doi:10.11659/jjssx.03E019144

·基础研究·

不同代昆明小鼠胚胎成纤维细胞的生长特性研究

黄 悦[1],严会文[1],王燕燕[1],苏 敏[2] (1.贵阳护理职业学院解剖学教研室,贵州 贵阳 550081;2.贵州医科大学组织学与胚胎学教研室,贵州 贵阳 550081)

[摘 要] **目的** 分离培养昆明小鼠成纤维细胞,研究其体外生长特性并用于胚胎干细胞培养。**方法** 消化法分离培养获得昆明小鼠胚胎成纤维细胞,利用MTT法绘制各代细胞生长曲线,免疫荧光对各代细胞进行细胞骨架分析;用不同浓度丝裂霉素C(10 μg/mL、20 μg/mL和30 μg/mL)分别处理MEFs 1、2、3 h,MTT法筛选饲养层制备的最佳条件,制备饲养层用于小鼠胚胎干细胞的培养。**结果** 分离的小鼠胚胎成纤维细胞3~5代细胞增殖能力较好;1~3代细胞微管微丝排列整齐,5代以后的细胞微管微丝排列紊乱;10 μg/mL丝裂霉素C处理2 h有利于小鼠胚胎干细胞的培养。**结论** 体外分离培养的3~5代小鼠胚胎成纤维细胞可用于小鼠胚胎干细胞的培养。

[关键词] 小鼠胚胎成纤维细胞;细胞骨架;饲养层
[中图分类号] R329 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-03-20

Growth characteristics of murine embryonic fibroblasts of Kunming species in vitro

HUANG Yue[1], YAN Hui-wen[1], WANG Yan-yan[1], SU Min[2] (1. Department of Anatomy, Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang Guizhou 550081, China; 2. Department of Histology and Embryology, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou 550081, China)

Abstract: Objective Isolation and culture of Kunming mouse embryonic fibroblasts (MEFs) for growth feature in vitro are used to culture the embryonic stem cell. **Methods** Kunming MEFs were isolated and cultured by digestion. MTT assay was used to plot the growth curve of each generation of cells. The cytoskeleton of each generation of cells was analyzed by immunofluorescence. The MEFs were dealt with different concentration of Mitomycin C(10 μg/mL, 20 μg/mL and 30 μg/mL) for 1 hour, 2 hours and 3 hours. The optimum condition of feeder layer preparation was screened by MTT assay. The feeder layer was prepared for the culture of mouse embryonic stem cells. **Results** The proliferation ability of generation 3 to 5 of MEFs was good. The cytoskeleton immunofluorescence staining showed that the generation 1 to 3 of cell microtubules and microfilaments arranged in neat rows, the generation 5 to 7 of cells microtubules and microfilaments were disorganized. The feeder cells dealt with 10 μg/mL Mitomycin C for 2 hours was better for the culture of mouse embryonic stem cell. **Conclusion** The generation 3 to 5 of MEFs can be used for the culture of mouse embryonic stem cells.

Keywords: mouse embryonic fibroblasts; cytoskeleton; feeder cells

近年来,胚胎干细胞在早期胚胎发育研究、基因打靶技术、定向诱导分化及细胞移植治疗疾病方面得到广泛的应用而成为生物医学领域的研究热点[1-4]。目前体外进行胚胎干细胞的培养需依赖大量的饲养层细胞,而市售的饲养层细胞成本较高且运输不便,还存在复苏成活率低等缺点。目前对饲养层细胞的分离培养研究较多,但对于制备小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)的小鼠最适胎龄、最佳消化浓度和时间、分离时间等结论不一,用于制备饲养层的处理浓度和时间及饲养层细胞的冻存方法有较大差异[5-8]。本研究参照现有的小鼠胚胎成纤维细胞分离培养方法,利用胰酶消化法体外获得小鼠胚胎成纤维

[基金项目] 贵州省科技厅基金[黔科合J字(2015)2011号];贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目[黔省专合字(2012)41号]

[通信作者] 苏 敏,E-mail:huranggaigaiyu@sina.com

[26] Khadra A, Fletcher P, Luzzi G, et al. Interleukin-8 levels in seminal plasma in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and non-specific urethritis[J]. BJU Int, 2006, 97(5): 1043-1046. doi: 10.1111/j.1464-410X.2006.06133.

[27] Miller LJ, Fischer KA, Goralnick SJ, et al. Interleukin-10 levels in seminal plasma: implications for chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome[J]. J Urol, 2002, 167(2 Pt 1): 753-756. doi: 10.1016/S0022-5347(01)69139-0.

[28] 贺大林,周 锋,何 辉,等.前列腺按摩液中IL-8和TNF-α测定在慢性前列腺炎诊断、分型中的临床意义[J].中华男科学杂志,2002,10(10):740-742. doi:10.13263/j.cnki.nja.2004.10.005.

[29] 李宏军,商学军,黄宇烽.IL-10、IL-8在慢性前列腺炎中的改变及意义[J].中华男科学杂志,2004,10(7):486-487. doi:10.13263/j.cnki.nja.2004.07.002.

(编辑:刘 艺)

细胞,利用细胞曲线和细胞骨架免疫荧光染色方法对不同代小鼠胚胎成纤维细胞的生长特性进行研究,筛选活力较强的细胞用于制备小鼠胚胎干细胞饲养层细胞,同时设置3种浓度的丝裂霉素C进行不同时间的处理,探索饲养层细胞制备的最佳条件,为后期研究基因转染胚胎干细胞进行体外诱导分化提供优质、充足的试验材料和研究基础,也为应用饲养层法进行胚胎干细胞培养与克隆的学者提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

健康清洁级昆明小鼠(贵州医科大学实验动物中心),C57BL/6胚胎干细胞(中国科学院干细胞库),胚胎干细胞完全培养基(中国科学院干细胞库)、DMEM-High(Hyclone)、胎牛血清(杭州四季青)、胰酶(Hyclone)、抗α微管蛋白单克隆抗体(GeneTex Inc,USA)、抗兔IgG-生物素(SouthernBiotech,USA)、抗生物素蛋白-Cy5(SouthernBiotech,USA)、鬼笔环肽-FITC(Sigma-Aldrich Co. LLC,USA)、碘化丙锭(PI)(Sigma-Aldrich Co. LLC,USA)、丝裂霉素C(Sigma)、牛血清白蛋白(北京索莱宝生物科技有限公司),酶标仪(BIO-TEK ELX800UV),激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000)。

1.2 MEFs的分离和培养

取8周龄健康小鼠,按2∶1雌雄同笼,每日清晨观察,有阴栓开始计为12 h,于怀孕13.5 d在无菌状态下取出小鼠胚胎,记录胚胎数,用含1%青链霉素的PBS清洗3次,超净工作台下去除小鼠胚胎的四肢、头、尾和内脏,PBS清洗,将剩余组织剪碎至1 mm^3,用0.25%胰蛋白酶于37 ℃培养箱中消化10 min,加入细胞培养液(10%胎牛血清)终止消化并吹打成悬液,1 000 r/min离心5 min,弃上清,细胞培养液重悬后按1×10^4密度接种至100 mm培养皿中,置入细胞培养箱内培养,计为P0代细胞,24 h后去除未贴壁细胞,更换新鲜培养基,每日观察,待原代细胞达90%汇合时按1∶3比例进行传代培养。

1.3 MEFs细胞曲线测定

胰酶消化收集P1、P3、P5、P7代对数期细胞,制成细胞悬液,以2 000个/100 μL的密度接种于96孔板,设5个复孔(边缘孔用无菌PBS填充),接种5板,分别置入细胞培养箱内培养,每日取一96孔板内细胞在酶联免疫检测仪(OD 570 nm)测量各代细胞吸光度,取平均值,绘制细胞生长曲线。

1.4 鼠胚胎成纤维细胞免疫荧光染色

胰酶消化收集P1、P3、P5、P7代对数期细胞,制成细胞悬液,以1×10^4/孔接种于激光共聚焦专用培养皿中,待细胞生长至80%汇合时,弃细胞培养液,PBS洗涤3遍,37 ℃水浴避光进行固定、穿透、封闭和免疫荧光染色。具体步骤如下:用4%多聚甲醛固定30 min,37 ℃预热的0.1% Tween-20 PBS(v/v)液洗涤3次,0.4% TritonX-100 PBS中穿透处理30 min,37 ℃预热的0.1% Tween-20 PBS(v/v)液洗涤3次,0.2%牛血清白蛋白(BSA)PBS中封闭1 h,37 ℃预热的0.1% Tween-20 PBS(v/v)液洗涤3次,封闭后抗α微管蛋白单克隆抗体(1∶50)37 ℃孵育1.5~2 h,37 ℃预热的0.1% Tween-20 PBS(v/v)液洗涤3次,抗小鼠IgG-生物素(1∶50)37 ℃孵育1 h,抗生物素蛋白-Cy5(1∶500)37 ℃孵育30 min,37 ℃预热的0.1% Tween-20 PBS(v/v)液洗涤3次,鬼笔环肽-FITC(0.2 μg/mL)37 ℃孵育1 h,37 ℃预热的0.1% Tween-20 PBS(v/v)液洗涤3次,150 μg/mL碘化丙锭(PI)中37 ℃染色20 min,37 ℃预热的0.1% Tween-20 PBS(v/v)液洗3次,在激光共聚焦显微镜下(LSCM)观察细胞的微管(蓝色)、微丝(绿色)和染色体(红色)并拍照。

1.5 制备鼠胚胎成纤维细胞饲养层

取9皿融合率达90%的P3对数生长期细胞,弃旧培养基,用浓度为10 μg/mL、20 μg/mL、30 μg/mL的丝裂霉素C分别处理1 h、2 h、3 h,PBS冲洗去胰酶消化丝裂霉素C处理过的细胞,活细胞计数后,以4 000个/100 μL密度接种于96孔板,边缘孔用无菌PBS填充,每组样本设立5个平行孔。MTT法在接种后第2、4、6、8、10天酶联免疫检测仪(OD 570 nm)测量各代细胞吸光度变化,绘制生长曲线,筛选丝裂霉素C处理的最佳浓度和时间。

1.6 饲养层细胞的冻存

取丝裂霉素C处理第3~5代对数生长期细胞,无菌PBS洗涤细胞6次,加0.25%胰酶37 ℃消化,加入细胞培养液(10%胎牛血清)终止消化并吹打成悬液,1 000 r/min离心5 min,弃上清,用细胞冻存液(90% FBS+10% DMSO)重悬细胞,以1×10^6个/mL冻存细胞,-80 ℃冰箱冻存,次日投入液氮中长期保存备用。

1.7 胚胎干细胞培养

取冻存的饲养层细胞,在37 ℃水浴中迅速复苏,以2.5×10^5/孔的密度接种至0.1%明胶包被的6孔板,24 h后接种小鼠胚胎干细胞(mESCs),细胞培养箱内培养,每日换液,观察细胞生长情况。

2 结果

2.1 MEFs 的分离和培养

P0 代细胞培养 24 h 贴壁生长,细胞呈梭形、多边形或不规则星形,大小不均匀,核卵圆形,可见 1 ~2 个核仁,细胞整体成漩涡状有序排列。P3 代细胞呈典型的成纤维细胞状态,细胞核清晰可见,胞质均匀,胞浆颗粒少。P5 代细胞以后,胞质内出现空泡,细胞分叉呈不规则形薄片状,胞浆内颗粒明显增多,细胞之间空隙增大,细胞呈现衰老形态(图 1)。

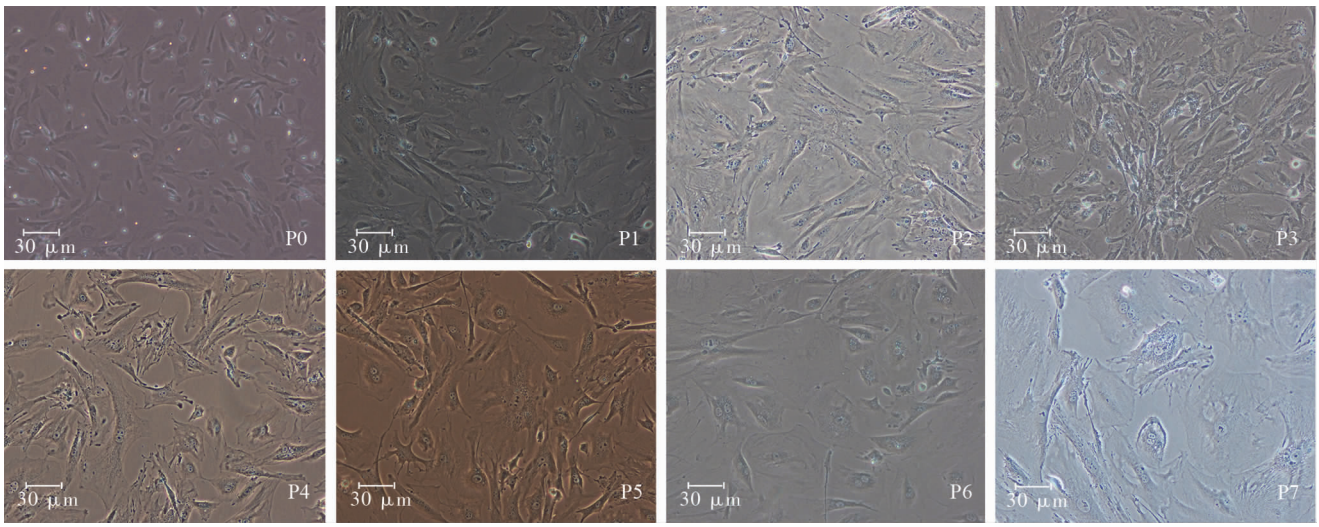


图 1 P0 ~ P7 代 MEFs 细胞

2.2 MEFs 生长曲线测定

取 P1、P3、P5、P7 代细胞,用 MTT 法测量其生长曲线,结果如图 2,P1、P3 代细胞第 2 天便迅速进入对数生长期,在第 4 天达高峰后进入衰老平台期,P5 代细胞生长速度明显变慢,到第 6 天达生长高峰,而到第 7 代细胞,细胞增殖速度明显减慢,增殖不明显,细胞老化(图 2)。

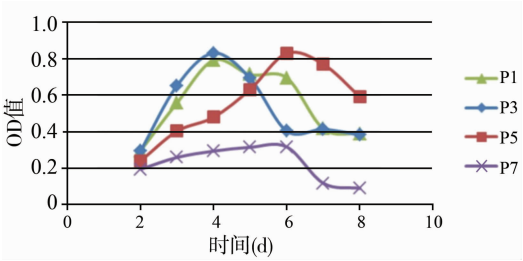


图 2 P1、P3、P5、P7 代 MEFs 细胞生长曲线测定

2.3 MEFs 细胞骨架免疫荧光

MEFs 细胞骨架免疫荧光结果显示:P1、P3 代细胞骨架结构较清晰,微管微丝大多平行且规则,提示细胞处于相对活跃期,到 P5、P7 代细胞骨架蛋白的荧光变弱,微管微丝出现解聚、断裂甚至散乱无序分布,核染色质也出现荧光变弱,提示细胞出现衰老的特征(图 3)。

2.4 饲养层制备

10 μg/mL、20 μg/mL 和 30 μg/mL 浓度的丝裂霉素 C 处理 MEFs 1、2、3 h 均可不同程度抑制 MEFs 的增殖且维持细胞的生存能力,表现为细胞形态不变,但细胞增殖不明显,且随培养时间的延长,细胞数量逐渐减少。细胞生长曲线显示,经 10 μg/mL 浓度处理的细胞死亡较 20 μg/mL 和 30 μg/mL 少,10 μg/mL 处理 2 h 与 3 h 没有明显差异,但处理 1 h 未明显抑制细胞增殖(图 4)。

2.5 胚胎干细胞培养

小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cells, mESCs)接种于自制的饲养层细胞仍可保持旺盛的增殖能力,接种 24 h 贴壁完全,并迅速增殖,细胞克隆和周围存在明显界限,细胞克隆呈圆形或类圆形集落状生长,彼此界限清楚(图 5)。

3 讨论

小鼠胚胎成纤维细胞是一种体外易于获取的生物材料,广泛应用于细胞结构、遗传发育、肿瘤体外模拟微环境建立及组织工程构建的试验材料和种子细胞;同时也是胚胎干细胞理想的天然饲养层细胞,可有效抑制胚胎干细胞体外分化并能分泌诸多细胞因子促进胚胎干细胞体外增殖。

干细胞培养需要大量的饲养层细胞,饲养层质量是影响干细胞生长的重要因素。昆明小鼠是中国特有的封闭群小鼠,因其具有适应性强、繁殖力高的特点而被众多学者列为制备饲养层的首选。但小鼠成纤维细胞是没有建系的细胞,在制作饲养层的过程就需要不断制备,由于各个实验室条件存在差异,因而制备小鼠

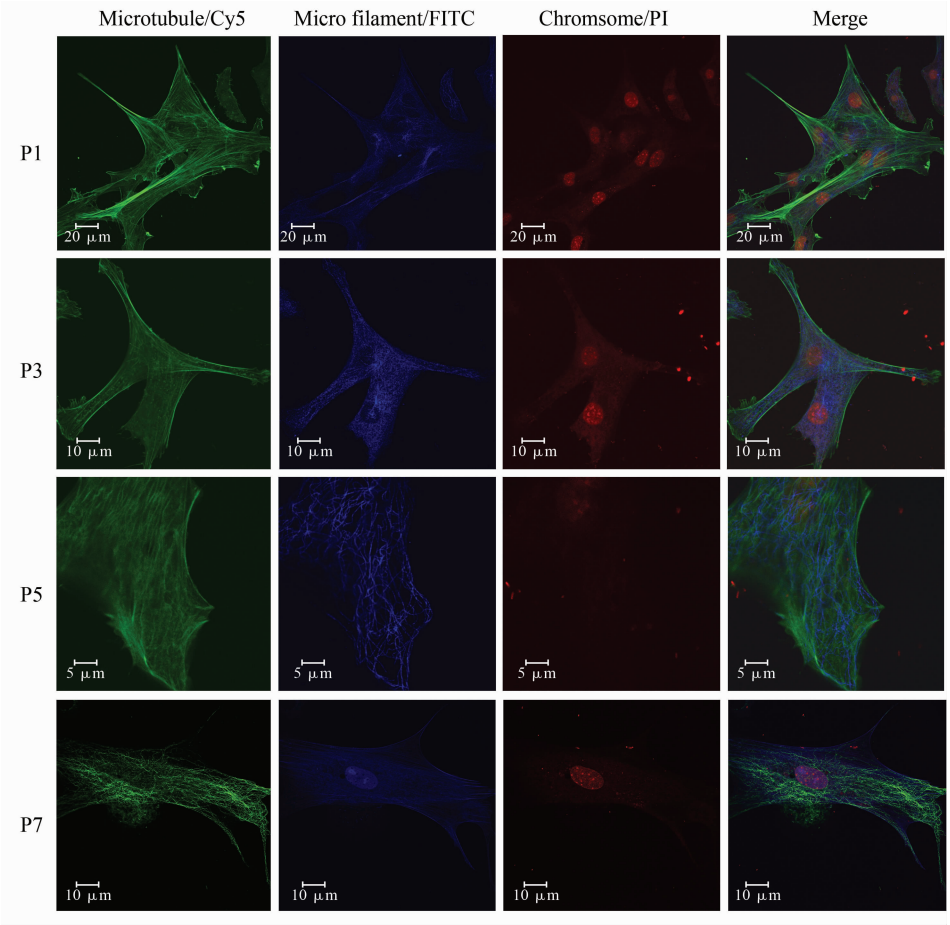


图 3 P1、P3、P5、P7 代 MEFs 细胞骨架免疫荧光

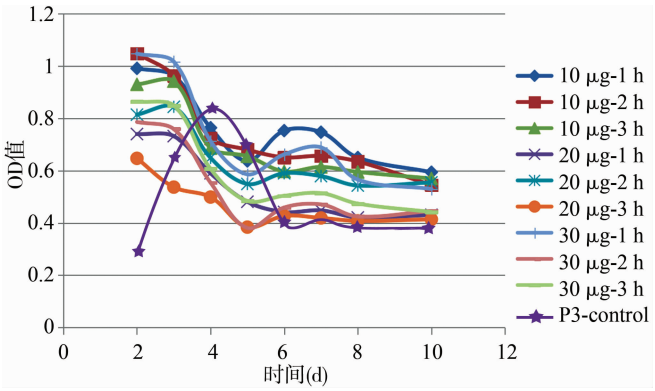


图 4 不同浓度丝裂霉素 C 处理不同时间 MEFs 细胞生长曲线

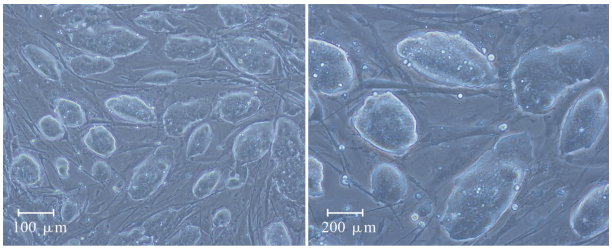


图 5 不同放大倍数下小鼠胚胎干细胞

胚胎成纤维细胞的最佳条件不尽相同,而建立稳定的 MEFs 细胞培养体系是培养胚胎干细胞及进行相关研究的首要环节。为满足后期对胚胎干细胞实验研究的需要,我们参考文献[5-8]报道的小鼠胚胎成纤维细胞分离培养方法,利用胰酶消化法体外获得小鼠胚胎成纤维细胞,利用细胞曲线和细胞骨架免疫荧光染色法对不同代小鼠胚胎成纤维细胞的生长特性进行研究。筛选活力较强的细胞用于制备小鼠胚胎干细胞饲养层细胞,同时设置 3 种浓度的丝裂霉素 C 进行不同时间处理,摸索饲养层细胞制备的最佳条件,使其适应小鼠胚胎干细胞的体外增殖培养并稳定传代不分化,为后期研究基因转染胚胎干细胞进行体外诱导分化提供优质、充足的试验材料和研究基础,也为应用饲养层法进行胚胎干细胞培养与克隆的学者提供参考。

纯度高、活力好的成纤维细胞是保证后续胚胎干细胞试验结果准确、可重复的关键,合适胎龄的胎鼠是获得小鼠胚胎成纤维细胞的原料,前期众多研究表明小鼠胚胎的最佳胎龄为 12 ~ 16 d[9-11]。本实验采用 13.5 d 的胎鼠进行 MEFs 原代细胞的提取分离及培养,可较好地将其头部、尾部、四肢及内脏器官去除而获得纯度较高、活力旺盛的成纤维细胞。实验中,原代培养的 MEFs 细胞含有其他杂细胞,经多次传代可去除杂细胞,到第 3 代细胞时,可得到较为单一的 MEFs 细胞。

小鼠胚胎成纤维细胞也是进行核移植、肿瘤体外模拟微环境构建及组织工程试验材料构建的理想生物材料和种子细胞,是进行细胞结构研究的理想实验材料[12]。近年来研究发现,细胞骨架不仅在维持细胞形态、承受外力、保持细胞内部结构的有序性方面起重要作用,而且与细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递、细胞分化等生命活动密切相关,在癌细胞的迁移、精子的游动、神经细胞轴突和树突的伸展等方面具有重要的作用[13-14]。本实验以不同代小鼠胚胎成纤维细胞为研究对象,利用免疫荧光染色法对不同代 MEFs 细胞进行染色,可清晰显示其微管、微丝及核染色质等细胞骨架成分,初步进行细胞骨架研究,为后期利用细胞骨架研究提供染色方法。同时通过比较 P1、P3、P5、P7 代 MEFs 细胞细胞骨架中微管、微丝及核染色质形态,判断细胞活力。第 1、3 代细胞微管、微丝整齐排列,核染色质清晰,提示细胞生长旺盛;第 5 代细胞核染色质明显下降,提示细胞增殖能力开始降低;第 7 代细胞微管、微丝排列紊乱,核染色质不清晰,显示细胞呈衰老状态。因此,第 3 代细胞是制备饲养层细胞最理想的材料。其结果也印证了 MTT 法得出的细胞生长曲线结果。

丝裂霉素 C 对 MEFs 细胞进行预处理是饲养层制备的关键步骤,适宜的处理浓度及时间能使 MEFs 细胞保持分泌功能的同时失去增殖能力,避免 MEFs 细胞与干细胞发生竞争生长,消耗培养基中的营养成分[15]。本实验选择浓度为 10 μg/mL、20 μg/mL、30 μg/mL的丝裂霉素 C 分别处理 1 h、2 h、3 h,MTT 法检测处理后细胞的增殖能力,结果表明,10 μg/mL 处理 2 h 的 MEFs 能够有效抑制其增殖,并支持 mESCs 的体外培养。丝裂霉素 C 对细胞毒性很大,预处理后要将丝裂霉素 C 尽量洗掉以减少残留,避免对接种的 mESCs 产生毒性。本实验结果显示,制备的 MEFs 饲养层可用于 mESCs 的培养。在制备的 MEFs 饲养层上,mESCs 细胞克隆呈椭圆形生长,细胞体积较小,细胞生长较快,需要每天换液,1 ~ 2 d 即达到亚融合状态,需传代培养。

本研究成功摸索饲养层细胞制备的最佳条件,使其适应小鼠胚胎干细胞的体外增殖培养并稳定传代不分化,为后期本研究小组基因转染胚胎干细胞进行体外诱导分化提供优质、充足的试验材料和研究基础,也为应用饲养层法进行胚胎干细胞培养与克隆的学者提供参考。

[参考文献]

[1] Zhuo B, Yu J, Chang L, et al. Quantitative analysis of chromatin accessibility in mouse embryonic fibroblasts[J]. Biochem Bioph Res Comm, 2017, 493(1): 814 - 820. doi: org/10.1016/j.bbrc.2017.08.065.

[2] Saba-El-Leil MK, Frémin C, Meloche S. Isolation of mouse embryonic stem cell lines in the study of ERK1/2 MAP Kinase signaling[J]. Methods mol Biol, 2017, 1487: 243 - 253. doi: 10.1186/s13287 - 015 - 0024 - 2.

[3] Pei H, Fu HY, Hirai H, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from Chinese hamster embryonic fibroblasts[J]. Stem Cell Res, 2017, 21: 132 - 136. doi: org/10.1016/j.scr.2017.04.010.

[4] Lalit PA, Rodriguez AM, Downs KM, et al. Generation of multipotent induced cardiac progenitor cells from mouse fibroblasts and potency testing in ex vivo mouse embryos[J]. Nat Protoc, 2017, 12(5): 1029 - 1054. doi: 10.1038/nprot.2017.021.

[5] Xu J. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts[J]. Curr Protoc Mol Biol, 2005: Unit 28.1. doi: org/10.1002/0471142727.mb2801s70.

[6] 张学红, 柳立军, 薛石龙, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞制备方法对比[J]. 兰州大学学报, 2014, 40(2): 10 - 15. doi: 10.13885/j.issn.1000 - 2812.2014.02.003.

[7] 张小梅, 方廖琼, 王智彪. 小鼠成纤维细胞饲养层的制备及 C57BL/6 小鼠胚胎干细胞系的建立[J]. 吉林大学学报, 2012, 38(6): 1081 - 1085. doi: 10.13481/j.1671x.2012.06.014.

[8] 胡三强, 王妍妍, 马勇宾, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离培养及饲养层制备[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45): 7306 - 7311. doi: 10.3969/j.issn.2095 - 4344.2014.45.017.

[9] 王胜洁, 景 瑾, 杨万路, 等. C57BL/6 小鼠胚胎成纤维细胞的分离培养与纯化鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, 2(1): 1 - 4. doi: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2015.0159.

[10] 王志强, 梁 锐, 陈明清, 等. 胰蛋白酶消化法和组织块法原代培养包皮成纤维细胞的比较[J]. 生命科学研究, 2012, 16(3): 242 - 247.

[11] 叶 珏, 张燕婉, 时 娜, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养及饲养层制备[J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 20(1): 46 - 48. doi: 10.11748/bjmy.1006 - 1703.2013.01.014.

[12] Li Y, Li L, Chen ZN, et al. Engineering-derived approaches for iPSC preparation, expansion, differentiation and applications[J]. Biofabrication, 2017, 9(3): 032001. doi: 10.1088/1758 - 5090/aa7e9a.

[13] Tee YH, Shemesh T, Thiagarajan V, et al. Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(4): 445 - 457. doi: org/10.1016/j.ydbio.2015.10.019.

[14] Peckham M. How myosin organization of the actin cytoskeleton contributes to the cancer phenotype[J]. Biochem Soc Trans, 2016, 44(4): 1026 - 1034. doi: 10.1042/BST20160034.

[15] 郝同扬, 陈世豪, 张光景, 等. 丝裂霉素 C 对 ICR 小鼠胚胎成纤维细胞饲养层制备的影响[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2013(4): 10 - 12. doi: 10.3969/j.issn.1000 - 7725.2013.04.004.

(编辑:左艳芳)