

文章编号: 1674-5566(2023)03-0553-11

DOI:10.12024/jsou.20220103705

长牡蛎与海豆芽外套膜细胞超微结构的比较观察

牟 伧^{1,2,3,4}, 陈雅茹^{1,2,3,4}, 产久林^{1,2,3}, 张琳琳^{1,2,3,4}

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266071; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要: 以软体动物中贝壳成分为碳酸钙的长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和腕足动物中贝壳成分为磷酸钙的鸭嘴海豆芽(*Lingula anatina*)为研究对象,借助组织学和透射电镜方法,分别对两个物种外套膜边缘区域和中央区域的细胞进行超微结构观察,发现长牡蛎和鸭嘴海豆芽外套膜中的细胞类型均包含柱状表皮细胞、电子稠密粒细胞和电子透明粒细胞,但是两个物种的柱状表皮细胞类型以及分泌细胞的内含物各不相同。长牡蛎柱状表皮细胞包括 3 类,主要分布在外套膜边缘区域的 A 型、主要分布在外套膜中央区域的 B 型以及很少存在的 C 型,细胞大小为 7~15 μm。海豆芽柱状表皮细胞则分为 A'型、B'型和 C'型,细胞大小为 10~15 μm。两个物种的分泌细胞都包含电子稠密粒细胞和电子透明粒细胞,海豆芽还包括一类含有板层小体的特殊分泌细胞。上述结果在一定程度上可以解释两者贝壳组成成分的差异,从而为研究腕足动物和软体动物贝壳的形成机制和矿化作用提供借鉴。

关键词: 长牡蛎; 海豆芽; 外套膜; 细胞超微结构; 透射电镜

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

贝壳是贝类生物最显著的特征,为贝类生物的内部器官提供保护和支撑,是贝类生物能够在漫长的进化历程中保持长盛不衰的物理屏障和防御手段^[1-2]。碳酸盐钙化矿物质广泛存在于甲壳类的角质层(Periostracum)^[3-5]、珊瑚骨架^[6]、软体动物贝壳^[7]和海胆骨针^[8]等中。然而,前期在对腕足动物的研究^[9-10]中发现,鸭嘴海豆芽(*Lingula anatina*)的外壳则主要由磷酸钙和胶原纤维组成,这种特异性磷酸钙质外壳多在脊椎动物骨骼中存在,目前被认为是和贝类碳酸钙质壳趋同演化而来。

外套膜是贝壳形成过程中最为关键的组织,在壳形成方面起到重要作用^[2,11-13],已有研究^[13-18]表明外套膜的不同区域在贝壳形成过程中可能对应着不同的生物学功能。此外,对于不同的贝类物种,其外套膜的结构也存在较大的差异,例如双壳纲物种一般将外套膜划分为边缘膜

区、套膜区和中央膜区 3 个区域,其中边缘膜区的 3 个褶皱各具不同功能,而腹足纲物种的边缘膜区则仅具有 2 个褶皱^[11,19]。除了对外套膜结构的研究以外,前期关于贝类外套膜超微结构的研究,同样揭示了外套膜组织中不同的细胞组成类型也在贝壳形成过程中发挥着不同的生物学功能,然而目前相关的研究^[14,20]主要集中在马氏珠母贝(*Pinctada martensi*)中。

虽然鸭嘴海豆芽和长牡蛎(*Crassostrea gigas*)在贝壳成分组成上存在显著差异,但它们的贝壳形成过程均被证明与外套膜组织密切相关,由外套膜上的细胞分泌形成^[9,11-12]。此外,基于长牡蛎和鸭嘴海豆芽基因组的注释结果,研究^[1,12]发现在两个物种中均有大量负责细胞外基质分泌的基因在外套膜中特异表达。然而,与碳酸钙质壳的长牡蛎相比,目前关于鸭嘴海豆芽外套膜及其细胞类型的研究相对较少,已有研究^[21]只将其

收稿日期: 2022-01-31 修回日期: 2022-03-24

基金项目: 国家自然科学基金(41976088); 中国科学院 B 类战略先导科技专项(XDB42000000); 中国科学院海洋大科学研究中心重点部署项目(COMS2019R01)

作者简介: 牟 伧(1996—),女,硕士研究生,研究方向为海洋生物进化与环境适应。E-mail: Muk1127@163.com

通信作者: 张琳琳, E-mail: linlinzhang@qdio.ac.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

外套膜结构进行简单地划分为外上皮 (Outer mantle epithelium, OME) 和内上皮 (Inner mantle epithelium, IME), 而对于其外套膜的结构、具体细胞类型及功能均不明确。另外, 关于外套膜组织如何介导长牡蛎和鸭嘴海豆芽贝壳成分组成差异的研究鲜有报道。

软体动物和部分腕足动物中贝壳的矿物质成分截然不同, 软体动物通常以含有碳酸盐钙化矿物质的形式存在, 而在有些腕足动物类群中贝壳的矿物质成分为磷酸钙。针对趋同演化而来的碳酸钙质壳和磷酸钙质壳的形成机制尚不明确的现状, 本文选取碳酸钙质壳的代表种长牡蛎和磷酸钙质壳的代表种鸭嘴海豆芽为研究对象, 借助 H. E 染色和透射电镜观测, 对其外套膜的结构以及细胞类型进行划分, 比较长牡蛎和鸭嘴海豆芽中细胞类型及超微结构的差异, 初步探究二者壳成分产生差异的可能原因。

1 材料与方法

1.1 实验材料的采集

本实验所采用的长牡蛎均购自青岛市南山水产市场, 平均壳长为 (120 ± 10) mm, 海豆芽采集于日照市东港区刘家湾附近海域, 平均壳长为 (30 ± 5) mm。实验材料采集后, 在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 海水中暂养 2 周, 每天投喂 2 次饵料。然后, 选择个体完整、规格相近、有活力的健康个体作为后续的实验材料。

1.2 苏木精-伊红染色 (H. E 染色)

将 3 个长牡蛎和 3 个海豆芽分别用剪刀剪取外套膜边缘和中央位置的组织, 大小约 $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$, 每个位置的组织取 3 个重复, 用磷酸缓冲液清洗后, 置于 Davidson's 固定液中保存 12 h 后, 利用梯度乙醇 (85%、95%、100%) 进行脱水, 二甲苯透明后进行常规石蜡包埋, 使用莱卡切片机 (型号 RM2235) 对石蜡包埋样品进行切片, 厚度为 $5\text{ }\mu\text{m}$, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干后, 二甲苯脱蜡处理, 然后将样品利用梯度乙醇 (100%、95%、85%、70%、50%) 和蒸馏水进行复水。对复水后的样品依次放入苏木素染料、分化液、伊红染料进行染色, 乙醇梯度脱水后, 中性树脂封片。

1.3 透射电子显微镜观察

利用刀片在低温环境下分别切取长牡蛎和海豆芽外套膜边缘区和中央区各 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times$

1 mm 大小的样品, 设 3 个生物学重复, 放入 2.5% 戊二醛 (分析纯) 固定液中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜保存。固定好的样品送到青岛大学医学院实验中心进行常规透射电镜超薄切片制样和染色。切片厚度为 $70\text{ } \sim 80\text{ nm}$, 染色剂为铀盐。使用 JEM-1200EX 透射电子显微镜对样品进行观察, 加速电压为 80 kV 。

2 结果与分析

2.1 长牡蛎和海豆芽外套膜表皮细胞的组织学观察

长牡蛎和海豆芽外套膜结构的研究^[9]表明, 长牡蛎外套膜边缘膜区和中央区域的内外表皮均为单层柱状表皮细胞, 表面微绒毛自由发育, 内具分泌细胞, 为单细胞腺体^[15]; 而海豆芽外套膜的边缘区域和中央区域的柱状表皮细胞并非都为单层, 边缘区域靠近刚毛附近为多层细胞, 其他位置为单层。在此基础上进行 H. E 染色实验, 发现在外套膜的不同区域, 各类细胞的分布、形态和数量都会有一定的变化。结果显示在长牡蛎和海豆芽外套膜边缘区域和中央区域都由结缔组织、肌纤维、内表皮和外表皮组成 (图版 I-1, 2), 还分布一些分泌细胞, 包括不着色 (或略嗜碱性) 颗粒细胞和嗜伊红 (酸性) 粒细胞 (图版 I-3, 4)。

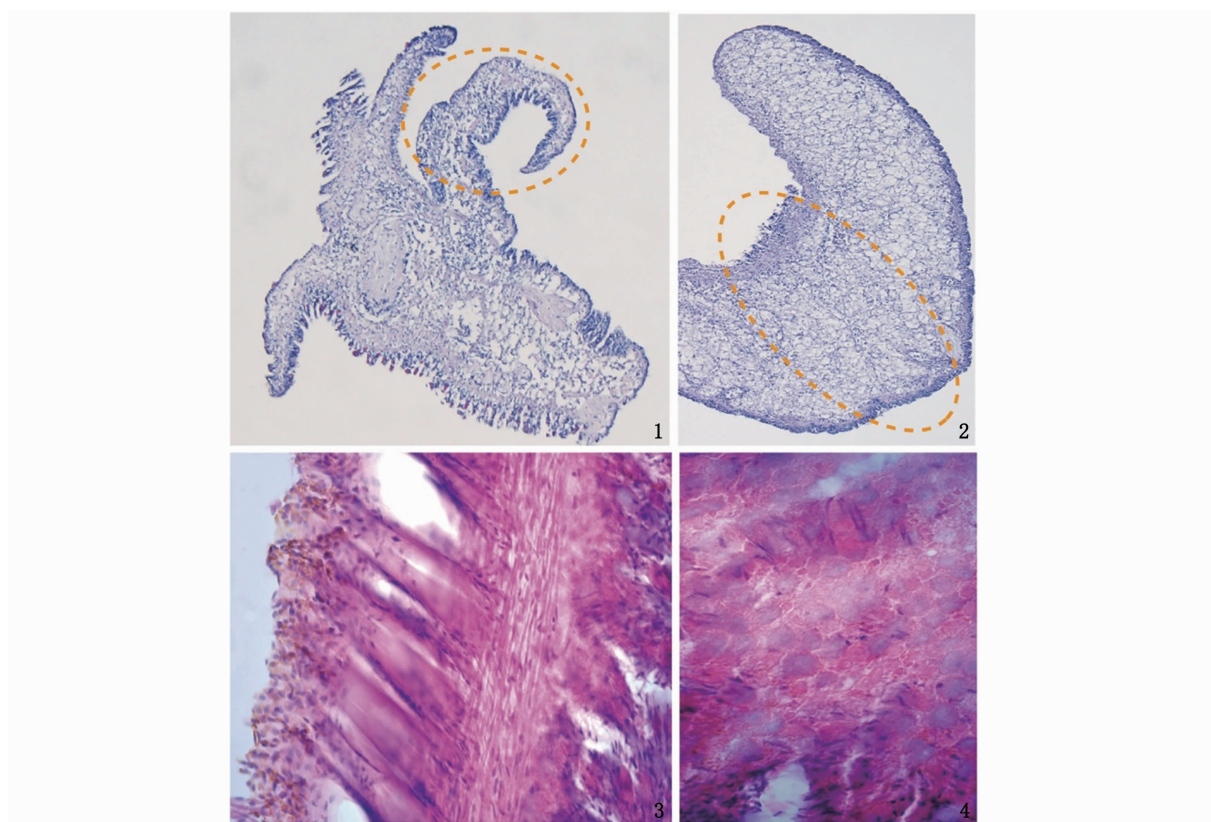
2.2 长牡蛎外套膜边缘区域表皮细胞类型及超微结构

在组织学观察的基础上, 进一步通过透射电子显微镜观察长牡蛎外套膜边缘和中央区域的细胞类型和结构 (图版 II), 结果显示, 长牡蛎外套膜边缘细胞类型大致分为 3 种: 柱状表皮细胞 (Columnar epithelia, CE)、电子稠密粒细胞 (Electron-dense granules cell, DGC) 和电子透明粒细胞 (Electron-transparent granules cell, TGC), 其中柱状表皮细胞包括 A、B、C 3 种类型。在外套膜边缘区域的内外表皮均可见柱状表皮细胞 (图版 II-1), 一侧为单层柱状细胞, 表面覆盖着微绒毛 (Microvilli, Mv), 少数生有纤毛 (Cilia, Ci), 见图版 II-9, 以基底膜 (Basement membrane, BM) 为界具有明显的分层, 以此分为上皮层和结缔组织层; 另一侧是假复层单层柱状表皮细胞, 游离缘染色较深的带状结构被称为纹状缘 (Striated border, SB)。以基底膜为底的多为柱状表皮细胞

A 型 (Columnar epithelia type A, CE-A), 基底膜以下普遍为柱状表皮细胞 B 型 (Columnar epithelia type B, CE-B)、电子透明粒细胞以及结缔组织细胞 (Connective tissue cell)。

在外套膜边缘区域的内外表皮中, 观察到的大量柱状表皮细胞 A 型 (图版 II-2, 3) 主要存在于上皮层, 形成单层柱状上皮, 细胞长度约为 7 ~ 15 μm , A 型细胞核位于细胞中下部, 异染色质和常染色质分明, 多数含有较大核仁, 具有较完整的细胞器, 分泌颗粒 (Secretory granules, SG) 的电子密度较低。基底面借基底膜与结缔组织相连, 观察到柱状表皮细胞 B 型 (图版 II-2) 主要分布

在上皮层与结缔组织层之间的区域, 形成单层扁平上皮, 相邻细胞互相嵌合, 细胞长度约为 8 ~ 12 μm , 其细胞核位于细胞中上部, 大多核仁不明显但是具有高电子密度的异染色质, 有较多透明池和较大电子稠密粒, 细胞器较少。柱状表皮细胞 C 型 (Columnar epithelia type C, CE-C) 在不同区域少有分布且数量很少 (图版 II-4), 它们的细胞核呈固缩状态, 胞质中充满各种不同电子密度的小泡、板层小体 (Lamellar bodies, LB) 和残存的线粒体 (图版 II-5), 无其他多余细胞器。同时, 发现在单层柱状上皮细胞间分布少量电子透明粒细胞 (图版 II-10)。



1. 长牡蛎外套膜边缘区域 (20 \times); 2. 长牡蛎外套膜中央区域 (20 \times); 3. 海豆芽外套膜边缘区域 (100 \times); 4. 海豆芽外套膜中央区域 (100 \times); 虚线标记处为透射电镜取样位置。

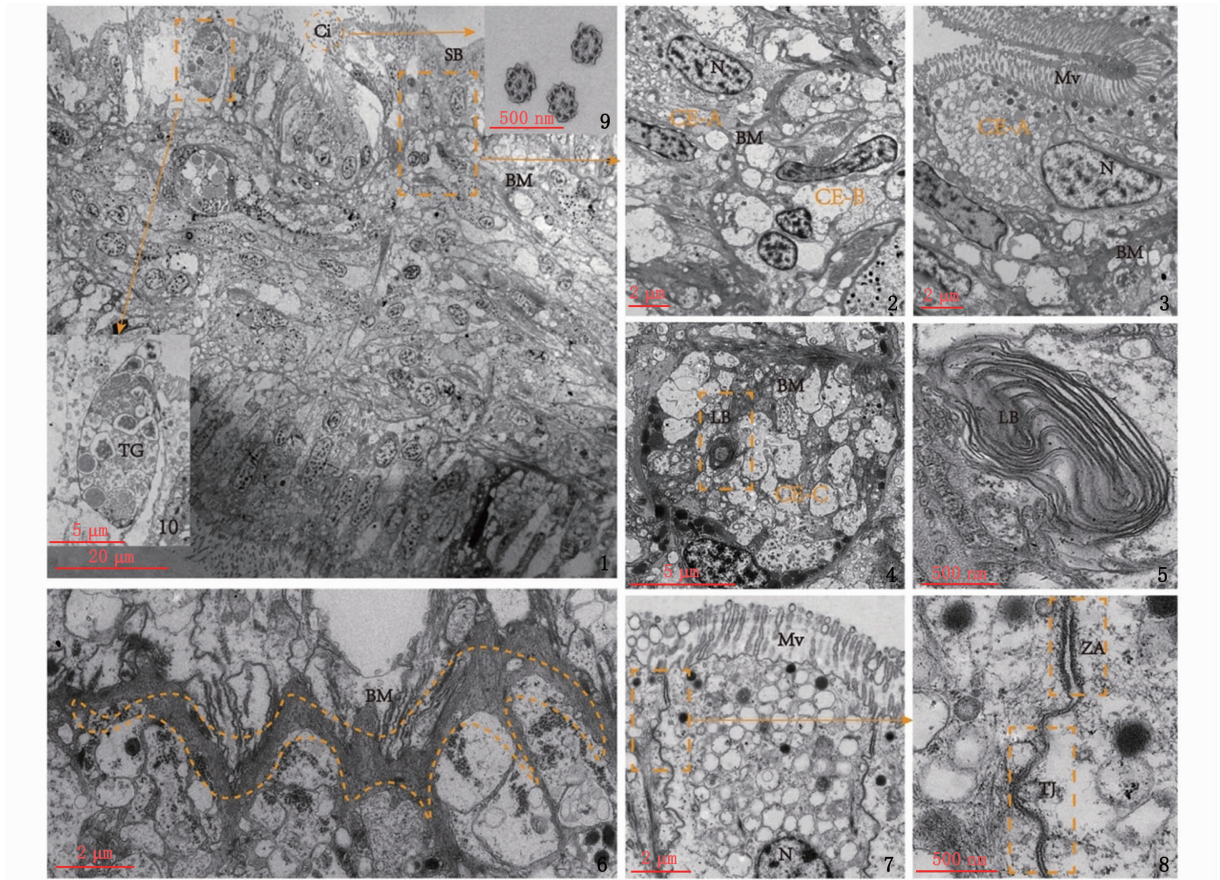
1. The marginal region of mantle of *C. gigas* (20 \times); 2. The central region of the mantle of *C. gigas* (20 \times); 3. The marginal region of mantle of *L. anatina* (100 \times); 4. Central region of mantle of *L. anatina* (100 \times); The dotted lines mark the sampling locations of TEM.

图版 I 长牡蛎和海豆芽外套膜的 H. E 染色

Plate I H. E staining of the mantles of *C. gigas* and *L. anatina*

除此之外,在细胞基底部会出现膜迷路 (Basal membrane invagination) 结构 (图版 II -6), 该特殊结构由柱状表皮细胞 A 和 B 型的基底膜内陷折叠而形成。在游离的细胞表面覆盖着大

量微绒毛,并且在微绒毛下侧观察到上皮细胞侧面的特殊结构:紧密连接 (Tight junction, TJ) 和黏合小带 (Zonula adherens, ZA), 见图版 II -7,8。



1. 长牡蛎外套膜边缘区域全视图 (虚线标记为部分放大图的来源); 2. 柱状表皮细胞 A 型和 B 型; 3. 柱状表皮细胞 A 型; 4. 柱状表皮细胞 C 型; 5. 板层小体; 6. 膜迷路结构 (虚线标记); 7. 上皮细胞侧面观; 8. 上皮细胞侧面特殊结构紧密连接和黏合小带 (虚线标记); 9. 纤毛放大图; 10. 电子透明粒细胞放大图; Ci. 纤毛; SB. 纹状缘; BM. 基底膜; TG. 电子透明粒; Mv. 微绒毛; N. 核仁; LB. 板层小体; ZA. 黏合小带; TJ. 紧密连接; CE-A. 柱状表皮细胞 A 型; CE-B. 柱状表皮细胞 B 型; CE-C. 柱状表皮细胞 C 型。

1. The view of the marginal region of the mantle of *C. gigas* (the dotted line marks the source of the partially enlarged image); 2. Columnar epidermal cells type A and B; 3. Columnar epidermal cells type A; 4. Columnar epidermal cells type C; 5. Lamellar bodies; 6. Membrane labyrinth structure (marked dotted line); 7. Lateral view of epithelial cells; 8. Special structures on the lateral surface of epithelial cells tight junctions and zonula adhesion (marked by dotted line); 9. Enlarged image of cilia; 10. Enlarged image of electron-transparent granules cell; Ci. Cilia; SB. Striated border; BM. Basement membrane; TG. Electron-transparent granules; Mv. Microvilli; N. Nucleolus; LB. Lamellar bodies; ZA. Zonula adherens; TJ. Tight junction; CE-A. Columnar epithelia type A; CE-B. Columnar epithelia type B; CE-C. Columnar epithelia type C.

图版 II 长牡蛎外套膜边缘区域的透射电镜结果

Plate II Transmission electron microscopy results of the marginal region of the mantle of *C. gigas*

2.3 海豆芽外套膜边缘区域表皮细胞类型

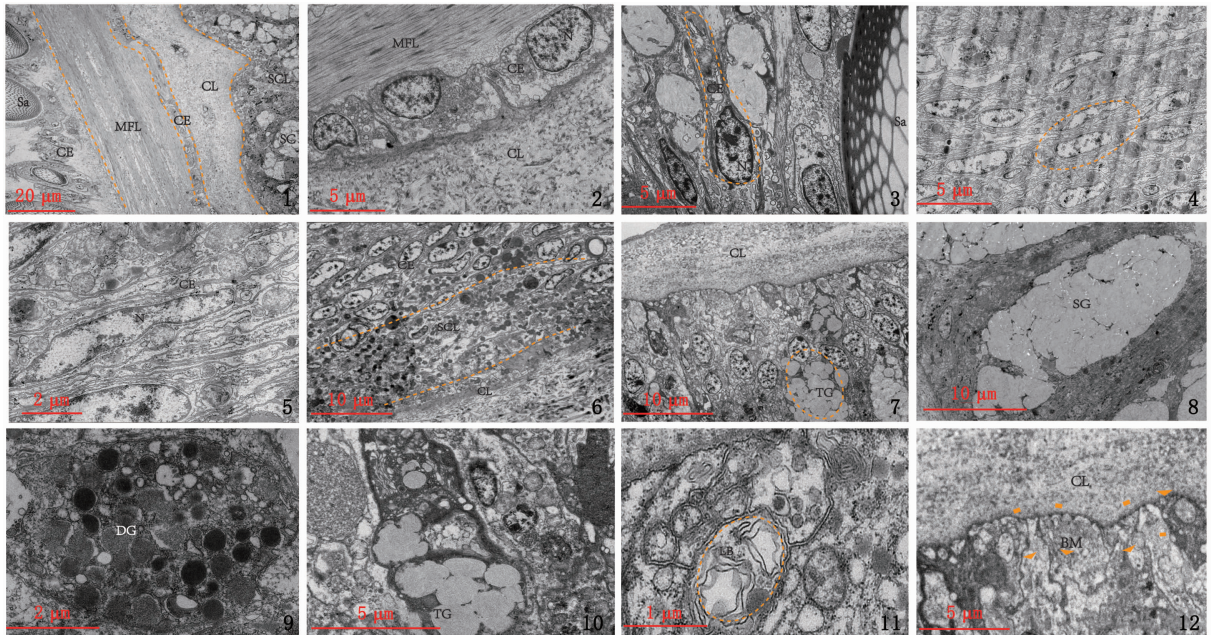
根据透射电镜观察,海豆芽外套膜边缘区域在靠近接合处具有多层柱状表皮细胞,包含的细胞类型大致分为 4 种:柱状表皮细胞、分泌细胞、

电子稠密粒细胞和电子透明粒细胞,其中柱状表皮细胞包括 A'、B'、C' 等 3 种类型。

在外套膜边缘区域,由于是横切面,可以看到明显的分层:刚毛 (Seta, Sa)、肌肉纤维层

(Muscle fiber layer, MFL)、几丁质层(Chitin layer, CL)和分泌细胞层(Secretory cell layer, SCL),见图版Ⅲ-1。在肌肉纤维层和几丁质层之间存在的单层细胞可能是柱状表皮细胞(图版Ⅲ-1,2),内含呈椭圆形的细胞核,长度约为 $5\sim 7\ \mu\text{m}$,无明显细胞器,细胞长度约为 $10\sim 15\ \mu\text{m}$,定义为柱状表皮细胞 A'型。在刚毛附近还观察到一种柱状表皮细胞(图版Ⅲ-3),细胞核内具有电子密度较高的异染色质,没有明显的核仁,核大小约为 $5\ \mu\text{m}$,

胞质内除含线粒体、内质网和高尔基体等细胞器还具有较大的透明池,细胞大小约为 $10\sim 12\ \mu\text{m}$,定义为柱状表皮细胞 B'型。除此之外,还有一类柱状表皮细胞(图版Ⅲ-4,5,6),多层细胞紧密排列,细胞核为不规则形状,大小约为 $10\sim 15\ \mu\text{m}$,几乎占据整个细胞,但是细胞内仍含线粒体、内质网和高尔基体等细胞器;偶尔可以看到纤维状物质,推断其为某种分泌物质,定义为柱状表皮细胞 C'型。



1. 海豆芽外套膜边缘区域全视图(虚线标记分层); 2. 单层柱状表皮细胞放大图; 3. 刚毛附近柱状表皮细胞放大图; 4. 多层柱状表皮细胞; 5. 柱状表皮细胞放大图; 6. 柱状表皮细胞和分泌细胞(虚线标记分层); 7. 柱状表皮细胞和分泌细胞(虚线标记); 8. 分泌细胞放大图; 9. 电子稠密粒细胞; 10. 电子透明粒细胞; 11. 板层小体(虚线标记); 12. 基底膜上的半桥粒(箭头标记处); CE. 柱状表皮细胞; MFL. 肌肉纤维层; SCL. 分泌细胞层; CL. 几丁质层; Sa. 刚毛; N. 核仁; TG. 电子透明粒; SG. 分泌颗粒; DG. 电子稠密粒; LB. 板层小体; BM. 基底膜。

1. The view of the marginal region of *L. anatina* (layers marked by dotted lines); 2. Enlarged image of simple columnar epidermal cells; 3. Enlarged image of columnar epidermal cells near seta; 4. Multiple columnar epidermal cells; 5. Enlarged image of columnar epidermal cells; 6. Columnar epidermal cells and secretory cells (layers marked dotted line); 7. Columnar epidermal cells and secretory cells (marked by dotted line); 8. Enlarged image of secretory cells; 9. Electron-dense granules cell; 10. Electron-transparent granules cell; 11. Lamellar bodies (marked by dotted line); 12. Hemidesmosomes on basement membrane (marked by arrows); CE. Columnar epithelia; MFL. Muscle fiber layer; SCL. Secretory cell layer; CL. Chitin layer; Sa. Seta; N. Nucleolus; TG. Electron-transparent granules; SG. Secretory granules; DG. Electron-dense granules; LB. Lamellar bodies; BM. Basement membrane.

图版Ⅲ 海豆芽外套膜边缘区域的透射电镜结果

Plate III Transmission electron microscopy results of the marginal region of the mantle of *L. anatina*

值得注意的是在海豆芽外套膜中观察到大量分泌细胞(图版Ⅲ-7,8),细胞内含有电子密度低的泡状分泌颗粒,仿佛充满非透明物质,但未发现明显细胞核和细胞器,细胞大小不等,长度

为 $8\sim 30\ \mu\text{m}$,并在其周围发现大量板层小体,该分泌细胞是一种独特的分泌细胞类型。海豆芽外套膜中含有电子稠密粒细胞(图版Ⅲ-9),细胞内充满长度均小于 $1\ \mu\text{m}$ 的电子稠密颗粒

(Electron-dense granules, DG), 又被称为致密体, 细胞核长度为 $3 \sim 5 \mu\text{m}$, 内含线粒体、粗面内质网和板层小体等, 其他细胞器不明显, 细胞大小为 $10 \sim 12 \mu\text{m}$ 。除此之外, 海豆芽外套膜中也含有电子透明粒细胞(图版 III-10), 细胞内充满 $1 \mu\text{m}$ 左右的电子透明泡(Electron-transparent granules, TG), 细胞核长度为 $3 \sim 5 \mu\text{m}$, 电子密度高, 内含线粒体、粗面内质网和板层小体(图版 III-11)等, 细胞大小为 $12 \sim 15 \mu\text{m}$ 。在基底膜上, 还可以观察到细胞基底面的特殊结构, 半桥粒(Hemidesmosome, Hm), 见图版 III-12。

2.4 长牡蛎外套膜中央区域表皮细胞类型

在长牡蛎外套膜中央区域主要观察到电子稠密粒细胞, 电子透明粒细胞和柱状表皮细胞(图版 IV-1, 2, 3, 4), 其中柱状表皮细胞 B 型居多。电子稠密粒细胞和电子透明粒细胞不仅分布在内外表皮层, 还分布在靠近表皮的结缔组织中(图版 IV-1)。电子稠密粒细胞的体积巨大(图版 IV-5, 6), 约为一般柱状表皮细胞体积的 $1 \sim 3$ 倍, 除在细胞核周围有少量细胞质外, 整个细胞由直径为 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ 的电子稠密粒(分泌颗粒)所充满, 有时可见极少的线粒体和核糖体。电子透明粒细胞同样体积巨大(图版 IV-7), 大概是一般柱状表皮细胞体积的 $1 \sim 3$ 倍, 除了含有一个电子深染的细胞核外, 细胞基本上由直径为 $1.5 \sim 2.0 \mu\text{m}$ 的电子透明泡(分泌颗粒)所填充, 有一些可以在透明泡之间观察到残存的线粒体, 透明泡其实并不完全透明, 其内分布有染色较浅的纤维状物质。在游离的细胞表面与边缘区域同样覆盖着大量微绒毛, 并且在微绒毛下侧也观察到上皮细胞侧面的两种特殊结构, 紧密连接和黏合小带(图版 IV-8)。

2.5 海豆芽外套膜中央区域表皮细胞类型

海豆芽外套膜中央区域除观察到柱状表皮细胞、分泌细胞和电子稠密粒细胞, 还观察到血细胞(图版 V-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)。由于海豆芽外套膜上分布血管, 并有一个区域充满血淋巴, 因此在取样组织中观察到游离状态的血细胞, 大小为 $12 \sim 18 \mu\text{m}$, 形似电子稠密粒细胞, 内含大量形状不规则且电子密度高的颗粒, 细胞核大小约为 $5 \mu\text{m}$, 细胞基质均匀致密。值得注意的是在分泌细胞周围还发现了大小为 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ 的电子透明泡(图版 V-6), 与已有研究中提到的脂滴(Lipid

droplets, LP)类似^[21]。在靠近基底膜的位置, 除了观察到与边缘区域同样的特殊结构半桥粒之外, 还发现了黏合连接(Adherence junction, AJ)和缝隙连接(Gap junction, GJ)两种特殊结构(图版 V-8)。

3 讨论

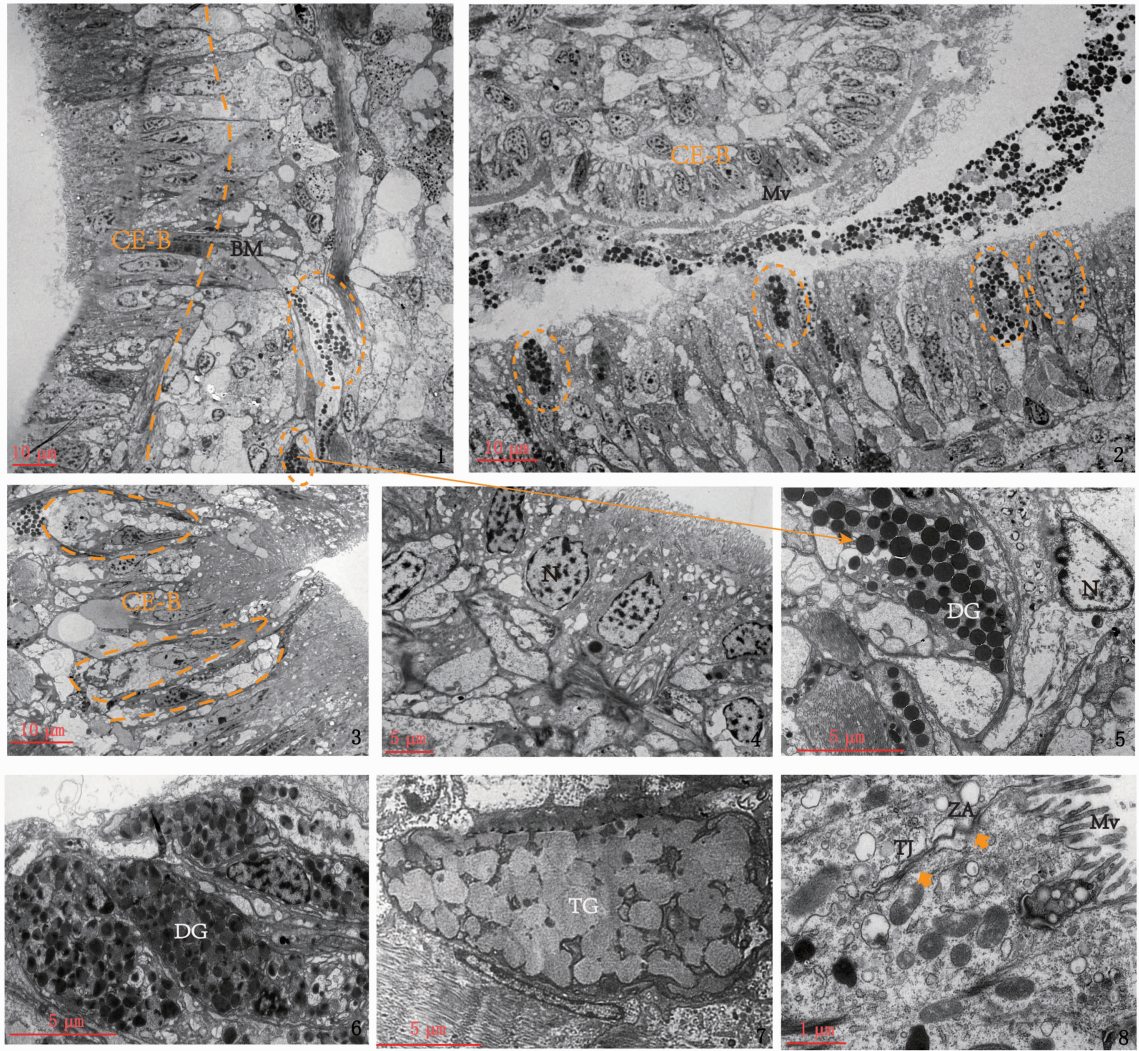
本文通过组织学和透射电镜的方法初步明确了长牡蛎和海豆芽外套膜边缘区域和中央区域的细胞类型组成及超微结构特点, 发现两个类群无论是细胞类型还是超微结构均具有不同之处, 这些差异可能为研究腕足动物和软体动物贝壳的形成机制和矿化作用提供借鉴。

通过比较观察, 首先是两者的细胞类型具有差异。相较于长牡蛎, 海豆芽的分层特点较为明显, 在外套膜边缘区域, 长牡蛎是单层柱状表皮细胞, 海豆芽是多层柱状表皮细胞, 而在外套膜中央区域, 两者均为单层柱状表皮细胞。相较于其他物种, 例如海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、马氏珠母贝、三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)、美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)等^[14, 17-18, 22-24], 柱状表皮细胞多为单层分布, 而海豆芽位于外套膜边缘区域的柱状表皮细胞则是多层分布, 与之相似的是同属腕足动物的穿孔贝(*Magellania venosa*)^[25]。在柱状表皮细胞类型方面, 基于超微结构不同, 两物种又分为不同的亚细胞类型。比如, 长牡蛎根据细胞发育时期不同分为 A、B、C 3 类, 分类方式具体参考了之前报道的马氏珠母贝和大珠母贝^[14, 16]; 而海豆芽则是根据细胞分布位置大概分为 3 类, 存在于肌肉纤维层和几丁质层之间的 A' 型、靠近刚毛区域分布的 B' 型以及接合处多层排列的柱状表皮细胞 C' 型。

其次, 在分泌细胞超微结构的比较方面, 两个物种均包含电子稠密粒细胞和电子透明粒细胞, 有研究表明电子透明粒细胞一般分为两类^[16], 一类是电子透明大粒细胞, 另一类是电子透明小粒细胞。由于电子透明小粒细胞体积小, 并且它们只分布于肠道表皮细胞, 与贝壳的形成无关, 本文中电子透明粒细胞均指电子透明大粒细胞。海豆芽中的电子稠密粒细胞和电子透明粒细胞, 无论细胞大小还是内含物和长牡蛎均不相同, 只是类比长牡蛎中两种分泌细胞的特征而定义的。值得注意的是在海豆芽中还有一类特

殊的分泌细胞,没有明显细胞核和细胞器,内含大量类似透明泡的结构和板层小体。表皮内的板层小体^[26]被认为是位于棘层上部和颗粒层细胞内椭圆形囊泡或泡管状分泌性细胞器,具有脂质储存和分泌的功能,可能是某些细胞器变形而

来,之前关于板层小体的报道多来自哺乳动物。推测含有板层小体的细胞可能是具有分泌功能的细胞。虽然在长牡蛎中也观察到了板层小体这一特殊结构,但是在数量上不如海豆芽显著,主要分布于柱状表皮细胞 C 型中。

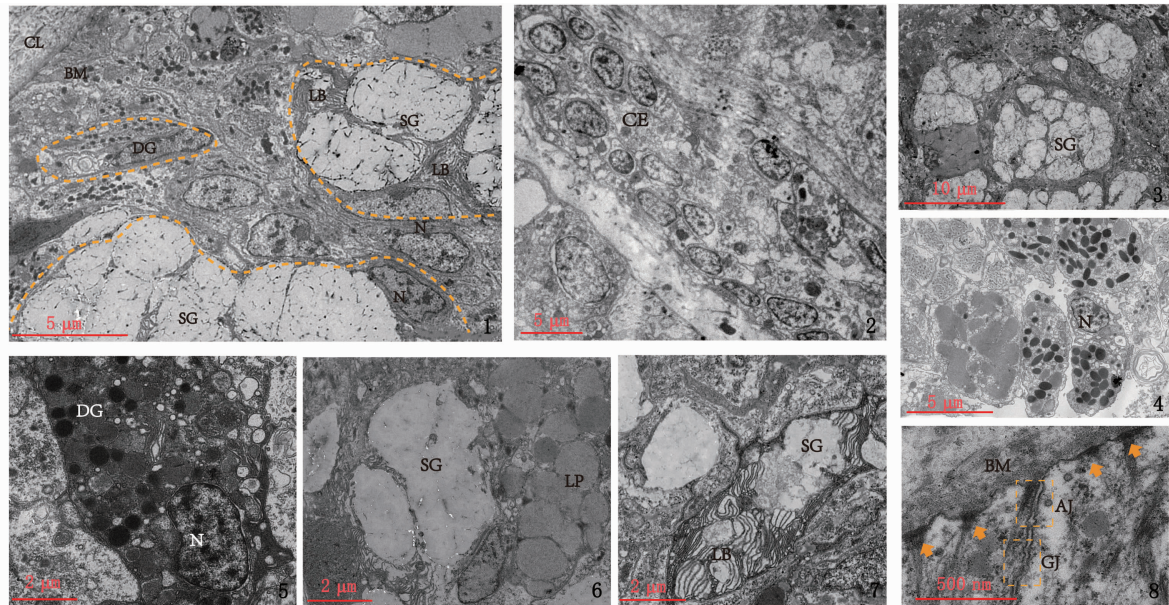


1. 长牡蛎外套膜中央区域全视图(直虚线标记基底膜,圈虚线标记电子稠密粒细胞); 2. 柱状表皮细胞 B 型(虚线标记电子稠密粒细胞); 3. 柱状表皮细胞 B 型放大图(虚线标记单个细胞); 4. 柱状表皮细胞 B 型放大图; 5. 电子稠密粒细胞放大图; 6. 电子稠密粒细胞; 7. 电子透明粒细胞; 8. 上皮细胞侧面特殊结构紧密连接和黏合小带(箭头标记处); BM. 基底膜; TG. 电子透明粒; DG. 电子稠密粒; Mv. 微绒毛; N. 核仁; ZA. 黏合小带; TJ. 紧密连接; CE-B. 柱状表皮细胞 B 型。

1. The view of the marginal region of *C. gigas* (basement membrane marked by straight line, electron-dense granules cell marked by circle lines); 2. Columnar epithelial cells type B (electron-dense granules cell marked dotted lines); 3. Enlarged image of columnar epithelial cells type B (simple cell marked by dotted lines); 4. Enlarged image of columnar epithelial cells type B; 5. Enlarged image of electron-dense granules cell; 6. Electron-dense granules cell; 7. Electron-transparent granules cell; 8. Special structures on the lateral surface of epithelial cells tight junctions and zonula adhesion (marked by arrow); BM. Basement membrane; TG. Electron-transparent granules; DG. Electron-dense granules; Mv. Microvilli; N. Nucleolus; ZA. Zonula adheren; TJ. Tight junction; CE-B. Columnar epithelia type B.

图版 IV 长牡蛎外套膜中央区域的透射电镜结果

Plate IV Transmission electron microscopy results of the central region of the mantle of *C. gigas*



1. 海豆芽外套膜中央区域全视图(虚线标记分泌细胞); 2. 柱状表皮细胞; 3. 分泌细胞放大图; 4. 血细胞; 5. 电子稠密粒细胞; 6. 分泌细胞及脂滴; 7. 分泌细胞及板层小体; 8. 基底膜上的半桥粒(箭头标记处), 黏合连接和缝隙连接(虚线标记); CE. 柱状表皮细胞; CL. 几丁质层; N. 核仁; TG. 电子透明粒; SG. 分泌颗粒; DG. 电子稠密粒; LB. 板层小体; BM. 基底膜; LP. 脂滴; AJ. 黏合连接; GJ. 缝隙连接。

1. The view of the central region of the mantle of *L. anatina* (dotted lines mark secretory cells); 2. Columnar epidermal cells; 3. Enlarged image of secretory cells; 4. Blood cells; 5. Electron-dense granules cell; 6. Secretory cells and lipid droplets; 7. Secretory cells and lamellar bodies; 8. Hemidesmosomes on the basement membrane (marked by arrows), adherence junction and gap junction (marked by dashed lines); CE. Columnar epithelia; CL. Chitin layer; N. Nucleolus; TG. Electron-transparent granules; SG. Secretory granules; DG. Electron-dense granules; LB. lamellar bodies; BM. Basement membrane; LP. Lipid droplets; AJ. Adherence junction; GJ. Gap junction.

图版 V 海豆芽外套膜中央区域的透射电镜结果

Plate V Transmission electron microscopy results of the central region of the mantle of *L. anatina*

除此之外,两个物种在外套膜不同位置均具有物种特异性的特殊结构。比如,表皮细胞的基底面上基底膜的结构不相同,长牡蛎上具有膜迷路,该结构被认为可以增加细胞的表面积,从而提高物质交换效率^[14],而海豆芽上具有半桥粒这一特殊结构,并且在半桥粒附近的外上皮细胞通常具有两个基底质膜^[21,27];在表皮细胞的侧面,长牡蛎发现了紧密连接和黏合小带^[15],海豆芽中存在类似结构,分别是缝隙连接和黏合连接^[21];在表皮细胞的游离面,长牡蛎中不仅具有微绒毛还具有纤毛,海豆芽中除此之外还具有刚毛^[9]。

再者,根据已有研究,发现长牡蛎和海豆芽的外套膜具有一个同样的骨膜沟(Periostracal groove)特殊结构,被认为是壳边缘的主要特征^[2,9,28],在等边浅蛤(*Gomphina veneriformis*)、美洲牡蛎和贯穿贝等物种^[15,17,21,27]中均发现该结构并认为其在壳形成中起重要作用,特别是与角质层的分泌有关。但骨膜沟在两个物种中的位置

并不相同。长牡蛎的骨膜沟位于外套膜的外褶和中褶之间,其内部上皮细胞分泌一种物质,形成角质层^[29]。海豆芽的骨膜沟位于外套膜边缘区域,靠近刚毛,该区域不断产生新细胞,分泌形成腕足动物外壳的所有层^[21]。

最后,两个物种外套膜中血细胞的含量并不相同。有研究^[25]报道参与壳形成的细胞有两个来源:外上皮细胞和循环血细胞。观察海豆芽外套膜中央区域的细胞时,由于其封闭的血液循环系统^[30],因此发现了血细胞。虽然长牡蛎中没有发现血细胞,但是有很多研究发现贝类的血细胞与壳形成有一定相关性^[31],甚至还发现携带含钙颗粒物和碳酸钙晶体的血细胞参与贝壳的再生^[32-33],此外还有研究^[34]报道牡蛎中的血细胞可能分泌了部分壳基质蛋白,因此可知血细胞在贝壳形成中起到重要作用。

综上所述,通过透射电镜的比较观察,对海豆芽和长牡蛎外套膜中不同细胞的超微结构有

了一定了解,无论是细胞类型还是细胞结构,都有异同之处,在一定程度上也许可以解释两者贝壳组成成分的差异,从而为研究腕足动物和软体动物贝壳的形成机制和矿化作用提供借鉴。

本文获得中国科学院海洋研究所海洋大数据中心的支持,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] ZHANG G F, FANG X D, GUO X M, et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54.
- [2] JOHNSON A B, FOGEL N S, LAMBERT J D. Growth and morphogenesis of the gastropod shell [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(14): 6878-6883.
- [3] BECKER A, ZIEGLER A, EPPLE M. The mineral phase in the cuticles of two species of Crustacea consists of magnesium calcite, amorphous calcium carbonate, and amorphous calcium phosphate [J]. *Dalton Transactions*, 2005 (10): 1814-1820.
- [4] HILD S, MARTI O, ZIEGLER A. Spatial distribution of calcite and amorphous calcium carbonate in the cuticle of the terrestrial crustaceans *Porcellio scaber* and *Armadillidium vulgare* [J]. *Journal of Structural Biology*, 2008, 163(1): 100-108.
- [5] 刘晓军, 李家乐. 养殖珍珠贝贝壳基质蛋白研究进展 [J]. *上海海洋大学学报*, 2013, 22(2): 200-205.
LIU X J, LI J L. Matrix proteins in the shell of cultured pearl bivalves [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2013, 22(2): 200-205.
- [6] MASS T, GIUFFRE A J, SUN C Y, et al. Amorphous calcium carbonate particles form coral skeletons [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(37): E7670-E7678.
- [7] WEISS I M, TUROSS N, ADDADI L, et al. Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite [J]. *Journal of Experimental Zoology*, 2002, 293(5): 478-491.
- [8] POLITI Y, ARAD T, KLEIN E, et al. Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase [J]. *Science*, 2004, 306(5699): 1161-1164.
- [9] WILLIAMS A, CUSACK M, MACKAY S. Collagenous chitinophosphatic shell of the brachiopod *Lingula* [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1994, 346(1316): 223-266.
- [10] KNOLL A H. Biomineralization and evolutionary history [J]. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 2003, 54(1): 329-356.
- [11] SUZUKI M, NAGASAWA H. Mollusk shell structures and their formation mechanism [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2013, 91(6): 349-366.
- [12] LUO Y J, TAKEUCHI T, KOYANAGI R, et al. The *Lingula* genome provides insights into brachiopod evolution and the origin of phosphate biomineralization [J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 8301.
- [13] 刘彧成, 梁健, 王培, 等. 缢蛏外套膜的组织学和组织化学研究 [J]. *水产学杂志*, 2020, 33(3): 61-65.
LIU Y C, LIANG J, WANG P, et al. Histological and histochemical observation of mantle membrane of razor clam *Sinonovacula constricta* [J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2020, 33(3): 61-65.
- [14] 师尚丽, 焦钰, 杜晓东, 等. 马氏珠母贝外套膜细胞的超微结构观察 [J]. *广东农业科学*, 2012, 39(8): 135-137.
SHI S L, JIAO Y, DU X D, et al. Ultrastructure of mantle epithelial cells in *Pinctada martensii* [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, 39(8): 135-137.
- [15] LEE J S, JOO J Y, PARK J J. Histology and ultrastructure of the mantle epidermis of the equilateral venus, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae) [J]. *Journal of Shellfish Research*, 2007, 26(2): 413-421.
- [16] 杜晓东. 大珠母贝外套膜表皮细胞的超微结构 [J]. *动物学报*, 1999, 45(3): 246-251.
DU X D. Ultrastructure of epithelial cells of the mantle of *Pinctada maxima* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, 45(3): 246-251.
- [17] MYERS J M, JOHNSTONE M B, MOUNT A S, et al. TEM immunocytochemistry of a 48kDa MW organic matrix phosphoprotein produced in the mantle epithelial cells of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. *Tissue and Cell*, 2007, 39(4): 247-256.
- [18] 任素莲, 傅郁. 海湾扇贝外套膜的组织结构与黏液细胞的类型与分布 [J]. *中国海洋大学学报*, 2006, 36(5): 739-744.
REN S L, FU Y. Microscopic anatomy and types of mucous cells of the mantle of *Argopectens irradians* [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2006, 36(5): 739-744.
- [19] 杜晓东. 九孔鲍外套膜表皮细胞的超微结构 [J]. *湛江海洋大学学报*, 1998, 18(3): 6-10.
DU X D. Ultrastructure of epithelial cells of the mantle of *Haliotis diversicolor aquatilis* [J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 1998, 18(3): 6-10.
- [20] 刘家良. 马氏珠母贝血液与外套膜外液细胞学和转录组学比较 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2014.
LIU J L. Comparison of hemolymph and extrapallial fluid on cytology and transcriptome in *Pinctada martensii* [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2014.
- [21] RODA M S, ZIEGLER A, GRIESHABER E, et al. Terebratulide brachiopod shell biomineralization by mantle epithelial cells [J]. *Journal of Structural Biology*, 2019, 207(2): 136-157.
- [22] 石安静, 张兵. 三角帆蚌外套膜细胞的超微结构 [J]. 水

- 生生物学报, 1987, 11(3): 236-240.
- SHI A J, ZHANG B. Ultrastructure of mantle cells of *Hyriopsis cumingii* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1987, 11(3): 236-240.
- [23] 施志仪, 李勇, 谢先中. 三角帆蚌外套膜碱性磷酸酶与钙代谢的关系[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(3): 291-297.
- SHI Z Y, LI Y, XIE X Z. Relations between alkalinity phosphatase and calcium metabolism in mantle of *Hyriopsis cumingii* [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2008, 17(3): 291-297.
- [24] 曹玉香. 三角帆蚌不同蚌龄外套膜细胞及其适龄蚌不同组织细胞的增殖能力和生物矿化活性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- CAU Y X. Proliferative capacity and biomineralization activity of mantle cells from different years and tissue cells of *Hyriopsis cumingii* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [25] SONG X R, LIU Z Q, WANG L L, et al. Recent advances of shell matrix proteins and cellular orchestration in marine molluscan shell biomineralization [J]. Frontiers in Marine Science, 2019, 6: 41.
- [26] 耿清伟, 宋秀祖. 板层小体在皮肤渗透屏障形成中的作用[J]. 中华皮肤科杂志, 2018, 51(2): 163-165.
- GENG Q W, SONG X Z. Effect of lamellar bodies on skin permeability barrier formation [J]. Chinese Journal of Dermatology, 2018, 51(2): 163-165.
- [27] RODA M S, GRIESSHABER E, ZIEGLER A, et al. Calcite fibre formation in modern brachiopod shells [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 598.
- [28] AWAJI M, MACHII A. Fundamental studies on in vivo and in vitro pearl formation—contribution of outer epithelial cells of pearl oyster mantle and pearl sacs [J]. Aqua-BioScience Monographs, 2011, 4(1): 1-39.
- [29] MARIN F, LUQUET G, MARIE B, et al. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2007, 80: 209-276.
- [30] 张志亮. 华南寒武纪早期磷酸钙质壳腕足动物研究[D]. 西安: 西北大学, 2018.
- ZHANG Z L. Early cambrian phosphatic-shelled brachiopods from South China [D]. Xi'an: Northwest University, 2018.
- [31] MOUNT A S, WHEELER A P, PARADKAR R P, et al. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster [J]. Science, 2004, 304(5668): 297-300.
- [32] LI S G, LIU Y J, LIU C, et al. Hemocytes participate in calcium carbonate crystal formation, transportation and shell regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 51: 263-270.
- [33] KADAR E, LOBO-DA-CUNHA A, AZEVEDO C. Mantle-to-shell CaCO₃ transfer during shell repair at different hydrostatic pressures in the deep-sea vent mussel *Bathymodiulus azoricus* (Bivalvia: Mytilidae) [J]. Marine Biology, 2009, 156(5): 959-967.
- [34] WANG X T, LI L, ZHU Y B, et al. Oyster shell proteins originate from multiple organs and their probable transport pathway to the shell formation front [J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66522.

Ultrastructural comparison of mantle cells between *Crassostrea gigas* and *Lingula anatina*

MU Kang^{1,2,3,4}, CHEN Yaru^{1,2,3,4}, CHAN Jiulin^{1,2,3}, ZHANG Linlin^{1,2,3,4}

(1. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. Oceanographic Research Center, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China; 3. Marine Biology and Biotechnology Functional Laboratory, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology Qingdao 266071, Shandong, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The Pacific oyster *Crassostrea gigas* is a mollusc with calcium carbonate shell, while the brachiopod *Lingula anatina* is with calcium phosphate biominerals. Here, we compared ultrastructure observations of the marginal region and the central region of mantles between *C. gigas* and *L. anatina* using histology and transmission electron microscopy (TEM) approaches. Our results found both species have similar cell types including the columnar epidermis cell, electron-dense granules cell and electron-transparent granules cell. However, the ultrastructure of the columnar epidermal subtype cells and the inclusion contents of secretory cells in those two species were different. The columnar epidermal cells of *C. gigas* consists of subtype A that mainly concentrated on the marginal region of mantle, subtype B mainly concentrated on the central region of mantle and subtype C was not common. The sizes of those cells were 7 – 15 μm . Meanwhile, columnar epidermal cells of *L. anatina* consist of subtypes A', B' and C'. Their sizes are 10 – 15 μm . As for secretory cells, both species had electron-dense granules cell and electron-transparent granules cell. However, *L. anatina* also contained a special class of secretory cells containing lamellar bodies. Those results can partially explain the difference of shell composition between brachiopods and mollusc, and provide reference for the study of shell formation mechanism and mineralization of brachiopods and mollusc.

Key words: *Crassostrea gigas*; *Lingula anatina*; mantle; ultrastructure of cells; transmission electron microscopy