

doi: 10.7541/2023.2022.0139

中华鲟精巢细胞系的建立和鉴定

叶欢¹ 王艺舟² 杜浩¹ 岳华梅¹ 阮瑞¹ 罗江¹ 李创举¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 武汉 430223;

2. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025)

摘要: 为了开展中华鲟(*Acipenser sinensis*)种质资源保存及其精原干细胞体外培养的研究, 采用蛋白酶消化法, 对中华鲟精巢组织细胞进行原代培养, 建立了中华鲟精巢细胞系(*Acipenser sinensis* testicular cell line, AST), 经352d传代培养, 已稳定传至80代。中华鲟精巢细胞系形态主要呈类纤维状, 培养基为DMEM, 培养温度为25℃, 最适血清浓度为15%。正常传代的AST细胞冻存、复苏后, 经台盼蓝染色, 约(81.36±1.13)%的细胞具有活性, 复苏后细胞仍生长旺盛。染色体核型分析结果显示, 第30代中华鲟精巢细胞系染色体数目分布在142—310, 众数为264。通过RT-PCR检测发现, 在P0和P1细胞中, Sertoli细胞特异表达基因(*amh*和*gsdf*)、Leydig细胞特异表达基因(*cyp17a1*)和生殖细胞特异表达基因(*dazl*、*dnd*和*vasa*)都有表达, 且表达量与精巢中的相似; 在P15、P30和P60细胞中, 只有*amh*和*vasa*基因有微弱的表达, 说明细胞系传代到了后期, 只含有极少量的Sertoli细胞和生殖细胞。通过脂质体转染法将pEGFP-N3质粒转入AST细胞中, 可表达增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)。AST细胞系的建立为中华鲟种质资源的保存、精原干细胞的体外增殖与分化、基因功能等研究提供了重要的实验材料。

关键词: 精巢; AST细胞系; 传代培养; 核型分析; 基因表达特征; 中华鲟

中图分类号: Q172

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)08-1261-08



鱼类细胞系作为一种重要的研究手段, 广泛应用于病毒学、生理学、毒理学、免疫学、细胞生物学、内分泌学、遗传学及种质资源保存等方面的研究^[1-3]。1962年, Wolf等^[4]建立了世界上首个鱼类细胞系, 即虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)性腺细胞系RTG-2。随着鱼类细胞培养技术的不断发展和成熟, 迄今为止, 已建立了170余种的800多株鱼类细胞系, 组织来源包括鳍条、皮肤、鳃、鳔、肝脏、肾脏、脾脏、脑、肌肉、性腺和胚胎等^[5]。然而, 鱼类精巢细胞系较少, 主要有半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)^[6]、暗色颌须鲷(*Gnathopogon caerulescens*)^[7]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[8]、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[9]、小体鲟(*Acipenser ruthenus*)^[10]和大黄鱼(*Larimichthys crocea*)^[11]等。

鱼类精巢主要由生殖细胞和体细胞(Sertoli细

胞、Leydig细胞、管周肌样细胞等)组成, 是精子发生的场所^[12]。目前, 除青鳉(*Orzias latipes*)外^[13], 鱼类精巢细胞系均为体细胞系, 体细胞在精原干细胞增殖与分化过程中发挥着重要作用^[14]。在斑马鱼(*Danio rerio*)和虹鳟中, Sertoli细胞作为饲养层可以有效地促进精原干细胞的体外增殖^[15, 16]。另一方面, 鱼类精巢体细胞系也为基因功能的体外研究提供了途径。在大黄鱼中, 通过RNA干扰技术敲降Sertoli细胞系中*dmrt1*基因的表达, 研究其与上下游基因的关系^[11]。在罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)中, Leydig细胞系的建立为类固醇生成及内分泌干扰物的研究提供了操作平台^[17]。因此, 鱼类精巢体细胞的培养及细胞系的建立为研究体细胞和精原干细胞的相互作用提供了重要的手段。

中华鲟(*Acipenser sinensis*)隶属硬骨鱼纲、软

收稿日期: 2022-04-10; 修订日期: 2022-07-14

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1200301和2018YFD0901205); 国家自然科学基金(31902353); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2020TD08)资助 [Supported by the National Key R & D Program of China (2021YFD1200301 and 2018YFD0901205); National Natural Science Foundation of China (31902353); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD08)]

作者简介: 叶欢(1985—), 男, 博士; 主要从事鱼类生殖发育研究。E-mail: yehuan@yfi.ac.cn

通信作者: 李创举, 研究员; E-mail: lcj@yfi.ac.cn

骨硬鳞总目、鲟形目、鲟科、鲟属鱼类,是一种大型江海洄游性鱼类,主要分布于东南沿海和长江中下游,为中国国家一级重点保护水生动物^[18]。由于水利工程建设、航运、污染和过度捕捞等人类活动的影响^[19],导致其自然种群资源量急剧下降,2010年被国际自然保护联盟(International Union for Conservation of Nature, IUCN)列为极度濒危级物种。更严峻的是,多家科研单位联合监测发现,自2013年开始中华鲟在葛洲坝下自然繁殖活动出现中断^[20],且2017—2021年连续中断,表明该物种自然种群面临绝迹的处境^[19]。虽然目前中华鲟的全人工繁殖技术已突破^[21, 22],由于其初次性成熟周期长(雌性在14—26年,雄性8—18年)、体型大,导致每年性成熟亲本数量有限,同时还面临着疾病暴发、养殖设施意外事故、天灾等各种风险。因此,迫切需要研发中华鲟种质资源保存和物种保护新技术。

精原干细胞是雄性动物体内唯一能向子代传递遗传信息的成体干细胞,且具有分化为两性配子的潜能^[23],是鱼类种质资源保存和生殖细胞操作的对象。鱼类精原干细胞体外培养技术尚未建立,但已有的研究发现,精巢体细胞对精原干细胞的体外培养及基因功能研究至关重要。因此,本研究以中华鲟精巢组织为材料,建立了中华鲟精巢细胞系AST,探究了AST体外培养合适的血清浓度,鉴定了AST的基因表达特征,并成功地在该细胞系中实现外源基因转入及表达。研究结果为后续中华鲟种质资源保存、精原干细胞的体外培养、增殖与分化、功能基因等研究提供了重要的实验材料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

本研究所用中华鲟来自中国水产科学研究院长江水产研究所太湖试验场(荆州),选用3龄雄性子二代中华鲟,体长为 (94.64 ± 5.31) cm,体重为 (4.51 ± 0.57) kg。实验鱼的使用得到了中国水产科学研究院长江水产研究所实验动物福利伦理委员会的批准,取样过程遵守了实验动物福利和相关制度。

1.2 原代培养

将中华鲟用MS-222(Sigma-Aldrich, E10521)麻醉后,置于20 mg/L的高锰酸钾溶液中浸泡1h,再用70%酒精擦拭鱼体表面,然后在生物安全柜内取精巢组织。用无菌PBS(BI, 02-024-1ACS)漂洗2次,浸泡在70%乙醇中1min, PBS清洗2次,然后将精巢组织置于终浓度为500 U/mL青霉素(Gibco, 15140122)、500 μ g/mL链霉素(Gibco, 15140122)和12.5 μ g/mL

两性霉素B(BI, 03-029-1B)的DMEM培养基(Gibco, 12100046),每20min换液1次,共3次。用剪刀将精巢组织剪成约1 mm³小块,培养基清洗2次。用蛋白酶消化液[含0.25% trypsin(Worthington, LS003707)、4 mg/mL collagenase H(Roche, 11074059001)、5% FBS(Gibco, 10091148)和0.05% DNase I (Roche, 11284932001)]制备精巢单细胞悬液(25℃孵育4h),每隔30min用移液枪轻轻吹打混匀,加入10%胎牛血清(FBS)终止反应,经40 μ m细胞筛过滤后,离心弃上清,用培养基清洗3次。用DEME培养液[100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素、50 mmol/L β -巯基乙醇(Gibco, 21985023)、20%FBS和10 ng/mL人碱性成纤维细胞生长因子(Gibco, PHG0263)和20 ng/mL表皮细胞生长因子(Gibco, PHG0313)]重悬细胞,然后置于25 cm²的细胞瓶中25℃培养,3—4d更换培养基。

1.3 传代培养

当细胞单层达到培养瓶面积80%时,吸出培养基,加入2.5 mL 0.25% 胰酶-EDTA溶液(Gibco, 25200072)消化细胞;将培养瓶置于显微镜下观察,待细胞开始皱缩,大部分变成圆形,加入含有血清的培养基终止胰酶消化,按照1:2比例进行传代培养。用移液枪将细胞转移到15 mL离心管中,离心弃上清,加入5 mL原代培养基,反复吹打细胞制成单细胞悬液,分瓶培养。

1.4 细胞的冻存与复苏

为了保存细胞每隔10代开展1次冻存。将细胞扩大到75 cm²的培养瓶中,当细胞生长至对数期时冻存。冻存液配方为10%二甲亚砜(Sigma-Aldrich, D2438)、20% FBS和70%培养基。配制完成后置于冰上预冷。用0.25%胰酶-EDTA溶液消化细胞,迅速用含有10%FBS的培养基终止消化,用细胞计数仪统计细胞数目,然后离心弃上清,用冻存液按 1×10^6 cells/mL的浓度重悬细胞,分装到冻存管。转移入4℃预冷的程序降温盒(Mr. Frosty™), -80℃过夜后,转移到液氮罐长期保存。

细胞复苏:从液氮罐中取出冻存细胞,立即放入37℃水浴锅中,快速摇晃使其融化,用移液管将细胞悬液转入15 mL离心管中,并加入8 mL DMEM培养基稀释,离心弃上清,加入5 mL含20%FBS的DMEM培养基于25℃培养过夜;同时,取少量细胞用0.4%台盼蓝(Gibco, 15250061)染色评估细胞的活力。次日吸出培养基,加入新鲜培养基继续培养。

1.5 最适血清浓度的确定

为了确定适合中华鲟精巢细胞系(AST)生长的FBS浓度,设置了5个浓度梯度,分别为2%、5%、

10%、15%和20%。按照每孔 3×10^4 个细胞接种到48孔板中, 设置3个重复。每隔1d用胰酶消化3个孔收集细胞, 共收集5d。将收集的细胞用细胞计数仪计数, 计算出每个时间细胞的数目。以培养时间为横坐标, 细胞数目为纵坐标, 绘制出不同FBS浓度条件下中华鲟精巢细胞的生长曲线。

1.6 染色体核型分析

中华鲟精巢细胞系AST培养至30代时, 对其进行核型分析。向75 cm²的培养瓶中加入终浓度为1 μg/mL的秋水仙素, 继续培养4—6h。用胰酶消化后, 收集细胞, 离心弃去上清。用0.075 mol/L KCl溶液室温低渗处理细胞40min, 离心后加入预冷的卡诺固定液(甲醛:冰醋酸=3:1)重悬细胞, 室温固定20min, 重复3次。将固定的细胞滴到预冷的载玻片上, 晾干后, 用吉姆萨染料染色, 接着蒸馏水缓慢冲净染液, 封片显微镜下观察染色体中期分裂相50个, 统计染色体数目和拍照。

1.7 细胞系表达基因鉴定

为了研究中华鲟精巢细胞系AST的基因表达特征, 通过RT-PCR检测Sertoli细胞特异表达基因(*amh*和*gsdf*)、Leydig细胞特异表达基因(*cyp17a1*)和生殖细胞特异表达基因(*dazl*、*dnd*和*vasa*)的表达水平。按照RNeasy Plus Mini Kit试剂盒(Qiagen)说明书步骤分别提取精巢、第0代细胞(P0)、第1代细胞(P1)、第15代细胞(P15, 培养第63天)、第30代细胞(P30, 培养第132天)和第60代细胞(P60, 培养第265天)的总RNA, 通过琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计(NanoDrop One, Thermo)检测其质量和浓度。取1 μg总RNA, 经PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa)逆转录为cDNA, 稀释5倍后置于-20℃保存备用。根据上述基因序列设计引物(表1), 其中基因*dazl*、*dnd*、*vasa*和内参基因*EF-1α*的引物序列来自于已发表文章^[24]。反应体系为20.0 μL: cDNA模板1 μL, 2×Rapid Taq Master Mix 10 μL(Vazyme), 10 nmol/L正、反引物各0.4 μL, ddH₂O 8.2 μL。PCR反应程序为: 94℃ 3min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 10s, 30个循环(内参

基因)或32个循环(其他基因); 72℃ 10min。琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 并回收目的产物, 连接到pMD19-T克隆载体(TaKaRa), 转化感受态DH5α(TransGen), 菌落PCR筛选阳性克隆并测序。

1.8 细胞转染

采用转染试剂Lipofectamine[™] 3000(Invitrogen)和质粒pEGFP-N3(Clontech)。选取第35代细胞, 细胞密度为 1×10^5 个/mL的细胞接种到12孔板中。细胞贴壁生长到对数期后, 用无菌PBS清洗3次后, 每孔加入800 μL Opti-MEM (Invitrogen)。用100 μL Opti-MEM分别稀释5 μL转染试剂和1.5 μg pEGFP-N3质粒, 两者混合后孵育20min, 然后将混合物加入到12孔板中, 与之前加入的800 μL Opti-MEM混匀。25℃培养4h后, 弃转染试剂, 加入含有15% FBS的DMEM培养基, 继续培养24—72h后观察细胞转染情况, 并拍照记录。

2 结果

2.1 中华鲟精巢细胞系建立

本研究采用蛋白酶消化法分离中华鲟精巢细胞, 原代培养第2天观察到细胞贴壁(图1A), 第6天左右细胞基本长满整个培养瓶底面, 按照1:2进行细胞传代培养。在首次传代后, 6—7d可重新长成细胞单层; 传至10代左右, 细胞增殖速度加快, 3—4d即可长满单层; 随着传代次数的增加(图1), 细胞类型逐渐趋于单一, 主要由成纤维样细胞构成, 目前已传至80代, 培养时间为352d左右, 细胞生长状态良好。

将冻存约3个月的中华鲟精巢第10代细胞从液氮中取出复苏, 通过台盼蓝染色, 检测细胞活性约为(81.36±1.13)%。复苏后4h左右开始贴壁, 5d后铺满培养瓶底面。复苏后细胞形态正常(图1F), 传代后细胞生长状态正常。

2.2 不同浓度FBS对中华鲟精巢细胞生长的影响

在2%—20% FBS浓度范围内, 中华鲟精巢细胞的生长速度与FBS浓度呈正相关。当FBS浓度为2%和5%时, 细胞的增殖速率非常缓慢, 5d时间细胞的数目为初始的2倍和3倍左右; 当FBS浓度高于5%时, 细胞的增殖速率明显加快; 在15%和20% FBS浓度条件下, 中华鲟精巢细胞生长曲线大致吻合(图2)。

2.3 中华鲟精巢细胞染色体核型分析

对第30代精巢细胞进行染色体分析, 统计50个形态清晰、分散好的中期分裂相发现, 染色体数在分布上远离正常2n值, 染色体数目变动范围很大, 从142到310不等, 但分裂相染色体数目出现频率最

表1 本研究所用引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称Primer name	引物序列Primer sequence (5'—3')
<i>amh</i> -F	TCAGCGAGGGCAGAGACAGAA
<i>amh</i> -R	TGGCAGTTACCGATGGACAGG
<i>gsdf</i> -F	TCACGGCTGCTTTGAGGACAGA
<i>gsdf</i> -R	AGTGAGGCTCGGTCTTTGCTCTC
<i>cyp17a1</i> -F	CCATCGCTTACCTCCTACACCAC
<i>cyp17a1</i> -R	CTCCCGTATCGTTGCTTCCAG

高为264条, 占总数的26%(图 3)。

2.4 中华鲟精巢细胞系的基因表达特征

为了明确中华鲟精巢细胞系的基因表达特征, 利用RT-PCR检测Sertoli细胞特异表达基因(*amh*和*gsdf*)、Leydig细胞特异表达基因(*cyp17a1*)和生殖

细胞特异表达基因(*dazl*、*dnd*和*vasa*)的mRNA表达水平。结果显示, 这些基因在P0和P1细胞中的表达量同精巢中的相似, 而在P15、P30和P60细胞中, 只有*amh*和*vasa*基因有微弱的表达(图 4)。以上结果表明, 中华鲟精巢细胞系传代到了后期, 细胞中只含有极少量的Sertoli细胞和生殖细胞。

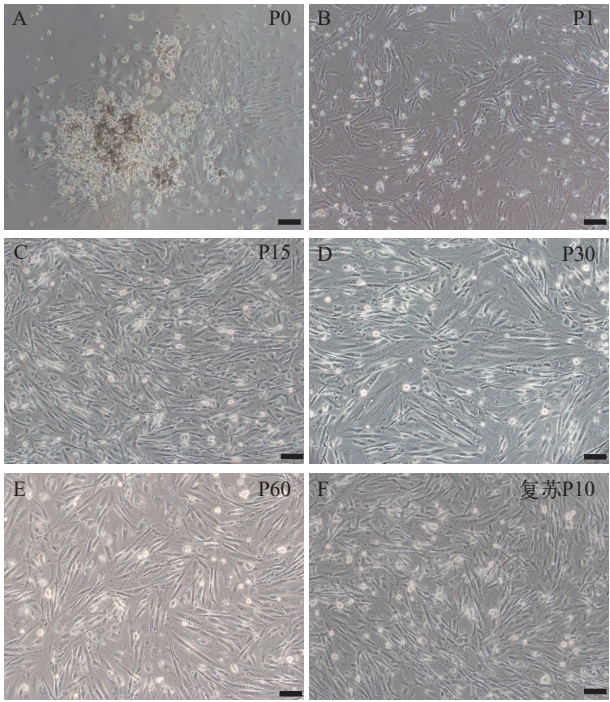


图 1 中华鲟精巢细胞的原代和传代培养

Fig. 1 Primary culture and subculture of cells from testis of Chinese sturgeon

A. 原代细胞; B. 传代培养的第1代细胞; C. 传代培养的第15代细胞; D. 传代培养的第30代细胞; E. 传代培养的第60代细胞; F. 复苏的第10代细胞; 标尺=100 μm

A. primary culture of cells; B. subculture cells at passage 1; C. subculture cells at passage 15; D. subculture cells at passage 30; E. subculture cells at passage 60; F. cells at passage 10 after cell thawing. Scale bars, 100 μm

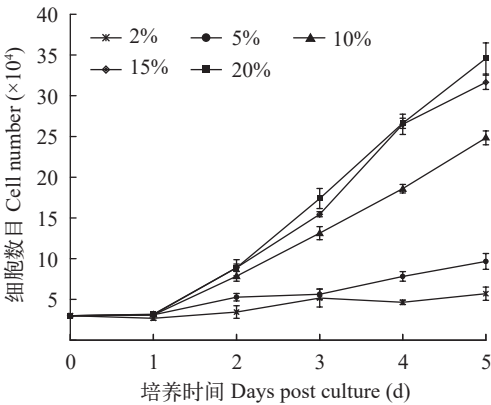


图 2 AST细胞在不同浓度FBS中的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of AST cells at different concentrations of fetal bovine

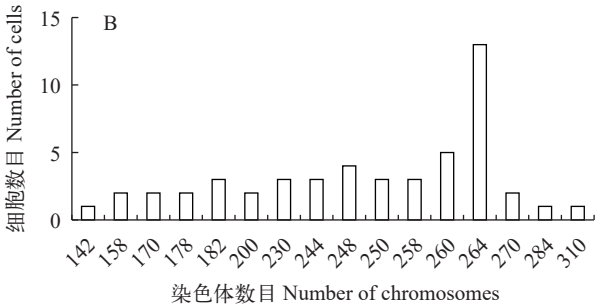
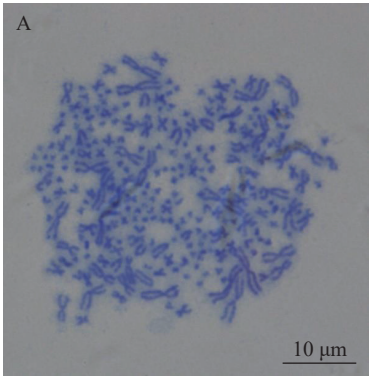


图 3 第30代AST细胞染色体核型分析

Fig. 3 Chromosome analysis of AST cells at the 30th passage

A. 染色体中期分裂相; B. 染色体数目分布

A. chromosome metaphase of AST cells; B. chromosome number distribution of AST cells

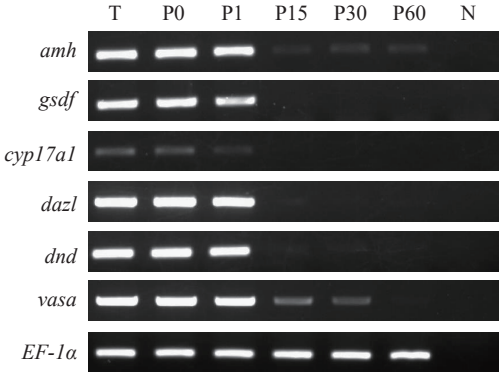


图 4 AST细胞系的基因表达特征

Fig. 4 Gene expression characterization of AST cell line

T. 精巢; P0. 第0代细胞; P1. 第1代细胞; P15. 第15代细胞; P30. 第30代细胞; P60. 第60代细胞; N. 阴性对照

T. testis; P0. AST cells at passage 0; P1. AST cells at passage 1; P15. AST cells at passage 15; P30. AST cells at passage 30; P60. AST cells at passage 60; N. negative control

2.5 外源基因的转染

通过脂质体成功地将pEGFP-N3质粒转入到中华鲟精巢细胞。在转染后24h观察到微弱的绿色荧光信号,转染48h时可以观察到较强的荧光信号(图5)。虽然转染效率较低 $[(2.56 \pm 0.47)\%]$,只有少数细胞表达绿色荧光蛋白,但是仍证明中华鲟精巢细胞系具有表达外源基因的能力。

3 讨论

近些年来,中华鲟自然种群资源量急剧下降,多次被监测到未进行野外繁殖,其生存前景堪忧。细胞系是物种种质资源保存的对象。本研究建立了中华鲟精巢细胞系AST,该细胞系能保持稳定生长,已传至80代,并对其开展了冻存复苏、染色体核型、基因表达特征分析和转染研究。中华鲟精巢细胞系建立对其细胞生物学的研究及种质资源的保存具有重要意义,同时也为精原干细胞的体外培养、基因功能等研究提供了操作平台。

3.1 细胞系的建立方法

细胞原代培养常用的方法有:组织块培养法、机械分离法和消化分散法等^[1, 3]。目前,通常采用组织块培养,如大菱鲷心脏细胞系^[25]、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)鳍细胞系^[26]、罗非鱼肾脏细胞系^[27]、小体鲟精巢细胞系^[10]和斑石鲷(*Oplegnathus punctatus*)肝脏细胞系^[28]等,该方法操作简单,对细胞的损伤较小。另一方面,蛋白酶消化法也较为常用。如在半滑舌鳎中,卵巢组织含有较多的脂肪阻碍了细胞的迁出,而该方法可以将细胞解离出来,促进其贴壁生长^[29]。在金钱鱼(*Scatophagus argus*)中,通过胰蛋白酶消化鳃组织制备细胞培养,发现细胞的数量多,而且状态较好^[30]。在本研究中,我们采用胰蛋白酶和胶原蛋白酶消化精巢组织制备成单细胞悬液培养,发现细胞能够快速贴壁且生长。虽然蛋白酶的损伤造成了部分细胞死亡,但由于细胞的数量较多,死亡细胞的影响可以忽略。因此,需要根据组织的特点选择不同的原代细胞培养

方法。

3.2 培养细胞生长的影响因素

鱼类细胞在体外培养时,培养温度与鱼自身的最适生活温度相关。叶湘辉等^[31]通过比较4、16、22、27、30和35℃六种温度下中华鲟性腺组织细胞的生长情况,发现其在16—30℃正常生长,最佳生长温度为27℃。在DMEM培养基中,通过比较中华鲟鳍条细胞在15、20、25和30℃四种温度下增殖情况,发现最佳培养温度为25℃^[32]。在中华鲟养殖过程中,如果水温长期高于25℃,会出现死亡的情况,因此,本研究选择在25℃下用DMEM培养基体外培养中华鲟精巢细胞。FBS是细胞培养常用的基本添加物,含有各种营养物质,能够提供细胞培养所必需的各种生长因子。在一般情况下,细胞体外培养常用的FBS浓度为10%—20%。本研究发现,当FBS浓度低于10%时,细胞增殖缓慢且无法正常传代;而在15%和20%FBS浓度条件下,细胞的增殖速度相差不大,因此,认为中华鲟精巢细胞最适血清浓度为15%。过高的FBS浓度会抑制斑石鲷^[28]肝脏细胞和鳗鲡(*Anguilla anguilla*)^[33]肾脏细胞的增殖。当FBS达到一定浓度后,继续增加其浓度对细胞的增殖不一定有利。此外,有研究表明,高浓度的FBS会使促进精巢体细胞的生长,从而抑制精原干细胞的增殖^[34, 35],所以在鱼类精原干细胞培养体系中,需要着重摸索FBS的浓度。青鳉^[13]和虹鳉^[16]精原干细胞的体外培养研究发现,培养基中添加一定浓度鱼自身的血清有利于精原干细胞的体外增殖。目前,由于鱼类生殖干细胞体外培养条件尚不成熟,培养基中的各种组分需要摸索和优化。

3.3 细胞系的核型特征

染色体的非整倍化和染色体数目的离散分布是无限细胞系形成的重要表征,目前认为可能是由于经过长期体外培养和多次地传代后,细胞的染色体可能发生了加倍、断裂和重组融合等现象,导致染色体数目的增加、染色体的重排和丢失等,导致



图5 中华鲟AST细胞系pEGFP-N3质粒转染

Fig. 5 Transfected AST cell line with pEGFP-N3 plasmid

A. 绿色荧光信号; B. 明场下的视野; C. 绿色荧光信号与明场视野的叠加; 标尺=100 μm

A. signal of green fluorescence; B. bright field; C. merge of green fluorescence and bright field; Scale bars=100 μm

细胞成为异倍体^[36]。大量的研究表明,体外培养细胞的非异倍染色体数比例多在50%—70%^[11,25,28,33,37]。然而,在本研究中,中华鲟精巢细胞非异倍染色体数比例只有26%。通过对中华鲟性腺和鳍条细胞染色体的核型分析,发现非异倍染色体数比例也分别只有20%和25%^[31,32]。中华鲟非异倍染色体数比例低的原因可能是细胞在体外培养过程中染色体大量丢失造成的;另一方面,由于中华鲟染色体中存在大量的微小染色体,这些微小染色体难以区分,导致统计时数量偏少。虽然中华鲟细胞存在染色体非整倍型的现象,但在中华鲟细胞系中大多数细胞的染色体还是以264条为主,说明建立的中华鲟细胞系相对稳定,可以应用于细胞生物学和遗传学的研究。

3.4 细胞系的基因表达特征

鉴定细胞系基因的表达特征是后续相关功能研究的基础。在鱼类精巢中,*amh*和*gsdf*基因主要在Sertoli细胞表达,而*cyp17a1*基因在Leydig细胞表达^[38]。我们前期的研究已表明^[39],中华鲟*dazl*、*dnd*和*vasa*在生殖细胞中特异地表达。通过检测这些基因在中华鲟精巢细胞系的表达特征,发现随着细胞传代次数的增加,到后期仅有*amh*和*vasa*基因的微弱表达,说明细胞系中存在着Sertoli细胞和生殖细胞。在斑马鱼和虹鳟中的研究表明^[15,16],Sertoli细胞在精原干细胞的体外增殖起着重要作用。因此,该细胞系的建立有助于我们在体外研究中华鲟精原干细胞的增殖与分化。

3.5 细胞系的转染效率

通过细胞转染可以实现目的基因的抑制和过表达,从而在体外水平研究基因的功能。在长江鲟(*Acipenser dabryanus*)鳍条细胞系中,Lipofectamine 2000的转染效率可达10%—15%^[40]。通过比较脂质体转染法、病毒感染转导法和电穿孔法在中华鲟肌肉细胞的转染效率,发现电穿孔方法的转染效率最高,可达15%^[41]。在西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)中,比较了3种常用的商业化转染试剂在心脏、头肾和性腺细胞系中的转染效率,最高的也只有5%左右^[42]。在本研究中,中华鲟精巢细胞也是仅有少数细胞表达了绿色荧光蛋白。因此,需要优化转染方法提高转染效率,从而实现中华鲟基因功能的体外研究。

综上所述,本研究成功建立了中华鲟精巢细胞系,在体外连续传代超过80次仍保持较强的细胞增殖能力。该细胞系的建立对于中华鲟种质资源的保存、精原干细胞的体外增殖与分化、基因功能等研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] Zhang B, Chen S L. Decades of researching progresses of fish cell culture and its application prospects [J]. *Marine Sciences*, 2011, **35**(7): 113-121. [张博, 陈松林. 近10年鱼类细胞培养研究进展及应用展望 [J]. 海洋科学, 2011, **35**(7): 113-121.]
- [2] Goswami M, Yashwanth B S, Trudeau V, *et al.* Role and relevance of fish cell lines in advanced in vitro research [J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, **49**(3): 2393-2411.
- [3] Thangaraj R S, Narendrakumar L, Prasannan Geetha P, *et al.* Comprehensive update on inventory of finfish cell lines developed during the last decade (2010–2020) [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, **13**(4): 2248-2288.
- [4] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells in vitro [J]. *Science*, 1962, **135**(3508): 1065-1066.
- [5] Bairoch A. The cellosaurus, a cell-line knowledge resource [J]. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2018, **29**(2): 25-38.
- [6] Zhang B, Wang X, Sha Z, *et al.* Establishment and characterization of a testicular cell line from the half-smooth tongue sole, *Cynoglossus semilaevis* [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2011, **7**(4): 452-459.
- [7] Higaki S, Koyama Y, Shirai E, *et al.* Establishment of testicular and ovarian cell lines from Honmoroko (*Gnathopogon caeruleus*) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2013, **39**(3): 701-711.
- [8] Peng L, Zheng Y, You F, *et al.* Establishment and characterization of a testicular Sertoli cell line from olive flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2016, **34**(5): 1054-1063.
- [9] Zhang N W. Development and characterization of brain and testis cell lines from turbot (*Scophthalmus maximus*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017: 18-26. [张念伟. 大菱鲆脑细胞系和精巢细胞系的建立与鉴定 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017: 18-26.]
- [10] Sun A, Zhu H, Dong Y, *et al.* Establishment of a novel testicular cell line from sterlet *Acipenser ruthenus* and evaluation of its applications [J]. *Journal of Fish Biology*, 2019, **94**(5): 804-809.
- [11] Xu Y, Zhong Z, Zhang Z, *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.
- [12] Schulz R W, França L R de, Lareyre J J, *et al.* Spermatogenesis in fish [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, **165**(3): 390-411.
- [13] Hong Y, Liu T, Zhao H, *et al.* Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line capable of sperm production in vitro [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, **101**(21): 8011-8016.
- [14] Lacerda S M d S N, Costa G M J, França L R de. Bio-

- logy and identity of fish spermatogonial stem cell [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014(207): 56-65.
- [15] Sakai N. Transmeiotic differentiation of zebrafish germ cells into functional sperm in culture [J]. *Development*, 2002, **129**(14): 3359-3365.
- [16] Iwasaki-Takahashi Y, Shikina S, Watanabe M, *et al.* Production of functional eggs and sperm from in vitro-expanded type A spermatogonia in rainbow trout [J]. *Communications Biology*, 2020, **3**(1): 308.
- [17] Huang Q, Yang Z, Wang J, *et al.* Establishment of a stem Leydig cell line capable of 11-ketotestosterone production [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2020, **32**(16): 1271-1281.
- [18] Wei Q, Ke F E, Zhang J, *et al.* Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, **48**(1/2/3/4): 241-255.
- [19] Wei Q W. Conservation of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) based on its life history: dilemma and breakthrough [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2020, **32**(5): 1297-1319. [危起伟. 从中华鲟(*Acipenser sinensis*)生活史剖析其物种保护: 困境与突围 [J]. *湖泊科学*, 2020, **32**(5): 1297-1319.]
- [20] Wu J M, Wang C Y, Zhang S H, *et al.* From continuous to occasional: small-scale natural reproduction of Chinese sturgeon occurred in the Gezhouba spawning ground, Yichang, China [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, **24**(3): 425-431. [吴金明, 王成友, 张书环, 等. 从连续到偶发: 中华鲟在葛洲坝下发生小规模自然繁殖 [J]. *中国水产科学*, 2017, **24**(3): 425-431.]
- [21] Guo B F, Chang J B, Xiao H, *et al.* The reproductive biology of first filial generation of *Acipenser sinensis* growing up in the freshwater environment [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, **35**(6): 940-945. [郭柏福, 常剑波, 肖慧, 等. 中华鲟初次全人工繁殖的特性研究 [J]. *水生生物学报*, 2011, **35**(6): 940-945.]
- [22] Wei Q W, Li L X, Du H, *et al.* Research on technology for controlled propagation of cultured Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, **20**(1): 1-11. [危起伟, 李罗新, 杜浩, 等. 中华鲟全人工繁殖技术研究 [J]. *中国水产科学*, 2013, **20**(1): 1-11.]
- [23] Kubota H, Brinster R L. Spermatogonial stem cells [J]. *Biology of Reproduction*, 2018, **99**(1): 52-74.
- [24] Ye H, Takeuchi Y, Du H, *et al.* Spermatogonia from cryopreserved testes of critically endangered Chinese sturgeon efficiently colonized and preferentially proliferated in the recipient gonads of Yangtze sturgeon [J]. *Marine Biotechnology*, 2022, **24**(1): 136-150.
- [25] Ma J L, Gao J, Sun A, *et al.* Development and characterization of a heart cell line from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, **24**(7): 1092-1100. [马佳璐, 高进, 孙爱, 等. 大菱鲆心脏细胞系的建立与鉴定 [J]. *农业生物技术学报*, 2016, **24**(7): 1092-1100.]
- [26] Wang J Y, Li X, Qin Y J, *et al.* Establishment and characterization of fin cell lines from redfin puffer *Takifugu rubripes* [J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2018, **33**(6): 703-708. [王缙云, 李霞, 秦艳杰, 等. 红鳍东方鲀鳍细胞系的建立及生长特性研究 [J]. *大连海洋大学学报*, 2018, **33**(6): 703-708.]
- [27] Zhao J Q, Jia P, Liu W Z, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from the kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, **26**(2): 382-390. [赵建青, 贾鹏, 刘文枝, 等. 罗非鱼肾脏细胞系的建立及其生物学特性 [J]. *中国水产科学*, 2019, **26**(2): 382-390.]
- [28] Zhang H X, Li K M, Wang N, *et al.* Establishment and characterization of a liver cell line from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, **28**(2): 360-368. [张宏祥, 李坤明, 王娜, 等. 斑石鲷肝脏细胞系的建立与鉴定 [J]. *农业生物技术学报*, 2020, **28**(2): 360-368.]
- [29] Sun A, Chen S L, Gao F T, *et al.* Establishment and characterization of a gonad cell line from half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* pseudomale [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, **41**(3): 673-683.
- [30] Zhou J N, Su M L, Zhang J B. Establishment and characterization of gill cell line from the spotted scat *Scatophagus argus* [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2019, **38**(6): 90-97. [周佳楠, 苏冒亮, 张俊彬. 金钱鱼鳃细胞系的建立及其生长特性的初步研究 [J]. *热带海洋学报*, 2019, **38**(6): 90-97.]
- [31] Ye X H, Liu H Q, Yu X M, *et al.* Preliminary research on tissue culture of Chinese sturgeon [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1999, **23**(6): 566-571. [叶湘辉, 刘汉勤, 俞小牧, 等. 中华鲟组织培养的初步研究 [J]. *水生生物学报*, 1999, **23**(6): 566-571.]
- [32] Zhou G Z, Gui L, Li Z Q, *et al.* Establishment of a Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* tail-fin cell line and its susceptibility to frog iridovirus [J]. *Journal of Fish Biology*, 2008, **73**(8): 2058-2067.
- [33] Li M M, Wu B, Lin N, *et al.* The established kidney cell line from European eel *Anguilla anguilla* and its susceptibility to anguillid herpesvirus [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(2): 237-244. [李苗苗, 吴斌, 林楠, 等. 鳗鲡肾脏细胞系的建立及其对鳗鲡疱疹病毒的敏感性 [J]. *水生生物学报*, 2020, **44**(2): 237-244.]
- [34] Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, *et al.* Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions [J]. *Biology of Reproduction*, 2005, **72**(4): 985-991.
- [35] Shikina S, Ihara S, Yoshizaki G. Culture conditions for maintaining the survival and mitotic activity of rainbow trout transplantable type A spermatogonia [J]. *Molecular*

- Reproduction and Development*, 2008, **75**(3): 529-537.
- [36] Liu X F, Chen S L, Sha Z X, *et al.* Establishment, characterization of a new cell line from heart of kelp bass (*Epinephelus moara*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, **23**(10): 1394-1400. [刘肖峰, 陈松林, 沙珍霞, 等. 云纹石斑鱼心脏细胞系的建立与鉴定 [J]. 农业生物技术学报, 2015, **23**(10): 1394-1400.]
- [37] Wei Y B, Fan T J, Jiang G J, *et al.* A novel heart-cell line from brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its susceptibility to iridovirus [J]. *Journal of Fish Biology*, 2010, **76**(5): 1149-1158.
- [38] Bhat I A, Dar J Y, Ahmad I, *et al.* Testicular development and spermatogenesis in fish: insights into molecular aspects and regulation of gene expression by different exogenous factors [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2021, **13**(4): 2142-2168.
- [39] Yang X, Yue H, Ye H, *et al.* Identification of a germ cell marker gene, the *dead end* homologue, in Chinese sturgeon *Acipenser sinensis* [J]. *Gene*, 2015, **558**(1): 118-125.
- [40] Liu J, Liu X, Zeng Q, *et al.* Establishment and characterization of a cell line derived from fin of the endangered Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus*) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2020, **56**(8): 650-658.
- [41] Wang Y Z. Establishment of five tissue cell lines from *Acipenser sinensis* and identification of germ cell marker gene *dazl* in *Mylopharyngodon piceus* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020: 34-37. [王艺舟. 中华鲟五种组织细胞系建立及青鱼生殖细胞标记基因 *dazl* 的鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020: 34-37.]
- [42] Lee J H, Lee S T, Nam Y K, *et al.* Gene delivery into Siberian sturgeon cell lines by commercial transfection reagents [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2019, **55**(2): 76-81.

ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A TESTICULAR CELL LINE FROM CHINESE STURGEON (*ACIPENSER SINENSIS*)

YE Huan¹, WANG Yi-Zhou², DU Hao¹, YUE Hua-Mei¹, RUAN Rui¹, LUO Jiang¹ and LI Chuang-Ju¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China; 2. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*, is a large anadromous fish, with an average 14 years for males and 21 years for females. It was listed as critically endangered by the International Union for Conservation of Nature (IUCN) since 2010, and its spawning activity was not observed during the past five spawning seasons. Therefore, there is an urgent need to preserve the genetic resources of Chinese sturgeon. To investigate the germplasm conservation of Chinese sturgeon and its spermatogonia stem cell culture in vitro, a new cell line (designated as AST) derived from the testis of Chinese sturgeon was established and characterized. The AST cell line are fibroblast-like cells, and have been stably subcultured for more than 80 passages. The optimal growth conditions for the AST cell line are DMEM medium, 25°C, and 15% FBS. After cryopreservation in liquid nitrogen, the viability of AST cells was about (81.36±1.13)%, as measured by trypan blue staining. Chromosome analysis of AST cells at the 30th passage showed that the number of chromosomes ranged from 142 to 310, and the modal number was 264. To detect the expression characterization of Sertoli cell-related genes (*amh* and *gsdf*), Leydig cell-related genes (*cyp17a1*), and germ cell-related genes (*dazl*, *dnd* and *vasa*) in AST cells by RT-PCR, all of the genes were found in the P0 and P1 cells, where their amounts were similar with those of in testis; however, in P15, P30, and P60 AST cells, only *amh* and *vasa* genes were detected with very low level, suggesting only a few number of Sertoli cells and germ cells in the late passage of AST cells. The signal of enhanced green fluorescence protein (GFP) were detected in a few of AST cells after transfection with pEGFP-N3 plasmid. The establishment of the AST cell line could provide important experimental material for the conservation genetic resources of Chinese sturgeon, the in vitro study of proliferation and differentiation of spermatogonia stem cell, and function analysis of testicular related genes.

Key words: Testis; AST Cell line; Subculture; Karyotype analysis; Genes expression characterization; *Acipenser sinensis*