

文章编号: 1000-0615(2018)10-1606-09

DOI: 10.11964/jfc.20170910950

## 草鱼肠巨噬细胞的分离培养与鉴定

陶会竹, 肖宁, 赵雨婷, 房慧, 李瑾年\*

(安徽农业大学动物科技学院, 兽医病理生物学与疫病防控安徽省重点实验室, 安徽合肥 230036)

**摘要:** 为了建立草鱼肠巨噬细胞的分离培养与鉴定方法, 本研究在采用刮除法结合胶原酶IV消化法制备肠黏膜固有层单细胞悬液的基础上, 使用鱼类脏器单核细胞分离试剂盒分离肠巨噬细胞, 再经差异贴壁法纯化肠巨噬细胞, 最后, 用含10%胎牛血清和5%草鱼血清的RPMI 1640完全培养液, 在28℃、5% CO<sub>2</sub>条件下原代培养肠巨噬细胞, 并通过细胞形态学检查、分子标记检测和功能验证实验加以鉴定。结果显示, 每尾鱼(约250 g)肠巨噬细胞的获得量约为 $3 \times 10^7$ 个, 细胞活率为99.6%, 纯度达到95%以上; 倒置显微镜观察发现, 原代培养4~5 d的贴壁细胞多呈圆形或多边形, 体积明显增大, 细胞汇合度达到95%; 光镜和电镜观察到染色后的贴壁细胞具有巨噬细胞的形态结构特征, 贴壁细胞经荧光定量PCR在mRNA水平检测到巨噬细胞特异性标志分子(草鱼巨噬细胞集落刺激因子受体), 功能实验证实贴壁细胞具有吞噬功能, 脂多糖能够显著提高其呼吸暴发活性。本研究首次成功建立了草鱼肠巨噬细胞的分离培养与鉴定方法, 为开展口服疫苗诱导的草鱼肠黏膜免疫应答研究提供细胞模型。

**关键词:** 草鱼; 肠巨噬细胞; 分离; 原代培养; 鉴定

**中图分类号:** S 941.42

**文献标志码:** A

肠道既是硬骨鱼类的消化吸收器官, 也是其黏膜免疫器官。尽管鱼类肠道不具有哺乳动物的组织化淋巴器官(Peyer氏淋巴集结及滤泡淋巴结), 但在肠道中后段黏膜层分布着大量巨噬细胞、淋巴细胞和粒细胞等免疫细胞, 其中, 黏膜固有层肠巨噬细胞除具有吞噬、杀伤和清除肠道病原微生物的功能外, 还扮演着抗原递呈细胞的角色, 发挥着启动和调节肠黏膜免疫应答的作用<sup>[1]</sup>。

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国淡水养殖最重要的鱼类之一, 但是随着养殖密度及规模的扩大, 各种病害问题日益突出, 且已成为制约其健康可持续发展的重要因素。渔用疫苗在提高水产动物特异性免疫水平的同时, 亦能增强机体抗应激能力, 且符合不污染环境、水产品无药物残留等要求, 是控制疫病的有效生

物制剂, 而口服疫苗是水产养殖中最适用的疫苗类型<sup>[2]</sup>。草鱼肠巨噬细胞的活性与功能是评价口服疫苗诱导的草鱼免疫应答水平的指标, 尤其是肠黏膜免疫水平的重要指标。由于巨噬细胞属不繁殖细胞群, 在适宜条件下可存活2~3周, 多用作原代培养, 且原代培养细胞与体内细胞的特性接近, 能较真实地反映体内细胞的活性与功能。因此, 建立可操作性强、重复性好的草鱼肠巨噬细胞分离、纯化、原代培养和鉴定方法具有重要意义。

硬骨鱼类肠壁结构由内向外分为黏膜层、肌肉层和浆膜层, 黏膜层又分为上皮层和固有层, 而肠巨噬细胞主要分布在黏膜固有层。由于鱼类肠黏膜表面覆盖着大量黏液, 黏膜固有层含有致密结缔组织, 对于鱼类肠巨噬细胞表面特异性标记分子也知之甚少, 使得鱼类肠巨

收稿日期: 2017-09-03 修回日期: 2017-10-12

资助项目: 国家自然科学基金(31672698)

通信作者: 李瑾年, E-mail: lijinnian2000@163.com

噬细胞的分离与纯化存在诸多困难。目前,鱼类巨噬细胞分离培养技术中,外周血、腹腔和头肾巨噬细胞的分离培养已获成功<sup>[3-5]</sup>。但国内尚未有关于鱼类肠巨噬细胞分离、纯化和原代培养的文献报道,国外对鱼类肠巨噬细胞的研究亦很少,仅有的一篇文献报道中也未详细介绍肠巨噬细胞的分离和培养方法<sup>[6]</sup>。本研究在参照哺乳动物肠巨噬细胞的分离、培养方法的基础上<sup>[7-8]</sup>,以草鱼为实验对象,探索草鱼肠黏膜固有层巨噬细胞的分离、纯化、原代培养以及鉴定方法,为后期开展口服疫苗诱导草鱼肠黏膜免疫应答研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**实验用鱼** 草鱼购自合肥高新技术农业园。选取体质量约250 g的草鱼饲养于循环水系统中,水温控制在25℃左右,气泵充气保持溶解氧在5.0 mg/L以上,pH在7.2~7.8范围内,每日投喂饲料2次,投喂量为草鱼体质量的3%~5%,适应7 d后用于实验。

**实验菌株** 拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)菌株04-14由本实验室从患腹水病草鱼体内分离获得并保存。

**主要试剂(盒)** Hank's平衡液、胎牛血清(FBS)、RPMI 1640培养液以及抗微生物液均为美国Gibco公司产品;鱼类脏器单核细胞分离试剂盒为天津灏洋华科生物制品科技有限公司产品;胶原酶IV和脂多糖(LPS)为Sigma公司产品;细胞总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、佛波醇豆蔻酸乙酸酯(PMA)、硝基四氮唑蓝(NBT)和二甲基亚砷(DMSO)均购自天根生化科技(北京)有限公司;健康草鱼血清为本实验室自行制备。

### 1.2 草鱼肠黏膜固有层巨噬细胞的分离

**草鱼肠黏液和肠上皮细胞层的刮除** MS-222(浓度为100 mg/L)麻醉实验草鱼,体表以75%酒精消毒,无菌剪取肠道中后段,放于含有预冷的无菌PBS缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)的培养皿中,去除肠道外脂肪与肠系膜,纵向剖开肠管,去除粪便并以PBS缓冲液清洗。之后用无菌弯头镊子反复刮除肠黏液与肠上皮细胞层,直至无黏液刮下(约15 min),再用PBS缓冲液清洗3次。此时,肉眼可见肠黏液与上皮细胞脱落进入PBS

缓冲液,并获得肠壁明显变薄,颜色变为淡黄色至白色的肠段。

**草鱼肠黏膜固有层单细胞悬液制备** 将上述处理后的肠段充分剪碎(体积<1 mm<sup>3</sup>),称取5 g组织块置于50 mL离心管中,加入10 mL细胞消化液[用Hank's平衡液配制的1.7 mg/mL胶原酶IV,并添加5%(V/V)FBS],28℃振荡培养箱轻微振荡(250 r/min)消化2 h。将消化后的细胞液过400目筛网,滤液转入15 mL离心管,1 800 r/min离心8 min,收集细胞沉淀,用Hank's平衡液洗1次后,配成浓度为1×10<sup>8</sup>个/mL的单细胞悬液,该单细胞悬液中含有巨噬细胞、淋巴细胞和粒细胞等。

**草鱼肠黏膜固有层巨噬细胞分离** 使用鱼类脏器单核细胞分离试剂盒从上述单细胞悬液中分离肠巨噬细胞。即在15 mL离心管中依次缓慢加入3 mL分离液1和2 mL分离液2,制成梯度界面。吸取5 mL单细胞悬液加在分离液面上,1 800 r/min离心30 min后,内容物自上而下被分成5层,分别为稀释液层、环状乳白色上层(富含巨噬细胞)、环状乳白色下层(富含淋巴细胞)、分离液层和红细胞层。用巴氏吸管小心吸取环状乳白色上层移至另一15 mL离心管中,用预冷的Hank's平衡液洗3次,1 800 r/min离心8 min,弃上清液,用1 mL预冷的RPMI 1640基础培养液[94%(V/V)RPMI 1640、5%(V/V)FBS、1%(V/V)抗微生物液]重悬细胞沉淀。吸取细胞悬浮液与0.4%台盼蓝染液各10 μL,混匀,取10 μL混合液于细胞计数板内,盖上盖玻片,静置2~3 min,于显微镜下对活细胞与总细胞进行计数,并计算细胞存活率(%)。

### 1.3 草鱼肠巨噬细胞的纯化

采用差异贴壁法对所分离的肠巨噬细胞悬液进行纯化,即采用RPMI 1640基础培养液重悬上述分离得到的细胞沉淀,调整细胞密度至3×10<sup>6</sup>个/mL并接种于96孔细胞培养板,100 μL/孔,28℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。培养4 h后弃去全部陈旧培养液,加入新鲜RPMI 1640完全培养液[84%(V/V)RPMI 1640、10%(V/V)FBS、5%(V/V)草鱼血清、1%(V/V)抗微生物液],继续培养12 h,再次弃去陈旧培养液,加入RPMI 1640完全培养液继续培养。

### 1.4 草鱼肠巨噬细胞的原代培养

用RPMI 1640完全培养液将纯化后的巨噬细

胞浓度调整至 $3 \times 10^6$ 个/mL, 接种于96孔细胞培养板, 100  $\mu$ L/孔, 28  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养, 待细胞开始贴壁后, 用含20  $\mu$ g/mL LPS的RPMI 1640完全培养液进行换液, 以后每隔2 d换液1次。换液时吸出500  $\mu$ L陈旧培养液, 再补加500  $\mu$ L新鲜的培养液继续培养。

### 1.5 培养的草鱼肠巨噬细胞鉴定

**细胞形态学检查** 将浓度为 $3 \times 10^6$ 个/mL的细胞悬液加入预先放有细胞爬片的35 mm培养皿中, 于28  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养。培养24 h后取出细胞爬片, 用Hank's平衡液漂洗2次, 瑞氏—吉姆萨染色, 光学显微镜下观察细胞形态与结构并拍照; 同时消化贴壁细胞, 收集于离心管中, 3 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 细胞沉淀用1 mL预冷的3%戊二醛4  $^{\circ}$ C避光固定10 min, 6 000 r/min离心5 min, 弃固定液。随后, 参考文献报道方法进行一系列脱水、包埋, 制作超薄切片<sup>[9]</sup>, 经醋酸铀—柠檬酸铅染色后在透射电镜(日立, HT7700)下观察细胞形态与超微结构。

**细胞特异性标志分子的表达分析** 将浓度为 $3 \times 10^6$ 个/mL的细胞悬液接种于12孔细胞培养板, 1 mL/孔, 共5孔, 用RPMI 1640完全培养液培养, 待细胞密度达到80%时, 弃培养液, 每孔加入1 mL Trizol裂解液吹打, 直至细胞全部脱落。通过总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA, 并以TIANGEN FastQuant cDNA第一链合成试剂盒反转录合成cDNA。根据草鱼巨噬细胞的特异性标志分子gcMCSFR(草鱼巨噬细胞集落刺激因子受体)序列<sup>[10]</sup>(GenBank登录号KF444352)设计一对特异性引物(5'-ACCGATGTGATTCT-CAGCTC-3'; 5'-TCGGGTCTATGAAGG-GTAG-3'), 用于扩增gcMCSFR基因。25  $\mu$ L荧光定量PCR (RT-PCR)扩增体系: ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L, cDNA模板2.0  $\mu$ L(RPMI 1640完全培养液为阴性对照), 20  $\mu$ mol/L上下游引物各0.5  $\mu$ L, 高保真Mix 12.5  $\mu$ L。PCR反应程序: 94  $^{\circ}$ C预变性5 min; 94  $^{\circ}$ C变性30 s, 53  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸1 min, 35个循环; 72  $^{\circ}$ C终延伸10 min。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后, 用胶回收试剂盒回收PCR产物, 并与pMD18-T Simple载体连接成pMD18-T-gcMCSFR, 送通用生物系统(安徽)有限公司进行测序鉴定。

**肠巨噬细胞吞噬功能检测** 用RPMI 1640完全培养液将肠巨噬细胞浓度调整至 $2 \times 10^6$ 个/mL,

接种12孔细胞培养板, 1 mL/孔, 28  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养24 h, 用巴氏吸管轻轻吸去细胞培养液, Hank's平衡液洗3次, 加入浓度为 $1.5 \times 10^7$  CFU/mL的经福尔马林灭活的拟态弧菌04-14菌株菌液, 1 mL/孔, 28  $^{\circ}$ C共孵育30和60 min。随后, 细胞用3%戊二醛固定后, 制作超薄切片, 透射电镜(日立, HT7700)下观察吞噬情况并拍照。

**肠巨噬细胞氧呼吸暴发活性检测** 分别用RPMI 1640完全培养液(未刺激组)和含20  $\mu$ g/mL LPS的RPMI 1640完全培养液(刺激组)将巨噬细胞浓度调整至 $2 \times 10^6$ 个/mL, 接种至96孔细胞培养板, 接种量为100  $\mu$ L/孔, 每组每一培养时间点重复3孔, 于28  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养, 分别于培养至12、24和36 h时, 每孔加入100  $\mu$ L、1 mg/mL NBT(含1  $\mu$ g/mL PMA), 28  $^{\circ}$ C避光作用1 h。随后, 每孔加入120  $\mu$ L无水甲醇作用15 min, 于96孔板水平式离心机1 280 r/min离心10 min, 弃上清液, 用70%甲醇溶液洗3次, 每孔再加入120  $\mu$ L DMSO和浓度为2 mol/L的KOH溶液140  $\mu$ L, 漩涡振荡5 min, 生成蓝色沉淀, 酶标仪测定OD<sub>620</sub>值。实验结果用每组3个复孔的平均光密度值(OD<sub>620</sub>平均值 $\pm$ SD)表示, 并对刺激组与未刺激组的氧呼吸暴发活性进行统计学分析。

**肠巨噬细胞氮呼吸暴发活性(一氧化氮)检测** 分别用RPMI 1640完全培养液(未刺激组)和含20  $\mu$ g/mL LPS的RPMI 1640完全培养液(刺激组)将巨噬细胞浓度调整至 $2 \times 10^6$ 个/mL, 接种96孔细胞培养板, 100  $\mu$ L/孔, 每组每一培养时间重复3孔, 28  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养。分别于培养后12、24和36 h, 按NO检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)操作说明进行NO浓度标准曲线制作和各实验组OD<sub>540</sub>的检测, 并由标准曲线计算各检样孔中的NO浓度。实验结果用每组3个复孔的平均NO浓度(NO浓度平均值 $\pm$ SD)表示, 并对刺激组与未刺激组的氮呼吸暴发活性进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 分离的草鱼巨噬细胞的数量、存活率与纯度

草鱼中后部肠段经无菌弯头镊子反复刮除处理后, 肠黏液与上皮细胞层大部分脱落, 但黏膜固有层保持完整, 而消化液处理2 h后黏膜固有层完全解离, 获得肠黏膜固有层单细胞悬

液。用鱼类脏器单核细胞分离试剂盒分离肠黏膜固有层单细胞悬液, 每尾鱼可分离得到1 mL 浓度约为 $3 \times 10^7$ 个/mL的肠巨噬细胞悬液, 台盼蓝染色结果显示, 细胞存活率为 $99.62\% \pm 0.13\%$ 。倒置显微镜下可见刚分离的巨噬细胞纯度约为

89%, 其体积较大, 胞浆内颗粒物质丰富, 并含少量空泡; 与淋巴细胞(体积较小、胞浆内多无颗粒物质)和粒细胞(胞浆内不含空泡)区别明显(图1-a), 而经差异贴壁法纯化后的贴壁巨噬细胞单层的纯度大于95%(图1-b)。

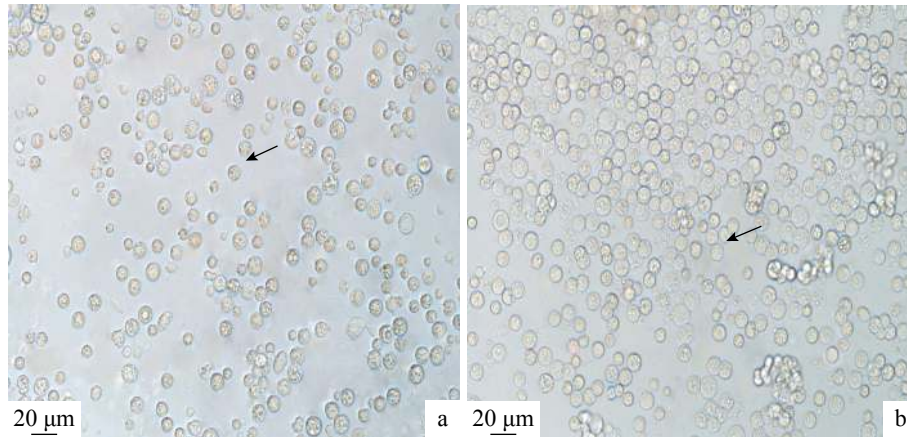


图1 倒置显微镜观察的分离的和纯化后的草鱼肠巨噬细胞(400 ×)

(a)分离的肠巨噬细胞(箭头标注); (b)纯化后的肠巨噬细胞

Fig. 1 Isolated and purified intestinal macrophages of *C. idella* observed under inverted microscope (400 ×)

(a)isolated intestinal macrophages (arrow); (b)purified intestinal macrophages

## 2.2 草鱼肠巨噬细胞的原代培养

倒置显微镜观察发现, 培养1 d后大多数巨噬细胞开始伸展生长, 并出现少数细胞团块(图2-a); 培养后2~3 d时, 细胞继续伸展生长呈各种形状, 体积逐渐增大(图2-b, 2-c); 培养后4~5 d时, 细胞多呈圆形或多边形, 体积明显增大, 第5天细胞汇合度达到95%(图2-d, 2-e); 培养到20 d细胞存活率仍超过90%(图2-f), 随后细胞逐渐出现萎缩、凋零, 悬浮于培养液中, 23 d培养细胞完全死亡。

## 2.3 培养细胞的形态结构特征

贴壁细胞经瑞氏—吉姆萨染色后, 油镜下可见细胞呈圆形或肾形, 大小为 $6 \sim 12 \mu\text{m}$ , 胞浆内含有空泡和大量染成淡蓝色的颗粒; 胞核较大、染成深蓝色, 偏居于细胞一端(图3-a)。透射电镜下可见细胞伸出伪足, 胞内有线粒体、溶酶体等细胞器, 胞核呈马蹄形(图3-b)。上述结果符合巨噬细胞的形态结构特征。

## 2.4 培养细胞的特异性标志分子的表达分析

草鱼巨噬细胞集落刺激因子受体(gcMC

SFR)是草鱼肠巨噬细胞特有的标志分子。通过RT-PCR检测gcMCSFR在原代培养贴壁细胞中的表达, 从贴壁细胞中扩增出大小约为1 607 bp的目的基因条带, 而在RPMI 1640完全培养液中未检测到目的基因(图4)。测序序列与GenBank收录中的gcMCSFR基因同源率达99.8%, 仅在第284位(G→A)、443位(T→C)和821位(T→C)碱基处发生了无义突变。结果显示, 贴壁细胞转录表达了草鱼巨噬细胞的特异性标志分子。

## 2.5 肠巨噬细胞的吞噬功能

肠巨噬细胞与拟态弧菌共孵育30 min后, 电镜下即可观察到吞噬现象, 每个巨噬细胞吞噬4~6个拟态弧菌(箭头所示), 细菌结构完整, 未见被消化(图5-a); 共孵育60 min后, 每个巨噬细胞内含有大量吞噬的细菌, 有些吞噬泡内的细菌已开始变形降解(箭头所示), 吞噬泡周围有较多溶酶体靠近(图5-b)。

## 2.6 肠巨噬细胞的呼吸暴发活性

分别采用NBT法和Griess法检测肠巨噬细胞中的氧自由基和一氧化氮含量来评价细胞的氧

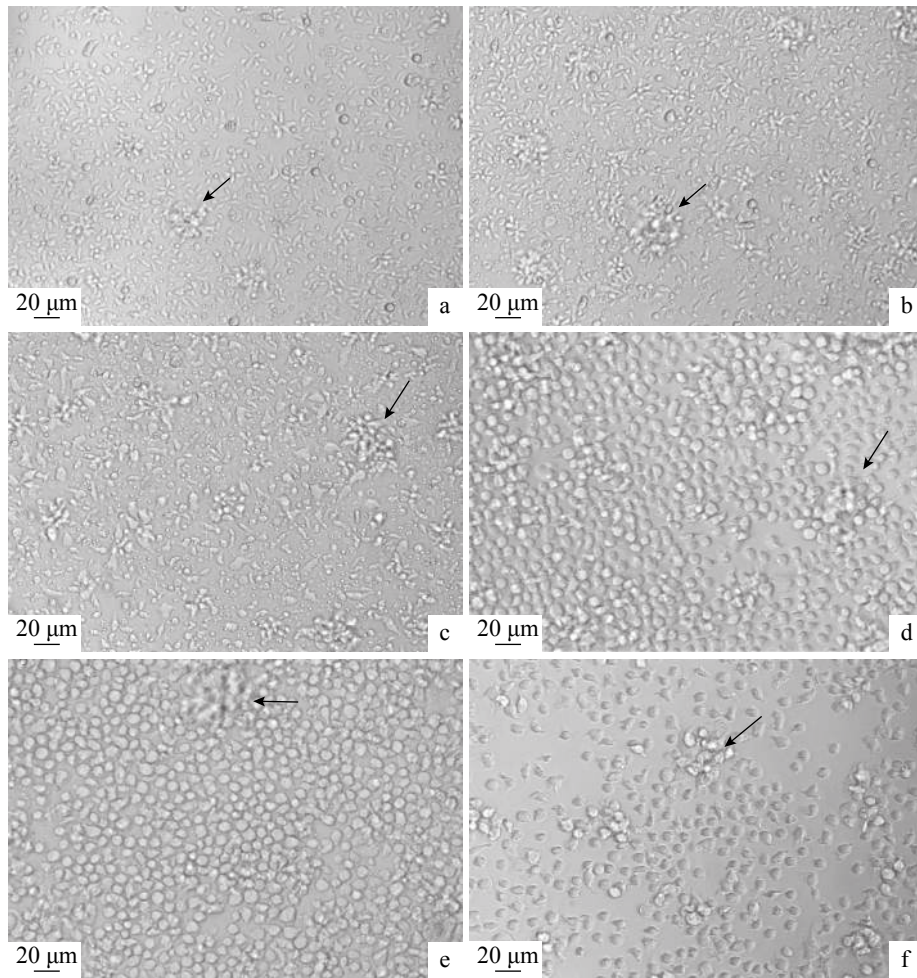


图 2 原代培养不同时间的草鱼肠巨噬细胞(倒置显微镜400×)

a~f 分别代表培养 1、2、3、4、5 和 20 d 的原代培养肠巨噬细胞；箭头示细胞团块

Fig. 2 Intestinal macrophages of *C. idella* after different days of primary culture (inverted microscope, 400 ×)

a-f represent intestinal macrophages after 1, 2, 3, 4, 5 and 20 days of primary culture, respectively; arrow indicates cell island

呼吸暴发活性和氮呼吸暴发活性。在各作用时间点, LPS 均能促进巨噬细胞产生氧自由基和一氧化氮; LPS 刺激组巨噬细胞产生氧自由基的能力显著高于未刺激对照组 ( $P < 0.05$ ), NO 产生量极显著高于未刺激对照组 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。结果发现, 所分离培养的草鱼肠巨噬细胞经 LPS 刺激后具有很好的氧呼吸暴发活性和氮呼吸暴发活性。

### 3 讨论

正常情况下单核细胞可以从血液中移行到各组织中, 分化成相应的组织巨噬细胞。肠巨噬细胞具有广泛的生物学效应, 如抗肠黏膜感染、抗肿瘤、参与免疫应答和免疫调节等, 其活性与功能是评价口服疫苗诱导肠黏膜免疫水

平的重要指标。因此, 建立一套完善的鱼类肠巨噬细胞分离培养与鉴定方法显得尤为重要。由于肠巨噬细胞主要位于肠道黏膜固有层, 并且肠黏膜表面覆盖着大量黏液, 导致无法直接使用消化酶将黏膜固有层中的巨噬细胞分离, 因此, 除去肠黏液和肠上皮细胞层是分离肠巨噬细胞的关键起始步骤。陆生恒温动物如人 (*Homo sapiens*) 和大鼠 (*Rattus norvegicus*) 等肠巨噬细胞的分离过程中多采用 DTT—EDTA (二巯苏糖醇—乙二胺四乙酸) 去除肠黏液与上皮细胞层, 并获得良好的效果<sup>[11-12]</sup>。但是, 前期预实验表明, 此方法并不适合生活在水环境中的变温动物草鱼, 即使降低 DTT 和 EDTA 的浓度, 它们对草鱼肠巨噬细胞的活力仍有较大影响, 贴壁培养 12 h 后细胞就开始大量死亡。对此, 本研究

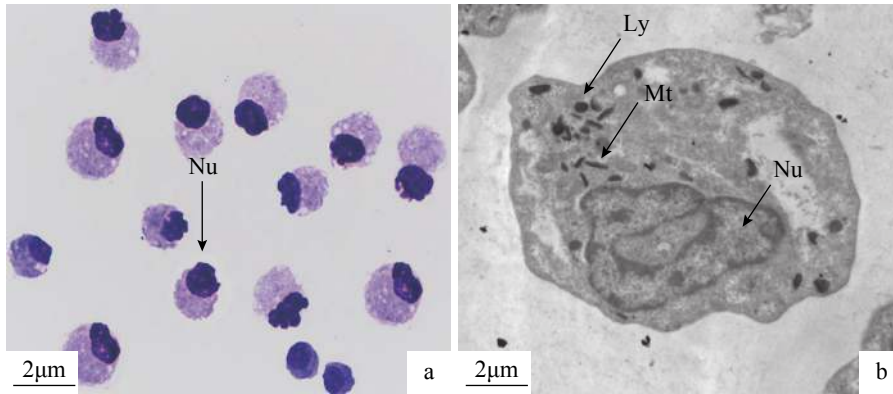


图 3 染色的草鱼肠巨噬细胞的形态结构

(a)瑞氏—吉姆萨染色细胞的光镜照片(1 000 ×), Nu. 细胞核; (b)醋酸铀—柠檬酸铅染色细胞的电镜照片(3 000 ×), Mt. 线粒体, Ly. 溶酶体

Fig. 3 The morphology and structure of intestinal macrophages of *C. idella* after staining

(a) light micrograph of cells treated by Wright's-Giemsa staining, Nu indicates nucleus; (b) electron micrograph of cells treated by uranyl acetate and citromalic acid lead double staining, Mt and Ly indicate mitochondria and lysosomes, respectively

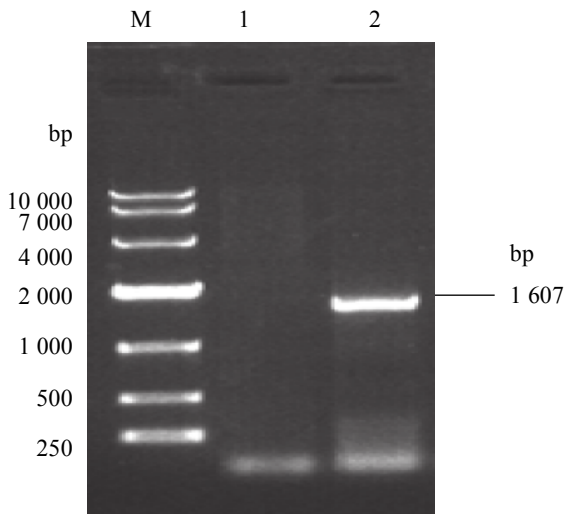


图 4 特异性标志分子gcMCSFR基因的表达分析

M. 标准物质10000; 1. RPMI 1640完全培养液; 2. 培养的贴壁细胞

Fig. 4 Expression analysis of specific marker molecule

M. DL10000 DNA Marker; 1. RPMI 1640 complete culture medium; 2. cultured adherent cells

经过反复摸索, 确定使用无菌弯头镊子刮除肠黏液与上皮细胞层约15 min, 即可获得肠壁明显变薄、颜色变为淡黄色至白色的肠段。倒置相差显微镜下观察到处理后肠段的上皮细胞层绝大部分脱落, 黏膜固有层保持完整, 再经胶原酶消化后固有层则完全解离, 获得浓度较高的肠黏膜固有层单细胞悬液。鉴于胶原酶消化肠黏膜固有层的时间较长(一般需要2 h), 有的学者在胶原酶消化液中添加10%新鲜小牛血清来稳定

细胞活力<sup>[13]</sup>, 而另一些学者则发现, 10%新鲜小牛血清对胶原酶具有明显抑制作用, 认为不需添加血清<sup>[14]</sup>。本研究在胶原酶消化液中添加5%胎牛血清, 结果发现优质血清对胶原酶无任何抑制作用, 并且能够显著提高细胞活力, 利于细胞的原代培养。

肠黏膜固有层单细胞悬液通过percoll密度梯度离心分离后, 分离液中仍残留少量淋巴细胞和粒细胞等杂细胞, 需要进一步纯化。对于人和小鼠(*Mus musculus*)等哺乳动物而言, 其巨噬细胞表面特异性标记分子已被探明, 亦已制备出标记分子单克隆抗体, 故可使用结合有抗标记分子单克隆抗体的免疫磁珠产品来纯化分离液, 获得高纯度的肠巨噬细胞<sup>[15-16]</sup>。尽管目前已明确草鱼巨噬细胞集落刺激因子受体是草鱼肠巨噬细胞特有的标志分子<sup>[10]</sup>, 但其单克隆抗体尚未制备成功。对此, 本研究根据淋巴细胞不具有贴壁能力; 粒细胞10~24 h内贴壁, 且为短寿细胞, 培养24 h后逐渐死亡; 巨噬细胞在2~4 h内贴壁, 且贴壁牢固, 采用差异贴壁法对分离后的草鱼肠巨噬细胞悬液进行纯化。结果显示, 经过短时间内2次(第4和12小时)更换培养液后, 可分离获得纯度大于95%的贴壁肠巨噬细胞。

细胞培养液是影响巨噬细胞原代培养效果的重要因素。本研究中比较添加10% FBS和5%草鱼血清的L-15和RPMI 1640细胞培养液的效果, 发现在L-15培养液中原代培养草鱼肠巨噬细胞

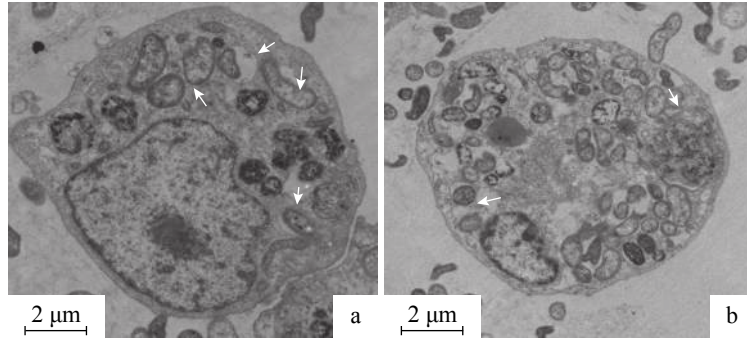


图 5 吞噬拟态弧菌后的草鱼肠巨噬细胞

(a)肠巨噬细胞与拟态弧菌共孵育30 min, 箭头示拟态弧菌(3 000 ×); (b)肠巨噬细胞与拟态弧菌共孵育60 min, 箭头示变形降解的拟态弧菌(3 000 ×)

Fig. 5 Intestinal macrophages of *C. idella* containing phagocytized *V. mimicus*

(a) intestinal macrophages were co-incubated with *V. mimicus* for 30 min, arrow indicates *V. mimicus* (3 000 ×); (b) intestinal macrophages were co-incubated with *V. mimicus* for 60 min, arrow indicates deformed and degraded *V. mimicus* (3 000 ×)

表 1 草鱼肠巨噬细胞的呼吸暴发活性

Tab. 1 The respiratory burst activity of intestinal macrophages of *C. idella*

处理时间/h treatment time	氧呼吸暴发活性 oxygen respiratory burst activity		氮呼吸暴发活性 nitrogen respiratory burst activity	
	未刺激组 unstimulated group	刺激组 stimulated group	未刺激组 unstimulated group	刺激组 stimulated group
	12	0.40±0.00	0.50±0.00*	9.37± 0.17
24	0.25±0.00	0.44±0.00*	29.50±0.10	40.44±0.17**
36	0.32±0.01	0.47±0.00*	17.98±0.32	33.67±0.17**

注: \*代表差异显著(P<0.05); \*\*代表差异极显著(P<0.01)

Notes: \* indicates significant difference between the two groups (P<0.05); \*\* indicates extremely significant difference between the two groups (P<0.01)

时, 细胞主要呈现圆形, 随着培养时间推移其形态和体积变化不大, 细胞存活时间大约为1周, 说明肠巨噬细胞在该培养液中生长状况并不好; 而在RPMI 1640培养液中培养时, 贴壁细胞很快伸展生长呈各种形状, 细胞体积逐渐增大, 细胞汇合度逐渐增加并有细胞集落出现, 细胞至少可存活20 d, 并经形态学检查、特异性标志分子检测和功能实验证实所培养的贴壁细胞是巨噬细胞。因此, 认为含有10% FBS和5%草鱼血清的RPMI 1640培养液培养草鱼肠巨噬细胞的效果较好。已有文献报道, 体外培养鱼类细胞时需添加适量同种鱼类血清, 以促进细胞生长<sup>[17-18]</sup>。本研究结果也证实健康草鱼血清可促进草鱼肠巨噬细胞增殖, 使细胞活力较长时间处于旺盛状态。

综上所述, 本研究建立了草鱼肠巨噬细胞的分离培养和鉴定方法, 所获草鱼肠巨噬细胞的纯度高、活力好, 可作为体外免疫实验的材

料, 为后续开展口服疫苗诱导的草鱼肠黏膜免疫应答研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Rombout J H W M, Abelli L, Picchiatti S, *et al.* Teleost intestinal immunology[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(5): 616-626.

[2] Brudeseth B E, Wiulsrød R, Fredriksen B N, *et al.* Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1759-1768.

[3] Sha Z X, Wang L Q, Sun L M, *et al.* Isolation and characterization of monocyte/macrophage from peripheral blood of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 65(6): 256-266.

[4] 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(S1): 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(S1): 224-228(in Chinese).
- [ 5 ] Li Q F, Ai Q H, Mai K S, *et al.* Development of a short-term *in vitro* model of macrophages from large yellow croaker, *larimichthys crocea* (Richardson, 1846)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(5): 885-891.
- [ 6 ] Paul N, Sengupta M. Lead induced overactivation of phagocytes and variation in enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in intestinal macrophages of *Channa punctatus*[J]. *Modern Research in Inflammation*, 2013, 2(2): 28-35.
- [ 7 ] Smith P D, Janoff E N, Mosteller-Barnum M, *et al.* Isolation and purification of CD14-negative mucosal macrophages from normal human small intestine[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1997, 202(1): 1-11.
- [ 8 ] Yoshioka N, Taniguchi Y, Yoshida A, *et al.* Intracellular localization of CD14 protein in intestinal macrophages[J]. *Anticancer Research*, 2009, 29(3): 865-869.
- [ 9 ] 梁静南, 杨琳, 赵彤, 等. 酵母常规透射电镜样品制备方法的比较与改进[J]. *电子显微学报*, 2015, 34(1): 85-88.
- Liang J N, Yang L, Zhao T, *et al.* Comparison and optimization of the conventional methods for yeast sample preparation for transmission electron microscopy[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2015, 34(1): 85-88(in Chinese).
- [10] 杨鹏. 草鱼单核/巨噬细胞的分离鉴定和激活新机制的研究[D]. 成都: 电子科技大学, 2014.
- Yang K. Separation, Identification and a novel activation mechanism of grass carp head kidney monocytes/macrophages[D]. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2014(in Chinese).
- [11] Nakata K, Inagawa H, Nishizawa T, *et al.* Specific messenger RNA expression for signal transduction molecules by lipopolysaccharide in intestinal macrophages [J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2006, 143(3): 484-493.
- [12] 胡蓉, 吴朝阳, 党胜春, 等. 髓系细胞触发受体-1对大鼠肠巨噬细胞氧化应激的影响[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2015, 25(5): 378-381.
- Hu R, Wu C Y, Dang S C, *et al.* Effect of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 expression on the oxidative stress of intestinal macrophages in rats[J]. *Journal of Jiangsu University (Medicine Edition)*, 2015, 25(5): 378-381(in Chinese).
- [13] Gibson P R, Hermanowicz A, Verhaar H J, *et al.* Isolation of intestinal mononuclear cells: factors released which affect lymphocyte viability and function[J]. *Gut*, 1985, 26(1): 60-68.
- [14] 刘小方, 欧阳钦, 黄丽彬, 等. 结肠粘膜活检标本中固有层单个核细胞的分离及表型分析[J]. *华西医科大学报*, 2000, 31(1): 116-118.
- Liu X F, Ouyang Q, Huang L B, *et al.* Isolation and phenotypic analysis of lamina propria mononuclear cells from colonoscopic biopsy specimens[J]. *Journal of West China University of Medical Sciences*, 2000, 31(1): 116-118(in Chinese).
- [15] 林炜明, 戴爱玲, 尹会方, 等. 人外周血巨噬细胞培养及功能鉴定[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(1): 86-89.
- Lin W M, Dai A L, Yin H F, *et al.* Culture and functional identification of macrophages from human peripheral blood[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2015, 31(1): 86-89(in Chinese).
- [16] 陈华海, 孙龙钦, 林巍然, 等. 鉴定血管加压素受体(V1aR)在小鼠肝脏枯否细胞和巨噬细胞中的表达[J]. *基因组学与应用生物学*, 2013, 32(6): 719-724.
- Chen H H, Sun L Q, Lin W R, *et al.* Identify the expression of vasopressin V1a receptor (V1aR) in mouse liver kupffer cells and macrophages[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32(6): 719-724(in Chinese).
- [17] Neumann N F, Barreda D, Belosevic M. Production of a macrophage growth factor (s) by a goldfish macrophage cell line and macrophages derived from goldfish kidney leukocytes[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1998, 22(4): 417-432.
- [18] Grayfer L, Walsh J G, Belosevic M. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor-alpha[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32(5): 532-543.



## Isolation, cultivation and identification of *Ctenopharyngodon idella* intestinal macrophages

TAO Huizhu , XIAO Ning , ZHAO Yuting , FANG Hui , LI Jinnian \*

(Anhui Province Key Laboratory of Veterinary Pathobiology and Disease Control, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** In order to establish the method for primary isolation, culture and identification of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) intestinal macrophages, in the study, the intestinal mucosal lamina propria mononuclear cells (LPMC) were firstly prepared by curettage combined with collagenase IV digestion. Then, the intestinal macrophages were isolated from LPMC suspension using fish organ mononuclear cell isolation kit and purified by differential adherence method. The intestinal macrophages after purification were cultured primarily with RPMI 1640 complete medium supplemented with 10% FBS and 5% serum of *C. idella* at 28 °C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator, and these cells were identified by morphological examination, molecular marker detection and function validation test. The results showed that the yield of intestinal macrophages was about  $3 \times 10^7$  cells per fish (about 250 g in weight), with a survival rate of 99.6% and a purity of more than 95%, respectively. The adherent cells in primary culture for 4–5 days were round or polygonal, the cell volume increased obviously, and the confluence degree of cell layer reached 95% observed under inverted microscope. After staining, the adherent cells had the morphological and structural characteristics of macrophages observed under light and electron microscopes, respectively. The expression of macrophage-specific marker molecule (macrophage colony stimulating factor receptor of *C. idella*) was detected by RT-PCR. It was also confirmed that the adherent cells in primary culture had phagocytosis, and LPS could significantly improve their respiratory burst activity. The above results indicated that the method for isolation, primary culture and identification of *C. idella* intestinal macrophages was successfully established for the first time, which might provide a cell model for research on the intestinal mucosal immune response of *C. idella* induced with oral vaccine.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; intestinal macrophages; isolation; primary culture; identification

**Corresponding author:** LI Jinnian. E-mail: lijinnian2000@163.com

**Funding projects:** National Natural Science Foudation of China (31672698)