

## 三种水生动物细胞系对两株蛙病毒敏感性的比较

雷存科<sup>1,2</sup>, 陈中元<sup>1,2</sup>, 张奇亚<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 利用3个不同物种的水生动物细胞系, 包括爪蟾肾细胞系(A6)、大鲵胸腺细胞系(GSTC)和鲤上皮瘤细胞系(EPC), 分别用沼泽绿牛蛙蛙病毒(RGV)和大鲵蛙病毒(ADRV)感染, 进一步研究细胞病变显微形态、病毒滴度、细胞病变与不同感染时间的相关性等。结果显示, 在光镜下可见感染病毒的细胞发生病变, A6和EPC细胞肿胀或破裂; GSTC细胞收缩或聚在一起形成多层。同种水产动物细胞系对不同蛙病毒的敏感性不同, 在A6、EPC和GSTC细胞中, RGV的滴度分别为 $10^{3.6}$ 、 $10^{5.9}$ 和 $10^{6.6}$  TCID<sub>50</sub>/mL; ADRV的滴度分别为 $10^{4.3}$ 、 $10^{5.4}$ 和 $10^{6.1}$  TCID<sub>50</sub>/mL, 表明GSTC细胞系对两种蛙病毒都更敏感。研究为后续蛙病毒致病机理提供了有用的信息和重要实验材料。

**关键词:** 沼泽绿牛蛙蛙病毒; 大鲵蛙病毒; 爪蟾肾细胞系; 大鲵胸腺细胞系; 鲤上皮瘤细胞系; 细胞病变

**中图分类号:** S 941.41

**文献标志码:** A

一些两栖类动物, 如沼泽绿牛蛙(*Rana grylio*)和中国大鲵(*Andrias davidianus*), 是优势水产养殖品种, 受到市场和消费者的欢迎。遗憾的是在养殖过程中, 它们经常出现高致死率的病毒病。从患严重系统性出血症的病蛙和病大鲵组织中, 已分离鉴定了不同蛙病毒株, 如沼泽绿牛蛙蛙病毒(*Rana grylio virus*, RGV)和大鲵蛙病毒(*Andriasda davidianus ranavirus*, ADRV)<sup>[1-2]</sup>。它们都是虹彩病毒科(Iridoviridae)蛙病毒属(*Ranavirus*)的成员, 相关基因组信息已被报道(基因注册号分别为JQ654586和KC865735)<sup>[3]</sup>。

水产动物病毒须在活的细胞内复制, 通常有一定的宿主特异性, 但现有证据表明蛙病毒不仅仅只感染蛙<sup>[4]</sup>, 在低等脊椎动物中, 蛙病毒有广泛的宿主范围, 可感染鱼类、两栖类和爬行类。上述RGV和ADRV这2株蛙病毒在鱼类和两栖类细胞中的感染性差异的研究, 将有助于认识蛙病毒与不同水产动物宿主间的相互作用

用, 以及预测蛙病毒病的流行趋势。

鱼类细胞可用于水生动物生理生化、毒理学、遗传发育和免疫学等多方面研究, 也是病毒分离、提纯、鉴定, 研究宿主与病毒病原相互作用的必备工具<sup>[5-6]</sup>。爪蟾肾细胞系(*Xenopus kidney cell*, A6)和大鲵胸腺细胞系(*Chinese giant salamander thymus cell line*, GSTC)分别来源于模式生物非洲爪蟾(*Xenopus*)和养殖的中国大鲵, 它们都是两栖动物细胞系<sup>[7-8]</sup>。鲤上皮瘤细胞系(*Epithelioma papulosum cyprinid*, EPC)则是来源于鲤鱼组织, 是鱼类细胞系<sup>[9]</sup>。为寻找能高效增殖蛙病毒的细胞系, 建立良好和充分的蛙病毒与宿主相互作用系统, 以深入研究水产动物蛙病毒病的致病机理及防控技术, 实验选择A6、GSTC和EPC这3种水生动物细胞系, 分别对RGV和ADRV蛙病毒引起的细胞病变、感染的时序等进行了测试和分析。

收稿日期: 2016-01-20 修回日期: 2016-03-20

资助项目: 国家自然科学基金(31430091)

通信作者: 张奇亚, E-mail: zhangqy@ihb.ac.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与病毒

3种水生动物细胞分别是大鲵胸腺细胞系(GSTC)、爪蟾肾细胞系(A6)和鲤上皮瘤细胞系(EPC)。其中GSTC是本实验室近年新建的细胞系<sup>[8]</sup>; A6为陕西师范大学生命科学学院孙燕教授惠赠; EPC为本实验室长期保存。2株蛙病毒分别是沼泽绿牛蛙蛙病毒(RGV)和大鲵蛙病毒(ADRV),均为本实验室从患严重系统性出血病的沼泽绿牛蛙或养殖大鲵组织中所分离<sup>[1-2]</sup>。

### 1.2 细胞的培养与病毒悬液制备

为降低样品来源不同所带来的误差,实验先进行同种细胞扩增和培养,分别制备RGV和ADRV两株蛙病毒悬液。具体方法:用含有10%的新生牛血清(FBS)(杭州四季青生物工程有限公司)的M199培养基在细胞培养瓶(75 cm<sup>2</sup>)置于25℃恒温培养箱中培养GSTC,共6瓶,培养24 h,待细胞长成致密单层,分为两组各3瓶,一组接种RGV,一组接种ADRV,每瓶接种100 μL病毒原毒,继续置于25℃恒温培养箱培养,待80%细胞出现病变后,将细胞培养瓶置于-20℃冰箱冻存,反复冻融3次后,4000 r/min、4℃离心10 min;收集上清液,用0.22 μm的滤膜过滤,即为病毒悬液。

另外,也按常规方法在细胞瓶中,分别对A6、GSTC和EPC细胞进行培养,但3种细胞所用的培养基有所不同,GSTC和EPC用M199培养基培养,而A6用L15培养基培养。

### 1.3 细胞病变的形态和时序观察

在96孔细胞板中,每4个竖列加同种细胞为一组,依次分为A6、GSTC和EPC,每孔加100 μL消化后的细胞悬液,细胞密度为 $6 \times 10^5$ 个/mL,GSTC、EPC所用培养基为含5% FBS的M199培养基,A6用含5% FBS的L15培养基。将加有不同细胞的细胞板置于25℃恒温培养箱培养1 d,待细胞长成致密单层后接毒。

将RGV和ADRV病毒悬液分别稀释10倍备用。在96孔板的第1~7横排依次每孔加一株病毒的稀释液100 μL。第8横排,在设为A6对照组的细胞孔中,加入100 μL含5% FBS的L15培养基;在设为GSTC和EPC对照组的细胞孔中,加入100 μL

含5% FBS的M199培养基。然后,将加了样的96孔细胞板置于25℃恒温培养箱培养,用倒置显微镜逐日(1~7 d)进行观察,拍照并记录细胞病变情况,方法参见文献[10]。以感染第2天病变的显微图为例,对两株蛙病毒引起细胞的显微形态变化进行描述和比较。重复相同实验,以细胞病变率为纵坐标,以感染病毒后的天数(d)为横坐标,以3次独立实验的平均值,绘制细胞病变率与病毒感染时序曲线图,比较病毒感染在不同时间引起3种细胞的病变情况。

### 1.4 蛙病毒滴度测定及细胞敏感性比较

将RGV和ADRV病毒悬液分别10倍系列稀释( $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ ~ $10^{-7}$ )备用。先准备好新鲜长有单层细胞的96孔板,并分别接种10倍系列稀释的RGV和ADRV病毒液,每孔加100 μL,每横排加一个病毒稀释液,方法同上。从接毒后第2天开始,逐日用倒置显微镜进行观察至第7天,记录细胞的病变情况并终止感染,用甲醛固定2 h,用结晶紫染色15 min,分别测算RGV和ADRV两株蛙病毒在A6、GSTC和EPC细胞中的滴度(TCID<sub>50</sub>)。将两株蛙病毒分别在3种细胞中感染产生的滴度列表进行比较。

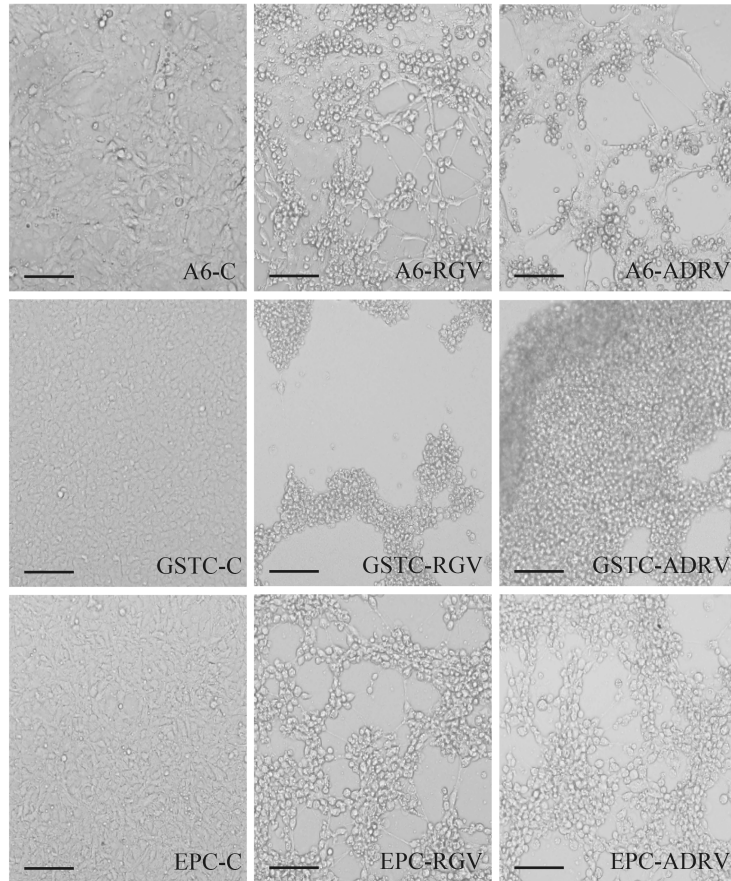
## 2 结果

### 2.1 感染细胞形态的显微变化

以接RGV和ADRV病毒10倍稀释液后第2天观察与记录的结果为例,与未接毒的相应对照细胞相比,3种细胞都出现不同程度的显微病变。A6细胞和EPC细胞肿胀和破裂,但仍有多数细胞保持贴壁状;随感染时间延长,破裂脱落的细胞越来越多,贴壁细胞呈网状或局部为稀疏网状。感染第2天的GSTC细胞出现收缩或产生碎片,细胞聚集或堆积形成多层,或局部出现无贴壁细胞的空洞,随感染时间延长,GSTC细胞快速大量脱落(图版)。在相同条件下,GSTC细胞出现的病变显得更严重。

### 2.2 感染细胞的时序变化

经10倍稀释的RGV接毒后第1天少量细胞出现病变;第2天,细胞病变速率加快。在GSTC细胞中的滴度为 $10^{6.2}$ TCID<sub>50</sub>/mL;而在A6和EPC细胞中滴度分别为 $10^{3.1}$ 和 $10^{4.4}$ TCID<sub>50</sub>/mL。接毒3 d



图版 细胞病变显微图

爪蟾肾细胞系(A6)、大鲵胸腺细胞系(GSTC)和鲤上皮瘤细胞系(EPC)在分别接种2株蛙病毒(RGV和ADRV)后的第2天。C.对照。比例标尺均为20  $\mu\text{m}$

#### Plate Micrograph of cytopathic changes

Chinese giant salamander thymus cell line (GSTC), *Epithelioma papulosum cyprini* cell line (EPC) and *Xenopus* kidney cell line (A6) infected with two ranaviruses (RGV and ADRV) at 2d post-inoculation. C. Control. Scale bar 20  $\mu\text{m}$

后, 细胞病变的速率趋缓, 但GSTC细胞病变量显著高于A6和EPC(图1-a)。

经10倍稀释的ADRV接毒后第1天, 也有少量细胞病变; 第2天, A6和EPC细胞病变速率加快, 但与同期GSTC感染的细胞相比, 病变率仍较低, 在A6和EPC细胞中的滴度分别为 $10^{2.6}$ 和 $10^{3.7}$ TCID<sub>50</sub>/mL, 在GSTC细胞中的滴度为 $10^{4.3}$ TCID<sub>50</sub>/mL。接毒3 d后, 细胞病变速度减缓; 在接毒后第4~7天, 病变速率趋缓, 但GSTC细胞病变量仍高于A6和EPC(图1-b)。

可见, 随感染时间延长, 分别接种了2株病毒的细胞病变程度和速率都有所不同。GSTC无论在感染早期或后期, 其变化速率都显著高于A6和EPC细胞。

### 2.3 蛙病毒在不同细胞中的滴度

分别测定和依据TCID<sub>50</sub>计算出2株蛙病毒在3种细胞中的滴度。结果是RGV在A6、GSTC和EPC细胞中分别为 $10^{3.6}$ 、 $10^{6.7}$ 和 $10^{5.9}$ TCID<sub>50</sub>/mL; ADRV在A6、GSTC和EPC细胞中分别为 $10^{4.3}$ 、 $10^{6.1}$ 和 $10^{5.4}$ TCID<sub>50</sub>/mL(表1)。比较而言, 2株蛙病毒在GSTC细胞中产生的滴度都是最高的。

## 3 讨论

在本研究中, 3种不同的水生动物细胞, 包括鱼类和两栖类细胞均能被2株蛙病毒感染, 并出现清晰和典型的细胞病变。这不仅证实蛙病毒不同株的确都有较广的宿主范围, 也为进一步分析比较蛙病毒与鱼类或两栖类细胞相互作用

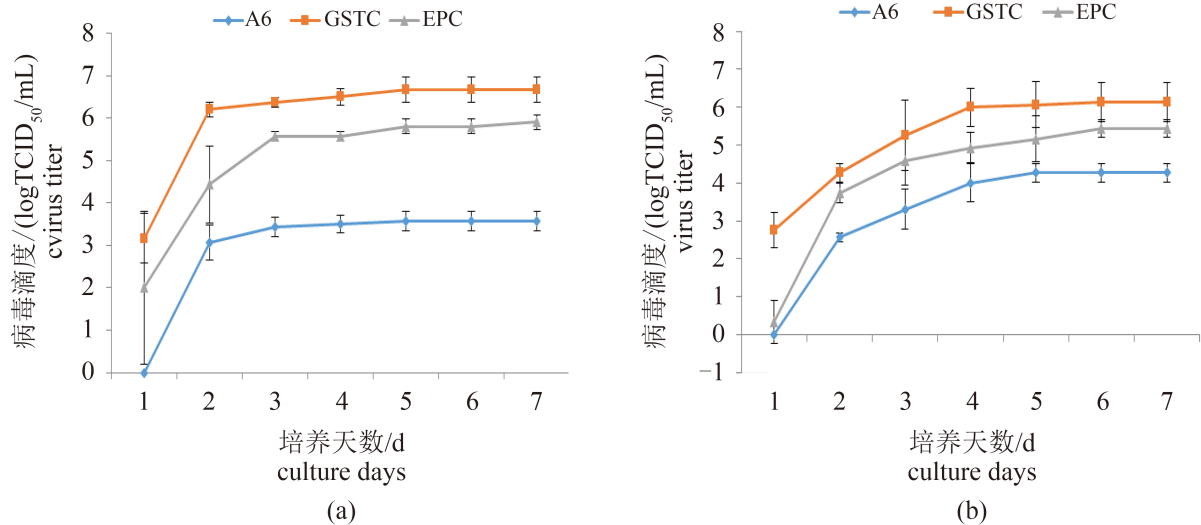


图1 接种RGV (a)或ADRV (b)病毒后的天数(d)与细胞病变率的相关性比较

Fig. 1 The relation between the time (d) of inoculation with RGV (a) or ADRV (b) and cytopathic effect rates

表1 两株蛙病毒在3种细胞中产生的滴度

Tab. 1 The titers of two ranaviruses in

	three cell lines			TCID <sub>50</sub> /mL
	A6	GSTC	EPC	
RGV	10 <sup>3.6</sup>	10 <sup>6.7</sup>	10 <sup>5.9</sup>	
ADRV	10 <sup>4.3</sup>	10 <sup>6.1</sup>	10 <sup>5.4</sup>	

用提供更多信息及研究参照系统。

对3种细胞分别被2株蛙病毒感染的测试结果进行比较, 无论是从细胞的起始病变时间、病变的严重程度、还是收获病毒滴度来看, GSTC对于2株蛙病毒都是最敏感和有利于病毒增殖的细胞系。GSTC来源于大鲵的胸腺组织, 而胸腺(产生T-淋巴细胞的器官)不仅是高等脊椎动物, 也是低等脊椎动物, 包括鱼类、两栖类和爬行类等的中枢免疫器官<sup>[11-13]</sup>, 提示两栖类动物中枢免疫器官胸腺是蛙病毒的靶器官, 且大鲵胸腺组织对蛙病毒有亲和力。蛙病毒之所以有较广的宿主范围<sup>[14]</sup>, 可能与其攻击低等脊椎动物的中枢免疫器官有关, 从而抑制了宿主的免疫应答, 导致蛙病毒扩散流行, 这值得进一步研究。

RGV和ADRV同为蛙病毒属成员, 但它们分别是自然发病的沼泽绿牛蛙和中国大鲵组织中分离到的。2株蛙病毒对同种细胞的致病时间、致病程度及病毒滴度也不相同。经基因组比对分析, 这2株病毒有基因组大片段反向、少量基因插入或缺失, 部分基因序列改变等差

异<sup>[2-3]</sup>, 蛙病毒基因组的遗传变异对不同水产动物物种感染性的影响需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Lei X Y, Ou T, Zhu R L, *et al.* Sequencing and analysis of the complete genome of *Rana grylio* virus (RGV)[J]. Archives of Virology, 2012, 157(8): 1559-1564.
- [2] Chen Z Y, Gui J F, Gao X C, *et al.* Genome architecture changes and major gene variations of *Andrias davidianus* ranavirus (ADRV)[J]. Veterinary Research, 2013, 44(1): 1.
- [3] 张奇亚, 桂建芳. 水产动物的病毒基因组及其病毒与宿主的相互作用[J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(012): 1236-1252.
- [4] Zhang Q Y, Gui J F. Virus genomes and virus-host interactions in aquaculture animals[J]. Science China: Life Sciences, 2015, 58(2): 156-169(in Chinese).
- [5] Chinchar V G, Waltzek T B. Ranaviruses: Not just for frogs[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10: e1003850.
- [6] 桂建芳, 朱作言. 水产动物重要经济性状的分子基础及其遗传改良[J]. 科学通报, 2012, 57(19): 1719-1729.
- [7] Gui J F, Zhu Z Y. Molecular basis and genetic improvement of economically important traits in aquaculture animals[J]. Chinese Science Bulletin, 2012, 57(19): 1719-1729(in Chinese).
- [8] 张奇亚, 桂建芳. 水生病毒及病毒病图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 1-479.

Zhang Q Y, Gui J F. Atlas of Aquatic Viruses and Viral

- Diseases[M]. Beijing: Science Press, 2012: 1-479(in Chinese).
- [7] Balls M, Simnett J D, Arthur E. Organ cultures of normal and neoplastic amphibian tissues[M]//Biology of Amphibian Tumors. Berlin Heidelberg: Springer, 1969: 385-398.
- [8] Yuan J D, Chen Z Y, Huang X, *et al.* Establishment of three cell lines from Chinese giant salamander and their sensitivities to the wild-type and recombinant ranavirus[J]. *Veterinary Research*, 2015, 46(1): 8.
- [9] Fijan N, Sulimanović D, Bearzotti M, *et al.* Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*[J]. *Annales de l'Institut Pasteur/Virologie*, 1983, 134(2): 207-220.
- [10] Gao X C, Chen Z Y, Yuan J D, *et al.* Morphological changes in amphibian and fish cell lines infected with *Andrias davidianus* Ranavirus[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2015, 152(2-3): 110-113.
- [11] Volpe E P, Turpen J B. Thymus: Central role in the immune system of the frog[J]. *Science*, 1975, 190(4219): 1101-1103.
- [12] Bajoghli B, Guo P, Aghaallaei N, *et al.* A thymus candidate in lampreys[J]. *Nature*, 2011, 470(7332): 90-94.
- [13] Nunes-Alves C, Nobrega C, Behar S M, *et al.* Tolerance has its limits: How the thymus copes with infection[J]. *Trends in Immunology*, 2013, 34(10): 502-510.
- [14] Grayfer L, Edholm E S, De Jesús Andino F, *et al.* Ranavirus host immunity and immune evasion[M]//Gray M J, Chinchar V G. *Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates*. Springer International Publishing, 2015, 141-170.

## Comparative susceptibility of three aquatic animal cell lines to two ranaviruses

LEI Cunke<sup>1,2</sup>, CHEN Zhongyuan<sup>1,2</sup>, ZHANG Qiya<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,

Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Ranaviruses not only infect frogs but can also infect many other aquaculture animals, such as fish, amphibians and reptiles. Here, three aquatic animal cell lines, including Chinese giant salamander thymus cell line (GSTC), *Epithelioma papulosum cyprini* cell line (EPC) and *Xenopus* kidney cell line (A6), were infected with two ranavirus strains, *Rana grylio* virus (RGV) and *Andriasda davidianus* ranavirus (ADRV), respectively. After the ranavirus infection, the morphological changes in these three cell lines were observed by light microscope. The pathological changes and virus titer were recorded and compared at different time post infection. Microscopic observation showed that A6 cells and EPC cells swelled and ruptured. GSTC cells shrank and gathered together to multilayer. The virus titers of two ranaviruses varied significantly in different cells lines. For RGV,  $10^{3.6}$ ,  $10^{5.9}$  and  $10^{6.6}$  TCID<sub>50</sub>/mL in A6, EPC and GSTC cells respectively. For ADRV,  $10^{4.3}$ ,  $10^{5.4}$  and  $10^{6.1}$  TCID<sub>50</sub>/mL in A6, EPC and GSTC cells, respectively. These results showed that the susceptibilities of the same aquatic animal cell lines to different ranaviruses were different. This suggested that GSTC is the most sensitive cell line to the ranaviruses. This study provides valuable information and materials for the further study of the pathogenesis of ranaviruses.

**Key words:** *Rana grylio* virus (RGV); *Andriasda davidianus* ranavirus (ADRV); *Xenopus* kidney cell line (A6); Chinese giant salamander thymus cell line (GSTC); *Epithelioma papulosum cyprinid* cell line (EPC); cytopathic change

**Corresponding author:** ZHANG Qiya. E-mail: Zhangqya@ihb.ac.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31430091)