

河蚌外套膜的组织培养

石 安 静

(四川大学生物系)

提 要

本文报道了褶纹冠蚌和背角无齿蚌外套膜的组织培养结果。试验表明,河蚌外套膜的上皮细胞和结缔组织的成纤维细胞能在离体培养条件下生长繁殖。在试验中还能观察到所培养的组织块上皮细胞,能分泌出茶褐色的有机珍珠质,使组织块逐渐变成茶褐色。

离体组织培养,是一种应用颇为广泛的技术。迄今,在人和脊椎动物的组织和细胞培养方面已有许多研究成果,建立了各种各样的细胞株和细胞纯系。但是在无脊椎动物的组织和细胞培养方面似乎还研究得不多,尤其对于水生低等变温动物的组织细胞培养的报道更是少见。在国内, Filander 和 Vago(1963)曾进行过蜗牛足和心脏的外套膜组织培养; Benex(1967)曾对贻贝的组织培养进行过研究; 町井昭(1977)则进行过阿古屋贝外套膜的组织培养。在国外,则尚未见到有关海水和淡水贝类组织培养的报道。作者前几年曾对河蚌的外套膜作了组织学研究^[2]和染色体研究^[1]。在此基础上,为了了解河蚌外套膜分泌珍珠的机理,对淡水河蚌的外套膜作了组织培养研究。现将结果报道如下:

料 料 和 方 法

1. 试验用的河蚌是四川成都产的背角无齿蚌 *Anodonta woodiana* (Lea)和湖南洞庭湖产的褶纹冠蚌 *Cristaria plicata* (Leach)。其年龄都在2龄以下。所培养的组织是上述两种蚌的外套膜的边缘膜。取材之前,先将蚌壳用肥皂水刷洗干净,然后割断闭壳肌,用自来水和蒸馏水反复冲洗外套膜及内脏团,剪下外套膜的边缘膜,立即放入用平衡盐溶液配制的抗菌素溶液(每毫升中含青霉素4000单位,链霉素5000微克),浸泡约半小时,再用这种抗菌素液洗涤20—30次。将组织剪成1平方毫米大小的碎块,再用自己设计配制的平衡盐溶液洗涤3—4次,准备培养。

2. 平衡盐溶液是按作者自行设计的配方配制的。其配方为:

NaCl	5.5 克
KCl	0.28 克
CaCl ₂	0.09 克
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.07 克

MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.07 克
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.04 克
KH ₂ PO ₄	0.04 克
葡萄糖	0.70 克
蒸馏水	1000 毫升
0.5%酚红	0.50 毫升

配成的平衡盐溶液经用 7.5%的 NaHCO₃ 溶液,将 pH 值调整到 6.8—7.0。

3. 培养基的制备,是用 1640 培养基 50 毫升、平衡盐溶液配制的 0.3%水解乳蛋白溶液 30 毫升、小牛血清 20 毫升,混合而成。并用 7.5%的 NaHCO₃ 调整使 pH 值为 6.8—7.0。再按每毫升培养基加入青霉素 100 单位,链霉素 100 微克。准备分装 20 个小方瓶。

4. 培养方法是先在 25 毫升的小方瓶底部涂上一薄层鸡血浆,并加入鸡胚汁二滴。再在每个培养瓶贴组织块 20—30 块,将培养基加在培养瓶未贴组织块的一面,放入 27°C 恒温箱中培养 12 小时左右,将培养瓶翻向,使培养基完全浸没组织块,继续培养。

试 验 结 果

在组织培养初期,组织块呈全白色,透明,在显微镜下观察,可见到细胞的轮廓。

组织培养到第三天,在显微镜下观察,可见到组织块边缘有许多圆形的游走细胞,这些细胞均为外套膜的上皮细胞,在组织块附近较密集,边缘较稀疏(图 1)。贴瓶后,细胞形态由圆形变成椭圆形或多角形(图 2)。培养至 4—5 天时,组织块出现生长晕,在紧靠组织块处的生长晕上,细胞排列紧密,而且细胞个体较小,在近边缘处的细胞排列稀疏个体较大。在组织块之间的空隙处,形成大片单层细胞。经用卡洛固定, Giemsa 染色后观察,可见细胞核着色较深,胞质几乎不着色,因而细胞之间的界限模糊不清。

结缔组织中的成纤维细胞,生长较慢。一般要培养到第六天左右时,在组织块边缘开

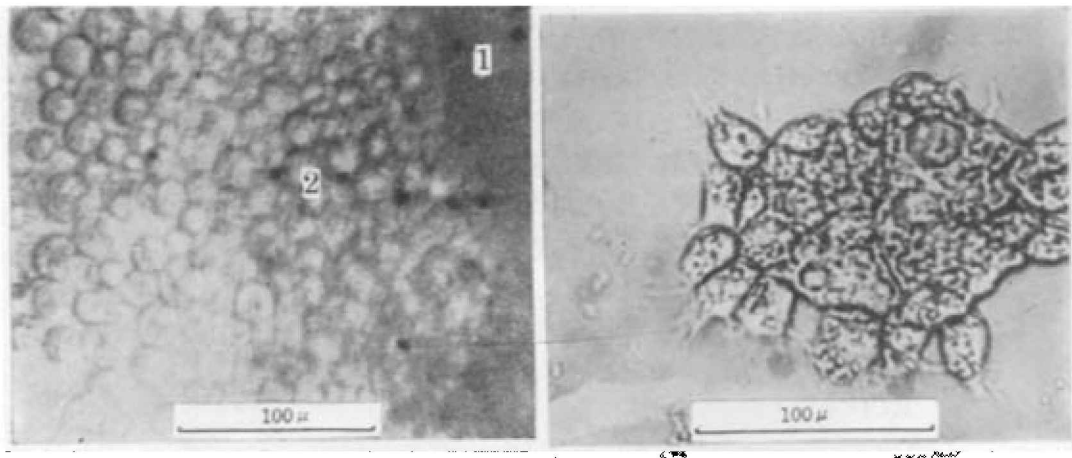


图 1 经三天培养的后角无齿蚌外套膜组织(1)及游离上皮细胞(2),(活体摄影)

图 2 经五天培养的后角无齿蚌外套膜开始增殖的上皮细胞(活体摄影)

始形成网状的生长晕,此后逐渐向外伸展。其细胞大多呈梭形(图 3),有的细胞则形成分叉的多枝状,有的细胞两端会形成细线状的突起,延伸得很远,并常与另一细胞的突起相连。图 4 是此时细胞活体的摄影图。用卡洛固定, Giemsa 染色后,细胞核呈圆形或椭圆形,胞质轻微着色(图 5),比上皮细胞的胞质着色深,能看清梭形细胞轮廓。

组织培养 4 天以后,部分组织块开始变为茶褐色。在显微镜下观察,可以看到黄色、棕色,以至褐色的大小不等的团块,这些团块在培养过程中会逐渐增大,互相连接,以至使整块组织变成茶褐色而完全不透明(图 6)。这与町井昭^[7]以海产阿古屋贝作组织培养时所见组织块变成茶褐色的情形是一致的。町井昭将茶色结晶物在直角尼科尔棱镜下作十字消光等分析后,认为这是上皮细胞所分泌的有机珍珠质沉积于组织块上所致。我们在组织培养过程中观察到的有机珍珠质的颜色、形状和透明度,同町井昭的报道的相同。所区别的是町井昭培养的阿古屋贝在培养到 12 天时才出现茶褐色的分泌物,而我们所培养的这两种河蚌的外套膜经 3—4 天之后,组织块的颜色就开始了变化,一星期内就完全变成

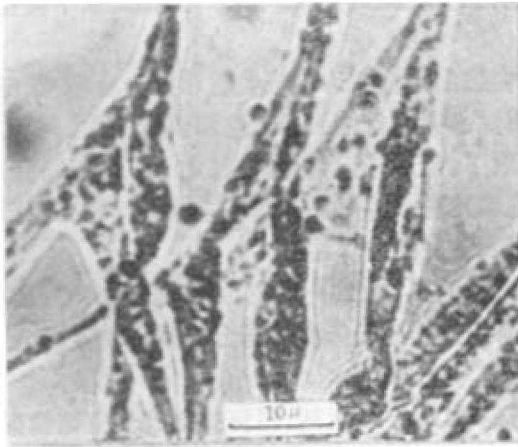


图 3 培养 10 天的背角无齿蚌的成纤维细胞(活体摄影)

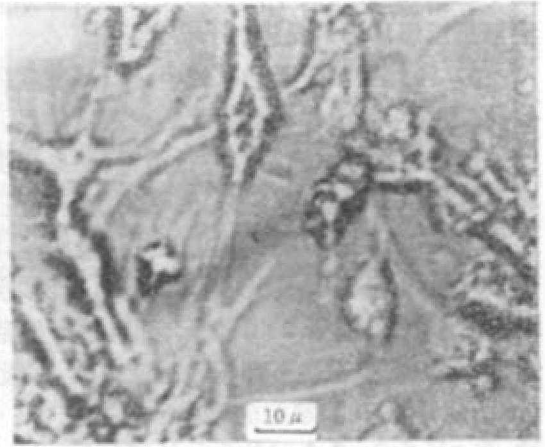


图 4 培养 7 天的褶纹冠蚌外套膜的成纤维细胞(活体摄影)

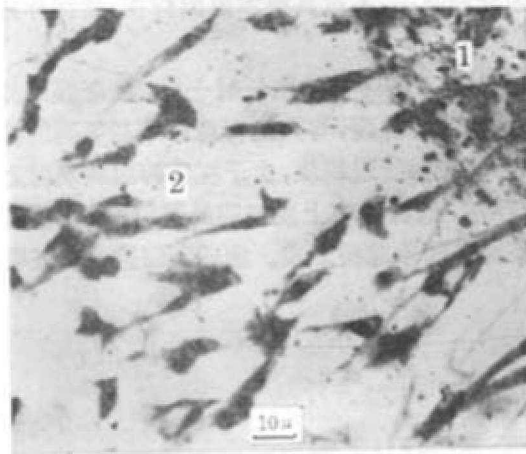


图 5 培养 7 天的背角无齿蚌外套膜成纤维细胞。卡洛固定, Giemsa 染色。

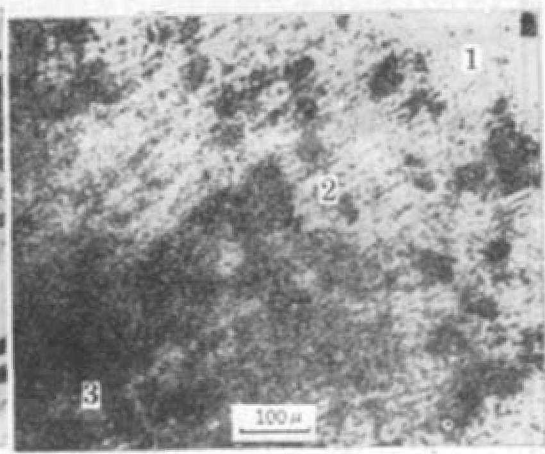


图 6 培养 7 天的褶纹冠蚌外套膜,示(1)无褐色斑块的边缘,(2)有褐的部分,(3)全部呈褐色部分。

了褐色。由此可见,褶皱冠蚌和背角无齿蚌外套膜细胞的分泌活动较阿古屋贝更旺盛,其潜伏期也更短一些。

讨 论

1. 各种软体动物细胞的渗透压是不同的,所以用于它们的组织和细胞培养的平衡盐溶液也应有所不同。例如町井昭培养海产的阿古屋贝的平衡盐溶液是人工海水,培养基是 199 加高浓度的盐类补强液^[7]。我们在进行河蚌的组织和细胞培养时,也曾经试用过人工海水、Hank 氏液,结果河蚌的外套膜组织在这些溶液中,发生卷曲、收缩,显然是由于盐度太高的表现,其结果导致细胞死亡溶解。以后又改用 Holtfreter 的变温动物培养液(鱼类、两栖类用)^[8],也未得到成功。经过相当长时期的摸索,最终换成现在所采用的平衡盐溶液,才获得培养成功。从我们的试验看来,各种动物所需的营养及无机盐类,基本上是相同的,所不同的是无机盐含量及各种盐类之间的比例。所以,正确配制平衡盐溶液是组织培养的关键。

2. 河蚌生活于天然水域中,其外套膜和内脏团上沾有许多微生物和原生动 物等污物,在组织培养中往往会由此造成不良结果,因此必须进行细致的清洗和消毒工作。我们曾采用高锰酸钾或酒精等进行消毒,结果都失败了。最后采用含青霉素(4000 单位/毫升)和链霉素(5000 微克/毫升)的平衡盐溶液浸泡和冲洗,并用消毒滤纸轻擦去河蚌外套膜上的粘液,才最终解决了防止细菌污染问题,得到较好的培养结果。

3. 河蚌外套膜组织培养的温度,经多次试验结果,以 26—27°C 为好,低于 26°C 组织细胞生长缓慢,高于 30°C 几乎不能生长。但是河蚌组织耐受低温的能力较强,在室温(稍低于 20°C)在显微镜下作较长时间观察,未发现不良影响。

一般脊椎动物细胞的培养基的适宜 pH 值是 7.2—7.4 之间,但河蚌细胞似宜略偏酸性,在 pH 6.8—7.0 时的生长情况较好。

河蚌的组织细胞培养,在春季容易获得成功,秋季比较困难,冬季几乎不能成功。这可能与蚌体内某些激素分泌或细胞内某些基因的调控有关,不过其根本原因何在,尚待作进一步研究。

4. 河蚌外套膜组织细胞在人工离体培养条件下,能同自然生长时一样,能旺盛地分泌茶褐色的有机珍珠质。在离体培养条件下所分泌的珍珠质,与人工育珠手术后见到的棱柱层珍珠相同。在我们进行的组织培养试验中有些较薄的组织块,由于在剪碎组织块时上皮细胞脱落,经显微镜检查看不到上皮细胞的存在,这种没有上皮细胞的组织块,无论经多长时间的培养,始终是透明无色的,不会有茶褐色的珍珠质形成。由此可以进一步证明珍珠质是外套膜的上皮细胞的分泌物。

参 考 文 献

- [1] 石安静,1981。我国淡水育珠河蚌外套膜的组织学研究。淡水渔业(2)2—5。
- [2] 石安静,1980。我国淡水珍珠蚌染色体的研究。四川大学学报(4)169—175。
- [3] 向近敏、朱宝莲,1965。细胞与组织培养。上海科学技术出版社。72—92。

- [4] 上海肿瘤研究所细胞生理组,1966。细胞营养与组织培养。上海科学技术出版社。
[5] 张玺、张福绥,1962。珠母贝及真珠的形成。生物学通报(1)1—4。
[6] 吴政安,1978。两栖类的组织培养。动物学报 24 卷(2)107—115。
[7] 町井昭,1977。真珠の培養研究組織培養 Vol.3 No. 4 96--105。
[8] 黑田行昭,1974。動物組織培養法。52,東京,共立出版株式會社。
[9] 中井準之助、山根績等,1976。組織培養朝倉書店。
[10] 渡部哲光、小林新二郎,1958。珍珠的研究(熊大仁译)。农业出版社。

THE TISSUE CULTURE OF THE MANTLE OF FRESHWATER CLAMS

Shi Anjing

(Biology Department, Sichuan University)

Abstract

The tissue culture of the mantle of freshwater clams *Criaria plicato* and *Anodonta woodiana elliptica* has been carried out. Both clams are generally used in artificial pearl cultivation in our country. A balance salt solution and a sythetic culture medium had been designed and improved. Epithelial cells and fibroblast cells can grow and reproduce well in the culture. It has been observed that the epithelial cells do secrete dark brown organic pearl matter, which makes the tissue picces becomes dark brown-coloured.