

文章编号: 1004-7271(2003)01-0012-07

金鱼疱疹病毒敏感细胞的体外培养

李霞^{1,2}, 福田颖穗³

- (1. 上海水产大学渔业学院, 上海 200090;
2. 中国水产科学院珠江水产研究所, 广州 510380;
3. 日本国东京水产大学水族病理研究室, 东京 108-8477)

摘要 采用组织块法和胰蛋白酶消化法对金鱼细胞进行体外培养和传代, 研究了高倍稀释、培养液中的小牛血清浓度以及冷冻保存等因子对显示出较高的增殖能力的来源于鳍的细胞 GFF 的影响进行了试验, 并对其进行金鱼疱疹病毒接种、病毒传代培养等试验和电子显微镜观察。结果不论是高倍稀释, 还是在低浓度小牛血清培养液 H-MEM-5 中培养, 细胞均具有足够的增殖速率, 而且冷冻保存在细胞在解冻后的培养仍然具有较好的增殖能力, 细胞的存活率在 85% 以上, 使此细胞的冷冻保存成为可能, 同时, 接种细胞出现了 CPE 且病毒传代培养的细胞内和培养液中均观察到病毒颗粒, 表明 GFF 细胞可以支持病毒的增殖, 为研究金鱼病毒奠定了基础。

关键词 金鱼细胞; 疱疹病毒; 体外培养; 传代

中图分类号: S941.41 文献标识码: A

In vitro culture of goldfish cell sensitive to goldfish herpes virus

LI Xia^{1,2}, FUKUDA Hideo³

- (1. Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;
2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
3. Lab of Fisheries Pathology Research, Fisheries University of Tokyo, Tokyo 108-8477, Japan)

Abstract By using the technique of tissue culture, we successfully obtained the cell from goldfish fin, skin, eye, heart, spleen, spermary, swim bladder and kidney. Among them, GFF (cell from goldfish fin) has the strongest proliferating ability. Tests of high times dilution, decreasing the percent of newborn calf serum and freezing conservation with GFF indicate that high times dilution cell still have the normal proliferating ability; GFF can be cultured in H-MEM-5; after defrosting, GFF still maintained high proliferating ability and the cell survival rate is 85%. At the same time, GFF was inoculated with herpes virus of goldfish, after CPE appeared, the passaged virus was observed by electron microscope. The results indicate that GFF cell can sustain the propagation of herpes virus of goldfish, and this established the basis of researches about goldfish virus.

Key words goldfish cell; herpes virus; *in vitro* culture; passage

1999 年 4 月始, 日本埼玉县发生养殖金鱼的异常死亡。东京水产大学水族病理研究室从病鱼的肾脏中分离到疱疹样病毒, 将该病毒接种于 RTG-2, FHM, EPC 等细胞株, 结果这些细胞株对此病毒均不敏感^[1,2]。敏感细胞的建立在病毒的分离、定量、病毒的性状解析以及抗血清和单克隆抗体的制备等领

域的研究中起着重要的作用。为检测病毒而进行的鱼类细胞原代培养即组织培养是从 20 世纪 60 年代开始的,1960 年 M. Michael Sigel & Annie R. Beasley 等为得到能检测病毒的宿主细胞,开始了硬骨鱼类的组织培养。目前为止已建立了多种细胞株系,并有许多对特定的病毒敏感^[3-6],但从实验中所分离到的金鱼疱疹病毒尚未发现有敏感的细胞株。另外,金鱼细胞培养的报道很少,目前为止较为成功的一例是 Laura McKenzie & Stephenson 等进行的培养,建立了 SZGT-37(来源于金鱼精巢细胞)细胞株^[6],但其培养温度范围 31~37℃ 不适宜病毒生长繁殖,而且其培养液营养要求较高。疱疹病毒发病最适温度 20℃ 为培养温度、以 H-MEM-10(14mMHepes 缓冲至 pH 7.6,添加胎牛血清 10% 的 MEM)为培养液,对金鱼细胞在细颈细胞培养瓶内的单层进行了静置培养。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验金鱼

来自东京水产大学吉田实验实习场,体重约 26~28g,体长约 7~8 cm。

1.1.2 病毒

从琦玉县发病濒死鱼的肾脏组织分离到的病毒滤液(220nm 的过滤器过滤)。

1.2 方法

1.2.1 组织块的原代培养

参见文献 7][8],将金鱼麻醉、消毒后,用酒精擦拭体表,剪下的鳍、眼和表皮在 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液中和 1min 后同各脏器如心脏、脾脏、肾脏、精巢和鳔一同投入未加小牛血清的 MEM 培养液(H-MEM-0)中漂洗并用解剖剪细切,静置使组织沉淀,再漂洗 2~3 次,加 H-MEM-10(含有青霉素 1000IU/mL,链霉素 1000ug/mL)并将细切组织连同培养液一并转移到 25cm² 细胞培养皿中,待组织沉淀后,轻轻立起培养皿约 2h 使组织固着在培养皿底部后将其放倒,20℃ 恒温室中培养。第二天除去心脏、脾脏和肾脏组织培养内的血细胞并更新培养液,其他组织则 2d 换一半培养液。

1.2.2 用细胞分散剂分散细胞的原代培养

组织切碎沉淀后,除去上清液并将组织移至离心管,加 0.25% 的胰蛋白酶溶液,作用 15min 后,离心去上清,分别用 PBS(-) 和 H-MEM-10 洗后,将分散细胞连同未消化完全的细切组织移至 25cm² 培养皿并加入新的 H-MEM-10(含有青霉素 1000IU/mL,链霉素 1000ug/mL),于 20℃ 恒温室中培养。待各组织细胞单层平铺后,除去心脏、脾脏和肾脏的血细胞。培养液一周换两次,每次换一半。

1.2.3 细胞的传代培养

原代细胞的传代与一般细胞的传代基本相同。细胞剥离后回收 1/4 于新的培养皿中,吸吹使其均匀分散,20℃ 恒温培养。

1.2.4 细胞的特性试验

高倍稀释对细胞的影响:来源于鳍的细胞(以下称 GF)第 4 次传代时,分别稀释 5 倍、10 倍和 20 倍,加入新的培养液 20℃ 培养,经 20h、50h 和 3d 后显微镜下观察其生长状况并拍照。

培养液营养对细胞的影响:GF(P4)进行传代时,将稀释 3 倍和 5 倍的细胞,分别加入新的 H-MEM-5 和 H-MEM-10 培养液,20℃ 培养,经 20h、50h 和 3d 后显微镜下观察其生长状况并拍照。

培养细胞冷冻保存:GF(P4)进行传代时,细胞分散悬浮后加入新的 H-MEM-5 培养液,移入离心管离心(3000r/min 4min 4℃),弃上清,加新的 H-MEM-5(含有 5%~10% 的 DMSO)稀释至细胞数为 1×10^6 ~ 2×10^6 /mL,分装 1mL 到冷冻储存管内,-80℃ 保存。一周后取出,37℃ 恒温槽融化,移至装有 8mL 培养液 H-MEM-5 的离心管内,离心(2000r/min 4min),弃上清,加入新的培养液,转入培养皿,20℃ 培养。细胞的存活率通过台盼蓝染色法求得。

1.2.5 培养细胞的病毒敏感性试验

病毒的接种与定量实验 病毒滤液按 10 倍梯度稀释(即 $10^0 \sim 10^{-5}$)接种到前一天传代的来源于鳃的细胞(GFF-P4)96孔板,每孔接 50 μ l,两列不接做对照,而后密封 20 $^{\circ}$ C 培养,每天镜检观察并记录细胞病变(CPE)的情况。96孔板接种的同时,GFF-P5培养皿内也接种了 0.5mL 病毒滤液。

病毒的传代及电镜观察 实验接种病毒的培养皿观察到了 CPE,用吸管吹打此培养皿内的细胞,回收培养液和细胞中的病毒并接种 0.3mL 到 GFF-P6 的培养皿和 GFF-P4 的 96孔板(50 μ L/孔),观察 CPE 并计算半数细胞感染剂量 TCID₅₀。然后,再将出现有 CPE 的培养皿或 96孔板回收并接种传代,计算 TCID₅₀。

将病毒 2 次传代的培养皿培养至 CPE 蔓延到整个培养(约 10d 左右),回收细胞和培养液至离心管,离心(1000r/min,10min),分开沉淀和上清,沉淀加 3 滴蒸馏水,混合,使病毒析出,作为细胞内的病毒样;上清再经高速离心(25 000r/min,20min),得到的沉淀以同样方法使病毒析出作为培养液中的病毒样。加少量两种样品于经真空放电做亲水化处理后的载样网格上附着 2min 后,余下的残液用滤纸吸去,接着加 2%的磷钨酸 pH6.8 进行阴性染色后,于电镜下观察。

2 结果

2.1 原代培养结果

2.1.1 组织块的原代培养结果

各组织通过表面张力固着在培养皿的底面,细胞向周围伸展开来。其中鳃的细胞伸展和增殖速度最快,原代培养 3~4d 后,便铺满培养皿的底面。其次为精巢、眼、表皮、鳔和心脏的细胞,脾脏和肾脏细胞增殖速度缓慢。增殖的细胞多为上皮细胞和纤维芽样细胞,靠近组织片周围的新增殖的细胞小而密,边缘处的细胞则大且疏(见图 1)。

2.1.2 胰蛋白酶分散细胞的原代培养结果

由于用胰蛋白酶处理过,分散的细胞和未被消化的小块组织的细胞很快增殖并延伸铺满整个培养面。最快的仍然是来源于鳃的细胞,其次是精巢、心脏和眼细胞,也在第 5 天铺满整个培养面成单层,鳔和表皮则多为未消化的块状组织,同 2.1 结果,脾脏和肾脏细胞增殖缓慢。增殖的细胞多为上皮细胞和纤维芽样细胞。

2.2 细胞传代结果

由于组织由多种细胞构成,原代的细胞呈现出各种形态,传代后保留下来的传代细胞则多为纤维芽细胞、上皮细胞。来源于表皮的细胞(GFS)多为上皮细胞,来源于鳃的细胞(GFF)多为纤维芽细胞和上皮细胞,其他如来源于眼(GFE)、精巢(GFT)、鳔(GFA)、脾脏(GFSP)和肾脏(GFK)的细胞则多为纤维芽细胞。传代细胞中仍然是 GFF 增殖最快,部分照片可观察到细胞的分裂过程(见图 2)。

2.3 GFF 细胞特性试验

2.3.1 高倍稀释的影响

高倍稀释的细胞比低倍稀释传代的细胞的增殖速度稍慢,到单层覆盖全培养皿所用的天数比低倍稀释的延迟 1~2d,但仍然维持一定的增殖能力,未见死亡。

2.3.2 培养液营养的影响

H-MEM-5 培养液中的细胞具有足够的增殖速率,3d 后即铺满整个培养面。

2.3.3 冷冻保存对细胞的影响

解冻后细胞仍然能快速增殖延伸,3~4d 即铺满整个培养面。同时台酚蓝染色法检测到细胞的存活率为 85%以上。(见图 3)

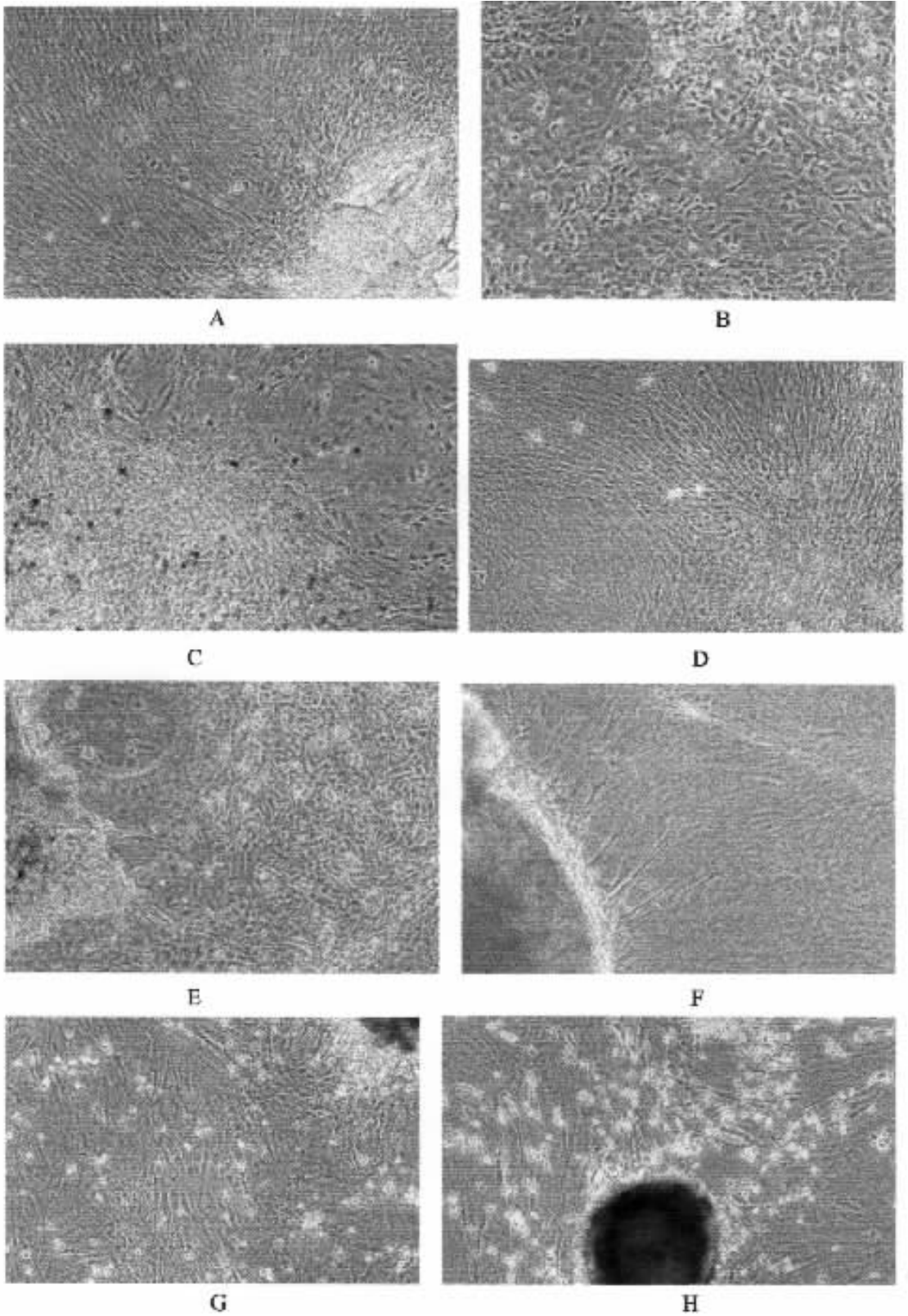


图1 原代细胞照片(A 鳍 B 皮肤 C 眼 D 精巢 E 心脏 F 鳃 G 肾脏 H 脾脏)

Fig.1 pictures of primary generation cell of different culture

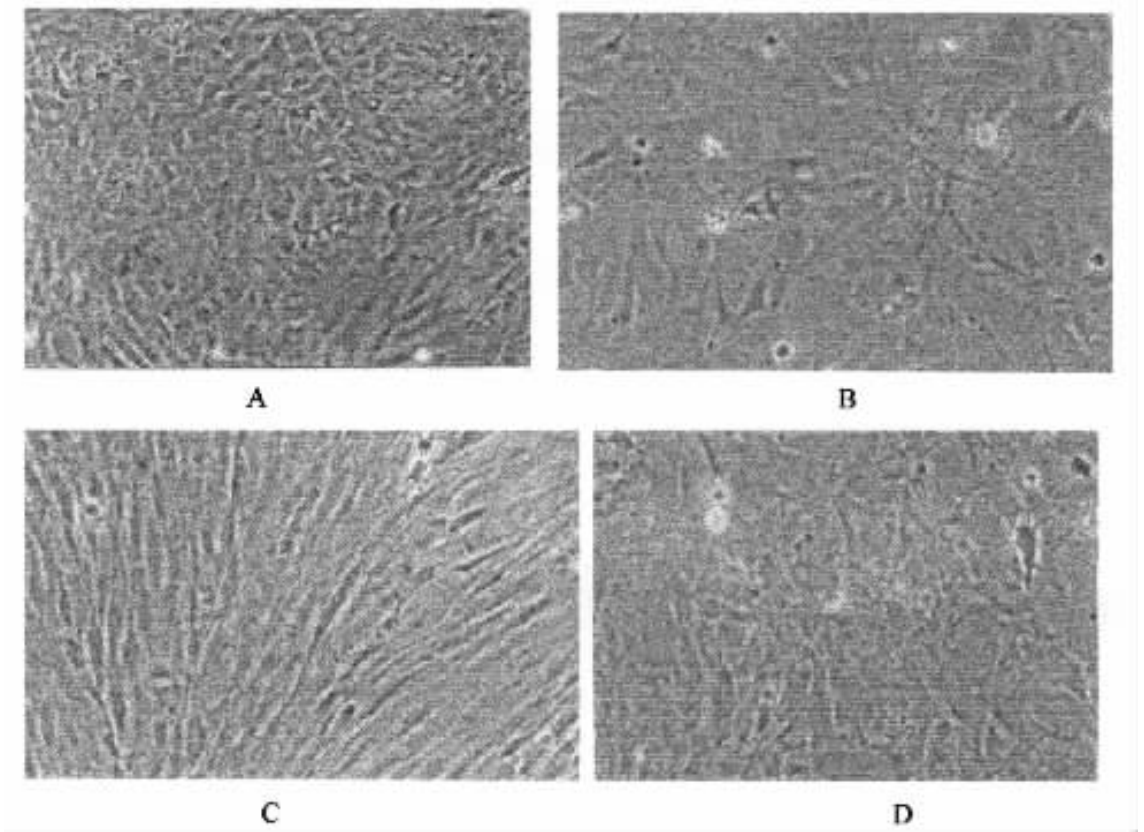


图 2 部分传代细胞照片(A 鳍 ,B 皮肤 ,C 眼 ,D 鳃)

Fig.2 cell pictures of P1 generation

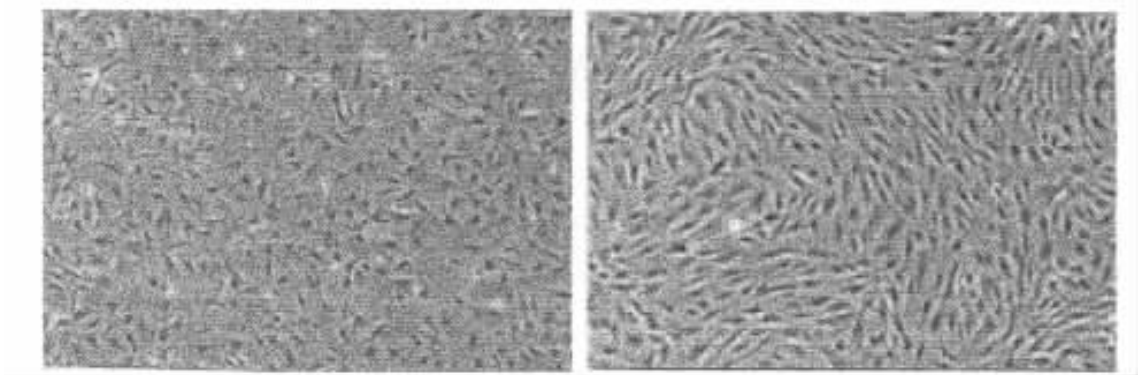


图 3 冻存细胞解冻后培养 24h 和 3d 的照片(左 24h 右 3d)

Fig.3 pictures of freezing conservation cell after defrosting and culturing for 24h and 3 days

2.4 培养细胞的病毒敏感性试验

2.4.1 病毒接种和定量结果

实验中两个 96 孔板 GFF-P4 细胞分别于接种后第 3 天和第 4 天出现 CPE。培养皿中 GFF-P5 细胞也在第 4 天观察到 CPE,对照组未见有细胞病变。CPE 出现的培养中,首先纤维芽样细胞萎缩、球形化而后剥离(见图 4)。病毒滤液的病毒滴度分别为 1.97、1.97 和 2.63(见表 1)。

2.4.2 病毒传代结果

培养皿和 96 孔板的 GFF 细胞均出现 CPE,而且目前已进行了 5 次病毒的传代。表 1 记录了每次传

代后 CPE 开始出现的天数和 $\lg\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ，从传代病毒的电镜照片看，两种样品均观察到直径约为 110nm、衣壳蛋白的排列等特征与疱疹病毒类似的病毒颗粒。（见图 5）

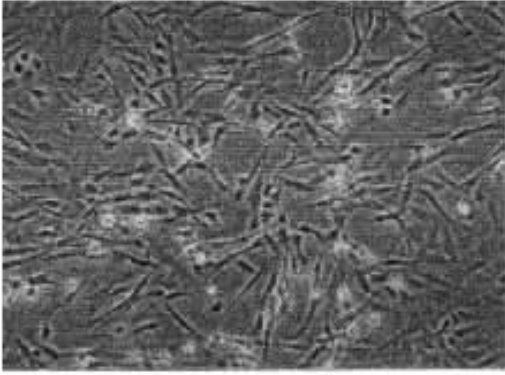


图 4 病毒接种的 GFF (P5) 细胞出现的 CPE

Fig.4 CPE of GFF (P5) after inoculating virus

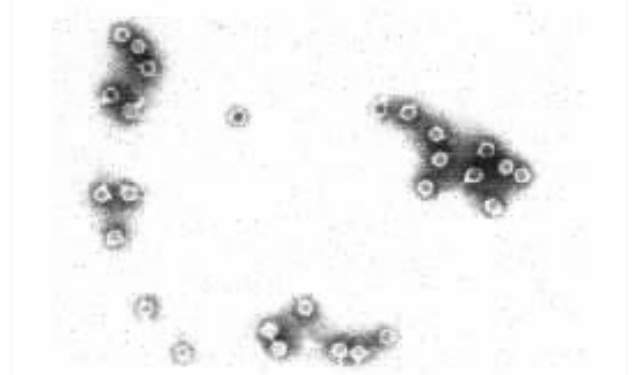


图 5 电镜观察到的金鱼疱疹病毒

Fig.5 Herpes virus observed by electro microscope

表 1 金鱼疱疹病毒在 GFF 细胞的传代及定量

Tab.1 passage of Goldfish Herpes Virus in GFF cell and its quantitation

接种用病毒的来源和传代数 (V_n)	宿主细胞的代数	CPE 出现的时间 (d)	病毒滴度 $\lg\text{TCID}_{50}/\text{mL}$
最初的病毒分离滤过液 (V_0)	GFF (P5) Flask	4	
	GFF (P3) Plate	3	2.67
	GFF (P4) Plate	3	1.97
	GFF (P5) Plate	4	1.97
从 V_0 接的 Flask 回收传代 V_1	GFF (P3) Flask	6	
	GFF (P5) Plate	4	3.80
从 V_1 接的 Flask 回收传代 V_2	GFF (P6) Plate	4	4.63
	GFF (P7) Plate	4	3.63
从 V_2 接的 GFF (P6) Plate 回收传代 V_3 (10 倍稀释)	GFF (P6) Plate	6	1.80
	GFF (P6) Plate (冷冻保存细胞)	6	3.47
从 V_3 接的 GFF (P6) Plate 回收传代 V_4 (10 倍稀释)	GFF (P7) Flask	5	
	GFF (P8) Plate	5	3.97
从 V_4 接的 GFF (P7) Flask 回收传代 V_5	GFF (P8) Plate	5	1.40
	GFF (P8) Plate	5	3.00

3 讨论

3.1 金鱼各组织体外培养条件的探讨

用组织块法和胰蛋白酶消化法进行了金鱼细胞在培养液 H-MEM-5 中的体外单层静置培养，其培养条件为 20℃，初步获得了来源于金鱼鳍、表皮、眼、心脏、脾脏、肾脏、精巢和鳔的原代培养细胞，其中来源于鳍的 GFF 显示出较高的增殖能力，不论是高倍稀释传代、冷冻保存还是牛血清浓度的下降均对其无较大影响。证明 GFF 细胞在此培养条件下具有强的增殖能力，从而为此培养细胞的克隆奠定了基础。

由于牛血清 (FBS) 中含有增殖因子、附着因子、营养物质和蛋白质消化阻止因子等，补充了培养环境。但因其来自生物体，组成成分不稳定，往往对病毒的增殖有影响，在牛血清含量为 5% 的低营养培养液 H-MEM-5 中培养的成功解决了这一问题。

细胞的反复传代会引起细胞性状的改变,细菌等微生物感染的机会也会增加。对培养细胞进行了冷冻保存,结果证明了其可行性。

原代培养中造血组织如肾脏和脾脏的细胞增殖缓慢,可能是由于培养液不适合,曾有 RPMI - 1640 培养液成功培养造血组织的报道,金鱼脾脏和肾脏细胞的培养液的成分有待探讨。另外,胰蛋白酶消化法中,鳔和表皮的培养多为块状组织,可能是由于组织中的胶原未被胰蛋白酶消化的缘故。这两种组织的培养前处理可能需要胶原酶的参与或应去除大的组织块。

3.2 金鱼疱疹病毒在 GFF 细胞中的传代

实验中获得的 GFF 细胞对金鱼疱疹病毒具有敏感性并且此病毒在 GFF 细胞中可以传代。目前为止已进行了至少 5 次传代(见表 1)。并且病毒在经冷冻保存的 GFF 细胞中同样显示有 CPE。因此,实验培养得到的 GFF 细胞可以支持金鱼疱疹病毒的增殖,这对于此病毒的研究具有重要的意义。究其原因可能是因为此细胞来源于金鱼疱疹病毒的宿主,此细胞对其他的鱼类病毒是否具有敏感性,还有待于进一步实验来探讨。但由于 GFF 细胞的传代次数尚不多,对病毒的感受性等性状还不稳定,有必要对细胞系继续进行传代培养或进行克隆,使其对病毒的感受性稳定下来。电镜照片虽观察到很多直径为 110nm 的病毒颗粒,但多数为中空的,从衣壳蛋白的排列等特征看为疱疹病毒。由于观察到的完全病毒颗粒较少,中空的颗粒占的比例较大,可能疱疹病毒只能在 GFF 细胞中复制到某阶段,很少产生完全的病毒颗粒,其原因有待研究。

承蒙吴淑勤研究员提出宝贵的修改意见,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] Ken Wolf. Fish viruses and fish viral diseases[M]. Comstock publishing associates. Coenell University Press, 1988, 6: 69 - 79.
- [2] S J Jung, T Miyazaki. Hepesviral Haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus*(L. [J]. J of Fish Disease, 18: 211 - 220.
- [3] 张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 ZC - 7901 及其亚株 ZC - 7901S1 的建立和特性观察[J]. 水产学报, 1981, (2): 111 - 119.
- [4] 左文功. 草鱼肾细胞系 CIK 的建立及其生物学特性[J]. 水产学报, 1986, 10(1): 11 - 17.
- [5] P F Kneec, M K Patterson. Tissue Culture-Method and Application[M]. Academic Press, 1973, 21: 133 - 146.
- [6] M L Diago, M P Lopez-Fierro, B. Razouin, et al. Establish and characterization of a pronephric stromal cell line(TPS) from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* W[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5: 441 - 457.
- [7] 北村 敬. ウィルス検査のための组织培养技术[M]. 日本近代出版社, 1976.
- [8] 中井 准之助, 冈本 道雄. 组织培养——基础と应用[M]. 日本朝仓镰造出版, 1964.