

{ 研究简报 }

白暨豚组织培养的初步研究

张义兵 俞小牧 陈敏容 赵庆中 陈道权 王铁辉 王 丁

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

APRELIMINARY STUDY OF THE TISSUE CULTURE OF *LIPOTES VEXILLIFER*

ZHANG Yi-bing, YU Xiao-mu, CHEN Min-rong, ZHAO Qing-zhong,
CHEN Dao-quan, WANG Tie-hui and WANG Ding

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词: 白暨豚, 组织培养

Key words: *Lipotes vexillifer* Miller, Tissue culture

中图分类号: Q959.841 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2000)01-0193-03

白暨豚(*Lipotes vexillifer* Miller)是一种仅生存于我国长江中下游的珍稀、濒危淡水豚类,目前已不足100头。近几十年来,对白暨豚的生物学、饲养和保护等进行了较系统的研究^[1],但白暨豚的组织培养至今仍是空白。建立白暨豚的永久细胞系,对研究白暨豚的细胞遗传学、细胞生物学以至白暨豚的保护都有重要的意义。因此,作者取白暨豚的肾脏、肝脏、皮肤等组织作了原代培养和继代培养。

1 材料与方法

1.1 组织获取 培养用的肾脏、肝脏、皮肤等组织取自1998年2月26日在长江上海水域搁浅死亡的白暨豚。取样处用酒精棉球擦净,点燃棉球,快速除去残留的酒精,去掉表面组织,每种组织用剪刀取指头大小数块置于4℃TC-199培养基(4倍抗菌素、无血清)中,4h后接种。

1.2 培养条件 培养基选用TC-199、RPMI-1640及DMEM,内含20%胎牛血清及双倍抗菌素(青霉素200U/mL,链霉素200μg/mL,卡那霉素100μg/mL),培养液pH值为6.8—7.2,培养温度37℃,接种后每周换液2次,每次弃去旧液2/3。细胞传代按文献[2]进行。

1.3 组织块培养 采用组织块贴壁法接种。组织块先用PBS(含2倍抗菌素)洗2—3次,再用含2倍抗菌素的199培养基清洗6—8次,加少许培养基,用弯头剪刀剪碎至1—2mm大小,以40—50块/瓶均匀接种于25cm²的塑料瓶(NUNC产品)中,接种组织块的瓶壁面向上,加入5mL培养基,置37℃培养。20h后,培养瓶翻面,将组织块浸入培养基中。

收稿日期: 1998-11-23; 修订日期: 1999-08-25

作者简介: 张义兵(1969—),男,湖北仙桃人,遗传学硕士,助理研究员。

1.4 分散细胞培养 采用冷消化法分散细胞接种。组织块用含抗生素的 PBS 洗 6—8 次, 剪碎后加 0.25% 胰蛋白酶(无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 配制)置于摇床上, 4℃下消化 12—20h, 离心去上清液, 用培养基重悬细胞, 再次离心, 收集细胞以大于 $1 \times 10^6 / \text{mL}$ 的密度接种。

2 结果与讨论

2.1 三种组织的培养结果

白暨豚的皮肤、肝脏、肾脏, 接种 8d 后, 均观察到新生细胞。皮肤和肝脏组织仅原代培养成功, 肾脏组织在原代基础上又传代培养。三种组织的培养细胞的形态特征见表 1。

表 1 三种组织的培养结果

Tab.1 The culture of three different kinds of tissues

组织 Tissue	接种方法 Method of inoculation	细胞形态 Form of cell	生长情况 Growth
肾脏 Kidney	组织块贴壁培养, 分散细胞培养	成纤维样	原代细胞生长良好, 经 3 次传代后, 不再生长, 体外培养 6 个月。
肝脏 Liver	组织块贴壁培养	成纤维样	未能传代
皮肤 Skin	组织块贴壁培养, 分散细胞培养	成纤维样 或上皮样	两种形态的细胞生长都很缓慢, 40 天后, 部分成纤维样细胞开始退化、死亡。

肾脏组织用三种培养基, 两种接种方法, 均获得生长良好的原代细胞。组织块贴壁培养法中, 肾脏细胞在组织块与瓶壁接触处生长, 并向组织块边缘放射状扩展(图 1a), 一段时间后, 组织块脱落, 脱落处可见细胞呈重叠生长。33d 后细胞铺满培养瓶并第一次传代, 生长良好(图 1b)。13d 后第二次传代, 细胞生长趋于缓慢, 又经过 17d, 第三次传代, 细胞生长更趋缓慢。加入 15% 条件培养基, 无明显效果。培养 6 个月后, 细胞逐渐老化脱落。

组织块贴壁法中, 肝脏、皮肤组织块不从瓶壁脱落。作者曾观察到肝脏组织块边缘长出纤维样细胞, 但几天后就被组织块在培养基中的溶解物所掩盖。以后用吸管小心去掉组织块或用消化液消化, 均没发现新生细胞。

皮肤组织有少量新生细胞生长, 在两种接种方法中, 观察到两种不同的细胞形态: 在组织块贴壁培养

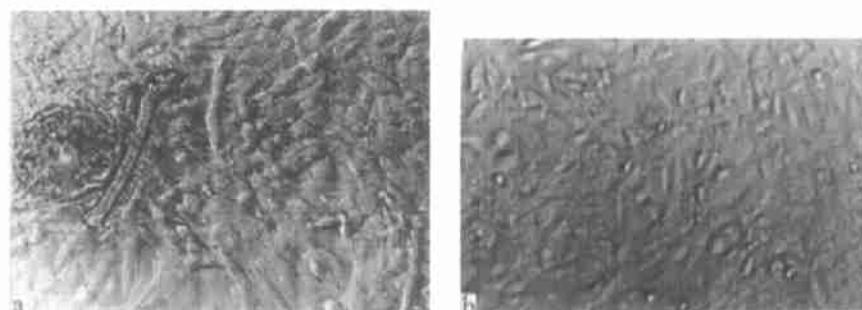


图 1 a 原代肾脏细胞(活体细胞相差显微照相), 示细胞向组织块边缘放射性延伸;
b 第二代肾脏细胞(活体细胞相差显微照相)

Fig.1 a The primary culture of kidney cells (Phase contrast micrograph of living cells), showing cell growth at the margin of the kidney tissue pieces; b The second passage of kidney cells (Phase contrast micrograph of living cells)

法中为上皮样,而分散细胞法培养中则为成纤维样,类似于肾脏细胞。但是两种形态的细胞生长均缓慢,40d后,部分成纤维样细胞开始退化、死亡。

2.2 培养基的筛选

通过三种培养基的比较,发现白暨豚肾脏细胞在TC-199培养基中状态较好、生长较快,RPMI-1640次之,DMEM最次。用组织块贴壁法接种,三种培养基中均生长出同样形态和大小的细胞,但在TC-199培养基中,90%以上的组织块边缘出现新生细胞,比其它两种培养基都好。表明TC-199培养基更适合于白暨豚细胞的生长。

2.3 两种接种方法的比较

用组织块贴壁培养法,肾脏、皮肤、肝脏均见新生细胞生长;用分散细胞培养法仅在肾脏组织获得成功。肾脏组织块经剪刀剪碎后,细胞很容易从组织块边缘向外生长,经25d的培养,细胞已铺满培养瓶的50%,30d后,部分组织块脱落,第33d传代。分散细胞培养,可以提高游离细胞的数量,但贴壁细胞不多,影响细胞生长,使培养成功率降低。

白暨豚原代肾脏细胞和第一次传代在TC-199培养基中生长正常,第二次传代后细胞状态发生变化,细胞分裂减慢,并经常见有细胞脱落,细胞第三次传代后这种状况更明显。清洗细胞,更换培养基不久仍有细胞死亡。皮肤组织出现两种形态的细胞,成纤维样细胞贴壁后生长较慢,40d后开始逐渐脱落死亡。培养用的无支原体胎牛血清在使用前经过常规灭活处理,并用同一批号的血清培养甲鱼细胞没出现类似问题,表明培养基中无污染因素的存在。是否因为受野外取样以及取样后没能及时培养、或者白暨豚自身因素的影响也不能最终确定。针对细胞分裂减慢,作者加入15%条件培养基,并加入能刺激细胞生长的猪胰岛素(Sigma产品),均无明显效果。本工作是白暨豚组织培养的首次尝试,但由于取样困难,使得这一工作不能继续进行下去以解决已经出现的问题。现在已开展了白暨豚的血细胞的培养研究,以期探索有益的经验。

参 考 文 献

- [1] 陈佩薰,刘仁俊,王 丁等.白暨豚生物学及饲养与保护[M].北京,科学出版社,1997
- [2] 陈敏容,陈宏溪,易咏兰.鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性[J].水产学报,1985,(2):121—130