

中华鲟组织培养的初步研究

叶湘辉 刘汉勤 俞小牧 张义兵 常剑波

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 取中华鲟的尾鳍、吻端、性腺等八种组织进行体外培养, 得到来源于吻端和性腺组织的两个细胞株, 分别命名为 CSSn 和 CSG. CSSn 和 CSG 均以成纤维样细胞为主. 两种细胞都含有微染色体, 染色体数目众多, 在分布上具有“双峰多态”的特点, 表明细胞已属异倍体. 细胞生长较慢, CSG 接种 9d 后, CSSn 接种 14d 后数目达到最高值. CSG 在 16-30℃ 生长正常, 最佳生长温度在 27℃, 最适 pH 为 7.2.

关键词 中华鲟, 组织培养, 染色体, 微染色体

鲟形目是一类比较原始的软骨硬鳞鱼类. 中华鲟 (*Acipenser sinensis* Gray) 是我国著名的鲟科鱼类, 其繁殖群体主要分布在长江水系和珠江水系. 在目前研究过的鱼类中, 中华鲟的染色体数目最多^[1], 在鱼类乃至脊椎动物进化史上具有重要的研究价值. 但是, 迄今为止对其的研究多限于形态学、资源生态学以及繁殖生物学领域, 在细胞遗传和分子遗传学领域的报道甚少^[2,3], 组织培养工作则未见开展. 通过组织培养的研究, 建立永久细胞系, 对中华鲟的细胞遗传学、细胞生物学以及保护生物学的深入研究都有重要意义. 而且, 探索中华鲟的细胞培养方面的经验, 无疑能为至今未实现人工繁殖的濒危近缘种—长江白鲟的细胞种质资源库的建立提供良好基础. 基于上述目的, 作者从 1998 年 5 月起开始中华鲟的原代和传代培养.

1 材料与方法

1.1 材料鱼 1 龄中华鲟, 系宜昌中华鲟研究所 1997 年秋季人工繁殖, 饲养在本所鱼类学研究室鱼池内.

1.2 原代培养和传代培养 原代培养采用组织块贴壁法接种细胞. 培养基选用 TC199 (GIBCO 产品), 内含 20% 胎牛血清 (中国医学科学院血液学研究所产品) 及双倍抗菌素 (青霉素 200U/mL, 链霉素 200(μg/mL), 卡那霉素 100(μg/mL), 调 pH 为 7.2 左右, 培养温度 27℃. 接种后每周换液 2 次, 每次弃去旧液 1/2-2/3. 细胞传代按文献^[4]进行. 在传代过程中培养基血清的量从 20% 逐步下降至 10%.

1.3 染色体研究 传代后 1-2d 的细胞, 收获前 3-5h 加入秋水仙素至终浓度 0.2μg/mL, 常规制片^[4]. 油镜下选择分散较好的中期分裂相摄影计数, 分区计算出现率, 绘制数

收稿日期 1999-10-20; 修订日期 1999-12-10
基金项目 国务院三峡办和中国长江三峡工程开发总公司资助(三环科 1.03-02-01).
作者简介 叶湘辉(1975-), 女, 湖南怀化人, 硕士生, 从事细胞遗传学研究.

目分布图.

2 结果与分析

2.1 不同组织的培养概况

先后 6 次取中华鲟的尾鳍、吻端、皮肤、肌肉、肝脏、肠、性腺、肾等八种组织做原代培养. 表 1 是不同组织的体外培养结果. 除了肝脏, 其余组织均在体外有不同程度的生长. 尾鳍、吻端、肌肉和性腺等四种组织在原代培养基础上进行了传代培养. 但只有吻端组织和性腺组织的细胞能保持较稳定的培养, 分别命名为中华鲟吻端细胞株细胞 CSSn (Chinese Sturgeon Snout Cells) 和中华鲟性腺细胞株细胞 CSG (Chinese Sturgeon Gonad Cells), 各传至 39 和 30 代.

2.2 CSSn 和 CSG 的部分生物学特性

2.2.1 细胞形态学观察 CSG 和 CSSn 细胞主要为成纤维样细胞. CSG 生长旺盛, 接种后初期呈“铺路石”状, 生长至稳定阶段呈“汇流”状. 图 1-1 是培养 3d 的第 10 代 CSG 在相差显微镜下的形态学观察, 图 1-2 是第 20 代 CSSn 接种 3d 后的形态学观察.

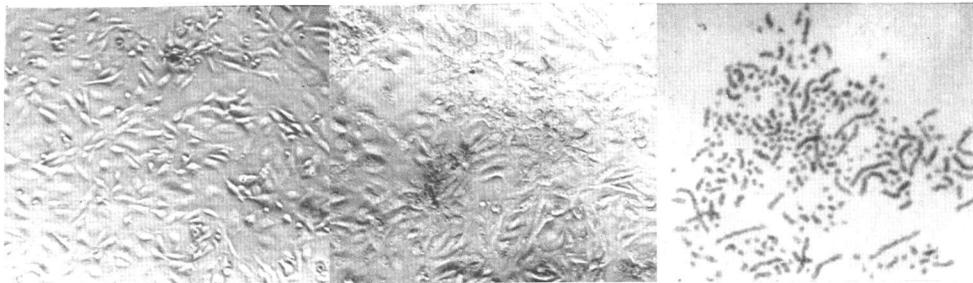


图 1 1. 第 10 代 CSG 的活体显微观察; 2. 第 20 代 CSSn 的活体显微观察; 3. 第 9 代 CSG 染色体形态

Fig. 1 1. Micrography of living CSG at passage 10; 2. Micrography of living CSSn at passage 20;

3. Micrography of chromosome of CSG at passage 9

表 1 八种不同组织的培养结果

Tab. 1 Cell culture results of eight kinds of tissues

组织来源 Tissue of origin	细胞生长状况 Growth state of cells		细胞形态 Morphology of cells
	原代培养 Primary culture	传代培养 Subculture	
肝脏 Liver			
皮肤 Skin	7d 后极少量贴壁, 无法连成片		成纤维样
肠 Intestine	3-5d 内出现生长, 能出现生长晕		成纤维样
肾 Kidney	生长较差		成纤维样
肌肉 Muscle	贴壁生长快, 形成生长晕较慢	100d 后继代培养, 大量脱落致死	成纤维样
尾鳍 Tail fin	生长较快, 脱落严重	22d 后继代培养, 脱落致死	上皮样为主
吻端 Snout	生长较快, 5d 内形成生长晕, 细胞脱落较多	14d 后传代, 一般 1-2 周传代 1 次	原代以上皮样为主, 传代后以成纤维样为主
性腺 Gonad	生长良好, 5d 内形成生长晕	14d 后顺利传代, 约 1 周传 1 次	成纤维样

2.2.2 染色体形态与数目分布 鲟鱼类染色体数目众多,含微染色体.第9代 CSG 细胞的染色体形态展示了上述特点(图 1-3).

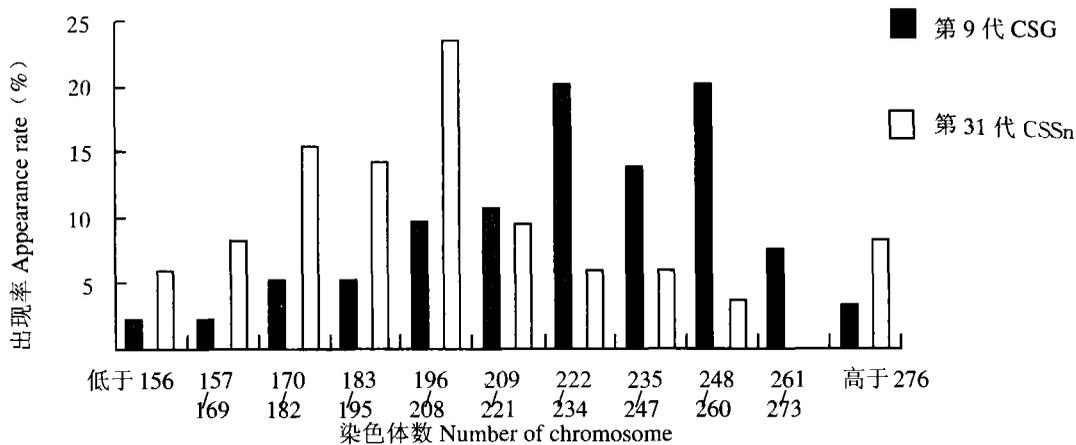


图 2 第 31 代 CSSn 和第 9 代 CSG 的染色体数目分布

Fig. 2 The distribution of chromosome numbers of CSSn at passage 31 and CSG at passage 9

第 31 代 CSSn 和第 9 代 CSG 的染色体数目分布情况如图 2(第 31 代 CSSn 记数 85 个分裂相,第 9 代 CSG 记数 94 个分裂相).中华鲟正常体细胞染色体数为 $2n=264 \pm 8$ ^[1]. 两株中华鲟培养细胞的染色体数在分布上远离正常 $2n$ 值,呈现出“双峰多态”的特点:染色体数目变动范围很大;第 9 代 CSG 的染色体分布的中心趋向落在 222-234 和 248-260 之间,各占记数细胞总数的 20.2%.第 31 代 CSSn 在 196-208 区间内出现率最高,为 23.5%;其次是在 170-182 区间,出现率 15.3%.可见这两种培养细胞已属异倍体.和一般鱼类细胞系不同的是,中华鲟细胞在体外培养中染色体大量丢失,大多数细胞染色体数低于正常 $2n$ 值.

2.2.3 生长曲线 用稳定生长的细胞传代,接种第 31 代 CSSn 和第 27 代 CSG.按文献^[4]测定生长曲线.从图 3 看,中华鲟细胞生长较为缓慢,接种初期数目下降,出现生长延迟现象.CSG 在接种 9d 后数目达到最高值;CSSn 则在 14d 才达到最高点.

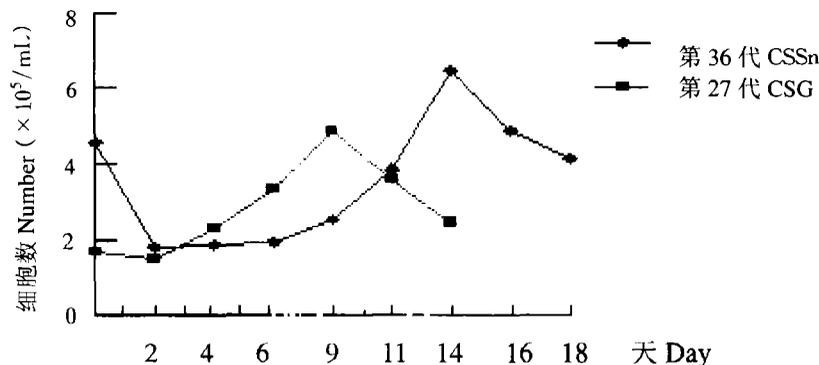


图 3 第 36 代 CSSn 和第 27 代 CSG 的生长曲线

Fig. 3 The growth curves of CSSn at passage 36 and CSG at passage 27

2.2.4 生长温度范围 接种相同数量的第 22 代 CSG 细胞在不同温度下培养,5d 换液 1 次,观察 13d,记录生长状况(表 2)。实验表明 CSG 细胞在 16-30℃ 下均能生长,维持正常形态;30℃ 生长最快,但脱落较多;27℃ 下生长最为稳定。

表 2 温度对 CSG 生长的影响

Tab.2 The effect of temperature on the growth of CSG

温度(℃) Temperature	细胞生长状况 Growth state of cells	
	5d 内	5-13d
4	大多数悬浮,贴壁细胞单个分散。	少数细胞单个贴壁,细胞边缘模糊,形态异常。6d 后移置 27℃ 下继续培养,13d 时形成疏松单层,细胞边沿清晰。13d 后移置,也有生长
16	生长缓慢,未形成单层	持续生长,形成均一单层
22	生长良好,形成均一单层	逐渐致密
27	生长良好,形成较密单层	逐渐致密,脱落细胞极少
30	生长很快,形成致密单层,脱落细胞多	细胞大量脱落
35	几乎不生长,贴壁细胞极少。	细胞不生长。3d 以后放回 27℃ 下,没有观察到生长现象

2.2.5 最适 pH 值 接种相同数目的第 22 代 CSG 在各 pH 值条件下,5d 换液 1 次,记录生长情况。结果表明 CSG 细胞的最适 pH 为 7.2 左右;细胞对偏酸性环境也有一定的适应性(表 3)。

表 3 pH 对 CSG 细胞生长的影响

Tab.3 The effect of pH on the growth of CSG

pH	细胞生长状况 Growth state of cells	
	5d 内	5-13d
5.5 以下	贴壁率很低	局部贴壁生长良好,疑为对酸性环境具有适应性的细胞大量脱落所致
6.0	生长为稀疏树枝状,形态异常	脱落
6.5	贴壁率较高,生长缓慢,无异常	脱落严重,细胞呈树状,异常
7.2	生长良好,形成较密单层	逐渐致密,脱落细胞极少
7.6	生长成疏松的树枝状细胞	脱落
8.0 以上	贴壁率非常低,贴壁生长的细胞为蓬松的细胞束	

3 讨论

采用组织块贴壁法在 27℃ 下进行中华鲟的组织培养,获得两种细胞株 CSSn 和 CSG,表明这种条件比较适合中华鲟细胞的体外培养。八种组织中,中华鲟的肝脏可能由于所含有的脂肪、油滴较多,难以适应体外培养。体表各组织和肠组织容易带菌,较难消毒,在培养过程中容易引起霉菌和细菌污染。肾脏紧贴脊柱,一般在最后取材,又由于分布狭长,挑取不便,也易染菌。肌肉组织分裂较慢,仅有一瓶最终能铺满瓶壁的 90% 以上,在原代培养 100d 后进行继代培养,仍未获成功。性腺组织的分裂增殖能力最强,在原代培养 14d 后

即可顺利传代,是中华鲟细胞培养的理想材料.但中华鲟的性成熟周期较长,材料鱼(1龄鱼)的性腺组织尚不发达,较难辨认,容易与肠混淆.如果能较好地消毒鱼体,选取生长良好的中华鲟,活体取吻端和尾鳍组织用于培养,则既能保证细胞培养的成功率,又不会损伤个体.

已报道的几个鲟鱼类细胞系中,仅 SH 细胞的异倍化程度不明显^[5],WSS 和 WSH 均属异倍体^[6].对中华鲟培养细胞的染色体分析表明,这两种细胞已属异倍体.并且我们注意到随着代龄增加,异倍化程度增大.这种异倍化的趋势,也许就是中华鲟细胞在体外培养过程中对环境的一种适应.

体外培养过程中,中华鲟细胞染色体丢失较为普遍.已报道的鲟鱼类细胞系,染色体数目均有减少的趋势.虽然说鲟鱼类是多倍体化起源的鱼类(一般认为中华鲟是八倍体),但染色体丢失后的细胞是否保留了一套完整功能的基因组 DNA,并且其 DNA 在培养过程中是否会发生较大程度的变异,从而影响细胞的正常功能呢?

刘勇根据对不同代龄的南方鲟 SME-1 细胞 DNA 指纹图的分析,推测染色体数目的变化是导致 DNA 指纹图谱发生变化的可能原因^[6].尽管有的学者对此持有异议,本文倾向于刘勇等人的观点.我们认为,随着体外培养时间加长(其实是分裂次数增加的“选择”压力),一方面染色体数目变化加剧,另一方面 DNA 的突变累积,将会使细胞的染色体和 DNA 都发生较大程度的改变.培养代数越长,变异程度将会越高.这种差异经过累积效应,甚至有可能超出种内的差异,也就是说,可以将培养细胞视为种的一个“变种”.根据中华鲟培养细胞染色体分布呈“双峰多态”的特点,可以大胆推测,随着体外培养时间继续增加,双峰将继续远离正常的 2n 数目区域.当细胞系稳定后,染色体数分布中心将有可能恒定落在四倍体到六倍体数目之间的某 2 个或 1 个区域,甚至也有可能就稳定在四倍体数目上.追踪中华鲟培养细胞的染色体变化情况无疑颇具意义.并且鉴于 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)技术多态性好,操作简便快捷的优点,作者正试图用 RAPD 等技术,检测不同培养时间下的细胞 DNA 的变异程度.希望能追踪到基因组 DNA 的变化态势,印证染色体的变化情况,从而能揭示出多倍体化起源鱼类的细胞体外培养过程中真正隐藏的规律.

参 考 文 献

- [1] 余先觉,周墩.中国淡水鱼类染色体.北京:科学出版社.1989
- [2] 张四明,晏勇,邓怀等.几种鲟鱼基因组大小、倍性的特性及鲟形目细胞进化的探讨.动物学报,1999,45(2):200-206
- [3] 张四明,邓怀,汪登强等.中华鲟(*Acipenser sinensis*)mtDNA 个体间的长度变异与个体间的长度异质性.遗传学报,1999,26(5):489-496
- [4] 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.水产学报,1985,9(2):121-130
- [4] Li M F, Marrayatt V, Annand C, et al. Fish cell culture: two newly developed cell lines from Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and guppy(*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Zoology*, 1985,63:2867-2874
- [5] Hedrick R P, McDowell T, Rosemark R, et al. Two cell lines from white sturgeon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 1991,120:528-534
- [6] 刘勇,洪锡均.不同代龄南方鲟 SME-1 细胞 DNA 指纹图的分析.遗传学报,1998,25(4):315-321

PRELIMINARY RESEARCH ON TISSUE CULTURE OF CHINESE STURGEON

Ye Xianghui, Liu Hanqin, Yu Xiaomu, Zhang Yibing and Chang Jianbo

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract Cell strains were established from snout and gonad tissues of Chinese sturgeon, *Acipenser Sinensis*, among eight tissues for primary culture and designated CSSn and CSG, respectively. Biological characteristics were partly examined for CSSn and CSG. Both strains appeared fibroblastic. They had large quantities of chromosomes and possessed microchromosomes. The distributions of their chromosome number exhibited the same feature described as “two wave crests distinguished and a great variety of distribution”, which demonstrated that they became aneuploid. Growth curve of both strains showed their relatively slow replication. The highest cell number of CSG was observed after incubated 9 days, while CSSn, 14 days. The effects of temperature and pH on growth were examined for CSG. CSG remained a normal state at 16 – 30°C, with optimum temperature of 27°C, and pH condition of 7.2.

Key words Chinese sturgeon, Tissue culture, Chromosome, Microchromosome