

草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性*

左文功 钱华鑫 许映芳 杜森英 杨先乐

(长江水产研究所)

提 要

作者于1982年1月开始进行草鱼肾组织单层细胞培养,至今已连续培养32个月,传至120多代,建立了细胞系,定名为草鱼肾组织细胞系(CIK)。本文介绍了原代和传代培养、细胞形态、细胞生长速度和分裂指数、细胞的保存和对温度的适应性、细胞染色体分析以及细胞系对病毒敏感性的试验和研究结果。CIK生长迅速、适应性强、以20°—38°C生长较好,28°C左右生长稳定,pH为6.5时仍能保持致密单层,染色体数为非整倍体,众数为55。对草鱼出血病左右病毒FRV具敏感性。

主题词:草鱼、肾脏、细胞系、出血病、草鱼肾组织细胞系

鱼类细胞系的建立是研究鱼类病毒学和细胞生物学的重要基础。自Clem等(1961)报告建立GF-1细胞系以后,据Wolf和Mann(1980)统计,到1979年为止国外相继报告来自冷水性和温水性真骨鱼类组织的细胞系已有61种。我国张念慈和杨广智(1981)曾报告了草鱼吻端组织二倍体细胞株ZC-7901及其亚株ZC-7901S₁的建立。台湾省陈秀男和郭光雄(1981)亦报告建立了鳊鱼卵巢组织细胞系。陈秀男等(1982、1983)还先后报告建立了鳊鱼肾脏组织和罗非鱼卵巢组织细胞系。但是到目前为止尚未见草鱼肾脏组织细胞系的建立。

草鱼出血病是当前危害草鱼的一种严重的病毒性疾病。为了对这种疾病的病原学和预防方法等方面进行研究,我们从1979年开始了鱼类组织单层细胞的培养研究,并于1982年1月正式着手草鱼肾脏组织单层细胞的培养,至今已连续培养32个月,传至120代,建立了细胞系,定名为草鱼肾组织细胞系(CIK)。本文报告了这一工作。

材 料 和 方 法

1. 原代细胞培养和传代培养 肾脏材料采用经室内暂养二个多月的二龄健康草鱼,先用0.01%高锰酸钾溶液浸泡消毒半小时,再用70%酒精在解剖部位擦洗,然后用无菌手术取出约0.5立方厘米的肾脏组织,在无菌室中剪碎,用Hanks液洗涤3—4次,用含

* 贺路、曾令兵、黄木桂参加部分工作,超薄切片和电镜观察由中国科学院武汉病毒所协作进行;本文初稿经谢天恩副研究员、冯玉孙副教授、胡解都副教授审阅并提出宝贵意见,在此一并致谢。——作者。

0.25%胰蛋白酶的原代细胞消化液进行热消化(20°C, 30分钟左右)。消化完毕,吹打分散,离心,倒去上清液,用 Hanks 液重悬,离心,再用培养液重悬,最后分装培养。分装培养的细胞浓度为 2×10^6 至 8×10^6 个细胞/毫升。

传代培养的消化液为胰酶-EDTA 混合消化液,其中胰酶含量为 0.1%, EDTA 为 0.02%。

培养温度是 28°C, 培养液开始用含 15%小牛血清的 Eagle MEM (日本制药株式会社生产),以后小牛血清含量降到 10%,培养液的 pH 为 7.2—7.4。

2. 细胞形态 将细胞悬液接种于预先放有 26×10 毫米小载玻片的小瓶内,经过一定时间培养,取出小载玻片,风干,用 Carnoy 氏液固定, H. E. 染色,制成标本在显微镜下观察。另外,用位相差倒置显微镜对活体细胞进行观察。

3. 细胞生长速度和分裂指数的测定 用不同浓度细胞传代,观察细胞生长情况。并以 25×10^4 个细胞/毫升的浓度传代,然后在每个选择的温度下同时放置二个培养瓶,每天定时观察,记录长成致密单层所需的培养时间。另外将等量的浓度为 25×10^4 个细胞/毫升的悬液分装 20 多个小瓶,在 28°C 条件下培养,每隔 24 小时任取三瓶计数,按平均值绘出生长曲线,并计算最大增长倍数及其倍增时间。

再将细胞制成 25×10^4 个细胞/毫升的悬液,接种于预先放有 26×10 毫米小载玻片的小瓶内,置 28°C 条件下培养,每隔 24 小时任取三个小载玻片,用 Carnoy 氏液固定, H. E. 染色,制成标本。然后用油镜统计 3000 个细胞的分裂指数,以其千分比作为分裂指数,并绘制成曲线图。

4. 细胞对温度的适应性和保存 将细胞放在不同温度下观察其对不同温度的适应性。另外将细胞用 10%甘油培养液制成悬液,先在 4°C 条件下放置 2 小时,再在 -20°C 条件下放置 2 小时,最后缓慢放入液氮罐中保存。复苏时用 37—40°C 温热水迅速使其解冻,离心后倒去保存液,用新鲜培养液重悬培养。为了达到实验室多途径保存细胞的目的,除上述液氮保存外,还探讨了其它较简便的保存方法。

5. 细胞染色体分析 用 CIK 细胞,在传代后 68 小时用秋水仙素在 28°C 条件下处理 4 小时(秋水仙素最终浓度为 0.2 微克/毫升),然后用 0.046M 氯化钾液低渗半小时,再用甲醇冰醋酸固定液(甲醇:冰醋酸为 3:1)固定 2 次,用 1:9 的 Giemsa 液染色 45 分钟,最后制成标本,用油镜观察统计。

6. 对病毒的敏感性 用草鱼出血病病毒(FRV)感染 CIK 细胞,进行敏感性试验。并将已感染的 CIK 细胞经超薄切片,同时将感染的 CIK 细胞冻融,低速离心除去细胞碎片,再经差异离心提纯病毒,最后进行电镜观察。另外,还用 10—13 厘米的草鱼种反复进行细胞毒的回接试验。除上述对病毒的敏感性试验外,还通过病毒感染 CIK 细胞后的 TCID₅₀ 的测定,确定在 CIK 细胞内病毒滴度升高的情况。

结 果

1. 建系过程

在原代细胞培养过程中曾换过培养液一次,培养大约半个月左右,细胞生长茂密,

即进行第一次传代。原代细胞培养开始的浓度是 8×10^6 个细胞/毫升, 当时认为太浓, 间隔 2 小时将其中一瓶稀释成 2×10^6 个细胞/毫升分装培养, 但最后都得到了单层细胞, 进行了传代。第二次到第五次传代培养的时间是 5—12 天, 第五代以后生长较稳定, 而且对培养环境也比较适应, 一般 4 天以后即可传代。传代培养的接种密度一般为每毫升 20 万个细胞左右。CIK 细胞从原代培养开始至今, 已连续培养二年多, 继代培养 120 多次, 不但生长旺盛未见衰退, 而且对培养环境的适应性亦强, 当培养液的 pH 下降到 6.5 时, 细胞的致密单层仍能维持较长时间。图 1 为 CIK 正常细胞。

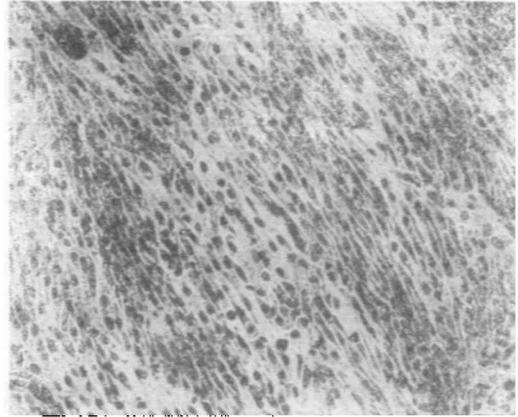


图 1 正常的 CIK 细胞

Fig. 1 The normal cells of CIK

2. 细胞形态

将 CIK 细胞固定、染色后, 在光学显微镜下任意选择视野观察, 统计了 1500 个细胞, 按其形态特征予以分类, 结果列于表 1。

表 1 CIK 细胞形态分类

Table 1 The morphological kinds of CIK

细胞类型 classifications of cells	各种细胞数的百分比 (%) percentage of cells (%)
纤维样细胞 fibre cell	98.3
多边形细胞 polygon cell	1.4
巨形细胞 giant cell	0.3

从表 1 可以看出, CIK 细胞系以纤维样细胞占绝对优势, 为总数的 98.3%, 其它形态细胞比例甚小。纤维样细胞大多为单核, 少数有两个核, 核仁数可多到 3—5 个不等。

3. 细胞生长速度和分裂指数

CIK 细胞生长迅速, 传代接种后长满单层的时间与细胞接种浓度和温度有关。在相同的温度条件下, 接种浓度越大长满单层的时间越短。在 28°C 条件下接种后不到 1 小时大多数细胞就贴壁, 3 个多小时后大部分细胞就沿壁伸长。传代培养的接种浓度在 25 万个细胞/毫升时, 在 20°C 条件下第 5 天长满单层; 27°C 第 4 天长满单层; 31°C 第 3 天长满单层; 36°C 第 2 天长满单层。可以看出, 在适宜温度范围内, 温度越高长满单层所需时间越短。第 98 代 CIK 细胞在 28°C 条件下的生长情况见表 2 和图 2。

表2 CIK 细胞(第98代)的增殖情况
Table 2 The reproduction of CIK (98th generation)

培养天数 cultured days	0	1	2	3	4	5	6
细胞数 ($\times 10^4$ 细胞/毫升) number of cells ($\times 10^4$ cells/ml)	26	32	39.4	46.8	56.5	70.8	84.5

根据倍增时间 $TD = \frac{T \cdot \lg 2}{\lg \frac{N_t}{N_0}}$ 公式,求得第6天细胞增长近3.5倍,倍增时间为84.6

小时。

图3为细胞分裂指数曲线。从图3可以看出CIK细胞从第1天到第4天分裂指数迅速升高,第4天分裂指数最高为33.7%。以后几天则下降。

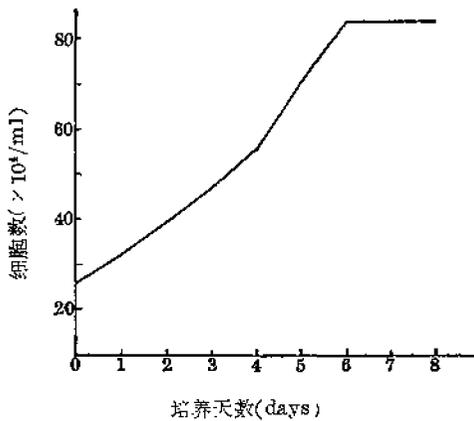


图2 第98代CIK细胞在28°C条件下的生长情况
Fig. 2 The growing curve of CIK (98th generation) under 28°C

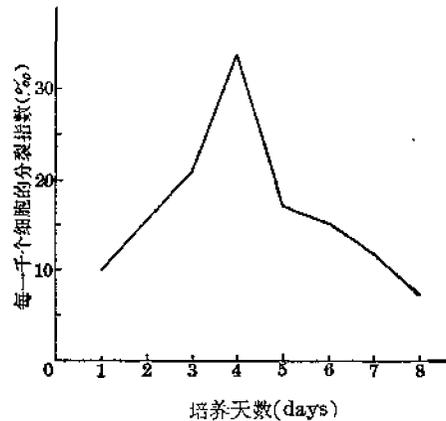


图3 第98代CIK细胞分裂指数曲线
Fig. 3 The fission index curve of CIK (98th generation)

4. 细胞对温度的适应性及保存

CIK细胞生长温度范围广泛,在11—40°C的条件下都可以生长,以20—38°C生长较好。但温度在28°C左右生长较稳定,并能维持较长时间,最长观察到20天仍是致密单层细胞,仍能正常传代。目前我们实验室短期保存CIK细胞的温度为20°C,在这个条件下所放置的各代细胞,一般保存1—2个月仍可传代。这里要特别提出的是,在这个条件下,在1983年4月20日放置的第14代细胞至1984年3月28日传代长势仍很好,已继代几次。

在普通冰箱4°C条件下贮存的CIK细胞最长期达一个月亦能传代。这里有二种情况,一种情况是细胞未脱壁,从冰箱取出即可传代;另一种情况是细胞全部脱落,这时就需要放到28°C温箱中,待细胞重新贴壁换液后长满单层时再传代。

按前述方法已在液氮中保存3个月的细胞仍可复苏,其活力未变。

上述细胞保存方法和数据仅仅是初步的结果,还有待今后继续研究。

5. 细胞染色体分析

草鱼染色体 $2N=48$ 。CIK 细胞第 26 代染色体数为 48 者占计数细胞总数的 66%，以二倍体细胞为主，但第 47 代细胞基本上已变为非整倍体。从 CIK 第 88 代细胞的 100 个分裂中期的染色体来看，本细胞系染色体数目分布为 28—117 个，都为非整倍体。染色体数目的优势范围在 55—61 个（占总数的 43.0%），第一优势数为 55 个（占总数的 17.0%）（见图 4）。图 5 为第 88 代 CIK 细胞染色体。

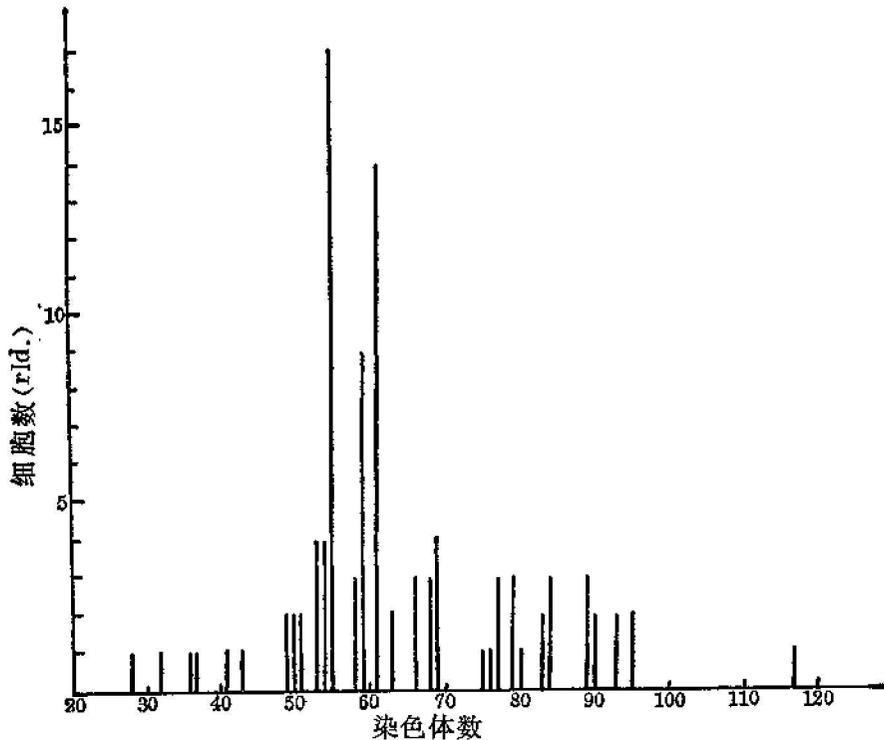


图 4 第 88 代 CIK 细胞的染色体分布

Fig. 4 The chromosome distribution of CIK (88th generation)

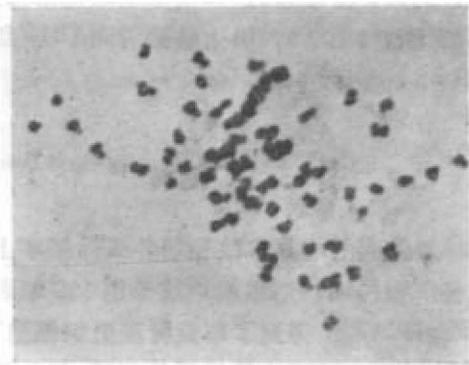


图 5 第 87 代 CIK 细胞的染色体

Fig. 5 The chromosome of CIK (87th generation)

6. 对病毒的敏感性

用草鱼出血病病毒(FRV)感染 CIK 细胞,在 28°C条件下,一般 3—4 天出现细胞致病作用(CPE)(见图 6 和图 7),细胞收缩,崩解。病毒滴度亦显著上升,如表 3 所示。

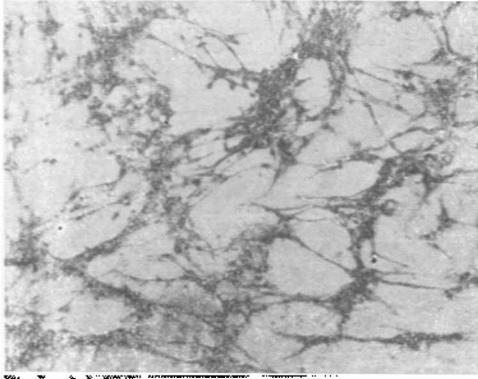


图 6 感染草鱼出血病病毒的 CIK
Fig. 6 The CIK infected by FRV

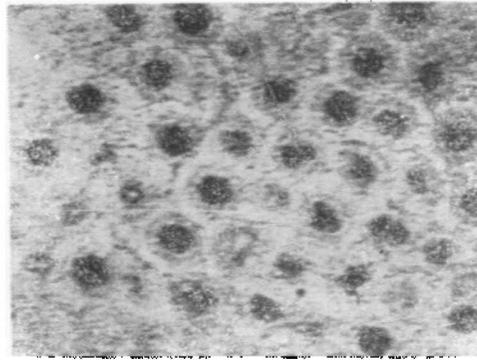


图 7 CIK 细胞中繁殖的病毒颗粒
Fig. 7 The reproduced virus in CIK

表 3 CIK 细胞系对草鱼出血病病毒的敏感性

Table 3 The sensitivity of CIK to FRV

细胞系 cell line	病毒 virus	最初接种病毒量 initial inoculum of virus (cells/ml)	接种 6 天后病毒的滴度 The titre after 6 days (TCID ₅₀ /ml)	CPE
CIK	FRV	2×10^3	10^9	+

将感染草鱼出血病病毒的 CIK 细胞回接健康草鱼,在 26—28°C 条件,一般 5 天左右,草鱼开始发病死亡,并复制出天然的出血病症状,然后再将这种病鱼组织制成病毒悬液感染正常 CIK 细胞,则 CIK 细胞又出现致病作用,再将带毒的 CIK 细胞回接草鱼,又得到理想的结果。第一次回接鱼的死亡率为 66.7%,再次回接鱼的死亡率增加到 85.7%,说明经继代毒力亦显著增强。另外,将带毒的 CIK 细胞经超薄切片,或者经差异离心浓缩提纯,用电镜都能观察到病毒颗粒(图 7)。以上结果说明 CIK 细胞对草鱼出血病病毒(FRV)具有敏感性。

讨 论

1. 试验结果表明,鱼类单层细胞的培养方法和培养条件基本上和哺乳动物的单层细胞培养方法相近。张念慈和杨广智(1981)用组织块法采用 199 培养基获得了 ZC-7901 细胞株,我们用热消化法采用 Eagle MEM 得到了草鱼肾脏组织细胞系 CIK。

2. 鱼类细胞在离体培养时对温度的适应性还是较强的,但是是否所有鱼类对低温的耐受力都大大超过对高温的耐受力,还是依鱼的种类和组织来源不同而有所不同,尚需

进一步观察。

3. 关于用液氮贮存鱼细胞前,用什么方法将贴壁细胞制成悬液较好, 还需进一步研究。我们的工作证明用胰酶——EDTA 消化法是可以的, 但最佳方法尚需进一步研究。

4. 我们用 CIK 第 87 代和第 89 代细胞做了两次集落形成效率 (Plating efficiency) 都未得到结果。另外, CIK 细胞的生长速度, 长满单层的时间与培养液中小牛血清的浓度亦有很大关系, 这都说明 CIK 细胞尚未转化。

参 考 文 献

- [1] 张念慈、杨广智, 1981. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S₂ 的建立和特性观察。水产学报, 5(2):111—119.
- [2] 王凯华, 1983. 人体胃低分化粘液腺癌细胞系 MGc80-3 的建立及其生物学特性的初步观察。实验生物学报, 16(3):257—267.
- [3] 陈瑞铭等, 1978. 人体肝癌体外细胞系 BEL-7402 的建立及其特性。实验生物学报, 11(1):37—47.
- [4] 江草周三, 1978. 鱼の感染症。恒星社厚生阁。
- [5] Chen, S. N. and G. H. Kou, 1981. A cell line derived from Japanese eel (*Anguilla japonica*) ovary. *Fish Path.*, 16(3): 129—137.
- [6] Chen, S. N., S. C. Chi, Y. Ueno and G. H. Kou, 1983. A cell line derived from Tilapia ovary. *Fish Path.*, 18(1): 13—18.

A CELL LINE DERIVED FROM THE KIDNEY OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*)

Zuo Wengong, Qian Huaxin, Xu Yingfang, Du Shenying and Yang Xianle

(Changjiang Fisheries Institute)

Abstract

A fibroblast-like cell line derived from kidney of healthy Grass Carp (*Otenopharyngodon idellus*) was established and designated CIK which has been passed for 126 time since its initiation in January, 1982.

The medium used in the cultivation is Eagle MEM (Nissui Seiyaku Co., LTD) supplemented with 10–15% fetal bovine serum. The incubation temperature is at 28°C.

Chromosome number at passage level of 88 ranged from 28 to 117 with a modal number of 55.

CIK cell line is susceptible to FRV.

Key Words: Grass Carp, Kidney, Cell line, Wemorrahgo, CIK