

蜘蛛神经节的解剖与神经细胞的分离培养

胡朝墩 颜亨梅*

(湖南师范大学生命科学学院 长沙 410081)

摘要:报道了虎纹捕鸟蛛 (*Ornithoctonus huwena*) 食道下神经节的解剖以及神经细胞的分离培养方法。为开展蜘蛛神经生物学实验方法的研究,创立了一种蜘蛛神经细胞解剖方法——去胸甲解剖法。神经节细胞培养基为: NaCl 223 mmol/L; KCl 6.8 mmol/L; CaCl₂ 8 mmol/L; MgCl₂ 5.1 mmol/L; Sucrose 5 mmol/L; Hepes 10 mmol/L; 谷氨酰胺 1 mmol/L; 青霉素 200 IU/ml; 链霉素 200 μg/ml; 小牛血清 20% pH 7.4。在温度(27±2)°C的培养箱中培养2~4 h。实验结果表明:与传统方法相比较,去胸甲解剖法具有取材简便、准确、快捷和高效的特点。改进的培养基非常适合蜘蛛离体神经细胞的培养。培养的细胞状态好、数量多,细胞体呈椭圆形,细胞形状近似汤勺,有一个长的单极突起,其大小为10~30 μm。

关键词:虎纹捕鸟蛛,食道下神经节,去胸甲解剖法,细胞培养

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)02-63-05

Anatomy of Spider Ganglion and Culture of the Spider Neurons

HU Zhao-Tun YAN Heng-Mei*

(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: The anatomy, dissociation and culture of neurons isolated from the subesophageal ganglion (SUB) of the spider *Ornithoctonus huwena*, are described. A new method, the anatomical method of removing the Sternum, to anatomize the spider ganglion was created. The culture media used for this study contained: NaCl 223 mmol/L; KCl 6.8 mmol/L; CaCl₂ 8 mmol/L; MgCl₂ 5.1 mmol/L; Sucrose 5 mmol/L; Hepes 10 mmol/L; Glutamine 1 mmol/L; Penicillin 200 IU/ml; Streptomycin 200 μg/ml; Bovin Calf Serum 20%; pH 7.4. The culture temperature was at 27±2°C and it took about 2-4 h for the process. The experimental results demonstrate that: the culture media is fit for the dissociated spider nerve cells. Most cells are in good condition, and above 70% cells survive in the cell culture dishes. The soma of the nerve cell shaped like an ellipse and the neural cell body which has a single axon shaped like a spoon. The size of those cells varies from 10 to 30 μm.

Key words: *Ornithoctonus huwena*; The subesophageal ganglion; The anatomical method of removing the sternum; Cell culture

蜘蛛不仅是农、林害虫的重要捕食性天敌,而且是我国传统的重要中药材,其蛛体和蛛毒均可入药。蜘蛛毒液可作为医治肿瘤、心血管疾病的新药源,许多国家的生物学界、医学界对蛛毒的研究方兴未艾,尤其蛛丝蛋白还可以作为国防工业的重要原料,有重要应用前景。

虎纹捕鸟蛛 (*Ornithoctonus huwena*) 是一种大型有毒的穴居蜘蛛,成体平均体重雌性为

32.17 g, 雄性为 11.31 g。湖南师范大学生物化

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 39570119, 30370208);

* 通讯作者 E-mail: yanhm03@126.com;

第一作者介绍 胡朝墩,男,硕士研究生,主要从事蜘蛛生态学、生理学以及蜘蛛毒素的研究 E-mail: huzhaotun@yahoo.com.cn。

收稿日期 2006-10-12, 修回日期 2007-01-13

学实验室从 20 世纪 90 年代初开始对虎纹捕鸟蛛毒素进行深入的研究,发现了数十种有生物活性的成分^[1-5]并对虎纹捕鸟蛛的生物生态学特征进行了系统的研究^[6]。但是到目前为止,国内外对于虎纹捕鸟蛛的神经解剖、神经细胞的培养及其细胞生物学的研究却未见报道。虎纹捕鸟蛛个体大,是研究蜘蛛神经生物学的一种最佳实验动物,因此很有必要对虎纹捕鸟蛛神经节解剖和神经细胞分离培养方法进行研究。本文旨在以虎纹捕鸟蛛为材料,探索蜘蛛神经组织的解剖、分离与神经细胞离体培养新方法,为开展蜘蛛的神经生物学研究提供相关形态学和细胞学信息。

1 材料与方法

1.1 供试蜘蛛 虎纹捕鸟蛛采自广西宁明县桐棉乡的山地和农区,置于肥皂盒内活体带回湖南并在实验室饲养一段时间备用。

1.2 蜘蛛神经细胞用液 培养基:NaCl 223 mmol/L, KCl 6.8 mmol/L, CaCl₂ 8 mmol/L, Sucrose 5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 谷氨酰胺 1 mmol/L, 青霉素 200 IU/ml, 链霉素 200 μg/ml, MgCl₂ 5.1 mmol/L, 小牛血清 20% pH 7.4。

生理液:NaCl 223 mmol/L, KCl 6.8 mmol/L, CaCl₂ 8 mmol/L, MgCl₂ 5.1 mmol/L, Sucrose 5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, pH 7.4。

酶解液:NaCl 223 mmol/L, KCl 6.8 mmol/L, CaCl₂ 8 mmol/L, MgCl₂ 5.1 mmol/L, Sucrose 5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 青霉素 200 IU/ml, 链霉素 200 μg/ml, 胰蛋白酶 0.3%, 胶原酶 0.15% pH 7.4。

以上配方据文献^[7]改进,将培养液和生理液配好后在无菌条件下过滤除菌并分装于 5 ml EP 管内保存备用,酶解液配好后在无菌条件下过滤除菌并分装于 0.5 ml EP 管内保存备用。

1.3 神经组织解剖方法 采用传统的去背甲解剖法和新创的去胸甲解剖法比较蜘蛛食道下神经节离体解剖的效果。

1.3.1 去背甲解剖法 按照传统的解剖方法从蜘蛛的背甲开始解剖,依次剥离背甲、肌肉、

消化道盲管和胃,然后分离得到神经组织,再经分离培养得到神经细胞。

1.3.2 去胸甲解剖法 作者新创的一种解剖方法,从蜘蛛胸甲开始解剖,依次剥离胸甲和血窦膜,然后分离得到神经组织,再经分离培养得到神经细胞。

1.4 神经细胞分离方法 采用酶解法和非酶解法比较蜘蛛神经细胞分离的效果。

1.4.1 酶解法 将蜘蛛食道下神经节分离冲洗干净后放入酶解液中,在 37℃ 恒温水浴内酶解 5~8 min。酶解完成后将神经组织从酶解液中转移到培养皿中。

1.4.2 非酶解法 将蜘蛛食道下神经节分离冲洗干净后直接放入培养皿中,中间不经过酶解步骤。

1.5 实验条件设置

1.5.1 温度 温度设置 5 个梯度:23℃、25℃、27℃、29℃、31℃。

1.5.2 培养基 血清浓度设置 3 个梯度:10%、15% 和 20%;pH 设置 9 个梯度:6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0。

1.5.3 生理液 pH 设置 9 个梯度:6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8、8.0。

实验时,只改变其中一个因子,其他因子固定不变。通过一系列的比较实验,最后确定规范化的蜘蛛神经细胞培养条件。

2 结果与分析

2.1 神经组织解剖 经过大量的新鲜标本和酒精浸泡标本解剖实验的比较,作者创立了一种新的蜘蛛食道下神经节细胞解剖方法——去胸甲解剖法。具体步骤如下:

(1) 将蜘蛛全身用酒精消毒,然后用长镊子夹住其头胸部,用眼科小剪刀将螯肢剪下,使蜘蛛背部朝下并用解剖针固定在解剖盘中(图 1:a)。

(2) 用解剖针沿蜘蛛四对步足基节之间的胸甲四周刺破胸甲,然后用弯头镊子夹住胸甲,用维纳斯剪刀将胸甲四周小心剪开,先剪断其上的肌肉,然后轻轻地剥离胸甲(图 1:b)。

(3)用镊子将血窦膜扒开,便可看到星状的食道下神经节,然后将食道下神经节通向各步足和触肢的分支神经剪断,将分离的食道下神经节取出,置入一预先加入1.5~2.0 ml生理液的培养皿中,并用生理液将神经节冲洗干净(图1:c)。



图1 虎纹捕鸟蛛食道下神经节去胸甲解剖法示意

Fig. 1 An anatomical method of removing the sternum of *Ornithoctonus huwena*

2.2 神经细胞分离 经酶解的神经节在倒置显微镜下观察,发现细胞数目很少,而且有些细胞已经破裂,但是在酶解液中发现很多悬浮的神经细胞。非酶解的神经节剪细后在倒置显微镜下看到很多形态完整的神经细胞。结果表明非酶解法是一种理想的蜘蛛神经细胞培养方法。它不仅避免了细胞的丢失,而且也避免了酶对细胞的损伤作用。由非酶解法培养的细胞具有数量多、形态清晰、结构完整和操作方法简便高效等优点。因此,对于蜘蛛的神经细胞分离来说,非酶解法优于酶解法。

2.3 神经细胞培养 将吹打分散后的细胞置入温度为 $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的培养箱中培养2~4 h。倒置显微镜下观察,培养后的细胞胞体明亮、大

(4)将神经纤维网从结缔组织和肌肉组织中分离出来并将其置入一预先铺有多聚赖氨酸和培养基的培养皿中,再用解剖针撕开神经纤维网,用口径为 $100\ \mu\text{m}$ 的玻璃吸管轻轻吹打组织,以离散细胞。

多数成椭圆形。整个细胞形似汤勺,有一个长的单极突起。大多数细胞大小 $10\sim 30\ \mu\text{m}$ (图2)。

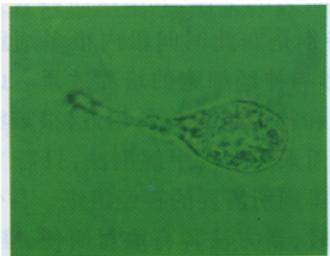


图2 虎纹捕鸟蛛食道下神经节细胞($\times 600$)

Fig. 2 A neuron isolated from SUB of *Ornithoctonus huwena*

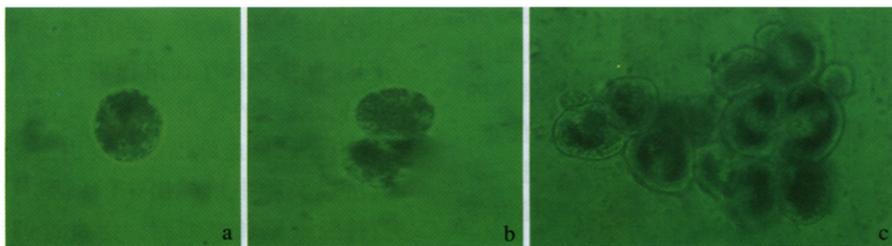


图3 虎纹捕鸟蛛血细胞($\times 200$)

Fig. 3 Haemocytetes isolated from *Ornithoctonus huwena*

a. 单个细胞(With single cell); b. 2个细胞(Two cells); c. 多个细胞(Multiple cells)。

2.4 血细胞培养 由于蜘蛛的食道下神经节直接浸润于血淋巴中,虽然神经节在解剖时已经反复冲洗,但在培养的细胞中除了神经细胞外还有少量血细胞。大多数血细胞为圆形,其体积较神经细胞大。血细胞形态多样,有以单个细胞存在(图 3:a),有以 2 个细胞(图 3:b)或多个细胞聚合体(图 3:c)的形式存在。当以聚合体的形式存在时,细胞变为椭圆形。

3 讨论和小结

3.1 解剖方法的比较 从实验材料来看,通过解剖获得形态完整、功能完善的神经细胞是进行神经生物学研究的前提。传统的解剖方法是从蜘蛛的背甲往下解剖。由于蜘蛛腹神经索在蜘蛛的腹面,其食道下神经节位置靠近胸甲的上部^[8,9]。如果按传统的方法解剖,在取得神经组织前必须先剥离蜘蛛的背甲、肌肉、胃、消化道盲管和血窦膜等诸多组织器官。如此解剖是一件费时费力的工作,其中组织器官分离需要 2~3 h,特别是在此时间段内很多细胞已经死亡,必然影响神经细胞的培养效果。此外蜘蛛肌肉组织和神经组织颜色相近,很难将两者区分清楚。而采用去胸甲解剖法,只需 15 min 就可以分离得到所需要的神经组织。与传统解剖方法相比较,新方法具有取材简便、准确、快捷和高效的特点。

3.2 非酶解细胞的培养 动物细胞培养一般是将组织先酶解分离后培养。但是在实验中,发现神经组织酶解后很多细胞丢失在酶解液里,所以尝试采用非酶解细胞培养方法。结果表明,该方法是一种理想的蜘蛛神经细胞培养方法。它不仅仅避免了细胞的丢失,而且也避免了酶对细胞的损伤作用。由非酶解法培养的细胞具有数量多、形态清晰、结构完整等优点,且培养方法简便高效。本方法可为今后进一步开展蜘蛛等节肢动物的神经生物学研究提供条件。

3.3 神经细胞的确定 蜘蛛属于节肢动物门蛛形纲。而节肢动物体腔在胚胎发育时期来自中胚层断裂解体后的体腔囊(真体腔),并与组织

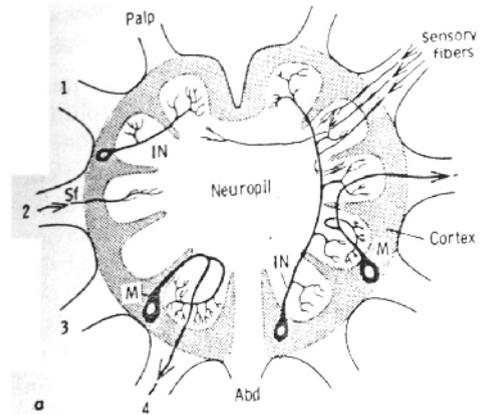


图 4 塔兰图拉蜘蛛(*Poecilotheria*) 食道下神经节(引自文献[8])

Fig. 4 Subesophageal ganglion of a Tarantula (*Poecilotheria*)

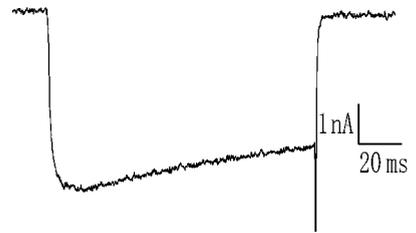


图 5 虎纹捕鸟蛛食道下神经节细胞钙离子通道电流

Fig. 5 A calcium channel current of a neuron isolated from SUB of *Ornithoctonus huwena*

间隙残存的囊胚腔(原生体腔)相互勾通,使最终形成的体腔具有双重来源,故称其为混合体腔。这种体腔的形态特点是组织间隙中充满血液(称血窦)。其体内没有宽阔的体腔,也没有呈网络的动脉、静脉、毛细血管和淋巴管,各组织间隙直接充满了血淋巴以获得营养物质。由此可见,蜘蛛的食道下神经节直接浸润于血淋巴液中。蜘蛛血淋巴液主要由血浆和血细胞组成,所以实验中培养出来的细胞只能是二类细胞,神经细胞和血细胞。但是这两种细胞无论从形态上还是功能上都易于区分。①形态区别:神经细胞胞体明亮,大多数呈椭圆形,且有细胞突起,而血细胞大多数为圆形,体积较神经

细胞大,无细胞突起。本实验培养的蜘蛛神经细胞形态与国外文献^[8]报道的一致(图4)。图4中M即为塔兰图拉蜘蛛(*Poecilotheria*)食道下神经节运动神经元,此神经元形状与本实验培养的神经元形状非常相似,只是本实验所培养的神经细胞时间较短,单极突起的末梢尚未分支。②功能区别:血细胞是一种非兴奋性细胞,而神经细胞具有兴奋性。本实验所培养的细胞在膜片钳实验中能够清晰地记录到离子通道电流(图5)。由此可见本实验所培养的细胞肯定是虎纹捕鸟蛛食道下神经节细胞。

致谢 感谢尹长民教授在蜘蛛解剖方面和王美迟老师在细胞培养方面的细心指导!

参 考 文 献

- [1] Liang S. An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)]. *Toxicon*, 2004, **43**(5):575 ~ 585.
- [2] 黄仁槐,刘中华,梁宋平. 虎纹捕鸟蛛毒素-III及其天然突变体的纯化和鉴定. 生物化学与生物物理学报, 2003, **35**(11):976 ~ 980.
- [3] Zhang P F, Chen P, Hu W J, et al. Huwentoxin-V, a novel insecticidal peptide toxin from the spider *Selenocosmia huwena*, and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino residues related to the biological activity. *Toxicon*, 2003, **42**(1):15 ~ 20.
- [4] Peng K, Shu Q, Liu Z, et al. Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J Biol Chem*, 2002, **277**(49):47 564 ~ 47 571.
- [5] Shu Q, Liang S P. Purification and characterization of huwentoxin- II. A neurotoxic peptide from venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. *J Pept Res*, 1999, **53**(5):486 ~ 491.
- [6] 颜亨梅,王洪全,卢岚等. 中国虎纹捕鸟蛛的生态学. 动物学报, 2000, **46**(1):44 ~ 51.
- [7] Juusola M, French A S. Adaptation properties of two types of sensory neurons in a spider mechanoreceptor organ. *J Neurophysiol*, 1998, **80**(5) 2 781 ~ 2 784.
- [8] Rainer F Foelik. *Biology of Spiders*(Second Edition). Oxford: Oxford University Press, 1996, 96 ~ 109.
- [9] John Hemy Comstok. *The Spider Book*. New York: Comstok Publishing Company, 1948, 160 ~ 169.