

I 型禽腺病毒 AV208 株在鸡肝癌细胞中 增殖规律的研究

赵莉^{1,2} 周洁¹ 高诚^{1*} 胡建华¹

(1. 上海实验动物研究中心 上海 201203)

(2. 扬州大学 兽医学院 江苏 扬州 225009)

摘要: 【目的】摸索鸡肝癌细胞系(LMH)培养条件, 并采用 LMH 细胞系对 I 型禽腺病毒 AV208 株(FAV I -AV208)进行增殖规律的研究。【方法】细胞以不同血清浓度培养并以不同接种比例传代。观察最佳感染复数下的细胞病变和病毒增殖情况, 并研究病毒接种物浓度与蚀斑形成数量之间的关系。【结果】LMH 细胞系的最适培养条件为, 以 10% FBS 的培养基以 1:5 比例传代培养。FAV I -AV208 毒株可以在 LMH 细胞中良好增殖并达到较高的滴度($10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1 mL)。在最佳感染复数(MOI)为 0.01 时, 72 h 细胞即出现明显的细胞病变(CPE), 特征为细胞变大变圆, 集聚成不规则的葡萄串状。病毒接种物浓度与蚀斑形成数量间呈线性相关。【结论】LMH 细胞是 FAV I 较合适的病毒培养系统, 为研制禽腺病毒重组疫苗提供了有利工具。

关键词: I 型禽腺病毒 AV208 株, 鸡肝癌细胞, 细胞病变, 增殖规律

Growth pattern of fowl adenovirus type I -AV208 strain on chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH

ZHAO Li^{1,2} ZHOU Jie¹ GAO Cheng^{1*} HU Jian-Hua¹

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai, 201203, China)

(2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: [Objective] To explore culture conditions for chicken hepatocellular carcinoma cell

基金项目: 上海市科研项目(No. 09140901400)

*通讯作者: Tel: 86-21-50783673; 信箱: gaochengdgb@hotmail.com

收稿日期: 2011-12-08; 接受日期: 2012-02-15

line (LMH) and growth pattern of fowl adenovirus type I -AV208 strain (FAV I -AV208) on LMH cells. [Methods] Cells were cultured with different concentration of serum and propagated at different subcultivation ratios. Cytopathic effect and growth pattern of FAV I - AV208 on LMH cells were studied at an optimal MOI. Relation between virus concentration and plaque number was discussed by a standard plaque assay. [Results] Culturing with 10% FBS is suitable for LMH cells and a subcultivation ratio of 1: 5 is recommended. FAV I - AV208 could be propagated efficiently in LMH cells and high virus titer up to $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1 mL was reached. Obvious CPE was observed after 72 h post- infection at an MOI of 0.01. The normal cobblestone- like pattern cells grew into larger and round, they aggregated into irregularly botryoidal appearance and finally disintegrated. A linear relation was proved between virus concentration and plaque number. [Conclusion] LMH cell line is a suitable virus culture system and provides an excellent tool for construction of recombinant fowl adenovirus type I .

Keywords: FAV I -AV208 strain, LMH, CPE, Growth pattern

I 群禽腺病毒有 12 个血清型, 与自然爆发的鸡包涵体肝炎有关, 可引起发病鸡死亡^[1]。一般采用鸡胚成纤维细胞(CEF)、鸡胚肾细胞(CEK)、雏鸡肾细胞(CK)、鸡胚肝细胞(CEL) 4 种原代细胞分离和增殖病毒。但原代肝肾细胞制备繁琐、易污染、不易转染, 且在制备细胞过程中易混入 CEF, 不利于实验操作。现在已经培养出适应鸡胚致死孤儿病毒(CELOV)生长的禽源性肝癌细胞系(LMH), 主要用于重组腺病毒的构建^[2]。国外在 I 群禽腺病毒载体方面已有初步的研究, 但离临床应用还有较大的距离, 而国内在此方面的研究较少^[3-4]。目前尚未有对 LMH 细胞系培养特性及 I 型禽腺病毒(FAVI)毒株在 LMH 细胞系上增殖规律研究的公开报道。本研究采用 LMH 细胞系对 FAV I -AV208 进行了增殖规律的研究, 为进一步研究该毒株的生物学特性及利用禽腺病毒为载体表达主要疫病的保护性抗原基因研制基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

FAV I -AV208 株, 购自中国兽医药品监察

所, 在 CEK 上的 TCID₅₀ 为 $10^{5.5}$ /0.5 mL。LMH 由复旦大学医学分子病毒学教育部重点实验室惠赠。DMEM/F12 培养液、胎牛血清、抗生素、胰蛋白酶均购自 Gibco 公司。低熔点琼脂糖购自 Promega 公司。

1.2 LMH 细胞的培养及形态学观察

LMH 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青链霉素的 DMEM/F12 培养液培养, 观察细胞形态。为摸索该细胞系培养条件, 将 LMH 细胞以 1:3、1:4、1:5、1:6 比例传代, 以血清浓度为 2%、4%、6%、8%、10% 的培养液, 分别于 37 °C、5% CO₂ 下培养。

1.3 病毒不同接毒剂量对 LMH 细胞感染试验

将 LMH 细胞以 1×10^4 /mL 密度接种 96 孔细胞板, 约 24 h 培养基颜色变为橙红色, 细胞开始进入对数期。按 1.3 中病毒接种细胞方法, 取 FAV I -AV208 种毒以维持液连续 10 倍梯度 (10^{-1} – 10^{-11}) 稀释后接种 96 孔板, 最后一列不接毒作为正常细胞对照(平行做 2 块 96 孔板), 按 Reed-Meunch 方法计算种毒对 LMH 细胞的 TCID₅₀。

将 LMH 细胞以 3×10^5 /mL 密度接种 6 孔细胞

板, 约 36 h 培养基颜色变为橙红色, 细胞开始进入对数期。消化一孔待感染的细胞, 稀释混匀后进行细胞计数。FAV I -AV208 种毒以 1:100、1:1 000、1:5 000、1:10 000、1:50 000 及 1:100 000 比例稀释后各接种 6 孔板上 3 个复孔, 观察各稀释度接毒孔病变情况, 摸索病毒对 LMH 细胞最适感染剂量。

1.4 FAV I -AV208 接种 LMH 细胞病变观察

取生长成致密单层的 LMH 细胞, 弃去细胞生长液, 以 2% 血清浓度的维持液稀释种毒液, 以最适感染剂量接种细胞。37 °C 吸附 2 h, 弃病毒吸附液, 重新加入维持液, 37 °C 继续培养, 每天于倒置相差显微镜下观察 CPE 变化, 待 85% 以上 LMH 细胞出现 CPE 后收毒。

1.5 FAV I -AV208 在 LMH 细胞上的生长曲线

按 1.4 中病毒接种 6 孔板细胞方法, 种毒以 1:1 000 稀释度接种 6 孔板各孔(平行做 2 块 6 孔板), 在接毒后 12、24、36、48、60、72 h 收细胞培养物各一孔, 冻融 3 次, 取病毒悬液按 Reed-Meunch 方法计算不同收毒时间病毒的 TCID₅₀, 并绘制病毒在细胞上的生长曲线。

1.6 病毒接种物浓度与蚀斑形成数量的关系

将病毒滴度为 10^{5.5} TCID₅₀/0.1 mL 的种毒液以维持液连续 10 倍稀释, 接种于 6 孔板上长成单层的 LMH 细胞上(平行做 2 块 6 孔板), 按蚀斑制备方法, 37 °C 吸附 2 h, 弃掉病毒吸附液, 覆盖预热的第一层营养琼脂(终浓度为 1% 低熔点琼脂糖、2.5% 胎牛血清的 1×DMEM/F12), 72 h 后铺第二层营养琼脂(终浓度为 1% 低熔点琼脂糖、2.5% 胎牛血清、0.01% 中性红的 1×DMEM/F12), 第 5 天后每天检查蚀斑形态及数目, 直至数目不变为止, 计算各剂量病毒悬液所含的平均蚀斑形成单位。

2 结果

2.1 LMH 细胞的基本特性

在倒置相差显微镜下观察 LMH 细胞形态。LMH 是贴壁细胞系, 呈典型上皮细胞特征, 该细胞系保持了鸡肝细胞分化的大量表型特征^[2]。镜下观察生长密度较小时细胞形态为树突样, 单个生长时甚至可呈梭形、三角形, 细胞间突起连接清晰可见; 生长密度较大时细胞呈扁圆铺路石样结构, 排列紧密, 接触性抑制丧失, 易长成双层, 见图 1。

将 LMH 细胞以 1:3 或 1:4 传代时, 细胞接种密度偏大, 生长速度过快, 培养 2 d 细胞即已长向双层; 此比例下细胞传代过于频繁, 导致细胞分裂状态、形态不一, 不利于实验后续操作。而将 LMH 细胞以 1:5 或 1:6 传代时, 细胞约 3 d 长满单层, 状态良好, 此传代比例较合适。采取 1:5 比例传代, 以 10% 血清浓度培养的细胞在第 3 天已长满单层; 8% 和 6% 血清浓度下细胞在第 4 天长满单层, 但细胞生长时疏密有间, 即细胞稍密处生长较快, 细胞稍稀处生长较慢; 而 4% 和 2% 血清浓度下细胞在第 5 天仍未长满单层, 细胞扎堆生长明显, 细胞较密处已长成两层, 细胞较稀处仍有空隙, 且 2% 浓度下细胞间空隙比 4% 大。故该细胞系的最适培养条件为以 10% 血清的培养基以 1:5 传代比例培养, 3 d 即可长满单层。血清浓度低于 4% 时, 细胞生长缓慢, 细胞维持液可采取 2% 血清浓度的培养液。

2.2 病毒不同接毒剂量对 LMH 细胞感染试验

FAV I -AV208 种毒对 LMH 细胞的 TCID₅₀ 为 10^{5.5}/0.1 mL。1:100 稀释度的病毒剂量在接种后 48–60 h, 90% 以上的细胞出现明显 CPE; 以 1:1 000 稀释度的病毒剂量在接种后 72 h, CPE 较明显; 而 1:5 000 稀释度的接毒剂量在接毒后 84–96 h 病变明显; 1:10 000 和 1:50 000 稀释度的

病毒剂量 5 d 内出现轻微 CPE; 而 1:100 000 稀释度在 5 d 内未出现 CPE。故将种毒以 1:1 000 稀释接种 LMH 细胞, 约 72 h 出现 CPE, 为较合适的病毒感染剂量。6 孔板单孔细胞计数结果为 1.2×10^6 个, 则 FAV I -AV208 感染 LMH 细胞系的最佳感染复数为 0.01。

2.3 FAV I -AV208 接种 LMH 细胞病变观察

FAV I -AV208 以 1:1 000 稀释度接种 LMH 细胞, 72 h 即产生明显的细胞病变(CPE), 病变特征为细胞变大变圆, 集聚成不规则的葡萄串状, 集

聚之外的细胞间隙增大, 相差显微高倍镜(400×)下可见细胞内出现类似包涵体的颗粒物, 最终致细胞崩解, 见图 2。

2.4 FAV I -AV208 在 LMH 细胞上的生长曲线

细胞接毒后 12、24、36、48、60、72 h 收取的细胞毒液, 按 Reed-Meunch 方法测得相应毒价分别为 $10^{2.7}$ 、 $10^{3.5}$ 、 10^4 、 $10^{4.3}$ 、 $10^{4.5}$ 、 $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1 mL。生长曲线见图 3。由图 3 可知, AV208 毒株在接种后 12–24 h 内病毒滴度未见明显增高, 表现出存在潜伏期, 36 h 病毒滴度出现

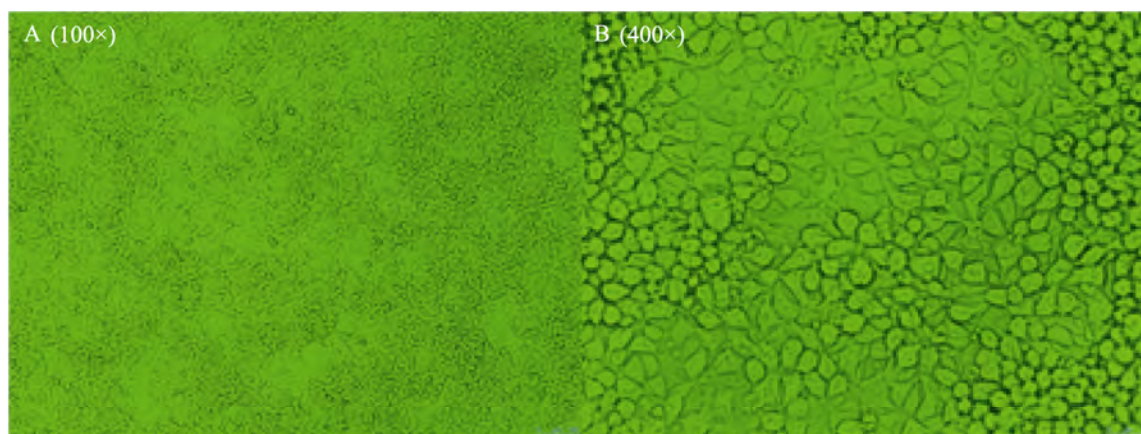


图 1 LMH 细胞形态呈典型恶性上皮细胞特征

Fig. 1 LMH cells exhibit a typical malignant epithelial morphology

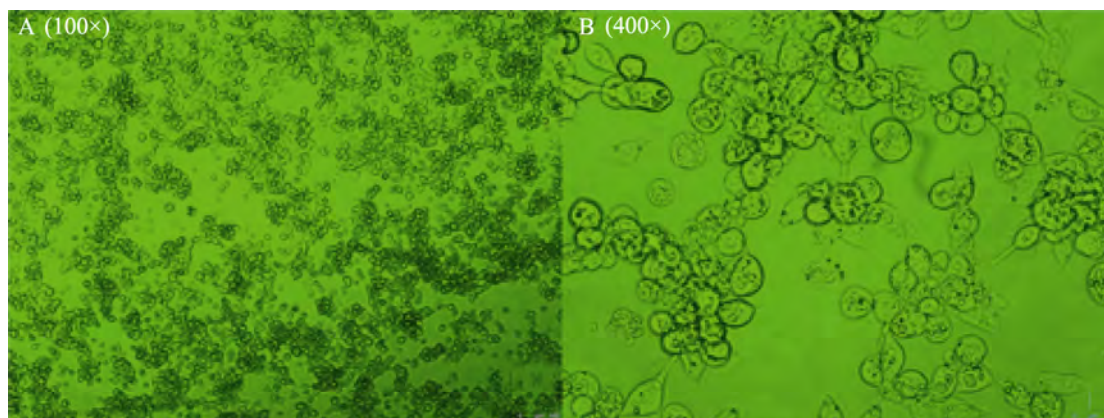


图 2 FAV I -AV208 在 LMH 细胞系上的病变

Fig. 2 Cytopathogenic effect by FAV I -AV208 in LMH cells

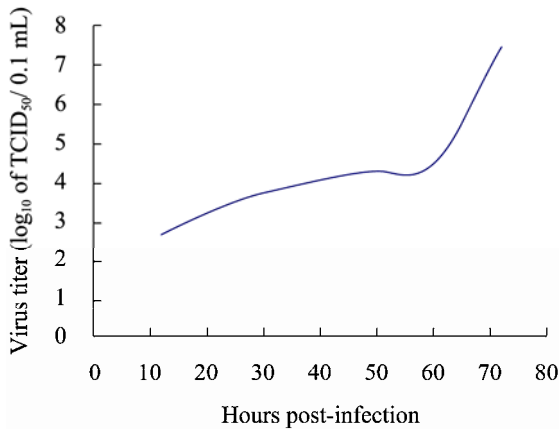


图3 FAV I -AV208株在LMH细胞培养物中生长曲线
Fig. 3 Growth curves of FAV I -AV208 in LMH cells

增高达到 10^4 TCID₅₀/0.1 mL, 到 72 h 病毒滴度增高至 $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1 mL。

2.5 病毒接种物浓度与蚀斑形成数量的关系

FAV I -AV208 种毒液用维持液做 10 倍比稀释, 每稀释度各接种 3 孔细胞单层, 感染第 7 天开始逐渐出现肉眼可见的小空白蚀斑, 至第 10 天蚀斑已充分发育, 显微镜下细胞病变严重, 蚀斑数目维持不变。病毒滴度为 $10^{5.5}$ TCID₅₀/0.1 mL 的种毒蚀斑形成单位为 $10^{5.7}$ PFU/mL, 这也与文献报道^[5]的 TCID₅₀ 法测得的病毒滴度对数值比标准空斑法高 0.7 相一致。各稀释度蚀斑计数见表 1, 并绘制成病毒接种物浓度与蚀斑形成数量关系图。由图 4 可知, 病毒浓度与蚀斑形成数量呈线性相关($y=-32x+228$)。

表 1 病毒液各稀释度蚀斑计数
Table 1 plaque number for 10-fold dilution of FAV I -AV208

病毒液稀释度	蚀斑计数
Dilution of FAV I -AV208	Plaque numble
10^{-2}	出斑完全融合
10^{-3}	出斑融合严重
10^{-4}	100
10^{-5}	65
10^{-6}	36
10^{-7}	3

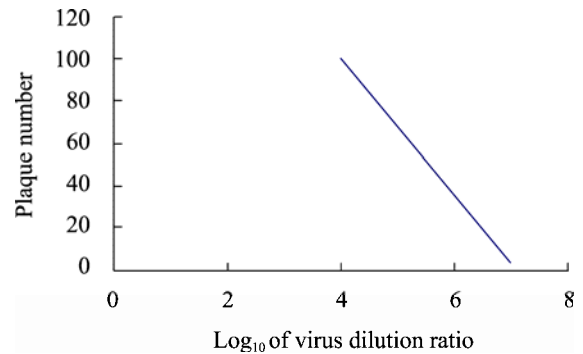


图 4 病毒浓度与形成蚀斑数关系

Fig. 4 Relation between virus concentration and plaque number

3 小结与讨论

LMH 作为一种肝癌细胞系, 可以很好地转染病毒基因组与质粒^[6], 而 CEK 细胞等制备繁琐且可能难以高效转染^[4], 因此 LMH 细胞用于重组病毒的研制更为方便^[7-8]。

国内报道 FAV I 江苏分离株可经 CEF 和 CEK 培养繁殖, 但仅在 CEK 上出现 CPE, 表现为细胞折光性增强, 聚集性增强形成细胞团或细胞束^[9]。FAV I -AV208 毒株在 LMH 细胞系上培养引起的 CPE 类似于 CEK, 但在细胞内形成类似包涵体的颗粒物需经电镜进一步鉴定。但这与报道^[10]称 I 群禽腺病毒引起的鸡包涵体肝炎的特征病变是在感染禽的肝细胞内形成包涵体相一致。

M Hess 等^[11]早期报道了 I 群禽腺病毒可在 CEL 和 CK 细胞上生长, 且 FAV 在 CEL 上繁殖滴度可达 10^7 PFU/ mL, 这与本实验 FAV I 在禽源性肝癌细胞系 LMH 上增殖得到较高滴度相似。LMH 细胞系属于肝上皮细胞, 而腺病毒倾向于感染上皮细胞, 这可能与上皮细胞表达较高水平的病毒受体有关。由于病毒对不同的细胞感染能力不一样, 所以在具体实验中需摸索最佳感染复数 MOI, 此值过高或过低均不利于病毒增殖, 因为感染细胞的病毒颗粒过多会导致宿主细胞迅速死亡, 而 MOI 值低就会出现感染比例低下。

但对于不同的细胞, 相同的 MOI 值达到的病毒感染率不同, 主要是细胞表面病毒受体表达水平不同所致。若细胞上病毒受体很多, 那么 MOI 值较低的便能达到较高的感染率。本实验得出最佳 MOI 值为 0.01 时, FAV I -AV208 株在 LMH 细胞系上增殖仍能得到较高滴度。无论是 FAV I 在 LMH 细胞系上较高的繁殖适应性, 还是病毒对该细胞系的最佳感染复数数值偏低, 都表明 LMH 细胞系作为肝上皮细胞, 可能表达较高水平的禽腺病毒受体。Poi king Tan 等^[12]通过对病毒的两种纤维蛋白的基因分析证实 FAV I 代表株 CELOV 有类似于人 5 型腺病毒一样的基于 CAR 的转导特性。CAR 即柯萨奇-腺病毒受体 (Coxsackie and Adenovirus receptor), 作为病毒受体介导腺病毒与柯萨奇病毒吸附感染靶细胞^[13], 能在多数上皮组织中表达。就单个细胞来说, CAR 定位在细胞膜上, 但是在组织上, CAR 有其亚定位, 主要表达在连接紧密的组织中^[14], 如肝细胞之间。最近有报道证实, 细胞 CAR 表达水平与其对病毒的敏感性显著相关^[15]。增强 CAR 低表达细胞的表达水平, 可明显提高其对腺病毒的感染率^[16-17]。

FAV 载体作为基因免疫的转移工具将具有广阔的前景。本实验丰富了 FAV I 在 LMH 细胞系上增殖规律的研究资料, 为今后将其研制成 FAV 重组疫苗奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Jack SW, Reed WM. Further characterization of an avian adenovirus associated with inclusion body hepatitis in bobwhite quails[J]. Avian Diseases, 1990, 34(3): 526-530.
- [2] Kawaguchi T, Nomura K, Hirayama Y, et al. Establishment and characterization of a chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH[J]. Cancer Research, 1987, 47(16): 4460-4464.
- [3] 何秀苗. 禽腺病毒载体的构建及其生物学特性的研究[D]. 扬州: 扬州大学博士学位论文, 2004.
- [4] 王凤雪. CELO 禽腺病毒载体的构建及 fiber 1 部分片段的原核表达[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2005.
- [5] Murhammer DW. Baculovirus and insert cell expression protocols[M]. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2007: 217-219.
- [6] Michouy AI, Lehrmann H, Saltik M, et al. Mutational analysis of the avian adenovirus CELO, which provides a basis for gene delivery vectors[J]. Journal of Virology, 1999, 73(2): 1399-1410.
- [7] François A, Eterradossi N, Delmas B, et al. Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmids[J]. Journal of Virology, 2001, 75(11): 5288-5301.
- [8] Cherenova LV, Logunov DY, Shashkova EV, et al. Recombinant avian adenovirus CELO expressing the human interleukin-2: characterization *in vitro*, *in ovo* and *in vivo*[J]. Virus Research, 2004, 100(2): 257-261.
- [9] 周斌, 郑其升, 刘华雷, 等. 禽腺病毒江苏分离株的细胞培养特性[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 140-143.
- [10] 王凤龙, 郝先谱. 鸡包涵体肝炎鸡胚肝细胞包涵体特性的研究[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(8): 6-9.
- [11] Hess M, Prusas C, Monreal G. Growth analysis of adenoviruses isolated from pigeons in chicken cells and serological characterization of the isolates[J]. Avian Pathology, 1998, 27(2): 196-199.
- [12] Tan PK, Michouy AI, Bergelson JM, et al. Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral fibre proteins[J]. Journal of General Virology, 2001, 82(6): 1465-1472.
- [13] Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5[J]. Science, 1997, 275(5304): 1320-1323.
- [14] Raschperger E, Thyberg J, Pettersson S, et al. The

- coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis[J]. *Experimental Cell Research*, 2006, 312(9): 1566–1580.
- [15] Okegawa T, Li YM, Pong RC, et al. The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy[J]. *Cancer Research*, 2000, 60(18): 5031–5036.
- [16] Sachs MD, Rauen KA, Ramamurthy M, et al. Integrin α_v and coxsackie adenovirus receptor expression in clinical bladder cancer [J]. *Urology*, 2002, 60(3): 531–536.
- [17] Pong RC, Lai YJ, Chen H, et al. Epigenetic regulation of *coxsackie* and *adenovirus receptor* (CAR) gene promoter in urogenital cancer cells [J]. *Cancer Research*, 2003, 63(24): 8680–8686.

(上接 p.1093)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>