

鹿茸干细胞体外培养技术的研究

孙红梅^{*}, 邢秀梅, 丛 波, 李春义, 杨福合
(中国农业科学院特产研究所, 吉林 132109)

摘 要: 利用消化酶消化法, 用 DMEM 培养基对鹿茸干细胞进行了体外培养, 分别从原代培养、传代、冻存、以及复苏等几个环节进行了试验。摸索鹿茸干细胞合适的体外培养条件, 为鹿茸的各项相关研究打基础。结果表明, 用透明质酸酶和胶原酶对组织样进行消化, 然后用 10% DMEM 培养基进行培养细胞生长效果较好。适宜培养条件是 37 ℃、5% CO₂ 最大饱和湿度。

关键词: 鹿茸; 干细胞; 体外培养

中图分类号: Q813.1⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7448(2007)01-0007-03

Cultural Technique of Deer Antler Stem Cell in Vitro

SUN Hong-mei, XING Xiu-mei, CONG Bo, LI Chun-yi, YANG Fu-he

(The Institute of Special Economic Animal and Plant Sciences, CAAS, Jilin 132109, China)

Abstract: The culture conditions of deer antler cell in vitro were studied in the research. The result showed that the cell could be cultured in vitro with the hyaluronidase and collagenase to digest tissue and grow well in the medium of 10% FCS DMEM. The optimized culture condition was in the environment of 37 ℃, 5% CO₂ and saturated humidity.

Key words: deer antler; stem cell; culture in vitro

鹿茸是鹿科动物的副性征, 作为鹿的一个器官, 具有周期性脱落、然后完全再生的特点。在快速生长期每天可生长 1.0~3.0 cm, 细胞分化的速度至少相当于癌细胞的 30 倍。对鹿茸再生机理的研究^[1]表明, 鹿茸的再生不是反向分化的结果, 而是建立在干细胞基础上的反应。研究表明, 鹿额外脊骨膜细胞是鹿茸发生的干细胞, 用基因标记的方法也证实了这一结论的正确性^[2]。从三维组织学方面^[2-4]研究得出, 鹿的一个生茸区有 200 万个干细胞, 可以维持鹿一生的生茸。对鹿茸干细胞的研究不仅为鹿茸发生及再生机制的研究打下了基础, 而且也对鹿茸快速生长及再生特性的研究与利用奠定了基础、指明了方向。而对鹿茸干细胞体外的成功培养正是所有研究的基础和前提。因此, 本文主要研究了鹿茸干细胞的体外培养技术, 旨在为鹿茸的各项研究打下坚实的基础。

1 试验材料

1.1 材料

1.1.1 培养基及主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、各种胶原酶、透明质酸酶、谷氨酰胺、hepes 等购于海澳生物技术有限公司。二甲基亚砷(DMSO) 购于 Sigma 公司; 10% FBS+DMEM 为细胞培养基基础液; 细胞消化液为 0.08% 的胰蛋白酶; 冻存液为 10% DMSO。所有细胞培养用液用孔径为 0.45 和 0.22 μm 的滤膜过滤。

1.1.2 主要设备 ESPEC BNA-311 型 CO₂ 培养箱; 奥林巴斯 CKX41-32PH 倒置显微镜。

1.2 方法

1.2.1 原代培养 ①取样: 取快速生长期鹿茸尖部前软骨组织, 立即放入无菌的装有 PBS 的小瓶里, 迅速带回实验室。

* 作者简介: 孙红梅(1978), 女, 硕士, 主要从事特种经济动物分子生物学的研究。

收稿日期: 2006-07-14

1.2.2 采用消化酶消化法进行原代培养 在无菌间内剪碎取样组织,用 PBS 洗 1~2 次,然后加入 30~50 倍体积的透明质酸酶和胶原酶 I 混合液消化一段时间,再用胶原酶 II 消化,在消化过程中注意观察消化液的混浊情况以及细胞的游离情况,当细胞部分游离时,800 r/min 离心 5 min,最后将收集到的细胞及组织小块用无血清的 DMEM 洗 1 次,接种到培养液中,放入 37 °C、5% CO₂ 最大饱和湿度的培养箱中培养。3~4 d 后观察细胞的贴壁情况,在倒置显微镜下可以看到细胞从骨髓碎块周围生长出来,饱满透明,立体感较强。此后,约 2 d 换 1 次液,8~10 d 即可长满汇合。

1.2.3 培养细胞的传代 待原代细胞生长到 80%~90% 汇合时,进行细胞传代培养。先用 PBS 液洗 1~2 次,或用少量的胰蛋白酶洗 1 次,以排除培养液对消化酶的影响。再用含 0.08% 胰蛋白酶的 Hanks 液消化,待细胞变圆、脱壁时收集消化下来的细胞于离心管内,800 r/min 离心 5 min,倒掉消化液,再以 1×10^5 个/mL 的密度接种到新的 10% FBS 的 DMEM 培养液中,用吸管吹打使细胞悬浮均匀,放入 37.0 °C、5% CO₂ 最大饱和湿度的培养箱中培养。此后每隔 4~6 d 传一代。首次传代和第 2、3 次传代时要注意调节消化时间来纯化鹿茸干细胞。以分离其他细胞^[5]。

1.2.4 细胞的冷冻保存 传代培养的细胞相互汇合形成单层细胞时,如果需要保存一部分细胞。首先,用与传代培养相同的方法消化、收集细胞。离心弃消化液后,加入含 10% DMSO 的细胞冷冻液,轻轻吹打,使其成为最终浓度为 5×10^6 个/mL 的均匀的细胞悬液。然后将细胞悬液分装入 2 mL 的冻存管内,所装体积为冻存管容积的 2/3 即可,用封口膜封口。再用较厚的脱脂棉包好,然后装入泡沫的保温盒内,直接放入超低温冰箱。使其缓慢冻结。最后放入液氮中长期保存,或放在 -80 °C 冰箱长期保存^[5]。

1.2.5 细胞的复苏 细胞的冻存需要慢冻,但细胞的复苏需要快速复苏,以避免在冷冻和融化的过程中形成冰晶,刺破细胞,影响其成活率。因此在复苏时首先将细胞冻存管从液氮罐中取出,迅速放入 37~38 °C 水浴中解冻,待冰块全部融化后,将细胞悬液放入 5 mL 离心管内,加入在培养箱中平衡至 37 °C 的 DMEM 培养液 3 mL,充分混合后,离心清洗 2 次,最后制成 1×10^5 个/mL 的

细胞悬液,放入培养箱中培养^[6]。

2 结 果

在营养充足,培养液未污染的情况下,培养第 4 d 就可在倒置显微镜下见到细胞从骨髓碎块周围长出,新生细胞呈多角形,饱满透明,立体感强,沿植块呈放射状贴壁生长。周围有光晕,细胞核位于中间,呈椭圆型,轮廓清晰,核内可见核仁。培养约至第 8~9 d,细胞开始融合成片,细胞分裂明显。细胞传代进化后,其结构与原代细胞无明显差异,只是接种后贴壁时间缩短(见图 1)。鹿茸干细胞用以上方法冻存、复苏细胞活力较高。

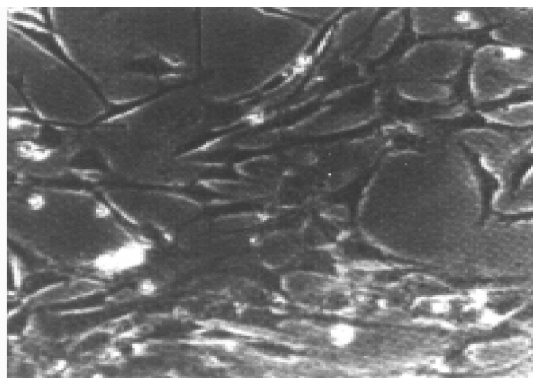


图 1 培养 6 d 的鹿茸干细胞

Fig. 1. The antler stem cell cultured for six days

3 讨论与结论

3.1 细胞培养

细胞或组织块在接种后,应避免经常翻动或振动,否则组织块不易附着在瓶壁上,或是附着后又脱落下来而不利于细胞贴壁生长。加入培养基后,翻瓶时间也不宜过早,以防组织块受液体轻微的波动或浮力作用从瓶壁上脱落下来。细胞随生长密度增加会停止分裂和生长(接触抑制),此时细胞会随传代时间的拖延出现空泡,脂滴和颗粒物增多,细胞机能下降;并且细胞在传代过程中不易从瓶壁上脱落,影响传代后的细胞密度,一般情况细胞在 80%~90% 的汇合阶段传代最好,有利于细胞维持二倍体性状。

细胞生长速度与细胞浓度有关,由于细胞的短距离相互作用是依靠相邻细胞间的连接而实现的,细胞过稀导致细胞生长缓慢;细胞浓度偏高,培养液中代谢废物浓度增长较快,pH 值快速下降,抑制细胞的正常生长,并且还会在短时间内连

接成片, 出现接触抑制现象, 因此传代后的细胞应维持在一定的密度范围内, 有资料表明, 当细胞浓度为 $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 个/mL 时, 细胞分裂旺盛^[7]。

3.2 细胞纯化

在初代培养及早期传代培养时, 可见鹿茸干细胞与其他细胞呈区域性生长, 在培养瓶表面形成一些小的细胞灶, 需对细胞进行纯化。根据鹿茸干细胞与混杂细胞对酶消化作用敏感性不同及其贴壁速度的差异可将其分离。将混杂生长的培养物用常规消化法作用 5~8 min, 用手轻轻拍打瓶壁, 此时鹿茸干细胞绝大部分可悬浮, 加入培养基后移入另一培养瓶内再培养。经过 2~3 次选择传代, 可完全纯化, 形成纯的鹿茸干细胞。

3.3 细胞培养条件的影响

3.3.1 pH 值 离体细胞对于培养液的 pH 值要求很高, 细胞的耐酸性比耐碱性强, 在偏酸性环境中更利于生长, 大部分细胞最佳生长 pH 值一般在 7.2~7.4 之间。本试验中使用 $\text{CO}_2/\text{NaHCO}_3$ 缓冲液系统来维持一定的 pH 值, 当培养液颜色偏黄, 表明 pH 下降, 此时细胞质内颗粒增多, 生长减慢, 培养液中漂浮的死细胞增多。当培养液颜色变为紫红色时表明 pH 升高, 影响细胞贴壁生长。在培养鹿茸干细胞的培养过程中, 由于细胞代谢旺盛, 培养液会较快地变酸, 因此, 培养液常配得稍微偏碱一些 (pH 7.3~7.4), 这样可使培养液得到较充分的利用。

3.3.2 温度 细胞代谢强度与温度呈正比, 随温度降低, 生长趋向缓慢, 但其对低温的耐受力比对高温强, 一般细胞的适宜生长温度为 $36.5 \sim 37.5$ °C。当温度上升至 $39 \sim 40$ °C 1 h, 细胞受到一定损伤仍有可能恢复; 上升到 $41 \sim 42$ °C 1 h, 细胞受到严重损伤; 相反, 温度不低于 0 °C 时, 细胞代谢变得缓慢, 但并无伤害; 温度降至冰点以下时, 细胞因胞质结冰受损而死亡。本试验中对鹿茸干细胞的培养温度范围控制在 (37.0 ± 0.5) °C, 取得满意效果。

3.3.3 消化液 对细胞的消化方法一般采用两种方式。①酶消化法: 采用蛋白消化酶将细胞间的蛋白质水解, 使细胞相互离散, 但胰蛋白酶溶液过度消化细胞会对细胞造成较大的伤害, 所以要把握酶作用的时间和强度; ②螯合剂解离细胞法: 使用螯合剂如乙二胺四乙酸钠 (EDTA)、柠檬酸钠等结合细胞间质中的二价阳离子从而破坏细胞连

接, 此效果较差且不易去除, 通常是将螯合剂和蛋白酶联合使用。本试验中, 主要采用 0.25% 胰蛋白酶作为细胞消化液, 控制 pH 值为 7.2~7.4, 温度 37 °C, 作用力最强。

3.3.4 血清质量及浓度 血清中含有促细胞贴壁的成分, 有助于细胞贴壁生长。不同来源 (如胎牛血清和小牛血清) 的血清, 在培养时虽然质量分级一样, 但细胞生长情况却有显著差异, 有时甚至不能生长 (如用小牛血清时细胞不能生长, 用标准胎牛血清和特级胎牛血清时差异不显著)。本试验采用体积分数为 15% 和 10% 的血清培养细胞时, 观察到细胞生长状态都保持良好, 没有明显区别, 因此在初培养和维持培养时全部采用体积分数为 10% 的血清。

3.3.5 抗菌素 据报道, 卡那霉素、新霉素、两性霉素、氯霉素、多黏菌素 B 都可用于防止细胞培养中大部分细菌和真菌的感染, 但最常用的还是青、链霉素。本试验中的培养液和 PBS 分别加有青、链霉素, 质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果良好, 能有效地抑制细菌生长而不影响细胞的正常生长, 且较安全。

3.4 微生物影响

试验过程中由于操作失误或环境污染, 培养瓶中偶有霉菌或细菌污染, 在显微镜下观察, 霉菌呈白色的丝状团块, 如棉絮状漂浮在培养液中或附着在培养瓶的表面。污染细菌的培养液变得浑浊, 黑色颗粒增多。一经发现污染应立即弃除, 并用过氧乙酸和新洁尔灭认真擦拭, 紫外灯照射或高压灭菌消毒。因此在细胞培养工作中, 要有无菌操作意识, 严格执行实验室无菌操作规程, 以保证试验顺利进行。

3.5 细胞冷冻和复苏

由于低温保护剂 DMSO 对细胞有毒性, 因而应尽量缩短 DMSO 与成细胞在 4 °C 以上的接触时间。降温 and 复温速度是影响细胞存活的关键因素。为保持细胞最大存活率, 一般采用慢冻快融的方法, 冻存液中加入保护剂 DMSO 后, 可使冰点降低, 在缓慢冻结条件下, 使细胞内水分在冻结前透出细胞外, 从而减少细胞内冰晶的形成。细胞复苏时采用 $37 \sim 42$ °C 水浴快速复温法, 使之迅速通过细胞最易受损伤的 $-5 \sim 0$ °C。结果证明, 鹿茸干细胞细胞复苏后仍具有正常的结构和形态并保持新陈代谢和自我复制功能。(下转第 14 页)

度为 0.444 2,而邢秀梅等^[4]分析的塔里木马鹿的平均杂合度为 0.243 8,阿勒泰马鹿平均杂合度为 0.218 1。赵宗胜等^[11]对塔里木马鹿血液蛋白多态性的研究计算出塔里木马鹿的平均杂合度为 0.442 4。也高于 Mahmut 等^[12]对野生塔里木马鹿杂合度的研究结果。可以看出,本群体天山马鹿的平均杂合度明显高于其它 2 种马鹿。说明人工授精和胚胎移植技术对本天山马鹿群体遗传结构有了很大的改良。改变了自然交配制度下人工圈养种源血统的单一性,大大丰富了种资源基地的马鹿群体遗传多样性,为今后群体的进一步扩大和产品质量的进一步提高打下基础。

参考文献:

[1] J 萨姆布鲁克, E F 佛里奇. 分子克隆实验指导[M]. 第 2 版. 金冬燕, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1999.

[2] 陈钧辉, 陶力. 生物化学实验[M]. 第 3 版. 北京: 科学技术出版社, 2003: 110-114

[3] 铃木正三. 比较血型学[M]. 北京: 中国科学出版社, 1991: 33-44.

[4] 邢秀梅, 杨福合, 苏伟林, 等. 新疆马鹿血液蛋白多态性研究[J]. 特产研究, 2002 (3): 1

[5] 孙东晓, 郑兴涛, 李和平, 等. 天山马鹿清原品系血液蛋白多态及其与产茸关系的研究[J]. 经济动物学报, 1998, 2 (2): 28-31.

[6] 岳秉飞. 马鹿血红蛋白和转铁蛋白多态性的研究[J]. 特产研究, 1989 (1): 14-15

[7] 李和平, 郑兴涛, 郅国良, 等. 天山马鹿清原品系血液蛋白多态性初步研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1995 (12): 32-33.

[8] 张才骏. 青海高原 10 种草食家畜血红蛋白的比较电泳[J]. 青海畜牧兽医杂志, 1992 (4): 11-14.

[9] 张才骏, 王勇, 马睿麟. 白唇鹿、马鹿、梅花鹿血红蛋白和转铁蛋白的电泳研究[J]. 动物科学与动物医学, 2000 (2): 16-18.

[10] 高庆华, 韩春梅, 何良军. 天山马鹿胚胎移植技术的研究[J]. 经济动物学报, 2005, 9(2): 71-73.

[11] 赵宗胜, 李大全, 李知勉, 等. 塔里木马鹿血液蛋白多态性的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40(10): 5-9

[12] Mahmut H, Ganzorig S, Onuma M, E *et al.* A preliminary study on the genetic diversity of Xin jiang Tarim red deer (*Cervus elaphus yarkandensis*) using microsatellite DNA method[J]. Japanese Journal of Veterinary Research, 2001, 49(3): 231-237.

(上接第 9 页)

参考文献:

[1] C LI, J M Suttie. Deer antler regeneration: A system which allows the full regeneration of mammalian appendages[J]. J Advances in Antler Science and Product Technology, 2004, 25(4): 11-20.

[2] CHUNYI LI, DAWN E CLARK. Sampling technique to discriminate the different tissue layers of growing antler tips for gene discovery[J]. J The Anatomical record, 2002, 268: 125-130.

[3] M Colitti. Programmed cell death in the regenerating deer antler

[J]. J Anat, 2005, 207: 339-343.

[4] J S Price, S Allen C. Fauchaux Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals[J]. J Anat, 2005, 207: 603-618.

[5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 北京: 世界图书出版社, 2004.

[6] 李惠斌, 蔡景龙, 潘博, 等. 成纤维细胞体外培养、冻存及复苏的实验研究[J]. 中国美容医学, 2005, 14(4): 31-38.

[7] 薛辉, 司徒镇强, 吴军正, 等. 腮腺腺细胞体外极性培养及形态观察[J]. 实用口腔医学杂志, 1995, 11(2): 125-127.