

DOI: 10.12264/JFSC2022-0112

齐口裂腹鱼鳃丝细胞系的建立、鉴定及免疫研究

巩志宏^{1,2}, 王娜², 刘娟娟³, 胡国斌¹, 陈松林²

1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266071;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 中国长江三峡集团有限公司中华鲟研究所, 湖北 宜昌 443100

摘要: 齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)是长江上游水域的珍稀鱼类, 近年来由于环境变化和疾病爆发野外齐口裂腹鱼数量急剧减少, 现已被列入长江上游二级急切保护的特有鱼类, 因此, 对齐口裂腹鱼的保护刻不容缓。建立齐口裂腹鱼细胞系是保护其种质资源的有效手段, 也可以在不伤害现有鱼群的条件下进行多种齐口裂腹鱼相关生物学研究。本研究建立了首个来源于齐口裂腹鱼的细胞系, SPG 细胞系。原代细胞分离自齐口裂腹鱼鳃丝组织, 呈均一的上皮状, 使用含 15%血清的 L-15 培养, 在 15 个月时间里成功传至 55 代。线粒体 COI 基因鉴定, 证明该细胞来源于齐口裂腹鱼, 核型检测细胞染色体数目为 $2n=96$ 。在液氮中保存 12 个月的细胞, 复苏后能保持 75%以上活力。EGFP-N3 质粒转染 SPG 细胞后观察到明显的绿色荧光蛋白表达。病毒类似物 poly(I:C)和大肠杆菌脂多糖 LPS 可引起细胞 IL-1 β 、IL-8、TNF α 和 TLR22 等免疫相关基因表达量升高。表明本研究建立的齐口裂腹鱼鳃丝细胞系可用于免疫学研究。此外, 此细胞系还将在种质保存, 外源蛋白表达和齐口裂腹鱼体外生物学研究中发挥重要作用。

关键词: 齐口裂腹鱼; SPG; 细胞系; 免疫研究

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)10-1407-10

长江流域鱼类资源丰富, 但是长期以来由于过度捕捞、外来生物入侵、气候变化、环境污染和疾病爆发等原因, 导致了长江流域多种鱼类的濒危和灭绝^[1-2]。齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)是长江上游水域的冷水底栖巡游鱼类, 隶属鲤科(Cyprinidae), 裂腹鱼亚科(Schizothoracinae), 裂腹鱼属(*Schizothorax*)^[3], 曾是产区重要的经济鱼类。近年来由于野外齐口裂腹鱼数量的急剧减少, 现已被列入长江上游二级急切保护的特有鱼类^[4-5]。因此, 对齐口裂腹鱼的保护刻不容缓。建立齐口裂腹鱼细胞系是一种保护其种质资源的经济有效的方法。自 1962 年鱼类细胞系 RTG-2 建立以来, 鱼类细胞建系研究迅速发展, 至 2020 年已使用

肝、脾、肾、性腺、皮肤、鳍条、鳃丝、肌肉、脑、眼、胚胎等多种鱼类组织建立 783 株细胞, 但至今没有齐口裂腹鱼细胞建系的相关报道^[6-9]。体外培养的细胞生长快速、成本低、结果容易重复, 可轻易地在不同实验室操作。建立齐口裂腹鱼细胞系不仅可以保护其种质资源, 还能在不伤害现有珍稀鱼群的前提下, 进行其生存环境毒理学、营养学、免疫学及病害防治等研究。

2011—2020 年间建立的 280 个细胞系中有 8%来自于鳃组织^[7]。使用卡特拉鲮(*Catla catla*)鳃组织建立的细胞系进行重金属毒理学检测其结果与活体有相同趋势^[10]。露斯塔野鲮(*Labeo rohita*)鳃组织建立的细胞系可表达外源蛋白, 用

收稿日期: 2022-03-28; 修订日期: 2022-04-06.

基金项目: 国家海洋水产种质资源库项目; 中国水产科学研究院创新团队专项(2020TD20); 山东省泰山学者攀登计划项目; 三峡工程鱼类资源保护湖北省重点实验室开放课题项目(191164740001).

作者简介: 巩志宏(1984-), 男, 博士研究生, 研究方向为鱼类种质保存和抗病分子育种. E-mail: gongzhihong@stu.ouc.edu.cn

通信作者: 陈松林, 研究员, 研究方向为鱼类种质保存、性别控制与抗病分子育种. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

于毒理学检测的结果与活体呈正相关趋势^[11]。来源于绿腹丽鱼(*Etroplus suratensis*)鳃丝的细胞系可表达外源蛋白,对野田病毒(nodavirus)敏感^[12]。齐口裂腹鱼在自然环境中会感染无乳链球菌引起发病。感染无乳链球菌后会出现凸眼、体表出血和神经症状,多种内脏器官出现明显的变性、坏死以及炎症细胞浸润^[13]。齐口裂腹鱼感染嗜水气单胞菌后鱼体表多处出现充血出血、溃疡,肝脏、肾脏和肌肉组织出现不同程度的损伤、变性和局部坏死^[14-15]。齐口裂腹鱼在细菌类似物 LPS 刺激后多种炎症因子出现显著上调^[16]。黏膜免疫是机体免疫系统的重要组成部分,鱼类的鳃、皮肤、肠的黏膜构成抵御病原微生物侵害的第一道防线^[17]。建立齐口裂腹鱼鳃丝细胞系将为齐口裂腹鱼免疫机制研究和病害防治研究提供良好细胞载体。使用细胞进行免疫研究的优点包括节省时间、低成本、易于操作、不伤害现有鱼群数量,而且实验结果不受鱼体自身调节和实验应激的影响。

本研究使用鳃丝组织建立了来自齐口裂腹鱼的细胞系,命名为 SPG 细胞系。并对此细胞系进行了来源鉴定、细胞核型检测、冻存复苏验证、外源基因表达和在细菌提取物 LPS 及病毒类似物 poly(I:C)刺激下免疫相关基因表达变化的研究。实验结果表明此细胞生长稳定,可用于齐口裂腹鱼种质保存,能表达外源蛋白和进行体外免疫学等研究,作为齐口裂腹鱼首个细胞系将在齐口裂腹鱼体外生物学研究中发挥重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验鱼 体长 11 cm 左右的齐口裂腹鱼,购自四川雅安。在实验室饲养 2 周以上,每日喂食 1 次。

1.1.2 主要试剂 二甲基亚砜(DMSO)、L-15 培养基、PBS 溶液、0.25%胰酶含 EDTA、青霉素、链霉素和两性霉素 B 均购自索莱宝生物科技有限公司;碱性成纤维细胞生长因子 bFGF 和上皮细胞生长因子 EGF 购自碧云天生物技术有限公司;beta-巯基乙醇(2-Me) (VWR Life Science, 美国);FBS 胎牛血清(GIBCO, 澳大利亚);反转录试剂、

PCR 试剂和荧光定量 PCR 试剂购自宝日医生物技术(北京)有限公司;细胞培养瓶、细胞培养板、移液管、15 mL 离心管、50 mL 离心管均为 Corning 公司产品。

1.1.3 主要仪器设备 生物安全柜(力康 HFsafe-1200, 中国);细胞培养箱(SANYO MIR-153, 日本);细胞冻存液氮罐(金凤 YDS-120-216, 中国);荧光倒置显微镜(Nikon TE2000-U, 日本);低温高速离心机(Eppendorf Centrifuge 5424 R, 德国);荧光定量 PCR 仪器(ABI 7500, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基和细胞冻存液 鱼类细胞培养最常用的培养基是 MEM 和 L-15, 其中 L-15 是一种富含氨基酸的培养基,而且不需要二氧化碳来维持培养基的 pH。2010—2020 年近十年全球新建立的 280 个鱼类细胞系,有 180 个使用 L-15 培养基,占总数的 64%^[7-9]。本实验以 L-15 为基础,配制齐口裂腹鱼细胞培养基。原代培养基以 L-15 培养基为基础添加 5 ng/mL bFGF, 5 ng/mL EGF, 27.5 μmol/L beta-巯基乙醇, 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素, 0.25 μg/mL 两性霉素 B 和 20%胎牛血清^[18]。传代培养以 L-15 培养基为基础添加 5 ng/mL bFGF, 5 ng/mL EGF, 27.5 μmol/L beta-巯基乙醇, 15%胎牛血清。细胞冻存液为 50% L-15 培养基加入 40% FBS 和 10% DMSO 制成。

1.2.2 原代培养 取齐口裂腹鱼放置含 500 U/mL 青霉素、500 μg/mL 链霉素和 1.25 μg/mL 两性霉素 B 的纯化水中过夜。第 2 天使用麻醉剂麻醉,用 75%酒精擦拭鱼体,移入超净台中。使用眼科手术剪在超净台内剪下鳃弓和鳃丝,移入盛有 PBS 的培养皿中。使用解剖刀沿鳃弓切下鳃丝,放入盛有含 500 U/mL 青霉素、500 μg/mL 链霉素和 1.25 μg/mL 两性霉素 B 的 PBS 中漂洗 5 次,每次更换 PBS 洗液。洗完后将鳃丝移入盛有 PBS 的培养皿中,使用解剖刀将鳃丝切至 1~2 mm³,使用一次性巴氏吸管将鳃丝组织块转移到 15 mL 离心管中,加入 PBS 洗液冲洗 3 次,洗掉表面碎屑和黏液。随后将冲洗干净的组织块接种于 T25 培养瓶,加入尽量少的培养基以没过组织块,又不至于让组织块漂浮移动。放入 24 °C 培养箱中静置培养,细胞

接种后 48 h 更换 1 mL 新鲜原代培养基, 以除去散落未贴壁细胞, 每日观察细胞外迁情况。当有细胞从组织块迁出后, 添加培养基至 3 mL 继续培养, 此后每 3 d 更换 1 次培养基以除去未贴壁细胞和杂质。

1.2.3 传代培养 原代细胞逐渐从组织块中迁出, 待细胞铺满后进行传代培养。细胞传代时弃去培养液, 加入 3 mL PBS 冲洗细胞, 加入 1 mL 胰酶消化 30 s, 用吸管吸走多余胰酶保留 0.5 mL 继续消化。待细胞整体圆缩脱落后, 加入培养基轻轻吸打混匀后按 1:1 分成 2 瓶传代培养^[19]。

1.2.4 冻存与复苏 取对数生长期的 SPG 细胞, 弃去培养液, 加入 3 mL PBS 冲洗细胞, 加入 1 mL 胰酶消化, 待细胞整体圆缩脱落后, 加入 1 mL 培养基轻轻吹打将培养瓶中细胞全部转移到 15 mL 离心管中, 1000 r/min 离心 5 min。在生物安全柜内吸掉上清, 向沉淀中加入 1 mL 细胞冻存液。将细胞悬液吸打均匀后转移到细胞冻存管中, 放入梯度降温盒, 放置 -80 °C 冰箱过夜, 第二天转至液氮中长期保存。细胞复苏时, 从液氮中取出冻存的细胞, 用镊子夹紧瓶盖, 将瓶体没入 37 °C 温水中轻轻摇动, 使细胞尽快融化, 当冻存的细胞大部分融化只剩少部分结冰未融化时, 从 37 °C 水浴中取出细胞。1000 r/min, 离心 5 min, 弃去上清液, 加入培养基重悬细胞。

细胞活力计算: 复苏的细胞经台盼蓝染色后, 使用倒置显微镜计数, 其中染蓝色为死细胞, 未被染色为活细胞。使用血球计数板, 计数 2 个对角线大格的细胞, 计算细胞活力。细胞活力=(活细胞数÷总细胞数)×100%。

1.2.5 最适血清浓度 取第 40 代细胞按细胞数为 1×10^5 cell/well 的密度将细胞接种到 24 孔细胞培养板。每 12 孔为一组, 培养 6 h 后每组分别更换血清浓度为 5%、10%、15% 和 20% 的培养基。培养至 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h 时, 不同血清浓度组细胞经胰蛋白酶消化后, 使用血球计数板计数。计算细胞在不同浓度血清中的增值速度。根据公式计算细胞倍增时间(doubling time, T_2): $T_2 = \Delta t / \log_2(\Delta N / N_0 + 1)$ 在公式中 N_0 为观察开始时的细胞数, Δt 为观察的时间长度, ΔN 为

时间长度 Δt 期间细胞数的增加量^[20]。

1.2.6 细胞分子特征鉴定 根据 NCBI 齐口裂腹鱼粒体细胞色素氧化酶亚基 1(cytochrome oxidase subunit 1, COI)序列(GenBank: KM364601.1)设计线粒体 COI 基因引物, SP-COI-F: GTATTTGGTG-CCTGAGCCGGAA; SP-COI-R: GCAGCCGTGA-AGTCATTCTACG。Trizol 法提取第 30 代细胞 RNA。反转录后 PCR 扩增 SPG 细胞线粒体 COI 基因片段。使用 40 μ L 反应体系进行 PCR 扩增, 体系中包括 2.0 μ L 模板, 2.0 μ L SP-COI-F 引物, 2.0 μ L SP-COI-R 引物, 14 μ L H₂O, 20 μ L Taq DNA 聚合酶 2×MIX。反应条件为: 94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 2~4 步 33 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 30 min。PCR 产物使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将有目的条带的 PCR 产物送擎科生物有限公司测序。测序结果通过 BLAST 进行比对分析。

1.2.7 细胞核型检测 使用第 40 代 SPG 细胞进行核型分析。细胞传代后第 48 小时, 在培养基中加入终浓度为 0.1 μ g/mL 的秋水仙素, 放置 24 °C 培养箱中培养 6 h。胰酶消化后, 1000 r/min 离心 5 min 收集细胞, 弃上清, 加入 5 mL 0.075 mol/L 的 KCl 低渗溶液作用 30 min。加入 5.0 mL 预冷的卡诺固定液(甲醇:冰乙酸=3:1, 体积比)固定 2 min。1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 离心管底部可见细胞团块明显变小, 加入 1 mL 预冷的卡诺固定液室温固定 30 min。1000 r/min 离心 5 min, 用适当卡诺固定液重悬细胞, 将细胞放入冰上预冷, 在 30 cm 左右的高度处, 用冷滴片法滴片, 每个载玻片上滴加 2~3 滴细胞悬液, 尽量使细胞均匀分散。待载玻片略微干燥后, 将载玻片过火微烤, 使载玻片进一步干燥。用浓度为 5% 的吉姆萨染液染色 20 min。用自来水缓慢地冲掉吉姆萨染液, 待干燥后用显微镜观察细胞核染色情况, 选择细胞分裂中期染色体进行拍照统计^[19]。

1.2.8 外源蛋白表达 按细胞数为 4×10^5 cell/well 的密度将细胞接种到 12 孔细胞培养板, 过夜培养, 第 2 天把 12 孔板中的培养基更换为含 5% FBS 的新鲜 L-15 培养基。将 1 μ g 的 pEGFP-N3 质粒与 2.5 μ L lipo8000 脂质体转染试剂分别稀释到 50 μ L

的 L-15 中, 室温静置 5 min 后将质粒溶液加入到脂质体中, 轻轻混匀在室温下静置 15 min, 将质粒-脂质体混合物加入细胞。转染后 24 h 观察荧光蛋白表达情况。

1.2.9 LPS 刺激 使用 PBS 溶解大肠杆菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 配制成 20 mg/mL 备用。细胞从培养瓶中消化后使用培养基稀释成 8×10^5 cell/mL, 1 mL 每孔接种 12 孔板。培养过夜后按照 1.5 μ g/mL、5 μ g/mL、15 μ g/mL、50 μ g/mL、150 μ g/mL、500 μ g/mL 的终浓度在孔板中加入 LPS, 每 3 个孔为一组, 对照孔加入等量 PBS 作为对照组^[21-23]。加入 LPS 刺激 12 h 后, 收细胞放置-80 $^{\circ}$ C 冰箱以备检测。

1.2.10 Poly(I:C)刺激 使用 PBS 将聚肌苷酸胞苷酸 (polyinosinic-polycytidylic acid, poly(I:C)) 配制成 20 mg/mL 备用。细胞从培养瓶中消化后使用培养基稀释成 8×10^5 cell/mL, 1 mL 每孔接种 12 孔板。培养过夜后按照 1.5 μ g/mL、5 μ g/mL、15 μ g/mL、50 μ g/mL、150 μ g/mL、500 μ g/mL 的终浓度在孔板中加入 poly(I:C), 每 3 个孔为一组, 对照孔加入等量 PBS 作为对照组^[24]。加入 LPS 刺激 12 h 后, 收细胞放置-80 $^{\circ}$ C 冰箱以备检测。

1.2.11 荧光定量 PCR LPS 和 poly (I:C) 刺激后样品使用 Trizol 法提取 RNA, 反转录成 cDNA。使用荧光定量 PCR 法 (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测 IL-1 β 、IL-8、TNF α 、TLR22 等免疫相关基因表达情况^[14,25](表 1)。在 Excel 中使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量^[26], 使用 Prism 9 制图。

表 1 荧光定量 PCR 检测相关引物		
Tab. 1 Quantitative real-time PCR detection related primers		
引物名称 prime	引物序列 primer sequence	参考文献 source
β -actin-F	GAT TCG CTG GAG ATG ATG CT	[25]
β -actin-R	CGT TGT AGA AGG TGT GAT GCC	
IL-1 β -F	GGT GGT GAA CAT CAT CAT TGC	
IL-1 β -R	AGA CGC TCT TCG ATC ACA TTC	
IL-8-F	GTT TTC CTC GGA TTC CTG AC	
IL-8-R	GAC CTT CTT AAC CCA TTG TGC	[14]
TNF α -F	TGTCTGCTTCACGCTCAACA	
TNF α -R	AATGGATGGCWGCCTTGGA	
TLR22-F	CTGCTGGTGCTACGWCTGGAT	
TLR22-R	GTTGCTTSCRATGTASAGTTCCT	

2 结果与分析

2.1 细胞原代培养和传代培养

组织块接种后 24 h 周围有上皮状细胞迁出, 视野内有部分散落的未贴壁细胞(图 1 A)。使用吸管吸走未贴壁细胞加入新的培养基, 此后每 3 d 换液 1 次, 培养到第 21 天时细胞铺满细胞瓶 80%(图 1 B), 细胞汇合度不再增加, 胰酶消化后传代培养。在前 10 代使用含 20%胎牛血清的原代培养基, 10 代以后使用含 15%胎牛血清的传代培养基, 每 5~7 d, 按 1:2 比例进行传代培养。细胞传代后贴壁良好生长稳定, 现已传至 55 代以上, 细胞低密度时呈现均匀分散的上皮状(图 1 C), 细胞铺满后呈现上皮状细胞组成的致密单层(图 1 D)。

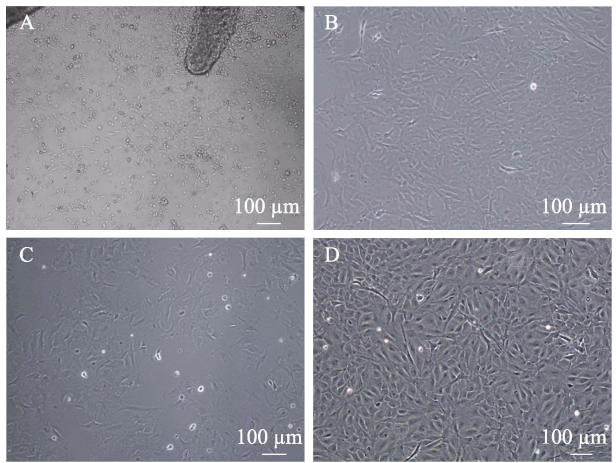


图 1 倒置显微镜下观察的原代和传代培养的细胞形态
A: 组织贴片法原代培养 24 h 的细胞; B: 培养 21 d 的原代细胞; C: 第 55 代 SPG 细胞低密度形态;
D: 第 54 代 SPG 细胞高密度形态.

Fig. 1 Morphology of primary cell and subculture cell observed under an inverted microscope
A: Primary cell cultured for 24 h; B: Primary cell cultured for 21 d; C: Low-density SPG cells at passage 55;
D: High-density SPG cells at passage 54.

2.2 细胞冻存复苏检测

取在液氮中分别冻存 3 个月、6 个月、12 个月的 P15 代细胞各 2 支, 复苏后使用台盼蓝染色计算活力。结果显示复苏的细胞活力均大于 75%。细胞复苏后能贴壁生长, 生长状态良好, 形态与冻存前无差异, 可见 SPG 细胞可以在液氮中长期保存。现已将细胞系保存至国家海洋水产种质资源库, 编号: YSFRI-C-2020-SPG。

2.3 细胞生长特性

SPG 细胞在 5%血清浓度培养基中几乎停止增长, 随着血清浓度增高细胞生长速度变快。在血清浓度为 20%的培养基中生长速度最快, 接种后第7天细胞密度达到 2.2×10^5 cell/well (图 2), 细胞群体倍增时间最短为 153.7 h (表 2)。血清浓度为 15%时细胞生长曲线与 20%时相近。从细胞生长速度和血清消耗两方面考虑, 我们选择含 15%血清浓度的培养基作为细胞传代培养用培养基。

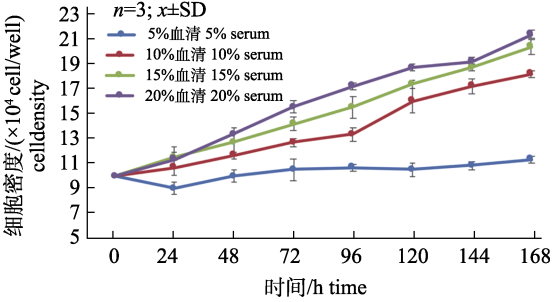


图 2 SPG 细胞在不同血清浓度培养基中的生长情况
Fig. 2 Growth of SPG cells in medium with different serum concentrations

表 2 细胞在不同血清浓度培养基中的倍增时间
Tab. 2 The doubling time of cells in different serum concentration media

血清浓度/% serum concentration	细胞密度/ $\times 10^4$ cell/well cell density			培养时间 Δt /h cultivation time	细胞倍增时间 T_2 /h doubling time
	起始数 N_0 starting number	最终数 final number	增长数 ΔN growth number		
5	10	11.3	1.3	168	923.6
10	10	18.2	8.2		195.0
15	10	20.3	10.3		164.1
20	10	21.3	11.3		153.7

注: $T_2=\Delta t/\log_2(\Delta N/N_0+1)$.
Note: $T_2=\Delta t/\log_2(\Delta N/N_0+1)$.

2.4 细胞特征鉴定

COI 基因 PCR 产物电泳显示在 1500 bp 处有阳性条带(图 3), 与设计引物时的预期长度相近。测序后 blast 结果显示扩增序列与 NCBI 中齐口裂腹鱼线粒体 COI 基因序列一致性为 99.9%。

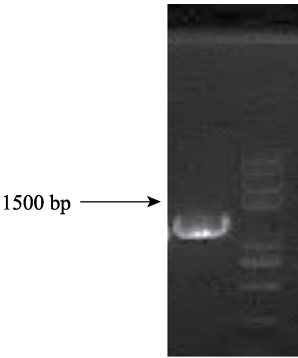


图 3 齐口裂腹鱼线粒体 COI 鉴定电泳图
Fig. 3 COI identification electropherogram of *Schizothorax prenanti*

2.5 细胞核型检测

选择拍照清晰的 100 个分裂相细胞进行染色体计数, 染色体最少为 86 条, 最多为 190 条, 其中 52%的细胞染色体数目为 96 条(图 4, 图 5)。

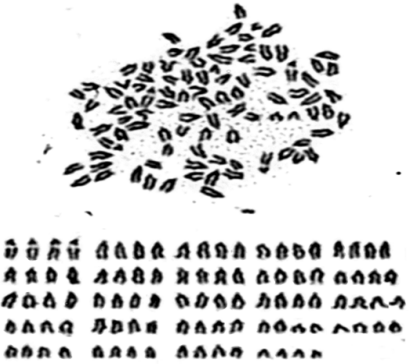


图 4 齐口裂腹鱼细胞核型
Fig. 4 Cell karyotype of *Schizothorax prenanti*

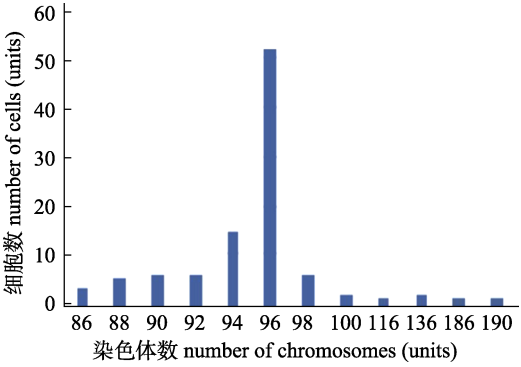


图 5 齐口裂腹鱼细胞染色体计数
Fig. 5 Chromosome count of *Schizothorax prenanti*

2.6 荧光蛋白表达

使用 Lipo8000 脂质体转染试剂成功将 pEGFP-N3 质粒转入细胞中, 转染后 48 h 可在细胞中观察到清晰的绿色荧光(图 6)。

2.7 LPS 刺激后几种免疫相关基因的表达情况

大肠杆菌脂多糖 LPS 刺激后细胞 IL-1 β 、IL-8、TNFa 和 TLR22 等 4 种免疫相关基因随 LPS 浓度的增加, 表达量逐渐升高。IL-8 在 LPS 浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$

时相对表达量远高于低浓度时的表达量(图 7)。

2.8 poly(I:C)刺激后几种免疫相关基因的表达情况

聚肌苷酸胞苷酸 poly(I:C)刺激后细胞 IL-1 β 、IL-8、TNFa 和 TLR22 等 4 种免疫相关基因表达量均有升高, 特别是当 poly(I:C)浓度达到 500 $\mu\text{g/mL}$ 时 4 种基因的表达量相比低浓度时有大幅度的升高(图 8)。

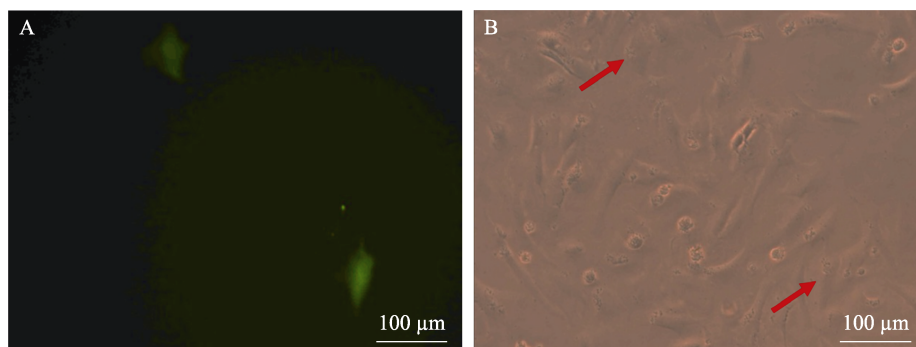


图 6 pEGFP-N3 质粒转染后 48 h 的荧光蛋白表达

A: 绿色荧光观察, B: 明场观察, 红色箭头指示发出绿色荧光的细胞位置。

Fig. 6 Fluorescent protein expression 48 h after pEGFP-N3 plasmid transfection
A: green fluorescence observation; B: bright field observation. Red arrows indicate the location of cells that emit green fluorescence.

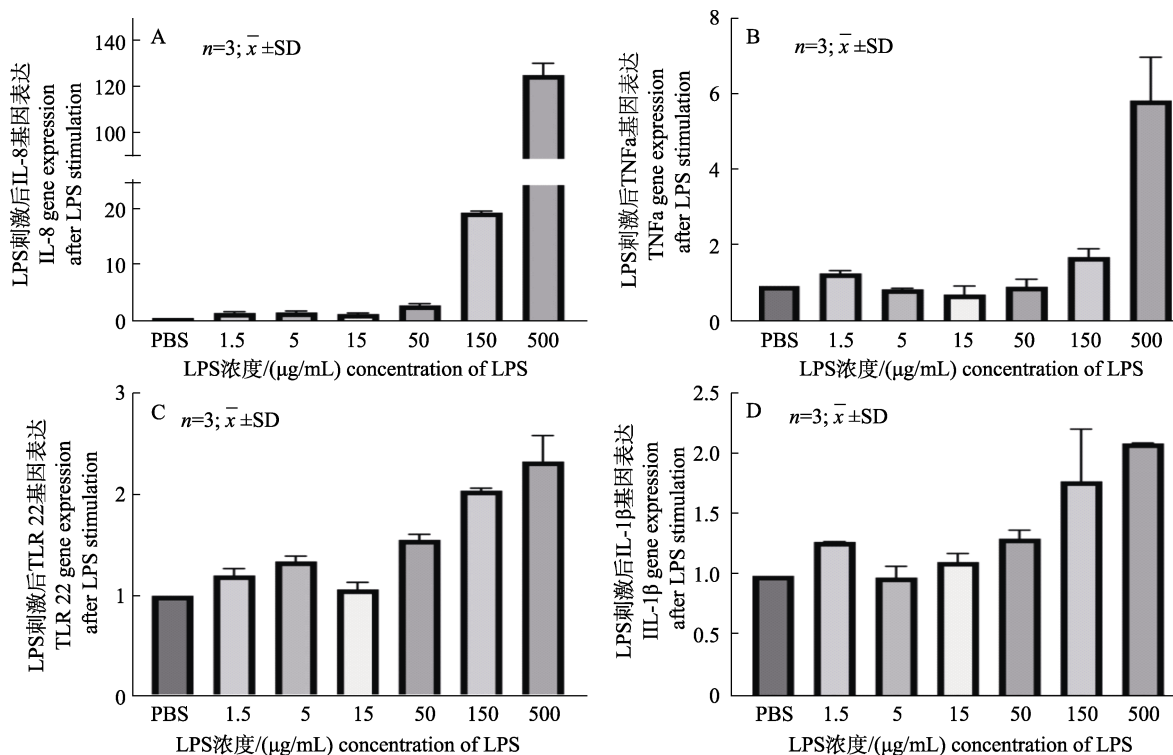


图 7 LPS 刺激后 qPCR 检测 IL-8 (A)、TNFa (B)、TLR22 (C)和 IL-1 β (D)基因表达情况

Fig. 7 Gene expression of IL-8 (A), TNFa (B), TLR22 (C) and IL-1 β (D) detected by qPCR after LPS stimulation

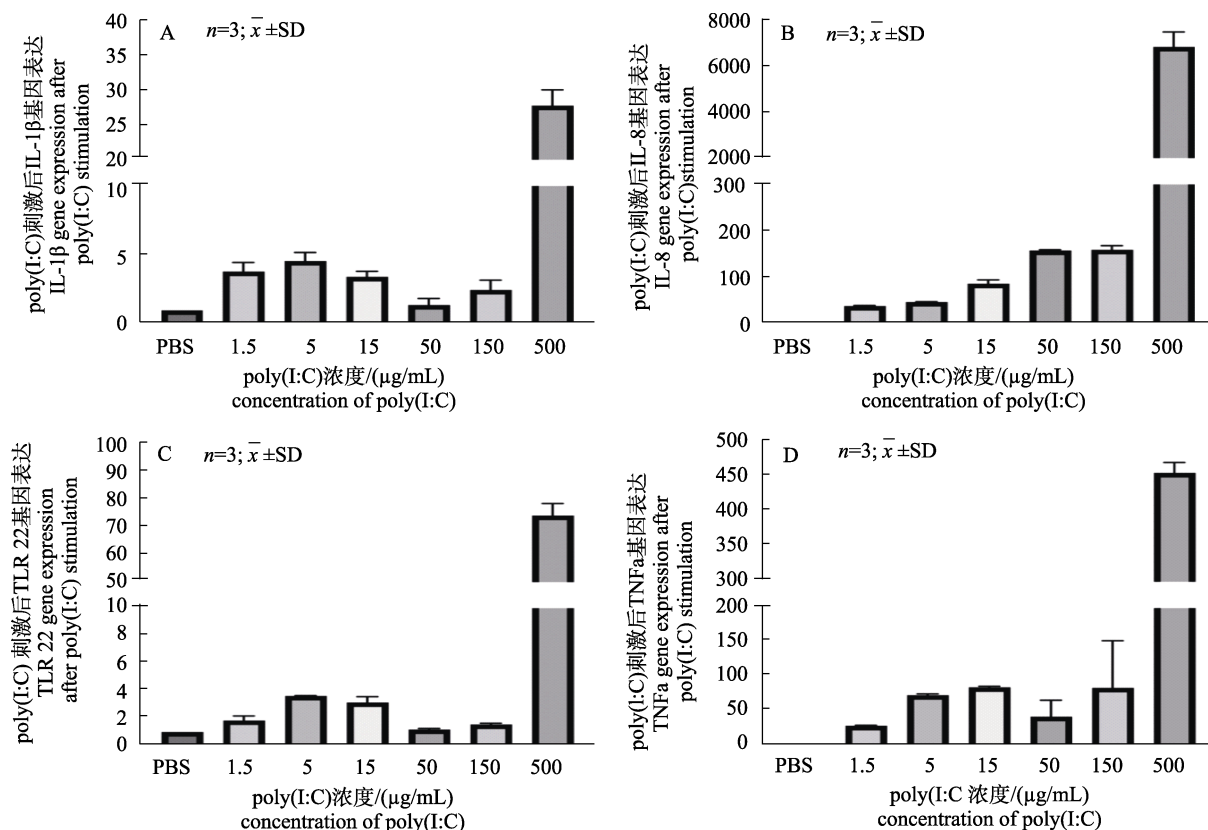


图 8 poly(I:C)刺激后 qPCR 检测细胞 IL-1 β (A)、IL-8 (B)、TLR22 (C)和 TNF α (D)的基因表达

Fig. 8 Gene expression of IL-1 β (A), IL-8 (B), TLR22 (C) and TNF α (D) detected by qPCR after poly(I:C) stimulation

3 讨论

齐口裂腹鱼作为曾经的重要经济鱼类,近年来由于野外齐口裂腹鱼数量的急剧减少,现已被列入长江上游二级急切保护的特有鱼类^[6],因此,对齐口裂腹鱼的保护刻不容缓。建立齐口裂腹鱼细胞系是保护其种质资源的有效手段,但至今没有齐口裂腹鱼细胞建系的相关报道。本研究于2019年10月从齐口裂腹鱼鳃丝组织中分离建立了SPG细胞系,已成功传至第55代,细胞生长稳定,液氮保存的复苏活性高于75%。SPG细胞呈均一上皮状,形态与纹鳃和卡特拉鱼分离的鳃丝细胞系相似^[10,27]。

细胞系排除了体内复杂生理环境的影响,是体外研究疾病作用机制的良好工具。齐口裂腹鱼在自然环境中会感染无乳链球菌引起发病^[13]。使用嗜水气单胞菌人工感染齐口裂腹鱼,导致其在24 h全身充血出血,48 h明显出现眼球突出、溃疡等症状,甚至死亡^[15]。齐口裂腹鱼感染嗜水气单

胞菌后肠和肾脏 IL-1 β 、TNF α 和 TLR22 表达量都有显著升高^[15]。齐口裂腹鱼在细菌类似物 LPS 刺激后多种炎症因子显著上调,包括 TNF α , IL-1 β 和 IL-8 等^[16]。本研究使用 LPS 刺激 SPG 细胞后 IL-1 β 、IL-8、TNF α 和 TLR22 等 4 种免疫相关基因表达量都有升高,并与 LPS 浓度的增加呈正相关。poly(I:C)可模拟病毒感染^[28], poly(I:C)刺激下齐口裂腹鱼脾脏 IL-1 β 、TLR22 和 TNF α 等免疫表达明显量升高^[29],本研究建立的 SPG 细胞在 poly(I:C)诱导下 4 个免疫相关基因 IL-1 β 、IL-8、TNF α 和 TLR22 的表达均有不同程度升高。说明此细胞系可以进行细菌和病毒相关的免疫学研究。

基因过表达和敲除是研究基因功能的常用方法。本研究使用脂质体转染试剂成功将 EGFP-N3 质粒导入细胞,并在细胞中成功表达了绿色荧光蛋白。说明此细胞系可转入和表达外源基因蛋白,可作为基因敲降或过表达研究的目标细胞系,也有作为蛋白表达工程细胞株的潜力。

尽管如今全球已建立了 783 种以上的鱼类细胞系。然而,人们对许多已经建立的细胞系尚未充分探索研究。而且鱼类细胞系开发领域的一个主要问题是,许多已开发的细胞系并未存放在方便使用者获取的细胞库中^[7]。为方便有需要的科研工作者获取本细胞,本研究建立的细胞系已保存至国家海洋水产种质资源库,编号: YSFRI-C-2020-SPG。

总之,本研究使用长江珍稀鱼种齐口裂腹鱼鳃丝组织建立了 SPG 细胞系,并对细胞系进行鉴定和应用研究。此细胞可用于齐口裂腹鱼种质保存,能代替活体进行免疫学和毒理学相关研究,有表达外源蛋白的能力,作为齐口裂腹鱼首个细胞系将在齐口裂腹鱼体外生物学研究中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Chen D Q. Status quo of fishery resources in Yangtze River and countermeasures for proliferation and protection [J]. China Fisheries, 2003, (3): 17-9. [陈大庆. 长江渔业资源现状与增殖保护对策[J]. 中国水产, 2003, (3): 17-19.]
- [2] Fu C, Wu J, Chen J, et al. Freshwater fish biodiversity in the Yangtze River basin of China: patterns, threats and conservation[J]. Biodiversity & Conservation, 2003, 12(8): 1649-1685.
- [3] Li G, Sun S, Liu H, et al. Schizothorax prenanti swimming behavior in response to different flow patterns in vertical slot fishways with different slot positions[J]. Science of the Total Environment, 2021, 754: 142142.
- [4] Ye H, Xiao S, Wang X, et al. Characterization of Spleen Transcriptome of Schizothorax prenanti during Aeromonas hydrophila Infection[J]. Marine Biotechnology, 2018, 20(2): 246-256.
- [5] Liu J. A quantitative analysis on threat and priority of conservation order of the endemic fishes in upper reaches of the Yangtze River[J]. China Environmental Science, 2004, 24(4): 395-399. [刘军. 长江上游特有鱼类受威胁及优先保护顺序的定量分析[J]. 中国环境科学, 2004, 24(4): 395-399.]
- [6] Wolf K, Quimby M. Established eurythermic line of fish cells in vitro[J]. Science, 1962, 135(3508): 1065-1066.
- [7] Fryer J L, Lannan C. Three decades of fish cell culture: a current listing of cell lines derived from fishes[J]. Journal of Tissue Culture Methods, 1994, 16(2): 87-94.
- [8] Lakra W, Swaminathan T R, Joy K. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: a review [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37(1): 1-20.
- [9] Thangaraj R S, Narendrakumar L, Prasannan Geetha P, et al. Comprehensive update on inventory of finfish cell lines developed during the last decade (2010–2020)[J]. Reviews in Aquaculture, 2021, 13(4): 2248-2288.
- [10] Taju G, Majeed S A, Nambi K S N, et al. Development and characterization of cell line from the gill tissue of Catla catla (Hamilton, 1822) for toxicological studies[J]. Chemosphere, 2013, 90(7): 2172-2180.
- [11] Abdul Majeed S, Nambi K S N, Taju G, et al. Establishment and characterization of permanent cell line from gill tissue of *Labeo rohita* (Hamilton) and its application in gene expression and toxicology[J]. Cell biology and toxicology, 2013, 29(1): 59-73.
- [12] Sarath Babu V, Chandra V, Nambi K S N, et al. Development and characterization of novel cell lines from *Etroplus suratensis* and their applications in virology, toxicology and gene expression[J]. Journal of Fish Biology, 2012, 80(2): 312-334.
- [13] Yu Z H, Zhang J, Geng Y, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from *Schizothorax prenanti*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(6): 1244-1252. [余泽辉, 张佳, 耿毅, 等. 齐口裂腹鱼无乳链球菌的分离鉴定及其感染的病理损伤[J]. 中国水产科学, 2014, 21(6): 1244-1252.]
- [14] Zheng Q, Wu Y, Xu H, et al. Immune responses to *Aeromonas hydrophila* infection in *Schizothorax prenanti* fed with oxidized konjac glucomannan and its acidolysis products[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 49: 260-267.
- [15] Luo H, Yang Y J, Xiang M B, et al. Blood biochemical indices and histopathology of the *Schizothorax prenanti* during early stage of infection by *Aeromonas hydrophila*[J]. Freshwater Fisheries, 2017, 47(4): 44-50. [罗辉, 杨月静, 向梦斌, 等. 齐口裂腹鱼感染嗜水气单胞菌后血液生化指标与组织病理学研究[J]. 淡水渔业, 2017, 47(4): 44-50.]
- [16] Li Y K. Transcriptome profiling of spleen provides insights into anti-viral and anti-bacteria immunity in *Schizothorax prenanti*[D]. Sichuan Agricultural University, 2017. [李云坤. 齐口裂腹鱼抗病毒和抗细菌免疫的脾脏转录组分析[D]; 四川农业大学, 2017.]
- [17] Sheng X Z, Tang Q, Tang X Q, et al. Function and regulatory mechanism of polymeric immunoglobulin receptor in mammals and fish[J]. Periodical of Ocean University of China, 2018, 48(S2): 1-8. [绳秀珍, 汤茜, 唐小千, 等. 多聚免疫球蛋白受体功能及其表达调节机制[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(S2): 1-8.]

- [18] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q. Establishment of a pluripotent embryonic cell line from sea perch (*Lateolabrax japonicus*) embryos[J]. *Aquaculture*, 2003, 218(1-4): 141-151.
- [19] Freshney R I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications (sixth edition)[Z]. Beijing: Science Press, 2014, 242-243, 303-306 [弗雷谢尼著; 张静波, 徐存拴, 等译. 动物细胞培养—基本技术和特殊应用指南(原书第六版)[Z]. 北京: 科学出版社, 2014, 242-243, 303-306]
- [20] Korzynska A, Zychowicz M. A method of estimation of the cell doubling time on basis of the cell culture monitoring data[J]. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 2008, 28(4): 75-82.
- [21] Kawano A, Haiduk C, Schirmer K, et al. Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide[J]. *Aquaculture Nutrition*, 2011, 17(2): e241-e52.
- [22] Li J, Jia P, Chen X, et al. Establishment and characterization of a fin tissue cell line derived from silver pomfret, *Pampus argenteus*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 42(10): 1391-1399.
- [23] Li Q, Cui K, Wu M, et al. Polyunsaturated fatty acids influence LPS-induced inflammation of fish macrophages through differential modulation of pathogen recognition and p38 MAPK/NF- κ B signaling[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020: 2238.
- [24] Zhao L, Zhong Z, Zhuang D, et al. Evidence of virus-responsive pathways in response to poly I: C challenge in a muscle cell line derived from large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 100: 179-185.
- [25] Fu F, Wang L. Molecular cloning, characterization of JunB in *Schizothorax prenanti* and its roles in responding to *Aeromonas hydrophila* infection[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 2788-2794.
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ method[J]. *methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [27] Majeed S A, Nambi K, Taju G, et al. Development and characterization of a new gill cell line from air breathing fish *Channa striatus* (Bloch 1793) and its application in toxicology: direct comparison to the acute fish toxicity[J]. *Chemosphere*, 2014, 96: 89-98.
- [28] Fortier M E, Kent S, Ashdown H, et al. The viral mimic, polyinosinic: polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism[J]. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2004, 287(4): R759-R766.
- [29] Du X, Li Y, Li D, et al. Transcriptome profiling of spleen provides insights into the antiviral mechanism in *Schizothorax prenanti* after poly (I: C) challenge[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2017, 62: 13-23.

Establishment, identification, and immunological study of gill filament cell line of *Schizothorax prenanti*

GONG Zhihong^{1,2}, WANG Na², LIU Juanjuan³, HU Guobin¹, CHEN Songlin²

1. College of Marine Life, Ocean University of China, Qingdao 266071, China

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

3. Research Institute of Chinese Sturgeon, China Three Gorges Corporation, Yichang 443100, China

Abstract: *Schizothorax prenanti* is a rare fish in the upper reaches of the Yangtze River and used to be an important economic fish in its production area. However, in recent years, due to diseases and environmental changes, the number of *Schizothorax prenanti* in the wild has decreased sharply. Thus, there is an urgent need to protect this fish species. The establishment of *Schizothorax* cell lines is a cost-effective method to protect its germplasm resources. Since the establishment of the fish cell line RTG-2 in 1962, research on the establishment of fish cell lines has developed rapidly. A total of 783 cell lines have been established from various fish tissues, including embryos. However, thus far, reports on the establishment of cell lines from *Schizothorax prenanti* are lacking. The establishment of the *Schizothorax prenanti* cell line not only enables the protection of its germplasm

resources but also facilitates research on its living environment toxicology, nutrition, immunology, and disease control without harming the existing population of this rare fish. *Schizothorax prenanti* can be infected with *Streptococcus agalactiae* in the natural environment, resulting in exophthalmos, surface hemorrhage, and neurological symptoms, as well as marked degeneration, necrosis, and inflammatory cell infiltration in various internal organs. Mucosal immunity is an important part of the immune system of this fish, wherein the gills, skin, and intestinal mucosa constitute the first line of defense against pathogenic microorganisms. Thus, the establishment of a stable growth of the gill filament cell line of *Schizothorax prenanti* will enable the study of immune mechanism and disease control of *Schizothorax prenanti*. The most commonly used media for fish cell culture are MEM and L-15, where L-15 is an amino acid-rich medium that does not require CO₂ to maintain the pH of the medium. Among the 280 newly established fish cell lines in the world from 2010 to 2020, 180 use L-15 medium, accounting for 64% of the total. In this study, L-15 was used as the basis to prepare the *Schizothorax prenanti* culture medium. The primary cell medium was based on L-15 medium supplemented with 5 ng/mL bFGF, 5 ng/mL EGF, 27.5 μmol/L beta-mercaptoethanol, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, 0.25 μg/mL amphotericin B, and 20% fetal bovine serum (FBS). The cell subculture medium was based on L-15 supplemented with 5 ng/mL bFGF, 5 ng/mL EGF, 27.5 μmol/L beta-mercaptoethanol, and 15% fetal bovine serum. The cell cryopreservation solution was made of 50% L-15 medium supplemented with 40% FBS and 10% DMSO. *Schizothorax prenanti* with a body length of about 11 cm was taken and placed in purified water containing 500 U/mL penicillin, 500 μg/mL streptomycin, and 1.25 μg/mL amphotericin B overnight. On the second day, anesthesia was used, and the fish was wiped with 75% alcohol and moved to an ultra-clean bench. Ophthalmic scissors were used to cut the gill arches and gill filaments, which were transferred to a Petri dish containing PBS. The gill filaments were cut along the gill arch with a scalpel before rinsing five times in PBS containing 500 U/mL penicillin, 500 μg/mL streptomycin, and 1.25 μg/mL amphotericin B, changing the PBS wash solution each time. After washing, the gill filaments were placed in a petri dish containing PBS. Then, a scalpel was used to cut the gill filaments into 1-2 mm³ sections. A disposable Pasteur pipette was used to transfer the gill filament sections into a 15-mL centrifuge tube, to which PBS washing solution was added three times to remove surface debris and mucus. Then, the tissue sections were inoculated into T25 culture flasks, and as little medium as possible to cover the tissue blocks was added, without causing the tissue blocks to float or move. The cells were placed in a 24 °C incubator for static culture, to which 1 mL of fresh primary medium was replaced after 48 h. Cell migration was observed daily. When the cells migrated from the tissue section, 3 mL of medium was added to continue the culture, which was changed every three days to remove non-adherent cells and impurities. In this study, a cell line derived from *Schizothorax prenanti* (SPG strain) was established for the first time. The cells were isolated from the gill filament tissue of *Schizothorax prenanti* with a uniform epithelium. These were then cultured with L-15 containing 15% serum and successfully passed to 55 passages in 15 months. Mitochondrial COI gene identification proved that this cell was derived from *Schizothorax prenanti*, wherein the number of chromosomes in the karyotype was 2n = 96. Cells stored in liquid nitrogen for 12 months can maintain over 75% viability after resuscitation. EGFP-N3 plasmid was transfected into SPG cells, and marked green fluorescent protein expression was observed. The viral analog poly(I:C) and *Escherichia coli* lipopolysaccharide LPS increased the expression of immune-related genes, such as IL-1β, IL-8, TNFα, and TLR22, indicating that the SPG strain can be used for immunological and toxicological studies. In addition, this cell line also plays an important role in germplasm preservation, exogenous protein expression, and *in vitro* biological studies of *Schizothorax prenanti*. Although over 783 fish cell lines have been established in the world today, many of these have not been fully explored. Furthermore, a major problem in the field of fish cell line development is that many of the developed cell lines are not deposited in user-friendly cell banks. To facilitate the acquisition of this cell by researchers, the cell line established in this study has been stored in the National Marine Aquatic Germplasm Bank (YSFRI-C-2020-SPG).

Key words: *Schizothorax prenanti*; SPG; cell line; immunological

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn