

施氏鲟不同组织来源细胞离体培养的初步研究

孟彦 张燕³ 张林^{1,2} 肖汉兵¹ 李罗新³ 杨焱清¹ 曾令兵^{1,2,3*}

(¹ 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室, ² 中国水产科学研究院长江水产研究所鱼类病害研究室, ³ 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 荆州 434000)

摘要 采用组织块移植培养技术, 对来源于施氏鲟(*Amur sturgeon, Acipenser schrencki* Brandt) 肝脏、脾脏、肾脏、鳍条和心脏组织的细胞进行了原代培养, 2~3 天左右可见组织块周围有成纤维样细胞迁出, 10 天左右组织块周围形成单层细胞。对原代培养的单层细胞用胰蛋白酶-EDTA 消化后传代培养, 建立了可连续传代的施氏鲟肝脏、脾脏、肾脏、心脏组织细胞系。初步确立施氏鲟细胞培养的条件, 培养基为 MEME, 培养温度为 25 °C, 血清浓度为 20%。对传代培养细胞以二甲亚砜为保护剂在液氮冷冻保存, 细胞复苏后可连续传代培养。施氏鲟细胞离体培养为开展鲟鱼病毒病和遗传资源保存研究提供了重要试验材料。

关键词 施氏鲟; 细胞系; 离体培养

施氏鲟原产于我国黑龙江和俄罗斯乌苏里江, 由于其资源保护、食用以及生产鱼籽酱等方面的重要价值, 受到人们的广泛关注。目前, 施氏鲟人工养殖规模不断扩大, 集约化程度不断提高, 但同时养殖过程中的病害问题也日趋严重, 养殖施氏鲟暴发性死亡事件时有发生^[1]。国外已经发现或报道了鲟科鱼类的多种病毒性疾病^[2-4]。细胞系是研究水生生物病毒病原分离鉴定、流行病学、发病机制、免疫预防以及保存珍稀鱼类遗传资源的重要材料^[5-7]。叶湘辉等^[8]报道了中华鲟组织培养的初步研究结果, 获得来源于中华鲟吻端和性腺组织的两个细胞系。Wang 等^[9]建立了来源于高首鲟鳍条、吻端和肌肉组织的细胞系, 而目前关于施氏鲟细胞离体培养研究尚属空白。本文通过施氏鲟细胞离体培养研究, 以期为我国施氏鲟和鲟科鱼类病毒性疾病研究以及鲟鱼遗传资源保存提供试验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验鱼 健康施氏鲟, 体长约 20 cm, 体重 120 g 左右。试验前室内暂养 1 周。

1.1.2 试剂 培养基 MEME(minimum essential medium eagle's), R1640、M199、L-15、两性霉素 B、青霉素/链霉素、Dulbecco's 磷酸盐缓冲液(DPBS)、胰蛋白酶-EDTA(trypsin-EDTA)、二甲亚砜(DMSO)、HEPES、HEPES-Na 均购自 Sigma 公司; 精制胎牛血清(defined fetal bovine serum, DFBS)

为 Hyclone 产品; 生长因子为 Peprotech 产品。

1.1.3 耗材与器皿 25 cm²、75 cm² 培养瓶(Corning); 1 ml、2 ml、5 ml、10 ml 移液管(Costar); 移液辅助器(HTL); 15 ml 和 50 ml 离心管(Becton Dickinson); 程序降温盒(Nalgene); 细胞冻存管(Nalgene); 过滤器(Nalgene)。

1.1.4 仪器 II 级生物安全柜(ESCO); 倒置显微镜(Nikon); 照相机(Nikon D80); 低速冷冻离心机(3K15, Sigma); 二氧化碳培养箱(Thermol); 恒温培养箱(Sanyo); 制冰机(Gelin); 液氮罐(MVE)。

1.2 方法

1.2.1 原代培养 用 10~20 ppm 高锰酸钾溶液对鱼体浸泡消毒 30 min, 再用 70% 酒精对鱼进行体表消毒。将鱼放入洁净托盘中置于 II 级生物安全柜中解剖。参考薛庆善^[9]和 Freshney^[10]的原代细胞培养方法, 分别取其鳍条、肝脏、脾脏、肾脏和心脏组织置于无菌培养皿中, 在终浓度为青霉素(500 U/ml)、链霉素(500 µg/ml)、两性霉素 B(12.5 µg/ml)的 DPBS 中洗涤 3~4 次, 用眼科剪将组织块剪成 1 mm³ 左右的小块, 尽可能将血细胞、结缔组织和脂肪等弃除。用不含血清的培养基将培养瓶润湿, 然后将组织块转移到培养瓶中, 均匀排列, 分别加入 1 ml 含 30% DFBS、青霉素(200 U/ml)、链霉素(200

收稿日期: 2007-01-22 接受日期: 2007-06-13

中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题和国家科技基础平台专项 (No.2006DKA30470-002) 资助

* 通讯作者: Tel: 0716-8115716, E-mail: zenglingbing@gmail.com

$\mu\text{g/ml}$)、两性霉素 B($5.0 \mu\text{g/ml}$)以及细胞生长因子的 MEME、R1640、M199 和 L-15, 于 25°C 下在培养箱中进行培养。在最初培养的 1~2 天内避免移动培养瓶以便使组织块贴壁, 在第 3 或 4 天吸出培养基, 添加 3 ml 新鲜培养基继续培养, 观察细胞从组织块中迁出与生长情况, 照相记录结果。

1.2.2 传代培养 参考细胞传代方法^[10]对从组织块中迁出并且生长良好细胞单层达到 70% 左右的细胞进行传代培养。传代前用手轻拍培养瓶使组织块脱离瓶壁, 吸出所有组织块和培养基, 用胰蛋白酶-EDTA 溶液(0.05% 胰蛋白酶, 0.02% EDTA-4Na, Sigma, T3924)消化细胞, 在显微镜下观察细胞消化进程, 待细胞单层渐渐解离成单个细胞后, 迅速用含 10% DFBS 的培养基中和过量胰蛋白酶-EDTA, 然后用 5 ml 的移液管吹打分散细胞数次, 将细胞悬液收集到 15 ml 离心管内, 1 000 r/min 离心 5 min。吸出离心管上层液体后用新鲜培养基重悬细胞沉淀, 将其按 1:2 比例转移至新的培养瓶内进行继续培养。

1.2.3 细胞培养条件 分别用 MEME、R1640、M199、L-15(DFBS 浓度为 20%; 25°C)进行传代细胞培养, 比较不同培养基条件下细胞生长情况。用含 20% DFBS 的 MEME, 分别置于 32°C 、 25°C 、 20°C 和 15°C 培养箱中培养细胞, 观察细胞在不同温度条件下的生长情况, 确定施氏鲟细胞的最佳生长温度。用含不同血清浓度(0%、10%、20% 和 30%)的 MEME 于 25°C 培养箱中培养细胞, 观察不同血清浓度对细胞生长的影响。在细胞培养过程中, 观察培养基 pH 的变化, 如发现培养基 pH 值变化明显, 用 HEPES 或 HEPES-Na 调节培养的酸碱度至 7.2~7.4 之间。

1.2.4 细胞冻存与复苏 参考 Freshney^[10]的方法对于生长旺盛、形态均匀的细胞分批进行液氮冷冻保存。保存液组成为含 10% DMSO, 30% DFBS 的 MEME。根据需保存的细胞数量, 确定保存液的总体积。首先配制一半总体积的保存液, 其中含 20% DMSO、30% DFBS, 其余为 MEME, 并置冰上预冷。然后将消化的细胞离心沉淀, 用含 30% DFBS 的 MEME 悬浮细胞沉淀, 将细胞悬液于冰上与保存液缓慢混合均匀, 再以 1.2 ml/管分装于细胞冻存管。将细胞冻存管放入内盛异丙醇的程序降温盒内(降温盒在 4°C 预冷), 再置于 -80°C 冰箱 12 h 后放入液氮罐中冻存。冻存细胞复苏时, 从液氮中取出冻存管, 迅速放入 37°C 水浴 5 min 解冻, 用移液管吸出细胞悬

液, 将其与含 20% DFBS 的 MEME 混合, 加入 25 cm^2 培养瓶内培养, 12 h 后吸出培养基和未贴壁细胞, 添加含 20% DFBS 的新鲜培养基继续培养。

2 结果

2.1 细胞原代培养

用含 30% DFBS、青霉素(500 U/ml)、链霉素($500 \mu\text{g/ml}$)、两性霉素 B($12.5 \mu\text{g/ml}$)以及细胞生长因子的 MEME、R1640、M199 和 L-15 对组织块进行培养, 在 2~4 天内有成纤维样、清晰的细胞从组织块迁出, 呈放射状生长。观察 4 种不同培养基中细胞的生长情况, 在 MEME 和 L-15 中细胞生长较为迅速, 且在 MEME 中肝脏、肾脏、脾脏、心脏和鳍条组织来源的细胞都生长较好, 而在 M199 和 R1640 中细胞较为缓慢。经过约 10 天培养, 大多数组织块周围迁出的细胞生长成 70% 左右的单层。经过对不同组织原代细胞培养的观察, 初步确立施氏鲟细胞的原代培养条件为: MEME, 温度 25°C , 血清浓度 30%。

图 1、图 2 分别表示施氏鲟脾脏组织细胞(Amur sturgeon spleen, AS-S)和肾脏组织细胞(Amur sturgeon kidney, AS-K)原代培养结果。

2.2 传代细胞培养

利用胰蛋白酶-EDTA 对原代培养长成长约 70% 单层的细胞进行消化 3~5 min, 显微镜下观察, 细胞间隙解离清晰, 细胞逐渐变圆, 轻拍培养瓶, 细胞可从瓶底脱落。传代细胞分瓶培养后, 贴壁稳定, 细胞呈典型成纤维样, 2~3 天可长成单层(图 3、图 4)。

以 AS-S 细胞为例, 使用 MEME 对不同温度(15°C 、 20°C 、 25°C 和 32°C)和血清浓度(0%、10%、20% 和 30%)条件下的细胞生长情况进行了初步比较。温度试验的结果表明, 使用相同的血清浓度(20% DFBS), 细胞在 15°C 培养条件下生长较为缓慢, 约培养 10 天细胞单层达到 80% 左右; 20°C 时细胞生长较快, 约培养 5 天细胞单层达到 80% 左右; 25°C 时细胞生长旺盛, 2~3 天内细胞长成汇合单层; 32°C 时细胞最初生长迅速, 但随后细胞单层出现退化脱落现象。不同血清浓度的试验结果表明, 于 25°C 条件下, 血清浓度为在 0%(即无血清)时, 少许细胞可贴壁, 但细胞伸展不明显, 不能生长成单层, 说明该细胞属于血清依赖型细胞; 10% 的血清浓度下细胞也可以正常生长, 但相对 20% 和 30% 浓度的培养基, 其速度相对较为缓慢, 约需 3~5 天长成单层。20% 和 30%



图1 施氏鲟脾脏组织在30%DFBS的MEME中原代培养第9天结果,成纤维样细胞以放射状向外生长形成单层(40×)

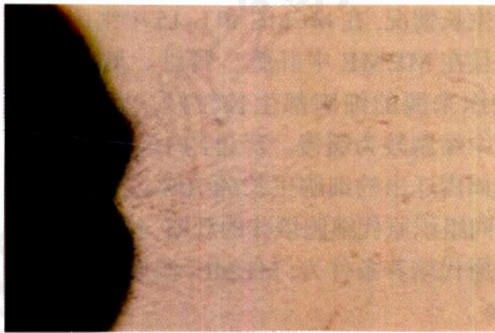


图2 施氏鲟肾脏组织在30%DFBS的MEME中原代培养第3天结果,成纤维样细胞以放射状向外生长(40×)

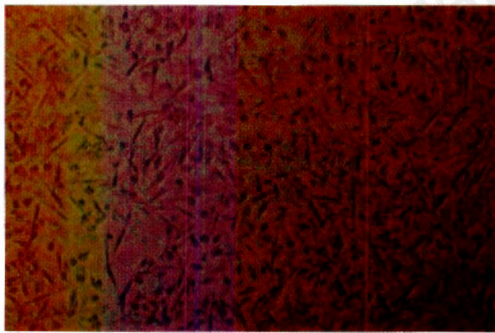


图3 施氏鲟脾脏组织细胞在25 °C、20%DFBS的MEME中传代培养第5代的致密单层细胞(100×)

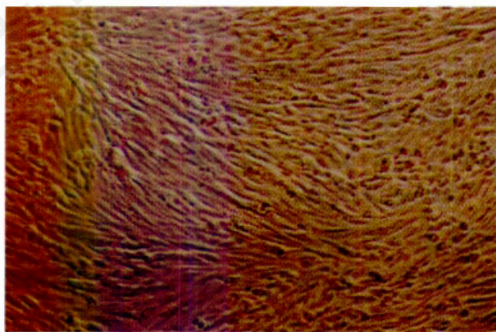


图4 施氏鲟肾脏组织细胞在25 °C、20%DFBS的MEME中传代培养第5代的致密单层细胞(100×)

血清浓度下细胞生长迅速,差异不显著,约2~3天细胞长成汇合单层单层细胞,且单层稳定,细胞形态均一。

综合对不同温度、血清浓度和培养基比较,初步确定施氏鲟细胞的传代培养条件为:MEME、温度25 °C、血清浓度20%。

2.3 细胞冻存与复苏

对生长良好的细胞用冻存液(10%DMSO, 30%DFBS以及MEME)制成细胞悬液,通过程序降温后置于液氮保存。保存1个月后复苏细胞,将细胞冻存管从液氮中取出,迅速放入37 °C水浴5 min解冻,用移液管吸出细胞悬液,接种于培养瓶内,添加5 ml含20%DFBS的MEME,培养12 h后吸出培养基,以去除未贴壁的细胞和残留DMSO,再添加5 ml含20%DFBS的MEME继续培养。冷冻复苏的细胞保持有较高的贴壁效率,约60%左右,且细胞形态均一,3~4天内可长成汇合单层。

综合上述结果,本试验初步确立了施氏鲟多种组织来源细胞的原代培养条件和传代培养条件。施氏鲟细胞传代培养的最佳条件为:培养基MEME、温度25 °C、血清浓度20%。细胞液氮冷冻后复苏生长旺盛,表明初步建立了施氏鲟可连续传代细胞系。

3 讨论

3.1 离体组织块细胞培养方法

组织块移植细胞快速培养方法是一种高效、快捷的细胞培养方法。组织块对细胞的生长提供了良好的基质和生长环境,新生细胞均质性良好^[11],容易贴壁和生长。Wang等^[12]利用组织块法对高首鲟的肌肉等组织来源细胞进行培养,发现在组织块接种后第2天有细胞从组织块周围迁出,第3~4天出现了细胞集落,而在5~6天细胞形成单层。邓云等^[12]对异源四倍体鲫鲤肾脏组织块进行原代培养,结果在培养第4天左右组织块周围出现明显的生长晕,第8天有集落形成,18天后形成细胞单层。而本试验在组织块接种后2~3天内细胞从组织块周围迁出,10天左右组织块周围的细胞长成单层。这与鱼类组织细胞原代培养时的不同生长速度与培养环境和细胞特性有关。组织块培养法有时会在组织块周围出现脱落的细胞(尤其在培养如肝脏组织细胞时),这些脱落的细胞会影响新生细胞从组织块迁出。通过试验我们发现原代培养的第3~4天待组织块贴壁稳定后,对组织进行轻微的洗涤,去掉脱落未贴壁的细胞,有利于

新生细胞的生长。

3.2 细胞传代

在细胞传代过程中, 胰蛋白酶-EDTA 对细胞的消化程度是传代过程中的关键之一。消化时间过长则对细胞造成损伤程度增加, 降低传代后的贴壁率。消化时间过短, 则不能完全将贴壁细胞消化完全^[11]。将细胞放回培养箱中消化以及结合显微镜观察消化程度是比较适宜的方法。采用离心法沉淀细胞, 可以比较彻底地去除残留的胰蛋白酶, 但应注意离心速度和离心时间, 速度过高, 时间过长, 会对细胞造成一定损伤。通常情况下, 1 000~1 200 r/min 离心 5 min 即可(3K15 离心机, Sigma)。使用移液管悬浮细胞沉淀时, 应充分分散细胞, 但需要控制吹打力度和次数, 避免损伤细胞。在细胞传代培养后 12 h, 观察细胞的贴壁情况, 如果有较多细胞没有贴壁, 需要进行清洗以除去未贴壁细胞。其方法是吸出培养基, 3 000 r/min 离心 5 min, 再吸出上清液, 加入培养瓶即可。此外, 在传代培养的过程中应及时观察和调节培养液 pH 值, 控制 pH 值在适宜范围, 使用 HEPES, HEPES-Na 溶液即可。施氏鲟细胞在 25 °C 时生长状态, 该培养温度与施氏鲟生长温度基本相一致。对于不同鱼类甚至同种鱼类的不同组织而言, 常用的 4 种培养基 MEME、M199、R1640 和 L-15 的细胞培养效果常常差异比较明显^[2,6,12,13], 这可能与不同来源细胞的一些独特特性相关。

3.3 细胞冻存与复苏

细胞冻存是使细胞温度逐渐下降并冰冻的过程, 该过程须特别注意温度变化速度和细胞质冰晶化过程。DMSO 是目前广泛应用的细胞冷冻保护剂, 尽管对细胞有一定的毒性作用, 但其保护效果好^[7]。细胞冷冻过程中采用异丙醇作为降温介质的程序降温盒效果较好, 可以在冷冻初期实现每分钟降温约 1 °C

要求。对液氮冷冻保存后的细胞进行复苏、再培养和可连续传代是检验细胞系的建立和冷冻保存效果的有效途径。在复苏细胞时, 将细胞冻存管迅速置于 37 °C 的水浴中解冻, 可降低对细胞造成的损害。Wang 等^[2]用含 20%DMSO 和 20%FBS 对高首鲟细胞进行冷冻保存, 18 个月后对其复苏后有 90% 的细胞保持活力。Zhao 等^[13]用 13%DMSO 和 10%FBS 对金鳍条细胞冷冻保存复苏后也有 85% 以上存在活力。本试验中通过液氮保存 1 个月后复苏, 约有 60% 左右的细胞可以贴壁生长, 有待于进一步改进细胞冷冻保存与复苏的条件。

本试验对施氏鲟不同组织来源细胞的原代培养、传代培养以及冷冻保存与复苏等进行了初步研究, 取得了一些重要数据和结果, 但是对于细胞系的详细生物学特征, 如生长曲线、细胞染色体组型、贴壁效率等, 以及不同组织来源细胞对鲟鱼病毒敏感性等正在进一步研究中。

参考文献 (References)

- [1] 赵玉宝等. 北京水产, 2006, (5): 6
- [2] Wang G et al. *Methods Cell Sci*, 2004, **25**: 211
- [3] Hua YP et al. *J Forest Res*, 2005, **16**: 79
- [4] Adkinson MA et al. *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 1998, **18**: 29
- [5] Wise JP et al. *J Exp Zool*, 2002, **292**: 217
- [6] Chen SL et al. *Aquaculture*, 2005, **249**: 63
- [7] Mauger PE et al. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2006, **144**: 29
- [8] 叶湘辉等. 水生生物学报, 1999, **23**: 566
- [9] 薛庆善. 体外培养的原理与技术, 北京: 科学出版社, 2001
- [10] Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 4th ed., New York: Wiley-Liss, 2000
- [11] 陆凤花等. 细胞生物学杂志, 2005, **27**: 451
- [12] 邓云等. 湖南师范大学自然科学学报, 2006, **29**: 75
- [13] Zhao Z et al. *Methods Cell Sci*, 2003, **25**: 155

Preliminary Establishment of Cell Lines Derived from Different Tissues of Amur Sturgeon, *Acipenser schrencki* Brandt

Yan Meng¹, Yan Zhang³, Lin Zhang^{1,2}, Han-Bing Xiao¹, Luo-Xin Li³, Yan-Qing Yang¹, Ling-Bing Zeng^{1,2,3*}

(¹Key Laboratory of Freshwater Ecology and Healthy Aquaculture, Chinese Academy of Fishery Sciences; ²Fish Pathology Laboratory, Yangtze River Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences; ³Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm and Biotechnology, Ministry of Agriculture of China; Jingzhou 434000, China)

Abstract By using the tissue explantation technique, primary culture of cells derived from the liver, spleen, kidney, fin and heart tissue of Amur sturgeon, *Acipenser schrencki* Brandt, were conducted. In 2–3 days cells migrate out around tissues and in 10 days post culture cells outgrow to monolayer. Continuous cell lines from liver, spleen, kidney and heart tissues were established after subculture of primary cells with trypsin-EDTA digestion method. The optimized conditions for these cells are: minimum essential medium eagle's (MEME), 25 °C 20% fetal bovine serum. Cells were cryopreserved with preservative DMSO in liquid nitrogen and grew well after recovery. The establishment of cell lines derived from Amur sturgeon has provided important experimental materials for the research on sturgeon virosis and genetic resources conservation.

Key words Amur sturgeon (*Acipenser schrencki* Brandt); cell lines; cultivation *in vitro*

Received: January 22, 2007 Accepted: June 13, 2007

This work was supported by the Key Laboratory of Freshwater Ecology and Healthy Aquaculture, Chinese Academy of Fishery Sciences and the National Basic Science and Technology Project (No.2006DKA30470-002)

*Corresponding author. Tel: 86-716-8115716, E-mail: zenglingbing@gmail.com