

体外培养成人包皮成纤维细胞周期同步化效果检测

韦精卫 李蓉* 耿岚 郝桂琴

(北京大学深圳医院生殖医学科, 北京大学香港科技大学医学中心, 深圳 518036)

摘要 供体细胞和受体胞质周期协调性是核移植胚胎发育的关键, 对人成体细胞的细胞周期分布及其同步化效果进行探讨, 将为人治疗性克隆研究打下基础。结果发现: 80%~85% 汇合生长成人包皮成纤维细胞 G_0/G_1 期细胞比例显著高于接种后第1天指数生长细胞及接种后第5天100%汇合生长细胞两组(67.0% vs 58.2%, 52.8%, $P<0.05$), 指数生长状态下, 仍有 58.2% 的成人包皮成纤维细胞处于 G_0/G_1 期; 以 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 和 2 $\mu\text{g/ml}$ 不同浓度阿菲迪霉素(aphidicolin, APD)处理成人包皮成纤维细胞 24 h, 2 $\mu\text{g/ml}$ APD 组 G_0/G_1 期细胞比例显著高于 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 组和对照组(10% FBS) (82.9% vs 68.8%, 63.5%, $P<0.05$), 2 $\mu\text{g/ml}$ APD 可有效的将成人包皮成纤维细胞同步于 G_0/G_1 期, 且培养液中添加 10%、0.5%、0% FBS 不同浓度血清对 2 $\mu\text{g/ml}$ APD G_0/G_1 期同步化效果无显著影响(82.6% vs 81.8% vs 74.6%, $P>0.05$); 以血清饥饿培养法(0.5% FBS)进行成人包皮成纤维细胞同步化处理, 血清饥饿处理 3 d 组 G_0/G_1 期细胞比例显著高于 0 d 组(对照组) (71.8% vs 59.6%, $P<0.05$), 血清饥饿培养 3 d 可有效将细胞同步于 G_0/G_1 期。因此, 2 $\mu\text{g/ml}$ APD 处理 24 h 和血清饥饿培养 3 d 可有效将成人包皮成纤维细胞同步于 G_0/G_1 期。

关键词 人; 成人包皮成纤维细胞; 细胞周期同步化; 体细胞核移植

自世界首例成年体细胞克隆羊“多莉”诞生后, 多种动物, 如小鼠、牛、猪、山羊、猫、兔、马、骡、大鼠、狗、狼、水牛等也被先后成功克隆, 随着动物克隆研究的不断深入, 人的治疗性克隆研究也引起学者广泛的关注。目前, 研究学者获得了来源于人胎儿成纤维细胞、颗粒细胞及成体成纤维细胞的核移植囊胚^[1-3], 但重组胚胎构建成功率仍很低, 人治疗性克隆研究离临床应用尚存较大的差距。而与人类最为近似的猴核移植研究, 直至目前仅获得胚胎细胞核移植后代^[4], 成体细胞核移植研究方面, 学者虽然也进行了大量的研究^[5-10], 但都未能获得体细胞克隆猴后代, 研究表明与人类最为相似的猴体细胞核移植研究未能获得突破进展是与不完全或不适当的供体核重编程有关^[5]。因此, 要提高人治疗性克隆效率, 就必须对影响供体细胞核重编程及表观遗传修饰过程的供体细胞类型, 细胞周期等因素进行探讨^[11,12]。Campbell 等^[13]的研究表明, 供体核和受体胞质所处的周期协调性对核移植胚胎的发育产生重要影响。在体细胞核移植中, 常用 MII 期卵母细胞作为受体, 要获得正常核型的重组胚胎, 供核细胞必须处于 G_0/G_1 期^[13], 如若选择 S 期和 G_2 期的供核细胞

将会导致染色体的非整倍性^[14]。研究证实供体细胞处于 G_0/G_1 期有利于核移植重组胚发育^[15,16], 至今, 效率最高的动物体细胞核移植研究则是以 G_1 期供核细胞与 M 期受体胞质所构建的重组胚胎发育而获得^[17]。因此, 将供体细胞周期同步化于 G_0/G_1 期成为决定体细胞核移植成功与否的关键因素。目前血清饥饿法、接触性抑制及化学抑制因子如蛋白酶、抗氧化抑制因子都可有效对动物体细胞周期进行调控, 人成体细胞各生长状态下周期分布及同期化处理效果如何, 尚未见报道。本研究拟对人包皮成纤维细胞各自然生长状态及血清饥饿法, DNA 合成抑制剂阿菲迪霉素同步化处理后的细胞周期特性进行探讨, 为下一步的人治疗性克隆胚胎构建打下基础。

1 材料与方法

所用试剂除 DMEM 购自 Gibco 公司(Gibco, Grand Island, NY), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone 公司(Hyclone, Logan, UT)外, 其余如阿菲迪

收稿日期: 2008-11-15 接受日期: 2009-02-02

国家自然科学基金(No.30440057)和深圳市重点专科建设项目资助

* 通讯作者。Tel: 0755-83923333-6156, E-mail: lrivf@163.com

霉素(aphidicolin, APD)等试剂均来自 Sigma 公司。

1.1 成人包皮成纤维细胞准备

临床辅助生殖(assisted reproductive technology, ART)治疗周期中,患有生精功能障碍的 37 岁男性患者经知情同意,手术取精后取小块包皮,以 PBS 和 75% 酒精清洗数次,剪碎成 1 mm³ 左右的小块,以 DMEM 清洗两次后植块于 50 ml 的细胞培养瓶中,倒置培养瓶 1~2 h,待组织块贴壁牢固后翻转细胞培养瓶,加入 DMEM(含 10%FBS),于 37.0 °C, 5% CO₂ 的培养箱培养 15~20 d,每间隔 2~3 d 换新培养液,待细胞汇合生长后,以 0.25% 胰酶消化传代 2~3 次,所获得的细胞进行细胞周期同步化处理或以 DMEM+20% FBS+10% DMSO 冻存,备实验用。

1.2 成人包皮成纤维细胞周期检测及同步化处理实验设计

1.2.1 不同生长状态下成人包皮成纤维细胞周期分布检测 以 10⁵ 个/ml 的浓度接种第 3~8 代的成人包皮成纤维细胞,分别检测接种后第 1 天指数生长细胞,接种后第 3 天 80%~85% 汇合生长细胞及接种后第 5 天 100% 汇合生长细胞周期分布情况,细胞周期检测按 1.3 所述方法进行。

1.2.2 不同浓度 APD 处理对成人包皮成纤维细胞周期分布的影响 80%~85% 汇合生长的成人包皮成纤维细胞,分别以 0.2 μg/ml、2 μg/ml APD 处理 24 h,为降低低浓度血清对细胞周期的影响,DMEM 培养液均添加 10% FBS,对照组则单以 10% FBS 处理 24 h,各组细胞消化后按 1.3 所述方法进行处理,然后进行细胞周期检测。

1.2.3 不同浓度血清对 APD 成人包皮成纤维细胞周期同步化效果的影响 80%~85% 汇合生长的成人包皮成纤维细胞,分别以含 2 μg/ml APD +10% FBS 和 2 μg/ml APD +0.5% FBS DMEM 培养处理 24 h,对照组则以 2 μg/ml APD +0% FBS 处理 24 h,各组细胞消化后按 1.3 所述方法进行处理,然后进行细胞周期检测。

1.2.4 不同血清饥饿培养处理时间对成人包皮成纤维细胞周期分布的影响 80%~85% 汇合生长的成

人包皮成纤维细胞,分别以含 0.5% FBS DMEM 培养 0 d (处理当天细胞为 0 d, 对照组)、1 d、2 d、3 d, 各组细胞消化后按 1.3 所述方法进行处理,然后进行细胞周期检测。

1.3 成人包皮成纤维细胞周期检测

各实验处理组细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后,收集于 5 ml 的离心管中,离心后以 PBS 洗涤 2 次(1 000 r/min, 5 min),去上清液,加入 2 ml 70% 乙醇(-20 °C 预冷)至待测细胞中,立即振荡混匀制成细胞悬液,冰浴 20~30 min 后离心并去除上清液,然后加入 0.25 ml 预冷 PBS 及 5 μl 10 mg/ml Rnase A,置 37 °C 水浴 30 min。分析时,以 50 μg/ml 碘化丙啶(PI)荧光染色 30 min,然后上流式细胞仪检测 G₀+G₁、S、G₂/M 各期的细胞比例,以上每实验处理组各重复 3 次。

1.4 统计分析

细胞周期检测的结果均用 SAS 软件单因素方差分析(one way ANOVA)统计分析,显著性差异以 P<0.05 为标准。

2 结果

2.1 不同生长状态下成人包皮成纤维细胞周期分布检测

检测接种后第 1 天指数生长期细胞,培养第 3 天 80%~85% 汇合生长细胞及第 5 天 100% 汇合生长细胞周期分布情况,结果如表 1 所示,以上三组细胞 G₀/G₁ 期细胞比例分别为 58.2%、67.0% 和 52.8%,接种后第 3 天 80%~85% 汇合生长细胞 G₀/G₁ 细胞比例显著高于接种后第 1 天指数生长细胞组及第 5 天 100% 汇合生长细胞组(67.0% vs 58.2%, 52.8%, P<0.05)。以上结果表明,处于指数生长状态的包皮成纤维细胞仍有 58.2% 的细胞处于 G₀/G₁ 期,培养第 3 天细胞至 80%~85% 汇合生长时, G₀/G₁ 期细胞比例有所升高,而培养第 5 天细胞至 100% 汇合生长时, G₀/G₁ 期细胞比例未继续增加,反而降低,接触性抑制效果不明显。

2.2 不同浓度 APD 处理对成人包皮成纤维细胞周期分布的影响

Table 1 Cell cycle results of adult male fibroblast during different proliferation stages (n=3)

Proliferation stages of cell	Percentage of different cell cycle stages ($\bar{x} \pm s$)		
	G ₀ +G ₁	S	G ₂ /M
exponential growth cell (1st day after seeding)	58.2±0.40 ^b	14.4±3.14	27.4±2.84 ^b
80%~85% confluency cell (3rd day after seeding)	67.0±1.86 ^a	6.8±3.45	26.2±1.65 ^b
100% confluency cell (5th day after seeding)	52.8±7.20 ^b	10.1±6.91	37.1±0.66 ^a

^{a, b} Treatments with different superscripts within a column are significantly different (P<0.05).

Table 2 Effects of adult male fibroblast cell cycle synchronization by different concentration aphidicolin (APD) treatment ($n=3$)

Concentration of APD	Percentage of different cell cycle stages ($\bar{x}\pm s$)		
	G ₀ +G ₁	S	G ₂ /M
0.2 $\mu\text{g/ml}$ APD	68.8 \pm 8.46 ^a	10.5 \pm 5.36	19.4 \pm 4.91
2 $\mu\text{g/ml}$ APD	82.9 \pm 2.82 ^b	1.7 \pm 0.55	15.4 \pm 2.63
Control group (10% FBS)	63.5 \pm 4.71 ^a	8.4 \pm 5.16	28.1 \pm 3.30

^{a, b} Treatments with different superscripts within a column are significantly different ($P<0.05$).

Table 3 Effects of adult male fibroblast cell cycle synchronization by APD combined with different levels of serum treatment ($n=3$)

Levels of serum	Percentage of different cell cycle stages ($\bar{x}\pm s$)		
	G ₀ +G ₁	S	G ₂ /M
0.5% FBS	81.8 \pm 1.10	1.6 \pm 0.55	16.7 \pm 0.55
10% FBS	82.6 \pm 3.20	2.9 \pm 2.56	14.5 \pm 1.96
Control group (0% FBS)	74.6 \pm 6.36	6.6 \pm 5.15	18.6 \pm 1.26

Table 4 Effects of adult male fibroblast cell cycle synchronization by APD combined with different levels of serum treatment ($n=3$)

Treatment	Percentage of different cell cycle stages ($\bar{x}\pm s$)		
	G ₀ +G ₁	S	G ₂ /M
0.5% FBS, 0 d (Control group)	59.6 \pm 3.52 ^a	5.6 \pm 5.60	34.8 \pm 5.55
0.5% FBS, 1 d	67.2 \pm 9.03 ^a	6.3 \pm 9.04	26.6 \pm 14.16
0.5% FBS, 2 d	69.7 \pm 5.13 ^a	1.8 \pm 0.95	28.5 \pm 4.24
0.5% FBS, 3 d	71.8 \pm 4.5 ^b	5.7 \pm 5.78	22.6 \pm 5.93

^{a, b} Treatments with different superscripts within a column are significantly different ($P<0.05$).

以 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 、2 $\mu\text{g/ml}$ 两种不同浓度的 APD 处理成人包皮成纤维细胞 24 h, 探讨其对细胞周期分布的影响, 实验结果见表 2, 2 $\mu\text{g/ml}$ APD 处理组 G₀/G₁ 期细胞比例显著高于 0.2 $\mu\text{g/ml}$ APD 组及对照组 (82.9% vs 68.8%, 63.5%, $P<0.05$), 但 0.2 $\mu\text{g/ml}$ APD 组和对照组间 G₀/G₁ 期细胞比例差异不显著 (68.8% vs 63.5%, $P>0.05$), 结果表明 0.2 $\mu\text{g/ml}$ APD 未能有效的将细胞同步于 G₀/G₁ 期, 而 2 $\mu\text{g/ml}$ APD 可将成人包皮成纤维细胞有效的同步于 G₀/G₁ 期。

2.3 添加不同浓度血清对 APD 成人包皮成纤维细胞周期同步化效果的影响

在 2.2 节的基础上, 进一步探讨不同浓度血清对 APD 成人包皮成纤维细胞周期同步化效果的影响, 结果如表 3 所示, 2 $\mu\text{g/ml}$ APD 联合 10% FBS, 0.5% FBS 及 0% FBS (对照组) 处理成人包皮成纤维细胞, 各处理组 G₀/G₁ 期细胞比例间差异不显著 (82.6% vs 81.8% vs 74.6%, $P>0.05$)。结果表明, 在不同血清浓度条

件下, 2 $\mu\text{g/ml}$ APD 均有效的将人包皮成纤维细胞周期同步于 G₀/G₁ 期, 添加不同浓度血清不影响 APD 对细胞周期的主调控作用。

2.4 不同血清饥饿培养时间对成人包皮成纤维细胞周期分布的影响

80%~85% 汇合生长成人包皮成纤维细胞以含 0.5% FBS DMEM 分别培养 0 d (对照组)、1 d、2 d 和 3 d, 并检测各处理组细胞周期分布情况, 结果如表 4 所示, 血清饥饿培养 0 d、1 d、2 d 和 3 d 组 G₀/G₁ 期细胞比例分别为 59.6%、67.2%、69.7% 和 71.8%, 血清饥饿培养 3 d 组 G₀/G₁ 期细胞比例显著高于 0 d 组 (71.8% vs 59.6%, $P<0.05$), 但血清饥饿培养 0 d、1 d、2 d 组 G₀/G₁ 期细胞比例间差异不显著 (59.6% vs 67.2% vs 69.7%, $P>0.05$), 结果初步表明 0.5% FBS 培养 3 d 可有效将成人包皮成纤维细胞同步于 G₀/G₁ 期。

3 讨论

体细胞核移植成功的关键很大程度取决于供体细胞和受体胞质的细胞周期状态。弄清供体细胞各生长状态细胞周期分布情况, 则是进行细胞周期同步化处理及核移植的基础。有研究结果显示, 猪胎儿成纤维细胞即使处于活跃分裂状态, 仍有 56% 左右的细胞处于 G₀/G₁ 期^[18]。Hashem 等^[19]的研究也发现处于分裂状态下的斑羚成纤维细胞仍有 64.9% 的细胞处于 G₀/G₁ 期。是否人类包皮成纤维细胞也存在同样的细胞周期分布状况? 本研究对未进行同步化处理, 不同生长状态下的成人包皮成纤维细胞周期分布进行检测, 结果发现成人包皮成纤维细胞处于活跃分裂状态下, 仍有 58.2% 的细胞处于 G₀/G₁ 期, 与 Kues 等^[18]和 Hashem 等^[19]结果一致。而成人包皮成纤维细胞体外培养 3 d 后, 当细胞至 80%~85% 汇合生长状态时, G₀/G₁ 期细胞比例达 67.0%, 随着培养时间的增加及细胞分裂生长速度的下降, 自然进入 G₀/G₁ 期的细胞比例显著升高。当细胞继续体外培养至 100% 汇合生长状态时, G₀/G₁ 期细胞比例为 52.8%, 未

能较 80%~85% 汇合生长细胞组有显著提高, 与先前的接触抑制可以有效将动物细胞静止于 G_0/G_1 期的结果有所差异^[20-22], 是否成人包皮成纤维细胞培养 5 d 后, 部分接触性抑制生长的细胞仍处增殖状态, 这有待于进一步探讨。

世界首例体细胞核移植后代是以 G_0 期(静止期)的绵羊乳腺上皮细胞为供核获得的, Wilmut 等^[23]认为 G_0 期供体细胞核移植后可发生发育程序重编程, 并发育到期。相关研究也显示 G_0 期细胞的代谢水平低, 基因转录大都关闭, 核糖体发生变化, 核染色质浓缩, 后者使供体核在受体卵胞质中更易于发生去分化及发育程序的重编程, 获得具有正常染色体倍性的重组胚胎^[23,24]。许多研究也证实供体细胞处于 G_0/G_1 期有利于核移植重组胚胎保持正常的核型及后期较高的发育率^[25,26]。因此, 要提高人治疗性克隆胚胎构建效率, 首先需探索人供体细胞同步于 G_0/G_1 期的有效方法。动物体细胞核移植中, 常使用血清饥饿法及一些抑制 DNA 合成或微管形成的药物来进行细胞周期调控。APD 是一种 DNA 合成抑制剂, 可与 DNA 聚合酶 α 结合, 进而抑制 DNA 的合成, 使细胞同步于 G_1 期^[27]。实验比较不同浓度的 APD 对成人包皮成纤维细胞周期同步化效果的影响, 结果发现 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 处理组 G_0/G_1 期细胞比例显著高于 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组和对照组(10% FBS 培养), APD 可有效的将细胞同步于 G_0/G_1 期, 与 Kues 等^[18]和 Pedrail-Noy 等^[28]的报道一致, 其实验结果分别表明 APD 可以使猪及啮齿类动物成纤维细胞可逆性的同步于 G_0/G_1 期。在此基础上, 实验进而比较了添加不同浓度血清对阿菲迪霉素同步化效果的影响, 结果发现含 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APD DMEM 液添加不同浓度血清后, 各处理组 G_0/G_1 期细胞比例未有显著差异, 这也表明 DMEM 培养液中含 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APD 时, 添加不同浓度血清都未能改变 APD 对细胞周期的主调控作用。

血清中含有多种细胞增殖促进因子, 血清浓度极低的培养环境仅能维持细胞处于某种状态, 而不发生增殖, 应用这一原理可以使细胞同步于某一特定的细胞周期。而经血清饥饿培养处理的细胞, 其生长特性、DNA 复制, 细胞骨架及消化后细胞的大小均有不同程度的改变, 以血清饥饿培养处理的成纤维细胞为供体核构建重组胚胎, 囊胚率显著高于非血清饥饿组^[29]。然而, 有研究表明血清饥饿处理的时间也并非越长越好, 长时间的血清饥饿培养处理, 非但不会显著增加 G_0/G_1 期细胞的数量, 反而会损伤细胞的

DNA, 进而影响核移植胚胎的卵裂及进一步的发育^[18], Beyhan 等^[30]的研究发现血清饥饿处理时间大于 11 d 将显著降低重组胚的囊胚发育率。因此, 要进行人治疗性克隆研究, 需对人成体细胞适宜的血清饥饿培养时间进行探讨。通过研究, 实验发现血清饥饿培养处理 3 d 的人包皮成纤维细胞 G_0/G_1 期比例已显著高于对照组, 随着血清饥饿培养时间的增加, G_0/G_1 期细胞比例会有所提高。在动物体细胞核移植中, 一般以血清饥饿培养处理 3~5 d 的动物生长期细胞为供核进行核移植, 便可获得较好的核移植效果^[31], 延长血清饥饿培养时间会损伤细胞 DNA, 核移植效果并不是与 G_0/G_1 期细胞比例成正比。因此, 我们认为血清饥饿培养 3 d 人包皮成纤维细胞可以作为供核进行核移植研究。

通过上述的实验研究, 我们发现处于生长分裂状态的成人包皮成纤维细胞仍有 58.2% 的细胞处于 G_0/G_1 期, 细胞经 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ APD 处理 24 h 及血清饥饿培养 3 d 后, 均获得最佳的 G_0/G_1 期同步化效果, 添加不同浓度血清并未改变 APD 的主调控作用。而上述同步化处理的成人包皮成纤维细胞是否有助于人治疗性克隆胚胎的构建及核移植效率的提高, 将在下一步的治疗性克隆研究中作深入探讨。

参考文献(References)

- [1] Lu C, Lin G, Xie C, *et al.* Reconstruction of human embryos derived from somatic cells, *Chin Sci Bull*, 2003, 48(17): 1840-1843
- [2] Heindryckx B, Sutter PD, Gerris J, *et al.* Embryo development after successful somatic cell nuclear transfer to *in vitro* matured human germinal vesicle oocytes, *Hum Reprod*, 2007, 22(7): 1982-1990
- [3] French AJ, Adams CA, Anderson LS, *et al.* Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts, *Stem Cells*, 2008, 26(2): 485-493
- [4] Meng L, Ely JJ, Stouffer RL, *et al.* Rhesus monkeys produced by nuclear transfer, *Biol Reprod*, 1997, 57(2): 454-459
- [5] Mitalipov SM, Yeoman RR, Nusser KD, *et al.* Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells, *Biol Reprod*, 2002, 66(5): 1367-1373
- [6] Simerly CR, Navara CS. Nuclear transfer in the rhesus monkey: opportunities and challenges, *Cloning Stem Cells*, 2003, 5(4): 319-331
- [7] Simerly C, Dominko T, Navara C, *et al.* Molecular correlates of primate nuclear transfer failures, *Science*, 2003, 300(5617): 297
- [8] Ng SC, Chen N, Yip WY, *et al.* The first cell cycle after transfer of somatic cell nuclei in a non-human primate, *Development*, 2004, 131(10): 2475-2484
- [9] Zhou Q, Yang SH, Ding CH, *et al.* A comparative approach to

- somatic cell nuclear transfer in the rhesus monkey, *Hum Reprod*, 2006, 21(10): 2564-2571
- [10] Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, *et al.* Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer, *Nature*, 2007, 450(7169): 497-502
- [11] Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, *et al.* Somatic cell nuclear transfer, *Nature*, 2002, 419(6907): 583-586
- [12] Wakayama T, Yanagimachi I. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei, *Reproduction*, 2001, 122(1): 49-60
- [13] Campbell KH, Loi P, Otaegui PJ, *et al.* Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer, *Rev Reprod*, 1996, 1(1): 40-46
- [14] Collas P, Balise JJ, Robl JM. Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos, *Biol Reprod*, 1992, 46(3): 492-500
- [15] Beyhan Z, Mitalipova M, Chamy T, *et al.* Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos produced using different types of adult donor cells, *Theriogenology*, 2000, 53(1): 210
- [16] Ono Y, Shimozawa N, Ito M, *et al.* Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer, *Biol Reprod*, 2001, 64(1): 44-50
- [17] Tsunoda Y, Kato Y. Full-term development after transfer of nuclei from 4-cell and compacted morula stage embryos to enucleated oocytes in the mouse, *J Exp Zool*, 1997, 278(4): 250-254
- [18] Kues WA, Anger M, Carnwath JW, *et al.* Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblast: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors, *Biol Reprod*, 2000, 62(2): 412-419
- [19] Hashem MA, Bhandari DP, Kang SK, *et al.* Cell cycle analysis of *in vitro* cultured goral (*Naemorhedus caudatus*) adult skin fibroblasts, *Cell Biol Int*, 2006, 30(9): 698-703
- [20] Kato Y, Tani T, Sotamaru Y, *et al.* Eight calves cloned from somatic cell of a single adult, *Science*, 1998, 282(5396): 2095-2098
- [21] Bordignon V, Charke HJ, Marchal J, *et al.* Chromatin remodeling and developmental potential of bovine somatic cell nuclei after nuclear transplantation: effect of donor cell culture conditions and host oocyte activation status, *Theriogenology*, 2000, 53(1): 212
- [22] Kasinathan P, Knott JG, Moreira PN, *et al.* Effects of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer *in vitro*, *Biol Reprod*, 2001, 64(5): 1487-1493
- [23] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, 1997, 385(6619): 810-813
- [24] Campbell KH. Nuclear equivalence, nuclear transfer and the cell cycle, *Cloning*, 1999, 1: 3-15
- [25] Liu CT, Yu KC, Ju JC. Cell cycle stage analysis of rabbit fetal fibroblasts and cumulus cells, *Reprod Domest Anim*, 2004, 39: 385-390
- [26] Lee CK, Piedrahita JA. Inhibition of apoptosis in serum-starved porcine embryonic fibroblasts, *Mol Reprod Dev*, 2002, 62(1): 106-112
- [27] Techakumphu M, Adenot P, Chense P, *et al.* Viability of bovine blastomeres after metaphase arrest with nocodazole, *Theriogenology*, 1993, 39(1): 328
- [28] Pedrail-Noy G, Spadari S, Miller-Faures A, *et al.* Synchronization of HeLa by inhibition of DNA polymerase with aphidicolin, *Nucleic Acid Res*, 1980, 8(2): 377-387
- [29] Miyamoto K, Hoshino Y, Minami N, *et al.* Effects of synchronization of donor cell cycle on embryonic development and DNA synthesis in porcine nuclear transfer embryos, *J Reprod Dev*, 2007, 53(2): 237-246
- [30] Beyhan Z, Mitalipova M, Chang TC, *et al.* Donor cell passage, starvation period and fusion, activation interval affect preimplantation development of bovine nuclear transfer embryos, *Theriogenology*, 2002, 57(1): 396
- [31] Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, *et al.* High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer, *Biol Reprod*, 2000, 63(2): 513-518

Cell Cycle Analysis of *in Vitro* Cultured Human Adult Skin Fibroblasts

Jing-Wei Wei, Rong Li*, Lan Geng, Gui-Qin Hao

(Reproductive Medicine Department, Medical Central of Peking University and Hong Kong Science and Technology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China)

Abstract The co-ordination of cell cycle between donor cells and recipient cytoplasm was the key aspect of reconstructed embryos development, studies on cell cycle characteristics of cells at different proliferation stages and the effects of synchronization of cell cycle were the foundation of therapeutic cloning research. As results, we found that the rates of G₀/G₁ cells at 80%–85% confluency stage were significant higher than the cells at exponential growth stage and 100% confluency stage (67.0% vs 58.2%, 52.8%, $P < 0.05$), 58.2% of human adult skin fibroblasts reached the G₀/G₁ stage even cells at exponential growth stage; 2 μg/ml aphidicolin (APD) treated group showed better results for synchronization of G₀/G₁ phases than 0.2 μg/ml and 0 μg/ml group (82.9% vs 68.8%, 63.5%, $P < 0.05$). Furthermore, there was no significant difference in synchronization of G₀/G₁ phases along with 2

$\mu\text{g/ml}$ APD combined with 0%, 0.5%, and 10% FBS respectively (74.6% vs 81.8% vs 82.6%, $P>0.05$), the synchronization of cell cycle mainly monitored by 2 $\mu\text{g/ml}$ APD when different concentration of serum coexist; Synchronization of cell cycle could effectively achieved by serum deprivation for 3 d, which was significant higher than control groups (71.8% vs 59.6%, $P<0.05$). Thus it could be concluded that 2 $\mu\text{g/ml}$ APD treated for 24 h and serum deprivation for 3 d could synchronize the cell cycle effectively.

Key words human; adult skin fibroblast; synchronization of cell cycle; somatic cell nuclear transfer

Received: November 15, 2008 Accepted: February 2, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30440057) and Major Medical Subject Program of Shenzhen City

*Corresponding author. Tel: 86-755-83923333-6156, E-mail: Irivf@163.com