

Cu²⁺ 对体外培养的日本沼虾血细胞的影响^{*}

王军霞^① 王维娜^{①②} 王安利^② 王亚斌^③

(①河北大学生命科学学院 保定 071002; ②华南师范大学生命科学学院 广州 510631;

③河北省保定市环境监测站 保定 071001)

摘要:以日本沼虾为实验材料研究血细胞的体外培养,发现添加 15% 胎牛血清(FBS)、100 IU/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素,渗透压为 472 mmol/L 的 199 培养基有利于血细胞的生长,在此基础上测定了 Cu²⁺ 对传代血细胞的影响,发现培养基中添加 2 μg/L Cu²⁺ 时血细胞生长较好,总磷含量、碱性磷酸酶活性均表现较高水平。

关键词:日本沼虾;细胞培养;Cu²⁺

中图分类号:Q954 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2003)03-22-04

Effect of Cu²⁺ on the Culture of Haemocytes from *Macrobrachium nipponense*

WANG Jun-Xia^① WANG Wei-Na^{①②} WANG An-Li^② WANG Ya-Bin^③

(① College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002;

② College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631;

③ Environment Monitor Bureau in Baoding, Baoding 071001, China)

Abstract: Haemocytes of *Macrobrachium nipponense* cultured *in vitro* were studied. It was found that satisfactory results could be obtained using medium 199 supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml Penicillin, 100 μg/ml streptomycin osmolarity adjusted to 472 mmol/L. The effect of Cu²⁺ on subcultured haemocytes was studied. Basal medium supplemented with Cu²⁺ 2 μg/L enhanced the growth of haemocytes and improved their total phosphate and AKP activity.

Key words: *Macrobrachium nipponense*; Cell culture; Cu²⁺

甲壳动物细胞培养作为一种潜在的工具有助于虾类疾病的诊断及探针技术的应用开发,因此受到日益广泛的关注^[1]。对当前由于采用高密度精养系统带来虾病暴发率急剧上升的养虾业来说,这种胞内工具的应用尤其重要。对各种甲壳动物的不同组织的体外培养所必需的实验参数,已有许多相关报道,但主要集中于各种组织的原代培养^[2]。虽然,迄今为止仍未建立甲壳动物组织的细胞系,但这些研究为探索合理的甲壳动物体外培养方法及条件提供了有益的信息。

日本沼虾是中国、日本等地一种重要的经济虾种,作者对日本沼虾的肌肉细胞体外培养进行了成功探索,将肌细胞传代三次并研究了 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 对体外培养肌细胞的作用^[3]。本文中作者对日本沼虾血细胞体外培养进行了首次探索,旨在为虾类体外组织培养提供一些有

^{*} 河北省重大科技攻关计划项目(No. 85-93-29);

第一作者介绍 王军霞,女,28岁,硕士;研究方向:水生动物生理学;E-mail: wangjun_xia@sohu.com.

收稿日期:2002-07-08,修回日期:2003-01-15

价值的资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料 日本沼虾(体长 6.1~7.2 cm, 平均体重 6.125 g)取自河北省白洋淀,实验前在含青霉素 1 000 IU/ml,链霉素 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的无菌水中暂养 24 h。

1.2 细胞培养 实验选用两种基础培养基 199 (Gibco)和 1640 (Gibco),分别添加 15% 胎牛血清(FBS),100 IU/ml 青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素,用 5 mol/L NaCl 调节渗透压分别为 472、750 mmol/L。所有培养基在用 0.22 μm 微孔滤膜过滤前将 pH 值调至 7.0。取无菌水中暂养的日本沼虾,用 75% 酒精擦洗头胸甲,无菌条件下用卡介苗注射器小心从心脏抽取血淋巴,接种于 24 孔培养板,每孔加入 1 ml 培养基,26 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养,每天用 OLYMPUS 倒置显微镜观察,记录不同培养基对细胞生长的影响。

原代细胞用 0.25% 胰蛋白酶 26 $^{\circ}\text{C}$ 消化 20 min,计数后传代,培养液中分别加入不同浓度梯度(0,2,4,6,8,10 $\mu\text{g}/\text{L}$)的 CuSO_4 ,培养一周后测定碱性磷酸酶(AKP)活力和总磷含量。

1.3 碱性磷酸酶活力测定 将传代的细胞消化下来,计数后超声波细胞破碎,12 000 r/min 离心 10 min,参照何海琪和孙凤^[4]所用方法测定 AKP 活力。

1.4 总磷测定 参照《生物化学实验指导》中消化法测定^[5]。

2 结果与讨论

2.1 不同培养基对日本沼虾原代细胞培养的影响 接种于 199 和 1640 两种培养液中的血细胞表现出不同的生长情况,在 1640 培养基中,培养血细胞 3 d 内仅达到 40% 的贴壁率(图版 I:1),最多存活 7 d,在 199 培养基中,培养细胞 3 d 达到了 80% 的贴壁率(图版 I:2),最多存活了 30 余天,这与 Wang 等对日本沼虾肌肉细胞的体外培养结果相似^[3],Wang 等将肌细胞传至 3 代并且证明 199 培养基较其它培养基更为

适合日本沼虾肌细胞的生长。199 培养基在虾类细胞培养中有非常广泛的应用,在日本沼虾体外细胞培养中可为细胞代谢提供更多的营养成分。

在 199 培养基的基础之上,比较了不同渗透压(472、750 mmol/L)对培养细胞的影响。结果表明,在 472 mmol/L 的渗透压条件下,已贴壁的成纤维状细胞不断扩展并且互相连接 3 d 内形成细胞单层(图版 I:3),而 750 mmol/L 的渗透压组接种后多为圆形细胞(图版 I:4),贴壁情况较差,最终未形成细胞单层。渗透压是影响体外培养细胞生长的一个重要因素,渗透压的高低直接影响细胞的形态、完整性及贴壁情况,适宜的渗透压下培养的细胞有较好的贴壁率并保持细胞的完整性^[6]。在各虾种的细胞培养中渗透压是各学者之间报道差异最大的,可分为高渗组(720~1 100 mmol/L)和低渗组(450~490 mmol/L),对于日本沼虾渗透压较低时(472 mmol/L)细胞贴壁较快,形态较好。

2.2 Cu^{2+} 对传代细胞的影响 Cu^{2+} 是生物体内很重要的微量元素。30 多种蛋白和酶中含有 Cu^{2+} (如血浆铜蓝蛋白、细胞色素 c 氧化酶等),同时它的浓度过高也抑制酶的活性(醛缩酶、葡萄糖氧化酶、脂酶、酸性磷酸酶等)从而影响生物体的生长^[7,8]。实验中在渗透压为 472 mmol/L 的 199 培养基中分别添加不同浓度的 Cu^{2+} ,研究 Cu^{2+} 对体外培养细胞的影响。结果表明,添加 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ Cu^{2+} 与其它浓度组相比,有利于细胞生长,在此浓度下,培养细胞达到了 75% 以上的贴壁率,而其它组的贴壁率则较低。AKP 活力测定也表明 Cu^{2+} 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,培养细胞有较高的酶活(图 1)。碱性磷酸酶存在于生物体内,是一种对底物专一性较低的磷酸单酯水解酶,是重要的解毒酶,并与一些营养物质的消化吸收有关^[9,10]。Muhammad 证明罗氏沼虾体内 AKP 活力与钙的吸收、沉积明显相关^[11]。Biesele 在一些快速生长的动物组织中发现许多 AKP^[12]。刘存岐也证明 Cu^{2+} 对中国对虾幼体生长发育的影响与 AKP 明显有关,并认为 AKP 可以作为中国对虾幼体生长发育的

重要指标^[13]。本实验结果也表明 Cu^{2+} 对日本沼虾体外培养细胞的影响与 AKP 活性高低一致,有研究证明低浓度的 Cu^{2+} 可以使虾体内丝氨酸的含量增加,而丝氨酸是许多蛋白酶类活性中心的重要成分^[14],实验中碱性磷酸酶被低浓度的 Cu^{2+} 激活,从而促进细胞的代谢生长。

(包括磷代谢),从而影响细胞生长,在进行传代培养时可考虑加入适量 Cu^{2+} 。

参 考 文 献

- [1] Toullec J Y. Crustacean primary cell culture: a technical approach. *Methods in Cell Science*, 1999, **21**:193 ~ 198.
- [2] Frerichs G N. *In vitro* culture of embryonic cells from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 1996, **143**: 227 ~ 232.
- [3] Wang W N, Liang H, Wang A L, et al. Effect of pH and Zn^{2+} on subcultured muscle cells from *Macrobrachium nipponense*. *Methods in Cell Science*, 2001, **22**:277 ~ 284.
- [4] 何海琪,孙凤. 中国对虾酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的特性研究. *海洋与湖沼*, 1992, **23**(5):555 ~ 560.
- [5] 王重庆,李云兰,李德昌. 高级生化实验教程. 北京:北京大学出版社,1994.113 ~ 115.
- [6] 刘凯于,杨凯,余泽华等. 斑节对虾组织的原代培养. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 1998, **32**(2):210 ~ 214.
- [7] 刘发义,吴玉霖,赵鸿儒等. 铜在中国对虾体内的积累和致毒效应. *海洋与湖沼*, 1988, **19**(2):133 ~ 138.
- [8] 刘发义,吴玉霖. 重金属污染物在海洋生物体内的积累和解毒机制. *海洋科学*, 1988(5):63 ~ 66.
- [9] Harada M. Protein phosphatase activity of calf intestinal alkaline phosphatase. *Experientia*, 1981, **37**:547 ~ 548.
- [10] Register T C, Wuthier R E. Effect of vandate a potent alkaline phosphatase inhibitor on ^{45}Ca and ^{32}P uptake by a matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilag. *Biol Chem*, 1984, **259**:3 511 ~ 3 518.
- [11] Muhammad A L. Effects of enviromental alkalinity on calcium-stimulated dephosphorlating enzyme activity in the gills of post-moult and intermoult giant freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol*, 1992, **107A**(4): 597 ~ 601.
- [12] Biesele J J. Alkaline phosphatase in mouse skin under methy cholanthrene treatment. *Res*, 1949, **4**:737 ~ 741.
- [13] 刘存枝,王安利,王维娜等. 海水中几种金属离子对中国对虾幼体体内碱性磷酸酶和 ATPase 的影响. *水产学报*, 2001, **25**(4):298 ~ 303.
- [14] 林汝榕,李少菁. 铜、镉对中华哲水蚤氨基酸含量影响的实验研究. *海洋与湖沼*, 1991, **22**(3):242 ~ 248.
- [15] 李爱杰. 水产动物营养与饲料学. 北京:中国农业出版社,1996.61 ~ 63.
- [16] 张道波,马琳,马娃. 中国对虾仔虾对磷需要量的研究. *青岛海洋大学学报*, 2000, **30**(1):63 ~ 67.

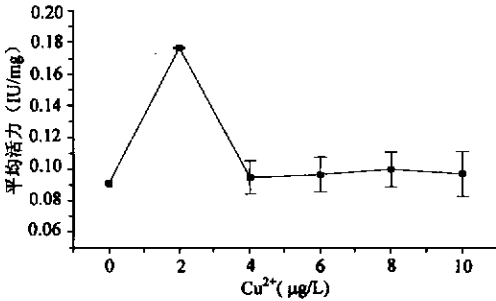


图 1 Cu^{2+} 对体外培养日本沼虾血细胞碱性磷酸酶的影响

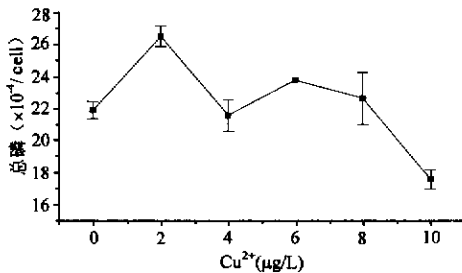


图 2 Cu^{2+} 对体外培养日本沼虾血细胞总磷含量的影响

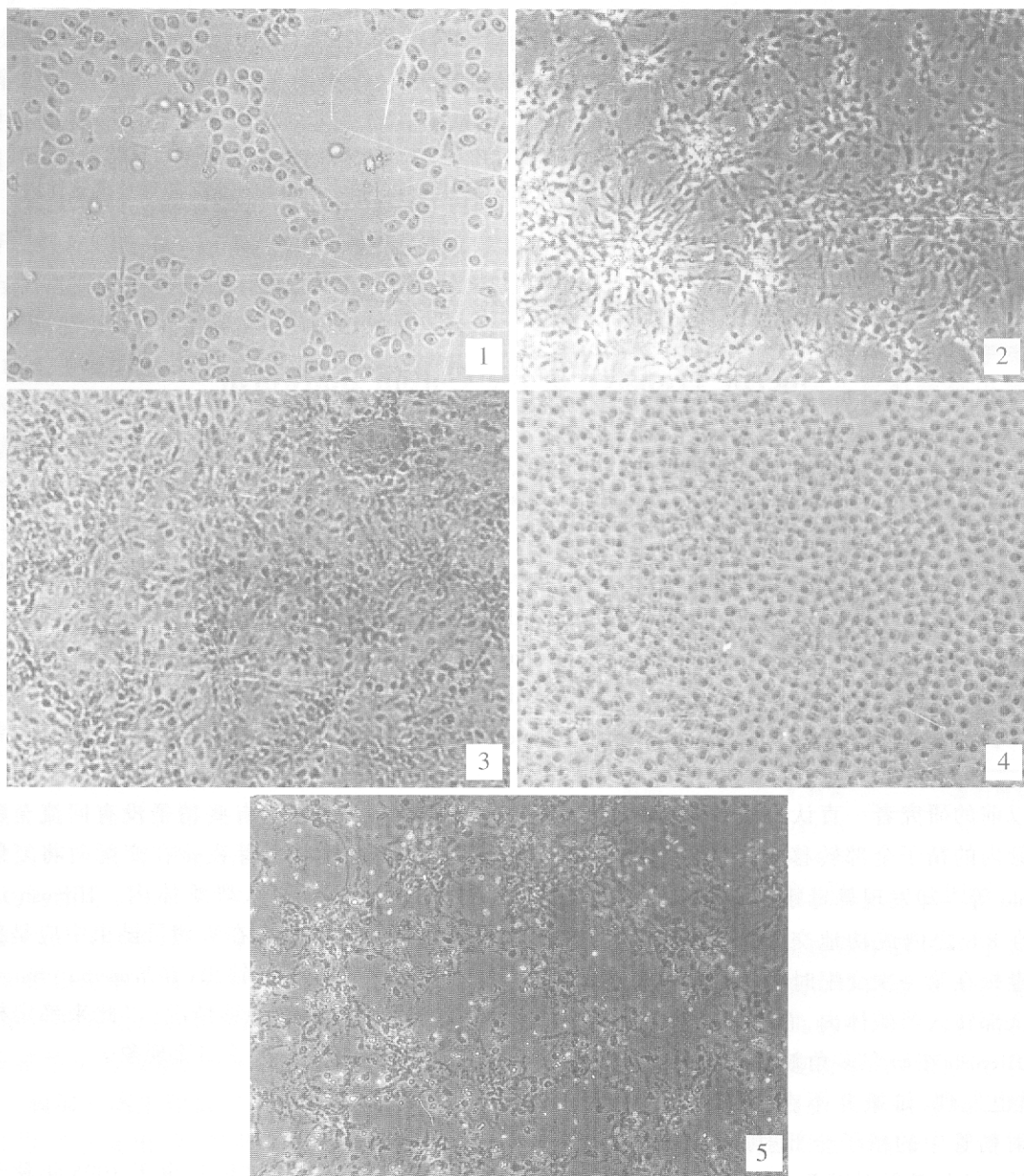
甲壳类动物钙磷代谢旺盛,需求量大,磷对虾类生长具有较大影响^[15]。饲料中适量的磷可促进中国对虾仔虾生长,磷含量过高可能抑制仔虾生长^[16]。本实验中对含不同 Cu^{2+} 浓度的 199 培养基中细胞总磷含量的测定表明,2 $\mu\text{g/L}$ 的 Cu^{2+} 浓度组显示出较高水平的总磷,10 $\mu\text{g/L}$ 的 Cu^{2+} 浓度组的总磷含量较低(图 2),在此浓度下培养的血细胞不仅贴壁率较低而且细胞轮廓不清,部分血细胞破裂(图版 I:5),说明较高浓度的 Cu^{2+} 不利于细胞的生长。培养基中添加痕量水平的离子态铜可以促进日本沼虾血细胞的生长, Cu^{2+} 可影响细胞内的 AKP 活力与构象进一步影响细胞正常的物质代谢

王军霞等: Cu^{2+} 对体外培养的日本沼虾血细胞的影响

图版 I

WANG Jun-Xia *et al.*: Effect of Cu^{2+} on the Culture of Haemocytes from
Macrobrachium nipponense

Plate I



1. 1640 培养基中日本沼虾血细胞 $\times 640$; 2. 199 培养基中日本沼虾血细胞 $\times 640$; 3. 渗透压为 472 mmol/L 的 199 培养基中的血细胞 $\times 640$; 4. 渗透压为 750 mmol/L 的 199 培养基中的血细胞 $\times 640$; 5. $10 \mu\text{g/L}$ Cu^{2+} 浓度组的 199 培养基中的血细胞 $\times 480$