

草鱼尾鳍组织二倍体细胞系GCCF-2的建立及其部分生物学特性分析*

魏彦章 陆仁后 白国栋

(中国科学院水生生物研究所)

提要 本文从草鱼尾鳍组织建立了一个二倍体细胞系GCCF-2。该细胞系用TC-199培养液加15%小牛血清培养。细胞生长旺盛,最高分裂指数达30.04%。现已在体外培养近32个月。细胞在28°C生长良好。染色体检查表明,GCCF-2为二倍体细胞系。初步估计其细胞周期为21—33小时。GCCF-2对草鱼呼肠弧病毒(GCRV)敏感,并在细胞中发现病毒颗粒。

主题词 尾鳍,二倍体细胞系,染色体

建立鱼类细胞系对鱼类的细胞遗传学、细胞工程学、鱼类病毒学及鱼类细胞毒理遗传学等学科的工作具有重大意义。目前已从各种鱼类建立了大量细胞系^[1,2]。仅国内近几年从草鱼建立的细胞系(株)就有张念慈等(1981)^[3]的草鱼吻端组织细胞株ZC-7901及一个亚株ZC-7901S₁;陆仁后等(1982)^[4]的草鱼尾鳍组织四倍体细胞株及左文功等(1986)^[5]的草鱼肾组织细胞系CIK。作者从1983年9月开始草鱼尾鳍组织的初代培养,目前已在体外培养了32个月,到1985年1月已传代100次,确立为建立的细胞系(established cell line),定名为GCCF-2。现在该系细胞仍在本实验室培养,生长稳定。本文即报道这项工作。

材料和方 法

1. 初代培养和传代培养 初代培养采用江藤久美(1978)^[11]的组织块培养法。自本所养殖场取当年健康草鱼鱼种一尾,在0.15% NaCl和0.15% NaHCO₃混合液中浸泡3小时,用75%酒精擦洗体表,无菌剪下尾鳍,剪成一立方毫米左右的小块。用消化液(0.25%胰蛋白酶加0.02% EDTA)在室温中消化10分钟。然后将组织块接种培养瓶,用TC-199培养液(Difco, USA)加20%小牛血清(内含100国际单位/毫升青霉素和100微克/毫升链霉素)在28°C进行培养。待从组织块周围游离出来的细胞长满整个瓶底时,即行传代培养。方法是轻轻摇动培养瓶,将较大的组织块连同旧培养液一起除去。加入上述消化液,将细胞及较小的组织块消化下来,制成悬液,接种培养瓶,一瓶传两瓶,继续培养。培养20代之前,培养液中小牛血清含量为20%,20代之后,小牛血清含量降至15%。

2. 细胞形态观察 用相差显微镜直接观察活体细胞,并随时拍照。另一种方法是,

* 王迎喜同志协助病毒测定,表示感谢。

将细胞培养在小盖片($20 \times 5 \text{ mm}^2$)上,长满后取出小盖片,用 PBS 洗涤两次。甲醇:冰醋酸(3:1)固定液固定两次,每次不少于 15 分钟。空气干燥后 Giemsa 染色,显微镜下即可观察。也可在培养瓶上直接固定染色。

3. 细胞生长速度 采用大星章一等(1979)^[10]的方法,选择生长良好的细胞,制成 1×10^5 细胞/毫升的悬液,接种于青霉素小瓶。每瓶一毫升,共计 21 瓶。接种后每隔 24 小时任取 3 瓶,将细胞消化下来,制成均匀悬液后记数。取 3 瓶的平均数为当日细胞数。绘制生长曲线。

4. 有丝分裂指数 选择生长良好的单层细胞,制成 1×10^5 细胞/毫升的悬液,接种于装有小盖片的小瓶内,共计 21 瓶,每瓶一毫升。每隔 24 小时任取 3 瓶,从中取出小盖片,按观察细胞形态的方法固定染色。每片记数 1000 个细胞中的分裂相数。以 3 瓶的平均值为当日分裂指数,以“%”表示,并绘制有丝分裂指数曲线。

5. 染色体数目 将细胞在 28°C 培养 48 小时,在终止培养前 2 小时加入最终浓度为 0.05—0.1 微克/毫升的秋水仙素溶液。收获细胞,用 0.075 M KCl 溶液低渗处理 7—20 分钟,甲醇:冰醋酸(3:1)固定液预固定后重复固定两次。然后滴片,空气干燥, Giemsa 染色。油镜下记数染色体数目,选择分散良好的中期分裂相拍照。

6. 有丝分裂周期 将细胞在含有 10—15 微克/毫升 BrdU (5-溴脱氧尿嘧啶核苷)培养液中分别暗培养 48 小时和 72 小时。按前述方法制成染色体标本。按李康等(1983)^[4]的硫堇-紫外光-Giemsa 法分化染色。油镜下分别统计一、二、三次 DNA 复制细胞所占比例,进行有丝分裂周期的估算。

7. 细胞的常温保存 选择生长良好的细胞若干瓶,分别放在 28°C 和 20°C 培养箱中培养,中间不更换培养液。定期检查细胞是否脱落及传代后的生长情况。

8. GCRV 敏感性 将正常生长的细胞 28°C 培养 24 小时,使细胞基本形成单层。接种 GCRV。病毒原液用含 5% 小牛血清的 Eagle 培养液稀释成 10^{-3} — 10^{-8} , 共 6 组,每组接种 3 瓶,并做对照。在 28°C 吸附一小时,倾去病毒液,用培养液洗涤两次,加维持液(5% 小牛血清的 Eagle 培养液) 28°C 培养,观察结果。 10^{-3} 组在第 3 天出现敏感效应(CPE)时,取两瓶及一瓶对照固定染色。其余细胞继续培养。到第 7 天将发生严重病变的细胞取出收集,用戊二醛固定 2 小时,然后交电镜室进行包埋处理,切片,电镜观察,拍照。

结 果

1. 建系 接种组织块后 5 小时,即有细胞游离出组织块。培养至第 6 天,已有许多细胞分裂生长。到第 16 天,细胞已基本长满整个瓶底。传代后细胞生长正常。经过十几次的传代培养,细胞逐渐稳定生长。一瓶传四瓶,4—5 天可传代一次。第 20 代以后培养液中小牛血清浓度的下降对细胞基本无影响。作者未对该系细胞的温度适应性做严格的比较实验。但从多次培养的结果来看,细胞在 28°C 生长良好。在 20 — 35°C 之间也可生长。

2. 细胞形态 多次观察结果表明, GCCF-2 为上皮样细胞、成纤维样细胞及中间型

细胞的混合细胞系。(图 1)。绝大多数细胞为单核,二核和多核细胞很少。

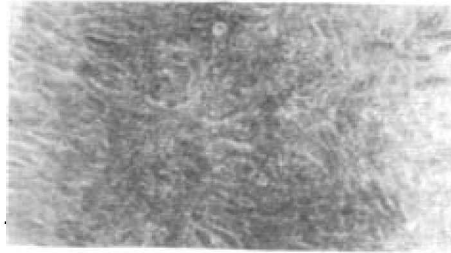


图 1 GCCF-2 细胞(相差照片)

Fig. 1 Normal cells of GCCF-2 (photograph of phase contrast)

3. 细胞生长速度 培养第一天细胞数即有所增加。第 5 天达最高峰,为 5.1×10^5 细胞/毫升。根据计算细胞倍增时间公式: 倍增时间 = $T \log 2 \div \log N_t/N_0$ (T 是培养时间; N_0 是开始培养时细胞浓度; N_t 是培养终止时细胞浓度),GCCF-2 细胞 1—5 天的倍增时间为 51.05 小时(图 2)。

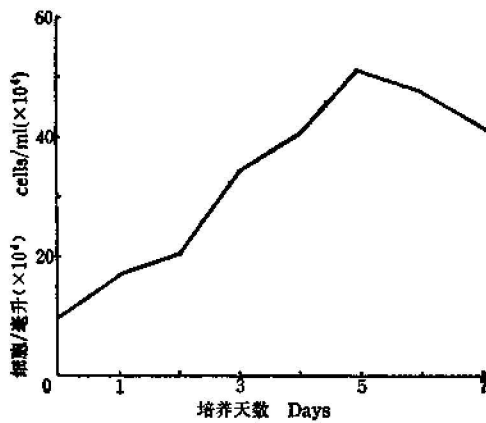


图 2 GCCF-2 生长曲线

Fig. 2 The growing curve of GCCF-2

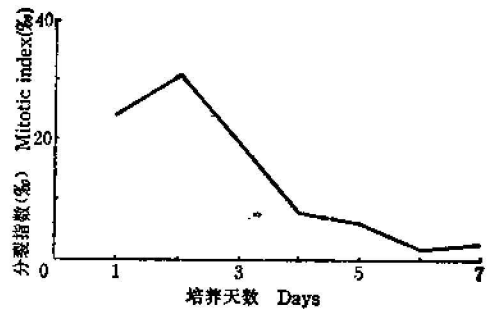


图 3 GCCF-2 分裂指数曲线

Fig. 3 The mitotic index curve of GCCF-2

4. 分裂指数 在显微镜下观察染色后的小盖片,可以看到许多处于分裂期的细胞。统计结果表明,培养 48 小时, GCCF-2 细胞有丝分裂指数最高,为 30.04%。第 6 天细胞已长满盖片,此时其分裂指数为 1.92%。分裂指数曲线见图 3。

5. 染色体数目 在培养过程中,分别对第 10、20、40、63、76 和 90 代细胞做了染色体数目分析。(表 1)。其中染色体数 $2n=48$ 的细胞分别占 81.8%, 83.2%, 77.1%, 73.6%, 78.7% 和 86.7%。(图 4,5)。

6. 有丝分裂周期 用姐妹染色单体分化(SCD)染色法测得, GCCF-2 细胞培养 48 小时,其进入第二次有丝分裂期的细胞占 27.3%;培养 72 小时,其进入第二次有丝分裂周期的细胞占 59.2%(表 2)。根据 Crossen 等 (1977)^[12]的看法并参考刘瑞清等 (1983)^[13]和张锡然等 (1984)^[6]的资料,初步估计, GCCF-2 细胞的有丝分裂周期为 21—33 小时。

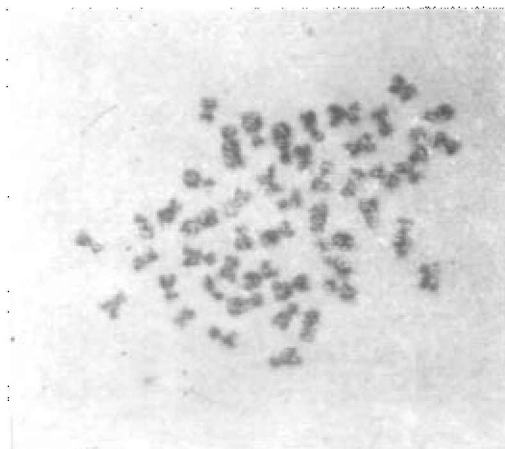


图4 第10代 GCCF-2 染色体

Fig. 4 The chromosomes of
GCCF-2 at the 10th passage

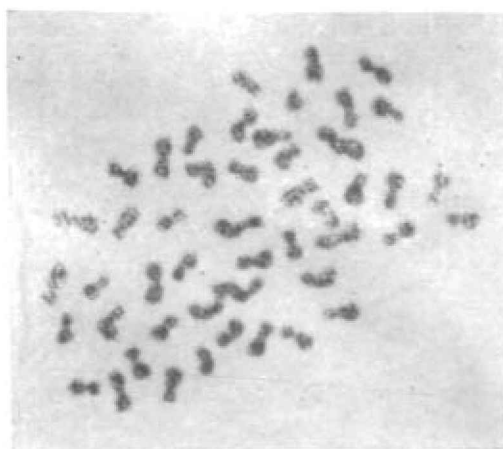


图5 第76代 GCCF-2 染色体

Fig. 5 The chromosomes of GCCF-2
at the 76th passage

表1 GCCF-2 细胞染色体分布

Table 1 The chromosome distribution of GCCF-2 cells

分裂相2)	染色体1)	染色体数																	2n%						
		31	35	36	38	39	40	42	43	44	45	46	47	48	49	50	52	70		77	86	92	94	95	96
10		1				1			4	1	1	3	4	81						1				2	81.8
20		1	1										4	2	79	1	1					1	1	4	83.2
40									2	1	1	4	5	54	2		1							77.1	
63					1		3	1	1	4	2	2	1	64	1	1	1	2		1				73.6	
76						1					2		7	4	74		1			1				78.7	
90									1	1	1	1	3	3	92	1								86.8	

1) No. of chromosomes. 2) No. of metaphases. 3) No. of passages.

表2 GCCF-2 细胞周期

Table 2 The cell cycle of GCCF-2

时间 (小时) Time (hr.)	细胞总数 No. of total cells	M1		M2		M3		M4	
		细胞数 No. of cells	%	细胞数 No. of cells	%	细胞数 No. of cells	%	细胞数 No. of cells	%
48	194	139	71.6	53	27.3	2	1	0	0
72	125	25	20	74	59.2	25	20	1	0.8

7. 细胞的常温保存 GCCF-2 细胞在 28°C 和 20°C 条件下保存一个月, 细胞经传代后生长正常, 染色体数目也在正常范围之内。在 28°C 存放二个月, 大部分细胞脱落, 但剩下的少量贴壁细胞经传代后仍可正常生长。在 20°C, 细胞存放二个月经传代后生长基本正常。(表 3)。作者还发现, 生长在较粗糙瓶壁上的细胞在同等条件下可保存得更久一

些。

表 3 GCCF-2 细胞在 28°C 和 20°C 条件下的保存情况
Table 3 The storage of GCCF-2 cells at 20 and 28°C

时间(月) Time (M.)	温度 Temperature (°C)	细胞瓶数 No. of cell flasks	细胞 cell	染色体数 No. of chromosomes
1	28	3	正常 Normal	正常 Normal
	20	3	正常 Normal	正常 Normal
2	28	3	约半数细胞脱落, 剩余的 细胞仍可生长 ¹⁾	-
	20	3	正常 Normal	-
4	28	3	完全脱落 Peeled off completely	-
	20	3	基本脱落 Peeled off basically	-
6	20	6	完全脱落 Peeled off completely	-

*-: 表示未做染色体检查

shows that no observation of chromosome was made.

1) About half of the cells was peeled off, but the remnant can grow.

8. GCRV 敏感性 用 GCRV 感染 GCCF-2 细胞, 10^{-8} 组第 3 天出现 CPE。与对照细胞相比, 其细胞变形, 颗粒增多, 并逐步变成网状(图 6)。从电镜照片上看, 在细胞质中能看到病毒颗粒(图 7), 但未做严格的病毒滴度测定。 10^{-8} 组到第 7 天也出现了 CPE。

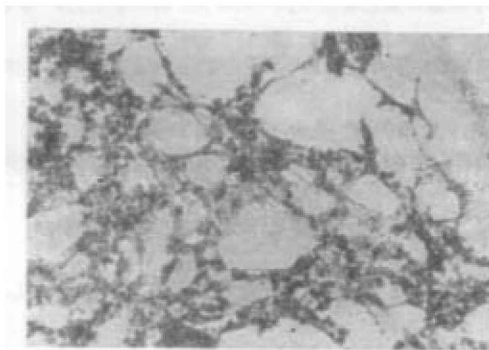


图 6 GCRV 感染的 GCCF-2 细胞

Fig. 6 The cells of GCCF-2 infected by GCRV



图 7 细胞质中的 GCRV 颗粒

Fig. 7 The particles of GCRV in cytoplasm

讨 论

经过近 32 个月的传代培养, GCCF-2 细胞已完全适应了体外培养环境,能进行稳定生长。大部分已建立的鱼类细胞系在正常条件下接种后一天,细胞数均有所下降,如 ZC-7901^[7] 和 GCC(4)^[8]等。但 GCCF-2 细胞和 CIK^[1]细胞一样,接种后一天细胞数即有所增加,说明 GCCF-2 是生长较旺盛的细胞系。GCCF-2 细胞培养到第 6 天,已形成单层,分裂指数仅为 1.92%,说明 GCCF-2 细胞接触抑制明显。另外, GCCF-2 细胞对小牛血清的大幅度变化表现敏感。从以上结果可以看出, GCCF-2 为一未转化细胞系。

受到左文功等^[1]实验结果的启发,作者对 GCCF-2 细胞也进行了常温保存试验。由结果可知,生长良好的细胞在 20°C 条件下,放置 2 个月而基本不受影响。这一点在细胞的短期保存及运输方面具有一定意义。

据报道^[3,9],草鱼染色体数 $2n=48$ 。GCCF-2 细胞各代染色体 $2n=48$ 的细胞所占比例基本符合 Priest^[10]的二倍体细胞系($2n$ 细胞 $\geq 75\%$)的标准。此外,从染色体数目分布来看,亚二倍体细胞明显地多于超二倍体细胞(75:32)。有人认为这一现象的出现可能是在制备染色体标本时染色体丢失的缘故^[9]。如果真是如此, $2n=48$ 的细胞所占比例会更高一些。因此,可以肯定, GCCF-2 为二倍体细胞系。

Crossen 等(1977)^[12]首次利用 SCD 法分析了人淋巴细胞的有丝分裂周期。此后,刘瑞清等(1983)^[8]和张锡然等(1984)^[9]也用这种方法分析了体外培养细胞的有丝分裂周期。但迄今还没有一个标准的计算公式或经验公式,所得结果变化较大,只能供参考。

在已建立的鱼类细胞系中,绝大部分都对某种病毒敏感^[14]。GCCF-2 对 GCRV 有敏感性,并在细胞中发现病毒颗粒,说明 GCRV 能在 GCCF-2 细胞中生长繁殖。这一点对 GCRV 的进一步研究是很有价值的。

参 考 文 献

- [1] 左文功等,1986.草鱼肾组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性.水产学报, 10(1):11—17.
- [2] 刘凌云,1980.草鱼染色体组型的研究.动物学报, 26(2):126—131.
- [3] 刘瑞清、刘爱华, 1983.赤麂成纤维细胞的细胞动力学和姐妹染色单体交换率的研究.动物学研究, 4(4): 309—314.
- [4] 李康等,1983.用改良的姐妹染色单体分化染色法对白鲢肾细胞增殖动力学和化学药品诱发姐妹染色单体交换频率的初步研究.细胞生物学杂志, 3:26—30.
- [5] 陆仁后等,1982.四倍化草鱼细胞株的获得和核移植实验的初步探讨.遗传学报, 9(5):331—338.
- [6] 昆明医学院生物研究所防室代用品组,1974.人二倍体细胞株(KMB-B)的建立及其生物学特性的初步观察.遗传学报, 1(2):147—156.
- [7] 张念慈、杨广智,1981.草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901 S₁ 的建立.实验生物学报, 14(1):101—109.
- [8] 张锡然等,1984.毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*)肺细胞株的建立及其生物学特性的研究.动物学研究, 5(1):71—76.
- [9] 替瑞光,宋峥,1979.草鱼、团头鲂染色体组型的分析比较.遗传学报, 6(2):205—209.
- [10] 大星章一,菅野晴夫著(吴政安等译),1979.人癌细胞培养, 63—64.科学出版社.
- [11] 江藤久美,1978.鱼类的细胞培养.遗传, 32(7):64—71.

- [12] Crossen P. E. and W. F. Morgan, 1977. Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.* **104**(2): 453-457.
- [13] Priest J. H., 1977. *Medical Cytogenetics and Cell Culture*, 2nd ed. pp. 289. Lea and Febiger, Philadelphia, Kenry Kimpton, London.
- [14] Wolf K. and J. A. Mann, 1980. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: A current listing for fishes. *In Vitro*. **18**(2): 168-179.

ESTABLISHMENT OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) CAUDAL FIN DIPLOID CELL LINE GCCF-2 AND ANALYSIS OF SOME OF ITS BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Wei Yanzhang, Lu Renhou and Bai Guodong

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica*)

ABSTRACT A diploid fish cell line, named GCCF-2, from grass carp caudal fin was established. The line was cultivated in TC-199 medium with 15% fetal calf serum containing a moderate amount of antibiotics. The morphology of GCCF-2 cells is a complex of epithelial-like cells, fibroblastic-like cells and the medial type cells. The cells can increase five times in five days and the highest mitotic index of GCCF-2 is 30.04% in two days after plating. An interesting discovery was observed that the cells which had been kept in the incubator at 20°C for two months without any care could grow normally after subculture. At the 90th passage, the cells which had a normal number of chromosomes of grass carp ($2n=48$) accounted for 86.7%, so the line was determined as a diploid fish cell line. So far, the line has been maintained in proliferating for over 32 months. Using the technique of BrdU-labeling and sister chromatid differential staining, we estimate the cell cycle time of mitotic division of GCCF-2 is between 21-33 hours. GCCF-2 was observed to be susceptible infection with grass carp reovirus (GCRV).

KEY WORDS caudal fin, diploid cell line, chromosome