

藏猪颗粒细胞的体外培养研究

赵彦玲, 任子利*, 吴庆侠, 王建洲, 强巴央宗

(西藏农牧学院 动物科学学院, 西藏 林芝 860000)

摘要: 为建立藏猪颗粒细胞的体外培养和保存方法, 从藏猪卵巢上采集卵泡的颗粒细胞, 进行分离培养和冷冻复苏。结果显示: 藏猪颗粒细胞形成单层需要 6~7 d; 细胞冷冻复苏后仍可进行正常生长, 冻存前后活率都在 90% 以上; 细胞生长曲线呈“S”型, 接种后, 经历 2 d 的潜伏期, 第 3 天细胞开始迅速生长, 进入对数生长期, 到第 8 天细胞开始发生接触抑制, 进入生长缓慢的平台期。表明建立的藏猪颗粒细胞的体外培养和保存方法可行有效。

关键词: 藏猪; 颗粒细胞; 体外培养

中图分类号: S828.9⁺9 Q954.6-33⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)11-0141-04

In Vitro Culture of Granule Cells in Tibet Pigs

ZHAO Yan-ling, REN Zi-li*, WU Qing-xia, WANG Jian-zhou, Chamba Yang-zom

(Department of Animal Science, Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Nyingchi 860000, China)

Abstract: In order to establish a set of methods for the *in vitro* culture and storage of granule cells of Tibet pigs, granule cells were collected from the ovary of Tibet pigs. The results showed that the formation of granule cells monolayers needed 6—7 days and the cells could be passaged after freezing-thawing. The survival rate of cells before or after freezing was above 90%. The growth curve was basically of the “S” type, and its incubation period, logarithmic growth phase, and plateau were about 0—2 d, 3—7 d, and 8—12 d after the cells inoculation, respectively. This indicated that the method for *in vitro* culture and save of granule cells of Tibet pigs was successfully established.

Key words: Tibet pig; granule cells; *in vitro* culture

动物体细胞作为保存动物遗传资源的一种补充, 越来越受到人们的重视^[1]。自从 1996 年第 1 头克隆羊“多利”诞生后^[2], 克隆动物的研究迅速发展, 而作为供体的体细胞的分离培养显得十分重要, 卵泡颗粒细胞就是较理想的供体细胞之一^[3]。同时, 卵泡颗粒细胞体外培养不仅可以检测卵泡刺激素(FSH)等激素的生理活性, 也可用于探讨某些因子或药物对卵巢的作用机制^[4-9]。本研究以藏猪的卵巢为材料, 采集其卵泡中的颗粒细胞, 进行分离培

养, 并对所得到的细胞进行冻存及复苏培养, 以建立藏猪颗粒细胞的体外培养和保存方法, 为藏猪的保种、细胞生物学等方面的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

藏猪卵巢取自当地屠宰场。DPBS 和高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 胰蛋白酶、EDTA、丙酮酸钠和 DMSO 购自 Sigma-Aldrich 公司; 胎牛

收稿日期: 2013-07-06

基金项目: 科技部国家科技支撑计划项目(2012BAD03B03); 西藏自治区强基惠民科研项目(2013)

作者简介: 赵彦玲(1972-), 女, 河南卫辉人, 讲师, 硕士, 主要从事动物科学的教学工作及高原动物生物技术研究。

E-mail: ylzhaoh@163.com

* 通讯作者: 任子利(1969-), 男, 河南卫辉人, 副教授, 博士, 主要从事动物科学的教学工作及高原动物生物技术研究。

E-mail: zlrn0925@163.com

血清(FCS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 藏猪颗粒细胞的原代培养 将藏猪卵巢放在加有抗生素、温度在 35~37℃生理盐水的保温瓶中,并于 4 h 内带回实验室。迅速用生理盐水将其冲洗干净,放置超净工作台内,并用 75%乙醇冲洗约 1 min,在 DPBS 液中快速漂洗 3 次,用灭菌纱布吸干,然后用 10 mL 无菌注射器抽取卵巢上的卵泡。将得到的卵泡液用 DPBS 液稀释,在体视显微镜下检出卵丘卵母细胞复合体,然后收集该卵泡液放到离心管中静置 3~5 min,吸取上层及中层液体(因最下层是一些组织碎片等杂质),1 500 r/min 离心 3 min,如此反复离心清洗 3 次,弃上清,留沉淀备用(沉淀即是卵泡液中的颗粒细胞)。将沉淀用 DMEM 培养液重悬并合并离心,弃上清,在沉淀中加入含 10% FCS 的 DMEM,然后用移液枪吹打均匀并将其接种于无菌培养皿中,放入 5% CO₂、37℃、最大饱和湿度的培养箱中培养,以后每隔 2 d 换 1 次培养液。

1.2.2 传代培养 原代培养的细胞生长到 80%汇合时,弃去旧培养液,先加入 DPBS 约 2~3 mL,用 1 mL 移液枪轻轻吹打,漂洗 1~2 次,然后加入胰蛋白酶-EDTA 的消化液 0.5~1.0 mL,显微镜下观察,待 70%细胞开始脱壁时,轻轻振荡培养皿皿底,并立即加入 2 mL DMEM 培养液终止消化。将消化后的细胞混合液转移到离心管中,1 500 r/min 离心 3 min,弃上清,再用 DPBS 离心清洗 2 次,在沉淀中加入少量培养液稀释并平分接种于 2 个新的培养皿中,每 2 d 换液 1 次,待细胞生长汇合至 80%以上再进行传代或冻存^[10-11]。

1.2.3 冻存与复苏培养 待传至 3 代的细胞生长汇合至 80%~90%时,根据 1.2.2 的消化方法得到细胞,加入 1 mL 4℃预冷的冷冻液(含 20% FCS、10% DMSO 的 DMEM 培养液),调整细胞密度达 4.0×10^6 个/mL,混匀,然后将细胞悬液放入无菌冻存管中。冷冻程序为:4℃ 1 h, -85℃ 过夜,次日投入液氮中长期保存^[12]。

细胞复苏培养:从液氮罐中取出冻存管,迅速投入 37℃的水浴锅中 1~2 min,然后用经 37℃预热的培养液重悬细胞,1 500 r/min 离心 3 min,弃上清,收集细胞,加入 2.0 mL 含 10% FCS 的 DMEM

培养液重悬细胞,将其接种于培养皿中培养^[13]。

1.2.4 细胞活率的测定 用血球计数板和细胞计数器计数细胞^[14]。按每毫升细胞悬液中加 0.1%台盼蓝溶液 1 μ L,用移液枪将它们吹打均匀,静置 10 min,在显微镜下观察计数,凡未染上蓝色者即为活细胞,而染上蓝色者则为死细胞,计数 1 000 个细胞,用活细胞占细胞总数的百分数来反映细胞活率^[15]。

1.2.5 细胞生长曲线的绘制 向 24 孔培养板每孔内接种 0.4 mL 密度为 1×10^5 个/mL 的细胞,从接种之日算起,每天在同一时间用胰蛋白酶消化 2 个孔内细胞,用血球计数板分别计数后计算细胞密度,取其平均值。连续 12 d 计数,以培养时间(d)为横坐标、细胞密度为纵坐标,绘制生长曲线^[16-17]。

1.3 数据处理

试验所得数据均采用 *F* 检验法分析,确定差异的显著性。

2 结果与分析

2.1 藏猪颗粒细胞的获得

藏猪原代培养的颗粒细胞,形成单层需要 6~7 d。这时的单层细胞形状并非呈成纤维样细胞的流线形,而是呈梭形或不规则三角形,呈放射状排列。传代培养时,接种密度保持在 1×10^5 个/mL,接种后 2~3 d 细胞开始贴壁,3~6 d 优势生长,7 d 左右长满皿底。当传至第 3 代培养后,可获得纯化的颗粒细胞。

冷冻保存一定时期后按上述介绍的方法随机解冻细胞,并将其进行培养。结果显示,解冻复苏后的细胞仍能正常贴壁生长,且生长良好,形态、生长特性与未冷冻的传代细胞培养时并无差别。

2.2 藏猪颗粒细胞冻存前后的活率

保存一定时期后按上述介绍的方法随机解冻细胞,细胞解冻复苏培养后可以正常贴壁生长,且生长良好,形态、生长特性与冻存前培养时基本一致。藏猪颗粒细胞冻存前细胞活率平均达到 92.2%,复苏后平均达到 90.3%,差异不显著($P > 0.05$)。说明细胞在冻存前后均有较高的存活率,达到 90%以上。

2.3 藏猪颗粒细胞的生长规律

藏猪颗粒细胞生长曲线基本上呈“S”型(图 1)。接种后,细胞经历 2 d 的潜伏期,第 3 天细胞开始迅速生长,进入对数生长期,到第 8 天细胞开始发生接

触抑制,之后细胞生长缓慢,进入平台期。

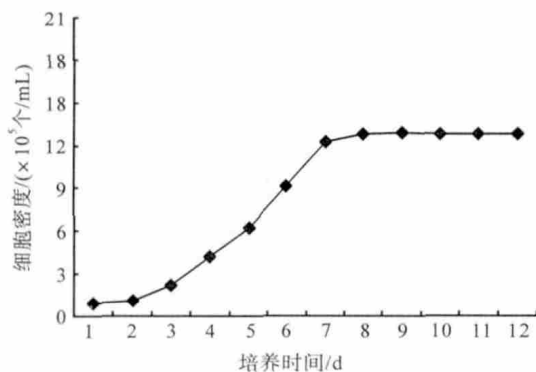


图 1 藏猪颗粒细胞生长曲线

3 结论与讨论

3.1 藏猪颗粒细胞的原代与传代培养

藏猪颗粒细胞包括卵母细胞周围的卵丘细胞和卵泡液中的颗粒细胞。藏猪原代培养的颗粒细胞,形成单层需要 6~7 d,这时的单层细胞形状并不是呈纤维样细胞的流线形,而是呈梭形或不规则三角形,呈放射状排列,这与吴赛辉^[18]、彭礼繁等^[19]和黄雅琼等^[20]的原代培养的颗粒细胞形状一致,但形成单层需要的时间只与吴赛辉^[18]的结论一致,均为 6~7 d,比彭礼繁等^[19]和黄雅琼等^[20]的培养时间 5~6 d 长 1 d,这可能与原代颗粒细胞的采集方法不同有关。本研究中原代采集的颗粒细胞是卵泡液中的颗粒细胞,吴赛辉^[18]采集的是卵母细胞周围的卵丘细胞,但这些卵丘细胞并未随卵母细胞一起体外成熟培养,而彭礼繁等^[19]和黄雅琼等^[20]的原代培养的颗粒细胞则是来自于经成熟培养的卵母细胞周围的卵丘细胞。

传代培养时,接种后 2~3 d 细胞就开始贴壁,3~6 d 呈优势生长,7 d 左右长满平皿底。传至第 3 代培养后,就可以获得纯化的成纤维细胞,这与吴赛辉^[18]、彭礼繁等^[19]和黄雅琼等^[20]的传代培养结果基本一致。

吴中红等^[21]认为,颗粒细胞的接种密度为 $(1 \sim 5) \times 10^4$ 个/mL 时,即使培养 7~10 d,也很难长满平皿,最后终止传代。因此,颗粒细胞的接种密度保持在 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个/mL 比较合适,这与 Cheong 等^[22]培养猪颗粒细胞的接种密度保持在 1×10^5 个/mL 的要求一致,也与本研究的接种密度 (1×10^5 个/mL) 一致。

3.2 藏猪颗粒细胞的生长曲线

细胞生长曲线是观察细胞生长基本规律的重要

方法,细胞的体外生命过程呈现 3 个时期,即潜伏期、对数生长期、平台期^[23]。在细胞正常的增殖过程中,生长曲线呈“S”型。

从本研究中藏猪颗粒细胞生长曲线可以看出,其潜伏期约需 2 d;对数期从第 3 天开始并延续到第 7 天;第 8 天细胞开始接触抑制,进入到平台期。表明,藏猪颗粒细胞要经历潜伏期、对数生长期、平台期。有研究^[24]表明,猪胎儿成纤维细胞生长初期 1~6 d 呈快速的对数增长,此后进入平台期,这与本研究不一致,本研究结果与叶雷等^[25]研究的猪耳成纤维细胞生长曲线基本一致。另外,刘伟等^[26]研究猪耳成纤维细胞时发现,将 1 周龄猪耳部组织采用组织块法培养 8~9 d 即可铺满整个瓶底;而成年猪耳部组织分化程度高,需要 2 周左右才能长满。以上研究结果的差异,可能与动物品种、细胞种类和培养环境等因素有关,其原因尚需进一步研究。

本研究结果表明,从藏猪卵巢上采集卵泡的颗粒细胞,其形成单层需要 6~7 d,细胞冻存前后活率都在 90% 以上,细胞冷冻复苏后仍可进行正常生长,生长曲线基本上呈“S”型,成功建立了藏猪颗粒细胞的体外培养和保存方法。

参考文献:

- [1] 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:自然科学版,1999,21(S3):7-10.
- [2] Wilmut I, Schnoeke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature,1997,385:810-813.
- [3] 刘海军,刘灵,刘玉堂,等. 受体卵母细胞来源和供体细胞类型对山羊体细胞核移植融合率的影响[J]. 华北农学报,2008,23(1):41-44.
- [4] 杨永梅,陈娟,陈洋,等. 哺乳动物卵泡颗粒细胞体外培养研究概况[J]. 中国畜牧兽医,2011,38(3):135-137.
- [5] 刘利杰,权富生,刘军,等. 卵泡颗粒细胞维持山羊卵母细胞减数分裂抑制状态的研究[J]. 华北农学报,2008,23(4):119-123.
- [6] 黄洋,孙晋艳,李鹏飞,等. 绵羊卵泡颗粒细胞体外培养条件的优化[J]. 山西农业科学,2012,40(2):161-163.
- [7] 禹学礼,邓雯,庞有志,等. 颗粒细胞和培养微滴大小对牛卵母细胞体外受精后胚胎发育的影响[J]. 河南农业科学,2005(9):87-90.
- [8] 孙晋艳,黄洋,张航,等. FSH 对体外培养猪卵巢颗粒细胞生长及增殖的影响[J]. 山西农业科学,2011,39

- (5):465-470.
- [9] 刘利杰,权富生,刘军,等. 卵泡颗粒细胞维持山羊卵母细胞减数分裂抑制状态的研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(4):119-123.
- [10] 楚秋霞,安森亚,施巧婷,等. 南阳牛成纤维细胞的体外培养及生物学特性研究[J]. 河南农业科学, 2009 (4):135-138.
- [11] 闫颖颖,张静芳,和小娥,等. 兔骨髓间充质干细胞的分离培养[J]. 河南农业科学, 2010(2):102-104.
- [12] 薛英,潘晓梅,黄炯,等. 不同条件下转化 BHK-21 细胞冻存复苏效果比较[J]. 现代农业科技, 2010(18): 20-22.
- [13] 王家敏,平玲,沈武玲,等. MDCK 细胞库的建立及其生物学特性研究[J]. 山西农业科学, 2012, 40(12): 1231-1234, 1261.
- [14] 弗雷谢尼 R I. 动物细胞培养:基本技术指南[M]. 章静波,徐存栓,马杰,等译. 5 版. 北京:科学出版社, 2008:241-257, 445-448.
- [15] Jenkins N. Animal cell biotechnology: methods and protocols[M]. New Jersey: Human Press Inc, 1999: 132-138.
- [16] 李喜艳,王加启,魏宏阳,等. 奶牛乳腺上皮细胞体外培养条件优化的初步研究[J]. 华北农学报, 2010, 25 (增刊):80-85.
- [17] 万发春,刘晓牧,宋恩亮,等. 用于保种的蒙山牛耳成纤维细胞的培养研究[J]. 华北农学报, 2009, 24(增刊):109-112.
- [18] 吴赛辉. 牛的卵泡颗粒细胞采集与培养[J]. 黑龙江农业科学, 2006(1):61-62.
- [19] 彭礼繁,罗光彬. 猪颗粒细胞和胎儿成纤维细胞的分离培养与冷冻保存试验报告[J]. 当代畜牧, 2007, (7):32-34.
- [20] 黄雅琼,王晓丽,崔奎青,等. 猪卵丘细胞和胎儿成纤维细胞的分离培养及传代[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(3):255-259.
- [21] 吴中红,邢凤英,刘国世,等. 猪输卵管上皮细胞、颗粒细胞、耳上皮细胞及胎儿成纤维细胞的培养[J]. 中国畜牧杂志, 2003, 39(6):5-6.
- [22] Cheong H T, Ikeda K, Martinez Diaz M A, *et al.* Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells[J]. Reprod Fertil Dev, 2000, 12(1-2):15-20.
- [23] 李晗. 三个畜禽品种成纤维细胞库构建及其生物学特性研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2005.
- [24] 李仕新,陈松玲,李加琪,等. 长大二元杂交猪胎儿成纤维细胞的生物学特性[J]. 四川农业大学学报, 2012, 30(2):220-225.
- [25] 叶雷,李红,魏红江,等. 成年版纳微型猪近交系克隆猪的制备[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(9):1491-1498.
- [26] 刘伟,吴华莉,张德福. 猪耳成纤维细胞体外培养及 EGFP 基因的转染[J]. 上海农业学报, 2007, 23(4): 10-13.