

金属离子对培养日本对虾肝胰腺细胞的影响^{*}

王宏伟^① 王安利^② 王维娜^② 刘瑞兰^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西南师范大学生命科学学院 重庆 400715)

摘要:研究了培养基中分别加入 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对培养日本对虾肝胰腺细胞的影响,以测定细胞的 RNA/DNA 值作为评价指标。当 Ca^{2+} 浓度为 1 g/L 时,细胞生长最好;本实验中随 Mg^{2+} 浓度的增加,培养的日本对虾肝胰腺细胞的 RNA/DNA 值也升高;当 Zn^{2+} 浓度为 80 $\mu\text{g/L}$ 时,其 RNA/DNA 值最高;培养基中混合加入 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 有助于细胞贴壁生长。

关键词: 日本对虾;肝胰腺;细胞培养;金属离子

中图分类号: Q954.6, Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)05-06-04

Effects of Metal Ions on Cultured Hepatopancreatic Cells of *Penaeus japonicus*

WANG Hong-Wei^① WANG An-Li^② WANG Wei-Na^② LIU Rui-Lan^③

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

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

^③ College of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The effects of metal ions on the cultured cells from hepatopancreas of *Penaeus japonicus* was probed through the RNA/DNA ratio of the cultured cells. The cells grew best when the addition of Ca^{2+} was 1 g/L; the RNA/DNA ratio of cultured cells raised following the increasing of the addition of Mg^{2+} ; the RNA/DNA ratio of cultured cells reached the maximum when the addition of Zn^{2+} was 80 $\mu\text{g/L}$. The attachment of cultured cells was enhanced with the adding of Ca^{2+} and Mg^{2+} at the same time.

Key words: *Penaeus japonicus*; Hepatopancreatic cell; Primary culture; Metal ions

日本对虾(*Penaeus japonicus*)是一种经济价值很高的甲壳动物。具有生命力旺盛、抗病力强、可短时间离水、利于运输和鲜活上市等优点。但近年来,病毒性虾病造成对虾养殖大面积减产,而组织培养技术是研究病毒学的基础。建立细胞株(系)以供病毒的分离、纯化,并进行各种特性的分析,为进一步研究单克隆抗体奠定基础。培养对虾的免疫细胞是研究对虾免疫机能和筛选免疫增强药物的手段,从而为解决虾病防治问题开辟一条有效途径。金属离子对

于生物来说可分为必需金属和非必需金属,必需金属对维持生物体的正常生物化学活动必不可少,是生化反应中许多酶的活性中心和辅助因子^[1]。王维娜等曾报道饵料中的铜对中国对虾生长的影响^[2]。而金属离子对培养细胞的促生长作用,国内外尚未见报道。本文研究了培

^{*} 河北省重大科技攻关计划项目(No. 85-93-29);

第一作者介绍 王宏伟, 32 岁, 女, 讲师, 硕士; 主要从事水生生物学研究; E-mail: whw6688@hotmail.com.

收稿日期: 2002-09-10, 修回日期: 2003-07-01

培养基中加入 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对培养日本对虾肝胰腺细胞的作用。RNA/DNA 比率已经成为鉴定鱼类生长的新指标^[8],但利用其评定对虾培养细胞的生长情况尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用日本对虾购自河北保定府河市场,体长 8.5 ~ 10.5 cm,体重 6.13 ~ 10.34 g,用加有双抗(1 000 U/ml 青霉素、1 000 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素)的人工海水(盐度 35)暂养 3 h。

1.2 实验方法

1.2.1 肝胰腺细胞的培养 取活体对虾,经乙醇体表消毒,剪取适量肝胰腺组织放入小瓶中,用双抗溶液浸泡,用 Hanks 平衡盐溶液冲洗 3 ~ 4 遍,加入适量培养基,剪成小于 1 mm^3 的组织块,用取样器接种至培养板上,每孔 1 滴,培养细胞的浓度为 5×10^4 细胞/ml。静置 10 min,待其贴壁后,每孔加入 1 ml 培养基。将培养板放入 CO_2 培养箱中,在 26°C 恒温,供以 5% 的 CO_2 培养,每天用倒置显微镜观察并照相。培养 6 d 后,用胰蛋白酶消化取样(方法参考文献[4]),测定细胞的 RNA/DNA。

1.2.2 RNA/DNA 值的测定 按文献[3]方法测定。

1.2.3 金属离子的添加 基本培养基 199 (GIBCOBRL Grand Island N. Y. 14072 U. S. A.), 加胎牛血清 20%,血清在培养基中起重要作用^[5]。配制好的培养基调 pH 值为 7.2。配制培养基时分别加入 CaCl_2 、 MgCl_2 和 ZnSO_4 提供金属离子,形成离子浓度梯度,空白作对照。

2 结果与讨论

2.1 Ca^{2+} 对培养细胞的影响 在培养基中加入 Ca^{2+} ,细胞生长良好,其 RNA/DNA 值均高于对照组(图 1),尤其是当 Ca^{2+} 浓度为 1 g/L 时(封 3,图版 I:2),其 RNA/DNA 值最高,比对照组(图版 I:1)高 3 倍。 Ca^{2+} 是甲壳类动物生长不可缺少的物质,并且在细胞离子交换中发挥重要功能。血液中的 Ca^{2+} 能调节酸碱平衡并有渗透作用。 Ca^{2+} 又参与其它的生物功能,包

括血块形成、肌肉收缩、神经刺激传递、维持细胞膜的完整,在各种酶反应过程中作为辅助因子^[6]。本实验在日本对虾肝胰腺细胞培养基中加入适量 Ca^{2+} ,有助于细胞生长。

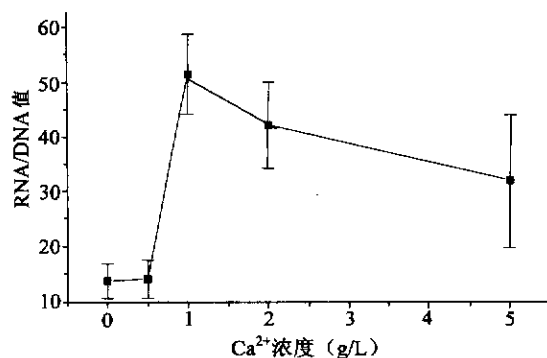


图 1 不同 Ca^{2+} 浓度下日本对虾肝胰腺原代细胞的 RNA/DNA 值

2.2 Mg^{2+} 对培养细胞的影响 在培养基中加入 Mg^{2+} ,细胞生长良好,其 RNA/DNA 值均高于对照组(图版 I:1),在本实验中随 Mg^{2+} 浓度的增加,培养的日本对虾肝胰腺细胞的 RNA/DNA 值也升高(图 2),但 Mg^{2+} 浓度为 5 g/L 时,细胞的 RNA/DNA 值不稳定。因此, Mg^{2+} 浓度为 4 g/L 时较适宜(图版 I:3)。不仅 Mg^{2+} 本身是外骨骼的组成成分,而且含有它的酶也参与生物体内各种生物化学活动^[6]。说明在日本对虾肝胰腺细胞培养基中加入适量 Mg^{2+} ,有利于细胞生长。

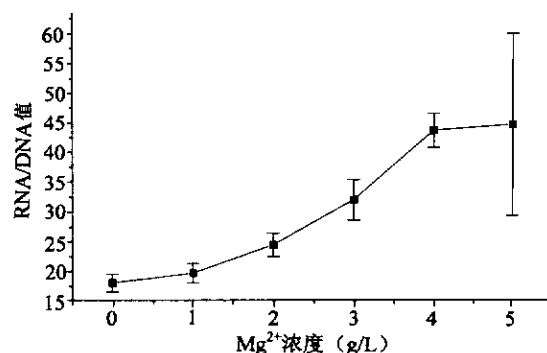


图 2 不同 Mg^{2+} 浓度下日本对虾肝胰腺原代细胞的 RNA/DNA 值

2.3 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 混合对培养细胞的影响 在培养基中混合加入 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,细胞生长非常

好,其 RNA/DNA 值均高于对照组(图 3),用倒置显微镜观察发现,培养基中添加 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 各 2 g/L 时,细胞贴壁率很高,细胞变形为扁平状(图版 I:4),细胞群整体上形成龟纹状贴壁生长。说明培养基中混合加入 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,有利于日本对虾肝胰腺细胞的贴壁生长,比不加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} (图版 I:1)和单独加入 Ca^{2+} 与 Mg^{2+} 的生长状况好很多。

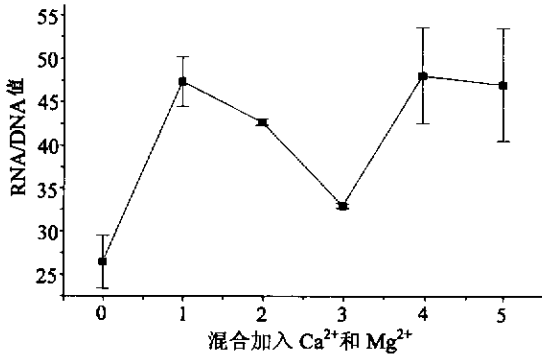


图3 不同 Ca^{2+} + Mg^{2+} 浓度下日本对虾肝胰腺原代细胞的 RNA/DNA 值

2.4 Zn^{2+} 对培养细胞的影响 在培养基中加入 Zn^{2+} , 细胞生长较好, 其 RNA/DNA 值均高于对照组(图 4), 尤其是当 Zn^{2+} 浓度为 80 $\mu\text{g/L}$ 时, 其 RNA/DNA 值最高, 与对照组(图版 I:1)相比差异显著 ($P < 0.05$), 倒置显微镜下观察也发现生长状况最好(图版 I:5), 说明此浓度较适宜。而当 Zn^{2+} 浓度再升高时, 其 RNA/DNA 值反而下降, 说明 Zn^{2+} 这种金属离子对培养日本对虾肝胰腺细胞有一定的适宜范围。 Zn^{2+} 是金属酶的组分, 参与蛋白质和碳水化合物分解酶的辅助因子。 Zn^{2+} 能防止上皮组织角化, 并参与胰岛素的贮藏。 Zn^{2+} 为生物正常生长发育所必需, 是很多金属酶的组成成分, 如碳酸酐酶、羧肽酶、碱性磷酸酶和乳酸脱氢酶等的组成成分或激活剂。 Zn^{2+} 也可作为某些酶的辅酶参与生物体内的代谢, 通过结合到细胞膜结构物上或通过金属催化的脂质过氧化反应使原生质和内膜处于稳定状态, 对维持细胞膜结构和功能方面起重要作用^[6]。

2.5 RNA/DNA 比率 RNA/DNA 比率已经成

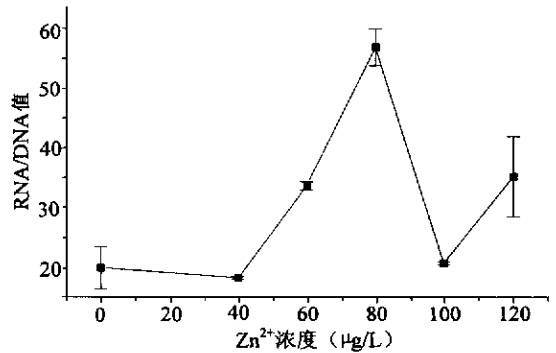


图4 不同 Zn^{2+} 浓度下日本对虾肝胰腺原代细胞的 RNA/DNA 值

为鉴定鱼类生长的新指标。但是利用其评定对虾培养细胞的生长状况在国内外尚未见报道。Naidhearat 和 Megusanik 于 1960 年提出 RNA 浓度可以作为细菌生长的指标。Bullow 首先研究鱼类生长与 DNA 的关系, 认为核糖核酸与脱氧核糖核酸之比率 (RNA/DNA) 与鱼类生长之间呈正相关^[7]。生长良好的鱼 RNA/DNA 较大, 生长差的鱼 RNA/DNA 较小^[8]。研究表明, 在蛋白质合成的体系中, 信使 RNA 及转运 RNA 是重要的组分, RNA 含量与蛋白质合成速度之间呈正相关。而蛋白质合成越多, 表明细胞生长越旺盛。司亚东和金有坤利用鲤鱼白肌中核糖核酸与脱氧核糖核酸的比值 (RNA/DNA) 来评价生态环境^[9]。赵振山等的实验也表明了肌肉中的 RNA/DNA 比率是一个能非常灵敏地反映鱼类生长和蛋白质含量的指标^[8]。由此可见, RNA/DNA 比率由于与蛋白质合成状况的正相关, 可以反映细胞生长的状况。本实验使用 RNA/DNA 值作为评价培养日本对虾肝胰腺细胞生长状况的指标, 较以往单凭观察的结果更为客观。

2.6 金属离子的影响 金属离子对虾类影响的研究约始于 20 世纪 70 年代初, Chinnayya 曾报道锌离子可降低淡水虾 (*Caridina rajadhary*) 的耗氧速度^[10], 曹登宫等曾报道过锌离子对中国对虾幼体的影响^[11]。以往对金属离子的研究主要着眼于一些毒性实验, 找出其致死浓度, 比较多地注重其毒害作用。然而作为生物生长

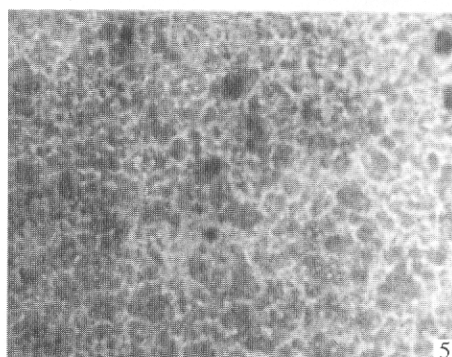
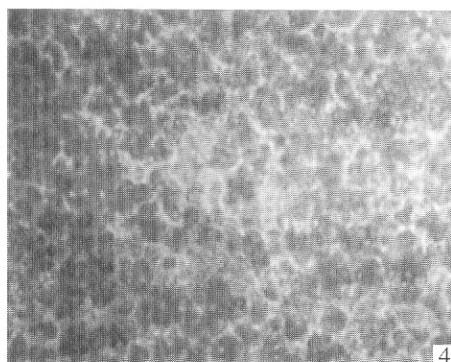
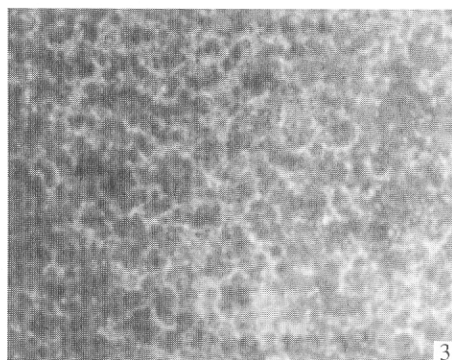
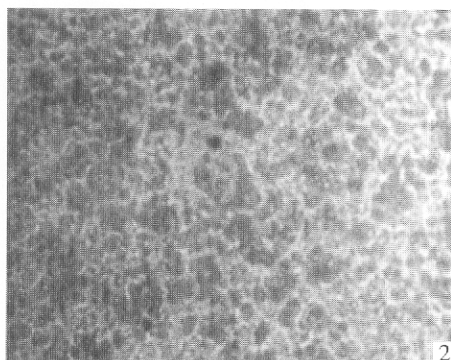
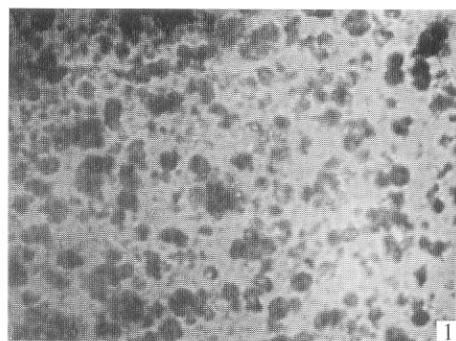
的必需金属,则在生命过程中起着相当重要的作用。王维娜等曾报道适量的金属离子对养殖对虾的生长有一定的促进作用^[2]。金属离子对细胞核的影响主要表现在:(1)金属离子与核蛋白产生相互作用,改变染色体的结构,影响DNA及RNA代谢酶的活性;(2)金属离子能够与核酸的磷酸基、核糖羧基和杂环基发生作用,影响正常的DNA复制和转录并影响核糖体水平上蛋白合成过程中RNA的含量及精确度;(3)金属离子对RNA的合成有的起诱导作用,有的则抑制。以往的研究主要针对鱼类,对虾类的研究报道很少。本实验在日本对虾肝胰腺细胞培养基中加入 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,细胞的RNA/DNA值均高于对照组,我们知道细胞的DNA量相对稳定,所以本实验中金属离子的加入,起了提高RNA量的作用,由此可以推测金属离子对培养日本对虾肝胰腺细胞RNA的合成起诱导作用,当然还需进一步深入细致地研究来证明。

参 考 文 献

- [1] 沈同,王镜岩主编.生物化学(下册).北京:高等教育出版社,1999. 156~158.
- [2] 王维娜,王安利,刘存枝等.饵料中的铜对中国对虾生

长及体内铜锌铁含量的影响.水产学报,1997,21(3): 258~262.

- [3] Buckley L J. Relationships between RNA/DNA ratio, prey density, and growth rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larva. *J Fish Res Board Can*, 1979, 36(12):1497~1502.
- [4] 霍正浩,樊景禹.大鼠表皮细胞的体外培养及纯化方法.动物学杂志,2001,36(2):37~39.
- [5] 王国杰,韩正康,陈伟华.无血清培养鹌鹑胚胎骨骼肌细胞的光镜与电镜观察.动物学杂志,1996,31(4):11~12.
- [6] 李爱杰,王道尊,麦康森等.水产动物营养与饲料科学.北京:中国农业出版社,1996.58~60.
- [7] Bullock F J. RNA/DNA ration as indicator of recent growth rates of a fish. *Ibid*, 1970, 27(12): 2343~2349.
- [8] 赵振山,林可椒.用RNA/DNA比率评定鲤鱼的生长状况及其配合饲料的营养价值.水产学报,1994,18(4): 257~264.
- [9] 司亚东,金有坤,周洪琪,陆桂.鲤鱼白肌中的RNA/DNA值与其生长的关系.上海水产大学学报,1992,13(4): 159~166.
- [10] Chinnayya B. Effect of heavy metals on oxygen consumption by the shrimp, *Caridina rajadhari* (Bouvier Indian). *Exp Biol*, 1971, 9:277~278.
- [11] 曹登官. Zn^{2+} 对对虾幼体发育的影响及EDTA钠盐的降解效应.见:中国水产学会编,全国海淡水养殖苗种及饵料学术会议论文报告汇编.北京:海洋出版社,1982. 25~29.



日本对虾肝胰腺细胞 ×400 1. 对照, 培养基中不添加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} ; 2. 培养基中添加 1 g/L 的 Ca^{2+} ; 3. 添加 4 g/L 的 Mg^{2+} ; 4. 添加 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 各 2 g/L; 5. 添加 80 $\mu\text{g/L}$ 的 Zn^{2+}