

瓦氏雅罗鱼鳃细胞系的建立及其耐碱生长特性初探

徐悦, 梁利群, 孙博, 常玉梅

Establishment of the gill cell line of *Leuciscus waleckii* and alkaline-tolerant growth characteristics

XU Yue, LIANG Liqun, SUN Bo, CHANG Yumei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403390>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

[碳酸盐碱度对达里湖瓦氏雅罗鱼耗氧率、氨氮排泄和排氨基因表达的影响](#)

Effects of carbonate alkalinities on oxygen consumption, ammonia excretion and ammonia excretion gene expression in *Leuciscus waleckii* Dybowski

上海海洋大学学报. 2016, 25(4): 551 <https://doi.org/10.12024/jsou.20160201663>

[不同渗透压条件下金钱鱼肾原代细胞的差异蛋白分析](#)

Differential proteins analysis for primary renal cells of *Scatophagus argus* under different osmotic stresses

上海海洋大学学报. 2018, 27(6): 855 <https://doi.org/10.12024/jsou.20180402267>

[ε-聚赖氨酸盐酸盐对腐败希瓦氏菌的作用机制初探](#)

Preliminary research on the antibacterial mechanism of ε-polylysine hydrochloride against *Shewanella putrefaciens*

上海海洋大学学报. 2022, 31(6): 1562 <https://doi.org/10.12024/jsou.20211003579>

[促肾上腺皮质激素释放激素对离体斑马鱼卵细胞类固醇激素合成的影响](#)

Effects of corticotropin-releasing hormone on the *in vitro* follicle steroidogenesis in zebrafish

上海海洋大学学报. 2022, (2): 336 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403397>

[铁离子对斑马鱼肝脏细胞应激低氧胁迫的影响](#)

Effect of iron on zebrafish liver cells under hypoxic stress

上海海洋大学学报. 2022, 31(5): 1048 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210403380>

文章编号: 1674-5566(2023)02-0283-09

DOI:10.12024/jsou.20210403390

瓦氏雅罗鱼鳃细胞系的建立及其耐碱生长特性初探

徐悦^{1,2}, 梁利群², 孙博², 常玉梅²

(1. 上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江哈尔滨 150070)

摘要: 为探究碱水环境中自然优势种瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)的耐碱离子调节机制, 采用胰蛋白酶消化法对其鳃细胞(Gill cells of *Leuciscus waleckii*, LWG)进行体外培养, 确定该类原代和传代细胞培养的适宜条件并进行耐受实验, 用以对瓦氏雅罗鱼在碱生境中的生长特性进行论证。结果表明: 瓦氏雅罗鱼原代鳃细胞培养在 15℃、含有 10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养基(Dulbecco's modified eagle medium)中可获得稳定、良好的培养效果; 36~72 h 即可传代, 稳定传代后的细胞命名为 LWG 细胞。传代培养过程中, 36 h 时 LWG 细胞生长代谢旺盛可用于后续实验。碱水生境中, 为缓解碱离子对鱼体造成的损伤, 鳃细胞将启动渗透压胁迫应答机制。对 LWG 细胞进行碱胁迫实验并检测其细胞活性和功能后发现: LWG 细胞在 25~50 mmol/L NaHCO₃ 浓度下耐受 3 h 时, 增殖率约 60% 并初现细胞凋亡。由此推断, 在 25~50 mmol/L 的碳酸盐碱度胁迫下, LWG 细胞具有强渗透压的碱度耐受性并促使细胞发生凋亡现象。对 LWG 细胞原代培养条件的摸索, 为探索瓦氏雅罗鱼碱胁迫下渗透压应激响应机制和相关基因功能的验证提供相对稳定的实验材料。

关键词: 瓦氏雅罗鱼; 鳃细胞; 原代培养; 耐碱; 渗透压胁迫响应机制

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

碱水是矿化度大于 11.90 mmol/L、小于 595.17 mmol/L 的非海洋性咸水资源, 具有高 pH、高碳酸碱度、主要离子比例失衡、水质类型多等特点, 人畜无法饮用, 农业无法直接利用, 绝大多数处于闲置状态。因此, 有效开发碱水养殖对内陆水产养殖业的可持续发展具有重要意义^[1]。鱼类是低等水生脊椎动物, 易受外界环境影响。碱度作为影响鱼体生理压力的常见参数, 当其超过承受范围时就会发生热应力及渗透压改变, 正常生理功能将发生改变并触发后续耗能的应力响应^[2], 即: 多器官功能紊乱^[3], 其生产性能受到影响, 引起多种疾病, 对鱼类健康造成不利影响^[4]。因此, 碱胁迫刺激鱼体造成的应激性疾病或死亡在水产养殖过程中经常发生, 给水产养殖业带来巨大的经济损失。

瓦氏雅罗鱼(*Leuciscus waleckii*)是我国北方知名的土著鱼, 隶属鲤形目、鲤科、雅罗鱼亚科的

雅罗鱼属, 亦称东北雅罗鱼, 主要分布在黑龙江流域的各个水系, 黄河下游、滦河、岱海以及内蒙古的达里湖等地也有分布。其中, 内蒙古达里诺尔湖的瓦氏雅罗鱼可以耐受碱度 53.57 mmol/L、pH 高达 9.69 的恶劣水质条件^[5]。窦新杰等^[6]对瓦氏雅罗鱼的 CO I 序列分析可知, 达里诺尔湖瓦氏雅罗鱼与黑龙江流域的松花江瓦氏雅罗鱼虽然亲缘较近, 但已出现明显分化。这表明具备较强渗透压调节能力的瓦氏雅罗鱼作为耐碱的自然优势种, 是研究非生物胁迫因子(碱度)渗透压应激响应机制的良好材料。

鱼类细胞培养技术的兴起和发展更有利于数据收集^[7]和实验的可重复性, 在鱼类细胞生物学领域意义重大。从 1980 年到 2021 年, 我国开展大量鱼类细胞培养研究, 其组织来源包括鱼的性腺^[8]、吻端^[9]、肾脏^[10]和鳃^[11]等。其中, 鳃组织是直接接触外界水环境呼吸和过滤食物的器

收稿日期: 2021-04-13 修回日期: 2022-02-03

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”(2019YFD0900405); 黑龙江自然科学基金重点项目(ZD2018008)

作者简介: 徐悦(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产遗传育种。E-mail: xuyuelucky986@126.com

通信作者: 梁利群, E-mail: liangliqun@hrfri.ac.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

官,鳃细胞也因此具有较强的有丝分裂能力,不易受鱼体成年与否的影响^[12],因而成为研究渗透压调节维持机体稳态机制的主要原代细胞培养类型,但因其直接与水体接触,表面易沾染细菌、真菌、支原体等污染源,故鱼类鳃细胞原代培养的进展缓慢。

本实验以瓦氏雅罗鱼原代培养鳃细胞(Gill cells of *Leuciscus waleckii*, LWG)为研究对象,设置碱耐受浓度分别为 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、25.0、50.0 和 75.0 mmol/L 来探讨碱生境对其增殖能力和生理功能的影响。依据文献,按照生境中含有的 NaHCO_3 浓度不同,可将水质划分为低碱度水域(< 10 mmol/L)、中碱度水域($10 \sim 30$ mmol/L)和高碱度水域(> 30 mmol/L)。由于瓦氏雅罗鱼长期生存于中盐碱($10 \sim 30$ mmol/L)和高盐碱(≈ 50 mmol/L)的自然环境

中,并且参照 LWG 细胞增殖规律,故将测试浓度设定在 25 mmol/L 与 50 mmol/L,以在实验条件下最大程度地模拟环境碱度。该实验的设立将为深入研究瓦氏雅罗鱼耐碱渗透压应答机制和相关基因功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与主要试剂

实验鱼为内蒙古达里诺尔湖瓦氏雅罗鱼(碱水种)自交 F_1 , 饲养于黑龙江水产研究所呼兰实验站。选择大小一致、体质量为(22.24 ± 4.68) g 的个体 120 尾, 运回实验室, 从中选取 3 尾进行碱度耐受实验。实验前, 实验鱼在循环可控水族箱($42.6 \text{ cm} \times 28.4 \text{ cm} \times 29.3 \text{ cm}$)暂养 1 周, 实验开始前 2 天停止喂食。实验主要试剂与仪器见表 1。

表 1 实验主要试剂与仪器
Tab. 1 The main consumables for the experiment

名称 Name	型号 Type	生产厂商 Manufacturers
磷酸盐缓冲溶液 (PBS) Phosphate buffered saline, PBS	ZKP -D160401-3	苏州泽科生物科技有限公司 Suzhou Zeke Biotechnology Co., Ltd.
青霉素-链霉素溶液 Penicillin-streptomycin solution, $100 \times$	SV30010	Hy Clone
碳酸氢钠粉末 Sodium bicarbonate	NaHCO_3	焦作市维联精细化工有限公司 Weilian Fine Chemical Co., Ltd.
DNA Ladder 试剂盒 DNA Ladder extraction kit with spin column	C0008	上海碧云天生物技术有限公司 Beyotime Biotechnology Co., Ltd.
Trypsin-EDTA (0.25%)	25200056	Thermo Fisher Scientific
胎牛血清 (FBS) Fatal bovine serum, FBS	16140071	Thermo Fisher Scientific
DMEM 高糖培养液 Dulbecco's modified eagle medium, DMEM	12430104	Thermo Fisher Scientific
CCK-8 检测试剂盒 Cell counting kit-8, CCK-8	PA5-84814	Thermo Fisher Scientific
CO_2 培养箱 CO_2 incubator	3308CTS	Thermo Fisher Scientific
显微镜 Electro-microscopy	VL0000D0	Thermo Fisher Scientific

1.2 LWG 细胞的原代培养与传代培养

采集组织前用 75% 乙醇棉球对实验鱼体表进行消毒, 后转至无菌操作台, 用镊子轻轻取出鳃组织, 用含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养液(含双抗, pH 7.0~7.4)清洗组织块 3~5 次后, 将其置于 PBS 中反复清洗至无杂质。随后, 将其转移至 400 U 青霉素-链霉素溶液中剪碎至 1 mm^3 大小, 加入 5 mL DMEM 培养液(含双抗, pH 7.0~7.4)后置于 15 mL 离心管中, $1\,000 \times g$ 离心 5 min, 吸去杂质。加入 0.25% 胰蛋白酶室温消化 ≥ 30 min, 每隔一段时间震荡 1 次防止其沉淀, 消化成絮状物。加入 5 mL 新鲜 DMEM 培养液(含双抗, pH 7.0~7.4)终止胰蛋白酶消化, 轻轻吹打混匀成细胞悬液。消化后的细胞悬液用 100

目灭菌滤网过滤, $100 \times g$ 离心 2 min, $50 \times g$ 离心 5 min, 重复 2 次以去除较大的组织和细胞团。随后用原代培养完全培养液(含 10% FBS、1% 青链霉素溶液的 DMEM 高糖培养液)重悬细胞, 调整密度后接种于 25 cm^2 培养瓶中, 置于 $15 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

当细胞长满瓶底, 细胞间无空隙时即可进行传代。吸去旧培养液, PBS 洗 2 遍, 加入胰蛋白酶消化, 轻轻摇晃培养瓶使液体覆盖瓶底, 静置 1~2 min, 镜下观察: 部分细胞呈圆形并漂浮后, 加入含血清培养液混匀停止酶解, 吹打瓶底各处按照适宜比例分装入新培养瓶并补加新鲜培养液。

1.3 LWG 细胞最佳培养基的确定

取第 3 代 LWG 细胞检测 DMEM、MEM 和 L-

15 三种培养基对细胞增殖的能力。每种培养基中均补充 10% 的胎牛血清、200 IU/mL 青霉素和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素。分别将大约 1.5×10^5 个细胞接种到 3 种培养基中 15 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。鳃细胞于培养后 12、24、36、48 及 72 h 用血球计数板进行细胞计数,绘制细胞在不同培养基下的生长曲线。

1.4 LWG 细胞存活率及活性鉴定

按照 CCK-8 说明书,雅罗鱼鳃细胞分别采用 96 孔细胞培养板各自检测。每孔接种细胞悬液 100 μL ,接种含量在 1.0×10^5 cells/mL,同时设立空白对照组(只加等量培养液),每隔 24 h 换液 100 μL ,每天相同时间取 5 个细胞孔和 3 个空白对照孔加入 CCK-8 溶液 10 μL ,继续培养 1 h 取出,固定时间段采用 660 nm 双波长法测定吸光值。

1.5 LWG 细胞的分子生物学鉴定

将细胞生长融合接近 90% 的培养瓶取出,弃培养液, PBS 漂洗。加入 TRIzol 试剂(购自 Thermo Fisher Scientific,型号:15596018)裂解细胞并提取细胞总 RNA,测定提取 RNA 的质量浓度与吸光度值后,利用 TaKaRa 试剂盒(Prime Script^{RT} Master Mix,型号:RR036A)反转成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 反应。

瓦氏雅罗鱼 camk2g2 (GenBank ID: PRJNA716095)克隆:通过 Primer Premier 6 设计引物,上游引物序列为 5'-ACCTCTCGCCTGAAGTCCTGAG-3';下游引物序列为 5'-CGGAGCAGTGGAAAGTGGATGTT-3'。PCR 反应体系(20 μL):cDNA (10 ng/ μL) 2 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 1 μL , Mix 10 μL , ddH₂O 6 μL 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.6 LWG 细胞碱耐受条件的确定

LWG 细胞弃去培养板中的培养基, PBS 清洗 2 遍以去除代谢产物。实验设置 3 个平行组,按照细胞数量分梯度接种于细胞培养板。培养 24 h 后,加入含 10 mmol/L NaHCO_3 的新鲜 DMEM 培养基放入 CO_2 培养箱中孵育 1~5 h,依据 CCK-8 检测试剂盒说明书,每小时分批收集细胞于 660 nm 处检测其吸光值,制作标准曲线确定

大致波动范围,以便后续碱梯度实验指标测定。

1.7 不同碱度下 LWG 细胞增殖规律

LWG 细胞弃去培养板中的培养基, PBS 清洗 2 遍以去除代谢产物。实验设置 3 个平行组,按照细胞数量分梯度接种于细胞培养板。随后,加入含有不同浓度 NaHCO_3 的新鲜培养基。设置碱度梯度为 0、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5、25.0、50.0 和 75.0 mmol/L,放入 CO_2 培养箱中孵育 3 h 后,采用酶标仪检测其存活率(CCK-8 法)。

1.8 碱耐受对 LWG 细胞功能的影响

采用 DNA 电泳分析法进行检测。收集细胞,按照 DNA Ladder 试剂盒要求提取 DNA,取 5 μL DNA 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,75 V,60 min。EB 染色后,凝胶成像系统照相。

1.9 数据统计与分析

数据处理以 3 个平行组数据的平均值 \pm 标准差(Means \pm SD)表示,进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),用 LSD 多重比较法进行组间差异显著性检验。采用 SPSS 26.0 软件包进行统计分析,显著性水平取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 LWG 细胞的原代培养

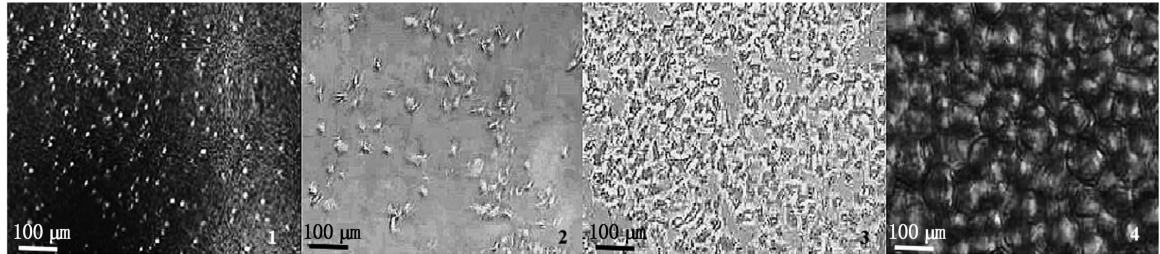
经胰蛋白酶消化法分离所得 LWG 细胞形态特征明显。培养 24 h 开始贴壁,形态呈多角形或鹅卵石样(图版-1)并出现大量死亡细胞;培养至 36 h 时开始增殖,更换培养液继续培养,死亡细胞明显减少,新生细胞从组织块中游离出来并贴壁生长,胞质丰富、状态良好(图版-2);培养至 72 h 时细胞汇集成片,形成细胞集落呈铺路石状占培养瓶底的 70%(图版-3);培养至 120 h 细胞铺满瓶底,形态呈铺路石状排列,单层生长不重叠(图版-4)。这说明本实验构建的细胞培养体系较适合 LWG 细胞的生长分裂。

2.2 LWG 细胞适宜培养基的确定

为筛选 LWG 细胞体外培养的最佳条件,比较分析 DMEM、MEM 和 L-15 等 3 种体外实验常见培养基在 15 $^{\circ}\text{C}$ 时对瓦氏雅罗鱼原代鳃细胞的影响。由图 1 可知:在利用 DMEM 培养基进行 LWG 细胞培养的过程中,与 24 h 时的 LWG 细胞数量相比,36 h 与 72 h 时细胞增殖数量出现显著增加($P < 0.01$)。采用 MEM 培养基培养至 36 h 时鳃细胞相较于 24 h 出现了显著性差异($P <$

0.01), 待到 72 h 其增长速度相较 DMEM 培养基中细胞明显放缓, 但与其 24 h 时的细胞数量相比仍表现出显著增加 ($P < 0.01$)。LWG 细胞在 L-15 培养基中培养至 36 h 时, 其生长状态与其 24 h 时出现显著性差异 ($P > 0.01$), 培养至 72 h, 该细胞生长速度明显低于 DMEM 和 MEM 中培养的

细胞, 但与其 24 h 时的细胞数量相比仍表现出显著增加 ($P < 0.01$)。综上所述表明: 在 3 种培养基培养的 LWG 细胞处于较稳定状态时 (培养至 72 h), DMEM 培养基中的鳃细胞增殖数量总体多于 MEM 与 L-15 培养基中的数量。因此, 本研究均采用 DMEM 培养原代 LWG 细胞。

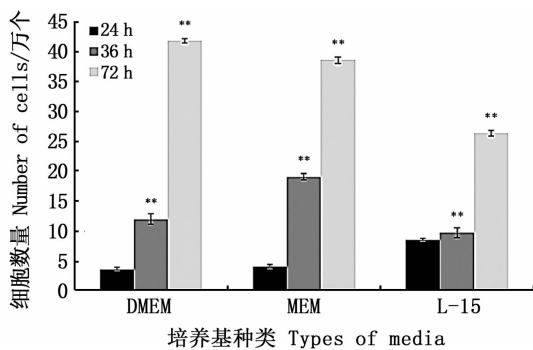


1. 细胞培养 24 h; 2. 细胞培养 36 h; 3. 细胞培养 72 h; 4. 细胞培养 120 h。

1. Cultured cells for 24 h; 2. Cultured cells for 36 h; 3. Cultured cells for 72 h; 4. Cultured cells for 120 h.

图版 胰蛋白酶消化法获得的 LWG 细胞形态学观察 (放大图)

Plate Morphological observation of LWG cells obtained by trypsin digestion (enlarged drawing)



柱形图上方含“**”代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

The “**” above the histogram shows significant difference ($P < 0.01$).

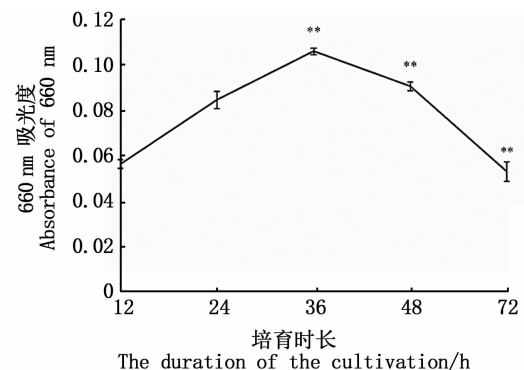
图 1 不同培养基对 LWG 细胞生长的影响

Fig.1 Effects of different media on the growth of gill cells of *Leuciscus waleckii*

2.3 LWG 细胞活性鉴定

DMEM 培养基培养 LWG 细胞增殖率如图 2 所示。细胞接种 96 孔板后在培养箱中培养 12 h 后采用 CCK-8 法进行细胞增殖状态的评估。与 12 h 时的细胞增殖状态相比, 24 h 细胞增殖速度较快, 但未表现出显著性增加 ($P > 0.05$), 说明细胞生长状态处于潜伏期。LWG 细胞培养至 36 h 进入对数生长期, 活性达到最高水平且相较于 12 h 时细胞数量出现显著性增长 ($P < 0.01$); 待培养至 48 ~ 72 h, 细胞快速增长后发生接触抑制,

细胞活性与 12 h 时相比逐渐出现显著性降低态势, 表征细胞状态进入停滞期并逐渐走向衰败 ($P < 0.01$)。综上所述表明, 36 h 是 LWG 细胞体外培养的适宜时期。



“**”代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

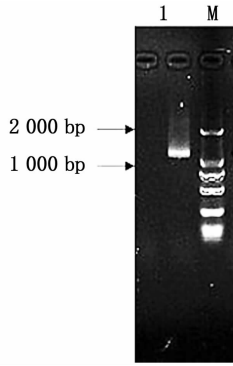
The “**” shows significant difference ($P < 0.01$).

图 2 CCK-8 法测定瓦氏雅罗鱼鳃细胞吸光度

Fig.2 Determination of absorbance value of gill cells of *Leuciscus waleckii* by CCK-8

2.4 LWG 细胞来源鉴定

通过扩增 LWG 细胞与瓦氏雅罗鱼 *camk2g2* (GenBank ID: PRJNA716095) 比较其同源性来确定细胞系来源。如图 3 所示, 根据实验室先前数据可知 *camk2g2* 片段全长为 1 559 bp。本研究中华琼脂糖凝胶电泳结果显示单一条带, 与之结果一致。



1. 鳃细胞; M. DL2000。
1. Gill cells; M. DL2000.

图3 *camk2g2* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 3 PCR amplification of *camk2g2*

克隆获得的瓦氏雅罗鱼 *camk2g2* 基因的 ORF

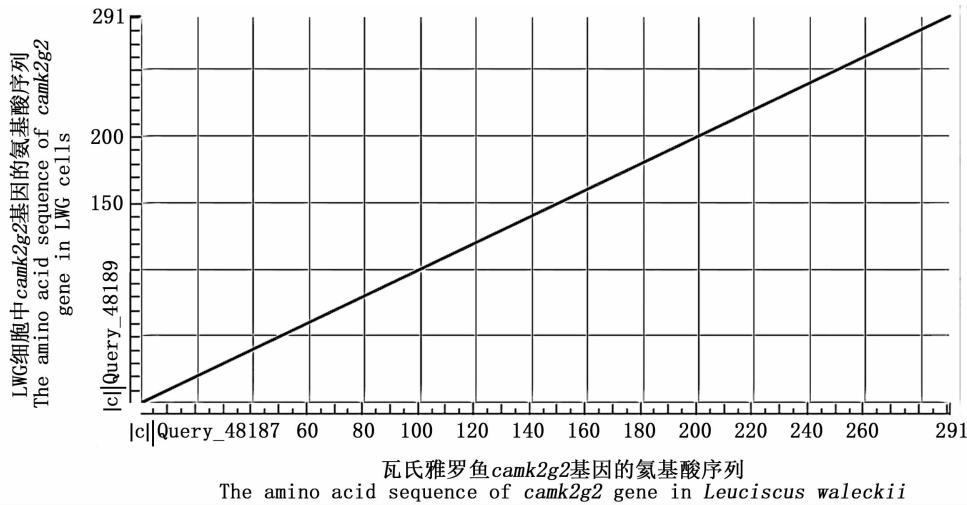


图4 瓦氏雅罗鱼鳃组织与 LWG 细胞的 *camk2g2* 氨基酸序列对比结果
Fig. 4 The dot plot of *camk2g2* with LWG cells in *Leuciscus waleckii*

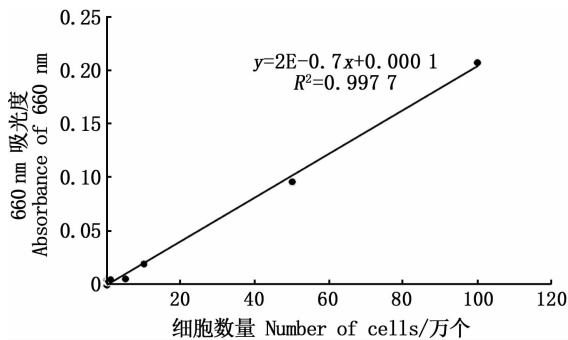


图5 10 mmol/L NaHCO₃ 耐受 3 h 时 LWG 细胞吸光度
Fig. 5 Absorbance values of LWG cells exposed to 10 mmol/L NaHCO₃ for 3 h

2.6 LWG 细胞增殖规律

采用 CCK-8 法测定 3 h 碱胁迫对原代培养

全长为 684 bp, 编码 228 个氨基酸。SMART 预测其 *camk2g2* 结构域, 第 81 ~ 100 位 AA 为低复杂度区域, 第 114 ~ 138 位 AA 是卷曲螺旋区域, 与 CaMK2a 蛋白最为相近, 是 CaMK 家族共有结构域。对氨基酸序列对比后发现(图 4), LWG 细胞中得到的 *camk2g2* 与之相似度为 90.0%, 确定 LWG 细胞来源于瓦氏雅罗鱼。

2.5 碱耐受条件的基本确定

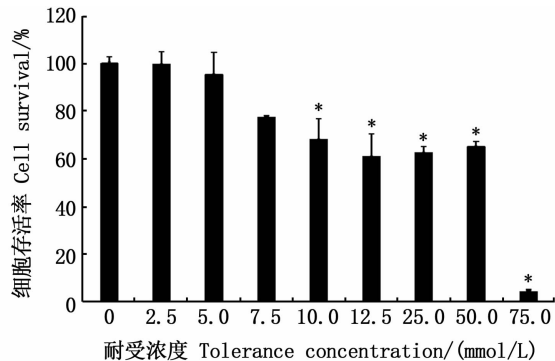
采用 660 nm 双波长法对 LWG 细胞碱耐受范围进行测定并绘制标准曲线。结果表明, 如图 5 所示, 在 10 mmol/L NaHCO₃ 的条件下, 发现在碱胁迫 3 h 时其标准曲线 $R^2 = 0.9977$, 说明在该条件下细胞增殖良好, 指征后续耐受实验可围绕该实验结果测定的范围展开。

LWG 细胞存活率的影响。如图 6 所示, 与 0 mmol/L 相比, 鳃细胞存活率总体呈现下降态势, 50 mmol/L 时细胞存活率下降至 60% 以下。与 0 mmol/L 相比, 当 NaHCO₃ 浓度为 0 ~ 7.5 mmol/L 时细胞存活率无显著性差异 ($P > 0.05$), 当 NaHCO₃ 浓度为 10 ~ 75 mmol/L 时细胞存活率出现显著性下降 ($P < 0.05$)。

2.7 碱耐受对 LWG 细胞功能的影响

细胞出现凋亡时, 内源性核酸酶被激活, 染色体 DNA 链在核小体之间被切割, 将这些 DNA 片段抽提出来进行电泳, 可得到 DNA 梯状条带 (DNA Ladder)。如图 7 所示, LWG 细胞经高碱胁迫 3 h 后出现特异性的细胞凋亡的生化特征, DNA 出现片段化, 即: 出现梯状电泳条带, 最小的条带为 180 ~ 200 bp, 其他条带为其整倍数大小。

正常 DNA 条带(0 mmol/L)因分子量大,迁移距离短,故停留在加样孔附近。未见典型凋亡细胞 DNA 条带,也无 DNA 弥散现象。以上现象表明, LWG 细胞受碱影响会产生细胞凋亡现象。



柱形图上方含“*”代表差异极显著($P < 0.05$)。
The “*” above the histogram shows significant difference ($P < 0.05$).

图6 CCK-8 法测定瓦氏雅罗鱼鳃细胞存活率
Fig. 6 Determination of gill cell survival rate by CCK-8

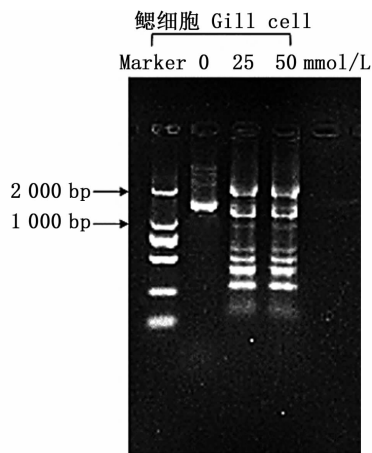


图7 DNA 电泳分析法测定 LWG 细胞功能
Fig. 7 Determination of LWG function by DNA Ladder

3 讨论

3.1 LWG 细胞原代培养与传代培养

细胞体外培养经历约百年发展历史,现已广泛应用于生物学研究的各个领域。近年来,以鱼类细胞为实验对象的研究得到长足发展。鱼类细胞原代培养技术主要集中于常见经济鱼类,自草鱼鳃组织^[13]中分离并建立鳃细胞系后,牙鲆^[14-15]、文昌鱼^[16]和圆斑星鲽^[17-18]等鱼类的鳃细胞系陆续建立,但有关瓦氏雅罗鱼等高碱环境下生存鱼类的鳃细胞研究相对较少。

研究^[19]表明,培养基对细胞体外培养性能具

有显著的影响。实验中分析了3种不同培养基(DMEM、MEM和L-15)对LWG细胞原代培养的影响,结果表明,鳃、肠细胞在含有10%胎牛血清的DMEM培养基中生长速度明显优于MEM和L-15培养基。这是因为体外培养技术发展至今,培养基的种类已达几十种之多,其中,DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培养基是在经典MEM培养基的基础上发展起来的,具有明显优势。鱼类细胞培养中,与MEM培养基相比,DMEM含有双倍氨基酸、4倍维生素、多种非必需氨基酸(如西林和甘氨酸)、微量 Fe^{2+} 及适量丙酮酸钠^[20]。此外,DMEM培养基不含蛋白质、脂类或生长因子,仅能提供基础营养物质并非完整介质,而胎牛血清(FBS)提供的蛋白酶抑制剂可以保护细胞不受剩余蛋白酶的消化,因此DMEM培养基中通常加入10%FBS作为补充来促进细胞贴壁,因此DMEM是许多研究人员开始原代培养和建立细胞系的最合适的培养基。如:斑马鱼性腺组织^[21],大龙六线鱼鳍、吻端和肾脏组织^[22],尼罗罗非鱼及斑马鱼胚胎细胞^[23],褐点石斑鱼^[24]和黄颡鱼^[25]鳍、心脏和鳔组织细胞系,赤点石斑鱼皮肤组织^[26],鲫肠道上皮细胞^[27]和剑尾鱼肝细胞^[28]等培养实验均将DMEM作为原代、传代培养最适宜的培养基,这与本实验的结论一致。

鉴定细胞系来源是确保实验准确性的必要步骤^[29]。*camk2g2*是一种多功能 Ca^{2+} 结合媒介蛋白,与 Ca^{2+} 结合后通过改变其与各种靶蛋白(如激酶或磷酸酶)的相互作用,成为 Ca^{2+} 信号传导途径的一部分^[30]。现已证实,其在真核细胞中均有表达^[31-33]。根据先前研究数据,本研究扩增瓦氏雅罗鱼组织及LWG细胞中共有的钙调蛋白*camk2g2*基因以证明此细胞系来源。根据实验室先前数据可知,本研究利用已知的1559bp雅罗鱼*camk2g2*片段与所建鳃细胞系中*camk2g2*序列大小一致,确定该细胞系来源于瓦氏雅罗鱼。综上,在本实验限定条件下胰蛋白酶消化法合适于LWG细胞的离散,含有10%FBS的DMEM培养基为LWG细胞原代培养最适培养基且该细胞在原代培养36~72h时生长代谢旺盛。

3.2 LWG 细胞耐碱特性初探

依照标准曲线确定3h为本实验中LWG细胞较为适宜的耐受时长(图6),并以此为基础设

置不同的碱度耐受梯度。本研究中,瓦氏雅罗鱼胁迫起始时 LWG 细胞存活率为 100%,随着碱胁迫浓度增加,细胞存活率也随之明显下降: LWG 细胞于 50 mmol/L 碱度环境下,细胞存活率降至 60% 以下,且出现显著性下降 ($P < 0.05$)。细胞存活率的降低主要是由于随着碱度 ($\text{NaHCO}_3 \rightleftharpoons \text{Na}^+ + \text{HCO}_3^-$) 升高,水体中离子浓度随之增加,摄入体内的离子逐渐累加引起的机体代谢负担加重,导致细胞凋亡率升高。不同碱度胁迫后 LWG 细胞于 10 mmol/L 碱度环境下,细胞存活率第一次出现显著性下降 ($P < 0.05$)。初步推测,可能是鳃细胞直接接触水环境,每个鳃片、鳃丝、鳃小片都完全张开使鳃和水的接触面积扩大增加了摄取水中溶解氧的机会,因此对水环境中离子变化反应敏感。

急性胁迫实验中, LWG 细胞在不同碱度处理组中细胞存活率均逐渐下降,尤其是在 50 ~ 70 mmol/L 的浓度变化时表现为骤降。该现象的出现可能与对碳酸盐相关离子浓度变化的敏感度和接触面积差异有直接关联,表明 LWG 细胞在一定程度上具备渗透压平衡调节能力。多项研究表明,在自然碱水环境中,鱼类除了维持渗透压调节外,还面临着酸碱平衡调节的压力。通常认为,碳酸盐型碱水对鱼类生存影响主要通过干扰其血液缓冲系统。其中, HCO_3^- 是血液缓冲系统中最重要组成成分。这表明, LWG 细胞在受到外界 HCO_3^- 离子浓度变化的刺激时,自身的生理状态可能会发生改变来重构高碱度条件下的内环境稳态。

鉴于上述实验结果,采用 DNA 电泳分析法对碱耐受影响 LWG 细胞功能进行了探索。细胞程序化死亡 (Programmed cell death, PCD) 是细胞在发育过程中或在某些环境因素作用下发生的、受基因调控的、主动的、有序的死亡方式^[34-35]。外界碱度达到一定值,会破坏许多鱼类细胞正常的生理功能,部分细胞甚至死亡,使鱼体生长发育受到限制,这是一种常见的生理现象^[36]。细胞 PCD 过程中,核酸酶活性上升,以 180 bp 为单位 DNA 被逐步降解,这一结果能够以梯状分布的形式呈现^[34,37],且只有存在一定比例凋亡细胞的时候才能检测到,可将该条带的形成认为是当前检测细胞程序性死亡的重要生化指标之一。本研究中对照 0 mmol/L 的 DNA 出现 1 条完整带谱,

没有降解。25 ~ 50 mmol/L 的碱胁迫 3 h 后 LWG 细胞出现 DNA Ladder,说明 LWG 细胞在 25 ~ 50 mmol/L NaHCO_3 条件下其 DNA 降解具备非随机性,该过程与细胞程序性死亡现象高度相关。目前,耐碱应激调控领域中有关鱼类细胞 PCD 过程未见相关研究报道,仅在植物细胞耐碱方面有少量研究。例如:HAJRAH 等^[38]高盐应力下大麦根尖组织细胞的细胞死亡具有典型的形态学和生物化学特征。500 mmol/L NaCl 胁迫可以诱导大麦根发生程序性死亡,胁迫 8 h 出现 DNA Ladder,12 h 根系分生组织细胞核开始解体,验证该作用过程与应激反应密切相关。本实验 DNA Ladder 结果与上述实验结果存在高相似度,这将为深入研究瓦氏雅罗鱼碱胁迫应激调控作用机制奠定基础。

参考文献:

- [1] 梁利群,任波,常玉梅,等. 中国内陆咸(盐碱)水资源及渔业综合开发利用[J]. 中国渔业经济, 2013, 31(4): 138-145.
LIANG L Q, REN B, CHANG Y M, et al. Inland brackish (alkaline-saline) water resources and fisheries utilization in China[J]. Chinese Fisheries Economics, 2013, 31(4): 138-145.
- [2] PORTZ D E, WOODLEY C M, CECH JR J J, et al. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes[J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2006, 16(2): 125-170.
- [3] BUCKNER S L, MOUSER J G, DANKEL S J, et al. The general adaptation syndrome: potential misapplications to resistance exercise[J]. Journal of Science and Medicine in Sport, 2017, 20(11): 1015-1017.
- [4] 骆源. 斜带石斑鱼肝细胞原代培养及皮质醇对其代谢的影响[D]. 厦门: 集美大学, 2016.
LUO Y. Primary culture of hepatocytes from grouper (*Epinephelus coioides*) and effect of Cortisol on the metabolism of hepatocytes[D]. Xiamen: Jimei University, 2016.
- [5] 池炳杰,常玉梅,闫学春,等. 瓦氏雅罗鱼达里湖群体和乌苏里江群体的遗传多样性和遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(2): 228-235.
CHI B J, CHANG Y M, YAN X C, et al. Genetic variability and genetic structure of *Leuciscus waleckii* dybowski in Wusuli River and Dali Lake [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(2): 228-235.
- [6] 窦新杰,常玉梅,唐然,等. 瓦氏雅罗鱼群体基于 CO I 序列的遗传多样性分析[J]. 华北农学报, 2014, 29(s1): 29-34.
DOU X J, CHANG Y M, TANG R, et al. Genetic Diversity of *Leuciscus waleckii* populations based on CO I sequence

- [J]. ACTA Agriculturae Boreali-Sinica, 2014, 29 (s1): 29-34.
- [7] BAKSI S M, FRAZIER J M. Isolated fish hepatocytes—model systems for toxicology research [J]. Aquatic Toxicology, 1990, 16(4): 229-256.
- [8] XU W G, AMAGAI T, MORITA Y, et al. Pituitary structures and immunohistochemical identification of FSH β and LH β expressing cells in four species of the adult groupers [J]. Aquaculture Science, 2019, 67(3): 249-256.
- [9] WANG X L, WANG N, SHA Z X, et al. Establishment, characterization of a new cell line from heart of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2010, 36(4): 1181-1189.
- [10] OU-YANG Z L, HUANG X H, HUANG E Y, et al. Establishment and characterization of a new marine fish cell line derived from red-spotted grouper *Epinephelus akaara* [J]. Journal of Fish Biology, 2010, 77(5): 1083-1095.
- [11] LIANG Z X, LIU H S, XIONG L, et al. A novel NF- κ B regulator encoded by circPLCE1 inhibits colorectal carcinoma progression by promoting RPS3 ubiquitin-dependent degradation [J]. Molecular Cancer, 2021, 20(1): 103.
- [12] XU Y, ZHONG Z W, ZHANG Z P, et al. Establishment and characterization of the gonadal cell lines derived from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) for gene expression studies [J]. Aquaculture, 2022, 546: 737300.
- [13] SHAH N, KHISROON M, SHAH S S A. Metals distribution, histopathological alterations, and health risk assessment in different tissues of fish (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Biological Trace Element Research, 2021, 199(7): 2730-2752.
- [14] GUO Y N, SUN Z D, ZHANG Y T, et al. Molecular identification and function characterization of four alternative splice variants of trim25 in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 120: 142-154.
- [15] FABER M N, SOJAN J M, SARAIVA M, et al. Development of a 3D spheroid cell culture system from fish cell lines for in vitro infection studies; evaluation with *Saprolegnia parasitica* [J]. Journal of Fish Diseases, 2021, 44(6): 701-710.
- [16] LOWE C J. Molecular insights into deuterostome evolution from hemichordate developmental biology [J]. Current Topics in Developmental Biology, 2021, 141: 75-117.
- [17] 樊廷俊, 郭雪阳, 姜国建, 等. 圆斑星鲷连续性鳃细胞系的建立 [J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(9): 69-74.
FAN T J, GUO X Y, JIANG G J, et al. Establishment of a continuous gill cell line from Spotted Halibut, *Verasper variegatus* [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(9): 69-74.
- [18] 徐晓辉. 两种星鲷组织细胞系的建立及久效磷对其毒性作用的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
XU X H. Establishment of two novel cell lines from barfin flounder (*Verasper moseri*) and spotted halibut (*Verasper variegates*), and their cytotoxicities treated by monocrotophos [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.
- [19] SILVA R F, LIMA L F, ROCHA R M P, et al. In vitro long-term culture of isolated ovine preantral follicles: Influence of ethanol on steroid production, oocyte meiotic resumption, and metabolomic profile [J]. Research in Veterinary Science, 2021, 135: 432-441.
- [20] YU L, DONG L, WANG Y, et al. Reversible regulation of SATB1 ubiquitination by USP47 and SMURF2 mediates colon cancer cell proliferation and tumor progression [J]. Cancer Letters, 2019, 448: 40-51.
- [21] 董丹丹, 孙燕侠, 郭华荣. 斑马鱼性腺组织的原代细胞培养技术的建立 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(15): 130-134.
DONG D D, SUN Y X, GUO H R. Development of primary cell culture from the gonad tissues of zebrafish [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(15): 130-134.
- [22] 郭莹, 李霞, 秦艳杰. 大泷六线鱼鳍、吻端和肾脏组织原代培养的研究 [J]. 大连海洋大学学报, 2012, 27(5): 387-391.
GUO Y, LI X, QIN Y J. Primary culture of fin, lip and kidney cells in fat greenling *Hexagrammos otakii* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(5): 387-391.
- [23] 胡洋. 尼罗罗非鱼及斑马鱼胚胎细胞分离培养的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2010.
HU Y. Study on isolation and culture of Nile tilapia and zebrafish embryonic cells [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2010.
- [24] 魏云波. 褐点石斑鱼 (*Epinephelus fuscoguttatus*) 三种细胞系的建立、病毒敏感性以及环境污染物对其毒性作用的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
WEI Y B. Establishment and viral susceptibility evaluation of three novel cell lines from brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, and their cytotoxicities treated by environmental pollutants [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009.
- [25] WANG Q, SHEN J Y, YAN Z T, et al. Dietary *Glycyrrhizauralensis* extracts supplementation elevated growth performance, immune responses and disease resistance against *Flavobacterium columnare* in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 153-164.
- [26] YANG M, CHEN J P, LI X S, et al. The transcription factor NFYC positively regulates expression of MHCIa in the red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2022, 127: 104272.
- [27] 宋增福, 吴天星, 潘晓东. 鲫肠道上皮细胞原代培养方法的研究 [J]. 淡水渔业, 2008, 38(1): 67-69, 34.
SONG Z F, WU T X, PAN X D. Study primary culture methods of intestinal epithelial cells of crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. Freshwater Fisheries, 2008, 38(1): 67-69, 34.
- [28] DAS S, RAVI A, JOSE M S, et al. Disease inductive potential of *Aeromonas sveronii* XhG1.2 isolated from *Xiphophorus shellerii*

- in selected ornamental fish [J]. *Aquaculture Research*, 2021, 52(11): 5891-5897.
- [29] 张莹莹, 梁雪梅, 曾文刚, 等. 金钱鱼肾细胞系的建立及生长特性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(3): 651-656. ZHANG Y Y, LIANG X M, ZENG W G, et al. Establishment and characterization of a new euryhaline fish kidney cell line of spotted scat *Scatophagus argus* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(3): 651-656.
- [30] STEVENS F C. Calmodulin: an introduction[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1983, 61(8): 906-910.
- [31] CHIN D, MEANS A R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor[J]. *Trends in Cell Biology*, 2000, 10(8): 322-328.
- [32] AMIN M M, RAMBE A S, RITARWAN K. Parkinson's disease and gene therapy [J]. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2021, 9(T3): 60-63.
- [33] GIFFORD J L, WALSH M P, VOGEL H J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs[J]. *Biochemical Journal*, 2007, 405(2): 199-221.
- [34] ŠOLN K, KLEMENCIC M, KOCE J D. Plant cell responses to allelopathy: from oxidative stress to programmed cell death [J]. *Protoplasma*, 2022: 1-14.
- [35] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 457-458. ZHAI Z H, WANG X Z, DING M X. *Cell biology*[M]. 3rd ed. Beijing: Higher Education Press, 2007: 457-458.
- [36] 郑春静. 淡水白鲢细胞寒害致死机理初步研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2002. ZHENG C J. Preliminary study on cold-stress induced cell death of cells from *Colossoma brachypomum* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2002.
- [37] WANG X Y, ZHANG M Z. A new image encryption algorithm based on ladder transformation and DNA coding [J]. *Multimedia Tools and Applications*, 2021, 80(9): 13339-13365.
- [38] HAJRAH N H, OBAID A Y, ATEF A, et al. Transcriptomic analysis of salt stress responsive genes in *Rhazya stricta*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177589.

Establishment of the gill cell line of *Leuciscus waleckii* and alkaline-tolerant growth characteristics

XU Yue^{1,2}, LIANG Liqun², SUN Bo², CHANG Yumei²

(1. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to explore the regulation mechanism of alkali resistance of *Leuciscus waleckii*, a dominant natural species in an alkaline water environment, gill cells of *Leuciscus waleckii* were cultured by trypsin digestion *in vitro*, and the suitable conditions for primary and subculture cell culture were determined. The tolerance experiment was carried out to demonstrate its growth characteristics in an alkaline environment. The experimental results show that the primary gill cells of *Leuciscus waleckii* can be cultured in a DMEM medium containing 10% Fetal bovine serum (FBS) at 15 °C, which can obtain a stable and good culture effect. It can be passaged within 36–72 h, and the stably passaged cells are named LWG cells. During subculture, LWG cells grew and metabolized vigorously at 36 h, which can be used for subsequent experiments. In alkaline water habitat, gill cells will start the osmotic pressure stress response mechanism to alleviate the damage caused by alkali ions to fish. Therefore, an alkali stress experiment on LWG cells was carried out and their cell activity and function were tested. It was found that when LWG cells tolerated for three hours the concentration of 25–50 mmol/L NaHCO₃, proliferation rate was about 60% and apoptosis occurred. It can be inferred that LWG cells have strong osmotic alkalinity tolerance and promote apoptosis under carbonate alkalinity stress of 25–50 mmol/L. This will provide stable experimental materials for exploring osmotic stress response mechanisms and verifying related gene functions under alkali stress.

Key words: *Leuciscus waleckii*; gill cell line; primary culture; alkali resistance; osmotic pressure stress response mechanism