

文章编号: 1000-0615(2017)03-0358-08

DOI: 10.11964/jfc.20161010567

中华鲮鱼皮肤细胞的分离及其细胞系的建立

李伟¹, 王建国¹, 郑蒙蒙², 陈小江¹,
熊良伟¹, 袁圣¹, 王权^{1*}

(1. 江苏农牧科技职业学院水产科技系, 江苏泰州 225300;

2. 泰州市姜堰区农业委员会, 江苏泰州 225500)

摘要: 采用对传统酶消化法稍进行改进建立了中华鲮鱼皮肤细胞的分离方法, 获得RSDCs株(系)以便用于后续关于中华鲮鱼体色细胞研究。结果显示, 对中华鲮鱼抑菌暂养8~24 h后, 0.25%胰酶—EDTA消化处理3~5 min, 用手术刀片顺鳞片方向刮除鳞片, 在体式显微镜下解剖获得鱼类皮肤, 采用IV型胶原酶—胰酶联合消化皮肤获得单细胞; 获得的RSDCs于28 °C, 5% CO₂条件下进行培养, 采用血球计数板计数法测定绘制了RSDCs生长曲线; 采用RT-PCR的方法检测RSDCs F₀、F₅和F₁₀上皮标记物(Keratin 18和Vinculin A)和内皮标记物(Collagen I)的表达情况。成功分离获得RSDCs细胞株(系); RSDCs以1×10⁴个/cm²接种, 倍增时间为30 h左右, 呈典型的“S”型, 与贴壁细胞的体外增殖行为一致; RT-PCR结果显示, 随着传代次数的增加上皮标记物表达呈现下降趋势, 而内皮标记物表达呈上升趋势。研究表明, 改良的酶消化法能够成功分离获得RSDCs株(系); 获得RSDCs体外培养生长曲线呈典型的“S”型, 与贴壁细胞的体外增殖行为一致; 分离获得RSDCs由上皮细胞和内皮细胞构成, 但随着传代次数的增加, 上皮细胞所占的比重越来越小。

关键词: 中华鲮鱼; 皮肤细胞; 细胞培养; 酶消化法

中图分类号: Q 25; S 917.4

文献标志码: A

中华鲮鱼(*Rhodeus sinensis*)、属鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲮鱼亚科(Acheilgnathinae)、鲮鱼属(*Rhodeus*)中的一种小型底栖性鱼类^[1-3], 雄鱼色彩艳丽背部具有五彩的金属色, 尾中央有红色尾红, 臀鳍末端呈现黄色、黑色或银白色花纹; 雌鱼在繁殖季节会长出长长的产卵管, 在其觅得大小合适的河蚌如褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)或圆顶珠蚌(*Unio douglasiae*)等后, 将卵产入河蚌体内瓣鳃处; 色彩艳丽的雄鱼随后排精, 精子随河蚌入水口水流进入与卵子结合完成受精。以往的研究也发现雄性的体色对繁殖对象的筛选具有一定的影响^[4-6]。

和其他脊椎动物一样, 中华鲮鱼皮肤由表

皮和真皮两层不同类型的组织构成, 形成了机体与外界的第一道屏障, 行使与生命息息相关的诸多生理活动, 如物化保护、免疫防御、体液调节、运动感知以及繁殖活动等过程。目前, 关于鱼类皮肤的研究主要集中在病理和免疫调控等方面, 但缺乏鱼类皮肤细胞模型的研究, 从而导致目前的研究仅停留在体内试验(结果虽真实可靠, 但常因环境复杂和不稳定影响数据分析), 很难上升到组织细胞水平(体外试验, 条件可控便于数据分析)。随着研究的不断深入, 缺乏鱼类皮肤细胞模型成为应对不良外界环境机制以及环境毒素评估等方面研究的制约因素; 不仅如此, 在损伤修复、药理反应、病理反应

收稿日期: 2016-10-08 修回日期: 2016-12-19

资助项目: 里下河流域鲮鱼种质资源保护与品种选育技术研究(Y2015-25)

通信作者: 王权, E-mail: wey@jsahvc.edu.cn

和免疫学研究等方面^[7-8], 鱼类皮肤细胞也具有较广泛的应用^[9-12]。

但相对其他脊椎动物, 鱼类细胞的分离培养相当落后, 已报道的细胞主要集中在肝脏、肠道上皮、鳃丝和鳍条等部位。已建系的细胞更为匮乏, 目前报道的有草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)吻端组织细胞系(ZC-7901)^[13]、斑马鱼(*Barchydanio rerio* var. 胚胎(ZF4、ZEM2S)^[14]、鳍条细胞(SJD.1, AB.9)^[15]、鳃丝细胞(Rtgill-W1, G1B)^[16-18]、卵巢细胞(CCO, RTG-2)^[19]和草鱼肾组织细胞系(CIK)^[20]等, 涉及品种主要集中在草鱼、斑马鱼、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、青鳉(*Oryzias latipes*)、胡子鲶(*Clarias fuscus*)和鲫(*Carassius auratus*)等^[19, 21-25]。除此之外, 由于鱼类之间的亲缘关系和温度耐受范围差异较大, 也制约了细胞应用和细胞模型的建立。本实验旨在建立中华鲮皮肤细胞(Rhodeinae skin derived cells, RSDCs)分离培养体系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼 中华鲮采集于里下河地区野生品种, 由本实验室渔获并进行繁育。

主要试剂 DMEM/F12培养基(HyClone), PBS磷酸缓冲液(HyClone), 胎牛血清(FBS, gibco, Australia Origin), 0.25%胰酶(含EDTA, gibco), IV胶原酶(Sigma), 双抗(100×, 碧云天), 可溶性两性霉素B(solarbio, 25 mg)

试剂配制 两性霉素B液(1000×): 25 mg溶解于10 mL PBS; 培养液 I: 88.9% DMEM/F12培养基+10% FBS+1% 双抗+0.1% 两性霉素B液(1000×); 培养液 II: 90% DMEM/F12培养基+10% FBS; 冻存液 I: 90% DMEM/F12培养基+10% FBS; 冻存液 II: 10% DMEM/F12培养基+70% FBS+20% DMSO。

1.2 实验方法

实验用鱼准备 中华鲮先暂养于无菌水槽内8~24 h后(内含三抗, 青霉素终浓度: 1000 μg/mL; 链霉素: 500 μg/mL; 两性霉素B: 25 μg/mL), 加入MS-222麻醉剂麻醉后, 剪断脊柱。

皮肤剥离 将鱼浸入胰酶溶液3~5 min后, 转移至体视显微镜下; 用无菌刀片顺着鳞片方

向刮除鳞片避免损伤皮肤; 再用尖头细镊沿着背脊逐步剥离皮肤, 该过程要注意剥离皮肤的完整性; 最后用手术刀片轻微刮除皮肤内侧的肌肉等组织, 获得透明的皮肤。

RSDCs的分离与原代培养 将上述获得的皮肤剪碎成糊状, 加入适当IV型胶原酶(4~8 mL)室温消化30 min; 1200 r/min离心10 min; 加入适当胰酶(3 mL)室温消化5 min; 弃上清加入适当FBS(3 mL)终止消化; 1200 r/min离心10 min; 取沉淀加入适当培养液I(1~2 mL)悬浮; 经100目和300目纱绢过滤后, 接种于35 mm培养皿; 于28 °C, 5% CO₂条件下培养; 贴壁12 h后换液去除悬浮杂质和未贴壁的细胞; 继续用培养液I进行培养。

RSDCs的传代与继代培养 RSDCs贴合至80%~90%时, 采用胰酶消化法(3 min)传代(1200 r/min离心10 min), 重新接种至新的35 mm培养皿; 其中0~5代细胞采用培养液I进行培养, 5代之后细胞采用培养液II进行培养。

RSDCs冻存与复苏 (1)冻存。先用冻存液I悬浮RSDCs, 计数并调整细胞浓度至(1~2)×10⁶个/mL, 加入等体积4 °C预冷冻存液II, 充分混合后分装至冻存管中, 置-70 °C冰箱进行程序降温16~24 h, 后转移至液氮长期保存; (2)复苏。取出冻存管, 于30 °C水浴锅中不断轻轻晃动使其快速解冻3/4, 操作台内将细胞转移至15 mL离心管, 逐滴加入10倍体积的冷藏FBS Free DMEM/F12, 轻轻悬浮细胞1200 r/min离心10 min, 弃上清; 加入适当培养液II, 采用Trypan Blue染色, 进行细胞计数并计算存活率, 最后置于28 °C、5% CO₂细胞培养箱中培养, 细胞复苏24 h后需首次换液。

RT-PCR分别提取F₀、F₅和F₁₀ RSDCs总RNA(Trizol裂解法), 采用TaKaRa PrimeScript[®] 1 st Strand cDNA Synthesis试剂盒(code: D6110A)进行反转录获得cDNA, 采用PCR技术分别扩增Collagen I、keratin 18和β-actin(引物和PCR扩增程序见表1), 并采用琼脂糖凝胶电泳检测其扩增情况。

生长速率的测定 待F₆ RSDCs生长汇合至85%~90%时, 消化收集细胞, 采用Trypan Blue染色细胞计数; 按1×10⁴个/cm²接种于6孔板[约(0.95~1)×10⁵个/孔], 每个时间段3个孔(即3个重复), 培养3 h贴壁后, 换新鲜培养基, 记为0 h; 每48 h换液一次, 1.5~2 mL/孔。分别于0、12、

表 1 引物和PCR扩增程序

Tab. 1 Primers and amplification procedure for PCR

基因 gene	引物设计 primers design		PCR程序 ^{1,2} amplification procedure		参考序列 refSeq
	引物 primers	产物大小/bp size	T _m /°C	循环数 cycles	
Collagen I	C_F: 5' AACCTGAAGAAGGCTGTG 3' C_R: 5' ATGGGAAGGCGAGATG 3'	93	50	35	NM_182968.2
Keratin 18	K_F: 5' CCAATGTGCCGACTTA 3' K_R: 5' ATCTCGCCTGTGCTAC 3'	96	46	35	NM_178437.2
Vinculin A	V_F: 5' CAGATGAACTCGGTAGAAC 3' V_R: 5' TGTCACTACCTTACTGGA 3'	91	48	35	NM_001128681.1
β-actin	A_F: 5' ACCGCTGCCTCTTCTT 3' A_R: 5' GGTGGTCTCGTGGATA 3'	91	50	35	AF057040.1

注: 1. 预变性95 °C 5 min; 变性94 °C 30 s, 退火 72 °C 1 min (相应循环数); 延伸72 °C 10 min, 4 °C保存。2. 反应体系参考TaKaRa Taq™(Code: DR100A)说明书

Notes: 1, pre-denaturation at 95 °C for 5 min; amplification cycles, 94 °C for 30 s, annealing 72 °C for 1 min; extension at 72 °C for 10 min, preserved at 4 °C

24、36、48、60、72、84、96和108 h, 各取一块6孔板, 胰酶消化获得细胞悬液、计数。

2 结果

2.1 RSDCs的分离与培养

酶解消化获得的RSDCs含有大量的细杆状杂质, 具有一定的增殖能力(图版-1); RSDCs在接种培养12 h前开始贴壁, 培养24 h后出现无明显触角上皮样细胞和有2~3个触角的纤维样细胞(图版-2, 3), 继续培养48 h (第3天)开始出现明显的细胞集落(图版-4, 5), 第5天开始出现类似火山口的细胞团块(island); 在RSDCs传代过程中发现在其F₁~F₁₀上皮样细胞的比例呈现下降趋势, 直至几乎找不到(图版-6, 7), 故认为起源于外胚层的上皮细胞增殖速度不如起源于中胚层间充质细胞的增殖速度。

2.2 RT-PCR鉴定

总RNA琼脂糖凝胶电泳结果表明, RNA基本无降解(图1), 可进行RT-PCR检测, 结果显示在RNA丰度基本相同(β-actin)的情况下, F₀、F₅和F₁₀ RSDCs的Collagen I表达丰度呈逐步上升的趋势, Keratin 18和Vinculin A的表达量有降低的趋势(图2), 表明RSDCs的细胞组成随着传代发生了改变, 由原先的上皮细胞(外胚层起源)和内皮细胞(中胚层间充质细胞起源)逐步向以内皮细胞为主过度。

2.3 生长速率的测定

采用Trypan Blue染色细胞计数方法, 以培养时间为横坐标, 单位细胞数为纵坐标, 绘制生

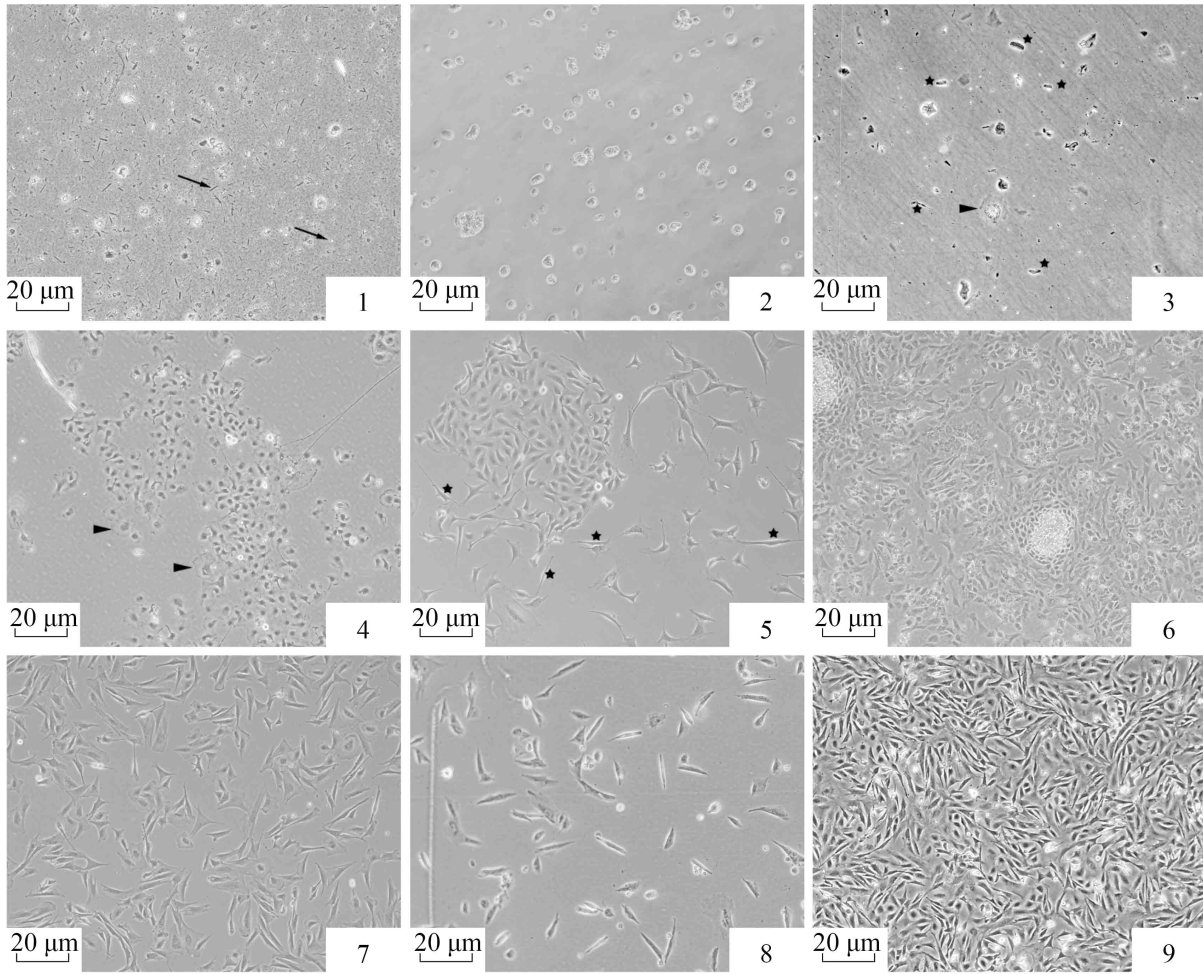
长曲线。所得RSDCs生长曲线呈典型的“S”型, 与贴壁细胞的体外增殖行为一致。

F₀ RSDCs以1×10⁴个/cm²接种, 倍增时间为30 h。传代后12 h内细胞数目无明显变化, 经过24 h的潜伏适应期, 细胞进入对数生长期(24~72 h), 达到平台期(84~120 h)后生长稳定, 增殖速度明显下降, 最终细胞将停止增殖, 衰老凋亡, 成片脱落(图3)。

3 讨论

目前, 中华鲟的研究主要集中在其与河蚌共生的复杂繁殖行为研究, 雄性的体色对繁殖对象的筛选具有一定的影响^[4-6], 然而关于鲟体色的决定和调控鲜有报道。现阶段关于鱼类体色调控的研究主要集中在日粮中添加物(色素^[26-28]、激素^[29-31]等)对鱼类体色影响, 缺乏合适的体外实验载体(皮肤细胞)是限制鱼类体色调控研究的重要原因之一, 以致研究只能停留在宏观数据的相关性分析, 本实验通过对传统贴壁法与哺乳动物细胞分离常用的酶消化法相结合加以改进, 提高鲟皮肤细胞分离的效率, 可为其他鱼类皮肤细胞的分离提供参考。

鱼类的皮肤和其他脊椎动物一样, 由表皮和真皮两层不同类型的组织构成, 其中位于表皮层的主要为起源外胚层的复层扁平上皮, 形成机体最外层的保护屏障; 位于真皮层的主要为起源于中胚层间充质的内皮细胞, 具有较强增殖、再生和分化能力, 能够根据机体的需要定向分化形成多种类型的细胞(如: 黏液细胞、色素细胞和感觉细胞等)进而行使相应的机能。



图版 RSDCs不同培养阶段光镜图片(200×)

1.酶消化后获得单细胞悬液接种, 含有大量的杂质和污染物(箭头标注); 2.RSDCs接种12 h, 细胞开始贴壁, 去上清, 重新加入培养液I培养; 3. RSDCs原代细胞(F₀)培养24 h, 出现无明显触角的上皮样细胞(三角形标注)和有2-3个触角的纤维样细胞(五角星标注); 4.RSDCs F₀培养3 d, 出现明显的上皮样细胞形成的细胞集落; 5.RSDCs F₀培养3 d, 出现明显的纤维样细胞形成的细胞集落; 6.RSDCs F₀培养5 d出现细胞团块(island); 7.F₅ RSDCs; 8.F₁₀ RSDCs; 9.F₂₀ RSDCs

Plate Micrographs of RSDCs of different periods (200×)

1. Image of cell suspension. There were a large number of impurities and contaminant (arrow) in it; 2. Image of primary RSDCs who were starting to adhere to the culture dishes. 12 later, discard the supernatant, and add fresh culture medium I; 3. Image of the primary cell cultures of RSDCs at 24 h. The RSDCs divided into epithelium-like cells (no pseudopod, triangle) and fibroblast-like cells (2-3 pseudopods, pentagon); 4. Image of epithelium-like cell colonies of the F₀-RSDCs at 3rd d; 5. Image of fibroblast-like cell colonies of the F₀-RSDCs at 3rd d; 6. Growth island of F₀-RSDCs at 5th d. 7. Image of F₅-RSDCs. 8. Image of F₁₀-RSDCs. 9. Image of F₂₀-RSDCs

除各类祖细胞外, 真皮层主要由成纤维细胞、色素细胞、鳞片和多种胶原组织构成^[7]。从分离的RSDCs的培养特征和RT-PCR鉴定结果来看, 采用改进的酶消化法获得的RSDCs在分离初期(F₀~F₅ RSDCs)由上皮细胞(外胚层起源)和内皮细胞(中胚层间充质起源)两大类型的细胞构成, 通过检测内皮标记物Collagen I和上皮标记物Keratin 18和Vinculin A^[29], 发现原代细胞和初代细胞(F₀~F₅代)存在明显的多样性, 两类细胞共同存在,

但随传代次数的增加, 上皮细胞标记物Keratin 18和Vinculin A表达量明显减少, 故推测起源间充质的内皮细胞具备更强的增殖能力, 最终导致内皮细胞取得绝对优势, 成为RSDCs的主要细胞, 这与Rakers等^[32]和Lamche等^[33]结论相类似。

虽然细胞在毒理学、病毒敏感性测验、致癌检测等方面应用广泛, 但由于鱼类细胞株、系的缺乏且物种之间的差异较大从而限制了鱼类细胞应用范围。目前, 从物种来看主要集中在海

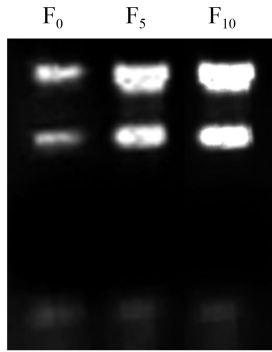


图1 F₀、F₅和F₁₀ RSDCs总RNA
琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Total RNA agarose gel electrophoresis of
F₀, F₅ and F₁₀ RSDCs

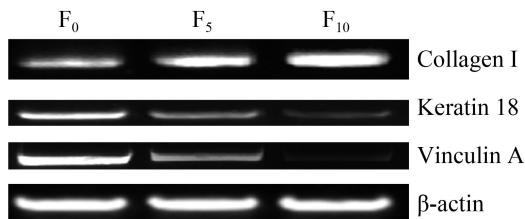


图2 F₀、F₅和F₁₀ Collagen I、Keratin 18和
Vinculin A基因PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of
Collagen I, Keratin 18, Vinculin A and β -actin of
F₀, F₅ and F₁₀ RSDCs

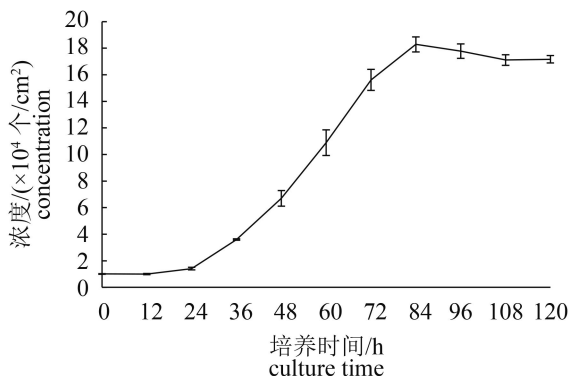


图3 F₆ RSDCs生长曲线

Fig. 3 The growth curve of F₆ RSDCs

水鱼类[如牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)]^[7, 10]和洄游性鱼类[如虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)]^[30], 而淡水鱼类相对较少(斑马鱼和草鱼); 从分离部位来看鱼类分离的细胞系(株)主要集中在鳃、肝脏、头肾、脾和鳍条等部位; 从分离方法来主要集中在组织贴壁法, 很少涉及酶消化法。组织贴壁

法由于细胞游离出来的时间周期较长、易污染等特征造成成功率往往较低; 然而酶消化由于分离周期短, 可以在短时间内获得大量的皮肤细胞用于实验。

中华鲟皮肤细胞分离培养的难点要点主要体现在: ①区别于哺乳动物。RSDCs的培养处于20~28 °C, 适宜真菌繁殖, 相对细菌污染更难控制, 通过采用高浓度三抗(青霉素、链霉素和两性霉素B)来消灭后抑制的暂养和分离培养初期(原代和F₁~F₅)的真菌及细菌, 同时通过消化—离心—接种传代一定程度上也控制了真菌和细菌的繁殖与传播; ②皮肤的剥离。不同于其他脊椎动物, 中华鲟体表被覆鳞片, 因鳞片的保护作用极大地影响皮肤的剥离过程, 本实验在鲟鱼处死后采用胰酶消化3~5 min后能够沿着鳞片的方向轻轻拨去鳞片而不损伤到皮肤, 最后通过尖头镊沿着背脊逐步撕开皮肤保证皮肤完整性, 最后采用手术刀片刮除皮肤内测附着的少量肌肉等, 保证了RSDCs的来源可靠。

参考文献:

- [1] 王建国, 王权, 封琦, 等. 戊二醛和苯扎溴铵对中华鲟的急性毒性[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(12): 157-159.
Wang J G, Wang Q, Feng Q, *et al.* Acute toxicity of glutaraldehyde and benzalkonium bromide on *Rhodeus sinensis*[J], Guizhou agricultural sciences, 2012. 40(12): 157-159(in chinese).
- [2] 王权, 王建国, 黄爱军, 等. 中华鲟产卵时对河蚌大小的选择研究[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(4): 559-562.
Wang Q, Wang J G, Huang A J, *et al.* Research on the selection of incubation clam size during the spawning period of *Rhodeus sinensis*[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2013, 22(4): 559-562(in Chinese).
- [3] 王权, 王建国, 封琦, 等. 中华鲟的生物学特性及人工养殖技术[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 193-194.
Wang Q, Wang J G, Feng Q, *et al.* Biological characteristics and artificial breeding technology of *Rhodeus sinensis*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(5): 193-194(in Chinese).
- [4] Smith C, Reynolds J D, Sutherland W J, *et al.* Adaptive host choice and avoidance of superparasitism in the spawning decisions of bitterling (*Rhodeus sericeus*)[J].

- Behavioral Ecology & Sociobiology, 2000, 48(1): 29-35.
- [5] Reichard M, Bryja J, Ondra M, *et al.* Sexual selection for male dominance reduces opportunities for female mate choice in the European bitterling (*Rhodeus sericeus*)[J]. Molecular Ecology, 2005, 14(5): 1533-1542.
- [6] Casalini M, Agbali M, Reichard M, *et al.* Male dominance, female mate choice, and intersexual conflict in the rose bitterling (*Rhodeus ocellatus*)[J]. Evolution, 2009, 63(2): 366-376.
- [7] 任国诚. 几种重要海水养殖鱼类细胞系的建立、鉴定及应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- Ren G C. The Establishment, identification and application of cell lines from several important marine fish[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007(in Chinese).
- [8] 谭凤霞. 三株鱼类细胞系的建立和十二株鱼类细胞系对重金属毒性的敏感性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- Tan F X. Establishment of three fish cell line and research on the sensitivity of twelve fish cell lines to heavy metal toxicity[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008(in Chinese).
- [9] 王艺. 葡萄球菌诱导斑马鱼皮肤免疫相关基因差异表的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- Wang Y. Study on differential expression of immune-related genes from the skin of zebrafish induced by *Staphylococcus*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2013(in Chinese).
- [10] 郭华荣. 海水鱼细胞系FG、SPH和RSBF的特性分析及其在典型海洋污染物毒性检测上的应用[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2001.
- Guo H R. Characterization of three marine fish cell line FG, SPH and RSBF and their application to toxicity assay of aquatic pollutants[D]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2001(in Chinese).
- [11] 商晓梅, 马爱军, 王新安, 等. 六种鲽形目鱼类无眼侧头部皮肤形态特征与功能探讨[J]. 水产学报, 2016, 40(2): 189-197.
- Shang X M, Ma A J, Wang X A, *et al.* Characterization and functional research on the blind side of six species of *Pleuronectiformes* [J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(2): 189-197(in Chinese).
- [12] Ueno Y, Kitao T, Chen S N, *et al.* Characterization of a herpes-like virus isolated from cultured Japanese eels in Taiwan[J]. Fish Pathology, 1992, 27(1): 7-17.
- [13] 张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株ZC-7901及其亚株ZC-7901S_1的建立和特性观察[J]. 水产学报, 1981, 14(1): 101-109.
- Zhang N C, Yang G Z. The establishment of strain ZC-7901 and substrain ZC-7901S_1 from the snout tissue cells of grass carp[J]. Journal of Fisheries of China, 1981, 14(1): 101-109.
- [14] Wang Y H, Chen Y H, Lu J H, *et al.* A 23-amino acid motif spanning the basic domain targets zebrafish myogenic regulatory factor myf5 into nucleolus[J]. Dna & Cell Biology, 2005, 24(24): 651-660.
- [15] Cobb M. Identifying Polymorphisms within AB, WIK, and SJD zebrafish strains[D]. Wsu Vancouver Honors Theses, 2013.
- [16] Lee L E J, Schirmer K, Bols N C. Applications and potential uses of Rtgill-W1, a cell line derived from gills of rainbow trout[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal, 2008, 44(1): 17-25.
- [17] Brennan L M, Widder M W, Lee L E J, *et al.* Long-term storage and impedance-based water toxicity testing capabilities of fluidic biochips seeded with Rtgill-W1 cells[J]. Toxicology in Vitro An International Journal Published in Association with Bibra, 2012, 26(5): 736-745.
- [18] Trubitt R T, Rabeneck D B, Bujak J K, *et al.* Transepithelial resistance and claudin expression in trout Rtgill-W1 cell line: effects of osmoregulatory hormones[J]. Comparative Biochemistry & Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2015, 182: 45-52.
- [19] Kuhar M. The effect of 17 β -estradiol on proliferation of CCo and RTG-2 fish cell lines[D]. Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2010.
- [20] 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾组织细胞系CIK的建立及其生物学特性[J]. 水产学报, 1986, 10(1): 11-17.
- Zuo W G, Qian H, Xu Y F, *et al.* A cell line derived from the kidney of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 1986, 10(1): 11-17(in Chinese).
- [21] Bopp S K, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line[J]. BMC Pharmacology, 2008,

- 8(1): 1-11.
- [22] George S, Lin S, Ji Z, *et al.* Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish gill cell line and zebrafish embryos[J]. *Acs Nano*, 2012, 6(5): 3745-3759.
- [23] Sebastian N, Helmut S. Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad - 2 for in vitro genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2005, 24(8): 2078-2087.
- [24] Wakamatsu Y, Ozato K, Sasado T. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo[J]. *Molecular Marine Biology & Biotechnology*, 1994, 3(4): 185-191.
- [25] 陈敏容, 陈宏溪, 易泳兰. 鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性[J]. *水产学报*, 1985, 9(2): 121-130.
- Chen M R, Chen H X, Yi Y L. The establishment of a heteroploid line from crucian carp and its biological characteristics[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1985, 9(2): 121-130(in Chinese).
- [26] 喻翔. 虾青素与甲基睾酮对樱桃鲃生长与体色的影响[D]. 西安: 西北大学, 2012.
- Yu X. The effects of astaxanthin and methyltransferase on the growth and bodycolor of cherry barb[D]. Xi'an: Northwest University, 2012(in Chinese).
- [27] 李小兵, 黎雪梅, 郑曙明, 等. 饲料中添加虾青素对金曼龙鱼体色的影响[J]. *饲料研究*, 2013, (11): 74-79.
- Li X B, Li X M, Zheng S M, *et al.* Research on the effect of astaxanthin in *Trichogaster microlepis* diet on the body color[J]. *Feed Research*, 2013, (11): 74-79.
- [28] 朱艺峰, 麦康森. 鱼饲料着色剂类胡萝卜素研究进展[J]. *水生生物学报*, 2003, 27(2): 196-200.
- Zhu Y F, Mai K S. A review of carotenoid of pigmentation additives in fish feeds[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(2): 196-200.
- [29] Takahashi A. Basic and practical researches on pituitary hormones related to body color regulation in fish[J]. 2016, 82(3): 270-273.
- [30] Sunny F, Oommen O V. Rapid action of testosterone and diethylstilbestrol on enzymes of osmoregulation in a freshwater fish *Oreochromis mossambicus*[J]. *Endocrine Research*, 2002, 28(1-2): 69-81.
- [31] 袁立强, 马旭洲, 王武, 等. 饲料脂肪水平对瓦氏黄颡鱼生长和鱼体色的影响[J]. *上海海洋大学学报*, 2008, 17(5): 577-84.
- Yuan L Q, Ma X Z, Wang W, *et al.* Effects dietary lipid levels on growth and body pigmentation of darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachellii* Richardson)[J]. *Journal Of Shanghai Ocean University*, 2008, 17(5): 577-584(in Chinese).
- [32] Rakers S, Klinger M, Kruse C, *et al.* Pros and cons of fish skin cells in culture: long-term full skin and short-term scale cell culture from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2011, 90(12): 1041-1051.
- [33] Lamche G, Meier W, Suter M, *et al.* Primary culture of dispersed skin epidermal cells of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum [J]. *Cellular & Molecular Life Sciences Cmls*, 1998, 54(9): 1042-1051.

The establishment of skin cell separation method and its cell lineage of *Rhodeus sinensis*

LI Wei¹, WANG Jianguo¹, ZHENG Mengmeng², CHEN Xiaojiang¹,
XIONG Liangwei¹, YUAN Sheng¹, WANG Quan^{1*}

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. Jiangyan County Agriculture Commission of Taizhou Prefecture, Taizhou 225500, China)

Abstract: Skin was the first barrier to protect fish body from the out-environment, and was the main carrier of the body color. For lack of fish skin cell lines, investigation on skin function and color regulatory mechanism reached a plateau. In this paper, *Rhodeus sinensis* was used to investigate the fish skin cell separation method, with modified enzyme digestion ways. Rhodeus were kept in bacteriostasis and fungistasis solution for about 8-24 hours. After digesting in the 0.25% Trypsin-EDTA for 3-5 min, *Rhodeus* were killed and stroked off the scales. Peeled fish skin, and removed muscle or other tissue which jointed to the skin in stereo microscope. Then skin was digested by collagenase IV and trypsin jointed digestion method. Later, *Rhodeus* Skin Derived Cells, RSDCs for short, were collected and cultured at 28 °C, 5% CO₂. The growth curve was drawn by hemacytometer counting method. The expression of epithelial markers, Keratin 18&Vinculin A, and endothelial label gene, collagen I, were tested by RT-PCR method at F₀, F₅ and F₁₀ generation. RSDCs lines were obtained and cultured well with doubling time of 30 h and “S”-growth-curve, which was familiar with the other adherent cells. The RT-PCR results revealed that the expression of Keratin 18 and Vinculin A declined along with cell passage cultivation, while the expression of Collagen I was on the rise. Our researches indicated that modified enzyme digestion method should be ideal method to obtain fish skin cell. The obtained RSDCs growth curve was typical adherent cells “S” type. And the obtained RSDCs were derived from epithelium (ectoderm) and endothelium (mesenchyme). Meanwhile, along with passage cultivation, the proportion of epithelium declined.

Key words: *Rhodeus sinensis*; skin cell; cell culture; enzyme digestion method

Corresponding author: WANG Quan. E-mail: wey@jsahvc.edu.cn

Funding projects: Researches on Conservation and Breeding Technology of *Rhodeus* Resources of Lixiahe Basin (Y2015-25)