

脊椎动物源细胞因子对合浦珠母贝外套膜细胞培养及其矿化功能的影响

孔 玮, 李世国, 谢莉萍, 张荣庆*

(清华大学生命科学院, 北京 100084)

摘要: 筛选出能促进合浦珠母贝外套膜细胞培养及矿化功能的细胞因子, 以作为优化本物种细胞培养基的参考, 挑选三龄合浦珠母贝, 获取其外套膜进行原代细胞培养。向各实验组细胞培养基中分别添加表皮生长因子(EGF)、内皮细胞生长添加剂(ECGS)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), 通过比较细胞活性、贴壁能力、迁移能力和4种基质蛋白基因(*pif80*、*n16*、*msi7*及*accbp*)表达水平的变化, 来评判这些因子对细胞培养及细胞矿化功能的影响。结果显示:(1)EGF能显著提高原代培养细胞的活性、贴壁能力和迁移能力, 并促进*pif80*、*n16*和*accbp*基因的表达;(2)ECGS能增强细胞的贴壁能力和迁移能力, 并大幅提高*pif80*、*n16*和*msi7*基因的表达水平;(3)IGF-1能显著增强细胞活性、贴壁能力、迁移能力和*msi7*的基因表达水平, 但对*pif80*、*n16*和*accbp*基因的表达有一定抑制作用;(4)碱性成纤维细胞生长因子能增强细胞的活性及贴壁能力, 并显著提升*pif80*、*n16*和*accbp*基因的表达水平。研究表明, 脊椎动物源细胞因子具有延长细胞培养时间、增强细胞活性及促进矿化相关基因表达的作用, 能够用于优化合浦珠母贝外套膜细胞的培养基。

关键词: 合浦珠母贝; 细胞因子; 外套膜; 细胞培养; 细胞系

中图分类号: S 966.16

文献标志码: A

合浦珠母贝(*Pinctada fucata*), 属于软体动物门(Mollusca), 双壳纲(Bivalvia), 珍珠目(Pterioidea), 珍珠贝科(Pteriidae), 是我国主要的海水珍珠养殖贝类, 具有重要的经济价值和生态价值^[1]。合浦珠母贝是目前研究海洋生物矿化的典型物种, 科学家已根据相关研究结果建立起多种贝类生物矿化机制的模型, 例如胞外基质介导和血细胞介导的生物矿化理论^[2]。外套膜是生物矿化的主要功能器官, 能够分泌多种矿化相关基质蛋白^[3-5]。基质蛋白指导下的碳酸钙矿物沉积过程是贝壳和珍珠形成基础, 并贯穿珍珠形成的主要时期。因此研究基质蛋白的功能和表达模型对于探明珍珠形成机理具有重要意义。然而, 目前关于基质蛋白的研究尚停留在分离、提取和纯化等阶段, 对其矿化功能的研究也仅限于体外模拟实验。缺乏有效的生物矿化研究体系是制

约相关研究发展的瓶颈, 而建立贝类外套膜细胞系是解决该问题的关键。

目前, 海洋软体动物的细胞培养尚停留在原代培养水平^[6], 缺少适宜的细胞培养基和细胞因子是无法建立无限细胞系的主要原因, 因此海洋软体动物细胞系的建立往往以这两个方面作为主要切入点。合浦珠母贝外套膜细胞在体外最长存活45 d, 并且原代培养细胞只有在与组织共同培养时才能表现出较高的活性和贴壁能力, 离开组织单独培养后, 原代细胞的活性及贴壁能力迅速下降^[7]。体外培养的原代细胞不具备增殖能力, 细胞活性随着培养时间的增加而减弱^[8]。目前, 合浦珠母贝外套膜原代细胞培养通常采用组织块培养法^[9], 因此细胞迁移能力强弱限制着细胞的产量。体外培养的外套膜细胞仍保持分泌矿化相关基质蛋白的能力^[7], 其中*pif80*、*n16*、*msi7*以及

收稿日期:2015-03-25 修回日期:2015-05-12

资助项目:国家自然科学基金(31372502;31372508);国家重点基础研究发展计划(2010CB126405)

通信作者:张荣庆, E-mail:rqzhang@mail.tsinghua.edu.cn

accbp 等参与贝壳形成过程的关键基质蛋白基因的表达水平可用来衡量外套膜细胞矿化功能的变化^[10-13]。

脊椎动物来源的表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、内皮细胞生长添加剂 (endothelial cell growth supplement, ECGS)、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor, IGF-1) 及碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 都具有促进细胞增殖的作用。EGF 和 bFGF 已被证明能促进文蛤 (*Meretrix lusoria*) 以及长牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 组织细胞生长^[14], 并能有效延长栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 担轮幼虫细胞的寿命^[15]; 类 EGF 因子已在贻贝 (*Mytilus edulis*) 组织中被分离, 并经实验被证明为外套膜原代细胞的有丝分裂原^[16]; 类 FGF 因子也从一种海洋软体动物 *Concholepas concholepas* 组织中被分离鉴定^[17]; 人重组 IGF-1 能促进扇贝 (*Pecten maximus*) 的外套膜边缘细胞生长, 并刺激其蛋白质合成^[18]; 而胰岛素相关多肽也能从贻贝、长牡蛎等多种软体动物的神经节中分离得到^[19-20]; ECGS 被证明能显著提高原生物帕金虫 (*Perkinsus*) 的细胞增殖能力^[21]。这些研究结果表明, 脊椎动物源的细胞因子在海洋贝类细胞系培养过程中可能有重要促进作用。以上几种细胞因子在合浦珠母贝外套膜细胞培养中也可能具有潜在的应用价值。

本实验通过向细胞培养基中添加多种脊椎动物来源细胞因子, 并对比刺激前后合浦珠母贝外套膜原代细胞的活性、贴壁能力、迁移能力和基质蛋白基因的表达变化, 多角度评估这些细胞因子对外套膜细胞的影响, 以期筛选适宜的合浦珠母贝外套膜细胞培养基提供参考。

1 材料与方法

1.1 合浦珠母贝外套膜细胞原代培养及收集

合浦珠母贝采集自北海珍珠养殖场, 饲养于装满人工海水 (盐度 30, 20 °C) 的水族箱中。外套膜细胞原代培养方法参考文献^[7]的方法。取外套膜边缘组织, 将组织碎片浸泡在组织消毒液^[7] (含有多种抗生素的 D-MBSS) 中约 30 min, 再用 D-MBSS^[7] 将组织碎片清洗 5~6 次, 最后将组织剪成边长约 2 mm 的小块, 分盘铺入规格为 35 mm × 10 mm 的一次性培养皿中。向每盘培养

皿中加入 500 μL 培养基 (含 10% 胎牛血清的 Pf-CM2.5)^[7], 静置于 25 °C 培养箱中培养, 培养过程中无需补充 CO₂。每隔 3 天, 向培养皿中补加 200 μL 新鲜培养基。组织块培养至 7 d, 收集迁移出组织的原代细胞。具体操作: 用 2 mL D-MBSS 冲洗培养皿底部及组织块边缘, 将细胞悬液收集至离心管中, 4 °C、1 000 r/min 离心 5 min。弃上清液, 加入新鲜培养基将管底细胞重悬。

1.2 细胞活性实验

将收集的原代细胞悬液加入 96 孔培养板中, 每孔 100 μL。为确保每孔细胞的数量及初始细胞活性一致, 每批刺激实验都使用来自同一管均匀混合的细胞悬液, 并通过血球计数板计数, 确保细胞浓度约在 5 × 10⁴/mL。加入细胞因子 (种类及浓度见表 1 中第 1~4 列)。对照设置两组, 一组为仅含 100 μL 培养基的空白对照, 第二组为含有 100 μL 细胞悬液却不加任何细胞因子的实验对照。所有处理做 3 次重复。将 96 孔培养板放入 25 °C 培养箱培养 24 h 后, 用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒 (东仁化学) 检测细胞活性。检测方法参考试剂盒说明书进行, 在 100 μL 的待测溶液中加入 10 μL CCK-8 试剂, 25 °C 培养箱孵育 4 h, 之后用酶联免疫检测仪测定 450 nm 处吸光度值。相对细胞活性计算方法: 相对细胞活性 = (实验组吸光度 - 培养基吸光度) / (对照组吸光度 - 培养基吸光度)。

1.3 细胞贴壁实验

将来自同一管均匀混合的细胞悬液加入新的一次性培养皿 (35 mm × 10 mm) 中, 每盘 500 μL, 初始细胞浓度约为 1 × 10⁶/mL。实验组加入细胞因子 (种类及浓度见表 1 中第 5 列), 对照组不添加任何细胞因子。将所有细胞重新培养在 25 °C 培养箱中, 无需添加 CO₂。期间, 每 3 天补加 200 μL 含有相应种类和浓度细胞因子的新鲜培养基。使用光学显微镜 (Nikon Eclipse Ti-U) 观察并拍摄每盘细胞在第 2、4、9 天的贴壁情况, 使用图像处理软件 (NIS elements D 4.3) 统计 5 个固定区域内 (150 μm × 150 μm) 贴壁细胞的数目, 并计算平均细胞密度。用第 4、9 天的细胞密度除以第 2 天的细胞密度, 得到细胞相对贴壁率: 相对贴壁率 = 细胞密度 (2 d、4 d、9 d) / 细胞密度 (2 d)。

1.4 细胞迁移实验

将源自同一只贝同侧外套膜的组织块随机分

配至两个相同直径的培养皿中培养(平均每盘4~5块组织),向其中一盘的培养基中加入单细胞因子(种类及浓度见表1中第5列),另一盘不加作为对照。培养7 d后,使用光学显微镜(Nikon Eclipse Ti-U)观察细胞迁移情况并用图像处理软件(NIS elements D 4.3)测量细胞迁移距离。

1.5 矿化相关基因表达分析

向外套膜原代细胞悬液中加入细胞因子进行处理(种类及浓度见表1中第1~4列),每种处理同时做3个平行实验。待刺激24 h后,重新收集细胞悬液,25℃、1 000 r/min离心5 min,弃上清液。使用 TRIzol[®] 试剂(Life Technologies)分别提取3个平行组细胞 RNA,具体操作按照说明书进行。提取的 RNA 利用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并利用荧光分光光度计检测其浓度。选取高质量的 RNA 合成 cDNA,使用 PrimeScript RT reagen Kit(TaKaRa)试剂盒进行反转录,合成的 cDNA 模板进行后续实时定量 PCR 反应,3个平行组分开进行。实时定量 PCR 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa)试剂盒进行,反应程序在 Mx3000P(Agilent)仪器上操作,使用两步法 PCR 扩增标准程序:95℃变性30 s;95℃变性5 s,60℃退火30 s,40个循环。反应结束后,绘制溶解曲线,以确保产物的特异性。4个基质蛋白基因(*pij80*, *n16*, *msi7*, *accbp*)及内参基因(*gadph*)的引物名称及其序列信息见表2。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量,运用 Microsoft Office Excel 处理数据并作图,利用 SPSS 19.0 进行显著性分析。

表1 细胞因子及浓度
Tab.1 Cell factors used for research

	浓度/($\mu\text{g}/\text{mL}$) concentration				
	1	2	3	4	5
鼠源重组 EGF(Millipore) recombinant mouse EGF	0.001	0.005	0.01	0.05	0.01
ECGS(Millipore)	10	20	50	80	20
鼠源重组 IGF-1(Sigma) recombinant mouse IGF-1	0.001	0.005	0.01		0.01
人源重组 bFGF(Sigma) recombinant human bFGF	0.001	0.005	0.01	0.05	0.01

表2 定量 PCR 分析的引物序列
Tab.2 Primer sequences used in real-time PCR assays

引物名称 primer	引物序列 sequence
<i>pij80</i> - f	TGCTGCCATCACGTGAGTATG
<i>pij80</i> - r	GACTCCCTTCTCACACTTCCA
<i>n16</i> - f	TGCGGACGTTACTCATACTGCT
<i>n16</i> - r	CCACATCTAAGCCACTCATACCTCT
<i>msi7</i> - f	GATCGTCTTAATGCTCTGTTTCT
<i>msi7</i> - r	CTCCAAGCCCGATAACACCT
<i>accbp</i> - f	GACATGGAACAAAGATGGTGGGA
<i>accbp</i> - r	CTGTGGCTGGAATGGTTGG
<i>gadph</i> - f	GCCGAGTATGTGGTAGAATC
<i>gadph</i> - r	CACTGTTTCTGGGTAGCTG

2 结果

2.1 细胞因子对细胞活性的影响

在4种因子的作用下,外套膜原代细胞的活性相对于对照组细胞都存在显著性差异($P < 0.05$, $n = 3$),但不同因子对细胞活性的促进效果差别较大,其中 EGF 与 IGF-1 的促进效果最为显著(图1)。在高浓度($> 0.005 \mu\text{g}/\text{mL}$)细胞因子处理下,EGF 和 IGF-1 都能使细胞相对活性提高2倍以上($P < 0.01$),而在低浓度($< 0.005 \mu\text{g}/\text{mL}$)条件下,细胞对 EGF 的刺激更为

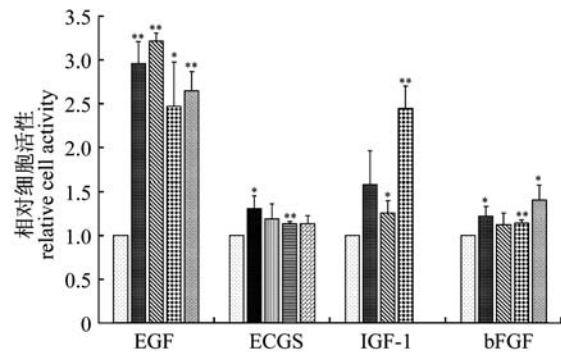


图1 细胞因子对细胞活性的影响

EGF、IGF-1、bFGF 从左至右浓度为 0、0.001、0.005、0.01、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ECGS 从左至右浓度为 0、10、20、50、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; * 与对照组差异显著($P < 0.05$); ** 与对照组差异极显著($P < 0.01$), $n = 3$

Fig.1 Effects of cell factors on cell activity

The concentrations of EGF, IGF-1 and bFGF from left to right are 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$; The concentrations of ECGS from left to right are 0, 10, 20, 50, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$; * significantly different from control at $P < 0.05$; ** extremely significantly different from control at $P < 0.01$, $n = 3$

敏感。经过 ECGS 和 bFGF 处理后的原代细胞同对照组相比,细胞活性未见大幅提升。结果表明,较高浓度的 EGF 和 IGF-1 对合浦珠母贝外套膜原代培养细胞的活性具有显著促进作用。

2.2 细胞因子对细胞贴壁能力的影响

合浦珠母贝外套膜原代细胞只具备半贴壁能力,并且随着培养时间的延长,贴壁能力逐渐减弱。悬浮的细胞会逐渐聚集在一起形成深色团块物质(图 2 箭头处),并趋于死亡。原代细胞从收集再培养至大部分细胞悬浮死亡的时间约为 20 d。

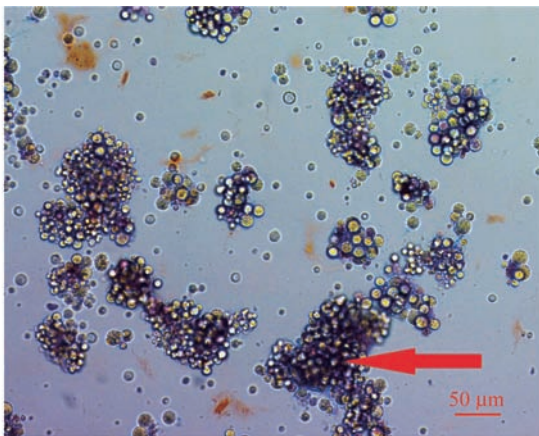


图 2 台盼蓝染色悬浮细胞团
Fig. 2 Trypan blue staining of suspended cell aggregates

随着培养时间延长,细胞相对贴壁率会逐渐下降(图 3)。经过短期处理(4 d),4 种细胞因子对相对贴壁率的影响并不显著;但从长期看(9 d),EGF(相对贴壁率 0.76)、ECGS(相对贴壁率 0.62)、IGF-1(相对贴壁率 0.71)和 bFGF(相对贴壁率 0.65)处理组分别比对照组(相对贴壁率 0.4)的相对贴壁率提高了 90.0% ($P < 0.01$)、55.0% ($P < 0.01$)、77.5% ($P < 0.01$)和 62.5% ($P < 0.01$)。因此,4 种细胞因子能有效延缓合浦珠母贝外套膜原代细胞贴壁能力的丧失。

2.3 细胞因子对细胞迁移能力的影响

当细胞迁移能力增强时,细胞迁移距离增加。由于外套膜组织的细胞迁移能力存在个体差异,因此,通过比较来自于同一只合浦珠母贝的外套膜组织在细胞因子刺激前后平均迁移距离的变化,来推断其迁移能力是否得到相对的增强/减弱。测量时,统一以组织块边缘与绝大部分迁移

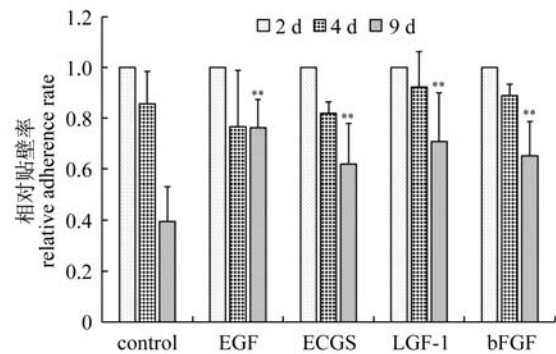


图 3 细胞因子对细胞贴壁率的影响

** 与对照组差异极显著($P < 0.01, n = 5$)

Fig. 3 Effects of cell factors on cell adherence rate

** extremely significantly different from control at $P < 0.01, n = 5$

细胞能抵达的最远距离,作为每块组织的迁移距离(图 4 黄线)。计算刺激前后的平均迁移距离(表 3)可知,EGF 处理后的细胞平均迁移距离由 451.05 μm 提升到 884.16 μm ($P < 0.05$);而经过 ECGS 刺激后的外套膜细胞的平均迁移距离为 801.19 μm ,显著大于未经刺激时 299.55 μm ($P < 0.01$);未添加 IGF-1 时,细胞平均迁移距离约为 262.50 μm ,受到 IGF-1 刺激后,细胞平均迁移距离提升到 619.83 μm ($P < 0.01$)。综上可知,EGF、ECGS 与 IGF-1 皆能显著增强外套膜细胞的迁移能力。然而 bFGF 对细胞迁移能力却有一定抑制作用,对照组中的细胞平均迁移距离为 360.1 μm ,而经过 bFGF 刺激后,细胞平均迁移距离降至 73.92 μm ,实验组与对照组之间存在显著性差异($P < 0.01$)。实验结果中,各对照组之间的差异代表不同合浦珠母贝细胞迁移能力的个体差异。

表 3 细胞因子对细胞迁移距离的影响

Tab. 3 Effects of cell factors on cell migration distance

		迁移距离/ μm migration distance	P -value ($n = 4$)
EGF	对照组 CG	451.05 \pm 128.01	< 0.05
	实验组 EG	884.16 \pm 305.23	
ECGS	对照组 CG	299.55 \pm 68.31	< 0.01
	实验组 EG	801.19 \pm 102.7	
IGF-1	对照组 CG	262.50 \pm 128.88	< 0.01
	实验组 EG	619.83 \pm 139.03	
bFGF	对照组 CG	360.10 \pm 102.71	< 0.01
	实验组 EG	73.92 \pm 74.54	

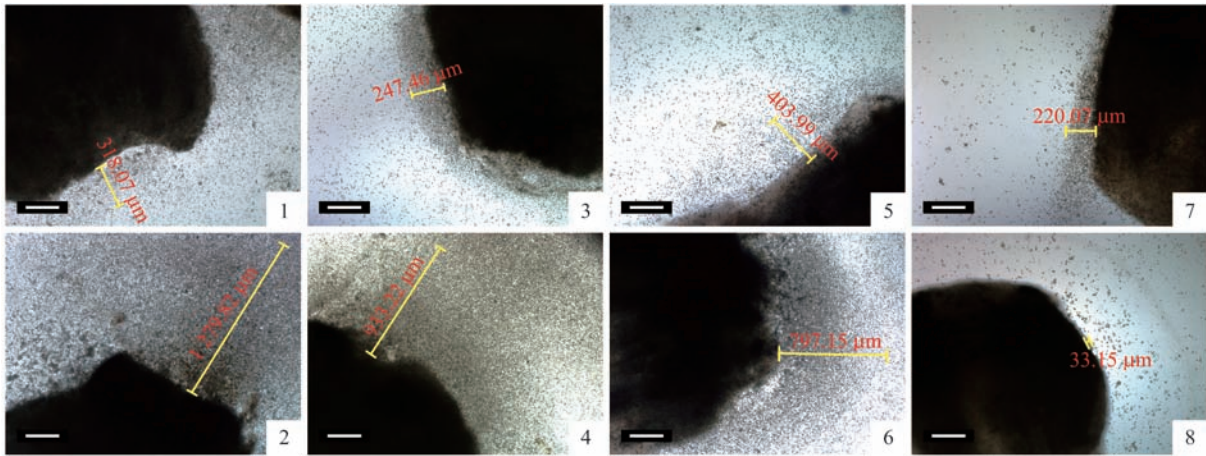


图 4 细胞因子处理前后的细胞迁移情况

1,2. EGF 对照组和实验组;3,4. ECGS 对照组和实验组;5,6. IGF-1 对照组和实验组;7,8. bFGF 对照组和实验组;黑色块状物为组织块,周围黑点为迁移细胞,黄色横线代表细胞迁移距离,标尺:200 μm

Fig. 4 Cell migration before and after treatment by cell factors

1,2. CG and EG of EGF; 3,4. CG and EG of ECGS; 5,6. CG and EG of IGF-1; 7,8. CG and EG of bFGF; the black mass are mantle tissues, the surrounding spots are cells, yellow lines represent migration distance, scale bars 200 μm

2.4 细胞因子对矿化相关基因表达的影响

外套膜细胞在 EGF 的刺激下, *pif80* 和 *n16* 两个基因的表达量均有显著升高 ($P < 0.01$), 最高表达量分别为对照组的 2.74 倍 (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 5.28 倍 (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$); *accbp* 基因表达量也有一定幅度的升高, 最高表达量为对照组的 1.62 倍 (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P < 0.05$); *msi7* 基因的表达水平在各种 EGF 浓度刺激下均没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 5)。

在 ECGS 刺激后, *pif80*、*n16*、*msi7* 基因最高表达量分别可达对照组的 14.76 倍 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 21.16 倍 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 5.16 倍 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3 种基因的表达水平均有显著提高 ($P < 0.01$); *accbp* 基因表达量也有一定幅度的升高, 最高表达量为对照组的 1.62 倍 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 但与其他 3 种基因相比受 ECGS 的影响相对较小。IGF-1 抑制 *pif80*、*n16* 和 *accbp* 基因的表达, 3 种基因的最低表达量分别为对照组的 38% (0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 45% (0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 31% (0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。相反, *msi7* 基因表达量却有显著的提升, 在 IGF-1 浓度为 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时提升幅度最大, 达到了对照组的 2.29 倍 ($P < 0.01$)。

受 bFGF 刺激后, *pif80*、*n16* 和 *accbp* 基因相对表达量皆有显著的升高 ($P < 0.01$), 最高相对表达量分别为对照组的 3.45 倍 (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$),

2.64 倍 (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 2.11 倍 (0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$); *msi7* 基因的相对表达量没有大幅度提升, 反而在 bFGF 浓度为 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时略有下降, 为对照组的 60%。

3 讨论

早期研究结果表明, 真核细胞中调节大分子合成以及细胞分裂的机制是高度保守的^[22], 与脊椎动物生长因子及其受体同源的相关因子也已在原生物和无脊椎动物中被分离鉴定^[16,20,23-24]。基于进化上存在的这种相似性, 脊椎动物源细胞因子在本实验中也可对合浦珠母贝外套膜细胞活性、贴壁能力和迁移等产生促进作用。

为了找到 EGF、IGF-1、bFGF 的适宜浓度, 通过预实验, 尝试在 0.005、0.001、0.1、0.5、1、2、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等 7 种浓度中进行筛选。最终确定在 0.005、0.001、0.1 和 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等 4 种浓度作用下, 3 种细胞因子对细胞的活性、基质蛋白表达量等方面有较为显著的作用。我们也通过预实验确定 ECGS 在 10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内的作用效果更佳。

结果表明, 增强合浦珠母贝外套膜原代细胞活性最有效的细胞因子是 EGF, 能使细胞相对活性最大提升 3 倍 (图 1)。IGF-1 也能够提高细胞活性, 其作用在高浓度下更为显著。而 ECGS

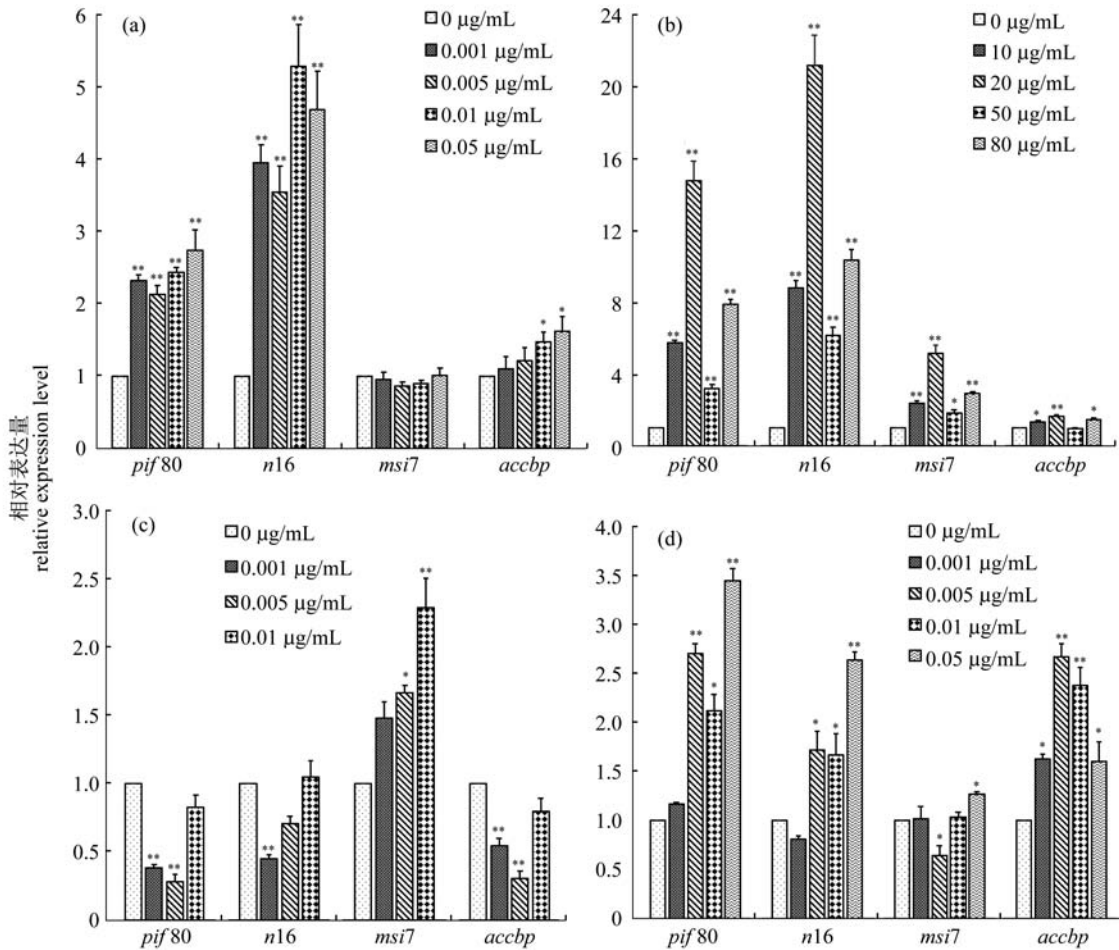


图5 细胞因子对基质蛋白基因表达量的影响

(a) EGF; (b) ECGS; (c) IGF-1; (d) bFGF; * 与对照组差异显著 ($P < 0.05$); ** 与对照组差异极显著 ($P < 0.01$), $n = 3$

Fig. 5 Effects of cell factors on expression level of matrix protein

(a) EGF; (b) ECGS; (c) IGF-1; (d) bFGF; * significantly different from control at $P < 0.05$; ** significantly different from control at $P < 0.01$, $n = 3$

与 bFGF 对细胞活性的促进作用并不明显,这可能是因为所用浓度高于两种因子的最适作用浓度,因此未能有效刺激细胞活性改变。检测细胞活性利用的 CCK-8 试剂中含有 WST-B,它可被线粒体中的脱氢酶还原成具有高水溶性的黄色甲臞产物,生成甲臞物的数量与活细胞数量成正比。由此可推测,EGF 与 IGF-1 能降低原代细胞死亡率,延长细胞寿命。但这两种细胞因子能否促使外套膜细胞增殖还需要进一步实验证明。

研究表明,提高细胞的贴壁能力有助于延长细胞寿命^[8]。外套膜原代细胞只具有半贴壁能力,当外界施加较强振动时极易发生重悬。其中,贴壁能力强的细胞能够重新沉降、贴壁;能力弱或丧失贴壁能力的细胞保持悬浮状态,这些悬浮细胞 1 周内将全部死亡。本实验研究的 4 种细胞因

子都能增强原代细胞的贴壁能力,其中 EGF 促贴壁作用最显著,其次是 IGF-1(图 3)。这两种细胞因子具有同时增强细胞活性和贴壁的能力,这一现象支持细胞的贴壁能力与细胞的活性成正相关性的预测。

细胞实验操作对所培养细胞的数量有严格的要求,原代细胞的收集量往往制约着相关实验进程。细胞整体迁移能力越强,在相同时间内脱离组织块的细胞则越多,细胞迁移距离也越长。因此,测量并对比细胞迁移距离,可间接推断出细胞因子是否具有增强原代细胞迁移的能力。为了排除不同贝外套膜细胞迁移能力的个体差异,用于每种细胞因子研究的实验组与对照组中的实验材料都来源于同一只合浦珠母贝的同侧外套膜。为使测量结果统一,每块组织的迁移距离都以从组

织边缘到绝大部分细胞能达到的最远端之间的垂直距离为准(图4黄线)。根据结果,EGF、IGF-1和ECGS都能增加合浦珠母贝外套膜原代培养细胞的迁移距离,推测这3种细胞因子具有增强外套膜细胞迁移能力的作用。因此,在培养外套膜组织块时,向培养基中添加这些细胞因子,可能在较短时间内得到大量原代培养细胞。与此同时,添加EGF和IGF-1还能增强细胞活性及贴壁能力,所以这两种细胞因子对原代细胞的作用至关重要,其机理非常值得深入研究。

外套膜细胞通过分泌矿化相关的基质蛋白指导珍珠质形成,外套膜原代培养细胞依然保持着分泌基质蛋白的能力^[7]。因此,分析基质蛋白基因表达量的改变,可以探知细胞矿化能力的变化。Pif80、N16都是与贝壳珍珠层形成相关的基质蛋白^[10-12],MSI7与棱柱层形成相关,ACCBP则与两个矿化层的形成都相关^[13]。EGF能提高*pif80*、*n16*和*accbp*基因的表达量;ECGS能同时提高*pif80*、*n16*、*msi7*和*accbp*基因的表达量;IGF-1抑制*pif80*、*n16*和*accbp*的表达,但能促进*msi7*表达;bFGF能增强*pif80*、*n16*和*accbp*的表达。其中,ECGS对基质蛋白基因表达量的影响最为突出,在该因子的作用下基质蛋白N16基因相对表达量最高提高了21倍。以上结果表明,从基因表达水平分析,EGF、ECGS、IGF-1和bFGF都在一定程度上增强了原代细胞的矿化功能,这些因子是否在合浦珠母贝活体组织中仍具有相应的促进作用非常值得进一步的实验验证。

EGF最早在哺乳动物中发现,其主要作用是促进上皮细胞增殖。类EGF因子已在贻贝组织中分离,功能研究显示该因子能促进其自身外套膜细胞分裂^[16]。最近,EGF受体基因已从合浦珠母贝中克隆得到,并被证明能够在外套膜中大量表达^[24]。本实验研究的合浦珠母贝外套膜原代细胞主要成分为上皮样细胞^[7,9],EGF对细胞活性、贴壁能力、迁移能力及矿化功能的促进作用都非常突出。这个结果进一步证实,合浦珠母贝外套膜细胞中确实存在EGF调控通路。IGF-1是一种多功能的生长因子,同时具备促进细胞代谢、增殖及分化的功能,其受体基因已在太平洋牡蛎中克隆得到^[25],其促进细胞生长及蛋白质合成的功能也在扇贝外套膜边缘细胞中得到验证^[18]。ECGS是提取自牛脑垂体的多种细胞因子(如

bFGF、EGF)的混合物,其对细胞的影响可视为多细胞因子的协同作用。相关研究表明,ECGS能促进多种类型细胞生长,甚至可取代饲养细胞的作用^[26]。在本实验中ECGS提高细胞迁移能力,刺激矿化相关基因表达的效果强于其他单因子,但在促进细胞活性和贴壁能力方面的作用并不突出,这可能与实验用到的浓度水平有关。同时,bFGF能够刺激海洋无脊椎动物组织细胞寿命延长^[14],但在本实验中对合浦珠母贝外套膜细胞活性的促进作用并不明显,反而对细胞的迁移能力有一定抑制作用,推测实验中使用的bFGF浓度可能仍高于其发挥作用的最适浓度,因此在未来对该因子的进一步研究中,可适当降低bFGF的浓度范围。

本研究首次证明了部分脊椎动物源的细胞因子能增强合浦珠母贝外套膜原代细胞的活性、贴壁能力、迁移能力和矿化功能。研究涉及到的因子中,EGF和IGF-1对细胞活性和贴壁能力促进效果最为显著,能够有效延长细胞寿命。ECGS作为多因子混合物,在提升外套膜细胞迁移能力和矿化功能方面的作用显著。虽然这些细胞因子的调控机制及有效作用浓度还需进一步探究,但本实验为改良合浦珠母贝细胞培养基、优化细胞培养条件提供了一定参考,相关研究结果对海洋无脊椎动物细胞系的建立也将起到重要的推动作用。

参考文献:

- [1] Li J L, Liu Y. The main influencing factors on the quality of cultured pearls[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1753 - 1760. [李家乐, 刘越. 影响养殖珍珠质量的主要因子. 水产学报, 2011, 35(11): 1753 - 1760.]
- [2] Weiner S, Addadi L. Crystallization pathways in biomineralization[J]. Annual Review of Materials Research, 2011, 41: 21 - 40.
- [3] Takeuchi T, Endo K. Biphasic and dually coordinated expression of the genes encoding major shell matrix proteins in the pearl oyster *Pinctada fucata* [J]. Marine Biotechnology (NY), 2006, 8(1): 52 - 61.
- [4] Zhang C, Zhang R Q. Matrix proteins in the outer shells of molluscs [J]. Marine Biotechnology (NY), 2006, 8(6): 572 - 586.
- [5] Marin F, Luquet G, Marie B, et al. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2008, 80:

- 209 – 276.
- [6] Rinkevich B. Marine invertebrate cell cultures; New millennium trends [J]. Marine Biotechnology, 2005, 7 (5) : 429 – 439.
- [7] Gong N, Li Q, Huang J, *et al.* Culture of outer epithelial cells from mantle tissue to study shell matrix protein secretion for biomineralization [J]. Cell and Tissue Research, 2008, 333 (3) : 493 – 501.
- [8] Odintsova N A, Khomenko A V. Primary cell culture from embryos of the Japanese scallop *Mizuchopecten yessoensis* (Bivalvia) [J]. Cytotechnology, 1991, 6 (1) : 49 – 54.
- [9] Machii A, Wada K T. Some marine invertebrates tissue culture [C] // Mitsuhashi J. Invertebrate Cell System Applications. Boca Raton: CRC Press, 1989. 225 – 233.
- [10] Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, *et al.* An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation [J]. Science, 2009, 325 (5946) : 1388 – 1390.
- [11] Samata T, Hayashi N, Kono M, *et al.* A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata* [J]. FEBS Lett, 1999, 462 (1 – 2) : 225 – 229.
- [12] Kim I W, DiMasi E, Evans J S. Identification of mineral modulation sequences within the nacre – associated oyster shell protein, n16 [J]. Crystal Growth & Design, 2004, 4 (6) : 1113 – 1118.
- [13] Ma Z, Huang J, Sun J, *et al.* A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, *Pinctada fucata* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282 (32) : 23253 – 23263.
- [14] Chen S N, Wang C S. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Roding [J]. Methods in Cell Science, 1999, 21 (4) : 183 – 192.
- [15] Yan M. Establishment and characteristic analysis of larval and tissue cells in vitro in *Chlamys farreri* [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013. [晏萌. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 幼虫和成体组织细胞的体外培养体系建立和特征分析. 青岛: 中国海洋大学, 2013.]
- [16] Odintsova N A, Nesterov A M, Korchagina D A. A growth factor from tissues of the mussel *Mytilus edulis* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A, 1993, 105 (4) : 667 – 671.
- [17] Cantillana P, Inestrosa N C. Presence of an heparin – binding growth – factor in *Concholepas concholepas* Bruguiere (Mollusca, Gastropoda, Muricidae) [J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1993, 171 (2) : 239 – 250.
- [18] Giard W, Lebel J M, Boucaud – Camou E, *et al.* Effects of vertebrate growth factors on digestive gland cells from the mollusc *Pecten maximus* L. : an in vitro study [J]. Journal of Comparative Physiology-Part B, 1998, 168 (2) : 81 – 86.
- [19] Kellnercousin K, Mialhe E, Mathieu M. Identification of insulin – like peptides in cerebral ganglia neurosecretory cells of the mussel *Mytilus edulis* [J]. Tissue & Cell, 1994, 26 (6) : 891 – 899.
- [20] Hamano K, Awaji M, Usuki H. cDNA structure of an insulin – related peptide in the Pacific oyster and seasonal changes in the gene expression [J]. Journal of Endocrinology, 2005, 187 (1) : 55 – 67.
- [21] Casas S M, La Peyre J F. In vitro effects of growth factors and hormones on three *Perkinsus* species and increased proliferation of *P. marinus* during cloning [J]. Experimental Parasitology, 2009, 121 (3) : 257 – 267.
- [22] Csaba G. Hormonal imprinting: its role during the evolution and development of hormones and receptors [J]. Cell Biology International, 2000, 24 (7) : 407 – 414.
- [23] Csaba G, Kovacs P, Pallinger E. Presence and localization of epidermal growth factor (EGF) - and EGF-receptor-like immunoreactivity in *Tetrahymena* [J]. Cell Biology International, 2004, 28 (7) : 491 – 496.
- [24] Zhu W, Fan S, Huang G, *et al.* Highly expressed EGFR in pearl sac may facilitate the pearl formation in the pearl oyster, *Pinctada fucata* [J]. Gene, 2015, 566 (2) : 201 – 211.
- [25] Gricourt L, Bonnec G, Boujard D, *et al.* Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*; hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor [J]. General Comparative Endocrinology, 2003, 134 (1) : 44 – 56.
- [26] Evans C H, Dipaolo J A. Equivalency of endothelial cell-growth supplement to irradiated feeder cells in carcinogen-induced morphologic transformation of Syrian-hamster embryo cells [J]. Journal of the National Cancer Institute, 1982, 68 (1) : 127 – 131.

Effects of vertebrate cell factors on cell culture and biomineralization ability of mantle cells from *Pinctada fucata*

KONG Wei, LI Shiguo, XIE Liping, ZHANG Rongqing*

(School of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The establishment of marine mollusks permanent cell lines is one of the scientific problems that has not been conquered. The main reasons are lacking appropriate culture medium and cell factors. In this study, we investigate the effects of vertebrate cell factors on primary cell culture and biomineralization ability of mantle cells from the pearl oyster *Pinctada fucata*. Mantle tissues of 3-year-old pearl oysters were selected to culture the primary cells. Epidermal growth factor (EGF), endothelial cell growth supplement (ECGS), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and basic fibroblast growth factor (bFGF) were added separately into the culture medium. The effects were evaluated by comparing the cell viability, adherence capacity, migration ability and expression levels of four matrix protein genes (*pif80*, *n16*, *msi7* and *accbp*). According to the results, the cell viability, adherence and migration ability were significantly improved by EGF. The expression levels of *pif80*, *n16* and *accbp* all increased under the stimulation of this factor. After ECGS treatment, the adherence and migration abilities of primary cells were improved, and the expression levels of *pif80*, *n16* and *msi7* were increased significantly. The cell viability, adherence, migration ability as well as the expression levels of *msi7* were increased by IGF-1 treatment. However the expression level of *pif80*, *n16* and *accbp* decreased after cells were treated by this factor. After bFGF treatment, the cell viability and adherence capacity were improved. The expression levels of *pif80*, *n16* and *accbp* were also increased by this factor. These results suggested that vertebrate cell factors may be used as cell culture supplements, which were able to increase cell viability and biomineralization ability of mantle cells in *Pinctada fucata*. This study therefore may provide some theoretical references for the establishment of marine mollusks permanent cell lines.

Key words: *Pinctada fucata*; cell factors; mantle; cell culture; cell lines

Corresponding author: ZHANG Rongqing. E-mail:rqzhang@mail.tsinghua.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31372508; 31372502); National key Basic Research Program of China (2010CB126405)