

The Primary Culture Method on Pituitary Cells *In Vitro* of Half-Smooth Tongue Sole *Cynoglossus semilaevis*

Bin Huang¹, Na Wang¹, Bao Shi¹, Linmei Cong², Songlin Chen¹, Weifang Wang¹

¹Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Shandong

²Guangzhou LiYang Aqua-Technology Co. Ltd., Guangzhou Guangdong

Email: wangwf@ysfri.ac.cn

Received: Jul. 9th, 2017; accepted: Jul. 30th, 2017; published: Aug. 2nd, 2017

Abstract

The primary culture method on pituitary cells *in vitro* of half smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) was developed in this study. The cells were cultured in L-15 medium supplemented with 5% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and were survived as long as 7 days without cell growth factor in the incubator of 24°C. The cells can secrete the gonadotropin hormone. The results showed that this established method is suitable for both brood stock fish and adult fish. The cultured cells can be used in the research on reproductive physiology, also can be applied in the mechanism study on nutrition and reproduction at the cellular level with this convenient experimental material.

Keywords

Cynoglossus semilaevis, Pituitary Cell, Primary Culture, Nutrition and Reproduction

半滑舌鲷垂体细胞体外原代培养方法研究

黄滨¹, 王娜¹, 史宝¹, 丛林梅², 陈松林¹, 王蔚芳¹

¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛

²广州利洋水产科技股份有限公司, 广东 广州

Email: wangwf@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017年7月9日; 录用日期: 2017年7月30日; 发布日期: 2017年8月2日

摘要

本文旨在探讨半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)垂体细胞的体外原代培养方法。采用胰蛋白酶消化法, 垂体细胞能够在含有5%的胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的L-15完全培养基中, 在24℃培养箱中, 在不添加细胞生长因子的条件下培养7天以上, 并分泌促性腺激素。结果显示, 建立的垂体细胞原代培养方法适用于亲鱼和成鱼。体外原代培养的细胞既可以应用其开展相关的生殖生理研究, 也可以从细胞层面探讨营养素发挥生殖调控的作用机制, 为亲鱼营养调控机制研究提供便捷的实验材料。

关键词

半滑舌鳎, 垂体细胞, 原代培养, 营养与繁殖

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

亲鱼的营养状况直接影响亲鱼的繁殖性能、胚胎发育和仔稚幼鱼的存活与品质[1]。因此, 在亲鱼养殖阶段, 营养强化至关重要。然而, 由于亲鱼营养研究存在饲养设施要求高、耗时长、投入成本大等限制因素, 导致亲鱼的营养学研究起步晚, 研究要素仅局限在蛋白质、脂肪酸和维生素等几个方面, 有关机理性研究鲜有报道; 在生产实践中也通常凭借经验进行亲鱼营养强化, 没有标准和依据可循。上述因素也成为了限制水产动物营养与繁殖研究领域发展的瓶颈问题。为了解决这一限制因素并拓展相关学科的发展, 作者以细胞学为切入点, 以调控亲鱼繁殖的生殖轴为靶目标, 对其中发挥重要激素调控功能的垂体组织进行体外原代细胞培养, 试图从细胞层面探讨相关营养素发挥生殖调控的作用机制, 为亲鱼营养与繁殖研究的发展提供新思路 and 便捷的实验材料。

众所周知, 除环境因素影响外, 鱼类的生殖活动直接受到下丘脑-垂体-性腺(生殖轴)三个不同层次内分泌系统的调控[2]。在下丘脑分泌的促性腺激素释放激素作用下, 激发了垂体分泌促性腺激素(促滤泡激素 FSH 和促黄体激素 LH)并作用于性腺, 促使其分泌性类固醇激素, 以促使性腺发育成熟与排出精子和卵子[3]。那么, 营养元素能够发挥调控作用的部位也离不开这条生殖轴。但是目前, 相关研究主要侧重营养素对水产动物性腺发育、配子质量和后代质量的影响[4]。

垂体分泌的激素对鱼类生长、代谢和繁殖起到重要调控作用。垂体组织细胞的原代培养方法多应用于内分泌研究的相关领域, 且在陆生动物中已成为常规的实验材料。原代培养的细胞保留了组织器官本身最大的生物活性和遗传特性, 而且不受神经系统影响, 反应的介质也易于控制和研究, 节约实验用动物数量且细胞混合后的实验系统误差小, 这些优势使得以原代细胞作为实验材料而广泛应用。目前, 已经在几种鱼类中体外成功培养了垂体的原代细胞并应用于生殖内分泌研究, 包括: 鲤鱼、金鱼、斑马鱼、罗非鱼、虹鳟等[5] [6] [7] [8] [9]。在这些鱼类的垂体细胞原代培养方法中, 具体的培养条件和一些参数因鱼种类、生活环境等各异而不同。优化培养参数和条件能够获得功能更加稳定的细胞, 使其应用于实验中发挥更大的功效。

半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)是我国近海特有的暖温性大中型底层鱼类, 主要分布于黄海、渤海,

生长速度快,肉味鲜美,营养价值很高[10]。近年来,半滑舌鳎已成为我国海水鱼类养殖的主导品种之一。但是,由于半滑舌鳎亲鱼繁殖性能较差,人工育苗中出苗率只有 30%左右[11],严重制约半滑舌鳎养殖业发展。有必要加强其亲鱼营养的研究,尤其是机理方面的研究,使得亲鱼营养调控精准化、科学化。目前,有关半滑舌鳎组织器官的细胞培养只见卵巢、精巢、头肾、脾脏、肝脏、心脏、血淋巴等报道[12]-[17],垂体细胞原代培养未见相关研究。本实验通过开展半滑舌鳎垂体细胞原代培养研究,优化其培养条件,获得了稳定的原代细胞,为其日后开展的细胞功能应用性研究奠定基础,为亲鱼营养调控机制研究提供便捷的实验材料。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

半滑舌鳎雌鱼(卵巢发育至 III 期)购自莱州明波水产有限公司,选取性腺隆起、体重 2.5 kg 左右的健康亲鱼 10 条;同时还购买体重 1 kg 左右的雌鱼 6 条为实验用鱼。

2.2. 亲鱼卵巢切片制备

取卵巢组织,用 Davidedsons 固定液固定 24 小时,经梯度酒精脱水后,进行石蜡包埋、冷冻切片及 HE 染色,使用中性的树脂封片,通过显微镜观察、拍照确定性腺发育时期。

2.3. 亲鱼垂体细胞的分离与培养

2.3.1. 配制细胞培养液

取 9.6 g L-15 培养基和 4.76 g HEPES 溶于水,充分溶解混匀 4 h 后,用 NaOH 调节 pH 为 7.4,然后抽滤,分装,即为 L-15 基础培养基,4℃保存;L-15 基础培养基中加入终浓度为 5%的胎牛血清、终浓度为 100 U/mL 的青霉素和终浓度为 100 μg/mL 的链霉素,即为 L-15 完全培养基,4℃保存。

2.3.2. 细胞分离

由于亲鱼取材的特殊性及其价格比较昂贵,在培养温度的选择方面直接参考经筛选过的半滑舌鳎血淋巴、肝脏和卵巢组织的最佳培养温度 24℃。摘取卵巢发育处于 III 期的半滑舌鳎的垂体,置于装有 L-15 完全培养基的一次性细胞培养皿中,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗一次,将垂体组织剪成大约 1 mm³的小块,采用两种常用的细胞分离方法进行分离。① 组织块分离方法:将 3 条鱼的垂体剪成的 1 mm³小块用 L-15 完全培养基均匀接种于 25 cm²培养瓶中,倒置放 6h 后加入 3 mL L-15 完全培养基正置于 24℃培养箱培养。② 胰蛋白酶消化法:将 7 条鱼的垂体剪成的 1 mm³小块,再用 PBS 冲洗一次,加入约组织块 10 倍体积的 0.25%的胰蛋白酶在 18℃水浴中消化 45 min,加入 2 mL PBS 吹打,然后用 200 目/70 μm 的尼龙网过滤,收集滤液,以 100 g/min 的速度离心 10 min 后,去上清然后重悬沉淀,按照 1 mL/孔的量分装至六孔板中,正置于 24℃培养箱中培养。

2.3.3. 细胞培养

在培养的 6 孔中,其中 2 孔添加生长因子(2-巯基乙醇和成纤维生长因子,终浓度分别为 50 mmol/L 和 10 ng/mL),2 孔添加无水乙醇(终浓度为 0.1%,v/v) [18],其余 2 孔无添加(对照)。培养后第 2, 3, 7 天连续观察细胞生长情况,倒置显微镜观察拍照记录,最终放大 100 倍镜。

2.4. 成鱼垂体细胞的分离与培养

按照上述亲鱼垂体细胞的分离培养方法,采用胰蛋白酶消化法分离垂体细胞,最终置于六孔板中 24℃培养箱中培养(不添加生长因子),第 2, 3, 7 天连续观察细胞生长情况。

2.5. FSH 和 LH 的酶联免疫吸附法(ELISA)分析

培养 7 天后, 将每孔垂体细胞转移至 15 mL 离心管中, 以 100 g/min 的速度离心 10 min 之后, 上清用于 ELISA 实验分析, 取 2 个检测孔的平均值作为结果。

采用北京冬歌博业生物科技有限公司的鱼促滤泡激素(FSH)ELISA 检测试剂盒和鱼促黄体激素(LH)ELISA 检测试剂盒, 取上述培养的细胞上清液为材料, 按照试剂盒说明书进行操作。

3. 结果

3.1. 卵巢组织切片

实验用半滑舌鲷亲鱼性腺组织切片如图 1 所示。鱼体解剖后, 卵巢呈亮乳白色, 表面血管丰富, 卵巢体积明显增大, 总体仍为扁平状, 前部膨胀延长, 呈三角形。切片观察, 卵母细胞形态基本呈圆球形, 细胞体积明显增大。一个较为明显的特征是皮质液泡的出现、增加和移位。液泡出现在细胞质外缘, 逐渐向内缘移位。卵黄颗粒出现并不断增加。说明实验用半滑舌鲷亲鱼卵巢发育处于 III 期。

3.2. 亲鱼垂体细胞分离

分别采用组织块分离法和胰蛋白酶消化法进行细胞分离。细胞观察发现组织块分离法只有少量细胞迁出, 无法进行后续实验, 分离失败。胰蛋白酶消化法获得的细胞杂质少, 镜检观察视野清晰, 细胞均匀分散, 利于后期对细胞进行的处理实验, 如图 2 所示。

3.3. 亲鱼垂体细胞培养

分别在细胞培养液中添加生长因子(促进细胞生长)和无水乙醇(细胞处理实验时作为脂溶性物质的溶剂)。结果表明, 添加生长因子培养的细胞与对照组比数量明显减少, 不足支撑后续的细胞实验(图 3(a)); 而添加无水乙醇培养的细胞与对照组比, 在细胞形态和数量上没有差异(图 3(b)); 图 3(c)为对照组细胞。

3.4. 成鱼垂体细胞分离和培养

采用胰蛋白酶消化法分离垂体培养细胞, 未添加生长因子, 观察发现, 细胞生长良好, 形态饱满, 如图 4 所示。

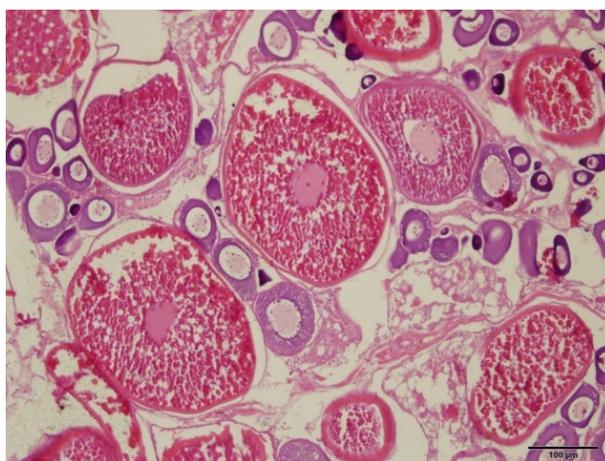


Figure 1. The tissue slice of *Cynoglossus semilaevis* ovary development on stage III

图 1. 半滑舌鲷亲鱼卵巢发育 III 期组织切片图

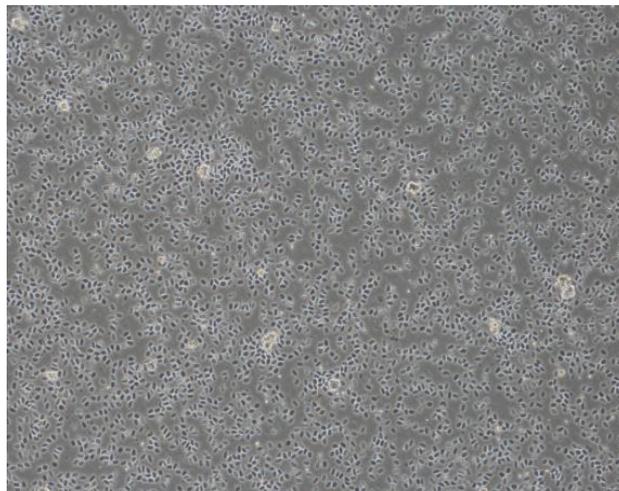


Figure 2. The primary culture on pituitary cells of *Cynoglossus semilaevis* broodstock fish (100×)

图 2. 半滑舌鲷亲鱼卵巢发育 III 期组织切片图(100 倍镜)

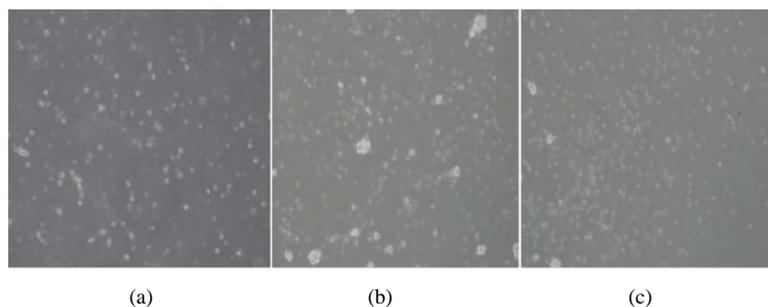


Figure 3. The primary culture on pituitary cells of *Cynoglossus semilaevis* broodstock fish (100×), (a) addition of growth factors, (b) addition of ethanol, (c) control

图 3. 不同物质对半滑舌鲷亲鱼垂体组织细胞原代培养的影响(100 倍镜); (a) 添加生长因子, (b) 添加无水乙醇, (c) 对照组

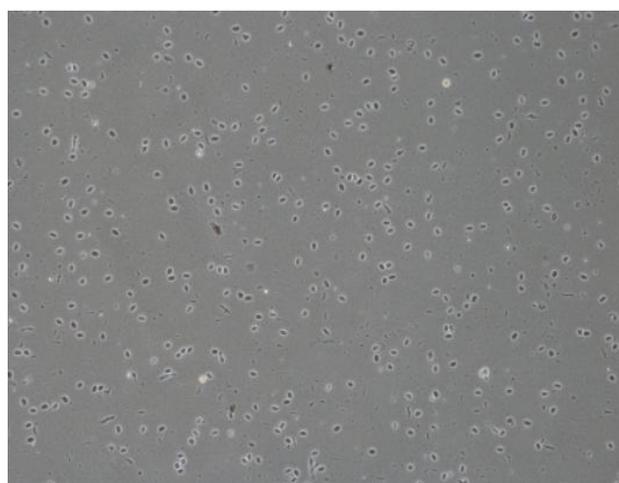


Figure 4. The primary culture on pituitary cells of *Cynoglossus semilaevis* adult fish (100×)

图 4. 半滑舌鲷成鱼垂体组织细胞原代培养(100 倍镜)

3.5. FSH 和 LH 的 ELISA 检测结果

图 5 和图 6 表明, 亲鱼组中添加乙醇(终浓度为 0.1%, v/v)的细胞培养上清中 FSH 和 LH 的含量与对照组无差异, 成鱼组 FSH 和 LH 的含量比亲鱼组低。

4. 讨论

组织的原代培养细胞最接近其在体内的生长状态, 也最能反映出其在体内的生长特性, 并最好保留

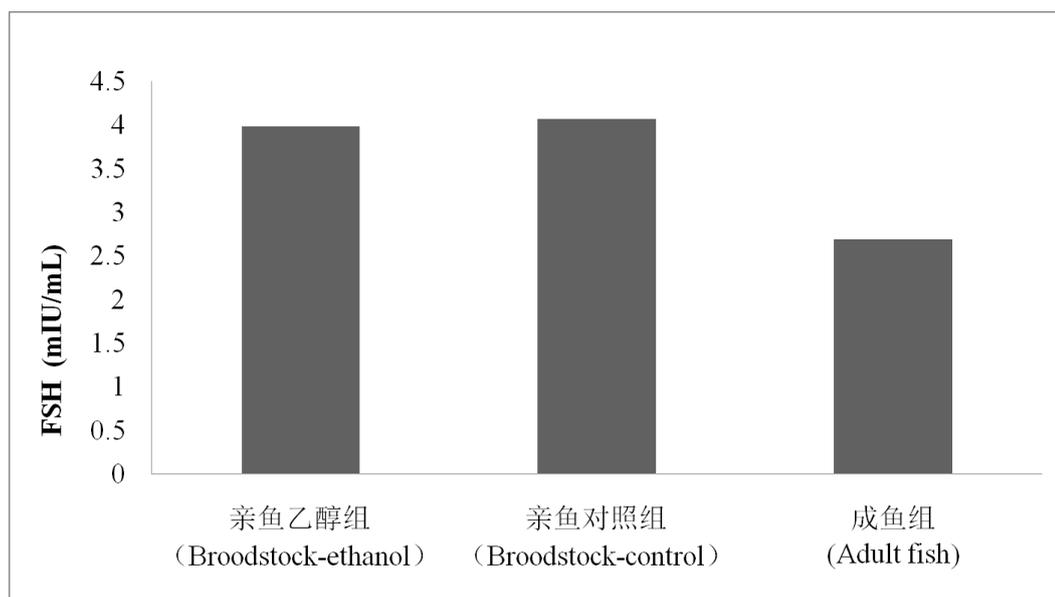


Figure 5. The content of FSH in the supernatant of primary culture pituitary cells on *Cynoglossus semilaevis*
图 5. 半滑舌鲷垂体组织细胞原代培养上清液中 FSH 的含量

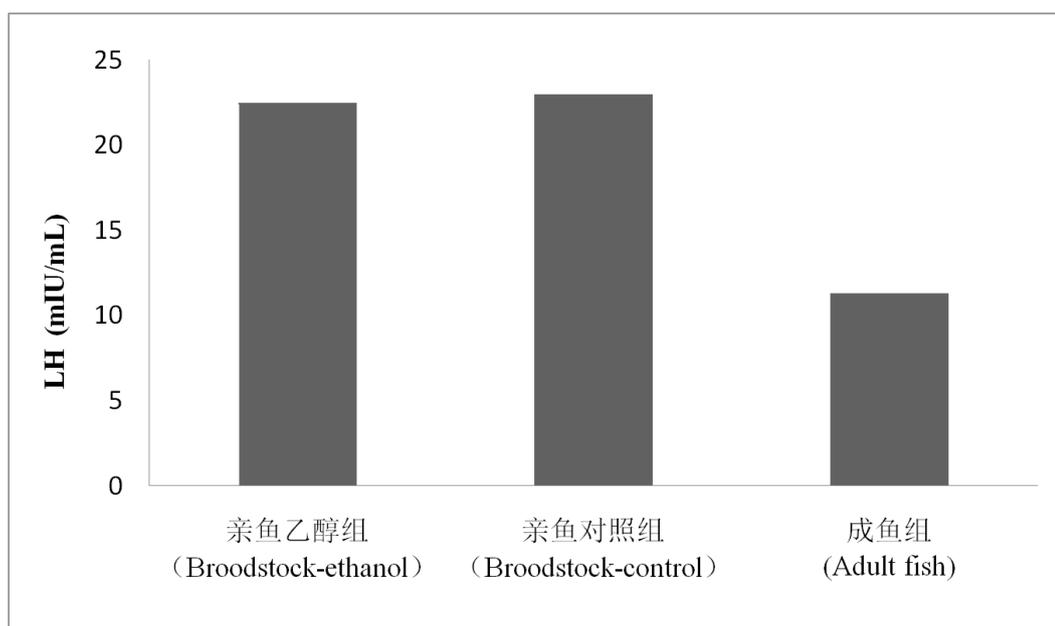


Figure 6. The content of LH in the supernatant of primary culture pituitary cells on *Cynoglossus semilaevis*
图 6. 半滑舌鲷垂体组织细胞原代培养上清液中 LH 的含量

其生物活性和遗传特性,适于应用其研究细胞的功能和调控机制等,为生物学实验提供便捷的实验材料,尤其是对于亲鱼等取材特殊、样品昂贵的实验动物来说无疑是比较理想的一种实验途径。本研究在系统的综合了多种鱼类垂体细胞原代培养方法的基础上,根据半滑舌鳎的特性,经过适宜调整和改进,建立了半滑舌鳎垂体原代细胞培养方法,体外培养可达到7天以上,并能分泌促性腺激素 FSH 和 LH,完全可以应用其开展细胞功能研究的相关实验。

细胞培养的最适温度选择是在该鱼种的适宜生长温度范围内。半滑舌鳎适宜生长温度范围为 $14^{\circ}\text{C}\sim 24^{\circ}\text{C}$,先前对这条鱼的肝脏和卵巢等组织的研究表明其最适宜的体外细胞培养温度为 24°C [12] [13],因此本实验采用在 24°C 条件下培养,能够保证细胞的最大活力。斑马鱼适宜的生长温度为 $26.5^{\circ}\text{C}\sim 28.5^{\circ}\text{C}$,Lin 和 Ge [7]对斑马鱼垂体细胞进行原代培养选择温度为 28°C ;虹鳟的适宜的生长温度为 $12^{\circ}\text{C}\sim 18^{\circ}\text{C}$,Weil[9]对虹鳟垂体组织进行细胞原代培养的温度为 12°C ;鲤鱼的适宜生长温度为 $25^{\circ}\text{C}\sim 27^{\circ}\text{C}$,Ribeiro 等 [5]在 25°C 条件下对鲤鱼垂体组织进行原代培养。由此可见,鱼种的适宜生长温度通常是细胞培养温度选择的重要依据。

由于垂体组织柔软且纤维成分少,在细胞分离时考虑采用组织块分离方法和胰蛋白酶消化法。通常,组织块法具有操作简单易行、存活率较高、纯度较高、实验重复性高等优点,而消化酶法的实验操作复杂、消化酶作用时间不易掌握、消化酶本身对细胞可能会有一定的负作用,但应用酶的生化作用可进一步使细胞间的桥连结构松动,使团块膨松,易于形成细胞悬液,利于贴壁培养[19]。本实验发现,组织块法分离只有少量细胞迁出,无法进行后续实验,其原因尚不明确,可能是垂体组织不适合应用此方法进行细胞分离;而胰蛋白酶消化法分离的细胞杂质少、细胞分散均匀且能够分泌激素。因此,对于半滑舌鳎垂体组织建议应用胰蛋白酶消化法进行细胞分离。

细胞生长因子 2-巯基乙醇对细胞的生长和增殖有很重要的作用,同时避免过氧化物对培养细胞的损害;成纤维生长因子是一种能促进成纤维细胞生长的多肽类物质[19]。本研究发现,加入生长因子时不利于细胞的培养,细胞数量减少。加入生长因子通常都是促进细胞的生长和传代,而垂体细胞很难传代培养(有关垂体细胞培养的文献基本都是原代培养),因此加入生长因子可能起到了负作用。所以,建议在半滑舌鳎垂体细胞分离培养过程中不添加生长因子。

Rimbach 等在体外培养白化病小鼠肝细胞时,在培养液中加入终浓度为 $0.1\%(\text{v/v})$ 的无水乙醇对细胞无影响[18]。本研究中,在垂体细胞培养液中加入无水乙醇(终浓度为 $0.1\%, \text{v/v}$)对细胞也没有影响,可以在研究细胞功能过程中向培养液中添加脂溶性物质,如维生素 E 等。本研究采用相同的方法,体外原代培养半滑舌鳎成鱼的垂体细胞,同样能够维持细胞在体外正常培养7天以上,且能够分泌促性腺激素,说明本研究建立的半滑舌鳎垂体细胞体外原代培养方法适用于亲鱼和成鱼。

由于亲鱼取材的特殊性,亲鱼营养研究也受到多种条件的制约,导致相关学科发展缓慢。本实验建立的半滑舌鳎垂体细胞原代培养方法,可以在体外培养垂体细胞,通过向其培养液中添加外源性营养素(如维生素 E)的方式来研究其对垂体激素分泌调控的影响,进而从细胞层面探讨亲鱼营养作用机制和调控机理,同时为亲鱼营养研究提供便捷高效的实验材料,也提供了新思路,为丰富和发展相关学科奠定了基础。

5. 结论

垂体细胞原代培养的适宜筛选条件:将半滑舌鳎的垂体置于装有 L-15 完全培养基的一次性细胞培养皿中,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗一次,将垂体组织剪成大约 1 mm^3 的小块,再用 PBS 冲洗一次,加入约组织块 10 倍体积的 0.25% 的胰蛋白酶在 18°C 水浴中消化 45 min,加入 2 mL PBS 吹打,然后用 200 目/70 μm 的尼龙网过滤,收集滤液,以 100 g/min 的速度离心 10 min 后,去上清然后重悬沉淀,按照 1 mL/孔的量分装至六孔板中,正置于 24°C 培养箱中培养。

基金项目

国家自然科学基金项目(31502177, 31201982, 31602133); 国家鲟鳇类产业技术体(CARS-50); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2016GH03, 2017HY-ZD0608)资助。

参考文献 (References)

- [1] 麦康森. 水产动物营养与饲料学[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- [2] 林浩然. 鱼类生理学[M]. 广州: 中山大学出版社, 2011: 240.
- [3] Nagahama, Y. and Yamashita, M. (2008) Regulation of Oocyte Maturation in Fish. *Development Growth & Differentiation*, **50**, 195-219. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x>
- [4] National Research Council (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington, DC.
- [5] Ribeiro, L.P., Ahne, W. and Lichtenberg, V. (1983) Primary Culture of Normal Pituitary Cells of Carp (*Cyprinus carpio*) for the Study of Gonadotropin Release. *Vitro*, **19**, 41-45. <https://doi.org/10.1007/BF02617992>
- [6] Chang, J.P., Cook, H., Freedman, G.L., et al. (1990) Use of a Pituitary Cell Dispersion Method and Primary Culture System for the Studies of Gonadotropin-Releasing Hormone Action in the Goldfish, *Carassius auratus*. I. Initial Morphological, Static, and Cell Column Perfusion Studies. *General and Comparative Endocrinology*, **77**, 256-273. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90310-1](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90310-1)
- [7] Lin, S.W. and Ge, W. (2009) Differential Regulation of Gonadotropins (FSH and LH) and Growth Hormone (GH) by Neuroendocrine, Endocrine, and Paracrine Factors in the Zebrafish—An *In Vitro* Approach. *General and Comparative Endocrinology*, **160**, 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.11.020>
- [8] Levavi, S.B. and Yaron, Z. (1992) Involvement of Cyclic Adenosine Monophosphate in the Stimulation of Gonadotropin Secretion from the Pituitary of the Teleost Fish, Tilapia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **85**, 175-182. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(92\)90256-6](https://doi.org/10.1016/0303-7207(92)90256-6)
- [9] Weil, C., Hansen, P., Hyam, D., et al. (1986) Use of Pituitary Cells in Primary Culture to Study the Regulation of Gonadotropin Hormone (Gth) Secretion in Rainbow-Trout—Setting Up and Validating the System as Assessed by Its Responsiveness to Mammalian and Salmon Gonadotropin-Releasing-Hormone. *General and Comparative Endocrinology*, **62**, 202-209. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(86\)90110-3](https://doi.org/10.1016/0016-6480(86)90110-3)
- [10] 宋文涛. 我国半滑舌鳎养殖及研究进展[J]. 科技经济导刊, 2016(20): 95.
- [11] 李仲明. 半滑舌鳎育苗设施和关键技术[J]. 科学养鱼, 2014, 30(10): 43-45.
- [12] 任国诚, 陈松林, 等. 半滑舌鳎肝脏细胞系的建立与鉴定[J]. 高技术通讯, 2008, 18(6): 657-660.
- [13] 郑媛, 陈松林. 半滑舌鳎脾脏、卵巢组织细胞离体培养的初步研究[J]. 水产学报, 2012, 36(10): 1537-1543.
- [14] 张博, 王贤丽, 等. 半滑舌鳎血淋巴细胞体外培养及其染色体制备在性别鉴定中的应用[J]. 水生生物学报, 2011, 35(3): 430-435.
- [15] Wang, X.L., Wang, N., Sha, Z.X., et al. (2010) Establishment, Characterization of a New Cell Line from Heart of Half-Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **4**, 1181-1184. <https://doi.org/10.1007/s10695-010-9396-5>
- [16] Zhang, B., Wang, X.L., Sha, Z.X., et al. (2011) Establishment and Characterization of a Testicular Cell Line from the Half-Smooth Tongue Sole *Cynoglossus semilaevis*. *International Journal of Biological Sciences*, **7**, 452-459.
- [17] Zheng, Y., Wang, N., Xie, M.S., et al. (2012) Establishment and Characterization of a New Fish Cell Line from Head Kidney of Half Smooth Tongue Sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **38**, 1635-1643. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9660-y>
- [18] Rimbach, G., Fischer, A., Stoecklin, E., et al. (2004) Modulation of Hepatic Gene Expression by α -Tocopherol in Cultured Cells and *In Vivo*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1031**, 102-108. <https://doi.org/10.1196/annals.1331.011>
- [19] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 第2版. 西安: 世界图书出版公司, 2007: 57.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：ojfr@hanspub.org