

胡 波,王 芳,范志宇,等. Sf9 昆虫细胞系的致瘤性研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(18):209-211.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.18.045

Sf9 昆虫细胞系的致瘤性研究

胡 波^{1,2}, 王 芳², 范志宇^{1,2}, 宋艳华², 魏后军², 薛家宾², 姜 平¹

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095;

2. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业农村部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210014)

摘要:为确定 Sf9 昆虫细胞系作为疫苗生产细胞株的安全性,检测了 Sf9 细胞对裸鼠的致瘤性。将 3 周龄 SPF 级雌性裸鼠随机分为 5 组,分别为 Sf9 基础细胞库细胞组、Sf9 最高限制代次细胞组、阳性对照 Hep-2 细胞组、阴性对照 CEF 细胞组和空白对照组,以各自细胞悬液皮下接种裸鼠。在接种后 21 d 和 84 d 观察接种部位肿瘤形成情况,并进行病理组织学检查。结果显示,接种后 21 d,Hep-2 细胞组裸鼠注射部位形成米粒大小结节,经病理组织学检查为鳞状细胞癌,而 CEF 细胞组和 Sf9 细胞组注射部位均无结节。接种后 84 d,经病理组织学检查,CEF 细胞组和 Sf9 细胞组均无肿瘤形成。本研究表明基础代次和最高限制代次 Sf9 细胞均不具有致瘤性,Sf9 细胞可用于疫苗生产。

关键词:Sf9 细胞;致瘤性;裸鼠;疫苗;安全性

中图分类号:S852.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)18-0209-03

昆虫细胞-杆状病毒表达系统(BEVS)属于真核细胞表达系统,广泛用于制备重组蛋白和病毒样颗粒以进行基础生命科学和生物医药领域研究,据报道已成功用于数百种外源蛋白的表达^[1]。目前,该系统研究较多的是苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒(AcNPV),其宿主是草地贪夜蛾卵巢细胞(Sf9 细胞)。

利用 BEVS 系统可实现在 Sf9 细胞中高水平表达外源蛋白,所表达的外源蛋白几乎均为可溶性蛋白,其生物学活性接近天然来源的分离物,因此可利用 BEVS 生产各种动物疾病的免疫疫苗或治疗药物。目前,国内动物疫苗研究中,已有猪流行性腹泻病毒^[2]、伪狂犬病病毒^[3]、猪圆环病毒^[4-5]、禽流感病毒^[6]、新城疫病毒^[7-8]、兔出血症病毒^[9]等数十种动物病毒的抗原蛋白在 Sf9 细胞中表达。据我国兽用生物制品相关规定,作为动物疫苗生产的 Sf9 细胞株,需对该细胞进行致瘤性检验以确保疫苗的安全性^[10]。本研究取不同代次的 Sf9 昆虫细胞,采用裸鼠体内接种法检测其致瘤性,为 Sf9 昆虫细胞作为疫苗生产细胞株的安全性提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与培养基

Sf9 昆虫细胞来源于美国典型培养物保藏中心(ATCC),由笔者所在实验室传代并保存;Hep-2 细胞购自中国科学院细胞库;CEF 原代细胞由笔者所在实验室分离培养;Sf-900™ II SFM 培养基和 DMEM 培养基,购自 Gibco 公司。

收稿日期:2018-06-15

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-43-C-1)。

作者简介:胡 波(1982—),男,江苏南京人,博士,副研究员,主要从事畜禽疫病防控与兽医生物技术研究。Tel:(025)84390337;E-mail:hubolshg@163.com。

通信作者:姜 平,博士,教授,主要从事动物传染病学研究。Tel:(025)84396640;E-mail:jiangp@njau.edu.cn。

1.2 实验动物

3 周龄 SPF 雌性裸鼠购自南京大学模式动物研究所,饲养于实验动物中心屏障系统隔离器中严格无菌饲养。

1.3 细胞传代及细胞库的建立

将笔者所在实验室保存的 Sf9 细胞作为原始种子 1 代,按细胞传代方法以“1 传 3,2 d 传 1 代”方式,于 27~28℃ 培养箱中连续传代培养至 60 代,建立 Sf9 细胞原始细胞库(第 5 代)、基础细胞库(第 10 代)、工作细胞库(第 15 代),并规定最高限制代次细胞为 60 代。

1.4 细胞接种

将 3 周龄 SPF 级雌性裸鼠 50 只随机分为 5 组,分别设为 Sf9 基础细胞库细胞组、Sf9 最高限制代次细胞组、阳性对照 Hep-2 细胞组、阴性对照 CEF 细胞组和不作任何处理的空白对照组,每组 10 只。基础细胞库细胞组裸鼠每只皮下注射 1×10^7 个/0.2 mL 第 10 代 Sf9 细胞悬液,最高限制代次细胞组裸鼠每只皮下注射 1×10^7 个/0.2 mL 第 60 代 Sf9 细胞悬液,阳性对照组裸鼠每只皮下注射 1×10^6 个/0.2 mL Hep-2 细胞悬液,阴性对照组裸鼠每只皮下注射 1×10^6 个/0.2 mL CEF 细胞悬液。

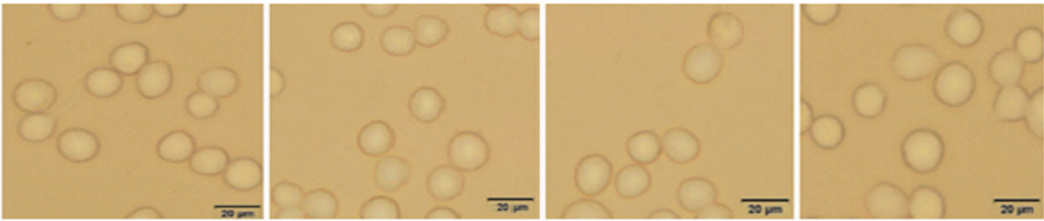
1.5 肿瘤观察及判定

各细胞试验组连续观察 14 d,检查接种部位皮下是否有肿瘤形成。如有结节或可疑病灶,继续观察 7 d,取病变部位组织,采用 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,普通光学显微镜下进行病理组织学检查。未发现结节裸鼠,分别于注射后 21 d 和 84 d,各取一半裸鼠脱颈椎处死,对接种部位进行解剖检查,观察各淋巴结和各器官中有无结节形成,如果可疑进行病理组织学检查。

2 结果与分析

2.1 Sf9 细胞显微镜观察

对第 5、10、15、60 代 Sf9 细胞进行显微镜观察拍照,由图 1 可知,各代次细胞的形态较为一致,呈圆形、晶莹透亮、大小



A. 第 5 代细胞 B. 第 10 代细胞 C. 第 15 代细胞 D. 第 60 代细胞

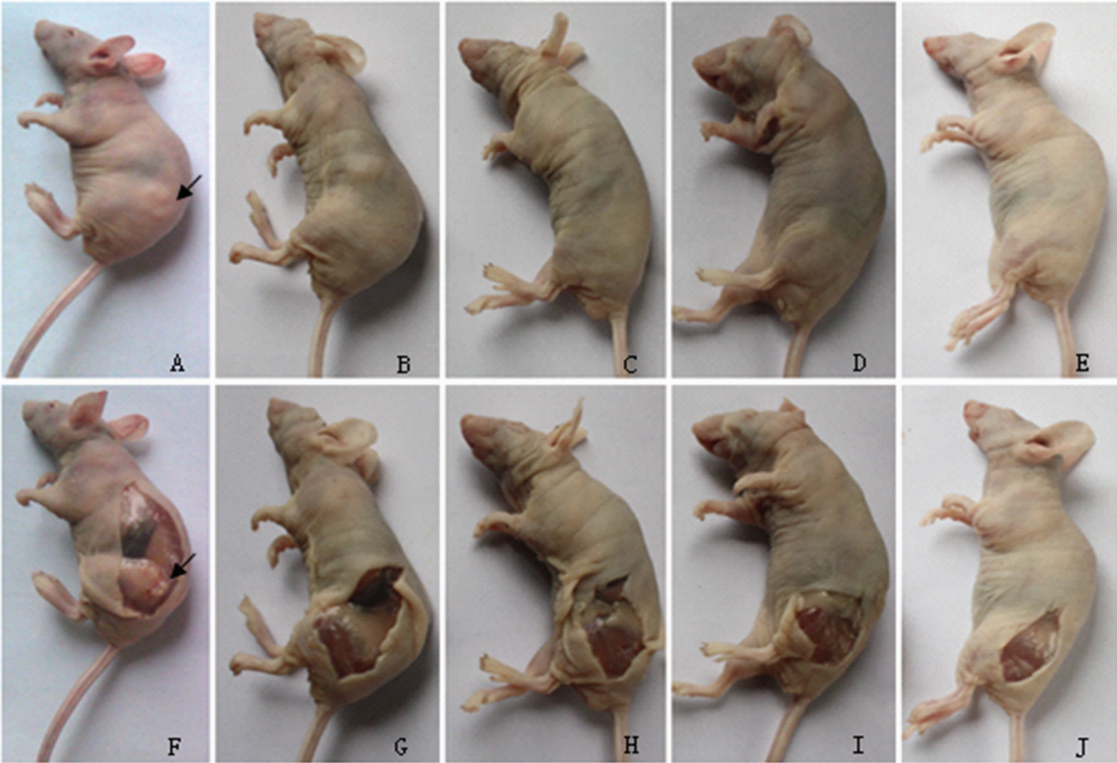
图1 Sf9 各传代细胞显微镜观察

均一,直径约为 15 μm。

2.2 裸鼠外部及解剖观察

各代次细胞接种裸鼠后,在试验观察期内各组动物均健康存活。在接种后 14 d,阳性对照 Hep-2 细胞组裸鼠经外部观察,发现注射部位有粟米大小的结节(肿块)形成,至 21 d 结节变大(图 2-A),经解剖发现注射部位有米粒大结节(图 2-F),各淋巴结、器官均正常,未见结节形成;而阴性

对照(CEF 细胞组、Sf9 基础细胞库细胞组和 Sf9 最高限制代次细胞组)注射部位未见有结节形成;在接种后 84 d,与空白对照组(图 2-E、图 2-J)和阴性对照 CEF 细胞组(图 2-B、图 2-G)相比,Sf9 基础细胞库细胞组(图 2-C、图 2-H)和 Sf9 最高限制代次细胞组裸鼠(图 2-D、图 2-I)经外部观察,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。



A、F—阳性对照 Hep-2 细胞组裸鼠; B、G—阴性对照 CEF 细胞组裸鼠; C、H—Sf9 基础细胞库细胞组裸鼠; D、I—Sf9 最高限制代次细胞组裸鼠; E、J—空白对照组裸鼠

图2 Sf9 细胞系致癌性观察

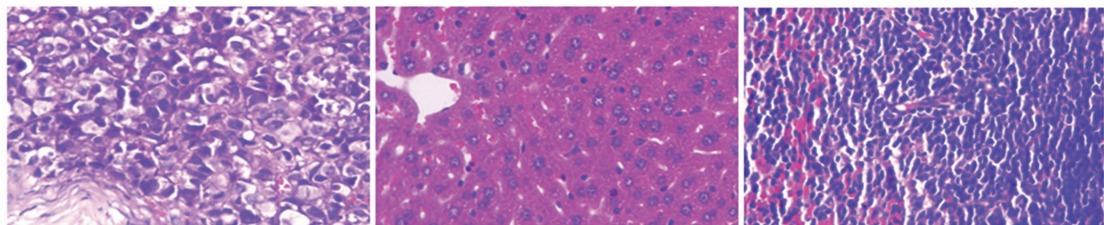
2.3 病理组织学检查

阳性对照 Hep-2 细胞组裸鼠,在接种细胞 21 d 后进行解剖,发现注射部位有米粒大结节。取注射部位病变组织,采用 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色,普通光学显微镜下做病理组织学检查。结果显示,病变部位组织内为鳞状细胞癌(图 3-A),阳性对照组接种肿瘤形成率为 100%;在接种后 84 d,与空白对照组和阴性对照 CEF 细胞组相比,Sf9 基础细胞库细胞组和 Sf9 最高限制代次细胞组经解剖后,注射部位未见有结节,各淋巴结、各内脏器官均正常,未见有结节形成,随机选取 Sf9 基础细胞库细胞组和 Sf9 最高限制代

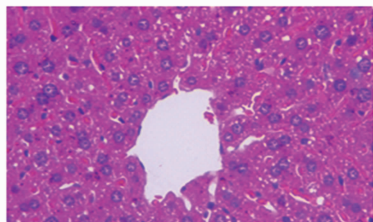
次细胞组裸鼠肝脏、脾脏做病理组织学检查,未发现有瘤细胞(图 3-B、图 3-C 和图 3-D、图 3-E)。

3 讨论与结论

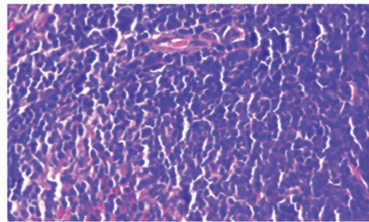
鉴于昆虫细胞-杆状病毒表达系统(BEVS)可获得大量免疫原性好、与天然蛋白功能相似的可溶性重组蛋白,已被用于蛋白质表达、疫苗生产和病毒制备等各方面^[11]。重组杆状病毒感染 Sf9 昆虫细胞后可对外源蛋白进行许多真核细胞的转录后加工作用,包括蛋白质折叠及糖基化、磷酸化、酰基化等。同时,相比于哺乳动物细胞,Sf9 细胞为半贴壁细胞,可在



A. Hep-2 细胞组注射部位肿瘤样品 B. Sf9 基础细胞库细胞试验组肝脏样品 C. Sf9 基础细胞库细胞试验组脾脏样品



D. Sf9 最高限制代次细胞试验组肝脏样品



E. Sf9 最高限制代次细胞试验组脾脏样品

图3 Sf9 细胞系致瘤性检测

不需要对细胞进行驯化和改造的情况下直接在培养基中进行悬浮培养,这为大规模高密度培养昆虫细胞创造了必要条件,因而其作为外源蛋白的表达细胞具有较明显优势。

BEVS 作为疫苗生产用表达系统已进行了广泛研究并取得了大量成果。人用疫苗研究方面,GSK 公司应用 BEVS 系统研制的 HPV16/18 双价疫苗,已于 2007 年获得批准上市^[12-13],另有多项采用该表达系统的人类亚单位疫苗进入Ⅱ期和Ⅲ期临床研究阶段,如流感疫苗^[14-15]、戊肝疫苗^[16]、糖尿病疫苗^[17]等。动物疫苗研究方面,Sf9 昆虫细胞已用于猪圆环病毒 2 型(PCV2)基因工程亚单位疫苗的商品化制备^[18],取得了良好的经济效益。Sf9 细胞作为 BEVS 系统常用的细胞株,必将在亚单位疫苗研发及产品制备中发挥重要作用,其安全性评价具有重要意义。

本研究根据兽用生物制品生产用细胞系试验研究指导原则和中国兽药典的要求,将不同代次 Sf9 细胞接种于裸鼠皮下,结果显示细胞接种后直至 84 d 均无结节形成,病理组织学检测无异常,表明 Sf9 细胞对裸鼠不具有致瘤性,安全性良好,可用于疫苗生产。

参考文献:

- [1] Miller L K. Baculoviruses; high - level expression in insect cells[J]. Current Opinion in Genetics & Development, 1993, 3(1): 97 - 101.
- [2] 杨德强, 李慧春, 陈鹏飞, 等. 猪流行性腹泻病毒 SI 基因在昆虫细胞中的表达与鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(3): 18 - 22.
- [3] 周金龙, 王同燕, 颜世君, 等. 伪狂犬病病毒 gE 基因在昆虫细胞中的表达[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(2): 180 - 184.
- [4] 黄娟, 袁飞, 韩先杰, 等. 猪圆环病毒 2 d 亚型衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(9): 1346 - 1353.
- [5] 张永武, 连海, 张锦霞, 等. 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组杆状病毒的构建及鉴定[J]. 动物医学进展, 2016, 37(3): 14 - 18.
- [6] 王盛, 谢芝勋, 罗思思, 等. H5N1 亚型禽流感病毒 HA 基因在 Sf9 细胞中的表达[J]. 中国兽医科学, 2017, 47(10): 1281 - 1286.
- [7] 王安平, 朱善元, 王永娟, 等. 鸭源新城疫病毒 NP 基因在昆虫细胞中的表达及抗原性检测[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1384 - 1388.
- [8] 张磊. NDV7793 - HN 蛋白在 Sf9 细胞中的表达[D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [9] 王芳, 胡波, 任雪枫, 等. 兔出血症病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及对家兔的免疫保护效果[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(10): 1382 - 1387.
- [10] 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.
- [11] 万婧, 相兴伟, 江玲丽, 等. 杆状病毒 - 昆虫细胞表达系统在复合体重组表达应用中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(2): 7 - 14.
- [12] la Torre G, de Waure C, Chiaradia G, et al. The health technology assessment of bivalent HPV vaccine cervarix in Italy[J]. Vaccine, 2010, 28(19): 3379 - 3384.
- [13] 孙博. 应用昆虫细胞表达预防性人乳头瘤病毒疫苗和应用填充床生物反应器表达 H1N1 流感病毒疫苗的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2012.
- [14] Cox M M, Patriarca P A, Treanor J F. A recombinant hemagglutinin influenza vaccine[J]. Influenza and Other Respiratory Viruses, 2008, 2(6): 211 - 219.
- [15] Pushko P, Kort T, Nathan M, et al. Recombinant H1N1 virus - like particle vaccine elicits protective immunity in ferrets against the 2009 pandemic H1N1 influenza virus[J]. Vaccine, 2010, 28(30): 4771 - 4776.
- [16] Shrestha M P, Scott R M, Joshi D M, et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine[J]. New England Journal of Medicine, 2007, 356(9): 895 - 903.
- [17] Peakman M, Tree T I, Endl J, et al. Characterization of preparations of GAD65, proinsulin, and the islet tyrosine phosphatase IA - 2 for use in detection of autoreactive T - cells in type 1 diabetes; report of phase II of the Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of T - cell assays in type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2001, 50(8): 1749 - 1754.
- [18] Felberbaum R S. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(5): U85 - 702.