

研究简报

## 孔雀鱼胚胎心血管发育的显微观察

张奇亚 李正秋 桂建芳

(中国科学院水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

### OBSERVATION OF GUPPY (*POECITIA RETICULATA*) EMBRYONIC CARDIOVASCULAR DEVELOPING *IN VIVO* AND *IN VITRO*

ZHANG Qiyia, LI Zhengqiu and GUI Jianfang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences; State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072)

关键词: 孔雀鱼; 心血管; 发育; 显微观察

**Key words:** Guppy; Cardiovascular; Embryo development; Tissues culture

中图分类号: Q954.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2002)04-0417-04

心血管系统的组织分化研究是近年热点课题之一<sup>[1]</sup>。胚体透明且发育速度快的鱼类胚胎由于具备便于观察的特性<sup>[2]</sup>, 正广泛用于脊椎动物造血系统发生、血细胞生成、及血液循环系统分化时序、调控因子等研究<sup>[3-5]</sup>。孔雀鱼(*Poecilia reticulata* Peters)是卵胎生(Ovoviparity)鱼类的代表种, 其卵子在雌鱼的泄殖腔内受精发育, 长成鱼后再出生; 同时孔雀鱼又是一种小型观赏鱼类, 在实验室易于饲养, 能不断提供实验用卵和胚胎。因此, 在本实验室长期进行鱼类组织细胞培养的基础上<sup>[6-11]</sup>, 制备孔雀鱼胚胎组织标本, 并对早期胚胎及心血管系统进行了体外培养, 观察和比较了孔雀鱼胚胎心血管系统在体内、外的形成过程。

#### 1 材料与方法

**1.1 材料鱼** 挑选健康、活泼、性成熟的孔雀鱼作为亲鱼, 按 3:1 的雌雄比例, 在水体为 pH 6.8—7.4, 水温 20—25℃的鱼缸中饲养至雌鱼“怀胎”。根据需要, 不同时间从“怀胎”鱼腹中取出卵巢。

**1.2 胚胎组织标本的制备** 取出不同发育期的胚胎, 用 Bouin 氏液固定, 石蜡包埋, 以 5μm 的厚度切片, 脱蜡, 经苏木精-伊红染色, 封片, 制成胚胎组织标本, 显微观察并照相。

**1.3 显微操作** 在严格无菌条件下, 从“怀胎”孔雀鱼的卵巢中取出早期胚胎, 置于含 199 培养基的培养瓶中, 25℃静置培养; 或取出发育阶段在胚体延长期至心脏出现前期的胚胎, 脱除卵壳, 置于 199 培养基或平衡盐溶液中先培养 2d, 随后在显微镜下挑或挤出卵黄, 再小心并尽可能取出保持完好的心血管组织, 转移到含新生牛血清的 199 培养基中, 在 25℃条件下静置培养。

收稿日期: 2001-06-20; 修订日期: 2001-09-04

基金项目: 国家重点基础研究计划(973)项目(G1999053908); 中国科学院生物特别支持费(STZ-0013)资助

作者简介: 张奇亚(1957—); 博士, 研究员; 从事水生动物病毒学及相关领域, 包括组织培养等研究

E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

## 2 结果

### 2.1 胚胎发育与心血管系统在体内的形成

经对大量组织切片的观察,显示孔雀胚胎心血管及循环系统发育的几个主要程序:在成熟的孔雀鱼卵细胞中,卵黄球几乎充满细胞,周围仅一层薄薄的细胞质,整个细胞呈卵圆形,其直径一般可达2mm。卵黄球表层有许多大小不一、结构致密的卵黄颗粒,在制备切片时,因不易固定和着色,而形成小的圆形空斑(图版I:1)。最初在胚胎卵黄囊内胚层和脏壁中胚层之间,出现了聚集成块状的细胞团,这是发育早期的血岛 BI(Blood island)(图版I:2)。处在原肠期的胚胎出现柱状脊索,显出膨大的头部,眼泡内陷;在胚体中部出现肌节;此时在卵黄囊的膜表面已布满血管,在头背部出现含大量血细胞的头肾 HR(Head kidney)(图版I:3)。随着尾芽不断发育延伸,卵黄囊由大变小,由圆拉长;眼泡出现晶体,在眼泡下方产生椭圆形的鳃板。位于肠侧呈圆或椭圆形的脾 SP(Spleen)清晰可见,脾内含有大量的血细胞(图版I:4)。胚体继续延长,卵黄囊由圆形、椭圆形到长椭圆形,并且越来越小。在鳃弓的后方,胚腹腔前方、心脏原基发生在胚体前部咽下方的腹系膜上,起初,胚心似一个两端固定的长管子,可称为心管 HT(Heart tube)(图版I:5),后来才逐渐扩大变粗。这时的胚心形态,在所制备的由鱼头至尾部的横向切片中观察,再比从鱼体侧位切片中观察更为清晰,如当胚胎的前、中、后脑相继形成时,心脏体积明显增大(图版I:6),表明此时的胚心已具有较强的搏动和泵血功能。卵黄囊进一步缩小,部分胚胎已形成小鱼,心血管系统的形成及功能逐渐完善。鱼体的其他组织器官由无到有、从细小到成熟的过程伴随胚心的整个发育过程,这些在鱼胚切片的显微观察及图片中也得到体现。

### 2.2 鱼胚的培养及心血管系统的形成

从受孕亲鱼体内,取出受精卵、脱去卵壳后进行培养。显微镜下观察,可见受精卵细胞经多次分裂,堆积在卵黄上端,呈桑椹状,也称之为桑椹胚。这些细胞不断分裂,就形成囊胚层,而且绕卵黄逐渐形成增厚的环。局部隆起并出现深红色的暗区,为发育早期的血岛(图版I:7)。在隆起部位的暗区内缘,血岛数目随胚胎发育时间的延长而增多,并继续分化,从孤立的点团状,逐渐连接成网络状。此时,可见卵黄囊的膜表面布满血管网(图版I:8)。随着胚体延长,可观察到一端固定在头部鳃弓、另一端固定在卵黄囊膜上的长管状胚心。另在胚胎的腹部,可见发育早期的脾,这是一个红色细胞团。随后胚心逐渐膨大,背主动脉延伸达头部后,紧贴在脊柱下方、腹腔背向躯干处,再向尾部延伸,同时发出许多横向血管(也称为动脉弓,Aortic arch),并通过这些横向血管与腹主动脉相联。心脏搏动有力,血液开始循环,并可见血液颜色由透明、浅黄转变成红色(图版I:9)。

### 2.3 胚胎心血管组织的体外培养

从发育至胚体延长期的孔雀鱼胚胎中取出心脏进行培养。培养一周内的心脏还可分辨心球(Bulbus cordis,也称动脉圆锥 Conus arteriosus),心室(Ventriculus cordis)和心耳(Auricula cordis,也称心房 Atrium,)等几个部分(图版I:10);胚心搏动也只见一个起搏点,且体外培养胚心的平均搏动速率与在整体胚胎中观测到的平均心搏速率相同,约为90—110次/min。随着培养时间延长,胚心组织表面细胞开始贴壁,然后胚心搏动频率逐渐下降(图版I:10)。贴壁生长两周后,组织表面贴壁的细胞越来越多,并向周围扩散生长,出现以上皮细胞或成纤维细胞为主的细胞群落,原来心脏隆起的部位逐渐扁平,心搏受到的限制力越来越大,胚心的原有形状逐渐消失。随体外培养的时间进一步延长,胚心呈团、块状生长(图版I:11)。体外培养的鱼胚心其搏动功能可维持4个月以上。

## 3 讨论

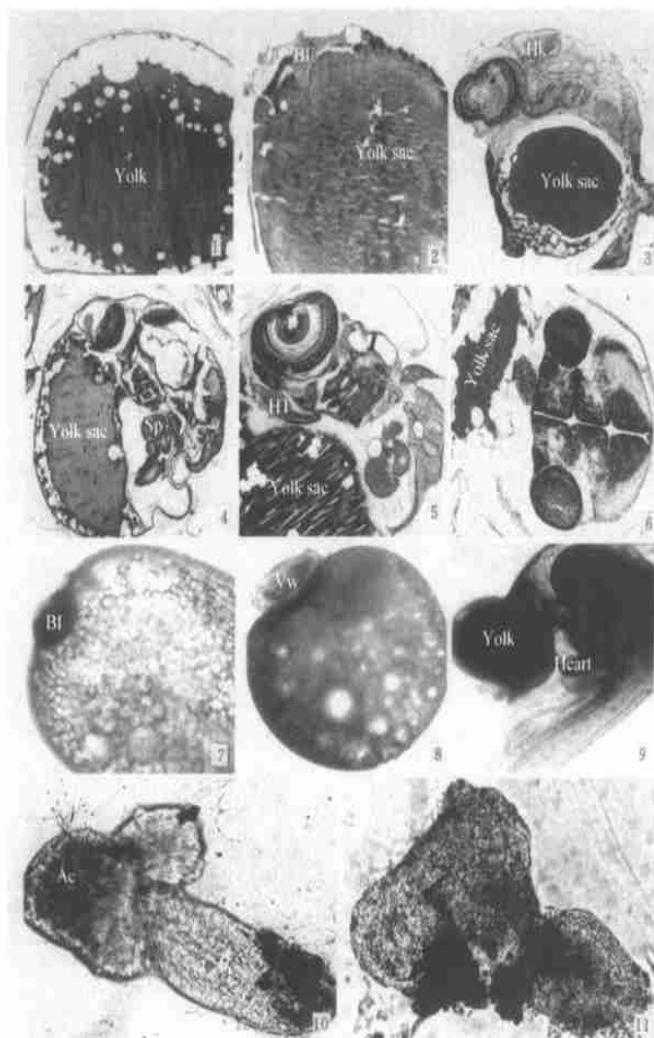
从组织和解剖学来看,对脊椎动物循环系统的形态发育已有初步了解,包括鱼类胚胎循环系统的形成等,在有关著作中已有专门论述。已知真骨鱼由胚体的体节和侧板中胚层之间的致密细胞团形成血管带,血管带逐渐合并,发育为循环系统。近年利用分子生物学方法,测定了斑马鱼胚胎中的血细胞早

期分化标志物GATA 1 或 GATA 2, 对斑马鱼的个体发育及胚胎期的血细胞分化有进一步了解<sup>[5]</sup>。受精9h后, 在斑马鱼的外胚层中就可测到已表达的GATA 2<sup>[3]</sup>。人们已知, 头肾是鱼类重要的免疫器官。同时头肾和脾一样, 属于血腺( Blood glands), 也是鱼类循环系统的组成部分, 都有生血功能。但对鱼类胚胎期脾脏和头肾发育的情况还研究得不够, 对体外与体内胚心发育的过程也缺乏了解。

经组织切片观察可见, 当鱼胚的头肾和脾脏轮廓非常清晰、且其中大量血细胞明确可见时, 却仍看不到胚心( 管), 而胚胎的一些其他组织, 如肠、鳍等也尚未发育完全( 图版I : 3, 4)。在对体外培养的鱼胚进行观察时, 还显示胚心管搏动和血管网中出现红色血流的时间, 要明显滞后于在胚鱼下腹部出现红色细胞团( 即脾) 的时间。证实了孔雀鱼胚胎心血管在发育中, 脾和头肾的出现要早于心血管, 而且它们有独立造血功能。孔雀鱼胚心在体外的成功培养, 可成为脊椎动物心脏及循环组织发育、造血的研究模型<sup>[9]</sup>, 但还需使之逐渐完善和适用。将胚胎组织体外培养与组织切片技术结合起来, 比较了孔雀鱼心血管组织和循环系统在体内、外的发育, 也为此积累了资料。

## 参考文献:

- [ 1 ] Hines P J, Pumell B A, Marx J. Stem cells branch out [ J ]. *Science*, 2000, **287**: 1417
- [ 2 ] 桂建芳. 分子发育生物学研究的理想模式—斑马鱼[ J ]. 生物工程进展, 1995, **15**( 3): 30—33
- [ 3 ] Brownlie A, Zon L. The zebrafish as a model system for the study of hematopoiesis, zebrafish mutants point the way to novel genes involved in the generation of vertebrate blood cells [ J ]. *BioScience*, 1999, **49**( 5): 382—392
- [ 4 ] Hong Y, Winkler C, Schartl M. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*) [ J ]. *Mechanisms Development* 1996, **60**: 33—44
- [ 5 ] Zon L. Developmental biology of hematopoiesis [ J ]. *Blood*, 1995, **86**: 2876—2891
- [ 6 ] Zhang, Q Y, Li, Z Q, Jiang, Y L, et al. Discovery of virus pathogen from soft shelled turtle *Trionyx sinensis*. *Chinese Science Bulletin*. 1997, **41**( 20): 1987—1999
- [ 7 ] Zhang Q Y, Li Z. Q. Gui J F Studies on morphogenesis and cellular interactions of *Rana grylio* virus in an infected fish cell line. *Aquaculture* 1999, **175**: 185—197
- [ 8 ] Zhang Q Y, Li Z Q, Gui J F. Isolation of a lethal rhabdovirus from the cultured Chinese sucker *Myoxocephalus asiaticus* [ J ]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2000, **42**( 1): 1—9
- [ 9 ] 张奇亚、李正秋、桂建芳, 孔雀鱼胚心的体外培养[ J ], 科学通报, 2001, **46**( 11): 930—934
- [ 10 ] 张奇亚、李正秋、袁秀平, 草鱼椎骨间质细胞的培养 [ J ]. 水生生物学报, 2000, **24**( 5): 567—569
- [ 11 ] 李正秋、张奇亚, 鲢低囊胚期胚胎的培养 [ J ]. 水利渔业, 2000, **20**( 6): 11



图版 I

1. 成熟的卵细胞, 细胞几乎被卵黄( Yolk )充满( $50\times$ ) ; 2 胚胎暗区卵黄囊组织, 血岛( Bi )形成, 苏木精和伊红染色, 该区域的细胞呈嗜碱性( $50\times$ ) ; 3,4 在胚中出现头肾(HK)和脾(SP)( $50\times$ )。5 心管( HT )出现( $50\times$ ) ; 6. 膨大的心脏, 前、中、后脑形成( $100\times$ ) ; 7 血岛( Bi )形成( $40\times$ ) ; 8 在卵黄囊的膜上形成血管网( Vw )( $40\times$ ) ; 9 出现心搏( $25\times$ ) ; 10 培养了 10d 的胚心, 心房( AC, 也称心耳 )、心室( Vc )和心球( Bc )仍清晰可见; 11. 培养了一个月的胚心。

1. A mature egg, showing full of the yolk in the cell ( $50\times$ ) ; 2. Showing yolk sac tissue in the opaque area of the fish embryo, the blood island ( Bi ) developing, some cells are basophilic ( $50\times$ ) ; 3,4. Showing the head kidney ( HK ) and spleen ( SP ) in the section of the embryo ( $50\times$ ) ; 5. Showing the heart tube ( HT ) in the section ( $50\times$ ) ; 6. Showing the heart, forebrain, midbrain and after brain of the embryo ( $100\times$ ) . 7. Blood Island ( Bi ) was forming ( $40\times$ ) ; 8. The vas web ( Vw ) was formed on the member of yolk sac ( $40\times$ ) ; 9. The heart was appeared and pulsated ( $25\times$ ) ; 10. The embryonic heart cultured for 10d, showing the auricula cordis ( AC ), ventriculus cordis ( Vc ) and bulbus cordis ( Bc ) ; 11. The embryonic heart cultured for 1 month.