

中国明对虾囊胚和原肠胚细胞的分离和培养

余黎明^{1,2}, 张晓军¹, 田丽萍^{1,2}, 张成松^{1,2}, 金松君¹, 相建海¹

(1.中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2.中国科学院 研究生院, 北京 100039; 3. 珠海市海洋与渔业环境监测中心, 广东 珠海 519000)

摘要: 尝试了多种方法分离中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 囊胚细胞和原肠胚细胞并进行了细胞培养。结果表明, 解剖法适用于囊胚细胞, 自行设计的压片法适用于原肠胚细胞。在培养起始阶段, 通过降低血清浓度和缩小培养体系可使中国明对虾囊胚细胞和原肠胚细胞迅速贴壁并铺展, 囊胚细胞铺展后有明显的生长晕, 中后期原肠胚细胞较易达到半汇聚状态。值得注意的是, 中国明对虾囊胚细胞在不同培养液中培养可发生形态上的分化。本实验方法有望用于对虾细胞分化机理和对虾细胞建系的研究。

关键词: 中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*); 囊胚; 原肠胚; 细胞培养

中图分类号: Q813.11

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)01-0058-05

胚胎细胞能够迅速分裂, 是建立细胞系的良好材料。开展对虾胚胎细胞培养的研究可以为建立对虾细胞系进行有益尝试, 以便打破尚无对虾细胞系的不利局面。另外, 囊胚等早期胚胎的细胞尽管数量有限, 但尚未分化, 具有多向分化潜能, 在一定的体外培养条件下可以分化为一定的细胞类型, 因此早期胚胎细胞培养可应用于细胞分化等发育生物学基础研究。兼有无限增殖能力和多向分化潜能的细胞是多能干细胞, 其中胚胎干细胞还有种系嵌合能力, 具有十分广泛的应用, 如克隆动物和转基因动物的生产, 真核基因表达与调控的研究, 细胞分化机制的探索和动物疾病模型的建立等^[1-4], 而胚胎干细胞来源于早期胚胎(桑椹胚、囊胚)或原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)^[5-7], 以囊胚等早期胚胎为材料建立胚胎干细胞系首先要能成功进行这些胚胎细胞的体外培养, 因此开展对虾囊胚细胞的体外培养研究可以为建立对虾胚胎干细胞系奠定基础。

十几年来不少学者对对虾成体组织的细胞培养已经进行了广泛的研究^[8-16]。在虾类胚胎细胞培养方面, Frerichs^[17]以发育了 7~13 d 的罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 胚胎为材料进行胚胎细胞培养, 取得原代培养的成功。在此基础上, Fan 等^[18]以中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 胚胎(肢芽期后胚胎)为材料进行胚胎细胞培养, 传了数十代。但是, 对虾囊胚和原肠胚等较早发育阶

段胚胎的细胞培养尚未见报道, 作者以中国明对虾囊胚和原肠胚为材料对此进行探索。

1 材料与方 法

1.1 材料

中国明对虾亲虾捕自青岛近海, 运至中国科学院海洋研究所生物培育楼暂养并促熟。采用相建海等诱导亲虾于白天产卵的方法获得中国明对虾受精卵^[19]。产后约 30 min 收集受精卵, 盛在 600 mL 烧杯中, 于杯底铺成一单层, 海水盐度为 32, 水温为 17~18℃。镜检观察胚胎发育, 取 32 或 64 细胞期囊胚(产后 4~6 h)、早期原肠胚(产后 6~10 h)或中后期原肠胚(产后 13~18 h)用于细胞培养。

1.2 培养基及其他试剂

培养液 A 以 1×Leibovitz's L-15 (GIBCO) 为基础培养基, 添加 5% 胎牛血清 (FBS) (HyClone), 12.0 g/L NaCl, 6.0 g/L 葡萄糖, 0.06 g/L 脯氨酸, 0.3 g/L 谷氨酰胺, 10 mmol/L HEPES 以及 200 IU/mL 青霉素钠, 200 IU/mL 硫酸链霉素等, pH 7.0~7.2。培养液 B 和培养液 A 类似, 但 FBS 浓度

收稿日期: 2005-09-13; 修回日期: 2008-10-30

基金项目: 国家 973 计划项目(2006CB101804); 国家 863 计划项目(2006AA10A401); 国家自然科学基金项目(302002130)

作者简介: 余黎明(1979-), 男, 福建宁德人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋生物细胞培养, E-mail: yuliming219@163.com

为 15%，葡萄糖则为 1.0 g/L。培养液 C 在培养液 B 中添加 25% 中国明对虾胚胎浸提液。

中国明对虾胚胎浸提液：取中国明对虾肢芽期胚胎，等体积加入盐度为 32 的陈海水，匀浆，60 °C 水浴 30 min，7 000 g，4 °C 离心 50 min，取上清，以孔径 0.22 μm 的微孔滤膜无菌过滤，-20 °C 储存。

改良的 PBS (Modified PBS, MPBS): 25.5 g/L NaCl, 0.6 g/L KCl, 0.9 g/L Na₂HPO₄, 0.27 g/L KH₂PO₄, pH 7.2。

1.3 细胞分离方法

以 120 目尼龙筛绢过滤收集胚胎，无菌海水冲洗 2~3 次，500 mg/L 碘伏(上海中卫消毒剂研究所)海水溶液浸泡消毒约 20 min，以无菌的 120 目尼龙筛绢过滤收集并用无菌海水冲洗 3~5 次。消毒的胚胎用下列方法在无菌条件下处理，使孵化膜破裂，获得胚胎组织和细胞。

研磨法：把胚胎悬浮于 MPBS，用组织匀浆器或研钵小心研磨，对光观察，上清刚变混浊即停止研磨，小心吹打几次，用 120 目尼龙筛绢过滤除去大的组织块，得到细胞悬液。200 g，4 °C 离心 7 min，弃上清，沉淀重悬于相应培养液。下文中其他方法的过滤和离心操作同本法。

解剖法：将胚胎悬浮于相应培养基，在解剖镜下用尖锐的解剖针侧向扎破孵化膜，用装有 10 μL 枪头的微量加样器小心吹打几次。

过筛法：用平整的粗玻璃棒头挤压单层平铺于 120 目无菌尼龙筛绢上的胚胎，用 MPBS 冲洗，使组织和细胞从网眼滤过，并离心重悬于相应培养液。

过针法：仿过筛法，将胚胎悬浮于 MPBS，以配有外径为 0.45 mm 注射针的 1 mL 注射器快速抽吸，使胚胎快速通过注射针时破裂，过滤并离心得到细胞，重悬于相应培养液。

压片法：将胚胎悬浮于 MPBS，适量滴加于血球计数板计数室，用载玻片压破胚胎，由于血球计数板的特殊设计，压片时载玻片被位于计数室两侧并略高于计数室的峭挡住，这样正好可以压破中国明对虾的胚胎(卵膜径约 400 μm)但不会完全压碎，用 MPBS 冲下这些胚胎并吹打几次，过滤并离心得到细胞，重悬于相应培养液。

以碘化丙啶 (PI) 排除法检测并统计活细胞浓度及细胞存活率^[20]。

1.4 细胞培养

以下列 2 种方法进行原代培养。

方法 1：用培养液 B 重悬前述除解剖法外各方法获得的早期原肠胚细胞和中后期原肠胚细胞，调整细胞密度，分别为约 10⁴ 个/mL 和 10⁵ 个/mL，然后接种于 35 mm 细胞培养皿 (Corning)，每皿 1.5 mL。囊胚细胞则以解剖法于培养液 B 中解剖获得，补足培养液 B 到 1.5 mL/35 mm 细胞培养皿。

方法 2：用培养液 A 代替培养液 B，以类似方法 1 的方法重悬原肠胚细胞并调整细胞密度，取 50 μL 该细胞悬液接种于 35 mm 细胞培养皿形成直径约 1.0 cm 的露珠状液滴，培养，镜检确定细胞已经贴壁，以培养液 B 半量换液，培养过夜，全部换成培养液 B，继续培养，2~3 d 半量换液；囊胚细胞则于培养液 A 中以解剖法获得，混匀后接种成上述直径约 1.0 cm 的露珠状液滴，培养，细胞贴壁后用培养液 B 或 C 进行后续操作，方法不变，观察比较培养液 B 与培养液 C 的培养结果。

方法 1 和方法 2 都是在 22.0 °C，饱和湿度条件下进行细胞培养。

选取未明显分化的原代培养囊胚细胞和原代培养 4~6 d 半汇聚或汇聚状态的原肠胚细胞进行传代，方法有以下 3 种。

方法 1：胰蛋白酶消化法，吸弃旧培养液，MPBS 洗涤 2 次，0.1% 胰蛋白酶 (Amresco, 1:250) -MPBS 溶液室温下消化到细胞开始变圆 (约 10~20 min)，吸弃消化液，加入培养液 A 或培养液 B 终止消化，吹打制成细胞悬液，以上述两种原代培养方法进行培养。

方法 2：以 0.02% EDTA-MPBS 溶液代替胰蛋白酶溶液消化细胞约 10 min，用细胞铲子铲起细胞制成细胞悬液，其他步骤同胰蛋白酶消化法。

方法 3：直接用细胞铲子铲起细胞制成细胞悬液，其他步骤同胰蛋白酶消化法。

2 结果

2.1 细胞分离方法比较

对于囊胚细胞分离，只有解剖法才具有较高的可靠性，细胞存活率约为 20%~40%，但该方法遭到污染的可能性较大，而且不便于大批量处理，一般不用于原肠胚细胞分离。对于原肠胚细胞分离，压片法具有很高的可靠性，历次实验中，细胞存活率都大于 70%，该法也便于大批量处理；过针法则需掌握一定的抽吸速率，太快或太慢效果都不理想，细胞存活率可大于 70%；过筛法和研磨法虽然便于大批量处理，但细胞存活率一般小于 5%，而

且细胞状态较差，贴壁率很低。

2.2 细胞培养结果

原代培养方法 1 效果较差，细胞贴壁率小于 10%。方法 2 效果较好，细胞在 12~14 h 内贴壁并开始铺展，细胞贴壁率大于 80%；铺展的囊胚细胞有明显

的生长晕，但是增殖不显著，之后迅速分化，可以存活 3~4 周；早期原肠胚细胞常铺展为铺路石状，增殖不显著，可以存活 1~2 周；中后期原肠胚细胞较易于达到半汇聚状态，细胞单层可以维持 4~5 周（图 1-1，1-2 和 1-3）。



图 1 原代培养的中国明对虾囊胚和原肠胚细胞

Fig. 1 Primary cultured cells from blastula and gastrula of *F. chinensis*

1-1. 囊胚细胞，培养 36 h；1-2. 早期原肠胚细胞，培养 3~4 d；1-3. 中后期原肠胚细胞，培养 4d；Bar=50 μm

1-1. blastula cells, cultured 36 h; 1-2. early phase gastrula cells, cultured 3~4 d; 1-3. metaphase or anaphase gastrula cells, cultured 4 d; 标尺为 50 μm

同一亲虾同一次所产的卵，受精后发育到同一时期的囊胚，其细胞用原代培养方法 2 经不同培养液培养，形态上可发生分化，培养液 B 培养数日囊胚细胞形成图 2-1 所示形态，而培养液 C 培养数日

则大部分形成图 2-2 所示形态，类似于神经细胞。

原代培养的囊胚细胞和原肠胚细胞以不同方法传代培养都无法重新贴壁，2~3 d 后死亡。

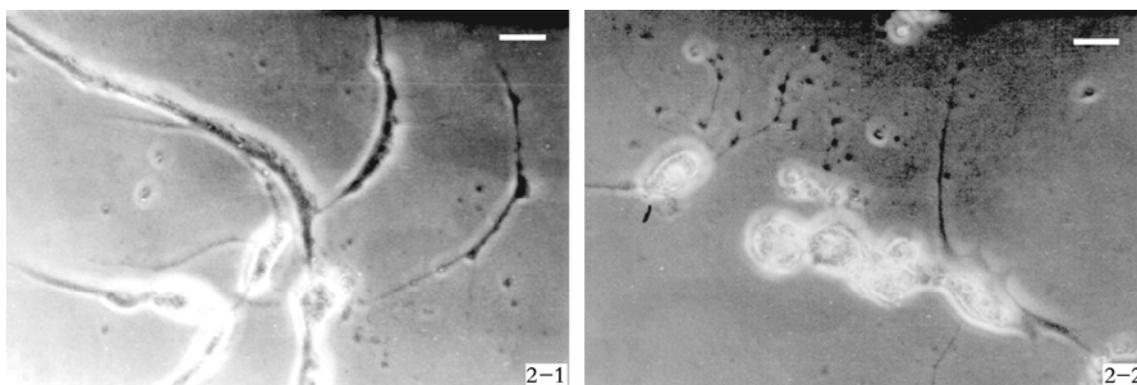


图 2 不同培养液培养的中国明对虾囊胚细胞(原代培养 5 d)

Fig. 2 Culturing blastula cells of *F. chinensis* in different mediums(primary cultures 5 d)

2-1. 培养液 B；2-2. 培养液 C；标尺为 100 μm

2-1. medium B; 2-2. medium C; Bar=100 μm

3 讨论

对虾养殖是我国水产养殖业的重要支柱之一，但是近年来对虾病害严重，造成了巨大损失，尤以病毒病为甚。对虾病毒学、免疫学和遗传学等研究

十分急迫。发展对虾细胞培养技术不仅可以为研究对虾病毒提供方便，还可以为对虾免疫学、遗传学以及发育生物学等研究提供便利。本实验以中国明对虾囊胚和原肠胚为材料进行体外细胞培养的研究，一方面为建立对虾细胞系乃至胚胎干细胞系进

行探索, 另一方面试图建立对虾囊胚细胞体外分化的模型以利于对虾发育生物学的研究。本研究已经成功进行中国明对虾囊胚和原肠胚细胞的原代培养, 并观察到囊胚细胞在不同培养基中培养可发生形态上的分化。

对虾卵裂为完全等裂式, 各分裂球充盈着卵黄, 因而其囊胚和原肠胚等胚胎细胞极易破损, 且不易变形和贴壁(Fan,私人通讯)。另一方面, 对虾受精卵会形成孵化膜以保护胚胎, 使之正常发育, 第一次卵裂之前, 其孵化膜已经举起并硬化, 所以机械方法分离对虾囊胚和原肠胚细胞需要破坏已硬化的孵化膜同时尽可能不损伤脆弱的分裂球。而目前, 去除对虾孵化膜的化学方法尚未建立。本实验尝试了多种机械方法, 某些方法能够方便地获得状态良好的中国明对虾囊胚或原肠胚细胞, 但囊胚细胞分离方法尚不够理想, 需进一步研究。本实验在培养起始阶段通过降低血清浓度, 缩小培养体系等措施使中国明对虾囊胚或原肠胚细胞迅速贴壁并铺展, 但是原代培养中囊胚细胞增殖不显著, 且迅速分化, 这些原代培养的胚胎细胞传代后都不能重新贴壁。这可能需要借鉴Fan等^[18]方法, 一方面添加bFGF和IGF- II 等生长因子刺激细胞迅速增殖, 保持良好状态, 另一方面添加壳聚糖等物质促进细胞贴壁。

目前, 胚胎干细胞培养方法有两大类: 有饲养层培养法和无饲养层培养法。以小鼠为例, 有饲养层培养法主要应用小鼠胚胎成纤维细胞(MEF, 取自小鼠 12dpc的胚胎)或STO细胞系作为饲养层细胞, 经一定处理后终止其分裂制成饲养单层来培养胚胎干细胞。无饲养层培养法则是利用各种能分泌抑制分化因子的细胞制备条件培养基, 或者添加重组白血病抑制因子(LIF)制备条件培养基来培养胚胎干细胞, 这一方法在小鼠胚胎干细胞培养上应用得很成功, 但用于其它动物胚胎干细胞培养效果尚不理想。比较而言, 作者认为中国明对虾胚胎干细胞培养采取饲养层培养法成功可能性较大。目前, Fan等^[18]已经传代培养中国明对虾肢芽期后胚胎的细胞, 培养细胞为成纤维状, 在此基础上, 以这样的胚胎成纤维状细胞或其它时期胚胎来源的传代胚胎细胞为饲养层, 结合本研究方法, 有可能以中国明对虾囊胚细胞为材料进行其胚胎干细胞

有饲养层培养法的研究。

参考文献:

- [1] Marshall E. Versatile cell line raises scientific hopes, legal questions [J]. **Science**, 1998, 282: 1 014.
- [2] Gretchen V. Harnessing the power of stem cells [J]. **Science**, 1998, 283: 1 432.
- [3] Watt F M, Hogan B L. Out of eden: stem cells and their Niches [J]. **Science**, 2000, 287: 1 427-1 430.
- [4] Kooy D V, Weiss S. Why stem cells [J]. **Science**, 2000, 287: 1 439.
- [5] Evan M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. **Nature**, 1981, **292**(9): 154-156.
- [6] Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1981, **78**(12): 7 634-7 638.
- [7] Piedrahita J A, Anderson G B, Bondurant R H. On the isolation of embryonic stem cells: Comparative behavior of murine, porcine, ovine embryos [J]. **Theriogenology**, 1990, **34** (5) : 879-901.
- [8] Chen S N, Chi S C, Kou G H, *et al.* Cell culture from tissues of grass prawn, *Penaeus monodon* [J]. **Fish Pathol**, 1986, **21**(3): 161-166.
- [9] Ellender R D, Najafabadi A K, Middlebrooks B L. Observations on the primary culture of hemocytes of *Penaeus* [J]. **Journal of Crustacean Biology**, 1992, **12**(2): 178-195.
- [10] 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 monodon* [J]. **Aquaculture**, 1995, 136: 43-55.
- [11] Tong S L, Miao H Z. Attempts to initiate cell cultures from *Penaeus chinensis* tissues [J]. **Aquaculture**, 1996, 147: 151-157.
- [12] Chen S N, Wang C S. Establishment of cell culture systems from penaeid shrimp and their susceptibility to white spot disease and yellow head virus [J]. **Methods Cell Sci**, 1999, **21**(4): 199-206.
- [13] Itami T, Maeda M, Kondo M, *et al.* Primary culture of lymphoid organ cells and haemocytes of kuruma shrimp,

- Penaeus japonicus*[J]. **Methods Cell Sci**, 1999, **21**(4): 237-244.
- [14] Gao C L, Sun J S, Xiang J H, *et al.* Primary culture and characteristic morphologies of medulla terminalis neurons in the eyestalks of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* [J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 2003, **290**: 71-80.
- [15] 王军霞, 王维娜, 王安利, 等. 日本对虾血淋巴和肌肉的原代培养[J]. 海洋科学, 2003, **27** (3): 61-63.
- [16] 余黎明, 张晓军, 相建海. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血细胞的原代培养[J]. 海洋与湖沼, 2003, 国家重点基础研究发展规划项目 (973) 专辑: 60-67.
- [17] Frerichs G N. In vitro culture of embryonic cells from the fresh prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. **Aquaculture**, 1996, **143**: 227-232.
- [18] Fan T J, Wang X F. In vitro culture of embryonic cells from the shrimp, *Penaeus chinensis* [J]. **J Exp Mar Biol Ecol**, 2002, **267**: 175-184.
- [19] 相建海, 周令华, 刘瑞玉. 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 四倍体诱导研究[J]. 海洋科学, 1992, **4**: 55-61.
- [20] 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术[M]. 第 2 版. 北京: 北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1990.115-121.

Separation and *In vitro* culture of the cells of blastula and gastrula from the penaeid shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*

YU Li-ming^{1,2}, ZHANG Xiao-jun¹, TIAN Li-ping^{1,2}, ZHANG Cheng-song^{1,2}, JIN Song-jun¹, XIANG Jian-hai¹

(1. Institute of Oceanology, the Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Marine and Fishery Environment Monitor Center of Zhuhai, Zhuhai 519000, China)

Received: Sep., 13, 2005

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; blastula; gastrula; cell culture

Abstract: To develop cell culture of penaeid shrimps, *in vitro* cell culture of the embryo, including the blastula and gastrula, of *Fenneropenaeus chinensis* was performed in this study. Viable blastula cells were obtained by dissecting the embryos (puncturing the chorion with fine acus and then gently pipetting the blastula cell mass), and good yields of viable gastrula cells were obtained by crushing the embryos gently. The attachment and spread of the embryonic cells could remarkably improved by decreasing the concentration of fetal bovine serum (FBS) and the volume of the culture medium at the beginning of the culture. After spreading, blastula cells took on growth hallow, but they couldn't proliferate notably, while the cells of the developed for 13~18 h gastrula could easily become sub-confluent. However, passage of primary cultures resulted in the loss of adherence of cells. The medium used was 1×Leibovitz's L-15 medium supplemented with 12.0 g/L NaCl, FBS and embryo extract of *F. chinensis*, and the concentration of FBS and the embryo extract was based on the need of different experiments. It was worth the whistle that the blastula cells cultured in different media could morphologically differentiate.

(本文编辑: 刘珊珊)