

(¹ 青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

(² 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

郎刚华¹ 王 勇² 刘万顺¹ 徐怀恕¹:

贝类组织培养及其应用研究*

RESEARCH ON TISSUE CULTURE OF SHELLFISH AND ITS APPLICATION

组织培养是生物工程领域的重要手段之一,细胞培养技术广泛应用于染色体分析、细胞代谢、癌变机制、病毒的分离和鉴定及药物筛选等研究领域。目前,在脊椎动物的细胞培养方面已积累了大量的研究成果,并建立了多种细胞株系。而在无脊椎动物的细胞培养方面,自 Grace 1982 年从鳞翅目昆虫

Antheraea eucalypti 建立细胞株以来,昆虫组织的细胞培养技术也已发展得相当成熟。但是在海洋无脊椎动物的组织培养方面,对虾细胞的建系问题至今仍是全世界所面临的挑战性课题,虽已积累了一些原代和传代培养方面的经验,但至今仍无建系的报道。贝类是一类非常重要的水产养殖品种,目前,在

贝类的组织培养方面已积累了一些资料,并就其育珠机理、组织损伤修复机制等方面进行了深入的研究。最近几年,我国发生了严重

* 联合国教科文组织资助项目 UNES
CO861.359.8 号。

收稿日期:1999-04-06;

修回日期:1999-07-10

的贝类病害,给贝类的养殖业带来了巨大的损失。如果能够建立起贝类的细胞系,必将为深入研究贝类发病机理,探索防病措施提供极大方便。

1 贝类组织的原代和传代培养

早在1967年Benex就曾对贻贝的组织进行过培养研究。三十几年

来研究人员先后对多种贝的多种组织进行了原代培养,并对有的组织进行了传代培养。最近十几年贝类组织培养的研究概况见表1。

从多年的贝类组织培养研究

表1 最近十几年贝类组织培养的研究概况

贝类	组织	培养基	培养类型	作者	论文发表时间
背角无齿蚌褶纹冠蚌	外套膜边缘膜	RPMI1640, 水解乳蛋白, 小牛血清等	原代培养	石安静等	1983
文蛤	外套膜	L-15, 文蛤血淋巴, 小牛血清等	原代培养	Chen <i>et al.</i>	1988
马氏珠母贝	外套膜	Pf35	原代培养	町井昭	1989
皱纹盘鲍	外套膜, 腮, 肌肉, 肝胰腺, 腮下腺	Eagle's MEM, 小牛血清等	原代和传代培养	李霞等 ^[1]	1997
栉孔扇贝	外套膜	TC199, 小牛血清, 水溶性甲壳质等	原代培养	郎刚华等 ^[5]	2000

工作可以发现,贝类组织培养工作有以下几个特点:(1)可培养的组织:贝类的外套膜、鳃、心肌、生殖腺、闭壳肌等都可用于组织培养。(2)除菌处理:由于贝类的大部分组织与外界直接接触,所以在培养前必须进行严格的除菌处理。淡水贝类组织取下后,放入含青霉素(4 000 IU/ml)和链霉素(5 000 μg/ml)的生理盐水中浸泡30 min,再用此液冲洗20~30次,然后用生理盐水洗3~4次,以除去高浓度的抗生素。但是,由于海水贝类体外沾有一些弧菌类微生物,用高浓度的抗生素还不能将其彻底除去,必须用二氯化汞或双氯苯双胍己烷等进行处理。在实验中还发现,扇贝组织外附有许多黏液性物质,在进行除菌前,如果用无菌脱脂棉将其轻轻擦除干净,将会提高除菌效果。(3)培养基渗透压的选择:不同种的贝的组织培养所需要培养基的渗透压是不同的,即使不同海洋

贝类之间所需要的渗透压也有很大差异,当进行未曾报道过的贝的组织培养时,应根据组织和细胞在溶液中所呈现的状态选择出最适的渗透压。(4)培养温度:从已有的报道看,贝类组织培养的最适温度范围在26~27℃。(5)pH值:河蚌组织培养的最适pH为6.8~7.0,海产贝类组织培养的最适pH值维持在7.2左右。一般用NaHCO₃和盐酸调整培养基的pH值。(6)组织接种方法:贝类组织培养可以用组织块培养法和酶分散培养法,在第一种方法中将组织剪成1 mm³的小块,用弯头滴管将其分布于瓶壁上,1.5 h[MSOffice1]后加入培养基,进行培养。此法培养到的是来源于各组织的混合细胞,但以来源于间充质的成纤维样细胞生长最盛;第二种方法对单细胞的损伤较大,故应选择合适的酶和适当的处理方法,Awaji^[4]等用Dispase(Godo Syusei, Inc., Tokyo, Japan)消化珍

珠贝外套膜而分离到上皮细胞,并进行了培养研究。因此,第二种方法较适用于研究特异的组织细胞。(7)组织培养的季节性:贝类组织培养在春季容易获得成功,秋季比较困难,冬季几乎不能成功,这可能与贝类体内的激素分泌和细胞的基因调控有关系。

2 外套膜组织培养物的应用研究

2.1 泌珠机理的研究

无论是海产贝类还是淡水贝类的外套膜组织在体外培养过程中都能分泌珍珠质。町井昭1977年进行海产阿古屋贝组织培养时,观察到组织块在培养过程中变成茶褐色,他将这些茶色结晶物在直角尼科尔棱镜下作十字消光等分析后,认为这是上皮细胞所分泌的有机珍珠质沉积于组织块上所致。石安静等1993年通过培养河蚌外套膜组织时,发现在离体培养条

件下,组织细胞同自然生长时一样,能旺盛地分泌茶褐色有机珍珠质。而且,在离体条件下所分泌的珍珠质与人工育珠手术后见到的棱柱层珍珠相同。另外,她们还发现,没有上皮细胞的组织块无论经过多长时间的培养,始终是透明无色的,不会有茶褐色的珍珠质形成。由此进一步证明珍珠质是外套膜的上皮细胞的分泌物。随后,石安静等在1995年^[2]又对褶纹冠蚌外套膜组织培养的分泌物进行了偏光显微镜观察,发现培养15 d的“内部”组织块的分泌物,部分有双折射现象,为因钙化而形成的结晶体;另一部分无双折射现象,为蛋白质类有机物。这与活体组织的分泌物是一致的。当组织培养30 d后,组织块表面生长出肉眼也能观察到的分泌颗粒,有强的双折射现象和色偏振现象。所以证明结晶在离体培养条件下是逐渐生长的。而边缘膜“外部”的组织块培养后变成黑色,在偏光显微镜下浓黑的部分没有双折射现象,表明此部位的分泌物不是结晶,而是蛋白类有机物。她们还用普通光学显微镜和偏光显微镜对比观察了组织培养不同时间的分泌物结晶的变化过程,发现双折射现象是随培养时间延长而加强的。石安静等认为,贝壳的结晶是以一种弱碱性的蛋白质分泌物为核心,其逐渐沉积上被细胞吸收后又排出的钙(以碳酸钙的形式),当形成三方晶系时则成为棱柱层的方解石结晶;当形成正交晶系时则形成珍珠层的霏石结晶。町井昭1989年在进行海产贝类——马氏珠母贝的外套膜组织培养时,发现其球形分泌物也具双折射现象,从而说明,海水贝类和淡水贝类外套膜的分泌物在体外

均有相同的钙化机制。

2.2 贝类组织损伤修复机理的研究

软体动物体壁的损伤修复过程一般包括以下4个连续的过程:变形细胞渗出到损伤部位并吞噬组织碎片;变形细胞形成鞘状结构以阻止血液流失并在鞘上形成细胞外基质;上皮细胞发生迁移;上皮细胞再生。对于育珠贝(*Pinctada fucata martensii*)的损伤修复过程已进行了组织学研究,Awaji等1995年^[3]的研究发现,上皮细胞除发生形态变化外还开始了DNA合成,但是在成熟贝的完整外套膜组织内上皮细胞是没有DNA合成活性的。为探讨其修复机制,Awaji等^[4]1998采用细胞培养的方法又进行了深入的研究,他们先把珍珠珠贝(*Pinctada fucata martensii*)的变形细胞作成饲养层,然后将育珠贝外套膜的上皮细胞分散后接种到变形细胞层上,发现上皮细胞在24 h内就贴附到变形细胞上,并形成单层和进行DNA合成。而且外套膜上皮细胞的形态特征与在体皮肤损伤修复时相似,从而排除了其他影响因素,证明上皮-变形细胞间的相互作用在上皮再生过程中起着非常重要的作用。通过细胞培养和组织化学方法,Suzuki等于1991年还证明颗粒变形细胞具有分泌I型胶原、糖蛋白及纤粘蛋白样分子的能力,这些分子构成的细胞外基质为上皮细胞的迁移和生长提供了支持。

3 贝类组织培养的应用前景

首先,通过培养育珠贝类的外套膜上皮细胞,提供一条体外育珠的新途径。研究已证明,体外培

养的外套膜上皮细胞可以分泌与在体时分泌成分相同的物质。如果通过进一步的研究,搞清上皮细胞的分泌机制和促进其分泌的因素,然后通过细胞培养的方法就可获得大量分泌特性优越的育珠细胞,再应用特定的细胞培养器,在特定的培养条件下,就可能得到大量优质的珍珠。通过这种离体育珠方法,不但可以避免传统育珠过程的复杂操作和外界环境条件对珍珠形成的影响,而且,因为培养条件可控性强,所以就有可能培育出高质量的珍珠。

其次,贝类细胞培养还可用于贝类病毒病的研究,已发现贝类的病毒有几十种,如在文蛤溃烂变黑的鳃部发现的IPNAb病毒、在牡蛎细胞核中发现的疱疹病毒及在牡蛎卵巢囊肿中发现的卵巢囊肿病毒等。由于体外培养的细胞具有可供病毒增殖的全部条件,所以可以用于分离、增殖病毒、鉴定病毒,研究病毒的感染、复制、形态发生和遗传变异及滴定病毒的效价等研究。而且,通过培养贝类的免疫细胞可以进行贝类免疫机制的研究和筛选增强免疫机能的活性物质或药物。近年来,贝类病害相当严重,而提高贝类的免疫机能、增强其抗病能力是解决贝类病害的有效途径之一。

另外,贝类的细胞培养技术可望在今后用于贝类细胞生物学和遗传学等方面的研究。因为随着个体的生长发育,细胞进一步分化,处于分裂状态的细胞不多,较难找到分裂相。但通过细胞培养手段,可以在较短时间内获得大量中期分裂相,从而便于进行染色体计数和观察。Wada等曾通过培养珠母贝的外套膜细胞进行贝类三倍体

的染色体分析。而且通过显微摄影系统可以系统的观察贝类细胞的分泌活动。

总之,进行贝类细胞培养的研究,并建立永久性的贝类细胞系,对于贝类细胞生物学、遗传学、病毒学、免疫学的研究及水产养殖业

的发展将起到巨大的推动作用。

参考文献

- 1 李霞、刘淑范。水产学报, 1997, 21 (2): 197~200
- 2 石安静、陈蜀娜。动物学报, 1995, 41 (1): 35~40
- 3 Awaji, M., Suzuki, T. . *Fidshenis*

Sci., 1995, 61: 747~751

- 4 Awaji, M., Suzuki, T. . *Biol. Animal.*, 1998, 34: 486~491

(本文编辑: 李本川)