DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.017
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)13-1171-04

论著

猪皮肤成纤维细胞的培养与鉴定

丁财[1],陈意生[1],魏 泓[2],刘 萍[3] (第三军医大学:[1]西南医院病理科,[2]实验动物中心,重庆 400038;[3]新桥医院妇产科,重庆 400037)

提 要:目的 研究猪内源性逆转录病毒在体内和体外的感染性,建立理想的细胞模型,为猪一人间跨种移植的生物安全性评价奠定良好的基础。方法 运用组织块培养法、冷胰蛋白酶方法及热胰蛋白酶方法培养猪皮肤成纤维细胞,比较3种方法的优点和缺点。结果 建立了猪皮肤成纤维细胞系组织块培养法优于胰酶法。结论 应用组织块培养法培养猪皮肤成纤维细胞优于胰酶法,经济实惠、操作简便、易于掌握;并为研究PERV在体内和体外的感染性提供了理想的细胞模型,为评估猪一人间跨种移植的生物安全性提供一种新的方法;对建立动物克隆生产的皮肤体外培养模式具有重要的参考价值。

关键词:成纤维细胞;猪内源性逆转录病毒;异种移植;生物安全性;感染;培养;皮肤;猪
中图法分类号:R322.99;R329.2 文献标识码:A

Cultivation and identification of porcine skin fibroblasts

DING Sheng-cai[1], CHEN-Yi-sheng[1], WEI Hong[2], LIU Ping[3] ([1]Research Institute of Pathology, Southwest Hospital, [2]Department of Laboratory Animal Science, [3]Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, 400037, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objectives** To establish an ideal cellular model for the study of infection of porcine endogenous retrovirus in intro and *in vivo* and to lay the foundation for evaluating the biological safety of xenotransplantation. **Methods** Porcine skin fibroblasts were cultured by tissue pieces, cold trypsin, and heat trypsin, respectively. The merit and defect of these methods were analyzed. **Results** Porcine skin fibroblast line was established and the tissue piece method was superior to trypsin methods. **Conclusion** Culture of porcine skin fibroblasts with tissue pieces is superior to trypsin method, with the characteristics of low cost and easy operation. The established porcine skin fibroblast cell line supplies an ideal cell model for the study of infection of porcine endogenous retrovirus *in vitro* and *in vivo*, provides a new method for the evaluation of biological safety of xenotransplantation, and plays an important role in the skin culture model of production of cloned animals.

Key words: fibroblast cell; porcine endogenous retrovirus; xenotransplantion; biological safety; infection; culture; skin; pig

猪器官、组织和细胞作为猪一人间跨种移植的供体源具有广阔的前景,但其基因组载有猪内源性逆转录病毒前病毒序列,可能导致猪内源性逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)种间传播发生的潜在危险。因此,建立猪皮肤成纤维细胞系,可为研究猪内源性逆转录病毒的体外和体内感染性提供理想的细胞模型。本研究以猪皮肤为材料来探讨一种简便有效的供体皮肤细胞体外培养方法及其应用。

1 材料和方法

1.1 猪皮肤成纤维细胞的培养

1.1.1 取材及处理 在实验室内取30日龄贵州小香猪腹部皮肤,腹部皮肤先予以剃毛,20%碘酒、75%乙醇消毒处理,局部麻醉后切取约3 cm×3 cm大小的全层皮肤,放入含250 U/ml青霉素和250 μg/ml链霉素的无菌磷酸盐缓冲溶液(双抗PBS)浸泡,移入超净无菌操作台,将猪皮肤组织块置入无菌培养皿中,以双抗PBS溶液洗涤3~5次,剪除毛茬,轻轻刮去表皮细胞和皮下组织,保留真皮层,将皮肤组织块剪碎至3~4 mm小

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G2000016106)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G2000016106)
作者简介:丁生财(1956-),男,江西省萍乡市人,博士,副主任医师,主要从事肝胆胰脾疾病治疗的实验和临床方面的研究,现在新桥医院肝胆外科工作,发表论文15篇,电话:(023)68774606
通信作者:魏 泓,E-mail:weihong@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2004-02-27;修回日期:2004-05-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

块。用吸管将组织块分别转移至3个10 ml玻璃离心管内，使组织块自然沉淀，移去上清液，注入新鲜无菌双抗PBS溶液，使组织块悬浮，沉淀，去上清液，重复洗涤3遍，去掉最后1次的洗涤液，将离心管置于冰上备用。

1.1.2 培养方法

1.1.2.1 组织块培养法[1] 向离心管内加入37 ℃预温的含20%胎牛血清(FCS)的DMEM培养基约3 ml，用无菌吸管将组织块转移至100 ml培养瓶内，并均匀铺开在培养瓶底部，吸去多余的培养液，以使组织块充分吸附于瓶底，即加入37 ℃预温的20% FCS的DMEM培养液10 ml，每2 d更换1次培养液，48~72 h观察组织块旁细胞生长情况。

1.1.2.2 冷胰蛋白酶解离细胞法[1] 向离心管内加入冷却的含0.25%胰蛋白酶的PBS溶液约10 ml，移至4 ℃冰箱内，放置18 h后，取出离心管，小心去上清酶液，仅留少量残存酶液，置37 ℃培养箱，30 min后加入3~4 ml培养液，轻轻吹散细胞，待组织块下沉后，吸取细胞悬液接种于100 ml培养瓶内，按每克组织10 ml培养液比例，加入37 ℃预温的20% FCS的DMEM培养液，置37 ℃ 5% CO_2 培养箱内培养。48~72 h后观察，发现贴壁细胞后更换培养液。

1.1.2.3 热胰蛋白酶解离细胞法[2] 向无菌烧瓶内加入含0.25%胰蛋白酶的PBS溶液约10 ml，置磁力搅拌器上，在36.5 ℃下，搅拌30 min；停止搅拌待组织块下沉后，第1次吸取细胞悬液，置4 ℃冰箱；加新鲜胰蛋白酶消化液继续搅拌30 min后吸取细胞悬液；混合两次细胞悬液，低温，800 r/min，离心5 min，弃去胰蛋白酶溶液；37 ℃预温的20% FCS的DMEM培养液重悬细胞，接种于100 ml培养瓶内，置37℃ 5% CO_2 培养箱内培养。48~72 h后观察细胞贴壁情况，发现贴壁细胞即更换培养液。

1.1.3 传代、冻存和复苏

1.1.3.1 传代和冻存 待细胞生长至90%汇合时，以0.25%胰蛋白/0.04% EDTA溶液消化3~5 min，显微镜下观察细胞变圆时，加入5~6 ml DMEM培养液终止消化，转轻吹打，以使细胞游离。取1 ml细胞悬液转移至37 ℃预温的20% FCS的DMEM溶液的培养瓶内进行传代培养。或细胞消化后，将细胞悬液转移10 ml离心管内，800转/min，离心5 min，倾去多余培养液，保留约1 ml，将细胞重新混悬，分装于2 ml冻存管，然后加入20% FCS和10%二甲基亚砜(DMSO)，密封冻存管，先将冻存管置4 ℃冰箱0.5 h，然后移入-20 ℃至细胞悬液冰冻，再将冻存管悬于液氮罐内，约20 min后将冻存管沉入液氮内，-196 ℃长期保存。

1.1.3.2 细胞复苏 复苏时将冻存管从液氮罐内取出，迅速放入37 ℃水浴中复温，吸出细胞悬液注入离心管并加入8 ml培养液，混合后低速离心5 min，倾去上清液，再加入10 ml培养液混悬，重复低速离心5 min，加入适量新鲜培养液重悬细胞，使细胞密度为1×10^6 ml，接种培养瓶，置37 ℃ 5% CO_2 培养箱培养。

1.1.4 细胞克隆的挑选 将培养至25代的对数生长期细胞消化，取细胞悬液置于无菌培养皿内，在显微注射仪下，吸取单个细胞转移至培养皿内进行单克隆培养，每隔2 d换培养液1次，待培养孔内细胞接近完全汇合时，选择形态典型、生长良好的单克隆继续进行传代培养。

1.2 猪皮肤成纤维细胞系的鉴定

1.2.1 细胞形态学观察 采用倒置显微镜下直接观察和HE染色光学显微镜下观察培养细胞的形态并摄像以及电镜观察猪皮肤成纤维细胞超微结构。

1.2.1.1 培养与固定 用胰蛋白酶溶液消化解离细胞，分别接种于预置载玻片的24孔培养板孔中，按前述方法进行培养，待细胞融合达90%时，取出载玻片，10%的福尔马林溶液固定。

1.2.1.2 电镜标本制备 用0.25%胰蛋白酶溶液消化培养的猪皮肤成纤维细胞，将解离的细胞悬液转移至离心管内，2 000 r/min离心5 min，去除上清液，加入2%的戊二醛溶液固定细胞，送本校电镜实验中心制作样本，在透射电镜下观察培养细胞的超微结构并摄像。

1.2.2 成纤维细胞特征的鉴定 免疫组织化学染色采用S-P法，按试剂盒操作说明进行，DAB溶液显色5~10 min，棕黄色胞质，胞膜染色判断为阳性。设阴性对照，一抗用PBS溶液代替。最后，于光镜下观察并摄像。免疫组化染色检测包括细胞波形蛋白(vimentin)和细胞角蛋白(cytokeratin)。

1.2.3 细胞生长曲线实验

1.2.3.1 细胞接种 用0.25%胰蛋白酶溶液消化培养细胞，计数，将细胞稀释成3个不同的浓度，即1×10^4 细胞/ml，3×10^4 细胞/ml，5×10^4 细胞/ml。将3种不同浓度的细胞分别接种于24孔培养板孔内，每孔接种1 ml细胞悬液，3个不同浓度的细胞各接种24孔。接种时注意将细胞悬液集中在凹孔中央。每隔2 d更换培养液次。

1.2.3.2 细胞计数 每日进行1次细胞计数，用0.25%胰蛋白酶溶液消化培养板各一孔细胞，取全部细胞悬液按台细胞计数方法进行计数。细胞计数前混悬细胞并重复计数4次，取其算术均数计算细胞浓度。

1.2.4 细胞染色体形态观察和计数

1.2.4.1 细胞准备 取对数生长期(培养6~8 d)时，向培养瓶内加入0.02 mg/ml秋水仙碱溶液200 μl，秋水仙碱终浓度为0.4 μg/ml，37 ℃孵箱培养3 h，倾去培养液，加入0.25%胰蛋白酶溶液1~2 ml消化细胞，镜下观察见细胞变圆并开始脱落时，加入5 ml PBS溶液，轻轻吹打细胞，吸取细胞悬液转移至离心管内，1 000 r/min，离心5 min，倾去上清液，备处理。

1.2.4.2 细胞固定 向离心管内逐滴加入37 ℃预热的0.5% KCl溶液5 ml进行低渗处理，边加边吹打，使细胞分散均匀，37 ℃温育25~30 min加入1 ml甲醇∶冰醋酸(3∶1)溶液固定，混匀，1 000 r/min，离心10 min，倾去上清液；加入5 ml甲醇∶冰醋酸溶液重悬细胞，室温放置20 min；1 000 r/min，离心10 min，倾去上清液；第3次加入5 ml甲醇∶冰醋酸溶液重悬细胞，室温放置30 min，1 000 r/min，离心10 min，倾去上清液；最后加入0.5 ml甲醇∶冰醋酸溶液重悬细胞。

1.2.4.3 细胞滴片 取0 ℃预冷载玻片，呈45°角放置，滴管吸取适当浓度的细胞悬液从高处滴加细胞2~3滴，猛吹液滴使之铺开，用吹风机吹干，光学显微镜下观察细胞密度。

1.2.4.4 细胞染色 将滴片标本置于40~60 ℃烤箱中干燥1~2 d。将PBS缓冲液和0.25%胰酶置于4 ℃冰箱过夜。取干燥滴片置于4 ℃预冷的PBS溶液浸泡5 min，取出滴片，在滴片上铺同样大小的擦镜纸，滴加4 ℃预冷的0.25%胰蛋白酶溶液，均匀铺开，室温放置5 min，揭去擦镜纸，并吸去多余溶液，滴加Giemsa染色液染色，光镜下观察染色体带型并计数染色体数目。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 不同培养方法的培养结果

组织块培养 5 d 后, 部分组织块有细胞向外生长, 7 d 后大部分组织块有细胞向外生长, 9 d 后将组织块取出, 光镜观察细胞呈梭形, 为典型的成纤维细胞形态, 大约 15 d 后细胞汇合成单层细胞。冷胰蛋白酶方法解离细胞相对较少, 但存活率较热胰蛋白酶要高; 热胰蛋白酶方法解离细胞数目较多, 但存活率非常低。完全汇合成单层细胞大约需要 3～4 周。复苏细胞在 48 h 内即可完全贴壁, 繁殖迅速, 约 7～9 d 就可长满。细胞在 7 个月内传代 24 代, 传代细胞与原代细胞在形态和生长速度上无明显差异。

2.2 猪皮肤成纤维细胞的形态学观察结果

HE 染色光镜下观察细胞呈长梭形, 为典型的成纤维细胞形态, 细胞大致呈平行排列, 核较大, 胞质较多。透射电镜观察细胞与细胞之间排列疏松, 无紧密连接和桥粒, 胞质内有丰富的细胞器, 胞质内有较为丰富的粗面内质网(图 1)和滑面内质网(图 2), 胞核呈长梭形, 常染色质较为丰富。

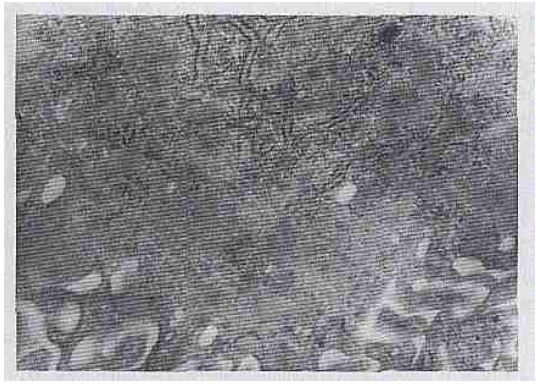


图 1　透射电镜猪皮肤成纤维细胞胞质内有较为丰富的粗面内质网　(TEM× 4 000)

Fig 1　Plenty of rough endoplasmic reticulum in cytoplasm of cultured fibroblasts from porcine skin　(TEM× 4 000)

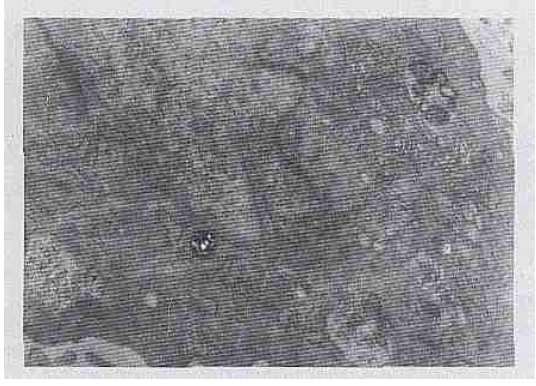


图 2　透射电镜猪皮肤成纤维细胞胞质内有较为丰富的滑面内质网　(TEM× 4 000)

Fig 2　Plenty of smooth endoplasmic reticulum in cytoplasm of cultured fibroblasts from porcine skin　(TEM× 4 000)

2.3 猪皮肤成纤维细胞免疫组化染色结果

将猪皮肤成纤维细胞进行免疫组化染色, 结果细胞波形蛋白呈阳性反应(图 3), 细胞角质蛋白呈阴性反应。



图 3　猪皮肤成纤维细胞免疫组化染色波形蛋白阳性　(S-P× 100)

Fig 3　Positive reaction of cellular vimentin cultured fibroblasts of porcine skin　(S-P× 100)

2.4 猪皮肤成纤维细胞生长特性

接种后第 1 天细胞计数略微下降, 第 2～4 天为缓慢生长期, 第 5～6 天细胞开始加速生长, 第 6～8 天细胞成倍增长, 为细胞快速增长期, 第 8 天以后细胞又转为缓慢增长, 为细胞增长平台期。

2.5 猪皮肤成纤维细胞染色体组型

加入秋水仙碱溶液, 将细胞终止于细胞分裂中期, 观察染色体形态并计数, 油镜下计数 102 个细胞的染色体, 其中二倍体(38 条染色体)细胞 58 个(图 4), 占总数的 56.86%, 四倍体(76 条染色体)细胞 1 个, 异倍体(非 19 整除染色体细胞)细胞数 43 个, 占 42.16%, 无单倍体(19 条染色体)和三倍体细胞(57 条染色体)。

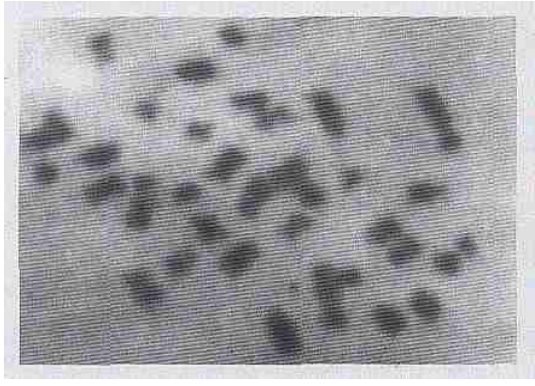


图 4　猪皮肤成纤维细胞二倍体染色体　(Giemsa× 400)

Fig 4　Diploid chromosomes of cultured fibroblasts in porcine skin　(Giemsa× 400)

3 讨论

3.1 细胞分离方法的比较

细胞的分离方法一般有胶原酶消化法[3]、胰蛋白

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

酶消化法和组织块培养法[4]。由于胶原酶价格昂贵，一般多选用胰蛋白酶消化法。胰蛋白酶解离细胞的主要缺点是破损细胞，因此酶浓度、处理温度和处理时间至关重要。在37 ℃时，酶浓度过高或处理时间过长，细胞容易破损死，剩余未损伤细胞也不易贴壁生长；反之，酶浓度过低或处理时间过短，则获得细胞量很少。冷胰蛋白酶消化法可使胰蛋白酶在低温(4 ℃)中与组织充分接触，细胞被酶消化作用很弱，细胞不会受到损害。低温时间可长(＞10 h)可短(1 h)，同时免去了搅拌和离心等操作，冷胰蛋白酶法获得的细胞质量相对较高，细胞容易贴壁生长。组织块法在一定限度内保持其原有组织结构，有利于其适应体外培养环境。本实验中比较了3种方法获得原代细胞的周期，以组织块法为最短，冷胰酶法次之，热胰酶法最长。通过组织块多次转移，可获得大量原代细胞，可充分满足对实验用原代细胞的特殊需要。胰酶法无法满足这一需求；此外，组织块法经济实惠，操作简便，易于掌握。

3.2 细胞系建立和纯化方法的改进

一般采用克隆化环或射线照射法[3]挑选细胞建立细胞系，其细胞系往往是多克隆，难以保证细胞的纯化。在本实验中采用传代后短期培养的细胞，用显微注射仪挑取单个细胞进行培养，得到一个单克隆细胞株，首先保证了细胞株的纯度。然后在光镜下观察，挑选形态典型、生长良好的细胞株进行传代培养，可充分保证细胞株纯度。

3.3 细胞系的鉴定

光镜下本细胞系呈典型梭形细胞，电镜观察未发现角质颗粒，免疫组化染色细胞波形蛋白呈阳性反应，细胞角蛋白呈阴性反应，因此，该细胞系不属于上皮细胞系。

细胞染色体计数及分析显示主要为38条染色体的二倍体组成。综合组织来源、光镜、电镜观察和免疫组化及染色体计数结果，判定该细胞系为猪皮肤成纤维细胞系。

3.4 猪皮肤成纤维细胞系的应用

猪基因组携带有PERV前病毒序列，人类接受猪器官、组织或细胞移植是否导致PERV的种间传播发生仍然存在争论[5]。本实验建立的猪成纤维细胞系为研究PERV的体内和体外感染性提供了理想的细胞模型(另有文献报道)，为评估猪一人间跨种移植的生物安全性提供种新的方法。

体细胞克隆是一种新型、高效且极具生产潜力的繁殖技术，在家畜改良和育种工作中前景广阔。在进行持续且大量的家畜克隆生产中，保证取材方便并不影响供体动物健康是十分关键的。只有这样才能使优势供体源基因不会受到损害。从这个角度看，动物的皮肤是最好的供体细胞源，它不但可提供供体个体的完整遗传物质，而且取材后对动物存活和正常生长无甚影响。因此，建立供体动物皮肤体外培养模式是克隆生产的前提。本实验对建立动物皮肤体外培养模式具有重要的参考价值。

参考文献：

[1] 陈瑞铭. 动物组织培养技术及共应用[M]. 北京：科学技术出版社，1998. 77－85.

[2] 刘翼珑，土闽康，李劲松，等. 牛耳成纤维细胞的培养[J]. 动物学报，1999，45(4)：472－473.

[3] Fresheny R I. Culture of animal cells[M]. New York：Alta R Liss Inc，1983. 549－599.

[4] Freshney R I. Animul cell culture[M]. Oxford-Wushington D C：IRL Press，1986. 112－119.

[5] Patience C，Takeuchi Y，Weiss R A. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs[J]. Nat Med，1997，3(3)：282－286.

(编辑 张大春)

(上接1168页)

因上腭为凹弓形，缝合时出针困难，选用小半圆缝合针，出针时用止血钳顶抵出针眼附近组织，使粘膜下陷利于针尖穿出。

3.2.1 对有小缺损伤口的处理 软腭部修整后4-0线褥式缝合；硬腭部在伤口两侧1.5 cm处作长与伤口1倍松弛切口，剥离粘骨膜瓣，拉拢缝合，松弛切口内填塞碘仿纱条，3～5 d抽出纱条[1]。鼻腔穿通伤口，严密缝合肌层及口腔粘膜即可。

3.2.2 上颌骨骨折致硬腭中缝裂伤的处理 对骨折作口内腭侧牵引，伤口闭合使其自行愈合。

3.3 术后观察及药物的应用

软腭伤可引起严重的并发症，应观察生命体征、出血情况以及有无大脑缺氧和神经症状等；术后给予抗菌素、止血药，加强口腔护理[2]。

总之，对儿童腭部外伤的治疗，应针对儿童特点及腭部解剖结构的特殊性，采取正确、有效的治疗方法，方能收到良好的治疗效果。

关键词：儿童；腭部外伤；临床分析

中图法分类号：R782.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴 冰，叶茂昌，李志来，等. 腭裂松弛切口碘仿纱条填塞的临床观察[J]. 临床口腔医学杂志，2003，10(7)：607－608.

[2] 邱蔚六. 口腔颌面外科学[M]. 第4版. 北京：人民卫生出版社，2000. 161－178.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net