

from mouse embryo striatum and passaged in serum-free culture medium, following identified by immunocytochemistry, the clones were fixed and cut into ultra-thin slice, the inner structure of neurospheres were observed under transmission electron microscopy. Neural stem cells proliferated and formed suspended neural stem cell clones called neurospheres in serum-free medium containing bFGF, these clones could be induced to differentiate into neurons and glia cells. In neurospheres, cells formed special membrane structure with each other, small bulbs were found in the cytoplasm and some cells had an apoptosis appearance.

Key Words: Neural stem cell *in vitro* Electron-microscopy transmission

牛胎儿成纤维细胞的分离与体外培养

李扬 郭继彤 吴凯峰 旭日干

(内蒙古大学实验动物研究中心 哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室 呼和浩特 010021)

动物细胞培养是细胞工程、胚胎工程等生物工程研究及生物学基础研究的重要技术。哺乳动物细胞培养始于20世纪五十年代,现已成为一项常规技术,但由于细胞的来源不同,其分离培养的方法也不同。体细胞的培养是克隆动物、转基因克隆动物所必需的。为了获取进行基因转染的牛胎儿成纤维细胞,我们比较了不同分离培养方法获得牛胎儿成纤维细胞的可行性,并研究了牛胎儿成纤维细胞原代培养和传代培养的生长特征。

材料与方 法

1. 酶消化法分离培养牛胎儿成纤维细胞

实验用牛胎儿采自呼和浩特市回民屠宰场,为防止污染,将胎儿与子宫一同放入37℃生理盐水中带回。用手术剪在PBS液中剥除胎膜,将分离出的牛胎儿(体长2.2cm,依据文献^[1],胎牛胎龄为40天左右)用PBS液洗两遍,用70%的乙醇进行消毒,再用PBS洗一遍。用手术剪将胎儿头(放入-20℃保存)、四肢、内脏去除,保留其躯干,将躯干剪碎放入三角瓶中,加入0.25%的胰蛋白酶(Gibco BRL),38℃,5%CO₂,饱和湿度下消化,消化组织块时间依次为11小时、8小时、5小时、3小时、40分钟。消化完毕后,用孔径为100μm的滤网过滤的细胞悬液,加入含10%胎牛血清的DMEM(Gibco BRL)培养液终止消化,2000转/分离心10分,离心完后用PBS(free-Ca²⁺, Mg²⁺)洗两遍,加DMEM培养液重悬细胞,接种于25ml的卡氏培养瓶,38℃,5%CO₂,饱和湿度培养。胶原酶Ⅲ消化法分离培养牛胎儿成纤维细胞时,处理胎牛方法同上,本实验所用胶原酶Ⅲ为Sigma分装产品,工作浓度为150IU/ml。消化组织碎块时间依次为34小时、30小时、24小时、20小时、18小时,消化完毕,同法接种培养。

2. 组织块法直接培养牛胎儿成纤维细胞

用手术剪于PBS中剥除胎膜,用PBS洗涤,70%乙醇消毒,去除头、四肢、内脏,保留躯干。将胎牛躯干用手术刀切成1-3mm、4-6mm、6mm以上的小块,用10%的DMEM培养液洗两遍,分别接种于盛有培养液35mm的培养皿中。将培养液吸干,放入培养箱中培养5小时,让组织块贴壁,5

小时后翻转法加入培养液,38℃,5%CO₂,饱和湿度培养。

3. 牛胎儿成纤维细胞生长曲线的测定

将传至第三代的牛胎儿成纤维细胞用0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化液消化贴壁的单层细胞,调整细胞浓度为4.2×10⁴,接种于24孔细胞培养板中,每孔接种0.4ml,38℃,5%CO₂,饱和湿度培养。每隔24小时消化收集细胞,用血球计数板计数3个孔的细胞数,每孔计数两次,求取平均值。pH下降时,72小时内对细胞进行换液。对不同培养时间的细胞进行计数,绘制生长曲线。

4. 胎牛成纤维细胞的细胞染色体的制备

为了获得更多的细胞,将传至第四代的胎牛成纤维细胞接种到125ml卡氏培养瓶,待成纤维细胞长至对数生长期时,将其放入4℃1小时,然后加含0.05μg/ml秋水仙素(Gibco BRL)的DMEM培养液,培养6小时,用消化液消化(38℃,5分)。然后加含10%胎牛血清的培养液终止消化,离心收集细胞,向细胞悬液中逐滴加入0.5ml预温(38℃)的KCl(75mmol/L),混匀并补加至5-8ml,38℃孵育30分。加入1ml新配制甲醇:冰醋酸(3:1)预固定3分钟,低速离心(1000转/分)5分,收集细胞,再缓缓加入固定剂5-8ml室温固定20分,低速离心收集细胞,按此法固定2-3次。固定完毕,加适量固定剂调整细胞浓度,吸取细胞悬液于30cm高度滴在-20℃冰冻的载玻片上,自然干燥,Giemsa(Sigma分装)液染色20-30分,流水冲洗,自然干燥,观察计染色体数。

结 果

1. 酶消化法分离培养牛胎儿成纤维细胞

胶原酶Ⅲ消化法分离牛胎儿成纤维细胞的动态过程见封三图版图A、B、C、D、E。胰蛋白酶消化1小时左右、胶原酶Ⅲ消化20小时左右得到的成纤维细胞,接种24小时后细胞贴壁,呈圆形,体积增大10%-30%,左右伸展成梭形,少部分成圆形;3天后细胞全部伸展成梭形,分布均匀。由表1可以看出,用胰蛋白酶消化时间不能过长,时间控制在一小

本文2001年11月28日收到,2002年3月20日接受。

时左右则成纤维细胞生长最旺盛,原代培养时间最短;表2可以说明,用胶原酶Ⅲ消化时间控制在20小时左右成纤维细胞生长增殖最旺盛,原代培养时间最短。

表1 胰蛋白酶消化时间对牛胎儿成纤维细胞原代培养的影响

消化时间	11小时	8小时	5小时	3小时	1小时	40分
原代培养时间	不能存活	12天	10天	5天	3天	3天

表2 胶原酶Ⅲ消化组织块时间对牛胎儿成纤维细胞原代培养的影响

消化时间	34小时	30小时	24小时	20小时	18小时
原代培养时间	10天	8天	5天	3天	3天

注:原代培养时间指细胞培养开始到细胞生长至80%汇合可传代培养所需的时间。

2. 组织块贴附法直接培养牛胎儿成纤维细胞

牛胎儿成纤维细胞体外生长特征:接种第二天,组织块边缘游离出许多单个细胞,大多数为上皮样细胞及一些颗粒物质,并呈晕状,只有少部分已开始游离出个别成纤维细胞;接种第三天,组织块周围仍有大量上皮样细胞,但大部分组织已游离出成纤维细胞;第5天上皮样细胞大量减少,成纤维细胞已占多数,成梭状延伸;第6天成纤维细胞生长旺盛,已基本铺满瓶底,但组织块间仍有间隙;7天后组织块间隙消失,细胞汇合连生,满铺瓶底(见封三图版图F、G、H、I、J)。

组织块贴附法直接培养牛胎儿成纤维细胞,组织块大小对成纤维细胞原代培养至关重要,由表3可以看出,接种大小范围在(1-3mm)的组织块成活率最高,并且原代培养时间最短,成纤维细胞生长旺盛。

表3 接种组织块大小对牛胎儿成纤维细胞原代培养的影响

组织块大小	组织块总数	开始贴壁生长的天数和组织块数							组织块成活率(%)
		D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	
大(6-7mm)	12	1	2	2	2	0	0	0	58.3%
中(3-5mm)	14	2	3	3	1	1	0	0	78.7%
小(1-3mm)	17	3	5	5	1	1	0	0	88.3%

3. 传代细胞生长曲线的测定

传至第三代的牛胎儿成纤维细胞以 4.2×10^4 /ml

浓度接种,细胞于7-8天长满。从测定的传代细胞生长曲线(图1)可以看出,牛胎儿成纤维细胞生长增殖的滞留期为0-2天,对数生长期为2-8天,平台期为8-10天。

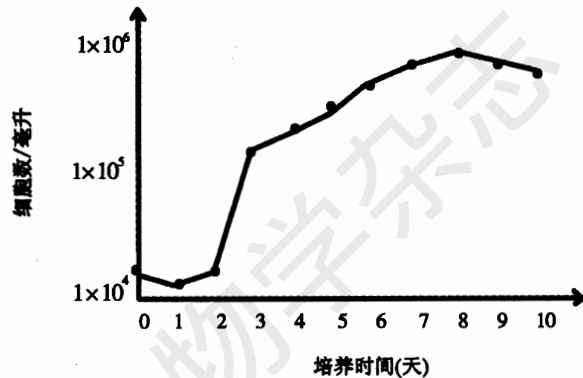


图1 牛胎儿成纤维细胞生长曲线

4. 胎牛成纤维细胞染色体检测

分别检测传至12代和9代的胎牛成纤维细胞染色体,结果染色体倍性均为含60条染色体的正常二倍体(封三图版图K、L)。

讨论

动物细胞培养方法有两种:一种是组织块贴壁培养法,另一种是分离单细胞接种培养法。组织块培养法简单方便,长出的细胞整齐且便于选择,培养动物成纤维细胞多用此法^[2]。

胰蛋白酶适用于消化细胞间质较少的软组织,如胚胎组织、羊膜、上皮组织、肝肾等软组织,传代细胞也非常好,消化纤维性组织和较硬的癌组织则较差^[3], Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及血清均可对其活性有抑制作用。胶原酶是从细菌中提取的酶,对胶原有很强的消化作用,适用于消化纤维性组织,对细胞间质有很好的消化作用,可使上皮细胞与胶原分离而不受伤害,且 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 及血清对其活性无抑制作用^[4]。

胶原酶有I、II、III、IV等类型,I、IV型比较常用,它们都可用于分离乳腺上皮细胞^[5]和肠上皮细胞^[6]。胶原酶Ⅲ消化法培养成纤维细胞未见报道。本实验用胶原酶Ⅲ成功地对牛胎儿成纤维细胞进行分离并对其进行体外培养,结果表明,用150IU/ml的胶原酶Ⅲ消化牛胎儿成纤维细胞20小时左右,可在较短的时间内成功地培养牛胎儿成纤维细胞,接种后贴壁效果好,也较经济。胰蛋白酶和胶原酶Ⅲ都可以成功分离培养牛胎儿成纤维细胞,但都有其缺点和优点:胰蛋白酶消化组织1小时左右所得到

的细胞数量比胶原酶Ⅲ消化组织 20 小时所得的细胞数多,但胰蛋白酶消化组织得到的细胞的死细胞比率要高于胶原酶Ⅲ。这说明胎牛成纤维细胞对胰蛋白酶较敏感,而胶原酶Ⅲ消化组织则较温和。组织块贴壁培养法较消化培养法简便经济,细胞生长快,且污染机率小,我们认为是一种行之有效的细胞培养方法。

牛胎儿成纤维细胞在体外培养时成贴附型生长,原代和早期传代细胞是上皮样和成纤维样细胞的混合物。上皮样细胞由表皮生发层的细胞分裂增殖而来,是源于外胚层的细胞;成纤维样细胞是由真皮层细胞分裂增殖而来,源于中胚层。在体内,生发层的细胞由于要不断地分裂产生新的表皮细胞以补充表层角化脱落的细胞,因而具有较强的增生能力。组织块培养初期,由于细胞仍基于原组织生长,还保持着强增殖能力,所以可见首先移出生长的主要是上皮样细胞。真皮层是一层致密的结缔组织,细胞成分较少,因此在组织块培养的最初几天,成纤维样细胞由于母细胞数量少而显得增加数量较慢。成纤维样细胞在体外的生存能力强,生长迅速,3-4 天后转呈优势生长。这一特征与人皮肤组织细胞体外生长特征相似。

成纤维细胞在体外培养存活时间取决于动物种类,人胚成纤维细胞约可培养 50 代,恒河猴皮肤成纤维细胞传代超过 40 代,小鼠成纤维细胞寿命最短,多数生长 8 代左右。长期反复传代,细胞可逐渐失去二倍体性,进入衰退期^[7]。本实验表明,经冷冻解冻传至 9 代、12 代的牛胎儿成纤维细胞染色体倍性正常,与初期传代生长相比未见衰退。

摘 要

分别用胶原酶Ⅲ和胰蛋白酶成功地分离了牛胎儿成纤维细胞,并对其进行了体外培养,同时探讨了两种酶消化分离牛胎儿组织的时间对牛胎儿成纤维细胞原代培养的影响。用组织块直接培养也成功得到了牛胎儿成纤维细胞,并探讨了不同组织块大小对牛胎儿成纤维细胞原代培养的影响。通过绘制生长曲线,可以研究牛胎儿成纤维细胞增殖规律;通过制备牛胎儿成纤维细胞的细胞染色体发现,经过传代(12 代)、冷冻保存、解冻,牛胎儿成纤维细胞染色体数目不变。

关键词:牛胎儿成纤维细胞 体外培养 染色体

参 考 文 献

- [1] 北京农业大学编. 1961, 家畜解剖学及组织胚胎学, 农业出版社, 北京.
- [2] Paul FK, Patterson MK(eds). , 1973, Tissue culture: methods and application. , Academic Press, New York.
- [3] 鄂征, 1995, 组织培养和分子细胞学技术, 北京出版社, 北京.
- [4] David WB, David AS, Gordon HS(eds). , 1984, Cell culture methods for molecular and cell biology, Vol: Methods for serum free culture of cells of the endocrine system. , 47 - 61, Alan R Liss Inc, New York.
- [5] Boris Z, Marilyn van D, Warren S, et al. , 1996, Establishment and characterization of a bovine mammary myoepithelial cell line. , In Vitro Cell Dev Biol, 1996, 32: 138 - 148.
- [6] 戴定威、吴圣楣、李敏等, 1997, 新生大鼠小肠上皮细胞分离培养研究, 细胞生物学杂志, 19: 31 - 34.
- [7] 司徒镇强、吴军正, 1997, 细胞培养, 世界图书出版社, 西安.

DISSOCIATION AND IN VITRO CULTURE OF BOVINE FIBROBLASTS

LI Yang GUO Ji Tong WU Kai Feng BAO Shorgan

(The Research Center for Laboratory Animal Science of Inner Mongolia University The Key Laboratory of Ministry of Education of China for Mammal Reproduction Biology and Biotechnology, Huhhot 010021)

ABSTRACT

The bovine fetal fibroblasts were successfully dissociated and cultured in vitro by using trypsin and collagenase III. It was indicated that the digestion time of two kinds of enzyme had great influence on the primary culture of the bovine fetal fibroblasts. The bovine fetal fibroblasts could also be obtained by tissue block culture, and the size of tissue block had influence on the primary culture of the bovine fetal fibroblasts. Through analyzing the growth curve, the proliferation - promoting law of the bovine fetal fibroblasts could be studied; after the cell chromosomes were prepared, it was found that there were no changes in the chromosome number of the bovine fetal fibroblasts, which were subcultured for 12 passages, cryo-preserved and thawed.

Key words: Bovine fetal fibroblasts Culture in vitro Chromosomes