

## 5 细胞间相互作用：胚胎诱导

自然界极为罕见连体人；十九世纪末实验胚胎学的诞生，却使人类在实验室得到连体动物；二十世纪末分子生物学的推进，一个学生一天可以注射特定分子制造成千的连体蝌蚪。

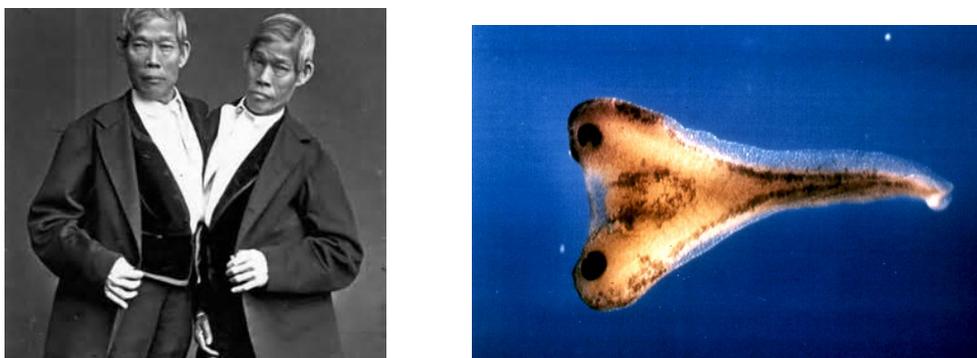


图 5-1 连体人和连体蝌蚪

连体胚胎反映了什么的生物学问题？研究它有什么意义？

发育生物学是研究一个细胞如何变成一个成体，并进一步变化直到死亡，包括细胞分裂、分化、生长、存活，组织和器官的形成和再生，个体的发育和衰老。发育生物学以前主要是研究胚胎发育，现在也研究超出胚胎基础过程的干细胞。而常为人类关心的组织、器官再生问题，缺乏基础研究的突破、有应用价值的结果更是微乎其微。发育生物学研究方法以前为简单的切割等操作，现代更多用分子生物学、也与物理和化学交叉。

### 5.1 预成论与后成论

动物的胚胎如何发育，曾有预成论(preformation)与后成论(epigenesis)的长期争论。预成论认为卵细胞(或精子、或受精卵)从开始就已形成了动物的各个部分，发育只是展开已有结构；而后成论认为受精卵并无成年的结构，而是在发育过程中逐渐形成。

希波克拉底(Hippocrates of Cos, 公元前 460-370)曾有类似预成论的观点：“胚胎中所有的都是同时形成。所有的肢体同时相互分开并生长，无一在其他之前或之后，而是那些自然较大的出现于较小的之前，并非更早形成”(引自 Needham, 1959)。

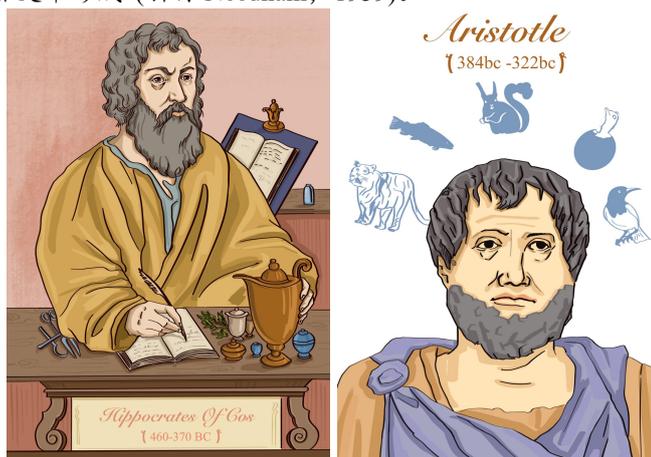


图 5-2 Hippocrates, Aristotle

亚里士多德(Aristotle, 公元前 384-322)将预成与后成作为解释胚胎发育的两种对立概念。在《动物形成》一书中，他写道：“要么所有身体部件，如心、肺、肝、眼及其它，皆同时形成、或逐渐形成”。亚里士多德反对预成论：“前者不对是显而易见的，因为有些部件在胚胎已经清晰可见，而有些并非如此，且不是因为它们太小，比如肺比心大，但其发育出现晚于心……，那么就很明显，虽然有些东西制造部件，但非确定的物体，也不在精子中完整存在”。他支持后成

论：“原则上，自然界一件东西来源于另外一件潜在可以成为终产物的东西……”。

后成论的支持者包括英国的哈维(William Harvey, 1578-1657)、法国的笛卡尔(Rene Descartes, 1596-1650)等，预成论的支持者包括意大利的 Marcello Malpighi(1628-1694)、荷兰的列文胡克(Antonie van Leeuwenhoek, 1632-1723)、德国的莱布尼茨(Gottfried Wilhelm von Leibniz, 1646-1716)等。哈维在 1651 年称：卵中并无未来胚胎的任何部件，但潜在含有所有部件...有些部件先形成、有些后形成，都继续生长...这样我们称为后成(Needham, 1959)。Malpighi 于 1673 年再启争论，到 18 世纪预成论被认为定论(Meyer, 1931; Needham, 1959)。荷兰显微镜专家 Nicolaas Hartsoeker(1656-1725)设想如果在显微镜下可以看到精子显示人体所有部分。此图在被误认为是他的观察、而非其设想的情况下广为传播(Hill, 1985)。如果精子就有整个人体，那么发育不过是长大，而无需形成新的结构，甚至早先的人(比如传说的亚当或夏娃)应该含有所有现代人类的个体。当时预成论广为接受，争论是预成于卵子、还是精子。



图 5-3 想象的精子中的小人 (Hartsoeker, 1694)

德国的 Caspar Friedrich Wolff(1733-1794)观察鸡胚发育。他于 1759 年在“发生理论”的论文中重提后成论，并叙述鸡胚在原本匀质的表面逐渐形成血管，1768 年在“小肠形成”一书中描述鸡胚的肠子从一片组织折叠形成，所以血管和小肠皆非预先形成，而是逐渐形成。Wolff 的结果推翻了传统的预成论(Meyer, 1931; Needham, 1959)。

## 5.2 自分化与依赖性分化

因为完全在体外发育，两栖类和鱼类的胚胎发育为早期研究的最佳对象。以非洲爪蟾为例，可以在海水、池塘水中从头到尾观察卵细胞受精到小蝌蚪形成的全过程(图 5-4)。

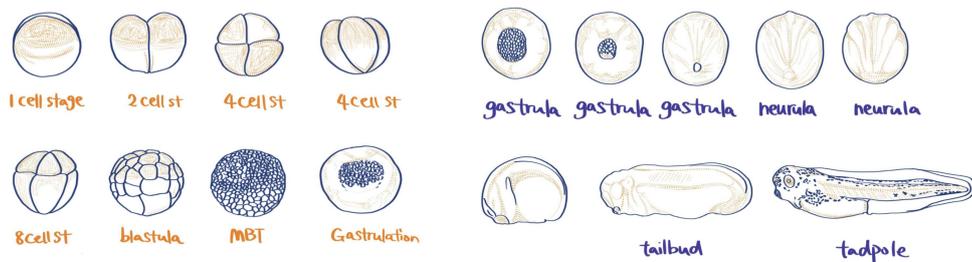


图 5-4 非洲爪蟾胚胎发育。1 细胞期与卵细胞就有动物极和植物极，后有腹背轴

十九世纪后期，德国科学家 Wilhelm Roux(1850-1924)区分两种观点：“不同部分的自分化”、“不同部分的分化性相互作用”。

Roux 称自己的研究为“发育成因学”(Entwicklungsmechanik)(Sander, 1991a)。以前的科学家包括他的老师 Ernst Haeckel(1834-1919)，对胚胎的研究依赖于观察，在描述的基础上提出理论；而德国的 Oskar Hertwig(1849-1922)、法国的 Laurent Chabry(1855-1893)等开始了实验研究(Fischer, 1990; Sander, 1991a); Roux 提倡分析性实验，不仅要有实验结果、还要思考结果、检验理论(Sander, 1991a; Hamburger, 1997)。他们开创的学科到二十世纪被称为“实验胚胎学”(Experimental Embryology)。

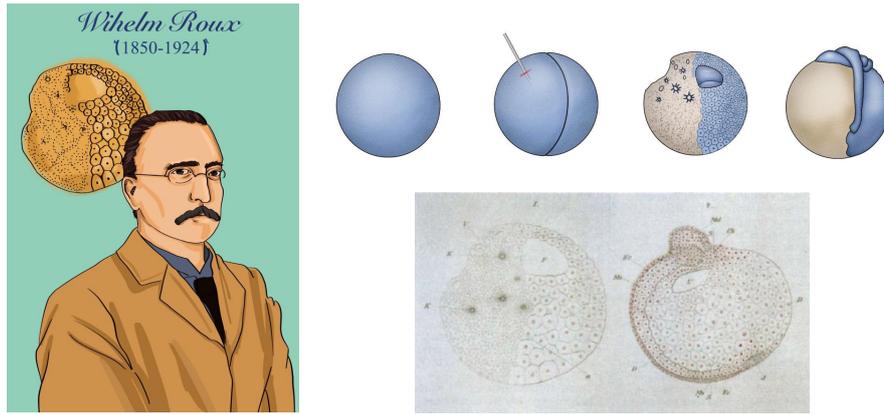


图 5-5 Roux, 其热针实验示意图, 其对热针实验结果的描绘

Roux 选择了重要“自分化”还是“依赖性”分化作为研究的问题, 实验模型用两栖类胚胎。1888 年, 他发表了对蛙胚研究的结果和结论。他集中研究受精卵第一次分裂后成为的两个细胞是自主发育、还是相互依赖。为此, 他在受精卵分裂后, 用加热的针“杀死”其中一个细胞, 观察未受针刺的细胞如何发育, 他观察到剩下的细胞本身继续分裂、发育后形成半个胚胎, 据此 Roux 认为最初两个细胞之一的失去并不影响另外一个细胞的发育, 所以两个细胞发育是独立的(Roux, 1888)。

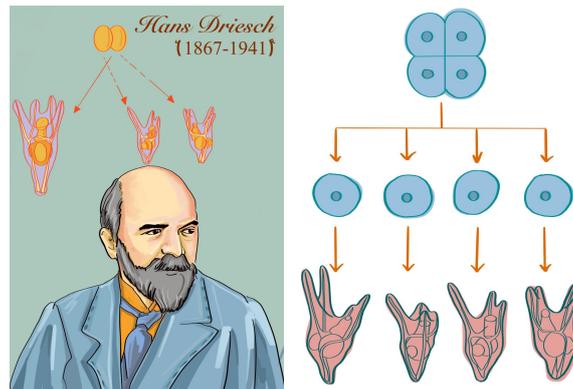


图 5-6 Driesch 及其海胆分离实验

德国的 Hans Driesch(1867-1941)曾于 1887 年和 1889 年师从 Haeckel。为了验证 Roux 的结论, Driesch 在意大利 Naples 海洋生物实验站用海胆胚胎做实验。此前已知摇晃海胆的受精卵可以出现脱落的情况, Driesch 在海胆受精卵分裂到两个细胞的时期, 摇晃海胆几分钟, 有些海胆胚胎的两个细胞会分开, Driesch 将它们分别培养, 然后观察分开的两个细胞如何发育。与 Roux 结论的预计不同, 分开的两个细胞分别形成两个完整的、虽然体积只有正常一半大小的胚胎。如果在卵受精后分裂两次变成四个细胞时再摇晃, 四个细胞都分别独立形成完整的胚胎(Driesch, 1891)。这些结果显示了“调节”现象: 胚胎的部分可以变成整体。对调节的解释说明: 在胚胎两细胞期(或四细胞期), 每个细胞都具有形成完整胚胎的潜力, 但它们的相互作用导致每个细胞在其他细胞存在的情况下分别只参与形成半个胚胎(或四分之一一个胚胎)。也就是说, 细胞之间一定有相互作用。

虽然 Roux 未接受 Driesch 结果的重要性, 认为低等的无脊椎动物海胆所得到的结论不如脊椎动物可靠, Roux 和 Driesch 等创造了发育生物学的第一个高峰。Roux 启迪了思路、开创了途径, Driesch 有更严格的实验和分析。

德国的 Hertwig(1893)最早试图用丝线分开两细胞期蛙胚的两个细胞(constriction, 结扎实验), 未成功(Beetschen, 1996)。美国的 Morgan(1895)、意大利的 Herlitzka(1895)、德国的 Endres(1896)等曾有类似工作。

德国的 Hans Spemann(1869-1941)在 Würzburg 大学随 Theodor Boveri 做研究生, 1895 年获博士学位。Spemann 在 Hertwig、Endres 等基础上, 在蝶螈受精卵第一次分裂后, 用头发把两个细胞分开, 结果两个细胞可以分别独立地形成完整的蝌蚪, 证明脊椎动物胚胎的细胞也有相互作用

(Spemann, 1901, 1902, 1903)(图 5-7)。

Spemann 发现结扎是否导致两个完整胚胎形成取决于胚胎第一次细胞分裂的平面(图 5-7 中和右)。如果分裂平面与胚胎未来的左右相应, 分开的两个皆完整胚胎。如果分裂平面与背腹相应时, 背侧部分可以形成一个几乎完整的胚胎(含神经系统等重要结构)、而腹侧部分只能形成皮肤等结构而不形成完整的胚胎, 说明胚胎具有腹侧和背侧的不对称性。

Spemann 认为腹侧缺乏某种“分化物质”: 这种分化物质可能是器官形成或释放所需的未组织的物质、也可能是有组织的胚胎物质具有分化为各种器官的能力、或者引导其它细胞分化 (Spemann, 1901; Hamburger, 1988)。因此, 在这些可能包括胚胎背侧含有诱导其他细胞分化物质的想法的雏形。

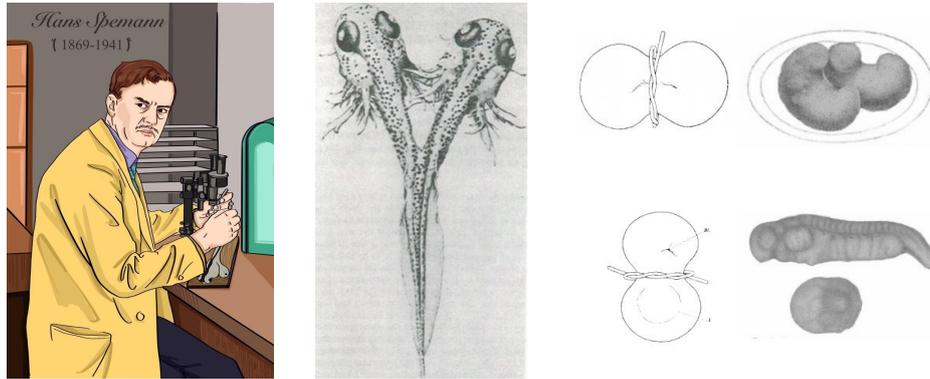


图 5-7 Spemann, 其结扎实验结果及其示意图(左, 1903, 右, 1924)

### 5.3 晶状体诱导

器官中不同部件优美地配合, 既是进化的奇妙、也是发育的奥秘。不同部件是否在发育中有相互关系?

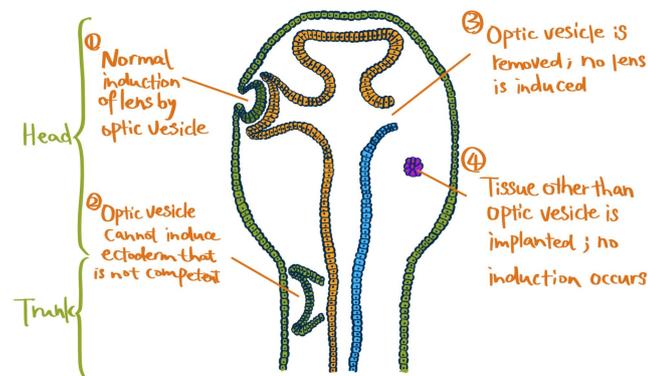


图 5-8 晶状体诱导实验

例如: 美妙的眼睛中, 晶状体(lens)在解剖上位于视网膜前特定部位、功能上调节光线准确地投射到视网膜。那么在发育过程中, 晶状体与视网膜的发育前体结构视杯(optic cup, 亦称 optic vesicle)是否相关? 比如空间、时间的协调, 抑或有依赖关系?

1901 至 1912 年, Spemann 曾研究晶状体形成, 认为在发育早期, 视杯诱导晶状体产生。支持诱导机理的实验包括: Spemann 于二十世纪初报道在去除视杯后, 晶状体不能形成 (Spemann, 1901b); 美国霍普金斯大学的 Warren Lewis(1870-1964)发现将原本不形成晶状体的外胚层移到视杯上方, 可以形成晶状体 (Lewis, 1904); Lewis 还发现将视杯移植到其他部位, 导致新部位形成晶状体 (Lewis, 1906)(图 5-8)。

其他研究者以及 Spemann 本人还看到有些胚胎晶状体产生不依赖视杯, 当时以为有晶状体依赖视杯、和晶状体不依赖视杯的两类胚胎。1980 年代后, 视杯诱导晶状体的简单方式不被认可, 而更复杂 (Grainger *et al.*, 1988)。

对于 Spemann 时代的胚胎学家来说, 晶状体的研究为胚胎诱导的研究埋下了伏笔。

#### 5.4 移植实验

两栖类胚胎发育最初从一个受精卵、分裂到几千个细胞皆为裂殖胚(blastula, 所含的每个细胞称为 blastomeres), 其后肠胚(gastrula)。在动物极与植物极交界的附近, 细胞开始内卷(invagination), 为肠胚形成的开始。内卷首先从背侧开始、继而侧面、后在腹侧, 最后形成一圈, 为裂殖孔(blastopore), 背侧内卷时偏动物极的上方部位称为“背唇”(the dorsal blastopore lip, 简称 the dorsal lip)(图 5-9)。

十九世纪 Roux 与 Driesch 等实验对象为裂殖胚。Spemann 将结扎实验延伸到不同的胚胎发育期, 发现一直到肠胚期如果分开背腹部分都有差别。分离的腹侧部只能形成皮肤、和腹侧及侧面中胚层组织如血液和间充质等, 而分离的背侧部产生神经系统、和背侧的中胚层结构如脊索和体节。在分离时, 背侧部分含背唇。

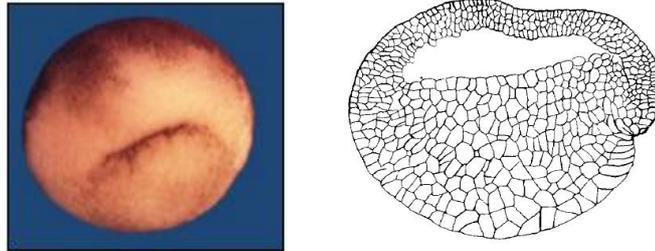


图 5-9 背唇。左为肠胚期外观照片, 右为 Morgan(1905)截面图

Roux 和 Morgan 认为胚胎早期赤道部分对发育很重要, Roux 还认为背唇可以产生背侧的外胚层结构神经管(Roux, 1892; Morgan, 1894; Lewis, 1907)。

1907 年, 霍普金斯大学的 Lewis 将肠胚期的背唇从一个供体胚胎移植到发育更晚期(tailbud)的宿主胚胎, 七天后观察发现宿主胚胎因为移植而多出现背侧中胚层组织脊索(c)和肌肉(m)、及外胚层组织神经管(n)(图 5-10)。Lewis 认为: 来自供体胚胎的背唇被移植到宿主的后自主形成了中胚层和外胚层组织, 因为背唇的发育命运已经决定了(determined)(Lewis, 1907), 也就是认为背唇自主发育为脊索、肌肉和神经管, 没有提出其中是否有因为背唇诱导宿主而产生的结构。

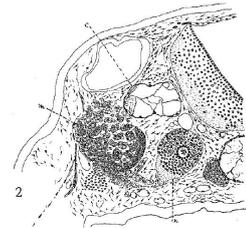


图 5-10 背唇移植

1916 年, Spemann 利用常见蝾螈(*Triturus taeniatus*)每个胚胎着色的自然差别, 在两个同种蝾螈胚胎之间进行移植, 通过着色深浅跟踪移植的供体在宿主胚胎中的发育命运。他发现肠胚期神经前体区域如果移植到另一胚胎的表皮区域, 会形成表皮, 而肠胚的表皮区域移植到神经区域会形成神经, 都不按供体原有命运, 而按被移植到的宿主区域改变了发育命运, 说明在移植前它们的命运没有固定, 而可以为新邻居所影响再确定(Spemann, 1916, 1918, 1919)。

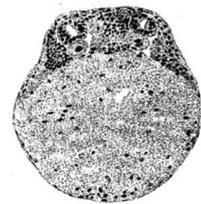


图 5-11 两根神经

Spemann 用蝾螈重复了 Lewis 蛙的背唇移植实验, 获得两根背轴。最初记录在他 1916 年 4 月 20 日的笔记中(Fäßler, 1996)、1918 年发表移植后两根背轴分别含神经管、脊髓(图 5-11)(Spemann, 1918)。

但 Spemann 与 Lewis 一样, 以为供体的背唇直接成为脊索和神经组织, 而未意识到出现了诱导现象。Spemann 在 1918 年的文章中还标明第二根神经管来源于移植的背唇(Spemann, 1918; Sander and Fässler, 2001)(图 5-12)。

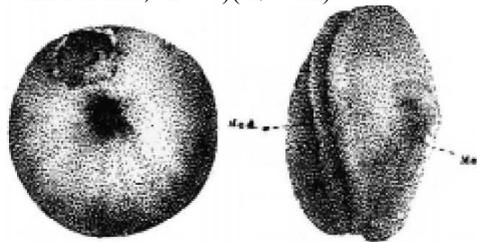


图 5-12 Spemann(1918)认为背唇直接成为脊索和神经管

令人惊讶的是，虽然 Lewis 和 Spemann 都曾积极研究过晶状体诱导，试图用不同方法证明或否定晶状体是否依赖于视杯，他们两人皆未考虑第二轴中是否有组织是因为供体诱导宿主而产生。这在 Spemann 尤为突出，因为他在 Lewis 文章九年后发重复性质的文章，而且获得的第二根背轴很漂亮。他居然仍与 Lewis 一样以为背唇发育成为脊索和神经管。在他 1918 年文章中，他标注第二根神经管来源于背唇(图 5-12) (Spemann, 1918; Sander and Fässler, 2001)。Spemann 的错误来源于对背唇命运的错误认识。1892 年，Roux 的结论是“依据于三种不同的实验方法，... 背唇的外表面是神经管的位置”(Roux, 1892; Sander, 1991c)。Spemann 因此认为肠胚期的背唇的深层和浅层分别成为脊索和神经管(图 5-13)(Hamburger, 1988; Fäßler, 1996)，他称背唇为“分化中心”(Spemann, 1918)。

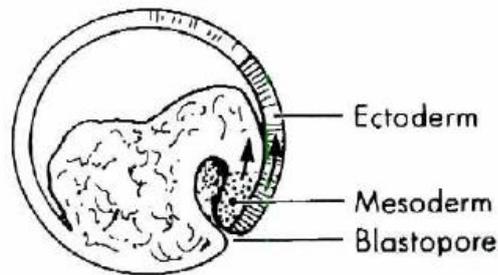


图 5-13 Spemann(1918)误认为背唇内层的命运为中胚层、背唇外层为外胚层(自 Hamburger, 1988)

如果 Spemann 仔细分析自己在 1918 年发表的结果(图 5-14)，可以看到：神经管来源的区域在背唇以上的区域。

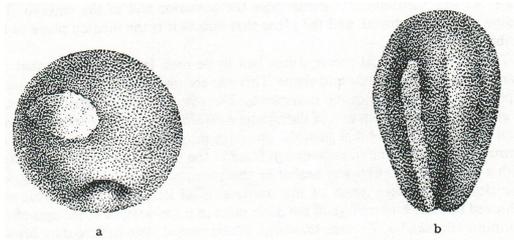


图 5-14 神经管的来源。Spemann(1918)显示移植蝾螈肠胚期背唇以上的区域形成神经管

1919 年海德堡大学的 Hans Petersen(1885-1946)在读到 Spemann(1918)后，去信 Spemann 指出背唇的表层也应该是中胚层(脊索、体节)、而不形成神经管(Spemann, 1921; Hamburger, 1988; Sander and Fässler, 2001)。因此 Spemann 决定要研究背唇移植后导致的第二根背轴中脊索和神经管到底是来自移植供体、还是宿主。

Spemann 于 1916 和 1918 年报道的移植是在同种胚胎之间，依赖供体和宿主同种的两个个体之间自然的色素差异，在分析时不太容易区分。为了确切区分背唇的命运，需要在颜色不同的不同种胚胎之间做背唇移植。1896 年，德国犹太科学家 Gustav Jacob Born(1852-1900)首先在异种胚胎间移植，他从一种蛙胚切下一块移植到另一胚胎上形成嵌合胚胎(chimera)(Born, 1896)。1898 年，美国霍普金斯大学的 Ross Harrison(1870-1959)用同样方法在不同种、不同色素的蛙之间进行过胚胎组织的移植(Harrison, 1898)，可以在移植后发育成的蝌蚪中区分来源于供体和宿主的组织。Spemann 于 1916 年做同种移植(homeoplastic transplantation)、1917 年开始做异种移植(heteroplastic transplantation)。Spemann 用不同颜色的蝾螈之间进行移植，他常用色浅的 *Triturus cristatus* 和色深的 *Triturus taeniatus*(或 *Triturus alpestris*)，以便区分供体和宿主来源的胚胎组织。

Hilde Mangold(1898-1924)上大学主修自然科学，她在 Frankfurt 大学听 Spemann 的学术报告后要求转学到 Spemann 所在的 Freiburg 大学，1920 年进 Spemann 实验室做研究生(Fässler and Sander, 1996)。Spemann 给她的第一个课题是研究水螅(hydra)，但实验遇到问题、Spemann 也不能解决，再给她的课题是 Spemann 自己做过、所以技术上应该没有问题：背唇移植。将来源于色浅的 *T cristatus* 的背唇移植到色深的 *T taeniatus*(或 *T alpestris*)。

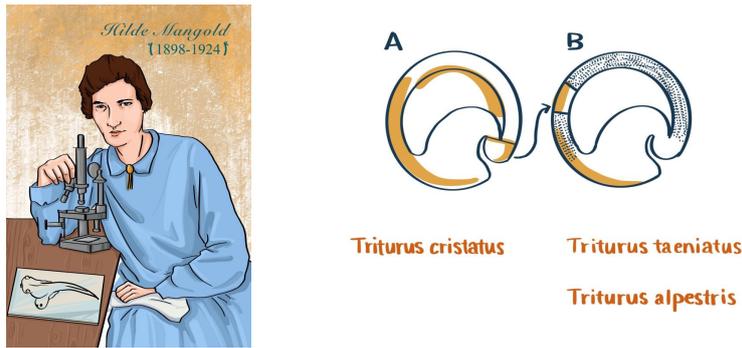


图 5-15 Mangold 与背唇移植实验

在 Mangold 尚未开始移植实验的 1921 年 1 月, Spemann 单独提交的文章写道:“也许整个移植的背唇属于...内中胚层...如果这样的话,从 *taeniatus* 胚胎来的背唇移植到 *cristatus* 宿主后,(中胚层的)脊索和体节应该属于前者,而(外胚层)的神经板属于后者”(Spemann, 1921; Sander and Fässler, 2001)。

很可能是在初稿提交后 Mangold 的移植实验开始有了结果, Spemann 将 Mangold 的一个结果于 1921 年 5 月作为后记补录在 Spemann(1921)论文中(Spemann, 1921; Sander and Fässler, 2001)。Mangold 将色浅的 *T cristatus* 肠胚期背唇移植到色深的 *T taeniatus* 肠胚侧面,观察到第二个背轴产生。1921 年, Spemann 用了组织者(organizer)一词描述背唇:在它正常存在或者移植到的部位,对未分化材料创造一定方向和程度的“组织场”(Spemann, 1921; Hamburger, 1988)。

### 5.5 胚胎诱导与组织者

1921 年和 1922 年, Mangold 记录了 259 次移植实验,其中 28 个宿主胚胎出现第二背轴,当时培养胚胎的溶液欠佳、也无抗生素,所以胚胎在手术后的成活率不高。Hilde 于 1923 年曾与丈夫 Otto Mangold 合作做移植实验(217 个宿主,其中 17 个有第二背轴), Spemann 没选 Mangold 夫妇合作获得的结果(Fässler and Sander, 1996)。

1924 年, Spemann 和 Mangold 发表合作的文章, Spemann 选择详细分析了 Mangold 获得的六个胚胎移植的结果(Spemann and Mangold, 1924)。

文章首先指出蝾螈肠胚化开始时,不同部位的决定性不同,通过移植可以检验,发现有些组织移植到其他部位后,其发育命运可以改变,这些工作 Spemann 于 1918 和 1921 已报道,而为 Otto Mangold 于 1922 年、1923 年所验证和推广。然后,他们指出, Spemann(1918)就发现背唇很不一样,移植到形成上皮的地方,背唇继续按自己确定的命运发育,而移植后的区域出现第二个胚胎原基,含神经管、脊索和体节。Lewis(1907)有类似的发现,只是用肠胚后期的背唇移植到更老一些的胚胎其他部位,观察到它发育为神经组织和体节。

Spemann 和 Mangold 提出发育命运确定在先的区域可以决定其他尚未确定命运区域的发育。他们用的例子是胚胎旋转的实验结果。蛙卵细胞有极性,着色深、较轻的为动物极,着色浅、较重的为植物极,这一极性维持到胚胎发育过程中,精子从动物极进入卵细胞,动物半球主要贡献于外胚层和中胚层,植物半球主要贡献于内胚层。1918 年 Spemann 的研究中曾将肠胚的动物极半球、植物半球分开,然后 180 度或 90 度旋转后再重合,结果认为植物极影响动物极的发育。由此,他们用了“组织中心”(organization center)的概念:胚胎中先决定的区域,再送出一定方向和一定量的决定性影响。

他们认为虽然 Spemann(1918)发现了胚胎不同区域的决定性不同,但当时只在同种胚胎之间进行移植,不易区分移植供体与宿主,而异种移植更好,比如将 *T cristatus* 胚胎中命运确定的区域移植到 *T taeniatus*(或 *T alpestris*)胚胎中未定区域(图 5-14)。

文章描述的六个移植为 1921 年的 Um8b, 和 1922 年 Um25b、Um214、Um131b、Um83b、Um132b。文章只在讨论 Um25 时有文字介绍、而未显示 Um214 的图片,而多个图片显示了其他每个移植胚胎在多个部位的切片。

Um8b 第二根神经管中很长部分来源于宿主、但有相当部分来源于供体,脊索来自供体; Um25b 第二根神经管完全来自于宿主,而脊索完全来源于供体; Um214b 的第二根神经管也完全来自于宿主,而脊索完全来源于供体; Um131b 的第二根神经管多来自宿主、少数部位细胞来自供体,脊索和体节来自供体; Um83b 的第二根神经管来自宿主,体节多数细胞来自宿主,脊索和部分体节来自供体; Um132b 第二根神经管多数来自宿主(后 2/3 部分少数细胞来自供体,皆在

神经管的底板), 脊索与部分体节来自供体(图 5-16)。可能是因为 Um25b 的两张组织切片的图不特别好看, 所以一般教科书不太用这一最能突出神经管可能由脊索诱导产生的例子, 而常用 Um132b 为例, Um132 的第二根神经管比较长, 其胚胎在体外培养的时期也较长。

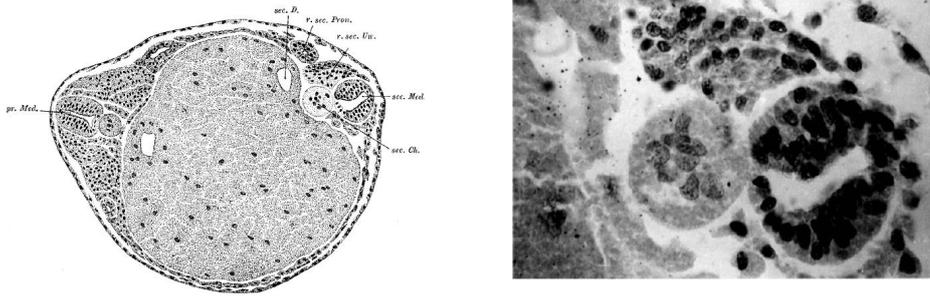


图 5-16 胚胎 Um132b 之第二根神经管的发育来源。左, Mangold 原绘图, 胚胎左边色深的第一根神经管、脊索、体节都来源于宿主, 右边的第二根神经管的大部分来自深色的宿主, 但脊索来自浅色的移植物。右: 后人拍摄的 Um132b 切片的照片(Sander and Fässler, 2001)

在讨论中, Spemann 和 Mangold 先谈了移植的方向、背唇的具体位置、发育期、第二原基内涵等。在机理讨论部分, 他们明确提出肯定出现了诱导, 但不清楚发生的确切的时间、是否直接诱导, 提出两种可能: 1) 移植供体本身产生少量神经组织并存在于外胚层表面(如 Um8b 所见), 而这些神经组织诱导宿主的细胞成为神经组织; 2) 中胚层诱导神经组织产生。他们当时的结果不能确定哪种解释为正确, 提出了一些可能的实验。他们还定义和讨论了组织者的概念。

什么是组织者、组织者如何起作用可能在今天还有争论, 而诱导为后来很多实验所证明, 并不限于胚胎、也不限于发育, 是细胞之间相互作用的一种范式。

## 5.6 余音缭绕

Walther Vogt(1888-1941)从 1920 年代初开始用染料跟踪胚胎细胞的命运(Vogt, 1923), 并于 1925 和 1929 年发表蛙胚的命运图(fate map)(Vogt, 1929)(图 5-17)。他的图谱清楚地显示背唇本身只成为中胚层, Spemann 以前以为背唇深层和浅层不同命运、浅层成为神经胚层的想法肯定不对。

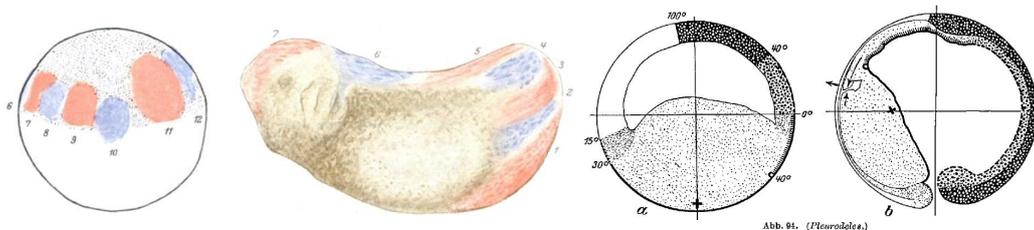


图 5-17 胚胎发育命运图谱(Vogt, 1929)。左, 裂殖胚或肠胚早期点活体染料; 中, 胚胎发育到 tailbud 期, 观察染色的区域成为何种组织; 右, 背唇命运为中胚层, 而不贡献给神经板

Spemann 的研究生 Johannes Holtfreter(1901-1992)、Otto Mangold 等推进了神经诱导的研究, 包括诱导的区域性、建立体外诱导模型等。Holtfreter 实验室的中国留学生庄孝惠研究了宿主胚胎不同区域对外源性诱导物的反应(Hamburger *et al.*, 1988)。

1919 至 1924 年 Spemann 没做实验, 1925 年重回实验第一线, 1929 年开始用不同方法“破坏”背唇的结构(切、压、加热、冷冻、干燥), 观察经过这些处理后, 背唇是否还有诱导的活性(Hamburger, 1988), 结果多为阴性。Holtfreter 离开 Spemann 实验室后独立做过类似的研究, 他改进了培养液, 大大提高了胚胎的存活率, 他发现多种方法处理后的背唇仍然有神经诱导的活性。1932 年, Spemann 与三个学生合作发表了一篇论文、四人分别写一段(Bautzmann *et al.*, 1932), 其中 Holtfreter 一人做过 130 个胚胎, 其他人做过少量的胚胎: Hermann Bautzmann 观察到背唇加温到 60 度处理 5 到 10 分钟后, 还可能有神经诱导活性; Holtfreter 发现背唇在 60 度干燥、100 度加温、冷冻后, 仍有神经诱导活性; Spemann 发现背唇用 96% 的酒精处理 3 分钟后, 仍有诱导活

性，不过他只有一例胚胎；Mangold 希望看诱导物质是否可弥散，将背唇附着于琼脂，干燥后将琼脂转到胚胎，检验其诱导性。Bautzmann 等(1932)证明无需活着的背唇组织或细胞就可能有诱导活性，被认为开启了胚胎诱导分子的研究。

Spemann 的研究生 Else Wehmeier 与化学家 Fischer 合作，试图用丙酮、乙醇、乙醚等提取背唇的神经诱导物质(Fischer and Wehmeier, 1933)。剑桥大学的李约瑟(Joseph Needham, 1900-1995)、Dorothy Moyle Needham(1896-1987)和 Conrad Waddington(1905-1975)研究蝶螈提取物的诱导活性(Waddington *et al.*, 1933; Needham *et al.*, 1934)。但是，生化胚胎学热潮中，并未得到诱导的分子。

1940 年代至 1970 年代的三十年为胚胎发育研究的寒冷期。其中最重要的是荷兰 Utrecht 大学的 Pieter Nieuwkoop(1927-2007)于 1969 年发现中胚层为内胚层诱导所产生。Nieuwkoop 将裂殖胚从动物极到植物极分成几个部分，发现虽然动物极单独不能形成中胚层，但它如果与植物极共同培养，可以形成中胚层(Nieuwkoop, 1969a, 1969b, 1970)。进一步通过同位素标记区分供体和宿主证明在植物极与动物极共培养时，中胚层来自动物极，所以是植物极诱导动物极产生中胚层(Nieuwkoop and Ubbels, 1972)。在正常发育过程中，中胚层之所以在动物极和植物极之间产生，是因为植物极发出信号诱导动物极和植物极之间的结构(Morgan 时代称赤道区、后称边缘区 marginal zone)形成中胚层。



图 5-18 中胚层诱导

由于背唇神经诱导曾被质问(Jacobson, 1982, 1983), 英国两个实验室于 1983 年将辣根过氧化酶(horseradish peroxidase, HRP)注射到供体胚胎，在肠胚早期获得背唇，移植到同期宿主的腹侧，观察到第二根背轴，其中 HRP 只存在于脊索中，而神经管完全来源于宿主(Smith and Slack, 1983; Gimlich and Cooke, 1983)，从而回答了质疑、再次证实了 1924 年的结论。

肠胚期胚胎的腹背轴已经形成，因此肠胚背唇移植导致背轴形成的实验需要在胚胎更早期进行研究。美国伯克利加州大学的 John Gerhart 实验室在 64 细胞期做移植实验，发现植物半球背侧的单个细胞如果移植到宿主胚胎的腹侧，可以诱导第二背轴产生(Gimlich and Gerhart, 1984)。实际上，腹背轴的形成可以推早到受精：在受精前，卵细胞无腹背差别，而精子进入导致卵细胞内细胞骨架变化、引起一系列变化，致使精子进入一侧为将来胚胎的腹侧(Gerhart *et al.*, 1989)。

所以，背唇移植实验延伸出中胚层诱导、腹背轴形成等多个重要问题的研究。

### 5.7 分子时代

1930 年代没找到胚胎诱导相关的分子，1970 年代重组 DNA 为代表的新技术导致分子生物学在生物医学多个领域的应用，1980 至 1990 年代不同的方法帮助找到了中胚层诱导、背轴诱导和神经诱导的分子，并对神经诱导的机理有新的理解。

因为胚胎植物极有诱导中胚层的活性，哈佛大学的 Douglas Melton 通过 mRNA 差异性分布，找到非洲爪蟾卵细胞动物极和植物极分别特有(或富集)的 mRNA(Rebagliati *et al.*, 1985)，其中植物极特有的 Vg-1 编码蛋白质为转化生长因子(TGF- $\beta$ )家族的成员(Weeks and Melton, 1987)。美国旧金山加州大学(UCSF)的 Kimelman 和 Kirschner 用裂殖胚的动物极部分(所谓“动物帽”，animal cap)体外培养作为检测方法，筛查当时已知生长因子的诱导活性。动物帽单独培养只形成皮肤，而培养时如果存在成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)，可以出现中胚层(特别是腹侧和侧面的中胚层组织)(Kimelman and Kirschner, 1987)。英国的 Jim Smith 发现爪蟾体外培养细胞系的分泌物有中胚层诱导活性(Smith, 1987)，以后被证明为 activin、也是 TGF- $\beta$  家族成员。Activin 的作用有剂量依赖性，低剂量诱导腹侧、侧面中胚层，高剂量诱导背侧中胚层(如背唇、或其衍化的脊索)。TGF- $\beta$  家族的骨形成蛋白(BMP, bone morphogenetic protein)可以诱导腹侧中

胚层产生。

一个偶然的发现开启了对背轴形成分子机理的理解。研究癌基因的英裔美国分子生物学家 Andrew McMahon 与研究蛙胚的 Randall Moon 合作, 将认为在老鼠过高或者异位表达导致乳腺癌的 *int-1* 基因所转录的 mRNA 注射到爪蟾受精卵, 结果胚胎形成两个背轴 (McMahan and Moon, 1989), 这一意外的发现当时被认为是“分裂”了组织者, 其后认为是激活了背轴形成的通路。从研究病毒导致老鼠癌症发现的 *int-1* 与从研究果蝇翅膀形成发现的 *wingless* 基因组成 Wnt 家族, 产生分泌型蛋白, Wnt 不同成员通过作用于其受体及信号转导分子参与多个生物过程。它们在蛙胚参与背轴形成, 但尚待确定胚胎内从哪一步开始用 Wnt 信号通路。1992 年, 伯克利加州大学的英裔美国科学家 Richard Harland 实验室发现表达于背唇的 *Noggin* 基因, 编码分泌型蛋白质也能诱导背轴 (Smith and Harland, 1992)。

1993 年, Harland 实验室发现 *Noggin* 有神经诱导的活性 (Lamb *et al.*, 1993)。1994 年, 洛杉矶加州大学的阿根廷裔美国科学家 De Robertis 实验室发现背唇表达 *Chordin*、也编码有神经诱导活性的分泌型蛋白质 (Sasai *et al.*, 1994)。

Melton 实验室的伊朗裔 Ali Hemmati-Brivanlou 在研究 *activin* 参与中胚层诱导的过程中, 用 *activin* 受体制造的抑制分子阻止中胚层形成时, 意外发现没有中胚层仍可出现神经系统, 从而提出神经胚层的诱导在分子机理上是去抑制: 胚胎内存在抑制神经胚层形成的分子, 而如果抑制这些抑制性分子就可以“诱导”神经发生 (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1994)。抑制分子可能是 BMP, 而 *noggin* 和 *chordin* 等蛋白质可以直接结合 BMP、并抑制 BMP 的活性 (Piccolo *et al.*, 1996; Zimmerman *et al.*, 1996)。

## 5.8 结语

预成论与后成论的古老争论, 在实验胚胎学兴起后, 刺激了人们感兴趣研究早期细胞发育是完全独立自主、还是相互作用。

Spemann 和 Mangold (1924) 的研究, 实验设计类似于 Lewis (1907)。Spemann 曾于 1916 年、1918 年重复 Lewis 的工作并沿用其理解, 而 Petersen 于 1919 年向 Spemann 提出以前对背唇自分化命运的理解可能有问题, 加上概念上曾有 Spemann 和 Lewis 等在二十世纪初研究晶状体可能被诱导产生的铺垫, 导致 Spemann 决定采用 Born (1896) 和 Harrison (1898) 的方法, 通过异种胚胎间移植确切地分清移植提供的背唇自身变成神经管、还是诱导宿主胚胎组织产生神经管, 最终 Spemann 指导 Mangold 的实验获得结果提示神经管为背唇诱导所产生。

胚胎诱导的概念, 不仅成为核心问题之一主导几十年的发育生物学研究, 也影响了人们思考细胞相互作用所参与的其他生物学过程, 但 1930 年代研究胚胎诱导的分子机理遭遇技术困难, 直到 1980、1990 年代才获突破。

在实验胚胎学研究过程中多次发现不同方法可以产生连体胚胎, 包括结扎实验、背唇移植实验、早期裂殖胚细胞移植实验、Wnt 家族分子注射、以及本文未讨论的 BMP 受体抑制剂注射。这些研究帮助我们理解基本的发育生物学机理, 但是, 迄今并不清楚连体人的发生原因。

注 1: 预成论与后成论部分参考了作者研究生论文: Rao Y (1991) *Molecular and genetic analyses of cellular communication in Drosophila neurogenesis*. University of California, San Francisco, California.

注 2: 对于依赖性分化和自主分化, 摩尔根总结为: “分裂的卵之不同部分协同工作、既相互作用形成结果, 或分裂导致卵的一部分与另一部分分开而独立发育?” (Morgan, 1897)。依赖性和自主分化也对应于当时所谓调节性 (regulatory) 发育和镶嵌性 (mosaic) 发育, 调节性意味着早期的细胞的命运并未固定、可以变化, 镶嵌性意味着胚胎早期特定的前体细胞 (或区域) 能、也只能发育为成体特定的细胞 (或组织)。现代的术语归纳为: 外源性 (extrinsic) 因素和内源性 (intrinsic) 因素在胚胎细胞发育过程中起作用。

注 3: 德文 *entwicklungsmechanik* 英译常为 *developmental mechanics*、中译“发育力学”, 但 Sander 认为 Roux 用 *mechanik* 应该是取康德的理解, 为“自然的因果” (Sander, 1991a), 本文采纳此说而译为“发育成因学”。

注 4: 胚胎和解剖学家 Gustav Jacob Born 为物理学家 Max Born (1882-1970) 之父。

注 5: 华盛顿大学的德裔美国科学家 Viktor Hamburger 于 1988 年很好地总结了 Spemann 的工作, 但未提到 Spemann and Mangold (1924) 原文引用的 Lewis (1907)。

注 6: Hilde Mangold 于 1921 年 23 岁生日当天与 Otto Mangold 结婚, 1923 年 2 月提交研究生论文, 其后与 Otto 合作做过更多实验, 包括怀孕期间, 实验记录于 1923 年 12 月儿子出生后停

止。不幸的是，1924年9月她在丈夫的农村老家因使用酒精炉为儿子准备食物，酒精外溢烧伤过重而去世(Fässler and Sander, 1996)，她的独子在二战中去世，丈夫 Otto Mangold 曾接任 Spemann 的职位，但二战后作为纳粹支持者被冷藏。

注 7: Spemann 不仅以自己的发现、而且通过一批学生(包括移民美国的 Holtfretter 和 Hamburger)，推动了欧洲和美国的发育生物学研究。他于 1935 年获诺贝尔奖，1941 年去世。

注 8: 李约瑟转行研究中国科技，最终与一些华人和非华裔学者合作写出 *Science and Civilization in China*。

注 9: Waddington 于 1942 年从原意为后成论的 epigenesis 衍生出 epigenetics 一词，当时他定义为“研究基因与其产物相互作用，导致表型产生的学科分支”，但基本涵义为发育，例如他于 1952 年出版《鸟的 epigenetics》一书叙述鸡的胚胎发育过程、而非遗传学。Epigenetics 经几重转用后成为今天的热门词汇“表观遗传学”。

### 参考文献

- Aristotle (384-322, BC) *De Generatione Animalium*, translated by Peck AL, Harvard University Press, 1942.
- Asashima M, Nakano H, Uchiyama H, Davids M, Plessow S, Loppnow-Blinde B, Hoppe P, Dau H, Tiedemann H (1990) The vegetalizing factor belongs to a family of mesoderm-inducing proteins related to erythroid differentiation factor (activin A). *Naturwissenschaften* 77:389-91.
- Bautzmann H, Holtfretter J, Spemann H, Mangold O (1932) Versuche zur Analyse der Induktionsmittel in der Embryonalentwicklung. *Die Naturwissenschaften* 20:971-974.
- Beetschen JC (1996) How did urodele embryos come into prominence as a model system? *International Journal of Developmental Biology* 40:629-636.
- Born G (1896) Über Verwachsungsversuche mit Amphibienlarven. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 4:349-465.
- Born J, Geithe HP, Tiedemann H, Kocher-Becker U (1972) Isolation of a vegetalizing inducing factor. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 353:1075-84.
- Born J, Hoppe P, Schwarz W, Tiedemann H, Tiedemann H, Wittmann-Liebold B (1985) An embryonic inducing factor: isolation by high performance liquid chromatography and chemical properties. *Biological Chemistry Hoppe Seyler* 366:729-35.
- Driesch H (1892) Entwicklungsmechanische Studien I. Der Werth der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermentwicklung. Experimentelle Erzeugen von Theil- und Doppelbildung. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 53:160-178.
- Endres H (1896) Anstichversuche an eiern von *Rana fusca*. 2. Theil: Ergänzung durch Anstichversuche an Eiern von *Rana esculenta*, sowie theoretische Folgerungen aus beiden Versuchsreihen. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 2:517-543.
- Fäßler PE (1996). Hans Spemann (1869-1941) and the Freiburg school of embryology. *International Journal of Developmental Biology* 40:49-57.
- Fässler PE and Sander K (1996) Hilde Mangold (1898-1924) and Spemann's organizer: achievement and tragedy. *Roux's Archive of Developmental Biology* 205:323-332.
- Fischer FG and Wehmeier E (1933) Zur kenntnis der Induktionsmittel in der Embryonalentwicklung. *Die Naturwissenschaften* 21:518.
- Fischer J-L (1990) Experimental embryology in France (1887-1936). *International Journal of Developmental Biology* 34:11-23.
- Geithe HP, Asashima M, Asahi KI, Born J, Tiedemann H, Tiedemann H (1981) A vegetalizing inducing factor. Isolation and chemical properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 676:350-6.
- Gerhart J, Danilchik M, Doniach T, Roberts S, Rowing B, Stewart R (1989) Intracellular signaling centers: their establishment and modes of action. *Development* 107:37-51.
- Gimlich RL and Cooke J (1983) Cell lineage and the induction of second nervous systems in amphibian development. *Nature* 306:471-473.
- Gimlich RL and Gerhart JC (1984) Early cellular interactions promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 104:117-130.
- Grainger RM, Henry JJ, and Henderson RA (1988). Reinvestigation of the role of the optic vesicle in embryonic lens induction. *Development* 102:517-526.
- Hamburger V (1988) *The heritage of experimental embryology: Hans Spemann and the organizer*. Oxford University Press, New York.
- Hamburger V (1997) Wilhelm Roux: visionary with a blind spot. *Journal of the History of Biology* 30:229-38.
- Harrison RG (1898) The growth and regeneration of the tail of the frog larva. Studied with the aid of Born's method of grafting. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 7:430-485.

- Hemmati-Brivanlou A and Melton DA (1994) Inhibition of activin receptor signaling promotes neuralization in *Xenopus*. *Cell* 77:273-281.
- Herlitzka A (1895) Contributo allo studio della capacita evolutiva dei due primi blastomeric nell'uovo di triton (*Triton cristatus*). *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 2:352-369.
- Hertwig O (1893) Über den Werth der ersten Furchungszellen für die Organbildung des Embryos. Experimentelle Studien am Frosch und Tritonei. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 42:662-07.
- Hill KA (1985) Hartsucker's homunculus: a corrective note. *Journal of the History of the Behavioral Sciences* 21:178-179.
- Jacobson M (1982) Origins of the nervous system in amphibians. In *Neuronal Development* (ed. Spitzer NC), pp. 45-99, Plenum Press, New York.
- Jacobson M (1983) Clonal organization of the central nervous system of the frog. III. Clones stemming from individual blastomeres of the 128-, 256-, and 512-cell stages. *Journal of Neuroscience* 3:1019-1038.
- Kimelman D, Kirschner M (1987) Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF- $\beta$  and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *xenopus* embryo. *Cell* 51:869-877.
- Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, Stachel SE, Economides AN, Stahl N, Yancopoulos GD and Harland RM (1993) Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* 262:713-718.
- Lewis WH (1904) Experimental studies on the development of the eye in amphibian. I. On the origin of the lens in *Rana palustris*. *American Journal of Anatomy* 3:505-536.
- Lewis WH (1906) Experimental studies on the development of the eye in amphibian. III. On the origin and differentiation of the lens. *American Journal of Anatomy* 6:473-509.
- Lewis WH (1907) Transplantation of the lips of the blastopore in *Rana palustris*. *American Journal of Anatomy* 7:137-143.
- Maienschein J (2008) Epigenesis and preformationism. Zalta EN (ed.), the Stanford Encyclopedia of Philosophy.
- McMahon AP and Moon RT (1989) Ectopic expression of the proto-oncogene *int-1* in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* 58:1075-1084.
- Meyer AW (1931) *Essays on the History of Embryology*. Palo Alto: Stanford University Press.
- Morgan TH (1894) The formation of the fish embryo. *Journal of Morphology* 10:419-473.
- Morgan TH (1895) Half embryos and whole embryos from one of the first two blastomeres of the frog's egg. *Anatomische Anzeiger* 10:623-628.
- Morgan TH (1897) *The development of the frog's egg: an introduction to experimental embryology*. MacMillan, New York.
- Morgan TH (1905) The relation between normal and abnormal development off the embryo of the frog: X. A re-examination of the early stages of normal development from the point of view of the results of abnormal development. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 19:588-614.
- Needham J (1959) *A History of Embryology*. New York: Abelard- Schuman.
- Needham J, Waddington CH and Needham DM (1934) Physico-chemical experiments on the amphibian organizer. *Proceedings of the Royal Society (London) B* 114:393-422.
- Nieuwkoop PD (1969a) The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. I. Induction by the endoderm. *Wilhelm Roux' Archive of Developmental Biology* 162:341-373.
- Nieuwkoop PD (1969b) The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. II. The origin of the dorso-ventral polarity of the mesoderm. *Wilhelm Roux' Archive of Developmental Biology* 163:298-315.
- Nieuwkoop PD (1970): The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. III. The vegetalizing action of the Li ion. *Wilhelm Roux' Archive of Developmental Biology* 166:105-123.
- Nieuwkoop PD and Ubbels GA (1972): The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. IV. Qualitative evidence for the purely "ectodermal" origin of the entire mesoderm and of the pharyngeal endoderm. *Wilhelm Roux' Archive of Developmental Biology* 169:185-199.
- Piccolo S, Sasai Y, Lu B and De Robertis EM (1996): Dorsal-ventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86:589-598.
- Rao Y (1991) *Molecular and genetic analyses of cellular communication in Drosophila neurogenesis*. Thesis at the University of California, San Francisco, California, USA.
- Rebagliati MR, Weeks DL, Harvey RP, Melton DA (1985). Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. *Cell* 42:769-777.
- Roux W (1888) Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo. Über die künstliche Hervorbringung halber Embryonen durch Zerstörung einer der beiden ersten Furchungskugeln, sowie über die Nachentwicklung (Postgeneration) der fehlenden Körperhälfte. *Virchows Archiv* 114:113-153. Translated in Benjamin William and Jane M. Oppenheimer (Eds), *Foundations of Experimental Embryology*, pp. 2-37, 1964, Hafner, New York.

- Roux W (1892) Ziele und Wege der Entwicklungsmechanik. *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 2:415-445.
- Sander K (1991a) Wilhelm Roux and his programme for developmental biology. *Roux's Archive of Developmental Biology* 200:1-3.
- Sander K (1991b) "mosaic work" and "assimilating effects" in embryogenesis: Wilhelm Roux's conclusions after disabling frog blastomeres. *Roux's Archive of Developmental Biology* 200:237-239.
- Sander K (1991c) When seeing is believing: Wilhelm Roux's misconceived fate map. *Roux's Archive of Developmental Biology* 200:177-179.
- Sander K (1992) Shaking a concept: Hans Driesch and the varied fates of sea urchin blastomeres. *Roux's Archive of Developmental Biology* 201:265-267.
- Sander K and Fässler PE (2001) Introducing the Spemann-Mangold organizer: experiments and insights that generated a key concept in developmental biology. *International Journal of Developmental Biology* 45:1-11.
- Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont LK and De Robertis EM (1994) Xenopus chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79:779-790.
- Smith JC (1987) A mesoderm-inducing factor is produced by Xenopus cell line. *Development* 99:3-14.
- Smith JC and Slack JMW (1983) Dorsalization and neural induction: properties of the organizer in *X. laevis*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 78:299-317.
- Smith WC and Harland RM (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos. *Cell* 70:829-840.
- Spemann H (1901a) Entwicklungsphysiologische Studien am Triton-Ei. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 12:224-264.
- Spemann H (1901b) Über Korrelationen in der Entwicklung des Auges. *Verhandlungen Anatomischen Gesellschaft* 15:61-79.
- Spemann H (1902) Entwicklungsphysiologische Studien am Triton-Ei. II. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 15:448-534.
- Spemann H (1903) Entwicklungsphysiologische Studien am Triton-Ei. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 16:551-631.
- Spemann H (1916) Über Transplantationen an Amphibienembryonen im Gastrulastadium. *Sitzungsberichte der Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin* 9:306-320.
- Spemann H (1918) Über die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo I-IV. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 43:448-555.
- Spemann H (1919) Experimentelle Forschungen zum Determinations- und individualitätsproblem. *Die Naturwissenschaften* 7:581-591.
- Spemann H (1920). Mikrochirurgische Operationstechnik. *Von E Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden* 2:1-30.
- Spemann H (1921). Über die Erzeugung tierischer Chimären durch heteroplastische embryonale Transplantation zwischen *Triton cristatus* und *Triton taeniatus*. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 48:533-570.
- Spemann (1924) Vererbung und Entwicklungsmechanik. *Die Naturwissenschaften* 12:65-79.
- Spemann H and Mangold H (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch, Implantation artfremder Organisatoren. *Archiv für Mikroskopische Anatomie Entwicklungsmechanik* 100:599-638. (translated as Spemann H and Mangold H (2001). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *International Journal of Developmental Biology* 45:13-38).
- Vogt W (1923) Morphologisches und physiologische Fragen der Primitiventwicklung, Versuche zu ihrer Lösung mittels vitaler Färbemarkierung. *Sitzungsberichte der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie in München* 35:22-32.
- Vogt W (1929) Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. II. Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 120:384-706.
- Waddington CH, Needham J and Needham DM (1933) Beobachtungen über die physikalisch-chemisch natur des organisators. *Die Naturwissenschaften* 21:771-772.
- Waddington CH (1942) The epigenotype. *Endeavour* 1:18-20.
- Waddington CH (1952) Epigenetics of Birds. Cambridge University Press.
- Weeks DL and Melton DA (1987). A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in Xenopus eggs codes for a growth factor related to TGF- $\beta$ . *Cell* 51:861-777.
- Wilson PA and Hemmati-Brivanlou A (1995) Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature* 376:331-333.

Zimmerman LB, De Jesús-Escobar JM and Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86:599-606.

### 阅读

Spemann H and Mangold H (1924). Über Induktion von Embryonalanlagen durch, Implantation artfremder Organisatoren. *Archive für Mikroskopische Anatomie Entwicklungsmechanik* 100:599-638. (translated as Spemann H and Mangold H (2001). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *International Journal of Developmental Biology* 45:13-38).

Nieuwkoop PD (1969) The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. I. Induction by the endoderm. *Wilhelm Roux' Archive of Developmental Biology* 162:341-373.