

猪耳皮肤成纤维细胞的培养

于珍珠* 刘 娣*,**** 孙兴参** 张冬杰* 梁 洋* 杨秀芹* 于 浩* 高文学***

(* 东北农业大学动物科技学院 ** 东北农业大学生命科学学院 *** 东北农业大学动物医学学院 哈尔滨 150030)

摘 要 本研究以猪耳皮组织为材料,采用胰蛋白酶冷热处理结合法成功地分离和培养了猪耳皮肤成纤维细胞。此方法的细胞存活率相对于胰蛋白酶热处理法较高。传代细胞与原代细胞的形态和生长速度均相似。传代细胞未检测到凋亡现象。细胞已传至 15 代以上,染色体倍性正常,说明我们所建立的胰蛋白酶冷热处理结合法可以快速有效的分离和培养猪耳皮肤成纤维细胞,并且能稳定的进行传代培养。

关键词: 成纤维细胞 体外培养 耳皮 猪 细胞凋亡

通过细胞核移植,目前已经成功获得了羊、鼠、牛等的体细胞克隆后代^[1-4],因此,利用体细胞核移植来进行克隆动物已经显示了广阔的前景。通过克隆动物,不但可以有效增加优良品种的群体数目以及保护濒危动物^[5],而且成为研究细胞分化和基因调控机制的重要手段。在哺乳动物的体细胞核移植中,供体细胞的制备是十分重要的一环,因为供体细胞的质量会直接影响到核移植的效率和结果^[6]。

虽然哺乳动物细胞培养是一项常规技术,但不同来源的细胞其分离和培养的方法也不尽相同。本研究以猪耳为材料,对比了胰蛋白酶冷热处理结合法与胰蛋白酶热处理法分离细胞的效果。通过对胰蛋白酶冷热处理结合法分离培养的细胞进行了染色体倍性与细胞凋亡的分析,从而了解细胞的生长状态,以便评价此种细胞分离培养的方法。

材料与方法

1. 取材

在种猪场中,选取 1-6 周龄幼猪,尽量挑选猪耳组织上血管较细少的部位,用刮毛刀刮毛后,无菌取一块猪耳组织,将组织块放入含 250U/ml 青霉素和 250 μ g/ml 链霉素的无菌 PBS 中,4℃ 保温立即带回实验室。

2. 酶消化法分离培养猪耳皮肤成纤维细胞

在超净台上,将猪耳组织块浸入 70% 酒精 10-30 秒,然后置于无菌培养皿中,用眼科剪去掉毛,用含 100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的无菌 PBS 涮洗 3-5 遍,在 PBS 中将猪耳组织块剪碎成 1-3mm³ 的小块,并将猪耳组织块等分至两个培养瓶中,分别采用胰蛋白酶热处理法与胰蛋白酶冷热处理结合法分离细胞。

(1) 胰蛋白酶热处理法 待组织块下沉后,吸去上

清,向其中一个培养瓶中加入含 0.25% 胰蛋白酶-0.04% EDTA(Sigma) 的消化液,密封瓶口后,置于 37℃ 下消化 30min,中间摇匀数次,消化结束后,收集含有解离下来细胞的消化液,置 4℃ 冰箱内冷却,在所余组织上再一次加入消化液,重复上述消化步骤四次,并将每次收集到的含有细胞的消化液混合到一起,离心去上清,重悬于 1ml 37℃ 预温的 DMEM/F12(GIBCO)培养液(含 20% 胎牛血清,2mmol/L 谷氨酰胺,100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素),吹打均匀后,将 1 滴细胞悬液与 2 滴 2% 的台盼蓝液混合后,滴入细胞计数板,2min 后,在显微镜下计数至少 200 个细胞,未着色的为活细胞,呈蓝色的为死细胞,计算活细胞百分比。

胰蛋白酶热处理法实验重复六次,统计实验结果。

(2) 胰蛋白酶冷热处理结合法 向另外一瓶中加入少量含 0.25% 胰蛋白酶-0.04% EDTA 的消化液,置于 4℃ 冰箱。冷消化 1-2h,改为用 37℃ 培养箱继续进行消化。30-60min 后加入 1ml 37℃ 预温的 DMEM/F12 培养液(含 20% 胎牛血清,2mmol/L 谷氨酰胺,100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素),吹打均匀后,用上述的台盼蓝排除检测法计算活细胞的百分比。胰蛋白酶冷热处理结合法实验重复六次,统计实验结果。并用培养液调整细胞密度至 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cells/ml。将培养瓶置于 37℃,饱和湿度,5% CO₂ 培养箱中培养。48-72h 后观察,发现贴壁后更换一半或全部培养液,此后每隔两天更换一次培养液。

3. 猪耳皮肤成纤维细胞的传代培养

待细胞长至 80%-90% 汇合时,用无菌 PBS 将细胞洗 1-3 遍,然后加入 0.25% 胰蛋白酶-0.04% EDTA 37℃ 消化细胞,显微镜下观察细胞变圆,加含 10% 胎牛血清,2mmol/L 谷氨酰胺,100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM/F12 培养液终止消化,并进行培养。

本文 2003 年 1 月 7 日收到,5 月 4 日接受。

基金项目:黑龙江省攻关项目(GB01B104)资助。

**** 通讯作者。E-mail:liudi1963@sohu.com

4. 猪耳皮肤成纤维细胞的染色体的制备

待成纤维细胞长至对数生长期,加入秋水仙碱使其浓度为 $0.1\mu\text{g/ml}$,培养4h。加入消化液消化细胞,然后用含10%胎牛血清的培养液终止消化,离心收集细胞,吸除上清液,加入5ml预温到 38°C 的 75mmol/L 的KCl, 38°C 孵育40min。然后加入1ml新配制的固定液甲醇:冰醋酸(3:1)预固定,离心收集细胞,再加入新鲜固定液3ml,离心弃上清,重复固定2-3次。在沉淀中加入新鲜固定液,吹打均匀。吸取细胞悬液于 -20°C 预冷的载玻片上滴片,自然干燥。Giemsa液中染色10min,水洗,晾干后观察。

5. 猪耳皮肤成纤维细胞的细胞凋亡检测

待细胞长至80%汇合时,用无菌PBS将细胞洗1-3遍,然后加入含0.25%胰蛋白酶-0.04%EDTA的消化液, 37°C 消化细胞。显微镜下观察细胞变圆,立即用含10%胎牛血清的DMEM/F12终止消化,分装入15ml的离心管中(0.5×10^6 cells/管),500g离心10min,细胞重悬于1ml冷的GM盐溶液中(6.1mmol/L glucose, 137mmol/L NaCl, 5.4mmol/L KCl, 1.5mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9mmol/L KH_2PO_4 , 0.5mmol/L EDTA),每管加入3ml 4°C 预冷乙醇, 4°C 固定过夜。用含 5mmol/L EDTA的PBS洗一次,加入含 $30\mu\text{g/ml}$ PI及 0.3mg/ml RNA酶(Sigma)的1ml PBS,室温避光染色1h,上样前用 $30\mu\text{m}$ 的尼龙筛网过滤细胞,利用流式细胞仪(FACS)检测细胞凋亡情况。

6. 数据统计分析

对所得数据采用t检验方法进行统计分析。

结 果

1. 不同方法处理所得的猪耳皮肤成纤维细胞的存活率

采用胰蛋白酶热处理方法所得细胞的存活率为 $40.3\pm 8.1\%$,采用胰蛋白酶冷热处理结合法所得细胞存活率为 $66.5\pm 10.4\%$,胰蛋白酶冷热处理结合法得到的细胞存活率显著高于胰蛋白酶热处理法所得到的细胞存活率。

表1 不同方法处理所得的猪耳皮肤成纤维细胞的存活率

胰蛋白酶不同处理方法	细胞存活率(%)
胰蛋白酶热处理方法	40.3 ± 8.1
胰蛋白酶冷热处理结合法	$66.5\pm 10.4^*$

* $P<0.01$ 。

2. 细胞的生长状态

组织块消化后,镜下观察可见到大量单个细胞悬浮在培养液中。24-48h后观察,已有许多细胞贴壁,细胞呈圆形,尚未伸展。培养3-5天后,细胞贴壁并开始伸展,有的细胞已呈现梭形。大约7-

15天后,细胞已汇合成单层铺满培养瓶底壁。细胞呈梭形、多角形等,为典型的成纤维细胞形态,胞质近中央处有椭圆形细胞核(图版图A-F)。成群细胞呈现放射状、漩涡状等走行形式。在细胞汇合成单层后进行传代,传代细胞与原代细胞在形态和生长速度上无明显差异。

3. 供体年龄对猪耳成纤维细胞原代培养所需时间的影响

实验中分别采取出生1周、2周、3周和6周的幼猪的耳组织块进行培养,发现供体猪的年龄越小,细胞贴壁和伸展所需时间越短,原代培养越快。

4. 细胞的染色体倍性分析

实验中我们分别检测了传至12代和15代的猪耳皮肤成纤维细胞的染色体,结果均为含38条染色体的正常二倍体(图版图G、H),没有发现染色体异倍现象。

5. 猪耳皮肤成纤维细胞的细胞凋亡检测

猪耳皮肤成纤维细胞的细胞凋亡情况见图1。在PI荧光的直方图上, G_0/G_1 期前未出现亚二倍体峰,说明传代培养的猪耳皮肤成纤维细胞基本无凋亡现象,说明此分离培养方法未引起培养的细胞凋亡。

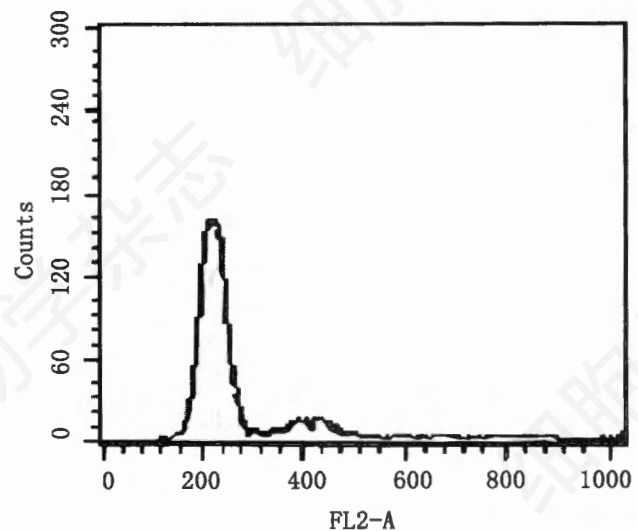


图1 猪耳皮肤成纤维细胞的凋亡检测图

讨 论

如何提高细胞在体外培养的成功率,是细胞培养实验工作的首要问题^[7]。培养成功与否与诸多因素有关,但有三方面问题最为主要:

1. 原代细胞分离方法

研究证明,不同消化方法对细胞贴壁和生长增殖有明显影响。体外培养中最常用的消化酶是胰蛋白酶^[8]。胰蛋白酶是一种能够破坏基质和黏附蛋白的蛋白水解酶^[9],容易破坏以单层方式生长的细胞所分泌细胞外基质和黏附蛋白。因此,必须严格控制酶量(酶浓度),作用时间长短以及酶处理温度。本实验中分别采用了胰蛋白酶热处理法(37℃)与胰蛋白酶冷热处理结合法(4℃ + 37℃)分离猪耳皮肤成纤维细胞,比较了两种方法对细胞的存活率的影响,结果表明胰蛋白酶冷热处理结合法的细胞存活率明显高于胰蛋白酶热处理法,说明胰蛋白酶冷热处理结合法对细胞的损伤较少,细胞产量较高。在进行胰蛋白酶冷热处理结合法时,先让耳组织块在4℃与胰蛋白酶充分接触1-2h,也可延长至10h以上,然后将处理温度改为37℃,30-60min后即可加入培养液终止消化,这样获得的细胞量较大,细胞容易贴壁生长。另外用此方法解离细胞时免去了离心,过滤等操作,节省了时间,且减少了样品污染的机会。

2. 组织和细胞的供体年龄

原则上,所有个体都可作为组织细胞的供体,但同样的培养物,来自幼年个体比老年个体易于培养;来自同一个体的组织,分化低的组织细胞比分化高的容易培养^[10]。因此,我们在取材时,尽量挑选供体动物的年龄较小的,以便使体外培养的成功率提高。选取1周龄的幼猪作为供体时,原代培养的成纤维细胞7-10天即可长至汇合。

3. 培养条件

不同细胞对培养液的需求不同,当前还没有一种培养液是万能的。我们在实验中发现 DMEM/F12 培养液 + 20% 胎牛血清进行猪耳皮肤成纤维细胞原代培养的效果较好。在进行传代培养时,利用了流式细胞仪检测了培养细胞的凋亡情况,发现传至第十二代的细胞仍无明显凋亡现象,说明此培养方案较为适于猪耳皮肤成纤维细胞的分离培养。

除此之外,长期反复传代,细胞可逐渐失去二倍体性,进入衰退期^[10]。本实验对第12代、第15代猪耳皮肤成纤维细胞的染色体进行了检测,结果染色体倍性均正常,这表明应用此方法可稳定地进行猪耳皮肤成纤维细胞的传代培养。应用此方法,本实验室已将猪耳皮肤成纤维细胞稳定传至15代,并在继续进行传代培养。

参 考 文 献

- [1] Kato Y, et al., 1998, *J. Science*, **282**:2095-2098.
- [2] Wakayama T, et al., 1998, *J. Nature*, **394**:369-374.
- [3] Wells D N, et al., 1999, *J. Biol Reprod*, **60**:996-1005.
- [4] Wilmut I, et al., 1997, *J. Nature*, **385**:810-813.
- [5] Wells D N, et al., 1998, *J. Reprod Fertil Dev*, **10**:369-378.
- [6] Liu J-L, et al., 2001, *J. Reproduction*, **122**:801-808.
- [7] 鄂征, 1995, 组织培养和分子细胞学技术, 北京出版社, 北京.
- [8] 薛庆善, 体外培养的原理与技术, 科学出版社, 北京.
- [9] [美] D. L. 斯佩克特, R. D. 戈德曼, L. A. 莱因万德(黄培堂等译), 细胞实验指南, 科学出版社, 北京.
- [10] 司徒镇强、吴军正, 1996, 细胞培养, 世界图书出版公司, 西安.

CULTURE OF PORCINE EAR SKIN FIBROBLASTS

YU Ling Zhu LIU Di* SUN Xing Shen ZHANG Dong Jie LIANG Yang YANG Xiu Qin YU Hao GAO Wen Xue
(Northeast Agricultural University, Harbin 150030 China)

ABSTRACT In this research, the porcine ear skin fibroblasts were successfully dissociated and cultured by using the porcine ear tissue as materials. The research adopted a kind of method combining trypsin cold treatment with trypsin heat treatment. The rate of living cells in this method was much higher than that of trypsin heat treatment. The passage cells were similar to the primary culture in shape and on the growth rate. The apoptosis in the passage cells was not been detected. Cells were subcultured to fifteenth passage. The chromosomes of passage 12 and passage 15 cells were analysed, and the results showed that they contained the euploid chromosome number of $n=38$. Thus it was illustrated that the porcine ear skin fibroblasts could quickly and efficiently be dissociated and cultured, and the subculturing was stable by using this kind of method combining trypsin cold treatment with trypsin heat treatment.

Key words: Fibroblast in vitro culture Ear skin Porcine Apoptosis

This study was supported by grants from the Heilongjiang Provincial Foundation.

* Corresponding author. E-mail: liudi1963@sohu.com