

罗非鱼腹腔巨噬细胞分离与培养

王秋华^{1,2}, 陈明^{1,2}, 黄维义¹, 王瑞²,
李莉萍², 甘西², 雷爱莹², 黄均¹, 梁万文²

(1. 广西大学 动物科学技术学院 广西 南宁 530005; 2. 广西水产研究所 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室 广西 南宁 530021)

摘要: 为获得罗非鱼腹腔巨噬细胞体外分离培养条件和培养形态特征, 试验在不同饲养温度和时间点注射角鲨烯的奥尼罗非鱼进行腹腔巨噬细胞分离; 通过培养基血清筛选和瑞氏染色对分离的巨噬细胞进行了体外培养及其形态观察。结果表明, 19~25℃ 饲养温度有利于腹腔巨噬细胞分离, 大于 28℃ 对分离效果有明显影响; 注射角鲨烯后 48~72 h 是分离腹腔巨噬细胞最佳时期; 体外培养显示自体血清有利于罗非鱼腹腔巨噬细胞的存活与生长, 胎牛血清不适于罗非鱼腹腔巨噬细胞培养。同时, 罗非鱼腹腔巨噬细胞体外培养具有哺乳动物巨噬细胞相似特征, 形态不规则、核浆比值低、贴壁生长、可形成多核巨大细胞。为下一步研究罗非鱼腹腔巨噬细胞免疫学功能奠定了基础。

关键词: 罗非鱼; 腹腔巨噬细胞; 分离; 培养

中图分类号: S965.125 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)增刊-0224-05

Separation and Cultivation of Tilapia Peritoneal Macrophage

WANG Qiu-hua^{1,2}, CHEN Ming^{1,2}, HUANG Wei-yi¹, WANG Rui², LI Li-ping², GAN Xi²,
LEI Ai-ying², HUANG Jun¹, LIANG Wan-wen²

(1. Institute of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Key Laboratory for Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture of Guangxi, Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China)

Abstract: In order to study factors that influence the separation and culture of tilapia peritoneal macrophages, and to recognition the characteristic of tilapia peritoneal macrophages. In the study, We separated macrophages from peritoneal cavity of Tialpia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus* ♂) after intraperitoneal injected with squalene in the condition of difference growth temperature; The cell characteristic was observed by screening cell medium and Wright's staining. The results show the macrophages were easily obtained in the condition of 19~25℃, Separation result was obviously affected when water temperature was aboved 28℃; It was a optimization period for separation between 48~72 h after injected squalene; Serum of tilapia play an important role in the tilapia peritoneal macrophages invitro cultrue and fetal bovine serum was not fit; The characteristic of tilapia peritoneal macrophage was similar to mammalian macrophage, irregularly shaped with a low nucleus to cytoplasm ratio, adherent to plastic and glass, able to form multi-nucleated giant. The work laid a foundation for the further research of immunological function about tilapia peritoneal macrophage.

Key words: Tilapia; Peritoneal macrophages; Separation; Cultivation

鱼类巨噬细胞与哺乳动物类似, 在识别、吞噬外来病原微生物、处理和呈递抗原、激活淋巴细胞启动特异性免疫应答以及分泌免疫因子等方面发挥重要

作用^[1-2]。巨噬细胞活性与功能是反映和评价鱼类免疫水平的重要指标, 其活性与功能测定已成为鱼类免疫学、鱼类免疫药物筛选、鱼类环境与免疫毒理

收稿日期: 2011-10-22

基金项目: 广西科学研究与技术开发课题(桂科攻1123006-4); 国家罗非鱼产业技术体系岗位科学家经费

作者简介: 王秋华(1981-), 女, 广西合浦人, 助理研究员, 硕士, 主要从事水生生物病害研究。王秋华和陈明为并列第一作者。

陈明(1979-), 男, 湖南新晃人, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事水产疫苗与免疫技术研究。

通讯作者: 黄均(1957-), 男, 广西北流人, 副教授, 主要从事水生生物病害研究。

梁万文(1961-), 男, 广西北流人, 研究员, 主要从事水生生物病害研究。

学等研究的重要内容^[3,4]。Miodrag Belosevic 等^[5]在 20 世纪 90 年代从金鱼前肾中分离巨噬细胞建立金鱼巨噬细胞系,经鉴定,该巨噬细胞形态、细胞化学及功能与哺乳动物巨噬细胞相似,具有哺乳动物巨噬细胞特点。近年来,鱼类巨噬细胞体外免疫功能指标已得到广泛研究,如吞噬活性、趋化性、产生活性氧及 NO 等,但大部分研究对象主要为鲈鱼、鲟鱼、鳙鱼、鲤鱼等^[6-9]。罗非鱼是世界水产业重点培养淡水养殖鱼类,在水产养殖业中占重要地位,有关罗非鱼品种改良研究较多,而对罗非鱼细胞免疫活性相关研究较少。本研究主要通过分离罗非鱼腹腔巨噬细胞,摸索不同条件下的分离与培养效果、体外培养特征,为进行罗非鱼细胞免疫学相关研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验鱼及试验分组

试验前 7 d 从试验网箱中挑选体重为 (65 ± 5) g 健康雄性奥尼罗非鱼(奥利亚罗非鱼 ♂ × 尼罗罗非鱼 ♀)转入可控温、充气水族箱中饲养,正常喂食,每尾腹腔注射 250 μ L 角鲨烯(Squalene)。分离细胞前一天停止喂食。

1.2 试剂

HBSS(GIBCO)、PBS(NaCl 8.00 g、KCl 0.20 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.56 g、 KH_2PO_4 0.20 g 加三蒸水至 1 L,调节 pH 值至 6.8)、角鲨烯(Squalene)(Sigma)、MS-222(Sigma)、L-15 培养基(GIBCO)、胎牛血清(FBS)(GIBCO)、台盼蓝染色液(Sigma)。

1.3 试剂配制

PBS:称取 NaCl 8.00 g、KCl 0.20 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.56 g、 KH_2PO_4 0.20 g 加三蒸水至 1 L 溶解,调节 pH 值至 6.8,0.22 μ m 滤膜过滤除菌;罗非鱼血清:取约 1.5 kg 的罗非鱼,尾静脉采血,置于离心管中室温放置 1 h,4℃ 放置 4 h,1 000 g 4℃ 离心 20 min,吸取血清,56℃ 灭活 30 min,1 000 g 4℃ 离心 20 min,0.22 μ m 滤膜过滤除菌,分装保存于 -20℃。

1.4 腹腔巨噬细胞分离

在注射 Squalene 后相应试验时间点,使用 100 mg/L 的 MS-222 对试验鱼进行麻醉,75% 酒精消毒体表。用预冷的 PBS 通过三通阀对腹腔进行冲洗,冲洗液收集于 45 mL 离心管中,300 g、4℃ 离心 10 min。吸去上清,细胞沉淀用 HBSS 重悬,300 g、4℃ 离心 10 min 洗涤一次。细胞重悬于 2 mL HBSS,加入 9 mL 灭菌三蒸水作用 20 s 破裂红细胞,立即加入 1 mL 10 × HBSS,300 g、4℃ 离心 10 min,HBSS

洗涤 2 次,最后用 L-15 培养基重悬细胞,进行适当稀释后台盼蓝染色,计算活细胞数,瑞氏染色观察细胞状态。

1.5 腹腔巨噬细胞培养

分别用含 5×10^{-5} μ mol/L β -巯基乙醇、100 IU/mL 氨苄青霉素、100 μ g/mL 硫酸链霉素的 10% 鱼血清/(10% FBS)/(5% 鱼血清 + 5% FBS) 的 L-15 培养基调整细胞密度约为 1×10^6 个/mL,吸取 100 μ L 细胞悬液,加于 96 孔板中,28℃ 培养 24 h 后吸去悬浮细胞,加入新培养基继续培养。

1.6 罗非鱼腹腔巨噬细胞体外培养特征观察

在不同培养时间,吸去培养上清,加入 40 μ L 瑞氏染色液 A,静置 1 min,加入 B 液 80 μ L,静置 5 ~ 10 min,吸去培养孔中染液,PBS 洗涤 2 次,倒置显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 罗非鱼巨噬细胞形态特征

罗非鱼腹腔巨噬细胞与哺乳动物巨噬细胞形态相似,瑞氏染色,细胞体积大,胞核偏离细胞中心,为紫蓝色;胞浆较多,呈淡蓝色,如图 1 所示。

2.2 水温对腹腔巨噬细胞分离的影响

试验中分别对 19、21、25、28、33℃ 饲养的奥尼罗非鱼,注射 Squalene 48 h 后进行分离腹腔巨噬细胞。结果表明,低水温试验组获得的细胞量多于高水温试验组。试验中饲养水温从低到高每尾鱼分离的细胞数量范围分别为: $2.9 \times 10^6 \sim 6.5 \times 10^6$, $3.85 \times 10^6 \sim 7.7 \times 10^6$, $3.64 \times 10^6 \sim 1.45 \times 10^7$, $6.0 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^6$, $3.7 \times 10^5 \sim 3.9 \times 10^6$ 。

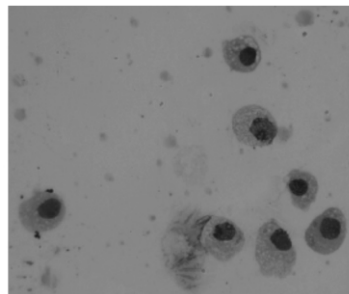


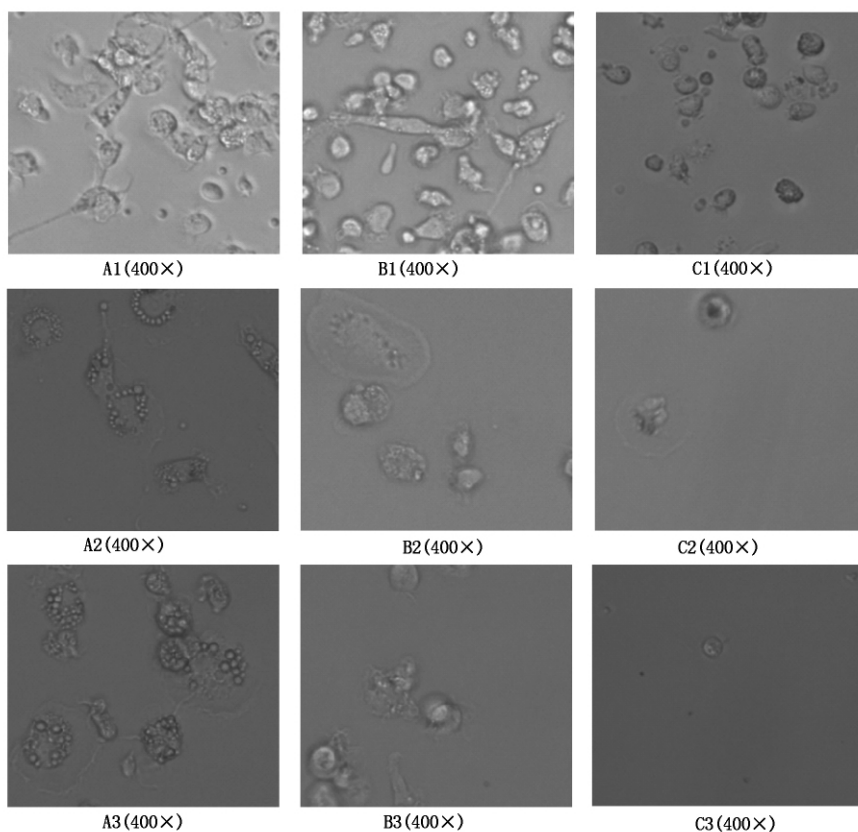
图 1 腹腔分离巨噬细胞瑞氏染色形态(1 000 ×)

Fig.1 Morphological of peritoneal cavity by Wright's staining(1 000 ×)

2.3 注射 Squalene 后不同时间对巨噬细胞分离的影响

试验中取水温为 25℃ 饲养的奥尼罗非鱼,分别在注射 Squalene 后 24、48、72、96、120 h 进行腹腔巨噬细胞分离。结果表明,在注射 Squalene 后 48 ~ 72 h 分离,每尾鱼获得细胞数量级可达到 10^6 以上,96 h 后

细胞数量则变少,每尾鱼获得细胞数量级为 10^5 。



A1 ,A2 ,A3. 为添加 10% 罗非鱼血清培养 3 24 48 h 的细胞; B1 ,B2 ,B3. 为添加 5% FBS +5% 罗非鱼血清培养 3 24 48 h 的细胞; C1 ,C2 ,C3. 为添加 10% FBS 培养 3 24 48 h 的细胞。

A1 ,A2 ,A3. Cell characteristic after culture 3 24 48 h in medium contain 10% tilapia serum; B1 ,B2 ,B3. Cell characteristic after culture 3 24 48 h in medium contain 5% tilapia serum and 5% ; C1 ,C2 ,C3. Cell characteristic after culture 3 24 48 h in medium contain 10% FBS.

图 2 含不同血清成分的培养基培养腹腔巨噬细胞(400 ×)

Fig2 Characteristic of peritoneal macrophages in difference serum medium(400 ×)

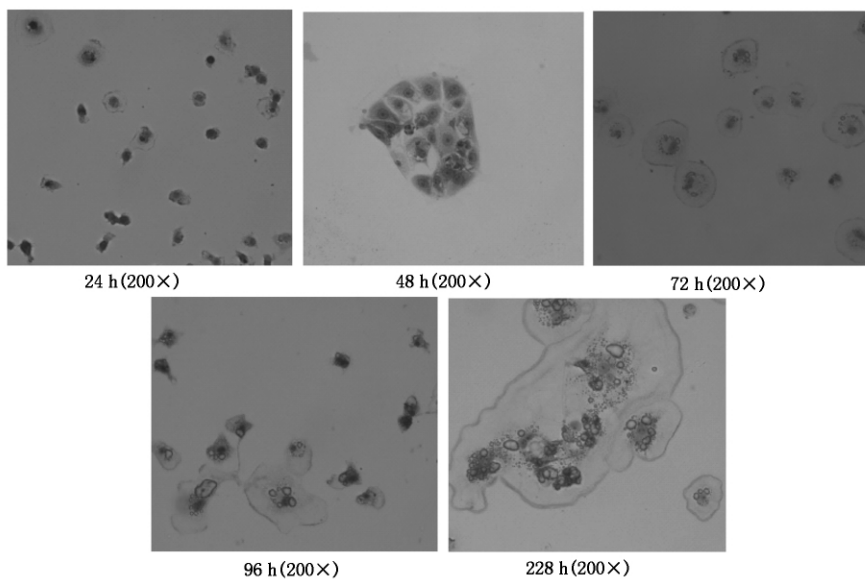


图 3 腹腔巨噬细胞体外培养不同时间点瑞氏染色(200 ×)

Fig. 3 Morphological of peritoneal cavity by Wright's staining at difference culture time(200 ×)

2.4 血清对罗非鱼巨噬细胞培养的影响

把同一尾奥尼罗非鱼腹腔巨噬细胞分 3 份,分别用含 5×10^{-5} $\mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇、100 IU/mL 氨

苄青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸链霉素的 10% 鱼血清 / (10% FBS) / (5% 鱼血清 + 5% FBS) L-15 培养基培养。培养 3 h 后显微镜下观察,含 10% 鱼血清组,已

有大部分细胞贴壁; 5% 鱼血清 + 5% FBS 组有部分细胞贴壁; 10% FBS 组只见极少数细胞贴壁, 而且大部分细胞变圆。培养 24 h 吸去培养上清, 加入新的培养基, 可见 10% 鱼血清组细胞体积增大, 呈不规则形态, 如星形、梭形、放射状, 细胞内可见到透亮空泡聚集; 5% 鱼血清 + 5% FBS 组细胞生长不良; 10% FBS 组大部分细胞死亡溶解, 贴壁细胞极少。培养 48 h, 10% 鱼血清组细胞体积显著增大, 成片生长、空泡增多增大; 5% 鱼血清 + 5% FBS 组贴壁细胞大部分脱落, 仅见少数贴壁; 10% FBS 组细胞几乎全部死亡, 如图 2 所示。

2.5 巨噬细胞体外培养特征

分别在培养后各时间点对贴壁细胞进行瑞氏染色, 结果显示, 细胞培养 24 h 后胞膜呈伸展状态, 体积增大。培养 48 h 巨噬细胞生长迅速, 胞核可见 2 个或 3 个核仁。72 h 后细胞体积增大显著, 细胞核周围空泡明显。培养 96 h 后胞核周围空泡体积增大, 邻近细胞接触融合生长明显, 包膜分界不清、空泡多。随培养时间延长, 细胞内空泡逐渐增多, 融合生长的细胞体积显著增大, 如图 3 所示。

3 讨论

目前在所报道鱼类巨噬细胞研究中, 巨噬细胞主要从头肾、脾脏获得, 而腹腔分离鱼类巨噬细胞的报道较为少见。通常为了获得充足的腹腔巨噬细胞, 采用注射刺激剂的方法, 使机体产生大量巨噬细胞后进行腹腔灌洗。本研究参考 Klesius P H 等^[10]采用角鲨烯作为激活剂, 其具有增加血液白细胞数量, 提高机体免疫力功能, 同时能诱导血液中单核细胞进入腹腔转化为巨噬细胞并使腹腔内巨噬细胞聚集, 试验中角鲨烯对腹腔巨噬细胞数量增加起双重作用。本试验分离获得的奥尼罗非鱼巨噬细胞形态不规则、具有伪足、贴壁生长、瑞氏染色细胞体积大, 胞浆多, 胞核偏离细胞中心, 具有典型巨噬细胞特征。

水温是鱼类生长环境重要指标之一, 水温变化对鱼类正常生长影响较大。不少学者研究环境胁迫对鱼类免疫系统影响表明温度对鱼体特异性免疫功能影响不容忽视。Hrubec 等^[11]报道, 于 10℃ 和 18℃ 条件下, 狼鲈对杀鲑气单胞菌 *A. salmonicida* 抗体反应在发生时间上延迟, 反应程度也有所下降; 在高于其最适温度 (29℃), 抗体反应则不受影响。Morvan 等^[12]报道低温 (12 ± 0.5)℃, 鲶鱼非特异性细胞毒细胞 (NCC) 活性增强, 而抗体生成减少, 表明低温条件下, 鲶鱼特异性免疫功能虽受抑制, 但非

特异性免疫功能却代偿性增强。罗非鱼适宜生长温度为 20 ~ 35℃, 最佳生长温度为 28 ~ 32℃, 研究中, 取不同水温饲养的奥尼罗非鱼, 分离腹腔巨噬细胞, 结果显示低温 (19 ~ 25℃) 饲养更易获得数量较多的巨噬细胞, 此结果与报道低温下鱼类非特异性免疫功能代偿性增强或许具有一定相关性。大部分研究表明单核细胞于血液中停留 2 ~ 3 d 后则迁移至周边组织, 本试验分离注射角鲨烯 48 ~ 72 h 后的奥尼罗非鱼, 获得较理想的巨噬细胞, 进一步证实鱼类白细胞分化发育过程与哺乳动物类似。因此, 为获得最佳的巨噬细胞, 可于罗非鱼适宜生长温度范围内低温饲养及腹腔注射刺激剂 2 ~ 3 d 内进行分离。

血清是细胞体外培养中使用最多最广的天然培养基, 其对动物细胞体外培养起重要作用, 不同种属动物细胞培养所需血清来源不尽相同。有报道表明鱼类细胞体外培养, 需添加适量同种鱼类血清^[13, 14], 而 Klesius P H 等^[10]在链球菌胞外产物对罗非鱼巨噬细胞趋化性影响研究中使用含有马血清的培养基。本研究中, 奥尼罗非鱼巨噬细胞于含 10% 罗非鱼血清的培养基中生长良好, 胎牛血清的培养基细胞出现死亡, 通过该研究可进一步证实同类血清的添加在鱼类细胞体外培养起重要作用, 胎牛血清不适用于罗非鱼巨噬细胞体外培养。

本研究分离获得的大部分腹腔巨噬细胞形态不规则, 与 Miodrag Belosevic 等^[5]描述的 R2 型巨噬细胞类似。巨噬细胞培养 24 h 后贴壁完全, 培养 48 h 后可见生长迅速, 胞核中有 2 个或 3 个核仁, 表明该时期细胞蛋白质合成旺盛, 培养 72 h 后瑞氏染色, 可明显见到核周围未着色空泡, 该现象可能与巨噬细胞产生活性氧有关。巨噬细胞生长过程中发生呼吸爆发 (Respiratory burst) 并制造大量胞毒活性氧 (ROIs), ROIs 包括 O_2^- 、 H_2O_2 等, 由于呼吸爆发时 O_2 的摄入量增加, O_2 在结合于细胞膜上的 NADPH 氧化酶的催化下被还原为 O_2^- , O_2^- 进一步被胞质超氧化物歧化酶 (SOD) 催化生成 H_2O_2 , H_2O_2 则可进一步转化成羟自由基 (OH^\cdot) 和单线态氧 (1O_2) 等。同时由于 O_2^- 和 H_2O_2 等的化学性质十分活泼, 极易对生物大分子如核酸、蛋白质、膜脂等发生氧化反应, 破坏其结构与功能, 因此构成了巨噬细胞胞内强力杀菌系统的基础^[15]。本研究建立了奥尼罗非鱼腹腔巨噬细胞培养体系, 对奥尼罗非鱼腹腔巨噬细胞体外生长特征进行观察, 为进行罗非鱼细胞免疫学相关研究奠定基础, 并为其他鱼类细胞体外研究提供参考。

参考文献:

- [1] Secombes C J. Macrophage activation during experimental allergic orchitis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Dev Com Immunol, 1986, 10: 539 – 546.
- [2] Weeks B A, Ellis A E. Chemotactic responses of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages to virulent and attenuated strains of *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 1995, 5: 313 – 323.
- [3] Haaparanta A, Valtonen E T, Hoffmann R *et al*. Do macrophage centers in freshwater fishes reflect the differences in water quality [J]. Aquat Toxicol, 1996, 34(3): 253 – 272.
- [4] Weeks B A, Warinner J E, Mason P L *et al*. Influence of toxic chemicals on the chemotactic response of fish macrophages [J]. Fish Biol, 1986, 28(5): 653 – 658.
- [5] Belosevic M, Haningtona P C, Barreda D R. Development of goldfish macrophages in vitro [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20: 152 – 171.
- [6] Enane N A, Frenkel K, O' Connor J M *et al*. Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes [J]. Immunology, 1993, 80: 68 – 72.
- [7] Hardie L J, Ellis A E, Secombes C J. In vitro activation of rainbow trout macrophages stimulates inhibition of *Renibacterium salmoninarum* growth concomitant with augmented generation of respiratory burst products [J]. Dis Aquat Organ, 1996, 25: 175 – 83.
- [8] Neumann N F, Fagan D, Belosevic M. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leucocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages [J]. Dev Comp Immunol, 1995, 19: 473 – 82.
- [9] Tafalla C, Novoa B. Requirements for nitric oxide production by turbot (*Scophthalmus maximus*) head kidney macrophages [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24: 623 – 31.
- [10] Klesius P H, Evans J, Shoemaker C A. The macrophage chemotactic activity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* extracellular products (ECP) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22: 443 – 450.
- [11] Hrubec T C, Robertson J L, Smith S A *et al*. The effect of temperature and water quality on an antibody response to *aeromonas salmonicida* in sunshine bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*) [J]. Vet Immunol Immunopathol, 1996, 50(1/2): 157 – 166.
- [12] Morvan C L, Deschaux P, Troutaud D. Effects and mechanisms of environmental temperature on carp (*Cyprinus carpio*) anti-DNP antibody response and non-specific cytotoxic cell activity: a kinetic study [J]. Dev Comp Immunol, 1996, 20(5): 331 – 340.
- [13] Neumann N F, Barreda D, Belosevic M. Production of a macrophage growth factor(s) by a goldfish macrophage cell line and macrophages derived from goldfish kidney leukocytes [J]. Developmental and Comparative Immunology, 1998, 22(4): 417 – 432.
- [14] Grayfer L, Walshe J G, Belosevic M. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor- α [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2008, 32: 532 – 543.
- [15] 项黎新, 孟真, 邵健忠. 草鱼巨噬细胞活化的生理生化指标研究 [J]. 浙江大学学报: 理学版, 2002, 29(4): 499 – 453.