noncontact erection, NCE)。非接触性勃起通常被认为是性觉醒 (sexual arousal) 的指征。向中间扁状体灌注雄激素能维持去势雄性大鼠的非接触性勃起, 说明中间扁状体也是调节雄性性行为的中枢。Bancroft 归纳总结了中枢神经控制雄性动物性兴奋和性抑制的可能通路 (图 13-2)。

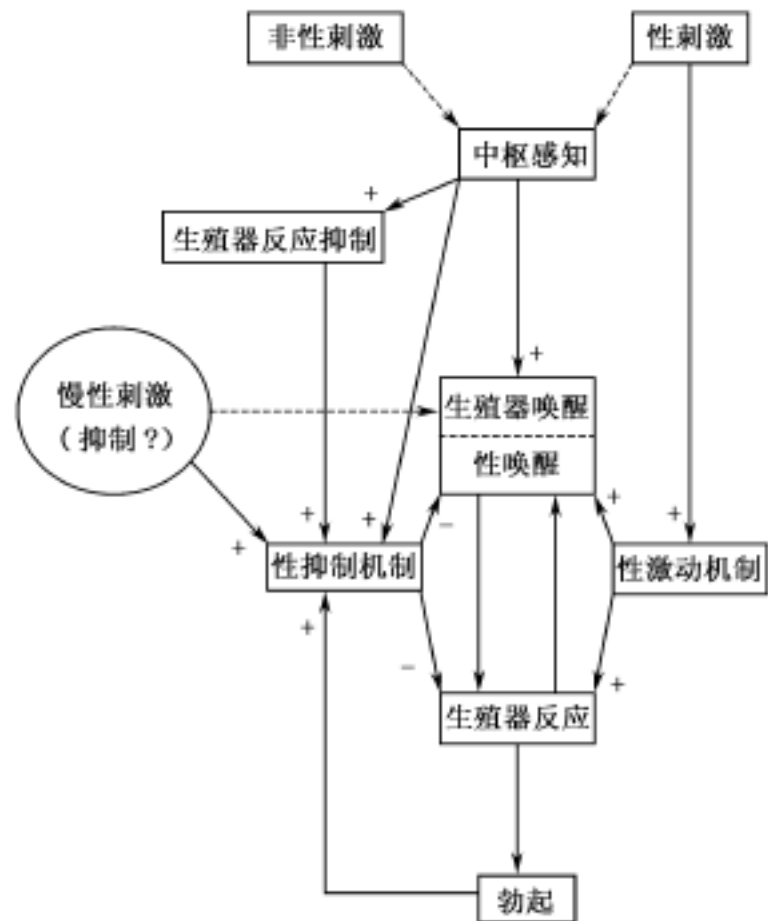


图 13-2 雄性动物中枢神经对性兴奋与性抑制调控模式
(引自 Bancroft, 1999)

(二) 性腺激素的调控作用

在已经研究的几乎所有的哺乳动物中，类固醇激素都控制着雄性动物性行为的表现。成年雄性动物外周血液中主要的性激素是睾酮，哺乳动物血清的睾酮浓度一般在每毫升 ng 水平，但不同的动物会有一定差异，犬的血浆睾酮含量很低，仅 0.5~1.0 ng/ml，兔子最高可达 10~20 ng/ml，而有的马中睾酮含量竟达 1~2 μg/ml。摘除睾丸会引起性行为的显著退化，而用注射外源性睾酮处理又会恢复性行为。去势不仅影响雄性动物的交配行为，而且还影响性激动和性倾向。雄性大鼠去势后，对发情雌鼠的性反应性显著降低，用睾酮处理可逆转这种作用。大量研究都显示，雄性去势后，睾酮经芳香化作用产生的雌二醇能有效地激发雄性对发情异性的性兴奋、异性亲近和交配行为。但单独注射雌二醇通常不足以使性行为恢复到去势前的状态。去势雄性大鼠用雌二醇和脱氢睾酮（睾酮的一种雄性激素代谢产物）同时处理，其性表现更接近于用睾酮单独处理，而不是更接近于雌二醇单独处理的效果。与此相类似，两者同时处理的雄性大鼠，其对异性反应也显著高于雌二醇单独处理者。这说明睾酮可能同时激发雄激素和雌激素受体，从而促进雄性性行为。用发情雌性大鼠给去势后的雄性大鼠试情，但不让其接近，发现去势后的雄鼠很快便失去了正常的勃起功能。睾酮或脱氢睾酮处理能恢复这种去势引起的非接触性勃起，但雌激素不能恢复这种去势引起的非接触性勃起。

去势后性行为的缺陷可用睾酮治疗，一般经 5~14 天的睾酮处理，就可以使大部分

去势的哺乳动物恢复交配能力。睾酮进入体内后常转变为对靶组织更具生物活性的另一种类固醇激素——雌二醇，后者在中枢神经系统水平上发生行为效应，直接促进了性行为。之所以这样认为，是因为脱氢睾酮（一种不能转化成雌激素的雄激素）不能诱发去势大白鼠和仓鼠的性行为，而雌二醇本身却可以促进交配行为。而生殖器官形态的维持则需要诸如双氢睾酮（dihydrotestosterone）这一类还原性代谢产物。有趣的是，低剂量的雌二醇本身并不对去势的雄性大鼠的性行为起作用，但是当与双氢睾酮配合使用时就能起作用。现在还不清楚，究竟是这两者对中枢神经系统的协同作用的效果大于两者单独使用时的作用的总和，还是由于两者同步化地作用于不同的靶组织而起的效应。

睾丸分泌睾酮和雌二醇，部分睾酮在中枢或外周被还原为脱氢睾酮，部分则芳香化为雌二醇。外源性的睾酮能维持睾丸摘除动物的交配行为，同时注射脱氢睾酮和雌二醇也有这种效果，但单独注射脱氢睾酮或雌二醇效果则不佳。注射对抗雌激素或雄激素的药物都会损伤大鼠的性行为。如果睾酮芳香化成雌二醇这个过程受到阻断，大鼠的交配行为也会受损害。小鼠芳香化酶基因敲除后，睾酮不能芳香化为雌激素，造成在发育和成熟的关键时期雌激素缺乏，在与异性交配时，爬跨行为受损，并表现出不同程度的不育。可见，雄性小鼠正常性倾向的建立需要功能性芳香化酶 CYP19 基因的参与。

与卵巢摘除的雌性动物相比，雄性动物的性行为在睾丸摘除后消失得较慢，如果用外源性的睾酮处理，1~2 周就又可以恢复性行为。许多啮齿类动物，包括小鼠，依靠嗅觉能够分辨出其他鼠所处的发情状态和生殖状态。但雄性芳香化酶基因敲除的小鼠其通过嗅觉和视觉分辨同类的能力减弱，交配行为也严重异常，表现为爬跨频率显著降低，插入和射精显著减少，爬跨到插入的时间间隔加长，对嗅觉和视觉性刺激兴趣降低，性动机减弱。这些说明睾酮芳香化为雌激素的过程对性动机和异性亲近是必需的，而雌激素本身对于雄性交配行为的作用可能十分有限。

在哺乳动物性分化的关键时期，性激素水平对动物以后的性行为的影响十分明显。新生的雄性大鼠用抗雄激素或抗雌激素抗体处理，性倾向和性行为都会发生变化。在雄性大鼠性分化的关键时期（围产期），用芳香化酶抑制剂处理会对生殖生理和性行为产生长期影响。给新生的雄性大鼠注射雌激素的类似物——克罗米酚柠檬酸盐，也会对成年后的生育力和性行为产生长期影响，如爬跨频率显著降低。但大多数大鼠仍能与雌鼠交配并使其受孕，只是这些受孕雌鼠在胚胎着床前后会有很多胚胎丢失。如果摘除这些雄鼠的睾丸，再用雌激素处理，则表现为雌性性行为。如果给刚刚出生的大鼠吸入乙醚，不会影响这些大鼠成年后的体重、睾丸湿重和血浆睾酮的水平，但雄鼠的生殖能力会发生变化，如生精细胞和精子的数量会下降，日产精子数下降，性行为也会减退，这可能是乙醚延迟或减弱了性分化期睾酮的峰值，从而改变了下丘脑的雄性化分化进程。4~5 月龄是初情期公羊性变化的关键时期，此时，睾酮对公羊的初情期和性成熟的启动起着重要作用。

除此之外，有的动物求偶时会发出超声波，这也与雄激素相关。睾酮还能迅速缓解小鼠的焦虑症。用雌激素受体 β 基因敲除的未阉割雄性小鼠发现，雌激素受体 β 还与抑制初情期和青年成熟小鼠的争斗行为紧密相关。

第三节 雌性性成熟和性行为

一、雌性性成熟

雌性动物初情期指的是初次出现发情表现和排卵的时期。与雄性动物一样，雌性动物发育到初情期，就初步获得了生殖能力，但此时动物身体其他系统的发育远未成熟。动物达到初情期时，性腺发育加快，性激素分泌增加，第二性征出现，开始表现出性行为。到性成熟时，生殖系统已经完全发育成熟，具备了生殖能力，此时交配，动物可以妊娠。但由于机体其他部位的发育仍未完全成熟，生产实践中并不宜配种。到体成熟时，动物生殖系统和其他系统的发育都基本成熟，具备了成年动物固有的外貌特征，体重约达到成年体重的 70% 左右，完全可以承担妊娠和产仔过程。生产上有时又把这个时期称为初配年龄。表 13-5 列出了几种动物的初情期、性成熟和体成熟的时间。

表 13-5 雌性动物初情期、性成熟和体成熟时间

动物	初情期	性成熟	体成熟	生殖机能停止期
牛	6~12 月龄	10~18 月龄	2~3 岁	13~15 岁
水牛	15~24 月龄	18~30 月龄	3~4 岁	13~15 岁
猪	2~5 月龄	3~6 月龄	9~12 月龄	6~8 岁
绵羊	5~7 月龄	6~8 月龄	12~15 月龄	8~11 岁
山羊	3~7 月龄	5~8 月龄	12~15 月龄	7~8 岁
马	12~20 月龄	18~24 月龄	3~4 岁	18~20 岁
驴	12 月龄	18~30 月龄	3~4 岁	
骆驼	20~36 月龄	24~40 月龄	5~6 岁	20 岁
兔	2~4 月龄	3~5 月龄	5~8 月龄	3~4 岁
犬	6~8 月龄	8~14 月龄	9~16 月龄	
猫	5~12 月龄	7~14 月龄	9~16 月龄	14~20 年
小鼠	30~40 日龄	40~50 日龄	55 日龄	1 岁
大鼠	45 日龄	60~70 日龄	70 日龄	1 岁
水貂	3~5 月龄	5~6 月龄	10~12 月龄	

二、雌性性行为表现

雌性性行为主要指发情行为。交配过程中，相对于雄性动物，雌性动物往往处于被动的地位，但只要它们进入发情状态，就会伴随相应的性行为反应，从而保证有效交配行为的顺利进行。前面已经说过，作为被选择方，雄性动物在性行为中相对比较积极主动。在择偶方面，由于许多野生哺乳动物的雄性有很强的争斗行为，争斗中获胜的雄性动物常获得更多的与雌性交配的机会，甚至垄断所有的交配机会，因此雌性动物往往没有很多选择的机会，家养动物如家畜和宠物也是如此。

在鸟类，雌性择偶现象十分明显，标准主要有两方面：一方面是体格健壮，如雄鸟羽色鲜艳、冠和肉垂大而鲜艳，这些常是体格健壮的主要标志；另一方面则是育幼能力，如拥有牢固的领域地，具有较好的觅食、筑巢和御敌能力。

处于乏情状态的雌性动物往往不接受交配，对雄性的各种求偶行为反应冷淡，对爬跨行为常表现躲闪回避，使雄性无法交配。但处于发情状态的雌性动物则会有完全不同的表现，食欲减退、鸣叫不安、静立呆望、举腰拱背、频繁排尿、离群，对雄性的形体、叫声和气味等十分敏感，主动接近异性。对雄性动物的求偶和爬跨表现出配合，如母猪的静立反射，雌性大鼠的脊柱下弯反应等等，甚至爬跨同性动物或类似形状的物体。

大鼠是研究哺乳动物性行为及其机制常用的动物模型。处于发情状态的雌性大鼠会表现出一系列的性行为，最典型的表现是脊柱下弯反应 (lordosis)，即在雄鼠爬跨时雌鼠的头和尾的脊柱向下弯曲，脊柱下弯反应表明雌性大鼠的性准备状态，开始接纳雄鼠的交配，这有助于调节交配行为。此外，还表现出欲求行为 (proceptive behavior)，如跳跃、投掷、摆耳等。只有具有性接受性的雌性大鼠才接纳公鼠的插入和射精。

雌鼠主动控制着雄鼠的一系列交配行为，掌握雄鼠爬跨、插入和射精的时机。雌鼠主要通过两种方法控制交配的时机，第一是控制接近后又离开雄鼠的时间长短 (contact-return latency)，第二是控制接近又离开的次数。研究发现，雌性大鼠接近又离开雄鼠的时间间隔与公鼠性接触（如爬跨、插入和射精）的强度呈正相关；同样，雌性大鼠离开雄鼠的次数与性接触的强度也呈正相关。

灵长类动物（不包括人）的性行为有季节性和非季节性两大类，如藏酋猴全年均有交配行为。猴有接受交配行为和邀配行为两种方式。发情期的母猴会主动接近雄性，将后躯转向雄性，使阴门暴露在公猴的视觉下。有的猴会抚摸雄性的生殖器，交配时母猴爬伏或四肢站立。一个猴群中只有一只公猴首领，当群中某一成年母猴临近两次月经周期之间，开始有性的接受能力时，这时它可同猴群中处于依附地位的公猴进行交配。当接近周期中期时，则转而同群体中地位较高的公猴相处一起，直至性接受能力达到高潮阶段则专一地同群中首领紧挨而坐，始终伴随不离。猴群中这种随性欲高潮渐次升高，相应地同群体地位也渐次上升的雄性动物进行交配的性行为特点，在其他动物是罕见的，这可能是动物界中试婚的方式，促进雌性动物排卵期的到来，以便雄性首领最终选择雌性动物进行交配。虽然藏酋猴全年均有交配行为，但产仔仅在 1~8 月间，属特殊的非季节性交配-季节性产仔繁殖类型。雌性在妊娠后选择的交配对象主要是群体中地位高的雄性，但非妊娠雌性则主要选择地位较低的雄性，妊娠后的雌性交配频率远低于非妊娠雌性，同时它们与成年雄性间理毛行为的发生频率亦低，反之受到成年雄性攻击的频率较高。

值得注意的是，初次发情的动物，往往发情表现很弱，有的甚至只排卵而不出现发情表现，这种现象称为安静发情。这是由于发情行为除需要雌激素刺激外，少量孕激素能够明显强化发情行为，而初次发情的动物卵巢上尚无能合成孕酮的黄体存在，外周血中的孕酮浓度很低。但高水平的孕酮则又对发情产生强烈的抑制作用。

发情周期中除了性行为发生周期变化外，生殖道、卵巢和激素水平也发生周期性变化，并且这些变化紧密地联系在一起，相互依存，互为因果。激素的变化是生殖道上皮

变化的基础和原因，性行为的变化也是激素变化的结果。过去把雌性动物（灵长类除外）对性有接受能力的周期变化看成是发情周期，实际上发情周期不仅包括行为方面的表现，也包括卵巢激素和阴道组织学的周期性变化。

三、雌性性行为的激素调节

性行为的建立依赖于在出生早期阶段下丘脑是否接触睾酮。实际上，睾酮（芳香化成雌激素）引起下丘脑中性中枢的雄性化；在缺乏睾酮时，下丘脑变成雌性化。在大鼠中已经证明，下丘脑的一个区域——正中视前区在接触睾酮后结构发生改变。

由于性行为的调控十分复杂，而且由于动物品种多，差异大，因此很难得出一个统一的模式。在对这部分内容进行介绍之前，先对性行为的激素调节作一个综合的介绍。

首先，激素对动物性行为的影响存在以下几个原则：第一，激素浓度变化的幅度对性行为的影响较小；如在猫中， 17β -雌二醇的血浆浓度需从 10pg/ml 升高到 20pg/ml 时才可引起发情前期的症状。第二，激素间的协同作用对于性容受通常是重要的；如在狗中，雌激素预处理对于孕酮的作用是重要的。第三，接触激素的顺序可能是重要的；如在绵羊中，在接触雌激素之前先用孕酮预处理对于发情的表现是重要的。

来自于发育的有腔卵泡中的雌激素在所有动物中对于性容受性都是必需的。来自于排卵前卵泡颗粒细胞或黄体的孕酮对于一些动物的发情也很重要。在绵羊中，只有事先接触过孕酮（通过黄体产生的）后才能对雌激素发生反应产生发情。发情通常发生于黄体期结束后很短的时间内，即 $24\sim 36$ 小时，这是由于在黄体溶解时大的有腔卵泡的出现造成的。因此从最后接触孕酮到发情开始的时间很短。性容受性需要孕酮意味着在繁殖季节的第一个卵泡期（在绵羊中导致排卵）并不伴随着发情。大多数成年母绵羊在第一次黄体期后才表现出发情。性刚成熟的绵羊通常需要经历两次或更多次的黄体期后才表现发情。

狗的性容受性是少见的，它最初由颗粒细胞产生的孕酮（在排卵前 LH 峰的作用下）控制，后来由此形成的黄体分泌的孕酮控制。事先接触雌激素只能使雌性对雄性更具有吸引力，但不能产生性容受性，发情需要额外地接触孕酮。在有发育黄体存在的情况下，发情通常可以持续一周。而在其他家畜中，孕酮对发情活动则主要起抑制作用。

孕酮的事先预处理对于发情表现的重要性在奶牛中也得到证实。奶牛在产后第一次排卵（ $15\sim 20$ 天）时的发情活动降低。这是因为牛临产前孕酮就已经完全消失，动物在这种情况下已经有 $2\sim 3$ 周没有接触孕酮。母猪在产后第一次排卵后也发生这种情况，猪产后排卵通常发生在断奶之后（通常在产后至少 45 天）。猫、山羊和马都在生殖季节的第一次排卵前有发情表现，并不需要明显的孕酮预处理。

睾酮对于雌性灵长类的性欲是重要的。退化卵泡的卵泡膜层形成一个活跃的间质，可分泌雄烯二酮和睾酮。

（一）中枢神经系统调节

对雌性动物性行为的神经内分泌机制的研究，引发了许多关于大脑结构和功能之间

的关系, 及其与激素功能之间关系的探讨。控制性行为的中枢在脑部, 下丘脑腹正中核 (VMH) 是控制雌性生殖行为的重要中枢。局部灌注和脑损伤研究都表明, 下丘脑的 VMH 是雌激素促进雌性啮齿类动物性行为的一个至关重要的神经靶组织。许多方法都检测出 VMH 中有雌激素受体的定位。雌激素对性行为的影响受 VMH 中神经元的突触组装 (synaptic organization) 调节。激素因子作用于脑组织中相应的靶细胞, 与特异性的受体结合发挥作用。如果向颅内灌注孕酮, 能抑制雌绵羊的性行为和 LH 波。纹状体能调节目式化的性行为, 促进雌性大鼠生殖能力。用 GnRH 灌注仓鼠大脑内室 (intracerebroventricular, ICV) 能缩短仓鼠尾脊下弯和摆尾的潜伏期, 加快性接纳性。急性禁食 74 小时会降低去势雌性大鼠的性接受性 (sexual receptivity), 这是通过降低 VMH 中雌激素受体 α 的免疫活性来实现的。运用神经生理学、肌电描记仪、损伤法、切除法和管道追踪法对 VMH 辐射出来的神经通路和微循环通路进行了大量的研究工作, 发现调节通路可能是由腹正中核 (VMH) 调节周围管状灰质 (periaqueductal gray, PAG), 再调节髓质网络结构 (medullary reticular formation), 通过腰椎腹角 (lumbar ventral horn) 作用于脊柱下弯反应的肌肉 (lordosis-producing muscles)。

神经核团中蛋白质的合成对于雌性动物的性行为同样是必需的。如阻断大鼠下丘脑腹中核 (ventromedial hypothalamus) 的蛋白合成, 雌鼠的脊柱下弯反应就消失。当雌性大鼠的下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPAA) 功能异常时, 作为一种补偿途径, 它可以改变 5-HT_{2A} 受体的敏感性来调节性行为。另外, 中枢与激素的调节是相互的, 如雌性大鼠的雌二醇和孕酮能调节纹状体和核横体 (nucleus accumbens) 的多巴胺活性。雌激素能够诱导下丘脑神经回路的重塑。

(二) 激素调节

激素与神经对性行为的调控是密不可分的。激素对性行为的调节作用直接、稳定而强烈。与雄性动物一样, 雌性动物的性行为受性腺激素的有力调节, 其中最主要的两种激素是雌激素和孕酮。性行为受固醇类激素变化的调节比较复杂, 激素在大脑内变化会激起动物的性反应和性经历, 最终引起有效的性活动、性欲、性冲动和性行为。动物的性经历通过条件反射会形成脑内的实质性联系, 将内部信号和外部刺激整合, 从而发生不同的性反馈。按照巴甫洛夫的观点, 了解内外刺激就可以预见动物最终的性表现。

1. 雌激素

在发情周期中, 卵巢类固醇类化合物含量的波动很显著。一般是在发情达到高峰前 1~3 天, 血液中雌二醇含量上升。在发情最高峰开始时 (猴、仓鼠、猪、大鼠、绵羊和牛) 或者在发情期之末 (犬), 血液中雌二醇含量开始急速下降。在调节发情行为中, 雌二醇是一种非常重要的激素。排卵前后生理和行为两者之间有内在的调节和时相联系, 而雌二醇及其受体在这个过程中起重要作用。用雌二醇处理雌性大鼠, 会对性行为序列产生明显影响。正因为如此, 一些特定的植物雌激素和工业化合物由于具有雌激素活性, 能对哺乳动物正常的神经内分泌系统产生严重的负面影响。

此外, 雌激素受体在雌性大鼠接受交配和程式化交配行为中也发挥作用, 雌激素受

体激活可降低性刺激引起的厌恶情绪。雌性大鼠在遇到雄性大鼠时会表现出性接纳行为，如脊柱下弯反应和跳跃、投掷、摆耳等欲求行为。用基因敲除模型研究发现，雌激素受体 α 对成年雌性小鼠的性行为具有调节作用；另外，雌激素还调节着雌性豚鼠的腹外侧核和弓形核中的神经肽类物质的合成和释放，如生长抑素、神经紧张素和 P 物质。

当雌激素水平很低时，仓鼠没有卵巢周期，也不接受交配。在交配期间，雌性仓鼠起初会有很强的反抗行为，后来反抗行为受抑制，转而接受交配行为。

在灵长类动物，雌激素是提升性激动的关键激素，如用雌二醇处理的雌性恒河猴，可以不依赖于雄性恒河猴的反应而启动性行为。

2. 孕酮

在许多动物，如猴、猪、山羊、犬、绵羊和牛，孕酮与雌二醇含量的变化是相互交叉的，因此这些动物在发情期间孕酮含量始终保持低的水平，而在排卵后不久孕酮含量即行上升。

啮齿动物的孕酮含量是在开始发情之前就已升高，看来孕酮在激活啮齿动物的性接受能力方面起着较重要的作用。用孕酮和雌二醇处理雌鼠，会对性行为序列产生明显影响。孕酮剂量依赖性地提高大鼠的脊柱下弯反应。雌性啮齿类动物的性行为的启动和持续时间受雌二醇和孕酮相互作用的调节，处于发情周期中的大鼠会表现出对性的欲求和接纳行为，这些行为与排卵正好吻合，血液中雌二醇和孕酮相对处于高水平上，可促使动物在交配后两性配子受精和胚胎着床。

脑组织中的孕酮可以通过两个重要的中枢神经系统的产物调节性行为。在下丘脑的腹正中区，P 物质对性行为有易化作用，而此作用又受细胞内孕酮受体活性的调节。孕酮能减弱 5-HT_{1A} 受体拮抗剂的影响作用，同时又对大鼠的脊柱下弯反应有轻度抑制作用。摘除卵巢后再用激素处理是研究孕酮对 5-HT_{1A} 受体功能影响的常用方法。5-HT_{1A} 受体对雌性大鼠的脊柱下弯反应有促进作用。用苯甲酸雌二醇预处理雌性大鼠，能减弱 5-HT_{1A} 受体拮抗剂对脊柱下弯反应的抑制影响。脊柱下弯反应是处于性接纳状态的雌性大鼠对公鼠的典型动作，它需要有激素的预先作用。脊柱下弯反应已经成为研究雌性性激素对 5-HT 家族功能影响的有效模型。用 5-HT 受体拮抗剂能影响雌性大鼠的脊柱下弯反应，具体是促进还是抑制作用则要看是哪一种 5-HT 受体受到了拮抗。5-HT_{1A} 受体分布于下丘脑腹正中核 5-HT 神经元的突触后，它的激活能部分促进该反应。用 5-HT 受体（包括 5-HT_{1A} 和 5-HT₂ 受体）拮抗剂处理雌性大鼠，发现对脊柱下弯反应具有抑制或促进作用，证明 5-HT 对脊柱下弯反应有双重调节作用。

在发情高峰时或临近发情高峰时，血浆中孕酮和雌二醇的含量与相互作用对于诱导性行为关系十分密切。给卵巢摘除的雌性大鼠单独用雌二醇处理 7~15 天虽然也能诱发性行为，但是若在雌二醇处理 48~72h 后再以孕酮处理，则可提前诱导发情。牛、羊、猪、兔和犬也有相同的现象，即两种性激素配合使用诱发性行为的效果更为明显。不过在牛及羊，必须在雌二醇处理之前先用孕酮处理才行。孕酮使用的剂量不同，其效应也不同。据报道，高浓度的外源性孕酮可以抑制母羊和母牛的发情，中等剂量的孕酮可使兔子、山羊和猴的发情终止。对于其他动物，注射外源性孕酮后是诱导发情还是中断发情，要看孕酮处理是在雌二醇处理之前还是之后来决定。例如，在正常性周期中在发情

高潮到来之前血液中孕酮量下降的动物，如果是在雌二醇之前给予孕酮处理，则可以抑制这种动物的发情。在用雌激素诱导牛发情的同时注射孕激素，能加强牛的发情行为，但这种做法并不能提高排卵率。

卵巢并不只是分泌雌激素和孕酮。大鼠、兔和羊的卵巢除了分泌雌激素和孕酮外，还分泌大量的睾酮和雄烯二酮。例如雌性大鼠血液中的睾酮量是发情期中雌二醇量的 6~80 倍。这种雄激素能诱导卵巢摘除的大鼠、猫和兔子发情。据认为，雄激素之所以能诱导发情是由于它先在外周血液中被芳香化为雌激素，然后这种新形成的雌激素再诱导性行为。由于雄激素在外周血液中含有量很高，因而不论其转化为何种成分，它本身对于激起雌性动物的发情都有着极其重要的作用。

3. GnRH 和神经肽

GnRH 除了能调节垂体前叶促性腺激素的释放从而间接调节性行为以外，还能直接促进性行为表现。GnRH 拮抗剂不仅抑制性腺的功能，而且抑制动物的性行为。给雌性动物注射或脑内灌注 GnRH 的类似物能提高其性行为。除了 GnRH 外，还有其他神经肽类激素也参与调节性行为，如 CRH（促肾上腺皮质激素释放激素）或 AVP（精氨酸加压素）。CRH 灌注不仅可以缩短尾脊下弯和摆尾的潜伏期，还能缩短公鼠第一次阴茎误插到再次插入的时间间隔。与 CRH 相比，加压素则能强化雌鼠气味标记行为。

4. 肾上腺皮质激素

肾上腺皮质激素在诱导雌性性行为中也发挥重要作用，雌性仓鼠在接受交配期间，其血浆皮质醇的水平会上升。摘除肾上腺、长期注射地塞米松或临时注射甲吡酮，都能阻止上述皮质醇的水平上升，使仓鼠的性接纳性大大减弱。给肾上腺功能不全的雌性仓鼠注射皮质醇或睾酮，可以促进其接受交配。

5. 其他激素

催产素也参与调节性行为。用催产素特异选择性拮抗剂研究证明，催产素启动并维持雌性大鼠的性行为。同期素 B（synchromate B）能使发情期奶牛的性行为不受卵泡生长的影响。IL-1 抑制雌性大鼠的性行为，但不抑制雄性大鼠的性行为。SCAMP-4 是分泌载体膜蛋白家族的一个新成员，在大脑中的基因表达受孕酮抑制，与雌性性行为相关。生产上常常利用激素对性行为的调节作用，有目的地控制动物的性行为状态和生殖能力，如诱导发情、同期发情、超数排卵、诱导分娩和药物流产等。也可以治疗许多生殖系统的疾病，如乏情、卵巢囊肿、持久黄体 and 流产等。

四、雌性性行为的影响因素

除了神经内分泌系统控制着动物性行为外，雌性哺乳动物的性行为还受很多因素的影响，如卵巢状态、配偶亲密程度和配偶选择对母猴性激动和性行为均有影响。与其他哺乳动物不同，灵长类动物的交配能力不受性激素调节，性激素只是影响性激动。由于交配能力与交配兴趣分离，那么性经历便成了影响灵长类（不包括人）性行为的关键因

素，无论是在发育阶段还是成年以后。如雄性恒河猴在青春期对同性和异性的爬跨几乎相当，但成年后只爬跨异性。对于这种转变，主要是由于爬跨异性引起射精的经历，而不是青春期睾酮浓度的上升。目前，尚不清楚产生这种分离的机制。青春期睾酮浓度上升刺激了雄性的性动机，增加了雄性爬跨异性的可能性，最终建立了对异性的性倾向。将成年男性或恒河猴血液中睾酮清除，会减弱其性动机，但不会降低其性能力。雄性恒河猴雄激素水平降低对性行为产生的影响与其在群体中的地位和性经历有关。人的性行为也会随着激素状态、社会地位及文化背景的不同而不同。

性行为与其他性状一样都是遗传与环境共同作用的结果。不同的品种，由于遗传基础不同，其性行为有很大差异。我国的地方猪品种，特别是华南、华中型品种大多数早熟，而外来品种相对晚熟。不同的环境对性行为也有很大影响，故公猪配种时，在炎热的夏季应选择清晨和傍晚，寒冷的冬季应选择中午气温较高时配种。台系杜洛克母猪发情症状不明显，尤其是青年母猪，没有爬栏、狂躁、不安等行为。因此，稍不注意，很容易错过发情期。根据阴户变化及公猪试情相结合的办法，可以比较准确地判断母猪发情，于出现静立反应 12h 第一次配种，24h 复配，受胎率 95% 以上。

社群中一个伙伴在身边，或是两者交往会对动物的神经内分泌产生广泛的影响。对于哺乳类幼仔来说，母亲的陪伴有助于建立正常的内分泌状态。在研究大鼠的性行为的解剖、药理和神经内分泌机制时，常将大鼠单独或成对饲养在双层小室内，记录采食和性行为。断奶前的大鼠，母亲对幼仔的密切的触觉交流对于维持幼仔外周血液中正常的生长激素水平是必不可少的。豚鼠是发育早熟品种，很小就不需要母鼠的哺养，在其生长发育期，有母亲或不熟悉的雌性在身边时，会改变幼子睾酮、孕酮、皮质醇和促肾上腺皮质激素的水平及行为的表现。如断奶后仍有母鼠在身边，反而会影响后代正常的神经内分泌和行为发育。另一方面，在豚鼠和一些灵长类动物，与母亲的短暂分开有助于激活下丘脑-垂体-肾上腺轴。断奶后，母亲对后代神经内分泌活性和相关行为产生影响，这些影响通常会损伤后代的生殖能力。例如，母豚鼠呆在幼鼠左右会推迟幼鼠的初情期，而无论幼鼠是雄性还是雌性。甚至是在完全性成熟的动物，性行为的表现也会因其母亲的存在而受抑制。如美洲长尾猴 (marmosets) 性成熟的雄性和雌性，如果离开家庭环境就会准备交配，但如果处于家庭环境中则情况相反。这种现象可能是为了加强同种动物之间的繁殖模式和避免近亲交配。不仅幼仔如此，而且年龄更大时也是如此，母亲的存在与否同样影响它们的下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能。例如，短时间离开母亲能使后代松鼠猴 (squirrel monkey) 正常断奶之后血浆皮质醇的水平继续升高。这种母亲对断奶幼仔的影响并不仅限于断奶后仍依赖母亲的物种和母亲在断奶后仍主动照养幼仔的物种。对于豚鼠这样早熟，且母亲又很少照看幼仔的啮齿类动物，母亲对于后代下丘脑-垂体-肾上腺功能和生殖能力的影响在断奶后相当一段时间内都存在。自出生后就将豚鼠与其母亲饲喂在一起，到 35~55 日龄 (大约是完全断奶后 10~30 天) 时将豚鼠幼仔转移至一个新的笼子单独饲养 1h，就明显表现出下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能。如果有母亲或是任一陌生成年雌性豚鼠在其身边，但没有其他同类，就会大大削弱上述反应。在这些条件下，雄鼠通常对雌鼠表现出性行为，但对其母亲则没有。但是，如果将雄性动物从母亲身边转移开，1~2 天后再做同样试验，发现它们频繁对其母亲表现出性行为。总之，母亲在断奶后很长一段时期内仍能对其后代或其他熟悉的后代的下丘脑

-垂体-肾上腺功能产生影响。与母亲生活在一起，能抑制后代对其母亲的性行为，对雄性后代的性腺活动也受到抑制。可见，动物的性行为和性取向深受母亲的影响。

第四节 性周期及其影响因素

一、性 分 化

正常的性分化包括性腺的分化和大脑的性分化，后者是指下丘脑-垂体-性腺轴，又称生殖轴 (reproductive axis) 的发育。性腺的分化常早于大脑的性分化，性腺的分化结果决定了大脑的性分化方向。哺乳动物的性分化是相对保守的，在很大程度上受激素的调节，尤其是受性腺类固醇激素，如雄激素和雌激素的调控。

哺乳动物在性分化之前，下丘脑都是按照雌性模式发育的。性腺的分化有一个关键期 (vital period)，对于妊娠期较长的动物来说，性分化的关键时期是在胎儿期，而对于那些妊娠期短的动物来说，性分化的关键时期是在围产期。雄性胎儿发育到了性分化的关键期，睾丸会突然合成睾酮。如大鼠的胚胎由输卵管进入子宫，从这时开始到出生后 2 小时，血清睾酮的含量增加了 4 倍，而人类男婴睾酮水平在出生后 12 小时内显著增加。正是雄性胎儿睾丸产生的雄激素抑制了这种固有的发育模式。雄激素参与了一系列重要的生理、神经和行为发育过程，使胎儿开始朝着雄性方向发育。而雌性胎儿则仍按照固有模式继续发育下去，这就引起了性别的差异。人类的性分化与动物不同，可能与大脑的结构形态有关。

实际上，睾酮到雌激素的转变对性分化的影响至关重要。睾酮转变成雌激素需要经芳香化作用，雄性大脑特定部位的神经元有芳香化酶细胞色素 P450，能够将雄激素经芳香化酶的作用转变成雌激素。对于大多数哺乳动物来说，这种芳香化作用是雄性性发育和雄性性行为表现至关重要的一步。如果这种作用发生异常变化，就会影响雄性性行为，如公绵羊的性倾向。

如果在性分化的关键时期用外源性的激素处理，会对正常的性分化产生深远的影响。如用雄激素处理围产期的怀孕母猪，其后代母猪中的生殖器会与公猪相近。新生豚鼠 (*Cavia aperea porcellus*) 的大脑尚没有性别分化，既产生雄性又产生雌性行为。如果对 4 日龄的雌性大鼠用雄激素处理，此后就不可能具有与正常成年雌鼠一样的性行为，在某些条件下还出现雄性行为特征。

将小公犬在出生时即去势，并与成年后再去势的公犬的性行为相比，发现这些犬阴茎都很小，但这些犬都按正常公犬的排尿姿势排尿，并且对外源性睾酮的反应相同。它们都对发情期的母犬反应积极并表现出爬跨，只是其未充分发育的外生殖器不能进入母犬阴道。子宫埋置雄激素栓和围产期注射雄激素的新生母犬，其生殖器的解剖学结构显著发生变化，没有外阴却具有阴茎。在半数情况下，它们以公犬的姿势排尿。

另一个影响性分化的因素是肾上腺分泌的激素。给妊娠期间的雌性大鼠或小鼠一定的应激刺激，其出生后雄性后代到成年后的雄性化性行为便减弱，而雌性化性行为加强。导致这种变化的原因仍不清楚，但较为可接受的假说认为，是应激引起了肾上腺糖皮质激素 (adrenal glucocorticoid) 分泌的增加。Holson 等对怀孕大鼠注射 ACTH、肾上

腺酮 (acorticosterone, CORT) 或地塞米松 (dexamethasone, DEX), 以每天三次强光刺激作为阳性对照, 结果发现地塞米松、肾上腺酮和强光刺激均降低了出生时雄性新生儿的肾上腺重量, 强光刺激削弱了后代中公鼠的性行为, 但对雌鼠的脊柱下弯反应不影响。对性腺摘除的成年雄鼠作上述相同处理没有上述影响。Holson 等得出结论, 认为出生前地塞米松处理会使后代中雄鼠的雄性化减弱, 而雌性化加强。是否只有肾上腺糖皮质激素调节了这种影响, 目前还不太清楚。ACTH 和肾上腺酮可升高妊娠母鼠血浆中肾上腺酮水平, 但不影响成年性行为。由于许多药物大剂量使用时都会引起妊娠母鼠的应激反应, 如糖皮质激素的分泌, 因此出生前的药物使用可能会对后代的性分化产生共同的影响。

性分化的一种异常情形是雌雄间性 (intersexuality)。雌雄间性又称两性畸形, 从解剖上来看, 动物同时具有雌雄两性的生殖器官, 但都不完全。两性畸形分为真两性畸形和假两性畸形。真两性畸形在解剖上也有三种表现形式, 第一种是生殖腺一侧为卵巢而另一侧为睾丸, 第二种是两个生殖腺都是卵睾体 (ovotestis), 第三种情形较少见, 有两个卵巢和两个睾丸, 两个睾丸分别位于两卵巢的前端大约 4~6 cm 处。真两性畸形多见于猪和山羊, 牛马较少见。真两性畸形可能与雌雄生殖细胞嵌合体有关。另一种理论认为, Y 染色体是由 X 染色体的连续缺失发展而成。按照这种理论, X 染色体可带有雄性化的基因, 而这些基因在正常情况下不表达。在遗传性别是雌性而带有睾丸的情况下, 说明 X 染色体上的雄性化基因表达出来。一种类似的理论认为, Y 染色体或雄性细胞产生的 H-Y 抗原有类似激素的作用, 它决定了原始性腺向雄性分化, 如雌性个体 (XX) 发生基因突变, 体内有 H-Y 抗原存在, 故能形成睾丸。假两性畸形是具有一种性别的性腺和另一种性别的外生殖器。雄性假两性畸形比雌性假两性畸形较多发生, 前者有睾丸, 无阴茎却有阴门, 而后者则有卵巢和输卵管, 无阴门却有肥大的阴茎。

二、两性动物性周期的差异

初情期以后到绝情期前, 雌性哺乳动物的性行为往往有明显的周期性, 这种周期性会由于动物处于妊娠或泌乳状态, 或者由于季节、病理等因素而暂时中断, 但雄性动物的性行为没有明显的周期性, 为什么会出现如此大的差异? 这也是神经中枢和激素相互调节的结果。无论是雌性还是雄性哺乳动物, 其下丘脑都存在着两个调节中枢, 一个是持续中枢或称紧张中枢 (tonic center), 另一个是周期中枢 (periodic center)。紧张中枢位于下丘脑的弓状核和腹内侧核区域, GnRH 在此合成, 它控制着下丘脑 GnRH 的持续分泌, 使体内 GnRH 维持一定的基础水平。两性动物合成和分泌的 GnRH 大致相同。周期中枢位于视交叉上核和内侧视前核区域, 对内外刺激非常敏感, 主要是通过影响持续中枢来控制 GnRH 的释放, 从而影响下丘脑-垂体-性腺轴的功能活动。在雌性哺乳动物, 由于受雌激素和孕酮的反馈调节, 周期中枢对紧张中枢有调节作用, 一定水平的雌激素可引起 GnRH 的大量释放, 而孕酮则抑制这种释放作用, 正是 GnRH 周期性的释放引起了雌性动物的周期性发情和排卵。在雄性动物, 周期中枢受到雄激素的长期抑制, 不能表现出功能活动, 而紧张中枢能够持续合成和分泌 GnRH, 通过下丘脑-垂体-睾丸轴促进精子生成和雄性性行为的出现, 因此雄性动物的性活动无周期性。控制

GnRH 分泌的高级中枢位于大脑基底部的中枢边缘系统，其中最重要的结构为海马、杏仁核和纹状体。

三、雌性动物的性周期

(一) 发 情 周 期

雌性动物的性周期又称发情周期 (estrous cycle)。一些灵长类动物，包括人具有不同的生殖周期，称为月经周期 (menstrual cycle)。哺乳动物发情周期有两种类型，一种是无季节性发情，一年四季都表现出性行为，如猪、牛等；另一种是季节性发情，只在一年中一定的季节内表现出周期性的发情和排卵，这些动物称为季节性发情的动物，典型的有犬、猫、绵羊、熊和狐等。表 13-6 列出了一些动物的发情季节。

表 13-6 几种动物的发情季节、发情周期和发情时间

动物种类	发情季节	发情周期/ 天	发情期
牛	全年	18~24	16~ 21 小时
水牛	全年夏秋旺盛	21~23	24~48 小时
猪	全年	17~25	2~3 天
绵羊	秋冬	14~20	24~36 小时
山羊	秋冬	20~21	26~48 小时
马	3~7 月份	16~25	5~7 天
驴	3~7 月份	21~25	4~9 天
骆驼	冬春	10~20	1~7 天
兔	全年	8~15	2~4 天
犬	春秋	7~9	8~14 天
大鼠	全年	4~5	数小时至 27 小时
小鼠	全年	4~6	9~20 小时
水貂	全年		2~3 天

除了性季节性周期活动外，许多哺乳动物只有一个很短的发情周期，如红狐 (*Vulpes vulpes*) 每年只发情一次，雌狐只是二月份在很短的时间内 (1~6 天) 接受交配。犬 (*Canis lupus familiaris*) 每年发情两次，春秋各一次。其他一些哺乳动物在繁殖季节以相对恒定的发情周期有规律地周期性发情。雌性大鼠的发情周期持续 4~5 天，只在排卵前接受交配，这时最有可能发生受精。雄性大鼠对发情的雌性大鼠释放的外激素十分敏感，并因之而受吸引。有的动物需要交配才能排卵，如兔 (*Oryctolagus cuniculus*)、猫 (*Felis catus*) 和短尾田鼠 (*Blarina brevicauda*) 等。但大多数哺乳动物不论有无交配都会排卵。

(二) 发情周期的划分

1. 四分法

这种划分方法最为常用，即分为发情前期 (proestrus)、发情期 (estrus)、发情后期 (metestrus) 和间情期 (diestrus)。

2. 二分法

根据动物的卵巢状态将发情周期划分为卵泡期 (follicular stage) 和黄体期 (luteal stage)。卵泡期指从卵泡开始发育至部分卵泡发育完全、破裂并排卵的时期；而黄体期则是指黄体开始形成至消失的时期。除妊娠、进入非发情季节或病理情况发生外，发情周期中卵泡期和黄体期交替进行。与四分法相比，卵泡期大致相当于发情前期、发情期；而黄体期则相当于发情后期和间情期。

3. 三分法

俄国的著名生理学家巴甫洛夫根据动物的精神状态，把动物的发情周期划分为三个阶段，即兴奋期、均衡期和抑制期。兴奋期大致相当于四分法中的发情前期和发情期，抑制期相当于间情期，而均衡期则相当于发情后期。这种划分方法术语比较抽象，生产上不常用。

四、性行为 and 性周期的影响因素

(一) 遗传因素

动物的性别在受精的一瞬间就决定了。性染色体决定了胎儿期看似无分别的性腺最终是发育成卵巢或是睾丸，因此从本质上说，雌雄动物性行为的差异是由基因差异引起的。在不同的物种和同种动物的不同个体间，性表现和强度都存在差异，如乳用品种的公牛比肉用品种公牛强，轻型马比重型马的性行为活跃，性反应也更敏捷迅速，而孪生动物间差异则较小。不同动物发情周期的长短不同，如小鼠的发情周期一般只有 4~6 天，绵羊的发情周期约 17 天，山羊的约 20 天。此外，不同动物或同种动物不同品种的发情表现、发情类型和发情特点都各有不同。但是值得注意的是：第一，无论是哪种性别的动物，都有雄性和雌性的行为潜意识；第二，基因对动物性行为的控制作用也受其他因素的影响，如环境的变化和激素的刺激等。

(二) 环境因素

季节、气候、温度、降雨和光照对动物性行为和性周期的影响很大。雌性动物在发情旺盛和配种季节，性行为表现明显而强烈。如果交配后没有怀孕，发情周期会缩短，很快进入下一个发情周期。而这个季节雄性动物的性行为也相应活跃，交配能力增强，

精液品质提高。炎热的夏季会抑制动物的性行为，精液品质也会显著降低，出现“夏季不孕症”。对于温带和热带培育的品种，在北方严寒的冬季，性行为也会受到不同程度的抑制，反之亦然。异性接触对两性性行为的发展和表现起着重要作用。初情期前同群饲养，有促进性行为表现的作用，而某些长期隔离饲养的雄性动物，交配时往往表现胆怯犹豫，性行为链不完整而难于完成交配的现象。但对断奶后同性饲养的公犊，以后的性行为表现不受影响，这与幼年期异性或同性间的性行为实践和性经验有关。季节性发情的动物，如水貂和鹿，在非繁殖季节里，不仅雌性的性行为消失，雄性的睾丸也暂时性萎缩或藏入腹腔内，雄激素的分泌水平也很低，雄性动物几乎处于无性欲状态。

(三) 营 养 状 态

营养过度、身体肥胖也会抑制性行为和性周期。母羊如果营养过度后脂肪沉积过多，则不再表现出发情周期，有时甚至令饲养者误以为其已经怀孕。种用的雄性动物也不能营养过度，否则会影响其性行为和生殖能力，如性欲减退等。同样，营养不足、过度消瘦或营养失衡也会使两性动物的性行为和性周期发生异常的变化，如营养不良而又过度使役的母畜，发情周期会相应延长，发情表现也会减弱，甚至不出现发情周期和发情表现。

此外，几乎所有哺乳动物的性行为都受饮食的影响。无论是急性还是慢性限制雌性大鼠的饮食，都会抑制其生殖行为，如抑制脊柱下弯反应的出现。急性的食物匮乏会延迟初情期的来临，延长发情周期，泌乳间情期延长，减弱性行为。急性禁食可降低雌性大鼠性容受性，并降低神经中枢中雌激素受体 α 的含量。营养性不育的原因之一是下丘脑脉冲式分泌 LH 受抑制，禁食或注射胰岛素 48h 后，血浆平均 LH 水平、LH 释放频率和 LH 脉冲幅度均下降。LH 分泌不足是 GnRH 释放减少引起的，而 GnRH 减少又是雌激素负反馈调节的结果。

(四) 群体生活状态

早在 1967 年 Vandenberg 就发现，雌性小鼠与雄性小鼠在一起时，发情周期出现的时间和性成熟的时间会提前，提示了异性存在对动物性行为和性周期的影响。实际上，群体生活对动物的性行为和性周期有一定的影响。雌性小白鼠在交配后 24h 内暴露到陌生的雄鼠中，雌鼠倾向于不再与原先交配的雄鼠交配，而和陌生的雄鼠再进行交配，这种现象就是前面介绍的“Bruce 效应”。在单独饲养的雌鼠群中引入雄鼠，可以使雌鼠发情出现同期化，即所谓“白化效应”。出现“白化效应”的雌鼠每窝产仔数也有增加。

野生动物常通过争斗确定其在社群中的地位，争斗中优胜的雄性动物获得与多个雌性交配的机会，这种方式能在一定程度上保持物种的生存和进化。而争斗中失利的雄性动物，其性行为和生殖能力被抑制。牧养动物常表现与野生动物相似的群体特征，生产上常通过扩大放牧的范围或选择社群地位相当的公畜参加配种以充分发挥公畜各自的繁殖能力。

对于一夫一妻制的物种，如草原田鼠 (*Microtus ochrogaster*)，表现为选择惟一的异性伴侣，双亲照看后代，对陌生的入侵者有强烈的敌对行为，对领地、巢穴和性伴侣有强烈防护意识。大多数一夫一妻制的哺乳动物，其独特的行为方式在首次与异性交配后才开始出现，而在此之前的发育阶段则没有。草原田鼠是典型的一夫一妻制野生动物，也是实验室用来研究这类动物的良好实验动物模型。草原田鼠是群居动物，但自出生后即表现出很强的亲合性。让一只雌性草原田鼠接触一只陌生的雄鼠，24h 内接受交配，交配后雌鼠即对雄鼠产生明显的好感，把它当作自己的伴侣。这种一见钟情式的关系能够持久地维持下去，但通过一定的方式仍能够诱导雌鼠与另一只雄鼠交配。

(五) 性 经 历

哺乳动物具有一定的记忆功能，有的动物的记忆能力甚至很强，因此性经历会对动物的性行为产生明显的影响。有交配经历的雄性动物在去势后，动物血浆中睾酮含量迅速下降，甚至消失，而交配活动还能较长期的保留。但在雄性动物的幼年时，初情期之前就摘除睾丸，则此后一直不会出现正常的性行为。

关于类固醇激素和性经历之间复杂的相互作用关系，有研究显示类固醇激素作用于大脑，负责引起性觉醒，而性经历则引起动物对性欲、性觉醒和性行为等一系列性活动的记忆和联想，使得动物能够在内外刺激和性行为之间形成实质性的联系。内外刺激因素对机体作用的结果使动物建立起性行为的巴甫洛夫联系，通过这些联系建立起本能的机制和性反应的自动模式。

动物在交配过程中如受到外界强烈干扰，就会引起雄性动物性行为障碍，出现性抑制或阳痿。同样，痛苦的性经历会弱化雄性动物的性行为并影响此后的性活动。雄性动物在求偶、爬跨和交配过程中遭遇挫折，如遇到意外惊扰和打击后，会因这种挫折程度的不同在此后的交配行为中有不同的影响。尽管生理的损伤会恢复，但仍会对性行为产生影响，甚至对交配产生恐惧、回避等行为，这正是由于对性挫折的记忆产生的结果。

关于雄性动物去势后交配活动还能较长期的保留，通常认为是由于雄性动物对性经历的记忆功能，但也有人认为除了性腺来源的性激素以外，还有其他腺体来源的雄激素，如肾上腺。但犬、大白鼠和猫等动物即使去势后再摘除肾上腺，也并不影响去势后性行为减弱的速度。估计这是由于残余睾酮的作用。

(六) 隐 睾

正常的雄性胎儿在妊娠期或出生后不久，睾丸即沿腹股沟从腹腔下降到阴囊内，称为睾丸下降。如牛在妊娠期的第 100~105 天，猪在第 100~110 天，羊在第 100 天左右，马在出生一周，犬在出生后 8~10 天。睾丸不能顺利下降到阴囊而停留于腹腔，称为隐睾 (cryptorchidism 或 retained testis)。精子发生过程对温度要求十分严格，由于阴囊的温度低于动物正常的体温，因此停留于腹腔的睾丸便丧失了生精能力。隐睾多为遗传病，在猪发生的几率较高，为 1%~2%，牛为 0.7%，犬为 0.05%~0.1%。隐睾有一侧性和两侧性之分，一侧性的正常睾丸有精子形成，两侧性的隐睾没有精子形成。

双侧隐睾的动物，性行为必然发生很大的改变，甚至没有交配能力。患单侧隐睾的雄性，通常都有正常的性行为，也具有生殖能力，但生殖能力会下降，畜牧业生产上通常不用作种畜。

(七) 异性吸引

动物的生理状态对异性的发情周期也有一定的影响，如处于发情状态的雌性动物会激发雄性动物的性兴奋；而成年健壮的雄性动物也能诱导和促进雌性动物提前进入发情周期，强化发情表现。动物的体型、毛色和气味对同种动物的异性都是一种性刺激，能易化动物的性行为，缩短雌性动物的性周期。许多灵长类动物中，雌性的性吸引力受行为的影响，包括性行为和性行为，两种行为通常与卵巢周期和雌性的激素状态有关。排卵时期母猴的行为可以提高母猴对公猴性的吸引力。雄性动物在交配和采精前，通过视觉刺激，可加强雄性动物的性行为表现，缩短采精的时间，提高射精量，增加精子密度。如公牛在采精前观察其他公牛采精 10min，再进行采精可提高射精量和精液品质。更换台畜也有同样的效果。

(八) 交配频率

这主要是针对雄性动物而言。在一定时间内，交配或采精的次数称为交配频率 (mating frequency)，也称交配能力 (serving capacity)。经长时间休息或季节性配种的家畜，公畜最初在母畜群中，其交配能力在开始几天特别强大。如公牛在 24 小时内交配次数可达 60~80 次，公羊为 50 次，公马为 20 次，公猪为 8 次。但这样频繁的交配并不能持久，如果交配频率得不到有效的控制，动物的性行为会很快减弱，生殖能力也会很快下降，种用动物的使用年限也会因此缩短。由于反复交配，射精与恢复再交配之间的时间间隔越来越长，最终停止。交配停止后，如引来新的异性，雄性则又开始交配。

动物与人的性行为和性周期有很大的差别，但在内分泌和神经内分泌系统上有相似性。对动物性行为和性周期的研究有助于人类认识自身有关性的问题。

五、异常性周期和性行为

(一) 同性恋

性倾向 (sexual partner preference) 或性取向 (sexual orientation) 指动物对同性或异性的性兴趣。一般情况下，成年雄性动物表现出相对固定的一套程式化的性行为，最终完成与雌性交配，此为正常的异性恋。但是，哺乳动物中同性恋 (homosexuality) 现象十分普遍，如奶牛、公绵羊、雌性非洲水羚和雌性日本猿等。对野生动物和家畜的性行为观察发现，同性之间的爬跨和交配现象也是屡见不鲜。

虽然有很多研究试图阐明其中的原因，但尚不清楚这种现象产生的原因。性取向可能反映了动物的进化史。有研究表明，功能性芳香化酶基因表达是雄性小鼠建立正常的

性倾向所必需的。据推测，这种方式有助于在一个动物群体内确立一种等级制度和统治关系，另一种说法认为同性之间爬跨对于后来与异性的交配行为是必需经历的探索过程。但也有人否定了以上观点，认为同性之间爬跨并不是为了树立统治地位，建立等级关系，也不是为了训练正确的性取向，而仅仅是不同的动物个体根据自己的喜好选择其同性恋的对象。

母绵羊在排卵前出现的 LH 峰，在同性恋和异性恋的公绵羊都没有。相反，同性恋的公绵羊扁状体中雌激素受体的含量却与母绵羊相近，但与异性恋的公羊不同，这种同性恋的公绵羊与异性恋的公绵羊在雌激素受体含量上的不同，说明扁状体起着性配偶选择的作用。可见，扁状体不仅在性行为中发挥作用，而且还参与了公绵羊的性取向。也有研究发现，同性恋的公绵羊在神经生物学和生理学的某些方面不同于正常异性恋的公羊，尚不能肯定是否是在围产期异常的性激素环境导致了性取向的异常。

无性动物（asexual animal）不表现性行为，对同性和异性都没有性的兴趣，还不清楚这种动物没有性行为的生理机制。同性恋和无性动物在表观上看不出与正常雄性动物有明显的差异，因此有时会被选作种兽，而这类动物用来配种显然不能引起雌性受孕。可以通过检测血液中 LH、睾酮和雌激素的浓度来评判公羊的生殖能力，激素水平高的应为生殖能力强的个体。

(二) 异常发情

雌性动物的性行为异常，有时会表现强烈而持续的发情，多见于牛、猪和马等动物。该动物精神极度不安，大声嚎叫，阴户浮肿，荐坐韧带松弛，尾根举起，身体消瘦，被毛逆乱，爬跨其他雌性动物，不接受雄性动物配种，形体甚至出现雄性特征，临床上称之为慕雄狂（nymphomania）。有的雌性动物发情时，外观的发情表现不明显，但卵巢上有卵泡发育成熟和排卵，称为安静发情。初情期的雌性动物，由于内分泌的紊乱状态，容易发生安静发情。发情旺季的雌性动物有时会出现发情周期缩短的现象，称为短促发情。此外还有断续发情、假发情和病理性发情等，都属于异常发情的范畴。

六、人为调节性行为

(一) 阉割去势

出于动物生产的考虑，很多家畜在很早的时候就被摘除性腺，以节省生殖行为引起的能量消耗。许多家养宠物也被阉割去势以抑制其性行为的表现。雌性哺乳动物在卵巢摘除后发情周期和性行为会很快消失。雄性动物去势后性行为也会逐渐消失，但相比于雌性动物，成年雄性动物的性行为在去势后往往消失得比较慢，这主要是由于激素水平和性经历的影响。近年来，对动物阉割去势的做法已经越来越少了，很重要的一个方面是人类对动物保护意识的加强。

(二) 诱导发情和同期发情

随着人类对激素调控性行为的认识不断深入,产生了许多调节发情行为的方法。如在畜牧业生产上,常通过向母畜群中引进公畜来诱导和促进母畜发情,主要是利用公畜的外激素诱导母畜发情。注射雌激素能够很快使雌性动物出现发情表现。阴道内埋置孕酮海绵栓,或连续注射孕激素制剂,都能够实现同期发情。此外,注射前列腺素也能实现畜群发情的同期化。

(三) 激素免疫

主动免疫或被动免疫是利用抗原抗体的特异性结合,通过免疫中和作用,消除动物内源性的激素。动物的激素水平发生变化,通过反馈调节作用,就会连锁影响体内其他激素水平的变化,实现对动物性行为以及生殖行为的调节,例如抑制素、类固醇激素和 GnRH 的免疫等。激素免疫既可以改变雌性动物的性行为和生殖性能,也能改变雄性动物的性行为,包括人类的生殖和避孕,并且具有传统方法不可比拟的优势,因此日益受到重视。

(陶勇编写 夏国良修改)

主要参考文献

- 陈斌,李灵,张达军,张锦余,汤海林.2002.台系杜洛克猪的性行为观测.当代畜牧(10):21~22
- 方富贵,章孝荣,张运海,袁运生,刘亚,陶勇.2002.GnRH 并列体二聚体主动免疫对公兔性腺的影响.中国兽医学报 22(4):373~374
- 韩登峤,罗水新,马晖.1998.笼养黑熊性行为的观察研究.黑龙江动物繁殖 6(1):10
- 刘敏雄,王柱三.1984.家畜行为学.性行为学:pp.79~97.北京:农业出版社
- 陶勇,章孝荣.1999.类固醇激素免疫的研究进展.畜牧兽医杂志(2):10~15
- 陶勇.1997.抑制素免疫的研究进展.黑龙江动物繁殖(4):36~38
- 王建辰.1993.家畜生殖内分泌学.北京:农业出版社 pp.4~112
- 熊成培.1998.藏酋猴社群雌体的性行为模式.兽类学报 18(4):247~253
- 杨晓军.1998.笼养川金丝猴雌性性行为的研究.甘肃农业大学学报 33(3):228~233
- 张忠诚.2000.家畜繁殖学(第三版).北京:中国农业出版社
- 朱景瑞.1996.家畜行为学.北京:中国农业出版社
- Agmo A.1997. Male rat sexual behavior. Brain Research Protocols 1: 203~209
- Agmo A.1999. Sexual motivation—an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. Behav Brain Res 105: 129~150
- Aikey JL, Nyby JG, Anmuth DM, James PJ.2002. Testosterone rapidly reduces anxiety in male house mice (Mus musculus). Horm Behav 42: 448~460
- Alcock J.1993. Animal Behavior: an evolutionary approach. In: Male and female reproductive tactics, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, pp.395~443
- Arena AC, Pereira OCM.2002. Neonatal inhalatory anesthetic exposure: reproductive changes in male rats. Comparative Biochemistry and Physiology 133 (Part C): 633~640

- Bakker J, Baum MJ .2000 . Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators . *Front Neuroendocrin* 21: 220~262
- Bakker J, Honda S, Harada N, Balthazart J .2002 . Sexual partner preference requires a functional aromatase (Cyp19) gene in male mice . *Horm Behav* 42: 158~171
- Bancroft J .1999 . Central inhibition of sexual response in the male: a theoretical perspective . *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23: 763~784
- Becker JB .1999 . Gender differences in dopaminergic function in striatum and nucleus accumbens . *Pharm Biochem Behav* 64: 803~812
- Bethea CL, Lu NZ, Gundlah C, Streicher JM .2002 . Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system . *Front Neuroendocrin* 23: 41~100
- Bialy M, Sachs BD .2002 . Androgen implants in medial amygdala briefly maintain noncontact erection in castrated male rats . *Horm Behav* 42: 345~355
- Blache D, Batailler M, Fabre-Nys C .1994 . Oestrogen receptors in the preoptic-hypothalamic continuum: immunohistochemical study of the distribution and cell density during induced oestrus cycle in ovariectomized ewe . *J Neuroendocrinol* 6: 329~339
- Blache D, Fabre-Nys C, Venier G .1996 . Inhibition of sexual behaviour and the luteinizing hormone surge by intracerebral progesterone implants in the female sheep . *Brain Res* 741: 117~122
- Blanchard DC, Blanchard RJ .1990 . Behavioral correlates of chronic dominance-subordination relationships of male rats in a seminatural situation . *Neurosci Biobehav Rev* 14: 455~462
- Brandling-Bennett EM, Blasberg ME, Clark AS .1999 . Paced mating behavior in female rats in response to different hormone priming regimens . *Horm Behav* 35: 144~154
- Carosi M, Heistermann M, Visalberghi E .1999 . Display of proceptive behaviors in relation to urinary and fecal progesterone levels over the ovarian cycle in female tufted capuchin monkeys . *Horm Behav* 36: 252~265
- Chaouloff F .1993 . Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems . *Brain Res Rev* 18: 1~32
- Clancy AN, Zumpe D, Michael RP .2000 . Estrogen in the medial preoptic area of male rats facilitates copulatory behavior . *Horm Behav* 38: 86~93
- Clark AS, Harrold EV, Fast AS .1997 . Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats . *Horm Behav* 31: 35~46
- Clemens GL (吴光锐译) .1984 . 大白鼠大脑内化学药物刺激与雌性性行为 . 韩正康 译校 . 家畜行为学研究进展——“动物行为学在畜牧中的应用” . pp .172~175 .北京: 科学出版社
- Connolly PB, Resko JA .1994 . Prenatal testosterone differentiates brain regions controlling gonadotropin release in guinea pigs . *Biol Reprod* 51: 125~130
- Cui S, Chen YF, Yue HN, He YQ, McNeilly AS .2003 . Sexual development and the effects of active immunization against GnRH in Chinese Tanyang ram lambs . *Anim Reprod Sci* 77: 129~139
- Dagg AI .1984 . Homosexual behavior and female-male mounting in mammals—a first survey . *Mammal Rev* 14: 155~185
- Dufourny L, Warembourg M .1999 . Estrogen modulation of neuropeptides: somatostatin, neurotensin and substance P, in the ventrolateral and arcuate nuclei of the female guinea pig . *Neurosci Res* 33: 223~228
- Etgen AM, Ansonoff MA, Quesada A .2001 . Mechanisms of ovarian steroid regulation of norepinephrine receptor-mediated signal transduction in the hypothalamus: Implications for female reproductive physiology . *Horm Behav* 40: 169~177
- Fabre-Nys C, Chesneau D, de la Riva C, Hinton MR, Locatelli A, Ohkura S, Kendrick KM .2003 . Biphasic role of dopamine on female sexual behaviour via D2 receptors in the mediobasal hypothalamus . *Neuropharmacology* 44: 354~366
- Farabollini F, Porrini S, Dessi-Fulgheri F .1999 . Perinatal exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects behavior in male and female rats . *Pharm Biochem Behav* 64: 687~694
- Flanagan-Cato LM .2000 . Estrogen-induced remodeling of hypothalamic neural circuitry . *Front Neuroendocrin* 21: 309~329

- Flanagan-Cato LM, Calizo LH, Daniels D .2001. The synaptic organization of VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behavior . *Horm Behav* 40: 178~182
- Foreman MM, Hall JL, Love RL .1989. The role of the 5-HT₂ receptor in the regulation of sexual performance of male rats . *Life Sci* 45: 1263~1270
- Freeman LM, Rissman E .1996. Neural aromatization and the control of sexual behavior . *Trends Endocrinol Metab* 7: 334~338
- Frye C, Seligaa A .2002. Olanzapine and progesterone have dose-dependent and additive effects to enhance lordosis and progestin concentrations of rats . *Physio Behav* 76: 151~158
- Frye CA, Vongher JM .1999. GABA (A), D1, and D5, but not progestin receptor, antagonist and anti-sense oligonucleotide infusions to the ventral tegmental area of cycling rats and hamsters attenuate lordosis . *Behav Brain Res* 103: 23~34
- Gardener HE, Clark AS .2001. Systemic ICI 182,780 alters the display of sexual behaviors in the female rat . *Horm Behav* 39: 121~130
- Gerardin DCC, Pereira OCM .2002. Reproductive changes in male rats treated perinatally with an aromatase inhibitor . *Pharm Biochem Behav* 71: 309~313
- Gooren LJG, Kruijver FPM .2002. Androgens and male behavior . *Mol Cell Endocrinol* 198: 31~40
- Gorzalka BB, Hanson LA .1998. Sexual behavior and wet dog shakes in the male rat: regulation by Corticosterone . *Behav Brain Res* 97: 143~151
- Grandien K, Berkenstam A, Gustafsson JA .1997. The oestrogen receptor gene: promoter organization and expression . *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1343~1369
- Grier JW, Burk T .1992. Biology of animal behavior (Second edition) . In: *Reproductive Behavior: mating system and parental behavior*, Mosby-Year Book, Inc ., St .Louis, Missouri, pp .359~391
- Hanson LA, Gorzalka BB .1999. The influence of corticosterone on serotonergic stereotypy and sexual behavior in the female rat . *Behav Brain Res* 104: 27~35
- Harvey PW, Chevins PFD .1984. Crowding or ACTH treatment of pregnant mice affects adult copulatory; behavior of male offspring . *Horm Behav* 18: 101~110
- Hennessy MB, Maken DS, Graves FC .2002. Presence of mother and unfamiliar female alters levels of testosterone, progesterone, cortisol, adrenocorticotropin, and behavior in maturing guinea pigs . *Horm Behav* 42: 42~52
- Henry LA, Witt DM .2002. Resveratrol: Phytoestrogen effects on reproductive Physio Behav in female rats . *Horm Behav* 41: 220~228
- Hernandez-Gonzalez M, Juarez J .2000. Alcohol before puberty produces an advance in the onset of sexual behavior in male rats . *Alcohol* 21: 133~140
- Holson RR .1986. Feeding neophobia: a possible explanation for the differential maze performance of rats reared in enriched or isolated environments . *Physio Behav* 38: 191~201
- Holson RR, Gough B, Sullivan P, Badger T, Sheehan DM .1995. Prenatal dexamethasone or Stress but not ACTH or corticosterone alter sexual behavior in male rats . *Neurotoxicology and Teratology* 17: 393~401
- Hovpt KA, Wolski TR .1986. 家畜行为学 . 家畜的性行为: pp .85~132. 河南省农业科学院图书馆出版
- Hunt PA, Hassold TJ .2002. Sex matters in meiosis . *Science* 296: 2181~2183
- Huntingford FA .1984. The study of animal behaviour . In: *Adaptive significance of behaviour accompanying mating*, Chapman and Hall Ltd ., London New York, pp .217~230
- Imwalle DB, Schillo KK .2002. Castration increases pulsatile luteinizing hormone release, but fails to diminish mounting behavior in sexually experienced bulls . *Domest Anim Endocrinol* 22: 223~235
- Insel TR, Preston S, Winslow JT .1995. Mating in the monogamous male: behavioral consequences . *Physio Behav* 57 (4): 615~627
- Jones JE, Wade GN .2002. Acute fasting decreases sexual receptivity and neural estrogen receptor- α in female rats . *Physio Behav* 77: 19~25

- Jurke MH, Pryce CR, Dobeli M .1995. An investigation into sexual motivation and behavior in female goeldi s monkey (*Callimico goeldii*): Effect of ovarian state, mate familiarity and mate choice . *Horm Behav* 29: 531~553
- Kendrick AM, Schlinger BA .1996. Independent differentiation of sexual and social traits . *Horm Behav* 30: 600~610
- Kendrick KM, Haupt MA, Hinton MR, Broad KD, Skinner JD .2001. Sex differences in the influence of mothers on the sociosexual preferences of their offspring . *Horm Behav* 40: 322~338
- Krackow S .1995. The developmental asynchrony hypothesis for sex ratio manipulation . *J Theor Biol* 176: 273~280
- Krebs CJ, Pfaff DW .2001. Expression of the SCAMP-4 gene, a new member of the secretory carrier membrane protein family, is repressed by progesterone in brain regions associated with female sexual behavior . *Mol Brain Res* 88: 144~154
- Kuiper GGJM, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA .1998. The oestrogen receptor b subtype: A novel mediator of oestrogen action in neuroendocrine systems . *Front Neuroendocrin* 19: 253~286
- Maney DL, Richardson RD, Wingfield JC .1997. Central administration of chicken gonadotropin-releasing hormone-**II** enhances courtship behavior in a female sparrow . *Horm Behav* 32: 11~18
- Maquivara M, Galinaa CS, Orihuelab A .2002. Cows treated with Synchronate B may cluster their sexual behaviour independent of follicular growth at the time of oestrus . *Physio Behav* 76: 199~203
- Matuszczyk JV, Larsson K .1995. Sexual preference and feminine and masculine sexual behavior of male rats prenatally exposed to antiandrogen or antiestrogen . *Horm Behav* 29: 191~206
- McFarland D .1985. Animal behavior .In: Sexual selection, The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc ., Menlo Park, Carlifornia, pp .113~126
- McGinnis MY, Kahn DF .1997. Inhibition of male sexual behavior by intracranial implants of the protein synthesis . *Horm Behav* 31: 15~23
- Melis MR, Argiolas A .1995. Dopamine and sexual behavior . *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19 (1): 19~38
- Nomura M, Durbak L, Chan J, Smithies O, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S .2002. Genotype/ age interactions on aggressive behavior in gonadally intact estrogen receptor β knockout (β ERKO) male mice . *Horm Behav* 41: 288~296
- Parthasarathy V, Price EO, Orihuela A, Dally MR, Adamsa TE .2002. Passive immunization of rams (*Ovis aries*) against GnRH: effects on antibody titer, serum concentrations of testosterone, and sexual behavior . *Anim Reprod Sci* 71: 203~215
- Pedersen CA, Boccia ML .2002. Oxytocin maintains as well as initiates female sexual behavior: Effects of a highly selective oxytocin antagonist . *Horm Behav* 41: 170~177
- Pereira OCM, Coneglian-Marise MSP, Gerardin DCC .2003. Effects of neonatal clomiphene citrate on fertility and sexual behavior in male rats . *Comparative Biochemistry and Physiology* 134 (Part A): 545~550
- Perkins A, Fitzgerald JA .1992. Luteinizing hormone, testosterone, and behavioral response of male-oriented rams to estrous ewes and rams . *J Anim Sci* 70: 1787~1794
- Perkins A, Fitzgerald JA, Moss GE .1995. A comparison of LH secretion and brain estradiol receptors in heterosexual and homosexual rams and female sheep . *Horm Behav* 29: 31~34
- Pfaff DW, Schwartz-Giblin S .1988. Cellular mechanisms of female reproductive behaviors . In E .Knobil and J .D .Neill (Eds .), *The Physiology of Reproduction*, pp .1487~1568. Raven Press, New York
- Pfaus JG .1996. Homologies of animal and human sexual behaviors . *Horm Behav* 30: 187~200
- Pfaus JG, Smith WJ, Coopersmith CB .1999. Appetitive and consummatory sexual behaviors of female rats in bilevel chambers . I . A correlational and factor analysis and the effects of ovarian hormones . *Horm Behav* 35: 224~240
- Phelps SM, Lydon JP, O Malley BW, Crews D .1998. Regulation of male sexual behavior by progesterone receptor, sexual experience, and androgen . *Horm Behav* 34: 294~302
- Pinckard KL, Stellflug J, Resko JA, Roselli CE, Stormshak F .2000. Review: brain aromatization and other factors affecting male reproductive behavior with emphasis on the sexual orientation of rams . *Domest Anim Endocrinol* 18: 83~96
- Propper CR, Dixon TB .1997. Differential effects of arginine vasotocin and gonadotropin-releasing hormone on sexual behaviors in an anuran amphibian . *Horm Behav* 32: 99~104

- Rissman EF, Wersinger SR, Fugger HN, Foster TC .1999. Sex with knockout models: behavioral studies of estrogen receptor α . *Brain Res* 835: 80~90
- Rudd CD, Short RV, Shaw G, Renfree MB .1996. Testosterone control of male-type sexual behavior in the tammar wallaby (*Macropus eugenii*) . *Horm Behav* 30: 446~454
- Schimpl PA, Rissman EF .1999. Cortisol facilitates female sexual behavior in the musk shrew (*Suncus murinus*) . *Behav Neurosci* 113: 166~175
- Schimpl PA, Rissman EF .2000. Effects of gonadotropin-releasing hormones, corticotropin-releasing hormone, and vasopressin on female sexual behavior . *Horm Behav* 37: 212~220
- Scott CJ, Rawson JA, Pereira AM, Clarke IJ .1998. The distribution of oestrogen receptors in the brainstem of female sheep . *Neurosci Lett* 241: 29~32
- Shoham Z, Schachter M .1996. Oestrogen biosynthesis-regulation, action, remote effects, and value of monitoring in ovarian stimulation cycles . *Fertil Steril* 65: 687~701
- Solano J, Orihuela A, Galina CS, Montiel F .2000. Sexual behavior of Zebu cattle (*Bos indicus*) following estrous induction by Syncro-Mate B, with or without estrogen injection . *Physio Behav* 71: 503~508
- Suzuki M, Nishihara M .2002. Granulin precursor gene: A sex steroid-inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain . *Molecular Genetics and Metabolism* 75: 31~37
- Truitt W, Harrison L, Guptarak J, White S, Hiegel C, Uphouse L .2003. Progesterone attenuates the effect of the 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, and of mild restraint on lordosis behavior . *Brain Res* 974: 202~211
- Uphouse L .2000. Female gonadal hormones, serotonin, and sexual receptivity . *Brain Res Rev* 33: 242~257
- van Eerdenburg FJCM, Daemen IAJM, van der Beek EM, van Leeuwen FW .2000. Changes in estrogen- α receptor immunoreactivity during the estrous cycle in lactating dairy cattle . *Brain Res* 880: 219~223
- van Furth WR, Wolterink G, van Ree JM .1995. Regulation of masculine sexual behavior: involvement of brain opioids and dopamine . *Brain Res Rev* 21: 162~184
- van Leeuwen FW, Chouham S, Axelson JF, Swaab DF, van Eerdenburg EJ .1995. Sex differences in the distribution of oestrogen receptors in the septal area and hypothalamus of the domestic pig (*Sus scrofa*) . *Neuroscience* 64: 261~275
- Vandenbergh JG .1967. Effect of the presence of a male on the sexual maturation of female mice . *Endocrinology* 81: 345~349
- Vasey PL .2002. Same-sex sexual partner preference in hormonally and neurologically unmanipulated animals . *Annu Rev Sex Res* 13: 141~179
- Vilain E, McCabe ERB .1998. Mammalian sex determination: From gonads to brain . *Molecular Genetics and Metabolism* 65: 74~84
- Wallen K .2001. Sex and context: Hormones and primate sexual motivation . *Horm Behav* 40: 339~357
- Ward OB, Monaghan EP, Ward IL .1986. Naltrexone blocks the effects of prenatal stress on sexual behavior differentiation in male rats . *Pharm Biochem Behav* 25: 573~576
- Yirmiya R, Avitsur R, Donchin O, Cohen E .1995. Interleukin-1 inhibits sexual behavior in female but not in male rats . *Brain, Behavior and Immunity* 9: 220~233
- Zehr JL, Maestriperi D, Wallen K .1998. Estradiol increases female sexual initiation independent of male responsiveness in rhesus monkeys . *Horm Behav* 33: 95~103

第十四章 生殖缺陷与辅助生殖

第一节 生殖缺陷

有资料显示，不孕症在国外的发病率约为 15%~20%。在美国，每 7 对夫妇中就有一对在其生育期的某些时候受孕困难。据报道，我国的发病率为 5% 左右（也有报道为 10%~15%）。90% 的不孕原因是可查的，其中女性因素占 50%，男性占 30%，共同因素占 20%，剩余 10% 则原因不明。也有报道表明，男性原因的不育占 50% 左右。至少 5%~10% 的男性不育症是由于基因缺陷引起的。在发达国家，三分之二以上的不育症夫妇都是由男性伴侣所引起的。近一个世纪以来，由于全球的逐步工业化所带来的环境污染日益加重，同时人类的生活习惯和工作方式也经历了较大的变化，人体的正常生物活动规律受到了一定程度的干扰和破坏。大气污染，噪声、放射性物质、化学毒物、农药、增塑剂、洗涤剂、人工合成激素、重金属等均可损害男性的生殖细胞，造成精液质量下降，精子数量减少，从而影响男性的生殖功能。有统计表明，1940 年美国男性精液的精子密度为 133×10^6 个/毫升，而到 1990 年下降到 66×10^6 个/毫升；1981 年，我国男性精液的精子密度为 103×10^6 个/毫升，而到 1996 年下降到 84×10^6 个/毫升。一些不良的生活习惯，如吸烟、吸毒、酗酒、性传播疾病等导致了人体内环境紊乱，造成生殖腺及生殖道损害，最终引起男性不育症。随着以上问题的日益突出，患男性不育症的人数还将进一步增加。

一、女性生殖缺陷

女性不孕的可能原因可归纳为五类：① 性生活失调，性知识缺乏，全身性疾病及不明原因等引起的不孕约占不孕症的 1/3 左右。② 排卵功能障碍：表现为月经周期中无排卵，或虽然有排卵，但黄体功能不健全。③ 生殖器官先天性发育异常或后天性生殖器官病变，阻碍从外阴至输卵管的生殖通道通畅和功能，妨碍精子与卵子相遇，导致不孕。输卵管阻塞或通而不畅是女性不孕症的重要原因，约占 1/3。输卵管发育异常较少见，临床上也不容易被发现，常与生殖道发育异常并发，导致不孕或宫外孕。后天性生殖器官病变造成的不育主要是由阴道炎、子宫炎、宫颈糜烂、输卵管炎等原因造成的，但非炎症病变率在逐渐地增加，也不可忽视。④ 免疫学因素，系指女性生殖道中存在有抗精子抗体，引起精子互相凝集，丧失活力或死亡，导致不孕或不育。此外，部分不孕妇女的血清中存在有对自身卵子透明带抗体样物质，可阻碍精子穿透卵子受精，亦可引起不孕。⑤ 妇女年龄的增加所造成的卵子质量下降，从而导致不孕。随着年龄的增加，自然流产的比例逐步增加（图 14-1），重要原因之一是卵子质量尤其是卵子胞质质量下降，引起减数分裂过程中同源染色体和染色单体的分配错误，从而导致非整倍

性的产生和流产率的增加。

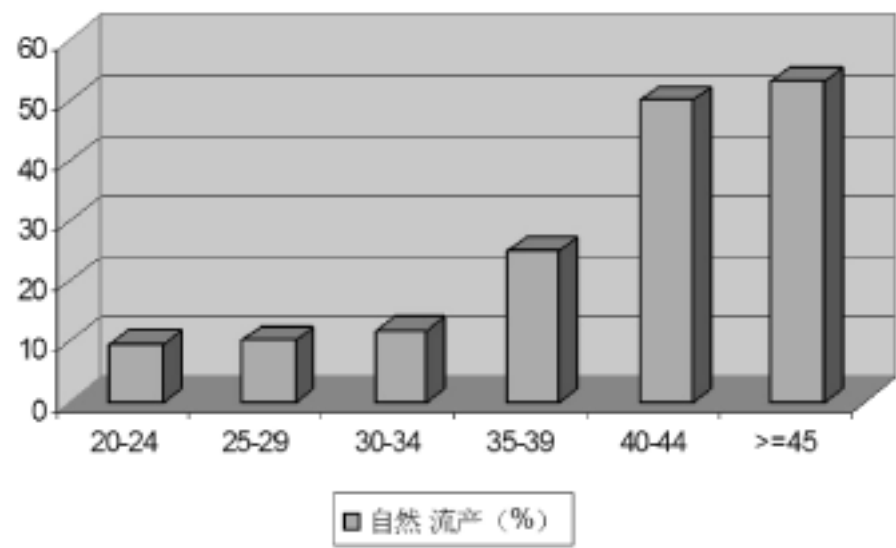


图 14-1 妇女年龄与流产率的关系 (刘辉提供)
横坐标为孕妇年龄/岁，纵坐标为流产率/ %。

二、男性生殖缺陷

引起男性不育的原因很多，主要有以下几个方面：① 性功能异常：性欲低下、阳痿、射精障碍、逆行射精等均是男性不育的重要原因。② 生殖器异常和病变：包括外生殖器畸形、睾丸鞘膜积液以及附睾、输精管、射精管和输尿管等处病变等。例如，附睾的炎症可影响附睾功能，改变附睾内环境，从而影响精子成熟，使其受精能力下降；炎症也可致附睾管堵塞，影响精子的输出，这些均可造成临床上不育。③ 精液异常：包括无精症、少精症、精子活力低下或不动精症、畸形精子过多、精液理化性状异常 (如精液射出后不凝固或液化不全) 等都可引起不育。④ 精子生成障碍：睾丸先天发育异常如无睾症、男性假两性畸形、先天性睾丸发育不全综合征或称小睾丸症 (Klinefelter s 综合征，简称克氏症)、睾酮合成障碍等和后天性因素 (如睾丸炎等) 引起的病变可导致精子发生缺陷。阴囊单侧隐睾患者中 30%~60% 不能生育，双侧隐睾患者中 60%~100% 不能生育；睾丸局部病变可使精子发生受损。⑤ 精索静脉曲张：可造成精子数量减少、活力降低和畸形精子增多。发病率在男性人群中为 10%~15%，多见于青壮年，在男性不育人群中占 15%~20%。⑥ 内分泌功能障碍：下丘脑-垂体-睾丸轴中的任一环节的内分泌紊乱都可造成不育。脑垂体机能减退、甲状腺功能亢进、肾上腺疾病等可以引起男性性功能障碍、少精症和无精症，导致男性不育。⑦ 附属腺异常：包括精囊腺炎和前列腺炎等。多数学者认为，前列腺的炎症可以影响前列腺的正常生理功能，使其分泌功能发生障碍，同时使精液带菌，进而影响精子的活力，造成生育能力下降。⑧ 其他病因：某些全身性疾病、重症营养不良、经常接触放射线、高温作业和药物中毒等均可引起不育。

三、男性不育的分子基础

尽管目前人们对于人类生殖生理学的认识有了巨大的进步，但导致男性不育症的原因仍未得到完全阐明。最近，遗传因素引起男性不育逐渐受到了人们的重视，与男性不育症相关的遗传因素包括遗传性的染色体紊乱、单遗传紊乱、多遗传紊乱和内分泌紊乱等。后来 Y 染色体基因的缺陷受到了人们的重视。患有不育症男性的染色体异常（例如 47XXY）是比较普遍的现象。除此之外，染色体结构的异常也能导致男性生殖紊乱现象。调查显示，不育男性病人中（ $n = 9\ 766$ ）染色体不正常的比例为 5.8%，其中性染色体异常的比例占 4.2%，而常染色体异常的比例占 1.5%。

（一）Y 染色体基因缺陷

研究表明，有相当数量的 Y 染色体长臂上的基因与性腺发育和精子发生有关。Y 染色体中至少有 15 个基因家族被认为参与调控精子发生。1976 年 Tiepolo 和 Zuffardi 发现 6 名具有正常男性体形的无精子症患者的 Y 染色体长臂远端部分缺失，因此提出在 Y 染色体长臂存在着控制精子发生的基因。由于该基因缺失患者多数表现为无精症，故将其称为无精子因子（azoospermia factor, AZF）基因。目前已知，AZF 至少包括两个基因家族，即 RBM 和 DAZ 基因，它们位于 Y 染色体长臂远端。

Vogt 等将 Yq₁₁ 区域分成 25 个亚区（D₁ ~ D₂₅），原发性无精子症和少精子症患者 Yq₁₁ DNA 位点的缺失分别位于 Yq₁₁ 的三个不同亚区，第一个亚区位于 Yq₁₁ 远端 D₂₀ ~ D₂₂ 亚区，第二和三亚区分别位于 Yq₁₁ 的近侧 D₃ ~ D₆ 和 Yq₁₁ 中间的 D₁₃ ~ D₁₆。睾丸组织活检发现，当微缺失位于 Yq₁₁ 同一亚区时，精子发生阻断在相同时相；而微缺失位于不同亚区时，精子发生则阻断在不同时相。因此认为在 Yq₁₁ 上存在三个精子发生位点，各位点在男性生殖细胞发育的不同时期起作用。由于每一位点的缺失都可导致无精子症，故将其命名为 AZFa、AZFb 及 AZFc。AZFa 定位在缺失基因区域 5 的起始端；AZFb 定位在缺失基因区域 6 接近于末端的部分，并延伸到缺失基因区域 5 的末端部分；AZFc 定位在缺失基因区域 6 的末端。AZFa 和 AZFb 末端基因的缺陷可导致男性不育包括严重的精子发生缺陷；而 AZFb 和 AZFc 末端基因缺失时，仍然有一部分精子能够发生。这几种基因的联合缺失（AZFb + c 和 AZFa + b + c）则与睾丸精子的完全阻断有关。AZFb 缺失后精子发生阻断在粗线期精母细胞阶段，而 AZFc 缺失后精子发生阻断在精子细胞阶段。在男性不育症中，染色体基因的缺陷大概占 2% ~ 20%。所报道的基因缺陷频率的明显不同可能是由于种族不同、病人选择标准不同和方法学方面的不同所引起的。

（二）影响男性不育的 Y 染色体基因

到目前为止，与 Y 染色体关联的不育症基因还没有确定。DAZ、RBM1、RBM2、CDY、BPY1、BPY2 和 PRY 基因中的几种基因可能对生育是必需的。两个其他的 Y 染

染色体基因 (TTY1 和 TTY2) 中则没有明显的开放阅读框, 因此它们不太可能与不育症有关。此外 DFFRY、DBY、UTY、TB4Y 和 EIFIAY 等在睾丸中不是特异表达。在近十年来, 许多研究都集中在阐明 DAZ 和 RBM 家族成员在男性不育症中的功能。

1. DAZ 基因

DAZ (deleted in azoospermia) 基因定位于 AZFc 区域内, 含有 1641bp, 其编码蛋白含 366 个氨基酸, 分子质量为 41 257Da, 在 DAZ 蛋白的 C 末端, 而半数蛋白的 N 端含有 RNA 结合位点, 因此认为 DAZ 基因可能具有结合 RNA 的功能。DAZ 基因家族最有可能是 AZF 候选基因。最初认为 DAZ 是一个单拷贝基因, 但是现在已经证实它是一个多拷贝基因家族。Northern blot 分析表明, DAZ 为睾丸特异表达。Southern blot 分析发现, 在人 Y 染色体上可见单个识别带, 在猩猩可见到 3 条识别带。睾丸组织原位杂交表明, DAZ 在减数分裂前期的生殖细胞特别是精原细胞中表达, 表明 DAZ 可能在精子发生的早期起作用。

据报道, 定位在 AZFc 区域的 DAZ 缺失的男性不能产生成熟的精子。有一部分少精症的男性也是 DAZ 缺陷型。小鼠 Dazla 基因和果蝇 Boule 基因似乎都能调节减数分裂细胞周期, 并与 DAZ 基因具有同源性这一事实暗示, DAZ 在进化中高度保守。

2. RBM 基因

RBM 基因 (包括 RBM1 和 RBM2) 于 1992 年被鉴定出来。这个基因家族分布在 Y 染色体的双臂上。免疫组织化学研究表明 RBM1 蛋白在睾丸特异性表达, 定位在人类男性生殖细胞的细胞核中, 特别是 Y 染色体的 AZFb 区。AZFb 缺陷的男性 RBM1 基因丢失是否可以导致不育仍不是很清楚。RBM 基因在进化上高度保守并特异表达在雄性生殖细胞的事实说明, 它在精子发生中可能具有重要的作用。然而有报道表明, 无论是否具有生殖能力, 日本家族男性经常不具有 RBM2 基因。

3. CDY、BPY2 和 PRY 基因

这些基因是最近才被发现, 所以对于它们的功能所知甚少, 仅仅知道这些基因定位在 Y 染色上并在睾丸组织特异性表达。

(三) 影响男性不育症的其他基因

尽管许多关于男性不育症的遗传学研究都集中在 Y 染色体上, 然而还有许多其他的精子发生基因存在于整个人类基因组中。事实上, 有 4 000 多个序列标签在人类睾丸组织中特异表达。所有这些基因都可能是男性不育症的候选基因, 还需要进一步阐明它们的确切功能。

许多生殖细胞特异的蛋白都表达在减数分裂期, 如乳糖脱氢酶 C4、磷酸甘油激酶 C2、细胞色素 C 和热激蛋白 HSP70-2。小鼠基因敲除研究表明, 在精子发生和精子功能特异阶段表达的几个基因, 如在原生殖细胞发育和迁移阶段 (C-kit、SCF、TIAR 和 Lhx9)、精原细胞增殖和生存阶段 (p27 和 Dazl)、减数分裂的各个阶段 (ATM、ATR、

TLS、SCP3、Msh5、HSP70-2、cyclinA1 和鱼精蛋白)、精子形成阶段 (MHR6b、CREM、蛋白磷酸酶 1c γ 和 nectin-2) 和受精阶段 (受精素- β)，它们对单倍体精子细胞的产生、精子形成和受精起着重要的作用。如果缺失，则会有一部分生精细胞阻滞在减数分裂阶段，并导致男性不育。一个最新的报道表明，不育症男性中 C-kit 受体和配体 (SCF) 表达减少可能改变细胞增殖/分化和细胞凋亡之间的平衡，导致男性不育症。另有报道暗示，热激蛋白 HSP70-2 在人类睾丸组织中的正常的和精子发生阻滞的精母细胞和精子细胞阶段都有表达。然而，精子发生阻滞时，HSP70-2 表达水平低，Sertoli 细胞没有 HSP70-2 表达。因此，热激蛋白 HSP70-2 表达减少可能与男性不育症的病理发生有关。惟 Sertoli 细胞综合征 (Sertoli-cell-only syndrome, SCOS) 病人的组织中只表达孕酮受体 A (PR-A)，但没有 PR-B 表达。雌激素受体在 SCOS 病人的组织中高表达。因此，雌激素和孕酮受体可能也与男性不育症的病理发生有关。

(四) 导致男性不育症的精子染色质异常

在精子发生过程中，组蛋白被高度碱性的鱼精蛋白 (含有丰富的半胱氨酸残基) 代替。在精子发生和附睾成熟过程中，半胱氨酸残基之间形成二硫键，为染色质的进一步稳定提供了条件，这对男性遗传物质的运输和完整性的保持是必需的。当评估精子受精能力的时候，染色质状态的质量是非常重要的。目前已经有许多技术用于评估精子的染色质状态，如光学显微术、电子显微术和流式细胞术。在辅助生殖技术和一般的受精过程中，精子染色质缺陷与精子受精能力的下降有关。此外，不育病人的精子染色质多出现异常。

(五) 男性不育症遗传异常的诊断

多种男性不育症的病因学至今仍未完全阐明。Yq 显微缺失研究将有助于发展更好的诊断方法和扩展我们对精子发生的理解。许多因素，包括 Y 染色体上许多重复性序列，增加了我们对于 Yq 显微缺失以及对精子发生起关键作用的候选分子研究的难度。一般来讲，患有严重不育症的男性应该接受扫描来检查 Yq 是否缺陷，以作为临床诊断依据。Yq11 染色体上的与精子发生相关的 AZFa、AZFb 和 AZFc 控制男性的精子发生并对生育有影响。细胞内单精子注射技术的快速发展为解决男性不育症问题提供可以接受的方法。在应用细胞内单精子注射时，AZFc 缺失的精子能够使卵子受精且受精卵具有完全的发育潜能。然而，应用细胞内单精子注射技术产生的婴儿很有可能遗传 Yq 缺陷，这就仍然有可能会造成后代的不育症。

Y 染色体上一系列特异序列靶位点 (STS) 的特性已经得到了确定，并且我们可以选择性地设计引物来覆盖这些缺陷位点。基因缺陷的诊断检测应该应用 Y 染色体 AZFa、AZFb 和 AZFc 上 STS 多元 PCR 扩增来进行，包括以下引物：sY84、sY86、sY127、sY134、sY252 和 sY255。目前越来越多的生殖医学实验室开始使用 Yq 微缺失分析，但方法差异较大，特别是所应用的 STS 数目和所见到的缺失差异很大。利用不同的方法，男性不育症会得到准确的诊断报告，这对其后来的治疗是很有帮助的。

(六) 男性不育症诊断的细胞生物学方法

传统的精液参数分析在诊断男性不育症方面具有重要的临床价值。除此以外，其他细胞生物学技术，如计算机辅助精液分析、顶体检测、精子穿入分析、透明带结合分析和精子染色质结构分析对我们正确理解男性不育症是非常有价值的。此外，睾丸活组织检查是诊断重型男性不育症的一个重要的病理学程序。

第二节 辅助生殖技术

随着辅助生殖技术 (assisted reproductive technology, ART) 的发展，不育夫妇的怀孕率可达 30%~50% 以上。目前辅助生殖技术，特别是体外受精和胞浆内单精子注射 (ICSI) 技术已成为临床上不育症治疗的最主要手段。自 1978 年 7 月 25 日世界上第一例试管婴儿路易斯·布朗 (Louise Brown) 在英国诞生以来，促排卵技术、ICSI 技术、体外胚胎培养技术和胚胎冷冻技术不断完善并应用于临床。目前，IVF 技术已广泛用于各种不孕症治疗，如输卵管疾病、免疫排斥不孕症、由男方原因导致不孕症、子宫内膜异位症及其他原因不明的不育症等。近几年人们得到了较高的 IVF 妊娠率，全世界每年大约有 100 000 例试管婴儿出生，世界各地已有 100 多万试管婴儿呱呱落地。我国的第一例试管婴儿是 1988 年完成的，目前体外受精和 ICSI 技术也已在临床上得以广泛应用。下面主要介绍这两种技术，并简单介绍其他相关的辅助生殖手段和目前还处于研究阶段的潜在技术。以下的描述以人类的辅助生殖技术为主，也兼顾到实验动物和家畜的辅助生殖。

一、辅助生殖技术的发展

辅助生殖技术的发展过程大致经历了三个阶段，即人工授精、体外受精或试管婴儿以及显微授精。

(一) 人工授精 (artificial insemination)

是将精子 (丈夫或供精者的精子) 直接注入处于排卵期妇女生殖道 (阴道、宫腔) 中。后来逐渐发展起来了输卵管内人工授精、配子输卵管内移植，合子输卵管内移植等助孕技术。这些助孕技术既克服了阴道、宫腔内人工授精的不足和缺点，又简便经济实用，为治疗少、弱、畸型精子综合征、单侧输卵管堵塞、免疫不孕和原因不明的不孕夫妇提供了有效的手段。这种技术的优点是操作简单，但最大缺点是在很多情况下，需采用供精者的精子，不育夫妇很难接受。

(二) 体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 或试管婴儿

使精子和卵子在体外完成受精和早期发育,然后把早期胚胎移植到子宫腔内,包括超数排卵、卵子的收集、体外受精、胚胎体外发育、子宫内着床条件的同步化、胚胎移植等步骤。这一技术目前在临床上得到广泛应用,对治疗输卵管堵塞等原因导致的不育非常有效,其优点是一般情况下都可采用不育夫妇的精子 and 卵子完成辅助生殖,但缺点是费用较高,且妇女要经历促排卵和胚胎移植所带来的刺激。

(三) 显微授精 (microinsemination)

指通过对男女配子进行显微操作而达到辅助受孕的目的。这一技术特别适用于不适合做体外受精的无精症、少精症、不动精症等男性不育治疗。开始出现的技术是为克服精子在穿卵时面临的天然屏障,为精卵结合创造最佳条件而逐步建立的透明带打孔和透明带下注射 (SUZI) 等技术,但这些技术并未提高成功率。当前应用最为广泛的是在透明带打孔或透明带下注射的基础上发展起来的卵子胞浆内单精子注射 (ICSI) 技术。

ICSI 技术的应用使无精症、少精症、不动精症或少、弱、畸形精子综合征患者可以获得自己完全“正宗”的孩子。ICSI 避开了自然受精过程中的多种天然屏障对精子的筛选,特别是宫颈和透明带这两大屏障的筛选作用。虽然技术本身不会造成任何新的基因缺陷,但该技术可能会将导致不育症的病因转移给下一代。所以可以想象,这些新生出的 ICSI 下一代完全有可能在其青春期后再现其父的悲剧。有人选择了 35 位不育男子进行研究,其中的 28 人都通过 ICSI 技术获得了自己的孩子,对孩子们进行了血样基因测试发现,没有明显的证据表明从 ICSI 技术得来的孩子染色体缺失,但也不能完全排除其可能性,因为 Y 染色体微缺失可代代相传。据报道,Y 染色体缺失的发生率在少精症患者中为 2.1%~26.1%,在无精症患者中波动于 0~31.2%之间,而在有生育能力的正常对照组中并未发现。因此,在 ICSI 治疗之前要进行有关的咨询和遗传测试。当前国际学术界建议在开展 ICSI 时应注意进行严格的遗传咨询,采用包括细胞遗传学和分子遗传学的检测手段,尽可能明确或排除遗传缺陷;开展移植前基因诊断,排除有遗传缺陷的男性胚胎,作为最后把关手段。随着分子遗传学在人类生育方面的快速发展,现在利用各种不同的高能量驱动的 PCR 技术和多颜色的荧光原位杂交技术,检测染色体异常已经成为可能。利用 DNA 芯片技术,将来我们可以发现更多的精子发生相关基因并检测变异表型。

下面主要介绍目前辅助生殖临床上常用的体外受精和显微授精技术。

二、体 外 受 精

多种动物包括人的体外受精技术都已建立起来,这里主要介绍人的体外受精步骤和操作流程,也简单介绍主要的实验动物小鼠的体外受精操作。

(一) 人卵母细胞体外成熟和体外受精

1. 人卵母细胞体外成熟和体外受精简介

人卵母细胞体外成熟和体外受精程序主要参考 Wang WH 的方法。

(1) 人卵母细胞体外成熟

在人体外受精技术中，卵母细胞体外成熟 (IVM) 技术是一项具有重要潜在价值的技术，它可以减少费用，避免应用促性腺激素所导致的副作用。Edwards 曾报道，人卵泡卵母细胞从卵泡中分离出来后，在适当的条件下可以体外成熟。1969 年人们就通过人卵母细胞体外成熟的方法得到了受精后胚胎。在临床上也有一些通过卵母细胞体外成熟方法获得的试管胚胎被移植到病人体内并得到妊娠的结果，但是直到最近 IVM 技术才在临床上被用来治疗妇女不孕症。与体内成熟卵母细胞相比，IVM 技术的成功率仍比较低。IVM 卵子的质量不高，由它获得的胚胎也经常出现发育阻滞现象，并且这样的胚胎着床率和妊娠率也比较低。最近在病人处理和卵子培养系统等方面的改进使得这项技术能够在辅助生殖临床治疗中得以应用。由多囊卵巢综合征 (PCOS) 所导致的妇女不孕病例可以考虑使用 IVM 技术。其他病人，例如正常受精胚胎质量总是不好或对排卵刺激反应不灵敏的患者，都可以考虑使用 IVM 技术。IVM 最大的优点是不使用药物来刺激卵巢中卵泡发育，因此就可以避免超数排卵综合征的负面效应，并可减少相关的医药费用。目前，可以通过以下三条途径获得 IVM 所需的卵子。

A. 超排卵巢中的未成熟的卵母细胞

病人经过激素处理后，有很多卵泡发育，当抽吸这些卵泡时，其中偶尔会有未成熟卵母细胞，经人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 处理后抽取的卵子中有超过 80% 的卵子成熟的，到达了 MII 期。但是其他正在成熟或没有成熟的卵母细胞只发育到 MI 期或 GV 期，这些卵母细胞经过培养可以完成核成熟并可正常受精发育。从超排卵巢中获得的未成熟卵母细胞经过体外成熟和受精所得到的胚胎移植后，已经得到妊娠的结果。在大多数情况下，从激素处理的病人中得到的正在成熟和已经成熟的卵母细胞的数量足够用以胚胎生产，因此未成熟卵母细胞往往不用来生产胚胎。这样的卵母细胞其实是很好的研究材料。最近 Chian 等人就是用这样的卵母细胞作为材料改进了 IVM 培养液并取得了令人振奋的结果。

B. 从 PCOS 病人中获得未成熟卵母细胞

人们已发现，在临床上对于 PCOS 病人来说 IVM 技术对不孕症的治疗是很有用的。患有 PCOS 的病人常常是不育的，而 PCOS 病人对于外源的促性腺激素容易产生卵巢过敏，因为她们对外源的促性腺激素非常敏感。在 IVM 成熟液中添加促性腺激素、血清和其他一些物质例如生长因子和雌二醇对于卵母细胞的核成熟和质成熟都是必要的。在回收卵之前 36 小时注射 hCG 可以显著提高卵子质量并可提高胚胎发育率和妊娠率。有一些 IVF 中心已经建立了一套针对 PCOS 病人的方法，妊娠率达到 30% 左右。

C. 从未超排卵巢中获得未成熟卵母细胞

这样的卵母细胞是从绝育处理 (输卵管结扎) 的病人中、剖腹产或卵巢切除的病人体内获得。IVM 时，需添加促性腺激素和病人的血清或胎牛血清，以保证卵母细胞的

核成熟和胞质成熟。由这样的卵母细胞得到的胚胎已经获得了妊娠的结果，并且发现来自输卵管结扎、剖腹产或卵巢切除的卵子可用于捐献或通过冷冻保存的方法建立卵子库。

(2) 人卵母细胞体外受精

体外受精就是在培养皿中将人的成熟卵子与精子共孵育，再将得到的胚胎（卵裂阶段或胚泡）送回到妇女子宫中。这项技术现已成为治疗人类不孕症的常规技术。IVF 技术首先在输卵管堵塞的妇女中得到应用，后来人们逐渐发现很多不孕症都可以通过 IVF 技术治疗。

2. 人卵母细胞体外成熟和体外受精所需的材料

(1) 卵子的回收

所需的器皿和试剂有：60mm 培养皿、100mm 培养皿、17 号抽吸针头、10ml 灭菌试管、灭菌的巴斯德移液管、移液管泵、灭菌的 30 号针头、灭菌的 1cc 注射器、预平衡的改进型人输卵管液（mHTF，表 14-1）和有恒温板的立体显微镜。

(2) 卵母细胞体外成熟

所需的器皿和试剂有：体外成熟培养液（表 14-2）、FSH（卵泡刺激素）和 LH（黄体生成素）、雌二醇、60mm 培养皿、70μm 孔径过滤器、组织培养级别的石蜡油、40IU/ ml 透明质酸酶。

(3) 精子准备

灭菌的采精杯、9'锥底试管、灭菌的带螺口盖的试管、9'巴斯德移液管、载玻片、盖玻片、5ml 血清吸管、橡胶吸耳球、枪头、血球计数板、恒温板、相差显微镜、离心机、精子洗涤液、微型涡旋器、糜蛋白酶（5mg/ 管，Sigma）、水浴锅。

(4) 卵母细胞的受精

灭菌枪头、酒精棉、受精液（表 14-1）、60mm 培养皿、组织培养级别的石蜡油。

(5) 受精检测

去卵丘吸管、培养液（表 14-1）、带有恒温载物台的立体显微镜、相差显微镜。

表 14-1 人卵母细胞体外受精培养液的组成成分

组成/ (mmol/ L)	Irvine Scientific			Sage Biopharma		
	HTF	mHTF	P-1	HTF ^a	mHTF ^b	卵裂液 ^c
NaCl	101.6	101.6	101.6	113.8	110.0	117.1
KCl	4.69	4.69	4.69	4.7	4.7	4.7
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
KH ₂ PO ₄	0.37	0.37	—	0.01	0.01	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.04	2.04	2.04	—	—	—
Ca-Lactate (L)	—	—	—	2.04	2.04	2.04
NaHCO ₃	25.0	4.0	25.0	17.9	4.0	17.9
HEPES	—	21.0	—	—	21.0	—

续表						
组成/ (mmol/L)	Irvine Scientific			Sage Biopharma		
	HTF	mHTF	P-1	HTF ^a	mHTF ^b	卵裂液 ^c
Glucose	2.78	2.78	—	2.78	2.78	0.1
Na Pyruvate	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Na Lactate (D/L)	21.4	21.4	21.4	—	—	—
Na Citrate	—	—	0.15 ^{**}	0.0005	0.0005	0.0005
Alanyl-glutamine	—	—	—	1.0	1.0	1.0
Aspartic acid	—	—	—	0.1	0.1	0.1
Asparagine	—	—	—	0.1	0.1	0.1
Glycine	—	—	—	0.1	0.1	0.1
Proline	—	—	—	0.1	0.1	0.1
Serine	—	—	—	0.1	0.1	0.1
Taurine	—	—	0.05	0.1	0.1	0.1
EDTA	—	—	—	0.01	0.01	0.01
青霉素 G [*]	100	100	—	—	—	—
硫酸链霉素 ^{**}	50	50	—	—	—	—
庆大霉素 ^{**}	—	—	10	0.01	0.01	0.01
酚红 ^{***}	10	10	5	3	3	3

* IU/ml, ** mg/ml, *** mg/L;

a 商品名为 Quinn's advantage fertilization medium;

b 商品名为 Quinn's advantage modified HTF medium;

c 商品名为 Quinn's advantage cleavage medium。

表 14-2 人卵母细胞体外成熟培养液配方 [*]		
	成分	浓度 (mg/L)
无机盐	CaCl ₂	200.0
	KCl	400.0
	MgSO ₄	98.0
	NaCl	6800.0
	NaHCO ₃	1250.0
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125.0
氨基酸	L-Alanine	8.9
	L-Arginine	126.4
	L-Asparagine	13.2
	L-Aspartic Acid	13.3
	L-Cystine	24.0
	L-Glutamic Acid	14.7
	L-Glutamine	292.0
	Glycine	7.5
	L-Histidine·HCl·H ₂ O	42.0
	L-Isoleucine	52.4

续表		
	成分	浓度/ (mg/ L)
	L-Leucine	52.4
	L-Lysine·HCl	72.5
	L-Methionine	15.1
	L-Phenylalanine	33.0
	L-Proline	11.5
	L-Serine	10.5
	L-Threonine	47.6
	L-Tryptophan	10.2
	L-Tyrosine	36.0
	L-Valine	46.8
维生素	Biotin	0.001
	D-Ca Pantothenate	1.0
	Choline Chloride	1.0
	Folic Acid	1.0
	i-Inositol	2.0
	Nicotinamide	1.0
	Pyridoxal·HCl	1.0
	Riboflavin	0.1
其他成分	Thiamine·HCl	1.0
	D-Glucose	1000.0
	Sodium Pyruvate	110.0
	Insulin	0.5
	Human Transferrin	5.0
	Selenite	0.0
	Hydrocortisone	0.0004
	FGF	0.0005
	EGF	0.0010
	酚红	5.0
	青霉素 G	50.0 单位
	链霉素	50.0 μg

* 用前加 10 % 合成血清替代物 (SSS), 0.075 IU/ ml FSH + LH 和 1.0 μg/ ml 雌激素 (引自 Chian RC 等, 2002)。

(6) 胚胎移植
35mm 培养皿、1cc 注射器、灭菌手套、移植导管。

3. 人卵母细胞体外成熟和体外受精方法

(1) 未成熟卵子的回收及体外成熟培养
A. 从超排的卵巢中获得的卵母细胞的成熟培养
用常规超排方法取得卵母细胞用于胞质内单精注射时所获得的未成熟卵母细胞是常

用的体外成熟材料。

- 1) 注射 hCG36 小时后借助超声波仪进行卵子的抽取；
- 2) 37℃，饱和湿度的 CO₂ 培养箱中，将收集的卵丘-卵母细胞复合体放于添加有 6% 合成血清替代物 (SSS) 的受精液中培养；
- 3) 在含有 40IU/ ml 透明质酸酶的 mHTF 培养液中利用机械吹吸法去掉卵丘细胞，使所有卵母细胞都成为裸卵；
- 4) 利用倒置显微镜检查卵母细胞时相 (图 14-2)，确定卵母细胞的成熟程度。成熟的 (MII) 卵母细胞可以看到排放的第一极体，可马上用于体外受精或单精注射；
- 5) 用成熟培养液洗涤未成熟卵母细胞，然后单独培养；
- 6) 记录卵母细胞所处时相，开始成熟培养；
- 7) 成熟培养 24 小时和 48 小时后 (MI 期卵母细胞成熟培养 6 小时后)，确定卵母细胞的成熟情况 (图 14-2)；
- 8) 成熟的 MII 期卵用于常规体外受精或 ICSI。

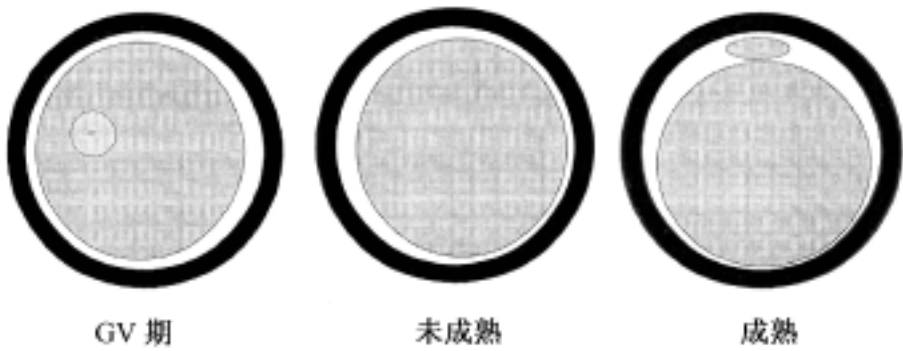


图 14-2 人卵母细胞成熟度的判断标准

B. 从未超排卵巢中获得的卵母细胞的成熟培养

- 1) 借助超声波仪从卵泡中抽取卵母细胞或直接从卵巢表面的卵泡中抽取卵母细胞；
- 2) 在立体显微镜下收集卵丘-卵母细胞复合体；
- 3) 用 IVM 培养液 (表 14-2) 洗涤卵丘-卵母细胞复合体，并在成熟培养液中培养 44~48 小时；
- 4) 检查卵子成熟情况并将所有成熟卵子用于体外受精或单精注射。

C. 从 PCOS 病人中得到卵母细胞的成熟培养

- 1) 病人准备
 - a. 疗程从给病人注射 10 天孕激素开始算起；
 - b. 月经出血的第 2 天或第 3 天对病人进行超声波检查；
 - c. 在第 6 到第 8 天进行第二次超声检查，并抽取血液制备血清，用于卵母细胞成熟培养；
 - d. 在第 10 到第 14 天的卵泡期采卵，采卵前 36 小时注射 10 000IU 的 hCG。
- 2) 采卵的前一天
 - a. 检查培养箱中 CO₂ 的浓度和温度 [见注释 (1)]；
 - b. 培养箱中，给每一个病人准备两培养瓶 30~40ml 的 mHTF，盖紧瓶盖；
 - c. 准备成熟液：在 9ml 卵母细胞成熟培养液 (表 14-2) 中添加 1ml 病人血清

(56°C灭活 30 分钟) 或人工合成血清替代品, 再添加 0.75IU/ ml 的 FSH + LH 和 10 μ g/ml 的雌二醇;

d. 准备 IVM 培养皿: 在组织培养皿的中间一孔中加入 1ml IVM 培养液, 在边沟加入 2ml IVM 培养液, 用组织培养级别的石蜡油覆盖培养皿;

e. 培养皿在 CO₂ 培养箱中平衡过夜。

3) 采卵当日

a. 借助于通过阴道的超声探测技术, 用特制的 17 号单腔抽吸针在 7.5kPa 的抽吸压力下, 将卵泡液收集到含有预热的 mHTF 的试管中;

b. 将 70 μ m 孔径的过滤器用冲洗液冲洗, 然后将卵泡液加到过滤器中过滤, 用 10ml 血清移液管吸入冲洗液, 反复吹打冲洗滤器;

c. 将留下的细胞重新悬浮于冲洗液中, 在实体显微镜下捡卵; 如果抽取的卵泡液中不含太多的血, 也可以在实体显微镜下直接捡卵;

d. 每一个皿都重复上述过程;

e. 捡卵完成后, 在成熟培养皿的边沟内清洗卵子, 然后移入中间的孔中;

f. 在病历中记录时间, 这是卵母细胞成熟培养的开始 [见注释 (2)]。

4) 成熟培养之后

a. 准备含有 40IU/ ml 透明质酸酶的 mHTF;

b. 在 60mm 培养皿的中间做一个透明质酸酶小滴并做标记, 再用 mHTF 做几个小滴用于清洗卵子, 倒入预热的石蜡油封住小滴;

c. 培养 24 小时后, 所有的卵子进行去卵丘处理, 将卵丘-卵母细胞复合体放入透明质酸酶小滴停留 45 秒钟, 然后将卵子移入清洗滴, 用机械吹打法去除卵丘;

d. 确定卵子时相 (图 14-2), 如果卵子处于 MII 期, 则将这些卵子用 IVF 或 ICSI 方法进行授精, 如果卵子未成熟, 则将这些卵子放回到成熟培养液中继续成熟培养 [见注释 (3)];

e. 体外成熟 48 小时之内每 12 小时检查一遍卵子, 成熟的卵子进行授精处理。

(2) 从超排卵巢中采集正在成熟和已经成熟的卵子 [见注释 (4)]

A. 病人准备

超排被用于获得大量卵母细胞以供授精之用。诱发排卵对于许多妇女来说是恢复生育能力的安全有效的方法。在诊断的基础上认真选择治疗方案是很重要的。它通常包括刺激排卵以获得更多的卵子和用数种不同的药疗方法进行治疗。用于不同病人诱发排卵的方法也有所差异。

1) 注射促性腺激素的治疗方案

a. 月经周期的第 3 天进行超声诊断, 并血检激素水平;

b. 如果一切正常, 在第 3 天开始注射 FSH;

c. FSH 注射后的第 5 天, 再次进行超声诊断和血检, 每隔一天注射 FSH 并进行超声诊断和血检, 直到注射 hCG;

d. 到至少有 2 个卵泡直径达 17mm 时, 皮下注射 10 000 IU hCG 诱发排卵;

e. hCG 注射 35~37 小时后采卵。

2) 促性腺激素释放激素 (GnRHa) 的治疗方案

- a. 月经周期的第 21 天开始每天皮下注射 0.5mg GnRHa, 直到注射 hCG 为止;
- b. 在第一次注射 GnRHa 后的第 14 天检测雌二醇水平;
- c. 如果雌二醇水平低于 100pg/ ml, 则将 GnRHa 的用量减少到 0.2mg/ 天, 直到注射 hCG 为止;
- d. 接下来的一天进行阴道 B 超, 并用 225 IU 的 Gonal-F 刺激卵泡发育, 每天用药直到采卵之日;
- e. 在注射 Gonal-F 的第 6 天进行阴道 B 超, 并每隔一天检查卵泡的数目和大小;
- f. 当至少有 2 个卵泡的直径达到 17mm 时, 皮下注射 10 000 IU 的 hCG 诱发排卵;
- g. hCG 注射 35~37 小时后采卵。

3) 简便方法

- a. 在病人月经周期的第 2 天同时注射 GnRHa 和 Gonal-F, 每天注射这两种激素直到至少有两个优势卵泡直径达到 17mm;
- b. 注射 10 000 IU hCG 诱发排卵;
- c. 注射 hCG 35~37 小时后采卵。

B. 采卵的前一天

- 1) 检查培养箱的 CO₂ 浓度和温度;
- 2) 将装有 30~40ml mHTF 的拧紧盖的瓶子放入培养箱中;
- 3) 授精液: 在 50ml 瓶中加入 18.8ml 授精液 (表 14-1), 再添加 1.2ml SSS; 授精皿: 在 60mm 组织培养皿的中间一孔中加入 1ml 授精液, 在边沟上加入 2.0ml 授精液, 石蜡油覆盖;
- 4) 准备精子洗涤液: 在 50ml 瓶中加入 28.2ml 精子洗涤液 (表 14-1), 再添加 1.8ml SSS;

- 5) 将培养皿连同液体放入培养箱中。

C. 采卵当日

- 1) 将几个灭菌的 100mm 组织培养皿放在恒温板上, 将液体倒入预热的培养皿中;
- 2) 将卵泡液倒入 100mm 灭菌的组织培养皿中, 用 2ml mHTF 清洗采卵器, 并将清洗液倒入组织培养皿中;
- 3) 在显微镜下检查所有的培养皿并捡卵;
- 4) 采卵结束后如果有过多的血液和残留物, 就用两套装有 30G 针头的 1cc 灭菌注射器进行去卵丘的处理, 即用一个针头固定卵丘细胞, 另一个针头则将这些细胞从卵子上去除;
- 5) 用授精皿边沟中的清洗液洗涤卵子, 之后将其放入中间的孔中 (每孔最多放 10 枚卵子);
- 6) 将含有卵子的培养皿放入培养箱中等待授精 (采卵后 5 小时) [见注释 (3)]。

(3) 精子准备 (浮游法)

在采卵的同一天, 用灭菌的采精杯采集男方的精液。男方应在 48~72 小时之内戒绝射精。采用浮游法的目的是保留男方精液中多数有活力的精子而去除死精子和残余物。这些有活力的精子用于卵子的授精, 有时也用冷冻精液授精。步骤如下:

A. 新鲜精子的准备

- 1) 将装有精液的采精杯在室温下静置至少 45 分钟使其液化;
- 2) 45 分钟后, 检查精液是否液化, 方法是: 用一个灭菌的 9'巴斯德移液管吸精液, 如果很难吸上来或者推出时发黏, 则精液需再静置 15 分钟。如果精液在 60 分钟后仍未液化, 则用装有 18 号针头的 10ml 注射器反复吹吸几下精液 (动作缓慢以避免产生气泡), 或者用糜蛋白酶使精液液化。糜蛋白酶的制备方法是 1ml 精子洗涤液中加入一小管糜蛋白酶并溶解。将此溶液加到精液中并在室温下静置 5 分钟。
- 3) 精液液化后用 5ml 血清移液管测一下精液的体积;
- 4) 将两滴精液放在预热的载玻片上测一下精子活力, 将两份 25 μ l 的精液放入试管中测定精子浓度;
- 5) 将精液分成四份放入锥形试管 (或离心管) 中, 每一管中加入两倍精液体积的精子洗涤液, 轻轻涡漩试管, 200g 离心 5 分钟两次;
- 6) 离心机一旦停下, 就用 9'巴斯德移液管去除上层液体, 注意一定确保试管底部精子沉淀的存在;
- 7) 向每个试管中缓慢加入 250 μ l 精子洗涤液, 并将帽拧松放在试管架上, 在培养箱中静置 75 分钟使精子“浮游”;
- 8) 75 分钟后从培养箱中取出试管, 用灭菌的 9'巴斯德吸管吸出上面的液体并移入小的螺口试管中, 检查精子活力和浓度;
- 9) 计算精液体积, 授精浓度应为每毫升 135 000 个有活力的精子;
- 10) 将精液放回培养箱中等待授精 (采卵之后 5 小时)。

B. 冷冻精子的解冻和准备

- 1) 将水浴锅温度调至 37°C;
- 2) 从记录本中找到所需精子在哪一罐、哪一排、哪一仓中;
- 3) 从液氮罐中取出载精杯后, 立即放入 37°C 水浴中停留 10 分钟;
- 4) 测定精液体积和精子的浓度与活力, 如果活力达不到使所有卵子授精的要求, 则解冻另一瓶精液;
- 5) 将精液加到锥形试管中, 如果精液体积超过 4ml, 就将其分装到两个管中, 缓慢加入 3 倍于精液体积的洗涤液;
- 6) 用灭菌的 9'巴斯德吸管重新使精子在溶液中悬浮;
- 7) 200g 离心 5 分钟;
- 8) 重复上述 6~10 步, 完成精子准备。

(4) 卵子受精 [见注释 (5)]

采卵后的 5 小时里准备精子, 5 小时后进行授精。

- 1) 用自动移液器准确量取精子 (μ l 水平) 以达到每毫升 135 000 个有活力的精子的要求;
- 2) 用酒精棉擦拭自动移液器的末端, 空气中自然干燥;
- 3) 从培养箱中取出精子, 每次都要检查两遍以确保你所拿到的精子是你需要的精子;
- 4) 轻拍盖帽的试管使精子摇起;
- 5) 在授精之前检查是否所有的卵子都在授精皿中;

- 6) 用枪头在授精皿中远离卵子的地方缓慢加入精子;
- 7) 将授精皿放回培养箱中 [见注释 (3)];
- 8) 在病历中记录授精日期和时间 [见注释 (2)]。

(5) 受精效果评价 [见注释 (3)]

检查卵子受精效果的过程包括去除 (或剥离) 包围在卵子周围的卵丘细胞, 用显微镜判断授精 12~20 小时后的受精情况。一旦去除卵丘细胞, 观察两个原核的形成则是非常容易的事。授精后 12~20 小时之间两个原核形成。

A. 受精评价的前一天

- 1) 在 50ml 瓶中加入 10 ml 10% 的发育 (卵裂) 培养液 (9ml 发育培养液中加入 1ml SSS, 表 14-1);
- 2) 在发育培养皿中做滴, 在 35mm 培养皿中, 最多可做 6 个 25 μ l 的发育培养液小滴, 覆盖石蜡油, 用 60mm 的培养皿做清洗用培养皿, 在其上可做八个 50 μ l 的小滴, 覆盖石蜡油;

- 3) 将盛有培养液的培养皿放入培养箱中。

B. 受精评价之日

- 1) 在受精评价之前进行每天一次的培养箱质控检查;
- 2) 将灭好菌的 9'巴斯德移液管置于酒精灯上拉制几个剥离卵丘细胞用的灭菌吸管;
- 3) 取出第一个受精培养皿;
- 4) 去除颗粒细胞和卵丘细胞以便看到原核, 在低倍的解剖镜下进行剥离以便可以看到卵子从吸管中吹出;
- 5) 参照图 14-3 检查受精情况, 将卵子洗涤 3~4 次, 将每一个卵子单独放入覆盖有石蜡油的 25 μ l 发育液滴中, 并在皿底对每一个小滴进行编号标记 (1、2、3、4 等), 在病历中记录每一个卵的受精结果, 例如 0PN (原核)、1PN、2PN、3PN 或你所看到的其他情况;
- 6) 检查所有没有原核的卵子看是否有极体, 将结果记录在病历中;

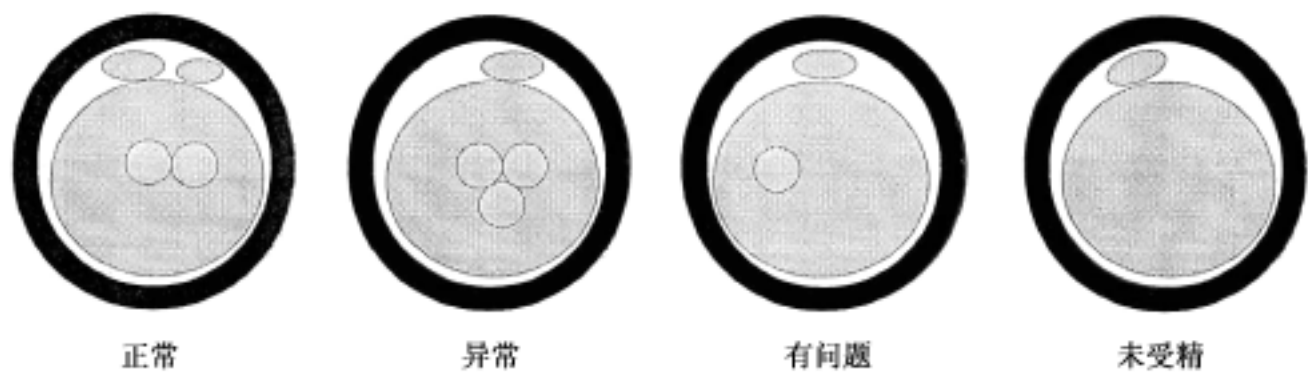


图 14-3 人卵母细胞的受精判断 (自左向右): 一个正常的受精卵, 胞质中有两个原核, 透明带下有两个极体, 有超过 95% 的受精卵是正常的。卵子中有三个原核, 透明带下有 1~2 个极体。当卵子多精受精或是非整倍体胚胎时才会有这样的卵子, 有 3%~5% 的受精卵会形成 3 个或更多的原核, 所有的有 3 个原核的卵子都应被弃掉。卵母细胞有一个原核, 透明带下有一个极体, 这是一个异常卵。有时卵子有一个原核, 透明带下有两个极体, 这也许是延迟受精的卵, 需要在 12~24 小时后对它进行再次观察, 如果有两个原核形成, 则这个卵是正常的。未受精卵, 卵子仍处于 M II 期, 透明带下可见一个极体。

- 7) 去掉所有非整倍体 ($\geq 3PN$) 和退化的卵子及其他被认为没有发育潜力的卵子;
- 8) 在发育培养液中培养胚胎, 直到胚胎移植。

(6) 胚胎评价和胚胎移植 [见注释 (3)]

当卵子受精成功并卵裂后, 将它们移入病人体内。胚胎在第 2 天发育到 2~4 细胞期, 在第 3 天发育到 6~10 细胞期, 在第 5 或第 6 天发育到囊胚期。根据临床方案和病人的胚胎数目, 确定移植日期。

查阅胚移合同中病人想要移植的胚胎数:

- 1) 移植手术前挑选质量最好的胚胎;
- 2) 当病人准备好接受胚胎移植时, 小心地将装有胚胎的培养皿从培养箱中取出放在解剖镜的载物台上;
- 3) 用灭菌的拉好的巴斯德移液管将所有胚胎移入胚移培养皿中;
- 4) 在显微镜载物台上, 胚移培养皿的旁边放置一个 35mm 的组织培养皿, 在其上做一个 100 μ l 的发育培养液小滴;
- 5) 将胚移皿中的所有胚胎吸入吸管, 轻轻地将它们吹到小滴中, 以便所有的胚胎在小滴中紧密排列;
- 6) 带上灭菌手套;
- 7) 拿起导管, 将 1cc 注射器连接到导管上, 用发育培养液洗 5 遍导管;
- 8) 将注射器从导管上拔下, 从胚移皿中吸取培养液, 去除注射器中所有的空气, 然后将其重新装到导管上, 推动活塞使导管中灌满培养液;
- 9) 用一只手的拇指与食指抓住离导管末端 1cm 的位置, 另一只手抓住 1cc 注射器;
- 10) 先抽吸大约 0.5cm 长的空气柱, 然后将导管的开口端置于有胚胎的液滴中, 抽吸 0.5cm 长或更少的液体以吸入胚胎, 这一过程应当在显微镜下操作以确保所有胚胎都进入导管中, 吸入胚胎后, 再抽吸 0.5cm 空气柱, 之后再抽吸 0.5cm 的培养液;
- 11) 小心地将导管带入移植室;
- 12) 将导管移交给 IVF 手术师, 手术师将把导管插入病人的子宫颈中, 将胚胎送到子宫中;
- 13) 手术师移植完胚胎后将导管返回实验室;
- 14) 将注射器从导管上拔下, 把导管末端置于一个空的 35mm 培养皿的上端;
- 15) 在导管的另一端连接一个装有培养液的注射器, 并把培养液通过导管注入培养皿中;
- 16) 将第二个装有培养液的注射器连到导管上并将培养液通过导管排到培养皿中, 拔下注射器抽吸空气, 将注射器再连到导管上, 推活塞以确保导管中所有的内容物都被排出;
- 17) 在显微镜下检查导管的末端, 对有子宫黏液的地方要多加注意, 因为那里可能有胚胎, 将第 3 只注射器连到导管的保护套中并将内容物吹到另外一个培养皿中;
- 18) 彻底检查两个培养皿, 以确保导管中没有胚胎;
- 19) 如果发现留有胚胎则应将其重新装入新的导管中重复以上的步骤;
- 20) 如果没有发现胚胎, 则一个 IVF 的全过程和胚胎移植就完成了, 如果有额外的胚胎, 则应冷冻保存以备将来之用。

4. 注释

1) 所有设备、培养液、塑料制品、导管和手套都应检查，看其对胚胎是否有毒性作用。所有的接触配子的新产品在使用前一定要做质量检测试验。就质量检测试验而言，许多 IVF 实验室都用鼠胚胎培养和人精子存活率做测试，至少应有 75% 的鼠胚发育到囊胚或者 85% 的人精子具有活力。

2) IVF 实验室中，每一实验步骤都应填好表格并存档。

3) 在配子的体外操作过程中减少 pH 和温度的波动是非常重要的。因此，做任何操作都要尽可能快，然后把培养皿放回到培养箱中。

4) 医生有必要根据自己的经验对病人进行超排处理，也要根据病人的年龄、诊断结果和激素水平采取相应措施。有时候很有必要修改超排方案。

5) 应用 IVF 技术时，有些病人也会受精失败，其原因大多与精液质量有关，有时也与卵子质量有关，例如卵子不能成熟。因此，为确保受精成功，在 IVF 之前要对精液及精子形态进行全方位评价。

(二) 小鼠卵母细胞的体外受精

小鼠的体外受精常采用的受精液是改进的台氏液 (modified Tyrode's solution, mT6)，后来采用 Ham's F10 和 MEM 等。近来证明，用于人体外受精的人输卵管液 (human tubal fluid, HTF) 对大多数品系的小鼠的体外受精效果都很好。HTF 的组成配方见表 14-1。大多数品系的小鼠受精卵体外发育时，都存在 2-细胞阻滞，原核期或 2-细胞期胚胎需从受精液中转移到胚胎发育液中，以继续进行胚胎发育。常用的胚胎发育液有 CZB 和 KSOM (表 14-3)。

小鼠体外受精时应注意以下问题：① 必须注意使用品质好的试剂和水以及适当批号的 BSA (Sigma A3311)；② 配液时，需准确加入 60% 的乳酸钠糖浆；③ 受精液用 0.22 μ m 的过滤膜过滤后，可在 4℃ 保存 2 周；④ 雄性小鼠应该在 3 月龄以上，可以考虑采用淘汰的种鼠；⑤ 不同品系小鼠之间存在较大的差异。

下面介绍一下小鼠体外受精的详细程序 (引自 Nagy A 等, 2003)。

1. 第一天

供卵雌鼠皮下或腹腔注射 5 IU 的 PMSG。用 PBS、生理盐水或蒸馏水配制 50 IU/ml 的 PMSG 溶液，分装后 -20℃ 冷冻保存。超排时每只鼠注射 0.1ml。要提前计算好注射时间。一般情况下，卵子采集是在注射 hCG 后 14 小时左右，如果要在第四天上午 9:00 授精的话，第三天的晚上 7:00 注射 hCG，PMSG 注射时间要在 hCG 注射 48 小时前，那么 PMSG 应在第一天晚上 7:00 注射，依此类推。

表 14-3 不同小鼠胚胎培养液的组成/ mmol/ L

组成	BMOC2	M16	MTF	CZB	KSOM (AA)	G1	G2
NaCl	94.88	94.66	114.2	81.62	95.00	85.16	85.16
KCl	4.78	4.78	4.78	4.83	2.50	5.50	5.50
K H ₂ PO ₄	1.19	1.19	1.19	1.18	0.35	—	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.19	1.19	1.19	1.18	0.20	1.00	1.00
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71	1.80	1.80
NaHCO ₃	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00	25.00
乳酸钠	25.00	23.28	4.79	31.30	10.00	10.50	5.87
丙酮酸钠	0.25	0.33	0.37	0.27	0.20	0.32	0.10
葡萄糖	5.56	5.56	3.40	0 (5.56)	0.20	0.50	3.15
谷氨酰胺		—	—	1.00	1.00	1.00	1.00
EDTA	—	—	—	0.11	0.01	0.01	—
牛磺酸	—	—	—	—	—	0.10	—
NaH ₂ PO ₄ (2H ₂ O)	—	—	—	—	—	0.50	0.50
BSA (mg/ ml)	1.00	4.00	4.00	5.00	1.00	2.00	2.00
MEM NEAA	—	—	—	—	(0.5X)	1X	1X
MEA EAA	—	—	—	—	(0.5X)	—	1X (0.5X)

所有培养液中加 0.001~0.01g/ L 酚红, 0.06g/ L (100 单位/ ml) 青霉素 G (钠盐), 0.05g/ L 硫酸链霉素。
MEM NEAA: Minimum Essential Medium non-essential amino acids; MEM EAA: Minimum Essential Medium essential amino acids。

2. 第三天

- 1) PMSG 注射 48 小时后, 每只鼠腹腔注射 5 IU 的 hCG, 诱发排卵。hCG 的溶液配制和保存方法同 PMSG。
- 2) 在进行体外受精的前一天下午, 做如下准备:
采精皿 (35mm 培养皿): 1ml HFT;
卵子收集皿 (35mm 培养皿): 1ml HFT;
受精皿 (35mm 培养皿): 3 只鼠 1 皿, 每皿 250μl HFT;
洗卵皿 (60 mm 的培养皿): 有几个受精皿, 就准备几个洗卵皿, 每个洗卵皿中做 5 个 250μl 的 HFT 滴 (也可把受精滴和洗卵滴做在同一个 60mm 培养皿中);
胚胎培养皿 (60mm 的培养皿): 有几个受精皿, 就准备几个胚胎培养皿, 每个胚胎培养皿中做 5 个 250μl 的 KSOM 滴。
- 3) 上述所有的受精或胚胎培养皿, 加石蜡油覆盖, 置培养箱中。

3. 第四天

(1) 采集精子

- 1) 在处死雌鼠采集卵子 1 个小时前, 处死雄鼠。为保证受精的成功, 可同时处死 2

只雄鼠。

2) 取出两侧的附睾和输精管 (如果同时处死 2 只雄鼠, 可每只取单侧附睾和输精管), 尽量去掉脂肪和血管。然后把附睾和输精管置于采精皿中, 在显微镜下, 用两注射器细针头把附睾划碎, 并用小镊子把输精管中的精子挤出。

3) 轻轻摇动采精皿中的精子悬液 30 秒, 置于培养箱中至少 1 小时, 使精子获能。取出一小部分精子悬液, 检查精子活力, 并用血球计数器计算精子密度。理想的精子浓度是每毫升含 $1 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 个活精子。

(2) 体外受精

1) 向每个受精皿中的受精滴中加大约 10 μ l 精子悬液。

2) 在 hCG 注射后 13~14 小时, 处死超排雌鼠。取出输卵管 (可把输卵管和卵巢一同取出), 放入卵子收集皿中的液体中。在显微镜下, 用磨尖的眼科镊子把输卵管膨大的壶腹部撕开, 使卵丘团释出。然后, 用比较粗的玻璃移卵管把 3 只鼠的卵丘团放入一个受精皿中 (卵丘团分散开)。

3) 把受精皿放回培养箱, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 和 95% 空气中培养 4~6 小时。

4) 将受精皿中的卵子取出, 在洗卵液中洗几遍, 以去掉周围的精子和卵丘残片。此时, 应该能看到第二极体排出, 在有的卵中可见到原核形成。

5) 卵子在 KSOM 滴中洗几遍后, 移入胚胎培养滴中培养。受精后的原核检查一般在受精后 8~9 小时比较合适。卵裂检查一般在次日早晨进行。受精前也可以把卵丘细胞用透明质酸酶消化掉。为了特殊目的, 需要获得大量同步受精的卵子, 也可以在受精前用酸性台氏液把透明带去掉。

(三) 胚泡培养和移植

近年来, 人们倾向于把人体外受精胚胎培养到胚泡阶段 (图 14-4) 再进行移植。这主要是考虑到以下几个方面的因素: ① 提高胚胎移植后的着床率。② 减少移植胚胎的数量, 降低多胎率。③ 可以进行产前遗传诊断。其实, 人胚胎体外培养在十几年以前就有人开展这方面的工作。人们把胚胎移植后多余的胚胎进行体外培养, 25% 的卵裂胚可发育到扩展胚泡。在进行体外胚胎培养时, 考虑到从合子到胚泡不同发育阶段的胚胎所需要的营养成分不同, 通常在前 3 天用一种培养液, 后 2 天采用另一种培养液。1997 年以后, 人们已经建立了不同的培养系统, 但基本上都是在 Quinn 等人 1985 年描述的人输卵管液 (HTF) 培养液的基础上修正的。在前 3 天的培养液中减少或去掉葡萄糖和磷酸盐, 加入氨基酸作为能源; 在后两天的培养液中, 再加入葡萄糖和氨基酸作为能源。研究表明, 把受精卵在不含葡萄糖和磷酸盐的培养液多培养一天, 即培养到三天再移植, 可明显提高着床率和妊娠率。曾有报道 2 天时移植的着床率和妊娠率分别为 13% 和 26%, 而 3 天时移植的着床率和妊娠率分别提高到 24% 和 44%。研究表明, 向培养液中添加氨基酸可明显增加胚泡细胞数。向不含葡萄糖的培养液中添加谷氨酰胺还可提高胚泡发育率。

除了培养系统外, 其他许多因素都影响胚泡发育率。例如, 培养箱中的氧压、受精条件、培养基中的大分子来源、胚胎本身的因素等都影响胚胎发育。通常各种动物包括

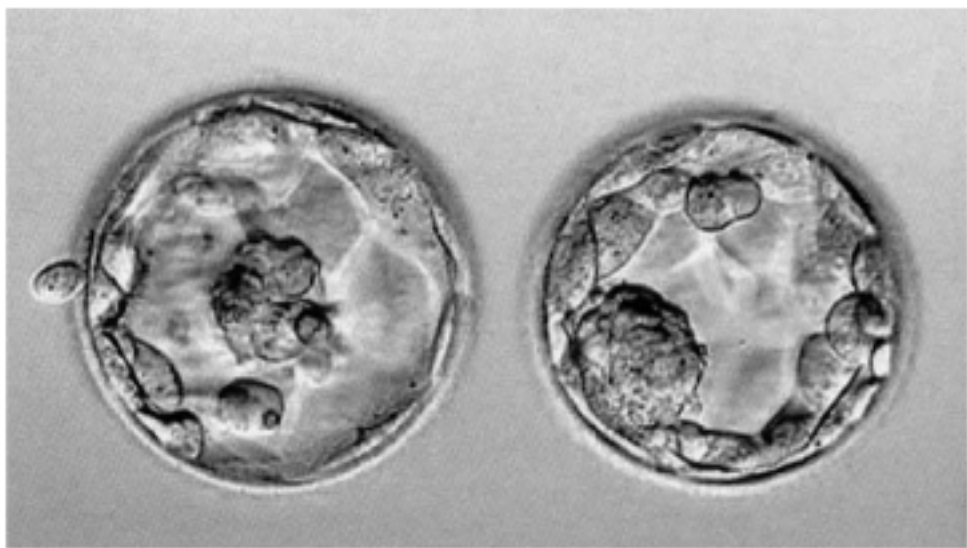


图 14-4 体外受精和体外培养后所获得的人胚泡

人的胚胎是在含 5% CO₂ 的空气环境中培养的，也有人采用 5% CO₂、5% O₂ 和 90% N₂ 条件。最近有人比较了在 5% CO₂ 和 20% CO₂ 条件下培养人胚胎的发育情况，表明二者在受精率、着床率和妊娠率方面均无差异。然而，5% CO₂ 条件下培养的胚胎的胚泡形成率和胚泡的平均细胞数明显高于 20% CO₂ 组。

培养液中的大分子物质对胚胎的生长和发育是很重要的。在人体外受精临床中，现在一般都以人血清白蛋白或合成的血清替代物代替了血清。这些大分子中的葡萄糖和磷酸盐等成分被去掉了。

胚胎本身的内在因素对其发育能力有很大影响。一般来讲，妇女 35 岁左右生殖能力开始下降，40 岁以后生殖能力急剧下降。1988 年美国有报道表明，35 岁以下、35~37 岁、38~40 岁和 40 岁以上的妇女辅助生殖以后的妊娠率分别为 37.2%、31.9%、24.2% 和 13.4%。因此，随着年龄的增长，卵子和胚胎的质量有逐渐下降的趋势。40 岁以下的妇女，体外胚泡发育率平均为 40.5%，而 40 岁以上的妇女，体外胚泡发育率平均仅为 22.2%。40 岁以下的妇女，胚胎移植后的着床率为 19.9%，流产率为 13.3%，而 40 岁以上的妇女，着床率和流产率分别为 8.9% 和 25%。另一项研究的结果是，34 岁以下组的妊娠率和胚胎着床率分别为 65% 和 41%，而 34~39 岁组的妊娠率和胚胎着床率分别为 45% 和 26%。

有证据表明，精子质量和操作技术影响 ICSI 后胚胎发育到胚泡的能力。精子质量差和 ICSI 操作技术差均可降低胚泡发育率。卵裂的速度也影响胚泡发育率。第 3 天时，细胞数 < 7、7~9 和 > 9 的胚胎，第 5 天的胚泡发育率分别为 13.8%、41.9% 和 27.5%。

胚泡阶段移植的优点是可以提高胚胎着床率。有报道指出，第 3 天移植和第 5 天移植的着床率分别为 30.1% 和 50.5%。在进行单个胚泡移植时，胚胎的质量决定着床率，高质量胚胎、中等质量胚胎和差质量胚胎的着床率分别为 44.9%、36.5% 和 7.1%。胚胎发育速度也可影响移植后着床率。第 5 天的胚泡移植后，着床率为 36.3%，而第 6 天的胚泡移植后，着床率仅为 19%。

胚泡移植时，可以减少胚胎移植的数量，防止多胎的发生。高质量的胚胎可以考虑

移植一个胚胎。有报道指出，第 5 天胚泡移植数量平均每个病人为 2 个，而第 3 天早期胚胎（8 细胞）移植时，平均每个病人移植 3.2 个胚胎，根据病人的情况和胚胎质量，约 80% 的病人移植 3 个或者 3 个以上的胚胎，双胎或双胎以上的比例在 35 岁以下年龄段为 42%，并常出现 3 胎或 3 胎以上的现象。移植 2 个胚泡的妊娠率为 58%，胚胎着床率为 47%，双胎率为 39%，基本上可杜绝 3 胎以上妊娠，而当移植 3 个囊胚时，妊娠率为 62%，双胎率为 50%，三胎率为 29%。

三、显微授精

显微授精（microinsemination）是 20 世纪 80 年代后期才发展起来的一种新型的辅助技术，即借助显微操作仪（图 14-5）将精子直接注入卵母细胞胞质内（intracytoplasmic sperm injection, ICSI）（图 14-6）或卵周隙中（subzonal insemination, SUZI）来实现受精的过程。这一技术不仅对于揭示哺乳动物雌雄配子间的相互作用机理和受精本质具有重要的理论意义，而且对提高良种公畜的利用率和保护濒危动物资源及拯救珍稀动物具有潜在的实践意义。尤其重要的是该项技术已被广泛地应用于治疗男性不育。在临床实践中，ICSI 已成为治疗因少精症和无精症导致的男性不育的不可缺少的手段。

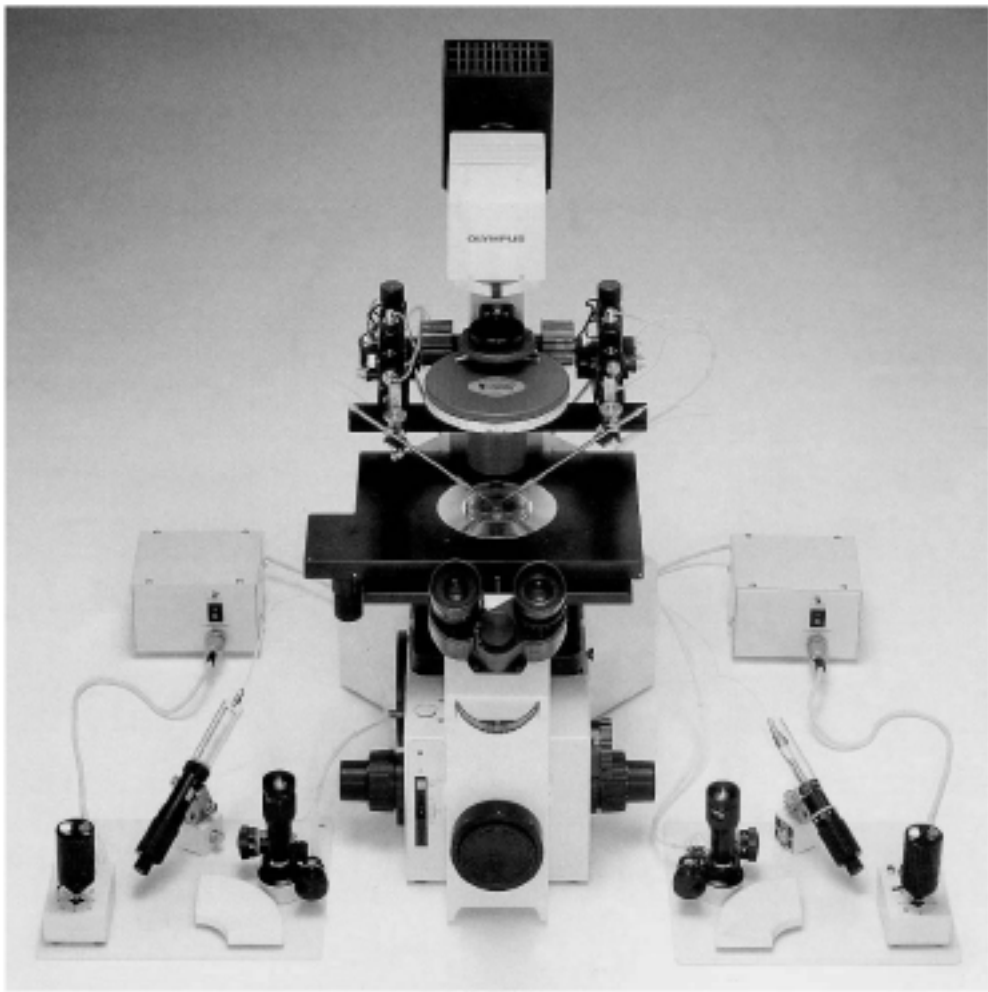


图 14-5 用于 ICSI 的显微操作系统

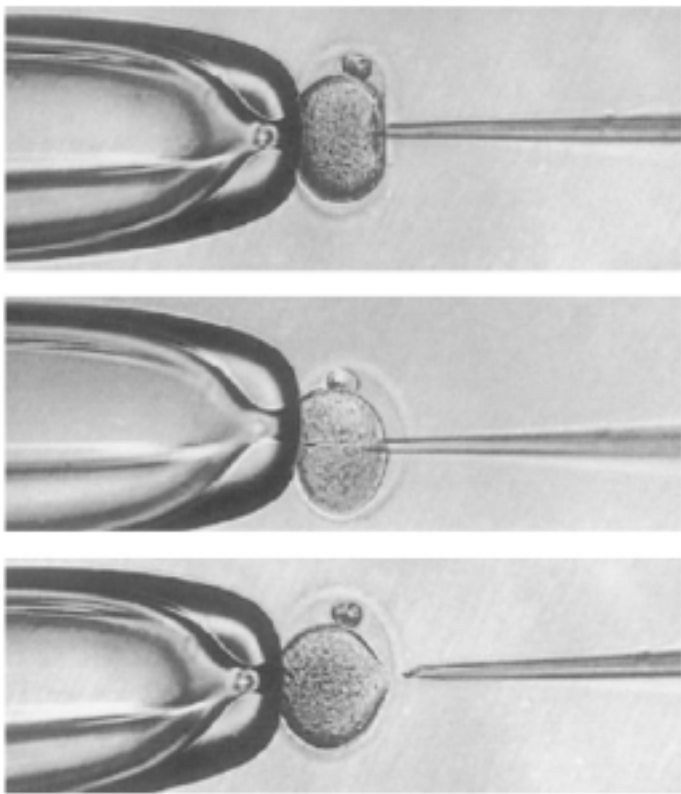


图 14-6 ICSI 操作过程

把卵子用固定吸管固定住（第一极体在 12 点位置），用注射针由尾到头吸取精子，然后从 3 点的位置注入卵胞质中。

（一）哺乳动物显微授精的研究历史

正常受精时，精子要穿过卵子周围的细胞外成分（在哺乳动物为卵丘层和透明带）。那么，把精子直接注射到卵子中情况会怎么样呢？Kite GL 在 20 世纪初就探讨过这一问题。他把海星精子注射到卵子里以后，没有发现受精。1962 年，有人把海胆精子注射到卵子中，发现精子核没有去致密，卵子也没有被激活的迹象。ICSI 首次成功获得后代是于 1974 在蛙实现的。Brun 注射了 562 个蛙卵子，最后得到 4 只正常的二倍体动物。哺乳动物的显微授精首先是于 1976 年在仓鼠上进行的，当把仓鼠精子头注射到卵胞质后，可以发生一系列的正常受精事件，包括精子核去致密、透明带反应、原核形成和 DNA 复制等。尽管仓鼠的 ICSI 开展得最早，但这种动物有其局限性，因为仓鼠的胚胎在体外很难通过 2-细胞阻滞，直到 2002 年才有 ICSI 后代的出现。直到 1989 年，才首次获得兔 ICSI 授精后代。小鼠的 ICSI 早在 1983 年就有报道，但由于其卵母细胞 ICSI 操作比较困难。直到 1995 年以后，由于 piezo 装置的出现，才建立起稳定的小鼠 ICSI 技术。大鼠的 ICSI 更加困难，因为其精子头大、精子尾长，胚胎体外培养难度大。大鼠的 ICSI 到 1998 年才有报道，但其受精率很低。迄今为止，该项技术已在兔（1998）、人（1992）、小鼠（1995）、猫（1998）、马（1998）、绵羊（1998）、牛（1999）、猴（1999）和猪（2000）等动物中获得试管后代。进入 90 年代后期，相继在美国、澳大利亚、加拿大、法国等国家有大批 ICSI 婴儿诞生，且证实人精子胞质内注射的受精率高达 60%~70%。该项技术已成为治疗因少精症和无精症导致的男性不育的理想手段，被广泛应用于临床中。而大家畜的 ICSI 虽有成功的报道，但成功率不高。

精子在睾丸中产生后，要经历附睾中成熟和雌性生殖道中的获能过程，发生一系列形态、生理和生化变化，到达受精部位，与卵子接触后发生顶体反应，使卵子受精。在正常受精时，精子的质膜和顶体是不进入卵子的，而在 ICSI 时，这些成分被一同注入卵子中。ICSI 的成功表明，卵母细胞具有清除这些成分的能力。另一个问题是，变态前的单倍体球形精子细胞能否和精子一样参与基因组的融合和胚胎发育呢？1993 年，有人将仓鼠精子细胞注入成熟的卵母细胞质中，结果表明在 95 % 的卵子中能够形成雄原核，89 % 的雄原核表现 DNA 合成活性，75 % 的受精卵能分裂发育至 2 细胞。当将仓鼠的球形精子细胞注射到透明带下，然后加一直流脉冲，使之融合，20 % ~ 40 % 的精子细胞可以融入卵细胞，其中 5 % ~ 10 % 的融合卵母细胞中可以形成正常大小的雄原核。此后 1 ~ 2 年中，美国夏威夷大学 Yanagimachi 等把小鼠球形精子细胞核注射到胞质内和透明带下受精均获成功，并获得试管小鼠。2002 年，大鼠的精子细胞显微授精获得成功，但成功率只有 0.5 % ~ 1.4 %。在人类，已有多例精子细胞显微授精试管婴儿诞生的报道。猴子实验模型证明，精子细胞显微授精的原核形成率较低，这一技术在临床上大范围应用还为时过早。精子细胞显微授精的结果说明，精子发生过程中减数分裂以后的事件，包括精子形成、精子成熟、精子获能和顶体反应等只是起到把精子引入卵子的功能。

Yanagimachi 等还进一步用次级精母细胞和初级精母细胞进行显微授精，证明它们能在正在成熟或已经成熟卵子卵质中完成减数分裂，参与正常的胚胎发育。用次级精母细胞和初级精母细胞（图 14-7）进行显微授精已成功地于 1995 年和 1998 年获得后代。

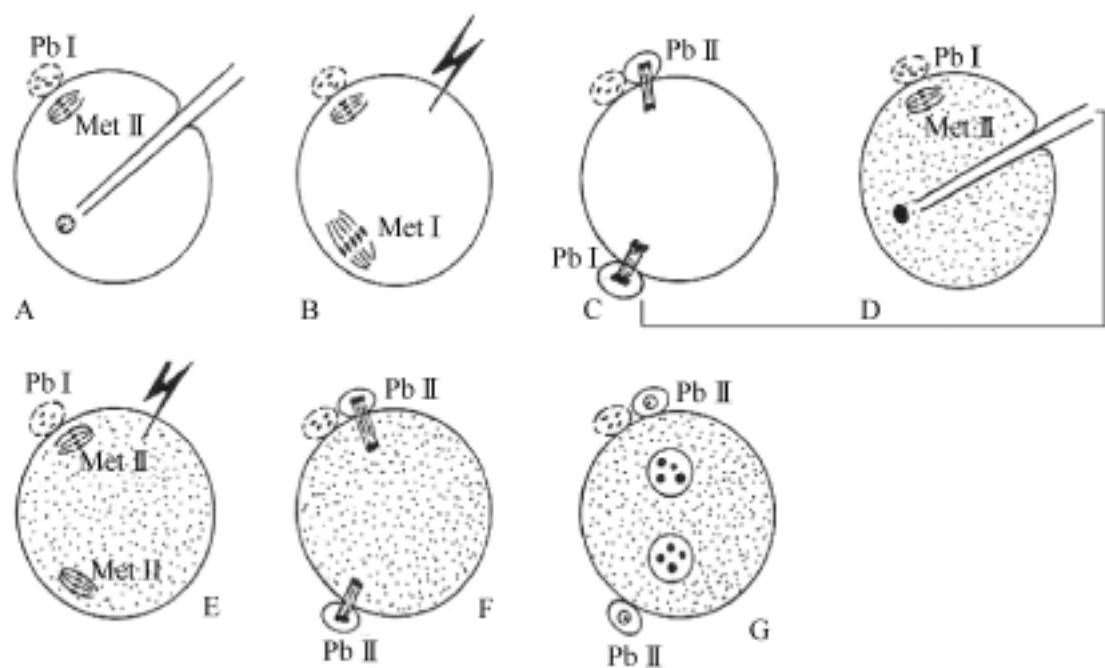


图 14-7 小鼠精母细胞显微授精过程示意图（引自 Yanagimachi R, 2001）

A ~ C，将初级精母细胞显微注射到 M II 期卵子后，经电刺激初级精母细胞可在卵质内随着卵子的第二次减数分裂的进行而完成第一次减数分裂。D ~ G，将初级精母细胞减数分裂而产生的雄极体（相当于次级精母细胞）注射到 M II 期卵子后，经电刺激，又可完成第二次减数分裂，最终形成雌、雄原核。

近几年，我国在显微授精方面也取得了令人瞩目的成绩，先后有显微授精小鼠、兔和人的后代产生。1995 年，用小鼠球形精子细胞进行带下授精，融合率达 60 % 以上，经移植顺产 12 只仔鼠。

(二) 显微授精的方法

1. 显微操作玻璃工具的制备

显微授精需要准备注射针和固定针。前者的作用是穿过透明带和卵质膜，将精子注射到卵子中，后者的功能是在显微注射时固定住卵子。

(1) 注射用针的制备

1) 硅化好的外径为 1mm 的玻璃毛细管，固定在拉针仪上，调节好拉针仪的参数拉出所需的理想针形。通常从针的尖端到开始变细处的长度为 8~10mm 为宜。在调节参数时应注意，热度增加，增加针的长度，减少口径；拉力增加，增加针的长度，口径不变；速度增加，减少口径；时间增加，减少针的长度，口径变细。

2) 将拉制好的针固定在煅烧仪上，在所需直径处（精子注射针为 5~6 μm ，球形精子细胞注射针为 10 μm ，初级精母细胞注射针为 17~18 μm ）与加热的玻璃珠稳定地接触，立即关闭电源，电热丝停电后突然冷却而收缩，拉断玻璃针。

3) 将上述断好的具有理想内径的玻璃针，以 35°~40° 角度置于磨针仪上，并做好标记，在磨针仪的小圆形磨石上加适量的三蒸水，调节磨针仪转速，使加上的水不被迅速离心甩掉为宜，之后调节升降杆，使针的尖端与磨石的界面刚好接触，开始磨针后随针口径的增大，针前端经毛细作用吸上来的水位变高，由此可判断针的内径及针是否已磨好。

4) 在 5% 氢氟酸中清洗后，三蒸水继续清洗数次（30s），清洗过程中由注射针打出的气泡的大小是判断玻璃针内径的有效标志。

5) 将清洗的针用电热丝在针的顶端拉出短而锐利的玻璃丝，针的边缘光滑，针尖锋利。这样的针既有利于刺透透明带，而针口又不损坏细胞质膜。

6) 将拉制好的针置于 70% 乙醇清洗过的塑料盒中，固定存放。

(2) 固定针的制备

1) 制备固定针的拉针与断针二步与注射针制备过程中的 1~2 步基本相同，不同之处只是在第二步断针过程中，在针的外径为 80~100 μm 处（离变细处 2~3cm）拉断玻璃针，要求断开的部位要平齐。

2) 加热电热丝至发红后，移动操纵杆，使断好的玻璃针口靠近，此时可见玻璃针的内径变窄且边缘光滑。当内径为 15~30 μm 处时，停止加热。如果操作得当，玻璃融化的时间应是 2~3s。口径是所持卵子直径的 20% 比较理想。

3) 制备好的针置于清洁的塑料盒中或大培养皿中，固定备用。

2. 显微授精的基本操作方法

(1) 透明带打孔技术

透明带是包围在卵母细胞周围的一层由复杂糖蛋白组成的非细胞成分。为了越过透明带的屏障作用，可采用在透明带上切口或打开小孔的技术，即透明带打孔技术。打开透明带有两种方法，一种是透明带穿孔，即在注射针中放入一种酸性溶剂，将注射针放

到需要穿孔的透明带处，酸性溶剂附着在该点形成一个小孔。起初用小鼠进行试验，结果表明对卵母细胞无害，受精率提高。而用于临床时，发现受精率非常低，而且卵母细胞也容易受损伤。另一种打开透明带的方法是透明带部分开孔技术，其方法是先用固定针吸住卵母细胞，用刚拉好的针沿切线方向穿透透明带，并在固定管上将透明带磨破。这种方法对打开的透明带小孔尺寸有一定要求，人卵母细胞通常 $25\sim 40\mu\text{m}$ 。此外，有人尝试用激光打孔的方法，也取得了理想的效果。目前透明带开孔技术已基本被淘汰，只是有时作为辅助手段，后面在生精细胞显微授精中还将提到。

(2) 透明带下注射法

将一个或多个精子（或其他生精细胞）注入卵周隙，被定义为透明带下注射法授精（subzonal insemination, SUZI）。SUZI 是在 PZD 的基础上为了控制多精受精而采取的方法。注射后，透明带自行关闭，阻止注入精子（或生精细胞）溢出。以小鼠为例，在透明带下注入单个顶体反应的精子可以获得正常的高受精率。生精细胞的带下注射只注入一个细胞即可，因为下一步通过电融合即可使生精细胞融入卵母细胞。

(3) 胞质内单精子注射法

将精子直接注入卵母细胞，以完成受精过程的方法称为胞质内精子注射法（intracytoplasmic sperm injection, ICSI）。ICSI 操作前，应先将精子在含有 PVP 的高黏度的溶液中进行处理，以降低其运动能力。ICSI 操作时，先将精子的尾部吸入到注射针中。用固定针在 9 点的位置将卵子固定住，使第一极体处于 12 点的位置，在 3 点的位置将精子注射到卵子中，以尽量防止注射时破坏卵子的纺锤体（图 14-6）。小鼠、人和牛等动物的卵子进行 ICSI 时，可采用一种 pol-scope 装置，直接观察到卵子纺锤体的位置，避开该位置进行精子注射。小鼠精子的尾部细长，卵子脆弱，通常很难用小鼠作为 ICSI 的模型。直到 1995 年运用特殊的液压驱动装置（piezo）和低温操作（ 17°C ），该技术才在小鼠上获得成功。注射前，通常用 piezo 装置将精子的头部和尾部分开，只将头部注入卵子内。1992 年，ICSI 用于男性不育治疗首次成功。目前 ICSI 技术作为治疗男性引起的受精障碍的方法，在全世界已被普遍采用。此种方法对精子几乎没有什么限制，活精子、死精子、射出的不运动的精子、附睾精子和睾丸精子都可用于 ICSI，并可获得很高的受精率。有报道表明，进行 ICSI 前，用注射针挤压精子头尾相接部位，然后注射效果比较好。

(三) 影响显微授精的因素

1. 显微授精的方式

注射方式的选择是依据动物卵母细胞的耐操作能力而定。大量的实验表明，小鼠和大鼠卵母细胞进行 ICSI 十分困难，所以开始多采用带下注射。目前，多采用 piezo 装置进行 ICSI 操作，效果很好。在人类，ICSI 和 SUZI 技术都十分有效，一般活的精子可选择 SUZI 法，而死的、运动力差的或不完整的精子则选择 ICSI 法。在家畜，用解冻活精子分别进行 ICSI 和 SUZI 试验，其受精率和胚胎体外发育率均无显著差异。在显微授精操作中，应根据精子类型和动物种类来选择合适的注射方式，以达到满意的结

果。

2. 精子状态与显微授精

在医学临床上，只要精子的基因组是正常的，各种有缺陷的精子都可以用来进行 ICSI 授精。据报道，ICSI 法所获得的婴儿的遗传缺陷率为 2.3%~2.6%，与正常人群没有明显差别。

(1) 精子成熟与显微授精

大多数哺乳动物附睾体或尾以前的精子不能完成正常受精。采用小鼠附睾头精子、附睾体精子和附睾尾精子进行带下授精 (SUZI) 时，受精率分别达 0%，30% 和 45%。与带下授精相比，睾丸和附睾精子的胞质内注射 (ICSI) 却十分有效。人睾丸精子胞内注射受精成功率与射出精子的没有差异，睾丸内采集的精子 ICSI 后的受精率高达 49%，临床妊娠率达 52%。小鼠睾丸精子 ICSI 后发育到 2-细胞、4-细胞、桑椹胚和囊胚的比例分别高达 99%、98%、89% 和 70%，移植后的产仔率为 54.4%。牛的比较试验表明，睾丸、附睾（头、体和尾）和射出精子的 ICSI 受精能力和发育到囊胚的比率无显著差异。由此可见，从睾丸精子到射出精子其成熟度有很大不同，但其对 ICSI 受精不产生显著影响。

(2) 精子获能和顶体反应与显微授精

精子获能和顶体反应与否，对于 ICSI 并不重要。在 SUZI 授精时，往往采用获能精子。小鼠精子获能后再进行 SUZI，可明显提高其受精率。也有报道表明，人顶体反应后的精子 ICSI 后的受精率和胚胎发育率比采用顶体完整的精子要高。正常受精时，精子的顶体是不进入卵子的，顶体进入卵子可能对卵母细胞造成有害作用。

(3) 精子新鲜程度、活动能力和死活与显微授精

在人，进行 ICSI 前将精子滞动，可明显提高受精率。在滞动过程中，精子质膜受到损伤，为什么还能提高受精率呢？这可能是由于当把质膜完整的活动精子注入卵子后，精子在胞质内运动一段时间，可对卵子的细胞器和细胞骨架造成损伤。虽然将不活动的人精子注入卵透明带下，也可使卵子受精，但精子的运动能力影响 SUZI 的受精效果。

将获能的牛精子不加冷冻保护剂做 -20℃ 冷冻解冻处理两次，全部精子都被杀死。将此种单个精子注入牛体外成熟的卵母细胞胞质中，用 A23187 激活后，卵可以发育至桑椹胚和囊胚。桑椹胚和囊胚移植后，3 头受体中有两头怀孕分娩。有人以高温法杀死精子来分析精子的耐热性。分别采集仓鼠、小鼠、人、鸟和鱼的精子，用超声波去除质膜和顶体及尾部后，精子核于 60~125℃ 水或蒸汽中处理 20~120min，然后将单精子核注入卵母细胞质内，结果表明，精子核于 90℃ 下处理 30 分钟后，仍具有原核发育潜力。将仓鼠精子核完全灭活的温度高达 125℃。鸟、鱼和不成熟的仓鼠和小鼠精子核耐热性较差，在 90℃ 处理后，虽可去致密，但却不能形成雄原核。所有这些结果都表明，精子核对低温和高温具有很强的耐受性。采用不加冷冻保护剂冷冻处理致死的精子、70% 的乙醇处理 1 天的精子或冻干处理几个月的小鼠精子进行 ICSI，都可以获得正常后代。所有这些证据都表明，精子的死活对 ICSI 的成功与否并不重要。最近，Yanagimachi 的实验室采用冻干的小鼠精子进行 ICSI，获得了正常的后代。

(4) 精子完整性与显微授精

兔的精子核可以在兔和仓鼠卵胞质内去致密，并发育成雄原核。用超声波将小鼠、牛、猴和人的精子头尾分开，然后将精子头注入体外成熟的卵母细胞质中，都可以激活卵子。用小鼠、猪等动物的精子头进行 ICSI，都获得了后代。在人，用不含顶体的圆头精子进行 ICSI，获得了正常后代。有人提出，精核是受精卵发育为个体不可缺少的部分，而其尾部只是精子的运动器官，以保证精子在正常生理状况下运动到达受精部位，帮助精子完成受精过程。

3. 卵子状态与显微授精

显微授精难免给卵子造成不同程度的机械损伤，因此卵子的状态和质量必然对显微授精产生直接影响。对美国 141 对夫妇（妇女的年龄 25~44 岁，平均 34.3 岁）的 ICSI 治疗资料的分析表明，妇女的年龄对 ICSI 的效果有显著性影响，在 36 岁以上妇女的 60 个周期中，注射卵的存活率、适合于冷冻和胚胎移植的胚胎发育率和妊娠率均显著低于 36 岁以下妇女的结果。还有研究表明，超数排卵方法直接影响卵母细胞的成熟度和受精率。显微授精的成功需要高质量的卵母细胞。对于高龄妇女（36 岁以上）卵母细胞质量普遍差的问题，现在有人正在尝试将高龄妇女卵母细胞的生发泡（GV）移至去 GV 的年轻妇女的卵母细胞质中（后面详述），进行体外培养成熟再进行 ICSI，从而提高胚胎质量，但这种尝试引发了很大的争议。在 ICSI 过程中，常会带出小部分细胞质，这不会影响 ICSI 卵子的正常发育。

4. 卵子的激活

受精激活主要包括两个概念，一是卵母细胞的激活，可由精子完成，也可由物理化学刺激完成。另一方面是精子激活，精子进入成熟卵母细胞后，在细胞质中某些因子的作用下，才能完成核去致密和组蛋白替代鱼精蛋白的过程。小鼠睾丸精子和成熟精子一样，具备了激活卵子的因子，而精子细胞则缺乏这种因子，注射后需对卵子进行激活处理。虽然精子已具有了激活卵子的能力，但由于显微授精部分或全部超越了正常受精时的环节，所以往往不能使卵母细胞完全激活。ICSI 卵子中 Ca^{2+} 振荡发生的时间比正常受精时要晚，这可能是由于注入的精子质膜破坏需要一定的时间。如果把去掉质膜的精子注入卵子， Ca^{2+} 振荡很快会发生。显微注射对卵母细胞的刺激来自两个方面，其一是注射针的机械刺激；其二是注入精子的生物刺激。针刺入卵母细胞可诱发单个 Ca^{2+} 波，对 ICSI 不产生显著影响。无论 ICSI 还是 SUZI 卵，人工激活对其受精和发育是有益的。显微注射卵子经 A23187 短时间处理，即可大大改善其受精率。曾有报道，人 ICSI 卵的自发受精率只有 32%，卵子用 A23187 处理后，受精率可达 88%。在临床上，有的病人的精子注入卵子后，不能激活卵子；有的病人精子头是圆形的，缺乏激活卵子的能力。在这种情况下，ICSI 后采用 A23187 处理，卵子可被激活，并产生正常的、健康的婴儿。

5. 操作技术

显微授精是一项极其精细的操作技术，所以操作人员的操作技能、操作工具的质量

及环境条件往往是影响成败的重要因素。在小鼠 ICSI 操作过程中, 较高环境温度 (25~37℃) 可加速卵胞质的恢复, 导致大量卵子崩解退化。显微操作中注射针的直径对 ICSI 授精成败也至关重要。以 7μm 和 12μm 外径的注射针进行牛 ICSI 试验, 7μm 针的显微受精率、卵裂率及桑椹胚和囊胚发育率显著高于 12μm 注射针的结果。

(四) 生精细胞显微授精

在睾丸中, 精原细胞经数次有丝分裂, 形成初级精母细胞, 后者完成第一次减数分裂后, 形成次级精母细胞; 次级精母细胞经第二次减数分裂形成单倍体的球形精子细胞。球形精子细胞经过变态 (精子形成), 形成精子。精子脱离曲细精管后, 依次经过附睾头、附睾体和附睾尾, 最终发育为成熟的精子。一般情况下, 常规体外受精多选用射出精子或附睾尾精子。少精症或死精症患者可以用射出精子、附睾精子或睾丸精子进行 ICSI 来达到受精目的。但某些男性患者, 精子发生障碍, 不能进行正常的体外受精或 ICSI, 而只能用睾丸内生精细胞来进行 ICSI 或 SUZI 完成受精。

1. 球型精子细胞显微注射 (round spermatid injection, ROSI)

球型精子细胞是初级精母细胞经过两次减数分裂后形成的最早的单倍体雄性生殖细胞。可以把小鼠球形精子细胞注入卵周隙, 通过电融合使其进入卵子, 也可以把精子细胞核直接注入卵母细胞质中。由于注入的精子细胞不能使卵子激活, 注射后, 应马上采取适当的方法激活卵子。已尝试使用电激活、IP₃ 受体类似物、SrCl₂、精子的卵子激活因子等。小鼠精子细胞用 SUZI 法注入卵周隙后, 融合率达 30%, 其中 80% 的卵子可发育形成一个大的雌原核和一个很小的雄原核, 经胚胎移植可获得正常的试管小鼠。小鼠球形精子细胞核直接注入电激活的卵母细胞质中, 注射成功率高达 96%, 受精率达 77%, 2 细胞发育率高达 96%~100%。131 枚 2 细胞胚胎移植后, 获得 37 只试管小鼠, 产仔率为 28.2%。ROSI 后, 胚胎发育的基因表达是正常的, 一直到第 5 代, ROSI 小鼠的发育、生殖能力和神经行为都是正常的。ROSI 也被用来恢复 33 月龄的无精症小鼠的生育能力。ROSI 于 1994 年在兔也获得成功, 但猪卵子 ROSI 后, 只有发育到 2 细胞的报道。

在人类, 1995 以后, 不同的 IVF 临床医院开始报道有 ROSI 成功的例子, 但总的来讲, 目前成功率还不高。有人提出, ROSI 技术应用于临床还为时过早。究其原因, 可能是由于挑选球形精子细胞还不够准确、ROSI 后卵子没有被完全激活、球形精子细胞中的中心体还没有成熟等。1999 年, 有人把人无精症患者的生精细胞体外培养到长形精子细胞, 经显微授精后, 产下 2 个婴儿。

2. 精母细胞显微注射

不仅球形精子细胞可支持正常的胚胎发育, 从成年小鼠睾丸中分离到次级精母细胞, 将其核注入卵母细胞质中 2h 后, 再电激活注射的卵母细胞, 75% 的卵中的次级精母细胞核和卵母细胞核各自完成第二次减数分裂, 排出两个极体, 并各自形成雄原核和雌原核。2-细胞、4-细胞、桑椹胚和囊胚发育率分别为 98%、94.2%、76.9% 和

65.3%。29枚2~4细胞胚胎移植后产仔鼠7只，产仔率24%。将初级精母细胞核注入正在成熟的卵母细胞中，观察到初级精母细胞的核可以与卵母细胞核同步完成两次减数分裂并形成雌、雄双原核。作者发现，将初级精母细胞注入成熟中的卵母细胞（MI）带下并进行电融合，初级精母细胞核在MI卵母细胞质中随卵母细胞的成熟经历三种变化：第一种是初级精母细胞核与卵母细胞核同步发生减数分裂，排出两个第一极体，经电活化后又排出两个第二极体形成雌雄双原核；第二种变化是融入的初级精母细胞核物质与卵母细胞的核物质混在一起形成一个减数分裂器并排出一个大极体，电活化后又排出第二极体而形成一个合子核；第三种变化是融入的初级精母细胞与卵母细胞各排出一个极体后，核物质又混在一起，经活化后又排出一个极体，形成一个合子核。用初级精母细胞核进行显微授精，也有产生后代的报道。初级精母细胞和次级精母细胞显微授精所获得的后代，具有正常的生育能力。尽管成功率只有不到2%，但研究结果说明，控制卵母细胞和精母细胞减数分裂的机制是相似的。也说明，生精细胞的基因印迹作用在精母细胞阶段已经完成。家畜变态前生精细胞显微授精研究较少。

（五）显微授精与男性不育症治疗

男性不育症的比率占不育症总数的大约一半。比起女性不育症的治疗，男性不育症起步晚，多半采用传统的药物治疗方法。造成男性不育的原因很多，其中主要临床表现是睾丸中精子发生障碍、精子形成数量过少或精子运动能力低下等。显微授精技术的研究开发，使过去的药物不能治愈的男性不育者拥有自己的后代成为可能。1992年首次用ICSI方法治疗男性不育症取得成功。此后随着各项基础研究和仪器设备的改良，现在显微授精技术已成为临床上治疗男性不育症的常规技术。显微授精方法的选择，要根据患者精子的具体情况来定，一般的操作是射出精子浓度为300~500万/ml，精子存活率在30%以上的患者可考虑采用透明带打孔法（PZD）；精子浓度为50~300万/ml，存活率在30%以下的患者可考虑采用透明带下注射（SUZI）；精子浓度在50万/ml以下，存活率在10%以下的患者则采用ICSI法。实际上，现在临床上广泛采用的方法就是ICSI法。对于无精症患者，可采用附睾精子或睾丸精子。当然对一些精子发生阻滞的患者，还需用精子细胞注射法加以解决，但临床上采用该方法的例子不多。目前我国广东、山东、北京、湖南、江苏等地区已应用显微授精技术获得了ICSI试管婴儿。

（六）显微授精的安全性

显微授精，尤其是ICSI已被广泛用于治疗男性不育。男性不育症的类型很多，如精索静脉曲张型（40%）、精子形成障碍型（10%）和遗传缺陷型（4.5%）等。不同类型的不育症病人产生的精子品质差异很大。ICSI绕过了受精过程中的多层次自然选择过程，有人怀疑ICSI有把遗传性不育症传递给下一代的可能。

任何一项新技术的应用，都要考虑其有效性和安全性。澳大利亚、美国、英国、比利时和瑞典的临床资料表明，显微授精技术对男性不育治疗是十分有效的，临床妊娠率

可达 30% 以上。对 400 多名试管婴儿的追踪调查表明, 显微授精技术在人类的应用是安全的。显微授精失败的主要原因是卵子未被激活, 异常受精的概率较低。那么对于遗传缺陷男性不育患者, 其安全性如何呢? 调查表明, 尽管 2%~3% 的不育男人的染色体异常, 比具有正常生育力男人的高 3~4 倍, 但 97%~98% 不育男人的核型是正常的。何况不育的原因可能是男方造成的, 也可能是女方造成的。如果男女双方都不含不育基因 (例如 Y 染色体微缺失), ICSI 本身不会造成胎儿的染色体异常。有报道表明, 在男性不育患者中, 11.9% 的无精症患者和 4.4% 的少精症患者有染色体结构异常。最常见的是 X 染色体异常, 如精子核型为 XXY, 这类患者往往可以射出具有运动能力的活精子, 但没有受精能力, 这通常是父系遗传。ICSI 后, 可能将父亲的遗传缺陷传给后代。就目前的显微授精试管婴儿来看, 先天畸形率为 3.5%。目前, 世界上已有人计划开展生殖细胞遗传工程研究, 对具有遗传缺陷的人的原始精原细胞或精原细胞的缺陷基因进行修复后放回小鼠的睾丸, 在小鼠睾丸中完成生精过程, 产生功能、遗传正常的精子, 这种精子再用于显微授精, 由此而得到的后代应该是正常的。此项计划一旦实施并取得成功, 一定会给人类生殖健康带来一次质的飞跃。

四、着床前遗传学检查

在人 IVF 临床上, 如果怀疑胚胎可能有遗传缺陷, 可以从第 3 天的胚胎中取出 1 个或几个细胞进行检测, 然后把胚胎继续培养 2 天, 即到第 5 天。有人对不明原因的反复性流产的 9 位妇女的 197 个胚胎进行了研究。首先用酸性台氏液在胚胎的透明带上消化出一个孔, 轻轻的吸出卵裂球, 然后固定、染色, 用荧光原位杂交 (fluorescent in situ hybridization, FISH) 检查染色体异常。FISH 检查后确认的 18 个胚胎移植到 8 个妇女体内, 2 例临床妊娠, 其中一例产下一个健康的婴儿。有人对 127 个预后较差的不育病人 (>36 岁, 3 次以上 IVF 失败) 的 717 个胚胎的卵裂球进行了 FISH 检查, 发现 60% 染色体异常。正常胚胎发育到囊胚移植到 99 个病人体内, 37 例 (37%) 妊娠, 胚胎着床率为 22.5%; 而对照组中, 妊娠率为 27%, 胚胎着床率为 10.2%。很明显, 卵裂球 FISH 检查发现着床前胚胎的遗传缺陷, 但这种方法的缺点是可能对胚胎造成一定的损伤。

在家畜, 从着床前胚胎取出少量细胞, 进行性别鉴定, 然后移植性别确定的胚胎。例如, 奶牛胚胎移植前, 如果准确确定胚胎性别, 移植雌性胚胎, 可有明显的经济效益。

五、生殖细胞和胚胎的冷冻保存

1. 低温生物学的基本概念

细胞 (包括生殖细胞和胚胎) 冷冻方法包括平衡冷冻法 (也叫程序冷冻法) 和非平衡冷冻法两种。平衡冷冻是指把细胞悬浮在含有相对较低浓度冷冻保护剂 (约 10% 或 1.5mol/L) 的溶液中, 以较慢速度 (0.5~2°C/min) 进行冷冻; 非平衡冷冻是指把细

胞置于高浓度 ($>40\%$ 或 $6\sim 8\text{ mol/L}$) 的混合冷冻剂中, 然后很快投入液氮中, 降温速率大于 500°C/min 。

2. 精子冷冻保存

精子冷冻保存对人工授精、体外受精和濒危珍稀动物遗传资源的保护都是非常重要的。在生产实践中, 采用冷冻精液进行人工授精已成为各种家畜繁殖, 尤其是奶牛繁殖的常规技术, 创造了巨大的经济效益。精子冷冻大大便利了许多实验室辅助生殖技术, 被用于各种动物包括人的体外受精。此外, 该技术对于保存珍稀动物包括转基因动物的遗传资源也具有重要意义。

早在半个世纪以前, 人们进行精子冷冻研究时就发现蛋黄和甘油可以作为冷冻保护剂。后来逐渐建立和完善了不同动物的精子冷冻程序。一种动物精子冷冻程序的建立, 要经过反复摸索各种成分包括冷冻保护剂的搭配、降温和冷冻的速度和条件以及解冻速度和条件, 才能最后实现。目前各种家畜 (牛、绵羊、山羊、马、猪等)、实验动物、濒危动物和人的精子冷冻都已形成了常规的标准程序。在大多数动物, 经冷冻解冻后, 精子的活力都达到了冷冻前的 50% 左右。在许多动物, 冻精和鲜精人工授精后成功率相差不大。精子冷冻基本上包括降温、细胞脱水、冷冻等基本步骤。早在 20 世纪 70 年代就发现, 甘油是牛精子非常有效的冷冻保护剂, 并建立起理想的牛精子冷冻程序。与其他动物相比, 冷冻精子在奶牛应用最成功、最广泛, 以后逐渐延伸到肉牛。采用冷冻解冻精液对奶牛和肉牛进行人工授精时, 精子用量少, 但成功率高。其他动物的冻精人工授精都在生产中得到应用, 但不如在牛上应用得广泛。在有的动物如绵羊, 受到人工授精操作技术的限制; 在马中, 不同个体的精液冷冻效果差异较大; 猪的精子对低温比较敏感, 人工授精后, 繁殖力和每窝产仔数有所下降。

目前, 实验动物的精子保存效果也比较理想。小鼠精子冷冻解冻后, 精子活力达到冷冻前的 60% 。许多动物园动物、野生动物和濒危动物的精子冷冻也取得满意的效果。例如, 圈养大熊猫的繁殖常采用冻精的人工授精技术。在人, 不同个体的精子对冷冻解冻的敏感性差异较大。国内外均已建立了精子库, 并用于临床人工授精。非人灵长类的精子冷冻解冻后, 尽管活力还可以, 但人工授精后成功率很低。有的动物例如猫的精子冷冻效果不理想, 常采用 4°C 短期保存。

哺乳动物精子冷冻解冻活力下降的原因之一是温度由体温下降到接近冰点时, 能引起精子的冷应激 (cold shock), 表现为精子圆圈运动, 运动能力过早丧失、精子的质膜和顶体内膜的性质改变或受到损伤, 以及代谢功能的改变。为减轻冷应激, 可以调节降温速度和向稀释精液中添加冷冻保护剂。牛精子冷冻时, 在使用冷冻保护剂 (蛋黄或牛奶) 的情况下, 以 $\leq 10^{\circ}\text{C/h}$ 的速度由体温降低到 5°C , 精子的损伤明显减少。蛋黄和牛奶减少精子损伤的机制还不清楚。精子冷冻解冻后, 常发生质膜成分的丢失或重新组织, 与精子获能变化非常类似。这些变化可引起精子存活时间缩短和精子与雌性生殖道作用的能力降低。

精子冷冻过程中, 在 -5°C 到 -10°C 之间是一个关键的阶段。在 -5°C 左右, 细胞外和细胞内的水分还没有结冰, 而处于超冷状态; 在 -5°C 到 -10°C 这一温度范围内, 细胞外的水分结冰, 而细胞内的水分仍处于超冷状态。因此, 在这一阶段, 要掌握适当的

降温速度，以使细胞充分脱水，避免细胞内结冰，又不要使脱水细胞暴露于高渗液中过长时间。理想的降温速度根据动物的种类不同而有所差异，在牛为 $50\sim 100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，在人为 $1\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

冷冻保护剂的应用可避免细胞内冰晶形成，降低溶液效应。冷冻保护剂分为渗透性和非渗透性两种。精子冷冻中最常用的甘油属渗透性冷冻保护剂，它和非渗透性冷冻保护剂一样，具有使细胞脱水的作用，但另一方面它进入细胞后可代替水分维持细胞的体积，与细胞内的离子和大分子作用，降低细胞内的结冰温度，从而降低脱水过程对细胞的过度刺激作用和损伤。冷冻保护剂的负面作用是对细胞有毒性，容易引起膜损伤并降低精子活力。因此，在精子冷冻过程中，除了考虑冷冻速度以外，还应考虑冷冻保护剂的选择和浓度。

3. 卵母细胞冷冻保存

Whittingham 首次成功冷冻保存了小鼠成熟卵母细胞并产仔。冷冻保存后的卵母细胞经体外受精后，已在兔、牛、马和人等产生了后代。1986 年，首次冷冻成功人卵母细胞并获得双胞胎妊娠。猫科动物的卵母细胞对低温不太敏感。 4°C 下保存 72h 的卵巢中的 GV 期卵母细胞，体外培养仍能完成成熟，并且从 4°C 下保存 24h 的卵巢中获得的卵母细胞经体外成熟和体外受精后，可获得囊胚。虎、狮子、豹、野猫等动物的卵巢在 4°C 下保存 36h 以内，其中的卵泡卵母细胞都可完成体外成熟。采用标准程序冷冻的猫卵母细胞体外受精后可以卵裂，11% 可发育到 8 细胞。总体来讲，各种动物卵母细胞由于体积较大，冷冻过程可对卵母细胞造成损伤，例如，纺锤体破坏、皮质颗粒胞吐等。最近人们尝试用玻璃化法冷冻卵子，并在多种动物和人获得成功。这项技术虽然具有诱人的潜在应用价值，但成功率仍不理想，目前还不能有效地应用于生产实践和医学临床。

4. 胚胎冷冻保存

胚胎冷冻最早于 1972 年在小鼠获得成功。迄今至少已在 22 种哺乳动物获得成功，冷冻胚胎移植生产出后代。1977 年，有人对小鼠胚胎冷冻程序进行了逐步改进，来进行牛和绵羊的胚胎冷冻并获得了后代，即采用 1.5mol/L 的二甲基亚砜 (DMSO) 作为冷冻保护剂，以 $0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度降温至 -36°C ，然后直接投入液氮中。这种方法冷冻的胚胎解冻时，必需采用快速解冻法 ($360^{\circ}\text{C}/\text{min}$)。此后，这种方法成为各种动物胚胎冷冻的标准方法。现在的基本操作程序如下：把胚胎装管到 20°C 的冷冻保护剂中 (图 14-8)，降温至 -7°C 植冰，然后以 $0.3\sim 0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 降温至 -30°C 至 -35°C ，最后直接投入液氮中。解冻时，采用约 $300^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度。各种动物胚胎冷冻时，采用的冷冻保护剂及其浓度举例见表 14-4。这种标准程序法对于对温度非常敏感的猪胚胎冷冻和早期卵裂阶段的牛胚胎并不适合，对卵母细胞的冷冻也不适合。

牛胚胎冷冻技术已被广泛应用于生产实践中。牛胚胎冷冻方法除了上面提到的标准程序外，近年来发展了玻璃化冷冻技术。玻璃化是指一种溶液通过快速冷冻，跨越冰晶形成过程，直接变成稳定的、无定型的、玻璃样的液体。玻璃化冷冻的最大优点是操作简单，不需要冷冻仪，省时省力，经济方便。1985 年这种技术首次成功地用于哺乳动

物胚胎冷冻。直到 1997 年，经过大规模的胚胎移植实验证明，玻璃化冷冻牛胚胎技术是有效可行的。玻璃化冷冻的牛体内胚胎和经典的标准法冷冻的牛体内胚胎非手术移植后的妊娠率分别为 44.5%（ $n = 393$ ）和 45.1%（ $n = 335$ ），二者无明显差异。

表 14-4 采用标准程序冷冻不同动物胚胎的冷冻保护剂

动物种类	冷冻保护剂	动物种类	冷冻保护剂
牛、绵羊	1.5M DMSO	猴	1.5M DMSO 或 PROH
山羊	1.4M 甘油	水牛	1.4M 甘油
人	1.5 M PROH	兔	1.5M DMSO
马	1.4M 甘油	鹿	1.4M 甘油
小鼠	1.5 M PROH	猫	1.35M 甘油

DMSO，二甲基亚砷；PROH，丙二醇

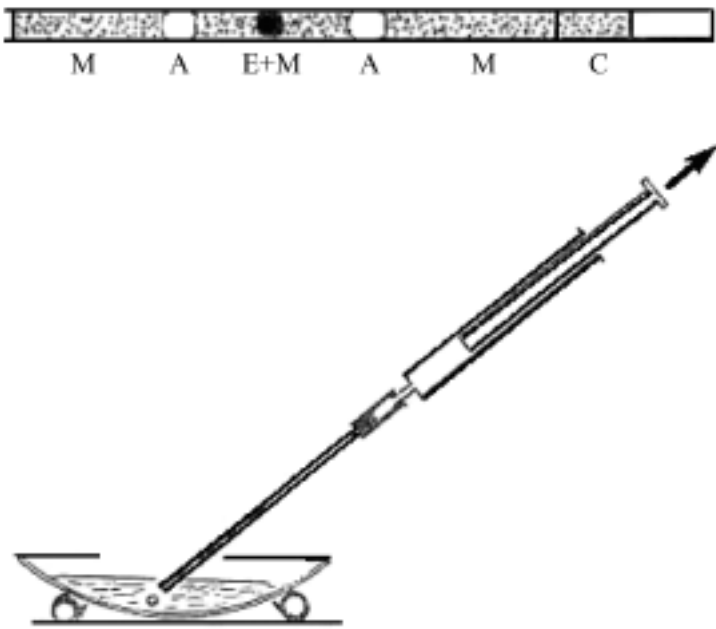


图 14-8 胚胎冷冻前的装管操作示意图（引自杉江佑，1989）
M，冷冻液；A，气泡；E，胚胎；C，绵栓。

体外胚胎对冷冻相对比较敏感，冷冻解冻后的发育能力降低。但最近也有体外胚胎玻璃化冷冻保存后移植受孕的成功率与鲜胚的妊娠率差别不大的报道。玻璃化冷冻体外胚胎解冻后 86%在体外可继续发育，而经典的标准法冷冻的牛体外胚胎解冻后 58%可继续发育。胚胎移植后，玻璃化冷冻体外胚胎的妊娠率达 24%，而标准法冷冻的牛体外胚胎妊娠率为 26%。来自不同体外培养系统的胚胎对冷冻的耐受力是不同的，例如，SOF 培养液中培养的囊胚率高，但胚胎对冷冻的耐受力差；TCM-199-颗粒细胞培养条件所获的囊胚率低，但胚胎对冷冻的耐受力强。当在 SOF 培养液中加入颗粒细胞后，胚胎质量明显提高。也有研究表明，SOF 培养液中加入适当的氨基酸可以提高牛囊胚冷冻解冻后的发育率。

1995 年以后，有许多冷冻绵羊胚胎移植成功的报道。玻璃化法冷冻的体内胚胎移植后的产羔率达 53%，标准法冷冻的体内胚胎移植后的产羔率高达 60%，与鲜胚移植的成功率没有差异。像牛的情况一样，体外生产的绵羊胚胎冷冻解冻后的发育能力下

降。猪的胚胎对 15℃ 以下的低温尤其敏感，标准法程序冷冻不适合。2000 年，采用细胞骨架稳定剂和玻璃化法首次成功冷冻了孵化囊胚，得到了后代。研究证明，大约有 30% 的猪扩展囊胚和 40% 的猪孵化囊胚玻璃化冷冻后可以存活，但桑椹胚不能存活。最近有报道，玻璃化冷冻的孵化囊胚移植后（20 个胚胎/受体），55% 的受体可以产仔，每头受体产仔 4~5 个。通过离心和显微操作的方法把桑椹胚和早期囊胚中的脂肪滴去掉以后，胚胎对冷冻的耐受力明显增强。采用经典标准程序和玻璃化法冷冻后，分别有 89% 和 83% 可以存活。经典标准程序冷冻的胚胎移植后，7 头受体中，3 头产下 14 个仔猪；玻璃化冷冻的胚胎移植后，4 头受体中，3 头产下 14 个仔猪。山羊体外胚胎冷冻解冻移植，也有成功的报道。由于受到材料的限制和马胚胎具有的特殊性，马的胚胎冷冻的效果不佳。

人的早期胚胎（包括合子）和囊胚都可以进行冷冻保存。囊胚的冷冻效果要比卵裂胚冷冻效果好。人囊胚冷冻解冻后移植时，平均移植 2.6 个胚胎，妊娠率为 30%~40%，胚胎着床率为 18%。曾有人报道，玻璃化法冷冻的成功率比标准程序冷冻法要高。原核期至桑椹胚期的非人灵长类胚胎也已冷冻成功并获得后代。

六、卵子细胞核和极体移植

前面提到，大龄妇女的卵子质量下降，用这些卵子进行 IVF 或 ICSI 时，受精卵发育能力低，并容易引起染色体的非整倍性，其主要因素可能是卵子细胞质存在缺陷。另外，有的病人有遗传性线粒体 DNA 变异，用其自身的卵子进行 IVF 或 ICSI 时，可将遗传缺陷传给下一代。为了解决这些问题，有人提出了卵母细胞生发泡移植的设想（图 14-9），即把大龄妇女卵母细胞的细胞核转移到年轻妇女卵母细胞的细胞质中，或把有线粒体遗传缺陷的妇女卵母细胞的细胞核转移到无缺陷卵母细胞的细胞质中，从而获得健康的后代。已在小鼠、兔和人进行了这方面的尝试。小鼠卵母细胞生发泡移植后，可以正常完成成熟、受精和早期胚胎发育。兔卵母细胞生发泡移植后，经体外成熟和显微授精已成功获得 2 只后代。人卵母细胞生发泡移植后，体外可以完成成熟，成熟卵母细胞的染色体也是正常的（图 14-10）。该项技术在临床上应用目前有很大的困难，因为需进行卵母细胞体外成熟培养，要保证成功的胚胎移植，每次需大量的卵母细胞。也有报道，把小鼠卵母细胞的 M I 或 M II 减数分裂器进行移植，经体外受精或 ICSI 获得后代。

2003 年，我国中山大学和美国纽约大学医学院的研究小组合作，在广州为一名 30 岁的不孕妇女做了卵子细胞核移植。此前，该妇女已两次接受试管婴儿技术治疗，但均未成功。该夫妇通过体外受精获得受精卵，随后，取出受精卵的细胞核，植入另外一个怀孕妇女受精卵的去核胞质中。采用该方法获得的 5 个早期胚胎被同时放进她的子宫内。不久，3 个胚胎成活。三个胚胎中的一个被人为“处死”；到了第 24 周，因为“非实验因素”，剩下的两个胎儿中有一个流产死亡；第 29 周，因为同样的原因，最后一个胎儿亦流产。

该项实验结果公布后，引起了很大争论。从遗传上来讲，该实验是有性生殖，而不是克隆。它通过卵子和精子的结合，让不孕妇女获得后代。后代的主要遗传基因来自不

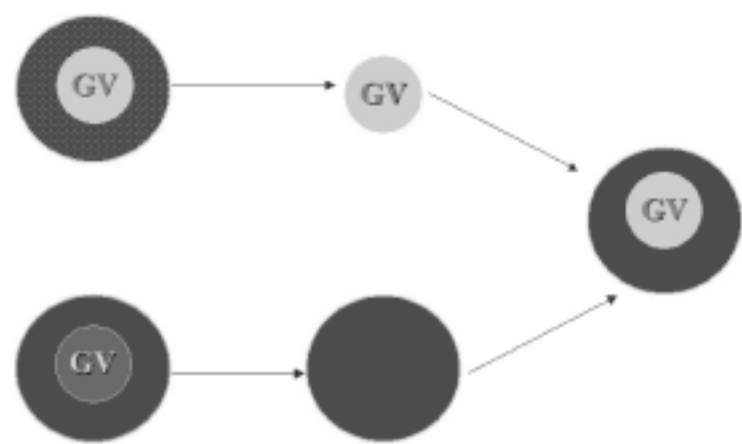


图 14-9 卵母细胞生发泡交换过程示意图

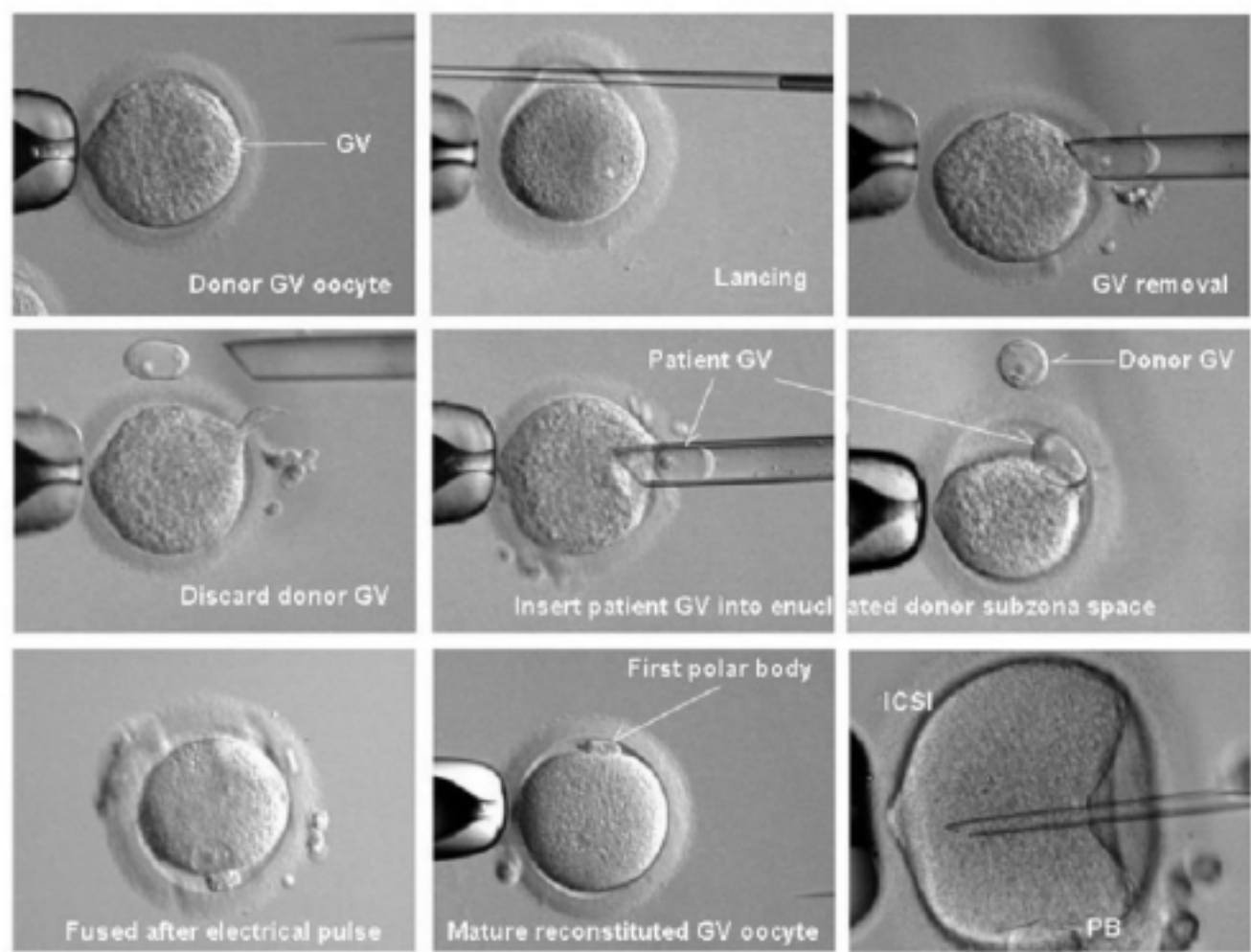


图 14-10 人卵母细胞生发泡交换及 ICSI 过程（刘辉提供）

孕妇女和她的丈夫，经过 DNA 的重组，后代既不完全和不孕妇女相同，又不完全和她丈夫相同。但也有人提出，孩子的遗传物质来自三方：不孕妇女卵子中的 DNA、丈夫精子中的 DNA 以及另一妇女细胞质线粒体中带有的遗传物质。虽然前两项决定了孩子的主要性状，但后者对于孩子的发育成长也有着不可否认的影响。因此，从生物学角度，孩子就有了一个父亲，两个母亲。目前，美国和中国都禁止这一以生育为目的的卵子细胞核移植实验。

极体是卵母细胞成熟过程中通过两次减数分裂释放出来的带有少量细胞质，但含有与卵母细胞相同遗传物质（染色体）的结构。第一次减数分裂初级卵母细胞发生不对称

分裂，形成一个次级卵母细胞和一个第一极体，二者均含有 2 倍体的 DNA 含量。在哺乳动物处于 M II 期的次级卵母细胞受精后排出第二极体，第二极体中含有单倍体的 DNA 含量。第一极体和第二极体不参与胚胎发育，而最终退化。第一极体和第二极体可被用来进行卵子和早期胚胎的遗传检测。有人通过显微操作，把小鼠受精卵的雌原核取出，用第二极体替代雌原核，最终产生了正常的后代。用第一极体替代雌原核也获得了后代。因此，从理论上讲，一个初级卵母细胞的遗传物质可以产生 4 个后代。

七、卵子细胞质移植

有的病人经卵子 IVF 或 ICSI 后，胚胎质量不好，着床率和妊娠率低。于是，科学家便提出了卵子细胞质移植的设想，即把捐献的、质量好的卵子的小部分细胞质转移到质量差的卵子中，以矫正缺陷，提高胚胎发育率和胚胎移植后的成功率。卵子细胞质移植有两种方法，即胞质体 (cytoplast) 移植和胞质注射，前者通过电融合的方法使供体胞质进入受体卵中，而后者是指把少量细胞质直接注射到卵子中。通过细胞质移植已在许多哺乳动物获得了后代。有人采用两种方法，即融合法和直接注射法，对多次妊娠失败的 7 对夫妇进行了卵子细胞质移植，以没有进行胞质移植而直接进行精子注射的病人卵子作为对照。胞质直接注射的卵子受精率为 63%，明显高于胞质融合卵子的 23%。胞质融合组的原核异常率高，胚胎形态没有改善，胚胎移植后 3 例均未妊娠。胞质直接注射病人中有 2 例胚胎形态有所改进，移植后均妊娠，其中一例流产，一例产下一个婴儿。有一对夫妇，经过重复胞质直接注射，胚胎形态虽无明显改进，但最终妊娠。另两个卵子胞质直接注射的夫妇，由于供体卵子质量就差，来自注射卵子的胚胎质量也差，移植后没有妊娠。目前全世界采用卵子细胞质移植方法所获得的婴儿大约有 30 个左右。

这种方法的有效性目前还存在争议，在大规模临床应用前还需进行深入研究。另一个令人关注的问题是细胞质移植的安全性。细胞质移植过程中带入了供体卵子的线粒体，造成了后代细胞中线粒体的异质性，目前正在追踪研究细胞质移植所获得的婴儿细胞内的异质线粒体 DNA 是否会引起不良作用。在小鼠的研究揭示，移入的异质线粒体与受体卵的基因组具有一定的不相容的现象，可引起基因表达和胚胎发育缺陷，并且这种缺陷可遗传给下一代。

八、胚胎分割

我们日常生活中常见同卵双胞胎的存在。同卵双胞胎的产生就是由于早期胚胎发育过程中（多在受精后 6~8 天），在未知因素的作用下，胚胎的内细胞团发生分离，然后每一半在体内发育成一个胎儿。胚胎分割是指在早期胚胎发育的某一阶段，人为地把卵裂球分开或把胚胎分割开来，然后让每一部分发育成一个个体。可用显微手术的方法把一枚胚胎分割成二分、四分甚至八分胚，经体内或体外培养，然后移植到受体中，以获得同卵双生或同卵多生后代。这一技术在发育遗传学、生理学及生产实践中都具有重要意义。家畜（主要是牛和羊）胚胎分割技术已被应用于畜牧生产中。世界上已有数以千计的胚胎分割牛犊产生，没有发现这种技术对后代有什么不良影响。胚胎分割一般应采

用质量高的胚胎，在囊胚至扩展囊胚阶段进行成功率最高，这样可以保证每个半胚含有足够数量的内细胞团细胞，以维持胚胎的发育。在牛，高质量的体内胚胎全胚移植后，妊娠率可达 70%；而分割后半胚移植妊娠率可达 50%~55%，这样一个胚胎的妊娠率可达 100%~110%。半胚也可以像全胚一样冷冻保存后，再用来移植。

有人提出，对于通过 IVF 仅能获得 1 个或少数几个胚胎的大龄妇女来说，胚胎分割可望提高其辅助生殖的成功率，但这一技术在临床上应用涉及到许多伦理学问题。

九、体外精子发生

精子发生是一个生殖细胞在睾丸曲细精管中增殖和分化而产生单倍体精子的过程。在体内，这需要内分泌、自分泌和旁分泌的调节，以及细胞与细胞之间的相互作用才能完成。如果能在体外完成精子发生过程，不仅对于了解精子发生的机制具有重要的理论意义，而且对于雄性生殖细胞的定向遗传改良和男性不育症的治疗具有重要的应用价值。在男性不育患者中，许多少精症、无精症和不动精症病人都存在遗传缺陷。尽管近几年辅助授精技术的兴起，尤其是 ICSI 技术的建立使这类病人也可以和正常人一样获得后代。然而，这些后代很有可能同样经历不育的痛苦。近来在实验动物证明，睾丸是一个所谓的免疫豁免区，一种动物的精原细胞移植到另一种动物的睾丸中，可以完成正常的精子发生过程。例如，把大鼠的生殖细胞移植到小鼠睾丸的曲细精管中，可产生大鼠的精子。也有人把小鼠、猪和山羊的未成熟睾丸移植到裸鼠体内，被移植的睾丸中，能进行正常的精子发生过程，产生有功能的精子。最近有人提出了生殖细胞遗传工程的新概念，即把精原细胞的遗传缺陷在体外进行基因修复或改造，然后再转移到睾丸中产生正常的精子。由此产生的后代将具有正常的生殖能力。这一技术也可用于其他遗传性疾病的治疗。但要实现这一目标，还有很多困难。如果能在体外完成精子发生过程，将更加便利精子发生的研究，为开发新的避孕手段和对生殖细胞进行遗传改造提供便利。

精子体外发生的早期研究，多采用简单的培养液，最好的结果是发育到初级精母细胞阶段。20 世纪 60~70 年代，对精子发生的适宜条件进行了很多探索，发现体外精子发生时，需采取低于体温的温度，促性腺激素的存在与否对生精培养并不关键，高氧对生殖细胞有毒性作用，并发现了一些对精子体外发生有益的培养基成分和细胞分化时间程序。80 年代，建立了体外维持细胞极性和使睾丸细胞（生精细胞和 Sertoli 细胞）建立联系的培养系统，并尽量模仿体内曲细精管中的环境。但采用这样的系统，体外培养 2 周内生殖细胞的活力就下降。最近，随着体外培养技术的改进，大鼠、小鼠、牛和人雄性生殖细胞完全在体外完成减数分裂都获得成功。虽然体外完成减数分裂的细胞数很少，但当把体外产生的牛圆形精子细胞通过 ROSI 注入牛卵子后，产生的囊胚中 50% 是二倍体。尽管目前已取得一定进展，要建立有效的体外精子发生系统，使生精细胞在体外很好地存活、增殖和分化还有漫长的路要走。

十、小卵泡体外培养、卵巢移植和人工卵子发生

1. 小卵泡体外培养

各种哺乳动物的卵巢中都含有大量的原始卵泡。每一个发情周期，一定数量的卵泡启动生长，最后少量的（有的动物一个）发育到成熟卵泡而排卵。如果能充分利用卵巢中的原始卵泡，无疑将会为各种以卵子为材料的生物技术提供大量的卵子，服务于畜牧业和人类生殖健康。1996年，Eppig的实验室首次报道从小鼠原始卵泡卵母细胞获得后代。他们把小鼠原始卵泡采用器官培养的方法，把新生小鼠的整个卵巢在体外培养8天，然后把卵母细胞-颗粒细胞复合体又培养了14天，从而获得了充分生长的成熟卵母细胞。卵母细胞经体外成熟和体外受精后，所获得的190个2细胞胚胎移植到假孕受体中，最后生下一只仔鼠。尽管成功率很低，但这一实验证明，人们有可能利用卵巢中的原始卵泡来提供卵子，以供体外受精或其他与卵子有关的生殖技术使用。生长期卵母细胞培养在大鼠、仓鼠、猫、猪、绵羊、山羊、牛和人等都有研究，但都局限于卵泡发育的情况报道，对卵母细胞生长情况报道很少。有人曾将直径为0.5~0.7mm早期有腔卵泡中直径为90~99 μ m的犊牛卵母细胞，与周围的卵丘细胞和部分颗粒细胞一起在体外培养2周，然后再进行卵母细胞体外成熟和体外受精，并由此获得了后代。在135个卵母细胞中，21个受精后卵裂（16%），有6个发育到囊胚（4%），将其中的3个囊胚移植到3个受体后，有一头受体妊娠并产下一头犊牛。猪的早期有腔卵泡（直径0.5~1.0mm）中的卵母细胞直径约100 μ m，卵母细胞与周围的卵丘细胞和部分颗粒细胞一起琼脂包埋后在含有次黄嘌呤的培养基中体外培养7天，45%的卵母细胞直径达到120 μ m。这些卵母细胞体外成熟培养后，9%可完成成熟，体外受精后可发育到囊胚。也有人报道把牛和绵羊的腔前卵泡在体外用无血清培养系统培养28天和30天后，卵泡中出现卵泡腔，并且有的绵羊卵母细胞发育到M II期。然而，对于牛和猪这样的大动物来讲，原始卵泡的培养是很困难的，因为卵泡发育需要很长的时间。牛和猪从卵泡发育启动开始到发育到排卵卵泡，卵母细胞的直径由30 μ m增加到120~125 μ m（不包括透明带），分别需要6个月和3个月。

2. 卵巢移植

有人把猫或绵羊的卵巢皮质小片移植到没有免疫排斥反应的裸鼠的肾囊中，几个月后，移植的卵巢皮质上有的卵泡发育到直径3mm，并且有卵泡腔形成。人的卵巢组织移植到裸鼠体内，FSH处理17周后，卵泡存活并发育到有腔卵泡阶段。到目前为止，异种卵巢组织移植还没有获得完全成熟的卵母细胞、受精或产生后代的报道。

在医学临床上，癌症患者经过化疗后的一个副作用是卵巢功能损伤，使妇女失去生殖功能或生殖能力下降。为了使这些妇女获得后代，可以在进行化疗前，把卵子或胚胎冷冻保存。如果小卵泡培养或卵巢组织移植可以成功的话，把卵巢组织冷冻是一个很好的选择，因为这不需要对病人进行激素处理，但到目前为止，尽管有很多尝试，但还没有成功的例子。

3. 卵子人工发生

最近报道,小鼠的胚胎干细胞可在体外培养条件下被诱导分化为卵子。将胚胎干细胞在含有灭活血清但不含饲养细胞和生长因子的培养基中培养 12 天,可形成不同大小的克隆,大的克隆中一些细胞能同时分离开来,形成一些小的悬浮细胞集团。把这些悬浮细胞集团通过离心的方法分离出来,接种到新的培养皿中,可形成早期卵泡样的结构,两周后可产生类似于晚期卵泡的结构。继续培养后大多数退化,约 20% 产生直径大于 $40\mu\text{m}$ 的类卵母细胞。在培养第 16 天时,将分离的单个卵泡在含有促性腺激素的培养基中培养,可引起类卵母细胞减数分裂,排出第一极体。培养第 26 天时类卵母细胞排出,悬浮于培养液中。大多数类卵母细胞的直径为 $50\sim 70\mu\text{m}$,与正常卵母细胞直径相当,但也有一些直径可达 $130\mu\text{m}$ 。卵母细胞周围有透明带样结构包围,并含有 ZP2 和 ZP3 成分,但比较脆弱,操作时容易丢失。第 43 天时,可发现类似于着床前胚胎的结构,周围有透明带包围,这可能是孤雌活化胚。采用雄性和雌性 ES 细胞都可获得卵母细胞和胚泡样结构。这种人工发生的卵母细胞是否可正常受精仍需进一步研究。

十一、我国辅助生殖技术的规范和原则

2003 年 3 月以来,卫生部对原出于 2001 年出台的人类辅助生殖技术管理办法及一系列相关文件进行了修改,提高了应用相关技术的机构设置标准、人员的资质要求和技术操作的技术规范,并进一步明确和细化了技术实施中所应遵循的原则。

卫生部新修订的《人类辅助生殖技术规范》中制定了 10 大禁令:① 禁止给不符合国家人口和计划生育法规和条例规定的夫妇和单身妇女实施人类辅助生殖技术。② 禁止性别选择。③ 禁止实施代孕技术。④ 禁止实施胚胎赠送。⑤ 禁止实施以治疗不育为目的的人卵胞浆移植及核移植(包括克隆人)技术。⑥ 禁止人类与异种配子的杂交,禁止人类体内移植异种配子、合子和胚胎,禁止异种体内移植人类配子、合子和胚胎。⑦ 禁止以生殖为目的的对人类配子、合子和胚胎进行基因操作。⑧ 禁止实施近亲间的精子和卵子结合。⑨ 禁止在患者不知情和自愿的情况下,将配子、合子和胚胎转送他人或进行科学研究。⑩ 禁止开展人类嵌合体胚胎试验研究。

卫生部近期出台的关于人类辅助生殖技术的文件强调了知情同意、知情选择这一自愿原则,同时规定实施人类辅助生殖技术的技术人员必须尊重患者的隐私权。《人类辅助生殖技术规范》及相关文件规定,这项技术必须在夫妇双方自愿同意并签署书面知情同意书后方可实施。同样,捐赠精子或卵子者 also 需获取书面知情同意书。需进行自身精子冷冻保存者,也应在签署知情同意书后,方可实施自身精子冷冻保存。与此同时,卫生部要求各精子库不得采集、检测、保存和使用未签署知情同意书者的精液。

供精和赠卵不得商业化。禁止买卖精子和以盈利为目的的供精行为。精子库的精子不得作为商品进行商业交易。精子库仅可以对供精者给予必要的误工、交通和其所承担的医疗风险补偿。人类精子库也只能向已经获得卫生部人类辅助生殖技术批准证书的机构提供符合国家技术规范要求的冷冻精液,亦不可为追求高额回报降低供精质量。类似的规定也适用于赠卵者,卫生部禁止任何组织和个人以任何形式募集供卵者进行商业化

的供卵行为。为保证后代质量，同一供者的精子或卵子最多可受孕 5 人。

(孙青原)

主要参考文献

陈大元, 孙青原, 李光鹏 . 2000 . 受精生物学——受精机理与生殖工程 . 北京: 科学出版社

Barritt J, Willadsen S, Brenner C, Cohen J . 2001 . Cytoplasmic transfer in assisted reproduction . Hum Reprod Update 7: 428~435

Chian RC, Buckett WM, Too LL, Tan SL . 1999 . Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin . Fertil Steril 72: 639~642

Chian RC, Tan SL . 2002 . Maturation and developmental competence of cumulus-free immature human oocytes derived from stimulated and intracytoplasmic sperm injection cycles . Reprod Biomed Online 5: 125~132

Cohen J, Scott R, Alikani M, Schimmel T, Munne S, Levrone J, Wu L, Brenner C, Warner C, Willadsen S . 1998 . Ooplasmic transfer in mature human oocytes . Mol Hum Reprod 4: 269~280

Dorbrinsky JR . 2002 . Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos . Theriogenology 57: 285~302

Feng HL . 2003 . Molecular biology of male infertility . Arch Androl 49: 19~27

Hale L . 2001 . Embryo splitting: a role in infertility . Reprod Fertil Dev 13: 95~98

Hawes SM, Sapienza C, Latham KE . 2002 . Ooplasmic donation in humans: the potential for epigenetic modifications . Hum Reprod 17: 850~852

Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss III JF, Boiani M, Scholer HR . 2003 . Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells . Science 300: 1251~1256

Leibo SP, Songsasen N . 2002 . Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic animals . Theriogenology 57: 303~326

Li GP, Chen DY, Lian L, Sun QY, Wang MK, Liu JL, Li JS, Han ZM . 2001 . Viable rabbits derived from reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) . Mol Reprod Dev 58: 180~185

Liu H, Zhang J, Krey LC, Grifo JA . 2000 . In-vitro development of mouse zygotes following reconstruction by sequential transfer of germinal vesicles and haploid pronuclei . Hum Reprod 15: 1997~2002

Malter HE, Cohen J . 2002 . Ooplasmic transfer: animal models assist human studies . Reprod Biomed Online 5: 26~35

Medeiros CMO, Forell F, Oliveria ATD, Rodrigues JL . 2002 . Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology 57: 327~344

Miyano T . 2003 . Bring up small oocytes to eggs in pigs and cows . Theriogenology 59: 61~72

Nagy A, Gentsenstein M, Vintersten K, Behringer R . 2003 . Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual . Third edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

Ogura A, Ogonuki N, Inoue K, Mochida K . 2003 . New microinsemination techniques for laboratory animals . Theriogenology 59: 87~94

Palermo GD, Takeuchi T, Rosenwaks Z . 2002 . Technical approaches to correction of oocyte aneuploidy . Hum Reprod 17: 2165~2173

Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT . 2003 . Prospects for spermatogenesis in vitro . Theriogenology 59: 73~86

Quinn P, Moinipaneh R, Steinber JM, Weathersbee PS . 1995 . Successful human in vitro fertilization using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate ions . Fertil Steril 63: 922~924

Smith AL . 2002 . Blastocyst culture in human IVF: The final destination or a stop along the way . Theriogenology 57: 97~107

Stephens PC, Edwards RG . 1978 . Successful birth after IVF . Lancet ii, 366

Trounson AO . 2001 . Nuclear transfer in human medicine and animal breeding . Reprod Fertil Dev 13: 31~40

Wang WH . 2004. In vitro maturation and in vitro fertilization of human oocytes . In: Schatten H eds . Germ Cells . Humana Press, NJ . pp . 235~353

Yanagimachi R . 2001. Gamete manipulation for development: new methods for conception . Reprod Fertil Dev 13: 3~14

第十五章 生殖免疫

现代免疫学的观点认为，免疫是指生物体对异体、异种或“自身”物质的各种反应性，即机体“识别异己”和“排斥异己物质”的功能。随着生物技术的发展，免疫学的范围也在扩大，并由它派生出许多相关的分支学科。生殖免疫学是 20 世纪 70 年代生殖生物学与免疫学两大学科交叉后出现的新学科，它不仅是一门重要的边缘学科，同时也阐明了人类和哺乳动物的生殖是在机体生殖系统和免疫系统相互作用的稳定状态下顺利进行的。国际生殖免疫学会（International Society for Immunology of Reproduction）成立于 1980 年。由此，生殖免疫学有了新的发展。中国免疫学会于 1991 年底组建了生殖免疫学委员会。生殖免疫学的核心是研究生殖过程中各个环节存在的极其复杂的免疫学问题，涉及生殖生理、妊娠生理、病理妊娠以及生殖控制等。

当代生殖免疫研究的主要问题是：母-胎免疫关系、母-胎界面的分子和细胞、胚胎发育与母体识别、配子的免疫学、着床的免疫学（与母-胎界面的分子和细胞关系）、MHC 与生殖、子宫与胎盘的免疫学、早期妊娠的免疫病理学、免疫性不育、自身免疫与妊娠、生殖道局部免疫、性传播疾病的免疫学、免疫避孕疫苗控制生育、细胞因子调节妊娠、早孕因子、自然流产免疫治疗等。生殖免疫学研究的重点是母胎之间存在的极其复杂的免疫学问题，特别是生育免疫的分子调节机理。

第一节 配子免疫

人类及哺乳动物生殖腺、生殖细胞和生殖激素都具有抗原性，均可引起机体免疫反应，影响生殖过程中配子的发生和发育、受精、胚泡着床、胚胎发育、分娩等各环节。若其中任一环节功能失调即可导致不育、流产及妊娠免疫性并发症。配子发生过程中，精子和卵子都表达一些特异性的蛋白，这些特异性的蛋白可以作为抗原刺激机体的免疫系统，引起免疫应答。免疫应答产生的抗体与相应的配子抗原结合，则会抑制配子的功能，阻断受精。因此，在理论上精子和卵子特异性蛋白可以作为避孕疫苗的候选抗原。

早在 1899 年 Metchnikoff 及 Landsfernr 发现，将异种动物精子注入机体可产生抗体。1900 年 Metchnikoff 进一步证实，豚鼠在注射自体精子后血液中有抗精子抗体存在。1922 年，证实精子具有抗原性。有资料表明，有 20% 的不孕症是与免疫因素有关。在动物妊娠失败中，有 80%~90% 与免疫因素密切相关。

各种哺乳动物的出生率高，伴随的死亡率亦相当高。绵羊和牛的受精率非常高，但通常活仔率约为 70%。大多数胚胎的死亡发生在妊娠的最初 3 周。猪约 30%~40% 孕体在妊娠期死亡。胚胎死亡的原因，除家畜管理和环境因素外，受精卵基因型异常及生殖免疫因素不容忽视。

一、卵子透明带抗原

哺乳动物卵子的透明带 (zona pellucida, ZP) 是由卵母细胞及颗粒细胞所分泌, 覆盖于卵母细胞及着床前胚胎外的一层基质。绝大多数哺乳动物的 ZP 是由 3~5 种糖蛋白组成的。以小鼠为例, 可分为 ZP1、ZP2 和 ZP3, 其分子质量分别是 200kDa、120kDa 和 83kDa。成熟 ZP 的厚度因物种不同从 5 μ m 到 20 μ m 不等, 有袋类动物的 ZP 比其他真兽亚纲的动物薄。ZP3 的编码基因比 ZP1 和 ZP2 短, 小鼠和人类的 ZP3 氨基酸均是 424 个, 氨基酸序列同源性的 67%, 并且半胱氨酸的位点是保守的。在小鼠、仓鼠、黑大鼠和人四者之间, ZP3 mRNA 同源性可达 80%。可见, ZP3 蛋白的编码基因在不同物种之间具有一定的保守性。从分布量来看, ZP3 与 ZP2 的量相当, 而 ZP1 较少。ZP 在精卵结合及保护早期胚胎发育方面具有重要作用。早期探索雌性生殖系统组织特异性抗原的研究发现, 哺乳动物卵透明带上有特异的抗原, 抗体与特异的抗原结合可以在哺乳动物卵透明带外围形成一个可见的沉淀带。用抗体处理过的卵子可以抑制精子与透明带结合, 从而阻止精子穿过透明带与卵子受精。这些抗原并不是种属特异的, 不同种的哺乳动物之间有交叉反应, 例如, 抗猪 ZP 的抗体可以在体外抑制人的精卵受精。

(一) 哺乳动物卵子 ZP 结构及其理化性质

不同哺乳动物卵子的 ZP 形态在本质上最大的区别就是它的相对大小。在仓鼠中 ZP 厚为 1~2 μ m, 在小鼠中是 5 μ m, 在人中是 13 μ m, 在牛中是 27 μ m。光学显微镜和电子显微镜的研究都证明, ZP 在物理和生化性质上有明显的分层现象, 这些研究都表明 ZP 是一种高度有组织的基质, 它可以介导精子在受精作用中通过有角度的轨道穿透 ZP。

(二) ZP 糖蛋白的生化性质

由于高度修饰的 ZP 抗原蛋白复杂的天然性质, 以及确认单个糖蛋白时的多种实验手段, 造成了早期对于 ZP 抗原蛋白定性的混乱。大鼠的 ZP 可以很容易地用非变性一维 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 的方法分成 3 类蛋白, 但其他许多动物的 ZP 糖蛋白只能用高分辨率的 2D-PAGE (two-dimensional SDS-PAGE) 来分析。由于异源分子的重量和电性与转录后修饰 (包括糖基化过程和硫酸化过程) 有密切的关系, ZP 蛋白的去糖基化使它在电泳中形成更多的带, 这就使得区分单个 ZP 糖蛋白非常困难。随着抗体生产和分子生物学技术的进展, 目前可以在 2DPAGE 上识别同源 ZP 抗原蛋白。

(三) ZP 蛋白的蛋白序列和核酸序列

1. ZP3 蛋白家族

第一个小鼠 ZP3 蛋白的 cDNA 克隆是由 Ringuette 分离和定性的, 他用多克隆抗血清构建了一个小鼠卵巢表达文库。Dean 等研究了小鼠 ZP3 蛋白的氨基酸序列, 这个寡核苷酸序列后来被用来分离大鼠和人 ZP3 的 cDNA 和构建基因组克隆。小鼠 ZP3 蛋白的氨基酸序列在长度上与其他同源蛋白基本是一致的, 有一段 22 AA 的信号序列, 与大鼠、人和猪分别有 91%、67% 和 66%~75% 的同源性, 半胱氨酸的数目和位置及潜在的 N-连接的 (N-linked) 糖基化位点高度保守。

有人提出了一段称为 ZP 组件 (module) 区域, 分析确定它具有 260 个氨基酸, 有 8 个保守的半胱氨酸残基和一些保守的疏水性、极性的位点。这些特征与 ZP 蛋白三维结构的保守性是一致的。Yurewicz 报道 ZP 组件结构中有 25 个氨基酸序列与猪 ZP3 β 的氨基酸顺序一致, 这个 ZP 组件还包含一个潜在的跨膜区域, 它定位在 C 末端, 暗示这些蛋白在分泌后可能经历了蛋白水解作用。在 ZP3 的蛋白骨架上, 分布着许多糖链。利用凝集素研究狗、猫和大象的 ZP 糖基组成时发现, 三者都有 β (1, 4) -半乳糖、Gal- β (1, 3) -GalNAC 和岩藻糖, 三者不同的是唾液酸 (sialic acid), 其中猫具有 α -2, 6-连接型唾液酸, 狗的是 α -2, 3-连接, 而大象两者都有。在猪中, 存在着数量相当的半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺、甘露糖、岩藻糖、唾液酸和 N-乙酰半乳糖胺等, 其中硫酸化常发生在 N-乙酰葡萄糖胺的 C₆ 位置。这种糖基化是 ZP3 蛋白翻译后的修饰加工造成的。

2. ZP2 蛋白家族

用抗体筛选的方法已分离到几种不同动物 ZP2 蛋白的 cDNA 序列, 证明其有相似的核苷酸序列。小鼠的 ZP2 蛋白是由 Dean 等人用抗 ZP 的单克隆抗体分离到的, 后来 Liang 和 Dean 等用小鼠 cDNA 片段从人基因组文库中分离得到人的同源蛋白。兔的 75kDa 的 ZP 蛋白的 cDNA 是由 Lee 等通过种属交叉的方法, 用纯化的抗体筛选 λ g11 文库分离到的。人和小鼠的 ZP2 在氨基酸水平上有 61% 的同源性。

3. ZP1 蛋白家族

55kDa 的兔 ZP 蛋白的 cDNA 是 Schwoebel 分离得到的, 这个蛋白的部分氨基酸序列非常独特。55kDa 的兔 ZP 蛋白的 cDNA 被用来分离猪 ZP3 α 。它们的蛋白在氨基酸水平上有 66% 的同源性, 除了 ZP 组件和跨膜区域外, 兔 55kDa 和猪 ZP3 α 蛋白都有一个三叶型区域, 这个区域被认为与蛋白水解酶的抗性有关, 与其他 ZP 蛋白家族一样, 这个蛋白家族的半胱氨酸残基的位点和潜在的糖基化位点高度保守。

(四) ZP 糖蛋白的功能

对于 ZP 功能的了解目前超过对其结构的了解。小鼠 ZP3 被证明是小鼠 ZP 中初级精子受体, 而 ZP2 是次级精子受体, 对应于 ZP3 的精子上的特异位点被证明是一个 O-

连接的寡糖，包含一个末端 α -半乳糖残基。Kinkoch 等在小鼠转入了一个仓鼠 ZP3 基因，这个基因可以在小鼠中正常表达，组成透明带并能起小鼠精子受体的作用。Kopf 等证明小鼠可溶性的 ZP3 以一种剂量依赖性的形式诱导小鼠精子的顶体反应。他们进一步证明小鼠 ZP3 的结合活性和顶体反应活性在药理学上是有区别的，顶体反应的诱导作用是 G 蛋白依赖的现象，Leyton 发现当小鼠精子与 ZP3 结合后，有一个精子蛋白特异的磷酸化过程。

另一个研究得比较多的是猪的 ZP 蛋白，实验证明猪 ZP2 和 ZP4 是 ZP1 的蛋白水解产物，ZP1 与小鼠 ZP2 及兔的 75kDa 的蛋白是同源蛋白。ZP3 α 是兔 55kDa 蛋白的同源物，而 ZP3 β 与小鼠 ZP3 蛋白是同源的，有趣的是猪 ZP3 β 不具有精子受体的功能。Yurewicz 等证明在猪中，ZP3 α 才具有这种功能。有人认为 ZP3 β 可能有稳定 ZP3 α 结构的作用或者与 ZP3 α 形成结构复合体。Prasad 和 Lee 等的研究说明，兔中的 55kDa 蛋白可能是精子的受体，它能在体外加强精卵结合，这暗示着可能还有其他因子的作用，这些因子起着与在体内相似的作用。有学者认为精子与 ZP 的相互作用是一个复杂的、在三维空间发生的作用，不同动物由不同的蛋白介导。如果精子与 ZP 表面初步的结合是由糖蛋白的糖基介导的，那么这种特异的糖基在不同的动物中分布在不同的蛋白上。

小鼠卵透明带是由 ZP1、ZP2 及 ZP3 三种糖蛋白组成，它是由卵母细胞分泌和合成。将 ZP3 基因敲除后可产生纯合子小鼠 mZP3 (-/-)，其卵母细胞不能分泌和合成 ZP3 mRNA 和蛋白。同时，也不能形成完整的 ZP。为了进一步检测纯合子小鼠 mZP3 (-/-) 的卵母细胞是否分泌 mZP2，激光共聚焦显微镜证实，纯合子小鼠 mZP3 (-/-) 卵母细胞能合成和分泌 mZP2，且能装配到正常小鼠 ZP3 (+/+) 卵母细胞产生的 ZP1、ZP3 结合，形成完整的 ZP。此外，来自 mZP3 (-/-) 小鼠的卵母细胞和成熟卵细胞几乎均检测不到 mZP2，而正常的小鼠 ZP3 (+/+) 的卵母细胞和成熟卵细胞中均检测到有 mZP2。

(五) 精子的穿透作用

Dunbar 等证明猪 ZP 用胰蛋白酶和顶体素处理后，形态上并不发生改变，但用 2D-PAGE 可以清晰地看出它已经被蛋白酶水解了。这个研究是非常重要的：第一，证明了不能用显微方法来评价 ZP 糖蛋白的改变；第二，说明了猪 ZP 糖蛋白潜在的结构作用。同 ZP1、ZP2、ZP4 相比，ZP3 β 蛋白保持不变，ZP3 α 蛋白只是被部分水解。这些研究提示 ZP3 α 和 ZP3 β 在保持 ZP 三维结构中起着主要的作用。成熟 ZP 基质中的 ZP1、ZP2 蛋白用蛋白水解酶处理后，可以完全水解但对 ZP 基质结构的影响不明显。ZP1、ZP2 很有可能就是通过这种方式与基质相连，精子蛋白水解 ZP 进而穿透 ZP。

(六) ZP 蛋白转录后修饰作用

1. ZP 糖蛋白糖基化的性质

ZP 结构复杂性是因为蛋白和糖基部分处在一个高度有组织的基质中，这些糖基被认为在发育卵泡的细胞相互作用中有重要作用，并且也影响成熟 ZP 与正在受精的精子

之间的相互作用。Dunbar 等最早对哺乳动物 ZP 蛋白的糖基性质进行了研究。高分辨率的 2D-PAGE 电泳证明, ZP 糖蛋白的糖基差异比其他典型的糖蛋白更大, 与 ZP 有关的糖基化和巯基化部分非常特异。酶法和化学法去糖基的实验证明, 大多数 ZP 糖蛋白都含有 N-连接和 O-连接糖基。目前研究主要集中在与 ZP-精子相互作用及穿透作用相关的糖蛋白分子上, 小鼠中 ZP-精子相互作用的 ZP 配基已初步确定为一个糖蛋白, 它的活性与一类特异的 O-连接寡糖有关, 通过共价键与 ZP3 相连。这些 O-连接寡糖与精子表面完整的黏附蛋白结合, 黏附蛋白包括半乳糖转移酶, 一个 56kDa 的卵子结合蛋白和一个 95kDa 精子蛋白, 它作为酪氨酸激酶的底物。

ZP3 上的寡糖链对于 ZP3 结合精子活性是至关重要的。人们对 ZP3 上的精子结合位点进行分析发现, ZP3 的初级精子受体活性可能与 ZP3 上的寡糖链有关。在小鼠中, ZP3 上的 O-连接寡糖链与精子结合。参与 ZP3-精子结合的糖基有: ZP3 末端的半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺。在猪中, 参与精子-ZP3 结合的是 N-连接的寡糖。在人类, 利用 SPR (表面胞质团共振) 研究人类受精过程, 表明参与 ZP3-精子结合的糖基是甘露糖。同时, 精子上还分布着 ZP3 受体。在小鼠中, β -1, 4-半乳糖基转移酶 (GalI-1) 与 ZP3 寡糖链上的 N-乙酰葡萄糖胺结合。GalI-1 是一种己糖基转移酶, 催化半乳糖基的转移。GalI-1 除了与 ZP3 结合外, 还与精子膜上的 G 蛋白形成复合物。当 GalI-1 与 ZP3 结合后, 可以激活 G 蛋白, 经过一系列信号转导途径, 使精子膜上的钙离子通道开放, 精子外膜内的钙离子增多, 进而诱发顶体反应。因此, GalI-1 起信号传递的作用。若 GalI-1 过表达, 则 G 蛋白活化, 精子与 ZP3 的结合和顶体反应都明显增多; 反之, 如果精子上缺乏 GalI-1, 精子不能发生顶体反应, 更不能穿过透明带, 但是并不影响精子与 ZP3 结合的起始, 提示精子与 ZP3 的结合起始可能不依赖于 GalI-1。在人类, 具有生物活性的重组人 ZP3 可与人精子上的神经元甘氨酸受体 (GlyR) 结合而诱发顶体反应; 同时, 重组人 ZP3 诱发人精子发生顶体反应还可能有烟酸乙酰胆碱型受体的参与。可见, 精子与 ZP3 的结合关系是复杂的, 并非简单的单一对应结合。

2. ZP 糖基抗原

ZP 糖蛋白在免疫遗传学和抗体遗传学水平上已有较详细的研究, 但是至今找到的抗原决定簇大部分与蛋白有关。Dunbar 等确定了一个与猪 ZP 糖基相关的特异的单克隆抗体 PS1 (presenilin 1)。用银染 2D-PAGE 的方法分离猪 ZP3, 可以得到一种单一的蛋白, 用它免疫小鼠后得到的单克隆抗体称为 PS1。这个抗体对于许多已经在免疫遗传学和抗体遗传学中应用的 ZP 糖蛋白的抗体是一个有效的补充。虽然这个免疫源是从猪 ZP 中分离得到的, 但是它的抗体可以识别包括猪、兔、狗、猫和狒狒在内的许多动物酸性条件下的 ZP 蛋白表位。包括人在内的许多动物的 ZP 蛋白上都具有这个表位。

PS1 可以在不使 ZP 蛋白变性的情况下, 在原位确定糖基决定簇。除了啮齿类动物以外, 所有动物与这种抗原相关性的差异可以用 N-连接的 PS1 抗原来说明。精子竞争结合实验证明, PS1 抗体会降低精子和猪 ZP 蛋白的结合, 主要是与猪 ZP 上的多聚乳糖氨基糖 (polylactosaminoglycan) 有关。许多含有多聚乳糖氨基糖的糖蛋白被证明锚定在细胞膜上。

(七) ZP 蛋白免疫反应的差异

实验证明, ZP 蛋白是由许多可能是种特异或相似的抗原决定簇组成的。抗猪 ZP 蛋白的多克隆抗体可以识别其他动物的 ZP, 不同的 ZP 蛋白中有共同的表位。ZP 蛋白的抗体遗传学和免疫遗传学都非常复杂, 免疫反应不但与免疫源的来源有关, 还与被免疫的动物有关, 这些免疫反应的差异主要反应了 ZP 蛋白在氨基酸水平上和转录后修饰水平上的差异。

用猪 ZP 蛋白免疫兔或其他动物 (包括灵长类) 可以刺激产生识别自身 ZP 抗原的抗体, 同时阻断受精和卵泡发育。用兔 ZP 蛋白同种免疫雌性兔子, 用抗体检测法没有检测到有显著的免疫反应。在豚鼠中产生的抗猪天然 ZP 的抗体可以识别猪和兔子的 ZP, 而在兔中产生的抗兔天然 ZP 的抗体只能识别兔的天然 ZP 和部分猪 ZP, 同时免疫反应在猪、兔的雌雄个体间也有差异。

(八) ZP 蛋白免疫

用 ZP 蛋白免疫将会导致不孕。ZP 抗原长期以来被认为是很有吸引力的抗生育疫苗的靶分子。针对 ZP 的抗体是组织特异性的, 主要对成熟 ZP 起作用, 阻止受精而不导致流产。有腔卵泡的卵泡液中的 ZP 长时间暴露于抗体, 所以低滴度的抗体也将产生很好的抗生育作用。因为正常情况下一个周期只排一个或几个卵, 所以所需的抗体相对于中和激素或精子抗原的抗体而言, 在数量上非常有限。因为 ZP 是一种细胞基质, 它不会离开卵巢进入血液循环, 所以不会形成免疫复合体。ZP 抗原在动物中有相似的抗原决定簇, 所以可以研究用同一 ZP 抗原免疫不同哺乳动物的抗生育效果。

有人报道, 卵泡中的 ZP 蛋白是在特异阶段产生的, 不同的 ZP 抗原在发育的不同阶段合成并分泌。用纯化的去糖基的天然或重组的 ZP 蛋白确定了特异的 ZP 抗原, 如用内 β 半乳糖苷酶 (endo- β -galactosidase) 消化过的猪 ZP3 α 和化学去糖基后的 ZP3 α 、ZP3 β , 它们可以产生抗体抑制精子与 ZP 结合和受精, 但并不改变卵泡的发育。但是用现有的方法得到大量经处理的 ZP 抗原, 来用于免疫避孕还比较困难。同时有研究发现, 用小鼠 ZP 蛋白的一段合成多肽与一种血清蛋白相连后免疫小鼠, 可产生免疫反应并抑制受精, 但并不改变卵巢的功能。

(九) 重组 ZP 抗原的表达

小鼠、仓鼠和兔的 ZP 蛋白的 cDNA 已在不同的细胞中做了表达, 但只有兔的重组 ZP 蛋白被用来研究其免疫遗传和抗生育的作用。在细菌中表达的兔重组 55kDa (ZPC)、75kDa (ZPA) 的 ZP 蛋白没有糖基化, 免疫兔和食蟹猴后并未产生明显的抗体。然而将这些重组蛋白与蛋白 A 相连后免疫食蟹猴, 则产生明显的抗天然 ZP 蛋白的抗体。

(十) 糖基化作用

研究证明 ZP 糖蛋白的糖基链影响抗原性和免疫活性, 去糖基化的 ZP 免疫原性比天然 ZP 蛋白小。非糖基化、不偶联的重组 ZP 蛋白是一个很差的免疫源。将兔 55kDa 的 ZP 蛋白 (一种猪精子受体 ZP3 α 同源蛋白) 可以在昆虫细胞中与重组病毒一同表达, 产生非融合的糖基化重组蛋白 (BV-55)。为了确定糖基化作用是否提高了这个重组蛋白的免疫原性, 用 BV-55 来免疫雌性兔和豚鼠, 发现这些动物产生的抗体可以识别与天然兔 55kDa 蛋白相关的抗原决定簇, 这和以前用天然 ZP 蛋白或在细菌中表达的重组 55kDa 蛋白免疫雌兔不产生抗体的情况正好相反, 说明 BV-55 蛋白的糖基化与自身 ZP 蛋白的糖基化在产生抗体时没有很大的差别。用 BV-55 蛋白免疫豚鼠可产生高滴度的抗天然 ZP 蛋白的抗体, 说明 BV-55 的免疫原性与天然 55kDa 蛋白是一样的。

免疫组化证明, ZP 在猪和人的卵巢发育中都有表达, 不管是出生前还是出生后, 利用抗 ZP 抗体的单克隆和多克隆抗体已将 ZP 定位在青春前期猪的卵母细胞和颗粒细胞上。卵母细胞和颗粒细胞被认为是 ZP 合成的位点, 但这个观点是有争议的。啮齿类动物的研究表明, 卵母细胞是 ZP 的惟一来源。在人和仓鼠的卵巢中, 用免疫荧光可以在卵母细胞中检测到 ZP 蛋白, 而颗粒细胞没有 ZP 蛋白。早期研究证明, 在许多动物中颗粒细胞是 ZP 糖蛋白的一个来源, 如兔、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠和猫。另有一些研究则认为卵母细胞和颗粒细胞在兔 ZP 合成和形成 ZP 细胞外基质中都有作用。有可能不同动物的 ZP 合成的位点也是不同的。

(十一) 免疫避孕

对免疫避孕几十年的研究表明, 要取得理想的避孕效果, 只有体液免疫的作用是远远不够的, 它往往需要体液免疫、细胞免疫和局部黏膜免疫等方面的协同作用。20 世纪 70 年代后, 相继在豚鼠、大鼠、小鼠、兔、猪和人等 ZP 上证实有特异性抗原存在, 其相应的抗 ZP 抗体能阻止受精。抗 ZP 抗体和 ZP 结合能干扰卵子和卵泡细胞间的信息交流, 导致卵泡的闭锁及卵子失去与同种精子结合的能力, 还可干扰胚胎着床。ZP 具有很强的抗原性, 主动或被动免疫动物后均可诱发产生抗体, ZP 具有异种交叉免疫应答特性, 如猪 ZP 与人卵的 ZP 之间有交叉抗原性。1977 年, Shivem 等用猪的 ZP 抗原进行间接免疫荧光实验, 首次检测出人血清中的抗 ZP 抗体。借助于特异、敏感的酶联免疫吸附测定技术发现, 约有 15%~20% 不明原因的不孕妇女血清中存在抗 ZP 抗体。随着年龄的增长及不孕时间延长, 其抗 ZP 抗体阳性率有升高趋势。这些事实表明, 抗 ZP 自身抗体可能是女性免疫性不孕的重要原因之一。

1. ZP 蛋白疫苗

关于 ZP 蛋白疫苗研究最多的是猪 ZP 抗原。猪的 ZP1 蛋白与小鼠 ZP2 及兔的 75kDa 的 ZP 蛋白是同源的。ZP2 和 ZP4 被确定为是 ZP1 的蛋白水解产物。猪的 ZP3 α 是兔 55kDa 的 ZP 蛋白的同源物, 而 ZP3 β 与小鼠 ZP3 蛋白是同源的。猪 ZP3 β 不具精子

受体的功能。在猪中，ZP3 α 才具有这种功能，抗猪 ZP3 α 的抗体可以降低受精率而不影响卵泡发育。然而值得一提的是，ZP3 α 与精子膜的结合可能需要可溶性的 ZP3 β 的存在，ZP3 β 对稳定 ZP3 α 的结构可能发挥作用。用猪 ZP 蛋白免疫兔或其他动物（包括灵长类动物）可以刺激产生识别自身 ZP 抗原的抗体，能同时阻断受精和卵泡发育。Dunbar 等用猪 ZP 来免疫兔和小鼠，发现兔不孕，但是小鼠却怀孕了。进一步研究表明，在小鼠中没有产生识别自身 ZP 的抗体，在兔中产生的抗体能分别识别猪、小鼠和兔的 ZP，而在小鼠中产生的抗体仅识别猪的 ZP，小鼠自身的 ZP 则不被识别。形态学研究发现，被猪 ZP 免疫的兔的卵巢发育不正常，小鼠的卵巢却未见异常。用猪卵透明带 55kDa 糖蛋白抗原（ZP3）免疫恒河猴后，由于猴对 ZP3 的免疫反应使卵泡发育在初级卵泡阶段被阻断，卵泡发育的停止可能是导致不孕的主要原因。用 MDP（methylene diphosphonate）作为佐剂免疫恒河猴，证实引起卵巢功能紊乱的不是福氏佐剂，而正是 ZP3 分子本身。

Skinner 等用兔 ZP 蛋白来免疫雄性和雌性的兔子，发现在雄性的兔子中产生了高滴度的抗体，在雌性兔子中未能检测到抗体，在雄性兔子中产生的抗体与兔 ZP 的反应较强，而且与猪 ZP 有明显的交叉反应。Dunbar 等人发现用兔的重组 ZP 蛋白免疫产生的抗体可以识别天然的 ZP 蛋白。当用在细菌中表达的兔 ZP 蛋白来免疫猴子后，与蛋白 A 相连的重组蛋白可以产生明显的抗体。Miller 等人首次证明，马的 ZP 由三种主要的糖蛋白组成，用抗兔子和猪的 ZP 抗体来分析马的 ZP 时发现，马的 ZP 上有与兔和猪相似的抗原决定簇。

人们一直在致力于用合成的多肽、重组蛋白或用单克隆抗体作分子探针来寻找 ZP 永久性的表位。Yurewicz 等报道，合成的猪 ZP3 α 多肽（残基 8~18）的抗体可以阻断精子与 ZP 的结合。迄今为止，小鼠、仓鼠和兔的 ZP 蛋白的 cDNA 均已在不同细胞系中表达，其中兔的重组蛋白其免疫遗传和抗生育作用研究得较为清楚。在细菌中表达的兔的重组 55kDa 和 75kDa 的 ZP 蛋白没有糖基化，用它来免疫兔和食蟹猴后，抗体滴度很低。但是与蛋白 A 相连后，重组蛋白可以产生明显的抗天然蛋白的 ZP 抗体。用单克隆抗体做探针来寻找 ZP 靶位点也是一种有效的手段。

2. ZP 基因疫苗

将 DNA 疫苗应用于生殖领域是一种新的尝试。Ronald 等人选取小鼠的 ZP3 基因为目的基因，重组到 ectromelia 病毒中，得到 ECTV-ZP3 重组病毒，以重组病毒作为抗生育疫苗来免疫小鼠，发现产生的抗体可以与卵巢的 ZP 蛋白结合，使小鼠不孕，然而这种不孕是暂时的，一旦抗体滴度降低，小鼠又恢复正常生育功能。同时也发现，有一半的不孕小鼠的卵巢结构出现异常。1999 年 Kerr 等人用 Myxoma 病毒作载体构建兔 ZPB 的病毒疫苗（VV-ZPB）。用这个 DNA 疫苗来免疫兔后，在兔中产生相当高的抗体滴度，且在雄兔中产生的抗体高于雌兔。产生的抗体可以和兔的 ZP 蛋白结合，使 80% 的兔子不孕。遗憾的是它也引起卵巢结构变化和功能紊乱。卵 ZP 免疫避孕的主要不足之处是，在主动免疫抗生育的同时，可损伤卵巢的功能，如卵巢炎、卵巢功能减退，甚至提前绝经。卵泡发育和卵巢的正常生理过程都受到不同程度的影响，对于动物这是可以接受的，但对于人类是不可以接受的。寻找一种特异的 ZP 蛋白或一个特异的抗原表

位，其抗体既可以抑制受精而又不影响卵巢正常生理功能。从目前的研究来看，无论是蛋白疫苗还是全长基因疫苗都会引起卵巢结构变化和功能紊乱，这就限制了 ZP 作为抗生育疫苗的应用。寻找一个最小、最简单的 ZP 免疫源，例如一个表位，它能产生抗体阻断精卵相互作用而抑制受精，而且几乎无副作用，是一个十分重要的课题。Hinsch 等人发现，用小鼠 ZP3 蛋白的保守序列的合成多肽（AA151~165，AA360~369），其抗体可以识别包括人和猴在内多种动物的 ZP 蛋白。

彭景蟾等人尝试不克隆兔 ZPC 的全长基因，而是有选择地选取兔 ZPC 基因的 153 个氨基酸（编码 263~415 位），目的是为寻找一个既能产生抗受精作用，又不影响卵巢结构和功能的靶抗原位点，进行抗生育疫苗的研究，以期找到最佳的阻断点，作为抗生育免疫原。选取兔 ZP3 编码氨基酸 263~415 的 cDNA 为免疫原，其中既保留了 ZP 家族的保守序列片段，也含有兔的特异序列片段。以质粒 pVAX1 为载体构建的 pVAX1-rZPC' DNA 疫苗在新西兰兔中产生了抗天然 ZPC 的抗体，而且雄兔的抗体滴度高于雌兔的抗体滴度。该疫苗免疫雌性 BALB/c 小鼠后避孕率达到 80%，而且小鼠卵巢切片病理检测结果说明，pVAX1-rZPC' DNA 疫苗对被免疫动物的卵巢没有明显的影响，取得了较好的避孕效果。用特异抗原决定簇构建基因疫苗，研究克隆 ZP 部分片段达到阻断精卵相互作用的可能性，这是一个新的探索。

（十二）抗 ZP 抗体

随着人们对 ZP 蛋白研究的深入，用 ZP 蛋白作为抗生育疫苗引起人们日益关注和浓厚兴趣。研究表明，ZP 抗原可诱发同种或异种免疫反应，产生抗 ZP 抗体。抗 ZP 抗体与 ZP 结合能干扰卵母细胞与卵泡之间的信息交流，导致卵泡闭锁和卵母细胞退化。经抗 ZP 抗体处理过的卵子失去与同种精子结合的能力。抗 ZP 抗体在体内还能干扰胚胎自透明带中“孵出”而妨碍着床。关于抗 ZP 抗体影响生殖功能的机制还不完全清楚，但目前研究表明抗 ZP 抗体能够掩盖 ZP 上的特异性精子受体 ZP3，从而阻止精卵结合；抗 ZP 抗体也能使 ZP 的结构加固，抵抗精子顶体酶的消化作用，阻止精子穿过 ZP；即使精子穿透了 ZP 与卵子结合受精后，受精卵被包裹在坚固的 ZP 内，而不能实现“孵出”后着床。抗原抗体复合物学说则认为，抗 ZP 抗体在 ZP 表面与其相应抗原结合后，形成抗原抗体复合物，从而阻止精子通过 ZP。临床不育症的研究资料表明，部分不孕妇女体内存在抗 ZP 抗体。有人认为抗 ZP 抗体的存在是不孕的原因所在。

二、精子抗原

人类精子抗原相当复杂，约有 100 多种，按其细胞定位，可分为核抗原、胞浆抗原、膜固有抗原及包被抗原。按其特异性分为精子特异性抗原和精子非特异性抗原。特异性精子抗原包括受精抗原-1（fertilization antigen-1，FA-1）、受精抗原-2（fertilization antigen-2，FA-2，亦为精子膜抗原）、卵裂信号-1（cleavage signal-1，CS-1）抗原、精子/滋养层交叉反应抗原（sperm/trophoblast cross-reaction antigen，STX-10）、乳酸脱氢酶-C4（LDH-C4）、PH-20、PH-30（是一种精子膜糖蛋白，具有细胞膜的外胞浆融合

作用)、生殖细胞抗原-1 (germ cell antigen-1, GA-1, 为精子膜蛋白)、精子蛋白-10 (sperm protein-10, SP-10)、YWK-II 相关抗原 (YWK - II 是一种具有精子凝集作用的单抗, 间接免疫荧光显示该单抗的相关抗原定位于精子中段、尾段和精子头赤道部的表面)、顶体素原结合蛋白和钙结合蛋白 (calbp) 等。非特异精子抗原包括肌酸磷酸激酶 (creatinephosphokinase, CPK)、甘露糖配体受体 (mannose-ligand receptor, MLR)、C-myc 蛋白、C-ras 蛋白、G 蛋白、膜磷酸酪氨酸蛋白 (membrane phosphotyrosine protein, MPP)。其他精子抗原还有顶体素 (acrosin)、ABO 血型抗原、HLA 抗原、鱼精蛋白 (protamine) 和精子膜抗原 (sperm coating antigen, SCA), 后者又称 scafferrin, 是一种包被精子表面的抗原, 来源于精囊腺等。

精子固有的细胞膜抗原由种属特异性抗原和组织相容性抗原 (HLA、H-y 和 F9) 等构成, 其中器官特异性抗原可引起同种和自身精子免疫反应。此外, 精子的特异性酶是细胞膜上的 LDH-C4 和顶体素 (acrosin)。抗精子抗体按其对精子的作用分为凝集性、制动性与结合性三类。精子凝集抗体有头对头、尾对尾及混合型三种。

目前已经分离且研究较为清楚的精子抗原主要有精子特异性 LDH-C4、PH-20、精子蛋白-10、兔精子自身抗原 (rabbit sperm autoantigen, RSA)、精子凝集抗原-1 (sperm agglutination antigen-1, SAGA-1)、受精素 $\alpha\beta$ (PH-30 抗原)、受精抗原-1、受精抗原-2 和卵裂信号-1 等。

(一) SP-10

人的 SP-10 由 265 个氨基酸组成, 位于精子的顶体内及顶体膜部位。SP-10 具有睾丸/精子特异性, 具有多个 MHS-10 抗原表位, 可诱导产生抗精子抗体。MHS-10 是一种特异性抗人类精子蛋白的单克隆抗体, 可使精子凝集, 而影响精子穿透仓鼠去透明带的卵细胞, 并影响精卵结合。用重组猴 SP-10 蛋白通过肌肉注射途径接种猴, 可以诱导猴的免疫反应, 在生殖道和血清中可分别检测到抗 SP-10 的抗体 IgA 和 IgG。体外受精实验发现, 抗 SP-10 的单克隆和多克隆抗体都能抑制获能精子次级结合到透明带上, 认为 SP-10 疫苗的作用是通过诱导抗 SP-10 抗体——MHS-10 产生, 从而抑制顶体反应, 以影响精卵间的相互作用。编码 SP-10 蛋白的 cDNA 已从人 cDNA 表达文库中得到克隆和测序。SP-10 正在作为一种口服避孕疫苗而被研究。已用减毒的沙门氏菌来表达重组人 SP-10 抗原。重组有 SP-10 的沙门氏菌口服接种雌性小鼠后, 在小鼠的生殖道分泌物中可检测到特异性抗 SP-10 的抗体, 它是首例通过口服接种途径在生殖道中诱导针对遗传工程精子抗原的黏膜免疫反应。

(二) PH-20

是通过糖基磷酸化锚定的精子膜表面糖蛋白, 分子质量为 64kDa, 参与精子与透明带的黏附。PH-20 蛋白表现出透明质酸酶活性, 这种活性使得精子能够穿透围绕在卵子周围的卵丘细胞。Primakoff 等报道用豚鼠 PH-20 免疫雄性和雌性豚鼠后, 能抑制豚鼠的生育, 并且这种不育效果可以逆转。但是, 抗豚鼠 PH-20 的抗体与人精子蛋白 PH-20

并无明显的结合反应。豚鼠、人和恒河猴的 PH-20 cDNA 已分别被克隆出来。由于 PH-20 的分布特点、免疫效果及其与生殖功能的关系，使 PH-20 成为一种有应用前景的免疫不育抗原。

(三) 兔精子自身抗原 (RSA)

是由 O'Rand 等用抗精子的多克隆抗血清在兔精子中发现的一类蛋白。RSA 作为低分子质量膜糖蛋白家族，位于兔精子头顶体后区的表面，其功能是作为透明带黏附蛋白。RSA 抗原的单克隆抗体可与人精子发生交叉反应。精子穿透试验证明，其抗体可以抑制精子/仓鼠卵的穿透。用合成的 RSA 的 B 细胞表位肽段免疫小鼠，其生育率与对照组相比降低了 80%。RSA-3 cDNA 克隆（被命名为 Sp17）已从兔、小鼠和人的睾丸文库中分离出来。

(四) 受精素 $\alpha\beta$ (PH-30)

是一种顶体质膜抗原，用来介导精-卵膜的相互作用。通过免疫荧光方法发现，抗 PH-30 抗体定位于完整豚鼠精子的后顶体质膜。PH-30 包含两个亚单位，它们都是完整的膜糖蛋白，其中 α 亚单位 (60kDa) 包含一段具有病毒融合蛋白特性的肽段，而 β 亚单位 (44kDa) 是一种整合素配体。抗 PH-30 单克隆抗体能够抑制豚鼠精卵融合。用纯化的豚鼠 PH-30 免疫雄性豚鼠，可导致完全不育，但免疫雌性豚鼠后则产生部分的免疫不育效果。编码鼠、人等受精素亚单位的 cDNA 已经被克隆，并进行了其特性的研究。

(五) 精子凝集抗原-1 (sperm agglutination antigen-1, SAGA-1)

是一个多态糖蛋白 (分子质量为 15~25kDa)。蛋白杂交和免疫荧光分析证明，SAGA-1 具有疏水性质，不能采用经典的去除外围膜蛋白的方法来分离提取。据此认为，SAGA-1 或者是一种整合膜蛋白，或者是通过共价键与质膜相连。推测 SAGA-1 引发的自身免疫会导致不育。目前，有关 SAGA-1 的研究集中在组织特异性分布及其在精子和透明带相互作用中的功能，有关其免疫不育的研究还未见报道。

(六) 精子特异性乳酸脱氢酶

精子特异性乳酸脱氢酶 (sperm-specific lactate dehydrogenase, LDH-C₄) 特异地存在于鸟类和哺乳类动物的睾丸和精子中，催化丙酮酸和乳酸的转化，为精子的运动和存活提供能量。LDH-C₄ 是由 4 个 C 亚基组成的同源四聚体，与体细胞乳酸脱氢酶仅分布于细胞内不同，LDH-C₄ 在精子细胞内和胞质膜上都有分布。

LDH-C₄ 在免疫学上与 LDH-A₄ 和 LDH-B₄ 截然不同，它可以作为抗原诱导机体的免疫反应。LDH-C₄ 蛋白主动免疫多种动物 (包括灵长类动物) 后，均能降低动物的生

育率，其抗原表位（主要为 B 细胞表位）疫苗亦具有抗生育的效果。

1. LDH-C₄ 的理化特性

LDH-C₄ 是 Zinkham 和 Goldberg 等分别用琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法各自独立发现的，它特异地存在于鸟类和哺乳类动物的睾丸和精子中，与体细胞中的乳酸脱氢酶 A₄ (LDH-A₄) 和 B₄ (LDH-B₄) 同属于乳酸脱氢酶家族。它们都以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 为辅酶催化丙酮酸和乳酸间的相互转化，在能量代谢中发挥着重要作用。但 LDH-C₄ 与体细胞中的 LDH 相比较又具有一些独特的性质。在人、小鼠等生物体内存在三种不同的乳酸脱氢酶亚单位即 A、B、C 亚单位，它们分别由三个基因 Ldh-a、Ldh-b、Ldh-c 编码。Ldh-a 和 Ldh-b 基因主要在体组织细胞中表达乳酸脱氢酶同工酶的 A 和 B 亚单位。在不同器官组织中，A 和 B 亚单位表达的比例有所不同，如 A 亚单位在肌肉中的表达量高于 B 亚单位，其组成的四聚体 LDH-A₄ 的酶活性适合在缺氧条件中催化丙酮酸的还原；而在心肌细胞中则相反，B 亚单位组成的四聚体 LDH-B₄ 含量明显高于 LDH-A₄，主要适合催化有氧条件下组织中的乳酸氧化。LDH-c 基因特异地在生精细胞中表达 C 亚单位，其分子质量约为 35 kDa。在精细胞中，LDH-C₄ 是由 4 个 C 亚单位组成的同源四聚体，分子质量为 140kDa，催化丙酮酸和乳酸的转化。

不同物种间 C 亚单位的氨基酸组成有所变化。人的 LDH-C₄ 与小鼠和红狐分别有 74% 和 86% 氨基酸序列同源，抗原表位氨基酸序列有一些位点的氨基酸发生替换。通过对小鼠和大鼠 LDH-C₄ 亚单位的氨基酸序列比较发现，它们有 32 个不同的氨基酸位点，这 32 个不同的氨基酸位点已被定位。推测这些氨基酸的不同可能与种属特异性有关，在一定程度上影响不同物种间 LDH-C₄ 的免疫原性。不同物种间 LDH-C₄ 亚单位氨基酸序列的较大变化与体细胞中的 LDH-A₄ 和 LDH-B₄ 亚单位氨基酸序列的高度保守性形成明显的对照。在一级结构序列和三维结构上，A、B 亚单位比较相似，而与 C 亚单位差别较大，表现在 C 亚单位的螺旋和环区的氨基酸序列与 A 和 B 亚单位有很大差异，尤其 N 端的臂区变化更为明显。对来自大鼠和小鼠的睾丸、猪的肌肉等七种脊椎动物 LDH 同工酶的氨基酸序列进行比较表明，LDH-A₄ 和 LDH-B₄ 二者间有更近的进化关系。而对人和小鼠的 LDH 同工酶基因序列的比较进一步证实，Ldh-c 基因可能在进化过程中较早地与 Ldh-a 和 Ldh-b 基因分离。在体内，C 亚单位只能结合成同源四聚体 LDH-C₄，分布于生精细胞中；A 和 B 亚单位间却能够相互结合成五种不同形式的四聚体结构蛋白，存在于机体的骨骼肌细胞和心肌细胞等体细胞中。对于同一物种而言，乳酸脱氢酶同工酶又有一定的同源性。小鼠 Ldh-c 基因的核苷酸序列和 C 亚单位氨基酸序列与 Ldh-a 基因序列和 A 亚单位氨基酸序列分别有 73% 和 72% 同源性。人乳酸脱氢酶 (LDH-A₄、LDH-B₄ 和 LDH-C₄) 亚单位的氨基酸序列则有 69%~75% 同源，它们的活性位点尤其保守，说明三者间又有一定的相关性。根据 LDH-C₄ 氨基酸序列和 X 射线衍射实验的数据，利用计算机成像系统构建了小鼠 LDH-C₄ 的空间结构模型。小鼠 LDH-C₄ 的三维结构是利用分子置换技术确定的。

2. 分布特点

LDH-C₄ 在细胞中具有双重分布的性质。免疫胶体金等实验证明，LDH-C₄ 主要是

胞内酶，但有一部分与质膜相结合。LDH-C₄在精母细胞、精子细胞及处于分化成熟阶段的精子尾的主段和中段的质膜上都有明显分布，取自附睾的成熟精子的主段和中段也有较强的染色。LDH-C₄在精母细胞、精子细胞和精子的线粒体上分布较少，在体细胞的线粒体上则未检测到LDH-C₄。LDH-C₄在精子膜上的分布使它能方便地与细胞外成分(如抗LDH-C₄的抗体)相接触。

3. 表达调控

LDH-C₄的C亚单位由大小为1 kb的Ldh-c基因编码。人Ldh-c基因位于11号染色体的短臂p15.3~p15.5处，在位置上与Ldh-a基因比较靠近。Ldh-c基因编码区含有6个内含子，其表达具有严格的时空调控。Goldberg等在小鼠初级精母细胞中检测到LDH-C₄ mRNA存在，但在体细胞中没有发现，说明LDH-C₄的表达具有组织细胞特异性。在睾丸分化过程中，LDH-C₄的mRNA表达有所变化，圆形精子细胞中LDH-C₄ mRNA的含量比粗线期精母细胞丰富得多。在不同物种中LDH-C₄的mRNA含量也存在差异，小鼠睾丸中LDH-C₄的mRNA含量约是大鼠的九倍，并在减数分裂后期仍保持较高水平；而在大鼠的初级精母细胞中含量最高，在精子中有所下降。由于小鼠LDH-C₄在转录水平上比大鼠只是略有提高，推测这种mRNA水平的明显差异主要是转录后事件的结果。LDH-C₄蛋白的合成及酶活性也只在精子发生的特定阶段才表现。小鼠在初级精母细胞的粗线期中期开始表达LDH-C₄，在粗线期精母细胞和精子细胞中也检测到LDH-C₄亚单位，并在整个精母细胞的胞浆中均匀分布。检测成年小鼠的生精细胞，结果表明LDH-C₄的合成起始于前细线期和细线期偶线期，在粗线期精母细胞、圆形精子和浓缩过程中的精子细胞中LDH-C₄含量显著升高，在精子中则有所下降。上述研究结果说明，在由A型精原细胞分化成为B型精原细胞进入精子发生周期时，Ldh-c基因就开始活化和表达。

小鼠和人的Ldh-c基因已经被克隆和测序。从小鼠基因文库中克隆得到包含一段发卡结构的Ldh-c基因克隆，这段发卡结构被认为与Ldh-c基因的启动子区域有关。体外转录实验证明，这个720 bp的片段在睾丸组织细胞核提取液中具有启动子活性，在肝脏细胞核提取液启动子活性却被显著抑制。应用CAT和lacZ报告基因对Ldh-c基因启动子进行研究，结果表明小鼠和人Ldh-c基因包含几个广义cis作用元件，但小鼠和人Ldh-c基因作用元件有所不同，小鼠Ldh-c基因包含一个功能性的TATA盒，但在人的Ldh-c基因中则不含这一结构；相反，在人的Ldh-c基因中含有六个潜在的Sp1结合位点而在小鼠中则没有，但也有实验证明人的Ldh-c基因启动子序列在转基因小鼠的睾丸提取液中起作用并且保持了时相和组织的特异性特点。这一与TATA盒交叠的发卡结构域在3'端延伸到转录起始位点。通过电泳迁移实验和核酸-蛋白杂交实验分析表明，在睾丸细胞的核提取液和肝脏细胞核的提取液中分别有分子质量为103 kDa和65 kDa的蛋白与这一发卡结构中一段60 bp的核心启动子区结合。位点突变实验表明，这一60 bp的核心启动子序列能够充分控制LDH-C₄睾丸特异性转录，转基因鼠的体内实验也进一步证明这一点。体外转录实验证明，当这一发卡结构的中间区域发生突变时，其在睾丸核提取液中的启动子活性丧失，表明转录激活因子与这一位点结合。对启动子的5'端进行随机突变，在睾丸组织细胞核提取液中启动子活性没有影响，但在肝脏核提取

液中启动子活性有明显的降低，认为在体细胞中 NF-I 蛋白与发卡结构域的结合抑制了 Ldh-c 基因的表达。在生精细胞中，NF-I 蛋白含量较低而 TBP 蛋白（TATA-binding protein）含量明显高于体细胞，有利于生精细胞中转录复合体的形成。不同的 NF-I 蛋白异构体或共同抑制因子也可能参与 LDH-C₄ 基因表达的调节。图 15-1 是小鼠 Ldh-c 基因组织特异性表达调节模式图。

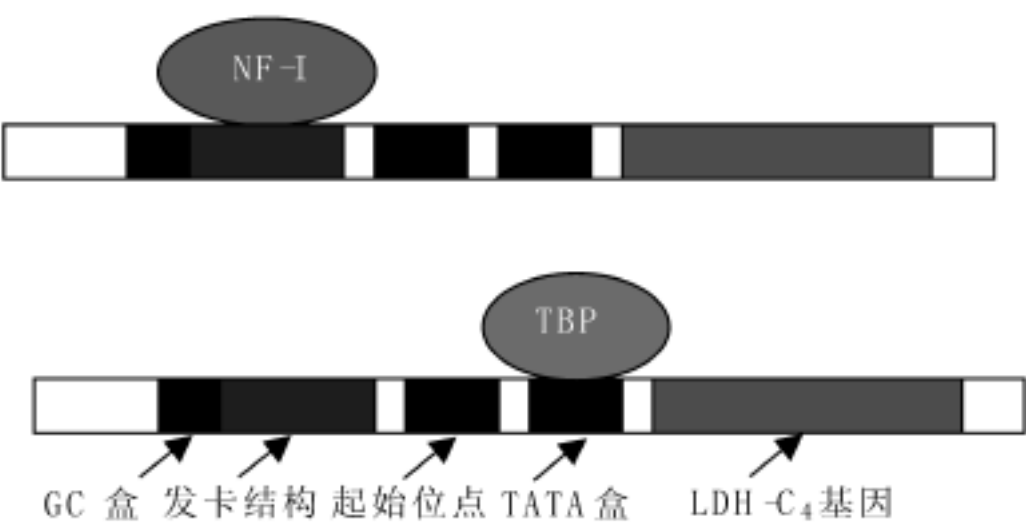


图 15-1 小鼠 LDH-c 基因组织特异性表达调节模式图

在体细胞中 NF-I 蛋白与启动子区的发卡结构结合抑制 LDH-C₄ 基因在体细胞中的表达；而在精子细胞（spermatid）中不存在 NF-I 蛋白的抑制作用，TBP 蛋白与 TATA 盒的结合促进 LDH-C₄ 转录复合体的形成，有利于 LDH-C₄ 在精子发生过程中的表达。其他转录因子可能也在 Ldh-c 基因特异性表达过程中发挥作用。

通过凝胶延迟实验和体外转录系统实验证明，转录因子蛋白 Sp1 在睾丸中含量丰富而在大部分的体细胞中并不表达，表明 Sp1 蛋白可能在睾丸 LDH-C₄ 基因表达中起重要作用。在精子发生过程中，LDH-C₄ 含量与 Sp1 含量变化存在线性关系。电泳迁移实验和蛋白-核酸杂交实验还表明，在睾丸和肝脏的核提取液中分别有分子质量约为 120kDa 和 70kDa 的蛋白与小鼠 LDH-C₄ 启动子区的 CCAAT 盒序列结合，推测 Sp1 等蛋白与 LDH-C₄ 组织特异性的表达调节有密切关系，提示 LDH-C₄ 表达调节存在一套十分复杂的调节机制，对此还有待进一步的研究。

4. LDH-C₄ 的免疫学特性

(1) 免疫原性

在哺乳动物中，雌性动物机体细胞不表达 LDH-C₄。雄性个体虽然在睾丸部位的生精过程中合成 LDH-C₄，但在正常情况下血睾屏障使其与免疫系统相隔离。因此对于雌性动物和雄性动物，无论是自身合成的还是外源的 LDH-C₄，都被机体的免疫系统识别为异己成分，作为自身抗原、异型抗原或同种异型抗原。当免疫系统与 LDH-C₄ 接触时，LDH-C₄ 作为抗原物质激发机体的免疫系统，产生免疫应答反应。用纯化的 LDH-C₄ 免疫小鼠的实验证明，LDH-C₄ 能够诱导特异性免疫应答反应，包括体液免疫和细胞免疫。当进行局部子宫内免疫小鼠时，在生殖道的分泌物中可检测到抗 LDH-C₄ 的抗体 IgA，说明 LDH-C₄ 能引起机体的局部黏膜免疫反应。

(2) 抗原决定簇

利用分离的 LDH-C₄ 片段与抗体的结合实验、合成肽段的免疫实验、LDH-C₄ 的衍生物竞争性结合等对 LDH-C₄ 抗原结构进行的初步分析认为, 围绕 LDH-C₄ 四聚体表面的一组肽段是免疫原性部位, 将其中的六个肽段与白喉类毒素连接后免疫, 根据免疫效果对其免疫原性进行排序: 5~15, 304~316 > 211~220, 274~286 > 49~58, 97~110, 这些肽段一般由 10~15 个氨基酸残基组成 (如 mC5~15 肽段, 其氨基酸序列为 KEQLIQNLVPE), 代表着四聚体 50% 的可接触溶剂表面。兔抗小鼠 LDH-C₄ 抗体与分离纯化的 LDH-C₄ 片段的结合实验表明, 小鼠的 LDH-C₄ 至少有 12 个抗原结构域, 它们都包含四聚体表面的几个氨基酸残基。当用分离纯化的 LDH-C₄ 片段 (如 Mc152~159) 或一些与白喉类毒素 (DT) 连接的包含免疫原性序列的肽段 (如 DT-Mc5~15、DT-Mc211~220) 免疫小鼠或兔时, 在小鼠或兔的血清中都检测到抗天然 LDH-C₄ 的抗体, 这些抗体可以特异地与精子表面的 LDH-C₄ 结合, 说明部分肽段能引起机体的免疫反应, 这些肽段可能是抗原决定簇的重要组成部分。有研究表明, 9 种抗小鼠 LDH-C₄ 的单克隆抗体与人的 LDH-C₄ 都能发生交叉反应, 但没有一种单克隆抗体与人和小鼠体细胞的 LDH 同工酶作用, 进一步证明 LDH-C₄ 存在多个特异性的抗原表位。

(3) 免疫特异性

LDH-C₄ 虽然在氨基酸序列和三维结构上与体细胞的 LDH 有一定的同源性, 但它们的免疫学特性不同。体细胞的 LDH 不能明显地诱导产生相应抗体。LDH-C₄ 具有性质不同且能够诱导免疫反应的抗原表位, 以及细胞特异性和剂量依赖性的免疫抑制位点, 能够作为免疫原刺激机体的免疫系统, 产生体液性抗体。LDH-C₄ 免疫产生的抗体与不同种属的 LDH-C₄ 可以发生交叉反应, 而与体细胞的 LDH 无论同种或异种均不发生交叉反应。因此 LDH-C₄ 免疫动物产生的抗体可以特异性地与表达 LDH-C₄ 的精母细胞、精子细胞及精子结合, 而不会与体细胞相结合, 从而表现出极强的细胞特异性。但近期实验证明, 抗天然 LDH-C₄ 的 IgG 虽然不能识别体细胞的 LDH, 但经化学修饰的 LDH-C₄ 免疫产生的抗血清能与来自体细胞 (如肾脏和胎盘) 的 LDH 稳定作用, 并且抗化学修饰的 LDH-C₄ 的抗血清和天然 LDH-C₄ 间的亲和力明显高于抗天然 LDH-C₄ 的抗体与天然 LDH-C₄ 的亲和力。有人据此认为, 天然 LDH-C₄ 之所以是精子特异性抗原, 是因为其诱导交叉免疫反应的抗原表位被隐藏在结构内部, 而在免疫学上表现为精子特异性。

(七) 雄性配子抗原疫苗

抗精子抗体及其抗生育影响的研究大约在一个多世纪前就已开始, 1899 年 Metchnikoff 首次报道了精子的免疫原性。20 年后, Savini 和 Savini-Castano 用精子进行主动免疫豚鼠, 降低了豚鼠的生育率。1932 年, Baskin 在美国申请了非特异性精子蛋白疫苗的专利。近几十年的研究进一步证实, 雄性配子抗原疫苗能够明显地影响生育率, 精子特异性蛋白作为免疫不育的靶抗原具有很好的应用前景。抗精子抗体 (ASA) 实验显示, 抗精子抗体在体外抑制了精子的功能并在实验动物模型上诱导了不育。精子特异性蛋白诱导产生抗精子的抗体可引起男子不育, 并不导致其他生理性疾病的发生, 说明利

用抗精子抗体的方法来避孕不会给人的正常生殖活动带来副作用。

用于免疫不育的精子抗原一般具有一些共同的特点。它们应是精子特异性的蛋白，在精子表面有一定分布，在生育过程中参与一定功能。精子抗原诱导机体特异性的免疫反应后产生的抗体与体细胞不发生交叉反应。抗体与精子表面相应特异性抗原间的作用能够阻断精子的正常生理功能。另外还有一些其他要求，如抗原获得途径、生育功能的可逆性等。关于精子蛋白疫苗已有较多的研究。临床证明，在体内含有抗精子抗体 (antisperm antibody, AsAb) 的病人几乎不能妊娠，因为抗精子抗体一旦进入生殖道与精子结合，就会影响精子的正常功能。一般认为当重组配子疫苗接种生物机体时，表达的配子抗原会诱导特异性免疫反应，在生殖道中产生特异性抗体。这些抗体可通过多方面的作用影响受精：①抗体在阴道、子宫颈、子宫、输卵管等部位引起精子凝集，致使精子失去运动能力。②精子抗体结合到精子表面也可改变精子的游动方式，损害精子穿透子宫颈黏液的能力。③抗体与配子结合将配子（精子或卵子）包裹，阻断精卵的相互作用，影响精子与透明带的结合、透明带的穿透、精卵膜的黏附和融合等，这些抗体与配子相互作用的结果最终都会阻断受精。④抗体也可能通过抑制精子的获能或抑制精子的顶体反应，导致精子不能完成受精过程。

在雄性个体内，抗精子抗体也可能通过某些途径影响精子的发生。抗精子抗体沉积在曲细精管的基底膜和生精细胞上，影响睾丸的生精功能。此外，抗精子抗体也可通过增强人体巨噬细胞的间接杀精作用而导致不育，在临床上表现为少精子症和无精子症。在抗体渗入到生殖道的同时，补体成分也一同进入男性生殖道的分泌物中，引起补体链的激活及巨噬细胞的调理作用等，从而影响生育。

1. LDH-C₄ 蛋白疫苗的研究

LDH-C₄ 独特的免疫学特性引起了许多科学家的兴趣，并以此作为免疫不育的模型，开展了蛋白免疫不育的研究。

Goldberg 等用 LDH-C₄ 接种不同品系的雌性小鼠，引起了不同程度的免疫应答，其中 BALB/c 和 SJL 等品系的免疫反应较强。用 LDH-C₄ 或其部分片段免疫注射小鼠、兔、狒狒等，都诱发了针对 LDH-C₄ 的特异性免疫应答，使动物的生育率降低，具有一定的免疫不育效果，但免疫原性较差，免疫避孕的效果并不理想。后来采取对 LDH-C₄ 残基进行化学修饰、注射弗氏佐剂、将分离或合成的 LDH-C₄ 部分片段与 DT 相连等方法，提高了其免疫原性，使抗生育效果虽有所提高，但抗原的纯化工艺复杂、成本昂贵、且需多次强化注射等问题使其实际应用受到制约。

2. LDH-C₄ 基因疫苗的研究

随着分子生物学的发展、黏膜免疫的研究和 DNA 疫苗技术的问世，使得通过基因免疫抗生育将成为可能，LDH-C₄ 的应用研究随之也进入一个新阶段。

随着基因重组技术及基因载体传递系统的迅速发展，20 世纪 90 年代初基因免疫技术问世。技术的核心是将编码抗原的核酸序列组装到含有必要表达调控元件的真核表达载体中构建核酸疫苗，然后将其导入动物体内，重组的核酸疫苗可以利用宿主体内的酶系合成外源基因编码的蛋白，从而诱发宿主对该外源蛋白的免疫应答，达到免疫预防的

目的。蛋白疫苗的研究已经证明, LDH-C₄ 的抗原表位疫苗具有抗生育作用。这些研究工作提示, LDH-C₄ 或其抗原表位疫苗免疫动物可能会刺激机体的免疫系统, 通过体液免疫和细胞免疫阻断受精等。将人精子表面蛋白 Sp10 基因和狐的 LDH-C₄ 基因与载体连接并通过沙门氏菌分别感染小鼠和狐后, 在小鼠的生殖道冲洗物和狐的唾液中分别检测到抗 Sp10 和 LDH-C₄ 的抗体, 说明将 LDH-C₄ 基因与载体连接构建的抗生育疫苗通过口服途径免疫动物可以刺激机体的黏膜免疫系统, 产生分泌型抗体。这表明, LDH-C₄ 基因疫苗通过口服途径免疫动物使动物不育将成为可能。

第二节 母胎免疫

正常妊娠时, 胎儿作为“半同种移植物”不被母体排斥的现象, 一直备受关注。从理论上说, 胎儿具有的父源 HLA 抗原, 其组织相容性抗原差异很大, 应该为母体淋巴细胞识别, 产生排斥反应。但正常妊娠母体的排异反应降低, 母体能有效地调节制约对胚胎潜在性的有害反应。母体对携带双亲的同种异型胎儿抗原, 仅予以低度的体液和细胞免疫反应, 有几种不同的特异的和非特异的免疫抑制的联合作用使胎儿免遭免疫排斥, 从而使妊娠获得成功。母体免疫系统不排斥胚胎抗原归因于复杂的母-胎特殊免疫调节机制。

胎儿逃避母体免疫攻击的确切机理, 以及因母体对胎儿免疫排斥导致妊娠失败的机制一直是生殖免疫学研究的热点课题。

早在 1953 年, Medawa 即提出并试图阐明为何在正常妊娠中母体能对带有异种抗原的胎儿产生免疫耐受。经过近 50 年的研究, 尽管对这一机制并未完全了解, 但已发现妊娠期间的免疫状态具有以下特点: ①胎盘不是一个惰性的免疫屏障, 母体和胎儿细胞可通过胎盘进行一定程度的相互转运。正常妊娠时胎儿细胞可转运至母体血循环中并长期存活, 母体细胞也可转运至胎儿组织而不引起胎儿的免疫攻击。②即使母体和胎儿主要组织相容性抗原基因存在差异, 胎儿成熟 B 细胞对母体主要组织相容性抗原缺乏反应性, 胎儿对母体细胞的免疫耐受可保持相当长的一段时期。③主要组织相容性抗原在母胎交界面胎盘细胞中的表达有特殊调控机制。④母胎之间主要组织相容性抗原系统存在不相容性可能对妊娠有利。将妊娠期间的这种免疫环境称为局部免疫或称蜕膜免疫。越来越多的实验提示, 主要组织相容性抗原在胎盘细胞的特殊表达有可能是母胎局部免疫调控的重要机制。

一、主要组织相容性抗原

主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC; 在人类为 HLA) 是编码细胞表面糖蛋白的一类多基因家族, 该类基因产物——主要组织相容性抗原在免疫识别中极为重要。T 细胞表面的高度抗原特异性的 T 细胞抗原受体 TCR 不能识别完整的抗原分子, 只能识别由 MHC 分子呈递的源于微生物蛋白质的分解肽段。病毒、细菌、寄生虫或自身蛋白在细胞内被蛋白酶作用分解成为小的片段后, 由 MHC 分子结合后再运送到细胞表面, 并由它将抗原呈递给 T 细胞, 激活相应的 T 细胞和继发的对 B

细胞的激活。T 细胞在对这些外来的并被呈递的抗原识别的同时，还要识别 MHC 分子，说明 TCR 对抗原的识别还依赖于呈递的 MHC 分子，即 MHC 分子具有限制识别的免疫现象。

MHC 限制是指抗原呈递细胞自身必须表达出 MHC 分子才能被 T 细胞识别，并进而对抗原产生免疫应答。由于遗传上的差异，表达的 MHC 分子也有所不同。因此，抗原呈递细胞呈递的 II 类 MHC 分子与抗原肽段形成的复合物不能激活不同种系的辅助性 T 细胞。当 B 细胞表达 II 类 MHC 分子被辅助性 T 细胞识别为自身细胞时，辅助性 T 细胞才能辅助 B 细胞，使之被激活和产生相应的抗体。病毒等侵染体内细胞后，只有当靶细胞产生的 I 类 MHC 分子与抗原肽段结合的复合物呈递出来时，才能被细胞毒性 T 细胞识别，进而释放淋巴毒素来裂解细胞。这些自身 MHC 限制现象，是机体免疫系统对识别抗原产生免疫应答的精细调节的重要手段。由此可见，MHC 在免疫识别中起极为重要的作用。

MHC 在脊椎动物进化中高度保守，不同动物的 MHC 在组成、结构、功能和分布上彼此相似。根据结构和功能可将 MHC 分为 I 和 II 两种类型，I 和 II 类抗原主要以细胞膜镶嵌蛋白的形式存在，也可脱落成为可溶性形式。I 和 II 类抗原都由 α 和 β 两个亚单位组成。

MHC I 类抗原的经典和非经典两种类型。在人类，HLA-I（基因位于人类第 6 号染色体上的主要组织相容性复合体，称为 HLA，代表人类白细胞抗原）类基因家族包括 HLA-A、B、C、E、F、G、H、J 基因位点，其中 HLA-A、B、C 位点所编码的分子被称为经典 HLA-I 类分子，其特点是具有高度多态性和广泛表达于各种有核细胞表面（神经元和滋养层细胞除外）；而 HLA-E、F、G 等位点所编码的分子则属于非经典 HLA-I 类分子，它们的特点是多态性程度较低，而且其蛋白抗原仅存在于某一特定组织。

HLA-E 与其他非经典 HLA-I 类抗原有些不同，它的表达不具有组织特异性，几乎每种组织均有这类抗原表达，而静息 T 淋巴细胞中表达尤多。由于它是滋养层细胞系——JAR 细胞表达的惟一的 HLA-I 类分子，推测 HLA-E 有可能属于管家基因。HLA-G 在某些细胞上有所转录，但表达却只限于滋养层细胞。

二、经典 MHC I 类抗原的选择性表达于滋养层细胞

目前人们对母胎界面胎盘滋养层细胞表面的经典 MHC I 类抗原进行了大量研究，认为在不同滋养层细胞亚型中，MHC I 类分子的 mRNA 及蛋白抗原含量有所不同；而对于某一特定的滋养层细胞，MHC I 类分子的 mRNA 及蛋白抗原含量随妊娠时期的变化而改变。在人妊娠的前三个月，滋养层细胞中经典 HLA-I 类抗原的表达高于足月滋养层细胞。在足月合体滋养层细胞中，经典 HLA-I 类抗原表达极其微弱。妊娠前三个月绒毛滋养层细胞中可检测到 HLA-C 的转录，足月绒毛滋养层细胞中 HLA-C 转录本被 HLA-A 和 B 转录本代替。此外，在绒毛滋养层细胞中，经典 HLA-I 类抗原的 β 链并未折叠形成三级结构，而是以展开状态存在于内质网中，分析原因有可能是翻译后的修饰缺陷所致。IFN γ 处理后，HLA-I 类抗原的 β 链可脱离内质网，以成熟形式出现于细胞

表面。而在羊膜上皮细胞中能检测到所有经典 HLA- I 类抗原存在，绒毛外滋养层细胞中则检测不到经典 HLA- I 类抗原。

经典 HLA- I 类抗原在滋养层的表达具有时空依赖性，因此它对于妊娠的作用很复杂，推测有两个作用。首先，它的表达可以激活 T 淋巴细胞，增强机体的抗感染能力，从而抑制滋养层细胞的过度增生。其次，HLA-C 的表达有可能抑制 T 淋巴细胞和 NK 细胞对异型抗原的杀伤反应。

三、非经典 MHC I 类抗原与母胎免疫

(一) HLA-E 在胎盘的表达

在人妊娠三个月及足月胎盘中，可检测到 HLA-E 的 1.7kb 和 2.7kb 的两个转录产物，体外培养的细胞滋养层和合体滋养层细胞中也检测到这两个转录本的存在，这两个转录本的差别在于 3'末端的 poly A 的数目，但免疫组化实验并未发现这些细胞存在 HLA-E 蛋白，说明这些细胞中存在转录后调控机制，阻碍了 HLA-E 基因的翻译。

近年，利用 N 末端氨基酸显微序列分析实验，在人羊膜上皮细胞检测到 HLA-E 蛋白。以后发现，在恒河猴基因组中也存在 HLA-E 基因，并且这一基因未发生 DNA 甲基化，仍具有较高的转录活性。在人滋养层来源的细胞系 JAR 中，其他 HLA- I 类基因均发生 DNA 甲基化，惟有 HLA-E 基因活跃转录。由此推测，HLA-E 具有重要功能，很可能属于管家基因。

(二) HLA-F 抗原与母胎免疫

关于 HLA-F 在人类胎盘的表达情况所知甚少。利用 RNase 保护分析实验，已在人胎盘中发现它的转录产物，但对于胎盘中何种类型细胞表达这类抗原以及这类抗原在胎盘的功能目前还不清楚。

(三) HLA-G 在母胎界面的表达

利用原位杂交、RNase 保护分析以及 Northern 印迹分析发现，在妊娠前三个月以及足月妊娠妇女的绒毛细胞滋养层、绒毛外细胞滋养层以及羊膜细胞中均有大量 HLA-G mRNA 存在。利用上述研究手段在合体滋养层细胞中未检测到有 HLA-G 转录本，但利用 RT-PCR 技术却检测到该类抗原的 mRNA 存在于合体滋养层，提示 HLA-G 基因在这类滋养层细胞中只有基础的转录而无大量翻译。利用 HLA-G 基因的不同引物进行 RT-PCR 时，在人类滋养层组织中检测到 6 种不同的 HLA-G 基因的转录本，其中 HLA-G1、HLA-G2 和 HLA-G3 编码膜蛋白，以后又发现这三种 HLA-G 膜蛋白在绒毛癌细胞系 JEG-3 以及绒毛外细胞滋养层细胞中共表达。此外，在体外分化的合体滋养层细胞也检测到有少量表达。

免疫沉淀实验表明，人妊娠早期和中期的绒毛外细胞滋养层大量表达 HLA-G 蛋

白，而在妊娠后期其表达量逐渐下降。近年来，随着 HLA-G 基因各种表达产物的单克隆抗体的研制成功，对于 HLA-G 蛋白在胎盘细胞的表达研究得越来越精细。现已知，HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3 等膜蛋白共表达于妊娠早期及中期的绒毛外细胞滋养层中，而绒毛滋养层和合体滋养层并不表达 HLA-G 蛋白。

(四) HLA-G 保护胎儿不被排斥

HLA-G 是绒毛外滋养层细胞中第一个被详细描述 HLA 基因，并且其表达产物是母胎界面含量最多的 HLA 蛋白，由此成为研究的热点。现在已经对 HLA-G 的核苷酸序列和氨基酸序列研究得很清楚，与经典 HLA-I 类抗原相同，有 8 个外显子和 7 个内含子，HLA-G 在 6 号外显子中提前出现终止密码，因而导致 HLA-G 蛋白质分子胞内段短于经典 HLA-I 类分子的胞内段。完整 HLA-G 蛋白质的分子质量仅为 40kDa，而经典 HLA-I 类分子分子质量可达 45kDa。这类抗原特异性表达于细胞滋养层，对于妊娠的维持至关重要，它可保护带有父方同种异体抗原的胎儿免受母体免疫系统的杀伤，具体的保护机制尚不清楚。根据目前的研究，有以下几种推测：①在子宫蜕膜淋巴细胞中 NK 细胞占多数，这些蜕膜 NK 细胞表面存在一种针对 HLA-I 类抗原的抑制型受体 (killer-cell inhibitory receptors, KIRs)。在人类，已发现的 KIR 有四种：NKAT1、NKAT2、NKAT3 和 NKAT4，这些等位基因位于 9 号染色体长臂，均是免疫球蛋白超家族的成员。它们的胞内段高度保守，含有两个可与蛋白酪氨酸磷酸酶 1C (PTP1C) 和 1D (PTP1D) 相连的抑制型位点，该位点在人和小鼠 KIR 上均存在，由 26 个氨基酸组成，并通过与两个蛋白酪氨酸磷酸酶结合而传递抑制信号。HLA-G 是 KIR 的公共配体，通过与 KIR 的结合抑制 NK 细胞的活化。②HLA-G 抗原结合了影响细胞生长和分化的细胞因子如胰岛素、表皮生长因子等，从而抑制了 T 细胞的活化。③HLA-G 转录产物的多样性使得 HLA-G 可以两种形式存在，一种是膜结合蛋白，即以膜上抗原形式存在，另一种则以可溶性蛋白形式分泌到胞外，而可溶性 HLA-G 分子可以介导同种异体反应性的 CTL (细胞毒性 T 淋巴细胞) 的凋亡，从而抑制其杀伤活性。④HLA-G 抗原多态性程度非常低，也就是说胎儿 HLA-G 蛋白与母体 HLA-G 蛋白的差异小，因此 HLA-G 抗原虽不是自身成分，但也不能看成严格的非己成分，减轻了母体免疫系统对滋养层的识别能力。

(五) HLA-G 基因的表达调控

HLA-G 的表达调控主要发生在转录、mRNA 的剪切、翻译以及翻译后的修饰等多个水平。

妊娠早期的绒毛外细胞滋养层细胞中，HLA-G 大量转录和翻译，并将翻译后蛋白转运至细胞表面。比较 HLA-G 基因与经典 HLA-I 类基因的调控区发现，HLA-G 基因缺少在经典 HLA-I 类抗原基因中存在的顺式作用元件 KB 区、干扰素作用区以及增强子 B，HLA-G 基因也不含有经典 HLA-I 类抗原调控序列中的负调控元件。有实验证明，将 5.7kb 和 6.0kb 的 HLA-G 基因转入小鼠后，则这两种转基因小鼠均在滋养层细胞和

胎盘间充质细胞中表达 HLA-G, 但 6.0kb 的 HLA-G 转基因小鼠中 HLA-G 在胚外组织表达的效率远高于 5.7kb 的 HLA-G 转基因小鼠, 说明在 HLA-G 基因上游 5.7~6.0kb 这一段约 250bp 片段含有重要的正调控序列, 这一段序列可能属于顺式作用元件。

在绒毛细胞滋养层, HLA-G 基因转录和翻译, 但翻译后的蛋白不能被转运至细胞表面, 说明在这类细胞中, HLA-G 的调控主要在翻译后的修饰水平。

在合体滋养层细胞, 只有高灵敏度的 RT-PCR 才能检测到 HLA-G 的转录产物, 但没有翻译成为蛋白质, 推测在这类细胞中 HLA-G 基因的转录被抑制。这类细胞中的 HLA-G 基因并未发生 DNA 甲基化, 因此细胞中有可能缺乏 HLA-G 基因转录所必须的反式作用因子。此外, 合体滋养层细胞中的染色体结构不同于细胞滋养层, 这也可能是 HLA-G 基因转录被抑制的原因之一。

四、MHC II 类抗原在胎盘细胞的表达

MHC II 类基因仅在活化的 T 细胞以及巨噬细胞、B 细胞、树突状细胞、胸腺上皮细胞等抗原提呈细胞中表达, 而且其表达水平可依细胞发育阶段不同而改变。例如, 未成熟 B 细胞不表达 MHC II 类抗原, 仅在成熟 B 细胞中表达。当成熟 B 细胞受到抗原刺激进一步分化为浆细胞时, MHC II 类抗原又停止表达。通过对小鼠、大鼠和人胎盘的研究发现, 在正常妊娠中滋养层 MHC II 类抗原的表达被完全抑制, 而习惯性流产妇女的胎盘滋养层细胞中可检测到大量 MHC II 类抗原的表达, 说明 MHC II 类抗原在胎盘滋养层被抑制是母胎之间免疫调控的重要机制, 对于妊娠的成功必不可少。

IFN γ 是 MHC II 类抗原的主要诱导因子, 可以使许多 MHC II 类抗原阴性细胞表达该类抗原。体外研究证实, IFN γ 不能诱导胎盘来源的细胞表达 MHC II 类抗原, 但能诱导某些胎盘细胞表达 MHC I 类抗原。将不同剂量的 IFN γ 注入小鼠后, 高剂量的 IFN γ 可诱导母体蜕膜细胞大量表达 MHC II 类抗原, 然而却完全不能诱导胚胎来源的巨细胞、成胶质细胞和迷路滋养层细胞等细胞表达这类表面抗原。以后又证实, 大鼠胎盘中不表达 MHC II 类抗原, 而且 IFN γ 及 DNA 甲基化抑制剂——5-氮胞苷均不能诱导其表达。但是也有报道指出, 在胎盘的不同类型细胞中, 人的细胞滋养层细胞、小鼠的成胶质滋养层细胞等细胞类型在 IFN γ 的刺激下能被诱导表达 MHC II 类抗原。

在鼠类胎盘成胶质滋养层细胞中检测到 IFN γ 受体的存在, 而且这类细胞可在离体或在体情况下被 IFN γ 诱导表达 MHC I 类抗原, 说明 IFN γ 受体是功能性受体。Peyman 等认为滋养层细胞不能被 IFN γ 诱导表达 MHC II 类抗原并非由于这些细胞不具有 IFN γ 受体。Chen 等提供了妊娠中期后的成胶质细胞膜表面存在 IFN γ 受体的直接证据。最近有报道指出, 将外源的 MHC II 类抗原 α 亚单位和 β 亚单位基因转染到滋养层细胞后, 滋养层细胞表面可表达 MHC II 类抗原。这些结果说明, IFN γ 不能诱导滋养层中 MHC II 类抗原的表达, 其具体机制尚不清楚。彭景蟾等以兔为实验材料, 利用 RT-PCR 方法研究了妊娠不同时期的胎盘滋养层中 MHC II 类抗原的表达情况。在妊娠 18 天, 滋养层细胞低水平表达 MHC II 类抗原, 妊娠 26 天时表达量显著升高。此外, 在妊娠不同时期, 孕兔胎盘滋养层细胞对 IFN γ 处理的反应不同。在妊娠 18 天, IFN γ 不能诱导其表达 MHC II 类抗原。妊娠 26 天时, 大剂量 IFN γ (10 万 IU) 显著诱导滋养层表

达 MHC II 类抗原。这些结果提示，在妊娠维持过程中 MHC II 类抗原的表达受到抑制，即使 IFN γ 也不能诱导其表达，分娩时滋养层细胞突然大量表达 MHC II 类抗原，从而激活母体的免疫系统，并在其他机制的协同作用下，将胎儿排出体外。

五、MHC II 类抗原表达的调控机制

滋养层细胞中，MHC II 类抗原表达的调控主要发生在转录水平上，目前已鉴定出高度保守的启动子序列以及与之作用的顺式作用元件及反式作用因子。MHC II 类基因启动子含有几个保守 DNA 序列，分别称为 X、Y、Z 盒，这三个序列对于该基因的组成型表达以及 IFN γ 诱导的基因表达起重要作用。与顺式作用元件相互作用的反式作用因子业已鉴定出以下几种：①与 X 盒相互作用的因子有 X 盒作用转录因子 1-5 (RFX₁₋₅)、X 盒作用转录因子激活蛋白 (RFX .AP)，它们与 X 盒相结合后调节 MHC II 类基因转录的起始阶段，其中关于 RFX₁₋₄ 的作用尚不清楚。RFX₅ 对 MHC II 类基因转录起激活作用。X 盒抑制因子 1 (NFX .1) 是一种新发现的 X 盒结合蛋白，是 MHC II 类基因转录的强阻遏子。②Y 盒可与几种广泛存在的 DNA 结合蛋白相结合，Y 盒抑制因子 (NF-Y) 即是其中之一，它是 MHC II 类基因转录所必需的，通过稳定 X 盒结合蛋白而起作用。Y 盒结合蛋白-1 (YB-1) 是冷休克区域因子多基因家族中的一员，对 MHC II 类基因起负调控作用，其过高表达可阻遏 IFN γ 诱导的 MHC II 类基因表达。

MHC II 类基因的调控因子除 DNA 结合蛋白外，还鉴定出一非 DNA 结合蛋白——MHC II 类抗原基因反式激活因子 (class II MHC gene transactivator, CII TA)。CII TA 的转录与 MHC II 类基因的转录密切相关。如 MHC II 类基因转录时，必有 CII TA 转录子存在。若 CII TA 的转录和表达受阻，则 MHC II 类基因不转录。这说明 CII TA 是 MHC II 类基因转录的必需因子，但 CII TA 并非 DNA 结合蛋白。CII TA 可与 MHC II 类基因转录激活因子 RFX₅ 相互作用，通过激活 RFX₅ 进而激活 MHC II 类基因的转录。哺乳动物滋养层细胞中的 CII TA 不表达，IFN γ 也不能诱导其表达。将带有 CII TA 外源基因的质粒转染至滋养层细胞后，会导致滋养层细胞中 MHC II 类基因部分转录。这说明 CII TA 在滋养层细胞的缺失是 MHC II 类基因不表达的原因之一。1997 年 Murphy 等利用凝胶阻滞法从滋养层细胞的 MHC II 类基因启动子中鉴定出一段负调控序列 (NRE)，这一序列位于转录起始点上游 -839 ~ -828bp，为 5'-TTTTCCAAATTT-3'。它可与核中某一负调控序列结合蛋白结合，抑制滋养层中 MHC II 类基因的转录，而对负调控序列结合蛋白的结构和性质等尚不清楚。

MHC 在滋养层细胞中的表达与否对于正常妊娠至关重要，是母胎之间免疫调控的重要因素。经典 MHC I 类抗原在滋养层细胞中是否表达尚存疑问。非经典 MHC I 类抗原在滋养层细胞表达且其表达可保护胎儿不被母体排斥。MHC II 类抗原在妊娠维持过程中不表达，若表达则会导致流产。

六、细胞因子网络调节

随着生殖机理研究的深入，人们逐渐认识到生殖过程不仅受神经系统和内分泌系统

的影响,而且还受到细胞因子网络的调节。细胞因子是激活的免疫细胞分泌的可溶性物质,能够通过协调母体免疫反应的平衡来保护着床的胚胎。如 IFN γ 是具有抗病毒活性的细胞因子,能够刺激巨噬细胞和激活自然杀伤细胞。在许多具有内分泌功能的组织中,IFN γ 能够诱导 MHCII 类抗原和促进 MHC I 类抗原。同时 IL-2 和 IFN γ 都可促进自然杀伤细胞的活性,并可能导致胚胎受到母体的免疫伤害。因此,细胞因子能够影响胚胎的存活。1993 年 Wegmann 提出了母胎关系中细胞因子的双向免疫调节学说,认为妊娠期间母体免疫系统和生殖系统之间具有双向作用机制。由于 IL-2、IFN γ 和 TNF 等 Th1 型细胞因子对妊娠的维持是有害的,因此妊娠早期的胚胎能够通过 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-11 等 Th2 型细胞因子的局部分泌(特别是 IL-10 的分泌),来保持胚胎生长发育的最适状态。Th1 型细胞和 Th2 型细胞能够相互作用。IL-10 能够抑制 Th1 型细胞因子的合成,而 IFN γ 则抑制 Th2 型细胞的增殖。要使胚胎免受与细胞免疫相关的细胞毒性的作用,关键在于 Th1 反应的抑制。妊娠早期的母体子宫内,IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10 的分泌水平相对较高,而 IL-2、TNF 和 IFN γ 的分泌水平较低,说明抑制细胞免疫反应的细胞因子发挥主导作用。随着着床过程的完成和胚胎的继续发育,IL-2、TNF、IFN γ 等促进细胞免疫反应的细胞因子的分泌量逐渐增加,到足月分娩时其分泌量迅速增加,并占主导地位,此时可激活 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞,因而使母体的细胞免疫反应迅速提高,最后强烈的免疫排斥反应,造成胎儿胎盘从母体子宫壁上的剥离,使胎儿顺利地娩出。

虽然胚胎和妊娠母体在免疫学上是不相容的异体,但在人类和哺乳动物的正常妊娠过程中,母体子宫和胚胎却能相互容忍,使个体得以繁殖,物种得以延续。妊娠建立过程中,母体和胚胎的免疫相容性关系是免疫反应中一个特殊而又具有重要意义的现象。作为同种异体移植物的胚胎,在母体子宫内能耐受母体的免疫进攻而不被排斥,其中妊娠母体的免疫系统起着至关重要的作用。

胚胎抗原的表达导致母体免疫系统的反应性增强,造成哺乳动物的胚胎在妊娠早期有相对较高的死亡率。但大多数妊娠中,胚胎不仅没有因为母体的免疫进攻而死亡,相反却能够正常生长发育及着床,直至分娩。这说明妊娠母体和胚胎之间必然有特殊的免疫调节机制协调着母体和胚胎间的免疫对抗关系。这种调节机制究竟如何?Beer 的研究结果认为,哺乳动物子宫液中含有免疫抑制大分子,这种大分子能够改变妊娠母体免疫系统的细胞免疫反应,保护胚胎不被免疫排斥。Bell 研究人子宫内膜和蜕膜后发现,子宫内膜能够分泌妊娠特异性蛋白。该蛋白不仅与蜕膜化相关,而且具有局部母体免疫反应的作用。众多的研究证明,妊娠后子宫和胚胎分泌物所产生的局部免疫调节是胚胎不被母体免疫排斥的主要机制。妊娠过程中母体和胚胎界面的关系十分复杂,影响母体和胚胎界面免疫调节的因素也很多。Psychoyos 强调母体的主导作用,认为着床的顺利与否完全依赖于孕酮和雌激素对子宫的调节,使子宫处于一种接受状态。Heap 等则认为胚胎的分泌物对子宫内膜具有重要的调节作用。尽管看法不一,但都认为母体和胚胎界面的免疫关系是一个相互作用的统一体。

第三节 妊娠期免疫

一、细胞因子与着床

细胞因子在胚泡着床过程中起着重要的作用，可促进胚胎细胞生长，参与调节胚胎细胞的正常发育和分化；可促使母体子宫内膜组织增殖分化，使之形成接受态窗口；可介导胚胎-母体子宫之间的信息交流和识别，限制胚胎组织对子宫组织的深层侵蚀；可促使母体子宫组织内微血管系统的发生与发育，有利于形成胎盘；并可作为信号分子参与妊娠过程中的黄体维持。

在胚泡着床阶段，母体和胚胎通过合成和分泌诸多的细胞因子，动态地调节子宫的细胞免疫反应，并抑制胚胎抗原物质的表达，在子宫中为胚胎营造了一个局部的免疫低下的环境，达到母体子宫免疫耐受性和胚胎免疫刺激性的动态平衡状态，使胚胎免遭母体的免疫排斥。

1. 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF α)

近年的研究证实，TNF α 在生殖系统的卵巢颗粒细胞和卵泡膜细胞、子宫腔上皮、腺上皮、子宫肌层和着床后的胎盘滋养层细胞中均有表达。TNF α 是典型的 Th1 细胞因子，有明显的促进细胞免疫反应的活性。因此，有人认为它是一个不利于妊娠的细胞因子。TNF α 能引起子宫局部炎症反应。TNF α 分泌性的 T 细胞过量或活性偏高，可造成流产。在易发流产的 CBA $\times$ DBA/2 小鼠中，子宫局部的 TNF α 是增加的。

TNF α 在子宫局部的另一作用是能诱导胚胎表达 MHC 抗原。Hunt 等人认为，TNF α 是哺乳动物中 MHC I 类抗原的诱导因子之一，可以诱导滋养层细胞中 HLA-G mRNA 的表达。与此同时，TNF α 还可以诱导滋养层中 HLA-II 类抗原的表达，这可能是 TNF α 引发流产的之一。有实验报道，TNF α 能降低鼠胚胎着床率。体内 IL1 β 和 TNF α 的高水平表达可使移植胚泡的着床成功率急剧下降。

2. 转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF β)

TGF β 具有多种生物活性，是较强的免疫调节因子，能增强单核细胞的功能，抑制 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的增殖，抑制胸腺细胞的增殖，以及抑制自然杀伤细胞。TGF β 能拮抗 IL-1、IL-2 和 IL-3 的作用，还能拮抗 TNF α 和 INF γ 等免疫调节因子，从而能够抑制免疫细胞的功能。TGF β 对胚泡着床及妊娠过程中的调节作用既可通过抑制胚胎单核滋养层细胞的增殖，诱导其向合体滋养细胞分化，同时又有促进胚胎滋养层细胞中 HLA-G 表达的作用。

3. 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)

EGF 在生殖过程中具有多种调节功能。它可抑制促卵泡激素 (FSH) 分泌，抑制孕酮和雌激素合成，以及引起卵泡闭锁等。在妊娠过程中，经 EGF 抗体处理后，体内 EGF 水平低的妊娠小鼠的胚泡着床率显著降低。EGF 可能是促进胚泡与子宫内膜的黏

附。EGF 对小鼠胚泡的尿激酶型纤溶酶原激活因子 (uPA) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 有促进作用。MMP-9 与 uPA 有利于胚泡侵蚀子宫内膜上皮组织的细胞间质, 促进胚泡在子宫的着床。EGF 具有促进细胞滋养层细胞向合体滋养层细胞分化和促进 hCG β 亚单位合成的作用。

4. 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)

在妊娠早期, 人和小鼠的子宫内膜受激素诱导后均可以合成和分泌 M-CSF。妊娠小鼠子宫内的 M-CSF 浓度比非妊娠期高 1000 多倍。胚泡滋养层细胞不仅有高浓度的 M-CSF, 其细胞膜上还有 M-CSF 受体表达。M-CSF 可使人胚泡滋养层细胞的纤黏连蛋白 (fibronectin) 和其受体整合素 $\alpha 5$ ($\alpha 5$ integrin) 的含量增加 2~3 倍。实验表明, M-CSF 可明显促进胚泡与子宫内膜之间的黏附。敲除 M-CSF 基因的小鼠中, 着床率明显降低, 胚胎的存活力亦明显减弱。

5. 白细胞介素 (interleukin, IL)

(1) IL-1 β

在免疫激活中发挥重要作用, 能增强免疫活性, 广泛存在于胚胎和子宫组织, 其受体在子宫组织中亦有表达。近年来的研究证实, IL-1 β 在妊娠过程中具有促进着床, 抑制蜕膜化, 参与母体对胎儿的免疫识别等重要作用。Simon 等报道, 在人和小鼠的子宫内膜上皮细胞具有 IL-1 β 的结合位点和 IL-1 的 I 型受体, 滋养层也能够表达 IL-1 β 。关于 IL-1 β 在妊娠过程中的作用, 有不同的实验结果报道。有人在小鼠桑椹胚就检测到 IL-1 β 受体 mRNA 的表达, 其受体拮抗物 mRNA 在 8 细胞胚胎也开始表达。另有人认为着床前胚胎中没有 IL-1 β 受体, 故 IL-1 β 在着床过程中对胚胎并不直接发挥调节作用。

Fakin 等认为, IL-1 β 对早期胚胎有毒性作用, 注射 IL-1 β 可阻断小鼠妊娠过程。也有资料报道, IL-1 β 对妊娠过程具有促进作用。由于 IL-1 β 作用的多向性和作用机制的复杂性, IL-1 β 对生殖过程究竟是有利还是有害, 目前尚未达成共识。

近来, 彭景蟾等采用 RT-PCR 检测了大鼠妊娠不同时期子宫和胎盘中 IL-1 β mRNA 的表达变化。IL-1 β mRNA 在妊娠早期和妊娠中期 I 子宫中的表达量显著低于妊娠中期 II 和分娩前期, 胎盘中 IL-1 β mRNA 的表达则在妊娠中期 I 显著高于妊娠中期 II 和分娩前期。这表明妊娠不同时期的子宫和胎盘中 IL-1 β mRNA 的表达存在着动态变化, IL-1 β 对维持大鼠正常妊娠可能发挥一定作用。

(2) IL-2

在免疫系统中, IL-2 在维持 T 细胞的持续生长过程中起着重要作用, 可促进细胞毒细胞前体分化为细胞毒细胞, 并增加其杀伤效应; 可促进 B 淋巴细胞的生长和分化; 还可增强 NK 细胞和巨噬细胞的功能。IL-2 是由 Th1 细胞分泌的, 是在机体免疫应答中起关键作用的细胞因子, 具有破坏免疫耐受性的作用。一般认为, IL-2 是一个对妊娠过程“不利”的细胞因子。在人类, 妊娠第 2 周出现的免疫抑制状态中, 子宫蜕膜组织中的 IL-2 水平下降。Croy 等的实验表明, 子宫中 NK 细胞的分化成熟并不需要 IL-2, 提示 IL-2 在子宫局部细胞免疫功能调节中的作用与在机体免疫中的作用是不同的。此外, 妊娠中存在免疫抑制或耐受, 在这一抑制性免疫反应过程中, 机体细胞的免疫增强

因子 IL-2 仍然与 Th2 细胞因子一起表达, 提示 IL-2 可能在妊娠过程中起着某些目前尚不清楚的调节作用。

(3) IL-4

对多种免疫细胞具有激活作用, 在生殖过程中具有多种促进作用。实验报道, 正常妊娠外周血中的 IL-2 和 IFN γ 浓度降低, 而 IL-4 则升高。在一些机制不明的习惯性流产病人的子宫内膜中, IL-4 的量却减少。有人认为, IL-4 具有抗流产作用。流产配型小鼠品系 CBA $\times$ DBA/2 中抗炎症细胞因子 IL-4 的浓度比正常妊娠配型 CBA $\times$ BALB/C 中低, 而 IFN γ 等炎症因子的局部浓度则增加。

(4) IL-6

是一种调节免疫应答和造血作用的多肽细胞因子。对 IL-6 在妊娠过程中的作用存在较大争论。有报道证实, 人的胚胎中有 IL-6 表达, 正常妊娠状态下蜕膜细胞持续分泌 IL-6。同时, IL-6 具有促进滋养层细胞分泌绒毛膜促性腺激素 (CG), 提示 IL-6 对妊娠过程具有促进作用。但另有资料报道, IL-6 对妊娠过程可能起抑制作用。体外培养实验显示, 雌激素和孕酮均可抑制子宫内膜上皮及基质细胞产生 IL-6。实验还发现, IL-6 明显地促进子宫内膜组织的抗原提呈活动, 进而引起对胚胎的免疫反应, 引起早产。IL-6 基因敲除后, 在这些小鼠中没有明显的妊娠异常现象, 表明 IL-6 在妊娠过程中不是必需的。

(5) IL-10

IL-10 的主要免疫学功能是抑制部分 T 细胞的增殖及有关细胞因子合成, 协同 IL-2 活化的胸腺淋巴细胞的分化成熟, 以及促进 B 细胞生长。IL-10 是主要的 Th1 抗炎症细胞因子, 被认为是对妊娠起保护作用的细胞因子。人正常妊娠时外周血中 IL-10 的浓度比非妊娠时明显增高, 且与妊娠时间呈正相关, 分娩时达最高。IL-10 在原因不明的习惯性流产妇女的子宫内膜中的量减少。

6. 干扰素 (interferon, IFN)

IFN 是一组在病毒或干扰素诱导剂的作用下, 由细胞基因组调控产生的一种具有多种功能的诱导蛋白。正常细胞一般不自发产生干扰素, 只存在合成干扰素的潜能, 干扰素基因处于被抑制的静止状态。在诱导剂的激发下, 干扰素基因去抑制而获得表达。具有免疫反应性的干扰素可分为两大类型, 即 I 型和 II 型, I 型主要有 α 和 β ; II 型为 IFN γ 。在 DNA 水平上, IFN γ 基因与 IFN α β 基因无同源性。人和小鼠的 IFN γ 在 DNA 水平上有 65% 左右同源性, 在氨基酸水平的同源性只有 40% 左右。近年来的研究表明, 干扰素在哺乳动物生殖过程中起重要的调节作用, 如反刍动物母体识别妊娠的信号是一类独特的 I 型干扰素, 为干扰素 τ 。妊娠早期人滋养层组织、恒河猴桑椹胚以及妊娠中期的胎盘组织中均存在干扰素。

IFN γ 对母体子宫局部免疫微环境的影响一直受到人们的高度关注。人妊娠时子宫蜕膜、胎盘合体滋养层细胞和霍夫包尔氏细胞 (Hofbauer cell) 均可以合成 IFN γ , 其作用在于提高胎盘对于感染的抵抗能力, 影响 MHC 为基础的母胎之间的免疫调控, 并调控胎盘的生长和发育。例如, 它可以促进 MHC I 类抗原的表达, 对于人白细胞抗原-G (HLA-G), IFN γ 通过诱导和促进其 mRNA 在滋养层细胞内的表达来实现。除此之外,

IFN γ 还可以促进人和大鼠 MHC II 类抗原的表达。研究表明, IFN γ 增强 MHC I 类抗原的表达主要是通过增强抗原加工过程中转运分子 TAP1 和 TAP2 的基因转录, 而不是增强抗原分子本身或 $\beta 2$ 微球蛋白 mRNA 的转录。例如, 临产胎盘中细胞滋养层和合体滋养层细胞表面缺乏 HLA I 类抗原, 就是因为缺乏转运蛋白而造成的。滋养层细胞有许多机制可防止 HLA-A、HLA-B、HLA-C 等 I 类抗原表达, 这些机制在临产绒毛细胞滋养层细胞可以被 IFN γ 所逆转, 结果使双亲的 HLA-A、HLA-B 多型性抗原出现于滋养层细胞表面。事实上, 在妊娠初期 IFN γ 的表达量很低, 到妊娠后期逐渐增高, 这对于早期妊娠过程中避免胚胎主要组织相容性抗原过量表达是适宜的。IFN γ 选择性的使胚胎细胞表达一些组织相容性抗原可能有助于机体调动 T 细胞的细胞毒性作用, 防止病毒从母体扩散到子宫。除此之外, IFN γ 还具有抑制内膜上皮细胞增殖的作用。

IFN γ 能够诱导子宫蜕膜中巨噬细胞活化, 产生 NO 等诱发流产的物质。因此, 注射 IFN γ 可以造成妊娠小鼠流产。给家兔注射 IFN γ 也将妊娠率降低 80% 左右, 而给 CBA $\times$ DBA/2 配型的妊娠小鼠注射 IFN γ 可进一步将此模型的流产率提高 75%。如果给 CBA $\times$ DBA/2 配型的妊娠小鼠注射 IFN γ 抗体, 能够有效地制止流产。

哺乳动物胎盘中具有大量的 IFN γ 受体。小鼠在妊娠第 12 天时, 滋养层细胞首次出现 IFN γ 受体的 mRNA。IFN γ 受体在妊娠第 12~14 天时位于成胶质滋养层细胞区域, 到妊娠第 18 天时分布于成胶质滋养层细胞及迷路滋养层细胞。整个妊娠过程中, 在滋养层巨细胞中未检测到受体存在。由此可见, IFN γ 受体在小鼠胎盘中的表达具有时空依赖性, 这很可能是调控 IFN γ 作用于妊娠的机制之一。

在妊娠早期, IFN γ 能够诱导少量合体滋养层细胞表达 MHC II 类抗原, 促进合体滋养层细胞凋亡, 以及降低血清中孕酮的浓度。诱导表达的 MHC II 类抗原能够激活母体蜕膜的淋巴细胞。活化的淋巴细胞一方面削弱母体子宫内的免疫抑制, 另一方面诱发更多的合体滋养层细胞凋亡。合体滋养层细胞凋亡增多必然导致胎盘结构破坏, 使蜕膜淋巴细胞侵入胎儿, 对胎儿产生细胞毒作用, 同时降低孕酮的分泌。孕酮是母体子宫内非特异性免疫的调控因子, 其浓度的降低势必增强子宫内的非特异性免疫, 破坏母胎局部免疫调控。这三个方面既直接受 IFN γ 影响, 又相互作用, 来共同影响母胎之间的免疫平衡, 最终导致妊娠失败。此外, IFN γ 对妊娠中期和分娩前期的合体滋养层细胞没有明显影响, 说明在妊娠早期合体滋养层细胞对外界因素的刺激较中期和后期敏感, 这可能是妊娠早期较易发生流产的原因之一。

7. Th1/ Th2 细胞因子理论

胚胎持续的发育与分化会不断要求与妊娠过程相关的细胞因子随之发生变化。换言之, 子宫局部细胞因子网络会因胚胎发育及分化不断深入, 以及因母体妊娠生理状况的变化而失去平衡。因此, 需要子宫局部的细胞因子网络系统不断地在神经及内分泌系统等协调与配合下建立新的动态平衡。如果来自外源(病毒、细菌感染等)或内源的(遗传性表达异常)因素严重地破坏了该系统的稳态, 当其程度超出母体生殖生理系统的有效调节限度而无法建立新的平衡时, 将会导致着床失败、胚胎吸收、流产、早产及胚胎发育异常等。

在妊娠过程中, 有些细胞因子的作用较为单一, 对整个妊娠的作用自始至终是一致

的,例如 LIF 始终表现为促进作用。然而,更多的细胞因子可能具有多种作用,或多种因子能够协同行使一种功能。从而使整个细胞因子网络系统显得错综复杂。诸如 IL-1 β 、TGF β 、IFN γ 等在妊娠过程中就属于具有多种活性功能的细胞因子。同时它们之间具有相互交叉的功能。按分泌细胞因子的淋巴细胞的异同将子宫局部的细胞因子分为两类,即由 1 型辅助 T 淋巴细胞 (type 1 T-helper) 分泌的细胞因子称 Th1 细胞因子,由 2 型辅助 T 淋巴细胞 (type 2 T-helper) 分泌的细胞因子称为 Th2 细胞因子。Th1 分泌产生的 IL-2、IL-12、TNF α 、IFN γ 、TNF β 、IL-3 等炎性细胞因子参与细胞免疫过程。而 Th2 分泌产生的 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、CSF1 和 GM-CSF 等细胞因子辅佐 B 细胞产生抗体,促进抗体介导的体液免疫反应。在正常妊娠状态下,母体的整体免疫系统中体液免疫反应增强,而细胞免疫反应降低。在异常妊娠过程中则相反。许多实验已证实,促进和维持胚胎生长与发育的细胞因子都是能增强体液免疫的 Th2 细胞因子家族的成员,而不利于妊娠的细胞因子均是与细胞免疫相关的 Th1 类细胞因子。胚胎可使 Th1 细胞因子分泌水平下降,而使 Th2 细胞因子的分泌水平显著增加。调节局部的有利与有害的细胞因子间的动态平衡可使胚胎免受母体免疫系统的排斥。

Th1/ Th2 两类细胞因子除以细胞和体液免疫各对妊娠过程发挥作用外,这两类细胞因子之间还相互作用及相互制约。如妊娠初期,IL-4 和 IL-10 等 Th2 细胞因子在抑制 Th1 细胞因子产生的过程中逐渐处于优势分泌,使子宫局部选择性地抑制了 Th1 细胞因子介导的细胞免疫炎症反应,形成局部的免疫耐受环境。到了妊娠后期,IFN γ 等 Th1 细胞因子逐渐摆脱受抑制的状态,强烈的细胞免疫活动促使子宫采取主动机制把胎儿娩出。当然这一观点也存在不足之处,它忽略了妊娠全过程中胚胎的不断发育和分化会对包括细胞因子在内的环境条件的动态变化提出的新要求。例如,在妊娠早期持续大量表达的 INF α 、IFN γ 、IFN β 等细胞因子在妊娠早期及中期的作用。此时,IFN γ 不能诱导子宫内膜及滋养层细胞表达 MHC II 类抗原。这用 Th1/ Th2 理论是无法解释的。由于 Th1/ Th2 理论是简单地以两种 T 淋巴辅助细胞划分,故无法把所有在妊娠子宫局部存在的和由胚胎分泌的细胞因子考虑在内。这些都是有待进一步研究的问题。妊娠过程中细胞因子的作用是复杂的、多样的。有人试图根据细胞因子对妊娠的结局影响,将妊娠时期子宫局部环境的细胞因子分为两大类,一类是妊娠破坏因子 (harmful cytokine),另一类是妊娠保护因子 (beneficial cytokine)。

二、子宫内膜与免疫

在围着床期,子宫环境发生了一系列变化,使胚泡的发育与子宫的分化达到同步,以利于着床。调节子宫内膜的生理性变化主要是通过类固醇激素、细胞因子和黏附分子网络等的协调作用来实现的。在着床前期,激素使子宫内膜细胞产生 CSF-1、GM-CSF 和 TNF α 等因子。这些因子对巨噬细胞有趋化作用,使着床前期含有丰富的巨噬细胞。巨噬细胞和其他子宫内膜细胞可产生一系列炎症型细胞因子,如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-7 和 TNF α 等,使内膜出现类炎症反应,而有利于胚胎着床。类固醇激素同时还可直接或通过产生一系列生长因子,如 EGF (表皮生长因子)、肝素结合样表皮生长因子 (heparin binding-epidermal growth factor, HB-EGF)、TGF (转化生长因子)、IGF

(胰岛素样生长因子)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 和血小板衍化生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 等, 促进胚胎细胞的增殖、分化、移行以及早期脏器的发生及形成。

子宫作为半同种移植物——胎儿的容受器官, 在整个妊娠过程中发生了一系列复杂的免疫调节反应。子宫局部免疫因素的调节直接地影响着胚胎的着床及发育。同时, 子宫内膜的免疫调节功能也经历着周期性的变化。众多研究表明, 在正常妇女子宫内膜中的 T 淋巴细胞亚群发生周期性变化。在排卵期中, 抑制性 T 淋巴细胞 (Ts) 所占比例增加, 而在黄体期减少。辅助性 T 淋巴细胞 (Th) 在月经周期中则无规律性变化。在原因不明的习惯性流产的妇女的子宫内膜中, 辅助性 T 淋巴细胞所占比例明显高于有生育力的正常妇女。上述资料提示, 子宫内膜中 T 淋巴细胞亚群的周期性变化对胚胎的着床可能起重要作用。

围着床期子宫内环境出现的适应性变化使胚泡的发育与子宫内膜的分化相同步, 以利于着床。在透明带包被的胚胎表面, 并不能表达足够的抗原。在胚胎发育的早期阶段, 其卵裂球和胚泡内存在小鼠 MHC 的产物, 包括 I 级抗原、小 H 抗原、F₉ 抗原和精子膜抗原, 而无 II 级抗原。有资料表明, 着床前的胚泡具有某种免疫抑制作用。体外实验证明, 小鼠的胚泡在体外可阻止 Tc 细胞的增殖和活化。但过度的免疫抑制亦不利于胚胎的着床。动物实验表明, 如给着床前的妊娠母兔由肌肉大量注射泼尼松 (免疫抑制剂), 可使着床胚胎数明显减少。近年来的研究证实, 着床前的子宫内膜中含有丰富的巨噬细胞, 它与其他子宫内膜细胞均可产生一系列细胞因子使子宫内膜出现类炎症反应, 而有助于着床。Baranao 等发现, 着床前的胚胎已具备合成和分泌 IL-1 的能力, 其合成能力与胚胎着床的成功与否呈正相关。胚胎培养液中高浓度的 IL-1 α 和 IL-1 β 预示着胚胎着床成功的能力显著增强, 说明 IL-1 可影响胚胎的着床。

蜕膜是母体免疫系统与胚胎接触最为密切的部位。胚胎抗原被蜕膜中的抗原特异性淋巴细胞识别后, 可产生免疫应答。然而在正常妊娠状态下, 蜕膜产生的这种免疫应答不但没有对胎儿产生免疫排斥反应, 相反, 对妊娠起到促进和支持作用。有人提出蜕膜具有免疫学作用。近年来妊娠免疫的相关结果也支持这一观点。蜕膜在妊娠过程中是免疫反应异常活跃的部位之一, 在胚胎抗原的刺激下, 蜕膜形成了妊娠期独有的蜕膜免疫微环境 (decidual immunological microenvironment)。蜕膜中的骨髓源性白细胞是其免疫细胞成分。CD13 和 CD10 在蜕膜基质细胞上的表达进一步证实了这一观点。同时有许多研究表明, 蜕膜的每种细胞成分均可分泌多种细胞因子, 而一种细胞因子也可由多种蜕膜细胞所分泌。

胚胎着床是一个复杂的细胞间相互作用的过程。着床期的胚胎已不能表达 MHC 抗原。同时, 胚胎被蜕膜组织包裹后也起到了保护作用。动物实验发现, 在大鼠着床期开始后 6~12h 内, 在子宫肌层和着床部位附近的内膜即有很多巨噬细胞出现。在着床部位的蜕膜周围虽有很多巨噬细胞, 但在蜕膜组织内部却没有巨噬细胞。而且, 在蜕膜组织内部也没有淋巴管。上述资料提示, 蜕膜组织介于胚胎和母体之间, 起到免疫保护作用。妊娠过程中, 胎儿与母体间存在复杂的免疫调控关系, 蜕膜作为母体与胎儿间的直接接触面, 是发生和影响免疫效应的重要部位。排卵及着床过程是一复杂的, 由多种免疫组分参与的生理过程。对于这一生理过程的调节机制目前仍有待于进一步研究。

第四节 病理妊娠与免疫

近年来,随着免疫学尤其是生殖免疫学研究的进展,逐渐认识到正常妊娠是一种特殊类型的外周免疫耐受。这种耐受遭破坏则会导致流产、妊娠高血压综合征等病理妊娠。病理妊娠中免疫因素所起的作用受到越来越多的研究者的关注。

哺乳动物子宫与胚胎之间的相互协调作用是胚胎着床和维持妊娠的关键,母胎界面免疫微环境是否正常直接影响妊娠结局。研究表明,妊娠期蜕膜中含有大量的免疫活性细胞,主要包括大颗粒淋巴细胞(LGL)、巨噬细胞以及T细胞等三类,这些细胞的种类和数量对妊娠的维持至关重要。近来有学者提出蜕膜局部的细胞因子网络学说,认为妊娠后上述免疫活性细胞在种类、数量以及功能等方面都发生了变化,并分泌多种细胞因子,主要分为Th1型(包括IL-2、IFN γ 、TNF α 等)和Th2型(包括IL-4、IL-10等)。正常情况下,Th1/Th2处于相对平衡状态,构成了蜕膜局部细胞因子网络。如Th1型免疫系统及其相关因子被抑制,Th2型免疫增强及其相关因子在蜕膜局部的优势表达,有利于维持正常妊娠。反之,将导致流产等病理妊娠结局。如用适当剂量的TNF α 干预妊娠过程,可导致孕小鼠的胚胎损失率增加,而其相应的拮抗剂则可降低胚胎损失率。此外,通过纠正母胎交界面Th2型细胞因子(如IL-4、IL-10等)的缺失状态,也可以降低孕鼠胚胎的损失率。因此,目前认为,蜕膜免疫微环境在调节妊娠的各个生理过程(包括胚胎着床、胚胎生长、胎盘的发育和分娩等)中都起着至关重要的作用。下面主要分述自然流产、妊娠高血压综合征两种病理妊娠中免疫方面的研究进展。

一、自然流产

自然流产指人妊娠28周以前、胎儿体重在1000克以内的妊娠终止,发生率为15%~20%。如自然流产连续发生2次或2次以上,则称反复性流产,发生率为1%。若连续发生3次或3次以上,称为习惯性流产。近来研究表明,反复性流产和习惯性流产的病因,除染色体、解剖和内分泌异常外,约50%~60%与免疫有关。

(一) 自身抗体

研究发现,多种原因不明的习惯性流产患者体内存在自身抗体,主要为抗磷脂抗体(抗心磷脂抗体ALC和狼疮抗凝因子LAC),其次为抗核抗体(ANA)、抗核可抽提抗体(抗ENA抗体)及抗平滑肌抗体等。关于自身抗体导致流产的机制尚不清楚,多数学者倾向于前列环素(PG I_2)抑制学说,即抗磷脂抗体可能与血管内皮表面的磷脂成分结合,损伤血管内皮细胞后,阻止血管内皮释放花生四烯酸,从而使前列环素合成减少,并且血管内皮损伤后使血小板黏附聚集,释放的血栓素A $_2$ 使血管收缩,使血管内形成血栓,从而引起胎盘及蜕膜血管病变,最后导致流产。

(二) HLA 的相容性

大量研究表明,习惯性流产与夫妻之间的 HLA 的相容性有关。Unander (1985) 提出,夫妻 HLA 不相容性的妊娠可使母体产生抗父源性 HLA 的抗体,这些抗体具有封闭细胞免疫的作用,同时诱导产生 T_s 细胞,这可能是母体对胎儿不产生免疫排斥的一种机制。如果夫妻之间的 HLA 相容性增高,不能使母体产生足够的封闭抗体和 T_s 细胞,导致母体对胎儿产生免疫排斥反应而流产。许多研究资料表明,在许多原因不明的习惯性流产患者中,夫妻之间的 HLA 的相容性增高,包括 MHC I 类抗原和 MHC II 类抗原。Beer 和 Giu 等均发现,习惯性流产患者中,其夫妻含有相同 HLA 抗原的比例明显高于对照组。Thomas 等对 HLA-DR 抗原的检测结果显示,反复自然流产的夫妇中,HLA-DR 抗原的夫妇共享性明显高于对照组。近年来,用丈夫的外周淋巴细胞对习惯性流产患者进行主动免疫治疗取得的成果,也支持上述理论。

二、蜕膜中的免疫活性细胞

巨噬细胞分布于子宫内膜基层与功能层,是抗原提呈细胞,能激活 T_s 细胞。动物实验发现,巨噬细胞被活化后可导致流产。在妊娠期蜕膜中 T 细胞,以 $CD8 + T$ 细胞为主,而 $CD4 + T$ 细胞甚少,这种分布特点对胚胎免受母体免疫系统排斥有利。研究发现,习惯性流产患者的蜕膜中 $CD4 + / CD8 +$ 的比率升高。

在哺乳动物和人类,NK 细胞是妊娠早期子宫蜕膜组织中的优势细胞群,在正常妊娠中起免疫抑制作用,其表面分子的表型主要是 $CD56 + CD3 -$ 。根据 $CD16$ 分子,分成 $CD56 + CD16 +$ 和 $CD56 + CD16 -$ 两种亚型。研究发现,不明原因的习惯性流产患者中 NK 细胞的总数无显著改变,而 $CD56 + CD16 + / CD56 + CD16 -$ 的比例增高,推测可能是 $CD16 +$ 触发了 NK 细胞的抗体依赖的细胞毒作用。并且发现, $CD56 + CD16 +$ 细胞较 $CD56 + CD16 -$ 细胞有持续的、强的细胞毒性, $CD16 +$ 细胞比例增加可能导致胎儿死亡。

三、细胞因子

$CD4 +$ 的 Th 细胞根据其分泌的细胞因子的不同,可分为 Th1 细胞和 Th2 细胞,其中 Th1 细胞主要分泌白 IL-2、 $IFN\gamma$ 、 $TNF\alpha$; Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5 及 IL-10。Th1 和 Th2 细胞有着不同的功能,Th1 细胞介导迟发型超敏反应,而 Th2 细胞可促使 B 细胞产生抗体。Th1 和 Th2 细胞亚型相互制约,决定着机体细胞免疫与体液免疫间的平衡。这种平衡一旦被打破,将导致疾病的发生。1993 年,Wegmann 等在实验中发现,妊娠母鼠的外周血淋巴细胞分泌的细胞因子中 IL-4、IL-5 和 IL-10 的水平升高,而 $IFN\gamma$ 水平降低。于是,他提出妊娠是以 Th2 型细胞因子为主的生理现象。大量研究发现,习惯性流产患者中 Th1 型因子升高,而 Th2 型细胞因子降低,导致 Th1/ Th 2 型细胞因子的比率增加。

TGF β 是一种调节细胞生长及分化的细胞因子，分子质量为 25kDa。哺乳动物体内几乎所有正常组织细胞都能合成和分泌 TGF β 家族的某个成员。TGF β 除能刺激相关细胞的增殖分化外，还具有比环孢素更为强烈的免疫抑制作用，能抑制 CTL 和 NK 细胞的杀伤作用，也抑制 TGF α 的分泌，并在参与诱导免疫耐受的形成机制中也起重要作用。因此，有学者认为，TGF β 也属 Th2 型细胞因子之列。在正常月经周期中，子宫内膜中 TGF β mRNA 的含量也呈现类似的周期性变化，以增生期最低，至分泌期明显增加，到妊娠早期时增加更明显。研究表明，TGF β 可通过刺激子宫内膜中的基质细胞分泌细胞外基质蛋白来促进内膜的蜕膜化，从而有利于胚胎的着床。TGF β 与流产相关性的研究结果表明，在习惯性流产患者的胎盘附着部位的蜕膜内，能够产生 TGF β 的免疫活性细胞数量减少。利用经典的小鼠自然流产模型发现，在流产小鼠的蜕膜中，TGF β mRNA 的含量较正常妊娠模型组显著降低，推测蜕膜中 TGF β 的异常表达与流产的发生有关，因为蜕膜局部 TGF β 的减少除了可严重影响子宫内相关细胞的生长分化外，还可能由于它的缺失削弱了妊娠期蜕膜局部应有的免疫抑制状态，相对增强了母体对胚胎抗原的免疫应答，从而产生异常的免疫排斥反应，导致流产的发生。

四、妊娠高血压综合征

妊娠高血压综合征 (pregnancy induced hypertension, PIH) 是发生于妊娠中晚期的、严重威胁母婴安全的产科常见并发症，是导致孕妇和胎儿死亡的主要原因之一。在妊娠期间，细胞免疫功能受到抑制，但体液免疫功能增强，Th1/ Th2 比值向 Th2 方向偏移。Th2 细胞优势环境对妊娠有利，而 Th1 细胞因子对妊娠有害，可导致妊娠并发症的发生。研究显示，妊娠高血压综合征患者外周血中的 CD4 + T 细胞增多、Th1 细胞因子增多、Th2 细胞因子减少及 Th1/ Th2 比值增大，且与病情严重程度呈正相关，提示这些患者中由 Th1 分泌的细胞因子介导的细胞免疫活动增强，而 Th2 分泌的细胞因子介导的体液免疫功能减弱，从而导致患者机体免疫功能的紊乱，进而导致妊娠高血压综合征的发生。TNF α 参与滋养层细胞的凋亡并损害母体及胎盘中的血管，使血管平滑肌收缩后导致血压升高。研究发现，TNF- α 与 IL-2 共同作用可使 NK 细胞活化，转变成具有细胞毒作用的淋巴因子活化的杀伤细胞，可损害母体细胞，并导致并发症的发生。研究发现，妊娠高血压综合征患者外周血中 IL-6 和 IL-8 升高。近年来对妊娠高血压综合征患者的胎盘进行免疫组化和原位杂交时发现，IL-1 和 TNF α 表达显著增加，且 IL-1 能增强胎盘中 TNF α 的表达。另有研究发现，妊娠高血压综合征患者在临床症状出现前，外周血和羊水中 TNF α 及其受体 STNFP55 含量已显著增高。

(彭景衍)

主要参考文献

- 常建军, 彭景蟾. 2002. 精子特异性乳酸脱氢酶的免疫学特性及其应用. 动物学杂志 37 (2): 85~88
- 常建军, 杨颖, 彭景蟾. 2003. PCR3. 1-bvLDH-C4 的构建及在体内外的表达. 动物学杂志 38 (1): 85~88
- 刘郎, 彭景蟾, 祝诚. 2001. 滋养层细胞表面主要组织相容性复合体抗原的研究进展. 生物化学与生物物理进展 28 (1): 26~28
- 刘郎, 陈云, 杨颖, 彭景蟾. 2002. 妊娠兔胎盘细胞凋亡及凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的动态变化. 生物化学与

- 生物物理进展, 29 (1): 47~51
- 刘郎, 杨颖, 彭景蟪. 2002. 人重组干扰素对兔妊娠的影响. 动物学报 48 (2): 277~280
- 王梦玖. 2000. 临床生殖免疫学. 上海科学技术出版社 p33~35
- 周 飞, 彭景蟪. 2001. 重组真核质粒 pCMV4-rZP3 构建及在小鼠体内的表达. 动物学杂志 36 (3): 22~27
- 周 飞, 彭景蟪. 2001. 卵透明带 ZP 疫苗的研究进展. 生殖医学杂志 10 (1): 50~53
- Barber MR, Fayrer-Hosken RA. 2002. Possible mechanisms of mammalian immunocontraception. J Reprod Immunol 46: 103~124.
- Bray C, Son JH, Meizel S. 2002. A nicotinic acetylcholine receptor is involved in the acrosome reaction of human sperm initiated by recombinant human ZP3. Biol Reprod 67: 782~788
- Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. 2002. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: roles and regulation during human pregnancy and parturition. Placenta 23: 257~273
- Catherine DT, Cardullo RA. 2002. Distinct membrane fractions from mouse sperm bind different zona pellucida glycoproteins. Biol Reprod 66: 65~69
- Caucheteux SM, Kanellopoulos-Langevin C, Ojcius DM. 2003. At the innate frontiers between mother and fetus: linking abortion with complement activation. Immunity 18: 169~172
- Chen Y, Yang Y, Peng JP. 2002. Infertility in mice induced by the rhesus monkey chorionic gonadotropin β -subunit glycoprotein using DNA immunization. Mol Cell Biochem 231: 89~96
- Choudhury SR, Knapp LA. 2001. Human reproductive failure I: immunological factors. Hum Reprod Update 7: 113~134
- Diekman AB, Norton EJ, Westbrook VA, Klotz KL, Naaby-Hansen S, Herr JC. 2000. Anti-sperm antibodies from infertile patients and their cognate sperm antigens: a review. identity between SAGA-1, the H6-3C4 antigen and CD52. Am J Reprod Immunol 43: 134-143
- Dunbar BS, Timmons TM, Skinner SM. 2001. Molecular analysis of a carbohydrate antigen involved in the structure and function of zona pellucida glycoproteins. Biol Reprod 65: 951~960
- EI - Mestrah M, Castle PE, Borossa G. 2002. Subcellular distribution of ZP1, ZP2 and ZP3 glycoproteins during folliculogenesis and demonstration of their topographical disposition within the zona matrix of mouse ovarian oocytes. Biol Reprod 66: 866~876
- Gajiwala KS. 2000. Structure of the winged helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. Nature 403: 916~921
- Goldberg E, Vandenberg JL, Mahony MC. 2001. Immune response of male baboons to testis-specific LDH-C4. Contraception 64: 93~98
- Gupta GS, Syal N. 2000. Newly exposed immunochemically cross-reactive epitopes in sperm-specific LDH after glucosylation and gossypol interaction. Am J Reprod Immunol 44: 303~309
- Jethanandani P, Goldberg E. 2001. Ldhc expression in non-germ cell nuclei is repressed by NF- κ B binding. J Biol Chem 276: 35414~35421
- Kadota Y, Okumura M, Miyoshi S. 2000. Altered T cell development in human thymoma is related to impairment of MHC class II transactivator expression induced by interferon-gamma (IFN- γ). Clin Exp Immunol 121: 59~68
- Kiefer SM, Saling P. 2002. Proteolytic processing of human zona pellucida protein. Biol Reprod 66: 407~414
- Liu Z, Chen Y, Yang Y, Peng JP. 2002. The effect on MHC class II expression and apoptosis in placenta by IFN- γ administration. Contraception 65: 177~184
- Liu Z, Sun QH, Peng JP. 2003. Effect of IFN γ on caspase-3, Bcl-2 and Bax expression, and apoptosis in rabbit placenta. Cytokine 24: 201~209
- Mellor AL, Munn DH. 2000. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. Annu Rev Immunol 18: 367~391
- Morgan BP, Holmes CH. 2000. Immunology of reproduction: protecting the placenta. Curr Biol 10: 381~383
- Mori T, Guo MW, Sato E. 2000. Molecular and immunological approaches to mammalian fertilization. J Reprod Immunol 47: 139~158

- Munno I, Chiechi LM, Lacedra G, Putignano G, Patimo C, Lobascio A, Loizzi P. 1999. Spontaneous and induced release of prostaglandins, interleukin (IL) -1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α by placental tissue from normal and preeclamptic pregnancies . *Am J Reprod Immunol* 42: 369~374
- Nakamura Y, Suda T, Nagata T. 2003. Induction of protective immunity to *Listeria monocytogenes* with dendritic cells retrovirally transduced with a cytotoxic T lymphocyte epitope minigene . *Infect Immun* 71: 1748~1754
- Palmer GW, Claman HN. 2002. Pregnancy and immunology: selected aspects . *Ann Allergy Asthma Immunol* 89: 350~359
- Saito S. 2001. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/ placenta . *J Reprod Immunol* 52: 15~33
- Sinowatz F, Kle S. 2001. T pfer-Petersen E . 2001 . Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals . *Cells Tissues Organs* 168: 24~35
- Thellin O, Heinen E. 2003. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection . *Toxicology* 185: 179~184
- Ting JP, Trowsdale J. 2002. Genetic control of MHC II expression . *Cell* 109: S21~S23
- Tollner TL, Overstreet JW, Branciforte D, Primakoff PD. 2002. Immunization of female cynomolgus macaques with a synthetic epitope of sperm-specific lactate dehydrogenase results in high antibody titers but does not reduce fertility . *Mol Reprod Dev* 62: 257~264
- Von Rango U, Classen-Linke I, Kertschanska S. 2001. Effects of trophoblast invasion on the distribution of leukocytes in uterine and tubal implantation sites . *Fertil Steril* 76: 116~124
- Waldburger JM, Masternak K, Muhlethaler-Mottet B. 2000. Lessons from the bare lymphocyte syndrome: molecular mechanisms regulating MHC class II expression . *Immunological Reviews* 178: 148~165
- Wang ZC, Yunits EJ, De Los Santos MJ. 2002. T helper 1-type immunity to trophoblast antigens in women with a history of recurrent pregnancy loss is associated with polymorphism of IL-1 β promoter region . *Genes Immunol* 3: 38~42
- Xiang RL, Zhou F, Yang Y, Peng JP. 2003. Construction of the plasmid pCMV4- rZPC 'DNA vaccine and analysis of its function . *Biol Reprod* 68: 1518~1524
- Zenclussen AC, Fest S, Busse P. 2002. Questioning the Th1/ Th2 paradigm in reproduction: peripheral levels of IL-12 are down - regulated in Miscarriage Patients . *Am J Reprod Immunol* 48: 245~251

第十六章 动物的无性生殖

无性生殖 (asexual reproduction) 是指亲体不通过性细胞 (精子和卵子) 的相互作用而产生后代个体的生殖方式, 包括自然条件下的无性生殖和人工辅助无性生殖。自然条件下的无性生殖多见于无脊椎动物, 脊索动物中的尾索类也进行无性生殖。人工辅助无性生殖一般指动物克隆而言。无性生殖的共同特点是参与生成新个体的细胞在遗传物质组成上和亲代的细胞相同, 一般都是含有相同数目染色体的二倍体细胞。无性生殖过程中不发生来自父母双方遗传信息的重组, 所以子代遗传物质基础和亲代完全相同。

自然条件下的无性生殖有利于处在适宜环境下的个体快速增殖, 扩大种群数量。在原生动物中, 这种生殖仅以细胞分裂方式产生新个体; 多细胞动物由于细胞和组织分化程度越来越高, 其无性生殖必须由成群的细胞或动物身体的特定部位来承担。自然无性生殖方式是极其多样的, 不过大致可分为三类。第一类是先由母体分离出或大或小的一部分, 再经过以后的发育过程成为一个完整的有机体。第二类是分裂生殖, 在这类生殖过程中, 子体在由母体分离之前就已形成, 以后只不过是子体的分离, 并开始独立生活而已。第三类是孤雌或孤雄生殖, 在这类生殖中, 个体虽然是由配子 (精子或卵子) 发育而来, 但并没有雌、雄配子的结合过程, 或没有雌、雄配子的遗传物质的共同参与, 而是由单独的卵子或精子发育而形成的一个胚胎或个体。

人工辅助的无性生殖是在人为条件下实现的无性生殖, 包括物理化学因子作用于卵子后的单性生殖和采用核移植技术而进行的动物克隆。在海胆、爬行类等都有人工单性生殖成功的例子。在人工辅助条件下, 如经放射处理两栖类和鱼类的卵子, 使生发泡遗传物质失活, 受精后增加水压抑制精子的第一次减数分裂, 孤雄生殖也能出现。在脊椎动物和果蝇中, 孤雄生殖也能被诱导发生。动物克隆是把供体的细胞核移植到一个去核的卵细胞中, 让这个重构卵在体外发育到一定阶段后, 移植到代孕受体中, 发育成与供体具有相同基因组的个体。

第一节 自然条件下动物的无性生殖

自然条件下的无性生殖在低等的原生动物、无脊椎动物和低等脊椎动物中是十分常见的现象。在原生动物、海绵动物、腔肠动物、蠕虫、棘皮动物和尾索动物等中, 无性生殖是非常普遍的生理现象。此种现象有规律地重演, 并表现有许多的不同类型。自然条件下的无性生殖主要有以下方式: ①出芽生殖: 不仅可在机体的外部, 而且也可在机体的内部进行。当在母体内部进行时, 先分出一部分, 然后再变为独立的有机体。海绵动物的芽球形成是内部出芽生殖的例子。内部芽体具有某些防御性装置 (膜、被囊), 这使它们在很大程度上和参与有性生殖的孢子形成过程十分相近。②分裂生殖: 是动物身体直接进行横裂或纵裂, 分裂后每一部分都成为一个完整新个体; 有一种较特殊形式

的复裂，由亲体细胞核分为若干子核，然后各子核带着一部分细胞质并彼此分离。③断裂：沿动物身体主轴横断为两部或多部，然后由各部分发育成新个体。④质裂生殖：细胞核不分裂，只由细胞质连同原有细胞核分成两个或多个新个体。⑤胞囊生殖：在环境不适时形成胞囊，待环境转好后，即行分裂。⑥孤雌生殖：是无雄性配子的任何作用，由雌性配子产生胚胎或个体。孤雌生殖在无脊椎动物和低等脊椎动物中较为常见。例如，蚜虫在夏季的良好环境下以孤雌生殖的方式增加其数量，而在较冷的秋、冬季节则以有性生殖方式来繁殖。蜜蜂通过孤雌生殖繁殖雄蜂，而通过有性生殖繁殖雌蜂。在鱼类、两栖类、爬行类及鸟类等脊椎动物中也存在孤雌生殖现象。⑦孤雄生殖：指个体是由雄性配子发育而来的一种生殖方式。在自然状态下，孤雄生殖只有在杂交的西西里粘虫中发现过。

在海绵动物门中，无性生殖不仅可引起个体数量增多，而且也可引起群体形成。海绵动物是以出芽生殖和断裂进行无性生殖。海绵动物的出芽生殖也有外部出芽生殖和内部出芽生殖两种形式。在昆虫中也普遍存在孤雌生殖现象。在这类生殖方式中，卵不经过受精就可进行充分发育，在多数目里都有这样的代表。孤雌生殖可分为专性的，即没有雄虫或只有极少没有生殖功能的雄虫；或兼性的，即同正常的两性生殖共存。已经知道有四种重要的孤雌生殖方式：①在蜜蜂和一些别的昆虫中，雌虫产两种卵。未受精卵只有单套染色体，无例外地产生雄虫，而受精卵具有完整的双倍染色体，只产生雌虫（包括蜜蜂的不育雌虫或工蜂）。所以，一般以性染色体决定性别的方法被这种更有伸缩性的方式所取代。②在部分叶蜂、竹节虫和一种介壳虫中，雌虫也产两种卵。受精卵产生数量大致相等的雄虫和雌虫，但未受精卵的卵核同第二极体融合了。这就恢复了双倍的染色体数，但这些卵只发育成雌虫。③在部分蚜虫、竹节虫、象鼻虫和蛾类中有一种特殊的专性孤雌生殖。卵不经过减数分裂，只产生雌性后代。这些昆虫没有雄虫，可以生殖得很快，但缺乏像两性生殖中的遗传可变性。④部分蚜虫和瘦蜂进行周期性的孤雌生殖：一代或几代孤雌生殖和一代两性生殖相交替。在这样的情况下，孤雌生殖发生在夏季，所以能在适宜的条件下快速生殖，而两性生殖的有益遗传作用没有完全丧失。

在昆虫中还存在一些其他的无性生殖形式，如幼体生殖和多胚生殖。幼体生殖是动物在幼期进行生殖。它只出现于很少几种昆虫中，其中最著名的例子是瘦蚊。未受精卵在母体内孵化子代幼虫，然后这些幼虫从母体幼虫里咬出来，母体幼虫就在这过程中死亡。多胚生殖是由一个卵（可以是未受精的，或是以孤雌生殖发生的）经过多次细胞分裂后产生2个以上的细胞群，每一群细胞都能够变成一个幼虫。这种生殖方式多见于捻翅虫中，也发生于寄生性膜翅目中的若干亲缘颇远的属。这个方式的主要特点是卵的分裂球分割成一群群的细胞（或称桑椹期），每个细胞群发育成一个昆虫成虫。

哺乳动物自发的无性生殖主要是指孤雌生殖，孤雌生殖在哺乳动物中尚无成功的报道。自发的孤雌胚在子宫内可以着床，而且至少也能发育到肢芽期。自发的孤雌生殖在大多数哺乳动物中是罕见的现象，因为卵子在体内没有经过受精刺激一般是不会发生分裂的。1974年，Stevens培养出一个叫LT/Sv的小鼠品系，这一品系的小鼠具有极高的孤雌发育率。未交配过的LT/Sv小鼠自然排卵，或者超数排卵后，在所排出的卵子中，有大约10%会发生孤雌发育。经过重组后的LTXBJ品系小鼠中，孤雌发育率可高达30%。这些自发的孤雌发育胚胎在桑椹期、囊胚期等与正常受精的着床前胚胎相比，在

形态上有很大的差异。孤雌胚在子宫内着床后，能形成着床点，但一般会在第 6 天或第 7 天停止发育。输卵管内自发的孤雌发育胚只排出第一极体，没有第二极体排出，所以其胚胎细胞仍然是二倍体。

哺乳动物孤雌发育胚在早期致死的原因可能是多方面的，其致死的真正原因目前尚不清楚。利用自发的孤雌发育胚与正常受精的胚胎进行嵌合，胚胎移植后可以获得成活的嵌合体小鼠。孤雌发育胚来源的细胞可以嵌合到所有的组织中，包括生殖细胞系，嵌合到生殖细胞系的小鼠可以正常繁殖后代，其后代也具有正常的表型。Hope 和 Illmensee 把 LT/Sv 自发孤雌囊胚的内细胞团细胞分离后，将它的一个核移植到去核的 C57BL/6J 的受精卵中。将 107 枚重构胚移植到假孕的 ICR 母鼠中后，有 25 枚发生了卵裂，7 枚发育到囊胚，移植后产下 4 只雌性的、表现 LT/Sv 性状的小鼠。不过，Illmensee 和 Hope 的早期核移植实验受到了许多人的质疑。如果他们的实验是正确的，那么，这些实验完全可以说明，孤雌发育胚中的细胞核具有发育全能性，孤雌发育胚早期致死的原因不是细胞核中遗传物质的缺陷，而是遗传物质以外的原因。Mann 和 Surani 等的实验结果却得到了与 Hope 和 Illmensee 不一样的结论。Mann 和 Ladge-Badge 向单倍体孤雌卵或在去除雄原核的合子中，移入一个雌原核而构成雌核胚 (gynogenetic embryo)，则雌核胚与孤雌胚一样在着床后数天内死亡，且主要表现出胚外成分发育不良，其内细胞团不能正常形成卵黄囊内胚层。Surani 等将合子的雌原核去除后移入另一个合子的雄原核，构成具有两个雄原核的雄核胚 (androgenetic embryo)，这种胚胎可以发育到囊胚阶段，但着床后只能形成滋养层和原始内胚层，不能进一步发育。Kono 等通过使 IGF₂ 和 H19 与其他印迹基因的适当表达，成功地获得了具有生殖能力的孤雌生殖小鼠。

畸胎瘤是孤雌发育的另一种形式。约有 50% 的 LT 品系的小鼠的雌性成体在卵巢内带有畸胎瘤。这种肿瘤含有由外、中、内胚层构成的各种组织，从未分化状态直到各种成熟的分化状态混在一起，并呈块状。Stevens 根据幼鼠卵巢的组织学检测，查明了畸胎瘤的起源是在卵巢的卵泡中，是由于不经受精的卵母细胞卵裂后的孤雌发育而形成的。在这些幼鼠卵巢的卵泡中，可以观察到处于各种发育阶段的孤雌发育胚，如卵裂期、桑椹期及囊胚期，以及失去胚胎常态而侵入周围卵巢组织的分化的三胚层组织等。

第二节 人工辅助条件下动物的无性生殖

人工辅助条件下动物的无性生殖主要包括人工诱导孤雌生殖、孤雄生殖和动物克隆。

一、人工诱导孤雌生殖

人工诱导的孤雌生殖在两栖类、鱼类、无脊椎动物中都已实现。在哺乳动物中，人工诱导的孤雌生殖的研究始见于 20 世纪 30 年代，Pincus 等采用改变温度和渗透压的方法激活兔的卵母细胞，卵裂后移植到受体中，最后产下了正常的后代。不过，这一结果至今尚未被重复。在大多数孤雌激活的实验中，孤雌胚在母体的子宫内均可以着床，但

只能发育到一定的阶段，而不能正常发育到期。例如，将孤雌激活的小鼠卵移入受体内可以着床，并发育 11 天；兔的孤雌激活胚在体内也可发育 11 天；绵羊的孤雌激活胚在妊娠 21 天时，有心脏跳动，但在 25~26 天死亡。

诱导孤雌激活的方法可以归纳为物理刺激方法和化学刺激方法两大类。物理刺激包括：①机械刺激，即卵母细胞的体外操作和穿刺处理。②温度改变，如低温或高温处理。③渗透压的改变。④哺乳动物中最常使用的电刺激处理。化学刺激激活包括：①用透明质酸酶或链酶蛋白酶处理等。②二价离子或钙离子载体处理。③蛋白质合成抑制剂的处理。④蛋白磷酸化抑制剂处理。⑤麻醉剂或镇定剂的处理等。卵子孤雌激活后，依据第二极体是否排放，以及第一次卵裂的时间和性质，孤雌激活胚可表现出不同的基因型（图 16-1）。

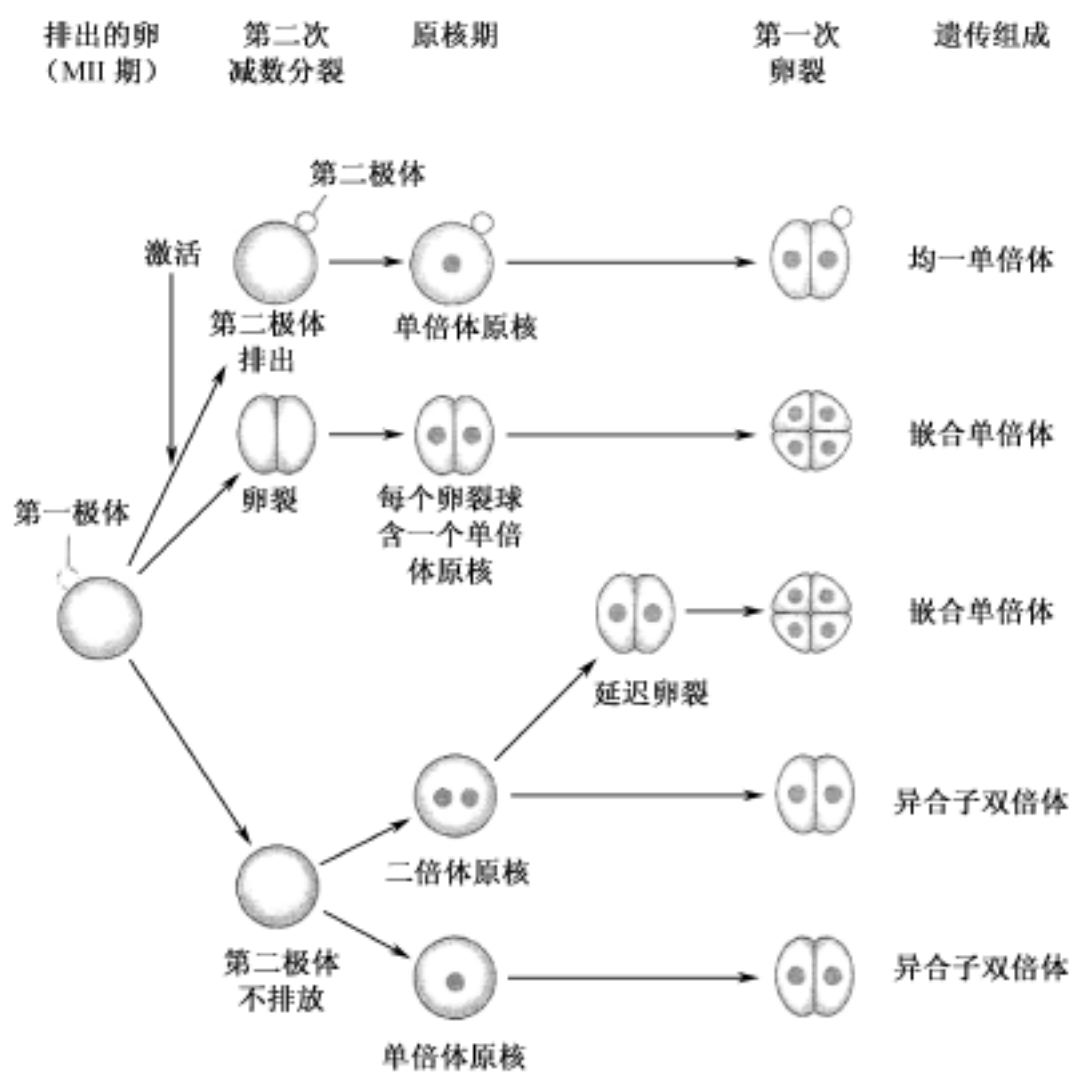


图 16-1 小鼠卵孤雌激活后所出现的不同基因型（引自 Nagy A 等，2003）

孤雌生殖可分为两种类型，第一种是卵母细胞经物理或化学的方法激活后，启动胚胎发育，由此发育而来的胚胎是一种纯孤雌胚。这种胚胎在整个发育过程没有任何雄性配子的参与。另一种是雌核发育（gynogenesis），精子正常地进入并激活了卵子，但精子的细胞核并没有参与胚胎的发育，来自精子的染色体因某种原因很快消失，胚胎的发育仅在雌核的控制下进行。大多数人工诱导的孤雌生殖动物的染色体组仍然是二倍性的。要使孤雌生殖动物达到二倍性，一般通过阻止卵母细胞第二极体的排放，或抑制第一次卵裂的发生而实现染色体组的二倍化。

人工诱导的雌核发育是指用经过紫外线、X 射线或 γ 射线等处理后失活的精子来授

精，再在适当时间对受精卵施以冷、热、高压等物理处理，以抑制第二极体的排出，使卵子发育为正常的二倍体。早在 1911 年，Hertwig 最先尝试了用人工方法失活来自精子的遗传物质。他在两栖类的研究中，利用射线对精子进行处理时发现，先用低于致死剂量的辐射剂量照射精子后，再用这种处理过的精子进行授精，结果胚胎的发育率不受影响；如进一步增加辐射剂量，胚胎的存活率将下降；倘若继续增加辐射剂量，胚胎的存活率则又恢复到正常水平。这说明只有在高的辐射剂量作用下，才能使精子的遗传物质完全失活；没有完全失活的雄性染色体在受精后能导致胚胎发育不正常或死亡。染色体失活的精子仍然能激活卵母细胞，启动胚胎的发育。在诱导两栖类和鱼类的雌核发育过程中，由于精子染色质失活处理，往往会导致其基因突变，这些基因突变会引起孤雌发育胚胎的早期死亡。这种现象称为“外源精子致死效应”。

不同种类的物理辐射和化学药品均可使精子的遗传物质失活。辐射处理包括 γ 射线、X 射线和紫外线。 γ 射线和 X 射线具有较高的穿透能力，其主要作用是诱使染色体发生断裂。经辐射处理过的精子，其存活时间比正常的精子要短，受精能力也有所下降。在用辐射处理的精子受精后的雌核发育胚胎中，有时还可以发现少量来自父系的特性和残留的父系染色体片段。

紫外线的主要作用是诱使胸腺嘧啶二聚体化，这一过程能在光的作用下修复。由于紫外光对细胞的穿透能力较低，因此，紫外光对较厚的、不透明的精细胞样品中染色体失活的效果较差。一些化学物质如甲苯胺蓝、乙烯尿素和二甲基硫酸等通过与精子的 DNA 的相互作用，可以使两栖类和鱼类的精子遗传物质失活。

应用显微操作方法直接将受精卵中的雄原核去除，然后抑制受精卵的第一次卵裂，这样就可以得到二倍体的雌核发育胚胎，这一方法在哺乳动物中也已经实现。哺乳动物的雌核发育胚胎体外培养可以发育到囊胚期，也可以在子宫内着床，但尚未见到纯雌核发育胚胎发育到期的报道。

二、人工诱导孤雄生殖

孤雄发育是指卵子经过射线处理，使其遗传物质失活，然后与正常精子受精，再施以温度休克或高水静压处理，抑制第一次卵裂，使精子的染色体在雌核失活的受精卵内加倍，恢复二倍性，胚胎经进一步发育后将完全表现为父本遗传性状的纯合个体。对鱼类孤雄生殖的研究表明，有很多因素影响孤雄生殖个体的存活率。这些因素包括精子基因的纯合性、卵子由于射线照射所受到的损伤，以及染色体二倍化的处理方法和处理时间。Parsons (1985) 将虹鳟鱼的卵用 Co^{60} γ 射线照射后进行受精，受精卵用水静压处理抑制第一次卵裂，使之恢复二倍性。当水静压为 9000 磅/平方英寸时，获得的胚胎的存活率为正常对照组的 32.5%~38.9%，而其他处理组的存活率都非常低。应用冷冻精子制作孤雄生殖的虹鳟鱼，获得了 42.5% 的孵化率和 10.5% 的幼鱼。在这些孤雄生殖的虹鳟鱼中，在最初的前 6 个月中死亡率极高，只有 0.9% 的幼鱼能存活到 2 年的时间。他们的结果显示，精子的冷冻并不影响孤雄生殖的制作效率。

在鱼类中，人工诱导孤雄生殖所使用的卵子和精子并不一定都是同一物种。Paschos 等 (2001) 将鲤鱼卵用射线照射后，再用一种具有伸缩眼的金鱼精子受精，受

精卵在 42℃ 下经热处理，同时获得了雌核和雄核发育的金鱼（金鱼为雄性异配子型）。不过，这种异种受精鱼具有极高的死亡率和畸形率，其雌核发育的金鱼可以存活，但孤雄核发育的金鱼不能存活。

孤雄生殖研究在遗传学研究、育种、物种的保护以及商业上具有应用价值。由于对动物卵子的冷冻保存技术尚未十分成熟，卵子的获取也不如精子获取容易，数量也不如精子多，而对精子的冷冻保存技术已经较为成熟。因此，孤雄生殖对物种的保护，不同种间的核质杂交和 YY 雄性引起的性别控制等研究具有特殊的意义。

三、动物克隆

现在所指的动物克隆技术主要是指动物细胞核移植技术。在 20 世纪 50 年代，经细胞核移植的动物克隆最先在两栖类上实现。20 世纪 80 年代，这一技术已应用到了哺乳动物上，主要研究早期胚胎细胞克隆。到 20 世纪 90 年代末，应用体细胞核移植进行的动物克隆获得成功，标志着动物克隆技术已进入了一个崭新的时代。这一重大的技术突破，是生物技术发展史上一个划时代的里程碑。以下的内容将重点对动物克隆技术的研究背景、基本操作程序、动物克隆的机理和研究进展作较为详细的介绍。

（一）核移植和动物克隆的概念

细胞核移植 (nuclear transplantation or nuclear transfer, NT)，也称作核移植，是指将一个核供体通过显微操作方法移植到一个核受体中，组成核质杂合细胞，这种核质杂合细胞也叫作重构胚 (reconstructed embryo)。核供体 (donor) 指的是提供细胞核的细胞，可以是胚胎细胞或体细胞，也可以是单纯的细胞核。核受体 (recipient) 通常是指去核的卵母细胞 (enucleated oocyte)、去核的合子 (enucleated zygote) 或去核 2-细胞期胚胎的卵裂球。根据核供体细胞的分化程度，可将核移植分为胚胎细胞核移植 (embryonic nuclear transfer) 和体细胞核移植 (somatic nuclear transfer)。根据核供体和核受体是否同一物种，又可将核移植分为同种核移植 (intraspecies nuclear transfer) 和异种核移植 (interspecies nuclear transfer)。

“克隆”一词是来源于英文单词 clone 的音译，其原义是通过无性形式由单个细胞产生和亲代非常相像的个体。克隆动物 (cloned animal) 是指由一个动物经无性繁殖或孤雌生殖而产生的后代，克隆个体和被克隆个体在遗传上是完全相同的。动物克隆 (animal cloning) 是指制作克隆动物的方法，主要有胚胎分割和核移植两种方法。在自然状态下，动物克隆的现象也偶有发生，如同卵双胞胎。用胚胎分割方法可以制作遗传性状完全一致的克隆动物，不过细胞核移植才是制作克隆动物最有效的方法，故此也有人将细胞核移植技术狭义地定义为动物克隆技术。事实上，用“克隆”这一单词来描述由核移植所获得的动物并不确切，因为供体细胞核虽然相同，但核移植所用的卵母细胞可能存在差异，除非卵母细胞和核供体细胞是来自同一个体。卵母细胞的差异主要是指线粒体的差异。

(二) 动物克隆研究的历史

1839 年，Theodor Schwann 提出细胞学说，后来 Rodolf Virchow 提出“所有的细胞都来自细胞”(All cells come from cells)。将这一理论应用到发育生物学时，就要求细胞同时具有遗传 (heredity) 和分化 (differentiation) 两种互相对立的特性。在细胞分裂过程中，每次分裂产生两个一样的子细胞还是两个不一样的子细胞？在胚胎发育过程中，是否每个卵裂球还具有产生一个完整胚胎的能力？也即细胞是否具有全能性 (totipotency)。为了回答这一问题，1888 年 Wilhelm Roux 用热针破坏 2-细胞蛙胚的一个卵裂球后，死亡的卵裂球留在原地不再分裂，而剩余的一个卵裂球却只发育成了半个胚胎。这一实验似乎证实了德国动物学家 August Weismann 提出的发育理论，他认为细胞分化是由于细胞分裂过程中丢失了某些遗传物质，所以分化不可逆转。不过，这一理论很快就被 Hans Driesch 的海胆实验所否定。1892 年，Driesch 将 2-细胞的海胆胚胎放在玻璃瓶中剧烈摇晃使两个卵裂球分离，他发现两个分离的卵裂球都可以各自发育成为一个完整的胚胎，后来许多研究者通过蛙和蝾螈等动物的卵裂球分离实验都证实，只要方法得当，每个分离的卵裂球都可以单独发育成为一个完整个体。这些实验都证明了细胞的遗传物质并未随卵裂而丢失，每个卵裂球中都含有发育为完整个体所需的遗传物质。Roux 的实验所得的错误结论来源于不当的实验方法，主要是由于他未将死亡的卵裂球与胚胎完全分离，死亡的卵裂球对另一个卵裂球的发育产生了不良影响。

Jacques Loeb 发现，用不同的盐溶液可以引发卵子的孤雌发育。用同样的方法处理受精卵时，可以引起受精卵的胞质突出，形成一个与受精卵相连接的单纯胞质体。当胚胎分裂时，在某些情况下，分裂的细胞核可以通过胞质桥转移到突出的胞质中，出现核转移现象。Hans Spemann 从 Loeb 实验中获得启示，他用婴儿的头发将蝾螈的合子结扎后，蝾螈的合子核在一端，另一端没有核，其中有核部分分裂，而无核部分则停止分裂。当有核部分分裂到 16-细胞时，将结扎的头发略微松开，可使其中一个卵裂球的核通过胞质桥进入无核部分，此时原来无核的部分在获得了一个细胞核后又开始分裂，这时再将两部分彻底分开，第二个卵裂球也可发育成一个完整的个体 (图 16-2)。Spemann 的这一实验说明，至少在 16-细胞期的细胞核还具有发育全能性。

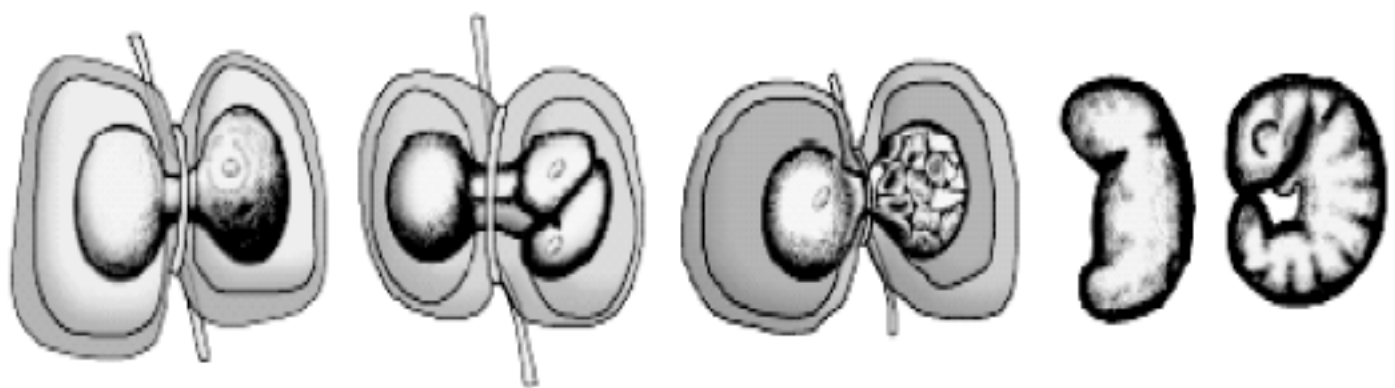


图 16-2 Spemann 经典实验示意图 (引自 Spemann H, 1938)

1938 年，Spemann 对这些结果进行思考和分析，并设想将分化程度更高的细胞核

放入去核的卵母细胞中，观察细胞核是否还能继续发育，验证遗传物质中所携带的信息在发育和分化中是否会丢失或失活。遗憾的是受当时技术条件所限，他本人未能将这一实验付诸实施。但这一假想实验的提出，却成了核移植技术的开端。1952 年美国科学家 Robert Briggs 和 Thomas King 首次成功地完成了细胞核移植实验。他们将豹蛙 (*Rana pipiens*) 未分化的囊胚细胞核注入去核的卵母细胞中，构成一个新胚胎，这种重构胚经适当刺激后，部分可以发育为蝌蚪，后来他们还证明这些蝌蚪经过变态可以变成幼蛙。这说明至少到囊胚期，细胞核还具有全能性。他们使用原肠期或分化程度更高的细胞作为核供体发现，用分化程度越高的细胞进行核移植，重构胚能够发育到蝌蚪期的比例就越低。最后，重构胚甚至都不能正常分裂，因此，他们认为，细胞核的全能性随着细胞的分化而逐渐丧失。

几乎在同一个时期，Michael Fishberg 和他的合作者报道了用爪蟾的早期囊胚细胞进行核移植，重构胚不仅可以发育成蝌蚪，而且能变态发育到成年。Gurdon 继续了这一工作，他发现分化程度高的细胞也可以支持重构胚发育到成年，但发育率降低。用囊胚期细胞核移植，重构胚有 30% 可以发育到成年，只有 6% 发育到孵化蝌蚪，而仅有 3% 发育到游动蝌蚪期。他们的结论是，分化的细胞核还具有发育全能性。Gurdon 等后来通过连续核移植方法，提高了核移植的成功率。他们用成年爪蟾的皮肤细胞进行核移植，重构胚也能发育到游动蝌蚪期。这说明成年动物的体细胞核还保留着心脏、肌肉、大脑和其他组织发育所需的遗传信息。

20 世纪 60、70 年代，我国生物学家童第周教授及其学生在鱼类的核移植研究上取得了举世瞩目的成就，并在国际上处于领先的地位。早在 1963 年，童第周等首次报道了鱼类的细胞核移植。他们在金鱼的两个亚科 (*Carassius auratus* 和 *Rhodeus sinensis*) 上还成功地实现了异种细胞核移植，并获得了发育正常的异种克隆鱼。后来他们在不同科、目，甚至不同纲之间进行异种核移植，如将金鱼核 (鲤形目鲤科) 移到泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 去核卵子 (鲤形目鳅科) 中，获得了 57%~62% 的囊胚发育率，其中 5% 的重构胚可以发育到幼鱼阶段。将罗非鱼核移入鲤鱼或泥鳅卵胞质中，甚至将小鼠细胞核移植入泥鳅卵胞质中，重构胚也能发育到囊胚或原肠胚阶段。

从 1952 年 Briggs 和 King 的首次细胞核移植实验开始，到 20 世纪 70 年代末，核移植在两栖类和鱼类上的研究已经达到了高峰，但在哺乳动物的研究上还是刚刚起步，因为哺乳动物的卵母细胞比两栖类要小得多，且容易受损伤，显微操作难度大。哺乳动物克隆根据所使用的供核细胞类型，大体上经历从以早期胚胎细胞为核供体的胚胎细胞克隆到以高度分化的体细胞为核供体的体细胞克隆阶段。

1. 哺乳动物的胚胎细胞克隆

虽然，在 20 世纪 60、70 年代的近 20 年的时间里，核移植的研究在两栖类和鱼类上获得了巨大成功，但直到 20 世纪 80 年代初，小鼠胚胎细胞核移植的成功才揭开了哺乳动物克隆研究的序幕。1981~1982 年，Karl Illmensee 和 Peter C. Hoppe 合作，把小鼠内细胞团细胞核直接注入合子后，再去除合子核，生出了 3 只克隆小鼠，但这一实验未能被其他实验室所重复。由于该方法采用的是胞质内的直接注射法，在当时的研究水平下，对卵子的损伤很大，这也可能是其实验结果很难得到重复的原因。1983 年，Mc-

Greath 和 Solter 发明了一种新的核移植技术，他们将细胞融合引入核移植研究，这一开创性的方法为核移植研究开拓了广阔的前景。他们采用微细玻璃管穿过透明带，在不用刺破卵质膜的情况下，将卵母细胞核及部分胞质一同吸出，形成由完整质膜包裹的核质体 (karyoplast)，从而达到去核的目的，然后将核供体细胞注入到去核的卵母细胞透明带下，用灭活的仙台病毒介导诱发核供体细胞和受体胞质进行融合，形成重构胚。这种方法大大提高了核移植的成功率。他们发现，用受精卵的原核作为核供体时，重构胚的囊胚发育率高达 95%；但当用 2-细胞、4-细胞和 8-细胞胚胎的卵裂球作为核供体时，重构胚发育率则分别降低为 19%、5% 和 0%。据此，他们认为，在哺乳动物，至少是小鼠，分化细胞的细胞核不具有全能性，这一结论大大地打击了很多研究者的热情。

正当很多人对哺乳动物克隆研究持观望和否定态度时，1986 年 Willadsen 改进了核移植的细胞融合方法，引入了电融合法，这一方法比传统的病毒或化学介导的融合方法更加方便、安全。他用此程序以绵羊的 8-细胞胚胎卵裂球作为核供体进行核移植，获得了发育到期的克隆绵羊。正是由于核移植程序的优化，迎来了动物克隆技术第一阶段的巨大发展。用类似方法，先后获得了小鼠、绵羊、牛、兔、猪、山羊和猴等哺乳动物的胚胎细胞克隆后代。克隆这些动物所用的核供体均来自卵裂球或囊胚细胞，这些研究结果表明，哺乳动物的早期胚胎细胞核具有发育全能性。

2. 哺乳动物的体细胞克隆

虽然哺乳动物的胚胎细胞克隆取得了成功，但当时所有的研究结果都显示，供核细胞的分化程度越高，重构胚的发育能力就越低。因此推断，高度分化的哺乳动物体细胞可能不再具有发育全能性。这一推论曾在学术界中流行了近 20 年的时间，也阻止了许多科学家去尝试哺乳动物体细胞克隆。不过，对哺乳动物体细胞克隆这一极具诱惑力的研究，并不是所有的人都望而止步。

苏格兰罗斯林研究所 (Roslin Institute) 的 Ian Wilmut 等试图寻找一种比受精卵原核注射法更为有效的制作牛、羊转基因动物的方法。他们意识到，用胚胎干细胞 (ES) 进行转基因操作非常方便，胚胎干细胞是来源于囊胚中的内细胞团细胞，而用牛囊胚中的内细胞团细胞进行核移植，已经得到了克隆动物，如果将这两种方法结合起来，可能是制作转基因动物的有效途径。Wilmut 的同事 Keith Campbell 是一位从事细胞周期研究的学者，对已高度分化的两栖类体细胞仍然具有发育全能性这一事实印象颇深。他相信，核移植成功的关键是供核细胞和受体细胞的细胞周期同步化。为了制作转基因绵羊，他们试图培养绵羊的 ES 细胞，但这一努力失败了，可能正是这一挫折成为他们后来成功的一个关键因素。他们把从绵羊囊胚中分离出的内细胞团进行了培养，发现这些培养的细胞已经出现分化。为了提高核移植成功的可能性，他们把这些细胞用血清饥饿的方法进行处理，使大部分细胞处于 G_0 期。 G_0 期细胞的状态与 MII 卵母细胞所处的状态十分相似，这样供核细胞和受体细胞的细胞周期基本上同步。他们从 9 日龄的胚胎获得的细胞培养了 6~13 代后用于核移植，共得到了 244 枚重构胚，其中 34 枚发育到囊胚，并移植到寄母绵羊的子宫中。1995 年夏天，有 5 只克隆绵羊出生，其中叫 Megan 和 Morag 的两只克隆羊存活，这是第一批用体外培养细胞克隆的哺乳动物，说明早期胎儿细胞经体外培养增殖后，也还保留了发育全能性。这些成功使 Wilmut 的研究小组

受到了极大的鼓舞。接着，他们用一只 6 岁绵羊的乳腺上皮细胞进行核移植，共构建了 277 枚重构胚，29 枚发育到囊胚，移植到 13 只寄母中，一只妊娠，最后得到一只活的克隆绵羊，取名“多莉” (Dolly)。多莉羊的出生震撼了世界，它不仅回答了在发育生物学领域中关于高度分化的体细胞核是否具有全能性的问题，而且，也引发了全世界关于“克隆”可能带来的各种问题的探讨。但不论公众如何评说，多莉羊的出生无疑是动物克隆研究的一个重要里程碑。以多莉羊的出生为标志，动物克隆研究从此由胚胎细胞克隆时代进入了体细胞克隆时代。

至此，已经有绵羊、小鼠、山羊、牛、猪、兔、猫、骡、马和大鼠等至少 10 种动物已经得到了体细胞克隆后代。这些体细胞克隆动物的出生，都表明了哺乳动物的体细胞核可以去分化，并重获发育全能性。

3. 哺乳动物的异种克隆

同种克隆是指构建重构胚所用的供体细胞和受体卵母细胞都是来源于同一物种。相对于同种克隆而言，动物异种克隆是指构建重构胚所用的供体细胞和受体卵母细胞不是来源于同一物种。哺乳动物异种克隆包含有异种核移植和异种妊娠两个方面。异种克隆突破了物种之间的“生殖隔离”限制，涉及物种之间在分子、细胞和生理水平上的相互作用。因此，异种克隆为研究核质关系、基因表达调控、细胞分化和物种进化等的一个十分重要的模型，对物种的改良、濒危动物的保护也具有十分积极的意义。

目前，虽然在多种动物已经实现了体细胞克隆，但要进一步克隆其他动物时，研究者却遇到了许多困难。首先是体细胞克隆的效率非常低，要得到一只克隆动物需要构建上百枚重构胚。因此，需要大量的卵母细胞，要获得大量的卵子对某些动物来讲又非常困难，甚至不可能，如濒危动物。其次，不同动物的卵母细胞存在巨大差异，某些动物的卵子十分脆弱，无法进行显微操作；由于未知的原因，某些动物的卵母细胞体外不能培养，也不能孤雌激活。因此，采用同种克隆方法来克隆这些动物是不现实的。是否可以用其他动物的卵母细胞作为替代，来克隆那些无法取到卵母细胞，但能得到体细胞的动物呢？在这一背景下，哺乳动物异种克隆方案被提了出来。就在“多莉”羊诞生后不久，科学家就提出异种克隆濒危动物的设想，并指出这一研究，无论是对发育生物学理论研究，还是拯救濒危物种都具有十分积极的意义。

童第周教授是我国鱼类异种核移植研究的先驱者，也是最先获得异种克隆鱼的科学家。他利用自制的显微注射仪成功地在金鱼的两个亚科 (*Carassius auratus* 和 *Rhodeus sinensis*) 上进行细胞核移植。后来，童教授及其后继者在不同科和目之间进行异种核移植，如将金鱼核 (鲤形目鲤科) 移到泥鳅 (*Paramisgurnus dabryanus*) 去核卵母细胞中 (鲤形目鳅科)，也获得了较高的囊胚发育率。这些研究说明，低等动物卵母细胞中存在的胞质因子可以使已分化了的细胞核去分化和重编程。哺乳动物的异种核移植研究早在 20 世纪 70 年代就有人尝试。异种核移植的研究较早见于 1973 年，Brun 尝试了将多种哺乳动物的体细胞核移植到爪蟾 (*Xenopus*) 卵内。1977 年 De Roeper 等将 Hela 细胞核移入爪蟾卵内，结果发现 Hela 细胞核在爪蟾卵内能够发生染色体扩展和 DNA 合成，暗示爪蟾卵母细胞内存在某些因子能够激活哺乳动物的体细胞核。早期对哺乳动物的异种核移植研究较少，1992 年，Wolf 等将牛的 16~32 细胞期的卵裂球细胞核分别移

植到其他动物的去核卵母细胞中，如美洲水牛、山羊、绵羊和仓鼠卵中，或把山羊、绵羊核移植入去核的牛卵母细胞中，但只有在牛、羊之间和牛、水牛之间的异种重构胚，体外培养可以发育到囊胚。

20 世纪末，同种细胞克隆在多种动物成功以后，科学家开始研究以应用为目的的异种体细胞克隆。1999 年，陈大元教授领导的研究小组将大熊猫的子宫上皮细胞、骨骼肌细胞和乳腺上皮细胞分别移入去核的兔卵母细胞中，得到了 10% 左右的囊胚发育率。同年，Dominko 等把绵羊、猪、猴和大鼠体细胞核移植到去核牛卵母细胞中，得到了异种重构胚，其中绵羊-牛、猴-牛、猪-牛异种重构胚在体外培养可以发育到囊胚。White 等把 Argali 野羊的皮肤成纤维细胞移入去核绵羊卵母细胞中，获得异种重构胚，重构胚发育到 16~32 细胞期时，移入 6 只受体绵羊中。胚胎移植后第 45 天用超声波检测发现有 1 只妊娠，但该受体羊妊娠到 59 天发生流产。到 21 世纪初，哺乳动物异种克隆的可行性才得到证实。2000 年，Lanza 等把一种野牛 (*Bos gaurus*) 的皮肤成纤维细胞移入去核的牛卵母细胞得到重构胚，最后有一头受体妊娠到期，产下 1 头发育正常的异种克隆野牛；2001 年，Loi 等将欧洲盘羊 (*Ovis orientalis*) 的颗粒细胞注入绵羊的去核卵母细胞中，重构胚发育到囊胚时移入受体绵羊子宫角，产下了 1 只正常的欧洲盘羊。这些研究结果表明，牛、羊、兔的卵母细胞可以使异种体细胞核去分化和重编程。虽然哺乳动物异种克隆的可行性已经得到证实，但作为一种技术却还远未成熟。

(三) 哺乳动物克隆的基本程序

哺乳动物克隆包括 5 个主要步骤：①核供体细胞的选择和准备；②受体细胞的获取和去核；③细胞核的移植；④重构胚的激活；⑤重构胚的培养和移植 (图 16-3)。

1. 供体细胞的选择和准备

(1) 核供体细胞的选择

哺乳动物的胚胎细胞和各种体细胞核中都包含了该物种特有的全套遗传信息。高度分化了的体细胞，其遗传物质并没有发生丢失，而只是基因选择性地开启或关闭 (可能有少数类型细胞的基因发生了重排或改变，如淋巴细胞)。因此，理论上讲，各种类型的体细胞经过核移植都能重获发育全能性，但实际上，能正常获得克隆动物的供体细胞类型只有少数几种：

1) 来源于生殖系统的细胞：如颗粒细胞、卵丘细胞、输卵管上皮细胞、子宫上皮细胞、未成熟的睾丸支持细胞等。而尤其以卵丘细胞和颗粒细胞为核供体所获得的克隆动物后代最多，这可能与其较低的分化程度有关。此外，还可能有下列几个因素：卵丘细胞是静止在 G₀/G₁ 期的细胞；卵丘细胞包围在卵母细胞周围，通过纤毛与卵母细胞发生物质交流，因此核移植后二者胞质容易相互兼融；卵丘细胞内具有端粒酶活性，保持着正常的端粒长度。因此，这些细胞不会因端粒问题而影响重构胚的发育。

2) 来源于胎儿细胞：如胎儿成纤维细胞。

3) 来源于成年个体生殖系统以外的细胞：如乳腺上皮细胞、皮肤成纤维细胞、耳成纤维细胞、肌肉细胞、尾尖成纤维细胞等。

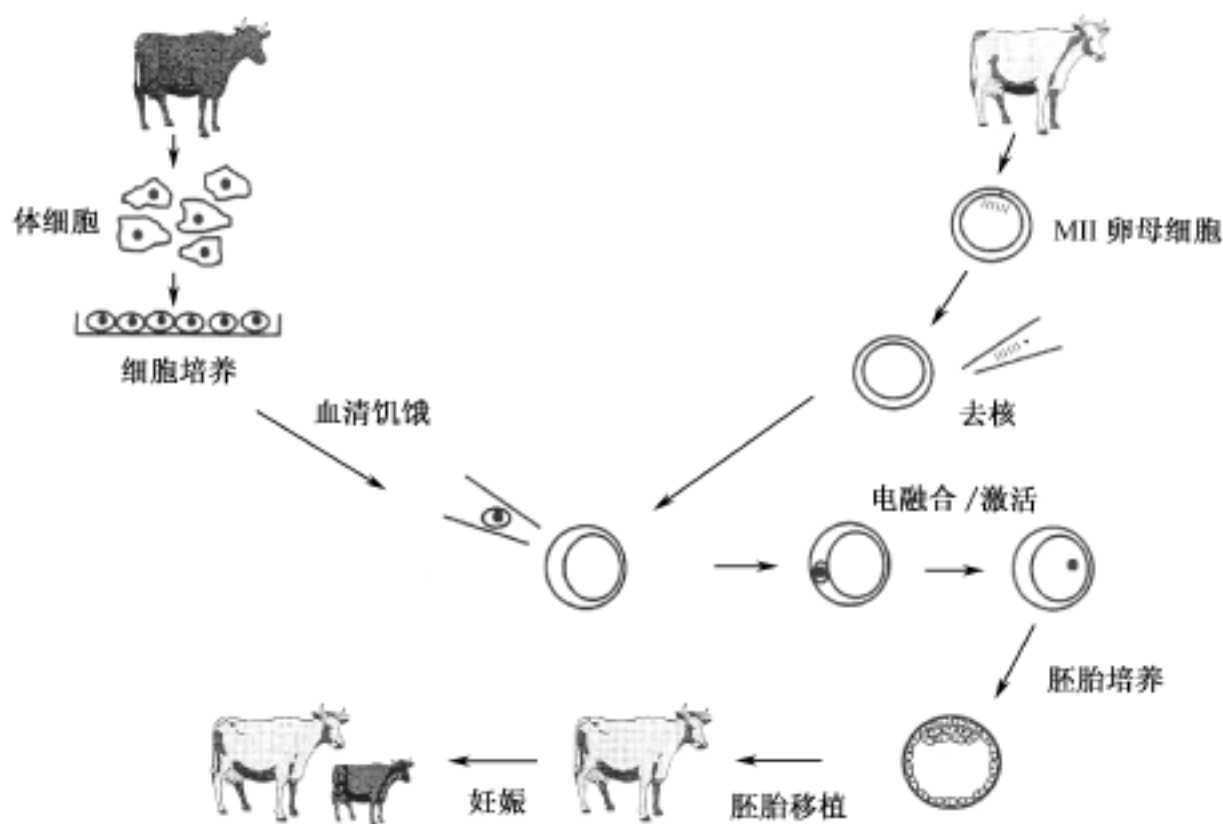


图 16-3 动物克隆的一般程序 (引自 Colman A, 2000)

4) 终末分化的 B 淋巴细胞或 T 淋巴细胞: Hochedlinger 等用完全分化的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞作为核供体克隆了小鼠胚胎, 用这种克隆胚胎先获得胚胎干细胞, 然后把胚胎干细胞注入到小鼠四倍体囊胚中, 胚胎移植后获得了分别来源于 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的克隆小鼠。

从现有的研究来看, 不同类型的体细胞经过核移植后, 去分化和重编程的能力可能有一定的差异。到目前为止, 还没有用神经细胞、原始生殖细胞进行核移植得到过克隆动物。

(2) 供体细胞的准备

应用于体细胞核移植研究的供体细胞主要有新鲜制备的和经体外培养的两大类。所谓新鲜制备是指直接从新鲜组织分离, 不经过体外培养过程, 如利用小鼠卵丘细胞克隆小鼠就采用的是这种方法, 该方法迅速、简便, 细胞不易发生遗传改变, 缺点是不能进行细胞周期同步化处理, 并且多次实验很难得到遗传背景统一的材料。首次应用培养细胞进行核移植研究的是 Campbell 等, 他们通过显微手术分离 9 日龄绵羊胚胎的胚盘细胞, 并且从类胚胎干细胞集落中建立细胞系——TNT4 细胞系, 其形态十分类似胚胎干细胞, 但更加扁平、上皮化, 至第六代后出现明显的分化趋势。在应用于核移植之前, 他们将细胞进行血清饥饿培养, 诱导细胞进入“静止”状态, 采用这种方法培养细胞进行核移植获得了克隆羊。该方法结合其他技术 (如冷冻和保藏技术) 可以获得大量同一遗传背景的供体细胞, 并且容易进行细胞周期同步化处理, 拓展了核移植的研究领域和研究方法, 其缺点是细胞培养传代是一项繁琐的工作, 传代过程中由于条件变化, 也可能引起供体细胞的遗传突变。

(3) 供体细胞周期

一个处于正常分裂周期的细胞具有 G_1 、 S 、 G_2 和 M 期四个明显的细胞周期阶段。

此外细胞还可能退出细胞分裂周期而进入静止期，叫 G_0 期（可以看作是特化的 G_1 期）。 G_0 期细胞分为两类，一类是暂时脱离细胞周期的休眠期细胞，它们不增殖，但在适当的刺激下可以重新进入细胞分裂周期；另一类是终末分化细胞，不能再进入细胞分裂周期，如神经细胞和肌纤维细胞。 G_1 期主要是完成与 DNA 合成启动有关的事件，为进入 S 期作准备；S 期主要进行 DNA 的复制和组蛋白、非组蛋白等染色体蛋白的合成，以及核小体结构的包装； G_2 期是为 M 期作准备，合成一定的蛋白质和 RNA 分子，这是进入有丝分裂所必需的，如与有丝分裂装置有关的微管蛋白合成即完成于 G_2 期；M 期完成细胞的分裂。一般来说， $S + G_2 + M$ 的时间变化较小，而 G_1 期持续的时间因细胞种类等差异可能很大。在动物早期胚胎的卵裂球中，由于成熟卵母细胞中已经储存了足够的营养物质和几乎所有细胞周期过程中所需要的酶，因此早期胚胎的 G_1 期和 G_2 期非常短，整个细胞周期实际上只由极短的 S 期和 M 期构成。对于体细胞来说， G_1 和 G_2 期的时间相对较长。

G_0 期细胞作为核供体可能具有一定的优越性，因为 G_0 期细胞的细胞周期状态与受体卵母细胞（MII 期卵）的周期基本相似，而且， G_0 细胞的基因转录大都已关闭，在重构胚中可能更容易发生去分化和重编程。细胞周期对克隆的成功可能不是关键的因素，实际上，除 S 期细胞外，应用 G_1 期、 G_2 期和 M 期的细胞作为核供体，均已获得了克隆动物。

对体细胞进行同步化处理目前有以下几种方法：

1) G_0 期同步化：将细胞培养液中的血清浓度由 10% 降低到 0.5%，培养 2~3 天，诱导细胞进入休眠状态，休眠状态的细胞大部分是 G_0 期细胞，这种方法被称为“血清饥饿法”。

2) G_1 期同步化：在 M 期恢复时，用抑制 DNA 合成的药物，如阿菲迪霉素 (aphidicolin) ($0.1 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$) 和羟基脲 (hydroxyurea) (5 mmol/L) 处理后，可以使细胞周期停滞在 G_1/S 转折期；用 $5 \mu\text{mol/L}$ 的噻氨酯吡啶 (nocodazole) 处理小鼠 4-细胞胚胎 9 小时，可使其发育到 8 细胞时卵裂球的细胞周期同步在 G_1 期。也有人用 $0.02 \mu\text{g/ml}$ 的 demecolcin 将细胞培养过夜，然后，将细胞在培养液中洗 2 遍，再在正常培养液中培养 2~3 小时即可。

3) G_2 期同步化：放线菌酮 ($5 \mu\text{g/ml}$) 可以抑制肽链延长，是一种蛋白质合成抑制剂，它可以诱导细胞同步化于 G_2 期，对细胞其他活动中的氨基酸利用无影响；另外 6-二甲氨基嘌呤 (6-dimethylaminopurine, 6-DMAP) 也可以用于 G_2 期同步化。Crissman 采用两步法对细胞进行 G_2 期的同步化。首先，细胞连续 2 次用胸苷进行阻断，使其停留在 S 期，然后，用拓扑酶 II (topoisomerase II) 抑制剂使细胞阻断在 G_2 期。

4) M 期同步化：用噻氨酯吡啶 ($3.0 \mu\text{g/ml}$)、乙酰基秋水仙碱 (colcemid, $0.02 \sim 0.1 \text{ mg/ml}$) 和秋水仙胺 ($0.05 \mu\text{g/ml}$) 培养 3 小时处理，可以使细胞同步于 M 期。

2. 受体细胞的选择和准备

用于核移植的受体细胞有去除原核的合子、2-细胞期胚胎卵裂球和成熟卵母细胞（包括激活后的卵母细胞）三种，这三类受体细胞用于动物克隆都得到过克隆动物。第一类去除原核的合子，最早是由 Illmensee 和 Hope 报道，他们将卵裂球细胞核直接注入

去除原核的合子中获得了克隆小鼠。第二类是早期胚胎，如 Tsunoda 等将 8-细胞卵裂球移入去核的 2 细胞的卵裂球中也获得了克隆小鼠。第三类受体即是去核的 MII 期卵母细胞，这是哺乳动物核移植中使用最多的一类受体。

在 MII 期卵胞质中存在一类重要的蛋白因子，称为成熟促进因子（maturation promoting factor, MPF）。MPF 是由细胞周期蛋白 B（cyclin B）和 $p34^{cdc2}$ 构成的蛋白复合体，是一类蛋白激酶，其活性由其磷酸化状态所控制。卵母细胞中的 MPF 活性在第一次和第二次减数分裂中期时活性最高。成熟的哺乳动物卵母细胞停滞在 MII 期，并维持着高水平的 MPF 活性。一旦受精或被激活，MPF 活性急剧下降，完成第二次减数分裂并排出第二极体，染色质发生凝集，形成原核。一方面，II 期卵母细胞在没有适当的刺激下，细胞周期是处于停滞状态，便于进行体外操作；另一方面，II 期卵母细胞的胞质环境完全不同于合子中的胞质环境，具有接纳处于不同细胞周期核的能力。因此，在核移植研究中，II 期卵母细胞是主要的核受体。在进行核移植之前，首先要将 II 期卵母细胞中的核物质去除，去除核物质的方法主要有以下几种：

(1) 盲吸法

Prather 等认为刚刚成熟的 II 期卵母细胞的核（实际上是染色体）总是处于第一极体附近，因此，以第一极体为指示，吸去第一极体及其下方的 $1/4 \sim 1/3$ 的胞质，就可以去除 II 期卵母细胞的核，因为没有染料示踪核的位置，故该方法称为“盲吸法”。该方法简单易行，对卵子的损伤较少。其缺点是随着卵龄的增加，卵母细胞核和第一极体都会发生移动，不能准确地估计核的位置，影响去核的效果。

(2) DNA 染色示踪去核法

卵母细胞用 DNA 特异性染料 Hoechst33342 染色后，借助荧光显微镜的紫外光使结合了染料的 DNA 发出蓝色荧光。该方法的去核率可以达到 100%，缺点是长时间的紫外线照射会损伤卵母细胞，造成胚胎发育降低。一般可通过缩短紫外线照射时间（小于 15s）和避免直接照射卵母细胞（检查吸取的胞质部分的荧光）的方法克服这一缺点。因此，该方法目前仍被使用。另外也有人尝试用对活细胞损伤较小的长波激发光进行示踪，如绿光激发的 SYBR14（激发波长 485nm，发射波长 520nm）和用红光激发的若丹明（激发波长 550~580nm，发射波长 605nm），但是 SYBR14 在连续光照下容易发生淬灭，而若丹明不能透过活细胞膜，必须通过注射的方式才能进入卵母细胞内部。

(3) 末期去核法

先将 II 期卵母细胞激活，待排出第二极体后，去除第二极体及其下方的少量胞质。因为，此时卵母细胞染色体与第二极体连在一起，因此只要去除少量胞质就可以达到去核目的，去核成功率可以达到 98%，远高于盲吸法。但该方法的缺点是得到的是已激活的 S 期胞质。

(4) 高渗处理示核法

用 3% 的蔗糖溶液处理小鼠卵母细胞，由于溶液的渗透压改变，使染色体所在区域的折光性发生改变，可以很清楚地在普通倒置显微镜下观察到核的位置，准确地去核。通过加大蔗糖的浓度，对牛的卵母细胞也成功地显示了核的位置，得到了理想的去核效果。

(5) 功能性去核

此方法曾在两栖类核移植研究中普遍采用，将卵母细胞用 DNA 特异性 Hoechst 染色，然后用紫外线照射，使 DNA 断裂失活，但长时间的紫外线照射会降低卵母细胞活力。

(6) 化学去核法

在小鼠体外成熟培养液中加入依托泊甙 (etoposide) 后，使 MI 期卵母细胞的染色体结合特别紧密，随后将处于后期和末期的卵母细胞放入含有放线菌酮 (cycloheximide, CHX) 和依托泊甙的培养液中，所有染色体均随第一极体而排出。这种两步去核法可得到 96% 的去核率。但去核卵母细胞中的 MPF 活性已经消失，须将这些卵母细胞再放入不含放线菌酮和依托泊甙的培养液中培养 15h，恢复卵母细胞的 MPF 活性。Baguisi 用 taxol、放线菌酮和秋水仙胺分别处理 MII 期卵母细胞，结果用秋水仙胺获得了最好的去核效果，去核率可以达到 54%，并用该方法也获得了克隆小鼠，而 Gasparini 用秋水仙胺去核只得到 24% 去核率。化学去核法操作简便，基本上不会损失卵胞质。

(7) 显微镜显示法去核

极化显微镜 (polscope) 是将液晶与电光控制及软件结合起来的光学系统，利用圆偏振光显示出双折射结构，并且与样品的定位无关，这就加速了对双折射结构的定量光观察。Liu 等 (2000) 报道用极化显微镜能清楚地观察到几个不同品系的小鼠 (C57B6、CF-1、CD-1 和 B6C3F1) 以及仓鼠卵母细胞的纺锤体，去核效率达到 100%。以前，虽然在 Nomarski imaging 系统下可以模糊地看到几种品系小鼠纺锤体和中期板的结构，但对于大多数动物来说，如绵羊、牛、猪、以及其他一些品系的小鼠 (如 B6C3F1)，该光学系统则不起作用，因为这些动物的卵母细胞中含有大量的脂肪颗粒，使其在光镜下呈现黑色，影响对核物质的观察。然而，用极化显微镜能清楚地观察到人和牛的卵母细胞中的纺锤体和中期板。

(8) 裸卵法或半卵法

有人将牛卵母细胞的透明带去除，把裸卵切成两半，用 Hoechst 染色后选择无核的一半，将两个无核的半卵夹住一个体细胞，在含有植物血细胞凝集素 (PHA) 的培养液中培养聚合，再用电融合方法使体细胞和裸卵融合，形成一个核移植胚胎。该方法简便，无需昂贵的显微注射装置，但需要去除透明带，显然在应用上受到局限。

3. 细胞核移植方法

将一个细胞核移植到去核的受体胞质中，通常有两种方法，一种是间接的细胞融合方法；另一种是直接的注入方法。

(1) 间接的细胞融合方法

将供体细胞注射到卵周隙中，通过细胞融合使供体细胞核进入受体胞质中。这一方法自 1983 年 McGreath 和 Solter 发明后，被广泛地应用于核移植研究。根据细胞融合方法的不同，又可以分为以下几种：

1) 病毒介导的融合：多种病毒都可以介导细胞融合，其中在动物细胞融合中最常用的是灭活的仙台病毒 (HVJ)。细胞融合的过程是：首先有足够数量的病毒颗粒附着

在细胞膜上起搭桥的作用，使细胞黏着成堆，在 37℃ 下，黏结部位的细胞膜破坏，形成通道，细胞质流通和融汇后，完成细胞融合。操作中要将病毒和供体核同时注射到透明带下，一般在 15~30min 内完成融合，1h 后检查最后的融合效果，此方法在小鼠克隆研究中获得成功，但在其他动物上融合率较低。

2) 化学融合：聚乙二醇 (PEG) 介导的细胞融合，其作用过程是先使细胞膜解聚，然后接触部位的细胞膜融汇，胞质流通，最后导致细胞融合。其处理方法是待融合的卵移入 0.1ml 含 45% PEG 的缓冲液中清洗一次后，移入同一溶液中处理 90s，然后用培养液洗三次，培养 2h 后，观察融合效果。此方法在早期的核移植研究中应用较多。

3) 电融合：Willadson 等在绵羊的核移植研究中首先引入了电融合的方法。电融合的原理是电脉冲可以使细胞膜上出现微小孔洞，而如果微小孔洞出现在两个相互靠近的细胞接触部位，就会引发两者之间的膜融合。Sowers 通过对血红细胞电融合发现，在电脉冲作用下，细胞膜出现两类直径不同的孔洞，一类为直径 8.4nm 的大孔洞，另一类为直径 0.5nm 的小孔洞，而小孔洞被证明是介导细胞融合的主要途径。由于电融合效率高、操作简便，所以在核移植研究中广泛应用。影响细胞电融合的因素很多，如温度、电脉冲参数、细胞膜的状态、融合液的渗透压、离子种类及浓度等。融合液及电脉冲参数对细胞融合的影响最大。常用的融合液一般是以一定浓度的甘露醇、山梨醇或蔗糖为基础液，添加少量的钙、镁离子，为了减少卵母细胞透明带的黏性，还要在融合液中添加一些牛血清白蛋白 (BSA)。应用融合液的类型对物种没有特异性，而融合液的渗透压对融合效果则有直接的影响，通常融合液的渗透压要稍稍高于卵母细胞的渗透压，这样在操作过程中，对卵母细胞有一定的保护作用。电脉冲的参数包括脉冲的电压强度 (以千伏/厘米表示)、脉冲持续时间 (也称脉冲宽度)、脉冲次数和多次脉冲之间的间隔时间。选用什么样的电融合参数，主要与卵母细胞的状态有关，如卵母细胞的时期、物种、大小和质膜的状态。要通过一些具体的实验来确定最佳的融合条件。

(2) 胞质内注射方法

在以往的核移植操作中，细胞融合是一个效率很低的步骤。Wakayama 等为了避开细胞融合，采用了把供体细胞核直接注射入受体卵胞质中的方法，他们先用略小于供体细胞直径的移植管，反复吹吸供体细胞，将供体细胞膜破坏，并借助一种压电装置 (piezo) 将细胞核直接注射到受体卵胞质中。应用这一方法以卵丘细胞、尾尖细胞和 ES 细胞等作为核供体，成功克隆了小鼠 (图 16-4)。应用这种方法也获得了体细胞克隆猪。应用普通的显微操作系统，直接将体细胞核注射入受体卵胞质中，也获得了克隆小鼠。胞质内直接注入方法可以减少供体胞质对重构胚发育的影响，特别是可以精确控制核移植后激活的时间间隔，因为通常应用的电融合方法，在融合时也往往将卵母细胞激活。

4. 重构胚的激活

哺乳动物正常排出的卵子一般是停滞在 MII 期，只有经过受精后才会重新进入细胞周期进行分裂，启动发育程序。将一个细胞核移植到去核的卵母细胞中，重组成一个新的细胞，称作重构胚。虽然重构胚的染色体恢复了二倍性，但其胞质还是停滞在卵母细胞的 MII 期状态，只有通过一定的外界刺激才能启动其发育程序，启动重构胚发育

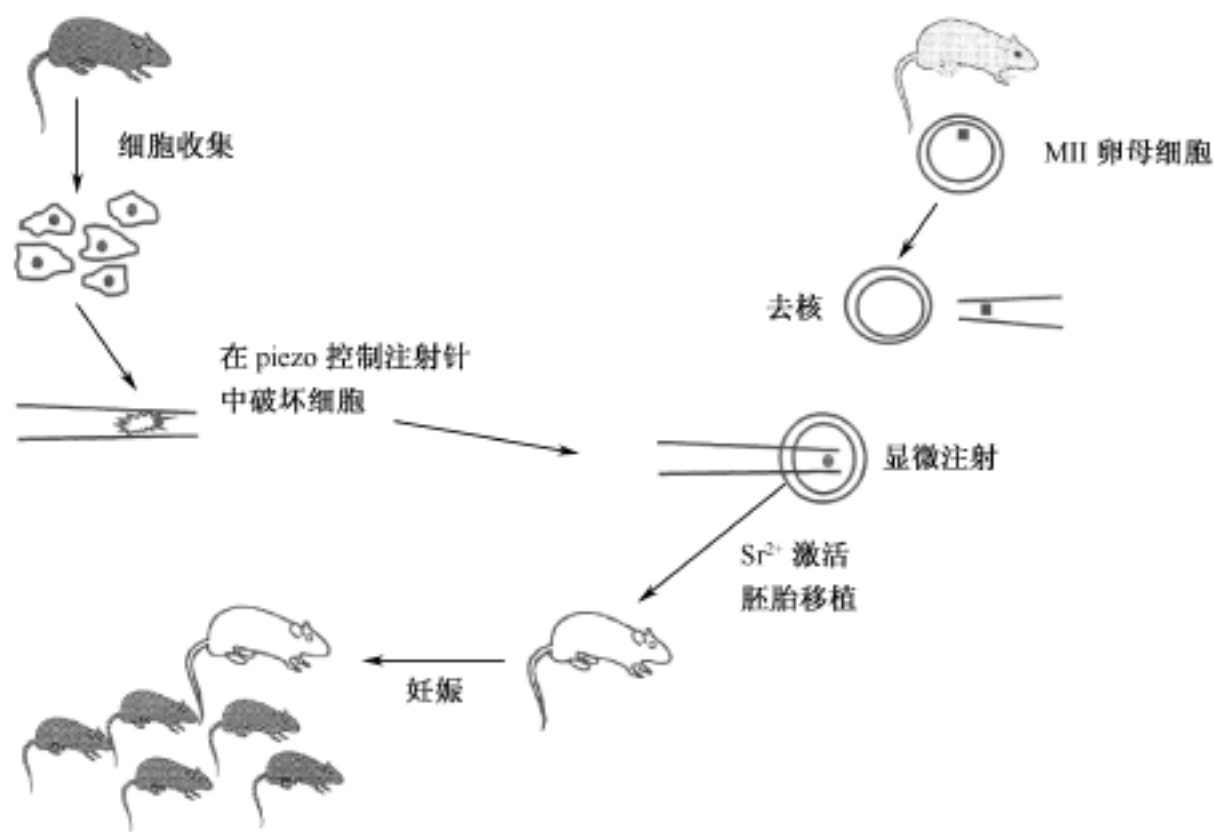


图 16-4 利用压电装置 (piezo) 将细胞核直接注射到受体卵胞质中克隆小鼠示意图
(引自 Colman A, 2000)

的过程叫激活 (activation)。重构胚激活的方法目前有三类：化学激活法、电激活法和精子提取物激活法。

(1) 化学激活

一般来说，能激活卵母细胞的化学物质都能激活重构胚。用于化学激活的物质和方法有多种：

1) Ca^{2+} 载体 A23187 激活：许多无脊椎动物和脊椎动物卵母细胞用 Ca^{2+} 离子载体 A23187 处理后，可以刺激皮质颗粒释放、第二极体排放和原核形成。小鼠和猪的卵母细胞用 A23187 处理后，可在无细胞外 Ca^{2+} 存在下，产生胞内 Ca^{2+} 振动，这说明 A23187 可触发细胞内储存 Ca^{2+} 向胞质的释放。A23187 在牛、山羊等体细胞克隆实验中已成功应用。一般使用浓度为 $5\sim 10\mu\text{mol/L}$ ，处理时间为 5min。

2) Ionomycin 激活：Ionomycin 可以模拟精子触发的钙振荡，在绵羊、牛和猪的体细胞核移植实验中已得到应用。使用浓度一般为 $5\mu\text{mol/L}$ ，处理 5min，也有研究者在猪的核移植研究中使用 $15\mu\text{mol/L}$ 的高浓度处理 20min，证实可以提高激活胚胎的发育率。

3) 乙醇处理：7%~8%乙醇在室温下作用 5~7min，可以激活卵母细胞。乙醇通过 IP_3 介导的 Ca^{2+} 释放而达到激活卵母细胞。

4) Sr^{2+} 激活： Sr^{2+} 激活卵母细胞可能是通过替代细胞内的非自由 Ca^{2+} ，诱导细胞内储存 Ca^{2+} 的释放。 Sr^{2+} 单独使用时可诱导一个长时程的 Ca^{2+} 升高，如与 DDT (dithiothreitol) 配合使用效果更好。 Sr^{2+} 多应用于对小鼠卵母细胞的激活。将小鼠的卵母细胞在含 $4.6\sim 10\text{mmol/L}$ SrCl_2 的无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 培养液中孵育 0.5~2h 后，排放第二极体的比例可高达 88%。 4mmol/L SrCl_2 加上 1mmol/L DTT 在小鼠卵母细胞上可

获得反复的 Ca^{2+} 振动, DTT 还可能促进 2 价阳离子的内流。

5) 嘌呤霉素 (puromycin): 卵母细胞的激活是一系列的信号传递过程, Ca^{2+} 只是这一信号级联过程中的一个较上游的信号分子, 影响其下游的任一信号分子都能控制卵母细胞的激活过程。嘌呤霉素的作用就属于这种情况, 其主要作用是抑制 Cyclin B 的产生, 以降低 MPF 的活性。但嘌呤霉素在不同动物上的作用效果很不稳定。

6) 放线菌酮: CHX 作用于 80S 核糖体从而抑制肽链的延伸, 进而抑制蛋白质的合成 (如 Cyclin B、CSF, 使钙信号所作用的下游蛋白分子的合成作用受到抑制。作为一种辅助的激活方法, CHX 经常与其他激活方法共同作用, 进一步提高重构胚的激活效果, 使用浓度一般为 $10\mu\text{g/ml}$ 。

7) 6-DMAP 的激活作用: 蛋白激酶抑制剂 6-DMAP 本身不能灭活 MPF, 但它能加速卵子激活后 MPF 及其他相关激酶去磷酸化, 并抑制其重新磷酸化, 从而加速激活的卵子由中期向间期的转变, 阻止第二极体的排出, 促进单个原核的形成, 使激活的卵子保持正常的染色体倍性。因此 6-DMAP 也是提高重构胚激活效果的一种辅助激活剂。使用浓度为 $1.9\sim 2\text{mmol/L}$, 处理时间为 $3\sim 5\text{h}$ 或更长。

8) Thimerosal 的激活作用: 巯基氧化剂 Thimerosal 能够诱发卵母细胞内钙离子的多次升高, 主要是通过致敏 IP_3 受体来动员胞内钙库, 它可以在小鼠、仓鼠和牛的卵子内引发钙振荡。它的这一作用可以通过巯基还原剂 DDT (dithiothreitol) 逆转。在猪的核移植研究中, 用 Thimerosal 短暂处理后, 在 DDT 中培养已经获得成功。

9) 三磷酸肌醇的激活作用: 胞内钙库的释放通过特异性的钙释放通道而实现。钙释放通道的开启受 1, 4, 5-三磷酸肌醇 (IP_3) 受体和 ryanodine 受体的调节。把受体激活剂 IP_3 注射入细胞中后, 可以使钙水平呈脉冲式升高。在无钙、镁离子激活液中加入 $25\mu\text{mol/L}$ 的 IP_3 后, 结合电激活和 6-DMAP 处理, 在兔的核移植研究中取得了良好的效果。

(2) 电刺激激活法

电刺激可产生显著的跨膜 Ca^{2+} 内流。一般认为短而高的直流电脉冲可导致真核生物物质膜脂双层不稳定。这种可逆的不稳定使得质膜瞬间产生小孔洞, 便于细胞内外离子和大分子的交换。孔洞大小受质膜电位变化、脉冲时程、培养液离子强度以及细胞类型等多种因素影响。质膜在温度稍高时恢复快, 这与膜脂和蛋白质的流动性有关, 也因细胞种类而异。在细胞外 Ca^{2+} 存在时, 电刺激可在多种动物上诱导卵母细胞活化。此外, 重复电刺激实际上也是模仿受精过程中的 Ca^{2+} 震荡。电激活被广泛应用于哺乳动物核移植重构胚的激活。

(3) 精子提取物激活法

MII 期卵在受精过程中, 会被精子上的某种因子激活。这种激活因子可能是精子胞质中的可溶性蛋白因子。在精子进入卵母细胞后, 这种蛋白因子释放作为信号分子激活卵母细胞内的钙释放系统, 从而激活卵母细胞。因此, 向卵母细胞内注射精子蛋白提取物也可以激活卵母细胞。Choi 等采用马精子提取物对马卵和马重构胚进行激活, 孤雌激活率可达 90%, 对马重构胚的激活率也可达 71%, 而在对照中, 用 A23187 和 CHX 对重构胚激活, 则只获得了 29% 的激活率。因此, 他们认为精子提取物可以提高重构胚的激活率。

5. 重构胚的培养和移植

(1) 胚胎培养

通过核移植的方法构建的重构胚一般在体外培养一段时间后才移植到寄母体内。重构胚的体外培养系统一般都采用该物种体外受精胚胎的体外培养系统，但在同一培养条件下，重构胚的体外发育能力远远低于体外受精胚胎的发育能力，这是由于重构胚本身因素造成的，还是由于体外培养系统不适宜于重构胚的培养，仍不清楚。但可以肯定，由体细胞核移植的重构胚，其发育能力要远低于正常胚胎，因为体细胞核首先要在重构胚中去分化和重编程，这一过程所涉及的因素太多，只要一个因素失控都有可能影响到胚胎的进一步的发育。

(2) 胚胎移植

重构胚的移植方法和步骤基本上和体外受精胚胎的移植方法相同。根据动物的种类不同，在胚胎发育的不同阶段采取手术移植或非手术移植。一般选用自然发情或激素处理后的受体动物进行移植。家兔的体细胞克隆经过多年的试验才于 2002 年取得成功。在此之前，有多个实验室都得到了兔的体细胞克隆胚，这些克隆胚在体外培养都有很高的囊胚发育率，但移植到寄母体内后却不能着床。后来发现，兔的克隆胚胎在体外的发育时程比正常胚胎要滞后一段时间，由于兔的着床窗口期很窄，将克隆兔囊胚移植到同期处理的母兔子宫中，这些母兔子宫的着床窗口期已过，胚胎无法着床。通过将克隆囊胚移植到推迟 22h 的受体兔中，则获得了克隆兔。因此，在动物克隆过程中，根据不同动物的生殖特点，选择合适的受体动物和胚胎移植程序也是克隆成功的关键因素之一。

(四) 哺乳动物体的细胞克隆机理

通过分析已往报道的动物克隆实验可以发现，不管使用的供体细胞是什么发育阶段（从胚胎细胞到老年动物的体细胞），不管供体细胞是什么类型，也不管供体细胞是来自何物种，重构胚能发育到期的比例都不超过 5%，大部分重构胚在发育过程中死亡，而且还有一部分出生的克隆动物具有胎儿超大综合征（large offspring syndrome），表现出胎儿超重，胎盘发育异常；还有一部分克隆动物的呼吸系统、免疫系统和其他系统发育不正常，导致出生后不久死亡等。如此低的克隆效率到底说明了什么？难道在所有的组织中，只有不到 5% 的细胞具有发育全能性吗？是否可以通过技术的改进来提高克隆效率呢？体细胞在重构胚中的去分化和重编程是如何进行的？又受到了哪些因素的影响？近年来，对动物克隆效率低的这一普遍事实，促使许多研究者从物种的克隆转移到克隆机理的研究上。

1. 重构胚细胞核的重建和核重编程

受精卵的合子核和体细胞核在结构和功能上均存在巨大的差异。在基因表达模式上，胚胎细胞和体细胞完全不一样，哺乳动物在个体发育过程中，其组织中正在分化和已经分化的细胞都具有组织特异性和细胞特异性的基因表达模式，如在颗粒细胞中转录非常活跃的基因可能在皮肤或肌肉细胞中不表达。但当将一个成年动物的体细胞核移植

到去核的卵母细胞中，重构胚可以发育成一个正常的个体，这说明成年体细胞中的基因表达模式经过细胞核移植后，可以恢复到合子期状态。体细胞核在重构胚中要恢复到合子期状态，必须经历结构和功能上的转变，将这种转变过程称为重构胚的核重建 (nuclear reconstruction)。体细胞核在重构胚中去分化 (dedifferentiation)，然后按一定的时空程序重新启动基因表达，重构胚的这一功能转变过程叫核重编程 (nuclear reprogramming)。

重构胚经过激活后，在第一次细胞分裂期间，会有大量的蛋白质从卵胞质向细胞核中运动，这种运动伴随着核膨胀 (nuclear swollen) 和体细胞核中异染色质的明显减少，体细胞核中的蛋白质有 75% 以上在这一过程中丢失，细胞核进行重建。核膨胀形成的类原核 (pseudo-pronucleus) 可以被认为是核重建和重编程的标志。爪蟾早期胚胎的细胞周期由 S 期和 M 期组成，DNA 复制在 20min 内完成，如果复制未完成也不影响 M 期的启动和卵裂。如果将体细胞核移入 S 期卵胞质的抽提物中，核膨胀和染色体去凝集过程会减慢，核重建完成后，体细胞核在 20min 内完成一次 DNA 复制。如果卵母细胞的生发泡先破裂，其内容物与胞质混合，则更利于核重建。这表明生发泡中储存的物质将参与体细胞核的重建。这些物质中有分子伴侣如核纤溶酶和 N_1/N_2 。分子伴侣主要介导核心组蛋白向 DNA 的转运以及核小体的构建。在受精之后，组蛋白 H_2A 和 H_2B 进入精子染色质的同时，核纤溶酶还介导去除富含精氨酸的精子特异的鱼精蛋白从精子染色质上解离下来。在卵母细胞成熟的过程中，核纤溶酶被磷酸化，磷酸化的核纤溶酶有利于去除精子核中的鱼精蛋白和精子染色质解凝集，以便于雄原核的形成。一种依赖 ATP 的多聚酶也参与了体细胞核的重建过程，这些属于 SWI/ SNF 家族并具有螺旋酶活性的蛋白能够以组织特异性的方式，解除与核基质结合的 TATA 结合蛋白，让 DNA 或核小体暴露出来，从而发生 DNA 结构上的转变。

核仁的变化也是重构胚核重建的一个重要特征。Kanka 等以体外受精的牛胚胎为对照，研究了两种核移植胚胎的核仁超微结构，一种以 MII 卵胞质 (未活化) 为受体，另一种以 S 期 (活化) 胞质为受体。对照组在前 3 次细胞周期中都是核仁前体 (第一个时期)，8-细胞期时在核仁前体中央有电子透明区的初级空泡 (第二个时期)。以 MII 卵胞质为受体的重构胚，在融合后 1h 核膜碎裂或完全破裂，在融合后 3h 又重新恢复。此时网状原纤维颗粒核仁基本保持圆形。重构胚 2-细胞时的核仁前体由混杂的丝状物和次级空泡组成。在对照组胚胎发育到 2-细胞时，未观察到有典型的核仁前体。没有核仁前体的重构胚不能发育到 8-细胞。相反，由 S 期胞质为受体的重构胚在融合后核膜完整，到 2-细胞时供体卵裂球原来的网状核仁变为典型的由同源原纤维结构组成的核仁前体，在 4-细胞时出现一个初级空泡，比对照组早了一个细胞周期。因此认为，只有那些已活化的胞质为受体的重构胚才进行了完全的核仁重建，最早在重构胚的 4-细胞期，供体核仁结构进行重新组织，形成有功能活性的核仁。这些核仁超微结构的变化与重构胚 RNA 合成相关。核仁超微结构在核移植后的变化反映了 rRNA 转录的抑制和重新激活。32-细胞期的兔胚胎的核仁是有活性的核仁，在其颗粒组分中镶嵌着许多原纤维中心，由组成密集的原纤维的细线相互连接。核移植 10~15h 后，核仁发生剧烈的变化，失去颗粒物质，核仁结构瓦解，核仁组分分离。第一次卵裂后自核仁分离的原纤维组分完全抑制了核仁转录，核糖体 RNA 的转录在 8-细胞期恢复，核仁超微结构的一

系列变化与正常兔胚胎发育类似。32-细胞期时，前核糖体颗粒排入胞质，可能是运送核糖体的调节机制发生了改变。Ouhibi 等应用外胚层细胞作为供体核研究了猪重构胚核仁超微结构和核糖体 RNA 合成的变化，并研究了融合前和融合后 16~18h 核仁的形态变化和转录模式。融合前外胚层细胞有网状核仁及 RNA 合成活性，而在融合后的重构胚中核仁结构进行了调整，在圆形致密的核仁前体和网状核仁内均无 RNA 合成。这些结果表明，猪外胚层细胞的核移入到去核 MII 期卵母细胞中，无论进行了完全或不完全的核重建，均无 RNA 合成。核仁超微结构的变化与 RNA 合成的变化是相一致的，有核仁活性的核在移植后，核仁超微结构发生变化，使核仁呈现无活性的特征。核仁活性在核移植胚胎的发育过程中的出现与正常胚胎相同。

目前，还不清楚核重建与核重编程之间的关系，但重构胚的成功发育还主要依赖于细胞核在功能上的一系列调整，也即核重编程。大量调节染色质结构的蛋白和酶被认为是核重编程的主要调节物质。最早在蛙克隆研究中，核重编程用来描述细胞核被移植到卵胞质中所出现的形态和分子上的变化，激活后的卵胞质可以抑制移植入细胞核的 RNA 合成，而诱导 DNA 的复制。蛙体细胞重构胚的第一次卵裂过程中，会出现非组蛋白从细胞核转运到细胞质的现象，也有从细胞质转运到细胞核的，但主要是从细胞质转运到细胞核。这说明，在核重编程过程中，染色质蛋白发生了修饰和改变。现在，通过直接分析染色质上的蛋白质变化，对这一过程已有了一些初步了解。染色质成分较明显的变化是体细胞核的组蛋白 H1 的丢失，取而代之以卵母细胞核的特异组蛋白 B4 和 HMG1，同时，体细胞核中的组蛋白 H2A 和 H4 被磷酸化。在小鼠、兔、猪和牛的体细胞核移植中，也观察到了类似的现象。连接组蛋白 H1 参与了早期胚胎的基因表达调节，体细胞型的 H1 组蛋白在卵母细胞中几乎不存在或浓度极低。当小鼠的体细胞核移植到卵母细胞后，体细胞型 H1 组蛋白很快就消失。体细胞型组蛋白 H1 的减少将有利于基因重排。组蛋白的酶修饰方式包括磷酸化、甲基化、乙酰化和泛素化。组蛋白的酶修饰以及这些修饰的解除过程，是核重编程的一个重要方式。

二十年前就已发现，哺乳动物细胞核中来自父亲和母亲的两套基因组是不等价的。在小鼠中，如果胚胎中的两套基因组均来自父亲或来自母亲，则这种胚胎不能发育到期，雌核胚 (gynogenetic embryos) 不能正常形成胎盘结构，雄核胚 (androgenetic embryos) 的个体发育受阻。这是由于母源和父源基因组中的后生遗传 (表观遗传, epigenetics) 修饰所造成的。在哺乳动物中，DNA 甲基化和染色质构象的变化是胚胎发育和转录调控的重要方式。小鼠的配子发育过程中发生第一次甲基化波动。原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 发生去甲基化，在雄性的精子发生和雌性出生后卵子发生阶段开始发生重新甲基化，导致成熟的精子和卵子基因组与体细胞相比有较高度度的甲基化 (基因印迹, imprinting)。雄原核在受精后几小时内即发生主动去甲基化，然而印迹基因和一些重复序列可逃过此过程。雌原核中发生被动去甲基化。到桑椹期时甲基化程度达到低谷。在囊胚期，内细胞团重新发生甲基化，但滋养层及其发育的胚盘和卵黄囊低甲基化。牛着床前胚胎中的 DNA 甲基化变化与小鼠类似，也包括雄原核的主动去甲基化、雌原核的被动去甲基化以及重新甲基化三个阶段，但重新甲基化在 16 细胞时期即发生，这导致囊胚中滋养层细胞的甲基化程度较高。Kang 等检测了包括卫星 DNA、SINE、LINE 及组织特异性单拷贝基因在内的牛的多个基因，发现卫星 DNA 和

SINE 有被动去甲基化现象，但 LINE 和单拷贝的组织特异性基因的去甲基化多数持续到囊胚，只有 galanin 基因在囊胚期发生重甲基化。DNA 甲基化的模式在体细胞中是非常稳定的。甲基化的不正常改变会导致胚胎的发育异常。

甲基化酶对哺乳动物的发育有重要作用，这可从敲除甲基化酶基因的小鼠表型看出。DNA 甲基化转移酶 (DNA methyltransferase1, Dnmt1) 基因敲除小鼠不能发育到期，在原肠中期死亡；Dnmt3a 基因敲除小鼠可发育到期，但个体小且大约在 4 周后死亡；Dnmt3b 基因敲除的小鼠直到妊娠第 9.5 天时发育正常，但出生前死亡；Dnmt3a 和 Dnmt3b 双重基因敲除小鼠的表型类似 Dnmt1^{-/-}。Dnmt3L 基因敲除小鼠可育，但胎儿因胎盘缺陷死于妊娠第 10.5 天。且 10 日龄基因敲除胚胎的 DNA 甲基化程度是野生型胚胎的 30%，这表明 DNA 甲基化对哺乳动物的正常发育具有很重要的作用。

体细胞一个很重要的特征就是基因组的高度甲基化，在核移植过程中它们是如何去除甲基化而恢复到类似于合子的全能性，其具体机制目前还不清楚。对克隆牛的桑椹胚和囊胚中的一些重复序列的检测表明，其甲基化水平与供体细胞的基因组类似，比正常胚胎的甲基化水平高。克隆牛桑椹胚的分裂间期核中的 DNA 甲基化水平也比较高，这说明虽然体细胞核在去核的卵母细胞中发生了类似于受精过程的去甲基化过程，但是并不完全，进一步的去甲基化并没有出现，并在 4 - 8 细胞胚胎的细胞核中出现了过早的甲基化过程。这些结果表明，大多数重构胚在发育早期的核重编程过程不完全，尤其是去甲基化明显不足。这很可能是由于体细胞核中存在着 Dnmt1，从而使基因组维持着甲基化状态，导致细胞分化出现异常。据报道，处于 G₀/G₁ 期成纤维细胞中的 Dnmt 水平明显降低，甲基化程度降低，并且染色质发生凝集，转录和翻译活性也下降，且 mRNA 降解，这也是休眠期细胞更适合于核移植后重编程的可能原因。重构胚的甲基化模式改变和去甲基化的不完全，还可能是导致牛、羊克隆时常出现胎儿超大综合征的原因之一。

目前的体细胞克隆动物中既有雌性动物，也有雄性动物。雌性哺乳动物的体细胞中有两条 X 染色体，但只有一条染色体具有活性，另一条染色体则在胚胎发育过程中被大量甲基化而失活。雌性哺乳动物胚胎在着床前，细胞核中的两条 X 染色体均有转录活性，在胚胎着床后出现胚层分化时，其中一条 X 染色体就要失活，选择哪一条 X 染色体失活，在胚胎的外胚层细胞中是完全随机发生的，而在滋养层 (trophectoderm, TE) 细胞中则是由一种尚不清楚的机制使父本 X 染色体选择性被失活。在小鼠的体细胞核移植过程中，雌性体细胞核中的两条 X 染色体只有一条具有活性，当移植到去核的卵母细胞中后，两条 X 染色体都首先会去甲基化，重新获得活性。重构胚着床后，也与正常胚胎一样，其中一条 X 染色体重新失活。然而，在滋养层中，选择哪一条染色体失活则不是随机的，而是体细胞中失活的那条 X 染色体被选择性地失活了。当用两条 X 染色体都是活跃的胚胎干细胞进行核移植时，发现 X 染色体不但在外胚层中是随机失活，而且在滋养层中也是随机失活。这些结果说明，通过甲基化而获得的基因印迹在核移植中可以保留，核移植过程中的核重编程不影响基因印迹模式。

合子阶段的胚胎细胞核几乎没有 RNA 转录活性，早期胚胎的发育主要是由母源性 RNA 和蛋白质控制的。只有胚胎发育到一定的阶段，控制胚胎发育的 RNA 和蛋白质才会从母源性转变成合子性 (maternal to zygotic transition, MZT)。这一阶段一般都是物

种特异性的。MZT 的一个主要特征是有大量的可以检测到的基因转录过程，合子核从时间和空间上控制着胚胎的发育进程。将体细胞核移植到去核的卵母细胞中，细胞核发生重建，同时还要去除分化，也即关闭所有转录的基因，而后重新在时间、空间和数量上重建基因表达模式。牛胚胎发育过程中，MZT 发生在 8-细胞期，家兔是 8-细胞期或 16-细胞期，而小鼠则是发生在受精卵或 2-细胞期。在小鼠、兔和猪的实验中，将具有转录活性的卵裂球细胞核移植到去核的 MII 期卵中，在重构胚中 RNA 的转录活性几乎全被抑制。这些结果表明，去核的 MII 或 S 期卵胞质可阻止供体核的转录活性，这种抑制作用不依赖供体核的细胞周期，而仅与受体的胞质有关。在牛的核移植中，用 8-细胞卵裂球作核供体，重构胚在最初的三个细胞周期中 RNA 合成被抑制，到 8-细胞期后 RNA 合成才重新开始，这与正常受精的牛胚胎相同。但有报道表明，在牛的早期重构胚中可检测到核 RNA 的转录。对牛重构胚基因表达的研究表明，一些基因在转录水平有所变化，如 bFGF、TGF、IGF-II 和 IGF-I 受体基因转录上调，而 IGF-I 基因转录下调，在小鼠中这些基因都是印迹基因。免疫化学研究表明，移植后供体核发生了一系列的变化，如牛、猪和小鼠的 B 型层粘连蛋白增加，而 B 型层粘连蛋白与胚胎卵裂球和未分化细胞有关；牛体细胞组蛋白 H2 被胚胎组蛋白 H2 所替代。目前还不清楚这些变化是否参与核重建和重编程过程。

2. 核供体和核受体的细胞周期

第一只体细胞克隆动物——“多莉”羊是用经过休眠处理的乳腺上皮细胞核移植后得到的。研究者曾认为，成功克隆“多莉”羊的关键是供体细胞经过了休眠处理，因为这种细胞大部分是处于 G_0 期。也许是这一原因，对供体细胞和受体细胞的细胞周期对核移植效率的影响，一直备受研究者的关注。

(1) 供核细胞的细胞周期

正常生长的体细胞是以有丝分裂的形式进行增殖，每进行一次有丝分裂，细胞都要经历 G_1 期、S 期、 G_2 期和 M 期四个不同的阶段，细胞经历这四个阶段一次就完成一个细胞周期。 G_1 期是处于 M 期与 S 期之间的一个阶段，这一阶段决定细胞是否开始下一个细胞周期，并为细胞进入 S 期作好准备，此时细胞核为二倍体。进入 S 期，DNA 开始合成，这一阶段的核物质处于活跃的复制状态。 G_2 期是位于 S 期和 M 期之间的时期，该期的细胞核为四倍体。在细胞周期中， G_1 期对细胞进入 S 期起重要作用，一旦细胞通过 G_1 期的检验点 (check point)，则会进入 S 期。如果在不适的条件下，细胞会停滞在 G_1 期或在 G_1 期时退出细胞周期，处于既不生长，也不分裂的相对静止状态，这种细胞叫休眠细胞，停滞在 G_1 期的细胞称为 G_0 期细胞。一般通过改变培养条件，可诱导细胞进入休眠状态，如血清饥饿。

从理论上讲，除 S 期的细胞外，其他各个时期的细胞都可以用于核移植。但处于不同细胞周期的细胞，核移植后核发生重编程的能力可能不一样。Campbell 等用培养的已分化的绵羊胚胎细胞作为供核进行核移植，当用培养 1~3 代细胞时获得了个体，而用 6~13 代的细胞却没有发育到期，但对细胞进行休眠处理后却获得了克隆动物。Wilmut 等第一次用休眠过的成年动物体细胞进行核移植，获得了“多莉”羊。Wakayama 等用处于 G_0 期小鼠体细胞获得了克隆小鼠。后来发现，不用休眠的细胞也可以克隆动物。

Wakayama 和 Yanagimachi 比较了经血清饥饿处理和未经血清饥饿处理的小鼠尾尖细胞, 将两类细胞核移植后都获得了正常的克隆动物。Ogura 等用未经休眠的小鼠尾尖细胞作为供体, 通过电融合方法也获得了克隆小鼠。近年来, 应用细胞同步化的方法, 可获得大量处于同一时期的体细胞。通过对已确定细胞周期的细胞进行核移植发现, 除 S 期外, 其他各个周期的细胞用于核移植时都能得到克隆动物。Kasinathan 等用 G_1 期的牛成纤维细胞获得了克隆牛。处于 M 期的细胞被认为是与 MII 期卵母细胞最同步的一种细胞, 用 M 期的细胞进行核移植可以得到较高的囊胚发育率, 虽然也能获得发育到期的克隆个体, 但着床后的胚胎死亡率很高。通过对细胞周期与克隆效率的研究, 寻找最合适的供体细胞周期用作核移植, 这对提高动物克隆的效率, 进一步了解克隆的机理都将有很大的帮助。

(2) 受体卵胞质的细胞周期

在核移植中, MII 期卵、合子和 2-细胞卵裂球都曾被作为受体, 并得到过克隆后代, 但在体细胞克隆中, 合子和 2-细胞卵裂球极少被研究者使用, 其原因是这种受体对体细胞核的接受性较低, 对核进行重编程的能力较弱。MII 期卵母细胞的胞质对处于不同周期的体细胞核都有很强的接受能力, 是目前进行体细胞克隆的主要受体。MII 期卵母细胞中含有 MPF。MPF 是一种具有蛋白激酶活性的蛋白复合体, 当 MPF 处于活化状态时, 可导致核膜破裂 (nuclear envelope breakdown, NEBD)、早熟染色体凝集 (premature chromosome condensation, PCC) 和核仁消解等现象。MII 期卵母细胞中含有较高水平的 MPF 活性, 当受精或激活后, MPF 活性迅速下降。

(3) 核供体和受体细胞周期之间的相互作用

在哺乳动物中, 正常体细胞的基因组含有两套染色体 ($2n$)。在一个细胞周期中, 基因组的所有 DNA 在分裂前必须完整地复制一次。如果 DNA 没能复制或复制多于一次, 在分裂后细胞的染色体倍性将出现异常。虽然细胞对每次分裂时确保 DNA 只复制一次的机制非常复杂, 但在分裂前确保核膜完整是其中的一个重要的机制。当将体细胞核移入到高 MPF 活性的 MII 卵胞质时, 核膜会立即破裂, 并出现早熟染色体凝集现象。NEBD 和 PCC 的程度取决于 MPF 的活性以及细胞核在 MPF 中暴露时间。NEBD 发生后, 胞质中一些因子可以直接接近 DNA, 从而改变 DNA 的构象, 不论是处于什么细胞周期, DNA 都将被诱导形成染色体。NEBD 和 PCC 对细胞核的影响程度, 取决于供体细胞所处的细胞周期位置, 如处于 G_1/G_0 期的供核细胞, 其 DNA 为二倍体, 因此, 发生 PCC 后, 会凝集成单个染色单体; 处于 G_2 期的供核细胞, 其 DNA 是四倍体, 因此, PCC 后会形成二倍染色单体; 而处于 M 期的供体细胞, 核 DNA 本身是处于染色体状态, 因此, 移植到 M 期的细胞核后, 不会发生 PCC 现象。不管供体细胞是处于 G_0 、 G_1 、 G_2 或 M 期, 在核移植中, NEBD 和 PCC 不会对细胞核引起明显的遗传损伤。相反, 如果用处于活跃复制的 S 期细胞进行核移植, NEBD 和 PCC 则会使 DNA 复制中断, DNA 形成典型的“粉末状”形态 (pulverized), 这样会造成 DNA 损伤。卵母细胞被激活后, 随着卵胞质中 MPF 活性的下降, 染色体去凝集, 核膜重新形成。在这种情况下, 不管供体细胞核处于什么细胞周期阶段, 由于 NEBD 的作用, 使一些许可因子 (licensing factors) 接近 DNA, 启动 DNA 的复制。相反, 如果将受体卵母细胞在核移植前激活, 在体细胞核移植到胞质中之前, 卵胞质中的 MPF 活性就已下降, 移植的体细

胞核将不会出现 NEBD 和 PCC，而这时 DNA 是否复制则取决于供体细胞所处的细胞周期位置。

在实际过程中，可以结合核移植和激活过程对卵母细胞的 MPF 活性进行控制，获得具有不同 MPF 活性的受体卵胞质。这一过程一般有三种情况：①是将细胞核移植到去核的 MII 期卵胞质中，随后将重构胚激活。将去核的 MII 期卵母细胞立即用于核移植时，此时卵胞质中有高水平的 MPF 活性，因此无论处于什么周期的供体细胞核移入后，在高水平的 MPF 作用下都会发生 NEBD 和 PCC，DNA 与胞质因子接触。重构胚经激活后，MPF 活性下降，核膜重新形成，染色体去凝集，并启动 DNA 的复制，其结果就会出现以下情况：移入的 G_1 期细胞核的染色体由 $2n$ 变为 $4n$ ；移入的 G_2 期核的染色体由 $4n$ 变为 $8n$ ，使重构胚形成四倍体，但胚胎也可以通过排放极体形式维持染色体的正确倍性；移入的 S 期细胞核，其原来的 DNA 复制将被中断，并将重新复制一次，因此其染色体倍性发生紊乱，不能形成正常的纺锤体。因此，在这一情况下，供体细胞周期对重构胚的发育非常重要，处于 S 期的细胞不能用作核供体。 G_2/M 期的细胞也可以用作核供体，并且得到了克隆动物。 G_2/M 期的细胞之所以能作为核供体，这是由于重构胚可以通过排出第二极体的方式，维持正确的染色体数目。②是预先将卵母细胞激活，使卵母细胞中的 MPF 下降，然后再移植供体细胞核。在受体卵母细胞无 MPF 活性后移入供体核，供体核则不会发生 NEBD 和 PCC，此时，DNA 是否合成则与核移植时核供体的细胞周期有关。因此，这种经预先激活的 MII 期卵母细胞质可以接受处于任一细胞周期的供体细胞核，而不会对供体细胞核产生遗传损害，这种经过预先激活的 MII 期卵母细胞称为“万能受体”。③将供体细胞核移植到未激活的 MII 期卵胞质中，卵胞质中的 MPF 活性维持较高水平，移植入的细胞核发生 NEBD 和 PCC，并且使 PCC 保持一段时间，这一方法的目的是使供体核在卵胞质中停留较长的时间，使胞质中的一些因子充分与供体核 DNA 接触，有利于核的重编程，从而提高重构胚的后期发育能力。应用该方法时，供体的细胞周期对重构胚的发育能力也是十分关键的，S 期的供体细胞也将出现“粉末状”形态。

也许供体细胞的细胞周期对动物克隆的成功不是关键因素，但可能在某种程度上影响到动物克隆的效率。核供体和受体的细胞周期，以及它们之间的相互作用，对核重编程和动物克隆效率的影响仍有待进一步探讨。

3. 体细胞克隆动物的端粒

(1) 端粒与端粒酶的结构和功能

真核生物线状染色体的两末端必须封闭和受到保护，而端粒就是封闭和保护染色体末端的一种特殊的核蛋白结构，由 DNA 和蛋白质构成。所有脊椎动物的端粒 DNA 都是由一个十分保守的六碱基重复序列 (TTAGGG) $_n$ 组成，哺乳动物的端粒 DNA 序列中含有成百个六碱基重复拷贝。端粒的长度通常指的是端粒 DNA 的长度，用碱基对表示 (bp)。对不同的物种、不同的组织、不同的细胞、不同的染色体，甚至同一对染色体之间，端粒 DNA 的长度也不一样。人的染色体端粒 DNA 有 5~15kb，而小鼠可达 20~150 kb。结合在端粒 DNA 上的蛋白质对染色体末段的保护起着重要作用。哺乳动物的端粒蛋白与低等生物不同，*Oxytricha nova* 的端粒蛋白是 TEBP，酵母是 CDC13 蛋

白，都是 DNA 单链结合蛋白，而哺乳动物中则是 TRF1 和 TRF2 蛋白，其中 TRF2 蛋白对单链 DNA 无亲和性，它结合在端粒 DNA 的双链区，使 DNA 形成一个套索，也叫 T-环。

端粒具有三个生物学功能：①封闭功能 (capping function)：通过端粒对染色体末端的封闭，防止 DNA 末段发生降解、融合和不适当的重组。②锚定功能 (anchor function)：在细胞减数分裂和有丝分裂过程中，分裂器通过端粒锚定染色体，进行染色体的移动和分配。③DNA 末段复制缓冲功能 (end-replication “buffer” function)：在 DNA 复制过程中，由于通常的 DNA 聚合酶只有单向复制功能，造成 DNA 5' 末端的最后一个片段无法被复制，因此，每次复制后，DNA 的末端都会丢失一个片段，丢失的片段长度每次可达 50~200bp。端粒的末端复制缓冲作用可从两个方面实现，一方面通过端粒酶来完成端粒 DNA 的末端复制，使端粒保持一定的长度；另一方面在大多数体细胞中，端粒酶无活性，细胞每次分裂后，端粒都会缩短一小片段，因此，端粒成了细胞分裂的“计数器”或“分裂时钟” (mitotic clock)。当端粒缩短到一定的程度后，就不能对染色体末端起封闭和保护作用，暴露的染色体末端能激活 DNA 损伤应答系统，可能通过 p53 介导的信号通路来诱导细胞进入休眠、衰老或凋亡状态。

端粒酶是一种逆转录酶，由一个蛋白催化亚基 (TERT) 和一个 RNA 分子 (TR) 组成，RNA 分子中包含复制端粒重复序列的模板。人的端粒酶蛋白催化亚基 (TERT) 的基因已经克隆。现已证明，在人的体细胞中，调节端粒酶活性的关键是 TERT 基因的表达。因为在所有的细胞中，TR 都有一定程度的表达，而 TERT 蛋白只在端粒酶具有活性的细胞中发现。通过将 TERT 基因转入无端粒酶活性的人体细胞中，可以在这些细胞中重建端粒酶活性。在体外培养中，表达 TERT 蛋白的转基因细胞，其端粒稳定，细胞寿命延长。在小鼠的基因组中，TR 基因只有一份拷贝。对 TR 基因敲除小鼠的研究发现，端粒在这种小鼠中以每代 4.8 ± 2.4 kb 的速度缩短。在端粒没有完全丧失前，基因敲除小鼠可以存活，也可以繁殖，说明端粒酶对胚胎的发育和分化，以及对组织细胞的更新调节不起关键作用。TR 基因敲除小鼠在第四代以后，染色体中已基本检测不到端粒重复序列，并开始表现出高频的染色体末端融合、染色体畸型和染色体非整倍性；在雄性小鼠中出现精子发生障碍，以及睾丸组织中的细胞凋亡增加。调节细胞端粒酶活性是控制端粒长度的主要机制。在不同组织和细胞中，存在不同的端粒酶活性，癌细胞在整个细胞周期中，端粒酶都具有活性，但在静止细胞和终末分化的细胞中，端粒酶无活性。端粒酶在大多数细胞中的半衰期只有大约 24 小时，细胞调节端粒酶的活性有以下几个途径：①抑制 TERT 基因的转录。在发育过程中，大多数组织是通过这一途径实现对端粒酶活性的调节。②通过选择性的剪接，产生无活性或无功能域的 mRNA。③细胞退出细胞周期时出现的转录抑制。④通过控制端粒酶全酶的组装和稳定，调节端粒酶的半衰期。⑤通过对端粒酶的转录后修饰，调节其活性。

端粒酶的活性与动物发育阶段有关。在卵母细胞中，端粒酶活性很低；受精后的合子中，酶的活性有所增加，但随后又下降；直到 8-细胞期，端粒酶活性又开始升高，当胚胎发育到桑椹期，端粒酶活性出现大幅度的增加，与卵母细胞相比，端粒酶活性增加了约 40 倍；到囊胚期，端粒酶活性达到高峰。随着胚胎进一步的发育，出现细胞分化和组织形成，端粒酶的活性整体上开始下降，最先是在大脑和骨组织，然后是在性

腺、肌肉、肺、肾和肝组织中的端粒酶活性下降，到出生以后，在大多数体细胞中已检测不到端粒酶活性，不过，仍有少数组织的细胞中保留了端粒酶活性，如生殖细胞系、干细胞和睾丸组织。在不同组织来源的细胞中，端粒酶的活性也有所不同，如在成年牛的成纤维细胞中，端粒酶活性非常低，而在胎儿成纤维细胞中，端粒酶活性则很高，两者可以相差 16 倍。研究细胞传代对端粒酶活性的影响时发现，牛类胚胎干细胞培养至 34 代，端粒酶活性下降了 31%，胎儿成纤维细胞培养 24 代后下降了 42%。细胞经血清饥饿处理后，端粒酶活性也显著下降，饥饿 10 天后，类胚胎干细胞中下降 44.8%，胎儿成纤维细胞中下降 51.4%。

(2) 克隆动物中的端粒

在哺乳动物中，染色体端粒随着动物年龄的增加而缩短。在体细胞克隆动物中，染色体端粒的长度是如何变化，以及克隆动物与两性生殖动物的端粒是否有差异，对这一问题的研究目前尚未取得一致结果。克隆动物的端粒长度变化与其同龄动物相比，已观察到三种情况，即端粒变长、端粒长度相似和端粒缩短。

Lanza 等将 45 日龄的牛胎儿成纤维细胞，在体外培养传代直到接近衰老。通过电镜观察显示，大部分表现出衰老细胞的形态，如出现明显巨大的高尔基复合体、大量的溶酶体、细胞体积增大和细胞碎片聚积等。他们利用这种衰老的成纤维细胞进行核移植，共获得了六头健康克隆牛。在克隆牛出生后 5 个月，取外周血细胞进行端粒分析后发现，六头克隆牛的染色体的端粒均显著长于同龄牛。他们还将衰老的胎儿成纤维细胞进行核移植，得到克隆牛胎儿，并在体外培养克隆牛胎儿的成纤维细胞，这种细胞在体外可培养到 92 代，而同龄的非克隆牛胎儿成纤维细胞只能增殖 60 代。对端粒分析表明，克隆牛胎儿成纤维细胞的端粒比非克隆牛胎儿成纤维细胞要长 2~4 kb。因此，他们认为，克隆牛的端粒长度在核移植过程中，不但可以恢复，而且还能够延长。这一结果令人振奋，因为如果通过克隆能使染色体端粒延长，也就意味着可能使动物的寿命延长。用早期胚胎的卵裂球（49-细胞期前）得到的克隆牛及克隆牛的后代端粒也比同龄牛的端粒要长。因此，在动物克隆中，染色体端粒延长这一现象可能不是特例。与此同时，另几个实验室也对克隆牛的端粒进行了研究。Tian 等用取自 13 岁的老年奶牛的成纤维细胞和颗粒细胞进行核移植，共得到 10 头克隆牛。对端粒的分析表明，克隆牛的端粒长度平均为 15.38 ± 0.62 kb，与同龄牛（ 14.73 ± 0.49 kb）比较无显著差异，而与核供体牛（ 12.43 ± 0.49 kb）相比，存在显著差异。Betts 等用牛胎儿成纤维细胞和老年成纤维细胞分别进行克隆，分析克隆牛的端粒，结果不管是从胎儿成纤维细胞，还是老年成纤维细胞克隆的牛，其端粒的长度与同龄牛相似，克隆牛的端粒长度不受供体细胞端粒长度的影响，但他们却没有观察到如 Lanza 等所报道的端粒延长现象。Wakayama 等对克隆小鼠的研究结果似乎也支持克隆动物的端粒长度可以恢复正常的观点，他们对克隆小鼠进行再克隆，连续克隆到第六代，克隆小鼠的端粒长度也还是正常，没有出现端粒缩短的现象。最近，Miyashita 等的观察更能说明问题。在哺乳动物中，精子细胞的端粒是维持该物种特有的长度，并不受动物年龄的影响。Miyashita 等检测两头克隆公牛的精子端粒发现，克隆牛精子的端粒长度与正常公牛的精子端粒长度一样，甚至有所延长。检查克隆公牛所生后代的端粒时，也显示出克隆牛后代的端粒与同龄牛一样，没有差异。以上的实验结果似乎都说明，染色体端粒长度在动物克隆过程中得到了

恢复，端粒也发生了重编程。不过，并不是所有的实验都支持这一推论。Shiels 等对包括“多莉”羊在内的克隆绵羊进行研究发现，用胚胎或胎儿组织细胞进行核移植后所获得的克隆羊，其端粒长度与同龄羊相比要短大约 10%~15%。用培养的 6 岁母羊乳腺上皮细胞克隆的“多莉”羊的端粒长度也比同龄羊要短大约 20%。这一现象绝非只在克隆羊上发现，在克隆牛也同样存在。Miyashita 等检测了 14 头克隆牛的端粒发现，从输卵管上皮和乳腺上皮细胞克隆的 6 头奶牛的端粒无一例外均比同龄牛短，这些克隆牛的端粒长度只相当于 30~35 岁奶牛的端粒长度，而事实上，奶牛的寿命只有 15~20 岁。尽管如此，这些克隆牛在发育上并未出现任何异常，并都能正常生育。

是什么因素造成克隆动物的端粒长度有如此多的变化？为什么不同的研究者会有不同的结果？对这些问题，目前尚无确切答案。通过对这些实验进行分析，推测可能主要与克隆动物的供体细胞类型有关。克隆“多莉”羊所用的供体细胞是乳腺上皮细胞，Miyashita 等克隆牛也使用了两种上皮细胞：输卵管上皮细胞和乳腺上皮细胞。这两种细胞克隆的动物，其染色体端粒均比同龄动物的端粒要短。用肌肉细胞、颗粒细胞、某些胚胎卵裂球细胞和成纤维细胞，不管是胎儿成纤维细胞还是成年成纤维细胞，作为供体所得到的克隆动物，其染色体端粒长度与同龄动物相比，大多数一致，少数有所延长，这暗示了克隆动物的端粒长度与供体细胞的类型有关。克隆动物的端粒长度反映的是供体细胞的端粒长度和核移植过程对端粒的改变结果，也即重编程。端粒酶是目前发现的惟一一种能使端粒延长的酶。在胚胎发育过程中，端粒酶活性是受到一些未知因素的调节，端粒酶活性最高是在胚胎的桑椹期和囊胚期，然后随着组织细胞分化程度的增加，端粒酶活性逐渐下降，直至在大部分体细胞中的活性完全消失。在克隆胚胎中，端粒酶活性的变化模式与正常胚胎基本相似。缩短了的体细胞端粒在动物克隆过程中被恢复或延长，这一过程可能是在胚胎着床前后完成的，因为这时的胚胎中有较高的端粒酶活性，而且尚未出现组织分化。如果在早期胚胎中，较长时间保持着端粒酶活性，就可能使克隆动物获得较长的端粒，或者使端粒的长度恢复到该物种特有的长度。否则，克隆动物中的端粒长度不会有太大的改变，基本保持体细胞的端粒长度，就如“多莉”羊的情况。某些细胞因子参与了端粒酶活性的调节，而且这些因子与细胞类型有关，上皮细胞中也许存在某种抑制端粒酶活性的因子，或是缺乏某种调节端粒酶活性的因子，使上皮细胞克隆胚胎中的端粒酶活性受到某种程度的抑制，使端粒长度不能恢复；而在其他如成纤维细胞和肌肉细胞中，存在某种使端粒酶活性提高的因子，从而使克隆胚胎的端粒长度得到恢复，甚至延长。实际情况是否如此，有待实验证实。一些研究者还指出，克隆动物端粒长度的差异可能还来自于不同的物种、不同的克隆方法、不同的供体细胞处理方式，以及检测端粒所用的细胞类型，也许还有因克隆动物个体的数量有限，而未能排除个体差异的可能。

（五）哺乳动物体细胞克隆的研究进展

自从“多莉”羊诞生以来，哺乳动物体细胞克隆已取得了长足的发展，在短短的 6 年时间内，先后已有 10 多种动物被克隆。这些实验的成功，充分显示了哺乳动物体细胞的克隆绝非个别事例。从理论上讲，任何一种哺乳动物都是可以被克隆的，成功与否

只是一个技术问题。

1. 哺乳动物的同种体细胞克隆

1997 年，Wilmut 等人的克隆羊论文在 *Nature* 发表，来自 6 岁成年羊的乳腺上皮细胞移植到去核卵母细胞中，重构胚发育最终生出克隆羊“多莉”（图 16-5）。“多莉”出生于 1996 年 5 月，它的名字取自一位西部乡村歌星——多莉·帕顿，也许是因为 Wilmut 博士喜欢这位歌手吧，不过多莉羊恐怕生来就注定要比歌星多莉赢得更多的关注和喝彩，从它出生的那一刻起，关于它的种种质疑和争论就未平息过。“多莉”一诞生，动物体细胞克隆的消息便如雨后春笋般萌发于世界的各个角落。



图 16-5 首例体细胞克隆哺乳动物“多莉”和它的代孕母亲
(引自 Wilmut I 等，1997)

1998 年，美国夏威夷大学 Ryuzo Yanagimachi 的实验室率先进行了小鼠成年体细胞的克隆。他们使用三种细胞作为核供体：支持细胞、神经元和卵丘细胞，结果表明三种细胞均可支持去核小鼠卵母细胞早期发育。接受卵丘的去核卵母细胞移植后有 2%～2.8%发育到期，由于小鼠生殖周期短，他们很快进行了第二代克隆，也获得成功（图 16-6）。由于小鼠卵质膜较脆，抗电击能力差，加上细胞相对较小，因此电融合率比较低。Wakayama 等借助压电装置（piezo）采用胞质直接注射法，避开了细胞融合这一步。压电装置使得显微注射穿刺速度加快，减少了对受体卵质膜的损伤。2000 年，有人采用电融合方法成功地克隆了小鼠。虽然体细胞克隆小鼠已经获得成功，但到目前为止仅有为数不多的几个实验室能重复出来。究其原因，一方面与卵质膜较脆、体积较小有关，另一方面可能与小鼠胚胎基因组在 2 细胞阶段，甚至在合子阶段的后期就开始表达，留给移入核进行重新程序化的时间很短有关。

2002 年初，Hochedlinger 等用完全分化的 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞分别作为供核移入去核的小鼠卵母细胞后发育到囊胚，然后将其内细胞团培养成 ES 细胞，并将其注入四倍体囊胚腔中，获得了分别来源于 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的克隆小鼠。从某种

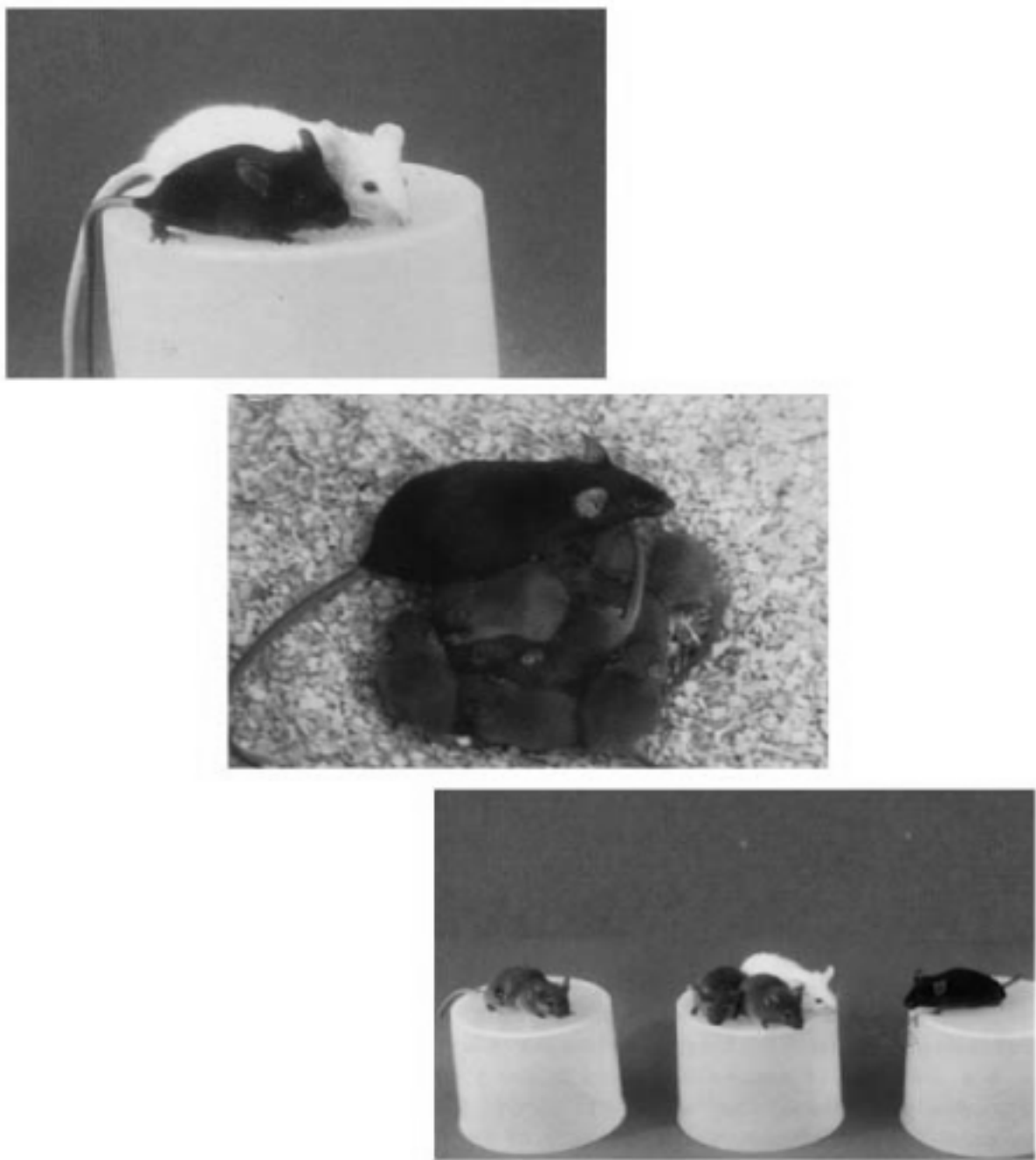


图 16-6 小鼠体细胞克隆、再克隆照片 (引自 Wakayama T 等, 1998)

意义上解决了克隆动物是来源于体细胞重编程，还是来源于夹杂在体细胞内的干细胞的争论。

“多莉”羊体细胞核移植技术建立后，很快就被扩展到在农业上以及在未来人类医药生产方面将扮演重要角色的动物上。1997 年和 1998 年，《Science》杂志报道了美国科学家用培养的携带外源基因的胎儿成纤维细胞作为供核获得转基因克隆绵羊和牛。7 个月后《Science》再次报道了日本科学家以完全分化的牛卵丘细胞和输卵管上皮细胞为核供体，成功地克隆了牛。随后，体细胞克隆牛在新西兰、法国、德国等国家也获得成功。

在中国，由扬州大学和中科院发育所合作，1999 年用胎儿成纤维细胞作为供核成功地克隆了山羊。2002 年西北农林科技大学用成年动物的体细胞克隆出山羊。2001 年 10 月，第一头克隆牛在深圳出生，但随后在喂奶中不幸被呛死；同年 11 月，山东莱阳农学院也培育出了 2 头克隆牛。上述克隆牛的胚胎都是在国外构建的。中国首批自主完成的成年体细胞克隆牛出生于 2002 年 1 月，由中国科学院动物研究所和山东中大胚胎

工程中心合作，以牛耳皮肤成纤维细胞克隆出高产奶牛和优质肉用黄牛。在技术上采用将受体卵母细胞去核时间提前、挤压去核法、细胞松弛素 D 和放线菌酮联合使用等一系列配套创新措施后，获得了 14 头克隆牛犊，有 5 头存活至今（图 16-7）。这项工作于 2003 年在新疆又得到了稳定重复。2002 年 5 月，中国农业大学也克隆出一头中国地方品种黄牛，同一研究小组于 2003 年获得了转基因克隆牛。



图 16-7 我国首次完成的成年体细胞克隆牛群体（引自 Chen DY 等，2003）

成年体细胞克隆猪出生于 2000 年，日本和美国的科学家几乎同时在《Science》和《Nature》发表了他们的研究结果（图 16-8）。Polejaeva 等将培养的颗粒细胞放入去核卵母细胞的卵周隙，电融合后发育到类合子期，再将重构胚的类合子核移入到正常受精的去原核的合子的卵周隙中，经电融合后立即移植到同期发情的受体母猪输卵管，72 枚重构胚经移植后得到 5 头克隆小猪。2002 年 2 月中国学者赖良学等在美国密苏里大学克隆出了敲除 $\alpha-1, 3$ -半乳糖苷转移酶基因的猪。

2001 年 12 月 22 日，第一只克隆猫出生。Westhusin 领导的研究小组将卵丘细胞进行培养，再原代用于核移植，获得 3 枚重构胚，并与另外两枚来源于成纤维细胞的重构胚一起移植给一只母猫后怀孕。在第 66 天时剖腹生产出第一只克隆猫（图 16-9）。

2002 年 4 月，Chesne 等在考虑到兔胚胎发育过程中快速的细胞周期动态规律以及受体子宫内短暂的着床窗口期的特点后，缩短了重构胚的活化时间，并采用非同步化的假孕母兔作为受体，移植了 371 枚以转绿色荧光蛋白（EGFP）基因兔卵丘细胞作为供核得到的 4 细胞期重构胚胎，10 只怀孕，4 只发育到期，产下 6 只仔兔，2 只出生后 1 天死亡，其他 4 只正常发育存活至今。

2003 年 5 月 4 日，一头体重 49kg 的小骡子在经过正常的 346 天妊娠后，在美国爱

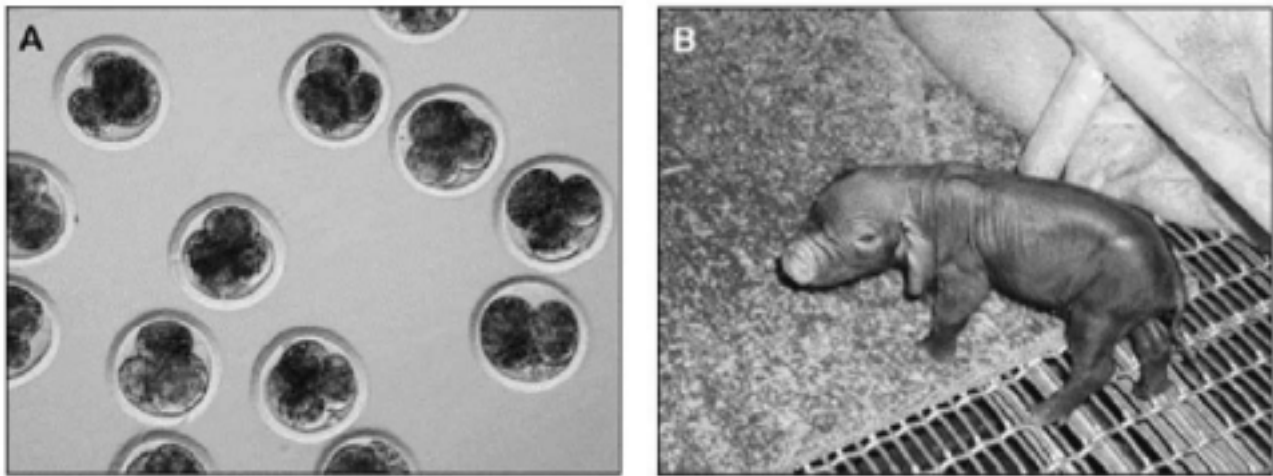


图 16-8 首例体细胞克隆猪（引自 Onishi A 等，2000）



图 16-9 体细胞克隆猫（引自 Shin T 等，2002）

达荷大学出生，这是世界上第一头被克隆的马属动物，也是第一头无生育能力的动物被克隆。由 Woods 领导的研究小组经过对体外成熟和胚胎培养体系进行改进，在培养液中提高了钙离子浓度，利用 45 天的骡子胎儿成纤维细胞进行核移植，将 305 枚重构胚移植到受体母马中，21 头受体妊娠超过 14 天，3 头受体妊娠超过 60 天，第一头克隆骡在正常妊娠 346 天后出生。

2003 年 8 月，Galli 等在《Nature》上报道他们成功地克隆了马。他们用一头成年母马的体细胞构建重构胚，再将重构胚移回到供体母马体内妊娠，最后成功地获得了自体克隆马。这一实验结果对马属动物中母体对胎儿抗原的免疫识别会影响胎儿的稳定和妊娠这一观念带来挑战。

2003 年 10 月，中国学者周琪与法国科学家合作，成功地在法国获得克隆大鼠。

2004 年李子义等成功地克隆出水貂。

2. 哺乳动物的异种克隆和异种妊娠

动物异种克隆在两个方面有别于同种克隆，一是异种核移植 (interspecies nuclear transfer)，二是异种妊娠 (interspecies pregnancy)。异种核移植是把一种动物的细胞核移植到另一种动物的去核卵母细胞中，构建成异种重构胚，异种重构胚中的细胞核与细胞质分别来源于两个不同的物种。因此，它们是一种核质杂合体 (nucleocytoplasmic hybrids)，与传统意义上的杂种不同，异种克隆动物主要表现为供核物种的遗传性状；异种妊娠是哺乳动物异种克隆中的关键技术，在体外构建的重构胚需要放回到动物的子宫中，才能完成全程发育。由于重构胚的细胞核和细胞质是来源于两个不同的物种，因此不管选用何物种作为异种重构胚的寄母，异种重构胚对于寄母来说都具有一定程度的异质性，也即重构胚的细胞核和细胞质的来源不可能同时与寄母的完全一致。

McGrath 和 Solter 在啮齿类中进行种间原核互换，发现异种重构胚在体外能进行分裂。1992 年，Wolfe 等将牛 (*Bos taurus*) 的 16~32 细胞期的卵裂球作为供核细胞，分别移植到水牛 (*Bubalus bubalis*)、羊 (*Ovis aries*) 和田鼠 (*Mesocricetus auratus*) 的去核卵母细胞中，结果发现牛-羊和牛-水牛之间的异种重构胚在体外培养后可以发育到囊胚。这些早期研究结果显示，某些哺乳动物的卵母细胞具有接受异种细胞核的能力，并且能使异种细胞核去分化，启动异种重构胚的早期胚胎发育。1999 年，陈大元等利用兔卵母细胞作为核受体，得到了异种克隆的大熊猫胚胎。同年，Dominko 等分别将绵羊、猪 (*Sus scrofa*)、猴 (*Macaca fascicularis*) 和大鼠 (*Rattus rattus*) 等动物的体细胞核移植到去核的牛卵母细胞中，异种重构胚在体外培养后也能发育到囊胚期。他们进一步将绵羊-牛、猪-牛和大鼠-牛异种重构胚分别移植到绵羊、猪和大鼠子宫中，但只有两只受体羊出现了妊娠迹象，在胚胎移植 32 天后没有发现胎儿心动，解剖子宫角可见明显的肉团块，但未见胎盘等膜性组织和胎儿残迹。White 等将盘羊 (*Ovis ammon*) 的体细胞核移植到绵羊的去核卵母细胞中，异种重构胚有 1.56% 可发育到囊胚，将 28 枚异种重构胚移植到 6 只受体绵羊的子宫中，49 天后用超声波检测发现，其中一只受体妊娠，但在 59 天后妊娠夭折。Lanza 等将野牛皮肤成纤维细胞移入去核的牛卵母细胞中，得到异种克隆野牛胚胎，体外培养异种克隆胚胎后有 12% 的囊胚发育率，将囊胚移植到受体母牛子宫中，有 18% 可以发育到胎儿阶段。在 5 头妊娠的母牛中，3 头在 46~54 天时人为中断妊娠用于其他研究，1 头妊娠到 201 天时流产，流产胎儿的体重已达 10.7 kg，其核型和表型都与供体野牛一致，另一头受体母牛妊娠到期，并产下 1 头发育正常的克隆野牛。Kitiyanant 等以水牛的胎儿成纤维细胞作核供体，分别移植到去核的黄牛或水牛的卵母细胞中，体外培养发现，水牛-水牛和水牛-黄牛的重构胚无论是分裂率，还是囊胚率都无显著差异。2001 年，Meirelles 等将瘤牛 (*Bos indicus*) 的早期胚胎卵裂球移植到黄牛 (*Bos taurus*) 的去核卵母细胞内，获得异种克隆囊胚，囊胚移植到 5 头受体黄牛中，其中二头妊娠，一头受体产下一头异种克隆瘤牛。同年，韩国的 Hwang 等用成年韩国虎 (*panthra tigris altaica*) 的耳缘皮肤成纤维细胞与牛的去核卵母细胞构建重构胚，并将重构胚移植到一只虎和三只狮子受体中，但均未发现妊娠。2001 年 1 月，美国先进细胞 (ACT) 公司宣布，一头奶牛顺利产下一头珍稀的亚洲野

牛 (*Bos gaurus*), 野牛的染色体数目是 58 条, 而奶牛 (*Bos taurus*) 则是 54 条, 分属两个不同的物种。这头克隆的野牛使用野牛的皮肤成纤维细胞作为供核细胞, 移植到去核的奶牛卵母细胞中获得异种重构胚, 并在奶牛的子宫内完成妊娠得到的。虽然, 这头牛在出生后仅两天就死于小牛痢疾病, 但这一结果表明, 野牛的体细胞核在异种的奶牛卵母细胞中能重新程序化, 并能支持异种重构胚完成全程发育。就在克隆野牛出生后不久, 异种克隆盘羊也取得了成功。Loi 等将欧洲盘羊 (*Ovis orientalis musimon*) 的颗粒细胞核移植到绵羊的去核卵母细胞中, 共获得 23 枚重构胚, 其中有 7 枚发育到囊胚阶段, 将 7 枚囊胚移入四只受体绵羊子宫中, 有两只妊娠, 其中一只在 40~50 天期间流产, 另一只受体正常妊娠最后产下一只异种克隆盘羊。异种克隆野牛和盘羊的成功证明了哺乳动物的异种体细胞克隆是可行的, 它们是继“多莉”羊之后, 动物克隆技术上的又一重要进展。

陈大元等将大熊猫成纤维细胞移植到去核的兔卵母细胞中, 构建大熊猫异种重构胚, 再将发育到 2~4 细胞期的大熊猫异种重构胚移植到经同期处理的 21 只家猫 (*Felis catus*) 受体内, 19 只受体先后返情, 另有 2 只胚胎移植 21 天后, 死于肺炎。经剖检发现其中 1 只怀孕 6 个胎儿, 微卫星分析表明有 2 个胎儿来源于大熊猫异种重构胚。另将家猫的成纤维细胞移植到去核的兔卵母细胞内, 得到猫-兔异种克隆胚, 体外培养获得 14.5% 的囊胚率。比较猫-兔异种克隆胚和猫同种克隆胚在体外的发育能力和发育时程, 两种胚胎在发育能力上无显著差异, 猫-兔异种克隆胚的前三次分裂时间是与兔同种克隆胚的分裂时间相似, 而不同于猫同种克隆胚, 但到达囊胚期的时间却是与猫克隆胚相似, 明显不同于兔同种克隆胚胎, 说明异种克隆胚的早期发育主要是由胞质控制, 到达囊胚的时间主要由核控制。

哺乳动物的异种妊娠通俗来讲是指在物种之间进行“借腹怀胎”, 即一种动物的胚胎在另一种动物的子宫内进行妊娠。在自然界中, 动物存在多个层次上的生殖隔离机制。如在遗传上, 两个不同物种的精子和卵子受精所产生的胚胎, 往往由于染色体不能正常分配及基因表达调控异常而不能发育; 在细胞水平上, 异种精子和卵子往往不能互相识别, 无法完成受精过程; 在生理上, 母体对异种胚胎存在强烈的免疫排斥现象。但物种之间并不存在严格的生殖隔离, 在某些特定的情况下, 异种妊娠也能发生, 如种间杂交动物, 驴和马杂交所得的骡子, 狮和虎杂交的狮虎兽, 斑马和驴杂交的斑驴, 这些动物的妊娠过程都属于异种妊娠。

异种妊娠可分为三类: 第一类是两物种杂交后代的异种妊娠; 第二类是物种间嵌合体的异种妊娠; 第三类是通过胚胎移植进行的完全异种妊娠。对于第一类的异种妊娠, 在自然界中发生的频率极低, 第二类和第三类异种妊娠只有在人工干预下才可能出现。通过胚胎移植技术, 可以对异种妊娠进行直接研究, 现已建立了三类主要的异种妊娠模型: 啮齿类模型、驴和马模型以及绵羊和山羊模型。通过异种妊娠研究发现, 异种妊娠失败有两个主要原因: ①胚胎的滋养层细胞与母体子宫内膜之间不能相互识别, 胚胎不能附植在子宫内膜上, 也即胚胎不能着床; ②胚胎着床后, 母体的免疫系统对胎儿进行排斥, 由于免疫排斥作用破坏了胎盘的形。

对嵌合体的研究发现, 异种妊娠能否建立与滋养层细胞的类型直接相关。当滋养层细胞与母体是同一物种时, 不管内细胞团细胞是来自何物种, 异种妊娠往往能够建立;

反之，如果滋养层细胞与母体不是同一物种，即使内细胞团细胞与母体是同一物种，也无法建立异种妊娠。在啮齿类模型中，将月鼠（*M. caroli*）的内细胞团注入去除内细胞团的小鼠囊胚腔中，将嵌合体胚胎移植到小鼠中妊娠，可以得到存活月鼠幼仔。如直接将月鼠的胚胎移植到小鼠子宫内，则不能妊娠。影响异种妊娠建立的因素有许多，如物种之间的亲缘关系、妊娠期长短、动物的体温差异、子宫结构等因素。亲缘关系也许是影响最大的一个因素，越近的两个物种，异种妊娠建立的可能性越大，如在猫科动物中，就有人用家猫作为受体，成功地繁殖了印度沙漠猫；异种克隆野牛和盘羊的成功，也许与供体和受体之间的亲缘关系较近，较容易建立异种妊娠有一定的关系。

（六）克隆胚胎或后代中的线粒体命运

线粒体是细胞的“动力工厂”，为细胞的一切生命活动提供能量，同时也是动物细胞中的惟一核外遗传物质。哺乳动物的线粒体中含有一个DNA分子，共编码37个基因，包括13条多肽、22个tRNA和2个rRNA，这些基因只是线粒体自身复制所需要基因的一小部分，大部分基因是在核DNA中。在核移植过程中，如果采用细胞融合的方法则不可避免地要将体细胞中的线粒体带入到重构胚中，因此，重构胚中同时存在受体和供体两种来源的线粒体。一个体细胞中大约有几千个线粒体，一个卵母细胞中则大约有十万个线粒体。在囊胚期前的胚胎中，线粒体只进行均匀分配而不增殖；到囊胚期后，线粒体开始增殖。在正常胚胎中，来源于卵母细胞的线粒体得到增殖，而来源于精子的线粒体经一种尚未完全清楚的机制被消除掉。在动物克隆中，从理论上讲，随着胚胎的发育，供体细胞的线粒体存在三种不同的命运：①供体细胞的线粒体随着胚胎的发育逐渐消失，受体卵母细胞中的线粒体不断增殖，最后从数量上占绝对优势，供体细胞中的线粒体则在克隆个体中完全消失；②供体细胞的线粒体随着胚胎的发育不断增殖，而受体卵母细胞的线粒体则逐渐消失，最后供体线粒体取代受体线粒体；③供体和受体的线粒体两者始终共存。

两种来源的线粒体如果没有选择压力，在囊胚期后线粒体的数量都将按几何级数增加，由于来源于体细胞中的线粒体比卵母细胞中的线粒体，在数量上至少相差十倍，通过多次增殖后，卵母细胞来源的线粒体在数量上将占绝对优势，体细胞来源的线粒体逐渐被稀释，最后导致供体来源的线粒体在个体中完全消失。实际上，许多研究人员都发现，多数同种克隆动物中的线粒体均是卵母细胞来源的，但也有卵母细胞来源的线粒体和供体细胞来源的线粒体共存的现象。Lanza等发现，用奶牛的卵母细胞克隆濒危的野牛，在所获得的三个克隆胎儿中，有11种组织中的线粒体是来源于受体奶牛，而没有来源于野牛的线粒体。Loi等用异种克隆方法克隆了欧洲盘羊，在克隆盘羊中，线粒体也完全来源于受体卵母细胞，盘羊的线粒体已检测不出。利用大熊猫体细胞作为供体，以兔卵母细胞作为受体进行核移植时，发现在囊胚期前的各个阶段，大熊猫和兔的线粒体共存，但在着床后的大熊猫胚胎中，则只能检测到大熊猫的线粒体。这可能是遗传距离较远的物种间异种克隆的线粒体遗传规律，也可能是胚胎不能发育到期的可能原因之一。在异种重构胚中，如果细胞核对供体来源和受体来源的线粒体的增殖都能够支持，但对供体来源的线粒体存在某种优先增殖的机制，那么，在克隆动物中，两种来源的线

粒体将出现共存的局面，也即第三种变化模式。Steinborn 等报道用瘤牛 (*B. indicus*) 或普通牛 (*B. taurus*) 的卵母细胞克隆牛，在 11 头克隆牛中，有 4 头是供体和受体的线粒体共存。最近，Takeda 等用单链构象多态性 PCR (PCR-SSCP) 对克隆过程中的线粒体进行检测发现，在 9 头克隆牛中，有 3 头是供体和受体线粒体共存，供体的线粒体所占比例从 6%~40% 不等。他们认为，这种高比例的供体线粒体的存在，是由于细胞核对供体线粒体优先增殖的结果。Hiendleder 等也发现，在克隆牛中普遍存在供体和受体线粒体共存的现象。

(文端成 孙青原)

主要参考文献

- 陈大元, 孙青原, 李光鹏. 2000. 受精生物学——受精机制与生殖工程. 北京: 科学出版社, 259~260
- Alberio R, Campbell KH. 2003. Epigenetics and nuclear transfer. *Lancet* 361: 1239~1240
- Babiak I, Dobosz S, Goryczko K, Kuzminski H, Brzuzan P, Ciesielski S. 2002. Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology* 57: 1229~1249
- Baguise A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempe MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 17: 456~461
- Betthausen J, Forsberg E, Augenstein M, Childs L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M. 2000. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol* 18: 1055~1059
- Betts D, Bordignon V, Hill J, Winger Q, Westhusin M, Smith L, King W. 2001. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1077~1082
- Chen DY, Sun QY, Liu JL, Li GP, Lian L, Wang MK, Han ZM, Song XF, Li JS, Sun Q, Chen YC, Zhang YP, Ding B. 1999. The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) somatic nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. *Sci China (Series C)* 29: 324~330
- Chen DY, Wen DC, Zhang YP, Sun QY, Han ZM, Liu ZH, Shi P, Li JS, Xiangyu JG, Lian L, Kou ZH, Wu YQ, Chen YC, Wang PY, Zhang HM. 2002. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod* 67: 637~642
- Chen DY, Li JS, Han ZM, Lei L, Liu ZH, Kou ZH, Ma SY, Du QK, Sun QY. 2003. Somatic cell bovine cloning: effects of donor cell and recipient. *Chin Sci Bull* 48: 549~554
- Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* 20: 366~369
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. 1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 16: 642~646
- Colman A. 2000. Somatic cell nuclear transfer in mammals: progress and applications. *Cloning* 1: 185~199
- Dominko T, Mitalipova M, Haley B, Beyhan Z, Memili E, McKusick B, First NL. 1999. Bovine oocyte cytoplasm support development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod* 60: 1496~1502
- Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. 2001. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6209~6214
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 424: 635

- Hochedlinger K, Jaenisch R. 2002. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells . *Nature* 415: 1035~1038
- Kato Y, Tani T, Sotomatu Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult . *Science* 282: 2095~2098
- Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, Mizoshita K, Tabara N. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture . *Proc Nat Acad Sci USA* 97: 990~995
- Lai L, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. 2002. Production of alpha-1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning . *Science* 295: 1089~1092
- Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, Mak J, Schertzer M, Chavez EA, Sawyer N, Lansdorp PM, West MD. 2000a . Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells . *Science* 288: 665~669
- Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P. 2000b . Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer . *Cloning* 2: 79~90
- Lanza RP, Cibelli JB, West MD. 1999. Prospects for use of nuclear transfer in human transplantation . *Nature Biotechnol* 17: 1171~1174
- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells . *Nat Biotechnol* 19: 962~964
- McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells . *Nature* 405: 1066~1069
- McLaren A. 2000. Cloning: pathways to a pluripotent future . *Science* 288: 1775~1780
- Meirelles FV, Bordonon V, Watanabe Y, Watanabe M, Dayan A, Lobo RB, Garcia JM, Smith LC. 2001. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos Indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos Taurus* oocyte . *Genetics* 15: 351~356
- Miyashita N, Shiga K, Yonai M, Kaneyama K, Kobayashi S, Kojima T, Goto Y, Kishi M, Aso H, Suzuki T, Sakaguchi M, Nagai T. 2002. Remarkable differences in telomere lengths among cloned cattle derived from different cell types . *Biol Reprod* 66: 1649~1655
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. 2003. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* . Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. 2000. Pig cloned by microinjection of fetal fibroblast nuclei . *Science* 289: 1188~1190
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dal Y, Boone J, Walker S, Ayres DL, Colman A, Campbell KSH. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells . *Nature* 407: 86~90
- Reik W, Dean W, Walter J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development . *Science* 293: 1089~1093
- Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. 2002. A cat cloned by nuclear transplantation . *Nature* 415: 859
- Steinborn R, Schinogl P, Wells DN, Bergthaler A, Muller M, Brem G. 2002. Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones . *Genetics* 162: 823~829
- Tian XC, Xu J, Yang X. 2000. Normal telomere lengths found in cloned cattle . *Nat Genet* 26: 272~273
- Wakayama T, Yanagimachi R. 1999. Cloning of male mice from adult tail-tip cells . *Nature Genet* 22: 127~128
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson, Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei . *Nature* 394: 369~374
- Wen DC, Yang CX, Cheng Y, Li JS, Liu ZH, Sun QY, Zhang JX, Lei L, Wu YQ, Kou ZH, Chen DY. 2003. Comparison of developmental capacity for intra-and interspecies cloned cat (*Felis catus*) embryos . *Mol Reprod Dev* 66: 38~45
- White KL, Bunch TD, Mitalipov S, Reed WA. 2000. Establishment of pregnancy after the transfer embryos produced from the fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes . *Cloning* 1: 47~54

- Wilmot I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. 2002. Somatic cell nuclear transfer . Nature 419: 583~586
- Wilmot I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells . Nature 385: 810~813
- Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. 2003. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer . Science 301: 1063
- Yanagimachi R. 2002. Cloning: experience from the mouse and other animals . Mol Cell Endocrin 187: 241~248
- Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation . Science 302: 1179

第十七章 环境与生殖健康

随着科学技术的进步和工业化的发展，人类对大自然的干预日益加剧。大量的化学物质通过废水、废气、废渣、农药、化肥等各种途径排入环境，造成了严重的环境污染，使人类生存的环境进一步恶化。环境污染成为全世界共同面临的重大问题。目前越来越多的证据表明，许多人工合成的化学物质可干扰人类及野生动物的繁殖和生长发育，导致种类众多的野生动物濒临灭绝；人工合成的化学物质还可引起人类的不孕不育率、畸胎率和自然流产率上升。此外，许多研究报告，全球男性的精液质量呈下降趋势，这可能与环境污染有关。由于关系到人类的生存和繁衍，环境对生殖健康的影响已日益受到人们的重视。

环境是人类赖以生存和繁衍的基本条件，环境中各种因素的变化都与人体的健康、疾病甚至死亡有着密切联系。疾病的发生大都是环境因素与遗传因素相互作用的结果。健康是机体内在环境与外界环境的整体统一，凡是能够影响机体内外环境改变的因素，都将会对健康产生一定程度的影响。生殖发育是生物繁衍种族的正常生理过程，包括生殖细胞（即精子和卵子）发生、受精、着床、胚胎形成和发育、分娩和哺乳等过程。环境污染对人类复杂生殖过程的每一阶段都可造成损害，具有生殖毒性的有害物质可以影响生殖器官及与生殖有关的内分泌调节，可导致生育力减弱、胎儿在母体子宫内的生长迟缓、自然流产以及各种各样的出生缺陷。

本文所论及的环境指人体外的一切环境，可分为自然环境和社会环境。自然环境包括大气环境、水环境、生物环境、地质和土壤环境等；社会环境是指经人类改造过的自然环境，包括居住环境、生产环境、交通环境、文化环境等。环境中对人体产生影响的因素主要可以分为物理因素、化学因素、生物因素以及行为因素等。

对人体产生不良影响的物理因素主要包括振动、噪声、电离辐射、非电离辐射（超声、微波等）等因素。

化学因素主要指人类生产和生活活动中排入环境中的各种化学污染物，主要包括农药、重金属、有机溶剂、环境类激素、各种职业性有害物质和微量元素等。

生物因素包括病毒和微生物感染等。目前为人们所重视的有风疹病毒、疱疹病毒、巨细胞病毒、淋球菌以及弓形虫等。

行为因素主要包括心理紧张、吸烟和饮酒等。

环境因素对男性生育力的影响主要通过两条途径：一是作用于下丘脑 - 垂体 - 性腺轴，影响精子的发生和性激素的产生，从而引起男性不育和男子性功能障碍；二是直接作用于睾丸，影响睾丸的支持细胞和精子发生过程，造成可恢复性或永久性生育障碍。环境中有害因素对女性生殖机能的影响往往是从月经、生殖、生育机能等方面表现出来的。

第一节 物理因素对生殖健康的影响

一、噪 声

从物理学角度来讲，噪声是指各种不同频率和强度的声音的无规则组合；从环境角度来讲，凡是不需要和不喜欢的声音都是噪声。噪声的来源多种多样，主要是由交通运输、工业生产、建筑工地、娱乐场所及家用电器引起。随着社会的发展，各种工业和生活噪声大大影响了人们正常的生活和学习，噪声污染被公认为一种重要的环境污染，同时，噪声也是一种常见的职业危害因素。它对人体的神经、心血管、消化等系统的生理功能均会产生不良的影响，对生殖系统的影响也较明显，特别是对女性月经周期的影响已得到公认。

1. 对雌性动物生殖机能的影响

噪声可导致大鼠雌激素水平下降和动情周期紊乱。研究噪声对雌性大鼠生殖系统的作用机理发现，雌鼠在暴露于 100 分贝的噪声 42 天后（每天 6 小时），噪声暴露组的大鼠出现动情周期紊乱、雌激素水平下降。这可能是由于长时间的噪声刺激使全身应激反应失调，使适应性反应的生殖功能减退，转变为下丘脑机能减退而导致动情周期延长和雌激素水平下降。动物研究结果表明：噪声可导致妊娠豚鼠流产，当噪声在 90~100 分贝持续 1 分钟条件下，豚鼠出现流产，流产率随噪声强度增加呈升高的趋势；在 80 ± 2 分贝的噪声中，妊娠豚鼠的流产率随噪声持续时间的延长也有升高趋势。

2. 对女性生殖机能的影响

人群研究表明，长期噪声暴露可引起女性的月经周期紊乱，如经期异常、月经量异常和痛经等，并且存在剂量反应关系。噪声还可影响妊娠过程及结局，使妊娠合并症如妊娠水肿、妊娠贫血、妊娠高血压等发生率增高，自然流产和早产增多，甚至出现死胎。噪声可能是通过对神经内分泌系统的作用影响女性的生殖机能，噪声作用于下丘脑-垂体-卵巢轴，引起机体神经内分泌出现一系列改变，随着暴露时间的延长，导致机体的功能丧失代偿。

对从事噪声作业女工的生育情况进行的调查结果发现，观察组的妊娠并发症的发生率显著高于对照组。85 分贝以上的噪声就会引起妊娠恶阻、妊娠高血压和先兆流产的发病率明显增高，在 90 分贝以上时观察组的妊娠恶阻、妊娠贫血、自然流产和泌乳不足的发生率显著高于对照组；随着噪声强度的增加，妊娠高血压的发生率也增加，且存在剂量反应关系；随着噪声强度的继续增加，妊娠并发症的种类增多，妊娠并发症和泌乳不足发生率出现增高的趋势；在 95 分贝以上时，难产的发生率有所增高，表明噪声对女工的妊娠机能和泌乳机能都存在不良影响。

3. 对男性生殖机能的影响

长期生活在 70~80 分贝的噪声环境中，会导致男性性功能减弱；90 分贝以上，会

导致男性性功能紊乱和睾丸发生退行性组织变化，从而影响男性生育能力。

二、振 动

物体在某一中心位置两侧所做的往复运动，叫做机械振动，常常简称振动。根据接触振动的方式和振动传入的范围，可分为全身振动和局部振动。车辆、飞机、轮船、拖拉机等交通运输工具的司机、驾驶员、售票员和乘务员、各种搅拌机、粉碎机、振动台及其他重型机械的操作人员等均可能受到全身振动。全身振动的长期慢性作用可引起周围神经和血管功能的改变和内分泌系统的调节功能紊乱。

1. 对女性月经机能的影响

全身慢性振动可影响卵巢的功能，还可影响妇女盆腔器官的血液供给，对女性的月经造成不良影响，主要表现为痛经，且与接触振动的时间长短有关。有多项研究报道，女司乘人员的月经异常率显著增高，包括经期改变、痛经、经量增加、经期疲倦和情绪改变等，且随着工龄的增加影响更加严重，这表明低频率、低强度的全身振动对女性的月经有不良的影响。全身振动还可导致子宫下垂、自然流产及异常分娩，容易出现胎儿窒息，产时无力等。

2. 对男性精液质量的影响

为探讨装甲兵训练中的噪声和振动等物理因素是否对男性的精液质量产生影响，对某部装甲兵的精液质量进行分析，结果发现，暴露组的精子存活率（ $62.30\% \pm 25.24\%$ ）和正常精子率（ $81.28\% \pm 11.18\%$ ）均分别明显低于对照组的精子存活率（ $68.02\% \pm 25.72\%$ ）和正常精子率（ $93.56\% \pm 5.03\%$ ），精子畸形率也明显增高，而精子活力明显低于正常值。这可能是由于长期受到噪声振动的影响，导致男性的精液质量下降。

三、电 离 辐 射

电磁辐射是指能量以电磁波的形式通过空间传播的物理现象，包括电离辐射和非电离辐射。凡能引起物质电离的电磁辐射称为电离辐射，包括 X 射线、 γ 射线、 α 粒子、 β 粒子、中子、质子等。人类所受到的电离辐射分为天然和人为两种，其中天然辐射来自于自然界，包括宇宙射线和地壳中天然电离辐射。电离辐射被广泛用于医学和工业等领域，其中医疗照射是最大的人为电离辐射来源。此外，在人们的日常生活中也经常能够接触到放射性材料，如夜光手表和烟雾探测器，以及在家庭装修中经常使用的大理石、瓷砖、花岗岩、坐便器等。

电离辐射能引起细胞中遗传物质 DNA 的损伤，对机体的损伤存在剂量效应关系，剂量越大，损伤越严重。人体组织对放射线的敏感性与其增殖能力成正比，与其分化程度成反比，即增殖能力越强的组织越敏感，分化程度越低的越敏感，睾丸、卵巢等是对放射线最敏感、最容易受损害的组织。电离辐射对生殖系统的作用主要是性腺，可对辜

丸和卵巢造成损伤，从而影响精子和卵子的发生。

1. 对动物生殖机能的影响

动物实验研究早已明确，辐射诱发的突变能导致有害的遗传效应。小鼠受到长期低剂量的电离辐射照射，可导致生殖细胞的染色体畸变。有研究结果显示，用 X 射线一次全身均匀照射和慢性全身照射小鼠，结果发现不论急性和慢性照射，随着照射剂量的增加，都会导致生殖细胞的染色体畸变和显性致死突变的发生率有所增加，而且存在正相关关系。其中电离辐射诱发不同阶段生殖细胞的遗传后果不同，生殖细胞分裂后损伤比精原细胞损伤更明显。一项关于受到电离辐射作用后人精子状况的报道显示，精液常规检查指标均在正常范围内，但 I 型精子率显著增多，而 IV 型精子率显著减少，表明电离辐射对人精子头部和尾部造成了严重损伤，使膜完整性显著下降，提示电离辐射易引起精子尾的膜受到损伤。

2. 对女性生殖机能的影响

妇女卵巢受到照射后，可对月经机能产生不良影响，引起月经不调甚至绝经。如果孕妇长期受到小剂量的放射线照射，可发生染色体畸变，导致胎儿畸形、造血系统障碍和神经系统缺陷。有研究报道，受照射人群中的自然流产率、多胎率、新生儿死亡率以及子女中先天性畸形和遗传性疾病的总发病率均明显高于对照人群。对视屏作业工人的调查显示，从事视屏作业女工的自然流产和妊娠高血压综合症的发生率明显高于对照组。视屏作业对作业女工的月经机能也有不良影响，可导致月经周期、经期和经量异常，使月经紊乱、痛经和经前紧张症的发生率增加。国外同类研究显示，从事视屏作业可引起妇女自然流产率增高，出现子代先天畸形、围产期死亡等，同时，还大大增加不孕的危险性。

3. 对男性生殖机能的影响

男性全身或睾丸局部受一定剂量照射后，可导致精子数减少、精子的活动能力降低及畸形精子增加，而且剂量越大，精子数减少越明显，恢复所需的时间也越长。长期低水平照射，可以影响睾丸的生精过程，使得精子生成减少，造成精子再生功能损害。大剂量照射会导致睾丸萎缩，生精细胞严重损害，甚至丧失生精功能，还可使生精细胞染色体畸变。一项对 5 名受⁶⁰Co 源辐射病人照射后 6 年中的精子和血清睾酮变化的观察显示，5 例病人在受照射后 1 年内性欲均有所下降，其中年轻未婚的 2 人在 1 年后性欲恢复正常，而年龄偏大已婚的 3 人的性欲则较前偏低。在受照射后 2~3 个月时患者的精子数明显减少或缺乏，部分患者 3~5 年才恢复，但活率、活力仍明显低于正常。受照剂量最大的患者，6 年时尚未恢复，精子数量不到正常青年男性的十分之一，表明生精细胞受到明显损害，并与受照射剂量成正比。

四、非电离辐射

不足以导致组织电离的电磁辐射称为非电离辐射，包括微波、红外线、可见光、紫

外线及激光等。一般所说的电磁辐射是指非电离辐射。电磁辐射污染又称电子雾污染，高压线、变电站、电台、电视台、电磁波发射塔和各种家用电子设备，包括空调机、电子计算机、彩电、卡拉 OK、电热毯、微波炉等，在正常工作时都会产生各种不同波长和频率的电磁波。微波是指波长 $1\text{m}\sim 1\text{mm}$ ，频率 $300\text{MHz}\sim 300\text{GHz}$ 的电磁辐射，是和人类密切相关的电磁辐射。微波应用广泛，是环境的主要污染物之一，日常生活中手机、微波炉和彩电等电器对人体的辐射即为微波辐射。

非电离辐射的生物效应是热效应和非热效应。热效应能够引起组织损伤，可以引起生殖腺组织损伤，非热效应可以使机体内大分子和亚细胞结构的生物学功能改变，从而可引起生精功能障碍。

长期暴露在电磁辐射中，容易引起人体生理功能紊乱，从而导致头痛、失眠、健忘等症状，甚至可导致睾丸内生精障碍，导致精液中精子数量减少甚至无精症的发生。长期接触低水平微波辐射会对生殖机能产生一定的功能性损害，微波辐射可对睾丸的生精上皮造成损伤，可导致睾丸间质细胞出现可逆性功能损害；可引起动物生精上皮、附睾上皮、曲细精管上皮出现改变，破坏睾丸的生精过程，使异常精子增多，精子的运动能力下降。

1. 对雄性动物性腺的影响

多项研究发现，用 $2\ 450\text{MHz}$ 低强度微波连续辐照，对小鼠精子畸变有明显的升高作用，还可降低小鼠睾丸中的必需微量元素的含量，并对 DNA 有损伤作用。 $2\ 450\text{MHz}$ 微波可影响睾丸间质细胞中一氧化氮合成酶 (NOS)。NOS 与雄性生殖的许多功能如雄激素分泌、精子成熟、运动和获能有关，微波对 NOS 产生影响，从而影响生殖机能。同时， $2\ 450\text{MHz}$ 微波还可使附睾的吸收、分泌和转运机能发生变化，使附睾功能受损，从而影响精子的成熟。用流式细胞术研究微波辐射对小鼠睾丸的影响发现，处于细胞增殖周期不同阶段的生精细胞的数量发生了改变，其中微波辐射组中 S 期 (DNA 合成期) 的细胞数较对照组低，而 G_2/M 期 (细胞增殖后期) 的细胞数比对照组高， G_0/G_1 期 (细胞增殖前期) 各组间一致，说明微波辐射可影响 DNA 的倍增与染色体的复制，DNA 合成期和合成后期是微波作用的敏感期，微波辐射可对该时期的细胞数产生影响，进而影响了整个生精过程。

2. 对男性性功能的影响

对从事微波与高频辐射作业男工的生殖机能进行回顾性调查时发现，暴露组生殖机能的异常率 (性欲减退、阳痿、早泄) 显著高于对照组，性欲减退发生率随工龄的增加而升高，且存在明显的时间反应关系。其中男工的性功能异常率随每日暴露时间的延长而升高，可能与辐射的累积效应有关，表明长期低水平微波与高频辐射对男性的生殖机能有一定的功能性损害。

3. 对女性生殖功能的影响

低强度、长时间接触微波对女性的妊娠结局有害，可导致死胎、畸胎、流产、先天缺陷和月经紊乱发生率增高。对 969 名怀孕妇女进行人群前瞻性队列观察以研究电磁场

对流产的影响,结果显示,当阈值为 16mG 左右时,孕期流产的危险性随磁场强度增大而增加,大于 16mG 时,流产危险增加 2.9 倍,早期流产的危险增加 5.7 倍,表明当电磁场暴露在一定的水平时可能会导致流产。

五、温 度

睾丸是产生精子的器官,睾丸在生精过程中要求温度低于正常体温。人的睾丸位于阴囊内,阴囊具有调节睾丸温度的作用,男性的阴囊温度在正常生理条件下低于体温,位于阴囊中的睾丸和附睾的温度也低于体温,这是精子发生和成熟的重要条件之一。研究不同水浴温度对小鼠睾丸组织及生精机能的影响发现,30℃水浴对雄鼠睾丸组织无明显影响;在 35℃水浴组,雄鼠睾丸组织的曲细精管出现明显退化变性现象;在 40℃水浴组,雄鼠睾丸组织退行性变化极显著。温度达到 35℃持续 45 分钟就会引起生精细胞可逆退行性变化,过高温度会造成睾丸组织明显的不可逆的退行性变化。高温(长时间坐位、泡浴或蒸气浴)、高寒的环境,可使阴囊的调节功能发生障碍,进而影响睾丸生精功能。长期处在高温环境中,可导致阴囊、睾丸和附睾温度升高而影响精子的生成与成熟,导致精子数量减少、精子活力减弱、不成熟精子和畸形精子的数量增加。经常洗热水澡,尤其是盆浴、桑拿浴,使阴囊经常处于高温状态,就会影响睾丸的生精功能。有报道显示,长期在高温作业的孕妇易生神经管畸形儿。

第二节 化学因素对生殖健康的影响

环境污染的化学因素主要是人类在生产和消费活动中向环境排出的污染物,如硫氧化物、氮氧化物、烟尘、挥发性烃、耗氧有机物、氮磷营养素、环境雌激素等。

近几年环境内分泌干扰物对人和野生生物的有害影响已广见报道,对人类健康的潜在影响已引起学术界和公众的巨大关注。环境内分泌干扰物又称为环境类激素,是指具有类似或抑制天然激素功能,或干扰生物体的免疫和神经内分泌系统自身调节功能的一大类环境化合物。这些环境化合物进入机体后,能够干扰机体正常内分泌物的合成、释放、运转、代谢、结合等过程,激活或抑制内分泌系统功能,从而破坏其维持机体稳定性和调控的作用。环境内分泌干扰物主要包括雌激素和抗雌激素、雄激素和抗雄激素、孕激素和抗孕激素、芳烃受体类化合物及影响循环甲状腺激素浓度的化合物等。目前对环境雌激素研究很多,人们将“环境雌激素”简称为“环境激素”。环境雌激素是指“环境内分泌干扰物”中的一大类化学物质,它们具有雌激素样活性,可模拟内源性雌激素的生理、生化作用,或具有拮抗雄激素的效应。环境雌激素结构与内源性雌激素相似,可与下丘脑、垂体、子宫等器官的雌激素受体结合,通过干扰内分泌系统而产生一系列的不良作用,对人体的生殖内分泌系统、消化系统、血液系统及免疫系统等产生不良作用。

环境雌激素广泛存在于生活和工作环境中,可以通过食物或食物链进入动物和人体中,通过食物、水、大气和土壤等介质与人类接触,其对人和动物的危害性已经得到不同程度的证实。外源性雌激素作用于成年男女会使其生殖系统出现一系列功能异常,包

括性腺功能紊乱、性欲降低、精子数少或无精子、畸形增多、不育、月经周期紊乱、绝经期提前、性欲和性行为异常等。

一、化学因素的种类

1. 环境雌激素

一般可分为天然存在和人工合成两种。①天然雌激素：是指天然食物中的雌激素，包括植物性雌激素和霉菌性雌激素。②人工合成雌激素：有些是类固醇衍生物，有些是非甾体雌激素，常被作为药物使用。己烯雌酚（DES）是其代表，还有己烷雌酚、炔雌醇、炔雌醚等口服避孕药和一些用于促进家畜生长的同化激素。这类雌激素对雄性生殖系统不良影响的报道多，结果也比较肯定。

2. 工业化学物

①农药和杀虫剂：主要为有机氯类。典型代表为六六六（HCH，常用的为丙体六六六，又名林丹）、DDT 及代谢产物 DDE、开蓬、硫丹、毒杀酚和狄氏剂，此外还有二氯苯醚菊酯（PMT）等拟除虫菊酯、马拉硫磷（MLT）等有机磷。②多环芳烃：其中对人类和生物种群危害最常见的有氯化芳烃或氯化环烃，如多氯联苯（PCBs）和二恶英。③表面活性剂：如非离子表面活性剂烷基酚聚氧乙烯醚（APEs），它大量用于洗涤剂、油漆、杀虫剂和化妆品中，是常见的环境污染物。④塑料制品添加剂：主要为邻苯二甲酸酯类（又名酞酸酯类，PAE）。PAES 是一类黏稠的液体，常见的包括邻苯二甲酸二异辛酯（DEHP 或 DIOP）、苯基丁基酯（BBP）、二丁酯（DBP）等，每年生产消耗的 PAES 估计达 300~400 万吨，是塑料生产过程中使用的增塑剂，是最常见的污染物之一。塑料瓶杯中游离出来的双酚 A 也具有激素活性。⑤汽车尾气中的一些汽油燃烧产物：过去使用的含铅汽油中防爆添加剂四乙基铅 $[(C_2H_5)_4Pb]$ 具有很强的生殖毒性。⑥重金属：铅、汞、有机锡、镉、锰、镍、汞、铜等。⑦植物生长调节剂：吲哚乙酸、2,4 滴（又名 2-4D）和赤霉素等。⑧食品添加剂：食品添加剂中的丁化羟基茴香醚也具有雌激素活性。⑨羟基化多环芳烃：如 3,9-二羟基苯蒽。⑩烷基化苯酚类：4-辛苯酚和 4-壬苯酚。

二、各种化学因素对生殖的影响

（一）农 药

环境中的农药通过大气、水体、土壤、作物经食物链富集，通过消化道、呼吸道和皮肤等途径进入人体，对人体产生不良作用。其中有机氯农药和部分有机磷农药具有类雌激素作用，可对生殖机能产生不良影响。研究发现，长期接触农药生产的女工中死胎、死产、新生儿死亡和畸形的发生率增高，长期接触农药还可导致月经异常和不良妊娠结局等。接触农药可使男工的精子数量下降，雄性动物的精子活力下降、精子数量减

少和形态异常、附睾组织形态学发生异常等。

1. 有机氯农药

有机氯农药的典型代表为六六六、DDT 及代谢产物 DDE、开蓬、硫丹、毒杀酚和狄氏剂等。

80 年代美国佛罗里达短吻鳄孵化率大幅下降，幸存的鳄鱼阴茎短小、生殖力低下，罪魁祸首是 DDT。对 DDT 的研究表明，它能抑制雄激素与雄激素受体的结合，可导致精子数目减少，从而干扰正常的生殖功能。甲氧 DDT 可以影响雄性大鼠的精子生成数量和附属性腺，延长其发育成熟时间。

据报道，六六六可导致小鼠血浆黄体酮水平下降、精子数减少、活力降低及精子异常率增加。小鼠在生殖器官发育的关键时期接触六六六，会损坏成年后的睾丸功能。有机氯农药甲氧 DDT 可导致雄鼠的附睾精子数目减少和睾丸重量降低。有机氯农药硫丹可导致大鼠睾丸精子细胞和附睾精子数减少和精子畸形，睾丸标志酶水平升高，表明硫丹是通过改变酶的活性产生对睾丸的损害从而影响精子发生；经硫丹染毒的高剂量组幼鼠青春期和成年期的精子生成量呈永久性减少，组织学检查发现是输精管减少，表明在怀孕和哺乳期间接触硫丹最易影响精子的日生成量。交配前接触有机氯农药七氯，可使雄性大鼠和雌性大鼠的生育能力受到影响，使雄性大鼠的精子数下降，而且呈明显的剂量反应关系，组织学检查输精管发现有轻度退化。有机氯农药氯丹可明显减小鼠输精管的直径，减少精原细胞、初级精母细胞和次级精母细胞的数量。

有机氯农药二溴氯丙烷（DBCP）作为杀虫剂在 20 世纪 50 年代被广泛应用，自从 70 年代确定 DBCP 与不育有关后，已在美国禁止使用。DBCP 的毒理未明，有研究认为是它产生的代谢产物直接作用于生殖细胞，抑制了精子生成。动物实验表明 DBCP 染毒动物精子数目减少，睾丸组织发生病理性改变，早期为初级和次级精母细胞数减少，生精现象不活跃，晚期可见曲细精管萎缩、破坏等不可逆的病理性损害。对生产 DBCP 的男工进行精液质量的检查发现，9 名男工中 6 名无精子，其中 5 名不育男工的睾酮水平明显降低，活检证实睾丸组织发生不可逆的病理性损害。DBCP 对曲细精管生精细胞的损害可能是通过直接损害精母细胞和睾丸间质细胞，使睾酮分泌减少和间接影响曲细精管生精过程的双重作用实现的。

有机氯农药甲氧 DDT 可导致雌性小鼠卵巢萎缩、重量下降；经硫丹染毒的雌鼠在怀孕期间体重下降；有机氯农药七氯可使雌性大鼠的平均体重明显降低，胚胎着床的能力降低，血浆中雌激素和黄体酮的水平下降。

2. 有机磷农药

有机磷农药因其高效低毒、分解快、残留率低，已经成为目前使用最广泛的农药。国内外相关研究报道提示，有机磷农药暴露可能对精液质量有不良的影响，职业接触有机磷农药可能会增加男性的精子非整倍体的发生率。

动物实验显示，连续 10 周给雄性青紫蓝兔饲喂 0.4mg/kg 有机磷农药敌敌畏，结果发现精子活力明显下降，精子体外活动时间明显缩短，附睾组织形态学发生异常，初级精母细胞数减少，推测敌敌畏慢性中毒对青紫蓝兔生殖系统有一定损害，能明显减少

睾丸曲细精管中初级精母细胞数，使精子生成减少。

有研究表明，接触有机磷农药（甲胺磷、对硫磷）的男工精子活率、密度、精子总数明显低于对照组，精原细胞和初级精母细胞个数、浓度和检出率显著高于对照组，说明长期慢性接触有机磷农药甲胺磷和对硫磷对男性生殖功能有一定的影响。

人群研究显示，农药接触女工的死胎、死产、畸形、智力低下和异常妊娠的发生率明显高于对照组女工。对 264 例有机磷农药作业女工进行生殖机能（月经异常、不良妊娠结局）的调查发现，暴露组女工的月经先兆症状如乳房胀痛、嗜睡、失眠、乏力、烦躁不安的发生率显著高于对照组，月经异常率也显著高于对照组，以经量减少最为显著，不良妊娠结局包括自然流产、早产、死胎或死产率也显著高于对照组，提示有机磷农药对作业女工生殖机能有不良影响。

（二）多环芳烃

多环芳烃主要来自于有机物的不完全燃烧过程。对人类和生物种群有危害的多环芳烃中，最常见的有多氯联苯（PCBs）和二恶英（TCDD）。

二恶英是一种毒性很强的含氯污染物，是在纸浆漂白、垃圾焚烧等过程中产生的，可以经食物及透皮途径进入体内。人体接触的二恶英 90% 以上是通过膳食接触的。由于二恶英在脂肪组织中蓄积，动物性食品是其主要来源，鱼、家禽及其蛋类、肉类等成为其主要污染的食品，其中以鱼体中含量最高。

TCDD 是已知的毒性最强的化合物之一，是已明确的致癌物，它具有致畸性、发育毒性和胚胎毒性。TCDD 能够导致出生缺陷如腭裂、生殖器官和生殖器异常；对后代产生发育问题、神经问题、延缓青春期、降低生育率等不良影响。在越战中美军曾广泛使用含有微量 TCDD 的脱叶剂，造成接触妇女流产、死胎、畸胎儿发生率增加，当地很多孕妇出生的婴儿肢体严重畸形，智能障碍。有调查发现母亲孕期食用含 TCDD 污染过的油或鱼，其后代出现发育不良和神经行为缺陷、流产或低体重。有研究报道，TCDD 可通过改变雌激素活性、降低机体免疫能力，而使女性改变激素水平、降低受孕率、增加流产率、改变月经周期及产生子宫内膜异位症。TCDD 可使男性日精子产量下降、射精量减少、精子运动能力和顶体反应能力降低。有研究报道，TCDD 对睾丸的形态和功能会产生多种影响，胚胎期用 TCDD 处理可使睾丸和附睾重量减少、睾丸下降延迟、曲细精管直径减小、血清雄激素水平下降、睾丸间质细胞数量减少等。TCDD 对孕鼠和胚胎有毒性作用，可引起孕鼠流产、胚胎死亡、活胎发育迟缓、腭裂、胚胎畸形等，可诱发小鼠初级精母细胞染色体畸变和精子畸形率升高。

多氯联苯（PCBs）是由 209 种同系物组成的一组氯代芳烃化合物，性质稳定、脂溶性高。PCBs 主要经消化道、呼吸道和皮肤进入人体，如接触被 PCBs 污染的土壤或废物，或食入被 PCBs 污染的食物（如污染的鱼）。而职业接触途径主要是经皮肤，其次为经呼吸道，人体接触高浓度 PCBs 主要是事故性接触和职业接触。许多研究表明，多环芳烃 PCBs 对鱼类具有生殖毒性。有研究报道，精子计数下降与体内升高的 PCBs 新陈代谢水平有关。日本发生了摄入受 PCBs 污染的米糠油引起的“米糠油”爆发中毒事件，PCBs 中毒对后代主要影响皮肤、骨骼和神经系统，米糠油中毒母亲所生的婴儿

出现“胎儿 PCBs 综合征”，出现全身皮肤黏膜黑褐色色素沉着，齿龈增生，面部水肿，眼球突出，睑结膜分泌亢进，骨骼异常钙化，出生体重下降等。动物实验表明，PCBs 能通过胎盘屏障转移至胎鼠体内，导致仔鼠出生体重下降。

(三) 表面活性剂

目前我国普遍使用的表面活性剂是阴离子洗涤剂，其主要成分是表面活性剂烷基苯磺酸和助洗剂，其毒性主要是由烷基苯磺酸决定的。研究表明：烷基苯磺酸对小鼠生殖细胞有影响，而且存在明显的剂量反应关系，可干扰精子的发生与成熟。有一项研究表明，健康雄性小鼠在接触某品牌的洗涤剂后，与阴性对照组（蒸馏水）相比，各剂量组的精子畸形率明显上升，而且有明显的剂量反应关系。

壬基酚是合成壬基酚聚氧乙烯醚的基本成分，壬基酚聚氧乙烯醚作为非表面活性剂广泛地应用于洗涤剂、乳化剂、造纸工业。壬基酚可导致大鼠睾丸日产精子数目和附睾中的精子数目明显减少，睾丸、附睾和前列腺萎缩。有研究显示，从孕期开始给予壬基酚，直至仔鼠性成熟，可对雄性仔鼠的生殖系统的结构和功能造成损害，表现为仔鼠睾丸和前列腺的重量均降低，睾丸日产精子数量和附睾精子计数随着剂量的增加而降低，说明壬基酚可影响子代雄鼠的生精功能。将成年雄性大鼠经口染毒壬基酚 28 天，结果发现壬基酚可引起大鼠精子数量和活力显著降低；睾丸组织病理学显示曲细精管萎缩，生精能力下降；睾丸细胞体外培养显示，壬基酚能抑制睾酮的分泌；电镜观察可见间质细胞内质网肿胀，合成功能减弱，表明壬基酚在高浓度时能明显损伤雄性大鼠的生殖功能。

(四) 塑料制品添加剂

动物体内实验已证明，一些邻苯二甲酸酯类可致睾丸萎缩，邻苯二甲酸二-2-乙基己酯可引起雄性大鼠的可逆性生殖毒性。有研究报道，邻苯二甲酸二-2-乙基己酯对雄性大鼠口服染毒，结果出现大鼠睾丸和附睾严重萎缩，附睾中精子数量显著减少，精子死亡率和畸形率明显增高。有研究显示，对雄性小鼠用邻苯二甲酸二辛酯腹腔注射染毒，可致染毒小鼠精子畸形率明显增高，可能是由于邻苯二甲酸二辛酯对生殖细胞有诱变作用。

双酚 A 主要用于生产碳酸聚酯、环氧树脂、聚苯乙烯树脂以及染料等，对大鼠和小鼠均有生殖毒性，可使雄性小鼠的精囊重量降低，使精子的运动能力降低。它通过引起支持细胞与生精细胞分离，从而减弱支持细胞对生精细胞的作用，影响精子的发生；并通过直接或间接影响生精细胞周期而干扰精子的正常发生，这可能是其生殖毒性的机制之一；也可能通过影响间质细胞而间接干扰雄性激素的平衡，进而影响精子的形成。用双酚 A 染毒大鼠，可导致生精细胞与支持细胞发生分离，排列紊乱。有研究显示，双酚 A 可影响接触者的生殖功能，接触者的性欲降低，妻子从结婚到第一次怀孕的时间较对照组长，尿中睾丸酮的含量较低。

(五) 汽车尾气

汽车尾气含有上千种化学物质，但主要成分是一氧化碳、多环芳烃化合物及铅，此外，还有甲醛、二氧化硫等多种有毒物质。

一氧化碳是燃油不充分燃烧的产物，大城市中 90% 的一氧化碳来自汽车尾气。一氧化碳是一种比较常见的职业危害因素及大气污染物，妊娠动物接触高浓度的一氧化碳可导致死胎、畸形、低出生体重等。孕妇职业性接触一氧化碳时，可导致新生儿低出生体重、流产、产期胎儿死亡等。职业接触男工中出现性欲减退、阳痿和早泄率增高。

氮氧化物主要是在高温燃烧条件下生成的二氧化氮，它还会与碳氢化合物一起生成光化学烟雾，对人体具有很强的毒性作用。

有研究报道，交警长期暴露于汽车尾气污染的环境之中，精子活力呈下降趋势，精子活动率降低，其精子活动能力下降可能与精子能量代谢障碍有关。

有研究表明，交通性污染物对小鼠呈现生殖细胞毒性，主要表现为对小鼠的生殖细胞的毒性作用，干扰精子的发育和成熟，对成熟精子的活动能力有一定的影响，使精子畸形率增高，而且呈现一定的剂量反应关系，可导致出生缺陷如腭裂、生殖器官异常等。

(六) 人工合成的雌激素

人工合成的雌激素有些是类固醇衍生物，有些是非甾体雌激素，常被作为药物使用。己烯雌酚 (DES) 是其代表，还有己烷雌酚、炔雌醇、炔雌醚等口服避孕药和一些用于促进家畜生长的同化激素。这类雌激素对雄性生殖系统不良影响的报道多，结果也比较肯定。

孕妇接触非甾体雌激素 DES 可导致子代不孕和生殖系统腺癌。妊娠期使用 DES 的妇女，所生的女孩在青春期易发生罕见的阴道透明细胞癌。20 世纪 40~70 年代欧美数百万孕妇服用人工合成的 DES 导致子代不孕、阴道腺癌；所生男孩易出现生殖器官先天畸形，如假两性畸形，生殖管道畸形、附睾囊肿、小睾丸和小阴茎、性腺发育不良导致的少精或无精、男性隐睾、成年男性性功能障碍等。

DES 可以引起雄性生殖系统异常，包括隐睾、尿道下裂、睾丸肿瘤、睾丸变小、精子数减少等。动物实验中，可见小鼠雄性子代 60% 不育。雄性动物出生早期接触人工合成的药用雌激素炔雌醇能减少支持细胞的数量，从而使成年后睾丸变小和精子数目减少。

(七) 重 金 属

比重在 5 以上的金属统称为重金属。从环境污染方面所说的重金属，实际上主要是指汞、镉、铅、铬以及类金属砷等生物毒性显著的重金属，也指具有一定毒性的一般重金属如锌、铜、钴、镍、锡等。重金属污染主要来自于工业“三废”的排放及城市生活

垃圾、污泥和含重金属的农药、化肥等。重金属进入土壤并积累，因而农田被重金属污染后很难消除。农作物主要通过根系从土壤中吸收并积累重金属，人们食用被污染的农作物后，重金属进入人体内而危害健康。生殖系统对重金属及其化合物的作用非常敏感，重金属对男性和女性的生殖功能均能产生毒性作用，且存在剂量反应关系，剂量越大，生殖毒性越大。重金属可导致精子形态变化、精子数量和活力下降，还可导致不育和死胎等。

1. 铅

随着工业的发展，铅（Pb）污染已不再局限于职业接触，生活环境中的铅暴露随处可见，如学习用品、玩具、劣质陶瓷器的釉质、珐琅、裂纹瓷器、汽车尾气、房屋装修等。

铅具有较强的生殖毒性和妊娠毒性，还可影响性激素的合成及下丘脑-垂体-性腺轴的正常生理调节功能，对胚胎的着床和胎儿发育有不良影响，可导致胚胎发育迟缓和畸形、自然流产率增高、早产、死胎等。它对卵巢具有直接毒性，职业接触铅的女工月经异常较多，表现为月经周期异常、经血量改变，痛经等。妊娠期铅暴露可使妊娠并发症发生率上升，妊娠早期高水平暴露会引起死胎、中晚期暴露则先天畸形的死产发生率上升。有研究显示，铅污染地区异常妊娠率及自然流产率远高于无铅污染区；胎膜早破的发生率与孕妇血铅的水平呈正相关关系，随血铅水平的增高，畸形发生率也呈现上升的趋势，并有明显的剂量效应关系；铅暴露可缩短孕期，导致早产的发生，导致新生儿出生体重下降、头围及腹围下降；会对后代的智商产生不利的影响，可造成后代神经行为的损害。对 275 名接触铅和噪声的女工和 293 名不接触铅的女工的生殖情况进行调查发现，接触组的月经异常、经期异常、痛经、周期异常和经量异常的发生率均显著高于对照组，自然流产率也明显高于对照组，表明铅及噪声作业对女工的生殖机能产生一定的有害影响，可能是不良环境干扰了下丘脑-垂体-卵巢轴的神经内分泌调节机能的原因。

铅对雄性（男性）睾丸具有直接的毒性，可使睾丸生精系统出现代谢障碍，导致精子生成减少，活动力减弱以及精子畸形等，男性职业性接触铅可引起精子质量和男性生育力的下降。动物实验中，铅染毒小鼠的睾丸、附睾和精囊的重量下降，生精过程受到影响，出现精子数目下降，死亡率增加和精子异常形态数目增多。雄性大鼠吸入含铅的汽车尾气后，睾丸、精囊和附睾萎缩，组织学显示精子发生有一定的病理学改变。研究显示，铅可通过血睾屏障，损害睾丸曲细精管生精上皮，对睾丸生精和附睾内精子的损害较明显；可对睾丸的形态和功能造成损害，从而影响精子的发生。用醋酸铅染毒雄性小鼠，结果小鼠的睾丸、附睾和精囊重量下降，生精过程也受到影响，表现为精子数目减少和死亡率增加、形态异常的精子数目增多，提示铅可能具有原发性生殖毒性。长期用醋酸铅染毒大鼠，可使睾丸、附睾和精囊重量下降，生精过程受到影响，导致精子生成减少、死亡率增加和形态学方面的变化。铅还能损害男性附属性腺的功能而导致精液质量下降，表现为精子数量减少，畸形率增高和活动能力减弱。有研究显示，铅作业男工的配偶受孕时间延长，不孕与自然流产发生率增高，早产及分娩低出生体重儿的危险性增加。铅作业男工的生殖系统症状、配偶流产、早产率显著高于对照组，睾酮水平降低，FSH 和 LH 水平升高，精子顶体酶活性明显降低；性功能降低（包括早泄、性欲减

退等)和精子畸形的发生率高于对照组,其妻子的自然流产率、死胎死产率和不育率也高于对照组。

2. 汞

汞(Hg)在自然界以金属汞和汞的化合物两种形态存在,汞的化合物又可分为无机汞化合物和有机汞化合物两大类,在自然界和人体内都有少量的汞负荷。汞污染主要来自使用和生产汞或汞化合物的工厂,如化工厂、农药厂和冶炼厂等工厂排出的含汞废水、废气和废渣,此外,煤和石油在燃烧过程中也会排出含汞废气。

汞及其化合物具有生殖毒性和胚胎毒性,致畸性强,并可引起染色体DNA的损伤,造成染色体畸形,可导致不孕、自然流产、胚胎发育延迟、死产和先天畸形等,还可通过胎盘对胎儿产生不良反应,可导致智力减退,畸形甚至脑瘫痪。日本著名的公害“水俣病”即为甲基汞慢性中毒所致。汞及其化合物会对雌性动物垂体激素的分泌产生影响,从而干扰卵巢的功能,导致动物死胎和畸胎发生率增高。甲基汞可作用于雌性生殖系统进而通过胎盘直接造成对胎鼠的损伤,也可对卵细胞造成遗传损伤从而危害子代,可导致大鼠仔鼠的早期生理发育及中枢神经系统发育延迟,出现神经功能异常。

汞及其化合物可影响雄性动物的发育能力,其中有机汞对睾丸损害较大,它主要对精原细胞产生不良影响,从而导致不育;而无机汞主要干扰生精细胞及精子,从而使生育力降低。动物实验表明,汞及其化合物可影响生精过程,导致精子数量下降、精子活力降低、精子畸形率增高等。对雄性大鼠腹腔注射氯化汞染毒21天发现,睾丸中汞的含量显著高于对照组水平,血清睾酮水平显著低于对照组,平均曲细精管面积小于对照组,而单位面积内的凋亡细胞数目高于对照组,提示氯化汞染毒可诱发大鼠睾丸生精细胞的凋亡,并和无机汞导致的精子数目减少、抑制精子发生有一定关系。甲基汞可通过血睾屏障,在睾丸组织中蓄积,影响生精过程,从而降低雄鼠的交配率和雌鼠的受孕率;可导致雄性动物的精子畸形及精子DNA的损伤,可通过对雄性亲代的生殖系统损伤作用影响其子代的生长发育。有研究报道甲基汞染毒小鼠的精子数量和受孕率显著低于对照组,精子畸形率高于对照组,表明甲基汞对雄性小鼠的功能存在不良影响。有研究观察到染毒雄性小鼠的睾丸曲细精管上皮排列紊乱,成熟精子减少,精子胞浆中脂质颗粒增多,表明精子出现退行性变化。

多项对汞接触男工的生殖机能的调查研究显示,汞接触男工的生殖功能受到一定的影响,表现为精液量减少,液化时间延长,精子密度减少,而精子畸形率增高,性欲减退明显。接触男工妻子的先兆流产的发生率也显著高于对照组。汞及其化合物还会影响女性月经机能,出现月经周期紊乱,月经量增多或减少。对直接接触金属汞的女工149人和男工37人以及不接触的女工133人和男工22人的生殖功能调查结果显示,汞接触组女工的月经异常检出率(52.35%)(包括周期紊乱、经期异常、血量异常、痛经、月经异常)、先兆流产率(4.53%)明显高于对照组的月经异常检出率(20.30%)和先兆流产率(0.78%);接触组男工精液量减少、精子密度减少、活精率下降和精子畸形率增高,提示汞对女性和男性生殖功能有一定的毒性作用。

3. 锰

锰 (Mn) 是人体必需的微量元素之一, 对于维持人的生命活动发挥着重要的作用, 钢铁、化工、医药、电子、磁性材料等行业都在大量使用。

有研究显示, 锰对雌性小鼠的性腺有影响, 可导致小鼠动情周期延长, 受孕率降低, 后代仔鼠生长迟缓。

在高锰地区人群中, 畸胎发生率高于一般人群, 锰接触女工的月经异常发生率增高, 以痛经为主, 且有剂量反应关系; 并且性功能障碍发生率明显增高, 主要表现为性冷淡, 同时自然流产、早产和后代先天缺陷发生率增高。有研究显示, 锰接触水平在 $0.4\text{mg}/\text{m}^3$ 以下, 锰作业女工出现月经周期缩短和经期延长, 超过 $0.4\text{mg}/\text{m}^3$ 时, 月经异常、经期延长和痛经的发生率明显增多, 呈明显的剂量反应关系, 推测锰可使下丘脑-垂体-卵巢轴的调节作用紊乱, 从而出现月经异常。接触锰男工妻子的早期自然流产率、死胎、死产率和后代先天缺陷发生率增高, 并随工龄延长而加重, 提示锰对人类具有一定的生殖毒性。

锰对雄 (男) 性性腺及内分泌均有影响, 可引起雄性动物睾丸曲细精管的损害、睾丸间质水肿和充血, 射精次数减少和精子活动率降低等; 可导致男性的睾酮分泌减少和后代畸形增多。动物实验表明, 锰对雄性性腺具有生殖毒性, 可导致睾丸曲细精管损害, 影响生精细胞, 出现性机能障碍。用氯化锰腹腔注射染毒雄性大鼠发现, 锰在睾丸细胞内的分布发生了明显的变化, 睾丸细胞内可溶性组分及微粒体中的锰含量上升明显, 可能会影响到睾丸细胞的生理和生化功能。硫酸锰染毒小鼠的精子数量、活动精子百分率明显下降, 精子畸形率明显上升, 血清睾酮明显低于对照组, 同时出现病理改变, 睾丸的曲细精管上皮细胞排列松散, 支持细胞和间质细胞减少, 附睾管腔内的精子减少, 表明硫酸锰可通过血睾屏障, 破坏其正常结构和机能, 干扰精子的生长和发育过程。

对职业接触锰男工调查结果显示, 职业接触锰可导致男性精液质量下降、睾酮水平降低和性功能障碍, 表现为阳痿、早泄和性欲减退等。对 22 名慢性锰中毒的男性工人和 23 名不接触锰的工人的精液质量分析结果显示, 锰中毒工人的精液量 (1.9ml)、精子总数 (98.6×10^9) 及精子存活率 (46.6%) 分别显著低于对照组的精液量 (2.8ml)、精子总数 (188.1×10^9) 和精子存活率 (74.8%), 但精子畸形率显著高于对照组, 提示锰对精子的发育具有直接的毒性, 能够损伤精子, 使精液质量下降, 从而对生殖机能造成损伤。

4. 镉

镉 (Cd) 是一种分布广泛的重金属, 生物半衰期很长, 体内蓄积性较强。镉污染主要来自工业生产, 如铅锌矿、有色金属冶炼厂、电镀厂、铜镉合金制造厂、荧光颜料厂等排出的“三废”中, 都含有镉。当环境受到镉污染后, 镉可在生物体内富集, 通过食物链进入人体, 引起慢性中毒, 日本的公害病之一“痛痛病”, 就是慢性镉中毒。

镉对雌性哺乳动物和生殖系统具有明显的毒性, 可在卵巢中蓄积, 直接作用于卵巢, 不仅能使卵巢组织的形态结构发生改变, 还能抑制卵泡的正常生长和发育, 并可抑

制卵巢的排卵功能，而且呈剂量效应关系，排卵数目随剂量增加而减少。长期给大鼠染毒镉可引起大鼠的子宫和小血管壁变厚，卵巢萎缩和坏死，引起卵母细胞的超微结构发生变化，初级和次级卵母细胞出现明显病理学变化；亚慢性镉染毒可致哺乳动物动情周期显著延长。镉能抑制卵巢颗粒和/或黄体细胞类固醇生物合成，影响卵巢内分泌功能，还可能对雌激素受体、孕酮受体的基因表达产生影响，使卵母细胞受到损害。

接触镉的女工的月经明显紊乱，而且与接触年限有关，镉还可导致女工闭经、胎儿生长迟缓等。

镉对哺乳动物的睾丸和附睾具有直接的性腺毒性，与睾丸肿瘤及不育症等有关，可使睾丸坏死，引起精子数目减少和精子畸形。用氯化镉皮下注射染毒大鼠，可导致染毒大鼠的睾丸和附睾体积缩小、重量减轻，睾丸曲细精管壁变薄、上皮排列紊乱，附睾出现大量异常精子，精囊管壁和前列腺细胞壁变薄。用氯化镉腹腔注射染毒，可对大鼠睾丸间质细胞早期产生直接损伤，然后出现毛细淋巴管和毛细血管的损伤。此外，染毒氯化镉还会导致葡萄糖-6-磷酸酶活性的降低，提示合成胆固醇与睾酮的功能受损。

对 30 名接触镉的男工和 33 名不接触镉男工精液中的微量元素分析结果发现，接触组男工精液中镉的含量 $[(0.80 \pm 0.19) \mu\text{g/L}]$ 明显高于对照组 $[(0.48 \pm 0.13) \mu\text{g/L}]$ ，但锌 $[(178.46 \pm 36.80) \mu\text{g/L}]$ 和镁 $[(160.11 \pm 25.42) \mu\text{g/L}]$ 的含量明显低于对照组 $[(193.26 \pm 68.34) \mu\text{g/L}]$ 和 $[(182.45 \pm 53.22) \mu\text{g/L}]$ 。精液中的微量元素是精子正常活动的重要条件，其中锌是男性精液的重要组成部分，锌的缺乏会导致男性生育能力的下降；镁也是细胞中重要的辅酶之一，接触镉男工精液中镉的含量上升、镁和锌的含量下降，表明镉在接触者的体内蓄积，从而对其生育机能造成损害。

5. 铬

铬 (Cr) 是人体必需的微量元素，它与脂类代谢有密切联系。铬广泛存在于自然环境中，铬污染源来自化工、制革、电镀、涂料、颜料等工业排放的废气、废水等。铬的化合物常以溶液、粉尘或蒸气的形式污染环境，通过消化道、呼吸道、皮肤和黏膜进入人体，危害人体健康。

铬具有发育毒性和致畸性。铬能透过胎盘进入胎儿体内，高水平的铬可导致胚胎死亡和先天畸形，能引起胎鼠生长迟缓和畸形。三氧化铬腹腔染毒受孕小鼠可导致胎鼠畸形。重铬酸钾染毒可导致小鼠精原细胞 DNA 损伤，表明其具有雄性生殖毒性。

有研究表明，接触铬化合物女工的月经异常发生率显著增高，主要表现为痛经和月经周期异常，可能是铬对下丘脑-垂体-性腺轴产生影响，破坏了体内激素的正常水平，导致月经紊乱。铬作业女工的妊娠恶阻、先兆流产、自然流产、婴儿先天异常和死产的发生率也显著高于对照女工，表明铬对于女工的生殖功能有一定的影响。

对 25 名职业接触铬的男工和 22 名不接触铬男工调查发现，六价铬接触组男工的精浆锌 $[(4811.85 \pm 1401.88) \mu\text{mol/L}]$ 和精子数量 $[(52.21 \pm 45.51) \times 10^9/\text{L}]$ 含量显著低于对照组 $[(5718.49 \pm 2827.90) \mu\text{mol/L}]$ 和 $[(88.96 \pm 74.82) \times 10^9/\text{L}]$ ，接触高浓度六价铬工人精子畸形率 (0.24 ± 0.09) 显著高于接触低浓度的工人 (0.17 ± 0.06) ，FSH 随着接触浓度的增高而逐渐上升，由于曲细精管上皮广泛受损时，FSH 浓度显著上升，LH 影响较小，提示六价铬可对人类精子生成与精子形态产生不良影响，接触一定浓度

铬化物可导致曲细精管上皮受损，精子生成减少，精子畸形率增加。

6. 砷

砷 (As) 元素及其化合物广泛存在于环境中，土壤、水、空气、植物和人体都含有微量的砷，是人体的必需微量元素之一。砷污染的主要来源为砷化物和有色金属的开采和冶炼、含砷农药的生产和使用、煤的燃烧以及砷化物在玻璃、木材、制革、纺织、化工、陶器、颜料、化肥等工业的广泛利用。

砷具有较强的生殖毒性和发育毒性，对生殖细胞有直接的损害，可导致死胎、畸形和生长迟缓，是较明确的生殖毒物之一。动物实验显示，用三氧化二砷水溶液染毒大鼠，染毒大鼠的精子畸形率显著高于对照组，染毒雌性大鼠可导致胎儿死亡率和生长迟缓增加。有研究用三氧化二砷水溶液口服染毒大鼠，结果显示，鼠仔出生后的体重在高剂量组明显低于对照组和其他剂量组，高剂量组两代大鼠的受孕率和幼仔哺育成活率明显低于对照组和低剂量组，提示砷可影响动物的发育能力，可通过胎盘屏障影响子代的生长发育和生理功能。

过量砷对性机能的影响可表现为性发育延迟、月经初潮推迟、月经紊乱等，男女均可出现性功能减退，可能与砷导致性器官的酶和蛋白质的功能受抑制，从而影响性细胞发育和性激素分泌有关。

7. 锌

锌 (Zn) 是人体必需的微量元素之一，对人的生长发育具有十分重要的作用。锌主要集中在睾丸、附睾和前列腺中，在精液中的含量特别丰富，对男性生殖器官的发育和性功能有重要的作用，锌缺乏对睾丸组织可产生不利的影响，造成睾丸组织不同程度的退化变性，影响精子的生成，从而导致不育，在男性不育患者精液中锌的含量常常低于正常人。

使用缺锌饲料饲喂大鼠，研究缺锌对雄性大鼠生殖系统的影响，结果显示，缺锌大鼠的血清锌含量与睾酮水平显著低于对照组，精囊腺、包皮腺、精子密度、精子存活率和精子穿透力均低于对照组；睾丸间质细胞及各级生精细胞形态异常，附睾管腔内成熟精子明显减少，提示缺锌可使雄性大鼠的生殖系统生长发育受阻、激素水平降低，精子数目减少、质量下降，甚至不育。

人体缺锌会导致男性精子生成异常、性欲减退、性功能异常（阳痿、性冷淡）、睾丸缩小和不孕等。有研究显示，少精子症的病人锌的含量明显低于正常人群，正常生育力的男子精浆中锌的浓度随着精子密度增高而增加，精子总数可随着精浆中锌水平的降低而降低，并呈显著的正相关关系，这可能与锌影响垂体分泌促性腺激素和睾丸的生精功能和影响前列腺的结构和功能有关。

8. 镍

镍 (Ni) 化合物是常见的工业毒物，在工业中应用广泛，镍化合物具有遗传毒性，可诱导精子畸变。有机镍是目前为止对海洋污染毒性最强的化学品之一，具有类雌激素作用。氯化镍对雌性小鼠具有胚胎毒性和致畸作用。

动物实验表明，有机锡化合物硫酸镍腹腔注射染毒大鼠可引起精子畸变，精子数量减少，活动力减弱以及精母细胞的严重损伤，部分精母细胞增大，多数精原细胞退变及细胞核着色不良。

研究证实，有机锡化合物可导致小鼠早期胚胎着床失败；怀孕大鼠体重下降，子宫萎缩，胎鼠畸形；雄性小鼠精子密度下降，死亡率和畸形率明显增加等。有机锡化合物三丁基锡能够引起软体动物生殖逆向改变，雌性激素转化为雄性激素，使得雌性个体比例下降，雄性个体增加。三苯锡可导致鱼卵孵化延迟和畸形。氯化二丁锡可导致大鼠胚胎着床率降低，着床后胚胎成活率明显下降；可导致妊娠小鼠子宫萎缩、怀胎数量减少、胎儿重量下降、死胎率和畸形率增加，且存在剂量反应关系。

(八) 微量元素

微量元素是人体必需的元素，缺乏和过量都会对人体产生不良的影响。对人类影响较大、较常见的微量元素包括碘和氟等，其中碘对人类的影响已经明确，孕妇缺碘可引起后代先天缺陷，可造成后代智力低下和劳动力丧失。

氟(F)是人体必需的微量元素之一，过量的氟是明确的生殖毒物，氟污染来自富氟煤燃烧释放的废气，以及冶炼厂、玻璃厂排放的粉尘等。

氟对雌性动物的影响是使其卵泡发育发生障碍，激素调节失常，导致动情周期异常，受孕失败，胎仔体重降低，存活率下降。动物实验证实，长期接触高浓度的氟对雌性小鼠的生殖和胎仔鼠的发育具有一定的毒性作用。氟染毒大鼠的受孕率、正常分娩率、出生存活率和哺育成活率降低，电镜观察发现各阶段卵母细胞均发生明显的病理变化，提示卵母细胞受损是受孕率降低的直接原因。

氟可直接作用于睾丸、附睾和前列腺等，导致睾丸间质细胞和支持细胞受损，精子数量减少，活力降低，出现各种畸形；还可作用于生殖细胞的遗传物质，引起染色体畸变和基因突变。氟对雄性动物生殖系统的影响是使其曲细精管变性坏死，不能够生成成熟的精子，使小鼠睾丸细胞染色体畸变率增加，引起睾丸细胞的DNA损伤。高氟对雄性生殖系统有明显的内分泌干扰作用，可导致染毒大鼠的精子数量下降、畸形率升高、血清睾酮和促黄体生成素下降、睾丸组织的病理学改变等。

人群调查发现，氟接触男工的精子数量减少、精子活动力下降。高氟地区男性精子密度明显降低，不育率及原发性男性不育率显著高于非高氟地区。

(九) 有机溶剂

有机溶剂是工业上最常见的一类化合物，包括二硫化碳，乙二醚和甲醛、苯及其化合物等广泛用于制鞋、农具制造、印刷和金属业等。有不少有机溶剂的生殖毒性已经得到证实。

1. 甲醛

甲醛是重要的化工原料，主要作为黏合剂广泛用于制造树脂、橡胶和染料等。由于

甲醛挥发度低，易从家具与装饰材料中缓慢挥发而污染空气，对人体产生不良的影响。甲醛对细胞内的遗传物质有很强的损伤作用，可导致基因突变、DNA 断裂以及染色体畸变等。动物实验显示，甲醛能对早期生精细胞的遗传物质造成损伤，并存在一定的剂量反应关系，腹腔注射甲醛染毒雄性小鼠，可出现早期精细胞微核率增高和睾丸组织脂质过氧化损伤。

2. 苯及同系物

苯及苯系物为芳香族有机溶剂，主要储存在脂肪内。接触苯及同系物可使胎鼠体质发育缓慢，雌鼠受孕率降低等。苯及苯系物对血清中的部分性激素具有抑制作用，危害作业女工的生殖机能，使女工的月经异常发生率增高，表现为月经量增多和痛经，可影响受孕能力或胚胎发育，造成自然流产、早产、死胎或死产、妊娠合并症、出生低体重儿的发生率明显增高，此外，妊娠贫血和染色体畸形等发生率也有所增高。有研究显示，接触苯作业女工痛经发生率 (27.27%)、自然流产率 (23.06%) 显著高于不接触女工 [(7.41%) 和 (7.21%)]，女工职业接触苯系物后的生育障碍率 (自然流产、早产、妊娠中毒症、死胎、胎儿先天缺陷等) 明显高于接触前，表明苯对女工的月经机能和生殖机能都有影响。接触混苯 (苯、甲苯、二甲苯) 作业的女工月经周期异常、经期异常、痛经的发生率均显著高于对照组，妊娠恶阻、妊娠贫血、自然流产、出生低体重儿的发生率也显著高于对照组，但接触组男工的妻子自然流产率无显著性差异，说明女性对苯所致的危害比男性敏感。混苯暴露能导致卵泡早期 FSH 水平的下降，影响卵子的发育和成熟，提示接触混苯能导致卵子发育与成熟受损，低浓度混苯接触能影响作业女工下丘脑-垂体-卵巢性腺轴中 FSH、雌激素和孕激素的正常水平。三硝基甲苯是常见的工业毒物，可损伤女工生殖系统，对作业女工的月经机能影响较为显著，对月经产生一定的影响，表现为月经经期延长，痛经和经前综合征等，可能是由于三硝基甲苯对性腺造成直接损伤或影响下丘脑、垂体及卵巢的神经内分泌调节，从而影响了卵泡的成熟和排卵以及黄体的功能，导致月经异常。

苯及苯系物可影响作业男工生殖内分泌的功能，导致男工性功能异常，包括性欲减退、早泄与阳痿，精液异常等。三硝基甲苯可引起男性精液质量改变，使血清睾丸酮水平及精液乳酸脱氢酶活性降低，接触组男工妻子的自然流产率显著高于对照组。高浓度苯暴露可诱导接触工人精子染色体非整倍体率增高和 DNA 断裂率增加。

3. 二硫化碳

二硫化碳 (CS_2) 是工业上应用十分广泛的有机溶剂，具有明显的性腺生殖毒性，可影响胚胎发育，导致胚胎死亡及自然流产或出生缺陷等。二硫化碳具有明显的雌 (女) 性性腺毒性作用。有关二硫化碳对大鼠和接触工人生殖效应研究的结果显示，妊娠雌性大鼠吸入染毒二硫化碳后，发现子代生长发育明显减慢，表明二硫化碳对大鼠有明显的致畸作用，主要引起骨骼系统和中枢神经系统畸形。对 513 名二硫化碳接触女工和 207 名不接触女工进行调查，结果显示接触组的月经周期异常 (10.33%)、痛经 (27.68%) 和经前综合征 (20.47%) 等月经异常发生率明显高于对照组 [(2.90%)、(1.51%) 和 (8.21%)]，而且与接触的年限有关，接触时间越长，月经异常发生率越高。

女工及其配偶均接触二硫化碳组早产率和自然流产率都比对照组高。

接触高浓度的二硫化碳对雄性动物和男子的生殖系统可造成器质性或功能性的损害。二硫化碳染毒可导致小鼠的性染色体异常率增高、睾丸萎缩及精子生成减少等。动物实验显示，二硫化碳对多种动物的睾丸有损害作用，可导致睾丸萎缩、间质增生、精子生成减少及常染色体和性染色体异常率增高等。

二硫化碳可导致男子的睾丸萎缩，精子形态的异常率上升，精子活动率下降，并可出现性功能障碍，多表现为性欲减退、勃起不良和阳萎等。对人群研究显示，接触二硫化碳男工的性功能减退明显，主要表现为性欲减退。接触男工的血清睾酮明显降低，睾丸间质细胞刺激素及黄体生成素浓度明显升高，精子形成异常率和精子活动率明显下降，精子数量减少，可能是由于二硫化碳和/或代谢产物损伤睾丸间质细胞，影响其分泌功能所致。

4. 丙烯腈

丙烯腈是一种用途广泛的有机溶剂，在工业中广泛用于合成纤维、橡胶和某些树脂等，除职业性接触外，人们在日常生活中使用食品包装袋等生活用品也可广泛接触到丙烯腈。

动物实验表明，丙烯腈对怀孕的母鼠可出现显著的胚胎毒性，导致胎儿畸形率增加。雄性大鼠经口染毒丙烯腈，可导致染毒大鼠睾丸重量下降，且存在剂量效应关系，精母细胞数量减少，精子数量及精子活力下降，平均每窝活胎数明显下降，胚胎吸收率明显上升，提示丙烯腈可能影响精子质量，从而影响胚胎的正常发育。皮下注射丙烯腈染毒雄性小鼠，结果显示小鼠的睾丸初级精母细胞染色体畸变率及精子畸形率均显著高于对照组，表明丙烯腈可使雄性小鼠的生殖细胞发生突变，并损伤精子的生成。

人群调查显示，职业接触丙烯腈男工妻子的死产、死胎、自然流产和子代先天缺陷的发生率明显高于对照男工。对接触组和对照组工人的生殖机能调查结果发现，丙烯腈对作业女工月经机能具有明显影响，接触组的月经周期异常、经期持续时间异常、经血量异常及痛经的发生率均明显高于对照组，多表现为月经周期缩短，经期缩短，经血量增多。接触组的女工妊娠合并症中恶阻及贫血，以及妊娠结局中早产、新生儿缺陷和发病率明显高于对照组。

5. 汽油

汽油是石油炼制的主要产品之一，是一种应用较广泛的有机溶剂，长期接触汽油对未婚女工及已婚女工的月经均有一定影响，可导致女工出现月经周期紊乱和绝经期症状，接触组女工的月经周期异常、经量异常、痛经的发生率明显高于对照组，并促进妊娠中毒症状的发生。对接触汽油的女工和不接触的女工的生殖情况调查发现，接触组月经异常发生率（22.2%）显著高于对照组（12.2%），月经异常发生率主要表现为周期异常、经期异常和经量过多，且存在接触剂量-反应关系；接触组女工的妊娠并发症（包括妊娠恶阻、先兆流产、妊娠高血压综合征、贫血）（29.5%）和低出生体重（6.4%）的发生率显著高于对照组 [(18.3%) 和 (2.9%)]，表明汽油对女工的月经机能和妊娠机能有一定的影响。

第三节 生物因素对生殖健康的影响

环境中影响生殖健康的生物因素包括病毒、细菌和寄生虫等。孕妇患病后可导致胚胎（胎儿）感染而引发流产甚至造成先天缺陷或发育异常，病原体主要包括弓形虫（toxoplasma, Tox）、风疹病毒（nubella virus, Rv）、巨细胞病毒（cytomegalo virus, cmv）和单纯疱疹病毒（herpes simplex virus, HSV）等。

一、弓形虫感染

弓形虫的主要传染源为受感染的猫及猫科动物，以经口感染为主，亦可经过伤口进入人体，还可通过胎盘传播。孕妇感染后可无明显症状或出现轻微症状，如低热、头痛、乏力、皮疹和淋巴结肿大等。但孕妇感染弓形虫后，可通过胎盘将弓形虫传给胎儿，重者可导致畸形、死胎或死产、流产等。对流产儿、死胎或畸形儿死后的病理检查和体液的动物试验证明，弓形虫是胎儿致畸、致死的重要病原体。

目前对弓形虫的研究主要集中在对女性生殖健康的影响上，对男性生殖的影响报道不多。对医院的男性不育症病人的精浆进行弓形虫抗体检测，发现在 87 例男性不育症患者中，精浆弓形虫抗体阳性率为 23%，明显高于正常人群的平均感染率 5.17%；在阳性病人中，精液质量较差，白细胞明显增多，个别病人看不到活精子；多数病人经抗弓形虫治疗后，精液质量明显好转。表明男性弓形虫感染可导致精液质量下降，可能是引起不孕的一个原因，应引起临床重视。

二、风疹病毒

风疹多在春季和冬季发病流行，经呼吸道传播，传染源为风疹病人。典型症状是经过 16~18 天潜伏期后出现轻度发热、卡他症状、皮疹及淋巴结肿大等。

风疹病毒是通过胎盘对胎儿危害最大的病毒，尤其在妊娠早期感染风疹对胎儿影响很大，可引起胎儿流产、死胎、早产、胎儿先天多发性畸形、出生后持续性病毒感染和进行性组织损害等严重后果，在临床上称为先天性风疹综合征。

孕妇如在怀孕前 8 周患风疹，胎儿几乎是百分之百受感染，怀孕前 12 周胎儿受感染率为 80%；若在怀孕 3~6 个月，则胎儿受感染率为 17%~25%。胎儿受感染后并不是都会发生先天畸形，怀孕 11 周前胎儿感染，几乎百分之百出现先天性畸形，怀孕 13~18 周，则有 35% 会出现异常，4 个月以后约 5% 的胎儿肝脏出现先天性畸形。

三、巨细胞病毒

巨细胞病毒的传染源主要是病人，主要通过性接触传播。据报道，我国大城市孕妇的感染率高达 94.7~96.3%，但多数感染者无临床表现；妇女孕前感染，仅 5%~15% 的感染出现发热、乏力、肌痛、咽痛和淋巴结肿大等。

妊娠期间感染巨细胞病毒，则很容易引起宫内胎儿感染，是出生缺陷的最常见病因。巨细胞病毒的致畸作用远比风疹为多，严重危害后代的健康。孕妇原发性巨细胞病毒感染引起胎儿先天异常比再发性感染的发生率高且病情严重，可导致流产、死胎、死产及新生儿死亡。在怀孕的不同时期感染可导致不同的结局，怀孕早期（少于 12 周）感染可导致流产；怀孕 20 周感染可引起低体重新生儿，伴有脑部畸形；怀孕晚期感染对胎儿影响不大。

总之，孕妇巨细胞病毒感染后对其本身并无多大危害，常无症状或症状不明显，但对胎儿的危害是严重的，应引起重视。

四、单纯疱疹病毒

单纯疱疹病毒感染是人类最常见的皮肤黏膜病毒感染性疾病。在多数妇女的一生中，可以反复遭其感染。传播途径以性接触为主。单纯疱疹病毒可引起生殖器疱疹，妊娠前 8 周感染可使胎儿发生先天畸形。

先天性感染可经胎盘传播或经生殖道上行性感染引起胎儿宫内感染，诱发流产、早产、畸形、死胎，发生的畸形与胚胎早期的弓形体、巨细胞病毒、风疹病毒感染造成的畸形相似，如小头、脑钙化、血小板减少、小眼球、脉络膜视网膜炎等，也可以发生皮肤疱疹、心脏及肢体异常等。

五、性传播病原体

由性交传播的疾病总称为性病，包括淋病、梅毒、衣原体感染、支原体感染及弓形虫感染等。这些疾病，有的可以引起输卵管梗阻；有的引起子宫内膜炎、子宫肌壁损害、内分泌功能紊乱等而导致不孕；有的引起重要脏器的损害，危及生命；有的在患病期间妊娠可发生流产、早产或死胎。

淋菌可引起宫颈管淋菌性炎症，输卵管内疤痕形成、黏连不通，输卵管伞部与周围黏连、闭锁，导致不孕。

衣原体感染可导致女性前庭大腺炎、宫颈炎、输卵管炎、子宫内膜炎等，甚至导致异位妊娠或不孕。支原体可引起输卵管黏连，甚至梗阻，导致不孕。

第四节 个人行为对生殖健康的影响

一、心理紧张

近年发现，紧张情绪是不育的一个重要致病因素。长期或重度的紧张和焦虑，可通过神经内分泌系统，对男子性功能及精子形成和女子卵巢功能产生明显影响，对男性生殖的影响可表现为精液量的减少以及精子数和活力的降低，可使女性月经不调，还可影响排卵，使受孕困难。由于神经内分泌系统在生殖过程中起着重要的作用，对神经内分泌平衡的任何干扰均可能对生殖功能产生不利影响。

用悬吊法研究慢性心理刺激对小鼠生殖功能的影响，对小鼠造成慢性心理刺激，使小鼠处于紧张、焦虑和恐惧的状态，结果出现小鼠内生殖器组织的湿重下降，阴道解化指数降低，性周期消失等生殖功能抑制的现象，表明不良情绪可对生殖功能产生抑制作用。

二、吸 烟

吸烟可显著降低小鼠的妊娠率，对大鼠宫内胚胎发育具有明显的毒性，并有剂量反应关系，可引起死胎和畸胎等。采用体内实验和卵母细胞体外培养、体外受精的方法，研究被动吸烟对小鼠生殖力的影响发现，被动吸烟可以显著降低小鼠胚胎的着床率、妊娠率和胚胎成活率，抑制卵母细胞的体内成熟，表明被动吸烟可以抑制卵母细胞的成熟，降低小鼠的生殖能力。提示香烟烟雾中的某些成分被育龄妇女吸收后，会导致可逆性的生殖能力下降，甚至不孕。用不同浓度的香烟烟雾浓度染毒小鼠，研究被动吸烟对小鼠的遗传毒性、生殖毒性和胚胎毒性，结果显示：雄性小鼠的骨髓嗜多染红细胞的微核率、骨髓细胞的姐妹染色单体交换率、早期精细胞微核率、精原细胞染色体畸变率和精子畸形率都随吸烟的浓度增加而上升，而且两者呈正相关。同时，雌性小鼠的高、中剂量组胎鼠存活率下降，死胎增加，平均身长、尾长和体重减少，骨髓发育不良的个体增加，这些结果表明被动吸烟有较明显的致畸、致突变效应。

香烟中含有大量的有害物质，如尼古丁、一氧化碳、镉等。长期大量吸烟能导致妇女卵巢功能下降，从而降低生育能力，还可导致绝经期提前。长期吸烟还可导致妇女盆腔炎和输卵管堵塞，引起自发流产率增高、胎儿畸形和发育迟缓，从而导致妇女生殖能力降低。对不吸烟者和吸烟者进行研究的结果显示，正在接受体外受精和胚胎移植治疗的吸烟妇女特别是年轻妇女（<36岁）的血清中FSH水平升高，吸烟的不孕妇女在进行体外受精治疗周期中所需要的促性腺激素的剂量明显提高，卵母细胞数目也明显减少，总受精率降低，吸烟还能够导致妇女的卵巢贮卵量下降。在35位怀孕的妇女中，28.8%为不吸烟者，12.5%为偶然吸烟者，但没有经常吸烟者，这表明吸烟对女性的生殖能力具有不良影响。

吸烟可以导致生殖细胞的遗传物质损伤，影响机体内分泌水平的改变，从而导致男性精子质量下降，出现精液量和精子活动能力下降、精子畸形率增多、精子密度下降和生殖力降低，甚至导致不育。此外，还可导致精原细胞染色体畸变率和精子畸形率增高，且均存在剂量反应关系。

对进行体外受精和胚胎移植治疗的有吸烟史的不孕患者进行研究，发现吸烟者对激素刺激的反应低于不吸烟者，吸烟者的平均成熟卵泡数（12.3个）、卵母细胞数（7.3个）和形成胚胎数量（3.3个）均少于不吸烟者（分别为16.2个、10.9个和4.7个）。

对每天至少吸烟30支，烟龄至少3年的吸烟者和不吸烟者进行了临床随机试验，结果发现吸烟组的精液质量各项指标（包括精子计数、活动率、正常精子形态百分率）均显著低于对照组，吸烟组的精子轴丝超微结构异常为99%，明显高于对照组的26%，这会明显损伤精子前向运动的能力，从而影响男性的生殖能力。一项对每天吸烟20支，烟龄至少2年的18岁青年和不吸烟者为对照进行队列研究的结果显示，吸烟者精子非

整倍体和圆头精子增多，精子直向运动率下降，表明青少年吸烟与异常精子和精子直向运动率下降有关，这可能会影响男性的生育力和导致男性后代的非整倍体综合征的危险性增加。对健康男性的精子检查发现，吸烟与精子携带异常 1 号染色体、倍数染色体精子和非整倍体精子有明显关联，认为吸烟可以增加男性非整倍体综合征的危险性。

三、饮 酒

动物实验显示，过量饮酒对生殖功能有明显的影响。用不同剂量的白酒作用于大鼠 1~2 个生精周期的结果发现，随着饮酒量的加大和饮酒时间的延长，大鼠的曲细精管萎缩，精子活力 ($50.50 \pm 0.25\%$) 和精子活率 ($57.17 \pm 0.78\%$) 显著低于正常对照 [$(76.33 \pm 0.12\%)$ 和 $(80.23 \pm 0.07\%)$]，精子畸形率 ($16.20 \pm 5.21\%$) 明显高于对照组 ($5.28 \pm 1.22\%$)，血清 LH、FSH 及睾酮均低于正常水平，表明酒精对哺乳类生殖细胞有明显损伤作用。对大鼠用 3000、4000mg/kg 的乙醇染毒 70 天，发现 LH、E₂、FSH 升高，血和睾丸匀浆中的丙二醛 (MDA) 明显升高，而超氧化物歧化酶 (SOD) 及谷胱甘肽-过氧化物酶 (GSH-Px)，总巯基 (-SH) 明显下降，提示乙醇及其代谢产物对机体产生明显的脂质过氧化作用，损伤间质细胞、支持细胞、生精细胞生物膜上的受体酶，从而产生损害作用。

过量饮酒可对睾丸造成直接的损伤，可造成精子密度、精子活力和正常精子形态率的下降，使精子畸形率明显升高，随着饮酒量的增加，精子的活力和活率降低，精子畸形率升高。短期大量比长期低量更容易造成损伤，可能与短期大量饮用影响内分泌系统的功能有关。长期饮酒者可出现性功能低下，精液质量下降，甚至不育，酗酒可造成曲细精管变性、退化、钙化，使精子发生减少，精子畸形，活动精子减少。

对男性饮酒者和慢性酒精中毒者进行调查发现，长期大量饮酒和酒精中毒者血清中睾酮和肾上腺皮质激素 (CS) 水平下降，而 LH 和 FSH 水平升高，精浆和精子中 LDH、LDH-X 和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PD) 活力下降，精子数量和活动精子率均降低，精子畸形率及异常精液检出率均升高，与对照组比较有显著性差异，提示长期饮酒可损害男性的生殖系统功能，可导致精液质量下降，直接影响男性的性功能及生育能力，甚至危及后代的健康。

一项研究显示，对 130 户 390 人 (夫妇及孩子一家 3 口) 外周血染色体检查发现，在检测出的 6 例具有染色体畸变的异常核型者中，有 5 例其父母生育前双方或一方大量饮用高度白酒，有 1 例其父母生育前未饮酒或少量饮用红酒，表明后代发生遗传性疾病与双亲妊娠期间饮酒的时间、种类和数量密切相关。

综上所述，由于环境中对生殖有害的物质种类繁多，毒性机理多样化，但产生的后果危害着人类的生存和发展，应努力加强对各种环境污染的治理，减轻环境有害因素对人类生殖功能的影响，从而提高人口素质和生活质量。

(高尔生 李文英)

主要参考文献

- 边新安, 江皓. 2000. 职业接触有机磷农药对男工生殖机能影响的初探. 劳动医学 17: 27~28
- 陈国元, 杨克敌, 鲁翠, 刘卫东, 蒋芸, 张招弟. 2001. 二硫化碳对大鼠和接触工人生殖效应的研究. 同济医科大学学报 30: 416~418
- 陈小玉, 赵一波, 张巧. 2001. 氯化汞对雄性大鼠生殖毒性的研究. 中华劳动卫生职业病杂志 19: 427~429
- 丁晓萍, 闫素文, 张宁, 汤洁, 鲁海鸥, 唐轶, 王喜良, 柳新. 2003. 某部装甲兵的精液质量分析. 解放军预防医学杂志 21: 23~26
- 董宏彬, 姜芳晶, 刘书乾, 李永宏, 赵进沛, 李清亚. 1998. 噪声对女性生殖机能的影响及其多因素分析. 中国公共卫生 14: 96~97
- 傅宝华, 吕玉民, 辛克北, 陈玉浩, 韩林. 2001. 事故照射对人精子膜完整性的影响. 中华放射医学与防护杂志 21: 37~39
- 顾世光, 高尔生, 赵鹏飞. 1998. 生殖健康. 人民卫生出版社.
- 郭永和, 刘永春, 王冬梅. 1999. 男性不育精浆弓形虫抗体测定的临床意义. 中国人兽共患病杂志 4 (15): 85
- 和利, 孔繁朵, 刘凤华. 1999. 电焊作业锰中毒男工精液质量分析. 中国工业医学杂志 12: 169~170
- 姜岳明. 1999. 锰与工人生殖健康. 铁道劳动安全卫生与环保 26: 240~243
- 孔庆芝, 柏松, 崔炼, 刘长智, 于有利. 1999. 长期饮酒对男性生殖系统功能影响. 沈阳医学院学报 1: 36~40
- 李春英. 2000. 敌敌畏生殖毒性及小柴胡汤拮抗作用的实验研究. 山西医科大学学报 31: 39~40
- 李洪, 陈琼宇, 李时恩, 徐玉宝, 姚武, 陈琛, Erik Erist. 1999. 六价铬男性生殖毒性的初步探讨. 中华预防医学杂志 33: 351~353
- 刘长云, 杨利丽, 玉华, 卢映, 张培森, 王永芹, 童祥华, 张志清, 孙思禄. 2000. 酒精对大鼠生殖细胞损伤的研究. 潍坊医学学报 22: 241~244
- 刘玮, 申艳青, 肖文. 2001. 汞对作业工人生殖功能影响的调查. 卫生毒理学杂志 15: 97~98
- 刘卫, 邵新玺, 杨会锁, 王常有, 鲁佩旭. 2000. 微波辐射对小鼠睾丸影响的流式细胞分析. 中华物理医学与康复杂志 22: 185~186
- 刘艳, 马明月, 张玉敏, 李海山, 崔金山, 王旭薇. 2000. 乙醇对雄性生殖内分泌系统的损害及其机制. 中国工业医学杂志 13: 206~209
- 鲁力, 陆继培, 农清清, 李习艺, 胡万达. 2001. 锰在大鼠睾丸细胞内的分布及其雄性生殖毒性影响研究. 中国公共卫生 17: 1017~1018
- 齐庆青, 韩历丽, 丁辉, 董翠英, 刘凤琴. 2001. 汽油对作业女工生殖损伤及子代影响的调查研究. 中华劳动卫生职业病杂志 19: 139~140
- 沈彤. 2001. 铅对男(雄)性生殖生育的影响研究现状. 国外医学卫生学分册 28: 342~346
- 沈维干, 陈彦, 李朝军, 毕春明, 张锡然. 2000. 被动吸烟对雌性小鼠生殖功能的影响. 生殖医学杂志 9: 159~164
- 史懋功, 战波, 崔毅, 李友好, 翟成顺. 2001. 二溴氯丙烷对男性生殖系统损害的调查. 中华劳动卫生职业病杂志 19: 461~462
- 唐怡, 张春, 张庆文. 2003. 慢性心理刺激对生殖功能的影响. 现代中西医结合杂志 12: 123~125
- 王桂敏, 李波, 白忠贞, 于素芳, 童振. 1999. 噪声对雌激素的影响作用的研究. 山东医科大学学报 37: 215~217
- 王桂珍, 王海燕, 狄妙香. 2001. 微波与高频辐射对男工生殖机能的影响. 内蒙古医学杂志 33: 564~565
- 王江敏, 臧桐华. 2003. 有机氯农药对生殖功能的影响. 中国公共卫生 19: 365~366
- 王晓梅, 李建秀, 程书珍, 杨曙民, 王丽君. 1999. 接触镉工人精液中微量元素分析. 邯郸医学高等专科学校学报 12: 115~116
- 王永芳. 2003. 有机锡化合物的污染及其毒性. 中国食品卫生杂志 15: 244~247
- 吴敬民, 窦志勇. 1999. 噪声对妊娠豚鼠流产率的影响. 上海实验动物科学 19: 114~126
- 吴青平, 李雯, 张碧兰. 2001. 饮酒对生育后代影响的初步探讨. 中国优生与遗传杂志 9: 54~55
- 肖卫, 王振全, 李芝兰, 冯三畏. 2001. 丙烯腈的生殖毒性作用研究. 卫生研究 30: 239~240
- 徐效清, 火忠礼. 2003. 接触苯及其同系物女工生殖机能状况调查. 中国公共卫生 19: 195

- 徐娅, 王明臣, 李爱军, 吕双喜. 2000. 有机磷农药对作业女工生殖机能影响的调查. 工业卫生与职业病 26: 278~280
- 绪广林, 钱之玉. 2000. 缺锌对雄性大鼠生殖系统影响的实验研究. 微量元素与健康研究 17: 5~8
- 宣登峰, 唐国慧, 李劲松. 2002. 二硫化碳对雄性生殖功能的影响. 中国工业医学杂志 15: 35~36
- 么宏彦. 2002. 铅污染对妊娠结局的影响. 中华妇产科杂志 37: 119~121
- 姚华, 张晨, 凌冰, 刘继文. 1999. 砷的生殖发育毒性研究. 中国公共卫生 15: 876~877
- 张浩, 曾祥贵, 程薇波, 吴德生. 2003. 壬基酚对成年雄性 SD 大鼠生殖功能的影响. 四川大学学报 34: 295~297
- 章卫平, 刘本, 郑家富. 1998. “6. 25” ^{60}Co 源辐射事故病人性腺功能损伤观察. 中华放射医学与防护杂志 18: 61~62
- 赵春生, 吕文发, 王恒, 车东升. 2002. 温度对小鼠睾丸生精机能的影响. 吉林农业大学学报 24: 78~81
- 赵景春, 王凌诗. 1999. 被动吸烟对小鼠遗传毒性和生殖毒性的研究. 癌变、畸变、突变 11: 229~234
- 赵一鸣. 1999. 长期接触噪声对月经影响的系统评述. 中华劳动卫生职业病杂志 17: 378~381
- 郑丽娟, 许崇荣, 苏纪政. 1998. 铅及噪声作业对女工生殖机能影响的调查. 劳动医学 15: 212~213
- Crha I, Hrubá D, Fiala J, Ventruba P, Zaková J, Petrenko M. 2001. The outcome of infertility treatment by in-vitro fertilisation in smoking and non-smoking women. Cent Eur J Public Health 9: 64~68
- El-Nemr A, AL-Shmwuf T, Subutini L et al. 1998. Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod 13: 2192~2198
- Harkonen K, Viitanen T, Larsen SB, Bonde JP, ASCLEPIOS, Lahdetie J. 1999. Aneuploidy in sperm and exposure to fungicides and lifestyle. Environ Mol Mutagen 34: 39~46
- Li DK, Odouli R, Wi S, Janevic T, Golditch I, Bracken TD, Senior R, Rankin R, Iriye R. 2002. A population-based prospective cohort study of personal exposure to magnetic fields during pregnancy and the risk of miscarriage. Epidemiology 13: 9~20
- Rubes J, Lowe X, Moore D, Perreault S, Slott V, Evenson D, Selevan SG, Wyrobek A. 1998. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. Fertil Steril 70: 715~723
- Zavos PM, Correa JR, Amtypas S et al. 1998. Effects of seminal plasma from cigarettes smokers on sperm viability and longevity. Fertil Steril 69: 425~429

第十八章 现代生殖生物学研究

方法与技术简介

现代分子生物学和细胞生物学理论与技术的发展，极大地推动了生殖生物学研究，使人们对生殖现象的认识深入到细胞和分子水平。从本质上讲，生殖过程是个体生命活动的一部分，与其他生命现象遵循共同的基本规律，如基因的时空特异性表达调控、细胞的增殖、分化和凋亡、细胞之间通过可溶性信号分子和细胞外基质相互作用等。但是，由于生殖过程在生命活动中担当特殊使命，因此也具有许多独特之处，如生殖细胞发生、性周期、受精、妊娠和分娩等等。基于上述原因，现代生殖生物学技术一方面是常规细胞和分子生物学技术在生殖领域的应用，另一方面也建立了一些特有的研究手段和实验模型。本章简单介绍常用的现代生殖生物学技术的原理、操作流程和应用范围。

第一节 细胞离体培养和操作

在生理状态下，高等动物的细胞生活在成分复杂的体液环境中，细胞的生命活动处于众多激素、生长因子和局部作用因子（如前列腺素、组织胺、一氧化氮等）的调节之下。内环境的高度复杂性对生殖生物学研究造成了很大不便，在体内生理过程中，很难排除其他影响因素而阐明单一特定因素对该生理过程的调节效应及其分子基础。而且，高等哺乳动物体型较大，生命周期较长，难于实验操作，因此也限制了针对整个动物体进行的生殖生物学研究。为了克服这些困难，近年来，人们逐渐建立了一系列适合于各种动物细胞或组织的体外培养系统，以期在人为控制的离体环境下，对特定生殖生物学过程进行实验研究。在适宜的条件下，大多数动物细胞都能在培养瓶（皿）中成活和增殖，并表现出它们的分化特征。如果人为向培养液中加入或减去一些特殊分子，如激素或生长因子，或者是把两种以上的不同细胞类型共培养，就可以在相对稳定和已知的培养环境中研究特定分子对细胞行为的影响，以及不同细胞群体之间的相互作用。另外，大量细胞周期同步化的细胞有利于进行生化分析。用体外（*in vitro*）培养的细胞进行的实验，易于操作和控制，但体外环境毕竟不能完全重现体内的生理过程，因此体外实验所得出的结果，必须与体内（*in vivo*）生长的细胞行为进行比较验证。

一、组织和细胞培养技术

组织培养是指从体内取出一小块组织放置在体外进行培养，细胞培养是指用从组织块内分离出的细胞悬液或已培养的细胞系进行培养。生殖过程是生殖器官内各种细胞类型之间相互作用的结果。利用细胞培养技术，可以从器官、组织的不同细胞类型混合群体中，分离、纯化特定类型的细胞，深入进行研究。比如在生殖生物学研究中，可以分

离子宫内膜上皮细胞和基质细胞、卵泡膜细胞和颗粒细胞、睾丸间质细胞和支持细胞、胚胎滋养层细胞和内细胞团细胞等等。大多数组织细胞不适应悬浮生长，必须在固体表面上生长和分裂。这种机械支持可采用玻璃或塑料培养瓶（皿）。有些细胞还要求在培养皿上覆盖胶原等细胞外基质成分，才能生长和分裂，如哺乳动物的扩展期胚泡。还有些特殊细胞类型，如小鼠的胚胎干细胞，只有在与胚胎成纤维细胞（称为饲养细胞，feeder cells）共培养的条件下，才能更好地维持其发育全能性，否则要添加白血病抑制因子（LIF）。

直接来自机体组织的细胞培养称为原代培养。在细胞长满培养瓶后，可以用胰蛋白酶把细胞从瓶壁上消化下来，稀释以进行传代培养。传代细胞通常能够显示出其来源组织的分化特征，这就为一些不能在完整组织中研究的课题提供了良好的实验材料。但是必须注意，传代细胞容易在增殖过程中失去染色体的整倍性，或者分化为某种类型的终末细胞，失去某些体内状态下的生理特征。

二、生殖细胞和胚胎体外培养技术

（一）卵母细胞的体外培养

成年哺乳动物的卵母细胞在卵巢中停滞在第一次减数分裂前期的双线期，也称为生发泡（germinal vesicle, GV）期。当卵母细胞生长并受到适宜信号刺激（在哺乳动物中为促性腺激素）后，恢复减数分裂，生发泡破裂（germinal vesicle breakdown, GVBD）、染色质凝集、纺锤体组装、排出第一极体（first polar body, PB1）并发育到第二次减数分裂中期（MII 期），此时卵母细胞的发育再次阻滞。受精或孤雌活化以后，卵子恢复第二次减数分裂并最终排出第二极体。

为了研究卵母细胞减数分裂和分裂阻滞的分子机理，并且为生殖工程提供大量成熟卵子，人们建立了卵母细胞体外培养系统。通过捣碎卵巢（大鼠、小鼠）或针刺卵泡（家畜）可以得到卵丘包裹的卵母细胞（cumulus-enclosed oocyte, CEO），没有卵丘细胞包裹的卵母细胞称为裸卵（denuded oocyte, DO）。大多数动物的 CEO 和部分实验动物（大鼠、小鼠）的 DO 可以在适宜的培养液中进行体外成熟，其中，家畜卵母细胞体外成熟所需的时间较长（20~44 h），而大鼠、小鼠体外成熟所需的时间较短（约 12 h），这是因为前者的减数分裂成熟需要有新的蛋白质合成。目前有两种实验模型可以支持哺乳动物卵母细胞在体外完成减数分裂。一种模型称作自发的减数分裂成熟（spontaneous meiotic maturation）。哺乳动物卵泡环境中的某些成分可以通过升高卵母细胞内的 cAMP 浓度而抑制减数分裂。如果人为把卵母细胞从抑制性的卵泡环境中释放出来，卵母细胞就能自发恢复减数分裂，发生 GVBD。大鼠和小鼠的 CEO 和 DO 可以在不添加任何特殊成分的平衡盐溶液中发育到 MII 期，猪、牛等家畜的卵母细胞也能发生自发的 GVBD，但通常不能正常发育到 MII 期，因为激素和卵丘细胞对于 GVBD 后的减数分裂事件具有重要影响。另一种模型称作促性腺激素诱导的减数分裂成熟（gonadotropin-induced meiotic maturation）。在该模型中，可以通过向培养液中添加次黄嘌呤（hypoxanthine, HX）来模拟卵泡抑制性环境，阻止卵母细胞发生自发的 GVBD。但是，如果

向该培养液中加入卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH), 就可以克服 HX 对减数分裂的抑制作用, 发生 GVBD。显然, 后一种模型更加接近于生理状态下的卵母细胞减数分裂成熟过程, 而自发的卵母细胞减数分裂恢复只是一种人工实验模型, 其机制与生理状态下有很大不同。近年来对卵母细胞减数分裂的研究趋向于把两种模型并用, 并加以比较。此外, 卵泡培养也可用于模拟体内环境研究卵母细胞成熟。

(二) 精子人工获能和体外受精

目前已经建立起相对成熟的培养系统, 可以对哺乳动物和人类的成熟精子进行体外操作并模拟某些生理过程, 如精子获能、顶体反应和卵子受精。

哺乳动物的卵子体积微小, 行体内受精, 受精卵在体内发育。因此, 在 20 世纪的大部分时间里, 哺乳动物体外受精一直是生殖生物学研究所面临的难题。与其他生物类群不同, 哺乳动物睾丸及附睾内的成熟精子并不具备使卵子受精的能力, 它们必须在雌性生殖道内存留一定时间, 并在某些酶类的作用下, 除掉精液和精子表面的一些抑制性物质, 才能获得使卵子受精的能力, 这种现象称为精子获能 (capacitation)。在了解了哺乳动物受精的这一特点后, 人们先后发明了多种方法对精子进行人工获能, 使哺乳动物卵子的体外受精成为可能。

精子体外获能是体外受精技术的关键环节之一。体外获能包括两个步骤: 首先是对精子的洗涤, 除去精液和精子表面的抑制性物质; 然后使用某些特定培养液成分诱导精子获能。与其他体外培养体系不同, 哺乳动物的精子体外获能条件具有很大的种属差异。对于大鼠、小鼠和人的精子, 用添加牛血清白蛋白 (BSA) 的常规培养液就能很容易地诱导精子获能。但是对于猪、牛、羊等家畜, 进行精子体外获能需要向培养液中添加特殊的化学物质, 如肝素、咖啡因、血小板激活因子、钙离子载体等。此外, 精子孵育的时间和温度也对体外获能的效率有重要影响。小鼠精子在一小时内即可获能, 但大鼠和猪精子获能则需要 3 小时。大多数物种精子的适宜获能温度是 $37\sim 38\text{ }^{\circ}\text{C}$, 但绵羊和猪的精子在 $39\text{ }^{\circ}\text{C}$ 才能有效获能。精子体外获能的实质是模拟体内自然获能, 但这并不意味着体外获能的机制与自然获能完全一致。

体外受精 (*in vitro* fertilization) 是在体外环境完成精卵结合的过程。对体外受精技术的研究和应用, 一方面加深了人们对受精机理的了解, 另一方面为动物繁殖和人类辅助生殖提供了有力手段。如上文所述, 精子在体外受精前要进行人工获能。成熟卵子一方面可以通过体外成熟培养而得到, 也可以通过超数排卵技术从体内得到。受精液应能提供精子穿卵的正常条件, 近年来常用的精子获能液也可兼用作受精液, 如适用于小鼠的 M16-T 液 (添加牛磺酸的 M16 培养液), 适用于大鼠的 DMEM+BSA 液, 以及适用于猪的 mTBM 液 (modified Tris-buffered medium)。获能后的精子在加入受精液之前要进行合适的稀释, 以避免精子浓度过高, 造成多精受精。在受精机理研究中, 为了提高受精率并增加卵子受精的同步性, 也可以用链蛋白酶或酸性 M2 液 ($\text{pH } 2.5$) 除掉透明带, 使精卵直接结合。受精后, 要把受精卵转移到合适的胚胎培养液中继续培养。

(三) 胚胎体外培养和胚胎移植

哺乳动物胚胎的早期发育是在输卵管中进行的，因此胚胎体外培养系统即是对输卵管环境的模拟。哺乳动物胚胎表现种特异性的发育阻滞。小鼠胚胎的发育阻滞发生在 2 细胞期，猪胚胎在 4 细胞期，人胚胎在晚 4 细胞期至早 8 细胞期，牛和绵羊胚胎发生在 8~16 细胞期。胚胎发育阻滞并不存在于体内发育的胚胎，可能是由母体-胚胎基因表达转换期体外培养条件的不完备引起。在合适的条件下发育阻滞可以被克服，比如小鼠和仓鼠的早期胚胎不能利用葡萄糖作为能源物质，如果从培养液中除去葡萄糖并添加其他营养物质，如丙酮酸、牛磺酸、半胱氨酸和谷氨酰胺等，就可以克服发育阻滞。CZB 培养液可以支持小鼠 1 细胞胚胎通过 2 细胞阻滞，但必须把胚胎转移到其他含有葡萄糖的培养液中才能继续发育。NCSU-23 培养液和添加牛磺酸的 M16 培养液分别支持猪和小鼠从受精卵到囊胚（哺乳动物的囊胚也叫胚泡）的发育。另外，与输卵管上皮共培养，也有助于胚胎顺利通过发育阻滞期。

哺乳动物的早期胚胎虽然能够在体外培养系统中发育到囊胚期，但随着胚胎的生长，培养系统所能提供的营养成分已不能满足胚胎发育的需要，必须把胚胎移植到有接受能力的子宫中，胚胎着床后形成胎盘，得到来自母体的营养供应，才能发育到分娩期。目前还没有在体外完成哺乳动物胚胎全程发育的报道。因此，无论是体外受精胚胎、细胞核移植重构胚，还是嵌合体胚胎，在体外发育到囊胚后都要移植到受体子宫中继续发育。供体胚胎与受体子宫发育进程的同步性，是胚胎移植成功的关键。哺乳动物的受精卵在输卵管内进行卵裂，几天后，即由桑椹胚向囊胚过渡的阶段从输卵管进入子宫。子宫只在着床窗口开放的短暂时间对胚泡具有接受性。因此，在获取或构建供体胚胎的同时，要用激素诱导或在自然群体中选择同期发情的成年雌性作为受体，在胚胎体外发育到胚泡期时进行胚胎移植。对于啮齿类动物，同期发情的受体还要与结扎输精管的雄性交配，形成假孕。对于小鼠、大鼠、兔和猫等小型实验动物，胚胎移植采用外科手术法，暴露子宫，用细针在子宫壁上穿孔，并用毛细玻璃针将胚泡移植入子宫。其中，在研究胚胎着床机理的实验中通常采用单侧胚胎移植，以未移植胚胎的一侧子宫作为对照。对于人类和牛、马等大型家畜，通常采用非手术法，通过阴道将胚胎导入子宫。除用于基础研究以外，胚胎移植技术在家畜的良种繁育和治疗人类不孕症等方面，都得到极为广泛的应用。

三、显微操作技术

生殖生物学研究中所指的显微操作技术就是借助显微操作仪，对卵母细胞进行核移植或显微注射（RNA、蛋白、精子等），或者对早期胚胎进行分割、嵌合的技术。这一技术不仅对于揭示减数分裂、受精和早期胚胎发育的本质具有重要的理论意义，而且对于人类和珍稀动物的辅助生殖、家畜良种的繁育都具有巨大的应用价值。哺乳动物的生殖细胞和早期胚胎体积微小，对显微操作人员具有极高的技术要求，其中的核心环节是显微操作用玻璃工具，即注射用针和固定用针的制备（详见陈大元等主编《受精生物

学》)。显微操作在无菌并覆盖石蜡油的培养液微滴中进行,用固定针把待注射的卵子或胚胎固定住,然后用注射针吸取待注射的物质(RNA、蛋白、体细胞、精子、胚胎干细胞乃至整个内细胞团等),穿透受体卵子或胚胎的透明带,把注射针的内容物注射到相应部位。比如把编码某种蛋白的 mRNA 或其反义 RNA、提纯的某种功能性蛋白质或其抗体直接注射到胞质或细胞核中,以研究特定基因产物对卵子成熟和胚胎发育的影响。该方法目前在研究减数分裂和胚胎有丝分裂的分子机理中得到广泛的应用。早在 1971 年, Masui 就在其著名实验中,通过向分裂间期的卵裂球中注射分裂中期细胞的细胞质,发现了成熟促进因子(MPF)和细胞静止因子(CSF)的存在。在动物克隆或研究核质关系的实验中,可把供体细胞注射到透明带下的卵周隙,再通过电融合方法把供体核导入受体胞质。当然,也可以把供体细胞核直接注射到受体胞质中。自 20 世纪 90 年代后期以来,体细胞克隆绵羊、山羊、小鼠、牛、猪、兔、猫乃至骡子已经相继问世,说明该技术已经取得长足进步。为了制作胚胎嵌合体,可以把胚胎干细胞或内细胞团细胞注入受体囊胚的囊胚腔中,以期外源细胞整合到胚胎的内细胞团中,将来发育成各种成体组织器官。该技术是制造转基因动物和基因敲除动物的一个重要环节。

四、低温生物学技术

低温生物学(cryobiology)是探索在低温条件下生命现象的特征、规律和生物体保存的边缘学科,在生殖生物学领域具有重要的理论和应用价值。培养细胞、精子和胚胎的冻存、复苏,都需要借助低温生物学技术。在自然条件下低温可以产生严重的损伤,杀死生物,但借助于抗冻剂和适当的冻存方法,低温又可以长期保存生物组织和细胞。低温损伤不仅取决于温度,还决定于温度变化的速度和条件。低温损伤的原因可能包括降温过程中细胞内水的结晶、复温过程中水的再结晶、冷冻使胞内电解质浓缩形成“溶质损伤”、冷冻损伤细胞器和细胞膜以及使细胞内大分子失去结构水等等。抗冻剂是生物低温冷冻时添加的保护剂,使细胞避免冷冻损伤。抗冻剂分为渗透性和非渗透性两类,前者如甘油、二甲基亚砷(DMSO)、甲醇、乙二醇、乙酰胺等,后者如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇、羟淀粉等。不同抗冻剂适用于不同细胞,如保存精子常用 4%~9%甘油,保存胚胎可用 1.5 mol/L DMSO。液氮温度(-196℃)是保存大多数生物样品的最佳温度。另外,降温和复温的程序、速度直接影响着冻存效果。目前多采用分段降温法,利用不同温级的冰箱或液氮罐,将活细胞在不同温度分段降温冷冻,例如从室温降到 4℃,再降至 -20℃、-80℃,直至 -196℃。低温冻存技术使生物体活细胞能够无限期地以生命活动休止状态保存,极大地方便了生殖生物学研究。

五、流式细胞术

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一种在功能水平上对单细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选的检测手段,它可以高速分析上万个细胞,并能同时从一个细胞中测得多个参数,与传统的荧光镜检查相比,具有速度快、精度高、准确性好等优点,成为当代先进的细胞定量分析技术。流式细胞仪就是进行流式细胞分析的仪器,它集电

子技术、计算机技术、激光技术、流体理论于一体，是一种非常先进的检测仪器。它的工作原理是将待测细胞进行荧光染色后制成单细胞悬液，用一定压力将待测样品压入流动室，不含细胞的磷酸缓冲液在高压下从鞘液管喷出，鞘液管入口方向与待测样品流成一定角度，这样，鞘液就能够包绕着样品高速流动，组成一个圆形的流束，待测细胞在鞘液的包被下单行排列，依次通过检测区域。流式细胞仪通常以激光作为发光源，经聚焦后垂直照射在样品流上，被荧光染色的细胞在激光束的照射下产生散射光和激发荧光。这两种信号同时被前向光电二极管和 90° 方向的光电倍增管接收。光散射信号反映了细胞体积的大小；荧光信号强度代表了所测细胞膜表面抗原的强度或其核内物质的浓度，经光电倍增管接收后可转换为电信号，再通过模/数转换器，将连续的电信号转换为可被计算机识别的数字信号。计算机把所测量到的各种信号进行计算机处理。细胞的分选是通过分离含有单细胞的液滴而实现的。在流动室的喷口上配有一个超高频电晶体，充电后振动，使喷出的液流断裂为均匀的液滴，待测定细胞就分散在这些液滴之中。将这些液滴充以正负不同的电荷，当液滴流经带有几千伏特的偏转板时，在高压电场的作用下偏转，落入各自的收集容器中，不予充电的液滴落入中间的废液容器，从而实现细胞的分离。该技术可用于细胞（包括精子）的分型、记数、细胞染色体的异倍性测定，以及免疫学研究等等。用该技术分离 X、Y 精子，准确率可达 90% 左右。

第二节 基因的克隆、表达检测及功能分析

一、基因克隆

不但众多已知基因及其产物在生殖过程中发挥着与生殖活动相关的功能，而且还有大量基因特异性地在生殖系统或生殖细胞中表达，其中许多还是未知的。因此，为了更加深入地揭示生殖生物学理论问题，新基因的克隆及其功能分析是必不可少的。对于已知多肽分子的基因克隆，可采用序列指导引物合成的方法，用 RT-PCR 技术扩增出目的基因的 cDNA。或者在拥有足量多肽的情况下，制备抗该多肽的抗体，并以此从表达性文库中筛选阳性克隆（详见 Sambrook 等《分子克隆》）。哺乳动物细胞在进化过程中，产生出许多具有高度同源性的基因，称之为基因家族。利用家族成员基因同源性很强的特点，可发现并得到新家族成员的基因。另外，许多调控生殖与发育基本生命活动的关键基因，在生物进化活动中高度保守。许多在线虫、果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾，乃至酵母等低等模式生物中发现的基因，都可以在小鼠和人类基因组中找到其同源基因。这些模式生物具有个体小、生命周期短、能诱导产生大量可供筛选的突变体、易于遗传学操作和分析等优点，因此在这些模式生物中的许多细胞和发育生物学的基础研究领先于哺乳动物。在现阶段，从哺乳动物基因组中寻找与模式生物的生殖、发育相关基因的同源基因，再研究其表达规律和产物功能，是一种有效方法。用模式生物中已知基因的高保守序列为探针，从哺乳动物相应文库中筛选出阳性克隆。为确认所得的新基因，还必须进一步通过核酸序列分析或其他手段鉴定。在缺乏全同源探针的情况下，可用其他种属的相关基因指导制备探针。用这种部分同源探针来筛选同源基因是基因克隆的常用技术。该法往往需要摸索核酸杂交技术条件，以降低背景杂交干扰。

二、生物芯片技术

20 世纪 90 年代初开始实施的人类基因组计划取得了巨大进展。目前已经测定了十多种微生物以及高等动植物的全基因组序列,大量的基因序列数据正在以前所未有的速度膨胀。一个现实的科学问题摆到了人们面前:如何研究如此众多基因的功能?如何有效利用如此海量的基因信息揭示人类生命的一般规律?于是,一项类似于计算机芯片技术的新兴生物高技术——生物芯片技术,随着人类基因组研究的进展应运而生了。它主要是指通过微加工和微电子技术在固体支撑物表面构建微型生物化学分析系统,以实现生命机体的组织、细胞、蛋白质、核酸、糖类以及其他生物组分进行准确、快速、大信息量的检测。目前常见的生物芯片主要分为基因芯片(genechip、DNAchip 和 DNA microarray)和蛋白芯片(proteinchip)两大类。基因芯片是高通量检测基因表达、突变等特征的一种新技术,它将分子生物学和微电子工艺有机地结合起来,使所设计的核酸探针阵列能够准确、有效地检测出目标序列或其突变。基因芯片技术主要包括四个基本技术环节:芯片微阵列制备、样品制备、生物分子反应和信号的检测及分析。目前制备芯片主要采用表面化学的方法或组合化学的方法来处理固相基质如玻璃片或硅片,然后使 DNA 片段或蛋白质分子按特定顺序排列在载体上。目前已有近 40 万种不同 cDNA 片段的高密度基因芯片,并且正在制备包含上百万个 DNA 探针的人类基因芯片。生物样品的制备和处理是基因芯片技术的第二个重要环节。生物样品往往是非常复杂的生物分子混合物,一般不能直接与芯片进行反应。要将样品进行特定的生物处理,获取其中的蛋白质或 DNA、RNA 等信息分子并加以标记,以提高检测的灵敏度。第三步是生物芯片上进行的生物分子反应。芯片生物分子之间的反应是芯片检测的关键一步。通过选择合适的反应条件使生物分子间反应处于最佳条件,减少生物分子之间的非特异性反应,从而获取最能反映生物本质的信号。基因芯片技术的最后一步就是芯片信号的检测和分析。目前最常用的芯片信号检测方法是将芯片置入芯片扫描仪中,通过采集各反应点的荧光强弱和荧光位置,经相关软件分析图像,即可以获得有关生物信息。

蛋白芯片与基因芯片的原理相似。不同之处有,一是芯片上固定的分子是蛋白质如抗原或抗体等;其二,检测的原理是依据蛋白分子之间、蛋白与核酸、蛋白与其他分子的相互作用。酵母蛋白质组芯片(proteomechip)是目前为止第一个包含一种生物全部蛋白质分子的蛋白质芯片。

生物芯片的主要特点是高通量、微型化和自动化。生物芯片上高度集成的成千上万密集排列的分子微阵列,能够在很短时间内分析大量的生物分子,使人们能够快速准确地获取样品中的生物信息。生命体内的生理过程,包括生殖过程,受众多基因协同作用的调节。因此,以往那些以单一或少数几个基因为研究对象的传统遗传学方法在现代功能基因组学研究中显得力不从心,生物芯片技术却能在现代生殖生物学研究中发挥有效作用,比如通过比较儿童和成人睾丸中基因表达的差异筛选精子发生相关基因,分析在胚胎干细胞向生殖干细胞分化时最初表达的基因以研究生殖细胞发生的机理等。Reese 等通过筛选近万个基因,在小鼠子宫中的胚泡着床位点检测到 36 个基因表达水平上调和 27 个表达下调,Kao 等通过筛选 12 686 个基因,发现在人子宫着床窗口开放期子宫

内膜中有 156 个基因表达上调，377 个基因表达下调。

三、蛋白质组学研究技术

基因芯片反映的是基因在转录水平的变化，然而，蛋白质是基因功能的执行者，mRNA 的翻译效率，蛋白质的折叠、修饰、降解和蛋白质间相互作用都直接影响到蛋白的功能发挥。所以基因在 mRNA 水平的变化只是细胞功能变化的前提，需要在蛋白水平进行验证，但通过对单个蛋白进行分析的手段已经不适应于蛋白质组范畴内高通量地研究蛋白功能。蛋白质二维电泳和质谱技术的结合是目前蛋白质组研究的常用手段。通过蛋白质二维电泳高效分离蛋白，将蛋白回收并用质谱仪进行氨基酸测序，得到目的蛋白的特征。而蛋白质芯片的产生，正在推动着对基因功能大范围的研究。

发现差异表达的蛋白是功能研究的前提。通过比较二维电泳图谱，可以直接分离差异蛋白，以便进行质谱分析，但不能发现低丰度蛋白。抗体芯片由数百、上千种蛋白的特异抗体点在载体上制成，它与样品中的蛋白进行杂交，可以筛选出表达水平有差异的蛋白，而抗体的特异性是芯片质量的关键。蛋白间的相互作用是蛋白质功能研究的主要方面，亲和层析 - 质谱、蛋白功能芯片、酵母双杂交都可以研究蛋白相互作用。通过亲和层析将目的蛋白和未知结合蛋白一起回收，再通过质谱分析复合物的组成。蛋白质功能芯片是指将成千上万个纯化蛋白点成微阵列，将待研究蛋白与之杂交，即可发现蛋白质组中所有与其相互作用的蛋白。

四、聚合酶链反应

利用化学合成的 DNA 寡核苷酸作为引物，用热稳定 DNA 聚合酶使特定的 DNA 序列在体外扩增的技术称为聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术。PCR 技术的大致过程是，首先从已知的 DNA 序列中，在所要扩增区段的两端合成两条分别互补于双链 DNA 模板的寡核苷酸作为体外合成 DNA 的引物。目前已经有多种分子生物学软件可辅助进行引物的设计。在每个反应周期的开始用高温处理 (94~95℃) 使双链 DNA 模板变性，再冷却至适当温度 (约 40~60℃) 使引物与模板发生复性而结合，然后在耐高温的 DNA 聚合酶催化下，在 4 种 dNTP 存在的情况下，于适当的反应温度 (约 72℃) 进行新 DNA 链的合成。在下一个循环中，前一个循环中合成的双链 DNA 可作为模板被扩增。这样周而复始，经过 20~30 个循环就可达到有效的 DNA 扩增。PCR 方法灵敏度高，可以检测到样品中微量 DNA 分子。mRNA 通过逆转录酶合成 cDNA 后，也可用 PCR 方法分析，称为 RT-PCR。在生殖生物学研究中，RT-PCR 被用于检测特定 mRNA 在组织器官中的表达。

五、核酸杂交技术

核酸杂交技术是分子生物学的标准技术之一，用于检测 DNA 或 RNA 分子的特定序列 (靶序列)。从样品中提取的总 DNA 或 RNA 先通过琼脂糖凝胶电泳，根据分子量

的不同在凝胶中分成不同的条带，再把这些核酸分子平行转移并固定到硝酸纤维素或尼龙膜上，以使它们相对位置不变。同时将与其互补的单链 DNA 或 RNA 探针用放射性或非放射性标记。在膜上杂交时，探针与其互补的靶序列结合，洗去未结合的游离探针后，可经放射自显影或显色反应检测特异结合的标记探针。其中 DNA 印迹杂交 (DNA blot hybridization) 也称为 Southern Blot，RNA 印迹杂交 (RNA blot hybridization) 也称为 Northern Blot。在生殖生物学研究中，RNA 印迹杂交应用较多，主要用于检测组织或培养细胞中特定基因在转录水平的变化。

六、免疫蛋白印迹分析

免疫蛋白印迹 (Western blot) 是检测生物样品中特定蛋白质的方法。第一，用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白，最常用的方法是将强阴离子去污剂 SDS 与某一还原剂 (通常为巯基乙醇或二硫苏糖醇) 并用，并通过加热使蛋白质变性后再加样于电泳凝胶上。变性的多肽与 SDS 结合并因此带负电荷，由于多肽结合的 SDS 量总是与多肽的分子质量成正比而与其序列无关，因此 SDS 多肽复合物在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的迁移率只与多肽的大小相关。而且，对多肽主链所进行的修饰，如糖基化和磷酸化，将显著影响其表观分子质量。因此，用免疫蛋白印迹分析方法，不仅能够研究某一特定蛋白在生理过程中的表达量变化，而且可以检测出蛋白质在不同生理时期受到的共价修饰。待蛋白样品经电泳之后，把凝胶中的所有蛋白转移 (通常是电转移) 到硝酸纤维素膜或 PVDF 膜上，再用特定蛋白的抗体与膜共同孵育一段时间，通过抗原-抗体相互作用使抗体结合到膜上相对应的蛋白位置，然后用标记的第二抗体去检测膜上特定蛋白的表达。常用的表达检测方法是增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL)，即用辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 交联的第二抗体去结合膜上的第一抗体，再加入辣根过氧化物酶的底物 (luminol 和 LCA)，该底物在 HRP 作用下生成发光产物。反应后的膜使 X 光片曝光，即在 X 光片上与硝酸纤维素膜相对应的位置显现出黑色条带，此即特定蛋白的表达信号。

决定免疫蛋白印迹实验成败的因素是蛋白的有效分离和抗体对抗原的特异性亲和能力，而且在某些稀有样品中，如哺乳动物的卵母细胞，蛋白质的含量成为免疫蛋白印迹的限制因素。为了使蛋白质得到有效分离，可以通过改变凝胶中丙烯酰胺的浓度来调整凝胶孔径。一般来说，小孔径凝胶 (如 15% 丙烯酰胺凝胶) 适用于小分子质量蛋白，并有利于分辨蛋白质的磷酸化等共价修饰，而大孔径凝胶 (如 8% 丙烯酰胺凝胶) 更有利于分离高分子质量蛋白，并使蛋白质较容易地从凝胶中转移到硝酸纤维素膜上。大多数中等分子质量的蛋白 (30~100 kDa) 适用的凝胶浓度是 10% 左右。为了增强抗体与膜上抗原结合的特异性，膜在与抗体共孵育之前必须经过封闭处理，即用一定浓度的牛血清白蛋白或脱脂奶粉先与膜共同孵育一段时间，使这些蛋白质分子与膜上的非特异性位点结合，从而阻止抗体在膜上的非特异性沉积。但是，如果封闭过分，也会影响抗体与靶蛋白的特异性结合。为了得到背景干净的免疫蛋白印迹结果，封闭过程是十分关键的，需要进行预实验确定最佳封闭方法。

七、基因转移技术

将人工分离和修饰过的基因导入到生物体基因组中，由于导入基因的表达，引起生物体的性状可遗传的变化，这一技术称之为基因转移（gene transfer）技术。转基因动物是指以实验方法导入外源基因，在染色体组内稳定整合并能遗传给后代的一类动物。1982 年获得的转基因小鼠，是转入大鼠的生长激素基因，导致小鼠体重为正常个体的二倍，因而被称为“超级小鼠”。在以后 10 年间相继报道过转基因兔、绵羊、猪、鱼、昆虫、牛、鸡、山羊、大鼠等转基因动物的成功。由于转基因动物体系打破了自然繁殖中的种间生殖隔离，使基因能在种系关系很远的机体间流动，它将对整个生命科学产生全局性影响。

转基因动物生产主要步骤包括：①目的基因的选择。②将重组基因转入受精卵，常使用的方法有显微注射法、反转录病毒感染法、胚胎干细胞法、精子载体法、脂质体法等。将转入了外源基因的受精卵植入同期发情的受体动物，在植入前完成整合胚胎的检测、筛选、建立 ES 细胞系。③对出生后基因整合、表达情况进行检测，对整合、表达的转基因动物进行育种试验，建立由成功转基因个体或群体组建的转基因系。

转基因动物是对多种生命现象本质深入了解的工具，如研究基因的结构与功能的关系，细胞发育的潜能性、细胞核与细胞质的相互关系、胚胎发育调控、性别分化机理等。例如，把一个来自 Y 染色体的 Sry 基因注入基因型为雌性的鼠胚胎内，可以使这些本来应该发育成雌鼠的胚胎最后发育成雄性。这个结果表明，Sry 基因是决定哺乳动物雄性性别的基因。利用转基因操作技术可以有选择地杀死某些特殊形态的细胞，其原理是：把某些经过改造的基因注入鼠的胚胎内，这些新基因只能在胚胎内的某些区域得到表达。这些区域内的细胞被由新基因控制产生的毒性物质杀死，其后的一系列结果要跟踪观察。这种方法对于追踪细胞的世系大有帮助。另一个研究途径是把标志基因注入胚胎。这些新导入的标志基因可以遗传给后代。通过研究这些标志基因的行为就可以更好地获得有关细胞“谱系”的信息。

八、基因敲除技术

基因敲除（gene knockout）是指从分子水平上设计实验，将目的基因去除，或用其他序列取代，然后从整体上观察实验动物，推测相应基因的功能。基因敲除的技术路线如下：①构建重组基因载体。②用电穿孔、显微注射等方法把重组 DNA 转入受体细胞核内。③用选择培养基筛选已发生同源重组的细胞。④将发生同源重组的细胞转入胚胎使其生长成为转基因动物。⑤对转基因动物进行回交及自交后，筛选缺陷型的动物，并进行形态观察及分子生物学检测。

基因敲除的靶细胞目前最常用的是小鼠 ES 细胞。80 年代初，胚胎干细胞（ES 细胞）分离和体外培养的成功奠定了基因敲除的技术基础。通过该技术，体外精细的基因操作与小鼠的整个生长发育和生命过程得到了直接的结合，为探讨高等动物基因组结构和功能提供了有效的方法。深入研究基因敲除小鼠在胚胎发育及生命各期的表型，可以

得到详细的有关该基因在生长发育中的作用，为研究基因的功能和生物效应提供模式。目前人类基因组研究多由新基因序列的筛选检测入手，进而用基因敲除法在小鼠上观察该基因缺失引起的表型变化。在线虫、果蝇、非洲爪蟾等低等模式生物中筛选出来的重要基因，也常常通过克隆并敲除其在小鼠基因组中的同源基因，来研究它们在高等哺乳动物中的相应功能。比如，敲除了编码白血病抑制因子（LIF）、环氧合酶-2（COX-2）、同源盒基因产物 HOX-10、细胞膜糖蛋白 Basigin、前列环素（prostacyclin）核受体等分子的基因以后，小鼠的胚胎着床过程受到抑制，这是对阐明胚胎着床机理的重要提示。敲除了小鼠原癌基因 *c-mos* 以后，成熟的卵母细胞不能阻滞在 MII 期，而是发生自发的孤雌激活，说明 *c-mos* 编码的蛋白激酶及其下游传号转导途径，对于维持哺乳动物卵母细胞的 MII 期阻滞是至关重要的。有人发现并敲除了一种平滑肌细胞膜上的离子通道蛋白基因，却意外地发现能引起小鼠不育。深入研究证明，配子发生没有受到影响，只是由于雄鼠交配时输精管平滑肌不能收缩，无法射精，说明该基因编码的离子通道对于接受交配刺激，引起射精，发挥着不可替代的作用。还有环氧合酶-1（COX-1）基因敲除导致小鼠不能分娩、核仁蛋白 NPM2 基因敲除引起受精卵不能发生卵裂等。但是，当人们敲除了一些以前认为极为重要的基因以后，却往往不能观察到预期的严重生理缺陷。例如，人们久已认识到催产素是一种重要的生殖激素，在体内具有相当广泛的作用。但敲除催产素基因以后，原先认为是由催产素介导的很多生理过程却不受影响。这并不能说催产素在体内没有作用，而是由于生命体内很多重要的生理过程都存在替代途径（redundant pathway）。当一个基因被敲除之后，其功能缺陷往往可以被其他分子补偿，而不表现出来，从而影响人们恰如其分地评价被敲除基因的作用。这种现象被认为是基因敲除技术的一个重要缺陷。另外，有些对个体生存极为重要的基因，其缺失会导致个体在胚胎早期即死亡，无法用于研究基因在特定生理过程中的作用。总之，基因敲除技术虽然有其局限性，但仍然是目前证实特定基因功能的最可靠方法之一，在生殖生物学研究中得到极为广泛的应用。

九、条件基因敲除技术

经典的基因敲除技术影响了一个动物的每个细胞，常常无法从一个复杂的表型中区分首要和次要的变化，而且经常导致胚胎在发育早期死亡，阻碍了对它们在发育后期和成体中功能的研究，包括它们在生殖系统中的功能。所以这种“全或无”的基因敲除技术已不能满足后基因组时代对基因功能研究的要求。为了准确了解一个基因在一种特异细胞类型、疾病或发育的关键时期的作用，需要设计更佳技术路线。

条件基因敲除（conditional knockout）技术是近年来新兴的小鼠基因敲除技术，其原理是：由位点特异的重组酶（site-specific recombinase）切除带有相应酶识别序列的靶基因片段，使后者无法产生活性产物。根据重组酶的组织特异表达模式或/和可诱导的方式，使目的基因以细胞类型特异的方式或/和在特定时间被诱导敲除。其中，产生各种可控制的转重组酶基因小鼠是控制发生基因敲除的组织和时间的关键。目前被广泛应用的是噬菌体 Cre-loxP 系统，另一个来自酵母的 Flp-Frt 系统也正在开始使用。例如，Weber 等发现，转录中间因子（transcriptional intermediary factor 1, TIF1）在雄性小鼠

中和 Sertoli 细胞及圆形精子细胞的异染色质结合，但具体作用不清楚，而且缺失 TIF1 的小鼠胚胎在进入原肠期以前死亡，他们接着利用被泰米酚诱导的 Cre - loxP 体系，使 TIF1 在生殖细胞系中特异缺失，发现雄鼠的精原干细胞系发生受阻，未成熟生殖细胞从曲细精管脱落。

十、RNA 干扰技术

近年来的研究表明，一些小的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 可以高效、特异地阻断体内特定基因的表达，促使 mRNA 降解，诱导细胞表现出特定基因缺失的表型，称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。RNAi 本来是生物体抵御外在感染的一种重要保护机制，但目前可以作为一种简单有效的基因沉默 (gene silencing) 工具，用于基因功能研究。在功能基因组研究中，需要对特定基因进行功能丧失或降低突变，以确定其功能。由于 RNAi 具有高度的序列专一性，可以特异的使靶基因沉默，导致功能丧失或降低，因此 RNAi 可以作为一种强有力的研究工具，用于功能基因组的研究。将功能未知基因的编码区 (外显子) 或启动子区，以反向重复的方式由同一启动子控制表达。这样在转基因个体内转录出的 RNA 可形成 dsRNA，产生 RNA 干涉，使目的基因沉默，从而进一步研究目的基因的功能。根据所选用序列的不同，可将其分为编码区 RNAi 和启动子区 RNAi 技术。与其他几种沉默基因的技术相比，RNAi 具有明显的优点，它比反义 RNA 技术更有效，更容易引起基因功能丧失或降低。而且通过与细胞特异性启动子及可诱导系统结合使用，可以在发育的不同时期或不同器官中有选择地作用，与基因敲除技术造成的功能永久性缺失相比，更受科学家偏爱。RNA 干扰最早在线虫中发现并得以应用，现在已经迅速扩展到果蝇和哺乳动物的研究中。RNA 干扰技术的出现，在功能基因组学领域掀起了一场革命，被 *Science* 评为 2001 年最重要的科学成果之一。

第三节 微观形态学技术

许多在生殖和发育上有重要意义的基因只是在复杂组织中的少数细胞里表达，或仅在一种器官及组织分化过程中的短暂时间内表达。确定这些基因及其蛋白产物在组织、细胞中的时空表达规律，对于研究它们在生殖过程中发挥的作用，具有重要的参考价值。虽然用 RNA 印迹分析和免疫蛋白印迹分析可以研究特定 mRNA 和蛋白在组织中的表达变化，但生殖器官是由多种组织和细胞类型构成的，特定基因的转录和翻译常发生在特定的细胞类型中和器官内很局限的一个部位，比如卵巢中正在发育的卵泡和子宫中胚胎的着床位点。这样，只分析器官中的总 RNA 和蛋白样品，不足以充分揭示生殖过程中的基因表达变化。只有通过原位杂交和免疫组化等方法，把特异基因表达的检测与特定时期的组织细胞类型联系起来进行研究，才能有效阐明生殖相关基因的时空调节规律。

一、免疫组织化学

免疫组织化学 (immunohistochemistry) 简称免疫组化, 是利用抗原抗体反应在组织细胞内检测特定蛋白质表达的方法, 具有灵敏度高、特异性强、定位准确和操作方便等优点。免疫组化大致包括组织固定、包埋和切片、封闭、抗体孵育、信号检测、组织对染和封片等步骤。组织固定和切片是影响免疫组化实验成功与否的关键, 常需针对每个具体实验用途进行优化。常用的固定剂包括甲醛、多聚甲醛、苦味酸、冰醋酸、甲醇、乙醇、丙酮、氯化汞、戊二醛等, 它们的作用在于使组织中的蛋白质迅速发生变性, 阻止组织自溶作用, 维持其自然结构形态。其中有些固定剂也充当有机溶剂的作用, 抽提细胞质和细胞膜中的脂类, 有助于提高组织对亲水性染料或抗体的通透性。为了使生物组织尽量保持活体状态的微观结构, 必须在动物体死亡之后对所需组织进行迅速固定, 而且为了保证固定液迅速渗透到组织中去, 组织块不能太大。另外, 针对生殖生物学的研究特点, 在组织取材时一定还要兼顾组织结构的完整性, 以及它所包含的生理信息。比如为了研究胚胎着床过程中子宫组织的结构变化, 就一定要在取材过程中保持子宫壁的完整性, 并且要选取包含胚胎着床位点的组织块进行取材。根据标记物的性质, 可将免疫组化分为免疫荧光法 (immunofluorescence)、免疫酶法 (immunoperoxidase)、免疫金法 (immunogold)、ABC 法 (avidin-biotin complex) 等。

针对于培养细胞的免疫组化与组织切片略有不同。可以把灭菌的小片盖玻片置于细胞培养板底部, 接种细胞。待细胞长满之后倾去培养液, 在培养板小室中对细胞进行固定、抗体孵育和显色等操作。待上述操作完成之后, 用镊子夹出盖玻片, 倒扣在载玻片上, 封片以后即可上镜观察。该方法也适用于培养细胞的激光共聚焦显微术。

二、激光共聚焦显微术

激光共聚焦显微术 (confocal microscopy) 是一项用途广泛的现代生物显微技术, 其基本原理是利用荧光物质标记组织或细胞的某一部分, 然后用确定波长的入射光扫描样品的不同层面, 并收集各个层面荧光物质发出的激发光, 用与显微镜相连的计算机系统进行分析, 把各个层面的荧光图像叠加起来, 形成立体图像。免疫荧光化学术 (immunofluorochemistry) 是利用抗原-抗体特异性反应来研究特定蛋白质在组织、细胞中表达时间和部位的有用方法。其基本原理是利用特定蛋白的抗体, 即一抗 (first antibody, Ab1), 使之与组织切片或整装片 (卵母细胞或早期胚胎) 中的该种蛋白结合, 然后加入荧光物质标记的抗一抗的抗体, 即二抗 (second antibody, Ab2), 在显微镜下用合适的入射光观察, 由于抗原-抗体的结合是高度专一性的, 所以只有在具有该种蛋白的部位才可见荧光, 由此研究蛋白的表达规律。目前已有大量商品化抗体出售, 使免疫荧光化学术成为当今生物学的常规技术。目前常用的荧光染料主要有异硫氰酸荧光素 (FITC)、罗丹明 (Rhodamine)、得克萨斯红 (Texas red) 和碘代丙啉 (PI) 等。

激光共聚焦显微术特别适合于哺乳动物卵母细胞和早期胚胎的分子细胞生物学研究。多种参与细胞周期调控、细胞传号转导的蛋白质以及细胞骨架成分都在卵母细胞中

呈现时空特异性分布，但是卵母细胞的体积远大于体细胞，且在排卵后游离于输卵管中，或在体外培养系统中游离于培养液中，不能采用常规的组织切片方法来进行免疫荧光化学处理，而必须使用适合于卵母细胞的特殊方法。首先，为了保证样品的立体形态，各个操作步骤都是在液滴中进行，用玻璃微吸管在各液滴之间转移样品，而不是像组织切片那样附着在载玻片上进行操作。其次，由于激光共聚焦显微术的研究对象是完整的细胞，而不是像组织切片中的细胞那样已经在切片过程中暴露出很多细胞断面，因此必须用合适的去污剂（如 Triton X-100 和 Tween-20 等）抽提细胞膜中的脂类，增加细胞膜对抗体的透性。对于猪卵、牛卵等富含脂滴的细胞，抽提过程更为重要，因为细胞质中的脂类也会影响抗体的扩散。在进行完一切操作步骤之后，再将样品以整装片的形式加载在载玻片上，用激光共聚焦显微镜观察。对该技术的详细描述见参考文献。

三、双光子荧光显微图像技术

双光子荧光显微图像系统是采用“双光子脉冲红外激光”作为光源，即用两个或多个长波长的光子激发短波长的荧光，再结合激光共聚焦显微镜的显微聚焦、图像扫描采集和数据处理功能的显微图像系统。激光共聚焦显微成像系统的局限性在于，绝大多数现有荧光物质的激发光波长都处于紫外或近紫外区域，而高强度的紫外或近紫外光经过聚焦，再集中照射到样品的微小区域内，使样品处于高能量辐射之下，很快死亡或改变其正常生理行为，称为“光毒性效应”。利用“双光子脉冲激发技术”，人们可以利用能量较低的红外或近红外光作为激发光源代替紫外或近紫外照射光，同样可以获得相应荧光信号，同时避免了“光毒性效应”。而且，由于红外或近红外光的穿透能力大大高于紫外光和可见光，此技术使得对样品的观察厚度提高了将近一倍。该技术以其明显优势大有取代激光共聚焦显微成像技术的趋势。目前已采用双光子显微技术进行了包括活体神经成像、胚胎发育全程动态观察、活体脑皮层上神经元的结构与功能信号检测等研究。

四、原位杂交技术

原位杂交技术（*in situ* hybridization）的原理是用一个特异性标记（放射性同位素标记或地高辛标记）的核苷酸探针与各个细胞或组织切片中的 RNA 进行杂交，然后通过检测特异性标记来确定目的 RNA 的表达位置和时间。在生殖生物学领域，该技术被用于研究特定基因在生殖过程中的时间和细胞类型特异性表达，以及其他因素对特定基因表达的调节作用。这需要三个方面的技术知识。首先，制备适用的核酸探针需要掌握相应的分子生物学原理和技术（如质粒制备、探针标记、核酸提取）；其次，要有熟练的组织学技能，制备成功的组织切片；最后，对实验结果的正确解释，需要熟悉细胞生物学、动物组织学和相关的生殖生物学原理。因为组织样品中待检测的 RNA 非常微量，而且极易被 RNA 酶降解，因此在实验过程中用到的所有物品都要经过高温烘烤或 DEPC 处理，以除去可能的 RNA 酶污染，而且在操作过程中要戴手套，避免皮肤接触。探针标记可以采用放射性同位素标记、地高辛标记、荧光标记等不同方法。原位杂交可

以在石蜡或冰冻切片上进行，二者各有优缺点。石蜡切片比冰冻切片更能保持清晰的组织形态和结构，而且更耐保存。但根据多数人的经验，用冰冻切片做原位杂交得到的表达信号更强，因为在石蜡包埋过程中会损失部分 RNA。此外，整体胚胎或器官的非同位素原位杂交是被广泛使用的方法，它使 RNA 空间分布的快速测定成为可能。无论采用何种方法，标本都要经过适当的固定，固定以后用蛋白酶消化，一方面使核蛋白结合的 mRNA 充分暴露其碱基，另一方面利于标记探针透过组织及细胞膜。在杂交前还要对组织切片进行脱脂，使探针更容易穿透细胞膜。

五、电子显微镜技术

光学显微镜的分辨率受到入射光线波长的限制，而电子束的波长比光波短的多，因此用电子束代替入射光的电子显微镜可以极大提高对样品的分辨率。虽然电子显微镜的基本原理与光学显微镜相似，但样品的制备方法却有着较大的不同。第一，要获得电镜的高分辨率，样品必须很好地固定，常采用戊二醛和戊二酸做固定剂。许多光学显微镜常用的固定液如乙醇和福尔马林不适合做电镜的固定液，因为它们会造成在超微结构水平上不能忽视的样品结构破坏。第二，因为电镜成像环境是高真空的，所以固定液必须能够脱水。第三，因为样品必须制成足够薄的切片以保证电子束能够有效穿透，所以样品必须包埋于树脂中防止剖面硬化，承受电子束轰击。第四，由于大多数生物结构在电镜下只有很小的内在对比度，所以样品必须用能够增加反差的化合物进行染色，通常选择重金属盐作为染色剂。在生殖生物学研究中，电子显微镜技术主要被用于细胞超微结构的观察，比如卵子表面的微绒毛、卵皮质颗粒的排放、精子顶体反应过程、内分泌细胞中分泌颗粒的积累、胚胎在子宫中着床时的母胎界面等。通过免疫电镜技术，即利用重金属离子标记和抗原 - 抗体反应原理，可以在细胞超微水平上对特异蛋白质的分布变化进行研究。

六、细胞特殊染色技术

(一) 活细胞中自由钙的成像和检测

钙离子是通用的第二信使，测定亚细胞钙离子浓度在空间和时间上的变化，对于监控许多生理活动，包括受精、平滑肌收缩、突触传递和细胞分裂等都很重要。在活细胞中 Ca^{2+} 是不能被直接观察到的，必须与另一种分子相互作用，引起该分子光学特性的改变，发出荧光，再通过光子传感仪或二维光子检测仪，以模拟形式或数据形式记录下细胞内钙离子引发的荧光发射变化。理想的钙指示剂应该是在钙浓度发生变化的地方，对钙的存在做出报告，而又不影响所研究的反应。目前常用的发光钙指示剂有人工合成物 Fura-2、Quin-2，以及水母发光蛋白等。

(二) 精子获能、顶体反应的评价

准确、客观地评价精子功能状态对于生殖生物学研究和辅助生殖技术都有重要的参考价值。精子质膜完整性是其死活的一个间接指标，死精子特异性荧光探针有碘代丙啶 (PI)、溴化乙啶 (EB) 和 Hoechst 33 258 等，活精子特异性荧光探针有羧基荧光素双醋酸盐 (carboxy fluorescein diacetate, CFDA)、羧基二甲基荧光素双醋酸盐 (carboxy dimethyl fluorescein diacetate, CDMFDA)、钙黄绿素乙酰基甲基酯 (calcein acetyl methyl ester, CAM)、Hoechst 33 342、SYTO-17 和 SYBR-14 等。这两类荧光探针一般结合使用，从而使死精子和活精子能够同时得到鉴定。精子运动能力与其线粒体活性密切相关，因此线粒体的功能状态是精子功能质量的一个关键指标。检测线粒体活性最常用的特异性探针是罗丹明 123 (R123)、Mitotracker green FM (MITO) 和 JC-1。前两种探针染色阳性精子的线粒体部位发绿色荧光，JC-1 染色阳性的精子发出绿色或红-橘红色荧光。精子获能过程中的一个重要事件是 Ca^{2+} 的内流。金霉素 (CTC) 能够进入细胞内具高浓度 Ca^{2+} 的区间，与 Ca^{2+} 结合。而且 CTC- Ca^{2+} 复合物能和细胞膜内的疏水区结合，在荧光显微镜下被激发出荧光，因而能够说明精子获能各时期 Ca^{2+} 的短暂变化和分布规律。精子 CTC 染色类型有三种：①F 型，整个精子头部有均一荧光，为未获能、顶体完整的精子。②B 型，精子头部顶体后区，靠近尾部的部分无荧光，而头前部为均一荧光，为获能、顶体完整的精子。③整个精子头部无荧光或只有非常弱的荧光，为发生了顶体反应的精子。因此 CTC 染色不但可以检测精子获能的比例，还能检测精子顶体反应的比例。目前这项技术已经被用于猴、小鼠、山羊、马、猪和牛等动物和人的精子获能检测。另外，利用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的植物凝集素和考马斯亮蓝可以检测精子的顶体状态。

(三) 细胞器的特殊荧光标记

生殖生物学所研究的细胞中，有些重要的细胞器可以特异性地与某些荧光化合物、染料或蛋白分子结合。利用这种现象，可以对这些细胞器进行快捷的染色标记，再借助显微成像系统进行观察，以研究这些细胞器相应的生物功能。例如，猪精子顶体和猪卵子皮质颗粒中的多糖成分可以和一种植物凝集素——花生凝集素 (PNA) 发生特异结合，大鼠、小鼠、兔的卵皮质颗粒成分则特异性地结合另一种植物凝集素——扁豆凝集素 (LCA)。于是，用荧光素标记的 PNA 或 LCA 就可以方便地示踪精子顶体或皮质颗粒内含物的分布和排放情况。几种荧光染料，如 Hoechst 33342、Hoechst 33258、DAPI、PI 等，可以结合到 DNA 双螺旋中，因此可被用于细胞核相的快速判断，或在显微操作过程中辅助去核。真菌代谢产物鬼笔环肽可以与聚合的肌动蛋白特异结合，因此可用荧光物质标记的鬼笔环肽显示细胞内微丝网络的组装和分布变化。另外，荧光染料罗丹明 123 (R123) 能特异性地与线粒体结合，NBDC₆-ceramide 和 DiOC₆ 能特异性地标记细胞内的高尔基体和内质网。

七、激光捕获显微分离技术

组织具有复杂的结构，并且由许多处于不同位置的、相互作用的细胞组成。通过从组织中取出的细胞在一个新的环境中进行培养而得的细胞的基因表达，与组织中实际细胞的基因表达有着很大的不同。从不同类型细胞中提取的蛋白在电泳图上将涵盖各种组织和细胞中存在的蛋白。不同组织的干扰问题由于激光捕获显微分离技术 (laser capture microdissection, LCM) 的引入而得到了解决。这项技术可以使用常规的在载玻片上制作冰冻或石蜡切片及染色的方法，并通过直接的显微镜观察，用能量较低的红外激光激发而获得同一类型组织细胞，甚至单个细胞。激光捕获显微分离技术自问世以来被广泛应用于基于组织类型的大分子的研究。通过激光捕获显微分离而获得的细胞在使用二维电泳进行蛋白分析及其他研究中，都取得了高灵敏度和良好重复性的结果。

第四节 模式生物

早在 19 世纪末和 20 世纪初人们就发现，如果把关注的焦点集中在相对简单的生物上，则发育（从广义上讲，发育生物学包括生殖生物学）的机理可以得到部分解答。因为这些生物的细胞数量更少，分布相对单一，变化也较好观察。由于进化的原因，细胞生命在发育的基本模式方面具有相当大的同一性，所以利用位于生物复杂性阶梯较低级位置上的物种来研究发育共同规律是可能的。尤其是当在有不同发育特点的生物中发现共同形态发生和变化特征时，发育的普遍原理也就得以建立。因为对这些生物的研究具有帮助我们理解生命世界一般规律的意义，所以它们被称为“模式生物” (model organism)。一种模式生物应具备以下特点：①其生理特征能够代表生物界的某一大类群。②容易获得并易于在实验室内饲养、繁殖。③容易进行实验操作，特别是遗传学分析。目前常用的模式生物包括酵母、线虫、果蝇、斑马鱼、非洲爪蟾、小鼠等。

1996 年 4 月，在国际互联网上公布了酿酒酵母（以下简称酵母）的完整基因组顺序（16 条染色体，共 12068 kb，编码约 5800 个基因），它被称为遗传学上的里程碑。因为一方面，这是人们第一次获得真核生物基因组的完整核苷酸序列；另一方面，这是人们第一次获得一种易于操作的实验生物系统的完整基因组。酿酒酵母作为一种模式生物在实验系统研究方面具有许多内在的优势。首先，酵母是一种单细胞生物，能够在基本培养基上生长，使得实验者能够通过改变物理或化学环境完全控制其生长。其次，酵母在单倍体和二倍体的状态下均能生长，并能在实验条件下较为方便地控制单倍体和二倍体之间的相互转换，对其基因功能的研究十分有利。有将近 31% 编码蛋白质的酵母基因或者开放阅读框与哺乳动物编码蛋白质的基因有高度的同源性。利用酵母温度敏感突变株在细胞周期不同阶段加以阻断，分离了众多细胞分裂周期基因 (cell division cycle genes, CDC genes)。后来发现，许多 CDC 基因的同源基因也广泛存在于包括哺乳动物在内的其他生物类群中，编码与有丝分裂和减数分裂相关的重要分子。比如 cdc-2 编码 MPF 的催化亚基 P34，cdc-5 编码 polo-like 激酶等。

秀丽隐杆线虫 (nematode, *Caenorhabditis elegans*) 通身透明，观察十分容易。更

为重要的是，它是惟一一个身体中的所有细胞都能被逐个盘点并各归其类的生物。它的幼虫含有 556 个体细胞和 2 个原始生殖细胞，成虫则根据性别不同具有不同的细胞数。最常见的雌雄同体成虫成熟后含有 959 个体细胞和 2000 个生殖细胞，而较少见的雄性成虫则只有 1031 个体细胞和 1000 个生殖细胞。此外，线虫的生命周期很短，它从生到死的全过程只有 3 天半，这就使得不间断的观察并追踪每个细胞的演变成为可能。通过 20 年的努力，到 90 年代中期，人们已经建立了线虫从受精卵到所有成体细胞的谱系图，并且完成了线虫基因组全序列测定。Sydney Brenner, John Sulston 和 Robert Horvitz 对线虫发育和细胞调亡的研究，获得了 2002 年诺贝尔生理学奖。

黑腹果蝇 (fruit fly, *Drosophila melanogaster*) 在近代生物学史上地位显赫，对果蝇的研究曾经三度获得诺贝尔生物学奖 (1933 年摩尔根, 1946 年缪勒, 1995 年刘易斯、尼尔森 - 沃哈德和维斯郝斯)。果蝇在 25℃ 下由卵至成虫只需 11 天，而且有大量可供筛选的突变表型。由于它们繁殖迅速、染色体巨大且易于进行基因定位，因此 1909 年摩尔根将之用作研究遗传变异和染色体关系的材料。它由 14 个体节构成的躯干完全对称，一套基因控制了这些体节从上到下的发生过程，后来的研究证明，这套基因普遍存在于从昆虫到人的基因组中，是决定机体左右对称布局形成的最基本因素。

海胆 (sea urchin) 是生物科学史上最早被使用的模式生物，它的卵子和胚胎对早期发育生物学的发展有举足轻重的作用。早在 1875 年，Oscer Hertwig (1849~1922) 就开始以海胆为材料研究受精过程中细胞核的作用。1891 年，Hans Driesch (1876~1941) 在显微镜下把刚刚完成第一次卵裂的海胆胚胎一分为二，结果发现，分开后的两个细胞各自形成了一个完整幼虫。这一实验的意义在于证明胚胎具有调整发育的能力，为现代发育生物学奠定了第一座观念里程碑。1890 年后，海胆更在受精和早期胚胎发育的研究中起了重要作用。同种海胆精卵表面分子的特异性识别、精子顶体反应、卵皮质反应等现象的发现，为受精生物学奠定了最初的基础。

斑马鱼 (zebrafish, *Danio rerio*) 和非洲爪蟾 (south African clawed toad, *Xenopus laevis*) 是目前最常用的两种模式低等脊椎动物。斑马鱼产卵量多，繁殖迅速，胚胎通体透明，是进行胚胎发育机理和基因组研究的好材料。非洲爪蟾的卵母细胞体积大、数量多，易于显微操作，还可制成具有生物活性的无细胞体系，易于生化分析，在卵母细胞减数分裂机理研究中具有不可替代的作用。参与调节哺乳动物卵母细胞减数分裂的重要蛋白激酶，其作用最初大都是在非洲爪蟾卵子中发现的。

小鼠 (mouse, *Mus musculus*) 来源于野生鼯鼠，从 17 世纪开始用于解剖学研究及动物实验，经长期人工饲养选择培育，已育成多达千余个独立的远交群和近交系。由于小鼠繁殖快，饲养管理费用低，所以成为生物医学研究中广泛使用的模式生物，也是当今世界上研究最详尽的哺乳类实验动物。目前全世界每天约有 2500 万只小鼠被用于生物医学研究，以小鼠为对象的研究已经获得了 17 项诺贝尔奖。小鼠胚胎干细胞的分离和基因敲除技术的应用，更为以小鼠为对象的生殖生物学研究起了推波助澜的作用。1999 年，美英几家大型科研机构成立了小鼠基因组测序的合作团体，2002 年 8 月，他们公布了小鼠基因组物理图谱的框架。完整的小鼠基因组图谱预计于 2005 年完成。小鼠作为哺乳动物的模式生物，对它的生理介绍贯穿本书之始终，在此不再赘述。

通过上面的介绍我们看到，模式生物已经在现代生命科学基础研究中具有举足轻重

的地位。但是，模式生物在我国的研究才刚刚起步，与国际领先水平差距很大，在生殖生物学领域的应用更加有限。我国业已启动了家蚕模式生物的研究计划，试图建立另具特色的新模式生物（家蚕是鳞翅目昆虫的代表物种，果蝇属双翅目昆虫）。在今后的生殖生物学研究中，为了解决哺乳动物生殖机理中若干悬而未决的复杂问题，也将不可避免地引进模式生物研究模型，这将不仅是新方法、新技术的应用，而是一种研究观念、研究策略的进步。

第五节 研究模型的选择

生殖生物学研究离不开对实验动物模型的利用，即使是首先用生物化学和分子生物学研究手段得出的结果，也必须在细胞、组织乃至整体水平去进一步评价其生理意义。生殖生物学的研究模型是根据对实验动物生殖过程的观察和了解，把特定的生殖事件置于人工可控的条件之下，加以研究利用。由于动物种类的繁多和生殖事件的复杂，本章无法尽述所有的研究模型，仅举出一些常用者，以说明实验动物模型对生殖生物学研究的意义。

卵母细胞是哺乳动物体内体积最大的细胞（不考虑神经细胞的长突起），在发育过程中要先后经历两次减数分裂阻滞，而且，减数分裂阻滞的维持和退出受到卵泡体细胞、激素和精子的调节，是历来进行细胞周期调控、细胞信号转导和核质关系研究的理想对象。如前所述，利用小鼠卵母细胞自发减数分裂成熟模型和激素诱导减数分裂成熟模型（详见本章第一节），可以分别研究卵母细胞内在的减数分裂启动机制和外界因素（激素与卵丘细胞）对卵母细胞分裂周期的调控作用。近年来，卵泡的体外培养技术取得了较大进展，已经可以把小鼠的原始卵泡体外培养，最终获得成熟卵子，并且成功体外受精，移植到受体子宫中发育到出生。于是，利用整个卵泡的体外培养模型，就可以进一步模拟体内环境，研究卵泡排卵和卵母细胞成熟机理。通过异种动物卵母细胞核移植，或者对同种动物卵母细胞进行发育时期不同步的核移植实验，就可以清楚地分析核质关系和细胞分裂机制的种属特异性。

在胚胎着床和黄体退化研究中，常常利用大鼠和小鼠的几个特殊实验模型。发情大鼠或小鼠与结扎输精管的雄鼠交配后，虽然没有胚胎形成，但交配刺激却能诱导卵巢和子宫发生某些类似妊娠的变化，称为“假孕”；在交配第四天向假孕小鼠子宫中注入一点植物油，油滴就会模仿胚胎诱导子宫内膜发生蜕膜反应，这叫做“人工诱导蜕膜化”；如果在雌鼠与可育雄鼠交配后切除卵巢（小鼠在见栓第四天，大鼠在见栓第五天），再每天给雌鼠皮下注射孕酮，胚胎无法植入子宫壁而是游离在子宫腔中，处于一种休眠状态，如果此时给雌鼠注射雌激素，胚泡就会迅速在子宫中着床，这叫做“延迟着床模型”；给处于正常发情周期之中的小鼠切除卵巢，待痊愈后人工注射雌激素或孕酮，就可以排除体内激素的干扰，研究外源激素对子宫各个细胞类型中特定基因及其蛋白产物表达的影响，这称作“激素诱导模型”。利用上述的假孕模型、人工诱导蜕膜化模型、延迟着床模型和激素诱导模型，就可以从多角度研究胚胎和激素对母体妊娠生理的影响，特别是对某些重要相关基因表达的调节作用。

另外，利用异位妊娠模型，即使胚胎在子宫以外的组织器官，如输卵管、体腔壁，

乃至肾囊中发生着床，再结合组织学方法研究母胎界面发生的分子变化，不但有助于研究正常着床过程，也可揭示人类发生宫外孕的可能原因。利用异种妊娠模型，把一种动物的胚泡移植到另一种动物的接受期子宫中，胚胎可以在异种子宫中着床并发育一段时间，但最终退化并被母体吸收，不能发育至分娩。藉此不但可以阐明哺乳动物各类群之间胚胎着床的通用机理和特殊事件，还有助于研究子宫对同种胚胎的免疫耐受和对异种胚胎的免疫排斥机理，这是生殖免疫学的重要课题。

在雄性生殖生理研究中，利用“隐睾模型”，即通过外科手术方法，把动物的一侧睾丸送回到腹腔中，并使之不能自由下降到阴囊中，研究正常精子发生过程和相关基因表达受到的影响，乃至克隆精子发生相关的温度敏感基因。

总之，现代细胞和分子生物学技术是生殖生物学理论研究的有力工具。新方法、新技术的涌现和在生殖生物学领域的应用是永无止境的。六、七十年代的电镜技术、70年代以后的分子生物学技术和胚胎工程技术、当今的生物芯片技术、基因敲除技术和RNAi技术，以及一个多世纪以来模式生物和动物研究模型的不断引进，都造就了生殖生物学发展的里程碑。生殖生物学的百年发展史证明，谁率先把生物科学乃至理化科学最新的方法与技术应用于生殖生物学研究，谁就站在了学科发展的前沿。

(范衡宇 孙青原)

主要参考文献

- 陈大元, 孙青原, 李光鹏. 2000. 受精生物学. 北京: 科学出版社
- 范衡宇, 佟超, 李满玉, 孙青原. 2001. 用激光共聚焦显微术在小鼠卵母细胞中检测蛋白激酶C. 生物化学与生物物理进展 28: 900~903
- 霍立军, 杨增明. 2002. 哺乳动物精子质量评价方法的研究进展. 动物学杂志 37: 89~93
- 晋康新, 李 晴. 1999. 新基因克隆技术进展. 国外医学分子生物学分册 21: 35~40
- 汪 仁, 薛少白, 柳惠图. 1998. 细胞生物学 (第二版). 北京: 北京师范大学出版社
- 杨景山. 1990. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社
- Fan HY, Tong C, Lian L, Li SW, Gao WX, Cheng Y, Chen DY, Schatten H, Sun QY. 2003. Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90rsk during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: MAPK-associated activation and localization. Biol Reprod 68: 968~977
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. 1998. Cells: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

中英文索引

(按英文名词字母顺序排列)

A

a disintegrin and a metalloprotease domain	去整合素和金属蛋白酶结构域	157
abembryonic pole	对胚极	186
accessory gland	附性腺	17
accessory placenta	副胎盘	265
acid phosphatase	酸性磷酸酶	39
acorticosterone, CORT	肾上腺酮	446
acrosin	顶体素	39, 148, 509
acrosomal granule	顶体颗粒	35
acrosome	顶体	35
acrosome reaction	顶体反应	138, 149, 175
active transport	主动转运	276
activin receptor, ACTR	激活素受体	408
activin, ACT	激活素	47, 76, 405
adaptive immune response	获得性免疫反应	222
adenohypophysis	腺垂体	369
adhesion	黏附	154
adluminal compartment	中央间	29
adrenal glucocorticoid	肾上腺糖皮质激素	445
adrenocorticotropic hormone, ACTH	促肾上腺皮质激素	283, 313, 323, 334, 405, 425, 443
adventitious placenta	异位胎盘	265
aggressive behavior	攻击行为	433
A-kinase anchoring protein 4, Akap4	激酶 A 锚定蛋白 4	53
allantochorion	尿囊绒毛膜	259
alternative splicing	选择性剪切	96
ambisexual	两性期	356
amniocyte, amnioblast	羊膜细胞	201
amnionic lateral fold	羊膜侧褶	255
amniotic cavity	羊膜腔	256
amniotic fluid	羊水	256
amniotic head fold	羊膜头褶	255
amniotic tail fold	羊膜尾褶	255
amniotic vesitle	羊膜囊	256
amphiregulin	两性调节因子	232
ampulla	壶腹部	12

anaphase-promoting complex	后期促进复合体	158
anchor function	锚定功能	559
anchoring villi	固定绒毛	268
androgen	雄激素	18
androgen binding protein, ABP	雄激素结合蛋白	45, 47, 384
androgenetic embryo	雄核胚	536, 554
andrology	男性学	5
animal cloning	动物克隆	539
anogenital	肛门生殖器区	429
anterior pituitary	垂体前叶	369
anti-mullerian hormone, AMH	抗缪勒氏管激素	84, 351
antral follicle	有腔卵泡	9, 82
aphidicolin	阿菲迪霉素	546
apical cell	顶细胞	22
appendix testis	睾丸附件	357
apposition	定位期	213
APRT	腺嘌呤核转移酶	101
arachidonic acid, AA	花生四烯酸	416
areolae	圆形绒毛晕	264
aromaization	芳香化	347
artificial insemination	人工授精	463
arylsulfatase	芳基硫酸脂酶	39
asexual animal	无性动物	452
asexual reproduction	无性生殖	2, 534
assisted reproductive technology, ART	辅助生殖技术	463
atretic follicle	闭锁卵泡	10
attachment	黏附	213
attachment reaction	黏附反应	214
autogamy	同配生殖	142
autosome	常染色体	346
avidin-biotin complex	ABC法	609
AVP	精氨酸加压素	443
axonemal complex	轴丝复合体	40
azoospermia factor, AZF	无精子因子	460
B		
Barr body	巴氏小体	198
basal body	基体	40
basal compartment	基底间	29
basal decidua	底蜕膜	268
basal lamina	基板	215, 218
basement membrane	基膜	227
benefical cytokine	妊娠保护因子	527
bFGF	碱性成纤维细胞生长因子	96, 360
bipotential	双向分化潜能	355
blastocoel	囊胚腔	182

中英文索引			· 619 ·
blastomere	卵裂球	182	
blastula	囊胚	182	
blood circulation of placenta	胎盘血液循环	271	
blood island	血岛	202	
blood-testis barrier	血-睾屏障	20, 29	
BMP	骨形态发生蛋白	77, 359	
BrdU	5-溴脱氧尿苷	95	
bromocriptine	多巴胺激动剂	376	
BST	牛生长激素	342	
bulbourethral gland	尿道球腺	16, 17	
bulk transport	大量转运	276	
bursa	卵巢膜	73	
busulfan	二甲磺酸丁二醇二酯	350	
C			
Ca ²⁺ osillations	Ca ²⁺ 震荡	159	
Ca ²⁺ -induced Ca ²⁺ release, CICR	钙离子诱导的钙离子释放	106	
Ca-calmodulin-CaMK II	钙-钙调蛋白-钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II	104	
cadherin	钙黏素	231	
calcein acetyl methyl exter, CAM	钙黄绿素乙酰基甲基酯	612	
calcisome	钙小体	173	
calcitonin	降钙素	231	
calcium wave	钙波	159	
calmodulin, CaM	钙调素	107, 374	
calmodulin-dependent protein kinase II	钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II	166, 167	
cAMP	3', 5'环腺磷酸	52	
cAMP response element modulator, CREM	CRE 调节因子	52	
cAMP response element, CRE	cAMP 应答元件	52	
campomelic dysplasia	CD 综合征	352	
capacitation	获能	138, 599	
capacitation in vitro	体外获能	63	
capacitation in vivo	体内获能	61	
capping function	封闭功能	559	
capsular decidua	包蜕膜	269	
carbaminohemoglobin	氨基酰血红蛋白	282	
carboxy fluorescein diacetate, CFDA	羧基荧光素双醋酸盐	612	
carboxy dimethyl fluorescein diacetate, CDMFDA	羧基二甲基荧光素双醋酸盐	612	
carboxyhemoglobin	碳氧血红蛋白	282	
carboxy-terminal domain CTD	羧基端	188	
cardiotrophin	心肌营养因子	230	
caring behavior	照管行为	433	
caruncle	子宫阜	14	
caruncle	子宫肉阜区	220, 249	
caspase	天冬酰胺特异酶切的半胱氨酸蛋白酶 3	244	
celecoxib	COX2 抑制剂	235	
cell block	细胞阻滞	194	

cell division cycle	细胞分裂周期	163
cell division cycle genes, CDC genes	细胞分裂周期基因	613
centrin	中心体蛋白	177
CEO	卵丘包被的卵母细胞	106, 115
challenge behavior	挑战行为	433
Chauvinist gene	沙文基因	48
check point	检验点	556
chemotaxis	化学趋化作用	61, 141
chitosan	多聚氨基葡萄糖/ 几丁聚糖	324
cholecystokinin 8, CCK8	胆囊收缩素 8	431
choriocarcinoma cell	绒毛癌细胞	242
chorionic cavity	绒毛膜腔	201
chorionic gonadotrophin, CG	绒毛膜促性腺激素	283, 284, 315
chorionic gridle	绒毛膜带	219, 315
ciliary neurotrophic factor	睫状神经营养因子	230
civetone	香猫酮	429
class II MHC gene transactivator, CII TA	MHC II 类抗原基因反式激活因子	521
clear cell	透明细胞	22
cleavage	卵裂	182
cleavage signal-1, CS-1	卵裂信号-1	508
clitoris	阴蒂	16
cloned animal	克隆动物	539
coated vesicle	被膜小泡	21
colcemid	乙酰基秋水仙碱	546
cold shock	冷应激	489
collagen fiber	胶原纤维	19
colliculu seminalis	精阜	22
committed follicle	始动生长的卵泡	83
compaction	致密化	184
complete hydatidiform mole	完全性葡萄胎	250
conceptus	孕体	13, 250
condensing spermatid	浓缩期精子细胞	31
conditional knockout	条件基因敲除	607
conditioned reflex	条件反射	424
confocal microscopy	激光共聚焦显微术	609
connecting piece	连接段	40
connecting stalk	体蒂	202
connexin	连接蛋白	78
connexin	间隙连接蛋白	226
connexin43, Cx43	间隙连接蛋白 43	78, 103, 326
contact-return latency	接近又离开的时间长短	439
convoluted seminiferous tubule	曲细精管	20, 26, 356
cornua uteri uterine horn	子宫角	12, 13
corona radiata	放射冠	10
corpora cavernosa penis	阴茎海绵体	24
corpus albicans	白体	10

中英文索引			· 621 ·
corpus luteum	黄体	10	
corpus rubrum	红体	10	
cortex	皮质	8	
cortical granule	皮质颗粒	171	
cortical granule envelope	皮质颗粒膜	176	
cortical reaction	皮质反应	173	
cortical sex cord	皮质性索	358	
corticotropin releasing hormone, CRH	促肾上腺皮质激素释放激素	371, 405, 415, 425, 431, 443	
cotyledonary placenta	子叶型胎盘	260, 265	
courtship	求偶	433	
CRE binding protein, CREB	CRE 结合蛋白	52	
creatinephosphokinase, CPK	肌酸磷酸激酶	509	
creatinine	肌酸酐	255	
CREB binding protein, CBP	CREB 结合蛋白	52	
cross talk	交互对话	375	
cryobiology	低温生物学	601	
cryptorchidism/ retained testis	隐睾	18, 353, 450	
CSF	细胞静止因子	108	
cultative diapause	间性滞育	238	
cumulus cell	卵丘细胞	144	
cumulus oocyte complex, COC	卵丘卵母细胞复合体	103	
cumulus oophorus/ cumulus	卵丘	10, 80	
cumulus-enclosed oocyte	卵母细胞	598	
Cx37	连接蛋白 37	78, 80, 101	
cycle of semineferous epithelium	生精上皮周期	35	
cyclic recruitment	周期募集	84	
cyclin	细胞周期蛋白	110, 163, 547	
cyclin dependent kinase 1, CDK1	周期蛋白依赖型蛋白激酶 1	54	
cycloheximide, CHX	放线菌酮	109, 435, 548	
cycloxygenase, COX	环氧合酶	149, 234, 417	
cytochrome C P450 side-chain cleavage enzyme, P450scc	细胞色素 P450 侧链裂解酶	404	
cytochrome P450 17 α -hydroxylase, P450c17	细胞色素 P450 17 α -羟化酶	413	
cytokinesis	胞质分裂	32	
cytomegalo virus, cmv	巨细胞病毒	591	
cytoplasmic ribonucluprotein, mRNP	胞浆核蛋白颗粒	56	
cytoplasm	胞质体	494	
cytosolic phospholipase A2 α	胞质型磷脂酶 A2 α	214	
cytostatic factor	细胞静止因子	158	
cytotrophoblast	细胞滋养层细胞	201	
D			
dCG	驴绒毛膜促性腺激素	283, 284	
death domain	死亡结构域	55	
decidua vera	壁蜕膜	269	

decidual immunological microenviroment	蜕膜免疫微环境	528
deciduate placenta	蜕膜胎盘	261, 270
dedifferentiation	去分化	553
defensin	防御素	222
definitive yolk sac	永久卵黄囊	202
delayed implantation	延迟着床	238
demecolcin, demecolcine	秋水仙胺	546
denuded oocyte, DO	裸卵	598
descent of the testis	睾丸下降	18
desmin	结合蛋白	241
desmocollin	桥粒芯胶黏蛋白	225
desmoglein	桥粒芯糖蛋白	225
desmoplakin	桥板蛋白	225
desmosome	桥粒	225
developmental biology	发育生物学	4
developmental block	发育阻滞	194
dexamethasone, DEX	地塞米松	446
DHT	双羟基睾酮	347
diacylglycerol, DAG	二酰基甘油	105, 374
dibutryl cAMP, dbcAMP	二丁酰基环腺苷一磷酸	104, 107
didelephia	双子宫	13
diestrus	间情期	11, 116, 448
differentiation	分化	540
diffuse placenta	弥散型胎盘	260, 263
dihydrotestosterone	双氢睾酮	437
discoïd placenta	盘状胎盘	260, 268
disintegration	失去完整形态	241
disintegrin	去整合素	155
displacement penetration	置换式穿入	215
distal centriole	远端中心粒	40
dithiothretitol, DDT	二硫赤藓糖醇	550, 551
DMSO	二甲基亚砷	490
DNA binding domain, DBD	DNA 结合区域	397, 401
DNA blot hybridization	DNA 印迹杂交	605
DNA methyltransferase, Dnmt	DNA 甲基化转移酶	555
dosage compensation	剂量补偿	198, 363
dosage sensitive sex reversal, DDS	剂量敏感性逆转	353
double-stranded RNA, dsRNA	双链 RNA	608
down-regulation	下调	374
ductuli efferentes	输出小管	21, 27
ductus epididymidis	附睾管	21
dynein	动力蛋白	40
E		
extraembryonic membrane	胚外膜	253
ectoderm	外胚层	202

中英文索引		· 623 ·
ectopic pregnancy	宫外孕	250
ectoplacental cone	外胎盘锥	200
ectoplasmic pads	外细胞质垫	215
efferent duct	输出管	17
EGF	表皮生长因子	47, 85, 97, 98
egg cylinder	卵柱	200
egg plasma membrane reaction	卵质膜反应	176
egg-binding protein	卵子结合蛋白	144
ejaculation	射精	433
elastic fiber	弹性纤维	19
embryology	胚胎学	4
embryonic germ cell	胚胎生殖细胞	206
embryonic nuclear transfer	胚胎细胞核移植	539
embryonic pole	胚极	186
embryonic stem cell	胚胎干细胞	205
encapsulated	包被的	249
end piece	末段	38
endo-beta-galactosidase	内 beta 半乳糖苷酶	505
endoderm	内胚层	202
endometrial granulated cell	内膜颗粒性细胞	241
endometrical cup	子宫内膜杯	264
endometrium	子宫内膜	14
endothelin	内皮素	419
endotheliochorial placenta	内皮绒毛膜胎盘	261, 270
endothelio-endothelial	内皮-内皮型	270
end-replication“ buffer ” function	DNA 末端复制缓冲功能	559
enhanced chemiluminescence, ECL	增强化学发光法	605
eNOS	内皮型一氧化氮合酶	114
enucleated oocyte	去核的卵母细胞	539
enucleated zygote	去核的合子	539
eosinophil	嗜伊红细胞	12
epiblast	上胚层, 表胚层	200
epidermal growth factor, EGF	表皮生长因子	523
epididymis	附睾	17
epigenetics	后生遗传, 表观遗传	554
epinephrine	肾上腺素	425
epithelial plaque	上皮斑	227
epitheliochorial	上皮绒毛膜	241
epitheliochorial placenta	上皮绒毛膜胎盘	261, 269
equatorial segment	赤道带	39
equatorin	赤道素	157
equine CG, eCG	马绒毛膜促性腺激素	283, 284, 315
erection	勃起	23, 433
erythroblast	成红细胞	251
ES-like cell	ES 细胞样细胞	206
estradiol, E2	雌二醇	326, 335, 385

· 624 ·		生殖生物学	
estrogen	雌激素	11,283	
estrogen receptor, ER	雌激素受体	377,397	
estrogen response element, ERE	雌激素反应元件	377,399	
estrous	发情	13	
estrous cycle	发情周期	447	
estrus	发情期	448	
ET-1	内皮素-1	97	
etoposide	依托泊甙	548	
exocoelom	胚外体腔	256	
exocoelom	胚外体腔	201	
exocoelomic membrane	胚外体腔膜	201	
extracellular matrix, ECM	细胞外基质	412	
extracellular signal-regulated kinase, ERK	细胞外信号蛋白调节激酶	107	
extracellular-regulated kinase	细胞外调节激酶	153	
extraembryonic reticulum	胚外网状基质	201	
extrinsic regulator	外源调节因素	45	
F			
facilitated diffusion	易化扩散	276	
Fas ligand, FasL	Fas 配体	55	
feedback inhibitor of lactation	反馈性泌乳抑制因子	342	
feeder cells	饲养细胞	598	
ferritin	铁蛋白	280	
fertilin	受精素	137,156	
fertilization	受精	139	
fertilization antigen-1, FA-1	受精抗原-1	508	
fertilization antigen-2, FA-2	受精抗原-2 或精子膜抗原	508	
fetal membrane	胎膜	253	
fetol-placental	胎儿胎盘	234	
fibroblast growth factor, FGF	成纤维细胞生长因子	97,528	
fibronectin	黏连蛋白	227,361	
fibrous sheath	纤维鞘	42	
fine hair	汗毛	16	
first polar body, PB1	第一极体	10,115	
fission	分裂	2	
flow cytometry, FCM	流式细胞术	601	
fluorescent in situ hybridization	荧光原位杂交	488	
follicle stimulating hormone, FSH	卵泡刺激素	12,45,47, 369,382,386, 425	
follicular atresia	卵泡闭锁	93	
follicular development	卵泡发育	74	
follicular stage	卵泡期	448	
folliculogenesis	卵泡发生	83	
follistatin	FSH 抑制蛋白	379	
follistatin, FS	卵泡抑素	405	

中英文索引			· 625 ·
forskolin	毛喉素	101	
fragmentation	碎裂, 断裂或裂片生殖	2, 138	
freemartin calves	异性孪生不孕牛犊	357	
full length	有效长度	96	
fundus uteri	子宫底	14	
fusion penetration	融合式穿入	216	
G			
galanin, GAL	甘丙肽	375	
gamete	配子	26	
gap junction	间隙连接	226, 232	
GAP, GnRH associated peptide	促性腺激素释放激素相关肽	370, 391	
GAPDH	磷酸甘油醛脱氢酶	50	
GDF-9	生长分化因子-9	77	
gemmule	芽球	2	
gene knockout	基因敲除	606	
gene silencing	基因沉默	608	
gene transfer	基因转移	606	
Genechip (DNA chip, DNA microarray)	基因芯片	603	
genital anlage	生殖腺原基	73	
genital ridge	生殖嵴	26, 73, 355	
germ cell	生殖细胞	3, 26	
germ cell antigen-1, GA-1	生殖细胞抗原-1	509	
germ plasm	生殖质	73, 359	
germinal epithelium	生发上皮	11	
germinal vesicle	生发泡	98	
germinal vesicle breakdown, GVBD	生发泡破裂	598	
germinal vesicle, GV	生发泡	598	
GH	生长激素	95, 98, 334	
glandular zone	腺体带	267	
glans clitoridis	阴蒂头	16	
glans penis	阴茎头	16, 24	
glial-derived neurotrophic factor, GDNF	神经营养因子	49	
global warming	全球变暖效应	348	
glucose transporter	葡萄糖转运器	277	
glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	363	
glutamate transferrin	谷氨酸铁转运蛋白	20	
glutamate, Glu	谷氨酸	375	
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-S, Gapds	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	53	
glycocalyx	糖萼	40	
glycodelin	糖蛋白	238, 246	
GnRHα	促性腺激素释放激素	470	
GnRH-like factor	GnRH 类似因子	117	
gonadotrophin	垂体刺激素	45	
gonadotrophin releasing hormone, GnRH	促性腺激素释放激素	45, 93, 96, 103, 369, 370, 374, 386, 425	

gonadotropin-dependent follicle	促性腺激素依赖性卵泡	83
gonadotropin-responsive follicle	对促性腺激素有反应的卵泡	83
gpCG	豚鼠绒毛膜促性腺激素	285
G-protein-coupled receptor	G-蛋白耦联受体	18
Graafian follicle	格拉夫卵泡	9, 81
granulose cell, GC	颗粒细胞	125, 358
growing follicle	生长卵泡	9
GVBD	生发泡破裂	98
gynecology	妇科学	5
gynogenesis	雌核发育	537
gynogenetic embryo	雌核胚	536, 554
H		
haematoxylin-erosin	苏木素-伊红	36
HAM	超激活运动	63
harmful cytokine	妊娠破坏因子	527
hCG	人绒毛膜促性腺激素	465
HDL	高密度脂蛋白	90
heat shock protein, HSP	热休克蛋白	54, 188, 192
helicine artery	螺旋动脉	24
hematopoiesis	血细胞生成	202
hemochorial placenta	血绒毛膜胎盘	223, 242, 267, 270
hemoendothelial placenta	血液内皮型胎盘	268
hemotrophic nutrition	血液营养	272
heparin binding-epithelial growth factor, HB-EGF	肝素结合样表皮生长因子	527
heparin sulfate	类肝素硫酸盐	237
heparin-binding placental protein	肝素结合胎盘蛋白	173
heredity	遗传	540
hermaphrodite	雌雄同体	3
herpes simplex virus, HSV	单纯疱疹病毒	591
heterochromatin	异染色质	198
heterogametic sex	异配子性别	346
heterogamy	异配生殖	3
heterogeneity	异质性	64
HGF	肝细胞生长因子	97
high mobility group box, HMGbox	高移动性 DNA 结合区	350
histocompatibility antigen	组织相溶性抗原	349
histone	组蛋白	30, 34
histotrophic nutrition	组织营养	272
HMG	人绝经期促性腺激素	94
holoblastic cleavage	完全卵裂	183
homeobox gene	同源框基因	18, 233
homogametic sex	同配子性别	346
homosexuality	同性恋	451
horseradish peroxidase, HRP	辣根过氧化物酶	605

中英文索引		· 627 ·
hPL	人胎盘促乳素	286
HPRT	黄嘌呤-鸟嘌呤核转移酶	101, 102
HSC/ HPC	造血干/ 祖细胞	274
human chorionic gonadotropin, hCG,	人绒毛膜促性腺激素	117, 126, 274, 283, 284, 372
human Sendai virus, HVJ	仙台病毒	548
hyaline-like substance	透明样物质	10
hyaluronidase	透明质酸酶	39
hydatidiform mole	葡萄胎	250
hydroxy-indole-O-methyltransferase, HIMOT	羟基吲哚氧位甲基转移酶	392
hydroxysteroid dehydrogenase, HSD	羟甾脱氢酶	413
hydroxyurea	羟基脲	546
hymen	处女膜	16
hypertension	高血压	251
hypoblast	下胚层	200
hypospadias	尿道下裂	353
hypothalamo-pituitary-disconnected, HPD	下丘脑-垂体功能性联系切断	373
hypothalamus pituitary adrenal axis, HPAA	下丘脑-垂体-肾上腺轴	424, 441
hypothalamus pituitary gonadal axis, HPGA	下丘脑-垂体-性腺轴	18, 424, 367
hypothalamus pituitary ovary axis, HPOA	下丘脑-垂体-卵巢轴	424
hypothalamus pituitary testis axis, HPTA	下丘脑-垂体-睾丸轴	424
hypothalamus, HY	下丘脑	431
hypoxanthine phosphoribosyl transferase, HPRT	次黄嘌呤磷酸核糖转移酶	363
hypoxanthine, HX	次黄嘌呤	101, 598
IBMX	异丁基甲基黄嘌呤	101, 113
I		
IGF	胰岛素样生长因子	47, 97, 334, 336, 341
IGFBP	胰岛素生长因子结合蛋白	94
IGF-I	胰岛素样生长因子 I	90, 94, 96
IL-1	白细胞介素-1	47, 97
IL-4	白细胞介素-4	360
imitation behavior	模仿行为	424
immunofluorescence	免疫荧光法	609
immunofluorochemistry	免疫荧光化学术	609
immunogold	免疫金法	609
immunohistochemistry	免疫组织化学	609
immunological privilege daoue	免疫豁免区	223
immunoperoxidase	免疫酶法	609
implantation	着床	12, 213
implantation chamber	着床小室	218
implantation cone	着床锥	218
implantation fossa	植入窝	40
implantation window	着床窗口	213
imprinting	基因印迹	554

in situ hybridization	原位杂交技术	610
in vitro fertilization	体外受精	141, 464, 599
in vitro maturation, IVM	体外成熟	465
in vivo fertilization	体内受精	141
indocin	氯苯酰甲氧基甲基咪唑乙酸	120
indomethacin	消炎痛	214, 235
induced ovulation	诱导排卵	116
infiltration	浸润	241
infundibulum	输卵管漏斗	12
inhibin, INH	抑制素	20, 47, 373, 405
initial recruitment	原始卵泡募集的启动	84
innate behavior	先天行为	424
innate defence	胎内防御	222
inner cell mass ICM	内细胞团	184
iNOS	诱导型一氧化氮合酶	115
inositol	肌醇	20
inositol trisphosphate, IP3	三磷酸肌醇	78, 104, 105, 551
insemination	授精	139
insight	推理学习	424
instinctive behavior	本能行为	424
insulin-like 3 gene	InsI3 基因	18
insulin-like growth biding protein	胰岛素样生长因子结合蛋白	242
integrin	整合素	155
interferon γ , IFN- γ	γ 干扰素	419
interferon, IFN	干扰素	525
interferon, INF	干扰素	381
interferon τ , INF τ	干扰素 τ	381
interleukin, IL	白细胞介素	524
intermediate spermatogonium	中间型精原细胞	32
intersexuality	雌雄间性	446
interspecies nuclear transfer	异种核移植	539, 566
interspecies pregnancy	异种妊娠	566
interstitial cell stimulating hormone, ICSH	间质细胞刺激素	384
interstitial fluid, IF	睾丸间隙液	46
intracerebroventricular, ICV	大脑内室	441
intracytoplasmic sperm injection, ICSI	胞浆内单精子注射	464, 479, 483
intraspecies nuclear transfer	同种核移植	539
intrinsic regulator	内源调节因素	45
intromission	插入	433
intrusive implantation	侵入性着床	215
invasion	侵入	213
IP3-induced Ca ²⁺ release, IICR	IP3 诱导的钙离子释放	106, 107
isogamete	同型配子	3
isogamy	同配生殖	3, 142

中英文索引		· 629 ·
isthmus	峡 部	12
J		
Janus kinase, JAK	Janus 激酶	390
junctional complex	连接复合体	29
K		
karyogamy	核配合	142
karyoplast	核质体	542
killer-cell inhibitory receptors, KIRs	抑制型受体	519
L		
lactation	泌乳	327
lactosaminoglycan	岩藻糖化乳糖	238
laminin	层黏连蛋白	221, 361
large decidual cell	大蜕膜细胞	241
large offspring syndrome	胎儿超大综合征	552
laser capture microdissection, LCM	激光捕获显微分离技术	613
LDH	乳酸脱酸酶	50
LDL	低密度脂蛋白	90
learning behavior	学习行为	424
lectin	凝集素	40
leptin	瘦素	185
leptotene	细线期	33
leptotene spermatocyte	细线期精母细胞	31
leucine-rech glycoprotein, LRG	富含亮氨酸糖蛋白	414
leukemia inhibitory factor	白血病抑制因子	228
leukotrienes, LTs	白三烯	153, 416
Leydig cell intersitial cell	间质细胞	17, 19, 45, 357
licensing factors	许可因子	557
LIF	白血病抑制因子	360
ligand binding domain, LBD	配体结合区域	397, 401, 403
lobule	小叶	19
lock	关塞	433
locus ceruleus	蓝斑	375
lordosis	脊柱下弯反应	439
lordosis-producing muscles	脊柱下弯反应的肌肉	441
L-selection	L-选择素	214
lumbar ventral horn	腰椎腹角	441
luteal stage	黄体期	448
luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH	促黄体激素释放激素	283, 431
luteinized unruptured follicle syndrome	未破裂卵泡黄体化综合征	123
luteinizing hormone, LH	促黄体激素	12, 45, 369, 384, 386, 425
lymphocyte	淋巴细胞	22
lysosyme	溶菌酶	222

	M	
M I	第一次减数分裂中期	99
M II	第二次减数分裂中期	99
macroglobin	巨球蛋白	223
macromere	大分裂球	183
macrophage	巨噬细胞	22
Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF	巨噬细胞集落刺激因子	524
major histocompatibility complex, MHC	主要组织相容性复合体	516
mamalian GnRH, mGnRH	哺乳类 GnRH	370
mammary gland	乳腺	345
mannose-ligand receptors, MLR	甘露糖配体受体	509
MAP kinase kinase, MAPKK	丝裂原激活的蛋白激酶	108
marginal hemotomas	边缘血肿	268
marmosets	美洲长尾猴	444
MAS-412	4,4 二甲基胆基 8,14 二烯 3β甾醇	111
MAS-414	4,4 二甲基胆基 8 烯 3β甾醇	111
mast cell	肥大细胞	12
maternal sinusoids	母体血窦	205
maternal to zygotic transition, MZT	母性到合子控制转换	555
mating frequency	交配频率	451
maturation-promoting factor or M-phase promoting factor, MPF	成熟促进因子/ M 期促进因子	110, 163, 547
mature follicle	成熟卵泡	9, 82
medial basal hypothalamus, MBH	下丘脑内侧基底部	371
medial preoptic area, MPOA	中央视前区	431, 435
median eminence	正中隆起	425
mediastinum testis	睾丸纵隔	19
medulla	髓质	8
medullary reticular formation	髓质网络结构	441
meiosis	减数分裂	33
meiosis activating sterols, MAS	促减数分裂甾醇	103, 111, 383
meiosis-inducing substance, MIS	减数分裂诱导物质	111
melanocyte-stimulating hormone, MSH	黑色素细胞刺激激素	431
melatonin, MLT	褪黑激素	380, 392
membrane phosphotyrosine protein, MPP	膜磷酸酪氨酸蛋白	509
menstrual cycle	月经周期	447
meroblastic cleavage	不完全卵裂	183
mesencephalic central gray, MCG	中脑中央灰质	431
mesenchymal cell	间充质细胞	218
mesoderm	中胚层	202
mesolimbic-mesocortical system	中央边缘和中央皮质系统	428
mesothelium	间皮	19, 358
metestrus	发情后期	11, 448
methyl-p-hydroxybenzoate	对羟基苯甲酸甲酯	429
microcanaliculi	微小管	21

中英文索引		· 631 ·
microinsemnation	显微授精	464, 479
micromere	小分裂球	183
microplacentome	微胎盘块	264
microvilli	微绒毛	21
midblastula transition	囊胚中期转换	183
middle piece	中段	38
minor phase	辅助阶段	187
mitogen-activated protein kinase, MAPK	丝裂原激活的蛋白激酶	107, 153
mitosis	有丝分裂	2
mitotic clock	“计数器”, “分裂时钟”	559
model organism	模式生物	613
monocyte chemoattractant protein, MCP	单核细胞趋化蛋白	419
monospermy	单精受精	141
motivation behavior	动机行为	424
mounting	爬跨	433
mouse germ cell-specific -box protein, MSY	Y-box 蛋白	56
M-phase promoting factor, MPF	M 期促进因子	54
MUA	电生理多单位活性	371
mucin	黏蛋白	228, 232
mucosa	黏膜	12
Müllerian tube	副中肾管	345
multiplex type	复合型	265
multi-unit activity, MUA	多单位活性	371
mural trophectoderm	壁滋养层	200
myelin basic protein, MBP	髓磷脂碱性蛋白	108
myofibroblast	肌成纤维细胞	241
myometrium	子宫肌层	14
N		
N-acetyltransferase, NAT	N-乙酰转移酶	392
natural suppressor	自然抑制	242
neck segment	颈段	38
neomycin	新霉素	105
neural groove	神经沟	203
neural plate	神经板	203
neural tube	神经管	203
neuraminidase	神经氨酸酶	39
neurohypophysis	神经垂体	369
neuropeptide Y, NPY	神经肽 Y	375, 431
neurotransmitter	神经递质	430
NGF	神经生长因子	47
nitric oxide synthase, NOS	一氧化氮合酶	114, 419
nitric oxide, NO	一氧化氮	114, 419
nNOS	神经型一氧化氮合酶	114
nocodazole	噻氨酯吡唑	546
noncontact erection, NCE	非接触性勃起	435

non-deciduate placenta	非蜕膜胎盘	261, 271
norepinephrine, NE	去甲肾上腺素	375, 425
notochord	脊索	202
nuclear envelope breakdown, NEBD	核膜破裂	557
nuclear receptor	核受体	236
nuclear reconstruction	核重建	553
nuclear reprograming	核重编程	553
nuclear swollen	核膨胀	553
nuclear transfer, NT	细胞核移植, 核移植	539
nuclear transplantation	细胞核移植, 核移植	539
nucleocytoplasmic hybrids	核质杂合体	566
nucleus accubens	核横体	441
nymphomania	慕雄狂	452
O		
obligatory diapause	专性滞育	238
obstetrics	产科学	5
occluding junction	紧密/ 闭缩连接	29
oCG	绵羊绒毛膜促性腺激素	283, 284
OGP	输卵管特异糖蛋白	62
okadaic acid	冈田酸	165
olfactory receptor	嗅觉受体	142
olfactory reflex behavior	性嗅反射行为	433
oligosaccharide	寡糖	237
oncostatin	抑瘤素	230
oocyte maturation inhibitor, OMI	卵母细胞成熟抑制因子	100
oocyte-associated granulosa cell, OAGC	卵母细胞相关的颗粒层细胞	384
oogenesis	卵子发生	73
oogonium	卵原细胞	74, 358
open-reading frame, ORF	开读框架	350
orifices of the urethra	尿道开口	16
orphan nuclear receptor	孤核受体	353
oscillin	震荡因子	169
osteopontin	骨桥蛋白	241
outer dense fiber	外周致密纤维	40
ovarian follicle	卵泡	9
ovary	卵巢	8, 355
oviduct or uterine tube	输卵管	8, 345
ovotestis	卵睾体	446
ovulation	排卵	12, 115
ovulatory follicle	排卵卵泡	83
oxytocin	催产素	83, 132, 248, 380
oxytocin receptor, OTR	催产素受体	381

中英文索引		· 633 ·
P		
P450arom	P450 芳香化酶	88
P450scc	P450 侧链裂解酶	89
PA	纤溶酶原激活因子	124
paced sexual behavior sequence	性行为序列	433
pachytene	粗线期	33
pachytene spermatocyte	粗线期精母细胞	31
paraventricular nucleus of the hypothalamus, PVN	下丘脑室旁核	431
parietal layer	壁层	19
partial hydatidiform mole	不完全性葡萄胎	251
parturition	分娩	313
PAS	过碘酸-希夫	36
PCO ₂	二氧化碳分压	282
PCOS	多囊卵巢综合征	78, 465
PDE	磷酸二酯酶	104
PEG	聚乙二醇	549
penetration	穿入	218
penis	阴茎	17, 345
periaqueductal gray, PAG	周围管状灰质	441
pericentrin	中心体外蛋白	177
perimetrium	子宫外膜	14
periodic center	周期中枢	375, 446
peritoneal mesothelium	腹膜间皮	14
perlecan	串珠素	237
PGF2 α	前列腺素 F2 α	335, 341
phopholipase C, PLC	磷脂酶 C	105
phorbol myristate acetate, PMA	乙酸肉豆蔻佛波醇	105
phosphatidyl inositol, PI	磷脂酰肌醇	374
phosphodiesterase, PDE	环核苷酸磷酸二酯酶	90
phosphogluconate dehydrogenase, PGDH	前列腺素脱氢酶	417
phospholipase A, PLA	磷脂酶 A	416
phospholipase A2	磷脂酶 A2	234
phospholipase C γ	磷脂酶 C γ	169
piezo	压电装置	483, 549
pinocytosis	胞饮作用	276
pinopod	吞饮泡	223
pivotal temperature	基准温度	347
PKA	蛋白激酶 A	47, 104, 105
placenta	胎盘	260
placental barrier	胎盘屏障	261, 272
placental lactogen	胎盘促乳素	246, 283, 285, 286, 334
placental septum	胎盘膈	268
placentoma	胎盘突	265
plakoglobin	桥粒斑珠蛋白	225

plasma cell	浆细胞	12
plasmonogen activator inhibitor	纤溶酶原激活因子抑制因子	125
platelet derived growth factor, PDGF	血小板衍化生长因子	528
PO ₂	氧分压	282
polar trophectoderm	极性滋养层	200
polscope	极化显微镜	548
polylactosaminoglycan	多聚乳糖氨基糖	504
polymerase chain reaction, PCR	聚合酶链反应	604
polyovular follicle	多卵卵泡	9
polyspermy	多精受精	141
postacrosomal ring	顶体后环	39
postnuclear ring	核后环	40
pregnancy induced hypertension, PIH	妊娠高血压综合征	531
pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG	孕马血清促性腺激素	265, 283, 315, 409
preleptotene	前细线期	33
preleptotene spermatocyte	前细线期精母细胞	31
premature chromosome condensation, PCC	早熟染色体凝集	557
preovulatory follicle	排卵前卵泡	82
prepuce	包皮	17
preputium clitoridis	阴蒂包皮	16
prereceptive	接受前期	213
primary decidual	初级蜕膜区	218
primary follicle	初级卵泡	9, 76
primary oocyte	初级卵母细胞	9
primary sex determination	初级性别决定	345
primary spermatocyte	初级精母细胞	30
primary stem villi	初级绒毛干	205
primary yolk sac	初级卵黄囊	201
primitive ectoderm	原始外胚层	200
primitive endoderm	初级内胚层	200
primitive spermatogonium	原始精原细胞	26
primitive streak	原条	202
primitive type A spermatogonium	原始 A 型精原细胞	30
primordial follicle	原始卵泡	9, 75
primordial germ cell, PGC	原始生殖细胞	26, 73, 206, 408, 554
principal cell	主细胞	22
principal piece	主段	38
PRLR receptor associated protein, PRAP	催乳素受体相关蛋白	390
proacrosin	前顶体素	148
proamniotic cavity	原始羊膜腔	200
proceptive behavior	欲求行为	439
proestrus	发情前期	448
progesterone	孕酮	11
progesterone bolck	孕酮阻止	248

progesterone receptor, PR	孕酮受体	119, 120, 403
progestin	孕激素	282
prolactin receptor, PRLR	催乳素受体	390
prolactin, PRL	催乳素	133, 134, 389
propria-scubmucosa	黏膜下层	15
pro-Sertoli cell	支持细胞的前体细胞	350
prostacyclin	前列环素	607
prostacyclin synthase, PGIS	前列环素合成酶	417
prostacyslin, PG I2	前列环素	234, 417
prostaglandin G/ H synthetase, PGHS	前列腺素合酶	417
prostaglandin, PG	前列腺素	381, 416
prostate gland	前列腺	17, 345
protamine	鱼精蛋白	30, 34, 56, 509
protein kinase C, PKC	蛋白激酶 C	90, 96, 105, 374, 381
proteinchip	蛋白芯片	603
protofilament	原丝	40
proximal centriole	近端中心粒	40
pseudoautosomal pairing region, PAPR	假常染色体配对区	349
pseudomalignant	假恶性	223
psuedo-pronucleus	类原核	553
puberty	初情期	431
puromycin	嘌呤霉素	551
puromycin-sensitive aminopeptidase	嘌呤酶素敏感的氨基肽酶	247
pyrathiazine	匹拉噻嗪	244
PZD	透明带下打孔	487
Q		
quiescent follicle	静止卵泡	83
R		
rabbit sperm autoantigen, RSA	兔精子自身抗原	509
reactive oxygen species	还原氧	153
receptive	接受期	213
receptor tyrosine kinase	受体酪氨酸激酶	152
recipient	受体	539
reconstructed embryo	重构胚	539
recruitment	卵泡募集	84
refractory	非接受期	213
relaxin	松弛素	243, 314
reproduction	生殖	1
reproductive axis	生殖轴	445
reproductive biology	生殖生物学	3
reproductive cycles	生殖周期	13
reproductive medicine	生殖医学	5
residual body	残体	35

resorptive vacuole	吸收空泡	21
rete testis	辜丸网	21, 57, 357
rhGH	人重组生长激素	95
rhythm behavior	节律行为	424
rib column	肋柱	42
rigidity	交配姿势	429
RNA blot hybridization	RNA 印迹杂交	605
RNA interference, RNAi	RNA 干扰	608
round spermatid	圆形精子细胞	31
round spermatid injection, ROSI	球形精子细胞显微注射	486
RT-PCR	反转录聚合酶链式反应	375
ryanodine	植物碱	160, 326
ryanodine receptor, RyR	植物碱受体	107
S		
salvage pathway	补救途径	101
scent marking	性嗅标记	435
SCF	干细胞因子	48, 360
second polar body	第二极体	10
secondary follicle	次级卵泡	9, 78
secondary sex determination	次级性别决定	345
secondary spermatocyte	次级精母细胞	30
secondary stem villi	次级绒毛干	205
secondary yolk sac	次级卵黄囊	202
selective estrogen receptor modulator, SERM	选择性雌激素受体调节剂	397
seminal vesicle	精囊腺	17, 345
seminallogenic	半异源	223
Sertoli cell	支持细胞	17, 27, 356
Sertoli-cell-only syndrome, SCOS	惟 Sertoli 细胞综合征	462
serving capacity	交配能力	451
sex body	性体	49
sex chromosome	性染色体	346
sex cord	性索	356
sex determination	性别决定	345
sex indifferent phase	性未分化期	356
sex-determining region of Y chromosome	Y-染色体性别决定区	349
sexual arousal	性觉醒	433, 435
sexual behavior	性行为	424
sexual behavior chain	性行为链	433
sexual maturity	性成熟	432
sexual motivation	性激动	433
sexual orientation	性取向	451
sexual partner preference	性倾向	433, 451
sexual performance	性表现	433
sexual pheromone	性外激素	429
sexual receptivity	性接受性	441

中英文索引			· 637 ·
sexual reproduction	有性生殖	2	
sexually dimorphic preoptic nucleus, MPN	性双向视前核	431	
simple diffusion	单纯扩散	276	
site specific	专一位点	375	
smooth chorion	平滑绒毛膜	269	
SNP	硝普钠	115	
somatic cell	体细胞	3, 26	
somatic nuclear transfer	体细胞核移植	539	
somite	体节	203	
sperm agglutination antigen-1, SAGA-1	精子凝集抗原 1	509	
sperm capacitation	精子活能	60	
sperm coating antigens, SCA	精子膜抗原	509	
sperm protein-10, SP-10	精子蛋白-10	509	
sperm receptor	精子受体	144	
sperm/ trophoblast cross-reaction antigen, STX-10	精子/ 滋养层交叉反应抗原	508	
spermadhesion	精子黏合素	148	
spermatid	精子细胞	20	
spermatocyte	精母细胞	20	
spermatocytogenesis	精母细胞发生	20	
spermatogenesis	精子发生	20, 26, 34	
spermatogenic stem cell	精原干细胞	31	
spermatogenic cell	生精细胞	20, 27	
spermatogenic epithlium/ serminiferous epithelium	生精上皮	27	
spermatogonium	精原细胞	20, 26	
spermatozoon	精子	13, 26, 31	
spermiogenesis	精子形成	20, 26	
sperm-specific lactate dehydrogenase, LDH-C4	精子特异性乳酸脱氢酶	510	
sphingosine	鞘氨醇	105	
spinal cord, SpC	脊索	431	
splicing factor	剪切因子	188	
spongy junctational zone	海绵连接带	267	
spontaneous Ca ²⁺ oscillation	自发的 Ca ²⁺ 浓度波动	106	
spontaneous meiotic maturation	自发性减数分裂成熟	598	
spontaneous ovulation	自发排卵	116	
sporrulation	孢子形成	2	
squamous epithelial cell	扁平上皮细胞	9	
SRY related autosomal, Sra	SRY 样基因	347	
SRY-like HMG box	SOX 基因	352	
stage of cervical dilatation	开口期	320	
stage of fetal-membrane expulsion	胎衣排出期	322	
stage of fetus expulsion	产出期	321	
staurosporine	星形孢菌素	105	
stereotypic behavior	定型行为	424	
steroid dehydrogenase	类固醇脱氢酶	20	
steroid hydroxylase enzymes	类固醇羟基化酶	353	
steroidogenic acute regulatory protein, StAR	类固醇激素快速调节蛋白	89, 404	

steroidogenic factor-1	类固醇生成因子	353
stigma	排卵柱头	119
striated muscle fiber	横纹肌纤维	16
subseratum	基膜	221
subzonal insemination, SUZI	透明带下注射	464, 479, 483
superactivation	超激活	70
superficial implantation	表面着床	215
supra chiasmtic nuleus, SCN	上交叉核	393
synaptic organization	突触组装	441
synchromate B	同期素 B	443
syncytial knob	合胞体突起	216
syncytiontrophoblast	合体滋养层	201
syncytium	合胞体	82
syndesmochorial placenta	结缔组织绒毛膜胎盘	261, 270
synepitheliochorial	合体上皮绒毛膜	241
syngamy	配子配合	142
synkaryon	合子核	142
T		
T3	三碘甲腺原氨酸	334, 337
T4	甲状腺素	334, 337
TATA-binding protein, TBP	TATA-结合蛋白	52
TBP-associated proteins, TAFII	TBP 相关蛋白	53
TBP-related factor2, Trf2	TBP 相关因子 2	52, 53
telomerase	端粒酶	210
temperature depent sex determination	温度依赖型性别决定	346
tenasin-c	肌腱蛋白	361
territory behavior	领域行为	433
tertiary follicle	三级卵泡	9, 80
tertiary stem villi	三级绒毛	205
testis	睾丸	17, 355
testis cord	精索	356
testis tissue MAS, T-MAS	睾丸组织 MAS	111
testis-determining factor, TDF	睾丸决定因子	348
testis-determining gene on the Y, Tdy	Y 染色体上睾丸决定因子	348
testosterone	睾酮	45, 376
TGF-β	转化生长因子-β	103, 360, 379
thecal cell, TC	卵泡膜细胞	125, 358
theriogenology	动物繁殖学	5
threat behavior	威胁行为	433
thromboxane A, TXA	凝血 烷 A	417
thromboxane synthase, TXAS	凝血 烷合成酶	417
thrusting	冲插	433
thyrotropin or thyroid stimulating hormone, TSH	促甲状腺激素	410
thyrotropin releasing hormone, TRH	促甲状腺激素释放激素	283, 391
tight junction	紧密连接	226

tissue inhibitor of metalloproteinase	金属蛋白酶的组 织抑制剂	221
tissue-type plasminogen activator, tPA	组 织型纤 溶酶原激活因子	125
tonic center	紧 张中枢	375, 446
topoisomerase II	拓 朴酶 II	546
totipotency	全能性	540
touch behavior	触 推行为	433
toxplasma, Tox	弓 形虫	591
transcription factor 2A, TFII A	转 录因子 II	53
transcription factor 2B, TF2B	转 录因子 2B	52
transcriptional intermediary factor 1, TIF1	转 录中间 因子	607
transferrin	转 铁蛋白	280
transforming growth factor, TGF	转 化生长 因子	47, 97, 361, 379, 388, 523
transition protein, TP	转 型蛋白	56
transmembrane domain, TM	跨 膜结构 域	374
triploid	三 倍体	251
TRK	酪 氨酸蛋 白激酶	48
trophectoderm, TE	滋 养层	555
trophoblast	滋 养层细胞	184
trophoblast giant cell	滋 养层巨 细胞	200
trophoblast lacunae	滋 养层腔 隙	205
trophoblastic girdle	胚 胎滋养 层带	283
trpophalst invasion	滋 养层侵 入	221
tryptophan hydroxylase, TPH	色 氨酸羟 化酶	392
tubulin	微 管蛋白	40
tumor necrosis factor a, TNFa	肿 瘤坏死 因子-a	523
tumor necrosis factor, TNF	肿 瘤坏死 因子	97, 419
tunica adventitia	外 膜	15
tunica albuginea	白 膜	11, 19, 357
tunica muscularis	肌 膜	12
tunica serosa	浆 膜	12
tunica vaginalis	鞘 膜	19
type A spermatogonium	A 型精原 细胞	30
type B spermatogonium	B 型精原 细胞	30
tyrosine protein kinase	酪 氨酸蛋 白激酶	168
U		
udder	乳 房	327
umbilical cord	脐 带	259
unconditioned reflex	非 条件反 射	424
up-regulation	上 调	374
urethra	尿 道	17
urogenital ridge	尿 生殖脊	355
urokinase-type plasminogen activator, uPA	尿 激酶型 纤溶酶 原激活 因子	125
uterine body	子 宫体	13
uterine cervix	子 宫颈	13, 345

uterine simplex	单子宫	13
uterus	子宫	8, 13, 345
uterus bipartitus	双分子宫	13
utricle prostaticus	雄性子宫	357
V		
vacillization	求偶发声	435
vagina	阴道	8, 345
vanadate	钒钠盐	67
vascular endothelial growth factor, VEGF	血管内皮生长因子	420
vascular layer	血管层	19
vasa deferentia/ spermatic duct	输精管	357
vasoactive intestinal peptide, VIP	血管活性肠肽	391, 431
vasoactive substances	血管活性物质	223
ventral tegmental area, VTA	腹外侧区	431
ventromedial hypothalamus	下丘脑腹中核	441
ventromedial nucleus of the hypothalamus, VMH	下丘脑腹正中核	431, 441
vestibule	前庭	8
visceral endoderm	脏壁内胚层	200
visceral layer	脏层	19
vital period	关键期	445
vitelline vasculature	卵黄囊循环	202
vitronectin	亲玻蛋白	221
vulva	阴门	8
W		
wave of seminiferous epithelium	生精上皮波	36
Western blot	免疫蛋白印迹	605
wet dog shake, WDS	湿狗抖	426
whitten effect	白化效应	429
Wilms' tumor suppressor gene 1	威尔氏抑制基因 1	352
Wolffian	中肾管	351
X		
X chromosome inactivation	X 染色体失活	198
X-inactive specific transcript	X 失活特异基因	363
Y		
yolk sac	卵黄囊	200, 254
Z		
zinc finger	锌指	53
zinc finger protein gene of the Y, ZFY	编码锌指蛋白的基因序列	349
zinc-finger transcription factor	锌转录因子	353
zona pellucida, ZP	透明带	9, 138, 420, 501

zona receptor kinase	透明带受体激酶	147
zonaadhesion	透明带黏合素	149
zonary placenta	带状胎盘	260, 267
zygotene	偶线期	33
zygotene spermatocyte	偶线期精母细胞	31
其他		
17β-HSD	17β-羟基类固醇脱氢酶	89, 91
3-HSD	3-羟基类固醇脱氢酶	89
5-hydroxytryptamine, 5-HT	5-羟色胺	380, 425
6-dimethylaminopurine, 6-DMA P	6-二甲氨基嘌呤	546
α-amino nitrogen	α-氨基氮	277
β-endorphin, β-END	β-内啡肽	375
β-N-acetylglucosaminidase	β-N-乙酰葡萄糖胺水解酶	39
γ-aminobutyricacid, GABA	γ-氨基丁酸	150, 375