

鲫鱼肝细胞分离与原代培养方法的优化

贾睿^{1,2},曹丽萍²,丁炜东²,杜金梁²,徐跑^{1,2},殷国俊^{1,2}

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院,江苏 无锡 214081;2. 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心,
农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室,江苏 无锡 214081)

摘要:通过不同的分离方法和培养条件探索鲫鱼肝细胞的原代培养,以建立稳定的鲫鱼肝细胞原代培养模型。用台盼蓝染色检测细胞存活率;用WST-1检测细胞活力,同时观察长期培养过程中肝细胞的形态变化。结果显示:组织块培养4~5 d后肝细胞从组织块中迁出并增殖,但这种方法所需时间长且细胞不易收集;机械分散法收集的细胞少,细胞存活率低;而胰蛋白酶消化法获得良好稳定的分离和培养效果。用0.1%胰蛋白酶消化30 min,每克肝重可收集 1.47×10^8 个细胞,平均存活率为91.43%。培养基和血清浓度均会影响肝细胞的贴壁和生长。在含有10% (V/V)胎牛血清(FCS) M199培养基中,4% CO₂、28℃,肝细胞培养8~9 d后传代。

关键词:鲫鱼;肝细胞;胰蛋白酶;原代培养

中图分类号:S917 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)增刊-0206-07

Optimization of Isolation and Primary Culture of Hepatocytes in Crucian Carp (*Carassius auratus*)

JIA Rui^{1,2}, CAO Li-ping², DING Wei-dong², DU Jin-liang², XU Pao^{1,2}, YIN Guo-jun^{1,2}

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: In order to establish a stable primary culture model of hepatocytes in *Carassius auratus*, 3 different isolation methods (tissue culture, mechanical separation and pancreatin digestion) and culture conditions of primary hepatocytes culture were compared in the present study. The survival rate was tested with trypan blue exclusion and the viability was assessed with WST-1; the morphological changes of cells in long-term culture were also observed. The results showed that in tissue culture, hepatocytes migrated from liver and proliferated after 4–5 days, compare with the other methods, it took much longer time for the hepatocytes to move out and it was difficult to collect the cells for further culture. The number and viability of the hepatocytes obtained by mechanical separation were obviously lower than by pancreatin digestion. The liver tissue digested by 0.1% trypsin for 30 min yielded 1.47×10^8 cell/g (liver weight) and the viability was 91.43%. Both culture medium and concentration of serum influenced the attachment and proliferation of the hepatocytes. The cell cultivated in M199 basal medium supplemented with 10% fetal calf serum at 28℃, 4% CO₂ for 8–9 days can sub-cultured.

Key words: *Carassius auratus*; Hepatocytes; Trypsin; Primary culture

肝脏是动物机体在物质和能量代谢过程中负有重要作用的脏器,其主要功能有:营养代谢、能量储存、蛋白质合成与分泌和分解毒物等^[1],是目前毒理学和药理学研究的主要对象之一。原代培养肝细

胞被广泛应用于研究肝细胞结构及其功能的各个方面,如碳水化合物和氨基酸的代谢^[2]、血清蛋白的合成与分泌^[3]和药物作用机理等^[4]。大量的研究已经表明体外培养肝细胞可作为在体肝组织替代模

收稿日期:2011-10-18

基金项目:科技部国际科技合作项目(2009DFA32620);无锡市科技计划(国际科技合作)(CZE00906);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金(2011JBFC05)

作者简介:贾睿(1987-),男,甘肃人,硕士,主要从事鱼类细胞培养及相关免疫学和药理学研究。

通讯作者:殷国俊(1967-),男,江苏人,研究员,博士,主要从事水生动物病害及免疫学研究。

徐跑(1963-),男,江苏人,研究员,博士,主要从事水生动物遗传育种研究。

型用于药理和环境毒理学研究^[5]。认同其优点有: 体外培养可节约动物数量、缩短试验时间、同时进行多种药物代谢试验、可排除体内其他因素的干扰、并且细胞存活情况在整个试验过程中也易于检测^[6]。

鱼类细胞不仅具有类似哺乳动物细胞的功能, 还具有其独特的功能, 如它们可在室温培养, 可暴露在不同渗透压的环境中。这意味着, 在毒理和药理试验中, 体外培养更有利于数据的收集^[7]。鱼类已建立 150 多种细胞系^[8], 这些细胞系可标准化, 管理更方便, 在毒理药理试验中减少大量的劳力。但相对于原代培养细胞, 细胞系失去了大部分原组织(器官)的生理生化特性。而原代细胞则保持组织(器官)原有的特色^[9]。

1976 年, Birnbaum 等^[10]用胶原酶灌注法分离金鱼肝细胞, 研究激素对肝糖原分解的影响, 此后, 以鱼类肝细胞原代培养为对象的研究相继展开。起初, 鱼类肝细胞只限于短期培养^[11]。1984 年, Klauning 等^[12, 13]第一次报道虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)和斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)肝细胞在体外可培养两周以上, 而后, 鱼类肝细胞体外长期培养的研究越来越多, 目前已有 250 多篇相关的报道^[14]。已有研究表明, 鱼类肝细胞原代培养不仅可应用于鱼类生理学研究, 还可以应用于药理学和环境毒理学研究^[7, 15, 16]。

最近十几年化学药物在水产养殖中大量的使用, 鱼类等水产动物生活环境发生很大改变, 导致各种疾病的爆发, 如肝胆综合征等^[17]。因此, 鱼类疾病的防治是目前水产养殖中面临的最严重的问题之一, 而肝细胞原代培养可作为在体替代模型, 用于鱼类药物的筛选、药物和毒物作用机理的研究, 大大缩短了研究周期。至今为止, 鱼类肝细胞培养主要集中于虹鳟^[18]、鲶鱼^[19]和鳊鱼^[20]等, 关于鲫鱼肝细胞原代培养的方法还不成熟, 相关的报道也很少。本试验通过不同的分离方法和不同的培养条件, 以建立稳定的鲫鱼肝细胞原代培养模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验用鱼 试验所用鲫鱼为野生鱼, 100 g 左右, 捕捞于太湖。

1.1.2 试剂 M199 培养基、DMEM 培养基、Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)、链霉素/青霉素(streptomycin/penicillin)、两性霉素 B(Amphotericin B)、0.25% 胰蛋白酶和 0.5% 台盼蓝购于 SIGMA 公司(St. Louis, Missouri, USA); 新生胎牛血

清(FCS)购自于 GIBCO 公司(USA); WST-1 购自于碧云天生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 组织块培养法 取暂养 1 d 后的试验鱼, 于 0.01% (W/V) 的高锰酸钾溶液中浸泡 30 min, MS-222 麻醉, 采血, 无菌条件下剪开腹部取出肝组织, 用无菌的冷 D-PBS 洗 3 遍, 除去血细胞和其他组织, 用无菌的眼科剪刀剪至 1 mm³ 大小组织块, 接种于 25 mL 培养瓶中, 每瓶 16~20 块。将培养瓶翻转使其瓶底朝上, 注入适量培养液, 置于 28℃ 4% CO₂ 培养箱中培养, 放置 2 h, 待组织小块贴附瓶底后, 将培养瓶慢慢翻转平放继续培养。每 2 d 换液一次。

1.2.2 酶消化法 取材操作方法同上, 将肝组织用无菌眼科剪刀剪碎后分别加入 0.1% 和 0.25% 胰蛋白酶进行消化, 消化时间分别为 10、20、30、40 min, 消化期间不断的摇动组织。消化所得细胞用 200 目无菌筛网过滤, 800 r/min 离心 5 min, 离心 3 次, 弃上清液, 加含 10% FCS 和 1% 链霉素/青霉素的培养基重悬, 台盼蓝染色, 显微镜下计数。以 5×10^4 cell/mL 接种于 96 孔细胞培养板中; 以 10^6 cell/mL 的浓度接种于 25 mL 的细胞培养瓶中, 每瓶 4 mL, 置 28℃ 4% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.3 机械分散法 取材操作方法同上, 将肝组织用无菌眼科剪刀剪碎, 先用 100 目的无菌筛网过滤, 再用 200 目的进一步过滤, 过滤后 800 r/min 离心 5 min, 离心 3 次, 弃上清液, 加含 10% FCS 和 1% 链霉素/青霉素的培养基重悬沉淀, 台盼蓝染色, 显微镜下计数, 以 5×10^4 cell/mL 接种于 96 孔细胞培养板中, 置于 28℃ 4% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 肝细胞数量和活力的测定

1.3.1 细胞数量测定 将细胞悬液稀释 10 倍, 滴于血球计数板上, 光学显微镜下计数, 结果以每克肝重分离的细胞个数表示。

1.3.2 细胞存活率测定 细胞悬液与 0.5% 台盼蓝染液按 1:1 体积比混合, 1 min 后于血球计数板上计数, 活细胞圆形透明, 死细胞染成蓝色, 用活细胞占计数细胞中的百分比表示细胞存活率。

1.3.3 WST-1 测定细胞活力 取用机械分散法和胰蛋白酶消化 30 min 收集的肝细胞, 以 5×10^4 cell/mL 的浓度接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μ L, 在特定的时间加入 WST-1 试剂, 每孔 10 μ L, 28℃ 4% CO₂ 孵育 2 h。把 96 孔板置于震动混匀器上 1 min, 以充分混匀检测体系, 选择 450 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上检测各孔光吸收值, 每孔 4 个重复, 测定时间分别为接种后 1、2、3、4、5、6 d。4

条鱼重复。

1.4 传代培养

肝细胞长满瓶底的 90% 后即可传代,倒去培养液后用 D-PBS 液冲洗 1 次后,加适量的 0.1% 的胰蛋白酶覆满瓶底作用短时间后留取少量胰酶继续作用,当细胞回缩隆起变圆后加含血清的培养基终止消化,轻轻吹打成单细胞悬液,计数、分瓶继续培养。

2 结果与分析

2.1 胰蛋白酶消化法和机械分散法对肝细胞数量和存活率的影响

表 1 显示:0.25% 胰蛋白酶在 30 min 时收集的细胞数量最多,消化 40 min 后细胞数量反而减少,

表 1 胰蛋白酶消化法和机械分散法对肝细胞数量影响

Tab.1 The effect of trypsin digestion and mechanical separation on the cell number

胰蛋白酶浓度/% Trypsin content	10 min	20 min	30 min	40 min	机械分散法 Mechanical separation
0.25	2.5×10^6	7.3×10^7	1.5×10^8	9.8×10^7	8×10^5
0.1	4.5×10^5	5×10^6	1.47×10^8	1.08×10^8	

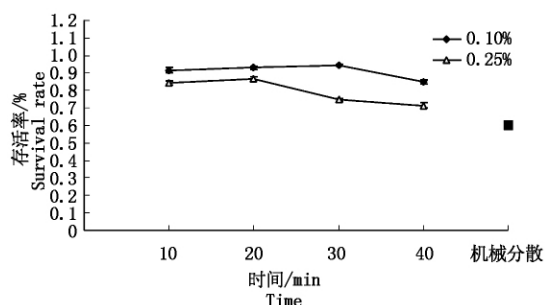


图 1 胰蛋白酶消化法和机械分散法对肝细胞存活率的影响

Fig.1 The effect of trypsin digestion and mechanical separation on the survival rate of the cell
(Results express as means \pm SD)

2.2 胰蛋白酶消化法和机械分散法对肝细胞活力的影响

比较两种不同的分离方法对细胞活力的影响, M199 培养基中添加 10% FCS 和 1% 青霉素/链霉素。图 2 结果显示,用 0.1% 的胰蛋白酶消化收集的肝细胞活力最好,0.25% 胰蛋白酶消化收集的细胞活力次之,机械分散法获得的细胞活力最差。在 1~6 d 的培养过程中细胞先增殖,随着培养时间的延长,培养基中的营养物质渐渐不足,导致细胞数量下降。

2.3 培养基和血清浓度对鲫鱼肝细胞活力的影响

比较了 M199 和 DMEM 两种培养基对细胞贴壁和长期培养的影响。培养基中添加 1% 青霉素/链霉素和 10% FCS。结果表明,培养基 M199 更有利于肝细胞贴壁和增殖(图 3)。

其消化速度比 0.1% 胰蛋白酶快。0.1% 胰蛋白酶 30 min 为最佳作用时间,细胞数量为 1.47×10^8 个/每克肝重,略少于 0.25% 胰蛋白酶在 30 min 时收集的细胞数量。用机械分散法获得的细胞数量为 8×10^5 个/每克肝重,明显少于胰蛋白酶消化所得的细胞。

台盼蓝染色后观察细胞的存活率发现(图 1):用 0.1% 胰蛋白酶消化收集的肝细胞存活率高于 0.25% 胰蛋白酶和机械分散法收集的细胞,10~30 min 时,其细胞活力均大于 90%,而 0.25% 消化收集的肝细胞存活率小于 90%;30 min 时,存活率仅 71.33%。机械分散法收集的细胞存活率只有 60.46%。表 1 和图 1 的结果表明:用 0.1% 胰蛋白酶消化 30 min 分离效果最佳。

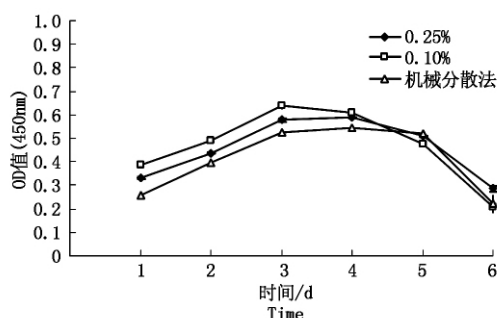


图 2 胰蛋白酶消化法和机械分散法对肝细胞活力的影响
Fig.2 The effects of trypsin digestion and mechanical separation on the cell viability
(Results express as means \pm SD)

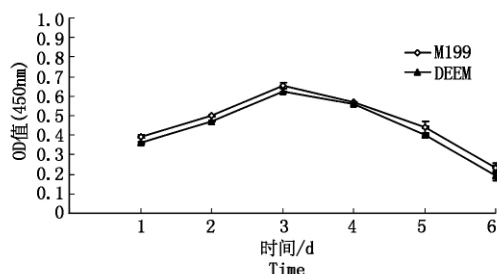


图 3 培养基对细胞活力的影响

Fig.3 The effect of culture mediums on the cell viability
(Results express as means \pm SD)

图 4 显示,鲫鱼肝细胞在含不同浓度血清的 M199 培养基中,细胞的贴壁和增殖都受到不同程度的影响。第 1 天的 OD 值可表示细胞的贴壁程度,结果显示,含 5% 和 10% FCS 的培养基中细胞贴壁数量最多。前 3~4 d 细胞处于增殖期,10% FCS 培养基中细胞增殖最快,但第 3 天后细胞数量开始减

少。在 20% 和 30% FCS 的培养基中,从第 4 天开始细胞数量减少。在无血清培养基中细胞不增殖。细胞在第 3 天或 4 天减少,可能是由于培养基中血清含量减少,营养成分不足。因此长期培养需每隔 2~3 d 对细胞更换新鲜的培养基。

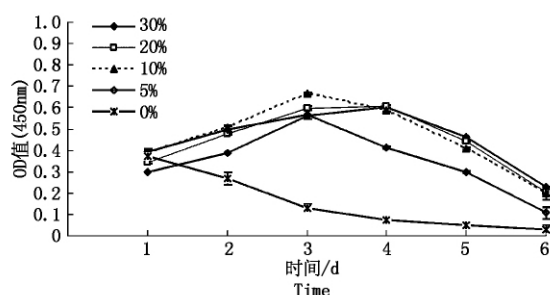


图 4 血清浓度对细胞活力的影响

Fig. 4 The effect of serum concentrations on cell viability
(Results express as means \pm SD)

2.4 肝细胞形态观察

倒置显微镜下观察,组织块培养 3 d 后细胞从组织块中开始迁出,随着细胞的生长,细胞形态逐渐变长,呈纤维状(图 5-A),14 d 后铺满培养瓶底部 90%(图 5-B)。用 0.1% 胰蛋白酶消化分离的肝细胞呈单个分散状态,活肝细胞呈透亮、具有立体感的圆形细胞(图 5-C, D)。在 48 h 后观察到大部分细胞贴壁,没有贴壁的细胞呈悬浮状,贴壁的肝细胞其形态上发生明显改变,细胞呈多角形铺开,胞体变平变薄,体积明显增大,紧紧粘附于培养瓶壁(图 5-E)。96 h 后,随着细胞的增值,部分细胞之间开始连接在一起,细胞主要为成纤维细胞状(图 5-F),培养 7~8 d 后,细胞生长处于停滞期(图 5-G)。随着培养时间的延长,细胞渐渐坏死或脱落(图 5-H)。

2.5 传代培养

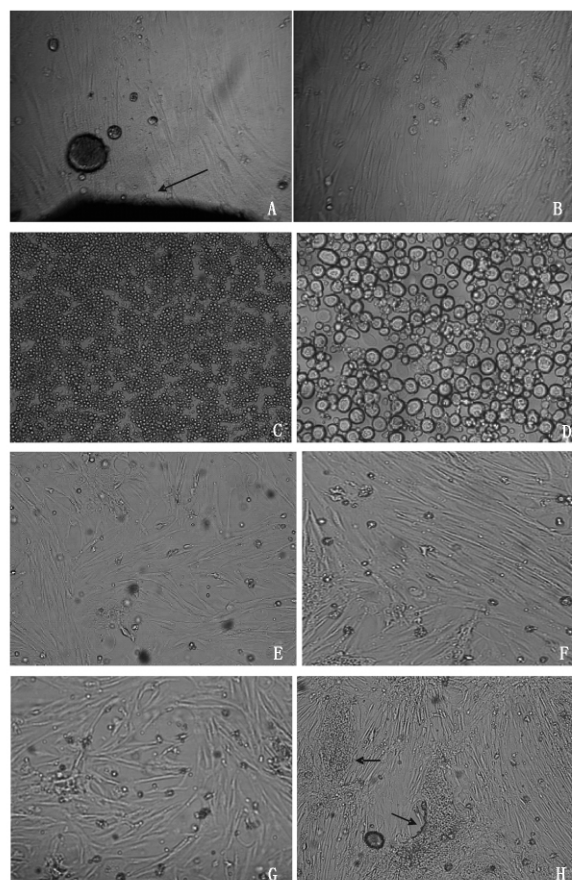
鲫鱼肝细胞培养 8 d 后即可传代,传代后的细胞难以贴壁,目前传至第二代,需进一步研究。

3 讨论

3.1 细胞除菌处理和杂细胞的去除

无菌处理是细胞培养中关键的一步,本试验中,在解剖前用 0.01% (W/V) 高锰酸钾浸泡鱼体 30 min,然后再用 75% 酒精浸泡 1 min,除去体表菌类并可麻醉鱼体。肝脏内有大量的血管分布,因此在分离肝细胞时不可避免地有大量的血细胞。血细胞和其他组织碎片对肝细胞的培养有一定影响。Christina 等^[21]通过 50 g/min 离心纯化虹鳟肝细胞;喻文娟等^[22]通过 500 r/min 离心 5 min 可将大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)肝细胞沉淀下来,并反复 2~3 次可获得较纯化的肝细胞;Khan 等^[23]将鲶鱼

肝细胞 100 g/min 离心 2 次进行分离纯化。本试验先用含有双抗和两性霉素的冷 D-PBS 将肝组织清洗 3 次,胰酶消化后的肝细胞通过 3 次低速离心对肝细胞进行纯化,取得了较好的效果。



A. 5 d 后组织块中迁出的细胞, $\times 200$ (\rightarrow) 表示组织块; B. 14 d 后组织块培养中细胞形态, $\times 200$; C, D. 新鲜分离的单个鲫鱼肝细胞, $\times 100$ 和 $\times 400$; E. 48 h 后细胞贴壁形态, $\times 200$; F. 96 h 后细胞形态, $\times 200$; G. 第 7 天细胞形态, $\times 200$; H. 第 13 天细胞形态 $\times 200$ (\rightarrow) 表示细胞脱落、坏死。

图 5 鲫鱼肝细胞不同时期形态观察

Fig. 5 Morphological changes of *micropterus salmoides* hepatocytes in different culture periods

3.2 分离方法

哺乳动物肝细胞分离方法一般采用传统的二步灌流法^[24]。1979 年, Walton and Cowey^[25]首次将二步灌流法应用于鱼类肝细胞的分离并成功地分离了虹鳟肝细胞。目前二步灌流法已广泛应用于鱼类肝细胞的分离, 鳊鱼^[26]、罗非鱼^[27]、鲤鱼^[28]等肝细胞均用此方法分离, 其平均数量为 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ 个/每克肝重, 台盼蓝染色, 存活率为 85%^[29]。但这种方法需要灌注机, 消耗大量的胶原酶, 操作复杂, 肝脏较大的鱼类(如虹鳟、鳊鱼)可用这种方法, 而有的鱼类则因其被解剖的部位结构细小, 不易用此种方法。目前, 有些研究中用酶消化法代替灌流法, 如 Faisal 等^[30]利用酶消化法成功地进行了叉尾石首鱼(*Leiostomus xanthurus*)肝细胞的分离。酶消化法不

需要特殊的设备,其收集细胞数量为 10^8 个左右每克肝重,存活率相对较低^[31]。但 Fan 等^[28]用改良的胰蛋白酶消化法收集鲤鱼肝细胞,其存活率为 98.4%,存活率大于灌流法。另外一种分离方法为机械分散法,这种方法收集的细胞数量大约为 10^5 个每克肝重,存活率为 78.3%^[32]。本试验采取胰蛋白酶消化法,获得良好的分离效果,而机械分散法分离的细胞数量少,存活率低。

组织块法是最简单的细胞分离和培养方法,常用于分离易分裂增殖的细胞,并建立细胞系^[33]。目前,这种方法已用于几种海水鱼类肝细胞的分离与培养。研究表明,花鲈(*Lateolabrax japonicus*)肝细胞从组织块中迁出并铺满培养瓶底部需要 2~3 周,细胞主要为成纤维状细胞^[34];半滑舌鲷(*Cynoglossus semilaevis* Gunther)肝细胞从组织块中迁出需 2~3 d,细胞形态多呈纤维状,通过传代培养可建立细胞系^[35]。但此方法成功用于淡水鱼类肝细胞分离与原代培养的报道还很少见。对大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)^[22]和中华鲟^[36](*Acipenser Sinensis Grap*)的研究发现细胞不能从肝组织块中迁出;Salvo 等^[37]对鲁氏银板鱼(*Metynnis roosevelti*)肝细胞培养发现,组织块法培养的肝细胞在第 21 天只铺满瓶底 70%,且细胞活力低,不易传代。本研究发现,鲫鱼来源会影响细胞迁出的时间,100 g 左右的池塘饲喂鱼肝细胞从组织块中迁出需要 7~8 d,而同样大小的野生鱼只需 3~4 d。而取 500 g 左右的池塘饲喂鲫鱼肝脏进行组织块法培养,观察 14 d,未见细胞迁出,由此可见,肝细胞活力可能也与鱼体大小有关。本试验中,从组织块中迁出的单层细胞多呈纤维状,可覆盖培养瓶底部,但消化传代后细胞不贴壁,无法应用于下一步的研究,需进一步探索。

3.3 培养方法

研究发现鱼类肝细胞由于存活率低,不适合悬浮培养^[13]。因此,鱼类肝细胞培养大多采取单层细胞贴壁培养技术。对虹鳟、鳊鲃、鲤鱼的研究表明,细胞接种后 12~24 h 贴壁。单层培养要受到培养皿环境的影响^[38],斑点叉尾鮰和虹鳟肝细胞贴壁率只有 50%,14 d 其活力分别 40.2% 和 63.4%^[12,39]。为了改善细胞贴壁环境,提高细胞接种率,通常在细胞培养板底部涂一层基质或者用 Falcon Primaria 培养板^[40]。在对鲤鱼肝细胞培养发现,培养板底部涂一层明胶,有利于细胞更好的贴壁^[28];Koban 等^[41]用鲢鱼肝脏基质覆盖细胞培养板底部,可使鲢鱼肝细胞培养 20 d 以上;Blairb 等^[38]发现,在培养皿底部涂一层鱼皮肤提取物,使得虹鳟鱼肝细胞贴壁数

量明显增多。

另一方面细胞的生长受血清、培养基和其他添加物的影响,由于培养基添加的血清中含有各种含量不稳定的生长因子、激素等有助细胞生长的物质,因此,血清浓度会影响细胞贴壁和生长。Segner^[16]研究结果显示,虹鳟鱼肝细胞在无血清的培养基中可很好的贴壁并存活 5~8 d,随着培养时间的增长,其存活率逐渐下降;适量浓度的血清可以促进虹鳟鱼肝细胞雌激素受体和卵黄蛋白原的表达,从而提高细胞活力^[42];但血清浓度过高会抑制细胞贴壁^[27],降低肝细胞的存活^[43],可能是由于血清中含有某些特定的脂质成分,引起细胞膜组成的改变或脂质的堆积,导致细胞活力的下降^[44,45]。研究还表明虹鳟原代肝细胞在含 10% FCS 的培养基中细胞存活率要高于含 1%、5%、20% FCS 的培养基^[13],这和本试验结果相似。不同鱼的肝细胞对血清的需求也有差别,如尼罗罗非鱼^[27]、鲤鱼^[28]和大口黑鲈^[22]分别在含 5%、10% 和 20% FCS 的培养基中很好的生长。

在鱼类肝细胞研究中显示,培养基不同会影响肝细胞的增殖。Fan 等^[28]以鲤鱼肝细胞为研究对象,比较 3 种培养基(DMEM、M199 和 L-15)对肝细胞增殖的影响,结果表明 M199 和 L-15 培养基最适合鲤鱼肝细胞的生长;余文娟等^[22]也报道大口黑鲈肝细胞在 M199/L-15 培养基中的生长状况明显好于 WillimaE's 和 DMEM/F12 培养基,可能原因是 M199 和 L-15 培养基中氨基酸含量较高可刺激蛋白质的合成、降低蛋白质的降解^[46];在虹鳟和罗非鱼肝细胞培养时很多研究者倾向于 M199 培养基^[47,48]。

本试验中, M199 培养基对鲫鱼肝细胞培养效果好于 DMEM 培养基。血清浓度即影响细胞的贴壁,也影响细胞的生长,5% 和 10% 的 FCS 对细胞的贴壁最有利,10% 的 FCS 最适合细胞培养。

参考文献:

- [1] 张训蒲,朱伟义.普通动物学[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [2] Probst I, Schwartz P, Jungermann K. Induction in primary culture of gluconeogenic and glycolytic hepatocytes resembling periportal and perivenous cells[J]. European Journal of Biochemistry, 1982, 126(2): 271-278.
- [3] Tanaka K, Sato M, Tomita Y et al. Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats[J]. Journal of Biochemistry, 1978, 84(4): 937-938.

- [4] Gerson R J ,Shaikh Z A. Uptake and binding of cadmium and mercury to metallothionein in rat hepatocyte primary cultures [J]. *Biochemical Journal* ,1982 ,208(2) : 465 – 469.
- [5] Pesonen M ,Andersson T B. Fish primary hepatocyte culture; An important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies [J]. *Aquatic Toxicology* ,1997 ,37(2 – 3) : 253 – 267.
- [6] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社 2001.
- [7] Baksi S M ,Frazier J M. Isolated fish hepatocytes-model systems for toxicology research. [J]. *Aquatic Toxicology* , 1990 ,16(4) : 229 – 256.
- [8] 左文功. 淡水鱼类细胞培养方法 [J]. *淡水渔业* ,1991 , 2: 37 – 40.
- [9] 于 淼,管华诗,郭华荣,等. 鱼类细胞培养及其应用 [J]. *Marine Sciences* 2003 ,27(3) : 4 – 8.
- [10] Birnbaum M J ,Schultz J ,Fain J N. Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes [J]. *American Journal of Physiology-Legacy Content* ,1976 ,231 (1) : 191 – 195.
- [11] Moon T W ,Walsh P J ,Mommensen T P. Fish hepatocytes: a model metabolic system [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* ,1985 ,42(11) : 1772 – 1782.
- [12] Klaunig J E. Establishment of fish hepatocyte cultures for use in in vitro carcinogenicity studies [J]. *National Cancer Institute Monograph* ,1984 ,65: 163 – 168.
- [13] Klaunig J E ,Ruch R J ,Goldblatt P J. Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* ,1985 ,21(4) : 221 – 228.
- [14] Braunbeck T ,Segner H. Isolation and cultivation of teleost hepatocytes [J]. *The Hepatocyte Review* 2000: 49 – 72.
- [15] Mommensen T P ,Moon T W ,Walsh P J. Hepatocytes: isolation ,maintenance and utilization [J]. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* ,1994 ,3: 355 – 373.
- [16] Segner H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* ,1998 ,120(1) : 71 – 81.
- [17] 孟祥林,丁庆秋. 鱼类肝胆综合症的发病原因及防治方法 [J]. *水利渔业* 2004 ,24(003) : 65 – 65.
- [18] R Bergh C M I ,Lipsky M M. Toxicity of chloroform and carbon tetrachloride in primary cultures of rainbow trout hepatocytes [J]. *Aquatic Toxicology* ,1997 ,37(2 – 3) : 169 – 182.
- [19] Fent K. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity ,cytochrome p4501a induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples [J]. *Toxicology in Vitro* ,2001 ,15(4 – 5) : 477 – 488.
- [20] Hayashi S ,Ooshiro Z. Primary culture of the eel hepatocytes in the serum-free medium [J]. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* ,1986 ,52(9) : 1641 – 1651.
- [21] Ferraris M ,Radice S ,Catalani P ,et al. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study [J]. *Aquatic Toxicology* ,2002 ,59(3 – 4) : 283 – 296.
- [22] 喻文娟,杨先乐,唐 俊,等. 大口黑鲈肝细胞原代培养方法的建立 [J]. *上海水产大学学报* ,2006 ,15 (004) : 430 – 435.
- [23] Khan E A ,Dasmahapatra A K ,Ghosh R. Evaluation of edta and fish skin extract in primary culture of fish liver cells [J]. *Methods in Cell Science* ,1997 ,19(3) : 153 – 159.
- [24] Berry M N ,Edwards A M ,Barritt G J ,et al. Isolated hepatocytes: preparation ,properties and applications [J]. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* ,1991 ,21(1) : 433 – 439.
- [25] Walton M J ,Cowey C B. Gluconeogenesis by isolated hepatocytes from rainbow trout *salmo gairdneri* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* ,1979 ,62(1) : 75 – 79.
- [26] Hayashi S ,Ooshiro Z. Primary culture of the freshly isolated liver cells of the eel [J]. *Bull Japan Soc Sci Fish* , 1985 ,51: 765 – 771.
- [27] Jung J O ,Mitema E S ,Gutzeit H O. Establishment and comparative analyses of different culture conditions of primary hepatocytes from nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as a model to study stress induction in vitro [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* , 2005 ,41(1) : 1 – 6.
- [28] Yanhong F ,Chenghua H ,Guofang L ,et al. Optimization of the isolation and cultivation of cyprinus carpio primary hepatocytes [J]. *Cytotechnology* 2008 ,58(2) : 85 – 92.
- [29] Ferraris M ,Radice S ,Catalani P ,et al. Early oxidative damage in primary cultured trout hepatocytes: a time course study [J]. *Aquatic Toxicology* ,2002 ,59(3 – 4) : 283 – 296.
- [30] Faisal M ,Rutan B J ,Sami-Dezmerle S. Development of continuous liver cell cultures from the marine teleost , spot (*leostomus xanthurus* pisces: sciaenidae) [J]. *Aquaculture* ,1995 ,132(1 – 2) : 59 – 72.
- [31] 梁 岳,马广智,方展强. 剑尾鱼肝细胞原代培养 [J]. *中国比较医学杂志* 2006 ,16(3) : 185 – 187.
- [32] Braunbeck T ,Segner H. Isolation and cultivation of teleost hepatocytes [J]. *The Hepatocyte Review* 2000 ,49 – 72.

- [33] 谭凤霞. 三株鱼类细胞系的建立和十二株鱼类细胞系对重金属毒性的敏感性研究[D]. 武汉: 华中农业大学 2008.
- [34] Ye H Q ,Chen S L ,Sha Z X ,*et al.* Development and characterization of cell lines from heart ,liver ,spleen and head kidney of sea perch *lateolabrax japonicus* [J]. *Journal of Fish Biology* 2006 ,69: 115 – 126.
- [35] 任国诚. 几种重要海水养殖鱼类细胞系的建立、鉴定及应用[D]. 青岛: 中国海洋大学 2007.
- [36] 叶湘辉,刘汉勤,俞小牧. 中华鲟组织培养的初步研究[J]. *水生生物学报* ,1999 ,23(6) : 566 – 571.
- [37] Salvo L M ,Malucelli M I C ,Richartz R R T B ,*et al.* Primary culture of hepatic cells from metynnis roosevelti (pisces ,teleostei ,characidae) [J]. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2000 ,37(5) : 10 – 16.
- [38] Blair J B ,Miller M R ,Pack D ,*et al.* Isolated trout liver cells: establishing short-term primary cultures exhibiting cell-to-cell interactions [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* ,1990 ,26(3) : 237 – 249.
- [39] Klaunig J E ,Ruch R J ,Goldblatt P J. Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* ,1985 ,21(4) : 221 – 228.
- [40] Duan C ,Hanzawa N ,Takeuchi Y ,*et al.* Use of primary cultures of salmon hepatocytes for the study of hormonal regulation of insulin-like growth factor i expression in vitro [J]. *Zoological Science* ,1993 ,10(3) : 473 – 480.
- [41] Koban M. Can cultured teleost hepatocytes show temperature acclimation? [J]. *American Journal of Physiology-Regulatory , Integrative and Comparative Physiology* , 1986 ,250(2) : R211.
- [42] Flouriot G ,Vaillant C ,Salbert G ,*et al.* Monolayer and aggregate cultures of rainbow trout hepatocytes: long-term and stable liver-specific expression in aggregates [J]. *Journal of Cell Science* ,1993 ,105(2) : 407 – 413.
- [43] Braumbeck T ,Storch V. Senescence of hepatocytes isolated from rainbow trout (*oncorhynchus mkiss*) in primary culture: an ultrastructural study [J]. *Protoplasma* ,1992 , 170(3 – 4) : 138 – 159.
- [44] Haschemeyer A E V ,Mathews R W. Temperature dependency of protein synthesis in isolated hepatocytes of antarctic fish [J]. *Physiological Zoology* ,1983 ,56(1) : 78 – 87.
- [45] Tocher D R ,Sargen J R ,Frerichs G N. The fatty acid compositions of established fish cell lines after long-term culture in mammalian sera [J]. *Fish Physiology and Biochemistry* ,1988 ,5(4) : 219 – 227.
- [46] 张莉萍,康格非. 原代肝细胞培养的研究现状[J]. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册* ,2004 ,25(3) : 193 – 196.
- [47] Pesonen M ,Andersson T. Characterization and induction of xenobiotic metabolizing enzyme activities in a primary culture of rainbow trout hepatocytes [J]. *Xenobiotica* , 1991 ,21(4) : 461 – 471.
- [48] Pawlowski S ,Islinger M ,Völkl A ,*et al.* Temperature-dependent vitellogenin-mrna expression in primary cultures of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) hepatocytes at 14 and 18°C [J]. *Toxicology in Vitro* 2000 ,14(6) : 531 – 540.