

叙利亚金地鼠肾上皮细胞系的建立 及其生物学特性变化的观察*

周济川 邓海凡 张世敏

(中国科学院武汉病毒研究所)

国外报道的 BHK₂₁ 为叙利亚金地鼠肾成纤维细胞系^[1]。国内报道的 BHK₂₁C₁₃ 亦为成纤维细胞系^[2]。因我们研究的病毒种类繁多,有的病毒对成纤维细胞敏感,有的则对上皮细胞敏感,故建立了叙利亚金地鼠肾上皮细胞系(BHK_p925)。并以一株新的菜白蝶非包涵体病毒和人疱疹病毒进行了敏感性试验。现将结果报道于下。

材料和方法

(一) 培养液 含 0.25% 水解乳蛋白的 199 液 80%, 56°C 灭活 30 分钟的乳牛血清 20%, 内加青霉素和链霉素各 100—200 单位/毫升, 以 3.5% NaHCO₃ 调整 pH 7.4 左右。

(二) 原代细胞培养 取 2—3 周龄叙利亚金地鼠以无菌操作取出肾, 置于盛有汉克斯(Hank's)液平皿中洗去血细胞, 剥去包膜, Hank's 液洗, 剪成约一毫米的小块, 再洗一次, 移至链霉素瓶中, 加入 pH 7.4 的 0.25% 胰蛋白酶(Difco, 1:250) Hank's 液室温消化约 10 分钟, 分散好之细胞集中于离心管, 以 1500 转/分(r. p. m.) 离心 10 分钟, 弃上清, Hank's 液洗一次, 细胞悬浮在培养液中, 约含 5×10^5 细胞/毫升, 每个链霉素瓶分装 1.5 毫升, 置 37°C 培养箱中静置培养。

(三) 传代细胞培养 长成致密单层的原代细胞瓶, 吸出培养液弃去, 每瓶加一毫升 0.125% 胰蛋白酶 Hank's 液, 室温消化约 10 分钟, 分散好之细胞集中离心管, 1000r. p. m. 离心 10 分钟, 弃上清, Hank's 液洗, 以培养液作

成均匀的细胞悬液, 约含 5×10^5 细胞/毫升, 每瓶分装一毫升, 置 37°C 培养箱中静置培养。

(四) BHK_p 925 细胞的冻存与复苏 长成单层的细胞瓶, 以钝头滴管轻微吹打将瓶壁上的细胞洗下, 1000r. p. m. 离心 10 分钟, 弃上清, 细胞悬浮在加有 10% 中性甘油的培养液中, 细胞浓度为 100 万/毫升, 分装安培瓶, 经严密封口后, 置 4°C 冰箱中过夜, 第二天上午取出置液氮贮藏罐口预冷一会后, 浸入液氮中保存。复苏培养时将安培瓶迅速置 37°C 水浴中待完全解冻后, 以无菌操作打开安培瓶, 细胞悬液分装培养瓶, 置 37°C 静置培养, 待细胞贴壁后更换新培养液, 置 37°C 培养箱中继续培养。

(五) 扫描电镜观察细胞表面变化 体外长期培养的细胞系, 其生物学特性改变的标志之一是细胞表面产生突起物或微绒毛(Microvilli)^[3,4]。我们将 BHK_p 925 细胞收集于离心管, 1000r. p. m. 离心去培养液, Hank's 液洗细胞一次, 2.5% 戊二醛固定二小时, 再以 1% 锍酸固定一小时, 不同浓度酒精逐级脱水的细胞样品, 用导电胶粘在直径为一厘米的铜扫描载片中央, 放在 JEE-4B 真空。喷涂中进行旋转喷涂, 首先喷涂厚度为 100—200 Å 的碳, 然后喷涂厚度为 200 Å 左右的金, 再在 JEM-100C 的 ASID 扫描电镜中进行观察拍照。

结 果

(一) 建系经过 我们连续做了五批原

* 本工作曾得到向近敏教授的指导, 彭可村, 邓红同志为本文拍摄染色体照片, 一并致谢。

代金地鼠肾细胞,传至20代左右出现危急,细胞生长不好,细胞间空隙逐步增大,不能形成致密单层,此时将培养液中血清量增至40%进行补救,大部分细胞仍堆积于培养瓶底部,以1%台盼兰染色,立即镜检,证明细胞死亡。仅少数细胞经补救后恢复了活性,能继续传代。以后培养液中血清量又降至20%。在初期传代的细胞培养物中,上皮细胞和成纤维细胞混杂生长(图1—5见封2)。由于两种细胞的生长速率不一致,成纤维细胞生长快,很快压抑了上皮细胞的生长。为了获得纯的上皮细胞,将上皮细胞较多的培养瓶以培养液作10倍连续稀释,然后接种新培养瓶,待长成单层后,又选择上皮细胞多的培养瓶作同样处理,重复数次,培养瓶中基本上是上皮细胞时,在无菌条件下将细胞瓶置于显微镜下以毛细滴管挑出单个上皮细胞,培养细胞克隆(Clone)(图2)。将克隆细胞扩增而获得肾上皮细胞系(BHK_p 925)(图3),迄今已传至128代。

(二) **细胞形态** BHK_p 925 细胞的形态为圆形上皮样细胞,细胞核大小一致。低代数的细胞牢固地贴壁生长,扫描电镜观察证实细胞表面无微绒毛。随着细胞传代数的增加,其贴壁生长的能力逐步减弱,部分细胞形成悬浮生长,后期分开传代,两部分细胞形态一致,均为圆形上皮样细胞。刚分开的贴壁生长的细胞表面无微绒毛,但经过连续传代之后又出现悬浮生长的细胞,此时两部分细胞表面均存在有微绒毛,而贴壁细胞表面的微绒毛少而细,悬浮生长的细胞表面微绒毛多而粗(图4),与Vero细胞表面的微绒毛类似。悬浮细胞传代时易于分散,同时失去依赖密度调节作用,局部细胞呈堆积状生长,即所谓失去接触抑制。贴壁细胞极少呈堆积状生长,失去接触抑制也较弱。

(三) **BHK_p 925 细胞的生长曲线** BHK_p 925 细胞初期传代时,其生长速率比较缓慢,一般需60多天传1代,11代以后其生长速率稍加快,53代至今保持在10天左右传1代。以血清量相同的Eagle、199和RPMI-1640三种培养液培养BHK_p 925细胞时,生长速率无

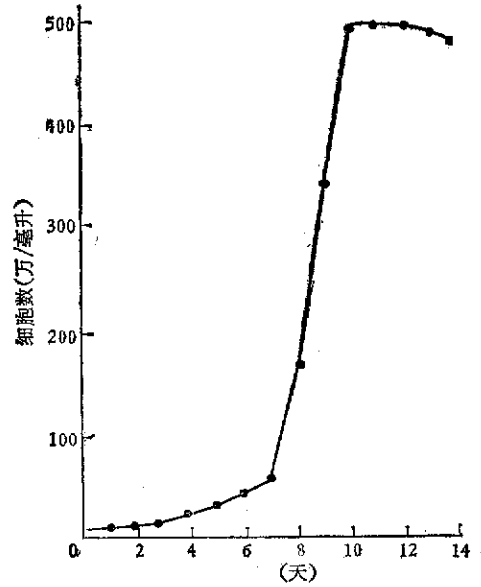


图6 BHK_p 925 细胞(68代)的生长曲线

明显差别。并以接种 1.3×10^5 细胞/毫升,置37°C培养,第二天开始每天进行细胞计数,测定生长曲线(图6)。

(四) **分裂指数** 将对数期的BHK_p 925细胞按常规方法固定,Giemsa染色,计数1000个细胞中分裂相的数目,取五次试验的平均数。结果表明BHK_p 925细胞的分裂指数为81%左右。

(五) **染色体分析结果** 采用Cooper等^[4]报道的方法将对数生长期的BHK_p 925细胞进行染色体分析(结果见表1)。从表1可以看出染色体数目的改变与细胞系的代数呈线性关系。低代数时二倍体($2n = 44$)占80%左右,传至110代时二倍体仅占18%,而多倍体染色

表1 BHK_p 925 细胞系不同代数的各50个中期细胞中染色体数目的变化

细胞代数	二倍体 (个)		三倍体 (个)		四倍体 (个)		五倍体 (个)	
	个	%	个	%	个	%	个	%
27	42	84	8	16				
30	40	80	6	12	4	8		
35	39	78	7	14	4	8		
68	28	56	18	36	4	8		
110	9	18	21	42	15	30	5	10

体占优势,并出现一个双着丝点染色体(有问号者)(图5)。

(六) 琼脂培养 琼脂培养是鉴定传代细胞生物学特性是否改变的一种方法。如有改变细胞则能在营养琼脂中生长,正常细胞则否。将42代和48代细胞接种在含1%琼脂的199培养液中,置37℃静置培养,经多次观察证明BHK_p 925细胞能在营养琼脂中呈零星状生长,未见成片的细胞生长。

(七) BHK_p 925 细胞冻存后的生长情况 冻存半月的BHK_p 925细胞,在37℃进行复苏培养时,其生长速率与未冻存的相应世代的细胞基本一致,均在继续传代。因氮源问题保存工作未能继续。

(八) 温度的影响 在培养BHK_p 925细胞的过程中,有一段时间由于供电紧张,有时本所发电机供电亦不能及时,培养细胞的温度有时在20℃左右,这对体外经连续传代适应的细胞不致引起死亡,但能促使细胞的生物学特性加速改变。

(九) 对病毒的敏感性 在建系的同时以菜白蝶非包涵体病毒和人疱疹病毒感染了BHK_p 925细胞。非包涵体病毒引起网状空洞细胞病变,病变细胞的胞核胀大,类似大蜡螟浓核病毒感染小白鼠L细胞出现的细胞病变特征。将该病毒以同样方法感染BHK₂₁细胞,其病变作用则不如BHK_p 925细胞明显。人疱疹病毒引起典型的融合细胞病变。对照的正常细胞未出现细胞病变作用(结果另报)。以上结果表明BHK_p 925细胞对多种病毒比较敏感。

讨 论

一种病毒只能在敏感的细胞中生长繁殖,复制子代病毒。各种细胞株和细胞系的建立为这一目的提供了有利的条件。虽BHK₂₁对多种病毒具有敏感性,但不可能对种类繁多的病毒都敏感。根据我们的试验证明BHK₂₁对近

期分离到的菜白蝶非包涵体病毒的敏感性则不如BHK_p 925上皮细胞。在斯托克(Stoker)建立BHK₂₁成纤维细胞系的基础上,我们建立了BHK_p 925上皮细胞系,在体外经过连续传代之后,其生物学特性与低代数细胞比较有了明显的改变。低代数的细胞牢固地贴壁生长,二倍体染色体占优势,细胞表面无微绒毛。随着细胞传代数的增多,逐步衍生为多倍体染色体占优势,并出现悬浮生长和贴壁生长两部分细胞。悬浮细胞表面有粗微绒毛,贴壁细胞有细微绒毛,两部分细胞均能在营养琼脂中呈零星状生长。贴壁细胞在继续传代时又不断地出现悬浮生长的细胞,表明随细胞传代数的增加,其生物学特性也在不断地改变,与Stoker报道的BHK₂₁细胞系的生物学特性的改变较一致。许多研究者报道过体外传代培养的细胞株(二倍体细胞),有一定的传代寿命(60代左右),但生物学特性有了改变之后,可在体外无限制地连续传代,即获得细胞系。引起体外传代细胞生物学特性改变的因素甚多,也是十分复杂的问题。根据我们的实践认为,培养细胞的温度如果不稳定,是引起细胞生物学特性改变的重要因素之一。由于我们培养细胞的温度有段时间不够稳定,使其生物学特性在40代左右开始改变。

感染试验证明BHK_p 925细胞对菜白蝶非包涵体病毒要比成纤维细胞敏感,该试验系统的建立对于研究该病毒的各种特性提供了有益的条件。

参 考 文 献

- [1] 大星章一等 1979 人癌细胞培养。科学出版社(中译本), 60—61。
- [2] 张茂金等 1981 细胞生物学杂志, 1: 27—32。
- [3] Aronson, J. F. et al. 1981 *In Vitro* 17: 61—70。
- [4] Cooper, H. L. et al. 1963 *J. of National Cancer Institute* 30: 1015—1025。
- [5] Stoker, M. and MacPherson, I. 1964 *Nature* (London) 203: 1355—1357。