

不同细胞密度冻存对奶牛乳腺上皮细胞的影响

杨银芬 考桂兰* 侯先志 高爱武 韩亚楠 赵青

(内蒙古农业大学动物科学学院, 呼和浩特 010018)

摘要 本试验采用了内蒙古呼和浩特健康荷斯坦奶牛乳腺组织经5代纯化后, 将奶牛乳腺上皮细胞分别设为1组(1×10^4 个细胞/ml)、2组(1×10^5 个细胞/ml)、3组(1×10^6 个细胞/ml)、4组(1×10^7 个细胞/ml)4个密度梯度进行冻存, 复苏后检测细胞死亡率、贴壁率、凋亡率并进行形态学观察。结果显示4组复苏后死亡率极显著低于其他三组($P < 0.01$), 贴壁率显著高于其他三组($P < 0.05$)。3组细胞凋亡率显著低于其他三组($P < 0.05$)。3、4组细胞到第3d基本铺满瓶底, 生长状态良好。

关键词 奶牛乳腺上皮细胞; 死亡率; 贴壁率; 凋亡率

长期体外传代培养细胞容易引起基因的不稳定和细胞表型变化, 随着细胞传代次数的增多, 细胞的各种生物特性都将逐渐发生变化, 如细胞生长速率、合成牛奶能力下降以及对催乳激素和生长激素敏感性改变^[1]。在培养细胞的传代及日常维持过程中, 需大量的耗费人力和药品, 为保证整个试验顺利完成和试验中供体的一致性, 随时提供大量的种子细胞, 及时进行细胞冻存是十分必要的^[2]。冻存是储存种子细胞的重要方法之一, 目前普遍认为: 一个好的冻存方法主要取决于冻存细胞的密度、冻存速度、冻存保护剂的类型及终密度等^[3,4]。其中后两者相关资料报道已有很多^[5,6], 但对细胞冻存密度的报道较少, 尤其对奶牛乳腺上皮细胞冻存密度的资料报道极少。因此本文就奶牛乳腺上皮细胞(BMECS)的冻存密度进行初步探讨, 以确定在常规梯度降温冻存条件下奶牛乳腺上皮细胞最适宜的细胞密度。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞来源 本试验采用内蒙古呼和浩特市健康荷斯坦奶牛7岁2胎新鲜乳腺组织。

1.1.2 试剂 生长培养基: DMEM/F12基础培养基(Gibco, 按说明书配)、胎牛血清(FBS Hyclone)、胰岛素、氢化可的松、胰岛素转铁蛋白硒钠(ITS)、表皮生长因子(EGF)、青霉素、链霉素等均购于Sigma公司。

终止培养基: DMEM/F12基础培养基中添加10% FBS(V:V)。

胶原酶消化液、胰蛋白酶(trypsin)消化液、

EDTA溶液的配制同《体外培养的原理与技术》^[7]。上述试剂均购于北京康倍斯公司。

冻存液: 10%DMSO+10%FBS+80%DMEM/F12基础培养基(V:V:V), DMSO购于SEALAND公司。

荧光染料: 碘化丙啶(PI)、Hoechst、多聚甲醛, 均购于Sigma公司。

1.1.3 仪器 超净台(江苏苏净)、CO₂细胞培养箱(Thermo, 美国)、倒置相差显微镜(Motic)、荧光显微镜(Olympus, 美国; Corning, 美国)、高压锅(Gene)、滤器(Millipore)、移液器(Eppendorf)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 采用新鲜乳腺组织进行原代培养, 培养方法见《细胞培养》^[8]。

1.2.2 细胞冻存与试验分组 培养到第5代, 细胞基本纯化完全。待细胞铺满瓶底80%~90%时, 用0.25% trypsin+0.02% EDTA将细胞消化, 收集细胞, 离心(128g/min, 8min)。再将细胞重悬浮于培养基中, 取9滴细胞悬液于小离心管中, 加1滴0.4%台盼蓝溶液, 混匀, 在3min内用血球计数板计数200个细胞, 分别记录活细胞和死细胞数。在镜下, 死细胞被染成蓝色, 而活细胞拒染^[7]。细胞死亡率(%)=死细胞总数/(活细胞数+死细胞总数)×100。然后将细胞按所需密度分为4组进行冻存。每冻存管内分装1.5ml, 3个平行样, 梯度降温^[7], 液氮保存。上述4组细胞密度分别为1组: 1×10^4 个细胞/ml; 2组:

收稿日期: 2010-04-04 接受日期: 2010-07-29

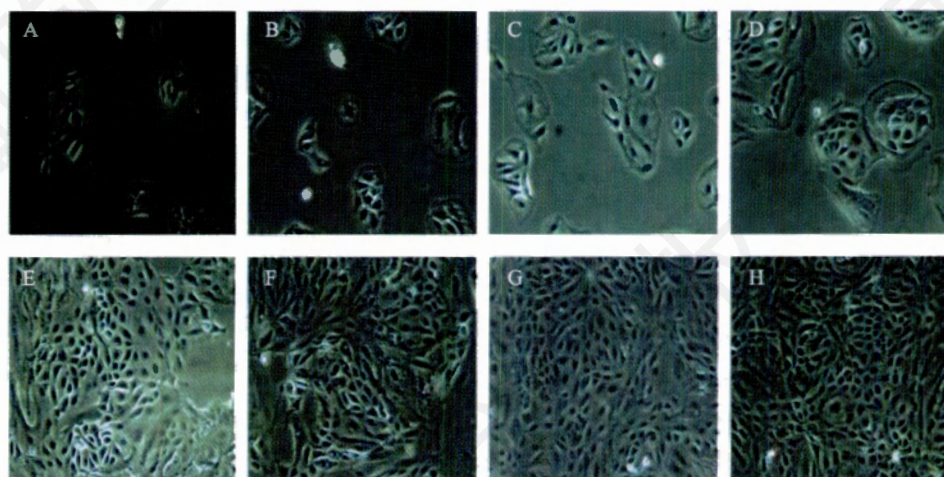
农业部(No.Nycytx-02-05)资助项目

* 通讯作者。Tel: 13074763921, Email: kaoguilan2006@126.com

Table 1 The death rate, adhesion rate and apoptosis rate with different cryopreserved cells density

Group	Death rate(%)	Adhesion rate (%)	Apoptosis rate(%)
1	32.936 ^a ± 2.401	78.706 ^{ab} ± 0.116	11.620 ^b ± 2.960
2	14.384 ^c ± 4.382	73.010 ^a ± 6.770	13.903 ^b ± 4.941
3	12.564 ^c ± 2.614	79.849 ^{ab} ± 7.530	4.816 ^a ± 3.311
4	3.521 ^a ± 0.951	91.590 ^c ± 0.580	12.490 ^b ± 1.472

Same letters have no significant difference ($P>0.05$), adjacent letters have significant difference ($P<0.05$), interval letters have significantly difference ($P<0.01$).

**Fig. 1 The appearance of BMECS after adhesion 1d and 3d**

A to D represent the appearance of group 1, 2, 3 and 4 respectively at 1d; E to H represent the appearance of group 1, 2, 3 and 4 respectively at 3d.

1×10⁵ 个细胞/ml; 3组: 1×10⁶ 个细胞/ml; 4组: 1×10⁷ 个细胞/ml。

1.2.3 细胞复苏 细胞冻存1个月后将细胞自液氮中取出, 迅速投到37℃水浴锅中使其尽量在1min内融化。将冻存管内的细胞移至离心管内, 台盼蓝染色计算细胞的死亡率, 方法同冻存前。将细胞密度调整至1×10⁵ 个细胞/ml, 分别接种于培养瓶(200 ml规格)10 ml和24孔板内0.4 ml, 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

1.2.4 细胞死亡率的测定 方法同冻存前测定方法。细胞死亡率 = 冻存后细胞死亡率 - 冻存前细胞死亡率

1.2.5 细胞贴壁率(即贴壁细胞占冻存前活细胞的比例)的测定 培养瓶中细胞培养24 h后换液, 收集上清液, 计数死亡细胞数。按以下公式计算贴壁率。

24 h 贴壁率 = (接种细胞的总数量 - 24 h 后上清液中细胞数量) / 接种细胞的总数量 × 100%

贴壁率 = 24h 贴壁率 / 冻存前活细胞比率 × 100%

1.2.6 细胞凋亡率的测定 24孔板中的细胞培养1d后, 弃去培养液, PBS清洗一次, 加入10ug/ml

Hoechst 200 μl 置37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中避光静置10min, 取出培养板弃去染色液, PBS清洗一次后再加入5ug/ml PI 200 μl 置4℃冰箱内避光静置10min, 取出培养板弃去染色液, PBS清洗一次, 加4%多聚甲醛200 μl于37℃避光固定10min, 取出培养板弃去甲醛, 加少量PBS在荧光显微镜下照相, 并计数100个细胞中凋亡细胞的个数。

细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 × 100%

1.2.7 细胞形态学观察 细胞复苏培养后, 在贴壁后第1d和第3d分别观察细胞的形态。

1.2.8 数据处理 采用SPSS 15软件进行统计学处理。试验数据以M ± s表示, 并进行方差分析。

2 结果

2.1 复苏后细胞活力

细胞活力包括复苏后细胞的死亡率、贴壁率及凋亡率(表1)。

由表1可见, 复苏后细胞死亡率4组显著低于其他组($P<0.01$), 2、3组间差异不显著($P>0.05$), 1组极显著高于其他组($P<0.01$); 复苏后细胞贴壁率4组

显著高于2、3组($P<0.05$), 极显著高于1组($P<0.01$), 1、2、3组间差异不显著($P>0.05$); 复苏后细胞凋亡率3组显著低于其他组($P<0.05$), 1、2、4组间差异不显著($P>0.05$)。

以上结果说明: 试验3组(BMECS冻存密度 1×10^6 个细胞/ml)细胞凋亡率低; 试验4组(BMECS冻存密度 1×10^7 个细胞/ml)细胞死亡率低, 贴壁率高。

2.2 复苏后细胞形态

细胞复苏贴壁后分别于第1d与第3d用倒置相差显微镜进行形态观察。

3、4组相对于1、2组贴壁的细胞相对较多。当生长到第3d时, 3、4组基本长满培养瓶瓶底, 且细胞状态较1、2组要好(图1)。

3 讨论

众所周知, 在细胞体外培养中由于各种原因进行细胞冻存是非常必要的。冻存细胞不仅使试验中供体保持一致性, 还可以为试验随时提供大量的种子细胞, 同时减少原代培养次数, 节省时间及试验经费, 保证试验连续顺利进行。本试验将细胞设4个密度梯度进行梯度降温冻存, 主要进行了细胞冻存前和复苏后接种细胞活力即细胞的死亡率、贴比率和凋亡率以及细胞形态学的研究。

复苏后细胞活力直接反映了细胞的冻存质量, 细胞活力是细胞生长状态好坏的重要标志之一。据相关报道介绍, 细胞冻存效果的好坏与细胞在冻存液中的分散程度密切相关, 细胞分散得越好, 冻存效果越好^[9], 过量的细胞会使冻存液中的营养物质不能满足细胞的需要, 细胞数过少, 在冻存或复苏时会损伤部分细胞导致复苏时细胞密度不够, 缺乏群间依赖, 不容易存活^[10,11]。在本试验条件下4组冻存细胞死亡率极显著低于其他组($P<0.01$), 贴壁细胞占活细胞的比例显著地高于其他组($P<0.05$), 说明4组冻存细胞密度优于其他组。温度刺激可以诱导细胞的凋亡^[12], 冻存过程是对细胞的一个冷应激, 会造成细胞的凋亡。试验中3组冻存细胞凋亡率显著低于其他组($P<0.05$), 说明3组密度下冻存细胞, 冷应激对细胞的损伤最小。本试验结果显示, 细胞冻存密度最大的第4组细胞死亡率最低, 细胞贴壁率最高, 生长状态良好, 这说明在这个试验中细胞密度越大对冻存后复苏细胞保护性越好。较高的细胞冻存密度如果经低温损伤造成渗漏, 即使损伤一些, 细胞的存活率也能达到很高, 这也许也是高密度冻存有较好结果的原

因之一。此外, 冻存密度还受实际操作可行性的影响, 例如本试验想要冻存细胞密度达 1×10^8 个细胞/ml, 则需要培养100多瓶(200 ml规格)细胞才能达到此密度。所以试验设计时舍弃了此处理。是否在试验过程中设计 1×10^8 、 1×10^9 个细胞/ml处理组冻存效果会更好还有待于今后再深入研究。

对细胞的形态进行观察, 可以较全面、细致的了解细胞的生长变化状况。细胞冻存效果还在于细胞贴壁密度, 如细胞密度太小, 细胞之间没有连接, 增殖速度会很缓慢。但是如果密度过大, 复苏后的细胞增殖没有适当的空间使贴壁细胞容易脱落^[13]。细胞在复苏后第1d倒置相差显微镜观察, 发现3、4组细胞贴壁明显多于1、2组, 这与细胞计数的结果一致。复苏后3d倒置相差显微镜观察两组细胞已经长满, 而1、2组细胞还没有长满。说明3、4组细胞贴壁密度适中, 细胞生长良好。复苏后第1d, 几个细胞分团生长, 第3d时细胞基本铺满瓶底, 呈铺路石状, 具有典型上皮细胞形状。但在试验中还发现随着细胞代数的增加, 铺路石样细胞逐渐向长梭形转变, 上皮细胞有向成纤维细胞转化的趋势。发生上述现象的原因还有待于进一步研究。

参考文献(References)

- 1 Ahn JY, Aoki N, Adachi T, Mizuno Y, Nakamura R, Matsuda T. Isolation and culture of bovine mammary epithelial cells and establishment of gene transfection conditions in the cells. *Biosci Biotech Biochem* 1995; 59: 59-64.
- 2 Kofron MD, Opsitnick NC, Attawia MA. Cryopreservation of tissue engineered constructs for bone. *Orthop Res* 2003; 21(6): 1005-10.
- 3 Lloid TD, Orr S, Skett P. Cryopreservation of hepatocytes: a review of current Methods for banking. *Cell Tissue Bank* 2003; 4: 3-15.
- 4 Canaple L, Nurdin N, Angelova N. Maintenance of primary murine hepatocyte Functions in multicomponent polymer capsules *in vitro* cryopreservation studies. *Hepato* 2001; 24:11-8.
- 5 杨东斌, 宋来君, 杨波, 李祥生. 不同人羊膜间充质干细胞冻存液冻存细胞效果比较. *郑州大学学报(医学版)* 2009; 44(3): 568-72.
- 6 刘亚, 章孝荣, 运海, 金仁桃, 章美玲, 汪存利, 等. 牛、羊成纤维细胞的冷冻与冷藏保存. *中国兽医学报* 2004; 24(2): 197-8.
- 7 薛庆善. 体外培养的原理与技术. 北京: 科学出版社, 2001, 21-372.
- 8 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版公司, 2004, 189-227.
- 9 王红. 利用动物耳皮肤组织培养成纤维细胞的研究. *草食家畜* 2001; S2: 210-4.
- 10 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 北京: 北京出版社, 2001, 78-111.

- 11 Monroe KR, Hankin JH, Pike MC. Correlation of dietary intake and colorectal cancer incidence among Mexican-American migrants: the multiethnic cohort study. *Nutr Cancer* 2003; 45(2):133-47.
- 12 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 2000, 454-68.
- 13 刘鸿凌, 王英杰, 郭海涛. 乳猪肝细胞 -196℃ 保存的初步研究. 第3军医大学学报 2003; 25(6): 472-4.

The Effect of Different Cells Density on the Bovine Mammary Epithelial Cells Cryopreservation

Yin-Fen Yang, Gui-Lan Kao*, Xian-Zhi Hou, Ai-Wu Gao, Ya-Nan Han, Qing Zhao
(College of Animal Science, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China)

Abstract In this study, the breast tissue of a healthy Holstein dairy cow was used. Through five-generation purification, the bovine mammary epithelial cells were divided into four groups, according to the cell density (1×10^4 cells/ml, group 1; 1×10^5 cells/ml, group 2; 1×10^6 cells/ml, group 3; 1×10^7 cells/ml, group 4 respectively) and cryopreserved, then thawed after 1 month and maintained separately. The results showed that group 4 had the lowest death rate, significantly lower to other three treatments ($P < 0.01$), and the highest adhesion rate, significantly higher to other three treatments ($P < 0.05$). Group 3 had the lowest apoptosis rate, significantly lower to other three treatments ($P < 0.05$). The cells of group 3 and group 4 basically covered with the bottom of the culture flask and the cells were in good condition at three days after adherence.

Key words bovine mammary epithelial cells; death rate; adhesion rate; apoptosis rate

Received: April 4, 2010 Accepted: July 29, 2010

This work was supported by The Department of Agriculture Funded Project(No.Nycytx-02-05)

*Corresponding author. Tel: 13074763921, Email: kaoguilan2006@126.com