科学通报 2011 年 第 56 卷 第 22 期：1780 ~ 1783
专题：濒危动物保护生物学 论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

扬子鳄肝脏、心脏和肌肉细胞系构建

曾长军[①], 叶青[②], 方盛国[②*]

① 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014;
② 浙江大学生命科学学院, 濒危野生动物保护遗传与繁殖教育部重点实验室, 国家濒危野生动植物基因保护中心, 杭州 310058
* 联系人, E-mail: sgfanglab@zju.edu.cn; sgfang@mail.hz.zj.cn

2011-03-02 收稿, 2011-05-20 接受
国家自然科学基金(30730019)和中央高校基础研究基金资助

摘要 扬子鳄属国家一级保护的珍稀濒危动物. 细胞系的构建和保存是濒危野生动物离体保护工程的主要内容之一. 本研究构建了扬子鳄肝脏、心脏和肌肉细胞系. 结果表明, 从 3 种不同来源组织块中原代细胞的生长速度表现出明显差异, 分别为 11~12, 13~14 和 17~18 d; 而传代细胞的生长速度在3种组织来源的细胞之间没有明显差异, 均在6~7 d, 细胞倍增时间为36 h. 扬子鳄的染色体核型为 $2n = 32$, 无明显的性染色体. 该研究所建立的 3 种不同组织来源的细胞系将为扬子鳄的相关保护及研究工作提供可靠的材料平台, 也将为其他两栖爬行动物的细胞系构建提供有益参考.

关键词
扬子鳄
保护
组织培养
细胞系

扬子鳄(*Alligator sinensis*)是世界上 23 种鳄类中最为濒危的物种之一[1]. 由于湿地面积减少及栖息地环境的破坏和片段化, 野生扬子鳄的种群数量急剧下降, 分布范围也急剧缩小[2]. 目前, 野生扬子鳄仅分布于我国的安徽南部、江苏和浙江毗邻的狭小地带[3]. 据野外调查, 现有野生扬子鳄的种群数量已不足 130 只, 而且以每年 4%~6%的速度下降[4]. 为了保护扬子鳄这一珍稀濒危物种, 中国政府于 1972 年将其列为国家 I 级保护野生动物[5], 并相继在安徽和浙江建立了扬子鳄自然保护区以加强扬子鳄的保护和圈养种群管理[5]. 基于野生扬子鳄种群数量极少的现状, 人工圈养的扬子鳄成为“重引入工程”的重要来源[6].

作为扬子鳄离体保护工程重要的组成部分, 保存扬子鳄的组织、器官、配子和胚胎以及基因组 DNA 都是切实可行的. 同时, 由于细胞遗传学和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)等新方法、新技术的出现, 使得体细胞成为非常重要的研究材料. 然而, 目前尚未有任何扬子鳄细胞系构建的报道. 因此, 本研究以扬子鳄肝脏、心脏和肌肉组织为材料, 采用组织块培养法, 成功构建了扬子鳄肝脏、心脏和肌肉细胞系, 这将为进一步开展扬子鳄细胞生物学、基因组学及保护生物学等相关研究提供可靠的材料平台.

1 材料和方法

(ⅰ) 样品来源. 本研究所用组织样品来源于浙江长兴尹家边扬子鳄自然保护区因打斗死亡的扬子鳄, 死亡后 1 h 内运抵实验室, 无菌采集扬子鳄肝脏、心脏和肌肉样品, 置于含双抗(青霉素 200 IU/mL, 链霉素 250 IU/mL)的 D-Hank’s 溶液中备用.

(ⅱ) 原代和传代培养. 扬子鳄组织块培养按 Valleley 等人[7]的方法进行并作部分修改. 将采集的扬子鳄组织样品在含有双抗的 D-Hank’s 溶液中反复清洗 3~5 次. 在无菌青霉素小瓶中用眼科剪将组织样品剪成约 1 mm^3 大小的组织块, 1500 r/min 离心 10 min, 去上清, 再用含 20%胎牛血清(FBS, Hyclone)的 DMEM 培养液清洗 3 次. 用玻璃棒将组织样品均匀铺在 25 mL 培养瓶底部, 加入约 4 mL 含 20%胎牛血清的 DMEM 培养液, 倒置放于 33 ℃, 100%湿

英文版见: Zeng C J, Ye Q, Fang S G. Establishment and cryopreservation of liver, heart and muscle cell lines derived from the Chinese alligator (*Alligator sinensis*). Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4622-9

度、5%CO_2培养箱中培养3~4 h. 待组织块贴壁后, 轻轻翻转培养瓶, 小心让培养液浸没组织块样品, 继续培养. 每3天更换2/3新鲜DMEM培养液. 原代细胞的培养和传代按Guan等人[8]的方法进行.

(ⅲ) 细胞冻存和复苏. 当细胞生长至铺满培养瓶底部80%~90%左右即可收获细胞. 首先, 全部吸去培养瓶中的培养液, 加入D-Hank's溶液反复清洗2~3次, 然后加入0.25%胰蛋白酶溶液2 mL, 于加载37℃热台的倒置显微镜下消化20~30 s, 加入2 mL含胎牛血清的DMEM培养液终止胰蛋白酶消化. 用吸管吹打培养瓶底部将贴壁细胞悬浮, 200 × *g* 离心10 min. 用4℃预冷的冷冻培养液(70% DMEM, 20% FBS和10% DMSO)重悬细胞, 用血球计数板计数细胞密度并调整细胞密度至 1×10^7~2×10^7. 将重悬的细胞吸入0.25 mL的冷冻麦管(straws)或冷冻管中封存, 并标注物种名称、日期及细胞类型等信息. 将准备好的冷冻麦管置于冰上平衡30 min, 然后置于–80℃冰箱过夜, 再转入液氮中保存.

细胞复苏时, 将冷冻保存的细胞从液氮中取出, 立即置于40℃水浴中解冻, 置于无菌离心管内, 加入2~3 mL新鲜培养液, 200 × *g* 离心5 min, 小心去除上清. 细胞沉淀用新鲜DMEM培养液调整至合适的细胞浓度, 然后置于33℃, 100%湿度、5%CO_2培养箱中培养, 观察记录细胞生长情况.

(ⅳ) 生长曲线绘制. 细胞生长曲线的绘制按Gu等人[9]和Kong等人[10]的方法和步骤进行. 将细胞浓度调整至3×10^4~4×10^4 个/mL, 分别接种于24孔培养皿内. 每日检测和记录细胞的生长情况和细胞密度, 至细胞铺满培养皿底部为止. 根据检测结果绘制细胞的生长曲线并计算细胞倍增时间.

(ⅴ) 染色体核型分析. 当细胞生长至铺满培养瓶底部80%~90%时更换新鲜培养液, 并加入终浓度为1.5 μg/mL的秋水仙碱继续培养30 min, 按上述方法收获细胞. G带和核型分析步骤按Valleley等人[7]和Lui等人[11]所述方法进行, 每代细胞分别计数100个中期分裂相.

2 结果和讨论

2.1 细胞培养、传代和冷冻保存

扬子鳄肝脏、心脏和肌肉组织块分别在培养11~12, 13~14和17~18 d时开始有上皮样细胞和成纤维样细胞从组织块中长出(图 1). 这种生长速度的差异表明, 两栖爬行类动物内脏源性的组织块培养相

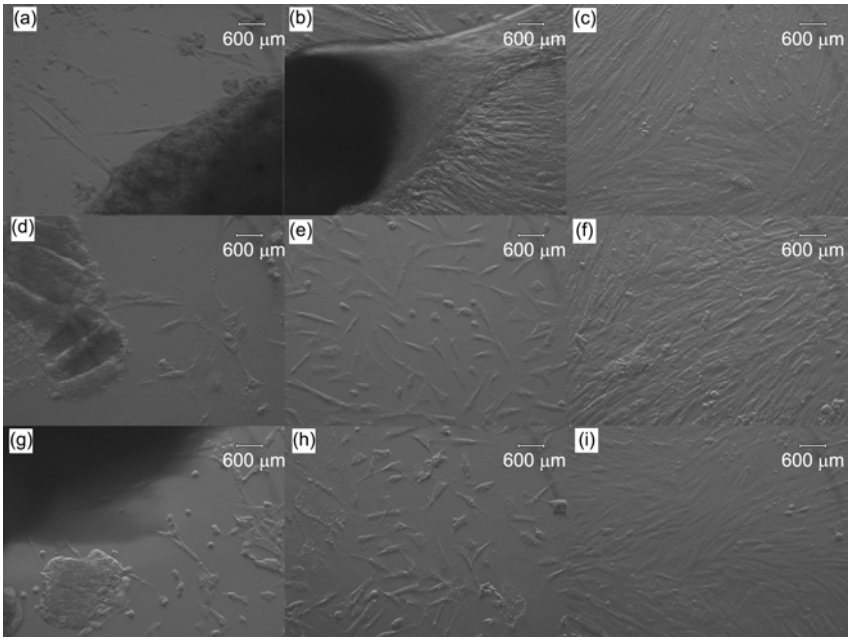

图 1 扬子鳄肝脏、心脏和肌肉细胞系的形态及特征

上皮样和成纤维样细胞从肝脏((a), 12 d)、心脏((d), 14 d)和肌肉((g), 18 d)组织块中长出情况; 肝脏(b)、心脏(e)和肌肉(h)细胞生长情况; 冷冻保存和传代前细胞的生长情况(肝脏(c); 心脏(f); 肌肉(i))

对比较容易. 而肌肉组织的培养时间达 17~18 d 才有细胞从组织块中长出, 提示我们在培养这些类型的组织细胞时更需耐心.

有研究表明, 在组织和细胞原代和传代培养的初期, 培养瓶内通常混杂着上皮细胞和成纤维细胞, 但是由于这些细胞的生长速度、细胞黏附及对胰蛋白酶的耐受性差异, 在传代过程中成纤维细胞生长速度快, 并抑制上皮细胞等其他细胞生长, 经过 2~3 代的传代培养, 即可获得纯度较高的成纤维细胞[12,13]. 在进行扬子鳄细胞传代时, 这 3 种组织来源的细胞生长速度却没有表现出明显的差异, 通常在 6~7 d 时即可铺满培养瓶底部 80%~90%.

扬子鳄细胞在冷冻前和复苏后, 细胞成活率分别为 96.5%和 85.6%, 表明本研究所采用的培养体系和冷冻保存条件是适合的, 有助于扬子鳄细胞系的长期保存.

2.2 细胞培养条件和细胞生长速度

鳄鱼在地球上生存了 200~250 万年, 被称为脊椎动物的活化石[7]. 温度依赖性的性别决定是该物种进化过程中的一种奇特现象, 有研究表明, 在 30℃孵化出来的 100%为雌性鳄鱼, 而在 33℃孵化出来的 100%为雄性[14]. Valleley 等人[7]检测了大量鳄鱼胚胎在 30℃和 33℃孵化条件下的核型, 没有表现出明显差异. 因此, Valleley 等人[7]采用 31℃的培养条件, 培养密西西比鳄胚胎尾部肌肉组织块并成功用于染色体核型分析. 此外, 有研究认为 32~35℃的温度范围比较适合鳄鱼心脏保持正常的生理活动, 最高不能超过 38℃[15]. 本研究选择 33℃温度条件并成功培养和建立了扬子鳄肝脏、心脏和肌肉细胞系, 表明 33℃是适合扬子鳄肝脏、心脏和肌肉组织细胞培养的. 我们曾试图在 37℃条件下培养扬子鳄肝脏、心脏和肌肉细胞, 尽管在初期细胞生长速度比 33℃快, 但是很快这些细胞就表现出凋亡样变化.

扬子鳄 3 种细胞系的传代细胞生长速度均表现出典型的“S”形(图 2), 其细胞倍增时间约为 36 h, 3 种不同组织来源细胞在传代过程中其细胞倍增时间并没有明显差异. 与哺乳动物和鸟类的细胞系相比, 扬子鳄的细胞生长速度比孟加拉虎[16]、鸡[17]和西门塔尔牛[18]等细胞生长速度要慢, 表现为上皮样细胞和成纤维样细胞从组织块长出的速度缓慢. 从扬子鳄 3 种组织来源的原代细胞生长速度来看, 肝脏细胞

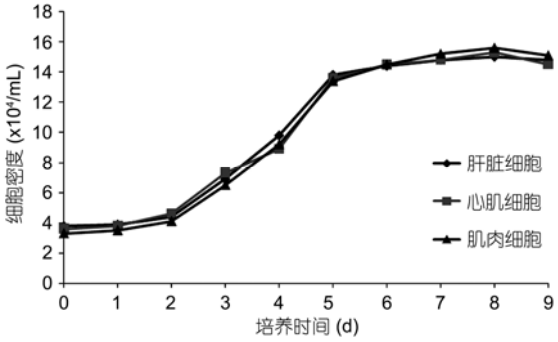

图 2 扬子鳄肝脏、心脏和肌肉传代细胞生长曲线

从肝脏组织长出的速度最快, 其次是心脏和肌肉组织. 但是, 从传代细胞生长来看, 这 3 种组织来源的细胞生长速度基本一致, 在 6~7 d 即可达到生长平台期.

2.3 扬子鳄染色体核型

扬子鳄细胞经过秋水仙碱处理, 获得中期染色体进行铺片, 经胰蛋白酶消化和 Gimsa 溶液染色, 其核型为 $2n = 32$, 没有明显的性染色体(图 3). 在细胞传代过程中, 随着传代代数增加, 染色体丢失率也会增加. 在本研究中, 经过计数 1~6 代细胞染色体核型, 结果具有完整染色体的细胞比例为 88.6%~93.4%. 鳄鱼属的性染色体非常特殊. 据报道, 在鳄鱼属染色体 G 带中, 性染色体是由一些相对未分化的区块所组成, 甚至分布于整个染色体臂上[17]. 其他类似的研究也表明, 在所有的鳄鱼属中均没有发现明显的性染色体[18,19]. Valleley 等人[7]分析了大量在 30℃和 33℃培养条件下密西西比鳄胚胎的染色体核型, 尽管有雌雄个体的差异, 但是染色体核型没有表现出特别的差异. 染色体比较作图研究表明, 在哺乳动物中与 X 染色体连锁的 *Zfc* 基因位于密西西比鳄 3 号染色体上[7]. 因此, 关于鳄鱼属 X 染色体的进化值得进一步的深入研究.

3 结论

本研究的结果表明, 新构建的扬子鳄肝脏、心脏和肌肉细胞系能够稳定传代和保存, 并具有正常的生理功能. 扬子鳄细胞系的建立将为保护这一珍稀濒危物种提供有效的手段, 也为进一步开展扬子鳄基因组学、遗传学和细胞生物学等研究提供了可靠的材料平台.

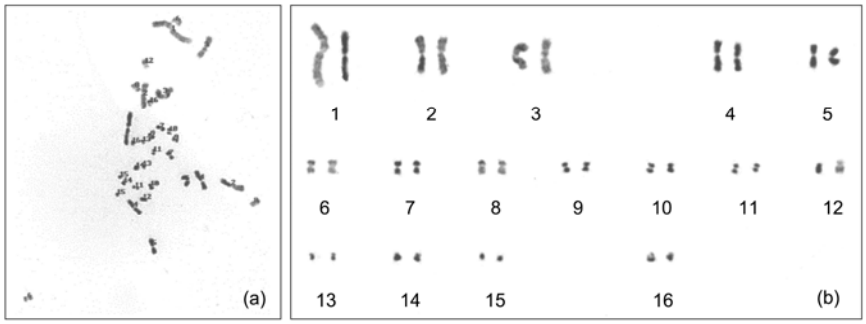

图 3　扬子鳄中期染色体(a)和染色体核型(b)图

致谢　在样品采集过程中, 得到实验室葛云法老师的大力支持, 特此感谢.

参考文献

1　Xu Q H, Fang S G, Wang Z W, et al. Heavy metal distribution in tissues and eggs of Chinese alligator (*Alligator sinensis*). Arch Environ Contam Toxicol, 2006, 50: 580–586
2　Thorbjarnarson J, Wang X M, Ming S, et al. Wild populations of the Chinese alligator approach extinction. Biol Conserv, 2002, 103: 93–102
3　Ding Y Z, Wang X M. Factors influencing the population status of wild Chinese alligators (*Alligator sinensis*). Biodivers Sci, 2004, 12: 324–332
4　Chen B C. The past and present situation of the Chinese alligator. As Herp Res, 1990, 3: 129–136
5　Wan Z, Gu C, Wang X, et al. Conservation, management and farming of crocodiles in China. In: Crocodiles. Proceedings of the 14th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group. IUCN-The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 1998. 80–100
6　Ross J P. Crocodiles: Status Survey and Conservation Action Plan. 2nd ed. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 1998
7　Valleley E M, Harrison C J, Cook Y, et al. The karyotype of *Alligator mississippiensis*, and chromosomal mapping of the ZFY/X homologue, *Zfc*. Chromosoma, 1994, 103: 502–507
8　Guan W, He X, Li L, et al. Establishment and biological characterization of fibroblast cell line from the Langshan chicken. Cell Prolif, 2010, 43: 157–163
9　Gu Y P, Li H Z, Mik J. Phenotypic characterization of telomerase-immortalized primary non-malignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines. Exp Cell Res, 2006, 312: 841–843
10　Kong D, Nishino N, Shibusawa M, et al. Establishment and characterization of human pancreatic adenocarcinoma cell line in tissue culture and the nude mouse. Tissue Cell, 2007, 39: 217–223
11　Lui J F, Valencia E F T, Boer J A. Karyotypic and analysis and chromosome biometry of cell cultures of the yellow throated alligator (*Caiman latirostris* Daudin). Rev Brasil Genet, 1994, 17: 165–169
12　Li L F, Yue H, Ma J, et al. Establishment and characterization of a fibroblast line from Simmental cattle. Cryobiology, 2009, 59: 63–68
13　Xue Q S. The Principle and Technique of *in Vitro* Culture. Beijing: Science Press, 2001. 432–444
14　Ferguson M W, Joanen T. Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. Nature, 1982, 296: 850–853
15　Wilber C G. Effect of temperature on the heart in the alligator. Am J Physiol, 1960, 198: 861–863
16　Guan W J, Liu C Q, Li C Y, et al. Establishment and cryopreservation of a fibroblast cell line derived from Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). Cryo Letters, 2010, 31: 130–138
17　King M, Honeycutt R, Contreras N. Chromosomal repatterning in crocodiles: C, G and N-banding and the *in situ* hybridization of 18S and 26S rRNA cistrons. Genetica, 1986, 70: 191–201
18　Cohen M M, Gans C. The chromosomes of the order Crocodilia. Cytogenetics, 1970, 9: 81–105
19　Fishman H K, Mitra J, Dowling H G. The karyotype of the Chinese alligator (*Alligator sinensis*). Mammal Chrom Newsl, 1968, 9: 81–82