

外套膜上皮细胞与组织块的离体珍珠囊形成试验

陈永富, 钱国英

(浙江万里学院, 浙江 宁波 315100)

摘要:通过对三角帆蚌外套膜上皮组织块培养和上皮细胞培养在包硬核、无包硬核的情况下的钙代谢进行比较分析,用偏光显微镜观察。结果发现,外套膜上皮组织块、上皮细胞在有硬核时与对照的无硬核培养钙含量无明显差别,外套膜组织块经培养迁移和增值,能形成珍珠囊的上皮细胞,其结缔组织细胞共同围绕珍珠囊上皮细胞组成完整的珍珠囊。偏光显微镜下能观察到双折射现象,表明产生由碳酸钙结晶形成的片层叠加构成珍珠质。该研究进一步探讨了体外培育珍珠(试管珍珠)的技术,为试管珍珠的研究提供了实验依据。

关键词:外套膜;硬核;钙含量;珍珠囊

中图分类号:S968.31⁺6 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2009)01-0074-04

珍珠是由珍珠贝体内珍珠囊(pearl-sac)的一种分泌物形成的,而珍珠囊是珍珠贝外套膜的上皮细胞受到刺激以后急剧增殖逐渐包围刺激原而形成(施志仪等,2007;邱安东和石安静,1999),因此珍珠贝的外套膜在珍珠形成中起着重要的作用。根据珍珠囊形成的原理,运用现代组织与细胞培养技术及生物工程技术,体外培养珍珠囊,插囊育珠,以进一步进行体外培育珍珠(试管珍珠),也许是从根本上提高珍珠质量和产量的有效方案,其中外套膜的组织和细胞培养是开展这些新的育珠方法最基本的前提。

国内外已开展了一些对珍珠贝外套膜的组织培养工作。Machii(1968)早在20世纪60年代末期就对海产的马氏珠母贝(*Pinctata martensii*)外套膜组织培养进行了研究,培养的外套膜组织在体外存活了30 d左右;石安静等(2002)在80年代初期对我国的淡水珍珠蚌三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)、褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)和背角无齿蚌(*Anodonta noodiano*)的外套膜组织进行了研究。王爱民等(2000a)从90年代中期一直对马氏珠母贝的外套膜组织培养开展研究,比较成功地培养了外套膜组织,同时初步培养出了体外珍珠囊,并进行插囊育珠移植实验。至于珍珠贝外套膜的细胞培养,Awaji M & Suzuki T(1998)曾用分散酶(dispace)消化珍珠贝外套膜而分离到上皮细胞,并进行了培养研究。本试验旨在通过体外对淡水育珠蚌外套膜的组织培养

和细胞培养,在包硬核和无包硬核的不同情况下的钙代谢进行比较分析,判断外套膜细胞分泌珍珠质的能力,在偏光显微镜下观察珍珠囊晶体的形成,探索体外形成珍珠囊机理,为培育优质珍珠提供科学思路。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)购于浙江省诸暨市山下湖镇淡水珍珠养殖场,为1~2龄的育珠贝。本实验采用的PRMI-1640、小牛血清为GIBCO公司产品。

1.2 培养液

1.2.1 平衡盐溶液的配制 按陈礼明等(2001)的方法配制平衡盐溶液。

1.2.2 胰蛋白酶消化液的配制 按王爱民等(2000b)的方法配制,胰蛋白酶消化液用国产胰蛋白酶制备,浓度为0.3%,pH值7.2~7.4,消化温度为25℃,消化时间20 min。预配好的胰蛋白酶消化液经0.22 μm除菌膜进行除菌处理后再使用。

1.2.3 完全培养液的配制 RMI-1640 10.4 g/L, Hepes 2.7 g/L,加珍珠贝体液10.0 mL/L,灭活小牛血清200 mL/L,青霉素100 000 IU/L,链霉素100 000 IU/L,pH 7.2。

1.2.4 钙离子溶液浓度 唐敏和石安静研究发现(2000),在不同的钙离子浓度下,I组 3.15×10^{-3} mol/L、II组 4.05×10^{-3} mol/L、III组 7.75×10^{-3} mol/L、IV组 1.32×10^{-2} mol/L,III、IV组都属于较高钙离子组,钙离子浓度与体液相近或稍高时,随着组织培养时间的延长,结缔组织中钙球体的数量明

收稿日期:2007-11-29

基金项目:浙江省农业科技重大攻关项目(2006C22030)。

作者简介:陈永富,1965年生,男,浙江绍兴人,讲师,主要从事细胞生物学与免疫的教研工作。E-mail:cyf@zwu.edu.cn

显增加,但当钙离子增加($7.75 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$)并到一定极限($1.32 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$)后,钙球体的数量反而大大减少,从而确定实验用的培养液的钙离子溶液浓度为 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$,用 CaCl_2 进行配制。

1.3 方法

1.3.1 外套膜上皮组织块培养方法 选取健康、生活力强的三角帆蚌,将蚌壳用肥皂水洗刷干净,然后切断闭壳肌,剪下外套膜,以自来水和双蒸水反复洗涤,再浸入以双蒸水配制的0.01%高锰酸钾溶液中30 min进行初步消毒。将边缘膜取出,立即浸入事先配好的抗菌溶液(青霉素4 000 U/mL,链霉素5 000 U/mL)中,浸泡15 min,再用抗菌溶液反复洗涤数次,最后用已灭菌的双蒸水洗2~3次。将边缘膜放入已消毒的培养皿中,用脱脂棉尽量吸干液体,再用已消毒的双面刀片切除色线部分,余下的切割成 1 mm^2 左右的小片,在每个培养瓶内贴20~30片,将5 mL培养基加在培养瓶未贴组织片的一面,放入27℃的 CO_2 培养箱中培养24 h,然后将培养瓶翻向,使培养基完全浸没组织片,继续培养。

1.3.2 外套膜上皮细胞培养方法 按上法获得组织块,再以撕膜法剥制外套膜外表皮,将其用抗菌溶液反复洗涤,再用已灭菌的双蒸水洗2~3次。将已获得的外套膜外表皮置于已消毒的玻璃皿中,用消毒过的单面刀片轻轻刮去内表皮和一部分结缔组织并切割成 1 mm^2 左右的小块,将组织块放入1个培养瓶中,加入适量浓度为0.3%的胰蛋白酶消化液,在pH值7.2~7.4和温度27℃条件下消化20 min,再移置离心管中,以1 000 r/min的速率离心5 min,将上清液倒去,加入平衡盐溶液离心2 min,重复操作3次,加入培养基移入培养瓶中,再加入1 mL河蚌自身血清,置于25℃的 CO_2 培养箱中,每5~6 d更换1次新鲜培养基,一直传至5代。

1.3.3 外套膜上皮组织块包硬核培养方法 与外套膜上皮组织块培养方法同样,另在每个培养瓶里放入3~5个硬核再进行培养。

1.3.4 外套膜上皮细胞包硬核培养方法 与外套膜上皮细胞培养方法同样,另在每个培养瓶里放入3~5个硬核再进行培养。

1.3.5 分析方法

1.3.5.1 培养物组织细胞生长与分泌物观察 每隔5 d将培养瓶中的组织块、细胞及培养液分别倾出,一部分倾出的组织块和细胞用来继续传代培养;另一部分在倒置显微镜和偏光显微镜下观察其组织

细胞的形态与生长状况、双折射现象,照相记录。

1.3.5.2 钙含量的测定 珍珠的主要组成物质是碳酸钙(CaCO_3),因此要比较分析外套膜上皮组织块和外套膜上皮细胞在不同情况下钙代谢的差异,将培养外套膜组织块和外套膜细胞每隔5 d倾出的培养液,采用EDTA法测定钙离子含量。

2 结果

2.1 倒置显微镜下观察

在培养过程中发现,外套膜组织块能很好地贴壁,而且贴壁比较牢固;与此相比较,细胞培养组的细胞能贴壁,但贴壁不牢固,有时甚至出现新生细胞不贴壁,从而悬浮于培养液中的情况。培养细胞在培养瓶中呈不均匀的岛屿状分布。

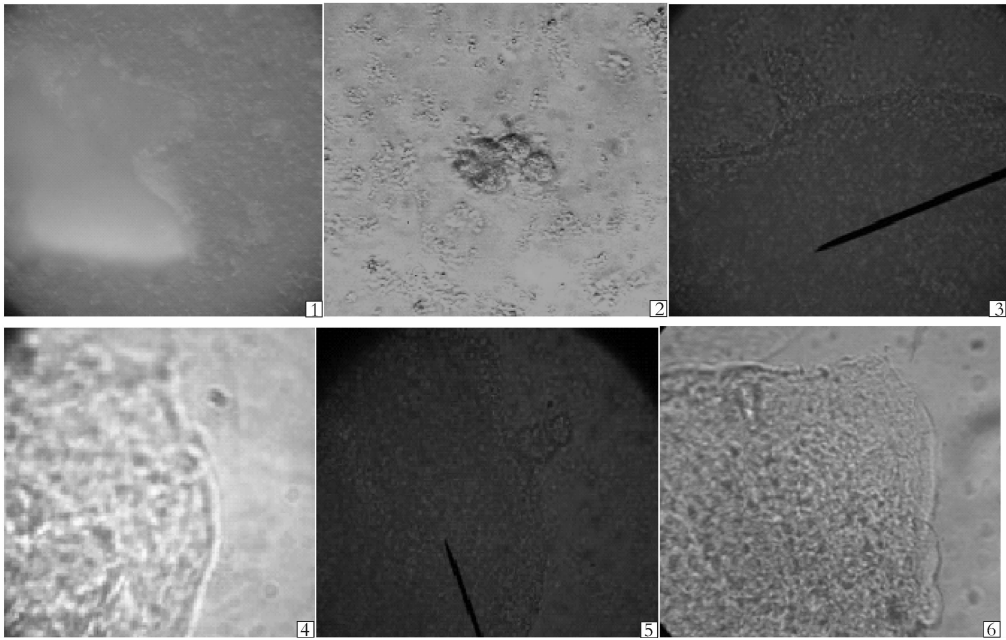
在倒置显微镜观察下发现,培养后第5天,组织块培养组的组织块很疏松,边缘由内而外有较多的细胞游离出来(图1-1),而细胞培养组的细胞略有增加(图1-2);第10天,组织块培养组的组织块已变成茶褐色,生长晕上的细胞排列紧密而且细胞生长旺盛(图1-3),而细胞培养组的细胞没有大量增殖的迹象(图1-4),第15天,组织块培养组在组织块边缘已形成明显层片的膜状结构(图1-5),而细胞培养组的细胞数目有所增多且有分裂现象(图1-6)。

2.2 偏光显微镜下观察

外套膜组织培养到第5天,组织块与细胞在偏光显微镜下尚未有双折射现象。第10天部分细胞内含颗粒物质,有一定的分泌能力,但分泌的颗粒较少、且微小,在偏光显微镜下见到少量微弱的结晶体存在的双折射现象(图2-1);外套膜培养到第15天,培养瓶底能见到一些颗粒状物质,数量已增多,在偏光显微镜下能观察到双折射亮点,亮度较强(图2-2);培养到第20天,在培养底面的颗粒物质有一定增加,颗粒大小也不一样,在偏光显微镜下为双折射亮点,亮度有强有弱,同第5天的相比,在培养到第20天的培养瓶中,分泌物有一点增加,颗粒也变大(图2-3)。培养到第25天的培养瓶底积聚大量的颗粒状物质,大小不等,分布不均匀,在偏光下,双折射现象的亮度不均匀,亮点不连续,但能显出成块的轮廓(图2-4)

2.3 不同培养方法营养液中钙含量的测定

外套膜不同培养方法营养液中钙含量的测定见表1。

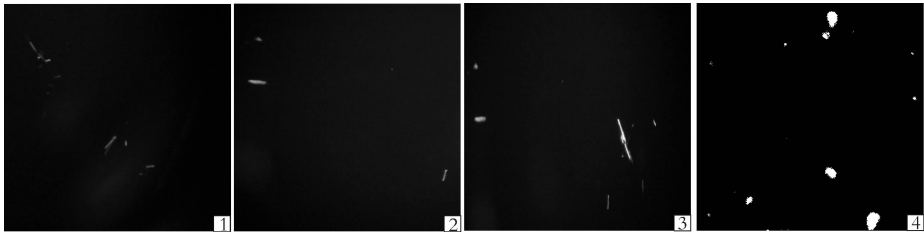


1. 培养到 5d:组织小片;2. 培养到 5d:细胞 ;3. 培养到 10d:组织块;4. 培养到 10d:细胞;5. 培养到 15d:组织块;6. 培养到 15d:细胞

图 1 不同培养时期的组织块和细胞 (×400)

1. after 5 days;tissue; . 2. after 5 days;cell ;. 3. after 10days;tissue;4. after 10 days;cell ;. 5. after 15 days;tissue ;6. after 15 days;cell

Fig.1 Tissue and cells of differential culture period (×400)



1. 培养到 10d,少量晶体的微弱双折射;2. 培养到 15 d,双折射现象;

3. 培养到 20 d,亮度、大小不一的双折射现象;4. 培养到 25 d,块状双折射现象。

图 2 组织培养物不同时期的双折射现象 (×400)

1. after 10days, A small amount of crystal weak birefringence;2. after 15days, Birefringence phenomenon;

3. after 20days, Brightness, large and small in the birefringence;4. after 25days, Massive birefringence phenomenon.

Fig.2 Birefringence of tissue culture in different periods(×400)

表 1 外套膜培养液中钙含量的测定 mg/L				
Tab.1 Mantle nutrient fluid calcium content determination record				
培养 代数	组织 块组	细胞组	组织块 + 硬核组	细胞 + 硬核组
generations	tissue groups	cell groups	tissue + hard core groups	cell + hard core groups
1	172. 80	194. 40	172. 80	189. 60
2	164. 95	175. 36	158. 32	168. 32
3	197. 32	213. 45	235. 36	221. 34
4	214. 32	221. 36	241. 35	231. 34
5	241. 22	224. 35	263. 35	243. 25

3 分析与讨论

经过第 1 次原代培养后,上皮组织块(或包硬

核)、上皮细胞(或包硬核)钙离子浓度相差不大,说明三角帆蚌外套膜上皮组织块和外套膜上皮细胞、外套膜上皮组织块包硬核和外套膜上皮细胞包硬核、外套膜上皮组织块和外套膜上皮组织块包硬核、外套膜上皮细胞和外套膜上皮细胞包硬核在体外培养条件下,分泌珍珠质的能力大体相同;同样,经过第 2 次到第 5 次传代培养也得出同样的结果。

在倒置显微镜观察下发现,组织块培养组随着时间的推移,其边缘由内而外有较多的细胞游离出来,这种最先迁移出来的细胞是颗粒细胞和透明细胞,具有伪足和棘突,能伸展,向四周运动,随即分泌构成生长晕上的细胞是上皮细胞,排列紧密而且细胞生长旺盛,具有形成珍珠囊的能力。外套膜上皮

细胞经迁移和增值能形成珍珠囊的上皮细胞,其结缔组织细胞共同围绕珍珠囊上皮细胞组成完整的珍珠囊。而细胞培养组随着时间的推移,细胞数目有所增多且有分裂现象,但没有组织块的生长速度快。说明组织块的生长速度要优于上皮细胞的生长。

通过原代培养得到的溶液中,钙的含量比原培养液中的减少,因为供应外套膜组织存活需要一定的营养成分,外套膜组织会吸收培养液中的钙来存活,并且生长;但传代培养中的数据高于原来钙浓度,因为外套膜存活后就会象正常存活的河蚌中的外套膜组织一样,具有旺盛的钙质吸收和分泌能力,使培养液中钙离子增加。这与唐敏和石安静(2000)研究得出的外套膜外表皮细胞钙的分泌是一致的。

外套膜组织培养到后期 25 d 同前期相比,分泌物增加,颗粒也变大。培养瓶底积聚一定量的颗粒状物质,在偏光下,双折射现象的亮度不均匀,亮点不连续,但能显出成块的轮廓,表明外套膜上皮细胞的分泌作用是逐渐增强,双折射现象明显增强,说明成核和结晶的生长是由外套膜上皮细胞合成的特殊有机化颗粒引起的,针状的结晶放射状地从有机核中心生长,形成小球,是一种弱碱性的蛋白质,上皮细胞排出的钙以碳酸钙的形式逐渐沉积,并与细胞合成的蛋白质共同形成石结晶(王爱民等,2003),而外套膜上皮细胞经迁移和增值能形成珍珠囊的上皮细胞,其结缔组织细胞共同围绕珍珠囊上皮细胞

组成完整的珍珠囊。

参考文献:

- 陈礼明,黄伟滨,叶新,等. 2001. 河蚌外套膜外表皮细胞培养[J]. 水利渔业, 21(6):9-10.
- 邱安东,石安静. 1999. 三角帆蚌珍珠囊细胞的分泌活动[J]. 水产学报, 23(2):115-121.
- 施志仪,李巍,李松荣,等. 2002. 三角帆蚌外套膜细胞培养与组织培养的比较[J]. 上海水产大学学报, 11(1):27-30.
- 施志仪,杨显祥,李勇,等. 2007. 体外培养三角帆蚌外套膜细胞的生物学特性及有核珍珠培育[J]. 中国水产科学, 14(1):149-154.
- 唐敏,石安静. 2000. 圆背角无齿蚌离体培养的外套膜组织钙代谢[J]. 水生生物学报, 24(1):86-89.
- 王爱民,阎冰,苏琼,等. 2003. 培养马氏珠母贝外套膜上皮细胞分泌物的分析[J]. 农业生物技术学报, 11(3):285-290.
- 王爱民,苏琼,阎冰,等. 2000a. 马氏珠母贝外套膜组织培养[J]. 广西科学, 7(2):135-139.
- 王爱民,阎冰,苏琼,等. 2000b. 马氏珠母贝珍珠囊体外培养及插囊育珠[J]. 广西科学, 7(1):70-74.
- Awaji M & Suzuki T. 1998. Monolayer formation and DNA synthesis of the outer epithelial cells from pearl oyster mantle in coculture with amebocytes[J]. In Vitro Cell Der Biol Anim, 34(6):486-491.
- Machii A. 1968. Histological studies on the pearl-sac formation[J]. Ball Natn Pearl Res Lab, 13:1 489-1 539.

(责任编辑 万月华)

Studies on the Formation of Pearl-sac in Vitro of Epithelial Cells and Tissue from Mantle

CHEN Yong-fu, QIAN Guo-ying

(Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

Abstract: By using polarizing microscope, the calcium metabolism of the cultured epithelial tissue and cells with hard nucleus-insertion or not of the mantle from *Hyriopsis cumingii* had been analyzed. The results showed that no differences in the calcium content were found between two different conditions. Whereas, the cultured mantle tissue proliferated and evolved to the epithelial cells of pearl-sac, the integrated pearl-sac was formed by the approach of the connective tissue encircling the epithelial cells of pearl-sac. Otherwise, birefringence phenomena was observed, which indicated that the calcium carbonate crystal made up of the nacre through lamellar accumulation. The study also discussed the technique of pearl culture in vitro (Tube pearl), which provided the data for the further experiments.

Key words: mantle; hard nucleus; calcium content; pearl-sac