

# 马氏珠母贝外套膜组织培养\*

## In Vitro Culture of Mantle of the Pearl Oyster (*Pinctada martensii*)

王爱民 苏琼 阎冰 叶力  
Wang Aimin Su Qiong Yan Bing 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** 用本实验室已建立的贝类组织培养技术对马氏珠母贝外套膜组织成功地进行了体外培养。在外套膜组织中最先迁出的是颗粒细胞,紧随其后为透明细胞,在培养到 20 h时,圆形的上皮细胞开始迁出,上皮细胞很快在组织块周围形成生长晕,继而铺满整个培养瓶底面;培养 4 d以后,上皮细胞开始分泌颗粒状物质,这时的上皮细胞从形态上可分为 A型和 B型两类,B型上皮细胞含有许多颗粒物质,而 A型上皮细胞不含或含少量颗粒物质,反映了其合成分泌物的状态。上皮细胞活跃的活动能持续很长时间,分泌物可在培养瓶内结块。上皮细胞在体外培养存活达 65 d左右。在外套膜组织的培养中,还出现了大量的棱形肌肉细胞。本研究同时对外套膜愈伤组织进行培养,其上皮细胞的迁出时间和上皮细胞的分泌活动都比正常培养的外套膜组织提前。

**关键词** 马氏珠母贝 外套膜 组织培养 珍珠质

中图法分类号 S 968.316.9; Q 246 Q 25

**Abstract** Mantle tissue of the pearl oyster, *Pinctada martensii* was cultured in vitro for periods of up to 65 days. After 2-5 hours of culture, roundish granulocytes began to migrate out from the mantle tissue explant. This was followed by the hyalinocytes or agranulocytes with pseudopodia. After 20 hour culture, the epithelial cells migrated and within a short time had formed growth sheets in the periphery of the explant and on the surface of the flask. Four days after initiation of the culture, the entire surface of the flask was covered by a cell sheet mostly consisting of the epithelial cells. At this time, epithelial cells were of two distinct morphologically types, epithelial cell A (ECA) and epithelial cell B (ECB). Both types of epithelial cells appeared to secrete fine nacreous matter, although ECA secreted considerably more nacre than ECB. The secretive activity of the epithelial cells continued until pieces of nacreous matter eventually formed on the flask. During culture, elongate, spindle like muscle cells also appeared. In this study, lacerated mantles were also cultured which was found to reduce the time before epithelial cells emigrated into the culture.

**Key words** *Pinctada martensii*, mantle, tissue culture, nacre.

珍珠是由珍珠贝体内的珍珠囊分泌珍珠质而形成的,珍珠囊是珍珠贝外套膜的上皮细胞受到刺激后增殖形成的,因此珍珠贝的外套膜在珍珠形成中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。现代人工珍珠培养技术就是将供体珍珠贝外套膜组织块单独或与珠核一道植入受体珍珠贝体内形成无核珍珠或有核珍珠。

对于珍珠贝外套膜的组织培养国内外已开展了不少工作。日本学者町井昭 (Machi)从 60年代末期就对日本产的马氏珠母贝外套膜组织培养进行了系统的研究,使培养的外套膜组织在体外存活 30 d左右,

并能分泌微型颗粒的珍珠质<sup>[2,3]</sup>;我国四川大学的石安静等从 80年代初期对我国的淡水珍珠蚌,三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii* (Lee))、褶纹冠蚌 [*Cristaria plicata* (Leach)]和背角无齿蚌 [*Anodonta woodiana* (Pacifica Heude)]的外套膜组织培养进行深入的研究,不但成功地建立组织培养技术和方法,而且对外套膜组织在体外培养中产生的分泌物(珍珠质)的性质和药理作用进行了分析<sup>[4-7]</sup>。我们从 90年代中期一直对马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*)的外套膜组织培养开展研究,建立了一套较完善的培养条件和方法,成功地培养了外套膜组织<sup>[8]</sup>;同时应用外套膜培养技术初步培养了体外珍珠囊,将体外珍珠囊进行插囊育珠移植实验培养出海水珍珠<sup>[9]</sup>。本文主要报道马

1999-11-01收稿,2000-01-24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)。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验用马氏珠母贝由广西北海市铁山港珍珠养殖场提供, 贝龄 1~2 龄。培养用外套膜组织块的制备为两种方式: 一是用手术刀切开贝闭壳肌的中部, 在无菌室中切下外套膜, 除去裙带部分, 净化处理后切成  $3\text{ mm}^2 \sim 4\text{ mm}^2$  的小块, 置于培养瓶内培养; 二是用手术刀沿贝一侧贝壳的内壁切割, 除去该侧的贝壳, 剪去该侧外套膜的外缘, 将此贝饲养 2 d 后取形成愈伤组织的外套膜组织, 净化后切成  $3\text{ mm}^2 \sim 4\text{ mm}^2$  的小块后, 置于培养瓶内培养。

### 1.2 培养方法

培养条件和方法见王爱民等建立的方法<sup>[8]</sup>; 每个培养瓶底面用 0.5% SM 物质处理, 蒸汽消毒后使用。

### 1.3 观察方法

用倒置显微镜的普通和相差镜头观察培养细胞的形态及生长, 并照相记录。

## 2 实验结果

### 2.1 培养外套膜组织的细胞活动特点

外套膜组织块培养 4 h 后开始有细胞从组织块中迁移出来, 这种最先迁移出来的细胞是颗粒细胞, 圆形或椭圆形; 胞质中含有数量不等的颗粒; 细胞核较大, 圆形, 细胞从组织块中迁移后留下明显的痕迹 (图 1)。培养 8 h 后, 组织块周围细胞增加, 除颗粒细胞外, 另一种形状的透明细胞出现, 这种细胞贴壁明显, 胞体突起较丰富, 突起端有明显的棘突和伪足, 胞质均匀, 透明细胞胞体伸展, 向四周迅速运动。



图 1 培养 4 h 的外套膜组织块, 周围是迁出的颗粒细胞。× 120

Fig. 1 The granulocytes migrating out from the mantle after culture of 4 hours. × 120

培养到 20 h, 上皮细胞从组织内迁出, 夹杂在透明细胞之间 (图 2); 上皮细胞圆形, 一部分上皮细胞

从组织块迁出后直接沿着培养瓶壁贴壁向四周运动, 另一部分上皮细胞则从组织块迁出后沿着组织块周围的粘液运动; 培养到 40 h, 组织块周围已形成明显的生长晕 (图 3), 即紧靠组织块周围的细胞密集, 细胞向四周排列逐渐稀疏, 组成生长晕的细胞主要是上皮细胞, 在组织块周围产生的粘液中, 上皮细胞的数量能够迅速增加, 在培养基中有不少悬浮的上皮细胞, 在组织块之间的空隙处, 上皮细胞分散存在, 随着培养的继续, 上皮细胞在组织块的空隙间连成一片片的细胞片。



图 2 外套膜培养 20 h, 圆形的上皮细胞开始迁出, 夹杂在具伪足的透明细胞之间。× 120

Fig. 2 The round epithelial cells and hyalinocytes with the pseudopodia from the mantle after culture of 20 hours. × 120



图 3 外套膜培养 40 h, 上皮细胞在外套膜组织块周围形成的生长晕。× 300

Fig. 3 The epithelial cell growth sheet in the periphery of the mantle after culture of 40 hours. × 300

组织块培养 4 d 以上, 上皮细胞在数量增加的同时, 形状上开始发生变化, 大部分细胞内聚集了颗粒物质, 在培养瓶底面已出现许多微细的颗粒物质 (图 4A), 这时的上皮细胞从形态上可分为两类, 一类细胞较大, 所含的颗粒少, 颗粒分布在细胞的周围或一端, 称为 A 型上皮细胞; 另一类细胞较小, 胞质中充满颗粒, 使细胞呈黑团状, 称为 B 型上皮细胞 (图 4B)。培养到第 8 d, 从组织块中又迁出一种呈棱形的

肌肉细胞,数量少,分布在上皮细胞之间,在以后的培养中,上皮细胞的数量增加不明显,而肌肉细胞数量开始增加,上皮细胞持续不断地进行分泌活动

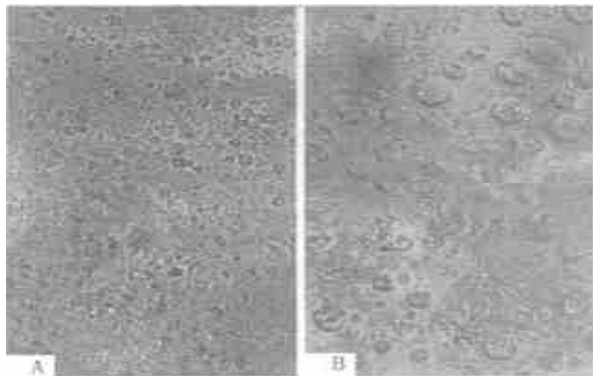


图4 A 外套膜培养4d,上皮细胞内含颗粒,并开始分泌珍珠质;示细胞间的颗粒物。×120; B 图A的部分放大,示A型上皮细胞大,内含颗粒少;B型上皮细胞小,内含颗粒多。×300

Fig. 4 A The epithelial cells containing granules and secreting nacreous matter on the flask after culture of 40 hours. × 120 B The part of 4 A, showing epithelial cell B containing granules much more than epithelial cell A. × 300

培养到24d时,在上皮细胞中,B型细胞在数量上超过A型细胞,肌肉细胞数量明显增加,肌肉细胞细长,仅在细胞核存在的部位为隆起状(图5);这时的组织块周缘有许多纤维状的突起,看似平滑肌细胞迁移后留下的痕迹。培养到30d~50d,上皮细胞继续分泌颗粒物质,在培养瓶底面已有很厚的白色块状物出现,特别是在培养细胞呈团存在的区域,白色块状物最明显,各种培养细胞的体积都明显地膨胀变大(图6),A型细胞仍保持圆形,胞质内含少量颗粒物质,B型细胞富含颗粒物质,B型上皮细胞的大小差别较大,B型上皮细胞往往贴壁不紧,在培养液中有许多悬浮的B型上皮细胞,因换培养液的缘故,B型上皮细胞常被换掉,使其数量不断减少,在以后的继

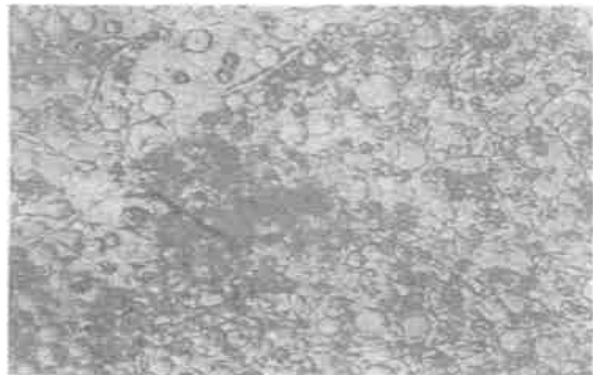


图5 外套膜培养24d,B型上皮细胞的数量超过A型上皮细胞,肌肉细胞呈纤细状。×300

Fig. 5 The epithelial cell B are much more than the epithelial cell A; muscle cells showing spindle and elongate shape after culture of 24 days. × 300



图6 培养45d,示上皮细胞及分泌颗粒,肌肉细胞;×300

Fig. 6 The epithelial cells, secreted nacreous matter and muscle cells after culture of 45 days. × 300

续培养中,除更换培养基使部分细胞损失外,大部分细胞仍继续存活,只是细胞代谢缓慢,分泌停止,这种状态可持续保持到65d

## 2.2 培养外套膜愈伤组织的细胞活动特点

用外套膜愈伤组织进行培养,培养2.5h组织块开始有细胞向外迁移,这些迁移的细胞既有上皮细胞又有肌肉细胞,透明细胞和颗粒细胞少见(图7),迁移出来的上皮细胞常呈细胞块;培养20h,组织块周围已形成生长晕(图8),在培养瓶底面和培养基中也有许多上皮细胞;培养到第3d,在组织块之间的培养瓶底面,上皮细胞已开始连成片,上皮细胞开始分泌颗粒物质,其中B型细胞所占的比例较大(图9),在以后的继续培养中,各类细胞的活动同常规培养方法的结果基本相同,用外套膜愈伤组织进行培养,在培养的早期,细胞迁出和活动比常规的培养方法要快要活跃,但后期分泌代谢活动和常规培养基本相同,



图7 培养2.5h的外套膜愈伤组织,示上皮细胞和肌肉细胞迁出。×120

Fig. 7 The epithelial cells and muscle cells emigrating out from wounding mantle after culture of 2.5 hours. × 120.

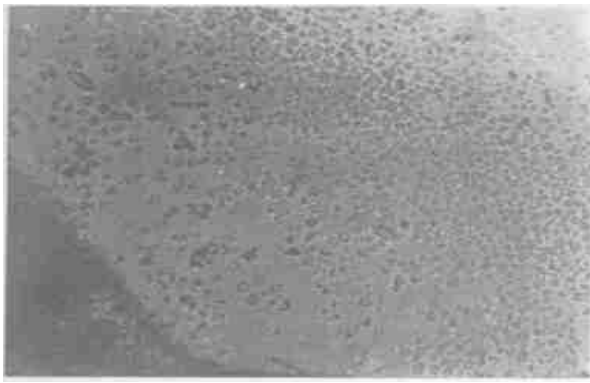


图 8 培养 20 h 的外套膜愈伤组织, 示上皮细胞生长量。  
× 120.

Fig. 8 The growth sheet of epithelial cells from wounding mantle after culture of 20 hours. × 120.

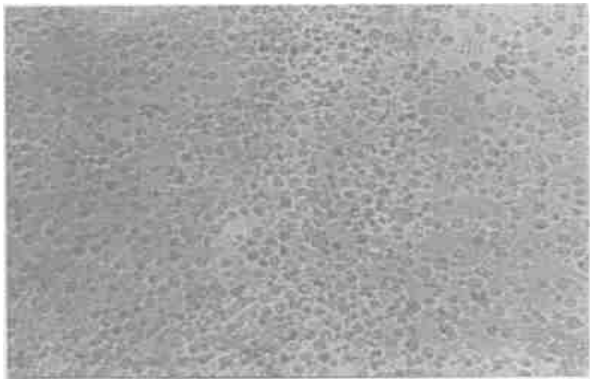


图 9 培养 3 d 的外套膜愈伤组织, 示上皮细胞分泌活动, B 型上皮数量增多。× 120

Fig. 9 The secreting of the epithelial cells, a lot of the epithelial cell B from wounding mantle after culture of 3 days. × 120.

### 3 讨论

上皮细胞并不是最先从外套膜组织块迁出的细胞, 它们是继结缔组织中的血细胞之后迁出的。随着培养, 上皮细胞逐渐增多, 在组织块周围形成生长晕, 继而逐渐扩展形成覆盖培养瓶底面的细胞片。这种过程同町井昭等在日本马氏珠母贝上研究的结果基本一致<sup>[3]</sup>。在体外培养中, 上皮细胞仍然保持其分泌的特性。培养到一定时间的上皮细胞从形态上出现 A 型上皮细胞和 B 型上皮细胞, 其差别是细胞的大小和细胞内所含颗粒的不同; 两种类型上皮细胞反映了它们所处的分泌活动阶段不同; A 型上皮细胞内颗粒少, 胞体较大, 可能是尚未开始合成分泌物质或处于合成的早期阶段, B 型上皮细胞内颗粒多, 胞体小, 细胞内合成并聚集了大量的分泌物。在培养的后期, B 型上皮细胞逐渐增加, 而 A 型上皮细胞不断减少,

说明了 A 型上皮细胞向 B 型上皮细胞的转化。上皮细胞直接将分泌物分泌在培养液中, 分泌多沉积在培养瓶底面, 最初是分散的细微颗粒, 后聚积成块, 这些分泌物经研究证明是珍珠质(另文讨论)。关于外套膜上皮细胞分泌珍珠质的方式, 我们的研究同町井昭等<sup>[3]</sup>、Samata 等<sup>[10]</sup>在日本马氏珠母贝和石安静等<sup>[4, 6]</sup>在褶纹冠蚌中研究结果不同, 他们都是根据从外套膜组织块上或组织块边缘观察到组织块变为褐色或茶色来判定其分泌作用, 是组织块而非独立的上皮细胞分泌珍珠质(钙结晶)。我们的研究表明, 从外套膜组织块迁移的上皮细胞具有较强的分泌珍珠质的功能。

在马氏珠母贝外套膜组织的培养中, 最早迁出的细胞是颗粒细胞, 紧跟其后迁出的细胞是透明细胞; 这两种细胞都属于血细胞。由于贝类血细胞还无统一的分类命名, 又有人将透明细胞称为无颗粒细胞。因这两类细胞都具有迁移和运动的特性, 往往又统称为游走细胞。从这两种游走细胞先于外套膜上皮细胞迁出的事实推测, 它们与伤口的修复、机体的免疫相关。Suzuki 等<sup>[11]</sup>通过植入核、植入核及外套膜小片、组织培养等方法说明, 无颗粒细胞具有活跃的吞噬作用, 并能合成细胞外基质, 使外套膜上皮细胞沿基质迁移; 认为无颗粒细胞是修复伤口和免疫反应的重要细胞。Wada<sup>[12]</sup>在对淡水蚌外套膜小片移植的研究中, 发现无颗粒细胞参与修复伤口, 颗粒细胞参与免疫反应, 吞噬细胞碎片等。Awaji 等<sup>[13]</sup>在研究马氏珠母贝珍珠囊的形成中发现, 血细胞首先包裹外套膜小片和珠核, 形成血细胞囊, 外套膜外上皮细胞沿血细胞囊内壁迁移、运动, 最后形成包裹珠核的珍珠囊。杜晓东等<sup>[14]</sup>在研究褶纹冠蚌珍珠囊的形成时也注意到游走细胞的存在, 认为游走细胞在珍珠囊发育的早期参与外套膜中结缔组织间质的分解作用, 对珍珠囊的形态重建有重大的影响。

棱形的肌肉细胞是培养中最后迁出的细胞, 至于肌肉细胞的作用尚不清楚。已研究的珍珠囊结构表明<sup>[15, 16]</sup>, 组成珍珠囊上皮细胞外围的结缔组织中含有肌肉细胞, 因此说明在外套膜组织块移植形成珍珠囊时其肌肉细胞参与了珍珠囊的结构。

从外套膜组织培养中各种细胞迁出的行为表现, 可以推测移植外套膜形成珍珠囊的过程包括: 首先, 颗粒细胞清理组织细胞碎片、清除感染细菌等, 参与免疫防御反应; 第二, 透明细胞或无颗粒细胞沿一定的方向迁移, 并分泌细胞外基质, 用于指导和影响外套膜上皮细胞的迁移方向和组成结构; 第三, 外套膜上皮细胞沿着细胞外基质运动, 形成珍珠囊上皮细胞, 包裹珠核; 最后, 外套膜组织的结缔组织细胞,

包括肌肉细胞和受体贝结缔组织细胞共同包裹在珍珠囊上皮细胞外围,形成完整的珍珠囊

用养殖 2 d 的外套膜愈伤组织进行体外培养,发现其细胞的迁出和迁移过程与未损伤的外套膜组织的培养有较大的区别:一是在培养的早期,游走细胞出现的极少;二是上皮细胞和肌肉细胞的出现均提前;三是上皮细胞的分泌活动提前。作为损伤的组织,游走细胞为修复伤口在体内一定出现过,但在培养前的组织净化过程中它们可能被洗掉了,因此在培养中极少再见到。上皮细胞、肌肉细胞迁出提前及上皮细胞分泌活动的提前说明在损伤的刺激下,机体出现了相应的反应,促进了外套膜组织细胞的分裂。继续研究外套膜愈伤组织的培养条件或从愈伤组织提取有效成分,也许是解决体外培养外套膜上皮细胞不分裂难题的有效途径

### 参考文献

- 1 蒙钊美,李有宁,邢孔武.珍珠养殖理论与技术.北京:科学出版社,1996.23~29.
- 2 Machii A. Histological studies on the pearl-sac formation. Bull Natn Pearl Res Lab, 1968, 13: 1489~1539.
- 3 Machii A, Wada K T. Some marine invertebrates tissue culture. Invertebrate Cell System Application. J Mitsuhashi. Florida, CRC Press. 1989, 3: 225~233.
- 4 石安静.河蚌外套膜的组织培养.水产学报,1983,7(2):153~157.
- 5 刘绍龙,石安静.育珠蚌外套膜组织培养适宜条件的研究.四川大学学报(自然科学版),1993,30(1):107~114.

- 6 石安静,陈蜀娜.褶纹冠蚌外套膜组织培养的分泌物的偏光显微镜观察.动物学报,1995,41(1):35~40.
- 7 石安静,王喜忠,张洪渊.淡水育珠蚌体外培养外套膜细胞分泌的珍珠质的性质研究.动物学报,1994,40(2):191~197.
- 8 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.
- 9 王爱民,阎冰,苏琼等.马氏珠母贝珍珠囊体外培养及插囊育珠.广西科学,2000,7(1):70~74.
- 10 Samata T, Somiya H, Horita C et al. SEM observation of microcrystals developed over black secretion on the cultured tissue of the pearl oyster *Pinctada fucata*. Fisheries Science, 1994, 60(3):343~344.
- 11 Suzuki T, Yoshinaka R, Mizuta S et al. Extracellular matrix formation by amoebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. Cell Tissue Res, 1991, 266: 75~82.
- 12 Wada K. Allograft and xenograft mantle transplantation in freshwater mussels. Venus, 1989, 48(3):174~190.
- 13 Awaji M, Suzuki T. The pattern of cell proliferation during pearl sac formation in the pearl oyster. Fisheries Science, 1995, 61(5):747~751.
- 14 杜晓东,何海平,吴熙载.褶纹冠蚌珍珠囊发育的研究.水生生物学报,1991,15(3):227~233.
- 15 俞豪祥.三角帆蚌外套膜及珍珠囊的组织学初步观察.动物学杂志,1985,(1):1~4.
- 16 杜晓东,许国领.褶纹冠蚌珍珠囊发育的超微结构观察.水产学报,1990,14(3):212~218.

(责任编辑:蒋汉明)

## 日本学者首次实验证实生命的诞生与水晶有关

据《科学时报》2000年5月25日报道,东京理科大学硃合宪三教授,经实验证实地球上生命诞生时,水晶有可能起到很大的作用。日前在日本人学理工工学部召开的日本化学会上,发表了这一假说的实验证据,引起与会者关注。

构成包括人类在内的生物的分子中,有氨基酸和核糖两类有机化合物,氨基酸是构成蛋白质的材料,而核糖是构成遗传子的材料,是生物体必不可少的物质。氨基酸和核糖的分子,存在着有如左手和右手(或实物和镜像)关系的两类型分子: D型和 L型。它们具有完全相同的化学性质,但对光的旋转方向完全相反,被称为光学异构体。

如果化学合成, D体与 L体以相同比例生成,但在生物体中,除极少例子外,都是 L-氨基酸和 D-核糖,其原因一直是生物学的一个谜。解释这一现象的假说之一,认为地球上生命诞生时用的 L-氨基酸和 D-核糖是由于水晶的作用产生的。水晶分为右旋光和左旋光两种。然而至今还没有得到水晶起作用的证据。

硃合教授的研究使用 D型和 L型嘧啶基烷基醇,由它可合成氨基酸中的缬氨酸。在这之前,硃合曾将少量单一异构体的嘧啶基烷基醇与大量它消旋体原料混合,反应后发现,新生成的产物几乎都是与少量异构体同一构型的产物。这种自催化作用机理目前尚不完全清楚。该研究结果已在 Nature上发表。

这次实验的目的是考察左水晶和右水晶在由嘧啶醛合成嘧啶基烷基醇过程中的作用。结果用右水晶时生成 L-嘧啶基烷基醇,使用左水晶时,生成 D-嘧啶基烷基醇。

硃合三教授指出,“嘧啶醛具有平面型构造,平面上对左水晶或右水晶的吸着方式不同。因此在水晶表面生成的嘧啶基烷基醇也就不同”,从而在世界上首次证实:有光学活性的有机化合物的生成与水晶的光活性有关。这项研究结果在美国化学会杂志发表后,引起巨大的反响。硃合三教授说“目前还不能直接用水晶选择合成 L-氨基酸与 D-核糖,但已初见端倪。一旦光活性体生成,同一光学异构体会自催化繁殖,这也是生命诞生过程中必然发生的情况”。