

文章编号: 1003-8701(2007)04-0052-04

猪骨骼肌卫星细胞体外培养

李 冲¹, 刘 娣^{*1}, 丁大有¹, 毛冠平², 周佳勃²

(1.东北农业大学动物科学与技术学院, 哈尔滨 150030; 2.东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘 要: 探索和建立猪骨骼肌卫星细胞体外分离、培养及鉴定的技术方法。结果表明, 通过机械法与酶消化法相结合的方法, 15%血清完全培养液分离、培养细胞效果最好, 对培养细胞进行了形态观察、生长曲线测定、染色体分析。结果表明, 培养的细胞具有正常的大小、形态和染色体数目, 该方法所获得的猪骨骼肌卫星细胞可在体外稳定培养, 为有关实验提供充足的猪骨骼肌卫星细胞。

关键词: 猪; 骨骼肌卫星细胞; 细胞培养

中图分类号: S828

文献标识码: A

提高猪胴体瘦肉率是猪育种工作的重要目标之一, 瘦肉率则是许多相关基因相互作用的结果。为了研究相关基因在细胞水平的调控机制, 有必要建立猪骨骼肌卫星细胞体外培养体系。同时, 与现在普遍使用的体细胞核移植技术相比, 骨骼肌卫星以其稳定的遗传性和可培养性, 可以通过改造成为核供体细胞。本实验对体外培养骨骼肌卫星细胞进行了探索, 建立了稳定的猪骨骼肌卫星细胞系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

由香坊猪场提供的妊娠 3 周流产长白猪胚胎, DMEM、PBS 平衡盐溶液、胰酶、胎牛血清为 Gibco 公司产品, 秋水仙素购自 Sigma 公司, 硫酸链霉素、青霉素产自华北制药股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞分离、培养

在无菌间小心剥离出羊膜包裹的胚胎猪, 放在盛有 10%双抗 PBS 无菌的培养皿中, 在无菌操作台中小心刺破羊膜, 取出胚胎猪, 取 9 份大腿的骨骼肌各 1 cm³, 平均分成 A, B, C 3 组分别用含有 1%双抗的 PBS 清洗 3 次, 然后在含有和 PBS 的青霉素小瓶中剪成 1 mm³ 的小块, 离心弃上清后, A 组分别加入含有 10%、15%和 20%胎牛血清的完全培养基(含胎牛血清、1%青链霉素、1%谷胺酰氨)分散组织块置 39[°]、体积分数为 5%CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养。

B 加入 400 μL 的 0.25%胰酶液吹均, 放入 37[°] 培养箱消化 30 min。转移到培养瓶中, 分别加入含有 10%、15%和 20%胎牛血清的完全培养基, 置 39[°]、体积分数为 5%CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养。

C 加入 400 μL 的 0.25%胰酶液吹均, 放入 37[°] 培养箱消化 30 min, 加入 PBS 后过筛, 过筛后细胞悬液以 5 000 r/min 离心, 弃上清, 分别加入含有 10%、15%和 20%胎牛血清的完全培养基分散细胞置 39[°]、体积分数为 5%CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养。

培养 2 d 后换液培养, 2 mL PBS 洗两次, A、B、C 3 组加入上述完全培养液。

3 d 后观察细胞铺满 80%~90%时进行传代培养, 倒出旧培养液, PBS 清洗, 加入 300 μL 的胰酶在

收稿日期: 2006-12-08

作者简介: 李 冲(1982-), 女, 在读硕士, 主要从事细胞遗传研究。

通讯作者: 刘 娣

37℃培养箱中孵育1 min,用加入完全培养液分散细胞,细胞以 1×10^4 个/mL接种至25 cm²的培养瓶中,在37℃、5%CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养。

按上述方法消化稀释,细胞以 1×10^4 mL接种于放有消毒盖玻片的12孔培养板,每孔接种1 mL,于39℃、体积分数为5%CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养。

1.2.2 骨骼肌卫星细胞形态观察

细胞铺盖玻片的60%~80%时,取出盖玻片,用PBS清洗3次,每次5min,用冰冻丙酮-甲醇(1

1)室温固定30 min,进行常规吉姆萨染色后光镜观察。

1.2.3 细胞的冻存和复苏

将已全部贴壁的细胞用PBS清洗两遍,加入400 μL的0.25%胰酶液消化2 min。加入400 μL胎牛血清终止消化,再加入2.6 mL DMEM后转移到离心管中,1 000 r/min离心5 min弃上清液。向离心管中加入700 μL DMEM、200 μL胎牛血清、100 μL DMSO后转移到冻存管中封存。先将冻存管置于4℃40 min,再转入-20℃冰箱,2 h后移入-80℃低温冰箱中过夜。第2天转入液氮中保存。

复苏时先将冻存管从液氮罐中取出,迅速放入42℃的水浴中5 min。融化后,吸出细胞悬液注入到离心管中,加入DMEM到10 mL充分混合,1 200 r/min离心5 min,弃上清。加入完全培养液充分悬浮细胞,均匀的接种于培养瓶中,培养观察。

1.2.4 细胞生长曲线的绘制

将细胞消化稀释,以 2×10^4 个细胞接种于12孔培养板,每孔接种1 mL,于39℃、5% CO₂、95%空气、饱和湿度条件下培养,每隔24 h收集3孔细胞并计数,取平均值,每3 d换液1次,连续计数7d后绘制生长曲线。

1.2.5 骨骼肌卫星细胞的核型分析

取对数生长期的细胞,加秋水仙素到培养液终浓度为0.4 μg/mL,在培养箱中继续培养4 h。加入含有0.25%胰酶液消化液,细胞全部脱落后转移到离心管1 000 r/min,室温离心10 min,弃上清,收集细胞,用0.07 mmol/L氯化钾,混匀,低渗20 min;加入1 mL新鲜配制的固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),预固定2 min,1 000 r/min,室温离心8 min;弃上清,加固定液6 mL,混匀,室温放置30 min,1 000 r/min,室温离心8 min;弃上清,加固定液6 mL,混匀,室温放置20 min,1 000 r/min,室温离心8 min;弃上清,加上相当于细胞体积约10倍的固定液,混匀;取干净、冷藏于20℃的载玻片,滴细胞悬液100 μL于载玻片上,吹散,空气干燥,吉姆萨染色。

2 结果

2.1 细胞分离、培养

采用组织块与胰酶消化培养法,成功培养了猪骨骼肌卫星细胞。相差显微镜下对细胞形态进行了观察,培养的原代细胞大部分呈梭形,具有方向性,其中夹杂有少量呈鹅卵石状的上皮细胞,但传代两次后成骨骼肌卫星细胞生长已占优势。

本研究发现,不同血清质量浓度对细胞增殖是有影响的,在原代培养时,高浓度的血清含量有利于细胞的生长,但15%血清不仅有利于细胞生长与增殖,还能有效控制细胞的融合。

2.2 细胞形态学观察

吉姆萨染色后光镜观察显示细胞梭形,胞核为深紫色,胞浆为淡紫色,呈长轴平行排列,具有明显的方向性(图1)。

2.3 冻存与复苏

表1 细胞分离、培养

	A 机械法	B 机械与酶消化结合法	C 酶消化法
原代培养细胞长满时间(d)	4	3	7

表2 细胞培养

	10%血清	15%血清	20%血清
传代后培养3 d计数(个)	5×10^4	7×10^4	10×10^4

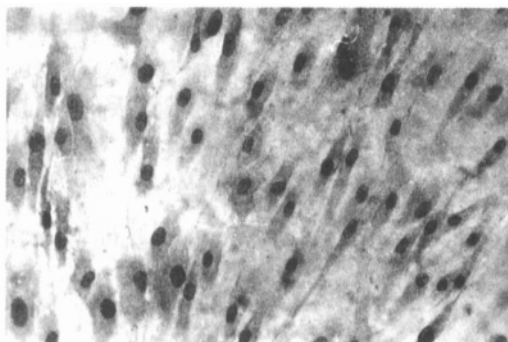


图 1 吉姆萨染色

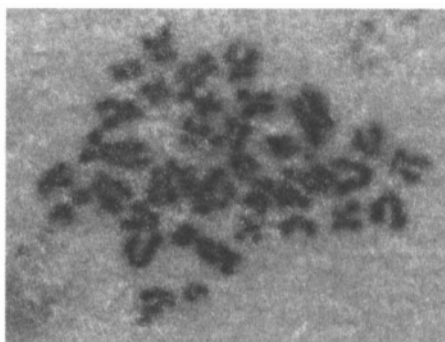


图 2 核型分析

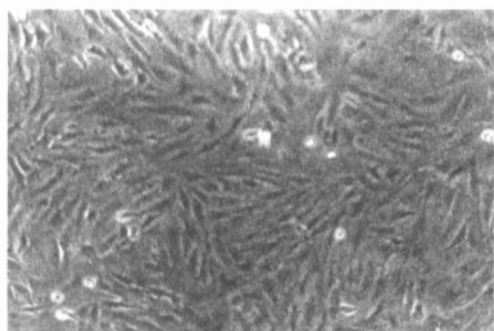


图 3 细胞冻存前

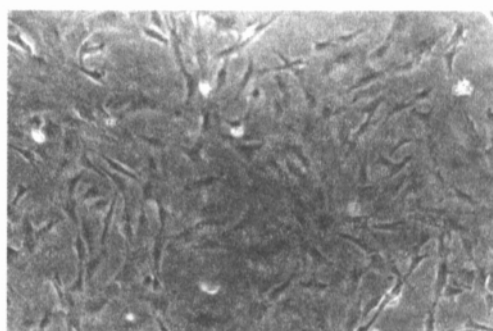


图 4 细胞复苏后

为保证细胞最大的存活率,经反复实践,采用了对多数细胞系适用的“慢冻快复苏”的方法^[1,2]。冻存液中含 10%的 DMSO, 90%的胎牛血清,细胞复苏时采用 42℃ 水浴快速复温法,使之迅速通过细胞最易受损伤的 -5~0℃,结果表明,采用该法冻存复苏细胞的成活率大于 90%,细胞复苏后仍具有正常的形态和结构(图 3, 图 4)。

2.4 细胞生长曲线

以培养天数为横坐标,细胞数为纵坐标绘制了猪骨骼肌卫星细胞生长曲线图(图 5),以 2×10^4 mL 接种于 24 孔培养板,细胞于第 5 d 长满。生长曲线(潜伏期、指数分裂期、平台期分别为 0~2 d、2~6 d 和 6~7 d)显示培养细胞具有正常的分裂增殖特性,没有转化倾向,反映培养条件较为适合。

2.5 核型分析

统计分析了培养细胞 10 个分裂相的染色体条数,图 2 为其中一个分裂相。统计结果表明,90% (9/10)的细胞具有正常的染色体数目,染色体核型分析显示有 36 条染色体为猪源性。

3 讨 论

骨骼肌卫星细胞是骨骼肌细胞的干细胞,为可增殖细胞,可发育为成肌细胞。由于在生长中的肌肉组织或具有再生能力的肌肉组织中含有大量骨骼肌卫星细胞,故体外培养骨骼肌细胞一般取材于胚胎动物或新生动物肌肉组织。

动物组织细胞培养技术已成为生物学、医学与药学研究中最有效的方法之一。一般培养方法有两

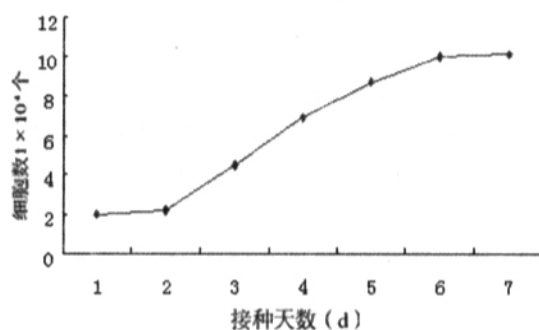


图 5 传代细胞生长曲线

种:即是组织块贴壁培养法和酶消化分离单细胞接种培养法^[3,4],本实验采用了两种方法相结合取得了很好的细胞分离效果。单独的组织块培养法在组织的周围游离生长细胞^[5,6],在培养 4 d 后细胞可以长满。但是采用组织块贴壁培养法和酶消化分离细胞培养法相结合,在培养 3 d 后细胞就会长满,而酶消化法则需要 7 d 细胞才能长满。通过实验证明本实验的方法优于单独的培养方法。

培养细胞形态为梭形,并呈长轴平行排列,具有明显的方向性,这与其在体内的排列方式,即与肌纤维长轴平行的情况相符合。肌细胞要完成功能性收缩,要求细胞的排列必须具有同向性,杂乱无章地排列既不能表现力,也不能表现位移。骨骼肌卫星细胞的按方向排列和融合的倾向是这种细胞内在的功能特性之一^[7]。

实验使用胎牛血清的培养液进行培养,结果发现,15%的胎牛血清培养液优于 10%、20%的胎牛血清培养液。虽然 20%的血清培养基使细胞生长很快会使细胞出现“疯长”现象,不能有效控制细胞融合时间,而 15%的血清培养液利于细胞生长并能控制细胞融合时间。

对于用来转染的细胞,要求质量较高,特别是细胞的遗传特性,骨骼肌卫星细胞的数量通过多次传代获得,但细胞经多次传代后会因培养条件的变化、X 射线、紫外线等影响染色体变异^[8],主要表现为染色体数目变异(整倍体或非整倍体)和染色体结构变异(双着丝点、断片及染色体破裂),使细胞生物学性状发生了变化。所以很有必要对细胞的染色体分析。染色体分析表明,我们培养的猪骨骼肌卫星细胞 90%以上具有正常的染色体数目,为以后的实验提供了前提条件。

参考文献:

- [1] 汪德耀.细胞生物学指导[M].北京:人民教育出版社,1983:345-354.
- [2] 章静波.细胞生物学实验方法与技术[M].北京:高等教育出版社,1990:4-10.
- [3] 牛家强,支海兵,许亚芬.不同方法制备鸡胚成肌细胞的比较实验[J].中国家禽,2003,25(5):11-12.
- [4] Hu WS, et al .Large-scale mammalian cell culture[J].Curry Opine Biotech, 1997,33(8):148-153.
- [5] 关伟军,马月辉.濒危畜禽品种细胞库的构建与鉴定[J].中国农业科技导报,2002,6(5):77-79.
- [6] 任芳丽.牛皮肤成肌细胞的体外培养与冻存[J].黄牛杂志,2002,28(1):7-10.
- [7] 徐蓬顾.兔骨骼肌卫星细胞的体外培养及生长特性的研究[J].实用口腔医学杂志,2000,1(16):1-3.
- [8] 陈宜峰,罗丽华,单祥年,等.中国灵长类染色体[M].北京:科学出版社,1981:182-185.

Culture of Porcine Myogenic Satellite Cells

LI Chong¹, LIU Di¹, DING Da-you¹,
MAO Guan-ping², ZHOU Jia-bo²

(1. College of Animal Sciences, Northeast Agricultural University;

2. College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The experiment was carried out for searching and establishing the method of culturing of myogenic satellite cells of porcine. Results demonstrated that myogenic satellite cells derived from porcine were successfully cultured with a normal tissue culture combining with enzyme digesting method and DMEM of 15% serum. The cultured cells were analyzed by morphology, chromosomes and cell growth curve. These cultured cells were typical myogenic satellite cells with normal morphology and chromosomes number. The culture and characterization of myogenic satellite cells can be provided for related experiments.

Key words: Porcine; Myogenic satellite cells; Cell culture.