

High Five 昆虫细胞系的致瘤性研究

汪伟, 周俊明, 王小敏, 何孔旺*, 温立斌, 倪艳秀

(江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,
国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014)

【摘要】 目的 检测 High Five 昆虫细胞系对 BALB/c 裸鼠致瘤性情况, 以确保其作为疫苗生产细胞株的安全性。
方法 将裸鼠随机分为 5 组, 分别为 High Five 基础细胞库细胞试验组、High Five 最高限制代次细胞试验组、HEp-2 细胞阳性对照组、CEF 细胞阴性对照组和不作任何处理的空白对照组, 用细胞悬液背部皮下接种裸鼠。3 周和 12 周后对裸鼠解剖及病理组织学检查, 其是否有肿瘤形成。
结果 阳性对照 HEp-2 细胞组裸鼠接种后 3 周注射部位形成结节, 病理组织学检查为鳞状细胞癌; 阴性对照 CEF 细胞组和 High Five 细胞组均无结节形成, 接种后 12 周经解剖用病理组织学检查, 均无肿瘤形成。
结论 基础代次和最高限制代次 High Five 细胞均不具有致瘤性, 可安全地应用于疫苗生产。

【关键词】 致瘤性; 裸鼠; High Five 细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 02-0186-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.02.013

Tumorigenicity of High Five insect cell line

WANG Wei, ZHOU Jun-ming, WANG Xiao-min, HE Kong-wang*, WEN Li-bin, NI Yan-xiu

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Ministry of Agriculture; National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-Products, Nanjing 210014, China)

【Abstract】 Objective To observe the tumorigenicity of High Five insect cell line in Balb/c nude mice, and make sure the safety of the cells when used in vaccine production. **Methods** Balb/c nude mice were randomly divided into 5 groups: the basic cell bank of High Five group, the highest limited passages of High Five group, HEp-2 cell group as positive control, CEF cell group as negative control, and blank control. Except of the blank control, cell suspension was injected subcutaneously into the nude mice in the different groups, respectively. At 3 and 12 weeks after injection, anatomical observation and histopathologic examination were performed to detect the tumor formation. **Results** At 3 and 12 weeks after injection, the tumorigenicity study results showed that no tumor developed at the transplantation site in the blank control group, negative group, and High Five groups. Histopathological examinations also showed no abnormality in these groups. Otherwise, squamous cell carcinoma was developed in the positive group at 3 weeks after injection. **Conclusions** High Five cells of basic cell bank and highest limited passages are not tumorigenic, and can be used in vaccine production safely.

【Key words】 Tumorigenicity; Nude mice; High Five cell line

Corresponding author: HE Kong-wang, E-mail: kwh2003@263.net

High Five 细胞系(BTI-Tn5B1-4)是从亲代粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)胚胎细胞系分离得到的克隆, 由博伊斯·汤普森植物研究所(Boyce Thompson Institute for Plant Research, BTI)构建, 通常用于使用杆状病毒表达载体系统(BEVS)的重组蛋白表

达^[1-3]。该细胞系具有以下 4 个特性: ①细胞数目倍增时间少于 24 h; ②贴壁生长良好, 但能形成无规则单层细胞, 使得确定蚀斑更加困难; ③能够悬浮培养于无血清培养基中; ④比在 S9 细胞中蛋白表达量要高 5~10 倍^[4]。

【基金项目】 国家公益性行业(农业)科研专项(201303046-10-3); 江苏省自主创新基金[CX(14)2045/ZX(15)1003]。

【作者简介】 汪伟(1988-), 男, 助理研究员, 硕士, 主要从事兽用生物制品研究。E-mail: weiwang054@126.com

【通讯作者】 何孔旺, E-mail: kwh2003@263.net

目前昆虫细胞 S9 已经应用于工业化生产猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 基因工程亚单位疫苗^[5,6], 取得良好的经济、社会效益^[7,8]。若使用 High Five 细胞代替 S9/21 细胞系表达重组蛋白, 提高蛋白产量, 降低生产成本, 进一步降低疫苗的市场价格, 提高猪场疫苗的使用率, 使更多猪群得到高质量疫苗的免疫保护。为确保 High Five 细胞作为疫苗生产的细胞株时的安全性, 需对其致癌性进行检测^[9]。

细胞的致癌性检测一般采用动物体内接种法, 可以根据细胞的特性及动物的敏感性选择动物的种类, 农业部及 WHO 建议可以采用裸鼠 (无胸腺小鼠) 或经抗胸腺抗体处理过的新生小鼠, 以一定的细胞量进行体内接种^[10,11], 检测细胞的致癌性。

本研究将不同细胞代次的 High Five 细胞进行体内裸鼠致癌性研究, 旨在说明 High Five 细胞对裸鼠的致癌性影响, 从而为 High Five 细胞作为疫苗生产细胞株的安全性提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠 50 只, 每只 20 g 左右, 购自上海灵畅生物科技有限公司【SCXK (沪) 2013-0018】。自购买之日起, 一直放置于江苏省农业科学院实验动物中心屏障系统【SYXK (苏) 2015-0020】的隔离器中, 同时严格按照裸鼠饲养要求进行饲养。饮用水均为高压灭菌纯净水, 小鼠饲料及垫料均为辐照灭菌产品。

1.2 细胞

High Five 原始细胞购自上海 Invitrogen 公司, 培养基为 Gibco® 公司 Express Five® SFM 培养基, 按照细胞说明书培养、扩大、冻存。致癌性试验使用细胞: (1) High Five 基础细胞库细胞, 为 High Five 原始细胞扩增 20 代, 本实验室液氮保存; (2) High Five 最高限制代次细胞, 为 High Five 原始细胞扩增第 60 代, 本实验室液氮保存; (3) 人喉癌细胞 (HEp-2 细胞) 第 20 代, 购自中国科学院细胞库, 原始细胞扩增 20 代, 本实验室液氮保存; (4) 鸡胚成纤维细胞 (CEF 细胞), 使用 SPF 鸡胚, 微生物等级 1 级, 本实验室自行分离, 为原代细胞。

1.3 实验分组与细胞接种

将 50 只裸鼠随机分为 5 组, 分别为 High Five 基础细胞库细胞试验组、High Five 最高限制代次细胞试验组、HEp-2 细胞阳性对照组、CEF 细胞阴性对照组和不作任何处理的空白对照组, 每组 10 只。实验组裸鼠每只背部皮下注射 $1 \times 10^7/0.2$ mL 基础细

胞库、最高限制代次 High Five 细胞悬液, 阳性对照组裸鼠每只背部皮下注射 $1 \times 10^6/0.2$ mL HEp-2 细胞悬液, 阴性对照组裸鼠每只背部皮下注射 $1 \times 10^6/0.2$ mL CEF 细胞悬液, 空白对照组裸鼠每只背部皮下注射生理盐水 0.2 mL。

1.4 观察指标、时间及判定方法

逐日观察 2 周, 检查有无结节或肿瘤形成。如有结节或可疑病灶, 应在观察至少 1~2 周后剖检, 取病变部位组织, 4% 多聚甲醛固定液固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜下做病理组织学检查。对未发现结节的动物, 对其中的一半动物观察 3 周后剖检, 对另外一半动物观察 12 周后剖检, 对接种部位进行解剖和病理学检查, 观察各个淋巴结和器官中是否形成结节, 如有怀疑, 应进行病理组织学检查。不应有移植瘤形成。

2 结果

2.1 外部观察、解剖和病理学检查

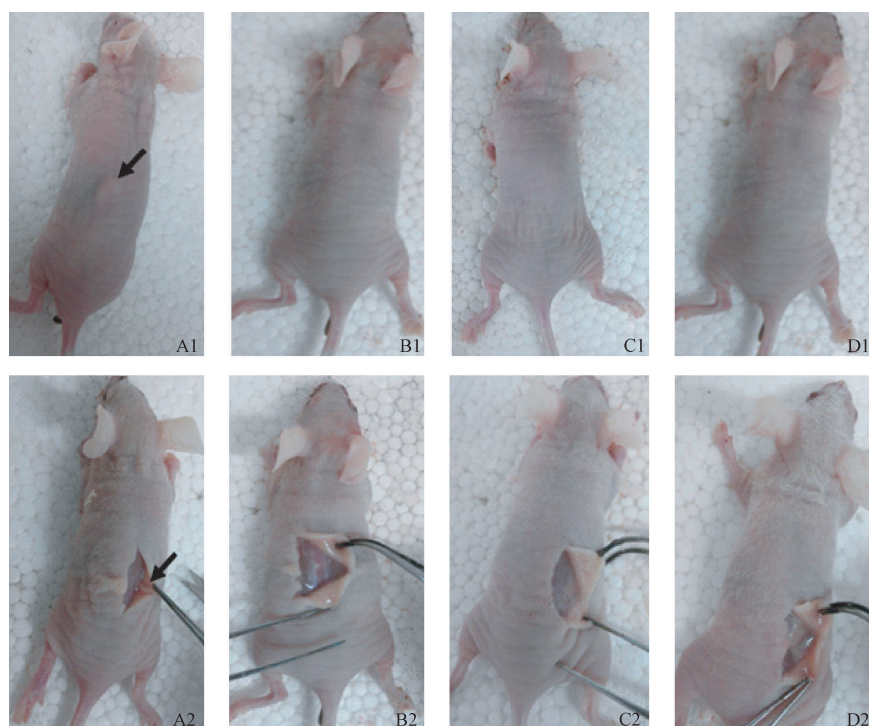
试验期间, 各组动物均存活。接种后 2 周, 阳性对照 HEp-2 细胞组裸鼠, 外部观察注射部位有结节 (肿块) 形成, 至 3 周, 结节变得稍大 (图 1-A1), 进行剖解, 发现注射部位有结节 (图 1-A2), 其他部位未见结节形成; 而阴性对照 CEF 细胞组、High Five 基础细胞库细胞组、High Five 最高限制代次细胞组外部观察、剖解, 注射部位未见有结节形成。

在接种后 12 周, 阴性对照 CEF 细胞组 (图 1-B1 与 B2)、High Five 基础细胞库细胞组 (图 1-C1 与 C2) 和 High Five 最高限制代次细胞组 (图 1-D1 与 D2) 裸鼠, 外部观察、注射部位未见有结节形成; 解剖后, 注射部位未见有结节, 各淋巴结、各内脏器官正常, 未见有结节形成。

2.2 病理组织学检查

阳性对照 HEp-2 细胞组裸鼠, 在接种细胞 3 周后, 进行剖解, 发现注射部位有米粒大小的结节, 取注射部位病变组织, 病理组织学检查显示, 病变部位组织灶内细胞巢状和 (或) 腺样排列, 细胞分裂像多见, 偶可见瘤巨细胞, 灶中大片细胞溶解性坏死, 为鳞状细胞癌 (图 2-A1 与 A2), 阳性对照组接种肿瘤形成率为 100%。

在接种 12 周后, 阴性对照 CEF 细胞组、High Five 基础细胞库细胞组、High Five 最高限制代次细胞组外部观察、剖解, 注射部位未见有结节形成; 各淋巴结、各内脏器官正常, 未见有结节形成。随机选取 High Five 细胞试验组和 CEF 细胞阴性对照组的肾、脾做病理组织学检查, 未发现肿瘤细胞 (图 2-



注: A1/A2: 阳性对照 HEp-2 细胞组; B1/B2: 阴性对照 CEF 细胞组; C1/C2: High Five 基础细胞库细胞组; D1/D2: High Five 最高限制代次细胞组。

图 1 裸鼠大体解剖学检查

Note. A1/A2: Positive control (HEp-2 cell group); B1/B2: Negative control (CEF cell group); C1/C2: High Five cell group of basic cell bank; D1/D2: High Five cell group of the highest limited passages.

Fig. 1 The gross anatomy examination of the nude mice

B1、B2、C1、C2)。

3 讨论

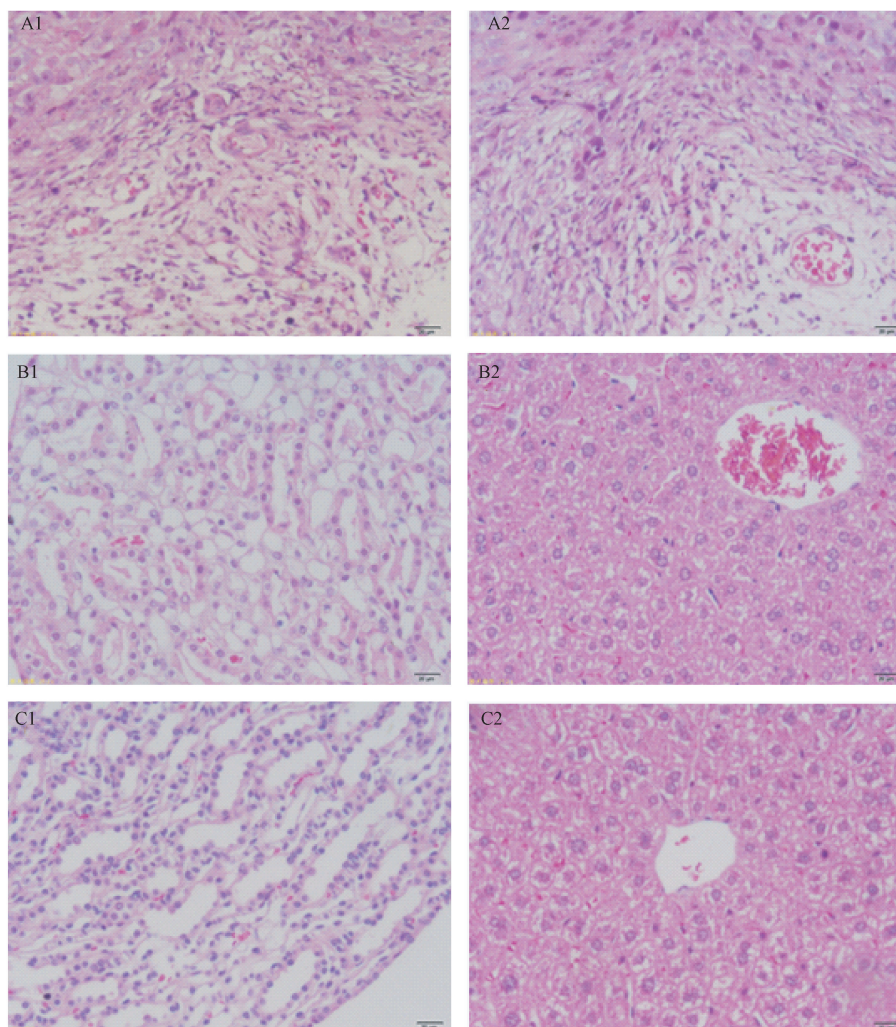
自 1969 年 Rygaard 和 Povlsen 首次将人结肠癌移植于裸鼠并获得成功以来,裸鼠在肿瘤学、免疫学、药品及生物制品的安全性评价领域占据愈来愈重要的地位。鉴于裸鼠先天性胸腺缺失,胸腺依赖性免疫功能缺乏,或 T 淋巴细胞功能基本缺乏,故异种移植时不产生排斥反应^[12,13]。裸鼠皮下接种可致瘤(或癌)性细胞系的细胞悬液,在特定环境、特定时间可生长成实体瘤,能够保持原发瘤的组织学形态、免疫学特点及其特有的染色体组型^[14],是一种较好的动物模型,并广泛应用于动物疫苗研发中。而 High Five 细胞作为一种应用于杆状病毒表达载体系统(BEVS)的表达重组蛋白的细胞株^[15,16],必将在疫苗及其他生物制品生产中发挥越来越重要的作用,评价其安全性,具有重要的意义。

本研究将 High Five 基础细胞库及最高限制代次细胞分别移植在 BALB/c 裸鼠皮下,移植 3 周后无结节形成,经 12 周后病理组织学检查无异常。而阳性对照 HEp-2 细胞注射部位出现结节,病理组织学检查确定为鳞状细胞瘤;同时阴性对照 CEF 细胞

组与 High Five 试验组相似,无肿瘤形成。以上数据证明,High Five 细胞在基础代次和限制最高代次内均对裸鼠不具有致瘤性,具有良好的安全性,可作为疫苗生产的细胞株。

参 考 文 献

- [1] Wickham TJ, Davis T, Granados RR, et al. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system [J]. Biotechnol Prog., 1992, 8 (5): 391-396.
- [2] Granados RR, Li GX, Derksen ACG, et al. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus [J]. J Invertebr Pathol, 1994, 64, 260-266.
- [3] Wickham TJ, Nemerow GR. Optimization of growth methods and recombinant protein production in BTI Tn-5B1-4 insect cells using the baculovirus expression vector [J]. Biotechnol Prog, 1993, 9, 25-30.
- [4] Davis TR, Trotter KM, Granados RR, et al. Baculovirus expression of alkaline phosphatase as a reporter gene for evaluation of production, glycosylation, and secretion [J]. Bio/Technology, 1992, 10: 1148-1150.
- [5] Beach NM, Meng XJ. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2) [J]. Virus Res. 2012, 164(1-2): 33-42.



注: A1/A2: 阳性对照 HEp-2 细胞组注射部位病变组织出现鳞状细胞癌; B1/B2: High Five 细胞组; C1/C2: 阴性对照 CEF 细胞组。

图 2 裸鼠注射部位及脏器病理组织学检查 (×400)

Note. A1/A2: Squamous cell carcinoma was found in the diseased tissue at the injection site in positive controls (HEp-2 cell group);

B1/B2: High Five cell group; C1/C2: Negative control (CEF cell group).

Fig. 2 Histopathological examination of tissues at the injection site and viscera of the nude mice

- [6] Oh Y, Seo HW, Park C, et al. Comparison of sow and/or piglet vaccination of 3 commercial porcine circovirus type 2 (PCV2) single-dose vaccines on pigs under experimental PCV2 challenge [J]. Vet Microbiol, 172 (2014): 371–380.
- [7] 王一平, 郭龙军, 唐青海, 等. 猪圆环病毒 2 型疫苗的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(9): 1337–1345.
- [8] 周波, 苏小齐, 张永红, 等. 国内外商品化猪圆环病毒 2 型疫苗分类及特点 [J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(10): 62–65.
- [9] 兽用生物制品生产用细胞系试验研究指导原则 [M]. 中华人民共和国农业部公告第 683 号: 31.
- [10] WHO Technical Report Series. Annex 1: Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals [R]. 1998: 878.
- [11] FDA. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals [S]. 1993.
- [12] Hua JL, Qiu BP, Zhu HJ, et al. Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord: Potential differentiation of germ cells [J]. Afric J Biochem Res. 2011; 5(4): 113–123.
- [13] 聂德志, 宛莹, 贲亮, 等. Balb/c 裸鼠体内的干细胞致瘤实验 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(6): 888–893.
- [14] 李六金, 李秦, 施新猷, 等. 五种动物传代细胞系对裸鼠的致瘤性 [J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): 738–740.
- [15] Shan M, Zhang SY, Jiang L, et al. Susceptibility to AcMNPV and expression of recombinant proteins by a novel cell clone derived from a Trichoplusia ni QAU-BTI-Tn9-4s cell line [J]. Vir-ol Sin, 2011, 26(5): 297–305.
- [16] 孔夏瑜, 李杰, 武坚锐, 等. 重组人凝血因子 VIII 在昆虫表达系统的分泌表达及鉴定 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(7): 18–20.

[收稿日期] 2016–06–21