

Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对罗氏沼虾体外培养肌细胞的影响

王军霞, 刘金, 王维娜, 杨波, 翟宗昭

(河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002)

摘要: 研究了 L-15 和 M199 两种培养基对体外培养罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 肌细胞生长的差异。结果表明, L-15 较 M199 更有利于罗氏沼虾肌细胞的生长。分别测定了不同浓度的 Zn^{2+} (0~160 $\mu\text{g/L}$) 和 Cu^{2+} (0~10 $\mu\text{g/L}$) 对罗氏沼虾离体培养肌细胞的影响, 通过 MTT 法测定肌细胞的增殖, NBT 法测定肌细胞活性氧的产生, 结果表明, Zn^{2+} 浓度为 80~120 $\mu\text{g/L}$ 时细胞的增殖效果较好, 细胞内活性氧的产生最少; Cu^{2+} 浓度为 8 $\mu\text{g/L}$ 时细胞的增殖达到最大, 活性氧产生最少。

关键词: 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 细胞增殖; 活性氧; Zn^{2+} ; Cu^{2+}

中图分类号: Q954 文献标识码: A 文章编号: 1000-3099(2005)01-0038-06

甲壳动物细胞培养作为一种潜在的工具有助于探针技术的应用开发和虾类疾病的诊断, 因此受到日益广泛的关注。对当前由于采用高密度精养系统带来虾病爆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, 但主要集中在各种组织的原代培养。Chen 等首先对斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 卵巢、心脏、肌肉、神经、肝胰腺、鳃和消化道等组织的离体培养进行了研究和比较, 并成功将卵巢细胞传代 3 次。Itami 等研究了日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 淋巴器官的离体培养。刘凯于等^[1]对斑节对虾的多种组织进行了培养。高玮等^[2]研究了斑节对虾肝胰腺和血淋巴的体外培养。郎刚华等^[3]对中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 的淋巴组织进行了长期原代培养。但虾的细胞培养与其他无脊椎动物一样都面临着细胞传代难、不易转化等困难。大多数研究者都是进行原代培养^[1,4,5], 传代很难成功。1995 年 Hsu 等^[6]对斑节对虾淋巴器官的各种培养条件进行了全面研究, 并使细胞继代培养超过 80 代, 成为世界上第 1 个对虾细胞系。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。

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 具有食性广、生长快、病害少、受地域条件限制小、养殖性能优良等特点。自 1976 年在大陆地区引种成功, 其养殖已在我国迅速发展起来。目前, 国内学者已对中国对虾、斑节对虾、凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vanamei*)、日本对虾、日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 等不同虾种进行了

多种组织的体外培养研究, 而关于罗氏沼虾还未见相关的研究报道。

作者采用不同的培养基对罗氏沼虾肌细胞进行体外培养, 并就 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 对体外培养肌细胞的影响进行了测定, 从而寻找适宜的罗氏沼虾细胞培养基, 为细胞传代和细胞系的建立提供参考。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 罗氏沼虾

购于河北省保定市府河市场, 充气暂养数日后用于实验。

1.1.2 试剂

100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素, 20% 胎牛血清 (FBS), 0.18 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.013 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L pH 7.4 平衡盐缓冲液 (PBS), MTT (4℃ 避光保存), NBT (4℃ 避光保存), 二甲基亚砜 (DMSO)。

1.1.3 培养基

两种培养基组成见表 1。

收稿日期: 2003-04-04 修回日期: 2003-06-18

作者简介: 王军霞 (1974-), 女, 河北新乐人, 讲师, 硕士, 目前在研课题: 对虾病毒性流行病防治技术研究, 电话: 0312-2290501 E-mail: wangjun_xia@sohu.com

表 1 两种培养基组成

Tab.1 The ratio of medium

培养基成分	培养基 (g/L)	胎牛血清 (%)	青霉素 (U/mL)	链霉素 ($\mu\text{g/mL}$)	pH 值
L-15	14.5	20	100	100	7.2
M199	9.9	20	100	100	7.2

1.2 实验方法

1.2.1 罗氏沼虾肌细胞的原代培养

罗氏沼虾在使用前用 4℃ 无菌水麻醉, 75% 乙醇体表消毒 2 min, 无菌滤纸吸干体表, 剪取虾的肌肉组织放入青霉素小瓶中, 加入 PBS, 用眼科剪剪成小块至糊状混匀, 取 100 μL 细胞悬液接种于 24 孔培养板, 细胞贴壁后加入 1 mL 培养基。于 24℃, 5% CO_2 培养箱中培养, 每日倒置 显微镜观察并拍照。

1.2.2 不同浓度的 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 对罗氏沼虾原代培养肌细胞的影响

将罗氏沼虾肌细胞以 1.2.1 方法原代培养 3 d 在培养基中分别加入 0, 40, 80, 120, 160 $\mu\text{g/L}$ 的 Zn^{2+} , 每种浓度组设 6 个平行, 24℃, 5% CO_2 培养箱中培养, 每日观察并拍照, 测定肌细胞的增殖及活性氧。同样方法测定 0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/L}$ 的 Cu^{2+} 对原代培养罗氏沼虾肌细胞的影响。

1.2.3 MTT 法测定罗氏沼虾肌细胞的增殖

参照陈志阳和林忠宁等^[7, 8]的方法, 将培养的肌细胞于无菌条件下, 每孔去除 700 μL 培养基后, 加入 20 μL MTT 培养 5 h, 加无水乙醇 300 μL , 静置溶解 20 min, 溶解后吸出悬液, 相同浓度组的培养基 2 孔合于 1 个离心管, 每种培养基 3 个平行, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 570 nm 比色测定其光吸收值。

1.2.4 NBT 法测定罗氏沼虾肌细胞活性氧的产生

参考 Marceloetal^[9]的方法, 将培养的肌细胞于无菌条件下, 每孔加入 50 μL 0.3% NBT, 培养 2 h, 加入 300 μL 甲醇固定, 静置 10 min, 弃上清液, 沉淀用 70% 甲醇清洗 2 次, 烘箱中烘干过夜, 用 700 μL 2 mol/L KOH 和 800 μL DMSO 溶解, 于 620 nm 比色测定其光吸收值。

2 结果与讨论

2.1 L-15 和 M199 两种培养基对罗氏沼虾肌细胞的影响

通过比较得出, L-15 培养基中的罗氏沼虾肌纤维细胞占优势, 在培养中可观察到分裂细胞, 但分裂

率不高。在此条件下可以观察到覆盖面积约 90% 的肌纤维(图 1-1, 1-2)。MTT 法可以通过颜色反应观察细胞代谢活化程度, 对体外培养细胞的增殖进行测定, 这种方法可以排除形态观察法的主观差异性^[8]。实验中以 570 nm 下的 A 值来评价细胞的增殖功能, 结果表明 L-15 培养基的增殖效果优于 M199 培养基(图 2)。

在正常生理情况下活性氧的产生与清除处于动态平衡状态, 当各种因素打破这一平衡而致活性氧浓度超过生理限度时就会损伤生物大分子。主要表现在: (1) 使酶的活性降低或丧失; (2) 使蛋白质肽链断裂; (3) 破坏 DNA 碱基之间的氢键和层堆积力等。Burdon^[10]指出当活性氧浓度处于 10 nmol/L ~ 1 $\mu\text{mol/L}$ 范围内时能促进细胞分裂, 超过此范围就会抑制分裂。目前, 定量测定细胞内活性氧的含量难度较大, 实验中利用 NBT 还原法, 通过 670 nm 下的 A 值的变化来反映活性氧水平的变化, 结果表明 L-15 培养基中肌细胞活性氧的水平较低, 利于细胞的生长增殖(图 2)。

目前, 对虾细胞培养的研究主要集中在培养基成分、培养组织的选择和培养条件等几个方面。常用的培养基有 L-15, GIM, DMCM, M199, TC-100 等, 对于不同虾种的培养基, 不同的学者有不同的报道^[5, 6, 11-13], 多数都添加了营养丰富的胎牛血清, 其浓度范围为 10% ~ 20% 此外还添加 100 U/mL 青霉素, 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素。常在培养基中添加的其他营养成分还有葡萄糖、氨基酸、维生素、生长因子等^[6, 14, 15]。本实验表明, 在胎牛血清浓度为 20% 条件下, L-15 培养基较 M199 更有利于罗氏沼虾肌细胞的生长。

2.2 不同浓度 Zn^{2+} 对罗氏沼虾肌细胞的影响

Zn^{2+} 是多种动物正常生长发育所必需的一种微量元素, 有着重要的生物学功能, 是许多金属酶的组成成分或激活剂, 如硫酸酐酶、羧肽酶、碱性磷酸酶等。 Zn^{2+} 也可作为某些酶的辅酶参与生物体内的代谢, 如缺锌会导致机体生长缓慢、食欲减退、死亡率较高等。

实验中, 在 L-15 培养基中添加不同浓度的 Zn^{2+} , 肌细胞的生长均好于对照组。当 Zn^{2+} 浓度为 120 $\mu\text{g/L}$ 时, 细胞贴壁率较高(图 1-3, 1-4), 通过测定不同浓度 Zn^{2+} 条件下细胞的增殖, 表明 Zn^{2+} 浓度为 0 ~ 80 $\mu\text{g/L}$ 时, 随其浓度升高, 细胞增殖加快(图 3),

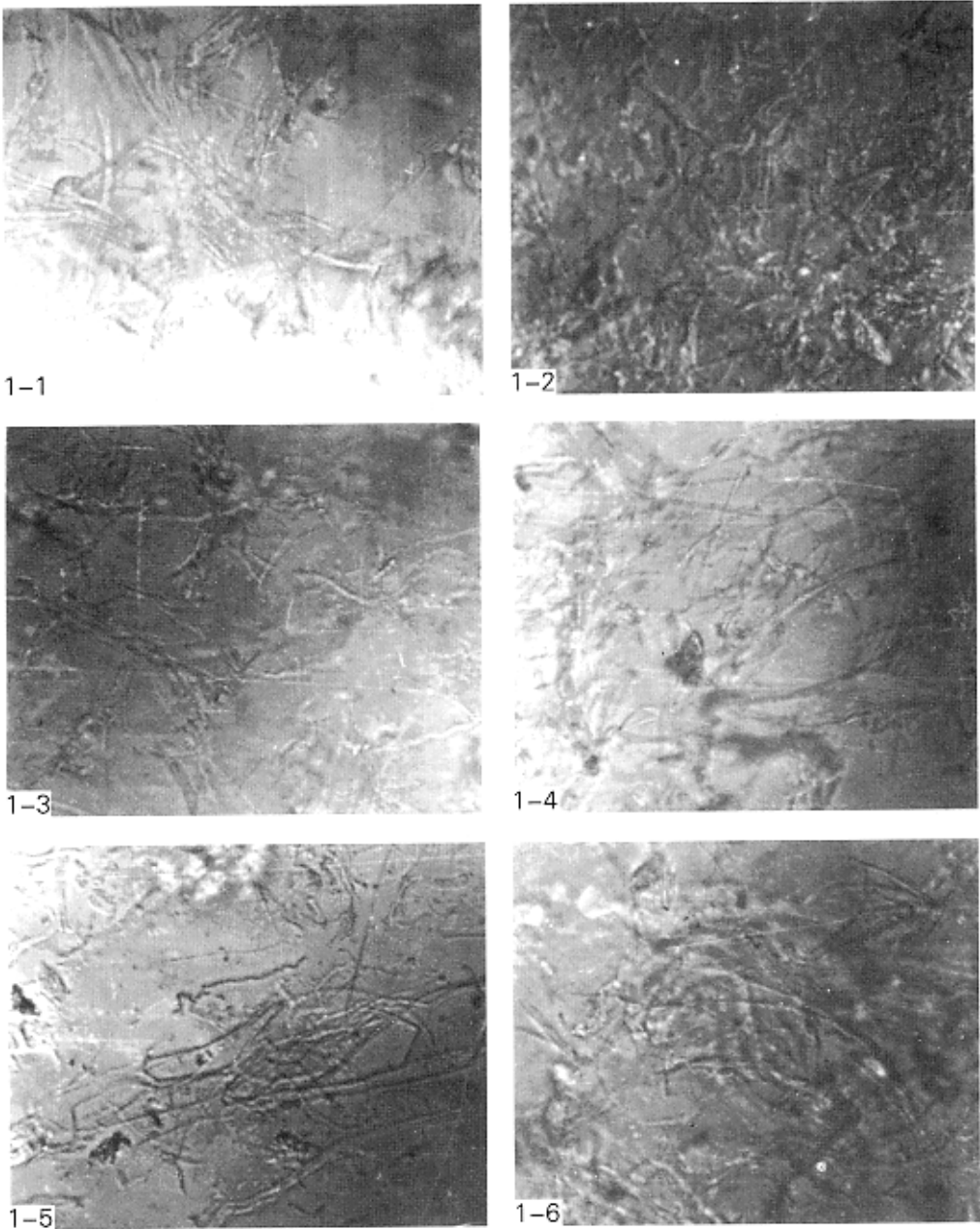


图1 体外培养的罗氏沼虾肌细胞(×960)

Fig. 1 The muscle fibre of *Macrobrachium rosenbergii* cultured in vitro (×960)

1-1. M199培养基中的肌细胞;1-2. L-15培养基中的肌细胞;1-3. 未添加 Zn^{2+} 的培养基中肌细胞形态;1-4. 添加 $120 \mu\text{g/L } Zn^{2+}$ 的培养基中肌细胞形态;1-5. 未添加 Cu^{2+} 的培养基中肌细胞形态;1-6. 添加 $8 \mu\text{g/L } Cu^{2+}$ 的培基中肌细胞形态

1-1. The muscle fibre of 199 medium; 1-2. The muscle fibre of L-15 medium; 1-3. The muscle fibre of medium without Zn^{2+} ; 1-4. The muscle fibre of medium supplemented with $120 \mu\text{g/L } Zn^{2+}$; 1-5. The muscle fibre of medium without Cu^{2+} ; 1-6. The muscle fibre of medium supplemented with $8 \mu\text{g/L } Cu^{2+}$

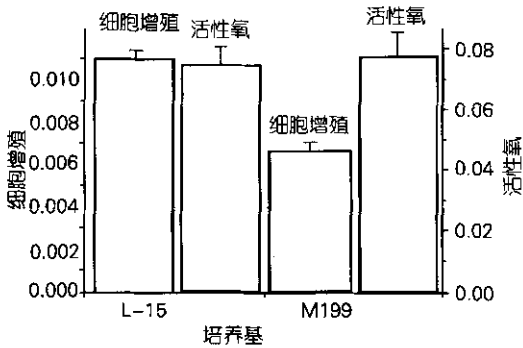


图2 两种培养基对罗氏沼虾肌细胞增殖、活性氧的影响
Fig.2 Effect of the two mediums on proliferation and active oxygen of muscle cells

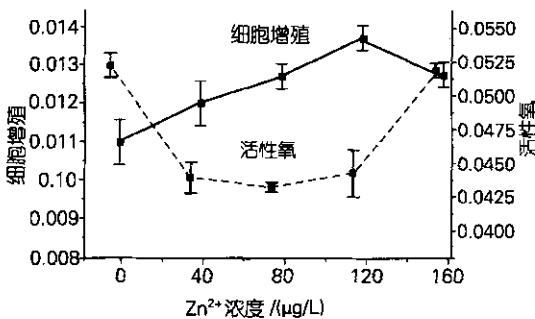


图3 不同浓度 Zn²⁺对罗氏沼虾肌细胞增殖、活性氧的影响
Fig.3 Effect of Zn²⁺ on the proliferation and active oxygen of muscle cells

而活性氧产生减少(图3)。分析可能由于低浓度的 Zn²⁺促进了磷酸酶、抗氧化酶和其他一些酶的活性,使细胞内的活性氧等有毒物质减少,从而促进了细胞增殖。Zn²⁺浓度在 80~120 µg/L 时,活性氧含量开始上升,而细胞增殖没有受到抑制,继续加快。可能活性氧的积累须达到一定程度才能抑制细胞增殖^[16],或者 Zn²⁺在 80~120 µg/L 之间可能存在某一浓度能使活性氧产生最少而细胞增殖最快,这还有待于进一步研究。随 Zn²⁺浓度继续升高(120~160 µg/L)细胞增殖开始减慢,活性氧产生增多,说明较多 Zn²⁺的积累已产生明显毒害作用,使酶的活性降低或丧失,从而抑制了细胞的活力。

2.3 不同浓度的 Cu²⁺对罗氏沼虾肌细胞的影响

在 L-15 培养基中添加不同浓度(0~10 µg/L)

的 Cu²⁺均能促进肌细胞的生长,从培养结果比较观察,8 µg/L 的 Cu²⁺浓度组的细胞密度、贴壁率均较高(图1-5,1-6),通过细胞增殖的测定,表明添加不同

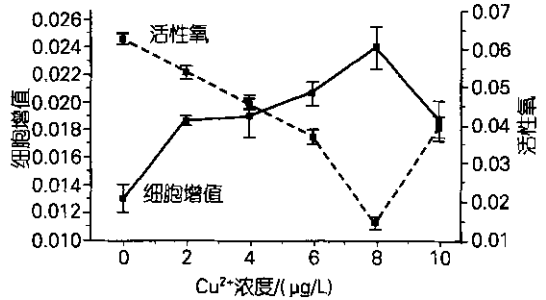
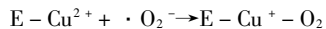


图4 不同浓度 Cu²⁺对罗氏沼虾肌细胞增殖、活性氧的影响
Fig.4 Effect of Cu²⁺ on the proliferation and active oxygen of muscle cells

浓度的 Cu²⁺均可促进细胞的增殖(图4),并可减少细胞活性氧的产生(图4)。含较高浓度的 Cu²⁺(10 µg/L)的培养基中,细胞增殖减缓,活性氧产生增多。

Cu²⁺是生命活动必需的微量元素之一,是一些重要蛋白质和酶的组成成分,能促进细胞对铁的吸收利用。铜和锌是同一副族元素,两者的化学性质有许多相似之处。低浓度的铜也可促进磷酸酶的活性^[17-20],并且肌肉组织中持续增加的 Cu²⁺促进了氨基酸及蛋白质的合成代谢,而组氨酸和丝氨酸,是许多蛋白酶活性中心的重要组成成分,使酶活受刺激或酶的合成增加,而 CuZn-SOD 催化·O₂⁻产生歧化反应,主要依 Cu²⁺的价态变化:



产生的 H₂O₂ 再由过氧化氢酶或过氧化物酶消除^[21]。因此,低浓度的 Cu²⁺可抑制活性氧的产生并促进细胞增殖。而较高浓度的 Cu²⁺会使各种酶的活性降低,使氨基酸的含量减少,从而使活性氧的产生增加,对细胞产生毒害作用。

综上所述,对于罗氏沼虾肌细胞的体外培养,L-15培养基较 M199 更为适合,同时添加 80~120 µg/L 的 Zn²⁺,8 µg/L 的 Cu²⁺对肌细胞生长较为有利。由于 Cu²⁺ Zn²⁺在体内的积累有拮抗作用^[22],因此,Cu²⁺ Zn²⁺对细胞的综合作用还有待进一步研究。另外,实验还发现,肌细胞培养时间超过 30 h 极易感染一种杆状的原生动物,逐渐地将培养物分解,如不添加青、链霉素,则几小时

内就会感染这种原生动物的,说明青、链霉素对抑制原生动物的污染有一定的作用。在大连湾牡蛎和皱纹盘鲍的组织培养中也出现过类似的原生动物污染^[23,24]。

参考文献:

- [1] 刘凯于,杨凯,余泽华,等. 斑节对虾组织的原代培养[J]. 华中师范大学学报,1998,33(2):210-214.
- [2] 高玮,黄灿华,兰萍章,等. 斑节对虾肝胰腺和血淋巴组织的体外培养[J]. 中山大学学报(自然科学版),2000,39(增刊):119-122.
- [3] 郎刚华,王勇,汪岷,等. 中国对虾淋巴组织的长期原代培养和化学诱变初探[J]. 青岛海洋大学学报,2001,31(3):411-414.
- [4] 高玮,张立人. 对虾病毒病害的研究进展[J]. 中国病毒学,1997,12(1):8-13.
- [5] 胡珂,王立平,段爱梅. 中国对虾的组织培养[J]. 水产学报,1991,15(4):328-331.
- [6] Hsu Y L, Yang Y C. Development of an in vitro subculture system for the oka organ (lymphoid tissue) of *Penaeus monodon* [J]. *Aquaculture*, 1995, 136: 43-55.
- [7] 陈志阳,王国华,杨敏,等. 一种简便、快速检测淋巴细胞增殖的方法[J]. 中国生化药物杂志,2000,21(5):245-247.
- [8] 林忠宁,董胜璋,董书芸,等. MTT法检测T淋巴细胞增殖功能的方法学探讨与应用[J]. 中国卫生检验杂志,2000,10(1):8-10.
- [9] Marcelo M, Ricardo C, Jenny R, et al. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 2000, 191: 89-107.
- [10] Burdon R H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation [J]. *Free Radic Biol Med*, 1995, 18(4): 775-794.
- [11] Luedeman R A, Lightner D V. Development of an in vitro primary cell culture system from the penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei* [J]. *Aquaculture*, 1992, 101: 205-211.
- [12] Groumellec M L, Martin C, Haffner P, et al. Cell culture from tropical shrimp [J]. *Aqua Trop*, 1995(10): 227-286.
- [13] Fan Tingjun, Wang Xiaofeng. In vitro culture of embryonic cell from the shrimp, *Penaeus chinensis* [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 267: 175-184.
- [14] 童裳亮. 海洋动物的细胞培养与应用 [J]. 生物工程进展,1994,14(6):47-48.
- [15] Cohick W S, Clemmons D R. The insulin-like growth factors [J]. *Ann Rev Physiol*, 1993, 55: 131-153.
- [16] 李慧,易静,高飞,等. 正常人成纤维细胞老化过程中活性氧水平的变化 [J]. 上海第二医科大学学报,2001,21(5):393-396.
- [17] 张洪渊,刘克武,龚由彬,等. 金属离子和脲对背角无齿蚌碱性磷酸酶的影响 [J]. 四川大学学报(自然科学版),1996,33(1):100-104.
- [18] 陈素丽,陈清西,丘文杰,等. 金属离子对长毛对虾酸性磷酸酶的影响 [J]. 台湾海峡,1998,17(1):96-99.
- [19] 蓝伟光,陈霓,杨孙楷. 重金属对真鲷生理生化作用的研究 [J]. 海洋学报,1993,15(1):92-97.
- [20] 王维娜,王安利,孙儒泳. 水环境中的铜锌铁钴离子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响 [J]. 动物学报,2001,47(专刊):72-77.
- [21] 方允中,李文杰. 自由基与酶 [M]. 北京:科学出版社,1994.6-12.
- [22] 刘发义,吴玉霖,赵鸿儒,等. 铜在中国对虾体内的积累与致毒效应 [J]. 海洋与湖沼,1988,19(2):133-138.
- [23] 崔龙波,李睿坤. 大连湾牡蛎的组织培养 [J]. 海洋通报,2001,20(2):30-34.
- [24] 崔龙波,魏峰,陆姚华. 皱纹盘鲍组织培养的研究 [J]. 烟台大学学报,2000,13(1):21-24.

Effect of Cu^{2+} and Zn^{2+} on cultured muscle cells of *Macrobrachium rosenbergii*

WANG Jun-xia , LIU Jin , WANG Wei-na , YANG Bo , ZHAI Zong-zhao
(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Received: Apr, 4, 2003

Key words: *Macrobrachium rosenbergii* ; cells proliferation ; active oxygen ; Zn^{2+} ; Cu^{2+}

Abstract: Primary shrimp cell cultures were developed from muscles of *Macrobrachium rosenbergii* in medium L-15 and M199. The influences of Zn^{2+} (0 ~ 160 $\mu\text{g/L}$) and Cu^{2+} (0 ~ 10 $\mu\text{g/L}$) in medium L-15 on proliferation of cells and active oxygen were studied. The result indicated that the L-15 medium had positive effect on culture cells, Zn^{2+} in 80 ~ 120 $\mu\text{g/L}$ significantly stimulated cell proliferation. The inner cell active oxygen production rate was the smallest. Cu^{2+} in 8 $\mu\text{g/L}$ also stimulated cell proliferation. Cell proliferation was the biggest and active oxygen production was the smallest.

(本文编辑 刘珊珊)