

文蛤外套膜组织与细胞培养

陈 颀^{1,2}, 许 璞³, 沈爱国⁴, 万夕和⁵, 刘海鸥⁴, 沈 辉², 杨家新²

(1. 江苏省南通中学, 江苏 南通 226001; 2. 南京师范大学 生命科学学院, 江苏 南京 210097; 3. 常熟理工学院生物与食品工程系, 江苏 常熟 215500; 4. 南通大学 基础医学院, 江苏 南通 226001; 5. 江苏省海洋水产研究所, 江苏 南通 226007)

摘要:以文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus) 外套膜为材料, 采用改良的 M199 培养基, 在不同温度和盐平衡条件下进行组织与细胞培养。培养结果显示, 24 h 左右外套膜组织边缘有细胞爬出, 48 h 后开始形成单层新生细胞, 并发展为生长晕, 7~10 d 细胞基本长满培养瓶底。细胞培养可持续 30~35 d。作者还描述了培养过程中出现的 3 种不同形态特征的细胞, 并对 37 °C 培养条件下细胞的生长及分裂特征作了描述与讨论。

关键词:文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus); 外套膜; 组织培养; 细胞培养

中图分类号: S969.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2007)06-0060-05

文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus) 为底栖双壳纲软体动物, 在东北亚、东亚和南亚沿海均有分布, 为中国沿海重要经济贝类。随着近年来文蛤病害呈现蔓延趋势, 已开始重视文蛤病害的研究。对水产动物类的疾病诊断及防控可以从多方面展开, 然而随着研究的深入, 揭示的病因复杂程度增加, 特别涉及到病毒类病原生物的研究, 仍缺乏基础的试验条件, 例如无研究使用的标准细胞系等。虽然组织与细胞培养技术在脊椎动物中的应用已经比较成熟, 但至今水生无脊椎动物细胞系的建立研究仍较缓慢^[1]。国内外学者在鲍鱼、扇贝、牡蛎和珍珠贝等海水贝类的组织与细胞培养研究方面, 取得了一些进展^[2-5], 与文蛤同属帘蛤科的菲律宾蛤仔和中国蛤蜊也有学者进行了相关研究^[6,7], 但是关于文蛤细胞的培养还未见相关报道。本研究以为文蛤细胞培养研究提供基础性资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

取海州湾沿岸池养文蛤 (2~3 龄), 体质量约 30~40 g, 挑选其中活力较好者作为实验材料。

1.2 方 法

1.2.1 前处理

选取健康文蛤以清水洗净外壳, 灭菌海水充气暂养。培养海水中添加青霉素 0.8×10^5 U/L, 链霉素 1.0×10^5 U/L。隔日换水。4~6 d 后, 暂养文蛤不再有排泄物时, 取出用作实验材料。

1.2.2 培养基配制

使用商品 M199 培养基, 参考王爱民等^[8]的方法进行改良。使用按叮井昭法 MMBSS 平衡盐溶液^[9], 调节培养基的盐度最终为 9 和 20。所有成分混合后用 HCl/NaOH 调节 pH, 经滤纸 + 双层 0.22 μ m 滤膜过滤, 最终 pH 为 7.2~7.4。

改进的 M199 培养基为: M199 0.95 g, 水解乳蛋白 0.5 g, NaHCO₃ 0.22 g, 外套膜组织液 10.0 mL, 小牛血清 10.0 mL, 硫酸庆大霉素 1.6×10^5 U, 头孢拉定 0.2 g, MMBSS + DDW 80 mL。

MMBSS 平衡盐溶液为: KCl 1.08 g, NaCl 26.22 g, 蔗糖 0.30 g, MgSO₄ 3.18 g, MgCl₂ 2.20 g, CaCl₂ 1.12 g, NaHCO₃ 0.30 g, NaH₂PO₄ 0.044 g, 蒸馏水 1 000 mL。

外套膜组织液的制备: 取文蛤外套膜组织约 5 cm³, 剪碎, -20 °C 反复冻融数次, 加少量 DDW 匀浆。匀浆液 3 500/min 离心, 取上清, DDW 稀释至 50 mL。

1.2.3 组织培养

实验用贝清水冲洗后, 切取外套膜, 弃外缘部分, 用无菌棉签擦净组织表面黏液。将材料剪成 1 cm²

收稿日期: 2006-12-10; 修回日期: 2007-03-12

作者简介: 陈颀 (1981-), 男, 江苏南通人, 硕士研究生, 研究方向为海洋水产病害防控, E-mail: cjofcn@sina.com; 许璞, 通讯作者, E-mail: xupu66@sina.com, 电话: 0513-85228268

大小的组织片,0.1% KMnO₄ 溶液处理 30 min,再浸置于含青霉素 0.8 ×10⁵ U/mL、链霉素 1.0 ×10⁵ U/mL 无菌生理盐水中 2 h。将无菌组织片浸于培养基中切成 1 mm² 左右小片,然后均匀贴布于培养瓶壁,20~30 片/瓶,将适量培养液缓慢加入培养瓶,浸没组织块恒温贴壁 6~12 h,翻瓶。每 5~7 d 更换一次培养基。不同培养条件分组如表 1 所示。

表 1 培养条件分组

Tab. 1 Groups of tissue and cell culture

条 件	分 组			
	1	2	3	4
温度()	27	27	37	37
盐度	9	20	9	20

1.2.4 细胞培养

培养组织发生新生长细胞并基本长满瓶底壁时,小心地分离取出较大的组织块,吸出旧培养液和碎离组织,加入 2~3 倍新鲜培养液,冲悬后使培养细

胞均匀悬浮,分瓶,CO₂ 培养箱恒温培养。其他培养条件同组织培养。

2 结果

2.1 培养细胞形态

在组织与细胞培养过程中,观察到 3 种具不同形态特征的细胞:A 型细胞,个体较小,圆形或椭圆形,直径约为 30~35 μm(图 1-1),可见于组织与细胞培养的整个过程;B 型细胞,个体较大,圆形,直径约 50~60 μm(图 1-2),在倒置显微镜下折光较强,正置光镜下可见完整的细胞结构,多见于新生细胞生长中期;C 型细胞,形态不规则(图 1-3),在细胞培养的中期和后期可观察到,但出现的数量较少。在不同培养温度和盐度平衡条件下均可观察到以上 3 种细胞的发生与生长,温度对细胞个体形态无明显影响,在盐度为 9 的培养基中的细胞较盐度 20 培养条件下的细胞略显饱满圆润。

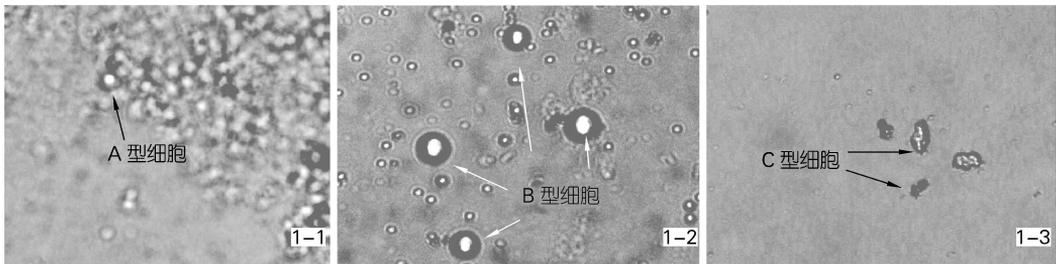


图 1 新生细胞类型

Fig. 1 Shapes of cultured cells

1-1:A 型细胞(×400);1-2:B 型细胞(×400);1-3:C 型细胞(×400)

1-1: Cell A(×400);1-2:Cell B(×400);1-3:Cell C(×400)

2.2 组织培养

翻瓶培养后 12~24 h,可见组织块色泽变浅,边缘较为明显。24 h 左右可见组织块边缘有单个细胞爬出(图 2-1),初期主要是 A 型细胞。48 h 后,组织块边缘可见单层平铺的新生细胞(图 2-2),外围开始形成生长晕(图 2-3)。在倒置显微镜下观察到细胞分裂,以二分裂为主(图 2-4、图 2-5、图 2-6),并可见三分裂和四分裂细胞。此时,在生长晕内及以外区域开始出现一些个体较大的 B 型细胞,该型细胞数量较少,多单独存在。在 37 培养条件下,可观察到较多由 A 型细胞构成的花环状结构,即在一个细胞周围聚合有数个或十余个新分裂的小细胞(图 2-7、图 2-8)。3~4 d 以后,培养细胞中开始出现小的细胞团(图 2-9),多由 A 型细胞组成。约 5 d 后,可观察到由

细胞分泌物产生的结晶体(图 2-10),并偶见形状不规则的 C 型细胞。培养 7~10 d,新生细胞基本长满培养瓶底壁,但细胞分裂生长速度开始趋缓。组织培养过程中形成的生长细胞,一般较难均匀布满瓶底壁,而较多的是形成以组织块为中心的内密外疏的圆晕状结构。

2.3 细胞培养

分瓶后的细胞生长与组织培养过程基本相同,细胞分裂活动略为提前。1 d 左右可见分裂细胞,2~3 d 后可见小的细胞团。37 下同样可见较多花环状结构。5~7 d,生长细胞逐渐布满瓶底壁,分布较均匀,但细胞总量较组织培养形成的生长晕区域稀疏。7~10 d 后细胞分裂生长又趋于缓慢,需再次分瓶培养。实验观察表明,当外套膜培养细胞传至 30~35

d,培养细胞分泌物形成的结晶体增多,细胞也随之 (图 2-11)。开始衰老凋亡。凋亡表现为萎缩、褐化甚至停止分裂

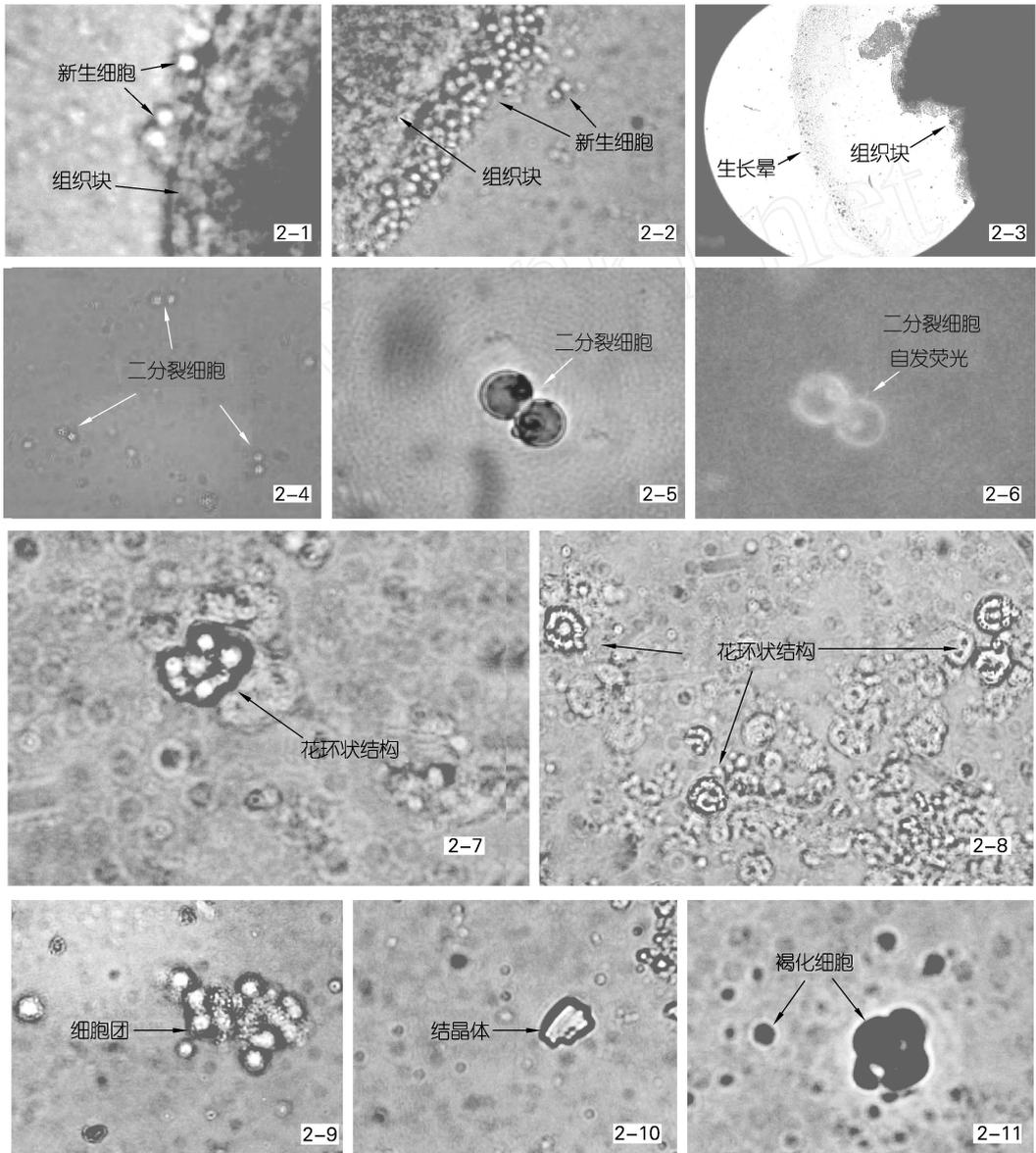


图 2 组织和细胞培养

Fig. 2 Tissues and cells culture

2-1:组织块边缘新生细胞(×400);2-2:形成单层新生细胞(×400);2-3:生长晕(×100);2-4:分裂细胞(×200);2-5:细胞分裂(×1 000);2-6:分裂细胞的自发荧光(×1 000);2-7:细胞分裂形成的花环状结构(×400);2-8:大量花环状结构(×200);2-9:细胞团(×400);2-10:分泌物结晶体(×400);2-11:凋亡细胞和细胞团(×400)

2-1:New cells(×400);2-2:A layer of proliferation cells(×400);2-3:Spreading cells(×100);2-4:Dividing cells(×200);2-5:Cell division(×1 000);2-6:Fluorescence of cell division(×1 000);2-7:A wreath of growing cells(×400);2-8:Cell wreaths(×200);2-9:A cell group(×400);2-10:Crystal secretion(×400);2-11:Languid cells(×400)

3 讨论

3.1 培养基成分的选择

3.1.1 基础培养基

目前研究使用的海水贝类细胞培养基有多种,一般多采用 M199、RPMI1640 或 MEM 等基础培养基,添加氨基酸、血清等生长必需物质,辅以盐平衡调节渗透压作为培养基^[1,8]。本实验所采用的 M199 培养基,在栉孔扇贝和马氏珠母贝等细胞培养实验中获得较好的效果^[3,8]。实验结果显示,该培养基同样也适用于文蛤外套膜组织与细胞培养。

3.1.2 培养液的盐平衡

在已报道的海水贝类细胞培养中,盐平衡较少讨论,培养基的盐度范围较大,盐平衡梯度从 3.5 到 20 均有报道^[2,9]。本实验选取的 9 和 20 两种盐度,分别为动物细胞生理盐浓度和海生动物环境盐浓度。实验结果显示,不论是组织培养或是细胞培养,生长细胞在盐度为 9 的培养基中总是较盐度 20 培养基中显得饱满圆润,而其他形态特征及生长趋势均无明显差异。表明,海水贝类外套膜细胞体外培养可耐受的盐平衡幅度较广,这为贝类细胞专业性培养基的盐平衡设计提供了启示。

3.1.3 外套膜组织提取液的使用与作用

本实验使用的市售 M199 培养基中含有 L-谷氨酰胺,在配制培养基中添加小牛血清和水解乳蛋白,并添加了文蛤的外套膜组织提取液^[8,10],目的是利用其自身组织提取液的促生长因子,达到增强组织与细胞培养的效果。实验结果显示,在使用组织提取液的培养基中,组织与细胞的贴壁、分裂和生长均明显好于对照培养基。这表明在未对贝类细胞促生长因子作明确结论之前,在体外培养中使用自身组织提取液是一个较好的解决办法。

但是,类似血清的使用有值得商榷一面,使用组织提取液也会导致各批次培养基成分相对不稳定,不便于提供和控制标准化的细胞体外培养环境^[7],并可能增加培养基污染的频率。因此在深入开展贝类细胞培养研究的过程中,必需重视建立标准培养基的研究。

3.2 温度对组织与细胞培养的影响

在已报道的研究中,多数海水贝类组织与细胞培养的适宜温度为 26~27^[11],仅有少数在 20 左右^[8]。本实验使用一般适宜温度(27)和 37 两种温度进行研究比较。在这里,37 为温血动物组织细胞培养的适宜温度,但对于野外生长的文蛤个体而言,已超出其正常生存的温度^[12]。但组织与细胞培

养结果显示,文蛤外套膜组织细胞在 37 的条件下可以存活、分裂和生长。与一般贝类细胞培养适温比较,其细胞分裂生长呈现更为快速的特点。在 37 培养温度中培养细胞有小型化趋势并出现了较多的花环状结构,似为快速分裂的小型细胞的聚合体。一般而言,培养细胞的快速分裂生长是建立细胞系的重要条件,对于贝类细胞在较高温度中体外培养的意义有积极探讨的价值。

3.3 细胞凋亡

在本研究中,野生型细胞生长至 30~35 d 以后,出现大量的细胞分泌物及细胞凋亡现象,这与以往贝类培养的报道相一致^[10,13]。凋亡细胞所表现出的萎缩、褐化和停止分裂行为,也与其他种类细胞培养的结果类似^[14]。细胞凋亡的原因与细胞株本身的寿命、培养基的成分及培养的条件等有不同程度的关系。就贝类细胞培养研究目的而言,需要重视可无限分裂细胞株的诱变和筛选、细胞连续培养条件的选择及优化等,为建立贝类细胞系提供基础条件。

参考文献:

- [1] 于焱,管华诗,郭华荣,等. 鱼类细胞培养及其应用[J]. 海洋科学,2003,27(3):4-8.
- [2] 李霞,刘淑范. 皱纹盘鲍的组织培养[J]. 水产学报,1997,21(2):197-198.
- [3] 朗刚华,王勇,刘万顺,等. 栉孔扇贝外套膜组织原代培养的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报,2000,30(1):123-126.
- [4] 崔龙波,李睿坤. 大连湾牡蛎的外套膜组织培养[J]. 海洋通报,2001,20(2):30-34.
- [5] Machii A. In vitro studies of pearl formation [J]. *Applied Cell Biol*,1998,15(1):1-10.
- [6] 孙振兴,张晾,刘雪,等. 菲律宾蛤仔外套膜组织原代培养的初步研究[J]. 海洋科学,2003,28(3):79-81.
- [7] 孙振兴,李清,唐锦秀,等. 中国蛤蜊的组织培养[J]. 齐鲁渔业,2005,22(6):1-2.
- [8] 王爱民,苏琼,阎冰,等. 马氏珠母贝外套膜组织培养[J]. 广西科学,2005,7(2):135-139.
- [9] Machii A, Wada K T. Some marine invertebrates tissue culture [A]. Mitsuhashi J. Invertebrate Cell System Application [C]. Vol . J Mitsuhashi Florida: CRC Press,1989. 225-233.
- [10] 魏育红,薛仁宇,贡成良,等. 褶纹冠蚌外套膜表皮细胞培养研究[J]. 水利渔业,2001,21(6):9-10.
- [11] 朗刚华,王勇,刘万顺,等. 贝类组织培养及其应用研究[J]. 海洋科学,2000,24(4):15-18.
- [12] 孙振兴. 海水贝类养殖 [M]. 北京:中国农业出版社,1995. 47-152.

- [13] 施志仪,李巍,李松荣,等. 三角帆蚌外套膜细胞培养与组织培养的比较[J]. 上海水产大学学报,2001,11(1):27-30.
- [14] 李冬杰,张进献,魏景芳,等. 培养基和培养条件与红豆杉细胞培养中褐化的关系[J]. 植物生理学通讯,2005,41(1):95-98.

Tissue and cell culture of mantle in *Meretrix meretrix*

CHEN Jie^{1,2}, XU Pu³, SHEN Ai-guo⁴, WAN Xi-he⁵, LIU Hai-ou⁴, SHEN Hui², YANG Jia-xin²

(1. Nantong High School, Nantong 226001, China; 2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 3. Department of Biology Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China; 4. School of Basic Medical Science, Nantong University, Nantong 226001, China; 5. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China)

Received :Dec. ,10 ,2006

Key words :*Meretrix meretrix*; mantle; tissue culture; cell culture

Abstract :The mantle tissues and cells of *Meretrix meretrix* were cultured in vitro with improved Medium 199 at some different temperatures and salinities. The new cells grow out from the brink of tissues after 24 hours. 48 hours later, a layer of proliferation cells was formed around the tissues. These cells needed 7 ~ 10 days to bestrew the bottom surface. The cell culture could last 30 ~ 35 days. Otherwise, this study described cultured cells with 3 shapes, and discussed some phenomena in tissue and cell culture at temperature 37 .