

鸡胚三类组织体外培养细胞的生物学特性分析

刘 坤 特日格乐 侯东霞 李 瑶 李 煜*

(内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021)

摘要 采用组织培养的方法获取鸡胚不同组织细胞, 利用M199培养基进行原代、传代培养, 经形态学观察、生长曲线绘制、分裂指数测定等进行生物学特性分析。实验表明, 鸡胚不同组织细胞具有不同的生物学特性, 从形态结构到生长周期都有明显差异。获得的躯体来源细胞、心来源细胞为成纤维型, 肺来源细胞为上皮型; 其中, 躯体来源细胞生长能力最强, 心来源细胞次之, 肺来源细胞最慢, 躯体来源细胞倍增时间最短; 核型分析表明, 该实验体外培养的鸡胚细胞染色体数目为78条。上述结果可为今后鸡胚不同组织细胞的深入研究提供实验材料和依据。

关键词 鸡胚细胞; 组织培养; 生长曲线; 分裂指数; 核型分析

鸡胚细胞是一类重要的禽类细胞, 广泛应用于病毒增殖研究^[1]、疫苗研发生产^[2-6]和疾病相关基因的表达及检测^[7-8]。在细胞培养中, 除哺乳动物细胞外, 鸡胚细胞是早期用于原代细胞培养的主要细胞, 现在它被用来生产各种鸡的疫苗, 如法氏囊、马立克、新城疫苗等, 也被用来表达一些基因工程产物^[9]。

目前, 人们正尝试通过病毒侵染鸡胚细胞, 来建立相关的生物模型^[10], 进而为病毒研究提供实验材料和数据。因此, 对鸡胚细胞的生物学特性就有必要进行研究和分析, 为选取适当的组织细胞提供参考。现在, 国内外的文献大都只对鸡胚躯体来源的成纤维进行分析和研究, 未能对其它组织来源的细胞进行体外培养的分析 and 比较。随着禽类细胞研究的深入, 鸡胚不同组织体外培养的细胞必将广泛使用, 因而, 对鸡胚不同组织来源的细胞进行特性分析就十分必要。

为此, 本实验对第六代的鸡胚躯体来源细胞(body tissue cells, BTC)、心来源细胞(heart tissue cells, HTC)及肺来源细胞(lung tissue cells, LTC)的生物特性进行研究, 通过原代培养、传代培养、细胞冻存等技术, 综合分析其形态学特点、生长曲线、分裂指数、染色体核型等指标, 阐明不同组织细胞间的差异, 为实验室研究、疫苗生产和病毒增殖模型的建立提供借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

孵化9~14日龄种鸡蛋, 购自内蒙古宏鑫种禽有

限责任公司, M199 (GIBCO), 新生牛血清(杭州四季青公司生物工程材料有限公司), 胰蛋白酶(Amresco), 二甲基亚砷(DMSO, Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 原代培养 将孵化9~14日龄的鸡蛋用新洁尔灭、酒精依次消毒, 无菌操作获取胚体、心、肺组织, 用Hank's液洗涤。然后将组织块剪成1 mm³大小, 贴于培养瓶内, 30~60 min后加入4 mL含15%新生牛血清的M199完全培养液, 放入38.5 °C, 5% CO₂培养箱中培养。

1.2.2 传代培养 弃去培养液, 用Hank's液洗涤, 加入胰蛋白酶消化液消化2~3 min, 加入M199完全培养液终止消化, 吹打悬浮细胞, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清。再加入M199完全培养液悬浮细胞, 以1×10⁵/mL细胞密度接种于培养瓶内, 放入CO₂培养箱中培养, 次日换液, 继续培养。

1.2.3 冷冻保存 取细胞汇合度为70%~80%的鸡胚细胞, 吸去培养液, Hank's液冲洗, 加入胰蛋白酶消化液, 待细胞收缩变圆。加入等体积M199完全培养液, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 再缓慢加入含有10% DMSO的M199完全培养液, 制成悬液, 移入冷冻管, 装入棉纱布袋, 置于冰箱内平衡、诱发结晶后转入液氮罐保存^[11]。

1.2.4 Giemsa染液配制 称取Giemsa干粉0.5 g、

收稿日期: 2011-03-23 接受日期: 2011-05-27

内蒙古自然科学基金(No.2009MS0503)和国家基础科学人才培养基金(No.J0730648)资助项目

*通讯作者。Tel: 0471-4995867-8017, E-mail: liyu_cn@hotmail.com

量取甘油22 mL, 先用少许甘油将Giemsa研磨至无颗粒, 再将剩余甘油倒入混匀, 56 °C保温2 h后, 加入33 mL甲醇, 于棕色瓶内保存。染色时, 使用pH7.2的PBS, 按1:9混合制成染色液^[12]。

1.2.5 绘制生长曲线 根据细胞生长能力, 胚体来源细胞(BTC)、心脏来源细胞(HTC)、肺来源细胞(LTC)分别取 $1.0 \times 10^4/\text{mL}$ 、 $1.67 \times 10^4/\text{mL}$ 、 $2.58 \times 10^4/\text{mL}$ 三种浓度细胞悬液, 接种于24孔板内, 每24 h任取三个孔的细胞进行计数, 待计数完毕绘制不同细胞生长曲线。

1.2.6 分裂指数测定 根据细胞贴壁能力, BTC、HTC、LTC按适宜浓度, 接种于内有无菌小盖玻片的小皿内, 每24 h选取一皿, 固定液固定, Giemsa染

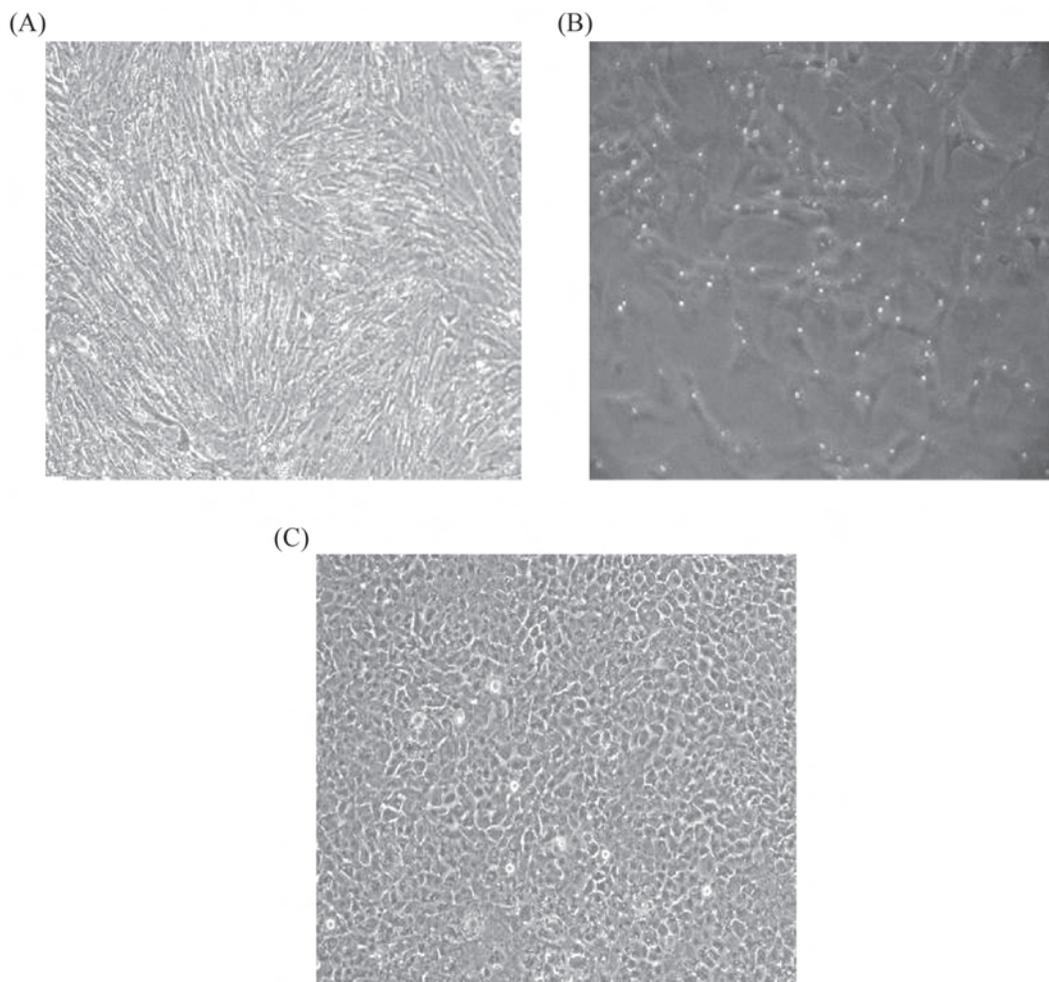
液染色, 自然风干。显微镜下选取疏、中、密三个区域, 计数视野内分裂细胞数目和细胞总数, 并按公式: 分裂指数=分裂细胞数/细胞总数 $\times 100\%$, 计算分裂指数并绘制曲线^[13]。

1.2.7 核型分析 参考柴艳等^[14]的方法, 稍作改进: 选取指数生长期细胞, 常规法制备染色体滴片, Giemsa染液染色后镜检、照相, 核型分析。

2 结果

2.1 鸡胚细胞的形态

对鸡胚细胞进行原代、传代培养, 显微镜下观察表明: BTC (图1A)和HTC (图1B)为成纤维型, 而LTC (图1C)为上皮型。



A: 胚体来源细胞(培养5日后, 100 \times); B: 心来源细胞(培养7日后, 100 \times); C: 肺来源细胞(培养12日后, 100 \times)。

A: the cells from the tissue of embryo body (cultured for 5 days, 100 \times); B: the cells from the tissue of heart (cultured for 7 days, 100 \times); C: the cells from the tissue of lung (cultured for 12 days, 100 \times).

图1 不同组织来源的细胞形态观察

Fig.1 The morphological observation of cells from different tissues

2.2 鸡胚细胞生长曲线的绘制

BTC、HTC、LTC连续计数8天, (表1)。并根据该数据绘制生长曲线(图2), 计算细胞倍增时间。结果表明, 以上三种组织细胞的倍增时间分别为20 h、46 h和48 h。

2.3 鸡胚细胞分裂指数测定

对BTC、HTC、LTC分裂相细胞计数8天(表2), 绘制细胞分裂指数(图3), 发现BTC分裂第4天达到最大值, 而HTC、LTC分别于第6天、第5天达到峰值。

表1 鸡胚不同组织细胞计数结果

Table 1 Counting results of different chicken embryo cells

天数 Day	躯体来源细($\times 10^4/\text{mL}$) Body tissue cells	心来源细胞($\times 10^4/\text{mL}$) Heart tissue cells	肺来源细胞($\times 10^4/\text{mL}$) Lung tissue cells
0	1.00	2.58	1.67
1	2.88	6.17	4.46
2	5.61	8.00	7.04
3	8.66	11.42	9.58
4	16.35	13.92	12.00
5	35.31	22.13	18.54
6	42.21	27.08	23.79
7	44.44	31.67	32.17
8	45.77	31.25	26.67

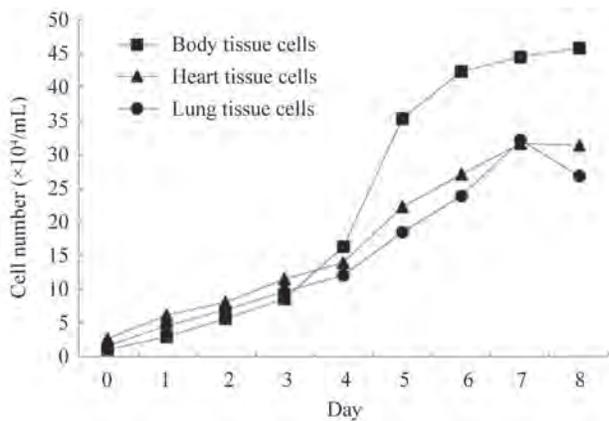


图2 鸡胚不同组织细胞生长曲线

Fig.2 The growth curves of different chicken embryo tissue cells

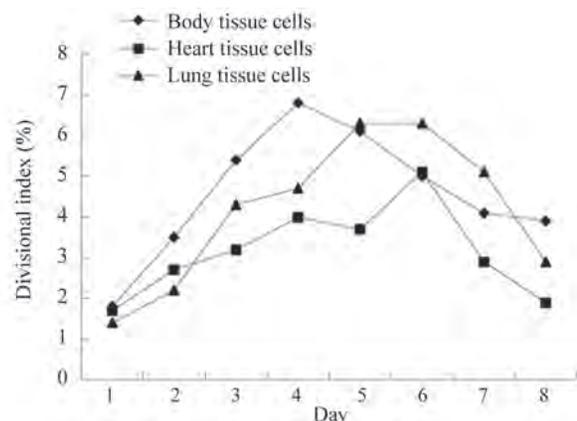


图3 鸡胚不同组织细胞分裂指数曲线

Fig.3 The divisional index curves of different chicken embryo tissue cells

表2 鸡胚不同组织细胞分裂指数记录(%)

Table 2 Divisional index data of different chicken embryo tissue cells (%)

天数 Day	躯体来源细($\times 10^4/\text{mL}$) Body tissue cells	心来源细胞($\times 10^4/\text{mL}$) Heart tissue cells	肺来源细胞($\times 10^4/\text{mL}$) Lung tissue cells
1	1.8	1.7	1.4
2	3.5	2.7	2.2
3	5.4	3.2	4.3
4	6.8	4.0	4.7
5	6.1	3.7	6.3
6	5.0	5.1	6.3
7	4.1	2.9	5.1
8	3.9	1.9	2.9

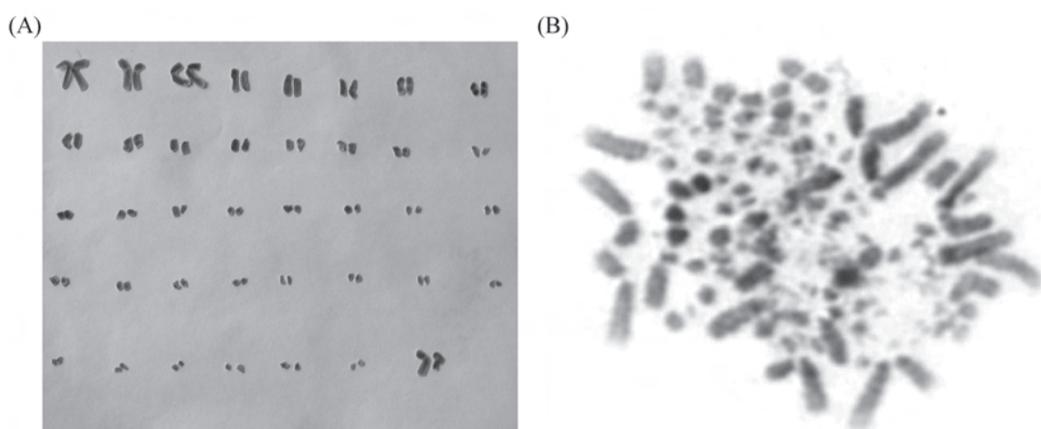
2.4 鸡胚细胞核型分析

选取分散度好、图像清晰的染色体拍照, 按照核型分析要求, 观察染色体形态、配对同源染色体。如图4所示, 鸡胚细胞染色体为78条, 其中, 有ZW染色体各一条。

2.5 鸡胚细胞的长期传代培养

对鸡胚各器官组织来源的细胞进行组织块培养发现, 各组织细胞从第4~5天才开始从组织周围生长出来, 约10天可铺满瓶底。BTC可传代培养18~20代左右, 18代以后有明显的生长停滞, 退化凋亡。BTC

传到7~8代有明显的生长瓶颈, 生长速度明显地下降, 甚至有的细胞生长形态变形。细胞体积变大, 透明度提高, 核仁增多。HTC传代培养期间也有明显的生长瓶颈, 但比BTC要晚2~3代。传至9~10代, 细胞内有明显的沉积物, 核增大, 核仁增多, 有细胞突触的生成。HTC可传代23~25代。LTC传代培养期间没有明显的生长瓶颈, 但生长期间细胞自身分泌的东西比较多, 9~10代后细胞形态有所变化, 趋向BTC细胞形态, 细胞内易出现空泡。本实验室可传代培养15~18代, 之后有明显的退化和凋亡现象。



A: 核型图; B: 中期分裂相。

A: ideogram; B: metaphase.

图4 鸡胚细胞的中期分裂相和核型图

Fig.4 Metaphase and ideogram of chicken embryo cell

3 讨论

实验发现, 9天的胚蛋比较适合BTC的培养, 而14天的胚蛋适合HTC、LTC等内脏细胞培养, 因而获取不同的组织需恰当地挑选不同孵化时间的胚蛋。其次, 原代培养要十分注意组织块贴壁时间和培养液添加方式, 尤其组织块大小直接影响贴壁时间长短, 一般1~2 mm³大小组织块需贴45~65 min, 随组织块增大, 贴壁时间应适当延长; 添加培养液, 要将培养瓶倒置添加, 待细胞贴壁牢固, 从侧面缓慢翻转180°即可。细胞传代中发现, 不同组织细胞的贴壁状况不同, LTC最为牢固, HTC、BTC次之, 但对胰蛋白酶的敏感程度则是BTC、HTC、LTC依次减弱。此外, 对鸡胚细胞的冻存表明: DMSO浓度和渗透量会直接影响细胞在降温时受到损伤的程度, 为此, 控制好冻存保护剂用量的同时, 要缓慢滴加并快

速震荡以利于细胞的吸收, 才能使复苏后的细胞达到较高活率。

显微镜下观察发现: BTC为成纤维型细胞, 大多呈梭形, 细胞核占细胞比重较另两种细胞而言最小, 细胞生长间距小, 生长能力强, 当细胞出现接触时会相互连接, 但并不立即抑制生长, 待细胞生长空间完全占用后, 细胞形态发生改变、细胞核变暗, 个别细胞会出现空泡; HTC也呈成纤维型, 但与BTC相比较, 大多为不规则三角形, 细胞核占细胞比重较大, 细胞生长间距大, 且当细胞出现接触时, 也不会相互连接, 细胞留有一定间距生长; LTC为明显的上皮型细胞, 扁平、不规则多角形, 与上述两种细胞相比, 细胞核占细胞比重大, 细胞之间生长距离最小, 紧密相连进行生长, 生长过程中有“拉网”现象存在^[5]。

生长曲线和分裂指数能更好地研究不同组织

细胞间的差异, 实验表明, 鸡胚BTC生长情况最好, 较HTC和LTC调整适应期短, 且细胞数量增加快。细胞的分裂指数也可看出, BTC的分裂指数峰值要高于另两种细胞, 且到达分裂最高点时间最短, 由此可推断, BTC和内脏细胞在生长周期上可能存在很大不同, 尤其对于体外条件下该现象明显。随后的细胞核型表明, 实验所用细胞染色体为78条, 在培养过程中未发生改变, 遗传性状稳定^[6], 能够为细胞建系等相关研究提供实验基础。

BTC、HTC和LTC的长期传代培养发现, 前两者有明显的第一瓶颈期, 传到7~9代细胞生长及倍增速度明显下降, 细胞形态有一定的改变。遗憾的是本实验未能发现突破第二瓶颈期的细胞。但LTC培养中未发现生长瓶颈。鸡胚细胞的长期传代培养还发现细胞之间的接触对细胞生长增殖影响很大。其传代浓度要比哺乳动物体外培养的大一些, 传代次数越多, 越明显, 且有“抱团生长”现象, 细胞浓度大的位置生长很快, 浓度低的位置生长十分缓慢。LTC的培养中此现象更明显。细胞退化以后细胞接触明显增多、折光性增强。

面对不同实验要求, 选取不同类型细胞可缩短实验周期、增加实验效率, 对研究有着至关重要的影响, 为此, 对选取的细胞进行生物学特性分析就十分必要。本实验对鸡胚不同组织体外培养条件下的细胞进行生物学特性分析, 得出了鸡胚BTC和以HTC、LTC为代表的内脏细胞间的差异, 使以鸡胚细胞为实验材料的研究有了更加明确的结论。此外, 目前鸡胚细胞的研究主要集中在疫苗和病毒研究方面, 而这些都是以细胞正常生长、代谢为基础, 在明确细胞特性后, 就可以通过其形态上、生长状态和分裂能力改变, 判断实验细胞体外生活情况, 从而采取相应措施, 改进培养方法。上述三种不同组织来源细胞的体外培养及其特性分析, 不仅弥补了鸡胚细胞研究中的空缺, 也为今后永生化细胞系的建立提供了借鉴。

参考文献 (References)

- 1 Coswig LT, dos Santos MB, Hafez HM, Ferreira HL, Arns CW. Propagation of avianmetapneumovirus subtypes A and B using chicken embryo related and other cell systems. *Virol Methods* 2010; 167(1): 1-4.
- 2 Sharma LB, Ohgimoto S, Kato S, Kurazono S, Ayata M, Takeuchi K, *et al.* Contribution of matrix, fusion, hemagglutinin, and large protein genes of the CAM-70 measles virus vaccine strain to efficient growth in chicken embryonic fibroblasts. *J Virol* 2009; 83(22): 11645-54.
- 3 Gilbert PA, Comanita L, Barrett J, Peters A, Szabat M, McFadden G, *et al.* Current status for high titre poxvirus stock preparation in CEF under serum-free medium conditions: Implication for vaccine development. *Cytotechnology* 2005; 48(3): 79-88.
- 4 Geerligs H, Quanz S, Suurland B, Spijkers IE, Rodenberg J, Davelaar FG, *et al.* Efficacy and safety of cell associated vaccines against Marek's disease virus grown in a continuous cell line from chickens. *Vaccine* 2008; 26(44): 5595-600.
- 5 Borges MB, Caride E, Jabor AV, Malachias JM, Freire MS, Homma A, *et al.* Study of the genetic stability of measles virus CAM-70 vaccine strain after serial passages in chicken embryo fibroblasts primary cultures. *Virus Genes* 2008; 36(1): 35-44.
- 6 Caride E, Borges MB, Marcovitz R, Galler R, Freire Mda S. Evidence for interferon production and its correlation with YF 17DD vaccine virus yields in primary chick embryo cells. *Virus Res* 2008; 137(1): 106-11.
- 7 刘爱玲, 刘长军, 张艳萍, 李晶梅, 施维松, 闫福海, 等. 鸡马立克氏病毒流行毒株高代次细胞毒株Meq、RLORF4、RLORF12及132bpr基因变异分析. *病毒学报* 2009; 25(5): 368-75.
- 8 Jang J, Hong SH, Choi D, Choi KS, Kang S, Kim IH. Overexpression of Newcastle disease virus (NDV) V protein enhances NDV production kinetics in chicken embryo fibroblasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 85(5): 1509-20.
- 9 张立, 张元兴, 华平, 俞俊棠. 鸡胚细胞的培养. *华东理工大学学报* 1994; 20(3): 331-6.
- 10 褚秀玲, 苏建青, 付本懂, 王鲁, 伊鹏霏, 王春元, 等. 马立克氏病毒感染鸡胚成纤维细胞模型的建立. *中兽医学杂志* 2009; 4: 6-9.
- 11 肖小璐, 秦洁, 李碧春. 鸡胚成纤维细胞的冷冻保存. *甘肃畜牧兽医* 2003; 33(5): 5-7.
- 12 李煜, 邢万金. *生物技术实验指导*. 呼和浩特: 内蒙古大学出版社, 2007: 81-2.
- 13 吴林花, 郭劲柏, 刘红梅, 刘伟. 仙鹤草注射液对人癌细胞生长抑制作用的研究. *中国中医药科技* 2005; 12(5): 297-8.
- 14 柴艳, 张丽春, 李丽红, 陈宝定, 文生萍, 李琦华, 等. 屏边大围山原鸡染色体核型分析. *中国畜牧兽医* 2009; 36(2): 90-3.
- 15 鄂征. *组织培养和分子细胞学技术*. 北京: 北京出版社, 1998: 11-3.
- 16 Wu H, Guan W, Li H, Ma Y. Establishment and characteristics of white ear lobe chicken embryo fibroblast line and expression of six fluorescent proteins in the cells. *Cell Biol Int* 2008; 32(12): 1478-85.

The Biological Characteristic Analysis on Three Different Chicken Embryo Tissue Cells Cultured *in vitro*

Tai Dapeng, Liu Kun, Terigele, Hou Dongxia, Li Yao, Li Yu*
(College of Life Science of Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract Different chicken embryo tissue cells were got by tissue culture in this experiment, and M199 medium was used for the primary culture and serial subcultivation. Then morphology observation, growth curves and divisional index were recruited for their biological characteristic analysis. The results showed that there were many differences between different tissue cells in chicken embryo, ranging from morphosis to growth cycle. The cells derived from body tissue and heart tissue were fibroblast-like cell, while the lung tissue cells were epithelial-like cell. And the body tissue cells were grown faster than heart tissue cells, the last, lung tissue cells. The body tissue cells' doubling time was shorter than other two tissues among the three tissues. The further karyotype analysis indicated that the number of chicken embryo cell chromosomes was 78, which belonged to the normal chicken karyotype. The results above could provide material and basis for further research in the field.

Key words chicken embryo cell; tissue culture; growth curve; divisional index; karyotype analysis

Received: March 23, 2011 Accepted: May 27, 2011

This work was supported by the Inner Mongolia Provincial Natural Science Foundation (No.2009MS0503) and the National Training Fund Basic Science (No.J0730648)

*Corresponding author. Tel: 86-471-4995867-8017, E-mail: liyu_cn@hotmail.com