

## THE STUDY FOR THE MECHANIZMS OF DEVELOPMENT BLOCK OF KM MOUSE EMBRYOS DERIVED FROM IVF

Pang Yefei

(The laboratory animal center of Shantou university medical college)

Li Dong Shorgan

(The laboratory animal research center of Inner Mongolia University)

### ABSTRACT

The CZB and Whitten media were employed in this study for the development of in vitro fertilized embryos of KM mouse, established a new practical method for the culture of KM mouse embryos, and by way of changing the composition and its content of the medium, the preliminary study were carried out for the mechanizms of embryo development block and the method to overcoming it. In Whitten medium, 48% of the embryos were blocked at the 2-cell stage, but 81% of the embryos cultured in the CZB medium developed as morulae and blastocysts. Total of 66% blastocysts were obtained by means of adding EDTA and Glutamine to Whitten medium. Increase the ratio of lactic acid and Na -Peruvate in the Whitten medium did not overcome the development block. The results of the experiment suggested that EDTA and Glutamine has some co-effect on overcoming the 2-cell block of embryo development.

**Key words, in vitro fertilization Embryo culture 2-cell block**

## 爪蟾肌细胞的决定

吴芝莉

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

两栖类中胚层是在内胚层的诱导作用下形成的, 这种诱导作用发生得很早(从卵裂到囊胚), 在原肠形成开始时就已完成。但是, 这时期中胚层细胞究竟分化为中胚层的哪一部分还没有决定。

在蝶螈, 已经有实验证实, 在神经胚早期中胚层各部分, 包括背部的肌细胞, 侧方的原肾物质以及腹方的红细胞还没有完全决定, 要到神经胚中期它们才获得稳定的决定<sup>[1]</sup>。爪蟾肌细胞的决定尚未有过报道。

爪蟾和蝶螈在发育的某些方面是有差别

的。就脊索的决定来说, 蝶螈要比爪蟾早。蝶螈的脊索在原肠晚期, 当脊索原基能和两侧肌节分离开来时已经决定。爪蟾脊索的决定是从原肠晚期到神经褶期逐渐完成的<sup>[2]</sup>。

爪蟾肌细胞的决定有一个逐渐稳定的过程, 在什么时期才稳定下来, 是值得弄清楚, 这也是进一步研究肌细胞的决定和分化所必需的。

本文在曾弥白教授的指导下完成, 谨表深切谢意。

照片由暗室金建中冲洗放大, 特此致谢。

## 材料与方 法

用爪蟾的胚胎作为实验材料。按照常规方法,雌雄每只注射 300—500 单位绒毛膜促性腺激素(HCG, 上海生化制药厂)。用 2%半胱氨酸 (pH 7.8—8.0) 去卵膜,用游丝镊子去受精膜后取得实验用胚胎。胚胎分期按 Nieuwkoop 和 Faber<sup>[3]</sup>,选择以下 5 个时期:小卵黄栓期(S 12—12 $\frac{1}{2}$ ),原肠末期(S 13),神经板期(S 14),神经褶早期(S 15)和神经褶中期(S 16)。从小卵黄栓期开始预定肌节和脊索之间有较明显的界限。用玻璃针将各期胚胎掀开神经板以后,在躯干部位分别割取两侧肌节,一侧一块分别培养。

所用培养液是我们实验室常用的两栖类培养液。(Steinburg 溶液和 Leiboritz's L15以 9:1 配制)。将预定肌节组织块放置在 35 mm Corning 培养皿中的小盖玻片上,在 22℃±1℃培养 5 天。

5 天后先在 Olympus 相差显微镜下观察拍照。然后进行结蛋白组织化学染色,用氯仿:甲醇(3:1)固定。第一抗体为兔抗结蛋白,(由本室丁小燕提供)室温染色 60 分钟。0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗 3 次,第二抗体为 FITC(Sigma)标记羊抗兔 IgG,室温染色 30 分钟。PBS 洗后甘油:PBS(2:1)封片。Zeiss Opten 荧光显微镜观察及拍照。

## 结 果

培养 1 天后观察,可见组织块粘贴在玻片

上,呈扁平状,表面光滑,少量长形细胞自组织块向外伸展。各组伸展的情况不同,伸展细胞的范围有大有小。有的几乎全部细胞均铺展形成薄层,中央看不到有隆起的部分,四周为长形细胞所围绕。横纹在一些细胞清晰可见。

为了比较各组肌细胞分化的情况,我们将培养 5 天后的结果分为四个级别:

四级:组织块中央无隆起,全部铺展成薄层,周围有长形细胞向外伸展(图版图 1),在长形伸展的细胞中横纹清晰可见(图版图 2)。

三级:组织块中央有一个或几个小隆起,细胞向周围铺展(图版图 3),在卵黄颗粒较稀少的长形细胞中横纹清晰可见(图版图 4)。

二级:组织块中央有隆起,部分铺展,在有些长形细胞中可见横纹(图版图 5)。

一级:组织块中央有较大隆起,少数细胞向外伸展(图版图 6)。

根据肌肉专一蛋白,结蛋白的免疫组织化学结果(图版图 7),以及横纹的出现,可以认定从组织块向外伸展的长形细胞是肌细胞。

各组实验结果见下表

在原肠晚期(S 12—12 $\frac{1}{2}$ ) 17 个组织块中分化等级出现频率最高的是二级占 47%,其次是三级占 35%。

表 发育不同时期肌细胞分化的情况

组 别\分 期	实验数	四级	三级	二级	一级
小卵黄栓期 (S 12—12 $\frac{1}{2}$ )	17	2(12%)	6(35%)	8(47%)	1(15%)
原肠末期 (S 13)	22	7(32%)	7(32%)	6(27%)	2(9%)
神经板期 (S 14)	20	5(25%)	8(40%)	6(30%)	1(5%)
神经褶早期 (S 15)	23	7(30%)	7(30%)	6(26%)	3(13%)
神经褶中期 (S 16)	27	19(70%)	4(15%)	4(15%)	0

从原肠末期(S 13)到神经胚早期(S 15)分化情况差别不大,二级、三级、四级的出现频率均在 25%—40%之间。

神经褶中期(S 16) 27 个组织块中有 19 块(占 70%)分化为四级。

## 讨 论

根据以上结果,从原肠晚期到神经胚中

期,预定肌节在离体培养的条件下分化的程度有明显的差别。原肠晚期(S 12—12 $\frac{1}{2}$ ),当预定肌节和预定脊索之间的界限刚可以划分时,外植块肌细胞的分化还处在二级到三级之间。原肠末期到神经胚早期(S 13—15),这三期分化程度没有多大差别,二级、三级和四级的出现频率也相差不大。到神经胚中期(S 16),几乎所有的组织块的分化都达到了四级。因此可

以说预定肌节的决定从原肠晚期开始,到神经胚中期已经达到稳定的状态。这种决定过程逐渐完成的情况和蝶螈是一致的。有实验指出蝶螈脊索的决定比爪蟾早<sup>[2]</sup>,在原肠晚期之前,考虑到脊索对肌节的决定起重要作用,有可能蝶螈肌节决定的过程比爪蟾要开始得早些,但是也是在神经胚中期达到稳定的决定。

关于中胚层的决定,主要是根据 Yamada<sup>[4]</sup>的移植和外植的实验。异位移植后,移植块的分化情况当然可以揭示移植块在移植时的决定状态,但是,即使移植的部位是相当中性的,仍很难避免宿主对移植块分化的影响。至于外植,虽然可以避免宿主的影响,但是,外植的组织块是包裹在表皮中,而我们实验室有资料说明,在这样的安排下,表皮对外植块的分化是有影响的(庄孝德,未发表)。我们所用体外培养的方法应该更可能说明外植块的决定状态。

### 摘 要

爪蟾肌细胞在什么时期决定尚未有过报

道,本文采用体外培养的方法,取原肠晚期到神经褶中期等五个不同时期检测肌细胞的决定。结果表明,这段期间预定肌节在离体培养条件下分化程度有明显差异,直到神经胚中期几乎所有组织块都分化为肌细胞。因此认为爪蟾肌细胞的决定在神经胚中期达到稳定的状态。

关键词: 肌细胞 体外培养 决定

### 参 考 文 献

- [1] 庄孝德、曾弥白, 1956, 实验生物学报, 5: 289—371.
- [2] 曾弥白, 1993, 实验生物学报, 26: 361—375.
- [3] Nieuwkoop P. D. & J. Faber, 1967, Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin) North Holland, Amsterdam.
- [4] Yamada, T. 1937, *Roux' Arch.*, 137, 151—270.

## DETERMINATION OF XENOPUS MUSCLE CELLS

Wu Zhi-li

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai, 200031)

### ABSTRACT

There have been no previous reports about the determination of *Xenopus* muscle cells. The presumptive somites from trunk region of 5 stages from late gastrula to mid-neurula were explanted and cultured in vitro. It was found that differentiation of muscle cells from these stages showed evident differences, only till mid-neurula stage all of the explants developed into well differentiated muscle cells. It is therefore suggested that the presumptive somite attained its stable determination at mid-neurula stage.

Key words: Muscle cells in vitro culture Determination