

Cu²⁺ 对栉孔扇贝外套膜组织培养的影响

李清, 孙振兴, 张丽, 苏小珊 (鲁东大学生命科学学院, 山东烟台 264025)

摘要 [目的]了解重金属对栉孔扇贝的毒理效应。[方法]在 DMEM 培养液中分别添加质量浓度为 0.05、0.10、0.20、0.40 mg/L 的 Cu²⁺, 以细胞迁出时间和组织块增殖状况为评价指标, 研究 Cu²⁺ 对栉孔扇贝外套膜组织培养的影响。[结果]栉孔扇贝外套膜在 DMEM 培养液中贴壁良好。培养至 72 h 时, Cu²⁺ 质量浓度为 0.05 mg/L 的实验组有游离细胞迁出, 且组织块增殖情况良好。培养至 89 h 时, Cu²⁺ 质量浓度为 0.10 mg/L 的实验组有游离细胞迁出, 且组织块增殖情况较差。随着 Cu²⁺ 质量浓度的增大, 细胞迁出所需的时间越长, 组织块增殖情况越差。Cu²⁺ 质量浓度为 0.40 mg/L 的实验组, 培养 96 h 时并没有游离细胞迁出。[结论]Cu²⁺ 质量浓度大于 0.10 mg/L 时对栉孔扇贝外套膜的组织培养有一定的抑制作用。

关键词 栉孔扇贝; 外套膜; Cu²⁺; 组织培养

中图分类号 S917 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)23-09882-03

Effect of Cu²⁺ on Mantle Tissue Culture of *Chlamys farreri*

LI Qing et al (College of Life Science, Ludong University, Yantai, Shandong 264025)

Abstract [Objective] The aim was to understand the toxicological effects of heavy metal on *Chlamys farreri*. [Method] Adding Cu²⁺ with concn. of 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 mg/L into DMEM medium, the effect of Cu²⁺ on tissue culture of *C. farreri* mantle was investigated with cell emigration time and proliferative status of tissue blocks as evaluation index. [Result] *C. farreri* mantle anchored well in DMEM medium. When *C. farreri* mantle was cultured for 72 h, the experimental group with 0.05 mg/L Cu²⁺ had emigration of free cells and the proliferative status of tissue blocks was well. When *C. farreri* mantle was cultured for 89 h, the experimental group with 0.10 mg/L Cu²⁺ had emigration of free cells and the proliferative status of tissue blocks was poor. With the increase of Cu²⁺ concn., the cell needed the longer migrating time and the proliferative status of tissue blocks was worse. The experimental group with 0.40 mg/L Cu²⁺ had no emigration of free cells. When *C. farreri* mantle was cultured for 96 h. [Conclusion] The Cu²⁺ with concn. above 0.10 mg/L had some inhibitory effect on the tissue culture of *C. farreri* mantle.

Key words *C. farreri*; Mantle; Cu²⁺; Tissue culture

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 是我国北方沿海重要的经济贝类之一, 也是北方浅海水产养殖业的主要养殖种类。但是由于近年来海域环境受到重金属等污染日趋严重, 加剧了海区生态环境的恶化, 对栉孔扇贝的生长与发育造成了不利影响, 以至于严重影响了栉孔扇贝的养殖成活率 and 经济效益。作为重金属的 Cu²⁺ 能抑制动物的酶活性, 妨碍机体的代谢作用, 还会造成机体生理生化指标的改变等^[1-2]。因此, 探讨 Cu²⁺ 对栉孔扇贝的影响, 具有重要的理论和实践意义。

组织与细胞培养技术已在鱼类、虾贝类等水产动物的病毒学、细胞生理学、毒理学和细胞工程等领域进行了一定的探索, 并得到了一些应用^[3-5]。笔者利用组织培养技术, 观察了不同质量浓度的 Cu²⁺ 对栉孔扇贝外套膜组织生长的影响, 以期建立栉孔扇贝的细胞系提供依据, 并为探究重金属对栉孔扇贝的毒理效应提供基础资料。

1 材料与方

1.1 材料 实验用栉孔扇贝购自烟台水产品市场, 扇贝壳高 6.0~6.5 cm, 选择健康、活力强的个体 20 只, 将贝壳刷洗干净, 置于含青-链霉素(终浓度均为 100 IU/ml)的天然海水中充气暂养数小时, 暂养阶段不投饵。

1.2 试剂及其配制 复方新洁尔灭用灭菌蒸馏水稀释 20 倍; 术必泰消毒剂用灭菌蒸馏水稀释 50 倍; Hanks 使用液按常规方法配制^[6], 再用 Hanks 使用液配成终浓度分别为 4 000、5 000 IU/ml 的青霉素、链霉素混合消毒液^[7]。用 Cu-SO₄·5H₂O 配制质量浓度为 0.2 mg/L 的 Cu²⁺ 储备液。DMEM、胎牛血清为 Sigma 公司产品, 其余试剂均为分析纯。

所有试剂在超净工作台上用 0.22 μm 的微孔过滤器进行过滤除菌, 分装, 4℃ 冰箱保存备用。DMEM 培养液配方(1 000 ml): DMEM 13.4 g, 青-链霉素各 10 000 IU, L-Gln 0.3 g; 胎牛血清 100 ml, 0.35% NaCl 900 ml, pH 值 7.2。

1.3 方法 将暂养的扇贝在无菌室的外壳用酒精棉球擦净外壳, 转移到超净工作台, 迅速打开贝壳剪取外套膜, 用青-链霉素混合消毒液冲洗外套膜表面的粘液, 然后将其放入该消毒液中浸泡 30 min, 再用该消毒液反复漂洗外套膜, 之后在术必泰消毒液中浸泡 30 s^[8], 最后用 DMEM 培养液冲洗外套膜以除去多余的消毒液。将外套膜剪成 1 mm³ 左右的小块, 分散排布在 25 ml 培养瓶的内壁上, 每瓶接种 15 块, 置 CO₂ 培养箱, 在 26℃, pH 值 7.2^[9] 的条件下进行培养。

4~6 h 后待组织块贴壁牢固翻转培养瓶, 分别添加 DMEM 培养液 2.5 ml 和 Cu²⁺ 储备液, 调整 Cu²⁺ 的终质量浓度使其分别为国家渔业水质标准(GB11607-89)^[10] 的 5、10、20、40 倍, 即 Cu²⁺ 的实验梯度为: 0.05、0.10、0.20、0.40 mg/L。各实验组设双样平行, 对照组不加入 Cu²⁺ 储备液, 仅加入 DMEM 培养液。

培养期间每天定时用倒置显微镜观察增殖细胞的生长状况, 每天更换培养液并添加相应浓度的 Cu²⁺。

2 结果与分析

栉孔扇贝的外套膜在 DMEM 培养液中贴壁良好, 但组织块生长较慢, 培养至 72 h 时, 对照组和 Cu²⁺ 为 0.05 mg/L 的培养瓶中, 最早从组织块边缘增生出游离细胞, 倒置显微镜下可见组织块边缘有游离的细胞迁出(图 1、2), 这些迁出的细胞多为圆形或椭圆形, 呈透明或半透明小泡状; 随着继续培养, 看到这些小泡多从组织块周边较薄的部分迁出, 并沿着组织块边缘运动, 靠近组织块边缘的细胞密集, 远离组织块边缘处逐渐稀疏, 形成明显的生长晕, 细胞贴壁状况、组

基金项目 鲁东大学科研基金项目(L20073303)。

作者简介 李清(1975-), 女, 陕西西安人, 讲师, 从事细胞生物学研究。

收稿日期 2008-06-03

织块增殖情况良好。 Cu^{2+} 为 0.10 mg/L 的实验组,培养至 89 h 才观察到有游离细胞迁出(图 3),而且细胞数目相对较少,并出现少量的菌丝污染,细胞贴壁状况、组织块增殖情况较差。 Cu^{2+} 为 0.20 mg/L 的实验组,培养至 96 h 有零星的细胞



注: Cu^{2+} 为 0 mg/L。

Note: The concentration of Cu^{2+} is 0 mg/L.

图 1 培养 72 h 的栉孔扇贝外套膜及游离细胞 ($\times 400$)

Fig. 1 Mantle and free cell of *Chlamys farreri* cultured for 72 h

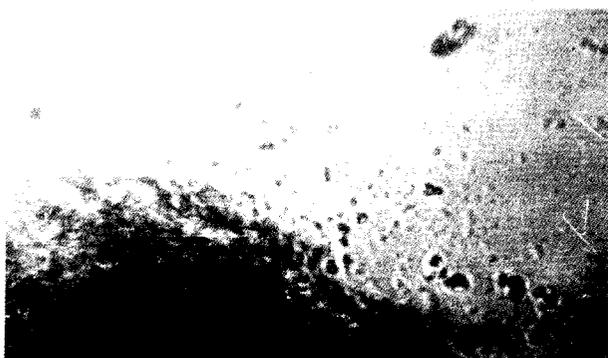


注: Cu^{2+} 为 0.05 mg/L。

Note: The concentration of Cu^{2+} is 0.05 mg/L.

图 2 培养 72 h 的栉孔扇贝外套膜及游离细胞 ($\times 400$)

Fig. 2 Mantle and free cell of *Chlamys farreri* cultured for 72 h



注: Cu^{2+} 为 0.10 mg/L。

Note: The concentration of Cu^{2+} is 0.10 mg/L.

图 3 培养 89 h 的栉孔扇贝外套膜及游离细胞 ($\times 400$)

Fig. 3 Mantle and free cell of *Chlamys farreri* cultured for 89 h

迁出(图 4),并出现明显的杂菌污染,细胞贴壁状况、组织块增殖情况最差,很快就浮在培养液表面,细胞存活时间也最短。 Cu^{2+} 为 0.40 mg/L 的实验组,培养 96 h 后始终未见有游离细胞迁出。各实验组的细胞生长状况如表 1 所示。



注: Cu^{2+} 为 0.20 mg/L。

Note: The concentration of Cu^{2+} is 0.20 mg/L.

图 4 培养 96 h 的栉孔扇贝外套膜及游离细胞 ($\times 250$)

Fig. 4 Mantle and free cell of *Chlamys farreri* cultured for 96 h

表 1 不同浓度 Cu^{2+} 对栉孔扇贝外套膜组织生长的影响

Table 1 Effects of different concentrations of Cu^{2+} on the growth of *Chlamys farreri* mantle tissue

Cu^{2+} 浓度//mg/L	细胞迁出时间//h	细胞贴壁率//%	组织块增殖状况
Cu^{2+} concentration	Cell emigration time	Cell attachment rate	Proliferation status of tissue mass
0	72	100	+++
0.05	72	100	+++
0.10	89	60	++
0.20	96	20	+
0.40	-	-	-

注:+++表示组织块生长良好,无杂菌污染;++表示组织块生长较好,有少量可见的菌丝污染;+表示组织块增殖少,菌丝污染明显多,细胞贴壁不牢;-表示没有细胞迁出。

Note:+++ stands for the well growth of tissue mass without sundry bacteria contamination; ++ stands for relatively well tissue mass with a little mycelium contamination. + means little proliferation of tissue mass with obviously more mycelium contamination and unstable cell attachment; - means no cell emigration.

3 讨论

栉孔扇贝生活在天然海水中,其外套膜组织上沾有大量微生物和原生动物等污染物,因此消毒是否彻底是组织培养成败的关键。该实验采用青-链霉素对组织块进行浸泡漂洗,同时结合术必泰溶液浸泡的消毒方法,获得了较好的效果。术必泰是一种由多种抗菌剂、表面活性剂及增效剂合成的复合型速效消毒剂,其主要杀菌成分是醋酸氯己啶、异噻唑啉酮等,具有高效广谱、迅速持久的杀菌作用,不仅对细菌有效,而且对真菌等也有效,此外还具有性能稳定、无毒、无着色、pH 值为中性等特点^[9]。因此,采用上述消毒液处理组织块后,污染率大大降低。

渗透压是外套膜组织培养的重要因素,会影响到组织细胞的正常生理,而且各种软体动物细胞的渗透压是不同的。笔者在栉孔扇贝的外套膜组织培养过程中曾尝试过多种培养基,发现如果培养基的渗透压过高,细胞会脱水,组织将发生卷曲和收缩,并很快从瓶壁上脱落下来;如果渗透压偏低,细胞会发生肿胀,培养液中会有大量细胞碎片,而且细胞不能从组织块迁出和生长;只有在适当的渗透压、pH 值和营养条件下,细胞才能正常生长。为适应栉孔扇贝外套膜细胞的

渗透压,该实验选择 0.35% NaCl 溶液取代蒸馏水,来配制 DMEM 培养液,添加 L-谷氨酰胺,并向其中补加了 10% 胎牛血清,取得了较满意的结果。其中,DMEM、L-谷氨酰胺和胎牛血清提供了细胞生长所需的氨基酸、生长因子、维生素及微量元素等,而无机盐可起到调整培养基渗透压和 pH 值等作用。

一般说来,金属元素可分为必需金属与非必需金属两大类。铜是生物体的必需元素之一,但是过量则会对机体造成毒害作用。铜在水中有 Cu^{2+} 、 $\text{Cu}(\text{OH})^+$ 、 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$ 以及与无机酸盐、有机酸形成的络合物等多种存在形式,但 Cu^{2+} 是唯一能与细胞膜载体蛋白结合并具有生物活性的。铜被吸收进入血液后,即与血浆中的蛋白质或氨基酸结合被运送至机体各部位,因铜的络合物相对较稳定,要求生物体液中的活性铜维持在较低浓度,否则它将取代其他必需金属或与大分子细胞结构络合而产生毒性,如抑制酶活性、妨碍机体代谢作用等。

此外,铜作为生物体必需的微量元素,在动物体内参与铁的吸收及新陈代谢,也是软体动物和节肢动物血蓝蛋白的组成成分。铜具有多种生物功能,参与许多生化过程,如氧的运送、超氧阴离子自由基的歧化、细胞色素 C 等有机物的氧化以及电子传递等,对血红蛋白合成、细胞呼吸和生物防御等具有重要作用^[11]。铜还能调节水产动物的免疫功能。Pipe 等研究发现,铜能够刺激贻贝 (*Mytillus edulis*) 的免疫调节,随着水体中铜含量的增加,其血细胞总数及释放活性氧的数量也显著增加,当水体中铜的质量浓度为 0.12 mg/L 时,贻贝的酚氧化酶活性增强;但质量浓度升至 0.15 mg/L 时,酶的活性反而降低,且活性氧数量减少^[12-13]。

毒物被机体吸收后,经血液转运到各个组织器官,在体内经过水解、氧化、还原和结合等一系列生物转化,改变了其原有的化学结构,生理活性也相应减弱,加速了在体内的代谢过程。通常,生物转化是将亲脂的外源性化学物质转变为

极性较强的亲水性物质,以降低其通过细胞膜的能力,从而加速其排出。但是由于催化外来毒物的酶和酶系主要位于动物的肝脏,体外培养的组织往往缺少这些酶和酶系,因此对毒物更敏感。该实验中,随着 Cu^{2+} 质量浓度增大,组织块生长逐渐缓慢甚至出现不生长的状况,就证实了这一点。

实验还发现,实验组游离细胞的迁出时间随着 Cu^{2+} 质量浓度增大而延缓,组织块生长也随着 Cu^{2+} 质量浓度增大呈现出减慢的趋势,可见 Cu^{2+} 质量浓度大于 0.10 mg/L 时对栉孔扇贝的组织培养有一定的抑制作用,这一结果与李国基的研究结果一致^[14]。

参考文献

- [1] 李少菁,王桂忠,翁卫华,等. 重金属对日本对虾仔虾存活及代谢酶活力的影响[J]. 台湾海峡,1998,17(2):15-120.
- [2] CANESI L,VIARENGO A,LEONZIOET C,et al. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues [J]. Aquatic Toxicology,1999,46:67-76.
- [3] 孟凡华,尹洪滨,孙中武,等. 鲤鱼 (*Carprinus carpio*) 体细胞系的建立及其生物学特性分析[J]. 实验生物学报,2005,38(1):80-84.
- [4] 李云玲,孙振兴,张明青. 虾贝类细胞培养技术及其应用[J]. 江苏农业科学,2006(3):145-147.
- [5] 李玉环. 镉对海湾扇贝的急性毒性研究[J]. 海洋水产研究,2006,27(6):80-84.
- [6] 杨汉民. 细胞生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2003:94.
- [7] 李霞,刘淑范. 皱纹盘鲍的组织培养[J]. 水产学报,1997,21(2):197-200.
- [8] 李云玲,孙振兴. 几个因素对菲律宾蛤仔组织培养的影响[J]. 湖北农业科学,2006,45(2):232-235.
- [9] 郎刚华. 贝类组织培养及其应用研究[J]. 海洋科学,2000,24(4):15-18.
- [10] 国家环保局. GB11607-1989 中华人民共和国国家标准 渔业水质标准[S]. 1989.
- [11] 许安阳,王安利. 锌铜铁对水产动物免疫机能的影响[J]. 水产科学,2004,23(9):36-39.
- [12] PIPE R K,COLES J A. Copper induced Immunomodulation in the marine mussel, *Mytillus edulis* [J]. Aquatic Toxicology,1999,46:43-45.
- [13] PIPE R K,COLES J A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve mollusks [J]. Fish and Shellfish Immunology,1995,5:581-595.
- [14] 李国基. 锌等金属离子对栉孔稚贝成活的毒性影响[J]. 海洋环境科学,1994,13(2):13-16.
- [15] BRIAN G S. Multilocus sequence typing: Molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet, current [J]. Opinion in Microbiology, 1999, 2: 312-316.
- [16] RIVAS B, MARCOBAL A, MUNOZ R. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains [J]. Microbiol, 2006, 152: 85-93.
- [17] FEIL E J, SPRATT B G. Recombination and the population structures of bacterial pathogens [J]. Annu Rev Microbiol, 2001, 55: 561-590.
- [18] DEVRIESE L A, VANCANNEYT M, DESCHEEMAER P, et al. Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum* [J]. J Appl Microbiol, 2002, 92: 821-827.
- [19] POYART C, QUESNES G, TRIEU-CUOT P. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 415-418.
- [20] VANCANNEYT M, SNAUWAERT C, CLEENWERCK I, et al. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 393-400.
- [21] SABRI M, NASER, FABIANO L THOMPSON, BART HOSTE, et al. Swings Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *mpoA* and *pheS* genes [J]. Microbiology, 2005, 151: 2141-2150.
- [22] DAR S A, KUENEN J G, MUYZER G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71: 2325-2330.
- [23] HORZ H, YIMGA M T, LIESACK W. Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism prowling [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 4177-4185.
- [24] GLAZUNOVA O, ROUX V, FREYLIKMAN, et al. *Coxiella burnetii* genotyping [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11: 1211-1217.
- [25] ISABEL JADO, RAQUEL ESCUDERO, HORACIO GIL, et al. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(12): 4572-4576.
- [26] SATIOU N, NEI M. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406-425.
- [27] SURESH B, SELVARAJU, IZHAR U H, et al. A new method for species identification and differentiation of *Mycobacterium chelonae* complex based on amplified *hsp65* restriction analysis (AHSPRA) [J]. Molecular and Cellular Probes, 2005, 19: 93-99.
- [28] VERO NICA RODR' GUEZ-NAVA, ANDRE' E COUBLE, GREGORY DEVULDER. Use of PCR-Restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for *hsp65* Gene-Based identification of *Nocardia* species [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 2: 536-546.

(上接第 9881 页)