

三角帆蚌珍珠囊细胞的分泌活动

邱安东 石安静

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要 本文对三角帆蚌珍珠囊细胞的分泌活动进行了亚显微结构的研究。发现珍珠囊表皮细胞能积极地进行物质合成, 这些物质主要是蛋白质、硫酸化粘多糖和中性粘多糖, 并将这些物质以微绒毛分泌、块状物分泌、细胞间隙分泌和大颗粒分泌等多种方式分泌到珍珠囊腔; 而位于珍珠囊表皮细胞之间的、来源于外套膜结缔组织的腺细胞则含有丰富的中性粘多糖, 并通过开口式分泌的方式释放到珍珠囊腔, 同珍珠囊表皮细胞分泌的物质一起, 共同参与珍珠结晶层的形成; 珍珠囊细胞分泌的多样性与珍珠组成的复杂有关; 珍珠囊细胞的分泌活动具有节律性和区段性的特点, 这种区段性和节律性的分泌与珍珠多层结晶纤层的形成相适应。

关键词 三角帆蚌, 珍珠囊细胞, 腺细胞, 分泌活动

珍珠囊是由育珠贝外套膜外表皮细胞进入或手术植入到外套膜或生殖腺中, 经过一系列生理生化变化后形成的、分泌形成珍珠的器官, 其所分泌的 CaCO_3 和有机基质在珍珠囊腔内按一定的钙化机制形成多层球状霰石结晶纤层——珍珠。关于珍珠囊的研究在珍珠囊形成的组织学[熊大仁 1965, 石安静等 1985]、亚显微结构[杜晓东和许国领 1990, Wada 1989, Suzuki 和 Mori 1991]、细胞识别[石安静等 1985, Wada 1989] 和发育[杜晓东和许国领 1990, 刘小明 1991] 等方面有一些研究, 而对于珍珠囊细胞在分泌形成珍珠过程中具体生理活动的研究则很少, 但这正是阐明珍珠形成的生物学机理所必须研究的一个极其重要的方面。本文对三角帆蚌珍珠囊细胞的分泌活动进行了亚显微水平的研究, 以阐明其物质合成、分泌的特点和机制。

1 方法

1.1 材料

四川人工繁殖的三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii* Lea) 按石安静和吴宗文[1994] 的方法进行人工植片育珠, 即用 1.5 龄的三角帆蚌制成边长为 $4\text{mm} \times 4\text{mm}$ 的外套膜外表皮细胞小片, 分别植入 20 只 1.5 龄三角帆蚌的外套膜中, 在微流水中养殖育珠两年。

1.2 方法

从三角帆蚌中取出珍珠囊分别固定于 Bouin 氏液、10% 中性甲醛固定液和用 0.2mol/L 二甲胍酸盐缓冲液配制的 2.5% 戊二醛 (pH 7.2) 中。前二者经常规石蜡切片, H·E 染色作一般组织学观察, 考马斯亮蓝法示蛋白质, 阿利新蓝法 (pH 1.0) 示硫酸化粘多糖, PAS 反应示中性粘

多糖;后者经 1% 锇酸(0.2molL 二甲胍酸盐缓冲液配制, pH 7.2)后固定 2h, 逐级酒精梯度脱水后, 环氧树脂 618 包埋, 用 LKB-超薄切片机切片, 醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染。日立 H-600 透射电镜观察和摄影。

2 结果

2.1 珍珠囊细胞的一般超微结构

珍珠囊细胞由占绝大多数的珍珠囊表皮细胞和少量位于珍珠囊表皮细胞之间、来源于外套膜结缔组织的腺细胞组成(图版 I-7)。珍珠囊表皮细胞结构特征表现为:细胞顶端具有发达的微绒毛;细胞之间的间隙非常发达,在许多区域形成很多池状的结构;细胞内有较发达的粗面内质网、丰富的线粒体和游离多聚核糖体;整个细胞的电子密度高(图版 I-1, 3, 4, 5)。而腺细胞的绝大部分则为大量的腺泡所占据,细胞核被挤到细胞的边缘,这些腺泡在电镜下表现为低电子密度,在 H·E 染色中也不着色(图版 I-7, 8)。腺细胞来源于结缔组织表现为:在结缔组织中有散在分布,在珍珠囊表皮下较密集分布,具变形性,常以胞体小部分、大部分或全部嵌入到珍珠囊表皮细胞之间(图版 I-7)。

2.2 珍珠囊细胞分泌活动的方式

微绒毛分泌:通过微绒毛,珍珠囊表皮细胞内的物质能以两种方式进行分泌:一种是细胞内的物质经运输进入到微绒毛后,在微绒毛顶端以液线的形式分泌到珍珠囊腔(图版 I-1, 2);另一种则是物质进入到微绒毛致使有的微绒毛顶端膨大,而与基部发生断裂,从细胞表面脱落下来而直接进入珍珠囊腔(图版 I-3)。

块状物分泌:珍珠囊表皮细胞内能合成一种电子密度低的块状物,它们由双层膜包围,形状多样,经运输到达细胞的游离端并直接地分泌到珍珠囊腔中(图版 I-4, 5)。

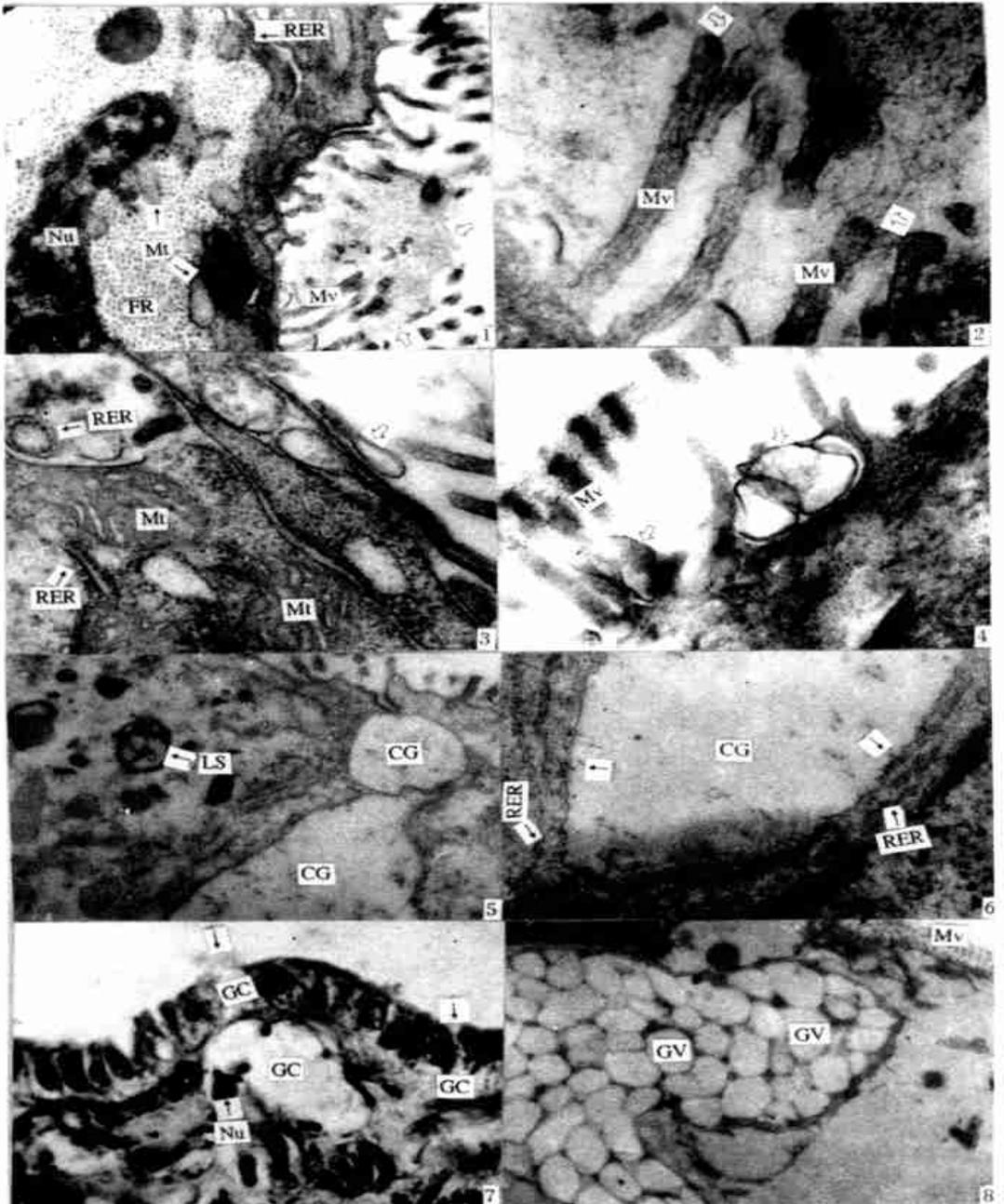
间隙分泌:珍珠囊表皮细胞间有非常发达的细胞间隙。在靠近细胞间隙的细胞质内分布有较发达的、与间隙平行的粗面内质网,并且细胞内的物质能以分泌小泡的形式向间隙腔中分泌(图版 I-5, 6)。

开口式分泌:位于珍珠囊表皮细胞之间、来源于外套膜结缔组织的腺细胞,其分泌活动表现为细胞顶端破裂,以开口的形式释放其细胞内含物到珍珠囊腔(图版 I-7, 8)。

大颗粒分泌:有的珍珠囊表皮细胞能合成一种体积较大的颗粒体。这种颗粒体由膜所包围,内含有许多电子密度较大的小颗粒,并主要分布于其周边区域。这些大颗粒在细胞的中下部积累了足够的物质以后,经运输到达细胞的游离端,穿越细胞膜而进入到珍珠囊腔(图版 II-1, 2, 3, 4)。

2.3 珍珠囊细胞分泌物的性质

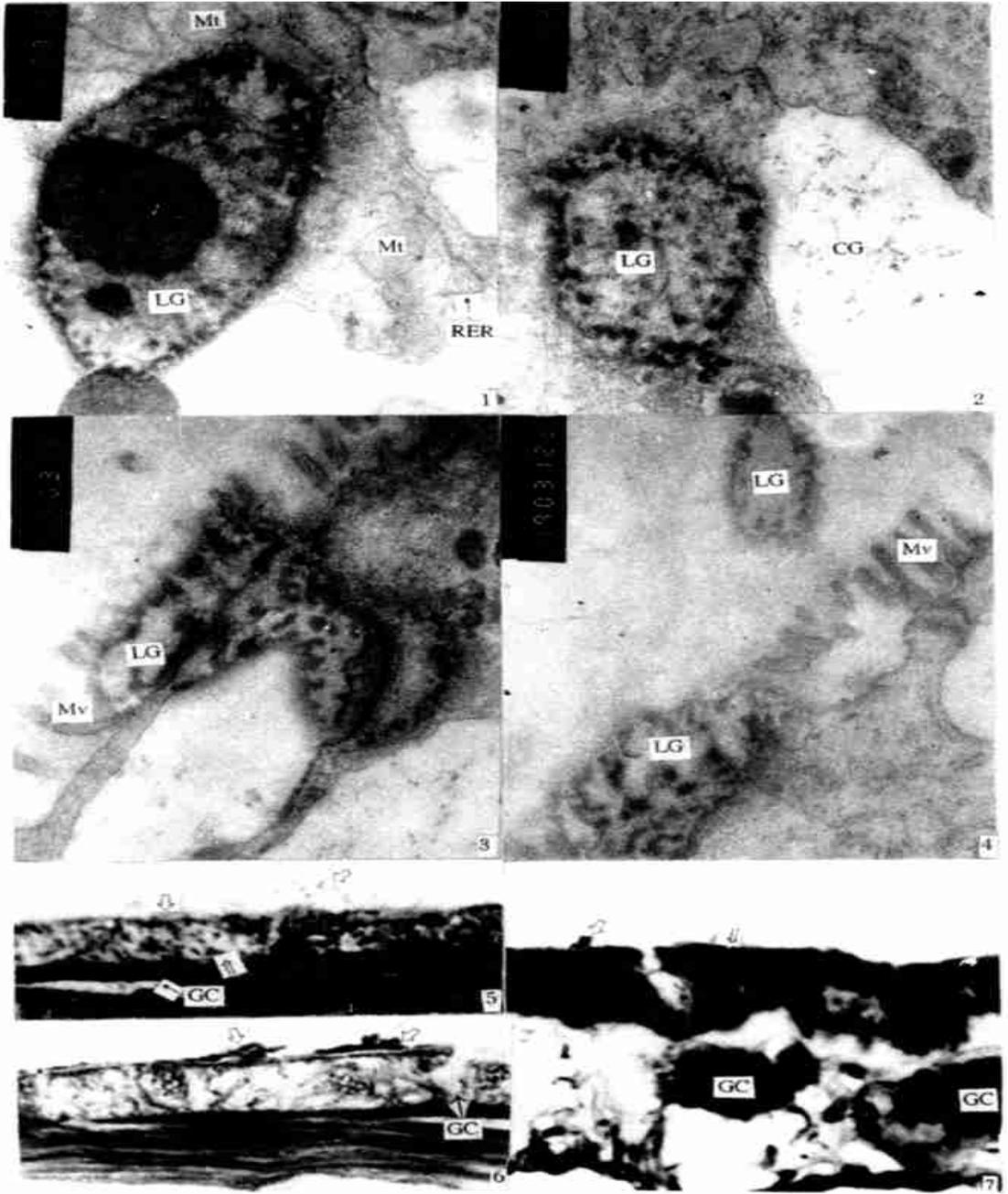
珍珠囊表皮细胞及其分泌物对阿利新蓝(pH 1.0)呈阳性,对考马斯亮蓝成较强阳性,对 PAS 反应呈强阳性;而腺细胞对考马斯亮蓝呈弱阳性,对阿利新蓝(pH 1.0)呈阴性,对 PAS 反应呈阳性。这一结果表明,珍珠囊表皮细胞内含有硫酸化粘多糖、较丰富的蛋白质(很可能其中还含有糖蛋白)和丰富的中性粘多糖,并能将这些物质分泌到珍珠囊腔;腺细胞内几乎不含硫酸化粘多糖,仅含有少量的蛋白质,但含有丰富的中性粘多糖(图版 II-5, 6, 7)。



图版I Plate I

1. 示珍珠囊表皮细胞的微绒毛液线式分泌(个) $\times 14\ 000$; 2. 微绒毛液线式分泌的放大(个) $\times 48\ 000$ 3. 示珍珠囊表皮细胞的微绒毛脱落分泌(个) $\times 36\ 000$ 4. 示珍珠囊表皮细胞的块状物分泌(个) $\times 36\ 000$; 5. 示珍珠囊表皮细胞内的块状物及发达的细胞间隙 $\times 10\ 000$; 6. 示珍珠囊表皮细胞内沿细胞间隙两侧分布的发达粗面内质及其向间隙性的小泡式分泌(个) $\times 19\ 000$; 7. 示珍珠囊表皮细胞之间和结缔组织中的腺细胞及其开口式分泌(个) $\times 1\ 056$; 8. 示腺细胞腺泡 $\times 5\ 800$.

Mv: 微绒毛, RER: 粗面内质网, Mt: 线粒体, FR: 游离核糖体, Nu: 细胞核, LS: 块状物, CG: 细胞间隙, GC: 腺细胞, GV: 腺泡.



图版II Plate II

1. 正在进行物质积累的大颗粒×14 000; 2. 运输中的大颗粒×19 000; 3. 已部分分泌到细胞外的大颗粒×19 000; 4. 已分泌到细胞外以及还存在于细胞顶端的大颗粒×19 000 5. 考马斯亮蓝法示蛋白质, ①: 含蛋白质的分泌物, ②: 珍珠囊表皮细胞内的蛋白质颗粒×1 056; 6. 阿利新蓝法(pH 1.0)示硫酸化粘多糖, ①: 含硫酸化粘多糖的分泌物×1 056; 7. PAS反应示中性粘多糖, ①: 含中性粘多糖的分泌物, ②: 珍珠囊表皮细胞内的中性粘多糖×1 056; 4~7示珍珠囊表皮细胞的大颗粒分泌。

Mv: 微绒毛, RER: 粗面内质网, Mi: 线粒体, CG: 细胞间隙, GC: 腺细胞, LG: 大颗粒。

2.4 珍珠囊表皮细胞分泌活动的特点

珍珠囊表皮细胞在同一时相有的细胞处于旺盛分泌活动状态, 而另外的细胞则表现为不分泌状态, 这一特征表明珍珠囊表皮细胞进行交替式分泌。

3 讨论

关于贝壳有机基质前体物质的来源, 最初有的学者认为由整个贝体或由一些特殊的、远离贝壳形成部位的结构合成[Kobayashi 1964, Neff 1972]。后来, Young[1977a、1977b] 通过 H^3 标记的甘氨酸对贝整体及其离体外套膜蛋白质的合成与分泌的研究发现, 外套膜自身能进行旺盛的蛋白质合成与分泌, 并是外套膜外腔粘液的主要来源。町井昭[1989] 和石安静和陈蜀娜[1994] 进一步的研究发现培养中的海水及淡水育珠贝外套膜外表皮细胞能分泌形成珍珠质, 这表明外套膜外表皮细胞能合成贝壳珍珠质有机基质的前体物质。珍珠囊是分泌形成珍珠的器官, 但关于珍珠的物质来源目前还研究甚少。我们对三角帆蚌珍珠囊细胞的超微结构和组织化学研究发现, 珍珠囊表皮细胞内的合成机构发达, 使这些细胞具有很强的物质合成能力, 所合成的物质很可能主要是蛋白质、硫酸化粘多糖和中性粘多糖; 同时, 在珍珠囊表皮细胞之间还有一种来源于外套膜结缔组织的腺细胞, 这些细胞内含有大量的低电子密度的腺泡, 这些腺泡的内含物很可能就是中性粘多糖, 并且, 分泌活动越旺盛的珍珠囊表皮, 其间镶嵌的细胞也越多; 这些物质均是参与贝壳钙化的重要成分[Keith 等 1993]。因此, 可以认为, 珍珠囊表皮细胞和结缔组织的腺细胞共同参与了珍珠的分泌形成。

三角帆蚌珍珠囊表皮细胞具有丰富的线粒体, 这种结构特征与其旺盛的分泌活动以及分泌方式的多样性相适应。Wada[1989] 发现微绒毛可以作为珍珠囊表皮细胞的一种分泌渠道。本研究还进一步观察到微绒毛能通过两种方式进行物质分泌, 即物质通过微绒毛顶端以液线形式和微绒毛直接脱落进行分泌。

块状物分泌可以说是我们发现的珍珠囊表皮细胞物质分泌的一种奇特形式。这些块状物首先在细胞内形成, 并由两层膜包围, 再经运输到达细胞表面。Arnold[1994] 曾经发现鹦鹉螺 (*Nautilus belanesis*) 的外套膜外表皮细胞能首先形成“原棱柱质”和“原珍珠质”, 这些物质运输到细胞表面后, 再组装成贝壳棱柱质和珍珠质。我们所观察到的珍珠囊表皮细胞内以及细胞表面的块状物是否就是他所发现的“原珍珠质”, 目前还不能肯定, 但这却是值得继续深入研究且极其有趣的问题。

与贝类钙化相关的细胞间隙分泌最初发现于外套膜外表皮细胞之间[Neff 1972, 石安静和曾家玉 1991, 石安静和龚由彬 1993], 这种方式是钙分泌的一种重要通道。我们发现珍珠囊表皮细胞之间具有比外套膜外表皮更宽大、更发达的间隙, 可以推测这些间隙具有与外套膜外表皮的细胞间隙相同的功能; 同时, 还发现珍珠囊表皮细胞能积极地以小泡形式向细胞间隙进行物质分泌, 因此可以说细胞间隙可能也是一种有机物质分泌的重要渠道。大颗粒分泌也是珍珠囊表皮细胞物质分泌的特殊形式, 其分泌物具有高电子密度, 表明其富含带电荷的阴离子基团, 因此可以推测这种分泌方式是提供形成所需富含阴离子基团物质的重要渠道。来源于外套膜结缔组织的腺细胞采用开口式分泌其内容物。腺细胞的腺泡电子密度极低, 表明其内含物带电荷的基团极少。

关于珍珠囊细胞分泌方式的多样性, 可能与珍珠组成的复杂性有关。珍珠与贝壳珍珠层

相似,均由 90%~95% 的 CaCO_3 和 5%~10% 的有机基质组成[熊大仁 1965],其中有机基质主要由富含酸性氨基酸的糖蛋白[Weiner 等 1983]、硫酸化粘多糖[Simkiss 1965, Crenshaw 和 Ristedt 1984]、中性粘多糖(主要为几丁质)[Jeuniaux 1963, Peters 1972]及少量的脂类[Beedham 1958]组成。通过对珍珠囊细胞及分泌物的组织化学研究也得到了一致的结果:珍珠囊细胞能向珍珠囊腔分泌蛋白质、硫酸化粘多糖和大量的中性粘多糖。已经知道,糖蛋白和硫酸化粘多糖是可溶性基质的重要组成部分,其丰富的阴离子基团与 CaCO_3 霏石结晶的起始、生长和调控有关[Crenshaw 和 Ristedt 1984, Weiner 等 1983];而中性粘多糖是不溶性基质的重要组成部分,对 CaCO_3 霏石结晶的形成起着脚手架的作用[Lowenstan 和 Weiner 1989]。微绒毛和大颗粒分泌物电子密度较高,表明其富含阴离子基团,因此它们很可能是参与形成可溶性基质的重要组成部分(如:糖蛋白和硫酸化粘多糖),参与 CaCO_3 霏石结晶的起始、生长、调控;块状物和细胞间隙分泌则很可能与珍珠囊细胞对钙的运输与分泌有关;而腺细胞的腺泡电子密度极低,表明其内含物带电荷的基团很少,因此很可能主要是参与不溶性基质形成的中性粘多糖。

贝壳和珍珠的结构表现为结晶层与有机基质相互交替排列。已经知道,贝类外套膜外表皮细胞对壳基质的分泌呈周期性和非连续性[Wilbur 1964, 石安静等 1994]。本研究则发现,珍珠囊细胞的分泌也具有区段性和节律性的特点,具体表现为:并不是所有的珍珠囊细胞都处于旺盛的分泌状态,有的细胞进行旺盛分泌,而有的细胞却处于分泌停滞状态,这一特点与其形成的珍珠的结构特征相适应。因此,很明显,珍珠囊细胞和它所分泌的珍珠囊腔之间存在着某种自我调节系统,通过这一系统,珍珠囊细胞所受的刺激决定了其对有机基质的周期性分泌,这些刺激可能是物理性的(如 CaCO_3 霏石结晶或有机基质表面),也可能是珍珠囊腔液中的某些调节因子。但是,这一机制的揭示,还需要运用多种物理以及化学因素刺激珍珠囊细胞,并分析研究珍珠囊腔粘液中无机和有机成分的变化特征。Beirao 和 Sorenson[1986]及 Beirao 和 Nascimento[1989]认为外套膜外表皮为一兴奋性分泌上皮,并认为其周期性分泌与两种不同的动作电位有关。珍珠囊表皮是否为兴奋性分泌上皮目前还不能完全肯定,但这方面的研究是揭示其周期性分泌机制的一个研究方向。

参 考 文 献

- 石安静,张 矛,吴宗文等. 1985. 三角帆蚌珍珠囊形成的研究. 水产学报, 9(3):247~252
- 石安静,吴宗文. 1994. 提高珍珠产量与质量的技术措施. 四川大学学报(自然科学版), 31: 101~108
- 石安静,陈蜀娜. 1994. 褶皱冠蚌外套膜组织培养的分泌物的偏光显微镜观察. 动物学报, 41(1): 35~39
- 石安静,陈维琼,刘晓光等. 1994. 淡水育珠贝外套膜表皮细胞分泌方式的研究. 水生生物学报, 18(4): 369~375
- 石安静,曾家玉. 1991. 河蚌外套膜的扫描电镜观察. 水产学报, 15(1): 68~71
- 石安静,龚由彬. 1993. 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. 水生生物学报, 17(1): 35~39
- 刘小明. 1991. 河蚌结缔组织细胞发生及发育观察. 水产学报, 15(2): 124~129
- 杜晓东,许国领. 1990. 褶皱冠蚌珍珠囊发育的超微结构观察. 水产学报, 14(3): 212~218
- 熊大仁(译). 1965. 珍珠的研究. 北京: 农业出版社. 52~56, 189~192
- 町井昭. 1989. 贝的组织培养, 蛋白质核酸酵素. 34(3): 193~196
- Arnold J M. 1994. Nautilus Embryology: A New Theory of Molluscan Shell Formation. Science, 253: 373~374
- Beedham G E. 1958. Observations on the non-calcareous of the shell of the Lamellibranchia. Q J Microsc Sci, 99:341~357
- Beirao P S, Sorenson A L. 1986. Two types of action potentials in a secretory epithelium of a clam mantle. J Exp Biol, 121: 179~195
- Beirao P S, Nascimento J H M. 1989. Sodium and calcium-dependent mechanisms in the action potential of the secretory epithelium of a

- clam mantle. *J Exp Biol*, 145: 395 ~ 402
- Crenshaw M A, Ristedt H. 1984. The histochemical location of reactive groups in septal nacre from *Nautilus pompilius* L. In: Watabe N, Wilbur K M (Editors), *The Mechanisms of Mineralization in the Invertebrates and Plants*. SC: University of South Carolina Press. 335 ~ 367
- Jeuniaux C. 1963. Chitine et chitinolyse. Messon, paris, France
- Keith J, Stockwell S, Remillard K, et al. 1993. Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp Biochem Physiol*, 105B(3/4): 487 ~ 496
- Kobayashi S. 1964. Studies on shell formation. X. A study of the proteins of the extrapallial fluid in some molluscan species. *Biol Bull*, 126: 414 ~ 422
- Lowerstam H A, Weiner S. 1989. On biomineralization. New York: Oxford University Press. 171 ~ 234
- Neff J M. 1972. Ultrastructure of the outer epithelium of the mantle in the clam *Merccenaria mercenaria* in relation to the calcification of the shell. *Tissue & Cell*, 41: 591 ~ 600
- Peters W. 1972. Occurrence of chitin in Mollusca. *Comp Biochem Physiol*, 41B: 541 ~ 550
- Simkiss K. 1965. The organic matrix of the oyster shell. *Comp Biochem Physiol*, 16: 427 ~ 435
- Suzuki T, Mori K. 1991. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *pinctada fucata*. *Cell Tissue Res*, 266: 75 ~ 82
- Wada K. 1989. Allograft and xenograft-mantle transplantation to freshwater mussels. *Venus JPN. J Malacol*, 48(3): 174 ~ 180
- Weiner S, Traub W, Lowenstam H A. 1983. Organic matrix in calcified exoskeletons. In: Westbroek P, Dejong E W (Editors), *Biomneralization Metal Accumulation*. Holland: D. Deidel. Dordrecht. 205 ~ 224
- Wilbur K M. 1964. Shell formation and regeneration. In: Wilbur K M, Younge C M (Editors), *Physiology of Mollusca*, Vol. 1. New York: Academic Press. 243 ~ 282
- Young S D. 1977a. Mantle protein excretion and calcification in the hardshell clam *Merccenaria mercenaria*. I Protein excretion in the intact clam. *Marine Biology*, 41: 253 ~ 257
- Young S D. 1977b. Mantle protein excretion and calcification in the hardshell clam *Merccenaria mercenaria*. II Protein synthesis and excretion by the isolated mantle. *Marine Biology*, 41: 259 ~ 262

THE SECRETING ACTIVITIES OF THE PEARL-SAC CELLS OF *HYRIOPSIS CUMINGII*

QIU An-Dong, SHI An-Jing

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064)

ABSTRACT By ultrastructural studies on the secreting activities of pearl-sac cells of *Hyriopsis cumingii*, the pearl-sac epithelial cells have developed rough endoplasmic reticulum for synthesizing was found. Some kinds of substance which are mainly composed of proteins, sulfated mucopolysaccharides and neutral mucopolycaccharides, and the synthesized substance can be secreted by ways of microvilli, lump-like substance, cell gap, large grain, and the gland cells between the pearl-sac epithelial cells, which are from the connective tissue of the mantle and contain rich neutral mucopolysaccharides, and can secrete their contents by means of the breaking of the top of these cells. The secretion diversity of the pearl-sac epithelial cells is determined by the complexity of the pearl composition. The secretion of the pearl-sac cells is rhythmic, which is adaptive for the formation of the multiple crystalline layers of the pearl.

KEYWORDS *Hyriopsis cumingii*, Pearl-sac epithelial cell, Gland cell, Secreting activity