

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19283

三角帆蚌不同蚌龄外套膜细胞的增殖能力及其矿化功能

曹玉香^{1, 2, 3}, 陆阿利^{1, 2, 3}, 李文娟^{1, 2, 3}, 施志仪^{1, 2, 3}, 陶家康^{1, 2, 3}

1. 上海海洋大学, 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306;
2. 上海海洋大学, 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306;
3. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306

摘要: 研究了淡水珍珠贝——三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)在不同蚌龄下外套膜组织的细胞增殖及生物矿化相关因子活性。选择 5 组不同蚌龄三角帆蚌(0.5 龄、1 龄、2 龄、3 龄、4 龄), 通过流式细胞技术分析了外套膜细胞的增殖指数(proliferation index, PrI)和胞内 Ca^{2+} 浓度, 并应用实时荧光定量 PCR 检测了与生物矿化相关的碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)基因的表达并测定其酶活性。结果表明, 2 龄蚌的外套膜细胞 PrI 及胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于其他蚌龄($P < 0.05$); 生物矿化相关基因在不同蚌龄的外套膜组织中表达量不同, 1 龄三角帆蚌 CA 基因表达量和 CA 酶活性最高($P < 0.05$), ALP 基因表达量和 ALP 酶活在 0.5 龄三角帆蚌中显著高于其他蚌龄($P < 0.05$)。本研究旨在深入探讨三角帆蚌外套膜细胞增殖能力及人工育珠过程中供体蚌的选择奠定基础。

关键词: 三角帆蚌; 外套膜; 细胞增殖; 矿化功能; Ca^{2+} ; 碳酸酐酶; 碱性磷酸酶

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)05-05160-08

中国淡水珍珠养殖产量持续位居世界第一^[1], 三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是中国最主要的淡水育珠蚌之一^[2], 国内超过 80%淡水珍珠产自三角帆蚌^[3], 该物种在淡水珍珠养殖中占据重要的战略和经济地位。

珍珠(无核珍珠和有核珍珠)培育过程均需将供体蚌外套膜外表皮制成约 0.5 cm^2 的小片, 将小片或包裹珠核的小片植入到受体蚌外套膜内外表皮之间, 被移植的外套膜小片的上皮细胞经过迁移、增殖形成珍珠囊, 继而分泌珍珠质形成珍珠^[4]。研究表明, 珍珠培育进程中提供小片的供体蚌(制片蚌, donor mussel)在人工育珠过程中发挥着重要的作用^[5]。三角帆蚌的壳色不仅影响到蚌体的生长和选育^[6], 在育珠过程中供片蚌贝壳珍珠质的颜色对所培育的珍珠也有很大影响^[7-8]。将不同年龄的三角帆蚌做供体蚌, 所培育的珍珠颜色也

不相同^[9]。

外套膜是珍珠培育不可或缺的组织, 其主要功能是参与生物矿化。目前, 关于珍珠贝类外套膜细胞活性的研究主要集中在原代培养方面, 靳雨丽等^[10]和李倩等^[11]分别对 1 龄和 2 龄三角帆蚌的外套膜细胞进行体外培养, 对其培养基成分进行了优化和改良, 为后期外套膜细胞建立细胞系奠定了基础; 魏育红等^[12]提出光照可以促进二龄褶文冠蚌(*Cristaria plicata*)外套膜外表皮细胞增殖, 这为外套膜细胞的传代提供了研究基础。孔玮等^[13]发现添加细胞因子可以延长 3 龄合浦珠母贝外套膜细胞培养时间, 增强细胞活性, 还可促进矿化相关基因的表达。以上文献均对单一蚌龄外套膜细胞培养过程中细胞增殖活性进行研究, 但对不同蚌龄外套膜细胞的增殖活性的系统性研究未见报道。

收稿日期: 2019-10-25; 修订日期: 2019-12-04.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201991); 国家重点研发计划项目(2018YFD0901406).

作者简介: 曹玉香(1993-), 女, 硕士研究生, 从事水生动物细胞分子生物技术研究. E-mail: yxcao77@126.com

通信作者: 施志仪, 男, 教授. E-mail: zyshi@shou.edu.cn

细胞增殖是生物体重要的生命特征, 细胞以分裂的方式进行增殖, 随着激光技术和荧光染料的发展, 流式细胞技术可以简单快速地检测细胞DNA的含量以及各周期细胞群体的数目^[14-15], 分析细胞增殖指数(proliferation index, PrI)。本研究选择5组不同蚌龄三角帆蚌, 将外套膜细胞增殖快的适龄蚌作为人工育珠的供体蚌, 以期缩短育珠周期。

贝壳和珍珠都是贝类进行钙代谢后最终以碳酸钙结晶形式沉积而成的矿化产物^[16], 因此细胞内钙离子的含量影响珍珠质的沉积速度。刘晓军等^[17]研究提到影响珍珠大小最主要的因素是珍珠囊中的CaCO₃的沉积速率, CaCO₃的沉积速率越快, 则相同生长周期的珍珠越大, 珍珠层越厚。通过检测细胞内Ca²⁺浓度探究不同蚌龄三角帆蚌摄取钙离子的能力, 对三角帆蚌生物矿化的研究具有重要意义。此外, 珍珠和贝壳矿化形成的过程中, 受到碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)、碱性磷酸酶(alkaline Phosphatase, ALP)等生物矿化关键酶的调控作用。

本研究从供体蚌着手, 选择5组不同蚌龄的三角帆蚌, 探讨不同蚌龄外套膜细胞增殖和生物矿化的活性, 旨在探讨选择外套膜细胞增殖能力快、生物矿化能力强的适龄蚌作为人工育珠的供体蚌的方法, 为人工育珠缩短育珠周期以及三角帆蚌外套膜细胞培养提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

三角帆蚌选购于湖南省常德市养殖地, 选取喷水有力、大小均一、体质健康的0.5龄、1龄、2龄、3龄、4龄三角帆蚌饲养于实验室养殖缸内, 以豆浆投喂并24 h不断充氧, 每两天换一次经过曝气的自来水, 暂养14 d后, 进行下一步实验。

1.2 实验方法

1.2.1 外套膜细胞的获取 取以上不同蚌龄三角帆蚌各8只, 转至含20 mg/L青-链霉素双抗水中暂养48 h后, 断裂闭壳肌并采集外套膜组织。首先将100×三抗试剂(青霉素、链霉素、两性霉素B)稀释成1倍浓度, 然后利用1×PBS配制分别含

有2%三抗、10%三抗、20%三抗的梯度缓冲液, 分别将不同蚌龄的外套膜组织按照梯度2%→10%→20%→10%→2%震荡清洗各5 min。之后将外套膜剪碎至1 mm², 加胰蛋白酶, 然后放于4℃冰箱过夜消化, 终止消化后分别利用200目绢和400目绢的细胞网筛过滤组织块, 收集细胞悬液, 1000 r/min离心5 min, 弃上清, 获得细胞沉淀, 添加含10%胎牛血清的完全培养基并将细胞团块用移液枪吹打均匀后转移到培养皿, 密度调整为10⁵~10⁶/mL, 用于后续实验。

1.2.2 细胞周期检测 取以上处理的不同蚌龄的外套膜细胞, 分别加入预冷70%乙醇1 mL, 吹打均匀, 4℃过夜固定; 固定后的细胞1000 r/min离心5 min, 弃上清, 加1 mL 1×PBS重悬细胞, 1000 r/min离心5 min后弃上清, 加500 μL PI/RNase Staining Buffer (BD, 美国)染料, 每组4个重复, 混匀过滤, 避光孵育30 min; 采用Accuri C6 PLUS流式细胞仪(BD, 美国)收集荧光信号, 并通过Novo express 分析软件进行拟合分析, 检测细胞周期, 细胞增殖指数PrI=(S+G₂/M)/(G₀/G₁+S+G₂/M)。

1.2.3 细胞内Ca²⁺荧光强度的测定 取1.2.1消化的不同蚌龄外套膜细胞悬液, 每组4个重复, 加入5 μmol/L Fluo-3/AM(Abcam, 英国), 避光37℃振荡孵育45 min。然后, 收集细胞悬液用1×PBS-free Ca²⁺反复洗涤3次后重悬于1×PBS-free Ca²⁺中, 采用流式细胞仪FITC荧光通道(激发波长488 nm)检测荧光信号, 取每处理组1×10⁵个外套膜细胞荧光强度的平均值为测定值。

1.2.4 ALP和CA活性测定 取不同蚌龄外套膜组织(每处理组各4只)进行匀浆。ALP活性测定根据施志仪等^[18]的方法。ALP活力[金氏单位/g(prot)]=(OD_{测定}-OD_{空白})/(OD_{标准}-OD_{空白})×标准品浓度(0.1 mg/mL)÷待测样品中蛋白浓度[g(prot)/mL]。CA活性测定采用酶联免疫分析——双抗夹心法(晶抗生物, 上海)按照试剂盒操作说明进行分析。测定标准品OD值, 绘制标准曲线得出回归方程, 后计算不同蚌龄外套膜组织中CA的活性(U/L)。

1.2.5 ALP及CA基因表达分析 取以上不同蚌龄外套膜组织(每处理组各4只), 按照祁晓翔等^[19]

的方法进行总 RNA 提取和反转录, 根据 NCBI 数据库已公布数据进行三角帆蚌的 *EF1α*(GW694601)和 *CA* 基因(KX181539.1)引物设计, *ALP* 引物设计是根据本课题组已有的转录组数据库筛选并克隆部分 *ALP* CDS 区信息, 引物信息见表 1。使用 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad, 美国)采用双标准曲线法(以 *EF1α* 为内参基因)进行目的基因 *CA*、*ALP* 的定量实验。反应体系为 20 μL, 包括 10 μL 的 2×TB Green Premix Ex Taq II (Tli *RNaseH* Plus)、1.0 μL cDNA、上下游引物各 0.4 μL 和 8.2 μL ddH₂O。反应采用两步法: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s, 40 次循环并于每循环至 60 ℃ 采集荧光; 95 ℃ 到 65 ℃, 每降 0.5 ℃ (5 s)采集一次荧光并生成熔解曲线, 目的基因和内参基因的扩增效率(*E*)接近 100%, $R^2>0.99$, 结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据统计分析。

1.3 数据分析

所有数据均采用平均值±标准误($\bar{x}\pm SE$)表示, 不同样品间的差异分析利用 SPSS 19.0 软件中的 one-way 方差分析(ANOVA), 使用 Dunnett's multiple comparisons 进行差异显著性检验, $P<0.05$ 代表差异显著。采用 sigmaplot 12.5 软件进行作图分析。

表 1 用于三角帆蚌基因表达分析的引物信息
Tab. 1 Primers information for gene expression analysis of *Hyriopsis cumingii*

引物 primer	序列(5'-3') sequence
EF1α-F	GGAACCTCCAGGCAGACTGTGC
EF1α-R	TCAAAACGGGCCGCAGAGAAT
ALP-F	CTACCTGCTGGGTCTGT
ALP-R	TGCCTTTCGGGTCATTCT
CA-F	ATCTTGCTGGCATTCTTT
CA-R	CTCTCCATCGTGTCTTCGC

2 结果与分析

2.1 不同蚌龄外套膜细胞的 PrI

根据不同蚌龄外套膜细胞周期时相分布, 计算细胞增殖指数。结果如表 2 所示, 2 龄蚌外套膜细胞增殖指数显著高于其他蚌龄($P<0.05$), 其次是 1 龄蚌, 然后是 3 龄和 4 龄蚌, 且 3 龄和 4 龄差异不显著($P>0.05$), 0.5 龄蚌的 PrI 最低($P<0.05$)。2 龄和 3 龄蚌 S 期所占比例显著性最高($P<0.05$), 其次是 1 龄和 4 龄蚌, 且这两个蚌龄间 S 期所占比例差异不显著($P>0.05$), 0.5 龄蚌的 S 期占比最低($P<0.05$); 1 龄和 2 龄蚌 G₂/M 期蚌比例显著高于其他蚌龄($P<0.05$), 其次是 0.5 龄和 4 龄蚌, 3 龄蚌 G₂/M 期占比最低($P<0.05$)。

表 2 不同蚌龄三角帆蚌外套膜细胞周期时相分布和增殖指数

Tab. 2 Cell cycle phase distribution and proliferation indexes of mantle cells from *Hyriopsis cumingii* with different ages
 $n=4$; $\bar{x}\pm SE$

周期 cell cycle	蚌龄/a age of year				
	0.5	1	2	3	4
G ₀ /G ₁ /%	44.85±2.00 ^a	36.24±1.80 ^b	29.52±0.58 ^c	38.36±0.50 ^b	38.66±1.00 ^b
S/%	37.59±1.10 ^c	40±1.15 ^b	49.33±1.00 ^a	49.1±0.64 ^a	41.17±0.58 ^b
G ₂ /M/%	17.57±0.90 ^b	23.77±1.25 ^a	21.16±1.53 ^a	12.54±0.67 ^c	20.17±1.52 ^b
PrI	0.55±0.02 ^d	0.64±0.02 ^b	0.70±0.01 ^a	0.61±0.01 ^c	0.60±0.01 ^c

注: 同行肩标中不同字母代表显著性差异($P<0.05$).
Note: Different superscript letters in the same line represent significant differences ($P<0.05$).

2.2 不同蚌龄外套膜细胞内 Ca²⁺荧光强度

通过流式细胞检测不同蚌龄外套膜细胞内 Ca²⁺荧光强度, 随着养殖年限的增高其外套膜细胞的荧光数值呈现先增高后降低的趋势。如图 1 所示, 2 龄蚌的荧光值显著高于其他蚌龄($P<0.05$), 其次是 3 龄和 4 龄蚌, 且 3 龄和 4 龄蚌荧光值差异不显著($P>0.05$), 然后是 1 龄蚌, 0.5 龄蚌外套膜

细胞内 Ca²⁺荧光强度显著性最小($P<0.05$)。由细胞内钙离子浓度和荧光强度成正比可知, 2 龄蚌外套膜细胞内钙离子浓度最高。

2.3 不同蚌龄三角帆蚌 ALP 和 CA 的酶活力

不同蚌龄三角帆蚌 ALP 活力有显著差别($P<0.05$), 由图 2a 可知随着养殖年限的增高, 其 ALP 活力呈现逐渐降低的趋势。0.5 龄蚌外套膜

组织中 ALP 活力最高($P<0.05$), 且是其他蚌龄活力的 2 倍以上, 1 龄蚌与 2 龄、3 龄蚌的活力没有显著差异($P>0.05$), 4 龄蚌活力最弱, 但 4 龄蚌与 2 龄、3 龄蚌的活力差异不显著($P>0.05$), 4 龄蚌外套膜组织的 ALP 活力显著低于 0.5 龄和 1 龄三角帆蚌($P<0.05$)。

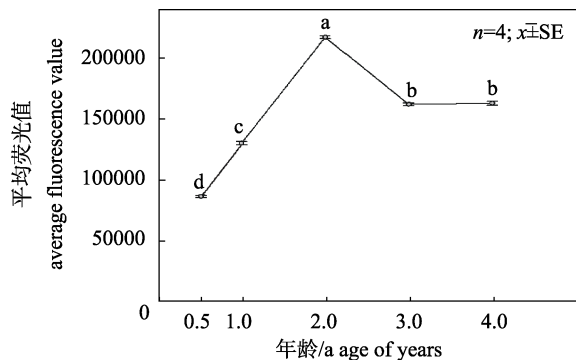


图1 不同蚌龄外套膜细胞内 Ca^{2+} 荧光强度变化
不同字母代表显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 1 The fluorescence intensity in mantle cells of *Hyriopsis cumingii* at different age of years
Different letters represent significant differences ($P<0.05$).

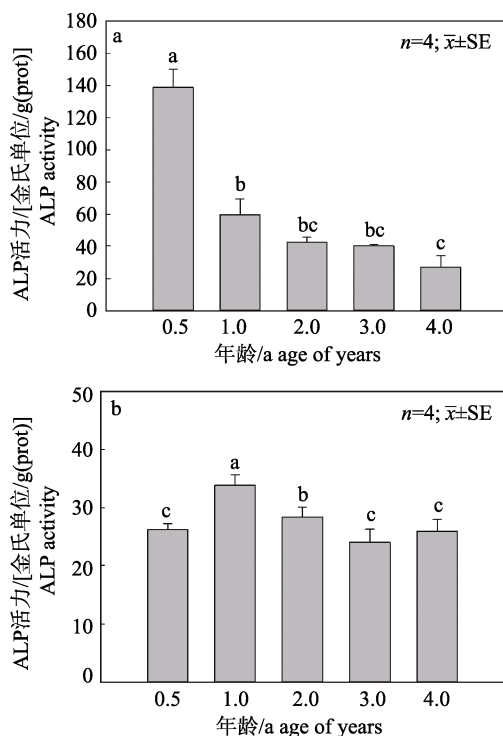


图2 不同蚌龄外套膜组织中碱性磷酸酶(a)和碳酸酐酶(b)活力的变化
不同字母代表显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 2 The activity of alkaline phosphatase (a) and carbonic anhydrase (b) in mantle tissue of *Hyriopsis cumingii* at different age of years
Different letters represent significant differences ($P<0.05$).

不同蚌龄的三角帆蚌外套膜组织 CA 活力如图 2b 所示, 随着蚌龄的增高, 其 CA 活力呈现先增高后降低并趋于平稳的趋势。1 龄蚌外套膜组织的 CA 酶活力显著高于其他蚌龄($P<0.05$), 2 龄蚌外套膜组织 CA 活力仅次于 1 龄蚌, 然后是 0.5 龄、3 龄、4 龄蚌, 且其 CA 活力差异不显著($P>0.05$)。

2.4 ALP 和 CA 基因在外套膜组织中的表达

qRT-PCR 检测发现, ALP 基因在不同蚌龄阶段外套膜组织中的表达水平存在显著差异($P<0.05$), 如图 3a 所示, 随着蚌龄的增高, 其 ALP 基因的表达水平呈现逐渐降低的趋势。ALP 基因在 0.5 龄蚌中表达量显著高于其他蚌龄($P<0.05$), 其次是 1 龄蚌, 然后是 2 龄蚌, 最后是 3 龄和 4 龄蚌, 且 3 龄和 4 龄蚌 ALP 基因表达水平差异不显著($P>0.05$)。

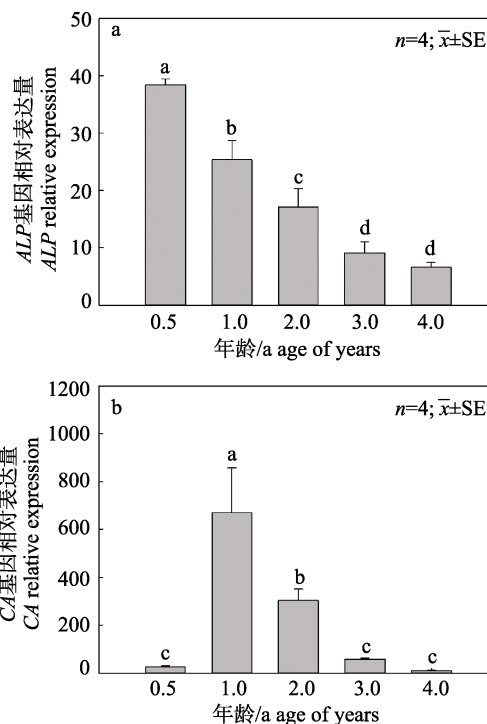


图3 不同蚌龄外套膜组织中碱性磷酸酶基因(a)和碳酸酐酶基因(b)基因的表达
不同字母代表显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 3 The expression of alkaline phosphatase gene (a) and carbonic anhydrase gene (b) in mantle tissue from *Hyriopsis cumingii* at different age of years
Different letters represent significant differences ($P<0.05$).

qRT-PCR 检测发现, 随着养殖年限的增高其 CA 基因的表达水平呈现先增高后降低并最后趋

于平稳的趋势(图 3b), *CA* 基因在 1 龄蚌中表达水平显著高于其他蚌龄($P<0.05$)且约为 2 龄蚌的两倍, 2 龄蚌 *CA* 基因在外套膜组织中的表达水平仅次于 1 龄蚌, *CA* 基因在 0.5 龄、3 龄和 4 龄蚌外套膜组织表达水平差异不显著($P>0.05$)且均显著低于 1 龄和 2 龄蚌($P<0.05$)。

3 讨论

产量和质量不平衡以及淡水无核珍珠培育周期长的问题, 是长期困扰珍珠产业的两大难题^[1]。目前, 中国的珍珠产业处于转型期, 这对珍珠培育提出了更高的要求, 科学选择供体蚌显然至关重要。生产上养殖珍珠的农户多选用低龄蚌制备供体小片^[20], 可能是导致以上问题的原因之一。不同年龄的供体蚌影响珍珠的颜色和珍珠质的沉积^[5]。本研究的结果显示 2 龄蚌外套膜细胞增殖活性和细胞内钙离子浓度均高于其他蚌龄, 推测选用 2 龄蚌作为供体可产生更好的育珠效果。研究结果为生产实践选择适宜蚌龄供片蚌以及提高珍珠生长及品质提供了生物学基础。

PrI 由 S 期和 G_2/M 期共同决定, 能够较好地反映整个细胞群体的增殖状态^[21], 处于 S 期和 G_2/M 期的细胞数越多, PrI 值越大, 则细胞增殖越活跃^[14, 22]。本研究中 2 龄蚌的 PrI 显著高于其他蚌龄($P<0.05$), 主要是因为 2 龄蚌 S 和 G_2/M 所占比例显著高于其他蚌龄($P<0.05$)。S 期主要进行 DNA 复制和有关蛋白质的合成, 一般处于增殖旺盛细胞的此时相比比例较高, G_2 期为细胞分裂前期, M 期为细胞有丝分裂期, 细胞增殖指数 $PrI = (S+G_2/M)/(G_0/G_1+S+G_2/M)$ 。运用流式细胞仪, 分选细胞周期^[15], 分析细胞增殖活性($S+G_2/M$)。研究结果初步证实, 并非蚌龄越小外套膜细胞增殖活力越大。生产上珍珠培育多采用低龄蚌制作小片, 可能是为了节约养殖成本, 但是结合本次研究结果, 选择 2 龄蚌作为供片蚌更有利于细胞增殖。

Ca^{2+} 作为珍珠质沉积矿化的重要成分, 在贝类形成珍珠和贝壳的过程通过外套膜内表皮从环境和食物中摄取而来^[23]。贝类 Ca^{2+} 的吸收、贮存、转运、分泌和沉积等代谢过程受到机体严格的调控^[24], 胞内 Ca^{2+} 的含量影响珍珠质的沉积速度。

李文娟等^[25]研究发现环境钙浓度在 1.25~3.0 mg/L 时有助于外套膜细胞内 Ca^{2+} 的贮存, 有利于 Ca^{2+} 的沉积。唐敏等^[16]论述了 Ca^{2+} 在外套膜腔液积累可加快碳酸钙晶体的成核和生长。本研究在保证养殖环境一致的前提下取材检测不同蚌龄外套膜细胞内 Ca^{2+} 平均荧光强度, 结果显示其平均荧光强度有显著差异($P<0.05$), 且 2 龄蚌细胞内 Ca^{2+} 平均荧光强度最高, 暗示了 2 龄蚌外套膜细胞摄取钙离子的能力强, 有利 Ca^{2+} 的贮存和沉积在矿化形成珍珠质的过程中具有显著优势。

ALP 在碱性条件下可以催化几乎所有的磷酸单酯生成正磷酸, 在羟基的参与下催化磷酸基团的转移^[26], 是参与生物矿化相关的重要物质。软体动物研究表明, ALP 与贝壳角蛋白等分泌相关^[27-28], 其表达水平代表着矿化相关细胞形成珍珠质的状况^[29]。在本研究中 ALP mRNA 在不同蚌龄的外套膜组织中都有表达, 且 0.5 龄和 1 龄蚌的 ALP 活性和基因表达均呈现较高的水平, 对马氏珠母贝^[30-32]、珠母贝^[33]、企鹅珍珠贝^[34]的研究表明, 贝壳长度的生长速度随着年龄的增加而下降, 第一年生长最快, 之后逐年下降, 这与 ALP 的表达结果基本一致, 故推测低龄(0.5~1 龄)蚌 ALP 主要功能为调节蚌壳长度的生长, 2 龄蚌 ALP 主要用于调节生物矿化形成珍珠质。

CA 是一种参与生物矿化的含锌的金属酶^[35-36]。Miyashita^[37]对马氏珠母贝中 *CA* 5'调控区进行了克隆和分析, 发现该基因在外套膜、闭壳肌、肝脏和斧足中均表达, 并参与外套膜的生物矿化作用。罗瑞红^[38]研究鉴定出一个新的 α -CA 基因 *HcCA₂*, 组织表达结果表明该基因主要在三角帆蚌外套膜内表达, 其他组织的表达量极低, 且在珍珠的形成过程中逐渐升高。这些研究证实了 *CA* 参与贝壳和珍珠矿化过程。本研究结果同样表明了 *CA* 基因在三角帆蚌外套膜中表达, 其中 1 龄和 2 龄蚌的 *CA* 基因的表达和活性都呈现较高的水平, 且 2 龄蚌的 *CA* 表达显著高于 3 龄、4 龄($P<0.05$)。顾志峰等^[34]研究发现, 年龄是影响双壳贝生长的重要因素, 第一年贝壳生长速度最快, 这与 *CA* 的表达结果一致。故 1 龄蚌 *CA* 的高表达主要用于调节贝壳的生长。2 龄蚌相对较高的表

达主要用于珍珠质的沉积。

ALP 和 CA 这两个生物矿化的关键酶, 在不同蚌龄阶段的外套膜组织中均有表达。在低龄阶段高表达, 而随年龄的增长表达能力逐渐下降。有关研究资料表明, 低龄阶段贝壳的生长速度较快, 故推测低龄蚌 ALP 和 CA 主要用于调节贝壳的生长相关的生理过程。综合 ALP 和 CA 的表达, 发现 2 龄蚌仅次于低龄蚌呈现持续的高表达。因此, 2 龄蚌也具有矿化优势。从取材的角度分析, 2 龄蚌的壳长、壳宽、壳高大于低龄蚌(1 龄、0.5 龄), 在撕取外套膜外表皮制备供体小片上也会更加方便。

综上所述, 关于三角帆蚌不同蚌龄外套膜细胞增殖能力及其生物矿化研究表明, 2 龄蚌外套膜细胞增殖活力和细胞钙离子荧光强度具有明显优势, 其 ALP 和 CA 的表达在珍珠质的形成上也具有优势。本研究可为生产实践上供体小片蚌的选择提供理论支持。

参考文献:

- [1] Li J L, Wang D F, Bai Z Y, et al. Report on the development of freshwater pearl culture industry in China[J]. China Fisheries, 2019(3): 23-29. [李家乐, 王德芬, 白志毅, 等. 中国淡水珍珠养殖产业发展报告[J]. 中国水产, 2019(3): 23-29.]
- [2] He X J, Shi Z Y, Li W J. Effects of pearl nucleus inserting operation on three immune factors in *Hyriopsis cumingii* Lea[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(6): 859-866. [何秀娟, 施志仪, 李文娟. 插核手术对三角帆蚌血淋巴中 3 种免疫防御因子的影响[J]. 中国水产科学, 2009, 16(6): 859-866.]
- [3] Wang G L, Bai Z Y, Liu X J, et al. Research progress on germplasm resources of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(9): 1618-1627. [汪桂玲, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌种质资源研究进展[J]. 水产学报, 2014, 38(9): 1618-1627.]
- [4] Wang M F, Yu X Y. Advances in cell patches and treatment techniques of cultured pearl shellfish[J]. Journal of Guangdong Ocean University. 2010, 30(4): 86-91. [王梅芳, 余祥勇. 育珠贝细胞小片及处理技术研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(4): 86-91.]
- [5] Arnaud-Haond S, Goyard E, Vonau V, et al. Pearl Formation: Persistence of the Graft During the Entire Process of Biomineralization[J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(1): 113-116.
- [6] Wu L M, Bai Z Y, Liu X J, et al. Evaluation of shell color and growth traits for F5 of the freshwater pearl mussel[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(3): 547-554. [吴雷明, 白志毅, 刘晓军, 等. 三角帆蚌 F₅ 壳色及生长性状选育效果评价[J]. 中国水产科学, 2016, 23(3): 547-554.]
- [7] Zhu W B. Study of the effect of two shell nacre colors on the color of pearls produced by *Hyriopsis cumingii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011: 1-39. [朱文彬. 三角帆蚌两种贝壳珍珠质颜色对珍珠颜色影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011: 1-39.]
- [8] McGinty E L, Evans B S, Taylor J U, et al. Xenografts and pearl production in two pearl oyster species, *P. maxima* and *P. margaritifera*: Effect on pearl quality and a key to understanding genetic contribution[J]. Aquaculture, 2010, 302(3-4): 175-181.
- [9] Zhang G F. The study of pearl mussel[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 57-68. [张根芳. 河蚌育珠学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 97.]
- [10] Jin Y L, Shi Z Y, Li W J, et al. Improvement on mantle cell culture and technique for large nucleated pearl producing in *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2011, 20(5): 705-711. [靳雨丽, 施志仪, 李文娟, 等. 三角帆蚌外套膜细胞培养的改进与大型有核珍珠的培育研究[J]. 上海海洋大学学报, 2011, 20(5): 705-711.]
- [11] Li Q, Shi Z Y, Li W J, et al. Impact of in vitro optimization and in vivo implantation culture on the growth of *Hyriopsis cumingii* mantle cells[J]. Journal of Fishery Sciences of China. 2014, 21(2): 225-234. [李倩, 施志仪, 李文娟, 等. 三角帆蚌外套膜细胞体外培养优化及体内植入培养对细胞生长的影响[J]. 中国水产科学, 2014, 21(2): 225-234.]
- [12] Wei Y H, Xue R Y, Gong C L, et al. Study on the culture of the outer epidermis cells of the mantle of *Cristaria plicata*[J]. Journal of Hydroecology, 2001, 21(6): 9-10. [魏育红, 薛仁宇, 贡成良, 等. 褶皱冠蚌外套膜外表皮细胞培养研究[J]. 水生生态学杂志, 2001, 21(6): 9-10.]
- [13] Kong W, Li S G, Xie L P, et al. Effects of vertebrate cell factors on cell culture and biomineralization ability of mantle cells from *Pinctada fucata*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(11): 1613-1621. [孔玮, 李世国, 谢莉萍, 等. 脊椎动物源细胞因子对合浦珠母贝外套膜细胞培养及其矿化功能的影响[J]. 水产学报, 2015, 39(11): 1613-1621.]
- [14] Hu N L. Method and technique for cell proliferation by flow cytometry[J]. Medical Information, 2019, 32(1): 47-49. [户乃丽. 流式细胞术研究细胞增殖的方法与技术[J]. 医学信息, 2019, 32(1): 47-49.]
- [15] Tang G H, He X S. Standardization and control of flow cytometry for detecting cell DNA content[J]. Journal of Chinese Physician, 2004, (S1): 278-280. [唐国华, 贺修胜. 流式细胞仪检测细胞 DNA 含量技术的标化与控制[J]. 中国医师杂志, 2004, (S1): 278-280.]
- [16] Tang M, Shi A J. Overview of studies on calcium metabolism in molluscs[J]. Journal of Fisheries of China, 2000(1): 86-91. [唐敏, 石安静. 贝类钙代谢研究概况[J]. 水产学报, 2000(1): 86-91.]
- [17] Liu X J, Guo W, Jin C, et al. A novel shell matrix protein hic 9 from *Hyriopsis cumingii* involved in the pearl biominerali-

- zation[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(4): 782-789. [刘晓军, 郭炜, 金参, 等. 三角帆蚌新发现的贝壳基质蛋白基因 *hic9* 的分离、鉴定及其在珍珠早期形成过程中的作用[J]. 水产学报, 2019, 43(4): 782-789.]
- [18] Shi Z Y, Li Y, Xie X Z. Relations between alkalinity phosphatase and calcium metabolism in mantle of *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2008(3): 291-297. [施志仪, 李勇, 谢先中. 三角帆蚌外套膜碱性磷酸酶与钙代谢的关系[J]. 上海水产大学学报, 2008(3): 291-297.]
- [19] Qi X X, Li W J, Shang C, et al. Molecular cloning and expression research of EFCB1 cDNA in *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of fisheries of China, 2015, 39(7): 962-970. [祁晓翔, 李文娟, 尚朝, 等. 三角帆蚌 EFCB1 基因 cDNA 序列克隆及表达研究[J]. 水产学报, 2015, 39(7): 962-970.]
- [20] Liu Y. The effect of donor *Hyriopsis cumingii* on the quality of pearls[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013: 1-68. [刘越. 三角帆蚌供片蚌对珍珠质量的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013: 1-68.]
- [21] Liu J, Ma X M, Wang Y, et al. Effects of platelet activating factor and its receptor antagonist on proliferation of hepatic stellate cells[J]. Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery, 2010, 16(2): 122-124. [刘军, 马雪梅, 王宇, 等. 血小板活化因子及受体拮抗剂对肝星状细胞增殖的影响[J]. 中华肝胆外科杂志, 2010, 16(2): 122-124.]
- [22] Ji Y B, Ji C F, Gao S Y, et al. The study on the effect of sudan I, III, IV on proliferation of SGC - 7901 by flow cytometry[J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2006, 38(5): 767-769. [季宇彬, 汲晨锋, 高世勇, 等. 流式细胞仪检测苏丹I、III、IV对 SGC-7901 细胞增殖的影响[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2006, 38(5): 767-769.]
- [23] Zhou Z R. Effects of calcium concentration on the calcium content of *Hyriopsis cumingii* mantle and visceral cells and influence on carbonic anhydrase[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2016: 1-68. [周子睿. 钙离子浓度对三角帆蚌外套膜和内脏团细胞内钙含量及碳酸酐酶的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 1-68]
- [24] Nikapitiya C, Zoysa M D, Whang I, et al. Characterization and expression analysis of EF hand domain-containing calcium-regulatory gene from disk abalone: Calcium homeostasis and its role in immunity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 29(2): 334-342.
- [25] Li W J, Shi Z Y, Hao Y Y, et al. Study of Ca^{2+} deposition and distribution in cells from different tissues with laser scanning confocal microscopy in *Hyriopsis cumingii*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(2): 214-220. [李文娟, 施志仪, 郝莹莹, 等. 应用激光共聚焦显微技术研究 Ca^{2+} 在三角帆蚌组织内的积累与分布[J]. 水产学报, 2011, 35(2): 214-220.]
- [26] Gao Z W. Synthesis and application of fluorescent probes for detection of alkaline phosphatase[D]. Hangzhou: Zhejiang Ocean University, 2018: 1-94. [高志伟. 检测碱性磷酸酶的荧光探针的合成及应用[D]. 杭州: 浙江海洋大学, 2018: 1-94.]
- [27] Chen J C, Shi A J. Malacozoan immunobiology research: a review[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1996, 20(1): 74-78. [陈竞春, 石安静. 贝类免疫生物学研究概况[J]. 水生生物学报, 1996, 20(1): 74-78.]
- [28] Zhou Y C, Pan J P. Progress on researches of cellular and humoral defense mechanisms in molluscs[J]. Journal of Fisheries of China, 1997, 21(4): 449-454. [周永灿, 潘金培. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 449-454.]
- [29] Hao Y Y. Effect of Three Different Factors on the Calcium Ion Metabolism and Expression of Alkaline Phosphatase Gene in *Hyriopsis cumingii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011: 1-58. [郝莹莹. 三种环境因子对三角帆蚌外套膜 Ca^{2+} 代谢和 ALP 基因表达的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011: 1-58.]
- [30] Wada K T, Komaru A. Effect of selection for shell coloration on growth rate and mortality in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*[J]. Aquaculture, 1994, 125(1-2): 59-65.
- [31] Komaru A, Wada K T. Meiotic maturation and progeny of oocytes from triploid Japanese pearl oysters (*Pinctada fucata martensii*) fertilized with spermatozoa from diploids[J]. Aquaculture, 1994, 120(1-2): 61-70.
- [32] Hwang J J, Yamakawa T, Aoki I. Growth of wild pearl oysters *Pinctada fucata*, *Pinctada margaritifera* and *Pinctada sugillata* (Bivalvia: Pteriidae) in Taiwan[J]. Fisheries Science, 2007, 73(1): 132-141.
- [33] Pouvreau S, Tiapari J, Gangnery A, et al. Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, in suspended culture under hydrobiological conditions of Takapoto lagoon (French Polynesia)[J]. Aquaculture, 2000, 184(1-2): 133-154.
- [34] Gu Z F, Wang Q Y, Fang J H, et al. Growth of cultured winged pearl oyster (*Pteria penguin*) in Li'an lagoon Hainan[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2009, 40(4): 423-429. [顾志峰, 王清印, 方建光, 等. 企鵝珍珠贝在海南黎安港的生长特征[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(4): 423-429.]
- [35] Henry R P. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism[J]. Annual Review of Physiology, 1996, 58(1): 523-538.
- [36] Yu S, Zhang X X, Guan Q J, et al. Expression of a carbonic anhydrase gene is induced by environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(1): 89-94.
- [37] Miyashita T, Takami A, Takagi R. Molecular cloning and characterization of the 5'-flanking regulatory region of the carbonic anhydrase nacrein gene of the pearl oyster *Pinctada fucata* and its expression[J]. Biochemical Genetics, 2012, 50(9-10): 673-683.
- [38] Luo R H. Cloning and Expression Analysis of Genes Involved in the Nacre color of shell in *Hyriopsis cumingii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015: 1-73. [罗瑞红. 三角帆蚌贝壳珍珠层颜色形成相关基因的克隆与表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015: 1-73.]

Proliferative capacity and biomineralization of mantle cells in *Hyriopsis cumingii* of different ages

CAO Yuxiang^{1,2,3}, LU Ali^{1,2,3}, LI Wenjuan^{1,2,3}, SHI Zhiyi^{1,2,3}, TAO Jiakang^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education; Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: The mantle is an indispensable tissue for pearl cultivation, but the biological activity (cell proliferation and biomineralization) of donor mussel mantle of different ages has not been systematically explored. In this study, *Hyriopsis cumingii* was used to investigate the proliferative activity and biomineralization capacity in mantle cells in different years. In this experiment, five groups of *H. cumingii* were selected by age, at six months and one, two, three, and four years. Flow cytometry was used to detect the cell cycle of *H. cumingii* mantle cells of different ages and to calculate the cell proliferation index. Fluo-3/AM, a calcium fluorescence probe, combines with intracellular Ca^{2+} to produce fluorescence. The average fluorescence intensity of mantle cells of different ages was measured by flow cytometry fluorescein isothiocyanate (FITC) channel, which represented intracellular calcium concentration. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to analyze expression of biomineralization related genes. Biomineralization-related genes included carbonic anhydrase gene (*CA*) and alkaline phosphatase gene (*ALP*). The enzyme activities of ALP and CA were determined chemically and by ELISA, respectively. The aim of this study was to determine the suitable age of *H. cumingii* with fast proliferation and strong biomineralization ability of mantle cells. The results showed that: (a) Under the same environment, the proliferation index of two-year-old *H. cumingii* mantle cells was the largest (i.e., fastest proliferation). (b) The average fluorescence intensity of the two-year-old *H. cumingii* was the highest, in other words, the concentration of calcium ion in the mantle cells of the two-year-old *H. cumingii* was the highest. (c) The expression level of *ALP* gene in six-month-old mussels was significantly higher than that in older mussels ($P < 0.05$), followed by the one-year-old mussels and the two-year-old mussels. There was no significant difference between the three and four-year-old mussels, with the lowest gene expression level ($P > 0.05$). ALP activity was the highest in six-month-old mussels ($P < 0.05$). (d) The expression level of *CA* was different in mantle tissues in mussels of different ages. The highest expression level ($P < 0.05$) was found in one-year-old mussels, followed by the two-year-old mussels, and the lowest expression level ($P > 0.05$) was found in six-month-old, three and four-year-old mussels. The activity of CA was different in mantle tissue of different mussels and the activity of CA was the highest in one-year-old mussels ($P < 0.05$). Finally, it was concluded that the proliferation of mantle cells of the two-year-old mussels was the strongest and the intracellular calcium concentration was the highest. This study provides a foundation for further research on the proliferation of mantle cells in *H. cumingii* and the selection of donor mussel age for pearl culture.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; mantle; cell proliferation; biomineralization; Ca^{2+} ; carbonic anhydrase (CA); alkaline phosphatase (ALP)

Corresponding author: SHI Zhiyi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn