

蒙古绵羊胎儿卵巢发育的组织学研究

阿拉达尔¹, 曹贵方², 张涌¹

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 内蒙古农业大学 动物医学系 动物胚胎与发育生物学研究室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

[摘要] 对37~99 d胎龄的蒙古绵羊胎儿卵巢进行组织学观察。结果表明, 绵羊胎儿在37 d, 可以从外观上分辨雌雄, 雌性胎儿的性腺初步出现卵巢的组织学特征; 37~51 d为卵原细胞的共质体期, 卵原细胞数量增长加快; 55~76 d卵巢中逐渐充满大量的合胞体样卵母细胞群; 从58 d开始卵巢皮质深层出现少量的形态不典型的原始卵泡。胎龄73 d时, 皮质深层出现真正的原始卵泡; 81 d时皮质中层出现大量原始卵泡; 99 d时皮质深层中可看到一些初级卵泡。与成体卵母细胞相比, 胎儿时期的生殖细胞有活跃的增殖分裂特征; 生殖细胞发育按卵原细胞增殖-卵母细胞分化-形成原始卵泡的步骤发育, 在位置分布上由卵巢皮质外层逐渐向皮质里层分步发育。

[关键词] 绵羊; 胚胎卵巢; 卵原细胞; 卵母细胞; 原始卵泡

[中图分类号] S826; S852.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0011-04

The histological study of germ cell genesis in mongolian ovine fetal ovary

A ladaer¹, CAO Gui-fang², ZHANG Yong¹

(1 Institute of Bioengineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Laboratory of Animal Embryo and Developmental Biology, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: Using the method of histological routine, histological structure of 37-99 day-old ovine fetal ovaries were studied. When the sheep embryo is 37 days old, it can be distinguished female or male from external appearance. About 37-51 d, the quantity of oogonia grows rapidly and the syncytium-like oogonia can be found in this stage. About 55-76 d, much of the syncytium-like cell group is found in the ovary. The un-typical primordial follicle is found in the ovary cortices from 58 d. The typical primordial follicle is found in deep layer of the ovary cortices from 73 d; and on the 81 d, the number of primordial follicles increases. Primary follicles are found in deep layer of cortices at 99 d. In contrast to mature oocytes, the germ cells are active cell-growing and dividing, changing shape and even migrating within the fetal ovary, hence more changes at this development stage. Our observations provide the morphometric and apoptosis aspects of sheep fetus ovary and evidence that apoptosis in the sheep fetus ovary is associated with germ cells.

Key words: mongolian sheep; fetal ovaries; oogonia; oocyte; primordial follicles

成熟的卵巢结构分为皮质和髓质, 皮质由卵泡细胞围绕生殖细胞形成的卵泡和卵泡外周的基质细胞及小血管构成; 髓质由间质组织和一些大血管构成, 为皮质提供营养。皮质中的卵泡由里层向外层发育形成成熟卵泡, 而在胎儿卵巢发育时, 雌性生殖细

胞是由卵巢的表层向里层逐步发育的。在胚胎形成早期, 原始生殖细胞从卵黄囊经背肠系膜迁移到生殖脊, 生殖脊则与为其提供体细胞的中肾组织相连^[1]。早期胎儿卵巢由原始生殖细胞、体腔上皮来源的卵泡细胞和中肾组织来源的间充质细胞构成的排

收稿日期: 2006-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(39960051)

作者简介: 阿拉达尔(1978-), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 在读博士, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: aldr1024@yahoo.com.cn

通讯作者: 曹贵方(1963-), 男, 内蒙古赤峰人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物发育研究。E-mail: guifangcao@yahoo.com.cn

列无规律的器官,变成成团索状排列有序的器官。一旦这种有序的索状结构形成,生殖细胞便会开始有丝分裂增殖及减数分裂分化,逐渐形成原始卵泡。在胎儿卵巢发育早期生殖细胞会出现增殖高峰,随后大部分生殖细胞会出现核固缩的退化现象。大部分哺乳动物在出生时其卵巢中的卵泡数已恒定,并且卵泡中的卵母细胞停留在减数分裂前期的双线期,直到青春期在激素的作用下继续分批发育。

关于绵羊胎儿卵巢卵原细胞的增殖、退化及原始卵泡的形成已有研究^[2],但关于生殖细胞发育分化的时间进展却未见详细报道。对30 d胎龄之前的蒙古绵羊胎儿生殖嵴和卵巢的发生前人已有过报道^[3],因此本研究对胎龄37~99 d的蒙古绵羊胎儿

卵巢进行了组织学研究,以探讨蒙古绵羊胎儿卵巢中生殖细胞增殖、减数分裂开始以及原始卵泡形成的时间,为蒙古绵羊胎儿卵巢发育研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蒙古绵羊胎儿从内蒙古穆斯林屠宰场获得。胎儿日龄由Richardson公式^[4]推算: $Y=2.1(X+17)$ 。式中:Y代表胎儿日龄(d);X代表胎儿体长(冠尾长,cm)。结果得到体长4~30 cm,日龄包括37,48,51,55,58,63,66,73,76,81和99 d的胎儿共计65个。体长与胎龄对应情况见表1。

表1 蒙古绵羊胎儿体长与胎龄

Table 1 Fetal sheep body length and gestation age

胎龄/d Fetus age	37	48	51	55	58	63	66	73	76	81	99
体长/cm Body length	4.0±0.3	6.2±0.5	7.2±0.6	9.0±0.9	10.6±0.8	12.8±0.9	14.5±1.0	17.8±0.9	19.2±1.2	21.8±1.1	30.0±1.4

主要仪器包括:YD325型轮转式石蜡切片机;Olympus BH-2型光学显微镜;Olympus PM-20型显微照相系统。

1.2 蒙古绵羊胎儿卵巢切片的制备

取蒙古绵羊胎儿双侧卵巢,用体积分数10%福尔马林(体积分数37%甲醛溶液5.0 mL、pH 7.4 10×PBS液5.0 mL、无DNase水40.0 mL)固定24 h,流水冲洗,然后依次用体积分数50%,75%,85%,95%和100%的乙醇逐级脱水(5 min/级),二甲苯透明20 min,浸蜡(石蜡1,石蜡2)、包埋、切片(片厚5~8 μm)、贴片,常规苏木素伊红染色,光镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 37~51 d胎龄蒙古绵羊胎儿卵巢组织学观察

31 d胎龄时,绵羊胎儿卵巢外型为长梭型,与中肾贴紧,无明显的髓质。卵巢上皮为单层立方上皮,一些卵原细胞夹在上皮间。卵巢与中肾相连的一侧没有上皮,由一些梭形细胞构成,此区域的细胞呈团、索状排列。实质中的卵原细胞分散存在或2~3个聚集在一起,其外周由单层梭型基质细胞围绕,形成“巢”结构。卵原细胞较其他细胞体积大而圆,核呈圆形,具有较高的核质比。细胞核中有1~2个核仁,染色质排列成细丝状或颗粒状,与其他细胞相比,细胞质嗜酸性较强(图1A)。接近皮质深层区还可看

到巢内卵原细胞数量增多,胞质融合在一起。

48 d胎龄时,卵巢中出现原始的皮质和髓质,48~51 d胎龄,皮质中的“巢”结构数量增多,体积增大,细胞间界限不明显,形成共质体样卵原细胞团^[5-6]。51 d胎龄时,有些共质体样细胞团中的卵原细胞开始进入第一次减数分裂前期的前细线期和细线期(图1B)。在细线期时染色质为染色体丝,此时的细胞较卵原细胞体积大,核仁不明显。

2.2 55~76 d胎龄蒙古绵羊胎儿卵巢组织学观察

55 d胎龄时,卵巢已离开中肾组织而单独存在,上皮较完整,但椭圆形卵巢的一端仍与中肾通过间充质的系带相连。卵巢皮、髓质界限较为清晰。皮质浅层的卵原细胞仍处于“巢”结构中;皮质深层中出现很多更大的生殖细胞群体,且细胞间界限明显,群体之间由梭形基质细胞相隔;其内部的生殖细胞开始进入减数分裂前期相。此种细胞群体称为合胞体样卵母细胞群^[5-6]。卵原细胞进入减数分裂后便称为卵母细胞。合胞体样卵母细胞群中的细胞为卵母细胞,有些细胞核染色较深,称为暗细胞(图1C),是处于偶线期的卵母细胞以及核固缩的卵母细胞;有些核染色较浅称为明细胞,是一些细线期的卵母细胞,(图1D,E)。

58~63 d胎龄时,卵巢皮质中普遍分布合胞体样卵母细胞群,其中暗细胞较多。在皮质与髓质邻界处出现由几个梭形细胞围绕卵母细胞形成的类似原

始卵泡的结构, 其中的卵母细胞有退化迹象。髓质中产生了较大的血管。66 d 胎龄时, 深层皮质中围绕在合胞体外周的扁平细胞开始进入合胞体内, 将单个的卵母细胞围住; 在皮质、髓质交界处有类似原始卵泡的结构, 卵泡内卵母细胞核固缩, 胞质较少, 呈退化趋势; 髓质中有大量的血管和结缔组织。73 d 胎龄时, 皮质深层有一些原始卵泡正在形成, 卵母细胞体积较大, 胞质染色较深, 卵泡细胞呈椭圆形或梭

形。在与髓质相邻的皮质深层, 原始卵泡中的卵母细胞核已固缩。76 d 胎龄, 皮质中层的合胞体样细胞群正在解体, 且有一些梭形细胞向合胞体内伸入, 将单个卵母细胞包裹住, 即将形成原始卵泡; 皮质深层为原始卵泡, 卵泡数量较73日龄增多, 卵母细胞核型处于粗线或双线早期, 卵泡形态基本正常, 为扁平或梭形, 周围有一些梭形基质细胞围绕(图1F)。

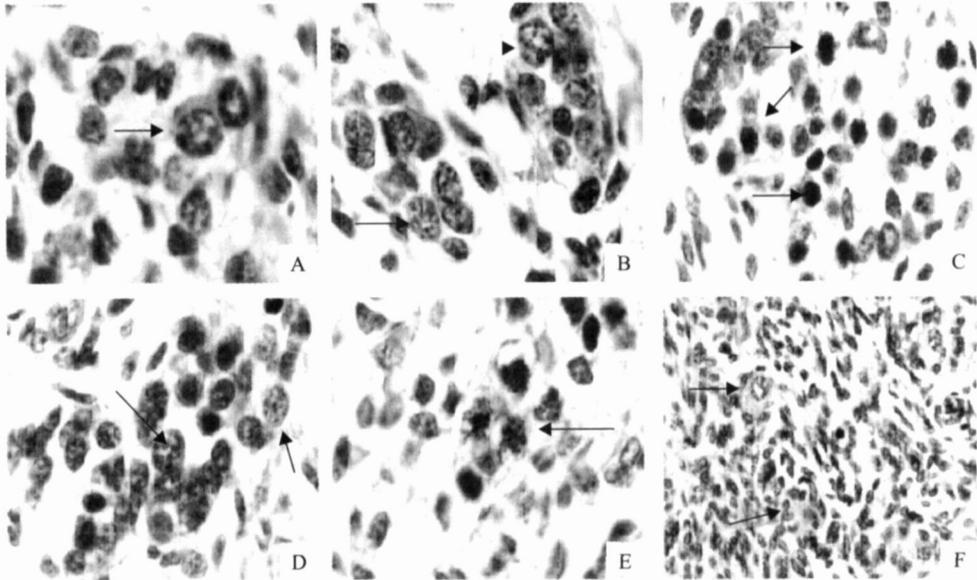


图1 37~ 76 d 胎龄蒙古绵羊胎儿卵巢石蜡切片的苏木素伊红染色照片

A. 37 d 胎龄时的卵巢(×100), 示卵原细胞; B. 51 d 胎龄时的卵巢(×100), 卵原细胞进入减数分裂周期的前期, 示前细线期卵母细胞, ◀示细线期卵母细胞; C. 55 d 胎龄时的卵巢(×100), 示合胞体样细胞群中的暗细胞; D. 55 d 胎龄时的卵巢(×100), 示合胞体样细胞群中的细线期卵母细胞; E. 55 d 胎龄时的卵巢(×100), 示合胞体样细胞群中的偶线期卵母细胞; F. 76 d 胎龄时的卵巢(×40), 示皮质深层出现的原始卵泡

Fig 1 Paraffin section of hematoxylin and eosin staining in ovine fetal ovaries

A. Ovary of 37 d ovine fetus Oogonium was packed with fusiform cell showing nucleus form. Note the oogonium (arrow) ×100; B. Ovary of 51 d ovine fetus Note the oogonium prophase of meiotic cycle, preleptonema oogonium (arrow) and leptotema oogonium (triangle) ×100; C. Note the "dark cell" of (arrow) ×100; D. Note the leptotema oocyte (arrow) ×100; E. Note the synaptotene oocyte (arrow) ×100; F. Ovary of 76 d ovine fetus Note the primordial follicle (arrow) ×40

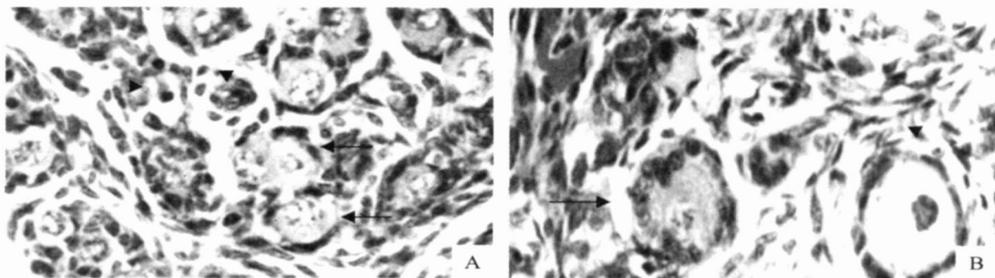


图2 81~ 99 d 胎龄蒙古绵羊胚胎卵巢石蜡切片的苏木素伊红染色照片

A. 81 d 胎龄时的卵巢(×40), 皮质中的原始卵泡囊, 示原始卵泡, ◀示退化的原始卵泡; B. 99 d 胎龄时的卵巢(×40), 示初级卵泡, ◀示退化的卵泡

Fig 2 Paraffin section of hematoxylin and eosin staining in ovine fetal ovaries

A. Ovary of 81-day-old ovine fetus Note the primordial follicle (arrow) and degenerative primordial follicle (triangle) in the ovarian cortex (×40); B. Ovary of 99-day-old ovine fetus Note the primary follicle (arrow) and degenerative follicle (triangle) (×40)

2.3 81~99 d 胎龄蒙古绵羊胎儿卵巢组织学观察

81 d 胎龄时,皮质中层和深层中出现了大量的原始卵泡,其外周被基质细胞围绕分割形成原始卵泡群体(图2A)。原始卵泡中的卵母细胞大多数处于双线期,卵泡细胞形态以梭形或扁平为主。99 d 胎龄时,皮质中无卵原细胞,浅层中有极少数的合胞体样细胞群,卵母细胞形态不正常。皮质中分布大量的原始卵泡,卵母细胞大部分处于双线期。在皮髓交界处,可见到含有立方卵泡细胞的初级卵泡(图2B),卵母细胞体积较大,但呈退化固缩状态。

3 讨论

胎儿时期的卵巢由外向里按卵原细胞、卵原细胞巢、共质体样卵原细胞团、合胞体样卵母细胞群和卵泡的顺序一层层发展,发育阶段不同其在皮质中占的比例不同。本研究结果表明,蒙古绵羊胎儿在37~51 d 胎龄时,卵巢皮质生殖细胞主要以卵原细胞的巢和共质体形式存在,此时期是卵原细胞增殖的时期;55~76 d 胎龄,皮质中主要含合胞体样的卵母细胞群,是卵原细胞大量增殖后进入减数分裂前期成为卵母细胞的时期;81 d 胎龄时,卵巢中出现大量的原始细胞,其卵泡细胞为单层扁平细胞,其卵母细胞体积增大,核偏位。这些阶段是卵原细胞向卵母细胞再向原始卵泡发育的渐进过程。杨庆章等^[5],房秀^[6]分别对猪卵巢和约2.5月龄牛胎儿卵巢组织结构进行了研究,结果发现卵巢中卵原细胞形态多样,界限不明显。曹贵方^[7]的研究发现,合胞体、共质体的细胞间有间桥相通,认为共质体中细胞变化是同步的。

哺乳动物卵泡发育是一个极为复杂的过程。卵泡主要是由一个生殖细胞及外围众多的颗粒细胞和卵泡膜间质细胞等组成。在促性腺激素等的调控下,卵泡中颗粒细胞增殖、分化,产生分化程度不一的颗粒细胞群。颗粒细胞又通过旁分泌和间隙连接的通讯方式控制卵母细胞的生长和成熟,因而卵泡发育是在一个庞大的调控系统的严格控制之下完成的^[8]。关于卵泡细胞的来源目前有两种观点:一种观点认为,卵泡细胞来自于未分化的性腺体腔上皮,由其向实质内生长而来的,即起源是皮质性的^[9];另一种观点认为,颗粒细胞起源于卵巢基质或卵巢网,即髓质性起源。本实验发现,卵原细胞在卵巢生殖上皮

向内增生时被同时带进,而且一起构成团索,生殖上皮的形态与立方卵泡细胞相似。

关于原始卵泡在卵巢分化过程中产生的时间问题,Witschi^[10]认为,初级卵母细胞被单层扁平颗粒细胞围绕形成原始卵泡是在迁移的PGCs定居于生殖嵴后不久形成的。但Wan W agenen和Simpson则认为,真正的卵泡是在卵母细胞处于粗线期晚期及双线期时才形成^[11]。本研究结果支持后者的说法,在蒙古绵羊胎儿发育到66 d和73 d时,卵巢皮质中的卵母细胞绝大多数处于偶线期和粗线期,在皮质深层有原始卵泡形成,其卵母细胞形态异常,趋于退化;81 d时原始卵泡数量增多,卵泡形态基本正常,卵母细胞大多数处在粗线期及双线早期,核形趋于正常,这一时间与山羊的卵泡产生时间也较为接近。

[参考文献]

- [1] Byskov A G, Hoyer P E. Embryology of mammalian gonads and ducts [C]//Knobil E, Neill J D. The physiology of reproduction. New York: Raven Press, 1994: 487-539.
- [2] Heywood R S, Peter S, Derek A H, et al. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep [J]. Biology of Reproduction, 2002, 66: 1134-1150.
- [3] 包彬, 荀崇文. 蒙古绵羊早期胚胎泌尿及生殖器官的发生[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1993, 14(3): 44.
- [4] Mufti A M, Wani G M, Wani N A, et al. Prenatal development of ovine fetus[J]. Small Ruminant Research, 2000, 38: 87-89.
- [5] 杨庆章, 秦鹏春. 东北民猪生后卵巢的形态学发育[J]. 北京农学院学报, 1981(2): 69-76.
- [6] 房秀. 胎牛卵巢组织学结构研究[J]. 兽医大学学报, 1992, 12(2): 136-139.
- [7] 曹贵方. 山羊体形和卵巢发生及卵泡组织化学的研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 1998.
- [8] Phillip K, Michael K S. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly [J]. Endocrinology, 2003, 144(8): 3329-3337.
- [9] 哈费兹 E SE. 人类生殖——受孕与避孕[M]. 袁其晓, 孙耘田, 译. 北京: 人民卫生出版社, 1985.
- [10] Witschi E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds[J]. Contrib, Embryol Carnegie Inst, 1948, 32: 67-77.
- [11] 刘斌, 高英茂. 人体胚胎学[M]. 北京: 人民出版社, 1996: 312-313.