

版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞系的建立及其生物学特征

李红^a, 魏红江^{a*}, 许成盛^a, 汪霞^b, 卿玉波^a, 曾养志^a

(云南农业大学 a.云南省版纳微型猪近交系重点实验室; b.动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 以版纳微型猪近交系妊娠 47 d 的胎儿为材料, 采用胰蛋白酶消化法消化培养胎儿成纤维细胞, 对其进行细胞形态观察、细胞冻存前和复苏后存活率测定、生长曲线绘制和染色体核型分析等生物学特征检测。结果表明, 培养的版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞呈典型的成纤维细胞形态; 细胞冻存前和复苏后的存活率分别为 98.06% 和 92.12%; 生长曲线呈“S”形, 倍增时间为 36 h; 对所制备染色体核型进行分析, 显示 $2n = 38$, XY, 并在体外培养 14 个代次后仍能保持正常核型。

关键词: 版纳微型猪近交系; 胎儿成纤维细胞; 细胞培养; 生物学特征

中图分类号: S858.28 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)06-0678-05

Establishment and biological characteristics of fetal fibroblast cell lines in Banna minipig inbred line

LI Hong^a, WEI Hong-jiang^{a*}, XU Cheng-sheng^a, WANG Xia^b, QING Yu-bo^a, ZENG Yang-zhi^a

(a.Key Laboratory of Banna Minipig Inbred Line of Yunnan Province; b.The Faculty of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Using a 47 d fetus of Banna minipig inbred line as materials, fetal fibroblast cells were dispersed *in vitro* with trypsinization and then subcultured. Observations on morphology, determination of viability, drawing of dynamic growth, and analysis of karyotype were carried out. The results showed that the cell was morphologically consistent with fibroblasts, cell viability was 98.06% before freezing and 92.12% after thawing, the growth curves was sigmoidal with population doubling time(PDT)of cells was approximately 36 h, karyotyping indicated a total chromosomes number $2n=38$, sex chromosomes were XY, and the karyotype is normal after cultured up to passage 14 *in vitro*.

Key words: Banna minipig inbred line; fetal fibroblast; cell culture; biological characteristics

猪与人类生活密切相关, 经遗传改造后, 还可应用于制药、生物医学^[1-2]、生物反应器^[3]和人类疾病模型建立^[4]等科研领域, 甚至可能成为人类异种器官移植的主要来源^[5-6]。版纳微型猪近交系是第一个培育成功的大型哺乳动物近交系, 具有基因纯合、遗传稳定、表型均一和遗传背景清楚等优点, 是当前生物医学、异种器官移植、人类疾病模型建

立等领域研究的理想材料^[7-8]。由于动物遗传资源能够以细胞系的方式保存^[9], 因此, 建立稳定的版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞系, 可以使版纳微型猪近交系这一宝贵的遗传资源在细胞学水平上得到长期保存。目前关于版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞系的建立及其生物学特征检测的研究还未见报道。笔者以版纳微型猪近交系妊娠 47 d 的胎儿

收稿日期: 2010-06-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060308); 云南省教育厅项目(07Z11542)

作者简介: 李红(1978—), 女, 湖南常德人, 硕士研究生; *通讯作者, hongjiangwei@126.com

为材料,培养胎儿成纤维细胞,对其进行细胞形态学观察,存活率测定,细胞生长特征和染色体核型分析,旨在探讨有效而实用的体外培养方法。

1 材料和方法

1.1 材料

以云南农业大学云南省版纳微型猪近交系重点实验室133家系22世代妊娠47 d的胎儿组织为试验材料。

1.2 细胞培养

1.2.1 原代培养

通过手术,把妊娠47 d的版纳微型猪近交系胎儿取出,浸泡在PBS(加有50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Kanamycin sulfate injection和100 IU/mL Pencillin-Streptomycin Solution)中,用PBS清洗3遍后滴加少许双抗,放入冰箱中保存2 h,再在超净工作台中用镊子去除胎儿头、尾、四肢和所有脏器,剩余的胎儿组织用无菌PBS洗去血污,用眼科剪充分剪碎,用PBS冲洗。将胎儿组织块转移至50 mL的培养瓶中,加入8 mL胰蛋白酶(0.25%胰蛋白酶+0.02% EDTA),放于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中进行12~15 h的低温消化。消化过程中,培养瓶置于水平摇床(WD-9405B型,沃德生物医学仪器公司)上振荡。消化后用离心法去除胰蛋白酶,收集消化下来的细胞,加入DMEM/F12培养液(含10%FBS, 2 mmol L-Glutamine, 100 IU/mL Pencillin-Streptomycin Solution),于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂的培养箱中进行培养,观察细胞生长情况。

1.2.2 传代培养

细胞增殖至接近汇合时,吸出培养液,用PBS冲洗3遍,向瓶内加入适量0.25%的胰蛋白酶5 min后加入适量DMEM/F12培养液终止消化,轻轻吹打,使细胞脱落,1 000 r/min离心5 min后,去上清液,用适量DMEM/F12培养液制成细胞悬液,按 5×10^4 个/mL的密度传代培养,观察细胞的贴壁和生长情况。

1.3 细胞的冻存和复苏

1.3.1 冻存

按常规方法消化细胞,制备成单细胞悬液,将细胞悬液收集于15 mL离心管中,1 000 r/min离心5

min,去上清,用冻存液(70%DMEM+20% FBS+ 10% DMSO)收集细胞,并控制细胞的密度为 1×10^6 个/mL,轻轻吹打,使细胞重悬,将悬液以1 mL/管分装于无菌塑料冻存管中,严密封口,标明细胞名称、培养代数、冻存编号、冻存日期等。将冻存管放入细胞程序冷冻盒,置于-79 $^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱冷冻12~24 h,然后转入液氮罐中保存。

1.3.2 复苏

从液氮中取出冻存管,立即放入38 $^{\circ}\text{C}$ 温水中不停地搅动,使其在1 min内完全解冻。将细胞悬液移入离心管中,加入10 mL的DMEM/F12培养液,1 000 r/min离心5 min,去上清,加入DMEM/F12培养液进行培养。

1.4 细胞活力测定

将冻存前与复苏后的传代细胞制成细胞悬液,取0.5 mL放入小离心管中,加入约0.1 mL 0.02 g/mL的Trypan blue染液混合,2 min后用血球计数板在显微镜下直接测定细胞的存活率。

1.5 细胞生长曲线

向24孔培养板每孔内接种1 mL密度约为 1×10^4 个/mL的细胞,从接种之日起,每隔24 h计数2个孔内的细胞密度,算出平均值,连续测定12 d。以培养时间为横坐标,以细胞密度为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.6 细胞染色体分析

取第6代、第10代和第14代生长良好的胎儿成纤维细胞,按照常规方法^[10]进行染色体制片,Giemsa染色后,观察并统计100个以上的分裂相,选择染色体分散与形态良好的分裂相在油镜下拍照,作出核型图。

1.7 数据分析

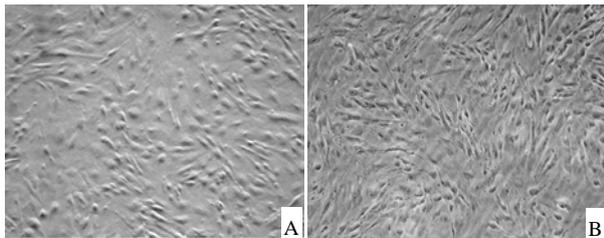
对细胞冻存前后的存活率进行*t*检验,用SPSS进行 χ^2 检验。

2 结果与分析

2.1 细胞形态学观察

采用胰蛋白酶消化法,从胎儿组织块中获取原

代细胞。在培养过程中，原代细胞的生长速率和形态与传代细胞无明显差异。在形态上，原代细胞与传代细胞都呈梭形或不规则的多角形(图1)，加入消化液后，细胞会回缩，变成圆形(图2)，为典型的成纤维细胞形态。细胞接种2 h后开始贴壁，6~7 h后贴壁率约为90%。如果以 5×10^4 个/mL的密度接种，一般5~7 d可以长满培养瓶。



A 原代细胞；B 传代细胞。

图 1 原代细胞和传代细胞($\times 100$)

Fig. 1 Primary fetal fibroblasts and subculture fetal fibroblasts($\times 100$)

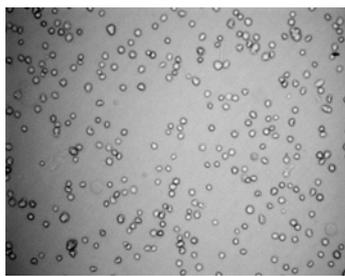


图 2 消化后的胎儿成纤维细胞($\times 100$)

Fig.2 Fetal fibroblasts after digesting ($\times 100$)

2.2 细胞冻存前和复苏后的存活率

细胞冻存前和复苏后的平均存活率分别为98.06%和92.12%，二者差异不显著($P > 0.05$)，表明冻存和复苏过程中的各项条件对细胞活力的影响较小。从冻存前的存活率来看，细胞生长的状况良好，培养条件适宜。

2.3 细胞生长曲线

版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞接种于24孔培养板后，连续12 d计数细胞密度，据细胞密度绘制出生长曲线(图5)。细胞密度与接种时间之间相关性极高， $y = 0.002 0x^5 - 0.069 3x^4 - 0.795 4x^3 - 3.424 8x^2 + 5.856 4x - 2.151 3$ 相关系数 $R^2 = 0.996 4$ ，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。细胞接种后有24~48 h的潜伏期，从

第3天起细胞进入对数生长期，持续5 d后即第8天细胞发生接触抑制，生长缓慢并进入平台期。细胞群体倍增时间为36 h。

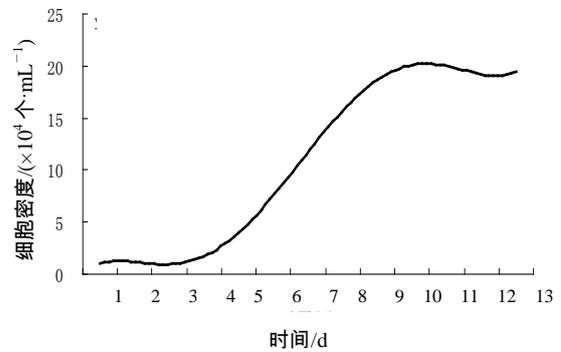


图 3 胎儿成纤维细胞生长曲线

Fig.3 Growth curve of fetal fibroblasts

2.4 细胞染色体分析

版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞中期分裂相染色体见图4。版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞的染色体 $2n = 38$, XY，根据对每一条染色体的臂比、相对长度和着丝粒位置进行核型分析来建立核型图(图5)。

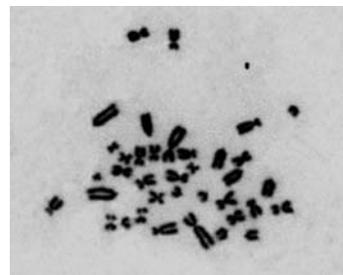


图 4 中期分裂相染色体

Fig.4 Chromosome metaphase plate

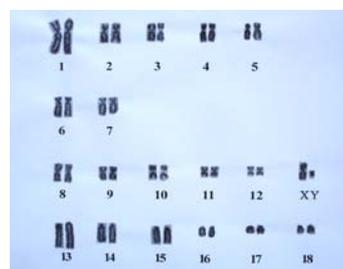


图 5 胎儿成纤维细胞核型图

Fig.5 Karyotype of fetal fibroblasts

分别取版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞第6、10、14代100个以上中期分裂细胞染色体进行分

析,结果(表1)表明,在选取的3个代次中,染色体 $2n=38$ 占主体,分别为88.19%、86.27%和87.50%,3个代次所含二倍体数目的差异不显著($P>0.05$)。本试验所建立的版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞系的遗传特征稳定,为稳定的二倍体细胞系。

表1 培养代次对胎儿成纤维细胞染色体数目的影响

Table 1 Effects of cell passage on fetal fibroblasts chromosome number

细胞代数	检测细胞数/个	染色体数			2n比率/%
		亚二倍体	二倍体	超二倍体	
第6代	127	13	112	2	88.19
第10代	102	10	88	4	86.27
第14代	104	12	91	1	87.50

3 结论与讨论

本研究中分离培养并获得的版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞系具有典型的成纤维细胞形态,冻存前与复苏后的存活率无显著差异,生长曲线呈“S”型,细胞群体倍增时间为36 h,经长时间体外培养后(14代),染色体的数目、形态以及核型等遗传特性仍能保持稳定。

采用胰蛋白酶消化培养法,将胎儿组织块用胰酶在4℃冰箱中进行12~15 h的低温消化,有效弥补了胰蛋白酶培养法的不足,细胞产量也较高,并且细胞容易贴壁生长,这与刘冀珑等^[11]的研究结果相似。成纤维细胞原代培养常采用组织块培养法和胰蛋白酶消化培养法。组织块培养法操作简便,步骤少,不易污染和对细胞的损伤小,但是细胞从组织块中游离出来的时间长^[12];胰蛋白酶消化法操作时间短,一次性获得的细胞较多,但是对酶作用的时间、温度要求很高,消化时间过短,细胞不易游离出来,消化时间过长,对细胞的损伤极大,消化下来的细胞缺乏活力,不易贴壁,无法增殖^[13-15]。

影响细胞冻存的因素有冷冻温度、冷冻速度、冻融速度及冷冻保护剂类型。通过对版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞系冻存前和复苏后平均存活率的测定与比较,发现冻存前与复苏后的存活率差异不显著($P>0.05$),复苏后继续培养的细胞具有正常的结构和形态,并保持旺盛的生命力,表明本试验细胞冻存中所使用的冻存液(70%DMEM+20%FBS+10% DMSO)、冷冻方法和冻存温度(-79℃)

以及复苏过程中解冻时间的控制等各项条件对细胞活力的影响较小。

从核型分析的结果来看,版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞系的染色体数目与太湖猪^[16]、贵州香猪^[17]、青海白猪^[18]以及国内外其他的一些家猪^[19-21]和某些野猪^[22]一致,染色体形态划分类型与太湖猪^[16]、贵州香猪^[17]的相同,说明版纳微型猪近交系胎儿成纤维细胞系染色体在数目和形态的进化上没有发生变异。在选取传至14代的细胞进行分析后,发现经长时间体外培养后,核型仍保持正常,表明该细胞系适合应用于转基因等需要长时间体外培养供体细胞的研究领域。

运用常规的方法来进行成纤维细胞核型分析时,秋水仙素浓度、注入时间和处理时间都对染色体产生影响^[22]。这与本试验结果一致,只有当多数细胞处于分裂中期时注入秋水仙素,染色体聚缩充分,显微镜下才清晰可辨,便于分析,如果多数细胞处于后期时注入秋水仙素,染色体会因为着丝粒已经分开,但细胞又没有完全分裂成2个子细胞,容易造成2组染色体合在一起,这样就会出现四倍体的分裂相,增加了系统误差。本试验中出现的多个超二倍体就属于这种现象。为避免这种系统误差,需要研究者有丰富的胎儿成纤维细胞培养经验,并在注入秋水仙素之前24 h内严密观察细胞的生长情况,把握关键时间。

参考文献:

- [1] Pursel V G, Rexlrad C E Jr. Status of research with transgenic farm animals[J]. J Anim Sci, 1993, 71: 10-19.
- [2] Prather R S, Hawley R J, Carter D B, et al. Transgenic swine for biomedicine and agriculture[J]. Theriogenology, 2003, 59: 115-123.
- [3] Velander W H, Johnson J L, Page R L, et al. High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 12003-12007.
- [4] Petters R M, Alexander C A, Wells K D, et al. Genetically engineered large animal model for studying cone photoreceptor survival and degeneration in retinitis pigmentosa[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15: 965-970.
- [5] Dai Y, Vaught T D, Boone J, et al. Targeted disruption of

- the alpha-1, 3-galactosyltransferase gene in cloned pigs [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 251-255.
- [6] Lai L, Kolber-Simonds D, Park K W, et al. Production of alpha-1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning[J]. *Science*, 2002, 295: 1089-1092.
- [7] Yu P, Zhang L, Li S F, et al. Screening and analysis of porcine endogenous retrovirus in Chinese Banna minipig inbred line[J]. *Transplant Proc*, 2004, 36: 2485-2487.
- [8] 曾嵘, 苗永旺. 版纳微型猪近交系 133 家系 SLA-DQ cDNA 的克隆和序列分析[J]. *中国实验动物学报*, 2005(4): 215-221.
- [9] 吴常信. 动物遗传资源保存的理论与技术——21 世纪动物农业持续发展的种质基础[J]. *云南大学学报*, 1999, 21(1): 7-10.
- [10] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [11] 刘冀珑, 徐真, 李劲松, 等. 牛耳成纤维细胞的培养[J]. *动物学报*, 1999(4): 472-473.
- [12] Levan A, Fredgk, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes[J]. *Hereditas*, 1964, 52(3): 201-220.
- [13] Kruse P F, Patterson M K. *Tissue Culture: Methods and Application*[M]. New York: Academic Press, 1973.
- [14] 徐燕, 李颂, 程继光, 等. 人牙龈成纤维细胞和牙周膜成纤维细胞的培养和生物学特征[J]. *口腔医学研究*, 2002, 18(6): 375-377.
- [15] 张利娟, 刘海峰, 李学伟. 太湖猪成纤维细胞系的建立及其生物学特性研究[J]. *四川农业大学学报*, 2008, 26(1): 85-88.
- [16] 张依裕, 刘培琼, 徐如宏. 贵州香猪染色体核型研究[J]. *养猪*, 2004(6): 38-41.
- [17] 许生成. 培育中的青海白猪染色体核型分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2003(8): 11-12.
- [18] 吕群, 江绍慧, 项维. 几种家畜淋巴细胞培养方法和染色体组型[J]. *遗传*, 1979, 1(2): 29-31.
- [19] 陈文元, 王子淑. 家猪体细胞染色体的研究[J]. *遗传*, 1979, 1(5): 6-11.
- [20] Hansen-Melander E, Melander Y. The karyotype of the pig[J]. *Hereditas*, 1974, 77: 149-158.
- [21] 曾养志, 何芬奇. 华南野猪核型及其与家猪进化的关系[J]. *云南农业大学学报*, 1986, 3(2): 152-155.
- [22] Moynihan E P, Mahon G A T. Quantitative karyotype analysis in the mussel *Mytilus edulis* L.[J]. *Aquaculture*, 1983, 33(1): 301-309.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠

(上接第 629 页)

- [6] 阮小蕾. 转 PRSV 复制酶基因 T₂ 代番木瓜植株的抗病性测定[J]. *华南农业大学学报*, 2004, 25(4): 12-15.
- [7] 冯黎霞. 转基因番木瓜抗病性测定和纯合系的获得[J]. *仲恺农业技术学院学报*, 2005, 18(4): 12-15.
- [8] 王加峰. 转复制酶基因番木瓜抗病性及抗病毒机制[D]. 广州: 华南农业大学, 2004.
- [9] 侯燕. 转基因番木瓜遗传稳定性及食品安全性评价[D]. 广州: 华南农业大学, 2006.
- [10] Murry M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980(8): 4321-4324.
- [11] 叶长明, 范怀忠, 叶寅, 等. 番木瓜环斑病毒 Ys-CP 基因的序列分析和植物表达载体的构建[J]. *中国病毒学报*, 1997, 12(1): 54-60.
- [12] 徐景升, 余爱丽, 姚伟, 等. 利用 MPCR 技术快速检测进口大豆转基因背景[J]. *江西农业大学学报*, 2005, 27(2): 262-269.
- [13] 孙大庆, 闫冰, 姜毓君, 等. 应用于转基因食品检测的技术及其进展[J]. *中国粮油学报*, 2007, 22(1): 138-144.
- [14] Forte V T, Pinto A D, Martino C, et al. A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize[J]. *Food Control*, 2005, 16: 4431-4436.
- [15] 赵锦, 邓平建, 刘建军, 等. 转基因食品多重定性 PCR 及实时荧光定量 PCR 检测方法研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2004(4): 412-414.
- [16] 陈文炳, 邵碧英, 李寿崧, 等. 应用复合 PCR 同时检测多种转基因成分[J]. *检验检疫科学*, 2002, 12(3): 1-13.
- [17] 杨冬燕, 杨永存, 邓平建. 抗环斑病毒转基因番木瓜 55-1 的 PCR 检测[J]. *中国公共卫生*, 2007, 23(1): 91-92.
- [18] 庄逸林, 相大鹏, 蔡颖, 等. 番木瓜及其深加工制品中转基因成分定性 PCR 检测方法的建立(英文)[J]. *食品科学*, 2007, 28(7): 352-355.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 胡东平