

文章编号: 0529-6579 (2000) S-0119-04

斑节对虾肝胰腺和血淋巴 组织细胞的体外培养^{*}

高 玮, 黄灿华, 兰萍章, 张立人

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

摘 要: 用斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的肝胰腺组织及血淋巴细胞进行了体外培养, 结果表明: 肝胰腺细胞培养共传 3 代, 促肝细胞生长因子效果不明显. 血淋巴细胞原代培养很成功, 血淋巴细胞 90% 多为贴壁生长, 其中圆形悬浮生长细胞可见分裂相, 少数瓶细胞传代 6 次, 生长时间达半年之久, 加入 PHA 后, 对细胞没有明显刺激作用.

关键词: 斑节对虾 (*Penaeus monodon*); 肝胰腺; 血淋巴; 体外细胞培养

中图分类号: S813.1 **文献标识码:** A

组织细胞培养技术在病毒学的发展中, 有其重要的地位, 它为病毒体外增殖和对病毒的鉴定作出重要的贡献. 然而对虾的细胞系至今尚未建成, 所有的对虾细胞培养工作均属原代培养和继代培养^[1~4]. 1995 年 Hsu 等^[5]曾报道在斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 类淋巴器官组织的细胞培养基中, 加入 20 ng/mL 的碱性成纤维生长因子, 使其细胞继代培养超过 80 代, 有可能成为世界上第 1 个对虾细胞系. 但是, 近几年来尚未见到进一步利用该细胞接种对虾病毒感染试验的报告. 本文应用斑节对虾的肝胰腺组织及血淋巴细胞进行了体外培养研究.

1 实验材料

(1) 斑节对虾: 市售斑节对虾于海水水晶配置的 2.55‰ 人工海水中, 充气暂养数日后用作实验.

(2) 培养液: 199 基础培养液, 添加 2 g/L 葡萄糖, $\rho=0.4\%$ 的水解乳蛋白, 5 g/L NaCl, 适量 HEPES; L15 培养液, 加 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 g/L, NaCl 7.6 g/L, KCl 0.16 g/L, 葡萄糖 0.3 g/L; L15 基础培养液, 加 5 g/L NaCl.

以上各种培养液临用前加入 0.3 g/L 谷氨酰胺和 100 U/mL 青链霉素.

(3) 其它培养用液: $\rho=25\%$ 胰蛋白酶, 用 Hanks 液配制; 胶原蛋白酶消化液 (4 000 U), 胶原蛋白酶由 GIBCO 公司提供; 对虾平衡盐溶液; 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 肝素钠; 饱和苯基硫;

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670030)

收稿日期: 1999-09-15

PHA 由上海生化所提供;肝细胞生长因子,分别配制成 1, 2, 3 和 $10 \mu\text{g/mL}$;胎牛血清(Sigma 公司)。

2 实验方法

将斑节对虾用 $\varphi=70\%$ 乙醇体表消毒 2 min,再用虾平衡盐溶液洗涤 2 次,用无菌滤纸吸干体表水分。

(1) 肝胰腺组织培养:①取健康的(淡黄色)肝胰腺组织在培养瓶上作组织块培养;②机械吹打组织块,使成游离细胞团;③用胰酶、EDTA 或胶原蛋白酶消化,将①、②2 种细胞经 4 层纱布过滤后,500 r/min 离心 1 min,去大组织块,上清液 500 r/min 离心 2 min,沉淀用无血清培养液 500 r/min 离心 2 min,洗涤 2 次,沉淀为较小的细胞团块及游离细胞,加入含 10%胎牛血清的完全培养液,另一组分别加入促细胞生长因子的培养液,26~28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,同时观察其促生长效果。

(2) 血淋巴细胞培养:用肝素钠(抗凝剂)溶液浸润无菌注射器,从斑节对虾的围心窦抽取血淋巴,滴入盛有少量苯基硫脲培养液的细胞培养瓶或 24 孔培养板中,用吸管稍加吹打,静置 30~40 min,血细胞沉降或贴附在培养瓶(板)壁上,小心吸去旧培养液,再加入等量的含有 $\varphi=10\%$ 胎牛血清的完全培养液,26~28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养;抽取血淋巴滴入盛有少量苯基硫脲的培养液中,吹打均匀方装入培养瓶和培养板中,另一组分别加入 PHA 至终质量浓度 $1 \mu\text{g/mL}$,26~28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,观察其刺激细胞分裂的作用;血淋巴不弃,自身血清直接培养。

3 结果与讨论

3.1 肝胰腺细胞培养

培养物内由较大的分泌细胞、吸收细胞及较小而光滑透亮的幼稚细胞组成,1~2 d 后,较大的细胞老化死亡,相反幼稚细胞继续生长、分裂,细胞少量轻度贴壁,并不拉伸。传代细胞加入等量新培养液 1 传 2,共传 3 代。

结果表明,2 种培养基效果无显差别;渗透压,加入 5 g/L NaCl 效果最好,超过 5 g/L NaCl 效果最差;10%与 20%的 FBS 效果相差不大;促肝细胞生长因子效果也不明显。

3.2 血淋巴细胞培养

血淋巴细胞原代培养很成功,去掉自身血清比不去掉维持生长时间长。

血淋巴细胞多为贴壁生长,血淋巴细胞放入培养基后 30~60 min,细胞贴壁率达 90%,多数拉伸成梭型或上皮样细胞,2~3 d 后拉成网状并开始死亡,有个别细胞经 2 次换液能维持生长 10 d 之久。

也有圆形悬浮生长细胞,可见分裂相,个别瓶细胞传代 6 次,生长时间达半年。

加入 PHA^[3]对细胞没有明显刺激作用。

斑节对虾是广盐性海洋甲壳动物,目前还没有适合其生长的理想培养基。

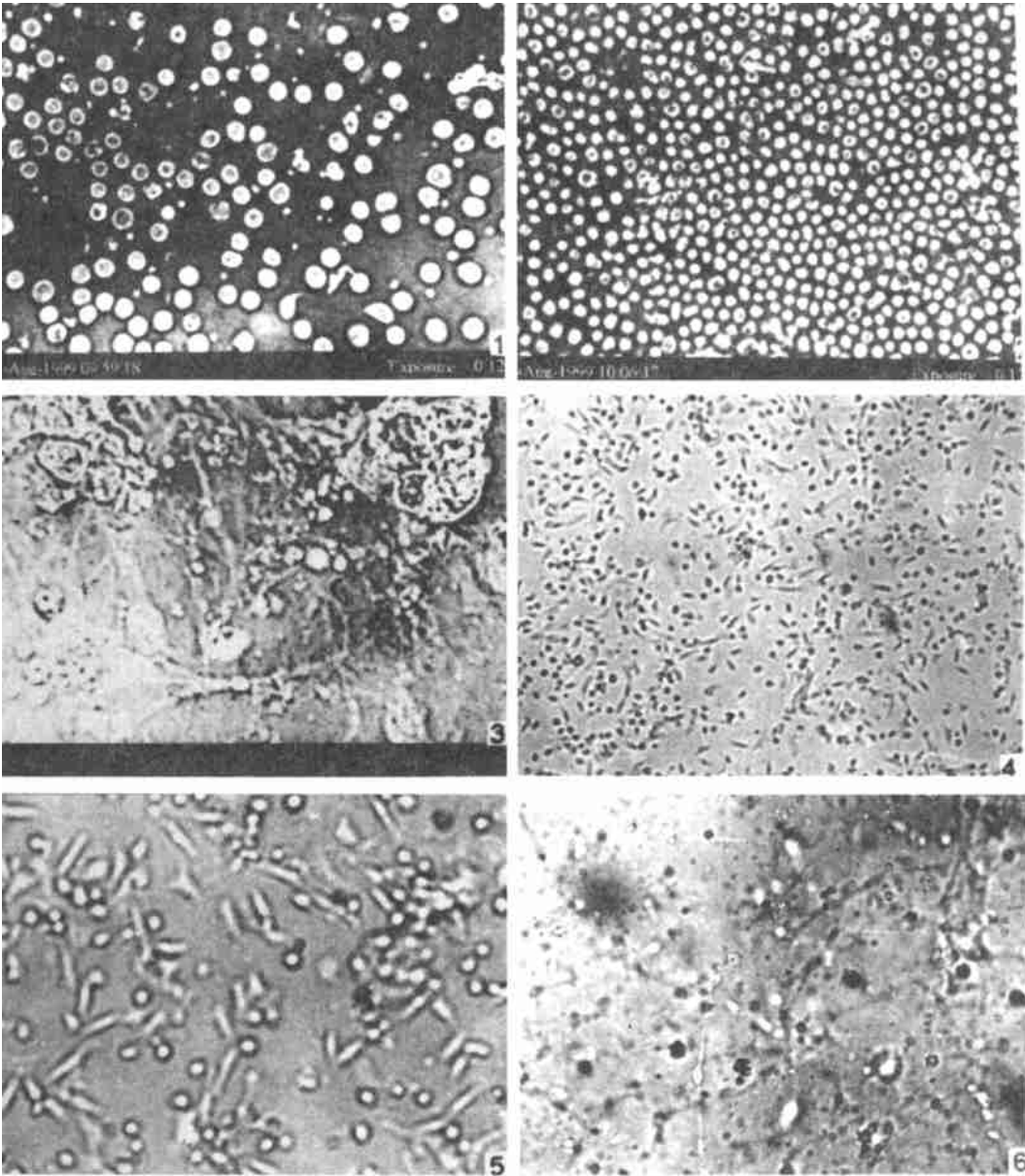


图 1 斑节对虾肝胰腺细胞经 EDTA 消化后，4 层纱布过滤，细胞大小一致
图 2 虾血淋巴细胞，加入 PHA，有明显的分裂相，→处为分裂相
图 3 斑节对虾肝胰腺细胞贴壁后，细胞进一步伸展成片，层次感增加
图 4 斑节对虾血淋巴细胞生长 7 h 已基本贴壁，细胞均匀，活性强
图 5 虾血淋巴细胞生长 24 h，贴壁生长有圆形，更多的是梭形
图 6 经 2 次换液的虾血淋巴细胞，生长已 10 d，细胞进一步拉伸成网状

参考文献:

- [1] 高玮, 张立人. 对虾病毒病害的研究进展[J]. 中国病毒学, 1997, 12(1): 8 ~ 13.
- [2] 胡珂, 王立平, 段爱梅. 中国对虾的组织培养[J]. 水产学报, 1991, 15(4): 328 ~ 331.
- [3] 余泽华, 等. 蓖麻蚕血细胞体外培养及病毒感染[J]. 华中师范大学学报, 1991, 25 (4): 479 ~ 483.
- [4] 刘凯于, 等. 斑节对虾组织的原代培养[J]. 华中师范大学学报, 1998, 32(2): 211.
- [5] HSU Y L, YANG Y H, CHEN Y C, et al. Development of an *in vitro* subculture system for Prawn tissues. Proceedings of the international symposium on biotechnology in aquaculture[J]. Asian Fisheries Society Special Publication, 1995 (10): 61 ~ 170.

In vitro* Cell Cultures from Hepatopancreas Tissue and Hemolymph of *Penaeus monodon

GOU Wei^{*}, HUANG Can-hua, Lan Ping-zhang, Zhang Li-ren

Abstract: Hepatopancreas tissue and hemolymph from *Penaeus monodon* were cultured *in vitro*. The results showed that some of hepatopancreatic cells could be subcultured for 3 generations, however, no apparent growth-stimulating effect can be observed when hepatocyte growth factor (HGF) was added. The primary culture of the hemolymph was successful, 90% of them attached to the culture plates and proliferate, some plaes of cells could be sub—cultured for 6 generations, keeping alive as six months, but PHA can't stimulate their growth either.

Keywords: *Penaeus monodon*; hepatopancreas tissue; hemolymph; cell cuture *in vitro*

^{*} Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China.