

广灵驴成纤维细胞系的建立及其相关生物学特性研究

张旭[§], 乐宝玉[§], 成志敏, 张宁芳, 张万锋, 郭玉龙, 刘泽军, 蔡明岐,

张琪琪, 高鹏飞, 郭晓红, 李步高, 曹果清*

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘要: 试验旨在建立广灵驴成纤维细胞库, 以期在细胞水平上对广灵驴进行保护。本研究以 1 月龄广灵驴耳缘皮肤组织为试验材料, 采用组织块贴壁法进行成纤维细胞培养, 建立了广灵驴耳缘皮肤组织成纤维细胞系, 并对其相关生物学特性进行了鉴定。结果发现, 试验所建立的广灵驴成纤维细胞系大多数细胞呈长梭形, 部分细胞呈三角状或星型。在培养过程中, 广灵驴原代成纤维细胞在贴壁 4 d 时开始有细胞从组织边缘游离出来, 贴壁 14 d 后, 细胞汇合率达到 80%, 可以进行第一次传代培养; 细胞生长状态良好, 生长曲线呈典型的 S 型曲线; 细胞冻存复苏后活率有所下降, 但生长状态良好。细胞分裂中期染色体数 $2n=62$, 说明成功建立了广灵驴成纤维细胞系。通过本方法建立的广灵驴成纤维细胞系为后续广灵驴的相关研究奠定了基础。

关键词: 广灵驴; 成纤维细胞; 生物学特性

中图分类号: S813.3

文献标识码: A

文章编号: 1671-7236(2018)03-0650-06

Establishment and Biological Characteristics Analysis of Fibroblast Cell Line of Guangling Donkey

ZHANG Xu[§], LE Baoyu[§], CHENG Zhimin, ZHANG Ningfang, ZHANG Wanfeng,

GUO Yulong, LIU Zejun, CAI Mingqi, ZHANG Qiqi, GAO Pengfei,

GUO Xiaohong, LI Bugao, CAO Guoqing*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine,

Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: This study was aimed to establish the fibroblast cell line of Guangling donkey, and protect Guangling donkey at the cell level. In the experiment, the fibroblast cell culture was performed on auricular skin of Guangling donkey using the method of tissue-sticking. The fibroblast cell line was established, and its biological characteristics were studied. The results showed that the shape of most fibroblasts in Guangling donkey were spindle, however, some of them were triangle or star. During the process of culturing, the primary fibroblasts began to dissociate from the edge of the tissue at 4 days of adherence. After 14 days of adherence, the cell confluence rate reached about 80%, and the cells could be subcultured for the first time. The measured cell growth curve which was the typical S-shaped curve showed that the cell growth was in good con-

收稿日期: 2017-07-17

基金项目: 三晋学者项目(2017); 山西省大学生科技创新项目(12-14); 山西省 1331 工程

作者简介: 张旭(1994-), 女, 山西朔州人, 本科, 研究方向: 动物遗传与育种, E-mail: xuhzhang@outlook.com

乐宝玉(1992-), 女, 海南保亭人, 硕士生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖, E-mail: 763940464@qq.com

张旭和乐宝玉对本文具有同等贡献, 并列为第一作者

* 通信作者: 曹果清, 教授, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖, E-mail: anniecao710502@aliyun.com

dition. After cryopreservation, the survival rate decreased. The quantity of chromosomes $2n=62$ indicated that the fibroblast cell line of Guangling donkey was successfully established. The fibroblast cell line established by this kind of method provided the foundation for the related research of Guangling donkey.

Key words: Guangling donkey; fibroblast cells; biological characteristics

动物遗传资源是经过漫长的进化和人类驯化而产生的具有遗传差异的动物种类和品种,是人类赖以生存和发展的物质基础。动物本身具有繁衍后代的能力,自身具有可再生性,但由于人类行为的干预,导致一些经济利用性较差的动物慢慢趋向于灭绝^[1]。保护好动物遗传资源,主要是保护遗传资源的多样性,保持其品种特征,为人类社会可持续性发展提供拥有遗传变异的生物材料^[2]。

广灵驴产于中国山西省东北部的广灵、灵丘两县,与关中驴、德州驴、泌阳驴和新疆驴并称为中国五大优良驴种。广灵驴体格高大,骨骼粗壮,体质结实,按其体形大小可分为大、中和小 3 种类型^[3],具有容易饲养、发病率低、适应性强和寿命长等特点,是当地农民耕种的主要役用牲畜^[4]。然而随着农业机械化的提高及保护意识的缺乏,广灵驴的数量正逐步减少。根据中国农业部第 662 号公告,广灵驴被确认为国家级畜禽遗传资源保护品种。近年来,因广灵驴驴肉蛋白含量高、营养丰富,驴皮可熬制阿胶等,使得市场上对广灵驴的消费日益增加,供不应求,因此对广灵驴进行保护和开发利用显得更为重要^[5]。早期研究者从染色体核型、带型^[6]、DNA 微卫星^[7-8]、线粒体^[9]及血清蛋白多样性^[10]等多个方面对广灵驴遗传结构及其物种进化进行了大量研究,充分说明了对广灵驴保种的重要性。

成纤维细胞是一种具有遗传稳定性的二倍体细胞,且因具有采样方便、容易分离、较易进行体外培养等特点,通过建立成纤维细胞系对物种进行保护已成为一种切实可行的有效方法^[11-12]。为了在细胞水平上对相应物种进行保护,目前,已通过细胞培养成功建立了多个物种的成纤维细胞系,如水牛^[13-14]、金华猪^[15]、五指山猪^[16]、龙陵黄山羊^[17]、白羽鸡^[18]、天祝白牦牛^[19]、马头山羊^[20]、大熊猫^[21]等,但广灵驴的成纤维细胞系仍未建立。本试验通过建立广灵驴耳缘皮肤组织成纤维细胞系,在细胞水平上对广灵驴这一优良的地方种质资源进行保存,为今后进行广灵驴的相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

从山西省大同市广灵县广灵驴保种场选取 1 月龄广灵驴 6 头(公母各半)。用剪刀去除广灵驴耳缘周围毛发,75%酒精消毒,然后用无菌剪刀剪取广灵驴约 1 cm^2 的耳缘组织。将耳缘组织于 75%酒精中浸泡 30 s,放入含双抗的 PBS 中漂洗两次,然后放入含双抗的 PBS 中带回无菌室,准备原代细胞培养。

1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基和 0.25%胰蛋白酶均购自美国 Hyclone 公司;双抗、磷酸缓冲液(PBS)和秋水仙素均购自武汉博士德公司;胎牛血清(FBS)购自北京四季青公司;台盼蓝染液和 DMSO 均购自北京博奥拓达公司。

1.3 成纤维细胞的原代培养

将耳缘组织取出并在 75%酒精中浸泡 10 s,然后用无菌剪刀将组织块剪成 1 mm^3 大小,用含双抗的 PBS 冲洗 3 次,然后平铺在 60 mm 培养皿中。用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基润洗后去除大部分培养基,所留培养基润湿组织块即可,使组织块贴壁,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。6 h 后取出培养皿,加入 3 mL 含 10% FBS 和 1%双抗的高糖 DMEM 培养基进行细胞培养,36 h 后进行首次观察,确认细胞是否被污染,2 d 后对所培养细胞进行首次换液,每隔 2 d 换一次培养液。

1.4 成纤维细胞的传代培养

待显微镜下观察细胞长至 80%~90%时,对成纤维细胞进行传代培养。将培养皿中的培养液去除,PBS 清洗两次后,加入 0.25%胰酶溶液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下消化细胞。待显微镜下观察细胞变圆但未漂浮起来后,立即加入 2 mL 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化。吹打细胞,使之分散在培养液中,并将其移至 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液。加入含 10%胎牛血清和双抗的 DMEM 培养液重悬细胞,吹打均匀后按 1:3 进行传代培养,然后加入含 10%胎牛血清和 1%双抗的

DMEM 培养液补足到 3 mL,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养。每隔 2 d 进行观察,视细胞生长情况进行换液和传代培养。

1.5 成纤维细胞的冻存与复苏

将长至 80%~90%、纯化后的成纤维细胞进行消化,后移入 15 mL 离心管内,1 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,加入含 10% DMSO、30% FBS 的 DMEM 培养基重悬细胞,调整细胞终浓度至 5×10^6 个/mL,分装于冻存管内,先置于 4 ℃ 存放 40 min,然后置于 -70 ℃ 过夜,最后放入液氮内长期保存。将冻存前的细胞进行细胞计数和活率检测。

将冻存管从液氮罐中取出,迅速放入 37 ℃ 水浴锅中。将融化后的细胞 1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,加入含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养液 3 mL,吹打均匀后移入培养基,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后进行观察,视细胞生长情况进行换液或传代操作。将复苏后的细胞进行细胞计数和活率检测。

1.6 成纤维细胞生长特性的检测

1.6.1 生长曲线的绘制 将终浓度为 1×10^4 个/mL 的成纤维细胞接种至 24 孔板进行细胞计数,常规条件下进行培养,每隔 24 h 进行一次细胞

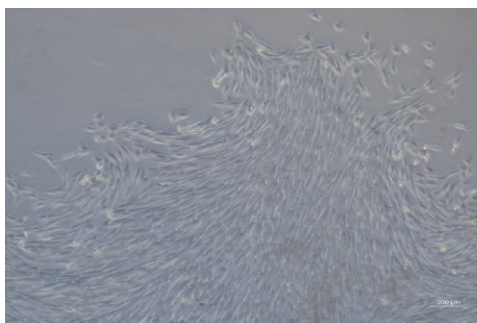
计数,每次计数 3 个孔,连续 8 d 计数。其余细胞每隔 2 d 进行一次细胞换液。将所得数据以培养时间为横坐标、细胞浓度为纵坐标,绘制广灵驴成纤维细胞生长曲线图。

1.6.2 染色体分析 对处于对数生长期的第 3 代成纤维细胞添加秋水仙素,调整其终浓度为 $0.067 \mu\text{g/mL}$ ^[22],然后按常规方法进行染色体制片,Gimesa 染色后显微镜下观察并拍照。对 50~100 个分裂中期细胞染色体数目进行统计,具体方法参照吉姆萨染色方法进行^[23]。

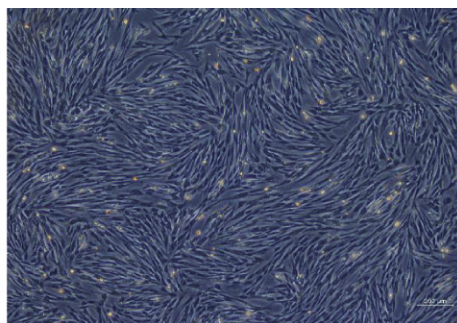
2 结 果

2.1 成纤维细胞的形态学观察

组织块贴壁 4 d 后,开始有细胞从组织块的边缘游离出来向外伸展形成生长晕,由成纤维细胞和上皮细胞组成。5 d 后成纤维细胞成为优势生长细胞(图 1A)。14 d 时细胞密度达到 80%,进行第一次传代,获得传代细胞。传代细胞生长迅速,3~4 d 后可达到 80%~90% 的汇合率,说明获得的细胞生长状态良好(图 1B)。显微镜下观察大多成纤维细胞呈长梭形,有部分细胞呈三角状或星型,胞体中央有扁圆形细胞核。



A



B

A,原代成纤维细胞;B,传代成纤维细胞

A,Primary fibroblasts;B,Passaged fibroblasts

图 1 广灵驴耳缘组织成纤维细胞(100×)

Fig. 1 Fibroblast cell line on auricular skin of Guangling donkey (100×)

2.2 广灵驴成纤维细胞冻存前和复苏后的活率

广灵驴成纤维细胞冻存前及复苏后细胞活率见表 1。由表 1 可知,复苏后 24 h 贴壁率达到 80% 以上。冻存前原代细胞生长状态良好,冻存和复苏条件对细胞状态伤害较小,细胞活力已完全达到细胞复苏及后续试验的要求。

2.3 广灵驴成纤维细胞生长曲线的绘制

广灵驴成纤维细胞生长曲线见图 2。由图 2

可知,生长曲线呈典型的 S 型曲线。刚接种细胞时,细胞数量较少且生长缓慢;从第 2 天开始,细胞生长速度加快,到达对数生长期;第 6 天时,由于生长空间的限制,细胞生长速度变慢;第 7 天由于细胞数量过大,养分较少,出现细胞数量减少的现象。

2.4 广灵驴耳缘组织成纤维细胞染色体观察

广灵驴耳缘组织成纤维细胞中期分裂相染色体

见图 3。由图 3 可知,染色体数目 $2n=62$, 包含 30 对常染色体和 1 对性染色体。计数 100 个细胞的染

色体数, $2n=62$ 的细胞占大多数, 说明所建细胞系的遗传特性是稳定的。

表 1 广灵驴成纤维细胞冻存前及复苏后细胞数

Table 1 Numbers before and after cryopreservation of Guangling donkey fibroblast cells

项目 Items		第一次 The first	第二次 The second	第三次 The third
冻存前 Before cryopreservation	活细胞数 Number of live cells/($\times 10^5$ /mL)	86	76	85
	细胞总数 Number of total cells/($\times 10^5$ /mL)	88	78	86
	细胞活率 Cell viability/%	97.73	97.44	98.84
复苏后 After cryopreservation	活细胞数 Number of live cells/($\times 10^5$ /mL)	72	74	79
	细胞总数 Number of total cells/($\times 10^5$ /mL)	74	76	82
	细胞活率 Cell viability/%	97.30	97.37	96.34

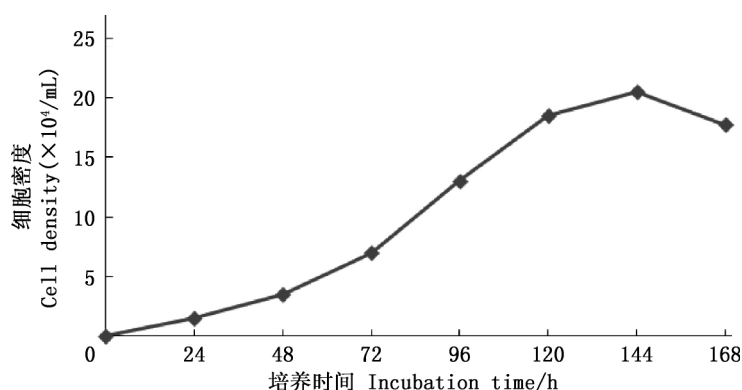


图 2 广灵驴原代成纤维细胞生长曲线

Fig. 2 Growth curve of fibroblasts from Guangling donkey

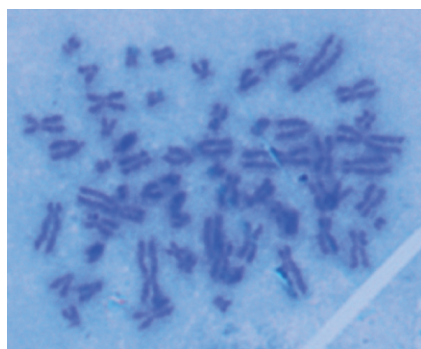


图 3 广灵驴成纤维细胞分裂中期染色体

Fig. 3 The fibroblasts mid-term chromosomes of Guangling donkey

3 讨论

成纤维细胞的贴壁速度和生长速度与供体动物年龄有密切关联,细胞活力随着动物年龄的增加而降低^[22]。本试验中,选用 1 月龄广灵驴的耳源组织进行组织块贴壁培养。对广灵驴的耳缘皮肤组织进

行采样,优点是对广灵驴的伤害较小,不会对其以后的生活造成影响,但缺点是极易发生污染。因此,在采样前应先对广灵驴耳部皮肤用 75% 酒精进行灭菌消毒,然后将所得皮肤组织在 75% 酒精中浸泡 30 s 后,再用 PBS 漂洗两次,以减少污染概率。酒精对细胞的危害较大,细胞在酒精中浸泡时间过长,在之后细胞培养中,细胞难以生长;时间太短则不能进行很好的杀菌。本试验中,耳部皮肤组织在酒精中浸泡 30 s 时,培养效果最好。

细胞的原代培养极易发生污染,因此,保证无菌操作极为重要。所用耗材均应为无菌耗材,且在操作过程中应尽量避免在细胞上方反复移动。细胞传代培养时,在细胞生长汇合率达到 70%~90% 时,应及时进行细胞传代。细胞传代太晚,细胞生长空间不足,且短时间内会产生大量的细胞代谢物,对后续细胞的生长产生不利影响。对于细胞冻存有多种方法,其区别是在 4℃ 平衡 40 min 后,是否要在

-20℃存放2~3 h。细胞在-20℃存放时,会形成冰晶,对细胞有较大危害^[24]。本试验跳过此步骤,细胞复苏活率相对较高。

在制备染色体切片时,低渗时间极其重要。低渗时间太短,染色体不能很好的分散,不适于计数分析;低渗时间太长,细胞膜较早破裂,容易发生染色体丢失的现象。秋水仙素浓度是影响试验结果的又一个重要因素^[22]。本研究选用不同的秋水仙素浓度进行试验,结果发现,秋水仙素浓度太低,会导致分裂相太少;秋水仙素浓度过高,染色体缩短严重,难以进行计数分析。

4 结 论

本研究采用组织块贴壁法对广灵驴的耳缘皮肤组织进行成纤维细胞的原代培养,并通过传代培养进行细胞纯化。通过研究生物学特性,确定所得的成纤维细胞系具有稳定的二倍体遗传特性,成功建立了广灵驴成纤维细胞系,为以后广灵驴的相关研究提供了理论依据和理想的生物学材料。

参考文献(References):

- [1] OSADA N. Genetic diversity in humans and non-human primates and its evolutionary consequences[J]. *Genes & Genetic Systems*, 2015, 90(3): 133-145.
- [2] 马省强. 家畜遗传资源多样性保护[J]. 西北民族学院学报(自然科学版), 2002, 23(4): 24-26.
MA S Q. Protection of genetic resources diversities in livestock[J]. *Journal of Northwest Minorities University (Natural Science)*, 2002, 23(4): 24-26. (in Chinese)
- [3] 张桂贤, 郭传甲, 李 桢, 等. 广灵驴及其开发利用价值[J]. 当代畜牧, 2002, 20(9): 26-27.
ZHANG G X, GUO C J, LI Z, et al. Guangling donkey and its development and utilization[J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2002, 20(9): 26-27. (in Chinese)
- [4] 梁 全. 广灵驴品种的保护与开发[J]. 中国畜牧业, 2015, 11(8): 53-54.
LIANG Q. Protection and development of Guangling donkey[J]. *China Animal Industry*, 2015, 11(8): 53-54. (in Chinese)
- [5] 张 攀, 马 杰, 韩冰毅, 等. 我国养驴业现状及趋势分析[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013, 29(1): 36-38.
ZHANG P, MA J, HAN B Y, et al. Analysis on the current situation and tendency of donkey raising in China[J]. *Zhongguo Xumu Shouyi Wenzhai*, 2013, 29(1): 36-38. (in Chinese)
- [6] 李艳红. 我国北方五个驴品种染色体特征的研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2005.
LI Y H. Studies on chromosomal characteristics in five donkey breeds of North China[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [7] 朱文进, 张美俊, 葛慕湘, 等. 中国8个地方驴种遗传多样性和系统发生关系的微卫星分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 398-405.
ZHU W J, ZHANG M J, GE M X, et al. Microsatellite analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of eight donkey breeds in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(2): 398-405. (in Chinese)
- [8] 李建国. 四个驴品种微卫星位点的遗传分析[D]. 太谷: 山西农业大学, 2004.
LI J G. Genetic analysis on microsatellite loci in four donkey breeds[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [9] 赵朝霞, 刘文忠, 朱文进, 等. 六个家驴品种 mtDNA D-Loop部分序列的遗传多样性分析[J]. 中国草食动物, 2008, 28(4): 3-5.
ZHAO C X, LIU W Z, ZHU W J, et al. Analysis on the genetic diversity of partial sequences in mitochondrial DNA D-loop of six donkey breeds[J]. *China Herbivores*, 2008, 28(4): 3-5. (in Chinese)
- [10] 李红梅. 六个驴品种血清蛋白多态性的研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2004.
LI H M. A study on serum protein polymorphism of six type ass breeds (lines) [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [11] SCOTT G M, RATNAMOHAN V M, RAWLINSON W D. Improving permissive infection of human cytomegalovirus in cell culture[J]. *Archives of Virology*, 2000, 145(11): 2431-2438. (in Chinese)
- [12] ZIMMERMANN T, KUNISCH E, PFEIFFER R, et al. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture-primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells[J]. *Arthritis Research*, 2001, 3(1): 72-76.
- [13] 罗 军. 水牛胎儿成纤维细胞系的建立及其生物学特性的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012.
LUO J. Establishment and biological characterization of fibroblast cell lines derived from buffalo (*Bubalus bubalis*) fetus [D]. Nanning: Guangxi University, 2012. (in Chinese)
- [14] GUASTALI M D, MONTEIRO B A, MAZIERO R R, et al. Influence of culture medium and age of bovine blastocysts in established colonies of embryonic stem cells[J]. *Journal of Stem Cells*, 2014, 9(4): 225-234.

- [15] 郝柱,王颖,彭静,等. 金华猪胎儿成纤维细胞系的建立与生物学特性分析[J]. 农业生物技术学报, 2012,20(5):536-542.
HAO Z, WANG Y, PENG J, et al. Establishment and biological characteristic analysis of fibroblast cell line for Jinhua pig[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012,20(5):536-542. (in Chinese)
- [16] 向杨,邢健生,白志明,等. 近交系五指山小型猪骨髓间充质干细胞分离培养及生物特性[J]. 中南大学学报(医学版), 2015,40(3):261-268.
XIANG Y, XING J S, BAI Z M, et al. Separation culture and biological characteristics analysis for bone marrow-derived mesenchymal stem cells from inbred line miniature pig of Wuzhishan[J]. *Journal of Central South University (Medical Science)*, 2015, 40(3):261-268. (in Chinese)
- [17] 吕春荣,王思宇,赵其毅,等. 龙陵黄山羊成纤维细胞系的建立及其生物学特性分析[J]. 中国草食动物科学, 2016,36(6):11-13.
LV C R, WANG S Y, ZHAO Q Y, et al. Establishment and the biological characteristics of fibroblast cell line in Yunnan Longling Yellow goat[J]. *China Herbivores*, 2016,36(6):11-13. (in Chinese)
- [18] LASSITER K, DRIDI S, PIEKARSKI A, et al. Bioenergetics in chicken embryo fibroblast cells; Evidence of lower proton leak in spontaneously immortalized chicken embryo fibroblasts compared to young and senescent primary chicken embryo fibroblast cells[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 2014,175:115-123.
- [19] 冯若飞,马忠仁,关伟军,等. 天祝白牦牛肾组织成纤维细胞系的建立与生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008,39(6):726-732.
FENG R F, MA Z R, GUAN W J, et al. Establishment and characteristics of Tianzhu White yaks kidney explant fibroblast [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(6): 726-732. (in Chinese)
- [20] 李天达,刘丑生,王志刚,等. 马头山羊成纤维细胞系的建立与生物学特性分析[J]. 生物工程学报, 2008, 24(12):2056-2060.
LI T D, LIU C S, WANG Z G, et al. Establishment of fibroblast cell line and its biological characteristics in Matou goat[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008,24(12):2056-2060. (in Chinese)
- [21] 张明. 大熊猫皮肤成纤维细胞系选育的初步研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2003.
ZHANG M. Primary studies on selective culturing and establishment of giant panda's cutaneous fibroblast line[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2003. (in Chinese)
- [22] 张静南. 马、驴和骡成纤维细胞培养、核型及其 G 带分析研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2011.
ZHANG J N. Fibroblast cell culture, karyotyping and G-banding of the chromosomes of horse, donkey and mule[D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2011. (in Chinese)
- [23] 梁仁敏,张伟永,杨子红,等. 小鼠中期染色体制备方法探讨[J]. 生物技术通讯, 2010,21(5):718-720.
LIANG R M, ZHANG W Y, YANG Z H, et al. Discussion of the methods for obtaining the mouse metaphase chromosomes [J]. *Letters in Biotechnology*, 2010,21(5):718-720. (in Chinese)
- [24] LI G C, LIU Y F, LIANG J. Isolation and protective effect in UW solution of human hepatocytes during cold storage[J]. *International Congress Series*, 2003, 1255:217-218. (in Chinese)

(责任编辑 晋大鹏)