

## 大泷六线鱼三种组织细胞的有限传代及其生物学特性分析

李霞\*, 郭莹, 秦艳杰, 姜志强

(大连海洋大学辽宁省海洋生物资源与生境恢复重点实验室, 辽宁 大连 116023)

**摘要:** 采用组织块培养法启动大泷六线鱼鳍、吻端和肾脏 3 种组织细胞的原代培养, 并稳定传代培养 30 代、31 代和 35 代。结果发现, 用透明质酸酶和 II 型胶原酶联合消化鳍和吻端组织后细胞分散效果更好。培养于添加 5 ng/mL 人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、20  $\mu$ g/mL 硫酸软骨素、40 ng/mL I 型胰岛素样生长因子 (IGF-I) 及 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 (pH 7.2) 中的 3 种组织细胞生长分裂旺盛, 均为成纤维样细胞。在此条件下第 20 代的鳍、吻端、肾脏组织细胞群体倍增时间分别为 58.7, 50.4 和 32.9 h。第 25 代大泷六线鱼 3 种组织细胞的特征性染色体数目均为 48 条。细胞经液氮冷冻保存 60 d 后, 解冻复苏并经台盼蓝染色, 3 种细胞成活率分别达  $84.59\% \pm 1.07\%$ 、 $85.75\% \pm 1.03\%$  和  $87.39\% \pm 1.05\%$ 。3 种细胞现已保存在中国典型培养物保藏中心。3 种组织细胞体外培养方法的建立为鱼类疾病防治和病理机制研究奠定了基础。

**关键词:** 大泷六线鱼; 有限传代; 生物学特性

**中图分类号:** Q 178.1; S917.4

**文献标志码:** A

大泷六线鱼 (*Hexagrammos otakii*) 又名欧式六线鱼, 隶属于鲷形目 (Scorpaeniformes)、六线鱼科 (Hexagrammidae)<sup>[1]</sup>, 是冷温性底层鱼类, 主要分布于中国山东和辽宁等近海多岩礁海区, 日本、朝鲜等近海也有分布。该鱼肉味鲜美, 营养丰富, 有“北方石斑”之称<sup>[2]</sup>, 是中国重要的经济鱼类, 也是新近开发的人工育苗和养殖的种类。大泷六线鱼的生物学研究目前主要集中在形态、生态、遗传育种等领域<sup>[3-6]</sup>。关于其细胞体外培养研究尚未见报道。

自 20 世纪 60 年代, Wolf 等<sup>[7]</sup>建立了世界上第一个鱼类细胞系——虹鳟生殖腺细胞系以来, 鱼类细胞培养研究进展迅速。到 2011 年, 全世界报道建立的鱼类细胞系 275 株, 其中淡水和溯河洄游性鱼类细胞系 175 株, 海水鱼类的细胞系 100 株<sup>[8]</sup>。鱼类细胞系的建立可为种质资源保护、病毒及疫苗的研究以及环境监测、功能基因的研究等奠定基础。但目前已建立的细胞系尤其是海水鱼类的细胞系远不能满足相关研究的需要, 利用鱼类细

胞进行污染物分析等工作还刚刚开始。本实验建立了大泷六线鱼鳍、吻端、肾脏组织细胞体外培养体系, 分析了 3 种细胞的特性, 一方面为鱼类病毒的分离、鉴定及疫苗研制打下基础, 另一方面作为生物污染指标为环境毒理学研究创造条件。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料和试剂

**材料** 大泷六线鱼购自大连市黑石礁海边鱼市, 全长 160 ~ 220 cm, 体质量为 150 ~ 200 g。

**试剂** L-15 培养基、DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰酶、青霉素-链霉素双抗溶液为 Hyclone 公司产品; 人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、I 型胰岛素样生长因子 (IGF-I)、透明质酸酶、II 型胶原酶为 Peprotech 公司产品; 硫酸软骨素为 Wolsen 公司产品。实验中所用其它化学试剂均为分析纯。

#### 1.2 取材和原代培养

鲜活大泷六线鱼于高双抗消毒海水 (1 000

收稿日期: 2012-08-29 修回日期: 2012-11-20

资助项目: 辽宁省科技厅重大项目 (2008203002)

通信作者: 李霞, E-mail: lx@dlou.edu.cn

IU/mL 青霉素,1 000  $\mu\text{g/mL}$  链霉素)中暂养 16~24 h 后,在超净工作台上取其鳍和吻端组织,分别放入青霉素小瓶中并加入新配置的双抗(100 IU/mL 青霉素,100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素)处理 30 min。将双抗吸出后,用 PBS 和 5% FBS-DMEM/F12 漂洗组织块各 1 次;解剖取肾组织于无菌的青霉素小瓶中,按上述方法漂洗组织块 1 次。用无菌眼科剪刀将组织块剪成 1  $\text{mm}^3$  碎块。参考樊廷俊等<sup>[9]</sup>用 0.5% 透明质酸酶和 0.2% II 型胶原酶联合消化吻端和鳍组织 30 min(肾组织不消化)。最后用 5% FBS-DMEM/F12 培养基充分悬浮组织块并接种于 25  $\text{cm}^2$  培养瓶中。16 h(肾组织 10 h)后,补加培养基每瓶至 5 mL。组织块在 25  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱(5%  $\text{CO}_2$ )中培养,每 2~3 天在 Olympus 倒置显微镜下观察和拍照。

### 1.3 最适培养基的筛选

使用含有 20% FBS 的 L-15、DMEM 和 DMEM/F12 培养基分别于 25  $^{\circ}\text{C}$  下原代培养大泷六线鱼鳍、吻端和肾组织细胞,通过观察组织块在 3 种不同培养基中细胞的贴壁和迁出情况,确定最适培养基。实验设 3 个重复。然后在最适培养基中添加 5  $\text{ng/mL}$  人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、20  $\mu\text{g/mL}$  硫酸软骨素、40  $\text{ng/mL}$  I 型胰岛素样生长因子(IGF-I)及 20% 胎牛血清<sup>[9]</sup>。

### 1.4 细胞的传代培养

大泷六线鱼上述 3 种组织细胞长成单层后,吸出培养瓶中的培养基,加入浓度为 0.25% 的胰蛋白酶溶液 1 mL,消化 60 s,待细胞变圆后,吸去胰蛋白酶溶液,加入含血清的培养基,用吸管吹打细胞,制成细胞悬液;然后接种于两个培养瓶内;在 25  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养。待细胞再次长成单层后,仍按照上述方法进行传代。

### 1.5 细胞冻存与复苏

冻存保护液各组份为 20% FBS,60% DMEM/F12 和 20% DMSO,配制后于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。取已长满瓶生长旺盛的细胞,0.25% 胰酶消化后收获细胞,1 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清液。向细胞沉淀中加入已配置好的 1 mL 冻存保护液,重悬,调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/mL,将细胞悬液转移到无菌冻存管中,并按以下程序降温:4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中放置 30 min、-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱放置 1 h、-80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜,最后放入液氮(-196  $^{\circ}\text{C}$ )中长期保存。把冻存 60 d 的细胞从液氮罐中取出,放入 40

$^{\circ}\text{C}$  水浴中,待细胞冻存液融化后转入 25  $^{\circ}\text{C}$  水浴中。然后无菌条件下将细胞冻存管中细胞悬液转移至 10 mL 离心管中,并加入等量 DMEM/F12 培养液,1 000 r/min 离心 10 min,去上清,收集细胞。用培养液重悬细胞,并转移到细胞培养瓶中,25  $^{\circ}\text{C}$   $\text{CO}_2$  培养箱中培养,12 h 后全量换培养液,继续进行培养。取少许重悬细胞用台盼蓝染色,常规血球计数板法计数,计算成活率。成活率 = 活细胞数/细胞总数。

### 1.6 细胞生长曲线的测定

大泷六线鱼鳍、吻端、肾脏组织细胞分别传代至 20 代时,用 0.25% 胰酶消化法收集细胞,每孔 1 mL 分别接种于 24 孔板中,接种密度不低于  $1.0 \times 10^4$  个/mL,置 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中 25  $^{\circ}\text{C}$  下培养,每隔 24 小时收集 3 个孔中的所有细胞进行计数,采用常规血球计数板法计数,实验周期为 7 d。以培养时间(d)为横坐标,细胞浓度(个/mL)为纵坐标,绘制 3 种细胞的生长曲线。根据公式  $T = t \times \text{Lg}2 / \text{Lg}(N_t / N_0)$  计算细胞的群体倍增时间,其中, $N_0$  为接种细胞数, $N_t$  为时间  $t$  后的细胞数。

### 1.7 染色体分析

以第 25 代对数期的大泷六线鱼 3 种细胞为材料进行了染色体分析。向 3 种细胞中加入秋水仙素,使其终浓度达到 1  $\mu\text{g/mL}$ ,25  $^{\circ}\text{C}$  下继续培养 12 h 后,吸出培养液,0.25% 胰酶消化法分散细胞,1 000 r/min 离心 10 min,收集细胞。参考 Wang 等<sup>[10]</sup>方法进行染色体制备,高倍显微镜下观察计数染色体数目、拍照,并按照 Levan 等<sup>[11]</sup>的方法进行核型分析。

### 1.8 数据处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,数据用均数  $\pm$  标准差的方式表示。

## 2 结果

### 2.1 最适培养基

原代培养 7 d 后的观察结果表明(表 1),鳍、吻端和肾脏组织细胞在 DMEM/F12 培养基中均有大量细胞迁出,迁出的细胞占瓶底面积的 10% 以上,且生长速度较快,而培养在 L-15 和 DMEM 培养基中的 3 种组织细胞的迁出量相对较少。可见,在上述 3 种培养基中,20% 的 FBS-DMEM/F12 培养基更适用于大泷六线鱼鳍、吻端和肾脏细胞的体外培养。

表 1 鳍、吻端和肾脏组织在不同培养基中培养 7 d 后迁出细胞的铺瓶率

Tab. 1 The number of migrated cells from fin, lip and kidney tissues cultured in different media for 7 d

	培养基 media		
	L-15	DMEM	DMEM/F12
鳍细胞 fin cells	+++	++	+++++
吻端细胞 lip cells	++	+	+++++
肾脏细胞 kidney cells	++++	++++	+++++

注:每个“+”代表 2% 的铺瓶率(表示迁出细胞占培养瓶底面积的百分数)。

Notes: + means cells migrated from tissues fragments occupy 2% area of culture flask bottom.

## 2.2 原代培养

鳍组织培养 48 h 后组织块边缘增厚,有上皮样细胞从周围迁出,培养 6 d 后成纤维样细胞迁出,第 21 天长成单层。吻端组织培养 24 h 后组织块边缘

增厚并于第 3 天迁出上皮样细胞,成纤维样细胞于第 10 天迁出,培养 15 d 后长成单层。肾脏组织培养 24 h 后便迁出大量上皮样细胞,第 11 天开始迁出成纤维样细胞并迅速增殖,继续培养 7 d 后长满单层。

## 2.3 传代培养

对于长成单层的大泷六线鱼 3 种组织细胞以胰酶消化法进行传代。实验表明,传代细胞生长与分裂状态良好,细胞形态单一,均为成纤维样细胞,胞质透明,核圆形,位于中央,6~7 d 便可长成单层。20 代以后,细胞增殖速度加快,其中鳍细胞、吻端细胞 5~6 d 便可长成单层,肾脏细胞 4~5 d 便可长成单层。此时停止添加两种生长因子和硫酸软骨素,细胞分裂能力未受到影响。目前鳍、吻端和肾脏组织已分别传代至 30 代(图 1-a)、31 代(图 1-b)和 35 代(图 1-c)。

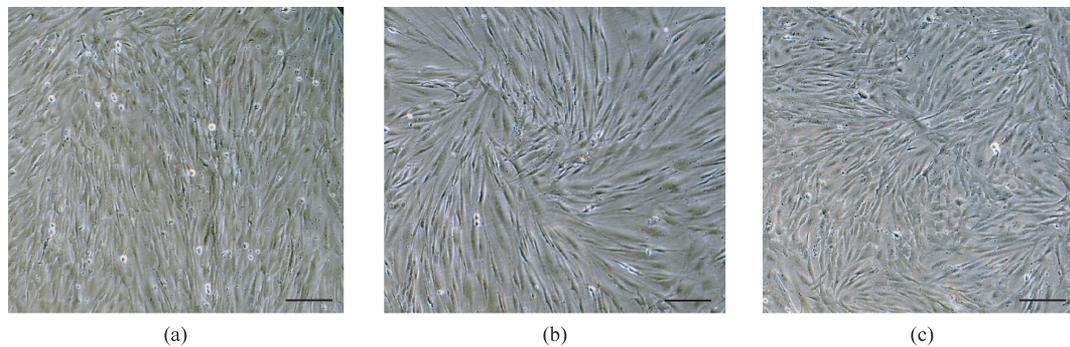


图 1 大泷六线鱼的 3 种组织细胞

(a) 第 30 代鳍细胞; (b) 第 31 代吻端细胞; (c) 第 35 代鱼肾细胞。标尺 = 100 μm。

Fig. 1 Three kinds of cells from tissues of *H. otakii*

(a) fin cells at passage 30; (b) lip cells at passage 31; (c) kidney cells at passage 35. Bar = 100 μm.

## 2.4 冻存与复苏

将分别传代 20 代的鳍、吻端、肾脏组织细胞在液氮中保存 60 d 后复苏。解冻 12 h 后,细胞培养液中出现少量悬浮和死亡细胞,但多数细胞胞质透明,形态均一,占瓶底面积 70% 左右。用台盼蓝染色法检测活细胞,结果显示 3 种细胞分别有  $84.59\% \pm 1.07\%$ 、 $85.75\% \pm 1.03\%$  和  $87.39\% \pm 1.05\%$  的细胞不着色,为活细胞。全量换新鲜培养液后,细胞增殖能力逐渐恢复并在 4~5 d 后重新长成单层。3 种细胞的形态和分裂能力均与冻存前相同并可持续传代。

## 2.5 大泷六线鱼 3 种细胞的生长特性

从大泷六线鱼 3 种细胞的生长曲线(图 2)可以看出,25 °C,培养于 20% FBS-DMEM/F12 培养基中的吻端和鳍细胞在第 2~2.5 天进入对数生长期,肾

细胞在 1~1.5 d 进入对数生长期,3 种细胞的群体倍增时间分别为 58.7、50.4 和 32.9 h,说明 3 种传代培养细胞的状态良好,生长分裂旺盛。

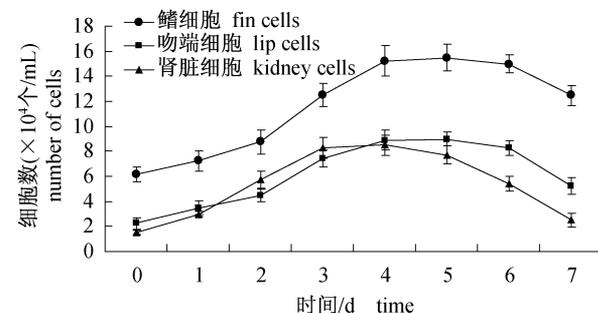


图 2 第 20 代鳍、吻端和肾组织细胞的生长曲线

Fig. 2 The growth curve of fin, lip and kidney cells at passage 20

## 2.6 染色体分析

实验结果表明,第 25 代大泷六线鱼 3 种组织细胞染色体数目分布在 36~78 之间,其中鳍组织细胞拥有 48 条染色体的细胞占细胞总数的 67%;吻端组织细胞占 58%;肾组织细胞占 65% (图 3)。由此可见,3 种细胞系的特征染色体数为 48 条。

核型分析结果显示,大泷六线鱼鳍、吻端和肾组织细胞的 48 条染色体中均有 3 对为中部着丝粒染色体 (m), 8 对为亚中部着丝粒染色体 (sm), 10 对为亚端部着丝粒染色体 (st), 3 对为端部着丝粒染色体 (t), 核型公式为  $2n = 48, 6m + 16sm + 20st + 6t, NF = 70$  (图 4)。

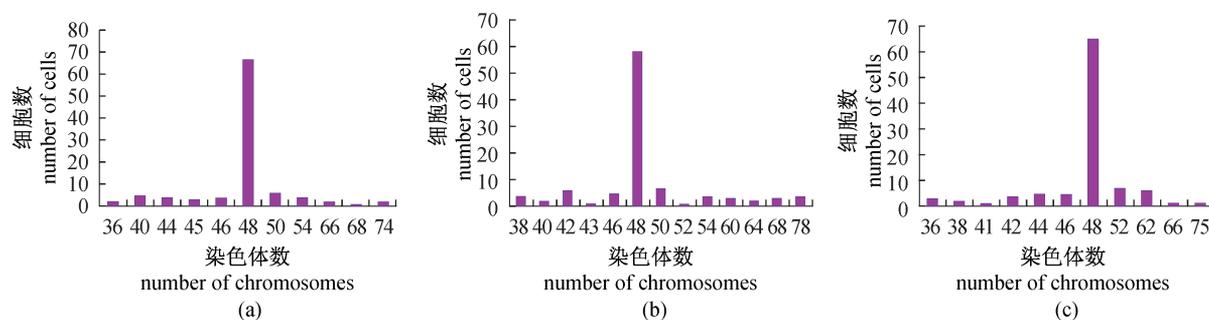


图 3 第 25 代鳍、吻端和肾组织细胞染色体数目分布

(a) 鳍细胞染色体数目分布; (b) 吻端细胞染色体数目分布; (c) 肾细胞染色体数目分布。

Fig. 3 Number distribution of fin, lip and kidney cells chromosomes at passage 25

(a) number distribution of fin cells chromosomes; (b) Number distribution of lip cells chromosomes; (c) number distribution of kidney cells chromosomes.

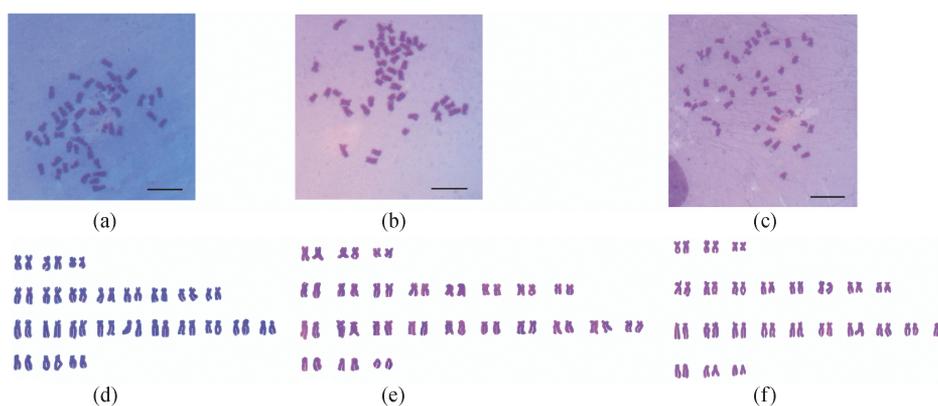


图 4 第 25 代大泷六线鱼 fin、lip 和 kidney 细胞染色体核型分析

(a) 鳍细胞染色体; (b) 鳍细胞二倍体核型; (c) 吻端细胞染色体; (d) 吻端细胞二倍体核型; (e) 肾细胞染色体; (f) 肾细胞二倍体核型。标尺 = 10 μm。

Fig. 4 Karyotype of fin, lip and kidney cell lines at passage 25

(a) chromosomes of fin cell; (b) diploid karyotype morphology of fin cell; (c) chromosomes of lip cell; (d) diploid karyotype morphology of lip cells; (e) chromosomes of kidney cell; (f) diploid karyotype morphology of kidney cells. bar = 10 μm.

## 3 讨论

### 3.1 大泷六线鱼 3 种组织细胞的原代培养方法

组织块培养法是常用的细胞体外培养方法,具有快速、简单、效率高等优点<sup>[12]</sup>。如李霞等<sup>[13]</sup>培养的皱纹盘鲍外套膜组织细胞、沈锦玉等<sup>[14]</sup>培养的鳊吻端皮肤细胞、王军霞等<sup>[15]</sup>培养的日本对虾肌肉细胞、黄晓明等<sup>[16]</sup>培养的文昌鱼尾、鳃、肝盲

囊等组织细胞、孟彦等<sup>[17]</sup>培养的施氏鲟肝脏、脾脏、肾脏、鳍和心脏等组织细胞以及樊廷俊等<sup>[9]</sup>培养的褐点石斑鱼鳍、心脏、鳃细胞,均采用了组织块培养法。从组织块中迁移出来的细胞贴壁性好,能迅速生长并汇合成单层,但是培养初期需要每周换液 1~2 次,清除未贴壁组织块及细胞,以利于已贴壁细胞的生长。由于大泷六线鱼鳍和吻端组织细胞外基质中含有多糖和胶原蛋白成分,不利于细胞

的迁出,本实验参考樊廷俊等<sup>[18]</sup>建立大菱鲆细胞系的方法,采用透明质酸酶和Ⅱ型胶原酶联合消化法取得较好的效果。透明质酸酶和Ⅱ型胶原酶可以降解细胞外基质中的透明质酸和Ⅱ型胶原,从而疏松组织使细胞迁出。与机械碾碎法和胰酶消化法相比,这种方法能够保证游离的细胞和细胞团不会受到损伤。肾脏组织剪碎后会自动分离出许多细胞,因而不需采用此种方法。根据不同组织的特点采用不同方法是本实验成功启动大泷六线鱼鳍、吻端和肾脏细胞原代培养的关键之一。

### 3.2 大泷六线鱼3种细胞最适体外培养体系

建立适合细胞体外生长的培养体系是成功建立细胞系的关键。本实验通过比较大泷六线鱼3种细胞在L-15、DMEM和DMEM/F12 3种培养基中的贴壁和迁出情况,认为含20% FBS的DMEM/F12(pH7.2)最适于大泷六线鱼鳍、吻端和肾脏组织的体外培养,与Imajoh等<sup>[19]</sup>报道的真鲷细胞系、樊廷俊等<sup>[9,20]</sup>建立的褐点石斑鱼三种组织细胞系和圆斑星鲷细胞系所使用的培养基一致。目前已建立的其他海水鱼细胞系也有使用L-15培养基<sup>[21-23]</sup>和DMEM培养基的报道,如任国诚等<sup>[24]</sup>使用DMEM培养基成功建立了漠斑牙鲆胚胎细胞系。体外培养海水鱼类细胞系所用培养基的不同,可能与鱼类的种属及组织来源不同有关。

本实验在培养基中分别添加了bFGF、硫酸软骨素和IGF-I,有效的促进了原代培养的鳍、吻端和肾脏组织细胞的迁出和分裂,取得了很好的结果。bFGF和IGF-I是海水鱼类细胞培养中常用的添加因子,这两种生长因子的主要作用是与酪氨酸激酶受体结合并激活其活性,然后激活ras蛋白,从而使细胞内MAP激酶的级联反应被激活,最终进入DNA合成期和分裂期,使细胞增殖<sup>[25-26]</sup>。樊廷俊等<sup>[9]</sup>在用DMEM/F12培养基培养褐点石斑鱼细胞时发现,添加10 ng/mL bFGF和40 ng/mL IGF-I能促进褐点石斑鱼3种组织细胞的增殖能力。任国诚等<sup>[24]</sup>通过添加2 ng/mL bFGF促进漠斑牙鲆胚胎细胞的有丝分裂。硫酸软骨素是一种天然酸性粘多糖,与细胞表面及基质中其他大分子物质结合紧密,对细胞具有支持、保护、促进分化和增殖作用<sup>[27]</sup>,尤其能促进成纤维细胞的增殖,可能是由于硫酸软骨素提供了适宜细胞代谢的酸性环境,加速成纤维细胞的分裂<sup>[28]</sup>。本研究培养的大泷六线鱼3种组

织细胞在早期培养过程中逐渐纯化为单一类型的成纤维样细胞,而上皮样细胞消失,可能与培养液中添加了硫酸软骨素有关。

### 3.3 大泷六线鱼鳍、吻端和肾脏组织细胞的染色体分析

真核生物的染色体数量具有物种特异性,是一种较为准确的细胞种属鉴定指标。染色体可以用来鉴定细胞系是否趋于稳定和在离体培养条件下细胞是否发生转化<sup>[17]</sup>。若要进行染色体组型分析,需要获得分散良好并且显色清晰的中期分裂相。获得中期染色体的方法通常是利用秋水仙素或秋水酰胺抑制纺锤丝形成,使染色体停留在有丝分裂的中期。对于不同物种,秋水仙素的作用浓度和时间各有不同。樊廷俊等<sup>[18]</sup>采用20 μg/mL的秋水仙素于24℃下作用10 h获得了大菱鲆鳍细胞中期染色体。曾令兵等<sup>[12]</sup>采用1 μg/mL的秋水仙素于28℃下作用13~15 h获得了斑点叉尾鲷肾脏细胞中期染色体。任国诚等<sup>[24]</sup>采用0.5 μg/mL的秋水仙素于24℃下作用4 h获得了漠斑牙鲆囊胚期胚胎细胞中期染色体。本实验则是采用1 μg/mL的秋水仙素于25℃下作用12 h,获得了较多中期染色体。第25代大泷六线鱼3种组织细胞染色体数分布于36~78,但48条的比例最高,鳍细胞中拥有48条染色体的细胞占细胞总数的67%,吻端细胞占58%,肾细胞占65%。虽然3种细胞系均出现了染色体非整倍性现象,但其特征染色体数目仍为48条,与卓孝磊等<sup>[29]</sup>报道的大泷六线鱼染色体数目相同。染色体核型分析显示大泷六线鱼鳍、吻端和肾脏细胞的48条染色体中均有3对为中部着丝粒染色体(m),8对为亚中部着丝粒染色体(sm),10对为亚端部着丝粒染色体(st),3对为端部着丝粒染色体(t),核型公式为 $2n=48,6m+16sm+20st+6t,NF=70$ ,与喻子牛等<sup>[30]</sup>报道的大泷六线鱼染色体核型分析结果一致。以上两点除能证明所做的实验材料为大泷六线鱼外,还说明现有实验条件满足3种组织分裂、生长的需要,细胞系尚没有发生变异。

### 参考文献:

- [1] 黄宗国. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京:海洋出版社,1994:741.
- [2] 中国科学院海洋研究所. 中国经济动物志(海产鱼类)[M]. 北京:科学出版社,1962:135-137.

- [ 3 ] 温海深,王连顺,牟幸江,等. 大泷六线鱼精巢发育的周年变化研究[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2007,37(4):581-585.
- [ 4 ] 邱丽华,姜志强,秦克静. 大泷六线鱼仔鱼摄食及生长的研究[J]. 中国水产科学,1999,6(3):1-4.
- [ 5 ] 冯昭信,韩华. 大泷六线鱼资源合理利用[J]. 大连水产学院学报,1998,13(2):24-28.
- [ 6 ] 郑家声,王梅林,史晓川,等. 欧氏六线鱼性腺发育的周年变化研究[J]. 青岛海洋大学学报,1997,27(4):497-503.
- [ 7 ] Wolf K,Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells *in vitro* [J]. Science, 1962, 135 ( 23 ): 1065-1066.
- [ 8 ] 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.
- [ 9 ] 樊廷俊,魏云波,徐晓辉,等. 褐点石斑鱼三种组织细胞系的建立[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2009,39(5):961-964.
- [ 10 ] Wang G,Lapatra S,Zeng L B, *et al.* Establishment, growth, cryopreservation and species of origin identification of three cell lines from white sturgeon, *Acipenser transmontanus* [J]. Methods in Cell Science,2004,25(3-4):211-220.
- [ 11 ] Levan A,Fredga K,Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. Hereditas, 1964,52(2):201-220.
- [ 12 ] 曾令兵,李晓莉,张林,等. 斑点叉尾鲷肾脏组织细胞系的建立及其生物学特性[J]. 中国水产科学,2009,16(1):75-81.
- [ 13 ] 李霞,刘淑范. 皱纹盘鲍的组织培养[J]. 水产学报,1997,21(2):197-200.
- [ 14 ] 沈锦玉,尹文林,曹铮,等. 鳊鱼 *Aristichthys nobilis* 吻端细胞系 BHS 的建立及特性观察[J]. 浙江水产学院学报,1993,12(4):265-270.
- [ 15 ] 王军霞,王维娜,王安利,等. 日本对虾血淋巴和肌肉的原代培养 [J]. 海洋科学,2003,27(3):61-63.
- [ 16 ] 黄晓明,李祺福,高媛媛,等. 文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri*) 离体细胞原代培养初步研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2006,45(增刊1):181-183.
- [ 17 ] 孟彦,张燕,张林,等. 施氏鲟不同组织来源细胞离体培养的初步研究[J]. 细胞生物学杂志,2007,29(5):718-722.
- [ 18 ] 樊廷俊,耿晓芬,丛日山,等. 大菱鲆细胞系的建立[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2007,37(5):759-766.
- [ 19 ] Imajoh M,Ikawa T,Oshima S I. Characterization of a new fibroblast cell line from a tail fin of red sea bream, *Pagrus major*, and phylogenetic relationships of a recent RSIV isolate in Japan [J]. Virus Research,2007,126(1-2):45-52.
- [ 20 ] 樊廷俊,郭雪阳,姜国建,等. 圆斑星鲷连续性细胞系的建立[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2010,40(9):69-74.
- [ 21 ] Qin Q W, Shi C Y, Gin K Y H, *et al.* Antigenic characterization of a marine fish iridovirus from grouper, *Epinephelus* spp [J]. Journal of Virological Methods,2002,106(1):89-96.
- [ 22 ] Qin Q W, Wu T H, Jia T L, *et al.* Development and characterization of a new tropical marine fish cell line from grouper, *Epinephelus coioides* susceptible to iridovirus and nodavirus [J]. Journal of Virological Methods,2006,131(1):58-64.
- [ 23 ] Lai Y S, John J A, Lin C H, *et al.* Establishment of cell lines from a tropical grouper, *Epinephelus awoara* ( Temminck & Schlegel ), and their susceptibility to grouper irido- and nodaviruses [J]. Journal of Fish Disease,2003,26(1):31-42.
- [ 24 ] 任国诚,陈松林,沙珍霞. 漠斑牙鲆胚胎细胞系的建立与鉴定[J]. 中国水产科学,2007,14(4):579-583.
- [ 25 ] Hrzencak M, Shain S A. Protein kinase C-dependent and-independent pathways of signal transduction in prostate cancer cells: fibroblast growth factor utilization of a protein kinase C-independent pathway [J]. Cell Growth and Differentiation, 1995, 6 ( 9 ): 1129-1142.
- [ 26 ] Sivaprasad U, Fleming J, Verma P S, *et al.* Stimulation of insulin-like growth factor ( IGF ) binding protein-3 synthesis by IGF-I and transforming growth factor-alpha is mediated by both phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in mammary epithelial cells [J]. Endocrinology,2004,145(9):4213-4221.
- [ 27 ] 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1988:133-137
- [ 28 ] 王红蓓,孔宪涛,张玲玲. 硫酸软骨素 A 对 NIH-3T3 鼠成纤维细胞及人皮肤成纤维细胞增殖的影响[J]. 第二军医大学学报,1994,15(2):161-164.
- [ 29 ] 卓孝磊,邹记兴. 我国海水鱼核型及染色体显带研究进展[J]. 热带海洋学报,2007,26(5):73-80.
- [ 30 ] 喻子牛,孔晓瑜,冯东岳,等. 许氏平鲈 *Sebastes schlegeli* 及欧氏六线鱼 *Hexagrammos otakii* 核型研究[J]. 青岛海洋大学学报,1992,22(2):118-124.

## Limited subculture and biological characteristic analysis of three cell lines from fat greenling (*Hexagrammos otakii*)

LI Xia<sup>\*</sup>, GUO Ying, QIN Yanjie, JIANG Zhiqiang

(Key Laboratory of Marine Bio-resource Restoration and Habitat Reparation in Liaoning Province,  
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** Fat greenling (*Hexagrammos otakii*) is one of the important commercial fishes along the northern coast of China, and its artificial breeding and culture have been developed recently. Primary culture of fin, lip and kidney from *H. otakii* was studied using tissue explant method. Until now cells of three tissues have been subcultured at passage 30 for fin, passage 31 for lip, passage 35 for kidney respectively. The results showed that the fin and lip tissues could be dispersed quickly after being digested with 0.5% hyaluronidase and 0.2% collagenase II. The optimal growth conditions for fin, lip and kidney tissues were 20% fetal bovine serum (FBS), 5 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF), 20 μg/mL chondroitin sulfate and 40 ng/mL insulin-like growth factor-I to medium DMEM/F12 (pH 7.2) at 25 °C. The doubling time of fin, lip and kidney cell numbers was about 58.7 h, 50.4 h and 32.9 h at the 20th passage. Karyotype analysis of 100 metaphase plates revealed that the feature diploid chromosome number was  $2n = 48$  in fin, lip and kidney cell at 25th passage. The cell livability of these three kinds of cell were  $(84.59 \pm 1.07)\%$ ,  $(85.75 \pm 1.03)\%$  and  $(87.39 \pm 1.05)\%$ , respectively, when recovered after being stored in liquid nitrogen for 60 d at the 20th. Now, the three kinds of cell have been preserved in China Center for Type Culture Collection (CCTCC). The methods of cell culture *in vitro* could be used to prevent and cure fish diseases and the pathomechanism study.

**Key words:** *Hexagrammos otakii*; limited subculture; biological characterization

**Corresponding author:** LI Xia. E-mail: lx@dlou.edu.cn