

黄海繁茂膜海绵细胞培养中抗生素的使用

方丽驹, 赵权宇, 金美芳, 虞星炬, 张 卫, 袁 权

(中国科学院 大连化学物理研究所 生物技术部, 辽宁 大连 116023)

摘要: 以黄海海域的繁茂膜海绵 (*Hymeniacidon perleve*) 为研究对象, 考察了海绵细胞培养中细胞团的形成过程。细胞在培养 24 h 后贴壁聚集, 有类似胶原物质分泌。培养第 5 天形成的细胞团, 中心致密, 边缘有平滑的表皮结构。为控制培养中的微生物污染, 比较了 6 种抗生素的使用效果, 其中庆大霉素有较好的抑菌效果且不影响细胞成团, 而两性霉素 B 对细胞的贴壁和成团有不利影响。

关键词: 繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perleve*); 细胞团; 微生物污染; 抗生素; 细胞培养
中图分类号: Q2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 3096(2004) 11- 0028- 05

海绵是最低等的海洋无脊椎动物, 也是海洋药物开发中重要的生物资源之一^[1]。目前海绵药源的“供给不足”问题是制约海绵化学成分药物研究的主要原因^[2]。海绵细胞培养能在可控的条件下生产海绵, 是解决上述问题的有效途径^[3,4]。

Custodio 等人^[5]首次建立了海绵 *Suberites domuncula* 的细胞团 (Pimmorphs) 培养体系, 培养在体外维持了 5 个月, 且细胞保持一定的增殖能力。研究发现, 离散的海绵细胞会失去端粒酶活性, 细胞不能进行 DNA 的合成。而细胞团的形成能使细胞恢复较高的端粒酶活性, 因而具有增殖潜能。因此, 海绵细胞团培养被认为是研究海绵细胞增殖和凋亡机制的新型模型体系^[5,6]。但是可传代的海绵细胞系还没有建立, 其中一个重要的原因就是细胞培养中的污染问题难以解决^[7]。不同于一般的后生动物, 海绵体内存在着大量共生微生物, 其中许多是胞内共生菌, 所以在细胞培养中很难得到一块无菌的组织材料。因此微生物污染的控制是海绵细胞培养中需克服的一个问题^[8]。

海绵细胞培养都要用持续高浓度的抗生素来抑制微生物的生长。其中青霉素和链霉素是最常用的抗生素^[3,6]。Pomponi 等人^[8]还考察了利福平抑制微生物的效果和对海绵细胞生长的影响, 认为单纯使用利福平就能达到较好的效果。De Rosa 等^[9]在培养中使用包括青霉素, 庆大霉素, 卡那霉素和四环素在内的大剂量的抗生素, 而且获得了较高的细胞生长量。但是持续高浓度的抗生素可能会对细胞的生长产生抑制

作用^[4]。对于不同种属不同海域的海绵, 其内部共生的微生物不同, 所适用的抗生素也可能存在差别。同时抗生素的使用还可能影响细胞团的形成。对 6 种海绵进行细胞培养, 使用两性霉素 B 和复合抗生素 (卡那霉素, 庆大霉素, 泰乐菌素和四环素) 的培养中, 细胞不能成团^[10]。

本实验以黄渤海海域的繁茂膜海绵为研究对象, 初步考察了海绵细胞培养中细胞团的形成过程, 同时比较了 6 种抗生素对细胞贴壁, 聚集和成团的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

(1) 天然海水 (NSW), 采自大连周边海域 15 m 深处, 沙滤后 0.22 μm 微孔滤膜过滤, pH 为 7.8~8.0; (2) 无钙镁海水 (CMFSW), 配方: 0.994 g Na₂SO₄, 0.0168 g NaHCO₃, 0.746 g KCl, 31.6 g NaCl 和 2.42 g Tris. HCl, 溶于 1 L 蒸馏水中, 调节 pH 为 8.2。0.22 μm 微孔滤膜过

收稿日期: 2003- 05- 11; 修回日期: 2003- 07- 24

基金项目: 国家高技术研究发展计划 863 项目(2001AA620405); 中国科学院“百人计划”资助项目; 中国科学院大连化学物理研究所“创新基金”资助项目。

作者简介: 方丽驹(1978-), 女, 浙江宁波人, 硕士, 研究方向: 海洋无脊椎动物细胞培养, E-mail: fanglijju@dicp.ac.cn; 张 卫, 通讯联系人, E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

滤。(3) 含 EDTA 的无钙镁海水 (CMFSW-E), 配方同 CMFSW, 此外还含有 20 mmol/L 的 EDTA; (4) 青霉素 G、链霉素、庆大霉素、利福平、两性霉素 B、卡那霉素、四环素(抗生素均购自 Sigma)。

1.2 海绵

繁茂膜海绵 (*Hymeniacidon perlewe*) 采集自大连周边黄海潮间带, 其种属由中国科学院海洋研究所李锦和鉴定。海绵养殖于本实验室自行设计的水族槽中, 水温保持在 20℃, 盐度为 30~35, 养殖 1 周后取用。

1.3 制备离散的海绵细胞

制备离散的海绵细胞是利用海绵细胞在无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的海水中不能聚集的特性^[11], 采用化学离散法进行分离的^[3,6,8]。用 NSW 冲洗组织块 3~4 次, 加入适量的 CMFSW 浸没, 用剪刀剪成 2~5 mm 的小块, 移入 50 mL 的离心管 (CORNING)。加 40 mL CMFSW-EDTA, 110 r/min, 15℃ 下振荡 10 min, 自然沉降, 弃上清。再加入 40 mL CMFSW-EDTA, 相同条件下振荡 30 min, 自然沉降后收集上清。为提高细胞收率, 可将剩余残渣移入平皿, 轻轻研磨, 将研出液与所收集上清混合, 500 目尼龙筛网过滤。滤液 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。CMFSW 清洗两遍后, 用 NSW 悬浮细胞, 制备成单细胞悬液。

1.4 海绵细胞培养

细胞以 1×10^6 个/mL 的密度接种到 24 孔板中, 除对照组外, 每孔事先加入含有不同浓度抗生素的培养液, 每个样设 3 个重复。16℃ 培养, 每隔 3 d 换液。每隔 8~12 h 观察细胞的生长和成团状况。实验中使用的 6 种抗生素及其标准使用浓度 (X) 见表 1, 标准使用浓度参考一般哺乳动物的细胞培养^[12]和 Sigma 产品手册。每种抗生素考察了 3 个浓度梯度, 分别标识为 10X, X, 0.1X。

表 1 不同抗生素在细胞培养中的标准使用浓度

Tab. 1 The normal concentration of different antibiotics in cell culture

抗生素	标准使用浓度 (mg/L)
青/链霉素	100/100
庆大霉素	200
利福平	150
两性霉素 B	2.5
卡那霉素	50
四环素	10

2 结果

2.1 海绵细胞团的形成过程

离散的海绵细胞以 1×10^6 个/mL 接种到不同抗生素的培养基中, 用相差显微镜观察, 拍照记录, 培养维持了 3 周。图 1-1~1-4 是典型的细胞团形成过程: 初始的细胞悬液经过 500 目筛网过滤, 溶液均一, 不含骨针, 细胞大小在 5~10 μm 之间 (图 1-1)。接种后 30 min, 细胞开始出现聚集 (图 1-2)。12 h 后大片细胞开始贴壁聚集, 聚集的形状不规则, 24 h 后在聚集周围有明显的类似胶原的物质出现 (图 1-3, 2-1)。培养第 3 天细胞停止贴壁生长, 形成小的细胞团, 大小约 100 μm , 团中心密实, 周边粗糙不规则 (图 1-4)。培养第 5 天形成了典型的细胞团, 团中心致密, 周边形成平滑的表皮结构 (图 2-3)。此外在培养 3~5 d 后可以观察到海绵骨针的出现。骨针先在细胞团中形成, 此时在高倍镜下观察可见骨针两端有清晰的囊膜结构 (图 1-5)。成形的骨针游离于细胞团外 (图 1-6), 其形态、大小均一, 长约 300 μm , 宽 3 μm , 并不是每一个细胞团都能形成骨针。以上观察是细胞正常聚集、贴壁和成团的过程, 使用不同的抗生素会对这一过程产生影响。

2.2 抗生素对海绵细胞贴壁和聚集的影响

实验表明使用抗生素会对细胞的贴壁和聚集产生较大影响, 见表 2。其中两性霉素 B 的影响最大, 在

表 2 接种 24 h 后不同抗生素对细胞贴壁和聚集的影响

Tab. 2 Effects of antibiotics on cell attachment and aggregation 24h after incubation

抗生素	浓度 (mg/L)		
	0.1X	X	10X
青链霉素	+	+	+
庆大霉素	+	+	+
利福平	+	+	-
两性霉素 B	+ / -	-	0
卡那霉素	+	+	-
四环素	+	+	+
无抗生素	+		

注: “+”表示细胞贴壁聚集;“-”表示细胞聚集但不贴壁;“+/-”表示两种现象都存在;“0”表示细胞离散, 无任何聚集

10 倍标准剂量下, 细胞不会发生任何聚集。在标准剂量及低于标准剂量下使用, 也会影响细胞的贴壁性质, 细胞有松散聚集, 但不贴壁, 无类似胶原物质产生 (图

2- 2)。其它 5 种抗生素在标准剂量及低于标准剂量下使用, 细胞贴壁和聚集情况良好, 有类似胶原物质分泌(图 2- 1)。其中利福平和卡那霉素在 10 倍标准剂量下会明显的影响细胞贴壁, 其余 3 种影响较小。

2.3 抗生素抑菌效果和对海绵细胞团形成的影响

实验表明不同抗生素的抑菌效果不同, 而且对细胞团的形成有较大影响, 结果见表 3。使用两性霉素 B 的培养中细菌污染最严重, 而且都不能形成细胞团。抑菌效果较好的是青链霉素, 庆大霉素和利福平, 但青链霉素和利福平在高浓度下会抑制细胞成团, 使团发生离散, 而庆大霉素浓度增加对成团影响不明显, 成团情况较好, 形成了典型的细胞团结构(图 2C)。同时结合表 2 可见, 在聚集初期不能贴壁生长的细胞, 培养 5 天后都不能形成明显的细胞团结构, 聚集松

散, 游离出大量离散细胞。

表 3 培养 5 d 后不同抗生素的抑菌效果和对细胞团形成的影响

Tab. 3 Effectivity of antibiotics to prevent microbial contamination and its effects on the formation of primmorphs

抗生素	浓度(mg/L)		
	0. 1X	X	10X
青链霉素	+ , clean	+ , clean	- , clean
庆大霉素	+ , clean	+ , clean	+ , clean
利福平	+ , clean	+ , clean	- , clean
两性霉素 B	- , cont.	- , cont.	- , cont.
卡那霉素	- , cont.	+ , clean	- , clean
四环素	+ , cont.	+ , cont.	+ , cont.
无抗生素		+ , cont.	

注:“+”表示形成细胞团;“-”表示无细胞团形成;“clean”表示无微生物污染;“cont.”表示存在污染

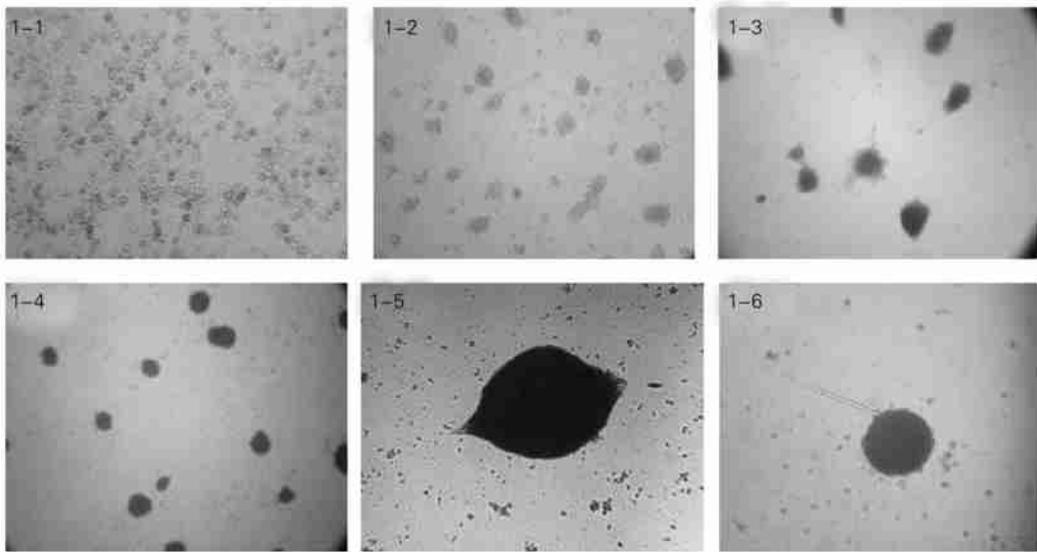


图 1 繁茂膜海绵细胞的成团过程

Fig. 1 Fomation of Primmorphs from sponge *Hymeniacidon perleve*

1- 1 单细胞悬液(× 100); 1- 2 接种后 30 min 细胞开始聚集(× 100); 1- 3 接种后 12 h 细胞壁聚集(× 100);
 1- 4 培养第 3 天形成的小细胞团(× 100); 1- 5 骨针在细胞团中形成(× 250); 1- 6 游离于细胞团外的骨针(× 250)。
 1- 1 Single cell suspension(× 100); 1- 2 Cell aggregates 30 min after incubation(× 100); 1- 3 Cell attachment and aggregation 12 h after incubation(× 100); 1- 4 Small primmorphs at day 3(× 100); 1- 5 Spicule formation in a primmorph(× 250); 1- 6 Primmorph with a fully developed spicule released(× 250).

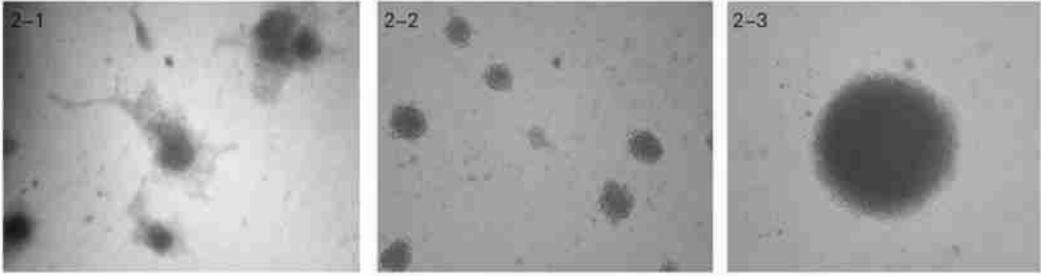


图 2 不同形态的聚集

Fig. 2 Different structural aggregations

- 2- 1 细胞贴壁聚集,周围有类胶原物质(× 250); 2- 2 细胞聚集,无贴壁(× 250); 2- 3 典型的细胞团(× 250)。
 2- 1 Cell attachment and aggregation with collagen secretion(× 250); 2- 2 Cell aggregation without attachment(× 250);
 2- 3 A typical Primorph(× 250).

3 讨论

作者研究了黄海繁茂膜海绵在细胞培养中的成团现象,其细胞团的形成过程与文献报道的基本一致^[3,5]。实验中还观察到细胞贴壁过程中类似胶原物质的分泌和细胞团中新骨针的生成。胶原质是海绵组织的重要组成成分,海绵中的胶原细胞,脊细胞和海绵质细胞都能分泌胶原物质。而骨针的形成则是由成骨细胞完成的,这类细胞能使硅沉积在纤维蛋白轴丝上,从而形成骨针^[12]。在淡水海绵 *Ephydatia muhleni* 的细胞培养中也有大量骨针生成的现象。所用的组织材料为海绵的芽球,其细胞具有较高的分化能力^[13]。作者采用的是混合细胞的培养,培养的细胞中可能包含一些功能细胞,如胶原细胞和成骨细胞等。它们在特定时刻行使细胞功能,因而出现胶原的分泌和骨针的形成。有关繁茂膜海绵细胞培养中胶原物质的分泌和骨针的形成,还有待进一步的研究。

为控制细胞培养中的微生物污染,作者考察了 6 种抗生素的抑菌效果及对细胞贴壁和成团的影响。其中庆大霉素的抑菌效果较好,且细胞贴壁和成团的情况最好。青链霉素和利福平虽然也有较好的抑菌效果,却不利于细胞的贴壁和成团。卡那霉素同样也不利于细胞的贴壁和聚集,且抑菌效果一般。四环素的抑菌效果较差,但对细胞的贴壁和聚集没有明显的抑制作用。使用两性霉素 B 对细胞的贴壁和成团影响最大。文献中也有报道在使用两性霉素 B 的培养中细胞团不能形成的现象^[10]。作者实验发现两性霉素 B 不

但不能使细胞成团,而且在培养的初期就能抑制细胞的聚集和贴壁。同时比较不加抗生素的培养,两性霉素 B 的污染现象也是最严重的。Griebenjuk 等^[4]发现细菌的内毒素能够刺激海绵细胞分泌一种抗菌因子,因此认为海绵细胞自身具有免疫能力,能够抵抗外界微生物的侵袭。作者所用的两性霉素 B 是一种真菌抑制剂,对培养中的细菌污染没有作用。但它对海绵的细胞毒性可能较大,影响了细胞自身分泌抗菌物质的能力,因此污染更严重。从实验结果看,建议在繁茂膜海绵的细胞培养中使用庆大霉素,避免使用两性霉素 B。同时为避免持续高浓度的抗生素对细胞培养不利,控制微生物污染的方法还可以同其它方法结合,这些都有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 孙林学,徐怀恕. 海绵动物中的生物活性物质研究进展[J]. 海洋科学, 1998, 22(5): 15- 17.
- [2] Osinga R, Tramper J, Wijffels R H. Cultivation of marine sponges[J]. *Mar Biotechnol*, 1999, 1: 509- 532.
- [3] Zhang W, Zhang X, Cao X, et al. Optimizing the formation of in vitro sponge primorphs from the Chinese sponge *Stylotella agminata* (Ridley) [J]. *J Biotechnol*, 2003, 100: 161- 168.
- [4] 张骁英,赵权宇,薛松,等. 海绵生物活性物质及海绵细胞离体培养[J]. 生物工程学报, 2002, 18(1): 10- 15.
- [5] Custodio M R, Prokic I, Steffen R, et al. Primorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and

- cell death[J]. **Mech Ageing Dev**, 1998, 105: 45- 59.
- [6] M ller W E G, Wiens M, Batel R, et al. Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from **Suberites domuncula**[J]. **Mar Ecol Prog Ser**, 1999, 178: 205- 219.
- [7] Rinkevich B. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements[J]. **J Biotechnol**, 1999, 70: 133- 153.
- [8] Pomponi S A, Willoughby R. Sponge cell culture for production of bioactive metabolites[A]. Van Soest, Van Kempen, Braekman eds. **Sponges in Time and Space**[C]. Rotterdam: Balkema, 1994. 395- 400.
- [9] Rosa S, Caro S, Tommonaro G, et al. Development in primary cell culture of the marine sponge *Ircinia muscarum* and analysis of the polar compounds[J]. **Mar Biotechnol**, 2001, 3: 281- 286.
- [10] Spkema D, Wielink R, Lammeren A A M, et al. Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure[J]. **J Biotechnol**, 2003, 100: 127- 139.
- [11] Bergquist P R. **Sponges**[M]. London: Hutchinson, 1978. 52- 83.
- [12] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001. 136- 141.
- [13] Insiecke G, Steffen R, Custodio M, et al. Formation of spicules by sclerocytes from the freshwater sponge *Ephydatia muelleri* in short- term cultures in vitro[J]. **Vitro Cell Dev Biol- Animal**, 1995, 31: 528- 535.
- [14] Grebenjuk VA, Kuuskalu A, Kelve M, et al. Induction of (2' - 5') oligoadenylate synthetase in the marine sponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium* by the bacterial endotoxin in lipopolysaccharide[J]. **Europ J Biochem**, 2002, 269: 1 382- 1 392.

Application of antibiotics in cell culture of Chinese sponge *Hymeniacidon perleve*

FANG Li- ju, ZHAO Quan- yu, JIN Mei- fang, YU Xing- ju, ZHANG Wei, YUAN Quan
(Marine Bioproducts Engineering Group, Laboratory of the Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Received: May, 11, 2003

Key word: *Hymeniacidon perleve*; marine sponges; primmorphs; antibiotics; cell culture

Abstract: The formation of in vitro primmorphs from Chinese sponge *Hymeniacidon perleve*, collected from the Yellow Sea, were investigated. 24 h after incubation, material similar to collagen was observed around the attaching and aggregating cells. Primmorphs at day 5 were special form of cell aggregations which have a condensed nucleus covered by an organized cell layer. In order to control the microbial contamination in cell culture, six antibiotics were compared. It is shown that gentamycin was effective to prevent bacterial contamination, and did not influence the formation of primmorphs. While using amphotericin, the attachment and aggregation of sponge cells was effected and primmorphs didn't form.

(本文编辑: 张培新)