

马氏珠母贝 *Pinctada martensii* 珍珠囊发育的超微结构观察

杜晓东¹, 焦钰¹, 邓岳文¹, 王庆恒¹, 黄荣莲¹

(1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025)

关键词: 马氏珠母贝; 珍珠囊; 表皮细胞; 分泌细胞; 超微结构

中图分类号: Q959.215⁺.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2010)05-0160-05

1 引言

马氏珠母贝 *Pinctada martensii* 是我国广东、广西和海南沿海海区主要的经济养殖贝类之一, 近年来我国海水珍珠的质量出现明显滑坡, 严重地削弱了在国际市场上的竞争力。为了使该产业健康持续发展, 对马氏珠母贝珍珠培育的相关生物学研究显得十分必要。人工培育珍珠是将供体贝的外套膜小片与珠核一起移植到受体贝的内脏团缔结组织中, 小片与受体组织相互作用, 逐渐形成包围珠核的囊状结构——珍珠囊, 珍珠囊细胞不断地分泌珍珠质, 珍珠质紧贴珠核形成珍珠。一般认为珍珠囊是由生理和组织上都与形成贝壳的外套膜上皮细胞相似的细胞组成的^[1], 因此国内外研究者都比较关注珍珠囊的形成及其生理机能, 围绕珍珠囊开展了多方面的研究^[2-10]。在我国许多研究工作者用组织形态学与组织化学的方法来研究淡水珍珠蚌珍珠囊的发育进程^[10-21], 然而对马氏珠母贝珍珠囊发育的研究很少有系统报道。本论文利用透射电子显微镜系统地观察了从移植小片到珍珠囊完全发育成形的整个过程的超微结构变化, 并探讨珍珠囊细胞结构与功能的关系, 以为培育优质的珍珠提供理论依据。

2 材料与amp;方法

2006 年 10 月从湛江流沙湾的养殖群体中选取规格基本一致(壳高 60.0 ~ 70.0 mm)的个体进行插核育珠实验, 在育珠贝体内植入细胞小片的同时插入一个直径约 5.0 mm 的圆形石蜡核。插核手术结束后, 按照常规技术进行海区养殖, 实验期间海水温度为(27.0 ± 2.0) °C, 海水相对密度为 1.021 ~ 1.022。

按照常规操作技术剪取外套膜边缘制作移植小片。在插核手术后的第 1, 3, 7, 15, 20, 30 和 60 天, 解剖取出珍珠囊。在 4 °C 条件下用 2.5% 戊二醛固定液固定移植小片和珍珠囊, 缓冲液洗涤, 2% 的锇酸固定 2 h, 丙酮逐级脱水, 环氧树脂浸透包埋, 超薄切片机切片, 醋酸铀-柠檬酸铅进行双染, 日立-600 型电子显微镜观察及拍照。

3 结果

3.1 移植小片的细胞超微结构

移植小片的外表皮细胞由柱状表皮细胞和分泌细胞组成。柱状表皮细胞一般长 12.0 ~ 18.0 μm, 宽 2.5 ~ 5.0 μm, 在游离端有发达的微绒毛, 细胞核呈柱状、椭圆或不规则形, 一般位于细胞的中上部。根据内质网、线粒体的发达程度以及细胞核的着色

收稿日期: 2009-10-29; 修订日期: 2010-03-18。

基金项目: 国家科技支撑计划(2007BAD29B01); 农业部公益性行业科研专项经费(nyhyzx07-047); 广东省海洋与渔业局重大科技兴海(渔)项目(A200708C01; A200908A05)。

作者简介: 杜晓东(1962—), 男, 四川省广元市人, 教授, 博士, 研究方向为海产无脊椎动物发育生物学、珍珠贝生物学与人工育珠技术。Email: zjdx@21cn.com

等情况可将移植小片的表皮细胞分为 A, B, C 三种类型。A 型细胞分布最多, 异染色质和常染色质分明, 有很多线粒体和电子透明小泡(见图 1-1)。B 型细胞胞核整体着色较深, 异染色质相对于 A 型细胞增多, 细胞器较少, 可见较大的电子透明泡(见图 1-2)。C 型细胞最少, 它的细胞核呈电子深染, 往往显浓缩态, 细胞质中充满了各种不同电子密度的小泡和残存的线粒体, 没有其他的细胞器(见图 1-1)。

电镜下分泌细胞体积很大, 为表皮细胞的 1~2 倍, 除含有一个不规则的细胞核和少量的细胞质外,

整个细胞被电子浅染的泡充塞, 这些泡里面含有染色较浅的纤维状物质, 它们也有分布在临近表皮的结缔组织中, 常见它们作变形运动并进入表皮层(见图 1-3), 同时还可以观察到具有少量的电子稠密粒或者电子中等稠密粒的分泌细胞(见图 1-2)。

3.2 不同发育期珍珠囊表皮细胞的超微结构变化

在插核后第 3 天可观察到移植小片的表皮细胞迁移, 迁移出来的表皮细胞形态不规则, 与正常细胞小片的表皮细胞相比增大, 在周围有很多的电子浅染的分泌泡(见图 1-4)。

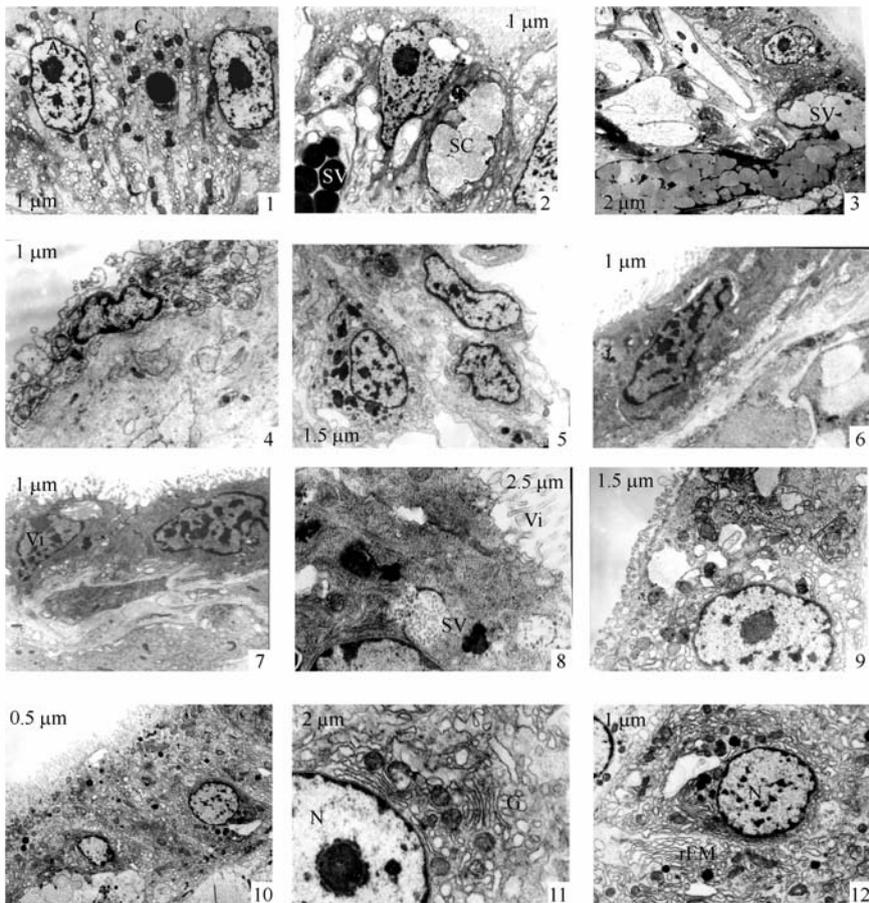


图 1

1. 细胞小片 A 型和 C 型表皮细胞; 2. 细胞小片 B 型表皮细胞和分泌细胞; 3. 分泌细胞由结缔组织向表皮迁移; 4. 插核后第 3 天细胞小片的外表皮细胞; 5. 插核后第 7 天迁移到蜡核周围的细胞小片外表皮细胞; 6. 插核后第 15 天的珍珠囊 C 型表皮细胞; 7. 插核后第 20 天的珍珠囊 C 型表皮细胞; 8. 插核后第 20 天 B 型表皮细胞和分泌细胞; 9. 插核后第 20 天 A 型表皮细胞; 10. 插核后第 30 天的珍珠囊 A 型表皮细胞; 11. 插核后第 30 天珍珠囊 A 型表皮细胞; 12. 插核后第 30 天珍珠囊 A 型表皮细胞。SV(secretory vesicle)为分泌泡, SC(secretory cell)为分泌细胞, Vi(microvilli)为微绒毛, N 为细胞核, C 为 C 型细胞, A 为 A 型细胞, B 为 B 型细胞, M 为线粒体, G 为高尔基体, rEM 为粗面内质网

插核后 7~15 d 是珍珠囊表皮细胞形成的初期, 可以观察到迁移到蜡核周围的表皮细胞没有微绒毛, 但有明显的细胞核(见图 1-5)。在插核后 15

d, 珍珠囊已经形成了单层的扁平细胞(见图 1-6), 在珍珠囊表皮细胞游离面密生微绒毛, 细胞整体着色较深, 细胞核为扁圆形, 内质网发达, 线粒体呈凝

聚状态,多分布于细胞的上部,在有的细胞内有少数几个高电子密度泡。

插核后 20~30 d,珍珠囊扁平细胞逐渐向柱状细胞转化,在转变过程中,细胞核上有许多凹凸,它们的形状不规则。细胞内形成少量的游离多聚核糖核蛋白体,这种核糖体集中分布在细胞的基底部和核的旁边区,附着到内质网上的核糖体也逐渐增多,部分细胞线粒体仍呈浓缩状态,而部分细胞线粒体恢复正常状态(见图 1-7,8 和 9)。

在插核后第 30 天,珍珠囊扁平细胞已转变为柱型细胞,柱型细胞核呈圆形或椭圆形,核表面平整,粗面内质网、线粒体和高尔基体发达,细胞内出现了大量的低电子密度分泌泡(见图 1-10,11 和 12)。

插核后 60 d 珍珠囊表皮细胞呈扁平状,细胞核为椭圆形或不规则的圆形,内质网多呈管状,有丰富的线粒体,游离多聚核糖体在细胞胞质呈不规则分布,低电子密度分泌泡增多(见图 2-1,2 和 3)。

3.3 珍珠囊细胞组成与超微结构

在不同的发育时期,珍珠囊细胞由珍珠囊表皮细胞和分泌细胞组成。

在珍珠囊形成的过程中根据细胞和细胞核的着色等可将表皮细胞分为 A、B 和 C 三种类型,它们与细胞小片外表皮的 A、B 和 C 型细胞相类似。A 型细胞细胞核异染色质和常染色质分明,异染色质较少(见图 2-1)。B 型细胞的细胞核呈弥散性染色,异染色质相对于 A 型细胞增多,而且较多异染色质聚缩成块状,分布在核边缘,电子密度高,相对于 A 型细胞来说有较多的低电子密度分泌泡,但内质网、线粒体不如 A 型细胞发达(见图 2-4)。C 型细胞整体着色较深,细胞核相对于 B 型细胞来说异染色质又增多,线粒体呈凝聚状态(见图 2-7)。在珍珠囊发育过程中,珍珠囊表皮细胞中所存在的细胞类型有明显差异。在珍珠囊形成的初期(插核后 20 d),珍珠囊表皮细胞主要为 C 型细胞;在插核后 30 d,珍珠囊表皮细胞主要为 A 型细胞,胞核为圆形,细胞内高尔基体特别发达,并且存在丰富的扁平囊状粗面内质网;在插核后 60 d,C 型细胞最少,A 型细胞所占比例最大,B 型细胞次之,此时 A 型细胞胞核多为椭圆形或不规则的圆形,细胞内有丰富的线粒体,内质网多为管状,游离多聚核糖体在细胞质内呈不规则分布。

在珍珠囊表皮细胞内有低电子密度分泌泡、高电子密度分泌泡和无定形团状物。电子密度分泌泡

大小为 0.2~1.0 μm ,在细胞内外均有分布,内含一些环状或丝状的物质,在有的小泡周围还可见一些核糖核蛋白体(见图 2-5);高电子密度分泌泡呈圆形,少数形状不规则,大小为 0.3~2.3 μm ,外面无明显的膜包围,可以观察到其由结缔组织向表皮细胞迁移(见图 2-6);在无定形团状物内缘分布着电子密度中等的小颗粒物质,主要分布在细胞顶端(见图 2-7)。

在珍珠囊的形成过程中可观察到两种类型的分泌细胞:I 型分泌细胞类似于细胞小片的分泌细胞,细胞体积为表皮细胞的 1~3 倍,细胞核形状不规则,细胞内有丰富的电子浅染泡充塞,常作变形运动并进入表皮层,通过细胞顶端开口的方式将其内含物分泌到珍珠囊腔(见图 2-8);II 型分泌细胞体积大小类似于珍珠囊表皮细胞,细胞内含有形状不规则的高电子致密颗粒,仅分布于表皮细胞间(见图 2-9)。

3.4 细胞间连接

在珍珠囊发育的各个时期,表皮细胞仅在游离端形成中间连接(见图 2-10)。细胞侧面的其余部分相互分离,形成了发达的胞间空间,同时细胞质向空间伸出突起,在细胞的基底部也有一些突起伸向结缔组织。

4 讨论

杜晓东等^[15]将褶皱冠蚌 *Cristaria plicata* 的珍珠囊发育分为早、中和晚三个时期,在这三个时期细胞超微结构存在明显差异。在发育早期上皮细胞和核均呈柱状,核糖蛋白体大都呈游离解聚状态,时常可见细胞器的自溶,最后形成板层小体;在发育晚期上皮细胞呈立方或扁平状,细胞粗面内质网越发达,形成的多聚核糖蛋白体越多^[15]。本研究结果表明,马氏珠母贝珍珠囊发育也可分为三个时期,而且这三个时期的细胞超微结构变化与杜晓东等^[15]报道的结果相类似。与以前研究结果不同之处在于马氏珠母贝珍珠囊的发育过程存在 A 型、B 型和 C 型三类表皮细胞,而且这三类表皮细胞的分泌能力依次减弱。在珍珠囊发育早期珍珠囊表皮细胞主要为 C 型细胞,C 型细胞线粒体呈浓缩状态。在发育后期珍珠囊表皮细胞主要为 A 和 B 型细胞,A 型细胞内有丰富的内质网、线粒体和高尔基体,而 B 型细胞有丰富的分泌小泡。

町井昭^[22]报道了形成光珠和骨珠的珍珠囊表皮细胞的形态结构存在明显差别,光珠珍珠囊表皮

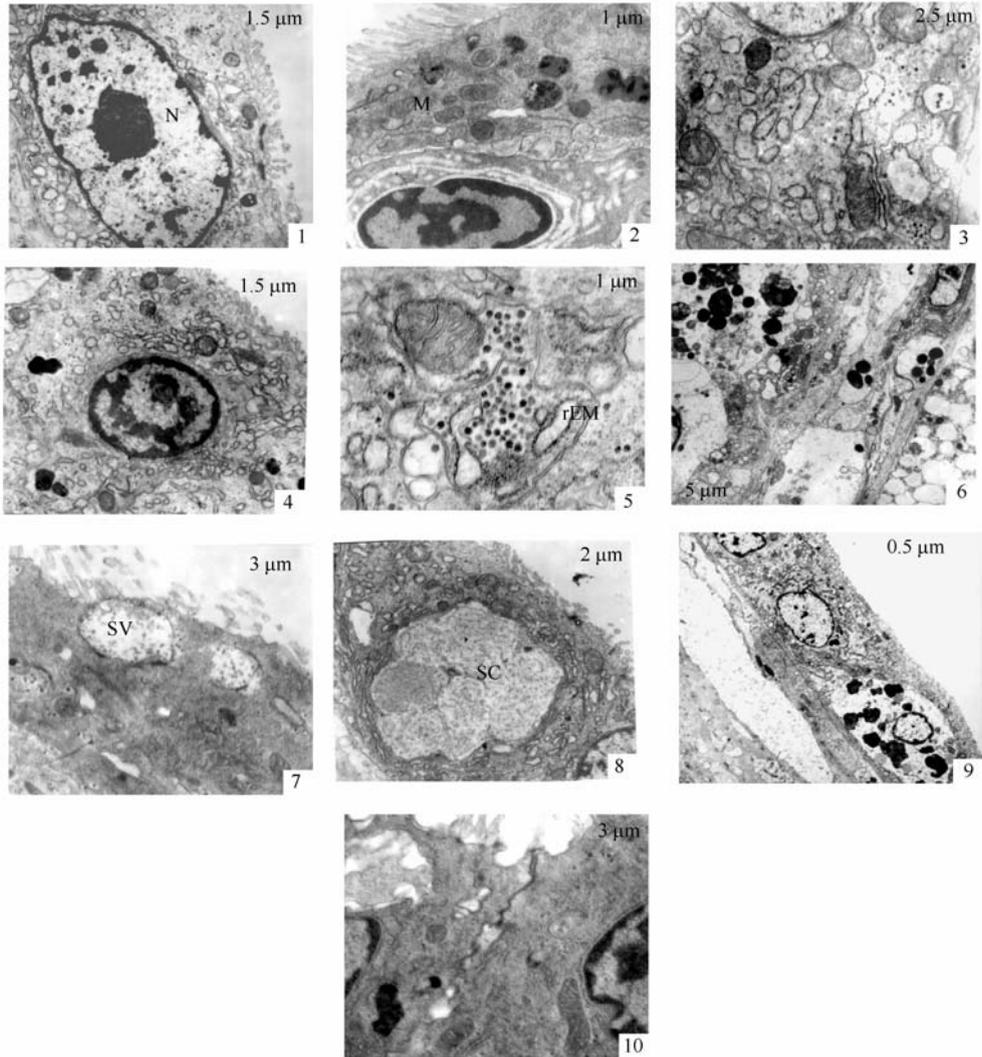


图 2

1. 插核后第 60 天珍珠囊 A 型表皮细胞; 2. 插核后第 60 天珍珠囊 C 型表皮细胞; 3. 插核后第 60 天珍珠囊 A 型表皮细胞内含物, 有很多的游离多聚核糖体; 4. 插核后第 60 天珍珠囊 B 型细胞; 5. 表皮细胞内形状不规则的小泡, 内有一些环状或丝状的物质; 6. 分泌颗粒由结缔组织向表皮细胞迁移; 7. 箭头表示表皮细胞内无定形团状物, 内有中等电子致密颗粒; 8. I 类分泌细胞; 9. II 类分泌细胞; 10. 表皮细胞间的连接。N 为细胞核, M 为线粒体, SV 为分泌泡, SC 为分泌细胞, rEM 为粗面内质网

细胞扁平, 而骨珠珍珠囊表皮细胞形状和大小变化较大, 高度大于形成光珠的表皮细胞。邱安东等^[20]从研究褶皱冠蚌的光珠与骨珠珍珠囊差异的结果也得出了相似结论。本研究的结果表明, 在珍珠囊形成的初期、中期及后期表皮细胞的超微结构存在明显差异, 也就是说细胞的大小及高度变化是随珍珠囊发育的进展逐步变化的。在发育初期珍珠囊的表皮细胞呈柱状或扁平状, 主要由 C 型细胞构成; 分泌细胞由结缔组织向珍珠囊表皮层迁移, 并且与迁移到珍珠囊腔的游走细胞的降解物共同形成棱柱层。在珍珠囊发育中期表皮细胞多呈柱状, A 和 B

型细胞增多, 分泌机理发生变化。在珍珠囊发育后期, A 型细胞最多, 分泌物形成珍珠层。

在马氏珠母贝珍珠囊发育不同时期均可观察到活跃分泌细胞, 根据分泌颗粒的电子密度高低可将分泌细胞分为两类, 即高电子密度分泌泡细胞和低电子密度分泌泡细胞。这些物质都通过特定的方式分泌到珍珠囊腔内, 这表明分泌细胞也参与了珍珠的形成^[7-8, 15]。

已有研究报道了珍珠囊细胞发育的起源, 然而对珍珠囊细胞的来源还存在分歧。例如, 熊大仁等^[10]认为把移植小片植入蚌体组织后, 经 4~5 d

移植小片边缘即与育珠蚌组织愈合,逐步形成完整的珍珠囊,而游离部分则成为母蚌组织中的一部分,珍珠囊的形成是移植小片的表皮细胞迅速增殖的结果。蒙钊美等^[25]利用光学显微镜研究了大珠母贝 *P. maxima* 外套膜细胞小片移植和珍珠囊的形成,结果表明珍珠囊是由移植小片外表皮细胞分裂生长形成的。石安静^[23]等认为植入的细胞小片的表皮细胞先形成一层“初生珍珠囊”细胞,这些植入的细

胞因受到育珠蚌细胞的“识别”而被排斥,“初生珍珠囊”表皮细胞与基部的细胞脱离,造成死亡并溶解。育珠蚌结缔组织最内层的细胞再转化为表皮细胞,形成一层“次生珍珠囊”细胞,“次生珍珠囊”细胞中出现分泌细胞,并分泌珍珠质而形成珍珠^[13]。根据本实验的研究结果,我们初步认为马氏珠母贝珍珠囊表皮细胞来源于移植小片,即移植小片的表皮细胞增殖而形成珍珠囊。

参考文献:

- [1] PENNAK R W. Fresh-water Invertebrates of the United States [M]. New York: John Wiley & Sons, 1978.
- [2] BEEDHANG E. Observations on the mantle of the Lamellibranchia. Quart[J]. Micr Sci, 1958, 99: 188—197.
- [3] BEEDHAN G E. Observation on the mantle of the Lamellibranchiate[J]. Proc Zool Soc Lond, 1965, 145: 181—197.
- [4] RICHARDSON C A, RUNHAM N W, CRRISP O J. A histological and ultrastructural study of the cells of the mantle edge of a marine bivalve, *Cerastoderma edule*[J]. Tissue Cell, 1981, 13 (4): 715—730.
- [5] LI Z C, LIAO B L, XU X M. SEM and TEM observation a pearl sac cells of *Pinctada fucata* (Could)[G]// XU Gong-zhan. Proceedings on Marine Biology of the South China Sea. Beijing: China Ocean Press, 1988: 83—85.
- [6] ADDADI L, WEINER S. A pavement of pearl [J]. Nature, 1997, 389: 912—915.
- [7] SUZUKI T, YOSHINAKA R, MIZUTA S, et al. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*[J]. Cell Tissue Res, 2004, 266: 75—82.
- [8] ARRNAUD-HAOND S, GOYARDE E, VONAU V, et al. Pearl formation: persistence of the graft during the entire process of biomineralization [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(1): 113—116.
- [9] 小林新二郎, 渡部哲光. 珍珠的研究[M]. 熊大仁译. 北京: 农业出版社, 1965.
- [10] 熊大仁, 吴教东, 何筱洁. 河蚌无核珍珠形成的初步研究[J]. 湛江水产学院学报, 1980, 3: 3—9.
- [11] 俞豪祥. 三角帆蚌外套膜及珍珠囊的组织学初步观察[J]. 动物学杂志, 1985, 1: 4—6.
- [12] 石安静, 吴中文. 三种淡水育珠河蚌外套膜酶的组织化学研究[J]. 水产科学, 1985, 4(2): 3—8.
- [13] 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—252.
- [14] 石安静, 曾家玉. 河蚌外套膜的扫描电镜观察[J]. 水产学报, 1991, 15 (1): 68—71.
- [15] 杜晓东, 许国领. 褶纹冠蚌珍珠囊发育的超微结构观察[J]. 水产学报, 1990, 14(3): 212—218.
- [16] 杜晓东, 何海平, 吴熙载. 褶纹冠蚌珍珠囊发育的研究[J]. 水生生物学报, 1991, 15(3): 228—233.
- [17] 杜晓东, 邓陈茂, 叶富良. 3种珍珠贝的外套膜小片外表皮细胞的超微结构[J]. 中国水产科学, 1998, 5(3): 2—7.
- [18] 杜晓东. 大珠母贝外套膜表皮细胞的超微结构[J]. 动物学报, 1999, 45(3): 246—251.
- [19] 邱安东, 石安静, 孙奇志. 三角帆蚌珍珠囊的超微结构研究[J]. 四川大学学报, 1999, 36(6): 1111—1115.
- [20] 邱安东, 石安静. 褶纹冠蚌光珠与骨珠珍珠囊差异的研究[J]. 水生生物学报, 2000, 24(2): 161—166.
- [21] 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.
- [22] 町井昭. 珍珠袋形成に関する组织学研究[J]. 国立真珠研究所报告, 1968, 13: 1489—1539.
- [23] 蒙钊美, 黎学章. 大珠母贝外套膜细胞小片的移植核珍珠囊形成的研究[G]//贝类学论文集: 第1辑. 北京: 科学出版社, 1983: 97—101.

Ultrastructure of the pearl sac cells of pearl oyster *Pinctada martensii*

DU Xiao-dong¹, JIAO Yu¹, DENG Yue-wen¹, WANG Qing-heng¹, HUANG Rong-lian¹

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Key words: *Pinctada martensii*; pearl sac; epithelial cell; secretory cell; ultrastructure