

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)性腺细胞系(GCO)特性和对鲤春病毒的敏感性*

王津津 刘莹 于力 贾鹏 陈兵
史秀杰 郑晓聪 兰文升 何俊强 刘荭^①

(深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心 深圳 518045)

摘要 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)性腺细胞系(GCO)是中国科学院水生生物研究所在 20 世纪 70 年代开展草鱼出血病研究时建立的一株细胞系,迄今已传至 300 多代,在中国鱼类病毒学研究领域发挥了重要作用。本研究采用形态学观察、细胞生长曲线测定、细胞周期测定、细胞核型分析、细胞凋亡检测、电镜观察等方法,对 GCO 的生长特性及鲤春病毒血症病毒(SVCV)在该细胞中的增殖特性等进行了研究。结果显示,GCO 细胞的最适生长温度为 25℃,在 M199 和 MEM 等细胞培养液中均能较好地生长,培养液中最适的胎牛血清浓度为 10%。测定了 GCO 细胞系对 SVCV 病毒的敏感性,发现与鲤(*Cyprinus carpio*)上皮瘤细胞系(EPC)、肥头鲤(*Pimephales promelas*)细胞系(FHM)、大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)胚胎细胞系(CHSE-214)等世界动物卫生组织(OIE)推荐和各检测实验室常用的鱼类细胞系相比,GCO 细胞系对 SVCV 表现出非常高的敏感性。生长曲线、电镜观察和凋亡实验显示,SVCV 能引起 GCO 细胞系出现明显而稳定的细胞病变,引起 GCO 细胞系出现凋亡,并在细胞质中大量增殖。结果表明,GCO 细胞系适用于 SVCV 病毒的分离、检测以及病毒致病性的有关研究。GCO 细胞的适宜生长温度为 15–28℃,这一特点将使它可以广泛地用于多种水生动物病毒的分离。

关键词 草鱼性腺细胞系;生物学特性;易感性;鲤春病毒血症病毒

中图分类号 S852.23 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2016)06-0056-06

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是中国重要的草食性淡水养殖鱼类,已经有 1700 多年的养殖历史,经过几十年的人工养殖,目前,草鱼的产量在世界淡水养殖鱼类中排名第一(沈玉帮等,2011)。

20 世纪 50 年代以后,在中国草鱼养殖中暴发了一种严重的传染性疾病——草鱼出血病(Hemorrhage disease of grass carp),引起草鱼大量死亡。在对该病原学、流行病学和防控技术进行的过程中,研究人员建立了多株草鱼细胞系,如草鱼吻端细胞系、草鱼肾细胞系和草鱼性腺细胞系(GCO)(张念慈等,

1981;左文功等,1986;陈燕桑,1978)等。其中,陈燕桑(1978)建立的 GCO 细胞系已稳定传至 300 多代,在淡水鱼类病毒,如草鱼出血病病毒、胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)弹状病毒、淋巴囊肿病毒等(陈立祥等,1998;张奇亚,2002)的研究中发挥了重要作用。

在检测和诊断工作中,研究人员发现 GCO 细胞系对鲤春病毒血症病毒(SVCV)表现出非常稳定的敏感性,并在 SVCV 检测的国家标准和行业标准中使用,但一直未对 GCO 细胞系的特性及其对 SVCV 的敏感性进行系统的研究和比较。本研究对 GCO 的生长特

* 国家质检总局科技计划项目(2014IK236)、国家质检总局公益性行业科研专项(201210055;20120214)和深圳检验检疫局科技计划项目(SZ2014202)共同资助。王津津, E-mail: w5213012@163.com

^① 通讯作者:刘荭,研究员, E-mail: liuhong@szciq.gov.cn

收稿日期:2015-11-19,收修改稿日期:2016-03-30

性、SVCV 在该细胞中的增殖特性等进行了研究, 以期 GCO 细胞系的使用、维护和应用提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞、试剂和仪器

1.1.1 细胞系 本研究使用的 4 种鱼类细胞系: GCO 细胞系、鲤(*Cyprinus carpio*)上皮瘤细胞系(EPC)、肥头鲤(*Pimephales promelas*)细胞系(FHM)、大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)胚胎细胞系(CHSE-214), 均为中国科学院水生生物研究所赠。

1.1.2 病毒 SVCV 10/3 株为英国环境、渔业及水产科学研究中心(The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, CEFAS)实验室赠送; 使用前测定病毒滴度, 并将病毒悬液稀释至 10^3 TCID₅₀/50 μ l 待用。

1.1.3 试剂 CELL LAB ApoScreen™ Annexin V-FITC Apoptosis Kit 及 DNA Prep Reagent kit 购自美国 Beckman 公司。细胞培养液均购自 GIBCO (美国), 戊二醛、秋水仙素、卡诺固定液、四氧化锇、树脂包被购自美国 Sigma 公司。

1.2 GCO 细胞系生物学特性

1.2.1 GCO 细胞生长特性分析 将初始浓度为 10^4 cell/ml 的 GCO 细胞悬液加入到 6 个 12 孔板中, 分别置于 15℃、20℃、25℃、30℃ 的培养箱中培养。在培养至第 1、2、3、4、5、6、7 天时, 每个温度培养的细胞分别取 3 孔进行消化, 测定细胞数量, 绘制细胞生长曲线。

1.2.2 GCO 细胞周期分析 对第 345 代 GCO 细胞系进行细胞周期研究。将细胞转至 6 孔板后, 约 35 h 后细胞处于指数生长期, 形成 70%–80% 的汇合层。用胰蛋白酶消化法收集细胞, 做成单细胞悬液, 室温下 1000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀, 用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次, 1000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀。先用 20–50 μ l/ml 的杜氏磷酸盐缓冲液(D-PBS)将细胞沉淀充分打散成单个细胞, 用 4℃ 预冷的 70% 冰乙醇 1 ml 重悬, 4℃ 过夜。采用流式细胞仪(Cytomics FC 500 Beckman Coulter)进行细胞周期检测。

1.2.3 GCO 细胞核型分析 采用 Ye 等(2006)的方法制备第 345 代 GCO 细胞染色体, 进行核型分析。待细胞贴壁稳定生长 36 h 后, 在培养基中加入 0.8 μ g/ml 秋水仙素, 孵育 4 h。吸去培养基, PBS 清洗, 用胰蛋白酶消化, 收集细胞, 1500 r/min 离心 5 min。去上清液, 加入 5 ml 0.075 mol/L 的 KCl, 低渗 25 min。缓慢加入 1 ml 新配的预冷卡诺固定液, 固定 15 min。1500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 重复此步骤 3 次。

冷滴片法滴片(Freshney, 2010), 待载玻片干燥后, 用 5% 吉姆萨染液染色 25 min, 干燥镜检, 随机统计 100 个细胞分裂相的染色体数目(Levan *et al*, 1964)。

1.2.4 GCO 细胞系对 SVCV 的敏感性分析

1.2.4.1 病毒生长曲线 准备足够的 GCO 细胞, 用胰蛋白酶消化后, 加入新鲜的细胞培养液。测定细胞浓度, 稀释至 10^5 cell/ml。在 9 个 12.5 cm² 的细胞瓶中, 接入 3 ml GCO 细胞悬液。24 h 后接种 300 μ l 滴度为 10^3 TCID₅₀/50 μ l 的 SVCV 悬液, 置于 20℃ 下培养。每隔 24 h, 取 3 瓶, 反复冻融 3 次, 用细胞培养液进行 10 倍系列稀释, 待用。在 96 孔板中, 接种新鲜的 GCO 细胞, 测定每瓶细胞中 SVCV 的滴度。根据 Yan 等(2011)的方法, 绘制 20℃ 时 SVCV 在 GCO 细胞中的生长曲线。

1.2.4.2 GCO 细胞系和其他常用鱼类细胞系对 SVCV 易感性的比较 SVCV 在不同细胞内滴度测定: 在 4 个 25 cm² 的细胞瓶中, 分别准备 GCO、EPC、FHM 和 CHSE-214 细胞系。在各细胞系最适培养温度下培养 24 h 后, 接种 500 μ l 滴度为 10^3 TCID₅₀/50 μ l 的 SVCV 悬液, 置于 20℃ 培养, 每天观察是否出现细胞病变效应(CPE)。待 CPE 完全后, 反复冻融 3 次。准备新鲜的 EPC 细胞用于病毒滴度的测定。

SVCV 诱导不同细胞凋亡情况分析: 根据 Riccardi 等(2006)的方法, 分别将 GCO、CHSE-214、EPC 和 FHM 细胞转至 6 孔板中。24 h 后, 每孔接种 100 μ l 滴度为 10^3 TCID₅₀/50 μ l 的 SVCV 悬液, 并设置空白对照, 置于 20℃ 培养箱中培养 48 h。用胰蛋白酶消化细胞, 制成细胞悬液, 用冰 PBS 洗涤细胞 2 次, 弃上清液。用试剂盒中的 1 \times 结合缓冲液重悬细胞, 细胞浓度达到 1×10^6 – 1×10^7 cell/ml。每个实验管中加入 10 μ l Annexin V-FIT, 轻柔涡旋震荡, 避光冰置 15 min, 然后加入 380 μ l 冰冷的 1 \times 结合缓冲液, 再加入 10 μ l 碘化丙啶(PI), 用于之后仪器分析。

1.2.4.3 电镜观察 SVCV 感染 GCO 细胞 用 SVCV 病毒感染单层 GCO 细胞, 在 CPE 出现明显时, 收集细胞。1500 r/min 离心 10 min, 用 PBS 洗涤 2 次后, 用含 2.5% 戊二醛的 PBS (0.1 mol/L, pH 为 7.2) 固定过夜。再用 PBS 洗涤细胞, 用 1% 四氧化锇固定 90 min 后, 最后用 PBS 洗涤 2 次。用梯度浓度的乙醇脱水, 树脂包被, 超微切片(Reichert-Jung)超薄切片, 用透射电镜(JEOL JEM-1000CX II, 日本)观察(100 kV)。

2 结果与分析

2.1 GCO 细胞系特性

2.1.1 生长特性 GCO 细胞系是从草鱼性腺组织

分离建立的连续细胞系，呈上皮样形态，细胞间存在接触抑制，无重叠生长(图 1)。从 GCO 细胞的生长曲线(图 2)可以看出，25℃最适宜 GCO 的生长。GCO 在贴壁生长后，第 1 天生长较慢，第 2 天生长开始加快，进入对数生长期，持续 3 d 左右后进入平台期。

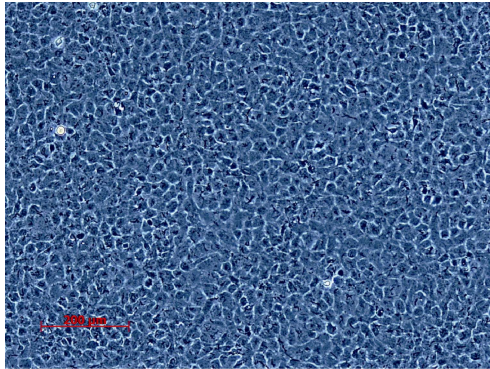


图 1 培养 3 d 的 GCO (100×)
Fig.1 GCO cultured for three days (100×)

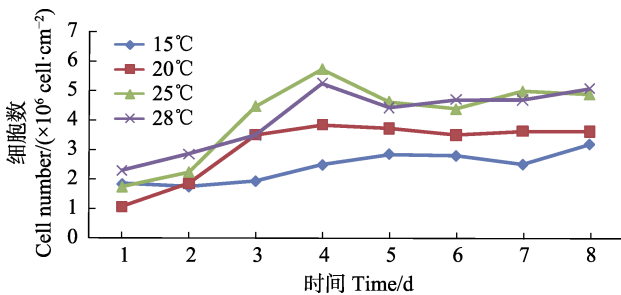


图 2 GCO 在不同温度下的生长曲线
Fig.2 Growth curve of GCO at different temperatures

2.1.2 细胞周期 应用流式细胞仪对第 345 代的 GCO 细胞进行细胞周期检测，发现 GCO 核型正常，为二倍体(图 3)。GCO 在 G1 期的 DNA 含量占 88.03%，在 S 期的 DNA 含量占 1.78%，表明 GCO 增殖活力旺盛。

2.1.3 细胞核型 对 100 个分裂中期的细胞进行染色体数目统计分析。结果显示，在 GCO 细胞系染色体中，2n=48 的分裂相占(98%)(图 4)，二倍体染色体数目出现频率非常高，其他非整数倍体只占了很小的比例。

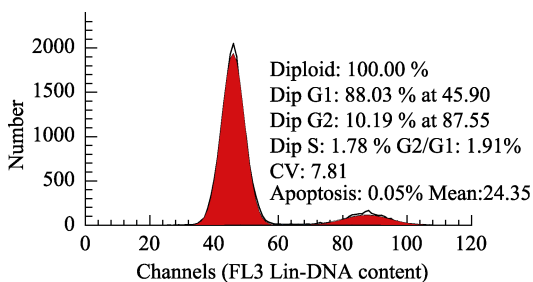


图 3 第 345 代 GCO 细胞生长周期
Fig.3 Cell cycle of GCO of the 345th generation

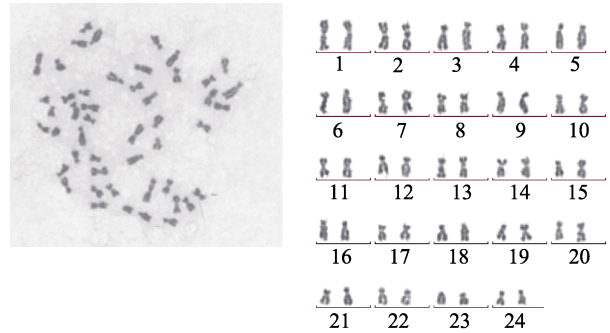


图 4 GCO 染色体核型
Fig.4 Chromosome karyotype of GCO

2.2 GCO 细胞系对 SVCV 的敏感性

2.2.1 病毒生长曲线 SVCV 接种 GCO 细胞出现典型 CPE(图 5)后，检测 SVCV 的滴度，并绘制病毒的生长曲线(图 6)。

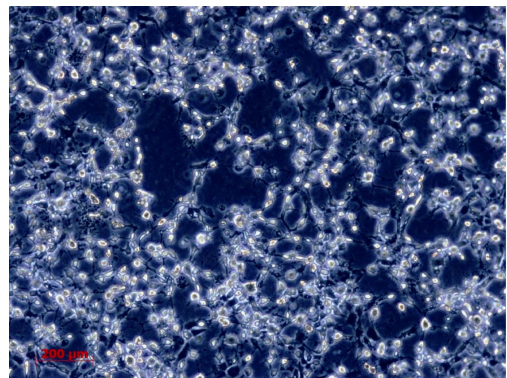


图 5 SVCV-10/3 在 GCO 中的 CPE
Fig.5 The CPE of SVCV-10/3 in GCO cells

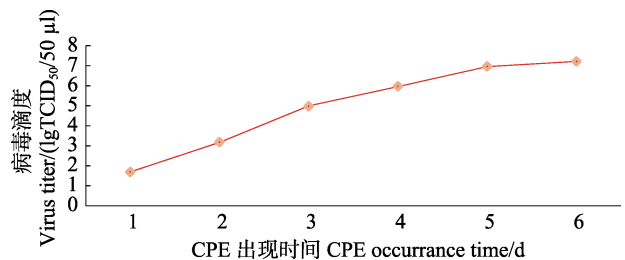


图 6 SVCV-10/3 在 GCO 中的生长曲线
Fig.6 The growth curve of SVCV-10/3 in GCO cells

2.2.2 GCO 和其他几种常用鱼类细胞系对 SVCV 易感性的比较 SVCV 分别接种 GCO、EPC、FHM 和 CHSE-214。出现 CPE 后，根据殷震等(1997)的方法测定 TCID₅₀(表 1)。从表 1 可以看出，SVCV 在 GCO 和 EPC 的滴度明显高于 FHM 和 CHSE-214。

2.2.3 SVCV 诱导不同细胞凋亡 通过流式细胞仪检测 SVCV 诱导的 GCO、EPC、FHM 和 CHSE-214。发现 SVCV 引起 GCO 的凋亡率为 38.0%，EPC 为 30.7%，FHM 为 17.5%，CHSE-214 为 13.3%(图 7)。

表 1 不同细胞感染 SVCV 毒株的病变和病毒滴度
Tab.1 CPE and titers of SVCV in different cell lines

细胞株 Cell line	CPE 完全所用时间 Time to absolute CPE (d)	病毒滴度 Virus titer (TCID ₅₀ /50 μl)
GCO	7	1.0×10 ^{7.25}
EPC	7	1.0×10 ⁷
FHM	7	1.0×10 ⁶
CHSE-214	7	1.0×10 ^{4.75}

2.2.4 电镜观察 SVCV 感染 GCO 细胞系 将 SVCV 接种 GCO 细胞后,电镜观察可见,在 GCO 细胞质内有典型弹状病毒颗粒(约为 140 nm,图 8)。

3 讨论

本研究通过对 GCO 细胞生长曲线绘制和形态学观察等发现,GCO 细胞的适宜生长温度为 15–28℃,最适生长温度为 25℃。一种细胞系的生长温度在一个宽泛的范围,使该细胞系具备了可以分离淡水鱼病毒

和冷水鱼病毒的潜力(Nicholson *et al*, 1987)。GCO 细胞系的这一特点使得它未来可以广泛地用于水生动物病毒的分离。通过对 GCO 细胞系细胞周期、染色体核型的分析发现,GCO 细胞系呈典型的二倍体特征,染色体数为 2n=48,这与舒琥等(2014)和 Beck 等(1984)描述的草鱼的染色体特征相符,说明 GCO 细胞系保持着稳定而正常的草鱼生理学特征,未发生变异,是可靠的病毒分离与检测的工具。

目前,SVCV 病毒已经在世界范围内广泛存在,可以感染鲤鱼(肖克宇等,2004)、鲫鱼(*Carassius auratus*) (Rougée *et al*, 2007)等多种鲤科鱼类,造成鱼类多器官感染。SVCV 存在多种分离株,如欧洲株、亚洲株等。世界动物卫生组织(OIE)推荐使用 EPC 分离 SVCV 病毒,但就目前的现状,EPC 不足以全面地对进出口鲤科鱼类 SVCV 感染情况进行监测,这就需要寻找更多的 SVCV 敏感细胞。

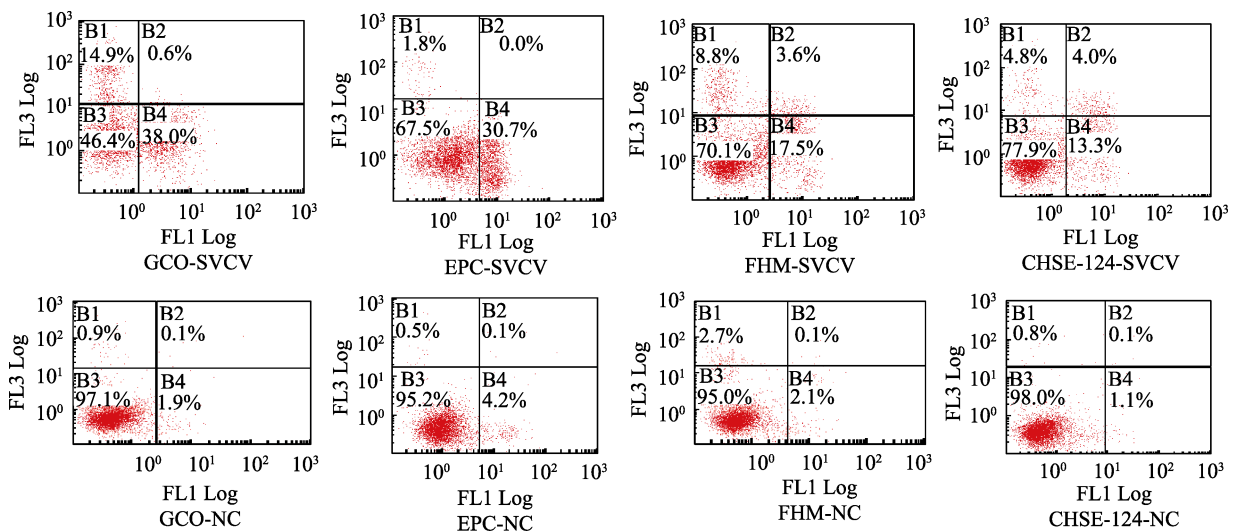


图 7 流式细胞仪检测 SVCV 诱导不同细胞凋亡

Fig.7 Apoptosis in different cell lines caused by SVCV by using flow cytometry

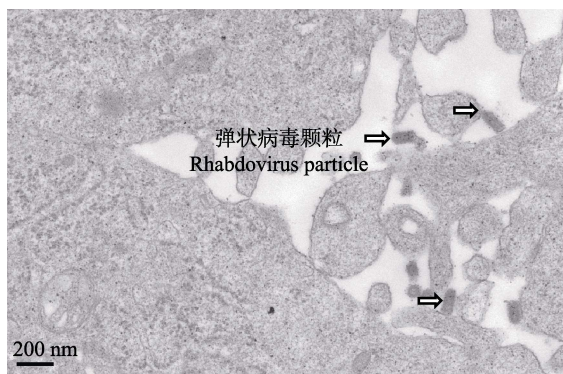


图 8 GCO 感染 SVCV 后电镜照片

Fig.8 Electron micrograph of GCO cells infected with SVCV

本研究通过接种 SVCV 病毒,检测细胞凋亡、CPE 观察、病毒粒子观察,发现 SVCV 能够很好地在 GCO 细胞内增殖,出现明显的病变。与其他已知的 SVCV 易感细胞相比,GCO 细胞对 SVCV 更加易感,可以快速出现 CPE,病毒滴度更高。研究结果显示,GCO 细胞可以作为分离 SVCV 病毒的可靠实验工具。

研究表明,GCO 对多种水生动物病毒有敏感性。张奇亚等(2012)用草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV,也称为草鱼出血病病毒 Grass carp hemorrhage virus, GCHV)感染 GCO 细胞,通过电镜在 GCO 细胞内观察到病毒粒子,诱导 GCO 细胞形成含多个细胞核的合胞体,细胞变大并发生崩解。这一

现象说明, GCO 细胞可以用来分离 GCHV 病毒, 但敏感性不如草鱼肾脏细胞(CIK)(肖雪, 2007)¹⁾。江育林等(1999)用 GCO 细胞从甲鱼(*Amyda sinensis*)中分离到甲鱼虹彩病毒(STIV), 孙颖杰等(2009)用 GCO 细胞从石鲮鱼(*Platichthys bicoloratus*)中分离到牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)弹状病毒。GCO 细胞具有生长活力强、细胞纯度高、细胞形态典型以及对病毒的特异性高等优点, 是一个具有广阔应用前景的生物模型。

参 考 文 献

- 左文功, 钱华鑫, 许映芳, 等. 草鱼肾脏组织细胞系 CIK 的建立及其生物学特性. 水产学报, 1986, 10(1): 11-17
- 江育林, 陈在贤, 郑坚川. 甲鱼虹彩病毒的分离和鉴定. 深圳特区科技, 1999(5): 62
- 孙颖杰, 江育林, 刘荃, 等. 石鲮鱼鱼苗中一种弹状病毒的分离与鉴定. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 277-282
- 肖克宇, 陈昌福. 水产微生物学. 北京: 中国农业出版社, 2004, 256-257
- 沈玉帮, 张俊彬, 李家乐. 草鱼种质资源研究进展. 中国农学通报, 2011, 27(7): 369-373
- 张奇亚, 桂建芳. 水生病毒及病毒病图鉴. 北京: 科学出版社, 2012, 317-322
- 张奇亚. 我国水生动物病毒病研究概况. 水生动物学报, 2002, 26(1): 89-101
- 张念慈, 杨广智. 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901S₁ 的建立和特性观察. 水产学报, 1981, 5(2): 111-120
- 陈立祥, 符少辉, 汪冬庚, 等. 草鱼出血病毒 H962 毒株的生物学特性研究. 湖南农业大学学报, 1998, 24(6): 468-470
- 陈燕桑. 草鱼出血病病原的研究. 水生生物学集刊, 1978, 6(3): 321-330
- 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1997, 239-241
- 舒璇, 刘远波, 魏秋兰, 等. 珠江野生草鱼、赤眼鳟的核型、银染和 C 带比较研究. 广州大学学报(自然科学版), 2014, 13(2): 53-59
- Beck ML, Biggers CJ, Barker CJ. Chromosomal and electrophoretic analyses of hybrids between grass carp and bighead carp (Pisces: Cyprinidae). Copeia, 1984(2): 337-342
- Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. New York: Wiley Blackwell, 2010, 387-389
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220
- Nicholson BL, Danner DJ, Wu JL. Three new continuous cell lines from marine fishes of Asia. In Vitro Cell Dev Biol, 1987, 23(3): 199-204
- Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc, 2006, 1(3): 1458-1461
- Rougée L, Ostrander GK, Richmond RH, et al. Establishment, characterization, and viral susceptibility of two cell lines derived from goldfish (*Carassius auratus*) muscle and swim bladder. Dis Aquat Organ, 2007, 77(2): 127-135
- Yan W, Nie P, Lu Y. Establishment characterization and viral susceptibility of a new cell line derived from gold fish, *Carassius auratus* (L.), tail fin. J Fish Dis, 2011, 34(10): 757-768
- Ye HQ, Chen SL, Sha ZX, et al. Development and characterization of cell lines from heart, liver, spleen and head kidney of sea perch *Lateolabrax japonicus*. J Fish Dis, 2006, 69(SA): 115-126

(编辑 马瑾艳)

1) 肖雪. 草鱼呼肠孤病毒人工感草鱼的条件筛选和病理学研究. 四川农业大学硕士研究生学位论文, 2007, 2-3

Characterization of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Ovary Cell Line and Its Susceptibility to Spring Viremia of Carp Virus

WANG Jinjin, LIU Ying, YU Li, JIA Peng, CHEN Bing, SHI Xiujie, ZHENG Xiaocong,
LAN Wensheng, HE Junqiang, LIU Hong^①

(Animal & Plant Inspection and Quarantine Technology Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection
and Quarantine Bureau of P.R. China, Shenzhen 518045)

Abstract Grass carp ovary cell lines (GCO) was used in the study of Grass Carp Hemorrhage and has been established by Chinese Academy of Sciences Institute of Aquatic Animal in 1970s. GCO has been cultured for more than 300 generations and plays an important role in fish virology research in China. In this study, we performed morphological observation, drawing of the growth curves, cell cycle analysis, chromosomal analysis, cytopathic effect assay (CPE), TCID₅₀ assay, cell apoptosis detection, and electron microscopic observation to demonstrate the characteristics of GCO and the cell proliferation of spring viremia of carp virus (SVCV). It was observed that GCO cell line mainly consisted of epithelial-like cells. GCO grew at temperatures between 15°C and 28°C, and the optimum was 25°C. The growth rate of GCO cells increased proportionally with the foetal bovine serum (FBS) concentration (5% to 20%), and the optimum concentration of FBS was 10%. There were 48 chromosomes in GCO cells. Four known fish cell lines were tested to determine the susceptibility of SVCV, and the results demonstrated that GCO was susceptible to SVCV. Moreover, GCO displayed higher sensitivity to SVCV and increased viral production than the control cell line, epithelioma papulosum cyprini (EPC), fathead minnow (FHM), and chinook salmon embryo (CHSE-214) cell lines. These results suggested that GCO cell line could be a useful diagnostic tool in SVCV isolation and diagnosis, and could serve as a suitable biological system in the pathogenicity study of SVCV. One advantage of this cell line is that it grows in a wide temperature range (15°C to 28°C), and thus can be used in isolating both warm-water and cold-water fish viruses. These characteristics of the GCO make it a potential tool in the future study of other fish viruses.

Key words Grass carp ovary cell lines (GCO); Biological characteristics; Susceptibility; Spring viraemia of carp virus (SVCV)

① Corresponding author: LIU Hong, E-mail: liuhong@szciq.gov.cn