

# 家蚕原代细胞有丝分裂观察

丁裕斌 潘敏慧 肖仕全 陈敏 洪锡钧 鲁成\*

(西南农业大学蚕学与生物技术学院农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

**摘要** 在 28 °C, pH 值 6.4~6.8 的条件下, 用 Grace 培养基辅以 20% 的标准胎牛血清培养半消化法接种的家蚕晚期胚。原代培养细胞能够长期存活, 观察到了家蚕原代培养过程中分化细胞的有丝分裂过程, 发现了原代细胞分裂过程中赤道板的异常和染色体分离的异常现象; 培养 6 个月和 10 个月的原代细胞分裂百分比分别为  $0.02 \pm 0.01$  和  $0.35 \pm 0.10$ , 原代细胞异常的有丝分裂细胞百分比逐渐减少, 分别为  $8.0 \pm 1.6$  和  $3.2 \pm 1.0$ 。

**关键词** 家蚕; 原代细胞; 有丝分裂

转化的昆虫细胞和细胞系作为生理模型, 已广泛应用于细胞生理、发育生物学、细胞分化与繁殖和药理学等各方面的研究。原代培养细胞的各项生理生化指标比转化的细胞和细胞系更接近体内相对应的细胞, 它们是细胞发育、分化、繁殖和基因表达调控研究极好的细胞原材料。Kishimito 等<sup>[1]</sup>利用家蚕的脂肪体细胞作原代培养, 研究了血淋巴主要蛋白质的合成和血淋巴主要蛋白质基因表达的调控机制; Lucas 等<sup>[2]</sup>利用原代培养的细胞研究了 *Mamestra brassicae* 触角细胞的体外分化情况。同时, 原代培养中的干细胞研究也逐渐走向成熟, Hakim 等<sup>[3]</sup>用昆虫的中肠研究了干细胞的生长与分化情况。

原代培养的昆虫细胞有丝分裂及其异常情况则极少有文章报道, 近期有学者在果蝇成神经细胞中进行了有丝分裂的研究<sup>[4]</sup>。昆虫早、晚期胚胎和幼虫组织含有很多干细胞和前体细胞, 可以用来作为细胞系建立的供体。家蚕作为一种模式生物, 其分离的组织在体外培养的生存、繁衍、分化为研究家蚕基因表达及细胞分化的途径和条件提供了可能<sup>[5]</sup>, 但是相关的研究却极少。早期的胚胎发育与有丝分裂主要见于 Nagy 等<sup>[6]</sup>的论述, 而晚期胚胎的发育分化及其原代培养条件下的分化与繁殖则未见报道。

本实验采用家蚕的晚期胚胎作原代培养, 研究了家蚕细胞体外培养条件下原代细胞向继代细胞转化过程(即原代细胞由分化向繁殖的转变过程)中细胞的有丝分裂情况。为进一步探明家蚕细胞分化与繁殖的调控、原代细胞向继代细胞转化的分子机制、

培养细胞的多倍化和异倍化产生的原因提供条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大造滞育卵, 由西南农业大学家蚕基因库提供; 胰蛋白酶购自 Sigma 公司; Grace 培养基干粉购自 Sigma 公司; 胎牛血清(fetal born serum, FBS)购自 Hyclone 公司; 链霉素、青霉素购自华北制药有限公司; 吉姆萨(Giemsa)购自 Sigma 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 材料的准备** 取冷藏的蚕卵浸酸, 置 25 °C 催青 4~6 天, 胚胎发育至戊 3~己 1 期间(反转期)停止催青, 置于 4 °C 冰箱冷藏备用。

**1.2.2 原代细胞接种方法** 取催青到反转期的家蚕胚胎, 75% 的酒精卵壳表面消毒, 削出胚胎, 用消毒的眼科剪剪成  $0.5 \sim 1 \text{ mm}^3$  的小组织块, 胰酶消化 10~15 min 后轻轻吹打, 除去酶液, 再用培养基洗两次以减小胰酶伤害, 添加 4 ml Grace 培养基制成悬液。将组织块悬液接种在一次性塑料培养瓶中, 辅以 20% 热灭活的标准胎牛血清, 置 28 °C 生化培养箱中培养。隔天再次换液, 去除悬浮杂物及残留的胰酶。

**1.2.3 原代细胞的培养** 原代培养物置倒置显微

收稿日期: 2004-04-20 接受日期: 2004-07-14

国家自然科学基金资助项目 (No.30471312) 和国家高技术研究发展计划资助项目 (863 计划) (No.2004AA2Z1020)

\* 通讯作者。Tel: 023-68250346, Fax: 023-68251128, E-mail: lucheng@swau.edu.cn

镜下,每周观察两次,根据细胞(组织)生长状况和培养液颜色,每隔7~15天,添加、换一半或全换液,记录和拍摄培养物在不同培养时间、不同处理方式下的细胞生长状况和繁殖现象。

**1.2.4 原代细胞有丝分裂的观察** 采用定点观察法拍摄和记录细胞有丝分裂的正常和异常现象。

**1.2.5 分裂细胞的比例** 采用空气干燥法<sup>[7]</sup>制备染色体(略有改动),吉姆萨(Giemsa)染色30 min,干燥后用树脂封片;置显微镜下观察并统计分裂比率。

## 2 结果

### 2.1 原代细胞的繁殖——有丝分裂

原代细胞经过了活跃的分化以后,有丝分裂开始出现。最早出现有丝分裂现象的时间是培养达到6个月的细胞,倒置显微镜下定点目测观察到了原代细胞有丝分裂的完整过程和原代细胞有丝分裂的异常,统计了随着培养时间的变迁,分裂细胞的比例和异常分裂细胞比例的变化情况。

### 2.2 原代细胞中有丝分裂的异常

最初发现的有丝分裂中期相中(原代培养6个

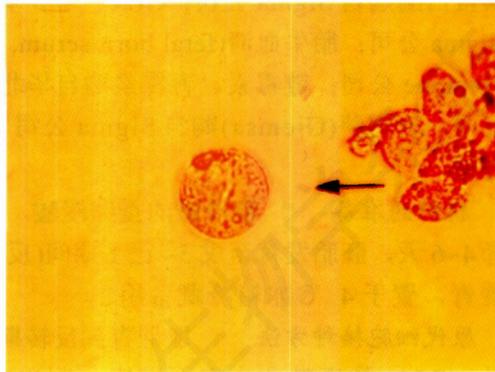


图1 异常分裂细胞  
箭头所指为赤道板弯曲异常分裂细胞(40×10)。

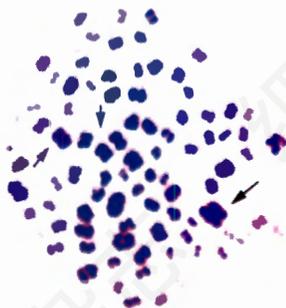


图2 异常分裂细胞  
箭头所指为核内有丝分裂形成的双分染色体(100×10)。

表1 分裂细胞百分比与异常细胞分裂百分比

细胞来源	分裂细胞百分比(%)	异常分裂细胞百分比(%)
原代培养6个月	0.02 ± 0.01	8.0 ± 1.6
原代培养10个月	0.35 ± 0.10	3.2 ± 1.0
BmN细胞系	3.55 ± 0.30	1.8 ± 1.2

月),部分分裂细胞中期赤道板弯曲(图1),但是能够完成有丝分裂的过程,形成两个子代细胞;部分细胞能够进入中期,但不能完成分裂的过程,无法形成两个子代细胞;进行过传代(第9代)的部分细胞虽然能够进行细胞分裂,但是缺少正常的分裂过程而进入了核内有丝分裂,形成双分染色体(图2);还有部分细胞进行了三极分裂,即分裂中期,赤道板为“⊥”型。原代培养至10个月则很少见到有丝分裂的异常情况(表1)。

### 2.3 分裂细胞与异常分裂比例

分别取培养6个月、10个月和转瓶24 h的家蚕卵巢细胞系的细胞进行实验,统计了分裂细胞数与细胞总数的百分比以及异常分裂数与分裂细胞数的百分比,结果见表1。

### 2.4 原代细胞有丝分裂过程

经过一段时间的观察,发现在体外培养条件下,原代细胞也能够进行完整的分裂,各分裂时相如下:

**前期(图3.1):** 细胞比其他未分裂细胞大,收缩成圆球形,有较强的立体感;轻轻晃动,细胞不会漂移;

**前中期(图3.2):** 细胞中的赤道板若隐若现,不太明亮;

**中期(图3.3):** 赤道板收缩为中部稍宽,两端较窄立体感很强的一条亮带,处于细胞的中部;

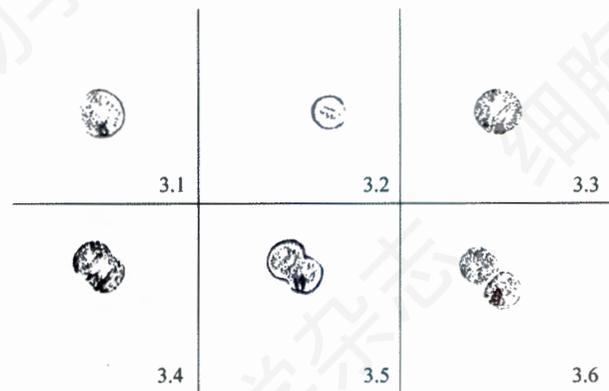


图3 原代培养细胞有丝分裂的各个时期  
原代培养6个月细胞开始出现细胞的有丝分裂,3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6分别为分裂前期、前中期、中期、后期、末期以及处于间期的子代细胞,40×10。

后期(图 3.4): 细胞开始拉长, 赤道板一分为二, 形成两群染色体(两条亮带), 逐渐向细胞的两端平行迁移, 细胞开始出现凹陷, 出现哑铃形结构;

末期(图 3.5): 凹陷逐渐收缩, 细胞形成明显的哑铃形, 此时染色体群逐渐消失;

间期(图 3.6): 形成两个子代细胞, 处于相对的“静息”状态。

### 3 讨论

#### 3.1 家蚕原代细胞向繁殖群体转变的原因

细胞培养初期, 细胞极少分裂的可能原因是细胞周期在 DNA 水平被破坏<sup>[8]</sup>。细胞培养至 6 个月后分裂广泛出现, 借鉴其他物种的组织分化与繁殖的机制, 家蚕原代细胞向繁殖群体转变的可能原因为晚期胚胎中干细胞被重新激活或已分化细胞周期基因被重新激活。目前, 干细胞的潜能已经通过实验证实<sup>[9]</sup>。昆虫中, 由胚胎组织分离出的细胞可以含有更多的干细胞和前体细胞, 活体中一些连续更新的组织, 如成虫盘、中肠, 血细胞等仍然存在一定数量的干细胞, 这些细胞在适当的条件下能够无限期的存活, 但是都增殖较慢。鳞翅目昆虫中肠上皮细胞目前研究得较为清楚, 它们包括杯型细胞、柱型细胞和干细胞, 其中干细胞在体内可以作为细胞生长和损坏修复的储备细胞, 在培养条件下, 干细胞能够逐渐取代成熟的细胞类群<sup>[10]</sup>。

哺乳动物细胞在培养条件下, 由于缺乏生长因子, 许多细胞停留在静止的生理状态, 这些细胞是  $G_0$  期细胞。在添加血清的情况下, 这些细胞甚至能够保持 90 天的静止状态, 但在适当的条件下, 它们能够重新进入细胞周期<sup>[11]</sup>。据此推测, 家蚕原代细胞中可能具有一定数量的  $G_0$  期细胞, 它们在适当的条件下被激活, 进入分裂周期。另外, Brooks 等<sup>[12]</sup>认为, 在培养条件下, 可能是培养细胞的细胞膜、酶和亚细胞结构的本质的改变或产生了遗传突变, 导致了细胞增殖的产生。由于这些细胞的分裂能力较强, 并且多不受密度限制, 它们在同一培养皿中的数量将逐渐超过正常的细胞。

#### 3.2 家蚕原代培养中有丝分裂的异常

细胞有丝分裂是一复杂的生理过程, 涉及到多种细胞周期基因的有序表达及多种细胞分裂因子的有序作用。高度分化的细胞, 其周期基因的表达和调控机制的恢复不可能一次全部正常, 单只是微管蛋白基因表达不足就可以导致纺锤体异常; 中心体

不能正确定位, 可以造成多极分裂。例如, 在有丝分裂过程中, 由中心体和纺锤丝等共同决定的细胞板的正确定位决定了子代两个细胞的大小和定位, 这也是细胞发育与分化的重要步骤<sup>[13]</sup>。本实验中细胞分裂中期的细胞板弯曲说明纺锤丝在将染色体向两极牵拉的过程中, 受力不一致所致, 因为在体外培养的细胞中牵拉染色体的微管作用方向是不一致的<sup>[14]</sup>。

细胞周期受到不同检验点的控制, 它们分别应急于 DNA 损伤、DNA 复制的意外终止和有丝分裂纺锤体装配缺陷等<sup>[15]</sup>, 这样才能确保细胞 DNA 的复制以及染色体准确分离进入子代细胞。细胞周期的改变将导致基因组不稳定, 促进染色体多倍化和异倍化, 控制的方法之一是 DNA 只复制在细胞有丝分裂之后, 并且只复制一次<sup>[16]</sup>。本试验中部分细胞进入中期, 但不能进行彻底分裂, 可能是因为在由中期进入后期时, 纺锤体检验点没能突破。目前, 哺乳动物的原代细胞可以通过电转化或显微注射的方法突破该检验点<sup>[16]</sup>; 细胞分裂过程的不完全还能导致细胞的核内有丝分裂, 本实验中的双分染色体(图 2)即是这种异常分裂。

#### 3.3 原代培养后期细胞数目的增加

本实验中有丝分裂异常逐渐减少, 说明原代培养的过程是有丝分裂基因表达的有序正常化和有丝分裂调控的正常化的过程, 这种对体外培养的适应过程是对细胞的筛选过程<sup>[12]</sup>。原代培养后期, 分裂比例和细胞数目的逐渐增加正是上述细胞筛选过程产生的良性结果, 正常分裂细胞被保留, 这一群体逐渐繁殖和扩大, 成为了建立细胞系的原初细胞群体。

#### 参考文献 (References)

- [1] Kishimoto A et al. *Cell Tissue Res*, 1999, **297**: 329
- [2] Lucas P et al. *Cell Tissue Res*, 1997, **289**: 375
- [3] Hakim RS et al. *In vitro Cell Dev Bio Anim*, 2001, **37**: 338
- [4] Savoian MS et al. *J Cell Sci*, 2002, **115**: 3061
- [5] Imanishi S et al. *Appl Entomol Zool*, 1999, **34**: 259
- [6] Nage L et al. *Dev Biol*, 1994, **165**: 137
- [7] Deng W. *Cytometry*, 2003, **51A**: 46
- [8] Braasch DA et al. *Methods Cell Sci*, 1999, **21**: 255
- [9] Lanza RP et al. *Science*, 2000, **288**: 665
- [10] Loeb MJ et al. *J Insect Physiol*, 1996, **42**: 1103
- [11] Baserga R 著. 薛绍白等译. *细胞繁殖的生物学*, 北京: 北京师范大学出版社, 1985, 28
- [12] Brooks MA et al. *Ann Rev Entomol*, 1971, **16**: 27
- [13] Canman JC et al. *Nature*, 2003, **424**: 1074
- [14] Mitchison TJ et al. *J Cell Biol*, 1985, **101**: 755
- [15] Zhou BB et al. *Nature*, 2000, **408**: 433
- [16] Jiang W et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 6193

## Mitosis in Primary Cultures of Silkworm

Yu-Bin Ding, Min-Hui Pan, Shi-Quan Xiao, Min Chen, Xi-Jun Hong, Cheng Lu\*

(The Key Sericulture Laboratory of Agriculture Ministry, College of Sericulture and Biotechnology,  
Southwest Agriculture University, Chongqing 400716, China )

**Abstract** The explants used for primary culture are tissue and semi-digestive tissue, which originate from the late embryonic tissue of silkworm (*Bombyx mori*). The optimal conditions for primary culture are Grace's medium supplemented with moderate amount of antibiotics, 20% fetal bovine serum and incubated at temperature 28 °C, pH 6.4–6.8. The whole process of mitosis and abnormal mitosis such as abnormal cell division plate and endonuclear mitosis were found when tissue had been cultured more than 6 months. With the time of culture prolonged, divide ratio increased from  $0.02 \pm 0.01$  to  $0.35 \pm 0.10$ , while the percentage of abnormal mitosis decreased from  $8.0 \pm 1.6$  to  $3.2 \pm 1.0$ .

**Key words** *Bombyx mori*; primary cell; mitosis

Received: April 20, 2004 Accepted: July 14, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471312) and the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2004AA2Z1020)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-68250346, Fax: 86-23-68251128, E-mail: lucheng@swau.cq.cn