

河蟹 MTXO 细胞的离体培养和细胞学研究

孙金生 刘安西 陈家童 贺秉军 王秀玲 郭世宜 王亦农

(南开大学生物学系, 天津 300071)

摘要: 对河蟹眼柄神经分泌细胞的细胞学进行了研究, 建立了河蟹眼柄视神经节终髓 X 器官 (MTXO) 细胞原代培养的实用方法。MTXO 神经分泌细胞在添加了谷氨酰胺和常量抗菌素的 L-15 培养基中表现出快速的再生生长, 细胞生长可保持 3—5d, 维持存活约 18d。在 pH6.8—7.8、温度 20℃—28℃ 及渗透压 950—1100mOsm 条件下, 均能存活和生长, 但在无 Ca^{2+} 或添加 Ca^{2+} 通道阻断剂 CdCl_2 的培养基中不能生长。依据大小、形态、分布和超微结构特征及体外生长方式区分出 A、B、C 三种不同类型细胞。

关键词: 甲壳动物; 中华绒螯蟹; X 器官; 神经分泌细胞; 超微结构; 细胞培养

中图分类号: 968.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2000)04-0374-06

眼柄视神经节 X 器官-窦腺复合体是甲壳动物重要神经内分泌器官, 它接受体内外环境的变化, 影响内分泌系统, 调控着甲壳动物的生殖、发育和蜕皮等重要生理功能^[1]。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis* H. Edwards) 俗称河蟹, 是我国重要经济蟹类之一, 对这一系统的研究将有助于解决河蟹养殖中的性早熟现象和成蟹养殖个体规格小等问题, 但目前关于此系统的一些基础问题尚不清楚。甲壳动物 X 器官神经分泌细胞多分布于终髓, 在不同种类中分布不同, 但多限于组织学观察^[2-4]。甲壳动物神经细胞培养始于 80 年代, 成功的报道甚少^[5], 神经分泌细胞离体培养的成功报道仅见于热带地蟹和龙虾^[6, 7]。我国对甲壳动物神经内分泌的研究刚刚开始^[8], 尚未见甲壳动物神经细胞培养的报道。作者对河蟹眼柄视神经节终髓 X 器官 (Medulla terminalia X organ, MTXO) 神经分泌细胞的超微结构作了较全面的观察, 并进行了体外分离和培养实验, 以期为认识这一系统的活动规律和神经分泌调控打下基础, 同时为河蟹养殖生产实践研究提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 动物和解剖 实验蟹取自天津市宁河县仁凤乡河蟹养殖场, 置室内水泥池暂养。选取一龄、二龄未成熟和成熟的健康雌蟹, 经 1:30 碘伏浸泡消毒 20min 后, 在 TJ-1 型超净工作台中切下眼柄。取下的眼柄经酒精消毒和无菌河蟹生理盐水 (210mmol/L NaCl; 13.6mmol/L KCl; 3.8mmol/L MgCl₂; 2.6mmol/L Na₂SO₄; 10mmol/L Hepse; 1mg/mL 庆大霉素, pH7.5。按 Van Harreveld 的配方改进^[9]) 冲洗三遍后, 在无菌生理盐水中剥离外

收稿日期: 1999-08-14; 修订日期: 2000-04-10

作者简介: 孙金生 (1965—), 男, 天津人, 博士研究生, 研究方向: 甲壳动物神经内分泌学。

骨骼、肌肉和一些连接组织, 取出视神经节, 并沿窦腺的轴路(图版 I: 1), 在视神经节终髓取出 MTXO。

1.2 电镜样品制作 供电镜观察 MTXO, 先于 4% 戊二醛固定 2—3h, 再经 1% 铁酸固定 1.5h。样品经丙酮系列脱水后, 于 Epon812 包埋, 瑞典 LKBV 型超薄切片机切片, Philips EM400ST 电镜下观察、记录。

1.3 分离、培养用液 消化酶液为溶解于无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 生理盐水的 0.3% 胰蛋白酶(Sigma 产品), 生理盐水中的 CaCl_2 和 MgCl_2 由 NaCl 代替。培养液为 L-15 培养基与等量 1.75 倍河蟹生理盐水的混合液($\text{pH}7.5$), 临用前加入 0.1mg/mL 庆大霉素、150mmol/L 葡萄糖和 1mmol/L 谷氨酰胺。

1.4 细胞的体外分离和培养 已彻底剔除结缔组织的 MTXO 于黑暗条件下, 在 0.3% 的胰酶消化液中, 于 24℃ 振动消化 1.5h, 然后加入 2 倍体积的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 生理盐水终止胰酶的消化过程。将酶消化的 MTXO 移入 35mm 塑料培养皿中, 在 0.5mL 的培养液中搅动打散细胞, 静置 30min, 待细胞贴壁后, 将培养液加至 2mL, 于 24℃—26℃、黑暗、潮湿条件下培养。培养细胞在 Olympus 倒置显微镜相差条件下观察和记录结果, 细胞大小以显微标尺测量。

1.5 培养条件 河蟹 MTXO 神经分泌细胞的常规培养不需添加或更换新鲜培养液。改变培养基和培养条件(不同的温度、 pH 和渗透压)均在细胞贴壁 1h 后进行。无 Ca^{2+} 培养液中的 CaCl_2 由 NaCl 代替, 并加入 1.0mmol/L EGTA 中和 L-15 培养基中的 Ca^{2+} 。 Ca^{2+} 通道的特异性阻断剂 CdCl_2 的添加量为 0.5mmol/L。在原培养基中添加无离子水或 0.2g/mL 的 KCl, 降低或提高培养液的渗透压(100mL 的培养液中加入 0.2g/mL 的 KCl 0.2mL, 渗透压升高 10mOsm; 加入 2.78mL 去离子水, 渗透压降低 10mOsm^[10])。

2 结果

2.1 河蟹 MTXO 神经分泌细胞的体外分离和离体生长

河蟹 MTXO 主要由一群相互无连接的神经分泌细胞组成, 胶质细胞较少, 因此, 消化酶的浓度不能太高, 不能用吸管吹打等剧烈方法打散细胞。作者采用 0.3% 的胰酶消化 1.5h, 在少量培养基(35mm 培养皿中一般不超过 0.5mL)中搅动打散的方法, 每个河蟹 MTXO(在一个直径 35mm 培养皿中)可获得 105 ± 16 个、大部分存在轴突残根的体外分离细胞(图版 I: 2), 静置 0.5h 后, 将培养基加至 2mL 继续培养。1h 之后未贴壁的细胞均属于酶消化和打散过程中受伤的细胞。虽然不经过酶处理也能将 MTXO 细胞打散, 但见不到分布于外层的 A 型大细胞, 分离的 B、C 型细胞数量也较少。贴壁细胞在仅添加了谷氨酰胺、葡萄糖和常量抗菌素的 L-15 培养液中表现出快速生长, 无轴突残根的细胞(不包括 B2 型细胞)离体不能生长。实验表明, 河蟹 MTXO 神经分泌细胞在所有塑料培养皿和 L-多聚赖氨酸包被的玻璃培养皿中均能贴壁, 贴壁后, 细胞的形状和大小无明显变化, 其轴突残根末端很快膨大(约 0.5—1h)(图版 I: 7), 并以此为生长点继续再生生长。贴壁后 3d, 细胞的形状已基本形成(图版 I: 4), 细胞生长可持续 3—5d, 一周左右细胞的轴突及其分支变粗, 形成了神经元的固定形状(图版 I: 5), 两周后细胞轴突开始萎缩, 细胞可保持存活 18d 以上。

2.2 河蟹 MTXO 神经分泌细胞的体外生长形态和细胞学观察

河蟹 MTXO 位于眼柄视神经节终髓基部外侧, 主要由神经分泌细胞及其轴突和少量神经胶质细胞组成。胶质细胞一般较小(胞体直径小于 10um), 呈不规则状, 细胞核相对较大, 核内异染色质多, 沿核膜内侧分布, 胞质密度较低, 可见一些长或椭圆型的线粒体(图版 I: 6)。在神经分泌细胞周围常观察到大量神经轴突, 轴突内可见微管、少量线粒体以及大小和特征不同的分泌颗粒(图版 I: 8)。神经分泌细胞胞质内多含有分泌颗粒, 依据大小、形状、分布和超微结构等特征可区分出 3 种类型分泌细胞(A、B、C 型)。这 3 种类型细胞的体外培养形态和生长方式亦存在明显差别, 其中 B 型细胞还可区分出 3 种亚型。A 型神经分泌细胞胞体直径为 30—40um(36.78 ± 6.25), 呈椭圆形或近圆形, 主要分布在 MTXO 的外表层, 在河蟹不同发育时期(一龄、二龄未成熟和二龄成熟雌蟹)均处于活跃状态, 即胞质内含丰富的分泌颗粒。超微结构观察结果表明, A 型神经元具有典型的神经分泌细胞特征, 其细胞器发达, 粗面内质网多, 呈囊状, 绕核周排列; 高尔基体丰富, 附近常聚集大量分泌颗粒; 线粒体数量多, 呈长杆状或椭球型, 脊发达; 细胞核相对较小, 异染色质很少, 几乎见不到(图版 II: 1)。体外培养的 A 型细胞胞体的大小和形状与活体细胞相似(图版 II: 2), 其体外培养时贴壁比较困难, 但贴壁后生长速度最快, 1d 后神经元的形态已基本形成, 生长保持 2—3d, 再生出的轴突长 50—80um, 轴突上无次生突起, 顶端突起呈树枝状, 同时胞体再生出一些树突。成熟的神经元一周后开始萎缩, 约保持存活 2 周。B 型神经分泌细胞胞体直径为 20~30um(24.32 ± 3.52), 主要分布在 MTXO 的内层, 近髓部的 C 型细胞群中亦有少量分布。其胞质内细胞器较发达, 可见少量小型空泡, 线粒体数量较多, 呈圆形或长杆状, 脊发达; 细胞核相对较大, 呈圆形, 核内异染色质较多(图版 II: 3)。体外培养的 B 型细胞大小与在体相似, 存在 3 种体外培养形态和生长方式, 可分为 3 种亚型(B1、B2、B3)。B1 型细胞为单极神经元, 胞体呈椭圆型, 表面光滑; 成熟细胞轴突长为胞体的 3~4 倍, 在轴突上次生出一些二级突起, 顶端突起呈缘膜状(图版 II: 4)。B2 型细胞胞体呈圆形, 亦为单极神经元, 轴突上无二级突起, 顶端突起呈树枝状(图版 II: 5); 无轴突残根细胞贴壁后呈星状再生, 无明显轴突(图版 I: 3)。B3 型细胞为多极细胞, 胞体近圆形, 表面呈波浪状, 成熟细胞胞体再生许多树突, 轴突上无二级突起, 顶端突起呈缘膜状(图版 II: 6)。C 型细胞属小型细胞(胞体直径为 $16.44 \pm 3.25\text{um}$), 数量最多, 胞体呈圆形或近圆形, 分布在 MTXO 的内层, 近髓部; 细胞核相对最大, 呈圆形, 核内异染色质多; 胞质中可见许多空泡, 线粒体数量多, 呈圆形或长杆状, 脊也较发达(图版 II: 7)。体外培养的 C 型细胞为单轴突细胞, 胞体呈圆形或椭圆型, 表面光滑; 成熟细胞轴突长为胞体直径的 5—10 倍, 轴突上无次生突起, 顶端突起呈树枝状(图版 II: 8)。

2.3 不同培养条件对细胞存活和生长的影响

在 $20^\circ\text{C} \sim 28^\circ\text{C}$ 温度范围内, 细胞都能正常贴壁, 26°C 条件下细胞维持生长和存活时间最长(18d 左右), 虽然在 28°C 条件下, 细胞贴壁和生长速度快, 但存活时间较短(8—10d)。 1010mOsm 是细胞存活和生长的最佳渗透压, 在 $950\text{—}1100\text{mOsm}$ 渗透压范围内细胞均能存活, 但在高渗透压条件下, 细胞膜较脆, 接触玻璃微电极后细胞容易破碎, 故不适合进行膜离子通道研究。细胞生长的最适 pH 为 7.5, 在 pH $6.8\text{—}7.8$ 的范围内细胞均能正常生长和存活。河蟹 MTXO 神经分泌细胞甚至在生理盐水中也能贴壁和生长, 但生长仅保持

2d, 2d 后轴突就开始萎缩, 细胞可维持存活 3—5d; 如果在生理盐水中添加谷氨酰胺、葡萄糖和庆大霉素, 细胞轴突可维持至 5d 后开始萎缩, 维持存活 6—8d。但在无 Ca^{2+} 或添加了 Ca^{2+} 通道电流阻断剂 CdCl_2 的培养基中, 细胞能贴壁而不能再生新的神经突, 生长明显受到抑制, 仅在轴突残根末端形成一帽状突起。

3 讨论

3.1 神经分泌细胞的体外生长机制

与海兔 (*Aplysia*)^[1]、凶狠圆轴 (*Cardisoma carnifex*)^[7] 和边缘龙虾 (*Panulirus marginatus*)^[6] 分泌肽神经细胞的体外培养结果一致, 河蟹眼柄 MTXO 细胞能在体外培养中快速生长并形成几种生长形态, 但在无 Ca^{2+} 或添加 Ca^{2+} 通道阻断剂的培养基中其生长受到抑制, 而升高培养温度可加速细胞的生长。这些结果表明, 神经轴突在体外培养中的再生与神经分泌颗粒的形成、运输和胞吐分泌过程有关, 因为 Ca^{2+} 是第二信使, 它的内流启动了细胞的分泌过程, 而培养温度的升高可能加速了 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ 依赖 ATPase 参与的神经颗粒沿微管的运输过程^[12]。关于神经细胞体外培养中神经突的再生机制目前尚无定论, 一些学者认为, 轴突再生是利用神经颗粒胞吐分泌后重新吸收的颗粒膜^[13], 本结果表明, 由于阻断细胞的胞吐分泌过程, 无重新吸收利用的颗粒膜, 河蟹 MTXO 神经细胞在体外不能进行再生生长, 进一步证明神经细胞可利用重新吸收的颗粒膜进行再生的假说。

3.2 甲壳动物神经分泌细胞种类和分布

在十足目甲壳动物不同种类中, X 器官神经分泌细胞种类和分布存在明显差别, 目前已观察到 2—6 种类型神经分泌细胞, 分布于眼柄视神经节的内髓、外髓和端髓^[2, 14, 15], 但视神经节中究竟有多少神经细胞属于 X 器官神经分泌细胞尚存在争议^[16, 17]。河蟹 X 器官的 5 种类型神经分泌细胞主要分布于眼柄视神经节终髓基部外侧, 在内髓亦有一些分布^[3], 但仅限于组织学观察。作者首次比较全面地观察了不同发育时期河蟹眼柄视神经节端髓神经细胞的超微结构, A 型细胞具有发达内质网和典型的神经分泌细胞特征—分泌颗粒, B、C 型细胞虽然不具有发达的内质网, 但一些细胞质中亦可观察到分泌颗粒, 而且在体外培养中也表现出快速生长。这些结果表明河蟹 MTXO 细胞均为神经分泌细胞, 这些类型细胞在多种培养条件下, 其形态特征等均不受影响, 表明不同种类甲壳动物神经分泌细胞种类和分布的差异与其生境和活动特征无关, 它代表了动物种群的固有特征。关于这些细胞的功能还需结合免疫标记方法进一步研究。

参考文献:

- [1] Keller R. Crustacean neuropeptides: structure, function and comparative aspects [J]. *Experimentia*, 1992, **48**: 439—448
- [2] 上官步敏, 李少菁. 锯缘青蟹 X 器官神经分泌细胞的细胞学研究 [J]. 海洋学报, 1994, **16**(6): 116—121
- [3] 康现江、米娅、孙辉健等. 中华绒螯蟹眼柄神经内分泌结构研究 I 神经分泌细胞的种类与分布 [J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 1998, (动物学专辑): 22—26
- [4] Bellon-Humbert C, Van Herp F, Strolenberg G E C M, et al. Histological and physiological aspects of the medulla externa X organ, a neurosecretory cell group in the eyestalk of *Palaemon serratus* pennant

- (Crustacea, decapod, natantia) [J]. *Biol. Bull.* 1981, **160**:11—30
- [5] Thoms W E, Jordan F L, Townsel J G. The status of the study of invertebrate neurons in tissue culturephylum Arthropoda [J]. *Comp. Biochem. Physiol.* 1987, **87A**:215—212
- [6] Cooke I M, Graf R A, Grau S, et al. Crustacean peptidergic neurons in culture show immediate outgrowth in simple medium [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989, **86**:402—406
- [7] Grau S M, Cooke I M. Peptidergic neurons of the crab, *Cardisoma carnifex*, in defined culture maintain characteristic morphologies under a variety of conditions [J]. *Cell Tissue Res.* 1992, **270**:303—317
- [8] 蔡生力. 甲壳动物内分泌研究与展望 [J]. 水产学报, 1998, **22**: 154—161
- [9] Van Harreveld A. A physiological solution for freshwater crustaceans [J]. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1936, **34**:428—432
- [10] Goodwin R H. Insect cell culture: improved media and methods for initiating attached cell lines from the lepidoptera [J]. *In Vitro*. 1975, **11**(6):369—378
- [11] Forscher P, Kaczmarek L K, Buchanan J, Smith S J. Cyclic AMP induces changes in distribution and transport of organelles within growth cones of *Aplysia* bag cell neurons [J]. *J. Neurosci.* 1987, **7**:3600—3611
- [12] Ochs S J, Ggaziri R, Jersild Jr. Metabolic and ionic properties of axoplasmic transport in relation to its methenism [A]. in: Iqbal Z (ed) Axoplasmic transport. Boca Raton. Florida, CRC. 1986
- [13] Goldberg D. Local role of Ca in formation of veils in growth cones [J]. *J. Neurosci.* 1988, **8**:2596—2605
- [14] Smith G, Naylor E. The neurosecretory system of the eyestalk of *Carcinus maenas* [J]. *J. Zool. Lond.* 1972, **166**:313—321
- [15] Perryman E K. *Procambarus simulans*: Light-induced changes in neurosecretory cells and in ovarian cycle [J]. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 1969, **88**(4):514—524.
- [16] Durand J B. Neurosecretory cell types and their secretory activity in the crayfish [J]. *Biol. Bull.* 1956, **103**: 157—169
- [17] Nagabhushanam R, Rao K R. Neurosecretory system of porunid crab, *Scylla serrata* [J]. *J. Anat. Soc. India.* 1966, **15**:138—144

CYTOTOLOGY AND CULTURE OF NEUROSECRETORY CELL IN THE EYESTALK OF *ERIOCHEIR SINENSIS*

SUN Jin-sheng, LIU An-xi, CHEN Jia-tong, HE Bing-jun, WANG Xiu-ling, GUO Shi-yi and WANG Yi-nong

(Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: the neurosecretory cells were studied in terms of cytology and primary culture in the MTXO of *Eriocheir sinensis*, and a practical method for primary culture of peptidergic neurons was set up. The peptidergic neurons, when dissociated from the MTXO, exhibited immediate outgrowth for 3—5 days and survived for 18 days or more in the defined medium supplemented with glutamine and antibiotics. The neurons could survive in some conditions involving changes of pH(7.0—7.9)、temperature(22°C—28°C) and osmolarity (950—1100mOsm). The outgrowth of the

peptidergic neurons could be restrained in the Ca-free medium and blocked by Cd²⁺ (Cd²⁺ current blocker) in the medium. Three types of neurosecretory cells were distinguished on the basis of size, morphology, distribution, form of outgrowth and ultrastructure. There is an ultrastructural evidence that B, C types of neurosecretory cells have a rest phase in the development of *Eriocheir sinensis*.

Key words: Crustacea; *Eriocheir sinensis*; X-organ; Neurosecretory cells; Ultrastructure; Cell culture

图 版 说 明 图 版 I

1. 活体视神经节, MT: 端髓; SG: 窦腺; ON: 视神经; 箭头: 窦腺轴路, $\times 45$; 2. 保留轴突残根的河蟹 MTXO 体外分离细胞, $\times 396$; 3. 无轴突残根的 B2 型细胞体外培养形态, $\times 396$; 4. 培养 3d 的 C 型细胞, $\times 396$; 5. 培养 6d 的 C 型细胞, $\times 396$; 6. 胶质细胞的超微结构, N: 细胞核; M: 线粒体; 箭头: 异染色质, $\times 5700$; 7. 培养 1d 的 C 型细胞, $\times 396$; 8. 神经分泌细胞轴突超微结构, M: 线粒体; g: 神经分泌颗粒, $\times 4200$.

1. Vivid optic ganglion, MT: Medulla terminal; SG: Sinus gland; ON: Optic nerve; Arrow: Tract from the sinus gland, $\times 45$; 2. Dissociated cells with axonal stump from the MTXO of the *Eriocheir sinensis*. Arrow: Axonal stump, $\times 396$; 3. Outgrowing morphology of neuron type B2 in the medium, $\times 396$; 4. Neuron of type C at the end of Day 3 in culture, $\times 396$; 5. Neuron of type C at the end of Day 6 in culture, $\times 396$; 6. Ultrastructure of glial cell, N: Nucleus; M: Mitochondria; Arrow: Heterochromatin, $\times 5700$; 7. Neuron of type C at the end of day 1 in culture, $\times 396$; 8. Ultrastructure of the neurite of neurosecretory cells, M: Mitochondria; g: neurosecretory granules, $\times 4200$.

图 版 II

1. A 型细胞超微结构, N: 细胞核; M: 线粒体; g: 神经分泌颗粒; G: 高尔基体; E: 内质网, $\times 4200$; 2. 体外培养的 A 型细胞, $\times 396$; 3. B 型细胞超微结构, N: 细胞核; M: 线粒体; g: 神经分泌颗粒, $\times 3400$; 4. 体外培养的 B1 型细胞, 箭头: 二级突起, $\times 396$; 5. 体外培养的 B2 型细胞, $\times 396$; 6. 体外培养的 B3 型细胞, $\times 396$; 7. C 型细胞超微结构, N: 细胞核; M: 线粒体; g: 神经分泌颗粒, $\times 3400$; 8. 体外培养的 C 型细胞, $\times 396$.

1. Ultrastructure of neuron of type A, N: Nucleus; M: Mitochondria; g: Neurosecretory granules; G: Golgi body; E: Endoplasmic reticulum, $\times 4200$; 2. Neuron of type A in culture, $\times 396$; 3. Ultrastructure of neuron of type B, N: Nucleus; M: Mitochondria; g: Neurosecretory granules, $\times 3400$; 4. Neuron of type B1 in culture, Arrow: Processes from the neurite, $\times 396$; 5. Neuron of type B2 in culture, $\times 396$; 6. Neuron of type B3 in culture, $\times 396$; 7. Ultrastructure of neuron of type C, N: Nucleus; M: Mitochondria; g: Neurosecretory granules, $\times 3400$; 8. Neuron of type C in culture, $\times 396$.



