研究报告

ICR 胎鼠成纤维细胞培养方法的优化

王 英,刘石磊,刘振伟,刘云海,倪和民, 邓桂馨, 郭 勇

(北京农学院动物科学技术学院,北京 102206)

【摘要】 **目的** 确定胎鼠成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts,MEF)最优制备方法,为 MEF 的制备节省时间与原材料。**方法** 取胎鼠组织,采用组织块培养法、胰酶消化培养法、胰酶消后组织块培养法进行分离培养 MEF,比较观察 MEF 纯度、生长速度、细胞形态等指标,筛选最节省时间与原料的一种培养方法。**结果** 组织块培养法所得 MEF 生长速度慢,细胞体积小,杂细胞少,纯化所需传代次数少。胰酶消化培养法的 MEF 生长速度快,体积较大,杂细胞数量多,纯化所需传代次数较多。胰酶消化后组织块培养法的消化后组织块的成纤维细胞生长速度介于前两种方法之间,细胞体积和形态与组织块法培养结果相似,杂细胞数量较少,纯化所需传代次数少。**结论** 胰酶消化结合组织块培养法能最大限度的利用材料,在短时间内可制备大量 MEF,满足核移植试验与作为饲养层细胞的需求。因此,胰酶消化结合组织块培养法是 MEF 最优培养方法。

【关键词】 ICR 小鼠;胚胎成纤维细胞;培养

【中图分类号】R33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2012)08-0048-03

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856.2012.008.011

Optimization of the Culture Method of ICR Mouse Embryonic Fibroblasts

WANG Ying, LIU Shi-lei, LIU Zhen, LIU Yun-hai, NI He-min, DENG Gui-xin, GUO Yong

(College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate a most suitable method for harvesting mouse embryonic fibroblasts (MEF)). **Methods** Three different protocols including tissue only, cell-trypsin digestion, and tissue-trypsin digestion were applied for harvesting and culturing MEF. The MEF growth speed and cell morphology were also compared and analyzed respectively among the 3 methods. **Results** The cell proliferation was slow, cell size was small, but cells of other types were very few in the tissue only method, but the duration of purification was short. In the cell-trypsin digestion method, the cell proliferation was fast, cell size was somewhat large, but there were a little bit more cells of other types and the duration of purification was somehow longer. Finally, in the tissue-trypsin digestion method, the cell proliferation was very slow, cell size was very small, but there were also very few cells of other types. The duration of purification was very short. **Conclusions** Our findings indicate that the most efficient method for collecting and culturing mouse embryonic fibroblasts is the protocol of tissue-trypsin digestion.

【**Key words**】 ICR mouse; Embryonic fibroblast; Culture

胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESC)是来源于早期胚胎内细胞团和原始生殖细胞的具有发育全能性的一类细胞[1-4]。诱导性多能干细胞(induced pluripotent cells,iPSC)是成熟的体细胞经诱导后又转变为具有全能性的细胞[5-8]。ESC、iPSC 体外增殖培养过程中首要解决的问题是抑制

[**基金项目**]国家自然基金面上资助项目(31072185,30871836),家禽产业技术体系北京市创新团队项目(2011,饲料营养功能)。

[**作者简介**]王英(1985-),女,硕士研究生,研究方向:动物产科及胚胎工程。E-mail: izbmyqdh@163.com 。

[**通讯作者**]郭勇(1963-),男,教授,研究方向:畜禽生殖生理与动物生物技术。E-mail: y63guo@126.com.

它们的分化。虽然在培养基中添加一些分化抑制因子能起到一定作用,但是效果不是很理想。成纤维细胞能够分泌成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, a-FGF, b-FGF)等生长因子和白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)等细胞分化抑制因子,具有能够改善接种细胞生长环境、促进接种细胞增殖同时抑制细胞分化的作用,已经成为培养 ESC、iPSC 的主要饲养层细胞。另外,自 1996 年多利羊诞生以来,体细胞克隆已经成为了科学界保护濒危物种、保存优良种畜、产生转基因动物等的主要方法[9]。而成纤维细胞借助取材方便、易于铺层、容易生长等优势成为体细胞克隆的首选供体细胞。常规成纤维细胞培养主要采用组织块法与胰酶消化法。前者成纤维细胞原代生长所需时间较长;而后者生长出的原代细胞中杂细胞较多,需多次传代才能得到纯化的成纤维细胞。两种培养成纤维细胞的常规方法均不能满足短期内对饲养层细胞的大量需求;为此本实验通过比较三种不同 MEF 的培养方法,从而确定一种 MEF 最优培养方法,进而能更快更好地为小鼠干细胞制备与核移植实验提供大量的饲养层细胞与供体细胞。

1 实验动物与试剂

1.1 动物

6 ~ 8 周龄 ICR 小鼠购自维通利华公司(生产许可证号码:SCXK - (京)2006 - 009),自然光照环境培养。

1.2 试剂

DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Sigma 公司),0.25% 胰蛋白酶 - 0.02% EDTA(Sigma 公司),DPBS(Sigma 公司),二甲基亚砜(Sigma 公司)。DMEM 培养液 1 L:13.4 g DMEM 粉末,3.7 g $NaHCO_3$,0.063 g 青霉素,0.10 g 链霉素,10% 胎牛血清。

2 实验方法

2.1 ICR 小鼠胚胎的获得

将正常发情 6 ~ 8 周龄雌鼠与公鼠 2∶1 合笼,次日上午 9∶00 检查阴栓,阳性雌鼠单独饲养,并记为妊娠 0.5 d。

2.2 MEF 原代培养

在 13.5 d 时,将怀孕母鼠脱颈处死,用酒精擦拭腹部皮肤,无菌开腹,剪下子宫。于超净台中,用 DPBS 将子宫血洗净后剪开子宫、胎膜,释放出胎鼠,用 DPBS 将胎鼠洗净,去除胎鼠头尾、四肢、内脏,将剩余部分组织用 DPBS 洗净后剪成肉泥状。将组织分为两份。

2.2.1 组织块培养法:用胎牛血清润湿 60 mm 培养皿,将一份组织均匀分散在培养皿中(每个培养皿约接种一只胎鼠组织)。吸净培养皿中多余血清后将接种组织的培养皿倒置放入 37℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中约 3 h。取出培养皿,每个培养皿加 DMEM 培养液 3 mL 后,放入培养箱继续培养。

2.2.2 胰酶消化法培养法:将剩余组织放入 10 mL 玻璃离心管中,加入胰酶溶液,液面没过组织块,用吸管吹打混匀组织块。将离心管放入培养箱静置 5 min,取出加入同胰酶等体积的 DMEM 培养液,用吸管混匀以终止消化,在培养箱继续静置 5 min 后,将上清转入另一干净的 10 mL 玻璃离心管中。按照上述方法将组织消化 3 次,收集上清液。

将装有上清的离心管以 1 000 r/min 离心 10 min 或1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液。用 DMEM 培养液悬浮沉淀细胞后,将细胞接种于 60 mm 培养皿中(每个培养皿约接种一只胎鼠消化下的细胞),每个培养皿补培养液至 2 mL,后放入 37℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱进行培养。

2.2.3 胰酶消化后组织块培养法:将胰酶消化后剩余的组织块用同 2.2.1 的方法移入培养皿进行培养。

2.3 MEF 传代培养

待细胞铺满培养皿底 80% ~ 90% 时,进行传代培养。将培养皿中培养液吸净,用 DPBS 洗 3 遍,每个培养皿用 250 μL 胰酶消化约 1 ~ 1.5 min,镜下观察细胞大部分变圆但没有脱离培养皿底时,加 1 mL DMEM 培养液终止消化。将细胞从皿底吹起(对于较大的组织块,待同细胞一块消化下后将其用镊子除去),然后按 1∶2或 1∶3进行传代培养,接种密度为 1.5×10^5 个/mL。之后每 2 ~ 3 d 传代 1 次。

2.4 MEF 冻存与复苏

细胞纯化后,待细胞铺满培养皿底 80% ~ 90% 时,进行细胞冻存。根据传代方法进行消化,然后将含有细胞的培养液移入 10 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 10 min 或1 500 r/min 离心 5 min,离心完后弃上清液。用单纯的 DMEM 液重悬细胞,移入冻存管中,然后逐滴加入 4℃ 预冷 DMSO∶FBS 混合液(细胞冻存密度约为 1×10^6 个/mL,DMSO∶FBS∶单

纯 DMEM 液 = 1∶2∶7)。按以下程序冻存:4℃ (30 ~40) min, -20℃ (1.5 ~2) h, -80℃ 过夜,最后液氮中长期保存。复苏时,从液氮中取出冻存的细胞迅速放入 37℃水浴中,不断摇晃冻存管使冻存液 1 ~2 min 之内融化,75% 酒精消毒管外壁。离心去上清,用 DMEM 培养液重悬细胞,移入 60 mm 培养皿中进行培养。

3 实验结果

3.1 组织块培养法

细胞生长速度最慢,20 d 左右才有细胞从组织块周围爬出,约 1 个月才可传代;长出的杂细胞最少,细胞体积较小,细胞形态几乎均为典型的梭形,细胞彼此连接成片,整体上观察如水流状或放射状(如图 1)。传代 2 ~3 次可得到纯化的成纤维细胞。

3.2 胰酶消化法培养法

细胞在 2 ~3 h 内即可贴壁生长,繁殖速度最快,如果细胞密度合适,2 ~3 d 即可传代 1 次;杂细胞数量最多;贴壁细胞密度小时,细胞体积较大,多为栅栏状、有较大触角等;细胞密度适宜时,细胞呈梭形;如果细胞密度过大,细胞则呈鹅卵石状(如图 2)。传代 3 ~4 次可得到纯化的成纤维细胞。

3.3 胰酶消化后组织块培养法

次日即有细胞从组织块爬出生长,15 d 左右即可传代;杂细胞种类较少;细胞体积同单纯的组织块培养方法得到的细胞体积相似;细胞形态也多为典型的梭形,细胞连接成片,整体上看如水流状或放射状(如图 3)。传代 2 ~3 次即可获得纯化的成纤维细胞(图 1 ~3 见封底)。

4 讨论

ICR 小鼠是国际通用的价格比较低廉的一种封闭群小鼠,因其遗传性能稳定、适应性强、繁殖能力强、实验重复性好,目前被广泛选为实验用鼠。前人实验证明,12.5 d ~14.5 d[10-12] 胎龄的小鼠适于制备 MEF;但是 12.5 d 小鼠胚胎个体较小,不利于彻底去除头、尾、四肢、内脏;14.5 d 小鼠个体较大,骨骼肌开始发育,不利于组织的剪碎与细胞培养;13.5 d 小鼠胚胎从胚胎体积、各组织发育程度等方面考虑都最适宜用于 MEF 培养。本实验通过比较 3 种不同培养方法培养 MEF,观察比较 MEF 的生长速度、细胞形态、纯化所需时间等来确定一种最快、最优质的培养 MEF 细胞的方法,为 ESC、iPSC 与核移植试验提供足够的符合要求的饲养层细胞与供体细胞。

组织块培养法只是用物理方法将皮肤制成组织块,影响细胞生长的细胞间质不能被去除,因此,细胞的生长速度比较慢,接种 20 d 后,组织块周围才有细胞长出。同时,由于细胞间质对细胞生长的妨碍,大部分杂细胞会因为营养物质不充足和代谢产物不能及时排除而死亡,而成纤维细胞比较容易生长,不易受这些因素的影响,因此,组织块法培养出的 MEF 杂细胞较少,传代 2 ~3 次即可得到纯化的 MEF。

胰酶消化法是利用胰蛋白酶去除妨碍细胞生长的细胞间质如基质、纤维等,使细胞不聚集在一起,从而形成悬液,利于细胞从外界吸收养分和排除代谢产物。接种后细胞在几小时内即可贴壁生长,由于胰蛋白酶的消化作用,使各类细胞都能更好地生长,所以杂细胞数量较多,传代 3 ~4 次可将杂细胞去除。

胰酶消化后组织块培养法是将消化后剩余的组织块按组织块培养法的操作培养 MEF。接种后 24 h 即有细胞从组织块爬出生长,15 d 即可传代;杂细胞种类较少,传代 2 ~3 次可得到纯化的 MEF。

鉴于上述培养结果,胰酶消化法结合消化后组织培养方法能在最短的时间内获得最大量纯化的 MEF,并且能够充分利用实验材料,减少浪费、缩短培养周期。

参考文献:

[1] 汪河海, 范必勤, 钟声. 研究哺乳动物早期胚胎发育与分化的 ES 细胞途径[J]. 生物工程进展, 1999, 19(2):61 -64.

[2] 张廷龙, 董雅娟, 柏学进, 等. 昆明小鼠 ES 细胞的分离培养及鉴定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(13):5380 -5383.

[3] 汪河海, 刘红林, 钟卉, 等. 小鼠胚胎干细胞(ES 细胞)培养体系的建立[J]. 江苏农学院学报,1997,19:8 -24.

[4] 王英泽, 贾青, 常万存, 等. 哺乳动物 ES 细胞与 EG 细胞研究进展[J]. 河北农业大学学报, 2002, 5:236 -239.

[5] 李月, 常城. 诱导多能干细胞新进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(19):9950 -9952.

[6] 山中伸弥. 特定因子诱导多能干细胞[J]. 生命科学, 2010, 22(3):259 -261.

[7] 袁源钟. 诱导多能干细胞的研究进展[J]. 临床新进展, 2010, 26(6):897 -899.

[8] 成德, 雷蕾, 卢智娟, 等. 诱导多能干细胞(iPS)的诱导培养与鉴定[J]. 生物工程学报, 2010, 26(4):421 -430.

(下转第 55 页)

仪器设备,具备可视化判定结果的能力,可作为一种高效检测 CDV 的手段,广泛应用于 CDV 的诊断和流行病学调查等相关研究。

参考文献:

[1] Soma T, Ishii H, Hara M, et al. Comparison of immunoperoxidase plaque staining and neutralizing tests for canine distemper virus [J]. Vet Res Commun, 2001, 25(4): 311 - 325.

[2] Appe IMJ, Yates RA, Foley GL, at al. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America [J]. J Vet Diagn Invest, 1994. 6: 277 - 288.

[3] Hoyland JA, Dixon JA, Berry JL, et al. A comparison of in situ-hybridization, reverse transcripitase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ-RT-PCR for detection of canine distemper virus RNA in Paget's disease [J]. J Virol Methods, 2003. 109(2):253 - 259.

[4] Jozwik A, Frymus T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper [J]. Vet Res Commun, 2005, 29(4): 347 - 359.

[5] 肖定福, 张汇东, 李文平, 等. RT-PCR 检测宠物犬的犬瘟热病毒 [J]. 经济动物学报, 2005, 9 (4) :221 - 224.

[6] Frisk AL, Konig M, Moritz A, at al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37:3634 - 3643.

[7] Doo KIM, Jeoung SY, So-Jeo AHN, at al. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs [J]. J. Vet Med Sci, 2006, 68(8):877 - 879.

[8] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et. al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):E63.

[9] Cho HS, Kang JI, Park NY. Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification [J]. J Vet Diagn Invest, 2006, 18(1):81 - 84.

[10] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H. Rapid diagnosis of H5N1 avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin gene-specific loop-mediated isothermal amplification method [J]. Vaccine,2006, 24(44 - 46): 6679 - 6682.

[11] Poon LL, Wong BW, Ma EH, et. al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting Plasmodium falciparum DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification [J]. Clin Chem, 2006, 52(2):303 - 306.

[12] Pham HM, Nakajima C, Ohashi K, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4):1646 - 1650.

〔修回日期〕2012-05-24

(上接第 50 页)

[9] 匡颖, 徐国江, 王龙, 等. 哺乳动物体细胞克隆技术的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(12):23 - 46.

[10] 邵晓云, 黄岚珍, 孙莉, 等. 昆明小鼠胚胎成纤维细胞的分离与培养[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(22):4226 - 4227.

[11] 方驰华, 胡海北, 郝建志, 等. ICR 小鼠胚胎成纤维细胞的分离培养及饲养层制备[J]. 2010, 14(23):4299 - 4302.

[12] 盛利琴, 叶荣, 韩甫, 等. 昆明小鼠胚胎成纤维细胞的分离与体外培养[J]. 苏州大学学报(自然科学版), 2007, 23(1):83 - 86.

〔修回日期〕2012-05-07