

# 日本七鳃鳗外周血细胞显微结构及类淋巴细胞体外培养

逢越<sup>1,2</sup>, 李庆伟<sup>1</sup>

(1. 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029; 2. 大连大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622)

**摘要:** 以日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)为研究对象, 观察其外周血细胞显微结构和探讨类淋巴细胞原代培养条件。采用 Wright 氏和 Giemsa 氏染色法对日本七鳃鳗外周血液有形成分进行显微观察, 可鉴别出红细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞; 未发现嗜碱性粒细胞。通过 Ficoll 密度梯度离心法和流式细胞仪分选获得高纯度的七鳃鳗类淋巴细胞。经条件优化后确定最适培养液 L15 + 20% FBS(5%七鳃鳗血清)+ 0.46% NaCl, 在 18℃, pH 6.8~7.0 的条件下对日本七鳃鳗类淋巴细胞进行体外培养, 大多数类淋巴细胞半贴壁生长, 细胞状态较好, 最长可以存活近一个月。类淋巴细胞的原代培养为日本七鳃鳗细胞体外培养的深入研究提供了实验依据。

**关键词:** 日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*); 血细胞; 类淋巴细胞; 细胞培养

中图分类号: Q952, Q253 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2012)01-0023-07

日本七鳃鳗(*Lampetra japonica*)属无颌类脊椎动物, 是现存最古老的脊椎动物代表。由于七鳃鳗是联系无脊椎动物与脊椎动物之间的重要阶元, 因此在遗传信息方面, 它必定印记了无脊椎动物的进化历史, 同时作为脊椎动物最直接的祖先, 又为脊椎动物的起源与进化提供丰富的遗传信息。2009 年美国冷泉港实验室<sup>[1]</sup>提出将七鳃鳗作为进化和发育生物学研究的模式生物。七鳃鳗不仅是研究脊椎动物起源与进化的关键物种, 且它所具有的特殊生活方式, 又赋予它诸多特有的功能基因, 特别是在脊椎动物适应性免疫应答的起源与进化等方面具有极为重要的意义。

20 世纪 80 年代初期 Fujii 等<sup>[2]</sup>首次发现七鳃鳗血液内具有形态上类似于有颌类脊椎动物淋巴细胞的一类细胞。中国学者文兴豪等<sup>[3]</sup>于 1998 年对日本七鳃鳗的血细胞进行了显微及亚显微结构观察, 证实其存在淋巴细胞。2000 年 Shintani 等<sup>[4]</sup>在七鳃鳗的肠壁组织中发现 PU.1/ Spi-B 同源基因的表达, PU.1/ Spi-B 基因是高等脊椎动物淋巴细胞中特异表达的一类蛋白基因家族, 该研究在分子水平上进一步验证了无颌类脊椎动物存在淋巴细胞。2002 年, Mayer 等<sup>[5]</sup>在海七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)的前肠组织中, 分离出一种类似于淋巴细胞的一类细胞, 其体积比哺乳动物的淋巴细胞略小, 有一个浓缩染色质的细胞核, 胞质中有相应的细胞器, 将其称为类淋巴细胞(lymphocyte-like cells)。于岑杰等<sup>[6]</sup>在 2007 年对日

本七鳃鳗外周血通过 Ficoll 密度梯度离心和流式细胞分选获得类淋巴细胞。2009 年, Cooper 等<sup>[7]</sup>提出七鳃鳗具有 VLRA 和 VLRB 两类淋巴细胞群, 功能上分别类似哺乳动物适应性免疫系统中分泌细胞因子的 T 细胞及分泌抗体的 B 细胞。作为重要的免疫细胞, 七鳃鳗类淋巴细胞的存在, 是研究其适应性免疫进化的基础。为此, 作者在原有工作的基础上, 探索七鳃鳗类淋巴细胞原代培养方法, 优化培养条件, 从而为七鳃鳗体外细胞培养及建立细胞株提供基础, 为今后开展七鳃鳗相关研究工作提供条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料

日本七鳃鳗 2009 年 12 月末采自黑龙江省松花江流域同江地区。选取健康、体表完整的个体, 观察 7 d, 证实无病后用于实验。

#### 1.1.2 试剂

淋巴细胞分离液(比重 1.092)购自天津灏洋生物公司; Leibovitz's L15 基础培养液购自 Sigma 公司;

收稿日期: 2010-10-05; 修回日期: 2011-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071991, 31140002); 大连市科技计划项目(2011J21DW016)

作者简介: 逢越(1975-), 女, 辽宁大连人, 讲师, 博士在读, 主要从事海洋功能基因研究, 电话: 0411-87402327, E-mail: pangyue01@163.com; 李庆伟, 通信作者, 电话: 0411-85827799, E-mail: liqw@263.net

RPMI 1640、M199 及高糖 Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)基础培养液购自 Hyclone 公司, 特级胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)为 Invitrogen Gibco 原装进口, 鼠尾胶原蛋白 型购自杭州生友生物技术有限公司, 多聚赖氨酸(Poly-D-lysine)购自碧云天生物技术有限公司; 台盼蓝、瑞氏(Wright)氏和姬姆萨(Giemsa)氏染液为实验室保存。

### 1.1.3 试剂配制

#### 1.1.3.1 配置培养液

按照实验设计在基础培养液中分别加入体积分数为 5%、10%、20% 的特级胎牛血清, 其中含 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素。

#### 1.1.3.2 七鳃鳗血清

从尾动脉中采取外周血, 室温放置 1 h 后, 4 过夜, 次日, 5 000 r/min 离心 20 min 取上清, 即为血清, 将血清在 56 °C 水浴灭活 30 min, 过滤除菌后分装, 置于-20 °C 备用。将 5 g/L 鼠尾胶原蛋白 型溶解于 0.006 mol/L 乙酸中, 使其终浓度为 0.012 g/L, 按 2 μg/cm<sup>2</sup> 包被培养瓶和培养板。将 5 g/L 多聚赖氨酸配制浓度为 0.1 g/L 的工作液包被培养瓶和培养板。培养液、平衡盐溶液及使用的器械经严格的灭菌消毒, 所有的培养液及平衡盐溶液 pH 值调为 6.8~7.0。

## 1.2 方法

### 1.2.1 血涂片观察日本七鳃鳗外周血细胞的形态特征

无菌条件下剪断尾巴, 取一滴血, 滴于洁净的载玻片, 制备血涂片。将制好的血涂片自然晾干, 然后将载玻片放入含有甲醇的染缸中固定 10 min, 再放入含有 Giemsa 氏染液或 Wright 氏染液的染缸中染色 45 min, 用蒸馏水冲洗, 干燥, 即可镜检。

### 1.2.2 外周血类淋巴细胞的分离

将日本七鳃鳗置 2%次氯酸钠中 10 min, 再移入 70%乙醇中浸泡 15 min 进行体表消毒, 用灭菌双蒸水洗涤 3 次, 将七鳃鳗置无菌纱布上吸干体表水分, 无菌条件下剪断尾巴, 外周血液滴入 2 mL 的抗凝管中, 加 2 倍体积 Hank's 液稀释。取比重为 1.092 的小鼠淋巴细胞分离液 3 mL 置于离心管中, 用移液器吸取稀释血液 3 mL, 沿管壁缓缓的加入到淋巴细胞分离液界面上, 水平转头离心 20 min (20 °C, 1200 r/min)。待离心后溶液出现四层界面, 中间白膜状层是白细胞层, 吸取中间白膜状单个核细胞层重复上述过程。最终经 3 000 r/min 离心 5 min 收集白细胞。

利用流式细胞仪对分离到的白细胞进行分选, 根据细胞的前向光及侧向光散射特征成功分选出类淋巴细胞, 分选效率高达 95%。

### 1.2.3 细胞计数

取类淋巴细胞悬液 0.5 mL 与 0.4%台盼蓝染液 0.5 mL 于离心管中混合均匀, 吸取少许混合液加入到血球计数板上, 显微镜下计数 4 个大方格内的细胞总数/ $4 \times 10^4 \times$ (稀释倍数)进行计算。同时进行细胞活力检测。按公式活细胞百分率=活细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ , 计数 200 个类淋巴细胞, 并计算出活细胞的百分率。当细胞培养两周后, 对现存活细胞计数, 计算细胞存活率(存活率=现存活细胞数/培养时活细胞总数 $\times 100\%$ )。

### 1.2.4 细胞培养条件

#### 1.2.4.1 不同培养液的细胞培养

以 L15、高糖 DMEM、M199、RPMI 1640 为基础培养液, 各加入 20%FBS 配制细胞培养液。倒置显微镜下观察日本七鳃鳗类淋巴细胞在不同培养液中细胞生长状况, 并计数细胞贴壁率和存活率(6 次重复实验数据)。

#### 1.2.4.2 不同血清浓度的细胞培养

在 L15 培养液中分别加入体积分数为 5%、10%、20%的特级胎牛血清以及 5%灭活的七鳃鳗血清, 配制细胞培养液培养日本七鳃鳗类淋巴细胞, 观察其生长情况。

#### 1.2.4.3 不同生长基质的细胞培养

以裸的玻璃培养瓶为对照, 用鼠尾胶原、0.01%多聚赖氨酸包被的培养瓶及一次性塑料培养瓶, 对类淋巴细胞进行培养, 观察其生长情况。

#### 1.2.4.4 不同温度的细胞培养

以 4、18、26、37 °C 为培养温度对日本七鳃鳗类淋巴细胞培养, 观察其生长情况。

## 2 结果

### 2.1 日本七鳃鳗外周血细胞的显微结构

将日本七鳃鳗外周血涂片置于光学显微镜下观察。椭圆形的红细胞占绝大多数, 少数单个或三五成群的白细胞分散于密集的红细胞之间, 见图 1。

红细胞: 红细胞呈椭圆形, 表面光滑, 核椭圆形, 位于细胞中央。核内含有致密染色质团块, 染成深紫红色。胞质内充满血红蛋白, 染成均匀的浅紫红色(图 1-1a)。

中性粒细胞(neutrophil): 细胞形态呈圆形、卵圆

形、椭圆形、近似长方形或不规则形状。核较大，形状多样，呈分叶状(图 1-1b, 1-2b, 1-3b)和杆状(1-4c)，分叶居多一般为 2-3 叶。胞质丰富，染成浅粉红色，其中充满小颗粒。

**淋巴细胞:** 在血涂片上个体较小的一类细胞。细胞呈圆形或不规则圆形。核圆形，所占比例大，位于细胞中央，核中染色质浓密，染成蓝紫色。胞质呈一薄层围于核外(图 1-2d, 1-3d)。

**单核细胞:** 细胞圆形、卵圆形或椭圆形。核卵圆形或肾形，多偏于一侧，也有位于中央位或略偏于

中央位。染色质疏网状，染成紫红色。胞质较丰富，染成蓝色，近核膜处较淡，胞质中有许多大小不等的空泡，空泡间有蓝紫色颗粒散布。小的单核细胞与较大的淋巴细胞形态结构较相似，但前者一般体积较大，而核质比例较小，胞质更丰富且着色更深，核的形状也较不规则(图 1-3e, 1-5e, 1-6e)。

**嗜酸性粒细胞:** 细胞圆形，核圆形偏于一侧，染成紫红色。胞质染成浅粉红色，胞质中嗜酸性颗粒较粗大，染成紫红色，近细胞膜处分布较多，在七鳃鳗的血涂片中不多见(图 1-3f)。

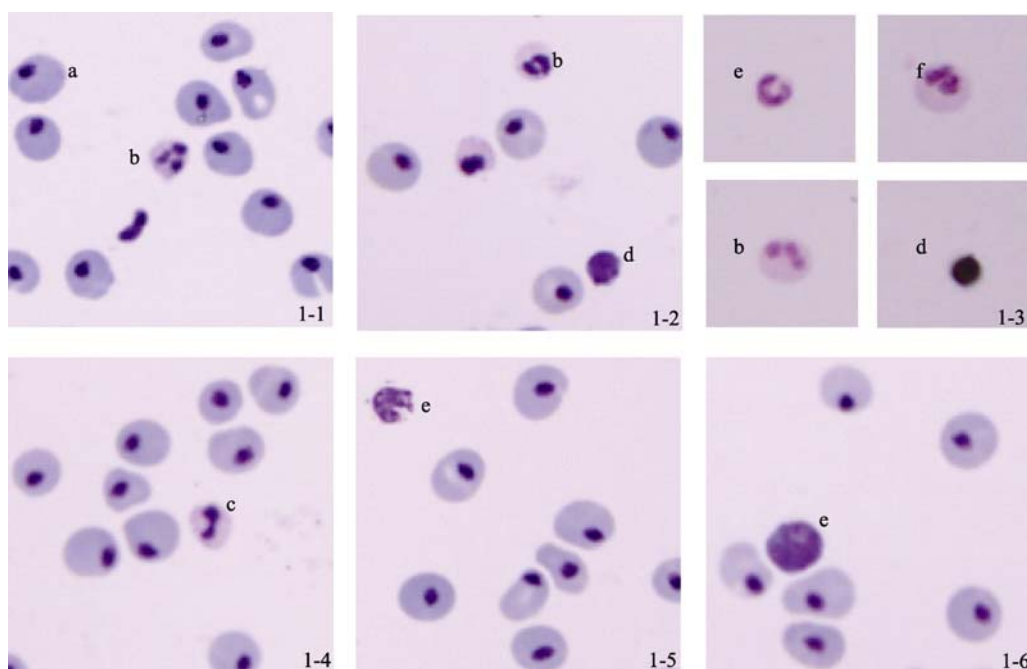


图 1 日本七鳃鳗外周血细胞的显微图像(×400)

Fig. 1 Microscopic structures of the lamprey peripheral blood cells

1-1~1-6. 显微镜不同视野范围内的细胞类型: a. 红细胞; b.分叶核中性粒细胞; c.杆状核中性粒细胞; d.淋巴细胞; e.单核细胞; f.嗜酸性粒细胞

1-1~1-6. cell types from different fields of microscope; a. erythrocyte; b. segmented neutrophil; c. stab form neutrophil; d. lymphocyte; e. monocyte; f. eosinophil granulocyte

## 2.2 不同培养液对日本七鳃鳗类淋巴细胞生长的影响

采用 L15、高糖 DMEM、M199、RPMI1640 为基础培养液，分别加入 20%FBS 制成基础培养液，对七鳃鳗类淋巴细胞进行培养，细胞培养初期各种培养基对细胞状态影响不大，但培养 1 个月时观察发现，L15 和 RPMI1640 培养液培养细胞效果明显优于 M199 和高糖 DMEM 培养液，其中加入 20%FBS 和 0.46%NaCl 的 L15 培养液为七鳃鳗类淋巴细胞较为理想的培养液，说明 L15 培养基的营养成分比较适

合七鳃鳗类淋巴细胞的生长，有利于细胞黏附、铺展和生长繁殖。实验结果见表 1。

## 2.3 不同浓度的血清对日本七鳃鳗类淋巴细胞生长的影响

在 L15 基础培养液中加入不同浓度的新生牛血清和七鳃鳗血清，以鼠尾胶原为基质的 6 孔培养板中进行细胞培养观察 1 个月，实验结果见表 2。培养液中加入 20%特级胎牛血清或加入 5%七鳃鳗血清都能使细胞在很短的时间内贴壁，细胞生长状态优于含有 5%和 10%FBS 的培养液，这表明胎牛血清含量

对于类淋巴细胞的生长状态呈剂量依赖关系, 此试验也说明用胎牛血清替代七鳃鳗自身血清, 对细胞培养能达到同样良好效果。

## 2.4 不同的生长基质对日本七鳃鳗类淋巴细胞生长的影响

采用 L15 + 20 %FBS + 0.46 %NaCl 细胞培养液,

在不同的生长基质上培养类淋巴细胞, 体外培养一个月实验结果见表 3。用多聚赖氨酸包被的培养板比用鼠尾胶原包被的培养板培养的细胞更易贴壁, 但就细胞生长状态来说, 鼠尾胶原对细胞无毒害作用, 所以其包被的培养板更有利于细胞长期良好的生长。

表 1 不同培养液对日本七鳃鳗类淋巴细胞生长的影响

Tab. 1 Effect of medium on primary cell culture of lamprey lymphocyte-like cells

组别	培养液组成	细胞贴壁率(%)	细胞状态	细胞存活率(%)
1	L15+20%FBS	84.50 ± 1.87	+++	75
2	1640+20%FBS	79.33 ± 2.16	+++	70
3	M199+20%FBS	69.50 ± 3.21	++	50
4	DMEM+20%FBS	68.83 ± 2.71	++	50
5	L15+20%FBS+0.46%NaCl	90.17 ± 1.60	++++	90

注: “+”、“++”、“+++”、“++++” 依次表示细胞形态特征由差到好的状态(下同)

表 2 不同血清浓度对日本七鳃鳗类淋巴细胞生长的影响

Tab. 2 Effect of serum on primary cell culture of lamprey lymphocyte-like cells

组别	血清	细胞贴壁率(%)	细胞状态	细胞存活率(%)
1	5%FBS	49.50 ± 2.17	++	30
2	10%FBS	70.50 ± 1.87	+++	70
3	20%FBS	90.17 ± 3.43	++++	90
4	5%七鳃鳗血清	89.50 ± 2.88	++++	80

表 3 不同生长基质对日本七鳃鳗类淋巴细胞生长的影响

Tab. 3 Effect of substrates on primary cell culture of lamprey lymphocyte-like cells

组别	生长基质	细胞贴壁率(%)	细胞状态	细胞存活率(%)
1	玻璃瓶	30.67 ± 3.32	+	70
2	塑料瓶	70.17 ± 1.94	++	80
3	0.01%Poly-Lys 包被	90.17 ± 2.04	+++	60
4	鼠尾胶原包被	80.00 ± 2.61	++++	90

## 2.5 不同温度对日本七鳃鳗类淋巴细胞生长的影响

采用 L15 + 20 %FBS + 0.46 %NaCl 细胞培养液, 以鼠尾胶原作为生长基质, 在不同温度条件下培养日本七鳃鳗类淋巴细胞 7 d, 实验结果见表 4。七鳃鳗类淋巴细胞在 18 °C 生长状态最佳, 4 °C 条件下活细胞数量比接种前减少一半, 而 37 °C 条件下培养的细胞形态较差, 一周后细胞全部死亡。

## 2.6 日本七鳃鳗类淋巴细胞生长形态学观察

用 L15 + 20 %FBS + 0.46 %NaCl 为基础培养液对日本七鳃鳗类淋巴细胞原代培养, 同时将七鳃鳗

红细胞和白细胞分别培养作对照, 实验结果见图 2。白细胞种类多样, 包括单核细胞, 淋巴细胞, 粒细胞等(图 2-1)。红细胞多呈圆形或椭圆形, 表面光滑, 有

表 4 不同温度对日本七鳃鳗类淋巴细胞生长的影响

Tab. 4 Effect of temperature on primary cell culture of lamprey lymphocyte-like cells

组别	培养温度 (°C)	细胞贴壁率 (%)	细胞状态	细胞存活率 (%)
1	4	69.83 ± 3.43	+++	50
2	18	90.67 ± 3.78	++++	90
3	26	59.33 ± 3.14	+	30
4	37	30.17 ± 3.43	+	0

细胞核,核呈椭圆形,位于细胞中央(图 2-2)。而经流式细胞分选仪分选后细胞种类趋于单一,细胞形态为圆形和椭圆形,一开始接种细胞可见细胞游离在培养基中,约 1 h 后细胞大部分贴壁,这些贴壁细胞并不重叠,而是依次排开,形成单层细胞,贴壁细胞密度与细胞开始接种量有关,接种量小,细胞分散贴壁,接种量大,形成单层密集。细胞整体透明,周边轮廓较淡,细胞颗粒较少。七鳃鳗类淋巴细胞生长周期慢,约间隔 3 或 4 d 换 1 次培养液(图 2-3),在培养 1 个月后,细胞数量逐渐减少,细胞膜发暗,细胞内颗粒增多,有半数细胞悬浮,但细胞聚集团块周围细胞数目增多,伴有新生细胞出现,细胞透明,有望继续传代培养(图 2-4)。

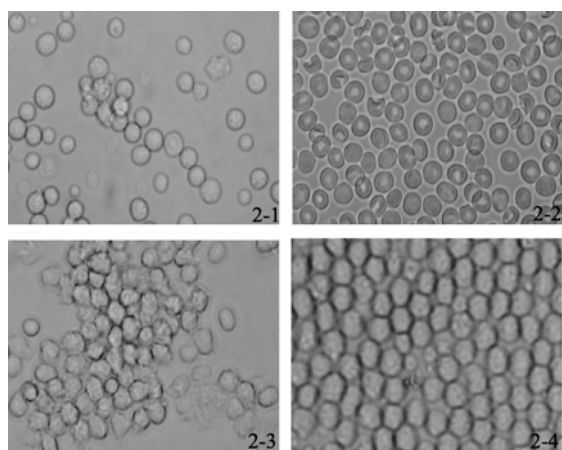


图 2 日本七鳃鳗白细胞、红细胞和类淋巴细胞的原代培养( $\times 400$ )

Fig. 2 Primary culture of lamprey leucocyte, erythrocyte and lymphocyte-like cells *in vitro*

2-1.培养 3 d 的七鳃鳗白细胞; 2-2.培养 3 d 的七鳃鳗红细胞; 2-3.培养 3 d 的七鳃鳗类淋巴细胞; 2-4.培养 1 个月的七鳃鳗类淋巴细胞

2-1. lamprey leucocyte cultured for 3 days; 2-2. lamprey erythrocyte cultured for 3 days; 2-3. lamprey lymphocyte-like cells cultured for 3 days; 2-4. lamprey lymphocyte-like cells cultured for 1 month

### 3 讨论

日本七鳃鳗外周血涂片的有形成分中红细胞占绝大多数,细胞是有核的圆形或椭圆形,体积比哺乳类的红细胞大<sup>[8-9]</sup>,与鱼类的相接近<sup>[10-11]</sup>。七鳃鳗外周血的白细胞中淋巴细胞所占比例最大,它的显微结构与其他鱼类及哺乳动物无明显差异,大小之间也无绝对的分界。众所周知,单核细胞存在于所有脊椎动物中,担负着非特异性免疫和抗原呈递重要

作用,七鳃鳗外周血中单核细胞形态比红细胞稍小,与鱼类单核细胞一样有较多的胞质突起,胞质中含有较多的液泡和吞噬物,它进行活跃的变形运动,具有黏附和较强的吞噬能力。粒细胞包括嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、中性粒细胞。中性粒细胞较多,偶尔可见嗜酸性粒细胞,未见到嗜碱性粒细胞的存在,这与鳗鲡(*Anguilla japonica*)<sup>[12]</sup>、鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)<sup>[13]</sup>、大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)<sup>[14]</sup>、日本白鲫(*Carassius auratus cuvieri*)<sup>[15]</sup>、海鳗(*Muraenesax cinereus*)<sup>[16]</sup>、淡水石斑(*Cichlasoma managuense*)<sup>[17]</sup>相同。鱼类嗜中性粒细胞具有吞噬和杀伤机能,能做变形运动<sup>[18]</sup>,参与机体的炎症反应<sup>[19]</sup>。日本七鳃鳗各类血细胞的大小与其他鱼类基本一致,细胞种类和形态特征与以前文献报道基本相近<sup>[3]</sup>。

目前分离鱼类白细胞较多采用标准 Ficoll 密度梯度离心法和 Percoll-Paque 法,这两种方法操作简单且可获得大量淋巴细胞,而 Ficoll 法是分离动物全血中单个核细胞的常用技术,但分离不同种属动物的单个核细胞使用分离液的比重有所不同。本实验室经过长期研究发现比重为 1.092 的分离液可有效分离日本七鳃鳗外周血单个核细胞,分离的细胞数量大且纯度高,可以满足进一步研究的需要。虽然细胞分离液的比重是影响类淋巴细胞分离的关键因素,但其他影响因素也较多,如外周血液用量、离心力大小与时间、七鳃鳗个体差异及血液黏稠度等都会影响分离的类淋巴细胞数量和纯度<sup>[20]</sup>。另外,因分离的类淋巴细胞还用于体外培养,所以整个操作过程和使用的试剂、器皿均需严格消毒灭菌。鉴于上述影响因素,经过多次实验探索,作者实验室已经确立了从日本七鳃鳗外周血中分离类淋巴细胞的一套最佳实验方案。

哺乳动物的淋巴细胞培养已成为临床检验和免疫学研究的基本技术,而七鳃鳗这个原始脊椎动物的代表其类淋巴细胞的培养还未见报道。要想体外培养七鳃鳗细胞首先要了解它的生活习性,日本七鳃鳗是洄游性种类,幼鳗在江河中生活 3~4 年,成体后进入海中生活,秋季由海回到江河,在江河下游越冬,翌年 5~6 月份,当水温达 15 左右时溯至上游繁殖。因此掌握日本七鳃鳗的渗透压值是至关重要的。早在 1933 年 Galloway<sup>[21]</sup>指出淡水七鳃鳗血液最适生理盐水浓度为 0.46%。而作者捕捞的日本七鳃鳗是从日本海洄游进入江河,因此本试验采用

淡水七鳃鳗血液最适生理盐水浓度值 0.46%NaCl 来调节细胞渗透压, 已获得良好的细胞生长状态。本试验还发现用 5%灭活的七鳃鳗血清代替 20%胎牛血清, 同样能使细胞贴壁和生长, 细胞状态基本一致。资料显示脊椎动物细胞培养基的适宜 pH 值为 7.2~7.4, 而虾细胞培养基的 pH 值为 6.8~7.2<sup>[22]</sup>, pH 值过高或过低时, 使细胞生长显著下降, 同样 pH 值对日本七鳃鳗类淋巴细胞的培养也有显著影响。经过长期试验确定了七鳃鳗类淋巴细胞体外培养的最佳条件, L15 + 20%FBS(或 5%七鳃鳗血清)+ 0.46%NaCl 为培养液, 以胶原蛋白为生长基质, 最佳 pH 在 6.8~7.0, 最佳培养温度在 18℃, 需要 5%CO<sub>2</sub> 培养箱。本实验所采用的培养条件较适合七鳃鳗类淋巴细胞生长, 得到了较好的培养效果, 从而为七鳃鳗体外类淋巴细胞培养、建株及开展有关七鳃鳗体外细胞培养水平的实验研究奠定良好基础。

众所周知, PHA 和 ConA 为 T 细胞有丝分裂原, LPS 为 B 细胞有丝分裂原, 这些有丝分裂原可促进体外培养的淋巴细胞增殖和分化。但将这些有丝分裂原加入到细胞培养液中, 对七鳃鳗类淋巴细胞的增殖和分化没有太大影响, 分析原因可能在日本七鳃鳗的类淋巴细胞中尚未分化出哺乳动物中具有的 T、B 淋巴细胞两大类群。本实验室用 PHA、ConA、LPS 对七鳃鳗鱼腹腔免疫, 用淋巴细胞分离液分离外周血获得白细胞数量明显增多, 而这些有丝分裂原对体外培养的类淋巴细胞却无显著变化, 其中缘由有待于进一步研究探讨。

#### 参考文献:

- [1] Nikitina N, Bronner-Fraser M, Sauka-Spengler T. The sea lamprey *Petromyzon marinus*: a model for evolutionary and developmental biology[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2009, 1: 113.
- [2] Fujii T. Electron microscopy of the leucocytes of the typhlosole in ammocoetes, with special attention to the antibody-producing cells[J]. J Morphol, 1982, 173 (1): 87-100.
- [3] 文兴豪, 张凯, 李德雪, 等. 日本七鳃鳗血细胞显微及亚显微结构[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(6): 614-617.
- [4] Shintani S, Terzic J, Sato A, et al. Do lampreys have lymphocytes? The Spi evidence[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(13): 7417-7422.
- [5] Mayer W E, Uinuk-Ool T, Tichy H, et al. Isolation and characterization of lymphocyte-like cells from a lamprey[J]. PNAS, 2002, 99 (22): 14 350-14 355.
- [6] 刘岑杰, 刘欣, 吴毓, 等. 日本七鳃鳗类淋巴细胞的分离及细胞学特征[J]. 动物学报, 2008, 43(1): 82-87.
- [7] Guo P, Hirano M, Herrin B R, et al. Dual nature of the adaptive immune system in lampreys[J]. Nature, 2009, 459(7248): 796-801.
- [8] 王铁恒, 岳占碰, 文兴豪, 等. 鹌鹑血细胞显微及亚显微结构研究[J]. 中国兽医学报, 1994, 14(3): 298-300.
- [9] 王铁恒, 冯怀亮, 文兴豪, 等. 鹅血细胞超微结构观察[J]. 兽医大学学报, 1992, 12(3): 285-287.
- [10] 冯怀亮, 李文武, 王铁恒, 等. 鲤鱼血细胞显微及亚显微结构的观察[J]. 水产学报, 1991, 15 (3): 241-244.
- [11] 王磊, 张圣强, 杨桂文. 黄鳝外周血细胞显微结构的观察[J]. 科技信息, 2009, 02: 354-355.
- [12] 朱越雄, 曹广力. 鳗鲡血液细胞的研究[J]. 水产养殖, 1997, (4): 18-20.
- [13] 袁仕取, 张永安, 姚卫建, 等. 鳊鱼外周血细胞显微和亚显微结构的观察[J]. 水生生物学报, 1998, 22(1): 39-47.
- [14] 曹伏君, 李长玲, 刘楚吾. 大弹涂鱼血液的研究[J]. 海洋湖沼通报, 2002, 2: 11-15.
- [15] 谢艳霞, 林光华. 日本白鲫外周血细胞显微及亚显微结构的研究[J]. 动物学杂志, 1996, 31(1): 12-16.
- [16] 谢嘉华, 陈朝阳. 海鲷外周血细胞的显微结构[J]. 动物学杂志, 2003, 38(6): 14-18.
- [17] 顾曙余, 杜寅, 丁力, 等. 淡水石斑外周血细胞显微结构观察[J]. 动物学杂志, 2007, 42(6): 115-119.
- [18] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1999, 82-87.
- [19] 周玉, 郭文场, 杨振国. 鱼类血细胞的研究进展[J]. 动物学杂志, 2001, 36(6): 55-57.
- [20] Maule A G, Schreck C B. Changes in numbers of leukocytes in immune organs of juvenile coho Salmon after acute stress cortisol treatment[J]. Aquat Anim Health, 1990, 2(4): 298-304.
- [21] Galloway T M. The osmotic pressure and saline content of the blood of *Petromyzon fluviatilis*[J]. Crichton Research Scholar, 1933, 1: 313-316.
- [22] 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[J]. 海洋湖沼通报, 1996, 2: 78-82.

# Microscopic structures of Japanese lamprey peripheral blood cells and culture of lymphocyte-like cells in vitro

PANG Yue<sup>1, 2</sup>, LI Qing-wei<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 2. College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China)

**Received:** Oct., 5, 2010

**Key words:** Japanese lamprey; haemocyte; lymphocyte-like cells; cell culture

**Abstract:** The microstructure of Japanese lamprey (*Lampetra japonica*) peripheral blood cells and the cultivation methods of lymphocyte-like cells were explored. The peripheral blood cells of *L. japonica* were stained by Wright's and Giemsa's staining methods and five major cell types including erythrocyte, lymphocyte, neutrophil granulocyte, monocyte and eosinophil granulocyte, but not basophil were recognized under light microscope. The lymphocyte-like cells were separated successfully with Ficoll-Paque centrifugation and flow cytometry and were cultured in L15 medium with 20% foetal bovine serum (FBS) including 5% *L. japonica* FBS and 0.46% NaCl. The optimal temperature of cells is 18°C and the optimal pH of cells is 6.8-7.0. They can develop attachment as a sheet of cells after 1 hour. Cells have a good condition for nearly a month. The establishment of primary cell cultures of lymphocyte-like cells from *L. japonica* provides a useful tool for the longevity of the culture and the investigation in cellular biology.

(本文编辑:谭雪静)