

## 应用激光共聚焦显微技术研究 $\text{Ca}^{2+}$ 在三角帆蚌组织内的积累与分布

李文娟<sup>1</sup>, 施志仪<sup>1,2\*</sup>, 郝莹莹<sup>1</sup>, 叶显峰<sup>3</sup>

(1. 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;

2. 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 安徽省芜湖市繁昌县农委, 安徽 繁昌 241200)

**摘要:** 为了探讨淡水贝类  $\text{Ca}^{2+}$  吸收和转运信号传递机理, 采用激光共聚焦技术研究了三角帆蚌不同组织细胞在静息状态下细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 以及水体  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对外套膜组织细胞内钙沉积的影响。试验选取 10 只健康的三角帆蚌, 分别获得外套膜外膜、内膜、斧足、腮及内脏团上表皮组织细胞, 短期培养后用 Fluo-3/AM 荧光探针孵育细胞 1 h, 观察细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度。研究表明, 蚌不同组织细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度存在显著差异, 外套膜外膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度最高, 内脏团上表皮细胞的最低 ( $P < 0.05$ ); 育珠三角帆蚌在相同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的孵育水平下, 外套膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度比非育珠蚌都有增加的趋势, 其中在 1.25 mmol/L 添加组中, 两组外套膜内膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ ); 不同  $\text{Ca}^{2+}$  孵育水平对细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度有显著影响 ( $P < 0.05$ ), 随着  $\text{Ca}^{2+}$  在孵育液中浓度的升高, 外套膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度显著增强 ( $P < 0.05$ ), 表明外套膜是从外界吸收  $\text{Ca}^{2+}$  的主要组织, 蚌体珍珠的培育增强了其对  $\text{Ca}^{2+}$  的沉积, 并且水体  $\text{Ca}^{2+}$  浓度在 1.25 ~ 3.00 mmol/L 有助于蚌体内  $\text{Ca}^{2+}$  的贮藏, 这对进一步开展淡水蚌类育珠学研究提供了基础理论, 为珍珠培育的生产实践工作提供了依据。

**关键词:** 三角帆蚌; 细胞培养; 激光共聚焦技术;  $\text{Ca}^{2+}$  沉积

**中图分类号:** Q 952; S 917

**文献标识码:** A

细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  作为一种重要的第二信使广泛参与细胞运动、分泌、代谢和分化等多种细胞功能活动的调节<sup>[1]</sup>。贝壳和珍珠主要成分均为  $\text{CaCO}_3$  (占 95% 以上),  $\text{Ca}^{2+}$  在维持正常生理功能的同时对珍珠和贝壳相关的生物矿化也承担着重要作用<sup>[2]</sup>, 细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化是珍珠生长调控研究的中心环节。因此, 直接准确地测量  $\text{Ca}^{2+}$  含量及其分布, 对钙信号传递机理及功能的研究极其重要。

目前国内外对贝类  $\text{Ca}^{2+}$  代谢的研究甚少, 尤其是淡水贝类。研究表明外套膜在珍珠和贝壳生长中起着非常重要的作用<sup>[3-4]</sup>。电化学生理的研究

表明, 海水贝类外套膜细胞上存在  $\text{Ca}^{2+}$  通道, 对  $\text{Ca}^{2+}$  具有高度通透性<sup>[5-6]</sup>, 我国淡水贝类外套膜内、外表皮具有主动吸收  $\text{Ca}^{2+}$  和贮存  $\text{Ca}^{2+}$  的功能, 并通过胞吐作用排出  $\text{Ca}^{2+}$  至外套膜外腔中, 参与贝壳和珍珠的合成<sup>[7-8]</sup>。此外, 由于淡水贝类养殖水环境体系中,  $\text{Ca}^{2+}$  的含量极低, 借助外套膜、斧足、腮等与水体直接接触的组织器官从外界吸收, 是  $\text{Ca}^{2+}$  进入体内的一种重要途径<sup>[9]</sup>。有研究表明, 水环境中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对育珠蚌体内  $\text{Ca}^{2+}$  吸收和贮藏有显著的影响,  $\text{Ca}^{2+}$  在外套膜组织中保持一个较高的水平<sup>[10]</sup>, 并能显著抑制蚌体内有害微生物数量<sup>[11-12]</sup>。研究贝类  $\text{Ca}^{2+}$  代谢, 特别是外套膜组

收稿日期: 2010-07-18 修回日期: 2010-11-08

资助项目: 上海市博士后科研资助计划面上项目(09R21413200); 上海市科委基础重大项目(06aj14003); 上海市重点学科水生生物学建设项目资助(S30701)

通讯作者: 施志仪, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

组织的  $\text{Ca}^{2+}$  代谢,对进一步阐明贝壳以及珍珠形成机理,提高优质珠的产量有着重要意义。

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是我国特有的优质淡水育珠蚌种,在我国淡水珍珠产业中占有重要经济地位。本研究采集三角帆蚌组织细胞,进行细胞原代培养,采用 Fluo-3/AM 为荧光探针及激光共聚焦显微 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 图像分析技术,观察育珠和非育珠蚌不同组织细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的沉积,探讨不同水体  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对外套膜内膜及外膜上皮细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响,以及细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  分布状态,为贝类  $\text{Ca}^{2+}$  代谢生理研究提供理论依据,并为进一步研究珍珠形成和生长提供生物学基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验动物

三角帆蚌由浙江诸暨市阮仕珍珠研究所养殖基地提供,为体格均一 (13 cm × 11 cm × 2.9 cm) 健康的 2 龄育珠和非育珠蚌,育珠蚌是已经进行了外套膜小片插核育珠处理后 6 个月的三角帆蚌。所有三角帆蚌暂养于曝气的自来水中,其水中含钙量调节至约 1.25 mmol/L。

### 1.2 主要试剂

胰蛋白酶、抗生素、DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS) 均购置于 Gibco 公司 (USA); Fluo-3/AM、Pluronic F-127 (Sigma, USA) 用 DMSO (Gibco, USA) 分别配成 1 mmol/L 和 25 mg/L 的储液,分装后放置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。 $\text{Ca}^{2+}$  标准品由无水  $\text{CaCl}_2$  配制,浓度为 0.5 mol/L,用 DMEM 无血清培养基以逐级稀释的方法配制成 3.00、1.25、0.50 mmol/L 的含不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的孵育液,  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。试验所用溶液 pH 调节至 7.4。

### 1.3 试验方法

**不同组织的细胞培养** 取活力较强的育珠及非育珠三角帆蚌各 5 只,用手术刀切断其前后闭壳肌,分别采集斧足、腮、内脏团上表皮组织,以及采用撕膜法<sup>[2]</sup> 分别获得其外套膜的内、外表皮,去除色线及表面结缔组织,所有组织净化处理后于无菌室内进行细胞培养。

在超净工作台中 (苏州净化设备厂),分别取斧足、腮、内脏团上表皮、外套膜内膜、外套膜外膜组织于 PBS 中洗涤,然后分别用 PBS + 200 IU/mL 双抗 (青霉素、链霉素)、PBS + 1 000 IU/mL

双抗、PBS + 200 IU/mL 双抗洗液各冲洗组织一次,最后于 PBS 再次冲洗。然后组织被剪成  $2\text{ mm}^3$  大小的小块,用 PBS 冲洗小片 2 次,在组织小片中加入 0.3% 的胰酶消化液 (PBS 配制),于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下消化 25 ~ 45 min 后用 FBS 终止胰酶反应,静置 15 min,取悬液离心,弃上清液,沉淀物再悬浮于 PBS 溶液中,并离心、洗涤细胞,然后用 DMEM 全培养基 (含 20% FBS、200 IU/mL 双抗) 悬浮细胞。用血球计数板对细胞悬液进行计数,调整细胞数在  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{mL}$ ,置于  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  恒温细胞培养箱 (REVCO, USA) 培养,并在倒置显微镜 (Olympus, Japan) 下观察其生长状态。

**$\text{Ca}^{2+}$  动态变化的测定** 细胞培养 12 h 后,分别收集细胞培养液,1 200 r/min 离心 10 min,收集细胞,用无血清培养基 DMEM 重新悬浮细胞,调整细胞浓度为  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{mL}$ ,取 0.5 mL 细胞重悬液分别接种于预先用多聚赖氨酸 (分子量 > 100 000, Invitrogen) 处理的共聚焦专用培养皿中央,置于  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  恒温细胞培养箱培养 8 h,使细胞粘附于盖玻片上生长。其中,每只蚌的斧足、腮、内脏团上表皮组织的细胞被分到 3 只培养皿中,而外套膜内、外膜细胞被分到 9 只培养皿中分别培养,共形成 270 个待测样本。

用含 1.25 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  孵育液的 (内含  $8\text{ }\mu\text{mol/L}$  的 Fluo-3/AM 荧光探针,2% 的 F-127) 分别置换斧足、腮、内脏团上表皮组织的细胞培养皿中培养液,用含 0 (对照)、0.50、1.25、3.00 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  孵育液,分别置换外套膜内、外膜细胞培养皿中培养液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  预孵 1 h。取出培养皿,用无血清培养基 DMEM 清洗 1 遍,洗去未进入细胞内的 Fluo-3/AM,在共聚焦图像分析仪 (Leica TCS SP5 显微系统,德国) 下观察荧光信号。检测条件设定为激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,采样频率 488 Hz,记录时长 5 min,扫描 20 次,测定温度  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。记录数个细胞在静息状态下细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化的荧光图像,同时应用荧光强度分析软件对图像中不同区域的细胞内荧光强度以及亚细胞区域的荧光强度<sup>[13-14]</sup>,每个测定样本观测 20 个细胞,取扫描 20 次荧光强度的平均值作为进一步分析的统计值。

### 1.4 统计学方法

所有数据采用 SAS 软件 GLM 程序的单因子方差分析<sup>[15]</sup>,数值表示为均值和 SE,不同组间显

著性分析采用 Duncan 氏多重比较及  $t$  检验, 显著水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\text{Ca}^{2+}$ 在外套膜内外膜上皮细胞内的分布

试验对三角帆蚌斧足、腮、内脏团上表皮、外套膜内膜、外膜 5 种组织细胞培养结果显示, 细胞经过 12 h 培养后, 形态完整, 内部颗粒状物质明显, 此时细胞由于重力的作用沉在培养皿的底部 (但不贴壁), 转置多聚赖氨酸处理过的培养皿培养 8 h 后, 细胞被粘附于孔中央的盖玻片上, 并且粘附力强。经 Fluo-3/AM 荧光探针负载后, Fluo-3/AM 跨过细胞膜后被胞内酯酶水解, 与细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  结合, 在 488 nm 激发光下发射荧光, 细胞内荧光强度均可达到较高水平 (图 1), 表明细胞活性良好。其中, 采用撕膜法获得的外套膜内、外膜细胞都呈现为卵圆形, 内膜细胞直径 ( $6.84 \pm 0.19$ )  $\mu\text{m}$  显著小于外膜细胞直径 ( $11.76 \pm 0.57$ )  $\mu\text{m}$  ( $P < 0.05$ )。

共聚焦扫描显微镜的明场下, 外套膜细胞轮廓和内部颗粒物质清晰可见, 并能够观察到绿色荧光点, 这些荧光信号反应了  $\text{Ca}^{2+}$  的分布情况。图 1-C~D 显示, 外套膜内、外膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  呈现颗粒状分布,  $\text{Ca}^{2+}$  在外膜细胞内各处均有分布, 在内膜细胞中常聚集在一起分布于胞质内, 偶见  $\text{Ca}^{2+}$  布满整个细胞。

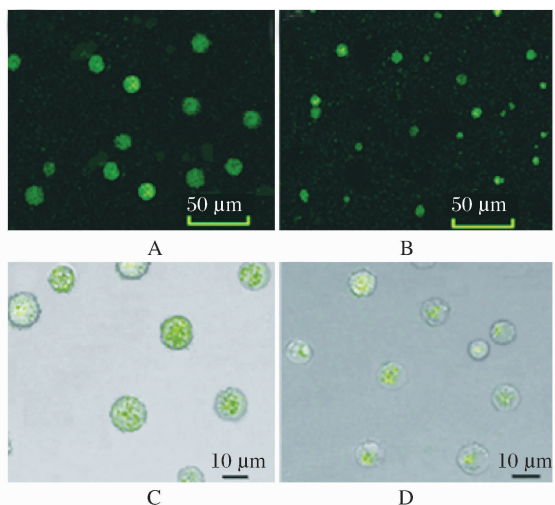


图 1 外套膜内外表皮细胞 Fluo-3/AM 负载

A、C 为外套膜外膜细胞; B、D 为外套膜内膜细胞。

Fig. 1 Loading of Fluo-3/AM in inner and outer epithelial cells from mantle tissue

A and C are outer epithelial cells; B and D are inner epithelial cells.

### 2.2 $\text{Ca}^{2+}$ 在不同组织细胞内沉积差异

三角帆蚌不同组织  $\text{Ca}^{2+}$  浓度水平测定数据显示, 在 1.25 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  水平下, 不同组织内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 而育珠状态对斧足、腮及内脏团上表皮组织细胞的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度均没有显著影响。如图 2 所示, 外套膜外膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度显著高于其他各组织 ( $P < 0.05$ ), 斧足细胞次之, 内脏团上皮细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度最低, 与外套膜外膜细胞及斧足细胞组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 腮、外套膜内膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度介于斧足及内脏团上皮细胞, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

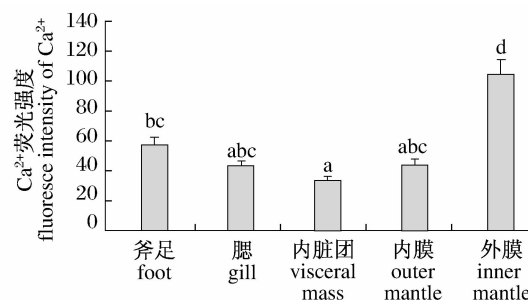


图 2 不同组织细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度分析

不同字母间表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity of cells from different tissues

Different letters mean significant difference,  $P < 0.05$ .

### 2.3 不同 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对外套膜外膜细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 荧光强度的影响

对外套膜外膜细胞  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度分析表明 (图 3), 育珠与非育珠三角帆蚌在相同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的孵育水平下, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度有增加的趋势, 但差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 不同  $\text{Ca}^{2+}$  孵育水平对细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度有显著影响 ( $P < 0.05$ )。随着  $\text{Ca}^{2+}$  在孵育液中浓度的升高, 外膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度显著增强 ( $P < 0.05$ ), 0.50 mmol/L 添加组与不添加  $\text{Ca}^{2+}$  的对照组间差异不显著, 而 0.50、1.25、3.00 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  添加组间细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度均存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 不同 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对外套膜内膜细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 荧光强度的影响

三角帆蚌外套膜内膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度分析如图 4 所示。与外套膜外膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度变化相似, 内膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的荧光强度也随着其细胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增大而呈现显著增大的趋

势( $P < 0.05$ )。其中,1.25 及 3.00 mmol/L 添加组胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度显著高于对照组,在育珠蚌中其与 0.50 mmol/L 添加组间差异显著( $P < 0.05$ ),而在非育珠蚌中其组间没有显著差异。此外,育珠蚌比非育珠蚌各个  $\text{Ca}^{2+}$  浓度组下细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度都有增高的趋势,在 1.25 mmol/L 添加组中,两组外套膜内膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度差异最大,达到显著水平( $P < 0.05$ )。

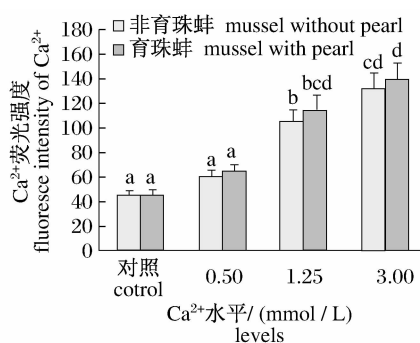


图3 不同  $\text{Ca}^{2+}$  水平对外套膜外膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度的影响

不同字母间表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  levels on  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity of outer cells from mantle tissue

Different letters mean significant difference,  $P < 0.05$ .

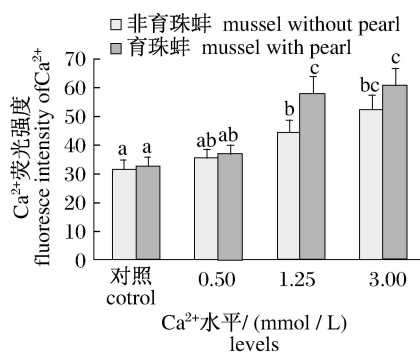


图4 不同  $\text{Ca}^{2+}$  水平对外套膜内膜细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度的影响

不同字母间表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  levels on  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity of inner cells from mantle tissue

Different letters mean significant difference,  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

贝壳和珍珠都是贝类进行钙代谢后最终以碳酸钙结晶形式沉积而成的<sup>[2]</sup>,故贝类  $\text{Ca}^{2+}$  代谢水平的研究是实现珍珠生长调控的基础。贝类育珠

生产过程中,钙的吸收和转运对于珍珠的产量和质量提高起着重要作用,加快钙到珍珠质的沉积过程,是促进珍珠快速生长的重要手段。

目前,激光共聚焦图像系统结合新一代荧光染料的使用,已广泛应用于精确分析活细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的动态变化。脂溶性钙荧光指示剂 Flou-3/AM 是一种单波长的发光基团,可穿越细胞膜进入细胞内,被活细胞内的非特异性酯酶水解后,与细胞内游离钙呈高度特异性结合,并在一定波长激发光激发后产生荧光,在无  $\text{Ca}^{2+}$  存在时基本不发光,细胞内荧光强度的改变可灵敏地反映细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化(与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度成正比),因而可精密观察分析细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的动态变化<sup>[16-17]</sup>。迄今为止,国内外运用激光共聚焦图像系统研究水生生物的报道不多,对淡水蚌类外套膜细胞的研究还未见报道,主要原因是蚌类外套膜细胞培养及细胞系的建立还没有一个成熟的方法,在细胞水平研究外套膜的生理学现象难度很大;另一方面细胞在测定过程中容易发生位移,使测定结果不稳定。本研究选择三角帆蚌组织细胞作为对象,采用细胞短时培养和粘附法,摸索出其测定的相关技术和注意事项,能为今后该领域的研究提供有用的技术支撑。

淡水贝类养殖环境水中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度很低,直接从环境中吸收是  $\text{Ca}^{2+}$  进入贝体的重要途径,而外套膜、斧足、腮等与环境水接触的贝体各组织器官对钙的吸收和转运能力决定着  $\text{Ca}^{2+}$  在贝体内的囤积<sup>[2]</sup>。本研究表明,外套膜组织细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度最高,其次是斧足,这与唐敏等<sup>[10]</sup> 育珠蚌养殖水体  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,提高了蚌体整体  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度,并且外套膜组织  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度最高的研究相符,暗示了外套膜组织在从外界吸收和转运  $\text{Ca}^{2+}$  上承担着重要作用。生理学研究表明,淡水贝类的外套膜对钙具有高度通透性<sup>[18-20]</sup>,NEFF<sup>[5]</sup> 研究表明贝类外套膜上存在细胞间可溶性钙通道,BEIRAO 等<sup>[6]</sup> 采用电刺激贝类外套膜表皮细胞,观察到了心肌样动作电位,也证明外表皮细胞膜上钙通道的存在,  $\text{Ca}^{2+}$  就是通过这些钙通道进入到组织内部,为外套膜  $\text{Ca}^{2+}$  代谢提供了生物学基础。此外,对三角帆蚌和椭圆背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 外套膜的超微结构研究发现,外套膜的内、外表皮都具有分泌和吸收功能,并且表皮间的结缔组织也参与贝壳、珍珠或其前

体物的合成<sup>[8]</sup>,外套膜上皮细胞具有通过细胞膜主动吸收  $\text{Ca}^{2+}$  和贮存  $\text{Ca}^{2+}$  的功能,并通过胞吐作用排出钙至外套膜外腔中<sup>[7]</sup>,而这些钙就是用来形成珍珠的基础。

环境钙浓度是影响育珠蚌钙代谢的主要原因之一<sup>[21-22]</sup>。本研究结果表明,环境中钙浓度对外套膜细胞的钙吸收有影响,这一结果与唐敏等<sup>[10]</sup>在活体研究结果一致,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。水体环境  $\text{Ca}^{2+}$  升高,一方面增加了外套膜组织  $\text{Ca}^{2+}$  浓度<sup>[23]</sup>,另一方面能显著抑制蚌体内有害微生物数量<sup>[11-12]</sup>,由此可见,提高水域中的钙容量既可以降低育珠母蚌致病性,又可以促进三角帆蚌的生长速度和珍珠质的沉积速度。需要指出的是,本研究表明 1.25 ~ 3.00 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度有利于促进三角帆蚌珍珠质沉积,这与钱伟平等<sup>[25]</sup>研究结果基本一致,然而过高的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对珍珠产业也是不利的,过高的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度则可抑制三角帆蚌细胞对钙的吸收和贮藏<sup>[26]</sup>。

采用非损伤微电极技术测定不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度下外套膜内、外膜组织外  $\text{Ca}^{2+}$  流量和流速的研究发现,外套膜内、外膜组织外  $\text{Ca}^{2+}$  存在震荡式内流(吸收)和外排(分泌),1.25 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  水平下,内膜组织外  $\text{Ca}^{2+}$  流动速率显著大于外膜,对  $\text{Ca}^{2+}$  表现出很强的敏感性, $\text{Ca}^{2+}$  流动方向为从水体流向内膜组织内,而外膜表现出  $\text{Ca}^{2+}$  少量外排,暗示了内膜组织对  $\text{Ca}^{2+}$  的吸收能力远远大于外膜。然而,本研究表明外套膜内外表皮细胞在  $\text{Ca}^{2+}$  的囤积上存在很大差异,外膜细胞显著高于内膜细胞 ( $P < 0.05$ ),这暗示了外套膜外膜细胞是机体  $\text{Ca}^{2+}$  贮存的主要组织,而内膜作为与水体直接接触的组织主要承担着  $\text{Ca}^{2+}$  吸收和转运功能,将吸收的  $\text{Ca}^{2+}$  转运到外套膜外膜组织细胞内。此外,对育珠与非育珠的三角帆蚌研究表明,三角帆蚌的育珠行为明显增加了  $\text{Ca}^{2+}$  在外套膜细胞内的沉积,推测育珠可能加快了河蚌对  $\text{Ca}^{2+}$  的吸收和转运,而促进贝壳之外的另一种矿化物质即珍珠的形成。

#### 参考文献:

- [ 1 ] ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, 4 (7): 552 - 565.
- [ 2 ] 刘士力,李家乐,张根芳. 三角帆蚌稚蚌形态发育与生长特性 [J]. 水产学报, 2009, 33 (4): 604 - 609.
- [ 3 ] GONG N, LI Q, HUANG J, et al. Culture of outer epithelial cells from mantle tissue to study shell matrix protein secretion for biomineralization [J]. Cell Tissue Res, 2008, 333 (3): 493 - 501.
- [ 4 ] KOBAYASHI I, SAMATA T. Bivalve shell structure and organic matrix [J]. Materials Sci and Engineering C, 2006, 26 (4): 692 - 698.
- [ 5 ] NEFF J M. Ultrastructure of the outer epithelium of the mantle in the clam *Mercenaria mercenaria* in relation to calcification of the shell [J]. Tissue Cell, 1972, 4 (4): 591 - 600.
- [ 6 ] BEIRAO P S, NASCIMENTO J H M. Sodium- and calcium-dependent mechanisms in the action potential of the secretary epithelium of a clam mantle [J]. Journal of Experimental Biology, 1989, 145 (3): 395 - 402.
- [ 7 ] 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 [J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29 (7): 483 - 488.
- [ 8 ] 石安静,吴宗文. 三种淡水育珠河蚌外套膜酶的组织化学研究 [J]. 水产科学, 1994, 4 (2): 1 - 6.
- [ 9 ] 李静,石安静,莫尚武,等.  $^{45}\text{Ca}$  在圆背角无齿蚌体内的代谢与分布 [J]. 水生生物学报, 2003, 27 (2): 188 - 191.
- [ 10 ] 唐敏,石安静. 圆背角无齿蚌离体培养的外套膜组织钙代谢 [J]. 水生生物学报, 2000, 24 (1): 86 - 89.
- [ 11 ] 申玉田,朱静. 蚌壳的层次结构与生物矿化机制 [J]. 电子显微学报, 2005, 24 (4): 398 - 398.
- [ 12 ] 张根芳,吴信忠,李家乐. 三角帆蚌病害及防治技术研究进展 [J]. 上海水产大学学报, 2005, 14 (3): 313 - 318.
- [ 13 ] ZHANG T, CAO E H, LI J F. A laser scanning confocal microscopy method. Simultaneous detection of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and apoptosis using Fluo-3 and Hoechst 33342 [J]. Anal Quant Cytol Histol, 2000, 22 (2): 93 - 97.
- [ 14 ] 洪方晓,岳红丽,田鸣,等. 丙泊酚对肺动脉平滑肌细胞跨膜钙离子移动影响的实验研究 [J]. 北京医学, 2008, 30 (8): 537 - 539.
- [ 15 ] SAS Institute. SAS User's Guide: Statistics, Version 8.1 [M]. Cary: SAS Institute Inc, 2000.
- [ 16 ] HIDEAKI L, HIROSHI O, MASATOSHI H, et al. Calcium movements, distribution and functions in the smooth muscle [J]. Pharmacol Rev, 1997, 49 (2):

- 157 - 230.
- [17] 王海燕,何韶衡,林珏龙. 激光扫描共聚焦显微镜观察胰蛋白酶对肺上皮细胞游离钙离子的影响[J]. 激光生物学报,2005,14(5):377 - 379.
- [18] KIRSCHNER L B, SORENSEN A L, KRIEBEL M. Calcium and electric potential across the clam mantle [J]. Science, 1960, 131(3402):735.
- [19] KIRSCHNER L B. Transepithelial electrical phenomena in the molluscan mantle [J]. J Gen Physiol, 1962, 46(1A):362 - 363.
- [20] ISTIN M, KIRSHNER L B. On the origin of the bioelectrical potential generated by the fresh water clam mantle [J]. J Gen Physiol, 1968, 51(4):478 - 496.
- [21] 张群. 生物钙化作用[J]. 安庆师范学院学报, 2002, 8(2):49 - 51.
- [22] 钱伟平,林国星,许梓荣.  $\text{Ca}^{2+}$  在三角帆蚌体内沉积效应的研究[J]. 水利渔业,2005,25(1):6 - 8.
- [23] 钱伟平,茹一宁. 不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  对三角帆蚌养殖水体微生物和浮游生物的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(26):8249 - 8250, 8253.
- [24] 肖调义,葛熹凯,许宝红,等. 三角帆蚌肝脏瘟病感染期抑制性削减 cDNA 文库的构建与分析[J]. 水产学报,2009,33(5):856 - 864.
- [25] 钱伟平,裘圆圆. 不同  $\text{Ca}^{2+}$  水平对三角帆蚌养殖水体藻类和细菌总量控制的研究[J]. 绍兴文理学院学报,2006,26(7):32 - 35.
- [26] 陈永富,钱国英. 培养条件对三角帆蚌外套膜离体上皮组织珍珠质分泌能力的影响[J]. 分子细胞生物学报,2009,42(3):249 - 253.

## Study of $\text{Ca}^{2+}$ deposition and distribution in cells from different tissues with laser scanning confocal microscopy in *Hyriopsis cumingii*

LI Wen-juan<sup>1</sup>, SHI Zhi-yi<sup>1,2\*</sup>, HAO Ying-ying<sup>1</sup>, YE Xian-feng<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystems, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Agriculture Committee of Fanchang of Wuhu, Fanchang 241200, China)

**Abstract:** The  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism is one of vital factors relative to growth of shell and pearl in freshwater mussel. In order to probe the  $\text{Ca}^{2+}$  absorption and transportation in freshwater shellfish,  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of cells (under resting state) from different tissues and effect of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of culture medium on  $\text{Ca}^{2+}$  deposits within the cells from outer mantle were researched by technology of laser scanning confocal microscopy in *Hyriopsis cumingii*. The total of healthy 10 *H. cumingii* with pearl and without pearl were selected, and then the cells from their mantle, gill, foot and epidermis of visceral mass were isolated. After short-term culture, the cells were incubated using DMEM with different  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (0, 0.5, 1.25, 3 mmol/L) and fluorescence probe of Fluo-3/AM for 1 h. The green fluorescence intensity was acquired to analyze the  $\text{Ca}^{2+}$  levels in these cells. The results showed that there were significant differences among intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescent intensity of 5 kinds of cells ( $P < 0.05$ ): intracellular calcium ions fluorescent intensity of the outer mantle cells was highest ( $P < 0.05$ ), while intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescent intensity of visceral mass epidermal cells was the lowest ( $P < 0.05$ ). The intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity of mantle cells in mussel with pearl mussel had increasing trends compared to that in mussels without pearl under the same  $\text{Ca}^{2+}$  level, and the difference was significant between the two groups of inner mantle with 1.25 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  level ( $P < 0.05$ ). Influence of different  $\text{Ca}^{2+}$  incubation levels on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity were significant ( $P < 0.05$ ). With increasing  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in incubating medium, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  fluorescence intensity of mantle cells was significantly enhanced ( $P < 0.05$ ). The present research indicated that mantle was main tissue on absorbing  $\text{Ca}^{2+}$  from external water; pearl cultivation strengthened calcium deposition in body of *H. cumingii*; calcium ion concentration of 1.25 – 3 mmol/L in water was beneficial to  $\text{Ca}^{2+}$  deposition in mussel. Our research provided theory basis for pearl cultivation in fresh-water mussels.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; cell culture; laser confocal technology;  $\text{Ca}^{2+}$  deposition

**Corresponding author:** SHI Zhi-yi. E-mail: zyshi@shou.edu.cn