

RPMI 1640 培养基对水螅体表渗透营养的初步观察

黄蓓^① 赵汉民^② 李振刚^{①*}

(^①中国科技大学生命科学学院 合肥 230026; ^②安徽大学生命科学学院 合肥 230039)

摘要:首次选用 RPMI 1640 培养基培养具较大相对面积的小水生生物水螅,以便探讨有关水生动物渗透营养等问题。通过稀释一定倍数的 RPMI 1640 加无机盐补液及新生牛血清等方法培养出体长及生存时间均优于对照组的水螅。通过渗透营养方式培养水螅具有操作简单、易观察,能为细胞培养做准备试验,为培养无菌动物创造条件等优点。

关键词:拟寡水螅; RPMI1640; 渗透营养

中图分类号:Q172 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)06-40-03

Preliminary Observations on Osmotic Nutrition of *Hydra pesudaligactis*

HUANG Bei^① · ZHAO Han-Min^② Li Zhen-Gang^①

(^①College of Life Science, University of Science and Technology of China Hefei 230026;

^②College of Life Science, Anhui University Hefei 230039, China)

Key words: *Hydra pesudaligactis*; RPMI 1640; Osmotic nutrition

水生动物渗透营养观点是 1907 年由 Pulter 最早提出来的,他认为水生动物生活于很浓的有机溶液中可以通过渗透方法从体表、鳃等吸收有机物。其它学者也进行了大量的研究工作,如 Ролция 等^[1]用 ³²P 跟踪一种丰年虫 (*Streptocephalus torvicornis*) 的营养情况后发现, ³²P 都是通过消化道被吸收的,并且通过食物吸收要比通过渗透营养快得多。海绵几乎是不加选择地吃浮游生物,细菌(约占食物总量的 1/5)和有机碎屑(约占总量的 4/5)或溶于水的其它营养物质^[2]。近年来用示踪原子所做的实验还发现,鱼类确实可通过体表和鳃的渗透作用来吸收养分,除了无机盐类以外,还能吸收有机质,其中包括半胱氨酸、蛋氨酸之类高分子有机化合物。何志辉等人^[1]认为,除了有很大相对面积的微型生物(如细菌、原生动物、某些藻类等)以外,单靠溶解有机质是难以满足营养需要的。鉴于以上论点,水螅属于那种有很大相对面积的小型生物,有可能靠渗透营养来满足生存需要^[3]。而通过渗透营养方式培养水螅具有操作简单、易观察,能为细胞培养做准备试验,为培养无菌动物创造条件等优点。因此,本文作者在

如何利用现有的商品培养基方面进行了初步尝试。

1 材料与方法

1.1 水螅的来源及饲养 拟寡水螅 (*Hydra pesudaligactis*) 系 1982 年春从合肥市郊采集并经室内长期无性繁殖培养所得,实验前食物为采自菜园沟渠中的多刺裸腹蚤 (*Moina macrocopa*) 或卤虫 (*Artemia nauplii*)。实验前用水螅平衡液冲洗、培养,并选用体壮、无芽体,体长基本相等的水螅作为实验材料。

1.2 试剂的配制

1.2.1 平衡液配方 1 000 ml 的蒸馏水中加入 11 mg Tris, 147 mg CaCl₂·2H₂O, 58.5 mg NaCl, 7.6 mg KCl, 20 mg MgCl₂·2H₂O, 7.25 mg Na₂EDTA。

1.2.2 RPMI 1640 培养基 GIBCO(R) Laboratories. Life

第一作者介绍 黄蓓,女,37岁,副教授,博士研究生;研究方向:发育生物学;

* 联系作者;

收稿日期:2000-05-26,修回日期:2001-03-20

Technologies, INC, Grand Island, New York 14072. U.S.A.

1.2.3 新生牛血清 杭州四季青生物工程材料研究所生产。

1.2.4 无机盐补液(10×) 1 000 ml 的蒸馏水中加入以下试剂:240 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 111 mg $CaCl_2$, 880 mg 葡萄糖, 10 mg $NaHCO_3$ 。

1.3 方法 RPMI 1640 是由 Moore 等针对淋巴细胞培养而设计的一种人工合成培养基, 主要适用于正常人和白血病白细胞、仓鼠肿瘤细胞的培养^[4]。随后发现此种培养基对其它种类的细胞也有较好的培养效果, 包括哺乳类、鸟类, 甚至昆虫纲的蚊子。因此, 作者选择此合成培养基作为对水螅尝试的对象。但直接使用该培养基时会使水螅很快解体。寻找原因后发现, $NaCl$ (6 000 mg/L) 等几种离子浓度与平衡液、重聚液的离子浓度 (58.5 mg/L) 相差太大, 致使培养液的渗透压太高。因此, 作者做了以下几步调整试验。

1.3.1 RPMI 1640 浓度稀释液实验 RPMI 1640 按出售说明配好的原液用无菌水分别稀释 2、4、6、8、10 倍, 并加入 50 $\mu g/ml$ 的硫酸卡那霉素、利福平, 每种浓度放入 10 条水螅 24 h 内进行观察。结果是在 2~8 稀释倍数中不同程度地出现了水螅解体、触手缩短、基盘丧失吸附力等情况, 只有 10 倍稀释液中的水螅无上述现象。为平衡由于稀释倍数过大而减少的其它主要离子浓度, 作者通过计算加进了 10% 自行配制的补液, 然后在 25 ml 的培养瓶内加 10 ml 上述培养液, 放 20 条水螅, 共 5 瓶为实验组, 1 瓶放 10 ml 平衡液为对照组, 在 20℃ 左右进行为期一个月的观察。观察期间, 每隔 2 d 换一次平衡液冲洗, 每次换液后进行体长度量。

1.3.2 RPMI 1640 稀释液加新生牛血清实验 由于 RPMI 1640 原液的稀释降低了氨基酸等营养成分的浓度, 作者尝试加一定量的新生牛血清以弥补这方面的损失。实验用的血清与含无机盐补液的 RPMI 1640 稀释液浓度百分比有 5%、10%、15%、20%, 同时加入 50 $\mu g/ml$ 硫酸卡那霉素、利福平, 每种浓度放 10 条水螅, 在 24 h 内 20℃ 左右进行观察。考虑到既要维持水螅正常状态又要保持较高营养成分, 决定选用 15% 为较合适的比例。之后, 在 25 ml 的培养瓶内加 10 ml 上述培养液, 放 20 条水螅, 共 5 瓶作为实验组, 1 瓶加平衡液为对照组, 在室内常温下进行培养、观察。观察期间每隔 2 d 换平衡液冲洗数小时后继续培养, 并记录下水螅舒展状态下的体长。

2 结果与分析

在 55 d 一轮的实验中, 把实验组与对照组在体长、

触手、生殖及体长与培养时间的关系等方面进行了比较, 具体分析如下。

2.1 实验组与对照组在形态观察与生殖方面的比较

从体长方面来看, 无论是在 RPMI 1640 稀释液还是在加血清后的培养液中, 水螅常处于一种舒展状态, 其最大伸展长度可达 2 cm, 宽 0.08 cm; 对照组中最大伸展长度也没超过 1 cm, 宽 0.08 cm。从触手与体长之比来看, 实验组为 1:3.2, 对照组为 1:1, 且实验组水螅触手端部膨大成小球状, 与对照组尖细的端部形成鲜明的对比 (图 1)。从水螅对培养液适应过程方面来看, 水螅从平衡液转到培养液中有一定数量的个体在实验过程中被淘汰, 30 d 后生存状况较好者占实验组总数的 65% 左右。50 d 后只剩 50% 左右, 而对照组除体长缩短外数量几乎没变。另外, 在生殖方面作者在 RPMI 1640 加血清实验组共 100 条水螅中还观察到了 5 个个体有出芽、产卵现象, 约占总个体数的 5%。

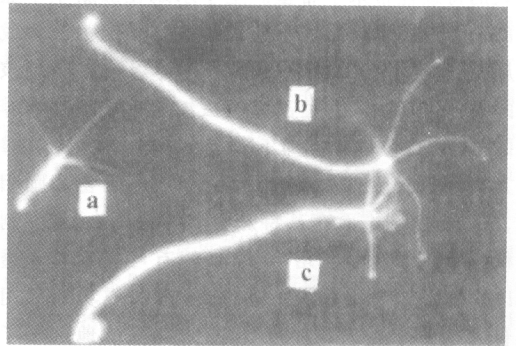


图 1 对照组(a)与 RPMI 1640 加血清实验组水螅(b,c)大小比较 (共培养 20 d, 放大倍数为 2.3)

2.2 实验组与对照组体长与培养时间的关系比较 如图 2 所示, RPMI 1640 稀释液加血清实验组水螅存活了 55 d, RPMI 1640 稀释液实验组水螅存活了 35 d 左右, 而对照组个体在 30 d 时身体已缩小到只剩下细长的触手。图中每个数据均在室内常温下测得, 可能会受温度、光线、pH 等因素的影响。

以上结果表明, 无论是从体长还是生存时间来看, 实验组水螅均优于对照组 ($P < 0.01$)。从图 1 中还可明显地看出水螅体为适应渗透营养的生存方式而起的的变化。舒展而修长的体型是为了增加渗透吸收的表面积, 较短且端部膨大成球状的触手、缺乏粘性的基盘说明其功能的退化, 这是因为实验组个体无需用触手来捕捉食物、用吸盘来固定身体。与其相反的是对照组水螅尽管其体长一直在缩短, 而触手长度及基盘吸附力始终没发生明显的变化。另外, 尽管在实验组仅观

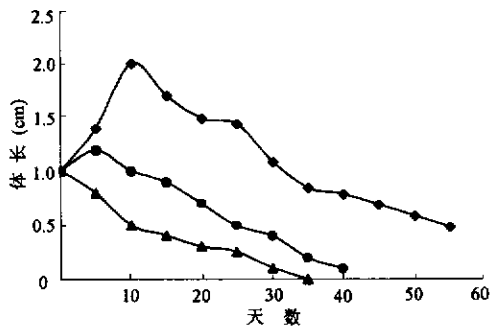


图2 实验组与对照组培养的水螅体长与时间关系 (—▲—:对照组;—●—:实验组 1:RPMI 1640 稀释液组;—■—:实验组 2:RPMI 1640 稀释液加小牛血清组。其中实验组的每一个数据为 5 个平行组共 100 条水螅的平均体长, 对照组为 20 条水螅的平均体长)

察到只有 5% 的水螅具生殖现象,但毕竟为此种培养方式的持续性带来了希望。至于水螅在加新生牛血清后的培养液中仍缓慢缩小的原因主要是因为营养成分不足所致,以致于最终因体弱而解体。最后还应该指出的是,对哺乳类、鸟类甚至昆虫细胞均有较好培养效果的 RPMI 1640 培养基却不太适合水螅,尤其是在渗透压方面,这至少说明水螅细胞与较高等动物细胞相比较,在细胞生理方面有其特殊性。作者认为,如配制出一种更为适合水螅的培养基,水螅有可能只靠渗透营养以维持其生存。综上所述,作者首次成功地只用人工合成培养基维持了水螅的生存,并系统地观察了培

养基中水螅体为适应新环境所起的变化;证明了渗透营养对于具有较大相对面积的小型水生生物水螅来说确实是一种重要的营养方式。

同时,还发现通过渗透营养方式培养水螅具有以下几方面的意义:其一,无需非常严格的无菌操作条件,在培养过程中如出现污染等情况可及时把水螅取出放入平衡液中冲洗,并且通过此途径可培养无菌水螅;其二,可通过观察身体的收缩状况、触手的长短,基盘的吸附性等情况了解培养基的效果,为细胞培养做准备。因为水螅为真核细胞的低等动物,具有很强的再生能力,如果能培养出离体的体细胞作为工程细胞来取代目前常用的细菌等原核生物,将会为生物工程开辟一条新途径。最后,此方法还可探索如何解决由于卤虫供应紧张而给水螅饲养所带来的问题。

参 考 文 献

- [1] 何志辉等. 淡水生物学(淡水生态部分). 北京:农业出版社,1983.72.
- [2] 邹世英. 多孔动物的生物学. 生物学通报, 1995(2):8~9.
- [3] Bursztajn, S., L.E. Davis. The role of the nervous system in regeneration, growth and cell differentiation in Hydra. I. Distribution of nerve elements during hypostomal regeneration. *Cell. Tiss. Res.*, 1974 (150): 213~230.
- [4] 鄂征等. 组织培养技术. 北京:人民卫生出版社, 1985. 219.