

鱼类细胞培养及其应用

CELL CULTURE OF FISH AND ITS APPLICATION

于 淼¹ 管华诗¹ 郭华荣² 张士瑾²(¹ 青岛海洋大学海洋药物与食品研究所 青岛 266003)(² 青岛海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

中图分类号 Q2 文献标识码 A 文章编号 1000 - 3096(2003) 03 - 0004 - 05

水生动物的细胞培养晚于陆生动物, 其中(包括水生无脊椎动物和水生脊椎动物), 水生无脊椎动物的细胞培养主要是甲壳类(如对虾、螯虾、龙虾、蟹和鲎)、贝类(如牡蛎、珍珠贝和蛤) 和海绵的体外培养。水生无脊椎动物的细胞培养比较困难, 原代培养细胞不能形成单层, 或即使形成单层, 但细胞不分裂, 难以进行传代。因而, 至今没有得到水生无脊椎动物的连续性细胞系。水生无脊椎动物的细胞培养不仅在甲壳类和贝类的病毒分离、检测和疫苗制备方面有很大的应用价值, 而且还可能用来生产天然产物比如药物。已经发现不少海洋无脊椎动物(如海绵、珊瑚、苔藓虫、海兔和海鞘) 能合成抗癌、抗病毒、抗心血管病的药物, 若能查明这些药物是在动物的哪些细胞中合成的, 便可能用细胞培养法来生产。

水生脊椎动物的细胞培养主要是鱼类的细胞培养, 始于 20 世纪 60 年代, 由 Wolf 和 Quimby 建立了世界上第一个鱼类细胞系, 即虹鳟鱼生殖腺细胞系 RTG2。此后, 鱼类的细胞培养研究进展十分迅速。据 Fryer 等^[1] 统计, 到 1994 年为止, 至少已建立了 159 株鱼类细胞系。其中, 淡水鱼类和溯河洄游性鲑科鱼类的细胞系有 125 株, 分别来源于 21 个科的 52 种鱼类的不同组织; 而海水鱼类的细胞系仅有 34 株, 分别来源于 13 个科的 22 种海水鱼类的不同组织。我国对于鱼类细胞培养的研究始于 20 世纪 70 年代, 迄今已建立了 20 多株细胞系(见表 1)。

1 鱼类细胞培养方法

鱼类细胞的培养方法基本上沿用了哺乳动物细胞的培养方法。包括原代培养和传代培养。

鱼类细胞原代培养的方法包括组织块固定法、机

械分散法、络合剂分散法和酶消化法。当组织量较少时, 可以采用组织块固定法; 机械分散法适于细胞间连接较松散的组织, 如胚胎组织及幼鱼全鱼; 络合剂分散法是用 EDTA 等螯合剂将细胞间的钙、镁离子结合掉, 而使细胞间连接松散, 主要用于囊胚细胞培养; 酶消化法是目前鱼类细胞培养中最为常用的方法, 胰蛋白酶质量分数为 0.25% ~ 0.5%。

与哺乳动物的细胞培养相比, 鱼类细胞的培养比较容易, 对传代培养时间的要求弹性比较大, 适温范围广。这些优点使得鱼类细胞系在生物学很多研究领域中得到广泛应用。

鱼类细胞原代培养的组织来源有很多。胚胎组织和幼鱼的各种组织, 分化程度低, 分裂潜能大, 是原代培养的主要组织来源。另外, 成年鱼的性腺、肾脏、心脏、鳃、脾脏、鳍条、吻端等组织以及成鱼的肿瘤组织也是常用材料。

对淡水鱼而言, 用于哺乳类的商品化培养基的渗透压是适宜的, 不需要进行调整, 而对海水鱼而言, 有些需要在培养基中添加 1.5% 的氯化钠, 调节渗透压至 4×10^5 Pa。

2 鱼类细胞系的应用

目前, 鱼类细胞培养技术已成为一种重要的研究

第一作者: 于淼, 出生于 1978 年, 硕士。E-mail: yumiacer@hotmail.com

通讯作者: 管华诗

收稿日期: 2002-06-18; 修回日期: 2002-08-28

手段,广泛应用于病毒学、环境毒理学、细胞生物学、肿瘤学以及资源保护等方面。鱼类培养细胞作为实验对象,有着活体鱼无法比拟的优点:(1)成本低,细胞系的维护不需要大型的养殖设备和大量的换水与充气;(2)重复性好,实验条件可以精确控制。因此,对鱼类细胞系进行深入研究,无论在理论研究方面,还是在实际应用方面,都具有深远意义。

2.1 鱼类病毒学

鱼类病毒学是鱼类细胞培养最主要的应用领域之一,主要应用于病毒的分离、鉴定以及病毒疫苗的制备。自 Wolf 首次利用鱼类培养细胞 RTG2 分离出第一个鱼类病毒——传染性胰坏死病毒以来,目前,世界上已经发现了 50 余种鱼类病毒^[2]。其中,已经分离鉴定的大约有 24 种,尚未分离的大约有 21 种。在已分离鉴定的鱼类病毒中,包括疱疹病毒科 6 种、呼肠病毒科 6 种、虹彩病毒科 4 种、副粘病毒科 3 种、双 RNA 病毒科 2 种、正粘病毒科 1 种、小 RNA 病毒科 1 种和杯状病毒科 1 种等。在已发现但尚未分离鉴定的鱼类病毒中,属于疱疹病毒科的有 9 种,属于反转录病毒科的有 7 种,属于虹彩病毒科的有 2 种。在已发现的 50 余种鱼类病毒中,有 7 种病毒对渔业生产有较为严重的不良影响,它们是:疱疹病毒科的斑点叉尾鲷病毒,双 RNA 病毒科的传染性胰坏死病毒,呼肠病毒科的草鱼呼肠病毒,弹状病毒科的鲤鱼春季病毒血症病毒、弹状病毒科的病毒性出血性败血症病毒、弹状病毒科的传染性造血器官坏死病毒和弹状病毒科的白斑狗鱼幼鱼弹状病毒。1965 年, Jensen^[3]用 RTG2 细胞研究了虹鳟病毒性出血性败血症(VHS)病毒的特性。1971 年, Fijan^[3]等用鲤鱼卵巢原代培养细胞分离出鲤鱼春季病毒血症病毒,而后又从 FHM 细胞分离出弹状病毒。Wolf 和 Darlington^[3]1971 年用云斑叉尾鲷细胞系分离出 CCVD 病毒。1988 年,童裳亮等利用虹鳟脾细胞系从病鱼中分离出鱼传染性胰脏坏死病毒,并对该病开发出 ELISA 和核酸探针检测技术。长江水产研究所和中科院病毒所通过草鱼肾脏组织的细胞培养分离鉴定了草鱼出血病病原——鱼呼肠病毒,并生产了减毒疫苗,广泛用于生产实践中。1999 年, Zhang 等^[4]人将虹彩病毒(Rana grylio virus)接种在 EPC 细胞系中,观察病毒的形态发生,对其进行了鉴定分类。2001 年 Chang 等^[5]建立了鲈鱼细胞系,研究了其对虹彩病毒、双 RNA 病毒、呼肠病毒、棒状病毒、野田村病毒的敏感性,证明该细胞系适合

作为分离各种鱼病病毒的载体。

2.2 毒理学

鱼类养殖业的快速发展与工农业污染对水质的破坏,促进了鱼类毒理学的研究与发展。但是,利用活鱼进行毒理学研究,需要一定的养殖场所和养殖设备,需要不断的充气和经常换水,周期长、成本高。再者,鱼类本身代谢作用具降解性,经常导致结果重复性差。利用体外培养鱼类细胞代替活鱼进行毒理实验,则解决了上述的问题,具有以下优点:(1)细胞的均一性好,在遗传上极为相似;(2)药物与细胞直接作用,反应速度快;(3)可结合多种技术方法测知药物效应;(4)比用活鱼更经济、方便。Rachlin 和 Perlmuter 于 1968 年首次将体外培养的鱼类细胞用于检测环境污染物对水生生物的毒性作用。在此后的几十年间,利用体外培养鱼类细胞对环境毒物,包括基因毒物、诱变剂、致癌物、环境激素和内分泌干扰素,进行污染监测和安全性评价,成为鱼类细胞培养的重要用途之一。1998 年, Bieberstein 和 Braunbeck 利用光镜和电镜描述了 3,5-二氯苯酚对 RTG2 的细胞病理学效应。Schirmer^[6]1998 年分析了 16 种多环芳香族碳水化合物对虹鳟细胞系 Rtgil-W1 的细胞毒性,发现这些化合物的毒性是通过破坏鱼类细胞膜的完整性来实现的。1998 年, Maracine 与 Segner^[7]检测了六种重金属盐在虹鳟 RTG2 细胞系中的细胞毒性,它们的毒性大小为: Hg > Cd > Zn > Cu > Pb > N, 并提出谷胱甘肽能够通过和重金属盐螯合保护鱼类细胞不受重金属毒害而起保护作用的。2000 年, Marques^[8]等人研究了褐色大头鲶 BB 细胞系和虹鳟 RTG2 细胞系对苯并芘的反应,苯并芘可以诱导 CYP1A1 的酶活,结果表明:苯并芘既有直接毒性,也可以通过代谢而产生毒性,细胞系的 CYP1A1 的诱导有效性使其成为环境生物检测和毒理学上的有用的工具。2001 年, Fent^[9]提出鱼类细胞系在生态毒物学研究中是一种多用途的工具,鱼类细胞系可用于评价样品的细胞毒性,评价有机化合物对细胞色素 P4501A 的诱导能力,还可以评价样品的雌激素活性,鱼类细胞系可以取代急性鱼类毒性实验,具有快速和节约资源的优点。随着细胞毒理学在实际应用中的增加,在鱼类细胞毒理实验中,人们不断改进实验手段,1999 年, Teresa 等^[10]用流式细胞术对基因毒素(丝裂霉素、长春花新碱硫酸盐、苯并芘)进行毒性评价,快速且客观。1999 年, Kohlpoth 等^[11]利用虹鳟细胞系 RTG2,以细胞微核化为基因毒

性分析终点,对 38 个工业废水样品进行分析,发现有 14 个样品显著提高了 RTG2 细胞的微核化水平。Ferre^[12]采用 RAPD 技术分析了丝裂霉素 C 对虹鳟细胞系 RTG2 的基因毒性,结果显示:丝裂霉素 C 对 RTG2 细胞基因组 DNA 的遗传损伤可以通过 RAPD 指纹中某些扩增带的有无或扩增强度的改变来表现。近年来,细胞培养被广泛用于取代整条鱼来测试药物作用。有资料表明:氯化铵可以抑制传染性胰坏死病毒在 CHSE214 细胞中增殖,苯丙咪唑钠可抑制传染性造血器官坏死病毒在 FHM 细胞的增殖。

2.3 鱼类肿瘤

水环境中基因毒物的不断增加及其对鱼类的基因毒性生态学效应越来越受到广泛关注。GESAMP 在 1991 年证明水中的基因毒物与鱼类肿瘤发生密切相关。因此,培养鱼类的癌细胞是研究肿瘤发生机理的途径之一。美人鱼神经纤维瘤(DNF)是一种自发性鱼类肿瘤,Schmale 等 1996 年从培养的 DNF 细胞系中分离出一种反转录病毒,认为该病毒是 DNF 形成的诱因。近年,郭华荣等在牙鲆鳃细胞系 FG 培养中发现肿瘤性转化,这在鱼类细胞系中是首次报道,他们从形态学、非贴壁依赖性和遗传变异方面分析了 FG 发生肿瘤转化的特点,这对于了解鱼类细胞系的转化和肿瘤发生有重要意义(待发表资料)。

2.4 基础理论研究

2.4.1 生理学 在鱼类生理学研究方面,细胞培养是研究细胞生理的基础,在某种程度上,也能够从细胞水平了解个体的功能。Beyenback, Wonderrge m 和 Amoter^[13]分别用细胞培养技术对鱼类细胞膜离子通透性和电生理特性进行了广泛而深入的研究。1998 年, Balebona 等^[13]人通过实验发现,将从病鱼中分离出的弧菌的上清液接种到加入了去甲肾上腺素嗜镉细胞瘤 PCI2 中,细胞向外释放乙酰胆碱的量增多,从细胞水平上解释了当致病弧菌感染鱼后,鱼所出现的行为。

2.4.2 内分泌学 国外的一些学者采用鱼类细胞系就鱼类的内分泌进行了研究。Emmart 等于 1970 年成功培养了鱼垂体细胞。Ribeiro 等 1983 年发现,鲤鱼原代细胞对鱼垂体促性腺激素释放因子和性激素有反应。1999 年, Huang 等^[14]研究了胰岛素样生长因子对欧洲鳗鲡原代垂体细胞分泌的促性腺激素和生长激素的反向调控作用。2001 年, Alak 等^[15]研究了鲈

鱼重组 GnRH R 在鱼的异源细胞系中活化的信号途径,实验通过将重组的垂体 GnRH R 在鱼类细胞系中表达,采用受体基因监测信号途径的活化来实现的。

2.4.3 免疫学 在鱼类免疫学研究中,也有很多利用细胞培养的例子。1998 年, Neumann 等^[20]从金鱼的巨噬细胞系中分离出巨噬细胞生长因子,证明肾脏白细胞能够分泌内源性生长因子,该生长因子在鱼

表 1 我国已建立的鱼类细胞系^[16-19]

鱼类名称	组织来源	细胞系名称
草鱼	吻端组织	ZC-7901, ZC-7901 S1
鳊鱼	卵巢组织	鳊鱼卵巢组织细胞系
鳊鱼	肾脏组织	鳊鱼肾脏组织细胞系
罗非鱼	卵巢组织	罗非鱼卵巢组织细胞系
鲫鱼	胚胎组织	CAB-80
草鱼	尾鳍组织	GCCF-2
草鱼	肾脏组织	CIK
虹鳟	头肾组织	虹鳟巨噬细胞系
草鱼	吻端组织	PSF
团头鲂	尾鳍组织	TQ-8801
草鱼	尾鳍组织	HGC-87
鲫鱼	鳃盖膜组织	HCC-87
南方鲇	胚胎组织	SM
牙鲆	鳃组织	FG
鲈鱼	脾脏组织	SPS
鲈鱼	心脏组织	SPH
真鲷	鳍组织	RSBF
淡水白鲳	吻端组织	CBW
淡水白鲳	尾鳍组织	CBT
淡水白鲳	臀鳍组织	CBS
淡水白鲳	胚胎组织	WM-9001

类调节巨噬细胞造血功能方面起重要作用。2000 年, Samamoto 等^[21]实验发现,鱼类具有特异性的抵抗被病毒感染的细胞的细胞毒性,这一点与高等脊椎动物相似,实验使用的是鲤鱼同源细胞系。2001 年, Shen 等^[22]人从淡水鲢鱼中分离出第一个变温动物的细胞毒细胞系,研究了 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的作用机制,实验证明,鲢鱼有一系列不同的细胞毒细胞,克隆细胞毒细胞有利于研究其功能,这在其它鱼类研究中尚未出现。2001 年, Nakanishi 等^[23]研究了鱼类的 T 细胞功能,实验结果证明,硬骨鱼的 T 细胞的免疫功能与高等脊椎动物的 T 细胞免疫功能相似,建立了用于检测起保护作用的抗原的模式系统,诱导由细胞介

导的免疫,建立鱼类疫苗。

2.4.4 遗传学 在遗传学方面,胚胎干细胞研究和基因打靶技术在鱼类发育生物学、鱼类基因工程育种及海洋生物技术等方面发挥很大作用^[24]。胚胎干细胞是从动物早期发育胚胎内细胞团和原始生殖细胞分离得到的一种未分化的永久性细胞系,它既保留了所有的发育潜力,在适合条件下能够发育成多种类型的细胞、组织,它还能让人对其基因组进行各种遗传操作。因此,胚胎干细胞是研究动物早期胚胎发生、细胞分化、基因功能和表达调节等发育生物学基础研究的一个非常理想的工具。1992年,Collodi等最早尝试进行斑马鱼胚胎细胞培养。Sun于1995年获得了斑马鱼胚胎成纤维细胞系(ZEF),1994年,Wakamatsu等报道了青鳞胚胎干细胞的建立和鉴定。Sun, Wakamatsu和Hong等人的研究均表明,胚胎干细胞具有很强的体外分化能力。Lin率先在斑马鱼上进行了囊胚细胞移植制作嵌合体鱼的研究。1993年Wakamatsu等通过显微注射将来自野生型青鳞的囊胚细胞移植到白化品系中,成功获得了能够通过生殖系传递的嵌合体个体。有关将经过长期培养鱼类胚胎干细胞移植后获得嵌合体的研究,目前只有一篇报道,Hong等将传代培养达40代的青鳞胚胎干细胞显微注射到白化品系中,获得了胚胎干细胞移植的嵌合体。

2.5 资源保护

鱼类细胞系还能够应用于资源保护领域。对珍贵的野生动物和有重要经济价值的动物,人们已从不同水平对这些物种保护进行了研究,我国已经建立了野生动物细胞库,鱼类细胞库是建立在细胞培养基础上的。由于鱼类干细胞具有该种的全套基因且具有发育潜能性,保存住了细胞就意味着保存了该物种基因,这对鱼类种质资源保护有重要意义。张义兵等^[19]于2000年报道了白暨豚组织培养的初步研究,建立白暨豚的永久细胞系,对研究白暨豚的细胞遗传学、细胞生物学以至资源保护都有重要意义。

2.6 活性物质

自从1957年发现干扰素后,关于鱼类细胞干扰素的报道陆续出现。所用的诱导剂多是恒温动物病毒,这些病毒在鱼类病毒学实验中有一定的限制。1999年,王铁辉等^[25]研究报道,草鱼出血病病毒被紫

外线灭活后,能够在鱼类培养细胞中诱导干扰素,同时,放线菌素D具有超诱导作用,同种干扰素具有启动效应。该研究为鱼类干扰素的进一步研究及其基因克隆奠定了基础。资料表明,鲨鱼终生不会生癌,这是因为在鲨鱼体内有一种名为硫酸软骨素的活性物质。但目前还没有鲨鱼细胞系建立报道,如果建立鲨鱼软骨细胞系,将使硫酸软骨素的大规模生产方便而低成本。

3 前景展望

鱼类细胞系的研究起步较晚,虽然人们已经取得了很多的研究成果,但是,与其它动物细胞系的应用相比,鱼类细胞系仍有很多领域等待着人们去更深入探索。比如,动物细胞系不仅已广泛用于生产疫苗、干扰素和单克隆抗体,还用于筛选抗癌药物和免疫增强药物;作为海洋动物的贝类,人们已经开始研究通过培养育珠贝类的外套膜上皮细胞进行体外育珠。人们还从海藻中分离出新的抗氧化剂,建立了大量生产生物活性化合物的海藻细胞和组织培养技术。也有人希望建立海绵细胞体外培养制备抗肿瘤化合物的方法。鱼类细胞系中同样有着丰富的宝藏等待着人们的发掘,不仅仅是鱼类,鲍鱼和海参是两种营养价值很高的海洋无脊椎动物,虽然它们的人工养殖已在许多沿海地区开展起来了,但是生长周期长,产量低,市场价格高,远远不能满足市场需求。如果我们体外培养鲍鱼和海参细胞获得成功,则可以通过大规模体外培养鲍鱼和海参的细胞,在短时间内生产大量具有同样营养价值的鲍鱼和海参细胞,以满足人们的食用要求,即所谓的“试管鲍”和“试管海参”。在不久的将来,“试管鲍”和“试管海参”将具有广阔的应用前景。因此,研究鱼类细胞系会对人们的生产生活做出极为重要的贡献。

参考文献

- 1 Fryer J L, Lannan C N. Three decades of fish cell culture: A current listing of cell lines derived from fish. *Journal of Tissue Culture Methods*, 1994(16): 87-94
- 2 陈怀青. 鱼类病毒研究评述. *国外水产*, 1990, 3: 30-32
- 3 钱华鑫, 张四明. 鱼类细胞培养在渔业科学上的应用. *淡水渔业*, 1991, 5: 40-42
- 4 Zhang Q Ya, et al. Studies on morphogenesis and cellular interactions of Rana grylio virus in an infected fish cell line. *Aquaculture*, 1999(175): 185-197

- 5 Chang S F, et al. Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcanifer*) for virus isolation. *Aquaculture*, 2001(192): 133-145
- 6 Kristin S, Denise J, et al. Ability of fractionated petroleum refinery effluent to elicit cyto and photocytotoxic responses and to induce 7-ethoxoresorufin O-deethylase activity in fish cell lines. *The Science of Total Environment*, 2001(271): 61-78
- 7 Magda Miracine, Helmut Segner. Cytotoxicity of metals in isolated fish cells: Importance of the cellular glutathione status. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1998A(120): 83-88
- 8 Araujo C S A, Marques S A F, Carrondo M J T, Goncalves L M D. In vitro response of the brown bullhead catfish (BB) and rainbow trout (RTG2) cell lines to benzopyrene. *The Science of the Total Environment*, 2000(247): 127-135
- 9 Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*, 2001(15): 477-488
- 10 Paloma S, et al. Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model genotoxic agents: mitomycin C, Vincristine sulfate and benzopyrene. *Mutation Research*, 2000(465): 113-122
- 11 Kohlpoth M, Rusche B, et al. Flow cytometric measurement of micronuclei induced in a permanent fish cell line as a possible screening test for the genotoxicity of industrial waste water. *Mitogenesis*, 1999,14(4): 397-402
- 12 Ferrero M, Castano A, et al. Characterization of RTG2 fish cell line by Randomly amplified polymorphic DNA. *Ecotoxicology and Environmentl Safety*, 1998(40):56-64
- 13 Balebona M C, et al. Neurotoxic effect on two fish species and a PC12 cell line of the supernate of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio anguillarum*. *Veterinary Microbiology*, 1998(63): 61-69
- 14 Huang YS, et al. Opposite effects of insulinlike growth factors (IGFs) on gonadotropin (GtH II) and growth hormone (GH) production by primary culture of European eel (*Anguilla anguilla*) pituitary cells. *Aquaculture*, 1999(177): 73-83
- 15 Alok D, Sampath K R, et al. Recombinant perciform GnRH R activates different signaling pathways in fish and mammalian heterologous cell lines. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001B(129): 375-380
- 16 洪锡钧. 南方鲶胚胎细胞培养及其细胞周期特性检测. *水产学报*, 1995, 21(3): 240-245
- 17 童裳亮, 李宏. 牙鲆、鲈鱼和真鲷的四个永生性细胞系建立. *生物工程进展*, 1997, 17(3): 3-4
- 18 张 铭, 陈苏红等. 淡水白鲢细胞系及其生长温度特性的研究. *生物工程学报*, 2001, 17(1): 105-108
- 19 张义兵等. 白暨豚组织培养的初步研究. *水生生物学学报*, 2000, 24(2): 193-195
- 20 Norman F, et al. Production of a macrophage growth factors by a goldfish macrophage cell line and macrophages derived from goldfish kidney leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 1998, 22(4): 417-432
- 21 Tomonori S, et al. Specific cell-mediated cytotoxicity against a virus-infected syngeneic cell line in isogenic gibel carp. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000(24): 633-640
- 22 Shen Linling, et al. Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001(26): 141-149
- 23 Nakanishi T, et al. Cytotoxic T cell function in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001(26): 131-139
- 24 陈松林. 鱼类胚胎干细胞研究进展. *中国水产科学*, 2001, 7(4): 95-98
- 25 王铁辉, 张义兵. 鱼类培养细胞干扰素的诱导. *病毒学报*, 1999, 15(1): 43-48

(本文编辑:刘珊珊)