

椭圆背角无齿蚌外套膜组织培养与未培养细胞分泌活动的扫描电镜观察*

石安静 龚由彬

(四川大学生物系, 成都 610064)

提 要

作者用扫描电镜及相差显微镜, 对椭圆背角无齿蚌外套膜组织培养与未培养细胞的分泌活动进行了研究, 观察到两者的分泌活动都是十分旺盛的。培养细胞有局部分泌和顶浆分泌。细胞分泌形态观察到三种: (1)分泌端形成由膜包裹的突起, 突起逐渐伸长, 基部变成细颈, 最后脱离细胞成为分泌泡(局部分泌); (2)细胞端部伸出长足, 将分泌物排到较远处分泌后, 长足缩回恢复原状; (3)分泌端伸出很多细枝, 分泌物随后如液流式涌出细胞(顶浆分泌)。取外套膜色线边组织为材料, 培养后在组织块和细胞上有角质素(与贝壳最外层相似)类的茶褐色结晶和无定形分泌物形成; 用去掉色线边的外表皮组织块培养, 则有珍珠(与贝壳最内层相似)状的白色和淡黄色结晶生成。表明了细胞在适宜的条件下培养, 所形成的分泌物的性质可能与活体相同。因此大批量培养细胞可能得到人们希望获得的细胞产物。

关键词 椭圆背角无齿蚌, 外套膜, 分泌活动, 扫描电镜

贝类外套膜的分泌物能形成贝壳, 保护内脏。随着贝的生长, 贝壳也逐渐长大和加厚, 外套膜也不断分泌具有润滑作用的粘液来保护表皮。贝的外套膜还能分泌珍珠质, 在贝壳内面形成绚丽的珍珠层^[1,2]。人们利用此种特性进行人工育珠, 获得球形或象形珍珠作为装饰品。珍珠又是贵重的中药材, 有解毒、明目、消炎等多种功效。因而研究贝类外套膜细胞的分泌作用, 对探讨分泌细胞的生理功能、珍珠形成机理和珍珠的药理作用等方面都是十分有意义的。尤其是研究外套膜组织培养细胞的分泌作用, 对了解体外培养细胞生长、繁殖和分泌的最适条件, 并为利用细胞大规模培养获得贵重的细胞产物的生物技术等方面, 从而提供了有价值的资料。

材 料 和 方 法

材料 使用分布十分广泛的椭圆背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana elliptica*) 为材料, 蚌采自成都郊区龙泉驿。

* 国家自然科学基金和四川省重点科学技术经费资助项目。
1990年11月9日收到。

未培养的组织块 把外套膜用削膜法将内、外表皮组织分开,在蚌的平衡盐溶液中反复洗涤。内、外表皮组织条分别切成约为 $3 \times 3 \text{ mm}$ 的小块,放在盖玻片上,用 1% 戊二醛 (4°C) 进行预固定 2h。

组织培养 外套膜在培养前为了防止细菌、霉菌、原生动物、藻类等的污染,除用自来水充分冲洗外,取材后入无菌室则用无菌的滤纸或纱布把分泌物和粘液仔细擦洗数次,又用含高浓度的青霉素、链霉素和卡那霉素的平衡盐溶液洗 20—30 次后,再用不含抗菌素的平衡盐溶液洗数次,以除去高浓度抗菌素对细胞的伤害。培养 5、10、15d 的外套膜内、外表皮组织块,用弯头镊子从培养瓶中取出,放在小盖玻片上,进行与未培养组织相同的预固定。

培养细胞 来自椭圆背角无齿蚌外套膜组织培养的原代细胞^[3,4]。取细胞时摇动培养瓶(细胞贴壁不太紧密),将培养液和细胞倒入离心管,再用 1000 r/min 的转速离心 5—6min,去掉培养液,用磷酸缓冲液($\text{pH}7.2$)洗两次,把细胞滴在铺有 Forma 膜的小盖片上,自然沉降 10min,用滤纸吸去多余的液体,再用 1% 戊二醛预固定 2h。

组织块和细胞处理方法均相同,即用磷酸缓冲液洗 3 次后,用 1% 锇酸固定 2h,再洗涤,逐级丙酮脱水,醋酸异戊酯置换丙酮,作临界点干燥,喷镀碳金后,进行扫描电镜观察。

结 果

(一) 未培养的组织 and 细胞表面的分泌物

1. 内表皮 低倍镜下观察到内表皮组织表面有许多无定形的块状和丝状分泌物。在高倍镜下观察,组织的表面密布纤毛丛,有许多基部光滑游离端具有微绒毛的细胞夹在纤毛细胞之间,亦有直径为 $1 \mu\text{m}$ 左右的球形分泌小泡(图版 1:1)附着于表皮细胞外面。

2. 外表皮 外表皮组织的上皮细胞中无纤毛细胞,在低倍镜下观察到外表皮表面的无定形分泌物和丝网状分泌物较内表皮为多。在高倍镜下看到大小不等的分泌小泡在外表皮细胞表面分散出现,大小悬殊(图版 1:2),数量也较内表皮稍多。这可能是由于内表皮组织中纤毛细胞多,表皮细胞排列不整齐,表面又有许多微绒毛而较小的分泌泡不易显露出来的缘故。

3. 板块与间隙 在低倍镜下观察未培养的组织,无论是内表皮还是外表皮都发现存在板块结构,每一板块由几十至几百个表皮细胞组成,板块之间有间隙,隙的长度不一,宽度约 $10-50 \mu\text{m}$,隙的排列不甚整齐,但基本走向与贝壳的生长线一致。间隙附近的无定形状块状和丝网状分泌物一般较多(图版 1:3)。

4. 结缔组织 单层的内、外表皮细胞易脱落,脱下表皮细胞的结缔组织表面,也呈板块和间隙状结构。结缔组织中的成纤维细胞埋于细胞间质中,结缔组织表面有许多血球、无定形分泌物和分泌小泡(图版 1:4)。

在高倍镜下观察到间隙中有许多球形细胞,根据其黑白反差不同,可知一些细胞色深,是在间隙深层,一些细胞色浅,是在间隙的表层暗示出结缔组织中的球形细胞,可以通过间隙,从内面移动到组织表面。内、外表皮组织的间隙两侧无定形分泌物较多,表明结缔

组织的细胞中形成的分泌物,可以通过间隙,从结缔组织深层输送到结缔组织表层进行分泌或再经过内、外表皮组织的间隙分泌到体表。

(二) 培养的组织块和细胞的分泌作用

经培养 1—2d 的内、外表皮的组织块,在倒置相差显微镜低倍镜下观察,许多表皮细胞逐渐从组织块上游离出来,有的开始贴壁生长,变成三角形、圆锥形(图版 I:5),有的一直在培养液中游动(细胞为圆形)。随着培养时间延长,游离出来的细胞数量也更多。

培养 5d 的内表皮组织块,表皮细胞已部分脱落游离,纤毛细胞减少,表皮细胞有变扁平的趋势(图版 I:6)。培养 15d 的内表皮组织块,上皮细胞几乎全部脱落,只有少数血球附于其上,已能隐约看见埋在结缔组织较深层的成纤维细胞。培养 5d 的外表皮组织块与培养 5d 的内表皮类似,只有少数细胞还附着于结缔组织上。培养 15d 的外表皮组织块上的表皮细胞几乎全部游离出来。

用相差显微镜对培养细胞作活体观察,在贴壁的多角形细胞(上皮细胞)和成纤维状细胞中都含有许多分布较均匀的颗粒(包括线粒体、分泌小泡等)。在未贴壁的圆形游动细胞中所含的颗粒,大多集中在细胞的一端和表面,使细胞形成圆锥状(图版 II:1),有的细胞分泌物形成分枝的细丝,形状如带叶的圆根萝卜(图版 II:2),前者可能是正在进行顶浆分泌的细胞,后者是分泌快结束的形态。还观察到培养 10—15d 的外表皮组织块上和细胞生长晕或游动细胞群上,均观察到有淡黄色或茶褐色的结晶体形成(图版 II:3)。若组织块取自外套膜最外缘(色线部分),生成的晶体为茶褐色,而且肉眼也看见大多数组织块由棕黄色变成黑褐色。若组织块取自去色线部分的外表皮(与人工育珠手术取细胞小片相同),则生成的晶体为淡黄色。培养时间达 1—2 月的组织块,肉眼看来一直呈乳白色。

在扫描电镜下观察到培养 5—15d 的表皮细胞有下面几种分泌形态:

培养 5d 的内表皮细胞,分泌泡刚从细胞上脱离开,分离的两端所形成的细突清晰可辨(图版 II:4)。培养 15d 的内表皮细胞,正在形成分泌小泡(图版 II:5),小泡从细胞一端突出后,逐渐形成细颈,细颈拉长,最后脱离细胞。由于细胞需要一定的压力将分泌物挤压出去,所以在细胞中部能观察到明显的内陷,由此所产生的压力完成了这一分泌过程。

侧面观培养 15d 的外表皮细胞,液流式顶浆分泌,细胞上部有许多细小颗粒、细丝及无定形分泌物(图版 II:6),正在从细胞顶部排出去,这是相差显微镜下观察到分泌颗粒集中于一端,外形呈圆锥形的分泌细胞(图版 II:1)。还可见细胞前半部下陷(图版 II:6),也是细胞运动压出分泌物的表现。正面观培养 15d 的外表皮细胞开始进行液流式顶浆分泌时,分泌的细丝和小颗粒都集中在细胞的一端。细胞中部两侧均可见到挤压分泌物的凹陷。在刚刚结束分泌活动的表皮细胞,在分泌后的孔穴边缘,一般能见到余下的少许分泌颗粒。培养 15d 的外表皮细胞进行分泌活动的另一形态,是分泌时细胞发生剧烈的变形运动,细胞中央部分突起,部分凹陷,在分泌端形成一个粗大的长足,由长足把分泌物排到较远的位置(图版 II:7)。

讨 论

1. 椭圆背角无齿蚌组织培养细胞有旺盛的分泌活动

贝的外套膜具有分泌贝壳物质(角质、棱柱质、珍珠质)和分泌粘液的能力^[5-9]。在倒置相差显微镜下观察接种 2—3d 的外套膜组织块为白色,在较薄的部分,十分透明,组织表面看不见无定形和结晶形的分泌物。从组织块上游离出来的细胞分泌颗粒很少,但培养 3—4d 后,很多细胞的一端已聚集有许多分泌颗粒(图版 II:1),有的已向外分泌(图版 II:2)。同时在组织块表面可观察到许多无定形和结晶形分泌物(图版 II:3)出现,并随时间的延长而增多,这时可见组织块表面由分泌细胞逐步分泌产生和积累的许多无定形的分泌物。表明椭圆背角无齿蚌外套膜细胞在体外进行组织培养也有十分旺盛的分泌活动。

2. 间隙是椭圆背角无齿蚌外套膜的一种分泌渠道

在扫描电镜下观察到外套膜内、外表皮和结缔组织都有间隙结构,从扫描电镜照片看出,间隙中的游走细胞,如血球、分泌细胞等的反差不同,反差大的色深,表示细胞在间隙深处,反差小的色浅,则在间隙浅处,这种分布显示出细胞可以通过间隙出入,此外还观察到间隙中的分泌细胞顶部有不同数量的分泌物。同时在间隙两侧分布的无定型分泌物、分泌颗粒、分泌小泡较其它区域为多。表明内、外表皮细胞中的分泌物可直接分泌到体表,而结缔组织中的分泌细胞,当分泌物形成以后,可能通过间隙从内部游走到组织表面去完成分泌活动,说明间隙可能是外套膜的一种分泌机构。同时可以认为间隙的存在为结缔组织的分泌细胞参与珍珠质和粘液的分泌活动及阐明其分泌途径,是一个较为有力的组织结构证据。

3. 椭圆背角无齿蚌外套膜细胞的分泌类型

细胞的分泌活动是一种较为复杂的过程,用固定、切片和染色的方法来研究分泌作用,只能知道个别时期的状态。研究分泌过程最好作活体观察,但活体观察在有些情况下是不易进行的^[10]。而从组织块上游离出来并在培养液中游动的细胞,有利于用倒置相差显微镜观察活细胞的分泌活动。作者观察到分泌颗粒聚集于一端的细胞,正在排出分泌颗粒的细胞和形成小泡分泌的细胞。将细胞固定、作临界点干燥和喷镀金以后,用扫描电镜观察到细胞的分泌类型与相差显微镜活体观察到的细胞分泌类型基本一致,即有形成小泡的局部分泌和液流式的顶浆分泌,以及形成长足进行块状物的分泌。通过对比观察,本文作者认为这三种分泌类型是椭圆背角无齿蚌内、外表皮细胞基本的分泌方式。

以上研究表明,椭圆背角无齿蚌外套膜在体外适宜的条件下进行组织培养,其分泌细胞能进行旺盛的分泌活动。日本町林昭^[11,12]进行的海水贝组织培养也证实了这一点。而且分泌物的性质与活体基本相同。说明大规模培养动物细胞,完全有可能得到期望获得的细胞产物和贵重的一些药物。

参 考 文 献

- [1] 俞豪祥。三角帆蚌外套膜及珍珠囊的组织学初步观察。动物学杂志, 1985, 20(1): 1—3。
[2] 蔡英亚等。贝类学概论。上海: 上海科学技术出版社, 1979: 3—34。
[3] 石安静。河蚌外套膜的组织培养。水产学报, 1983, 7(2): 153—157。
[4] 石安静。人工育珠河蚌钩介幼虫的原代细胞培养。四川大学学报, 1983, (4): 88—91。
[5] 石安静。我国淡水育珠蚌外套膜的组织学研究。淡水渔业, 1981, (4): 2—5。
[6] 石安静等。三角帆蚌外套膜的亚显微结构。水生生物学报, 1987, 11(3): 236—340。
[7] 石安静等。三角帆蚌珍珠囊形成的研究。水产学报, 1985, 9(3): 247—253。
[8] 矢野勤。アコヤガイ貝殻および真珠の真珠層に形成された暗褐色異物中の色素。国立真珠研究所報告, 1975, 19: 2129—2151。
[9] 矢野勤。アコヤガイ外套膜の縁膜部に含まれる色素。国立真珠研究所報告, 1976, 20: 2241—2243。
[10] 朱洪文。组织学。北京: 人民教育出版社, 1979: 33—44。
[11] 町林昭。アコヤガイ外套膜の組織片培養。国立真珠研究所報告, 1977, 18: 96—105。
[12] 町林昭。細胞培養を用いた真珠形成の研究。应用细胞生物学, 6(3): 1—9。

OBSERVATION ON THE SECRETION ACTIVITIES OF CULTURED AND NON-CULTURED CELLS OF MANTLE TISSUE OF *ANODONTA WOODIANA ELLIPTICA* WITH SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

Shi Anjing and Gong Youbin

(Biology Department, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract

By using scanning electron microscope and phase contrast microscope, the authors have studied the secretion by the cultured and non-cultured cells of the pallial tissue in *Anodonta woodiana elliptica*, and observed that both kinds of cells have very vigorous secretion activities. The cultured cells show merocrine and apocrine secretion. There are three modes of secretion: 1. The secretory end forms a bulge wrapped by a membrane. The bulges stretch gradually, and then their bases turn into narrow tubes, which finally separate from the cells and become secretory vesicles (merocrine). 2. Long footlike structure begins to grow at the end of the cells, pushes the secretory substances into a distance and secretes them. Afterwards, the footlike structure shrinks into its original form. 3. Many narrow branches are formed at the secretory end, and the secretory substances are secreted out of the branches-like fluid (apocrine secretion). When the rim zone of chromogenesis tissue of pallial layer is cultured, dark brown conchiolin-like crystals are similar to the substances on the outermost layer of the shell, formed in the tissue piece and on the cells; When the exocuticle tissue piece without rim zone of chromogenesis is cultured, white or pale-yellow pearl-like crystals (similar to the substances on the inner-most layer of the shell) are produced. These results show that, if cultured under proper conditions, the cells may produce the secretory substances having the same property as the substances produced in vivo. It is thus feasible to obtain the cell products by mass culturing cells.

Key words

Anodonta woodiana elliptica, Mantle, Secretion activities, Scanning electron microscope