

# 大黄鱼性腺原代细胞培养技术的建立

郭一兰<sup>1,2</sup>, 王志勇<sup>1,2</sup>

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 为建立大黄鱼精巢和卵巢组织的原代细胞培养技术, 获得单层的性腺原代细胞, 采用组织块贴壁法, 对来源于大黄鱼的卵巢和精巢组织的细胞进行原代培养, 并使用0.25%胰酶消化法尝试传代培养。在26℃条件下, 添加20%胎牛血清, 在100 IU/mL青霉素(Penicillin)和100 μg/mL硫酸链霉素(Streptomycin)的DMEM/F-12(HAM)1:1培养基中培养大黄鱼卵巢和精巢组织的细胞。结果显示: 1) 大黄鱼卵巢组织在贴壁后第4天成纤维细胞开始迁出, 呈辐射状生长; 贴壁后第6天迁移出上皮样细胞, 呈“铺石路”状生长; 贴壁后第17天左右出现不同程度贴壁抑制。2) 大黄鱼精巢组织在贴壁后第5天迁出成纤维细胞; 第9~17天, 部分成纤维细胞呈长梭形涡旋状生长, 部分呈三角形均匀分布增殖; 贴壁后第18天左右部分细胞空泡化严重。3) 在培养后第8天对卵巢和精巢组织原代细胞进行胰酶消化传代培养, 传代培养第2天部分细胞贴壁分裂增殖, 传代培养3d后可进行第二次传代, 第二次传代后细胞长势变缓, 细胞空泡化加快。

**[关键词]** 大黄鱼; 精巢; 卵巢; 原代细胞培养

**[中图分类号]** Q 813.1

## Establishment of Primary Cell Culture Technique for Gonadal Tissue of Large Yellow Croaker

GUO Yilan<sup>1,2</sup>, WANG Zhiyong<sup>1,2</sup>

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea of Ministry of Agriculture(Jimei University), Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In order to establish the primary cell culture technique of the testis and ovary tissue of large yellow croaker(*Larimichthys crocea*) and obtain monolayer gonadal primary cells, the primary cells from ovary and testis of large yellow croaker were cultured by direct adherent method and subcultured by 0.25% trypsin digestion. Cells were cultured in DMEM/F-12(HAM) 1:1 with 20% FBS, 100 IU/mL Penicillin and 100 μg/mL Streptomycin at 26℃. Results showed that fibroblasts began to migrate from the ovary tissue of large yellow croaker on the 4th day after adherent. Epithelial cells migrated out and grew ‘stone-like’ on the 6th day after adherent. Different degrees of adherent inhibition were observed around the 17th day after adherent. Fibroblasts began to migrate from the testis tissue of large yellow croaker and on the 5th day after adherent. During the 9th day to the 17th day after adherent, some fibroblasts grew like vortex with long spindle shape and some were distributed evenly in triangular shape. Some cells cavitated seriously after culture to about the 18th day after adherent. The primary cells of ovary and testis tissue were digested and subcultured by trypsin on the 8th day after adherent. On the second day after digestion, some cells attached to the wall divided and

**[收稿日期]** 2019-11-27

**[基金项目]** 海水鱼产业技术体系项目(CARS-47-G04)

**[作者简介]** 郭一兰(1995—), 女, 硕士生, 从事水产动物遗传与育种研究。通信作者: 王志勇(1963—), 男, 教授, 博导。从事水产动物遗传与育种研究。E-mail: zywan@jmu.edu.cn

proliferated. The second passage could be carried out on the 3th day after digestion. After the second passage, the growth of cells slowed down and the vacuolization of cells accelerated.

**Keywords:** large yellow croaker (*Larimichthys crocea*); testis; ovary; primary cell culture

## 0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 属鲈形目 (Perciformes), 石首鱼科 (Sciaenidae) 黄鱼属 (*Larimichthys*), 是我国传统四大海产之一<sup>[1]</sup>。大黄鱼肉质鲜嫩, 经济价值较高, 市场需求量较大, 为当前养殖量最大的经济海水鱼类, 具有较高的研究意义。随着社会需求的增长, 大黄鱼亲鱼资源枯竭, 种质退化严重, 人工养殖的大黄鱼出现了生长速度慢、肉质下降、抗病力弱等现象<sup>[2]</sup>。这些严重影响了大黄鱼养殖产业的健康发展, 因此对大黄鱼病害防治、良种选育、遗传背景的研究极为迫切。

大黄鱼为海水鱼类, 对养殖条件要求较高; 大黄鱼 1~2 年才性成熟, 活体试验周期较长; 采用大黄鱼活体进行试验对设备、人力需求量大; 大黄鱼应激性强, 试验或运输过程中活体极易死亡。因而, 转基因、RNA 干扰、基因编辑等新型技术较难在大黄鱼活体中开展。而使用鱼类细胞进行病毒学<sup>[3-4]</sup>、免疫学、生理生化研究、遗传学和药理学等领域<sup>[5-6]</sup>研究, 具有试验周期短, 试验数据获取较快, 设施耗材较简单, 人力物力需求不大, 实验稳定性、重复性较好, 能有效避免个体间差异等活体鱼实验无法比拟的优点<sup>[7]</sup>。因此, 进行鱼类原代细胞培养技术的探索及鱼类细胞素建立的深入研究非常重要, 不仅能丰富鱼类细胞学知识, 提供理论基础, 也能为鱼类生理生化研究、病毒学、病理学、遗传学等研究提供合适的实验材料, 具有实际应用的重要价值。

目前, 大黄鱼心、脑、肾脏、肝脏、肌肉、鳍、吻端以及脾脏等 8 种细胞的培养技术已有研究介绍<sup>[3,8-10]</sup>, 但关于大黄鱼性腺组织原代细胞的培养研究鲜见报道。而大黄鱼部分性别相关基因的表达具有组织特异性, 在性腺中特异表达, 当进行性别相关研究时若使用非性腺组织细胞作为实验材料, 很难得到真实且准确的实验结果。

本文拟建立大黄鱼性腺组织 (卵巢和精巢) 的原代细胞培养方法, 旨在为今后大黄鱼性腺细胞系的建立奠定基础, 为后续科研探索提供一个合适的实验材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验鱼

实验用 400 g 左右性成熟的活体大黄鱼 5 尾, 采自福建省宁德市蕉城区金铃水产科技有限公司, 在实验室暂养至解剖取性腺组织。

#### 1.1.2 实验试剂

Hank's 平衡盐溶液无酚红 (HBSS basic) (1X)、胎牛血清 (FBS) 均为 Gibco 公司产品, PBS (pH=7.4) 缓冲液、DMEM/F-12 (HAM) 1:1 培养基、胰蛋白酶消化液 Trypsin EDTA Solution A (0.25% 胰酶和 0.02% EDTA) 均为 BI 公司产品, 双抗 (Penicillin 10 000 IU/mL - Streptomycin 10 mg/mL) 为 MP 公司产品。

完全培养基配方为: 在基础培养基 DMEM/F-12 中添加 20% (体积分数) FBS、1% (体积分数) 的双抗。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 性腺组织处理方法

取实验室暂养的活体大黄鱼于干净的解剖盘中, 先用 75% (体积分数) 酒精喷洒消毒鱼体表面, 防止细菌污染影响后期组织细胞培养, 再用高温灭菌过的解剖工具快速解剖鱼体并取出性腺组织

(卵巢和精巢), 将性腺组织放入含 1% (体积分数) 双抗的预冷 PBS 溶液中。接着, 移入提前灭菌处理的超净工作台上, 用镊子和手术刀剥去除卵巢或精巢组织中的生殖细胞后, 将组织置于含 1% 双抗的 PBS 溶液中, 以 600 g 低速离心收集组织, 除去液体, 用 PBS 溶液重悬后重复离心洗涤至少 3 次。

1.2.2 原代细胞培养方法

将洗涤后的组织取出放置在干净的培养皿中, 加入少许含 1% 双抗的 HBSS 并保持组织湿润。先用手术刀去除血液等杂物, 再用两把手术刀交叉切割将组织切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小块。随后用 HBSS 低速离心洗涤 2 次, 取出一些小块组织放入 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中, 使其均匀铺满瓶底, 待组织贴壁后, 轻轻将培养瓶翻转过来, 将适量培养液加到非细胞生长面上, 注意翻瓶时勿令组织小块流动, 然后将细胞瓶倒置放在 27 ℃ 培养箱中密闭培养 18 ~ 24 h。

从培养箱中取出细胞培养瓶, 46°斜持培养瓶, 向瓶内轻轻注入 5 mL 完全培养液, 然后缓缓把培养瓶翻转过来, 让培养液慢慢覆盖附于瓶底的组织小块, 置温箱中静止培养。此后每 2 ~ 3 d 更换 80% 培养液, 继续培养。

从加入培养基开始每天于倒置显微镜下观察和记录细胞的迁出和生长状况。

1.2.3 传代细胞培养方法

弃旧培养基, 用 1 mL PBS 缓冲液洗涤细胞后弃掉 PBS, 加入 1 mL 0.25% (体积分数) 的胰蛋白酶消化液, 消化大约 5 min 至细胞开始脱落, 弃掉胰蛋白酶后立即加入 3 mL 完全培养基终止消化。用移液管吹打 10 次左右, 平均接种到 3 个新的细胞培养瓶中, 补充完全培养基至 5 mL, 放入 27 ℃ 培养箱中继续培养。

2 结果

2.1 大黄鱼卵巢组织原代细胞培养结果

大黄鱼卵巢组织从贴壁后第 4 天开始迁移出的成纤维细胞, 呈多突的纺锤形或三角形细胞; 贴壁后第 6 天上皮细胞开始迁出, 呈多边形, 与成纤维细胞相比生长速度较缓慢; 贴壁后第 8 ~ 14 天成纤维细胞和上皮细胞繁殖旺盛, 成纤维细胞呈辐射状成簇生长且生长速度快, 上皮细胞呈“铺路石”状均匀贴壁生长; 贴壁后第 12 天前期迁出的成纤维细胞出现空泡化; 贴壁后第 14 ~ 16 天空泡化的成纤维细胞脱落, 上皮细胞生长状态良好; 贴壁后第 17 ~ 19 天成纤维细胞和上皮细胞出现贴壁抑制现象, 生长变缓慢 (见图 1)。

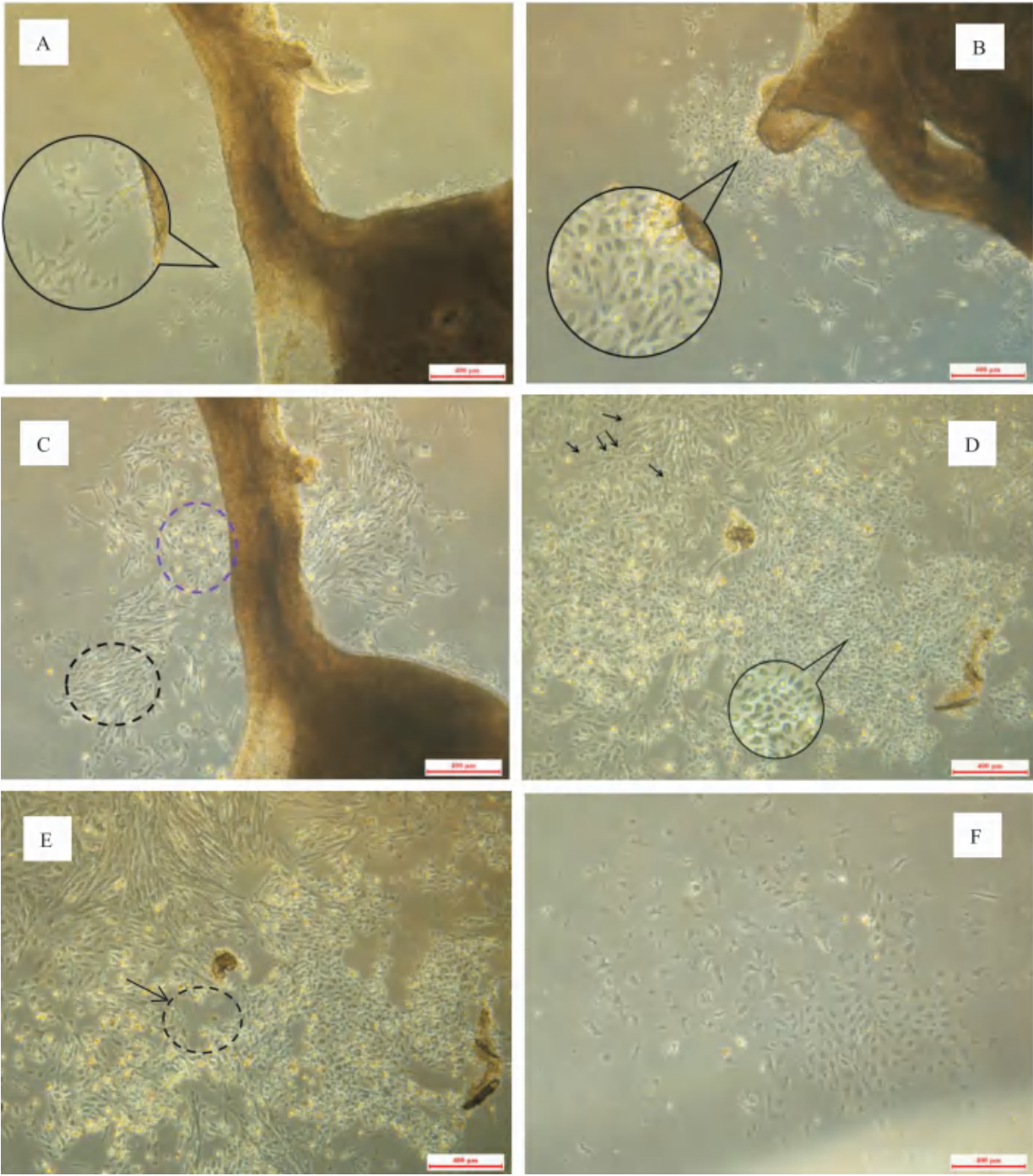
2.2 大黄鱼精巢组织原代细胞培养结果

大黄鱼精巢组织从贴壁后第 5 天开始迁出的成纤维细胞, 呈长梭形、多角纺锤形, 细胞较大, 缓慢增殖; 贴壁后第 7 天迁出的成纤维细胞开始成簇生长, 细胞紧密呈长梭形; 贴壁后第 12 天成纤维细胞生长较快, 少部分成纤维细胞开始出现空泡化, 接下来一两天空泡化细胞会逐渐死亡、脱落; 贴壁后第 9 ~ 17 天成纤维细胞繁殖旺盛, 排列紧凑, 大部分呈长梭形, 涡旋状生长繁殖 (细胞较小), 少部分细胞呈三角形且均匀分布繁殖, 期间两种形态细胞均有小部分细胞死亡脱落; 贴壁后第 18 ~ 19 天细胞紧凑, 繁殖速度逐渐变缓, 部分细胞出现严重空泡化, 细胞变肥大, 边界模糊, 逐渐死亡 (见图 2)。

2.3 传代培养结果

大黄鱼性腺 (卵巢和精巢) 组织在原代细胞培养第 8 天时细胞生长旺盛, 因此使用胰酶消化法进行传代培养。室温状态下胰酶消化 5 min 左右后细胞形态变圆, 缓慢脱落。收集脱落的细胞转至新的培养瓶继续培养。传代培养的第 2 天有部分细胞贴壁, 贴壁的细胞开始分裂增殖。传代培养的第 3 天细胞出现空泡化, 部分细胞变圆脱落, 进行第二次传代。传代后细胞较少数贴壁, 细胞增殖变缓, 形态变化, 生长状态不佳, 之后渐渐死亡。



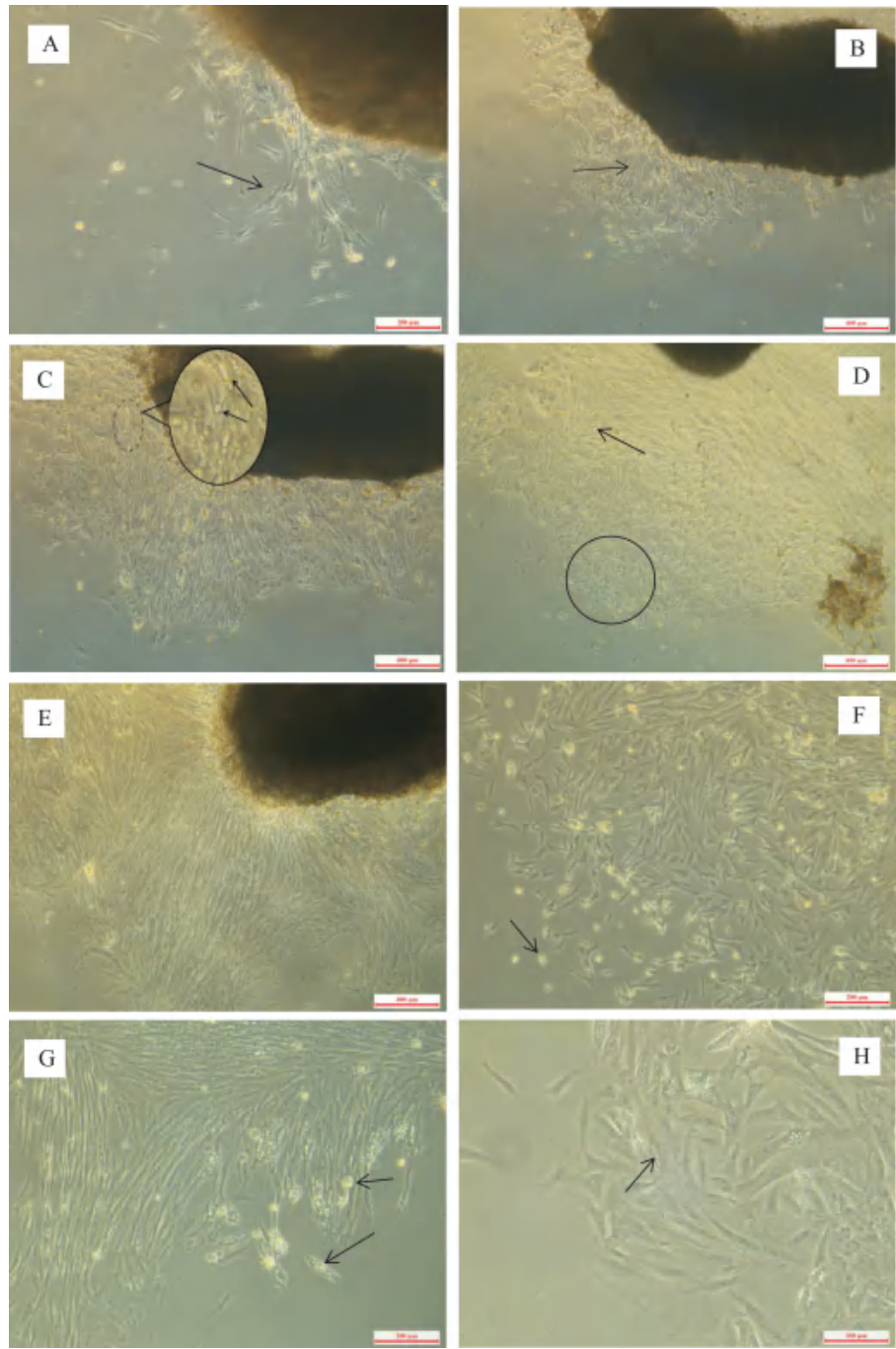


A—贴壁后第 5 天多突纺锤形的成纤维细胞迁出，生长缓慢；B—贴壁后第 10 天多边形方的上皮细胞生长迅速；C—贴壁后第 11 天成纤维细胞和上皮细胞同时存在，分别为黑框和紫框所示；D—贴壁后第 15 天部分成纤维细胞出现箭头所示空泡化，上皮细胞生长良好如框内所示；E—贴壁后第 17 天空泡化的成纤维细胞脱落，上皮细胞出现贴壁抑制现象，部分上皮细胞脱落如框内所示；F—贴壁后第 19 天部分上皮细胞空泡化严重，边界模糊。

A—The multi-spindle-shaped fibroblasts migrated from voary and grew slowly on the 5th day after adherent；B—The multilateral squared-like epithelial cells grew rapidly on the 10th day after adherent；C—Fibroblasts and epithelial cells co-existed on 11th day after adherent；D—On the 15th day after adherent,partial fibroblasts cavitated and epithelial cells grew well；E—On the 17th day after adherent,vacuolated fibroblasts exfoliate,and epithelial cells showed adhesion inhibition,and some epithelial cells fell off；F—Partial epithelial cells were cavitated seriously and the boundary was blurred,on the 19th day after adherent.

图 1 大黄鱼卵巢组织的原代细胞培养结果

Fig.1 Light micrographs of the primary culture cells derived from the ovary tissues of *L. crocea*



A—贴壁后第 6 天长梭形的成纤维细胞迁出;B—贴壁后第 8 天成纤维细胞开始成簇生长;C—贴壁后第 12 天成纤维细胞排列紧凑,部分成纤维细胞出现轻微空泡化如箭头所示;D—贴壁后第 13 天部分成纤维细胞螺旋状成簇生长如箭头所示,部分成纤维细胞均匀排列繁殖如圆框所示;E—贴壁后第 14 天前期空泡化的成纤维细胞脱落,新生细胞繁殖旺盛;F—贴壁后第 16 天部分呈三角形的成纤维细胞空泡化,部分细胞变圆,开始脱落,如箭头所示;G—贴壁后第 17 天部分呈长梭形簇状生长的成纤维细胞出现空泡化,细胞变大,开始变圆脱落如箭头所示;H—贴壁后第 19 天部分成纤维细胞严重空泡化,边界模糊。

A—The long spindle-shaped fibroblasts migrated from testis on the 6th day after adherent;B—Fibroblasts begin to grow in clusters on the 8th day after adherent;C—The fibroblasts were compact and some of them cavitated slightly on 12th day after adherent;D—On the 13th day after adherent, part of fibroblasts grow in spiral clusters and some other fibroblasts propagate in uniform arrangement;E—On the 14th day after adherent,the vacuolated fibroblasts exfoliate,and new fibroblasts proliferate vigorously;F—On the 16th day after adherent,triangular fibroblasts cavitated,and some cells became round and began to shed ;G—On the 16th day after adherent,the long spindle-shaped fibroblasts showed vacuolization and larger,and began to become round and shed ;H—Partial fibroblasts were cavitated seriously and the boundary was blurred,on the 19th day after adherent.

图 2 大黄鱼精巢组织的原代细胞培养结果

Fig.2 Light micrographs of the primary culture cells derived from the testis tissues of *L. crocea*

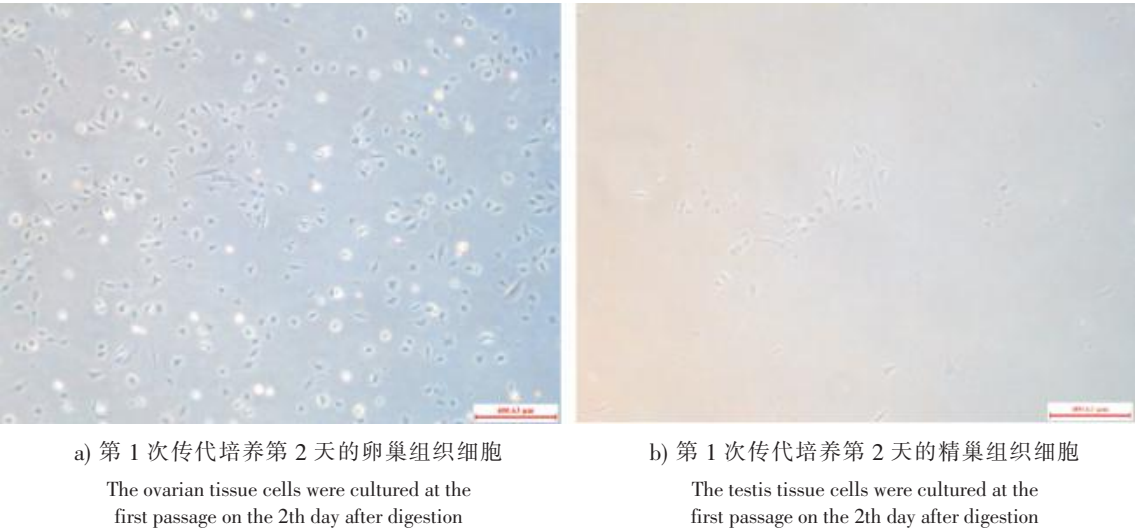


图 3 大黄鱼卵巢和精巢组织的原代细胞传代培养结果

Fig.3 Light micrographs of the primary cells of ovary and testis tissue were subcultured of *L. crocea*

3 讨论

鱼类细胞可在细胞水平上为研究鱼类的免疫学、生化学、遗传学、营养学、分子生物学等提供便利的研究材料<sup>[11]</sup>。世界上第 1 个鱼类性腺组织的细胞系——虹鳟性腺细胞系（RTG-2）由 Wolf 等<sup>[12]</sup>于 1962 年建立。此后，鱼类的细胞系培养发展十分迅速。据 Lakra 等<sup>[13]</sup>的统计，截至 2011 年，世界各地至少已经建立了 283 种鱼类细胞系，但仍未见大黄鱼性腺细胞系建立的相关研究报道。培养大黄鱼性腺原代细胞和建立大黄鱼性腺细胞系应用于大黄鱼性别决定与分化机制的研究，对大黄鱼的性别控制育种有十分重要的作用，对揭示脊椎动物性别决定机制的形成和进化也有重要的意义。

现已有关于大黄鱼性别分化相关基因的研究<sup>[14-15]</sup>，激素调节性别分化的研究<sup>[16]</sup>及性别决定候选基因功能的研究<sup>[17]</sup>等，涉及到的实验包括大黄鱼活体实验，用分子生物学技术进行基因克隆、定量实验，以及在非大黄鱼的模式生物或模式生物的模式生物的细胞系中进行的未涉及到使用大黄鱼性腺细胞进行的实验。而使用培养的细胞作为实验材料比活体实验更经济、便利、有效，且使用同物种的同源细胞可获得准确、稳定、可重复的结果。

组织块贴壁培养法是一种简便易行且成功率较高的原代细胞培养方法，在多种鱼类原代细胞培养中证实有效。经多次实验重复发现：前期组织处理是实验成功的关键，需严格无菌操作，有效防止微生物的污染；在组织处理剪切时应使用锋利的手术刀，采用两把手术刀交叉切割以避免过强的机械压力造成细胞的损伤；对组织反复洗涤和接种，也会对细胞造成一定的损伤，因此不是每个小块都能迁移出细胞；切割过程中防止切块较大的情况，较大的组织块在培养过程中因细胞堆积在一起，无法充分接触培养液，细胞易坏死产生毒素，对组织块活性的维持和细胞的增殖产生负影响；接种时尽量均匀（间距 5 mm）铺满整个瓶底；培养期间翻转和放置培养瓶时要非常注意动作轻巧；更换培养基时也要缓慢吸加，防止组织块脱落飘起；要及时去除漂浮起的组织块或杂质，防止产生有害物质影响细胞生长。

本研究大黄鱼卵巢和精巢组织分别从贴壁后第 4、第 5 天迁移出细胞。早期迁出的均为纺锤形或三角形的成纤维细胞，之后两种组织的成纤维细胞分别以辐射状和涡旋状繁殖生长，培养后期精巢组织的成纤维细胞生长较卵巢组织更旺盛。贴壁后第 6 天卵巢组织迁出“铺石路”状生长的上皮细胞，且培养后期上皮细胞比成纤维细胞生长状态更好。贴壁后第 12 天左右卵巢和精巢的原代细胞均出现部分成纤维细胞空泡化的情况，更换培养基时这些细胞脱落。精巢组织原代细胞培养过程中未见明显



的上皮细胞增殖,但存在两种形态的成纤维细胞:一种形态为长梭形,涡旋状成簇生长,很快形成大片的细胞群,繁殖旺盛;另一种形态多为三角形,排列不紧密,易出现空泡化后死亡的情况。培养至第18天左右,由于细胞排列紧凑,出现较多汇合呈一片的情况,分裂停止,细胞在静止状态维持。

大黄鱼性腺(卵巢和精巢)原代细胞的传代培养选择在细胞生长旺盛时,使用0.25%的胰酶消化法进行传代培养,胰酶消化时间和吹打次数可视具体情况进行调整。此前本研究有尝试在原代细胞培养后3周左右进行传代,由于细胞密度较高导致传代效果不理想,因此,建议原代细胞培养1~2周左右在细胞生长状态良好时进行传代。添加胰酶1 mL,室温消化5 min后吹打,吹至单细胞悬液后转移至新的培养瓶,转移时尽量使用较高的细胞密度,细胞可尽快适应新环境重新贴壁生长。传代细胞可成功传至第二代。原代细胞传代成功即可进行相关实验研究,为大黄鱼体外实验提供理想的实验材料。

本文首次建立了大黄鱼性腺(卵巢和精巢)组织的原代细胞培养技术,为今后大黄鱼性腺细胞系的建立奠定了基础,为大黄鱼性腺特异表达的基因调控研究及性腺组织生理生化研究提供了一个合适的实验材料。

## [ 参考文献 ]

- [1] 朱振乐. 大黄鱼人工育苗技术 [J]. 渔业现代化, 1999, 29(6): 3-5.
- [2] XIAO S, LI J, MA F, et al. Rapid construction of genome map for large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) by the whole-genome mapping in BioNano Genomics Irys system [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 670.
- [3] 樊廷俊, 孙爱, 杨秀霞. 大黄鱼鳍细胞系的建立及久效磷对其毒性作用的研究 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2010, 42(12): 64-70.
- [4] 李文峰. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)体细胞培养及其在病毒研究中的应用 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [5] 于森, 管华诗, 郭华荣, 等. 鱼类细胞培养及其应用 [J]. 海洋科学, 2003, 27(3): 4-8.
- [6] 樊廷俊, 徐晓辉, 姜国建. 条斑星鲷连续性鳍细胞系的建立与鉴定 [J]. 山东大学学报(理学版), 2010, 45(5): 22-27.
- [7] 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.
- [8] 孙爱. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)三种组织细胞系的建立、鉴定及其应用的初步研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
- [9] 郑在予, 杨金先, 陈秀霞, 等. 大黄鱼肾脏组织细胞系(YCK)的建立 [J]. 福建农业学报, 2017, 32(10): 1051-1056.
- [10] 庄道华. 欧洲鳗鲡与大黄鱼四种细胞系的建立及其特性研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2013.
- [11] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 2版. 西安: 世界图书出版西安公司, 2007: 68-69.
- [12] WOLF K, QUIMBY M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro* [J]. Science, 1962, 135(3508): 1065-1066.
- [13] 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.
- [14] 林爱强, 谢仰杰, 徐双斌, 等. 大黄鱼 *gsdf* 和 *amh* 基因的克隆及表达分析 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(6): 1-13.
- [15] 陈芸, 周鹏, 张子平, 等. 大黄鱼 *cyp19a/b* 基因的克隆与表达分析 [J]. 集美大学学报(自然科学版), 2015, 20(2): 81-89.
- [16] 朱阳阳, 张梦, 叶坤, 等. 17 $\beta$ -雌二醇对大黄鱼性别分化相关基因表达的影响 [J]. 集美大学学报(自然科学版), 2019, 24(6): 401-408.
- [17] 高玉雪. 大黄鱼性别决定候选基因 *Dmrt1* 功能的初步研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2018.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)