

野牦牛成纤维细胞分离培养与部分生物学特性观察

郭志林^{1,2*} 杨永梅³ 赵明德¹ 于军¹ 王伟¹ 庞礴² 郭松长² 赵新全²

(¹青海民族大学化学与生命科学学院, 西宁 810007; ²中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810008;

³青海民族大学公共管理学院, 西宁 810007)

摘要 野牦牛是青藏高原珍稀牛种, 国家一级保护动物。为了保存野牦牛遗传资源, 采用组织块法建立了3株野牦牛成纤维细胞株。体外培养的野牦牛细胞呈现典型的成纤维细胞形态, 增殖能力强, 测定的细胞群体倍增时间为38.47 h, 平台期密度为 $2.08 \times 10^6/\text{mL}$ 。经免疫荧光染色, 细胞表达FGFR5, 经单克隆培养建立了FGFR5阳性细胞株。F₇细胞染色体核型分析表明, 二倍体正常核型率为84.33%, 核型 $2n=60$, 常染色体均为近端着丝粒染色体, X、Y染色体为近端着丝粒染色体。所建立的野牦牛体细胞株为开展野牦牛克隆研究提供了材料。

关键词 野牦牛; 细胞培养; 成纤维细胞; 免疫荧光染色

Isolation and Culture of Fibroblast Cells from *Bos mutus* and Analysis on Some Biological Characteristics

Guo Zhilin^{1,2*}, Yang Yongmei³, Zhao Mingde¹, Yu Jun¹, Wang Wei¹, Pang Bo², Guo Songchang², Zhao Xinquan²

(¹Academy of Chemistry and Life Science, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China; ²Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; ³Academy of Public Management, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China)

Abstract *Bos mutus* is the rare bovine species under first-grade protection and is native to the Qinghai-Tibet Plateau. In order to preserve *Bos mutus* genetic resource, three fibroblast cell strains from *Bos mutus* were established by tissue culture. *Bos mutus* cells *in vitro* culture appeared typical morphology of fibroblast cell and had strong hyperplasia ability. Population doubling time of the cells was 38.47 h, and plateau phase density of the cells was $2.08 \times 10^6/\text{mL}$. FGFR5 expression in cells was confirmed by immunofluorescence staining. Cell strains with FGFR5 positive expression were established by monoclonal cell culture. Chromosome karyotypes analysis to F₇ cells showed that the rate of normal diploidy ($2n=60$) was 84.33%. Moreover, all autosomes were acrocentric chromosomes, and X as well as Y chromosome belonged to acrocentric chromosomes. *Bos mutus* cell strains established in the study offered the material for the *Bos mutus* cloning research.

Key words *Bos mutus*; cell culture; fibroblast cell; immunofluorescence staining

野牦牛(*Bos mutus*)是我国青藏高原上的珍稀牛种, 国家一级保护动物, 是家牦牛(*Bos grunniens*)的最近祖先^[1]。目前, 野牦牛种群数量锐减, 基因库丰富度下降^[2]。野牦牛冷冻精液已成功地应用于家牦

牛复壮及改良, 使牦牛生产性能大幅度提高, 这是野牦牛资源利用的典范^[3]。牦牛-黄牛体细胞核移植研究也取得了一定的进展^[4-5], 提示野牦牛克隆可能成为保护野牦牛种质资源的途径。本研究用组织块法

收稿日期: 2013-06-14 接受日期: 2013-09-30

教育部科学技术研究重点项目(批准号: 211192)、青海民族大学高层次人才科研项目(批准号: 2012G002)、财政部战略生物资源科技支撑专项(批准号: KSCXZ-YW-Z-0951)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0971-8800379, E-mail: gzl7511@hotmail.com

Received: June 14, 2013 Accepted: September 30, 2013

This work was supported by the Ministry of Education Science and Technology Research Projects (Grant No.211192), Qinghai University for Nationalities High Level Talents Science Research Projects (Grant No.2012G002) and the Ministry of Finance Strategic Biological Resources Science and Technology Support Special Projects (Grant No.KSCXZ-YW-Z-0951)

* Corresponding author. Tel: +86-971-8800379, E-mail: gzl7511@hotmail.com

网络出版时间: 2013-11-12 12:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131112.1245.006.html>

进行野牦牛成纤维细胞分离培养, 对野牦牛细胞形态、生长曲线、FGFR5表达及细胞遗传学特征进行了研究, 在细胞水平保存了野牦牛珍贵的遗传资源, 为野牦牛克隆提供了供体细胞, 也为野牦牛低氧、低温适应机制研究提供了材料。

1 材料与方法

1.1 皮肤组织的获取、保存与处理

皮肤样品来自青海玉树地区四头6~8月龄野牦牛(二公二母)。经耳部剪毛、清洗和消毒后, 剪取皮肤组织约0.5 cm², 放入4 °C组织保存液, 6~8 h内运回实验室。用PBS溶液洗涤, 将皮肤组织剪成约1 mm³小碎块, 放入细胞培养液[D/F12(Gibco)添加10%胎牛血清、100 IU/mL青霉素、100 μg/mL链霉素]中。

1.2 细胞原代培养与传代

将组织块均匀摆放于T25培养瓶(Corning)底部, 加入3 mL细胞培养液, 每3 d更换一次细胞培养液。细胞在组织块周围成片生长时传代, 加入2 mL 0.25%胰蛋白酶和0.04%乙二胺四乙酸二钠混和溶液(Gibco)消化细胞3~4 min, 再加入2 mL细胞培养液终止消化, 于1 000 r/min离心细胞, 用细胞培养液重新悬浮细胞, 计数后以5×10⁴/mL的密度接种于新培养瓶继续培养。经过5~7 d的生长后, 细胞达到85%~90%汇合, 再次按1:3或1:4比例进行传代培养。

细胞冷冻时, 在传代细胞离心后的沉淀物加1 mL预冷至4 °C的细胞冻存液, 混匀后移到细胞冻存管(Corning), 放入预冷的细胞冻存盒(Nalgene)于4 °C平衡0.5 h后, 放入-80 °C低温冰箱保存, 24 h后可将细胞冻存管投入液氮保存。复苏细胞时, 将冻存管于37 °C水浴中解冻细胞, 移到15 mL离心管, 加入9 mL细胞培养液混匀, 离心沉淀细胞, 加入细胞培养液重新悬浮细胞, 计数并调整细胞密度为5×10⁴/mL, 移到细胞培养瓶培养。

1.3 细胞生长曲线绘制

采用常规方法制作细胞生长曲线。传代细胞稀释至1×10⁵/mL, 分别加入24孔培养板(NUNC)孔中, 每孔1 mL, 每一列加3孔, 共加10列。每天在固定时间取出培养板, 从第1列开始消化同一列3个孔的细胞, 稀释后用血球计数板进行细胞计数, 计算其平均值。共计数10 d, 以天数作为横坐标, 以细胞数作为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。细胞群体倍增时间(population doubling time, PDT)用以下公式求得:

$$PDT = t \times \frac{\lg 2}{\lg N_t - \lg N_0}$$

公式中*t*代表培养时间, *N*₀代表首次计数获得的细胞数, *N*_{*t*}代表培养*t*时间后的细胞数。

1.4 细胞单克隆培养筛选与FGFR5免疫荧光分析

用胰酶消化培养的细胞, 细胞计数后, 将细胞悬液稀释至1×10⁵/mL, 取200 μL细胞悬液加至20 mL培养液(1:100稀释), 再按上述比例稀释1次, 使细胞悬液稀释为1×10⁴/mL, 按每孔0.1 mL细胞悬液加入到96孔培养板, 并在显微镜下标出只含1个细胞的孔, 连续培养3周, 观察细胞集落的出现。出现的细胞集落进行传代培养, 并进行FGFR5免疫荧光分析。参考已报道的方法^[6], 稍作修改。将细胞悬液按每孔4 mL的量加入预先放置盖玻片(NUNC)的6孔板内, 培养细胞至50%~70%汇合。用含2%甲醛的PBS固定, PBS洗涤2次。加2 mL含10% FBS的PBS, 放置10~20 min。用含0.2%~0.5% Triton X-100和10% FBS的PBS稀释一抗(FGFR5兔多克隆抗体, 200 μg/mL, Santa Cruz Biotechnology Inc.), 稀释比例为1:200。用高速离心机最大速度离心抗体稀释液和对照组溶液, 从沉淀物中吸出抗体溶液作为对照, 不进行PI(prodipium iodide)染色。加一抗25 μL, 于湿盒内孵育1 h。加入含10% FBS的PBS, 洗涤2次以上。用含0.2%~0.5% Triton X-100和10% FBS的PBS溶液稀释二抗[DyLight 488山羊抗兔IgG(H+L), EarthOx, LLC Inc.], 稀释比例为1:100。加二抗25 μL, 避光孵育1 h。加含10% FBS的PBS, 洗涤2次以上。滴加含0.2% Triton X-100和10 μg/mL PI的PBS孵育2 min, 用PBS洗涤3次。用抗荧光淬灭封片剂(Fluoromount-GTM, SouthernBiotech Inc.)封片后, 在荧光显微镜下观察。DyLight 488用493 nm激发光, PI用535 nm激发光。通过与对照组比较, 确定非特异染色区域。

1.5 细胞核型检测

参考已报道的方法^[7], 稍作修改。传代细胞以3×10⁴/mL的密度接种于T25培养瓶, 培养3~5 d。加入终浓度为0.1 μg/mL的秋水仙素溶液处理3 h, 胰酶消化细胞, 离心, 加入2 mL 0.075 mol/L KCl溶液37 °C低渗处理13 min。加新鲜配制的冰冷醋酸甲醇(1:3)固定液, 混匀后100×g离心2 min, 弃上清液, 震荡细胞团块, 重复一次。加入0.2 mL固定液, 震荡混悬细胞。用吸管将细胞悬液滴到预冷的洁净玻片上, 火焰干燥。用G带法进行染色体显带。烘干玻片, 用胰酶消化染色体45 s, 滴加Giemsa染液, 染色10 min。在尼康显微镜(Nikon Eclipse Ti)油镜下拍摄染色体图片。

用Photoshop软件剪切单个染色体,按照带纹成对排列后,用尼康显微镜图像处理软件(NIS-Elements BR 3.00, SP1)进行染色体数据测量并按大小排列。

2 结果

2.1 野牦牛成纤维细胞的形态特点

用组织块法共建立了来自不同个体的3株野牦牛皮肤成纤维细胞,分批进行冷冻保存。组织块培养10 d,周围可见梭形或铺路石样多边形细胞游出并向四周成片生长(图1A)。组织块培养14~16 d时进行传代培养,传代后细胞生长迅速,约4~5 d生长至85%~90%汇合,所形成纤维细胞呈现漩涡状生长(图1B)。

2.2 细胞生长曲线

D/F12培养液中F₆代野牦牛成纤维细胞生长曲线见图2,体外培养细胞经过短暂的潜伏期后开始快速增殖,存在着明显的对数生长期(3~8 d),大约在第7~8 d达到平台期,此后逐渐进入衰退期。PDT和平

台期密度分别是38.47 h和 $2.08 \times 10^6/\text{mL}$ 。

2.3 细胞遗传学结果

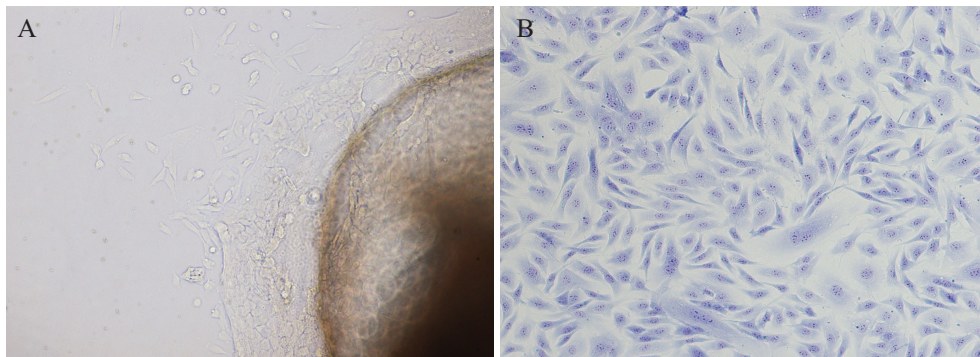
野牦牛F₇代成纤维细胞正常二倍体核型百分率是84.33%,正常二倍体染色体标本见图3。G带法制作的染色体核型图见图4,2n=60,常染色体为近端着丝粒染色体,X染色体为近端着丝粒染色体,Y染色体为近端着丝粒染色体。

2.4 细胞单克隆培养筛选与FGFR5免疫荧光分析结果

细胞在96孔培养板连续培养3周后,标记的单细胞培养孔形成8个细胞集落,传代培养扩增后进行FGFR5免疫荧光染色,有6个细胞集落呈现FGFR5阳性。与对照图5B相比呈现明显的阳性结果,被绿色荧光标记的FGFR5蛋白主要分布在细胞表面(图5A)。

3 讨论

目前,有一些报道建立了牦牛乳腺上皮细胞系^[8]



A: 组织块培养; B: 传代培养的细胞(Giemsa染色).
A: tissue culture; B: subculture cells (Giemsa staining).

图1 体外培养的野牦牛成纤维细胞(100×)

Fig.1 Fibroblast cells from *Bos mutus* in vitro culture (100×)

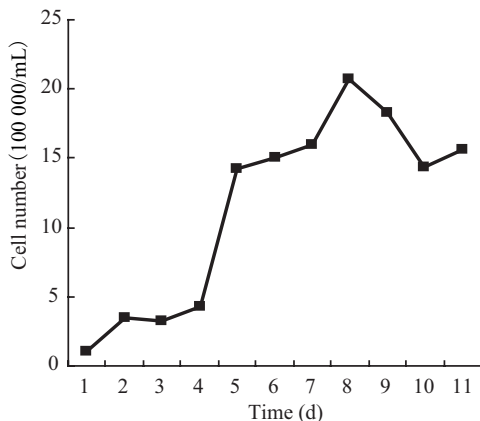


图2 野牦牛成纤维细胞的生长曲线

Fig.2 Growth curve of fibroblast from *Bos mutus*

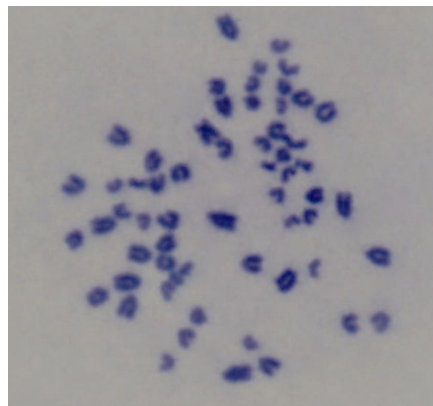


图3 野牦牛细胞染色体标本

Fig.3 The chromosomes specimen of *Bos mutus* cells

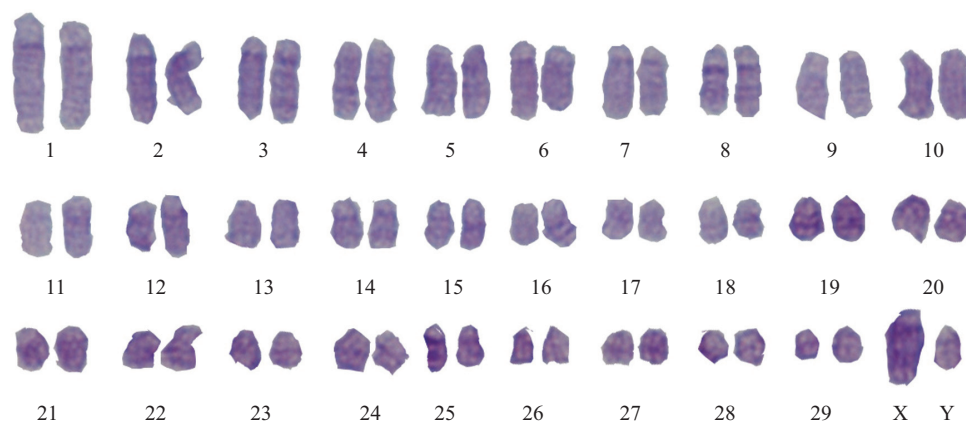
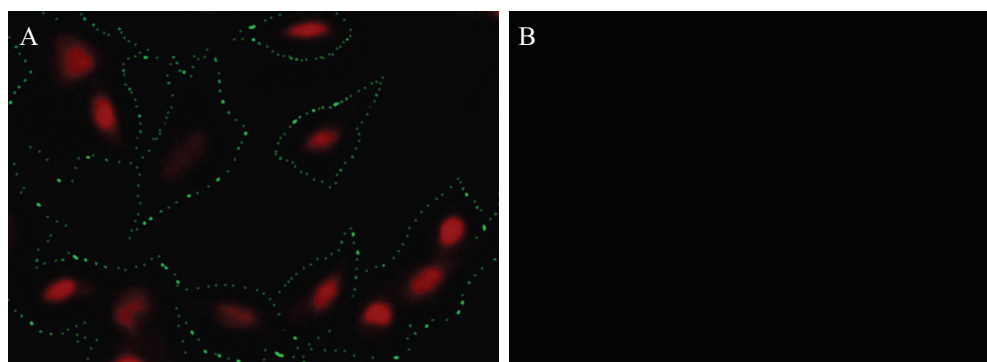


图4 野牦牛G带染色体核型

Fig.4 The chromosomes karyotype of G band from *Bos mutus*

A: FGFR5免疫荧光染色; B: 对照组; PI染色的细胞核呈现红色荧光; FGFR5结合DyLight 488呈现绿色荧光。

A: immunofluorescence staining of FGFR5; B: control group; Cell nuclei showed red fluorescence by PI staining; FGFR5 combined by DyLight 488 showed green fluorescence.

图5 野牦牛体细胞FGFR5免疫荧光染色(400×)

Fig.5 Immunofluorescence staining of FGFR5 in *Bos mutus* somatic cells(400×)

和成纤维细胞系^[9-11], 并使用所建立的牦牛成纤维细胞系进行了牦牛-黄牛种间体细胞核移植研究^[12-13]。野牦牛体细胞培养与生物学特性研究尚未见报道。本研究用组织块法建立了3株野牦牛成纤维细胞, 对细胞形态、生长曲线、FGFR5表达、细胞核型进行了分析, 获得了高活力和细胞核型正常的野牦牛成纤维细胞株。

组织块培养法简单易行, 能较好地保存组织细胞特性, 避免了酶消化法对细胞的损伤, 此法培养的细胞更适合体细胞克隆的要求。正是出于这一点考虑, 本试验采用了组织块法来建立野牦牛细胞株, 使细胞能更好地保留较完整的组织细胞特性, 获得较高的细胞活力, 有利于提高野牦牛克隆的效率。

商品化细胞培养液因不同的设计方案和培养目的其成分存在着较大的差异, 在选择上应充分考虑所要分离培养的细胞类型, 为其提供最佳的生长环境使目标细胞成为优势群体。在野牦牛细胞体外培养中,

证实D/F12培养液培养下细胞增殖能力较强, PDT时间较短, 二倍体核型正常率较高, 与以前的报道一致^[14]。

FGFR5是酸性和碱性成纤维细胞生长因子家族成员之一, 属于跨膜蛋白, 但缺乏胞内区段^[15]。FGFR5在皮肤组织中表达, 参与毛囊发育和被毛生长调节^[16-17]。研究表明, FGFR5主要分布于野牦牛皮肤成纤维细胞表面, 并利用FGFR5作为标志建立了FGFR5阳性单克隆细胞株, 以便以后进一步研究该细胞株的生物学特性。体外培养的动物体细胞处于不良环境时, 随着传代次数的增加容易发生染色体变异。在D/F12培养液中野牦牛F₁代细胞二倍体核型正常率为84.33%, 发生了一定程度的染色体数目变异, 需考虑优化培养条件, 可以使用细胞生长因子增强细胞增殖能力, 缩短传代所需时间来减少染色体变异。

野牦牛是生活于青藏高原的珍稀牛种, 分类地位特殊而有争议。本实验对野牦牛染色体核型进行

了分析,可为野牦牛的细胞遗传学研究及分类提供参考。野牦牛细胞二倍体 $2n=60$,常染色体均为近端着丝粒染色体,X、Y染色体为近端着丝粒染色体,与家牦牛及含野血牦牛染色体数目一致、组型相类似^[18]。野牦牛常染色体中存在着大量微小染色体,在核型分析上存在着一定的困难。本试验应用G带法进行染色体核型分析,借助染色体上的部分带纹进行染色体配对,在一定程度上提高了配对的准确性,也降低了核型分析的难度。然而,仍存在着部分带纹不清晰的染色体,需要以后用其他显带方法进一步鉴别。

细胞冷冻保存使后期的细胞培养及使用变得非常便利。把细胞株保存于细胞库,可为各个研究机构提供源源不断的细胞样品。本研究建立了3个野牦牛成纤维细胞株,冷冻保存了各代细胞约60多管(2 mL冻存管),保存了野牦牛珍贵的遗传资源和研究材料,是继野牦牛精子冷冻保存后的另一种野牦牛资源保存方式。在此基础上,研究组将利用已建立的野牦牛成纤维细胞系作为供体细胞、以黄牛或牦牛卵母细胞作为受体胞质开展野牦牛体细胞核移植研究,将获得的克隆囊胚移植到黄牛子宫内生产克隆野牦牛,进一步扩大优秀野牦牛育种群,为野牦牛遗传资源利用与家牦牛复壮提供新的技术措施。

野牦牛成纤维细胞株的建立,保存了野牦牛珍贵的遗传资源,所建立的细胞培养技术及生物学特性资料能为牦牛属动物细胞培养和研究提供参考。

参考文献 (References)

- 赵新全,祁得林,杨洁. 青藏高原代表性土著动物分子进化与适应研究. 北京: 科学出版社(Zhao Xinquan, Qi Delin, Yang Jie. Beijing: Science Press) 2008, 7.
- 杨博辉,郎侠,阎萍,梁春年,孙晓萍. 中国野牦牛种质资源库体系的建立. 家畜生态学报(Yang Bohui, Lang Xia, Yan Ping, Liang Chunian, Sun Xiaoping. Construction for the system of genetic resource banks on wild yak in china. Acta Ecologiae Animalis Domastici) 2006; 27(1): 1-5.
- 杨荣珍,罗晓林. 野牦牛资源及其利用现状. 青海科技(Yang Rongzhen, Luo Xiaolin. The *Bos mutus*'s resource and present situation of utilization. Qinghai Science and Technology) 1995; 2(4): 14-7.
- Li Y, Li S, Dai Y, Du W, Zhao L, Wang H, et al. Nuclear reprogramming in embryos generated by the transfer of yak (*Bos grunniens*) nuclei into bovine oocytes and comparison with bovine-bovine SCNT and bovine IVF embryos. Theriogenology 2007; 67: 1331-8.
- Guo ZL, Wang YS, Zhang Y. Leptin promoted meiotic maturation of bovine oocytes and development of parthenogenetic activation and yak (*Bos grunniens*)-bovine interspecies cloned embryos. Belgian J Zool 2008; 138(2): 184-90.
- Bonifacino JS, Dasso M, Harford JB, Lippincott-Schwartz J, Yamada KM. 章静波,方瑾,王海杰,谭玉珍,译. 精编细胞生物学实验指南. 北京: 科学出版社(Bonifacino JS, Dasso M, Harford JB, Lippincott-Schwartz J, Yamada KM. Short Protocols in Cell Biology. Beijing: Science Press) 2007, 175-7.
- Freshney RI. 章静波,马杰,杨峰,赵永娟,徐存拴,陈实平等译. 动物细胞培养——基本技术指南(第五版). 北京: 科学出版社(Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th ed. Beijing: Science Press) 2008, 346-7.
- 郝明超,刘犇,樊江峰,陈鹏,张华,王明亮,等. 牦牛乳腺上皮细胞系的建立与生物学特性. 兽类学报(Hao Mingchao, Liu Ben, Fan Jiangfeng, Chen Peng, Zhang Hua, Wang Mingliang, et al. Establishment and characterization of yak mammary epithelial cell line. Acta Theriologica Sinica) 2013; 33(2): 157-63.
- 屠迪,崔燕,余四九. 牦牛胎儿成纤维细胞的分离培养. 中国兽医科学(Tu Di, Cui Yan, Yu Sijiu. Isolation and culturing *in vitro* of yak embryonic fibroblasts. Veterinary Science in China) 2006; 36(7): 573-7.
- 张小建,李键,张兴友,王蕊,郜勇. 牦牛成纤维细胞的体外培养研究. 湖北农业科学(Zhang Xiaojian, Li Jian, Zhang Xingyou, Wang Rui, Gao Yong. Study on yak fibroblasts culture *in vitro*. Hubei Agricultural Sciences) 2007; 46(3): 344-7.
- 任子利,赵彦玲,王建洲,李瑜鑫,强巴央宗. 西藏牦牛胎儿成纤维细胞的分离与培养. 江苏农业科学(Ren Zili, Zhao Yanling, Wang Jianzhou, Li Yuxin, Qiangbayangzhong. Jiangsu Agricultural Science) 2011; 39(3): 42-5.
- 刘颖,朱士恩,李荣,王莉莉,王海萍,丁方荣,等. 供体细胞不同性别和处理方式对异种克隆牦牛胚胎发育的影响. 农业生物技术学报(Liu Ying, Zhu Shien, Li Rong, Wang Lili, Wang Haiping, Ding Fangrong, et al. Effects of donor sex and different cell treatments on *in vitro* development of yak-bovine interspecies nuclear transfer embryos. Journal of Agricultural Biotechnology) 2008; 16(1): 61-5.
- 熊显荣,高川,符梅,李键,字向东,钟金城. 供体细胞来源和TSA处理对牦牛iSCNT胚胎重编程的影响. 西北农林科技大学学报(自然科学版)(Xiong Xianrong, Gao Chuan, Fu Mei, Li Jian, Zi Xiangdong, Zhong Jincheng. Effects of donor cell source and TSA treatment on reprogramming of yak-bovine iSCNT embryos. Journal of Northwest A&F University, Nat Sci Ed) 2012; 40(10): 9-14.
- 楚秋霞,安森亚,施巧婷,辛晓玲,王二耀,魏成斌,等. 南阳牛成纤维细胞的体外培养及生物学特性研究. 河南农业科学(Chu Qiuxia, An Senya, Shi Qiaoting, Xin Xiaoling, Wang Eryao, Wei Chengbin, et al. Culture and biological characteristics of Nanyang bovine fibroblasts. Journal of Henan Agricultural Sciences) 2012; 41(4): 135-8.
- Sleeman M, Fraser J, McDonald M, Yuan SN, White D, Grandison P. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. Gene 2001; 271(2): 171-82.
- Ryan AF. The cell cycle and the development and regeneration of hair cells. Curr Top Dev Biol 2003; 57: 446-9.
- 刘丹丹,张志宇,赫晓燕,董彦君,朱芷葳,白瑞,等. FGFR5在青年羊驼背部和耳部皮肤中的表达和定位. 中国生物化学与分子生物学报(Liu Dandan, Zhang Zhiyu, He Xiaoyan, Dong Yanjun, Zhu Zhiwei, Bai Rui, et al. FGFR5 Expression and Immunolocalization in back and ear skin of Young Alpaca (*Lama pacos*). Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology) 2011; 27(5): 473-9.
- 张周平. 家牦牛与不同野血牦牛染色体组型的比较分析. 青海畜牧兽医杂志(Zhang Zhouping. Comparative analysis on karyotype of domestic yak and yak with wild blood. Qinghai Journal of animal husbandry and veterinary medicine) 1998; 28(6): 15-7.