

恒河猴肾 MK-8611 细胞系的建立及其生物学特性

王佩球 秦明晖 何吉兰 陈立礼 张淑琼 白锦华

(四川省卫生防疫站)

恒河猴肾细胞对多种病毒敏感, 国外虽早已有该细胞系报道^[1,2], 但国内仍主要应用原代细胞, 尚未建立传代细胞。我们于1986年11月起, 进行恒河猴肾传代细胞建系工作, 经过体外传代10月后, 获得一株能稳定传代的细胞系, 命名为MK-8611细胞系, 现已连续培养61代。本文报道该细胞系培养建立的过程及其生物学特性。

材 料 和 方 法

一、取材及培养 由本站动物房饲养的8周岁健康雄性恒河猴(Macaca Mulatta), 体重约5公斤, 放血致死, 在无菌操作下取出双侧肾脏, 除去包膜和髓质, 将肾皮质剪碎, 用Hank's液洗净血液和组织碎片, 经0.25%胰酶-EDTA二钠消化液冷消化, 将细胞以 5×10^5 /毫升的浓度悬浮在含10%小牛血清的Eagle营养液中, 37°C温箱中静置培养, 5天后形成致密单层, 即1:2开始进行细胞传代。

二、细胞的冻存与复苏 按100万/毫升细胞浓度悬浮在10%二甲基亚砷保存液中(内含小牛血清15%), 分装安瓶, 放4°C冰箱过夜, 次日先放液氮罐气层, 1小时后浸入液氮中保存。复苏时, 将安瓶取出迅速投入37°C水浴解冻后, 将细胞加入9倍量的营养液, 放37°C培养, 次日更换新的培养液继续培养。

三、病毒敏感性试验 试验采用的脊灰、麻疹等毒株, 分别由医科院医学生物学研究所和卫生部药品生物制品检定所购进; 其中COXB₂、ECHO_{7,11}、腺病毒3、7型等为本实验室分离鉴定的地方株; 流感、出血热病毒由本站病毒科赠给。病毒滴定采用微量滴定法^[3]、按Karber法计算TCID₅₀/毫升和标准差^[4]。

四、微生物污染的检查 马丁、胰酪、猪胃3种培养基均由医科院医学生物学研究所赠给。细胞传代后培养至第4天, 吸培养液1毫升, 分别接种于马丁、胰酪培养基中各3支; 用消化液消化细胞, 加入

无抗菌素的营养液分散细胞, 吸细胞悬液1毫升接种于3支支原体培养基中, 放37°C温箱, 培养15天, 逐日观察。

结 果

一、建株经过

细胞在5代前, 每隔5—6天传代1次, 至第6代, 待细胞长成单层后, 放28°C孵箱, 每隔10—15天换液1次, 随着放置时间延长, 许多细胞死亡, 最后瓶中只保留了数个形态一致的细胞小集落, 此时改换成含20%牛血清营养液, 37°C继续培养。细胞逐渐向四周扩展生长, 至3个月细胞集落直径约1.5—2厘米时, 用消化液分散细胞, 在原瓶37°C继续培养。约经过两个月, 待形成较多的小岛状细胞集落后, 再消化细胞原瓶继续培养, 如此反复3次后, 细胞生长速度加快, 细胞量由少增多, 并能形成致密单层, 开始进行正常传代。14代后将血清量由20%降至10%。从原代培养开始, 体外传代10个月后, 细胞生长趋于稳定, 每隔4—5天传代1次, 已历时21个月, 传61代, 并冻存有不同代次的3批细胞。

二、生物学特性

1. 细胞形态 细胞接种后1小时, 即开始贴壁, 4小时有少量细胞分裂。用普通光学显微镜活细胞观察, 细胞透明, 颗粒少, 立体感强, 形态呈多边形、梭形和原代猴肾细胞基本相似。将细胞培养在盖玻片固定后, 以H.E

本文承中国医科院医学生物学研究所郭仁教授, 唐恩华副教授, 四川省人民医院胡开华副主任技师热情帮助; 我站余明泽、林世华、秦光明、张明成等同志协助部分工作, 谨此一并致谢。

染色高倍镜观察,细胞直径平均约为51微米,常可看到不同时期的有丝分裂相(图版图1)。核直径约为23微米,多数为单核、双核和多核巨细胞约占8.14%。核仁清晰易见,1—3个占85.86%,5个以上约占3.5%。

取34代细胞用电镜进行超微结构观察,细胞形状不规则,其表面有多少不等,长短不一的微绒样突起,细胞核有圆形,椭圆形,分叶状及多核。有的细胞核内核仁大、多个,核内常染色质丰富。胞浆内可见丰富的丝管、溶酶体、游离核蛋白体和大小、长短不等、形状多样的线粒体,有粗面内质网及少量的滑面内质网(图版图2)。

2. 生长曲线 用25代的 10^5 /毫升细胞悬液,接种20支细胞管,每支接种1毫升,每天取出2支,连续10天,用0.25%胰酶消化,血球计数板计数,取平均值,绘制生长曲线。从图1看出,细胞接种后24小时,增殖不明显,24小时以后开始生长,至第7天为细

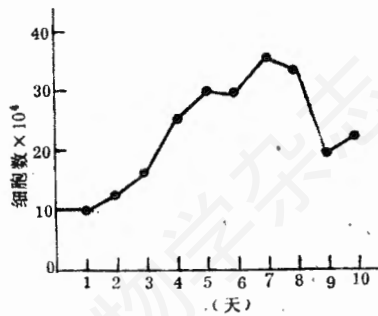


图1 MK-8611细胞系第25代生长曲线

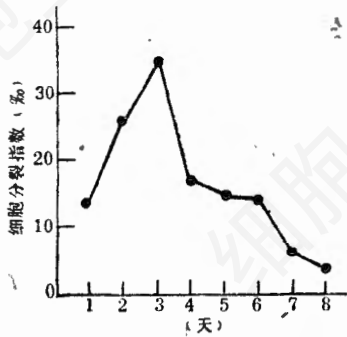


图2 MK-8611细胞系第30代分裂指数曲线

胞增殖高峰,此时细胞量为接种时的3.5倍,培养至5天,细胞群体倍增时间约为75.7小时。

3. 分裂指数 用30代的 10^5 /毫升细胞悬液,接种在内含窄条盖玻片链霉素瓶内,每瓶接种1毫升,每日取2张盖玻片,用H.E染色,连续8天,逐日计3000个细胞中的各分裂期细胞数,绘制成分裂指数曲线,从图2看出,培养第3天末细胞分裂达高峰,分裂指数为35%。

4. 平板集落效应 用第24代的100个细胞/10毫升,接种在3个直径8厘米的培养皿内,置3%CO₂培养箱内,35℃静置培养20天,吸出培养液,加0.0075%结晶紫甲醛溶液染色,用肉眼观察平板集落数,其平均集落形成率为56±1.4%。

5. 核型分析 将培养第3天24代细胞,加秋水仙素,最终浓度为0.1微克/毫升,培养5小时后,胰酶消化,收集细胞,经低渗、固定、制片、晾干、姬姆萨液染色,计算100个中期分裂相细胞染色体数(表1)。MK-8611细胞系染色体为非整倍体(图版图3),其数目在41—190之间,主流为61—80,占总数61%,正常二倍体染色体(2n=42)仅占6%^[6]。

表1 MK-8611细胞系染色体数分布情况

| 染色体数 | 41—50 | 51—60 | 61—70 | 71—80 | 81—90 | 91以上 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 细胞数 | 12 | 7 | 34 | 27 | 14 | 6 |

6. 单层细胞维持培养及细胞冻存 细胞形成单层后,换成5%小牛血清维持液,分别置35℃和28℃,每隔10—15天换液,观察培养物维持正常形态时间。经两批单层细胞观察,平均维持正常形态时间为59天和75天。

细胞在14、21、32代分别进行液氮冻存,冻存后1月、6月、1年复苏,细胞存活约为90%左右,细胞形态、生长特性与冻存前细胞基本一致。

7. 对病毒的敏感性 MK-8611细胞系对

表2 MK-8611 细胞对病毒的敏感范围

| 病毒名称 | 结 果 | 病毒名称 | 结 果 |
|--------------------|-----|--------------------------|-----|
| 脊灰 Sabin I | + | *轮状病毒 Wa 株 | + |
| Sabin II | + | SA ₁₁ | + |
| Sabin III | + | Hachi | ± |
| Brunhilde | + | 腺病毒 3 | + |
| MEF 1 | + | 7 | + |
| Saukett | + | *11 | + |
| COX B ₂ | + | 麻疹病毒 | + |
| *B ₄ | + | 流感病毒甲 1/青防 85-42 | - |
| *B ₅ | + | A ₃ /贵防 89-30 | - |
| ECHO 7 | + | 乙/京科 87-1 | + |
| 11 | + | *呼吸道合胞病毒 | + |
| *甲型肝炎 | - | 流行性出血热病毒 | + |

* 医科院医学生物研究所和四川省人民医院病毒室协助进行。

表3 MK-8611 细胞对病毒的敏感性

| 病毒名称 | 病毒感染滴度 (LgTCID ₅₀ /毫升) | | 滴度差 | t | P |
|-------------------|-----------------------------------|----------|-------|------|-------|
| | MK-8611 细胞 | Hep-2 细胞 | | | |
| ECHO 7 | 2.8 | 2.63 | +0.17 | 0.85 | >0.05 |
| 11 | 3.8 | 2.63 | +1.2 | 5.85 | <0.01 |
| 腺病毒 3 | 2.97 | 2.8 | +0.17 | 0.85 | >0.05 |
| 脊灰病毒 I | 7.8 | 6.63 | +1.17 | 5.85 | <0.01 |
| II | 7.63 | 7.39 | +0.24 | 0.44 | >0.05 |
| III | 7.63 | 7.53 | +0.1 | 0.32 | >0.05 |
| COXB ₂ | 6.97 | 7.3 | -0.33 | 1.04 | >0.05 |
| 麻疹病毒 | 5.63 | 4.97* | +0.66 | 2.09 | <0.05 |

* 用 vero 细胞滴定的病毒滴度

多种肠道、呼吸道和流行性出血热等病毒的感染均敏感(见表2)。用该细胞与 Hep-2 细胞(人喉癌细胞系)同时滴定脊灰 I、II、III 型、腺病毒 3 型、ECHO₇、11 型、COXB₂ 病毒,除个别病毒外,其病毒感染滴度均略高于 Hep-2 细胞;测定麻疹病毒滴度,明显高于 Vero 细胞(见表3)。

8. 异种动物移植实验 用 40 代细胞接种裸鼠 4 只(雌雄各 2 只),在左侧前肢皮下接种细胞悬液 3×10^6 /只,观察 100 天后小鼠均健在,接种部位未生长肿瘤、解剖后各脏器均正常。取接种部位皮下组织作病理切片,未见异

常细胞和肿瘤组织。

9. 微生物污染检查 用马丁、胰酪、猪胃 3 种培养基检查,未发现细菌、支原体等微生物生长。

讨 论

本文报道从恒河猴肾组织成功地建立了一株细胞,定名为 MK-8611 细胞系。本株细胞除在某些生物学特性,如细胞形态、生长条件、速度等方面与 Hull 等报道的 LLC-MK₂ 细胞^[7]基本相似外,尚具有细胞退变缓慢,维持正常形态时间长和对病毒有较广谱的敏感性等

特点。

MK-8611 细胞在建系初期, 采用延长传代时间和 28℃、37℃交替培养的方法。细胞通过延长传代时间, 使一些易于退变、衰老的细胞被淘汰而保留了形态均一、生命力较强的极少数细胞, 再由这些细胞增殖发展成细胞系。这样既提高了细胞群体的纯度, 同时又可筛选出能够在较长时间内不传代而仍保持正常形态的细胞, 克服了很多传代细胞非特异性退化出现快, 维持正常形态时间短的缺点, 有利于各种敏感病毒的分离, 特别对一些增殖缓慢的病毒可提高分离机会。

MK-8611 细胞系对多种病毒具有较高的敏感性。接种脊灰、柯萨奇、ECHO, 麻疹等病毒后, 病变速度快且典型, 接种乙型流感病毒, 24小时后即可观察到细胞病变, 并且有明显的血球吸附现象。接种流行性出血热病毒后, 中途不需要换液, 一般 7—10天即可用免疫荧光或酶联免疫试验检测出病毒抗原。接种轮状病毒 wa 和 SA₁₁ 株后, 在第 3 天即可出现典型病变。对这些病毒的研究和分离培养提供了一株新的敏感细胞。实验表明该细胞系是有较大的应用前景, 为病毒培养及研究提供了一个很好的细胞实验模型。

摘 要

从健康雄性恒河猴肾脏, 经胰酶——EDTA 二钠液消化, 获得的细胞悬液, 采用延长传代时间和 28℃及 37℃交替单层静置培养, 建立一株能稳定传代的细胞系, 命名为 MK-8611 细胞系。该细胞退变缓慢、维持正常形态时间长, 未发现细菌、霉菌、支原体等微生物污染, 对异种动物无致癌性, 经试验对脊灰、麻疹、腺病毒、ECHO、COXB、乙型流感、轮状病毒、呼吸道合胞、流行性出血热等病毒敏感。

参 考 文 献

- [1] Westwood J. C. et. al, 1957, *Brit J. exp. pathol.*, 38(2) P 138—154.
- [2] Hull, R. N. et. al., 1956, *Anat. Rec.*, 124:490.
- [3] 李昌尊等, 1979, 中国医学科学院学报 1: 97.
- [4] [苏] o. r. 安札柏里哲著, 组织培养, 人民卫生出版社, 1965, P 246—252.
- [5] William B. et al., *Methods in Enzymology*, 1979, V 58, P 150.
- [6] 赵天寿等, 1964, 科学通报 (9):817.
- [7] Hull R. N. et al., 1962, *J Exp Med*, Vol, 115 No 5 P 903—917.

角膜内皮和角膜上皮的细胞培养研究*

林 宁

(中山医科大学中山眼科中心眼科研究所)

Dale R Meyer James P. McCulley

(美国德克萨斯大学达拉斯健康科学中心眼科)

近年对角膜病研究的一个重要方面是角膜内皮细胞和角膜上皮细胞的培养, 并在此基础上进行一系列的实验研究。早在 50 年代末 Stocker 等^[1]已进行兔角膜内皮细胞的组织培

养, 1974 年 Perlman 和 Baum^[2]改进了培养方法, 获得具有兔角膜内皮细胞形态学特点的培

* 本实验在美国德克萨斯大学达拉斯健康科学中心眼科完成。