

流式细胞仪分析法检测黑熊成纤维细胞 周期同步化处理效果*

刘志春^{1,2}, 李六金¹, 杨贵忠¹, 朱德生¹, 张生勇², 冯秀亮³

(1 第四军医大学 实验动物中心, 2 基础部化学教研室, 3 西京医院, 陕西 西安 710032)

[摘要] 分离培养黑熊皮肤成纤维细胞, 传3代, 分别经血清饥饿2~6 d和10 g/L Nocodazole 处理24 h后, 用流式细胞仪分析2个处理组和对照组细胞的周期相, 以研究黑熊成纤维细胞同步化处理后的细胞周期时相的变化, 探讨核移植供体细胞的细胞周期对核移植胚胎发育的影响。结果显示, 血清饥饿组、Nocodazole 处理组及对照组的G₀+G₁期成纤维细胞的百分率分别为(85.05±7.00)%, (45.9±3.7)%和(59.3±6.7)%; G₂/M期细胞的百分率分别为(10.4±6.8)%, (46.3±4.2)%及(23.05±1.05)%。表明血清饥饿法能较好地使黑熊成纤维细胞同步于G₀和G₁期, Nocodazole 处理可以使细胞较大幅度同步于G₂和M期。

[关键词] 成纤维细胞; 细胞周期同步化; 流式细胞仪; 黑熊

[中图分类号] Q 813.1⁺; Q 954.4

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2003)04-0077-03

核移植是哺乳动物克隆技术的核心组成部分, 从核移植成功之日起就受到科学界的高度重视。而在克隆动物研究中, 供体细胞的细胞周期状态是影响核移植重构胚胎进一步发育的重要因素^[1]。目前认为, 供体细胞与受体卵母细胞的细胞周期协调一致时, 有利于供体核在受体的卵母细胞质中形态重塑, 并在新卵胞质的指导下恢复发育的全能性, 引起发育程序重编。本研究采用经典的血清饥饿法和Nocodazole 处理法对黑熊成纤维细胞进行同步化处理, 通过流式细胞仪检测细胞内DNA 的含量来确定各周期细胞所占的百分比, 以评价同步化处理的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

胎牛血清, Nocodazole, RPMI 1640 培养基(无Ca²⁺, Mg²⁺ PBS液), 胰蛋白酶(Sigma公司), 无Ca²⁺和Mg²⁺磷酸盐缓冲液(无Ca²⁺, Mg²⁺ PBS液), 6个月雌性黑熊(陕西省楼观台野生动物保护中心), 流式细胞仪(美国Coulter公司Elite-ESP型), 倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 方法

1.2.1 黑熊成纤维细胞培养 取黑熊颈部皮肤组织, 按常规的组织块培养法分离培养黑熊皮肤成纤

维细胞, 并传3代。

1.2.2 黑熊成纤维细胞同步化处理 将传3代的成纤维细胞分为不同处理组。①对照组; ②血清饥饿处理组: 用含5 mL/L 血清的1640培养液培养2~6 d; ③Nocodazole 处理组: 用含10 g/L Nocodazole和100 mL/L 血清的1640培养液对培养3 d的细胞处理24 h。

1.2.3 流式细胞仪细胞分析 用含2.5 g/L 胰蛋白酶+0.4 g/L EDTA的无Ca²⁺, Mg²⁺ PBS液消化各组细胞, 并分别收集于5 mL的离心管中, 用2.5 mL PBS洗涤2次(800~1 000 r/min离心5 min)弃上清, 加入1 mL PBS将细胞混匀, 再加入2 mL无水乙醇立即振荡混匀, 封口膜封口, 置4℃冷藏室备用(细胞固定以后15 d内均可使用)。检测时, 调整细胞浓度为5×10⁵~1×10⁶ mL⁻¹, 振荡混匀, 流式细胞仪检测G₀, G₁, S, G₂和M各期的细胞。

1.2.4 统计学处理 流式细胞仪检测结果均以($\bar{x} \pm s$)表示, 用SPSS 10.0统计软件处理, 采用ANOVA分析数据。

2 结果与分析

2.1 同步化处理对成纤维细胞周期的影响 用流式细胞仪检测对照组和同步化处理组

* [收稿日期] 2003-04-22

[作者简介] 刘志春(1971-), 男, 云南宜良人, 讲师, 在读硕士, 主要从事胚胎工程研究。

G₀+ G₁, S 和 G₂/M 各期细胞的百分率, 结果见表 1。由表 1 可知, 血清饥饿处理 72 h 后, G₀+ G₁ 期成纤维细胞的百分率为(85.05±7.00)%, 明显高于对照组和Nokodazole 处理组(P<0.05); 而经Noko-

dazole 处理后, G₂/M 期成纤维细胞的百分率为(46.30±4.20)%, 明显比对照组(23.05±1.05)%高(P<0.05), 而处于其他周期相的细胞数量则相对减少。

表 1 不同处理方法对成纤维细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of different treatment methods on cell cycle				%
组别 Groupes	G ₀ + G ₁	S	G ₂ /M	
对照 Control	59.30±6.70 a	17.65±4.65	23.05±1.05 a	
饥饿 72 h Starvation 72 h	85.05±7.00 b	4.55±1.50 a	10.40±6.80 b	
Nokodazole 处理 24 h Nokoda- zole Treatment 24 h	45.90±3.70 bc	7.80±5.60	46.30±4.20 bc	

注: 同一列字母不同表示差异显著(P<0.05)。下表同。
Note: Different small letters in same column indicate significant difference (P<0.05). The same is to the following tables

2.2 饥饿时间对细胞周期的影响

用含 5 mL/L 血清的 RPM I 1640 培养液对处于对数增长期的成纤维细胞分别进行 2, 3, 4, 5, 6 d 的饥饿培养, 流式细胞仪检测 G₀+ G₁, S 和 G₂/M

各期细胞的分布, 结果见表 2。由表 2 可见, 饥饿 3, 4 d 时 G₀+ G₁ 期的细胞所占百分率明显高于 2, 5, 6 d 时的细胞(P<0.05), 而饥饿 5, 6 d 时, G₀+ G₁ 期细胞的数量减少, 细胞碎片增多。

表 2 不同饥饿时间对细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of starvation time on cell cycle				%
饥饿时间/d Starvation time	G ₀ + G ₁	S	G ₂ /M	
2	78.85±6.65 a	13.35±3.15 a	7.80±3.80 a	
3	85.05±7.00 b	4.55±1.50 b	10.40±6.80 a	
4	81.50±3.50 b	10.50±1.00 c	8.00±2.50 a	
5	75.15±3.05 a	11.90±1.70 c	12.95±1.25 b	
6	67.30±4.30 c	15.43±2.60 a	17.87±7.10 b	

3 讨 论

第一例体细胞克隆动物是用血清饥饿法培养后, 处于 G₀ 期(静止期)的绵羊乳腺上皮细胞作核移植供体获得的。此后, 供核细胞和受体卵母细胞的细胞周期协调性在核移植中的作用引起了人们的广泛关注。许多研究者认为, 供体细胞在 G₀+ G₁ 状态下有利于核移植重组胚胎的发育^[2,3]。本试验用血清饥饿法处理培养至对数增长期的黑熊成纤维细胞, 结果表明, 血清饥饿法处理后 G₀+ G₁ 期细胞的百分率显著升高(P<0.05), G₂/M 期细胞比例降低。这一结果与 Zakhartchenko 等^[4]的报道类似。Nokodazole 是一种细胞微管抑制剂, 可阻止微管蛋白聚合和纺锤体形成, 使细胞同步于 M 期, 从而使大部分

细胞的发育停滞在 G₂/M 期和 M 期。Tanaka 等^[5]报道, 经Nokodazole 处理的 M 期细胞的数量显著增加。本试验结果也表明, 经Nokodazole 处理后 G₂/M 期细胞比例明显高于对照组, 而其他周期相的细胞数量则相对减少。

血清中含有多种促进细胞增殖的因子, 血清浓度极低的培养液仅能维持细胞处于某种状态, 而不发生增殖, 应用这一原理可以使细胞同步于某一期。通常, 随着饥饿时间的延长, G₀+ G₁ 细胞的百分比增加, 但超过一定限度时细胞会因长时间缺乏营养而受到损伤, 核内 DNA 碎片增多, 甚至死亡, 从而影响核移植的总体效率^[6]。本研究结果表明, 饥饿 3 d, G₀+ G₁ 期细胞所占百分率最高(85.05±7.00)%。

[参考文献]

[1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature, 1997, 385: 810- 813
[2] Ono Y, Shimozawa N, Ito M, et al. Cloned mice from fetal fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer[J]. Biol Reprod, 2001, 64(1): 44- 50
[3] Beyhan Z, Mitalipova M, Chany T. Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos produced using different types of adult

donor cells[J]. Theriogenology, 2000, 53: 210

- [4] Zakhartchenko V, Durcova-Hills G. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts[J]. Reprod Fertil, 1999, 115(2): 325- 331.
- [5] Tanaka H, Takahashi Y, Hishinuma M. Influence of nocodazole on the development of donor blastomeres from 16-cell stage bovine embryos in nuclear transfer[J]. Jpn J Vet Res, 1995, 43(1): 1- 14
- [6] Boquest A C, Day B N, Pblack Bearher R S. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells[J]. Biol Reprod, 1999, 60(4): 1013- 1019

Effect of synchronization-treated bear fibroblast cells cycle analysed by flow cytometer

L IU Zhi-chun^{1,2}, L IL iu-jin¹, YANG Gui-zhong¹,

ZHU De-sheng¹, ZHANG Sheng-yong², FENG Xu-liang³

(1 Laboratory Animal Center of FMMU; 2 Department of Chemistry of FMMU; 3 Xijing hospital of FMMU, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract: After 3 passages of the primary black bear fibroblast cells, the cells were serum starved for 2- 6 days or treated with 10 g/L Nocodazole for 24 h, then calculation of percentages of the treated cells and the control cells in G₀, G₁ and G₂+ M phases of the cell cycle by using flow cytometer was conducted respectively, to investigate the cell cycle characteristics of different treatment cultured fibroblast cells. The results showed that: G₀+ G₁ cell percentage of the serum starvation, Nocodazole treatment, and control are (85.05±7.00)%, (45.9±3.7)% and (59.3±6.7)%, respectively. G₂/M are (10.4±6.8)%, (46.3±4.2)% and (23.05±1.05)%, respectively. Black bear fibroblast cell treated with serum starvation for 5 days contained higher ($P < 0.05$) percentages of G₀+ G₁, whereas cells treated with nocodazole contained higher percentage of G₂+ M.

Key words: fibroblast cell; synchronization of the cell cycle; flow cytometer; black bear

欢迎订阅 2004 年《上海交通大学学报·农业科学版》

《上海交通大学学报·农业科学版》是由上海交通大学主办,上海交通大学农业与生物学院承办的综合性学术期刊。主要刊登作物遗传育种、种质资源、植物保护、生理生态、耕作栽培、土壤肥料、灌溉及排水、园林园艺、农产品加工、畜牧兽医等学科的基础及应用研究的综述、论文、简报等。读者对象主要是国内外农业科学研究单位、农业院校以及综合性大学等有关农业科学研究与管理人员。

《上海交通大学学报·农业科学版》2004 年为季刊,大 16 开,国内外公开发行,国内刊号:CN 31-1837/S,国际标准刊号:ISSN 1671-9964,邮发代号:4-695。每期 80 页,定价 7.00 元,全年 28.00 元。

编辑部地址:上海市七莘路 2678 号,邮政编码:201101。电话:(021)64789728,传真:(021)64785707,电子邮箱:xuebao@sjtu.edu.cn