

褶纹冠蚌光珠与骨珠珍珠囊差异的研究

邱安东 石安静

(四川联合大学生物系, 成都 610064)

摘要: 运用多种组织化学方法和电镜技术研究了褶纹冠蚌光珠和骨珠珍珠囊表皮细胞的形态结构、分泌物性质和功能等方面的差异。结果表明:骨珠珍珠囊表皮细胞合成和分泌珍珠前体物质的能力较光珠的强,故骨珠的形成速度比光珠快;光珠和骨珠珍珠囊表皮细胞合成和分泌的蛋白质的差异决定了光珠和骨珠的形成;光珠和骨珠珍珠囊表皮细胞的形态结构特征差异可作为检验和预测人工培育珍珠质量的细胞学标准。

关键词: 褶纹冠蚌; 光珠; 骨珠; 珍珠囊

中图分类号: S966.222 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2000)02-0161-06

珍珠可分为珍珠质珍珠(光珠)、棱柱质珍珠(骨珠)和有机质珍珠^[1]。人工培育的珍珠实践表明:来源于外套膜色线边的“供体小片”植入育珠贝形成的珍珠大且形状普遍较好,但是光泽差;采用去色线边的“供体小片”植入育珠贝形成的珍珠较小,但光泽好。因此,如何改进人工培育珍珠的各种内外环境条件,提高优质珍珠的形成速率和比例已是我国人工培育珍珠进一步发展所亟待解决的问题。但是,要很好地解决这一问题,则必须先弄清各种内外环境因子对珍珠形成的影响机理。为此,本文应用多种组织化学方法、扫描电镜及透射电镜等方法研究了来源于不同部位的供体小片植入育珠蚌后所形成的珍珠囊表皮细胞的形态结构、功能和分泌物性质等的差异,以阐明其制约优、劣质珍珠形成的机制,同时也为判断优质珍珠和劣质珍珠的珍珠囊,确立一种方便、准确的形态学标准。

1 材料与方法

1.1 材料 在一只育珠的褶纹冠蚌(*Cristaria plicata* Leach)中,同时植入另一只褶纹冠蚌外套膜边缘膜色线边制成的“供体小片”和用边缘膜去色线边后制成的“供体小片”,手术后在四川省安岳县珍珠养殖场培育三年,作为实验材料。总共采用了5只按上述方法培育的褶纹冠蚌。

1.2 光镜组织学及组织化学观察 从同一只褶纹冠蚌中分别取出光珠和骨珠珍珠囊,固定于Bouin's固定液和10%的中性甲醛中。重复取材五次,常规石蜡切片,切片厚4 μ m,共

收稿日期: 1997-11-29; 修订日期: 1999-09-28

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(39570561)

作者简介: 邱安东(1970—), 男, 四川省广汉市人, 四川联合大学生物系讲师, 主要从事贝类生物学及珍珠形成机理的研究

制作切片 150 张。H.E 染色作一般组织学。PAS-爱尔蓝法显示酸性粘液嗜爱尔蓝,呈蓝色;中性粘液为 PAS 反应阳性,呈红色;中性和酸性混合粘液呈紫色^[2]。醛品红-爱尔蓝法显示强硫酸化粘液物质呈深紫色,弱硫酸化粘液物质呈紫色,酸性粘液呈蓝绿色^[2]。蛋白质嗜考马斯亮蓝,呈蓝色^[3]。Von kossan 法中,钙分布区呈黑色;茜素红 S 法中,钙分布区为橙红色^[2]。

1.3 扫描电镜 从同一褶纹冠蚌中取出的光珠和骨珠珍珠囊分别固定于 2.5% 的戊二醛 (0.2mol/L 二甲胍酸盐缓冲液配制, pH7.2) 中 24h, 中间换一次。0.2mol/L 二甲胍酸盐缓冲液洗涤过夜, 2% 锇酸 (0.2mol/L 二甲胍酸盐缓冲液配制, pH7.2) 固定 3h, 乙醇逐级脱水, 醋酸异戊酯置换, 液态 CO₂ 临界点干燥, 镀金, 日立 S-450 型扫描电镜进行观察和摄影。

1.4 透射电镜 与扫描电镜样品制备过程相同的前固定和后固定, 丙酮逐级脱水, 环氧树脂 618 包埋, 制作 1 μ m 的半薄切片, 用天青-美蓝染色定位和观察。超薄切片用醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染, 日立 H600-4 型透射电镜观察和摄影。

2 结果

用外套膜边缘膜色线边制作供体小片长成的珍珠囊形成的珍珠较大, 但呈骨色, 无光泽, 无药用和经济价值; 用外套膜边缘膜去色线边制作供体小片长成的珍珠囊形成的珍珠一般均闪耀珠光, 但个体比骨珠小。

2.1 褶纹冠蚌光珠和骨珠珍珠囊细胞的形态结构特征

珍珠囊由占绝大多数的珍珠囊上皮细胞和少量位于上皮细胞之间、来源于外套膜结缔组织的腺细胞组成 [图版 I: 1, 6]。光珠和骨珠珍珠囊在表皮细胞的形态结构、腺细胞的分布及数量方面均存在着非常显著的差异。骨珠珍珠囊表皮细胞明显比光珠的高, 为低柱状, 高度为 11—12 μ m, 而光珠珍珠囊的表皮细胞呈扁平状, 高度为 7—8 μ m; 骨珠珍珠囊表皮细胞的内容物也明显较光珠的丰富, 在 H.E 染色中比光珠的深, 呈深紫红色, 而光珠的仅呈淡紫红色。腺细胞来源于外套膜结缔组织, 其腺泡占据整个细胞的绝大部分, 把细胞核和细胞质挤到细胞的一侧, 且在 H·E 染色中基本不着色 [图版 I: 1]。相比之下, 骨珠珍珠囊表皮细胞间和表皮下的结缔组织中有大量密集分布的、形状和大小不同的腺细胞, 结缔组织中的腺细胞向表皮细胞间游走也很活跃; 而光珠珍珠囊表皮细胞间及表皮下结缔组织中仅分布有少量的腺细胞, 结缔组织中的腺细胞向表皮细胞间游走也不甚活跃。骨珠珍珠囊表皮细胞和腺细胞的分泌活动较光珠更强, 所分泌的物质在细胞表面形成一层较厚的紫红色分泌物线 [图版 I: 1, 2]。

2.2 蛋白质、粘液物质和钙

2.2.1 蛋白质 光珠珍珠囊表皮细胞被考马斯亮蓝染成蓝色, 骨珠珍珠囊表皮细胞被染成深蓝色, 腺细胞的腺泡则呈纤维网状着色, 表明骨珠珍珠囊表皮细胞中含有较光珠丰富得多的蛋白质, 腺细胞内的蛋白质比一般表皮细胞含量少 (表 1) [图版 I: 3, 4]。

2.2.2 粘液物质 光珠和骨珠珍珠囊表皮细胞对爱尔蓝染色 (显示酸性粘液) 呈阴性, 对 PAS 反应 (显示粘多糖) 和醛品红染色 (显示硫酸化粘液) 呈阳性, 表明珍珠囊表皮细胞不含酸性粘液, 而含有中性粘多糖和硫酸化粘液; 腺细胞仅对 PAS 反应呈强阳性, 表明腺细胞含有丰富的中性粘多糖, 但并不含有酸性粘液和硫酸化粘液 [图版 I: 5—8]。骨珠珍珠

囊表皮细胞对 PAS 反应和醛品红染色的阳性较光珠的强, 表明所含的硫酸化粘多糖较光珠的多; 同时, 骨珠珍珠囊表皮中腺细胞的分布数量也较光珠的多, 所以其中性粘多糖也较光珠的丰富。

表1 骨珠和光珠珍珠囊表皮细胞的高度、蛋白质、中性粘多糖、硫酸化粘液、钙含量和分泌能力的差异

Tab.1 Difference in height, protein content, neutral polysaccharide, sulfated mucus, calcium amount and secreting ability of the nacreous and prismatic pearl-sac epithelial cells

	高度 Height (μm)	蛋白质 Protein	中性粘多糖 Neutral polysaccharide	硫酸化粘液 Sulfated mucus	钙 Calcium amount	分泌能力 Secreting ability
光珠珍珠囊表皮细胞 (Nacreous pearl-sac epithelial cells)	7—8	+	+	+	+	++
骨珠珍珠囊表皮细胞 (Prismatic pearl-sac epithelial cells)	11—12	++	++	+++	+++	++++

注: “+”表示组织化学反应呈阳性, 每增加一个“+”, 反应的阳性愈强。(“+” representation of the histochemical reactions positive, and addition of another “+” indicating a much more positive) reaction

2.2.3 钙 Von Kossan 法和茜素红 S 法定位钙的结果均表明, 骨珠和光珠珍珠囊中腺细胞均不含钙, 而珍珠囊表皮细胞均为钙分布的阳性区。其中, 骨珠珍珠囊表皮细胞的阳性较光珠强得多 [图版 I: 9, 10]。

2.3 扫描电镜特征差异

骨珠珍珠囊表皮细胞表面的分泌物明显较光珠的多, 在细胞的表面形成厚厚的一层, 而光珠珍珠囊表皮细胞表面仅有少量分泌物; 同时, 骨珠珍珠囊表皮表面的分泌孔较光珠的多 [图版 II: 11—13]。这一结果与光镜所观察到的结果一致。

2.4 透射电镜特征差异

骨珠与光珠珍珠囊表皮细胞表面均具有发达的微绒毛, 细胞内都存在发达的腔。同时, 两者的亚显微结构又表现出明显的差异, 即: 骨珠珍珠囊表皮细胞较光珠的细胞更高, 粗面内质网更为发达, 分泌活动更为活跃, 在细胞表面布满一层分泌物, 基膜附近结缔组织中的腺细胞也更多 [图版 II: 14—17]。

3 讨论

3.1 光珠和骨珠的生长速度和光泽不同

珍珠主要由 90%—95% 的 CaCO_3 和 5%~8% 的有机基质组成, 所以有机基质前体物质和钙的供应是珍珠形成速度的两个决定性因素, 有机基质前体物质的多少决定了有机基质形成的快慢, 而钙的供应决定了 CaCO_3 晶体的生长速率^[4]。本文的研究表明, 光珠和骨珠珍珠囊表皮细胞内均含有蛋白质、硫酸化粘多糖和钙, 腺细胞含有丰富的中性粘多糖, 这些物质均能被分泌到珍珠囊腔中参与珍珠的形成, 其中, 蛋白质与 CaCO_3 晶体的起始、生长调节和结晶类型的决定有关^[5-7], 中性粘多糖为有机基质中不溶性骨架成分, 并与

蛋白质相互作用,形成适合的分子识别位点,起始 CaCO_3 晶体的形成,硫酸化粘多糖则可能通过结合钙离子而作为结晶生长的离子交换中介,调节 CaCO_3 晶体的生长。骨珠珍珠囊表皮中这些物质的含量较光珠的丰富得多,分泌活动也较光珠的旺盛,这表明骨珠的形成速度要较光珠快得多。但是,在骨珠珍珠囊表皮中腺细胞的分布并不均匀,有的区域分布较少,而在有些区域却呈密集分布,这就造成了珍珠囊腔中骨珠形成的前体物质的不均匀分布,致使骨珠各部分形成快慢不一致,所形成的骨珠表面粗糙,无光泽;光珠珍珠囊表皮中腺细胞较少,但分布均匀,所以形成的珍珠光滑细腻,光泽好。这与生产实践的经验完全一致。这充分表明理论研究结果由实践中得到了良好印证。

3.2 分泌蛋白质的结构性质决定了珍珠的结晶型

光珠为霰石结晶,骨珠为方解石结晶。Wilbur等^[18]认为贝类贝壳结晶型的决定,与环境中无机离子、环境温度和有机基质有关。锶和镁能促进贝壳珍珠层霰石结晶的形成。在生物学温度范围内,温度的升高利于贝壳霰石结晶的形成。这种影响是通过引起外套膜外表皮细胞分泌活动的改变而使外套膜外腔中的无机和有机成分发生变化,进而使形成的有机基质发生改变^[4]。Hare^[5]和Meenakshi等^[6]研究发现,贝壳的结晶型是由有机基质中蛋白质的结构性质决定的。方解石结晶层的有机基质中蛋白质的酸性氨基酸残基与碱性氨基酸残基的比值大于1,而霰石结晶层小于或等于1。Weiner^[9]进一步研究发现,贝壳方解石和霰石结晶层可溶性基质的蛋白质大约一半的组分是一样的,并可能执行同样的功能,而另一半却是各自特有的。本文所采用的光珠和骨珠珍珠囊,均来自同一褶纹冠蚌,因此排除了环境中无机离子和温度对于珍珠结晶类型差异的影响。事实上,这两种珍珠囊是采用不同部位细胞结构上有差异的供体小片植入育珠蚌后形成的。两种珍珠囊表皮细胞在形态结构上和分泌物质方面表现出的显著差异,由于其细胞功能不同,各自合成了决定其结晶类型的分泌性蛋白质,分泌到珍珠囊腔,导致了骨珠和光珠的形成。充分证明光珠与骨珠的结晶型不是由于环境中的无机离子和温度等决定的。

3.3 光珠与骨珠珍珠囊细胞的形态结构特征作为判断优质珠与劣质珠的细胞学标准

町井昭^[14]在光镜下研究的结果表明,形成光珠和骨珠的珍珠囊细胞形态结构存在着非常显著的差异:光珠珍珠囊细胞扁平,嗜酸性,游离端胞质相对致密,细胞间夹杂着分泌细胞;而骨珠珍珠囊表皮细胞形状和大小变化较大,高度较光珠高,柱状表皮细胞之间夹杂腺细胞,嗜碱性。本文的研究发现,骨珠和光珠珍珠囊表皮细胞的差异,除以上研究者描述的以外,还存在另外一些超微结构上的差异。骨珠珍珠囊表皮细胞内容物很丰富;扫描电镜及透射电镜下均观察到分泌活动旺盛,在细胞表面形成厚厚一层分泌物;表皮细胞间及表皮下结缔组织中的腺细胞数量多,而且分布不均匀,在有些区域很密集;结缔组织中的腺细胞向表皮游走非常活跃。而光珠珍珠囊表皮细胞内容物较少,分泌活动较骨珠弱,表皮细胞间和表皮下结缔组织中的腺细胞也分布较少,结缔组织中腺细胞向表皮游走不活跃。因此,骨珠和光珠珍珠囊表皮细胞形态学特征的差异主要表现在细胞高度、排列、内含物的多少、细胞间隙细胞的数量和分布、分泌活动的强弱等方面。事实上,有机质珍珠的珍珠囊表皮细胞与光珠和骨珠相比也主要表现在高度、腺细胞的数量等的形态学差异,其表皮细胞较骨珠的更高,细胞间腺细胞更多^[10]。因此,这些结构特征上的差异可以作为判断优质珍珠和劣质珍珠珍珠囊的细胞学标准。

参 考 文 献

- [1] 小林新二郎、渡部哲光(熊大仁译). 珍珠的研究 [M]. 北京: 农业出版社. 1965
- [2] 皮尔斯(马仲魁译). 组织化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社. 1992
- [3] Kiernan J A. Histological & Histochemical Methods [A]. In: Theory and Practice (2rd) [C]. Oxford: Pergamon Press. 1990, 157—158
- [4] Wilbur K M. Shell formation and regeneration. In: [Edited by Wilbur K M, et] Physiology of Mollusca New York; Academic Press 1964, (1): 243—282
- [5] Hare P E. Amino acids precipitation and its consequences for aquatic ecosystem: a review [J], *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1963, **110**: 669—707
- [6] Meenakshi V R, et al. Studies on shell regeneration. I. Matrix and mineral composition of the normal and regenerated shell of *Pomacea paludosa*, 1975, **50a**: 347—351
- [7] Weiner S, et al. Macromolecules in Mollusc shells and their function in biomineralization, Phil [J]. *Trans. R. Lond. Ser. B.*, 1984, **304**: 421—438
- [8] Wilbur K M. and Bernhardt A M. Effects of amino acids, magnesium and molluscan extrapallial fluid on crystallization of calcium carbonate: In vitro experiments [J]. *Biol. Bull.* 1984, **166**: 251—259
- [9] Weiner S. Mollusk shell formation: Isolation of two organic proteins associated with calcite deposition in the bivalve *Mytilus californianus* [J] *Biochemistry*, 1983, **22**: 4139—4145
- [10] 町井昭. 真珠袋形成に関する組織学的研究. 国立真珠研究所報告 [J]. 1968, **13**: 1489—1539

**DIFFERENCE OF NACREOUS AND PRISMATIC PEARL-
SACS IN THE FRESHWATER PEARL MUSSEL
*CRISTARIA PLICATA***

QIU An-dong and SHI An-jing

(Department of Biology, Sichuan united University, Cheng Du 610064)

Abstract: The mechanism of the formation of different CaCO₃ crystal types by nacreous and prismatic pearl-sacs of freshwater pearl mussel *Cristaria plicata* was studied with various histochemical methods and electron microscope techniques. The prismatic pearls formed much faster than nacreous ones, because prismatic pearl-sac epithelial cells can synthesize and secrete more precursors of pearl than those of nacreous pearl-sac. The proteins secreted by pearl-sac epithelial cells are tightly relevant to the crystal type of pearl, which may result in the formation of nacreous and prismatic pearls. The pearl-sac epithelial cells of nacreous and prismatic pearls have different morphological features which can be used as the cytological standard to foretell and check the quality of the formed pearl.

Key words: *Cristaria plicata*; Prismatic pearl; Nacreous pearl; Pearl-sac

图版说明

图版 I

1—2. H. E 染色示骨珠 (1) 和光珠 (2) 珍珠囊表皮细胞的形态结构差异, \uparrow : 珍珠囊表皮细胞; \uparrow : 腺细胞; \uparrow : 细胞表面的分泌物线, $\times 1056$; 3—4. 考马斯亮蓝法示骨珠 (3) 和光珠 (4) 珍珠囊表皮细胞及腺细胞内的蛋白质含量差异, \uparrow : 腺细胞; \uparrow : 含蛋白质的分泌物线, $\times 1056$; 5—6. PAS—爱尔蓝法示骨珠 (5) 和光珠 (6) 珍珠囊表皮细胞及腺细胞内的中性粘多糖含量差异, \uparrow : 腺细胞内的中性粘多糖; \uparrow : 细胞表面的分泌物, \uparrow : 珍珠囊表皮细胞内的中性粘多糖, $\times 1056$; 7—8. 醛品红—爱尔蓝法示骨珠 (7) 和光珠 (8) 珍珠囊表皮细胞及腺细胞内的硫酸化粘液含量差异, \uparrow : 腺细胞; \uparrow : 含硫酸化粘液的分泌物线, \uparrow : 珍珠囊表皮细胞内的硫酸化粘液, $\times 1056$; 9—10. 骨珠 (9) 和光珠 (10) 珍珠囊表皮细胞及腺细胞内的钙含量差异, \uparrow : 腺细胞, \uparrow : 珍珠囊表皮细胞内的钙, $\times 1056$

1—2. The morphological difference of the prismatic (1) and nacreous (2) pearl-sac epithelial cells by H. E staining. \uparrow : pearl-sac epithelial cells, \uparrow : gland cells, \uparrow : secretion substance; $\times 1056$; 3—4. The different content of proteins in the prismatic (3) and nacreous (4) pearl-sac epithelial cells by using Coomassie brilliant blue methods. \uparrow : gland cells, \uparrow : secretion substance containing proteins; $\times 1056$; 5—6. The different content of neutral mucopolysaccharide in the prismatic (5) and nacreous (6) pearl-sac epithelial cells by using Alcian blue—PAS reaction. \uparrow : neutral mucopolysaccharide in the gland cells, \uparrow : secretion substance, \uparrow : neutral mucopolysaccharide in the pearl-sac epithelial cells; $\times 1056$; 7—8. The different content of sulfated mucus in the prismatic (7) and nacreous (8) pearl-sac epithelial cells and gland cells by using Aldehyde fuchsin—Alcian methods. \uparrow : gland cells, \uparrow : secretions substance containing sulfated mucus, \uparrow : sulfated mucus in the pearl-sac epithelial cells; $\times 1056$; 9—10. The different content of calcium in the prismatic (9) and nacreous (10) pearl-sac epithelial cells and gland cells in Alizarin red reaction. \uparrow : gland cells, \uparrow : calcium in the pearl-sac epithelial cells, $\times 1056$

图版 II

11—13. 扫描电镜示骨珠 (12, 13) 珍珠囊表皮表面的分泌物较光珠的 (11) 多, \uparrow : 分泌孔, \uparrow : 分泌物, 11: $\times 1500$; 12: $\times 1500$; 13: $\times 10000$; 14—17. 透射电镜示光珠 (14) 和骨珠 (15—17) 珍珠囊表皮细胞的亚显微结构特征差异, \uparrow : 基膜, \uparrow : 表皮细胞内发达的腔, Mv: 微绒毛, FPN: 游离多聚核糖体, GC: 腺细胞, RER: 粗面内质网, Se: 分泌物线, 14: $\times 7200$, 15: $\times 1900$, 16: $\times 36000$, 17: $\times 36000$

11—13. The secretion substances on the surface of the prismatic pearl-sac epithelial cells (12, 13) is richer than those on the nacreous pearl-sac epithelial cells (11) shown by scanning electron microscopy. \uparrow : secreting cavity, \uparrow : secretion substance; 11: $\times 1500$, 12: $\times 1500$, 13: $\times 10000$; 14—17. The ultrastructural difference of the prismatic (15—17) and nacreous (14) pearl-sac epithelial cells shown by transmission electron microscopy. \uparrow : basal membrane, \uparrow : well-developed cavity in the pearl-sac epithelial cells, Mv: microvilli, FPN: free polyribosome, GC: gland cell, RER: rough endoplasmic reticulum, Se: secretion substance, 14: $\times 7200$, 15: $\times 1900$, 16: $\times 36000$, 17: $\times 36000$