

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

施志仪, 杨显祥, 李勇, 李巍

(上海水产大学 生物技术研究中心, 上海 200090)

摘要:通过光学显微镜、透射电镜、流式细胞仪等方法对体外培养的三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea)外套膜细胞进行观察和检测,证明其具有与蚌体内细胞相同的生物学结构、分裂增殖能力和分泌珍珠质的生物活性。在此基础上,对三角帆蚌有核珍珠培育技术进行探讨。将培养细胞黏附在表面经过促黏壁物质处理的珠核表面,再插入育珠蚌体内培育,120 d后,蚌体内可形成完备的珍珠囊,并在珠核表面有明显的珍珠质沉积;6个月后,珍珠质可将整个珠核包裹起来形成有核珍珠。本研究初步证明了细胞法培育有核珍珠的可行性。[中国水产科学,2007,14(1):149—154]

关键词:三角帆蚌;细胞培养;生物学特性;有核珍珠培育

中图分类号:Q959.212

文献标识码:A

文章编号:1005—8737—(2007)01—0149—06

目前,淡水有核珍珠培育主要采用植片法,就是将外套膜外表皮切成小片,移植到育珠蚌体内并植入珠核,贴附在珠核上的外表皮细胞经移行、增殖、包裹珠核形成珍珠囊,最后形成珍珠^[1]。由于外套膜小片是贴附于珠核的一侧,外表皮细胞在移行增殖过程中,并不能均匀地包裹珠核,从而使珠核的小片贴附处有较多的外表皮细胞堆积,随着珍珠质的分泌和沉积,就会造成珍珠质的不均匀分布,容易产生尾巴珠、焦头珠等各种疵珠。为了找到一种更好的提高珍珠质量的培育方法,本研究在对培养细胞生物特性检测的基础上,尝试将获得的外套膜细胞黏附在促黏壁物质处理的珠核表面,植入到育珠蚌体内,细胞在育珠蚌体内完全贴附到珠核上,形成完备的珍珠囊,从而达到培育有核珍珠的目的。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

所用三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea)为1龄、2龄、3龄蚌,由浙江诸暨市阮仕珍珠研究所养殖基地提供。

透射电子显微镜由第二军医大学细胞学实验室提供,FACS CLIBUR流式细胞仪由复旦大学遗传工程国家重点实验室提供。

CO₂恒温细胞培养箱(Napco Model6100)为上海水产大学生物技术研究中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 外套膜细胞的培养 选择1龄或1龄以内健康、活力强的小蚌,用手术刀切开小蚌闭壳肌,用无菌蒸馏水反复冲洗外套膜,用撕膜法分离出外套膜外表皮,将外套膜外表皮剪成1 mm²的小片,于0.25%胰酶中37℃下消化后,用300目绢网过滤去多余组织块。用血球计数板对细胞悬液进行计数,调整细胞数在5×10⁵~1×10⁶ mL⁻¹,置于25℃CO₂恒温细胞培养箱培养。

1.2.2 培养细胞的透射电镜观察 取原代培养的细胞,加入适量4%多聚甲醇固定,用吸管吹打均匀。固定后的细胞经1.0%四氧化锇固定,乙醇逐级脱水,环氧树脂812浸透包埋,LKB2088超薄切片机切片,醋酸铀—柠檬酸铅双染色,透射电镜观察并拍照。

1.2.3 培养细胞的流式细胞仪分析 取不同时段培养细胞,用75%乙醇处理2 h对细胞打孔,RNA酶处理10~30 min降解细胞中的RNA,然后加入碘化丙啶(propidium iodide,PI,50 ng/mL)处理10 min对DNA染色。FACS CLIBUR流式细胞仪检测,每组检测5 000个细胞,CellKuest软件处理数据。

1.2.4 有核珍珠培育 按上述方法获取外套膜细胞悬液。以促黏壁物质处理珠核过夜。

选择健壮的2龄和3龄育珠蚌进行插核育珠。2龄蚌70只,3龄蚌70只,共140只。首先将促黏壁物质处理过的珠核置于细胞悬液中,使游离的细

收稿日期:2006—01—19;修订日期:2006—07—06。

基金项目:上海市重点学科建设项目(Y1101);上海市属高校自然科学研究项目(01H02)。

作者简介:施志仪(1954—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事水产动物生物技术,海洋药物研究。E-mail:zyshi@shfu.edu.cn

胞均匀黏附在珠核上,然后移植到育珠蚌体内。采取1蚌2核的方式,左右两侧各插1颗珠核,共插核280颗。育珠蚌吊养于浙江诸暨市阮仕珍珠研究所养殖基地育珠蚌池塘中,并于吊养蚌垂直下方,吊放1个有小孔的塑料篮子,以对蚌的吞核现象进行观察。实验从2004年11月下旬开始,2005年5月下旬结束,分别于插核后30 d、60 d、90 d、120 d,对育珠蚌的吐核情况、蚌的死亡率、细胞的贴壁情况和珍珠层的形成情况进行观察和记录。

2 结果与分析

2.1 培养细胞的生长观察

培养24 h后,可观察到游离的细胞已开始贴附瓶底,但还未伸展开(图1-a);细胞培养至12 d后,可发现许多细胞完全伸展开,连接成片状结构(图1-b)。同时,细胞增殖生长表现出集聚性,一些生长很旺盛的细胞有向一个点聚集的趋势,逐渐形成一个不透光的圆形或近圆的区域(图1-c)。

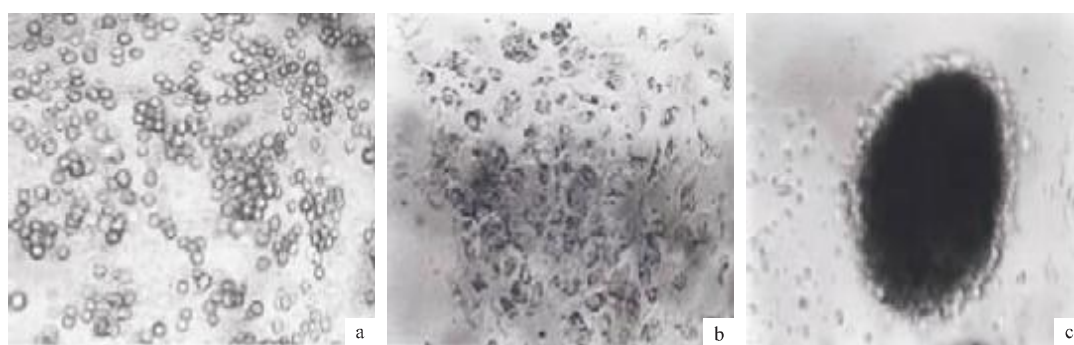


图1 对培养的外套膜细胞不同时间的观察

a:培养24 h,×100;b:培养12 d,×100;c:培养22 d,×40;

Fig. 1 Cultured mantle cells observed at different time

a:cultured for 24 h,×100;b:cultured for 12 d,×100;c:cultured for 22 d,×40.

2.2 培养细胞的透射电镜观察

通过电镜观察可以发现,细胞核位于细胞的一侧,常染色质和异染色质清晰可见。在细胞膜的内膜上可观察到含有高密度颗粒物质的小泡。胞质内

有光面、粗面内质网和较丰富线粒体,并且还有以单层膜包被大量电子密度高的颗粒的团状物质(图2-a);在细胞外可看到分泌的这种物质,膜已经破裂,颗粒已经释放出来(图2-b)。

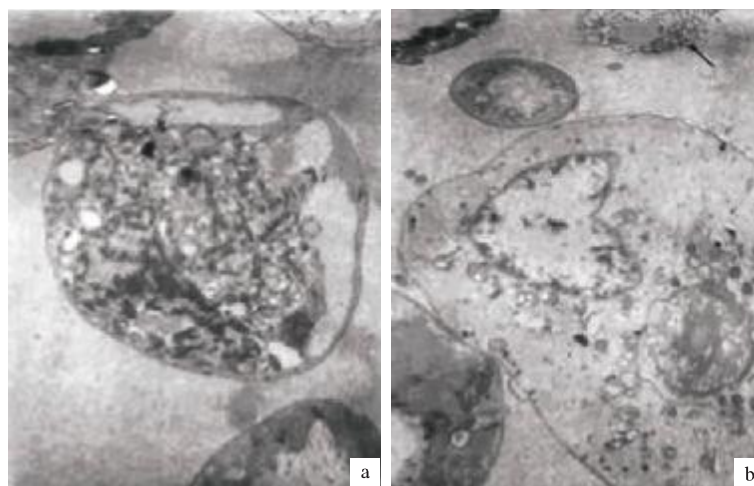


图2 三角帆蚌外套膜培养细胞的电镜观察(a.×4 000;b.×5 000)

Fig. 2 Observation of cultured mantle cells of *Hyriopsis cumingii* by transmission electron microscope

2.3 培养细胞的流式细胞仪分析

采用流式细胞仪对培养细胞进行细胞周期分析,见图 3。

通过测定可以得到,培养 24 h 与培养刚开始(1 h)各期的细胞数量所占比例并无明显差异。培养

6 d 后至 10 d,进入 S 期细胞数逐渐增加。培养 6 d 和 10 d 的 S 期和 G2/M 期细胞百分率相对于培养 24 h 的细胞有所增加,但在所有取样时间点,G1/G0 期细胞数量都占到了 90%左右(表 1),这说明体外培养的细胞具有分裂增殖能力但生长相对较缓慢。

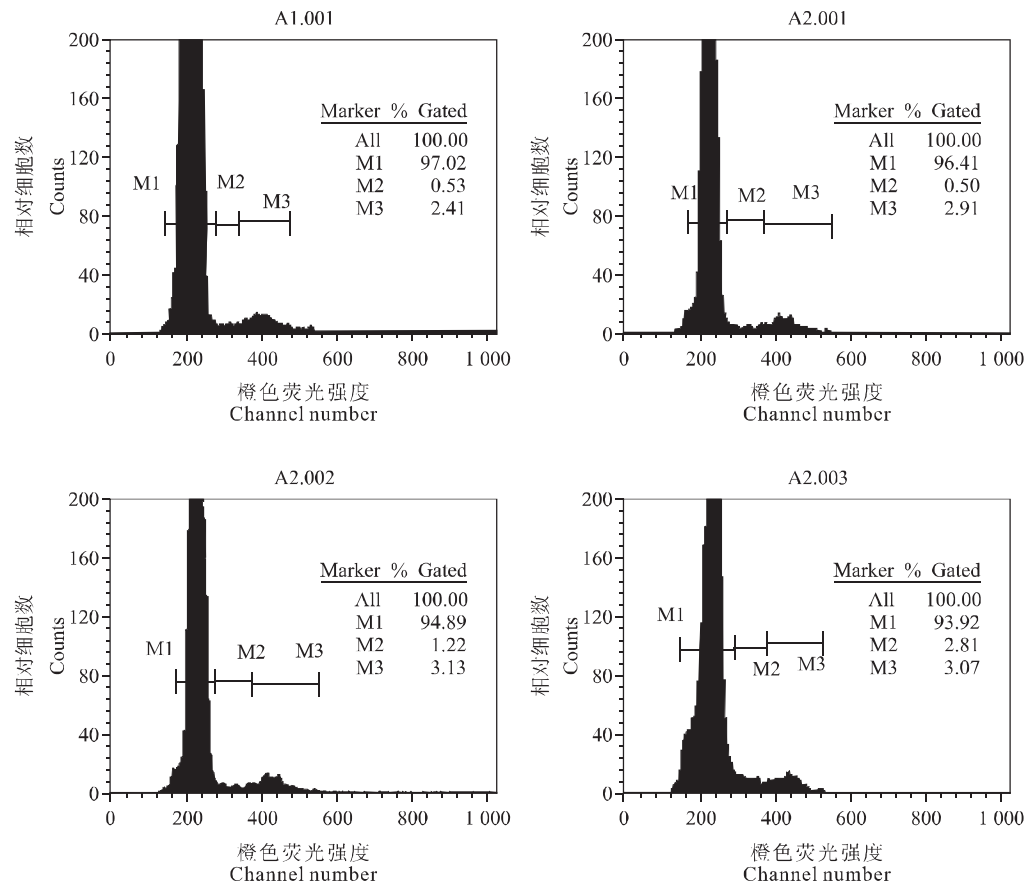


图 3 流式细胞仪细胞周期分析
A1. 001:培养 1 h 组;A2. 001:培养 24 h 组;A2. 002:培养 6 d 组;A2. 003:培养 10 d 组;

Fig. 3 Analysis of cell cycle through flow cytometer
A1. 001:cell group cultured for 1 h;A2. 001:cell group cultured for 24 h;
A2. 002:cell group cultured for 6 d;A2. 003:cell group cultured for 10 d.

表 1 流式细胞仪测定结果

培养时间 Cultivated time	时相 Estate			%
	M1(G1/G0)	M2(S)	M3(G2/M)	
1 h	97.02	0.53	2.41	
24 h	96.41	0.50	2.91	
6 d	94.89	1.22	3.13	
10 d	93.92	2.81	3.07	

2.4 有核珍珠的培育

2.4.1 蚌吐核和死亡情况的观察 插核手术后30 d,育珠蚌有吐核现象,2龄蚌吐核8颗,3龄蚌吐核3颗;并且2龄蚌死1只,3龄蚌死1只;蚌死吐核4颗,共吐核15颗。60 d后,2龄和3龄蚌均无死亡,2龄蚌再次吐核11颗,3龄蚌再次吐核3颗,总吐核数增加到29颗。90 d和120 d后,育珠蚌吐核数和死亡率均没有新的增加。120 d后,在插入280颗珠核的140只蚌中,总计蚌死2只,吐核29颗。

2.5.2 珍珠囊和珍珠层沉积的观察 30 d后,珍珠囊已初步形成(图4-a);60 d后,可以发现珍珠质的沉积。120 d后,检查的10只蚌(含20颗珠核)发现16颗有明显金黄色的珍珠质的沉积(图4-b)。6个月后,检查的10蚌中含19颗珠核(其中1颗珠核已吐掉),发现有10颗珠核表面已均匀分布珍珠质,形成有核珍珠(图4-c、4-d),其中8颗珠核表面大部分也有明显珍珠质的沉积。

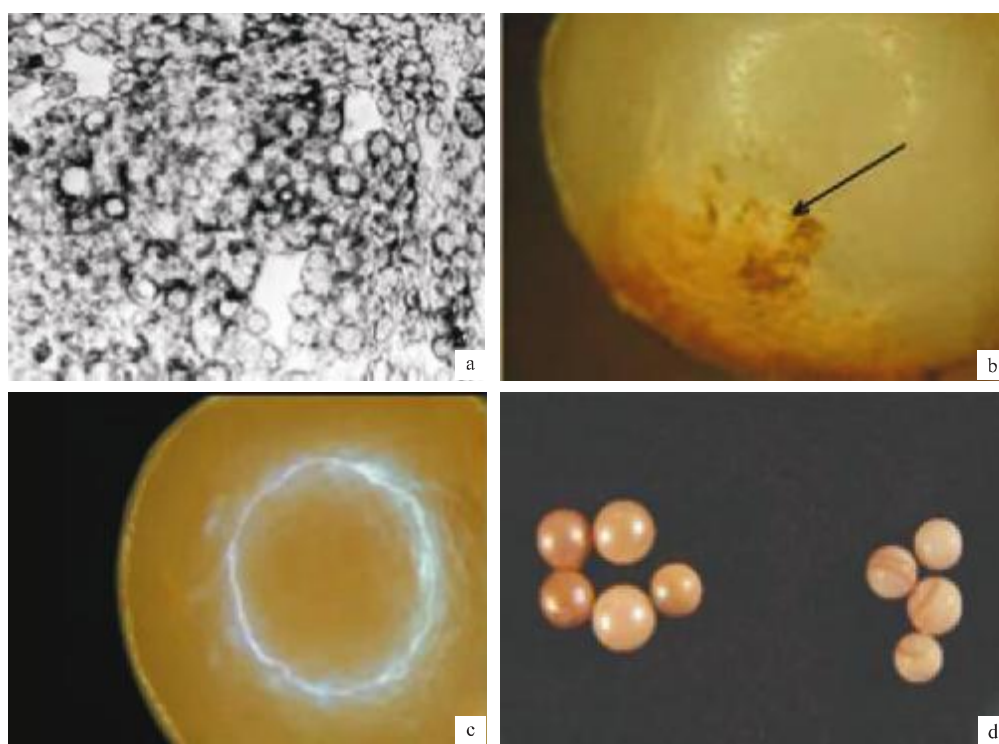


图4 珍珠囊和珍珠质沉积的观察

a:30 d后,珍珠囊形成,×200;b:120 d后,珍珠质沉积(箭头),×8;

c:6个月后,形成有核珍珠,×8;d:左为实验形成的有核珍珠,右为实验所用珠核

Fig. 4 Observation of pearl-sac and pearl on the surface of pearl nuclear

a:formation of pearl-sac 30 days later,×200;b:aggradation of the pearl 120 days later(arrow),×8;

c:formation of nucleated pearl six months later,×8;d:left-nucleated pearl six months later;right-pearl nuclear

3 讨论

3.1 体外培养三角帆蚌外套膜细胞的生物活性

根据电镜的照片上来看,细胞超显微结构与石安静报道的相一致^[2-3]。石安静等^[3]直接取三角帆蚌外套膜上皮组织小片插于蚌内并培养2年形成的珍珠囊制成超薄切片进行透射电镜的观察,发现珍珠囊的绝大多数细胞都是表皮细胞。表皮细胞顶端

有发达的微绒毛,细胞核外膜上附着很多核糖体,胞质有发达的光面、糙面内质网和非常丰富的线粒体。另外胞内还存在3种类型物质:电子密度低的无定形块状物、电子密度高的颗粒状物质和电子密度高且均匀的球形大颗粒物质。石安静认为,这3种类型物质与珍珠 CaCO_3 霏石结晶的起始、生长和结晶型形成有关。在本实验中,没有观察到微绒毛结构,这可能是体外培养环境对细胞影响的原因,但观察

到与物质合成和分泌有关的内质网、多聚游离核糖体、线粒体,还观察到体积大、电子密度高的球形颗粒,并且有些已分泌到细胞外。

采用流式细胞仪对培养细胞进行细胞周期分析。细胞周期分为 G_1 、S、 G_2 和 M 期, G_1 期代表细胞处于 DNA 合成前期,S 期表示 DNA 合成期, G_2 期表示细胞有丝分裂的前期,M 期表示细胞有丝分裂期。从流式细胞仪对培养细胞测定结果可见,在 24 h,S 期细胞占总细胞数为 0.5%, G_2 /M 期为 2.91%;在 6 d,S 期细胞为 1.22%, G_2 /M 期为 3.13%;在 10 d,S 期细胞为 2.81%, G_2 /M 期为 3.07%。随着时间增加,进入分裂增殖期的细胞也逐渐增多,表明体外培养的细胞具分裂增殖能力,但同时也发现,在实验的各个时间段, G_1 / G_0 期占有很大的比例,说明体外培养外套膜细胞的生长相对比较缓慢。这个结果与对三角帆蚌外套膜培养细胞生长观察的结果是相一致的。

值得注意的是,从对体外培养细胞生长的观察,三角帆蚌外套膜细胞增殖生长表现出集聚性,细胞朝一个点集聚,出现重叠,形成一个圆形或近圆的区域。三角帆蚌外套膜细胞的这种集聚重叠生长可能与其在体内能形成珍珠囊相关,是这种细胞的生长特征。由此提示,利用三角帆蚌外套膜细胞进行体外培养,进而形成珍珠囊是可能的。

3.2 有核珍珠的培育

珍珠的形成是通过珍珠囊分泌珍珠质来实现的。迄今,普遍认为有两种形成珍珠囊的方法,一种是通过传统的植片法,就是将外套膜外表皮小片植入育珠蚌体内,外表皮细胞经过迁移和增殖形成珍珠囊,但这种珍珠囊形状往往不规则,不能形成正圆,甚至有时形成多囊现象,从而造成珍珠质量不高;另一种方法也是很多学者所提倡的^[4],在体外环境下培养珍珠囊,相对于体内环境而言,这种方法可控性强,可以避免体内珍珠囊形成过程中众多因素

的影响,细胞可均匀地贴到珠核表面形成珍珠囊,但这种技术要求高,难于推广,并且由于贝类外套膜外表皮细胞在体外环境下增殖生长相对缓慢,使得体外培育珍珠囊的难度加大。为了得到质量较高的珍珠,采用细胞培养的方法,将所得的培养细胞黏附在促黏壁物质处理过的珠核表面,后植入到育珠蚌体内,利用育珠蚌体内的营养和环境条件,使植入的细胞贴附、包裹珠核,形成完备的珍珠囊,从而达到提高珍珠质量的目的。在插囊手术后,对育珠蚌吐核情况和死亡率进行统计,1 个月后育珠蚌有少量的吐核,2 个月后仍有吐核现象,3、4 个月后基本没有吐核发生。同时,发现 2 龄蚌的吐核数要明显多于 3 龄的育珠蚌,这是由于实验中采用的 2 龄的育珠蚌偏瘦,外套膜组织偏薄的缘故,因此本研究认为,进行细胞法育珠,采用蚌龄较大或蚌体肥厚的育珠蚌为好。1 个月后,植入细胞已完全贴附于珠核上,珍珠囊初步形成,这与杜晓东对珍珠囊发育的结构观察相一致^[5]。在 4 个月后,可发现珠核上有明显珍珠质的沉积;6 个月后,形成有核珍珠,这说明采用体外培养外套膜细胞法育珠可以形成有核珍珠。根据科技查新报告,目前尚无采用这种方法培育淡水有核珍珠的报道。至于采用这种方法对珍珠质量的影响如何,仍需进一步观察和研究。

参考文献:

- [1] 胡曦璇,石安静. 珍珠研究概况[J]. 水生生物学报,1994,18(1):76—81.
- [2] 邱安东,石安静,孙奇志. 三角帆蚌珍珠囊的超微结构研究[J]. 四川大学学报(自然科学版),1999,36(6):1 111—1 115
- [3] 石安静,曾家玉. 河蚌外套膜的扫描电镜观察[J]. 水产学报,1991,15(1):68—71.
- [4] 郎刚华,王 勇,刘万顺,等. 贝类组织培养及其应用研究[J]. 海洋科学,2000,24(4):15—18.
- [5] 杜晓东,许国领. 褶纹冠蚌珍珠囊发育的超微结构观察[J]. 水产学报,1990,14(3):212—218.

Bio-characteristics of cultured mantle cells of *Hyriopsis cumingii* and technique for nucleated pearl producing

SHI Zhi-yi, YANG Xian-xiang, LI Yong, LI Wei

(Research Center of Biotechnology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: At present, the traditional method of producing nucleated pearl in freshwater is to adhere small flakes incised from outer epithelium of mussel mantle to the surface of pearl nuclear in the mantle of accepting mussel during the process of mussels growth. The epithelial cells from mantle flasks entrap the whole pearl nuclear by proliferation and form the pearl-sac. As mantle flask is on one side of pearl nuclear, pearl nuclear can't be evenly entrapped during the process of proliferation, which results in inferior pearl with anomalous shape. In this study, the cultured mantle cells of *Hyriopsis cumingii* was observed by light microscope, transmission electron microscope and flow cytometer. It was proved that the cultured mantle cells had the same ultra-structure, proliferous capability and secreting activity as the mantle cells *in vivo*. Especially the cultured cell *in vivo* showed the trait of getting together in the growth process, which suggested that the mantle cells could form the real pearl-sac *in vivo* and producing pearl *in vivo* would be possible. Based on these, study on nucleated pearls producing technique was also performed. The cultured cells were adhered to the surface of pearl nuclear treated by a sticking material. Then the treated pearl nuclear was inserted into the mantle of *Hyriopsis cumingii*. The result showed that complete pearl-sac could form 30 d later; pearl on the surface of the pearl nuclear was obviously found 120 d later and the nucleated pearls formed six months later. This method is proved to be feasible. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 149—154]

Key words: *Hyriopsis cumingii*; cell culture; bio-characteristics; producing nucleated pearls

更 正

本刊在 2006 年第 5 期发表的文章“长江春季禁渔对崇明北滩渔业群落的影响”(作者:刘凯,张敏莹,徐东坡,段金荣,施伟纲)中,图 1 有误,现将正确图 1 更正如下:



图 1 采样点示意图

Fig. 1 Sketch of sampling station