

日本三角涡虫无性繁殖系 *Dugesia* ZB-1 的建立

徐振彪, 韩亚红, 宋林霞*

(山东理工大学生命科学院, 山东 淄博 255049)

【摘要】 目的 建立来源于我国的日本三角涡虫无性繁殖纯品系。**方法** 野外采集日本三角涡虫, 之后在实验室进行切割损伤再生, 通过不断地切割培养, 建立日本三角涡虫无性繁殖纯品系。**结果** 经过 10 年上万次实验, 将来源于山东淄博地区的日本三角涡虫培养成为一个实验室可控条件下稳定生长的单切无性繁殖纯品系 *Dugesia* ZB-1。**结论** *Dugesia* ZB-1 的建立, 为开展后续相关实验, 推动我国涡虫研究的进程及参与国际涡虫研究的竞争奠定了坚实的基础。

【关键词】 日本三角涡虫; 无性系; *Dugesia* ZB-1; 模式生物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 02-0166-03

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.02.009

Establishment of a planarian asexual strain *Dugesia* ZB-1

XU Zhen-biao, HAN Ya-hong, SONG Lin-xia*

(College of Life Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

【Abstract】 Objective To establish a pure planarian *Dugesia* asexual strain in China. **Methods** The planarian worms were collected from a wild stream, and then made the worm grow after amputation in the lab. To establish an asexual strain through cutting and culturing for the single worms. **Results** After ten years and more than ten thousand experiments, an asexual pure planarian strain *Dugesia* ZB-1 originated from Shandong Zibo area was established. It grows stably under laboratory controlled conditions. **Conclusions** The establishment of *Dugesia* ZB-1 provides a solid foundation for further experiments and promoting planarian research in our country and participation in the field of the international planarian research.

【Key words】 Planarian; Asexual strain; *Dugesia* ZB-1; Model animal

Corresponding author: SONG Lin-xia, E-mail: slxch@163.com

三角涡虫是扁形动物门涡虫纲的代表动物, 身体柔软, 扁平叶状, 背面稍凸, 多褐色, 腹面色浅, 前端头部呈三角形, 出现了三胚层, 体型两侧对称。消化道分为三支, 原肾管排泄系统; 具有网状神经系统; 雌雄同体, 既可性生殖, 也可无性生殖。生活在水流平缓、清澈、无污染的小溪中。

三角涡虫具有极强的再生能力, 因此被当作模式生物用于再生、衰老、神经系统等领域的研究^[1-4]。无论如何切割损伤, 只要包含干细胞, 涡虫的组织块都可以再生为一个完整个体, 甚至当移植一个干细胞到射线杀死的涡虫体内, 都可以让涡虫重新活过来^[4,5]。涡虫的再生是由一类称为 neoblasts 的成体干细胞调控, 研究其干细胞行为及功能可以在完全的

生理条件下进行, 即不用分离其干细胞, 在在体 (in vivo) 情况下即可进行, 因为涡虫的再生是肉眼可见的生物学现象^[4,6]。因此, 涡虫可以作为筛选有关生长及抑制生长、甚至衰老和肿瘤等药物的模型^[6-8]。又因为可以在完全的细胞生理环境下进行筛选, 所以比离体细胞筛选更具有准确可靠的优势^[9]。

我国涡虫资源丰富, 分布广泛, 对涡虫的分类、野外资源、生理生化方面的研究也早已开展。涡虫作为模式生物研究材料, 在我国乃至世界上, 目前都还属于小众领域。在已报道的文献中发现, 从美国和日本引进的涡虫 *S. mediterranea* 品系和 GI 品系^[8,10-11], 我国科学家都有使用, 但这两个品系主要是在欧美和日本的实验室常用。除此之外还有我

【基金项目】 国家自然科学基金 (项目编号 31550005, 31350004); 山东省自然科学基金 (项目编号 ZR2011HM065)。

【作者简介】 徐振彪 (1970 -), 男, 讲师, 研究方向: 分子细胞生物学。E-mail: xzbss@163.com

【通讯作者】 宋林霞 (1972 -), 女, 副教授, 研究方向: 分子细胞生物学。E-mail: slxch@163.com

国吴畏博士建立的 Pek-1 品系^[12]。可以看出,将涡虫进行实验室稳定养殖及系统化,成为可利用的纯品系的研究相对不足。目前,本课题组经过近十年上万次实验的探索,已经养殖成功一个来源于我国山东淄博地区的三角涡虫无性繁殖品系,命名为 *Dugesia* ZB-1^[9,13],实验室已经连续繁殖 60 多代,生长条件已经标准化,其生长状态非常稳定,相关的基因组结构、转录组结构以及其它与涡虫再生相关的关键特征都在研究中。该无性繁殖品系的建立,为推动我国涡虫研究的标准化及参与国际研究竞争打下了基础,具有重要的科学意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

日本三角涡虫 *Dugesia japonica*, 采自山东省淄博市博山区源泉镇泉河村(东经 118.05 度,北纬 36.41 度,海拔 279 m)的小溪中。

1.2 实验器材

生化培养箱(SPX-150BSH-II,上海新苗医疗器械制造有限公司),直径 100 mm 的玻璃平皿,50 mL 烧杯,手术刀,毛笔,市售桶装矿泉水或 Mont 溶液(1.6 mmol/L NaCl, 1.0 mmol/L CaCl₂, 1.0 mmol/L MgSO₄, 0.1 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L NaHCO₃),市售线虫、新鲜牛肝、鸡肝、煮熟的鸡蛋黄等作为涡虫的食物,投喂之前不需要灭菌。

1.3 实验方法

从小溪中采集涡虫,在实验室中进行清洗,去除泥土等杂物,将干净的涡虫转入市售矿泉水或 Mont 溶液中,在 22~24℃ 的生化培养箱中避光适应性培养,每周平均喂食涡虫 3 次,食量以涡虫能够吃完,剩余残渣较少为宜。经过 3~4 周的适应后,挑取相对健壮的涡虫置于玻璃平皿中进行切割,根据涡虫大小可以在咽部的一端或两端用手术刀将其切割为 2~3 段,然后将一条涡虫切割所得的身体片段转入小烧杯中,于生化培养箱中避光培养,切割一星期后开始每周喂食 3 次,等涡虫再生完全并长至 1 cm 左右时,再次进行切割,所得身体片段仍放在同样的烧杯中培养,如此循环,并根据涡虫数量更换合适的培养器皿,直到建立稳定的涡虫单切无性繁殖系。

2 结果

经我国涡虫分类及资源调查研究的学者研究确定,山东淄博博山区的小溪中所产涡虫为日本三角

涡虫(*Dugesia japonica*),属于扁形动物门(Platyhelminthes)涡虫纲(Turbellaria),三肠目(Tricladida),淡水亚目(Paludicola),三角涡虫科(Dugesidae),三角涡虫属(*Dugesia*)^[14-16]。将涡虫从野外的小溪中采集回实验室后,经过清洗和适应性培养,然后利用切割损伤再生的方式建立涡虫的无性繁殖品系。经过十年上万次切割培养实验,养殖成功一个来源于中国山东省淄博市博山区源泉镇并且可以在实验室稳定繁殖的日本三角涡虫无性品系,目前实验室已经稳定繁殖 60 多代,命名为 *Dugesia* ZB-1。

Dugesia ZB-1 为雌雄同体,是由一条涡虫切割所得的无性繁殖品系(图 1,图 2),主要通过人为切割方式进行繁殖,染色体核型为 $2n=16$ (图 3)。



图 1 *Dugesia* ZB-1 的整体形态

Fig. 1 Gross appearance of a *Dugesia* ZB-1



图 2 塑料盆中养殖的 *Dugesia* ZB-1 群体

Fig. 2 The asexual strain of *Dugesia* ZB-1 in a plastic container

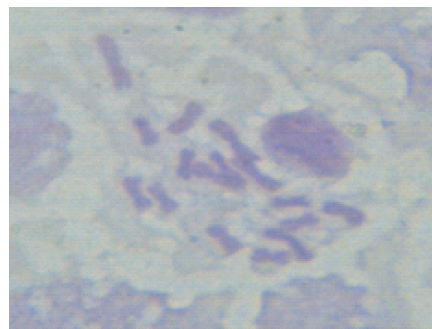


图 3 *Dugesia* ZB-1 细胞的中期染色体

Fig. 3 Metaphase chromosomes of a *Dugesia* ZB-1 cell

3 讨论

在建立涡虫无性系的过程中,我们摸索了适宜涡虫生长的各种条件及切割涡虫的方法。首先,*Dugesia* ZB-1 对水质非常敏感,水质的好坏直接决定涡虫命运。自然界中的涡虫生活在水流平缓,清澈无污染的小溪中。所以,*Dugesia* ZB-1 养殖用水为购买的桶装矿泉水,水质要求干净无污染。同时在养殖过程中要根据水质的清洁程度及时进行清洗和更换,尤其水质已经变脏后一定要及时更换。

与自然界中的涡虫生长环境相似,*Dugesia* ZB-1 可以在 4~30℃ 的水温条件下生活,所以实验室选择养殖温度为 22~24℃,这也是 *Dugesia* ZB-1 的最适无性繁殖温度。经过多年观察,在 22~24℃ 的最适养殖温度下,*Dugesia* ZB-1 不进行有性生殖,只进行无性繁殖。*Dugesia* ZB-1 每年可以发生自然断裂方式的无性繁殖 2~6 次。自然界中的涡虫繁殖方式与温度、染色体的倍性、种群密度等都有关系。在实验室 22~24℃ 恒温养殖环境中,其无性繁殖的高峰主要发生在 4~7 月份,由此我们推测,涡虫的繁殖方式也许还与季节或者其体内感知生物钟的调控有关系,这是一个需要深入研究的课题。

Dugesia ZB-1 与自然生活状态下的涡虫所需食物无异。实验室可以喂食线虫、牛肝、蛋黄、鸡血、鸡肝、鱼肝等食物。无论何种食物,都要尽量保持新鲜、无污染、未变质。对涡虫进行清洗时可以使用软毛笔擦抹养殖容器。如果有条件可以使用适宜的玻璃器皿,一段时间后,将养殖容器完全清洗并高压灭菌后再次循环使用。

再生是涡虫的一种重要的生物学现象,由于细胞调控,这也是涡虫作为模式生物的主要优势。一般一条 *Dugesia* ZB-1 自然断裂成两段,再生形成两个成体涡虫,但这种自然的无性繁殖方式对扩大种群数量来说比较缓慢,所以实验中使用的涡虫一般采用切割损伤进行再生的无性繁殖方式扩大种群。22~24℃ 养殖条件下,体长 1 cm 左右的 *Dugesia* ZB-1,可以非常容易地切割为 3~6 段,7 d 左右损伤的涡虫可以基本再生完全,并且可以正常进食。切割 *Dugesia* ZB-1 时,尽量保持其咽部不被破坏,这对中间段的再生有利。通过对上述条件的控制,可使 *Dugesia* ZB-1 在实验室环境稳定地生长起来。该无性繁殖品系的建立,为加速我国利用涡虫作为模式生物进行相关科学研究的步伐提供了基础和保证,

具有非常重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Hagstrom D, Cochet-Escartin O, Collins EM. Planarian brain regeneration as a model system for developmental neurotoxicology [J]. *Regeneration (Oxf)*, 2016, 3(2): 65–77.
- [2] Hagstrom D, Cochet-Escartin O, Zhang S, et al. Freshwater planarians as an alternative animal model for neurotoxicology [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 147(1): 270–285.
- [3] Slack JM. Planarian pluripotency [J]. *Science*, 2011, 332(6031): 799–800.
- [4] Elliott SA, Sanchez Alvarado A. The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration [J]. *WIREs Dev Biol*, 2013, 2(3): 301–326.
- [5] Wagner DE, Wang IE, Reddien PW. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration [J]. *Science*, 2011, 332(6031): 811–816.
- [6] Oviedo NJ, Nicolas CL, Adams DS, et al. Planarians: a versatile and powerful model system for molecular studies of regeneration, adult stem cell regulation, aging, and behavior [J]. *CSH Protoc* 2008, 2008: pdb emo101.
- [7] Perrigoe PM, Najbauer J, Jozwiak AA, et al. Planarians as a model of aging to study the interaction between stem cells and senescent cells in vivo [J]. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 2015, 5: 30052.
- [8] Scimone ML, Kravarik KM, Lapan SW, et al. Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea* [J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(2): 339–352.
- [9] 徐振彪, 宋林霞. 三角涡虫: 在体筛选再生及衰老相关药物的模型生物 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2016, 38(6): 744–749.
- [10] Nishimura O, Hosoda K, Kawaguchi E, et al. Unusually large number of mutations in asexually reproducing clonal planarian *Dugesia japonica* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0143525.
- [11] Basquin C, Orfila AM, Azimzadeh J. The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for studying motile cilia and multiciliated cells [J]. *Methods Cell Biol*, 2015, 127: 243–262.
- [12] Ma C, Wang X, Yu S, et al. A small scale expression screen identifies tissue specific markers in the *Dugesia japonica* strain Pek-I [J]. *J Genet Genomics*, 2010, 37(9): 621–635.
- [13] Xu Z, Chen M, Ren Z, et al. Deep sequencing identifies regulated small RNAs in *Dugesia japonica* [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(6): 4075–4081.
- [14] 陈广文, 陈晓虹, 吕九全. 中国淡水三角属涡虫研究的历史与进展 [J]. *动物学杂志*, 1999, 34(6): 37–41.
- [15] 王衍喜, 陈艳珍, 张录强. 鲁中山区东亚三角头涡虫有性生殖过程研究初报 [J]. *四川动物*, 2006, 25(4): 794–795.
- [16] 陈广文, 吕九全, 马金友, 等. 中国淡水三肠目涡虫已知属种及其地理分布 [J]. *动物学报*, 2001, 47(专刊): 9–12.

[收稿日期] 2016-09-13