

研究报告

马头山羊成纤维细胞系的建立与生物学特性分析

李天达¹, 刘丑生², 王志刚², 张利平¹, 孙秀柱², 赵俊金², 孟飞², 罗桂河³, 朱金清³

1 甘肃农业大学动物科技学院, 兰州 730070

2 全国畜牧总站畜禽牧草种质资源保存利用中心, 北京 100193

3 北京市昌平区畜牧技术推广站, 北京 100193

摘要: 采用组织块贴壁培养法对马头山羊耳缘组织进行培养, 成功构建了马头山羊耳缘组织成纤维细胞系, 并对其形态学、生长动力学、细胞活力测定、中期染色体、微生物污染等特性进行了研究。结果表明: 培养细胞形态为典型的成纤维细胞, 细胞群体倍增时间(PDT)约为 36 h。细胞冻存复苏后的活率为 96.7%, 传代后生长状况与冻存前一致。细胞中期染色体二倍体($2n=60$)占主体约为 96%。微生物检测细菌、真菌、病毒支原体检测结果为阴性。细胞系各项指标均达到美国典型培养中心(ATCC)标准。此细胞库的建立对马头山羊的遗传资源进行了保存, 也为今后的生物学研究以及体细胞克隆保种等研究提供了理想的实验材料。

关键词: 马头山羊, 成纤维细胞系, 细胞培养, 生物学特性

Establishment of Fibroblast Cell Line and Its Biological Characteristics in Matou Goat

Tianda Li¹, Chousheng Liu², Zhigang Wang², Liping Zhang¹, Xiuzhu Sun², Junjin Zhao², Fei Meng², Guihe Luo³, and Jinqing Zhu³

1 College of Animal Science & Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730050, China

2 National Animal Husbandry & Veterinary Service of the Ministry of Agriculture (MOA), Beijing 100193, China

3 Animal Husbandry Station of Changping, Beijing, 100193, China

Abstract: Taking Matou goat ear margin as the study material, we succeeded in established a fibroblast cell line by the method of explant culture directly. Observations on morphology, dynamic growth, determination of viability, analysis of karyotype, test of microorganism and other characteristics were detected. Results showed: Population Doubling Time (PDT) of cells was approximately 36 h; Cell viability was 96.7% after thawing; The status of cell After passage was constant; Analysis of chromosomal karyotyps indicated that diploid ($2n=60$) account for 98% in the cell line. Every index in the cell line met all the standard quality controls of ATCC in USA. The established of Matou goat ear fibroblast cell line has not only important genetic resources preserved at the cell level, but also valuable material for genome, postgenome and somatic cell nuclear transfer research.

Keywords: Matou goat, fibroblast cell line, cell culture, biological characteristics

我国是一个畜禽遗传资源十分丰富的国家, 据 调查, 我国畜禽遗传资源有 20 个物种, 共计 576 个

Received: May 23, 2008; **Accepted:** July 23, 2008

Supported by: Project of the National Natural Science and Technology Resource Platform (No. 2005DKA21101).

Corresponding author: Chousheng Liu. Tel/Fax: +86-10-62814021; E-mail: liuchousheng@sina.com

国家自然科技资源平台项目(No. 2005DKA21101)资助。

品种和类群, 其中地方品种和培育品种约占总数的86%。然而自上世纪90年代以来, 畜禽品种消失速度加快, 其中确定有16个地方品种或类群已经灭绝^[1]。因此, 保护畜禽遗传资源已经破在眉睫, 利用动物体细胞保存的方式, 使遗传资源在细胞水平上得以长时间保存^[2]。

成纤维细胞是一种二倍体稳定的细胞并且具有高度的遗传稳定性, 世界各国都将动物成纤维细胞作为一种重要的遗传资源进行保存。动物耳朵皮肤是一种理想的成纤维供体细胞, 它不仅可以提供优良、完整的遗传物质, 采后应激小且对动物的存活与生长无大影响。本试验中马头山羊产于我国湘、鄂西部山区, 其羔羊早期育肥好, 屠宰率和净肉率好, 肉质好, 繁殖率高, 适于山区放牧饲养, 皮板品质好。利用马头山羊耳缘组织体外培养建立的成纤维细胞库在细胞水平上对马头山羊的遗传资源进行了保存, 也为体细胞克隆等研究提供了理想的实验材料^[3]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用生物材料 40 只马头山羊的耳缘组织采自全国畜牧总站畜禽牧草种质资源保护利用中心基地。

1.2 培养基及主要试剂

DMEM(Gibco)、DPBS(Gibco)、胎牛血清(FBS)(Gibco)、胰蛋白酶、青霉素、链霉素、秋水仙胺、 NaHCO_3 、KCl、 NaH_2PO_4 、EDTA、DMSO、Hoechst33258、Trypan blue 等, 以上没有特殊说明的均为 Sigma 产品。

1.3 细胞培养

1.3.1 耳缘组织获取

选取健康马头山羊 40 只, 碘酊及酒精棉球消毒后用手术刀片除净耳毛, 用剪刀快速剪下耳尖的皮肤组织块约 1 cm^2 , 将样品用含有青链霉素的 DPBS 清洗几次, 放入含有青链霉素的 DMEM 中, 封口膜封口, 2~4 h 送回实验室。

1.3.2 原代培养

将采回的马头山羊耳缘组织在超净工作台下操作, 75%酒精中浸泡 30 s, 再用 DPBS 冲洗 3 次, 用手术刀片剔除皮肤间的结缔组织后, 将皮肤组织剪成 1 mm^3 左右的小块, 用消毒玻璃弯头吸管将组织

碎块均匀分布在培养瓶中, 培养瓶倒置后加入 5 mL 含有 20% FBS 的 DMEM 培养液, 在 37.5°C , 5% CO_2 的培养箱中倒置培养 6 h 后, 正置培养瓶, 使培养液缓慢浸没组织块, 继续培养^[4]。

1.3.3 传代培养

当原代成纤维细胞生长至 80%汇合时, 弃旧培养液, DPBS 冲洗细胞 2 次, 加入 5 mL 浓度为 0.25% 的胰蛋白酶, 放入培养箱中消化 1~2 min。细胞脱壁后加入含血清的 DMEM 培养液终止消化。1000 r/min 下离心 5 min 后收集细胞, 按照 1:3 比例分瓶后加入培养液放回培养箱继续培养, 每 2 天更换培养液^[5]。

1.3.4 细胞冻存

取对数生长期的细胞, 按常规法消化。加入含 10% DMSO 和 15% FBS 的 DMEM 培养液, 调整细胞密度为 4×10^5 个/mL。将细胞悬液分装到细胞冻存管中, 严密封口, 标明品种、名称、性别、培养代数、冻存编号等信息。然后将冻存管装入细胞程序降温盒中, -70°C 过夜, 次日放入液氮罐中保存^[4]。

1.3.5 细胞复苏

将冻存管从液氮罐中取出, 迅速投入 37.5°C 水浴锅中, 晃动冻存管大约 1 min, 迅速解冻。解冻的细胞加入适当 DMEM 培养液, 37.5°C , 5% CO_2 的培养箱中培养, 每 2 天更换培养液^[4]。

1.4 细胞生物学研究

1.4.1 细胞活力测定

检测冻存细胞的存活率采用 Trypan blue 拒染试验。计数 1000 个细胞, 计算细胞存活率。

1.4.2 生长曲线

常规法消化细胞, 调整细胞浓度, 按照每孔细胞数 1×10^4 个/mL, 种植在 6 孔板中。从接种时间起, 每隔 24 h 计数 3 个孔内细胞数, 取平均值, 连续计数, 绘制细胞生长曲线。

1.5 染色体分析

具体操作参见门正明等^[6]的方法。

1.6 微生物检测

1.6.1 细菌、真菌检测

所有的待检细胞在无抗生素培养液中培养, 传代 3 d 内进行检测。具体操作参见 Donyle 等人的检测方法^[7]。

1.6.2 病毒检测

日常培养中, 在相差显微镜下注意观察有无蚀

斑、空斑等病毒损伤情况;另外随机挑选细胞进行红细胞吸附试验。

1.6.3 支原体检测

待检前弃掉旧培养液,加入含有 5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst33258 的 DMEM 培养基,培养箱中培养 20 min,荧光倒置镜下观察,判断是否有支原体污染。

2 结果与分析

2.1 细胞形态学观察

组织块经过 4~7 d 的培养,即可见细胞沿组织块边缘向外伸展形成生长晕,可见成纤维细胞和上皮细胞。最初生长的主要是上皮细胞,随后成纤维细胞转成优势生长,形成上皮细胞与成纤维细胞的界限。培养 14 d 左右细胞可达 80%~90% 汇合。即可传代培养,经过 2~3 次传代便可得到纯化的成纤维细胞,细胞呈成菱形长条状或不规则多角形,胞体近中央处有扁圆的细胞核,具有明显的成纤维细胞特征。原代及传代细胞见图 1、图 2。



图 1 马头山羊原代成纤维细胞(10×10)

Fig. 1 Primary fibroblasts of Matou goat (10×10)

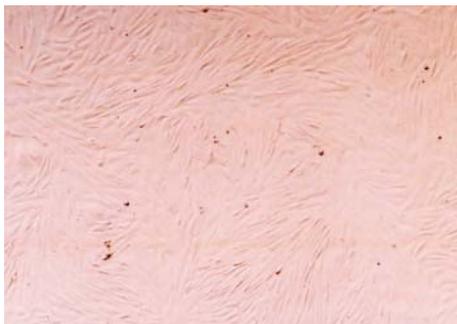


图 2 马头山羊传代成纤维细胞(10×4)

Fig. 2 Subculture fibroblasts of Matou goat (10×4)

2.2 细胞活率及贴壁率

细胞冻存前和复苏后的平均活率分别为 98.0%、96.7%,复苏后 24 h 贴壁率为 87%,从冻存前的活率来看原代和传代细胞生长的状态良好,培养条件适

宜,由复苏后的活率和贴壁率来看,细胞冻存和复苏的过程对细胞活力状况损害较小。冻存前和复苏后 48 h 细胞见图 3、图 4。



图 3 马头山羊冻存前的细胞(10×4)

Fig. 3 Matou goat fibroblasts before freezing (10×4)



图 4 马头山羊复苏后 48 h 的细胞(10×10)

Fig. 4 Matou goat fibroblasts after revival 48 h (10×10)

2.3 生长曲线

马头山羊传代成纤维细胞在高糖 DMEM 为条件的培养液添加 15% FBS 条件下连续培养 7 d,记录各次细胞密度见表 1,绘制成细胞生长曲线(图 5),其生长曲线呈典型的“S”型,即经过了潜伏生长期、对数生长期以及平台期。其表现为 1 d 时的潜伏生长期细胞总数稍有下降,3 d 左右细胞进入对数生长期,细胞数量增长快速,5 d 后细胞进入平台期,细胞由于缺乏足够生长空间而细胞增速放缓。细胞群体倍增时间为 36 h。

2.4 染色体分析

分别取传代次数为 2、5、10 代的细胞各 50 个中期分裂细胞染色体进行统计分析(图 6),结果表明马头山羊染色体 $2n=60$ 的细胞占主体(约 98%),但随着传代次数的增加,染色体数目的变异略微增大,说明体外培养对细胞遗传的稳定性有影响,但总体影响不大,染色体仍以二倍体为主,说明本实验所建细胞系的遗传特性稳定(表 2)。

表 1 马头山羊成纤维细胞接种 7 天的细胞密度
Table 1 Fibroblast cell density cultured for seven days of Matou goat

Time (d)	0	1	2	3	4	5	6	7
Cell density ($\times 10^4$ 个/mL)	1.00	0.93	3.76	8.87	43.00	78.00	85.00	89.00

表 2 马头山羊耳缘成纤维细胞染色体数目
Table 2 Matou goat ear margin fibroblast cell chromosome number

Race	Matou goat		
Cell generation	2	5	10
Observed number of cell	50	50	50
Chromosome number	Hypo-diploid number	1	2
	Diploid number	49	46
	Hyper-diploid number	0	1
	Diploid number	0	1
Chromosome common variation number	1	2	4
Chromosome common variation percent (%)	98	96	92

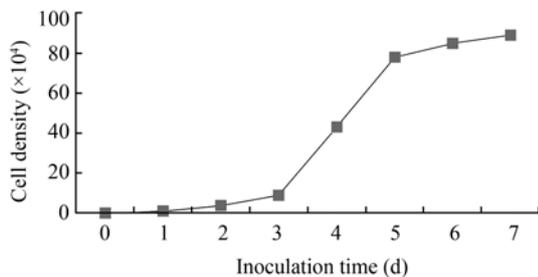


图 5 马头山羊成纤维细胞生长曲线

Fig. 5 Growth curve of Matou goat fibroblasts

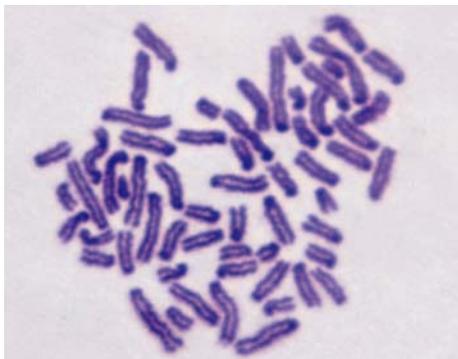


图 6 马头山羊(雌)中期分裂相染色体

Fig. 6 Chromosome metaphase plate of Matou goat

2.5 微生物污染检测结果

2.5.1 细菌、真菌污染检测结果

待检细胞没有浑浊或其他变化, 而阳性对照均明显有微生物生长。细菌、真菌检测结果为阴性。

2.5.2 病毒检测结果

日常相差显微镜观察, 未见有病毒造成的细胞损伤现象。红细胞吸附试验结果为阴性。

2.5.3 支原体检测结果

Hoechst 33258 荧光染料检测, 结果为阴性细胞

表面光滑, 仅细胞核发出蓝色荧光, 细胞周围无丝状或颗粒状荧光点。支原体检测结果为阴性(图 7)。

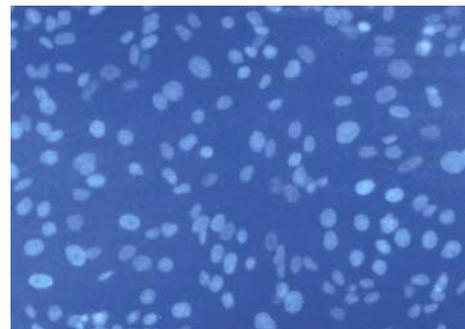


图 7 Hoechst33258 染色荧光检测阴性细胞

Fig. 7 Negative mycoplasma contamination for the fibroblasts stained with Hoechst 33258

3 讨论

3.1 畜禽种质资源的保护

在目前技术水平下, 冷冻保存牛、羊的精子和胚胎是可行的。对于难以进行精子和胚胎冷冻保存的畜种, 收集其组织(特定组织的细胞系或生殖细胞), 对组织细胞建立细胞系或细胞株进行低温长期保存。世界各国大多利用成纤维细胞保存作为体细胞保存的重要方式, 成纤维细胞不仅容易培养, 而且形状稳定, 很难发生转化, 比较容易传代或者克隆, 传代培养的或经克隆的细胞与其来源的成纤维细胞保持高度一致性。畜禽成纤维细胞库的建立为今后开展畜禽资源的繁育、品种改良、恢复种群数量、功能基因组等分子生物学研究提供珍贵的研究材料。

3.2 培养方法

原代细胞培养法主要有 2 种: 消化培养法和组织块培养法。组织块培养法简单方便, 长出的细胞整齐且便于选择, 多用于动物成纤维细胞的培养。因为本试验培养的细胞主要用于动物体细胞保种, 要求细胞具有较高的活力, 而酶消化法对细胞损害较大, 所以在原代培养中, 本试验采用了组织块培养法获得细胞, 而没有采用传统的胰蛋白酶(或胶原酶) 解离细胞法, 目的是为了减少胰酶对解离细胞的伤害。构建畜禽细胞库进行资源保存, 所做畜禽品种多, 样本含量大, 且组织块小, 不利于消化培养, 选择组织块贴壁培养较为合适^[8]。另外, 原代细胞培养过程中, DMEM 培养液中血清的质量与含量对成纤维细胞的生长影响较大, 多次试验证明血清含量 20% DMEM 培养液有利于成纤维细胞生长, 含量过高和过低都对其生长有抑制作用。

3.3 污染

微生物污染是细胞培养中最为常见的污染现象, 培养的细胞被有害物污染是细胞培养工作的大敌。空气、器材、操作、血清、组织样本等都可能成为细胞污染的途径。细胞培养所用器皿要经过严格的洗涤和灭菌程序处理, 各种溶液灭菌除菌要仔细, 操作室及剩余的无菌器材要定期清洁消毒灭菌。操作者责任心要强, 要细心稳重, 操作技术要熟练。进入无菌室半小时前打开超净工作台及无菌室的紫外灯。事先要严格检查器材、溶液和培养物, 不要把污染品或未经消毒的物品带入无菌室内, 以免造成污染。

REFERENCES

[1] Qi JF, Jia YL, He XT, *et al.* Report on Domestic Animal

Genetic Resources in China. Beijing: China Agriculture Press, 2006, 12-13.

齐景发, 贾幼陵, 何新天, 等. 中国畜禽遗传资源状况. 北京: 中国农业出版社, 2006, 12-13.

[2] Liu CS, Wang ZG, Li N, *et al.* The present condition and the counter plan of domestic animal genetic resources. *China Anim Husb Bull*, 2004, **21**(17): 28-31.

刘丑生, 王志刚, 李宁, 等. 我国濒危畜禽遗传资源保护的现状与对策. 中国畜牧业通讯, 2004, **21**(17): 28-31.

[3] Sun XZ, Li QW, Dai WP, *et al.* *In vitro* isolation and culture of luxi cattle skin fibroblast cells. *Anim Sci Abroad*, 2004, **31**(12): 29-32.

孙秀柱, 李青旺, 戴蕴平, 等. 鲁西黄牛皮皮肤成纤维细胞分离与培养的研究. 中国畜牧兽医, 2004, **31**(12): 29-32.

[4] Freshney RI ed. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, 1992, 119-122.

[5] He ZX, Zhang SZ. *Electrophoresis*. Beijing: Science Press, 1999: 35-39, 288-289, 296-298.

何忠效, 张树政. 电泳. 北京: 科学出版社, 1999, 35-39, 288-289, 296-298.

[6] Men ZM, Liu HX, Ma HM, *et al.* Karyotype analysis of Lanzhou fat-tailed sheep. *J Gansu Agri Univ*, 2002, **37**(2): 158-160.

门正明, 刘霞, 马海明, 等. 兰州大尾羊染色体组型分析. 甘肃农业大学学报, 2002, **37**(2): 158-160.

[7] Doyle A, Hay R, Kirsopeds BE. *Animal cells, living resources for biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1990, 81-100.

[8] Guan WJ, Ma YH, Ding H, *et al.* The establishment of fibroblast cell line and its biological characteristic research in small tail han sheep. *ChinJ Anim Vet Sci*, 2005, **36**(5): 511-516.

关伟军, 马月辉, 丁鸿, 等. 小尾寒羊耳组织成纤维细胞系的建立与生物学特性研究. 畜牧兽医学报, 2005, **36**(5): 511-516.