

淡水白鲢细胞建系及其生长温度特性的研究*

张 铭^{1*} 陈荪红² 赵小立¹

(¹ 浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

(² 上海第二医科大学, 上海 200025)

关键词 淡水白鲢, 细胞系, 胚胎, 动物细胞培养

中图分类号 Q954.633 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0105-04

1962 年, Wolf 和 Quimby^[1]首次建成鱼类细胞系以来, 我国张念慈和杨广智^[2]也成功地建立了草鱼的吻端细胞株; 随后, 陈敏容、洪锡钧、李宏和童裳亮等^[3~7]分别建立了鲫、团头鲂、南方鲇、牙鲆、鲈鱼、真鲷细胞株或细胞系。而淡水白鲢的细胞建系及其生物学特性研究还未见报道。鱼类的细胞培养工作, 前期主要用于鱼类病毒和病理学研究, 尔后逐渐扩展到水体污染^[8]、基因表达^[9]、诱变机理^[10]以及温度突变^[11]和选择性抗性突变株^[12]等研究。近年来还有通过囊胚细胞培养建立鱼类 ES 样细胞用于发育生物学^[15], 以及用鱼类培养细胞作为细胞杂交、转基因和制作嵌合体材料的报道^[13]。

淡水白鲢系我国引进的喜温性鱼类, 因其食性杂、耐低氧、生长快、肉质鲜美、营养丰富等优点而深受欢迎, 现已成为我国优良的养殖鱼类。本研究旨在建立喜温性鱼类白鲢的细胞系, 并研究其在培养过程中对温度条件的反应, 为进一步探讨喜温性鱼类寒害的生理生化及其分子机理提供一个较为理想的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

成体淡水白鲢由杭州市水产研究所提供, 受精卵则取自广东番禺罗非鱼良种场。

1.2 方法

1.2.1 细胞建系 健康的成体白鲢在 0.01% 高锰酸钾溶液中浸浴 30min, 分别剪取吻端、尾鳍、胸鳍、臀鳍、肾、肝、肠、鳔和眼球等组织, 再用 70% 酒精漂洗后, 剪成 1mm³ 的小块, 接种在培养瓶的壁上, 于 30℃ 静止培养 10h, 然后加入含有 20% 小牛血清(杭州市四季青生物工程材料公司)的 MEM 或 RPMI1640(GIBCO 培养液, pH7.0~7.2。待组织块周围的细胞生长晕相连接时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 进行传代, 然后恒温静止培养。

胚胎细胞建系采用人工授精的白鲢受精卵, 发育至高囊胚期, 用 0.01% 高锰酸钾表面灭菌, 再经 70% 酒精漂洗后, 在含有 1000u/mL 青霉素和 1000u/mL 链霉素的无血清 RPMI1640 培养液中, 用镊子小心剥去卵膜, 有时也采用 0.25% 胰蛋白酶消化去膜。然后切取囊胚细胞团, 移入细胞瓶中, 经 30℃ 8h 贴壁后, 加入含有 20% 小牛血清的 MEM 或 RPMI1640 培养液, 进行培养和传代。

用 Nikon 相差显微镜观察并记录细胞生长情况及其形态。

1.2.2 分裂指数的测定 采用玻片法, 逐日统计 1000 个细胞, 计算分裂指数。

1.2.3 细胞周期分布 取 15~39 代贴壁细胞, 经胰蛋白酶处理后, 用 4 号针头吹打, 制备成 10⁶~10⁷ 个/mL 的单细胞悬浮液。经 0.1mol/L PBS 液洗涤 2 次后加入 RNase, 37℃ 温育 30min 以除去 RNA。细胞沉淀用 50μg/mL 碘化乙锭 (PADI) 于 37℃ 染色 20min, 流式细胞仪检测。

1.2.4 细胞染色体数测定 用 0.25μg/mL Colcemid 处理对数生长期细胞 4~8h, 在 37℃ 下用 0.075mol/L KCl 低渗处理 30min, 制片后用 Giemsa 染色。最后统计 200 个中期分裂相的细胞染色体数。

1.2.5 细胞生长温度特性测定 取对数生长后期的细胞经胰蛋白酶消化后, 于 27℃ 令其贴壁, 分别置于 5、10、15、20、25、30、35 和 40℃ 下培养, 5d 后测其生长量。以 2 × 10⁵ 个/瓶的细胞密度接种到 25mL 培养瓶中, 分别在 20、27、30 和 37℃ 下培养, 每天观察并统计 3 瓶细胞以绘制细胞生长曲线。

2 结果与讨论

2.1 细胞建系

2.1.1 体细胞培养建系 实验曾多次选用 500~1000g 重的成体白鲢的多种体素和内脏组织进行原代培养, 但只观察到

吻端、尾鳍、胸鳍、鳔和眼球组织的周缘出现细胞生长晕,而且在传代过程中,多数细胞因不能贴壁而死亡。只有为数很少的吻端、尾鳍和臀鳍的培养细胞传代成功,目前已依次传至 40、47 和 45 代,现将它们分别命名为 CBW、CBT 和 CBS。同时,我们还发现在这些组织的细胞建系过程中,若用 MEM 培养液进行原代培养,虽然尾鳍、臀鳍和吻端组织块均能出现生长晕,但却难以传代,当改用 RPMI1640 培养液时,虽然未观察到细胞生长有任何明显差异,但贴壁率可达 50%~60%。这表明培养液对淡水白鲟体细胞原代培养建系起着重要作用。此外,取材时间也对细胞建系有一定影响,成功建系的取材时间均发生在 6~8 月份气温较适宜白鲟生长的季节。而且,就是在细胞建系成功的例子中,其建系的难易程度也不一样。其中吻端组织建系最难,尾鳍次之,臀鳍最易,其成功率依次为 1.2%、5.0% 和 6.7%。同时,在体细胞建系实验中,曾多次用 15~20g 重的幼鱼进行组织培养,但细胞建系均未获得成功。

2.1.2 胚胎细胞培养建系:当受精卵在 28℃ 发育到高囊胚期时,经表面灭菌后,在无菌条件下,分别用镊子和酶法除去卵膜,然后进行胚胎细胞培养建系。发现不同的去膜方法对

原代培养建系的成功率有一定影响。见表 1。同时,在胚胎细胞建系中,培养液 MEM 和 PRMI1690 对培养细胞的正常生长和传代时细胞贴壁均没有明显差异,这与体细胞建系对培养液有一定要求的情况不一样。至今胚胎细胞已传至 70 代,将它命名为 WM-9001。从表 1 可以看出,本研究采用胚胎细胞培养建系的途径,特别是用镊子机械去膜的胚胎培养物能 100% 存活并能继续传代培养。

表 1 不同去膜方式对原代培养的影响
Table 1 The effects of the de-membrane means to the primary culture

	De-membrane with 0.25% trypsin	De-membrane with tweezers
Amount of culture flask (primary culture)	8	10
Survival number of cul- ture flask	5	10
Survival rat(%)	62.5	100

在白鲟的体细胞和胚胎细胞建系后,我们对 4 种细胞系的一些基本生物学特性进行了研究,其结果列成表 2。

表 2 4 种细胞系的生物学特性
Table 2 Biological characteristics of four cell lines

	WM-9001	CBW	CBT	CBS
Subculturing survival rate(%)	83.3	6.7	5.0	1.2
Subculturing interval of 1~5 passage	12-16d	55-60d	50-55d	30-40d
Subculturing interval of 25~35 passage	5d	7d	7d	7d
Suitable medium	MEM ,RPMI1640	RPMI1640	RPMI1640	RPMI1640
Attachment time(h)	1	7	7	4
Doubling time(h)	19.71±3.74	28.05±3.73	33.40±20.08	27.00±12.60
Cell morphology	Fibroblast-like cell	Fibroblast-like cell	Fibroblast-like cell	Fibroblast-like cell
Chromosomal number(2n)	54	54	54	54
Maximum mitotic index(%)	50-80	34-55	43-62	45-60

由表 2 可见,本研究采用胚胎细胞培养建系的途径要比通过体细胞建系的成功率高得多,平均传代成功率可达 83.3%,若用镊子去卵膜的方法,其成功率可达 100%,相比之下,体细胞建系的成功率非常低,仅为 1.2%~6.7%,而且体细胞培养的初期,细胞生长十分缓慢,传代间隔长达 30~60d。这可能与胚胎细胞处于未分化状态,细胞分裂旺盛有关。

同时,在相差显微镜下观察胚胎细胞系和体细胞来源的细胞系,发现它们在培养瓶中均为单层贴壁生长,其细胞形态主要是以成纤维样细胞为主,但有时也会出现一些上皮样细胞群(图 1)。而且胚胎细胞系 WM-9001,在其传代过程中,常常在成纤维样细胞群中出现一些较小的细胞,丛生成簇并分化成形态各异的细胞类型,这一现象与 Wakamatsa 等^[12]在一种青鳉(*Oryzias latipes*)囊胚培养中建立的发育多潜能干细胞非常类似。

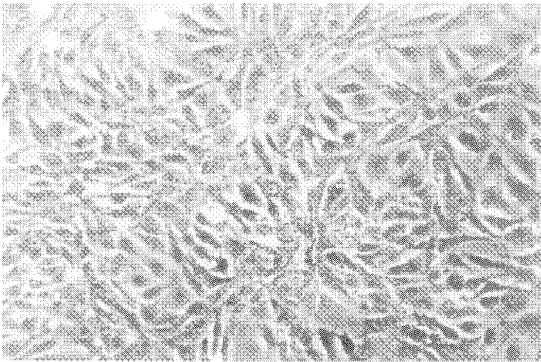


图 1 白鲟胚胎细胞系

Fig.1 Embryonic cell line (39 passages) (×150)

这些细胞系在仅含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液培养时,细胞形态呈瘦长状,且生长缓慢。而在添加 20% 小牛血清的培养条件下,细胞生长则表现良好,其分裂速度明

显加快。图 2 为 4 个细胞系细胞在含有 20% 小牛血清培养液和 30℃ 时的细胞周期分布情况。

从图 2 分析可得 ,胚胎细胞系 WM-9001 的 $G_0 + G_1$ 期细胞只占 76.71% ,而细胞系 CBW、CBT 和 CBS 则分别为 83.89%、84.37% 和 89.08% ,明显高于 WM-9001。同时 ,对 4 个细胞系的细胞染色体数的检查结果表明 $2n=54$ 的细胞均超过 68%(图 3)。根据淡水白鲢的体细胞染色体数 $2n=54$,我们认为 4 个白鲢细胞系应为正常的二倍体细胞。

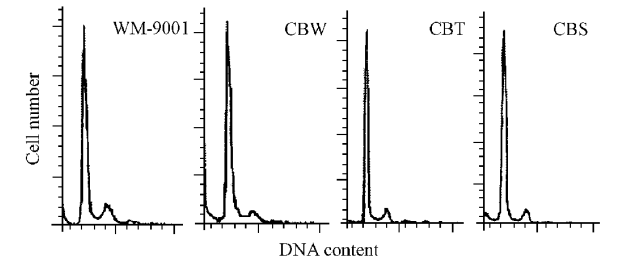


图 2 细胞周期分布图
Fig. 2 The distribution of the cell cycle

2.2 细胞系生长的温度特性

WM-9001 细胞系在 27℃ 传代贴壁后 ,分别置于 5、10、15、20、25、30、35 和 40℃ 条件下 ,恒温培养 5d ,测得不同温度下细胞分裂增值情况 ,如图 4 所示。WM-9001 细胞系在 15℃ 培养时 ,细胞基本停止生长 ,10℃ 以下细胞则脱落而死亡。

图 5 是 WM-9001、CBW、CBT 和 CBS 4 种细胞系在 20、27、30 和 37℃ 温度-生长曲线。

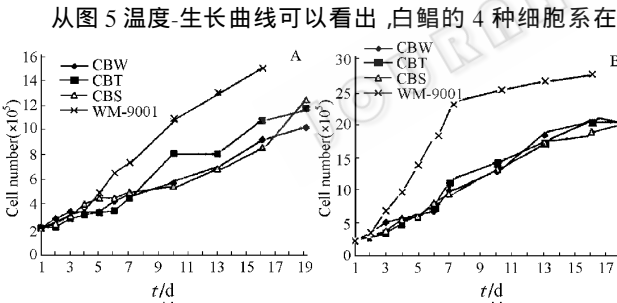


图 5 4 种细胞系在 20℃、27℃、30℃ 和 37℃ 的温度-生长曲线
Fig. 5 Growth curve of the four cell lines at 20 27 30 and 37℃
A. 20℃ ; B. 27℃ ; C. 30℃ ; D. 37℃

30℃ 培养时 ,细胞增值速度最快 ,27℃ 次之 ,20℃ 时细胞生长缓慢。而在相同温度下 ,胚胎细胞系细胞的生长速度快于其它 3 种体细胞系。特别在 37℃ 时 ,胚胎细胞系 WM-9001 在试验的最初 10d 内生长显著快于尾鳍为代表的体细胞系(图 5d)。

总之 ,我们所建立的淡水白鲢的 4 个细胞系生长的温度要求基本相同 ,均能在 20~35℃ 下生长 ,27~30℃ 为最适生长温度 ,而在 15℃ 以下生长基本停止。当培养温度降到 10℃ 以下时 ,2d 后细胞轮廓清晰 ,少量细胞开始收缩 ,4d 后细胞成团漂浮 ,6d 后大部分细胞死亡。由此也可看出 ,白鲢细胞系生长的温度特性与个体生长的温度要求十分一致。这与台湾大学 Chen J P^[13] 报道的喜温性罗非鱼卵巢细胞系 TO-2 的最适生长温度范围相似。我们在低温胁迫白鲢细胞

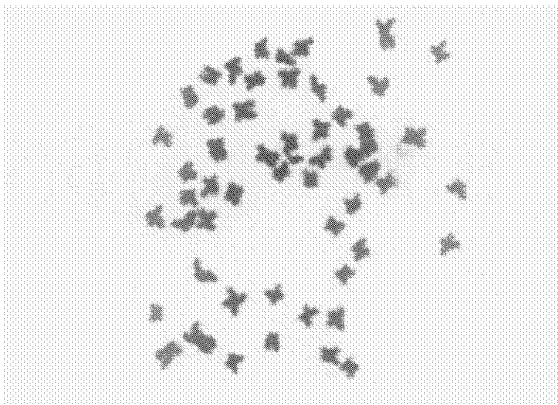


图 3 胚胎细胞系细胞的染色体数
Fig. 3 The chromosome number of embryonic cell lin(×1000)

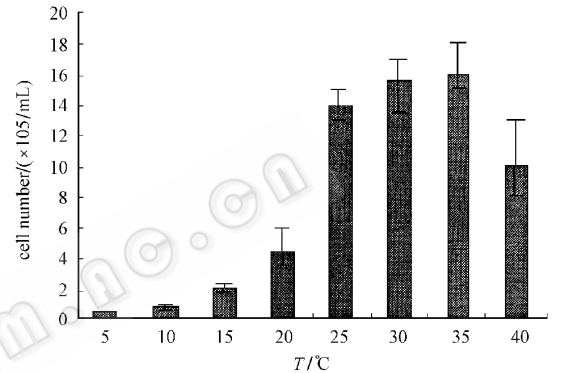
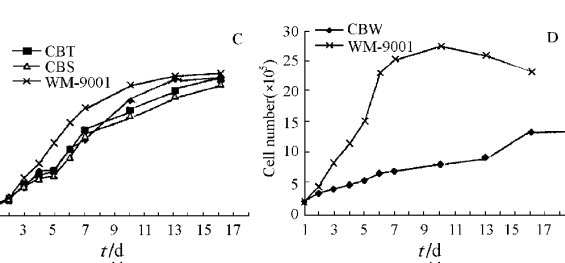


图 4 不同温度下胚胎细胞系的生长情况(40 代)
Fig. 4 Growth of Embryo cell line (40 passages) at different temperature



系时还发现 ,低温胁迫需要一定时间才开始反应 ,常常在 3d 后寒害出现 ,6d 后则寒害不可逆转。鉴于喜温性鱼类的寒害机理至今仍是众说纷纭并无可信的实验依据 ,所以 ,喜温性淡水白鲢细胞系的建立 ,使我们有可能获得大量的遗传上同源的培养细胞 ,为研究鱼类寒害的生理生化变化机理提供理想的细胞实验模型。

REFERENCES(参考文献)

[1] Kenwolf Quimby M C. Established enrythermic line of fish cells in vitro ,Science ,1962 ,135 :1065 ~1066
[2] ZHANG N(张念慈) ,YANG G(杨广智) . The establishment of strain ZG-7901 and substrain ZC-7901s of grass carp
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.igm.ac.cn

- (ctenopharyngodon idellus) lip cell. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*(实验生物学报), 1981, **14**(1):101~109
- [3] CHENG M R(陈敏容). The establishment of a heteroploid line from crueian carp and its biological characteristics, *Journal of Fisheries of China*(水产学报), 1991, **9**(2):121~130
- [4] HONG X J(洪锡钧), WANG M Q(王明权). Establishment and biological characteristics of a new fish cell line(SME-1) formom-southern catfish(SILURUS MERIDIONALIS CHEN), *Journal of Southwest Agricultural University*(西南农业大学学报), 1995, **17**(5):419~422
- [5] LI H(李宏), TONG S L(童裳亮). The tissue culture of par-alichthys olivaceus and the derivation of gill cell line, *Journal of Fisheries of China*(水产学报), 1997, **21**(2):193~196
- [6] TONG S L(童裳亮), LI H(李宏), MIAO H Z(苗宏志). Four continuous cell lines of three marine fish species were established, *Progress in Biotechnology*(生物工程进展), 1997, **17**(3):3~4
- [7] ZHANG N Q(张念慈), YANG G Z(杨广智). Establishment of cell line TQ-8801 from the caudal fin tissue cells of blunt-snout bream, *Bulletin of Science and Technology*(科技通报), 1991, **7**(2):87~89
- [8] MAO S J(毛树坚), WANG C L(王昌留). The effect of some pollutants on see of grass carp(ctenopharyngodon idellus) cell, *Oceanologia et Limnologia Sinica*(湖泊与海洋), 1990, **21**(3):205~211
- [9] Bearzotti M, Perrot E, Michard V C *et al.*. Gene expression following transfection of fish cells, *J Biotechnology*, 1992, **26**(2~3):315~325
- [10] O'REILLY J P, Mothersill C. Comparative effects of UVA and UVB on clone genic survival and delayed cell death in skin cell lines form humans and fish, *INT-J Radiat Biol*, 1997, **72**(1):111~119
- [11] Arai A, Mitani-H, Naruse K, Shima A. Relationship between the induction of proteins in the HSP70 family and thermosensitivity in two species of cryzias(Pisces) comp, *Biochem Physiol*, 1994, **109**(4):647~654
- [12] WANG-JIYANG, JIMA-Y. Isolation and characterization of a BudR-Resistant fish cell line, *Proc Japan-ACAD Ser-B*, 1989, **65**(5):112~115
- [13] WAKAMATSU-Y, SASADO-T, OZATO-K. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka(Oryzias) blastula embryo, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, **3**(4):185~191
- [14] CHENG J D, YEW F H, LI G C. Thermal adaptation and heat shock response of tilapia ovary cells, *J Cell Physiol*, 1988, **134**(2):189~199
- [15] HONG Y, WINKLER C, SCHARTL M. Production of medaka fish chimeras from a stable embryonic stem cell line, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **31**(7):3679~3684

The Establishment of Four Cell Lines from *Colossoma brachypomum* and Their Growth Characteristics Under Various Temperatures

ZHANG Ming¹* CHEN Sun-Hong² ZHAO Xiao-Li¹

(¹ College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

(² Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

Abstract Four cell lines originated from embryo, caudal fin, anal fin and snout of *Colossoma brachypomum* were established and subcultured for 70, 47, 45 and 40 passages to the present. The results of the experiment indicated that the four cell lines were fibroblast-like diploid cells, and the model number of their chromosome is 54. These cell lines could grow under temperature of 20~35°C, and its optimum temperature was 27~30°C. The cells grew slowly at 20°C, stopped growth at 15°C, and died below 10°C. This indicated that the growth temperature of the these cell lines was coincident with that of fish. In addition, the attachment time, doubling time, mitotic index, passage survival rate and cell cycle were determined and compared.

Key words *Colossoma brachypomum* cell line, embryo, animal cell culture

Received May 8, 2000

This work was supported by Grant from the Scientific Foundation of Zhejiang Province(394339).

* Corresponding author. Tel 86-571-8273423; E-mail zhangmzu@mail.hz.zj.cn