

文章编号: 1000-0615(2016)10-1606-07

DOI: 10.11964/jfc.20150609931

红螯螯虾XO-SG神经细胞的原代培养

张岩, 段虎, 金松君, 李富花, 相建海*

(中国科学院海洋研究所, 实验海洋生物学重点实验室, 山东青岛 266071)

摘要: 本研究采用酶解的方法获得红螯螯虾眼柄XO-SG复合体的单个神经细胞, 并依据显微观察对XO-SG神经细胞进行分类, 同时利用Leibovitz's L-15等作为基础培养基离体培养解离的神经细胞。目的是建立虾类XO-SG神经细胞的分类标准并确定合适的培养条件, 便于在体内外开展神经内分泌系统的调控研究。结果显示, 根据神经细胞形态特点, 红螯螯虾XO-SG神经内分泌细胞分为6种类型, 不同类型的细胞在细胞大小以及显微结构上存在明显差异; 建立了红螯螯虾眼柄XO-SG神经元的体外原代培养方法, 细胞在改良的L-15培养基中存活状态良好, 原代培养的神经细胞可以在体外存活14 d。离体培养过程中, 不同类型神经细胞的再生速率存在差异, 部分细胞在第2天就出现再生的轴突或树突。再生过程基本可以持续7 d, 随后细胞开始萎缩凋亡。本研究为红螯螯虾眼柄神经细胞的分类以及利用神经细胞在体外开展虾类的内分泌代谢和调节机制研究提供了基础依据和研究平台。

关键词: 红螯螯虾; 眼柄; 原代培养; 神经细胞; 再生

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

甲壳类的X-器官(X-organ)是一个离散的, 大约由200个亮白的神经元胞体簇组成的器官, 这些神经元的轴突膨大并终止于神经血管器官——窦腺(sinus gland)^[1]。眼柄X-器官—窦腺复合体(X organ-sinus gland, XO-SG)是甲壳动物主要的神经内分泌器官^[2], 类似于哺乳动物的下丘脑—垂体系统^[3-4]。神经内分泌系统整合了神经系统和内分泌系统, 神经内分泌细胞出现于腔肠动物, 这些细胞可以分泌神经激素以调节机体内的某些生理功能。锥形蜗牛(*Cone victoriae*)的神经节可以分泌一种具有利尿作用的神经激素, 而章鱼(*Octopus vulgaris*)的视腺分泌的激素则促进了其性腺的发育和成熟^[5]。研究表明甲壳动物的XO-SG系统控制着神经肽类激素的合成、储藏和分泌, 根据神经元的形态及大小, 主要分2大类, 其中一类为能分泌促色素细胞激素的神经元^[6], 而大的神经元则呈现分泌多种肽和激素的活力,

包括甲壳动物高血糖激素(crustacean hyperglycemic hormone, CHH)以及含量丰富的蜕皮抑制激素(molt-inhibiting hormone, MIH)^[7-8]。其中, CHH是一种多功能的内分泌激素, 其主要作用是调控动物血淋巴中血糖的浓度, 当甲壳动物的生理状态发生变化或处于逆境, 如高温、缺氧、争斗等时, 可以升高血淋巴中血糖的浓度以做出应对, 也有研究表明这类激素可能参与脂类代谢、渗透调节以及蜕皮等过程^[9-11]; 而甲壳动物的MIH可通过降低蜕皮激素在靶组织中的水平, 或提高蜕皮激素在靶组织中的代谢和排泄来间接调控动物的蜕皮过程^[12-13]。另外它们的神经系统中还含有儿茶酚胺神经类物质, 其中的多巴胺(dopamine, DA)含量丰富, 在同属节肢动物的昆虫中, DA参与了飞行过程中的感应、攻击的调整、记忆^[14]以及嗅觉的产生^[15]。昆虫间脑中的神经内分泌细胞释放的脑激素对幼

收稿日期: 2015-06-15 修回日期: 2016-05-31

资助项目: 国家重点基础研究发展计划(2012CB114403); 国家基金国际合作交流项目(31461143007); 国家自然科学基金(41376165)

通信作者: 相建海, E-mail: jhxiang@qdio.ac.cn

虫的蜕皮以及变态过程有调控作用,也因此调控了胚胎的生长发育^[16]。此外,神经内分泌系统还调节了贝类的吞噬免疫过程^[17]。

就甲壳动物的神经细胞培养而言,已经有关于土地蟹(*Cardisoma carnifex*) X-器官的肽能神经元以及口胃的神经节的体外培养成功的报道^[18-19]。另外,也有学者研究真蟹(*Carcinus maenas*)的心脏神经节神经元体外培养及维持它们原有的递质反应等^[20]。国内学者也先后开展并建立了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)^[21]和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)等甲壳动物眼柄XO-SG的体外培养方法^[22]。

由于虾蟹等甲壳动物眼柄中的神经内分泌细胞在个体发育、蜕皮以及激素调节等过程中的重要作用,因此受到研究者的高度关注。另外在克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)体内,由免疫细胞转化成神经元的研究也为神经退行性疾病的防治以及神经元的损伤修复提供了线索和思路^[23-24]。红螯螯虾(*Cherax quadricarinatus*)隶属于节肢动物门(Arthropoda),甲壳纲(Crustacea),十足目(Decapoda),拟螯虾科(Parastacidae),光壳虾属(*Cherax*)。由于其食性广、适应性强、生长快、个体大、肉质细嫩、味道鲜美、营养丰富,在欧洲、日本和中国受到欢迎,具有很大的市场价值。本研究完成了红螯螯虾的眼柄神经内分泌细胞的分类,优化了体外培养条件,实现了XO-SG神经细胞的体外培养,培养的细胞存活时间超过14 d,部分细胞在损伤后有再生现象,这不仅可以为研究以红螯螯虾为代表的甲壳动物繁育、生长等调控的神经内分泌细胞分子机理提供研究平台,也可为水产养殖人工调节甲壳动物的繁育和生长提供理论和方法学指导,同时也有助于开展神经的损伤修复机制等研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物及处理

实验用红螯螯虾购自福建厦门。室内暂养2周,不间断充气,隔日喂食剁碎的茎柔鱼(*Dosidicus gigas*)。实验时选取体长12~15 cm、身体健康、处于蜕皮间期的个体,先将头胸甲及眼柄部位用医用酒精仔细喷洒,10 min后再用酒精棉球擦拭。在超净工作台中剪下眼柄,于淡水螯虾磷酸缓冲液(CPBS, Na₂HPO₄ 10 mmol/L, KH₂PO₄ 10 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, CaCl₂ 10 μmol/L, MnCl₂ 10 μmol/L, KCl 2.7 μmol/L)^[25]中冲洗3遍。在CPBS中,用无菌的医用剪刀和眼科镊剥离外骨骼、肌肉以及其他结缔组织,将分离的组织再用CPBS清洗2~3遍。配制CPBS时,使用NaOH调整该缓冲液的pH值为7.2~7.5, 0.22 μm滤膜过滤后使用。

1.2 细胞的分离与培养

用解剖刀分离获得XO-SG复合体,胰蛋白酶[用CPBS稀释0.25%胰蛋白酶(索莱宝)母液至0.1%]中室温、黑暗消化30~45 min,具体时间视消解状况而定,期间每隔10 min轻轻颠倒几次;消化完毕后,小心吸弃胰蛋白酶消化液,CPBS洗2~3次,获得解离的XO-SG复合体细胞。

向解离细胞中加入不同组成的培养基(表1),轻轻吹打以混匀细胞,并将其转移至24孔细胞培养板中,室温、黑暗中静置20~30 min。各培养基临用前添加140 mmol/L D-葡萄糖和1 mmol/L L-谷氨酰胺以及抗生素(青霉素200 units/mL、链霉素100 units/mL和庆大霉素80 units/mL)。细胞贴壁完成后转移至生化培养箱中,于22~24 °C黑暗状态下继续培养,过夜后将培养基全部换掉,此后隔天半量换液。

表1 体外培养神经细胞所用的培养基

Tab. 1 Media for cell culture *in vitro*

	基础培养基 medium	螯虾磷酸缓冲液(CPBS) crayfish phosphate buffer saline	胎牛血清10%(FBS) fetal bovine serum	酵母提取液(YE) yeast extract	D-葡萄糖 D-Glu	L-谷氨酰胺 L-Gln	抗生素 antibiotics
M199	1×	+	+	+	+	+	+
Grace's	1×	+	+	+	+	+	+
L-15(1)	1×	+	+	+	+	+	+
L-15(2)	1×	+	-	+	+	+	+

注: +, 添加; -, 未添加

Notes: +, added; -, no added

1.3 细胞观察

原代培养期间,隔天使用NIKON TS100倒置显微镜观察和记录实验结果,细胞大小以显微标尺测量,镜检过程持续15 d。

2 结果

2.1 红螯螯虾视神经节的结构与神经内分泌细胞的分类

解剖观察,红螯螯虾的眼柄主要由外骨骼,结缔组织,肌肉以及视神经节组成。视神经节外被鞘膜,自前端(an)至后端(po)依次为视皮层(lamina ganglionaris, LG)、外髓(medulla externa, ME)、内髓(medulla interna, MI)以及端髓(medulla terminalis, MT),其中视皮层外被复眼色素层。X-器官(XO)的神经元轴突到达血窦周围分枝膨大,形成神经血管器官,即窦腺(sinus gland, SG)。SG位于MI和MT之间,由外窦和内窦组成,外窦呈半球形,内窦则不易观察到(图1),XO位于MT上,共同组成了眼柄神经节的MTXO复合体。视神经束(OT)则与脑神经节相连。

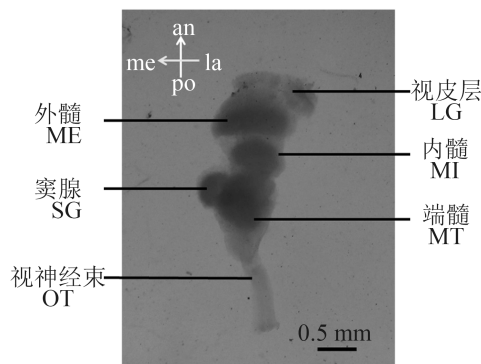


图1 红螯螯虾视神经节解剖图(腹面观)

an.前端, po.后端, la.外侧, me.内侧

Fig. 1 Optic ganglion anatomy of *C. quadricarinatus* (ventral view)

an. anterior, po. posterior, la. lateral, me. medial

结合昆虫神经细胞的分类标准,光镜下根据细胞的大小、轴突的数目以及细胞的复杂程度等,将酶解结束后未进行体外培养的红螯螯虾XO-SG复合体内神经内分泌细胞分为6种主要类型:球形颗粒细胞(图2-a)、I型假单极神经元(图2-b)、II型假单极神经元(图2-c)、III型假单极神经元(图2-d)、双极神经元(图2-e)以及多极神经

元(图2-f)。其中,球形颗粒细胞是所有类型细胞中最大的一类,胞体多为圆形或椭圆形,直径超过50 μm ,内有许多折光性较强的颗粒物,无树突或轴突;I型假单极神经元直径一般不超过50 μm ,内部有许多折光性较强的颗粒,有轴突;II型假单极神经元胞体直径约为20 μm ,胞体的一极连有树突,长度约30 μm ;III型假单极神经元胞体直径约为20 μm ,细胞内无或者很少的颗粒,因此光镜下几乎没有折光性,胞体的一端带有长的轴突(> 50 μm);双极神经元胞体长轴约10 μm ,短轴约5 μm ,胞体的两极带有轴突,长度超过25 μm ;多级神经元在所有类型中数目最少,其胞体常带有多个轴突。

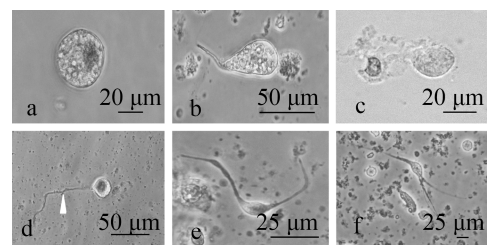


图2 XO-SG神经元的类型

a-f. 酶解结束未经培养的细胞; a.球形颗粒细胞; b-d. I、II、III型假单极神经元; e.双极神经元; f.多极神经元; 白色箭头.轴突

Fig. 2 Types of neurons cell of XO-SG

a-f. derived from enzyme digestion without the cultured primary cells; a. spherical granular cell; b to d. type I to III pseudounipolar neurons; e. bipolar neuron; f. multipolar neuron; white arrow. axon

2.2 培养基的选择优化

体外培养结果表明, XO-SG神经细胞经0.1%胰蛋白酶消化30 min后,均可以在4种培养基(表1)中正常贴壁生长。其中, M199培养基中细胞存活不超过2 h; Grace's中,细胞过夜后仅剩少量的小的假单极神经元,球形颗粒细胞和I型假单极神经元全部裂解死亡;添加10% FBS的L-15培养基中细胞的贴壁性优于未添加FBS的,但没有表现出明显的生长优势,且细胞存活时间也无明显差别。本研究最终确定优化的XO-SG神经元体外培养条件为CPBS配制的1×L-15,添加适量酵母提取物而不添加FBS,临用前再添加谷氨酰胺和葡萄糖以及抗生素,神经元存活时间可超过14 d。

2.3 神经内分泌细胞的体外培养

将分离的XO-SG复合体经胰蛋白酶消化,

于改良的L-15(2)培养基(表1)中启动原代培养。消化过程中吹打掉轴突, 仍保有轴突残存的神经细胞并出现轴突再生现象, 但球形颗粒细胞(图2-a)可能由于本身并无轴突或者树突, 因此体外培养期间一直未观察到长出轴突或树突等现象。对于 I 型假单极神经元而言, 呈现的轴突再生的细胞数目少, 再生速率缓慢, 其余类型的细胞一般在贴壁后第2天开始贴壁生长, 其中假单极神经元的体外存活时间较长, 7 d后仍能维持良好的细胞形态(图3)。双极神经元再生后可以持续存活5 d左右, 再生第5天时, 轴突和树突都发生萎缩, 但胞体仍然完整(图4)。再生的多极神经元存活时间较短, 4 d左右细胞出现凋亡, 可能是因为再生的轴突数目较多, 细胞不能及时进行生物合成(图5)。I 型假单极神经元细胞和 II 型假单极神经元细胞类似, 包括其胞体大小以及再生树突的形态。再生的假单极神经元(图6-a)则同 III 型假单极神经元相似; 此外, 再生的假单极神经细胞多形成轴突(图3, 图6-a); 而双极和多极神经元则在再生出轴突后形成树突(图4, 图6-b~d)。

3 讨论

眼柄XO-SG复合体是甲壳动物的重要神经内分泌器官, 类似于哺乳动物的下丘脑—垂体系, 它们和Y器官(YO)等一起产生多种激素并

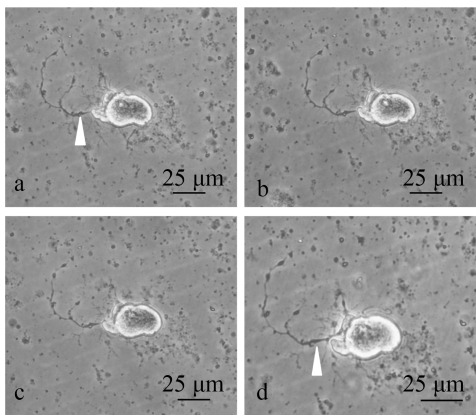


图3 体外培养的真单极神经元的轴突再生变化
a.第6天的假单极神经元; b.第8天的假单极神经元; c.第9天的假单极神经元; d.第11天的假单极神经元; 白色箭头.轴突

Fig. 3 Changes of axon for regeneration of pseudounipolar neuron *in vitro*

a-d. regeneration of pseudounipolar neuron were cultured for 6, 8, 9, 11 d *in vitro*, respectively; white arrow. axon

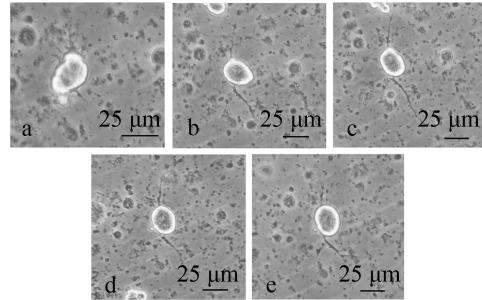


图4 体外培养的双极神经元轴突再生变化
a.第4天的双极神经元; b.第5天的双极神经元; c.第6天的双极神经元; d.第7天的双极神经元; e.第8天的双极神经元

Fig. 4 Changes of axon for regeneration of bipolar neuron *in vitro*

a-e. regeneration of bipolar neuron were cultured for 4, 5, 6, 7, 8 d *in vitro*, respectively

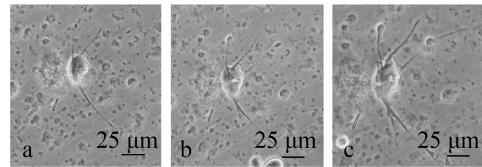


图5 多极神经元的轴突再生变化
a.第2天的多极神经元; b.第3天的多极神经元; c.第4天的多极神经元

Fig. 5 Changes of axon for regeneration of multipolar neuron *in vitro*

a-c. regeneration of multipolar neuron were cultured for 2, 3, 4 d *in vitro*, respectively

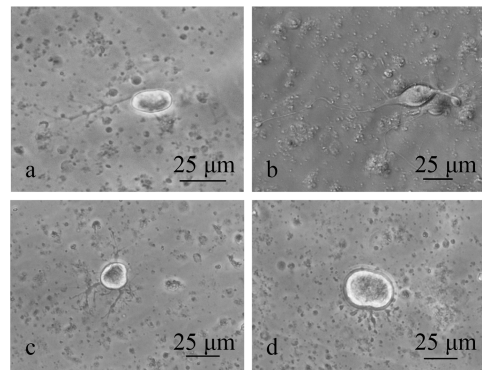


图6 其他再生的神经细胞
a.体外培养4 d, 再生的III型假单极神经元; b.体外培养4 d, 再生的双极神经元; c和d.体外培养6 d后, 2种不同再生形式的多极神经元

Fig. 6 Regeneration of other neurons

a. regeneration of type III pseudounipolar neuron, 4 days later *in vitro*; b. regeneration of bipolar neuron, 4 days later *in vitro*; c and d. different regeneration types of multipolar neuron, 6 days later *in vitro*

通过协同作用来调控动物的蜕皮、生长、发育乃至免疫等生理过程^[21]。其中,SG是甲壳动物神经激素的释放位点,通过神经束和脑神经节相连。MTXO主要由一群神经分泌细胞组成,胶质细胞较少,这些细胞分泌许多激素,如GIH(gonad inhibiting hormone)、MIH和CHH等多种神经肽激素,许多神经传导物质是由MTXO激活^[26]。因此,将这些神经细胞分离出来并加以鉴别分类,对于深入研究甲壳动物的生理活动及调节显得尤为必要。对于甲壳动物XO-SG神经细胞分类的研究大多是利用切片通过显微或超微观察,结合细胞内容物进行分类,因此忽视了细胞的真实大小和神经细胞所特有的轴突或树突的特点,造成细胞分类的不准确;有些研究则通过获得单细胞的方法进行分类,但可能是由于在获得单细胞的过程中丢失了某些细胞,造成分类不全。本研究利用酶解的方法,在掌握好浓度、温度、消解时间以及吹打技术的前提下,能够获得结构完整且种类完全的神经细胞,可以综合判定并对神经细胞进行相对准确的分类。尽管本研究已经获得种类完全的XO-SG神经细胞,但要准确鉴定和深入研究这些神经细胞的功能仍有很大难度,主要是因为目前仍缺乏单克隆抗体等甲壳动物特异性的神经细胞标记物,因此要深入研究某种类型的细胞功能可能还需要结合免疫标记方法或者开发特异性的抗体才能实现。

由于虾类缺乏能够长期培养的细胞系,建立能够针对不同科学问题的原代细胞模型同样十分重要。培养基的选择和无菌培养是细胞培养成功与否的关键,虾类由于生活条件等原因,常用的培养条件及方法很难长久维持细胞的体外存活;另外,由于眼柄的独特结构,在解剖和酶解过程中极易发生污染,导致体外培养失败。本研究最初尝试采用较为成熟的红螯螯虾造血组织的培养条件^[27-28]培养XO-SG神经细胞,但是细胞在上述条件中并不能很好地生长和再生;另外,添加胎牛血清以及改进其他培养条件均不能使红螯螯虾神经内分泌细胞很好地生长。本研究在培养基中添加一些因子,如Ca²⁺能使虾的神经内分泌细胞表现出良好、旺盛的生长状态,推测这种良好的状态可能与活跃的信号传递、激素的激活与运输以及分泌等机制相关。目前的培养条件能使眼柄神经元存活并保

持良好的再生态势,尽管控制神经元突起的分枝及神经元的成熟机理目前仍不清楚,但利用体外培养分离的神经元可以进行细胞的离体操作以便深入研究甲壳动物的生殖、蜕皮以及免疫等方面。

参考文献:

- [1] Potter D D. Observations on the neurosecretory system of portunid crabs[M]//Bargmann B, Hanström B, Scharrer B, *et al.* Zweites Internationales Symposium über Neurosekretion. Berlin Heidelberg: Springer, 1958.
- [2] Bliss D E, Durand J B, Welsh J H. Neurosecretory systems in decapod Crustacea[J]. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie, 1954, 39(5): 520-536.
- [3] Cooke I M, Sullivan R E. Hormones and neurosecretion[M]//Bliss D E, Atwood H L, Sandeman D C. The Biology of Crustacea. New York: Academic Press, 1982: 205-290.
- [4] Cooke I, Graf R, Grau S, *et al.* Crustacean peptidergic neurons in culture show immediate outgrowth in simple medium[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86(1): 402-406.
- [5] Nakamura S, Osada M, Kijima A. Involvement of GnRH neuron in the spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis*[J]. Molecular Reproduction and Development, 2007, 74(1): 108-115.
- [6] Mangerich S, Keller R, Dircksen H, *et al.* Immunocytochemical localization of pigment-dispersing hormone (PDH) and its coexistence with FMRFamide-immunoreactive material in the eyestalks of the decapod crustaceans *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus*[J]. Cell and Tissue Research, 1987, 250(2): 365-375.
- [7] Dircksen H, Keller R. Immunocytochemical localization of CCAP, a novel crustacean cardioactive peptide, in the nervous system of the shore crab, *Carcinus maenas* L.[J]. Cell and Tissue Research, 1988, 254(2): 347-360.
- [8] Keller R, Jaros P P, Kegel G. Crustacean hyperglycemic neuropeptides[J]. American Zoologist, 1985, 25(1): 207-221.
- [9] Soyez D, Van Deijnen J E, Martin M. Isolation and characterization of a vitellogenesis-inhibiting factor from sinus glands of the lobster, *Homarus americanus*[J]. Journal of Experimental Zoology, 1987, 244(3): 479-

- 484.
- [10] Webster S G, Keller R, Dircksen H. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction[J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2012, 175(2): 217-233.
- [11] Soye D, Toullec J Y, Ollivaux C, *et al.* L to D amino acid isomerization in a peptide hormone is a late post-translational event occurring in specialized neurosecretory cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(48): 37870-37875.
- [12] 朱小明, 李少菁. 甲壳动物幼体蜕皮的调控[J]. *水产学报*, 2001, 25(4): 379-384.
- Zhu X M, Li S J. Regulation of molting in crustacean larvae[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(4): 379-384 (in Chinese).
- [13] Webster S G. Amino acid sequence of putative moult-inhibiting hormone from the crab *Carcinus maenas*[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1991, 244(1311): 247-252.
- [14] Menzel R, Muller U. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates[J]. *Annual Review of Neuroscience*, 1996, 19(1): 379-404.
- [15] Álvarez R A, Villalobos M G P, Rosete G C, *et al.* Dopaminergic modulation of neurosecretory cells in the crayfish[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2005, 25(2): 345-370.
- [16] Hartenstein V. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective[J]. *The Journal of Endocrinology*, 2006, 190(3): 555-570.
- [17] Ottaviani E, Franceschi C. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems[J]. *Immunology Today*, 1997, 18(4): 169-174.
- [18] Graf R A, Cooke I M. Primary culture of crustacean stomatogastric ganglion neurones in a defined medium[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1990, 149: 521-525.
- [19] 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 and Tissue Research*, 1992, 270(2): 303-317.
- [20] Saver M A, Wilkens J L, Syed N I. *In situ* and *in vitro* identification and characterization of cardiac ganglion neurons in the crab, *Carcinus maenas*[J]. *Journal of Neurophysiology*, 1999, 81(6): 2964-2976.
- [21] 孙金生, 刘安西, 陈家童, 等. 河蟹 MTXO 细胞的离体培养和细胞学研究[J]. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 374-379.
- Sun J S, Liu A X, Chen J T, *et al.* Cytology and culture of neurosecretory cell in the eyestalk of *Eriocheir sinensis*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(4): 374-379(in China).
- [22] Gao C L, Sun J S, Xiang J H. Primary culture and characteristic morphologies of medulla terminalis neurons in the eyestalks of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 290(1): 71-80.
- [23] Benton J L, Kery R, Li J J, *et al.* Cells from the immune system generate adult-born neurons in crayfish[J]. *Developmental Cell*, 2014, 30(3): 322-333.
- [24] Hartenstein V. From blood to brain: the neurogenic niche of the crayfish brain[J]. *Developmental Cell*, 2014, 30(3): 253-254.
- [25] Söderhäll I, Bangyeekhun E, Mayo S, *et al.* Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2003, 27(8): 661-672.
- [26] Cary G A, Cuttler A S, Duda K A, *et al.* Melatonin: neuritogenesis and neuroprotective effects in crustacean x-organ cells[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2012, 161(4): 355-360.
- [27] Jiravanichpaisal P, Söderhäll K, Söderhäll I. Characterization of white spot syndrome virus replication in *in vitro*-cultured haematopoietic stem cells of freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*[J]. *Journal of General Virology*, 2006, 87(4): 847-854.
- [28] Duan H, Jin S J, Zhang Y, *et al.* Granulocytes of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* can endocytose beads, *E. coli* and WSSV, but in different ways[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2014, 46(2): 186-193.

Primary cell culture of XO-SG from red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)

ZHANG Yan, DUAN Hu, JIN Songjun, LI Fuhua, XIANG Jianhai*

(Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: In this study, eyestalks of red claw crayfish were dissociated with trypsin to gain single neurons and classified neurons by microscopic inspection. And then, dissociated neurons were cultured into sterile Leibovitz's L-15 medium to screen out proper conditions, etc. The goal of the study is to establish a standard for neurons classification and carry out further research about the endocrine system regulation for crustacean *in vitro* and *in vivo*. The results showed that eyestalk XO-SG neurons of red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* were classified into six different types based on morphological characters with differences on the cell size, and some other differences at microscopic levels. A cell culture approach has been established for XO-SG neurons *in vitro*, and neurons showed an immediate outgrowth and could regenerate in modified L-15 medium for axon or dendrite. Primary neurons could survive more than 14 d with different growth rate. Some neurons exhibit regeneration of axon or dendrite two days later. Regenerative process can last for 7 days, from then on, the neurons start to shrink and apoptosis. This research provided basis for further study in classifying XO-SG neurons and understanding the endocrine metabolism and regulation at the cell level.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; eyestalk; primary cell culture; neurons; regeneration

Corresponding author: XIANG Jianhai. E-mail: jhxiang@qdio.ac.cn

Funding projects: Major State Basic Research Development Programs of China (2012CB114403); National Natural Science Foundation of China-Israel Science Foundation (31461143007); National Natural Science Foundation of China (41376165)