

研究简报

# 牙鲆的组织培养与鳃细胞系的获得

## THE TISSUE CULTURE OF *PARALICHTHYS OLIVACEUS* AND THE DERIVATION OF GILL CELL LINE

李 宏 童裳亮

(青岛海洋大学生命学院, 266003)

LI Hong, TONG Shang-Liang

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, 266003)

Hetrick F M

(Department of Microbiology, University of Maryland, MD 20742, USA)

关键词 牙鲆, 组织培养, 鳃细胞系, 染色体组型

KEYWORDS *Paralichthys olivaceus*, Tissue culture, Gill cell line, Chromosome karyotype

牙鲆(*Paralichthys Olivaceus*)属于鲽形目, 鲽亚目, 鲆科, 牙鲆属, 该属我国仅牙鲆 1 种。它广泛分布于我国各海域, 其肉细、刺少、味美、个体较大, 是我国重要的捕捞对象, 近 10 年来已进行人工养殖。牙鲆的组织培养研究, 目的在于建立永久性细胞系, 以便为牙鲆等海水养殖鱼类的病毒性传染病研究提供宿主细胞。于 1993 年 7 月, 对牙鲆的心、脾、肾、肝和鳃等组织进行组织培养, 只有鳃组织的迁出细胞才形成细胞系, 该细胞系至今已传代 70 次。根据染色体组型分析和其它特征观测, 证明该细胞系已发生转化, 成为永久性牙鲆鳃细胞系(Flounder Gill Cell Line, 简称 FG)。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

用人工养殖的牙鲆稚鱼为材料, 体长为 5~6 cm。另外, 用人工孵化的原肠胚期胚胎作为该鱼正常染色体组型的分析材料, 以便与培养细胞的染色体组型比较。

### 1.2 培养方法

采用组织块培养法, 将各组织剪碎成 1 mm<sup>3</sup> 左右, 接种国产 25 mL 玻璃细胞培养瓶中[童裳亮 1989]。原代培养用 Leibovitz's L-15 培养基, 外加 20% 胎牛血清, 100 IU/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素, pH 为 7.2~7.4, 在 20℃ 恒温培养箱中培养。每隔 5~7 天更换培养液。待细胞形成单层后, 用 0.25% 胰酶消化, 使细胞脱落进行传代培养。从第二次传代起, 培养液改为 Eagle's MEM, 血清含量降至 10%~15%。

收稿日期: 1996-03-09

### 1.3 染色体组型分析

胚胎细胞的染色体组型按王琼和童裳亮[1994]的方法进行。选择500个染色体清晰并分散良好的中期分裂相在高倍或油浸物镜下对染色体计数,且进行显微照相,在放大的染色体照片上测量染色体臂长。培养细胞的染色体制备技术按左文功等[1986]的方法进行。

## 2 结果

### 2.1 不同组织的培养结果

心、脾、肝、肾和鳃等组织在培养过程中均有细胞迁出,并持续分裂一段时间。除鳃细胞外,其余组织的细胞未能形成单层和传代。鳃细胞在较长时间内保持旺盛的分裂状态。每隔7~10天便可传代一次。但传代至第32次后,细胞分裂减缓,传代时间延长至15~20天,并有大量细胞死亡。传代至第43次后,细胞的生长加速,至今已传代70次。

### 2.2 鳃细胞系的形态特征

原代培养时,从鳃组织迁移出来的细胞有纤维状和上皮状两种。但纤维状细胞在传代过程中消失,只留下上皮状细胞。第57代细胞的形态如图版I-1所示。贴壁细胞大部分呈鱼鳞状,也有梭形的双极细胞。细胞大小相差很大,其长轴为 $17\sim 151\mu\text{m}$ 。70%的细胞具单核,少数细胞具有2~4个细胞核。

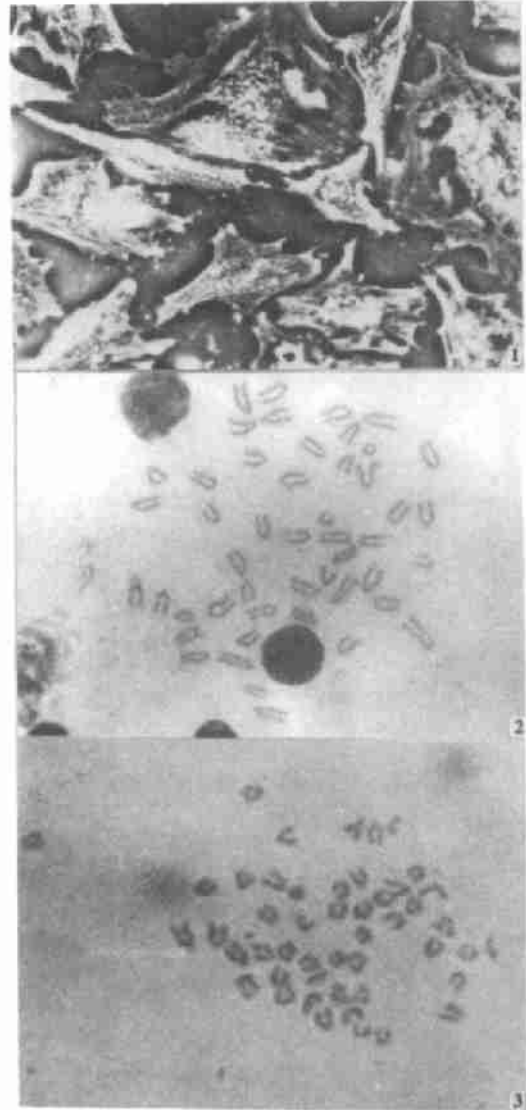
### 2.3 染色体组型

牙鲆胚胎细胞的染色体众数为 $2n=48$ ,均为端着丝点,其组型为 $2n=48,48t,NF=48$ (图版I-2)。但有7%的细胞染色体数为 $2n=46$ 。染色体长度、相对长度等特征见表1。

第10代鳃细胞系的染色体组型也是 $2n=48,48t,NF=48$ 。但染色体比胚胎细胞的要小(图版I-3)。此外,有6%的细胞其染色体数为 $2n=46$ 。第57代鳃细胞系的染色体数发生明显变化。虽然 $2n=48$ 者仍占优势,但只占细胞总数的59%。另有16%的细胞染色体数为 $2n=46$ 。出现异倍体和非整倍体,染色体数目从38至102均有出现(图1)。

### 2.4 适宜培养温度

鳃细胞系的适宜培养温度为 $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ 。 $15^{\circ}\text{C}$ 时细



图版I Plate I

1. 牙鲆鳃细胞系的活细胞形态。×200;
2. 牙鲆胚胎细胞的染色体照片。×1000;
3. 第10代鳃细胞系的染色体照片。×1000

胞生长十分缓慢,35℃导致细胞死亡。

表 1 牙鲆胚胎细胞的染色体长度、相对长度及染色体类别

Table 1 The average length, relative length and classification of flounder embryonic chromosome

染色体对	染色体长度	染色体相对长度	染色体类别	染色体对	染色体长度	染色体相对长度	染色体类别
1	7.81±0.11	6.47±0.07	t	13	5.02±0.05	4.16±0.04	t
2	7.68±0.10	6.36±0.08	t	14	5.00±0.01	4.14±0.01	t
3	6.60±0.13	5.49±0.01	t	15	4.91±0.08	4.07±0.06	t
4	5.91±0.08	4.90±0.06	t	16	4.75±0.01	3.94±0.01	t
5	5.90±0.09	4.89±0.07	t	17	4.44±0.11	3.68±0.09	t
6	5.83±0.10	4.83±0.09	t	18	4.15±0.12	3.44±0.11	t
7	5.64±0.06	4.67±0.04	t	19	4.10±0.08	3.40±0.04	t
8	5.57±0.07	4.61±0.05	t	20	3.94±0.08	3.26±0.07	t
9	5.38±0.01	4.46±0.01	t	21	3.50±0.08	2.90±0.05	t
10	5.36±0.08	4.44±0.07	t	22	3.20±0.08	2.65±0.04	t
11	5.09±0.03	5.03±0.06	t	23	3.10±0.12	2.57±0.08	t
12	5.03±0.06	4.17±0.05	t	24	2.79±0.13	2.31±0.05	t

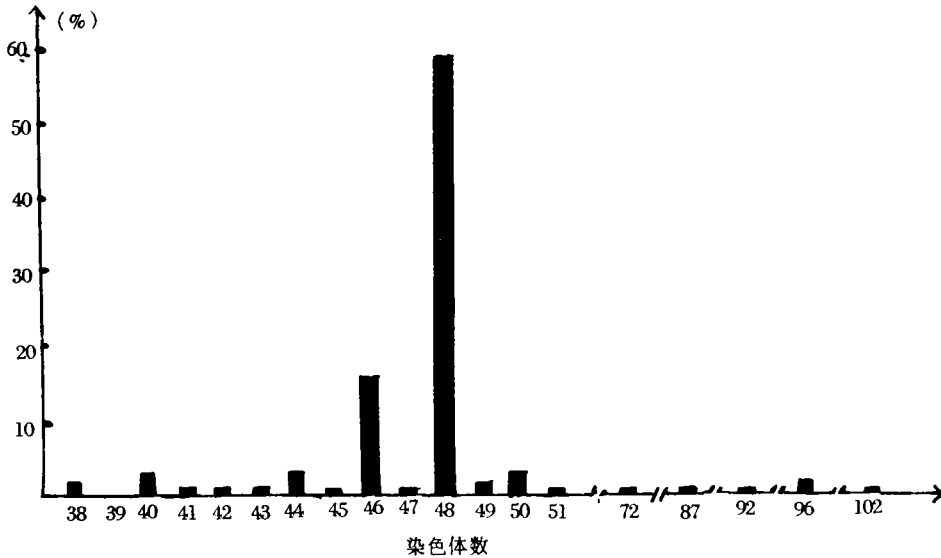


图 1 第 57 代鳃细胞系的染色体数分布图

Fig.1 The distribution of chromosome numbers of FG cell line at 57 passages

### 3 讨论

鱼类的细胞培养研究始于 60 年代初。Wolf 和 Quimby[1962]首次建立虹鳟鱼生殖腺细胞系。该细胞系一直传代至今,并被广泛用来分离和研究鲑鳟鱼类的病毒。此后,一些发达国家都先后建立了主要养殖鱼类的细胞系,作为这些鱼病毒性传染病的监测工具[ Wolf 和 Mann 1980]。

我国对鱼类的细胞培养研究起步较晚。80 年代初,为了研究病毒性草鱼出血病的需要,张念慈和杨广智[1981]建立了草鱼吻端细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S<sub>1</sub>。此后,有草鱼和鲫的细胞系建立[左文功等 1986,李亚南等 1992,张念慈和杨广智 1981,魏彦章等 1986]。这些细胞系为我国淡水鱼类病毒病研究发挥了积极的作用。我国海水鱼的养殖业近几年才逐渐发展起来,建立永久性细胞系为目标的海水鱼类细胞培养研究才刚刚开始[童裳亮 1994]。

牙鲆是我国的重要养殖对象。随着养殖规模扩大,养殖密度提高,病害不断发生。牙鲆鳃细胞系的建立为研究牙鲆等海水鱼类的病毒病和立克次氏体病创造了条件。

本研究表明,牙鲆胚胎细胞的染色体众数为  $2n=48,48t,NF=48$ 。第10代牙鲆鳃细胞系的染色体数与胚胎细胞相同,只是染色体较小而已。无论胚胎还是第10代鳃细胞系都有少量细胞(6%~7%)的染色体数为  $2n=46$ 。为了排除在制片过程中染色体的丢失,特选择核膜完整的细胞进行染色体计数。关于牙鲆的染色体组型国内外有过报道[喻子牛等 1995, Kikuno 等 1986, Meguro 等 1991, Kim 等 1988]。染色体均为  $2n=48$ ,与本实验结果相同。

第57代鳃细胞系的染色体数发生明显变化。其主要特点是染色体数目的分布范围很广,从  $2n=38\sim 102$  均有出现。其中,  $2n=48$  的细胞数只占59%。而  $2n=46$  的细胞数从第10代细胞的6%上升到16%,出现明显的双峰。

染色体出现非整倍体和异倍体被认为是人工培养细胞发生转化的重要特征[Freshney 1986]。加上细胞分裂加速,对血清的需求量下降等其它特征变化,证明第57代鳃细胞系已发生转化,成为永久性细胞系。

本研究系国家自然科学基金资助项目,编号:39370549。作者李宏现在青岛市卫生检疫局工作。

## 参 考 文 献

- 王琼,童裳亮.1994.贻贝核型和染色体带型分析.动物学报,40(3):309~316.
- 左文功等.1986.草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性.水产学报,10(1):11~17.
- 李亚南,张义,毛树坚.1992.两株鱼类细胞系—草鱼尾鳍组织细胞系(HGC-87)及鲫鱼鳃盖膜细胞系(HCC-87)的建立.生命科学论文集(毛树坚主编).杭州大学出版社.112~119.
- 张念慈,杨广智.1981.草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S<sub>1</sub> 的建立和特征观察.实验生物学报,14(1):101~105.
- 张念慈,杨广智.1991.团头鲂尾鳍细胞系 TQ-880 的建立.科技通报,7(2):87~89.
- 喻子牛等.1995.山东近海 21 种经济鱼类的核型研究.中国水产科学,2(2):1~6.
- 童裳亮.1989.硬头鲂巨噬细胞的体外长期培养.实验生物学报,22(2):242~245.
- 童裳亮.1994.海洋动物的细胞培养与应用.生物工程进展,14(6):47~48.
- 魏彦章等.1986.草鱼尾鳍组织二倍体细胞 GCCF-2 的建立及其部分生物学特性的分析.水生生物学报,10(3):293~294.
- Freshney R I. 1986. Animal cell culture-A practical approach. IRL Press. 5.
- Kikuno T, Ojima Y, Yamashita N. 1986. Chromosome of flounder, *Paralichthys olivaceus*. Japan Acad,62(B):194~196.
- Kim D S, et al. 1988. Cytogenetic and biochemical studies on the flatfish, *Paralichthys olivaceus*. Bull Natl Fish Res Dev,42:135~142.
- Meguro Y, et al. 1991. A cell line derived from the fin of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Gybyo Kenkyu,26(2):69~75.
- Wolf K, Mann J A. 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses; a current listing for fishes. *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.