

# 鱼类肝细胞分离、原代培养 与应用研究综述

贾睿<sup>1,2</sup>, 曹丽萍<sup>2</sup>, 丁炜东<sup>2</sup>, 杜金梁<sup>2</sup>, 徐跑<sup>1,2\*</sup>, 殷国俊<sup>1,2\*</sup>

(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:** 鱼类肝细胞分离与原代培养技术已有 30 多年的历史, 目前已有 40 多种鱼的肝细胞被分离、培养并用于各种研究中。主要讨论鱼类肝细胞的分离与培养方法以及不同条件对细胞生理的影响; 概括鱼类肝细胞体外培养在生理学、环境毒理学和药理学等方面的应用研究, 旨在为建立更多的鱼类肝细胞原代培养模型并应用于相关的研究领域提供参考依据。

**关键词:** 鱼类; 肝细胞; 原代培养; 细胞分离

中图分类号: S961.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)01-0147-11

## Isolation, Primary Culture and Application of Fish Hepatocytes: An overview

JIA Rui<sup>1,2</sup>, CAO Li-ping<sup>2</sup>, DING Wei-dong<sup>2</sup>,  
DU Jin-liang<sup>2</sup>, XU Pao<sup>1,2\*</sup>, YIN Guo-jun<sup>1,2\*</sup>

(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:** For more than 30 years primary culture technique of fish hepatocytes has been utilized extensively and over 40 fish species studied with respect to the isolation and cultivation of hepatocytes. The review discusses procedures for isolation, primary culture of fish hepatocytes and the influence of different culture conditions on the physiology of the cells; meanwhile the application of ecto-culture of fish hepatocytes culture in physiology of fish, environmental toxicology and pharmacology was summarized. This paper aims to provide referential information for the establishment of more primary culture models of fish hepatocytes and application in related research.

**Key words:** Fish; hepatocytes; primary culture; cell isolation

1907 年, Harrison<sup>[1]</sup> 为了研究神经突起的起源问题而进行了一项系统的体外培养活体组织试验, 标志着体外培养技术的创立。鱼类组织体外培养技术晚于陆生动物。20 世纪 60 年代, Clem 等<sup>[2]</sup> 对海水鱼蓝仿石鲈 (*Haemulon sciurus*) 尾鳍细胞进行组织培养。1962 年, Woif 和 Quimby<sup>[3]</sup> 建立了虹蹲

收稿日期: 2011-10-12 修回日期: 2011-12-15

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

作者简介: 贾睿(1987—) 男, 硕士, 主要从事鱼类细胞培养及相关免疫学和药理学研究, E-mail: jiarui5582@yahoo.com.cn; \* 通讯作者: 徐跑 研究员 博士 E-mail: xup@ffrc.cn 殷国俊 博士 研究员 E-mail: yingj@ffrc.cn

(*Oncorhynchus mykiss*) 性腺细胞系(RTG-2)是被公认的第一株真骨鱼类的永生性细胞系。随后 Gravell 和 Maisberger<sup>[4]</sup>于1965建立了另一株鱼类细胞系—胖头鲤(*Fathead minnow*)肌肉细胞系(FHM)。鱼类细胞系的建立表明鱼类体外培养技术的成熟。

肝脏是脊椎动物体内维持代谢平衡的主要器官,通过调整肝细胞的结构和功能来适应环境的变化,是目前药理学、毒理学、生理学和生物化学研究的主要对象。大量的研究<sup>[5-6]</sup>已经表明肝细胞体外培养细胞可作为肝组织代替模型用于药理和环境毒理学等研究。鱼类肝细胞的体外培养要也晚于哺乳动物,1976年,Brinbaum等<sup>[7]</sup>用胶原酶灌注法分离金鱼肝细胞,在体外研究激素对肝糖原分解的影响,这是鱼类肝细胞首次在体外培养。此后,关于鱼类肝细胞分离、培养及其应用的研究相继展开。其研究过程经历了短期培养、长期培养到建立细胞系并应用于相关领域,目前相关的报道已有250多篇<sup>[8]</sup>。

## 1 鱼类肝细胞的分离

鱼类细胞的分离基本上是沿用了哺乳动物的分离方法,主要方法有组织块法、机械分散法、酶消化法和二步灌注法<sup>[1,9]</sup>。目前鱼类肝细胞的分离主要应用二步灌注法和酶消化法<sup>[10]</sup>。

酶消化法:该法是目前采用极为广泛的方法,适用于绝大多数组织器官。此法所用的消化酶主要是胰酶或胶原酶,常用的质量浓度是2.5 g/L。

二步灌注法:即通过静脉入口插管灌注肝脏从而获得单个分离的肝细胞,首先用不含Ca<sup>2+</sup>的螯合剂(EDTA等)螯合掉肝组织中的Ca<sup>2+</sup>,从而打破固定细胞的细胞桥粒样结构,然后灌注消化酶(主要为胶原酶),充分消化肝组织后,用弯钳撕去包膜,分离至培养液中,通过离心分离得到纯化肝细胞。这种方法首先在哺乳动物上获得成功,于1979年首次应用于鱼类肝细胞分离研究<sup>[11]</sup>。另外,有研究<sup>[12]</sup>报道,可用EDTA代替胶原酶分离肝细胞,但Segner<sup>[10]</sup>认为这种方法不稳定,可重复性低。

不同的分离方法影响肝细胞的分离数量和活力,研究表明二步灌注法收集的细胞数量多,活力强,易于培养<sup>[13]</sup>。鳊鱼<sup>[14]</sup>、罗非鱼<sup>[15]</sup>、鲤鱼等<sup>[16]</sup>肝细胞均用此方法分离。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。酶消化法不需要特殊的设备,操作简单,可用于鱼类大多数组织的分离。研究<sup>[17]</sup>报道,此方法收集的细胞数量为108个左右每克肝质量,存活率相对较低。但也有研究显示,用胰蛋白酶消化所得的细胞存活率高于二步灌注法。目前在很多研究者已用胰蛋白酶消化法代替二步灌注法分离肝细胞<sup>[18]</sup>。影响鱼类肝细胞分离因素还有物种、品系、雌雄、年龄和养殖条件等<sup>[19]</sup>。

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<sup>[20]</sup>。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<sup>[21]</sup>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;半滑舌鳎(*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<sup>[22]</sup>。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*)<sup>[18]</sup>和中华鲟<sup>[23]</sup>(*Acipenser Sinensis* Grap)的研究发现细胞不能从肝组织块中迁出;鲁氏银板鱼(*Metynnis roosevelti*)肝细胞可以从组织块中爬出,但需时间长,且细胞活力低,不易传代<sup>[24]</sup>。

肝细胞分离时杂细胞的去除是至关重要的。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。肝组织由肝细胞和其他杂细胞组成(表1),血细胞和其他组织碎片对肝细胞的培养有一定影响。通常采用低速梯度离心来纯化肝细胞<sup>[25-26]</sup>。

## 2 鱼类肝细胞的培养及影响因素

### 2.1 鱼类肝细胞的培养

鱼类肝细胞由于其存活率低,不适合用悬浮培养<sup>[30]</sup>,因此大多数研究中,采用单层贴壁技术,并在细胞培养皿底部涂抹各种细胞外基质,模拟体内环境,以提高培养效果。对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[31]</sup>、日本鳊鱼(*Anguilla japonica*)<sup>[32]</sup>和鲤鱼(*Cyprinus carpio*)<sup>[33]</sup>的研究表明,细胞接种后12~24 h贴壁,细胞形状从圆形变成扁平。细胞单层贴壁培养会受到各种因素的影响,如细胞培养的环境、培养基、血清和各种生长因子。

表 1 硬骨鱼类肝组织组成成分  
Tab. 1 Composition of bony fish liver tissue

| 组成成分<br>Composition        | 相对比例 / % Relative volume                          |  | 分离<br>Isolation                    |
|----------------------------|---|--|------------------------------------|
|                            | 虹鳟 ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) <sup>[27]</sup> | 斑马鱼 ( <i>Danio rerio</i> ) <sup>[19]</sup> |                                    |
| 肝组织 (Liver tissue)         | 100.0   | 100.0                                      |                                    |
| 基质 (Stroma)                | 5.3   | 7.8  |                                    |
| 肝细胞 (Hepatocytes)          | 80.1  | 81.7                                       | 低速离心, 50 ~ 120 × g <sup>[25]</sup> |
| 杂细胞 (Non-hepatocytes)      | 14.6  | 10.4                                       | 高速离心, > 600 × g <sup>[28]</sup>    |
| 细胞间隙 (Extracellular cells) | 9.4   | 7.2  | 密度梯度离心 <sup>[16 29]</sup>          |
| 胆管细胞 (Biliary cells)       | 1.2   | 1.8  |                                    |
| 内皮细胞 (Endothelial cells)   | 2.2   | 1.4  |                                    |
| 脂细胞 (Fat cells)            | 1.3   | 0.2  |                                    |
| 巨噬细胞 (Macrophages)         | 0.6   | —  |                                    |

## 2.2 影响鱼类肝细胞培养的因素

2.2.1 肝细胞来源 供体的选择对鱼类肝细胞分离与培养十分重要。很多鱼类属于季节性生长,其肝细胞的活力和生长旺盛程度与季节相关,因此在其生长最旺盛时分离肝细胞的成功率高。取材动物必须是健康无病,生理状态良好。有研究<sup>[34]</sup>认为供体鱼的大小、年龄和雌雄也会影响肝细胞的分离,因此在大多数试验中,通常选用 100 ~ 200 g,年龄较小的鱼进行试验。

目前,已报道有 40 多种鱼的肝细胞被分离并进行体外培养,有些鱼肝细胞已建立细胞系。其中关于虹鳟肝细胞培养及应用的研究占大多数,可能是因为除斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 外,虹鳟是最适合研究的鱼类之一<sup>[35]</sup>。但是由于试验的特殊需求、取材的限制和目的不同等原因,越来越多的鱼类肝细胞被分离并用于各种试验(表 2)。

2.2.2 培养环境 细胞培养的环境主要包括:温度、pH 值、渗透压和贴壁环境。

温度:鱼类细胞体外培养温度应该与其体内环境相似<sup>[69]</sup>。因此,鱼类肝细胞体外培养温度和鱼种类相关<sup>[15 70 71]</sup>。如虹鳟肝细胞在 10 °C 培养时,贴壁数量明显高于 27 °C<sup>[72]</sup>;花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 心脏细胞、肝细胞、脾细胞和头肾细胞的最佳培养温度为 24 °C<sup>[21]</sup>;而鲤鱼肝细胞在 27 °C 培养时效果明显好于 17 °C 和 37 °C<sup>[16]</sup>。温度对细胞活力的影响可能和细胞细胞膜上不饱和脂肪酸和细胞内蛋白质的合成有关<sup>[73]</sup>。

pH 值和渗透压。和哺乳动物一样,鱼类肝细胞培养的最适 pH 一般为 6.8 ~ 7.4。但 pH 值过高或过低均对细胞生长不利<sup>[74]</sup>,会影响细胞内生理生化反应<sup>[75]</sup>。NaHCO<sub>3</sub> 溶液和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液是最常用的缓冲液。细胞在体外培养时,缓冲液和 CO<sub>2</sub> 的相互作用使得培养基中 pH 值相对稳定。鱼类肝细胞培养时缓冲液的浓度一般为 4 ~ 8 mmol/L,CO<sub>2</sub> 体积分数为 0.5% ~ 1%<sup>[37]</sup>。为了使细胞在体外更好的培养,需提供和活体相似的渗透压<sup>[76]</sup>。研究表明低渗培养基会影响虹鳟肝细胞 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup> 和 Cl<sup>-</sup> 的运输<sup>[77]</sup>,而高渗培养基促进 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 和 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 的交换<sup>[78]</sup>。

细胞贴壁环境:鱼类肝细胞培养大多采取单层细胞贴壁培养技术。不同的鱼类肝细胞,其贴壁数量不同,可能和肝细胞表面特殊的化学物质有关<sup>[10]</sup>。单层培养要受到培养皿环境的影响,鱼类肝细胞在普通的培养皿中很难贴壁<sup>[79]</sup>,斑点叉尾鮰和虹鳟肝细胞贴壁率只有 50%,14 d 后其活力分别 40.2% 和 63.4%<sup>[30 70]</sup>。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<sup>[80]</sup>。在鲤鱼肝细胞培养时发现,培养板底部涂一层明胶,有利于细胞更好的贴壁<sup>[16]</sup>;Koban 等<sup>[81]</sup>用鲶鱼肝脏基质覆盖细胞培养板底部,可使鲶鱼肝细胞培养 20 d 以上;Blairbi 等<sup>[79]</sup>发现,在培养皿底部涂一层鱼皮肤提取物,使得虹鳟肝细胞贴壁数量明显增多;在培养板上铺细胞外基质可是虹鳟肝细胞贴壁率达到 93%,而在塑料板或胶原蛋白涂层培养板上贴壁不牢固,贴壁率只有 20% 左右<sup>[82]</sup>;在培养板底部涂马纤连蛋白可更好的鳊鱼肝细胞贴壁<sup>[83]</sup>。Maitre 等<sup>[76]</sup>发现虹鳟肝细胞在普通的培养皿中可培养 10 ~ 12 d,但贴壁慢、活力弱,当涂上一层纤维蛋白或胶原蛋白后明显的提高

细了胞的贴壁率和增殖。Mommssen 和 Lazier<sup>[84]</sup> 用 Falcon Primaria 培养板培养鲑鱼肝细胞,在无血清培养基中可稳定的持续 8 d。

表 2 鱼类肝细胞分离、培养鱼应用的部分报道

Tab.2 Partial reports on isolation , primary culture and application of fish hepatocytes

| 种类 Species                           | 研究方向 Subject of the study   |
|--------------------------------------|---|
| 虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>        | 分离与培养 <sup>[36]</sup> ; 代谢模型 <sup>[37]</sup> ; 细胞凋亡 <sup>[38]</sup> ; 病理学研究 <sup>[30]</sup> ; 环境毒理学研究 <sup>[39]</sup> ; 肝细胞系( RTL - 1) 建立 <sup>[40]</sup> 。 |
| 大西洋鲑 <i>Salma salar</i>              | 肝细胞糖异生功能 <sup>[41]</sup> 。  |
| 鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>          | 分离与培养 <sup>[42]</sup> ; 肝细胞功能 <sup>[43]</sup> ; 糖原分解与胰高血糖素的调节 <sup>[44]</sup> 。   |
| 鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>            | 分离与培养 <sup>[16, 29, 33]</sup> ; 鱼类药物筛选 <sup>[45-46]</sup> ; 环境毒理学研究 <sup>[47]</sup> 。   |
| 罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>     | 建立原代培养模型 <sup>[15]</sup> ; 环境毒理学研究 <sup>[48]</sup> 。  |
| 斑马鱼 <i>Danio rerio</i>               | 肝细胞系( ZF - 1) 建立 <sup>[49]</sup> ; 环境毒理学研究 <sup>[50]</sup> 。  |
| 大马哈鱼 <i>Oncorhynchus nerka</i>       | 激素调节 <sup>[51]</sup> 。  |
| 斑点叉尾鮰 <i>Ictalurus punctatus</i>     | 分离与培养 <sup>[52]</sup> ; 温度应激 <sup>[53]</sup> 。  |
| 花鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>      | 分离、培养并建立细胞系 <sup>[21]</sup> 。   |
| 条纹鲈鱼 <i>Morone saxatilis</i>         | 环境毒理学研究 <sup>[54]</sup> ; 蛋白质分泌 <sup>[55]</sup> 。   |
| 大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>    | 分离与培养 <sup>[18]</sup> ; CYP450 活性的诱导 <sup>[56]</sup> 。  |
| 黄鳍鲷 <i>Sparuslatus houtuyn</i>       | 分离与培养 <sup>[57]</sup> 。   |
| 半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>   | 肝脏细胞系的建立、鉴定 <sup>[22]</sup> 。   |
| 剑尾鱼 <i>Xiphophorus helleri</i>       | 分离与培养 <sup>[17]</sup> 。   |
| 鲁氏银斑鱼 <i>Metynniss roosevelti</i>    | 分离与培养 <sup>[24]</sup> 。   |
| 石斑鱼 <i>Epinephelus awoara</i>        | 分离、培养并建立细胞系 <sup>[58]</sup> ; 糖代谢 <sup>[59]</sup> 。   |
| 中华鲟 <i>Acipenser Sinensis</i> Grap   | 组织培养 <sup>[23]</sup> 。  |
| 大龙六线鱼 <i>Hexagrammos otakii</i>      | 分离与培养 <sup>[60]</sup> 。   |
| 条纹斑竹鲨 <i>Hhiloscyllium plagiosm</i>  | 分离与培养 <sup>[61]</sup> 。   |
| 鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>          | 分离与培养 <sup>[62]</sup> 。   |
| 和鲢鱼( <i>Aristichthys nobilis</i>     |   |
| 草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>   | 分离、培养和环境毒理研究 <sup>[63]</sup> ; 细胞系建立及 CYP3A 相关酶活性的研究 <sup>[64]</sup> 。  |
| 底鲮 <i>Fundulus heteroclitus</i>      | 碳代谢 <sup>[65]</sup> 。   |
| 光若花鲮 <i>Poecliopsis lucida</i>       | 肝细胞系( PLHC - 1) 的建立 <sup>[66]</sup> 。   |
| 日本青鲮 <i>Gobicypris rarus</i>         |   |
| 和稀有鮡鲫( <i>Oryzais latipes</i>        | 原代培养和环境毒理学研究 <sup>[67]</sup> 。  |
| 青海湖裸鲤 <i>Cymnocypris przewalskii</i> |   |
| <i>przewalskii</i> Kessler           | 分离与培养 <sup>[68]</sup> 。   |

2.2.3 培养基 在鱼类细胞培养中,一般常使用化学合成培养基作为其基础培养基,包括 Eagle's Minimum Essential Medium( MEM); Leibovitz's L - 15 Medium( L - 15); Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F - 12 ( 1:1) powder( DMEM/F12); Dulbecco's Modified Eagle Medium( DMEM); Medium 199( M - 199); Medium 1640( M - 1640) 等<sup>[85]</sup>。不同的培养基所含氨基酸、维生素、无机盐等物质比例不同<sup>[86]</sup>。研究表明,不同鱼类的肝细胞对营养物质的需求也各有差异,因此所需的培养基不同,但大多数鱼类肝细胞培养时用 M199 或 L - 15 培养基。Fan 等<sup>[16]</sup>比较 DMEM、M199 和 L - 15 三种培养基,结果表明 M199 和 L - 15 最适合鲤鱼肝细胞培养,且 L - 15 培养基不需要 CO<sub>2</sub>; 对大口黑鲈<sup>[18]</sup>和罗非鱼肝细胞的培养研究中也得出同样的结果。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<sup>[87]</sup>。关于 M199 和 L - 15 两种培养基中那种更适合于鱼类肝细胞的培养,其观点各不一致,有的研究者倾向于用 M199 培养基<sup>[88]</sup>而有的则倾向于 L - 15 培养基<sup>[54, 70, 89]</sup>。

2.2.4 添加物 肝细胞体外培养常见的添加物主要有血清、生长因子、激素和维生素等<sup>[90]</sup>。胎牛血清或小牛血清是体外培养常用的基本添加物,血清中含有各种营养物质,包括增殖因子、附着因子和蛋白质消化阻止因子等。可以调节体外细胞培养环境,提供细胞培养所必需的各种生长调节因子,补充基础培养基中缺乏或不足的成分<sup>[85]</sup>。血清还可提供多种载体蛋白,从而促进细胞贴壁和生长<sup>[91]</sup>。但血清中也存在着不少有害成分,不利于细胞生长,如补体、免疫球蛋白和生长因子等<sup>[92]</sup>。不同的鱼类肝细胞对血清的最佳需求也不同。Flouriot等<sup>[93]</sup>认为血清可以促进虹鳟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;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%、和20% FCS的培养基<sup>[31]</sup>。但Braumeck等<sup>[38]</sup>研究发现血清浓度过高也可降低虹鳟肝细胞的存活。其原因可能是血清中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<sup>[94]</sup>。尼罗罗非鱼<sup>[15]</sup>、鲤鱼<sup>[16]</sup>和大口黑鲈<sup>[18]</sup>分别在含5%、10%和20% FCS的培养基中很好的生长。有些研究中用鱼血清代替FCS,如Kocal等<sup>[95]</sup>发现在无血清培养基中虹鳟肝细胞的贴壁率低于10%,且不能铺展开,但添加虹鳟血清后贴壁率明显提高,且形成单层细胞。但和FCS相比鱼类血清成分不明确,缺乏标准化。

鱼类细胞培养中常用的生长因子有酸性成纤维样细胞生长因子(aFGF)、碱性成纤维样细胞生长因子(bFGF)、表皮细胞生长因子(EGF)和胰岛素样细胞生长因子(IGF)等。在哺乳动物肝细胞培养时常添加一些上皮细胞生长因子(EGF)、肝细胞生长因子、成纤维细胞生长因子和生长激素等,促进细胞贴壁和增殖<sup>[96]</sup>。同样鱼类肝细胞培养时也需加一些特殊的生长因子, Hayashi等<sup>[97]</sup>在无血清的培养基中添加胰岛素、胰高血糖素、表皮细胞生长因子(EGF)、促乳素、生长激素和 $H_2SeO_3$ 培养鳊鱼肝细胞,发现激素和EGF是细胞增殖必不可少的成分,胰岛素、胰高血糖素和促乳素不但影响细胞的增殖还影响细胞单层贴壁的形成。

### 3 鱼类肝细胞培养的应用

#### 3.1 生理生化功能研究

在鱼类生理学研究方面,细胞培养是研究的基础。1998年,Neumann等<sup>[98]</sup>从金鱼的巨噬细胞系中分离出巨噬细胞生长因子,证明肾脏白细胞能够分泌内源性生长因子,该生长因子在鱼类调节巨噬细胞造血功能方面起重要作用。细胞培养技术在鱼类细胞膜离子通透性和电生理特性等方面的研究也广泛的开展<sup>[99]</sup>。鱼类肝细胞已被作为替代模型研究肝脏代谢功能<sup>[100]</sup>,如儿茶酚胺对糖原代谢的影响<sup>[101]</sup>、肾上腺素对糖原分解和糖异生的作用<sup>[59]</sup>、激素调节<sup>[102]</sup>等。Moon等<sup>[103]</sup>用分离的鱼类肝细胞研究三种激素对相关酶活性的影响,发现糖原磷酸化酶对三种激素最为敏感。

离体培养的动物细胞具有培养条件可控制且便于观察检测的特点,因此动物细胞培养可用于研究动物的正常或病理细胞的形态,检测细胞的功能、生长发育,细胞营养,代谢以及病变等微观过程。Marinus等<sup>[104]</sup>研究虹鳟肝细胞中蛋白质合成与能量消耗的关系; Zhang等<sup>[105]</sup>通过原代培养的鱼类肝细胞研究肾上腺素对 $Ca^{2+}$ 浓度的影响;鱼类肝细胞原代培养还被广泛的用来研究细胞色素酶活性及基因的表达<sup>[56]</sup>,如雌二醇(E2)可调节虹鳟肝细胞CYP1A基因的表达<sup>[106]</sup>。

#### 3.2 环境毒理学研究

鱼类养殖业的快速发展与工农业污染对水质的破坏,促进了环境毒理学的研究与发展。但是,利用活鱼进行毒理学研究,需要一定的养殖场所和养殖设备,周期长、成本高。受各种交叉因素的影响。利用体外模型不仅可以保留体内比较复杂的特征,而且整个实验过程容易操作。体外培养的鱼类细胞代替活鱼进行毒理实验,其优点有:第一,实验过程可以中各种条件可以控制,如温度、pH和各种离子浓度等;第二可消除不确定因素的影响。最近几十年,鱼类肝细胞已经作为一种模型来研究毒理学,其应用主要包括毒性研究和异生物代谢研究。

毒性研究主要集中于检测各种毒物的危害和作用机理。化学毒素直接或间接的改变细胞膜结构,影响细胞膜的功能。Awaz等<sup>[107]</sup>观察Cu、Cd和Cr对鲤鱼肝细胞的影响,结果发现Cu和Cr可以促进肝细胞ROS的形成和脂质过氧化; Baski<sup>[108]</sup>将鲈鱼肝细胞暴露在含溴代物的环境中,随着溴代物的浓度升高,细胞活力逐渐降低,且抑制蛋白质的合成。

关于鱼类原代肝细胞应用于外生物物质代谢的研究报道很多,如重金属和激素对金属硫蛋白表达的影响<sup>[109]</sup>; Grosvik 和 Goksoyr<sup>[110]</sup>应用大西洋鲑肝细胞研究多氯联苯( PCB - 105)、苯并芘( BaP)、 $\beta$ -萘黄酮( BNF)和重金属对蛋白质表达的影响,结果显示多环芳香烃化合物和重金属均诱导 45 Ku 蛋白的表达。多环芳香烃化合物也会诱导 CYP1A 酶的活性<sup>[77]</sup>。大量的研究表明水环境中的各种化学物质影响水生动物的内分泌系统, Bickley 等<sup>[111]</sup>通过鲤鱼原代肝细胞检测水环境中的内分泌干扰物( EDCs)的具体化学成分,评估其可能产生的危害。

### 3.3 药理学研究

目前,鱼类原代肝细胞在药效学的早期筛选方面还主要应用于保肝降酶新药,一般多是在原代肝细胞培养的基础上建立肝细胞损伤模型,再与相关化合物共同孵育一定时间,最后检测肝细胞活性和相关酶含量。Yin 等<sup>[45-46]</sup>用 CCl<sub>4</sub> 建立鲤鱼肝损伤模型研究洛神花提取物和甘草提取物对鲤鱼肝细胞的保护作用;曹丽萍等<sup>[112]</sup>以 t-PHB 损伤异育银鲫肝细胞研究玫瑰茄水提取物对细胞生化指标的影响;喻文娟等<sup>[56]</sup>通过分离大口黑鲈肝细胞研究利福平( RIF)对氨基比林-N-脱甲基酶( ANDM)的诱导作用; Collodi 等<sup>[113]</sup>比较斑马鱼的肝组织、原代肝细胞、单倍体和二倍体胚胎以及肝的继代培养细胞中 TCDD 对药物代谢酶影响;Klaunig<sup>[52]</sup>以虹鳟和斑点叉尾鮰肝细胞为研究对象,研究二甲基硝铵、黄曲霉素 B<sub>1</sub>、苯并 a 芘、N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍对非程序 DNA( UDS)合成的影响,结果发现黄曲霉素 B<sub>1</sub>可减少 UDS 的合成,而 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍对 UDS 没有影响。

## 4 展 望

### 4.1 建立不同鱼类的肝细胞系

目前,世界上的鱼类有 25 000 ~ 30 000 种,而只有 40 多种鱼的肝细胞被分离和应用<sup>[114]</sup>。鱼类建立的肝细胞系数很少,已报道的有虹鳟肝细胞系( RTL - 1)、斑马鱼肝细胞系( ZF - 1)、半滑舌鳎肝细胞系( HTLC)、花鲈肝细胞系( LIL)、石斑鱼( GL)、光若花鲈肝细胞系( PLHC - 1)和草鱼肝细胞系( RTL)。细胞系克服了原代细胞培养可变性、重复性高、可标准化,管理更方便。尽管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,但由于研究的需要,建立不同的鱼类肝细胞系是细胞培养继续探讨的一个方向。

### 4.2 建立更多鱼类肝细胞体外培养模型

鱼类肝细胞作为一种实验模型,主要用来研究环境毒理学、细胞活力、细胞结构、细胞的凋亡等。但关于细胞在原代培养不同阶段的形态、生理及其在药理研究中的研究报道很少<sup>[10]</sup>。细胞短期单层贴壁培养会有有效的保护细胞内基因的表达。但在体外长期培养过程中,肝细胞其表型会发生改变,在细胞培养时需改进技术,尽可能的模仿体内环境,为了研究病理学和毒理学,其他新的鱼类肝细胞培养方法有待于建立。尤其是物种稀有的鱼类,利用细胞代替活体研究其特殊的功能,大大减少了研究所用鱼类的数量。因此,建立更多的稳定的肝细胞体外培养模型,为其他研究奠定基础。

### 4.3 渔药筛选及作用机理的研究

随着技术水平的不断提高,原代培养鱼类肝细胞已用于药物初步筛选研究<sup>[45]</sup>,但相关的报道还很少。药理学方面的研究包括药物在肝中的代谢途径和药物药代动力学的研究<sup>[5,115]</sup>;评价药物和外源性物质对肝微粒体中细胞色素 P450 酶诱导作用并探讨其诱导机制;预测和解释药物与药物之间的相互作用;研究药物的细胞毒性等。在分子水平研究基因表达,进一步研究药物作用机制。而肝细胞是评价外源性化合物很好的体外模型,尤其在代谢途径和消除速率方面与体内肝脏代谢有可比性。通过体外简单、快速获得这些化合物的代谢资料以推断这些化合物在人体内是否安全有效。进入体内的外源性化合物多数在肝脏进行生物转化,形成各种代谢产物,这些代谢产物或是产生药理效应或是产生毒性作用。因此鱼类肝细胞体外模型将促进渔药筛选及作用机理的研究。

### 参考文献:

- [1]薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2]薛淑群,尹洪滨. 细胞培养技术的发展动态及其动物克隆技术研究进展[J]. 水产学杂志, 2005, 18(1): 75-79.

- [3] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells in vitro [J]. Science, 1962, 135(3508): 1065-1066.
- [4] Gravell M, Malsberger A R. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Ann N Y Acad Sci, 1965, 126: 555-565.
- [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] Yin G, Cao L, Xu P, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of glycyrrhiza glabra extract against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) - induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37: 209-216.
- [7] Birnbaum M J, Schultz J, Fain J N. Hormone - stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes [J]. American Journal of Physiology, 1976, 231(1): 191-197.
- [8] Braunbeck T, Segner H. Isolation and cultivation of teleost hepatocytes [J]. The Hepatocyte Review, 2000: 49-72.
- [9] 于淼, 管华诗, 郭华荣 等. 鱼类细胞培养及其应用 [J]. 海洋科学, 2003, 27(3): 4-8.
- [10] Segner H. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes [J]. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, 1998, 120(1): 71-81.
- [11] 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.
- [12] Mommsen T P, Moon T W, Walsh P J. Hepatocytes: isolation, maintenance and utilization [J]. Biochemistry and molecular biology of fishes, 1994, 3: 355-373.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Jung A 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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(4): 430-435.
- [19] Braunbeck T, Segner H. Isolation and cultivation of teleost hepatocytes. in: Berry M N, Edwards A M (eds) The hepatocytes review [M]. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2000: 49-72.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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): 71-75.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Hampton J A, Lantz R C, Hinton D E. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, *richardsoni*) liver: III. Morphometric analysis of parenchyma, stroma, and component cell types [J]. American journal of anatomy, 1989, 185(1): 58-73.
- [28] Blair J, Ostrander G, Miller M, et al. Isolation and characterization of biliary epithelial cells from rainbow trout liver [J]. In Vitro Cell Dev Biol, 1995, 31: 780-789.
- [29] Bouche G, Gas N, Paris H. Isolation of carp hepatocytes by centrifugation on a discontinuous ficoll gradient. A biochemical and ultrastructural study [J]. Biol Cell, 1979, 36: 17-24.
- [30] Klaunig J E. Establishment of fish hepatocyte cultures for use in in vitro carcinogenicity studies [J]. National Cancer Institute

- te Monograph ,1984 ,65: 163-169.
- [31]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.
- [32]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.
- [33]Segner H ,Scholz S ,Bohm R. Carp( *Cyprinus carpio*) hepatocytes in primary culture: morphology and metabolism [J]. Actes Colloq Ifremer ,1995 5: 77-87.
- [34]Mommsen T P ,Moon T W ,Walsh P J. Hepatocytes: isolation ,maintenance and utilization [J]. Biochemistry and molecular biology of fishes ,1994( 3) :355-373.
- [35]Braunbeck T. Cytological alterations in isolated hepatocytes from rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to 4 - chloroaniline [J]. Aquatic toxicology ,1993 ,25( 1/2) :83-110.
- [36]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.
- [37]Moon T W ,Walsh P J ,Mommsen T P. Fish hepatocytes: a model metabolic system [J]. Canadian journal of fisheries and aquatic sciences ,1985 ,42( 11) :1772-1782.
- [38]Braunbeck 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.
- [39]Riergh 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.
- [40]Lee L E J ,Clemons J H ,Bechtel D G ,et al. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome p450 - dependent monooxygenase activity [J]. Cell biology and toxicology ,1993 ,9( 3) :279-294.
- [41]Mommsen T P. Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes [J]. Can J Zool ,1986 ,64: 1110-1115.
- [42]Hayashi S ,Ooshiro Z. Primary culture of the freshly isolated liver cells of the eel [J]. Bull Japan Soc Sci Fish ,1985 51 ( 21) :765-771.
- [43]Honda S ,Kashiwagi M ,Miyamoto K ,et al. Multiplicity ,structures ,and endocrine and exocrine natures of eel fucose - binding lectins [J]. Journal of Biological Chemistry ,2000 ,275( 42) :33151-33157.
- [44]Foster G D ,Moon T W. The role of glycogen phosphorylase in the regulation of glycogenolysis by insulin and glucagon in isolated eel ( *Anguilla rostrata*) hepatocytes [J]. Fish Physiology and Biochemistry ,1990 ,8( 4) :299-309.
- [45]Yin G ,Cao L ,Xu P ,et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of glycyrrhiza glabra extract against carbon tetrachloride ( CCl<sub>4</sub>) - induced hepatocyte damage in common carp ( *Cyprinus carpio*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry ,2011 ,37: 209-316.
- [46]Yin G ,Cao L ,Xu P ,et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of hibiscus sabdariffa extract against carbon tetrachloride - induced hepatocyte damage in *Cyprinus carpio* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal ,2011 ,47: 10-15.
- [47]Li X ,Liu Y ,Song L ,et al. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp ( *Cyprinus carpio* L. ) To the toxicity of microcystin - lr [J]. Toxicon ,2003 42( 1) :85-89.
- [48]Liu C ,Du Y ,Zhou B. Evaluation of estrogenic activities and mechanism of action of perfluorinated chemicals determined by vitellogenin induction in primary cultured tilapia hepatocytes [J]. Aquatic toxicology ,2007 ,85( 4) :267-277.
- [49]Ghosh C ,Zhou Y L ,Collodi P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line [J]. Cell Biology and Toxicology ,1994 ,10( 3) :167-176.
- [50]Ibabe A ,Herrero A ,Cajaraville M P. Modulation of peroxisome proliferator - activated receptors ( ppar) by ppar [alpha] - and ppar [gamma] - specific ligands and by 17 [beta] - estradiol in isolated zebrafish hepatocytes [J]. Toxicology in vitro ,2005 ,19( 6) :725-735.
- [51]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.
- [52]Klaunig J E. Establishment of fish hepatocyte cultures for use in in vitro carcinogenicity studies [J]. National Cancer Institute Monograph ,1984 ,65: 163-173.
- [53]Koban M ,Graham G ,Prosser C L. Induction of heat - shock protein synthesis in teleost hepatocytes: effects of acclimation temperature [J]. Physiological zoology ,1987 ,60( 2) :290-296.
- [54]Baksi S M ,Frazier J M. A fish hepatocyte model for the investigation of the effects of environmental contaminants [J]. Ma-



- rine Environmental Research , 1988 , 24( 1/4) : 141-145.
- [55]Fukazawa Y , Siharath K , Iguchi T , et al. In vitro secretion of insulin - like growth factor - binding proteins from liver of striped bass , morone saxatilis [J]. General and comparative endocrinology , 1995 , 99( 2) : 239-247.
- [56]喻文娟 , 李聘 , 王翔凌 , 等. 大口黑鲈原代肝细胞的培养及其应用于 CYP450 活性的诱导 [J]. Fisheries , 2008 , 3( 1) : 33-36.
- [57]吴国平 , 纪荣兴 , 李丽美 , 等. 黄鳍鲷肝细胞体外培养研究 [J]. 动物医学进展 , 2003 , 24( 3) : 102-103.
- [58]Lai Y. Two iridovirus susceptible cell lines established from kidney and liver of grouper , epinephelus awoara ( temminck & schlegel) , and partial characterization of grouper iridovirus [J]. Journal of Fish Diseases , 2000 , 23( 6) : 379-388.
- [59]Danulat E , Mommsen T P. Norepinephrine: a potent activator of glycogenolysis and gluconeogenesis in rockfish hepatocytes [J]. General and comparative endocrinology , 1990 , 78( 1) : 12-22.
- [60]王文君. 大泷六线鱼 (*Hexagrammos otakii*) 肝脏和脾脏细胞学观察及其原代培养的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学 , 2008.
- [61]于森. 鲨鱼肝实质细胞培养及其细胞膜分离纯化的方法学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学 , 2002.
- [62]李效宇 , 刘永定 , 宋立荣. 鲢, 鲤和鲫肝细胞原代培养 [J]. 水生生物学报 , 2001 , 25( 4) : 420-421.
- [63]Wan X , Ma T , Wu W , et al. Erod activities in a primary cell culture of grass carp ( *Ctenopharyngodon idellus*) hepatocytes exposed to polychlorinated aromatic hydrocarbonas [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety , 2004 , 58( 1) : 84-89.
- [64]Li D , Yang X L , Zhang S J , et al. Effects of mammalian cyp3a inducers on cyp3a - related enzyme activities in grass carp ( *Ctenopharyngodon idellus*) : possible implications for the establishment of a fish cyp3a induction model [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology , 2008 , 147( 1) : 17-29.
- [65]Moerland T S , Sidell B D. Characterization of metabolic carbon flow in hepatocytes isolated from thermally acclimated killifish *fundulus heteroclitus* [J]. Physiological Zoology , 1981 , 54( 3) : 379-389.
- [66]Jung D K J , Klaus T , Fent K. Cytochrome P450 induction by nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons , azaarenes , and binary mixtures in fish hepatoma cell line plhc - 1 [J]. Environmental toxicology and chemistry , 2001 , 20( 1) : 149-159.
- [67]马陶武 , 王子健 , 易浪波. 稀有鮎鲫和日本青鳉肝细胞原代培养及其对 2 , 3 , 7 , 8 - TCDD 的敏感性比较 [J]. 环境科学学报 , 2010 , 30( 6) : 1243-1249.
- [68]谢保胜 , 王刚 , 史健全 , 等. 青海湖裸鲤体外肝胰细胞原代与传代培养 [J]. 生物学杂志 , 2009 , 26( 4) : 34-37.
- [69]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.
- [70]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.
- [71]Hayashi S , Ooshiro Z. Effects of glucagon , insulin , and the eel serum in the eel liver cells in primary culture [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries , 1985 , 51( 7) : 1123-1127.
- [72]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) : 407-416.
- [73]Hazel J R. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish [J]. American Journal of Physiology - Regulatory , Integrative and Comparative Physiology , 1984 , 246( 4) : 460-470.
- [74]Kleeman K T , Fryer J L , Pilcher K S. Observed differences in co2 requirements between mammalian and salmonid fish cell lines [J]. The Journal of Cell Biology , 1970 , 47( 3) : 796-798.
- [75]Wood C , Marshall W. Ion balance , acid - base regulation , and chloride cell function in the common killifish , *fundulus heteroclitus*—a euryhaline estuarine teleost [J]. Estuaries and Coasts , 1994 , 17( 1) : 34-52.
- [76]Maitre J , Valotaire Y , Guguen - Guillouzo C. Estradiol - 17 $\beta$  stimulation of vitellogenin synthesis in primary culture of male rainbow trout hepatocytes [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant , 1986 , 22( 6) : 337-343.
- [77]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.
- [78]Fossat B. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and osmotic shrinkage in isolated trout hepatocytes [J]. Journal of experimental biology , 1997 , 200( 17) : 2369-2376.
- [79]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.
- [80]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.

- [81]Koban M. Can cultured teleost hepatocytes show temperature acclimation [J]. American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 1986, 250(2): 211-220.
- [82]Lipsky M, Sheridan T, Bennett R, et al. Comparison of trout hepatocyte culture on different substrates [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 1986, 22(6): 360-362.
- [83]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.
- [84]Mommensen T P, Lazier C B. Stimulation of estrogen receptor accumulation by estradiol in primary cultures of salmon hepatocytes [J]. FEBS letters, 1986, 195(1/2): 269-271.
- [85]薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社 2001.
- [86]Skett P. Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism/metabolism – based toxicity testing – solutions [J]. Toxicology in Vitro, 1994, 8(3): 491-504.
- [87]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.
- [88]Pawlowski S, Islinger M, Vlkl 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.
- [89]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.
- [90]徐哲. 肝细胞原代培养的常用添加物 [J]. 国外医学: 流行病学 传染病学分册, 2002, 29(6): 356-359.
- [91]Block G D, Locker J, Bowen W C, et al. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium [J]. The Journal of cell biology, 1996, 132(6): 1133-1149.
- [92]Bottenstein J E. Culture methods for growth of neuronal cell lines in defined media [M]// Barnes D W, Sirbasku D A, Sato G H. Methods For Serum – free Culture Of Neuronal And Lymphoid Cells, New York: 1984.
- [93]Flouriou 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): 407-416.
- [94]Bell J G, Tocher D R, Farndale B M, et al. The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr – smolt transformation [J]. Lipids, 1997, 32(5): 515-525.
- [95]Kocal T, Quinn B, Smith I, et al. Use of trout serum to prepare primary attached monolayer cultures of hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 1988, 24(4): 304-308.
- [96]陈慧梅, 廖红, 高静. 肝细胞培养方法研究进展 [J]. 细胞生物学杂志, 2002, 24(3): 163-166.
- [97]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.
- [98]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 & Comparative Immunology, 1998, 22(4): 417-432.
- [99]Bianchini L, Fossat B, Porthe – Nibelle J, et al. Effects of hyposmotic shock on ion fluxes in isolated trout hepatocytes [J]. Journal of Experimental Biology, 1988, 137(1): 303-318.
- [100]Fabbri E, Capuzzo A, Moon T W. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: an overview [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1998, 120(2): 177-192.
- [101]Brighenti L, Puviani A C, Gavioli M E, et al. Mechanisms involved in catecholamine effect on glycogenolysis in catfish – isolated hepatocytes [J]. General and comparative endocrinology, 1987, 66(3): 306-312.
- [102]Mommensen T P, Danulat E, Walsh P J. Hormonal regulation of metabolism in hepatocytes of the ureogenic teleostopsanus beta [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1991, 9(3): 247-252.
- [103]Moon T W, Busby E R, Cooper G A, et al. Fish hepatocyte glycogen phosphorylase – a sensitive indicator for hormonal modulation [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1999, 21(1): 15-24.
- [104]Pannevis M C, Houlihan D F. The energetic cost of protein synthesis in isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, 1992, 162(5): 393-400.
- [105]Zhang J, Desilets M, Moon T W. Evidence for the modulation of cell calcium by epinephrine in fish hepatocytes [J]. American Journal of Physiology – Endocrinology And Metabolism, 1992, 263(3): 512-519.
- [106]Navas J M, Segner H. Estrogen – mediated suppression of cytochrome P4501a (cyp1a) expression in rainbow trout hepa-

- toocytes: role of estrogen receptor [J]. *Chemico - Biological Interactions*, 2001, 138(3): 285--298.
- [107] Nawaz M, Manz C, Krumschnabel G. In vitro toxicity of copper, cadmium, and chromium to isolated hepatocytes from carp, *Cyprinus carpio* L. [J]. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 2005, 75(4): 652-661.
- [108] Baksi S M. Fish hepatocyte model for investigation of the effects of trihalomethanes( Chapter 27) [J]. *Water Chlorination*, 1990, 16: 341-246.
- [109] Olsson P E, Hyllner S J, Zafarullah M, et al. Differences in metallothionein gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes and the rth - 149 cell line [J]. *Biochimica et Biophysica Acta ( BBA) - Gene Structure and Expression*, 1990, 1049(1): 78-82.
- [110] Grösvik B E, Goksöyr A. Biomarker protein expression in primary cultures of salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes exposed to environmental pollutants [J]. *Biomarkers*, 1996, 1(1): 45-53.
- [111] Bickley L K, Lange A, Winter M J, et al. Evaluation of a carp primary hepatocyte culture system for screening chemicals for oestrogenic activity [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 94(3): 195-203.
- [112] 曹丽萍, 丁炜东, 殷国俊. 玫瑰茄水提物对 t - BHP 诱导原代培养异育银鲫肝细胞损伤生化指标的影响 [J]. *浙江农业学报*, 2011, 23(2): 273-277.
- [113] Collodi P, Miranda C L, Zhao X, et al. Induction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) P450 in vivo and in cell culture [J]. *Xenobiotica*, 1994, 24: 487-493.
- [114] Nelson J. *Fishes of the world* [M]. New York: Wiley & Sons, 1994.
- [115] Scown T M, Goodhead R M, Johnston B D, et al. Assessment of cultured fish hepatocytes for studying cellular uptake and (Eco) toxicity of nanoparticles [J]. *Environmental Chemistry*, 2010, 7(1): 36-49.

( 上接第 146 页)

- [11] 夏德全, 杨弘, 吴婷婷, 等. 天鹅洲通江型长江故道“四大家鱼”种群遗传结构研究 [J]. *中国水产科学*, 1996, 3(4): 11-18.
- [12] 鲁翠云, 孙效文, 曹洁, 等. 磁珠富集法筛选白鲢的微卫星分子标记 [J]. *农业生物技术学报*, 2005, 13(6): 772-776.
- [13] 朱晓东, 耿波, 李娇, 等. 利用 30 个微卫星标记分析长江中下游鲢群体的遗传多样性 [J]. *遗传*, 2007, 29(6): 705-713.
- [14] 王长忠, 梁宏伟, 邹桂伟, 等. 长江中上游两个鲢群体遗传变异的微卫星分析 [J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1341-1348.
- [15] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in mall using restriction fragment length polymorphism [J]. *Am J Human Genetic*, 1980, 32(3): 314-331.
- [16] Li Q, Park C, Endo T, et al. Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1/4): 207-222.
- [17] Skaala O, Høyheim B, Glover K, et al. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Allelic diversity and identification of individuals [J]. *Aquaculture*, 2004, 240(1/4): 131-143.
- [18] Norris A T, Bradley D G, Cunningham E P. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations [J]. *Aquaculture*, 1999, 180(3/4): 247-264.
- [19] Fritzner N G, Hansen M M, Madsen S S, et al. Use of microsatellite markers for identification of indigenous brown trout in a geographical region heavily influenced by stocked domesticated trout [J]. *Journal of Fish Biology*, 2001, 58(5): 1197-1210.
- [20] 杨德国, 危起伟, 王凯, 等. 人工标志放流中华鲟幼鱼的降河洄游 [J]. *水生生物学报*, 2005, 29(1): 26-30.
- [21] Chemnick L, Robbins M, Garner K, et al. Paternity determination in captive lowland gorillas and orangutans and wild mountain gorillas by microsatellite analysis [J]. *Primates*, 1998, 39(2): 199-209.