

# 日本沼虾雄性生殖细胞原代培养方法

郭忠海 康现江\* 穆淑梅 孙 婧 郭明申

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

**摘要:**细胞培养方法对于研究虾类疾病、内分泌生理是一种有力的工具。本文介绍了日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 雄性生殖细胞原代培养的方法。实验发现精原细胞和精母细胞在体外具有较强的分裂能力。通过测定细胞的贴壁率及观察细胞生长情况,初步确定了该类细胞体外培养的最适 pH 范围为 7.2~7.4,渗透压范围为 400~500 mmol/L。

**关键词:**日本沼虾 雄性生殖细胞 原代培养

中图分类号:Q952.S917 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)01-89-05

## Primary Culture of Male Germ Cells in *Macrobrachium nipponense*

GUO Zhong-Hai KANG Xian-Jiang\* MU Shu-Mei SUN Jing GUO Ming-Shen

(College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract:** Cell culture is a significant tool for studying endocrinology and diseases in shrimp. A primary male germ cell culture method in *Macrobrachium nipponense* is introduced in this paper. We found that spermatogonia and spermatocytes had active division capability. According to the data about cell adherence and cell growth, we determined the optimal pH and osmolarity for *in vitro* culture of these cells. The optimal pH was 7.2 - 7.4 and the proper osmolarity was 400 - 500 mmol/L.

**Key words:** *Macrobrachium nipponense*; Male germ cells; Primary culture

甲壳类动物细胞培养始于 20 世纪 60 年代末 70 年代初,早在 1971 年 Peponnet 等<sup>[1]</sup>就报道了对螯虾、龙虾的血淋巴、心脏、卵巢等组织的体外培养。之后,不少科学家对斑节对虾 (*Penaeus monodon*)<sup>[2,3]</sup>、南美蓝对虾 (*P. stylirostris*)<sup>[4]</sup>等经济价值较大的虾类进行了广泛的体外培养研究。培养的组织有血淋巴、卵巢、肝胰腺、心脏、上皮组织等,报道较多的是血淋巴组织和卵巢。80 年代到 90 年代初,全世界养虾业受到病毒侵害,造成严重损失,因而对虾类病毒的研究、诊断和防治迫切需要虾类细胞系的建立。尽管全世界水产业都投入很大精力,尤其在模仿昆虫细胞系的建立和发展过程中做了许多重要工作,然而,至今没有成功建立起虾类细胞系。Toullec<sup>[5]</sup>总结认为,虾类细胞原代培养中,细胞可以较好地存活,但细胞增殖

率低,传代培养细胞基本不增殖。他指出 3 个可能的原因,即培养基可能不适合,或缺乏特殊生长因子,或细胞已经失去增殖能力。为深入探索虾类细胞在体外培养的分裂增殖规律,我们选用分裂能力较强的精巢为实验对象进行研究,以尽可能地减少第三个可能的原因。日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 是我国分布较广的淡水经济虾类之一,国内已有对其血细胞和肝胰腺的体外培养研究<sup>[6,7]</sup>,但是对其精巢细胞的培养还未见报道。本实验介绍了日本沼虾

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.30371115);

\* 通讯作者, E-mail: xjkang@mail.hbu.edu.cn;

第一作者介绍 郭忠海,男,硕士研究生,研究方向:生殖生物学, E-mail: gzhai304@126.com

收稿日期 2006-06-13,修回日期 2006-11-08

精巢生殖细胞的培养方法,并初步确定了该细胞类群的最适 pH 和渗透压范围,描述了细胞生长的基本情况。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 日本沼虾幼虾(额剑前端至尾扇末端长度 < 25 mm,重量 < 0.30 g),2006 年 4 月上旬购于保定白洋淀,养于实验室水族箱,并饲以豆粉制成的人工饵料,24 h 不间断充气。进行原代培养前,冲洗虾体,无菌水暂养 2 d,并禁食。然后再将其放于含高浓度双抗(1 000 IU/ml 青霉素,1 000 IU/ml 链霉素)<sup>[8]</sup>和 20 μg/L 制霉菌素的无菌水中 24 h。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基配制** 实验选用培养基为 M199 (GIBCO 31100-035),添加 15% 胎牛血清(FBS),添加抗生素(100 IU/ml 青霉素,100 IU/ml 链霉素,20 μg/ml 庆大霉素,2.5 μg/ml 两性霉素 B)。

固定培养基的 pH 为 7.2,添加固体 NaCl 把液体培养基调为 6 个渗透压梯度(mmol/L: 300、400、500、600、700、800),分装过滤灭菌,进行渗透压梯度实验。

固定培养基的渗透压为 400 mmol/L(渗透压实验中最适渗透压条件),用 7.5% NaHCO<sub>3</sub> 和 2% HCl pH 调整液,将培养基 pH 在临用时调成 6 个梯度(6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8),进行 pH 梯度实验。

**1.2.2 原代培养方法** 取 2 只雄性日本沼虾,先在 -20℃ 下冷冻麻醉 10 min,然后用碘酒擦拭虾体表面,70% 酒精浸泡虾体 5~10 min。移入超净工作台,吸干体表酒精,剪开头胸甲,摘取精巢,在培养皿中用 Hank's 液漂洗 5 次,转入含少量培养液的青霉素小瓶。轻轻敲打,使细胞分散开,加入 3 ml 培养液形成悬液,静置 10 min。细胞计数,细胞密度约  $1 \times 10^5$  个/ml。

取中上部细胞悬液分 2 排 12 个孔(两组平行)加入到 48 孔培养板,每孔 100 μl,然后每孔再加入 6 个梯度的培养基 400 μl。CO<sub>2</sub> 培养箱培养,温度 26℃,CO<sub>2</sub> 浓度为 5%。6 h 后换成完全梯度培养基,之后每 3 d 更换 2/3 培养液。

**1.2.3 细胞贴壁率检验** 换液后进行每孔细胞计数,采用视野计数法。250× 下选取每个孔的特定区域,计数该区域 5 个视野下的细胞数。计数完毕后,24 h 后从孔的底部吸取培养液 2/3,然后再次进行原区域计数(方法如上)。统计细胞数量的变化(减少量),计算贴壁率。

$$\text{贴壁率}(\%) = \frac{\text{换液后细胞数}}{\text{换液前细胞总数}} \times 100\%$$

**1.2.4 台盼蓝染色** 吸去培养液,每个孔中加入 450 μl Hank's 液,然后加入 50 μl 0.4% 台盼蓝染液,染色 3 min,观察细胞染色和存活情况。

**1.2.5 数据分析** 实验数据由 SPSS 13.0 软件进行统计分析,用 Student's paired *t*-test 评价组间差异的显著性( $P < 0.05$ ,差异显著; $P < 0.01$ ,差异极显著)。

## 2 结果

### 2.1 最适 pH 和渗透压范围

**2.1.1 不同渗透压条件下的细胞贴壁率** 日本沼虾雄性生殖细胞接种后通常可以在 1 h 内贴壁,接种初期细胞能相对稳固地贴壁。24 h 后换液,一些孔中细胞数量明显减少。当渗透压在 300 mmol/L 时,细胞的贴壁率为 60%~70%;当渗透压升至 400 mmol/L 时,细胞的贴壁率达到 97% 左右,较 300 mmol/L 时的情况,差异极显著( $P < 0.01$ );渗透压 500、600 mmol/L 时,细胞贴壁率有所下降,较 400 mmol/L 的贴壁率有显著差异( $P < 0.05$ );渗透压高于 700 mmol/L,细胞贴壁率急剧下降(表 1)。表 1 中渗透压 700 mmol/L 的细胞贴壁率略低于 800 mmol/L 的,但二者差异不显著( $P > 0.05$ )。

另外,不同渗透压对日本沼虾雄性生殖细胞的影响也反映在细胞的生长情况上。细胞接种 2 周后,除了 400、500 mmol/L 组细胞生长较好外,其余组细胞生长均较差,尤其是渗透压 700 mmol/L 和 800 mmol/L 组,细胞数量减少较多(图版 I:a)。这除了有影响贴壁率的其他原因外,细胞由于高渗发生皱缩和不断死亡也是重要原因之一,台盼蓝染色发现多数细胞被染色。因而对日本沼虾雄性生殖细胞来说,体外

培养最适的渗透压约为 400 ~ 500 mmol/L。

表 1 6 个渗透压梯度下的细胞贴壁率 (Mean ± SD)

Table 1 Cell adherence under different osmolarities

渗透压 (mmol/L)	贴壁率 (%)			
	实验组 1	实验组 2	实验组 3	平均值
300	74.3 ± 4.5	65.4 ± 6.6	60.2 ± 7.8	66.6 ± 7.1
400	98.2 ± 3.3	98.1 ± 4.7	97.5 ± 5.0	97.9 ± 0.4
500	82.5 ± 5.6	87.4 ± 4.2	88.7 ± 5.2	86.2 ± 3.3
600	72.3 ± 3.2	67.7 ± 6.5	70.6 ± 5.4	70.2 ± 2.3
700	32.4 ± 7.4	19.3 ± 8.4	22.0 ± 7.1	24.6 ± 6.9
800	30.1 ± 6.2	28.2 ± 10.2	35.4 ± 8.8	31.2 ± 3.7

每个实验组的样本数  $n = 10$ 。下表同。

**2.1.2 不同 pH 条件下的细胞贴壁率** 日本沼虾雄性生殖细胞适合的 pH 在偏碱性范围, 7.0 ~ 7.6 条件下细胞都可以较好的生存, 这与哺乳动物精子生存的 pH 条件相近。日本沼虾雄性生殖细胞最适 pH 在 7.2 和 7.4, 二者的贴壁率无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 但是较 pH 7.0 和 7.6 均有显著差异 ( $P < 0.05$ ), pH 在 7.8 和 6.8 附近, 贴壁率下降更趋明显 (表 2)。

表 2 6 个 pH 梯度下的细胞贴壁率 (Mean ± SD)

Table 2 Cell adherence at different pH values

pH	贴壁率 (%)			
	实验组 1	实验组 2	实验组 3	平均值
6.8	31.3 ± 6.4	20.2 ± 4.2	28.5 ± 7.6	26.7 ± 5.8
7.0	72.2 ± 8.6	66.3 ± 8.8	51.0 ± 7.3	63.2 ± 10.9
7.2	85.4 ± 6.3	87.6 ± 6.9	91.1 ± 5.5	88.0 ± 2.9
7.4	89.3 ± 5.6	90.1 ± 4.0	90.4 ± 4.2	89.9 ± 0.6
7.6	78.7 ± 7.6	76.6 ± 5.6	70.2 ± 6.7	75.2 ± 4.4
7.8	43.9 ± 9.7	39.8 ± 7.8	33.3 ± 6.8	39.0 ± 5.3

细胞接种 2 周后的生长情况也很好地反映了 pH 对日本沼虾雄性生殖细胞的影响。pH 7.2 和 7.4 组, 细胞长势较好, 基本保持接种时的数量, 而 pH 6.8 和 7.8 组细胞减少较多, 生长稀疏 (图版 I : b)。台盼蓝染色发现, pH 7.2 和 7.4 组多数细胞拒染, 具有较强活力, pH 6.8 和 7.8 组则多数细胞被染色。pH 7.0 和 7.6 组的细胞染色情况介于二者之间。

**2.2 细胞体外培养生长分裂的特征** 4 月日本沼虾生殖腺处于发育期, 幼虾精巢较小但细胞分裂活跃。日本沼虾雄性生殖细胞接种后,

在最适 pH、渗透压条件下可以在 1 h 内贴壁, 贴壁后细胞形态不发生变化, 仍为圆形。所含细胞种类有精原细胞、精母细胞、精细胞和成熟精子。其中处于精子发生过程的精细胞数量较多, 其细胞中央可见暗色点状物质。

体外培养观察发现, 接种 1 ~ 3 d, 250 × 下的视野通常可以发现 1 ~ 2 细胞 (精原细胞和精母细胞) 处于分裂状态, 多数为精原细胞, 直径 7 ~ 9 μm, 圆形 (图版 I : c)。精母细胞数量相对较少, 直径 10 ~ 12 μm, 分裂通常先形成 2 个核后细胞才缢裂 (图版 I : d)。

实验发现, 简单的培养基不能促使精原细胞和精母细胞连续分裂, 多数细胞分裂一次后分裂停滞, 甚至停滞于正在分裂的状态。台盼蓝染色发现, 精原细胞和精母细胞存活时间短, 仅维持 1 周左右, 而不分裂的精细胞和精子则存活时间较长, 可达 40 d 以上。

### 3 讨论

**3.1 pH 和渗透压对细胞贴壁的影响** pH 和渗透压是体外培养首先考虑的重要因子, 二者对细胞生长和存活的影响十分明显。虾类细胞和多数哺乳动物细胞一样在体外具有贴壁性, 贴壁对于细胞而言是进一步生长分裂的基础。细胞对周围环境有主动适应性, 不能较好地贴壁往往反映环境条件的不适合。一般认为, 细胞贴壁黏附是通过细胞外基质分子先黏附到带电底面实现的, 它会受到离子浓度和 pH 的影响。通过接种后 24 h 检测细胞贴壁性来评价 pH 和渗透压, 可以获得较稳定的数据, 在所确定的最适条件下细胞生长较好。接种 24 h 后换液, 不适条件孔中的细胞数量明显减少, 可能是因为细胞需要一段时间才对环境因子作出反应。王军霞<sup>[6]</sup>培养日本沼虾血细胞, 通过观察细胞贴壁情况和生长状态发现其最适渗透压为 472 mmol/L; Frerichs<sup>[9]</sup>在培养罗氏沼虾 (*M. rosenbergii*) 胚胎细胞时, 也认为渗透压在 450 mmol/kg 较适合。这与本实验结果 400 ~ 500 mmol/L 较为接近。在 pH 方面, 有文献报道日本沼虾肝胰腺细胞的最适 pH 为 7.0 ~ 7.2<sup>[7]</sup>, 肌

肉细胞为  $7.6^{[10]}$ , 这些差异可能更多地体现了组织不同的原因。

**3.2 细胞的生长和分裂** 在已有的虾类细胞培养报道中, 用组织块进行原代培养形成的细胞单层往往是由于细胞的迁移而非细胞分裂, 而传代的虾类细胞虽然能够较长时间地保持活性, 但多数不能表现出持续分裂能力且分裂指数非常低。Owens 报道存活最好的组织是上皮组织(培养时间平均 15.6 d, 最长 240 d), 其次为心脏组织(培养时间平均 12.7 d, 最长 307 d)<sup>[11]</sup>。而 West 等在培养斑节对虾血淋巴组织时发现, 细胞在培养初期分裂较快, 平均每周数量加倍一次, 可持续增殖 5~6 周, 至少存活 5 个月<sup>[12]</sup>。Frasher 等在培养斑节对虾卵巢组织时发现, 细胞出现 4 种形态, 即上皮样细胞、成纤维样细胞、圆形细胞和大核的上皮样细胞。其中上皮样细胞不能被传代, 存活时间不超过 2 个月, 而成纤维样细胞可以传代 3 次, 存活 17 个月<sup>[13]</sup>。Lang 等在研究日本对虾 (*P. japonicus*) 淋巴细胞培养时, 跟踪了 12 个处于分裂状态的淋巴细胞, 在培养第 4 d 可观察到分裂的细胞, 平均每 8 个视野 (200×) 有 1~2 个分裂相; 4~8 d, 分裂的细胞增多, 有时一个视野可以观察到 3 个分裂的细胞; 15 d 后分裂的细胞数减少; 40 d 后不再有分裂的细胞<sup>[14]</sup>。对日本沼虾雄性生殖细胞的培养, 发现精细胞和精子也可以存活较长时间, 但具有分裂能力的精原细胞和精母细胞却存活较短, 需要进一步探讨其原因。另外, 从目前的报道来看, M199、L-15 以及昆虫细胞培养基都可以满足多数虾类细胞在体外的存活, 但虾类细胞的分裂能力仍会逐步丧失, 尽管尝试添加胎牛血清、肌肉提取液及血淋巴提取液, 但均难以使其分裂持续。这与哺乳动物细胞培养情况不同, 后者即便是处于  $G_0$  期的细胞, 在体外通常添加一些细胞因子均可启动分裂。虾类的这一“反常现象”, 应当不能否定细胞分裂需要特定细胞因子这一普遍规律, 那么这些细胞因子的活性问题就是最值得关注的, 如血淋巴提取液或肌肉提取液中

的细胞因子是否具有很好的活性, 以及虾类在体外条件下的生长代谢是否影响细胞因子的活性等, 有待于进一步研究。

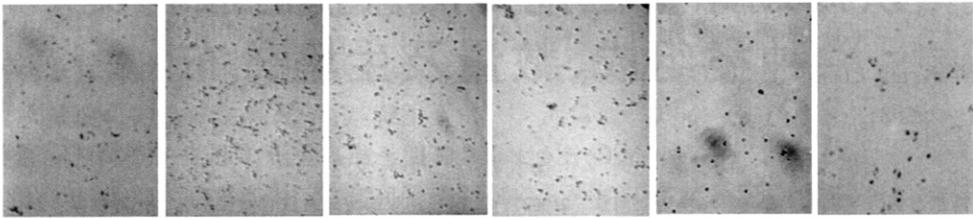
## 参 考 文 献

- [ 1 ] Peponnet F, Quiot J M. Cell cultures of Crustacean, Arachnida and Merostomacea. New York and London: Academic Press, 1971, 341~359.
- [ 2 ] Chen S N, Chi S C, Kou G H, et al. Cell culture from tissues of grass prawn, *Penaeus monodon*. *Fish Pathol*, 1986, 21: 161~166.
- [ 3 ] Chen S N, Kou G H. Infection of cultured cells from the lymphoid organ of *Penaeus monodon* Fabricius by monodonte baculovirus (MBV). *J Fish Dis*, 1989, 12: 73~76.
- [ 4 ] Luedeman R A, Lightner D V. Development of an *in vitro* primary cell culture system from the penaeid shrimp, *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 1992, 101: 205~211.
- [ 5 ] Toullec J Y. Crustacean primary cell culture: a technical approach. *Meth Cell Sci*, 1999, 21: 193~198.
- [ 6 ] 王军霞, 王维娜, 王安利等.  $Ca^{2+}$  对体外培养的日本沼虾血细胞的影响. *动物学杂志*, 2003, 38(3): 22~25.
- [ 7 ] 王宏伟, 刘瑞兰, 郭明申等. 亚油酸对培养日本沼虾肝胰腺细胞的影响. *河北大学学报(自然科学版)*, 2005, 25(1): 79~83.
- [ 8 ] 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. *海洋科学*, 2003, 27(3): 61~63.
- [ 9 ] Frerichs G N. *In vitro* culture of embryonic cells from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 1996, 143: 227~232.
- [ 10 ] Wang W N, Liang H, Wang A L, et al. Effect of pH and  $Zn^{2+}$  on subcultured muscle cells from *Macrobrachium nipponense*. *Meth Cell Sci*, 2000, 22: 277~284.
- [ 11 ] Owens L, Smith J. Early attempts at production of prawn cell lines. *Meth Cell Sci*, 1999, 21: 207~212.
- [ 12 ] West L, Mahony T, McCarthy F, et al. Primary cell cultures isolated from *Penaeus monodon* prawns. *Meth Cell Sci*, 1999, 21: 219~223.
- [ 13 ] Frasher C A, Hall M R. Studies on primary cell cultures derived from ovarian tissue of *Penaeus monodon*. *Meth Cell Sci*, 1999, 21: 213~218.
- [ 14 ] Lang G H, Nomura N, Wang B Z, et al. Penaeid (*Penaeus japonicus*) lymphoid cells replicate by cell division *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002, 38: 142~145.

郭忠海等:日本沼虾雄性生殖细胞原代培养方法

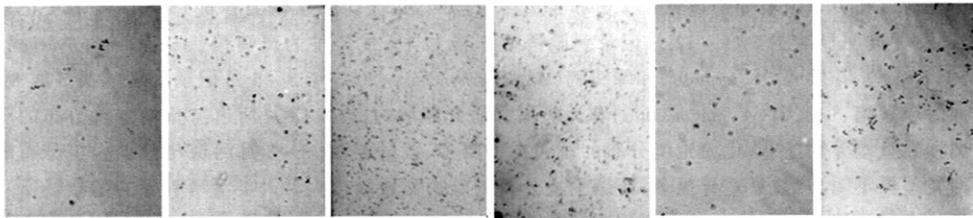
图版 I

GUO Zhong-Hai *et al.*: Primary culture of male germ cells in *Macrobrachium nipponense* Plate I



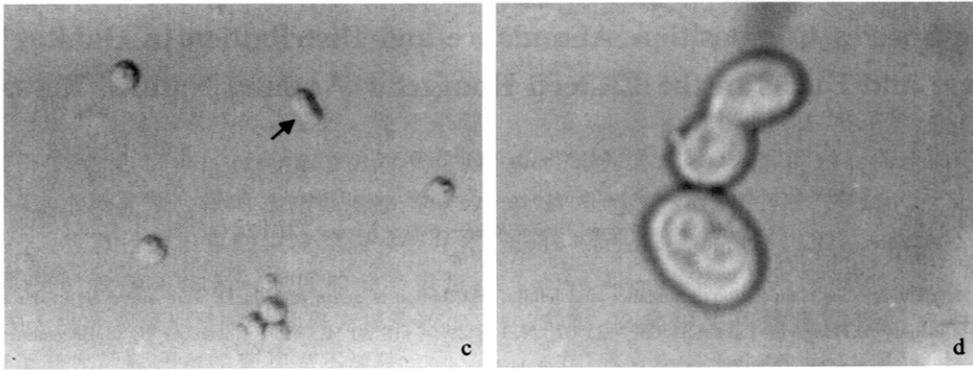
300 400 500 600 700 800

a. 渗透压 (mmol/L)



6.8 7.0 7.2 7.4 7.8 7.6

b. pH



c

d

a. 接种 2 周后 6 个渗透压梯度下的细胞生长 × 100; b. 接种 2 周后 6 个 pH 梯度下的细胞生长 × 100; c. 精原细胞分裂 (箭头) × 550; d. 精母细胞的分裂 × 890。

a. Cell growth under different osmolarities 2 weeks after being seeded × 100; b. Cell growth at different pH values 2 weeks after being seeded × 100; c. Spermatogonium division (arrow) × 550; d. Spermatocyte division × 890.