

胚葉細胞之發育

唐品琦

一、前言

多細胞生物起源自單細胞之受精卵，在其發育過程中，細胞的分裂與分化，極為奧秘與奇妙。早期之胚，其胚葉細胞 (blastomere) 具有能發育成完整個體的全能性 (totipotency)，在實驗動物或家畜之單一胚葉細胞，於其未分化之前，運用細胞分離及外源性基因導入技術，可產製出多胞胎仔畜和增加基因轉殖動物產生的機會^(4、29、30)，達到品種改良或者其他預期之目的。

受精卵到達子宮預備著床之前已發育至囊胚期，此時兔胚之細胞數有八萬個以上⁽⁴⁾。一般而言，哺乳動物囊胚期之胚葉細胞已有了初步的分化，形成二類細胞—滋養葉細胞 (trophoblast) 以及內細胞群 (inner cell mass; ICM)，前者位於囊胚外層，會變成高度薄細化，鱗片狀的單層上皮細胞，被覆濃密的微絨毛，具有選擇性吸收營養份的功能，在其不斷發育之後，形成絨毛膜；後者則位於滋養葉下方的一端，其於原腸胚形成過程中，發育形成胚的三個原始胚層⁽²⁾。而稍前，在晚期桑椹胚 (morulae) 或早期囊胚時期，進行適當之胚二分切處理，亦可產製出正常雙胞胎仔畜^(15、16、17、19、31、33、34)，此暗示著，處理過後之半胚其胚葉細胞仍能重新組織繼續發育^(11、15)。

此篇報告將探討單一胚葉細胞於體內及體外之發育潛能，以及胚在發育過程中，胚葉細胞相互間之作用對其未來分化之影響。

二、胚葉細胞於體外培養系統之發育能力

利用玻璃針破壞不需要之胚葉細胞，只留一個或二個胚葉細胞於其原來之透明帶中⁽¹⁴⁾，或是以蛋白質酵素 (pronase) 軟化透明帶，並用吸管以機械方式吸放去除之且分離胚葉細胞^(12、18、27、33)，來探討胚葉細胞之發育潛能。在鼠胚方面，單一四細胞期及二個八細胞期胚葉細胞之發育，其形成囊胚之比例分別為45.2%及31.4%，而單一八細胞期胚葉細胞形成囊胚之比例則只剩18.2%，顯示出八細胞期之鼠胚，胚葉細胞之全能性顯著減少。在形態上，它們所形成之囊胚的內細胞群，只有正常內細胞群的44.5% (圖一)。

O'Brien et al., (1984) 培養鼠胚單一二細胞期及四細胞期胚葉細胞，其結果如表一、二所示，顯示出在胚葉細胞具有發育潛能的期別做分離時，於細胞數愈多時分離培養，則形成總囊胚數之比例愈高 (二細胞期：322/291, 111%; 四細胞期：126/92, 137%)。於兔胚葉細胞培養方面，Lioi (1987) 及 Yang et al., (1987) 分離兔胚葉細胞，其單一個細胞發育至囊胚的能力，到八細胞期仍然具有，但是比例亦隨細胞期的增加，而漸次減少 (單一二細胞期、四細胞期、八細胞期、十六細胞期之胚葉細胞，發育形成囊胚之比例為100%、58%、33.3%、15.5%)。

另外，半個桑椹期兔胚做體外培養時，亦可發育到囊胚^(32、33)，且比例可達77%，但於鼠方面，則只有57.3%⁽¹⁵⁾。

三、胚葉細胞於體外培養系統之發育能力

兔胚於二細胞期、四細胞期及八細胞期時，以玻璃針破壞胚葉細胞，如同前述之方法

，只留單一胚葉細胞於透明帶內，然後移置到同期化之受胚兔輸卵管中，結果如表三，顯示出兔胚至八細胞期，其單一胚葉細胞仍具有全能性⁽¹⁴⁾。在家畜方面，綿羊之四細胞期、八細胞期以及乳牛八細胞期胚，其胚葉細胞經分離之後，再將一個胚葉細胞（1/4=一個四細胞期胚葉細胞或1/8=一個八細胞期胚葉細胞）或二個胚葉細胞（2/8=二個八細胞期胚葉細胞）注入一個空透明帶，然後把同源之胚葉細胞包埋於同一個agar中，再移置到結紮的綿羊輸卵管中培養90個小時左右，使其發育到囊胚期，其發育情形如圖二所示，將形成之囊胚移置到同期化之受胚動物的子宮角。在乳牛方面，2/8胚葉細胞形成之囊胚，經移置後有63%繼續發育，但只有36%可產出仔代；而於綿羊，1/4、2/8胚葉細胞形成之囊胚移置後約有50%可產出仔羊，而1/8胚葉細胞則只有6.4%^(29、30)。

發育到後期之胚，於桑椹期或早期囊胚時進行分切，移置後，此半胚仍具有發育形成個體的能力而產製出同卵雙胞胎之仔畜。在實驗動物小鼠及兔子^(15、33、34)，以及家畜豬、綿羊和乳牛^(16、17、19、31)等，除了兔胚因透明帶外有一層於其他哺乳動物胚所沒有的黏液蛋白層(mucin)⁽⁸⁾，不易以玻璃針或顯微刀分切⁽³²⁾，而改用微吸管吸走一半胚葉細胞來產製半胚⁽³³⁾外，其他之半胚的產製法均同，且已成功發育形成個體。

四胚葉細胞之發育及其相互間之作用

精子和卵分別攜帶著父母雙方之遺傳訊息，在受精後早期胚之發育，完全依靠來自母方之mRNA來製造其生長所需之蛋白質⁽²⁸⁾，但是，在整個發育過程中，仍需有父母雙方之遺傳基因組的貢獻^(13、25)。

胚在早期分裂，約四~八細胞期時，胚葉細胞會分為極性與非極性二種⁽²⁰⁾，極化的細胞其細胞內之胞器會重新組織，且表面覆有微絨毛的部位，無法與其鄰近之細胞形成接合(junction)，故只能形成滋養外胚層，而內部沒有微絨毛成分者，則趨於形成內細胞群⁽¹⁾(圖三)。在Glass(1963)及Hastings II et al.,(1975)之報告中指出，囊胚腔的維持及擴大需有一封閉完整的外層細胞，滋養葉細胞之間會形成接合複合物(junctional complex)，並且細胞與細胞間並沒有“溝”(gaps)的存在，而內細胞群除形態上與扁平的滋養葉細胞不同外(它為圓形之細胞)，其細胞間具有溝⁽³⁾。

鼠胚自桑椹期其胚葉細胞開始分化⁽¹⁵⁾，而胚葉細胞的分化，其表型與位置為其主要影響因子。位於胚之內部的胚葉細胞，易形成內細胞群，反之，位於外側者則易形成滋養葉細胞^(6、10)。以注入微油滴到胚葉細胞中來觀察此細胞之後續發育的實驗中，亦證實正中央部位，細胞接觸愈多，在分化發育上易形成內細胞群⁽⁷⁾。

另外，利用嵌合之實驗，將同時沖洗出來，但發育速度不同的胚葉細胞聚合在一起，如圖四所示，以放射性元素觀察構成內細胞群之細胞來源，結果如表四，顯示出發育較快之胚葉細胞，比其他發育較慢之細胞，更具有形成內部細胞之趨勢^(23、24)。

Prather et al.,(1987)在小鼠配種後不同時間沖洗出二細胞期及八細胞期的胚，以螢光染料標定八細胞期胚，利用顯微操作技術，將一個八細胞期的胚葉細胞注入到二細胞期胚的透明帶內(圖五)。在培養三十二小時後觀察，十九個胚中只有一個胚整個佈滿螢光，其餘只有在周圍的細胞觀察到螢光，而嵌合胚之內細胞群細胞來源探討，則利用GPI(Glucose Phosphate Isomerase)分析，結果列於表五，由此表中看出二細胞期之胚葉細胞對於內細胞群的貢獻，較八細胞期之胚葉細胞多。

發育較快之細胞易形成內部細胞，似與Prsther et al.,(1987)矛盾，但是二者間之相異處在於後者之1/8胚葉細胞，與二細胞期胚葉細胞不同時沖洗出來，且鼠胚自身基因組之活化於二細胞期開始⁽²⁸⁾，八細胞期細胞已達將分化之階段，1/8胚葉細胞於二細胞期胚內無法確認其周圍細胞之成分，故只能發育形成滋養葉細胞；我們可以由表六得知，細胞與細胞之間的溝通，亦影響其未來分化之命運^(11、22)。

五 結 論

Nagashima et al.,(1984)認為，由體外培養胚葉細胞系統中，觀察囊胚形成的過程將可提供為預測其移置後之發育能力。在一個正常的胚內，發育較快之胚葉細胞，因每次分裂使細胞體積稍稍變小，故較易被發育較慢之胚葉細胞所包圍，致使其位於胚之中央位置，並不發生極化作用 (polarize) 而分化形成內細胞群。具有內細胞群之囊胚，將來移置時才可能具有形成胎體的能力，而其他如缺乏明顯內細胞群之“偽囊胚”者，則很難發育形成一正常的胎體⁽²⁷⁾。

而影響胚葉細胞分化的因子，除表型與位置外，細胞之間訊息的溝通亦甚重要。但若欲找出細胞在未來發育所扮演之確切的角色，則待進一步之研究及新技術的開發。

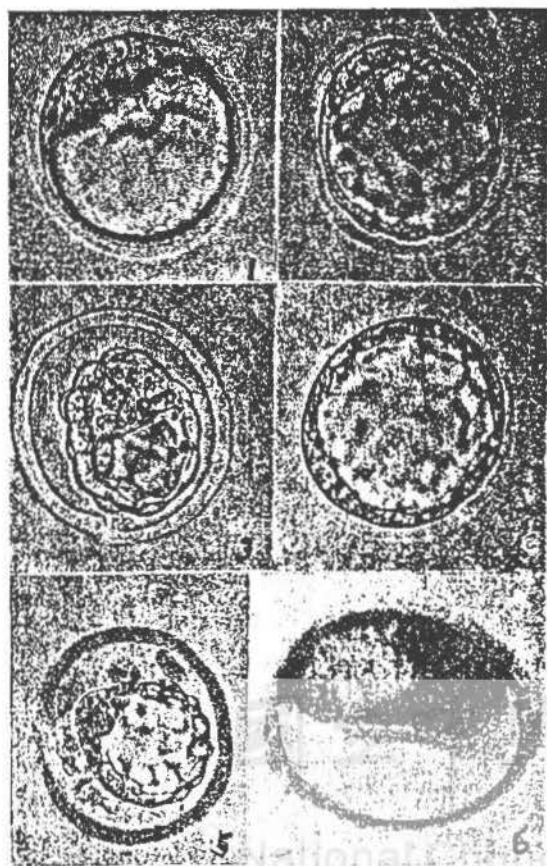


Fig. 1

- (1) 3天半正常之囊胚
- (2) 半個“囊胚”，大小與正常者同，ICM 較小
- (3) 半個“囊胚”與透明帶鬆弛地相連
- (4) 半個“囊胚”無分化之 ICM
- (5) 1/4“囊胚”約由 20 個細胞組成，大部份為 滋養葉細胞
- (6) 1/4“囊胚”約由 20 個細胞組成，6個 ICM，2個為滋養葉細胞 (Tarkowski, 1959)

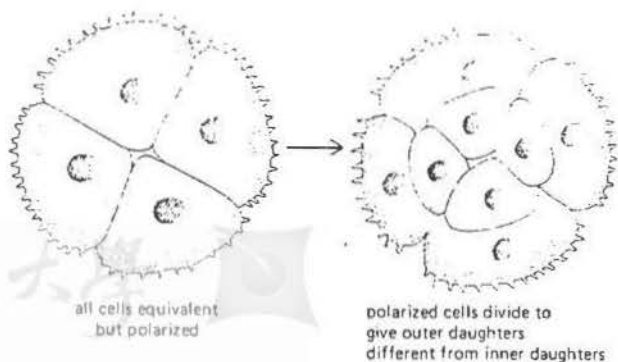


Fig. 3 鼠胚葉細胞於8-cell期之極化作用導致其於16-cell期分爲不同之內外細胞 (Alberts et al., 1989)

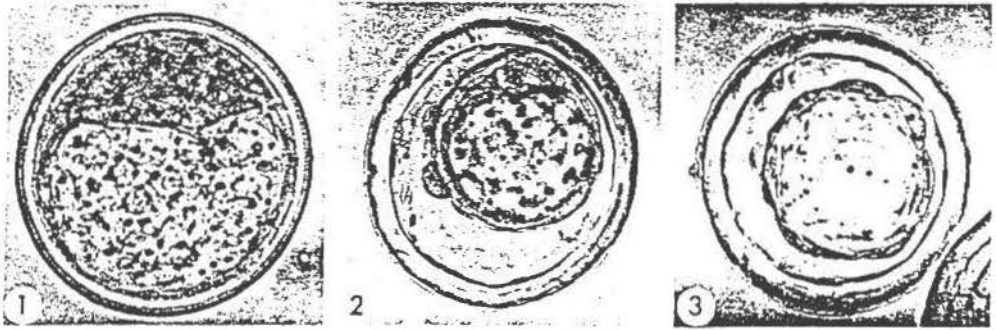


Fig. 2 (1)於發情(=day 0)後第7天收集之正常囊胚
 (2)由單一4-cell 期胚葉細胞發育形成之day 7囊胚
 (3)由單一8-cell 期胚葉細胞發育形成之day 7空腔形態
 (Willadsen, 1981)

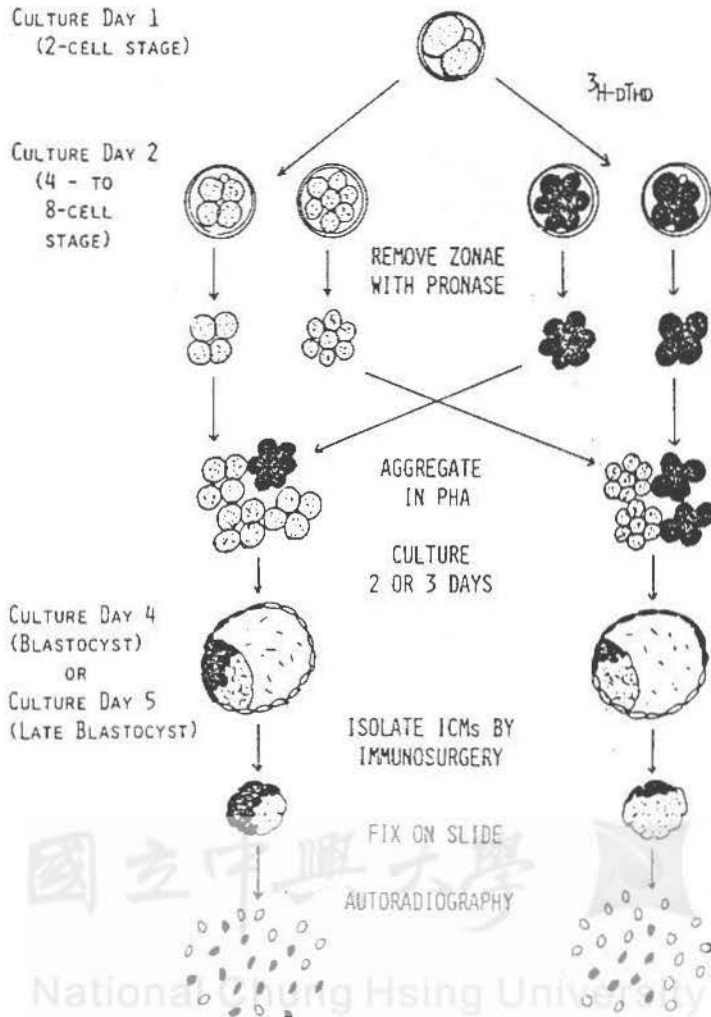


Fig. 4 試驗之流程圖

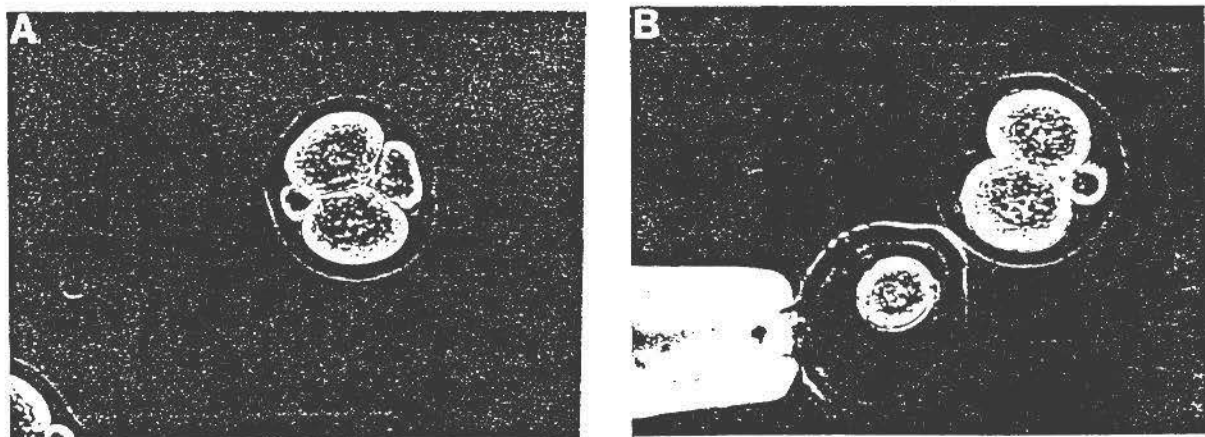


Fig. 5 A.嵌合組(1/8+2)極體與1/8胚葉細胞於2-cell 期胚透明帶內
B.非嵌合對照組(1/8,2) (Prather et al, 1987)

Treatment	No. of Embryos	No. into Culture (z)	No. Blastocysts Total Viable (z)
Zona intact (Controls)	166	166 (100)	156/166 (94)
Zona removed	166	129 (78)	92/129 (71)
Isolated blastomeres	291	478 (82)	322/478 (67)

^aData were analyzed by least squares analysis using the Funcat-SAS statistical package and by orthogonal contrasts. For both viability and blastocyst formation zona removed and isolated blastomeres were not different. The mean of these treatments differed ($P < 0.01$) from controls.

Table 1 pronase 處理 (除去透明帶) 與胚葉細胞分離於2-cell期鼠胚體外發育之影響 (O'Brien et al, 1984)

Treatment	No. of Embryos	No. into Culture (z)	No. Blastocysts Total Viable (z)
Zona intact	52	52 (100)	50/52 (96)
No zona	55	43 (78)	33/43 (77)
Isolated blastomeres	92	194 (53)	126/194 (65)

^aData were analyzed by least square analysis using the Funcat-SAS statistical package and by orthogonal contrasts. For both viability and blastocyst formation zona removal differed ($P < 0.05$) from isolated blastomeres and the mean of these groups differed ($P < 0.01$) from intact controls.

Table 2 pronase 處理 (除去透明帶) 與胚葉細胞分離於4-cell期鼠胚體外發育之影響 (O'Brien et al, 1984)

Cell stage	No. single blastomeres transferred	Survived to Day 10		Survived to term	
		No.	%	No.	%
2	70	24	34	21	30
4	72	18	25	14	19
8	72	11	15	8	11

Table 3

單一 2、4 和 8-cell 期兔胚葉細胞留於自身透明帶移置到同期化受
胚後之存活率 (Moore et al, 1986)

1/8 C57 (Gpi ^b) + 2/2 CD2 (Gpi ^a)	Gpi variant detected		
	A	B	A,B
ICM	38	—	2
Whole	10	—	24

*P < .01.

Table 5 於 1/8+2 嵌合組之囊胚和 ICMs 中 GPI 之變異
(Prather et al, 1987)

Expt. No.	Chimera	% Labeled cells (mean ± SE)	No. of ICMs
1	1 labeled 8-cell + 3 unlabeled 4-cell	64.47 ± 6.27	9
	1 labeled 4-cell + 3 unlabeled 8-cell	8.08 ± 3.71*	8
2	1 labeled 8-cell + 3 unlabeled 4-cell	63.22 ± 5.22	31
	2 labeled 4-cell + 2 unlabeled 8-cell	30.76 ± 4.69*	21

*Significantly different from labeled 8-cell chimeras (P < 0.01, Student's t-test).

Table 4 ICMs 中標定細胞之比例 (Spindle, 1982)

Embryos	n	Incorporation of ³ H-uridine (fmoles/embryo/2 hour: ± 98% Confidence Intervals)	
		24 hours	45 hours
1/8 + 2	15	2.0 ± 0.8*	7.1 ± 4.6*
1/8, 2 control	14	2.1 ± 1.5*	17.7 ± 3.8*

*a, b, within columns significantly different (P < .02).

Table 6 嵌合後 24 和 45 小時處理組與對照組其總 RNA³H-Uridine 之吸收量
(Prather et al, 1988)

參考文獻

1. Alberts, B. D., Bray, J., Lewis, M., Raff and J. D. Watson. 1989. Molecular biology of the cell 2nd. ed. pp.894-901. Garland Publishing Inc. N.Y. & London.
2. Bazer, F. W., R. D. Geisert, and M. T. Zavy. 1987. Fertilization cleavage and implantation. In: E. S. E. Hafez, Reproduction in farm animals, 5th ed. Lea Febiger, Philadelphia. pp.216-219.

- 3.Calarco,P. G. and C. J. Rpstein. 1973. Dev. Biol,32:20-213.
- 4.Craham,E. W. and R. H. Foote. 1990. J. reprod. FERT. 89:543-551.
- 5.Glass,L. E. 1963. Anim. Zoologist 3:135-156.
- 6.Graham,C. F. and Z. A. Deussen. 1987. J. Rmbryol. Exp. Morph. 48:53-72.
- 7.Graham,C. F. and E. Lehtonen. 1979. J. Embryol. Exp. Morph. 49:227-294.
- 8.Greenwald,G. S. 1962. Anat. Rec. 142:407-415.
- 9.Hastings II,R. A. and A. C. Enders. 1975. Anat. Rec. 181:17-34.
- 10.Hillman, N. 1972. J. Embryol. Exp. Morph. 28:263-278.
- 11.Johnson,M. H. and C. N. Ziomek. 1988. Dev. Biol.95:211-218.
- 12.Lioi,M. B. , D. . Berardino,I. Burguete and D. Matassino. 1987. Teriogenology. 27:249.
- 13.McGrath, J. and D. Solter. 1984. Cell 37:179-183.
- 14.Moore,N. W. , C. E. Adams, and L. E. A. Rowson. 1968. J. Reprod. Fert. 70:357-362.
- 15.Nagashima,H. ,K. Matsui,T. Sswasaki, and Y. Kane. 1984.J. Reprod. Fert. 17:527-731.
- 16.Nagashima,H. ,Y. Kato,K. Shibata, and S. Ogawa. 1988. Theriogenology. 29(2):485-493.
- 17.Nagashima,H. ,Y. Kato and S. Ogawa. 1989. Gamete Res.23:1-9.
- 18.O'Brien, M. J. ,E. S. Critser and N. L. First. 1984. theriogenology. 22:601-307.
- 19.Ozol,J. P. ,Y. Heyman,J. P. Renard. 1982. Vec. Rec. 110:126-127.
- 20.Prather, R. S. ,L. J. Hagemann and N. L. First .1989. Gamete Res. 22:233-247.
- 21.Prather,R. S. and N. L. First. 1987. J. Exp. Zool. 242:27-33.
- 22.Prather,R. S. and N. L. First. 1988. J. Exp. Zool. 19:359-367.
- 23.Spinble, A. 1982. J. Exp. Zool. 219:361-367.
- 24.Surani, M. A. H. and S. C. Barton. 1984. Dev. Biol. 102:335-343.
- 25.Surani, M. A. H. , S. C. Bareon and M. L. Norris. 1986. Cell. 45:127-136.
- 26.Tarkowski, A. K. 1959. natrue. 184:1286-1287.
- 27.Tarkowski, A. K. and J. Wrobleka. 1967. J. Embryol. Exp. Morph. 683-691.
- 28.Telford,N. A. ,A. J. Watson and G.A. Schultz. 1990. Reprod. Dev. 26:90-100.
- 29.Willadsen, S. M. 1981. J. Embryol. Exp. Morph. 65:165-172.
- 30.Willadsen, S. M., C. Polage. 1981. Vet. Rec. 108:211-213.
- 31.Willadsen, S. M., R. A. Godke. 1984. Vet. Rec. 114:240-243.
- 32.Yang,X. ,M. Battista and R. H. Foote. 1985. Theriogenology. 23:238.
- 33.Yang,X. and R. H. Foote. 1987. Biol. Reprod. 37:1007-1014.
- 34.Zhouji,W., A. Trounson and M. Dziadek. 1990. Reprod. Fert. Dev. 2:683-691.