

大熊猫皮肤成纤维细胞系的建立和冷冻保存

张明^① 侯蓉^② 郑鸿培^① 朱庆^{①*} 张志和^② 刘玉良^②

(^① 四川农业大学动物科技学院 雅安 625014; ^② 成都大熊猫繁育研究基地 成都 610081)

摘要: 简要介绍了大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)皮肤成纤维细胞的建系过程和冷冻保存。在研究中,采用 200 IU/ml 的胶原蛋白酶 I 酶在 4℃ 下解离皮肤组织。在 DME/Ham's F12 和 M199 两种培养液中添加 100 IU/ml 青链霉素、5 μg/ml 两性霉素 B、5 μg/ml M-Plasmocin™、2 mmol/L L-Glu、10 μg/ml 的胰岛素、40 ng/ml EGF 和 20%(原代)或 10%(传代)FBS 组成培养液,分别用于细胞的贴壁培养和植块培养,均获得培养成功。用 PBS 添加 0.4% BSA、0.1 mol/L 蔗糖和 10% DMSO 组成的冷冻保存液对细胞进行冷冻保存,解冻后获得 93.258% 的活率,解冻细胞再次培养能正常生长。研究结果表明,大熊猫皮肤成纤维细胞建系和冷冻保存获得成功。

关键词: 大熊猫;成纤维细胞;体外培养;皮肤

中图分类号 S863.3; Q953; Q813 文献标识码:A 文章编号 0250-3263(2005)05-61-07

Establishment and Cryopreservation of a Giant Panda Skin Fibroblast Cell Line

ZHANG Ming^① HOU Rong^② ZHENG Hong-Pei^① ZHU Qing^①
ZHANG Zhi-He^② LIU Yu-Liang^②

(^① College of Animal Science & Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014;

^② Giant Panda Breeding Research Base in Chengdu, Chengdu 610081, China)

Abstract: The paper describes the process of establishment and cryopreservation of a Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) skin fibroblast cell line. Firstly, the skin tissue was digested with 200 IU/ml collagenase type I under 4°C. Secondly, we added 100 IU/ml penicillin and streptomycin, 5 μg/ml M-plasmocin™, 5 μg/ml Amphotericin B, 2 mmol/L L-Glu, 10 μg/ml insulin, 40 ng/ml epidermal growth factor (EGF) and 20% (the first passage) or 10% (after the first passage) fetal bovine serum (FBS) into DME/Ham's F12 and M199, and then cultured dispersive cells in DME/Ham's F12 and tissue pieces in M199. Finally, Giant Panda skin fibroblast cells were cryopreserved in phosphate balance solution (PBS) containing 0.4% bovine serum albumin (BSA), 0.1 mol/L sucrose and 10% dimethyl sulphoxide (DMSO). Living cell percentage was 93.258% after thawing of cells half a year after cryopreservation. Thawed fibroblasts still grow well in culture, showing the successful establishment and cryopreservation of a Giant Panda fibroblast cell line.

Key words: Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*); Fibroblasts; Culture; Skin

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是我国特有的珍稀濒危动物,由于其繁殖力低下、栖息环境不断缩小和割裂、遗传交流中断、遗传多样性逐渐丢失,加上人为干扰等原因,野生大熊猫的数量急剧减少,已处于濒临灭绝的境地^[1]。大熊

基金项目 成都大熊猫繁育研究基金项目(No.2001003);

* 通讯作者;

第一作者介绍 张明,讲师,博士研究生,主要从事动物繁殖生物技术相关研究, E-mail: zhm3000@163.com

收稿日期 2005-03-04, 修回日期 2005-07-15

猫具有珍贵的遗传价值,是人类共同的财富。对大熊猫遗传资源进行保护和研究,已迫在眉睫。

通过对细胞培养,选育大熊猫遗传资源细胞系,建立大熊猫遗传资源细胞库,可以与大熊猫配子库、胚胎库一起,形成多层次、多角度、全方位的遗传资源保藏系统^[2]。细胞培养不仅可以使大熊猫的遗传资源扩大,得到长期保存,而且可以为研究者提供丰富的研究材料,更有利于开展大熊猫保护的世界性联合研究。本文扼要地介绍了成都大熊猫繁育研究基地的大熊猫皮肤成纤维细胞建系过程和冷冻保存方法。该建系方法已经成功的应用于 0.5~8 岁年龄阶段大熊猫皮肤成纤维细胞的培养。

1 材料与方法

1.1 实验材料 0.5~8 岁的大熊猫共 18 只,来自成都大熊猫繁育研究基地。大熊猫麻醉后,股内侧剃毛消毒(碘酒消毒后立即用 75% 的酒精脱碘)后,用 9~12 号针头挑起皮肤,再按与针尖垂直的方向切割挑起的皮层,每块皮肤约 2~3 mm²,然后迅速将其放入含 500 IU/ml 青链霉素(长征制药二厂)的 PBS 液中(自配制),4℃ 下保存备用,保存时间最好不超过 48 h。

1.2 实验方法

1.2.1 皮肤组织细胞的分离 将大熊猫皮肤组织在含 100 IU/ml 青链霉素的 Hank's 液(HyClone, AME16016)中洗涤 3 次,每次浸 5 min 后 1 000 r/min 离心后放在吸水纸上晾干。用电子天平称重皮肤组织块,然后在 4℃ 下用 200 IU/ml 的胶原蛋白酶 I(Gibco BRL, 1021082)持续酶解时间 36~48 h。酶解过程中随时观察,待皮肤组织呈絮状时停止酶解。细胞悬液洗涤后用血球计数法测量细胞密度,计算细胞得率。

1.2.2 植块培养 按照 1.2.1 中的方法将皮肤组织块清洗,然后剪碎成 1 mm³ 的小块。将组织块在 M199(HyClone, AME16086)中添加 100 IU/ml 青链霉素、5 μg/ml 两性霉素 B(Sigma, 171375) 5 μg/ml M-Plasmocin™(InvivoGen, 晶美分装, 24-103-MPP) 2 mmol/L L-Glu(Gibco BRL,

1062503) 10 μg/ml 的胰岛素(Sigma, I5500) 40 ng/ml EGF(InvivoGen, 1120677)和 20% FBS(HyClone, AKB11420)组成的原代培养液浸润。再将组织块移入 50 ml 培养瓶(FALCON, 353014)瓶底,将瓶翻转,加入 2 ml 原代培养液,静置 12 h,将瓶轻轻翻转,让培养液浸没组织块,漂浮的组织块吸出。每 2 d 更换 2/3 的培养液。当组织块周围长出细胞铺满瓶底 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶(Gibco BRL)消化脱壁传代。传代培养液添加 10% FBS。

1.2.3 贴壁培养 将植块培养中 M199 换成在 DME/Ham's F12(HyClone, AME15972)组成培养液。FBS 添加和传代与植块培养相同。培养时,将酶解获得的细胞用培养液调整浓度到 $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 个/ml,每个 50 ml 培养瓶中添加 2 ml,静置 6 h 后再添加相应培养液 3 ml。换液传代同 1.2.2 中的方法。贴壁培养时,根据上皮细胞和成纤维细胞差速粘附特性将其分离。具体做法是:室温下消化贴壁细胞 5 min,未脱壁细胞丢弃,传代接种细胞 6 h 后,吸出培养瓶中悬浮细胞。消化时容易脱壁和接种后贴壁快的细胞主要是成纤维细胞。

1.2.4 培养条件 所有培养液调节 pH 值为 7.2。在饱和湿度,5% CO₂,37.2℃ 的环境条件下进行培养。

1.2.5 生长速度测定 取贴壁培养传至第 6 代的细胞,按 1.673×10^5 个每孔接种 0.5 ml 细胞悬液到 12 孔板培养板(FALCON, 353043),每隔 12 h 消化 1 孔测定细胞个数,8 个重复。然后以测定次数为横轴,细胞个数为纵轴绘制细胞生长曲线。

1.2.6 核型分析 取第 5 代细胞,用秋水仙碱(Sigma 31K1534)处理后进行核型制片,具体方法见参考文献[3],并将核型片制作成临时装片。分析 116 个细胞的核型,根据细胞染色体数目(N)将其分成亚单倍体(N < 21)单倍体(N = 21)亚二倍体(21 < N < 42)二倍体(N = 42)超二倍体(42 < N < 63)和多倍体(N ≥ 63)6 种类型,并分别计算每种类型细胞所占的百分比,通过染色体数目变异率测试,衡量细胞体

外培养的遗传特性。根据核型确定培养细胞来源的动物种属。

1.2.7 细胞冷冻保存和复苏 在 PBS(Sigma 药品自配)中 添加 0.4% BSA(Gibco BRL) 0.1 mol/L 蔗糖(Gibco BRL) , 然后再添加 10% DMSO (Sigma) 组成冷冻保存液 , 用细管(FHK 牛冻精管) 分装细胞 , 按程序(4℃ 下平衡 1 h ; - 25 ~ 4℃ , 1℃/min ; - 80 ~ - 25℃ , 10℃/min ; - 80℃ 时直接投入液氮) 冷冻细胞 , 液氮中保存半年后解冻培养。用 55 ~ 60℃ 温水快速解冻 , 用培养液洗细胞 3 次。用贴壁培养液进行培养。

2 结 果

2.1 皮肤组织分离效果 由于大熊猫年龄和组织块大小的差异 , 酶解分离时间一般需要 36 ~ 48 h。酶解后的皮肤组织呈絮状悬浮物 , 其中最上层为非细胞悬浮物 , 紧接着是单细胞层 , 中层为细胞团 , 最下层为毛根和未被消化的皮肤表层。酶解所得的细胞悬液经离心洗涤 , 取中层悬液 , 其他非细胞成份含量会大大减少(图版 I : 1 , 2)。大熊猫皮肤组织酶解分离的细胞平均得率为 5.079×10^6 个/g。

2.2 植块培养 用 M199 进行组织块培养时 , 幼仔熊猫(出生 50 d 左右) 的皮肤组织块在培养 6 ~ 8 d 左右可看见梭状的成纤维细胞从组织块周围长出(图版 I : 3)。在 50 ml 的培养瓶中放 6 块皮肤组织时 , 铺满瓶底需要 26 ~ 32 d ;

成体(2 岁或 2 岁以上) 大熊猫的皮肤组织块在培养 12 ~ 14 d 左右可以看见梭状成纤维细胞从组织块周围长出。在 75 ml 的培养瓶中放 6 块皮肤组织时 , 铺满瓶底需要 50 ~ 60 d 左右。植块培养获得原代细胞主要为成纤维细胞。

2.3 成纤维细胞的纯化 在贴壁培养原代培养细胞主要为上皮样细胞和成纤维细胞 , 两类细胞在生长过程中往往形成同种细胞集落(图版 I : 4) , 同种细胞集落形成表明 : 培养细胞存在运动现象和细胞间联系。酶解分离得到的上皮样细胞和成纤维细胞贴壁后的形态差异较大 : 贴壁生长的成纤维细胞成梭形长条状或不规则状(图版 I : 5)。上皮样细胞多呈扁平的多角形 , 细胞之间紧密相连 , 成片状(图版 I : 6)。经过连续 3 代成纤维细胞和上皮细胞的差速粘附分离后 , 得到的主要是成纤维细胞。

2.4 细胞生长速度 生长速度测定中 , 以 1.673×10^5 个细胞接种后共测定 10 次 , 测得细胞的个数依次为 : 1.229×10^5 、 2.201×10^5 、 2.430×10^5 、 2.973×10^5 、 4.231×10^5 、 6.089×10^5 、 6.890×10^5 、 6.089×10^5 、 5.661×10^5 和 6.118×10^5 个。绘制的生长曲线见图 1。从细胞的生长曲线可以区分出细胞生长的前 3 个时期 : 潜伏期约 12 h , 增殖期约 72 h , 平台期和衰退期区分不明显 , 细胞数量呈波动下降状态。

2.5 染色体数目变异率和核型分析 染色体变异率分析中 , 各种染色体数目(N) 类型

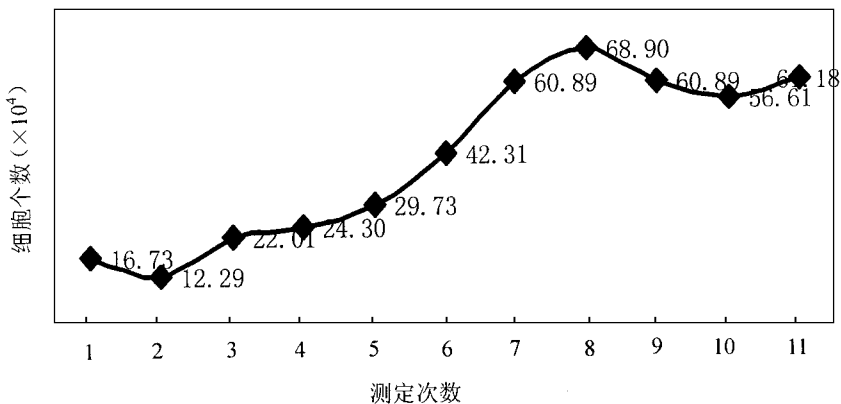


图 1 成纤维细胞的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of fibroblast

的百分比为:亚单倍体($N < 21$)占 2.90%,单倍体($N = 21$)占 1.45%,亚二倍体($21 < N < 42$)占 16.09%,二倍体($N = 42$)占 74.77%,超二倍体($42 < N < 63$)占 4.80%,多倍体($N \geq 63$)占 0%。统计的 116 个核型中,染色体数目范围是 15 ~ 49,染色体数目众数是 42。体外培养细胞基本

维持了二倍体特性,数据见表 1。

将贴壁培养的大熊猫皮肤成纤维细胞进行核型分析。染色体比较清晰的细胞进行放大、测量、统计、分组、编号,将染色体的相对长度和着丝粒指数与陈大元等^{4,5}(1991)发表的大熊猫染色体组型进行比较,数据见表 1。

表 1 大熊猫染色体相对长度和着丝粒指数

Table 1 Relative length and centromere index of Giant Panda chromosome

染色体编号 Chromosome No.	染色体类型 Chromosome type		相对长度 Relative length		着丝粒指数 Centromere index	
	测试 Test	对照* Control	测试值 Test value	对照值* Control value	测试值 Test value	对照值* Control value
	1	m	m	8.267 ± 0.583	8.04 ± 0.085	45.353 ± 3.607
2	m	m	7.573 ± 0.621	7.66 ± 0.163	41.770 ± 2.402	43.41 ± 0.704
3	m	m	6.703 ± 0.437	6.62 ± 0.127	40.123 ± 2.552	45.12 ± 0.680
4	m	m	6.028 ± 0.189	6.12 ± 0.110	39.128 ± 3.858	43.28 ± 0.759
5	sm	sm	5.870 ± 0.284	5.58 ± 0.108	31.508 ± 6.410	31.84 ± 0.846
6	m	m	5.690 ± 0.187	5.77 ± 0.081	38.960 ± 7.227	45.75 ± 0.740
7	sm	sm	5.623 ± 0.264	5.47 ± 0.107	35.405 ± 9.312	32.22 ± 0.783
8	m	m	5.278 ± 0.331	5.22 ± 0.121	42.163 ± 1.729	41.25 ± 0.664
9	m	sm	5.048 ± 0.180	4.92 ± 0.101	38.953 ± 6.540	36.03 ± 0.693
10	m	sm	4.935 ± 0.242	4.92 ± 0.069	39.233 ± 5.430	35.64 ± 0.654
11	m	m	4.578 ± 0.225	4.62 ± 0.082	41.955 ± 6.139	42.98 ± 0.627
12	m	m	4.410 ± 0.034	4.44 ± 0.089	44.718 ± 5.882	45.12 ± 0.915
13	m	m	4.228 ± 0.045	4.36 ± 0.074	42.620 ± 4.662	43.34 ± 0.531
14	m	m	4.120 ± 0.133	4.14 ± 0.060	43.243 ± 6.380	45.89 ± 0.709
15	m	m	3.870 ± 0.154	3.90 ± 0.074	42.145 ± 2.864	42.78 ± 0.683
16	m	m	3.720 ± 0.236	3.76 ± 0.058	43.293 ± 4.143	45.98 ± 0.731
17			2.780 ± 0.681	3.54 ± 0.150		
18			2.253 ± 0.456	2.13 ± 0.047		
19			1.843 ± 0.171	1.90 ± 0.047		
20			1.618 ± 0.224	1.79 ± 0.036		
X	m	m	5.353 ± 0.260	5.51 ± 0.083	42.668 ± 5.060	40.36 ± 0.606
Y			1.260 ± 0.058			

* 对照值来自陈大元 1991 年发表的大熊猫核型数据。

* The control value is from the karyotype data which were published by CHEN D Y in 1991.

培养细胞的染色体众数为 42,与大熊猫正常核型的染色体数目一致。经配对试验 *t*-检验,染色体相对长度的测量值与理论值之间差异不显著($P > 0.05$),染色体着丝粒指数测量值和理论值之间差异显著($P < 0.05$)。根据着丝粒指数确定的染色体类型中,第 9、10 号染色体测量类型为中部着丝(m),理论类型为亚中部着丝(sm),这种差异可能主要由测量误差引起,但不排除 9、10 号染色体结构变异的可能

性。

大熊猫染色体组型见图 2。

2.6 细胞冷冻保存和复苏 冷冻保存前用 0.4% 台盼蓝(Gibco BRL, 25K1563)染色排除法测得细胞活率为 95.694%,冷冻保存半年后,取出解冻、洗涤后测得细胞活率为 93.258%,经卡方(χ^2)检验,差异不显著。解冻后的细胞以 $(9.875 \pm 1.1085) \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种 2 ml 到 50 ml 培养瓶,经过 18 h,细胞铺满瓶底 50% 以

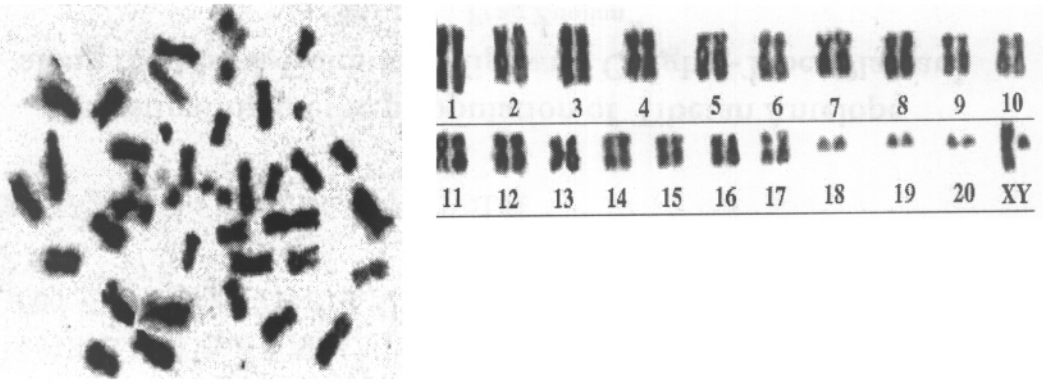


图 2 大熊猫染色体组型(雄)

Fig.2 Giant Panda karyotype (male)

上,细胞生长状况良好。

3 讨论

成纤维细胞被广泛应用于细胞或分子生物学的许多方面。这主要由于成纤维细胞是最易培养的细胞,在常见的培养液中,已实现传代的成纤维细胞的生命周期约 50 代。此外,成纤维细胞良好的耐受性使之易于进行从基因转移到微注射等较多领域的研究^[6]。皮肤成纤维细胞是存在于真皮及其皮下结缔组织中的一类细胞,在体外培养时增殖较快,要求的培养条件相对容易。因此本研究以培养成纤维细胞为主。

植块培养获得的原代细胞各种特性更接近组织细胞本身^[7],但植块培养由于培养液渗入组织内部困难,细胞的营养物质供应不平衡,细胞之间的接触抑制,使细胞的生长、增殖缓慢,培养经历的时间延长,增加了细胞培养过程污染的可能性。组织块的大小、大熊猫的年龄、取材的部位等因素,也会影响细胞生长、增殖的速度和潜力。一般组织块越小,细胞的增殖越快;大熊猫的年龄越小,细胞的增殖越快,增殖的潜力越强;取材部位组织的再生能力越强、越幼嫩,角化程度越低,细胞的增殖速度越快,增殖潜力越强。

贴壁培养需要对组织块酶解,可用于解离组织的酶类较多,常见的有胰蛋白酶、胶原蛋白酶和链霉菌蛋白酶等。胰蛋白酶的酶解能力强,

酶解皮肤组织获得的细胞以上皮细胞为主。皮肤和皮下主要为 I 型胶原,用胶原蛋白酶 I 酶解的效果较好,容易获得皮肤成纤维细胞。链霉菌蛋白酶的细胞毒性较强^[8]。贴壁培养的细胞增殖迅速,需要不断传代,容易获得大量的培养细胞,但细胞原有特性的维持困难,随着传代次数增加,细胞原有的形态、细胞生物学特性逐渐发生改变^[9]。

作为遗传资源保存的细胞系,遗传稳定性是极其重要的。张德礼等在研究 7 种动物的肾细胞系(F-18,CRFX,CKF,MDCK,Vero,Vero-2,MA-104,BHK-21)和 HeLa 细胞系中若干细胞株的染色体变异率、克隆形成率和肿瘤形成的相互关系时发现:体外培养的细胞系,染色体数目变异是普遍现象^[10]。寻找尽可能能够维持遗传资源保存细胞系的遗传稳定性的培养体系,是遗传资源保存细胞建系研究的重点。

细胞冷冻保存是培养细胞得以长期保藏的有效方法。研究表明,科学的冷冻保存方法,对细胞的 DNA 结构和遗传稳定性几乎没有影响^[11]。本研究中熊猫皮肤成纤维细胞用 0.4% BSA + 0.1 mol/L 蔗糖 + PBS + 10% DMSO 冷冻保存半年后,细胞快速解冻的复苏率为 93.258%,冷冻保存效果与安立龙、常万存的保存效果相当^[12,13]。

参 考 文 献

[1] 冯文和,叶志勇,何光昕.大熊猫生育能力的研究.四川

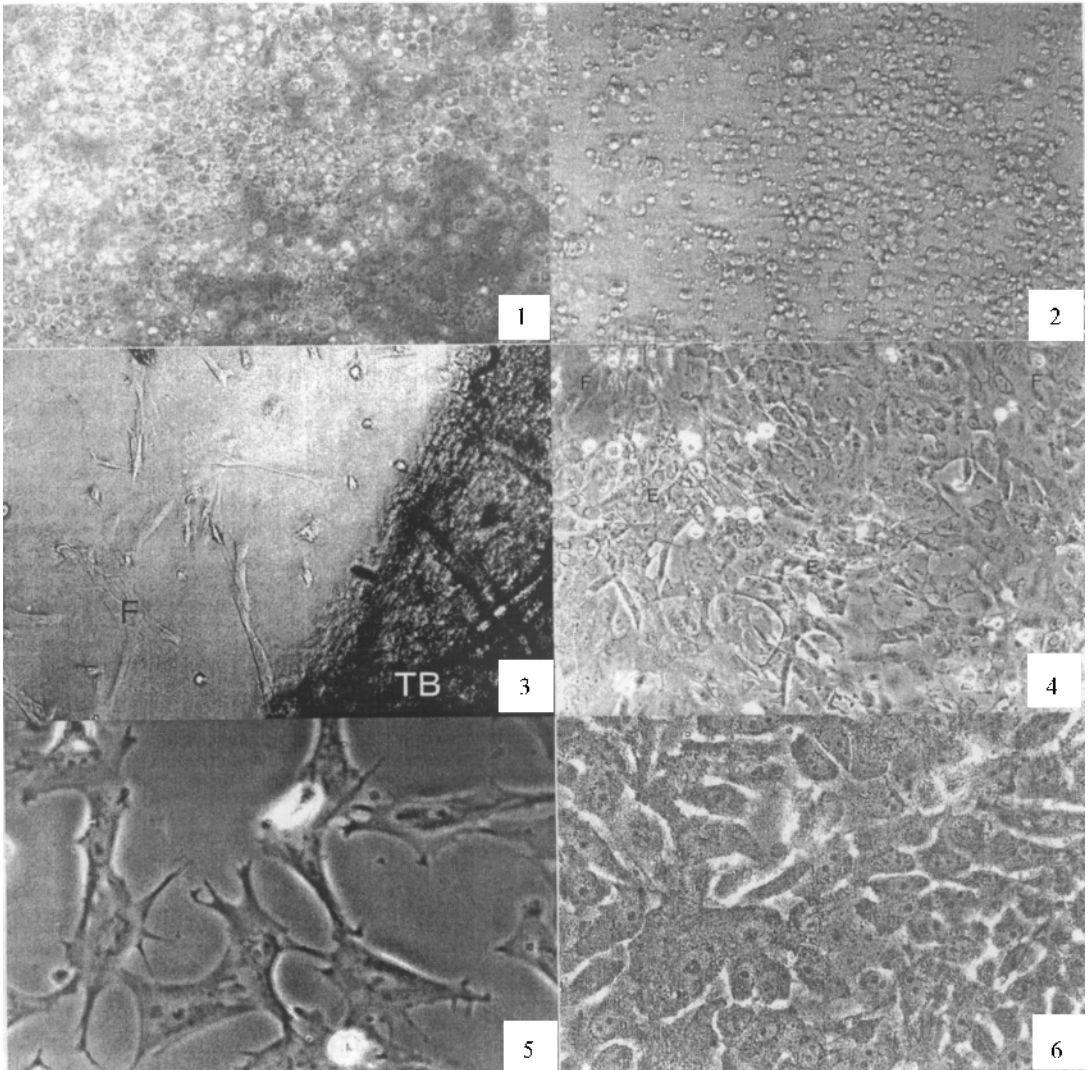
- 大学学报,1984(3)98~102.
- [2] Gilmore J A ,McGann L E ,Ashworth E ,*et al*. Fundamental cryobiology of selected African mammalian spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome resource banking. *Animal Reproduction Science* ,1998 , 53(1~4) 277~297.
- [3] 王一平,程在玉.小鼠成纤维细胞中期染色体标本制备及G带核型分析.遗传,1989,11(1)21~23.
- [4] 陈大元,王喜忠,王子淑.大熊猫染色体组型:大熊猫繁殖与疾病研究.成都:四川科学技术出版社,1991.
- [5] 陈大元,王喜忠,王子淑.大熊猫显带染色体研究:大熊猫繁殖与疾病研究.成都:四川科学技术出版社,1991.
- [6] 斯佩克特 D L,戈德曼 R D,莱因万德 L A 等著(黄培堂等译).细胞实验指南(上册):成纤维细胞的分离和培养.北京:科学出版社,2001.
- [7] 薛庆善主编.体外培养的原理及技术:体外培养方式.北京:科学出版社,2001.
- [8] 鄂征主编.组织培养和分子细胞技术:组织细胞的分离方法.北京:北京出版社,1995.
- [9] 陈瑞铭主编.动物组织培养技术及其应用:细胞的传代.北京:科学出版社,1991.
- [10] 张德礼,李六金,夏耕田等.动物细胞系的染色体组型与遗传变异率的分析.遗传学报,2001,28(4)327~344.
- [11] Labbe C , Martoriati A , Devaux A. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Biology of Reproduction* ,1988 , 42 862~869.
- [12] 立龙,杨奇,窦忠英.小鼠胎儿和牛睾丸成纤维细胞的冷冻保存.西北农业学报,2000,29(3)5~8.
- [13] 常万存,窦忠英,高志敏.人胚胎成纤维细胞的冷冻保存.西北农业学报,2000,29(1)6~9.

张 明等 :大熊猫皮肤成纤维细胞系的建立和冷冻保存

图版 I

ZHANG Ming *et al.* . Establishment and Cryopreservation of a Giant Panda Skin Fibroblast Cell Line

Plate I



1. 皮肤块酶解后得到的细胞悬液(× 100 ,LCAch /PhL ,with IF550 filter); 2. 经过简单处理后的细胞悬液(× 100 ,LCAch / PhL ,with IF550 filter); 3. 从组织块(TB)周围长出的成纤维细胞(F)(× 100 ,LCAch/PhL ,with IF550 filter); 4. 成纤维细胞(F)中的上皮细胞(E)集落(× 100 ,LCAch/PhC ,with IF550 filter); 5. 典型的贴壁成纤维细胞(× 400 ,LCAch/PhL ,with IF550 filter); 6. 贴壁的上皮细胞(× 200 ,LCAch/PhC ,with IF550 filter)。

1. Suspended cell after skin-tissue being digested with enzyme(× 100 ,LCAch /PhL ,with IF550 filter); 2. Suspended cell liquid by simple treatment(× 100 ,LCAch/PhL ,with IF550); 3. Growing fibroblast (F) about tissue block(TB)(× 100 ,LCAch/PhL ,with IF550 filter); 4. Epithelium(E) group in fibroblast (F)(× 100 ,LCAch/PhC ,with IF550 filter); 5. Adhesive fibroblast (× 400 , LCAch/PhL ,with IF550 filter); 6. Adhesive epithelium(× 200 ,LCAch/PhC ,with IF550 filter).