



两栖类胚胎少量细胞的短期离体培养*

蒋琬素

(中国科学院上海细胞生物研究所)

以往研究两栖类的胚胎诱导常用的方法是外植、浸泡法,都利用胚胎的预定外胚层进行实验,这种外植块细胞众多,在分化中所表现的,除诱导物质的作用外,还有细胞与细胞或组织与组织间的作用。为了避免细胞与细胞之间相互作用、相互影响,设想应用少量细胞培养的方法进行细胞分化的问题。为了实现这目的,首先要建立少量细胞培养的方法,经过各种摸索,我们认为玻璃小室培养方法比较适用,现将该法概略介绍于下:

一、材料和方法

培养技术按照 Jones, K. W. 等(1963')^[1]加以改进,胚胎的少量细胞在小室中培养。

1. 玻璃板小室的制备

小室的制备是:取厚0.2厘米、长10厘米、阔7厘米的玻璃,在玻璃上面打8个孔洞,4个一行,分两行,孔洞直径约0.9厘米(图1),在孔洞的底面用加拿大树胶胶上一片经处理的盖玻片,使用前在120℃消毒2小时。

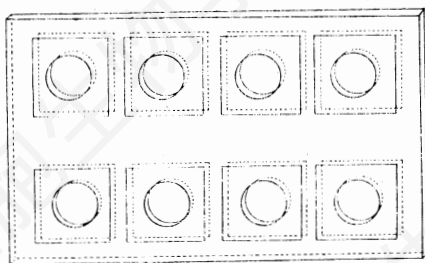


图1 玻璃小室模式图

2. 盖玻片的处理

盖玻片的处理,用0.5M无水 Na_2CO_3 5.3克加200毫升蒸馏水煮沸1小时,继续浸泡12小时后,取出流水冲洗,蒸馏水冲洗后到70%酒精,最后用绸

布擦干,存放使用。

3. 培液

培养液用的是 Steinberg's 溶液,分别配制以下溶液,A.17%NaCl,B.0.5%KCl,C.0.8% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$,D.2.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。使用时取A液10毫升,B、C和D液各5毫升加双重蒸馏水至500毫升煮沸,冷却后加280毫克Tris(国产),用1NHC1调pH到7.8—8.0,最后加入2%的链霉素。

4. 胚胎细胞的分离和培养

我们用的胚胎材料是东方蝾螈 (*Cynops orientalis*) 早期原肠胚的背唇(图2)。把背唇割下,经缺钙溶液处理30—45分钟后,细胞完全散开,然后用玻璃针把约20、50、100、150个细胞堆在一起,再加入双倍钙溶液,使其重新聚合。把这些重新聚合的细胞团移至含有一定量 Steinberg's 溶液的玻璃小室的玻片上,再用 Steinberg's 溶液充满孔洞,注意不要产生气泡,再用另一块未经处理的玻片覆盖,四周用石蜡或白凡士林油紧密封固,培养10—14天,用 Nikon 相差倒置显微镜观察并照相。

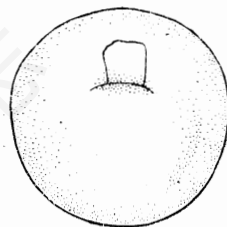


图2 示早期原肠胚背唇切割部位(腹面观)

二、实验结果

细胞团放入培养小室后,最初几小时内,细胞不改变原来的形态和位置。几小时后,细

* 本工作是在曾弥白教授指导下进行的。

胞团光滑的边缘开始不整齐了,部份的边缘细胞形成伪足伸展于玻璃表面,伪足以变形运动移动,有的伪足长而宽(图3),以后逐步分化成各种类型的细胞。胚胎细胞数目不同,分化情况也不一样。20个细胞的团块一般难以养活,不易在玻璃上紧贴,绝大多数团成球形,2—3天后就解体;有极少数即使在开始两天能粘住玻璃,但到第三天就立即缩回成圆球,不能继续向外生长,分化也就不能进行。50个细胞团有部分能很好地贴壁,而且能进一步向外扩展,分化成很好的成纤维细胞(图4)。这种细胞是棱形或星形的、有突起,许多细胞的突起可以相互连接,它具有透明的不含内含物的原生质,细胞核常为椭圆形,它们和哺乳类或鸟类培养的成纤维细胞很相似,一般能生存7—10天左右。100个与100个以上的细胞团,绝大部分都能粘在玻璃上,培养6整天就能见到分化很好的脊索细胞(图5、6)、大量的肌细胞与成纤维细胞。图6是一个放大600倍的脊索细胞,其特点是整个细胞边缘附着于玻片,细胞体扁平,核偏于细胞的一端,核的周围有大量的卵黄,核膜外围有囊泡。肌细胞细而长,细胞体形如一个纺锤体,核通常位于细胞的中央,两边的细胞质中有卵黄。在培养中分化得好而培养时间长的尚能见到部分细胞有横纹,但大部分细胞看不到横纹。大量的肌细胞常形成一片(图7)。在图8中可以清楚地看到核与核仁,另外,还能看到一类肌细胞沿着细胞表面有着丰富的精细的突起,像细胞质发附着于玻璃,这些细胞称为发状肌细胞。

三、讨 论

众所周知,细胞培养方法有多种多样,如

(上接第46页)

- [10] Hsu, M. T., H. J. Kung., N. Davidson, 1973. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 38: 943.
- [11] Thomas, M., R. W. Davis, 1974. *J. Mol. Biol.* 91: 315—328.
- [12] 匡达人、何俊坤、居其达、龚启蕙、王妙

表玻璃法、玻瓶法、悬滴法、转管法等,但是都不适合于两栖类胚胎少量细胞的培养。吴政安(1978'a)^[2]报道过使用GLPY培养基及修改的Eagle培养基对两栖类13种成体组织的组织块进行了培养,取得良好的结果。但根据两栖类胚胎细胞本身含有大量卵黄的特点,以及短期离体培养的要求,我们摸索了玻璃板小室培养法,初步实验结果证明这种方法对于培养50个以上的胚胎细胞大部分是可以进行分化的。一般可培养两周左右,这点与Deuchar E. M. (1970')^[3,4]报告指出要使两栖类晚期原肠胚外胚层产生神经分化,至少需要100个外胚层细胞的结果是一致的。根据我们目前的结果同样认为培养的细胞数量不能少于50个,需要有一定量的细胞数目才能进行生长与分化。此外,该方法具有设备简单、耗材少、实验过程中进行一般消毒即可的优点,所以在没有专门的组织培养室的条件下也能进行培养,观察与照相都很方便。这方法存在的问题是细胞团培养在封闭的小室中,因而培液的更换比较麻烦。同时,培养细胞的数目是否还能减少,甚至能否达到单个细胞,这些都是还待进一步摸索与改进的问题,以便使该技术更适合于我们胚胎诱导研究工作的需要。

参 考 文 献

- [1] Jones, K. W. and Elsdale, T. R. 1963 *J. Embryol. Exp. Morph.*, Vol. 11, part 1, pp. 135—154.
- [2] 吴政安 1978a 动物学报 第24卷第2期.
- [3] Deuchar E. M. 1970 *Exp. cell Res.* Vol. 59 341—343.
- [4] Deuchar E. M. 1970 *Develop. Biol.* Vol. 22 185—199.

珠、朱心良 1980. 实验生物学报 13: 289—295.

- [13] Davidson, N. 1978. in Ninth International Congress on Electron Microscopy. III. 587—594.
- [14] White, R. L., D. Hogness, 1977. *Cell*, 10: 177—192.