

# 马氏珠母贝珍珠囊体外培养及插囊育珠\*

## Pearl Sacs Culture in Vitro and Production of Pearls by Culturing Pearl Sacs in the Pearl Oysters (*Pinctada martensii*)

王爱民 阎冰 苏琼 叶力  
Wang Aimin Yan Bing Su Qiong Ye Li

(广西海洋研究所 广西北海市长青东路 92号 536000)

(Guangxi Institute of Oceanography, 92 East Changqinglu, Beihai, Guangxi, 536000, China)

**摘要** 为建立马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 珍珠囊体外培育和插囊育珠技术, 一用 0.3% 胰蛋白酶消化液在 pH 值 7.2~7.4 和温度 25°C 条件下对马氏珠母贝外套膜组织进行解离, 收集消化 15 min 的细胞悬液于珠核上培养珍珠囊; 二直接用外套膜组织块在珠核上形成珍珠囊。方法一所产生的珍珠囊未培育出珍珠; 方法二所产生的珍珠囊培育出少量的珍珠。为促进细胞在珠核上的粘附和珍珠囊的形成, 研究了各种贴壁因子的作用; 其中多聚赖氨酸和 SM 物质能明显促进珍珠囊形成。

**关键词** 马氏珠母贝 珍珠囊 体外培养 插囊育珠

中图法分类号 S 968.316.9

**Abstract** To raise production of pearls, the pearl sacs were cultured with the cells from the mantle tissue which was digested in 0.3% trypsin solution in pH 7.2~7.4 at 25°C for 15 minutes. The pearl sacs were also cultured in another way of emigrating the pieces of mantle tissue to a nuclear. Only the pearl sacs by the second method could produce a few of pearls. To promote cell adhesion and pearl sac formation in vitro, the collagen, poly-lysine, laminin and SM substance were tested, and poly-lysine, SM substance could enhance the formation of pearl sacs.

**Key words** *Pinctada martensii*, pearl sac, culture in vitro, culture

海水养殖珍珠均为有核珍珠, 是经外套膜植片法培育的。外套膜植片法指用人工手术将珍珠贝 (供体) 外套膜组织分割成组织块, 将组织块移植到受体珍珠贝的体内, 并植入珠核, 被移植的外套膜组织块的上皮细胞经移行、增殖、包裹珠核形成珍珠囊, 尔后, 上皮细胞分泌珍珠质沉积在珠核表面而产生人工有核珍珠。在移植手术过程中, 上皮细胞贴附于珠核的位置、紧密程度、组织块的面积、形状及取材的位置、植核位置、植核手术时对育珠贝的机械损伤程度都直接关系到珍珠囊的形成和上皮细胞的分泌状态, 常引起各种疵珠的产生, 如污珠、尾巴珠、素珠等, 此外, 外套膜植片法还会使育珠贝损伤严重, 增加植核后育珠贝的死亡率和吐核率, 从而严重地影响珍珠的质量和产量。由于外套膜植片法固有的缺陷, 本文根据珍珠形成的原理, 利用组织培养技术、体外培育

有核珍珠囊, 再进行插囊育珠, 试图建立一种新的珍珠培育方法。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

实验用马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 由广西北海市铁山港珍珠养殖场提供, 为 1~2 龄的育珠贝。

#### 1.2 方法

##### 1.2.1 外套膜组织的解离

用国产胰蛋白酶制备消化液, 浓度为 0.3%, pH 值 7.2~7.4, 消化温度为 25°C。

##### 1.2.2 细胞产量

(1) 以 CMF (Calcium, Magnesium Free BBS 不含  $Ca^{++}$  和  $Mg^{++}$  的平衡盐溶液) 和 MCMF (Modified CMF 以相同摩尔数的葡萄糖酸钠代替 CMF 中的氯化钠) 分别配制胰蛋白酶液 TS 和 MTS, 分别消化 1 g 外套膜组织, 20 min 后, 取解离细胞液, 用血球计数板计取解离细胞数, 比较 TS 和 MTS 消化的细胞产量; 每次实验各组所用材料均取自相同的贝。

1999-11-01 收稿, 2000-01-03 修回。

\* 国家自然科学基金 (39560066) 和广西自然科学基金匹配资助项目 (9624010)。

(2) MTS中分别加入 1 mMol的 EDTA, 1 g/L的葡萄糖和 1 g/L的半乳糖, 消化 1 g外套膜组织, 20 min后计数, 比较细胞的产量。

(3)取 1 g外套膜组织,用 MTS消化 30 min,每隔 5 min计取解离细胞数,绘制细胞产量与消化时间的关系曲线

### 1.2.3 上皮细胞的纯度

(1) 取外套膜组织,用 MTS消化 30 min,每隔 5 min计取解离细胞总数和圆球形的上皮细胞数,计算出上皮细胞的纯度

(2) 取 1 g外套膜组织浸于平衡盐溶液中,用手术刀轻轻刮去内表皮和一部分结缔组织, MTS消化 30 min,每隔 5 min计取细胞总数和上皮细胞数,计算上皮细胞纯度及不同时间段被解离下来的细胞总数和上皮细胞数

### 1.2.4 外套膜细胞及组织的短期培养

使用王爱民等<sup>[1]</sup>建立的方法对外套膜细胞及外套膜组织进行短期培养。

### 1.2.5 体外珍珠囊的培养

#### 1.2.5.1 贴壁因子对珍珠囊形成的影响

将纤粘蛋白(Sigma产品)、多聚赖氨酸(Sigma产品)、鼠尾胶原(按鄂征的方法制备<sup>[2]</sup>)、SM物质(一种海洋生物提取物,实验室自制)涂抹在珠核上,干燥后高压蒸汽消毒,分别以吸滴外套膜组织的细胞悬液于珠核上和以贴附外套膜组织块于珠核上,再吸滴培养基培养 3 d后,检查珍珠囊形成的状况。检查方法:将培养后的珠核置于载玻片上,滚动珠核一圈,在倒置显微镜下观察,若形成一密集的细胞带,则说明珍珠囊已形成

#### 1.2.5.2 体外珍珠囊的培养

在无菌的条件下,制备 2% 琼脂培养皿平板,将消毒、已涂抹贴壁因子的珠核置于琼脂表面,使之固定,分别以吸滴外套膜组织细胞悬液于珠核上和以贴附外套膜组织块于珠核上培养,2 h~ 3 h后滴加培养基进行培养,以后每隔 12 h再滴加 1次培养基,72 h后珍珠囊初步形成。

#### 1.2.5.3 体外珍珠囊的插囊育珠

按常规方法把具珍珠囊的珠核移植到育珠贝体内。插核完毕,将育珠贝送回广西北海市铁山港珍珠养殖场养殖,8个月后统计育珠的结果。

## 2 实验结果

### 2.1 外套膜组织的酶解处理

#### 2.1.1 细胞产量

表 1显示,以葡萄糖酸钠代替消化液中的氯化钠,可大幅度地提高消化液消化外套膜组织的细胞产

量。EDTA、葡萄糖、半乳糖分别加入和同时加入对酶液的消化效果没有明显的改进。MTS消化外套膜组织的细胞产量在 0 min~ 30 min内,随着消化时间的延长而增加(图 1)。对图 1的分析表明,在消化开始后的第 5 min~ 15 min和第 25 min~ 30 min两个时间段,细胞以较快的速度解离,而在第 15 min~ 25 min时间段,细胞的解离速度较慢。

表 1 TS和 MTS等消化液消化 1 g组织 20 min收获的细胞产量 ( $\times 10^6$  细胞)

Table 1 The number of cells from 1 g mantle digested separately in TS and MTS after 20 minutes ( $\times 10^6$  cells)

消化液 Digesting solution	TS	MTS	MTS+ EDTA	MTS+ 葡萄糖 MTS+ glucose	MTS+ 半乳糖 MTS+ galactose	MTS+ 葡萄糖 + 半乳糖 MTS+ glucose+ galactose
A	0.64 (7)*	1.8 (7)				
B	1.69 (2)	1.72 (2)				
C	1.88 (5)		1.93 (1)	1.96 (1)	1.93 (1)	

\* 括号中的数字为实验次数,结果为平均值。The numbers in brackets are experiment times, the result is average of total count.

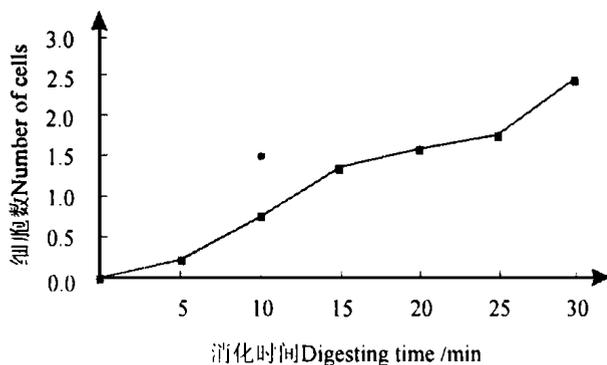


图 1 MTS消化外套膜组织的细胞产量随时间的变化曲线

Fig. 1 The curve of the number of cells and digesting time by MTS

#### 2.1.2 上皮细胞纯度

经不同时间消化,外套膜上皮细胞的纯度测定结果见表 2,消化 15 min、20 min和 25 min所获得的上皮细胞的比例比较高,且较为接近。分析不同时间段解离细胞总数和上皮细胞的增加情况(表 3)表明,第 5 min~ 15 min期间解离的细胞以上皮细胞为主,约占 78%;第 25 min~ 30 min期间,解离的细胞中以结缔组织细胞居多,约占 60%。

用刀刮法处理后的外套膜组织进行同样的酶解处理结果见表 4,与表 2比较,刀刮法处理的组织所得的上皮细胞数减少了 40%~ 60%,说明刀刮法能有效地去除内上皮细胞,对各时间段细胞增加的比较发现,5 min~ 15 min时间段增加的上皮细胞数量最多,纯度较高(表 5)。

表 2 MTS消化 1 g外套膜组织在不同消化时间获得的上皮细胞纯度

Table 2 The purity of epithelial cells from 1 g mantle digested by MTS in different duration of digesting

消化时间 Digesting duration (min)	细胞总数 Total number of cells ( $\times 10^5$ )	上皮细胞数 Number of epithelial cells ( $\times 10^6$ )	上皮细胞纯度 Purity of epithelial cells (%)
5	0.23	0.06	26.10
10	0.74	0.43	58.10
15	1.36	0.95	69.80
20	1.57	1.11	71.20
25	1.75	1.21	69.10
30	2.43	1.44	59.20

表 3 各时间段增加的细胞总数 $\Delta N_0$ 和上皮细胞数 $\Delta N$ 及上皮细胞纯度

Table 3 Total number of cells  $\Delta N_0$ , number of epithelial cells  $\Delta N$  and purity of epithelial cells in different duration

时间段 Periods (min)	$\Delta N_0$ ( $\times 10^5$ )	$\Delta N$ ( $\times 10^6$ )	上皮细胞纯度 Purity of epithelial cells (%)
5~10	0.51	0.37	72.50
10~15	0.62	0.52	83.90
15~20	0.21	0.16	76.20
20~25	0.18	0.10	55.60
25~30	0.68	0.23	33.80
5~15	1.13	0.89	78.80

表 4 MTS消化刀刮法处理 1 g外套膜组织收获的细胞总数 $\Delta N_0$ 和上皮细胞数 $\Delta N$ 及上皮细胞纯度

Table 4 Total number of cells  $\Delta N_0$ , number of epithelial cells  $\Delta N$  and purity of epithelial cells from 1 g mantle digested after inner epithelium scraping

消化时间 Digesting time course (mins)	$\Delta N_0$ ( $\times 10^5$ )	$\Delta N$ ( $\times 10^6$ )	上皮细胞纯度 Purity of epithelial cells (%)
5	0.14	0.06	28.60
10	0.65	0.27	41.50
15	1.17	0.59	50.40
20	1.29	0.67	51.90
25	1.38	0.71	51.40
30	1.79	0.78	43.60

## 2.2 体外培养珍珠囊

### 2.2.1 用解离细胞体外培养珍珠囊

分别选择用 MTS直接消化和用 MTS消化刀刮法处理的外套膜组织,经消化 15 min和 25 min后的细胞悬液培养珍珠囊,并检查贴壁因子对珍珠囊形成的影响。

从表 6可以看出,直接用 MTS消化的整块外套膜组织的细胞悬液进行珍珠囊的建立与培养效果并不理想,各种贴壁因子也起不到应有的作用。用 MTS

加刀刮法处理外套膜组织所得的细胞悬液培养珍珠囊由于处理时间的不同和使用的贴壁因子的不同出现了不同的效果。在 MTS加刀刮法处理 15 min的细胞悬液在具有多聚赖氨酸和 SM 物质的珠核上,聚集的细胞较多,在培养到第 3天时,初步形成了珍珠囊。

表 5 不同时间段增加的细胞 $\Delta N_0$ , 上皮细胞数 $\Delta N$ 及上皮细胞纯度

消化时间段 Digesting period	$\Delta N_0$ ( $\times 10^5$ )	$\Delta N$ ( $\times 10^6$ )	上皮细胞纯度 Purity of epithelial cells (%)
5~10	0.51	0.23	45.10
10~15	0.52	0.32	61.50
15~20	0.12	0.08	66.70
20~25	0.09	0.04	44.40
5~15	1.03	0.55	53.40
10~20	0.64	0.40	62.50
10~25	0.73	0.44	60.30

表 6 不同消化方式和不同贴壁因子对珍珠囊形成的影响

Table 6 Effects of different digesting methods and different adhering materials on the formation of pearl sacs

贴壁因子的种类 Adhering materials	胶原蛋白 Collagen	纤粘蛋白 Laminin	多聚赖氨酸 Poly-lysine	SM 物质 SM material	对照 Control
M TS 15 min	+	+	+	+	+
M TS 25 min	+	+	+	+	-
M TS: 刀刮法 M TS: Scraping 15 min	+	+	++	++	+
M TS: 刀刮法 M TS: Scraping 25 min	+	+	+	+	+

+ : 细胞少量 a few of cells; ++ : 细胞较多 many cells; - : 细胞无; no cells

### 2.2.2 用外套膜组织块体外培养珍珠囊

表 7显示,将外套膜组织块贴附在珠核上,无论珠核上是否涂抹贴壁因子,其获得的珍珠囊的效果都较用细胞悬液形成的珍珠囊好。其中多聚赖氨酸和 SM 物质能够促进上皮细胞从外套膜组织块中迁移,并增加上皮细胞在珠核上的粘附,促进体外珍珠囊的形成。

### 2.3 体外珍珠囊的插囊育珠

上述一系列实验表明,用刀刮法加 MTS消化外套膜组织 15 min获得的细胞悬液和用外套膜组织块直接培养都能形成珍珠囊,并且以多聚赖氨酸和 SM 物质作为贴壁因子的结果较为理想。鉴于多聚赖氨酸价格昂贵,使用不方便,而 SM 物质获取简单,价格低廉,在珠核表面所形成的网状结构稳定,其粘附细胞的效果同多聚赖氨酸相同,故在下面的体外珍珠囊

的插囊育珠实验中,均以 SM 物质处理珠核,再分别用刀刮法加 MTS 消化 15 min 获得的细胞悬液和用外套膜组织块培养的珍珠囊进行插囊育珠研究。

表 7 不同贴壁因子对外套膜组织块形成珍珠囊的影响  
Table 7 Effects of different adhering materials on the formation of pearl sacs from mantles

贴壁因子的种类 Adhering materials	胶原蛋白 Collagen	纤粘蛋白 Laminin	多聚赖氨酸 Poly-lysine	SM 物质 SM material	对照 Control
珍珠囊状况 Condition of pearl sac	++	++	+++	+++	++

++ : 细胞较多 many cells; +++ 细胞极多 a great many of cells.

表 8 表明,用刀刮法加 MTS 消化 15 min 获得的细胞悬液所形成的珍珠囊进行的 2 年插囊育珠并不成功,收获的珍珠都是素珠,即仅为珠核,珠核上无任何珍珠质,不是真正意义上的珍珠。

用外套膜组织块培养的珍珠囊所进行的 3 年插囊育珠实验都获得了珍珠(表 9),这种珍珠表面具有珍珠质。前两年(1997~1999)取得的成珠率极低,分别是 0.58% 和 0.12%,最后一年,通过在操作技术上的改进,不但使育珠贝成活率提高,而且使成珠率大幅度提高,达到 4.05%。

### 3 讨论

建立体外珍珠囊的方法有两种,一是用外套膜组织细胞悬液,特别是以上皮细胞为主的细胞悬液,在珠核上进行培养,使之建立包裹珠核的珍珠囊;二是先将外套膜组织块贴在珠核上,经过培养后,外套膜上皮细胞沿着珠核迁移包裹珠核形成珍珠囊,再将组织块除去。在培养第一种方式形成的珍珠囊时,必须获得外套膜上皮细胞的细胞悬液。

为使马氏珠母贝外套膜组织细胞充分分离,根据

表 8 用刀刮法加 MTS 消化 15 min 获得的细胞悬液所形成的珍珠囊插囊育珠实验

年份 Year	育珠贝数 No. of pearl oysters	成活贝数 No. of living pearl oysters	成活率 Rate of living pearl oysters (%)	插核数 No. of inserted Nuclei	收珠数 No. of pearls	素珠数 No. of non-nacred pearls	珍珠数 No. of nacred pearls	成珠率 Rate of nacred pearls
1998	323	78	24.1	422	38	38	0	0
1999	439	182	41.5	537	60	60	0	0

表 9 外套膜组织块培养的珍珠囊进行的插囊育珠实验

Table 9 The production of pearls from pearl sacs cultured from digested mantles

年份 Year	育珠贝数 No. of pearl oysters	成活贝数 No. of living pearl oysters	成活率 Rate of living pearl oysters (%)	插核数 No. of inserted Nuclei	收珠数 No. of pearls	素珠数 No. of non-nacred pearls	珍珠数 No. of nacred pearls	成珠率 Rate of nacred pearls
1997	304	62	20.4	517	41	38	3	0.58
1998	845	156	18.5	1690	89	86	2	0.12
1999	654	266	40.7	1283	183	131	52	4.05

外套膜组织的特点,我们在研究中选择了消化分离法。在对动物细胞进行酶消化解离时,人们经常以柠檬酸钠代替消化液中的氯化钠,以提高细胞的产量<sup>[3]</sup>。我们以同样的方法消化马氏珠母贝外套膜组织也得到了较好的效果。

酶消化法可采用 4℃ 的冷消化法和 37℃ 的热消化法。我们采用冷消化法所得的结果无明显改善,热消化法又过于激烈,消化 30 min 时可看到许多细胞碎片,而选择 25℃ 消化外套膜得到的效果较好。

在消化外套膜组织时,所获得的细胞悬液既有上皮细胞又有结缔组织细胞,上皮细胞有外上皮细胞和內上皮细胞。目前尚无有效的方法分离内外上皮细胞。我们用刀刮法能有效地除去大部分內上皮细胞,而且这种方法既简单又可靠。

由于珍珠的形成是通过珍珠囊来实现的,因此,国内外学者都比较关注珍珠囊的形成和珍珠囊的结构<sup>[4,6]</sup>。在珍珠囊形成和结构的细节上,不同学者研究的结果虽然有差异,但他们普遍认为外套膜植片(组织)外上皮细胞经迁移和增殖能形成珍珠囊的上皮细胞,其结缔组织细胞和受体贝的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,而外套膜植片的內上皮细胞则退化,不参加珍珠囊的形成<sup>[7]</sup>。在体外培养珍珠囊时既要解决细胞在珠核表面的粘附问题,又要解决体外珍珠囊的细胞组成问题。为使珠核表面能够使细胞在其表面粘附,我们选择了细胞培养中常用的贴壁因子,纤粘蛋白、多聚赖氨酸、鼠尾胶原以及我们自己筛选的 SM 物质处理珠核。实验结果表明只是带有正电荷的大分子物质多聚赖氨酸和 SM 物质能起到较好的作用。我们发现在体外珍珠囊培养的早期,纤粘蛋白和鼠尾胶原具有明显的促使

细胞贴壁的作用,但培养到第 2 天,已粘附的细胞大部分脱落;珠核表面变得非常光滑,这可能与蛋白质物质被细胞分解融化有关。刘汀等在珍珠囊的预培育中也发现虽然鼠尾胶原对细胞悬液具贴附作用,但随着培养时间的延长会失去贴壁能力<sup>[8]</sup>。而多聚赖氨酸和 SM 物质对细胞的粘附作用一直能持续到进行插囊育珠。一方面可能因为粘附的细胞不能消化分解这类物质,另一方面同这类物质本身的结构特性有关。

在体外培养珍珠囊最重要地是建立完整的珍珠囊结构。由于目前尚无法精确地分离外套膜组织中的各类细胞,特别是外上皮细胞、内上皮细胞和结缔组织细胞三类细胞,因此无法按比例在体外建立珍珠囊。其结果是虽然有不少细胞粘附在珠核上,但细胞之间无法建立应有的连接,不能形成结构完整的珍珠囊。相反,用外套膜组织块贴附在珠核上进行培养,外套膜组织建立体外珍珠囊的过程同体内建立珍珠囊的过程基本上是一致的,外上皮细胞从外套膜组织块中迁出,沿着珠核的表面移动,逐渐包裹珠核表面,同时外套膜组织中的结缔组织细胞再包裹在外上皮细胞表面,最终形成结构较完整的珍珠囊,这种珍珠囊是真正意义上的珍珠囊。

我们在几年的插囊育珠中得出的一个共同的结果:用外套膜组织的细胞悬液形成的体外珍珠囊用于插囊育珠无法得到珍珠,而将外套膜组织块形成的体外珍珠囊用于插囊育珠能够得到珍珠。说明,细胞悬液所形成的珍珠囊还不是完善的珍珠囊,而由外套膜组织块形成的珍珠囊才具有完整的结构和功能。

用外套膜组织块形成的体外珍珠囊用于插囊育珠实验中往往出现成珠率低、素珠多和育珠贝死亡率高。这同插核技术无不相关。切口的大小及珠核通过切口运至预定核位的方式直接影响到体外珍珠囊的

结构变化。若体外珍珠囊在珠核上贴附不牢固、切口过小,就会造成体外珍珠囊受到破坏,使它们在到达预定核位之前完全脱落,无法产生珍珠,只能是素珠,而保持完整结构珍珠囊的珠核最终产生珍珠。我们在 1999 年的实验中,改进了插核技术,切口变大,扩大输送通道,使成珠率明显提高。我们取得的部分成功说明,插囊育珠的方式和设想是可行的,但真正用于生产还需要做大量的基础工作。

### 参考文献

- 1 王爱民,苏琼,阎冰等. 马氏珠母贝外套膜组织培养条件和方法初探. 广西科学院学报, 1995, 11 (3-4): 17~22.
- 2 鄂征. 组织培养技术. 第 2 版,北京:人民卫生出版社, 1988. 55~91.
- 3 Farris V K. Molluscan cell dissociation and reaggregation. Science, 160: 1245~1246.
- 4 杜晓东,何海平,吴熙载. 皱纹冠蚌珍珠囊发育的研究. 水生生物学报, 1991, 15 (3): 227~233.
- 5 Machii A. Histological studies on the pearl-sac formation. Bull. Natn. Pearl Res. Lab., 1968, 13: 1489~1539.
- 6 Awaji M, Suzuki T. The pattern of cell proliferation during pearl sac formation in the pearl oyster. Fisheries Science, 1995, 61 (5): 747~751.
- 7 胡曦璇,石安静. 珍珠囊研究概况. 水生生物学报, 1994, 18 (1): 76~81.
- 8 刘汀,沈亦平,郑俊英等. 合浦珠母贝 (*Pinctada martensii* Dunker) 珍珠囊体外预培育的初步研究. 武汉大学学报 (自然科学版), 1997, 43 (6): 802~804.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 66 页 Continue from page 66)

- 4 Koch AE, Harlow LA, Haines GK et al.. Vascular endothelial growth factor, a cytokine modulating endothelial function in Rheumatoid arthritis. J Immunol, 1994; 152 (8): 4149~4156.
- 5 Maeda K, Chung Y, Ogawa Y et al.. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. Cancer, 1996; 77 (5): 858~863.
- 6 Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R et al.. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. J Clin Invest, 1989; 84 (5): 1470~1478.
- 7 Roychowdhury PF, Tseng A, Fu KK et al.. New

prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma tumor angiogenesis and C-erb B2 expression. Cancer, 1996, 77 (8): 1419~1426.

- 8 Horak ER, Leek R, Klenk N et al.. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast Cancer. Lancet, 1992, 340 (8828): 1120~1124.
- 9 Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P et al.. Tumor microvessel density, P53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. J Clin Oncol. 1994, 12 (2): 454~457.

(责任编辑: 蒋汉明)