

中国鲎血细胞原代培养及部分生物学现象观察

金 刚^{1,2} 蔡国平¹

(1 清华大学深圳研究生院, 深圳 518055 2 深圳职业技术学院, 深圳 518055)

PRIMARY CULTURE OF HORSESHOE CRAB TACHYPLEUS TRIDENTATUS, AMEBOCYTES AND SOME BEHAVIOR OF THE CELLS

JIN Gang^{1,2} and CAI Guoping¹

(1 Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055 2 Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055)

关键词: 中国鲎; 血细胞; 培养

Key words: Tachyples tridentatus Amebocyte Cell culture

中图分类号: Q25 文献标识码: A 文章编号: 100023207(2008)0520770204

中国鲎 (*Tachyples tridentatus*), 隶属于节肢动物门 (Arthropoda)、有螯亚门 (Chelicerata)、肢口纲 (Merostomata)、剑尾目 (Xiphosura)、鲎科 (Limulidae), 分布于中国、日本和东南亚其他国家。鲎科动物 (Horseshoe crab) 现有三属四种, 自从早古生代奥陶纪出现, 至今 4 亿多年, 其形态结构以及生活习性无重大变化。在胚胎发育后期有三叶虫幼体的形态特征, 被誉为活化石。在天然免疫、视觉、胚胎发育等许多方面, 鲎成为研究者的模式动物^[1]。

一百多年来, 鲎血细胞的抗菌作用一直吸引着研究者。鲎以原始的天然免疫抵抗入侵的微生物^[2]。自 Bang^[3]及 Levin 和 Bang^[4]开展鲎血液变形细胞和细菌内毒素之间关系的经典研究之后, 有关鲎血液细胞学研究、鲎试剂的研究和开发, 以及鲎其他诸多活性蛋白的研究取得巨大成就。尽管已经对美洲鲎 (*Limulus polyphemus*)、中国鲎和圆尾鲎 (*Carcinoscopius rotundicauda*) 血细胞培养开展过初步研究^[5-10], 但其最佳的培养条件仍然没有摸清。本文对中国鲎血细胞进行了体外培养, 并对培养的血细胞部分行为进行了观察, 为今后进一步深入研究其合适的培养条件及生物学提供基础。

1 材料与方法

1.1 中国鲎来源及室内暂养 取血用的中国鲎来自深圳南海鲜市场, 前后共 5 只雄性个体, 体重在 450~730 g。中国鲎运回实验室后, 放于盛有干净海水的大塑料箱中, 连续充气, 水温在 24~27℃ 之间, 暂养期间不喂食, 存活时间在

45~68 d。

1.2 鲎血清制备 把鲎的头胸甲与腹甲向内弯折, 用酒精棉和去离子水反复擦洗后, 用一次性注射器从关节处插进心脏, 抽出 50~60 mL 血液, 置离心管 3000 r/min 离心 6 min, 0.122 Lm 过滤后, 分装于小瓶, 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 培养基配置 用双倍 L215 培养基^[5] (Hazleton Biologicals Inc. KS, USA), 另添加 510 mmol/L glucose, 10 mmol/L HEPES 和双抗 (青霉素和链霉素各 0.15 g/L)。用去离子水配制后 0.122 Lm 滤膜过滤, 添加 3% (20% 小牛血清 (Hyclone 产品)), 4℃ 冰箱保存备用。

1.4 血细胞培养及部分生物学现象观察 用 10 mL 注射器吸入 91.5 mL 培养基, 再抽入 0.15 mL 鲎血, 缓慢颠倒注射器, 使血细胞均匀分散于培养基中。迅速拔掉针头, 将注射器内容物注入 2 个培养皿 (各 5 mL), 由于细胞太密, 以后每隔 4~6 d 把每皿的细胞取出一半放入新皿中培养, 加入新鲜培养基 (含鲎血清 10%)。或将血液离心 (800 r/min, 3 min) 后收集血细胞团块, 将团块放入培养基小心吹打, 即有大量细胞游离出来, 弃去细胞团块后可正式培养。用倒置显微镜成像系统 (Nikon TE2000U, 日本) 对血细胞的运动、变形和脱颗粒现象等进行观察并拍照。

2 结果与讨论

2.1 培养条件对血细胞存活的影响

本研究用 L215 (2@) 培养基培养中国鲎血细胞。添加小牛血清和中国鲎血清对血细胞存活有明显的作用 (表 1)。

收稿日期: 2006205212 修订日期: 2007212203

基金项目: 广东省自然科学基金 (04011209); 深圳市科技计划项目 (03KJ6044) 资助

作者简介: 金刚 (1965), 男, 汉族, 湖北当阳人; 研究员, 博士; 研究方向为水生生物学和生物技术

通讯作者: 金刚, E-mail: jingang@oa.szpt.net

在培养 60d 时, 添加小牛血清在 10%) 20% 时, 鲎血细胞仍有一定的活细胞数量, 说明培养基中一定浓度的小牛血清对鲎血细胞较长时间存活非常重要, 血清浓度在 15% 时, 存活率最高。相同浓度的小牛血清和鲎血清相比, 鲎血清的效果较好。要指出的是, 培养时间到了 20d 后, 细胞裂解的数量开始增多, 细胞碎片会影响细胞的计数。

表 1 添加不同小牛血清和鲎血清浓度下细胞存活率
Tabl 1 Viability of *Ta dypheus tridentatus* anebocytes under different calf serum and the crab serum concentrations (%)

培养时间 Culture days (d)	小牛血清浓度和中国鲎血清浓度 Calf serum and the crab serum (h) concentrations (%)						
	0	5	5 ^h	10	10 ^h	15	20
5	351.5	481.7	501.8	621.3	731.6	641.6	551.2
10	281.3	431.5	471.9	451.6	501.5	431.2	411.1
20	201.1	271.4	301.6	211.5	311.4	261.8	221.8
30	0	121.6	211.4	101.6	231.4	151.5	131.7
60	0	0	11.7	31.6	61.8	51.7	41.2

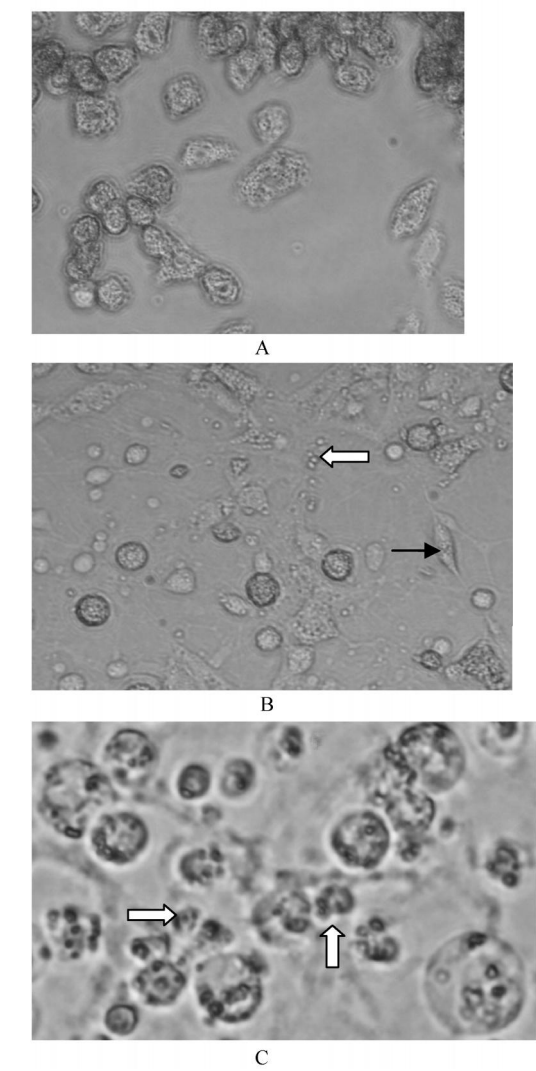
徐德源等^[9]采用 4 种培养基 (TNM2FH、 IPLB241、 BML2TC10 和 RPMI1640) 对中国鲎血细胞进行培养, 发现 TNM2FH 效果最好, 细胞存活可达 202d 以上。其他 3 种只能使细胞存活 39) 43d。由于没有细胞存活率数据, TNM2FH 究竟是不是鲎血细胞群体存活最适宜的培养基, 无法作出结论。 Hurton et all^[5]为了摸索美洲鲎 *L1 pol2 yphanus* 血细胞适宜的培养条件, 采用了 6 种培养基: L2 15 2 @L215、 GM M (Gracps modified insect medium)、 GM (Gracps insect medium)、 IPL241 和 Insec2Xpress (无蛋白培养基)。在 7d 的培养过程中, 发现在 GM M 中, 血细胞形态基本保持体内状态 (即圆形), 细胞也没有脱颗粒现象, 存活率达 771 2%。而在其他培养基中, 血细胞形态变化很大, 脱颗粒量大, 存活率低。如 Gracps Insect Medium 存活率只有 351 1%。由此认为, 添加鲎血清的 GM M 是今后优化鲎血细胞培养基的候选者。但是, 7d 的培养时间是否太短, 血细胞是否增殖, GM M 对中国鲎血细胞培养怎样? 这些问题都值得研究。

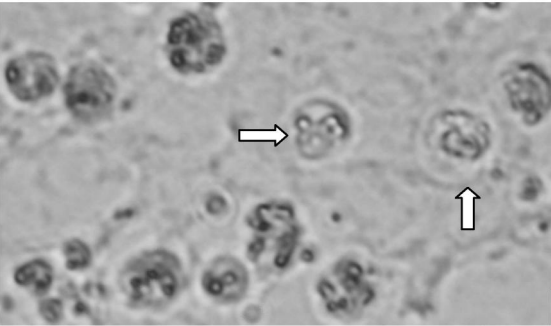
21 2 变形与脱颗粒现象

鲎体内的血细胞呈圆形 (直径约 10) 20Lm), 从体内抽出后置入培养板约 10m in 就有少数细胞开始变形, 从圆形变成三角形、棒形或者不规则的多变形 (纵长有的达 80Lm)。 30m in 后, 变形的细胞越来越多。变形的细胞在形态上一般比圆形细胞要大, 且贴壁。因细胞密度大而分瓶培养时, 用 01 02% 胰酶消化约 10) 15m in 贴壁的细胞会悬浮。

在操作过程中, 中国鲎血细胞极易脱颗粒, 在鲎血或鲎血离心后的团块进入培养基后即发生脱颗粒现象, 在培养的前几天尤为明显 (图 1)。美洲鲎循环血中也只有一种细胞形态 颗粒血细胞, 在免疫系统中是最重要的角色^[11]。这些颗粒由具有免疫效应的蛋白质和肽组成, 几乎充满细胞质。细菌脂多糖 (LPS) 等特异性的促分泌素能够诱导血细胞脱颗粒^[12]。 LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的基本成分, 以前认为只有革兰氏阴性细菌才有 LPS, 后来发现, 在无菌培养条件

下, 真核绿藻 (*Chlorella* , strain NC64A) 也有类似 LPS 的分子, 并能够引起血细胞颗粒的外吐^[11]。本实验过程中, 常常观察到血细胞的脱颗粒现象, 具体原因还不清楚, 值得今后继续研究。





D

图 1 中国鲎血细胞培养过程中的形态变化 (@400)

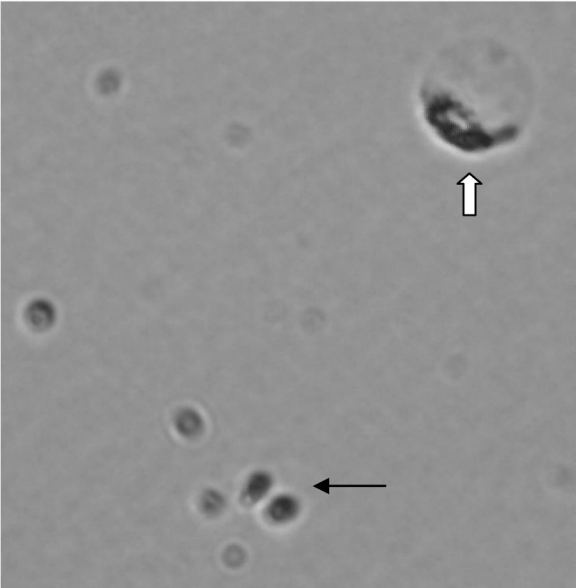
Fig1 Changes in the cell shape during culture of *Tachypleus tridentatus* anebocytes (@400)

A1 中国鲎血细胞培养第 1 天; B1 中国鲎血细胞培养第 2 天 (白色箭头示脱颗粒; 黑色箭头示变形); C1 中国鲎血细胞培养第 10 天 (白色箭头示细胞裂解成碎片); D1 中国鲎血细胞培养第 20 天 (Trypan 染色, 白色箭头示部分细胞存活)

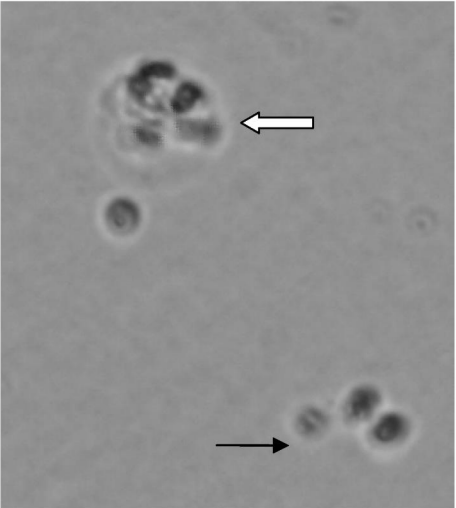
A1 The cell shape in the first day of culture B1 Cells in the second day of culture showing degranulation and transfiguration C1 In the tenth day of culture, many cells broken into fragments D1 In the twentieth day of culture, a small population of the cells is living by Trypan dyeing

21.3 培养血细胞的移动

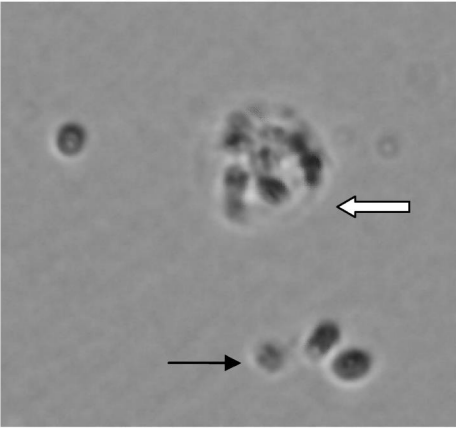
在中国鲎血细胞培养过程中, 常常观察到它们的运动。血细胞的运动有两种方式, 一种是以细胞中心为轴心的旋转, 另一种是明显的空间移动, 移动的速率可达 $6 \sim 8 \mu\text{m}/\text{min}^{[9]}$ 。在本实验中, 观察到移动细胞的空间位移和自身旋转 (从细胞质内颗粒的状态变化来看), 细胞的运动包含了上面的两种方式 (图 2)。



A



B



C

图 2 中国鲎血细胞培养过程中的运动轨迹 (@400)

Fig2 An anebocyte of *Tachypleus tridentatus* is moving (@400)

A1 0min; B1 12min后; C1 55min后; 白色箭头示移动中的细胞, 黑色箭头示相对固定的参照物

A1 At the beginning of observation B1 After 12 min; C1 55 min later white arrow showing the moving cell black arrow showing the still background

21.4 血细胞分裂问题

我们开展血细胞培养的目的, 是想从血细胞中找到造血干细胞, 从而能够有效地扩增血细胞。但是在反复多次培养过程中, 对中国鲎血细胞进行长时间观察, 均未发现分裂现象。结合其他研究可以推测, 鲎循环血中造血干细胞数量极其稀少或者没有。通过常规培养来扩增鲎血细胞数量是非常困难的。

致谢:

清华大学深圳研究生院蔡中华博士、厦门大学洪水根教授和华中农业大学研究生程文等给予帮助, 在此一并感谢。

参考文献:

[1] Smith S A, Berkson J Laboratory culture and maintenance of the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) [J]. *Lab Animal*, 2005, 34 (7): 27) 34

[2] Iwanaga S The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2002, 14 87) 95

[3] Bang F B A bacterial disease of *Limulus polyphemus* [J]. *Bull Johns Hopkins Hosp.*, 1956, 98(5): 325) 351

[4] Levin J, Bang F B The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood [J]. *Bull Johns Hopkins Hosp.*, 1964, 115 265) 274

[5] Hurton L V, Berkson J M, Smith S A Selection of a standard culture medium for primary culture of *limulus polyphemus* amoebocytes [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2005, 41 (10): 325) 329

[6] Frieberg J A, Weathers P J, Gibson D G III Culture of amoebocytes in a nutrient mist bioreactor [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, 28A: 215) 217

[7] Chen I J, Hong S J, Chen Y M, et al Cultivation of horseshoe crab amoebocytes [J]. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 1989, 5 515) 521

[8] Ding J L, Kim J C, Ho B Pokeweed mitogen stimulates DNA synthesis in cultured amoebocytes of *Carcinoscorpius rotundicauda* [J]. *Cytobios*, 1988, 55: 147) 154

[9] Xu D Y, Zhou S J, Yu G D, et al Primary culture of amoebocytes of *Tachyplesus tridentatus* Leach [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1987, 8: 623) 625 [徐德源, 周水娟, 余国定, 等. 中国鲎 (*Tachyplesus tridentatus* Leach) 变形细胞原代培养的研究. 科学通报, 1987, 8: 623) 625]

[10] Chen I J, Chen Y M, Hong S J et al Morphological changes of horseshoe crab amoebocytes during in vitro cultivation [J]. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 1986, 2: 769) 773

[11] Pardy R L, Armstrong P B. Response of the blood cell of the American Horseshoe crab, *Limulus polyphemus* to a lipopolysaccharide like molecule from the green alga *Chlorella* [J]. *Biol Bull*, 2001, 201: 246) 247

[12] Armstrong P B, Rickles F R. Endotoxin induced degranulation of the *Limulus* amoebocyte [J]. *Exp. Cell Res*, 1982, 140 15) 21