

半滑舌鳎脾脏、卵巢组织细胞离体培养的初步研究

郑媛^{1,2}, 陈松林^{2*}

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业部海洋渔业资源可持续利用重点实验室, 山东 青岛 266071)

摘要: 实验采用胰酶消化法, 对半滑舌鳎脾脏、卵巢组织细胞进行离体培养, 结果显示, 脾脏、卵巢细胞能够在添加 20% FBS, 50 mmol/L 2-Me, 100 U/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 10 ng/mL bFGF 的 MEM 完全培养基中生长, 两种细胞的形态均为成纤维样, 脾脏细胞可传至第 9 代, 卵巢细胞至今已传至第 11 代。脾脏、卵巢细胞染色体中期分裂相均为正常的二倍体核型 ($2n=42$), 且具有异型 W 染色体。20% 的血清浓度更适用于卵巢细胞传代培养。利用脂质体可将含有 RFP 荧光报告基因的质粒成功转入脾脏细胞中。

关键词: 半滑舌鳎; 脾脏; 卵巢; 离体培养; 传代培养

中图分类号: Q 175; S 965

文献标志码: A

半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 属鲽形目 (Pleuronectiformes), 舌鳎科 (Cynoglossidae), 舌鳎属 (*Cynoglossus*), 俗称牛舌头、鳎目、鳎米, 是一种暖温性近海大型底层鱼类, 终年生活栖息在我国近海海区^[1], 具广温、广盐和适应多变的环境条件的特点。半滑舌鳎市场价值高, 但自然资源量少, 是我国新开发的重要海水养殖鱼类。但是, 随着半滑舌鳎人工养殖规模的不断扩大和集约化程度的不断提高, 养殖过程中的病害问题也日趋严重, 如 2006 年夏, 山东青岛某渔场养殖半滑舌鳎大量死亡, 致病病原菌为美人鱼发光杆菌杀鱼亚种 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)^[2]; 2008 年, 江苏赣榆某渔场半滑舌鳎出现大量死亡, 判定分离菌为利斯顿氏菌属 (*Listonella* MacDonell and Colwell 1986) 的鳗利斯顿氏菌 [*Listonella anguillarum* (Bergeman 1909) MacDonell and Colwell 1986]。目前, 国内外尚未见到有关半滑舌鳎病毒病害的报道。半滑舌鳎不同器官组织的培养细胞, 不仅可用于该鱼种病毒学、免疫学以及资源保护等领域的研究, 为该鱼种基因的筛选与功能分析、基因工程遗传育

种提供好的实验体系, 而且能为细胞骨架、发育学和细胞系统发生等方面的分子及细胞水平研究提供稳定的细胞来源。

目前, 已经建成并见诸报导的半滑舌鳎细胞系有 4 个, 分别为胚胎细胞系^[3]、肝脏细胞系^[4]、心肌细胞系^[5]和精巢细胞系^[6]。国内外尚未见到关于半滑舌鳎脾脏、卵巢组织细胞离体培养的报道。本实验通过开展半滑舌鳎脾脏、卵巢细胞离体培养研究, 以期今后脾脏、卵巢组织细胞体外培养及其细胞系的建立提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

半滑舌鳎雌鱼取自烟台海阳市黄海水产有限公司, 选取体质量 100~200 g 的健康个体。

1.2 实验方法

原代培养 无菌取出半滑舌鳎脾脏、卵巢, 放在添加 400 U/mL 青霉素、400 μ g/mL 链霉素的 MEM 基本培养基 (Modified Eagle's Medium, Gibco) 中移入超净工作台内, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 2 遍后将脾脏、卵巢组织剪成

收稿日期: 2012-02-15 修回日期: 2012-06-04

资助项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903046); 国家自然科学基金重点项目 (31130057); 山东省泰山学者工程专项

通讯作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

约 1 mm^3 大小,接着用 1 mL 的 0.25% 胰酶混合液(添加 0.25% 胰酶和 0.2% EDTA 的 PBS 溶液)消化 20 min 后添加 3 mL MEM 完全培养基[MEM 基本培养基添加 20% 胎牛血清(FBS), 50 mmol/L 2-巯基乙醇(2-Me), 100 U/mL 青霉素, $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 链霉素, 1 mmol/L 丙酮酸钠, 10 ng/mL bFGF(成纤维生长因子)]终止消化。收集脾脏组织细胞悬液,以 $2\ 200\text{ r/min}$ 离心 2 min ;将所得沉淀用 1 mL MEM 完全培养基悬浮后接种在 25 cm^2 培养瓶中;另将经消化处理的卵巢组织细胞悬液用 200 目的尼龙筛网过滤后收集滤液,以 $2\ 200\text{ r/min}$ 离心 2 min ,将所得沉淀用 1 mL MEM 完全培养基悬浮后接种在 25 cm^2 培养瓶中。置 $24\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养;次日,添加 1 mL MEM 完全培养基至培养瓶。

传代培养 脾脏组织细胞悬液和卵巢细胞悬液原代培养 5 d 后,用 0.25% 胰酶混合液消化并进行原瓶传代;待细胞再次长满瓶底后按照常规方法以 $1:2$ 比例进行传代培养。培养卵巢细胞前 5 代需添加一半旧培养基。培养液均为添加 MEM 完全培养基,培养温度为 $24\text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.3 染色体分析

脾脏、卵巢细胞传代次日,加入秋水仙素至细胞培养瓶内,使之终浓度为 $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$,处理 2 h 后按细胞传代方法收集细胞悬液并移入 15 mL 离心管,以 $2\ 200\text{ r/min}$ 离心 2 min 。吸弃上清,加入 5 mL 的 0.075 mol/L KCl 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中低渗处理 25 min ,然后缓慢加入 1 mL 新配的预冷卡诺固定液,以 $1\ 000\text{ r/min}$ 离心 5 min 。吸弃上清,加入 2 mL 预冷卡诺固定液,冰浴固定处理 15 min 后以 $1\ 000\text{ r/min}$ 离心 5 min ,重复操作两次。冷滴片法滴片;待载玻片干燥后,用 5% Gimsa 染色 25 min ;干燥后镜检。

1.4 不同血清浓度对卵巢细胞生长的影响

用血清浓度分别为 0 、 10% 和 20% 的 3 种不同血清梯度实验用培养基在 12 孔培养板中对所获继代培养卵巢细胞进行培养,接种密度均为 $2\times 10^5/\text{mL}$,并设 3 个平行实验组。在 $24\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱培养 6 d 后,用 0.25% 胰酶混合液消化细胞并计数。

1.5 含 RFP 质粒转化脾脏细胞

实验所用 pDsRed₁-N₁ 质粒由本实验室保存。采用脂质体 lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) 进行

质粒转染,转染方法按说明书进行。将密度为 $2\times 10^5/\text{mL}$ 的细胞接种到 12 孔板中,待细胞贴壁后,更换新鲜不含 FBS 和抗生素的 MEM 完全培养基。将适量含 DsRed₁ 基因的质粒 DNA 和脂质体分别溶于不含 FBS 和抗生素的 MEM 完全培养基中,然后将二者混合,静置作用 20 min 后,将 DNA-脂质体混合物逐滴加到细胞中, 4.5 h 后更换为含有 FBS,不含抗生素的 MEM 完全培养基。继续培养 24 h 后观察荧光。

2 结果

2.1 原代培养

半滑舌鳎脾脏组织细胞悬液接种培养 1 d 可见单细胞贴壁生长, 2 d 可见贴壁的组织块周围有少量细胞迁出并开始生长;接种后 5 d 细胞形成部分单层,即可进行传代培养。显微观察显示,在脾脏细胞原代培养中,存在淋巴细胞、上皮样细胞、成纤维样细胞、血红细胞等多种类型细胞(图版 I)。培养初期淋巴细胞扩增明显,呈簇状生长, 3 d 时淋巴细胞数量最多,之后则逐渐减少, 7 d 时最少(图版 I-1)。成纤维样细胞和上皮样细胞虽然起初生长速度不及淋巴细胞,但数量持续增多,甚至出现细胞交叉重叠生长现象(图版 I-2,3)。

卵巢组织块经消化后会变得粘稠而相互粘连,仅少数组织块边缘有细胞迁出且生长缓慢,而经过筛网过滤后分离出的大量单细胞和较小细胞团能很快贴壁并在接种后 5 d 长成细胞单层,显微观察显示,细胞单层主要由成纤维样细胞组成。

2.2 传代培养

脾脏细胞原瓶传代后 3 d 长满培养瓶底(图版 II-1),按照 $1:2$ 比例分瓶传代。随着传代次数的增加,细胞生长速度变慢,细胞形态趋于均匀,绝大多数为成纤维细胞,还有少数上皮样细胞(图版 II-2)。但是,约传代 5 次之后,随着传代次数增加细胞形态发生较大变化,成纤维样细胞长度缩短,上皮样细胞直径变小,均分布稀疏,生长缓慢,仅能维持原瓶传代,难以扩增培养(图版 II-3,4)。

卵巢细胞原瓶传代后 10 d 长满培养瓶底,按照 $1:2$ 比例分瓶传代。随着细胞传代次数增加,细胞生长速度加快, 5 代之后传代间隔期稳定在

7 d,目前,该细胞系已经传至第 11 代(图版Ⅲ)。

2.3 染色体

染色体分析结果表明,脾脏、卵巢细胞中期染色体数目均为 42 条,其中包含 W 异型染色体,与已报道的半滑舌鳎染色体数相符,证实培养的脾脏、卵巢细胞均源自半滑舌鳎雌性个体(图版Ⅳ)。

2.4 不同血清浓度对卵巢细胞生长的影响

培养基中的血清含量对卵巢细胞的生长具有明显的影响,随着血清浓度的升高,细胞生长增长,在血清浓度为 20% 时细胞生长最快(图 1)。

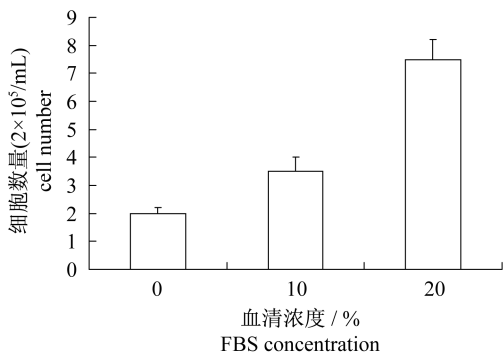


图 1 不同血清浓度对卵巢细胞生长的影响
Fig.1 Effects of the different FBS concentrations on the growth of the ovary cells

2.5 RFP 在脾脏中的表达

通过脂质体 lipofectamine™ 2000 成功将 pDsRed₁-N₁ 质粒转入脾脏细胞中,转染 24 h 后能分别观察到红色的荧光,证明离体培养的脾脏细胞具有作为外源基因功能分析实验材料的可能。

3 讨论

在脾脏组织细胞原代培养中需要适时用 PBS 冲洗培养瓶底,清除血细胞^[7]。将胰酶不完全消化法用于启动脾脏组织原代培养,只消化了细胞表层,在一定程度上保持了细胞繁殖的小环境,利于组织块贴壁、培养基渗入、细胞迁出和细胞单层的及早形成^[8]。脾脏组织细胞在传代培养过程中发生的形态变化与鲈鱼脾脏细胞类似^[9-10]。实验结果显示,目前的培养系统可以支持细胞短期生长,但仍不能实现细胞的稳定传代,在后续实验中,可以尝试通过培养条件的逐步优化实现细胞的稳定传代和成功建系,如添加一些对体外培养细胞贴壁和增值具有促进作用的物质^[11]或对

适用培养基进行优选,如尝试采用已建成脾脏细胞系选用的培养基 L-15 进行培养^[12-13,16],还可以对脾脏组织的取材时间进行优化^[14]。其次,可以通过调整胰酶消化时间进一步探索脾脏组织的上皮样细胞系^[15]和成纤维样细胞系^[16]建立方法。另外,从形态学及生长特征的角度推测培养的脾脏上皮样细胞可能是脾脏内皮细胞,成纤维样细胞可能为脾脏基质细胞,而在成纤维样细胞单层中表面持续出现一些圆形,或零散,或成团分布的细胞的位置也许是造血灶^[17]。

材料鱼选择的好坏是细胞培养成败的关键。作卵巢细胞的培养时尤为重要,发育阶段的性腺含脂肪少,便于培养。鱼类生殖组织细胞培养的相关研究起步较早,被公认的真骨鱼类第一个永久性生殖组织细胞系是由 Wolf 与 Quimby 于 1962 年建立的虹鳟性腺细胞系(RTG-2),近些年相关研究较少且进展缓慢,大多数性腺细胞仅能维持原代培养,因此迄今国内外仅建立了十几个生殖组织细胞系,而且其中源自海水鱼的则更少,其中包括 Fernandez 等^[18]建立的条石鲷性腺细胞系(JSKG)和 Zhang 等^[6]建立的半滑舌鳎精巢细胞系(CSGC)。在生殖组织细胞培养过程中,生殖细胞随着传代次数增多逐渐减少直至消亡。但值得一提的是,Hong 等^[19]建立了一个青鳉精原细胞细胞系,该细胞系细胞能在体外产生精子,该发现和所得细胞系为研究和概括体外精子发生提供了独特的时机。在生殖组织离体培养细胞的应用方面,较早建立的生殖组织细胞系 RTG-2 和 TO-2 更多被应用于病毒学和毒理学方面的研究。而利用培养的性腺细胞开展如涉及到性腺发育的基因调控及其下游相互作用的研究^[20],精子发生的分子控制机制^[21]等有关方面的研究较少。半滑舌鳎属于雌、雄异体的分化型鱼类,雌、雄个体在发育和生长方面的差异非常大,并且雌性个体染色体中含有特异型 W 染色体^[22],加之筛选到的半滑舌鳎雌性特异分子标记和克隆到的性别相关基因^[23-25],以及针对温度对性别决定和性腺分化影响的相关探索都为利用该鱼种进行性别分化研究奠定了基础^[26],而卵巢组织细胞培养及细胞系建立的研究能够成为开展性别决定基因表达调控等性别控制及性别决定机制有关方面的理论及应用研究的重要体外实验体系。

原代培养细胞最接近在体时的生长情况,也

最能反映体内生长特性,并较好的保留细胞遗传特征;适宜用于环境毒理学检测、药物敏感性试验、鱼类内分泌学研究、鱼类免疫细胞研究、鱼类染色体研究和细胞功能及其机制研究等。因此,在进行细胞培养及细胞系建立的同时开展原代培养细胞的应用性研究也将具有重要意义。

参考文献:

- [1] 牛化欣,常杰,马甦,等.半滑舌鳎生物学及养殖生态学研究进展[J].水产科学,2007,26(7):425-426.
- [2] Wang Y, Han Y, Li Y, *et al.* Isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from diseased tongue (*Cynoglossus semilaevis* Günther) in China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(5): 763-768.
- [3] Sha Z X, Ren G C, Wang X L, *et al.* Development and characterization of a cell line from the embryos of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2010, 29(2): 81-87.
- [4] Ren G C, Chen S L, Sha Z X. Development and characterization of a liver cell line from half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. High Technology Communication, 2008, 18(6): 657-660.
- [5] Wang X L, Wang N, Sha Z X, *et al.* Establishment, characterization of a new cell line from heart of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2010, 36(4): 1181-1189.
- [6] Zhang B, Wang X L, Yang C G, *et al.* Establishment and characterization of a testicular cell line from the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* [J]. International Journal of Biological Sciences, 2011, 7(4): 452-459.
- [7] 曾令兵,李晓莉,张林,等.斑点叉尾鲷肾脏组织细胞系的建立及其生物学特性[J].中国水产科学,2009,16(1):75-81.
- [8] 洪锡钧,王明权.南方鳊 SME-I 细胞系的建立及其生物学特性的研究[J].西南农业大学学报,1995,17(5):419-422.
- [9] 童裳亮,李宏,苗宏志.牙鲆、鲈鱼和真鲷的四个永生性细胞系建立[J].生物工程学报,1979,17(3):3-4.
- [10] 童裳亮,李宏,苗宏志.牙鲆鱼腮细胞系(FG)、鲈鱼脾与心细胞系(SPS与SPH)以及真鲷鳃细胞系(RSBF)的建立与部分特性测定[J].鱼类病害研究,1998,20(1-2):16-21.
- [11] 樊廷俊,耿晓芬,丛日山,等.大菱鲆细胞系的建立[J].中国海洋大学学报,2007,37(5):759-766.
- [12] Ellender R D, Wharton J H, Middlebrooks B L. An established spleen cell line from *Bairdiella chrysura* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1979, 15(2): 112-113.
- [13] Parameswaran V, Shukra R, Bhonde R R, *et al.* Splenic cell line from sea bass, *Lates calcarifer*: establishment and characterization [J]. Aquaculture, 2006, 261(1): 43-53.
- [14] 张铭,陈荪红,赵小立.淡水白鲢细胞建系及其生长温度特性的研究[J].生物工程学报,2001,17(1):105-108.
- [15] Kang M S, Oh M J, Kim Y J, *et al.* Establishment and characterization of two new cell lines derived from flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel) [J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26(11-12): 657-665.
- [16] Qin Q W, Wu T H, Jia T L, *et al.* Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus [J]. Journal of Virological Methods, 2006, 131(1): 58-64.
- [17] 王文君.大泷六线鱼肝脏和脾脏细胞学观察及其原代培养的研究[D].青岛:中国海洋大学,2008.
- [18] Fernandez R D, Yoshimizu M, Kimura T, *et al.* Characterization of three continuous cell lines from marine fish [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 5: 127-136.
- [19] Hong Y H, Liu T M, Zhao H B, *et al.* Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production *in vitro* [J]. PNAS, 2004, 101(21): 8011-8016.
- [20] Beverdam A, Wilhelm D, Koopman P. Molecular characterization of three gonad cell lines [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2003, 101(3-4): 242-249.
- [21] Tokalov S V, Gutzeit H O. Spermatogenesis in testis primary cell cultures of the tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Developmental Dynamics, 2005, 233(4): 1238-1247.
- [22] 周丽青,杨爱国,柳学周,等.半滑舌鳎染色体核型分析[J].水产学报,2005,26(5):9-14.
- [23] Chen S L, Li J, Deng S P, *et al.* Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification

- of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Marine Biotechnology, 2007, 9(2): 273 – 280.
- [24] Ma H Y, Chen S L, Li J, *et al.* Cloning, characterization of two female-specific AFLP markers and development of PCR-based sex identification method for the half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Current Zoology, 2009, 55(4): 309 – 314.
- [25] 邓思平, 陈松林. 半滑舌鳎 Dmrt1 α 基因的 cDNA 克隆及其表达 [J]. 中国水产科学, 2008, 15(4): 577 – 584.
- [26] 邓思平, 陈松林, 田永胜, 等. 半滑舌鳎的性腺分化和温度对性别决定的影响 [J]. 中国水产科学, 2007, 14(5): 714 – 718.

The preliminary researches on half-smooth tongue sole spleen and ovary cells *in vitro* culture

ZHENG Yuan^{1,2}, CHEN Song-lin^{2*}

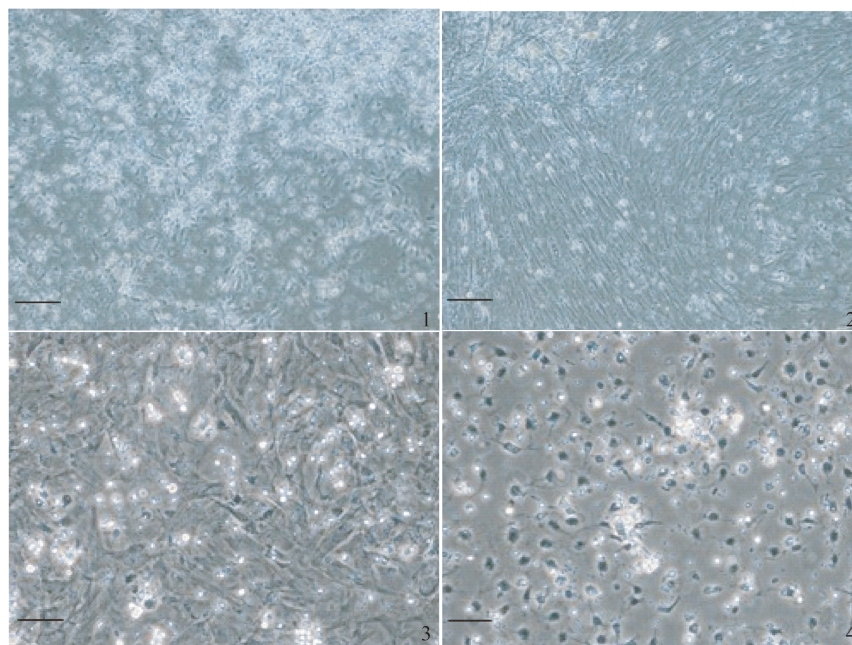
(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: The cell lines from different organs of half-smooth tongue sole were the ideal material for researches on fish virology, genetic screening and functional analysis, etc. In this study, the researches of the spleen and ovary cells from female individual *in vitro* culture were developed by trypsin digestion method. The results showed that the spleen and ovary cells were cultured in minimum essential medium (MEM) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 50 mmol/L 2-Mercaptoethanol (2-Me), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 1 mmol/L sodium pyruvate and 10 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF), and microscopically, the cells were composed of fibroblast-like cells. The spleen cells were subcultured for 9 passages. Up to now, the ovary cells had been subcultured for 11 passages. Chromosome analysis revealed that the spleen and ovary cells maintained normal diploid number ($2n = 42$), containing the heterogametic W chromosome. In subculture, the suitable concentration of FBS for the ovary cells was 20%. The spleen cells had been successfully transformed with red fluorescent protein (RFP) reporter plasmid.

Key words: *Cynoglossus semilaevis*; spleen; ovary; *in vitro* culture; subculture

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri. ac. cn

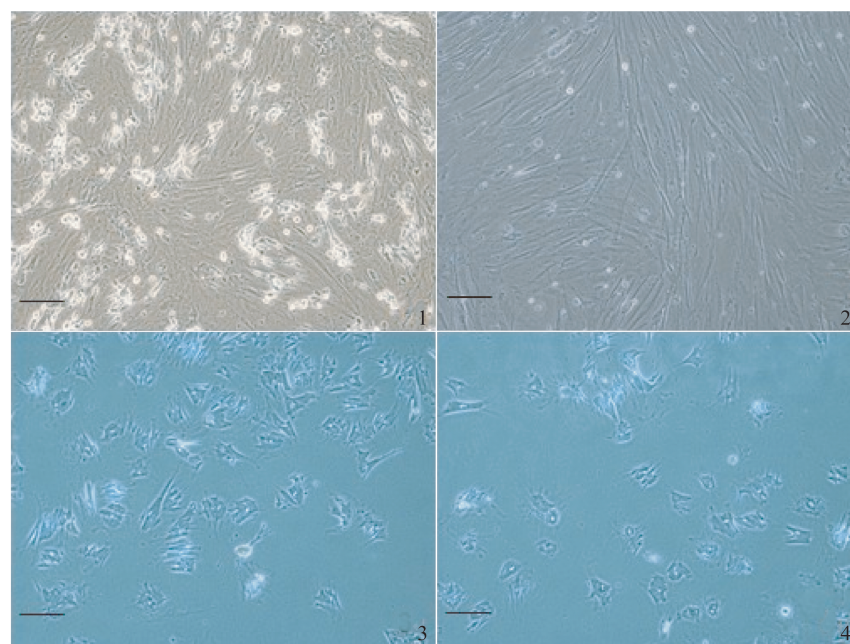


图版 I 原代培养的脾脏细胞

1. 培养 3 d 的脾脏细胞, 示淋巴细胞; 2. 培养 5 d 的脾脏细胞, 示成纤维样细胞; 3. 培养 5 d 的脾脏细胞, 示上皮样细胞; 4. 培养 7 d 的脾脏细胞, 该细胞形态与巨噬细胞类似。标尺 100 μm 。

Plate I The spleen cells in primary culture

1. the spleen cells after 3 d incubation, show lymphocytes; 2. a monolayer of spleen cells after 5 d incubation, show fibroblast-like cells; 3. a monolayer of the spleen cells after 5 d incubation, show epithelial-like cells; 4. the spleen cells after 7 d incubation, show cells that like macrophages. (Bar 100 μm).

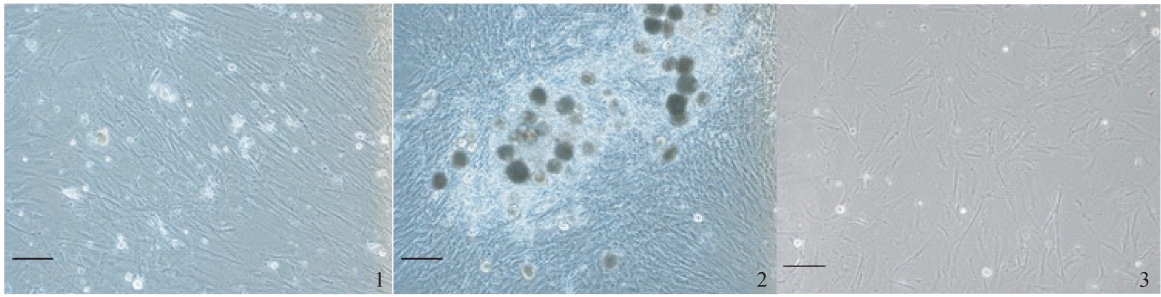


图版 II 继代培养的脾脏细胞

1. 第 1 代脾脏细胞; 2. 第 7 代脾脏细胞; 3, 4. 传代培养的脾脏细胞, 示细胞形态变化。标尺 100 μm 。

Plate II The spleen cells in subcultures

1. the spleen cells at passage 1; 2. the spleen cells at passage 7; 3, 4. the spleen cells in subcultures, show the changed morphology of the cells. (Bar 100 μm).

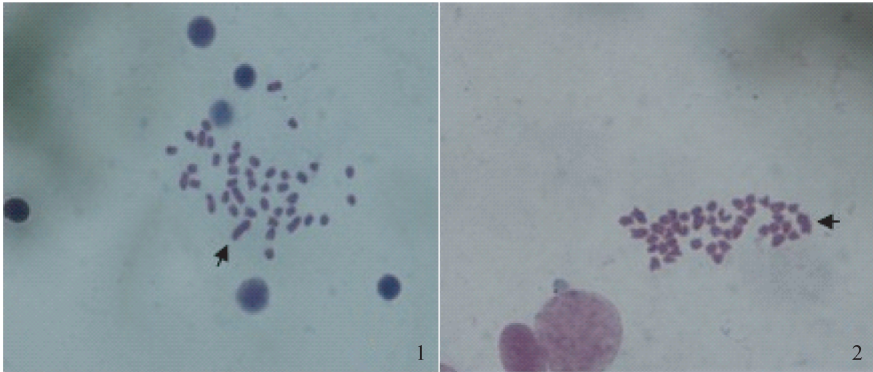


图版Ⅲ 卵巢组织培养细胞

1,2. 第 1 代卵巢细胞;3. 第 11 代卵巢细胞。标尺 100 μm 。

Plate III The ovary cells in culture

1,2. the ovary cells at passage 1; 3. the ovary cells at passage 11. (Bar 100 μm).



图版Ⅳ 脾脏细胞中期 42 条染色体(1) ($\times 100$),卵巢细胞中期
42 条染色体(2) ($\times 100$)

箭头示雌鱼 W 染色体。

**Plate IV The metaphase chromosomes of spleen(1) and ovary(2) cells
with a diploid number of 42 from half-smooth tongue sole**

heterogametic W chromosome(arrow).