

河蚌外套膜组织培养细胞 分泌的珍珠质的药理作用*

龚由彬 石安静 张洪渊

(四川大学生物学系, 成都 610064)

提 要

本文研究河蚌外套膜组织培养细胞分泌珍珠质的药理作用。组织培养后的培养液,能缩短小白鼠出血时间。用组织培养后的培养液及组织块水解液,对大鼠离体子宫及蟾蜍离体心脏收缩有增强作用,对兔离体小肠有抑制作用。这些药理作用与培养液中牛磺酸含量变化一致。实验结果表明,河蚌分泌珍珠质的细胞,在离体人工培养条件下,能旺盛地分泌珍珠质,分泌的珍珠质具有天然珍珠相同的一些药理作用。

关键词 珍珠质,组织培养,药理作用,河蚌

贝类的外套膜能分泌珍珠质,并形成珍珠。珍珠不仅是高级装饰品和化妆品的原料,也是名贵中药材,具有多种药效作用^[1,2]。近年来的研究表明,珍珠中具有药效和药理作用的重要成分之一是牛磺酸(2-氨基乙磺酸)^[3]。关于河蚌外套膜的离体组织培养,本文作者已作报道^[4]。在离体培养下,外套膜组织细胞不仅能生长与繁殖,并具有旺盛的分泌活动。但是,培养细胞的分泌物是否具有珍珠质的药效和药理作用,至今国内外尚未见报道。为此,本文利用离体组织培养细胞分泌物对小鼠出血时间、大鼠离体子宫、家兔离体小肠、蟾蜍离体心脏的影响,以及这些影响与分泌物中牛磺酸含量的关系等几方面,探讨了培养组织分泌物的药理作用,从而证明离体培养组织能够产生并分泌珍珠质。

1 材料与方法

三角帆蚌[*Hyriopsis cumingii* (Lea)]产于南京浦口;褶纹冠蚌[*Cristaria plicata* (Leach)]由湖南引种成都金堂自繁;背角无齿蚌[*Anodonta woodiana* (Pacifica Heude)]产自成都郊区。取上述三种河蚌(1—2龄)的外套膜,按报道的方法进行组织培养。

1.1 分别取组织培养5、10、15d后的培养液,以1500r/min离心10min,取上清液调pH7.0,备用。实验时以未培养组织的空白培养基作对照。

* 国家自然科学基金资助项目。

1994年4月7日修回。

1.2 将培养 7、10、15d 后的组织块用河蚌的平衡盐溶液^[4]洗涤数次, 1500r/min 离心 10min, 去掉上清液。将组织块剪碎放进试管, 加入 6 mol/L HCl 110℃封管水解 24h, 将水解液过滤, 滤液于 70℃水浴上蒸干。以 1g 组织分别加入洛氏(Locke)液(用于子宫试验)、台氏(Tyrodé)液(用于小肠试验)、任氏(Ringer)液(用于心脏试验), 并调 pH 至中性, 备用。另取鲜河蚌外套膜组织, 用同样方法制备未培养组织水解液, 作为对照。

1.3 用小鼠 112 只进行出血时间试验, 鼠体重 18—27g, 随机分成 5 组, 分别以 1ml/只剂量腹腔注射 5、10、15d 的培养液或空白培养基或生理盐水, 30min 后按剪尾法^[5]进行试验: 将小鼠躯体装进用塑料筒特制的固定器中, 只露出尾巴, 剪去尾尖的细毛, 然后剪去尾尖, 长度统一为 2mm, 用秒表记时间。出血后每隔 10—20s 用滤纸吸去血滴, 避免挤压伤口, 直到滤纸上无血为止, 所需时间即为出血时间。

1.4 大鼠离体子宫试验共用体重 140—250g 的雌性无孕大鼠 29 只, 仿 Magnus 法^[6], 并略加改进: 用锤子猛击大鼠头部致昏, 剖开下腹取子宫角, 长度为 1.5cm 左右, 固定于盛有 30ml 洛氏液的麦氏浴槽内, 并不断向麦氏浴槽内充入空气。洛氏液保持在 36℃左右, 然后将子宫角一端连于描记笔上, 待记纹鼓上收缩曲线稳定后, 再分别加入不同时间培养后的培养液、空白培养基、培养组织与未培养组织水解液, 观察对子宫收缩的影响。

1.5 家兔离体小肠试验共用家兔 20 只, 体重 1.7—2.5kg, 雌雄不限, 按文献^[7]的方法, 略加改进: 用锤子猛击兔头致死, 沿腹白线剖开腹腔, 取回肠管, 长 1.5cm 左右, 立即放入盛有 38℃台氏液的培养皿中, 除去肠中内容物, 洗涤肠管数次, 然后固定于盛有 30ml 台氏液的麦氏浴槽内, 不断向浴槽充入空气, 台氏液温度保持 38℃左右。在记纹鼓上描记其活动曲线, 待曲线稳定之后, 再分别加入培养后的培养液、空白培养基、培养组织与未培养组织水解液, 观察对小肠活动的影响。

1.6 蟾蜍离体心脏试验共用蟾蜍 15 只, 体重 145—200g, 雌雄均有。按 Straub 氏蛙心灌注法制备离体心脏^[7], 描记活动曲线于记纹鼓上。套管内盛有任氏液 2ml, 记录正常收缩曲线。待收缩活动完全稳定后, 吸出全部任氏液, 迅速加入等量未培养组织水解液, 观察心脏活动 5—10min, 又吸出未培养组织水解液, 用任氏液洗涤心脏数次。直到心跳恢复正常为止, 再加入培养 10d 后的组织水解液 2ml, 观察对心脏收缩的影响。

1.7 牛磺酸含量测定, 取组织培养 5、10、15d 后的培养液及空白培养基, 以 1500r/min 离心 10min, 取上清液 2ml 于试管中, 加 6mol/L HCl 2ml, 混合后真空下封管, 于 110℃水解 24h, 取出开管, 在 100℃水浴上蒸干, 加重蒸水两次蒸干, 再加入 0.5ml 0.01mol/L NaOH 溶液, 室温下放置 4h, 用 0.01mol/L HCl 定容至 5ml。使用美国 Beckman 121MB 氨基酸分析仪, 按单锂柱生理体液法测定牛磺酸含量。

2 结果

2.1 组织培养后的培养液对小鼠出血时间的影响

以培养不同时间的培养液分组注射小鼠, 对小鼠出血时间的影响见表 1。

由表 1 可见, 注射培养基和培养 5d 的培养液组, 与注射生理盐水组(对照组)相比, 其出血时间没有显著性差异($p > 0.05$); 注射培养 10d 的培养液组, 与对照组比较, 其差异

显著 ($p<0.05$); 而注射培养 15d 的培养液组, 与对照组相比, 具有极显著性差异 ($p<0.01$)。这表明河蚌外套膜经组织培养后的培养液, 具有缩短小鼠出血时间的作用, 并随培养时间的延长, 这种作用愈强。

表 1 外套膜组织培养后的培养液对小鼠出血时间的影响

Tab.1 Effects of the mantle tissue cultured solution on the bleeding duration of mice

组 别 Groups	样 品 数 量 Sample size	$\bar{X} \pm SD$ Minutes	t Value	p
1. 生理盐水 Saline	20	7.26 ± 1.62	—	—
2. 未培养细胞的培养液 Culture solution	22	5.90 ± 0.96	1.372	> 0.05
3. 培养 5d 的培养液 Solution with 5 day tissue culturing	22	5.14 ± 0.88	1.914	> 0.05
4. 培养 10d 的培养液 Solution with 10 day tissue culturing	26	3.68 ± 0.72	2.566	< 0.05
5. 培养 15d 的培养液 Solution with 15 day tissue culturing	22	3.31 ± 0.66	3.563	< 0.01

2.2 组织培养后的培养液和组织水解液对大鼠离体子宫的影响

2.2.1 组织培养液的影响 实验用 25 只大鼠离体子宫, 依次加空白培养基、组织培养 5d、10d、15d 后的培养液 2ml。结果组织培养液与空白培养基比较, 使子宫收缩幅度有明显增加, 并且随着培养时间的延长, 对子宫收缩的影响愈大 (图 1)。

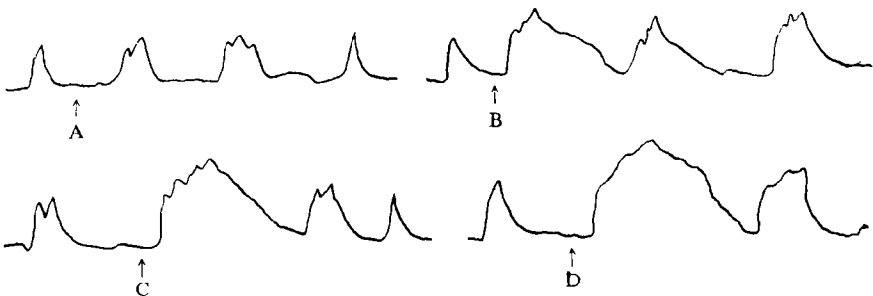


图 1 外套膜组织培养液对大鼠离体子宫的影响

Fig.1 Effects of the mantle tissue cultured solution on rat uterus *in vitro*

A 加未培养液 Culture solution added; B 加 5d 培养液 5-day tissue cultured solution added; C 加 10d 培养液 10-day tissue cultured solution added; D 加 15d 培养液 15-day tissue cultured solution added

2.2.2 组织水解液的影响 用 4 只大鼠离体子宫, 依次加未培养和培养 7d、15d 后的组

织水解液 1ml。结果培养组织水解液使大鼠离体子宫收缩均有明显增加,而且随组织培养时间延长,子宫收缩幅度更加显著地增人(图 2)。

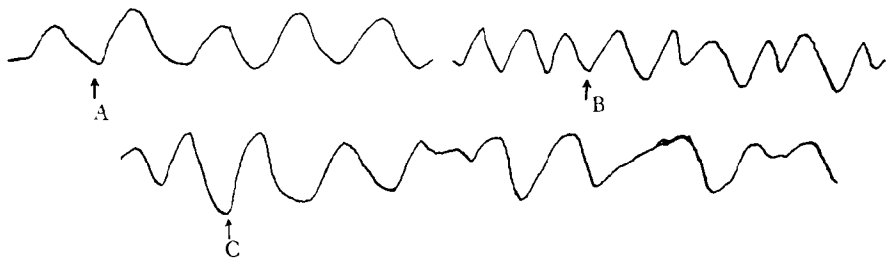


图 2 外套膜培养组织水解液对大鼠离体子宫的影响

Fig.2 Effects of the hydrolysed mantle tissue cultured solution on rat uterus *in vitro*

A 加未培养组织水解液 Hydrolysed culture solution added; B 加培养 7d 水解液 Hydrolysed 7-day tissue cultured solution added; C 加培养 15d 水解液 Hydrolysed 15-day tissue cultured solution added

2.3 组织培养后的培养液和培养组织水解液对家兔离体小肠活动的影响

2.3.1 组织培养液的影响 用 15 只兔离体小肠,依次加空白培养基和组织培养 5d、10d、15d 后的培养液各 2ml。实验结果表明,空白培养基作用不明显,而组织培养液均使小肠收缩受到抑制,10d 与 15d 的抑制作用比培养 5d 的显著,而培养 15d 又比 10d 的抑制作用更强(图 3)。

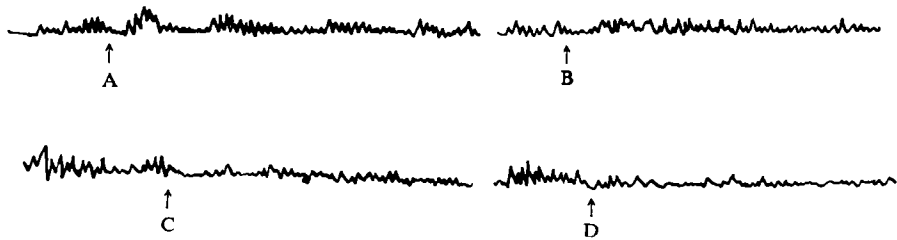


图 3 外套膜组织培养液对家兔离体小肠的影响

Fig.3 Effects of the mantle tissue cultured solution on activity of rabbit small intestine *in vitro*

A—D 图注同图 1 See the legends. for Fig.1

2.3.2 组织水解液的影响 实验用 5 只兔离体小肠,依次加未培养组织水解液和培养 7d、15d 的组织水解液各 1ml,结果表明,培养组织水解液也具有抑制小肠收缩的作用,主要表现为小肠收缩的频率减少,舒张期延长。培养组织比未培养组织作用强,培养 15d 的又比 7d 的更显著(图 4)。

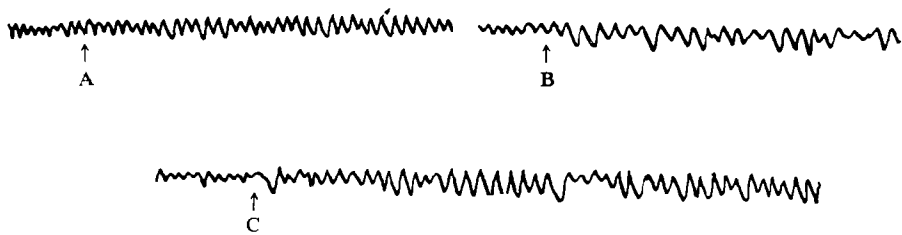


图 4 外套膜培养组织水解液对家兔离体小肠的影响

Fig.4 Effects of the hydrolysed mantle tissue cultured solution on activity of rabbit small intestine *in vitro*

A—C 图注同图 2 See the legends. for Fig.2

2.4 未培养和培养 10d 后的组织水解液对蟾蜍离体心脏活动的影响

未培养组织水解液和培养 10d 的组织水解液对心跳频率均无影响 ($p>0.05$) (表 2)。加未培养组织水解液后的心搏工作量,与加药前正常工作量相比,无显著性差异 ($p>0.05$);加培养 10d 培养液的心搏工作量,两者有极显著性差异 ($p<0.01$)。表明 10d 的组织水解液对心搏强度有明显增强作用,而未培养组织水解液作用极不明显。

表 2 未培养和培养 10d 的组织水解液对蟾蜍离体心脏活动的影响

Tab.2 Effects of hydrolysed un-cultured and 10-day cultured solution on activity of toad heart *in vitro*

	未培养组织水解液 Un-cultured solution			培养 10d 的组织水解液 10-day cultured solution		
	未加水解液 Hydrolysed so- lution un-added	加水解液 Hydrolysed so- lution added	p	未加水解液 Hydrolysed so- lution un-added	加水解液 Hydrolysed so- lution added	p
心 率 HR(Beats/min)	35 ± 2.064	35 ± 2.024	>0.05	32 ± 1.677	32 ± 1.657	>0.05
工作量 Work amount (mm / min)	158.7 ± 2.031	158.9 ± 2.024	>0.05	159.8 ± 1.384	186.0 ± 1.566	<0.01

2.5 牛磺酸含量测定

背角无齿蚌外套膜经组织培养 5d、10d、15d 后的培养液,与空白培养基(加有牛血清等成分,本身含有一定量牛磺酸)比较,牛磺酸的含量明显增加,并随着培养时间的延长,牛磺酸含量增加更显著(表 3)。

表 3 组织培养后的培养液与空白培养基中牛磺酸含量的比较 (μg / L)

Tab.3 Comparison of taurine content in the culture solution between cultured and un-cultured tissue

	空白培养基 Control media	培养时间(d) Cultured time		
		5	10	15
含 量 Content	14.53	45.27	52.43	69.22
增加量 Increased value	—	30.74	37.90	54.69
相对增加量(%) Relative increased val- ue	—	211.60	260.84	376.39

3 讨论

组织培养技术,在人和脊椎动物方面已有不少成功的报道,已获得多种用途的研究成

果。但在无脊椎动物,尤其是水生低等变温动物方面,成功地应用这种技术的报道极少。作者在应用三种淡水育珠蚌外套膜组织培养成功的基础上,进一步探索培养组织细胞在培养过程中是否能产生珍珠质,其分泌物是否具有珍珠的药理作用,得到了初步结果。

3.1 育珠河蚌外套膜组织培养液和组织水解液均能明显缩短小鼠出血时间,表明有止血作用;对大鼠离体子宫和蟾蜍离体心脏收缩可增大振幅,表明具有增强子宫平滑肌和心肌收缩强度的作用;能抑制兔离体小肠的收缩,表明有降低小肠平滑肌张力的作用。这些结果与珍珠的药理作用相同^[1],也与已用于临床的珍珠贝精母注射液的药理作用一致^[3]。

3.2 实验中观察到,随外套膜组织培养时间的延长,组织培养液及培养组织水解液的药理作用越强。至于超过 15d 继续培养,分泌活动及其药理作用是否继续加强,培养多少时间为最佳,有待进一步研究。

3.3 未培养组织培养基中的牛磺酸,来自培养基成分中的小牛血清,因而未培养组织的培养液也对小鼠出血时间等药理作用略有影响(但不具统计学意义)。培养细胞分泌物中牛磺酸的含量,随培养时间的延长而显著增加,表明培养细胞有合成牛磺酸的能力。其变化趋势与药理作用的变化一致,与王顺年等^[8]及陈再智等^[3]的研究结果相吻合。同时还表明,组织培养后的培养液和培养组织水解液对出血时间、大鼠子宫、家兔小肠及蟾蜍心脏活动也有影响。

3.4 本文药理作用试验,既用了组织培养后的培养液,又用了培养组织的水解液,两者的药理作用及其作用趋势均相同,表明培养组织的培养细胞既能形成珍珠质成分,也能分泌珍珠质成分,以液态和可溶性形式存在于培养液中。

本文从药理作用的角度表明,淡水育珠蚌外套膜能进行离体组织培养,培养组织的细胞能够分泌与珍珠相同药效的有效成分,这为证明利用组织培养技术来生产用于医药、化妆品、保健食品等方面的珍珠液的意义和价值,提供了证据。并为利用其它软体动物的组织培养技术来获得有广泛应用价值的细胞产物,提供有益的参考。

参 考 文 献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 上海: 上海人民出版社. 1977: 1493—1495.
- [2] 潘炳炎. 珍珠的药用. 海洋药物. 1984, (3): 45—46.
- [3] 陈再智等. 珍珠精母注射液提取物牛磺酸的药理作用研究. 海洋药物. 1984, (2): 1—3.
- [4] 石安静. 河蚌外套膜的组织培养. 水产学报. 1983, 7(2): 153—157.
- [5] 张家铨等. 血伤宁的药理研究. 中成药研究. 1980, (2): 43—46.
- [6] 黄厚聘等. 漆姑草的药理研究2. 贵阳医学院学报. 1981, 6(3): 1—4.
- [7] 徐叔云等. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社. 1982: 857—861.
- [8] 王顺年等. 合浦珠母贝有效成分研究. 海洋药物. 1985, (1): 23—26.

THE PHARMACOLOGICAL FUNCTIONS OF NACRUM SECRETED BY THE CULTURED PALLIUM CELLS OF FRESH WATER OYSTER

Gong Youbin, Shi Anjing and Zhang Hongyuan

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract

The pharmacological function of nacrum secreted by cultured pallium cells of a fresh water oyster was examined. Injections of the cultured mantle tissue solution into mice can reduce the bleeding duration after their tails being cut. The cultured solution and the hydrolysed cultured solution can strengthen the systole of the rat uterus (*in vitro*) and the toad heart (*in vitro*), but suppress the systole of rabbit small intestine. This pharmacological function changes with taurine content in the cultured solution.

The results indicate that the oyster cells secrete nacrum vigorously under cultured conditions *in vitro*, and the secreted nacrum has the same pharmacological function as the natural pearls.

Key words Nacrum, Tissue culture, Pharmacological function, Fresh water oyster.