

#### 四、討論

首先，為了模擬胚胎的礦化，我們選擇負子蟾(*Xenopus laevis*)的卵細胞做為實驗材料，由於卵細胞為未受精狀態，所以不會進入各種不同的發育階段，對實驗觀察而言較為有利，並且由於細胞直徑達 1.0 ~ 1.3mm，對實驗操作與觀察而言也較為方便。

除此之外，我們認為由於 Briggs 的實驗是以生物體本身作為礦化的磷來源 (Briggs, 1993)，所以需要較長的時間讓微生物分解部分有機組織以釋放出磷與鈣後，再重新產生磷酸鈣結晶並於其他的生物組織中沈積下來。如此不但容易降低軟組織細胞內之細微結構保存潛力，也難以解釋像瓮安磷礦這樣大規模的生物礦化結果，因此決定根據其他磷礦沈積的相關推論，提供實驗系統額外的磷離子與鈣離子以進行礦化模擬。磷礦共以三百多種不同的化學形式存在 (Dorozhkin, 2002)，例如 octacalcium phosphate (OCP) 的化學式為  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、tetracalcium phosphate (TTCP) 的化學式為  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  等。我們從中選擇了 hydroxyapatite (HA) 做為沈積的種類，是由於其為磷酸鈣於水溶液中較為穩定的形式，化學式為  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Rodríguez-Lorenzo, 2000)。

一開始進行沈積時，是以海水作為溶液，置入卵細胞後同時加入  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NH}_4\text{OH}$  與  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  使其反應形成磷酸鈣，結束沈積後，以 EDS (energy dispersive spectrometer) 進行元素分析，目的是希望於細胞內先定性出 Ca 與 P 後再進行其他觀察。但這樣的作法始終無法測得 Ca 與 P 的訊號，因為我們發現  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NH}_4\text{OH}$  與  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  三者反應形成磷酸鈣的速度非常快，也就是說鈣離子與磷離子還來不及滲入細胞內時，就在細胞外反應形成磷酸鈣的結晶，而磷酸鈣的結晶顆粒並不能通過細胞膜，因此無法在蛙卵內部沈積下來。因此，找尋能讓礦物進入組織中的可行沈積模式便成為第一要件。

由於其他非磷礦沈積層的形成過程有較多的文獻可供參考，於是我們從一些珊瑚與貝類的黃鐵礦 (pyrite) 化石資料中瞭解到，一般認為這些化石形成的原因

是由於硫與鐵必須”分別”進入生物體，才能在其中形成黃鐵礦的沈澱物並將組織礦化下來(Berner, 1984)。故此，我們著手改變實驗中磷酸鈣的沈積模式，也就是讓鈣與磷能夠有機會分別滲透(diffuse)進入 oocyte 中以沈澱出磷酸鈣的晶體。因此，先於卵細胞所處的海水溶液中加入  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  與  $\text{NH}_4\text{OH}$  以提供鈣離子，在  $55^\circ\text{C}$  的烘箱中放置一個星期之後，再加入過量的  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  以提供磷離子，同樣靜置於  $55^\circ\text{C}$  中一個星期進行沈積，如此之後的元素分析才成功地定性出 Ca 與 P。(圖一)

在這裡提供高於鈣離子濃度的磷離子，目的是為了使其除了與在海水中的鈣離子形成磷酸鈣之外，還有額外游離的磷離子可進到 oocyte 內，與已經先滲透入 oocyte 裡面的鈣離子形成磷酸鈣以沈積下來。另外，依此化學方式可在  $25\sim 100^\circ\text{C}$  之間結晶出磷酸鈣，而選擇  $55^\circ\text{C}$  做為沈積的溫度，是根據文獻(肖金凱等人, 1997)推測早期寒武紀成磷時期的海水溫度約在  $50\sim 60^\circ\text{C}$  之間的緣故。

我們在元素分析所得到的結果(圖一)中除了測得磷與鈣的訊號外，還可看見氯的訊號，這是由於經過沈積後，依化學反應式得到的晶體為  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ，但其中  $\text{OH}^-$  容易被其他陰離子取代(最常見的為  $\text{F}^-$  及  $\text{Cl}^-$ ) 以形成較穩定的磷酸鈣晶格。所以這裡所測得的氯訊號應該是由於海水中大量的氯離子進入磷酸鈣的晶格中取代  $\text{OH}^-$  所致。

儘管如此，我們認為這時卵細胞中磷酸鈣晶體的量仍還不足以完全填充細胞結構，如卵內數量最多的蛋黃顆粒(yolk granules)，如此便無法達到複製與保存生物體型態的目的。故接下來的實驗目的，即是進一步增加磷酸鈣於細胞內的沈積量。

首先，我們認為細胞膜(plasma membrane)本身即是一種 barrier，其滲透性的高低將會決定能進入卵內的鈣、磷離子數目。為了增加細胞膜的通透性，我們利用一種非離子介面活性劑，Triton X-100 先行處理 oocyte，使其細胞膜的通透性(permeability)增加後，再以同樣方法進行沈積實驗，然後進行各項觀察。在石蠟切片染色(圖六)與穿透式電子顯微鏡(圖八)的觀察結果中發現，確實

在細胞膜的通透性增加後，能使較多的鈣、磷離子進入細胞內，進而在蛋黃顆粒中沈積出較多的磷酸鈣晶體。另外，由於含有大量生物化石的磷礦層中還可以再細分成許多層次，顯示沈積事件可能發生過很多次，因而增加了磷礦層和其中生物化石之密度的結果。因此我們也著手做了重複沈積的實驗，以觀察 oocyte 內部磷酸鈣礦晶的量是否有所增加。結果由穿透式電子顯微鏡可以看到，無論是否有先改變卵細胞的通透性，其蛋黃中的結晶量在沈積三次後，明顯較沈積一次的量多(圖九、圖十一)，放大觀察可看到晶體密度高低的明顯差別(圖十、圖十二)。

雖然穿透式電子顯微鏡可以用來於觀察卵細胞內的沈積情形，但所能觀察的切片數量畢竟有限，無法確實反應細胞內磷酸鈣之沈積量的多寡。因此若欲對入侵細胞內的磷酸鈣加以定量，則需藉助感應耦和電漿質普儀(ICP-MS)的分析。感應耦和電漿質普儀是一種極佳的微量多元素分析和同位素分析技術，具有快速、靈敏及低偵測極限的特性，對於評估環境與樣品中的金屬含量是一種理想的分析儀器。利用此分析方法，不僅可以使我們瞭解各種沈積條件是如何影響卵細胞內的礦化程度，更可以針對大量的樣品進行分析以減少誤差。質譜分析的結果(圖十三)說明在改變細胞通透性的實驗裡，當細胞通透性增加後，由於能沈積較多的磷酸鈣於其中，所以檢測出的磷濃度與鈣濃度也跟著上升。也就是說當細胞膜的通透性增加後，才能在一定的時間內使大量的磷酸鈣結晶沈積並填充於細胞內的組織，如此才足以達到初步將軟組織礦化下來而避免被微生物分解掉的目的。而在重複沈積的實驗中，藉由質譜分析(圖十四、圖十五)更可以清楚瞭解卵內磷與鈣的濃度在整個連續沈積的過程裡，顯著地隨著沈積次數而持續上升。不過我們也發現，改變卵的通透性後再進行重複沈積的效果並沒有特別顯著，我們認為這部分還需要再做實驗加以確定。不過可以肯定的是，短時間內的連續沈積的確可以使非常大量的磷酸鈣礦晶在細胞中沈積下來，而足以使日後展現良好的保存效果。

事實上，在我們的實驗中並無特別使整個沈積系統控制於厭氧下，雖然過程

中有較大的 pH 值變化(加入  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  與  $\text{NH}_4\text{OH}$  時上升至 9~10 間，後加入  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  時下降至 4~5 間)與溫度變化(升溫至  $55^\circ\text{C}$ )可能會短暫抑制微生物對卵細胞的分解作用，但就長時間來看，只有在礦化過程之初即大量與快速的將組織礦化下來，才能提供卵細胞足夠的保護以免於被分解。而從我們的實驗看來，細胞膜通透性的增加與重複沈積，的確均有助於使大量的礦物在短時間內入侵組織中，以達到複製與保護組織型態的目的。

除此之外，從我們的各項觀察結果中可以發現，磷酸鈣晶體沈積的位置幾乎均集中於蛋黃顆粒中。這是因為蛋黃顆粒裡充滿許多有機巨分子，包括各種能於發育過程中提供營養的醣蛋白、脂蛋白，和各種具有不同功能性的酵素等，而磷酸鈣晶體在此沈積下來，即是無機礦物和蛋黃顆粒中高密度的有機分子交互作用的結果，如此不但抑制了一些具分解性功能之酵素的活性，礦物晶體也將各種蛋白質、醣類及脂質給包裹保護起來，因而達到維護細胞內組織結構和型態之良好性的功能。

由於胚胎化石展現了不同的卵裂時期，且其內部細微結構皆相當明確，在被礦化前似乎沒有遭受嚴重的微生物分解，看起來更像是在活生生的情況下即被磷酸鈣入侵礦化下來，隨之而來的埋藏亦幫助其免受微生物分解和其他生物干擾。我們推測，如果這些胚胎的礦化僅由單一次的沈積與埋藏所完成，或是距離下一次的沈積作用時間間隔太長，那麼勢必需要某種原因來大大地改變這些胚胎的細胞通透性，也許是當時海底火山爆發所噴射出的特定化學物質改變了胚胎的通透性，使大量的礦物入侵其中並將細微結構都礦化下來，以避免日後的微生物分解。或者是短時間內曾發生多次重複沈積的地質事件，當時的磷來源可能來自長年累積於沈積層中的無機磷，由連續火山爆發的噴發物所帶出，不斷使愈來愈多的磷酸鈣結晶於組織內沈積下來而完成礦化。也可能兩種因素均同時存在，例如這些胚胎的通透性先是受到改變，使大量磷酸鈣入侵其內以完成初步礦化，並於往後長期的歲月中經由多次沈積作用而大大增加了磷礦層和其中生物化石的密度，因而展現良好的保存效果。



將來，也許還需要一些工作以進一步探討磷酸礦化的機制。在細胞膜通透性方面，可以藉助地質化學的知識以尋找當時環境中可能改變細胞通透性的因素。例如，海水中氯的含量相當高，約有 19.353 g/Kg，而鈣的含量也有 0.412 g/Kg，是否當時可能以氯化鈣( $\text{CaCl}_2$ )的形式存在，在突發的地質事件中被大量釋放出來，並且因而改變了瓮安生物群之細胞膜的通透性，正如目前我們將之運用於增加細胞膜通透性以利傳送核酸，隨後的磷酸礦化便將細微的生物結構給複製保存下來；另外，由於磷酸鈣存在的形式眾多，其形成的化學途徑與方法也有所不同，而我們只是藉由其中一種化學方式（即 hydroxyapatite）進行礦化的模擬，也許經由其他方式還可以找到相異的生物礦化成因。例如，另一種產生磷酸鈣 octacalcium phosphate(OCP)的化學方式是靠改變溶液的 pH 值以發生沈澱作用 (Liu, Y. et al., 2004)，如能以此方法進行沈積的模擬，也許可以推測是否由於遠古時曾發生某地質事件或氣候變異，造成海水 pH 值的改變，因而發生大規模的沈積作用並將其生物礦化保存下來，如此均可增加推論上的多元性。

當瓮安化石於五億八千多萬年後再度呈現於我們眼前時，引起我們對其礦化機制的興趣，藉由實驗而提出了兩種可能幫助礦化的因素，即增加細胞通透性和短時間內連續沈積。當然，我們相信石化過程也許更為複雜，必須在各種有利於化石形成的條件都存在並互相配合下才得以完成。希望往後有更多的證據與實驗，能幫助我們再進一步瞭解這種大自然記錄地球歷史的寫作手法。