

金属离子对皱纹盘鲍组织培养的影响

孙振兴,李 清,张 丽,马运超,张 媛

(鲁东大学生命科学学院,山东 烟台 264025)

摘要:采用3因素3水平 $L_9(3^4)$ 的正交设计,以组织块增殖百分率作为评价指标,研究了在M199和RPMI-1640培养基中分别添加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 金属离子对鲍的外套膜和上足触手组织培养的影响.结果显示, Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 对细胞增殖具有明显的促进作用, Mg^{2+} 的作用不明显;对上足触手细胞生长最好的组合为5 g/L的 Ca^{2+} 、1 g/L的 Mg^{2+} 、20 μ g/L的 Zn^{2+} ;对外套膜细胞生长最好的组合为1 g/L的 Ca^{2+} 、1 g/L的 Mg^{2+} 、60 μ g/L的 Zn^{2+} .

关键词:皱纹盘鲍;外套膜;上足触手;组织培养;金属离子

中图分类号:Q813.1;S917.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-8020(2006)03-0224-04

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)是我国北方沿海重要的经济贝类之一,近年来鲍的养殖业发展迅速,但由于病毒等引起的疾病严重地影响了鲍的养殖成活率 and 经济效益.进行鲍的组织和细胞培养研究,旨在建立鲍的连续性细胞系,以便为病毒性疾病研究提供宿主细胞,为防治鲍的疾病奠定基础.有关鲍的组织培养研究虽有一些报道^[1,2],但至今尚未获得细胞系.

在细胞生命过程中必不可少的金属元素被称为生命金属^[3].在生物体内,大多数微量金属离子是酶体系或其他蛋白质的关键成分,它们常参与构成酶的活性中心,对酶的活性及构象起着稳定作用,以利于底物接近,并通过酶-金属离子-底物三者的诱导应变配合,抑制或激活酶的活性,促进细胞的代谢和生长繁殖,生命金属的缺乏或过量都会对细胞生命活动产生不利的影响.因此,研究生命金属对细胞的生物学效应有着重要的理论和实践意义.在培养基中加入钙和镁有助于体外培养的对虾肝胰腺细胞贴壁生长^[4],但有关金属离子在贝类组织和细胞培养中的作用,尚未见报道.本文研究了在培养基中添加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 三种金属离子对鲍的外套膜和上足触手细胞生长的影响,可望为建立鲍的细胞系提供依据.

1 材料与方 法

1.1 实验材料

供试动物为人工养殖的皱纹盘鲍,2龄,壳长4.0—5.0 cm.实验前将健康活鲍放入室内具充气装置的水族箱内暂养24 h,暂养海水中添加抗菌素,以抑制细菌.

1.2 培养基

基础培养基M199和RPMI-1640均为美国GIBCO公司产品,其他试剂为国产分析纯.培养基按常规方法配制,经Nalgene抽滤装置灭菌后使用,pH调整为7.4—7.5. Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 分别用 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 配制成10 g/100 mL的母液, Zn^{2+} 用 $ZnSO_4$ 配制成0.2 mg/100 mL的母液,使用时用微量移液器添加至培养基中.

1.3 实验设计

采用3因素3水平 $L_9(3^4)$ 的正交设计,三种金属离子的添加浓度各设3个水平, Ca^{2+} 添加浓度(A)设1,3,5 g/L; Mg^{2+} 添加浓度(B)设1,3,5 g/L; Zn^{2+} 添加浓度(C)设20,60,100 μ g/L.共9个实验组,每组均为2个平行重复.

1.4 培养方法

将外套膜和上足触手组织块接种于培养瓶中

进行封闭培养,接种 12 h 后翻瓶添加培养液,以后每天更换培养液一次,培养温度 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH 7.4—7.5,实验方法同文[5].每次更换培养液时,根据实验要求分别向培养基中添加不同量的 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 溶液.

1.5 细胞增殖评价指标与数据处理

以培养第 7 天时,接种组织块周缘有 1/2 以上出现增生细胞的组织块数量占全部接种组织块数量的百分率作为评价细胞增殖的指标.分别计算 3 因素各水平之和(k 值)与极差(R),并进行直观分析.

2 结果

2.1 上足触手组织块的增生

鲍上足触手组织块增生的正交实验及结果直观分析如表 1.从表 1 可以看出,增生率以第 8 组最高,各因素水平为 $A_3B_2C_1$,其次为第 1 组,其组

合为 $A_1B_1C_1$;从 R 值看,3 因素对上足触手组织块增生率的影响大小依次为 Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ,而且各因素的 R 值均大于空列 R_c 值,说明 3 因素对组织块增生率的影响显著.

分析 k 值变化可以看出,5g/L 的 Ca^{2+} (A_3), 1g/L 的 Mg^{2+} (B_1), 20 $\mu\text{g/L}$ 的 Zn^{2+} (C_1), k 值最大,即各因素的最佳水平组合为 $A_3B_1C_1$,这与增生率的直观分析结果基本一致.培养第 7 天时鲍上足触手细胞的增殖状况见图 1.



图 1 培养第 7 天时鲍上足触手细胞的增殖状况
 $C_{\text{Ca}^{2+}} = 5\text{g/L}$, $C_{\text{Mg}^{2+}} = 3\text{g/L}$, $C_{\text{Zn}^{2+}} = 20\mu\text{g/L}$

表 1 鲍上足触手组织块增生结果及直观分析

试验号	A	B	C	D	组织块增生率/%		
	$C_{\text{Ca}^{2+}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$C_{\text{Mg}^{2+}}/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	$C_{\text{Zn}^{2+}}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	空列	X_1	X_2	$X = X_1 + X_2$
1	1(1)	1(1)	1(20)	1	66.7	81.8	148.5
2	1	2(3)	2(60)	2	37.5	53.3	90.8
3	1	3(5)	3(100)	3	57.1	50.0	107.1
4	2(3)	1	2	3	62.5	50.0	112.5
5	2	2	3	1	30.0	30.0	60.0
6	2	3	1	2	66.7	63.6	130.3
7	3(5)	1	3	2	50.0	77.8	127.8
8	3	2	1	3	75.0	91.7	166.7
9	3	3	2	1	58.3	83.3	141.6
k_1	115.47	129.60	148.50	116.70			
k_2	100.93	105.83	114.97	116.30			
k_3	145.37	126.33	98.30	128.77			
R	44.43	23.77	50.20	12.47			

注:括号内数字表示各金属离子的添加浓度.

2.2 外套膜组织块的增生

鲍外套膜组织块的增生状况见图 2,正交实验及结果直观分析如表 2.从表 2 可以看出,增生率以第 1 组最高,各因素水平为 $A_1B_1C_1$,其次为第 2 组,其组合为 $A_1B_2C_2$;从 R 值看,3 因素对外套膜组织块增生率的影响大小依次为 Ca^{2+} , Zn^{2+} ,

Mg^{2+} ,而且各因素的 R 值均大于空列 R_c 值,说明 3 因素对组织块增生率的影响显著.

分析 k 值变化可以看出,在 1g/L 的 Ca^{2+} (A_1), 1g/L 的 Mg^{2+} (B_1), 60 $\mu\text{g/L}$ 的 Zn^{2+} (C_2) 时, k 值最大,即各因素水平的最优组合为 $A_1B_1C_2$,这与增生率的直观分析结果基本吻合.

表 2 鲍外套膜组织块增生结果及直观分析

试验号					组织块增生率/%		
	A $C_{Ca^{2+}}/(g \cdot L^{-1})$	B $C_{Mg^{2+}}/(g \cdot L^{-1})$	C $C_{Zn^{2+}}/(\mu g \cdot L^{-1})$	D 空列	X_1	X_2	$X = X_1 + X_2$
1	1(1)	1(1)	1(20)	1	80.0	33.3	113.3
2	1	2(3)	2(60)	2	66.7	28.6	95.3
3	1	3(5)	3(100)	3	25.0	18.2	43.2
4	2(3)	1	2	3	60.0	0	60.0
5	2	2	3	1	23.5	12.5	36.0
6	2	3	1	2	7.7	0	7.7
7	3(5)	1	3	2	20.0	22.2	42.2
8	3	2	1	3	46.7	33.3	80.0
9	3	3	2	1	33.3	33.3	66.6
k_1	83.93	71.83	67.00	71.97			
k_2	34.57	70.43	73.97	48.40			
k_3	62.93	39.17	40.47	61.07			
R	49.37	32.67	33.50	23.57			

注:括号内数字表示各金属离子的添加浓度。



图 2 培养第 7 天时鲍外套膜细胞的增殖状况
 $C_{Ca^{2+}}, C_{Mg^{2+}}$ 均为 $1g/L$, $C_{Zn^{2+}} = 20\mu g/L$

3 讨论

1) Ca^{2+} 是细胞生命活动中必不可少的营养元素,参与生物体内的代谢调节、肌肉收缩、神经信号的传递、酶促反应、细胞离子交换等重要生理过程,因此, Ca^{2+} 的含量将对细胞的生长和增殖产生重要影响。体外培养细胞的贴壁生长与微丝形成的应力纤维有密切关系,在培养基中添加适量 Ca^{2+} ,有利于细胞吸收 Ca^{2+} ,促进应力纤维的形成。本实验中, Ca^{2+} 为 $1g/L$ 时,外套膜细胞生长最好; Ca^{2+} 为 $5g/L$ 时,上足触手细胞生长最好。前者虽然与培养日本对虾肝胰腺细胞加入 Ca^{2+} 为 $1g/L$ 时细胞生长最好的结果^[3]相类似,但也说明不同组织对 Ca^{2+} 的需求是不同的。

2) 本文实验结果表明, $20-60 \mu g/L$ 的 Zn^{2+} 即可促进培养细胞的生长,说明 Zn^{2+} 对皱纹盘鲍细胞生长的影响是极为明显的。锌是生物体的必需元素,参与 DNA 的复制、RNA 的转录及细胞内

的各种生命活动,它主要以 Zn^{2+} 的形式与蛋白质结合存在于机体中。 Zn^{2+} 是酶的激活剂,对细胞的增殖作用可能与其参与构成多种酶和辅酶有关。 Zn^{2+} 也可作为某些酶的辅酶参与生物体内的代谢,通过结合到质膜上或通过金属催化的脂质过氧化反应使质膜处于稳定状态,对维持细胞膜的结构和功能起重要作用。但 Zn^{2+} 浓度过高会对细胞产生毒性,这是由于核酸内切酶中存在着相同的 Zn^{2+} , Ca^{2+} 结合位点,当细胞内 Zn^{2+} 浓度较高时, Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 与核酸内切酶竞争性结合,从而抑制了 DNA 酶的活性^[6]。文^[7]曾报道,当 Zn^{2+} 浓度达 $30 \mu mol/L$ 以上时,培养 24 h 的哺乳动物神经元因 DNA 降解而发生凋亡。

3) Mg^{2+} 能激活细胞中的许多酶,对 DNA 复制和蛋白质的生物合成至关重要。 Mg^{2+} 对维持体液和细胞内电荷平衡有着重要作用,还对一些酶、蛋白质的构象起稳定作用^[5]。文^[8]实验证明, Mg^{2+} 浓度为 $0.3-1 mmol/L$ 时,对体外培养的人内皮细胞增殖有明显的促进作用。本实验中, Mg^{2+} 对细胞增殖的促进作用不如 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 明显,表明细胞生长对金属离子的需求是不同的。

4) 金属离子对细胞增殖有促进作用,是因为这些元素在各种金属蛋白和金属酶中具有重要的功能,但如果这些元素出现在不适当的时机和位置,就会对机体中的其他生物分子产生毒性,导致蛋白质聚集,或者受到金属催化引起分子的氧化损伤或失活等,因此这些金属离子在生物体内必须处于严格的内稳态控制中^[9]。

有关水生生物与水体中金属离子相互作用的机理还有待深入研究^[10]。

参考文献:

- [1] 李霞,刘淑范.皱纹盘鲍的组织培养[J].水产学报,1997,21(2):197—198.
- [2] 崔龙波,魏峰,陆瑶华.皱纹盘鲍鳃组织培养适宜条件的研究[J].海洋科学,2000,24(7):17—18.
- [3] 萨克林 C J,金道森,等.酶化学:影响与应用[M].北京:科学出版社,1991:40—108.
- [4] 王宏伟,王安利,王维娜,等.金属离子对培养日本对虾肝胰腺细胞的影响[J].动物学杂志,2003,38(5):6—10.
- [5] 孙振兴,张暄,刘雪,等.菲律宾蛤仔外套膜组织原代培养的初步研究[J].海洋科学,2004,28(3):79—81.
- [6] 罗琦,王建华,王远亮,等.金属离子在细胞凋亡中的调控作用[J].重庆大学学报,2003,26(8):97—101.
- [7] Kim Y H, Kim E Y, Gwag B J, et al. Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: Mediation by free radicals [J]. Neuroscience, 1999, 89(1):175—182.
- [8] 吕晓华,王瑞叙.镁对人脐静脉内皮细胞增殖活力的影响[J].中国公共卫生,2001,17(9):807—808.
- [9] 黄仲贤.金属蛋白研究中几个值得注意的动向[J].化学进展,2002,14(4):318—322.
- [10] 刘彬,王维,邓南圣.水生生物与金属离子相互作用机理研究现状[J].水生生物学报,2002,26(6):697—703.

Effects of Metal Ions on Tissue Culture of *Haliotis discus hannai*

SUN Zhen-xing, LI Qing, ZHANG Li, MA Yun-chao, ZHANG Yuan

(School of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: The effects of three metal ions on the cultured tissue from mantle and epipodial tentacle of *Haliotis discus hannai* with Ca^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} ions which are added into the M199 and RPMI-1640 medium are studied respectively. The experiment is projected according to orthogonal design $L_9(3^4)$, the proliferation percent of tissue blocks is estimated as the indicator of growth. The results show that the Ca^{2+} and Zn^{2+} have an obvious effect on accelerating the proliferation of cultured cells, but the effect of the Mg^{2+} is not evident. When the concentration of Ca^{2+} is 5g/L, Mg^{2+} is 1g/L and Zn^{2+} is 20 $\mu\text{g/L}$, the growth of cells of epipodial tentacle is the best. But the best growth conditions of the mantle cells are that the concentration of Ca^{2+} is 1g/L, Mg^{2+} 1g/L and Zn^{2+} 60 $\mu\text{g/L}$.

Key words: *Haliotis discus hannai*; mantle; epipodial tentacle; tissue culture; metal ions

(责任编辑 司丽琴)