

文章编号: 1674-5566(2011)05-0705-07

三角帆蚌外套膜细胞培养的改进与大型有核珍珠的培育研究

靳雨丽¹, 施志仪^{1,2}, 李文娟¹, 郝莹莹¹, 强刚³

(1. 上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室, 上海 201306; 2. 上海市高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306; 3. 安徽省芜湖市繁昌县农委, 安徽 芜湖 241200)

摘要: 为得到大颗粒优质的淡水有核珍珠, 进行了游离细胞植入法在三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 内脏团插核育珠的研究。实验采用两种培养基 (培养基 1、2) 进行外套膜外膜细胞的培养, 对不同培养时间 (2、4、6、12 h) 的细胞活力进行检测, 同时将处理过的珠核分别置于两组细胞悬液中共培养, 6 h 后采用内脏团插核手术, 对 500 只三角帆蚌进行插核, 并进行为期 5 个月的淡水有核珍珠生产实验。实验结果表明: 细胞活力随培养时间逐渐增大, 培养到 6、12 h 时, 两种培养基中的细胞活力较 2、4 h 时均有显著提高 ($P < 0.05$), 6 h 与 12 h 相比差异不显著 ($P > 0.05$); 细胞在两种培养基中分别培养, 在培养 2 h 时两组间细胞活力没有显著差异 ($P > 0.05$), 而在培养 4、6、12 h 时培养基 2 组的细胞活力显著高于培养基 1 组 ($P < 0.05$); 培养基 2 组培养的细胞孵育珠核 6 h 后, 贴附的细胞数量明显增多且分布均匀, 插核 5 个月后, 形成了包裹完整、具有光泽、沉积 0.8 mm 珍珠质的大型珍珠, 而采用培养基 1 组培养的外套膜细胞进行珠核孵育而后插核, 得到的素珠较多, 且没有形成完整珍珠质包被的珍珠。实验表明改进后的培养基有利于三角帆蚌外套膜细胞培养, 从而有利于内脏团有核珍珠的培育, 这为进一步开展淡水贝类细胞培养的研究提供了实践基础, 为大型有核珍珠的培育提供了依据。

研究亮点: 本文对体外培养三角帆蚌外套膜细胞的培养基进行改进, 添加牛磺酸、 Ca^{2+} 等适宜细胞生长以及珍珠质沉积的成分, 促进了细胞的生长。利用改进后的游离细胞悬液与珠核共培养, 并进行内脏团插核手术, 5 个月得到了包被完整、具有光泽、沉积 0.8 mm 珍珠质的大型有核珍珠。

关键词: 三角帆蚌; 细胞培养; 内脏团插核; 有核珍珠

中图分类号: S 968.31

文献标志码: A

随着现代珍珠养殖技术迅猛发展, 大量的小型珍珠已经不能满足市场的需求^[1], 8 mm 以上、光泽度好的正圆珍珠在国内外市场倍受关注, 人们逐渐将目光转向大型和优质珍珠培育的研究^[2-3]。

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 是我国主要淡水育珠蚌之一。目前国内有关淡水有核珍珠的培育主要是在外套膜中进行。由于外套膜比较薄, 容易插破, 不适宜插大核来培育大颗粒的珍珠; 相比之下内脏团分布空间很大, 且具有珍珠生物矿化所需的生化条件^[4], 利用内脏团插核培育大型珍珠成功的可能性很大。本文对传统的

三角帆蚌外套膜细胞培养方法^[5]进行了改进, 并将用两种方法培养的游离外套膜细胞处理之后的珠核, 插入三角帆蚌内脏团与斧足交界处, 进行了小规模生产育珠实验, 以期对三角帆蚌大型珍珠的插核培育技术推广提供基础性资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

选取体质健康、大小均一的 1 龄三角帆蚌用作细胞培养, 3 龄的三角帆蚌为内脏团插核之用, 实验蚌均由安徽省芜湖市繁昌县旺龙水产养殖基地提供。

收稿日期: 2011-04-08 修回日期: 2011-05-20

基金项目: 上海市科学技术委员会基础重大项目(06DJ14003); 上海市教育委员会重点学科建设项目(S30701)

作者简介: 靳雨丽(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生生物细胞生物学。E-mail: lulyling@163.com

通讯作者: 施志仪, E-mail: zyshi@shou.edu.cn

RPMI1640 培养基购自于 Hyclone; 胎牛血清、0.25% 胰酶、10 000 IU 双抗(青、链霉素)购自于 GIBCO; Ca^{2+} 、牛磺酸、抗坏血酸(ascorbic acid)、水解乳蛋白(lactalbumin hydrolysate)、制霉菌素购自于 SIGMA; Cell Counting Kit-8、多聚赖氨酸(分子量 > 150 000) 购自于江苏碧云天; 珠核(8 mm 直径) 购自于浙江省诸暨市。

1.2 外套膜上皮细胞培养条件的改进

清洗 1 龄小蚌后,用手术刀切断其前后闭壳肌,撕膜法分离出外套膜外表皮,将外表皮置于玻璃板上,用已消毒的刀片切除色线部分,余下部分置于 PBS 中,在无菌室超净工作台(SUKUN)中按如下顺序清洗:PBS→含 2% 双抗的 PBS→含 10% 双抗的 PBS→含 2% 双抗的 PBS→PBS→75% 乙醇→PBS,在乙醇中停留不超过 10 s,其余浸泡 10 min。将组织剪碎成 1 mm 小片,用 0.25% 胰酶消化液在 26℃ 消化 30~35 min,当组织碎片基本悬浮在胰酶中不再下沉时用 FBS 终止反应,离心取上清液,用 200 目绢网过滤去除残留的组织块,收集液体后低速离心,得到细胞沉淀。分别加入两种不同的完全培养基(表 1)得到相应的细胞悬液。改进后的培养基是在传统培养基的基础上添加牛磺酸、ascorbic acid、lactalbumin hydrolysate、 Ca^{2+} 等适宜细胞生长以及珍珠质沉积的成分。调整细胞浓度为 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7/\text{mL}$ 后,将两组细胞接种到 35 mm 培养皿中,置于 26℃ 生化培养箱中培养,用倒置显微镜(OLYMPUS)观察细胞短期的生长贴壁情况。

表 1 细胞培养基组成

Tab.1 The components of culture medium

	成分
培养基 1 组	79% RPMI 1640 + 15% 胎牛血清 + 5% 自制蚌血清 + 1% 双抗
培养基 2 组	79% RPMI 1640 + 15% 胎牛血清 + 5% 自制蚌血清 + 1% 双抗 + 128.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛磺酸 + 1.25 mmol/L Ca^{2+} + 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid + 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lactalbumin hydrolysate + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制霉菌素

1.3 细胞活性与贴壁效果的检测

采用台盼蓝染色法检测消化后的细胞状态。将细胞悬液放入 26℃ 生化培养箱中培养,分别在 2、4、6、12 h 时检测细胞活力,每个时间点重复 5 次,用空白培养基做对照,每孔加入 100 μL 培

养液,相应加入 Cell Counting Kit-8 检测试剂 10 μL ,放入培养箱中孵育 3 h,用酶标仪(KHB)在 450 nm 处采集信号,记录吸光值。

显微镜下采用五点取样法计算不同时间点贴壁的细胞数量,同时结合细胞计数法对细胞悬液中的游离细胞进行计数,细胞贴壁率表示为贴壁细胞占细胞总数的百分比。

1.4 珠核的预处理

将珠核多次洗涤后高压灭菌干燥,放入无菌室中,用 0.1% 多聚赖氨酸浸泡过夜,取出珠核在超净台中彻底干燥。将干燥后的珠核分别放入两种培养基培养的细胞悬液中,完全淹没珠核,26℃ 下孵育 6 h,使培养细胞贴附珠核表面。

1.5 内脏团插核手术

2010 年 5 月在安徽省芜湖市繁昌县旺龙水产养殖基地(水温 16~19℃),选取健康大小均一的 500 只 3 龄三角帆蚌进行内脏团插核手术,其中 250 只育珠蚌采用培养基 1 培育的珠核,另 250 只采用培养基 2 培育的珠核,分别进行插核,每只蚌植核 1 颗。

插核手术的器械经过严格消毒后,用通道针在内脏团与斧足交界处开口,并制造通道,深度为 2 cm,口径为 1 cm,将处理后的珠核移植到育珠蚌体内,之后用注射器吸取 0.5 mL 外套膜细胞悬液,注射到珠核周围。用浸泡在双抗中的一次性棉棒擦拭伤口,按压以促进伤口消炎愈合。

将插核手术处理后的育珠蚌在清水池中暂养 8 h 后吊养于育珠水域,为减少吐珠率,采用垂直吊养方法,吊养位置为水面下 25 cm 处,进行常规育珠养殖。

对育珠蚌进行编号,记录其壳生长(长、宽、高)、体重变化,同时对育珠蚌的固核情况、死亡情况以及珍珠囊的形成情况进行观察和记录。2010 年 10 月实验结束。

1.6 数据分析

所有统计数据采用 SAS 软件 GLM 程序的单因子方差分析,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,显著水平为 $P < 0.05$,极显著水平为 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 细胞培养与活力分析

消化后的细胞经台盼蓝染色后可观察到

90%以上存活。使用 Cell Counting Kit-8 检测得到细胞活力分析如图 1 所示,细胞活力随培养时间逐渐增大。对于培养基 1 来说,培养 2 h 和 4 h 的细胞活力增长不显著($P > 0.05$);6、12 h 的细胞活力与 2 h、4 h 相比均有显著提高($P < 0.05$);6 h 与 12 h 相比,细胞活力无显著差异($P > 0.05$)。对于培养基 2 来说,培养 4 h 比 2 h 的细胞活力增长显著($P < 0.05$);6、12 h 的细胞活力比 2 h 和 4 h 增长极显著($P < 0.01$);6 h 与 12 h 相比,细胞活力也无显著差异($P > 0.05$)。从对两组培养基的比较来看,培养 2 h 时,两组间的细胞活力差异不显著($P > 0.05$),培养到 4 h、6 h、12 h 时后,使用培养基 2 培养的细胞活力显著高于培养基 1 培养的细胞活力($P < 0.05$)。

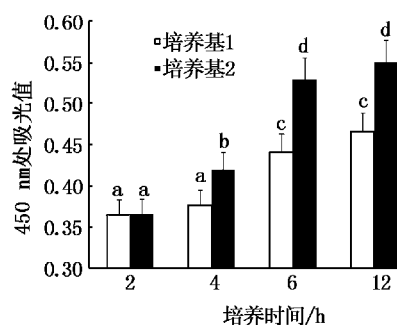


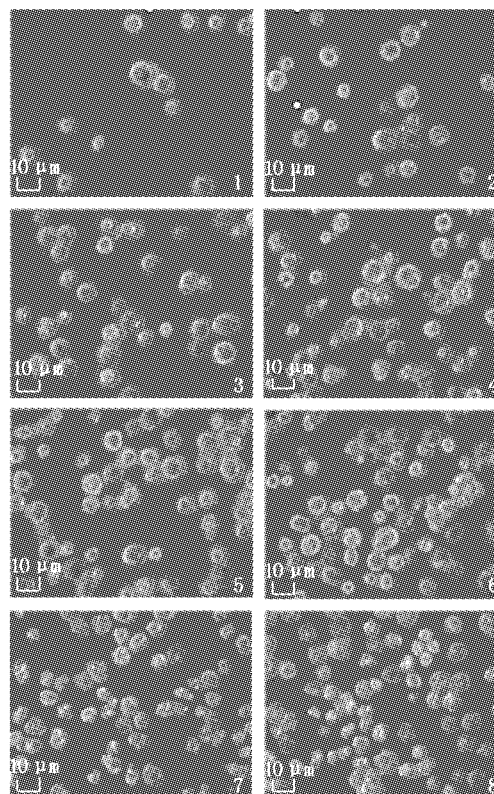
图 1 不同培养基对外套膜细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of the different culture mediums on mantle cell viability

不同字母间表示差异显著, $P < 0.05$; 相同字母间表示差异不显著, $P > 0.05$ 。

对两组培养基的细胞生长进行倒置显微镜下观察如图版所示,2 h 后,用培养基 2 培养的细胞,有 18.6% 的细胞呈上皮状贴附于培养皿底部,此时仍有大量细胞游离于培养液中,无论是已贴壁还是游离的细胞,都比较透明且表面光滑(图版-2)。4 h 后,贴壁的细胞达到 47.3% (图版-4)。6 h 后,细胞贴壁率达到 70.2%,细胞间开始加强接触(图版-6)。12 h 后,细胞贴壁率 70.9%,没有明显增加(图版-8)。

相比之下,用培养基 1 培养的细胞贴壁数量较少,贴附速度也较慢。2 h 后,仅有 9.7% 的细胞贴壁于培养皿底部,大量的细胞仍游离于培养液中,细胞呈圆形透明状(图版-1)。4 h 后,贴壁细胞仅达到 32.5% (图版-3)。6 h 后,细胞的贴壁数量有所增加为 46.1% (图版-5)。12 h 后,细胞贴壁率达到 49.3% (图版-7)。



图版 外套膜细胞培养的显微观测

Plate The microscopic observation of mantle cells

1. 培养基 1 培养 2 h 的细胞显微观察; 2. 培养基 2 培养 2 h 的细胞显微观察; 3. 培养基 1 培养 4 h 的细胞显微观察; 4. 培养基 2 培养 4 h 的细胞显微观察; 5. 培养基 1 培养 6 h 的细胞显微观察; 6. 培养基 2 培养 6 h 的细胞显微观察; 7. 培养基 1 培养 12 h 的细胞显微观察; 8. 培养基 2 培养 12 h 的细胞显微观察。

2.2 不同培养基对珠核培养效果差异分析

图 2 为培养基 1 培养得到的外套膜细胞悬液孵育珠核 6 h 后的显微图,箭头所指示的为贴附于珠核的细胞。

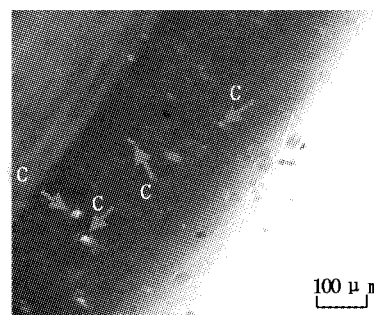


图 2 珠核与外套膜细胞 1 的共培养

Fig. 2 Co-culture of pearl-nucleus and mantle cells from culture medium 1

“C”为外套膜细胞。

图3为培养基2培养得到的外套膜细胞悬液孵育珠核6h后的显微图,箭头所指示的为贴附于珠核的细胞,可以看到细胞数量明显增多,且贴附的细胞分布均匀。

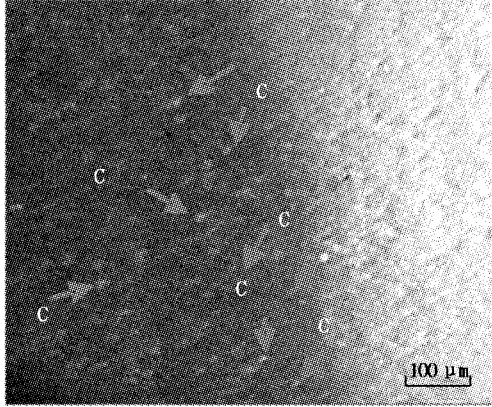


图3 珠核与外套膜细胞2的共培养

Fig.3 Co-culture of pearl-nucleus and mantle cells from culture medium 2

“C”为外套膜细胞。

2.3 育珠蚌的生长与育珠分析

实验采用内脏团插核手术对500只三角帆蚌进行插核。插核蚌在术后15d之内伤口缓慢愈合,并在手术1个月内,育珠蚌出现死亡高峰,死亡率达到8%。表2为两组在插核前后蚌体生长及成珠情况,可以看到两组壳长、壳宽、壳高及

体重变化一致:在插核后1个月内增长不显著,3、5个月后壳长、壳高及体重有明显增长,其中体重增长最明显,最终增长率达到26.5%,表明蚌体生长状态良好。

5个月后的统计数据表明,培养基2组所培育的珍珠所得素珠率(5.6%)显著低于培养基1组(19%, $P < 0.05$),在育珠蚌的生长、污珠率和珍珠质沉积上,两组间没有显著差异。

图4为本实验通过游离细胞培养珠核后插核5个月内得到的珍珠质沉积状态。每隔一个月每组分别解剖2~3只蚌,第5个月全部取珠,观察珍珠质沉积情况。从图中可以看出,插核后1个月,珠核表面颜色略微变黄,但无明显珍珠质沉积;插核后2个月,珠核表面出现沙点状矿物质沉积,没有完全包被珠核,也无珍珠光泽;插核后3个月沙点状沉积均匀布满珠核,出现珍珠光泽,但并不明显;插核后4个月,珠核表面矿物质明显沉积,厚度约为0.4mm,并呈现出珍珠光泽。插核5个月,珠核完全被珍珠质包被,珍珠光泽均匀,珍珠质厚度为0.8mm。培养基2组最终留核率为89.2%,其中污珠率占27.1%,培育出的大颗粒珍珠形状正圆,厚度均匀,光泽明亮。培养基1组最终留核率为81.7%,其中污珠占8.6%。

表2 两组培养基插核前后三角帆蚌生长状态及成珠情况比较

Tab.2 The comparison of growth status and pearl-forming after operation of pearl-nucleus in *Hyriopsis cumingii*

	培养基2组					培养基1组				
	长/cm	宽/cm	高/cm	体重/g	死亡率/%	长/cm	宽/cm	高/cm	体重/g	死亡率/%
插核前	16.62 ± 0.13 ^a	13.76 ± 0.12 ^a	3.82 ± 0.04 ^a	431.64 ± 10.91 ^a	-	16.37 ± 0.12 ^a	13.81 ± 0.12 ^a	3.81 ± 0.04 ^a	430.58 ± 10.81 ^a	-
术后1月	16.83 ± 0.13 ^a	13.89 ± 0.12 ^a	3.95 ± 0.04 ^a	448.40 ± 10.90 ^a	8.0	16.79 ± 0.12 ^a	13.92 ± 0.12 ^a	3.95 ± 0.04 ^a	447.76 ± 10.82 ^a	8.0
术后3月	17.25 ± 0.15 ^b	13.95 ± 0.13 ^a	4.21 ± 0.07 ^b	493.84 ± 12.55 ^b	5.4	17.12 ± 0.13 ^b	13.97 ± 0.13 ^a	4.22 ± 0.07 ^b	491.02 ± 12.14 ^b	5.4
术后5月	17.33 ± 0.14 ^b	14.11 ± 0.14 ^a	4.55 ± 0.06 ^c	546.79 ± 13.28 ^c	3.4	17.26 ± 0.13 ^b	14.13 ± 0.14 ^a	4.54 ± 0.06 ^c	544.43 ± 13.26 ^c	3.4
污珠率	27.1%					28.6%				
素珠率	5.6%					19%				
珍珠质沉积率	67.3%					52.4%				

注:上标不同字母间表示差异显著, $P < 0.05$; 相同字母间表示差异不显著, $P > 0.05$ 。

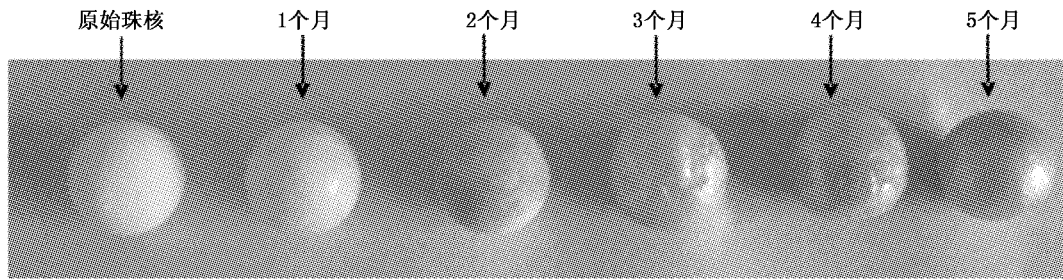


图4 三角帆蚌内脏团插核后珍珠质沉积状态

Fig. 4 The status of pearl after operating pearl nucleus in visceral mass of *Hyriopsis cumingii*

3 讨论

3.1 外套膜细胞培养条件的改进

珍珠贝外套膜外表皮的上皮细胞对珍珠的形成起着决定性的“内因”作用^[6],研究表明,体外培养的外套膜上皮细胞依然具有分泌珍珠质的能力^[5]。体外培养的珍珠贝类游离细胞主要是由组织块培养以及酶消化法这两种方法得到,组织块培养迁出的细胞速度慢,而酶消化法可以在短时间内获得大量游离细胞,但是贴壁性比较差。目前国内用酶消化法对三角帆蚌外套膜表皮细胞培养进行的研究较少,使用的完全培养基大多采用 RPMI1640(或 M199)加血清及抗生素配置而成^[5,7]。

本文借鉴马氏珠母贝外表皮细胞培养的方法^[8],对培养基的营养成分做了改进,考虑到海水珍珠蚌与淡水珍珠蚌所需的渗透压差异,参考文献[9-11],将 Ca^{2+} 浓度由 2.5 mmol/L 调整为 1.25 mmol/L。此外,牛磺酸是天然珍珠质有效成分之一,体外条件下在细胞培养基中加入一定的牛磺酸可以促进珍珠质的分泌^[12]。Ascorbic acid,是一种抗氧化剂,在生理条件下行使多种细胞保护功能^[13],在体外能诱导多种细胞的分化^[14-15]以及降低卵泡细胞的凋亡^[16-17]。lactalbumin hydrolysate,为乳白蛋白经蛋白酶和肽酶水解的产物,含有丰富的氨基酸,可以补充培养液中缺乏的氨基酸、小肽物质,更好地促进细胞生长。贝类的外套膜细胞一般很难在体外长时间存活,表现出增殖能力较弱^[18],而且微生物污染比较严重。本文对三角帆蚌外套膜细胞进行了短期培养,通过添加以上营养物质,并且采用青霉素、链霉素和制霉菌素联用,避免了微生物污染。研究表明,改进后的细胞培养方

案,能在短时间内明显提高细胞贴壁率以及细胞活力,因此用细胞悬液孵育珠核时,有利于细胞包被珠核,从而保证了优质珍珠的培育。

3.2 大型有核珍珠的培育

目前国内关于淡水珍珠贝类内脏团培育圆形有核珍珠的研究文献相对较少。20世纪70年代,刘鹏智^[19]曾利用三角帆蚌和褶纹冠蚌内脏团插核培育珍珠,但插核蚌未成活。江苏省吴县水产科学研究所^[20]也曾三角帆蚌和褶纹冠蚌的唇瓣下面内脏团插入大核,但留核率极低,大多为素珠或脱核。李庆乐^[21]多次在三角帆蚌的足部、内脏团部植核均未成功,植核蚌死亡率很高。黄惟灏等^[22]采用大核包裹细胞小片植入三角帆蚌内脏团进行大规模养殖,两年后留核率高达94%,成珠率为86%,但中高档珠仅占37.2%。小片植入法培育内脏团有核珍珠所需的时间长,植入的小片可能会脱落形成无核珠和素珠,在培育过程易形成尾巴珠等不规则的现象,大大降低了形成中高档珠的比例。本实验突破传统工艺,采用游离细胞植入法,将经过多聚赖氨酸处理后的珠核与三角帆蚌外套膜外表皮细胞在体外共培养,插入内脏团中培育,5个月后得到了包被完整、具有光泽、沉积0.8 mm珍珠质的大型珍珠,弥补了小片育珠技术的不足,在三角帆蚌内脏团培育出高品质的大颗粒正圆珍珠,并可大大缩短育珠时间。

有关淡水珍珠蚌内脏团培育得到素珠的原因,有研究认为这与将外套膜分离后,切取壳侧面上皮细胞,移植后容易被消化掉,不能形成珍珠囊有关^[23]。而黄惟灏等^[22]采用小片贴珠实验证明:淡水蚌内脏团植核后脱核或核片分离后的细胞小片仍可形成珍珠囊,产生无核珍珠,把不成珠原因归结为外套膜壳侧面上皮细胞小片移

植后易被消化掉,不形成珍珠囊的推测缺乏相关的证据。本实验通过插入游离细胞孵育的珠核,发现仍然有素珠的产生,认为原因可能是受插核工艺的影响,手术切口过小等,造成贴附珠核细胞在插核过程中大量损失。因此,内脏团插核工艺的改进是避免素珠产生的关键因素之一。然而,与前人研究相比,我们采用改进后的培养基培养细胞,贴附于珠核的细胞数量明显增多,明显地降低了素珠的产生。

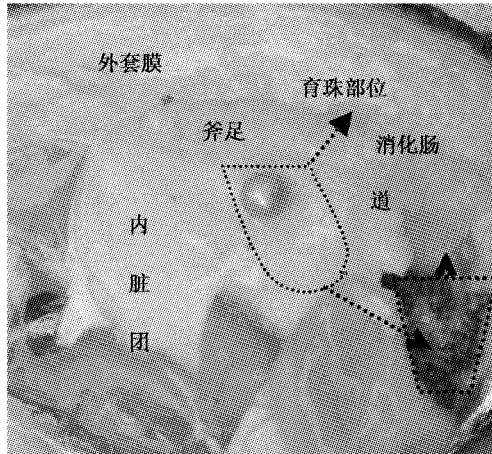


图5 本实验形成的珍珠以及插核示意图
Fig. 5 Pearl forming by 5-month cultivation and sketch of inserting position

为了提高留珠率,本实验在内脏团插核手术结束后对育珠蚌采用了垂直吊养的方式,插核两个月后解剖珍珠蚌并没有发现珠核移位(未产生污珠),而5个月时发现在留珠率提高到89.2%的同时,污珠的数量达到了近20%。污珠颜色较黑较暗,且没有珍珠光泽。将污珠剖开后,在珠核表面发现珍珠质的沉积,但后期核位的改变使珠核落入消化系统,珍珠质停止沉积。由于内脏团组织内部较为柔软,长期垂直吊养很容易使珠核在重力作用下滑落,到达消化肠道及围心腔(图5),从而产生污珠。为解决这一现象,本研究认为在养殖的过程中应采取吊养和平养轮换方式进行。

本实验经过为期5个月的养殖,得到了比较理想的大颗粒正圆珍珠,外套膜游离细胞法与内脏团插核结合这样的方式在淡水有核育珠领域初见成效,然而插核工艺以及术后的养殖管理有待改善,以期提高中高档珍珠的数量,完成淡水珍珠产业由量到质的转变。

参考文献:

- [1] 张根芳,方爱萍. 21世纪中国淡水珍珠产业的发展态势[J]. 金华职业技术学院学报, 2003, 3(4): 24-29.
- [2] 张根芳. 河蚌育珠学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 70-86.
- [3] 罗玉敏,魏开建,胡莲. 三角帆蚌培育淡水珍珠的研究现状[J]. 水利渔业, 2007, 27(1): 33-35.
- [4] 施志仪,谢先中,何秀娟. 三角帆蚌内脏团珍珠培育部位的生物性状研究[J]. 生物技术通报, 2008(3): 178-182.
- [5] 施志仪,李巍,李松荣. 三角帆蚌外套膜细胞培养与组织培养的比较[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(1): 27-30.
- [6] 林湧. 珍珠成因学说辨析及对海水珍珠养殖业的思考[J]. 广西中医药, 2008, 31(5): 52-54.
- [7] 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.
- [8] 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 and Tissue Research, 2008, 333(3): 493-501.
- [9] 李文娟,施志仪,郝莹莹,等. 应用激光共聚焦显微技术研究 Ca^{2+} 在三角帆蚌组织内的积累与分布[J]. 水产学报, 2011, 35(1): 109-114.
- [10] 钱伟平,林国星,许梓荣. 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, 31.
- [11] 邵晓阳,黄惟灏,林景雄,等. 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(3): 483-488.
- [12] 龚由彬,石安静,刘绍龙,等. 背角无齿蚌组织培养细胞分泌的珍珠质的药理作用研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 1992, 29(1): 134-138.
- [13] ROSSETTO R, LIMA-VERDE I B, MATOS M H, et al. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles [J]. Domest Anim Endocrin, 2009, 37(2): 112-123.
- [14] 陈永珍,朱旻,李芳,等. 抗坏血酸体外诱导人胚胎生殖细胞向心肌细胞分化[J]. 江苏医药, 2010, 36(13): 1551-1554.
- [15] 陈梅玲,沈岳飞,罗彦妮,等. 抗坏血酸联合胶质细胞源性神经营养因子诱导神经干细胞向多巴胺能神经元分化的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2009, 26(5): 523-526.
- [16] THOMAS F H, LEASK R, SRSEN V, et al. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture [J]. Reproduction, 2001, 122(3): 487-495.
- [17] MURRAY A A, MOLINEK M D, BAKER S J, et al. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in

- intact mouse ovarian follicles in vitro [J]. *Reproduction*, 2001, 121(1): 89-96.
- [18] 刘万磊. 水生无脊椎动物细胞培养[J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28(2): 173-178.
- [19] 刘鹏智. 淡水养殖有核珍珠[J]. *动物学杂志*, 1974, 9(1): 14-16.
- [20] 江苏省吴县水产科学研究所. 淡水有核珍珠初步试养成功[J]. *动物学杂志*, 1977, 12(3): 9, 17.
- [21] 李庆乐. 关于提高细胞片活力和三角帆蚌外套膜不同部位培育有核珍珠的对比试验[J]. *广西农业科学*, 1990, 21(3): 46-48.
- [22] 黄惟灏, 沈智华, 童建民, 等. 三角帆蚌内脏团培育圆形有核珍珠的试验[J]. *淡水渔业*, 2009, 39(4): 72-74.
- [23] 谢忠明, 张元培, 邹乐道, 等. *人工育珠技术*[M]. 北京: 金盾出版社, 2004: 40-47, 116-117.

Improvement on mantle cell culture and technique for large nucleated pearl producing in *Hyriopsis cumingii*

JIN Yu-li¹, SHI Zhi-yi^{1,2}, LI Wen-juan¹, HAO Ying-ying¹, QIANG Gang³

(1. Key laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China; 2. Aquaculture Division, E-Institute of Shanghai Universities, Shanghai 201306, China; 3. Agriculture Committee of Fanchang of Wuhu, Wuhu 241200, Anhui, China)

Abstract: In order to obtain large and high quality pearls, the methods of the pearl culture in visceral mass combined with inserting large pearl-nucleus co-cultured by dissociating mantle cell were studied. The mantle cell was cultured by two different culture mediums that were named medium 1 and medium 2. The cell viability was detected at the different time points (2, 4, 6 and 12 h) during the process of culture. Then large pearl-nucleus was co-cultured by the two different dissociating cell groups. 500 *Hyriopsis cumingii*, divided into two groups, were separately inserted with the two kinds of co-cultured pearl-nucleus in their visceral mass. The results showed that the cell viability significantly increased with the cultured time in both culture mediums. The cell viabilities at 6 h and 12 h were both obviously higher than those at 4 h and 2 h ($P < 0.05$), the difference of the cell viability was insignificant between the groups of 6 h and 12 h ($P > 0.05$). As for the two different culture mediums, the difference of the cell viability at 2 h was insignificant ($P > 0.05$). While, at 4 h, 6 h and 12 h, the cell viability of medium 2 was apparently higher than that of medium 1 ($P < 0.05$). The pearl-nucleus co-cultured by the medium 2 was attached with more cells than that by medium 1. After 5-month cultivation, large and glossy pearl with 0.8 mm nacrum was obtained in the group of medium 2. However, the rate of pearl-nucleus without nacrum in the group of medium 1 was much higher than that in the group of medium 2. The research indicated that the improved culture medium was more beneficial to the mantle cell culture and the nucleated pearl culture in visceral mass of *Hyriopsis cumingii*, which provides practical basis for the mantle cell culture and theoretical foundation for the large nucleated pearl culture in freshwater mussels.

Key words: *Hyriopsis cumingii*; cell culture; pearl culture in visceral mass; nucleated pearl