

牛成纤维细胞的分离与体外培养

叶 荣 陈学进¹ 杨利国^{2*}

(苏州大学生命科学学院, 苏州 215007; ¹上海第二医科大学发育生物学研究中心, 上海 200025;

²华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070)

摘要 研究了牛胎儿和成年牛皮肤组织成纤维细胞的分离、培养、纯化方法和生长特征。通过组织块贴壁培养和分离单细胞接种培养均能获得原代牛皮肤细胞。用 2.5 g/L 胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA 和 5 g/L 胶原酶 I 联合消化牛皮肤组织较 2.5 g/L 胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA 消化, 得到更多的单个细胞, 两者之间差异极显著 ($P<0.01$), 但其死细胞比率却有较大升高; 2.5 g/L 胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA 消化牛胎儿组织得到的单细胞数显著高于皮肤组织消化后得到的细胞数 ($P<0.01$), 死细胞比率也高于同种酶消化的皮肤组织。分离纯化的胎儿和皮肤成纤维细胞的生长曲线都正常且相似。2.5 g/L 胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA 消化贴壁细胞后死细胞率明显高于用 0.5 g/L 胰蛋白酶+0.53 mmol/L EDTA 消化的细胞 ($P<0.05$); 培养 24 h 后细胞贴壁率前者要明显低于后者 ($P<0.05$)。用 0.5 g/L 胰蛋白酶轻度消化混杂生长的成纤维细胞和上皮样细胞, 经过反复贴壁传代 2~3 代, 可得到较纯的成纤维细胞。

关键词 皮肤; 胎儿; 成纤维细胞; 体外培养; 牛

近年来, 核移植技术得到迅速发展, 不同细胞类型供体的克隆动物相继产生。充分表明分化的体细胞在卵母细胞胞质的作用下可以完全重建而重新发育成新个体。体细胞的培养对其作为供体细胞在核移植后对重建胚胎进一步发育有很大影响, 而如何简便、高效地获取丰富的供核体细胞是核移植技术上游步骤的关键。

目前, 体细胞培养技术虽已较为成熟, 但是各种动物、不同组织细胞的分离和培养方法、体外生长增殖的规律又有一定的特异性。本研究比较不同分离培养方法获得牛皮肤成纤维细胞的可行性, 并研究了牛胎儿和皮肤成纤维细胞的分离及原代、传代培养方法, 观察总结其在体外的生长特征, 旨在获得能在体外传代生长的正常牛成纤维细胞, 以满足克隆动物及其他细胞生物学的需要。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牛耳皮肤组织的采集 样品取自上海南汇区芦潮港农场真元奶牛场一头 4 岁健康黑白化奶牛的耳部, 用酒精棉简单消毒, 手术剪刀剪下 1 cm² 耳朵组织块, 置培养瓶 2 h 后带回实验室。去毛后先碘酒擦洗干净, 酒精脱碘后用含 500 IU/ml 青霉

素、500 µg/ml 链霉素的 PBS 液冲洗 3 遍后置于该液中浸泡 20 min。移入无菌操作台处理。

1.1.2 牛胎儿组织的获取与处理 牛胎儿采自上海南汇区个体屠宰场, 为防止污染, 将胎儿与子宫一同置于 37 °C 生理盐水的保温瓶中于 1 h 内带回实验室。用手术剪在 PBS 液中剥除胎膜, 将分离的牛胎儿(体长 3.8 cm, 依据文献[1], 胎牛胎龄为 50 天左右)用含 500 IU/ml 青霉素、500 µg/ml 链霉素的 PBS 液冲洗 3 遍后, 移入无菌操作台处理。

1.2 组织块贴壁培养

1.2.1 耳皮肤成纤维细胞的培养 先用手术剪将组织块剪至 3~4 mm² 大小, 去除耳组织中软骨, 然后将皮肤组织用加入 500 IU/ml 青霉素和 500 µg/ml 链霉素的 H/H (10% Hanks + 1 mmol/L Hapes) 液(Gibco BRL)冲洗 6~7 遍, 再用不含青、链霉素的 H/H 液冲洗 2~3 遍。将皮肤组织剪成 1 mm² 大小后, 接种在 35 ml 的一次性培养瓶底部, 加入 2 ml EFM (DMEM+10% FBS +1%100 IU P/S)(Gibco BRL)培养液, 底部向上倒置放入 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的培养箱, 3~4 h 后轻轻翻转培养瓶, 使培养液

收稿日期: 2004-01-04 接受日期: 2004-10-12

国家自然科学基金资助项目(No.30070555)

* 通讯作者。Tel: 027-87281886; E-mail: ylg@mail.hzau.edu.cn

浸没组织块,于培养箱继续培养。

1.2.2 胎儿成纤维细胞的培养 先将剥离胎膜的牛胎儿移至无菌操作台,用H/H液冲洗2~3遍,然后用剪、镊去除头、四肢、内脏,仅保留躯干部分。用手术剪将胎儿躯干剪成2~3 mm²大小的碎块,用EFM培养液冲洗2遍后,将碎块接种至培养瓶的底部。其余步骤同上。

1.3 分离单细胞接种法培养

将无菌的组织块剪碎至糊状,分别用两组消化剂:①2.5 g/L胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA(Gibco BRL),37℃消化40 min;②2.5 g/L胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA+5 g/L胶原酶I(Sigma),37℃消化60 min。用H/H液将消化的组织吹打悬浮后用孔径350目的滤网过滤到离心管中,滤液经1000 r/min离心7 min后弃上清液,加入EFM液吹打均匀,移至培养瓶置于37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱培养。

1.4 成纤维细胞的传代培养

待细胞铺满培养瓶底后,吸出瓶内的培养液。用H/H液清洗2遍后加入0.5 g/L胰蛋白酶+0.53 mmol/L EDTA(Gibco BRL),使消化液浸没细胞2~3 min,当在显微镜下看到大部分细胞收缩脱壁后,吸出消化液在37℃继续消化,直至大部分成纤维细胞脱壁。此时加入EFM终止消化,敲打培养瓶使细胞悬浮,收集细胞传入新培养瓶,添加EFM培养液后,于37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱培养。

1.5 台盼蓝活体染色

取9滴细胞悬液加入1滴0.4%台盼蓝(Sigma)液混合均匀,静置5 min,于显微镜下观察计数。活细胞不着色,死细胞呈蓝色。计数200个细胞,求出存活与死亡细胞的比例。

1.6 成纤维细胞生长曲线的测定

对传至第3代的牛皮肤成纤维细胞和胎儿成纤维细胞,用0.5 g/L胰蛋白酶+0.53 mmol/L EDTA消化贴壁单层细胞,调整细胞浓度分别为2.0×10⁴个/ml和2.2×10⁴个/ml,接种于24孔细胞培养板中,每孔接种0.4 ml,于37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱培养。每隔24 h消化收集并计数3个孔的细胞数,求平均值。pH值下降时,72 h内进行换液。对不同培养时间的细胞进行计数,绘制生长曲线。

1.7 细胞贴壁率统计

记录细胞接种的浓度,培养一定时间后,倒掉含有未贴壁细胞的培养液,然后加入胰蛋白酶消化已贴壁的细胞,记数已贴壁细胞,与原接种数相

比求出贴壁率。

1.8 数据分析

实验数据经*t*检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 牛耳皮肤组织在不同消化方式下的分离效果和生长特征

组织块贴壁法:组织块贴壁后,经培养48 h可见有单细胞游离出来,少量的成纤维细胞已贴壁生长(图1A)。3~5天后贴壁细胞逐渐增多,多数组织块周围游离出少许成纤维细胞。换液后,随时间推移,组织块周围可见大量成纤维细胞包绕,其间有上皮样细胞共生。9~10天后成纤维细胞生长旺盛,上皮样细胞和成纤维细胞出现分区呈片生长,形成明显界限(图1B)。从形态上看,成纤维细胞呈梭形或不规则三角形、放射状或漩涡状走行(图1C、图1D);上皮样细胞多为扁平多角形,细胞之间衔接紧密,连接成片(图1E)。两周后,组织块移出的单层细胞汇合,细胞铺满瓶底,可消化传代。

分离单细胞接种法:剪碎的皮肤组织经2.5 g/L胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA消化后得到的细胞悬浮液接种至培养瓶,24 h后可见部分细胞贴壁,呈圆形,48 h后有少量细胞伸展呈梭型。3~4天后贴壁细胞70%~80%伸展呈梭形、条型,分布均匀,其间有上皮样细胞混生。换液除去悬浮的死细胞和碎片,随后细胞逐渐向周围铺开,成纤维细胞的生长占优势地位,并能形成漩涡状或放射状的有序排列(图1D)。待细胞铺满瓶底后,进行传代。胰酶消化后成纤维细胞较上皮细胞容易脱离瓶壁。

2.2 不同消化方法对牛耳皮肤和胎儿组织的消化效果

方法一:用2.5 g/L胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA皮肤组织,消化时间40 min;方法二:用各1/2的2.5 g/L胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA、5 g/L胶原酶I联合消化牛皮肤组织,消化时间60 min;方法三:用2.5 g/L胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA胎儿组织,消化时间30 min。结果显示,方法一较方法二得到更多的单个细胞,两者之间差异极显著($P<0.01$),但其死细胞比率较高。胎儿组织在相同消化剂作用下,尽管消化时间稍短,但方法三得到的单细胞数显著高于方法一消化后得到的细胞数($P<0.01$),死细胞比率也高于同种酶消化的皮肤组织(表1)。以上3种消化情况所产生的细胞数均能达到接种数量。

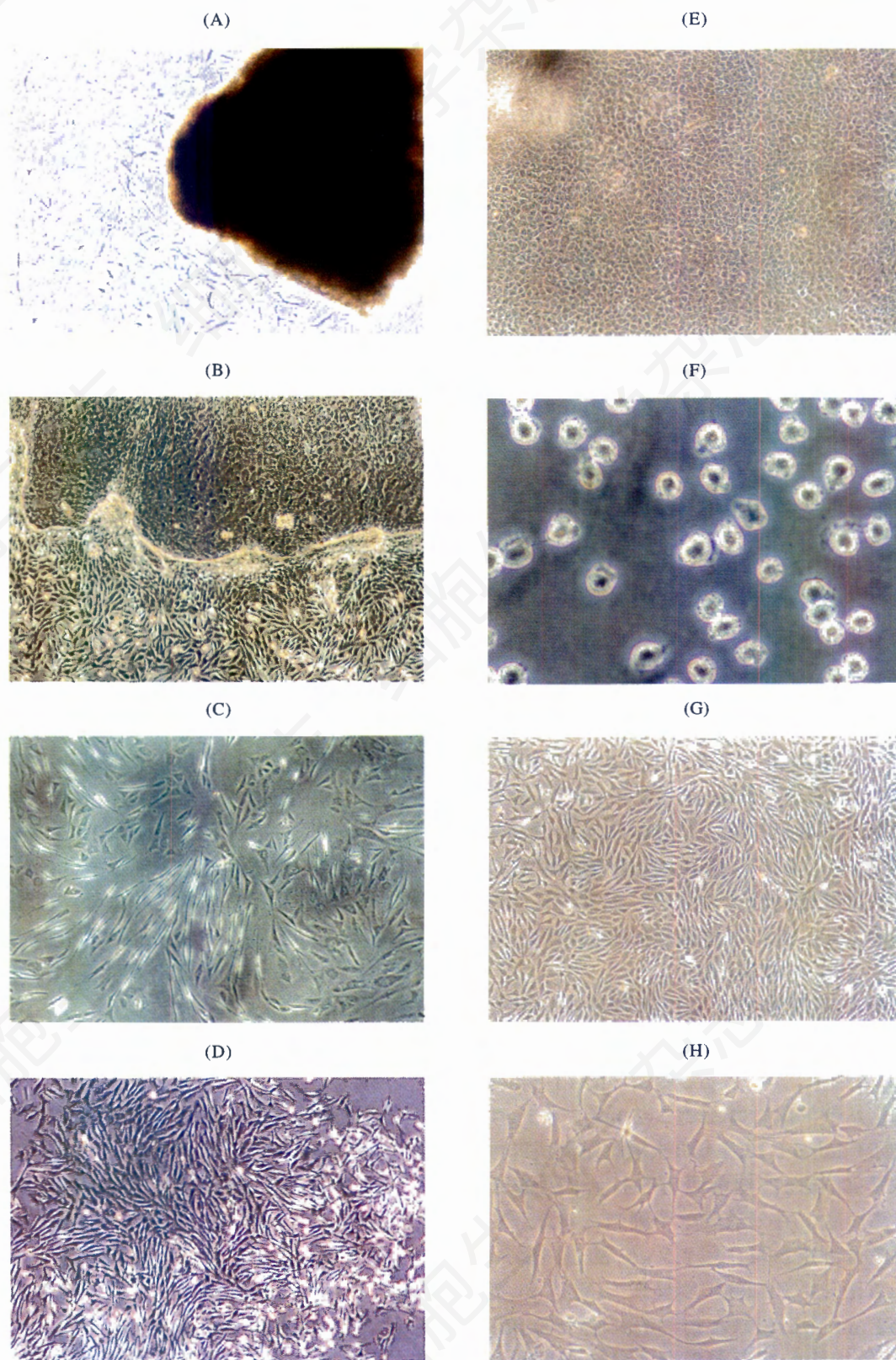


图1 牛耳皮肤成纤维细胞的各种形态

(A)组织游离出单个细胞($\times 100$); (B)两种细胞共生($\times 100$); (C)成纤维细胞形态($\times 200$); (D)成纤维细胞呈旋涡状($\times 100$); (E)上皮细胞($\times 100$); (F)消化后的成纤维细胞($\times 400$); (G)纯化的成纤维细胞($\times 100$); (H)放大的成纤维细胞形态($\times 400$)。

表 1 不同消化方法对牛皮肤和胎儿组织的消化效果

消化方法	组织	组织变化	活细胞数 (10^5 个/ml)	死细胞比率(%)
2.5 g/L 胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA, 40 min	皮肤	组织块松软, 边缘发毛, 出现细胞团, 吹打后产生较多单细胞及颗粒状物质	27.75 ± 4.25^a	15.25
各用 1/2 的 2.5 g/L 胰蛋白酶 + 1 mmol/L EDTA+ 5 g/L 胶原酶 I, 60 min	皮肤	组织块变粘、松软, 出现细胞团, 吹打后出现单细胞及颗粒状物质	41.13 ± 4.76^b	23.25
2.5 g/L 胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA, 30 min	胎儿	组织块变小、松软, 出现由细胞组成的絮状物质, 吹打后大量单细胞产生	82.13 ± 7.30^c	22.50

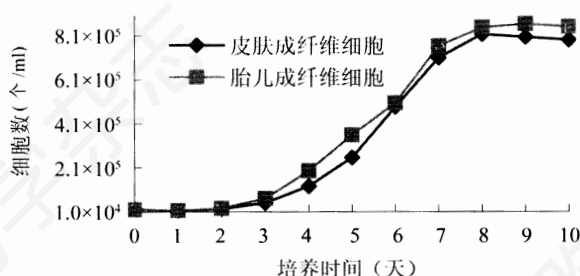
a : b, b : c, a : c = $P < 0.01$ 

图 2 牛皮肤和胎儿成纤维细胞生长曲线

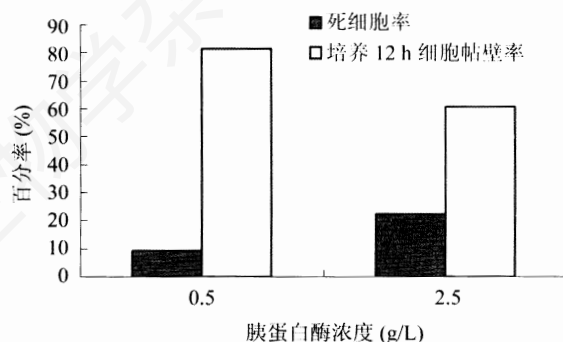


图 3 不同胰酶浓度消化对传代细胞的影响

2.3 牛胎儿成纤维细胞和耳皮肤成纤维细胞生长规律

胎儿成纤维细胞和皮肤成纤维细胞在传至第 3 代时, 分别以 2.0×10^4 个/ml 和 2.2×10^4 个/ml 浓度接种, 细胞于 7~8 天长满。从测定细胞数绘制的生长曲线(图 2)可以看出, 胎儿成纤维细胞生长曲线稍高于皮肤成纤维细胞生长曲线, 但其生长曲线图形相似, 潜伏期、指数增生期和停滞期相同, 分别为 0~2 天、2~8 天和 8~10 天。

2.4 胰蛋白酶和不同 EDTA 浓度对传代细胞消化效果的影响

在 37 °C 条件下, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA 消化贴壁的成纤维细胞 2~3 min, 0.5 g/L 胰蛋白酶+0.53 mmol/L EDTA 两次消化贴壁成纤维细胞, 每次 2~3 min, 结合吸管吹打, 可使贴壁细胞全部解离瓶底, 并分散成单个细胞。对悬浮的细胞生存力进行测定发现, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA 消化后死细胞率明显高于用 0.5 g/L 胰蛋白酶+0.53 mmol/L EDTA 消化的细胞($P < 0.05$); 在培养 24 h 后细胞贴壁率前者要明显低于后者($P < 0.05$)。表明, 用 0.5 g/L 胰蛋白酶+0.53 mmol/L EDTA 消化传代细胞的效果要明显好于 2.5 g/L 的胰蛋白酶+1 mmol/L EDTA(图 3)。

2.5 牛耳皮肤成纤维细胞的分离纯化

在原代细胞和早期培养时, 常见有上皮细胞和成纤维细胞混杂生长。根据这两种细胞对胰蛋白酶耐受性不同的原理, 在牛耳皮肤细胞培养物中加入用 0.5 g/L 胰蛋白酶和 0.53 mmol/L EDTA, 37 °C 消化 2~3 min, 成纤维细胞大部分变圆(图 1F), 加入 EFM 培养液后, 敲打培养瓶, 可使成纤维细胞脱壁, 收集悬浮细胞再培养。这样经过胰蛋白酶消化和反复贴壁处理 2~3 代后, 即可得到纯化的成纤维细胞(图 1G、图 1H)。

3 讨论

动物细胞的原代培养主要有两种方法, 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。通常情况下, 组织块贴壁培养法长出细胞比分离单细胞培养法需要较长的时间, 长出的细胞整齐而便于选择, 由于该方法简单方便, 目前多用此法培养动物成纤维细胞。本实验在培养原代细胞时发现, 这两种方法在长出细胞的时间上并无太大区别, 在接种 48 h 后均可发现有贴壁细胞生出。而且组织块贴壁培养法长出的细胞生长旺盛, 能迅速地延伸成片。这与李裕强等在山羊上的研究结果不同^[2]。

目前分离单细胞常用的消化剂有胶原酶、胰蛋

白酶及胰蛋白酶+EDTA联合消化^[3~5]。本实验研究表明,用胶原酶和胰蛋白酶+EDTA联合消化牛耳皮肤组织分离出的单个细胞数要明显多于用胰蛋白酶+EDTA的消化,说明真皮中存在的胶原分子,由于胶原酶的作用而使上皮细胞得到分离。但消化结果发现,其细胞死亡率也明显高于用胰蛋白酶+EDTA的消化,这可能是由于成纤维细胞对胶原酶比较敏感而受到损害所致。

胎儿组织在用胰蛋白酶+EDTA消化后,所收集到的单个细胞要显著多于皮肤组织。可能是胎儿组织较为脆弱,在消化过程中由于机械和消化液的作用以及体外环境的影响,细胞死亡率要高于皮肤组织。尽管如此,我们仍收集到了足够量的活细胞供原代培养,而胎儿成纤维细胞在以后体外培养中的发育能力并不比皮肤成纤维细胞差,这在我们对两种成纤维细胞生长曲线的测绘中得到说明。

牛耳皮肤的成纤维细胞在体外培养是呈贴附型生长,原代和早期传代细胞是上皮细胞和成纤维细

胞的混合物。获得纯净的单一类型的细胞对进行核移植和细胞生物学的研究十分必要。我们在对牛成纤维细胞的消化传代中发现,成纤维细胞和上皮样细胞对胰蛋白酶的耐受性不同,常常是成纤维细胞先脱壁,而上皮样细胞要消化较长时间才能够脱壁,而且接种后成纤维细胞的贴壁展开也较快,多数细胞能在30 min内完成贴附,而上皮细胞在短时间内不能贴附或贴附不牢,稍加振动即浮起。根据这一特征采用多次差别消化方法,可得到纯化的成纤维细胞。该方法用于纯化牛皮肤成纤维细胞简单而易行。

参考文献 (References)

- [1] 秦鹏春等主编. 哺乳动物胚胎学, 北京: 科学出版社, 2001
- [2] Freshney RI. *Culture of Animal Cells*, 3rd ed., New York: Wiley-Liss, Inc., 1994
- [3] 李裕强等. 农业生物技术学报, 2000, 8: 133
- [4] Zavizion B et al. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1996, 32: 149
- [5] 戴定威等. 细胞生物学杂志, 1997, 19: 31

The Dissociation and Culture of Bovine Fibroblasts *in Vitro*

Ye Rong, Xue-Jin Chen¹, Li-Guo Yang^{2*}

(College of Life Science, Soochow University, Suzhou 215007, China;

¹The Research Center for Development Biology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China;

²College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract The experiment were studied on the dissociation, culture and purification of bovine fetus fibroblasts and skin fibroblasts. The attachment and monolayer cells could be obtained by primary culture with bovine fetus and skin tissue. More fibroblast cells were obtained by 2.5 g/L trypsin+1 mmol/L EDTA and 5 g/L collagenase I digestion bovine skin tissue than by 2.5 g/L trypsin+1 mmol/L EDTA ($P<0.01$), but digestion fetus tissue by 2.5 g/L trypsin+1 mmol/L EDTA got a higher yield of cells than that of skin tissue ($P<0.01$). The growth curves of fetus and skin fibroblast are normal and similarity, although the death rate of cells increased with the fibroblast yield increase. The death rate of attachment cells digested by 2.5 g/L trypsin+1 mmol/L EDTA was significantly higher than that by 0.5 g/L trypsin+0.53 mmol/L EDTA ($P<0.05$), and the attachment rate of the former was significantly lower than the latter ($P<0.05$) with 24 h culture. Homogeneous fibroblasts could be obtained by 0.5 g/L trypsin digestion of fibroblasts with small part of epithelial cells in it and by passed 2-3 subcultures.

Key words skin; fetus; fibroblasts; *in vitro* culture; bovine

Received: January 14, 2004 Accepted: October 12, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30070555)

*Corresponding author. Tel: 86-27-87281886, E-mail: ylg@mail.hzau.edu.cn

厦门大学生命科学学院生物学系

生物学系创立于1922年,为国家培养了一大批优秀人才,享誉海内外。生物学系现有教师39人,其中教授13人(院士2名,博士生导师8人),副教授13人,讲师8人。

生物学系设有动物学国家重点学科(首批);现代动植物学国家“211工程”重点建设学科;生物学国家理科基础科学研究与教学人才培养基地;生物学博士后科研流动站;教育部寄生动动物学研究室;厦门大学湿地与生态工程研究中心。设有生物科学和生态学2个本科专业,动物学、植物学、生态学、发育生物学、遗传学等5个博士和硕士招生专业。主要研究方向有:

寄生动动物学研究:(1)研究与人类健康和人类赖以生存的各类经济动物(尤其是家畜、家禽、养殖的经济鱼类和贝类等)及经济植物资源的重要寄生虫病害问题;(2)研究各种重要寄生虫病病原的生命规律(包括宏观和微观)及流行传播规律,为各种病害的预防和治疗提供科学理论依据;(3)重要寄生虫病害的防治研究。获1978年科学大会科技成果奖;1982年国家自然科学奖三等奖;1988年国家自然科学奖三等奖;1990年国家自然科学奖四等奖;1988年国家教委科技进步一等奖;1980年福建省人民政府科技二等奖;1987年福建省人民政府科技一等奖;1999年教育部科技进步二等奖等12项。

生态学研究:主要从事植物生理生态学、自然保护区建设、污染生态学和生态工程,其中重点是红树林湿地生态学尤其是红树林生态系统能流和物流、红树植物生理生态学、红树林生物多样性、红树林生态恢复、红树植物系统演化、红树林与全球变化等方面。另一重点是亚热带森林生态系统研究和自然保护区的建设与管理。获国家科技进步二等奖1项,三等奖1项,部(省)级一等奖1项,二等奖4项、三等奖5项。出版专著6部,编著4部,教材2部。

亚热带资源动物研究:(1)动物的遗传育种;(2)动物生理和生态毒理;(3)鸟类生态;(4)比较基因组与进化生态学。在家禽的遗传育种方面已经有几十年的研究积累,获国家科技进步二等奖,在家禽育种的理论和应用研究上处于国内领先水平。

植物基因与基因技术研究:主要从事植物组织培养技术,植物优良基因的筛选克隆,植物转基因技术等研究。

南方医科大学珠江医院肿瘤中心

Oncology Center, Zhujiang Hospital, The Southern Medical University



南方医科大学附属珠江医院肿瘤中心(原第一军医大学全军肿瘤中心)国家肿瘤学硕士学位授权学科, 肿瘤学博士培训点, 肿瘤学博士后临床工作站。中心现有教授3名, 副教授4人, 博士10人, 硕士12人, 博士后3名。拥有床位100张, 设有空气层流治疗室, 适形放疗中心和大学重点

专业实验室。拥有国际上先进的流式细胞仪、血细胞分离机、程序降温仪、造血干细胞保存装置, 在亚洲率先引进氩氦刀靶向治疗技术; 较早安装了伽玛刀、光子刀、射频热疗、激光治疗, 微波治疗, 直线加速器等先进的肿瘤治疗设备。2000年以来中心先后被指定为国际生物治疗协会亚洲培训中心; 中国人民解放军肿瘤诊治中心; 中国生物医学工程肿瘤靶向治疗技术中心; 国际氩氦靶向治疗中心。中心承担和完成了国家863、国家自然科学基金、广东省及军队重点课题15项。申请专利5项。中心主任张积仁教授担任国际生物治疗学会副主席; 国际肿瘤标志学会科学顾问; 全军肿瘤专业委员会主任委员; 中国生物医学工程学会肿瘤靶向治疗技术分会主任委员; 中国细胞生物学会和中华肿瘤学会常务理事; 广东省细胞生物学会理事长。获国家、军队和省科技成果二等奖3项。

珠江医院肿瘤中心临床开展了细胞免疫治疗、基因治疗、介入治疗、生物靶向治疗、靶向热疗、适型放疗、氩氦靶向治疗等先进治疗技术。在国内率先开展肿瘤精确治疗的临床研究; 开展造血干细胞移植联合大剂量化疗治疗中晚期肿瘤; B7基因转移及联合T淋巴细胞回输治疗原发性和转移性肝癌; 异基因T细胞克隆和移植治疗鼻咽癌; 世界上率先开展经皮穿刺氩氦靶向治疗肝癌、肺癌及立体定向氩氦靶向治疗脑肿瘤新技术; 在临床上较早实施了国际先进的规范化治疗、综合治疗和精确化疗方案, 取得了满意的临床疗效。

目前中心已聘请奥地利维也纳大学、美国加州大学、加拿大渥太华大学、意大利米兰肿瘤研究所、英国剑桥大学、香港大学等20余名专家为中心的科学顾问, 并建立了协作关系。