

不同 pH 值条件下日本对虾肝胰腺及血的细胞培养

王宏伟 孟翠丽 刘晋 齐小强* 张毅

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘要: 动物细胞培养是生物技术的一个重要领域, 因为培养的细胞可以用来分离纯化病毒、生产疫苗和药物。本实验在日本对虾肝胰腺细胞和血细胞原代培养的基础上, 利用 RNA/DNA 值进行不同 pH 值培养基的比较, 认为对于血细胞 pH 7.2 为最适宜, 而对于肝胰腺细胞 pH 7.6 比较合适。同时利用光镜及电镜做了一些形态和结构上的观察。

关键词: 日本对虾; 细胞培养; 肝胰腺; 血细胞

中图分类号: Q954.S917 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2005)01-88-04

Culture of Hepatopancreatic Cells and Hemocytes under Different pH Values in *Penaeus japonicus*

WANG Hong-Wei MENG Cui-Li LIU Jin QI Xiao-Qiang ZHANG Yi

(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: Culture of animal cells is an important area of biotechnology because the cells can be used for virus isolation, vaccine and medicine production. In the present study, RNA/DNA ratio was used to evaluate three kinds of media of different pH values. The results showed that pH 7.2 was the optimized condition for hemocyte culture while pH 7.6 was a proper condition for hepatopancreatic cell culture in *Penaeus japonicus*. The morphology, structure and ultrastructure of cells were also examined.

Key words: *Penaeus japonicus*; Cell culture; Hepatopancreas; Hemocyte

日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 是重要的经济养殖虾类。我国沿海对虾养殖曾是出口创汇的支柱产业, 但近年来由于病毒性流行病的爆发, 使得对虾养殖业遭受了巨大的损失, 对虾病毒病的防治已成为迫在眉睫的攻关课题。由于病毒没有独立的新陈代谢系统, 必须借助于活的组织细胞才能培养分离出来, 所以需要建立细胞系以供病毒的分离纯化, 并进行各种病毒特性的研究。国内外已建立了主要经济养殖鱼类的许多细胞系, 可作为这些鱼病毒性传染病的检测工具。然而, 对虾细胞培养难度很大, 且从事此研究的学者也不多, 目前国内外报道已建立的细胞系只有几个, 还只是限于细胞系^[1], 并没有成为商品细胞。而细胞培养的关键是选择适宜的培养基, 创造最佳生长条件。

值来检验日本对虾的肝胰腺细胞和血细胞在不同 pH 值培养基中的生长状况, 并找出适合对虾肝胰腺细胞和血细胞生长培养基的 pH 值, 为选择培养基提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 日本对虾购自河北保定府河市场, 体长 8.5~10.5 cm, 体重 6.13~10.35 g, 用配有双抗 (1 000 U/ml 青霉

基金项目: 河北省动物学重点学科基金, 河北大学自然科学基金青年基金项目 (No. Q200407);

第一作者介绍: 王宏伟, 女, 博士研究生, 讲师, 主要从事水生生物学研究; E-mail: whw6688@126.com

* 现为协和医科大学博士研究生。

收稿日期: 2004-08-16, 修回日期: 2004-11-08

本实验利用倒置显微镜、电镜观察以及 RNA/DNA

素、1 000 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素)的人工海水(盐度 35)养殖 3 h。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

1.2.1.1 血细胞的培养 将对虾取出,用脱脂棉擦拭体表,放入冰海水(0~4 $^{\circ}\text{C}$)中,浸泡麻醉 10 min 以上取出。以下操作均在无菌间进行,用无菌吸水纸拭干体表,用取血针按 3:2 吸入抗凝剂(0.25% 半胱氨酸),自头胸甲后缘围心窦刺入心脏取血,接种至培养板。每只虾接一至二孔,每孔加 1 ml 培养基。

1.2.1.2 肝胰腺细胞的培养 取活体对虾放入 75% 乙醇中,浸泡体表除菌 10 min 以上。取出后用剪刀剪取适量肝胰腺(注意不要碰破胃、肠组织)放入小瓶中,用双抗溶液(1 000 U/ml 青霉素、1 000 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素)浸泡 10~15 min,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。静置 10 min,待其贴壁后,每孔加入 1 ml 培养基。

以上操作均在无菌间的超净台上进行,所有物品

均需严格灭菌,培养基需用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤。配制培养基时调节 pH 值分别为 6.8、7.2 和 7.6 (pH 值若超过 7.6 对细胞生长不利^[2]),分为 3 组培养基对细胞进行培养。将培养板放入 CO_2 培养箱中,26 $^{\circ}\text{C}$,供以 5% 的 CO_2 培养,每天用倒置显微镜观察并照相,镜检时应用封口膜将培养板封严。

1.2.2 RNA/DNA 值的测定 按文献^[3]的方法。

1.2.3 超微结构的观察 取生长较好的孔,用刮片刮出细胞进行双固定,即用 3% 戊二醛固定 30 min,2% 锇酸固定 40 min。然后脱水、渗透、包埋、修块和切片。超薄切片用醋酸铀和柠檬酸铅进行双染色,干燥后用透射电镜进行观察并拍照。

2 结果

2.1 肝胰腺细胞的生长状况 在相同基础培养基上调定 6.8、7.2 和 7.6 三种不同的 pH 值,发现当 pH 值 7.6 时细胞生长状况最好,可见到组织团块构成团簇细胞集落,细胞成圆形,光滑透明,折光性强,富于立体感

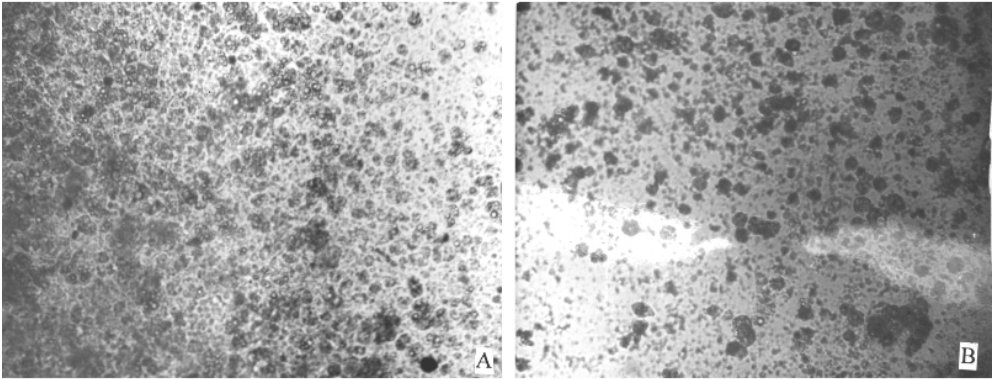


图 1 原代培养 72 h 的日本对虾肝胰腺细胞 $\times 400$

A: pH 7.6; B: pH 6.8

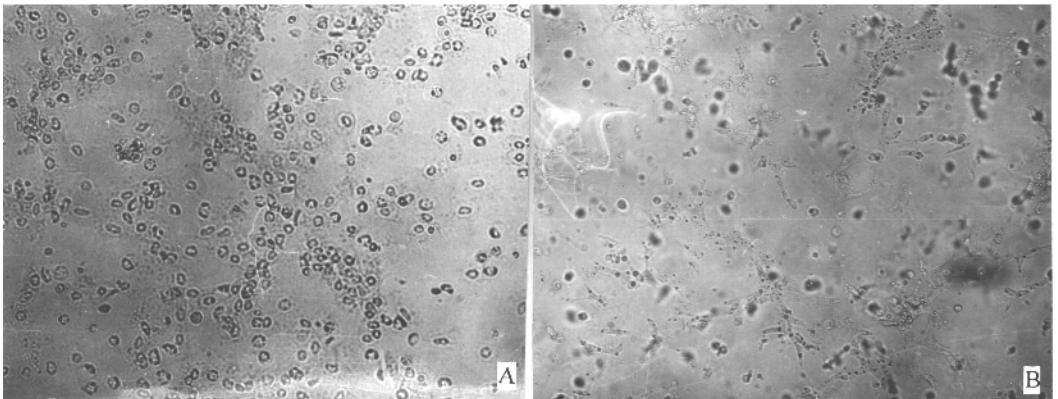


图 2 原代培养 72 h 的日本对虾血细胞 $\times 400$

A: pH 7.2; B: pH 7.6

(图 1:A) 细胞分布均匀、广泛,甚至培养孔的边缘都有分布。测定 RNA/DNA 值, pH 7.6 时值最高,比 pH 值 7.2 时高 1 倍,比 pH 值 6.8(图 1:B) 时高 4 倍,且经 One Way ANOVA 检验,有显著性差异($P < 0.05$)。在预实验中,曾调定 pH 为 8.0,细胞松散,生长不良,测定 RNA/DNA 值,比其他各实验组的 RNA/DNA 值小很多。故认为 pH 值 7.6 时,肝胰腺细胞生长较好(图 3),而 pH 值大于 7.6 时,对细胞生长不利。

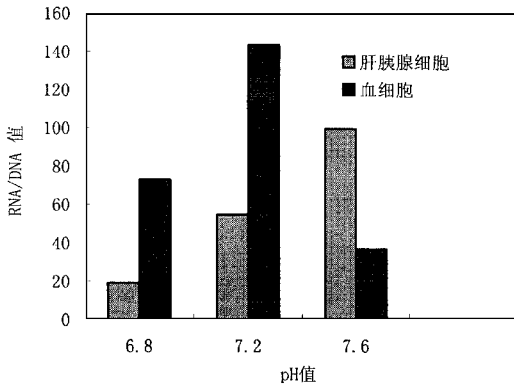


图 3 肝胰腺细胞和血细胞在不同 pH 值条件下 RNA/DNA 值比较

2.2 血细胞的生长状况 血细胞在 6.8、7.2 和 7.6 三种 pH 值条件下都可生长,但仔细观察可看出在 pH 值 7.2 时生长情况最好,细胞多呈圆形,分布均匀,部分细胞已贴壁,开始变形(图 2:A)。从 RNA/DNA 值看来,也是 pH 值 7.2 时最高,比 pH 6.8 时高出 1 倍多,比 pH 7.6(图 2:B) 时高出 2 倍多(图 3),且差异显著($P < 0.05$)。延长培养时间可见贴壁的梭状变形细胞。

2.3 血细胞超微结构的观察 通过电镜观察发现本实

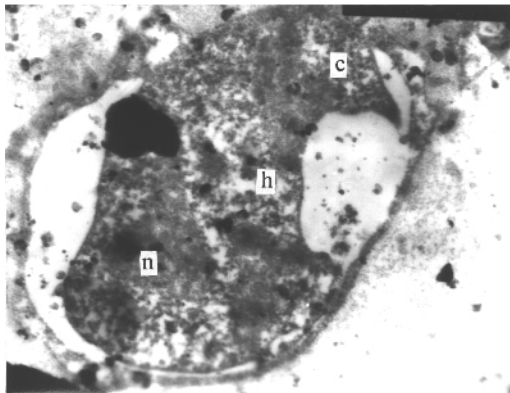


图 4 原代培养 72 h 的日本对虾血细胞超微结构 (pH 7.2) × 10 000
c 细胞质; h 高电子密度颗粒; n 细胞核

验血细胞中细胞质较少,细胞核较大,部分核膜紧贴着质膜,发现核中有颗粒状物质,细胞质中未发现细胞器,其质膜清晰可见(图 4)。

3 讨论

本实验发现, pH 值对培养日本对虾细胞有着显著影响。在以往的研究中都是通过测定所需培养动物体液的 pH 值,来决定培养基的酸碱度^[4],一般脊椎动物细胞培养基的适宜 pH 值为 7.2~7.4 之间,而培养对虾细胞的 pH 值多为 6.8~7.2^[1]。以往的研究都没有强调不同组织所需培养条件的差异。实际上,不同组织因为有其不同的生理功能,也应有其各自不同的生长环境,就象人的胃和肠,同是消化道, pH 值却截然不同,它们的细胞生存条件也有差异。因而对于不同的组织细胞进行培养时,也应有不同的 pH 值。

经测定,日本对虾肝胰腺的内部偏碱性,本实验证明其细胞在碱性条件下生长得较好,细胞多为圆形,成簇存在。即在 pH 值 7.6 的条件下细胞生长最好,并与其它组有显著差异($P < 0.05$)。

由于对虾是开管式循环,其血液不仅要起到促进循环和运输物质的作用,更为重要的是作为一种缓冲液,调节体内的平衡状态,因而其 pH 值更趋向于中性。本实验证实, pH 值为 7.2 时日本对虾血细胞生长较其它两组更好,并且与倒置显微镜下观察到的细胞生长状况相一致。

在对虾血细胞体外培养的研究中,胡珂等将体外培养血细胞中的多形吞噬样细胞分为两种类型,一种为胞体向四周伸展的多边形不规则细胞;另一种为胞体向两极伸展的 I 形细胞^[5]。在实验中观察到梭形、三角形、多角形的细胞。陈平等将对虾血细胞分为透明细胞(无颗粒细胞)、大颗粒细胞、小颗粒细胞和“浆样细胞”4 类^[6],叶燕玲等将中国对虾血细胞分为透明细胞、小颗粒细胞和大颗粒细胞^[7]。本实验发现在电镜下血细胞中含有电子致密颗粒, Soderhall 和 Smith 认为对虾血细胞颗粒中存在着酚氧化酶酶原,而这种酶原的活化是对虾免疫反应的关键^[8]。

实验中发现血细胞主要有圆形淋巴细胞和多形吞噬样细胞,且以圆形细胞为主,多形细胞主要有菱形和不规则形两种。我们认为圆形淋巴状细胞是血细胞的主要成分,为血液的主要功能细胞。多形吞噬样细胞由于可作变形运动,可能参与对外来异物的吞噬和清除,形成对虾血液的防御功能^[5]。延长培养时间,圆形细胞可贴壁变形形成梭状(图 1:B)。

用 RNA/DNA 值来评价鱼类的生长状况,在国内外

均有一些报道,但在虾类上的报道很少。Bullock 对蓝鳃鱼的肌肉和肝脏进行 RNA/DNA 值测定,认为 RNA/DNA 值可作为鱼类近期生长率的指标^[9]。Haines 对几种鲤科鱼的肝脏进行测定,认为 RNA/DNA 值还可衡量鱼类种群的长期生长^[10]。Buckley 对于大西洋鲑鱼的肌肉测定表明, RNA/DNA 值与其食物量及生长率有关^[3]。赵振山等人的实验表明,肌肉中 RNA/DNA 值是一个能非常灵敏地反映鱼类生长和蛋白质含量的指标。他们的结果表明, RNA/DNA 值与鱼类生长率呈正相关,并确认这一比率是评定鱼类近期及长期生长的良好指标^[11]。笔者曾采用测定培养细胞的 RNA/DNA 值来评定其生长状况^[12],同时还辅以用倒置显微镜观察其形态变化和分布情况。实验证明 RNA/DNA 值与细胞的实际生长情况是相符的。

综上所述,原代培养的日本对虾肝胰腺细胞在 pH 值 7.6 的条件下生长较好,血细胞在 pH 值 7.2 的条件下生长较好。可用 RNA/DNA 值来评定细胞的生长状况,相对而言,其值越高细胞生长越好。本实验表明,不同组织所需要的培养条件是有差别的,因此细胞培养需要根据培养对象,摸索最佳的培养条件。

对虾的肝胰腺具有解毒功能,但同时也是最易发病的部位,血细胞是直接与免疫机能相关的。所以本实验选取日本对虾肝胰腺和血细胞来培养,力图为建立对虾细胞系奠定基础,利用离体培养细胞研究病毒感染机制,从而为解决虾病防治问题提供一条有效途径。

参 考 文 献

[1] 张晓华,王立平,徐怀恕. 对虾组织培养研究进展及其

开发应用的潜在价值. 海洋湖沼通报, 1996, 2: 78 ~ 82.

- [2] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养. 北京:世界图书出版公司, 1996, 1 ~ 5.
- [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): 1 497 ~ 1 502.
- [4] 李霞. 浅谈虾贝细胞培养方法和应用前景. 国外水产, 1993, 4: 1 ~ 3.
- [5] 胡珂,王立平,段爱梅. 中国对虾的组织培养. 水产学报, 1991, 15(4): 328 ~ 331.
- [6] 陈平,黄槐,池信才等. 四种对虾血细胞组成及超微结构. 水生生物学学报, 1995, 22(2): 158 ~ 163.
- [7] 叶燕玲,陈宽智. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 血细胞超微结构分类计数. 青岛海洋大学学报, 1983, 23(2): 35 ~ 42.
- [8] Soderhall K, Smith V J. Separation of the hemocyte populations of *carcinus maenas* and other marine decapods and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol*, 1983, 7: 229 ~ 239.
- [9] Bullock F J. RNA/DNA ratio as indicator of recent growth rates of a fish. *Ibid*, 1970, 27(12): 2 343 ~ 2 349.
- [10] Haines T A. An evaluation of RNA/DNA ratio as a measure of long-term growth in fish populations. *J Fish Res Board Can*, 1973, 30(2): 195 ~ 199.
- [11] 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.
- [12] 王宏伟,王安利,王维娜等. 金属离子对培养日本对虾肝胰腺细胞的影响. 动物学杂志, 2003, 38(5): 6 ~ 9.