

中华按蚊(*Anopheles sinensis*)细胞系的建立和特征

潘李珍 石梦辉 张 漪 张志敏

(北京首都医学院)

蚊虫细胞培养,对于人体和动物体的病原体(虫媒病毒,寄生虫……等)的培养研究,以及作为一种细胞模型,对真核细胞生理学、分子生物学的研究已发展为成熟的技术。迄今为止,已建立的蚊虫细胞系共20种43个^[1]。中华按蚊是我国间日疟、丝虫病的主要虫媒。资料证明,从中华按蚊成蚊体内,曾分离到乙脑病毒^[2]。建立中华按蚊细胞系,不仅为研究这些病原体提供实验条件,而且对于本种蚊虫的生理、生化、灭蚊试验等研究,亦为良好的材料^[3]。目前国际上已经建立的按蚊细胞系有2种8株,即 *Anopheles gambiae*(LSTM-AG-55), *Anopheles stephensi*, (LSTM-43, LSTM-44, LSTM-45, LSTM-46……等)^[1,4,5],但尚无中华按蚊细胞系的报告。

我们于1984年6月,从中华按蚊初孵幼虫碎片培养物中,建立了一个细胞系,命名为AS-684。细胞系传代70代次,历时16个月。本文报告AS-684建系经过及特性研究结果。

材 料 和 方 法

实验材料:中华按蚊的卵,来自山东济宁地区驯化品系在我室饲养的蚊群。产卵24小时后收集,用我们修改的Schneider法进行表面消毒。除菌的蚊卵,放在无菌平皿潮湿的滤纸上,在28℃温箱中成熟一天备用。

原代培养:制备原代培养物,用我们改良的199培养基(含有水解乳白蛋白,谷胱甘肽, L-半胱氨酸,维生素C等成分)。于培养液中加入20%小牛血清V/V及50微克/毫升的庆大霉素,用5.6%碳酸氢钠调整pH至6.8。在无菌条件下,将蚊卵洗到含有Earle液的培养瓶内,即可见幼虫孵出。小心吸取幼虫,放到无菌漏斗的滤纸中,过滤浓集。用培养液悬浮幼虫,放到无菌小瓶中,用虹膜剪剪碎幼虫,经

Earle液洗涤两次,再用培养液悬浮幼虫碎片,接种到20毫升的培养瓶内,将培养物放到28℃温箱中培养,每周换液一次,每次换去旧培养液的一半。

传代培养:原代培养形成单层细胞后,立即传代。方法是:移出原代培养物中的幼虫碎片,用弯头滴管直接吹散单层细胞,制成单细胞悬浮液,然后等量分种与两个与原瓶容积相同的新培养瓶。移出的幼虫碎片,加入新鲜培养基,在原培养瓶中继续培养。为促进细胞生长,传代初期使用条件培养基,并且间隔7—10天传代一次。自第10代后,间隔4—5天传代一次,并完全使用新鲜培养基。传代过程中,始终保持1:2分种率,连续传70代次。为研究细胞系生长条件,曾使用含有10%F12的Mitsubishi-Mara-moroch培养基。

结 果

一、细胞系的建立

在64批次124瓶原代培养物中,均观察到幼虫碎片抽缩活动,持续半年之久。原代培养48小时后,于碎片断端,出现很多囊泡,以及数量较少的细胞球(图版I图1)。一周后,单个细胞贴壁,并出现细胞集落,而囊泡数量增加达高峰,其中大部分也贴壁并发育成细胞集落。培养至第20天细胞,集落增加,铺满瓶壁,构成单层细胞(图版图2)。单层细胞中各个集落的细胞形态是不相同的,多数是多边形和纺锤形的上皮细胞集落,另外还有少数散在的双核细胞、巨细胞,以及长梭形的成纤维细胞。

细胞传代初期,一般1—2小时贴壁,生长较慢,需培养7—10天才形成单层细胞。传10代后,细胞繁殖速度增加,培养4—5天,就能达到原来传代的密度,并始终保持1:2的分种率连续传代70代次。传代后形成单层细胞时,细胞密度约1.5百万个/毫升。细胞系

从 45 代起, 虽然培养基中小牛血清的含量降低至 15%, 但仍可保持原有的繁殖能力。在传代中期, 曾使用含有 10%F12 的 Mitsuhashi-Maramorosch 培养基, 其中小牛血清含量为 15%, 结果细胞更适应生长。

传代后, 原培养瓶中的幼虫碎片加入新鲜培养基, 每两周形成单层细胞一次。这种碎片培养物持续半年之久仍不失产生细胞的能力, 而且形成与原代培养物相似的细胞集落。碎片培养物形成的单层细胞也可传代, 曾传至 5 代以上, 细胞生长十分稳定。

图版图 3 为第 45 代细胞, 经 3 天培养后, 形成单层细胞的活体照片。

二、细胞系生物学特性

(一) 细胞形态特征

将小盖片置于培养瓶中, 接种细胞, 培养至对数生长期取出。长着细胞的盖片经空气干燥, 1:3 冰醋酸甲醇固定液固定, Giemsa 染色。镜检标本制片, 计数 2000 个细胞, 统计不同代次的细胞, 在对数生长期中各种细胞类型所占平均百分数, 结果如下表:

AS-684 细胞形态分类

代次	多边形上皮细胞%	纺锤形上皮细胞%	双核细胞%	长梭细胞%
11代	33.3	56	8.5	2.3
15代	34	53	7.6	5.4

表中指出: 经过传代的细胞, 在不同代次不同培养时间内, 细胞系始终保持以多边形和纺锤形上皮细胞为优势。它们在形成单层细胞时, 均表现为多边形上皮细胞的形态而不易区别。此外, 双核细胞及长梭形细胞数量所占百分数较小。偶尔可见多核巨细胞。各种细胞类型的形态描述如下: (图版图 4、5)

1. 多边形上皮细胞: 直径平均为 18.2 微米。单核, 核大小为 5.2 微米, 有核仁。胞质有颗粒。

2. 纺锤形上皮细胞: 短梭形, 大小平均为 15.6 微米×28.6 微米。单核, 核大小为 6.6 微米。胞质有颗粒。

3. 双核细胞: 直径平均为 31.2 微米。两个圆形核位于细胞中间, 大小各为 6 微米。胞质颗粒较前两种细胞的颗粒小。

4. 长梭形细胞: 两端突起较长, 大小平均为 15.6×83 微米。单核, 核圆形, 大小为 10 微米, 有核仁。胞质颗粒较少。

在原代培养或传代培养中, 均可见到囊泡。特别在细胞传代中, 若接种细胞数目过少生长不良时, 囊泡数目会增加。囊泡一般为圆球形, 由表皮细胞构成囊膜, 囊的内部是空的(图版图 1a), 或有细胞, 即细胞球(图版图 1b)。它们贴在瓶壁上, 或浮在培养液中。

曾对 21 代、27 代、35 代、55 代的传代细胞做过 4 次透射电镜观察, 在不同放大倍数下(1 万—4 万倍), 未发现支原体及病毒质点。

(二) 细胞生长特性

细胞分裂指数的测定: 试验是测定不同代次细胞, 在四天生长过程中的分裂指数。即接种细胞于带小盖玻片的培养瓶中, 每天定时取出三个培养瓶中的盖玻片, 固定染色, 制成标本片, 显微镜检查。统计每个盖片中 1000 个细胞的平均分裂相数目(包括前期、中期、后期的全分裂相), 划点作图测得分裂指数如图 1。

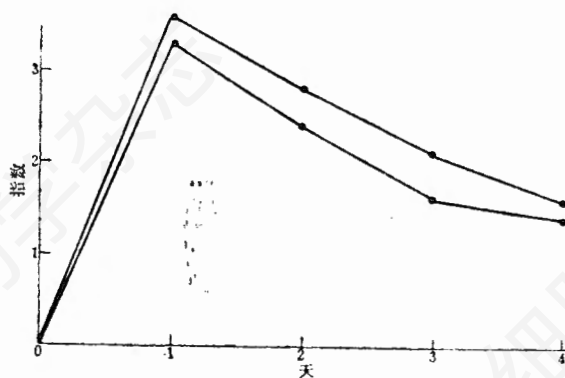


图 1

曲线表明: 第 11 代细胞(上)和第 15 代细胞(下)的测定结果相似, 均以 24 小时分裂相最多, 48 小时稍有下降, 至 96 小时只有很少

的分裂相。

2. 细胞生长曲线的测定: 应用 Earle 等 (1951) 建立的生长率测定法进行^[6]。即在同一规格大小的培养瓶中, 等量接种同一份细胞悬浮液, 使每瓶细胞数量相等, 在相同条件下培养。每天定时取出 3 瓶细胞, 精确计数, 求出平均值, 逐日将细胞生长数划点作图。

试验测定 30 代次细胞, 每瓶接种细胞数为 39 万个/毫升, 按日增长数定点, 测得曲线, 如图 2。

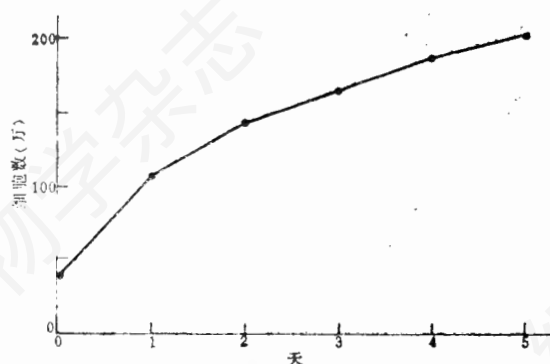


图 2

曲线所示, 细胞生长迟缓期很短, 24 小时就开始倍增, 以后细胞数逐日增长, 至第五天细胞相当于原接种数的 5 倍。用计算机程序计算, 细胞对数期二倍增长的时间为 16 小时。

(三) 细胞染色体特征

参照 Schneider 氏的方法^[7], 在传代过程中, 每隔 5 代制作染色体标本制片一批(材料来自同一个培养物), 对细胞染色体进行分析。主要是检查细胞染色体数目以及有无断裂, 异常结构等。检查结果如图 3 所示, 两个不同代次的细胞(9 代, 21 代), 绝大部分是二倍体细胞, 染色体 3 对 6 条($2n=6$), 分别占细胞染色体总数的 87% 及 84%。四倍体 6 对 12 条, 分别占染色体总数 12% 及 14%。多倍体细胞染色体为 12 对 24 条, 分别占染色体总数 1% 及 4%, 没有发现断裂和异常结构的情况。染色体分析说明, 细胞虽经多次传代, 仍保持以二倍体细胞为主的特征。图版图 6 为

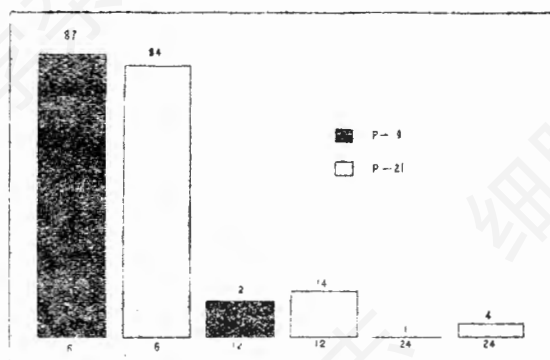


图 3

AS-684 6 个染色体的二倍体细胞, 图 3 为 AS-684 细胞染色体(P-09, P-21)比较结果。

(四) 细胞对小牛血清需要量的测定

为了解细胞系最适合的小牛血清浓度, 以及维持细胞生存的最小小牛血清量而设计本试验。方法是: 用含有 2% 小牛血清浓度的培养基(V/V), 制成细胞悬浮液。精确计数, 等量分种于同一条件的培养瓶。然后补加小牛血清使之成 2%, 5%, 10%, 20% 不同浓度, 而每瓶细胞数目相等。培养至 48, 96 小时, 分别取出培养物, 精确计数, 按细胞生长数定点作图, 得曲线如图 4:

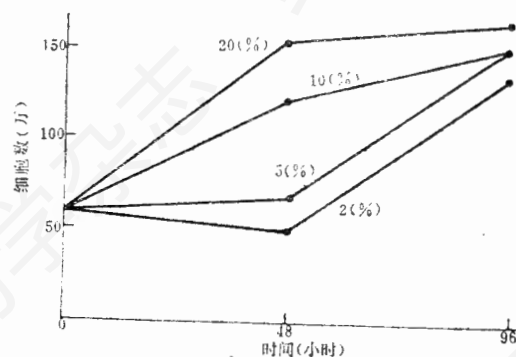


图 4

如图所示, 在 48 小时, 2% 小牛血清浓度的细胞生长率稍下降, 5% 小牛血清浓度的细胞稍有一些增长, 但它们均不能形成单层细胞, 需培养四天, 才构成单层细胞。10%—20% 小牛血清浓度细胞生长较快, 48 小时形成单层细胞。虽然 10% 小牛血清浓度细胞生

长率比20%小牛血清浓度的生长率低,但它们都呈现血清剂量依赖关系,到96小时都构成致密的单层细胞。因而这两个浓度为细胞合适的血清浓度。2%小牛血清浓度是维持细胞生存的最小剂量。

(五) 细胞同工酶分析

试验采用组织等电点聚焦电泳技术,分析细胞酯酶同工酶。其过程如下:取30代培养至48小时的单层细胞培养物,加入pH 6.8 P. B. S. 洗涤3次,然后加入1/2培养量的P. B. S. 液,轻轻地冲散细胞,制成单个细胞悬浮液。将细胞悬浮液吸入离心管中,1000 r. p. m 离心10分钟,弃上清。加少许无离子水,混匀后放到普通冰箱冷室中,反复冻融三次,得到的液体为电泳样品。将样品放在LKB聚丙烯酰胺平板凝胶上(pH 4-6.5),作等电点聚焦电泳。电泳2.5小时后,随即用电极测出平板胶各部位的pH值。最后,胶板放在脂酶反应液中,在37℃下保温40分钟染色,清水洗涤数次,计算每条酯酶同工酶带等电点值(PI)。试验使用中华按蚊细胞系AS-684第30代细胞材料,并在同一条件下,以埃及伊蚊细胞材料作对照。结果中华按蚊细胞样品,在聚焦电泳酶谱上显示两条酶带,其等电点值(PI)分别为4.75、4.85。埃及伊蚊细胞样品也显示两条酶带,但等电点值却为5.25、5.35。

三、细胞系冷冻贮存

AS-684细胞系从第三代起有不同代次的细胞贮存于液态氮贮罐中。在培养基中加入10%二甲基亚砷作保护剂。到目前为止,细胞系已保存3年。经多次复苏证明,细胞不但存活,能传代,而且保持原有的特性不变。例如前述细胞分裂指数的测定,11代次是第4代细胞冷冻复苏后的传代细胞,它的分裂指数与未经冷冻15代次的细胞比较相差无几。AS-684也有不同代次的细胞保存在4℃普通冰箱之中,它们无需加入任何保护剂,只要制成200—300万个/毫升的细胞悬浮液,就可存放

冰箱内。经保存1个月后,作过4次复苏试验,细胞悬浮液放到28℃温箱中培养,能很好恢复生长,5—7天便可形成单层细胞。

讨 论

1. AS-684在体外传代70代次,并进行过多项特性研究,我们认为可以确定为细胞系。AS-684的建立,使现存的蚊虫细胞系增加了一个新蚊种。从AS-684主要特征上看:细胞系生长迅速;在传代中始终保持二倍体细胞为主的性质;四个代次透射电镜检查无支原体及病毒质点;易于冷冻保存等,我们认为此细胞系是性质稳定的,可以应用于疟原虫、丝虫等体外培养的研究,以及其他生物学上的研究。

遵义医学院曾引用本细胞系作马来丝虫微丝蚴体外培养研究,结果证明微丝蚴在含有中华按蚊细胞的改良199培养基中能发育,培养至第12天有25.5%发育至腊肠期蚴。但在含有白纹伊蚊细胞同样的改良199培养基中,以及在无蚊虫细胞TC 199培养基中,只能存活,未见脱鞘和发育。目前这一研究正在深入进行^[8]。

2. AS-684在建系方法上,首先,使用我们修改的199培养基,以及后来用含有10% F 12的MM培养基,在过去建立的各种按蚊细胞系中没有报告。其次,是原代培养中遇到了比别的蚊种建系时更难解决的污染问题,使用我们修改Schneider消毒法,以含有滤纸的漏斗代替塑料筒得到满意的结果。此外,我们在传代中始终保留幼虫碎片的培养,不但观察到它产生细胞的能力,而且将它形成的单层细胞与AS-684原代培养单层细胞作过比较,细胞形态类型和传代能力都相同,我们认为这种培养物对于疟原虫体外培养可能更为有利,因为这种培养物并非长期传代细胞,更接近于蚊虫的体内环境。

3. 原代培养形成的单层细胞培养物并非都能传代。我们认为掌握好传代时机,以及使

用条件培养基是传代成功的关键。传代没有使用酶化技术, 尽管在传代初期生长速度有些缓慢, 但后来生长加快, 而且始终保持二倍体细胞为主的特性。

4. AS-684 能在 4℃ 普通冰箱中保存, 因而在无液态氮冷藏设备的条件下, 可采用每月复苏一次的轮换办法, 达到长期保存细胞系的目的。细胞系的这种特性对于推广应用有一定价值。

5. 对 AS-684 酯酶同工酶分析的结果, 对照 Karl, Maramorosch 所描述的蚊虫细胞酯酶酶谱为两条酶带一样, 试验结果也获两条酶带。曾用埃及伊蚊细胞作过对照, 结果两种蚊子在酶带等电点值(PI)上表现不同, 这对于细胞系的蚊种鉴别可以作为参考。应用此分析结果, 似乎能排除细胞之间的交叉污染。细胞系对小牛血清需要量的测定, 在病毒学应用上有一定参考价值。

6. AS-684 是由很多初孵幼虫全虫组织混合培养成功的。细胞组成是一种混合体, 不能确定来源于某个幼虫的某种组织, 需要进一步克隆化, 挑选出合适的细胞株。

摘 要

从中华按蚊初孵幼虫中, 建立一株细胞系, 命名 AS-684。建系使用我们改良的 199 培养基及含有 10%F12 的 M-M 培养基。原代培养 20 天形成单层细胞。传代培养, 以 1:2 分种率, 相隔 4—5 天传代 1 次, 连传 70 代次。细胞系由 4 种细胞类型组成, 以多边形和纺锤形上皮细胞为优势, 掺杂少数双核细胞及

长梭形细胞。细胞生长, 从 24 小时开始倍增分裂达高峰, 对数期二倍增长时间约为 16 小时。自 45 代起, 培养基中血清含量从 20% 降至 10—15%。4 次电镜观察, 没有发现支原体和病毒质点。细胞系以二倍体细胞为主, 染色体 6 条 ($2n=6$)。细胞酯酶同工酶分析, 酶谱为两条酶带, PI 值为 4.75, 4.85。各种代次细胞保存于 -196℃ 的液态氮中及 4℃ 普通冰箱中, 经多次试验能成功复苏。

参 考 文 献

- [1] Timothy, J. Kurtti., and Ulrike, G. Munderloh., 1984, In *Advances in Cell Culture* (Karl. Maramorosch), PP. 276-280. pp. 281-282. PP. 287-288. Academic press, New York.
- [2] 徐秉锬等, 1984, 人体寄生虫学, p 211-212.
- [3] 潘李珍, 1980, 实验生物学报, 13(2):147-153.
- [4] Varma, N. G. R., Pudeny, M., and Leake, C. J., 1979. In *Practical Tissue Culture Application* (K. Maramorosch, and H. Hirumi, eds.), PP. 331-333. PP. 346-340. Academic press, New York.
- [5] Schneider, I. 1969, *J Cell Biol.* 42(1):603-606.
- [6] Evans, V. J., Earle, W. R., Sanfor., K. K., Shannon, J. E. and Waltz, H. K., 1951, *J. Nat. Cancer Inst.* 11:907-927.
- [7] Schneider, I. 1973. In *Tissue Culture. Methods and Application* (P. F. Kruse Jr., and M. K. Pittensom, Jr., eds.), PP. 150-152. PP. 788-790. Academic press, New York.
- [8] 陶鸿章, 1987, 全国第二次寄生虫学讨论会论文交流汇编。