

着床后嵌合鼠的制作方法

梶原裕二 井上稔

(日本国立水俣病研究中心, 基础研究所病理室)

R-332

过去记述的嵌合体, 都是将卵裂期的胚细胞聚合在一起, 或者将细胞注入胚泡的胚泡腔以后, 返回到假妊养母的子宫里。因为着床前的胚胎, 是悬浮在输卵管或子宫腔内, 能够取出在试管内进行各种操作。而着床以后, 胚胎在子宫内被肥厚的蜕膜所包围, 与母体组织紧密地相连。如将此时期的胚胎取出至试管中, 并再次返回至子宫内是很困难的。

1985年 Jaenisch 将培养的小鼠神经脊细

胞, 从子宫外注射进妊娠 9 天小鼠着床后的胚胎内。那些注入受体胚的细胞参与了正常色素细胞的形成。笔者改良了那个实验方法, 使操作更简便。在本文中, 解说着床后嵌合小鼠的制作方法, 并且叙述应用此方法所取得的一些结果。

(一) 实验方法 实验方法分供体细胞的准备和向受体胚内注入细胞两部分。大概步骤(见图 1)。

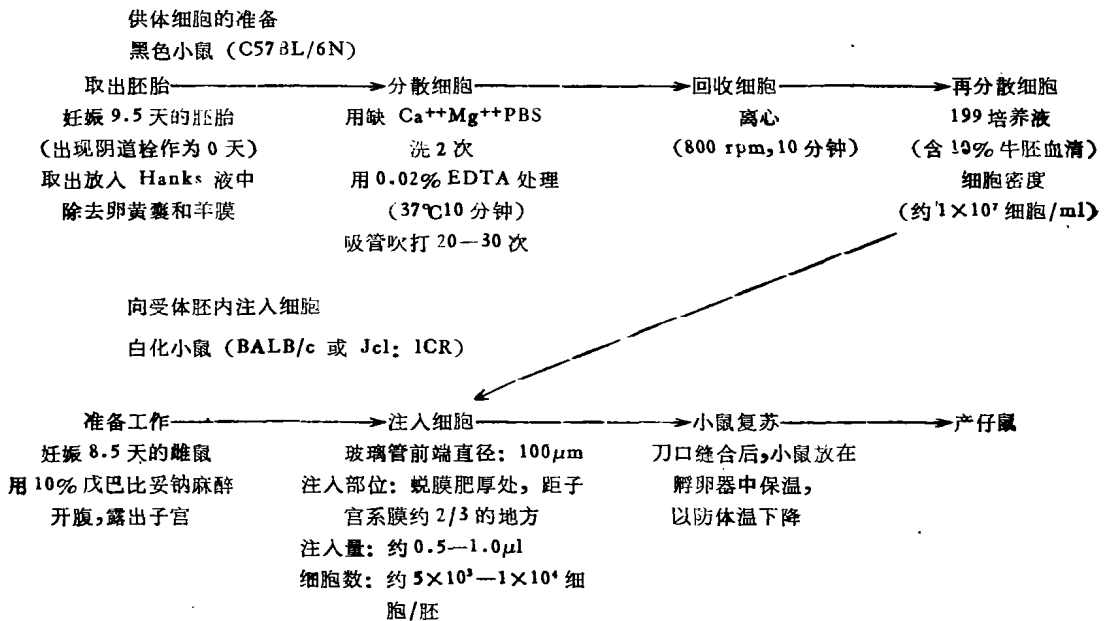


图 1 着床后嵌合鼠的制作方法

(二) 小鼠/小鼠嵌合体 向 242 个胚中注入细胞, 其中产仔鼠 153 个, 140 个体生存到断乳以后, 其中有 24 个小鼠具有来源于供体的有色毛。嵌合小鼠的出现率为注入胚的 10% 左右。

由着床前的操作技术产生的嵌合小鼠, 毛

色大多是复杂地混合存在的。但由本方法产生的嵌合小鼠, 出现有色毛的区域是有限制的。如出现在头部的正中线上, 胸部和前肢, 腹部和后肢, 尾部等区域, 形成“补丁”状。在头部, 多数例子是细胞向腹侧方向移动, 但偶然也有从身体背侧正中线上向腹侧移动的例子。此现象

提示是神经脊细胞移动的结果。有色毛出现的区域之所以有限制,认为是由于细胞侵入至受体胚的途径受到限制的缘故。

(三) 使用粒子的模型实验 为了研究细胞入侵受体胚的途径,采用不具有生物活性的粒子代替活胚细胞来进行实验。

粒子是将楮(カジノキ; *Broussonetia*)的花粉(Polyscience 公司)用钼酸固定并洗净后使用。采用这种花粉的理由是因为着成黑色很容易在胚内看到,而且它们的直径为 12—13 μm ,近似于胚细胞。花粉粒子的注入方法与小鼠嵌合体法相同。48 小时后(妊娠 10.5 天)把胚胎连同子宫一块固定,在实体显微镜下取出胚胎,观察花粉的进入和存在区域。

注入花粉的胚胎有 167 个,其中有 26 个进入花粉。花粉在胚胎中成堆存在,主要存在于头部背侧正中线上,亦存在于前肢的内侧和胸膜、腹壁。如此,花粉成堆的区域被认为是与小鼠嵌合体出现有色毛的区域相一致的,即细胞的侵入区域。总之,认为注入到羊膜腔或胚体外腔的花粉或细胞,是随着神经管的封闭从背

侧正中线上,又随着腹壁的封闭从腹侧被动地进入胚胎中去。

(四) 大鼠/小鼠嵌合体 一些人曾尝试使用着床前的嵌合技术,进行大鼠/小鼠异种间嵌合体的制作。那种实验虽然能产生嵌合的胚胎,但着床后的发育受到母体的免疫干扰。故利用着床后嵌合体的技术来进行异种间嵌合体的制作,观察是否能避免母体的影响。

大鼠采用野生色品系 [Dark Agouti 系统和 Crj: CD (SD) 系统的杂交品系] 从妊娠 10.5 天、11.5 天、12.5 天的雌鼠中取出胚胎,与小鼠/小鼠同样的操作法制作嵌合体。

结果: 嵌合体出现率低, 10 个个体(约 3%)具有有色毛,其中有两例有色毛与小鼠的情况相似,即扩展成补丁状。这个实验显示出大鼠的细胞在小鼠胚内能够移动、增殖、和分化为色素细胞;同时显示能避免着床后母体的免疫干扰。认为这是着床后嵌合体制作法的一个最大的优点。

[黄国屏摘译自日《細胞》21(3): 104—108, 1989

译文蒙陆德裕教授审阅,谨此致谢。]