

半滑舌鳎肝脏细胞系的建立与鉴定^①任国诚^② ** 陈松林^③ ** 沙珍霞 **

(* 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

(** 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室,中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 以半滑舌鳎肝脏组织为材料,探索了组织细胞分离培养条件,建立了半滑舌鳎组织细胞培养技术及半滑舌鳎肝脏细胞系(HTLC)。该细胞系的培养基是添加了抗生素、胎牛血清(FBS)、花鲈血清(SPS)、成纤维生长因子(bFGF)的MEM。HTLC形态呈纤维状,在培养基中生长迅速,经200多天的培养,成功传代30多代。检测了温度、FBS浓度、bFGF对其生长的影响,结果表明,在24~30℃生长良好,但当温度低于12℃时细胞生长速度明显减慢;在一定浓度范围内,其生长速度随血清浓度的升高而增快,血清浓度过高或过低对其生长不利;在培养基中添加bFGF可以使细胞生长速度显著提高;其二倍体核型为 $2n = 21t$ 。将绿色荧光蛋白(GFP)报告基因通过脂质体介导的方法转入HTLC中并成功地获得了表达,转化率为20%左右。该细胞系的建立为研究鱼类病毒学、免疫学、遗传学、功能基因组学提供了很好的实验材料。

关键词 半滑舌鳎,肝脏细胞系,核型,GFP报告基因

0 引言

鱼类的细胞培养起始于20世纪60年代初,迄今为止,已经建立的鱼类细胞系多为淡水鱼类和溯河性鱼类,主要用于病毒学研究、免疫学研究^[1-4],海水鱼类中建立的细胞系比较少^[5-11]。半滑舌鳎属于鲽形目舌鳎科,是我国新开发的重要海水养殖鱼类,在我国沿海均有分布,其分布数量以渤海最多。半滑舌鳎是一种近海温水性大型底层鱼类,具有活动范围小、营养等级低、食性温和、个体大、生长快和市场价值高等优点。半滑舌鳎雌鱼中期分裂相具有异型染色体(ZW),雄鱼中期分裂相具有同型染色体(ZZ)^[12]。经过核型分析发现,半滑舌鳎染色体数目为 $2n = 42$,全部为端着丝点染色体。值得关注的是,半滑舌鳎雌鱼生长速度为雄鱼的2~3倍,雌雄生长速度差别在所有鱼类中最为明显。因此,半滑舌鳎除具有重要的养殖价值和广阔的推广前景外,还是一个在进行性别发育和分化研究上很有潜力的模式鱼类。性别控制将成为今后鱼类研究的重点和热点,但由于缺少细胞系这种良好的实验材料,目前

对半滑舌鳎的研究主要限于养殖条件探索、人工育苗,在筛选、分析功能基因方面的研究很少,为此,本研究建立了半滑舌鳎肝脏细胞系HTLC,现未见国内外有建立半滑舌鳎细胞系的报道。

1 材料和方法

1.1 原代培养和继代培养

本实验所用的半滑舌鳎取自烟台海阳渔场。自半滑舌鳎体内取出肝脏,70%酒精消毒2~3min,磷酸缓冲液(PBS)清洗3次,然后将组织块在10倍胰酶(Trypsin 0.5%,EDTA 0.2%,NaCl 0.8%)中处理10~20min,待组织块软化后,PBS清洗3次,用剪刀将组织块剪成 1mm^3 的小块,然后把小组织块和单细胞悬浮液接种于培养瓶中,置于24℃恒温培养箱中培养。完全培养基HTLCM1是在MEM培养基中添加20mM的Hepes,100U/ml的青霉素,100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的链霉素,20%的FBS,0.5%的花鲈血清(SPS)和4ng/ml的成纤维生长因子(bFGF)而成,每隔6~7天更换一次培养基^[13,14]。当细胞长满培养皿的95%时,用胰酶消化法将细胞按1:2的比例进行继代

① 863计划(2006AA10A01,2006AA09Z406)资助项目。
② 男,1978年生,博士生,研究方向:鱼类细胞生物学。
③ 通讯作者,E-mail:chensl@ysfri.ac.cn
(收稿日期:2007-02-02)

培养。当细胞长至一定数量后,进行冷冻保存:将已经消化好的细胞悬浮液与冷冻保存液(含20% DMSO的 HTLCM1)在冷冻保存管中等体积混合,先在-80℃超低温冰箱中冷冻4h,再转入液氮(-196℃)中长期保存^[8,9]。

1.2 温度对细胞生长的影响

将 HTLC 以 2×10^4 的初始密度接种在 12 孔培养板中,将培养板分别置于 12、18、24 和 30℃ 培养箱中。在第 2、4、6、8 天,用血球记数板在显微镜下计算每孔细胞的数量。实验重复 4 次^[13,14]。

1.3 不同浓度 FBS 和 bFGF 对细胞生长的影响

将 HTLC 以 4×10^4 的初始密度接种于 12 孔培养板中,培养板放在 24℃ 培养箱中。16~24h 后,将原来的培养基去掉,换上含不同浓度 FBS 和 bFGF 的培养基。6 天后,用血球记数板在显微镜下计算每孔细胞数量。实验重复 4 次^[13,14]。

1.4 染色体分析

HTLC 传至 20 多代时,进行了核型分析。传代后的细胞在 25cm² 培养瓶中培养 36~48h,在培养基中加入 0.5μg/ml 的秋水仙素,处理 4h 后收集细胞,用 0.075M 的 KCl 低渗 25min,然后加入 1ml 预冷的卡诺固定液,离心后加入预冷的卡诺固定液 5ml,处理 5min,重复 3 次。滴片时采用冷滴片法,空气中干燥后,用 5% 的 Giemsa 染色 25min。最后进行核型分析并统计了 100 个分裂相的染色体数目^[15,16]。

1.5 细胞转化

实验所用的 pCMV-EGFP 质粒由本实验室保存,该质粒利用病毒 CMV 作为启动子。转化方法采用脂质体(Genejammer)法。将 HTLC 以 4×10^4 的密度接种在 12 孔板上,18~24h 后待细胞贴壁稳定,更换新鲜的完全培养基。转化前,用不含血清和抗体的 MEM 将细胞洗两遍,换上不含血清和抗体的 MEM 培养基,同时,将适量含 GFP 的质粒 DNA 和脂质体分别溶于不含血清和抗体的 MEM 中,然后将两者以 1:6 的比例混合,形成 DNA-脂质体混合物。将 DNA-脂质体混合物逐滴加到培养基表面,振动培养板,使混合物均匀分布在培养基中,培养 6h 后,更换新鲜的完全培养基,继续培养 24~72h 后,观察荧光的表达。

2 实验结果

2.1 半滑舌鳎肝脏细胞系的建立

剪成小块的肝脏组织块和分离出的单细胞悬浮

液置于培养瓶中培养,1~2 天后发现细胞贴壁,刚贴壁的细胞直径为 30~40μm,随着细胞的生长,细胞形态逐渐变长,呈纤维状(图 1)。5~6 天后,培养瓶里的细胞在底部铺至 90% 满,需要进行传代,以后每隔 6~7 天传代 1 次。至今 HTLC 已培养了 200 多天,传至 30 多代,冷冻保存的细胞经解冻复活,成活率达到 70% 以上。

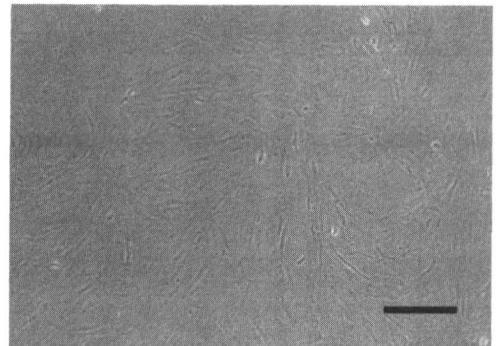


图 1 第 16 代 HTLC 形态(标尺为 100μm)

2.2 温度对细胞生长的影响

在 12~24℃ 之间,HTLC 的生长速度随着温度的升高而增高,虽然细胞在 24℃ 和 30℃ 时生长都良好,但在 30℃ 时生长速度开始下降,在 12℃ 和 18℃ 时,细胞生长速度下降尤为显著(图 2)。

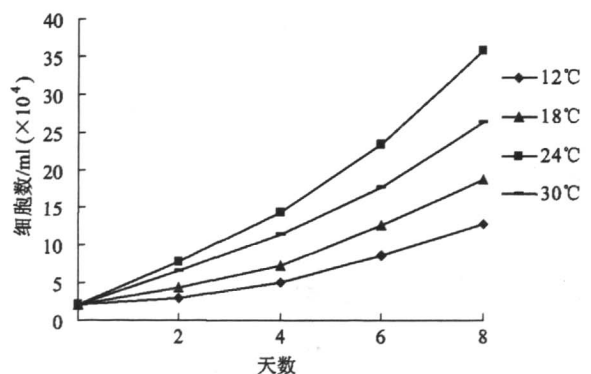
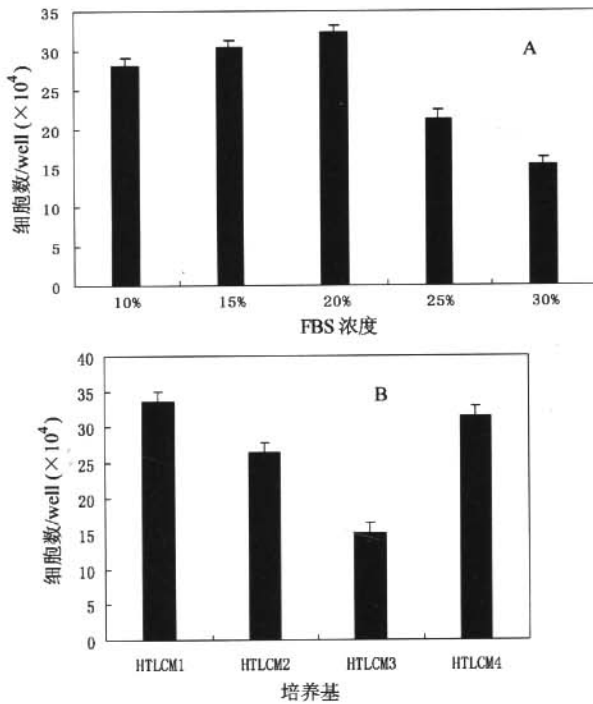


图 2 不同温度对 HTLC 生长的影响

2.3 不同浓度的 FBS 和 bFGF 对细胞生长的影响

HTLC 在含 20% FBS 的培养基中的生长速度比在含 15% 和 10% FBS 的培养基中要快(图 3-A), bFGF 的缺失对细胞生长具有明显影响,而缺少 0.5% 的 SPS 对细胞生长影响不大(图 3-B)。



HTLCM1 : 20% FBS , 4 ng/ml bFGF and 0.5% SPS ; HTLCM2 : 20% FBS , 2 ng/ml bFGF , 0.5% SPS ; HTLCM3 : 20% FBS , 0.5% SPS ; HTLCM4 : 20% FBS , 4 ng/ml bFGF .

图3 不同浓度的 FBS 和 bFGF 对 HTLC 生长的影响

2.4 核型分析

HTLC 传至 21 代时进行了染色体分析 , 在统计的 100 个分裂相中 , 染色体数目从 21 到 63 不等 , 但 64% 的分裂相染色体数目为 42 条 (图 4-A)。虽然染色体数目分布不均匀 , 但二倍体染色体数目出现的频率是最高的 , 其他非整倍体只占了很小的比例。对含有正常二倍体染色体数目的分裂相进行了核型分析 , 42 条染色体全部是端着丝点染色体 (图 4-B)。

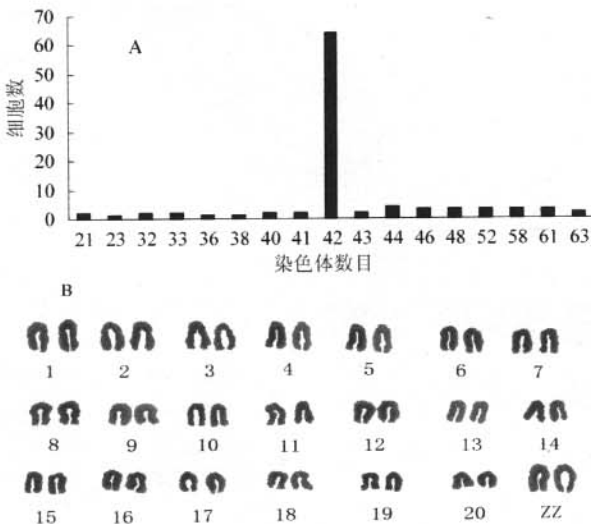


图4 第 21 代 HTLC 染色体数目分布 (A) 和染色体核型 (B)

2.5 GFP 基因在 HTLC 中的表达

通过脂质体 (genejammer) 法成功的将线性化的 pCMV-EGFP 质粒转入到 HTLC 中 , 并在转化后的 48h 观察到了 EGFP 基因的表达 (图 5)。在大约 20% 的细胞中 , EGFP 基因得到了表达 , 这证明用脂质体法可以成功地对 HTLC 进行转化 , 并且 CMV 启动子可以在 HTLC 中启动 EGFP 基因的表达。

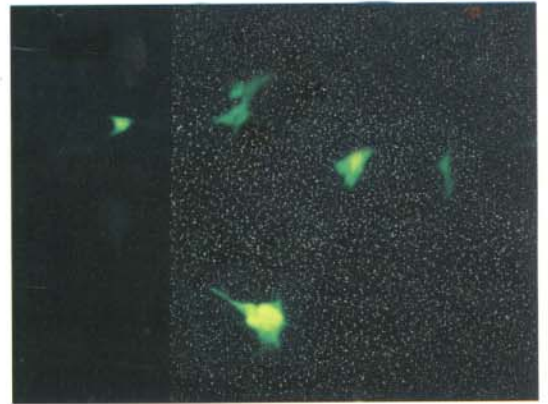


图5 GFP 基因在 HTLC 中的表达

3 讨论

本研究从半滑舌鲷肝脏组织中建立了半滑舌鲷肝脏细胞系 , 该细胞系一直稳定生长 , 具有正常的二倍体核型 , 至今已培养了 200 多天 , 传至 30 多代。

半滑舌鲷肝脏细胞在 12 ~ 30℃ 的温度范围内都能生长 , 24℃ 时达到最快生长速度 , 是其最适宜生长温度 , 温度过高或过低都会使其生长减慢。在一定浓度范围内 , HTLC 的生长速度随 FBS 浓度的增高而加快 , 但血清浓度过高会抑制 HTLC 的生长。在人类细胞中 , bFGF 是促进黑色素细胞有丝分裂的因子^[17]。在斑马鱼中 , bFGF 能促进有丝分裂并抑制黑色素细胞^[18]。本文通过对比 HTLC 在含有和缺失 bFGF 的培养基里生长的差异 , 证明 bFGF 是一种能促进 HTLC 有丝分裂的因子 , 因此推测在其他鱼类细胞培养中也应该有此作用^[8,9,19,20]。整倍体核型是鉴定一个细胞系的重要参数 , 本研究通过对半滑舌鲷肝脏细胞进行核型分析发现有 64% 的细胞具有二倍体染色体数目 ($2n = 42$)^[12] , 具有二倍体核型的细胞所占比例接近于或高于其他鱼类细胞系中的报道^[8,9]。以 GFP 基因为报告基因 , 通过脂质体介导半滑舌鲷肝脏细胞的转化 , GFP 基因在 HTLC 中成功获得了表达 , 为进一步进行基因打靶和功能

基因分析研究奠定了基础。

目前,病毒学、功能基因组学已成为鱼类研究的重点,很多研究工作难以开展或进展缓慢都是因为缺少良好的实验材料,细胞系的建立弥补了这一缺陷。很多鱼类雌性个体生长速度明显比雄性个体快,在半滑舌鲷中已筛选到特异的性别相关片段,利用细胞系可以检测片段的特异性及在染色体上进行定位,因此半滑舌鲷细胞系的建立对于把半滑舌鲷建成性别控制模式鱼类具有重大意义,而且也进行其他功能基因的筛选和分析奠定了良好基础。

参考文献

[1] Hightower L H , Renfro J L . Recent applications of fish cell culture to biomedical research . *J Exp Zool* , 1988 , 248 :290-302

[2] Bahich H , Borenfreund E . Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells : a review . *Toxicol Vitro* , 1991 , 5 :91-100

[3] Bols N C , Lee L E J . Technology and uses of cell culture from tissues and organs of bony fish . *Cytotechnol* , 1991 , 6 :163-187

[4] Wise J P Sr , Winn R N , Renfro J L . Generating new marine cell lines and transgenic species . *J Exp Zool* , 2002 , 15 :292-295

[5] Fryer J L , Lannon C N . Three decades of fish cell culture : a current listing of cell lines derived from fish . *J Tiss Cult Methods* , 1994 , 16 :87-94

[6] Bejar J , Borrego J J , Alvarez M C . A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata*) . *Aquaculture* , 1997 , 150 :143-153

[7] Chen S L , Hong Y , Scherer S , et al . Lack of ultra-violet light inducibility of the medakafish (*Oryzias latipes*) tumor suppressor gene p53 . *Gene* , 2001 , 264 :197-203

[8] Chen S L , Sha Z X , Ye H Q . Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch blastula embryo . *Aquacul-*

ture , 2003 , 218 :141-151

[9] Chen S L , Ye H Q , Sha Z X , et al . Derivation of a pluripotent embryonic cell line from red sea bream blastulas . *J Fish Biol* , 2003 , 795-805

[10] 杨先乐 . 鱼类组织培养的回顾与展望 . 水产学报 , 1999, 23 :74-81(增刊)

[11] Chi S C , Hu W W , Lo B J . Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper , *Epinephelus coioides* : a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV) . *J Fish Dis* , 1999 , 22 :173-182

[12] 周丽青 , 杨爱国 , 柳学周等 . 半滑舌鲷染色体核型分析 . 水产学报 , 2005 , 29 :417-419

[13] Chen S L , Ren G C , Sha Z X , et al . Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder for virus isolation . *Diseases of aquatic organisms* , 2004 , 60 :241-246

[14] Chen S L , Ren G C , Sha Z X , et al . Development and characterization of a continuous embryonic cell line from turbot . *Aquaculture* , 2005 , 249 :63-68

[15] Levan A , Fredga K , Sandberg A . Nomenclature for centromeric position on chromosomes . *Hereditas* , 1964 , 52(2) :201-220

[16] Liu J , You F , Wang X C , et al . Chromosome and karyotype evidence of artificial induced gynogenesis in the olive flounder *Paralichthys olivaceus* . *Ocean Limnol Sinica* , 1999 , 30 :68-72

[17] Halaban R , Langdon R , Birchall N , et al . Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes . *J Cell Biol* , 1988 , 107 :1611-1619

[18] Bradford C S , Sun L , Barnes D W . Basic fibroblast growth factor stimulates proliferation and suppresses melanogenesis in cell cultures derived from early zebrafish embryos . *Mol Mar Biol Biotechnol* , 1994 , 3 :78-86

[19] Sun L , Bradford C S , Ghosh C , et al . ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos . *Mol Mar Biol Biotechnol* , 1995 , 4 :193-199

[20] Hong Y , Winkler C , Schartl M . Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*) . *Mech Develop* , 1996 , 60 :33-44

Development and characterization of a liver cell line from half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*)

Ren Guocheng^{***} , Chen Songlin^{**} , Sha Zhenxia^{**}

(* College of Marine Life Science , China Ocean University , Qingdao 266003)

(** Yellow Sea Fisheries Research Institute , Chinese Academy of Fisheries Sciences , Qingdao 266071)

Abstract

A liver cell line from half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*) , named HTLC , was established and was cultured for more than 200 days with more than 30 passages . The HTLC cells were cultured in the MEM medium supplemented with antibiotics , fetal bovine serum (FBS) , sea perch serum (SPS) , and basic fibroblast growth factor (bFGF) . The cells were fibriform and stably grew in culture . The effects of temperature , FBS concentration and bFGF on the growth of HTLC cells were examined . The cells grew well in the temperature range of 24-30°C , but had a reduced growth rate at the temperature below 12°C . The growth rate of HTLC cells in the medium containing 20% FBS was higher than that in the medium containing 15% and 10% FBS . Addition of bFGF to the medium significantly increased the growth rate of HTLC cells . Chromosome analysis revealed that HTLC cells had a normal diploid karyotype with 2n = 21t . Green fluorescent protein (GFP) reporter genes were transferred into HTLC cells and were successfully expressed .

Key words : half-smooth tongue-sole , liver cell line , karyotype , GFP reporter gene

作者: 任国诚, 陈松林, 沙珍霞, Ren Guocheng, Chen Songlin, Sha Zhenxia
作者单位: 任国诚, Ren Guocheng (中国海洋大学海洋生命学院, 青岛, 266003; 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛, 266071), 陈松林, 沙珍霞, Chen Songlin, Sha Zhenxia (农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛, 266071)
刊名: 高技术通讯 ISTIC EI PKU
英文刊名: CHINESE HIGH TECHNOLOGY LETTERS
年, 卷(期): 2008, 18(6)
被引用次数: 4次

参考文献(20条)

1. [Hightower L H;Renfro J L Recent applications of fish cell culture to biomedical research](#)[外文期刊] 1988
2. [Bahich H;Borenfreund E Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells:a review](#) 1991
3. [Bols N C;Lee L E J Technology and uses of cell culture from tissues and organs of bony fish](#) 1991
4. [Wise J P Sr;Winn R N;Renfro J L Generating new marine cell lines and transgenic species](#) 2002
5. [Fryer J L;Lannon C N Three decades of fish cell culture:a current listing of cell lines derived from fish](#) 1994
6. [Bejar J;Borrego J J;Alvarez M C A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream \(Sparus aurata\)](#) 1997
7. [Chen S L;Hong Y;Scherer S Lack of ultra-violet light inducibility of the medakafish \(Oryzias latipes\) tumor suppressor gene p53](#)[外文期刊] 2001(2)
8. [Chen S L;Sha Z X;Ye H Q Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch blastula embryo](#)[外文期刊] 2003
9. [Chen S L;Ye H Q;Sha Z X Derivation of a pluripotent embryonic cell line from red sea bream blastulas](#)[外文期刊] 2003(3)
10. 杨先乐 鱼类组织培养的回顾与展望 1999(zk)
11. [Chi S C;Hu W W;Lo B J Establishment and characterization of a continuous cell line \(GF-1\) derived from grouper, Epinephelus coioides:a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus \(GNNV\)](#)[外文期刊] 1999
12. 周丽青;杨爱国;柳学周 半滑舌鳎染色体核型分析[期刊论文]-水产学报 2005(3)
13. [Chen S L;Ren G C;Sha Z X Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder for virus isolation](#)[外文期刊] 2004
14. [Chen S L;Ren G C;Sha Z X Development and characterization of a continuous embryonic cell line from turbot](#)[外文期刊] 2005(1/4)
15. [Levan A;Fredga K;Sandberg A Nomenclature for centromeric position on chromosomes](#) 1964(02)
16. [Liu J;You F;Wang X C Chromosome and karyotype evidence of artificial induced gynogenesis in the olive flounder Paralichthys olivaceus](#) 1999
17. [Halaban R;Langdon R;Birchall N Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes](#) 1988
18. [Bradford C S;Sun L;Barnes D W Basic fibroblast growth factor stimulates proliferation and suppresses melanogenesis in cell cultures derived from early zebrafish embryos](#) 1994

19. [Sun L;Bradford C S;Ghosh C](#) [ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos](#) 1995
20. [Hong Y;Winkler C;Schartl M](#) [Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish \(*Oryzias latipes*\)](#) 1996

本文读者也读过(2条)

1. [任国诚. 陈松林. 沙珍霞. REN Guo-cheng. CHEN Song-lin. SHA Zhen-xia](#) [漠斑牙鲆胚胎细胞系的建立与鉴定](#) [期刊论文]-[中国水产科学](#) 2007, 14(4)
2. [樊廷俊. 郭雪阳. 姜国建. 徐晓辉. 孙爱. 徐彬. FAN Ting-Jun. GUO Xue-Yang. JIANG Guo-Jian. XU Xiao-Hui. SUN Ai . XU Bin](#) [圆斑星鲽连续性鳃细胞系的建立](#) [期刊论文]-[中国海洋大学学报 \(自然科学版\)](#) 2010, 40(9)

引证文献(4条)

1. [郑媛. 陈松林](#) [半滑舌鳎脾脏、卵巢组织细胞离体培养的初步研究](#) [期刊论文]-[水产学报](#) 2012(10)
2. [李文峰. 麦康森. 黄健. 史成银](#) [鱼类细胞培养及其在病毒学研究中的应用](#) [期刊论文]-[动物医学进展](#) 2010(5)
3. [孟凡华. 肖红梅. 张东](#) [鲤鱼吻端和尾鳍细胞的生长形态及增殖能力比较研究](#) [期刊论文]-[内蒙古师范大学学报 \(自然科学汉文版\)](#) 2013(1)
4. [张博. 陈松林](#) [近10年鱼类细胞培养研究进展及应用展望](#) [期刊论文]-[海洋科学](#) 2011(7)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_gjstx98200806019.aspx