

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00129

红条毛肤石鳖齿舌主侧齿中铁还原酶分布及与生物矿化的关系

刘传林^{1,2} 陈西广¹ 姜明³ 陈朋² 刘成圣¹ 于乐军¹

(1. 中国海洋大学生命科学院, 青岛 266003; 2. 烟台大学化学与物理工程学院, 烟台 264005;

3. 中国海洋大学环境科学院, 青岛 266003)

摘要: 以红条毛肤石鳖 *Acanthochiton rubrolineatus* (Lischke) 齿舌为材料, 通过切片和酶组织化学技术, 在光镜和电镜下对齿舌主侧齿的微结构及高铁还原酶的存在进行观察, 从微观角度了解齿舌主侧齿齿尖的矿化机理。结果显示, 成熟主侧齿由齿尖和齿基组成。齿尖结构由外至内分为三层, 最外层为磁铁矿层, 前后齿面磁铁矿层的厚度不等, 后齿面约 50 μm , 前齿面约 5—10 μm 。向内依次为棕红色的纤铁矿层, 厚约 10 μm , 及略显黄色的有机基质层, 有机基质层占据着齿尖内部的大部分结构。高分辨透射电镜下显示磁铁矿由条状四氧化三铁颗粒组成, 长约 2—3 μm , 宽约 100—150 nm。齿舌的矿化是一个连续过程, 不同部位处于不同的矿化阶段, 齿舌囊上皮细胞沿囊腔分布, 并形成齿片。未矿化的新生主侧齿齿尖中存在由有机基质构成的网状结构。随矿化的进行, 有机基质内出现矿物颗粒。初始矿化的齿尖外表面有一个细胞微突层, 微突的另一端为囊上皮细胞, 矿物质经由微突层达齿尖并沉积于有机基质中, 齿尖随之矿化并成熟。初始矿化齿尖的外围有大量的三价铁氧化物颗粒, 稍成熟的齿尖外围同时还出现二价铁氧化物。新生或初始矿化主侧齿齿尖外围的囊上皮细胞中有大量球形类似于铁蛋白聚集体的内容物, 直径 0.6—0.8 μm , 球体由膜包围。齿舌囊上皮组织中存在三价高铁还原酶, 此酶分布于上皮细胞的膜表面, 可能与齿尖表面磁铁矿的生成有一定的关系。

关键词: 石鳖; 主侧齿; 微结构; 矿化; 铁蛋白; 铁还原酶

中图分类号: Q954.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)01-0129-10

石鳖 *Acanthochiton rubrolineatus* (Lischke) 隶属于软体动物多板纲, 草食性海洋生物, 软体动物中较原始物种, 全世界大约只有 600—800 种, 是软体动物中数量较小的一个纲。石鳖分布于海岸带岩石间, 口腔内有一条带状齿舌, 横向长有大约 50—60 排牙齿。靠刮食岩石上包括硅藻等底栖藻类细胞生活。多数石鳖生活在潮间带, 只有小部分种类生活在深水区^[1, 2]。石鳖为非经济类生物, 目前经济价值不大, 与软体动物中的一些养殖种类相比, 它们一般很少得到关注。自 1962 年首次在齿舌中发现大量的磁铁矿(Fe_3O_4)以来^[3], 尤其是 20 世纪 90 年代纳米材料成为材料科学研究领域的一个热门课题后, 由于齿舌内的磁铁矿颗粒直径在 20—50 nm 范围内,

大小均一, 含量高, 约有 10^9 个纳米级颗粒集中在齿舌上^[4—6], 并且磁性纳米颗粒有着广泛的应用前景^[7—9]。因此, 石鳖越来越受到生物学家、材料学家和物理学家们的关注, 成为研究铁矿化及天然纳米材料的最好实验材料之一。此外, 与石鳖生活习性类似的帽贝的齿舌中也矿化了大量的铁氧化物^[10]。目前, 关于石鳖齿舌的矿化, 多数研究是从物理、化学方面研究了铁矿化物的组成、结构及磁性等^[3—6, 11—13], 但齿舌中的纳米级磁铁矿颗粒的形成机理仍不清楚。趋磁性细菌体内磁铁矿颗粒形成的研究, 表明磁铁矿的形成由细菌多个基因控制, 与铁蛋白及三价铁还原酶密切相关^[14—17]。铁蛋白是生物体内的铁库, 脊椎动物血液中铁含量较低, 约 50—250 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 。

收稿日期: 2008-03-07, 修订日期: 2009-01-23

基金项目: 国家自然科学基金(No.30770582); 国家教育部博士点基金(No. 20070423013)资助

作者简介: 刘传林(1965—), 男, 汉族, 山东烟台人; 博士, 副教授; 主要从事无脊椎动物发育与矿化。

E-mail: clliu301@yahoo.com.cn; Tel: 0535-6903551; Fax: 0535-6902063

通讯作者: 陈西广, 教授; E-mail: xgchen@ouc.edu.cn

石鳖的血淋巴中含量很高,血淋巴中铁含量达 10000 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$,铁蛋白含量也达到 0.4 mg/mL ,是齿舌中铁元素的来源,对石鳖齿舌的矿化极为重要^[12]。由于石鳖齿舌的矿化主要表现在主侧齿上,齿舌沉积物中的大部分矿物质沉积在主侧齿的齿尖中,并且沉积物中的主要成分为铁化物,尤其是主侧齿表面矿化了大量的磁铁矿^[3—6,11—13]。齿舌可不断地生长,齿舌上所有齿片均生自齿舌囊上皮细胞组织,上皮细胞按在齿舌囊中的位置分为齿舌囊上方上皮细胞和下方上皮细胞,前者负责齿片生成,后者负责齿舌基膜的产生^[13,14]。因此,本文以红条毛肤石鳖齿舌和齿舌囊为材料,通过显微切片和酶组织化学技术,在光镜和电镜下对齿舌的微结构尤其是主侧齿齿尖的微结构,以及高铁还原酶的存在部位进行了观察,从微结构和酶组织化学的角度来探讨齿舌主侧齿的铁矿化及磁铁矿的形成原因,为今后从分子学方面研究磁铁矿形成及生物模拟合成可降解纳米磁铁颗粒提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

红条毛肤石鳖采自山东烟台月亮湾处海岸礁石,时间为 2005—2007 年,退潮时采集成熟个体,体长 2—3 cm。实验时将整条齿舌(连带着齿舌囊)取出,非切片观察的样品将齿舌囊剔除,先用纯水清洗 2—3 遍,然后 0.1 mol/L 盐酸浸泡 30s,最后纯水洗净,70%乙醇内保存。部分齿舌截取囊尖(0.5 cm)用于组织切片。

1.2 方法

光镜显微切片观察的样品 Bouin 氏液固定,系列酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片厚度 5—8 μm ,苏木精伊红染色;奥林巴斯 BH-2(配有 CCD 彩色照相系统)下观察并照相。透射电镜切片观察的样品处理参照李明^[18]及李娜^[19]方法并略修改,先用 65 mmol/L 磷酸缓冲液配置的 2.5% 戊二醛固定,后用相同缓冲液配置的 1% 锇酸固定,系列酒精脱水,环氧树脂包埋,超薄切片(50—80 nm),醋酸铅、醋酸铀染色(各 30min),日立 H-7000 75 kV 下观察并拍照。酶组织化学观察的样品处理参照王贺等方法^[20],并略微修改。样品截取后立即置入新配置的酶反应液中。反应液组成为:65 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.6)、300 mmol/L 酒石酸钾钠、5 mmol/L 硫

酸铜、1.5 mmol/L 铁氰化钾,反应液的最终 pH 为 6.6。样品 37℃ 下反应液中反应 30 min。对照实验的样品经 100℃ 水浴煮 10min,然后反应液中反应。反应完毕后 65 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.6) 冲洗 2—3 次,每次 10min。透射电镜观察的样品按上述结构观察程序固定、脱水、包埋、超薄切片,电镜观察拍照。光镜观察的样品用 4% 甲醛固定,常规石蜡切片处理,切片厚度 5—8 μm ,光镜观察。切片组织内 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 矿化物的显示参照 Nesson^[14]的方法并略有修改,分别采用亚铁氰化钾-盐酸和铁氰化钾-盐酸溶液(4% 铁氰化钾或亚铁氰化钾、4% 盐酸、v/v 1:1)染色。齿舌扫描电镜样品从 70% 乙醇中取出后无水乙醇脱水,室温下干燥后表面镀金, S-4200 扫描电镜观察。齿舌光镜观察样品从 70% 乙醇中取出后纯水清洗后直接观察。为获得齿尖内磁铁矿的微结构,齿尖研磨后无水乙醇内保存,观察时摇匀,滴样后高分辨透射电镜 JEM-200cx 下观察。

2 结果

2.1 主侧齿微结构

齿舌全长 0.8—1.0 cm,宽 1—1.5 mm,条状,横向长有 50—60 排齿,每排有 17 个齿,齿片较小,形态各异,空间高度不一,齿片间凹凸相嵌,对称分布于齿舌基膜上。除主侧齿和与之邻近的齿片外,其他齿片低矮,瓦片状。其中主侧齿的形状最特殊,齿尖具三齿,呈“山”字型,齿尖约 45° 角斜向朝齿舌中央倾斜,齿尖向后面弯曲,齿尖宽约 100 μm ,厚约 50 μm ,高约 150 μm 。齿基长柄状,长约 240 μm ,上粗下细,稍扁,“V”字型斜向外伸托着齿尖。齿基与齿尖结合处下方有一小突起,位于齿基侧背面,左右两侧的主侧齿呈合抱状,紧贴主侧齿的象牙状齿片,长约 150 μm (图版 -1)。齿舌不同部段的齿片呈现规律性颜色变化,主侧齿尤为明显。成熟段主侧齿齿尖亮黑色、齿基红棕色,初始矿化段主侧齿齿尖棕黄色,表面斑驳状,未矿化段齿片无色(图版 -2、3、4)。主侧齿的齿尖、齿基在结合处很容易断裂。成熟主侧齿矢面切片可以看到齿尖由外向内分为三层,最外层为黑色磁铁矿层,齿尖前后齿面磁铁矿层的厚度明显不同,后面磁铁矿层厚度约为 50 μm ,前面则约为 5—10 μm 。向内依次为纤铁矿层和有机质层,纤铁矿层为红棕色,有机质层棕黄色,由几丁质、蛋白等有机质纤维和部分矿化物

组成。齿尖前齿面, 齿尖与齿基结合处上方有一处齿面裸露, 无磁铁矿层包被(图版 -5)。有机质层内纤维成束或散开, 少量的矿化物零星地矿化于其中(图版 -6)。光镜下磁铁矿层中的磁铁矿颗粒大小约 $2\ \mu\text{m}$, 沿有机纤维线条状排列(图版 -7), 高分辨透射电镜下颗粒为长条形, 宽约 $100\text{—}150\ \text{nm}$, 长约 $2\text{—}3\ \mu\text{m}$, 颗粒按统一方向(平行于齿片的长轴)排列并叠加在一起(图版 -8)。齿基表面有凹槽纵贯全长, 中央有空腔, 腔内有细胞分布。红外光谱测试证明齿基的主要成分为几丁质(此处不显示数据)。光镜下初始矿化段的主侧齿齿尖完全被齿舌囊上皮细胞包围, 上皮细胞胞核较大, 齿尖与上皮细胞间有大量的矿物质颗粒分布, 颗粒大小为 $0.6\text{—}1.0\ \mu\text{m}$, 颗粒层厚度约 $4\text{—}6\ \mu\text{m}$ (图版 -9、10), 铁染色结果显示矿物质颗粒为三价铁化物(图版 -11)。光镜下可以看到齿尖表面与上皮细胞之间有一层空囊状结构(图版 -12), 透射电镜放大后可清晰地看到空囊状结构由细胞形成的微突组成, 微突直径约 $0.5\ \mu\text{m}$ (图版 -13、14)。透射电镜下齿尖周围的齿舌囊上皮细胞内含有许多由膜包围的聚集体, 聚集体大小不一, 膜厚度约 $10\ \text{nm}$, 参照 Kim 和 Webb, *et al.* 的报道^[12, 13]可以推定此聚集体为铁蛋白聚集体。有些聚集体完全被铁蛋白充满, 而有些则仍有空隙, 处于积累状态。较大的聚集体略为椭圆形, 长径约 $0.8\ \mu\text{m}$, 短径 $0.6\ \mu\text{m}$ (图版 -15、16)。新生主侧齿中无矿物质沉积, 有机质呈网眼状的结构, 而初始矿化的主侧齿中开始出现矿化质, 但含量很少, 主要由有机基质组成(图版 -17、18)。

2.2 三价铁还原酶组织化学

齿片微结构结果显示初始矿化的主侧齿齿尖周围有大量的含铁矿物质颗粒, 且颗粒为三价铁化物, 齿舌囊上皮细胞内有铁蛋白聚集体, 根据文献报道铁蛋白内的铁化物也为三价铁化物^[19, 20]。但成熟主侧齿齿尖表面被一层磁铁矿(四氧化三铁)所覆盖, 很显然三价铁矿物在齿尖矿化的过程中发生了铁价态的变化。切片经酶组织化学反应显示对照无棕色颗粒(图版 -19), 实验组呈阳性, 证明三价铁还原酶的确存在, 且存在于由齿舌囊上皮细胞构成的组织中, 上皮细胞周围的基质被染成浅棕色。细胞边缘及周围基质中均可看到细微的棕色颗粒(图版 -20、21)。透射电镜下可以更加清晰地看到对照的切片中无反应颗粒出现(图版 -22), 而酶反应形

成颗粒, 颗粒大小 $40\ \text{nm}$ 左右, 且颗粒集中于上皮细胞的胞膜表面(图版 -23、24)。

3 讨 论

3.1 主侧齿齿片微结构与铁矿化

石鳖齿舌矿化程度非常高, 齿舌内含多种元素, 包括一些金属元素和非金属元素硫、氯、磷和硅等, 这些元素以无机矿化物或作为有机结构组分的形式存在。齿舌矿化过程中, 铁化物首先沉积, 接着钙化物, 然后硅化物及硫化物等^[11-13]。对主侧齿而言, 由于齿尖中集中了齿舌沉积物的大部分, 其矿化程度最高, 因此齿舌的矿化过程也就自然地表现为主侧齿齿尖的矿化^[13, 14]。纵观整个红条毛肤石鳖的齿舌, 根据矿化程度可分为五个部分, 齿舌前端的 1—3 排, 矿化程度最高, 齿片最早生成, 主侧齿齿尖由于长期取食, 与基底摩擦造成明显磨损, 齿尖变平变小; 之后的 4—25 排, 矿化程度次之, 齿尖略有磨损; 取食时主要利用这两部分。再后的 26—40 排, 矿化程度再次之, 齿尖轮廓明显, 无磨损。以上三个矿化段的主侧齿表面都有磁铁矿沉积。到 41—45 排时, 矿化程度更低, 处于初始矿化阶段, 齿片小而薄, 齿片表面无磁铁矿。最后的 46 至末端, 齿片处于生成阶段, 几乎无矿化。据报道齿舌约 $2\text{—}3\text{d}$ 就可生成新的一排, 同时齿舌前端的齿片不断地脱落, 后排齿片前移, 保持总数稳定^[1, 14]。主侧齿齿尖中沉积的铁化物主要是以水铁矿($5\text{FeOOH}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)、针铁矿($\alpha\text{-FeOOH}$)、纤铁矿($\gamma\text{-FeOOH}$)、磁铁矿(Fe_3O_4) 形式存在^[11-13]。从以往的研究看, 主侧齿中铁化物的形成必定与铁蛋白密切相关^[11, 13, 14], 本次实验也证实了这点。根据以往研究^[13, 14]及本次实验的结果可推断主侧齿的矿化历程可能是先由齿舌囊上皮细胞分泌的有机质构成齿片的基本框架, 然后细胞分泌矿物质, 分泌的矿物质中可能包括存在于细胞内的铁蛋白聚集体也一同被分泌到细胞外。这些铁蛋白聚集体中的铁蛋白的铁核聚集着大量的三价铁化物, 铁蛋白中的铁核可能在这种有机环境下被逐步释放出来, 由于铁核本身的结构类似于水铁矿^[21, 22]。因此, 释放后的铁核首先转化为水铁矿, 然后在齿片内发生相变, 相继转化为其他形式的铁化物, 如针铁矿和纤铁矿及磁铁矿。铁化物结构的改变也说明齿片中生成铁化物的微环境发生了改变。在齿片这样一个微环境中, 有机的几丁质

及蛋白等生物大分子构成一定的空间结构,这种结构限制了铁化物包括磁铁矿颗粒的生长,使其颗粒大小均一,成为纳米级大小的颗粒。总的看来,在矿化过程中,无机物沉积的同时,有机基质的结构也发生着规律性的变化。有机质在未矿化的齿片中是松散地排布,呈网眼状结构,随矿化的进行,网眼状结构逐渐消失,有机质含量减少,纤维结构更加紧密,纤维排布更具方向性。有机质的减少,矿化物的增加,使柔软性下降,尤其磁铁矿含量的增加,使齿片的硬度也不断加大。

3.2 铁还原酶与磁铁矿形成

碳酸根离子存在时利于针铁矿或纤铁矿形成,有机质含量丰富时利于水铁矿形成。目前,磁铁矿可以在实验室以三价铁盐或/和二价铁盐为反应物,在一定介质(主要以大分子)下控制pH和温度人工合成。二价铁盐在中性至碱性环境低温条件下,可直接氧化形成磁铁矿,也可与体系内先前存在的三价铁盐生成磁铁矿,颗粒大小受多种因素的影响,包括温度、pH及反应介质^[7-9]。齿舌切片铁染色主侧齿齿尖中最初形成的铁化物为三价铁化物,随矿化的进行,开始出现二价铁化物,磁铁矿随后才出现在一些齿片的表面,这与在其他种类石鳖的研究上获得的结果基本一致^[11-14]。铁化物中铁价态的改变涉及到铁氧化还原反应,可能有生物酶的参与,本次研究结果表明三价铁还原酶确实存在,且酶初提物活力为 $0.9 \mu\text{g Fe}^{2+}/\text{mg}\cdot\text{min}$ 。由此推测,酶作用过程大致为齿片中首先沉积下来的三价铁化物-水铁矿,在酶作用下部分转化变为二价铁化物,并可能在其他因素的共同作用下发生结构重排,最终形成磁铁矿。综观整个齿舌可以看到第三矿化段的最后几个主侧齿中已开始出现磁铁矿,但磁铁矿结合松散斑驳状,易碎,而第四矿化段的主侧齿中无磁铁矿沉积,且第五矿化段的主侧齿全是有机质组成,这说明磁铁矿是在铁矿化进行到第四矿化段才开始转化产生,并在第三矿化段从外观上表现出来。石鳖齿舌中磁铁矿的产生,除三价铁还原酶途径外可能还存在其他方式,但目前还无法得知。

石鳖齿舌的结构精巧、合理,像传送带,使刮取的食物不断地被传递到口腔内。在齿舌结构设计上,充分考虑到经济、有效,为增加硬度,石鳖在其齿舌中矿化了大量的无机物,无机物中主要选择了铁化物,因为铁元素很容易从海水或海洋生物及岩石中

获得。铁化物中磁铁矿的硬度远大于其他形式的铁化物,因此,通过在齿尖中矿化形成磁铁矿,可以大大减少取食带来的磨损。但为了经济,只在齿尖表面形成一层,而不是整个齿尖,内层仍由有机质成分填充,有机质层可充当减震器的功效,减少了取食带来的震动,这样既节约又轻便。齿片中磁铁矿的功能除增加硬度以外,可能还有其他作用,如可能利用其微磁场帮助取食。目前在淡水单胞藻体内已发现了磁铁矿颗粒^[23],是否石鳖取食的单胞藻中也有磁铁矿颗粒,目前还不清楚。研究发现家鸽的喙中也有磁铁矿颗粒,且磁铁矿与家鸽的定向飞行有密切关系^[24],使人们联想到石鳖齿片中的磁铁矿是否也具有类似的功能。齿尖的矿化不是简单的一个物理变化,其中包含着一些复杂的化学及生物反应。因此要充分了解主侧齿的矿化,并彻底弄清磁铁矿的形成机理及磁铁矿的生物学功能还有待于今后深入的研究。

参考文献:

- [1] McNeill Alexander R. The Invertebrates [M]. London: Cambridge University Press. 1979, 259
- [2] Ruppert E E, Barnes R D. Invertebrate Zoology [M]. Fort Worth: Saunders College Press. 1994, 372
- [3] Lowenstam H A. Magnetite in denticle capping in recent chitons (Polyplacophora) [J]. *Bulletin of the Geological Society of America*, 1962, 73: 435—438
- [4] Qian X, Zhao J G, Liu C L, et al. Magnetic anisotropy of the radula of chiton *Acanthochiton rubrolineatus* [J]. *Bioelectromagnetics*, 2002, 23: 480—484
- [5] Qian X, Zhao J G, Liu C L. Study of nano-magnetic materials in the major lateral radula teeth of chiton *Acanthochiton rubrolineatus* LISCHKE by scanning electron microscope [J]. *Acta Physica Sinica*, 2002, 51: 1393—1397 [钱霞, 赵见高, 刘传琳. 红条毛肤石鳖主要横向牙齿内纳米磁性矿物质的扫描电镜研究. 物理学报, 2002, 51: 1393—1397]
- [6] Liu C L, Zhao J G, Cui L B, et al. The morphology and the concentration of metals in the radula of chiton *Acanthochiton rubrolineatus* Lischke [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, 47: 553—557 [刘传琳, 赵见高, 崔龙波, 等. 红条毛肤石鳖齿舌形态及矿物成分含量. 动物学报, 2001, 47: 553—557]
- [7] Pankhurst Q A, Connolly J, Jones S K, et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine [J]. *J. Physics D: Applied Physics*, 2003, 36: 167—181
- [8] Kawashita M, Tanaka M, Kokubo T, et al. Preparation of ferrimagnetic magnetite microspheres for in situ hyperthermic treatment of cancer [J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 2231—2238

- [9] Asmatulu R, Zalich M A, Claus R O, *et al.* Synthesis, characterization and targeting of biodegradable magnetic nanocomposite particles by external magnetic fields [J]. *J. Magnetism and Magnetic Materials*, 2005, **292**: 108—119
- [10] Cruz R, Farina M. Mineralization of major lateral teeth in the radula of a deep-sea hydrothermal vent limpet (Gastropoda: Neolepetopsidae) [J]. *Marine Biology*, 2005, **147**: 163—168
- [11] Webb J, Evans L A, Kim K S, *et al.* Controlled deposition and transformation of iron biominerals in chiton radula teeth [A]. In: Suga S, Nakahara H (Eds.), *Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological systems* [C]. Tokyo: Springer-Verlag. 1991, 283—290
- [12] Webb J, St. Pierre T G, Macey D J. Iron biomineralization in invertebrates [A]. In: Frankel R B, Blakemore R P (Eds.), *Iron biominerals* [C]. New York: Plenum. 1990, 193—218
- [13] Nesson M H, Lowenstam H A. Biomineralization processes of the radula teeth of chitons [A]. In: Kirschvink J L, Jones D S, MacFadden B J (Eds.), *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Biomagnetism* [C]. New York: Plenum. 1985, 333—363
- [14] Kim K S, Macey D J, Webb J, Mann S. Iron mineralization in the radula teeth of the chiton *Acanthopleura hirtosa* [J]. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 1989, **237**: 335—346
- [15] Matsunaga T, Okamura Y. Genes and proteins involved in bacterial magnetic particle formation [J]. *Trends in Microbiology*, 2003, **11**: 536—541
- [16] Wang X K, Zhao L Z, Song T, *et al.* Effect of pulse magnetic field on magnetosome formation and expression of mamA, mms13, mms6 and magA in *Magnetospirillum* sp. AMB21 strain [J]. *High Technology Letters*, 2007, **17**: 412—417 [王小柯, 赵露泽, 宋涛, 等. 脉冲磁场对趋磁螺细菌 AMB-1 磁小体形成及相关基因表达的影响. 高技术通讯, 2007, **17**: 412—417]
- [17] Noguchi Y, Fujiwara T, Yoshimatsu K, *et al.* Iron reductase for magnetite synthesis in the magnetotactic bacterium *Magnetospirillum magnetotacticum* [J]. *J. Bacteriology*, 1999, **181**: 2142—2147
- [18] Li M, Wang J G, Zhang J Y, *et al.* Observation on the *Apiosoma piscicola* under optical and transmission electron microscope [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(2): 208—213 [李明, 汪建国, 章晋勇, 等. 鱼杯体虫 (*Apiosoma piscicola*) 的光镜及透射电镜观察. 水生生物学报, 2007, **31**(2): 208—213]
- [19] Li N, Shi H R, Li H Y, *et al.* Microstructure and ultrastructure of the gill of *Haliotis diversicolor* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(5): 516—523 [李娜, 石和荣, 李海云, 等. 杂色鲍鳃的显微与亚显微结构. 水生生物学报, 2007, **31**(5): 516—523]
- [20] Wang H, Yi C L, Zhang F S. A cytochemical method for light and electron microscopic demonstration of ferric reductase [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1997, **39**: 411—414 [王贺, 易翠林, 张福锁. 一种在光学和电子显微镜下显示铁还原酶活性的细胞化学方法. 植物学报, 1997, **39**: 411—414]
- [21] Reilly C A, Aust S D. Iron loading into ferritin by an intracellular ferroxidase [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1998, **359**: 69—76
- [22] Curry P M P, Chasteen N D. Molecular aspects of iron uptake and storage in ferritin [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 1995, **144**: 347—368
- [23] Torres de Araujo F F, Pires M A, Frankel R B, *et al.* Magnetite and magnetotaxis in algae [J]. *Biophysics J*, 1986, **50**: 375—378
- [24] Mora C V, Davison M, Wild J M, *et al.* Magnetoreception and its trigeminal mediation in the homing pigeon [J]. *Nature*, 2004, **432**: 508—511

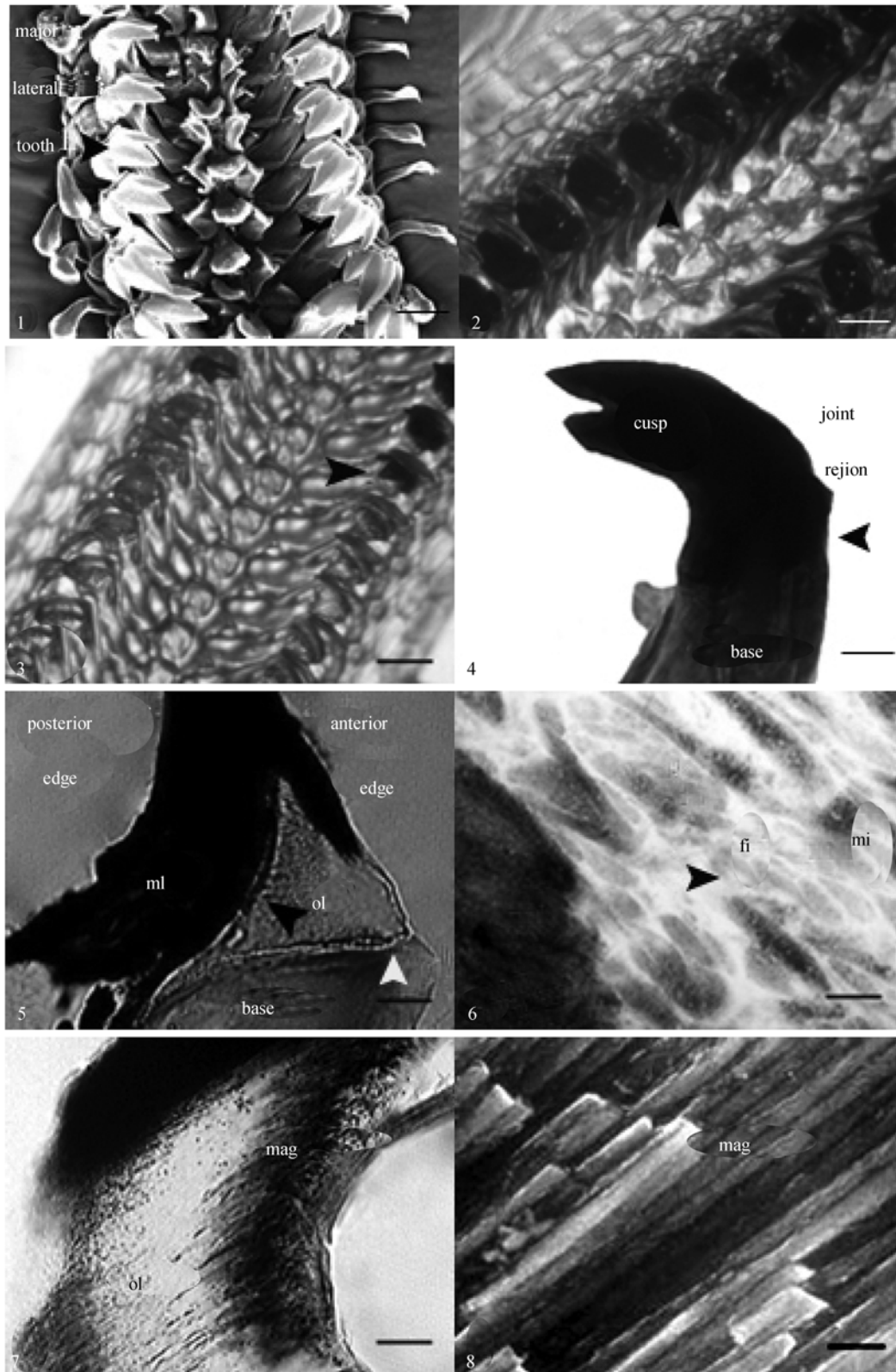
THE DISTRIBUTION OF THE FERRIC REDUCTASE AND BIOMINERALIZATION OF THE MAJOR LATERAL TOOTH OF THE CHITON *ACANTHOCHITON RUBROLINEATUS*

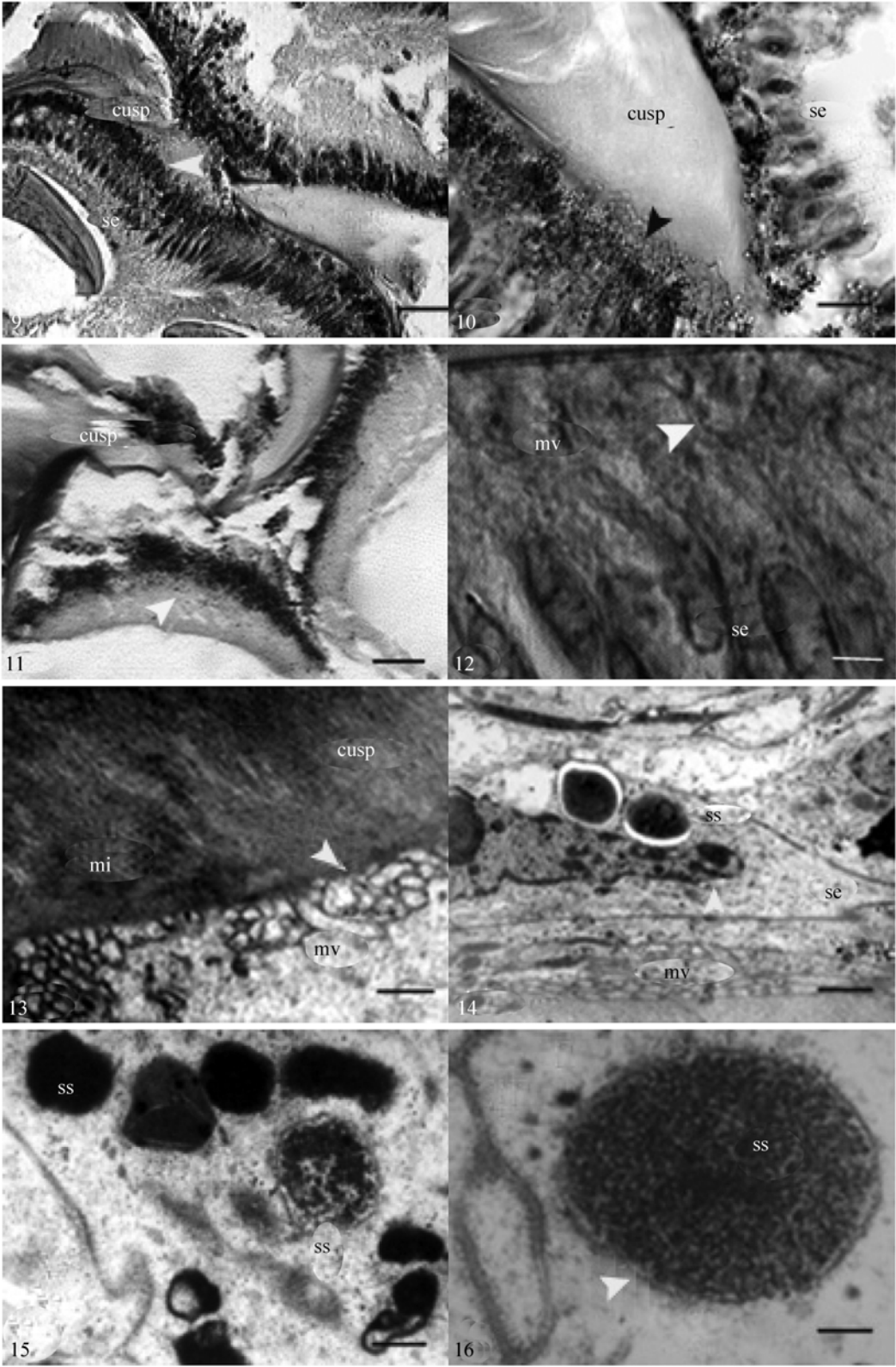
LIU Chuan-Lin^{1,2}, CHEN Xi-Guang¹, JIANG Ming³, CHEN Peng², LIU Cheng-Sheng¹ and YU Le-Jun¹

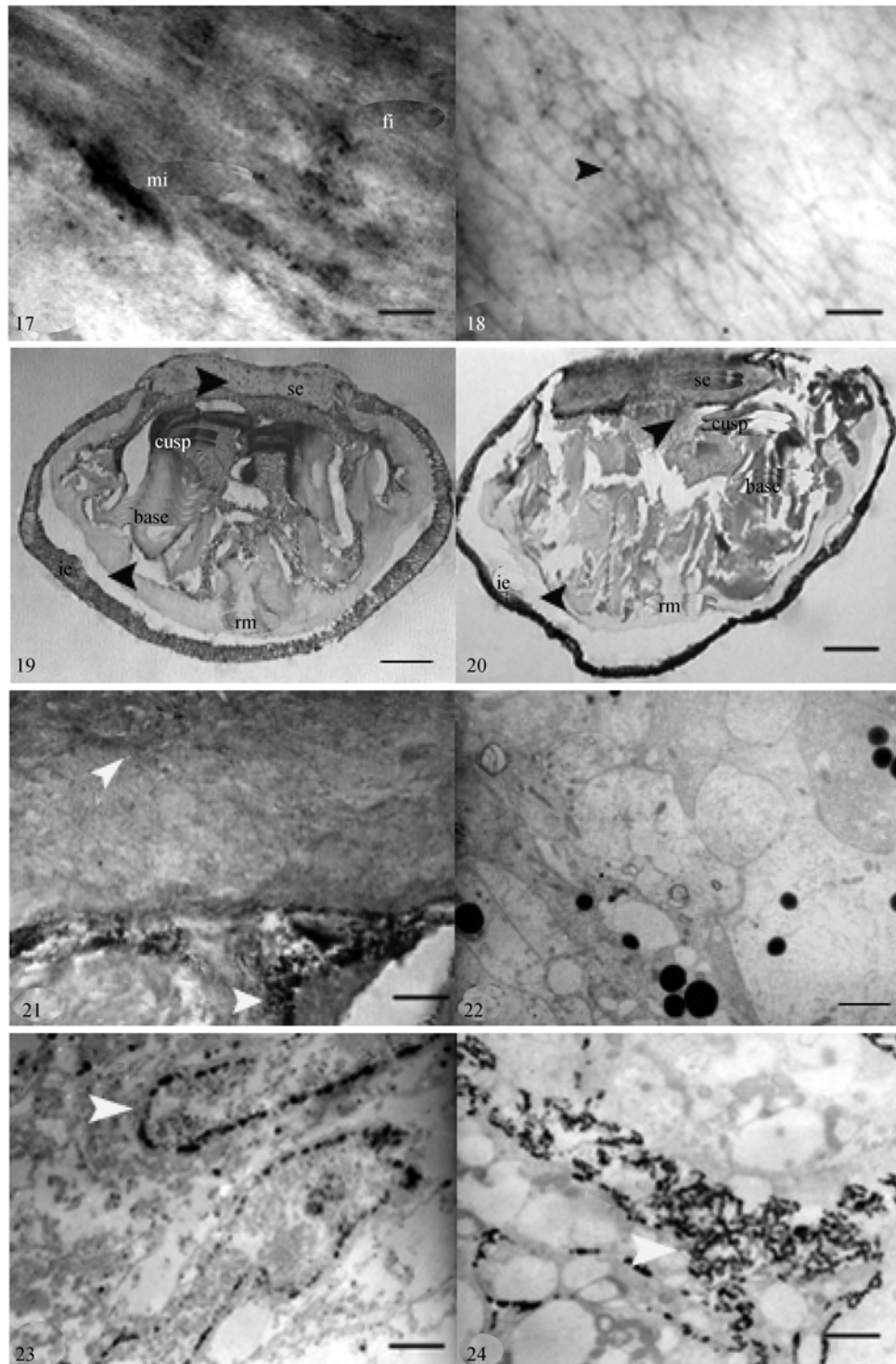
(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003; 2. College of Biological Science and Engineering, Yantai University, Yantai 264005; 3. College of Environmental Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract: The radula in the chitons is a ribbon-like apparatus which bears a series of distinctive mineralized teeth called the major lateral teeth. Great amounts of minerals including magnetite have been deposited at the cusps of the teeth. The magnetite mineralization could harden the teeth. In order to investigate the mechanism of the biomineralization of the cusp, the radulae of chiton *Acanthochiton rubrolineatus* Lischke were extracted and posterior ends of the radulae approximately 0.5 cm in length were fixed, sectioned and observed with light microscope, scanning electron microscope and transmission electron microscope. In addition, aimed to display the iron minerals, the existence and the distribution of the ferric reductase, the sections were examined by histochemistry technology. Results showed that the radula underwent a mineralization progress and the different parts of the radula exhibited various mineralization degrees; the major lateral tooth cusp was a composite structure made up of three distinct layers from the outer to inner. The black magnetite layer was about 50 μm in thickness on the posterior edge, and 5—10 μm on the anterior edge. The lepidocrocite layer in red-brown color below the magnetite layer was only 10 μm in thickness; the core was the yellow organic fibril layer. Magnetite particles which constituted the magnetite layer presented chip-shaped pieces and were 100—150 nm in width, hundreds of nanometers to several micrometers in length; moreover, all the magnetite particles were arranged to be parallel to the length axis of the tooth cusp. Radular teeth including the major lateral teeth were formed by epithelial cells of the radular sac, and the epithelium lining the lumen of the radular sac varied markedly along its length. Newly formed major lateral tooth cusp was almost composed of organic matrix, and the fibrous matrix presented meshwork-like appearance. With the development of mineralization, some fine mineral granules began to be deposit into the organic matrix of mineralizing major lateral tooth. The minerals first appeared in the organic matrix were ferric iron minerals, then ferroc iron minerals. Along the outer surface of mineralizing major lateral tooth cusp surrounded by epithelium of the radular sac, a microvilli-like structure was formed, by which minerals gradually were transported into the cusp. Iron-containing minerals presumably originated from the inclusions which were membrane-bound aggregates of resembling ferritin molecules with 0.6—0.8 μm diameter in surrounding epithelium of the radular sac. The ferric reductase occurred in the epithelial tissue of the radular sac, and mainly distributed on the membrane of these epithelial cells, furthermore, it may be involved in the formation of the magnetite mineralized in the cusp.

Key words: Chiton; Major Lateral Tooth; Microarchitecture; Biomineralization; Ferritin; Ferric Iron Reductase







图版 Plate

1. 扫描电镜下的齿舌, 示齿舌主侧齿(箭头), 标尺= 100 μm ; 2. 体视镜下的齿舌成熟段, 示齿舌成熟主侧齿(箭头), 标尺= 120 μm ; 3. 体视镜下的齿舌未成熟段, 示齿舌未成熟主侧齿(箭头), 标尺= 150 μm ; 4. 偏振光镜下的成熟主侧齿, 示齿尖(cusp)与齿基(base) 连接处(joint region, 箭头), 标尺= 50 μm ; 5. 光镜下成熟主侧齿纵切片, 示齿尖前齿面(anterior edge)、后齿面(posterior edge)、磁铁矿层(mi)、纤铁矿层(黑箭头)、有机层(ol)、齿基(base)及齿尖与齿基连接处(白箭头), 标尺= 20 μm ; 6. 透射电镜下齿尖纵切片, 示有机层内的矿化物(mi)及有机纤维(fi, 黑箭头), 标尺=1.5 μm ; 7. 光镜下成熟齿尖纵切片, 磁铁矿颗粒(mag)及有机纤维层(ol), 标尺= 20 μm ; 8. 高分辨透射电镜下的条状磁铁颗粒(mag), 标尺= 300 nm; 9. 光镜下齿舌初始矿化段纵切片, 示初始矿化齿尖(cusp)、齿舌囊上方上皮细胞

(se)、矿化物颗粒(箭头), 标尺= 45 μm ; 10. 初始矿化齿尖(cusp)纵切面, 示齿舌囊上方上皮细胞(se)及矿化物颗粒(箭头), 标尺= 10 μm ; 11. 初始矿化齿尖(cusp)纵切面铁染色, 示三价铁化物(箭头); 标尺=45 μm ; 12. 初始矿化齿尖(cusp), 示表面的微突(mv)、齿舌囊上方上皮细胞(se), 标尺=5 μm ; 13. 初始矿化齿尖(cusp) 纵切透射电镜图, 示微突(mv, 箭头)、矿化物(mi), 标尺=1.5 μm ; 14. 初始矿化齿尖纵切透射电镜图, 示齿舌囊上方上皮细胞(se), 微突(mv)及铁蛋白聚集体(ss), 标尺=1.5 μm ; 15. 图 14 放大, 示齿舌囊上方上皮细胞内两种不同形态的铁蛋白聚集体(ss), 标尺= 600 nm; 16. 铁蛋白聚集体(ss), 示铁蛋白聚集体膜(白箭头), 标尺=100 nm; 17. 透射电镜下初始矿化齿尖切片, 示星星点点的矿化物(mi) 及有机纤维(fi), 标尺= 1.5 μm ; 18. 透射电镜下未矿化齿尖切片, 示有机网孔状结构(箭头), 标尺= 2.5 μm ; 19. 光镜下齿舌初始矿化段横切片, 三价铁还原酶对照. 示齿尖(cusp)、齿基(base)齿舌基膜(rm)、齿舌囊上方上皮组织(se, 箭头) 及齿舌囊下方上皮组织(ie, 箭头), 标尺= 90 μm ; 20. 光镜下齿舌未成熟段横切片, 示齿尖(cusp)、齿基(base)、齿舌囊上方上皮组织(se)、齿舌囊下方上皮组织(ie)、齿舌基膜(rm)及三价铁还原酶的位置(箭头), 标尺= 90 μm ; 21. 图 20 放大, 示三价铁还原酶的位置(箭头), 标尺= 30 μm ; 22. 透射电镜下齿舌未成熟段纵切片, 三价铁还原酶对照, 标尺=0.6 μm ; 23. 透射电镜下齿舌未成熟段纵切片, 示三价铁还原酶的位置(箭头), 标尺= 0.6 μm ; 24. 透射电镜下齿舌未成熟段横切片, 示三价铁还原酶的位置 (箭头), 标尺= 0.6 μm

1. Scanning electron micrograph (SEM) of a radula of chiton *Acanthochiton rubrolineatus* showing the major lateral tooth (arrow), Bar = 100 μm ; 2. Stereo microscope micrograph of mature part of a radula showing the mature major lateral tooth (arrow), Bar =120 μm ; 3. Stereo microscope micrograph of immature part of a radula showing the immature major lateral tooth (arrow), Bar =150 μm ; 4. Polarized light micrograph of a mature major lateral tooth showing the joint region between the cusp (cusp) and the base (base), Bar = 50 μm ; 5. Light micrograph (LM) of longitudinal section through a major lateral tooth showing the anterior and the posterior edge of the cusp, magnetite layer (ml), lepidocrocite layer (black arrow), organic fibrils layer (ol), the base (base) and the joint region between the cusp and the base (white arrow), Bar = 20 μm ; 6. Transmission electron micrograph (TEM) of longitudinal section as in Fig. 5 showing the minerals (mi) and the organic fibrils (fi, arrow) in the organic matrix, Bar =1.5 μm ; 7. LM of longitudinal section through the cusp of a mature major lateral tooth showing magnetite particles (mag) and organic fibrils layer (ol), Bar = 20 μm ; 8. High resolution TEM of magnetite particles (mag) showing the lath-like structure, Bar =300 nm; 9. LM of longitudinal section through an incipient mineralizing part of a radula showing the incipient mineralizing cusp (cusp), the superior epithelium (se), and the mineral granules (arrow), Bar =45 μm ; 10. High magnification of an incipient mineralizing cusp as in Fig.9 showing superior epithelium (se) of the radula sac and the mineral granules (arrow), Bar =10 μm ; 11. LM of longitudinal section cross an incipient mineralizing cusp showing the ferric iron-containing mineral granules (arrow) with iron staining, Bar=45 μm ; 12. LM of longitudinal section cross an incipient mineralizing cusp showing the microvilli (mv) and the superior epithelium (se) of the radula sac, Bar=5 μm ; 13. TEM of longitudinal section through an incipient mineralizing cusp (cusp) showing the microvilli (mv, arrow) and minerals (mi), Bar =1.5 μm ; 14. TEM of longitudinal section through an incipient mineralizing cusp showing the superior epithelium (se) of the radula sac, the microvilli (mv) and the siderosome (ss), Bar =1.5 μm ; 15. Magnification of an incipient mineralizing cusp as in Fig.14 showing two forms of siderosomes (ss) in a superior epithelium of the radula sac, Bar = 600 nm; 16. A siderosome (ss) showing the membrane of a siderosome (white arrow), Bar =100 nm; 17. TEM of section of an incipient biomineralizing cusp showing scattered minerals (mi) and the organic fibrils (fi), Bar =1.5 μm ; 18. TEM of section of an unmineralized cusp showing the organic fibrils meshwork (arrow), Bar =2.5 μm ; 19. LM of transverse section cross the immature part of the radula showing the control of the ferric reductase, the cusp (cusp), the base (base), the radula membrane (rm), the superior epithelium tissue (se, arrow) and the inferior epithelium tissue(ie, arrow) of the radula sac, Bar =90 μm ; 20. LM of transverse section cross the immature part of the radula showing the cusp, the base, the superior epithelium tissue (se), the inferior epithelium tissue (ie) of the radula sac, the radula membrane (rm) and the ferric reductase (arrow), Bar = 90 μm ; 21. Magnification of Fig.20 showing the ferric reductase (arrow), Bar = 30 μm ; 22. TEM of longitudinal section cross the immature part of the radula showing the control of the ferric reductase, Bar=0.6 μm ; 23. TEM of longitudinal section cross the immature part of the radula showing the ferric reductase (arrow), Bar = 0.6 μm ; 24. TEM of transverse section cross the immature part of radula showing the ferric reductase (arrow), Bar = 0.6 μm