

一种提高体外培养细胞中期分裂相的新方法

侯颖^{1,2}, 谭立新¹, 李文蓉¹, 牛志刚¹, 郭志勤¹

(1. 新疆畜牧科学院农业部家畜繁育生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

摘要: 为了提高体外培养细胞中期分裂相, 用黄牛胎儿成纤维细胞系(YFF)和西门塔尔小牛成纤维细胞系(CNF)为实验材料, 先经4℃低温休克再用秋水仙素处理后制备染色体, 比较了不同低温休克处理时间获得的中期分裂相百分率, 并运用该方法对20代内YFF和CNF核型变异进行了分析。实验发现, YFF和CNF经低温休克中期分裂相百分率显著高于对照组($P < 0.05$)。其中, 20 h低温组中期分裂相(31.7%和40.2%)高于对照组(4.7%和6.4%)5倍以上($P < 0.01$)。实验结果表明, 4℃低温休克法是一种提高体外培养细胞中期分裂相的简便方法, 适于监测体外培养细胞核型变异。

关键词: 4℃低温休克; 中期分裂相; 牛成纤维细胞; 体外培养

中图分类号: Q952

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)03-0457-04

A Novel Method for Increasing the Number of Metaphase Cells Cultured *in vitro*

HOU Ying^{1,2}, TAN Li-Xin¹, LI Wen-Rong¹, NIU Zhi-Gang¹, GUO Zhi-Qin¹

(1. Key Laboratory of Livestock Reproduction and Breeding Biotechnology of Ministry of Agriculture, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China; 2. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: To increase the number of metaphase cells cultured *in vitro*, two bovine fibroblast cell lines(YFF and CNF) were frozen at 4℃ for different length of time prior to colchicine treatment, and then chromosomal specimen were prepared. The percentage of metaphase cells was examined under conditions above. Using this method, the variation rate of karyotype of YFF and CNF subcultured up to passage 20 were also analyzed. It was found that the percentage of YFF and CNF metaphase cells in treatment group were significantly higher than that in control group($P < 0.05$), and the number of YFF and CNF metaphase cells obtained in 20 h treatment group were increased more than 5 fold as many as that in control group($P < 0.01$), 31.7% and 40.2% vs 4.7% and 6.4%, respectively. These data suggest that the method of freezing at 4℃ could be used for increasing the number of metaphase cells *in vitro* conveniently, and analyzing the variation rate of karyotype of cultured cells efficiently.

Key words: freezing at 4℃; metaphase cells; bovine fibroblasts; culture *in vitro*

成纤维细胞是一种用于体细胞克隆的供体细胞, 由于其取材方便、安全^[1], 在核移植技术研究中

广泛应用^[2~6]。供体细胞必须是完整的二倍体, 以保证克隆后代的遗传性状。但体外培养过程会引起

收稿日期: 2004-05-26; 修回日期: 2004-09-07

基金项目: 新疆高技术研究发展计划项目。家畜乳腺生物反应器关键技术平台的建立与应用(批准号: 200311105)[Supported by High Technology Research and Development Program of Xinjiang. Establishment and Application of Key Technology of Livestock Mammary Gland Bioreactor(No. 200311105)]

作者简介: 侯颖(1969—), 女, 江苏人, 硕士, 研究方向: 细胞培养和转基因研究。Tel: 0991-5629827; E-mail: houying69@hotmail.com

通讯作者: 李文蓉(1969—), 女, 江苏人, 副研究员, 博士, 研究方向: 生物化学与分子生物学。Tel: 0991-4832343; E-mail: xjlwr@hotmail.com

细胞遗传变异^[7],因此核移植前需要分析细胞核型。获得大量中期分裂相是制备优良染色体标本的先决条件。体外培养细胞在指数生长期时分裂相虽多,但都处于不同分裂期,其中处于分裂中期的细胞数并不多。常用的秋水仙素法^[8],通过阻止纺锤体形成使细胞停止在分裂中期,从而截获更多的中期分裂相。然而,随着秋水仙素剂量加大或作用时间加长,在获得更多中期分裂相的同时,也会使染色体缩短甚至破碎,影响结果观察。本实验采用 4℃ 低温休克法,获得的牛成纤维细胞中期分裂相比传统秋水仙素法提高 5 倍以上。同时,采用摇落法选择收获分裂期细胞,使制片后中期分裂相比比例更高,更易观察。目前,有关 4℃ 低温休克法提高体外培养细胞中期分裂相的研究尚未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

牛成纤维细胞 CNF 和 YFF,由新疆农业部家畜繁育生物技术重点开放实验室提供。细胞培养皿购自 Corning 公司。

1.1.2 试剂和仪器

DMEM 高糖培养基,优级胎牛血清,秋水仙素等试剂分别购自 Gibco、Hyclone 和 Sigma 公司。其余试剂均为国产分析纯。CHS 光学显微镜和 IMT-2 倒置相差显微镜为 Olympus 公司产品, BB16UV/BB5060UV CO₂ 培养箱为 Heraeus 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 低温休克法制备染色体标本

取对数生长期牛成纤维细胞 CNF 和 YFF,以 10⁵ 细胞/mL 的密度接种于含 2 mL DMEM + 10% FBS 的 35 mm² 细胞培养皿中,于 37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱培养。待细胞汇合至 60%~70%,置 4℃ 冰箱低温休克处理一定时间,吸除培养液,加入含 0.1 μg/mL (CNF) 和 0.06 μg/mL (YFF) 秋水仙素的 DMEM。继续培养 3 h 后,采用摇落法,横向反复摇动培养皿收获上清中分裂期细胞,按常规空气干燥法^[9]制片, Giemsa 染色后镜检。

1.2.2 传统秋水仙素法制备染色体标本

生长至 60%~70% 汇合的 CNF 和 YFF 细胞,不经低温休克处理,分别加入终浓度 0.1 μg/mL 和 0.06 μg/mL 秋水仙素的 DMEM 培养,其他同上。

1.2.3 低温休克处理时间对细胞中期相的影响

将汇合 60%~70% 的 CNF 和 YFF 细胞随机分成对照组和低温组,低温组根据处理时间分为 4 个亚组。对照组,不经 4℃ 处理直接加秋水仙素培养 3 h;低温组分别置 4℃ 低温休克处理 5 h、10 h、15 h、20 h 后加秋水仙素培养 3 h。高倍镜下每片随机选取 10 个视野计数中期相细胞,并计算中期分裂相百分率。中期分裂相百分率 = 中期细胞数 / 观察细胞数 × 100%。

1.2.4 低温休克法在细胞核型变异分析中的应用

10、15、20 代 CNF 和 YFF 细胞按低温休克法制备染色体,选取 100 个分散良好的中期分裂相,统计染色体畸变类型和频率数目,并计算核型变异率。

1.2.5 数据统计分析

统计结果以 SPSS11.0 软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 低温休克处理时间对细胞中期相数目的影响

从表 1 可见, YFF 和 CNF 低温组与对照组相比,中期分裂相百分率均有显著差异 ($P < 0.05$)。随着低温休克处理时间延长, CNF 和 YFF 中期分裂相百分率均增高。在 20 h 低温组中,细胞中期分裂相百分率 (YFF 31.7% 和 CNF 40.2%) 最高,高于对照组 (YFF 4.7% 和 CNF 6.4%) 5 倍以上 ($P < 0.01$)。根据分裂期细胞胞体呈圆球形,折光性强的特点,在倒置相差显微镜下可见, YFF 经低温休克处理后分裂期细胞明显多于对照组 (图 1、图 2),制片后获得的中期分裂相比比例也较高 (图 3)。



图 1 低温处理 17 h YFF 分裂期细胞 (×100)
Fig. 1 Mitotic cells of YFF after freezing for 17 h (×100)



图 2 YFF 对照组分裂期细胞($\times 100$)

Fig.2 Mitotic cells of YFF in control group ($\times 100$)



图 3 低温处理 17 h YFF 中期分裂相细胞($\times 200$)

Fig.3 Metaphase cells of YFF after freezing for 17 h($\times 200$)

2.2 低温休克法在细胞核型变异分析中的应用

采用低温休克法获得的大量中期分裂相,发现 20 代内胎牛成纤维细胞 YFF 保持二倍体核型(图 4)。而小牛成纤维细胞 CNF 10 代内呈二倍体核型,但培养至 15 代后出现三倍体、四倍体核型,20 代细胞核型变异率(15%)高于 15 代(9%)($P > 0.05$,表 2)。这说明体外长期传代培养的胎牛成纤维细胞 YFF 染色体能够正常复制和分裂。



图 4 YFF 染色体($2n, \times 1000$)

Fig.4 The chromosome of YFF ($2n, \times 1000$)

表 1 不同低温休克处理时间对细胞中期相数目的影响

Table 1 Effect of different length of freezing time on the number of metaphase cells

细胞 Cell	低温时间 Length of freezing time(h)	观察细胞数 No. of cells observed	中期分裂相百分率 Percentage of metaphase cells (%)
YFF	0	321	4.7(15/321) ^a
	5	305	9.5(29/305) ^b
	10	246	22.0(54/246) ^c
	15	231	27.3(63/231) ^c
	20	312	31.7(99/312) ^c
CNF	0	296	6.4(19/296) ^a
	5	554	10.5(58/554) ^b
	10	664	27.6(183/664) ^c
	15	428	37.6(161/428) ^d
	20	498	40.2(200/498) ^d

注:同列内不同上标者差异显著, $P < 0.05$ 。

Note: Values with different superscripts represent significant differences ($P < 0.05$).

表 2 不同代次牛成纤维细胞核型变异率比较

Table 2 Comparison of variation rate of karyotype of bovine fibroblasts at different passages

细胞 Cell	培养代次 Passage	染色体数目 No. of chromosome		核型变异率 Variation rate of karyotype (%)
CNF	10	2n	100	0
	15	2n	91	9(9/100) ^a
		3n	9	
		2n	85	
	20	3n	10	15(15/100) ^a
4n	5			
YFF	10	2n	100	0
	15	2n	100	0
	20	2n	100	0

注:同列内不同上标者差异显著, $P < 0.05$ 。

Note: Values with different superscripts represent significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论

骨髓细胞、外周血淋巴细胞和体外培养细胞是动物染色体制备最常用的 3 种途径。骨髓细胞分裂指数高,淋巴细胞由于有丝分裂刺激剂的作用,二者

均能获得丰富的中期分裂相。但大多数体外培养细胞在指数生长期时,细胞分裂指数在 5% 以内。虽然传统的秋水仙素法对提高体外培养细胞中期分裂相有一定效果,但尚不能满足研究需要。为此,本实验利用 4℃ 低温休克法来提高体外培养细胞中期分裂相,其原理是低温休克可逆地抑制 DNA 合成而不影响其他期细胞沿细胞周期运转,使细胞群体同步于 S 期,此时再用秋水仙素处理来抑制细胞有丝分裂装置形成,可将细胞阻断于分裂中期。另外,根据分裂期细胞变圆,应力纤维和细胞质微管消失^[10],稍加振荡即可脱落的特点,采用摇落法这一简易方法来选择性收获分裂期细胞,防止了大量间期细胞混入,起到了类似提高分裂相比例的效应。

本实验结果表明,与对照组秋水仙素法相比,低温组获得的牛成纤维细胞中期分裂相显著高于前者 ($P < 0.05$; 表 1),而且随着低温处理时间延长,中期相细胞增加。20 h 低温组中期分裂相百分率 (YFF31.7%, CNF40.2%),高于对照组 (YFF4.7% 和 CNF6.4%) 5 倍以上 ($P < 0.01$; 表 1)。可能是长时间的低温休克会使更多的细胞同步于 S 期,从而获得更高的分裂指数效应。据报道细胞分裂受阻能持续 16~20 h^[11]。随着体细胞克隆技术和组织工程技术的迅速发展,核移植供体细胞和胚胎干细胞 (ES) 的体外培养成为当今生物技术的热点。供体细胞和 ES 细胞在体外培养过程中易失去二倍体核型,需要定期检查细胞核型变化。因此,建立 4℃ 低温休克法来提高培养细胞中期分裂相,在核移植供体细胞选择和 ES 细胞诱导分化监控方面具有重大应用价值。

4℃ 低温休克法的独特之处在于,在细胞培养中采用同步化处理来提高分裂指数,具有便于操作、重复性好、对细胞损伤小及所需材料少的优点。该方法不仅为监测体外长期培养细胞核型变化提供了有效的方法,也为开展原位杂交等细胞遗传学分析奠定了基础。应用该方法时要注意:(1) 掌握好体外培养细胞动态,以 60%~70% 汇合度为宜,此时细胞处于对数生长期有较多的分裂相;(2) 鉴于低温休克处理 20 h 与 15 h 获得的中期分裂相差异不显著,为节约时间和便于安排实验,以 15 h 低温休克处理为宜,超过 20 h 会影响细胞活力;(3) 采集分裂期细胞时勿用力过大,以免非分裂细胞脱落影响

观察。

参考文献 (References):

- [1] LIU Ji-Long, WANG Min-Kang, LI Jin-Song, SUN Qing-Yuan, XU Zhi, CHEN Da-Yuan. Culture of bovine ear fibroblasts. *Acta Zoologica Sinica*, 1999, 45(4): 472~473.
刘冀珑,王敏康,李劲松,孙青原,徐直,陈大元.牛耳成纤维细胞的培养. *动物学报*, 1999, 45(4): 472~473.
- [2] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, Kane J J, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon F A, Robl J M. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280: 1256~1258.
- [3] Keefer C L, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau A S, Zhou F J, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H, Karatzas C N. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biology of Reproduction*, 2002, 66: 199~203.
- [4] Schnieke A E, Kind A J, Ritchie W A, Mycock K, Scott A R, Ritchie M, Wilmot I, Colman A, Campbell K H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, 278 (5346): 2130~2133.
- [5] Ono Y, Shimosawa K, Muguruma K. Cloned mice from fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2001, 64: 44~50.
- [6] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry A C. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289 (5482): 1188~1190.
- [7] Kues W A, Carnwath J W, Niemann H, Paul D. Serum deprivation induced DNA fragmentation of porcine fetal fibroblasts. *Theirogenology*, 2000, 53: 228~239.
- [8] WANG Yi - Ping, CHNEG Zai - Yu. The methods of preparing early metaphase chromosomes and the study of their G-banding patterns in mouse fibroblasts. *Hereditas (Beijing)*, 1989, 11(1): 21~23.
王一平,程在玉.小鼠成纤维细胞早中期染色体标本制备及 G 带核型分析. *遗传*, 1989, 11(1): 21~23.
- [9] YANG Zhi-Ming. Tissue engineering. Beijing: Chemical Industry Press, 2002, 155~157.
杨志明. *组织工程*. 北京: 化学工业出版社, 2002, 155~157.
- [10] WANG Kun-Ren, XUE Shao-Bai, LIU Hui-Tu. Cell Biology (Second Edition). Beijing: Beijing Teacher-Training University Press, 1998, 287~293.
汪堃仁,薛绍白,柳惠图. *细胞生物学(第二版)*. 北京: 北京师范大学出版社, 1998, 287~293.
- [11] E Zheng. Technology of Tissue Culture and Molecular Cytology. Beijing: Beijing Press, 1994, 164~167.
鄂征. *组织培养和分子细胞学技术*. 北京: 北京出版社, 1994, 199~201.