

甜菜夜蛾幼虫脂肪体细胞建系方法的探讨

张 寰 李 瑄 苗 麟 王红托 张爱君 杜 贺 杨 青 秦启联*

(中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 本研究以甜菜夜蛾幼虫脂肪体组织为材料, 探讨最初该细胞通过原代培养从组织中游离出不断增殖, 经过数次传代, 最终建立细胞系的过程以及培养过程中污染控制、培养基结晶对原代培养的影响等。结果表明, 贴壁处理对原代细胞的游离具有重要作用, 经贴壁处理, 有62%的培养出现游离细胞; 游离出来的细胞持续增殖, 能够布满培养表面并进行传代的比率为33%; 最终有15%的原代培养建系成功。起始培养至首次传代成功的平均时间是85天。污染和培养基结晶是原代培养失败的重要原因之一。

昆虫细胞系最重要的应用就是研究杆状病毒, 或者通过杆状病毒载体系统表达外源蛋白质。由于杆状病毒复制和感染的专一性, 每种病毒的扩增都需要相应同源的细胞系。缺乏对特定病毒敏感的细胞系, 已经成为该病毒相关研究的瓶颈。因此, 更多种类和来源的昆虫细胞系一直受到昆虫病毒研究者的欢迎, 也是昆虫病毒学研究的重要内容之一。昆虫细胞原代培养工作十分繁琐, 环节很多, 探讨培养条件和操作细节, 对于成功建立细胞系具有十分重要的意义。

昆虫的脂肪体同哺乳动物的肝脏具有相似的功能, 是重要的生理代谢组织, 也是杆状病毒侵染、复制的主要部位之一。目前已经建立了约30株昆虫脂肪体或脂肪体与卵巢混合物来源的细胞系, 数量仅占所有已建立昆虫细胞系的5%。目前, 虽然有关新的昆虫细胞系建立及特性的报道较多, 但对细胞系建立方法的探讨较少^[1-12]。本研究以甜菜夜蛾脂肪体组织为实验材料, 探讨昆虫脂肪体细胞系建立的方法, 其中包括原代培养的条件, 最初几次传代培养过程中的相关因素, 如取材的虫龄、脂肪体组织块大小、对组织块的处理、培养基是否出现结晶等, 以及这些因素对培养过程中细胞在体外分离和增殖的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验昆虫甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)来自中国科学院动物研究所农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室昆虫病毒学研究室, 以甜菜夜蛾人工饲料在 26 ± 1.5 °C、65%~75%相对湿度的条件下饲养。

1.2 主要试剂

细胞培养液 TNM-FH 购自 Sigma 公司(Cat. No. T1032), 配制时加入 10 U/ml 青霉素和 10 μ g/ml 链霉素; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自哈尔滨海生物工程公司。苯基硫脲(phenylthiourea, PTU)为国产分析纯。

PTU 饱和 TNM-FH 培养液: 在 TNM-FH 培养液中加入过量的 PTU 晶体, 充分搅拌后, 静置过夜。取上清液过滤除菌。

原代培养液: 其中 TNM-FH、FBS、PTU 饱和 TNM-FH 的比例为 8 : 1 : 1。

传代细胞培养液: 含有 10% FBS 的 TNM-FH。

条件培养液: 甜菜夜蛾脂肪体细胞系 IOZCAS-Spex-II^[13]传代培养于含 10% FBS 的 TNM-FH 培养液中, 当细胞生长到对数生长期时, 吸出其中的培养液, 1 000 g 离心 10 min, 吸取上清液, 用 0.22 μ m 的滤膜过滤后备用。条件培养液现配现用。

1.3 原代培养

在超净工作台内, 将末龄后期至化蛹前甜菜夜蛾幼虫浸于 70% 乙醇, 体表消毒 10~20 min, 用无菌吸水纸吸干虫体表面的乙醇, 放入装有 Ringer's 生理盐水的培养皿中解剖虫体, 获得脂肪体组织, 充分清洗脂肪体组织以除去血细胞, 将多块脂肪体组织用尖嘴镊转移到含有 1 ml 原代培养液的 T-25 cm² 塑料培养瓶(Corning, NY, 14831)中, 放入 27 °C 培养箱中培养。

收稿日期: 2009-04-13 接受日期: 2009-08-24

北京市自然科学基金(No.5093028)和中国科学院知识创新工程重点方向项目(No.KSCX2-YW-G-040)资助

* 通讯作者。Tel: 010-64807056, E-mail: qinql@ioz.ac.cn

过夜后, 加入 2 ml 传代培养液。加入传代培养液时, 注意不要触动贴壁的组织。以后每 7 天更换 2 ml 传代培养液, 待细胞长满瓶底后开始传代^[4,12,13]。

1.4 传代培养

第一次传代和最初几次的传代采取更换二分之一的培养液的方法。将培养液连同悬浮的细胞全部吸出放入新培养瓶, 并加入 2 ml 传代培养液; 而原瓶(含脂肪体组织块)中加入 4 ml 传代培养液。待细胞生长稳定后, 再次传代时根据细胞密度, 取 1~3 ml 细胞悬液放入含有 3~5 ml 传代培养液的新培养瓶中。

1.5 接种病毒

原代出芽型病毒(budded virus, BV)的获得: 使用三龄末期的甜菜夜蛾幼虫接种浓度为 1×10^7 个/ml 的甜菜夜蛾核型多角体病毒(*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus, SeNPV), 26 °C 饲养 3 天后收获幼虫血液于饱和 PTU 的 TNM-FH 培养液中, 离心过滤后贮存于 20 °C。苜蓿银纹夜蛾多粒包埋核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)的制备方法同 SeNPV, 但接种的幼虫为棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)。

接种病毒方法: 接种 2×10^6 个/瓶的对数生长期

的细胞于 T-25 cm² 的培养瓶中, 27 °C 贴壁培养 12 h, 去掉培养液后, 加入 1 ml SeNPV BV, 27 °C 培养 1 h, 中间晃动 3 次, 最后加入 5 ml 新鲜传代培养液。3~5 天后观察感染情况。

2 结果

在体外培养不同种类昆虫脂肪体组织, 其贴壁能力和增殖能力均有所不同。通过比较研究发现, 由脂肪体组织建立细胞系时, 应选择老熟或者较大龄期的幼虫, 解剖出的脂肪体组织应尽量保持完整。组织块在体外同培养器皿表面紧密贴附, 非常利于该组织块细胞的分裂生长, 推测这样的贴壁改善或稳定了细胞在体外的微环境, 利于细胞的生长和增殖。

本研究中共进行了 39 瓶甜菜夜蛾幼虫脂肪体原代培养, 这些培养的脂肪体组织都在培养表面形成了很好的贴壁。其中, 有 24 瓶细胞运动比较活跃, 组织块周围游离出大量状态较好的透明细胞, 占总培养的 62% (图 1A); 细胞持续增多并进行首次传代的共 13 瓶, 占 33%; 成功建立细胞系的共 6 瓶, 建系成功率 15%。以上所建立的 6 株细胞系, 均对甜菜夜蛾核型多角体病毒 SeNPV 和苜蓿银纹夜蛾核型

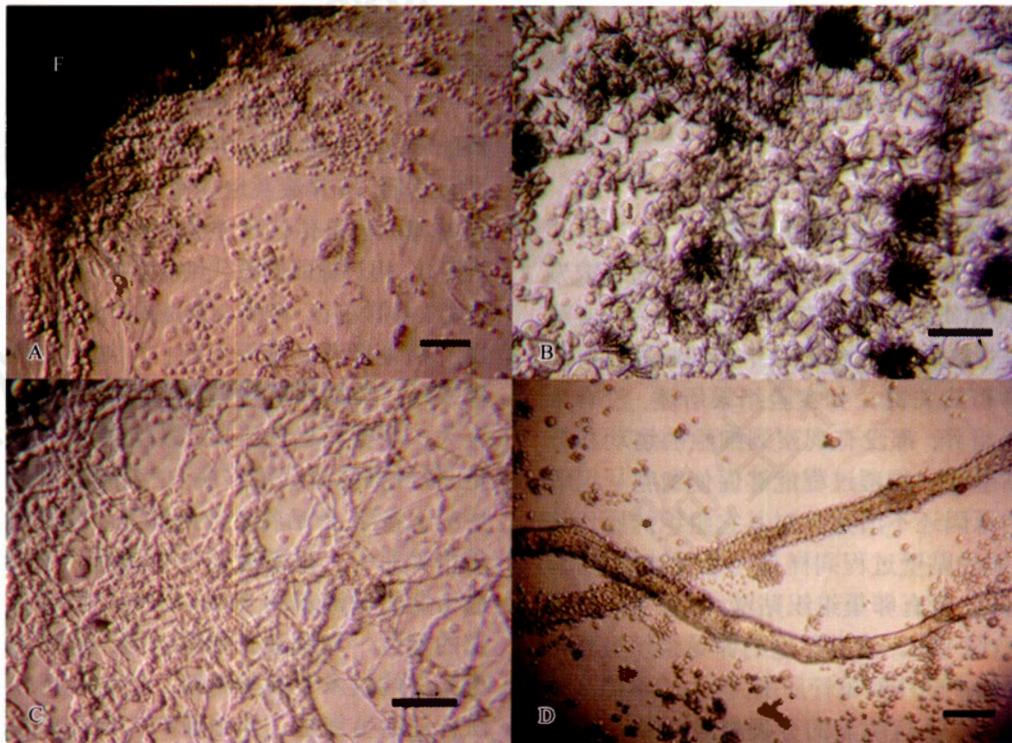


Fig.1 Phenomenon appeared in the primary culture of fat bodies and ovaries

A: cells came out of the fat body, F indicates the fat body; B: crystal formed in the medium of a primary culture; C: reticulate structure was observed in a primary culture that failed in establishment of the cell line; D: numerous cells detached from the ovaries inclined to adhere to the surface of the flask. Scale bar: 100 μm.

Table 1 Established cell lines from *S. exigua* larval fat bodies in this study

Cell line	Durations from initiation of primary culture to the first subculture (d)
IOZCAS-Spex-II	22
IOZCAS-Spex-III	23
IOZCAS-Spex-IV	133
IOZCAS-Spex-V	149
IOZCAS-Spex-VI	149
IOZCAS-Spex-VII	34

多角体病毒 AcMNPV 敏感。6 株细胞系的起始培养至首次成功传代时间如表 1 所示, 有 3 株近 1 个月, 另有 3 株近 5 个月, 平均 85 天。

由于建立细胞系过程中原代培养所需时间较长, 加上原代培养的组织是从虫体中取出, 如何避免污染是一个非常重要的问题, 处理不慎往往导致非常有希望的培养, 最终因污染而功亏一篑。在本次实验中, 共有 6 瓶污染, 污染率 15%。

培养过程中, 如果细胞生长状态不佳, 导致培养环境 pH 值升高, 培养基成分出现结晶。结晶的出现会对健康的细胞造成影响, 导致细胞状态更加恶化, 在本研究中出现结晶的比率是 23% (图 1B)。除建系成功的 6 株细胞系外, 其它未成功建系的细胞平均培养时间 58 天, 最长 142 天, 最短 9 天。

除在这 39 瓶贴壁培养之外, 其它所有组织块悬浮的培养都没有观察到细胞的运动和分裂。

3 讨论

3.1 原代培养过程中组织贴壁步骤

借鉴哺乳动物植块培养法, 结合我们的研究发现, 昆虫脂肪体组织块同培养表面紧密接触并形成贴壁状态的过程非常重要, 是组织块中的细胞能够游离出来并分裂增殖的关键。如实验结果所述, 没有形成贴壁的悬浮培养, 都没有观察到细胞的运动和分裂。组织块贴壁这一物理过程能够促使细胞从组织中游离出来的原因还不清楚。对其它组织的原代培养也发现, 组织的贴壁过程同样是一个关键的步骤。以卵巢组织为例, 只有卵巢组织贴壁, 细胞才能够从其中游离出来(图 1D)。没有贴壁的卵巢组织虽然可以看到有大量的细胞在卵巢管周围, 但由于不能从其中游离出来, 所以没有明显的分裂增殖现象。用胚胎组织进行的实验也有类似的情况, 贴壁的胚胎组织比不贴壁的更容易游离出细胞来。

3.2 从贴壁组织中游离出细胞的来源

组织贴壁后会有细胞自发从组织中游离出来, 关于这些游离出的细胞是何种性质的细胞, 与哺乳动物的组织干细胞有何异同, 是否具有较强的分裂增殖潜力, 贴壁处理是否激发了细胞的增殖以及昆虫的其它组织和器官中是否也具有这种类型的细胞, 能否找到其特异性标志物等问题, 都是非常重要而又极少被研究的。我们推测至少在昆虫脂肪体组织中, 可能存在极少数的类似于组织干细胞的、具有活跃分裂增殖潜力的细胞, 这样的组织干细胞类的细胞可能是最终成系细胞的母体。建立一种有效的分离培养这类细胞的技术和方法, 将可能有助于阐明昆虫细胞成系机理, 并打破昆虫细胞系建立的瓶颈。

3.3 传代过程中细胞的持续增殖

细胞原代培养时对体外生存条件有较高的要求, 需要适应新的体外环境后才能正常生长。在通常的脂肪体原代细胞培养过程中, 往往会出现两种情况: 一种是完全无细胞游离出或移动, 组织块呈无可见变化的状态; 另一种是有细胞移动和游出, 但这些细胞并不增殖, 长时间处于停滞状态以致难以传代, 或者经过数代缓慢生长的停滞期后, 才呈现旺盛生长状态, 形成稳定生长的传代细胞系。因此, 在原代细胞培养过程中, 有两个关键步骤, 一个是如何分离得到具有增殖潜力的细胞, 另一个是如何使这些具有增殖潜力的细胞持续增殖。

稳定初期传代细胞的生长环境、维持其持续增殖的状态, 是建系成功非常关键的因素。当细胞长满瓶底后, 培养液及培养空间有限, 需要对其进行传代处理。但是传代可能会致使细胞生长环境发生较大变化, 相对脆弱的原代细胞常常不适应这种变化, 在培养 1~2 周左右, 可能会形成网状或者长梭状结构(图 1C), 后期漂浮到液面而死亡。细胞在传代后停止增殖并死亡的原因可能与细胞传代的条件和传代时机有关。根据我们的经验, 最佳的第一次传代的方法是: 轻轻摇晃原代培养瓶, 使细胞在不受太多损伤的情况下悬浮, 然后将悬浮的细胞以较高的密度传入新的培养瓶中。换液量要依据细胞生长情况而定, 一般为瓶内原液量的 50%~70%。传代过程中细胞内部的变化、细胞死亡的原因等, 还有待进一步利用更先进的技术手段来阐明。比如利用 5'-BrdU 掺入法标记增殖细胞、从细胞凋亡和端粒酶活性检测等角度, 研究细胞增殖的潜力。端粒酶活性是细胞寿命和增殖潜力的表征之一, 哺乳动物正常的体细胞几乎没有端粒酶活性, 而永生化的哺乳动物细胞系具有

较高的端粒酶活性^[15]。借鉴哺乳动物端粒酶研究的成果, 可以将端粒酶的活性与昆虫细胞成系可能性联系起来, 进一步探讨昆虫细胞成系的机制。

3.4 传代细胞对病毒敏感与否的问题

传代细胞对同源病毒敏感性与细胞系的组织来源有无相关性, 这个问题国内外目前都没有确定的研究结果。我们实验发现, 新建立的细胞系大部分细胞对病毒敏感, 但仍有部分细胞接种病毒后并没有多角体出现。同时发现, 原代培养过程较长的细胞系, 细胞对病毒的敏感性相对较低, 比如已建立的来自棉铃虫幼虫脂肪体组织的细胞系 IOZCAS-Ha-I 原代培养长达 8 个月, 对同源病毒敏感的细胞就较少^[14]。细胞系对病毒敏感与否, 与原代培养时间的长短是否有关? 在原代培养过程中, 怎样的处理操作将有利于保留对病毒敏感的细胞群? 这些都是昆虫细胞与杆状病毒关系的理论和应用研究中非常关键的问题, 在今后的工作中将继续关注和探讨。

3.5 细胞污染

细胞系建立的工作往往需要较长的时间, 大多数原代培养都在几个月甚至 1~2 年以上, 期间需要进行多次的换液操作。原代培养一旦被污染, 补救的机会几乎为零。因此, 细胞系一旦进入稳定的传代阶段, 应尽早进行细胞的冻存。污染的来源主要是两个, 一个是杂菌微生物的污染, 最有效的防止方法就是规范、仔细地操作; 另一个是其它细胞系的污染。细胞系在建成后, 需要对其进行鉴定, 以确定是否被实验室其它培养的细胞系污染。通过对多种细胞系鉴定方法的比较, 我们认为, 最简便可靠的鉴定手段就是 DAF-PCR (DNA amplified fingerprint polymerase chain reaction) 技术。使用这种方法也对新建立的 6 株细胞系进行了鉴定, 确定了 6 株细胞系均是新建细胞系, 并非其它细胞系的污染。

参考文献(References)

- [1] Lynn DE, Ferkovich SM. New cell lines from *Ephestia kuehniella*: characterization and susceptibility to baculoviruses, *J Insect Sci*, 2004, 4(9): 1-5
- [2] Eguchi D, Iwabuchi K. A new cell line from the wax moth *Galleria mellonella* Linne (Lepidoptera: Pyralidae), *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2006, 42(1): 1-3
- [3] Gelernter WD, Federici BA. Continuous cell line from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) that supports replication of nuclear polyhedrosis viruses from *Spodoptera exigua* and *Autographa californica*, *J Invertebr Pathol*, 1986, 48(2): 199-207
- [4] Inoue H, Mitsuhashi J. Further establishment of continuous cell lines from larval fat bodies of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), *Appl Ent Zool*, 1985, 20(4): 496-498
- [5] Iwabuchi K. An establishment cell line from the beetle *Xylotrechus pyrrhoderus* (Coleoptera: Cerambycidae), *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, 35(10): 612-615
- [6] Iwabuchi K. A continuous cell line derived from larval fat bodies of *Thysanoplusia intermixta* (Lepidoptera: Noctuidae), *Appl Ent Zool*, 2000, 35(2): 245-249
- [7] Mitsuhashi J. Establishment and some characteristics of a continuous cell line derived from fat bodies of the cabbage armyworm (Lepidoptera, Noctuidae), *Dev Growth Differ*, 1981, 23(1): 63-72
- [8] Mitsuhashi J. Continuous cell line derived from fat bodies of the common armyworm, *Leucamia separata* (Lepidoptera: Noctuidae), *Appl Ent Zool*, 1983, 18(4): 533-539
- [9] Mitsuhashi J. Isolation of a continuous cell line from larval fat bodies of an arctiid moth, *Spilarctia seriatopunctata* (Insecta, Lepidoptera, Arctiidae), *J Zool Sci*, 1984, 1(3): 415-419
- [10] Mitsuhashi J, Inoue H. Obtainment of a continuous cell line from the larval fat bodies of the mulberry tiger moth, *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera: Arctiidae), *Appl Ent Zool*, 1988, 23(4): 488-490
- [11] Mitsuhashi W. A new continuous cell line from the larval fat bodies of the mulberry tiger moth, *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera: Arctiidae), *Bull Natl Inst Seric Entomol Sci*, 1994, 11: 1-8
- [12] Philippe C. Culture of fat body of *Periplaneta Americana*: tissue development and establishment of cell lines, *J Insect Physiol*, 1982, 28(3): 257-265
- [13] Zhang H, Zhang YA, Qin QL, et al. New cell lines from larval fat bodies of *Spodoptera exigua*: characterization and susceptibility to baculoviruses (Lepidoptera: Noctuidae), *J Invertebr Pathol*, 2006, 91(1): 9-12
- [14] Zhang H, Zhang YA, Qin QL, et al. A new cell line from larval fat bodies of the bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2006, 42(10): 290-293
- [15] 甄 蕾。端粒、端粒酶与细胞永生, *口腔颌面外科杂志*, 2008, 18(4): 285-287

Establishment of Cell Lines from the Fat Bodies of *Spodoptera exigua* Larvae

Huan Zhang, Xuan Li, Lin Miao, Hong-Tuo Wang, Ai-Jun Zhang, He Du, Qing Yang, Qi-Lian Qin*

(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology,

Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract This study focused on how to initiate insect cell lines from primary culture using the fat bodies of *Spodoptera exigua* larvae as culture tissue. Factors influencing proliferation of new cells from the primary culture, how to deal with subculture, as well as impact of microorganism pollution or medium crystallization on the primary culture were investigated and discussed. The results showed that the treatment that ensured the cultured tissue fast adhere to the culture surface was very important for new cells proliferating from the tissue. In the all adhesion cultures there were 62% of the cultures observed cell proliferation. Those continuous proliferating and further covering the whole culture surface were of 33%. Finally, approximate 15% of the primary cultures were developed to continuous cell lines. The average time from initial training to the success of the first passage was 85 days. Pollution and crystallization of the primary culture were important causations of failure.

Key words insect cell culture; *Spodoptera exigua*; cell line; fat body

Received: April 13, 2009 Accepted: August 24, 2009

This work was supported by the Beijing Municipal Natural Science Foundation (No.5093028) and the Knowledge Innovation Project of Chinese Academy of Sciences (No.KSCX2-YW-G-040)

*Corresponding author. Tel: 86-10-64807056, E-mail: qinql@ioz.ac.cn