

文章编号: 1004-7271(2000)04-0362-04

·研究简报·

## 草鱼囊胚细胞系的生物学特性

### The biological characteristics of grass carp blastula cell line

叶湘辉, 刘汉勤, 王铁辉

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

YE Xiang-hui, LIU Han-qin, WANG Tie-hui

(Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072, China)

关键词: 草鱼囊胚; 细胞系; 草鱼出血病病毒

Key words: grass carp blastula; cell line; hemorrhagic virus of grass carp

中图分类号: S917 文献标识码: A

国外鱼类细胞培养始于60年代<sup>[1]</sup>。我国起步较晚,主要取材于鲤科经济鱼类,多为对草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)出血病病毒(GCHV)敏感的细胞系/株<sup>[2-5]</sup>。本实验室为了进行GCHV的分离、培养及鱼类干扰素的诱导和鉴定等鱼类遗传育种研究,从1989年4月起开始进行草鱼囊胚细胞培养,建立了草鱼囊胚细胞系(GCB)。目前,该细胞系已传至200余代,部分保存于液氮中。本文对其部分生物学特性进行了分析。

## 1 材料

### 1.1 细胞

试验草鱼受精卵取自广东南海。胚胎发育至囊胚期,以含抗菌素的平衡盐溶液浸洗、分散胚胎细胞后,在含20%新生牛血清的TC199培养基中培养。原代培养3d后换新鲜培养基,5d后开始传代培养。细胞传代10次后,培养基中血清浓度逐渐由20%降低到10%。

将液氮中保存的85代GCB细胞取出,融冻复苏,用含10%新生牛血清的TC199培养基进行传代。每隔3~5d用消化液ET进行传代扩增,分别对GCB细胞的各项生物学特性进行分析(ET是以不含 $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ 的PBS配制的0.25%胰酶和0.02%EDTA溶液等量混合而成)。

### 1.2 病毒

草鱼出血病病毒毒株GCHV-873<sup>[6]</sup>,病毒在CIK(草鱼肾组织细胞系)细胞<sup>[3]</sup>中繁殖,收集细胞培养液,差异离心纯化,病毒悬浮于PBS溶液中,病毒滴度为 $10^6$ TCID<sub>50</sub>/mL。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞的形态学观察

培养细胞经卡诺固定液固定后,Giemsa染色观察。草鱼囊胚细胞在原代培养和传代培养的初期为

收稿日期: 1999-12-15

作者简介: 叶湘辉(1975-),女,湖南怀化人,硕士,攻读细胞及分子遗传学方向。

上皮样细胞和成纤维样细胞的混合型。经过连续传代,细胞形态发生了变化。稳定生长后的 GCB 细胞主要为成纤维样细胞,以单核为主,核呈圆形或椭圆形(图版-1)。

## 2.2 细胞的染色体数目

细胞经秋水仙素处理后,按常规染色体制片法制片、染色,油镜下选择分散较好的中期分裂相摄影计数,根据染色体数各区段的出现率作图。从图 1 看,染色体数目变动范围较大,中心趋向为 93~106,占计数细胞总数的 34.8%,其次为 79~92,占 21.2%。正常的草鱼细胞染色体数为  $2n = 48$ ,可见 GCB 细胞已属异倍体。其中期分裂相如图版-2。

## 2.3 生长曲线和分裂指数

按本试验常规法<sup>[5]</sup>,用稳定生长的细胞进行生长曲线和分裂指数的测定,结果见图 2。接种后第 1 天细胞数目减少,观察到了延迟期。第 2 天细胞数量上升,接近接种量。3d 后细胞进入对数生长期,随之进入稳定生长期,第 8 天左右细胞数量达到最高值。此后细胞数目开始下降,进入对数死亡期。按倍增时间( $t$ )公式  $t = 0.301T / (\lg N_2 - \lg N_1)$  ( $T$  是两次细胞计数的时间间隔,  $N_1, N_2$  分别是先后两次的细胞计数值)推算得接种后 1~2d 的倍增时间为 67.9h, 2~3d 为 30h, 4~5d 为 32h, 6~7d 为 73.7h。从图 2 还可看出,细胞刚接种后分裂指数较高,第 2 天达到高峰,以后呈波动式下降,第 8 天接近零值。分裂指数与生长曲线从发展态势上基本吻合。

## 2.4 细胞对温度的适应范围

以  $1.6 \times 10^5$  个细胞/mL 的密度接种细胞,分置 9、16、20、24、28、32、37℃ 下培养。以测定细胞数与接种细胞数的比值表示相对生长率。图 3 表明 GCB 细胞在 16~37℃ 下均能生长。28℃ 下生长最快,为最适温度。在 9℃ 时仍有部分细胞能贴壁和伸展,但细胞多数死亡。可见 GCB 细胞在 9℃ 以下不能正常生长。

## 2.5 最适 pH

用 pH 分别为 5.4、6.4、7.0、7.6、8.0、8.5 的培养液重新悬浮离心后的细胞悬液,使密度为  $2.0 \times 10^5$  个/mL。4d 后收集细胞,以测定细胞数与接种细胞数的比值表示相对生长率。图 4 表明细胞在偏酸性 (pH 5.4 以下) 和偏碱性 (pH 8.5 以上) 条件下难以生长,在 pH 6.4~7.6 间均生长良好,最适 pH 为 7.0 左右。

## 2.6 对病毒的敏感性

将病毒液以一定稀释度感染细胞,通常 10~18h 内表现出明显的细胞致病作用 (CPE)。低倍显微镜下观察到病毒裂解细胞后形成的空斑。空斑中残有一些细胞成分,空斑周围细胞界限不明显,并可发

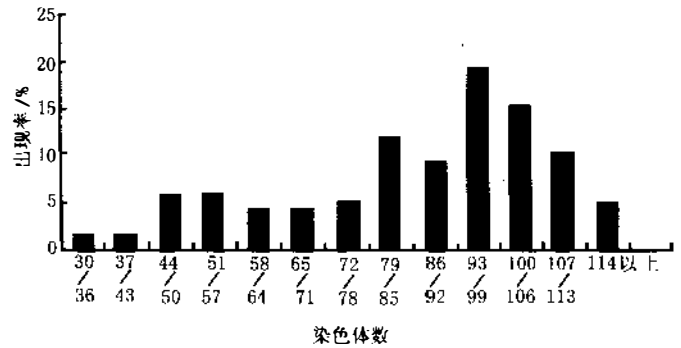


图 1 第 87 代 GCB 细胞的染色体数目分布图

Fig. 1 The distribution of chromosome numbers of GCB cells at passage 87

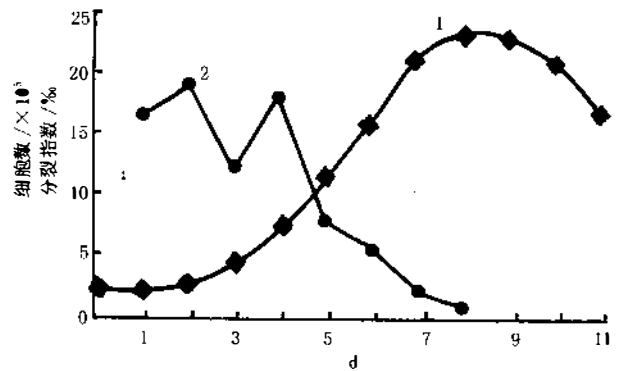


图 2 第 90 代 GCB 细胞生长曲线和分裂指数

Fig. 2 The growth curve and the index of mitotic division of GCB cells at passage 90

注: 1. 生长曲线; 2. 分裂指数曲线

现几个细胞形成合胞体的现象(图版-3)。。本实验室曾对所用的草鱼出血病病毒毒株 GCHV-873 的致病性进行过研究<sup>[7]</sup>。研究结果显示病毒对机体的致病性与体外直接感染培养细胞的能力不一致。873株感染培养细胞出现典型的 CPE,而感染健康草鱼未见发病死亡,和以往报道不一致<sup>[6]</sup>。可能是由于 873 株为培养细胞增殖的病毒,经过多年体外培养,细胞连续传代,毒力逐渐减弱了。

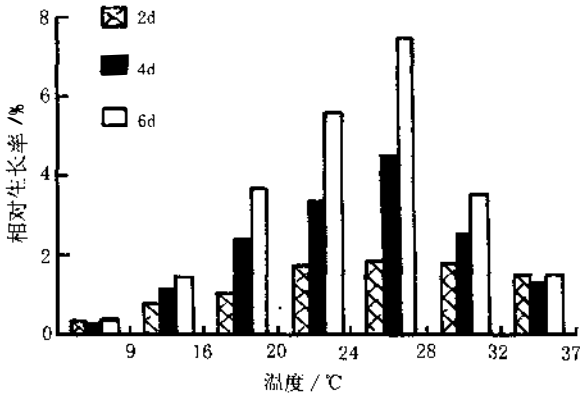


图3 温度对 GCB 细胞生长的影响

Fig.3 The effect of temperature on the growth of GCB cells

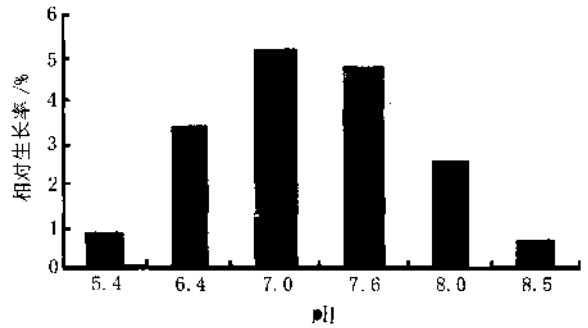
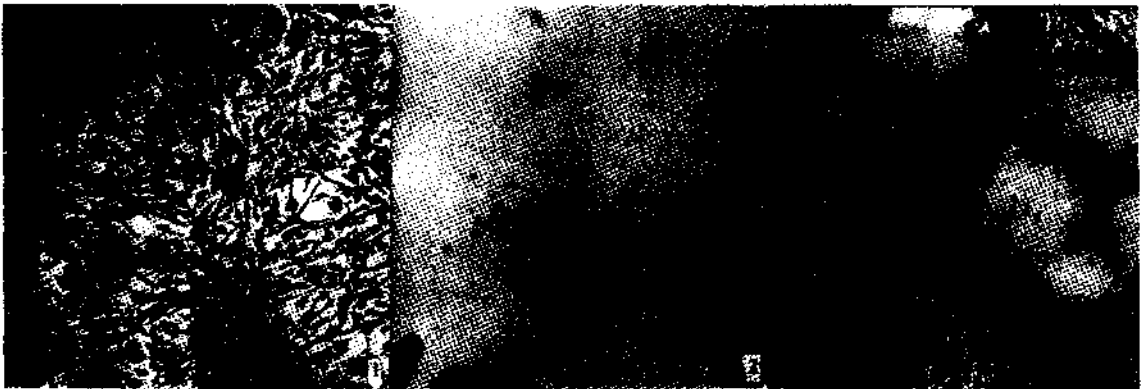


图4 pH对 GCB 细胞生长的影响

Fig.4 The effect of pH on the growth of GCB cells



图版 Plate

1. GCB 细胞的形态学观察 ×106; 2. 87 代 GCB 细胞染色体形态观察 ×1000; 3. 病毒感染细胞形成空斑 ×106。

### 3 结论

草鱼囊胚细胞建系已近 10 年,对其生物学特性的研究表明:GCB 细胞主要由成纤维样细胞组成,染色体数目已异倍化;传代接种后 2d 分裂指数最高,8d 细胞数目最大,种群倍增时间为 30~73.7h;GCB 的生长温度范围较宽(16~37°C),最适生长温度为 28°C;受 pH 限制较小,最适 pH7.0 左右。

GCB 细胞对草鱼出血病毒敏感,这一特性使其具有一定的研究和应用价值<sup>[6,8-9]</sup>,如病毒扩增和分离鉴定,培养细胞疫苗的研制以及鱼用干扰素的研究。GCB 细胞为本实验室正在开展的鱼类干扰素的诱导、检测、鉴定及其基因克隆的研究等提供了材料。采用紫外线灭活的 GCHV 诱导几种鲤科鱼类培养细胞产生干扰素,GCB 细胞的干扰素诱导率仅次于 CAB(鲫鱼囊胚细胞系)细胞,经诱导能产生较高滴度的干扰素<sup>[10]</sup>。

**参考文献:**

- [1] Wolf K, Quimby M C. Established eurythermic line of fish cells in vitro [J]. *Science*, 1962, 135: 105 - 106.
- [2] 张念慈, 杨广志. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S<sub>1</sub> 的建立和特征观察[J]. *实验生物学报*, 1981, 14(1): 101 - 105.
- [3] 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性[J]. *水产学报*, 1986, 10(1): 11 - 17.
- [4] 魏彦章, 陆仁后, 白国栋. 草鱼尾鳍组织二倍体细胞 GCCF-2 的建立及其部分生物学特性的分析[J]. *水生生物学报*, 1986, 10(3): 293 - 294.
- [5] 陈敏容, 陈宏溥, 易泳兰. 鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性[J]. *水产学报*, 1985, 9(2): 121 - 130.
- [6] 柯丽华, 方 勤, 蔡官权. 一株新的草鱼出血病分离物的特性[J]. *水生生物学报*, 1990, 14(2): 153 - 159.
- [7] 李 军, 王铁辉, 周立舟. 两种草鱼出血病病毒株的比较[J]. *中国水产科学*, 1998, 5(3): 115 - 118.
- [8] 杨先乐, 夏 春, 左文功, 等. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究[J]. *水产学报*, 1989, 13(2): 138 - 144.
- [9] Snieszko J. Induction of interferon synthesis in rainbow trout leukocytes by various homotherm viruses[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1993, (3): 191 - 198.
- [10] 张义兵, 王铁辉, 李戈强, 等. 鲫鱼囊胚细胞和干扰素诱导及部分特性[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(2): 163 - 169.