

克氏原螯虾精巢与输精管组织细胞 原代培养方法初探

刘凯于 姚汉超 邱宝国 郭建军 彭建新 洪华珠

(华中师范大学生命科学院 教育部农药与化学生物学重点实验室 武汉 430079)

摘要: 将剪碎的克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 精巢与输精管组织块分别接种于含 20% FBS、双抗以及添加了适量无机盐等的 M199-MK、MEM、S20、Grace 's 和 L-15 培养基中, 25°C 恒温静置培养。结果表明, 在 Grace 's 培养基中, 只有少量组织块贴壁。在其余培养基中, 大多数组织块能在 1~2 周内逐渐贴壁。L-15 和 S20 培养基培养效果最好。组织块贴壁后, 一些成纤维细胞和上皮样细胞逐渐从组织块迁移出来。传代后组织块可继续贴壁并重新迁移出一些成纤维细胞与少量上皮样细胞。添加部分草鱼细胞系 PSF 或斜纹夜蛾细胞系 S1 驯化的培养基进行培养, 驯化培养基: 新鲜培养基 = 1:5 (v/v), 结果表明, S1 驯化培养基能促进细胞的迁移。组织块一般可离体培养 2~4 个月, 但是都未能形成细胞单层。胰蛋白酶消化后分散的虾细胞不能贴壁。

关键词: 克氏原螯虾 细胞培养 精巢 输精管 原代培养

中图分类号: Q952 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2007)04-60-05

Preliminary Studies on the Cell Culture of the Spermary and Spermaduct in *Procambarus clarkii*

LIU Kai-Yu YAO Han-Chao QIU Bao-Guo GUO Jian-Jun PENG Jian-Xin HONG Hua-Zhu

(Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, School of Life Science,

Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: The minced tissue of the spermary and spermaduct in *Procambarus clarkii* was cultured in different media including M199-MK, MEM, S20, Grace 's medium and modified leibovitz L-15 medium, supplemented with 20% FBS, antibiotics and salts at 25°C. The results showed that only a few pieces of tissue attached to the flasks in Grace 's medium, many pieces of tissue could attach to the culture flasks during 1 to 2 weeks in M199-MK and MEM media; and the cells grew well in S20 medium or modified L-15 medium. Two types of conditioned media were tested and the modified L-15 medium conditioned by insect cell line S1 could improve the migration of the cells. The cells could survive for 2-4 months, but could not form a monolayer. The cells dissociated by trypsin could not attach to the flasks.

Key words: *Procambarus clarkii*; Cell culture; Spermary; Spermaduct; Primary culture

虾病毒性疾病的爆发严重威胁着虾类养殖业的健康发展, 但迄今仍未建立或筛选到虾病毒敏感的细胞系, 这已成为病毒性虾病研究的一个瓶颈^[1-8]。虽然 Hsu 等建立了虾细胞系, 但其对虾病毒敏感性低^[9], 而且在此基础不断

基金项目 湖北省自然科学基金项目(No. 9523), 校自然科学基金项目;

第一作者介绍 刘凯于, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 无脊椎动物病理学和细胞生物学, E-mail: liukaiyu@mail.ccnu.edu.cn.

收稿日期 2006-12-11, 修回日期 2007-05-12

改进方法,也尚未见新的虾细胞系建立的报道^[3]。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)来源广泛,对白斑症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)很敏感,以此为材料有望建立对虾病毒敏感的细胞系^[10]。笔者尝试了克氏原螯虾精巢等组织细胞的多种原代培养方法,现将初步结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

克氏原螯虾购自集贸市场,室内常温饲养。

1.2 细胞系和培养基

斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)昆虫细胞系 SI 由中山大学建立并惠赠,用改良的 L-15 替换 Grace's 培养基培养。草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)吻端细胞系 PSF 采用含 10% FBS 的 L-15 培养基进行培养。本实验所使用的培养基见表 1。

1.3 细胞培养

从饲养水缸中挑选出活力较强的雄性克氏原螯虾,用自来水冲洗 2~3 遍,去掉粘附物。将洗好的虾放入广口瓶内,再把吸有少量乙醚的棉球置入瓶内将虾麻醉。5 min 后用镊子取出雄虾,用含 70% 酒精的棉

表 1 培养基配方*
Table 1 Preparation of media

	M199-MK	MEM	S20 ^[11]	Grace's (TNM-FH)	L-15**
来源 Sources	利用 M199 粉剂自配	GIBCO	参照文献自配	GIBCO	GIBCO
pH	6.8	7.4	7.4	6.5	7.2
添加物 Supplements	3 g/L 酵母提取物、3 g/L 水解乳蛋白和 1 g/L 葡萄糖	无	无	3 g/L 酵母提取物、3 g/L 水解乳蛋白和 1 g/L 葡萄糖	3 g/L 酵母提取物、3 g/L 水解乳蛋白和 1 g/L 葡萄糖
主要用途 Usage	培养多种昆虫细胞等	培养蚊子细胞 C7-10 等	培养蟑螂细胞系等	培养多种昆虫细胞	培养多种昆虫细胞等

* 添加 20% FBS (GIBCO-BRL) 100 IU/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素; ** 添加 5.2 g/L NaCl, 1.5 g/L CaCl₂ 和 0.05 g/L MgCl₂; 培养斜纹夜蛾细胞系 SI 的培养基 L-15 不添加额外的无机盐 (pH 6.4); 培养草鱼细胞系 PSF 的 L-15 培养基不添加额外的无机盐、酵母提取物、水解乳蛋白和葡萄糖 (pH 7.4), FBS 浓度为 10% (v/v)。

* Media were supplemented with 20% FBS, 100 IU/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin. ** Media were supplemented with 5.2 g/L NaCl, 1.5 g/L CaCl₂ and 0.05 g/L MgCl₂; L-15 medium without the supplemented salts was used to culture SI cells (pH 6.4). L-15 medium without the supplemented salts, yeast extract, lactalbumin hydrolysate and glucose was used to culture PSF cells (pH 7.4)。

球将虾体表擦拭 2~3 遍进行消毒,或者将虾浸入 70% 酒精内浸泡 5~10 min,再用无菌 PBS 漂洗 2 遍以去掉酒精,然后用无菌滤纸吸干体表。在无菌条件下用眼科剪将虾的头胸部剪开,用眼科镊取出精巢和相连的输精管放入青霉素小瓶内。加入 PBS 洗涤 2 次,去掉附着的血淋巴细胞,再用眼科剪将组织块反复剪碎。加入无血清培养基,吹打均匀,1 000 r/min 离心 10 min。弃上清,加入适量体积的完全培养基,吹匀后将悬液接入细胞培养瓶中,置 25℃ 恒温培养箱中常规气相条件下静置培养。或者剪碎后用 0.25% 胰蛋白酶消化 5~10 min (28℃),其余步骤同上。隔日用倒置显微镜观察一次,每 10 d 采取半量换液法换液一次。

2 结果与讨论

7~14 d 内,精巢与输精管组织块在 Grace's 培养基中只有少量贴壁;在 M199-MK 和 MEM 培养基中,贴壁组织块较多;在 L-15 和 S20 培养基中,贴壁组织块最多,瓶底上几乎布满大小不一的组织块。一些成纤维细胞和上皮样细胞从贴壁组织块逐渐迁出,同时不断有一些体积较大的球形细胞从组织块释放出来,早期组织块周围经常可见精子细胞。10 d 后将组织块吹打下来移入新瓶,部分组织块可继续贴壁和迁移出新的细胞。培养物在 S20 或改良 L-15 中可存活 2~4 个月,但是都没有形成细胞单层。克氏原螯虾精巢组织细胞能离体培养较长时

间, 这为细胞体外转化的研究提供了很好的条件, 也有利于离体研究虾生殖细胞的发育。

添加 1/5 体积的草鱼细胞系 PSF 或斜纹夜蛾细胞系 SI 驯化的培养基至新鲜 L-15 培养基中培养虾组织块, 结果表明 SI 细胞驯化的培养基能促进细胞的迁移, 但是草鱼细胞系 PSF 驯化的培养基似乎没有促进细胞从组织块迁移出来

的作用(图 1)。组织细胞在两种培养基中都未能形成细胞单层。胰蛋白酶消化后分散的精巢与输精管细胞不能贴壁, 只能在培养基中维持 7~10 d。有关驯化培养基或饲细胞层对原代培养细胞生长的促进作用已被不少学者所证实^[12,13]。

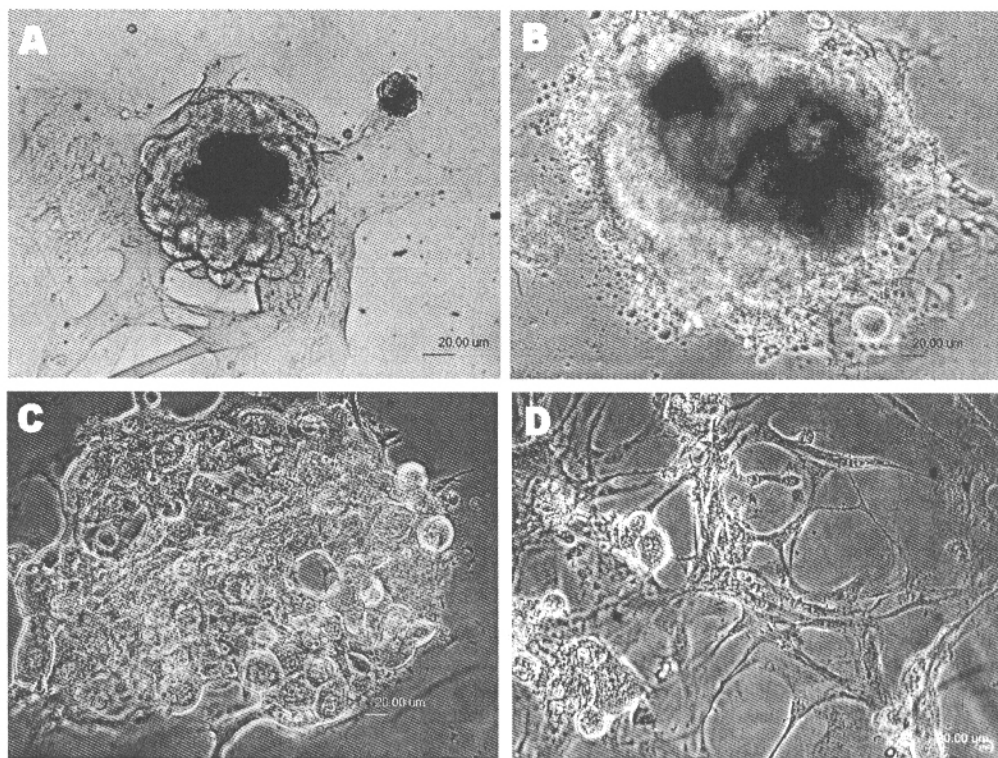


图 1 原代培养的精巢和输精管组织细胞

Fig.1 Primary culture of the spermary and spermaduct from *Procambarus clarkii*

在草鱼吻端细胞系 PSF 驯化培养基中培养 70 d (A) 和 80 d (B) 克氏原螯虾精巢和输精管组织细胞, 分别示细胞聚集成团和释放出许多小泡; 在昆虫细胞系 SI 驯化培养基中培养 60 d (C) 和 80 d (D) 的克氏原螯虾精巢和输精管组织细胞, 分别示上皮样细胞和纤维状细胞。驯化培养基与新鲜培养基体积比为 1/5。

The cells cultured in the modified L-15 medium conditioned by carp cell line PSF for 70 d (A) and 80 d (B), showing cell aggregation and the formation of vacuoles, respectively. The epidermal-like cells cultured in the modified L-15 medium conditioned by insect cell line SI for 60 d (C) and the fibroblast-like cells cultured for 80d. The ratio of conditioned media to fresh media is 1 to 5 (v/v).

目前虾细胞培养的研究主要取材于多种对虾^[4], 有关淡水虾细胞培养研究的报道较少, 特别是螯虾细胞培养的报道更少。众所周知, 同一个纲、目甚至属内不同种类动物, 其细胞原代培养难易程度差别很大。例如, 粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 多种组织细胞的原代培养较易获得成功^[14], 而蝗虫细胞原代培养迄今尚未获

得理想结果。因此尝试不同种类虾的细胞培养具有一定的意义。其次, 对虾的血淋巴细胞和淋巴器官组织块等的原代培养维持时间一般都较短^[2], 而本文中精巢等的组织块能离体培养较长时间。第三, 本文筛选的培养基增补了酵母提取物、水解乳蛋白, 文献报道二者都含有一些促进细胞生长的物质^[15]; 异源细胞驯化的培

培养基含有培养细胞分泌的多种蛋白质,也许能促进虾细胞的生长,培养基中无机盐的含量也参照克氏原螯虾的血淋巴的成分进行了增补^[16]。因此本文的研究方法为今后继续开展虾细胞培养的研究提供了一定的参考。

考虑到虾与昆虫同属于节肢动物门,两者具有一定的亲缘关系,因此主要尝试多种可用于培养昆虫细胞的培养基对螯虾精巢组织细胞等培养的效果。特别是改良后的 L-15,其无机盐的含量参考了螯虾的血淋巴成分。基于大多数的鳞翅目昆虫细胞都需要优质的胎牛血清才能正常生长或存活,本实验中虾细胞的培养全部采用了优质的 GIBCO 胎牛血清。

由于 L-15 培养基既能培养脊椎动物细胞系(如鱼细胞系和哺乳动物细胞系),又能培养无脊椎动物细胞系(如昆虫细胞、蝉细胞和已经建立的虾细胞系),因此被选作主要的培养基。细胞系一般在培养过程中能分泌一些物质促进自身的增殖,我们初步观察了鲤鱼细胞系 PSF 驯化培养基和斜纹夜蛾细胞系 SI 驯化培养基对精巢等培养细胞生长的影响(PSF 鱼细胞系培养基是 L-15 + 10% FBS, pH 7.4;斜纹夜蛾细胞系的培养基是 L-15 + 3 g/L 水解乳蛋白 + 3 g/L 酵母提取物 + 1 g/L 葡萄糖, pH 6.4),结果表明 SI 细胞驯化的培养基能促进克氏原螯虾精巢等组织细胞的迁移,但是未能形成细胞单层。

文献已经报道了一些动物的精巢细胞系,例如鳞翅目樗蚕(*Philosamia cynthia*)和青鳉鱼(*Oryzias latipes*)精巢细胞系^[17,18],其中鱼的精巢细胞系还可以产生精子细胞^[18],因此克氏原螯虾精巢等组织细胞也有望作为成功建系的材料之一。虽然克氏原螯虾的精巢和输精管组织细胞能在体外培养较长时间,但是目前仍未能转化,可尝试采用基因工程等手段促使细胞转化^[19,20]。此外,如果能从已经建立的斑节对虾(*Penaeus monodon*)淋巴细胞系中筛选到 DNA 合成旁路代谢途径缺陷株,那么也可尝试建立杂交细胞系,并以此为材料筛选虾病毒敏感的细胞系。

虾细胞系的建立可能需要一个较长的过

程,不能操之过急。例如,我们先后建立了 7 种昆虫的 10 余株细胞系,经验表明一个细胞系的建立短则需要 3 个月,长的需一至多年^[21]。特别是我们曾尝试用 Grace's 培养基建立棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)细胞系,但没有成功^[22],然而后来陆续有使用 Grace's 培养基建立棉铃虫细胞系的报道^[23]。Hansen 等在 740 次培养工作中,仅有 1 次出现螺细胞群的生长,并成功建立了细胞系 Bge^[24]。很多文献报道昆虫细胞系可适应多种不同类型的培养基(包括无血清培养基),许多细胞系(如蝉、鱼、哺乳动物、蚊子、鳞翅目昆虫和斑节对虾的淋巴细胞系)都能在同一种培养基中生长(如改良的 L-15 培养基)^[9,25-27]。本研究结果表明 S20 培养基无需改良,就能适合克氏原螯虾精巢和输精管组织细胞的原代培养。Hsu、Tapay 和 Neumann 等分别采用 L-15 和 Eagle's Minimum Essential Medium(MEM)培养基成功地建立了对虾淋巴组织和污泥鲸螯虾(*Orconectes limosus*)神经组织的永生细胞系^[10,28,29]。因此适合于虾细胞培养的培养基种类可能较多,建立虾细胞系的关键是细胞的转化。

参 考 文 献

- [1] 王立新,杨朝霞.海产虾类细胞培养研究进展.动物医学进展,2002,23(5):7-9.
- [2] 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.
- [3] Kasornchandra J, Khongpradit R, Ekpanithanpong U, et al. Progress in the development of shrimp cell cultures in Thailand. *Methods Cell Sci*, 1999, 21(4):231-235.
- [4] 胡超群,罗鹏.对虾细胞培养及对虾病毒体外培养研究进展.热带海洋科学,2006,25(1):76-82.
- [5] Chen S N, Chi S C, Kou G H, et al. Cell culture from tissues of grass prawn, *Penaeus monodon*. *Fish Pathology*, 1986, 21(3):161-166.
- [6] Tong S, Miao H. Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues. *Aquaculture*, 1996, 147(3):151-157.
- [7] Fan T, Wang X. *In vitro* culture of embryonic cells from shrimp, *Penaeus chinensis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 267(2):175-184.
- [8] 王军霞,王维娜,王安利等. Cu²⁺ 对体外培养的日本沼虾细胞的影响.动物学杂志,2003,38(3):22-25.

- [9] Hsu Y L , Yang Y H , Chen Y C , *et al.* Development of an *in vitro* subculture system for the oka organ (Lymphoid tissue) of *Penaeus mondon* . *Aquaculture* , 1995 , **136** : 43 ~ 55 .
- [10] 李钊 杨丰 . 对虾白斑杆状病毒对螯虾血淋巴原代细胞的感染 . 高技术通讯 , 2002 , **12** (12) : 74 ~ 77 .
- [11] Philippe C . Culture of fat body of *Periplaneta americana* : tissue development and establishment of cell lines . *J Insect Physiol* , 1982 , **28** (3) : 257 ~ 265 .
- [12] Degrassi A , Hilbert D M , Rudikoff S , *et al.* *In vitro* culture of primary plasmacytomas requires stromal cell feeder layers . *PNAS* , 1993 , **90** (5) : 2 060 ~ 2 064 .
- [13] Tokiwa T , Miyagiwa M , Kawai A , *et al.* The effect of conditioned medium on fetal human liver cells in primary culture . *Research in Experimental Medicine* , 1986 , **186** (6) : 463 ~ 468 .
- [14] McKenna K A , Hong H , Vannunen E , *et al.* Establishment of new *Trichoplusia ni* cell lines in serum-free medium for baculovirus and recombinant protein production . *J Invertebr Pathol* , 1998 , **71** (1) : 82 ~ 90 .
- [15] Nagasawa H , Misuhashi J , Suzuki A . Growth factors in the lactalbumin hydrolysate to the cells of the flesh fly , *Sarcophaga peregrina* . In : Kuroda Y , Kurstak E , Maramorosch K eds . *Invertebrate and Fish Tissue Culture* . Tokyo : Japan Scientific Society Press , 1987 , 29 ~ 32 .
- [16] Van Harreveld A . Physiological saline for fresh-water crustacean . *Proc Soc Exp Biol Med* , 1936 , **34** (4) : 428 ~ 432 .
- [17] 刘淑珊 , 王林美 , 范琦等 . 柞蚕蛹 (*Philosamia cynthia*) 精巢细胞系的建立 . 蚕业科学 , 1999 , **25** (1) : 41 ~ 45 .
- [18] Hong Y , Liu T , Zhao B , *et al.* Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro* . *PNAS* 2004 , **101** (24) : 8 011 ~ 8 016 .
- [19] Lynn D E . Development of insect cell lines : virus susceptibility and applicability to prawn cell culture . *Methods Cell Sci* , 1999 , **21** (4) : 173 ~ 181 .
- [20] Crane M S . Mutagenesis and cell transformation in cell culture . *Methods Cell Sci* , 1999 , **21** (4) : 245 ~ 253 .
- [21] 陈曲侯 , 麦克塔希 , 伊格诺佛 . 菜蛾科小菜蛾细胞系的建立 . 华中师院学报 (自然科学版) , 1984 , **18** (3) : 99 ~ 103 .
- [22] 李宗池 , 刘秉正 , 陈曲侯等 . 棉铃虫的细胞培养 . 华中师院学报 (自然科学版) , 1981 , **15** (1) : 50 ~ 57 .
- [23] Zhang H , Zhang Y , Qin Q , *et al.* New cell line from larval fat bodies of the bollworm , *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) . *In Vitro-animal* 2006 , **42** (10) : 290 ~ 293 .
- [24] Hansen E L . A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata) : establishment and characteristics . In Maramorosch K ed . *Invertebrate Tissue Culture : Research Applications* . New York : Academic Press , 1976 , 75 ~ 99 .
- [25] 刘凯于 杨芳 , 刘克金等 . 改良的 L-15 培养基对鳞翅目昆虫细胞生长和芹菜夜蛾核型多角体病毒增殖的影响 . 中国生物防治 , 2007 , **23** (1) : 39 ~ 43 .
- [26] Varmar M G R . The establishment of three cell lines from the tick *Rhipiciphallus appendiculatus* (Acari : Ixodidae) and their infection with some arboviruses . *J Med Entomol* , 1975 , **11** (6) : 698 ~ 706 .
- [27] 陈佩惠 , 周述龙主编 . 医学寄生虫体外培养 . 北京 : 科学出版社 , 1995 , 428 ~ 429 .
- [28] Tapay L M , Lu Y , Brock J A , *et al.* Transformation of primary cultures of shrimp (*Penaeus stylirostris*) lymphoid (Oka) organ with Simian virus-40 (T) antigen . *Proc Soc Exp Biol Med* , 1995 , **209** : 73 ~ 78 .
- [29] Neumann T , Kaiser H E , Rath F W . A permanent cell line of the crayfish *Orconectes limosus* as a potential model in comparative oncology . *In Vivo* 2000 , **14** (5) : 691 ~ 698 .