

水牛皮皮肤成纤维细胞的分离与体外培养

陆凤花 石德顺* 牛向丽 房慧伶 杜玉兰 王晓丽 邵小云

(广西大学动物繁殖研究所, 南宁 530005)

摘要 探讨水牛皮成纤维细胞的分离与传代培养方法。组织块培养法培养的成纤维细胞原代生长较慢, 需 12 天左右方可汇合形成单层, 而酶消化法培养的成纤维细胞原代生长相对生长快, 仅需 8 天便可汇合形成单层。两种方法传代细胞的生长速度相似, 仅需 4~5 天就可汇合形成单层。通过体细胞的核型分析发现, 成纤维细胞在传代培养过程中的核型变化不大, 66.67%~81.67% 的细胞具有正常的二倍体核型, 各代之间无显著差异。结果表明, 水牛皮成纤维细胞均能稳定地进行传代培养。

关键词 水牛; 成纤维细胞; 培养; 核型

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关键技术。自从 Wilmut 等^[1]报道获得了体细胞核移植后代以来, 体细胞核移植技术发展很快, 小鼠卵丘细胞^[2,3]、牛卵丘细胞、输卵管上皮细胞^[4]、耳皮成纤维细胞^[5]、肌细胞^[6]、猪卵丘/颗粒细胞^[7]、山羊皮肤成纤维细胞^[8]等多种供体细胞克隆动物已先后通过核移植获得成功。由于体外传代培养的细胞能够为核移植提供大量的供体细胞, 并且便于基因操作进行转基因克隆动物的生产, 所以传代培养的细胞被广泛应用于核移植技术^[9], 建立供体细胞的体外培养模式是体细胞核移植研究的前提。本研究拟对成年水牛皮成纤维细胞的分离、培养、传代和冷冻保存的方法进行系统研究, 以便建立水牛皮成纤维细胞系, 为水牛皮体细胞核移植的研究提供充足的供体细胞来源。

1 材料与方法

1.1 培养基及主要试剂

除 DMEM 购自 Gibco BRL 公司外, 所用无机盐、胎牛血清(FBS)、二甲基亚砷(DMSO)等均购自 Sigma 公司。10%FBS+DMEM 为细胞培养基础液; 细胞消化液为无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Hanks 液加 2.5 g/L 胰蛋白酶; 细胞冷冻液为细胞培养基础液加 10%DMSO。实验中所有培养液均添加 60 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素, 并用孔径 0.2 μm 的微孔滤膜过滤消毒。

1.2 水牛皮成纤维细胞的分离和体外培养

1.2.1 采样 本研究的组织样品来自广西品种改

良站的 1 头沼泽型公水牛的耳部皮肤组织。成年水牛在预取材前, 将其耳朵边缘 1 cm^2 左右的毛去掉, 酒精棉球消毒后, 用消毒过的牛用打耳号钳剪下约 0.5 cm^2 的组织块。用含有青、链霉素的 PBS 缓冲液洗涤几遍, 放入 70% 酒精内浸泡 30 s, 再用含有青、链霉素的 PBS 缓冲液清洗几遍, 放入含有青、链霉素的 Hanks 液中, 尽快带回实验室。将带回的组织块用 PBS 洗涤几遍后, 放于无菌培养皿中, 用灭菌眼科剪去掉毛和软骨, 将剩余的皮肤剪碎至 2 mm^3 小块, 准备做原代培养。

1.2.2 组织块培养法 组织碎块用含抗生素的 PBS 洗 2 次后, 用吸管将碎组织块移入培养瓶中, 均匀地平铺于培养瓶底部, 小块间的相互距离以 0.5 cm 为宜, 每瓶接种组织块约 20 块。将培养瓶倾斜, 加入 10%FBS 的 DMEM 培养液 0.5 ml, 底面向上放入 38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 和最大饱和湿度培养箱中培养 4 h, 待组织块贴壁后, 再加入 4 ml 含 10%FBS 的 DMEM 培养液(注意动作要轻, 以防组织块浮动), 继续放入培养箱中培养, 每隔 3~4 天换一次液。

1.2.3 酶消化法培养 皮肤组织碎块用无菌 PBS 洗涤数遍后, 用 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化 30 min。离心洗涤去掉胰蛋白酶后, 用 2 g/L 的胶原酶再消化 45 min。然后用粗口吸管抽打(如有较大组织块就先挑出去)制成细胞悬液并离心清洗两次(5 min,

收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2005-03-09

国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(No.2002AA206651)和广西大学博士启动项目(No.X041109)资助

* 通讯作者。Tel: 0771-3239202, Fax: 0771-3239202, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn.

500 g), 最终悬浮在含有 10%FBS 的 DMEM 培养液中。细胞悬液以 1×10^6 个/ml 的浓度接种于 60 mm \times 15 mm 的塑料培养皿中, 放入 38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 和最大饱和湿度的培养箱中培养, 每隔 3~4 天换液一次。

1.3 培养细胞的传代

待原代细胞长到 80%~90% 汇合时, 进行细胞传代培养。先用无 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 洗两遍, 再用含 2.5 g/L 胰蛋白酶的 Hanks 液消化 3~5 min, 待细胞变圆时, 吸出消化液, 再加入含 10%FBS 的 DMEM 培养液终止消化。用吸管吹打使细胞悬浮, 离心清洗两次(5 min, 500 g), 重悬液以 1×10^6 个/ml 接种于新的培养皿中, 放入 38.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 和最大饱和湿度的培养箱中培养。此后每隔 4~5 天传一代。

1.4 细胞的冷冻保存

传代培养的细胞相互汇合形成单层细胞时, 用与传代培养相同的方法消化、收集细胞。离心弃上清液后, 加入含 10%DMSO 的细胞冷冻液, 并使其细胞最终浓度为 5×10^6 个/ml。细胞悬液装入 0.25 ml 的胚胎冷冻管内, 封口。先放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱平衡 2 h, 再移入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱平衡 2 h, 最后投入 -196 $^{\circ}$ C 液氮内, 长期保存。

1.5 细胞的复苏

将细胞冻存管从液氮罐中取出, 迅速放入 37~38 $^{\circ}$ C 水浴中解冻, 待冰块全部融化后, 将细胞悬液放入 5 ml 离心管内, 加入在培养箱中平衡至 37 $^{\circ}$ C 的 DMEM 培养液 3 ml, 充分混合后, 离心清洗两次, 最后制成 1×10^6 个/ml 的细胞悬液, 做成 16 μ l 的微滴培养, 上面覆盖石蜡油, 放入培养箱中培养。待细胞长满汇合后, 进行核移植前的特殊培养处理。

1.6 细胞染色体分析

水牛成纤维细胞培养到 80%~90% 汇合成单层时, 加入秋水仙素, 使其最终浓度为 0.5 μ g/ml, 并在培养箱中继续培养 4~6 h。然后用粗口吸管在培养细胞表面反复轻轻吹打, 这样可以把处于分裂中期细胞体变圆的细胞吹起, 收集培养液并移入离心管, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放过夜。而后离心(5 min, 500 g)。去掉上清液, 加入预温至 37 $^{\circ}$ C 的 0.075 mol/L KCl 溶液, 用吸管轻轻打匀, 使细胞均匀悬浮, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱静置 20 min, 使细胞膨胀。直接加入 1 ml 新配制的醋酸/甲醇(1:3)固定液, 终止低渗并进

行预固定 1 min, 离心去掉上清液, 立即加入 5 ml 新鲜醋酸/甲醇(1:3)固定液, 用吸管轻轻吹打均匀, 使细胞团分裂成单细胞, 室温固定 20 min。离心, 留下 1 ml 固定液, 反复均匀抽打, 然后滴片, 轻轻吹气, 并在酒精灯上过 2 次, 使细胞平铺并固定在载玻片上, 然后令其自然干燥。用 10% Giemsa 染液染色 15 min, 水洗凉干后, 在显微镜下观察染色体数目。采用染色体分析系统, 对染色体组型进行分析。

1.7 统计分析

所得试验数据结果均用卡方(χ^2)进行统计分析, 确定差异的显著性。

2 结果

2.1 组织块培养法培养的水牛皮肤成纤维细胞

用组织块培养法培养水牛的皮肤成纤维细胞, 接种后 1 天组织块就可贴壁。培养 2 天后, 可见组织块边缘游离出许多单个细胞, 大多数为扁平的上皮样细胞, 呈多角形, 只有少部分梭形长条状的成纤维细胞, 呈不规则的三角形或放射状排列; 第 6 天后, 大部分组织已游离出成纤维细胞, 呈梭状延伸且呈优势生长, 但组织块间仍有间隙; 12 天后组织间隙消失, 细胞汇合成单层, 铺满培养瓶底部, 并以成纤维细胞为主(成纤维细胞的形态见图 1)。一般用该法培养原代细胞生长比较慢, 大约需要 10~14 天方可长满传代, 但细胞在传代后生长十分迅速, 4~5 天就可传一代。贴壁生长的成纤维细胞多呈梭形长条状、不规则三角形、漩涡状或放射状排列。

2.2 酶消化法分离培养的水牛皮肤成纤维细胞

用胰蛋白酶和胶原酶联合消化组织块, 可以得到较多的单个游离细胞, 接种后细胞的生长和贴壁都良好。一般, 用酶消化法分离出来的细胞, 接种到培养皿后, 24 h 就可贴壁, 形状由圆形变成长梭形, 向四周伸展; 2 天后细胞已开始生长, 且分布均匀; 第 8 天, 贴壁的细胞不断生长, 成纤维细胞排列成单层, 细胞生长形状变得不规则, 相互之间紧挨着, 铺满平皿底部(图 2), 此时就可传代, 此后每隔 4~5 天就可传代一次。

2.3 细胞冷冻保存后的生长情况

冷冻在含 10%DMSO 冷冻液中的细胞, 经解冻后, 细胞成活率达 70%~80%。复苏的细胞接种后 8 h 左右就可贴壁, 且生长速度迅速, 一般 3~4 天

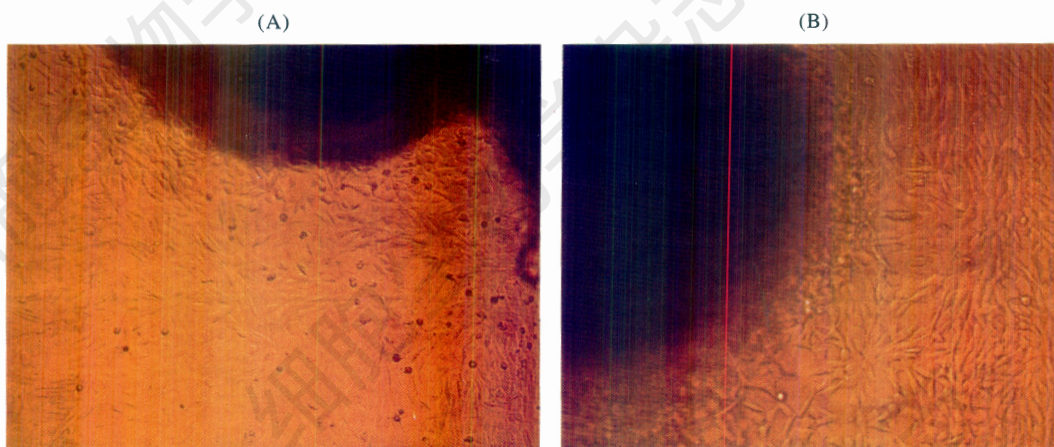


图1 组织块培养法培养的成纤维细胞($\times 100$)
(A)培养6天; (B)培养12天。

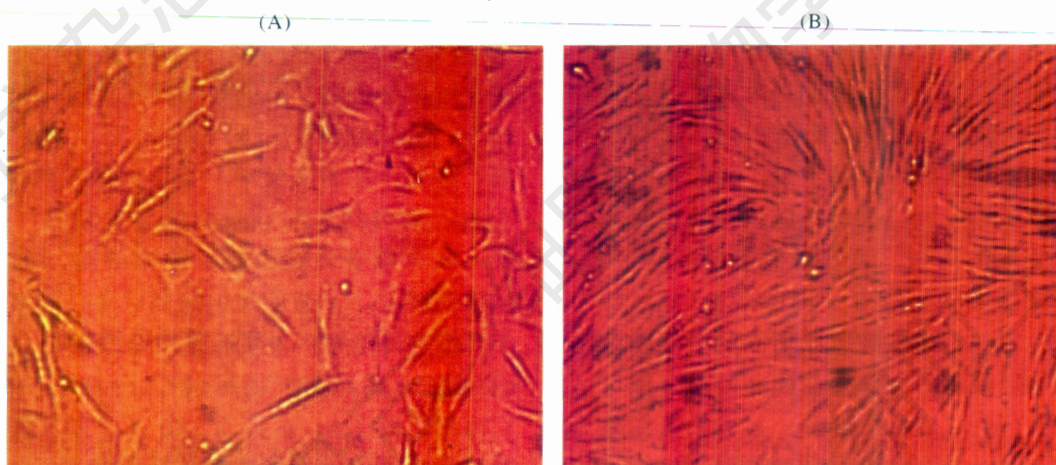


图2 酶消化法培养的成纤维细胞($\times 100$)
(A)培养3天; (B)培养8天。

表1 不同培养代数的水牛皮成纤维细胞染色体组型的比较

传代数	细胞数	二倍体(%)	四倍体(%)	非整倍体(%)
G ₁	66	52 (78.79)	6 (9.09)	8 (12.12)
G ₃	60	49 (81.67)	6 (10.00)	5 (8.33)
G ₆	60	40 (66.67)	9 (15.00)	11(18.33)
G ₁₀	60	47 (78.33)	4 (6.67)	9 (15.00)

就可长满汇合成单层。

2.4 细胞传代培养过程中的核型变化

如表1所示：通过细胞染色体倍性分析发现，水牛皮成纤维细胞在传代培养过程中染色体倍性并未发生明显的改变($P>0.05$)，具有正常整二倍染色体的细胞比例在66.67%~81.67%之间。可见，细胞经传代培养后各代间的核型变异不大(水牛皮成纤维细胞的核型见图3)。

3 讨论

动物组织细胞培养技术已成为生物学、医学与药学研究中最有效的方法之一。一般培养的方法有两种：即是组织块贴壁培养法和酶消化分离单细胞接种培养法。本研究中，水牛皮成纤维细胞原代培养采用组织块以及酶消化法都取得了较好的效果，都可获得核移植研究所需要的供体细胞，而且能够保证细胞传代的需要。通常，胰蛋白酶可消化任何组织，更适用于细胞间质较少的组织。但是，胰蛋白酶可作用于细胞膜，细胞长时间置于胰蛋白酶的环境下，会增加其受损伤的程度^[10]，进而降低其继代生长增殖能力，且Ca²⁺、Mg²⁺及血清对其活性有抑制作用。而胶原酶是从细菌中提取的酶，适用于消化纤维性组织，对胶原或细胞间质有很好的消化作用，且Ca²⁺、Mg²⁺及血清对其活性无抑制作用。本研究采用胰蛋白酶消化30 min后，再用胶原酶消化45 min，这样可以避免因胰蛋白酶处理时

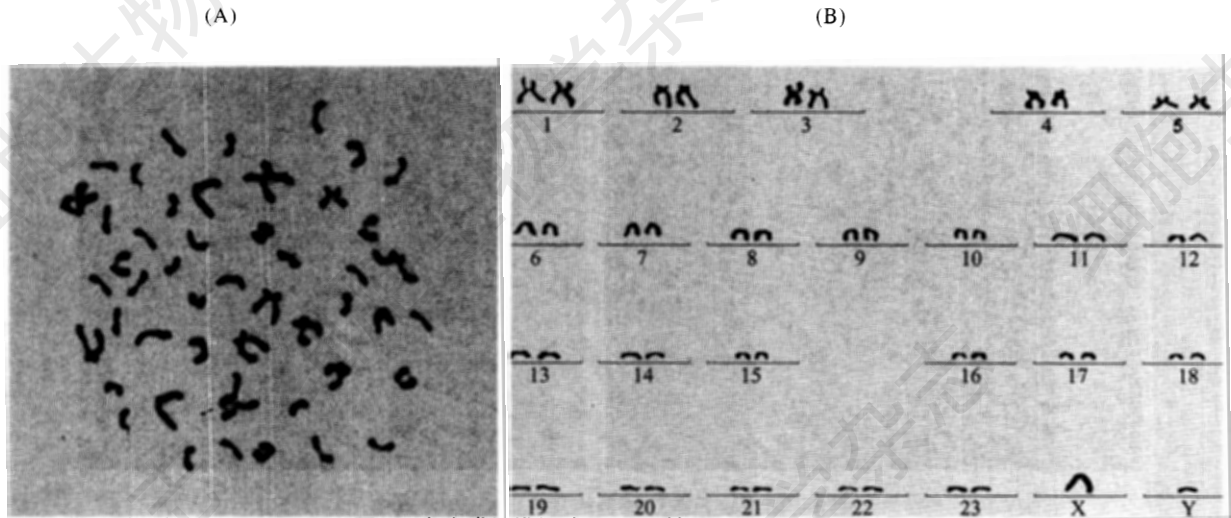


图3 水牛成纤维细胞48,XY核型($\times 1000$)
(A)水牛成纤维细胞48,XY染色体;(B)核型排列。

间长而导致细胞容易破损,或因处理时间短,获得的细胞数量少的缺点;另外,细胞外间质含有结缔组织,妨碍细胞从组织中释放出来,而胶原酶特异性作用于结缔组织的胶原,因此经胰蛋白酶短时间消化后,再用胶原酶消化,可获得数量较多的细胞,且减轻了对细胞的损伤程度,细胞接种后活力好,生长增殖能力较强,建立细胞系所需的时间相对短一些。李杨等也报道^[11]:胰蛋白酶和胶原酶都可以成功分离培养牛胎儿成纤维细胞,虽然胰蛋白酶消化组织1 h左右所得到的细胞数比胶原酶消化组织20 h所得的细胞数多,但前者所得到的细胞中死细胞比率要高于胶原酶,这说明牛的成纤维细胞对胰蛋白酶较敏感,而采用胶原酶消化细胞则较温和。因此,本研究采用两种酶短时联合消化组织块,不但能省时,而且也能获得较好的分离和培养水牛成纤维细胞的效果,说明这方法是可行的。另外,组织块直接贴壁培养法较酶消化培养法简便经济,细胞匀质性好,生命力强,且污染机率小,也是一种有效的细胞培养方法。

水牛成纤维细胞在体外培养时也和山羊等动物的成纤维细胞生长方式相似^[10],呈贴附型生长。实验中发现,成纤维细胞原代培养及早期传代培养时,上皮细胞和成纤维细胞同时出现,混杂生长。但是由于上皮细胞和成纤维细胞对胰蛋白酶耐受性不同,在消化传代培养细胞时,常常是成纤维细胞先脱壁,而上皮细胞需要相对较长的时间才脱壁,所以本实验在传代培养时利用胰蛋白酶消化法传2~3代后,就能够纯化成纤维细胞。

细胞在传代培养中,2.5 g/L胰蛋白酶作用的时

间长短十分关键。酶的作用时间长时,对细胞就有损伤;而消化时间过短则会使有些细胞消化不下来。因此,在本实验中,采用胰蛋白酶作用5 min左右,当看到大部分细胞体型变圆后,吸去消化液,配合吸管轻轻吹打,收集细胞,这样不但容易掌握时间,又能使细胞完全游离且对细胞损伤较小。细胞冷冻时,本实验采用10%DMSO+10%FBS的DMEM培养液作为冷冻液,分装好的细胞先在4℃冰箱平衡2 h,再移入-80℃冰箱平衡2 h后就直接投入液氮中保存,解冻后细胞存活率达70%~80%,培养后细胞贴壁良好,而且生长迅速。该方法较为简单,且可获得较好的效果,是一种较理想的细胞冻存方法。

此外,本实验对水牛不同培养代数的成纤维细胞的染色体分析表明,细胞在传代培养过程中没有发生染色体数目的改变,说明用该方法培养传代所建立起来的细胞系相对比较稳定,可以为水牛的体细胞核移植提供充足的供体细胞,而且我们采用此方法建立的水牛胎儿成纤维细胞系用做供体细胞进行核移植,已获得世界第一头体细胞克隆水牛(待发表)。这表明了经体外长期培养和冻存的体细胞其功能和遗传性状没有发生改变,在卵母细胞质的支持下仍能发育到个体出生。可见,在体外建立一个正常、稳定的细胞系作为核移植的供体细胞,才能保证体细胞核移植的研究取得成功。

参考文献 (References)

- [1] Wilmut I et al. *Nature*, 1997, **385**: 810
- [2] Wakayama T et al. *Nature*, 1998, **394**: 369
- [3] Kato Y et al. *J Biol Reprod*, 1999, **61**: 1110

- [4] Kato Y *et al. Science*, 1998, **282**: 2095
[5] Zakhartchenko V *et al. J Reprod Fertil*, 1999, **115**: 325
[6] Shiga K *et al. Theriogenology*, 1999, **52**: 527
[7] Polejaeva IA *et al. Nature*, 2000, **407**: 86
[8] 郭继彤。西北农林科技大学博士学位论文, 2000
[9] Cibelli JB *et al. Science*, 1998, **280**: 1256
[10] 李裕强等。农业生物技术学报, 2000, **8**: 133
[11] 李 杨等。细胞生物学杂志, 2002, **24**: 254

***In Vitro* Isolation and Culture of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Skin Fibroblast Cells**

Feng-Hua Lu, De-Shun Shi*, Xiang-Li Niu, Hui-Ling Fang, Yu-Lan Du, Xiao-Li Wang, Xiao-Yun Shao
(Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract Methods for isolation and culture of buffalo fibroblast cells were studied. The primary buffalo fibroblasts derived from tissue explant culture grown slowly and confluent together by 12 days of culture, while fibroblasts derived from enzymatic digestion grown faster and confluent together by 8 days of culture. However, the growing speed of passaged fibroblasts derived from the two methods was similar, which could confluent within 4 to 5 days of culture. There were 70%–80% of cells survived after frozen and thawed. Karyotype analysis showed that 66.67%–81.67% of fibroblasts had normal karyotype, which did not show significant difference among passages. These results indicated that fibroblast cells can be passaged and keep relatively stable karyotype *in vitro*.

Key words buffalo; fibroblasts; culture; karyotype

Received: December 10, 2004 Accepted: March 9, 2005

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AA206651) and Guangxi University Doctor Initiated Program (No.X041109)

*Corresponding author. Tel: 86-771-3239202, Fax: 86-771-3239202, E-mail: ardsshi@gxu.edu.cn