

# 马氏珠母贝外套膜培养细胞的电镜观察\*

王爱民<sup>1,2</sup> 阎冰<sup>1</sup> 苏琼<sup>1</sup> 叶力<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 广西海洋研究所 北海 536000)

(<sup>2</sup> 海南大学农学院水产系 海口 570228)

**提要** 运用扫描电镜和透射电镜对马氏珠母贝(*Pinctada martensii* D)外套膜组织培养过程中各种细胞的生长变化和活动状况的研究,重点是对上皮细胞分泌活动的观察。最初从外套膜组织迁出的上皮细胞为圆球形,细胞表面近似光滑,但有走向规则细而浅的花纹;培养到第4天,上皮细胞形态上发生了较大的变化,分成A型和B型两种细胞,A型上皮细胞内颗粒物少,是处于合成分泌物的早期阶段或尚未开始合成分泌物,B型上皮细胞处于旺盛的分泌物合成阶段,细胞内粗面内质网和线粒体丰富。培养到第15~16天的B型上皮细胞体积明显变大,细胞合成并聚集了大量单层膜包裹的颗粒物,培养到第31天的B型上皮细胞分泌活动减弱,上皮细胞逐渐失去分泌功能,进入衰老、死亡,胞体明显萎缩变小,整个培养过程持续了65 d。

**关键词** 马氏珠母贝(*Pinctada martensii* D),外套膜,组织培养,透射电镜,扫描电镜

珍珠贝外套膜的分泌能形成贝壳和珍珠。现代人工海水珍珠的培育技术就是通过人工手术,将供体珍珠贝的外套膜组织块同珠核一道移植到受体珍珠贝的体内,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,珍珠囊上皮细胞在珠核表面分泌珍珠质,最后形成人工有核珍珠。鉴于珍珠贝外套膜在珍珠形成中的重要作用,国内外学者对珍珠贝外套膜的组织学、组织化学以及珍珠囊的形成过程进行了大量的研究,但对珍珠贝外套膜的组织培养研究,主要有四川大学石安静等对淡水蚌外套膜组织培养及分泌物性质的研究和日本学者町井昭(Machii)对日本产的马氏珠母贝外套膜组织培养的研究<sup>[6]</sup>。作者从上世纪90年代中期一直坚持对我国沿海重要的经济珍珠贝——马氏珠母贝(*Pinctada martensii* D)外套膜组织培养的研究,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,使外套膜上皮细胞分泌珍珠质<sup>[1,2]</sup>;并且应用培育的体外珍珠囊进行插囊育珠移植试验培养出海水珍珠<sup>[3]</sup>。本文主要报道马氏珠母贝外套膜组织的培养过程中各种细胞的生长变化、活动状况及超微结构变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

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 a。培养用外套膜组织块的制备:用手术刀切开贝闭壳肌的中部,在无菌室中切下外套膜组织,除去裙带部分,净化处理后切成3~4 mm<sup>2</sup>的小块,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>[1,2]</sup>;TC199培养基,外加珍珠贝体液 $10.0 \times 10^3$ ,胎牛血清 $10.0 \times 10^3$ ,卡那霉素0.05 g/L,青霉素0.05 IU/L,链霉素0.05 IU/L,改进的海水贝类平衡盐溶液配制培

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

第一作者:王爱民,出生于1961年,教授,主要从事贝类养殖、育种及海洋生物技术研究。E-mail: aiwang6@hotmail.com

收稿日期:2002-03-11;修回日期:2002-06-18

培养基, pH 6.8 ~ 7.0, 培养温度 20 °C。每个塑料培养瓶底面用 0.5% 细胞贴壁物质处理, 蒸汽消毒后使用。

### 1.3 电镜制样方法

将培养 30 h, 4 d, 16 d, 23 d, 31 d 和 41 d 的外套膜组织培养瓶中的细胞 (用于透射电镜制样的细胞为培养 4 d, 15 d 和 32 d 的培养细胞) 吸出, 以 2 000 r/min 速度离心 15 min, 弃上清液, 收集细胞; 用 Milloning 缓冲液配制的 2.5% 戊二醛固定, Milloning 缓冲液清洗数次, 1% 锇酸 (Milloning 缓冲液配制) 固定, 丙酮脱水, (1) 临界点干燥, 真空喷金, S450 型扫描电镜观察并拍照; (2) Epon 812 包埋, LKB 型超薄切片机切片, 醋酸铀——柠檬酸铅复染, JEM100 X 型透射电镜观察并拍照。

## 2 结果

外套膜组织培养到 30 h, 已有大量的上皮细胞从组织块中迁移出来向四周移动, 扫描电镜观察可见上皮细胞呈圆球形, 细胞表面近似光滑, 但有走向规则细而浅的花纹, 胞体大小为 4.7  $\mu\text{m}$  (图 1-1); 颗粒细胞形状为椭圆形, 长径约 13.0  $\mu\text{m}$ , 短径约 6.4  $\mu\text{m}$ , 细胞表面不光滑, 有走向规则的隆起 (图 1-2), 颗粒细胞数量较上皮细胞少。外套膜培养到第 4 天, 游离的上皮细胞的胞体大小约 4.8  $\mu\text{m}$ , 形态已开始发生较大的变化, 一种情况是细胞仍保持着圆球形, 但细胞表面已具有许多细小的突起 (图 1-3), 这类细胞为 A 型上皮细胞; 另一种情况是细胞表面形成大而明显的凸起 (图 1-4), 这类细胞为 B 型上皮细胞。这种上皮细胞形状的变化和分泌活动相关。培养到第 16 天的上皮细胞胞体显著增大, 在 9.0 ~ 11.0  $\mu\text{m}$  之间, A 型上皮细胞仍呈圆球形, 但细胞表面不光滑 (图 1-5); B 型上皮细胞分泌活动明显, 部分 B 型上皮细胞其表面有许多大小不等的圆球形分泌颗粒, 最大的颗粒直径有 1.4  $\mu\text{m}$  (图 1-6), 有些 B 型上皮细胞表面的凸起 (分泌颗粒) 向外延伸, 脱离胞体, 分泌颗粒脱离胞体后在细胞表面留下明显的凹陷, 最大的凹陷直径达 1.2  $\mu\text{m}$  (图 1-7), 这时在培养瓶底面已见明显的分泌物质。外套膜培养到第 23 天, B 型上皮细胞的数量远远超过 A 型上皮细胞, B 型上皮细胞仍保持着分泌活动, 细胞表面既有分泌颗粒, 又有分泌颗粒留下的凹陷, 胞体直径达 13.5  $\mu\text{m}$  (图 1-8), 这时已能见到不少肌细胞,

肌细胞呈长梭形, 细胞核所在的部位胞体较粗, 细胞表面光滑, 长约 34.0  $\mu\text{m}$ , 最宽处约 5.5  $\mu\text{m}$  (图 1-9)。在外套膜培养到第 31 天时, B 型上皮细胞表面分泌颗粒较多, 但无凹陷, 胞体直径达 17.0  $\mu\text{m}$  (图 2-1); 肌细胞已开始明显地收缩, 其两端已不尖锐, 变得较钝。培养超过 40 d 以后, 上皮细胞体积明显变小, 细胞表面虽有分泌颗粒附着, 但数量少, 细胞已开始有萎缩现象, 胞体变小为 5.5 ~ 9.0 之间 (图 2-2); A 型上皮细胞表面不平整, 胞体略微大于 B 型细胞, 约 9.5  $\mu\text{m}$  (图 2-3)。

运用透射电镜观察培养到第 4 天的外套膜上皮细胞, 细胞的形状为椭圆形或圆形, 细胞核偏向于一端, 核内异染色质结构明显, 细胞内有发达的粗面内质网和丰富的线粒体, 在胞质的部分区域有大小不同的单层膜包裹的颗粒物, 在小的颗粒物中, 内容物电子致密度低, 在大的颗粒物中, 内容物电子致密度较高 (图 2-4)。培养到第 15 天的上皮细胞明显地分成 A 型和 B 型, A 型上皮细胞细胞核仍偏向一侧, 胞质中有少量单层膜包裹的颗粒物, 颗粒物中的内容物电子密度低 (图 2-5); B 型上皮细胞最大的特点是细胞内单层膜包裹的颗粒物增加, 充满胞质内, 颗粒物大小差别较大, 大的颗粒物有一部分内容物致密均匀, 另一部分则不均匀, 可以看出是由许多小的颗粒物融合形成的 (图 2-6); 在培养第 32 天的 B 型上皮细胞内, 小的颗粒物明显减少, 大的颗粒物仍较多, 部分大的颗粒物甚至聚集成超大型的颗粒物, 占据细胞内很大的空间, 胞质内出现许多大小不等的空泡; 在培养中出现的肌细胞为梭形, 细胞核位于中央, 细胞内充满肌原纤维, 肌原纤维主要有两个排列垂直的方向 (图 2-7)。

## 3 讨论

### 3.1 体外培养外套膜上皮细胞的分泌作用

在马氏珠母贝外套膜组织培养中, 上皮细胞经历了合成、分泌和衰老三个阶段。上皮细胞刚从外套膜组织中迁移出来时, 其形状是圆球形的, 表面光滑具规则的花纹, 无任何明显的突起, 其内部结构表现为线粒体和粗面内质网发达, 具有各种不同程度的单层膜包裹的电子致密颗粒, 说明上皮细胞具有旺盛的合成能力; 随着细胞的继续培养, 上皮细胞从形态上可分为 A 型和 B 型, B 型上皮细胞内充满单层膜包裹的

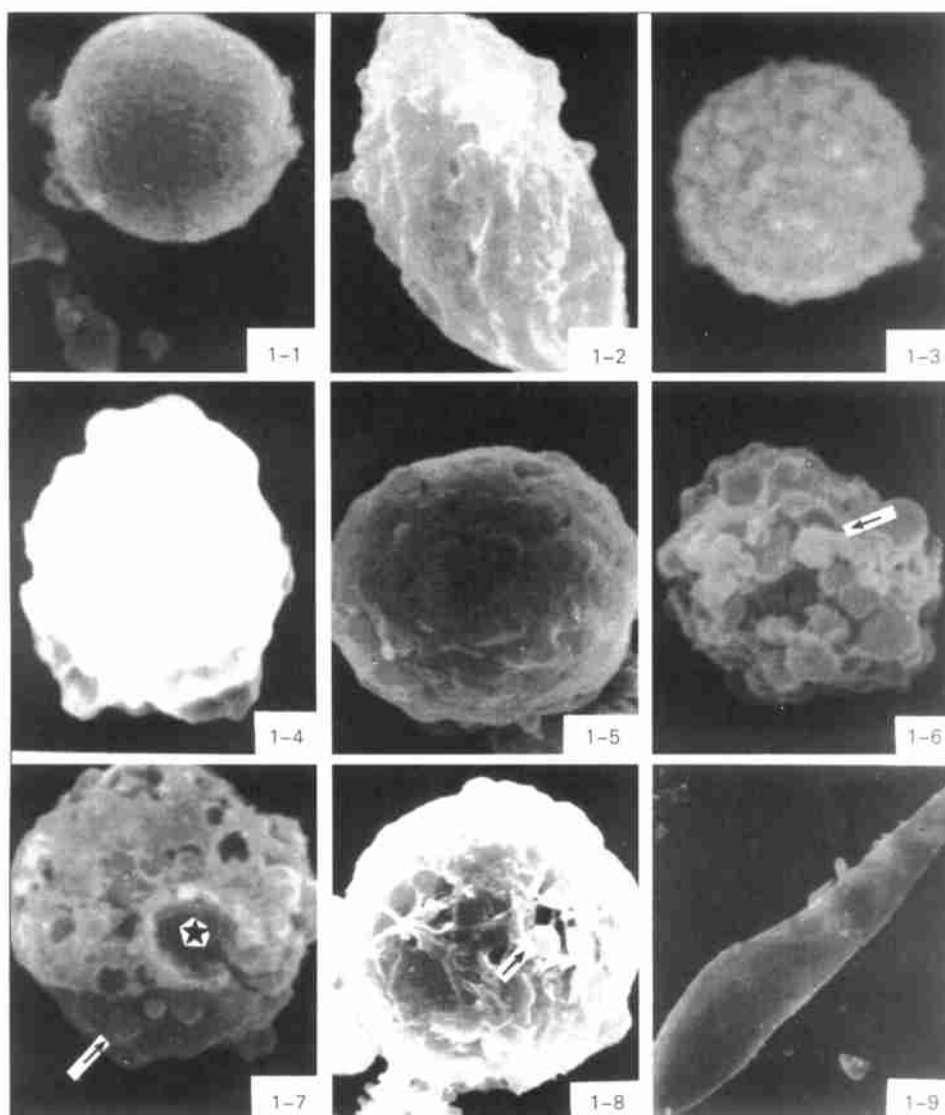


图1 培养不同时间马氏珠母贝外套膜培养细胞的扫描电镜观察

Fig.1 SEM observations on the cells from cultured mantle in the pearl oyster, *Pinctada martensii* D during the culture  
 1-1 培养到 30 h 的上皮细胞,  $\times 7\ 000$ ; 1-2 培养到 30 h 的颗粒细胞,  $\times 4\ 300$ ; 1-3 培养到第 4 天的 A 型上皮细胞,  $\times 12\ 000$ ;  
 1-4 培养到第 4 天的 B 型上皮细胞,  $\times 9\ 000$ ; 1-5 培养到第 16 天的 A 型上皮细胞,  $\times 3\ 700$ ; 1-6 培养到第 16 天的 B 型上皮细胞, 箭头示分泌颗粒,  $\times 4\ 300$ ;  
 1-7 培养到第 16 天的 B 型上皮细胞, 开口式分泌, 箭头示分泌颗粒,  $\star$  示分泌颗粒脱离后留下的凹陷,  $\times 4\ 200$ ;  
 1-8 培养到第 23 天的 B 型上皮细胞, 箭头示分泌颗粒,  $\times 2\ 800$ ; 1-9 培养到第 32 天的肌细胞,  $\times 2\ 200$ 。

颗粒物质, 用透射电镜观察颗粒物, 发现其内为电子致密度不同的物质, 扫描电镜观察发现, 若此类细胞未分泌, 则细胞表面形成许多大小不等的圆形隆起, 若此类细胞分泌, 则在细胞表面附有许多大小不同的

球形颗粒, 或留有許多圆形凹陷; 这表明了 B 型上皮细胞旺盛的分泌过程, 此时的上皮细胞体积明显变大。随着培养的延续, 上皮细胞的分泌活动逐渐降低, 细胞呈现衰老现象, 停止分泌活动及进入衰老的上皮

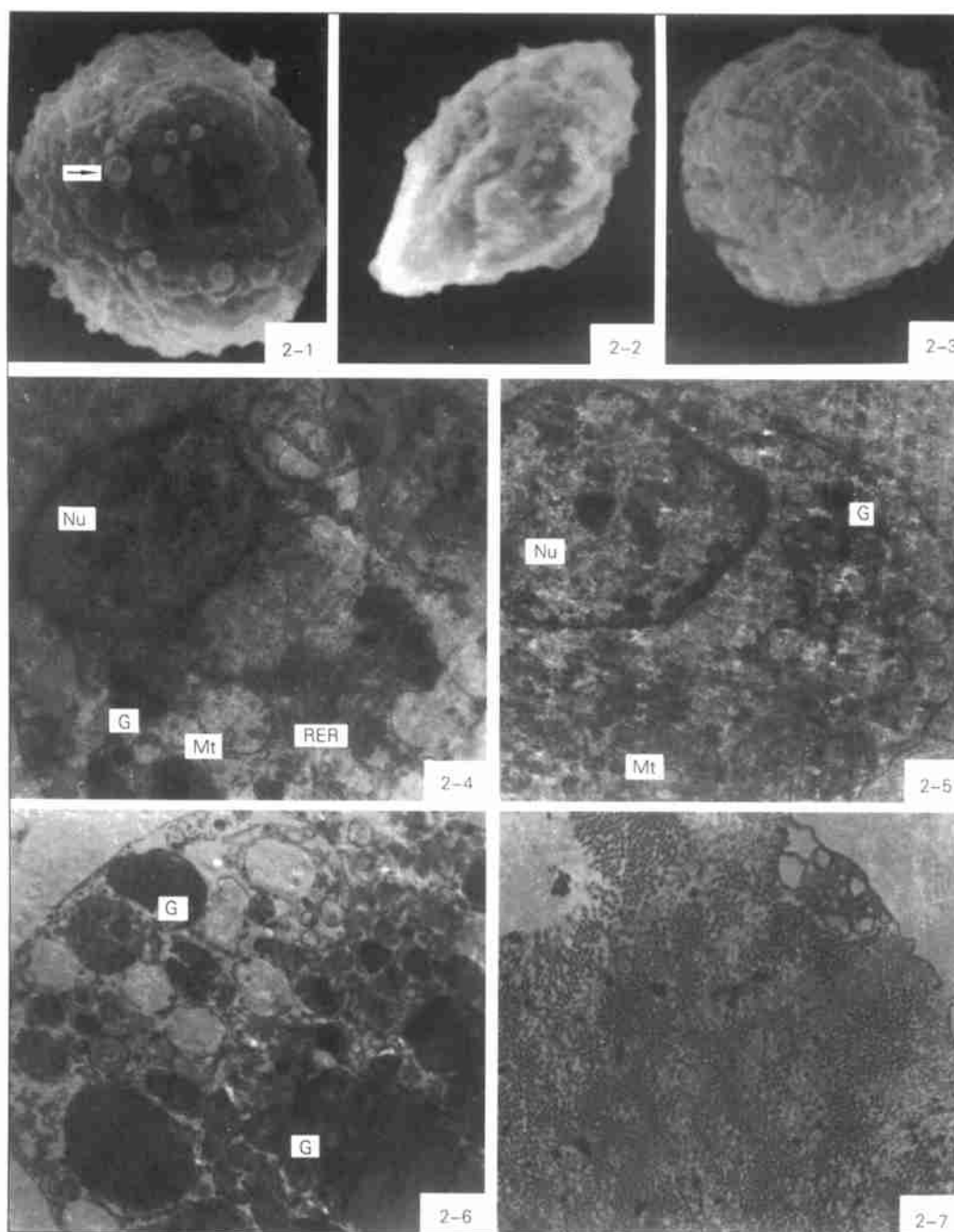


图2 培养不同时间马氏珠母贝外套膜培养细胞的扫描电镜和透射电镜观察

Fig. 2 SEM and TEM observations on the cells from cultured mantle in the pearl oyster, *Pinctada martensii* D during the culture  
 2-1 培养到第 31 天的 B 型上皮细胞, 颗粒式分泌, 箭头示分泌颗粒, 扫描电镜照片,  $\times 2\ 800$ ; 2-2 培养到第 40 天的 B 型上皮细胞, 扫描电镜照片,  $\times 5\ 700$ ; 2-3 培养到第 40 天的 A 型上皮细胞, 扫描电镜照片,  $\times 4\ 300$ ; 2-4 培养到第 15 天的 A 型上皮细胞, 细胞核 (Nu) 位于一侧, 粗面内质网 (RER) 和线粒体 (M) 丰富, 单层膜包裹的颗粒物 (G); 透射电镜照片,  $\times 8\ 600$ ; 2-5 培养到第 15 天的 A 型上皮细胞, 细胞核 (Nu) 位于一侧, 线粒体 (M) 和单层膜包裹的颗粒物 (G) 少, 透射电镜照片,  $\times 6\ 700$ ; 2-6 培养到第 15 天的 B 型上皮细胞, 示细胞内充满单层膜包裹的颗粒物 (G), 透射电镜照片,  $\times 6\ 500$ ; 2-7 肌细胞, 示排列整齐的肌纤维, 透射电镜照片,  $\times 9\ 700$ 。

细胞体积明显萎缩变小。从形态上区分的上皮细胞类型代表了上皮细胞处于不同的分泌活动状态, A型上皮细胞内颗粒物少,可能是处于合成的早期阶段或尚未开始合成分泌物质, B型上皮细胞处于旺盛的分泌阶段,细胞内颗粒物多,细胞合成并聚集了大量的颗粒物。这同作者用光镜观察上皮细胞的行为及分泌活动相一致<sup>[2]</sup>。

珍珠的化学组成和产生它的贝类的贝壳化学成分相同。海水珍珠含碳酸钙 95%,硬蛋白 4%和水份 1%<sup>[4]</sup>。作者对马氏珠母贝外套膜上皮细胞分泌物的分析表明,其分泌物就是珍珠质,性质同珍珠和贝壳的珍珠质结构相同或相似;是由碳酸钙结晶形成的霏石晶层层叠加而成,其间有壳角蛋白膜粘结<sup>①</sup>。在培养的外套膜上皮细胞处于旺盛的合成和分泌阶段,细胞内合成聚积的单层膜包裹的电子致密颗粒物可能是蛋白质性质的物质和粘多糖。对于珍珠贝外套膜表皮细胞及珍珠囊细胞的分泌方式已有不少研究,但因研究的种类和采用的研究方法不同以及细胞类型的差异,已发现了各种不同的分泌方式<sup>[5]</sup>。由于培养的外套膜上皮细胞是从组织块中迁移出来的,处于一种自由和无压力的状态,细胞失去了极性,因此,不但细胞的形状发生了改变,多为圆球形,而且分泌的方式同样随之改变。作者观察发现,由于上皮细胞合成大量颗粒物,在细胞表面就形成明显的隆起,细胞表面隆起的部位破裂将胞内的颗粒物直接排于胞外,这种分泌为开口式分泌。在分泌最旺盛的细胞中这种分泌方式较普遍,开口式分泌的分泌物量大,分泌速度快,在分泌颗粒离去后,在细胞表面常留下凹陷;随着分泌活动的减弱,上皮细胞的分泌方式又转变为颗粒式分泌,这种分泌是将胞内合成的物质输送到细胞表面,通过细胞膜的包裹呈颗粒状脱离细胞;颗粒式分泌量少,速度不及开口式分泌。在培养期间, A型和 B型上皮细胞一直同时存在,表明外套膜上皮细胞分泌活动的节律性在体外培养中并没有丧失。

### 3.2 体外培养外套膜结缔组织细胞的作用

在马氏珠母贝外套膜组织的培养中,颗粒细胞是最先迁移出来的结缔组织细胞,属于血细胞,又称为游走细胞。Awaji等<sup>[7]</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。因此,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。

梭形的肌细胞是培养中最后迁出的结缔组织细胞,至于肌细胞的作用并不清楚。已研究的珍珠囊结构表明,其组成珍珠囊上皮细胞外围的结缔组织中具有肌细胞,因此说明在外套膜组织块移植形成珍珠囊时其肌细胞参与了珍珠囊的结构。

### 3.3 体外培养外套膜上皮细胞增殖分裂问题

运用作者所在实验室建立的马氏珠母贝外套膜组织培养技术已成功地培养了上皮细胞,并使上皮细胞保持旺盛的分泌功能,上皮细胞在体外培养时间可达 65 d,但未能传代培养<sup>[2]</sup>。从超微结构上分析,上皮细胞是一种高度分化的细胞,在培养的条件下,特别是营养条件优越时,上皮细胞会大量合成单层膜包裹的颗粒物,颗粒物以开口式分泌的方式大量排出胞外,势必造成上皮细胞的损伤,又由于某些原因不能及时排出胞外的颗粒物,就会在胞内积累,使上皮细胞产生病态,这两种状况都会造成上皮细胞的衰老,最终导致细胞死亡。马氏珠母贝外套膜上皮细胞在体外培养过程中仍然保持高度分化可能是影响培养细胞增殖分裂的关键所在。

### 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):17~22
- 2 王爱民,苏琼,阎冰等.马氏珠母贝外套膜的组织培养.广西科学,2000,7(2):135~139
- 3 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
- 4 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,1996.7~14
- 5 邱东安,石安静.三角帆蚌珍珠囊细胞的分泌活动,水产学报,1999,23(2):115~121
- 6 Mchii A. and Wada K. T. . Some marine invertebrates tissue culture. In: Mtsuhashi J. (ed.) .Invertebrate Cell System Application ( Vol. III) . Florida: CRC Press, 1989. 225~233
- 7 Awaji M. and Suzuki T. . The pattern of cell proliferation during pearl sac formation in the pearl oyster, *Fisheries Science*,1995,61(5):747~751

① 待发表资料

快报

EXPRESS Letters

# ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS ON THE CELLS FROM CULTURED MANTLE OF THE PEARL OYSTER, *Pinctada martensii* D

WANG Ai-min<sup>1,2</sup> YAN Bing<sup>1</sup> SU Qiong<sup>1</sup> YE Li<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Guangxi Institute of Oceanography, Beihai 536000)

(<sup>2</sup> Fishery Department, Agriculture College, Hainan University, Haikou 570228)

Received: Mar., 11, 2002

**Key Words:** *Pinctada martensii* D, Mantle, Tissue culture, Scanning electron microscope (SEM), Transmission electron microscope (TEM)

## Abstract

The culture of mantle of the pearl oyster, *Pinctada martensii* D, has been carried out. Scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscope (TEM) were used to observe the changes of the cells from cultured mantle during the culture. The morphological changes and the secreting activities in the epithelial cells were mainly focused on. The epithelial cells just migrated from the mantle were round and had fine lines on the surface. After 4 day's culture, the epithelial cells could be distinguished morphologically into two types, epithelial cell A (ECA) and epithelial cell B (ECB). ECA was a primary synthesizing cell or did not start synthesizing. ECB showed active synthesizing and contained a lot of mitochondria and rough endoplasmic reticulum (RER). 15-16 days after initiation of the culture, ECB contained a large number of membrane packed granules, and secreted the granules by the secretion of breaklike. After 31 day's culture, the activities of secretion in ECB became weak and the way of secretion turned to be the granular secretion. After 41 day's culture, the epithelial cells stopped the secretion and got into weak and dying. The whole culture was carried on for 65 days, but no division appeared in the epithelial cells. This paper also discussed why the epithelial cells did not divide in vitro and how to improve the medium and the culture technique.

(本文编辑:刘珊珊)