

我国小儿包皮成纤维细胞 (CHILDREN'S FORESKIN FIBROBLASTS) 原代与传代培养的研究*

范保荣 方家椿 高捷 武纯静 **汪堃仁

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物化学研究室, 细胞遗传学研究室)

** (北京师范大学生物系, 细胞生物化学研究室)

在所建立的人类正常组织细胞株均为人类婴儿包皮成纤维细胞株, 即 FS₁ 和 FS₁-705^[1], 但随后新建立的细胞株, 则尚未列入。例如, 美国的 Julius S. Horoszewicz 等人于 1978 年建立了 15 例新生婴儿包皮成纤维细胞株^[2]。

本文介绍我们在我国小儿包皮成纤维细胞的培养过程中所作的一些科研工作。包括原代与传代培养的过程, 该细胞的生物学特征, 以及冷冻保存方法。

一、小儿包皮成纤维细胞的短期培养

1. 原代培养的技术与操作步骤

从北京市儿童医院门诊手术室取 4—11 岁的小儿包皮环切术后的新鲜标本 9 例 (见表 1), 以无菌方法保存于 Hanks 液内, 在半小时至 1 小时内进行接种。

组织块放在盛有新鲜 Hanks 液与 10% 小牛血清及青、链霉素 (双抗) 的小型培养皿内清

表 1 我国小儿包皮成纤维细胞的原代培养
(1980 年 9 月—1982 年 5 月)

培养次数	小儿姓名与年龄	培 养 时 间	培养瓶数	冻存细胞情况
第一次	1. 张 ×, 9 岁	1980 年 10 月 20 日—11 月 20 日	7 小瓶	反复冻存备用, 共计应用 1 年
	2. 郑 ×, 6 岁	1980 年 11 月 3 日—12 月 3 日	6 小瓶	
第二次	3. 李 ×, 9 岁	1982 年 1 月 14 日—2 月 14 日	5 小瓶	冻存备用
	4. 段 ×, 10 岁		6 小瓶	
第三次	5. 孔 ×, 4 岁	1982 年 2 月 18 日—3 月 18 日	5 小瓶	冻存备用
第四次	6. 佟 ×, 8 岁	1982 年 2 月 25 日—3 月 25 日	2 大瓶, 5 小瓶	冻存备用
第五次	7. 张 ×, 7 岁	1982 年 4 月 8 日—5 月 8 日	2 大瓶	(一) 冻存备用
	8. 李 ×, 9 岁		2 大瓶	(二) 正在培养, 为做实验用
	9. 王 ×, 11 岁		2 大瓶	

洗, 清除皮下的血管与脂肪等组织。清洗三次以上后, 剪成 1 立方毫米大小或更小的碎块。移至培养瓶内, 先将组织块纵横成行排列, 或用手摇使组织块均匀分散, 将培养液自培养瓶内的角落或边缘吸取出。细小组织块即呈均匀而不规则形贴壁。将小或大培养瓶翻转, 使贴组

织块的玻璃面向上, 加入培养液 3—4 毫升 (小瓶) (培养液的配方见后); 或 7—8 毫升 (大瓶)。将橡皮塞塞紧, 放入温箱。约经 1—2 小时翻瓶, 静置培养三天。此时部分或大部分组

* 本文蒙北京市儿童医院颜纯副教授等提供小儿包皮环切术后的新鲜标本。谨致谢意。

[3] 吴素萱。1955。植物学报, 4 (3): 233—243。
[4] 郑国锷, 王耀芝。1956。植物学报, 5 (4): 363—376。
[5] 吴素萱。1956。植物学报, 5 (1): 1—14。
[6] 姜成后等。1956。植物学报, 5 (1): 345—362。
[7] 郑国锷等。1959。兰州大学学报 (自然科学版), 1959 (1): 31—37。
[8] 姜成后等。1962。科学通报, 1962 (12): 52—54。

[9] 郑国锷等。1964。植物学报, 12 (4): 289—304。
[10] 郑国锷等。1973。植物学报, 15 (1): 53—63。
[11] 郑国锷。1974。遗传学报, 1 (1): 117—124。
[12] 郑国锷等。1975。植物学报, 17 (1): 60—69。
[13] 郑国锷等。1980。植物学报, 22 (3): 216—220。
[14] 周锦鹏。1981。细胞生物学杂志, 1981 (2): 13—14。

组织块已贴壁。漂离的组织块倒出后仍能再用于接种。如果将漂离的组织块倒出后,加入新鲜培养液,每周换液 1—2 次,成纤维细胞即可旺盛的生长。

2. 原代培养过程中对活细胞的观察

在倒置光显微镜下连续观察活细胞的生长情况。培养第一周,在接种培养三至四日,就逐渐有上皮细胞自组织块移出,构成肉眼可见的生长晕。组织块越细小,生长晕越多。培养第二周,在生长晕的周围少量的成纤维细胞呈放射状向四周生长。贴壁细胞呈稀疏排列。培养第三周,成纤维细胞从组织块周围继续生长,细胞增多。贴壁细胞密集而汇集成束。培养第四周时,成纤维细胞已铺满全部瓶底,即可进行传代培养^[3]。(图版图 1, 2)。

3. 传代培养

传代培养所用的培养液与原代培养时相同,即应用日本产 Eagle 氏培养粉与 L——谷氨酰胺配制的 Eagle 氏培养液,应用时加入 15% 的小牛血清,调 pH 至 7。应用 D-Hanks 液配制 0.25% 的胰蛋白酶。用三蒸水配制浓度为 0.02% 的 EDTA (又称 Versen)。应用三蒸水配制 5.6% 的 NaHCO_3 溶液,作为 pH 调整液。用灭菌的 Hanks 液配制青、链霉素(双抗),使每毫升含有 100 单位的青霉素和 100 微克的链霉素。

在传代时,先用 0.25% 的胰蛋白酶与 0.02% 的 EDTA 消化细胞。倾去消化液,加新鲜培养液后,用吸管吹打。将悬浮细胞分种新的瓶内,每一瓶传二瓶。传代培养时应应用 100 毫升大培养瓶培养成纤维细胞比较适宜。传代后的成纤维细胞可于 24 小时以内全部贴壁。以 3 天换液一次,7 天传代一次为宜。适合用于科研的范围是自第 5 代至第 25 代^[4]。

Heckman C.A. 等人(1977)研究了人类成纤维细胞组织培养中基底附着物质的特性,他们认为小牛血清是重要的基底附着物质^[4]。我们认为,如果小牛血清质量好(即 1. 胎牛血清或出生后当日取血制备的小牛血清。2. 取血与制备小牛血清过程中,消毒严格。3. 血清为

黄色透明液体,镜检无支原体污染),则成纤维细胞生长即更好。

二、小儿包皮成纤维细胞的生物学特征

1. 形态特征

成纤维细胞在组织培养中,常呈多突起的扁平梭形,胞体较大,细胞界限较清楚,有一个较大的扁卵圆形的核,1—2 个明显的核仁。

2. 生长速率

生长最适宜的温度为 37°C 。我们应用第五次原代培养的经传代培养至第 6 代的小儿包皮成纤维细胞。随后又用继续培养的第六次原代培养的经传代培养至第 6 代与第 7 代的小儿包皮成纤维细胞做了三组细胞生长速度的实验。结果如下:1. 以 5×10^4 个细胞/毫升为基数,一周以后,细胞数可增长一倍,可达 10×10^4 个细胞/毫升。2. 以 10×10^4 个细胞/毫升为基数,一周以后,细胞数可增长二倍,可达 29.5×10^4 个细胞/毫升。3. 以 20×10^4 个细胞/毫升为基数,一周以后,细胞数可增长 1/2 倍,可达 32.25×10^4 个细胞/毫升。各组实验均需每日

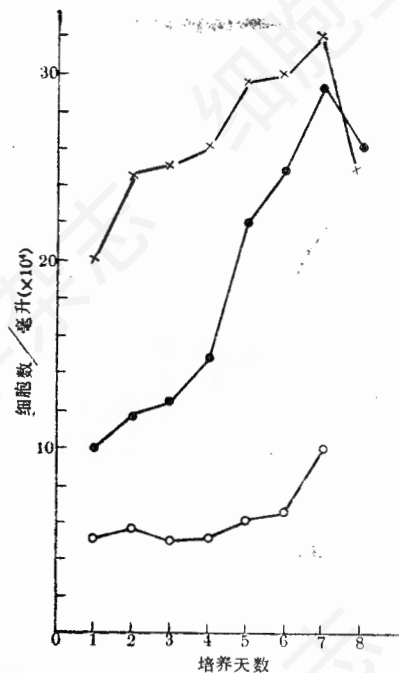


图 1 我国小儿包皮成纤维细胞的生长曲线

○——○实验(一) ×——×实验(三)
●——●实验(二)

或隔日换液一次。生长曲线见图1。

3. 分裂指数的观察

用第五次(组一)与第六次(组二)原代培养而经传代培养至第7代的小儿包皮成纤维细胞分别做了两组分裂指数的实验。其方法是挑选生长良好的细胞,制成 10×10^4 个细胞/毫升的细胞悬液,接种于预先贴在每个小培养瓶中两片 20×5 毫米小盖片上培养。每天将一瓶内的盖片取出,用95%的酒精固定,H.E.染色,制成标本后计数。即统计每日每片中,每1000个成纤维细胞中的有丝分裂细胞数,其所占百分比即为细胞的分裂指数。

小儿包皮成纤维细胞具有较旺盛的增殖能力,分裂指数以接种后第四天与第五天数值最高,说明成纤维细胞在传代后短时间内就开始旺盛增殖,以后随着培养瓶中细胞密度的增加而递减。我国小儿包皮成纤维细胞的分裂指数,第一组为0.5—3.5%。第二组为1—3.6%。取第二组的数字绘制小儿包皮成纤维细胞的分裂指数曲线图(见图2)。

4. 核型

用第五次原代培养后传至第5代的小儿包皮成纤维细胞进行核型的鉴定。细胞用最终浓度为0.04微克/毫升的秋水仙素处理3—4小时,用0.75 M的KCl液低渗30分钟,再用甲

醇、冰醋酸(3:1)固定液固定3次后制片。干后即放入10%的Giemsa染液,配制时用pH 6.8的磷酸缓冲液稀释,染色10分钟。制成染色体标本。将标本放在油镜下观察、统计并照相。

小儿包皮成纤维细胞的核型为正常人男性二倍体细胞,即 $2n=46$, 具有性染色体XY。二倍体细胞可达70—80%以上。二倍体细胞只能传30—50代,50代以后即生长缓慢,大约能生存一年左右。我们曾传至30—40代以上,但细胞已经生长缓慢。我国小儿包皮成纤维细胞的染色体核型如图版中图3。

三、小儿包皮成纤维细胞的冷冻和复苏

将培养良好的、排列致密的小儿包皮成纤维细胞在冻存以前24小时换新培养液。以0.25%的胰蛋白酶溶液与0.02%的EDTA溶液各1.5毫升处理细胞。弃消化液后,加入Eagle氏培养液约6—8毫升。用吸管吹打收集分散而变圆的细胞,镜下计数。用500转/分或1,000转/分离心10分钟,弃上清液,留下部分培养液,使细胞浓度变为 $4-6 \times 10^6$ 个细胞/毫升,配制10%的二甲亚砷冷冻保护剂的培养液。将1毫升的细胞悬液用注射器吸出放在安瓿内,火焰封口。用药棉与纱布包好,使安瓿的温度每分钟下降1度,一小时后放入液氮罐中保存。

我们将一定数目的短期培养的小儿包皮成纤维细胞从第5代起,保存于液氮罐中。解冻时直接放入37℃水浴中速溶,离心,弃上清液,加入营养液,计活细胞数。保存的细胞存活率可达95%以上。但经一年冻存的细胞,其生活能力差。

参 考 文 献

- [1] Swim, H. E. and Parker, R. F., 1957, *Am. J. Hyg.* 66, 235-243.
- [2] Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Ito, M., Berardino, L. D. and William, A. C., 1978, *Infection and Immunity*, Feb.: 720-726.
- [3] Kruse, P. F. and Patterson, M. K., 1973, "Tissue Culture Methods and Applications", 39-40. Academic Press, New York and London.
- [4] Heckman, C. A., Vroman, L. and Pitlick, A., 1977, *Tissue and Cell*, 9 (2): 317-334.

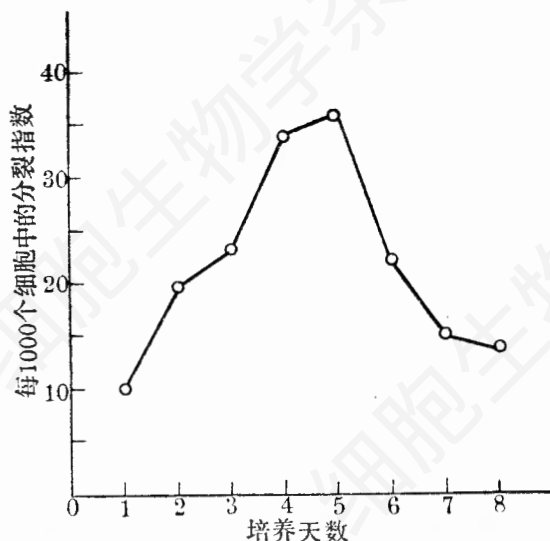


图2 我国小儿包皮成纤维细胞的分裂指数