

南方鲶胚胎细胞培养及其细胞周期特性检测

洪锡钧

(西南师范大学生命科学系, 重庆 630715)

摘 要 南方鲶晚期胚胎细胞经原代和传代培养 40 次, 历时 36 个月建立了上皮型细胞系 (SM)。该细胞系表现低世代生长缓慢, 每代时间随代龄增加而减少, 经 FMF 测定: G_1 期细胞占 70.1% ~ 85.6%; S 期细胞占 12.2% ~ 25.3%, G_2 、M 期细胞占 1.6% ~ 4.6%, 由 30 代到 40 代 G_2 、M 细胞增加了一倍多, SM 细胞能在 1 ~ 4℃ 冰箱长期存活并可保持繁殖能力达 13 个月。

关键词 南方鲶, 胚胎细胞, 传代培养, 细胞周期

我国的鱼类细胞培养工作起步较晚, 80 年代初才建立了第一个鱼类细胞系—草鱼吻端组织 ZC-7901 细胞系 [张念慈和杨广智 1981], 以后陆续在其它几个鱼种也建立了细胞系 [陈敏容等 1985, 李亚男和毛树坚 1990, Wolf 和 Marson 1980, Nicholon 等 1987, Lu 等 1990]。但直到最近, 国内尚无鲶鱼细胞培养的报道。在细胞周期研究方面, 过去的工作集中在人癌细胞以及两栖类和酵母的研究上, 鱼类细胞周期和 DNA 的分析方面仅有国外的几篇报道 [Hoeven 1982, Yew 和 Yang 1984, Komura 1987, Banerjee 等 1992], 其中 Komura 等的工作, 以显微光度术分析了青鳞鱼 OL-17 及 OL-32 细胞的 DNA 含量, 但未做周期分布的分析, 到目前为止, 国内外均未见有流式细胞光度术对不同代龄的鲶类细胞作周期分析的报道。南方鲶是我国名贵的淡水鱼类, 有重要的经济价值和医学生物学价值, 本文拟用不同代龄的南方鲶传代细胞, 考查在细胞系形成过程中, 细胞增殖速率及周期分布的变化以及在低温下细胞增殖能力的保持等细胞生物学问题, 丰富鲶类细胞学理论, 为鲶鱼人工养殖提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

南方鲶胚胎取自本系动物学教研室, 人工催产、受精、孵育后取“出膜前”晚期胚胎 (受精后 30 小时左右) 共 80 枚, 经原代和传代培养获得不同代龄的南方鲶细胞 (SM Cells)。

1.2 方 法

原代培养: 按常规组织块法和半消化法接种组织细胞进行原代培养。(半消化法即将剪碎之组织块用 0.25% 胰酶液消化 15 ~ 20 分钟, 使组织块表面细胞松散, 然后再接种培养)。

传代培养: 按常规传代, 密度 10^5 个/mL 接种于 RPMI 1640 培养基, 加 15% ~ 20% 小牛血清和适当的旧培养液, pH 值为 6.8 ~ 7.5, 28 ~ 29℃ 恒温培养。

低温培养:将生长旺盛的不同代龄细胞直接放置在 1~4℃ 冰箱的干燥器中培养,定时取出。传一代后再进入冰箱低温培养(细胞不浓集也不加任何抗冻剂)。

细胞繁殖的分析:将初级培养物和传代细胞按瓶编号,并逐日记载其代龄和传代时间,然后进行归类统计。

生长曲线的绘制:将细胞悬液按 12×10^4 个/管的细胞数量接种于指状培养管中进行培养,然后逐日取出三管在 NIKON 微分干涉镜下观察并计数,按平均值绘制生长曲线。分裂指数曲线则是逐日取细胞用空气干燥法制片,计算 1 000 个细胞中分裂像所占的千分值,然后绘制曲线图。

细胞周期分析:参照 Gray 等[1979]以及 Morasca 等[1986]的方法,分别取不同代龄的 SM 细胞,胰蛋白酶消化制成 1×10^6 个/mL 细胞悬液,离心去上清液,细胞沉淀以 0.1M PBS 洗涤二次,后加入 RNA 酶(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,华美公司)37℃ 温育 30 分钟,除去 RNA 细胞沉淀,以碘化丙锭(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,Sigma)于 37℃ 染色 20 分钟,600 目尼龙网过滤,收集滤液于流式细胞光度仪(FMF)(Beckman Dickinson)上检测,计算机分析细胞群体的周期分布情况。

2 试验结果

2.1 不同代龄细胞的繁殖速率

本试验从 1992 年开始进行原代培养共接种 36 瓶,其中成功 7 瓶,这些初级培养物大都经历了相当长的原代培养时间(34~94 天),最短也在一个月多,最长达 3 个月。进入传代后细胞繁殖较慢,有的培养瓶每代(两次传代

之间的时间)经历 100 天以上,就不同代龄的细胞而言,低世代细胞每代时间较长,随着世代增高每代时间逐渐缩短,目前已稳定在每代 7~10 天的速率(表 1)。

就每一世代来看细胞的增殖集中在接种后的最初几天,现将第 33 代细胞的生长增殖情况列于表 2。

表 1 南方鲶 SM 细胞的传代时间

Table 1 The generation time of subculture SM cell

细胞代龄(代)	1~5	5~20	20~40	40~
每代时间(天)	86	28	15	7~10

表 2 南方鲶 SM 细胞的生长和繁殖

Table 2 Growth and reproduction states of SM cells

培养时间(天)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
细胞数($\times 10^4$)	12.5	21.70	39.90	46.00	55.16	55.66	63.54	63.55	63.54	63.57
分裂指数(‰)		26.82	32.66	27.13	7.22	7.87	8.18	1.02	0.85	0.50

南方鲶体外培养的传代细胞在传代后 1~4 日细胞数迅速上升,到 4 日曲线形成平台(图 1),5 日加入新鲜培养液,血清细胞数再度增加,曲线又有一段上升,6 日后细胞数一直保持不变,出现接触抑制现象。图 2 中有丝分裂指数只在传代后第二天出现高峰,以后逐渐降低。7 日后细胞的有丝分裂已很微弱了。

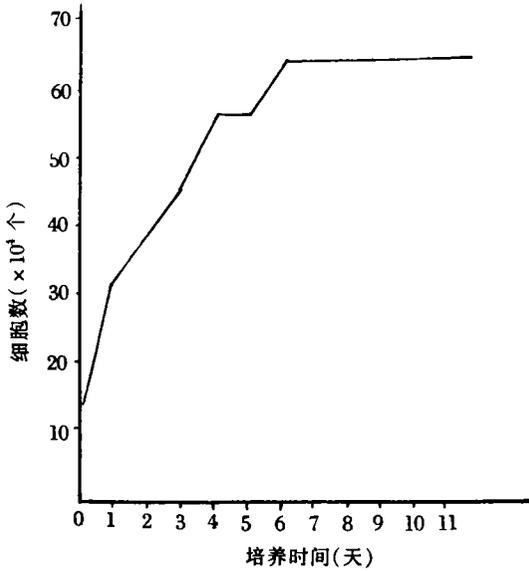


图1 SM细胞的生长曲线

Fig.1 Growth curves of SM cell

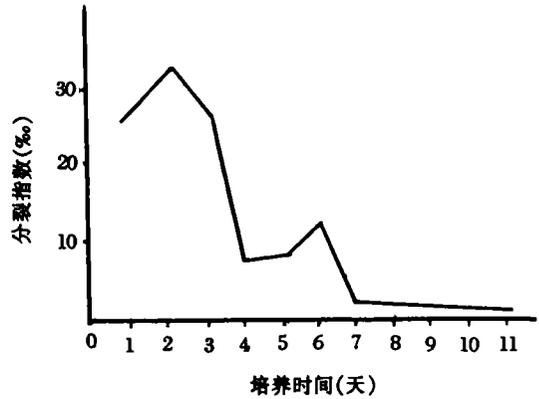


图2 SM细胞的分裂指数曲线

Fig.2 Mitotic index curves of SM cell

2.2 不同代龄 SM 细胞周期分布的变化

流式细胞光度术分析细胞周期是以每个细胞的 DNA 含量为根据,如以 G₁ 期细胞内 DNA 含量为 2C,则 G₂+M 期细胞内 DNA 含量为 4C;S 期细胞内正在进行 DNA 复制,其 DNA 含量应介于 2C~4C 之间。图 3 为 22 代、30 代、40 代南方鲶细胞的流式细胞光度技术测定的结果。由图可见在细胞的 DNA 分布曲线上有两个峰,在横坐标 6 处有一比较尖锐的峰代表 G₁ 细胞, DNA 含量为 2C;横坐标向后有一个低峰为 G₂+M 期细胞,其 DNA 含量为 4C;介于两者之间的曲线部分为 S 期细胞 DNA 含量介于 2C 到 4C 之间。G₁ 期、S 期、G₂+M 期细胞所占的百分数可由 DNA 分布曲线的计算机拟合计算出来。各时期细胞的比例和数目见表 3。

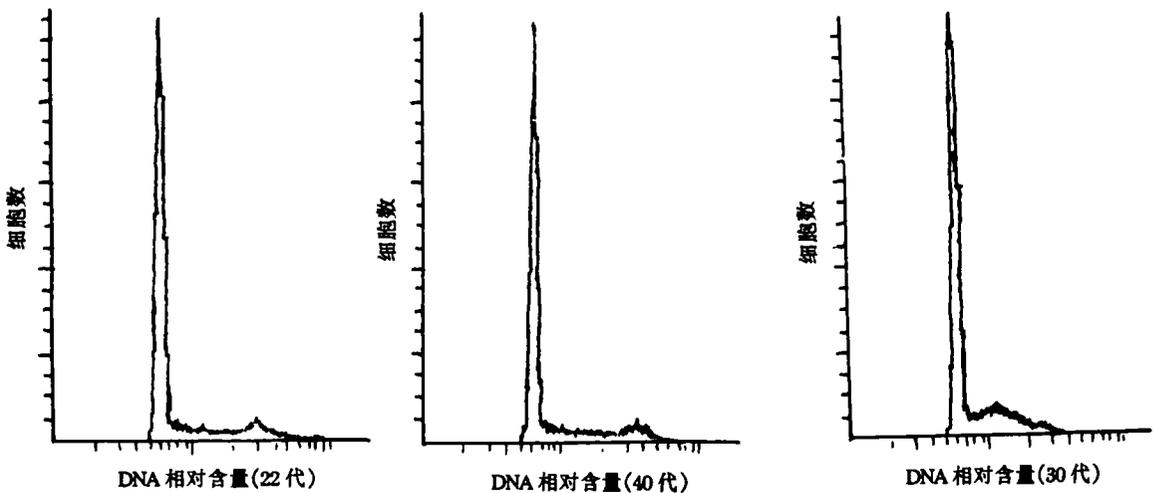


图3 SM细胞的DNA分布情况

Fig.3 The distribution of DNA of SM cell

表 3 SM 细胞的周期分布

Table 3 Cyclical distribution of SM cells

细胞代龄	G ₁ 期		S 期		G ₂ + M 期	
	细胞数	百分比	细胞数	百分比	细胞数	百分比
22 代	8 534	85.6	1 271	12.8	162	1.6
30 代	8 536	85.6	1 220	12.2	220	2.2
40 代	6 992	70.1	2 528	25.3	460	4.6

由表 3 可见,在南方鲈 SM 细胞(不同代龄)群体内大多数细胞(70.1% ~ 85.6%)为 G₁ 期细胞;其次为 S 期细胞(12.2% ~ 25.3%);G₂ + M 期细胞最小(1.6% ~ 4.6%)。就不同代龄而言,从 22 代到 30 代各周期时相细胞的比数变化不大,但从 30 代到 40 代细胞群体的周期分布变化较大,表现为 G₁ 期细胞比例下降而 S 期和 G₂ + M 期细胞数则增加了一倍多。这与前面提到的 SM 细胞随代龄增加而每代时间缩短的现象有一定联系。

2.3 不同代龄 SM 细胞对低温的耐受力

将不同代龄 SM 细胞放置在 1 ~ 4℃ 冰箱中培养,定时取出复温(28 ~ 29℃)观察细胞的生存和增殖情况。发现多数 SM 细胞都能不同程度地在低温下生存,并保持繁殖能力(以复温后细胞能否铺瓶并正常传代为准)。

从表 4 可知:在低温条件下(1 ~ 4℃)不经任何冻存处理细胞大都能存活一个月以上,南方鲈 SM 细胞显然比对照 HeLa 细胞存活时间长,而低世代 SM 细胞又比高世代 SM 细胞存活时间更长。在本次试验中经低温存放 13 个月的低代龄 SM 细胞仍能存活,并保持繁殖力。

表 4 在低温(1~4℃)下 SM 细胞保持存活和繁殖的时间
Table 4 Survival and reproduction time(1~4℃) of SM cell

细胞代龄	供试瓶数	存活瓶数	存活时间(月)
10 ~ 20	4	3	13
20 ~ 30	6	6	9
30 代以上	10	9	5
HeLa 细胞(对照)	3	2	1

3 讨论

南方鲈胚胎细胞无论原代培养还是传代培养(低世代),细胞的生长繁殖都比较缓慢,这可能一方面是因 SM 细胞来自上皮组织,而上皮细胞较其它细胞周期长;另一方面从 SM 细胞的周期分布看:在 30 代以前有 85% 以上细胞在 G₁ 期,其实这 85% 的细胞即是 2C 细胞,应包括 G₀ 期的 2C 细胞。这种 G₀ 期 2C 细胞比例较大也可能是细胞繁殖缓慢的原因。

以流式细胞光度术测定细胞周期分布用于癌细胞较多。非癌细胞的测定较少,现将几种已测细胞株(系)的测定结果列表同南方鲈细胞比较,从表 5 可以看出:高世代的 SM 细胞其 G₂ + M 细胞数已接近其它细胞株(系)的水平。此外,南方鲈细胞从 30 代到 40 代其增殖速率大大提高,G₂ + M 细胞数增加了一倍多,这表明细胞系内已形成有一个有较高增殖率的细胞群体。至于这一细胞群体是怎样形成的,是否属于自发转化结果,则有待进一步研究。

表5 用流式细胞光度术测定细胞周期的比较
Table 5 Comparison of Cell cycle analysis by FMF

细胞株(系)	DNA分布(%)			作者
	G ₁	S	G ₂ + M	
CHO	51.4	41.2	7.4	Crissman 和 Tobey[1975]
Hela	54.7	38.1	7.2	Crissman[1979], 薛绍白等[1985年中译本]
CFV	83.3	12.8	3.9	史剑慧等[1992]
HMEC	90.0	8	2	Olle Larsson [1993]
SM(南方鲇)	70.1	25.3	4.6	洪锡钧等[1994]

南方鲇细胞最适温度为 28 ~ 29℃,属于温水性鱼类范围,但我们的低温培养试验表明:在 1 ~ 4℃低温下,鲇鱼 SM 细胞不经任何冻存处理也可以存活较长时间,并保持繁殖能力,Wolf 和 Quimby[1962]曾作过虹鳟 RTG₂ 细胞系的低温耐受试验,发现培养 21 个月的细胞(相当于我们的 20 代 SM 细胞)可以在 4℃下保存 9 个月而不失去分裂能力。继后 Wolf 和 Mann[1980]进一步发现 RTG₂ 细胞在 4℃下可以存活 2 年。陆仁厚等[1982]认为:低温(17℃)培养 GCC (4)细胞可以作为一种安全的细胞贮存方法。我们认为 SM 细胞在不经过冻存处理的条件下,在 4℃冰箱较长时期贮存是完全可行的。

王明权同志参加部分工作,何学福等老师曾大力支持本工作,仅致谢意。

参 考 文 献

- 史剑慧等.1992.人胎肝细胞裂解液对照射小鼠多能造血干细胞的影响.细胞生物学杂志,14(4):182~186.
- 李亚男,毛树坚.1990.紫外线诱变建立草鱼抗出血病原病毒的 AHZC88 细胞株.水产学报,14(2):89~94.
- 张念慈,杨广智.1981.草鱼吻端组织细胞株 ZC-790 及其亚株 ZC-7901S₁ 的建立.实验生物学报,14(1):101~109.
- 陆仁厚等.1982.四倍化草鱼细胞株的获得特性和移核实验的初步试探.遗传学报,9(5):381~388.
- 陈敏容等.1985.鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性.水产学报,9(2):121~130.
- 薛绍白等译.1985.细胞繁殖的生物学.北京师范大学出版社.
- Banerjee S K, et al. 1992. Cell division cycles of snake-head fish. Cytobios. 70:191~198.
- Crissman H A, Tobey R A. 1975. Unique technique for cell cycle analysis utilizing mithramycin and flow microfluorocytometry. Exp Cell Res, 93:235~239.
- Gray J W, Coffino P. 1979. Cell cycle analysis by flow cytometry. In: William B, Jakoby, Pastan Lra H, ed. Methods in Enzymology Vol. IV III; Cell Culture. Sanfrancisco London; Academic Press Inc. 233.
- Hoeven L C M, et al. 1982. The killfish and light band DNA cell, 31:121~129.
- Komura Jun-Ichiro, et al. 1987. Fish cell culture; Establishment of two fibroblast-like cell lines (OL-17 and OL-32) from fins of the medaka, *Oryzias latipes*. In Vitro cell. Dev Biol, 24(2):294~298.
- Lu Yuanan, et al. 1990. Fish cell lines; Establishment and characterization of three new cell lines from grass carp; In Vitro cell. Dev Biol, 26:275~279.
- Morasca L, Erba E. 1986. Flow cytometry. In: Freshney R I, ed. Animal Cell Culture; a practical approach. Oxford and Washington DC: IRL Press Limited. 125~148.
- Nicholon B L, et al. 1987. Three new continuous cell lines from marine fish of Asia. In Vitro cell. Dev Biol, 23(3):199~204.
- Olle Larsson, et al. 1993. A cell cycle study of human mammary epithelial cells. Cell Biol Intl, 17(6):565~571.
- Wolf K, Mann J A. 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses. 1642:168~179.
- Wolf K, Marson J A. 1980. Poikilothermic vertebrate cell lines and virus. A current listing for species. In vitro cell. Dev Biol, 16:168~179.
- Wolf K, Quimby M C. 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science, 135:1065~1066.
- Yew F H, Yang L M. 1984. DNA replication and repair in tilapia cells. ① The effects of ultraviolet radiation. J Cell Sci, 72:213~216.

SUBCULTURE AND OBSERVATION OF CELL CYCLE CHARACTERISTICS OF EMBRYONIC CELL FROM *SILUROIDEI SOLDATOV MERIDIONALIS*

HONG Xi-Jun

(Department of Biology, Southwest Teachers University, ChongQing 730715)

ABSTRACT The paper deals with the fish SM cell line which originally came from the culture of late embryonic cells of *S. sodatovi meridionalis* Chen. The cell line has been established through 40 subculture passage over a period of 36 months. SM cell generation time (days) decreased with increasing subculture time. The subculture substratum was RPMI 1 640 supplemented with moderate antibiotics 20% newborn calf serum and incubated at temperature 28 ~ 29℃, pH 6.5 ~ 7.2. The results of flow microfluorometry (FMF) showed the percentage of cells at G₁ phase is 70.1% ~ 85.6%; S phase is 12.2% ~ 25.3% and G₂ + M phase are 1.6% ~ 4.6%. With the increase of passages the percentage of the cells at G₂ + M phase got higher. In laboratory SM cells were cultured below the temperature of 1℃ to 4℃ they could survive for 13 months.

KEYWORDS *Siluroidei soldatov meridionalis*, Embryonic cell, Subculture, Cell cycle

1998 年度《现代渔业信息》杂志征订启事

《现代渔业信息》杂志系农业部主管、中国水产科学研究院东海水产研究所主办和农业部东海区渔政与渔港监督管理局等四十个单位协办的一本供全国农、林、水系统各级领导、高等院校教师、科技人员以及生产单位工作者参阅的渔业科技综合性信息刊物(月刊)。

本刊系全国水产系统和上海市科技期刊优秀刊物,1993 年被美国收入国际期刊名录,向国内外公开发行。报道的主要内容侧重于国外渔业生产、水产科学技术的新动态、新工艺、新材料和新方法等信息;同时报道国内渔业生产、科技及教育等方面进展动态。九十年代是信息时代,对您单位或个人及时了解国内外渔业发展动向,掌握国内外水产科学发展趋势,特别是对各级领导正确决策、科研人员开阔思路、院校教师更新教材以及生产单位技术改造、引入竞争机制等均有参考价值。

欲订者,每期 3.00 元(包括邮费),全年 12 期,共计 36.00 元。请将款通过邮局直接寄往:邮编 200090,上海市军工路 300 号,中国水产科学研究院东海水产研究所《现代渔业信息》杂志编辑部发行部。壹佰元以上请信汇,帐号为上海市杨浦区工商银行办事处 022223 - 08900575。

国际标准刊号:ISSN1004 - 8340

国内统一刊号:CN31 - 1465/S

《现代渔业信息》杂志编辑部