

家蚕微孢子虫感染家蚕胚胎细胞与 草地贪夜蛾细胞的病变比较*

潘国庆¹, 李艳红¹, 谢 俐¹, 庞 敏¹, 潘敏慧¹, 鲁 成¹, 周泽扬^{1,2}
(1. 西南大学 蚕桑重点实验室, 重庆 400716; 2. 重庆师范大学 校长办公室, 重庆 400047)

摘 要:家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)是引起家蚕微粒子病的病原,是一种无线粒体的专性细胞内寄生的原虫。将 *N. bombycis* 经 KOH 处理后,接种于家蚕胚胎细胞(BmE 细胞)和草地贪夜蛾卵巢细胞(Sf21)。用倒置显微镜对微孢子虫在宿主细胞中感染增殖过程中的形态变化进行了跟踪观察,比较两种细胞接种 *N. bombycis* 后所出现的形态学变化。接种后第 12 天起,两种细胞内均充满不同发育阶段的孢子,并可见大量的胞外游动。在感染晚期,Sf21 中有许多孢子从细胞中逸出,留下许多空泡,细胞还保持一定的完整性,而家蚕胚胎细胞则在感染后期完全崩解。这种差异可能是 Sf21 作为一种非原宿主细胞,对 *N. bombycis* 的感染有一定耐受性有关。

关键词:家蚕微孢子虫;草地贪夜蛾卵巢细胞;家蚕胚胎;细胞病变

中图分类号:S884.7⁺²

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2005)03-0025-04

Comparison of Cytopathic Effect (CPE) of Sf21 Cell and Embryo Cell of Silkworm Infected by *Nosema bombycis*

PAN Guo-qing¹, LI Yan-hong¹, XIE Li¹, PANG Min¹, PAN Min-hui¹, LU Cheng¹, ZHOU Ze-yang^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Sericulture, Southwest University, Chongqing 400716;

2. President Office, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: *Nosema bombycis* is the pathogen of Pebrine of silkworm. It is an obligate intracellular parasite without mitochondria. After treatment with KOH, *N. bombycis* is inoculated into two cell lines, embryo cell of *B. mori* and Sf21 respectively. The comparison of morphological changes of the two cell lines Post Inoculation is conducted. The results show that after inoculation 12 days most of cells are filled with spores in different stages, and some spores are released from the cells. At the late stage of infection, many vacuoles with spore shape are observed in the Sf21 cell and membrane integrity is partially conserved. For BmE cell, the infected cells were disrupted into debris. It may be that Sf21 is non-original host cell of *N. bombycis*. It can bear heavier burden of infection than BmE, the original cell.

Key words: *Nosema bombycis*; Sf21; embryo cell of *B. mori*; infection

家蚕微孢子虫是家蚕微粒子病的病原体,是一种专性细胞内寄生的原虫,无线粒体,属于较原始的真核生物。在体外利用昆虫细胞培养家蚕微孢子虫,是研究家蚕微孢子虫的有力工具。自从 Trager^[1]1973 年首次利用昆虫培养细胞对家蚕微孢子虫进行研究以后, KAWARABATA^[2]、贡成良^[3]、郑祥

明^[4]、钱永华等^[5]先后利用 *Antheraea Eucalypti* 细胞系、BmN 细胞系在体外成功建立了家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*)感染增殖体系。2005 年笔者报道了利用草地贪夜蛾卵巢细胞(Sf21)培养家蚕微孢子虫, Sf21 具有培养速度快、细胞体积大等优点,但作为非原宿主细胞,在进行功能基因组研究时,总有

* 收稿日期:2005-07-18

资助项目:国家自然科学基金项目(No. 30371085);中法先进研究计划项目(PRA BT03-05)

作者简介:周泽扬(1958-),男,四川内江人,教授,博士生导师,校长,主要从事家蚕分子生物学研究;

潘国庆(1973-),男,河南中牟人,讲师,硕士,主要从事微孢子虫功能基因组研究。

些不便。最近,本实验室初步建立一种家蚕胚胎细胞系(暂定名为 BmE),和 Sf21 细胞相比,也具有繁殖速度快等优点。通过研究,利用 BmE 培养家蚕微孢子虫也取得了成功。在此,比较了 *N. bombycis* 感染 BmE 和 Sf21 细胞后形态学变化特征,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

接种用家蚕微孢子虫(*N. bombycis*)由重庆西南农业大学蚕桑重点实验室保存种,经家蚕继代繁殖后备用。

家蚕胚胎细胞(BmE),来源于家蚕细胞胚胎,由本实验室细胞生物学分室建立。

Sf21 细胞株,来源于草地贪夜蛾卵巢,由华中师范大学陈曲侯教授惠赠,本实验室保存。两种细胞的培养液为含 10% 胎牛血清的 Grace 完全培养液,培养液中青霉素、链霉素的质量浓度分别为 200IU/mL、200mg/L。

1.2 *N. bombycis* 接种细胞

接种孢子的发芽处理:将提纯的孢子用 20 万单位/mL 的双抗经差速离心(300r/min 离心 10min 取上清,后 1000r/min 离心 10min 取沉淀)反复漂洗两三次,最后调制孢子含量为 10^8 个/mL。

参照王爱荣^[6]、贡成良^[3]等方法,将纯化的约 10^8 个/mL *N. bombycis* 孢子 27℃ 预温 12h 敏化,后经 1000r/min 离心得孢子沉淀,再加入相同体积的 0.1mol/L 的 KOH 溶液,混合后于 27℃ 温育 60min,再 12000r/min 离心 15s,取沉淀加入等体积

的 Grace 培养液,分别加到细胞含量约 10^7 个/mL 的 BmE 和 Sf21 细胞悬液混合(细胞数:*N. bombycis* 孢子数 = 1: 10 ~ 30),轻轻摇动 3min,使其充分混合,静置 5min 后,用移液枪将孢子细胞混合液以每孔 1mL 等量分注入 12 孔细胞培养板内密封,于 28℃ 培养 1h,使其完全贴壁后,再用吸管轻轻除去培养液,重新加入新鲜的 Grace 完全培养液后密封,置 28℃ 培养。

1.3 观察细胞感染微孢子虫后的变化

取同期接种 *N. bombycis* 的 BmE 细胞和 Sf21 细胞,显微观察,比较二者感染 *N. bombycis* 后的形态差别。

2 结果与分析

2.1 BmE 初期感染率测算

经过观察测算,BmE 细胞的初期感染率为 10%,增殖速度较快,但即使在感染后期,仍然可以看到有少量未感染的细胞存在。

2.2 两种细胞感染后的形态学比较

图 1 为两种细胞在接种 *N. bombycis* 前的正常形态。在感染前期(P11 ~ 4d),两种细胞无明显差异,见图 2。在感染中期(P15 ~ 10d),微孢子虫在细胞质内增殖,感染细胞体积增大,都有巨型细胞的出现,见图 3。

在感染后期(10 ~ 20d),许多孢子从 Sf21 细胞内逸出,留下大量空泡,细胞尚保持一定的完整性;而 BmE 细胞感染后期细胞崩解碎裂,细胞完整性彻底破坏。在感染后期,均可看到感染的细胞聚集,细胞融合等现象(见图 5)。

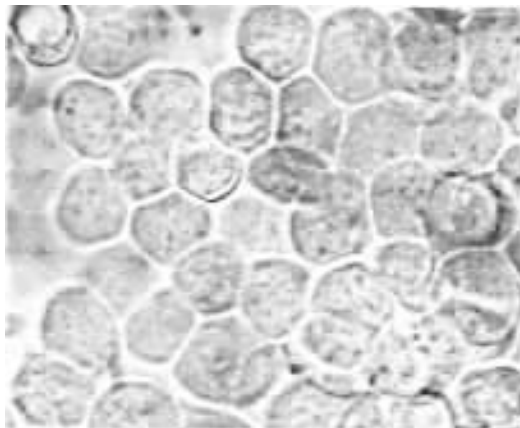


图 1(a) Sf21 × 400

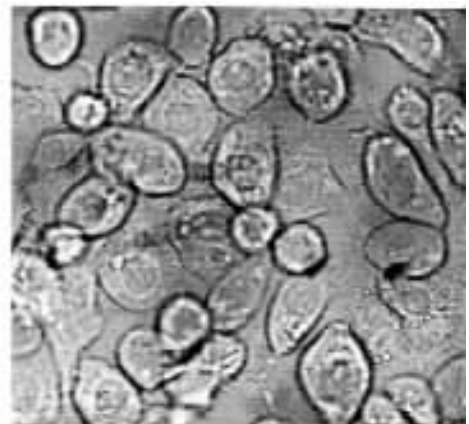


图 1(b) BmE × 400

图 1 正常的 Sf21 和 BmE 细胞



图 2(a) Sf21 × 400

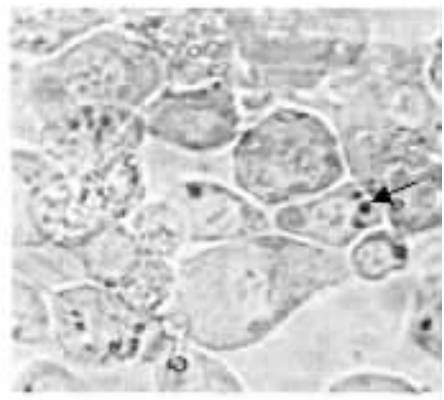


图 2(b) BmE × 400

图 2 *N. bombycis* 感染前期的 BmE 细胞和 Sf21 细胞生长观察
可见部分细胞感染了孢子(见箭头), 细胞体积略增大, 其它无明显变化。

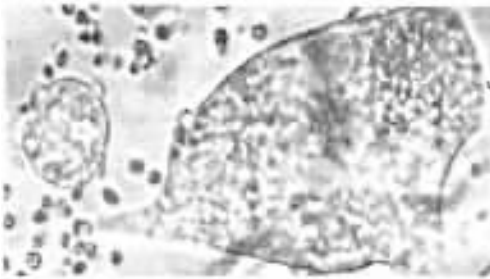


图 3(a) Sf21 × 400

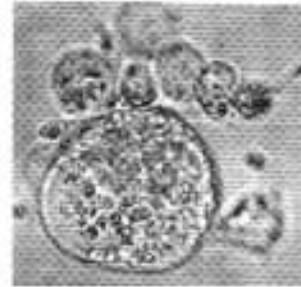


图 3(b) BmE × 400



图 3(c) Sf21 × 400

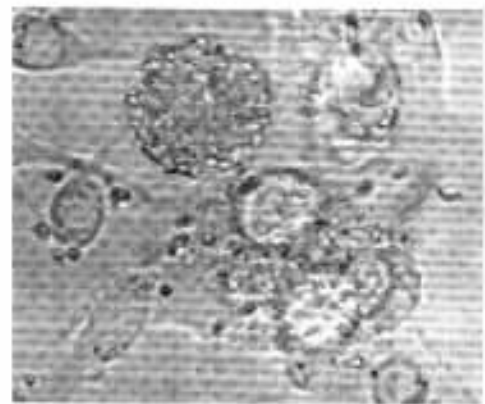


图 3(d) BmE × 400

图 3 感染中期的 BmE 细胞和 Sf21 细胞培养观察
感染中期, 两种寄主细胞体积增大, 大量孢子生在细胞膜内分布。

3 结论与讨论

Sf21 是草地贪夜蛾卵巢细胞, BmE 是本实验室细胞生物学分室以家蚕胚胎为基础建立的一个新细胞系。家蚕微孢子虫在 Sf21 和家蚕胚胎细胞 (BmE) 中均可以成功增殖, *N. bombycis* 对两种细胞均有良好的适应性。Sf21 细胞体积大于 BmE 细胞, 但 Sf21 中可以增殖更多的 *N. bombycis*。二者在感染

N. bombycis 的前期和中期, 出现的病理变化基本一致。在感染晚期, Sf21 中有许多孢子从细胞中逸出, 留下许多空泡, 细胞还保持一定的完整性, 而家蚕胚胎细胞则在感染后期, 完全崩解。

这些差别可能与 *N. bombycis* 的天然宿主是家蚕有一定关系。Sf21 对于 *N. bombycis* 来说, 是异源细胞, 对 *N. bombycis* 的感染有一定的耐受性。而 *N. bombycis* 对 BmE 的初次感染率较高, 其作为

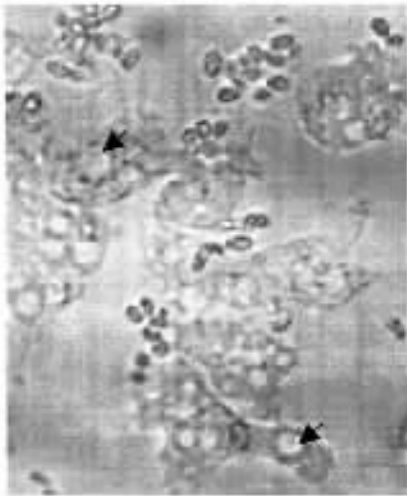


图4(a) S721 × 400

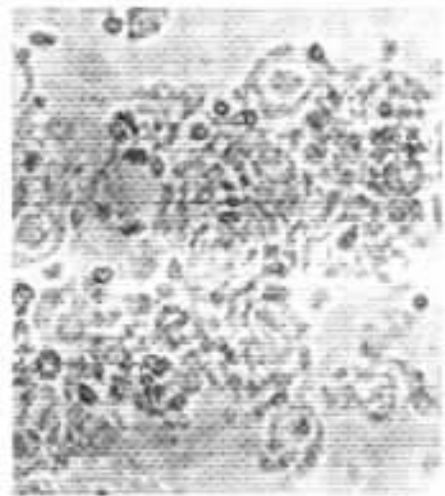


图4(b) BmE × 400

图4 感染晚期的BmE细胞和Sf21细胞培养观察

图4(a)中,细胞内出现大量空泡,形状与孢子形态类似(见箭头);图4(b)中,感染细胞崩解、碎裂。



图5(a) Sf21 × 400

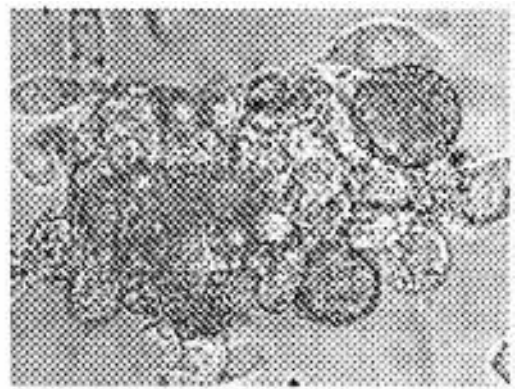


图5(b) BmE × 400

图5 *N.bombycis* 感染晚期的BmE细胞和Sf21细胞出现的细胞碎片

N. bombycis 的原宿主细胞,对 *N. bombycis* 增殖的耐受性较差,到感染的后期,细胞完全崩解。

参考文献:

- [1] TRAGER W. The Hatching of Spores of *Nosema bombycis* NAGELT and the Partial Development of the Organism in Tissue Cultures[J]. J Parasitol, 1937, 23: 226-227.
- [2] KAWARABATA T, ISHIHARA R. Infection and Development of *Nosema bombycis* (Microsporidia; protozoa) in a Cell Line of *Antheraea eucalypti* [J]. Invertebr Pathol, 1984, 44: 52-62.
- [3] 贡成良, 早板昭二. 家蚕微孢子原虫(*Nosema bombycis*) 在 *Antheraea eucalypti* 细胞中的增殖[J]. 蚕业科学, 1999, 25(2): 92-95.
- [4] 郑祥明, 安勇智佐, 河原畑勇. 中国广东家蚕微孢子孢子在 *Antheraea eucalypti* 细胞系的感染增殖[J]. 蚕业科学, 1999, 25(3): 170-174.
- [5] 钱永华, 鲁兴萌, 金伟, 等. 家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*) 向家蚕 BmN 细胞接种与增殖观察[J]. 蚕业科学, 2003, 29(3): 260-263.
- [6] 王爱荣, 李健男, 刘向国, 等. 柞蚕微孢子虫孢子人工发芽的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(4): 281-284.

(责任编辑 李若溪)