

圆背角无齿蚌血细胞培养

石安静¹ 邱安东¹ 唐 敏¹ 余燕萍¹
张洪渊¹ 町井 昭²

(1 四川大学, 成都 610064; 2 日本山胜珍珠养殖研究室)

摘要: 用新设计的培养基培养了圆背角无齿蚌的血细胞, 在倒置相差显微镜下进行了活体观察及扫描电镜摄影。发现培养的血细胞有无颗粒细胞、颗粒细胞、透明细胞和类淋巴细胞。前三者均能伸出长的伪足和突起, 与瓶壁紧密贴附, 呈体外培养的成纤维细胞性型; 后者呈圆形, 不与瓶壁贴附; 四者的比例约为 4:2:3:1。在活体内注射或在培养基上加入 PHA 和 ConA, 培养 2—7d 中, 每天取部分供加入秋水仙素, 用空气干燥法制片, 作染色体观察, 但未观察到转化细胞和有丝分裂相。研究结果表明, 圆背角无齿蚌的颗粒细胞、无颗粒细胞和透明细胞在体外贴附玻璃表面的特征与高等动物的巨噬细胞类似。而不贴瓶的圆形细胞与高等动物的淋巴细胞类似。但在体外培养均不能繁殖, 它们可能是高度分化的细胞。

关键词: 圆背角无齿蚌; 血细胞; 培养

中图分类号: S966.224 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2001)02-0116-07

动物血细胞在体外培养已开展非常普遍, 这是由于取血比其它组织细胞更容易, 它既少影响动物的正常生理功能, 又可多次抽取同一个体的血液进行反复实验。脊椎动物的外周血在体外用植物凝集素(PHA)进行刺激可使淋巴细胞进入分裂周期而得到大量的分裂相, 所以该技术已成为细胞遗传学和实验肿瘤学研究等常用技术。

贝类的细胞培养开展极少, 日本町井昭曾作过海产的阿古屋贝外套膜的组织培养^[1], 石安静曾报道了三种淡水贝外套膜的组织培养及染色体研究和河蚌钩介幼虫的原代细胞培养^[2-4]。河蚌血细胞的培养国内外还鲜见报道。这一方面是由于河蚌血液无色, 没有可见的血管, 不便从血管抽取, 而心脏又为薄膜状, 为开放式血循环, 要抽取能供细胞培养的血液十分困难, 而且河蚌心脏在近壳顶处, 从心脏抽血时, 从外套膜不断有水往下流, 非常容易污染。过去河蚌体液渗透压尚未见借鉴资料, 配制的培养基难以适合其生长。所以作者通过测定河蚌体液渗透压后并根据体液氨基酸测定, 新设计了培养基, 改进了取血方法, 进行了血细胞的体外培养, 期望为淡水贝类血细胞的形态、结构、分类和功能的研究提供有益的资料。

收稿日期: 1998-07-02; 修订日期: 2000-03-22

基金资助: 国家自然科学基金资助项目 编号: 39770586

作者简介: 石安静, 女, 重庆市梁平县人; 教授; 主要从事淡水贝类的研究

1 材料和方法

1.1 材料 使用中国广泛分布、尚能产珍珠的圆背角无齿蚌(*Anodonta woodiana pacifica* Heude),采自成都郊区大面铺池塘。

1.2 渗透压测定 用日本第一科学(厂)生产的渗透压仪(Osmostat OM-6020)测定的圆背角无齿蚌体液渗透压为42 Osm/kg。

1.3 培养基配制 平衡盐溶液配制同文献^[5]。培养基氨基酸成分根据河蚌体液氨酸测定结果,与Morgan等设计的199综合培养基相比,增加(mg/L)牛磺酸3.70;磷酸丝氨酸8.00;鸟氨酸13.20;氨基丁酸20.60;天门冬酰胺7.90;而减少了L-胱氨酸、L-谷氨酸、L-麦酰胺、甘氨酸、L-蛋氨酸、L-脯氨酸、L-羟脯氨酸。培养基中维生素(mg/L)加入偏多酸钙10;氯化胆碱12;叶酸10;菸酰胺10;盐酸吡哆醇10;肌醇20;核黄素0.1,维生素B₁₂10;维生素C20。综合培养基每100mL加胎牛血清0.1mL,青霉素、卡那霉素各100(μg/L)。

1.4 血细胞培养 因心脏取血易污染改为从闭壳肌取血,每只蚌抽取5—10mL。用75%乙醇消毒闭壳肌以后,将注射器插入闭壳肌,慢慢抽取血液,注入培养瓶,放置1—2h,再用吸管将血清吸出,加入培养基,27℃恒温箱中培养。培养的血细胞用倒置相差显微镜作活体观察及摄影。

1.5 注入或加入有丝分裂原的培养 注入有丝分裂原的培养是在取血前1d和2d在蚌的内脏团中注入PHA或ConA(刀豆蛋白A)各0.5g(用蚌平衡盐溶液溶解为1mL),然后从闭壳肌取血进行体外培养。加入有丝分裂原的培养是取血前不作任何处理,而在培养基中加入最终浓度为0.02—0.2mg/mL PHA或ConA,取血细胞培养2—7d,每天取一批,于终止前6—12h加入秋水仙素(最终浓度为0.02μg/mL),然后用蒸馏水低渗,卡洛液固定,用空气干燥法制备染色体。

1.6 扫描电镜观察 将培养4—6d的血细胞振摇或用吸管吹打下来,倒入离心管,以500—800r/min离心5min,用滤纸吸去多余的液体,用1%的戊二醛(4℃)预固定2h,用磷酸缓冲液洗3次,1%锇酸后固定1h,逐级丙酮脱水,醋酸异戊酯置换丙酮,作临界点干燥,喷镀碳金后,在扫描电镜下观察。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜的活体观察

培养0.5h的血细胞,许多已贴于瓶底,轻摇培养瓶,细胞只略微晃动而不再悬浮,此时细胞基本上为圆形,个别伸出了短的伪足。培养2—3h后,多数细胞边缘伸出了较长的突起,已与瓶壁较好贴附,摇动培养瓶,不再晃动,仔细观察已伸出伪足的细胞能借突起的伸长在玻璃表面缓慢移动。

培养24h,绝大多数细胞已伸出长的伪足并互相连成网状(图版I:1),细胞有时向相同一个方向伸出伪足,形成竹丛状(图版I:2),此时的细胞立体感强,已与瓶壁紧密贴附,从形态上可分为四类:①无颗粒细胞:胞体伸展很长,胞质中看不见颗粒,类似离体培养的实体组织的成纤维细胞;②颗粒细胞:胞质中有许多大小不等折光性强的圆形粗大颗粒

(图版 I:5),胞体伪足较无颗粒细胞短,但数量多;③透明细胞:胞体铺展宽大、扁平,呈透明状(图版 I:3,↑);④类淋巴细胞:圆形,胞核大,核外仅包被一薄层胞质,整个细胞折光性强,有的有短的伪足,但一直不与瓶壁贴附,常附着于颗粒细胞和无颗粒细胞伸出的伪足旁边(图版 I:1、2,↑)此类细胞具脊椎动物典型的淋巴细胞形态。几种细胞的比例约为4:2:3:1。在血细胞密集的地方,也有些细胞形成类似培养的上皮细胞片,细胞有短的伪足或突起,但细胞间的空隙仍较一般体外培养的实体组织的上皮细胞为宽(图版 I:6)。

培养3—4d时,部分细胞的胞质更加铺展,细胞变得扁平,而部分细胞的伪足则缩短,细胞相互靠拢,常形成折光性强的细胞团(图版 I:3、4,↑)。培养5—6d后,绝大多数细胞收回伪足和突起,而逐渐变圆,贴壁能力减弱而易浮动,这种半悬浮、悬浮状态可持续10—15d,以后细胞逐渐解体,细胞数量减少(图版 I:7)。

2.2 扫描电镜观察

扫描电镜下也观察到血细胞有颗粒细胞、无颗粒细胞、透明细胞和类淋巴细胞四种。类淋巴细胞略小,呈球形,表面有微小皱折或沟纹(图版 II:8,↑);无颗粒细胞常在一侧伸出许多树根样的粗大突起,胞体呈现凹凸不平的沟或谷(图版 II:9);颗粒细胞呈球形时,从表面几乎能清楚数出包在细胞内的颗粒数目(图版 II:10),颗粒的大小变化很大,小颗粒直径约为0.5μm;大颗粒直径可达1.5μm(图版 II:9)。颗粒细胞有脱颗粒现象。当细胞脱颗粒时,常在未脱颗粒的一侧(图版 II:11,↑)伸出长的放射状伪足,脱去颗粒一侧,胞质铺展呈多皱折的叶片状(图版 II:11,↑)。当颗粒脱完后,细胞铺展呈不规则的多层次花瓣状(图版 II:12)。当脱颗粒时,颗粒呈球形,大小均匀,脱出的颗粒一般离开细胞而不粘附于细胞表面(图版 II:11,12)。而当颗粒小、颗粒形状大小不规则时,细胞脱出的颗粒几乎都粘附在细胞表面(图版 II:8,↑)。

2.3 活体注入或加入 PHA、ConA 的血细胞培养

在活体内注入 PHA、ConA 有丝分裂原,然后取血和在培养基中加入多种不同浓度的 PHA 和 ConA,培养细胞2—7d中,每天取一批中止培养,经过低渗、固定后滴片,观察到约有1/5的细胞核完全固缩,被Giemsa均匀染成深蓝色,有4/5的细胞核染成浅紫红色,染色质较疏松,异染色质呈点状或丝状。然而所有标本中均未见细胞核体积变大、发生转化、形成棒状染色体的细胞核,更未见有丝分裂相。

3 讨论

3.1 脊椎动物的全血培养或分离的淋巴细胞在体外培养时,均为悬浮型^[6]。而作者培养的圆背角无齿蚌的血细胞除少数组细胞核大、胞质少、圆球形、不贴附玻璃瓶的类淋巴细胞外,其余的血细胞包括无颗粒细胞、颗粒细胞和透明细胞均可贴附于玻璃表面,呈体外培养的成纤维细胞型(图版 I:1—4)。已有研究表明,脊椎动物体外培养细胞除实体组织的细胞外,具游走性的细胞中,只有巨噬细胞和其前身——单核细胞,在体外具贴附玻璃和塑料表面的特性^[7]。因而常用此法来分离巨噬细胞进行体外培养,体外培养的巨噬细胞在2—3h失去圆球形,附着在玻璃表面,变成扁平状,伸出大量伪足,用相差显微镜容易看到扁平极薄的胞质外缘扩展为皱折,进行连续的波浪式运行。当细胞拥挤、彼此接触时,伸出短的伪足,彼此粘着类似上皮,从培养瓶表面剥下来时可成为一层很坚固的不破坏的

膜^[8]。从圆背角无齿蚌贴瓶的血细胞的特点来看,起初为圆球形,2—3h后紧贴玻璃瓶表面,有活跃的变形运动,细胞密集时形成类似培养的上皮细胞型。这些特征都与体外培养的巨噬细胞相同。因此,作者认为圆背角无齿蚌的血细胞中除少数类淋巴细胞外,大量的脊椎动物血细胞中很少而在疏松结缔组织及其它组织中较多的巨噬细胞,这表明贝类可能由于无体液免疫,只有细胞免疫,因而在血液中有大量在免疫中起重要作用的巨噬细胞。这种巨噬细胞数量很多,其吞噬功能可能在贝类免疫中起着主导作用。

3.2 在扫描电镜下观察到圆背角无齿蚌的颗粒细胞中含有粗大颗粒和小颗粒,并有脱颗粒现象。在脊椎动物血细胞中,现知道只有嗜碱性粒细胞和肥大细胞的胞浆中有粗大的颗粒,并具有脱颗粒作用,它们的脱颗粒作用是一种主动过程,通常不破坏细胞,脱颗粒的机制是机体接受引起超敏反应的变应原刺激后,有些个体在体内能产生 IgE 类抗体,IgE 与肥大细胞和嗜碱性粒细胞结合,当相同变应原再次入侵时,与细胞表面的 IgE 特异结合形成复合物,该复合物能激活肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒。从排出的颗粒中释放出一系列生物活性物质,如组胺、白三烯、激肽等,而引起毛细血管扩张、血管壁通透性增加、平滑肌收缩、腺体分泌增多等超敏反应^[9]。培养的血细胞在扫描电镜下观察到了脱颗粒的一系列形态变化,即尚未脱颗粒、脱去部分颗粒、脱去全部颗粒后细胞完好呈铺展的多皱折状态,均表明脱颗粒是一种主动过程,细胞并不破坏。至于脱颗粒的原因及机制,由于贝类体内不产生抗体,那么脱颗粒作用是受什么刺激后而发生? 颗粒中含有什么生物活性物质? 深入研究这些问题对贝类免疫机理的阐明是十分有意义的。

3.3 贝类血细胞的分类一直分歧很大,有人将其分为三类:无颗粒细胞、微小颗粒细胞、粗大颗粒细胞^[10],也有人将其分为四类:颗粒细胞、无颗粒细胞、透明细胞、浆细胞,还有人将其分为八类,甚至几十类^[11],至今无统一命名。从圆背角无齿蚌血细胞培养在倒置相差显微镜下作活体观察和用扫描电镜观察后表明,圆背角无齿蚌血细胞有四种类型:(1)类淋巴细胞:圆球形,不贴附玻璃表面,胞核大,胞质少仅外绕核一薄层,无颗粒,这些特征均为脊椎动物淋巴细胞相似。由于贝类尚未发现淋巴组织,因此称类淋巴细胞比较恰当。(2)透明细胞:能紧贴玻璃表面,胞体宽大、扁平,呈透明状。(3)颗粒细胞:胞质中有大小不等的粗大颗粒。(4)无颗粒细胞:形态特征略与颗粒细胞相同,只是胞质中无颗粒。颗粒细胞中的颗粒大小、数量本身相差是比较大的,因此将其分为粗大颗粒细胞和微小颗粒细胞不是很确切的。至于有人在贝类血细胞分类中分为浆细胞,因浆细胞在高等动物体液免疫中是产生抗体的细胞,而无脊椎动物不产生抗体,所以作者认为贝类血细胞命此名不甚妥当。

3.4 植物凝集素(PHA)和刀豆蛋白 A(ConA)是常用的有丝分裂原,与脊椎动物外周血淋巴细胞共同孵育可刺激静止的 T 淋巴细胞转化为淋巴母细胞,合成 DNA,进行有丝分裂。这是由于 T 淋巴细胞表面有 PHA、ConA 相应的表面受体。脊椎动物的巨噬细胞在体外培养也不能繁殖,被认为是高度分化的缘故。对圆背角无齿蚌的血细胞在培养前活体注入 PHA、ConA 和在离体培养过程中加入多种浓度的 PHA、ConA,均未见细胞转化和有丝分裂相,一方面表明其血细胞可能无此两种有丝分裂原的受体,另一方面也可能是因为细胞已高度分化,在离体条件下也不能繁殖。到底是什么原因还有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] 町井 昭. 真珠の培养研究[J]. 组织培养. 1977,3(4):96—105

- [2] 石安静. 河蚌外套膜的组织培养[J]. 水产学报, 1983, 2(2): 153—158
[3] 石安静. 中国几种淡水育珠蚌染色体的研究[J]. 四川大学学报, 1980, (4): 88—91
[4] 石安静. 人工育珠蚌钩介幼虫的原代细胞培养[J]. 四川大学学报, 1983, (4): 169—175
[5] 石安静, 余燕平, 町井 昭. 河蚌体液渗透压测定及新设计的平衡盐溶液的组织培养[J]. 四川大学学报(自然科学版), 1994, 31(专辑): 189—193
[6] 鄂 征. 组织培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 8—9
[7] 成令忠主编. 组织学与胚胎学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992
[8] G. D. Wasley 编(何申等译). 动物组织培养技术[M]. 北京: 科学出版社, 1982
[9] 郑武飞编. 医学免疫学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 91—180
[10] 船越将二. アコヤガイの血球について[J]. 国产真珠研究所报告. 1974, 18: 2140—2147
[11] 陈竞春 石安静. 贝类免疫生物学研究概况[J]. 水生生物学报, 1996, 20(1): 74—78

HEMOCULTURE OF ANODONTA WOODIANA PACIFICA

SHI An-jing¹, QIU An-dong¹, TANG Min¹,

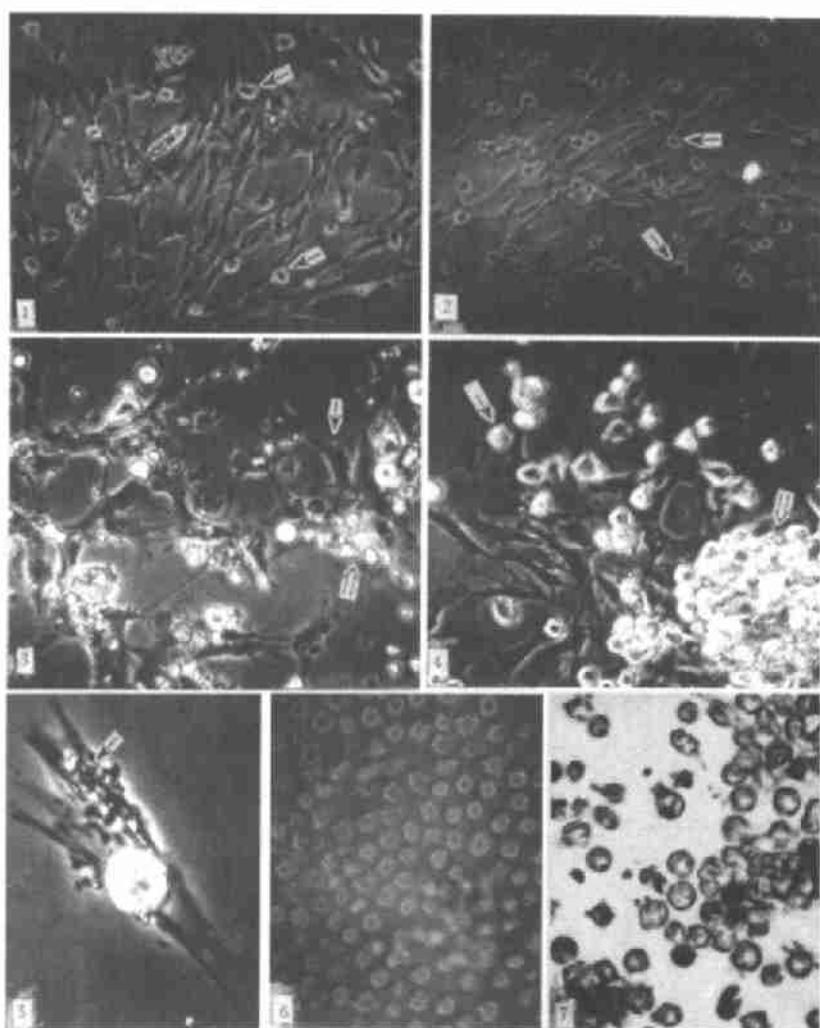
YU Yan-ping¹, ZHANG Hong-yuan¹ and Akira Machii²

(1 Biology Department, Sichuan University, Chengdu, 610064;

2 Research Office of Freshwater Pearl Culture Breeding, Shansheng, Japan)

Abstract: Using the newly designed culture medium for the cell and tissue culture of fresh-water bivalves, the hemolymph from the oyster, *Anodonta woodiana pacifica* (Heude), has been cultured in vitro. Four different kinds of hemocytes in the cultured hemolymph can be observed with phase contrast microscopy: agranulocytes, granulocytes, hyalinocytes and lymphoidocytes. Agranulocytes, granulocytes and hyalinocytes are fibroblast-like and can form long pseudopods and extensions and adhere to the culture bottle wall tightly. Lymphoidocytes are always round and never adhere to the bottle wall. The proportion of the four kinds of hemocyte is 4:2:3:1. PHA and ConA were injected into the oyster before withdrawing the hemolymph, or these molecules were added to the culture medium of hemolymph, and the hemolymph were cultured for 2—7 days. Every day, part of the cultured hemolymph was taken out for the treatment of colchicine and hypotonic solution, and the observation of mitotic chromosomes by air-drying technique. However, no mitotic figure was observed. It can be concluded that the in vitro adhering properties of granulocytes, agranulocytes and hyalinocytes of the freshwater pearl oyster, *Anodonta woodiana pacifica*, are the same as those of macrophages of the higher animal, and lymphoidocytes of the freshwater oyster, which never adhere to the bottle, morphologically like lymphocytes of the higher animal. All of the four kinds of hemocytes cannot proliferate when cultured in vitro, which is probably because they are highly differentiated cells.

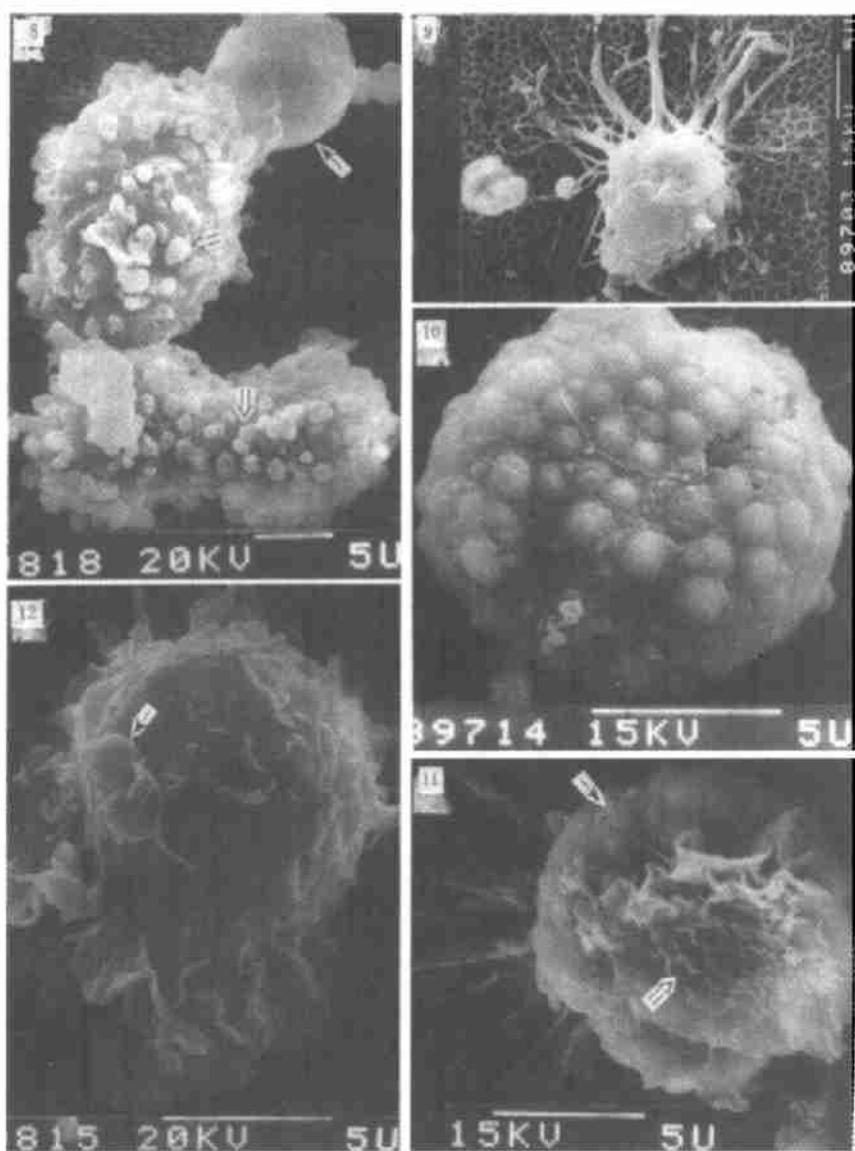
Key words: *Anodonta woodiana pacifica*, Hemocyte, Culture



图版 I

1. 示培养1d呈网状的血细胞及圆形的类淋巴细胞(↑), $\times 200$;2. 培养1d呈竹丛状的细胞, $\times 150$;3. 培养3d胞体更
加铺展,部分细胞伪足缩短形成细胞团(↑),↑示透明细胞, $\times 250$;4. 培养4d,示折光性强的细胞(↑)增多,↑示细胞
团增大, $\times 300$;5. 培养2d的颗粒细胞,↑示圆形颗粒, $\times 1500$;6. 培养3—4d,示类似上皮的细胞片, $\times 250$;7. 培养
15d,细胞变圆呈悬浮态, $\times 500$ 。

1. Many of hemocytes extend the pseudopods which join together to form webs and a few lymphoidocytes are still round after having been cultured for 24h, $\times 200$; 2. After having been cultured for 24h, some hemocytes extend their pseudopods to the same direction to form silk-like structures. ↑ shows the round lymphoidocyte, $\times 150$; 3. After having been cultured for 3 days, the hemocyte become flatter, and the pseudopods of some hemocytes shorten to form cell dumplings (↑). ↑ showing the hyalinocyte, $\times 250$; 4. After having been cultured for 4 days, the number of strong defrahesive hemocytes (↑) increases, and the cell dumplings become larger (↑), $\times 300$; 5. The granulocytes cultured for 2 days, ↑ showing the round granules, $\times 1500$; 6. After having been cultured for 3—4 days, tightly connected hemocytes form analogy of the epithelial cell flakes, $\times 250$; 7. After having been cultured for 15 days, hemocytes become round, small and floating, $\times 300$.



图版 II

8. ↑示颗粒细胞,↑示类淋巴细胞;9. 无颗粒细胞;10. 未脱颗粒的球形细胞;11. ↓胞体脱去颗粒呈叶片状,↑示未脱出的颗粒;12. 示脱完颗粒呈花瓣状的细胞,↑示已脱出尚未离开胞体的颗粒。

8. ↑ showing the granulocyte, and ↑, the lymphoidocyte; 9. Agranulocytes; 10. Round granulocytes without the loss of their granules; 11. ↓ showing the granules in the hemocyte, and ↑ that the hemocyte having lost their granules become leaf - like ; 12 . The petal - like hemocytes which have lost all their granules , ↑ showing the lost granules , and a few have not separated from the hemocyte completely.