

文章编号: 1004-7271(2008)03-0291-07

三角帆蚌外套膜碱性磷酸酶与钙代谢的关系

施志仪, 李勇, 谢先中

(上海水产大学生物技术研究中心, 上海 200090)

摘要:利用切片染色确定了碱性磷酸酶在三角帆蚌外套膜中主要分布在黏膜层。在培养的细胞中分别加入碱性磷酸酶激活剂、抑制剂和放线菌酮,并用原子吸收光谱仪检测钙离子的含量和碱性磷酸酶的活力,结果表明:当加入碱性磷酸酶激活剂时,其活力升高,钙离子浓度升高;而加入抑制剂时,其活力降低,钙离子浓度相应下降;加入放线菌酮时,碱性磷酸酶和钙离子浓度开始升高,后来下降,其结果与蛋白质抑制剂的作用相一致,综合上述结果,表明三角帆蚌外套膜的碱性磷酸酶有促进钙代谢的作用。

关键词:三角帆蚌; 碱性磷酸酶; 钙代谢; 激活剂; 抑制剂

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Relations between alkalinity phosphatase and calcium metabolism in mantle of *Hyriopsis cumingii*

SHI Zhi-yi, LI Yong, XIE Xian-zhong

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

Abstract: In this paper, alkalinity phosphatase (ALP) distribution in mantle of *Hyriopsis cumingii* is defined by carrying out the tissue slice and dyeing using the calcium-cobalt law. The mantle cells of *Hyriopsis cumingii* is cultured by adding the ALP inhibitor, the activating agent and the protein inhibitor-cycloheximid, then the concentration of calcium ion and the ALP activity are measured by using atomic absorption spectrometry. The results show that the activity of ALP and the concentration of calcium ion both rise when the activating agent was added; while both of them decline when the inhibitor was added, and after cycloheximid was added, they increase at first, then decline. It proved that ALP in mantle of *Hyriopsis cumingii* accelerates calcium metabolism.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; alkalinity phosphatase (ALP); calcium metabolism; activating agent; inhibitor

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,珍珠主要在贝类的外套膜和内脏团附近的囊袋中形成,而贝壳则是由外套膜分泌物形成的。因此,研究贝类钙质的沉积,特别是外套膜组织的钙质沉积,对进一步阐明贝壳以及珍珠形成机理,提高优质珠的产量都有重要意义^[1]。

碱性磷酸酶(EC 3. 1. 3. 1) (alkalinity phosphatase, ALP) 是一种分解单磷酸酯的水解酶,同时它的活性中心又是包含了两个锌离子和一个镁离子的典型的金属酶。ALP 主要位于细胞膜上,它通过一个磷

收稿日期: 2007-03-19

基金项目: 上海市重点学科建设项目(Y1101); 上海市科委基础重大项目(06aj14003)

作者简介: 施志仪(1954 -), 男, 上海市人, 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

酯酰多糖肌醇(GPI)的侧链连接在细胞的外表面^[2]。目前ALP的研究在人类临床医学方面有很多报道,研究认为,ALP是牙齿和骨骼等硬组织形成、代谢和再生过程的重要矿化酶,组织化学研究表明,骨组织发生钙化的部位有ALP活性,该酶的出现先于钙化的发生,而钙化发生后,ALP迅速消失,说明ALP与钙化过程有关^[3]。在水产方面,关于ALP的研究主要是集中在它的分布和性质,而关于它与钙代谢的关系还鲜有报道,本文旨在在这方面作一探索。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试验仪器

1.1.1 试验材料来源

本试验采用的三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii* Lea)是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,在小型玻璃水族缸(40 cm × 30 cm × 20 cm)中暂养,所用的暂养水都是双蒸水,并调整水中钙的最终浓度为30 mg/L。

1.1.2 试验材料与试剂

CO₂恒温细胞培养箱(Napco Model6100)、显微镜(Olympus BH-2)、原子吸收光谱仪(GBC 932 plus)均为上海水产大学生物技术研究中心提供。

左旋咪唑和MgCl₂试剂购于上海生工生物工程技术有限公司;放线菌酮购于北京楚和霞光生物技术发展中心;ALP测定试剂盒购于南京建成生物研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 外套膜细胞的培养

取几只健康,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,用撕裂法分离出外套膜外表皮,并将其剪成1 mm²的小片,于0.25%的胰酶中37℃消化30 min,用300目的绢网滤去余下的碎片。用血球计数板对细胞悬液进行计数,调整细胞数至5 × 10⁵/mL ~ 1 × 10⁶/mL,置于25℃CO₂恒温细胞培养箱培养。

1.2.2 切片和染色

取三角帆蚌外套膜外表皮,于甲醛中固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,做连续切片,厚度6 μm,常规HE染色。组织化学染色过程如下:切片脱蜡至水后入孵育液(3%β-甘油磷酸钠溶液+2%巴比妥钠溶液+2%氯化钙(无水)溶液+2%硫酸镁溶液+双蒸水)37℃10 h后洗净,然后2%硝酸钴37℃5 min,流水洗净后放到2%硫化铵溶液中2 min,最后透明,封片。阴性对照除3%β-甘油磷酸钠溶液以双蒸水替代之外,其余步骤均同试验组同步进行。

1.2.3 钙离子浓度的测定(紫外原子吸收测钙法)

配置钙离子的标准浓度,分别是25 mg/L,50 mg/L,75 mg/L,100 mg/L,125 mg/L,在422 nm处测定钙离子不同浓度的原子吸收值,并做出标准曲线。样品的钙离子浓度直接从标准曲线上算出。

取三角帆蚌外套膜细胞,分为3组:ALP激活剂组(Mg²⁺)并设2个浓度(高浓度组:3 g/100 mL和低浓度组:2 g/100 mL)、ALP抑制剂组(左旋咪唑)并设2个浓度(高浓度组:3.3 g/100 mL和低浓度组:2 g/100 mL)和正常组,在培养不同的时间(1 d、3 d、10 d、15 d)后测定钙离子浓度。在测定钙离子浓度时,每组取三瓶细胞,调整细胞的数量,每瓶的细胞调整在60 × 10⁶/mL左右,把细胞培养液倒出,并把细胞破碎,加5 mL浓硫酸,加热消化,直至溶液透明为止,加双蒸水定容至25 mL,在422 nm处测定钙离子浓度和ALP的活力(方法如下),取其平均值。

按上述方法培养细胞,加入蛋白抑制剂—放线菌酮(20 mg/L),并设相应对照组,在培养不同的时间(1 d、3 d、10 d、15 d)按上述方法处理细胞后测定钙离子浓度和ALP的活力(方法如下),取其平均值。

1.2.4 碱性磷酸酶活力的测定

取上述方法细胞并用0.9%的生理盐水制成10%的匀液,1 500 r/min 离心 10 min,留取上清液。把上清液用生理盐水 1:9 配成样品,加考马思亮兰 595 nm 紫外分光光度计测定样品的吸光值,并计算蛋白含量;样品加 ALP 显色剂 520 nm 测定样品的吸光值,并计算其 ALP 活力,取其平均值。

计算公式:

样品中蛋白含量(gprot/L) = 测定管吸光值/标准管吸光值 × 0.615(gprot/L)

碱性磷酸酶(U/gprot) = 测定管吸光值/标准管吸光值 × 标准管含酚量(0.003 mg) ÷ 样品中蛋白含量

钙含量(mmol/gprot) = 测定管吸光值/标准管吸光值 × 标准管浓度(2.5 mmol/L) ÷ 样品中蛋白含量(gprot/L)

取 1 龄的三角帆蚌分别在不同的温度下暂养。从不同温度暂养的水体中分别取四只重量基本相同的三角帆蚌,处死并取其外套膜组织块,称重,放在研磨器中研磨,用 0.9% 的生理盐水制成 10% 的匀浆,1 500 r/min 离心 10 min,留取上清液。根据上述方法测量活体三角帆蚌外套膜中的 ALP 的活力,并用紫外原子吸收测钙法测定其钙离子浓度,取其平均值。

2 结果与分析

2.1 三角帆蚌外套膜组织学特点

三角帆蚌的外套膜区是主要插核的地方,其前段比较厚是插核的主要区域。同其它动物类似,外套膜外表皮分黏膜层,黏膜下层,肌肉层和浆膜。黏膜层(图版-1、2中a)主要由柱状或圆形的杯状细胞构成,其中含有一些游离细胞。柱状杯状细胞排列整齐且连续,而圆形的杯状细胞在有些地方聚集成团,很不规则。固有层和黏膜下层分界不明显。固有层(图版-1、2中b)主要由致密的结缔组织构成,含有胶原纤维等,而黏膜下层主要由疏松的结缔组织构成,其中包含大量的成纤维细胞,在图中不明显。肌肉层(图版-1、2中c)主要由平滑肌构成。

钙-钴法 ALP 染色的基本原理是在酶活动的位置形成磷酸钙的沉淀,磷酸钙经硝酸钴处理变为不溶的磷酸钴,经硫化铵作用成为黑色的硫化钴沉淀,因此阳性细胞染成黑褐色,而阴性细胞是无色的。从图版-3、4 可以看出,ALP 主要分布在三角帆蚌外套膜的前段和中段,而在后端含量很少(图版-5)。从高倍镜可以看出(图版-6、7、8),ALP 主要分布在外套膜的黏膜层,在黏膜下层和固有层也有存在,但是含量不多。

2.2 ALP 对钙分泌的作用

2.2.1 镁和咪唑对钙分泌的影响

首先测定标准浓度钙离子的原子吸收值,并以浓度作为横轴、吸光值做纵轴做曲线图(表 1 和图 1)

表 1 标准钙离子浓度

Tab.1 The concentration of criterion calcium ion

| 标准钙离子浓度 | 25 mg/L | 50 mg/L | 75 mg/L | 100 mg/L | 125 mg/L |
|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
| 原子吸收值 | 0.047 | 0.146 | 0.243 | 0.328 | 0.461 |

采用紫外原子吸收测钙法分别对正常组,抑制组和激活组外套膜细胞的钙离子进行测定,测得结果如表 2 和表 3。以时间作为横轴、外套膜组织中钙含量为纵轴,可得外套膜细胞钙离子含量曲线(图 2、3)。

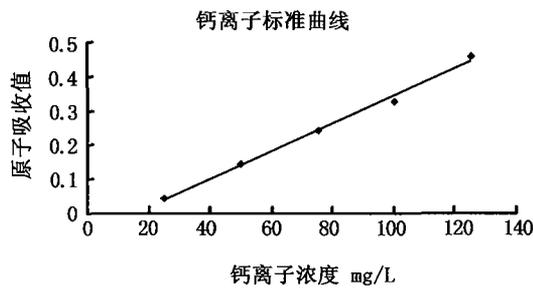


图 1 标准钙离子曲线

Fig. 1 The concentration of criterion calcium ion curve

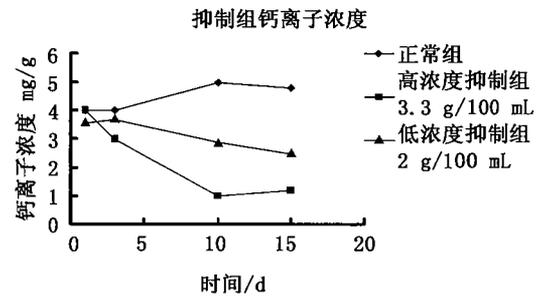


图 2 抑制组钙离子浓度

Fig. 2 The concentration curve of calcium ion after the ALP inhibitor was added into the mantle cells of *Hyriopsis cumingii*

ALP 的活性中心包含了两个锌离子和一个镁离子,是一个典型的金属酶。根据颜思旭等^[4]的研究,镁离子是较有效的激活剂,表现为部分非竞争性效应,激活常数(Ka)为 $2.48 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$,有镁离子存在时该酶活性中心的转换数量是无镁离子时的 4.0 倍,增加镁离子的浓度(一定浓度下),会刺激 ALP 的活性中心,增强 ALP 的活力;相反,左旋咪唑是降低或抑制 ALP 活力的药物^[5],它扰乱了 PLAP 的整体构象,使其活性部位的结构进一步松散破坏,最终导致酶活力的丧失^[6]。从表 2 和表 3 可以看出,当加入 ALP 活剂时,其活力升高,钙离子浓度升高;当加入抑制剂时,ALP 活力下降,钙离子浓度也随之下降。

表 2 三角帆蚌外套膜细胞钙离子含量

Tab. 2 The concentration of calcium ion of the mantle cells of *Hyriopsis cumingii*

mg/g

| | 正常组 | | | | 抑制组 | | | | 激活组 | | | |
|--------------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|
| | 1 d | 3 d | 10 d | 15 d | 1 d | 3 d | 10 d | 15 d | 1 d | 3 d | 10 d | 15 d |
| 钙离子浓度 (mg/g) | 4.0 | 4.0 | 5.0 | 4.8 | 4.0 | 3.0 | 1.0 | 1.2 | 4.1 | 4.9 | 5.1 | 5.6 |
| | 4.0 | 4.0 | 5.0 | 4.8 | 3.6 | 3.7 | 2.9 | 2.5 | 3.4 | 3.7 | 5.0 | 5.2 |

同时进行了 ALP 活力的测定,结果见表 3。

表 3 三角帆蚌外套膜细胞 ALP 活力

Tab. 3 ALP activity of the mantle cells of *Hyriopsis cumingii*

| | 正常组 | | | | 抑制组 | | | | 激活组 | | | |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 d | 3 d | 10 d | 15 d | 1 d | 3 d | 10 d | 15 d | 1 d | 3 d | 10 d | 15 d |
| ALP 活力 (U/gprot) | 21.05 | 21.96 | 23.21 | 24.03 | 22.08 | 21.46 | 18.70 | 16.11 | 22.13 | 22.15 | 23.53 | 24.17 |
| | 21.05 | 21.96 | 23.21 | 24.03 | 21.33 | 21.53 | 20.19 | 18.63 | 20.71 | 21.09 | 22.94 | 24.06 |

2.2.2 放线菌酮对钙分泌的影响

在培养的细胞中加入蛋白抑制剂(正常组和抑制组),培养不同的时间,测其钙离子浓度和 ALP 的活力,结果见表 4 和表 5。以时间作为横轴、外套膜组织中钙含量为纵轴,可得外套膜细胞钙离子含量曲线(图 4)。

表 4 加入蛋白抑制剂后钙离子的浓度

Tab. 4 The concentration of calcium ion after the protein inhibitor was added into the mantle cells of *Hyriopsis cumingii*

| 培养时间(h) | 3 | 5 | 10 | 16 | 20 |
|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 钙离子浓度 (mg/g) | 3.8 | 3.9 | 4.4 | 4.0 | 4.2 |
| | 3.7 | 4.0 | 4.1 | 3.7 | 3.1 |

表 5 加入蛋白抑制剂的 ALP 的活力

Tab. 5 ALP activity after the protein inhibitor was added into the mantle cells of *Hyriopsis cumingii*

| 培养时间(h) | 3 | 5 | 10 | 16 | 20 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ALP 活力 (U/gprot) | 20.10 | 21.01 | 23.45 | 19.12 | 10.09 |
| | 21.09 | 22.14 | 21.73 | 12.42 | 6.75 |

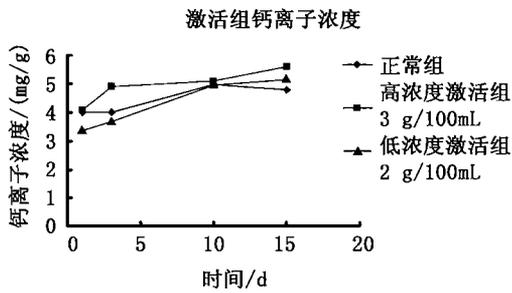


图3 激活组钙离子浓度

Fig. 3 The concentration curve of calcium ion after the ALP Activating agent was added into the mantle cells of *Hyriopsis cumingii*

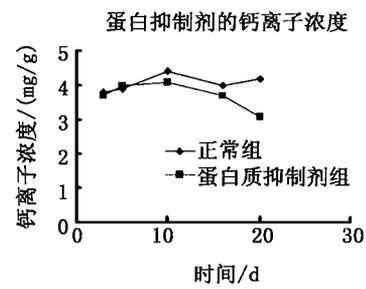


图4 蛋白抑制的钙离子浓度

Fig. 4 The concentration curve of calcium ion after the protein inhibitor was added into the mantle cells of *Hyriopsis cumingii*

放线菌酮可抑制真核生物核糖体大亚基,阻止蛋白质的合成,降低 ALP 的活力^[7]。当加入放线菌酮时(5 mg/mL),它抑制了细胞的蛋白的合成,而已经合成的蛋白则不受影响,所以先前的 ALP 活性不受到任何影响;当细胞中先前的蛋白逐渐消耗完时,因为新的蛋白合成被抑制,因此 ALP 的活性降低。从表 3 可以看出,刚在开始时,ALP 活性没有受到影响时,钙离子浓度是增加的;但当 ALP 活性降低时,钙离子浓度就变得越来越低。

2.2.3 温度对 ALP 及其钙分泌的影响

在不同温度下测定活体蚌的 ALP 的活力,结果见表 6:

表 6 温度对 ALP 和钙的测定

Tab. 6 The mensuration of ALP and calcium content by temperatureshift

| | 10 °C | 15 °C | 23 °C | 27 °C | 37 °C |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ALP 活力(U/gprot) | 67.25 | 72.97 | 86.12 | 64.54 | - |
| 钙的含量(mmol/gprot) | 4.21 | 4.23 | 5.38 | 3.57 | - |

三角帆蚌的最适生长温度为 20 °C ~ 30 °C,为了找到 ALP 在其体内的最适温度,我们又做了上述试验。通过上述结果可以看出,ALP 在蚌体内 23 °C 时活力最强,温度越高活力越差,在 37 °C 时,蚌死亡。当温度低于 23 °C 时,活力不是最强,但相差不多。相应的,对于这几个温度测定钙离子浓度,可以看出,钙的浓度变化与 ALP 活性的强弱相对应。

3 讨论

提高珍珠的质量是目前珍珠培育领域中一个正待解决的重要课题。业已证明,钙质的沉积对于珍珠形成是不可获缺的,因此,利用 ALP 的作用,提高钙质在珍珠囊中的沉积,从而达到提高珍珠的质量,是本研究的重要思路。那么,只有在弄清三角帆蚌的 ALP 与钙代谢关系的基础上,才能更好地利用环境因子对 ALP 的影响,提高培育珍珠的质量。本研究从两个方面研究三角帆蚌外套膜中 ALP 与钙代谢的关系,首先是确定 ALP 在外套膜中的定位;其次是确定 ALP 对钙代谢的作用。

从外套膜的切片染色可以看出,ALP 在三角帆蚌外套膜外表皮中大量存在,主要分布在外套膜的前段和中段外表皮黏膜层。珍珠的主要成分是 CaCO₃,因此外套膜的钙代谢与珍珠的形成有很大关系,本结果与常规插珠部位相一致,为插珠部位的选择提供了实验依据。

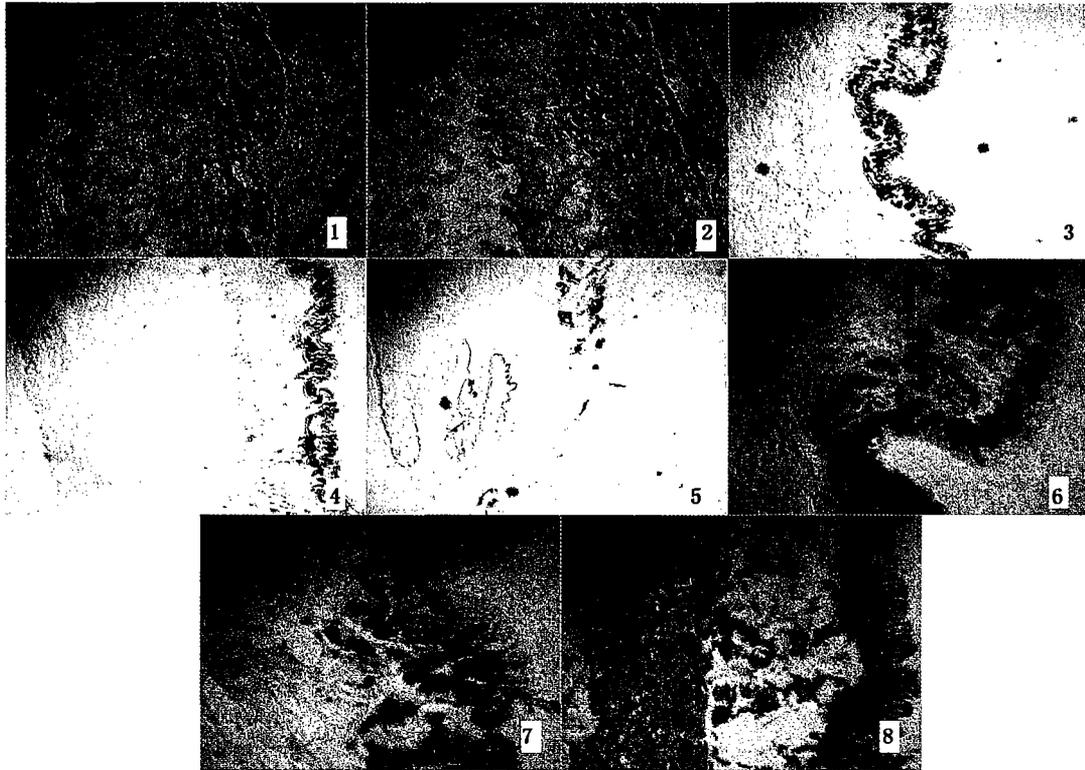
本研究表明,当加入 ALP 抑制剂时,钙的含量随着培养时间的延长而减少;当加入 ALP 激活剂时,钙的含量增加,说明 ALP 的活性与蚌体内的钙含量有直接关系。为进一步确定 ALP 与钙代谢的关系,又做了放线菌酮的抑制试验,反应曲线表明,当 ALP 合成受到抑制后,钙含量明显降低,所得结果与预

计相一致。体内的实验结果也表明,温度对酶活性的影响,在不同的温度下,ALP的活性不同,而此时的钙浓度亦随着ALP的变化而变化,当ALP的活性下降时,细胞中钙浓度也下降。由此可见,ALP与三角帆蚌外套膜钙代谢成正比关系,当ALP活性增强,钙浓度随之升高,反之亦然。之所以如此,推测是因为ALP通过水解有机磷酸酯,使局部无机磷浓度升高,促进磷酸钙沉淀,从而促进钙的吸收^[8]。本研究结果与Robison R的研究相一致^[9]。

外套膜上钙质主要来源于两个渠道:一是通过消化系统吸收和分泌钙;二是通过与周围环境相接触的贝体各组织器官(如外套膜、鳃、足等)直接从环境中吸收钙^[10-13]。在河蚌育珠的生产过程中,钙的吸收和转运对于珍珠的产量和质量提高起着重要作用,加快钙在珍珠囊中的沉积,是促进珍珠快速生长的重要手段。因此,除了增加水体中的钙含量外,还可在水体中加入一些ALP的激活剂,增强碱性磷酸酶的活性,促进三角帆蚌体内钙的代谢,增加珍珠囊中的钙离子的沉积,有利于形成好的珍珠。

参考文献:

- [1] 小林新二郎,度部哲光. 珍珠的研究[M]. 熊大仁,译. 北京:中国农业出版社,1965.
- [2] Tsuchiya H, Mitani K, Kodama K. Placental transfer of heavy metals in normal pregnant Japanese women[J]. Archives of Environmental Health, 1984, 39(1): 11-16.
- [3] Ivanvski S, Haase H R, Bartold P M. Expression of bone matrix protein mRNAs by primary and cloned cultures of regenerative phenotype of human periodontal fibroblasts[J]. J Dent Res, 2001, 80: 1665-1671.
- [4] 颜思旭,陈清西. 金属离子对文昌鱼碱性磷酸酶的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1986, 25(6): 692-698.
- [5] 小川和郎,中根一惠. 酶组织细胞化学技术[M]. 钟慈声,译. 上海:上海医科大学出版社,1989.
- [6] 张辉,张海莲. 碱性磷酸酶在水产动物中的作用[J]. 河北渔业, 2003, 5(131): 12-13.
- [7] Moreno J, Cortes C S, Asteggiano C A, et al. Changes of intestinal alkaline phosphatase produced by cholecalciferol of 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ in vitamin D-deficient chicks[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1985, 240(1): 201-207.
- [8] Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, et al. Dynamic cell stretching increase human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity[J]. J Biomechanics, 2000, 33(1): 45-51.
- [9] Robison R, Macleod M, Rosenheim A. The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification: Calcification *in vitro* [J]. Biochem J, 1930, 24(6): 1927-1941.
- [10] 丘安东,石安静. 不同pH值对三角帆蚌珍珠质分泌的影响[J]. 动物学报, 1999, 45(4): 361-370.
- [11] 唐敏,石安静. 贝类钙代谢研究概况[J]. 水产学报, 2000, 24(1): 86-91.
- [12] 唐敏,石安静. 环境钙浓度对淡水育珠蚌外套膜及珍珠囊钙代谢的影响[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2000, 37(5): 741-744.
- [13] Neff J M. Ultra structural studies of periostrium formation in the hard shelled clam of *Mercenaria mercenaria* [J]. Tissue and cell, 1972, 4: 311-326.



图版 Plate

1. 外套膜中段 HE 染色 $\times 40$; 2. 外套膜前段 HE 染色 $\times 100$; 3. 外套膜前段碱性磷酸酶分布 $\times 40$; 4. 外套膜中段碱性磷酸酶分布 $\times 40$; 5. 外套膜后段碱性磷酸酶分布 $\times 40$; 6. 外套膜前段碱性磷酸酶分布 $\times 100$; 7. 外套膜中段碱性磷酸酶分布 $\times 100$; 8. 外套膜后段碱性磷酸酶分布 $\times 100$; a: 黏膜层; b: 固有层; c: 肌肉层