

# 犬五联病毒活疫苗制备用犬肾细胞系的 建库筛选与检定

张德礼<sup>1</sup>, 李六金<sup>3</sup>, 夏耕田<sup>2</sup>, 何旭玉<sup>2</sup>, 高步先<sup>2</sup>,  
白晓鸿<sup>2</sup>, 黄高升<sup>4</sup>, 刘尚高<sup>5</sup>, 阎隆飞<sup>5</sup>, 方福德<sup>6</sup>

(<sup>1</sup> 北京大学医学部基础医学院免疫学系, 北京 100083; <sup>2</sup> 北京军区联勤部卫生防疫队, 北京 100071;

<sup>3</sup> 第四军医大学动物保健品研制中心; <sup>4</sup> 第四军医大学基础部病理学教研室, 西安 710032;

<sup>5</sup> 中国农业大学动物医学院和生物学院, 北京 100094; <sup>6</sup> 中国医学科学院基础医学研究所/

中国协和医科大学基础医学院, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

**摘要:**以人类宫颈癌细胞系 HeLa 为阳性对照, 以连传 3 代的犬猫肾原代细胞 (CKC、FKC) 作为阴性对照, 对来自国内外不同单位收集的另外 4 株 MDCK 传代细胞系培养 25~67 代的完整活细胞进行裸鼠致癌/致瘤实验观察, 筛选出致癌性极低、符合细胞遗传学要求、无传染因子污染的 2 株 MDCK 细胞系用于制苗, 并建立了相应的细胞种子库和工作库, 供科研和生产使用, 4 年运转很好。不同代次 MDCK 细胞系染色体众数所占比率的相差率一般不超过 5%~15%, 结构畸变率一般为 0~3%。研究表明, MDCK 细胞染色体遗传特征决定致瘤性质, 并具有种属特异性, MDCK 细胞不论核型如何, 始终具有致瘤性, 但其致癌/致瘤性差(23/59), 且一般致上皮源性恶性肿瘤, 多为高中分化腺癌。降低制苗毒液中细胞系基因含量, 完全可以将 MDCK 细胞系(WB 和 H 株)用于犬五联苗生产。MDCK 细胞超二倍体 YB 株和亚二倍体与超二倍体 KA 株不能用作病毒活疫苗培养基质。找出了 MDCK 细胞系的染色体变异率、软琼脂中克隆形成率、对植物凝集素的凝集性和在裸鼠体内形成癌肿的潜力之间的可能相关性, 发现细胞系染色体数目增加、克隆形成率增高、凝集性增强, 则致癌/致瘤性相应提高。

**关键词:** 细胞系; MDCK; HeLa; 猫犬肾细胞; 染色体组型; 致癌/致瘤性

## Establishment of Master Cell Stock and Working Cell Bank of MDCK Lines and Selection and Evaluation of the Lines as Candidate Viral Substrates for Approval Production of Combinational Canine Attenuate & live Virus Vaccines

ZHANG De-li<sup>1</sup>, LI Liu-jin<sup>3</sup>, XIA Geng-tian<sup>2</sup>, HE Xu-yu<sup>2</sup>, GAO Bu-xian<sup>2</sup>, BAI Xiao-hong<sup>2</sup>,  
HUANG Gao-sheng<sup>4</sup>, LIU Shang-gao<sup>5</sup>, YAN Lung-fei<sup>5</sup>, FANG Fu-de<sup>6</sup>

(<sup>1</sup> Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Peking University Health Science Center, Beijing 100083; <sup>2</sup> Beijing Institute of Preventive Medicine, Beijing 100071; <sup>3</sup> Center for Research and Development of Animal Health-care Products, Fourth Military Medical University; <sup>4</sup> Department of Pathology, School of Pre-clinical Education, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; <sup>5</sup> College of Animal Medical Sciences and College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094; <sup>6</sup> State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences at the Peking Union Medical College/Institute of Basic Medical Sciences at the Chinese Academy of Medicine, Beijing 100005)

**Abstract:** Under the prerequisite that the incidence of cancer or tumor in negative-control nude mice inocu-

收稿日期: 2000-05-08

基金项目: 国家火炬计划重大项目

作者简介: 张德礼(1962-), 男, 陕西山阳人, 高级医师, 主要从事人类基因组学、蛋白质组学与生物信息学研究。Tel: 010-62092541(O), 010-62092600-4201(H); Fax: 010-62091149; E-mail: delizhang@bjmu.edu.cn, delizhang2000@sohu.com

lated subcutaneously with primary feline or canine kidney cell cultures purified *in vitro* at passage 3 was 0 (0/22) and 0 (0/10), respectively. The incidence of the progressively growing malignant tumor (MT) in positive-control nude mice inoculated subcutaneously with Hela cell cultures of KB, X, or NM20/ X strain was 10/10, 25/25 and 5/51, respectively. The results showed that the incidence of tumor in nude mice with di-and hyperploid YB strain of MDCK cell during 17 - 23 passages, with hyper- and hypoploid KA strain of MDCK cell during 6 - 8 passages, with hypoploid WB strain of MDCK cell on passage 6, with hyper- and hypoploid H strain of MDCK cell during 8 - 24 passages was 2/24, 6/10, 5/10 and 10/15, respectively. The chromosomal analysis results showed that the ratio of difference in the rate of modal chromosome number between high (mcs + n) and lowest (mcs) passages was not more than 5% - 15% and the structure aberrations was generally 0 - 3%. These results proved that the genetic characteristics of chromosomal number of cell lines determines their tumorigenicity, but it is species-specific. MDCK line has tumorigenicity no matter what its chromosome karyotype is, at least it has very low tumorigenicity even when its modal chromosome number is hypoploid. It is thus evident that MDCK cell of WB or H strain can be approved as substrate for the preparation of attenuated viral vaccines, but MDCK cell of YB or KA strain can not be approved as substrate for the preparation of attenuated viral vaccines.

Key words: Cell line; MDCK; Hela; Feline or canine kidney cell; Karyotypes; Carcinogenesis or tumorigenicity

制苗用人二倍体细胞系(HDC)的安全性检定国外已有标准(Guideline)<sup>[1]</sup>,但制苗用传代细胞系(CCL)的致癌安全性检定尚无标准。按国家兽药药政要求,用于制苗的细胞系须经有关实验证明为非致癌/非致瘤性的细胞系<sup>[2~4]</sup>。美国犬联苗宣传使用说明中指出,制备用MDCK细胞系无致癌性。UHS与Boerner P等将正常(即野生型)MDCK细胞系以 $2 \times 10^6/0.1$  ml皮下接种裸鼠的致癌/致瘤率为0/6<sup>[5]</sup>。但我们研究证明犬肾细胞系(MDCK株)致癌/致瘤性差<sup>[2]</sup>,本研究旨在进一步确定供生物制品制造用和生物工程产品生产用MDCK犬肾传代细胞系有无致癌/致瘤性。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

Hela人类子宫颈癌细胞系(human cervical epithelioid carcinoma)与MDCK犬肾细胞系<sup>[6]</sup>,均经美国典型培养物保藏中心(ATCC)保藏确认,第四军医大学动物保健品研制中心从中国预防医学科学院(YB株)、中国典型培养物保藏中心(CTCC)(WB, H株)、军事医学科学院(KA株)、西安交通大学医学院(X株)和第四军医大学口腔医学院(KB株)引进。细胞系的代次为本实验室所传代次,如MDCK犬肾细胞系WB, H, KA和YB株引入本实验室时分别为62, 63, 88和102代, Hela细胞系KB株与X株引入本实验室时的代次不详,均按0代对待,传后均为1代。Hela细胞NM20/X株,猫肾原代细胞

(FKC)和犬肾原代细胞(CKC)的来源和制备同文献[2]。细胞培养方法同文献[2, 7, 8]。

### 1.2 细胞库建立

查清细胞系的建立背景、来源情况、传代代次,在5~10代各代次分别冻存种子批,以后每间隔5~10代冻存一批,冻存至46代以上,并确保无微生物(细菌、霉菌、霉形体、病毒)污染。

### 1.3 实验动物

Balb/C无胸腺裸鼠136只,体重18~22g(平均体重约20g),约2月龄,中国药品生物制品检定所和中国医学科学院上海市肿瘤医院提供。

### 1.4 细胞接种及产生肿瘤的实验要求

细胞接种及肿瘤判定标准同常规。实验要求同文献[2]。

### 1.5 瘤切片的病理形态学观察

自动物皮下取出瘤结节,10%甲醛固定,或直接将动物浸泡于10%甲醛溶液中,次日更换1次固定液,石蜡包埋切片,常规H.E染色,显微镜下观察。

### 1.6 细胞染色体遗传变异率和核型分析

方法见文献[2, 4]。

### 1.7 细胞在软琼脂中的抛锚独立生长特性和植物凝集素(PHA)作用下的凝集性实验

方法见文献[3]。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞系染色体数目变异率、结构畸变率和核型分析与致癌/致瘤性观察结果

**2.1.1 MDCK犬肾细胞系** MDCK细胞 YB株 17~23代(13~47代的染色体众数为 $80 \pm 2$ ,所占比率为26%~75%,相差率为7.14%~48.51%,结构畸变率为0~3%)以每只 $(0.98 \sim 3.35) \times 10^7 / (0.2 \sim 0.4)$  ml皮下接种5组24只裸鼠,在31~41d观察期内的肿块形成率为23/24,肿块均缩小乃至消退,致癌/致瘤率为2/24,病理组织学观察8只裸鼠肿块,2/8为恶性肿瘤(其中1/8为上皮源性恶性肿瘤,1/8为高-中分化腺癌),6/8为非肿瘤(其中4/8为坏死,1/8为炎性退变坏死组织,1/8为微脓肿);另外,9只剖检正常(表)。

MDCK细胞 KA株 6~8代(9代的染色体众数为 $78 \pm 2$ ,所占比率为46%,结构畸变率为0)以每只 $(4.63 \sim 9.65) \times 10^7 / (0.26 \sim 0.4)$  ml皮下接种2组10只裸鼠,在63~69d观察期内的肿块形成率为10/10,肿块均缩小乃至消退,致癌/致瘤率为6/10,病理组织学观察9只裸鼠肿块,6/9为恶性肿瘤(其中1/9为上皮源性恶性肿瘤,考虑为中分化腺癌,1/9为高分化腺癌,2/9为高-中分化腺癌,2/9为中分化腺癌),3/9为非肿瘤(其中1/9为炎性包块,1/9为炎性肉芽组织,1/9为黄色肉芽肿样病变);另外1只剖检为恶性肿瘤(表)。

MDCK细胞 WB株 6代(7代的染色体众数为 $74 \pm 2$ ,所占比率为40%,结构畸变率为1%~2%)以每只 $(2.26 \sim 3) \times 10^7 / 0.16$  ml皮下接种2组10只裸鼠,在24~40d观察期内的肿块形成率为10/10,肿块增大、缩小、消退均有,致癌/致瘤率为5/10,病理组织学观察,5/8为恶性肿瘤(其中4/8为中分化腺癌,1/8为腺癌纤维性肉瘤),3/8为非肿瘤(其中1/8为坏死,1/8为炎性退变坏死,1/8未见肿瘤组织);另外2只剖检正常(表)。

MDCK细胞 H株 8~24代(7~31代的染色体众数为 $76 \pm 3$ ,所占比率为43.5%~85%,相差率为2.78%~13.38%,结构畸变率为0)以每只 $(1.925 \sim 2.7) \times 10^7 / (0.2 \sim 0.3)$  ml皮下接种3组15只裸鼠,在30~45d观察期内的肿块形成率为15/15,肿块大小基本稳定或缩小、消退,致癌/致瘤率为10/15,病理组织学观察,10/11为恶性肿瘤(其中5/11为中分化腺癌,4/11为癌肉瘤),1/11为非肿瘤(凝固性坏死);另外4只剖检正常(表)。

**2.1.2 肿瘤阳性对照 HeLa细胞系** 4~20代 X株 HeLa细胞(超二倍体细胞染色体众数为 $62 \pm 3$ ,所占比率为69%,结构畸变率为2%)以每只 $(0.605 \sim 8.316) \times 10^7 / (0.10 \sim 0.28)$  ml皮下接种5组25只

裸鼠,均产生进行性生长的上皮源性低分化恶性肿瘤(100%)。NM20/X株 HeLa细胞为超二倍体和亚四倍体细胞(染色体众数 $68 \pm 3$ ,所占比率52%,结构畸变率为0),11代该株细胞以每只 $5.205 \times 10^7 / 0.2$  ml皮下接种1组5只裸鼠,均快速产生恶性横纹肌样瘤(MRT)。KB株 HeLa细胞为超二倍体细胞(染色体众数 $60 \pm 3$ ,所占比率72%~76%,结构畸变率为5%~18%),5~22代该株细胞以每只 $(0.255 \sim 12.75) \times 10^7 / (0.14 \sim 0.2)$  ml皮下接种2组10只裸鼠,均产生恶性肿瘤。

**2.1.3 肿瘤阴性对照猫肾原代细胞(FKC)和犬肾原代细胞(CKC)** 0~4代 FKC以每只 $(0.15 \sim 6.02) \times 10^7 / (0.14 \sim 0.4)$  ml皮下接种6组22只裸鼠,无一产生肿瘤(致癌/致瘤率为0/22)。CKC第3代以 $(1.6 \sim 2.66) \times 10^7$  接种裸鼠2组10只,无一产生肿瘤(0/10)。

## 2.2 细胞系软琼脂中克隆形成(抛锚独立生长特性)实验与凝集实验

本实验所用不同株的 HeLa细胞系, YB株 MDCK细胞系在0.33%软琼脂中均具有抛锚独立生长特性,并在终浓度 $3.125 \sim 200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 植物凝集素(PHA)作用下出现凝集现象,而二倍体原代细胞 FKC与 CKC不具有抛锚独立生长特性,在不同浓度 PHA作用下也不发生凝集,其它3株 MDCK细胞的抛锚独立生长特性和凝集性均差,但不够十分规律。这就说明本实验所用不同株的 HeLa细胞符合肿瘤细胞系体外常规检定特性,并与裸鼠体内致癌/致瘤性观察结果相符,说明本实验所用不同株的 HeLa细胞符合肿瘤细胞系体外常规检定特性。

## 3 讨论与结论

**3.1 不同核型细胞的致瘤性不同,细胞染色体数目变异大小和致癌/致瘤性强弱相关及肿瘤细胞系高变异率株可在裸鼠体内快速选育成功**

NM20/X株3代相当于X株23代,却比X株31代的染色体数目变异性还大,说明成瘤细胞染色体数目变异大大加快。肿瘤细胞系高变异率株可在裸鼠体内快速选育成功这一结论与敏感性差异极显著细胞系交替选育获得超高增殖率细小病毒株<sup>[7]</sup>,均属于自然选择规律的结果。

**3.2 细胞染色体遗传特征决定致瘤性质并具有种属特异性**

细胞系染色体遗传特征决定致瘤性质。HeLa细胞X株的染色体众数为超二倍体 $62 \pm 3$ ,致瘤性

表 MDCK 犬肾细胞系 YB, KA, WB 和 H 株皮下接种裸鼠的致瘤/致瘤性的实验观察结果<sup>1)</sup>

Table Results of the experimental investigation on carcinogenesis or tumorigenicity of MDCK canine kidney cell line of YB, KA, WB or H strain inside nude mice inoculated subcutaneously

实验组别 No. of groups	裸鼠只数 No. of nude mice	MDCK 株名 MDCK cell strain inoculated	本室所传细胞代数 Passage of cell cultivation <i>in vitro</i> in this lab.	接种细胞数 (千万/鼠) No. of cells inoculated ( $10^7$ /mouse)	接种细胞量 (ml/鼠) Volume of cells inoculated (ml/mouse)	观察天数 Investigational days	肿瘤形成率 Incidence of nodule formation	致瘤率 Incidence of cancer or tumor formation	进行性增长或缩小 Progressive growing or negative-growing	平均体重/平均瘤重 Mean body weight/mean tumor or nodule weight when killed at last
14	4	YB	17	0.98	0.2	41	3/4	0/4	消退	23.9(4只 mice)
15	5	YB	20	1.875	0.2	35	5/5	0/5	Disappearing 消退	22.325(4只 mice)
16	5	YB	20	1.875	0.2	35	5/5	0/5	Disappearing 缩小、消退	22.62(5只 mice)
17	5	YB	23	3.35	0.2	31	5/5	1/5	Decreasing or disappearing 消退	26.6(5只 mice)
18	5	YB	22	2.2	0.4	39	5/5	1/5	Decreasing 消退	27.3(4只 mice)
14~18	24	YB	17~23	0.98~3.35	0.2~0.4	31~41	23/24	2/24	Disappearing 缩小、消退	32d 时死亡 1 只 1 mouse died on day 32
19	5	KA	6	9.65	0.4	63	5/5	5/5	Decreasing or disappearing 消退	23.54(5只 mice)
20	5	KA	8	4.63125	0.26	69	5/5	1/5	Disappearing 缩小、消退	28.66(5只 mice)
19~20	10	KA	6~8	4.63~9.65	0.26~0.4	63~69	10/10	6/10	Decreasing or disappearing 缩小、消退	
21	5	WB	6	3	0.16	40	5/5	1/5	Decreasing or disappearing 缩小、消退缩小、消退	23.925(4只 mice)
22	5	WB	6	2.26	0.16	24	5/5	4/5	Decreasing or disappearing 增大	23.48(5只 mice)
21~22	10	WB	6	2.26~3	0.16	24~40	10/10	5/10	Increasing	
24	5	H	8	2.7	0.2	30	5/5	5/5	基本稳定 Basically stable	24.28(5只 mice)
25	5	H	19	1.925	0.22	45	5/5	1/5	消退	24.533(3只 mice) 33 与 39d 各死亡 1 只 1 mouse died on day 33 and another on day 39
26	5	H	24	1.925	0.3	39	5/5	4/5	Decreasing 消退	26.42(5只 mice)
24~26	15	H	8~24	1.925~2.7	0.2~0.3	30~45	15/15	10/15	Decreasing	

<sup>1)</sup> 体表光滑、无肿块之裸鼠,如剖检后发现接种部位局部有残痕或小结节,均做病理切片检查

Any of the nude mice both with smooth body and with no palpable nodule was examined for further determination by histopathology if it had sign or micronodule body on local site inoculated with cells determined by pathological-anatomic examination

强,接种少量细胞即可快速产生上皮源性低分化恶性肿瘤(100%),且肿瘤生长迅速。KB株的染色体众数为超二倍体 $60 \pm 3$ ,比X株变异小,也不如X株致瘤性强,加大细胞接种量有利于快速生瘤。NM20/X株Hela细胞为超二倍体和亚四倍体细胞,染色体众数 $68 \pm 3$ ,比X株变异大,也比X株致瘤性强,均致MRT(5/5)。

细胞致癌/致瘤性具有种属特异性,即同样染色体核型的不同种类动物细胞系的致癌/致瘤性不同,Hela细胞为超二倍体以上细胞,所选育的NM20/X株致MRT的比率高达5/5。MDCK犬肾细胞系致癌/致瘤性差,一般致上皮源性恶性肿瘤,多为高中分化腺癌,未导致MRT产生。

### 3.3 MDCK犬肾细胞系为低致癌细胞系,降低制苗毒液中细胞系基因含量可以将其用于犬五联苗生产

本研究证明MDCK株细胞系至少是低致癌/致瘤性细胞系,实际上并不存在非致癌/致瘤性的MDCK株细胞系,这有可能打破学术界长期认为存在非致癌/致瘤性MDCK细胞系的观点,从而在有关生物制品和基因工程产品安全性上提出新的要求标准。亚二倍体的WB株MDCK细胞皮下接种量在低于 $3 \times 10^7$ /只时只有轻微的致癌/致瘤性。国际上制苗用非致癌/致瘤性细胞系的筛选一般是以 $1 \times 10^7/0.2$  ml(或低于此接种细胞数量标准)皮下接种裸鼠21d不致癌为检定标准,按此标准,WB株MDCK细胞系可用于病毒活疫苗制备。本试验还表明,冻融裂解细胞系的致癌/致瘤性相应降低,非致癌/致瘤性细胞系不会因冻融裂解而增加致癌/致瘤性。MDCK细胞系冻融裂解物不致癌<sup>[2]</sup>,降低制苗毒液中细胞系基因含量<sup>[9]</sup>,完全可以将MDCK细胞用于犬五联苗生产。

### 3.4 不同生物制品研制单位必须建立自己的强大传代细胞库,并须经检定合格方可启用

(1)细胞系致癌/致瘤性具有种属特异性,MDCK犬肾细胞系为低致癌细胞系。本研究证明,MDCK细胞系不论核型如何,始终具有致癌性,至少是低致癌/致瘤性细胞系,实际上并不存在非致癌/致瘤性的MDCK株细胞系,这有可能打破学术界长期认为存在非致癌/致瘤性MDCK细胞系的观

点,从而在有关生物制品和基因工程产品安全性上提出新的要求标准。

(2)MDCK细胞系冻融裂解物不致癌,降低制苗毒液中细胞系基因含量,完全可以将MDCK细胞系(WB,H株)用于犬五联苗生产。但MDCK细胞超二倍体YB株和亚二倍体与超二倍体KA株不能用作病毒活疫苗培养基质。

(3)在软琼脂中的细胞克隆形成实验和在植物凝集素作用下的细胞凝集实验结果具有规律性,并与裸鼠体内实验结果一致。

## References

- [1] Jacobs J P. Guidelines for the acceptability, management and testing of serially propagated human diploid cells for the production of live virus vaccines for use in man. *J. Biol. Stand.* 1981, 9:331 - 342.
- [2] Zhang D L, Li L J, Xia G T, He X Y, Gao B X, Bai X H, Huang G S, Liu S G, Yen L F, Fang F D. Experimental researches on the carcinogenesis or tumorigenicity of canine kidney cell(CKC) lines and analysis of their chromosome karyotypes. *Scientia. Agricultura Sinica*, 2002, 35(5): 562 - 570. (in Chinese)  
张德礼,李六金,夏耕田,何旭玉,高步先,白晓鸿,黄高升,刘尚高,阎隆飞,方福德.犬肾细胞系的染色体组型分析与致癌/致瘤性的实验研究.中国农业科学,2002,35(5):562 - 570.
- [3] Zhang D L, Li L J, Huang G S, Liu S G, Yen L F, Fang F D. Carcinogenesis or tumorigenicity testing of animal cell lines for vaccine preparation by colony formation on soft agar and by agglutination under plant lectins. *Cell Biology International*. 2001, 25: 997 - 1002.
- [4] Zhang D L, Li L J, Huang G S, Liu S G, Yen L F, Fang F D. Analyses of chromosomal karyotypes and cytogenetic variations of animal cell lines. *Acta Genetica Sinica*. 2001, 28:327 - 344. (in Chinese)  
张德礼,李六金,黄高升,刘尚高,阎隆飞,方福德.动物细胞系的染色体组型与遗传变异率分析.遗传学报,2001,28(4): 327 - 344.
- [5] UHS, Boerner P. Characterization of chemically and virally transformed variants of Madir Darby canine kidney(MDCK) epithelial cells. *J. Cellular Physiol*. 1985, 122:299 - 307.
- [6] Gauth C R. Characterization of an established line of canine kidney cells(MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (USA)*, 1966, 122:931 - 935.
- [7] Zhang D L. Development of mink parvovirus vaccines. *Biologicals*, 1997, 25:103 - 111.
- [8] Zhang D L, Yin Z, Wang S Z. Evaluation of mink parvovirus vaccines. *Biologicals*, 1997, 25: 93 - 101.
- [9] Kahn P. Cellular tumorigenicity in nude mice. Tests of associations among loss of cell surface fibronectin, anchorage independence, and tumor forming ability. *J. Cell Biol.* 1979, 82:1 - 16.