

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200421001

http://www.yykxjz.cn/

张子仙, 田依萌, 刘志, 潘鲁青. 栉孔扇贝鳃细胞原代培养与 B[α]P 细胞毒性检测技术的研究. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 105-112

ZHANG Z X, TIAN Y M, LIU Z, PAN L Q. Study on the primary culture of gill cells and B[α]P cytotoxicity detection technology in the scallop *Chlamys farreri*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 105-112

栉孔扇贝鳃细胞原代培养与 B[α]P 细胞毒性检测技术的研究*

张子仙¹ 田依萌¹ 刘 志² 潘鲁青^{1①}

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室 中国海洋大学 山东 青岛 266003;

2. 黄岛出入境检验检疫局 山东 青岛 266555)

摘要 本研究优化了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)鳃细胞制备方法和原代培养条件,采用 3 种细胞活性检测技术,比较分析了苯并(a)芘(B[α]P)对栉孔扇贝鳃细胞的毒性作用。结果显示,栉孔扇贝鳃组织在 1%青霉素-链霉素(双抗)和庆大霉素消毒 10~30 min 内,原代培养鳃细胞存活率无明显差异。消毒 30 min 时,镜检无染菌现象,细胞状态良好。胰蛋白酶消化时间对鳃细胞收获量影响显著,在消化 15~25 min 内,鳃细胞存活率较高,胰蛋白酶的最佳消化时间为 25 min。在 150~300 g 相对离心力作用下,鳃细胞形态和存活率存在明显差异,在 150 g 时,存活率和细胞完整性较好。添加胎牛血清(5%~20%)在 6~12 h 内鳃细胞存活率无显著变化,培养 24 h 时,5%和 20%处理组存活率显著下降,10%和 15%处理组存活率无明显变化。台盼蓝拒染法细胞活性检测表明,B[α]P 对栉孔扇贝鳃细胞活性无明显影响;CCK8 试剂法得出,仅在 16 μg/mL 最高浓度下,鳃细胞活性受到显著抑制;而中性红比色法显示,鳃细胞毒性作用与 B[α]P 浓度、染毒时间呈正相关性。研究表明,栉孔扇贝鳃细胞最佳制备方法:消毒 30 min、胰蛋白酶消化 25 min、相对离心力为 150 g、原代培养基添加 10%胎牛血清为最佳。同时,中性红比色法可以作为评价 B[α]P 对栉孔扇贝鳃细胞毒性的敏感指标。

关键词 栉孔扇贝; 鳃细胞; 原代培养; B[α]P; 细胞毒性

中图分类号 Q954.6; X174 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)05-0105-08

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)主要来源于有机物的热解或不完全燃烧,作为一种持久性有机污染物,具有内分泌毒性、神经毒性、免疫毒性和生殖毒性等。其中,苯并(a)芘(benzo[a]pyrene, B[α]P)是致癌性最强的 PAHs(朱利民等, 1993; 杨帆等, 2013)。随着海上石油和轮船运输业

的快速发展和工农业、生活污水的大量排放,海洋环境污染日趋严重。研究表明,大连海域、青岛近岸海域、海口湾海水 PAHs 污染含量分别为 65~1130、8.23~272.02 和 420.2~2539.1 ng/L(李先国等, 2012; Li *et al*, 2015),我国近岸部分海域 PAHs 已接近中等污染水平。

* 山东省 2018 年重点研发计划 (2018GHY115007)资助 [This work was supported by Shandong Province 2018 Key Research and Development Plan (2018GHY115007)]. 张子仙, E-mail:349789592@qq.com

① 通讯作者: 潘鲁青, 教授, E-mail: panlq@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-04-21, 收修改稿日期: 2020-05-07

双壳贝类分布广泛,营滤食性生活,代谢率较低,对 PAHs 有较强的生物富集作用,常被作为海洋污染监测的指示生物(Birmelin *et al*, 1999; Faucet *et al*, 2003; Gacic *et al*, 2014)。许多学者研究利用鱼类组织细胞评估体外生态毒理风险和监测水域环境污染状况(Fent, 2001; Bols *et al*, 2005)。已有学者将双壳贝类原代培养的组织细胞用于增塑剂、重金属等污染物的毒性评估和生物监测,如 4 种增塑剂对珠蚌(*Unio pictorum*)组织细胞毒性检测方法的研究表明,中性红比色法适于检测双酚 A 对外套膜、鳃和性腺细胞的活性影响,MTT 比色法更适于检测 DiDP 对消化盲囊细胞的毒性(Yurdakök-Dikmen *et al*, 2018)。重金属对淡水贻贝(*Lasmigona costata*)鳃组织细胞的毒性检测方法为台盼蓝拒染法(Nogueira *et al*, 2013),由此说明污染物对贝类原代培养细胞毒性在检测方法上存在差异。目前,贝类原代组织细胞培养刚刚起步,在组织(外套膜、鳃、消化盲囊和性腺)消毒处理和细胞分离制备等技术方面仍不够完善(Daugavet *et al*, 2015; Yurdakök-Dikmen *et al*, 2018)。

栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)是我国浅海重要的经济贝类,基于双壳贝类的生态习性,鳃组织作为直接与外界水环境接触的呼吸、滤食器官,鳃细胞的活力、形态和受损程度可直接反映海洋环境污染状况。本研究以栉孔扇贝为研究对象,在已有双壳贝类细胞培养方法的基础上,优化栉孔扇贝鳃细胞的制备技术和原代培养条件,并采用 3 种细胞活性检测技术,比较分析 B[α]P 对栉孔扇贝鳃细胞的毒性作用,旨在为双壳贝类原代细胞培养和海洋 PAHs 毒性评估提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用栉孔扇贝购于山东青岛市沙子口贝类养殖场,壳高为(6.0±0.5) cm,暂养在塑料水槽中,海水盐度为 31,温度为(18±1)°C, pH 为 8.0,连续充气,日换水量 1/2,暂养密度为 4~6 个/L,投喂螺旋藻(*Spirulina*)粉,日投饵量为软体部鲜重的 0.5%。暂养 2 d 后,选取健康个体,去除贝壳表面附着物,置于经 0.22 μm 滤膜过滤的海水中,加入适量双抗(1000 U/mL 青霉素、1000 μg/mL 链霉素),养殖 2 d。

1.2 鳃细胞的制备

选取活力好的栉孔扇贝,用过滤灭菌海水冲洗贝壳表面,参考郎刚华等(2000)的方法,用无菌脱脂棉

蘸取 75%酒精消毒贝壳,晾干。在超净工作台中,取鳃组织置于培养皿中,称重,然后用过滤灭菌的海水冲洗数次(去除残留的血细胞),再用消毒液(由无菌海水、青霉素 100 U/mL—链霉素 100 μg/mL 双抗和庆大霉素 80 μg/mL 配制)冲洗鳃组织 3 次,然后浸泡于消毒液中除菌。将浸泡后的鳃组织用 CMFS (HEPES 20 mmol/L、NaCl 500 mmol/L、KCl 12.5 mmol/L、EDTA 5 mmol/L、1%庆大霉素, pH=7.3,渗透压=1100 mOsm)缓冲液冲洗 3 次,置于 CMFS 溶液中,将鳃组织剪至 1~2 mm³ 小块,将剪碎的组织块转移至等体积混合的 CMFS 和胰蛋白酶(浓度为 0.25%)中,26°C 振荡消化,加入适量的 L15 培养基(10%胎牛血清、1%庆大霉素, pH=7.3,渗透压=1100 mOsm)。将鳃细胞悬液先后经 400 目和 150 目的灭菌金属细胞筛过滤,离心 5 min,弃上清液,加入不含血清的 L15 培养基,重悬沉淀,再次离心 5 min,弃上清液,加入 L15 培养基重悬,将细胞密度调整至 1.2×10⁵ cells/mL,接种至 96 孔细胞培养板,置于 26°C、5% CO₂ 细胞培养箱中静置培养。

1.3 鳃细胞原代培养方法优化

1.3.1 消毒时间 消毒液浸泡时间设置为 10、20、30 和 40 min 4 个组,每组均设 3 个平行组,按设置的消毒浸泡制备鳃细胞,取细胞悬液,在 NIKON TS100 倒置显微镜下观察鳃细胞形态和染菌情况,并采用台盼蓝拒染法计数鳃细胞,用活细胞占总计数细胞的百分比表示细胞存活率。

1.3.2 胰蛋白酶消化时间的筛选 胰蛋白酶消化时间设置为 15、20、25 和 30 min,每个组均设 3 个平行组,按设置的胰蛋白酶消化时间制备鳃细胞,取细胞悬液稀释 10 倍滴至血球计数板上,于光学显微镜下计数,细胞收获量以每克鳃重分离的细胞总数表示,并计算细胞存活率,方法同上。

1.3.3 离心力的筛选 鳃组织经消化后,离心、重悬收集鳃细胞,离心力设置为 150、200 和 300 g,每组均设 3 个平行,按设置的离心力制备鳃细胞,存活率计算方法同上,并观察鳃细胞形态。

1.4 鳃细胞原代培养基的优化

实验以 L-15 作为基本培养基,设置 4 个胎牛血清浓度梯度 5%、10%、15%和 20%,每组均设 3 个平行,分别培养 6、12 和 24 h,存活率计算方法同上。

1.5 B[α]P 实验梯度设置

实验所用 B[α]P 为美国 Sigma 公司生产,采用

DMSO 作为助溶剂配制 B[α]P 储备液, 将储备液加入 L-15 培养液中配制各染毒实验梯度, 染毒梯度设置为 2、4、8 和 16 μg/mL, 以未加 B[α]P 组为对照组, 且各实验染毒组 DMSO 浓度均为 0.1%。经预实验显示, DMSO 处理组和对照组的鳃细胞活性无明显差异。将制备的鳃细胞以 1.2×10^5 cells/孔接种于 96 孔培养板中, 加入含有 B[α]P 的 L-15 培养液, 以 6 个孔为 1 个平行组, 每个实验梯度均设 3 个平行, 进行原代细胞培养, 分别在 6、12 和 24 h 时取鳃细胞培养液, 检测鳃细胞活性。

1.6 鳃细胞活性的检测方法

1.6.1 台盼蓝拒染法 参考 Katsumiti 等(2018)的方法, 收集培养的鳃细胞, 调整细胞浓度为 10^6 cells/mL, 取 9 滴血细胞悬液, 加 1 滴 0.4% 台盼蓝染料, 混匀, 在 3 min 内用血球计数板分别计数活细胞和死细胞数量, 计算鳃细胞相对活性(%)=实验组细胞存活率/对照组细胞存活率 $\times 100\%$ 。

1.6.2 中性红比色法 在 B[α]P 染毒的细胞培养液中, 加入 10 μL 0.33% 的中性红溶液, 黑暗处孵育 1 h, 弃上清液, 用 PBS 洗涤底部沉淀 2 次, 加入 100 μL 乙酸乙醇裂解液(乙酸 1%、乙醇 50%), 20℃ 下孵育 15 min, 分别在波长 550 和 630 nm 下用酶标仪测定吸光度值(OD 值), 并以 $OD_{550\text{ nm}} - OD_{630\text{ nm}}$ 值为结果, 计算鳃细胞相对活性(%) = $OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

1.6.3 CCK8 法 在 96 孔鳃细胞培养板中, 每孔加入 10 μL CCK8 溶液, 在 37℃、CO₂ 培养箱中孵育 4 h, 然后去细胞培养液, 用酶标仪测定 450 nm 的 OD 值, 计算鳃细胞活性(%) = $(OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.7 数据处理与分析

所有数据均以 3 个平行组数据的平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan 检验法统计分析。

2 结果

2.1 栉孔扇贝鳃细胞制备方法的优化

2.1.1 消毒时间对栉孔扇贝鳃细胞存活率的影响

由表 1 可知, 栉孔扇贝鳃组织在消毒 10、20 和 30 min 时, 原代培养鳃细胞存活率无明显差异, 而消毒 40 min 时存活率显著下降; 经倒置显微镜观察, 消毒 10 和 20 min 时染菌明显, 30 min 时无染菌现象, 细胞状态良好(图 1)。

表 1 消毒时间对栉孔扇贝鳃细胞存活率的影响

Tab.1 Effects of disinfection time on the survival rate of *C. farreri* gill cell

项目 Item	消毒时间 Disinfection time /min			
	10	20	30	40
存活率 Survival rate/%	91.2 \pm 0.3	90.3 \pm 0.2	92.1 \pm 0.4	86.5 \pm 0.8

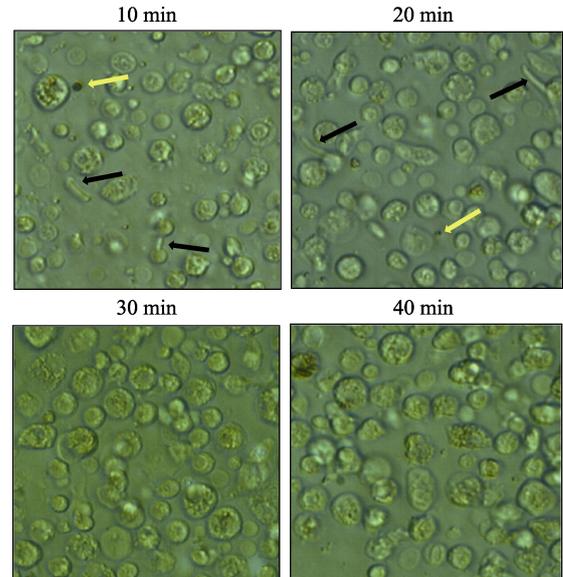


图 1 栉孔扇贝鳃组织在不同消毒浸泡时间下细胞染菌情况(40 \times)

Fig.1 Contamination of *C. farreri* gill cells after disinfectant treatment for different time (40 \times)

黑色箭头为细菌污染, 黄色箭头为黑胶虫污染
The black arrow indicates bacterial contamination, and the yellow arrow indicates black gum contamination

2.1.2 胰蛋白酶消化时间对栉孔扇贝鳃细胞存活率的影响 由表 2 可见, 胰蛋白酶消化时间对栉孔扇贝鳃细胞收获量影响显著。在消化 15、20 和 25 min 时, 原代培养鳃细胞存活率无明显差异, 而消化 30 min 时, 存活率显著下降。因此, 基于鳃细胞收获量和存活率, 栉孔扇贝鳃组织胰蛋白酶的最佳消化时间为 25 min。

表 2 胰蛋白酶消化时间对栉孔扇贝鳃细胞收获量和存活率的影响

Tab.2 Effects of trypsin digestion time on the amount and survival rate of *C. farreri* gill cell

消毒时间 Disinfection time /min	细胞收获量 Cell amount /($\times 10^6$ cells/mL)	存活率 Survival rate /%
15	0.98 \pm 0.3	91.7 \pm 0.4
20	1.32 \pm 0.1	91.3 \pm 0.2
25	1.68 \pm 0.3	91.6 \pm 0.3
30	2.26 \pm 0.2	82.6 \pm 0.4

2.1.3 相对离心力对栉孔扇贝鳃细胞存活率的影响

表 3 显示, 相对离心力对栉孔扇贝鳃细胞存活率影响显著。经倒置显微镜观察: 离心力过大时, 鳃细胞破损, 内容物释出, 细胞碎片较多(图 2)。因此, 相对离心力为 150 g 时, 栉孔扇贝原代培养鳃细胞存活率较高, 细胞完整性好。

表 3 相对离心力对栉孔扇贝鳃细胞存活率的影响

Tab.3 Effects of relative centrifugal force on the survival rate of *C. farreri* gill cell

项目 Item	相对离心力 Centrifugal force /g		
	150	200	300
存活率 Survival rate /%	91.8±0.4	87.1±0.2	75.6±0.3

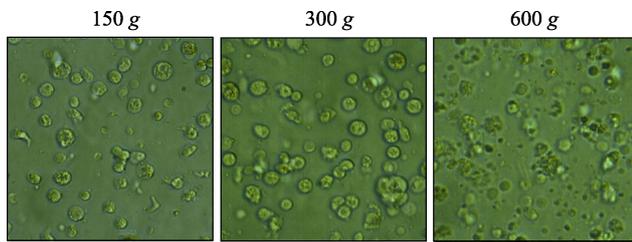


图 2 不同相对离心力收集后的栉孔扇贝鳃细胞
Fig.2 The gill cells of *C. farreri* collected by different relative centrifugal force

2.2 栉孔扇贝鳃细胞原代培养基的优化

从表 4 可以看出, 添加胎牛血清对栉孔扇贝原代培养鳃细胞存活率有明显影响。6~12 h 内, 各处理组鳃细胞存活率无显著变化; 培养 24 h 时, 5%和 20% 胎牛血清处理组存活率明显下降, 而 10%和 15%处理组存活率略有下降, 显微观察显示, 鳃细胞饱满, 活力好(图 3)。

表 4 添加胎牛血清对栉孔扇贝鳃细胞存活率的影响

Tab.4 Effects of FBS on the survival rate of *C. farreri* gill cell

胎牛血清含量 FBS content /%	细胞存活率 Cell survival rate /%		
	6 h	12 h	24 h
5	90.6±0.2	89.1±0.3	75.4±0.8
10	90.1±0.4	91.2±0.2	89.9±0.2
15	90.8±0.6	90.1±0.3	89.3±0.4
20	90.5±0.3	89.7±0.4	80.5±0.8

2.3 B[α]P 对栉孔扇贝鳃细胞活性的影响

采用台盼蓝拒染法检测显示, B[α]P 对栉孔扇贝原代培养鳃细胞活性无显著影响($P>0.05$) (图 4a)。由 CCK8 试剂法检测得出, B[α]P 对栉孔扇贝鳃细胞

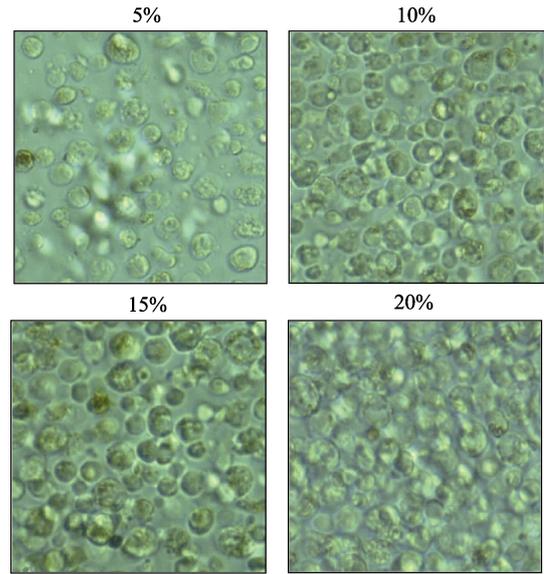


图 3 栉孔扇贝鳃细胞在不同浓度胎牛血清下原代培养 24 h 的显微观察结果
Fig.3 Gill cells of *C. farreri* after cultured under different FBS concentration

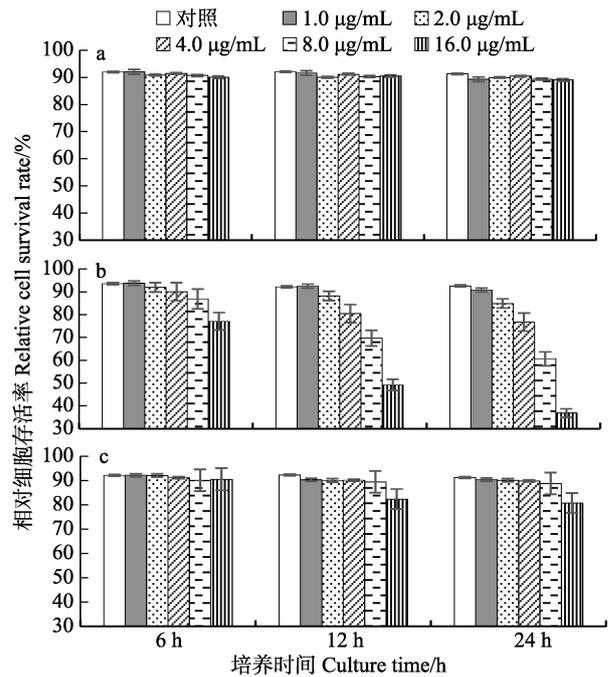


图 4 B[α]P 对栉孔扇贝鳃细胞活性的影响
Fig.4 Effects of B[α]P on the viability of *C. farreri* gill cell

a: 台盼蓝拒染法; b: 中性红比色法; c: CCK8 法
a: Trypan blue exclusion assay; b: Neutral red assay; c: Cell counting kit-8 assay

活性仅 16.0 μg/mL 处理组在 12 和 24 h 表现出显著的抑制效应($P<0.05$) (图 4c)。而中性红比色法显示, 除 1.0 μg/mL 处理组在 6、12 h 和 2.0 μg/mL 组在 6 h 外, B[α]P 对栉孔扇贝鳃细胞活性具有显著影响($P<0.05$),

其毒性与 B[α]P 染毒浓度、时间呈正相关(图 4b)。

3 讨论

越来越多的研究将贝类细胞作为体外模型用于环境监测和生态毒理学研究,而细胞的生存能力和功能活性是体外毒性实验的关键(Galgani *et al*, 2005)。本研究通过改进栉孔扇贝鳃细胞的制备方法和原代培养条件,分离得到了具有更高活力、更多数量且不易染菌的原代细胞。

3.1 贝类组织原代细胞制备技术

贝类鳃组织作为与外界水体直接接触的呼吸、滤食器官,鳃细胞的状态和活力直接受海水环境的影响,因此,选择鳃细胞作为毒性实验材料具有一定的代表性。而鳃丝表面富含黏液,极易附着微生物群,在原代细胞培养取材过程中,需进行严格的除菌处理(Yoshino *et al*, 2013)。邓瑞鹏等(2004)将僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)鳃组织于消毒液(由青链霉素 1000 U/mL 和 0.1%复方洗必泰配制而成)中浸泡 50 min,鳃细胞培养传至第 3 代并无明显染菌现象。据季爱昌等(2018)报道,栉孔扇贝心脏组织在消毒液(青霉素 100 IU/mL-链霉素 500 μg/mL、庆大霉素 100 IU/mL、制霉菌素 2 μg/mL)中处理 20 min,成功建立了可长期存活的原代培养细胞系。本研究利用青霉素 100 U/mL-链霉素 100 μg/mL 双抗、庆大霉素 80 U/mL 配制而成的消毒液,消毒浸泡 30 min 时,除菌效果最佳,能够保证鳃细胞原代培养活性。这说明在双壳贝类原代细胞培养中,组织消毒液成分主要为抗生素,且抗生素种类、剂量和消毒时间与除菌效果密切相关。研究表明,双壳贝类组织的消毒处理是细胞原代培养的关键,应根据原代培养细胞的目的和要求,选择适宜的消毒液和消毒时间。

与外植体法相比,酶消化法能在较短时间内分离并获得大量的原代细胞,且均一性好、便于观察、细胞增殖速度较快,这对毒理学实验至关重要(邓瑞鹏等, 2004; 艾庆辉等, 2012)。同时,酶解所获细胞经金属细胞筛去除未消化完的较大细胞团和组织,一般通过离心获得原代细胞。常用于分离脊椎动物细胞的胰蛋白酶、EDTA 剂量和酶解时间易使某些无脊椎动物细胞受损,而降低酶浓度或酶解温度、缩短处理时间能有效减少对细胞的损伤(Yoshino *et al*, 2013; 康恺等, 2020)。苗晶晶(2010)将栉孔扇贝消化盲囊置于 CMFS 缓冲液和胰蛋白酶分离 2 h,获得 6 种不同类型的消化盲囊细胞,原代培养 24 h 细胞存活率>80%。Yurdakök-Dikmen 等(2018)采用 0.125%胰蛋白酶温育

珠蚌鳃组织块 4 h,获得活力良好的鳃细胞。Faucet 等(2003)分别采用 180 g 离心 5 min、200 g 离心 10 min 收集紫贻贝(*Mytilus edulis*)消化盲囊、鳃原代细胞。本研究采用等体积的 CMFS 和 0.25%胰蛋白酶混合液,在 26℃下消化栉孔扇贝鳃组织 25 min,150 g 离心 5 min 后获得大量分布均匀、高存活率的原代细胞。说明在双壳贝类组织原代细胞制备过程中,酶解浓度、时间和离心力、离心时间与细胞存活率、形态、活性直接相关。

3.2 贝类组织细胞原代培养条件

在双壳类的外套膜、消化盲囊、鳃和心脏等组织细胞培养中,多采用 L-15 作为基础培养基。同时,胎牛血清含有大量细胞生长所必需的营养物质,常作为动物细胞培养基中的添加成分。Faucet 等(2003)研究表明,紫贻贝消化盲囊细胞在 L-15 培养基中,培养 72 h 后细胞活性可达 75%以上。Le Marrec-Croq 等(1999)将欧洲大扇贝(*Pecten maximus*)心脏细胞培养在 L-15 海水培养基中,可在体外培养 1 个月左右。据 Birmelin 等(1999)报道,在紫贻贝消化盲囊细胞的 L15 培养基中加入 10%胎牛血清,原代细胞培养存活时间长达 13 d。Lang 等(2000)在培养栉孔扇贝外套膜原代细胞时发现,M199 培养基中添加 20%胎牛血清,细胞存活时间、活性明显提高。季爱昌等(2018)比较了 3 个胎牛血清浓度(5%、10%和 20%)对栉孔扇贝心脏原代细胞的培养效果。研究表明,添加 5%胎牛血清时,细胞存活时间最长,且更易从组织块中迁出。本研究表明,在 L-15 培养基中添加 10%和 15%胎牛血清时,栉孔扇贝鳃原代细胞活性最高。L-15 培养基仅能满足双壳贝类组织细胞的存活、活性等,而添加胎牛血清可明显提高细胞生存状态。目前,双壳贝类组织细胞培养还处于探索阶段,尚未达到细胞系水平。因此,关于双壳贝类组织细胞培养基优化还需进一步研究。

3.3 B[α]P 对栉孔扇贝鳃细胞毒性效应

由于海洋无脊椎动物尚未培养出永久细胞系,因此,大多数研究集中在原代培养细胞的应用上,如用软体动物细胞评估环境中污染物的毒性(Pennec *et al*, 2001)。目前,体外细胞毒性检测方法有很多,如台盼蓝拒染法、四甲基偶氮唑(MTT)、二甲氧喹黄(XTT)比色、CCK8 法、中性红(NR)比色法和结晶紫比色法等,而相较于 MTT 和 XTT 等方法,CCK8 法没有细胞毒性,操作便捷,且更稳定、更灵敏(Su *et al*, 2017)。Domart-Coulon 等(2000)采用 MTT 法检测有机杀虫剂

Mexel-43 对长牡蛎(*Crassostrea gigas*)心脏细胞、蛤仔(*Ruditapes decussatus*)鳃细胞的活性影响。Morcillo 等(2016)研究表明,相较于 NR 比色法,MTT 法更适合测定重金属对金头鲷(*Sparus aurata*)成纤维细胞的毒性。本研究表明,栉孔扇贝鳃细胞在 B[α]P 胁迫浓度范围 2~16 μg/mL 时,采用 NR 比色法检测显示,鳃细胞活性显著下降,且下降程度与 B[α]P 胁迫时间、胁迫浓度呈显著正相关;CCK8 法检测的鳃细胞活性仅在 16 μg/mL B[α]P 处理 12 h 后明显下降;台盼蓝拒染法未检测出 B[α]P 对鳃细胞活性的影响。由此可见,不同海洋生物的组织细胞对不同种类的污染物敏感度不同,应筛选不同的细胞活性检测方法,这一点需引起研究者重视。

Pennec 等(2001)利用荧光素二乙酸酯(FDA)法、MTT 法、NR 方法检测了原油(含大量 PAHs)对欧洲扇贝消化盲囊原代培养细胞的毒性影响,认为 MTT 法和 NR 比色法可以反映 PAHs 对细胞的毒性作用。Gómez-Mendikute 等(2003)和刘静等(2009)研究表明,NR 比色法可分别作为检测贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)和栉孔扇贝血细胞在 B[α]P 胁迫下毒性效应的方法。这与本研究 NR 比色法适合检测 B[α]P 胁迫下栉孔扇贝鳃细胞活性的研究结果类似。台盼蓝拒染法、CCK8 法和 NR 比色法分别被用于评估膜结构的完整性、线粒体损伤和溶酶体损伤,说明 PAHs 对双壳贝类组织细胞溶酶体损伤最为严重,其受损程度远大于线粒体。研究表明,PAHs 作为一种亲脂类有机污染物,能够穿过细胞膜进入细胞,而溶酶体通过释放代谢酶与 PAHs 发生化学反应,有助于消除 PAHs 对细胞的毒性作用,可能对 PAHs 毒性较为敏感,适合作为 PAHs 对细胞毒性实验的检测指标。

综上所述,本研究优化了栉孔扇贝鳃细胞的制备方法,改进了培养基营养成分,为鳃原代细胞分离和培养提供了一种操作简便、快速可行的方法。同时,探索 B[α]P 对鳃原代培养细胞的毒性检测方法,筛选出中性红比色法可以作为评价 B[α]P 对栉孔扇贝鳃细胞毒性的检测方法,为海洋环境 PAHs 污染的细胞毒性评估提供了科学依据。

参 考 文 献

- AI Q H, LI Q F, MAI K S. Advances in research on fish cell culture techniques. *Progress in Fishery Sciences*, 2012, 33(3): 122-128 [艾庆辉, 李庆飞, 麦康森. 鱼类细胞培养技术研究进展. *渔业科学进展*, 2012, 33(3): 122-128]
- BIRMELIN C, PIPE R K, GOLDFARB P S, *et al.* Primary cell culture of the digestive gland of the marine mussel *Mytilus edulis*: A time-course study of antioxidant and biotransformation-enzyme activity and ultrastructural changes. *Marine Biology*, 1999, 135(1): 65-75
- BOLS N C, DAYEH V R, LEE L E, *et al.* Chapter 2 Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish: Piscine cell lines in environmental toxicology. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2005, 6: 43-84
- DAUGAVET M A, BLINOVA M I. Culture of mussel (*Mytilus edulis* L.) mantle cells. *Cell and Tissue Biology*, 2015, 9(3): 233-243
- DENG R P, HAN Y L, AO L M, *et al.* Tissue culture of oyster gills and the effects of TBTCI on cells activity. *Marine Environmental Science*, 2004, 23(2): 5-7 [邓瑞鹏, 韩雅莉, 敖丽梅, 等. 牡蛎鳃组织的培养及 TBTCI 对细胞活力的影响. *海洋环境科学*, 2004, 23(2): 5-7]
- DOMART-COULON I, AUZOUX-BORDENAVE S, DOUMENC D, *et al.* Cytotoxicity assessment of antibiofouling compounds and by-products in marine bivalve cell cultures. *Toxicology in Vitro*, 2000, 14(3): 245-251
- FAUCET J, MAURICE M, GAGNAIRE B, *et al.* Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis*. *Methods in Cell Science*, 2003, 25(3/4): 177-184
- 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. *Toxicology in Vitro*, 2001, 15(4): 477-488
- GACIC Z, KOLAREVIC S, SUNJOG K, *et al.* The impact of in vivo and in vitro exposure to base analogue 5-FU on the level of DNA damage in haemocytes of freshwater mussels *Unio pictorum* and *Unio tumidus*. *Environmental Pollution*, 2014, 191: 145-150
- GALGANI F, CHIFFOLEAU JF, LEGALL Y, *et al.* Deep sea caging of the mussel *Mytilus galloprovincialis*: Potential application in ecotoxicological studies. *Chemistry and Ecology*, 2005, 21(2): 133-141
- GÓMEZ-MENDIKUTE A, CAJARAVILLE M P. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in Vitro*, 2003, 17(5/6): 539-546
- JI A C, WANG H, YAN M, *et al.* Cell cultures from *Chlamys farreri* heart cells. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(2): 346-353 [季爱昌, 王华, 晏萌, 等. 栉孔扇贝心脏细胞的体外培养. *中国水产科学*, 2018, 25(2): 346-353]
- KANG K, WU J, YUAN L Y, *et al.* Establishment and optimization of an isolation and culture system for Sertoli cells of *Nile tilapia*. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 119-126 [康恺, 吴江, 苑麟勇, 等. 尼罗罗非鱼精巢支持细胞分离培养体系建立及优化. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 119-126]

- KATSUMITI A, THORLEY A J, AROSTEGUI I, *et al.* Cytotoxicity and cellular mechanisms of toxicity of CuO NPs in mussel cells in vitro and comparative sensitivity with human cells. *Toxicology in Vitro*, 2018, 48: 146–158
- LANG G H, WANG Y, LIU W S, *et al.* Research on tissue culture of shellfish. *Marine Sciences*, 2000, 24(4): 15–18 [郎刚华, 王勇, 刘万顺, 等. 贝类组织培养及其应用研究. *海洋科学*, 2000, 24(4): 15–18]
- LANG G H, WANG Y, LIU W S, *et al.* Study on primary culture of *Chlamys farreri* mantle cells. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 2000, 30(1): 123–126
- LE MARREC-CROQ F, GLAISE D, GUGUEN-GUILLOUZO C, *et al.* Primary cultures of heart cells from the scallop *Pecten maximus* (mollusca-bivalvia). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 1999, 35(5): 289–295
- LI X G, DENG W, ZHOU X, *et al.* Distribution of PAHs in surface seawater of Qingdao coast area and their preliminary apportionment. *Chinese Journal of Environmental Science*, 2012, 33(3): 741–745 [李先国, 邓伟, 周晓, 等. 青岛近岸表层海水中 PAHs 的分布特征及物源初步解析. *环境科学*, 2012, 33(3): 741–745]
- LI Y H, LI P, MA W D, *et al.* Spatial and temporal distribution and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface seawater from the Haikou Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 92(1/2): 244–251
- LIU J, PAN L Q. Screening and application of the haemocyte viability detection methods of scallop *Chlamys farreri*. *Periodical of Ocean University of China*, 2009, 39(6): 1198–1202 [刘静, 潘鲁青. 栉孔扇贝血细胞活性检测方法的筛选与应用. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2009, 39(6): 1198–1202]
- MIAO J J. Molecular mechanism behind the tonic effects of benzo(a)pyrene on scallop *Chlamys farreri*. *Doctoral Dissertation of Ocean University of China*, 2010 [苗晶晶. 苯并[a]芘对栉孔扇贝分子毒理学机制的研究. *中国海洋大学博士研究生学位论文*, 2010]
- MORCILLO P, ESTEBAN M Á, CUESTA A. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. *Chemosphere*, 2016, 144: 225–233
- NOGUEIRA L S, WOOD C M, GILLIS P L, *et al.* Isolation and fractionation of gill cells from freshwater (*Lasmigona costata*) and seawater (*Mesodesma mactroides*) bivalves for use in toxicological studies with copper. *Cytotechnology*, 2013, 65(5): 773–783
- PENNEC G L, PENNEC M L. Acinar primary cell culture from the digestive gland of *Pecten maximus* (L.): An original model for ecotoxicological purposes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2001, 259(2): 171–187
- SU K Q, PAN Y X, WAN Z J, *et al.* Smartphone-based portable biosensing system using cell viability biosensor for okadaic acid detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 251: 134–143
- YANG F, ZHAI Y X, REN D D, *et al.* Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by high performance liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet detection. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(5): 104–111 [杨帆, 翟毓秀, 任丹丹, 等. 高效液相色谱-荧光/紫外串联测定海洋沉积物中 16 种多环芳烃. *渔业科学进展*, 2013, 34(5): 104–111]
- YOSHINO T P, BICKHAM U, BAYNE C J. Molluscan cells in culture: Primary cell cultures and cell lines. *Canadian Journal of Zoology*, 2013, 91(6): 391–404
- YURDAKÖK-DIKMEN B, ARSLAN P, KUZUKIRAN Ö, *et al.* *Unio* sp. primary cell culture potential in ecotoxicology research. *Toxin Reviews*, 2018, 37(1): 75–81
- ZHU L M, LU Q. Benzo(a)pyrene—Environmental carcinogen. *Chinese Journal of Chemical Education*, 1993, 14(2): 3–6 [朱利民, 鲁氢. 苯并(a)芘—环境致癌物. *化学教育*, 1993, 14(2): 3–6]

Study of the Primary Culture of Gill Cells and B[α]P Cytotoxicity Detection Technology in the Scallop *Chlamys farreri*

ZHANG Zixian¹, TIAN Yimeng¹, LIU Zhi², PAN Luqing¹^①

(1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China;

2. Huangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong 266555, China)

Abstract In this study, the preparation method and primary culture conditions of *Chlamys farreri* gill cells were optimized. The toxic effects of benzo[a]pyrene (B[α]P) were compared and analyzed by three cell activity detection techniques. The results showed no significant difference in the survival rates of the primary cultured gill cells disinfected with 1% penicillin-streptomycin solution (Pen-Strep) and gentamicin for 10~30 min. There were also no bacterial infections observed in the microscopic examinations after 30 min, and the cells were in good condition. The effect of trypsin digestion time on the harvest of gill cells was significant. Within 15~25 min of digestion, the survival rate of the gill cells was higher, and the best trypsin digestion time was 25 min. With 150~300 g relative centrifugal force, the morphology and survival rate of the gill cells significantly differed, and the survival rate and cell integrity were better at 150 g. There were no changes in survival within 6~12 h after adding fetal bovine serum (FBS, 5%~20%). At 24 h, the survival rates of the 5% and 20% treatment groups decreased significantly, but the 10% and 15% treatment groups were unaffected. The cytotoxicity of B[α]P on the scallop gill cells was detected by three cell activity tests, and the results showed no change in the activity of the gill cells with the trypan blue exclusion assay. The cell counting kit-8 assay showed that the activity of the gill cells was significantly inhibited at the highest concentration (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$), while the neutral red assay showed a positive toxicity correlation between the B[α]P concentration and time. These results suggest that the best preparation method for *C. farreri* gill cells is disinfection for 30 min, trypsin digestion for 25 min, relative centrifugal force at 150 g, and the addition of 10% fetal bovine serum to the primary culture medium. The neutral red assay can be used as a sensitive index to evaluate the toxicity of B[α]P.

Key words *Chlamys farreri*; Gill cells; Primary culture; B[α]P; Cytotoxicity

① Corresponding author: PAN Luqing, E-mail: panlq@ouc.edu.cn