

DOI: 10.12264/JFSC2022-0032

斑石鲷肾脏细胞系的建立、特征分析及其免疫相关基因的表达分析

王洁^{1,2}, 王娜^{1,2,3}, 俄泽琛^{1,2}, 巩志宏², 张子威², 陈张帆², 陈松林^{1,2,3}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;

3. 山东省海洋渔业生物技术与遗传育种重点实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)是我国重要的海水养殖鱼类, 本研究以斑石鲷肾脏组织为材料, 建立了斑石鲷肾脏组织细胞系(*O. punctatus* kidney cell line, OPK)。斑石鲷肾脏细胞系生长旺盛, 目前已成功传至 34 代。本研究检测了不同 FBS 浓度对斑石鲷肾脏细胞生长的影响, 结果表明最适生长 FBS 浓度为 20%。将 OPK 细胞液氮冷冻复苏后, 细胞具有活性, 可正常生长和传代。核型分析结果显示, 第 24 代斑石鲷肾脏细胞系核型为正常二倍体核型($2n=2sm+46t$)。将 Cy3-siRNA 转染到 OPK 细胞后, 可以成功表达荧光。对斑石鲷 OPK 细胞提取 DNA, 用斑石鲷线粒体色素细胞 C 氧化酶 I (CO I) 基因进行检测, 结果表明该细胞系来源于斑石鲷。斑石鲷肾脏细胞系细胞在受到脂多糖(LPS)和聚肌胞苷酸(poly I : C)刺激后能产生免疫反应, 免疫相关基因 *IκB*、*IL-1β*、*IL-8* 和 *IRF3* 的表达水平发生显著变化。本研究成功建立了斑石鲷肾脏细胞系, 可运用于斑石鲷基因功能分析、细胞遗传学、致病性细菌和病毒感染机制等研究, 可为斑石鲷的基础研究和细胞工程育种等提供重要的基础材料。

关键词: 斑石鲷; 肾脏细胞系; 原代培养; 传代培养; 免疫刺激

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)11-1529-12

鱼类细胞培养技术是进行鱼类生物学基础研究的重要手段和方法, 被广泛应用于病毒学、免疫学、遗传学、基因工程和细胞生物学等各个领域^[1-3]。世界上第一个鱼类细胞系是 1962 年由 Wolf 等^[4]建立的虹鳟生殖腺细胞系 RTG-2。随着鱼类生物技术的发展, 越来越多不同组织的鱼类细胞系被建立, 据统计, 截至 2020 年全世界已报道建立的鱼类细胞系共有 780 多种^[5]。肾脏是鱼类重要的淋巴器官, 在鱼类抵抗外来病原菌入侵, 进行免疫应答过程中发挥重要作用^[6-8]。近年来, 由于鱼类免疫学研究的深入开展, 已建立多种肾脏细胞系并分析了其生物学特性, 用于探索鱼类

免疫基因功能和进行病毒的分离纯化等研究, 如鳊鲃肾脏细胞系^[9]、斑点叉尾鲷肾脏细胞系^[10]、松江鲈肾细胞系^[11]、金钱鱼肾细胞系^[12]、西伯利亚鲟头肾细胞系^[13]和宽口裂腹鱼中肾组织细胞系^[14]等。此外, Xue 等^[15]建立了青鱼细胞系(MPK), 发现 MPK 细胞可成功感染鲤病毒血症病毒。Liu 等^[16]建立了云纹石斑鱼肾脏细胞系(EMK), 发现 EMK 对新加坡石斑鱼虹彩病毒和神经坏死病毒易感。Zhou 等^[17]发现金鲳肾脏细胞系对病毒和细菌的胞外产物均有易感性。由于鱼类免疫组织的多样性, 同一种鱼的不同组织对同种病原体的敏感性不同, 因此, 为满足不同研究需求, 对开发、培养

收稿日期: 2022-02-14; 修订日期: 2022-03-02.

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2021LZGC028); 农业农村部物种品种资源保护费项目-海洋渔业生物资源收集与保藏; 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.

作者简介: 王洁(1992-), 女, 博士研究生, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: 1099914188@qq.com

通信作者: 陈松林, 研究员, 研究方向为水产动物遗传育种. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

鱼类不同的细胞系提出了更高的要求^[18]。

斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)隶属于鲈形目(Perciformes), 石鲷科(Oplegnathidae), 石鲷属(*Oplegnathus*), 广泛分布在朝鲜、日本和中国, 属于温、热带鱼类, 近年来在我国的养殖产量大幅度上升^[19-20]。然而, 随着斑石鲷养殖规模的不断扩大, 病害频发, 严重影响了斑石鲷的产量和经济效益。虹彩病毒引起的虹彩病毒病^[21]和哈维氏弧菌引起的黑身病^[22]是斑石鲷养殖业中的主要疾病, 死亡率高, 病鱼均会出现脾肾肿大和脾肾造血组织坏死。研究表明, 肾脏作为重要的免疫器官在斑石鲷抗细菌和抗病毒应答中发挥重要作用, 斑石鲷在感染虹彩病毒后免疫相关基因 *TGF-β1* 在肾脏中的表达量与未感染组出现显著性差异^[23], 在感染鳃弧菌后, 免疫相关基因 *MyD88* 在肾脏中的表达量也显著上调^[24]。斑石鲷基因组序列已经测定完毕, 这为探讨斑石鲷分子免疫机制提供了研究基础, 而稳定的细胞系则是斑石鲷抗病免疫相关基因筛选和功能分析的重要平台^[25]。迄今为止, 斑石鲷仅建立了 3 种细胞系(脑细胞系、肌肉细胞系^[20]和肝脏细胞系^[26]), 尚未见关于斑石鲷肾脏细胞系的相关报道。因此, 急需建立斑石鲷肾脏细胞系, 进行斑石鲷对不同细菌和病毒的易感性、免疫相关基因功能验证、分子免疫机制等研究, 为解析斑石鲷抗病分子免疫机制提供重要的研究基础和保障。

本研究以斑石鲷肾脏为材料, 采用胰酶消化法进行斑石鲷肾脏原代细胞的培养, 在原代细胞稳定后进行传代培养, 建立斑石鲷肾脏细胞系, 并对斑石鲷肾脏细胞系的生长特性、特征、免疫刺激后的表达分析进行研究。旨在为进行斑石鲷免疫基因功能的探索、细菌性和病毒性疾病发病机制等研究奠定研究基础, 同时推进了斑石鲷免疫学、病理学和生理学等研究进展。此外, 斑石鲷肾脏细胞系的建立丰富了鱼类细胞系资源, 为鱼类培养优良抗病育种和病害防治的研究提供重要的体外实验平台。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究采用的健康无病斑石鲷, 体重 200 g,

体长(18±2) cm, 来自山东省莱州市明波水产有限公司。

实验试剂: Leibovitz's L-15 培养基(Solarbio, 北京), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco, 美国), 10 ng/mL 碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(R&D, 美国), 50 mmol/L β-巯基乙醇(2-mercaptoethanol, 2-ME) (Gibco, 美国), 200 IU/mL 青链霉素混合液(Solarbio, 北京), 100×青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液(Solarbio, 北京), 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液(Solarbio, 北京), 1×PBS 缓冲液(Solarbio, 北京), 二甲基亚砜(DMSO, Solarbio, 北京), 秋水仙素(碧云天, 上海), 甲醇(沪试), 乙酸(沪试), 异丙醇(沪试), 乙醇(沪试), Tissue DNA kit 试剂盒(OMEGA), TB Green® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 北京), PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa, 北京), Premix Taq™ (Ex Taq™ Version 2.0 plus dye) (TaKaRa, 北京), TRIzol™ Reagent (Invitrogen, 美国), pEASY-T1 载体(全式金, 北京), 大肠杆菌感受态细胞 Trans T1 (全式金, 北京), riboFECT™MCP 转染试剂(锐博, 广州), Cy3-siRNA (锐博, 广州), 吉姆萨染液(Solarbio, 北京), 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) (Solarbio, 北京), 聚肌胞苷酸(poly I : C)(Sigma, 美国)。

L-15 完全培养基是在 L-15 培养基中添加 20% FBS、10 ng/mL bFGF、50 mmol/L 2-ME 以及 200 IU/mL 青链霉素混合液。

1.2 原代培养和传代培养

将斑石鲷在实验室暂养 4 d 后, 用 MS-222 麻醉剂进行麻醉后放入 75%的乙醇中消毒, 在无菌条件下取出肾脏组织放在培养皿中移入超净工作台进行操作。将肾脏组织用含 3%三抗的 1×PBS 冲洗 3 次, 用手术刀将肾脏组织切成 1 mm³ 的小块, 再用 1×PBS 冲洗 3 次后移入 15 mL 离心管, 用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液室温消化肾脏组织块 15 min 后, 用含 20% FBS 的 L-15 完全培养基终止消化。将消化液用 100 μm 的过滤筛收集细胞悬液, 以 1000 g 离心 5 min。倒掉上清液后用含 20% FBS 的 L-15 重悬细胞, 1000 g 离心 5 min, 如此重复两次。将冲洗后的细胞沉淀用 3 mL L-15

完全培养基悬浮后接种在 25 cm² 的细胞培养瓶中, 并在培养瓶上记录细胞信息(细胞组织类型、时间和培养代数)。将细胞培养瓶放入 24 ℃ 生化培养箱(SANYO, 日本)中, 每天观察细胞生长状况。

观察到细胞铺满培养瓶约 85%~95%时, 进行传代培养。移除培养液, 加入 2 mL PBS 清洗贴壁细胞, 如此重复两次。加入 1 mL 0.25%的胰蛋白酶-EDTA 消化液, 静置 30 s 后移除 0.5 mL 胰蛋白酶, 室温下消化至 95%左右的细胞变圆脱离细胞培养瓶时加入 L-15 完全培养基, 按 1:2 的比例进行传代培养。

1.3 细胞的冻存和复苏

取传代后培养至细胞贴壁率达 90%以上的斑石鲷肾脏细胞系, 移除瓶内原有培养基后用 PBS 冲洗贴壁细胞两次, 然后用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液消化细胞, 将消化后悬浮细胞收集到离心管中, 1000 g 离心 5 min, 加入 2 mL 细胞冻存液(50% L-15 完全培养基、40% FBS、10% DMSO)重悬, 充分混匀后移入无菌冻存管。将冻存管放入程序性降温盒中放入-80 ℃ 冰箱过夜, 然后转入液氮中长期保存。

对冻存细胞进行复苏时, 先将冻存的细胞从液氮中拿出, 迅速在 37 ℃ 水浴锅中不断摇晃解冻, 然后 1000 g 离心 5 min。将离心后的上清移除, 加入 1.5 mL 的 L-15 完全培养基重悬细胞, 接种到 25 cm² 细胞培养瓶中并将培养基补足至 3 mL, 放置于 24 ℃ 生化培养箱中进行培养, 次日观察细胞生长状态并更换培养基。

1.4 不同浓度 FBS 对细胞生长的影响

将第 23 代斑石鲷肾脏细胞以 1×10^5 /孔的密度接种到 12 孔板上, 将细胞培养板放在 24 ℃ 生化培养箱中培养。培养 16 h 后, 将旧的培养基更换为除 FBS 浓度不同而其他条件均相同的培养基, FBS 浓度为 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%。在培养 6 d 后, 用血球计数板(Brand, 德国)对各个浓度下的每孔细胞分别进行计数, 每个浓度处理组设置 3 个平行。

1.5 染色体核型分析

取斑石鲷第 24 代肾脏细胞进行核型分析。在传代后的细胞培养 2 d 后, 细胞生长铺满瓶底约

60%, 在培养基中加入秋水仙素, 使其终浓度为 0.5 μg/mL。将细胞放在 24 ℃ 继续培养 4 h 后, 吸除原培养基, 用 PBS 冲洗两次, 加入 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液消化后收集细胞, 1000 g 离心 5 min。弃上清, 用 5 mL 0.075 mol/L 的 KCl 溶液在 24 ℃ 低渗 30 min。现配卡诺固定液(冰醋酸: 甲醇=1:3)并放在冰里预冷, 同时将载玻片放在酒精中置于-20 ℃ 预冷。低渗结束后, 加入 5 mL 预冷的卡诺固定液预固定 5 min。将细胞 150 g 离心 5 min, 弃上清, 加入 5 mL 卡诺固定液重悬细胞, 冰浴 10 min, 离心弃上清, 固定步骤重复两次。根据细胞的残存量加入 0.5~1 mL 的固定液回溶细胞。用冷滴片法进行滴片, 用吸管将含有细胞的卡诺固定液以 30 cm 以上的高度滴到预冷的载玻片上。将载玻片放在通风处自然晾干, 10%吉姆萨染液染色 10 min 后, 用缓水流轻轻冲掉吉姆萨染液, 放在通风处晾干后用 FISH 与核型高端分析系统(徕卡仪器有限公司, 徕卡 Cytovision, MB8)拍照观察。

1.6 细胞系来源鉴定

取适量细胞, 使用动物基因组 DNA 提取试剂盒(天根, 北京), 按照操作步骤提取斑石鲷肾脏细胞的基因组 DNA, 将提取好的基因组 DNA 放置 4 ℃ 备用。使用线粒体基因组 DNA CO I (cytochrome oxidase subunit I, CO I)基因引物进行 PCR 扩增(表 1), 引物设计参考张宏祥等^[26]。使用 PCR 仪(Bio-rad, 美国)进行目的片段扩增, PCR 反应体系为 50 μL: 2×Ex Taq Master Mix (TaKaRa, Cat: RR902A) 25 μL, 上、下游引物各 2 μL, DNA 模板 2 μL, 加 RNA-Free 水补足至 50 μL。PCR 反应条件为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 1 min, 57 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min, 12 ℃ 保温。取 5 μL PCR 产物在 1% 琼糖凝胶中进行电泳检测, 并使用多色荧光/化学发光成像系统(法国 VILBER, FX6)拍照。将 PCR 产物纯化后连接到 pEASY-T1 载体(全式金, 北京)并转化到大肠杆菌感受态细胞 Trans T1 (全式金, 北京)中, 挑阳性单克隆送至擎科生物科技有限公司(青岛)测序, 将测序结果通过 NCBI 的 BLAST 工具进行序列比对分析。

1.7 细胞转染

将第 23 代斑石鲷肾脏细胞以 2×10^5 的密度接种在 12 孔板中,待细胞完全贴壁后,移除旧的培养基,用 PBS 清洗细胞表面,重复此操作两次,确保洗净细胞表面的双抗,换为每孔 931 μL 的无双抗完全培养基。转染使用 riboFECT^{TMCP} 转染试剂(锐博,广州),按照以下步骤进行转染:在 60 μL 1 $\times$ riboFECT^{TMCP} Buffer 中加入 3 μL Cy3-siRNA 荧光标记,轻轻混匀;然后加入 6 μL riboFECT^{TMCP},轻轻吹打均匀,室温孵育 15 min,制备成转染复合物。然后将转染复合物加入 12 孔板中的一个孔,混匀。24 h 后使用倒置荧光显微镜(日本尼康公司,尼康 ECLIPSE, TE2000-U)观察细胞荧光信号。

1.8 斑石鲷肾脏细胞感染实验

将第 23 代斑石鲷肾脏细胞以 1×10^5 的密度接种在 12 孔板中,待每孔细胞长满培养孔 80%~90%时,分别加入脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)和聚肌胞苷酸(poly I : C)对 OPK 进行刺激。LPS 组的终浓度分别为 1.5、5、15、50、150、500 $\mu\text{g/mL}$, poly I : C 组的终浓度分别为 1.5、5、15、50、150、500 $\mu\text{g/mL}$,每个浓度设置 3 个重复,均以 PBS 为对照组。在 LPS 和 poly I : C 刺激 12 h 后收取细胞,用于 RNA 提取。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测

将处理 12 h 后的细胞,用 TRIzol 法提取总 RNA,用 Nanodrop2000 (Thermo, 美国)检测 RNA 的质量和浓度,并使用反转录试剂盒(TaKaRa, Cat: RR047A)将 RNA 反转录为 cDNA。使用 7500 Fast 荧光定量 PCR 系统(ABI, 美国)检测免疫相关基因的表达量,引物如表 1 所示。实时荧光定量实验的反应体系按照 TB Green[®] Premix Ex TaqTM (TaKaRa, Cat: RR420A)说明书介绍的方法进行。反应体系为 20 μL : SYBR Taq (2 $\times$) 10 μL 、Rox Dye II (50 $\times$) 0.4 μL , 上游和下游引物分别为 0.4 μL , 模板 cDNA 2 μL , RNA-Free 为 6.8 μL 。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 15 s。根据实验结果的 C_t 值,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算每个样品的相对表达量。实验数据使用 SPSS 软件进行单因素方差分析,设定

$P<0.05$ 为差异显著。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因 gene	引物序列 primer sequence
CO I	F: 5'-CACAAAGATATCGGCACCCT-3' R: 5'-CCTGCAGGGTCAAAAAAGGTGGT-3'
IL-1 β	F: 5'-CTCAGTTCCAGCGGTTTG-3' R: 5'-GTTCCCTTGATGCCCAGA-3'
IL-8	F: 5'-CCAGCAACCGCCTTCTGTAAACAA-3' R: 5'-AGGTGGAAGTGAAGTCAAGTGGTCT-3'
IkB	F: 5'-GGAGGACGAGCTGGTGAA-3' R: 5'-GAGGGCATGATCTGTGGC-3'
IRF3	F: 5'-CAGGAGCAGACAGCCAGAAGAGA-3' R: 5'-GCCGCTACAACAGCCATATTCTT-3'
β -actin	F: 5'-GCTGTGCTGTCCCTGTA-3' R: 5'-GAGTAGCCACGCTCTGTC-3'

2 结果与分析

2.1 原代培养和传代培养

将用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液消化后分离的细胞悬浮液置于细胞培养瓶中,3 d 后发现贴壁细胞,并随着培养时间的延长,贴壁细胞逐渐增多,细胞呈现纤维状(图 1a)。2~3 d 更换 1 次培养基,在原代细胞培养 10~14 d 之后,细胞能够铺满培养瓶底部大约 90%,然后按照 1 : 1 的比例进行传代。细胞初次传代后,大约 7 d 能够铺满细胞培养瓶。随着传代次数的增加,斑石鲷肾脏细胞生长速度加快,5 d 即可传一代,同时细胞类型逐渐趋于单一(图 1a),命名为 OPK 细胞系。

2.2 不同浓度 FBS 对细胞生长的影响

用分别添加 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% FBS 的 L-15 完全培养基对 OPK 细胞进行培养,6 d 后对不同 FBS 浓度处理组的细胞数量进行计数。结果如图 2 所示,在 FBS 浓度为 0%~20%这个范围内,细胞生长速度与 FBS 浓度呈正相关。当 FBS 浓度为 0%时,细胞几乎不生长,当 FBS 浓度为 20%时细胞生长最快,细胞数量约为 2.5×10^5 ,是添加 0% FBS 组的 2.5 倍。当 FBS 浓度为 25%时细胞数量与添加 0%, 5%, 10%, 15% FBS 组相比,具有显著差异($P<0.05$),但与 20% FBS 组无显著差异($P>0.05$)。

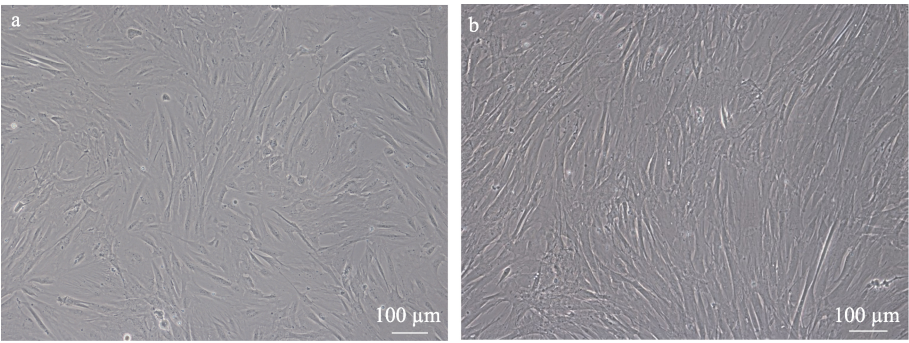


图 1 原代和传代细胞培养的斑石鲷肾脏细胞系(OPK)细胞
a. 原代培养 9 d 的细胞; b. 第 20 代的 OPK 细胞.

Fig. 1 The *Oplegnathus punctatus* kidney cell line (OPK) cell in primary culture and subculture
a. Primary cultured OPK cells at 9 d; b. Subcultured OPK cells at passage 20.

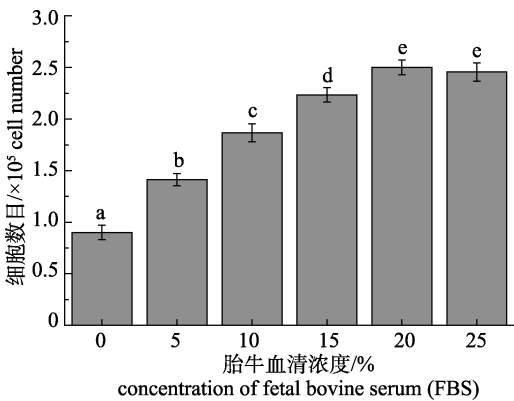


图 2 不同浓度的胎牛血清(FBS)对斑石鲷肾脏细胞系(OPK)细胞生长的影响
不同字母代表用不同浓度的胎牛血清培养的细胞生长差异显著($P<0.05$).

Fig. 2 The effects of different concentrations of fetal bovine serum (FBS) on growth of *Oplegnathus punctatus* kidney cell line (OPK) cells
Different letters represent significant differences in cell growth between different concentration FBS treatment group ($P<0.05$).

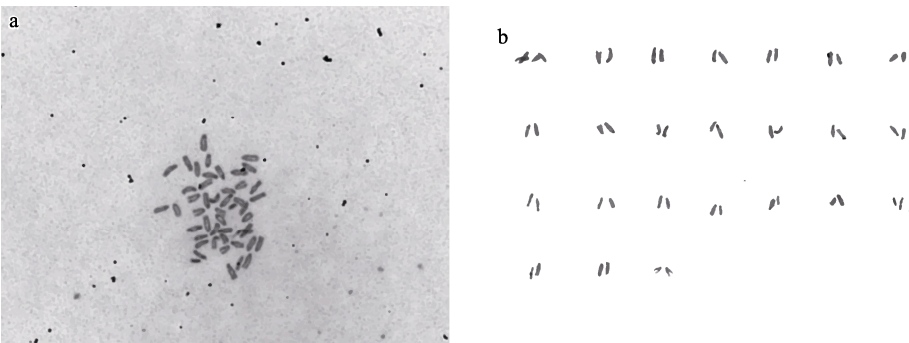


图 3 第 24 代斑石鲷肾脏细胞系(OPK)细胞染色体核型分析
a. 一个二倍体数目为 48 的斑石鲷肾脏细胞系(OPK)细胞的染色体; b. OPK 细胞染色体二倍体核型.

Fig. 3 The chromosome analysis of *Oplegnathus punctatus* kidney cell line (OPK) cells at passage 24
a. Chromosome from one OPK cells with a diploid number of 48; b. Diploid karyotype morphology of OPK.

2.3 核型分析

染色体核型分析结果显示(图 3), 第 24 代 OPK 细胞染色体数目分布在 35~72 之间, 但大部分为 48 条($2n=2sm+46t$). 在已报道的研究中, 斑石鲷染色体核型在雌性和雄性中的数目分别为 $2n=2sm+46t$ 和 $2n=1m+2sm+44t$ ^[27].

2.4 细胞系来源鉴定

将 OPK 细胞系基因组进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳结果为特异性单一条带, 与预期结果一致(图 4a)。将 OPK 细胞测序结果与斑石鲷线粒体 CO I (GenBank No. MN927588.1) 序列进行比对, 结果显示(图 4b), OPK 细胞系与斑石鲷线粒体 CO I 序列相似性约为 100%, 说明 OPK 细胞系来源于斑石鲷。

2.5 细胞转染

通过 riboFECT^{TMCP} 转染试剂(锐博, 广州)将 Cy3-siRNA 成功转入 OPK 细胞中。结果显示, 在



图 4 斑石鲷肾脏细胞线粒体 CO I 基因 PCR 扩增与序列比对

a. OPK 细胞线粒体 CO I 基因 PCR 扩增产物; b. OPK 细胞线粒体 CO I 测序序列与斑石鲷线粒体 CO I 序列(GenBank No. MN927588.1)比对分析; 深蓝色为一致序列。

Fig. 4 PCR amplification and sequence alignment of CO I gene of *Oplegnathus punctatus* kidney cells (OPK)

a. PCR amplification products of CO I gene of OPK; b. Comparative analysis of sequences between CO I in *O. punctatus* mitochondria (GenBank No. MN927588.1) and CO I in OPK cells; Dark blue indicates the same nucleotide sequence.

转染 24 h 后可观察到荧光信号(图 5), 转染效率约为 60%。结果表明 OPK 细胞系可以进行 siRNA 转染并基因敲降, 可用于基因功能分析等研究。

2.6 免疫相关基因的表达分析

OPK 细胞系经 LPS 和 poly I : C 刺激后, 使用实时荧光定量 PCR 检测免疫相关基因 *IκB*、*IL-1β*、*IL-8* 和 *IRF3* 的表达水平。经 LPS 刺激后 *IκB*、*IL-1β*、*IL-8* 和 *IRF3* 的相对表达量随着 LPS 浓度的增加而增加(图 6a, b, c 和 d)。如图 7 显示, 在经 poly I : C 刺激后, *IκB* 的相对表达量随着 poly I : C 浓度的增加表达量不断上升(图 7a), 并且在 poly I : C 浓度为 500 μg/mL 的表达量最高。*IL-1β* 的相对表达量呈现先下降后上升的趋势(图 7b)。*IL-8* 和 *IRF3* 的基因

相对表达量呈现先上升后下降的趋势(图 7c, 7d)。

3 讨论

斑石鲷作为一种新型的工厂化养殖鱼类, 在养殖过程中病害的频发严重制约了斑石鲷养殖业的发展。因此, 研究斑石鲷分子免疫机制, 进行抗病育种迫在眉睫。鱼类细胞系是进行鱼类免疫学、病理学、转基因和鱼类资源保护与遗传育种等研究的重要工具^[28]。本研究建立了斑石鲷肾脏细胞系, 测定了在相同条件下含不同浓度 FBS 的 L-15 完全基培养对其生长的影响, 并对 OPK 细胞进行转染、核型分析、细胞系来源鉴定, 同时对 OPK 细胞系进行 LPS 和 poly I : C 刺激后, 检测免

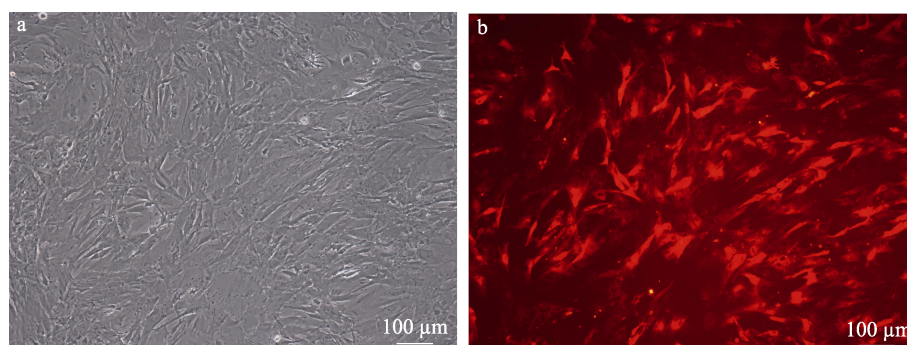


图 5 斑石鲷肾脏细胞系 Cy3-siRNA 转染

a. b 的相应光镜图像; b. 转染 48 h 表达情况, 有荧光信号。

Fig. 5 Transfected *Oplegnathus punctatus* kidney cell line (OPK) cells with Cy3-siRNA

a. Light microscope image of b; b. OPK transfected with Cy3-siRNA plasmid after 48 h, and fluorescence signal appeared.

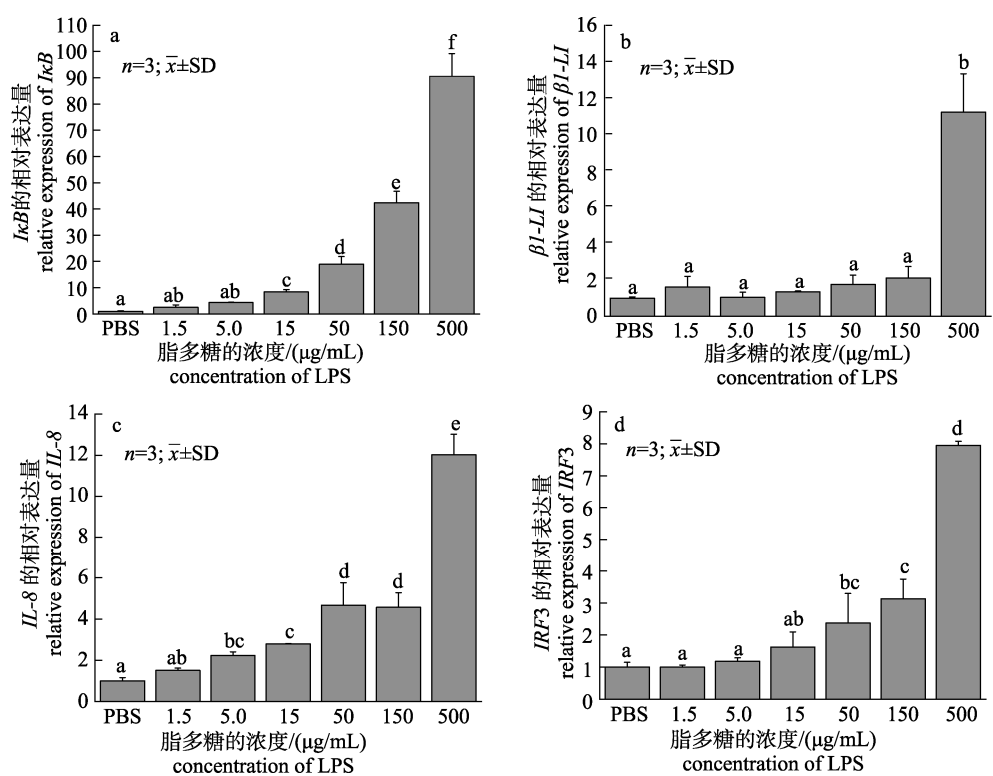


图 6 不同浓度脂多糖(LPS)刺激斑石鲷肾脏细胞后免疫相关基因的表达

a. *IkB* 在不同浓度 LPS 刺激后的相对表达量; b. *IL-1β* 在不同浓度 LPS 刺激后的相对表达量;
c. *IL-8* 在不同浓度 LPS 刺激后的相对表达量; d. *IRF3* 在不同浓度 LPS 刺激后的相对表达量。
基因表达量计算以 β -actin 作为内参; 不同字母表示不同 LPS 浓度间存在显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 6 Expression analysis of immune related genes in OPK cells after lipopolysaccharide (LPS) stimulation

a. Expression level of *IkB* after LPS stimulation; b. Expression level of *IL-1β* after LPS stimulation;
c. Expression level of *IL-8* after LPS stimulation; d. Expression level of *IRF3* after LPS stimulation.
The expression of gene is calculated relatively to the gene β -actin. Different letters indicate significant difference between different LPS concentration groups ($P<0.05$).

疫相关基因的相对表达量。斑石鲷肾脏细胞系的建立, 为 OPK 细胞系的进一步应用奠定了基础, 同时为斑石鲷的免疫机制研究提供了重要的研究材料, 对培育优良的抗病新品种, 促进斑石鲷养殖业的健康可持续发展具有重要的意义。

鱼类原代细胞的培养方法主要有胰酶消化法、组织块培养法和机械分离法、悬浮细胞培养法和微载体细胞培养法等^[29-30]。本研究采用胰蛋白酶消化法获取原代细胞, 此方法简单方便、成功率高, 胰酶消化法在将组织分散成细胞悬液时可以去掉妨碍细胞生长的细胞间质, 使大量的分散细胞直接黏附于细胞培养瓶, 同时还可以避免对分离出的原代细胞产生机械损伤^[31-32]。斑石鲷肾脏组织原代细胞系 1~2 d 就可贴壁, 前几代生长较慢, 生长稳定后可 5~6 d 传代。FBS 是细胞基

础培养基中常用的添加物, 在细胞培养中 FBS 不仅含有细胞生长所需的生长因子、激素、各种蛋白等营养物质, 同时还可以促进细胞贴壁、铺展和生长^[33]。之前的研究表明, 在同一培养条件下, 不同 FBS 浓度培养的细胞的数量具有明显差异, 说明不同的 FBS 浓度对原代细胞的生长有显著影响^[34-36]。在本研究的 FBS 浓度实验中, 不添加 FBS 的细胞可以正常贴壁, 但细胞未生长, 说明 FBS 是 OPK 细胞增殖所必需的添加剂。当 FBS 浓度在 5%~20% 的范围内, OPK 细胞的生长速度与 FBS 浓度呈正相关, 当 FBS 浓度为 20% 和 25% 时, 细胞生长并无明显差异, 考虑降低成本和节约资源的因素, OPK 细胞培养的最适血清浓度为 20%。细胞的染色体核型分析是进行细胞系鉴定的一项重要指标, 本研究中斑石鲷第 24 代与

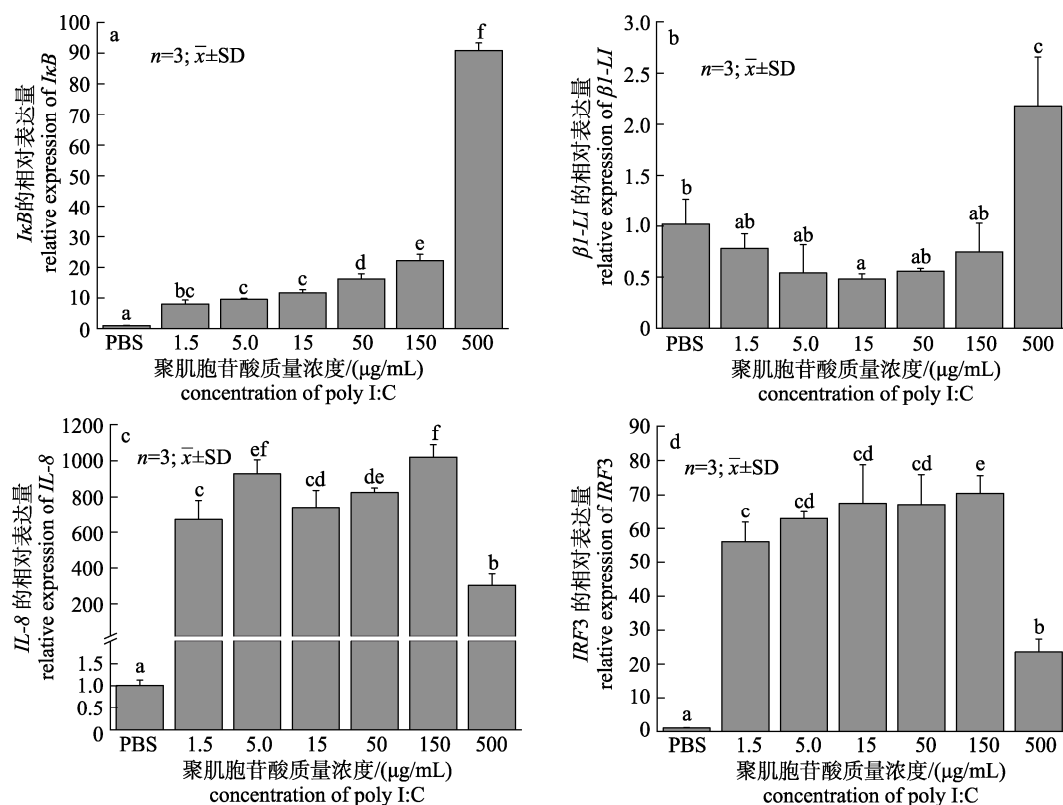


图 7 不同浓度聚肌胞苷酸(poly I:C)刺激斑石鲷肾脏细胞后免疫相关基因的表达

a. *IkB* 在不同浓度 poly I : C 刺激后的相对表达量; b. *IL-1 β* 在不同浓度 poly I : C 刺激后的相对表达量; c. *IL-8* 在不同浓度 poly I : C 刺激后的相对表达量; d. *IRF3* 在不同浓度 poly I : C 刺激后的相对表达量。基因表达量计算以 β -actin 作为内参; 不同字母表示不同数据间存在显著性差异($P < 0.05$)。

Fig. 7 Expression analysis of immune related genes in OPK cells after poly I : C stimulation

a. Expression level of *IkB* after poly I : C stimulation; b. Expression level of *IL-1 β* after poly I : C stimulation; c. Expression level of *IL-8* after poly I : C stimulation; d. Expression level of *IRF3* after poly I : C stimulation.

The expression of gene is calculated relatively to the gene β -actin. Different letters indicate significant difference between different poly I : C concentration groups ($P < 0.05$).

之前的研究一致^[27]。对 OPK 细胞提取 DNA 后, 用斑石鲷线粒体色素细胞 C 氧化酶 I (CO I) 基因检测, 测序结果显示 OPK 细胞系与斑石鲷线粒体 CO I 序列相似性约为 99.37%。染色体核型分析和 OPK 细胞来源鉴定均说明 OPK 细胞系来源于斑石鲷。

肾脏作为硬骨鱼类主要的淋巴器官, 在鱼类免疫应答中发挥重要作用^[37-38]。本研究发现, 斑石鲷肾脏细胞系经 LPS 刺激后, 细胞中部分免疫相关基因(*IkB*、*IL-1 β* 、*IL-8* 和 *IRF3*)的表达水平随着 LPS 浓度的增加而增加。经不同浓度的 poly I : C 刺激后, 斑石鲷肾脏细胞中的 *IkB*、*IL-1 β* 、*IL-8* 和 *IRF3* 的相对表达量均发生显著变化。白介素

1 (*IL-1 β*)和白介素 8 (*IL-8*)是重要的促炎细胞因子, 通常用作激活炎症反应的标志物^[39]。岩鲷(*Oplegnathus faciatatus*)在经 LPS 和 poly I : C 刺激后, 头肾中促炎因子 *IL-1 β* 和 *IL-8* 的表达量均出现显著变化^[40]。*IkB* 为 NF κ B 抑制剂, 可以防止核易位, 在 NF κ B 激活中起着重要作用^[41]。干扰素调节因子 3 (*IRF3*)是干扰素调节因子家族中的重要成员, 在先天性免疫抗病毒攻击中发挥重要作用^[42]。虹鳟 *IRF3* 在脂多糖(LPS)和聚肌胞苷酸(poly I : C)刺激后表达量上调^[43]。斑石鲷肾脏细胞在受到 LPS 和 poly I : C 刺激后能产生免疫反应, 说明斑石鲷肾脏细胞可以作为体外研究免疫相关基因功能和表达调控的重要工具。细胞转染实验是进行体外水

平研究目的基因功能的重要途径。在本研究中通过转染 Cy3-siRNA, 成功表达荧光, 说明斑石鲷肾脏细胞系可以用于目的基因的敲降, 表明 OPK 可为斑石鲷基因功能研究提供重要的体外研究平台。

4 结论

本研究以斑石鲷为研究对象, 以其肾脏组织为材料, 采用胰酶消化法建立了斑石鲷肾脏组织细胞系, 细胞生长状态良好, 已持续传代至 34 代。研究表明, 斑石鲷肾脏细胞的最适 FBS 浓度为 20%, 可转染 Cy3-siRNA 并成功表达荧光。斑石鲷肾脏细胞在受到脂多糖(LPS)和聚肌胞苷酸(poly I : C)刺激后, 免疫相关基因的表达水平显著上升。斑石鲷肾脏细胞系的建立对斑石鲷的功能基因的分析鉴定、病毒的鉴定和分离, 以及进一步研究斑石鲷的疾病感染机制和疾病防控技术提供了重要材料。

参考文献:

- [1] Lakra W S, Swaminathan T R, Joy K P. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2011, 37(1): 1-20.
- [2] Collet B, Collins C, Lester K. Engineered cell lines for fish health research[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2018, 80: 34-40.
- [3] Sr J P W, Winn R N, Renfro J L. Generating new marine cell lines and transgenic species—conference summary[J]. *The Journal of Experimental Zoology*, 2002, 292(3): 217-220.
- [4] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*[J]. *Science*, 1962, 135(3508): 1065-1066.
- [5] Thangaraj R S, Narendrakumar L, Prasanna 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.
- [6] Bjørgen H, Koppang E O. Anatomy of teleost fish immune structures and organs[J]. *Immunogenetics*, 2021, 73(1): 53-63.
- [7] Cha I S, Kwon J, Park S H, et al. Kidney proteome responses in the teleost fish *Paralichthys olivaceus* indicate a putative immune response against *Streptococcus parauberis*[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(17): 5166-5175.
- [8] Liu X M, Li Z, Wu W Z, et al. Sequencing-based network analysis provides a core set of gene resource for understanding kidney immune response against *Edwardsiella tarda* infection in Japanese flounder[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 67: 643-654.
- [9] Li M M, Wu B, Lin N, et al. The established kidney cell line from European eel *Anguilla anguilla* and its susceptibility to anguillid herpesvirus[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(2): 237-244. [李苗苗, 吴斌, 林楠, 等. 鳗鲡肾脏细胞系的建立及其对鳗鲡疱疹病毒的敏感性[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(2): 237-244.]
- [10] Xu J. Establishment of channel catfish kidney cell line and pathology study of channel catfish hemorrhagic disease[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012: 108. [徐进. 斑点叉尾鲷肾脏细胞系建立与出血病病原学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012: 108.]
- [11] Shan L J. Establishment and characterization of kidney cell lines from rough skin sculpin (*Trachidermus fasciatus*)[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2015: 51. [单莉娟. 松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)肾脏细胞系的建立及生物学特性分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2015: 51.]
- [12] Zhang Y Y, Liang X M, Zeng W G, et al. Establishment and characterization of a new euryhaline fish kidney cell line of spotted scat *Scatophagus argus*[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 651-656. [张莹莹, 梁雪梅, 曾文刚, 等. 金钱鱼肾脏细胞系的建立及生长特性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 651-656.]
- [13] Ryu J H, Kim M S, Kang J H, et al. Derivation of the clonal cell lines from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head-kidney cell lines and its applicability to foreign gene expression and virus culture[J]. *Journal of Fish Biology*, 2018, 92(5): 1273-1289.
- [14] Dai J C, Nie Z L, Liu J Y, et al. Preliminary study on the establishment of kidney tissue cell lines in *Schizothorax eurystomus*[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(6): 61-68. [代金彩, 聂竹林, 刘洁雅, 等. 宽口裂腹鱼中肾组织细胞系建立的初步研究[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(6): 61-68.]
- [15] Xue T, Wang Y Z, Pan Q H, et al. Establishment of a cell line from the kidney of black carp and its susceptibility to spring viremia of carp virus[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(2): 365-374.
- [16] Liu X F, Wu Y H, Wei S N, et al. Establishment and characterization of a kidney cell line from kelp grouper *Epine-*

- phelus moara*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(1): 87-93.
- [17] Zhou L L, Li P F, Liu J X, et al. Establishment and characterization of a mid-kidney cell line derived from golden pompano *Trachinotus ovatus*, a new cell model for virus pathogenesis and toxicology studies[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 2017, 53(4): 320-327.
- [18] Liu X F, Chen S L, Sha Z X, et al. Establishment, characterization of a new cell line from heart of kelp bass (*Epinephelus moara*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2015(10): 1394-1400. [刘肖峰, 陈松林, 沙珍霞, 等. 云纹石斑鱼心脏细胞系的建立与鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2015(10): 1394-1400.]
- [19] Wang H B, Shi C Y, Xie G S, et al. Red seabream iridovirus causing mass mortality in farmed spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 151-158. [王海波, 史成银, 谢国骊, 等. 真鲷虹彩病毒引起养殖斑石鲷大规模死亡的研究[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 151-158.]
- [20] Wang M X, Zhu H, Wang Y J, et al. Establishment and characterization of two cell lines derived from spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus* muscle and brain[J]. Periodical of Ocean University of China, 2018, 48(6): 67-74. [王梦珣, 朱鹤, 王玉珏, 等. 斑石鲷肌肉、脑细胞系的建立与生物学特性[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(6): 67-74.]
- [21] Shuang F, Luo Y W, Xiong X P, et al. Virions proteins of an RSIV-type megalocytivirus from spotted knifejaw *Oplegnathus punctatus* (SKIV-ZJ07)[J]. Virology, 2013, 437(2): 89-99.
- [22] Xu Y, Wang Y G, Zhang Z, et al. Variance analysis of bacterial community in the intestine of cultured spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) at different healthy levels and intervened with florfenicol[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(3): 388-398. [许燕, 王印庚, 张正, 等. 不同健康程度和抗生素氟苯尼考干预下斑石鲷肠道菌群的结构差异[J]. 水产学报, 2018, 42(3): 388-398.]
- [23] Wang S. Cloning and expression pattern analysis of rpl10 and TGF- β 1 in spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019: 77. [王杉. 斑石鲷免疫相关基因 rpl10 和 TGF- β 1 克隆及表达分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 77.]
- [24] Liu X B, Li X M, Du X X, et al. Spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) MyD88: Intracellular localization, signal transduction function and immune responses to bacterial infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 719-726.
- [25] Li M, Zhang R, Fan G Y, et al. Reconstruction of the origin of a neo-Y sex chromosome and its evolution in the spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(6): 2615-2626.
- [26] Zhang H X, Li K M, Wang N, et al. Establishment and characterization of a liver cell line from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(2): 360-368. [张宏祥, 李坤明, 王娜, 等. 斑石鲷肝脏细胞系的建立与鉴定[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(2): 360-368.]
- [27] Xue R, An H, Liu Q H, et al. Karyotype and Ag-NORs in male and female of *Oplegnathus punctatus*[J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2016, 47(3): 626-632. [薛蕊, 安皓, 刘清华, 等. 斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)雌、雄鱼核型及 Ag-NORs 带型分析[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(3): 626-632.]
- [28] Lakra W S, Swaminathan T R, Joy K P. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37(1): 1-20.
- [29] Zhang B, Chen S L. Decades of researching progresses of fish cell culture and its application prospects[J]. Marine Sciences, 2011, 35(7): 113-121. [张博, 陈松林. 近 10 年鱼类细胞培养研究进展及应用展望[J]. 海洋科学, 2011, 35(7): 113-121.]
- [30] Long S T, Luo P T, Zhang Y X, et al. Research advances in the methods, conditions and application of fish cell culture[J]. Biology Teaching, 2020, 45(9): 4-5. [龙舒婷, 罗鹏佗, 张永馨, 等. 鱼类细胞培养的方法、条件及应用研究概述[J]. 生物学教学, 2020, 45(9): 4-5.]
- [31] Zhou J N, Su M L, Zhang J B. Establishment and characterization of gill cell line from the spotted scat *Scatophagus argus*[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2019, 38(6): 90-97. [周佳楠, 苏冒亮, 张俊彬. 金钱鱼鳃细胞系的建立及其生长特性的初步研究[J]. 热带海洋学报, 2019, 38(6): 90-97.]
- [32] Nathiga Nambi K S, Abdul Majeed S, Taju G, et al. Effects of nicotine on zebrafish: A comparative response between a newly established gill cell line and whole gills[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2017, 195: 68-77.
- [33] Liu X F, Wu Y H, Wei S N, et al. Establishment and charac-

- terization of a kidney cell line from kelp grouper *Epinephelus moara*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2018, 44(1): 87-93.
- [34] Li Z L, Wang J M, Zhao C H, et al. Study on the effect of different types of bovine serum on the cultivation of MDCK cell[J]. Journal of Biology, 2020, 37(4): 21-25. [李自良, 王家敏, 赵彩红, 等. 不同类型牛血清对 MDCK 细胞培养效果研究[J]. 生物学杂志, 2020, 37(4): 21-25.]
- [35] Yashwanth B S, Goswami M, Kooloth Valappil R, et al. Characterization of a new cell line from ornamental fish *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830) and its susceptibility to nervous necrosis virus[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 20051.
- [36] Ryu J H, Kim M S, Kang J H, et al. Derivation of the clonal-cell lines from Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) head-kidney cell lines and its applicability to foreign gene expression and virus culture[J]. Journal of Fish Biology, 2018, 92(5): 1273-1289.
- [37] Zapata A, Diez B, Cejalvo T, et al. Ontogeny of the immune system of fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(2): 126-136.
- [38] Bjørgen H, Koppang E O. Anatomy of teleost fish immune structures and organs[J]. Immunogenetics, 2021, 73(1): 53-63.
- [39] Seppola M, Larsen A N, Steiro K, et al. Characterisation and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. Molecular Immunology, 2008, 45(4): 887-897.
- [40] Hong S, Jin J W, Park J H, et al. Analysis of proinflammatory gene expression by RBIV infection in rock bream, *Oplegnathus faciatius*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 50: 317-326.
- [41] Huang G J, Zhang Z Q, Jin D Y. I κ B kinase: An update[J]. Progress in Biotechnology, 2003, 23(5): 17-21. [黄国锦, 张智清, 金冬雁. I κ B 激酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(5): 17-21.]
- [42] Sun H, Jiang Z Q, Jiang J L, et al. Cloning and expression analysis of IRF3 in *Gadus macrocephalus* using absolute quantitative PCR[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 887-895. [孙航, 姜志强, 蒋洁兰, 等. 太平洋鲑 IRF3 基因的克隆及绝对定量表达分析[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 887-895.]
- [43] Holland J W, Bird S, Williamson B, et al. Molecular characterization of IRF3 and IRF7 in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: Functional analysis and transcriptional modulation[J]. Molecular Immunology, 2008, 46(2): 269-285.

Establishment and characterization of spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) kidney cell line (OPK) and expression analysis of immune-related genes in OPK

WANG Jie^{1,2}, WANG Na^{1,2,3}, E Zechen^{1,2}, GONG Zhihong², ZHANG Ziwei², CHEN Zhangfan², CHEN Songlin^{1,2,3}

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao 266071, China

3. Shandong Key Laboratory of Marine Fisheries Biotechnology and Genetic Breeding, Qingdao 266071, China

Abstract: A new kidney cell line, *Oplegnathus punctatus* kidney cell line (OPK), was established from spotted knifejaw (*O. punctatus*). At present, the OPK has been successfully subcultured to 34 generations. In this study, the effects of different fetal bovine serum (FBS) concentrations on the growth of *O. punctatus* kidney cells were examined, and the results showed that the optimal concentration of FBS for OPK growth was 20%. After recovery from cryopreservation in liquid nitrogen, the cells could grow and be subcultured normally. Additionally, the karyotype analysis showed that the 24th generation kidney cell line had a normal diploid karyotype (2n=2sm+46t). The transfection of Cy3-siRNA showed that the *O. punctatus* kidney cell could be successfully transfected with siRNA and indicated that the OPK could be used for gene function analysis. The cytochrome oxidase subunit I (CO I) was used to identify the origination of OPK cells, and the results showed that the OPK cells were derived from spotted knifejaw. In addition, after *O. punctatus* kidney cells were stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and poly I : C at different concentrations (1.5, 5, 15, 50, 150, and 500 µg/mL), the expression of immune related genes were significantly upregulated or downregulated, including *IκB*, *IL-1β*, *IL-8*, and *IRF3*. These results indicated that OPK cells can be used as an important tool to investigate the function and expression regulation of immune-related genes *in vitro*. The establishment of OPK provided important materials for the analysis of functional genes and further studies on the mechanism of disease infection of spotted knifejaw.

Key words: *Oplegnathus punctatus*; kidney cell line; primary culture; subculture; immune stimulation

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