

背角无齿蚌外套膜的组织化学研究

石安静

吴中文

(四川大学生物系) (四川省安岳县珍珠生产科研所)

背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana elliptica*) 在我国分布很广,是我国三种淡水育珠蚌之一。它所形成的珍珠微带金黄色,具有特殊的风格。四川省安岳县自 1971 年开始使用背角无齿蚌进行珍珠养殖以来,获得了不少经济利益,并积累了一些育珠经验。为了进一步探讨珍珠形成机理,以利于提高珍珠质量,从而获得更多优质珍珠。我们在对我国淡水育珠河蚌外套膜组织学^[1]和染色体等^[2,3]研究的基础上,又采用组织化学方法,对背角无齿蚌外套膜细胞中的核酸、糖类、酶等生物大分子物质作了组织化学方面的一些观察研究。

一、材料和方法

材料采自成都郊区大面铺池塘 2—3 龄的背角无齿蚌,在外套膜边缘膜上取 3 × 5 毫米大小的组织块,用波恩 (Bouin) 氏液固定,石蜡包埋,作常规的 H、E 染色;卡洛 (Carnoy) 固定,石蜡包埋,作核酸及糖类组织化学染色;用冷丙酮 (4℃) 固定,作冰冻切片和液氮骤冷,在恒冷箱切片机中切片,进行酶组织化学显色反应,切片厚度均为 8 微米。

组织化学显色方法 显示 DNA 用孚尔根 (Feulgen) 反应;同时显示 DNA 和 RNA 用布拉舍特 (Brachet) 的甲绿-派咯宁法;显示多糖用高碘酸-雪夫反应(简称 PAS 反应);显示非硫酸化粘液物质用伯斯特 (Best) 法;用醛品红阿新兰法,显示酸性硫酸化粘液物质;碱性磷酸酶和酸性磷酸酶用戈莫里 (Gomori) 的钙钴法和罗达 (Lojda) 的偶氮偶联法^[5,6]。显示酶时,均以不加底物作对照。

二、结果与讨论

(一) 核酸

孚尔根反应可特异性地将细胞中的脱氧核糖核酸 (DNA) 染成红色。由此法显示出外套膜内、外表皮细胞核中有细小而分散存在的孚尔根阳性颗粒,在核仁区深染的球形颗粒较多。结缔组织及肌细胞中,孚尔根阳性颗粒多呈块状,大部分靠近核膜。

用甲绿-派咯宁同时显示 DNA 和 RNA 的方法,观察到 DNA 阳性颗粒与孚尔根反应一致。派咯宁显示的 RNA,在内、外表皮细胞中都很强,在细胞内则是远心端 (游离端) 比近心端 (基部) 更强。肌细胞也呈强阳性,但结缔组织染色很浅。

在外套膜表皮细胞中,含有丰富的 RNA,这表明其细胞中有旺盛的蛋白质合成活动,远心端比近心端强,这说明合成的外输性蛋白质 (分泌用) 比细胞内需用的蛋白质更多。

(二) 糖类

1. 多糖

高碘酸-雪夫反应显示糖元为红色颗粒,在外套膜三个褶的表皮细胞及肌细胞中,均为阳性反应。在色线以下的结缔组织中,有形状不规则的强阳性团块;而在色线以下的外表皮细胞,向着外套痕 (外套膜组织结构如图 1) 方向移动,其反应强度逐渐增加,在快接近外套痕处,则为极强阳性,整个细胞都染得很深,此处的红色颗粒已不能互相区分;而在色线以下的内表皮细胞中,就只有粘液细胞呈强阳性反应,向外套痕方向移行,毫无增加趋势。可见色线

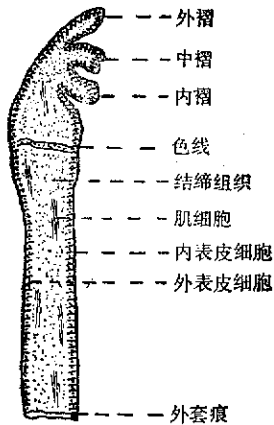


图 1 河蚌外套膜边缘膜组织结构示意图

以下的内、外表皮细胞的 PAS 反应强度有相当大的差异。

2. 粘液物质

(1) 用醛品红-阿新兰法显示硫酸化粘液物质时,酸性强硫酸化粘液物质为深紫色,而酸性弱硫酸化粘液物质为淡紫色。

在外套膜内褶和中褶里的结缔组织中其分泌细胞呈强阳性[图 A2、3(见封2,下同)深色团块所示]。中褶与外褶之间,已经分泌出细胞的粘液也呈阳性反应(图 A5)。

外套膜内表皮细胞中的粘液细胞及紧靠内表皮的结缔组织中的粘液细胞呈深紫色(图版 A: 箭头所指),即为酸性强硫酸化粘液物质;外表皮细胞和绝大部分结缔组织及肌细胞呈淡紫色,即为酸性弱硫酸化粘液物质。使内、外表皮细胞形成鲜明的对比(图 B 粗箭头示内表皮,细箭头示外表皮)。

(2) 用胭脂法显示非硫酸化粘液物质时,观察到外套膜三个褶的表皮细胞都呈阳性反应,外褶比中、内褶稍强,肌细胞中有弥散的红色颗粒。在色线以下的结缔组织中,有由红色颗粒组成的圆形或椭圆形的团块(图 C1)。特别是在外套痕的附近,紧靠外表皮细胞的结缔组织中,红色颗粒已密集而愈合成很强的斑块(图 C2)。此处的外表皮细胞呈极强阳性(图 C、D 粗箭头所指),而相对部位的内表皮细胞则较弱(图 D 细箭头所指),两者的差异是相当

悬殊的。

从粘液物质的分布来看,硫酸化粘液物质是内表皮强,非硫酸化粘液物质(富含唾液酸等)是外表皮强。但硫酸化和非硫酸化粘液物质,两者都属于酸性粘液物质。北野康(1955)的研究认为外套膜外表皮分泌的粘液为中性,内表皮分泌的粘液为酸性。从我们的实验来看,内、外表皮细胞分泌的粘液都是酸性,只不过内表皮分泌的粘液其酸性较强而已。还有人认为珍珠囊的酸性分泌物形成有机质,中性分泌物形成珍珠质,碱性分泌物形成棱柱层^[4]。珍珠囊在人工育珠时是由植入的外表皮细胞所形成,但其分泌物的性质和 pH 值是否与外表皮细胞相同,以及在什么条件下分泌物形成贝壳质,什么条件下形成珍珠质,这是需要今后从多方面进一步研究的问题。

(三) 酶类

1. 碱性磷酸酶 (AKP)

外套膜的表皮细胞中,碱性磷酸酶反应很强,结缔组织中只有游走细胞为阳性,其余细胞为阴性,肌细胞活性不明显。在表皮细胞中,外表皮细胞比内表皮细胞活性更强,但构成中褶的小细胞移行区则为弱阳性(图 E 箭头所指)。

从内褶的顶端向外套痕方向看,内表皮细胞的碱性磷酸酶活性有减弱的趋势,但在外表皮细胞中则无此现象。

2. 酸性磷酸酶 (ACP)

酸性磷酸酶在表皮细胞中呈强阳性反应,而结缔组织及肌细胞呈阴性。在三个褶中,外褶(图 F1)比中、内褶(图 F2、3)稍强。褶以下的外表皮细胞比内表皮细胞强。在表皮细胞内主要分布在细胞的远心端。

显示碱性磷酸酶和酸性磷酸酶用戈莫里的钙-钴法和萘酚 AS-BI 的偶联偶氮法,其结果是一致的,对照片均为阴性。

伯得哈门(Beedham 1958)用双壳贝类作了外套膜的组织化学研究,观察到外套膜表皮细胞中碱性磷酸酶活性很强,认为此酶与蛋白质的分泌有关^[9]。卡多(Kado, Y. 1954)的研究指出,碱性磷酸酶与细胞直接从外界摄取钙

无关,而与蛋白质的分泌有关^[10]。目前还有一些资料说明,碱性磷酸酶与钙的吸收、膜的吸收和转运以及维持细胞内磷酸浓度有关。在我们的实验中观察到碱性磷酸酶在外套膜三个褶的表皮细胞中活性很强,外表皮比内表皮强,细胞远心端比近心端强,这与细胞中 RNA 的分布情况是互相平行的,因此我们认为碱性磷酸酶不仅与蛋白质分泌有关,还参与蛋白质合成,特别是碱性磷酸酶在色线以下的内表皮中逐渐减弱,外表皮中一直很强,这表明此酶还可能参与贝壳和珍珠质前身物质的形成、矿物化过程,以及具有分泌物运输等重要作用。

内外表皮细胞中酸性磷酸酶活性很强,此酶是溶酶体的标志酶,溶酶体是细胞内的消化器官。因而内、外表皮细胞除有旺盛的分泌活动外,还有很强的物质吸收和消化等功能。

辻井(1955)把珍珠脱灰制成切片,进行组织化学研究,查明珍珠是由碱性蛋白和多糖类组成。因而珍珠质的前身物质必然是一种含有蛋白质和多糖的复合物。在我们作的实验中,观察到糖元、非硫酸化粘液物质在外表皮细胞中特别丰富(内表皮弱),我们认为外表皮细胞中合成的外输性蛋白,与这些多糖结合,所形成的复合物就是珍珠质的前身物质。同时外套膜色线以下的外表皮多糖含量比三个褶的表皮细胞丰富得多,我们推测随着贝的长大,在贝壳的生长中,褶的表皮细胞所分泌的蛋白质复合物含糖较少,矿物化后先分泌形成无光泽的角质层(表面层)和棱柱层(中间层),其后再由褶以下的外表皮细胞(尤其是色线以下的外表皮细胞)

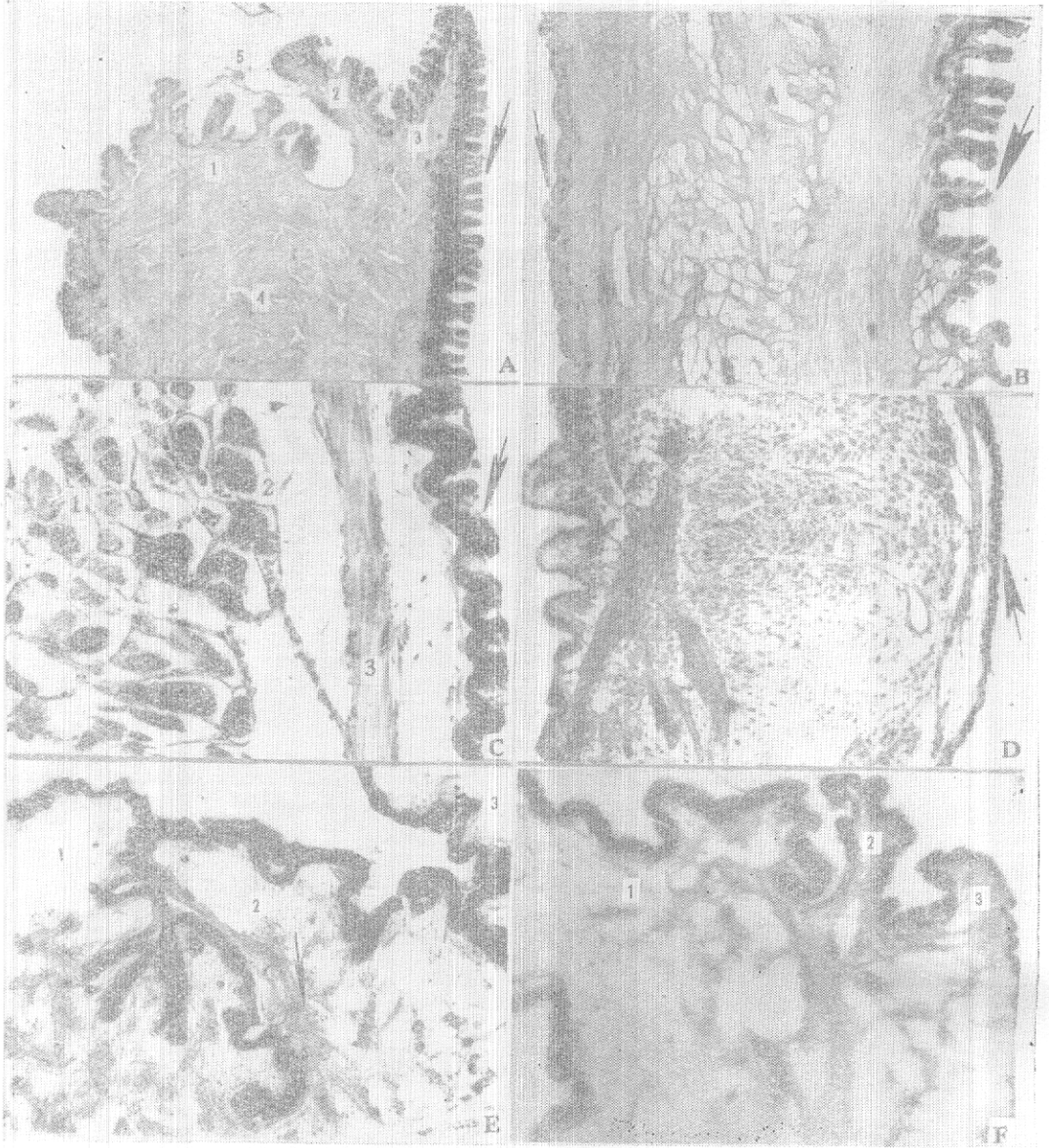
合成的蛋白质与多糖结合(此处细胞含糖类特别多),形成糖蛋白和粘蛋白类物质,矿物化后再分泌形成有光泽而美丽的珍珠层(内层)。在生产实践上制作插片的细胞小片,必须把色线以外的部分截净,否则会形成白色无光的骨珠和黑色无光的泥珠。从人工育珠经验上说明色线内外的细胞在形成珍珠的光泽和色彩上是完全不同的,这种差异我们认为可能与糖类含量和成分不同有关。这一点在赤松蔚·小松博等(1977)对黄色珍珠和白色珍珠含糖成分的差异研究^[6]中,也间接地说明珍珠色彩的不同是与糖类的含量和种类有关的。

参 考 文 献

- [1] 石安静 1981 我国淡水育珠蚌外套膜的组织学研究。淡水渔业(2): 2—5。
- [2] —— 1980 我国几种珍珠蚌染色体的研究。四川大学学报(4): 169—175。
- [3] —— 1983 河蚌外套膜的组织培养。水产学报 7(2): 153—157。
- [4] 吴县农水局等 1972 河蚌育珠。7—9。江苏人民出版社。
- [5] 陈嘯梅等 1982 组织化学手册。47—128。人民卫生出版社。
- [6] 赤松蔚·小松博等 1977 黄色系真珠と白色系真珠における糖成分の相違。日本水产学会誌 43(6): 773—776。
- [7] 和田浩爾 1973 外套膜の酵素組織化学による研究。国立真珠研究所報告 17 2059—2074。
- [8] Bacroft, J.D. et al. 1977 Theory and Practice of Histology Techniques. Edinburgh, London and New York: Churchill Livingstone, 287—304。
- [9] Beedham, G. E. 1958 Observations on the mantle of the lamellibranchia. *Quart. micr. Sci* 99: 188—197。
- [10] Kado, Y. 1954 The distribution of alkaline phosphatase in mantle tissue of bivalves. *Jour. Sci. Hiroshima Univ., ser. B*, 15: 183—188。

《背角无齿蚌外套膜的组织化学研究》

一文之附图 (正文见第1页)



- 图A 外套膜三个褶的硫酸化粘液物质在内表皮(箭头所指)及附近的结缔组织中为强阳性。1.外褶; 2.中褶; 3.内褶; 4.结缔组织; 5.粘液。×25。
- 图B 硫酸化粘液物质在外套膜色线以下的内表皮(粗箭头所指)中强,外表皮中弱(细箭头所指)。×30。
- 图C 非硫酸化粘液物质在外套膜色线以下的外表皮(箭头所指)和附近的结缔组织中很强。1.阳性颗粒团块; 2.强阳性斑块; 3.肌纤维。×100。
- 图D 非硫酸化粘液物质在外套膜色线以下内表皮(细箭头所指)中较弱;外表皮(粗箭头所指)中强。×30。
- 图E 碱性磷酸酶在三个褶的表皮细胞中呈强阳性,中褶小细胞移行区为弱阳性(箭头所指)。1.外褶; 2.中褶; 3.内褶。×75。
- 图F 酸性磷酸酶在外褶(1)表皮细胞中比中褶(2)、内褶(3)强。×5。