

光肩星天牛幼虫脂肪体原代培养方法的研究

张 寰 李 瑄 张永安¹ 秦启联* 苗 麟 王玉珠¹

曲良建¹ 温发园¹ 张爱君 杨 青

(中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101;

¹中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护重点实验室, 北京 100091)

摘要 以光肩星天牛幼虫脂肪体组织为实验材料进行原代细胞培养, 研究原代培养过程中, 取材的虫龄、脂肪体组织块大小、组织块是否贴壁及培养表面等因素对原代培养及其细胞在体外分离和增殖的影响。结果表明, 较高龄的光肩星天牛幼虫(4龄或8龄)的较完整的脂肪体组织, 在同培养表面紧密贴附的情况下, 原代培养的成功率较高, 其细胞在体外从组织块中游离出来并增殖的几率较大。

关键词 昆虫细胞培养; 光肩星天牛; 原代培养; 细胞增殖

昆虫细胞系在昆虫病毒学、免疫学、遗传育种学、药理学及环境毒理学等生物学研究中具有非常重要作用。昆虫细胞系除了可以作为基础细胞生物学研究的材料外, 还可以有很多独特的用途。如在昆虫病理学中, 可用来研究昆虫病原物的侵染发病机理; 作为生物反应器, 可以规模化生产昆虫病毒或微孢子虫进行害虫的生物防治, 或表达外源蛋白; 用来对昆虫生理活性物质、细菌毒素等进行生物鉴定; 作为杀虫剂的作用物, 鉴定其杀虫效率和作用靶标等。最近有研究表明, 寄生昆虫细胞系作为人工饲料的添加物, 可以提高天敌成虫的生育能力^[1]。昆虫脂肪体组织分化程度较高, 其细胞较昆虫胚胎和卵巢上皮等组织的细胞, 更难于体外培养成系。到目前为止, 有报道的来源于脂肪体的细胞系较少^[2-14]。然而, 脂肪体是昆虫重要的合成和代谢组织, 来源于脂肪体的细胞系在昆虫生理学和病理学等研究中具有不可替代的作用。因而研究影响脂肪体细胞体外培养成系的因素, 不仅有助于探讨其细胞体外成系的机制, 而且可以为建立更多的、具研究和实用价值的脂肪体细胞系提供指导, 具有重要的理论和实际意义。

光肩星天牛(*Anoplophora glabripennis*)是严重为害阔叶树的蛀干害虫, 在对其的治理中采用了多种生物防治的方法, 包括天敌昆虫和病原物的应用。在光肩星天牛的基础生物学研究及其专一性病原物的体外培养等工作中, 原代培养的光肩星天牛细胞及其细胞系是重要的实验材料。本文研究了光肩星天牛幼虫脂肪体组织体外培养时, 实验昆虫虫龄的大小, 脂肪体组织块的状态, 以及体外培养处理等因素, 对其

培养特性的影响, 以此探讨昆虫脂肪体细胞体外成系的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的光肩星天牛在中国林科院森林生态环境与保护研究所国家林业局森林保护学重点实验室用人工饲料饲养, 环境温度 26 ± 1.5 , 相对湿度为65%~75%。

主要试剂: 细胞培养液(TNM-FH, Sigma公司, Cat.No.T1032), 配制时加入青霉素和链霉素, 使终浓度分别达到10 U/ml; 优质胎牛血清(FBS, 哈尔滨江海生物工程公司)。原代培养液: 80% TNM-FH加10% FBS加10% 苯基硫脲饱和的TNM-FH培养液(在TNM-FH培养液中加入过量的苯基硫脲晶体, 充分搅拌后, 静置过夜。取上清液过滤除菌, 即获得苯基硫脲饱和的TMN-FH培养液)。传代细胞培养液: 90% TNM-FH加10% FBS。

1.2 原代培养细胞的分离

在超净工作台内, 将适龄光肩星天牛幼虫浸于70%乙醇, 体表消毒10~20 min, 用无菌吸水纸吸干虫体表面的乙醇后, 放入装有Ringer's生理盐水的培养皿中解剖虫体, 获得脂肪体组织, 充分清洗脂肪体组织以除去血细胞, 将多块脂肪体组织用尖嘴镊

收稿日期: 2008-08-31 接受日期: 2009-02-16

国家自然科学基金(No. 30671688)和国家科技支撑计划(No. 2006BAD08A1202)资助

*通讯作者。Tel: 010-64807056, E-mail: Qinql@ioz.ac.cn

转移到含有1 ml原代培养液的培养瓶中,放入27培养箱中培养。过夜后,加入2 ml传代培养液。加入传代培养液时,注意不要触动贴壁的组织。以后每星期更换半量的培养液,待细胞长满瓶底后开始传代^[4,12,13]。

1.3 原代培养的换液和传代

第一次传代和最初几次的传代,采取更换1/2的培养液的方法。传代时视细胞密度,取1~3 ml细胞悬液放入含有3~5 ml传代培养液的新培养瓶中。

2 结果

2.1 光肩星天牛不同虫龄脂肪体组织的原代培养

光肩星天牛属中大型昆虫,与甜菜夜蛾等鳞翅目昆虫不同,即使2龄幼虫,脂肪体组织也很丰富,易于解剖。因而,从实验取材的角度考虑,光肩星天牛幼虫脂肪体是比较不同龄期脂肪体成系可能性的很好的实验材料。实验设置了2龄、4龄和8龄共3个处理,研究不同龄期的脂肪体材料对原代和传代培养的影响。结果表明,2龄幼虫的脂肪体组织体外培养状态较差,原代培养仅能维持1个月左右,并且观察不到细胞增殖。而4龄和8龄幼虫脂肪体组织在原代培养的第4天,组织块周围就出现游离的细胞,一周左右可以见到细胞的增殖,约一个月后细胞布满瓶底。因此,与使用较低龄期的幼虫相比,使用较大龄期(4龄和8龄)的幼虫为实验材料,细胞更容易从组织中游离出来,能够传代的几率也较高(表1)。4龄和8龄幼虫两者之间能够传代的几率无明显差异。

2.2 组织块的完整性及组织块大小的差异对原代培养细胞分离增殖的影响

实验过程中发现,脂肪体组织块是否完整,以及取材的大小在一定程度上影响到培养的结果。据此,我们设计了以下实验,试图为最优优化取材提供实验依据。

解剖8龄光肩星天牛幼虫脂肪体,分别选取三种类型:1)完整的大块组织,2)将大块组织分成2~3块的中块组织,3)用玻璃棒将脂肪体碾碎的小块组织。通过培养3种不同大小和完整性的组织块发现,破碎的小块组织中含有大量的细胞碎片及脂滴样等物质,

并且散布在培养瓶底,游离出的细胞在这种培养环境下,生长停滞、细胞形状膨大,随着时间的推移而逐渐死亡。推测破碎组织释放细胞内容物较多,在体外环境下对细胞具有毒性作用。而完整的大块组织,细胞碎片和内容物释放少,培养体系背景清澈透明,从组织中游离出来的细胞个体小而透明,状态良好(图1A)。随着培养时间的延长,细胞逐渐增殖(图1B,图1C),最后布满瓶底。另外,在相同的完整组织的断面,常常因具有细胞碎片和脂滴样等物质而难于游离出细胞(图1D),即使有细胞长出也很难持续增殖,随着时间的推移而逐渐死亡。因此,在以脂肪体组织为实验材料进行细胞培养时,尽量获得完整的脂肪体组织块,同时在进行培养前,应尽量洗去组织块周边的细胞碎片及脂滴样等物质。这样,可以大大提高成功传代的比率。

2.3 组织贴壁处理对原代培养细胞分离和增殖的影响

以光肩星天牛幼虫脂肪体组织为材料,分为组织悬浮和组织贴壁两种培养。组织悬浮是指将解剖出的脂肪体组织直接放入含有原代培养液的培养瓶中培养。组织贴壁又分为两种,一种是将培养液润洗过的脂肪体组织放入培养瓶中,贴壁4 h后缓慢加入3~4 ml传代培养液进行培养;另一种是将培养液润洗过的脂肪体组织直接放入含有1 ml原代培养液的瓶中,培养液的高度低于脂肪体组织高度,过夜后,取出原代培养液,加入2~3 ml传代培养液培养。经实验发现,悬浮的组织培养无任何变化,经2~3星期后,培养体系中出现结晶体,逐渐死亡。而贴壁的组织周围在3 d左右就会游离出细胞,7 d左右大量增殖,2~4个星期就会布满瓶底,并会有大量的梭形细胞悬浮在培养液中(图1A,图1B)。实验表明,将脂肪体组织块较紧密地粘附于培养表面,对细胞从组织中游离出来,具有较好的诱导作用。用较少的培养液(1 ml, T-25 cm²培养瓶),浸润脂肪体组织,经过过夜培养,此时组织贴壁牢固,再加入较多培养液进行长期培养时,组织块不易因浮力作用而悬浮于培养液中,是较好的贴壁处理方法。

实验表明,昆虫脂肪体原代培养过程中,组织贴

Table 1 Comparisons of state for culture of larval fat bodies of *A. glabripennis* in different ages in vitro

Ages	Times of culture	The average culture time (d)	Ratio of cell proliferate (%)	Ratio of subculture (%)
2	6	33	0	0
4	16	72.8 (28-173)	100	25.0
8	49	74.5 (12-203)	58	27.1

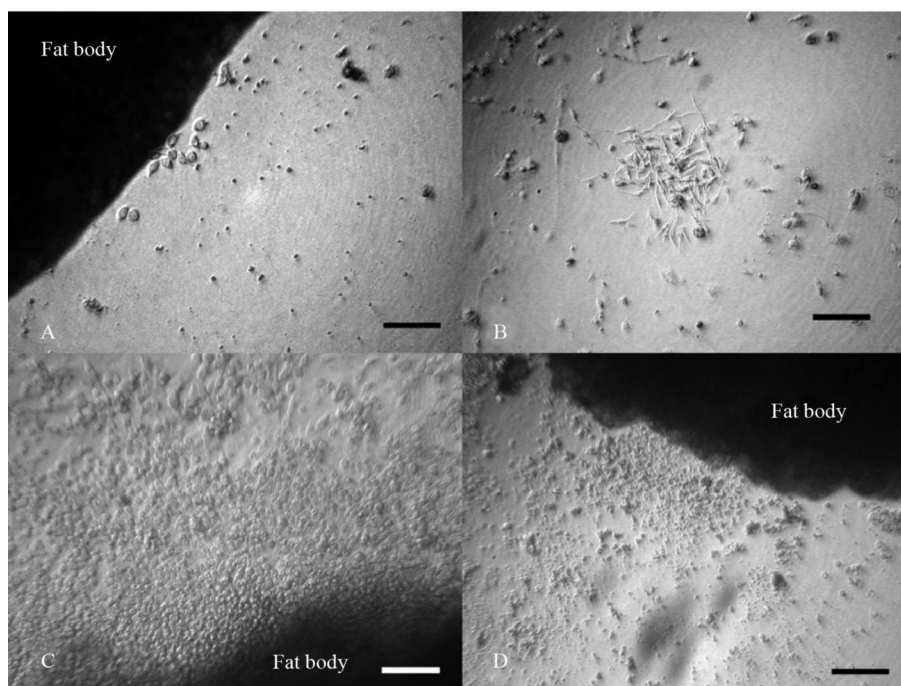


Fig.1 Cells growing out from the larval fat bodies of *A. glabripennis* and which were proliferated continuously
A: 3 d; B, C: 14 d; D: 7 d. Marker bar is 100 μm

壁的步骤非常重要,是决定细胞是否成系的关键步骤之一。

2.4 不同培养表面对原代培养细胞组织贴壁效果的比较

涂膜基质在哺乳动物的细胞培养中较常使用,并取得良好的效果。一般常用的涂膜基质有多聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)、胶原、纤粘蛋白(fibronectin, FB)、层粘连蛋白(laminin, LN)等。原代细胞的培养中,贴壁细胞附着材料对培养的成功有很大影响。为了比较不同培养表面对原代培养效果的影响,分别用以下几种处理对光肩星天牛8龄幼虫脂肪体组织进行原代培养:

A) 新的一次性 T-25 cm^2 塑料培养瓶(T-25 cm^2 , Corning, NY);

B) 表面涂有Cell matrix胶的T-25 cm^2 塑料培养瓶;

C) 洗涤后用Co-60灭菌的用过的T-25 cm^2 塑料

培养瓶(旧塑料培养瓶);

D) T-12.5 cm^2 玻璃培养瓶;

E) 新的一次性35 mm塑料培养皿。

实验表明,除玻璃培养瓶的贴壁率较低外(44.3%),其它培养表面的贴壁率之间差异不显著,约为50%。而表面涂布胶原蛋白(cell matrix, 一种大鼠尾胶)并不能促使细胞从贴壁组织中游离出来,可能由于胶原蛋白来源于哺乳动物,与昆虫细胞的胞间基质性质差别较大,不利于其正常的生命活动。游离出的细胞在新的和旧的培养瓶中存活时间最长,而在布胶的培养瓶和玻璃培养瓶中存活较短。一次性培养瓶中原代培养成功进入传代培养的比率远大于在玻璃瓶中的成功率(表2)。综合以上因素认为,商品化的一次性塑料培养瓶,其培养表面经过一定的细胞吸附优化处理(供应商说明书),利于原代细胞的贴壁和生长。已经使用的塑料培养瓶(旧培养瓶),虽然其出厂时培

Table2 Effect of different culture surfaces on attachment of the tissues and proliferation of primary cells

Deal	Surface of culture	Ratio of attachment (%)	Ratio of cell dissociation (%)	The average culture time (d)
A	New plastic flask	61.4	71.4	90
B	Plastic flask with cell matrix	55.0	16.7	30
C	Old plastic flask	51.4	83.3	90
D	Glass flask	44.3	80.0	38
E	New plastic Dish	52.9	21.4	49

养表面的优化处理已被破坏,但是仍保留较强的细胞吸附能力,因而也有较高的传代培养成功率。

由此看来,有助于原代培养组织紧密贴壁的培养表面,是能否成功进行传代培养的非常关键的因素之一。

3 讨论

相对于哺乳动物细胞培养研究的历史和现状,昆虫细胞培养技术仍然处于初始阶段,难点和问题很多,许多基本的技术和方法有待建立,需要做大量细致的研究工作。昆虫种类繁多,不同物种、甚至相同物种不同组织来源细胞的培养方法、现象、规律往往都有差异。一些研究思路可以从哺乳动物细胞培养中借鉴,但是也要注重昆虫细胞自身的特殊性。

细胞原代培养时对体外生存条件有较高要求,并需经对新环境适应才能生长。在通常的细胞培养过程中,往往会出现两种情况,其一是完全无细胞游离或移动;其二是细胞移动和游出,但无细胞增殖,细胞长时间处于停滞状态以致难以传代,或者传数代后细胞增殖缓慢,经过一段停滞期后,才呈现旺盛生长状态,形成稳定生长的传代细胞系。因此,在原代细胞培养过程中,有两个关键步骤,一个是如何分离得到具有增殖潜力的细胞,另一个关键步骤是如何使这些具有增殖潜力的细胞持续增殖。

普遍认为,昆虫脂肪体组织建立细胞系是非常困难的。我们通过研究发现,虫体组织块在体外同培养器皿表面紧密贴附,非常利于该组织块细胞的分裂生长,可能这样的贴壁改善或稳定了其在体外的微环境,促进细胞分裂生长。希望此种方法,应用于其他种类的昆虫,以及其他的组织建立细胞系的过程中。

参考文献(References)

- [1] Lynn DE, Ferkovich SM. New cell lines from *Ephestia kuehniella*: characterization and susceptibility to baculoviruses, *J Insect Sci*, 2004, 4: 9
- [2] Eguchi D, Iwabuchi K. A new cell line from the wax moth *Galleria mellonella* LINNE (Lepidoptera: Pyralidae), *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2006, 42(1): 1-3
- [3] Gelernter WD, Federici BA. Continuous cell line from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) that supports replication of nuclear polyhedrosis viruses from *Spodoptera exigua* and *Autographa californica*, *J Invertebr Pathol*, 1986, 48: 199-207
- [4] Inoue H, Mitsuhashi J. Further establishment of continuous cell lines from larval fat bodies of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), *Appl Ent Zool*, 1985, 20(4): 496-498
- [5] Iwabuchi K. An establishment cell line from the beetle *Xylotrechus pyrrhoderus* (Coleoptera: Cerambycidae), *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, 35(10): 612-615
- [6] Iwabuchi K. A continuous cell line derived from larval fat bodies of *Thysanoplusia intermixta* (Lepidoptera: Noctuidae), *Appl Ent Zool*, 2000, 35(2): 245-249
- [7] Mitsuhashi J. Establishment and some characteristics of a continuous cell line derived from fat bodies of the cabbage armyworm (Lepidoptera, Noctuidae), *Dev Growth Differ*, 1981, 23(1): 63-72
- [8] Mitsuhashi J. Continuous cell line derived from fat bodies of the common armyworm, *Leucamia separata* (Lepidoptera: Noctuidae), *Appl Ent Zool*, 1983, 18(4): 533-539
- [9] Mitsuhashi J. Isolation of a continuous cell line from larval fat bodies of an arctiid moth, *Spilarctia seriatopunctata* (Insecta, Lepidoptera, Arctiidae), *J Zool Sci*, 1984, 1: 415-419
- [10] Mitsuhashi J, Inoue H. Obtainment of a continuous cell line from the larval fat bodies of the mulberry tiger moth, *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera: Arctiidae), *Appl Ent Zool*, 1988, 23(4): 488-490
- [11] Mitsuhashi W. A new continuous cell line from the larval fat bodies of the mulberry tiger moth, *Spilosoma imparilis* (Lepidoptera: Arctiidae), *Bull Natl Inst Seric Entomol Sci*, 1994, 11: 1-8
- [12] Philippe C. Culture of fat body of *Periplaneta Americana*: tissue development and establishment of cell lines, *J Insect Physiol*, 1982, 28(3): 257-265
- [13] Zhang H, Zhang YA, Qin QL, et al. New cell lines from larval fat bodies of *Spodoptera exigua*: characterization and susceptibility to baculoviruses (Lepidoptera: Noctuidae), *J Invert Pathol*, 2006, 91(1): 9-12
- [14] Zhang H, Zhang YA, Qin QL, et al. A new cell line from larval fat bodies of the bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2006, 42(10): 290-293

Evaluation of Some Factors Effecting *in Vitro* Primary Culture of Larval Fat Body Cells of *Anoplophora glabripennis*

Huan Zhang, Xuan Li, Yong-An Zhang¹, Qi-Lian Qin*, Lin Miao, Yu-Zhu Wang¹,
Liang-Jian Qu¹, Fa-Yuan Wen¹, Ai-Jun Zang, Qing Yang

(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ¹Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract Some factors effecting *in vitro* primary culture of larval fat body cells of the Asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*) were evaluated in the paper. The results showed that the insect stages, size and integrality of the fat body tissue, character of culture surface and whether the cultured tissues attaching to the culture surface were important for the success of the primary culture. Under the optimized conditions, which were in combination with higher larval stages (4th or 8th instar), more intact cultured tissue and close attachment of the cultured tissue and the culture surface, the fat body cells were inclined to separate from the cultured tissues and proliferate.

Key words insect cell culture; *Anoplophora glabripennis*; primery culture; cell proliferation

Received: August 31, 2008 Accepted: February 16, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30671688) and the National Key Technology R&D Program of China (No.2006BAD08A1202)

*Corresponding author. Tel: 86-10-64807056, E-mail: Qinql@ioz.ac.cn