

用于克隆的猕猴耳成纤维细胞的培养 及其有关生物学特性

杨彩侠¹ 吴昱琪¹ 韩之明¹ 朱子玉^{1,2} 陈大元^{1*}

(¹中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080; ²苏州大学生命科学学院, 苏州 215006)

摘要 应用组织块培养法成功地分离培养了猕猴耳皮肤成纤维细胞。对培养细胞进行了形态观察、生长曲线测定、免疫细胞化学分析、染色体和周期分析, 结果表明培养的细胞具有正常的大小、形态、细胞骨架系统和染色体数目, 而且随着细胞汇合程度的增加, G₀/G₁ 期细胞所占的比例上升, 70%~80% 和 90%~100% 两种汇合程度的 G₀/G₁ 期和 S 期比例间存在明显的差异 ($P < 0.05$)。对培养猕猴耳成纤维细胞的有关生物学特性进行分析, 有利于给同种和异种体细胞克隆猴研究提供形态良好、染色体数目正常的供体细胞, 同时也为体细胞转基因等其他领域的研究提供了基础条件。

关键词 猕猴; 细胞培养; 细胞骨架; 染色体; 细胞周期

1997 年体细胞克隆羊“多莉”诞生^[1]。随后, 多种体细胞克隆动物纷纷问世^[2-6], 但至今仍没有一种体细胞克隆灵长类动物出生。猕猴是一种常用的灵长类实验动物, 其克隆研究将对核质关系的探索、治疗性克隆的开展有极大的推动作用。1997 年 Meng 等^[7]用胚胎细胞作为供核细胞成功克隆出了胚胎细胞克隆猴, 为了给同种和异种成年体细胞克隆猴研究提供形态良好、核型正常的供体细胞, 我们分离培养了猕猴耳成纤维细胞, 并对其生长特性、细胞遗传和周期等相关特性进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 猕猴耳成纤维细胞的培养^[8,9]

活体取成年的猕猴 (*Macaca mulatta tcheliensis*) 耳组织, 置于含双抗的 0.9% 生理盐水中, 4 °C 带回实验室。猕猴耳组织经刮毛、碘酊和 75% 酒精浸泡消毒后, 无菌生理盐水洗 3~5 遍, 剪碎, 加入 0.25% 胰蛋白酶, 4 °C 冷消化 12 h, 然后转入 37 °C、5%CO₂ 培养箱中消化 0.5 h, 加入含 10%~20% 胎牛血清 (FBS, Gibco) 的 D-MEM/F-12 培养基 (Gibco), 37 °C、5%CO₂、饱和湿度培养箱中原代培养, 倒置显微镜下观察细胞贴壁后更换培养基继续培养。当细胞长至 70%~80% 汇合时, 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 消化, 传代培养或冻存。

1.2 生长曲线的绘制

将第 4 代细胞以 3×10^4 个/ml 的密度接种于 24 孔板 (Nunc, Roskilde, Denmark), 每孔加入 0.5 ml 培养基 (D-MEM/F-12+20%FBS), 37 °C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。每天同一时间用胰蛋白酶消化 3 孔细胞, 血球计数板进行计数, 连续进行 8 天。

1.3 免疫细胞化学分析

采用免疫荧光方法检测培养细胞的细胞骨架。室温下用 1:1 混合的甲醇与丙酮将生长在盖玻片上的细胞固定 15~20 min, 以 PBS (pH 7.4) 清洗 3 遍, 再浸入含 1% BSA 的 PBS 中作用 30 min 作封闭处理, 然后加一抗于 37 °C 共同温育 1 h 或 4 °C 过夜。一抗分别为 β 微管蛋白 (1:400 稀释) 和抗波形蛋白 (1:200 稀释) 的小鼠单克隆抗体。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 再与 1:80 稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 的二抗 37 °C 温育 30 min。染微丝的样品直接与 1:200 稀释的 FITC 标记的鬼笔环肽 37 °C 温育 30 min 或 4 °C 过夜。在 PBS 清洗 3 次后, 所有的 FITC 标记的样品均再用 5 mg/ml 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 室温温育 10 min。封片后尽快

收稿日期: 2003-11-17 接受日期: 2004-02-18

* 通讯作者。Tel: 010-62560528, Fax: 010-62565689, E-mail:

chendy@panda.ioz.ac.cn

用TCS-4D 激光扫描共聚焦显微镜(Leica, Heidelberg, Germany) 观察(所有试剂均来自 Sigma)。阴性对照实验中, 用PBS代替第一抗体来排除非特异性的二抗结合。

1.4 染色体分析

细胞处于80%汇合时加入秋水仙素(终浓度为0.3 μ g/ml), 在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中作用3~5 h, 然后尽量吹打使阻断于分裂中期的细胞脱壁, 将细胞悬液装入10 ml离心管。1100 r/min离心10 min(LD5-2A, 北京医用离心机厂), 去上清液, 再向离心管中轻轻加入6 ml低渗盐溶液0.075 M KCl, 37 $^{\circ}$ C静置30 min。然后加入2 ml新鲜固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)预固定, 用移液管吹打调匀。1100 r/min离心10 min, 去上清液。之后加入新鲜固定液8 ml, 轻轻吹打均匀, 离心10 min; 本步骤再重复2遍。末次离心后, 小心吸除大部上清液, 余下0.5~1 ml固定液, 轻轻吹打调匀。然后吸少量细胞悬液, 滴落在-20 $^{\circ}$ C预冷过的洁净载玻片上, 迅速在酒精灯火焰上烤干。制备好的玻片于次日或立即用Giemsa染色。显微镜下观察染色后的标本, 统计其染色体数目。

1.5 周期分析^[10]

0.25%的胰蛋白酶消化用于细胞周期分析的培养细胞, D-MEM/F-12重悬后移至1.5 ml离心管中, D-PBS离心清洗3遍后, 加入D-PBS配制的75%冰乙醇, 4 $^{\circ}$ C固定2 h或过夜, D-PBS再离心清洗1遍后, 用1 mg/ml RNA酶37 $^{\circ}$ C消化20~30 min, D-PBS离心清洗2遍, 300目尼龙网过滤, 0.2~0.3 ml D-PBS重悬, PI染色5 min后流式细胞仪(FACs Calibur, Becton-Dickinson, San Jose, CA)测定细胞周期。

2 结果

2.1 猕猴耳成纤维细胞的培养

采用常规细胞原代培养法, 成功培养了猕猴耳成纤维细胞。相差显微镜下对细胞形态进行了观察, 培养的原代细胞大部分呈梭形, 具有典型的成纤维细胞形态, 其中夹杂有少量呈鹅卵石状的上皮细胞, 但传代两次后成纤维细胞生长已占优势(图1)。

2.2 猕猴耳成纤维细胞的生长曲线

以培养天数为横坐标, 细胞数为纵坐标绘制了猕猴耳成纤维细胞生长曲线图(图2)。生长曲线显

示培养细胞具有正常的分裂增殖特性, 没有转化倾向, 反映培养条件较为适合。

2.3 细胞骨架分析

免疫细胞化学分析了培养细胞的微管、微丝和波形蛋白表达情况(图3), 结果显示培养细胞具有良好的细胞骨架系统, 从另一侧面反映了培养条件比较适合于猕猴耳成纤维细胞的生长。

2.4 染色体分析

统计分析了培养细胞10个分裂相的染色体条数, 图4为其中一个分裂相, 统计结果表明90%(9/10)的细胞具有正常的染色体数目($2n=42$)。

2.5 周期分析

流式细胞仪测定了70%~80%和90%~100%两种不同汇合程度的第7代培养细胞的细胞周期(表1, 图5), 结果显示, 随着细胞汇合程度的增加, G₀/G₁期细胞所占的比例上升, S期和G₂/M期细胞所占的比例则相应降低。G₀/G₁期和S期细胞比例在两种汇合程度间的差异达到了显著水平($P<0.05$)。

3 讨论

常规的原代细胞培养方法有组织块培养和悬浮培养两种^[11-12]。我们采用本实验室的组织块培养法培养了猕猴耳成纤维细胞, 获得了较好的效果。原代培养中我们省去了操作繁琐、对细胞有机机械性损伤的离心分散细胞的步骤, 并以0.25%的胰蛋白酶4 $^{\circ}$ C消化12 h、37 $^{\circ}$ C消化0.5 h的两步消化法代替37 $^{\circ}$ C消化2 h, 使胰蛋白酶在温和的条件下对组织块进行消化, 避免了对细胞的破坏作用。在核移植研究中, 我们实验室还应用这种方法成功培养了多种供体细胞, 如牛耳成纤维细胞^[8]、大熊猫成纤维细胞^[9]、胎猫和幼猫皮肤成纤维细胞(未发表资料)、胎兔和幼兔皮肤成纤维细胞(未发表资料)等, 表明这种方法具有广泛的适用性。

电融合法是体细胞核移植研究中最常用的方法, 即把供体细胞放至受体卵的透明带下, 施加直流电脉冲, 使之与受体卵质膜融合。因此, 供体细胞的形态和大小是影响融合效率的重要因素。相差显微镜下观察培养的猕猴耳成纤维贴壁细胞, 呈梭形, 胰蛋白酶消化后变圆, 边界清晰; 免疫细胞化学检测培养细胞的微丝、微管和波形蛋白, 结果表明培养细胞的胞质骨架蛋白表达均正常, 具有正常的成纤维细胞特征, 从侧面显示了培养细胞具有正常的形态, 适用于动物克隆研究的核移植操作

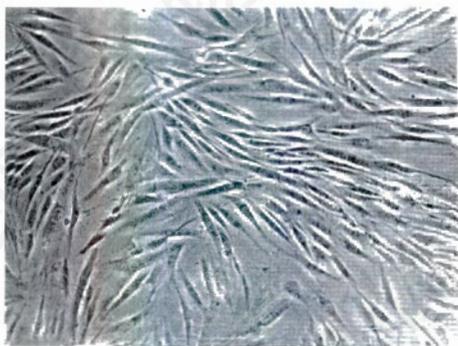


图1 猕猴成纤维细胞的相差显微镜照片(300×)

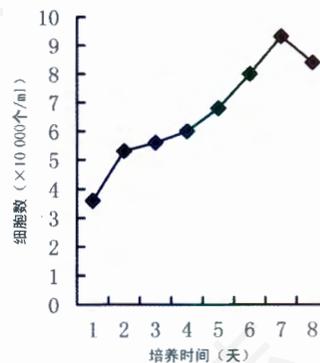


图2 猕猴成纤维细胞的生长曲线

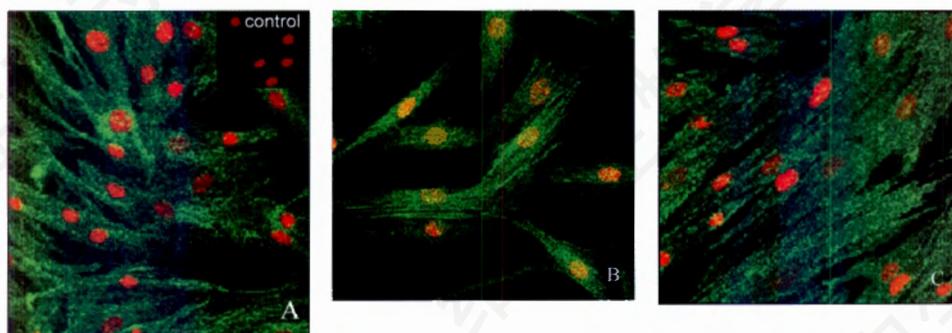


图3 猕猴成纤维细胞的激光扫描共聚焦显微镜图(400×)

(A) 绿色染微管, 红色染细胞核; (B) 绿色染微丝, 红色染细胞核; (C) 绿色染波形蛋白, 红色染细胞核。



图4 猕猴成纤维细胞的染色体(2n=42)

过程。

细胞核中的DNA是遗传信息的载体,它编码细胞增殖、分化、衰老和凋亡等生理过程所需的全部基因,这些基因的选择性表达决定着细胞的分化方向;而细胞质中的若干因子可以通过核孔运输进入细胞核,结合在核DNA上,对核基因的选择性表达起着调控作用,因此核质互作是细胞完成各种生理功能的先决条件。体细胞克隆研究中,重构胚

表1 不同汇合程度的猕猴成纤维细胞的细胞周期($\bar{x} \pm s$)

汇合程度	G ₀ +G ₁	S	G ₂ +M
70%~80%	84.94 ± 2.54 ^a	13.25 ± 2.75 ^b	1.80 ± 1.50 ^a
90%~100%	94.59 ± 2.95 ^b	4.58 ± 2.95 ^a	0.83 ± 0.88 ^a

注: 同列不同上标表示两者差异显著(P<0.05), 相同上标表示差异不显著。

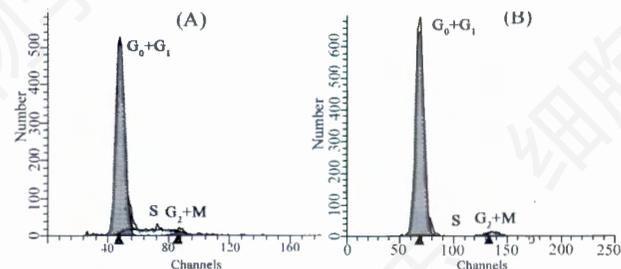


图5 第7代猕猴成纤维细胞的细胞周期图

(A)70%~80% 汇合; (B)90%~100% 汇合。

是一核质杂交体,细胞核来源于供体细胞,细胞质来源于去核卵母细胞,因此只有携带正常遗传物质的供体细胞,融入去核的卵母细胞中后,供核才能在胞质因子的作用下启动重构胚的卵裂并进而指导

其进行正常的发育。如果供体细胞的遗传物质异常,融合后则会导致重构胚卵裂异常,进而使其发育受到阻滞。染色体分析表明我们培养的猕猴耳成纤维细胞90%以上具有正常的染色体数目,为克隆猴研究中重构胚的正常发育提供了前题条件。

供体细胞核与受体卵胞质相互作用使供核正确地重编程是核移植实验获得成功的先决条件,而供核能否正确地重编程又主要取决于供体细胞所处的周期。研究表明,处于 G_0/G_1 的供体核更易于重编程,形成正常的二倍体,第一头成年体细胞克隆羊“Dolly”的供体细胞就是经血清饥饿处理后处于 G_0/G_1 的乳腺细胞^[1]。在供体细胞培养中,接触抑制也可使大部分的细胞进入 G_0/G_1 期。本研究表明,随着汇合程度的增加,处于 G_0/G_1 期的细胞所占的比例相应上升,90%~100%汇合时, G_0/G_1 期细胞所占的比例也在90%以上,与70%~80%汇合的 G_0/G_1 期之间存在显著的差异。对猕猴耳成纤维细胞的周期进行分析,为选用合适的供体细胞,进一步提高体细胞克隆效率打下了基础。在此基础

上,我们以90%~100%汇合的培养猕猴细胞作为供体,去核的MII期兔卵母细胞作为受体,重构胚胎经体外培养可以发育到囊胚阶段^[13],这一方面表明成年猕猴体细胞可以在异种去核的兔卵胞质中去分化重获全能性,同时也从另一方面反映供体细胞具有正常的生物学特性。

参考文献 (References)

- [1] Wilmut I *et al. Nature*, 1997, **385**: 810
- [2] Wakayama T *et al. Nature*, 1998, **394**: 369
- [3] Kato Y *et al. Science*, 1998, **282**: 2095
- [4] Polejaeva IA *et al. Nature*, 2000, **407**: 86
- [5] Chesne P *et al. Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 366
- [6] Shin T *et al. Nature*, 2002, **415**: 859
- [7] Meng L *et al. Biol Reprod*, 1997, **57**: 454
- [8] 刘冀琬等. *动物学报*, 1999, **45**: 472
- [9] Han ZM *et al. In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2001, **37**: 644
- [10] Boquest AC *et al. Biol Reprod*, 1999, **60**: 1013
- [11] 司徒镇强等主编. *细胞培养*, 西安: 世界图书出版公司, 2001, 68
- [12] 斯佩克特等著. *细胞实验指南*, 北京: 科学出版社, 2001, 27
- [13] Yang CX *et al. Mol Reprod Dev*, 2003, **65**: 396

Culture and Related Characteristics of Macaque Ear Fibroblasts Used for Cloning

Cai-Xia Yang¹, Yu-Qi Wu¹, Zhi-Ming Han¹, Zi-Yu Zhu^{1,2}, Da-Yuan Chen^{1*}

(¹State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

²College of Life Science, Soochow University, Suzhou 215006, China)

Abstract Fibroblasts derived from macaque (*Macaca mulatta tcheliensis*) ear were successfully cultured with a normal tissue culture method. The cultured cells were analyzed by their morphology, skeleton, chromosomes and cell cycle. Results demonstrated that these cultured cells were typical fibroblasts with normal morphology, cell skeleton and karotype, and G_0/G_1 rate increased with the confluence of cells. Marked difference existed in the G_0/G_1 and S stage rate of 70%–80% and 90%–100% confluence. The culture and characterization analysis of macaque fibroblasts provided not only a ready supply of somatic cells for the intraspecies and interspecies cloning of macaque but also fundamental conditions for somatic transgene and other related fields.

Key words macaque; cell culture; cell skeleton; chromosome; cell cycle

Received: November 17, 2003 Accepted: February 18, 2004

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.001CB5099)

*Corresponding author. Tel: 86-10-62560528, Fax: 86-10-62565689, E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn