

粘虫细胞培养及苦皮藤素IV, V对其毒力的研究

李君浩¹, 祁志军¹, 陈华保², 钱 勇¹, 姬志勤¹

(1 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 四川农业大学 农学院, 四川 雅安 625014)

[摘 要] 以东方粘虫(*Mythimna separate* Walker)为材料建立了新的昆虫细胞系, 原代培养6个月后, 胚胎细胞开始传代; 用苦皮藤素IV和V处理第3代传代细胞, 24 h后细胞裂解, 出现大量细胞碎片, 培养液变浑浊, 其致死中质量浓度分别为76.42和129.34 $\mu\text{g/mL}$ 。粘虫背纵肌经胰蛋白酶部分消化后在Grace培养液中生长良好, 培养2个月后有大量肌卫星细胞出现。

[关键词] 东方粘虫; 细胞培养; 苦皮藤素; 细胞毒性

[中图分类号] Q 965

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0207-05

自德国人Richard Benedict最早进行昆虫细胞的离体培养以来, 目前已有500多株来自不同昆虫及组织的细胞系得以建立^[1-2]。我国已经建立了20多株昆虫传代细胞系, 并利用昆虫细胞杆状病毒表达系统成功表达了40多种外源蛋白^[3]。昆虫细胞培养技术作为现代实验生物学极为重要的手段之一, 已广泛应用于医学、农业以及生物学的各个领域。刘惠霞等^[4]研究表明, 新型天然产物杀虫剂苦皮藤素IV, V作用于昆虫肌系统, 中毒试虫肌细胞的质膜及内膜系统发生明显病变。但有关离体条件下苦皮藤素对昆虫细胞的相关研究尚未见报道。本研究以东方粘虫(*Mythimna separate* Walker)为材料建立了新的昆虫细胞系, 并从细胞水平研究了苦皮藤素IV和V对昆虫细胞的影响, 以为从分子水平研究苦皮藤素IV, V在细胞上的作用部位及靶标提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 供试昆虫: 东方粘虫6龄幼虫、成虫及卵, 均由陕西杨凌西北农林科技大学农药研究所提供。供试药剂: 苦皮藤素IV和V, 纯度97%以上, 由陕西杨凌西北农林科技大学农药研究所提供。培养液: Grace培养液(Gibco公司)、胰蛋白酶(Genview公司)、台盼蓝(北京鼎国生物技术发展中心Sigma公司分装)。

1.1.2 试剂 昆虫生理盐水: NaCl 6.8 g, CaCl₂

0.2 g, KCl 0.2 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.2 g, NaHCO₃ 0.15 g, 葡萄糖7.7 g, 双蒸水1 000 mL (122 MPa下水蒸气灭菌20 min), 4℃冰箱保存备用。

台盼蓝染色液: 取1 mL不完全培养基(未加血清), 加入10 μL 0.3%台盼蓝, 4℃冰箱保存备用。

1.2 细胞培养方法

1.2.1 粘虫胚胎细胞培养 参照Mitsushashi^[5]和Frerichs^[6]的方法并略有修改。取东方粘虫成虫新产的受精卵500粒, 于28℃条件下培养24 h, 用体积分数0.2% NaClO消毒30 min, 再用体积分数75%酒精浸泡8 min, 然后用昆虫生理盐水洗3次。在操作台上用昆虫生理盐水漂洗, 同时置筛网上用圆底试管轻轻磨碎, 少量培养液冲洗, 收集细胞, 加5 mL昆虫生理盐水, 900 r/min离心8 min, 弃上清液。用培养基悬浮细胞, 转培养瓶中于28℃条件下培养, 每10 d半量换液。

1.2.2 粘虫肌细胞培养 参照Marcia等^[7]和Baines等^[8]的方法并略有修改。取羽化第1天的粘虫雌成虫, 去翅与足, 用体积分数75%乙醇消毒5~10 min, 然后用毛笔去鳞毛、鳞片, 固定于蜡盘上, 解剖镜下用单面刀片去前胸背板, 暴露出中胸背纵肌(鳞翅目成虫胸部最大的一块肌肉, 由10束肌纤维组成)。在超净工作台上用刀片沿两翅基片内缘做纵向切割, 除去头、腹部及背腹肌, 即获得完整的背纵肌。用Ringer液冲洗3~5遍, 用眼科剪将肌肉束剪成1 mm × 1 mm的小块。在1 000 r/min下离心10

· [收稿日期] 2005-10-26

[基金项目] 国家“973”项目“从天然生物源小分子发现农药新作用靶标、机制及先导结构”(2002AA245121)

[作者简介] 李君浩(1978-), 男, 河南洛阳人, 在读硕士, 主要从事农药毒理学研究。E-mail: junhao072@sina.com

[通讯作者] 姬志勤(1971-), 男, 山西永济人, 讲师, 主要从事天然产物农药研究。E-mail: jizhijun@163.com

m in, 弃上清液。取质量分数0.25%胰蛋白酶3 mL加入离心管, 与组织块混匀, 加上管口塞, 消化15 m in, 向试管中加7 mL昆虫生理盐水, 在1 200 r/m in下离心8 m in, 弃上清液。加入3 mL Grace培养液到离心管, 用吸管吹打混匀后移入培养瓶中, 置27℃恒温箱中培养。

1.3 苦皮藤素IV、V对粘虫胚胎细胞的毒力测定

1.3.1 细胞接种 将处于对数生长期的粘虫胚胎细胞用新鲜培养基悬浮, 向96孔板每孔中加100 μ L细胞悬液, 在28℃培养箱中培养3 d, 使细胞处于稳定状态并贴壁。

1.3.2 细胞毒力测定 参考Decombel等^[9]的方法。分别取2 mg苦皮藤素IV、V, 先用0.1 mL二甲亚砜溶解配成20 mg/mL母液。根据初试结果, 分别设60, 70, 80, 90和100 μ g/mL苦皮藤素IV 5个处理和100, 125, 150, 175和200 μ g/mL苦皮藤素V 5个处理, 每处理重复5次。为了排除溶剂(二甲亚砜)对细胞的毒性效应, 每处理药液中补加Grace培养液使各浓度处理组中的二甲亚砜终体积浓度为1%, 并以含体积分数1%二甲亚砜的Grace培养液作为空

白对照。将药液添加到接种有胚胎细胞的96孔板中, 100 μ L/孔, 培养24 h后, 在显微镜下观察细胞中毒情况并拍照。

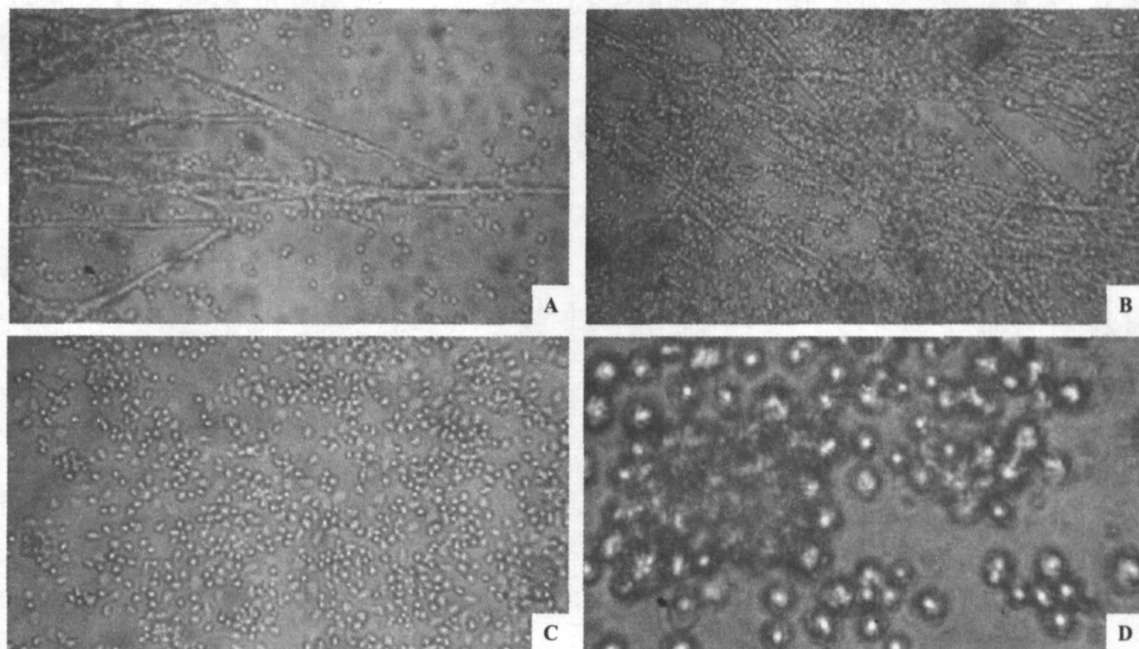
1.3.3 细胞染色 吸出培养液, 加入30 μ L质量分数0.2%胰蛋白酶在37℃消化2 m in, 待细胞变圆并即将脱壁时加入30 μ L台盼蓝染液, 充分混匀并染色10~15 m in。用移液器取少量混合液按一定比例稀释后, 在倒置显微镜下用血球计数板统计活细胞数, 计算细胞死亡率和校正防效。

$$\text{校正防效}/\% = \frac{\text{处理平均死亡率} - \text{对照平均死亡率}}{1 - \text{对照平均死亡率}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 粘虫胚胎细胞的培养结果

粘虫胚胎细胞在培养30 d左右形成贴壁的细胞纤维束(图版I-A); 约5个月后呈网络的纤维状组织布满瓶底(图版I-B), 在纤维状组织或其下方生出少量不同形状的细胞; 约6个月后呈网络的纤维状组织开始脱落, 细胞长满瓶壁(图版I-C), 并开始进行原代传代培养, 原代细胞多呈现卵圆形, 分散不均匀且贴壁生长(图版I-D)。



图版I 粘虫胚胎细胞培养结果

A. 原代培养30 d($\times 100$); B. 原代培养5个月($\times 100$); C. 原代培养6个月($\times 100$); D. 原代培养6个月放大($\times 400$)

Plate I Strain of *Mythimna separata* Walker embryo cell culture

A. 30 d after primary culture ($\times 100$); B. 5 months after primary culture ($\times 100$);

C. 6 months after primary culture ($\times 100$); D. 6 months after primary culture ($\times 400$)

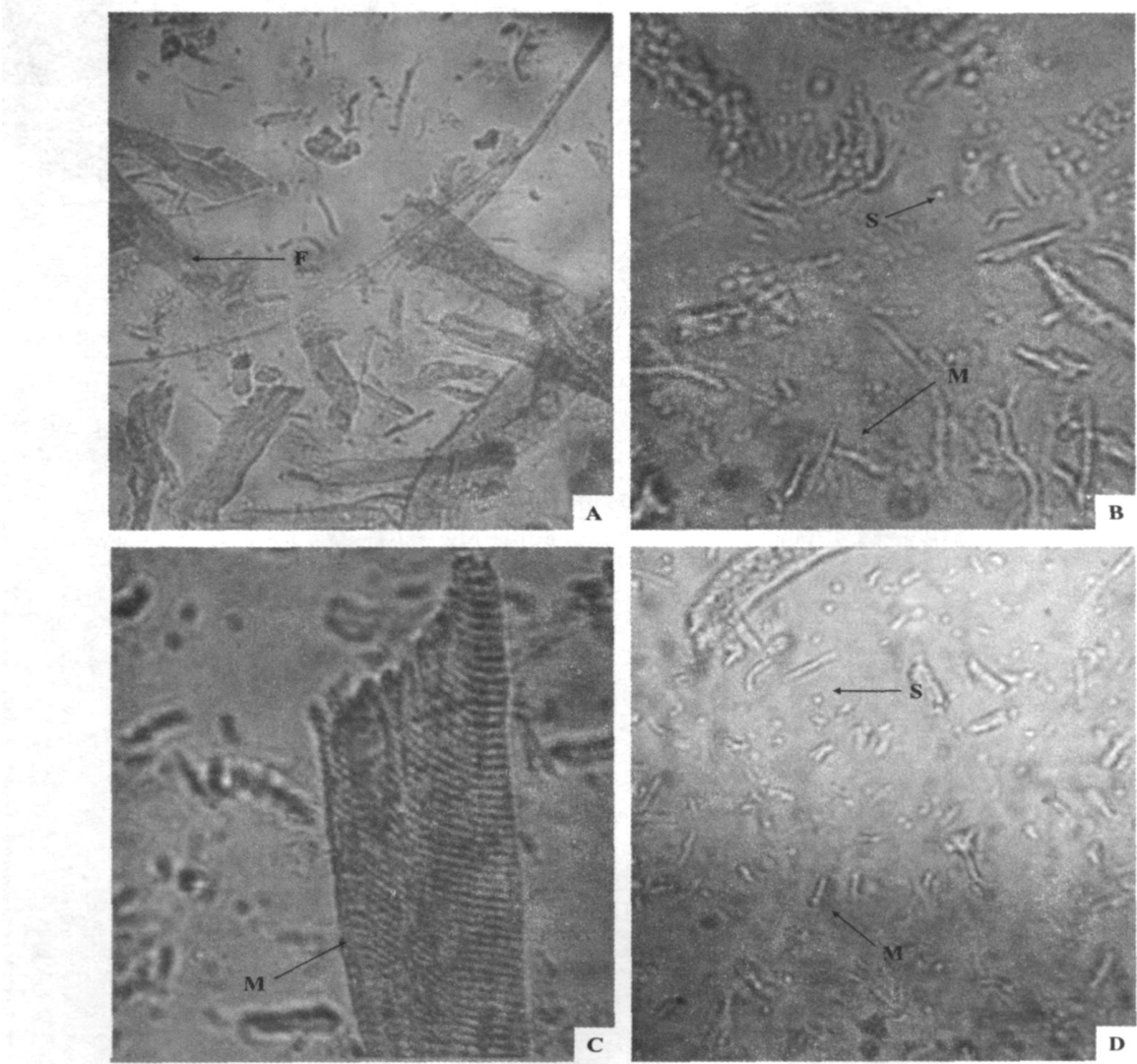
2.2 粘虫肌细胞的培养结果

粘虫肌细胞在Grace培养液中生长发育良好, 并且细胞培养的pH为弱酸性, 培养温度为27℃。原

代培养2 d后, 粘虫肌肉组织块结构变松散, 肌纤维从肌肉组织上游离出来(图版II-A); 原代培养15 d后, 大部分肌纤维解离, 成肌细胞从肌纤维上游离出

来, 有少量肌卫星细胞游离, 细胞透亮、圆形(图版 II-B); 培养 1 个月后, 成肌细胞结构清晰, 纵纹肌与横纹肌间隔排列, 同时有较多肌卫星细胞出现(图版 II-C); 培养 2 个月后, 有大量肌卫星细胞出现(图版

II-D); 3 个月后细胞开始凋亡。说明粘虫肌细胞可能会在已知条件下传代培养, 甚至可以建立新的细胞系。



图版 II 粘虫肌细胞培养结果

A. 原代培养 2 d (×50); B. 原代培养 15 d (×100); C. 原代培养 1 个月 (×640);
D. 原代培养 2 个月 (×100); E. 肌纤维; M. 成肌细胞; S. 肌卫星细胞

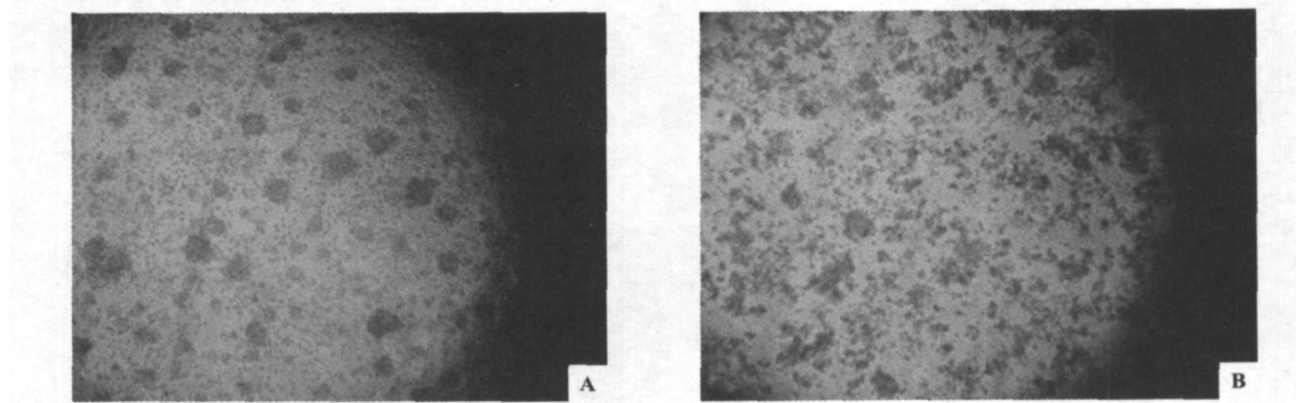
Plate II Strain of *Mythimna separate* Walker myoblast cell culture

A. 2 days after primary culture (×50); B. 15 days after primary culture (×100); C. 1 month after primary culture (×640);
D. 2 months after primary culture (×100); E. Fibre of muscle; M. Mature myoblast cell; S. Satellite cell

2 3 苦皮藤素 IV, V 对粘虫胚胎细胞毒力的测定结果

2 3 1 苦皮藤素 IV, V 对粘虫胚胎细胞形态特征的影响 对苦皮藤素 IV, V 处理 24 h 后的粘虫胚胎细

胞观察发现, 对照的胚胎细胞呈圆形、透明, 折光率良好(图版 III-A), 苦皮藤素 IV, V 处理的胚胎细胞裂解, 出现大量细胞碎片, 培养液变浑浊(图版 III-B)。



图版III 粘虫胚胎细胞形态的变化
A. 对照的胚胎细胞(×50);B. 苦皮藤素IV, V处理的胚胎细胞(×50)

PlateIII Strain of *Mythimna separate* Walker embryo cell culture
A. Symptom of CK (×50);B. Symptom of treatment Celangulin IV and V (×50)

2 3 2 苦皮藤素IV, V对粘虫胚胎细胞毒力的测定 别为76.42和129.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$, χ^2 值分别为2.08和0.81, 均小于 $P_{0.05,3} = 7.82$, 表明回归方程可代表质量浓度-效应间的相关性。

结果 从表1, 2可以看出, 苦皮藤素IV和V对粘虫胚胎细胞有较强的毒杀活性, 其致死中质量浓度分

表1 苦皮藤素IV, V对粘虫胚胎细胞的毒性

Table 1 Cytotoxicity assay of Celangulin IV and V against the *Mythimna separate* Walker embryo cell

药剂 Insecticide	质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration	活细胞数/($\times 10^4 \text{mL}^{-1}$) Living cell number		死亡率/% Mortality	校正防效/% Corrected efficacy
		处理前 Before treatment	处理后 After treatment		
苦皮藤素IV Celangulin IV	CK	40.3	38.6	4.2	-
	60		31.6	21.6	18.2
	70		25.1	37.7	35.0
	80		20.0	50.4	48.2
	90		13.3	67.0	65.6
	100		4.7	88.3	87.8
苦皮藤素V Celangulin V	CK	25.2	24.3	3.6	-
	100		19.2	23.8	21.0
	125		12.2	51.6	49.8
	150		10.4	58.7	57.2
	175		5.0	80.2	79.5
	200		2.9	88.5	88.1

表2 苦皮藤素IV和V对粘虫胚胎细胞毒性的回归方程和LC₅₀

Table 2 Toxicity regression equation and LC₅₀ of Celangulin IV and V against the *Mythimna separate* Walker embryo cell

药剂 Insecticide	回归方程 Regression equation	LC ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration	r	95% 置信限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 95% confidence
苦皮藤素IV Celangulin IV	$y = -10.8173 + 8.3991x$	76.42	0.9770	72.543~80.505
苦皮藤素V Celangulin V	$y = -8.0354 + 6.1728x$	129.34	0.9883	116.973~143.012

注: y 为细胞死亡率; x 为苦皮藤素IV, V质量浓度。
Note: y is cell mortality; x is concentration of celangulin IV, V.

3 讨 论

(1) 以往的研究^[10]认为, 昆虫细胞如上皮细胞(皮细胞、肠壁细胞)、卵细胞、精细胞等均可以进行原代培养和传代, 而关于肌细胞的传代培养或细胞

系的建立尚未见报道。本研究将粘虫雌成虫的中胸背纵肌经过胰蛋白酶部分消化后, 在Grace培养液中进行原代培养, 可以观察到粘虫成肌细胞生长良好, 肌卫星细胞可以进行分离、生长和分裂, 但培养3个月后细胞出现调亡现象, 说明Grace培养液对于

肌细胞的原代培养是可行的,但是肌细胞能否进行传代培养并建立细胞系,还需要进一步研究。

(2)一般情况下细胞在传至20代以后才建立稳定的细胞系。本研究采用第3代细胞,细胞稍有聚集生长现象,这对药物的渗透和作用均有一定影响。因此,生物测定结果会有一些偏差,这还有待于进一步完善。

(3)在统计细胞死亡率时,常规方法是计算视野中死细胞占总细胞的比例,本研究中苦皮藤素IV, V处理粘虫胚胎细胞后,细胞裂解成碎片,无法统计每个孔的死细胞数和细胞总数,而采用处理组活细胞数占对照组细胞总数的百分比来代替处理组的细胞死亡率,由于每个孔中细胞的原始数量和增殖能力存在差异,因此对本研究结果也有一定的影响。

[参考文献]

- [1] 李文青,肖成祖 昆虫细胞的大规模培养[J]. 生物技术, 1995, 5(1): 5-8
- [2] 洪华珠,彭建新 一株高水平表达重组蛋白昆虫细胞系的建立[J]. 昆虫学报, 2001, 44(3): 276-279
- [3] 张传溪 昆虫分子科学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 271-276
- [4] 刘惠霞,杨从军 苦皮藤素V对东方粘虫肌细胞的影响[J]. 昆虫学报, 2003, 46(4): 417-423
- [5] Mitsuhashi J. A continuous cell line from the cupreous, *Anomala cuprea* Hope (insecta, coleoptera, scarabaeidae) [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2003, 39: 399-401.
- [6] Frerichs G N. *In vitro* culture of embryonic cells from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Aquaculture*, 1996, 143: 227-232
- [7] Marcia J L, Hakim S R. Insect Midgut Epithelium. *In vitro* an insect stem cell system [J]. *Insect Physiology*, 1996, 42(11-12): 1103-1111.
- [8] Baines D, Brownwright A, Schwartz J L, et al. Establishment of primary and continuous cultures of epithelial cells from larval lepidopteran midguts [J]. *Insect Physiology*, 1994, 40(4): 347-357.
- [9] Decombel L, Smacche G, Tirry L, et al. Action of major insecticide groups on insect cell lines of the beetle *Mythimna separata*, compared with larvicidal toxicity [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2004, 40: 43-51.
- [10] 李异丹,程罗根,张晓飞 鳞翅目昆虫细胞株的建立与应用[J]. 植物保护, 2001, 27(4): 38-40

The cell culture of *Mythimna separata* and cytotoxicity assay of Celangulin IV and V against the cell

LI Jun-hao¹, QI Zhi-jun¹, CHEN Hua-bao², QIAN Yong¹, JI Zhi-qin¹

(1 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: After 6 months' primary culture, *Mythimna separata* Walker embryo cell began continuous culture, and the 3rd generation of continuous culture cells was treated by Celangulin IV and Celangulin V. The result showed that lysated after 24 hours, the medium became haze, and the value of LC_{50} were 76.42 and 129.34 $\mu\text{g/mL}$ respectively. In addition, Primary cultures were done in Grace medium after the middle dorsal vertical muscles from female adult *Mythimna separata* Walker was partly digested by enzyme, and the growth of Myoblast cells cultured was better and clear; after 2 months' culture, large number of satellite cells appeared.

Key words: *Mythimna separata* Walker; cell culture; Celangulin; cytotoxicity