

研究简报

圆背角无齿蚌离体培养的外套膜组织钙代谢

唐 敏 石安静

(四川联合大学生物系, 成都 610064)

CALCIUM METABOLISM OF THE CULTURED MANTLE TISSUE OF *ANODONTA WOODIANA PACIFICA* (HEUDE)

TANG Min and SHI An-jin

(Department of Biology, Sichuan Union University, Chengdu 610064)

关键词: 河蚌, 外套膜, 钙代谢, 离体培养

Key words: Freshwater mussel, Mantle, Calcium metabolism, Tissue Culture

中图分类号: S966.22⁺⁴ **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2000)01-14

本次实验采用离体组织培养技术研究外套膜组织的钙代谢, 它排除了蚌体内的其他因素, 如神经、激素等对外套膜生理、生化等方面的影响, 并用组化方法对外套膜中钙及有关粘多糖的分布进行了观察研究, 期望能进一步了解外套膜组织钙代谢调控的机理, 同时, 为淡水珍珠养殖业提供一些参考资料。

1 材料与方法

1.1 本实验所用材料是我国各地分布最广的圆背角无齿蚌 *Anodonta woodiana pacifica* (Heude), 采自成都郊区大面铺池塘。蚌龄 2—3 龄。

选取体格健壮的河蚌, 切断闭壳肌, 用自来水和蒸馏水反复冲洗内脏团及外套膜。用削膜法将外套膜的边缘膜与其外表皮分开, 去掉色线边, 再用平衡盐溶液洗净后, 将外表皮切成边长为 3—4mm 的小方块, 在不同钙浓度的培养液中进行组织培养。培养方法是在每个培养瓶中贴组织块 12—16 块, 将培养基加在培养瓶未贴组织块的一面, 放入 27℃ 恒温箱中培养 12h 后再将培养瓶翻转, 使培养基完全浸没组织块, 继续培养。各实验组培养液的 $[Ca^{2+}]$ 浓度 (mol / L): I 组 3.15×10^{-3} ; II 组 4.05×10^{-3} ; III 组 7.75×10^{-3} ; IV 组 1.32×10^{-2} 。其中 I 组的 $[Ca^{2+}]$ 是石安静等测定河蚌体液渗透压后, 制定的平衡盐溶液和培养液中的标准钙离子浓度^[1a], II、III 组系较高 $[Ca^{2+}]$ 组, IV 组为高 $[Ca^{2+}]$ 组。

1.2 在相同实验条件下, 进行组织培养, 每实验组培养 4 瓶, 在培养 8、17、28d 后, 分别取出组织块, 在常温下以 10% 的中性甲醛固定, 石蜡包埋, 切片厚 8μ。然后做以下处理: ①H. E. 染色, 进行一般组织结构

收稿日期: 1997-06-11; 修订日期: 1998-05-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 编号: 3957056

作者简介: 唐 敏 (1972-), 女, 甘肃省秦安县人, 讲师, 硕士, 从事动物组织学细胞培养及生物材料学的研究。

及细胞形态的观察;②用组化的茜素红 S 法(A. R. S 法)、钙红法(C. R. 法)进行钙的定位^[2]。A. R. S. 法显示钙沉淀为橙红色,C. R. 法显示钙沉淀为红色。用这两种方法作钙定位以后,再用苏木精复染,使组织结构更加鲜明,以利于分析研究。用醛品红-阿新兰法对粘多糖进行显示及定位^[3],该法显示酸性硫酸粘多糖为深紫色,酸性弱硫酸粘多糖为淡紫色,酸性非硫酸粘多糖为蓝色。

2 结果

2.1 H.E.染色后可观察到外套膜外表皮细胞呈柱状,排列紧密,细胞核位于细胞中部。从外套膜缘至外套痕,表皮细胞的高度明显下降,由长柱状变成低柱状,细胞核也由棒形、长椭圆形变为圆形。表皮下的结缔组织呈疏松的网状,其中分布有成束的肌纤维。

2.2 用显示钙的 C. R. 法和 A. R. S. 法染色后,可观察到表皮细胞的游离边缘呈钙阳性反应,细胞中部有呈钙强阳性反应的块状或颗粒状物质分布,细胞基部多为空泡状的钙阴性区(图版 I: 1)。表皮细胞外一些区域有呈不规则钙阳性、宽度不一的分泌物带,表明培养的外套膜表皮细胞有十分旺盛的钙分泌活动(图版 I: 2),在 C. R. 法和 A. R. S. 法染色的切片上,均观察到在钙浓度相同时,随着培养时间的延长(8、17、28d),肌纤维及网络状结构显示的钙阳性愈强,表明钙含量有所增加。结缔组织中散在分布的大颗粒血细胞,其胞质中的颗粒经 C. R. 法和 A. R. S. 法染成红色,表明这些颗粒中含有丰富的钙。

2.3 比较观察钙浓度不同,培养时间相同的各实验组,发现结缔组织中钙球体数量的变化十分显著,在标准 $[Ca^{2+}]$ 组和较高 $[Ca^{2+}]$ 组的结缔组织中有很多散在和密集成堆、呈钙阳性反应的钙球体(图版 I: 3),经 A. R. S. 法及 C. R. 法染成红色。它广泛分布于结缔组织网格空隙及血窦中,特别是在内表皮皮下附近的网状结缔组织中分布尤其密集,但在肌纤维间却很少(图版 I: 4)。培养 8d 后,发现组织中钙球体数量在较高 $[Ca^{2+}]$ 组的分布比标准 $[Ca^{2+}]$ 组明显增加(图版 I: 5, 6),但培养 17、28d 时,发现较高 $[Ca^{2+}]$ 组和标准 $[Ca^{2+}]$ 组的钙球体数量已没有明显差别。而在高 $[Ca^{2+}]$ 组的所有组织切片上都只有少量、零散的钙球体分布于结缔组织中(图版 I: 7)。研究结果表明,在 $[Ca^{2+}]$ 与体液相近或稍高时,随着组织培养时间的延长,结缔组织中钙球体的数量明显增加,但当 $[Ca^{2+}]$ 增加到一定极限后,钙球体的数量反而大大减少。这种变化在培养 8、17、28d 各取材时间的切片上都是一致的,且随着培养时间的延长,这种变化趋势更为显著。

2.4 在钙球体分布较多的组织切片上,还可见钙球体的大小和组化特征有较大的变化。经 A. R. S. 法或 C. R. 法染色再经苏木精复染的组织切片上,发现小的钙球体着均一的深蓝色,大的钙球体多数呈红色,有少量的呈淡蓝色,中心一般不着色[图版 I: 8]。推测这些形态可能表明钙球体处于形成或被消化的不同阶段。

2.5 采用醛品红-阿新兰法显示粘多糖的反应,发现钙球体被染成紫色,显示它含有酸性硫酸粘多糖,分布有大量钙球体的内表皮下结缔组织间隙则染成了紫色的板块状,结合显示钙的结果来看,呈钙阳性反应的区域也是硫酸粘多糖的阳性反应区,表明钙和粘多糖的分布有一致性。

3 讨论

3.1 实验组中的标准 $[Ca^{2+}]$ 组、较高 $[Ca^{2+}]$ 组组织中钙球体的数量都比高 $[Ca^{2+}]$ 组的多,这种差别显然是培养液中钙浓度的影响所致。钙球体广泛地存在于无脊椎动物组织中,如原生动物的原生动物,环节动物的软体动物等,放射自显影、组化及电子探针分析都表明,钙球体富含钙、磷、硫和糖蛋白有机物,是钙的贮存库^[4]。 Ca^{2+} 是细胞最普遍而重要的信号转导成分。细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的变化与调控对于参与维持存在于细胞质膜两侧的跨膜 Ca^{2+} 梯度,介导细胞对外界 Ca^{2+} 刺激的应答反应,实现信息跨膜传导等具有重要的调节作用^[5]。特别是,河蚌的外套膜外表皮细胞具有旺盛的钙质吸收和分泌活动^[16],所以外套膜组织中钙球体在钙的运输、贮存及钙的稳态平衡中起着重要作用,钙球体在组织中分布数量的多少从一定角度反映了外套膜组织对外界钙的截流,贮存效率的高低。

3.2 本实验中外套膜表皮细胞周围介质中钙离子浓度为 $10^{-3} \sim 10^{-2} \text{ mol/L}$, 据报道, 一般细胞胞质内钙离子的浓度低于 10^{-6} mol/L [13], 细胞质膜内、外 Ca^{2+} 浓度比率形成较大的浓度梯度, 驱动细胞外 Ca^{2+} 内流。已知, 这些 Ca^{2+} 大多是通过相嵌在膜脂双层中的钙通道进入细胞内的 [17]。然后在细胞内运输, 再通过外排作用进入结缔组织, 作者推测, 这些钙被其中的硫酸粘多糖捕获, 包装成钙球体, 经游走变形细胞运输到一定部位, 作为钙库而贮存起来, 本研究中外套膜和粘多糖、游走变形细胞分布的一致性和游走变形细胞胞质中含有大量的钙球体亦可得到证实。

然而, 当外界环境中 Ca^{2+} 浓度升高超过一定水平时, 组织培养的外套膜表皮细胞的 Ca^{2+} 吸收、截流能力反而下降, 造成组织内贮存钙量降低, 表现为高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组 (IV 组) 组织中钙球体的减少。可以推测其中的机制与钙通道 Ca^{2+} -ATPase 的状态密切相关。高浓度的钙离子通过影响膜脂的物理状态, 使膜蛋白的构象发生变化, 从而使膜蛋白的功能受到调节 [6]。有关资料表明 [7], 蚌外套膜外分泌细胞是兴奋性细胞, 细胞处于分泌状态时, 产生类似心肌细胞的动作电位, 包括一个钠离子依赖性的峰电位和一去极化及电位。这种去极化电位形成一明显的平台期。去极化电位可被钙通道抑制剂如 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 所阻断, 并与细胞外钙离子浓度密切相关, 当钙离子浓度增大时, 去极化电位增大, 持续时间延长。可见, 细胞外钙离子的内流, 使细胞内 Ca^{2+} 累积到一定程度后, 高浓度的钙对钙通道产生反馈抑制作用, 导致细胞质膜内、外两层的膜脂流动性下降, 使镶嵌于膜脂中的钙通道构象发生变化, 由激活转变成抑制状态, 从而减少了通过钙通道进入细胞的钙量, 也就使外套膜外分泌细胞对钙离子的截流能力下降。

3.3 实验结果还显示, 在培养了 17d 后, 实验组中标准 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组与较高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组的组织中, 其钙球体的数量和分布都没有明显的差别。这表明在一定的钙浓度变化幅度内, 离体外套膜组织能够调控钙代谢平衡。估计这种调控主要与牛磺酸有关。石安静等研究了外套膜组织在离体培养条件下分泌物的性质 [16], 证明培养组织可分泌大量的牛磺酸。已有实验证明 [8], 牛磺酸具有使内向电流 (ICa) 稳定的作用: 当 ICa 减弱或 Ca^{2+} 通道受抑制时, 牛磺酸能促进 Ca^{2+} 内流; 相反, 当 Ca^{2+} 内流超过正常时, 牛磺酸能发挥类似 Ca^{2+} 拮抗抑制剂的作用, 提示了牛磺酸对动物细胞内的 Ca^{2+} 具有稳态调节作用, 能抑制由各种原因引起的细胞内 Ca^{2+} 的超负荷。如 Sidney K. Pierce [9] 发现处于低渗状态的海水贝红细胞在恢复体积的过程中要受 Ca^{2+} 的调节, 首先在细胞中出现 Ca^{2+} 内流, 随后某些特定的膜蛋白磷酸化, 引起牛磺酸外流, 表明牛磺酸与 Ca^{2+} 内流密切相关。Pierce S. K. 等 [10] 还发现高浓度的钙会立即引发牛磺酸的外流。宿燕岗等 [11] 在离体大鼠心室肌细胞中发现低浓度的牛磺酸在高钙浓度时对钙内流有抑制作用, 高浓度的牛磺酸作用更显著。因此作者推测离体培养的外套膜组织在较高钙浓度条件下, 对钙代的调节主要是通过牛磺酸来实现的。显然, 牛磺酸的调节作用是限制在一定的钙浓度范围内的。钙浓度过高时, 超过了牛磺酸的调节能力, 外套膜组织中钙的累积和贮存则受到了抑制。

在淡水珍珠养殖业中, 人们经常施用生石灰 (CaO) 作为营养物质中钙的添加剂和水体的消毒剂。研究表明, 养殖水体中钙浓度要保持一定水平, 才有利于蚌组织对钙的正常吸收和代谢, 过量施用生石灰, 使钙浓度过高, 反而会出现钙代谢受阻滞现象, 使蚌的正常代谢活动及珍珠、贝壳的形成受到影响。所以, 建议在生产实际中使用生石灰要适量, 在达到营养和消毒目的的同时, 应考虑到水体中钙浓度不能过高。

参 考 文 献

- [1] 石安静等. 河蚌体液渗透压测定及新设计的平衡盐溶液的组织培养 [J]. 四川大学学报 (自然科学版), 1994, 31 (专辑): a189—193; b59—63; c78—83
- [2] Pearse A. G. E (马仲魁等译). 组织化学—理论和实用 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1990: 614.
- [3] 郑国铝等. 钙和细胞功能. 细胞生物学进展 [J], 1990, 2: 160—200.
- [4] Walter L. An electron microscopic histochemical and X-ray microprobe study of sperites in a mussel [J]. *Tissue and Cell*, 1982, 14(1): 61—67.
- [5] 杨小毅等. 单细胞内 Ca^{2+} 时空变化的激光共聚焦显微测定 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(5): 442—

445.

- [6] 汪 弋等. Ca^{2+} 通过膜脂影响肌质网 Ca^{2+} ATP 酶的活性与 Ca^{2+} 转运功能 [J]. 生物物理学报, 1988, 4: 110—115.
- [7] Paulo S. et al. Two types of action potentials in a secretory epithelium of a clam mantle [J] *J. Exp. Biol.*, 1986, 121: 179—195.
- [8] 宿燕岗等. 牛磺酸跨膜转运的意义及机制 [J]. 细胞生物学杂志, 1997, 19(1): 4—9.
- [9] Pierce. S. K. Osmolyte permeability in molluscan red cells is regulated by Ca^{2+} and membrane protein phosphorylation: the present perspective [J]. *J. Exp. Zool.*, 1994, 268: 166—170.
- [10] Pierce S. K. et al. Ionomycin produces an improved volume recovery by an increased efflux of taurine from hypototically stressed molluscan red blood cells [J]. *Cell Calcium*, 1992, 13: 321—327.
- [11] 宿燕岗等. 牛磺酸对大鼠培养心肌细胞感染病毒后钙离子内流的影响 [J]. 上海医科大学学报, 1996, 23(5): 339—334.

图 版 说 明

图 版 I

1. 培养 17d, 较高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组 (III 组), 钙红法, A 示外表皮细胞, 游离端呈钙强阳性反应 (大箭头所示), 细胞中部有很多钙阳性反应团块 (双箭头所示) 和钙颗粒 (小箭头所示), 黑三角形 (\blacktriangle) 示细胞基部的钙阴性区, B 示结缔组织. $\times 1320$;
2. 培养 17d, 较高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组 (III 组), 钙红法, 外表皮细胞 (小箭头所示) 分泌物形成的、呈钙阳性反应的分泌带 (大箭头所示), B 示结缔组织. $\times 230$; 3. 培养 17d, 较高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组 (II 组), 茜素红 S 法, 结缔组织中呈钙极强阳性、密集成斑块状的钙球体 (细箭头所示). $\times 825$; 4. 培养 28d, 较高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组 (II 组), 钙红法, 结缔组织网络中密集的钙球体 (细箭头所示), 而肌纤维 (双箭头所示) 间钙球体少. $\times 1320$; 5. 培养 8d, 标准 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组 (I 组), 茜素红 S 法, 结缔组织中单个 (小箭头所示) 和成团的 (大箭头所示) 钙球体及游走变形细胞中的钙球体 (双箭头所示). $\times 1320$; 6. 培养 8d, 较高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组 (III 组), 茜素红 S 法, 结缔组织中呈钙阳性的钙球体已聚积成大的团块 (细箭头所示). $\times 720$; 7. 培养 28d, 高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组 (IV 组), 茜素红 S 法, 结缔组织中钙球体很少. $\times 1320$; 8. 培养 17d, 较高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 组 (III 组). 茜素红 S 法, 结缔组织中有大小、形态差异大的钙球体. 大、着色浅的钙球体 (双箭头所示), 小、着色深而均一的钙球体 (粗箭头所示). $\times 1720$

1. The mantle tissue cultured 17 days, the higher $[\text{Ca}^{2+}]$ experimental group (III), C. R. staining method, "A" indicating the outer mantle epithelium (OME), strong Calcium-positive portion in apical of the OME (big arrow), Calcium-positive blocks (double arrow) and granules (small arrow) in the midst of the OME, Calcium-negative portion in basal of the OME (dark \blacktriangle), "B" connective tissue. $\times 1320$; 2. Cultured 17 days, the higher $[\text{Ca}^{2+}]$ experimental group (III), C. R. staining method, the OME (small arrow) secreting Calcium-positive band-shaped secretion (big arrow), "B" connective tissue. $\times 230$; 3. Cultured 17 days, the higher $[\text{Ca}^{2+}]$ experimental group (II), A. R. S. staining method, very strong Calcium-positive calcospherules accumulating spots and blocks (thin arrow) in connective tissue. $\times 825$; 4. Cultured 28 days, the higher $[\text{Ca}^{2+}]$ experimental group (II), C. R. staining method, densely distributing calcospherules (thin arrow) in connective tissue net, but few calcospherules in muscular tissue (double arrow). $\times 1320$; 5. Cultured 8 days, the standard $[\text{Ca}^{2+}]$ experimental group (I), A. R. S. staining method, single (small arrow) and accumulating (big arrow) calcospherules in the connective tissue and some calcospherules in amoebocyte (double arrow). $\times 1320$; 6. Cultured 8 days, the higher $[\text{Ca}^{2+}]$ experimental group (III), A. R. S. staining method, calcium-positive calcospherules accumulating big blocks (thin arrow) in connective tissue. $\times 720$; 7. Cultured 28 days, the highest $[\text{Ca}^{2+}]$ experimental group (IV), A. R. S. staining method, few calcospherules in connective tissue. $\times 1320$; 8. Cultured 17 days, the higher $[\text{Ca}^{2+}]$ experimental group (III), A. R. S. staining method calcospherules of different size and shape, big light-staining calcospherules (double arrow), small and equally deep-stained calcospherules (thick arrows). $\times 1720$