

[文章编号] 1000-2782(1999)05-0017-05

血清饥饿对兔成纤维细胞生长的影响

寇全安, 张涌, 李裕强, 郭继彤

(西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨陵 712100)

[摘要] 用含体积分数 0.3% 血清的 DMEM 直接饥饿胎儿及皮肤成纤维细胞, 细胞数先是略有增长, 然后逐渐下降。胎儿和皮肤成纤维细胞在血清梯度饥饿期间, 更换含体积分数为 4%, 2% 和 1% 血清的 DMEM, 细胞仍缓慢增长; 更换含体积分数为 0.3% 血清的培养液后, 细胞数逐渐降低。血清饥饿成纤维细胞后, 细胞直径明显小于对数生长期的细胞 ($20.19 \text{ VS } 36.14 \mu\text{m}$, $P < 0.01$)。血清饥饿的成纤维细胞, PCNA 单抗染色阴性, 证明离开了细胞周期, 进入 G_0 期, 该期的细胞仍保持着活力。

[关键词] 成纤维细胞; 体外培养; 血清饥饿; 兔

[中图分类号] S814.6 [文献标识码] A

Campbell 等^[1]报道, 绵羊胚盘细胞体外培养并用血清饥饿法诱导细胞进入 G_0 期, 作为核供体核移植后, 重组胚能够发育到期产生羔羊。Wilmut 等^[2]报道, 用上述方法获得了以胚胎细胞、胎儿成纤维细胞以及乳腺上皮细胞作为核供体的核移植羔羊。体细胞克隆技术关键在于调节核供体细胞进入 G_0 期, 静止细胞的染色体经历了调整, 在卵母细胞中更容易发生程序重排和发育程序的重新活化^[1,2]。但是 Campbell, Wilmut 没有报道血清饥饿对细胞生长的影响, 本试验通过对兔成纤维细胞分化的研究, 为研究兔的体细胞克隆奠定基础, 并为其他动物的克隆提供参考。

1 材料与方法

1.1 成纤维细胞的分离与培养

1.1.1 胎儿成纤维细胞的分离与培养 手术采摘胎龄为 20 d 的胎儿, 去除胎儿头部和内脏, PBS 清洗后, 任取 1 小块 (约 1 g) 剪碎。将组织碎块移入三角瓶, 加入 2.5 g/L 胰蛋白酶 (Gibco BRL) 10 mL, 室温下用磁力搅拌器搅拌消化 40 min 后, 加入含体积分数为 10% NBS 的 DMEM 终止消化。过滤细胞悬液, 收集分离的单细胞, 离心, 弃上清液, 加入 DMEM (Gibco BRL) 培养液制成细胞悬液, 调整细胞浓度接种卡氏培养瓶, 置于 37℃、体积分数为 5% 的 CO_2 饱和湿度条件下的 CO_2 培养箱中培养。

1.1.2 皮肤成纤维细胞组织块培养法 将组织块修剪为 1 mm³, 用 PBS 液多次洗涤后, 将皮肤组织小块接种在 25 mL 的卡氏培养瓶底, 加入 2 mL 含体积分数为 10% NCS 的

[收稿日期] 1998-10-12

[基金项目] 农业部生物技术重点项目 (95 牧 -01-04-01)

[作者简介] 寇全安 (1972-), 男, 硕士, 在读博士

DMEM培养液,在 37°C 、体积分数为5%的 CO_2 饱和湿度条件下的 CO_2 培养箱中培养

1.1.3 成纤维细胞的纯化 结合使用酶消化法和反复贴壁法,将上皮细胞与成纤维细胞分开。

1.1.4 成纤维细胞传代培养 当培养的成纤维细胞连生后,用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的PBS液清洗后,加入胰蛋白酶, 37°C 消化10 min左右,加入含血清的培养液终止消化,调整细胞浓度接种。置 37°C 、体积分数为5%的 CO_2 饱和湿度条件下的 CO_2 培养箱中培养。

1.2 生长曲线的测定

用2.5 g/L胰酶消化单层细胞,调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^4$ 个/mL接种24孔培养板,每孔接种0.4 mL,置于 37°C 、体积分数为5%的 CO_2 饱和湿度条件下的 CO_2 培养箱中培养。每24 h后,消化收集计数2个孔的细胞数,求取平均值。培养板在培养箱外的时间尽可能短,以避免对正常生长的影响。如果pH值下降,72 h或稍早些换液。以培养时间为横轴,细胞数为纵轴,描绘在半对数座标纸上,连接成曲线,即为该细胞的生长曲线。

1.3 血清饥饿培养

成纤维细胞处于对数生长期尚未连生时,倾出培养液,每次以5 mL PBS洗涤,重复2~3次。直接饥饿,加入含体积分数为0.5%血清的DMEM(Gibco BRL)培养液,培养5~7 d。梯度饥饿,加入含体积分数为4%血清的DMEM培养液,以后每培养24 h,依次更换含体积分数为2%,1%,0.5%血清的培养液,每次更换培养液以前,用PBS洗涤2~3次。

1.4 PCNA单抗ABC染色法

消化细胞,收集细胞悬液,用PBS离心($1\,000\text{ r/min}$,5 min)洗涤2次,弃上清液,加入体积分数为95%酒精固定10 min,然后加等量质量分数为0.1%铬矾明胶混匀,滴加在载玻片上,自然干燥。用PBS振洗5 min,浸入新配制的体积分数为0.5%过氧化氢甲醇溶液处理30 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS振洗后,滴加1:50稀释的增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体(Sigma),在湿盒中, 4°C 下过夜。PBS振洗后,滴加体积分数为1:50稀释的二抗,在湿盒中, 37°C 孵育1 h。PBS振洗3次后,滴加ABC复合剂,在湿盒中, 37°C 孵育1 h。PBS振洗后,0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液THB振洗1次,浸入新配制的含体积分数为0.05% H_2O_2 的DAB液中,室温下暗处显色30 min,用水洗5 min,常规脱水、透明、封片,镜下观察,照相记录。

2 结果与分析

2.1 血清饥饿对成纤维细胞生长的影响

胎儿成纤维细胞与皮肤成纤维细胞分别以 1.5×10^4 个/mL接种0.4 mL在24孔培养板上, 37°C 、体积分数为5% CO_2 饱和湿度下培养。当细胞处于对数生长时,分别进行血清梯度饥饿和直接饥饿。在 $10 \times 10^4 \sim 20 \times 10^4$ 个/mL时,用含体积分数为0.5%血清的培养液,对一些孔进行换液,换液后每24 h后计数。在 $5 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ 个/mL时,以含体积分数为4%血清的培养液对一些孔进行换液,以后每培养24 h,依次更替含体积分数为2%,1%,0.5%血清的培养液并进行计数。

由图1.2可见,胎儿及皮肤成纤维细胞在血清直接饥饿后,细胞数量先是略有增长,

然后逐渐平缓下降。胎儿及皮肤成纤维细胞血清梯度饥饿期间,在更换含体积分数为 4%, 2%, 1% 血清的培养液后,细胞仍缓慢增长;更换含体积分数为 0. 5% 血清以后细胞数量逐渐降低。添加 cGM P 的皮肤成纤维细胞,在更换含体积分数为 4% 血清的培养液以后,细胞数仍有增长;更换含体积分数为 2%, 1%, 0. 5% 血清的培养液后,细胞数量平缓下降。

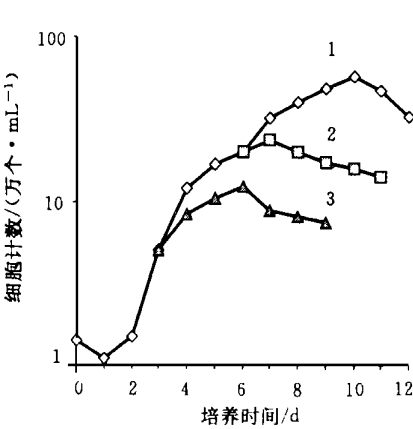


图 1 血清饥饿对胎儿成纤维细胞生长的影响

- 1.胎儿成纤维细胞生长曲线;
- 2.直接饥饿对细胞生长的影响;
- 3.间接饥饿对细胞生长的影响

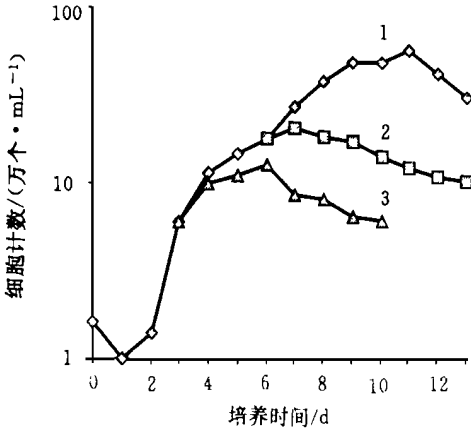


图 2 血清饥饿对皮肤成纤维细胞生长的影响

- 1.皮肤成纤维细胞生长曲线;
- 2.直接饥饿对细胞生长的影响;
- 3.间接饥饿对细胞生长的影响

2. 2 血清饥饿对细胞大小的影响

对数生长期细胞,血清直接饥饿后第 5~ 7 天及血清梯度饥饿的细胞,在更换含体积分数为 0. 5% 血清的培养液培养后,第 2 天细胞进行消化,细胞脱壁变圆,随机测量 100 个细胞直径,求平均值,结果见表 1.对数期细胞直径显著大于血清饥饿的细胞 ($P < 0. 01$),而血清直接饥饿和梯度饥饿的细胞大小差异不显著 ($P > 0. 05$).

2. 3 PCN A 单抗 ABC 法对成纤维细胞染色结果的影响

分别对对数生长的成纤维细胞以及血清饥饿处理的成纤维细胞进行 PCN A 单抗 ABC 法染色,结果 (表 2)表明,血清饥饿后的成纤维细胞 PCN A 单抗 ABC 染色为阴性 (阴性不着色,阳性为黄褐色)。

表 1 血清饥饿对细胞大小的影响

细胞类型	直径 μm
对数期细胞	36(29~ 41) a
血清直接饥饿细胞	20(19~ 24) b
血清间接饥饿细胞	19(15~ 25) b

注: a b, $P < 0. 01$

表 2 PCN A 抗体法成纤维细胞染色

细胞类型	对照	结果
对数期细胞	一抗对照	(-)
	二抗对照	(-)
		(+)
血清直接饥饿细胞		(-)
血清间接饥饿细胞		(-)

3 讨 论

本试验中,胎儿和皮肤成纤维细胞在血清直接饥饿后,细胞数先略微增加,然后平缓下降。对数期细胞大多数处于最佳繁殖阶段,多数细胞分裂生长^[3,4]。在细胞分裂增殖过程中,一旦 DNA 复制完成,细胞增殖活动就会继续进行下去,直到细胞完成分裂^[5]。所以,在更换含体积分数为 0.5% 的血清培养液后第 1 天,细胞数仍有较小程度的增加。含体积分数为 0.5% 血清的培养液,缺乏血清生长因子,不能刺激细胞分裂,细胞停滞在静止的生态。用血清梯度饥饿成纤维细胞,在更换含体积分数为 4%、2% 和 1% 的血清培养液后,细胞仍能缓慢生长;更换含体积分数为 0.5% 血清的培养液,细胞数量逐渐降低。一般减少培养液中的血清含量,细胞增殖就要降低;增加血清含量,则细胞增殖加速^[5]。在含体积分数为 4%、2%、1% 血清的培养液中,虽然血清生长因子的浓度下降,仍然能促进细胞分裂,但效果不如含体积分数为 10% 的血清。更换含 1% 血清的培养液后,细胞数量略有增长,与用体积分数为 1% 小牛血清培养 3T3 细胞的情况相似^[6]。

组织培养中,在限制生长的条件下,主要是缺乏生长因子,许多细胞系则停留在静止的生理状态(G_0 期),并且 G_0 期细胞是完全可逆的。Renato 认为^[5],用含体积分数为 1% 血清的培养液或条件培养液可使 WI-38 细胞保持静止状态 100 d。更换含体积分数为 10% 血清培养液后,静止细胞仍能进入细胞周期进行分裂增殖^[5]。本试验中,血清饥饿长达 10 d 的细胞台盼蓝染色表明,细胞存活率在 90% 以上,添加含体积分数为 10% 血清的培养液培养 2 d 后,可见大量的成纤维细胞正在分裂。这表明,饥饿后进入静止状态的细胞仍保持着生命力。

本试验测得对数生长期的兔成纤维细胞直径平均为 $36\mu\text{m}$,血清饥饿的兔成纤维细胞体积明显减小,血清直接饥饿细胞直径平均为 $20\mu\text{m}$,血清梯度饥饿细胞值平均为 $19\mu\text{m}$ 。1 个细胞从这次有丝分裂到下一次有丝分裂,其大小增加 1 倍,如果 M 期的细胞不增加 1 倍的话,则经过每一次分裂,细胞就变得越来越小,直到最后消失^[7]。细胞在有丝分裂中,其蛋白质、RNA 重量均加倍^[8,9]。只有在有丝分裂完成时,一些对细胞生长所必须的物质丢失后才具有 G_1 期,这时细胞变小^[10,11]。体积分数为 0.5% 血清饥饿成纤维细胞后,由于缺乏生长因子细胞不能正常生长和有丝分裂,从而停止在静止状态,这可能是细胞饥饿后变小的原因。

PCNA 是在进化中高度保守的 36 kD 分子,在 G_1 期出现,在 S 期结束后消失,在哺乳类细胞中是 DNA 聚合酶 δ 的附属蛋白,能促进 DNA 聚合酶 δ 延伸 DNA 链以及参与 DNA 损伤的修复^[12,13]。用 PCNA 单克隆抗体分别对对数生长及血清饥饿的成纤维细胞进行 ABC 法染色,对数生长的成纤维细胞表现为阳性,而血清饥饿的细胞为阴性,这与 Wilmut 报道血清饥饿诱导细胞进入 G_0 期相一致^[2],从而证明了经血清饥饿变小的细胞离开了细胞周期,而进入 G_0 期。

[参考文献]

[1] Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. Nature, 1996, 380: 64-66.

[2] Wilmut J, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J].

- Nature, 1997, 385: 310~ 313.
- [3] Ian Freshney. Culture of animal cells, a manual of basic technique[M]. Second edition. New York: Alan R Liss Inc, 1987.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996.
- [5] Renato Baserga 著. 细胞繁殖的生物学[M]. 薛绍白, 张鸿卿, 王端瑞, 等译. 北京: 北京师范大学出版社, 1985.
- [6] 章静波. 细胞生物学实用方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990.
- [7] Skog S, Eliasson E, Eva Eliason. Correlation between size and position within the division cycle in suspension cultures of Chang liver cells[J]. Cell Tissue Res, 1979, 12: 501~ 511.
- [8] Baxter G C, Stanner C P. The effect of protein degradation on cellular growth characteristics[J]. J Cell Physiol, 1978, 76: 139~ 146.
- [9] Ashihara T, Tragano F, Baserga R, et al. A comparison of cell cycle related changes in post mitotic and quiescent AFB₁ cells as measured by cytofluorimetry after acridine orange staining[J]. Cancer Res, 1978, 38: 2514~ 2518.
- [10] Liskay R M. Genetic analysis of a Chinese hamster cell line lacking a G₁ period[J]. Exp Cell Res, 1978, 114: 69~ 77.
- [11] Liskay R M, Prescott D M. Genetic analysis of the G₁ period: isolation of mutant (or variants) with a G₁ period from a Chinese hamster cell line lacking G₁[J]. Proc Natl Acad Sci, 1978, 75: 2873~ 2877.
- [12] Waseem N H, Lane D P. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) – structural conservation and the detection of a nucleolar form[J]. J Cell Sci, 1990, 96: 121~ 129.
- [13] Shivji K K, Kenny M K, Wood R P. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair[J]. Cell, 1992, 69: 367~ 374.

The impact of serum starvation on growth of rabbit fibroblasts

KOU Quan-an, ZHANG Yong, LI Yu-qiang, GUO Ji-tong

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwestern
Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract After using DMEM including 0.5% NCS for direct starvation, the numbers of fetal and skin fibroblasts first increased slightly, then gradually decreased. During the serum gradient starvation, with changing DMEM including 4%, 2% and 1% NCS, the numbers of fetal and skin fibroblasts still increased a little; and after being changed medium including 0.5% NCS, the numbers gradually decreased. Diameter of the fibroblast was obviously smaller than that of cells during log phase ($20\mu\text{m}$, $19\mu\text{m}$ VS $36\mu\text{m}$, $P < 0.01$) after serum starvation. Stained by antiproliferating cell nuclear antigen (PCNA), the cells after serum starvation were negative. This confirmed the cells had exited from cell cycle and been induced to G₀ phase. The cells in G₀ phase still maintained viable.

Key words fibroblast; culture in vitro; serum starvation; rabbit