

文章编号: 1004-7271(2002)01-0027-04

三角帆蚌外套膜细胞培养与组织培养的比较

施志仪, 李 巍, 李松荣, 楼允东

(上海水产大学生物技术研究中心, 上海 200090)

摘 要 通过对三角帆蚌外套膜外表皮进行组织培养和细胞培养的比较研究, 表明组织培养比细胞培养更易获得大量游离细胞。并且通过原子吸收光谱分析, 证明体外培养的三角帆蚌组织和细胞皆能正常分泌珍珠质, 且两者的分泌能力大体相同。

关键词 三角帆蚌; 外套膜; 上皮细胞; 珍珠囊; 组织培养; 细胞培养

中图分类号: S917 文献标识码: A

Comparision of the tissue culture and cell culture from the mantle epithelium of *Hyriopsis cumingii*

SHI Zhi-yi, LI Wei, LI Song-rong, LOU Yun-dong

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

Abstract In this paper the tissue culture and cell culture of the mantle epithelium of *Hyriopsis cumingii* were performed. The experimental results show that the tissue culture was better than the cell culture in gaining a large amount of free cell. Both tissue and cell cultures in vitro were able to secrete the organic pearl materials, and the secretive ability was nearly same based on atomic absorption spectrometric analyses.

Key words *Hyriopsis cumingii*; mantle epithelial cell; pearl-sac; tissue culture; cell culture

珍珠是珍珠贝体内珍珠囊(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^[1-3], 因此珍珠贝的外套膜在珍珠形成中起着重要的作用。人工珍珠培养技术就是将珍珠贝外套膜组织块单独或与珠核一起植入珍珠贝体内形成无核珍珠或有核珍珠^[4]。目前人工育珠技术得到广泛的应用, 使我国的珍珠养殖业有了较大的发展, 然而, 所产的珍珠质量不高。就目前人工育珠所采用的两种方法而言, 人工无核珍珠的质量与有核珍珠的质量相比, 人工有核珍珠的质量较好, 但由于目前人工有核珍珠多采用直接插核的方法, 难以形成珍珠囊, 成珠极少, 不利于大规模的生产。因此, 有必要寻找新的育珠方法。根据珍珠囊形成的原理, 运用现代生物工程技术, 体外培养珍珠囊, 插囊育珠, 以及进一步进行体外培育珍珠(试管珍珠), 也许能从根本上提高珍珠质量与产量。而外套膜的组织与细胞培养是开展这些新的育珠方法的最基本的前提。

对于珍珠贝外套膜的组织培养国内外已开展了一些工作。Machi^[5]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 30d 左

收稿日期 2001-10-13

基金项目 香港三圆国际有限公司资助项目。

作者简介 施志仪(1954 -)男, 上海市人, 理学博士, 副教授, 主要从事水产动物生物技术, 海洋药物研究。E-mail: zyshi@shfu.edu.

右石安静^[6]在 20 世纪 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*)的外套膜组织培养进行了研究。王爱民等^[7]从 20 世纪 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,同时应用外套膜培养技术初步培养出体外珍珠囊,并进行插囊育珠移植实验。但到目前为止,还未见关于淡水育珠蚌外套膜组织培养培育出体外珍珠囊的报道。至于珍珠贝的外套膜的细胞培养,Awaji 等^[8]曾用分散酶(dispase)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细胞培养与组织培养的比较,探索体外形成珍珠囊并最终生成优质珍珠的最佳方法。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的材料采自苏州黄埭镇珍珠养殖场并在实验室水族箱暂养的三角帆蚌,其年龄在 2 龄左右。

1.2 方法

1.2.1 组织块培养方法

选取健康、生活力强的河蚌,将蚌壳用肥皂水洗刷干净,然后割断闭壳肌,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 30min 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 4000 U/mL,链霉素 5000 U/mL)中,浸泡 15min,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 1mm² 左右的小片,在每个培养瓶内贴 20~30 片,将 5mL 培养基加在培养瓶未贴组织片的一面,放入 25℃ 的恒温箱中培养 24h,然后将培养瓶翻向,使培养基完全浸没组织片,继续培养。

1.2.2 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,将剥制好的外套膜外表皮用抗菌溶液反复洗涤,再用已灭菌的双蒸水洗涤 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切割成 1mm² 左右的小块,将组织块放入一个培养瓶中,加入适量消化液,置于 37℃ 恒温摇床上以 120r/min 的速率消化 30min,再移置离心管中,以 1000r/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 1mL 河蚌自身血清,置于 25℃ 恒温培养箱中,24h 后更换一次培养基。以后每两天更换一次新鲜培养基。

1.2.3 钙含量的测定

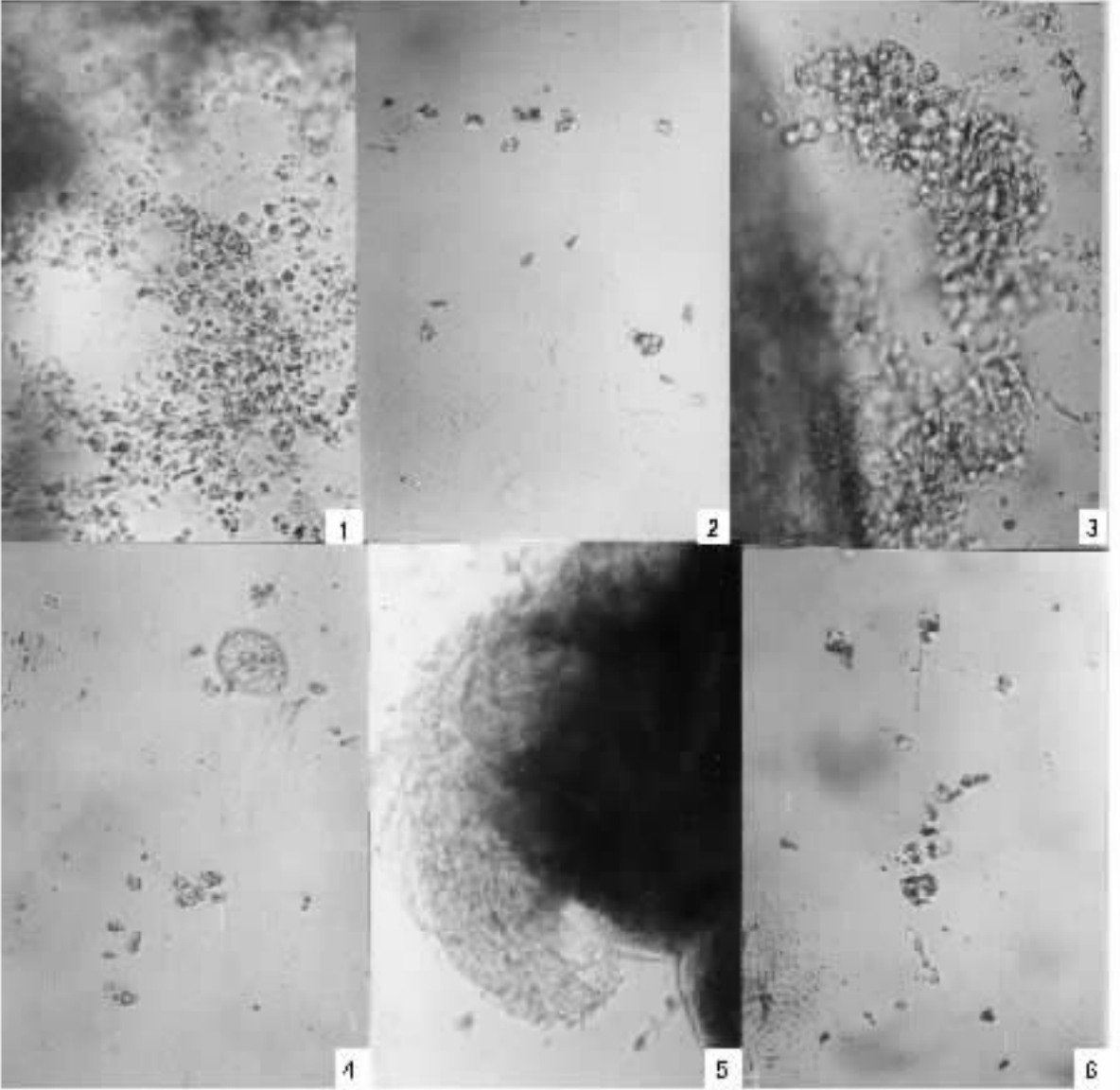
珍珠的主要组成物质是碳酸钙(CaCO₃),因此要断定细胞能不能分泌珍珠质或者分泌出来的是不是珍珠质,可以通过测定培养细胞的钙离子含量^[9,10]。利用原子吸收光谱仪(GBC 932 型,澳大利亚 GBC 科学仪器公司产)来测定培养细胞或组织钙离子的含量。在测定钙含量之前先按文献配制 1μg/mL、2μg/mL、3μg/mL 和 4μg/mL 的各浓度确定工作曲线从而估计培养细胞或组织钙离子的浓度,然后再测定培养细胞或组织的钙含量。

2 结果

2.1 光学显微镜观察结果

在倒置显微镜观察下发现,培养后第 3 天细胞培养组的细胞数量略有增加(图版 1),而组织培养组的组织块边缘很疏松,边缘由内而外有较多细胞游离出来(图版 2);第 6 天,细胞培养组的细胞没有大量增殖的迹象(图版 3),而组织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(图版 4);第 10 天,细胞培养组的细胞数目有所增多且有分裂现象(图版 5),而组织培养组在组织

块边缘已形成明显层片的膜状结构,并有结晶物出现但数量不多(图版6)。



图版 培养后不同时间在光镜下观察到的细胞和组织

Plate Observed tissues and cells under light microscope at different time after culture

1. 培养后 3d 的组织 2. 培养后 3d 的细胞 3. 培养后 6d 的组织;
4. 培养后 6d 的细胞 5. 培养后 10d 的组织 6. 培养后 10d 的细胞

2.2 钙含量的测定结果

组织培养组和细胞培养组中的钙离子含量比对照组(无外表皮细胞的培养基)中的钙离子含量明显增加,而且随着培养的进展其钙离子也随之增加(表1),由此推断所培养的细胞或组织能正常分泌出珍珠质。

表 1 不同培养时间钙含量的测定值($\mu\text{g}/\text{mL}$)Tab.1 Ca^{2+} concentration of tissue and cell cultured at different time

培养时间	对照组 (平均值)	组织培养 (平均值)	细胞培养 (平均值)
3d	1.189	1.478	1.968
10d	1.189	2.265	2.318

3 讨论

本试验证实了珍珠蚌外套膜外表皮细胞及外套膜组织块在体外培养条件下能与自然生长时一样,分泌珍珠质。如表 1 所示,经过 3d 培养之后,组织块培养的钙含量为 $1.478\mu\text{g}/\text{mL}$,细胞培养的钙含量为 $1.968\mu\text{g}/\text{mL}$,而作为对照的纯培养基中的钙含量为 $1.189\mu\text{g}/\text{mL}$,经过 10d 的培养之后,组织块培养的钙含量上升为 $2.265\mu\text{g}/\text{mL}$,细胞培养的平均为 $2.318\mu\text{g}/\text{mL}$,两者相差不大,说明珍珠蚌外套膜外表皮细胞和外套膜组织块在体外培养条件下的分泌能力大体相同。但将培养的组织块与细胞的增殖能力相比较,组织块的生长速度明显比细胞快。从试验结果中可以看到,培养 3d 后的细胞数量只是略有增加,而组织块的边缘有较多细胞游离出来,培养 6d 后的细胞仍然没有大量增殖的迹象,而组织块边缘的细胞大量增殖形成生长晕,培养 10d 后的细胞数目虽有增多,但不明显,而在培养的组织块边缘已形成膜片状结构并有结晶物质(珍珠质)出现。从显微图片中也可以看到,培养的细胞虽然有分裂,但数目不多;而培养的组织块周围有大量的游离细胞,由内而外逐渐生长出来,在细胞密集区已形成生长晕。通过仔细观察还可以发现,培养的细胞的形状不好,这也是细胞生活力不强的表现。由此可见,组织块的培养更有利于培育体外珍珠囊。虽然我们成功地培养了外套膜组织块且证实了在体外培养中它具有分泌珍珠质的能力,但要在体外培育珍珠囊还需要进一步改进培养方法。

本校渔业学院生物技术专业 2000 届钟凌燕和 2001 届唐冬英学生参加了本实验部分工作,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 胡曦璇,石安静.珍珠囊研究概况[J].水生生物学报,1994,18(1):76-81.
- [2] 石安静,张矛,吴中文,等.三角帆蚌珍珠囊形成的研究[J].水产学报,1985,9(3):247-253.
- [3] 邱安东,石安静.三角帆蚌珍珠囊细胞的分泌活动[J].水产学报,1999,23(2):115-121.
- [4] 李松荣.淡水珍珠培养技术[M].北京:金盾出版社,1999.
- [5] Machii A. Histological studies on the pearl-sac formation[J]. Bull Natn Pearl Res Lab,1968,13:1489-1539.
- [6] 石安静.河蚌外套膜的组织培养[J].水产学报,1983,7(2):152-157.
- [7] 王爱民,苏琼,阎冰,等.马氏珠母贝外套膜组织培养[J].广西科学,2000,7(2):135-139.
- [8] Awaji M, Suzuki T. 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,1998,34(6):486-491.
- [9] 胡曦璇,石安静.背角无齿蚌珍珠囊形成过程中钙代谢的初步研究[J].动物学杂志,1995,30(1):8-10.
- [10] 张洪渊,石安静,刘克武,等.河蚌培养组织的几种生化成分分析[J].动物学杂志,1994,29(4):8-12.