

鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性*

陈敏容 陈宏溪 易咏兰

(中国科学院水生生物研究所)

提 要

在来源于鲫鱼囊胚细胞用含常量抗菌素的 TC 199 培养基中加 20% 小牛血清, 于 27—28°C、pH 7.2 条件下培养。经过 24 个月继代培养 100 次, 建立一个命名为 CAB-80 的鲫鱼异倍体细胞系。这个细胞系主要由上皮样细胞和少量成纤维样细胞组成。最适生长温度为 22—28°C, 最适 pH 在 7.2—8.2 之间, 种群加倍时间为 21—45 小时, 接种 24 小时后分裂指数达到 29.5%, 第 60 代细胞的染色体数目分布范围为 68—178, 因此, 它是一个异倍体细胞系。CAB-80 细胞系对呼肠孤病毒的感染有一定的细胞病原效应, 因此有可能作为鱼类病毒的一种检测材料。

鱼类细胞系的建立和研究, 至今已有三十余年的历史。据 Wolf^[1,2]报道, 国外已建立的细胞系共有 61 个, 包括 17 个科, 36 个种。这些细胞系大都是为鱼类病毒学、免疫学和病理学的研究而建立的。我国鱼类细胞培养的工作起步较晚, 只是在发现草鱼病毒性鱼病之后, 才引起重视并开始进行鱼类细胞培养的研究。正式发表的研究结果也很少见, 近年来只有草鱼吻端组织细胞株及其亚株^[4]与四倍化草鱼细胞株^[5]。我们于 1979 年 4 月——1981 年 4 月用鲫鱼 (*Carassius auratus* L.) 囊胚细胞为材料进行鱼类体细胞培养工作, 获得原代培养细胞, 并顺利地进行传代。最终建立一个由鲫鱼囊胚细胞起源的异倍体细胞系, 将其定名为 CAB-80。本文主要描述鲫鱼囊胚细胞系的建立及其生物学特性。现报道如下:

材 料 和 方 法

1. 材料

试验鱼取自湖北省武汉市向阳湖大队鱼池, 采用人工催情, 人工授精方法获得受精卵, 在室温下孵化, 取数十颗发育至囊胚期的受精卵。先用含抗菌素浓度较高的赫氏平衡盐溶液(其最终浓度为: 青霉素 1000IU, 链霉素 1000 μ g, 卡那霉素 500 μ g。)处理半小时, 然后用含常量抗菌素的赫氏液冲洗 2 次, 并在此液中剥膜, 切下胚盘, 吸至培养液中备用。

* 王迎喜同志协助进行病毒感染试验, 谨致谢忱。

2. 细胞培养与建系过程

自1979年4月9日开始培养至1981年4月3日止,共培养了714天,经过100次再培养,并冷冻保存一部分细胞。其建系过程叙述如下:

(1) 原代培养 将处理过的囊胚细胞团块切碎,按组织块贴壁法接种于10ml链霉素瓶中。每小瓶6个囊胚,细胞密度为 $6.14 \times 10^3/\text{ml}$ 。培养液的配方是:8ml TC199+2ml小牛血清,附加常量抗菌素。培养液pH为7.2,培养温度为27—28°C。

接种后,注意观察细胞的生长情况。由于接种密度过小,细胞生长较慢,至第9天才形成生长晕。在单层细胞铺满瓶壁以前,5天左右换液一次,每次换去2/3旧液,约2个月左右形成致密单层。此时就可作继代培养。本细胞系的原代培养历时52天。

(2) 继代培养 用0.25%的胰蛋白酶溶液(用缺钙镁的磷酸缓冲液配制)消化,去掉胰蛋白酶加入适量的新鲜培养液,制成密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 左右的细胞悬液,传至原瓶的另一面,第2次由原瓶传至新瓶。第4次以后则可以1瓶传3瓶。每隔5天左右传代一次。第10代后,培养液中小牛血清的含量可减至10%。传代细胞的接种密度为每毫升15万—20万左右。本细胞系传了100代,历时24个月。至此,可认为它已能适应体外培养条件,可作为一个建立的细胞系,并命名为CAB-80。

细胞的生物学特性

CAB-80细胞系经传代培养至第18代后,陆续观察和分析了以下几个方面的特性。

1. 细胞的形态观察

将77代细胞接种于链霉素瓶中的小盖片上。培养2天后,经卡诺液固定、吉姆萨染色、封片。在光学显微镜下观察,每张盖片任数1000个细胞左右,共数3片,取平均值。结果是:上皮样细胞占98%以上,梭形细胞和巨大细胞只有2%左右。细胞以单核为主,双核也偶有所见。核呈圆形或椭圆形。巨大细胞的核有时不太规则,但仍以圆形和椭圆形为主。经染色后,核内核仁明显可见,一般为1—2个,多至3—5个不等(图1-B)。

2. 细胞的生长曲线

采用Earle等^[9]所建立的生长率测定法,测定了第76代细胞的生长率。具体做法是:首先扩增第75代细胞,待其长满瓶壁后,按传代方法分散和收集细胞,制成密度为 $1.82 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液接种于几十个小瓶中,在28°C的培养箱中培养。1天后,任取3瓶细胞计数,其余换液。从第1天起到实验终止,每天计数一次,以后隔天换一次培养液。根据所得数据绘制出第76代细胞的生长曲线(图2)。从图2中可以看出,接种后第1天,细胞数目明显下降,第2天上升到接近接种量。以后细胞数目明显上升,到第7—8天可达对数生长期,第9—10天达到平稳期,第11—13天接近对数死亡期。按倍增时间公式: $t = 0.301 T \div (\log N_2 - \log N_1)^{[1]}$ (T 是两次细胞计数的时间间隔, N_1 、 N_2 分别是第1、2次细胞计数值。)推算得接种后第1—2天的倍增时间为21.2小时,第2—4天为36.1小时,

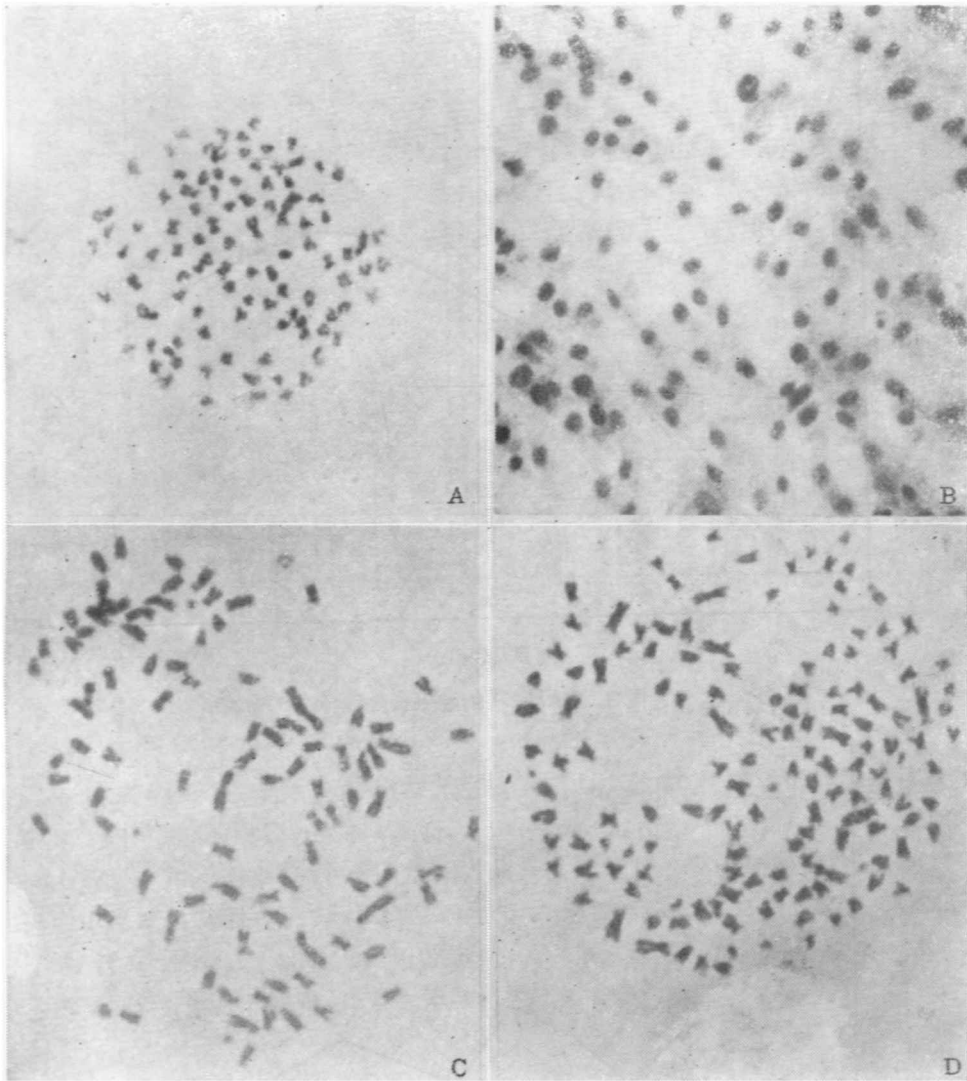


图1 CAB-80 鲫鱼异倍体细胞系

A. 鲫鱼淋巴细胞中期相; B. CAB-80 细胞单层培养, 卡诺固定, 吉姆萨染色照片;
C. CAB-80 的 18 代细胞中期相; D. CAB-80 的 64 代细胞中期相

第 4—5 天为 45.1 小时, 第 7—9 天为 62.8 小时。

3. 细胞的分裂指数

在收细胞前 1 小时加入秋水仙素, 使最终浓度为 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 。按常规制片法制片, 染色。每天滴 1 片, 每片任取左、中、右三个不同座标各计数 1000 个细胞中的分裂相数, 取平均值。用%来表示分裂指数, 所得数据用图 3 表示。从图 3 可看出, 第 76 代细胞的分裂指数随着时间的推移而呈波浪形。图中出现三个高峰, 峰的高度依次递减。第 1 天最高, 它的分裂指数是 29.5%, 其次是第 6 天, 为 12.25%, 最小的高峰是第 9 天, 为 9.42%。第 13 天达到最低值, 只有 0.89%。

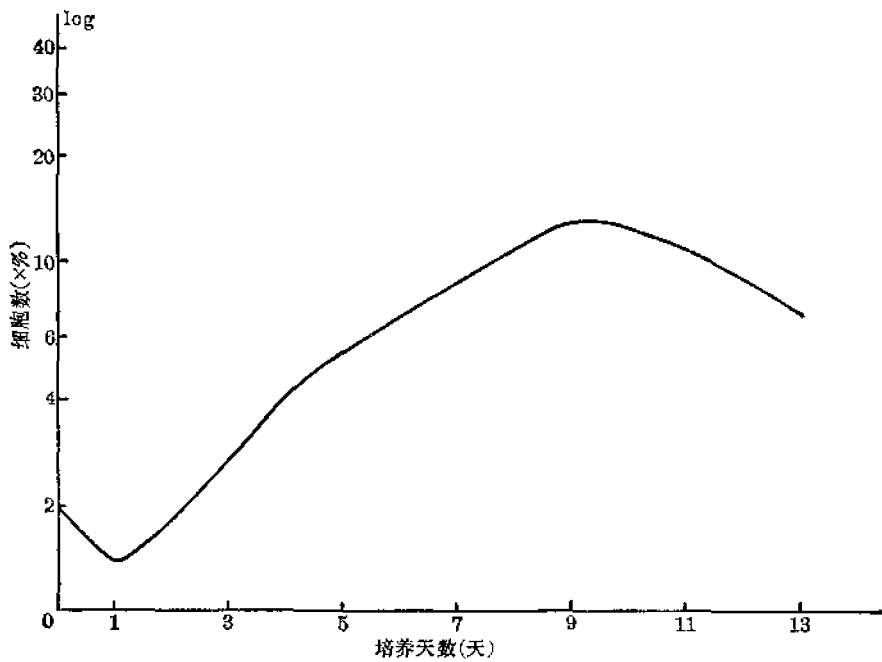


图2 CAB-80 细胞生长曲线

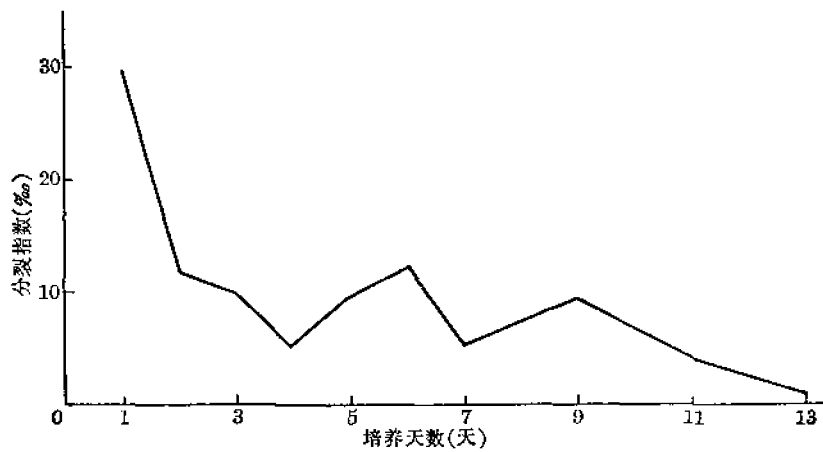


图3 CAB-80 细胞的分裂指数

4. 细胞的染色体数目

传代2天后的细胞,正值生长旺盛时换培养液,22小时后加入秋水仙素,最终浓度为 $0.2\mu\text{g/ml}$,处理2小时。然后按传代方法用0.25%的胰蛋白酶消化、分散,再加入等量的培养液终止胰酶作用,常规方法制片、染色、镜检。选择分散较好的中期相在高倍镜下分别数它们的染色体数目。共分析了第18代和第60代细胞,结果用图4表示。

18代细胞观察了50个中期相,染色体数目的变动范围是94—100,染色体数目为100的有31个,占计数细胞总数的62%。其余是:97的有1个,96的7个,95的1个,

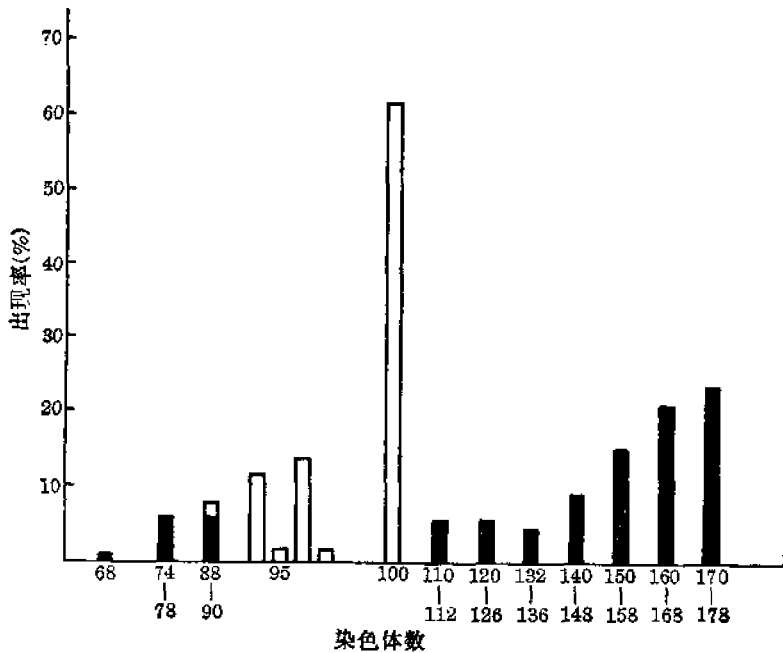


图4 CAB-80 18代、60代细胞的中期相染色体数目

94的6个, 91的4个。这些数字均在二倍体范围内。故18代细胞仍属二倍体细胞。图1-C表示18代细胞的中期分裂相, 其染色体数目为94。

60代细胞, 作者观察了78个中期相, 其染色体数目的变化范围是从68—178个之间。然而中心趋向为160—178个的有46个, 占计数细胞总数的45.2%; 其次是106—146之间, 计有18个, 占23.1%。由此可见, 第60代细胞已属异倍体细胞。图版—4图1-D表示64代细胞的中期相, 其染色体数目为140个。

5. 细胞对温度的适应范围

取第84代细胞, 制成密度为 $16.2 \times 10^4/\text{ml}$ 的细胞悬液, 接种于若干个小培养瓶中, 为使细胞贴壁率较一致, 均在 28°C 的培养箱中培养1天后, 任取3瓶, 计算其细胞密度, 然后分组在 -3°C , 3°C , 10°C , 28°C , 39°C , 40°C , 45°C 的温度条件下培养。到第3天和第6天, 分别计算它们的细胞密度, 并与第1天作比较。结果是, 温度为 28°C 的一组, 细胞数的增长是最快的, 第3天已为第1天的3.5倍, 第6天为6.3倍。而在 -3°C , 3°C , 10°C , 39°C , 40°C , 45°C 等温度条件下的各组细胞密度均明显下降。在 39°C 培养了3天至6天的一组细胞仍有部分存活。而在 40°C , 45°C 温度下的两组细胞, 培养3天仍有少量存活, 但形态不佳, 至第6天即全部死亡。在 -3°C 的低温条件下, 细胞培养至第3天比第1天减少了93%, 至第6天即减少97%, 在存活的细胞中, 形态正常的仍占多数。在 3°C 的低温条件下, 第3天比第1天减少了87.4%, 第6天减少90.2%, 但细胞形态正常。在 10°C 的条件下, 第3天的细胞只减少了10.3%, 第6天减少22.9%, 细胞形态正常。因此, 本细胞系的生长温度范围是 $10-37^\circ\text{C}$, 它的最适温度为 28°C 左右。

6. 最适 pH 值

方法与温度实验相同,在 22°C, 28°C, 39°C 三种温度条件下进行培养实验, 每种温度有 5 个 pH 值, 即 5.9, 6.2, 7.2, 8.0, 8.2。在开始实验前, 各个 pH 值的细胞均在 28°C 的温度下培养, 一天后, 分别将它们放在三种不同的温度条件下培养, 这时每个 pH 值取出 2 瓶细胞, 计算第 1 天的密度。培养到第 3 天和第 7 天后, 又分别取 2 瓶细胞计数。结果列于表 1。细胞数目的增加和减少都与第 1 天的细胞数相比, 增加和减少的数字用百分比表示。

表 I CAB-80 细胞在不同温度和 pH 下的生长情况

pH	孵育时间(天)	温 度		
		22°C	28°C 细胞数 × 10 ⁵	37°C
5.9	1	1.99	1.99	1.99
	7	1.19 40% D	0.94 53% D	0.06 97% D
	3	2.48 2.95 19% I	2.48 2.67 8% I	2.48 0.32 87% D
6.2	1	2.48	2.48	2.48
	3	2.95 19% I	2.67 8% I	0.32 87% D
	7	1.79 28% D	3.28 32% I	0.19 92% D
7.2	1	2.22	2.22	2.22
	3	4.88 120% I	3.39 53% I	0.87 61% D
	7	8.89 301% I	7.28 228% I	0.69 69% D
8.0	1	1.78	1.78	1.78
	3	3.37 89% I	4.39 147% I	0.94 47% D
	7	4.03 126% I	6.22 249% I	0.12 93% D
8.2	1	1.79	1.79	1.79
	7	3.94 120% I	6.97 289% I	0.13 93% D

I: 表示细胞增加

D: 表示细胞减少

从表 1 可以看出, 在一定的温度条件下, 培养基的酸碱度对细胞的生长有明显的影 响。温度为 27°C 时, 无论那一种 pH 值均不利于细胞生长。只是在 pH 为 7.2 时, 细胞数 目减少的百分数较低。温度为 28°C 时, pH 为 5.9 的情况下, 细胞数目减少, 而 pH 在 6.2- 8.2 之间, 细胞数目增长明显, 尤其在 pH 为 8.2 时增长较快。温度为 22°C, pH 值为 5.9 和 6.2 时, 对细胞的生长不利, pH 偏高, 细胞数增长明显, 尤以 pH 为 7.2 最显著。因此本

细胞系在 22—28°C 的温度下, 最适 pH 值为 7.2—8.2 之间。

7. 病毒感染试验

将具典型出血病症状的草鱼鱼种的肝、脾、肾组织制成匀浆, 无菌过滤成病毒原液 (1:20)。然后用含 2% 小牛血清的 TC-199 培养基稀释成 10^{-1} — 10^{-4} 病毒稀释液, 以 CAB-80 第 89 代细胞进行感染试验。每个病毒原液的稀释度分别接种于已培养 24 小时的致密单层细胞的两个小方瓶中, 每瓶接种 0.5ml, 吸附 1 小时, 洗净, 置 28°C 培养箱中培养 4 天, 观察结果。 10^{-1} 感染组细胞全部脱落, 但颜色未变; 10^{-2} — 10^{-3} 两组细胞变圆, 聚集成团, 并有网状侵袭斑点出现; 10^{-4} 一组细胞无明显变化; 对照组的细胞亦无任何变化。又将产生细胞病原效应的细胞培养物置 -30°C 冻融之后, 然后稀释成 10^{-1} — 10^{-4} 悬液注射感染健康草鱼鱼种。每一稀释度注射 6 条鱼, 每条鱼注射 0.3ml, 分别暂养在 26—28°C 水缸中, 连续观察 14 天, 每天检查鱼种死亡数与表现症状, 结果如下表:

表 2 草鱼鱼种感染试验

病毒稀释度	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	对 照
试验鱼尾数	6	6	6	6	6
死 亡 数	6	5	5	3	1

由表 2 可以看出, 产生细胞病原效应的细胞培养物悬液, 有相当强的毒性。感染死亡的草鱼鱼种, 外观均具典型出血病症状。试验初步表明, CAB-80 细胞被草鱼出血病的病毒原液感染以后, 可明显的观察到病变现象。至于电镜检验与免疫血清中和反应仍在继续进行。

讨 论

鱼类细胞培养的历史较短, 许多方面乃是从哺乳类动物细胞培养中移植过来的。凡是适用于哺乳类动物细胞培养的方法、技术和培养基等, 基本上也适用于鱼类。我们所用的培养基就是其常用的 TC-199。对培养基的 pH 值要求也十分严格, 尤其是原代培养, pH 值范围仅限于 7.2—7.4 之间。偏酸或偏碱都不利于细胞生长。然而, 生长较稳定后的继代细胞, 在温度为 28°C 时, pH 值范围可允许在 6.2—8.2 之间。

温度是鱼类细胞培养的主要条件。Wolf^[14]认为鱼类细胞培养温度的选择, 应是接近于该鱼类个体最适生长温度为前提。他总结了前人的经验后指出: 生活在不同纬度的鱼类, 其细胞培养的温度范围也各异。冷水性鱼类的细胞培养温度范围是 4—26°C 之间, 最适生长温度为 20°C; 温水性鱼类的温度范围是 13—37°C 之间, 最适温度为 25°C; 热带鱼的温度范围是 20—37°C, 最适温度也是 25°C。我们实验的结果与此基本一致, 生长温度范围是 10—37°C 之间, 最适培养温度为 22—28°C。

生长曲线是细胞系的一个主要生物学特性。它表示传代后, 细胞在培养过程中的动态变化。一般在传代后第 1 天细胞数有所减少, 经过几天的增殖迟缓期后进入对数增殖

期。达到高峰后进入稳定期,最后进入对数死亡期。CAB-80细胞系的生长曲线基本上是循着这一规律发展的。

生长曲线与分裂指数曲线同属一组细胞。因此,它们的发展趋势基本上是一致的。接种后第1天,细胞迅速贴壁生长,分裂频繁,因而分裂指数最高;第2、3天,分裂指数仍保持一定高度,此时生长曲线坡度仍很大;第4、5天,分裂指数下降,细胞生长进入增殖迟滞期,接着出现两个高峰,曲线进入对数生长期直到平顶;第11天,分裂指数开始下降,至第13天,几乎下降到零;同时,在第11天后,生长曲线也开始下降,进入对数死亡期。

本文所记载的CAB-80细胞系的染色体数目有很大的变异,但有一定的中心趋向。对鲫鱼染色体的研究,早在1941年日本学者Makino^[7]用精巢作材料,采用石蜡切片法研究了鲫鱼的染色体。结果是 $2n=94$ 。而后,Ohno, S.和N. B. Atkin (1966)^[8]的报告认为:在同一鲫鱼个体中,它的 $2n$ 值在94—104条之间变动。Ohno, S. (1967)^[9],用未经离体培养的组织作材料,进一步纠正了 $2n$ 值,认为 $2n=104$ 。Ojima等(1966)^[10]用气干制片法确定了鲫鱼染色体数目 $2n$ 为100。我国管瑞光(1980)^[12]、吴政安(1980)^[8]等的实验结果也认为鲫鱼的 $2n$ 数为100。我们所用的鲫鱼 $2n$ 也是100。

经过离体培养的细胞,染色体数目的变异是存在的,而且随着传代次数的增加而增大。正如文中所述,传至18代时染色体数目已开始变动,其范围是90—100之间,但染色体数为100的细胞居多,仍属二倍体。传至60代以后,染色体数目变动范围很广,在68—178之间,其主要趋向是160—178,已属异倍体。Wolf (1969)^[12]认为:已检查过染色体数目的鱼类细胞系,几乎全部是异倍体细胞系。与哺乳类动物相似的鱼类二倍体细胞系是存在的,但很少。张念慈(1981)^[4]等的草鱼吻端组织细胞株是正常二倍体细胞株。而Wingfield (1968)^[11]报道,红大麻哈鱼(*Oncorhynchus nerka*)胚胎细胞系二倍体数目可以维持到50代,但不能继续下去。G. J. Rio (1973)^[13]所建立的鲫鱼细胞系,染色体数目范围也很广,从47—193。Tasuku Watanabe (1978)等^[16],报告了他们建立的大麻哈鱼(*Oncorhynchus keta*)胚胎细胞系,染色体数目的变异也很大,虽然其主要变动范围是从53—79,但是115—125也观察到。而它的二倍体数目是74,因此也是一异倍体细胞系。Wolf^[12]早就指出:“在所有的动物细胞系中,在获得无限期培养的潜能时,总是伴随着改变成为异倍体染色体组成,这样一种鱼类细胞系的染色体众数,显然是十分稳定的。”根据这一见解,我们认为CAB-80细胞系是一个异倍体细胞系。在实验室条件下容易维持。冷冻保存的细胞解冻后基本的生物学特性变化不大。

我们的实验表明,CAB-80细胞对草鱼出血病病毒感染会产生一定的病变现象。在以后的多次重复感染试验中,时有细胞病原效应发生,尽管如此,这个试验结果尚未从电镜观察中直接检出出血病病毒颗粒,也未被免疫血清中和试验得到进一步的证实,因此有待于进一步的研究。如果CAB-80对草鱼出血病病毒的敏感性能得到了最后肯定,则可作为出血病病毒分离、鉴定和病原与宿主细胞相互关系研究的一种工具。业已证实草鱼出血病的病原是一种呼肠孤病毒(reovirus),至今仅在草鱼种中发现,而鲫鱼并无此种疾病。然而体外培养的鲫鱼细胞却能对此种病毒有一定的病变发生,是否意味着在体外培养条件下,此种病毒并无严格的种族专一性。这是一个饶有兴趣的问题,也有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] 余慕贞、黄国屏, 1980. 小白鼠 S_{180} 瘤细胞系的建立及其特性. 实验生物学报, 13(1): 81.
- [2] 詹瑞光、宋静, 1980. 鲤、鲫、鲢、鳙染色体组型的分析比较. 遗传学报, 7(1): 72—77.
- [3] 吴政安、杨慧一, 1980. 鱼类细胞遗传学的研究 II. 鱼类淋巴细胞的培养及其染色体组型分析. 遗传学报, 7(4): 870—875.
- [4] 大星章一、菅野晴夫主编, (吴政安等译) 1975. 人癌细胞培养. 63—64, 朝仓书店出版.
- [5] 张念慈、杨广智, 1981. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901 S 的建立和特性观察. 水产学报, 5(2): 111—119.
- [6] 陆仁后等, 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): 881—888.
- [7] Makino, S., 1941. A karyological study of gold fish of japan. *Cytologia* 12: 96—111.
- [8] Ohno, S. and N. B. Atkin, 1966. Comparative DNA values and chromosome complements. *Chromosoma* (Berlin) 18: 455—466.
- [9] Ohno, S., Muramoto, J., Christian, L. & Atkin, N. B., 1967. Diploid-tetraploid relationships among old world members of the fish family, Cyprinidae. *Chromosoma* 23: 1—9.
- [10] Ojima, Y., Hitosumachi, S. & Makino, S., 1966. Cytogenic studies in lower vertebrates, 1. A preliminary report on the chromosomes of the funa (*Carassius auratus*) and the goldfish (a revised study). *Proc. Jap. Acad.* 24: 62—66.
- [11] Wingfield, W. H., 1968. Characterization of the oregon sockeye salmon virus. Doctoral dissertation, oregon state university. in fish physiology (Eds Hoar, W. S. & Randall D. J.) 3: 294.
- [12] Wolf, Ken, and Quimby, M. C., 1969. Fish cell and tissue culture. in: Hoar, W. S. and Randall, D. J. (ed): fish physiology. 3: N. Y., Academic press.
- [13] G. J. Rio, F. J. Magnavita, J. A. Rubin and Wm, H. Beckert, 1973. Characteristics of an established goldfish *carassius auratus* (L.) cell line. *J. fish biol* 5: 315—321.
- [14] Ken Wolf, 1979. Cold-blooded vertebrate cell and tissue culture. in methods in enzymology (Edited by William B. Jakoby) vol lniif: 466—477.
- [15] Ken Wolf and Joyce A Mann, 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines a current listing for fishes In *Vitro* 16(2): 168—179.
- [16] Tasuku Watanabe et al., 1978. Continuous cell line derived from the kidney of Tamame, *onco-rhynchus masou*. *Bull Japan soc. sci. fish* 44: 415—418.

THE ESTABLISHMENT OF A HETEROPOLOID LINE FROM CRUCIAN CARP AND ITS BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Chen Minrong, Chen Hongxi and Yi Yonglan

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica)

Abstract

This paper deals with the establishment of a heteroploid cell line, designated CAB-80, which originally comes from the culture of blastulae embryonic cells of crucian carp (*Carassius auratus* L.). Some biological characteristics of this cell line are described briefly. The conditions used in primary cell culture and subculture are TC-199 medium containing a moderate amount of antibiotics and 20% calf serum and incubated at temperature 27—28°C, pH 7.2. A heteroploid cell line has been established

through 100 subculture passage over a period of 24 months.

The cell line consists of epithelial like cells in a great measure and a few fibroblast like cells.

The optimum growth conditions of CAB-80 is at temperature 22—28°C and pH value range at 7.2—8.2. The time for doubling CAB-80 cell population requires 21—45 hours. After incubation for 24 hours, the mitotic index of CAB-80 is 29.5%. The distribution of chromosome numbers of 60th passage cells are ranged from 68 to 178, so it is heteroploid cell line.

The experiment shows that the CAB-80 cells have somewhat cytopathogenic effect to reovirus infection. It may be used as a bioassay indicator for fish virus.