

研究简报

中国对虾的组织培养

TISSUES CULTURE OF THE PENAEID SHRIMP, *PENAEUS CHINENSIS* OSBECK

胡珂

Hu Ke

(黄海水产研究所, 青岛 266003) (Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266008)

王立平 段爱梅

Wang Liping and Duan Aimei

(山东省海洋药物科学研究所, 青岛 266003)

(Shandong Institute of Marine

Material Medica, Qingdao 266003)

关键词 组织培养, 中国对虾

KEYWORDS tissues culture, *Penaeus chinensis* Osbeck

目前组织细胞培养研究迅速发展, 已被应用于无脊椎动物和脊椎动物生物学的各个领域。在鱼类组织培养方面的研究已逾三十余载, 据 Wolf 和 Mann 统计, 国外从冷水性鱼和温水性鱼获得细胞株(系)共 61 个^[9]。无脊椎动物组织培养研究工作进展则较为缓慢, 自 Grace 从鳞翅目昆虫 *Antheraea eucalypti* 建立首株细胞后^[6], 昆虫组织培养才进一步活跃起来。迄今国外甲壳动物组织培养仅有零星报道, 对虾科的则更属罕见。随着对虾养殖业的发展, 对虾的产量与日俱增, 已成为世界养殖业的重要组成部分。因此, 对虾组织和细胞的培养研究, 将使对虾的细胞遗传学, 细胞生物学, 细胞工程学, 对虾生理学和毒理学, 以及对虾病毒学等各个学科的研究工作有所提高。为建立对虾的组织培养方法, 并作为今后对虾病毒学研究的重要手段, 作者从 1987 年始, 对中国对虾几种组织和细胞的体外培养进行了初步探索。

材 料 与 方 法

(1) 实验材料 本文所用中国对虾系采自山东省青岛市崂山区沙子口镇对虾养殖场和黄岛区对虾养殖场。选择放养四至五个月, 体长约 10—13 厘米的健康对虾, 带回实验室立即使用或暂养后使用。供体外培养的对虾组织和细胞为: 肝胰腺、卵巢、心脏、上皮组织、肌肉和血细胞。

(2) 实验材料的处理和实验方法 对虾使用前用清洁的海水洗净, 在无菌条件下依次用 2% 碘酊和 75% 酒精消毒体表, 然后用无菌器械剖取所需组织。剪取之组织置于组织培养液中洗涤后, 用锋利的剪刀将组织细切成 1 立方毫米的方块, 加入少量培养液, 吹打分散细胞, 接种组织培养瓶后, 加入适量的培养基。对虾血细胞系由对虾心脏采血, 防凝剂采用 0.25% L-半胱氨酸, 抽取血液置离心管中, 以 1,000 转/分的转速离心 10 分钟, 弃去上清液, 将沉淀后的血细胞分散均匀, 然后分装培养瓶。采用 TC 199 培

培养基(Nissui Seiyaku Co, Ltd. Japan)。在该培养基中加入 15—20% 小牛血清, 100 单位/毫升的青霉素和 100 微克/毫升的链霉素^[1]。将培养瓶置 25—27°C 恒温箱中静置培养。培养后细胞之形态观察, 是将细胞悬液接种于预先放有 5×21 毫米盖玻片的 Leighton 氏培养瓶中, 经过一定时间的培养, 取出盖玻片, 用 Carnoy 氏液固定, 常规苏木素和伊红染色(H.E.)。

结 果

一、六种对虾组织细胞的培养结果

在对虾肝胰腺、卵巢、心脏、肌肉、上皮组织和血细胞六种组织细胞中, 以卵巢组织和血细胞较容易培养成活, 肝胰腺组织次之, 而肌肉组织仅得一株细胞。虽然心脏和上皮组织在离体培养中比较容易贴附于培养瓶瓶壁, 且可维持较长时间, 但均未能见到有细胞分裂繁殖。从肝胰腺组织培养中获得五株细胞, 其中一株传代培养 2 代, 一株 5 代, 另外二株存活 5 个多月, 分别传代 17 代和 28 代。从对虾卵巢和肌肉组织培养所获细胞均为原代细胞。在血细胞培养所得的数株细胞中, 一株存活 10 个月, 继代培养 3 代。各种组织细胞的培养结果和细胞形态特征见附表。

附 表 对虾几种组织及细胞培养结果的比较

Attached table Comparison of tissues and cell culture of penaeid shrimp

组 织	培养批数	培养所得细胞株		组织细胞贴壁	细胞形态	细胞平均直径(μ)
		原代细胞	传代细胞			
肝胰腺	14	1	4	-	圆形细胞	12—16
卵 巢	4	3	0	+	上皮样细胞	58—60
血细胞	6	4	1	+	淋巴样细胞	5—6
					吞噬样细胞	10.3—13.5
					吞噬样细胞	20.1×4
肌 肉	7	1	0	+	纤维样细胞	NT
上 皮	3	0	0	+	-	-
心 脏	3	0	0	+	-	-

二、肝 胰 腺

肝胰腺组织和细胞多松散贴附于培养瓶瓶壁, 轻轻摇动易于脱落。接种培养 3—5 天后即见组织团块周围长出生新细胞, 构成簇状细胞集落。细胞呈圆形, 光滑透明, 折光性强, 富于立体感。亦可见较多新生细胞自肝小管残端向外呈扇形生长, 该现象在肝小管末端尤为多见(图版-1, A)。偶尔见体积较大的多形性细胞, 胞浆多, 胞核清晰可见, 但该细胞经传代后即消失。细胞繁殖增多后形成细胞单层(图版-1, B)。

继代培养之细胞经苏木素和伊红染色后观察, 见细胞大小较均匀, 直径均为 14—16 微米。细胞分化程度较低, 细胞核大, 占整个细胞体积的大部分, 核染色呈兰色。核外包围一层较薄的细胞质, 染成淡红色。

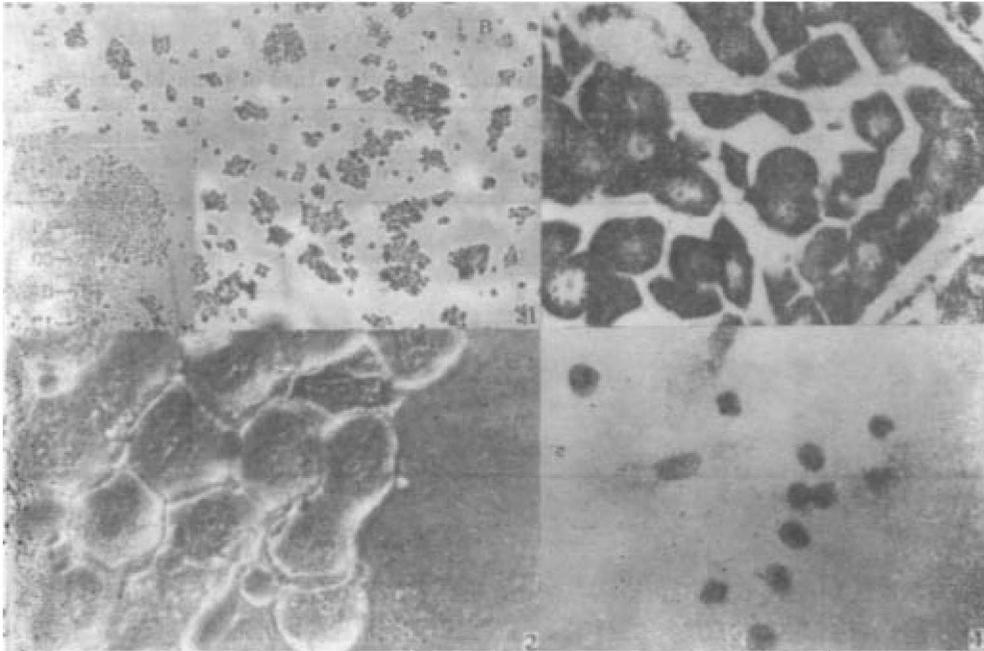
三、卵 巢

卵巢的组织团块和分散细胞较易粘附在培养瓶瓶壁, 接种 2—3 天后即见组织块周围有细胞抽动和游离, 并逐渐长出生新细胞。细胞呈圆形, 透明。随着细胞不断分裂繁殖, 细胞数量增多形成牛长景, 生

长晕逐渐增大连成一片,形成细胞单层。此单层细胞形态呈多角圆形或椭圆形上皮样细胞,直径约58—60微米,细胞核清晰,核仁5—7个不等,呈车轮状排列(图版-2)。该种细胞形态与正常卵巢的次级卵母细胞极为相似(图版-3)。从卵巢组织培养所得数批原代细胞,进行传代培养均未成功,单层细胞多自行退化,脱落而死亡。

四、血细胞

血细胞贴壁速度较快,细胞为圆形淋巴样细胞和多形吞噬样细胞。圆细胞直径约5—6微米,核仁形态多样,经苏木素和伊红染色后胞浆呈桔红色,胞核呈兰黑色。扫描电镜观察到圆形淋巴样细胞表面有较多微绒毛,并且胞浆有小伪足伸出,借此粘附于玻片。吞噬样细胞因胞体向外伸展,所以胞体极薄,体积较大(图版-4)。按细胞伸展的形态可将吞噬样细胞分为两种类型:一种为胞体向四周伸展的多边形不规则细胞;另一种为胞体向两极伸展的I型细胞。经苏木素和伊红染色后,两种形态之吞噬样细胞胞浆均呈淡红色,胞核呈淡兰色,胞浆和胞核中均有较多粗大染色颗粒。吞噬样细胞寿命极短,培养数日后即自行退化脱落。而圆形淋巴样细胞则常常可在离体培养基中存活很久。其中一株血细胞传代培养3代。



图版 Plate

- (1) A. 从对虾肝胰脏肝小管中生长出的新生细胞。×100 (1) B. 对虾肝胰脏的传代培养细胞。×100 (2) 对虾卵巢的原代培养细胞(相差照片)。×250 (3) 正常对虾的卵巢组织照片。H—E, ×400 (4) 对虾血液中的淋巴样细胞和吞噬样细胞。

讨 论

近十余年来,对虾养殖业已遍及世界许多国家和地区。随着对虾的大面积养殖,对虾的各种疾病常常给养殖业造成重大损失。自 Couth 在 1974 年首先报道了墨西哥湾桃红对虾杆状病毒后^[2],一些学者相继发现了数种对虾病毒,例如日本对虾中肠腺坏死病毒、斑节对虾杆状病毒、对虾传染性皮下及造血

器官坏死病毒、对虾肝胰腺微小病毒和对虾呼肠病毒。这些病毒已发现流行于对虾的六个属十三个种。由于病毒有严格寄生于活细胞的特性, 而目前世界上尚没有建立对虾细胞株和较为理想的对虾细胞组织培养方法, 影响了对虾病毒的深入研究。

甲壳类动物的组织培养国外报道较少, 国内也未见到这方面的材料。Peponnet 等人报道了螯虾、龙虾和蟹的类淋巴组织、性腺和心脏等组织的体外培养^[2]。Fyhn 和 Daig 介绍了藤壶外套膜和小龙虾上皮组织的培养^[5,4]。Patterson 等人对美洲龙虾和美洲鲎血细胞离体培养做了尝试^[3]。但这些学者的研究仅限于甲壳类动物的原代组织培养。Chen 于 1980 年首先对斑节对虾的卵巢、心脏、肌肉、神经、肝胰腺和鳃等组织的体外培养做了研究和比较, 发现前两种组织在体外生长较好, 并成功地将卵巢的原代细胞继代培养了三代^[6]。本文实验结果表明, 中国对虾的卵巢组织, 肝胰腺, 血细胞和肌肉组织在体外培养生长较其他组织为好。其中几种肝胰腺细胞分别传代培养了 2—28 代, 一株血细胞传代培养 8 代; 卵巢组织的培养结果不太满意, 数株细胞均为原代培养细胞; 心脏组织的培养未能成功。这与 Chen 报道的结果略有不同, 其原因可能与 Chen 所采用的对虾品种、培养基和其它培养条件不同有关。另外本文中肝胰腺、卵巢和血细胞等培养之细胞在体外维持时间比较短, 继代培养代数较少, 说明现有的组织培养条件和培养基仍然不够理想, 尚待不断地改进和探索。

Ratcliffe 等(1981)指出对虾的血细胞参与对虾外伤伤口的修复和对各种外来物质及微生物的防御作用。在健康对虾血液中, 血细胞形态为大小较为均匀的圆形细胞。Dall 曾描述了新对虾 *Metapenaeus mastersii* 的三种血细胞, 即 thengma 细胞, 淋巴细胞和胞内含大颗粒的变形细胞^[3]。作者观察了离体培养后的中国对虾血细胞, 从其形态和染色的不同可分为两种细胞: 一种为圆形淋巴样细胞; 另一种为吞噬样细胞。后者在体外可做变形运动, 有可能参与对外来异物或微生物等的吞噬和清除, 与脊椎动物的大单核细胞功能类同。但这两种对虾血细胞的形态与功能的关系需进一步研究加以证实。对虾血细胞的体外培养将为对虾免疫功能和免疫机制的研究提供一种实验手段。

参 考 文 献

- [1] Chen, S. N. et al., 1986. Cell culture from tissue of grass prawn, *Penaeus monodon*. *Fish Pathol.* **21**: 161—166.
- [2] Couch, J. A., 1974. An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: Ultrastructure, prevalence, and enhancement. *J. Invert. Pathol.*, **24**: 311—331.
- [3] Dall, W., 1964. Studies on the physiology of a shrimp, *Metapenaeus mastersii* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). I. Blood constituents. *Aust. Jour. Mar. Freshw. Res.*, **15**: 145—161.
- [4] Daig, K. and K. D. Spindler, 1979. An *in vitro* culture system for crayfish organs. *Z. Naturforsch.* **34(c)**: 1234—1247.
- [5] Fyhn, U. E. H. and J. D. Costlow, 1975. Tissue cultures of cirripeds. *Biol. Bull.*, **149**: 316—330.
- [6] Grace, T. D. C., 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. *Nature*, **195**: 788—789.
- [7] Patterson, W. D. and J. E. Steward, 1974. *In vitro* phagocytosis by hemocytes of American lobster (*Homarus americanus*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **31**: 1051—1056.
- [8] Peponnet, F. and J. M. Quiot., 1971. Cell cultures of Crustacea, Arachnida and Merostomacea. In C. Vage(ed) *Invertebrate tissue culture*, Vol. I. p. 341—159. Academic Press, New York and London.
- [9] Wolf, K. and J. A. Mann, 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses. A current list for fishes. *In vitro*, **16(2)**: 168—179.