

婴儿皮肤组织成纤维细胞系的建立及生物学特性

王家敏¹, 沈武玲², 平 玲², 徐水林¹, 赵 彬², 马忠仁¹, 乔自林¹

(1. 甘肃省动物细胞工程技术研究中心, 兰州 730030)

(2. 西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030)

[摘要] 采集婴儿皮肤组织,用组织块法制备原代细胞,通过差速消化和差速贴壁法纯化细胞,扩大培养至第 3 代液氮冻存,复苏细胞后进行活力、形态、生长曲线、微生物污染、核型、乳酸脱氢同工酶谱及荧光蛋白质粒转染表达等特性研究. 结果显示,婴儿皮肤组织细胞呈成纤维型,生长状态良好;生长曲线呈“S”型,最大增值浓度为 $1.64 \times 10^5/\text{mL}$,倍增时间为 63.12 h;细菌、真菌、支原体检测均为阴性;染色体 $2n=46$,二倍体为 86%,占主体;乳酸脱氢酶同工酶电泳图谱显示有 5 条谱带;外源质粒在该细胞中能进行复制和表达. 表明已成功建立了婴儿皮肤组织成纤维细胞系,这为复合人工皮肤的组织工程学研究奠定了前期工作基础,也为皮肤相关疾病的研究提供了实验条件,因而具有重要的理论和实践意义.

[关键词] 婴儿皮肤,成纤维细胞系,生物学特性

[中图分类号] Q813.1⁺1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2014)03-0100-06

Establishment and Characteristics of Baby Skin Explant Fibroblast

Wang Jiamin¹, Sheng Wuling², Ping Ling², Xu Shuilin¹, Zhao Bin², Ma Zhongren¹, Qiao Zilin¹

(1. Gansu Engineering Research Center for Animal Cell, Lanzhou 730030, China)

(2. College of Life Science and Engineering, Northwest University for Nationalities, Lanzhou 730030, China)

Abstract: The baby skin explants were cultured with tissue pieces method. The primary cells were purified and preserved with liquid nitrogen after being passaged to the third generation. Observations on morphology, dynamic growth, microbial contamination, analysis of karyotype, isoenzyme of lactate dehydrogenase and fluorescein plasmid transfection and expression were carried out. The results showed that the cell line was fibroblast and grew well. The maximum proliferation concentration was $1.64 \times 10^5/\text{mL}$ and population doubling time of cells (PDT) was 63.12 h. The tests for bacteria, fungi, virus and mycoplasma were all negative. The chromosomes were 46 and diploid cells were dominant of 86%. The banding patterns of the isoenzyme of lactate dehydrogenase had significant difference and there were five bands in all. The exogenous plasmid could copy and express in the cell. Those showed that the cell line was established successfully, which lays the foundation of the work bases for composite artificial skin tissue engineering and provides the experimental conditions for skin diseases. So this has the important theoretical and practical significance.

Key words: baby skin, fibroblast cell line, characteristics

成纤维细胞是构成皮肤真皮的主要细胞,其正常增殖、分化维系着皮肤正常的结构和生理功能,也是皮肤组织受损后的主要修复细胞. 皮肤成纤维细胞的原代体外培养技术是建立皮肤成纤维细胞系必不可少的步骤,也是复合人工皮肤组织工程研究的先决条件.

1 材料

3110 型 CO_2 培养箱 (Thermo)、CK40-32PH 型倒置相差显微镜 (Olympus)、CK41 型荧光倒置相差显微镜 (Olympus)、液氮贮存器 (Thermo) 等.

DMEM (HyClone)、胎牛血清 (兰州民海)、胰蛋白酶 (Gibco)、DMSO (ThermoFisher)、秋水仙素 (Sirius)

收稿日期: 2012-08-28.

基金项目: 西北民族大学中青年科研基金.

通讯联系人: 乔自林, 高级实验师, 研究方向: 细胞培养技术和细胞生物反应器. E-mail: 670267497@qq.com

进口分装)、THIO(DIFCO)、TSB(DIFCO)、Hoechst33258(Sigma)、脂质体(Lipofectamine™ 2000, Invitogen)、红色荧光蛋白质粒(pDsRed-Monomer-N1, Clontech)等。

2 方法

2.1 样品采集

样品采自兰州军区总医院外科,刘某之子右手拇指畸形多指,经患者及家属同意,断截术后取拇指部皮肤。在75%酒精中浸泡30s,用PBS冲洗后放入含500 IU青霉素和500 IU链霉素的PBS中,2 h内送回实验室。

2.2 细胞培养及冻存

2.2.1 原代培养

将皮肤组织用PBS冲洗后,用眼科剪剪碎成1 mm³左右的小块,贴于细胞培养瓶生长面,翻转瓶底朝上,加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,倒置放在37℃,5% CO₂的培养箱中,隔夜后翻瓶继续培养^[2]。

2.2.2 传代培养

当培养的细胞80%~90%汇合后,采用常规的方法进行传代,在传代时采用差速消化和差速贴壁法,纯化成纤维细胞^[3,4]。

2.2.3 细胞冻存

采用液氮保存(-196℃),用冻存保护液(10% DMSO+20%胎牛清+70% DMEM)调整细胞密度至 $3.0 \times 10^6/\text{mL}$ 。

2.3 生物学特性研究

2.3.1 细胞复苏

从液氮中取出冻存管,按常规方法复苏细胞,2 h后换加等量的新鲜细胞培养液以降低DMSO对细胞的损害作用^[5]。

2.3.2 细胞活力检测

每次复苏细胞结束后,用台盼蓝染色法进行活力检查^[6]。

2.3.3 细胞形态观察

在培养过程中利用倒置相差显微镜对其生长形态进行观察并拍照。

2.3.4 复苏细胞生长曲线

将复苏后传代一次的细胞,调整终浓度为 $1.0 \times 10^4/\text{mL}$ 并接种到24孔培养板上,每孔1 mL,置37℃,5% CO₂的培养箱中,每隔24 h取3孔细胞进行消化计数,直至细胞密度降低为止,绘制生长曲线并求得最大增殖密度和倍增时间(PDT)^[7]。

2.3.5 微生物污染检测

2.3.5.1 细菌、真菌检测

实验所有细胞均无抗生素培养液中培养。在培养过程中用肉眼观察培养液是否出现浑浊并在显微镜下观察有无活动的黑色颗粒;从培养瓶中取2 mL细胞培养液分别加入THIO和TSB培养基中,培养14 d观察结果。

2.3.5.2 病毒检测

运用直接观察法、细胞培养法及红细胞吸附法检测传代细胞^[8]。

2.3.5.3 支原体检测

运用培养法及DNA荧光染色法^[8]对传代细胞进行检测。

2.3.6 染色体分析

按照常规方法进行染色体制片,Gimesa染色后油镜下观察并照相。对50个铺展完好的中期相统计染色体数目,并进行核型分析^[9-12]。

2.3.7 荧光蛋白质粒转染表达

采用红色荧光蛋白质粒进行转染表达^[13]。

3 结果

3.1 婴儿皮肤组织成纤维细胞系形态学观察

原代培养 3 d~5 d 后便可见大量上皮样细胞与成纤维样细胞混杂生长,9 d~10 d 后可铺满瓶底,如图 1. 细胞经传代、筛选纯化后,成纤维细胞生长逐渐占优势,经 2~3 次传代,即可完全排除上皮型细胞. 细胞贴壁后大致呈梭形或不规则形,细胞核位于中央,胞质外伸出 2~3 个长短不同的突起,生长时呈放射状、漩涡状走向,如图 2.

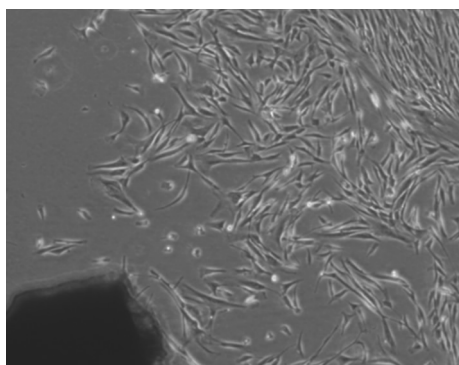


图 1 婴儿皮肤组织成纤维细胞原代细胞(120 h, ×40)
Fig.1 Primary explants culture fibroblasts of baby skin

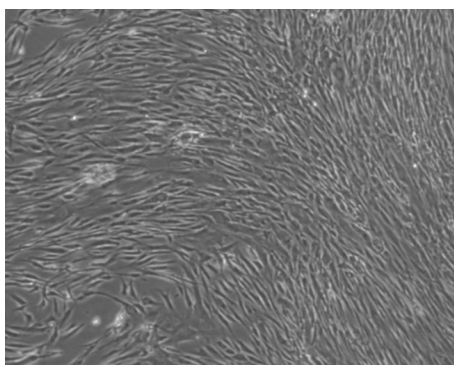


图 2 婴儿皮肤组织成纤维 F2 代细胞(48 h, ×40)
Fig.2 F2 explants culture fibroblasts of baby skin

3.2 婴儿皮肤组织成纤维细胞复苏细胞活率

婴儿皮肤组织成纤维细胞复苏细胞活率最少达到 91.8%, 平均 95.2%.

3.3 婴儿皮肤组织成纤维细胞生长的动态观察

婴儿皮肤组织成纤维细胞生长曲线呈“S”型, 如图 3, 其最大增值浓度为 $1.64 \times 10^5 / \text{mL}$, 平均倍增时间为 63.12 h.

3.4 微生物污染检测

3.4.1 细菌、真菌检测

在原代培养、冻存和复苏以及 THIO 和 TSB 培养基检测均没有发现污染.

3.4.2 病毒检测

在原代与传代培养过程中, 利用倒置相差显微镜观察未见病毒引起的细胞损伤; 将细胞分别接种至猴源细胞、人源二倍体细胞和同种不同批的细胞, 亦未见病毒引起的细胞损伤及病变现象; 红细胞吸附试验为阴性.

3.4.3 支原体检测

3.4.3.1 培养法

细胞培养液接入专用支原体琼脂培养基中培养 14 d, 没有出现任何菌落.

3.4.3.2 DNA 荧光染色法

待检细胞用荧光染料(Hoechst 33258)染色后, 只有细胞核出现蓝色荧光, 细胞核与细胞表面之间看不到荧光, 如图 4.

3.5 婴儿皮肤组织成纤维细胞核型分析

婴儿皮肤组织体外培养的成纤维细胞正常染色体数为 $2n=46$, 包括 22 对常染色体和 1 对性染色体, 常染色体 5 对为中着丝粒染色体(M), 12 对为亚中着丝粒染色体(SM), 5 对为亚端着丝粒染色体(ST), 性染色体 X 为

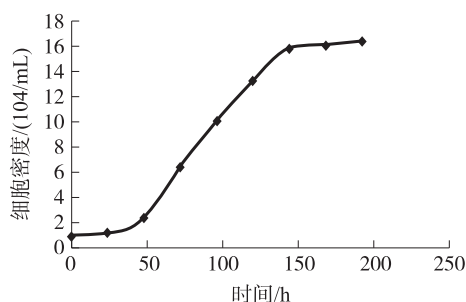


图 3 婴儿皮肤成纤维细胞生长曲线(F3)
Fig.3 The growth curve of baby skin fibroblasts(F3)

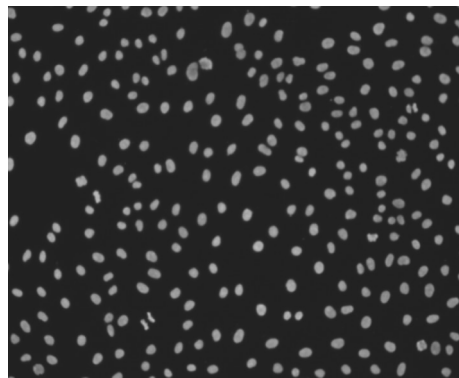


图 4 细胞 DNA 荧光染色图
Fig.4 The cell DNA stain by Hoechst

亚中着丝粒染色体(SM),Y染色体为亚端着丝粒染色体(ST).计数100个细胞染色体数目时,正常2倍体核型细胞占86%.染色体的特征见表1和染色体核型见图5.

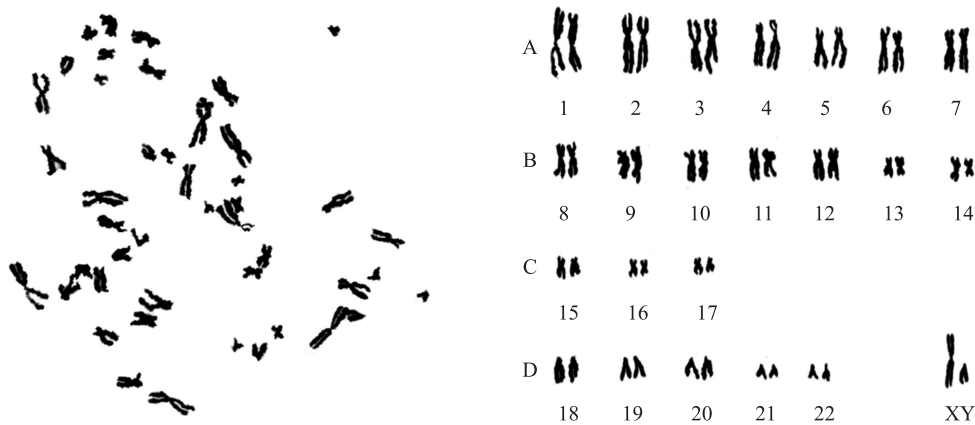


图5 婴儿皮肤组织成纤维细胞系染色体核型(♂)

Fig.5 Metaphase chromosome and its karyotype of baby skin fibroblasts(♂)

表1 婴儿皮肤组织成纤维细胞染色体特征(♂)

Table 1 Chromosome characteristics of baby skin fibroblasts(♂)

编号	相对长度/%	形态类型	编号	相对长度/%	形态类型
1	8.45±0.33	M	13	3.25±0.22	SM
2	7.67±0.34	SM	14	3.18±0.18	SM
3	6.58±0.21	M	15	3.11±0.13	M
4	6.22±0.11	SM	16	2.66±0.19	M
5	6.10±0.08	SM	17	2.44±0.17	M
6	5.98±0.13	SM	18	4.10±0.25	ST
7	5.39±0.37	SM	19	3.86±0.23	ST
8	4.99±0.02	SM	20	3.78±0.37	ST
9	4.86±0.01	SM	21	1.90±0.22	ST
10	4.69±0.22	SM	22	1.64±0.13	ST
11	4.67±0.26	SM	X	5.26±0.21	SM
12	4.49±0.31	SM	Y	1.99±0.16	ST

3.6 婴儿皮肤组织成纤维细胞同工酶分析

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳,对婴儿皮肤组织成纤维细胞的乳酸脱氢酶进行了测定,结果如图6所示,可以看出婴儿皮肤组织成纤维细胞系的乳酸脱氢酶图谱呈5条谱带,从阳极到阴极分别是LDH₁、LDH₂、LDH₃、LDH₄、LDH₅,且LDH₄浓度较高、活性较强,其迁移率分别是LDH₁=54.04%,LDH₂=45.20%,LDH₃=37.37%,LDH₄=28.54%,LDH₅=15.66%;与管卫^[14]报道的人血清中LDH同工酶有5条谱带,但LDH₂浓度较高、活性较强不同.说明该婴儿皮肤组织成纤维细胞遗传性能稳定,未发生与其他物种细胞的交叉污染和恶性转化.

3.7 荧光蛋白质粒转染表达

婴儿皮肤组织成纤维细胞经脂质体介导红色荧光蛋白质粒(pDsRed-Monomer-N1)转染后12h即可见发红色荧光的细胞,分布均匀,但强度较弱.转染24h后阳性细胞明显增



图6 婴儿皮肤组织乳酸脱氢同工酶谱带

Fig.6 The banding patterns of LDH isozyme of the fibroblast cells

多,强度增强(如图7).表明婴儿皮肤成纤维细胞能有效地转染外源基因.

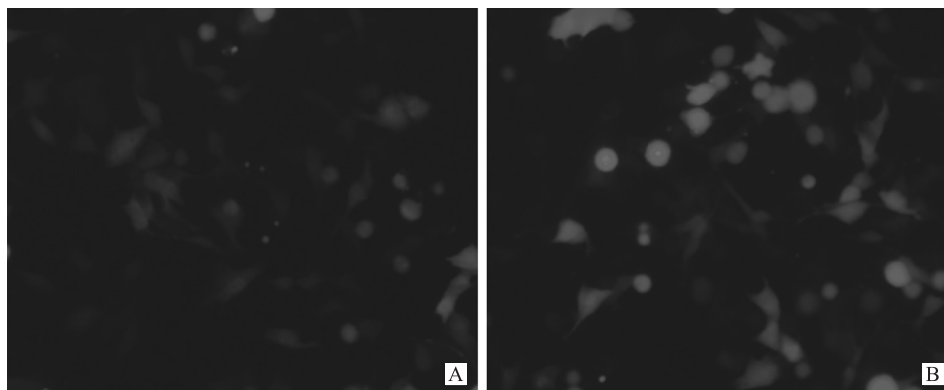


图7 婴儿皮肤组织成纤维细胞荧光蛋白质粒表达(A:12 h,×40;B:24 h,×40)

Fig.7 Transfection of baby skin fibroblast cells(A:12 h,×40;B:24 h,×40)

4 讨论

婴儿皮肤成纤维细胞传代培养第3 d进入指数生长期,到第6 d生长进入平稳状态,倍增时间为63.12 h,最大增殖浓度为 $1.64 \times 10^5 / \text{mL}$,表明该细胞系生长较慢,且细胞胞体较大.冻存前后细胞活力用 t 检验方法统计, $t=0.041 < t_{0.05}$, $P>0.05$,表明冻存前后细胞活力差异不显著,说明冻存的各项条件对细胞没有损伤,细胞在生长时状态良好,培养条件适宜;染色体数目为23对,其中二倍体细胞占主体,冻存复苏细胞染色体没有异常表现,说明该细胞系为稳定二倍体细胞系.由于同工酶在种与种之间,甚至种内之间存在多态性,因此,通过色谱或电泳得到的同工酶图谱是区别种间细胞系的一个极好的方法^[15],在细胞系鉴定的质量控制以及种间污染检测中,同工酶多态性生化分析被认为是标准方法,在世界几个重要的生物资源中心如ATCC,ECACC,DSMZ等,常使用这种方法对细胞的种间污染进行检测^[15,16].对婴儿皮肤组织成纤维细胞系的LDH同工酶酶谱进行了检测,从结果来看,LDH有5条区带,且LDH₄浓度较高、活性较强,与管卫^[14]报道的人血清中LDH同工酶有5条区带,但LDH₂浓度较高、活性较强不同,说明该细胞系没有种间污染,且存在明显的种别特征.外源质粒(pDsRed-Monomer-N1)能在保存的婴儿皮肤成纤维细胞内进行有效复制、转录、翻译和翻译后修饰,能用于瞬时转染和永久表达系的建立,这为以后对皮肤组织的结构基因组、功能基因组、转基因研究以及皮肤组织工程等工作提供了依据^[15].

本研究对婴儿皮肤组织成纤维细胞的生物学特性检测项目与美国ATCC细胞库进行比对,除了致癌性、药物敏感性没有进行,其他项目检测方法基本一致,且检验结果也符合CAL特征要求^[17].表明通过本项研究建立了性质稳定的婴儿皮肤组织成纤维细胞系,该细胞系的建立不仅为复合人工皮肤的组织工程学研究奠定了前期工作基础,也为皮肤相关疾病的研究提供了实验条件,因而具有重要的理论和现实意义.

[参考文献]

- [1] 吴国选,伍津津,朱堂友,等.人皮肤成纤维细胞库的构建[J].实用医药杂志,2005,22(4):324-326.
- [2] 侯兰新,陈轶霞.动物细胞培养技术教程[M].兰州:甘肃科学技术出版社,2009:58-59,124-126.
- [3] 沈翠英,肖忠明.原代培养的二倍体上皮细胞和成纤维细胞的纯化[J].细胞生物学杂志,1989,11(4):173-174.
- [4] 刘永清,孙浩.鸡胚成纤维细胞原代培养与纯化的初探[J].猪与禽,2008,28(1):72-74.
- [5] 程宝鸾.动物细胞培养技术[M].广州:中山大学出版社,2006:28-29.
- [6] 李玲,李雪峰.细胞生物学实验[M].长沙:湖南科学技术出版社,2003:17-19.
- [7] 严泉剑,郭金龙,刘恩靖,等.绘制细胞生长曲线及细胞群体倍增时间的简化计算[J].前卫医药杂志,2000,17(4):228-229.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(2005年版)[M].北京:化学工业出版社,2005:14-15,75-77.
- [9] 雷初朝,韩增胜,陈宏,等.关于马的染色体核型分析[J].西北农林科技大学学报,2001,29(4):5-8.

- [10] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京:北京出版社,2001:164-169.
- [11] Yunis J J. Human Chromosome Methodology[M]. New York:Academic Press,1974:59-61.
- [12] Franklin E,William F,Blazak. Horse, ass, and mule chromosomes[J]. Journal of Heredity,1976,67:361-367.
- [13] 良宋平. 生物化学与分子生物学实验教程[M]. 北京:高等教育出版社,2003:35-41.
- [14] 管卫,齐静,沈永明,等. 1 例儿童血清乳酸脱氢酶同工酶异常区带的分析[J]. 临床检验杂志,2010,28(1):75-76.
- [15] 周向梅,马月辉,关伟军,等. 北京油鸡胚胎成纤维细胞系建立与生物学特性研究[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(3):209-215.
- [16] Drexel H G,Dirks W G,MacI E R,et al. Sensitivity hematopoietic cell lines;cross-contaminations and misinterpretations[J]. Keukemia,1999,13:602-606.
- [17] 何申. ATCC 美国所属培养的细胞库[M]. 北京:中国学术期刊电子杂志社,2006:52-56.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 99 页)

- [5] Datsenko K A,Wanner B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97(12):6 640-6 645.
- [6] Isaacs F J,Carr P A,Wang H H,et al. Precise manipulation of chromosomes in vivo enables genome-wide codon replacement [J]. Science,2011,333(6 040):348-353.
- [7] Wang H H,Kim H,Cong L,et al. Genome-scale promoter engineering by coselection MAGE[J]. Nat Methods,2012,9(6):591-593.
- [8] Kuhlman T E,Cox E C. Site-specific chromosomal integration of large synthetic constructs[J]. Nucleic Acids Res,2010,38(6):e92.
- [9] 张飞飞,王瑞青,朱宇鹏,等. 大肠杆菌系列融合表达载体的构建[J]. 南京师大学报:自然科学版,2013,36(3):97-102.
- [10] Sambrook J,Fritsch E F,Maniatis T. Molecular Cloning:A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.
- [11] Jere P S,Richard L J. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate[J]. Meth Enzymol,1972,28:54-63.
- [12] Takahashi S,Ohsawa T,Miura R,et al. Purification of high molecular weight(HMW) renin from porcine kidney and direct evidence that the HMW renin is a complex of renin with renin binding protein(RnBP)[J]. J Biochem,1983,93(1):265-274.

[责任编辑:黄 敏]