

三种不同因子对三角帆蚌外套膜细胞 Ca²⁺ 流动性的影响

施志仪* 郝莹莹 李文娟 韩健 靳雨丽

(上海海洋大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 201306)

关键词 三角帆蚌; 外套膜细胞; 非损伤微测; Ca²⁺ 流动性

三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)是我国主要的育珠母蚌,其所培育出的珍珠色泽鲜艳、细腻光滑,因而成为目前淡水育珠生产中首选的育珠母蚌之一。蚌的外套膜是贝壳和珍珠形成的重要组织器官,有内外两层表皮细胞及其间的结缔组织构成。它对钙具有高度通透性^[1-3],其上皮细胞具有通过细胞膜主动吸收Ca²⁺和贮存Ca²⁺的功能^[4],并通过胞吐作用排出钙至外套膜外腔中,这些钙就是形成珍珠的基础。维生素D₃可促进Ca²⁺的吸收和增加钙的运转,对钙吸收起着重要作用^[5]。对贝类的研究表明,适量维生素D₃能够促进矿物质在贝壳中的沉积^[6]。而促进贝壳和珍珠很好的生长的一个不容忽视的因素是环境中的钙浓度^[7-9],水体环境中Ca²⁺增加,可增加外套膜组织Ca²⁺浓度^[10]。研究表明,60~80 mg/L的Ca²⁺浓度最有利于促进三角帆蚌珍珠质沉积^[11]。此外,温度对外套膜细胞的珍珠质的沉积也有影响^[12],温度过高或过低都会影响珍珠质分泌,甚至造成蚌体死亡。

非损伤微电极测定技术(Non-invasive micro-test technology, NMT)在细胞和组织水平进行功能鉴定、跨膜生物信息传递机制研究等方面发挥了重要的作用^[13]。国内外已经有许多研究者运用NMT对生物Ca²⁺流动进行了研究。本研究运用NMT在不同浓度Ca²⁺、维生素D₃以及不同温度的培养条件下,研究三角帆蚌外套膜细胞外的Ca²⁺的流动特性,以期对三角帆蚌Ca²⁺代谢的分子调控机制的研究提供资料,也为日后提高珍珠培育产量提供理论基础。

本试验采用2龄的活力较强的三角帆蚌,蚌体大小(长宽高)11 × 8 × 3 cm,由浙江诸暨养殖基地提供,育珠蚌在小型玻璃水族缸(40 × 30 × 20 cm)中暂养,所用的都是曝气的自来水,调节其含钙量约为1.25 mmol/L。

本试验所用试剂和仪器有:维生素D₃(上海生工),二甲基亚砜(DMSO)(天根生化科技),RPML1640培养

基、抗生素(青霉素、链霉素各10 000 U/ml)、优级胎牛血清(上海博升生物),胰蛋白酶、EDTA(Gibco公司),全培养基(RPML1640+20%胎牛血清+200 U/ml双抗^[14]),0.25%的胰酶(含有0.02%EDTA),VD₃孵育液用二甲基亚砜溶解为40 000 U/L的储液,Ca²⁺孵育液用无水CaCl₂配成为0.5 mol/L的储液,测试液使用无Ca²⁺Hanks(C0218,碧云天)配成。恒温细胞培养箱(REVCO,美国),倒置显微镜(Olympus,日本),非损伤微电极测定(BIO-001系列,美国扬格公司),超净工作台中(苏州净化设备厂)。

外套膜组织细胞的培养:取3只蚌用手术刀切开蚌的闭壳肌,用无菌蒸馏水反复冲洗外套膜,采用撕裂法分离出外套膜外表皮^[15],再浸入双蒸水配制的0.01%高锰酸钾溶液中30 min进行初步消毒。然后依次用含有3个浓度梯度的双抗(青霉素+链霉素)的PBS冲洗,3个浓度梯度依次为:不添加双抗的PBS;含有200 U/ml双抗的PBS;含1 000 U/ml双抗的PBS。然后将外套膜外表皮组织剪成1 mm²的小片,浸于0.5 ml的0.25%的胰酶(含有0.02%EDTA)中37℃消化30 min,再用2 ml含有胎牛血清的培养基终止胰酶消化细胞,然后将液体吸出,用PBS清洗组织块,将组织细胞贴于培养皿中,在26℃恒温培养箱中倒置培养4小时后再正置,添加2 ml全培养基继续培养,共培养组织15份(15个培养皿)。培养24小时稳定后再进行孵育测定。

培养的组织被分成3组,其中,第1组9个培养皿采用Ca²⁺终浓度为0.5 mmol/L、1.25 mmol/L、3 mmol/L测试液分别孵育9个培养皿的组织,即3个

收稿日期: 2010-07-25 接受日期: 2010-09-02

本研究由上海市博士后科研资助计划面上项目(No.09R21413200),上海市科委基础重大项目(No.06aj14003)和上海市重点学科水生生物学建设(No.S30701)资助项目

* 通讯作者。Tel: 021-61900051, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

浓度, 每个浓度 3 个培养皿组(生物学重复), 30 min 稳定后进行细胞外 Ca^{2+} 流动研究^[6]。由于 NMT 测试中, 测试液必须含有所要测试的离子, 因此, Ca^{2+} 测试组中 Ca^{2+} 浓度不能为 0 mmol/L; 第 2 组 3 个培养皿采用瞬时添加的方法用 VD_3 储液(40 000 U/L)将细胞外测试液 VD_3 分别调节为终浓度 0U/L、50U/L、100U/L、500 U/L, 进行细胞外同一位点的 Ca^{2+} 流动研究(溶液中调节 Ca^{2+} 浓度为 1.25 mmol/L); 第 3 组采用自动控温装置分别在细胞外同一位点的 20℃、26℃、30℃检测 Ca^{2+} 的流动(每组都有 3 个重复样, 每个样测定 6 个位点)。实验过程为: 首先将 24 小时后培养稳定的组织细胞中培养基吸出, 用无钙 Hanks 先轻轻润洗组织 2 遍, 然后置于 Hanks(其调至添加了我们所需的每组不同的钙离子的浓度)中培养 30 min, 待细胞在测定过程中能保持稳定的生物状态, 测定 Ca^{2+} 流动速度与方向。其中 Ca^{2+} 组采用调至 Hanks 中 Ca^{2+} 终浓度为 0.5mmol/L、1.25mmol/L、3 mmol/L 分别孵育 9 个培养皿即 3 个浓度, 每个浓度 3 个培养皿组(生物学重复) 30 min; VD_3 组则采用从低浓度开始添加, 根据加入后的液体体积再计算第二浓度的添加量, 由于液体体积变化很小, 对浓度影响不大, 如添加维生素 D_3 终浓度为 50 U/L 时, 测试液是 198 μl , 按浓度计算应添加 0.25 μl 的孵育液, 依次类推。每测定一个浓度需 5 min, 观察其 Ca^{2+} 流动变化, 待稳定后记录数据。

细胞外 Ca^{2+} 的测定: 非损伤微测技术是利用一种灌有液体离子交换剂的微电极在细胞周边进行测定, Ca^{2+} 选择性微电极在接近细胞与远离细胞的两点间(间距 30 μm)往返移动(图 1)。在已知距离 dx 进行两

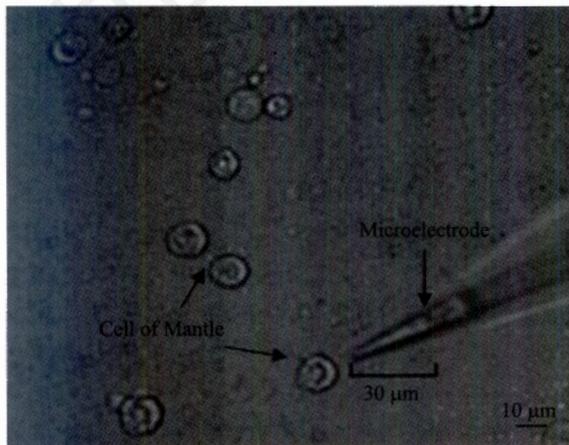


Fig.1 Cells were monitored by non-invasive micro-test technology

点测定, 获得两个电压 V1 和 V2, 算出两点的浓度差, 最终数据通过 Fick 第一扩散定律公式计算出 Ca^{2+} 移动速率, 数据表现形式为 $\text{pmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 即每秒通过 1 平方厘米的该离子/分子摩尔数(其中, 流速为正值表明 Ca^{2+} 外排, 负值表明 Ca^{2+} 内流)。样品测定持续时间为 5 min, 测试液除了进行 20℃和 30℃测定时, 均为 26℃。

数据处理: 所有数据采用 SAS 软件 GLM 程序的单因子方差分析(SAS 6.12, 1996), 数值表示为均值和 SE, 不同组间显著性分析采用 Duncan 多重比较及 *t*-test, 显著差异为 $P<0.05$, 极显著差异为 $P<0.01$ 。

组织细胞培养结果

培养 24 小时后稳定的外套膜组织细胞在倒置显微镜下观察发现(图 2), 培养稳定后组织周围有许多散落的细胞与细胞群, 多个细胞群形成一个生长晕, 生长晕的细胞之间排列紧密, 远离组织周围的游离细胞个体很大, 排列稀疏, 细胞呈圆形, 直径大小在 $11.29\pm 0.2 \mu\text{m}$, 在高倍镜下可见细胞中有颜色较深的颗粒状物质。

添加不同 Ca^{2+} 浓度对胞外 Ca^{2+} 流动性的影响

水体 Ca^{2+} 的浓度对外套膜细胞胞外 Ca^{2+} 流动有显著的影响($P<0.05$)。如图 3 所示, 随着孵育液中 Ca^{2+} 浓度增大, 外套膜外的 Ca^{2+} 外排速度减小, Ca^{2+} 运动方向也由外排变为内流。当 Ca^{2+} 浓度增大时, 去极化电位增大, 电压依赖性钙通道打开, 膜电压也

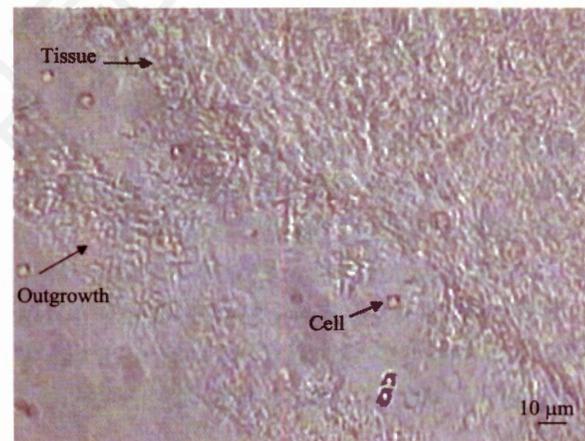


Fig.2 Observed tissues and cells under inverted microscope after stable culture

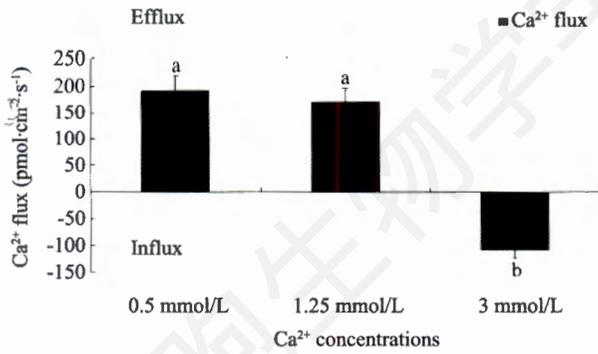


Fig.3 The change of the average rate of Ca^{2+} out of mantle movement after adding Ca^{2+} with different concentrations
The same letter expresses no significant difference ($P>0.05$); different letters express very significantly difference ($P<0.01$).

发生了改变,引起 Ca^{2+} 的大量内流^[17]。本研究数据显示,在添加 Ca^{2+} 浓度为 0.5 mmol/L 时,细胞处于 Ca^{2+} 外排状态,平均流速为 $190.8 \pm 6.9 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;当 Ca^{2+} 浓度增大为 1.25 mmol/L 时,细胞仍处于 Ca^{2+} 外排状态,平均流速为 $171.2 \pm 10.6 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, Ca^{2+} 外排速度变小,相对 0.5 mmol/L 组 Ca^{2+} 运动变化差异不显著($P>0.05$);当 Ca^{2+} 浓度添加至 3 mmol/L 时, Ca^{2+} 内流加大,即 Ca^{2+} 运动方向由外排转变为内流,平均流速为 $108.3 \pm 27.4 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,流速与 0.5 mmol/L 和 1.25 mmol/L 组间存在极显著差异($P<0.01$)。唐敏等^[18]在活体研究中也表明:较高的环境钙浓度有利于三角帆蚌组织对钙的吸收和贮藏。

添加不同 VD_3 浓度对胞外 Ca^{2+} 流动性的影响

采用 NMT 技术对培养 30 min 稳定后的细胞进行测定,测定过程中在测定液里瞬时添加不同浓度的维生素 D_3 孵育液,结果表明:胞外 Ca^{2+} 流动与膜外电压一致,同样以振荡式变化;随着维生素 D_3 浓度的增加,细胞外的 Ca^{2+} 的运动方向由外排逐渐变为内流,内流速度越来越大(图 4)。这与丛玉艳等^[19]的研究一致,维生素 D_3 通过加速对钙的吸收,进而促进钙的沉积。本试验结果数据分析表明,当测试液中不添加维生素 D_3 时,细胞主要处于 Ca^{2+} 外排状态;当添加浓度为 50 U/L 时细胞仍处于 Ca^{2+} 的外排状态,与对照组相比差异不显著($P>0.05$);当添加浓度达到 100 U/L 时细胞外 Ca^{2+} 运动方向开始转变为内流,与对照组和 50 U/L 组有显著差异($P<0.05$),并且达到极显著水平($P<0.01$);当添加的浓度增大到 500 U/L 后细胞外 Ca^{2+} 的内流平均流速增大,与其它组间均存在极显

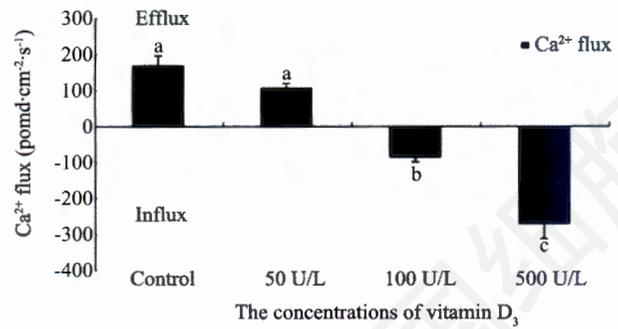


Fig.4 The change of the average rate of Ca^{2+} flux after adding vitamin D_3 with different concentrations

The same letter expresses no significant difference ($P>0.05$); different letters express very significantly difference ($P<0.01$).

著差异($P<0.01$)。外套膜表皮细胞对维生素 D_3 及其代谢产物都很敏感,把此甾体激素注射到外套膜溶液中后,钙大量地被吸收^[20],因此认为维生素 D_3 可以刺激通道蛋白的通透性增大,大量的 Ca^{2+} 可以流入细胞内。

温度对 Ca^{2+} 流动性的影响

孵育液的温度对外套膜细胞外 Ca^{2+} 流动的影响如图 5 所示,胞外 Ca^{2+} 流动以振荡式有规律的变化:温度在 20°C 时,细胞膜外 Ca^{2+} 总体上表现为微量外排,平均速度为 $12.8 \pm 9.5 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;温度从 20°C 升到 26°C 时,细胞外 Ca^{2+} 运动方向是由微量外排逐步变为内流,且内流速度变大: 26°C 时平均速度为 $-237.1 \pm 8.5 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$;温度逐步升至 30°C 时,膜外 Ca^{2+} 流动方向发生了显著变化(从内流逐步变为外排, $P<0.05$),且 Ca^{2+} 外排速率增大,平均速度为 $262.3 \pm 8.2 \text{ pmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。三角帆蚌的最适生长温度为 $20^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$,

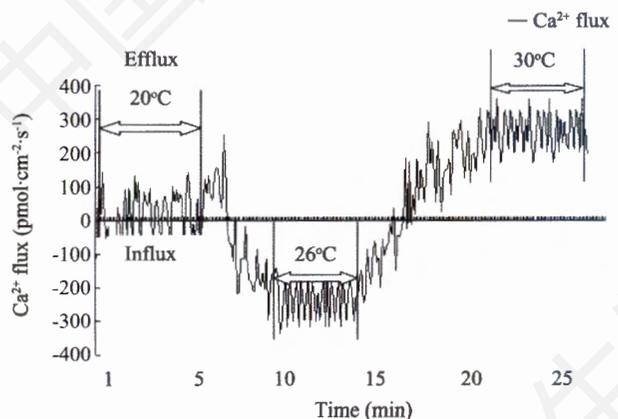


Fig.5 Influence of temperature on the average rate of Ca^{2+} out of mantle movement

而23℃~30℃的水温范围则是育珠蚌分泌珍珠质的较适温度^[20],其中26℃是三角帆蚌培育珍珠的最佳温度^[21]。与本研究结果一致,大量的Ca²⁺流入蚌体内,加快Ca²⁺的沉积,有助于珍珠的培育。

在三角帆蚌育珠的生产过程中,钙的吸收和转运对珍珠的产量和质量提高起着重要作用,加快钙在蚌体内的沉积,是促进壳和珍珠快速生长的重要手段。本试验利用NMT技术能够在不接触样品的情况下实时检测进出Ca²⁺的流速及方向。经研究发现在26℃的条件下,较高浓度的维生素D₃和Ca²⁺的刺激使得细胞外Ca²⁺大量涌入细胞内。这可能是由于高浓度的Ca²⁺通过影响膜脂的物理状态使膜蛋白的构象发生变化,从而使膜蛋白的功能受到调节,而Ca²⁺又结合在某种结合蛋白质上,通过胞饮或胞吐作用出入细胞^[22]。总之,蚌的钙代谢的分子水平的研究对推动育珠业的发展有着重要意义。

参考文献(References)

- 1 Kirschner LB, Sorensen AL, Kriebel M. Calcium and electric potential across the clam mantle. *Science* 1960; 131(3402): 735.
- 2 Kirschner LB. Transepithelial electrol phenomena in the molluscan mantle. *J Gen Physiol* 1962; 46: 362A-3A.
- 3 Istin M, Kirshner LB. On the origin of the bioelectrical potential generated by the fresh water clam mantle. *J Gen Physiol* 1968; 51(4): 478-96.
- 4 邵晓阳,黄惟灏,林景雄.三角帆蚌内脏团与外套膜钙盐分布的组织化学研究. *青岛海洋大学学报* 1999; 29(7): 483-8.
- 5 徐肇敏, Wood RJ. 维生素D和氟美松对钙运转作用的实验研究. *中国内科杂志* 1994; 33(10): 98.
- 6 周歧存,麦康森.皱纹盘鲍维生素D营养需要的研究. *水产学报* 2004; 28(2): 155-60.
- 7 钱伟平,林国星,许梓荣. Ca²⁺在三角帆蚌体内沉积效应的研究. *水利渔业* 2005; 25(1): 6-8.
- 8 张群.生物钙化作用. *安庆师范学院学报* 2002; 8(2): 49-51.
- 9 申玉田,朱静.蚌壳的层次结构与生物矿化机制. *电子显微学报* 2005; 24(4): 398.
- 10 钱伟平,茹一宁.不同浓度Ca²⁺对三角帆蚌养殖水体微生物和浮游生物的影响. *安徽农业科学* 2007; 35(26): 8249-50, 53.
- 11 钱伟平,裘圆圆.不同Ca²⁺水平对三角帆蚌养殖水体藻类和细菌总量控制的研究. *绍兴文理学院学报* 2006; 26(7): 32-5.
- 12 王春华,刘瑾冰,张朝阳,吴尼尔.宁夏引黄灌区河蚌培育珍珠关键技术. *宁夏农林* 2009; (6): 39-42.
- 13 丁亚男,许越.非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用. *物理学报* 2007; 36(7): 548-58.
- 14 Kang MS, Oh MJ, Kim YJ, Kawai K, Jung SJ. Establishment and characterization of two new cell lines derived from flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *J Fish Diseases* 2003; 2(6): 657-65.
- 15 何福林,向建国.无核珍珠培育的手术技术. *河北渔业* 2005; 3: 27-33.
- 16 Yuan FL, Chen FH, Lu WG, Li X, Wu FR, Li JP, *et al.* Acid-sensing ion channel 1a mediates acid-induced increases in intracellular calcium in rat articular chondrocytes. *Mol Cell Biochem* 2010; 340(1-2):153-9.
- 17 唐敏,石安静.圆背角无齿蚌离体培养的外套膜组织钙代谢. *水生生物学报* 2000; 24(1): 86-9.
- 18 唐敏,石安静.环境钙浓度对淡水育珠蚌外套膜及珍珠囊钙代谢的影响. *四川大学学报* 2000; 37(5): 741-7.
- 19 从玉艳,边连全,殷泽洋,张霞飞.补饲维生素D₃对育肥猪血钙与肌肉钙含量的影响. *中国饲料* 2009; (6): 29-31.
- 20 张根芳.河蚌育珠学.北京:中国农业出版社 2005; 74-9.
- 21 钱伟平,许梓荣,张明霞,施妙琴.注射法培育三角帆蚌有核珍珠的研究. *浙江农业学报* 2002; 14(2): 82-6.
- 22 李静,石安静,莫尚武,刘克武,张辉芳,高衍昆.硫酸铜及pH值对圆背角无齿蚌Ca²⁺跨膜流动的影响. *核技术* 2004; 27(1): 62-5.

The Effect of Three Different Factors on Extracellular Ca^{2+} Flux of Mantle Cell from *Hyriopsis cumingii*

Zhi-Yi Shi*, Ying-Ying Hao, Wen-Juan Li, Jian Han, Yu-Li Jin

(Key laboratory of Aquatic Genetic Researches and Aquaculture Ecology Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract In order to study the molecular mechanisms of calcium metabolism in mantle cell from *Hyriopsis cumingii*, Ca^{2+} flux direction and rate were detected by non-invasive micro-test technology (NMT). Three mantle cell cultures were divided into three groups (3 reduplication/each group). For the first group, the different concentrations of Ca^{2+} (0.5 mmol/L, 1.25 mmol/L, 3 mmol/L) were added to culture medium; for the second group, the different concentrations of vitamin D_3 (control, 50U/L, 100U/L, 500 U/L) were added into culture medium; for the third group, cells and tissues were cultured in the different temperatures (20°C, 26°C, 30°C), respectively. The results showed that extracellular Ca^{2+} flux was gradual changed from efflux to influx, and movement rate increased when adding Ca^{2+} into culture medium. The Ca^{2+} flux of 3 mmol/L Ca^{2+} adding group had significant difference compared with the control group ($P < 0.01$). The movement of Ca^{2+} was gradual changed from efflux to influx, and movement rate increased when adding vitamin D_3 in cultured cells. Among of this, the Ca^{2+} flux of 500 U/L vitamin D_3 group had significant difference compared with the control group ($P < 0.01$). Furthermore, culture temperature significantly affected the extracellular Ca^{2+} flux of the mantle cells. The flow directions of extracellular Ca^{2+} changed from efflux to influx with increasing temperature ($P < 0.05$). The influx rate at 26°C was the biggest among all the groups ($P < 0.05$). This experiment has a great significance on clarifying the formation and formation mechanism of pearls.

Key words *Hyriopsis cumingii*; mantle cell; non-invasive micro-test technology; Ca^{2+} flux

Received: July 25, 2010 Accepted: September 2, 2010

This work was Support by Shanghai Postdoctoral Research Project Funded Programs(No.09R21413200), Shanghai Science and Technology Commission of Major Projects(No.06aj14003) and Shanghai Aquatic Biology Key Discipline Construction Project(No.S30701)

*Corresponding author. Tel: 86-21-61900051, E-mail: zyshi@shou.edu.cn