

## 无尾两栖类胚胎心脏离体外植——在培养液中加入一些因素对心脏发育的影响

贺 鲲

(江西大学生物系)

当前做无尾两栖类胚胎离体外植心原基在培养液中形成为心结构的工作还是比较稀少的。史推尔 (Stöhr) 曾外植铃蛙心脏原基, 看见培养液中有内胚层存在, 则培养中的离体心原基的分化愈为成功; 爱克曼 (Ekman) 在任氏 (Ringer) 液中, 曾单独培养棕蛙的心原基, 从神经沟至尾芽期、不同发育期的预定心中胚层, 得到分化程度不一样的心脏结构; 袁春及分离无尾类黑斑蛙、泽蛙和狭口蛙神经胚的预定心中胚层与覆盖于其外面的外胚层, 外植于荷氏 (Holtfreter) 液中, 结果发育为跳动的的心脏。这三位科学工作者都是针对心原基的决定和分化这一论点而进行工作的。帕斯 (Paz)<sup>[6]</sup> 也用无尾类讨论心区分化时内胚层的诱导作用。

为了探索心原基的发育与分化, 研究了无尾两栖类胚胎心原基的离体外植工作, 发现无尾类的心原基外植, 关键处与理论密切相关, 如果培养时掌握要点, 处理恰当则能恒定地培养出转动的圆球, 在球中出现有节律跳动的心结构, 是具有生理性机能的有机体; 这是前人还没有注意和指出过的。可认为用这一有机体来作药理和其他有关生物学试验, 当作模型比较适宜。

### 材 料 和 方 法

实验前将与胚胎接触的一切器械灭菌, 培养成心区域的荷氏液消毒后加入 100 单位/毫升硫酸庆大霉素。实验用无尾类胚胎为 17 期 (尾芽期) 的中华大蟾蜍、黑斑蛙、泽蛙等三种胚

胎, 实验时取尾芽期胚胎的心区, 即割取胚胎的前端、吸盘后方、咽囊的腹壁及复盖于其外面的中胚层和外胚层; 手术时不可避免地将一部分吸盘连带上来, 但这对实验结果并不妨碍 (见图 1, 2)。手术皿及培养皿都用 6 厘米直径的玻璃培养皿, 手术时使用的器械是玻璃针、发环及解剖显微镜, 手术前, 充入 12 毫升消了毒的荷氏液于手术皿中, 然后移入胚胎; 在解剖镜下用

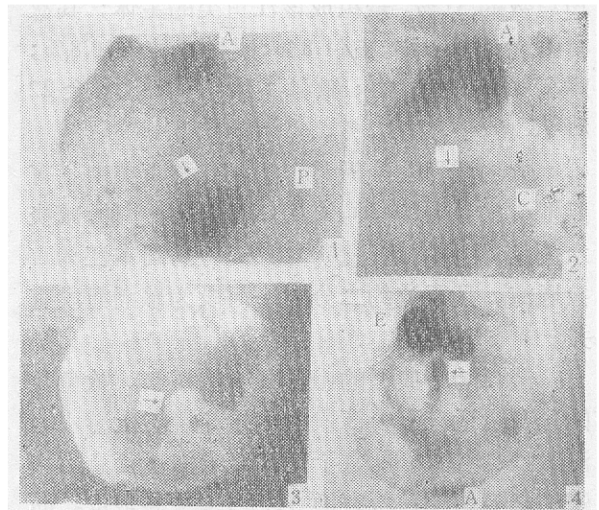


图 1 黑斑蛙尾芽期心区 (含三胚层) 加前肾碎片外植培养 7 天, 出现有心状跳物的转动球,  $\times 40$ 。“ $\uparrow$ ”示块状跳动物; A·培养后的吸盘形象; P·附加碎片的残剩物。图 2 黑斑蛙尾芽期心区 (含三胚层) 加中脑碎片外植培养 9 天, 出现有心状跳动物的转动球,  $\times 40$ 。“ $\uparrow$ ”示杆状跳动物, 端部有髓; A·培养后的吸盘形象; C·与中脑碎片粘连之处。图 3 黑斑蛙尾芽期心区 (含三胚层) 未加胚胎碎片外植培养 11 天后, 出现有心跳曲管的转动球,  $\times 40$ 。“ $\uparrow$ ”示跳动的似心曲管。图 4 泽蛙尾芽期心区 (含三胚层) 加前脑及其视泡外植培养 8 天, 出现有心跳管的转动球,  $\times 64$ 。“ $\uparrow$ ”示似蝌蚪状心跳管, 管上有大小不等的两个块状物; E·外植转动物球上产生的眼睛 (此标本已录相存于我校电化教室)

玻璃针和发环割取尾芽期胚胎的心区作为外植块。取心区主要用发环，发环有直径为 0.8 毫米及 0.5 毫米的两种，我所取黑斑蛙及中华大蟾蜍、大个胚胎心区碎片用的发环其直径为 0.8 毫米，取泽蛙小型胚胎心区的发环用直径 0.5 毫米的。取下后用弯头吸管移外植块进入另一盛 12 毫升荷氏液的培养皿中培养。

实验培养组合的设计，是用 17 期胚胎不同情况的心区外植块与胚胎自体不同胚区的碎片共同外植培养。不同情况的心原基外植培养互为对照，观察自体碎片在培养中对心区外植块发育的影响。其作法列举于下：

1. 尾芽期，切取其心区(包含内、中、外三个胚层)外植培养。
2. 切取其心区内之中胚层(不包含内、外胚层)外植培养。
3. 切取其心区内之外、中胚层(不包含内胚

层)外植培养。

4. 切取其心区内之内、中胚层(不包含外胚层)，另取本体胚胎的一片腹部表皮包在外面，外植培养。

5. 切取其心区的内、中、外三个胚层加同一胚胎的前脑小块外植培养(另有几例，则用前脑连着视泡的小块接种于心区外植块之上)。

同样，用含三个胚层的心区外植片加胚胎的自体碎片去外植的实验；还做了加中脑(6)、后脑(7)、躯干部的神经管(8)、前肾(9)、鳃板(10)、及添加其内胚层的量(11)，再去培养等方法；在外植时一般用器械拨动，使加入的碎片与心区外植块紧贴一起，或接种于其上。

## 实验结果

按照实验培养组合的设计所做的实验，可编成表(见表 1)。

表 1 无尾类尾芽期胚胎成心区域不同情况外植培养的结果

实验项目	中华大蟾蜍		黑斑蛙		泽蛙		获得心跳总数	百分率
	外植胚胎数	获得心跳数	外植胚胎数	获得心跳数	外植胚胎数	获得心跳数		
1. 胚胎心区外植块(含三胚层)	24	13	190	137	51	32	182	68.8
2. 胚胎心区外植块(只取中胚层)	7	0	4	0			0	0
3. 胚胎心区外植块(含外、中胚层剥去其内胚层)			12	0			0	0
4. 胚胎心区外植块(含内、中胚层剥去其外胚层,另取腹部表皮一块包在外面)			38	8			8	20.51
5. 胚胎心区外植块(含三胚层)+同一胚的前脑碎片			25	16	14	12	28	71.8
6. 胚胎心区外植块(含三胚层)+同一胚的中脑碎片			36	23			23	63.9
7. 胚胎心区外植块(含三胚层)+同一胚的后脑碎片			40	28			28	70.0
8. 胚胎心区外植块(含三胚层)+同一胚的躯干部神经管碎片			42	31			31	73.8
9. 胚胎心区外植块(含三胚层)+同一胚的前肾碎片			18	9			9	50.0
10. 胚胎心区外植块(含三胚层)+同一胚的鳃板碎片			5	3			3	60.0
11. 胚胎心区外植块(含三胚层),增添内胚层的量去外植			16	2			2	12.5

从表 1 中可以看见实验 1 获得心跳总数 182，其百分比率为 68.8，这是用 17 期胚胎心区三胚层(中胚层是心原基)外植得出的结果，是最基本的对照；用这个实验为基础加同一胚胎的前脑所得的百分比为 71.8；加中脑所得的百分比为 63.9；加后脑所得的百分比为 70.0；加躯干部神经管所得的百分比为 73.8；加前肾及鳃板所得的百分比分别为 50.0 和 60.0。其

中除加前肾及鳃板因做的例子不多，意义不大外，其余都与实验 1 的比值差似，甚至还要超过。这一点说明无尾类尾芽期胚胎心区外植比较恒定，能够发育为跳动的心脏；在同一胚胎上取几种不同组织，分别与之外植亦不影响心结构的出现。加前脑的例中有 3 个特例，带上了视泡组织碎片，结果因诱导而产生了眼睛(图 4)；庄孝惠等<sup>[4]</sup>认为神经组织可抑制心脏的发

生。但本实验用无尾类胚胎的神经物质,在与心原基共同外植中未见抑制心结构发生的情况;故无尾类心原基外植发生为心结构比较恒定。在实验2和实验3中,所得的百分比为0,说明在心区的外植中,单纯用心区中胚层原基,缺乏形成心脏的条件;又剥去内胚层亦不能形成心脏,所以心区内胚层可能是心形成时的诱导物质。换言之 Stöhr (1924) 早期看见的事实“内胚层与外植心脏原基的分化、同时存在”非常重要。从实验4可以确定,心区三胚层中的外胚层,对外植心结构的形成很重要;虽然在本实验中,用腹部表皮代换了心区外胚层,有心脏结构的生成,但是百分比只有20.51,对原位外胚层的效果(68.8%)相差甚大,说明心区外胚层在心区三胚层外植中,对心结构的形成,除有保护作用外,还有别的作用。

最后分析实验11,由于事先了解到 Stöhr 的看法及庄孝惠的内胚层诱导心脏逐渐形成的议论,所以在做这个实验时特别注意在培养液12毫升中加入内胚层的量。经多次实验,当心区三胚层外植块中、加入内胚层碎片的量大于规定取全心区块的1.5—2倍时,则可抑制心结构的产生,但若小于所取心区块量的1/3,往往不能唤起激动,心结构就不能产生。一般加入心区外植块培养中的内胚层碎片的量等于或略小于规定取全心区外植块的1/2时,对于心结构的发育有促进作用,是比较适宜的。实验11中所取内胚层的量,大于规定取的心区块的2倍,所以生成心结构的百分率只有12.5。在实验中还看见、培养时取的内胚层过多或不够时,会抑制心结构的产生。此外也观察到添加共同外植的神经组织过多,会引起心结构产生被抑制的情况。与约克孙(Jacobson<sup>[4]</sup>)的结论相同。如果所加神经组织的量适宜,则不会有抑制心结构生成(见图2,4)。

在本实验中,切尾芽期心区放入含有12毫升荷氏液的培养皿中外植,在室温下不久愈合形成一个转动的圆球,过4—6天球渐透明,此时在镜下检查,可见到发育不同形状有节奏的跳动物(在尾芽期前的神经期切取胚体腹侧内、

中、外三胚层物;其中胚层是侧板中胚层,同样外植培养,也能做出这样的结构,但不及尾芽期心区三胚层碎片能恒定地发生为心结构。)。跳动物的形状多样,有曲管状(图3)、直杆状,杆端有小槌(图2)、马铃薯块状(图1)、蝌蚪状(图4)、弦索状、小丘状等。对呈管状的、经过切片(切片7微米,苏木精染色)及录象观察,全是实心的,而且在全跳动的心样结构上,没有横纹出现。呈节律跳动,跳动力弱,不能持久,开始第1天在室温20—25℃下为100—120次/分,以后逐渐减低。转动球可保持2周,球中的跳动物可保持6—7天,如若在培养中加1%DL酪氨酸1毫升,则能跳16天。

## 讨 论

(一) 关于外植产生心脏结构的本质 我们做的无尾类尾芽期心区外植得出的心脏转动球中的节律跳动物,经切片及录象观察,看不出管状结构中的空隙和横纹、闰盘等心脏肌结构的特征,其形状多样且不规则。Duffey, Lowell M.<sup>[9]</sup>在早期鸡胚胎中研究心区的代谢特征,认为胚胎肌细胞的肌结构的前阶段是肌球蛋白和肌球蛋白, Ambrose<sup>[4]</sup>亦认为具有上述2种蛋白存在肌结构的前阶段是会出现节律性收缩的。本实验培养的恒定无尾类、尾芽期的节律跳动物,可能是心肌结构的前身物,它既无定形又无心肌结构的特征,但有节奏跳动,把它说成心脏,与成体的心脏含混起来,不恰当;称做心脏的前阶段较妥。

(二) 神经物质、内胚层对心脏结构物的生成和抑制的关系 内胚层和神经物质对无尾类、尾芽期心区外植中心结构的生成和抑制,其间的关系前人未见报道,我们假定“凡利于心结构生成的诱导物,如内胚层或神经块,可能其中含有对心脏形成有益的某种化学物质。但心原基发育和分化需要这种化学物又有一定的限度,即有阈值存在。当供应所需化学物的量适当时,对心结构的产生是有利的。如果供应的化学物超过限度,则对心结构的产生不利,甚至使整个有机体破裂,即产生抑制作用”。或者

(下转第34页)

(上接第20页)

在培养情况中,心原基外植片与两种以上的、同一胚胎的不同胚区的胚胎组织同时存在于培养液中,而且“这两种以上的胚胎组织与培养中的心原基外植块对某种化学物有共同的需要,或可相互利用时,可能出现竞争,在互相竞争的情况下,大胚胎碎片保留,小胚胎碎片消灭。有时外植的心结构亦由于竞争失败,遭到了抑制”。

### 参 考 文 献

[1] 庄孝惠等 1956 蝶螈神经胚时期各种中胚层构造的

决定和分化以及它们的发育机制实验生物学报 5(2): 289—371。

[2] 袁春及 1964 无尾两栖类心脏的决定与分化南京大学学报(自然科学) 8(1): 125—133。

[3] E. J. Ambrose 等 1970 细胞生物学(上海实验生物研究所译),科学出版社出版 310—327。

[4] Antone G. Jacobson et al. 1969 Heart induction in Salamanders. J. Exp. Zool. 167(1): 79—104.

[5] Duffey, Lowell M. et al. 1957 Metabolic characteristics of the heart forming areas of the early chick embryo. J. Embryol. and Exptl. Morphol. 5: 324—339.

[6] Paz, Dante A. et al. 1985 Inductive action of the endoderm during cardiac area differentiation. Biol. Abstr./RRM 29(12): cs—34.