

# 文昌鱼鳃组织原代培养

石松林, 黄晓明, 李祺福, 王三英, 杨海波

(厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 采用组织块培养法培养文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri japonicum*) 鳃细胞, 使用 L15, M199, Eargle's MEM 为基础培养基, 加入一定量的 NaCl 及 5%, 10%, 20% 等不同体积分数的牛血清。经条件优化后得到最适合的培养条件为 2L15+20%FBS+0.45%NaCl, 在 26~28℃ 条件下培养, 组织块贴壁后 12 h 内就有至少 4 类上皮样细胞从中迁移出来, 这些细胞在前 3 天迅速增殖, 到第 6 天基本上达到平稳期, 往后细胞开始凋亡, 最长可以存活近两个星期。鳃细胞的原代培养为文昌鱼细胞体外培养的深入研究提供了实验依据。

**关键词:** 文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri japonicum*); 鳃组织; 原代培养

**中图分类号:** Q28, Q253

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3096(2009)03-0044-05

文昌鱼属于脊索动物门头索亚门文昌鱼纲, 是一种低等的脊索动物。被认为是无脊椎动物和脊椎动物的中间过渡体, 在研究动物的起源和进化上的有着十分重要的地位, 是发育生物学研究中一种重要的模式生物<sup>[1]</sup>。但迄今为止由于文昌鱼的细胞系仍未能建立, 使得相关研究仍集中在文昌鱼形体结构、胚胎发育、生理生化等方面的研究<sup>[2~5]</sup>, 围绕这一模式动物的细胞与分子水平的实验研究仍未能得到深入开展。为此, 作者在原有工作的基础上以文昌鱼鳃组织为原材料, 对文昌鱼细胞的原代培养条件进行优化, 从而为文昌鱼体外细胞培养和建株的进一步研究提供基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri japonicum*) 采自厦门同安欧厝海域, 挑取体长为 2~4 cm 的健康个体, 在室温条件下用单细胞藻喂养。实验前一个礼拜停止投喂藻类, 改用灭菌的海水暂养, 每天更换海水。

L15 基础培养粉购自 Sigma 公司, M199 及 Eargle's MEM 基础培养粉购自 Hyclone 公司, 新生牛血清购自杭州四季生物工程材料有限公司, 鼠尾胶原<sup>[6]</sup>和多聚赖氨酸购自 Sigma 公司。

将 L15 基础培养粉及 Eargle's MEM 基础培养粉分别用超纯水配成 2 倍浓度的基础培养基 (2L15 与 2MEM), 0.22 μm 滤膜过滤后保存于 4℃ 备用。M199 粉参考相关文献配制成 K199 基础培养基<sup>[7]</sup>, 其中加入 0.11 g/L 的丙酮酸钠, 过 0.22 μm 滤膜保存于 4℃ 备用。

按照实验设计在基础培养基中分别加入体积分数为 5%, 10%, 20% 的新生牛血清, 配置成培养液, 其中含 100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素及 50 U/mL 的卡那霉素、2.5 mg/L 可溶性两性霉素 B。培养液、平衡盐溶液及使用的器械经严格的灭菌消毒, 所有的培养液及平衡盐溶液 pH 值调为 7.2。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 组织块培养法

实验前一天用  $5 \times 10^{-12}$  g/L 硫酸铜和  $2 \times 10^{-12}$  g/L 硫酸亚铁合剂处理文昌鱼 20 h, 将文昌鱼经过灭菌海水漂洗多次, 然后转入到层流净化室内, 用 0.01% 高锰酸钾处理 15 min, 再用灭菌的海水漂洗多次, 在解剖镜下迅速取出鳃去除其它多余的组织。将组织块用眼科剪剪成约为 1 mm<sup>3</sup> 大小的小块, 用 D-Hank's 漂洗多次, 放入抗菌液 (由 2 500 U/mL 青霉素、2 500 mg/L 链霉素, 2 500 U/mL 卡那霉素组成) 中处理 10 min, 再用 D-Hank's 液中漂洗两次。接种于培养瓶中, 用解剖针轻轻的将组织块涂布均匀, 使得组织块间隙约为 0.5 cm, 将培养瓶倒置, 让组织块贴壁, 在培养瓶的另一面加入培养液, 2~3 h 后将瓶子轻轻翻转过来, 使培养液没过组织块, 28℃ 静置培养。每天用倒置显微镜观察, 并根据细胞生长情况以半量换液的方式更换培养液。

收稿日期: 2006-11-13; 修回日期: 2009-01-05

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2005AA626013)

作者简介: 石松林 (1974-), 男, 安徽凤阳人, 博士后, 主要从事肿瘤分子细胞生物学研究, 电话: 0592-2185363, E-mail: shisonglin@xmu.edu.cn; 李祺福, 通信作者, E-mail: chifulee@xmu.edu.cn

## 1.2.2 不同培养条件的设计

### 1.2.2.1 不同培养液的细胞培养

以 2L15, 2MEM, M199 为基础培养基, 加入 20%FBS 制成培养液, 培养文昌鱼鳃组织, 观察其生长情况。

### 1.2.2.2 不同血清浓度的细胞培养

在上述三种培养基中挑选中最适合于细胞生长的基础培养基, 分别加入体积分数为 5%, 10% 和 20% 的新生牛血清, 制成培养液来培养文昌鱼鳃组织, 观察其生长情况。

### 1.2.2.3 不同生长基质的细胞培养

以裸的玻璃培养瓶为对照, 用 1% 明胶、鼠尾胶原、0.01% 多聚赖氨酸等包被的培养瓶, 及一次性塑料培养瓶, 进行植块培养, 观察组织块贴壁生长情况。

### 1.2.2.4 不同温度的细胞培养

以 20°C, 28°C, 32°C, 37°C 为培养温度对文昌鱼鳃组织进行培养, 观察其生长情况。

## 2 结果

### 2.1 不同的培养基对文昌鱼鳃细胞生长的影响

本文采用了 2L15、2MEM、M199 为基础培养基, 以鼠尾胶原为包被生长基质, 对文昌鱼鳃组织以组织块的培养方式进行培养, 实验结果见表 1。

表 1 不同培养基对文昌鱼鳃细胞生长的影响

Tab. 1 Effect of mediums on primary cell culture of gill cells of amphioxus

组别	培养基组成	组织块贴壁率 (%)	细胞迁移出组织块时间 (h)	细胞增殖形成细胞单层能力
1	2L15+20%FBS	90	12	+++
2	2L15+20%FBS+0.45%NaCl	95	12	++++
3	2MEM+20%FBS	70	12	+
4	K199+20%FBS	80	12	++

注: “-”表示没有细胞从组织中迁移出来; “+”表示有个别细胞从组织块中迁移出来; “++”表示有一些细胞从组织中迁移出来, 并增殖达到单层铺盖率为 30%; “+++”表示有较多细胞从组织中迁移出来, 并增殖达到单层铺盖率为 50%; “++++”表示有较多细胞从组织中迁移出来, 并增殖达到单层铺盖率为 70%

### 2.2 不同浓度血清对文昌鱼鳃细胞生长的影响

在 2L15 基础培养基中加入不同浓度的新生牛血清, 在鼠尾胶原包被培养瓶进行细胞培养, 实验结果见表 2。

表 2 不同血清浓度对文昌鱼鳃细胞生长的影响

Tab. 2 Effect of foetal calf serum on primary cell culture of gill cells of amphioxus

组别	培养基组成	组织块贴壁率 (%)	细胞迁移出组织块时间 (h)	细胞增殖形成细胞单层能力
1	5%FBS	85	12	+++
2	10%FBS	90	12	+++
3	20%FBS	95	12	+++

### 2.3 不同的生长基质对文昌鱼鳃细胞生长的影响

以 2L15+20%FBS+0.45%NaCl 为培养液, 用不同的生长基质来接种鳃组织, 实验结果见表 3。

表 3 不同生长基质对文昌鱼鳃细胞生长的影响

Tab. 3 Effect of substrates on primary cell culture of gill cells of amphioxus

组别	培养基组成	组织块贴壁率 (%)	细胞迁移出组织块时间 (h)	细胞增殖形成细胞单层能力
1	玻璃瓶	20	12	+
2	1%明胶包被	40	12	++
3	鼠尾胶原包被	90	12	+++
4	塑料瓶	70	12	+++
5	0.01%Poly-Lys包被	70	12	+++

### 2.4 不同温度对文昌鱼鳃细胞生长的影响

以 2L15+20%FBS+0.45%NaCl 为培养液, 鼠尾胶原包被的培养瓶接种鳃组织, 在不同的温度下培养文昌鱼鳃组织, 实验结果见表 4。

表 4 不同温度对文昌鱼鳃细胞生长的影响

Tab. 4 Effect of temperature on primary cell culture of gill cells of amphioxus

组别	培养基组成	组织块贴壁率 (%)	细胞迁移出组织块时间 (h)	细胞增殖形成细胞单层能力
1	20	90	24	++
2	28	90	12	+++
3	32	50	12	+
4	37	10	-	-

### 2.5 文昌鱼鳃组织细胞的生长形态学观察

组织块在贴壁后 12 h 内就有细胞从组织块中迁移出来。首先迁移出来的是上皮样细胞(图 1-6), 它们呈明显的上皮样细胞的形态特征, 细胞间十分致

密,细胞体积较小,不过细胞增殖速度很快,在 24 h 内能生长达到离组织块近 1 mm 的区域,这类细胞在第三天达到最多,它们形成密集的细胞单层,然后开始凋亡,到 5 d 左右细胞基本上消失了。另外还有一类上皮样细胞(图 1-1, 1-2)也从组织块中迁移出来,细胞呈多边形及三角形,细胞生长速度慢于第一类上皮样细胞,在 3 d 能达到离组织块 1 mm 的区域,细胞单层杂细胞较少,在原代培养过程中该细胞集落为总细胞的主要组成部分,在少数的组织块中能

迁移出一种体型明显大于这类细胞的上皮样细胞(图 1-5),用 HE 染色发现该细胞能被染较深的颜色,推测可能跟这类上皮细胞不是一个类型细胞,这两类细胞第 5 d 达到最多,随后也开始凋亡,到 10 d 后基本上消失了。除了上面三类细胞外,在培养过程中还出现过另一类上皮样细胞,有胞质突起,细胞间连接紧密,常堆积在一起,分散不均匀(图 1-3, 1-4),生长速度一般,该细胞能存活时间相当较长,最多可以达到 20 多天。

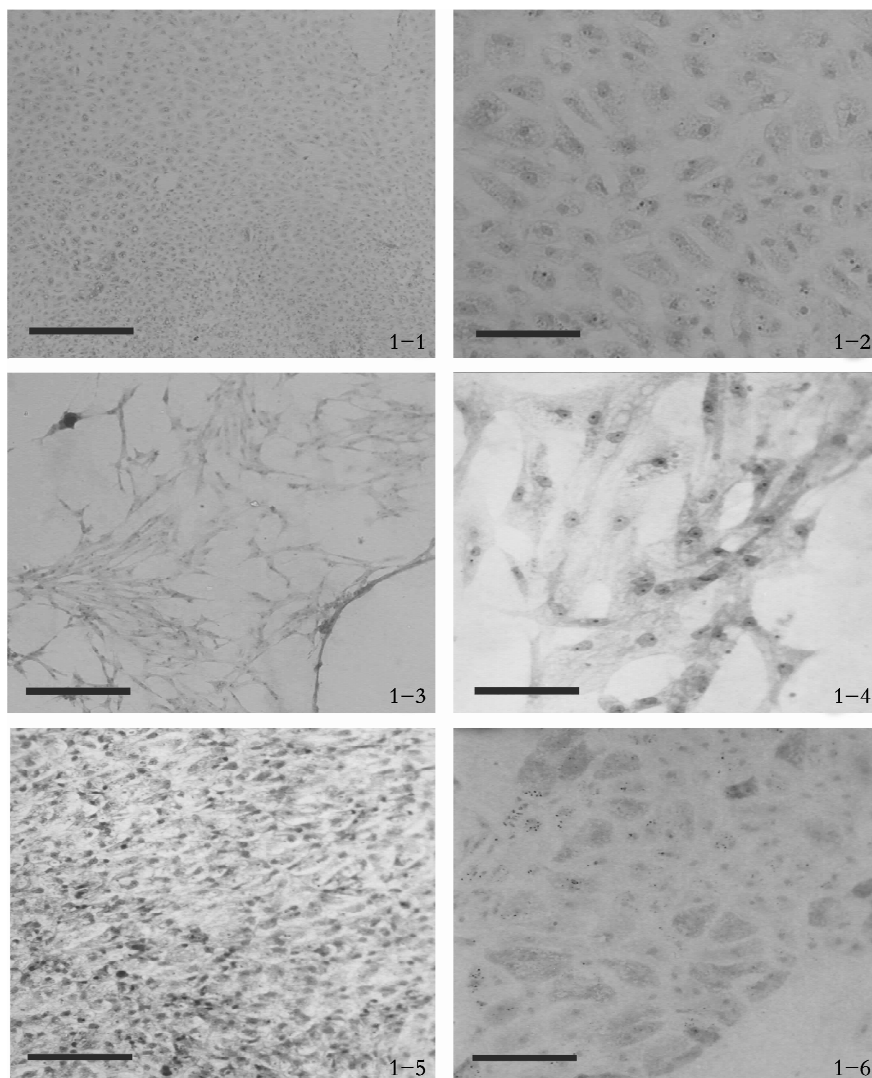


图 1 文昌鱼鳃组织细胞的原代培养 (H. E. 染色)

Fig. 1 Primary cell culture from gill of amphioxus(H. E. staining)

1-1. 培养 3 天文昌鱼第 2 类上皮样鳃细胞 (标尺示 150  $\mu\text{m}$ ); 1-2. 培养 3 天文昌鱼第 2 类上皮样鳃细胞 (标尺示 50  $\mu\text{m}$ ); 1-3. 培养 12 天文昌鱼第 4 类上皮样鳃细胞 (标尺示 75  $\mu\text{m}$ ); 1-4. 培养 12 天文昌鱼第 4 类上皮样鳃细胞 (标尺示 33  $\mu\text{m}$ ); 1-5. 培养 3 天文昌鱼第 1 类上皮样鳃细胞 (标尺示 70  $\mu\text{m}$ ); 1-6. 培养 3 天文昌鱼第 3 类上皮样细胞 (标尺示 50  $\mu\text{m}$ )

1-1. The second kind of epithelioid cells from amphioxus gill after cultured for 3 days (bar = 150  $\mu\text{m}$ ); 1-2. The second kind of epithelioid cells from amphioxus gill after cultured for 3 days (bar = 50  $\mu\text{m}$ ); 1-3. The fourth kind of epithelioid cells from amphioxus gill after cultured for 12 days (bar = 75  $\mu\text{m}$ ); 1-4. The fourth kind of epithelioid cells from amphioxus gill after cultured for 12 days (bar = 33  $\mu\text{m}$ ); 1-5. The first kind of epithelioid cells from amphioxus gill after cultured for 3 days (bar = 75  $\mu\text{m}$ ); 1-6. The third kind of epithelioid cells from amphioxus gill after cultured for 3 days (bar = 50  $\mu\text{m}$ )

### 3 讨论

海产鱼类及无脊椎动物细胞培养中一般采用 L15, RPMI1640, M199, Earle's MEM 等作为基础培养基, 其中 L15 培养基的营养成分相对其它培养基更为全面, 在大部分的鱼类及无脊椎动物细胞培养中被广泛采用<sup>[8]</sup>。和哺乳动物的细胞培养一样, 海产类动物的细胞培养也要加入一定量的添加剂, 来满足细胞培养所需的微量的生长因子。牛血清是最常用的添加剂之一, 一般采用的浓度在 5%~25% 之间。有些学者还添加各种提取物, 如肌肉提取液、卵巢提取液<sup>[9,10]</sup>等, 这些提取液对细胞培养效果相差比较大。在培养温度上, 一般都采用更改物种原来适合的生长温度, 不同的物种其最适合的培养温度也相差较大, 大部分在 10~30℃ 之间, 其中 20~28℃ 间的相对较多些。海产类动物细胞培养液中通常要加入适量的盐分才能满足细胞生长的要求, 最适合渗透压从 1 212~1 857 kPa 间不等。在文昌鱼鳃细胞培养条件优化中, 作者采用了上面四种基础培养基及不同的牛血清浓度, 和不同的渗透压, 来培养文昌鱼鳃细胞, 培养结果表明在 2L15 的培养基中细胞生长情况优于其它的培养基, 增加牛血清浓度对于细胞生长来说影响不大, 但对于组织块的贴壁则有一定的帮助, 而一定的生长基质对文昌鱼细胞贴壁增殖有一定的帮助, 其中以鼠尾胶原包被的细胞生长基质好于其它的生长基质。文昌鱼鳃细胞最适合培养温度为 26~28℃, 还发现文昌鱼鳃细胞在 1 340~1 857 kPa 的渗透压范围内均能生长, 以 1 857 kPa 生长的最好。研究表明, 文昌鱼鳃细胞最适培养条件: 温度 27℃ ± 1℃, 培养液为 2L15 + 20% FBS + 0.45% NaCl。

鳃组织是一种增殖能力较强的组织, 作为一种较好的细胞培养材料应用于研究中。目前已有鳃组织来源的商品化细胞系及各种不同物种来源的原代培养细胞, 它们广泛应用于水体毒理学、病理学、细胞离子通道等的研究中<sup>[11~13]</sup>。作者采用文昌鱼鳃组织为材料, 进行细胞原代培养, 发现至少有 4 种类型的上皮样细胞从鳃组织中迁移出来, 它们细胞形态及体积上有着很大的差异, 细胞生长十分迅速, 存活时间也较短, 最长能活两个星期左右。跟前人在无脊椎动物菲律宾仔蛤鳃细胞形态上有一定的不同<sup>[14]</sup>, 但跟其它学者报道虹鳟鱼类鳃细胞很相似<sup>[15]</sup>, 均有典型的上皮样细胞形态, 但是细胞增殖速度较快, 细胞存活时间则相对较为短。可见文昌鱼鳃细胞较为接近脊椎动物。

对文昌鱼鳃细胞原代培养的研究结果表明, 本

实验所采用的培养条件较适合文昌鱼鳃细胞生长, 得到了较好的培养效果, 从而为文昌鱼体外细胞培养、建株及开展有关文昌鱼体外细胞培养水平的实验研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Holland L Z, Laudet V, Schubert M. The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology[J]. **Cell Mol Life Sci**, 2004, **61**(18): 2 290-2 308.
- [2] 方永强. 文昌鱼在生殖内分泌进化中的地位[J]. 海洋通报, 1998, **43**(3): 225-232.
- [3] Zhang Q J, Zhong J, Feng S H, et al. Branchiostoma japonicum and B. belcheri are distinct lancelets (*Cephalochordate*) in Xiamen waters in China[J]. **Zoological science**, 2006, **23**: 573-579.
- [4] Fang Y Q, Weng Y Z, Huang W Q, et al. Localization of aromatase in the nervous system Hatschek's pit and gonad of amphioxus by in situ hybridization and immunocytochemistry [J]. **Acta Zoologica Sinic**, 2003, **49**(6): 800-806.
- [5] 王勇, 郎刚华, 徐永立, 等. 文昌鱼同源框基因研究进展[J]. 海洋科学, 2000, **24**(3): 35-37.
- [6] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 74-75.
- [7] Lang G H, Nomura N, Matsumura M. Growth by cell division in shrimp (*Penaeus japonicus*) cell culture [J]. **Aquaculture**, 2002, **213**: 73-83.
- [8] Rinkevich B. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements [J]. **Journal of Biotechnology**, 1999, **70**: 133-153.
- [9] Sunil K G, Bright S I S, Philip R. Development of a cell culture system from the ovarian tissue of African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. **Aquaculture**, 2001, **194**: 51-62.
- [10] Chen S N, Wen C M. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* R ding [J]. **Methods in Cell Science**, 1999, **21**: 183-192.
- [11] Zhou B S, Liu W H, Wu R S, et al. Cultured gill epithelial cells from tilapia (*Oreochromis niloticus*): a new in vitro assay for toxicants [J]. **Aquatic Toxicology**, 2005, **71**: 61-72.
- [12] Wood C M, Kelly S P, Zhou B, et al. Cultured gill epithelia as models for the freshwater fish gill [J]. **Biochim Biophys Acta**, 2002, **1 566**: 72-83.
- [13] Leguen I, Prunet P. In vitro effect of various xenobiotics on trout gill cell volume regulation after hypotonic shock [J]. **Aquatic Toxicology**, 2001, **53**: 201-214.
- [14] 孙振兴, 张瞭, 郝丽红, 等. 菲律宾蛤仔鳃组织的原代

培养[J]. 水产科学, 2004, 23(2): 12-14.

[15] Leguena I, Cravedib J P, Pisamc M, *et al.* Biological functions of trout pavement-like gill cells in primary culture on solid support: pH regulation, cell volume

regulation and xenobiotic biotransformation[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2001, 128: 207-222.

## Primary cell culture from gill explants of amphioxus

SHI Song-lin, HUANG Xiao-ming, LI Qi-fu, WANG San-ying, YANG Hai-bo

(College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Received:** Nov. , 13, 2006

**Key words:** *Branchiostoma belcheri japonicum*; gill cell; primary cell culture

**Abstract:** Primary cultures of gill cells were initiated from gill filament explants of amphioxus (*Branchiostoma belcheri japonicum*) by a tissue block culture method. The explants were cultured in Leibovitz L15 medium, M199, Earle's MEM medium with 5%, 10% or 20% foetal calf serum(FCS) and a certain amount of NaCl. We found that gill cell could grow better in 2 L15 medium than in others. The attachment efficiency was serum-dependent though increased FCS concentration did not stimulate further outgrowth of cells. The explants produced four different kinds of epithelia cell outgrowth in 12 h after attachment as a sheet of cells. There was high proliferation for the first 3 days, then a stable plateau for 3 days followed by a decline phase for 14 days. The use of gill explants to establish primary cultures of fish gill cells has advantages which include longevity of the culture and successive proliferations from explants and could provide a useful tool for the investigation of long-term processes in cellular biology.

(本文编辑:刘珊珊)