

乌龟脑和肝组织细胞的体外培养*

李贵生¹, 赵振云¹, 翁少萍², 梁宠荣¹, 梁志锋¹

(1. 暨南大学生物工程学系, 广东 广州 510632;

2. 中山大学生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要: 以乌龟脑和肝组织为材料, 用 $\varphi=20\%$ 胎牛血清的DMEM培养液进行体外培养, 同时也对肾、心肌、脾脏、尾部肌肉等组织进行了体外培养, 结果表明: 原代培养的脑细胞(TBCs)和肝细胞(TLCs)生长良好, 传代TBCs前3代生长稳定, 第4代出现聚集生长, 第5代出现“自发转化”现象, 至12代, “转化”后的细胞体系生长旺盛; TLCs传代后不易增殖, 第3代出现衰退; 肾脏细胞在培养过程中有少量贴壁; 心肌、脾脏、尾部肌肉的细胞培养都不成功。

关键词: 乌龟; 脑; 肝脏; 体外细胞培养

中图分类号: Q954 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579(2010)05-0093-04

Brain and Liver Tissue Cell Cultures *In vitro* from *Chinemys reevesii*

LI Guisheng¹, ZHAO Zhenyun¹, WENG Shaoping², LIANG Chongrong¹, LIANG Zhifeng¹

(1. Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The tissues of brain and liver of *Chinemys reevesii* were cultured *in vitro* by DMEM contained 20% blood serum of cattle fetus and the kidney, cardiac muscle, spleen and tail muscle also were cultured *in vitro*. The results showed that the primary culture of the brain cells (TBCs) and the liver cells (TLCs) grew well and grew steadily for 3 generations. The 4th generation of TBCs showed gathering growth, and “spontaneous transformation” occurred in the 5th generation of TBCs. The “transformed” TBCs grows well until the 12th generation. TLCs propagated hardly after subculture and became declined at the 3rd generation. Some kidney cells attached to the culture plates. The cell cultures of cardiac muscle, spleen and tail muscle were unsuccessful.

Key words: *Chinemys reevesii*; brain; liver; cell culture *in vitro*

全球龟鳖类动物约有13科、89属、270余种^[1], 乌龟 *Chinemys reevesii* 隶属于龟鳖目 Testudinata 曲颈龟亚目 Cryptodira 淡水龟科 Bataguridae 乌龟属 *Chinemys*, 在我国以及东南亚地区广泛分布, 具有重要的经济价值, 是目前我国龟类养殖的主要品种^[2], 也是龟类研究的常用材料。但是随着养殖密度的不断增加和养殖环境的恶化, 近年来频繁暴发的流行病使龟鳖养殖业损失惨重, 特别是病毒病的流行缺乏有效的治疗药物, 只能依赖于预防措

施。组织培养技术可以为分离、鉴定病毒以及病毒在体外增殖提供理想的途径, 但目前未见乌龟细胞系建成的报道, 甚至爬行类动物的细胞系都普遍缺乏。离体培养的细胞可作为病毒体外扩增的场所^[3], 而且动物病毒对细胞系的敏感性正如其对物种的敏感性一样, 具有一定的特异性^[4]。国内李正秋等^[5]在2000年首次建立了中华鳖心组织稳定生长的成纤维细胞系(TSH), 培养至60余代。吴康等^[6]进行了中华鳖胚胎细胞体外培养的研究;

* 收稿日期: 2009-09-13

基金项目: 国务院侨务办公室资助项目(020930)

作者简介: 李贵生(1954年生), 男, 教授; E-mail: ligs56@163.com

李晓莉等^[7]采用组织块移植培养技术,对来源于中华鳖肝脏、脾脏、肾脏、心脏、皮肤及裙边组织细胞进行了原代培养。这些研究为中华鳖的病害防治打下了一定的基础。乌龟细胞系的建立具有深远的科研意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用的乌龟为3~6月龄,体质量10~30 g,取自暨南大学爬行动物养殖场。

1.2 组织培养材料

试验用国产24孔培养板,进口一次性塑料培养瓶。DMEM培养基和胎牛血清,均为美国Gibco公司产品。所有培养液的pH值都调整到7.20。实验在紫外线杀菌1 h以上的无菌室进行。

1.3 组织细胞原代培养

将幼龄乌龟体表清洗干净,消毒和麻醉后放入玻璃平皿,转入超净工作台,将乌龟头骨和甲桥打开,分别取出其脑部组织、肝脏、脾脏、肾、心脏和尾部肌肉等,放入不同的平皿中,用PBS浸泡。

脑部组织用含有双抗的PBS漂洗,剔除软骨组织并剪成块,再用PBS漂洗多次后吸去多余液体。其他脏器组织用含有400万单位/mL双抗的PBS漂洗。各组织小块集中于平皿一角,用眼科剪不断反复剪切组织块约20~30 min,约剪成1 mm³大小。剪好的脑部组织块无需经胰酶消化,直接加入约2 mL含有双抗的 $\varphi=20\%$ 胎牛血清的DMEM培养液,用移液器移至25 cm²培养瓶中,轻轻晃动使瓶内液体铺满底面,做好标记,放入27℃恒温生化培养箱内培养,3~5 d组织块贴壁后补加培养液至5 mL,继续培养。其他脏器组织以被消化物5~10倍体积的 $w=0.25\%$ 胰蛋白酶-EDTA消化液消化组织,对于较大的组织块可在消化时继续剪切。消化完全后,加入含有 $\varphi=20\%$ 胎牛血清的DMEM培养液终止消化,反复吹打数次,以400目不锈钢筛网过滤数次,吸入15 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃去上层消化液,加入5 mL新鲜含有双抗和 $\varphi=10\%$ 血清的DMEM培养液重悬细胞,接入25 cm²培养瓶,作好标记,放入27℃恒温培养箱中培养。培养过程中,随时观察细胞的贴壁以及生长情况,培养初期隔3~5 d更换半量的培养液,发现有污染的培养瓶要及时丢弃。

1.4 原代细胞传代

吸去原瓶内培养液,加1 mL含有EDTA的胰

蛋白酶消化液,倾斜培养瓶使消化液覆盖细胞面,在倒置显微镜下观察细胞消化变化并计时,当观察到大部分细胞出现胞质回缩、细胞变成圆球形和细胞间隙增大现象时,加入2 mL含有血清的培养液终止消化。然后用吸管有序地吹打瓶壁细胞,将消化的细胞液移入离心管中,1 000 r/min,离心5 min后去除上层液体。在离心管中加入10 mL含 $\varphi=20\%$ 无抗生素的DMEM培养液,并反复吹吸以将细胞团充分打散。将10 mL的细胞培养液分装于两个25 cm²的培养瓶中,作好细胞类别、代数和日期标记,放入27℃恒温培养箱中培养。

1.5 脑细胞生长曲线测定

取第5代传代细胞,用常规胰酶消化传代方法,制成细胞悬液,在倒置显微镜下,用血球计数板调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,接种到48孔培养板中,待细胞贴壁后换液,隔24 h随机完全消化3孔细胞进行计数,每孔计数3次,取其均值。连续计数7 d,然后绘制曲线。

1.6 细胞的冻存和复苏

用 $\varphi=20\%$ 胎牛血清的DMEM培养液配制含有 $\varphi=10\%$ DMSO的冻存液,待细胞相对密度长至 1×10^6 以上时,将单层细胞培养物按照细胞传代的方法,经胰蛋白酶消化后制成细胞悬液,1 000 r/min离心3 min去上清。加入 $\varphi=10\%$ DMSO冻存液并分散细胞。细胞悬液分装在2 mL冻存管中,每管1~1.5 mL。旋紧冻存管,做好冻存标记,放入冻存盒中,-70℃过夜后投入液氮罐中。

从液氮中取出需要复苏的冻存管,迅速投入43℃水浴中,不断振荡使其快速融化约1 min。室温下5 min内,用25℃左右的 $\varphi=20\%$ 胎牛血清培养液稀释至原体积的4倍,于15 mL离心管中800 r/min,离心3 min,然后去掉上清,加入新鲜培养液,接种于培养瓶培养。待细胞贴壁后,更换培养液继续培养。

2 结果

2.1 脑细胞的原代培养结果

乌龟脑部组织培养至2~3 d开始贴壁。5 d后可见组织块周围有细胞迁出,迁出细胞有神经突起伸长并逐渐增多。乌龟脑细胞(TBCs)生长10 d后可见迁出范围逐渐扩大,形成生长晕,细胞呈扁平三角形,细胞核呈椭圆形,位于细胞中央(图1A)。此后细胞逐渐向组织块外扩展,经2周左右,各生长晕联合成片(图1B,图1C)。原代

细胞培养需要较长时间, 待细胞 90% 铺满培养瓶底即可进行首次传代。

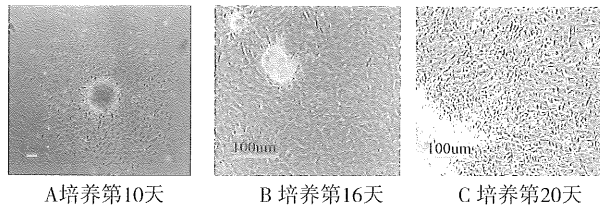


图1 脑细胞的原代培养
Fig. 1 Primary culture of TBCs

2.2 脑细胞的传代结果

TBCs 首次传代贴壁后观察, 可清晰地看到多极的细胞, 伸出较多且粗的突起。第2代 (TBCs-2) 培养1周后, 铺满整个培养瓶的85%以上, 细胞密集。从第3代 (TBCs-3) 开始, 培养瓶中突起逐渐消失, 细胞增殖旺盛。第4代 (TBCs-4) 和第5代 (TBCs-5) 细胞出现聚集生长现象, 且在TBCs-5 细胞生长后期, 在细胞群中出现了细胞体积较小的“转化”细胞 (图2A)。第6代 (TBCs-6) 部分培养瓶中形成了明显的转化灶, 转化的细胞生长旺盛 (图2B), 而原来的细胞停止生长。由第7代 (TBCs-7) 开始, “转化”后的细胞大量增殖, 形成明显的“转化灶”。“转化灶”周围细胞明显空泡化 (图2C), 并逐渐崩解, 培养液中细

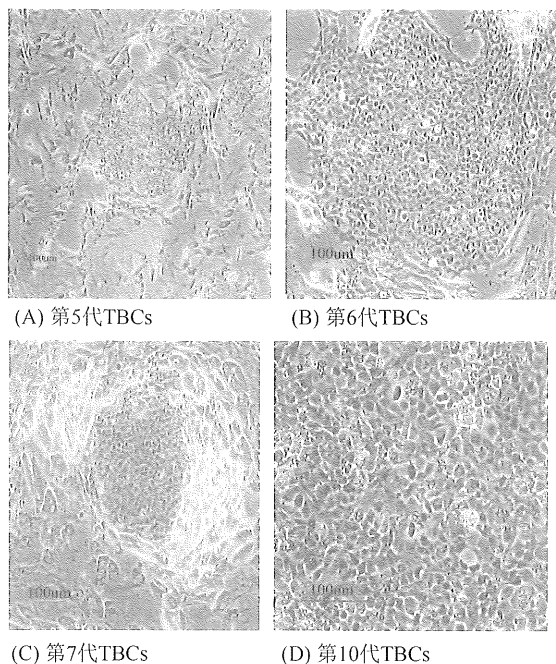


图2 脑细胞的传代培养
Fig. 2 Subculture of TBCs

胞碎片和分泌物增多。第8代 (TBCs-8) 中, 转化细胞不断生长, 原来的细胞继续死亡。至第9代 (TBCs-9) 时, 转化后细胞取代原来细胞稳定生长, 培养瓶完全被转化后的细胞占据。培养至第10代 (TBCs-10), 转化细胞呈多边形 (图2D)。转化细胞形态均一出现在第12代 (TBCs-12)。

2.3 冻存细胞的复苏

将生长状态良好的TBCs-4 细胞冻存, 8周后进行细胞的复苏, 4 h 换液后观察, TBCs-5 已经大部分贴壁, 细胞呈多角形, 有突起。复苏1 d 后细胞生长旺盛, 已经铺满培养瓶底80%。复苏后3 d, TBCs-5 开始聚集生长。至1周时, 细胞聚集呈放射状, 生长停止。

2.4 其他脏器组织的体外培养

肝组织细胞经过胰酶消化并用细胞筛网过滤后较难贴壁, 培养2~3 d 观察, 大部分细胞仍未贴壁, 呈大小相似的圆球形。培养至第9天, 细胞开始贴壁。培养至第11天, 细胞开始生长, 多呈梭状结构。培养2周时, 梭状细胞迅速增加, 汇合成片。第16天时培养瓶中出现典型的多边形细胞, 符合肝细胞特征, 高倍镜下可清楚地看到细胞核和核仁, 且细胞中存在颗粒结构。培养第17天时, 细胞生长汇合成片。培养第18天, 细胞铺满培养瓶底。

传代后的乌龟肝脏细胞 (TLCs) 培养瓶中杂细胞增多。至第3代 (TLCs-3), 培养瓶中非实质细胞增多, 原有的肝实质细胞生长开始下降。传至第4代 (TLCs-4) 时, 细胞成片浮起, 剩余的贴壁细胞内空泡增多, 细胞折光性降低。

分离培养的乌龟肾脏细胞2 d 后即可见贴壁, 但细胞不见生长。培养至第9天, 细胞呈梭状, 无明显增殖。10 d 左右原有的细胞出现死亡。

3 讨论

迄今为止, 未见有关乌龟脑组织细胞的原代及传代培养的报道, 本实验取材于幼年的乌龟脑部组织, 由于幼年乌龟的体型小, 其脑部组织难以大量获得, 机械法和常规的胰酶配合细胞筛网的消化法容易造成细胞的损失, 因此本实验对乌龟的脑细胞采用了传统的组织块移植培养法。我们也曾尝试使用胰酶消化法培养乌龟脑细胞, 结果采用组织块培养法更容易贴壁成功。关于培养体系, 目前我们主要使用高糖的DMEM 培养液进行培养, 我们对比了高糖DMEM 和RPMI1640 两种培养液在乌龟细胞体外培养中的效果, 结果发现高糖的DMEM 更加

适合乌龟细胞的原代培养。

在脑细胞的传代培养中,当培养至第5代时,细胞开始出现衰老。第5代后期,在大量空泡化的衰老细胞中出现了形态同原代细胞明显不同的细胞群体,这种上皮样细胞个体小于原代脑细胞,在原代细胞出现普遍衰老的时候,其生长状态反而更好。镜检可见细胞均质、明亮、透明度大、折光性好。我们认为这种现象是细胞发生了自发转化(Spontaneous Transformation)。体外培养的细胞,受到致突变作用时可发生转化。Reynolds等^[9]在培养胚胎纹状体细胞时用神经表皮生长因子(EGF)诱导一种前体细胞增殖分化成神经元和胶质细胞。这类细胞具有自我分裂、自我复制、自我更新及自我维持的能力,并具有多向分化潜能。其作用类似于造血系统的干细胞,被命名为神经干细胞(neural stem cells, NSCs)。NSCs不仅存在于发育中的哺乳动物的神经系统,而且存在于包括人在内的所有哺乳动物的成熟神经系统内,包括脑室区、海马、脊髓、皮层和中脑均已分离培养出NSCs^[10]。本实验中转化的细胞是否为NSCs,有待进一步研究。

肝脏是动物在正常生理和病理状态下进行能量代谢、毒素的生物转化以及血浆蛋白合成的中心器官。离体培养的肝细胞是一种可以精确模仿体内肝脏活动的简单系统^[11]。目前肝细胞的培养大多处于原代培养阶段,传代培养较少报道,有待进一步开展。本研究结果表明,乌龟肝细胞在原代培养时生长良好,但传代培养至第3代,乌龟肝细胞开始出现退化现象,至第4代细胞开始大量死亡,无法继续传代培养。此外,本实验还尝试分离培养乌龟

的心肌、脾脏、尾部肌肉以及肾脏细胞,结果均不理想。

参考文献:

- [1] 周婷. 龟鳖分类图鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2004:15.
- [2] 周婷,王伟. 中国龟鳖养殖原色图谱[M]. 北京:中国农业出版社,2009.
- [3] WOLF K. Fish Virus and Fish Viral Diseases[M]. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1988:459-472.
- [4] WOLF K, MANN J A. Poikilotherm vertebrate cell lines and viruses: a current listing for fishes[J]. In Vitro, 1980, 16:168-179.
- [5] 李正秋,张奇亚. 中华鳖心组织成纤维细胞系的建立及特征[J]. 中国兽医学报,2001,21(6):583-585.
- [6] 吴康,薛明强,倪建国,等. 中华鳖胚胎细胞体外培养的研究[J]. 中国水产科学,2000,7(2):10-13.
- [7] 李晓莉,曾令兵,张燕,何力,许映芳. 中华鳖5种组织细胞的离体培养实验[J]. 水生态学杂志,2010,3(2):111-115.
- [8] 谷海晶,凌均荣,杜宇. 大鼠牙囊细胞培养方法的探讨[J]. 中山大学学报:医学科学版,2007,28(5):586-589.
- [9] REYNOLDS B A, WEISS S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell[J]. Developmental Biology,1996,175:1-13.
- [10] MCKAY R. Stem cells in the central nervous system[J]. Science,1997,276(5309):66-71.
- [11] 田三德,潘婕,解尚云. 体外肝细胞培养的研究进展[J]. 陕西科技大学学报,2006,24(5):152-155.