

# 背角无齿蚌四种组织细胞原代培养的比较

阎明军<sup>①</sup> 陈修报<sup>②</sup> 刘洪波<sup>②</sup> 杨健<sup>①②\*</sup>

① 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; ② 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔业微化学研究室 无锡 214081

**摘要:** 以背角无齿蚌 (*Anodonta woodiana*) 血细胞 (含颗粒细胞和透明细胞)、消化腺细胞 (含上皮样细胞和圆形小细胞)、外套膜细胞 (含上皮样细胞、透明细胞、圆形大细胞和圆形小细胞)、斧足细胞 (含上皮样细胞、透明细胞、圆形大细胞和圆形透亮细胞) 为材料, 比较了上述各类细胞的原代培养特征以及不同条件下的细胞存活率, 优化了细胞制备及细胞活性鉴定的方法。结果显示, 上述各类组织细胞存活率受不同培养温度、培养时间和培养基种类的影响, 其中, 血细胞 96 h 在 20 °C 下、培养基 2 中的存活率最高, 为  $94.67\% \pm 0.47\%$ ; 消化腺细胞 48 h 在 20 °C 下、培养基 3 中的存活率最高, 为  $93.67\% \pm 1.70\%$ ; 外套膜细胞 48 h 在 15 °C 下、培养基 1 中的存活率最高, 为  $93.67\% \pm 1.7\%$ ; 斧足细胞 48 h 在 15 °C 下、培养基 1 的存活率最高, 为  $94.33\% \pm 0.94\%$ 。相较于 25 °C, 在 20 °C 和 15 °C 下, 4 种组织细胞 96 h 的存活率更为理想。本研究旨在为背角无齿蚌组织细胞系的建立及贝类细胞水平毒理学的研究提供基础数据。

**关键词:** 背角无齿蚌; 组织细胞; 温度; 原代培养; 存活率

**中图分类号:** Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 05-751-09

## Comparison on Primary Culture of Four Tissular Cells in *Anodonta woodiana*

YAN Ming-Jun<sup>①</sup> CHEN Xiu-Bao<sup>②</sup> LIU Hong-Bo<sup>②</sup> YANG Jian<sup>①②\*</sup>

① Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; ② Laboratory of Fishery Microchemistry, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China

**Abstract: [Objectives]** Animal cell culture technologies become more crucial in ecotoxicological researches. Due to some technical difficulties, studies on tissular cell culture of freshwater mussels are still limited. Although primary culture of gill cell in *Anodonta woodiana* was succeeded in previous study, breakthroughs have not yet been obtained for other tissues. Therefore, we intend to expand the primary culture of *A. woodiana* cells from four tissues (hemocyte, digestive gland, mantle, and foot). **[Methods]** The healthy 2-year-old “standardized” *A. woodiana* were used to obtain tissue cells. Different culture conditions (e.g.,

**基金项目** 中国水产科学研究院基本科研业务费 (No. 2019GH10), 中国水产科学研究院科技创新团队项目 (No. 2020TD18), 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 31502166);

\* 通讯作者, E-mail: jiany@ffrc.cn;

**第一作者介绍** 阎明军, 男, 博士研究生; 研究方向: 水域生态学; E-mail: 1195116392@qq.com.

收稿日期: 2022-08-29, 修回日期: 2023-05-05 DOI: 10.13859/j.cjz.202305009

culture media, temperature) were designed to comparatively reveal survival rates and cell viabilities of the above four tissular cells so as to optimize the culture conditions for the primary culture. **[Results]** The results showed that the survival rates of the above four tissular cells were affected by different culture temperature, time and medium type. The survival rates were  $94.67\% \pm 0.47\%$  in culture medium 2 at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 96 h for the hemocytes,  $93.67\% \pm 1.70\%$  in medium 3 at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h for the digestive gland cells,  $93.67\% \pm 1.70\%$  in medium 1 at  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h for the mantle cells, and  $94.33\% \pm 0.94\%$  in medium 1 at  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h for the foot cells (Fig. 2). Compared to  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , the survival rates of four tissular cells were higher at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 96 h. **[Conclusion]** The study obtained the breakthrough on primary culture of hemocyte, digestive gland, mantle, and foot cells in *A. woodiana*. The study provides basic data for the establishment of cell lines of *A. woodiana*. It can also provide theoretical support for subsequent studies of toxicology at the cellular level of freshwater mussels in the future.

**Key words:** *Anodonta woodiana*; Tissular cells; Temperature; Primary culture; Survival rate

随着人口的快速增长、全球经济的迅猛发展,传统及新型污染物被大量排放,使得水域生态系统成为了严重的“受害者”。因此,建立基于污染物毒理学研究的生物模型,成为有效诊断污染状况和评估风险后果的重要手段,也是当下研究的热点方向之一。

双壳贝类以滤食性为主,具有分布广、易采集、寿命长等特点,在生物积累过程中,因其低代谢、高累积特性,能够将周围水域的各种污染物,尤其是难以用化学方法识别和量化的异型生物物质(xenobiotic)等富集于体内。因此,双壳贝类常被用作水生毒理学研究的重要指示生物(杨健 2015,陈修报等 2021)。然而,应用贝类成体进行水生毒理学研究成本较高且耗时,亟需寻求一种高性能、低成本和效果可靠的材料来替代贝类成体。生物细胞能够表征相应组织的关键功能,并能可重复性地研究掌握各种外源性污染物的胁迫作用,使破解不同水平毒性机制研究的难题成为可能(Attaallah et al. 2020)。因此,开发和应用相关的细胞培养技术变得尤为重要。

值得注意的是,淡水贝类细胞原代培养技术正不断取得突破。石安静等(2001)尝试进行圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana pacifica*)血细胞培养,但是未报道成活率;陈修报等(2020)培养的青角无齿蚌鳃细胞 120 h 后的

存活率达 90% 以上;斑马贻贝(*Dreissena polymorpha*)的鳃、消化腺细胞悬液培养 8 d 后的存活率达 80%以上,外套膜外植体培养可达 14 d (Quinn et al. 2009); Parolini 等(2011)进一步培养了斑马贻贝鳃、消化腺和血细胞,15 d 后存活率分别可达 78.8%、79.36% 和 73.23%;淡水珠蚌(*Unio pictorum*)的外套膜细胞在培养 10 d 后的存活率低于 30% (Yurdakök-Dikmen et al. 2018);三角帆蚌(*Hyriopsis cumingii*)的外套膜细胞培养至 108 h,细胞状态逐渐恶化,RNA 含量显著下降(李倩等 2014)。然而,上述所培养的细胞仍存在时间短、存活率低、传代情况不佳等“瓶颈”(van der Merwe et al. 2010)。

目前,还未有成功培养贝类细胞系的报道。姜德勋等(2008)对福寿螺(*Ampullaria gigas*)外套膜和足组织细胞进行了体外培养,分别传代培养了 9 代和 8 代。王彬等(2010)实现近江牡蛎(*Crassostrea hongkongensis*)鳃细胞传代 6 次。晏萌等(2013)对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)担轮幼虫细胞体外培养了 19 代。细胞系难以构建的主要问题来自微生物污染,其中细菌、真菌、支原体污染最为常见(李建军等 2015, Barrick et al. 2018, Attaallah et al. 2020)。另外,细胞损伤、增殖速度慢,以及对特定生长因子的了解不足等也是重要问题(Daugavet

et al. 2015)。

背角无齿蚌是水生毒理学研究使用广泛的一种双壳贝类, 其鳃细胞可作为短期污染物毒理学的评价材料(陈修报等 2020)。本研究拟在解决背角无齿蚌原代培养问题基础上, 如温度设定和培养基选择, 进一步拓展对其血、消化腺、外套膜和斧足等细胞进行原代培养的尝试, 并在此基础上优化不同组织细胞的培养条件, 以期探索淡水贝类原代细胞培养特征, 为进一步建立相关细胞系及后续利用背角无齿蚌的不同组织细胞开展相关毒理学研究提供理论和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

用于获取组织细胞的健康 2 龄“标准化”背角无齿蚌(陈修报等 2020)采自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心繁育基地养殖池塘。蚌经曝气自来水冲洗干净后转移至室内实验室, 并置于室温下暂养 2 d。

### 1.2 培养相关溶液及培养基的设计

前人报道背角无齿蚌等淡水贝类体液渗透压范围为 42 ~ 400 mOsm (Jordan et al. 1999, 石安静等 2001), 但它们属于变渗透压动物, 能够对外部环境渗透压做出适应性变化(蒋葛等 2020)。本研究所采用的培养基渗透压在贻贝(*Mytilus edulis*)血细胞(Barrick et al. 2018)、紫贻贝(*M. galloprovincialis*)血细胞(Cao et al. 2003)以及斑马贻贝鳃、消化腺、外套膜细胞(Quinn et al. 2009)培养中已被成功应用。

抗生素溶液成分分配比参考 Quinn 等(2009): 10 ml 青霉素(penicillin,  $1 \times 10^7$  IU/L, Gibco, 美国)-链霉素(streptomycin, 10 g/L, Gibco, 美国), 80 mg/L 庆大霉素(gentamicin, 50 g/L, Gibco, 美国), 40 mg/L 卡那霉素(kanamycin, 759 mg/L, Sigma, 德国)和 990 ml 无菌水, 此抗生素溶液原液(每升含  $1 \times 10^5$  IU 青霉素、100 mg 链霉素、80 mg 庆大霉素和 40 mg 卡那霉素)随后用缓冲液(1 L 无菌水、

2.32 g NaCl, pH 为 7.5)稀释 1 倍(每升含  $5 \times 10^4$  IU 青霉素、50 mg 链霉素、40 mg 庆大霉素和 20 mg 卡那霉素)和 2 倍(每升含  $2.5 \times 10^4$  IU 青霉素、25 mg 链霉素、20 mg 庆大霉素和 10 mg 卡那霉素)。

链酶蛋白酶溶液成分分配比参考 Quinn 等(2009): 75 ml 缓冲液、25 ml 抗生素溶液原液和 0.285 7 g 链酶蛋白酶( $3.5 \times 10^3$  units/L, Sigma, 德国)。

Alsever's 溶液成分分配比: 20.8 g/L 葡萄糖(Macklin, 中国)、8.0 g/L 柠檬酸钠(Sigma, 德国)、3.36 g/L EDTA (Macklin, 中国)、22.5 g/L NaCl (国药, 中国), 加蒸馏水至 100 ml, 加热溶液后调节 pH 至 7.0, 经 0.22  $\mu$ m 滤网过滤除菌, 保存在 4  $^{\circ}$ C。

培养基 1 (L-15) 配方: 99 ml L-15 (Sigma, 德国)、20.2 g/L NaCl、0.54 g/L KCl (Sigma, 德国)、0.6 g/L CaCl<sub>2</sub> (Sigma, 德国)、1.0 g/L MgSO<sub>4</sub> (Sigma, 德国)、3.9 g/L MgCl<sub>2</sub> (Sigma, 德国)、20.8 g/L 葡萄糖、1 ml 青霉素-链霉素、40  $\mu$ g/L 庆大霉素、0.10 mg/L 两性霉素 B (Macklin, 中国), 使用前添加 10 ml 胎牛血清(FBS, Sigma, 德国), pH 为 7.5。

培养基 2 (L-15) 配方: 15 ml L-15, 0.25 ml 青霉素-链霉素, 0.01 g 庆大霉素, 0.001 g 卡那霉素, 84.75 ml 无菌水和 0.238 g 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES, Sigma, 德国), 并用 0.22  $\mu$ m 滤网过滤, 于 -20  $^{\circ}$ C 保存。使用前加 10 ml FBS 和 1 ml L-谷氨酰胺(Macklin, 中国), pH 为 7.5。

培养基 3 (M199 + L-15) 配方: 22 ml M199 (含 L-谷氨酰胺, Macklin, 中国), 22 ml L-15, 1 ml 青霉素-链霉素, 40  $\mu$ g/L 庆大霉素, 0.10 mg/L 两性霉素 B, 55 ml 无菌水, 使用前添加 5 ml FBS 和 1 ml L-谷氨酰胺, pH 为 7.5。

除无菌溶液外, 其他溶液均用 0.22  $\mu$ m 滤网过滤, 并用密封条封存于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中。上述培养基分别用于培养背角无齿蚌血细胞、消化腺细胞、外套膜细胞和斧足细胞 4 种组织细胞。

### 1.3 血细胞原代培养条件

首先, 将蚌置于稀释 1 倍的抗生素溶液中浸泡 2 h。用无菌注射器抽取 0.1 ml Alsever's 溶液, 于闭壳肌处取血, 立即加入到离心管中 (无菌操作), 离心管内注有 7 ml 抗生素溶液原液, 静置 30 min。2 000 r/min 离心 10 min (20 °C) 收集血细胞, 去除上清液后将含有血细胞的溶液分别悬浮在培养基 1、2 和 3 中, 混匀。调整细胞浓度为  $2 \times 10^8$  个/L。血细胞悬液接种于 96 孔板中, 每孔约 100  $\mu$ l, 参考陈修报等 (2020) 和 Dessai (2012) 的细胞培养适宜温度, 设定 15 °C、20 °C 和 25 °C 三个温度培养, 并于 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 用血球计数板计算细胞存活率。

所有玻璃器皿、设备均高压蒸汽处理, 并保证无菌操作。

### 1.4 消化腺、外套膜和斧足细胞原代培养条件

抽过血的背角无齿蚌用 70% 酒精冲洗, 自然晾干, 用无菌水再次冲洗。无菌条件下依次解剖出消化腺、外套膜和斧足。用缓冲液清洗后, 剪成 1 或 2 mm<sup>2</sup> 左右小块, 并置于带盖塑料培养皿中。依次用抗生素溶液原液、稀释 1 倍的抗生素溶液、稀释 2 倍的抗生素溶液浸泡 30、20 和 10 min, 后用缓冲液冲洗干净。加入 5 ~ 10 倍 0.025% 链酶蛋白酶溶液于无菌试管中, 于培养箱内分解细胞, 时间分别为 12 h (消化腺)、40 h (外套膜)、24 h (斧足), 加入 FBS 终止消化。用 70  $\mu$ m 滤网过滤细胞液至 50 ml 离心管, 用缓冲液冲洗滤网和离心管。分装至 10 ml 离心管, 1 200 r/min 离心 3 min, 去除上清液, 再次加入缓冲液, 1 200 r/min 离心 3 min, 去除上清液; 向离心管中加入少量细胞培养基, 混匀, 调整细胞密度为  $2 \times 10^8$  个/L。各细胞悬液接种于 96 孔板中, 每孔约 100  $\mu$ l, 分别在温度 15 °C、20 °C、25 °C 下培养, 并于 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 用血球计数器计算细胞存活率。

### 1.5 细胞活性鉴定及计数

用霍夫曼相衬倒置显微镜 (DYS-810C 型,

中国) 观察细胞形态。用台盼蓝溶液排除试验检测细胞的生存能力, 丧失活性或细胞膜不完整的细胞被台盼蓝染成蓝色, 而正常的活细胞细胞膜结构完整, 能够排斥台盼蓝, 细胞不会被染成蓝色。向细胞悬液中加入台盼蓝溶液, 室温染色 3 ~ 5 min。然后吸取少量经过染色的细胞, 置于血球计数板计数, 每组统计血球计数板中的死、活细胞数量, 总计数不少于 300 个细胞。细胞存活率 (%) 为活细胞总数占细胞总数的百分比。

### 1.6 统计分析

数据运用 SPSS 软件 (version 22.0), 采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 培养基及温度间细胞存活率的差异。  $P < 0.05$  表示差异性达显著水平。

## 2 结果

### 2.1 不同培养基的 4 种组织细胞活性

在相同温度培养条件下, 组织细胞存活率均随着培养时间的增加出现不同的存活率下降趋势。对血细胞的台盼蓝染色结果见图 1。单因素方差分析, 3 种培养基间的细胞存活率差异不显著 ( $F = 0.133$ ,  $P > 0.05$ )。

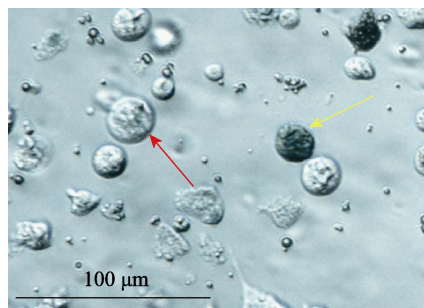


图 1 细胞活性鉴定

Fig. 1 Identification of cell viability

红色箭头示正常细胞, 黄色箭头示死亡细胞。

The red arrow indicates normal cell, the yellow arrow indicates dying cell.

20 °C 下, 血细胞 96 h 在培养基 2 存活率最高, 为  $94.67\% \pm 0.47\%$ ; 消化腺细胞 96 h 在培养基 3 的存活率最高, 为  $69.33\% \pm 0.94\%$ ; 外

套膜细胞 96 h 在培养基 3 的存活率最高, 为  $50.33\% \pm 0.47\%$ ; 斧足细胞 96 h 在培养基 3 的存活率最高, 为  $65.67\% \pm 3.09\%$ 。消化腺、外套膜和斧足细胞分别在培养 48 h、24 h 和 48 h 后的存活率均低于 90% (图 2)。

经倒置显微镜观察 (图 3), 血细胞类型可被划分为颗粒细胞和透明细胞; 消化腺细胞类型可被划分为上皮样细胞和圆形小细胞; 外套膜细胞类型可被划分为上皮样细胞、透明细胞、圆形大细胞和圆形小细胞; 斧足细胞类型可被划分为上皮样细胞、透明细胞、圆形大细胞和圆形透亮细胞。多数细胞以圆形或椭圆型为主。经原代培养, 部分细胞破损, 形态不规则, 内容物释出, 细胞碎片增多及粘连在一起。

## 2.2 不同温度的 4 种组织细胞活性

单因素方差分析结果显示, 血、消化腺和斧足等细胞在不同温度下的存活率无明显差异 ( $P > 0.05$ )。仅外套膜细胞存在显著性差异 ( $F = 8.063, P < 0.05$ ), 且在  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 外套膜细胞存活率明显高于  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

$20\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 血细胞 96 h 的存活率更高, 分别为  $93\% \pm 0.82\%$  和  $90.33\% \pm 1.7\%$ ; 在  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 消化腺细胞 96 h 的存活率最高, 为  $69.33\% \pm 0.94\%$ ; 在  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 外套膜细胞 96 h 的存活率最高, 为  $50.33\% \pm 0.47\%$ ; 在  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 斧足细胞 96 h 的存活率最高, 为  $65.67\% \pm 3.09\%$ 。消化腺、外套膜和斧足细胞均在培养 48 h 后的存活率均低于 90% (图 4)。

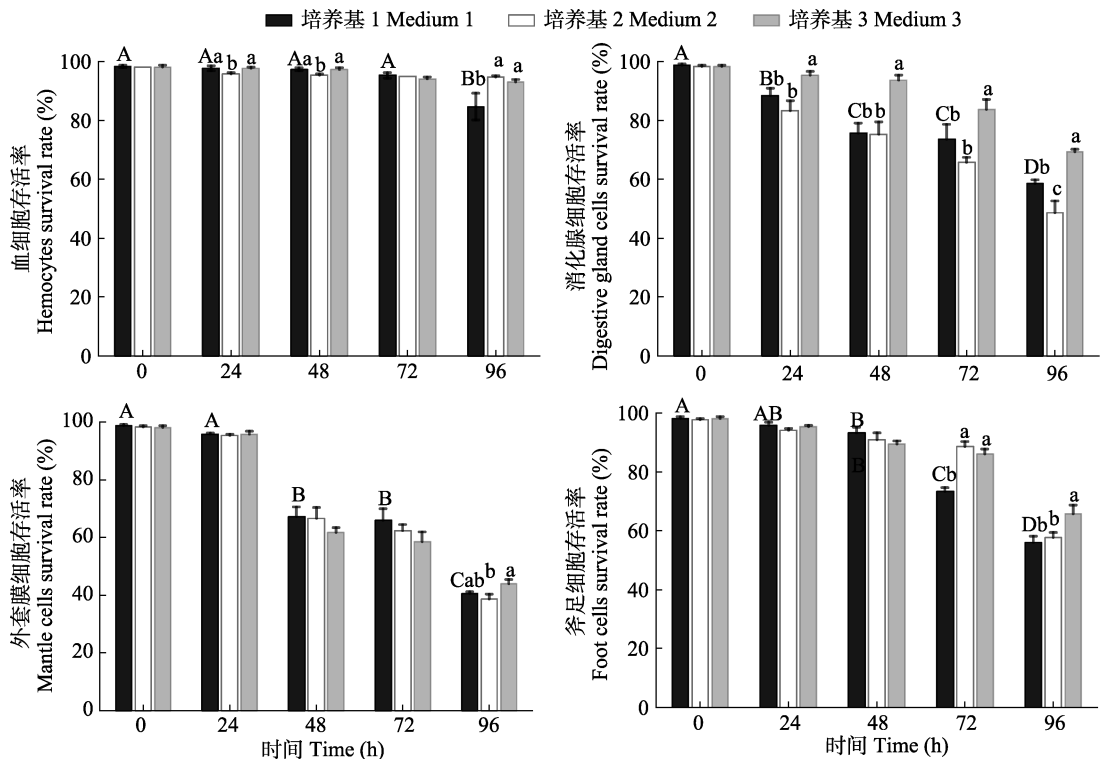


图 2 不同培养基对 4 种组织细胞存活率的影响 ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

Fig. 2 Effects of different medias on survival rates of four tissular cells ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

不同小写字母表示同一时间点不同培养基之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母表示同一培养基不同时间点之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate that there are significant differences ( $P < 0.05$ ) among different media at the same time point, while different uppercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between different time points in the same media.

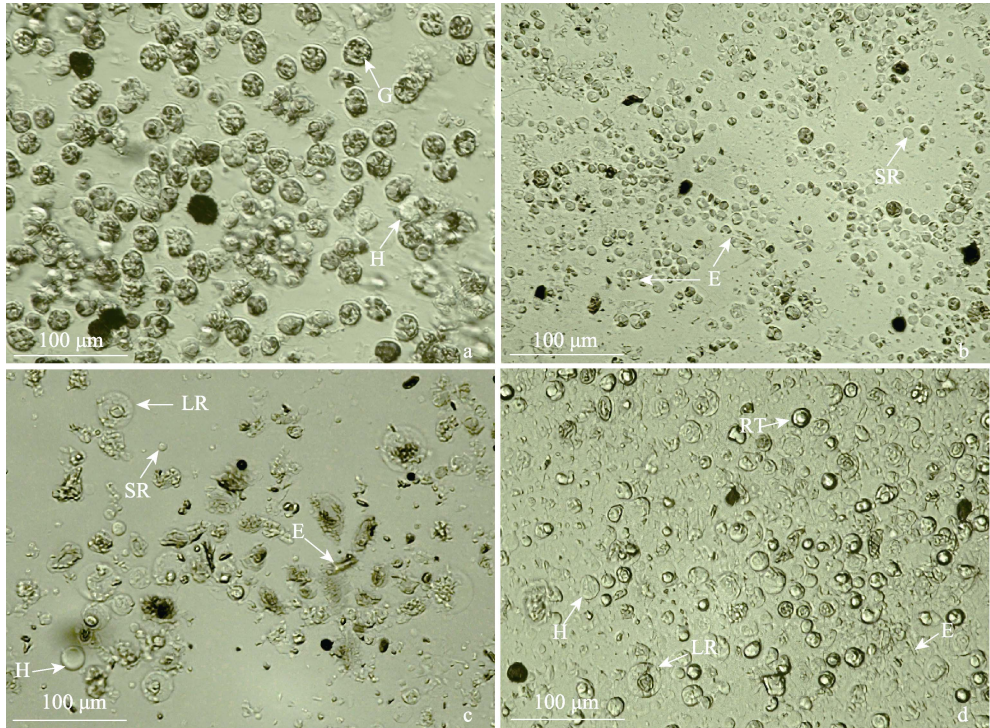


图 3 背角无齿蚌的 4 种组织细胞 (× 400)

Fig. 3 Four tissular cells of *Anodonta woodiana* (× 400)

a. 血细胞; b. 消化腺细胞; c. 外套膜细胞; d. 斧足细胞。E. 上皮样细胞; G. 颗粒细胞; H. 透明细胞; LR. 圆形大细胞; RT. 圆形透亮细胞; SR. 圆形小细胞

a. Hemocytes; b. Digestive gland cells; c. Mantle cells; d. Foot cells. E. Epithelial-like cells; G. Granulocytes; H. Hyalinocytes; LR. Large round cells; RT. Round translucent cells; SR. Small round cells

### 3 讨论

#### 3.1 不同组织细胞原代培养活性的差异性

贝类组织原代细胞基本维持了原组织在体内环境的特性, 在体外细胞模型和生态毒理学毒性机制研究中发挥重要作用。器官特异性的细胞能够为探究调控机体、组织功能及相关机制提供研究基础。

血细胞是贝类生态免疫研究中常用的细胞模型。在本研究中, 确立了背角无齿蚌血细胞的最佳培养条件, 即在 20 °C 下, 含 L-15 的改良培养基中存活率最高。L-15 培养基广泛应用于贝类组织细胞的原代培养(Quinn et al. 2009, Parolini et al. 2011)。研究表明, 在培养菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 血细胞时,

改良的 L-15 培养基培养效果明显优于 Hank's、RPMI 和 DMEM 培养基, 细胞存活时间及活性明显提高(Ladhar-Chaabouni et al. 2021)。Quinn 等(2009)在培养斑马贻贝细胞时, 最终将 L-15 培养基选为最优培养基。Suja 等(2007)比较了 L-15、Ham's F12 和 M199 培养基对瘤鲍螺 (*Haliothis varia*) 外套膜外植体的培养效果, 认为 L-15 和 M199 更利于细胞存活和粘附。在观察血细胞原代培养过程中, 细胞生长状态良好, 多数细胞形状完整, 仅存在少量的破损细胞及碎片。随着培养时间的增加, 抗生素的效力逐渐下降, 培养基更易受支原体和酵母菌等污染, 导致细胞破损和碎片增加(Barrick et al. 2018, Attaallah et al. 2020)。同时, 维持细胞活性的营养物质含量也会下降, 及时更换新鲜

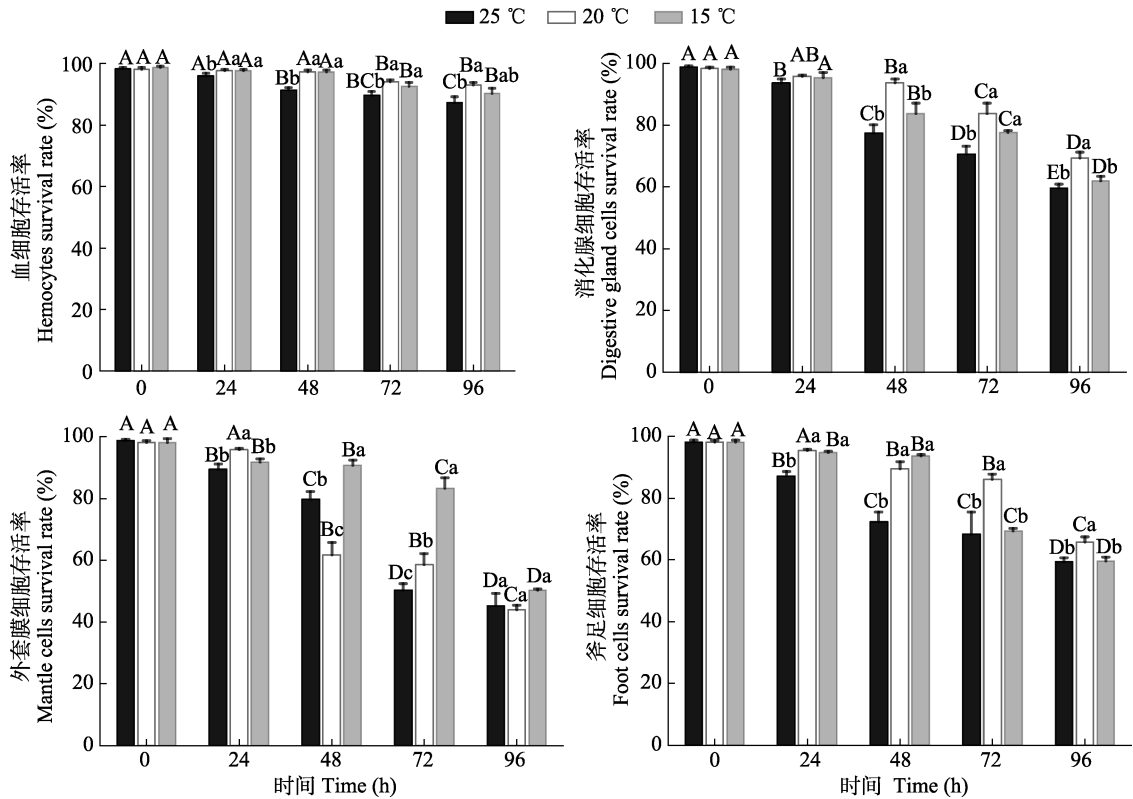


图 4 不同温度对 4 种组织细胞存活率的影响 (培养基 3)

Fig. 4 Effects of different temperatures on survival rates of four tissular cells (medium 3)

不同小写字母表示同一时间点不同温度之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母表示同一温度不同时间点之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters indicate that there are significant differences ( $P < 0.05$ ) among different temperature at the same time point, while different uppercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between different time points in the same temperature.

培养基能够维持细胞的存活时间和活性 (Daugavet et al. 2015)。虽然血细胞实现了短期成功培养, 仍需要建立长期培养确定细胞的活力以及为传代培养做准备。

除血细胞外, 本研究涉及的另外 3 种组织细胞存活能力由高到低依次为, 消化腺、斧足、外套膜。这 3 种组织因长期与外界环境直接接触, 极易藏匿共生微生物群, 难以进行全面的消杀, 极易引起生物污染, 并改变细胞行为和代谢活性, 减少细胞存活率。在本研究中, 外套膜细胞在 96 h 存活率最高仅为 50.33%, 是所有组织中活性最低的。在观察外套膜原代培养过程中, 出现了杂菌污染, 细胞破碎数量增加等。为尽可能降低污染风险和程度, 本研究

采取三步消毒法: (1) 在抽血前将蚌置于稀释 1 倍的抗生素溶液中浸泡 2 h; (2) 在组织消解前, 用不同浓度的抗生素溶液清洗和浸泡;

(3) 在培养基中加入抗生素。另外, 严格遵循无菌操作规范是成功培养的关键。建立生物安全柜清洁制度, 加强实验环境及器皿的消毒工作可以有效降低微生物的污染 (钟伟月等 2022)。

总体来看, 包括背角无齿蚌在内的淡水贝类原代细胞培养需要关注的主要问题包括:

(1) 自身的属性特征, 黏液和消化系统内共生微生物群种类繁多, 彻底消毒、减少污染是关键; (2) 贝类体内存在复杂的生命过程, 目前仍缺乏相关的营养需求及代谢基本信息, 寻

找最佳培养基及生长因子有助于提高细胞生存能力及活性,促进细胞增殖(Quinn et al. 2009);

(3) 强烈的机体刺激易引起应激反应,造成机体损伤,活性下降,应选取强壮的贝类成体。

(4) 组织细胞具有特异性,可能存在不同的增殖潜力。血细胞是贝类主要的免疫防御细胞,在免疫防御和氧气运输等方面发挥作用(Lacaze et al. 2015);消化腺负责消化和代谢食物,为机体提供营养;外套膜负责生物矿化的调节,分泌和沉积有机质(Gong et al. 2008);斧足是贝类的运动器官,负责爬行和掘沙等生命活动。有研究表明,三角帆蚌外套膜和鳃细胞的增殖活力明显高于内脏团(曹玉香 2020),弄清增殖调控机制和细胞分裂的分子机制将为细胞系的建立提供科学依据(李建军等 2015)。

### 3.2 不同培养基的 4 种组织细胞活性的差异性

贝类组织细胞基础培养基多是基于哺乳动物细胞培养经验而开发的,因此其细胞培养应对培养基进行优化。目前,应用于贝类体外细胞的培养基包括 L-15 等天然培养基, Hank's、Tyrod's、Eagle's 等平衡盐溶液,以及 M199、DMEM 等合成培养基(Dessai 2012)。选择合适的基础培养基有利于细胞存活和生长增殖,这与培养基提供的生长环境及营养物质有关。另外,添加 5%~20% 的 FBS 有利于细胞的生长(Quinn et al. 2009, Dessai 2012)。除 FBS 外,葡萄糖作为细胞能量的主要来源,添加到培养基 1,有利于细胞的传代。在培养基 2 和 3 中添加 L-谷氨酰胺这种化学不稳定性氨基酸,为培养的细胞提供重要的必需氮源,促使蛋白质合成和核酸代谢(Vardhana et al. 2019)。在培养基 2 中添加 HEPES 的主要作用是防止培养基 pH 的迅速变动,为维持 pH 的稳定性提供帮助。还需进一步筛选和优化培养基生长因子的使用量,以促进细胞的正常生长和代谢。

### 3.3 不同培养温度的 4 种组织细胞活性的差异性

温度是影响贝类组织细胞活性的另一关键因素。陈修报等(2020)认为,背角无齿蚌鳃

细胞的最适培养温度为 20 °C。Dessai 等(2012)比较了不同温度对短颈黄蛤(*Paphia malabarica*)外套膜细胞生长的影响,发现 20 °C 和 25 °C 的细胞密度高于 15 °C、30 °C 和 35 °C,且在更高温度(30 °C 和 35 °C)下出现了细菌污染。本研究结果表明,在 20 °C 和 15 °C 下,背角无齿蚌 4 种组织细胞 96 h 的存活率更高。这可能是由于相对低温条件下,细胞代谢率减弱,且不利于微生物的繁殖。当温度在合适范围内,细胞能够维持体内基本状态下的免疫活性,一旦温度上升,就会破坏细胞内外稳态,为微生物群的滋生提供条件。另一方面,背角无齿蚌对温度具有适应性。研究表明,背角无齿蚌能够在 15~30 °C 下正常生存(徐钢春等 2007)。寻找适宜温度将有利于细胞存活。

## 参 考 文 献

- Attaallah A, Marchionni S, El-Beltagy A, et al. 2020. Cell cultures of the Manila clam and their possible use in biomonitoring and species preservation. *The European Zoological Journal*, 87(1): 624-641.
- Barrick A, Guillet C, Mouneyrac C, et al. 2018. Investigating the establishment of primary cultures of hemocytes from *Mytilus edulis*. *Cytotechnology*, 70(4): 1205-1220.
- Cao A, Mercado L, Ramos-Martinez J I, et al. 2003. Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: Expression of IL-2R alpha subunit. *Aquaculture*, 216: 1-8.
- Dessai S N. 2012. Primary culture of mantle cells of bivalve mollusc, *Paphia malabarica*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 48(8): 473-477.
- Daugavet M, Blinova M. 2015. Culture of mussel (*Mytilus edulis* L.) mantle cells. *Cell and Tissue Biology*, 9(3): 233-243.
- Gong N, Li Q, Huang J, et al. 2008. Culture of outer epithelial cells from mantle tissue to study shell matrix protein secretion for biomineralization. *Cell and Tissue Research*, 333(3): 493-501.
- Jordan P J, Deaton L E. 1999. Osmotic regulation and salinity tolerance in the freshwater snail *Pomacea bridgesi* and the freshwater clam *Lampsilis teres*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 122(2):



- 199–205.
- Lacaze E, Pédelucq J, Fortier M, et al. 2015. Genotoxic and immunotoxic potential effects of selected psychotropic drugs and antibiotics on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes. *Environmental Pollution*, 202: 177–186.
- Ladhar-Chaabouni R, Ayadi W, Sahli E, et al. 2021. Establishment of primary cell culture of *Ruditapes decussatus* haemocytes for metal toxicity assessment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 57(4): 477–484.
- Parolini M, Quinn B, Binelli A, et al. 2011. Cytotoxicity assessment of four pharmaceutical compounds on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) haemocytes, gill and digestive gland primary cell cultures. *Chemosphere*, 84(1): 91–100.
- Quinn B, Costello M J, Dorange G, et al. 2009. Development of an *in vitro* culture method for cells and tissues from the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Cytotechnology*, 59(2): 121–134.
- Suja C, Sukumaran N, Dharmaraj S. 2007. Effect of culture media and tissue extracts in the mantle explant culture of abalone, *Haliotis varia* Linnaeus. *Aquaculture*, 271: 516–522.
- van der Merwe M, Auzoux-Bordenave S, Niesler C, et al. 2010. Investigating the establishment of primary cell culture from different abalone (*Haliotis midae*) tissues. *Cytotechnology*, 62(3): 265–277.
- Vardhana S A, Arnold P K, Rosen B P, et al. 2019. Glutamine independence is a selectable feature of pluripotent stem cells. *Nature Metabolism*, 1: 676–687.
- Yurdakök-Dikmen B, Arslan P, Kuzukiran Ö, et al. 2018. *Unio* sp. primary cell culture potential in ecotoxicology research. *Toxin Reviews*, 37(1): 75–81.
- 曹玉香. 2020. 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. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文.
- 陈修报, 郑浩然, 王洋, 等. 2020. 基于原代培养背角无齿蚌细胞的镉毒性效应评价. *环境科学学报*, 40(7): 2665–2670.
- 陈修报, 杨健, 刘洪波, 等. 2021. 淡水贝类观察——生物阐释水污染和毒理的创新手段. *湖泊科学*, 33(1): 11–27.
- 姜德勋, 许璞, 沈爱国, 等. 2008. 福寿螺足组织和外套膜组织细胞培养的初步研究. *淡水渔业*, 38(2): 54–59.
- 蒋葛, 姜琦, 沈辉, 等. 2020. 背角无齿蚌在低盐度环境下的适应性及摄食率初步研究. *水产研究*, 7(2): 93–99.
- 李倩, 施志仪, 李文娟, 等. 2014. 三角帆蚌外套膜细胞体外培养优化及体内植入培养对细胞生长的影响. *中国水产科学*, 21(2): 225–234.
- 李建军, 黄宝玉. 2015. 海洋贝类细胞培养技术及其应用. *海洋通报*, 34(3): 247–251.
- 石安静, 邱安东, 唐敏, 等. 2001. 圆背角无齿蚌血细胞培养. *水生生物学报*, 25(2): 116–122.
- 王彬, 张其中. 2010. 近江牡蛎鳃细胞的原代培养. *海洋科学*, 34(6): 1–5, 21.
- 徐钢春, 顾若波, 闻海波, 等. 2007. 温度、pH 对圆背角无齿蚌滤水率的影响. *水生生物学报*, 31(4): 600–603.
- 晏萌. 2013. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)幼虫和成体组织细胞的体外培养体系建立和特征分析. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文.
- 杨健. 2015. 渔业生态环境指示生物诊断和预警技术研究进展. *中国渔业质量与标准*, 5(2): 1–7.
- 钟伟月, 黄海燕, 冯焱, 等. 2022. 广西某高校细胞培养实验室污染状况的调查研究. *广西医科大学学报*, 39(9): 1469–1473.