

永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞系的建立及鉴定

张永德, 潘传燕, 余艳玲, 冯鹏霏, 罗洪林*

(广西水产科学研究院 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 广西南宁 530021)

摘要: 为获得具有单一克隆特性的能稳定传代培养的罗非鱼巨噬细胞系, 本研究从尼罗罗非鱼腹腔中分离纯化巨噬细胞, 采用EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染, 筛选单克隆细胞的方法建立了尼罗罗非鱼巨噬细胞系, 并对其进行了EBV感染鉴定、电镜观察、端粒酶活性检测、致癌性评估、核型分析以及分子生物学鉴定。研究表明, EBV已整合到尼罗罗非鱼巨噬细胞中且稳定表达, 经30代稳定传代, 该细胞系仍维持较好的增殖状态; 该细胞系表面不平滑, 有明显的钝圆形突起和细长的伪足, 表现为典型的巨噬细胞形态; 端粒酶活性显著高于未经感染的巨噬细胞, 而与HeLa细胞差异不显著, 且该细胞系不具有致癌性, 说明永生化细胞系构建成功。核型分析结果发现, 该细胞系具有44条染色体, 其核型公式为 $2n=2x=44=4sm+17st+1t$ 。PCR检测发现, 该细胞系存在CD33和CD205的转录本, 这些都是单核巨噬细胞的标志物, 经18S rRNA检测证明该细胞系来自尼罗罗非鱼巨噬细胞。永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞系已被成功建立, 该细胞系为研究罗非鱼链球菌HSP70-肽疫苗的高保护率, 以及罗非鱼的免疫防御机制提供了工具。

关键词: 尼罗罗非鱼; 巨噬细胞; 永生化; 细胞系

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

与哺乳动物的基本免疫机制相似, 硬骨鱼类也具有高度发达的免疫系统, 其先天免疫在防御病原生物入侵方面发挥决定性作用^[1]。在鱼类中, 巨噬细胞是抗病的重要因子, 是先天免疫反应的主要效应细胞, 并且在免疫的起始和调节中作为辅助细胞发挥关键作用^[2]。鱼体中的巨噬细胞吞噬惰性或抗原物质后, 通过分泌炎症细胞因子产生细胞毒性ROI_s、白细胞因子和其他调节分子^[3]。巨噬细胞广泛存在于脊椎动物体内, 以确保宿主对外来入侵者的连续监测, 多数情况下, 巨噬细胞提供了细胞介导的宿主防御病原体的第一道防线。

热休克蛋白(HSP)是一组应激蛋白, 介导细胞和组织对多种细胞毒性刺激的保护作用, 并作为宿主免疫系统的关键调节剂^[4]。研究发现, HSP70和抗原-HSP70复合物都可以促进尼罗罗非

鱼(*Oreochromis niloticus*)淋巴细胞和巨噬细胞的增殖, 显著增强巨噬细胞吞噬和释放NO的能力, 且HSP70还可以辅助抗原增强疫苗针对海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)的免疫保护作用, 在HSP70的协助下, 尼罗罗非鱼链球菌(*Streptococcus*)HSP70-肽疫苗获得了约77%的高免疫保护率^[5], 但其高保护率的重要机制尚不明确, 这就需要首先获得单一克隆特性的能稳定传代培养的尼罗罗非鱼巨噬细胞系。

自成功从金鱼(*Carassius auratus*)前肾中分离并建立巨噬细胞系^[6]以来, 鲤(*Cyprinus carpio*)^[7-9]、野鲮(*Labeo niloticus*)^[10]、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[11]等多种鱼类的巨噬细胞系也先后建立, 并广泛进行了体外免疫功能指标如吞噬活性、趋化性、产生活性氧及NO等的研究^[9-10, 12-13]。虽然尼罗罗非鱼巨噬细胞已成功分离^[14-15], 但对其

收稿日期: 2017-04-18 修回日期: 2017-08-04

资助项目: 国家自然科学基金(31372553); 广西自然科学基金(2015GXNSFAA139068); 广西科技计划基地和人才专项重点实验室建设项目(16-380-38)

通信作者: 罗洪林, E-mail: 541365548@qq.com

巨噬细胞免疫活性的相关研究仍然较少,且未能获得具有单一克隆特性的能稳定传代培养的尼罗罗非鱼巨噬细胞系,使得相关免疫学研究停滞不前。基于此,本研究在分离纯化尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞的基础上,利用EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)感染巨噬细胞,通过筛选单克隆细胞的方法,经传代稳定性、体外增殖、端粒酶活性、核型分析及特异性基因检测等实验鉴定,获得了能连续传代且功能确切的永生化的尼罗罗非鱼巨噬细胞系,以期为尼罗罗非鱼先天免疫及链球菌的防治研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验用鱼 尼罗罗非鱼取自国家级广西南宁尼罗罗非鱼良种场,体质量为(99.6±5.4)g,于28~30℃水温下在200 L水族箱中暂养,日换水量50%。

主要试剂 L-15培养基、胎牛血清、HBSS购自美国Gibco公司;胰酶、青霉素—链霉素双抗购自Hyclone公司;角鲨烯、MS-222、台盼蓝染色液购自美国Sigma公司;秋水仙素购自Fluka公司;反转录试剂盒、*Bgl*III内切酶购自大连宝生物工程有限公司;QIAamp DNA mini Kit购自Qiagen公司;SYBR Green Master Mix购自TOYOBO公司,其他试剂为国产分析纯。

1.2 方 法

腹腔巨噬细胞的分离培养及体外增殖 参考王秋华等^[15]的方法进行尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞的分离培养。实验鱼连续注射3次角鲨烯,每次注射250 μL,每隔2 d注射一次;用预冷的PBS缓冲溶液冲洗腹腔,收集冲洗液于45 mL离心管中,1400 r/min、4℃离心10 min,沉淀用HBSS缓冲溶液重悬,1400 r/min、4℃离心10 min洗涤1次;细胞重悬于2 mL HBSS缓冲溶液,加入9 mL灭菌三蒸水作用20 s破裂红细胞,立即加入1 mL 10×HBSS缓冲溶液,1400 r/min、4℃离心10 min,HBSS缓冲溶液洗涤2次,最后用L-15培养基重悬细胞,台盼蓝染色,计算活细胞数,瑞氏染色观察细胞状态。利用MTT方法对所分离培养的细胞进行体外增殖测试。首先将消化后细胞铺至96孔板中,每孔100 μL细胞悬液,约5000个细胞,然后将培养板在培养箱孵育

30 min,向每孔加入10 μL CCK-8溶液,将培养板在培养箱内孵育1~4 h,用酶标仪测定在450 nm处的吸光度。

EBV分离及永生化的巨噬细胞系的建立 采用L15培养基+10%胎牛血清+1%双抗(100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素)进行B958细胞的培养,培养至所需量后,停止加培养液至培养液完全变黄;培养液于4℃、4000 r/min离心30 min,转移上清液至另一无菌离心管,4℃、12 000 r/min离心120 min,弃上清液,加入5 mL新鲜培养液吹打重悬,4℃、3000 r/min离心20 min,将上清液用0.22 μm一次性过滤器过滤得到EBV浓缩液。待尼罗罗非鱼巨噬细胞生长至60%面积后开始感染EBV,首先将细胞置于4℃约2 h,然后向每皿加入1×10⁸个EBV,28℃孵育10 h,更换新鲜培养液,共感染3次,每次间隔2 d。最后挑取状态好的单克隆细胞于28℃静置培养,24 h后更换一次10% FBS-L15完全培养液,待细胞汇合度达90%时按每孔2 mL接种于24孔细胞培养板中传代培养,每3 d传代一次,连续传代培养30代,在显微镜下观察细胞形态变化。利用MTT方法对所获得的永生化的尼罗罗非鱼巨噬细胞进行体外增殖测试。

永生化的巨噬细胞EBV感染鉴定 将稳定传代(15代)的巨噬细胞提取RNA,采用DNase I处理以除去基因组DNA,PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit反转录为cDNA,并采用LMP1-F: 5'-GGTCTACTCCTACTGATGAT-3', LMP1-R: 5'-GGGTCTGCCCTCGTTGG-3'进行LMP1基因部分序列的扩增,预期扩增片段大小为410 bp;采用EBV-F: 5'-CTTAGAATGTGGCCGGGCTGTAAAAT-3', EBV-R: 5'-ATCCAGTACGTC TTTGTGGAGCCCAAG-3'进行EBV BALF5基因部分序列的PCR扩增,预期扩增片段大小为229 bp,退火温度均为55℃,反应结束后用1%琼脂糖凝胶电泳检测目的条带。

EBV LMP1基因整合和表达鉴定 对永生化的巨噬细胞2号和6号样品分别提取基因组DNA,采用Southern blot方法检测EBV LMP1基因。首先设计并合成地高辛标记的探针引物LMP1-F: 5'-TTTATCTTCAGAAGAGACCT-TCTCTGT-3', LMP1-R: 5'-GTTGGAGT-TAGAGTCAGATTCATGG-3',对巨噬细胞DNA进行PCR扩增获得片段大小为607 bp的标记

探针, 采用Bg/III对巨噬细胞基因组DNA进行过夜酶切, 然后利用0.9%的琼脂糖凝胶40 V电泳过夜; 经碱变性和虹吸印迹转膜, 与探针在42 °C杂交过夜, 20×SSC溶液洗膜5次, 最后在暗室的红光下, -70 °C低温曝光3 d。

利用生物素标记的寡核苷酸作为探针, 采用Northern blot方法检测目标RNA。EBV LMP1和Actin基因探针序列见表1, 探针长度分别为221 bp、199 bp, 采用1.2%甲醛/MOPS胶分离RNA, 120 V电泳3 h, 上行毛细管转移法转膜; 然后将探针

放入杂交管中65 °C杂交过夜; 2×SSC缓冲液/0.2% SDS在65 °C 15 min条件下洗膜2~3次; 最后将膜转移至两层塑膜, 放入磷屏中压10 h。

永生化的巨噬细胞电子显微镜观察 将永生化的巨噬细胞培养至对数期, 在2.5%戊二醛溶液中固定过夜; 细胞用0.1 mol/L二甲胍盐缓冲液(pH 7.4)洗涤3次, 用1% OsO₄水溶液处理2 h, 酒精梯度脱水(10%~100%, 每步15 min), 空气干燥24 h后, 细胞用金覆盖, 在TESCAN VEGA 3扫描电子显微镜中检测, 运行电压为5.0 kV。

表1 永生化的尼罗罗非鱼巨噬细胞Northern blot检测用探针信息

Tab. 1 Northern blot probe information for immortalized *O. niloticus* macrophages

探针名称 probe name	探针序列(5'→3') probe sequence(5'→3')	探针大小/bp probe size
LMP1 基因 探针	GAGGGAGTCATCGTGGTGGTGTTCATCACTGTGTCGTTGTCATGGTAATACATCCAGATTAATAATCG CCAGAAACAGGAGGAGCCAAAGGAGATCAACCAATAGAGTCCACAGTTTTGTTGTAGATAGAGAGC AATAATGAGCAGGATGAGGTCTAGGAAGAAGGCTAGGAAGAAGGCCAAAAGCTGCCAGATGGTGGC ACCAAGTCGCCAGAGCATCT	221
Actin 探针	AAGAGAGGTATCCTGACCCTCAAATACCCATTGAGCACGGTATTGTGACCAACTGGGATGACATGGA GAAGATCTGGCATCACACCTTCTACAATGAGCTCCGTGTTGCCCTGAGGAGCACCCCTGTCGTGCTCA CTGAGGCTCCCCTGAATCCCAAAGCCAACAGAGAGAAGATGACACAGATCATGTTTCGAGACCT	199

端粒酶活性的检测 采用TRAP法检测端粒酶活性, 10 μL PCR反应体系包含: 细胞裂解液2 μL, 10×TRAP buffer 2 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL, TS primer (10 mmol/L) 1 μL, 混合均匀后, 30 °C反应30 min, 94 °C灭活10 min。采用RT-PCR检测端粒酶活性, 其上下游引物序列分别为: 5'-ATTTCCTTCGGACAGCGTAA-3', 5'-GAGGACTTACTCTTACACTTCGCTCACC-3', 20 μL反应体系包含: SYBR Green Master Mix 5 μL, ACX primer (10 mmol/L) 1 μL, 反应混合液10 μL。混匀以后, 94 °C 10 min; 94 °C 30 s、60 °C 90 s, 40个循环, 60 °C 90 s收集信号。

永生化的巨噬细胞的核型分析 无菌条件下取永生化的巨噬细胞, 加入含20%胎牛血清和PHA的培养液, 28 °C培养4 d, 加秋水仙素碱至终浓度为0.08 μg/mL, 继续培养2 h。用75 mmol/L KCl低渗处理细胞30 min, 然后固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)漂洗4次, 制成染色体中期分裂相的玻片。染色体玻片用吉姆萨染色0.5 h后在显微镜下观察并照相, 采用Karyo 3.0软件进行染色体分类及核型分析。

永生化的巨噬细胞的致癌性评估 取2株永生化的尼罗罗非鱼巨噬细胞培养至对数期, 将细胞消化后离心收集细胞, 用100 μL PBS缓冲溶液重悬后注射无胸腺裸鼠(nude mouse)背部皮下,

每株细胞注射5只无胸腺裸鼠(1×10⁶个细胞), 以HeLa细胞为阳性对照, 以PBS缓冲溶液为空白对照; 注射后3~4周观察成瘤情况。

永生化的巨噬细胞的分子鉴定 根据GenBank中β-actin与18S rRNA基因序列, 采用Primer Premier 5.0设计2对引物(表2), 参考已报道的尼罗罗非鱼CD33、CD205、GATA3基因特异性引物^[6], 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。对永生化的巨噬细胞提取RNA, 经反转录、PCR扩增和1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 扩增片段送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序, 然后采用MAFFT在线系统(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>)将测定序列与原序列比对分析, 确定该细胞系的细胞起源。

统计分析 数据以平均值±标准差(mean±SD)表示, 各均数之间的比较采用One-way ANOVA和post hoc检验, P<0.05被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 腹腔巨噬细胞的分离培养及体外增殖

腹腔分离的细胞经24、48和72 h培养后, 细胞呈多形性, 大小不一。培养48~96 h过程中, 细胞呈指数增殖状态, 可见细胞形态呈圆

表 2 尼罗罗非鱼巨噬细胞分子鉴定引物信息

Tab. 2 Primer information for molecular identification of *O. niloticus* macrophages

引物名称 primer	引物序列(5'→3') sequence (5'→3')	扩增片段大小/bp product	退火温度/°C annealing	GenBank号 GenBank No.
β -actin_F	GCAAGCAGGAGTACGATGAGT	115	55	XM_003455949
β -actin_R	CAGTTGTTGGGTTGTAGCAG			
18S rRNA_F	CGCCGAGAAGACGATCAAAC	669	56	DQ397879.1
18S rRNA_R	TTCATTGATGCACGAGCCGA			

形、梭形、星形等多种形态, 细胞核中有2个或3个核仁; 72 h后, 其增长速度逐渐放缓(图1)。经吉姆萨和瑞氏染色后, 发现细胞呈典型的单核巨噬细胞形态特征。

以培养时间为横坐标, 以细胞吸光度为纵坐标, 绘制尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞体外增殖曲线(图2)。结果发现, 尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞体外培养96 h均呈增殖状态, 细胞贴壁生长的前24 h处于迟缓期, 48 h后呈对数增长趋势, 随着时间的推移, 72 h后由于营养缺乏、生长空间受限等因素, 其增长速度逐渐放缓, 进入衰退期, 而对照组则在此培养周期内无明显的增殖。

2.2 EBV分离及永生化巨噬细胞系的建立

将永生化巨噬细胞继续传代培养, 每3 d传代一次, 连续传代培养30代, 从中选取永生化巨噬细胞的2号和6号样品进行实验, 非永生化巨噬细胞作为对照。结果发现, 从第5代开始, 永生化的巨噬细胞2号和6号均出现细胞集落, 至第30代可见明显细胞集落, 而非永生化的巨噬细胞从第5代开始细胞逐渐死亡并集落消失(图3)。

2.3 永生化巨噬细胞EBV感染鉴定

对第15代巨噬细胞提取RNA, 经反转录后, 分别对EBV *BALF5*基因与样本 *LMP1*基因进

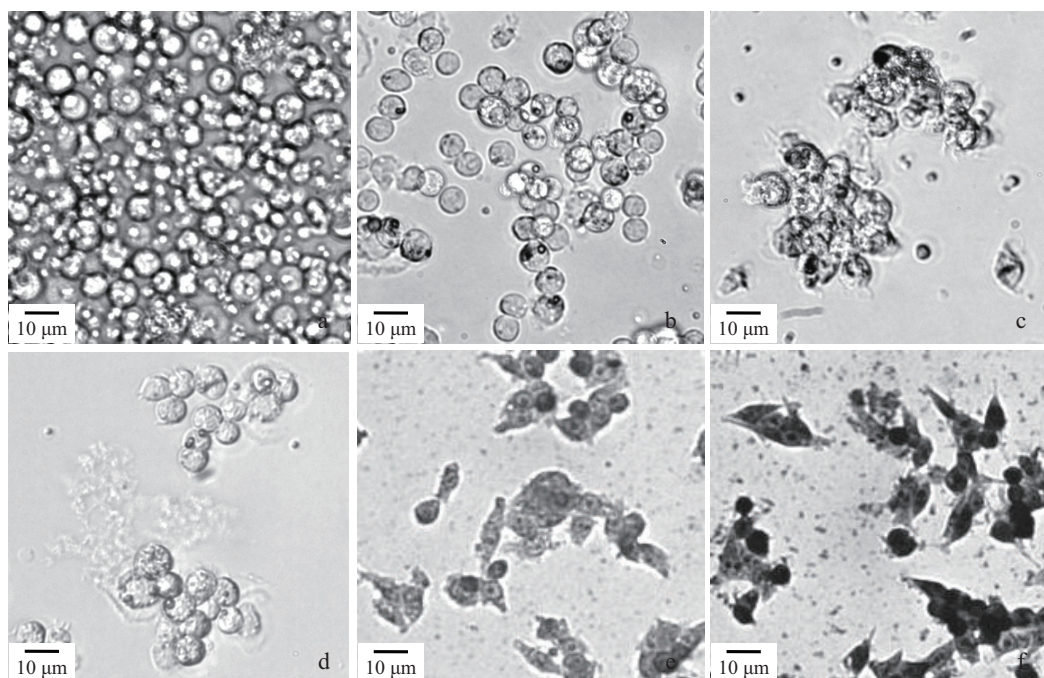


图 1 尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞分离培养的显微图

a. 分离的尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞; b、c、d分别代表巨噬细胞培养24、48和72 h的细胞形态; e和f分别是吉姆萨和瑞氏染色后的巨噬细胞形态

Fig. 1 Micrograph of the cultured *O. niloticus* peritoneal macrophages

a is isolated *O. niloticus* peritoneal macrophages cultured for 24 hours; b, c and d represent the cell morphology of macrophages for 24, 48 and 72 h, respectively; e and f are the macrophage morphology after Giemsa and Wright's staining, respectively

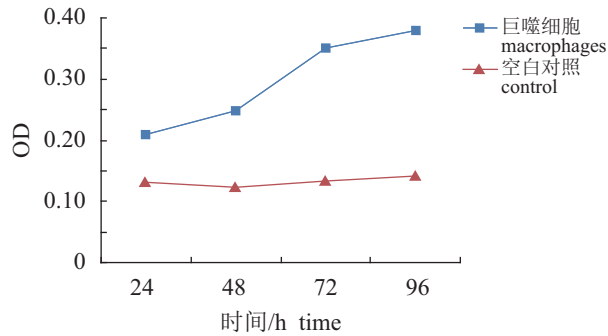


图2 尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞体外培养不同时间的增殖曲线图

Fig. 2 Proliferation curve of *O. niloticus* peritoneal macrophages *in vitro* cultured at different time

行PCR扩增,以未被感染的细胞作为对照,产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析,结果发现,检测样本在229 bp处有一条特异性扩增条带,与预期的

EBV *BALF5*基因片段大小一致,而对照组则无此条带(图4);检测样本在410 bp处有一条特异性扩增条带,与预期的*LMP1*基因片段大小一致,对照组无此条带(图5)。

2.4 EBV *LMP1*基因整合和表达鉴定

对永生化巨噬细胞2号和6号样品提取基因组DNA,并设计探针对其进行PCR扩增、酶切和Southern blot检测。结果发现,2号和6号永生化巨噬细胞样品经3'地高辛标记的*LMP1*基因片段特异性探针杂交、曝光显色后均显示为一条谱带(图6),说明EBV已经整合到该巨噬细胞,而其余非永生细胞样品则无此谱带。

利用生物素标记的寡核苷酸作为探针,采用Northern blot方法对永生化巨噬细胞RNA进行检测,以非永生细胞作为对照,结果发现,样品2和6为永生细胞, *LMP1*探针杂

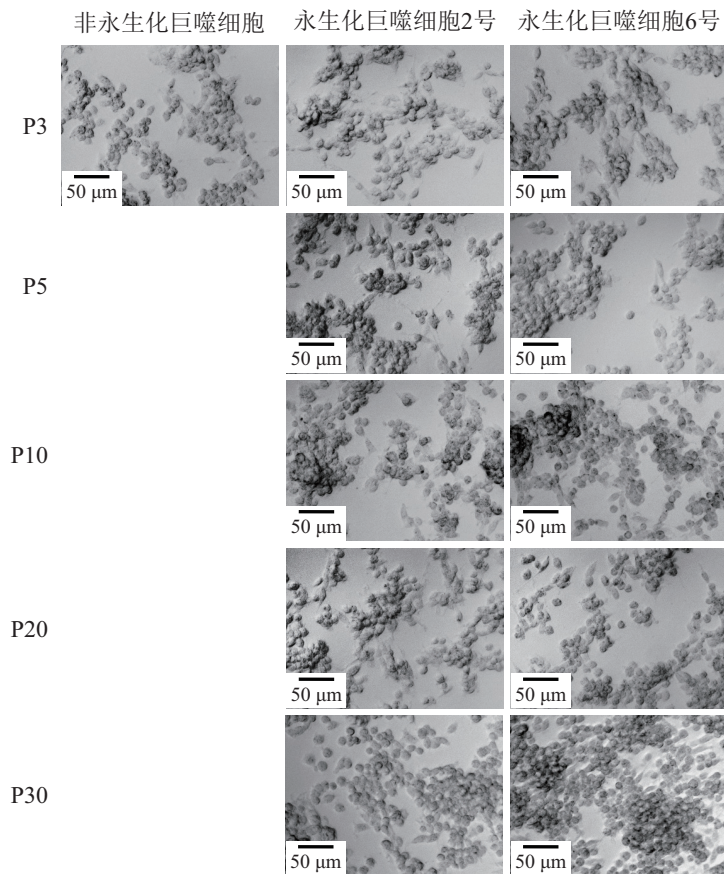


图3 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞不同传代稳定性显微图

P3、P5、P10、P20和P30分别代表第3、5、10、20和30代;从第5代开始,永生化巨噬细胞2号和6号出现细胞集落,而非永生巨噬细胞从第5代开始细胞集落消失

Fig. 3 Micrograph of immortalized *O. niloticus* macrophages with different passages

P3, P5, P10, P20 and P30 represent the 3 th, 5 th, 10 th, 20 th and 30 th generations, respectively; from the 5 th generation, immortalized macrophages 2 and 6 displayed cell colonies, whereas non-immortalized macrophages disappeared from the 5 th generation

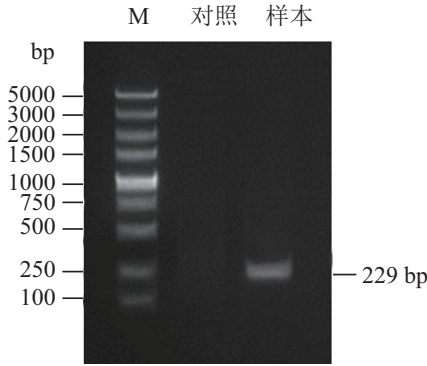


图 4 EBV感染尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞的电泳图

Fig. 4 Electrophoresis of *O. niloticus* peritoneal macrophages infected by EBV

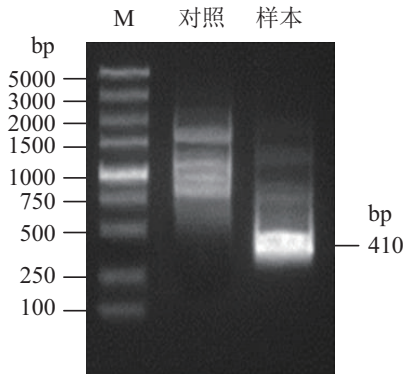


图 5 尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞LMP1基因检测电泳图

Fig. 5 Electrophoresis of *LMP1* gene in *O. niloticus* peritoneal macrophages

交结果均显示为阳性, 而样品1、3、4、5为非永生巨噬细胞, *LMP1*探针杂交结果均显示为阴性, 说明永生巨噬细胞已经将EBV整合进巨噬细胞中。样品1~6号 β -actin探针杂交结果均显示为阳性, 且片段大小一致, 说明所检测样品均为巨噬细胞(图7)。

2.5 电镜观察

将第30代的巨噬细胞经固定、脱水、干燥、镀膜等处理后进行扫描电子显微镜检测。结果显示, 细胞在培养物中形态为3D圆形或卵圆形, 表面不平滑, 有明显的钝圆形突起和细长的伪足(图8), 表现为较为典型的巨噬细胞形态。此时由于该细胞系分裂旺盛, 细胞处于生长的对数阶段, 几乎所有的细胞参与细胞分裂。

2.6 端粒酶活性检测

采用TRAP法, 以HeLa细胞作为阳性对照,

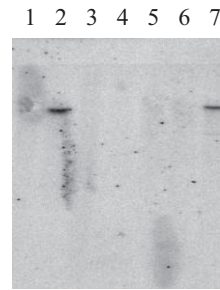


图 6 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞Southern blot杂交结果

2和7号为永生巨噬细胞, 探针杂交后显示为一条阳性带; 1、3、5、6号为非永生巨噬细胞, 探针杂交后无带; 4号未加样品

Fig. 6 Southern blot electrophoresis of immortalized *O. niloticus* macrophages infected by EBV

2 and 7 are immortalized macrophages, the probe hybridization showed a positive band pattern; samples 1, 3, 5 and 6 are non-immortalized macrophages, the probe had no band after hybridization; 4 is blank lane

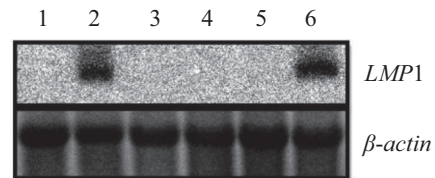


图 7 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞Northern blot杂交结果

2、6. 永生巨噬细胞; 1、3、4、5. 非永生巨噬细胞

Fig. 7 Northern blot electrophoresis of immortalized *O. niloticus* macrophages infected by EBV

2, 6. immortalized macrophages; 1, 3, 4, 5. nonimmortalized macrophages

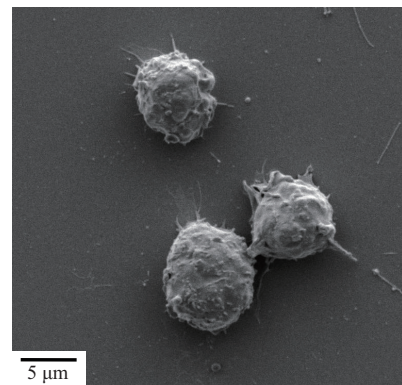


图 8 尼罗罗非鱼巨噬细胞系电子显微镜检测

Fig. 8 SEM photographs of immortalized *O. niloticus* macrophages

以未被感染的巨噬细胞作为阴性对照, 对永生巨噬细胞4个EBV被感染克隆细胞

株进行端粒酶活性检测。结果显示, 4个克隆细胞株端粒酶RT-PCR的平均 C_T 值为23.41, 显著低于未被感染巨噬细胞的30.35($P<0.05$), 而与

HeLa细胞的平均 C_T 值差异不显著($P>0.05$)(表3), 说明该细胞系端粒酶活性与HeLa细胞一致, 且显著高于非永生化巨噬细胞。

表3 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞端粒酶活性检测结果

Tab. 3 Test results of telomerase activity in immortalized *O. niloticus* macrophages

细胞 cell	C_T 值				平均 C_T 值
永生化巨噬细胞 immortalized macrophages	25.32	21.42	24.04	22.85	23.41±1.67b
HeLa细胞 HeLa cell	22.98	22.98	22.85		22.98±0.08b
非永生化巨噬细胞 non-immortalized macrophages	30.35	30.39	30.09		30.28±0.16a

注: 同一列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Notes: the different lowercase letters indicate the significant difference ($P<0.05$)

2.7 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞的核型分析

对永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞染色体制备中期分裂相, 并进行染色体核型分析(图9), 共分析112个分裂相。112个分裂相中, 染色体数目从32条到56条不等, 但分裂相染色体数目最多的是44条, 为68个细胞, 占总细胞分裂相的58.6%, 表明该细胞染色体数目应为44(图10)。对永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞进行核型分析, 其核型公式为 $2n=2x=44=4sm+17st+1t$ (图10), 即细胞有4组亚中着丝粒染色体(sm), 17组亚端着丝粒染色体(st)和1组端部着丝粒染色体(t)。

2.8 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞的致癌性评估

随机选取4株永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞, 注射无胸腺裸鼠背部皮下观察成瘤情况。结果发现, 注射永生化巨噬细胞3~4周后, 所注射部

位未出现成瘤情况, 实验无胸腺裸鼠生理状况均表现正常(图11-a)。而注射HeLa细胞的无胸腺裸鼠, 其注射部位出现了一个明显的瘤状突起(图11-b), 解剖发现该突起为一直径0.7~1.2 cm的红色瘤状物(图11-c)。

2.9 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞的分子生物学鉴定

采用5个基因对永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞进行分子生物学鉴定。结果显示, 这5个基因 β -actin、18S rRNA、CD205、CD33、GATA3在永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞中均具有1个特异性扩增片段, 扩增片段大小分别为: 115 bp、669 bp、624 bp、569 bp、1259 bp(图12)。将上述扩增片段纯化测序, 并与NCBI数据中的对应基因进行序列比对分析, 表明目的基因正确无误, 即所获得的永生化细胞为罗非鱼巨噬细胞。

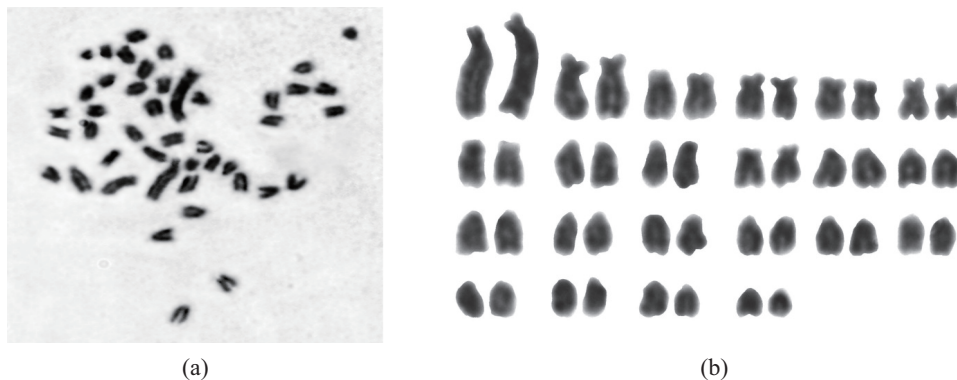


图9 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞染色体图及核型分析图

(a) 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞染色体图, (b) 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞染色体核型分析图; 细胞染色体数为44, 核型为 $2n=2x=44=4sm+17st+1t$

Fig. 9 Metaphase plate and karyo of immortalized *O. niloticus* macrophages

(a) metaphase plate of immortalized *O. niloticus* macrophages, (b) Karyo of immortalized *O. niloticus* macrophages; the chromosome number is 44, and the karyotype formula is $2n=2x=44=4sm+17st+1t$

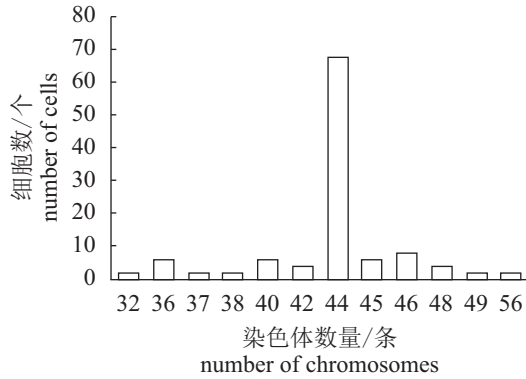


图 10 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞染色体数目分布图
 Fig. 10 The frequency distribution of chromosomes in immortalized *O. niloticus* macrophage cells

3 讨论

白细胞系为评估免疫防御机制提供了有用的工具, 可以对鱼类的免疫状态进行评估^[17]。巨噬细胞的生物学特征已在多种鱼类中被研究和描述, 且生物学特征在许多鱼类中具有相似之处, 其形态通常不规则, 可以像淋巴细胞、成纤维细胞、树突状细胞、原始间充质细胞或体内的其他细胞类型, 而早期的鱼类巨噬细胞系形态为巨噬细胞样^[18]或成纤维细胞样^[19-20]。许多鱼类的巨噬/单核细胞系从外周血白细胞^[8, 19]、头肾^[6, 21]、胸腺^[9, 22]和腹腔^[23-25]中分离获得。腹腔是一个独特的腔室, 里面有肝脏、脾脏、大部分胃肠及其他内脏器官, 且多种免疫细胞存在于其中, 包括巨噬细胞、B细胞和T细胞。在腹腔中存在大量的巨噬细胞, 使其成为收集分离巨噬细胞的优选位点^[26], 然而, 由于存在多种

不同成熟度的异种细胞群, 鱼类腹腔巨噬细胞的分离纯化相对比较困难^[24]。Watanabe等^[25]对真赤鲷(*Pagrus major*)腹腔巨噬细胞进行了长期的培养, 此后, 鲶(*Silurus asotus*)^[24]、舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)^[27]和日本比目鱼(*Paralichthys olivaceus*)^[28]的腹腔巨噬细胞先后被分离培养, 并用于各种免疫学研究。本研究从尼罗罗非鱼腹腔中成功分离纯化并培养获得了巨噬细胞, 利用EBV感染, 通过筛选单克隆细胞的方法建立了能连续传代且功能确切的永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞系, 并且此细胞系具有优异的增殖能力, 即使在长期培养期或反复冻融循环中也未发生表型改变。该巨噬细胞系的建立, 为进一步研究这些细胞的功能及其鱼类的免疫学提供了有用的工具。此外, 该细胞系有助于开发和表征巨噬细胞标志物, 并可用作巨噬细胞信号肽的来源, 例如影响白细胞生长和成熟的细胞因子和其他因子。

核型分析显示, 在大多数细胞中二倍体染色体计数为44, 这与已有的尼罗罗非鱼研究结果一致^[29], 表明本研究建立的永生化巨噬细胞为正常的尼罗罗非鱼巨噬细胞。通常认为, 非整倍体是癌细胞的常见特征^[30], 而对本研究培养的永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞的致癌性评估结果发现, 该细胞不具有致癌性。细胞中的异常染色体数量可能是由于核型制备期间染色体的丢失或附近细胞的添加^[31]造成的。通过对培养的永生化巨噬细胞进行Southern blot和Northern blot检测都证明EBV成功感染了尼罗罗非鱼巨噬细胞, 利用尼罗罗非鱼特异性18 S *rRNA*进一步证实了永

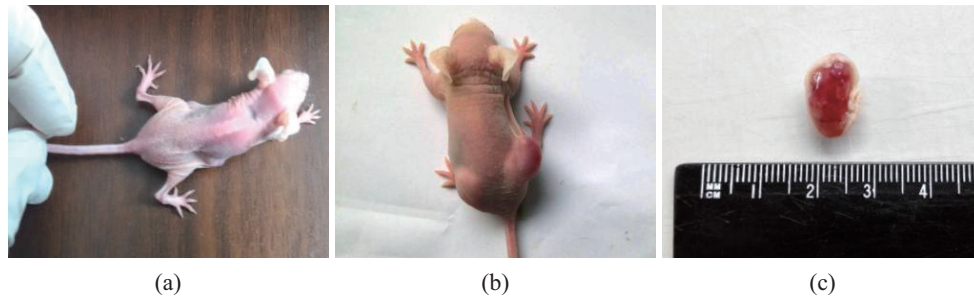


图 11 永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞的致癌性评估

(a) 注射永生化尼罗罗非鱼巨噬细胞的无胸腺裸鼠, 注射部位未出现成瘤情况; (b) 注射HeLa细胞的无胸腺裸鼠, 注射部位出现了一个明显的瘤状突起; (c) 注射HeLa细胞无胸腺裸鼠的瘤状物, 红色, 椭圆形, 直径为0.7~1.2 cm

Fig. 11 Carcinogenicity of immortalized *O. niloticus* macrophages

(a) nude mice injected with immortalized *O. niloticus* macrophages, and no tumor was found at the injection site; (b) nude mice injected with HeLa cells, and an apparent neoplasm appeared in the injection site; (c) tumor of nude mice injected with HeLa cells, red color, oval shape with 0.7~1.2 cm in diameter

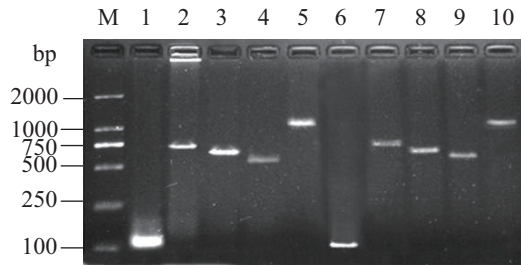


图 12 永生化的尼罗罗非鱼巨噬细胞多基因鉴定电泳图

其中泳道1~5为未永生化的巨噬细胞检测结果电泳图, 泳道6~10为永生化的巨噬细胞检测结果电泳图; M. DL2000 Marker; 1. β -actin (115 bp); 2. 18S rRNA (669 bp); 3. CD205 (624 bp); 4. CD33 (569 bp); 5. GATA3 (1259 bp); 6. β -actin (115 bp); 7. 18S rRNA (669 bp); 8. CD205 (624 bp); 9. CD33 (569 bp); 10. GATA3 (1259 bp)

Fig. 12 Multi - gene identification of immortalized macrophage cell line of *O. niloticus*

Lane 1~5. non-immortalized macrophage; Lane 6~10. immortalized macrophage; M. DL2000 Marker; 1. β -actin (115 bp); 2. 18S rRNA (669 bp); 3. CD205 (624 bp); 4. CD33 (569 bp); 5. GATA3 (1259 bp); 6. β -actin (115 bp); 7. 18S rRNA (669 bp); 8. CD205 (624 bp); 9. CD33 (569 bp); 10. GATA3 (1259 bp)

生化尼罗罗非鱼巨噬细胞的起源。线粒体18S rRNA基因序列比对已经被用作可靠的分子方法来准确地鉴定许多鱼类细胞的起源, 如大西洋鲑(*Salmo salar*)^[32]、赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)^[33]和金鱼^[34]等。

簇分化抗原(cluster of differentiation, CD)最初由国际人类白细胞分化抗原研讨会(HLDA)命名, 用于分类白细胞表面抗原的分化簇。其中CD33在骨髓干细胞、成肌细胞、单核细胞/巨噬细胞、粒细胞前体和肥大细胞中表达^[35]; CD205在树突状细胞、单核细胞、朗格汉氏细胞上有表达^[36], CD205也是虹鳟有丝分裂生殖细胞的表面标记物^[37]; 锌指转录因子GATA3可在多种组织中表达, 作为II型炎症的中枢介质, GATA3对于ILC2细胞发育和Th2细胞因子产生是必需的^[38], 而 β -actin在巨噬细胞分化过程中参与转录调控^[39]。本研究对永生化的尼罗罗非鱼巨噬细胞的分子生物学鉴定结果发现, 该细胞系存在CD33和CD205的转录本, 这些都是单核白细胞的标志物。

端粒是由每条染色体两端发现的富含G的串联重复序列组成的DNA片段。端粒在正常体细胞增殖期间会逐渐缩短, 从而为细胞的分裂次数设定了上限^[40]。而端粒酶是一种核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物, 其典型功能是保持染色体末端结构(端粒)的完整性, 从而使细胞

持续增殖而获得永生化^[41]。端粒酶活性已经被广泛的用于永生化的细胞和癌细胞的研究。本研究采用TRAP法对永生化的尼罗罗非鱼腹腔巨噬细胞4个被感染克隆细胞株进行端粒酶活性检测, 其平均 C_T 值显著低于未被感染巨噬细胞的 C_T 值, 而与HeLa细胞平均 C_T 值差异不显著, 说明该细胞系端粒酶活性与HeLa细胞的端粒酶活性相似, 也进一步印证了该细胞系永生化的成功。

参考文献:

- [1] Russo R, Shoemaker C A, Panangala V S, et al. In vitro and in vivo interaction of macrophages from vaccinated and non-vaccinated channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(3): 543-552.
- [2] Mulero V, Meseguer J. Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata*L.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1998, 8(2): 143-156.
- [3] Giacomo Zaccane, J Meseguer, A García-Ayala. Fish Defenses[M]. New Hampshire: Science Publishers, 2009: 46-49.
- [4] Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy[J]. Journal of leukocyte biology, 2007, 81(1): 15-27.
- [5] Chen M, Wang R, Li L, et al. Immunological enhancement action of endotoxin-free tilapia heat shock protein 70 against *Streptococcus iniae*[J]. Cellular immunology, 2014, 290(1): 1-9.
- [6] Wang R, Neumann N F, Shen Q, et al. Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5(5): 329-346.
- [7] Sieroslawska A, Rymuszka A. Effects of cylindrospermopsin on a common carp leucocyte cell line[J]. Journal of Applied Toxicology, 2015, 35(1): 83-89.
- [8] Chaudhary D K, Sood N, Pradhan P K, et al. Establishment of a macrophage cell line from adherent peripheral blood mononuclear cells of *Catla catla*[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2012, 48(6): 340-348.
- [9] Chaudhary D K, Sood N, Rathore G, et al. Establishment and characterization of macrophage cell line from

- thymus of *Catla catla* (Hamilton, 1822)[J]. *Aquaculture Research*, 2014, 45(2): 299-311.
- [10] Awasthi A, Rathore G, Pradhan P K, *et al.* Isolation and characterization of head kidney derived macrophages of *Labeo rohita*[J]. *Journal of Environmental Biology*, 2014, 35(5): 949-960.
- [11] Pham P H, Lumsden J S, Tafalla C, *et al.* Differential effects of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotypes IVa and IVb on gill epithelial and spleen macrophage cell lines from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 34(2): 632-640.
- [12] Joerink M, Ribeiro C M S, Stet R J M, *et al.* Head kidney-derived macrophages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) show plasticity and functional polarization upon differential stimulation[J]. *The Journal of Immunology*, 2006, 177(1): 61-69.
- [13] Walsh C J, Toranto J D, Gilliland C T, *et al.* Nitric oxide production by nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) and clearnose skate (*Raja eglanteria*) peripheral blood leucocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 20(1): 40-46.
- [14] Soto E, Fernandez D, Thune R, *et al.* Interaction of *Francisella asiatica* with tilapia (*Oreochromis niloticus*) innate immunity[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(5): 2070-2078.
- [15] 王秋华, 陈明, 黄维义, 等. 罗非鱼腹腔巨噬细胞分离与培养[J]. *华北农学报*, 2011, 26(S2): 224-228.
- Wang Q H, Chen M, Huang W Y, *et al.* Separation and cultivation of tilapia peritoneal macrophage[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2011, 26(S2): 224-228.
- [16] Wen C M. Development and characterization of a cell line from tilapia head kidney with melanomacrophage characteristics[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 49: 442-449.
- [17] Datta S, Ghosh D, Saha D R, *et al.* Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: role of head kidney macrophages as biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 92(2): 86-94.
- [18] Weyts F A A, Rombout J, Flik G, *et al.* A common carp (*Cyprinus carpio* L.) leucocyte cell line shares morphological and functional characteristics with macrophages[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, 7(2): 123-133.
- [19] DeWitte-Orr S J, Lepic K, Bryson S P, *et al.* Development of a continuous cell line, PBLE, from an American eel peripheral blood leukocyte preparation[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2006, 42(8): 263-272.
- [20] Katakura F, Takizawa F, Yoshida M, *et al.* Co-culture of carp (*Cyprinus carpio*) kidney haematopoietic cells with feeder cells resulting in long-term proliferation of T-cell lineages[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 131(1): 127-136.
- [21] Salazar S, Oliver C, Yáñez A J, *et al.* Comparative analysis of innate immune responses to *Streptococcus phocae* strains in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 51: 97-103.
- [22] 雷存科, 陈中元, 张奇亚. 三种水生动物细胞系对两株蛙病毒敏感性的比较[J]. *水产学报*, 2016, 40(10): 1643-1647.
- Lei C K, Chen Z Y, Zhang Q Y. Comparative susceptibility of three aquatic animal cell lines to two ranaviruses[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1643-1647.
- [23] Ghosh E E B, Cassado A A, Govoni G R, *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(6): 2568-2573.
- [24] Jenkins J A, Klesius P H. Elicitation of macrophages from the peritoneal cavity of channel catfish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1998, 10(1): 69-74.
- [25] Watanabe T, Shoho T, Ohta H, *et al.* Long-term cell culture of resident peritoneal macrophages from red sea bream *Pagrus major*[J]. *Fisheries Science*, 1997, 63(6): 862-866.
- [26] Gonçalves, R, Mosser, D M. The isolation and characterization of murine macrophages[J]. *Current Protocols in Immunology*, 2015, 111: 14.1.1-14.1.16.
- [27] Do Vale A, Afonso A, Silva M T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 13(3): 183-198.
- [28] Ishibe K, Osatomi K, Hara K, *et al.* Comparison of the

- responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(2): 243-251.
- [29] 陈敏容, 陈宏溪. 三种罗非鱼染色体组型的比较研究[J]. *遗传学报*, 1983, 10(1): 56-62.
- Chen M R, Chen H X. Comparative study of karyotypes in three tilapia fishes[J]. *Acta Genetica Sinica*, 1983, 10(1): 56-62.
- [30] Weaver B A A, Cleveland D W. Does aneuploidy cause cancer?[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2006, 18(6): 658-667.
- [31] Swaminathan T R, Lakra W S, Gopalakrishnan A, *et al.* Development and characterization of a new epithelial cell line PSF from caudal fin of green chromide, *Etrorplus suratensis* (Bloch, 1790)[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2010, 46(8): 647-656.
- [32] Minghetti M, Leaver M J, Tocher D R. Transcriptional control mechanisms of genes of lipid and fatty acid metabolism in the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) established cell line, SHK-1[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2011, 1811(3): 194-202.
- [33] Huang X, Huang Y, Ouyang Z, *et al.* Establishment of a cell line from the brain of grouper (*Epinephelus akaara*) for cytotoxicity testing and virus pathogenesis[J]. *Aquaculture*, 2011, 311(1): 65-73.
- [34] Rougée L, Ostrander G K, Richmond R H, *et al.* Establishment, characterization, and viral susceptibility of two cell lines derived from goldfish *Carassius auratus* muscle and swim bladder[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 77(2): 127-135.
- [35] Naeim F, Rao P N, Grody W W. Hematopathology: morphology, immunophenotype, cytogenetics, and molecular approaches[M]. California Academic Press, 2009: 41.
- [36] Kato M, McDonald K J, Khan S, *et al.* Expression of human DEC-205(CD205) multilectin receptor on leukocytes[J]. *International Immunology*, 2006, 18(6): 857-869.
- [37] Nagasawa K, Shikina S, Takeuchi Y, *et al.* Lymphocyte antigen 75(Ly75/CD205) is a surface marker on mitotic germ cells in rainbow trout[J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 83(4): 597-606.
- [38] Tindemans I, Serafini N, Di Santo J P, *et al.* GATA-3 function in innate and adaptive immunity[J]. *Immunity*, 2014, 41(2): 191-206.
- [39] Xu Y Z, Thuraisingam T, de Lima Morais D A, *et al.* Nuclear translocation of β -actin is involved in transcriptional regulation during macrophage differentiation of HL-60 cells[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21(5): 811-820.
- [40] Pickett H A, Reddel R R. Molecular mechanisms of activity and derepression of alternative lengthening of telomeres[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(11): 875-880.
- [41] Levy M Z, Allsopp R C, Futcher A B, *et al.* Telomere end-replication problem and cell aging[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 225(4): 951-960.

Establishment and identification of immortalized macrophage cell line of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ZHANG Yongde, PAN Chuanyan, YU Yanling, FENG Pengfei, LUO Honglin*

(Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture,
Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning 530021, China)

Abstract: To obtain a continuous monoclonal *Oreochromis niloticus* macrophage cell line, macrophages were isolated and purified from peritoneal cavity of *O. niloticus*. The *O. niloticus* macrophage cell line was established and EBV infection identification, electron microscopy, telomerase activity assay, carcinogenicity evaluation, karyotype analysis, and molecular biology identification were then carried out. The results showed that EBV had been integrated into *O. niloticus* peritoneal macrophages and stably expressed. After 30 generations of stable passage, the cell line still maintained a good proliferative state. The cell line surface was not smooth and had obvious blunt round protrusion and slender pseudopodia, which was the typical morphology performance of the macrophages. Telomerase activity of this cell line was significantly higher than that of untreated macrophages ($P < 0.05$), but the difference was not significant with HeLa cells, and the cell line was not carcinogenic, which indicated that immortalized cell lines were successfully constructed. Karyotype analysis showed that the cell line had 44 chromosomes, and the karyotype formula was $2n=2x=44=4sm+17st+1t$. PCR detection revealed that *CD33*, and *CD205* transcripts were found in this cell line, all of which were markers of monocytes/macrophages. 18S *rRNA* detection showed that the cell line was from *O. niloticus* macrophages. Immortalized tilapia macrophage cell lines were successfully established. The establishment of this cell line laid the foundation for the further study of the immunological function of peritoneal macrophages in *O. niloticus* and also provided a tool for studying the mechanism of high protection rate of *O. niloticus* *Streptococcus* HSP70-peptide vaccine.

Key words: *Oreochromis niloticus*; macrophages; immortalization; cell line

Corresponding author: LUO Honglin. E-mail: 541365548@qq.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31372553); Natural Science Foundation of Guangxi Province (2015GXNSFAA139068); Key Laboratory Construction Project of Guangxi Science and Technology Base and Talent (16-380-38)