

团头鲂骨组织细胞系的建立及其生物学特性

关柠楠^{1,2}, 兰天¹, 陈宇龙^{1,3}, 刘莉芳^{1,3}, 周芬¹, 高泽霞^{1,2,4*}

(1. 华中农业大学水产学院, 农业部淡水生物繁育重点实验室,
农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 湖北武汉 430070;

2. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430070;

3. 华中农业大学水产养殖国家级实验教学示范中心, 湖北武汉 430070;

4. 池塘健康养殖湖北省工程实验室, 湖北武汉 430070)

摘要: 为研究鱼类骨组织细胞的特征, 实验建立了团头鲂骨组织细胞的体外分离培养方法, 并对其生物学特性进行了鉴定。以3月龄团头鲂尾椎骨及肋骨为实验材料, 利用组织块培养法和胰蛋白消化法分别进行骨组织细胞培养, 确定最佳培养条件: 采用组织块培养法, 28 °C培养, M-199培养基中加入体积分数为20%的胎牛血清、25 ng/mL表皮生长因子EGF和25 ng/mL碱性成纤维生长因子bFGF。细胞生物学特性鉴定结果显示: 细胞碱性磷酸酶、钙化结节茜素红染色及矿化结节von Kossa氏法染色均呈阳性, 表明所培养的细胞具有典型成骨细胞的生物学活性; 鱼骨钙素ELISA试剂盒检测培养细胞中骨钙素含量为997.25 ng/L; 荧光定量PCR结果显示特异性调节成骨细胞分化的转录因子*runx2a*、*runx2b*和*osterix*基因在团头鲂骨组织细胞系中均有表达, 且*runx2b*和*osterix*的表达量显著高于团头鲂肌肉细胞系。利用本方法可获得增殖活性良好, 生长速率快, 且细胞生物学特性稳定的团头鲂骨组织细胞系(MBCs), 为日后鱼类骨组织体外实验研究奠定了基础。

关键词: 团头鲂; 骨组织细胞; 细胞系; 基因表达; 生物学特性

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

细胞系作为一种体外培养系统, 因其成本低、重复性好、条件可精确控制等优点而成为育种相关研究的重要工具。鱼类组织细胞培养开始于20世纪60年代初, Wolf等^[1]建立了世界上第一个鱼类细胞系——虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)生殖腺细胞系, 此后鱼类的细胞培养研究进展迅速, 越来越多的鱼类细胞系被建立。截至2010年, 全世界已报道的鱼类细胞系约有275类, 淡水鱼类约175株。而我国已建立的鱼类细胞系约70多种, 来源的组织主要为肾脏、性腺、肝脏、胚胎、鳍条等^[2-4]。

骨组织细胞主要包括成骨细胞(osteoblast, OB)及骨细胞(osteocyte)等^[5]。成骨细胞是一种结

缔组织细胞, 一般存在于骨小梁的表面及骨膜内侧, 主要介导骨细胞的生成, 并对破骨细胞进行调节, 使骨的生成维持在动态平衡^[6]。骨细胞位于胞外矿物质沉积形成的骨陷窝内, 由成骨细胞分化而来, 是骨组织中机械应力的主要感受器^[7]。鱼类与哺乳动物有许多类似的重要特征, 如器官构造、组织结构、生理生化机制等, 因此近年来部分学者尝试用脊椎动物模型替代哺乳动物进行骨骼系统相关研究^[8]。目前国外已有针对鱼类骨组织细胞培养的报道, 如Vijayakumar等^[8]利用斑马鱼(*Danio rerio*)椎骨、上下颌和鳃弓等组织培养出斑马鱼骨组织细胞; Marques等^[9]以脊柱及鳃弓组织块为材料培养出金头

收稿日期: 2017-03-21 修回日期: 2017-05-05

资助项目: 国家自然科学基金(31472271); 武汉市青年科技晨光计划(2016070204010143); 国家大宗淡水鱼类产业技术体系建设项目(CARS-45-08); 国家级大学生创新创业训练计划(2015308200630)

通信作者: 高泽霞, E-mail: gaozx@mail.hzau.edu.cn

鲷(*Sparus aurata*)的钙化组织细胞;另Rafael等^[10]利用颌部及脊柱培养了大西洋鲑(*Salmo salar*)的骨组织细胞。国内至今还未见鱼类骨组织细胞培养的相关报道。

团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)俗称武昌鱼,隶属于鲤形目(Cypriniformes),鲤科(Cyprinidae),鲃亚科(Culterinae),鲂属(*Megalobrama*),是我国特有的重要草食性经济鱼类之一^[11-12],具有存活率高、生长快、营养价值高和易捕捞的特点。目前关于团头鲂细胞培养方面的研究还较少,仅有团头鲂肌肉、鳍条和心脏细胞系培养的报道^[13]。本实验以团头鲂尾椎及肋骨为材料,探讨其骨组织细胞培养的方法,并利用成骨细胞的生物学特性对细胞进行鉴定。团头鲂骨组织细胞系(*Megalobrama bone cells*, MBCs)的建立为日后鱼类骨组织生长代谢的体外研究提供了一定的材料基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

团头鲂材料取自华中农业大学水产学院团头鲂遗传育种中心(湖北黄冈团风镇白鹤林村),实验过程中对动物的处置符合《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[14]。实验所用M-199培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶、1%Ⅱ型胶原酶、双抗、PBS为Gibco公司产品;表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、人碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)为Peprotech产品;鱼骨钙素ELISA测定试剂盒来自上海双赢生物科技有限公司;碱性磷酸酶(alkaline phosphates, ALP)试剂盒(AS1117),核固红染液来自武汉阿斯本生物技术有限公司;二甲基亚砷(DMSO)、茜素红购于Sigma公司;PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)试剂盒及SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TliRNaseH Plus)试剂盒来自大连宝生物工程有限公司。

1.2 实验方法

团头鲂骨组织细胞的分离培养 实验采用组织块培养法和酶蛋白消化法分别对团头鲂骨组织细胞进行培养。①组织块培养法:3月龄团头鲂暂养24 h,实验前使用0.01%高锰酸钾溶液浸泡20 min。用乌来糖将实验鱼麻醉5 min后,

放入无菌操作台内,使用酒精对鱼体进行消毒。用消毒过的手术刀切去尾鳍,自泄殖孔后方切下整个尾部。镊子小心剥离皮肤后,在解剖镜下剥离尾椎及肋骨周围的肌肉,仅留下最靠近尾椎和肋骨的结缔组织。PBS冲洗组织块3~4次后,用眼科剪将其剪碎至2 mm³小块。将组织块在胎牛血清中润湿后,用镊子将其放入培养瓶,每25 cm²培养瓶约接种20个组织块。放入28 °C培养箱倒置培养3~4 h后,轻轻翻面,使组织块慢慢浸润在M-199培养基(含1%双抗、20% FBS、25 ng/mL EGF、25 ng/mL bFGF)中。同时,设置未添加EGF和bFGF生长因子的实验组,其他实验条件和方法相同。逐日观察2实验组的组织块贴壁情况及细胞生长情况。每2~3 d换液1次,换液量为1/3。②酶蛋白消化法:取材方法同组织块培养法,将组织块切至2 mm³小块后,加入0.25%胰蛋白酶,28 °C振荡消化30 min,1 000 r/min离心10 min,弃上清液;加入0.1%Ⅱ型胶原酶28 °C振荡消化1 h后,加入新鲜培养基终止消化,1 000 r/min离心10 min。加入M-199培养基(含1%双抗、20% FBS、25 ng/mL EGF、25 ng/mL bFGF)重悬后,接种至培养瓶。同时设置未添加EGF和bFGF生长因子的实验组,其他实验条件和方法相同。

团头鲂骨组织细胞的传代培养及细胞系的建立 待原代细胞的汇合度达到70%~80%时开始细胞的消化传代,采用0.25%胰蛋白酶消化1 min后,加入新鲜培养基终止消化;1 000 r/min离心5 min后重悬,1:1接种于2个新的培养瓶中继续培养,M-199培养基中含1%双抗、10% FBS、25 ng/mL EGF和25 ng/mL bFGF。

团头鲂骨组织细胞的保存 配制含20%二甲基亚砷(DMSO)、20%FBS和60% M-199的细胞冻存液。取10代后生长旺盛的细胞,胰蛋白酶消化重悬后,加入2 mL新鲜培养液,向其中加入细胞冻存液,自下而上轻轻吹打均匀后转移至冻存管中。将冻存管放入盛有异丙醇的降温盒后立即置于-80 °C,24 h后,将装有细胞的冻存管转移到液氮内。

团头鲂骨组织细胞染色体分析 取第10代团头鲂骨组织细胞,传代2 d后,更换5 mL新鲜培养液,加入0.1 mL秋水仙素(1 μg/mL)培养12~15 h,胰蛋白酶消化重悬后,参照祝冬梅^[13]的方法进行染色体制片,高倍显微镜下观察并统

计染色体数目, 并参照Levan等^[15]的分类标准进行染色体核型分析。

团头鲂骨组织细胞的鉴定 ①细胞培养后, 每日用倒置相差显微镜(Nikon, TS100)观察其形态及生长情况, 并拍照。

②Giemsa染色: 待第2代细胞汇合度达到80%左右时, 接种到6孔细胞培养板内, 每孔接种2 mL; 待细胞汇合度达到80%时, PBS (pH=7.4)洗3次, 甲醇固定10 min; Giemsa试剂染色3 min, 蒸馏水冲洗3次, 常温晾干。

③碱性磷酸酶检测: 第2代细胞接种于6孔细胞培养板, 使用碱性磷酸酶试剂盒进行检测。

④茜素红钙化结节染色: 细胞接种方法同上, PBS洗3次; 体积分数95%的乙醇固定30 min, 蒸馏水冲洗3次; 0.1%茜素红染色, 28 °C, 30 min。用蒸馏水冲洗后晾干。

⑤von Kossa氏矿化结节染色法: 细胞接种方法同上, 4%多聚甲醛固定标本, PBS洗涤3次; 5%硝酸银溶液避光孵育45 min后, 日光曝晒15 min, 蒸馏水洗涤; 核固红染液染色5 min, 蒸馏水冲洗, 晾干后观察。待培养板干燥后, 在倒置显微镜下观察染色结果并拍照保存。

⑥鱼骨钙素(OT)水平检测: 利用机械法(反复冻融)破坏第5代骨组织细胞, 释放细胞内成分。使用鱼骨钙素ELISA试剂盒对实验细胞骨钙素含量进行测定。抗体—抗原—酶标抗体复合物使底物显色后, 使用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度, 通过标准曲线即可计算得到样品中鱼骨钙素浓度。

runx2a、*runx2b*和*osterix*基因的表达分析

①总RNA的提取: 取汇合度达到80%的第5代骨

组织细胞, PBS洗涤2次后, 每个25 cm²培养瓶内加入1 mL Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA), 混匀后室温静置5 min; 用枪吹打细胞直至细胞完全裂解, 转移至EP管, 加入0.2 mL氯仿, 静置10 min; 4 °C下12 000 r/min离心15 min; 吸取上层溶液至新EP管中, 加入0.5 mL异丙醇, 在室温下静置10 min, 于4 °C下12 000 r/min离心10 min; 弃上清液, 加入1 mL 75%预冷乙醇漂洗2次, 4 °C下12 000 r/min离心5 min, 弃上清液; 开盖室温下自然干燥10~20 min, 加入20 μL RNase Free Water溶解; 使用NanoDrop 2000(Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)对溶解后的RNA浓度进行测定, 同时用1%的琼脂糖检测RNA的完整性。为了验证团头鲂活体骨组织与体外培养骨组织细胞基因表达的一致性, 利用Trizol抽提法提取团头鲂活体骨组织RNA。此外, 采用与骨组织细胞相同的方法提取实验室已经培养获得的团头鲂肌肉细胞总RNA。

②反转录及定量分析: 用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser反转录试剂盒对RNA进行转录。以β-actin为内参, 基于团头鲂*runx2a*、*runx2b*和*osterix* 3个基因的cDNA序列, 利用Primer Premier 5.0设计其定量引物, 由武汉昆泰瑞公司合成(表1)。半定量PCR扩增条件为94 °C预变性5 min, 94 °C变性20 s, *runx2a*、*runx2b*和*osterix*的退火温度分别为60、52和60 °C, 72 °C延伸30 s, 循环40次, 每组设置2个平行。每个样品2 μL用于琼脂糖电泳检测, 根据条带亮度初步判断表达量。荧光定量PCR使用SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNaseH Plus)试剂盒, 以团头鲂活体骨组织、骨组织细胞及肌肉细胞样品为模板,

表1 本实验所用PCR引物

Tab. 1 PCR primers in this study

引物名称 primer name	PCR引物序列(5'-3') primer sequences	退火温度/°C annealing temperature	扩增片段长度/bp amplified length
<i>runx2a</i> -F	GTTGTGGCTCTGGGAGATGTT	60	247
<i>runx2a</i> -R	GTCCGTCCACTGTGACCTTT		
<i>runx2b</i> -F	AGGAATGCCTCAGGGGTTATG	52	124
<i>runx2b</i> -R	CTTGCGGTGGGTTTGTGAAT		
<i>osterix</i> -F	GCACCCCTATGGCTCATGGT	60	214
<i>osterix</i> -R	AGGCGTGAAATCGGGAGTGT		
β-actin-F	CGTGCTGTTTTCCCTTCCATT	60	204
β-actin-R	CAATACCGTGCTCAAAGGATACTT		

PCR反应总体积20 μL ，包括10 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II，正反向引物各0.8 μL ，ddH₂O 6 μL ，0.4 μL ROX Reference Dye II，cDNA模板2 μL 。反应程序为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s，94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s，60 $^{\circ}\text{C}$ (*β -actin*)/60 $^{\circ}\text{C}$ (*runx2a*)/52 $^{\circ}\text{C}$ (*runx2b*)/60 $^{\circ}\text{C}$ (*osterix*)条件下退火30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s，QuantStudio[™]6 Flex荧光定量PCR系统(Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)中进行40个循环。在每一循环延伸温度时收集荧光进行实时监测。采用双标准曲线的方法进行计算，利用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[16]，得到目的基因在团头鲂骨组织细胞、肌肉细胞及活体骨组织内的相对表达量。使用SPSS软件中的独立样本 t 检验来比较各基因在不同细胞或组织中相对表达水平的显著差异性($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 团头鲂骨组织细胞原代培养及传代培养细胞观察

原代培养约4 d后，加入生长因子的实验组组织块周围开始有细胞迁出，细胞多成梭形及多角形，8 d左右出现生长晕(图1-a)。传代后，细胞增殖速率较快，约20 d后汇合度达到80%(图1-b)；而未加入生长因子的实验组20 d后仍无细胞迁出。采用酶消化法分离培养骨组织细胞，0.1% II型胶原酶消化后离心，未见明显细胞沉淀，接种培养瓶2 d后仍无贴壁细胞。

2.2 团头鲂骨组织细胞系染色体分析

秋水仙素处理后，第10代骨组织细胞染色

体制片后对染色体进行计数，骨组织细胞中期分裂相的染色体数目 $2n=48$ (图2-a)，与已报道的团头鲂体细胞染色体数目 $2n=48$ 相符^[13]。染色体核型分析结果显示，团头鲂骨组织细胞48条染色体中有13对中部着丝粒染色体(m)，9对亚中部着丝粒染色体(sm)及2对亚端部着丝粒染色体(st)，核型公式为 $2n=26m+18sm+4st$ (图2-b)，符合团头鲂的染色体特征^[13]。

2.3 团头鲂骨组织细胞系生物学鉴定

Giemsa染色结果显示团头鲂骨组织细胞多成梭形，细胞核被染成深蓝色，核仁明显，位于细胞中央(图3-a)。碱性磷酸酶染色后，可见阳性细胞胞浆内有棕色沉淀(图3-b)。茜素红钙化结节染色结果表明骨组织细胞连续培养后，可聚成灶状形成钙化结节，茜素红将结节染为红色(图3-c)。von Kossa氏矿化结节染色骨组织细胞后，有大量的矿化结节生成，且结节成黑色沉淀(图3-d)。鱼骨钙素ELISA检测分析中，根据酶标仪在450 nm波长下测定样品吸光度后，制作标准曲线，根据标准曲线测定出细胞样品中鱼骨钙素浓度平均值为997.25 ng/L。

2.4 基因表达分析

经琼脂糖半定量检测，*runx2a*、*runx2b*及*osterix*在骨组织细胞中均有表达，且琼脂糖电泳条带明亮(图4)。Real-time PCR结果显示，3个基因中，*runx2a*的表达量最高，*runx2b*及*osterix*次之。与活体团头鲂骨组织相比，骨组织细胞内3个基因的表达均显著低于活体条件下。与团头鲂肌

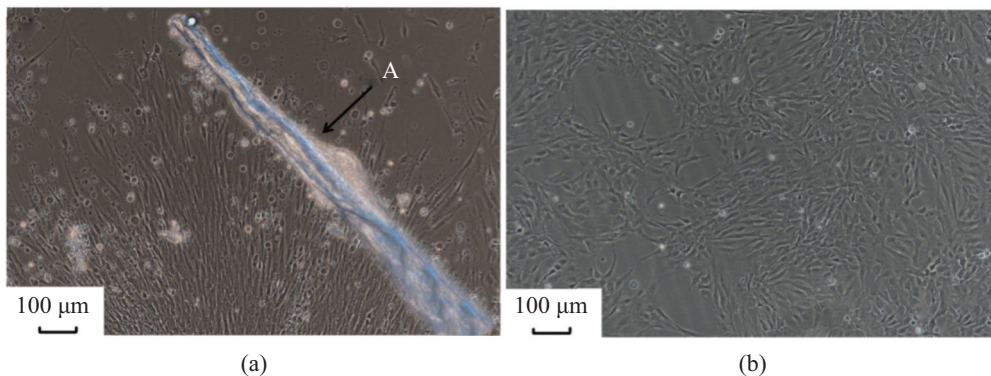


图1 团头鲂骨组织细胞原代培养及传代培养

(a) 生长8 d后的团头鲂骨组织细胞($\times 100$)，开始出现生长晕，A. 肋骨；(b) 团头鲂骨组织细胞传代20 d后，细胞汇合度可达到80%($\times 100$)

Fig. 1 *M. amblycephala* bone cells primary culture and subculture

(a) the bone cells were obtained after 8 days that began to display growth halo ($\times 100$) and A indicates rib; (b) bone cells were passaged for 20 days and cell convergence could reach 80% ($\times 100$)

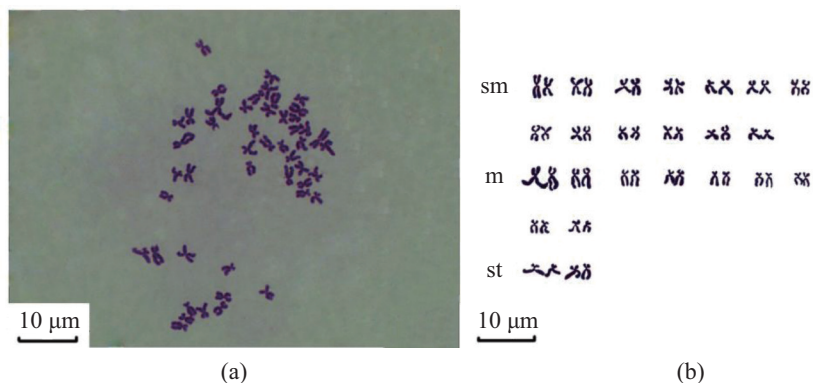


图 2 第10代团头鲂骨组织细胞正常染色体中期分裂相和染色体模型($\times 1000$)

(a) 团头鲂骨组织细胞正常染色体中期分裂相; (b) 团头鲂骨组织细胞染色体模型

Fig. 2 Chromosome metaphase and karyotype of *M. amblycephala* bone cells at 10th passage ($\times 1000$)

(a) chromosome metaphase of *M. amblycephala* bone cells; (b) chromosome karyotype of *M. amblycephala* bone cells

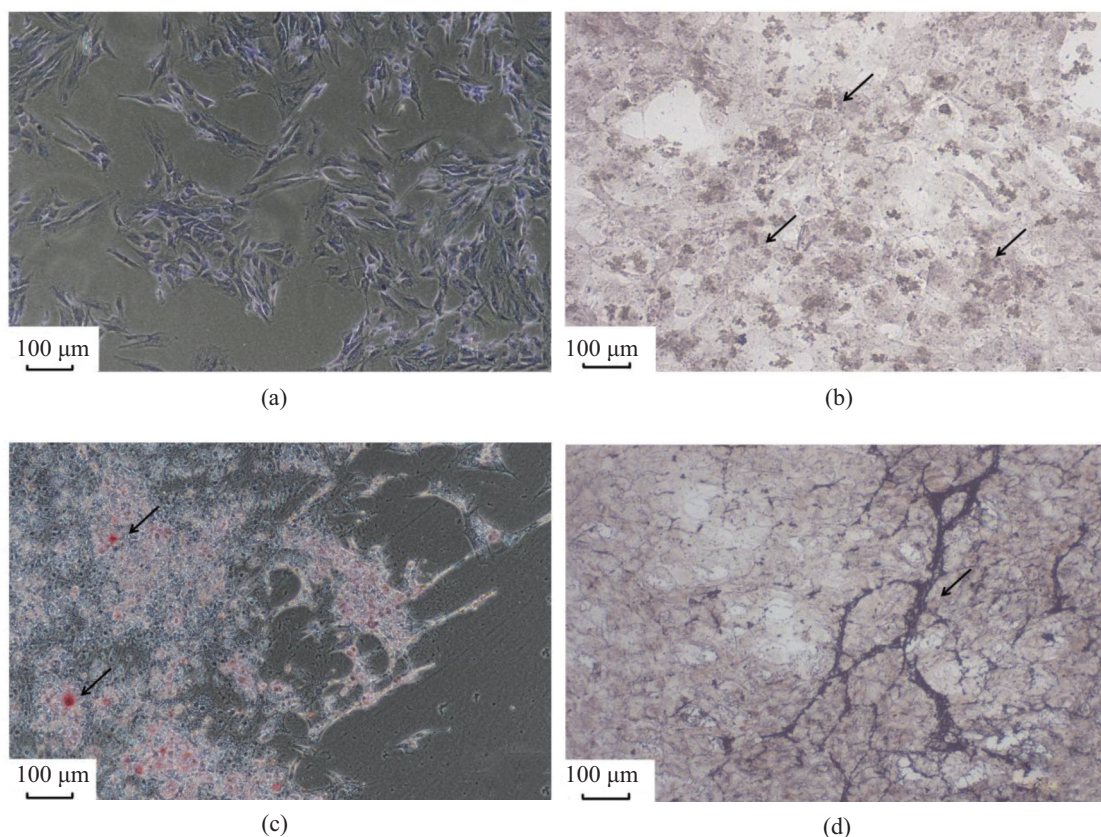


图 3 第3代团头鲂骨组织细胞生物学鉴定

(a) 骨组织细胞Giemsa染色($\times 100$); (b) 骨组织细胞ALP染色($\times 100$); (c) 骨组织细胞茜素红染色($\times 100$); (d) 骨组织细胞von Kossa氏染色($\times 100$)。图中黑色箭头所指为染色阳性区域

Fig. 3 Biological identification of bone cells from third passage

(a) Giemsa staining ($\times 100$); (b) alkaline phosphatase staining ($\times 100$); (c) alizarin red staining ($\times 100$); (d) von Kossa's staining ($\times 100$). The black arrow in the figure marked the positive region

肉细胞相比, 骨组织细胞中 $runx2b$ 和 $osterix$ 基因的相对表达量显著高于肌肉细胞($P < 0.05$), $runx-2a$ 基因则没有显著性差异($P > 0.05$, 图5)。

3 讨论

鱼类骨组织细胞的培养对于研究鱼类骨组

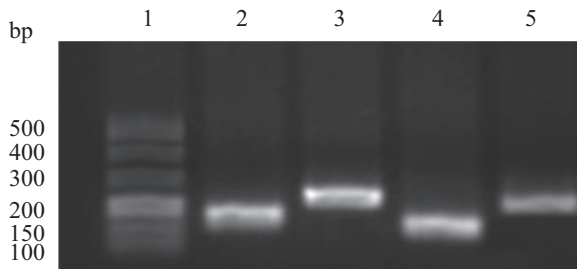


图4 基因扩增后电泳图

1. Marker; 2. β -actin; 3. *runx2a*; 4. *runx2b*; 5. *osterix*

Fig. 4 The electropherogram of PCR amplifications for the genes

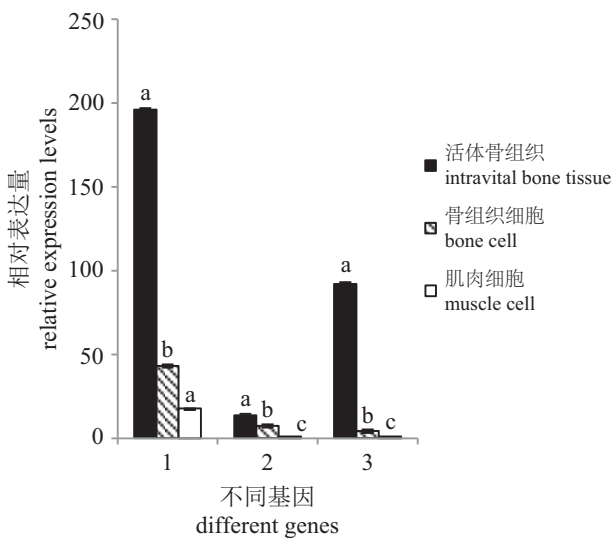


图5 基因在团头鲂骨组织和肌肉细胞系及活体骨组织中的相对表达量

1、2和3分别代表*runx2a*、*runx2b*和*osterix*基因。同一基因不同组织上标不同字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)

Fig. 5 The relative expression of genes in bone cells, muscle cells and intravital bone tissue of *M. amblycephala*

1. *runx2a*; 2. *runx2b*; 3. *osterix*. Different letters represent significant differences for each gene ($P < 0.05$)

织的生成和生长具有重要作用。对于不同年龄、种类、组织器官生理结构的鱼类，其取样方法，细胞培养条件也有所不同。组织块培养法操作简单、快速、效率高，组织块为细胞的迁出提供了良好的生长条件，并且使细胞贴壁更加稳定，可更快地长出单层细胞^[17]。而酶消化法则可以分离出大量的单个细胞，但其应用则受到组织限制。例如肝脏等组织使用酶消化法时，分离成单个的肝细胞易失去细胞外基质和体液调节作用，失去肝脏的特异性功能，从而

导致细胞无法贴壁，失去增殖能力^[18]。本实验中，采用组织块培养法和酶蛋白消化法分别在有无生长因子的条件下培养团头鲂骨组织细胞。结果表明，胰蛋白酶及胶原酶Ⅱ无法降解组织块细胞间结合处的蛋白从而无法分离出单个骨组织细胞，推测这种结果可能与组织块的类型有着密切的关系。另外，未加生长因子时，组织块培养法和酶蛋白消化法进行原代培养均无细胞生长，由此推测，生长因子为团头鲂骨组织细胞的增殖所必须。Zellin^[19]已证明bFGF可以刺激用以修复骨缺损的自体骨移植块的生长，有利于新骨的形成和血管的再生。另外，研究学者最早发现EGF的活性是刺激新生小鼠牙齿的萌生，其对成骨细胞的分化作用可能存在二重性，在促进早期前成骨细胞分化的同时也可以抑制成骨细胞的成熟^[20-21]。

团头鲂骨组织细胞在倒置显微镜下呈梭形或多角形，其形状与现已报道的小鼠成骨细胞形态相近^[22-23]，染色体模型与现公布的团头鲂染色体特征相符^[13]。现有研究表明骨组织细胞的主要成分为骨细胞及成骨细胞，而骨细胞由成骨细胞直接分化而来^[23]，因此本研究中骨组织细胞主要基于成骨细胞的特性进行生物学鉴定。在成骨细胞分化早期，碱性磷酸酶开始表达，细胞外基质逐渐成熟^[24]，待成骨细胞进入成熟期后，细胞钙化开始发生^[25]，当成骨细胞分化晚期细胞进入矿化期时，细胞内ALP含量下降，此时细胞内骨钙素、骨桥蛋白表达达到高峰^[22]。因此这些特征都成为检验成骨细胞生物学特性的主要特征。本实验培养出的团头鲂骨组织细胞的细胞生物学特性鉴定结果显示其细胞碱性磷酸酶、钙化结节茜素红染色及矿化结节von Kossa氏法染色均呈阳性，表明所培养的细胞具有典型成骨细胞的生物学活性。骨钙素是成骨细胞合成并分泌的一种非胶原蛋白，具有骨代谢调节剂的作用，虽不促进骨的生长，但在骨代谢中起重要作用^[26]。由于其特异性为成骨细胞所分泌，因此可作为鉴定成骨细胞的参考量。一般鱼类体内骨钙素含量为35~1 400 ng/L，小鼠体内为1 000~3 992 ng/L，本研究所测定的团头鲂骨组织细胞中骨钙素含量(997.25 ng/L)在鱼类所在范围，已有研究表明骨钙素含量与不同生物体、年龄大小及含骨量有着一定关系^[27]。

*Runx2*是*runt*结构域基因家族成员之一。

Ducy等^[28]研究发现, *runx2*基因与成骨细胞特异顺式作用元件(osteoblast specific cis-acting elements, OSE)结合后, 能够激活骨钙蛋白(osteocalcin, OC)、骨桥素(osteopontin, OPN)、骨涎蛋白(bone sialoprotein, BSP)和 I 型胶原基因的转录和表达。目前研究认为, *runx2*是间充质干细胞向成骨细胞分化的特异性转录调节因子^[29]。2002年 Nakashima等^[30]在 小鼠体内新发现了转录因子 *osterix*, 它是目前所发现的调节成骨细胞分化的重要转录因子之一, 缺失时会直接导致骨形成能力的完全丧失, 其位于成骨细胞分化路径中 *runx2*的下游, 调控成骨细胞的生成。定量结果显示, 在团头鲂骨组织细胞中, *runx2a*的表达最为丰富, *runx2b*及 *osterix*次之, 且 *runx2b*和 *osterix*在团头鲂骨组织细胞中的表达量显著高于肌肉细胞, 此结果表明本方法所培养的团头鲂骨组织细胞具有较高的纯度。另外本实验中3个基因在活体水平表达量均显著高于体外细胞水平。实验中所用团头鲂为幼龄鱼, 处于快速生长代谢阶段, 因此3个基因表达较高。另外, 在活体状态下, 组织内细胞的生长受到多个通路、多种激素及生长因子的调节, 而在体外虽补充有 bFGF和 EGF外源调节因子, 但尚不能弥补与体内环境的差异, 这也可能是基因表达具有较大差异的原因^[31]。

骨骼是鱼类支持身体、保护柔软器官的主要构造, 它配合骨肉产生动作, 协助鱼体完成各种形式的运动。本实验通过组织块培养法培养出了纯度较高的团头鲂骨组织细胞, 且增殖能力强、生物学特性稳定, 为日后鱼类骨骼发育研究的体外实验提供了良好的研究模型。

参考文献:

- [1] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*[J]. Science, 1962, 135(3508): 1065-1066.
- [2] Zhou G Z, Gui L, Li Z Q, *et al.* Establishment of a Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* tail-fin cell line and its susceptibility to frog iridovirus[J]. Journal of Fish Biology, 2008, 73(8): 2058-2067.
- [3] 孟凡华, 尹洪滨, 孙中武, 等. 鲤鱼(*Cyprinus carpio*)体细胞系的建立及其生物学特性分析(简报)[J]. 实验生物学报, 2005, 38(1): 80-84.
- Meng F H, Yin H B, Sun Z W, *et al.* Construction and characteristics analysis of somatic cell lines from common carp *Cyprinus carpio*[J]. Acta Biologiae Experimentalis Sinica, 2005, 38(1): 80-84(in Chinese).
- [4] 张铭, 陈荔红, 赵小立. 淡水白鲢细胞建系及其生长温度特性的研究[J]. 生物工程学报, 2001, 17(1): 105-108.
- Zhang M, Chen S H, Zhao X L. The establishment of four cell lines from *Colossoma brachypomum* and their growth characteristics under various temperatures[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2001, 17(1): 105-108(in Chinese).
- [5] 傅淑平, 蔡宇. 成骨细胞在破骨细胞性骨吸收中的调节作用[J]. 陕西医学杂志, 2004, 33(11): 1040-1041.
- Fu S P, Cai Y. Regulatory effects of osteoblasts on osteoclastic bone resorption[J]. Shaanxi Medical Journal, 2004, 33(11): 1040-1041(in Chinese).
- [6] Parfitt A M. Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: Implications for the understanding of osteoporosis[J]. Osteoporosis, 2008, 90(6): 71-89.
- [7] 霍波, 郭向东, 龙勉. 骨细胞网络中力致钙信号响应与传递的理论模型与数值分析[C]//2009中国力学学会学术大会. 郑州: 中国力学学会, 2009.
- Huo B, Guo X D, Long M. Theoretical model and numerical analysis of calcium signal response and transmission in bone cell networks[C]//Chinese Conference Applied Mechanics Proceedings. Zhengzhou: Chinese Society of Mechanics, 2009 (in Chinese).
- [8] Vijayakumar P, Laizé V, Cardeira J, *et al.* Development of an *in vitro* cell system from zebrafish suitable to study bone cell differentiation and extracellular matrix mineralization[J]. Zebrafish, 2013, 10(4): 500-509.
- [9] Marques C L, Rafael M S, Cancela M L, *et al.* Establishment of primary cell cultures from fish calcified tissues[J]. Cytotechnology, 2007, 55(1): 9-13.
- [10] Rafael M S, Marques C L, Parameswaran V, *et al.* Fish bone-derived cell lines: an alternative *in vitro* cell system to study bone biology[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2010, 26(2): 230-234.
- [11] 高泽霞, 王卫民, 蒋恩明, 等. 团头鲂种质资源及遗传改良研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(3): 138-144.
- Gao Z X, Wang W M, Jiang E M, *et al.* Research advances on germplasm resources and genetic improvement of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(3): 138-144(in Chinese).

- [12] 王为民. 团头鲂养殖产业现状[J]. 科学养鱼, 2009(4): 44-45.
Wang W M. Present situation of aquaculture industry of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)[J]. Scientific Fish Farming, 2009(4): 44-45(in Chinese).
- [13] 祝冬梅. 团头鲂三种细胞系的建立、鉴定及其初步应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
Zhu D M. Establishment and characterization of three cell lines from blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*, and their preliminary applications studies[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013(in Chinese).
- [14] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见[OL]. 2006-09-30[2008-04-20]. http://www.most.gov.cn/fggw/zfwj/zfwj2006/200609/t20060930_54389.htm.
The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals [OL]. 2006-09-30[2008-04-20]. http://www.most.gov.cn/fggw/zfwj/zfwj2006/200609/t20060930_54389.htm(in Chinese).
- [15] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220.
- [16] 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.
- [17] 肖艺, 曾令兵, 徐进, 等. 锦鲤鳍条组织细胞系的建立及其生物学特性[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(8): 767-774.
Xiao Y, Zeng L B, Xu J, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from fin of *Cryprinus carpioid*[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2012, 34(8): 767-774(in Chinese).
- [18] 梁岳, 马广智, 方展强. 剑尾鱼肝细胞原代培养[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(3): 185-187.
Liang Y, Ma G Z, Fang Z Q. Primary culture of sword-tail fish (*Xiphophorus helleri*) hepatocytes[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2006, 16(3): 185-187(in Chinese).
- [19] Zellin G. Growth factors and bone regeneration: Implications of barrier membranes[J]. Swedish Dental Journal Supplement, 1998, 129: 7-65.
- [20] Nishimura R, Harris E, Imamura K, *et al.* Expression of transcription factor Cbfa1 is enhanced by the BMP-2/SMAD signal transduction cascade in pluripotent mesenchymal cells[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 1998, 23: S150.
- [21] St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon A P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation[J]. Gene & Development, 1999, 13(16): 2072-2086.
- [22] 韩云珍. 大鼠成骨细胞分离培养及其生物学特性鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2008.
Han Y Z. Isolated culture and identification about biometrics in rat osteoblast[D]. Fuzhou: Fujian Agricultural and Forestry University, 2008 (in Chinese).
- [23] 谢艳芳, 陈克明, 马小妮, 等. 大鼠颅骨成骨细胞和骨细胞的分离纯化与比较研究[J]. 解放军医药杂志, 2015, 27(3): 1-5.
Xie Y F, Chen K M, Ma X N, *et al.* Isolation and identification and comparative study of calvarial osteoblasts and osteocytes of rats[J]. Medical & Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2015, 27(3): 1-5(in Chinese).
- [24] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995: 202-206.
E Z. Tissue culture and molecular cytology[M]. Beijing: Beijing Publishing House, 1995: 202-206(in Chinese).
- [25] 尹美珍, 李世普, 刘琴. 成骨细胞的数量对外钙化结节形成的影响[J]. 解剖学杂志, 2008, 31(2): 257-258.
Yin M Z, Li S P, Liu Q. Effect of the number of osteoblasts on the formation of calcified nodules *in vitro*[J]. Chinese Journal of Anatomy, 2008, 31(2): 257-258(in Chinese).
- [26] 孟昭亨. 骨钙素及其临床意义[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1992, 8(1): 41-44.
Meng Z H. Osteocalcin and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 1992, 8(1): 41-44(in Chinese).
- [27] 姜利华, 张瑾, 韩翠华, 等. 不同年龄段的血清骨钙素含量检测的临床意义[J]. 放射免疫学杂志, 2006, 19(2): 93-95.
Jiang L H, Zhang J, Han C H, *et al.* Clinical significance of changes of serum osteocalcin(BGP) levels in subjects of different age-groups[J]. Journal of Radioimmunology, 2006, 19(2): 93-95(in Chinese).

- [28] Ducy P, Starbuck M, Priemel M, *et al.* A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development[J]. *Gene & Development*, 1999, 13: 1025-1036.
- [29] 徐道志. 成骨细胞分化与骨骼发育的转录因子Cbfal/Runx2[J]. *中医正骨*, 2006, 18(11): 61-63.
Xu D Z. Osteoblast differentiation and bone development of the transcription factor Cbfal/Runx2[J]. *The Journal of Traditional Chinese Orthopedics and Traumatology*, 2006, 18(11): 61-63(in Chinese).
- [30] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation[J]. *Cell*, 2002, 108(1): 17-29.
- [31] 陈杨林. 不同体外培养条件对小鼠早期胚胎发育及外胚层多能干细胞建立的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2015.
Chen Y L. Effect of *in vitro* culture conditions on early development and epiblaststem cell isolation of mouse embryos[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2015 (in Chinese).

Establishment and characterization of bone cell line for blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*)

GUAN Ningnan^{1,2}, LAN Tian¹, CHEN Yulong^{1,3}, LIU Lifang^{1,3}, ZHOU Fen¹, GAO Zexia^{1,2,4*}

(1. Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding of Ministry of Agriculture, College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

4. Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to study the characteristics of fish bone cells, methods for isolating and culturing bone cells from caudal vertebrae and rib of blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* were explored in the present study, and the biological characters of bone cells were identified. The bone cells were cultured with tissue culture and trypsin digestion respectively by using 3-month-old *M. amblycephala* caudal vertebrae and ribs from tail part. The optimal conditions were as follows: 25 ng/mL epidermal growth factor (EGF) and 25 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) were added to the M-199 medium at 28 °C using tissue culture. The results of cell biology identification showed that the cultured cells had the biological activity of typical osteoblasts, with alkaline phosphatase staining, calcium nodules alizarin red staining and mineralized nodules von Kossa staining being positive. The osteocalcin content was 997.25 ng/L in the bone cells tested by the fish bone osteocalcin ELISA kit. The genes of *runx2a*, *runx2b* and *osterix* which regulated osteoblast differentiation, were expressed in bone cells, with the *runx2b* and *osterix* expression levels significantly higher than that in muscle cells. Results indicated that bone cells of fish have good proliferation and faster growth rate as well as stable cell biological characteristics, which is suitable for related studies *in vitro*.

Key words: *Megalobrama amblycephala*; bone cells; cell line; gene expression; biological characterization

Corresponding author: GAO Zexia. E-mail: gaozx@mail.hzau.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31472271); Wuhan Youth Science and Technology Plan (2016070204010143); Modern Agriculture Industry Technology System Construction Projects of China Titled as-Staple Freshwater Fishes Industry Technology System (CARS-45-08); National Undergraduate Innovation and Entrepreneurship Training Program (2015308200630)