

# 家蚕胚胎细胞系 BmE-SWU1 的建立及其生物学特性

潘敏慧 肖仕全 洪锡钧 鲁成\*

(西南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** 对家蚕反转期胚胎组织进行一年多的原代培养, 分离筛选出了高繁殖细胞群体, 建立了 BmE-SWU1 细胞系。该细胞系以梭形和近圆形细胞为主, 杂以少量多突起和巨型细胞。细胞系的倍增时间在 28 °C 时为 57.6 h, 染色体呈短杆状或颗粒状, 染色体数目异倍化, 具有典型鳞翅目昆虫细胞系的染色体特征。BmE-SWU1 细胞系对家蚕核型多角体病毒(BmNPV)高度敏感, 半数组织培养感染剂量(TCID<sub>50</sub>)为  $2.92415 \times 10^{-7}$ 。

**关键词** 家蚕; 胚胎细胞系; 核型; 生长曲线; 病毒敏感性

昆虫细胞培养是为了适应昆虫病毒学研究的需要而迅速发展起来的技术体系。我国高尚荫教授在 1957 年成功地将家蚕卵巢细胞培养了 30 代以上, 建立了第一个家蚕细胞系, 并首次应用单层细胞培养在体外对家蚕核型多角体病毒(BmNPV)的细胞病理学变化进行了详细的研究。Grace<sup>[1]</sup>在 1962 年建立了 4 个柞蚕(*Antheraea eucalypti*)蛹卵巢细胞系。迄今为止, 通过全世界学者们的不懈努力, 已从 100 多种昆虫中构建了 500 个细胞系<sup>[2]</sup>, 这些细胞系中绝大多数是从鳞翅目昆虫和双翅目昆虫的组织中构建获得。它们已被广泛地应用于细胞生物学、寄生虫学、昆虫病理学和昆虫细胞表达系统等领域的研究中<sup>[3-5]</sup>。

家蚕细胞培养和细胞系的建立始于 20 世纪 50 年代。至今已建成 13 个家蚕细胞系<sup>[6]</sup>。这些细胞系主要是由家蚕胚胎和卵巢建立的, 其中由 3~4 天胚胎组织建系的有 10 个, 由 5 龄幼虫卵巢组织建立的有 3 个。家蚕作为一种模式昆虫, 应用家蚕培养细胞进行理论研究和生产应用倍受关注。但由于现有家蚕细胞系多是上世纪 90 年代建立起来的, 培养时间已经有了近 10 年, 这些细胞系已出现了不同程度的老化, 细胞逐渐失去了原来的特性<sup>[7]</sup>。家蚕基因组框架图完成以后<sup>[8]</sup>, 家蚕功能基因组的研究迫切需要提供不同发育时期、不同分化程度、不同组织特异性的家蚕细胞系作为研究平台。为了满足家蚕细胞生物学、发育生物学和建立家蚕工程细胞等方面的需要, 迫切需要建立新的家蚕细胞系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 蚕品种 夏芳、秋白、大造、C108、夏芳×秋白, 由农业部蚕桑学重点实验室家蚕基因库提供。

1.1.2 培养基及血清 Grace 昆虫细胞培养基为 Gibco 公司产品。标准胎牛血清为德国 PAA 公司和 Hyclone 公司产品。

1.1.3 病毒 家蚕核型多角体病毒由西南大学家蚕病理研究室提供

1.1.4 细胞系 BmN 由华南农业大学惠赠, 本研究室保存。BmE、Hi5、Sf9、Sf21 由华中师范大学陈曲侯教授惠赠, 本研究室保存。

### 1.2 方法

1.2.1 家蚕原代细胞培养 采用胰蛋白酶半消化法接种原代培养物。取催青发育至反转期的蚕卵, 用 70% 乙醇消毒后, 在无菌条件下, 用消毒刀片削破卵壳, 尽量保证胚胎的完整性。用吸管吸取培养基吹出暴露的胚胎, 待收集到大量的胚胎后, 用培养基洗涤 2~3 次。洗净的胚胎用眼科剪剪碎, 再用适量 0.25% 胰蛋白酶溶液消化 15~30 min。弃去胰蛋白酶溶液, 用培养基润洗 2~3 次。再加入适量

收稿日期: 2005-09-01 接受日期: 2005-11-04

国家自然科学基金(No.30471312)、国家攻关计划(No.2005BA711A07)和国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(No.2005CB121000)资助

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

培养基吹打, 使之尽可能分散。最后辅加 20% 标准胎牛血清, 接种到培养瓶中, 放入 28 °C 恒温培养箱中静置培养。待大部分胚胎组织贴壁(约 2 天)后换液, 除去残余的胰蛋白酶。以后根据细胞和组织块的生长情况采取换一半液、加液或全换液的方式处理。

**1.2.2 细胞生长曲线和群体倍增时间的测定** 取处于对数生长期的细胞, 用机械吹打法获得单细胞悬液, 经计数后接种于多孔培养板上(1 ml/孔), 于 28 °C 培养箱中静置培养。每隔 24 h 随机收获 3 孔细胞, 计算出细胞的密度, 取其平均值, 绘出细胞生长曲线。按 Hayflick 法计算细胞的群体倍增时间。

**1.2.3 细胞的核型分析** 染色体制片: 采用空气干燥法; 核型分析: 在 Olympus BX51 显微镜下观察细胞的染色体制片, 用 CCD 自带软件 SPOT Advance (vision 4.0.4) 中的标尺工具测量染色体的长度, 对染色体的数目进行统计, 计算二倍体细胞和异倍体细胞所占的比例。

**1.2.4 细胞对 BmNPV 的敏感性** 参照张严俊等<sup>[9]</sup>的方法制备 BmNPV 病毒液。取对数生长期 BmE-SWU1、BmE 和 BmN 细胞, 调配成  $3 \times 10^5$  个/ml 浓度, 接种到培养瓶中, 每瓶 3 ml, 细胞总量为  $7.5 \times 10^5$  个/瓶。培养 2~3 h 后, 弃去培养基, 留下贴壁细胞, 将制备好的病毒液接种于该细胞, 每瓶 1 ml。在 28 °C 培养箱中吸附 2 h 后弃去病毒悬液, 重新加入等量培养基培养, 每天观察细胞被感染的情况。在接种病毒 10 天后, 以细胞中出现多角体为感染, 计算细胞感染率, 重复 3 次, 取其平均值。用冻融法裂解病毒感染细胞, 充分释放多角体, 计算出多角体的浓度。

半数组织培养感染剂量(TCID<sub>50</sub>)的测定采用文献<sup>[10]</sup>和<sup>[11]</sup>方法, 稍作修改。在超净工作台内, 以原浓度为基本浓度单位, 将毒液用含 10% 标准胎牛血清的 Grace 昆虫细胞培养基以 10 倍稀释法稀释至  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  等 8 个浓度梯度。取生长良好、健康的对数期细胞用移液管轻轻冲洗瓶壁使细胞充分悬浮, 用含血清的培养基调节浓度至  $2 \times 10^5$  个/ml, 将调整好的细胞加入 96 孔细胞培养板, 每孔加入该细胞悬液 0.1 ml, 在 28 °C 培养箱中静止培养 24 h 后, 加入各级病毒 0.1 ml。每个浓度加 12 个孔, 加盖后, 将 96 孔板用封口膜封好, 在 28 °C 培养箱中静止培养 3 天后, 在显微镜下观察, 以产生多角体为感染特征。按照 Reed-Muench 算法测定了 BmNPV 感染

BmE-SWU2 细胞系的 TCID<sub>50</sub> 值。

## 2 结果

### 2.1 家蚕胚胎细胞系的建立

**2.1.1 原代培养物的发育分化和筛选** 在原代培养约 1 个月, 在培养瓶中发现大量不同的组织类型, 最多的是致密网状组织和疏松网状组织、腺管状组织、上皮组织、类脂肪组织、类根瘤状组织以及游离细胞, 但这些组织出现的先后没有一定的规律。当这些组织块开始出现时, 迅速伸展, 但发展到一定水平时, 伸展变缓并逐步从瓶壁脱落或颗粒化而衰落, 取而代之的是新生的同类型组织或其他类型组织。在近 1 年的组织更替过程中, 大部分组织类型先后衰退, 最后只剩下根瘤状组织和其他少数组织, 并在根瘤状组织周围出现较多的游离细胞。这些游离细胞较以前出现的游离细胞的生命周期大大延长, 数量增加较快。通过定点观察, 观察到了有丝分裂的全过程(图 1 A~图 1D)。但这时除了游离细胞外, 还有类根瘤状组织和其他少数组织存在, 通过传代培养, 类根瘤状组织最终消失, 取而代之的是具有较强繁殖能力的单细胞群体。

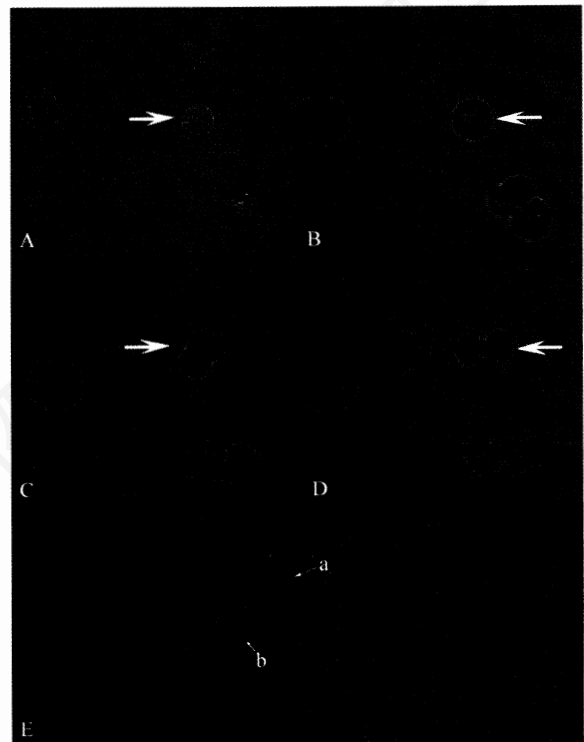


图 1 原代培养过程中发现的有丝分裂全过程及细胞形态 (A~D, 400 ×; E, 100 ×)

A: 前期; B: 中期; C: 后期; D: 末期(箭头所指为正在分裂的细胞); E: 细胞形态, 以短梭形细胞(a)和近圆形细胞(b)为主。

表1 细胞在不同培养时段的密度

细胞系	细胞密度( $10^5$ 个/ml)									
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h
BmE-SWU1	2.25	0.9	1.5	3.0	4.0	6.5	11.6	13.0	14.4	16.2

2.1.2 细胞系 BmE-SWU1 的建立 在繁殖群体刚刚形成时, 细胞群体中具有正常有丝分裂能力的细胞逐渐增多, 细胞逐渐铺满瓶内, 在第 12 个月时进行了第一次传代, 在第 28 天后进行第二次传代, 以后细胞的繁殖能力加强, 传代间隔时间逐步缩短, 到了第八代以后, 细胞传代间隔时间稳定在 7 天左右。组织块也在传代过程中完全消失。至此, 历时 14 个月, 传代细胞基本上能稳定生长繁殖, 可定为细胞系。因其来自于家蚕胚胎, 故定名为西南大学蚕胚 1 号细胞系, 英文名 Embryo cell line of *Bombyx mori* -Southwest University 1, 简称为 BmE-SWU1。

2.1.3 BmE-SWU1 的细胞形态 BmE-SWU1 细胞系以短梭形和近圆形为主, 也有少量多突起的不规则细胞(图 1E)。细胞的长径为 16~30  $\mu\text{m}$ , 短径为 7~14  $\mu\text{m}$ , 有部分细胞较小并几个黏在一起形成团块。细胞从传代后 1 h 内大部分细胞贴壁, 3 h 全部贴壁, 故 BmE-SWU1 细胞系为上皮型贴壁生长细胞系。

2.1.4 BmE-SWU1 细胞系的传代培养 细胞系传代的最初几代生长缓慢且极其不稳定, 有很多的传代细胞在分瓶传代培养过程中死亡, 这是昆虫建系的危险时期。当细胞系稳定后, 用 0.25% 胰蛋白酶处理, 一般 3~5 min 即可传代, 细胞在 5~7 天就可以铺满整个瓶底。

## 2.2 BmE-SWU1 细胞系的生长曲线和群体倍增时间

取第 10 代处于对数生长期的细胞, 用胰蛋白酶处理制成单细胞悬液, 再用培养基稀释成  $2.25 \times 10^5$  个/ml 的密度接种于 24 孔培养板中。每隔 24 h 随机抽取 3 孔对其生长状况进行测定, 分别计数不同时段细胞平均密度(表 1)。根据表中数据绘出生长曲线如图 2 所示。并按 Hayflick 法计算出细胞的群体倍增时间, 计算出 BmE-SWU1 的群体倍增时间为 57.6 h。

从生长曲线可以看出, 从接种到细胞铺满细胞瓶底部分为 4 个阶段: 从接种到 24 h 内, 细胞数量急剧下降, 这是由于传代时胰蛋白酶损伤及机械吹打作用造成的伤害在继续发挥作用, 在这 24 h 内

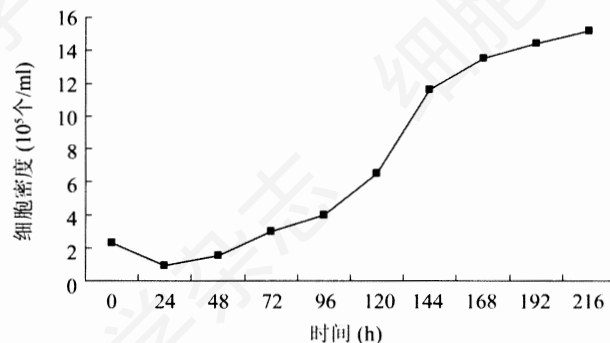


图2 BmE-SWU1 细胞系的生长曲线

表2 细胞染色体数目统计表

有丝分裂	染色体数目			合计
	<56	56	>56	
正常	0	122	27	149
异常	1	1	9	11
合计	1	123	36	160

一方面是大量的细胞死亡, 另一方面受伤较轻和没有受到伤害的细胞开始贴壁伸展, 但分裂的细胞少; 从 24 h 到 96 h, 细胞缓慢增长期, 此时细胞中有细胞继续死亡, 但有更多的细胞开始分裂; 从 96 h 到 144 h 是细胞的对数生长期, 此时细胞完全适应了新的环境, 细胞快速铺瓶, 生长旺盛; 从 144 h 起, 细胞进行缓慢增长期, 细胞基本铺满细胞瓶, 细胞由于营养、空间等原因生长缓慢, 此时应及时传代, 否则细胞容易结块, 老化。

## 2.3 BmE-SWU1 细胞系的染色体核型分析

在 Olympus BX51 显微镜下观察细胞的染色体制片, 染色体一般呈短杆状或颗粒状, 最长的有 4  $\mu\text{m}$ , 最短的约 1  $\mu\text{m}$ , 宽约 0.9  $\mu\text{m}$ , 为弥散型着丝粒。染色体数目变化较大, 最少的 43 条, 不足二倍体, 最多的达到 387 条, 高度异倍化, 表现为典型鳞翅目昆虫传代细胞的核型特征。对染色体的数目进行统计, 结果见表 2。在统计的 160 个细胞中, 正常有丝分裂的有 149 个, 占 93%。二倍体有 123 个, 占 76.8%。异常染色体占 6.8%。

用繁殖期细胞制作染色体滴片, 在显微镜下 (400 $\times$ ) 进行分裂相(包括前、中、后、末四个时期)的计数。总共计数细胞 5 637 个, 处于分裂期的细胞有 994 个, 占 17.6%, 具有比较高的分裂率。

表3 BmE-SWU1对BmNPV的感染率

细胞种类	总细胞密度 ( $10^5$ 个/ml)	感染细胞密度 ( $10^5$ 个/ml)	感染率 (%)	多角体浓度 ( $10^5$ PIB/ml)	多角体产量 (PIB/感染细胞)
BmE-SWU1	2.3	1.9	82.6%	10.3	5.4
BmN	4.4				

表4 BmE-SWU1对不同浓度BmNPV的感染率

病毒稀释倍数	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
感染孔数	12	12	12	12	10	6	4	1
非感染孔数	0	0	0	0	2	6	8	11
感染率 %	100%	100%	100%	100%	83.3%	50%	33.3%	8.3%

## 2.4 BmE-SWU1 细胞对 BmNPV 的敏感性

新建立的胚胎细胞系 BmE-SWU1 在接种病毒后, 与对照相比生长极其缓慢, 绝对数量也有所下降, 可能是因为感染多角体导致部分细胞破碎所致。在接种病毒前的细胞浓度为  $2.5 \times 10^5$  个/ml, 在接种 96 h 后, 细胞的浓度为  $2.3 \times 10^5$  个/ml。远低于正常细胞的水平  $5.1 \times 10^5$  个/ml。细胞接种病毒 24 h 即可以见到细胞核膨大, 48 h 可以见到部分细胞内产生了多角体。到 96 h 后, 绝大部分细胞已经感染, 并可见游离于培养基内的多角体, 说明细胞已开始破裂。此时对其进行感染率及产量的统计, 计算 3 瓶, 取平均数, 结果见表 3。96 h 达到了 84% 的感染率, 此时已有部分细胞破裂, 在 240 h 后, 培养瓶内几乎看不见完整的细胞。在同样条件下, 对照细胞系 BmN 和 BmE 培养 240 h 仍未发现多角体。采用病毒 10 倍稀释法和 96 孔板培养, 细胞的感染情况见表 4。按 Reed-Muench 算法测定了 BmNPV 感染 BmE-SWU1 细胞系的 TCID<sub>50</sub> 值。

比距 = (高于 50% 的感染率 - 50%) / (高于 50% 的感染率 - 低于 50% 的感染率) = 0.534

则  $\text{LgTCID}_{50}$  = 高于 50% 感染率稀释度的对数 - 比距 = -6.534

$$\text{TCID}_{50} = 10^{-6.534} = 2.92415 \times 10^{-7}$$

## 3 讨论

### 3.1 细胞系的建立与材料和时间的关系

本细胞系的建立曾利用多种家蚕品种进行原代培养, 包括: 夏芳、秋白、大造、C108 以及杂交种夏芳 × 秋白。前 4 个品种为纯系品种, 在培养过程中, 纯系品种出现的组织类型与杂交种没有多大的区别, 但纯系品种的原代培养在培养至 7~11 个月时都逐步衰亡, 组织细胞更替终止, 最后走向死亡。而杂交种夏芳 × 秋白品系的原代细胞在体外培养经过一段时间的缓慢更替后最终出现了具有分裂

能力的细胞群体, 这个细胞群体从少到多, 细胞有丝分裂从不规则到规则逐步完善, 最终形成了繁殖力旺盛、细胞形态单一的细胞系。这种结果的可能原因是杂种优势, 即杂交种的细胞比纯种的细胞生活力强, 更能适应体外培养的环境, 更容易得到细胞系。这与洪锡钧等在建立鲢鱼细胞系时所得到的结论是一致的<sup>[12]</sup>。

昆虫细胞系的建立非常困难, 通常需要经过长时间的培养和筛选才能获得具有繁殖能力的细胞, 并且成功机率也较低。昆虫细胞系建系困难的可能原因是昆虫细胞的基础研究薄弱和昆虫细胞去分化所需条件不清楚。同时, 昆虫细胞培养使用的是哺乳动物的血清, 而昆虫与哺乳动物差异很大, 二者去分化所需要的条件也可能不同, 由此也可能延迟昆虫细胞去分化形成具有繁殖能力的细胞。

### 3.2 胚胎发育时期与细胞类型的关系

国外现已经建立的 10 个家蚕胚胎细胞系全部来源于家蚕早期胚胎。除 BmE21-HNU5 来源于 4 天的早期胚胎外, 其他均是由发育 3 天的早期胚胎建成<sup>[6]</sup>。这些已经建立的细胞系除了 NISES-BoMo-15Ahe 是纺锤形的贴壁细胞外, 其余均是球形的悬浮型细胞。本研究采用的是第 5 天中晚期胚胎, 建成的是贴壁型细胞系, 其细胞形态复杂, 曾出现过大量多突起的类神经细胞。这可能是家蚕中晚期胚胎的细胞分化加剧造成的。选第 5 天的中晚期胚胎, 既容易获得足够数量的胚胎, 也能够得到具有繁殖力的群体。而且在培养过程中观察到了各种分化类型细胞的出现, 表明中晚期胚胎细胞仍有一定分化繁殖潜能。

### 3.3 染色体数目变化与核型

BmE-SWU1 细胞染色体数目上的变化与前人研究鳞翅目昆虫细胞系一致<sup>[12,13]</sup>, 表明鳞翅目昆虫细胞系的染色体具有与一般培养细胞系不同的特征: 从形态上看, 呈短杆状或颗粒状, 染色体之间很难从形态上加以区分, 从着丝粒上看, 比较认同的是家蚕染色体是弥散型着丝粒, 从染色体数目上看, 异倍化严重, 但二倍体仍然占绝大多数。是什么原因导致家蚕细胞系的染色体异倍化, 现在国内外研究较少, 可能是由于长时期体外培养导致核内有丝

裂频率增加所致。

### 3.4 细胞系 BmE-SWU1 对 BmNPV 的敏感性

BmE-SWU1 对 BmNPV 高度敏感, 远高于实验室保存细胞系。根据黎路林等<sup>[14]</sup>的研究结果, BmE 对 BmNPV 不感染, 只是生长习性由悬浮变为贴壁生长, 而 BmN 则是理想的 BmNPV 宿主细胞。本研究表明 BmE 受感染后与前人研究一致, 转为贴壁型细胞, 未见多角体出现, 但本研究室保存的 BmN 细胞系对 BmNPV 的敏感性大大降低, 可能是由于该 BmN 细胞系保存时间较长, 传代次数多, 从而引起细胞特性发生变化所致。另外, BmE-SWU1 细胞系对 BmNPV 高度敏感, 具有巨大的潜在利用价值。

### 参考文献 (References)

- [1] Grace TDC. *Nature*, 1962, **195**: 788
- [2] Lynn DE. *J Insect Sci*, 2002, **2**: 9
- [3] 河原烟勇等. *国外农学—蚕业*, 1993, (1): 45
- [4] 钱永华等. *蚕业科学*, 2002, **28**: 64
- [5] 高 音等. *北京大学学报(自然科学版)*, 1993, **29**: 648
- [6] 彭建新等. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 1989, **23**: 541
- [7] 普孝英等. *蚕业科学*, 2003, **29**: 136
- [8] Xia Q *et al. Science*, 2004, **306**: 1937
- [9] 张严峻等. *核农学报*, 2002, **16**: 301
- [10] 黎路林. *杆状病毒表达载体系统*. 武汉: 华中师范大学出版社, 1996, 141
- [11] 洪锡钧等. *西南农业大学学报*, 1995, **17**: 419
- [12] 洪 鹰等. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2003, **25**: 144
- [13] 今西重雄等. *国外农学—蚕业*, 1989, (1): 62
- [14] 黎路林等. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 1991, **25**: 469

## Establishment and Characterization of Embryo Cell Line of *Bombyx mori* -SWU1

Min-Hui Pan, Shi-Quan Xiao, Xi-Jun Hong, Cheng Lu\*

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

**Abstract** Embryo cell line of *Bombyx mori*-SWU1 (BmE-SWU1) was established after one year primary culture of differentiation and filtration. The cell line was mainly constructed with two types: shuttle and spheroid. And a few prominency and huge cells were found in cultivation. The cell population doubling time was 57.6 h at 28 °C. The chromosome of BmE-SWU1 cells showed typical characteristics of lepidoteran insect chromosome of metaphase without apparent centromere, and was short pole-like and pellet-like. The longest chromosome was about 4 μm. The cells were heteroploidy. The infection of BmNPV on the different insect lines showed that BmE-SWU1 was more sensitive to BmNPV. TCID<sub>50</sub> was 2.92415×10<sup>-7</sup>.

**Key words** silkworm; embryonic cell line; karyogram; growth curve; virus susceptibility

Received: September 1, 2005 Accepted: October 4, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471312), National Key Technologies R & D Program of China (No.2005BA711A07) and the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2005CB121000)

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