

毛脚鵟细胞体外培养体系建立及三种组织来源细胞特性分析

刘 刚, 道日娜, 王蓉蓉, 李云霞, 戴雁峰, 李喜和, 李 煜, 李 瑶*

内蒙古大学 蒙古高原动物遗传资源研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010021

摘要: 用组织块培养法对毛脚鵟不同组织进行原代培养, 获得了 3 种不同组织来源的细胞, 并成功对细胞进行了冷冻保存和复苏。在传代培养过程中, 对比分析了 3 种组织来源细胞的形态学、生长曲线、贴壁率、核型等生物学特性。形态学方面, 3 种来源细胞均为成纤维样细胞。对于 3 种组织来源细胞的贴壁能力分析显示, 输卵管源细胞最强, 肺源细胞和气管源细胞次之。3 种不同组织来源细胞的倍增时间分别为 (29.91 ± 0.39) 、 (33.18 ± 0.21) 和 (30.67 ± 0.28) h, 群体倍增次数分别为 3.54 ± 0.01 、 4.52 ± 0.02 和 4.38 ± 0.03 。毛脚鵟细胞的染色体数目为 $2n=68$, 性染色体为典型的 ZW 型。本实验为今后毛脚鵟细胞利用、遗传信息的保存及生物学特性的深入研究提供实验材料和依据。

关键词: 毛脚鵟; 细胞培养; 生长曲线; 细胞贴壁率; 核型分析

中图分类号: Q959.7⁺24; Q253 文献标志码: A 文章编号: 0254-5853-(2013)03-0244-05

Establishment of cell culture system of rough-legged buzzard and biological characteristic analysis on different tissue cells cultured *in vitro*

Gang LIU, Daorina, Rong-Rong WANG, Yun-Xia LI, Yan-Feng DAI, Xi-He LI, Yu LI, Yao LI*

Institute of Animal Genetic Resources of Mongolia Plateau Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China

Abstract: In total, three different tissues from the rough-legged buzzard were obtained by culture and successfully cryopreserved and then recovered. During the subculture process, biological characteristics including as cell morphology, growth curve, cell adhesion rate, and karyotype were analyzed and compared, and overall all three kinds of tissue cells exhibited fibroblast-like growth. Oviduct-derived cells had the strongest adherent ability, followed by lung-derived cells and trachea-derived cells. The doubling times of lung-derived cells, trachea-derived cells, and oviduct-derived cells were 29.91 ± 0.39 h, 33.18 ± 0.21 h, and 30.67 ± 0.28 h, respectively, with population doubling times 3.54 ± 0.01 , 4.52 ± 0.02 , and 4.38 ± 0.03 , respectively. Likewise, we noted the chromosome number of the rough-legged buzzard was 68, within the typical type of ZW. These results may potentially provide material and a basis for further research in the field, with the successful preservation of genetic information of rough-legged buzzard.

Keywords: Rough-legged buzzard; Cell culture; Growth curve; Cell adhesion rate; Karyotype analysis

动物遗传资源是自然资源的重要组成部分, 是人类社会赖以生存和发展的生物资源, 是满足人类食物与健康需求的直接来源, 同时也是国家重大战略性基础资源 (Liu et al, 2005)。

近年来, 随着人类经济活动的不断发展, 自然资源和生态系统平衡遭到严重破坏 (Hu et al, 2002)。由于环境污染、鸟类栖息地丧失和碎裂化等原因 (Huang et al, 2008), 一些地区的鸟类, 尤其是处于生态食物链顶层的大型猛禽种类 (Jia et al,

2008)日趋减少, 对当地的生物多样性构成了直接威胁, 因此, 对于大型猛禽的保护以及遗传信息的保存问题越发重要。

毛脚鵟 (*Buteo lagopus*)隶属鸟纲隼形目鹰科鵟属, 在蒙古高原属冬候鸟 (Xiao et al, 2001), 在国内分布于内蒙古、东北及华北等地, 保护级别为 CITES 附录 II (Liu et al, 2010; MacKinnon & Phillipps, 2000; Meng et al, 2008; Qiao et al, 2009)。

对毛脚鵟的保护首先要保护其生存环境, 而更

收稿日期: 2012-12-17; 接受日期: 2013-03-05

基金项目: 国家科技部农业科技成果转化资金项目(2007GB2A400047)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: liyao@life.imu.edu.cn

重要的工作是对其遗传信息进行有效保存。由于材料难以获得,目前国内对于毛脚鳶的研究仅停留在其形态学方面,而对其细胞特性及遗传信息方面的研究尚未见报道。本文建立了稳定的毛脚鳶细胞培养体系,并分析比较了培养所得的第三代毛脚鳶肺源细胞(lung tissue cells)、气管源细胞(trachea tissue cells)及输卵管源细胞(oviduct tissue cells)的特性,为进一步展开毛脚鳶细胞生物学、基因组学及保护生物学等相关研究提供可靠的材料平台。

1 材料与方法

1.1 试剂

本研究所用试剂包括 MEM alpha 培养基(GIBCO)、胎牛血清(Hyclone)、0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA 消化液(GIBCO)、新生牛血清(杭州四季青)及胰岛素(江苏万邦生化医药股份有限公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 取材

雌性毛脚鳶一只,取材自呼和浩特市白塔飞机场,由于挂网严重受伤,于2011年11月30日濒亡,及时将其用0.2%新吉尔灭浸泡后,取出其肺、气管及输卵管等组织,浸泡在无菌生理盐水(4℃)中,并于30 min内带入无菌室。

1.2.1 原代培养

无菌操作取部分肺、气管及输卵管组织,在75%酒精中浸泡2~3 s, PBS 冲洗3次;将其剪成~1 mm³的组织块,均匀贴于培养瓶内,静置培养2 h;加入5 mL含10%胎牛血清及0.4 U/mL胰岛素的MEM alpha 完全培养基,放入39.5℃,5% CO₂培养箱中培养。

1.2.2 传代培养

取细胞汇合度为75%~85%的细胞,吸去培养液,1 mL PBS 洗涤3次;加入1 mL 0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA 消化液消化2~3 min后,加入等量的MEM alpha 完全培养液终止消化,吹打悬浮细胞,1 000 r/min 离心5 min,弃上清;加入1 mL MEM alpha 完全培养液悬浮细胞,以1×10⁶/mL细胞密度接种于培养瓶中,放入CO₂培养箱培养;12 h后换液,继续培养(Lu et al, 2008)。

1.2.3 冷冻保存

及时对每一代培养细胞进行冷冻保存,取细胞

汇合度为75%~85%的细胞,吸去培养液,1 mL PBS 洗涤3次;加入1 mL 0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化液,待显微镜下细胞收缩变圆后,加入等量的MEM alpha 完全培养基,1 000 r/min 离心5 min,弃上清;缓慢加入含有10% MSO 的新生牛血清,制成细胞悬液,静置5 min后,移入冻存管;在-80℃冰箱中保存24 h后,转入液氮内冻存。

1.2.4 细胞贴壁率计算

将3种不同组织来源的培养细胞分别以一定浓度接种于35 mm 培养皿中,放入培养箱中培养6 h后,吸取上清液,细胞计数,获得上清液中细胞数,并计算贴壁率[贴壁率=(接种细胞数-上清细胞数)/接种细胞数×100%]。每组实验重复3次,并于培养12 h及24 h后各重复以上实验。

1.2.5 生长曲线绘制

将3种不同组织来源的培养细胞分别以一定浓度接种于24孔板内,放入培养箱中培养,每24 h取3个孔培养细胞进行计数,计数8 d后绘制3种组织来源培养细胞的生长曲线,计算细胞倍增时间及其群体倍增次数(Hou et al, 2004)。

细胞倍增时间计算公式:

$$DT=t \times [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$$

DT:细胞倍增时间; t :培养时间; N_t : t 时间时的细胞数; N_0 :首次计数时的细胞数。

群体倍增次数 X 计算公式: $X = (\lg N_H - \lg N_1) / \lg 2$
 N_H : 对数期末收获细胞数; N_1 : 接种细胞数。

1.2.6 复苏存活率对比

液氮中冻存一月后,将冻存管从液氮中取出,立即投入40℃温水中,迅速搅动直至管内冰晶融化,将液体转移至含有5 mL完全培养基的离心管中,静置5 min,1 000 r/min 离心5 min;向细胞沉淀中加入1 mL完全培养基,悬浮细胞;取100 μL细胞悬液,加入100 μL 4%台盼蓝母液,静置5 min后,镜检并计算复苏后细胞存活率。

1.2.7 核型分析

取第4代生长旺盛细胞,换液12 h后,向培养基中补加0.1 mL终浓度为0.1 mg/mL的秋水仙素;3.5 h后收获细胞,向细胞沉淀中缓缓加入10 mL 40℃预热的KCl低渗液(0.075 mol/L),轻悬细胞;常温下低渗处理20 min,低渗结束前1 min,加入1 mL新鲜的固定液(甲醇:冰乙酸=3:1),2 000 r/min 离心10 min,弃上清;向沉淀中缓慢加入10 mL固定液,轻悬细胞,固定30 min后,2 000 r/min 离心10 min,

弃上清；再次重复以上固定程序；在细胞沉淀中加入 0.5 mL 固定液，轻轻吹打制成细胞悬液，滴片；Giemsa 染液处理 15 min，流水冲洗，自然晾干后行镜检、照相及核型分析 (Zhang et al, 2011; Tai et al, 2011)。

1.2.8 统计学分析

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示，并采用 SPSS19.0 软件进行单因子分析和相关分析，显著性水平 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异显著。

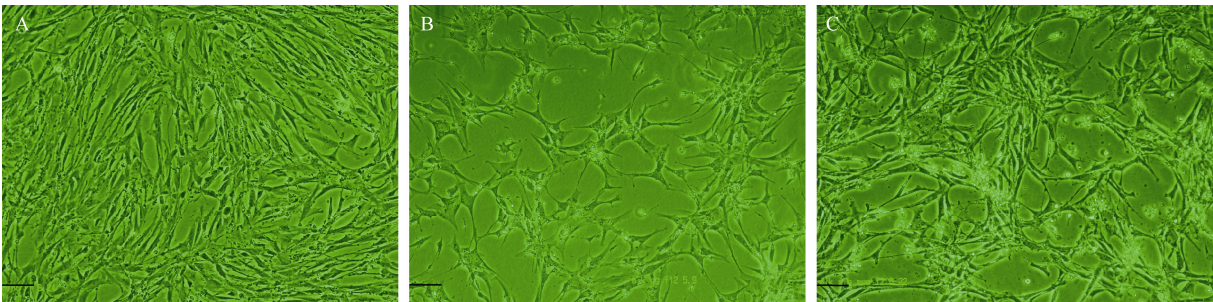


图 1 毛脚鳶不同组织来源细胞形态学观察 (×100)

Figure 1 Morphologies of fibroblast cells from lung, trachea and oviduct tissue (×100)

A: 肺源细胞; B: 气管源细胞; C: 输卵管源细胞; 标尺=100 μm。
A: Cells from lung tissue; B: cells from trachea tissue; C: cells from oviduct tissue; Bar=100 μm.

2.2 细胞贴壁率计算

分别于接种后 6、12、24 h 细胞计数，并计算细胞贴壁率 (表 1)。3 种组织来源细胞的细胞贴壁率随时间的增加而逐渐增加，3 个时间段中输卵管来源细胞的贴壁率与其余两者相比，均具显著性优势，而肺来源细胞和气管来源细胞的细胞贴壁率仅在接种 24 h 后，才呈现显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 1 毛脚鳶不同组织细胞贴壁率 (%)
Table 1 Cell attachment rates of tissue cells (%)

	6 h	12 h	24 h
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
肺源细胞 Lung tissue cells	73.42 ^b ±0.10	81.14 ^b ±3.14	85.53 ^c ±1.83
气管源细胞 Trachea tissue cells	76.24 ^b ±0.10	80.28 ^b ±0.76	86.72 ^b ±0.78
输卵管源细胞 Oviduct tissue cells	84.73 ^a ±1.38	88.93 ^a ±0.68	94.92 ^a ±1.23

$n=3$; 同列中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
 $n = 3$; Letters in the same column denote level of significance at $P < 0.05$.

2.3 毛脚鳶细胞生长曲线

肺源细胞、气管源细胞及输卵管源细胞连续计数 8 d (表 2)。并根据表中数据绘制生长曲线 (图 2)，计算细胞倍增时间。结果表明，以上 3 种组织细胞

2 结 果

2.1 毛脚鳶培养细胞的形态

自毛脚鳶细胞原代培养第 4 天开始，逐渐有细胞从组织块周边游离出来，细胞长势缓慢，需要 30 d 才能铺满培养瓶。显微镜下，肺源细胞 (A)、气管源细胞 (B)及输卵管源细胞(C)均呈成纤维型生长(图 1)。肺源细胞和输卵管源细胞虽然在形态上相似，但是在其生长过程中，后者的细胞间隙较大，分泌物较多。

的倍增时间分别为(29.91 ± 0.39)、(33.18 ± 0.21)及(30.67 ± 0.28) h，群体倍增次数分别为 3.54 ± 0.01 、 4.52 ± 0.02 及 4.38 ± 0.03 。

表 2 毛脚鳶不同组织细胞计数结果 ($10^4/\text{mL}$)
Table 2 Counting results of tissue cells ($10^4/\text{mL}$)

天数 Day	肺源细胞 Lung tissue cells	气管源细胞 Trachea tissue cells	输卵管源细胞 Oviduct tissue cells
0	2.4	2.7	1.5
1	4.89±0.21	15.06±0.37	6.14±0.24
2	5.28±0.21	22.78±0.32	10.14±0.22
3	10.92±0.32	36.58±0.54	17.75±0.48
4	18.08±0.32	62.11±0.83	31.28±0.46
5	28.00±0.35	69.22±0.45	33.19±0.37
6	30.72±0.49	72.31±0.58	36.86±0.40
7	32.50±0.25	79.08±0.50	39.44±0.62
8	33.08±0.33	80.81±0.39	36.78±0.35

2.4 复苏存活率对比

细胞复苏后，台盼蓝染色，镜检，计算细胞复苏存活率 (表 5)。在同样的冻存体系中，气管来源细胞复苏存活率最高，并较其余两者均有差异显著 ($P < 0.05$)，说明气管来源细胞对于本研究采用的冻存方法具有较强的适应性。

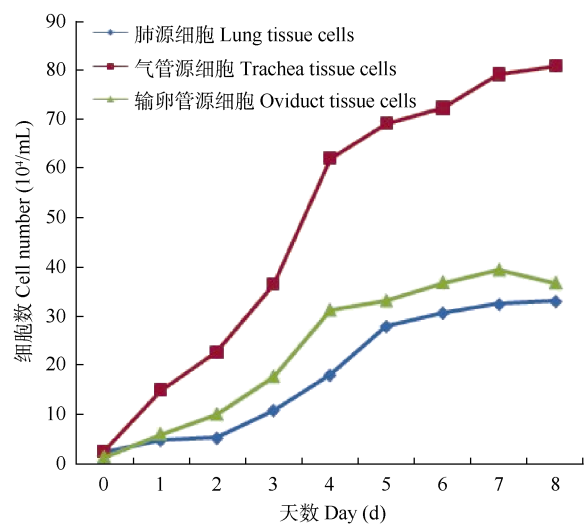


图2 毛脚鹳不同组织细胞生长曲线图
Figure 2 Growth curves of different cells

2.5 毛脚鹳细胞核型分析

90%的毛脚鹳细胞 ($n=50$) 中期分裂相的染色体数目均为 68 条, 即其染色体数目为 $2n=68$ 。核型配对结果 (图 3) 显示, 毛脚鹳染色体中含有 5 对微小染色体, 形态不能完全识别, 且其性染色体与常染色体形态明显不同, 呈蝌蚪状。

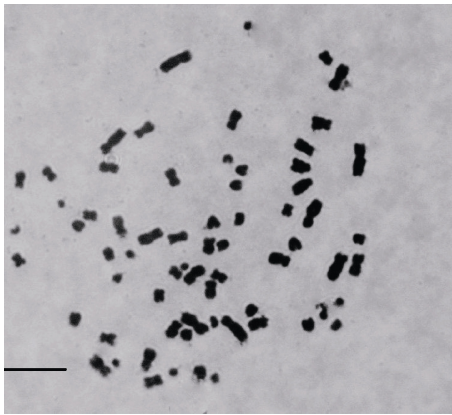


图3 毛脚鹳细胞的中期分裂相和核型图
Figure 3 Metaphase and ideogram of rough-legged buzzard cells (Bar=10 μ m)

3 讨论

3.1 细胞培养方法

组织块贴壁培养法是目前最常用的细胞建系方法, 与胰酶消化法相比, 具有操作简便、对细胞损害小等特点, 且长出的细胞整齐有序。本实验采用组织块贴壁法对毛脚鹳 3 种组织块进行贴壁培养, 获得了 3 种不同组织来源的细胞。

实验发现, 毛脚鹳 3 种组织块接种时组织块的

表3 毛脚鹳不同组织细胞倍增时间 (h)

Table 3 Cell doubling time of tissue cells

肺源细胞 Lung tissue cells Mean±SD	气管源细胞 Trachea tissue cells Mean±SD	输卵管源细胞 Oviduct tissue cells Mean±SD
(29.91±0.39) ^c	(33.18±0.21) ^a	(30.67±0.28) ^b

$n=3$; 同行中不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
 $n=3$; Letters in the same line denote level of significance at $P<0.05$.

表4 毛脚鹳不同组织细胞的群体倍增次数

Table 4 Cell population doubling times of tissue cells

肺源细胞 Lung tissue cells Mean±SD	气管源细胞 Trachea tissue cells Mean±SD	输卵管源细胞 Oviduct tissue cells Mean±SD
3.54±0.01 ^c	4.52±0.02 ^a	4.38±0.03 ^b

$n=3$; 同行中不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
 $n=3$; Letters in the same line denote level of significance at $P<0.05$.

表5 毛脚鹳三种组织来源细胞复苏后细胞存活率(%)对比

Table 5 Comparison of cell survival rate after being thawed

肺源细胞 Lung tissue cells Mean±SD	气管源细胞 Trachea tissue cells Mean±SD	输卵管源细胞 Oviduct tissue cells Mean±SD
70.05±0.87 ^b	78.16±0.81 ^a	68.16±0.38 ^b

$n=3$; 同行中不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
 $n=3$; Letters in the same line denote level of significance at $P<0.05$.

大小、接种密度及培养温度对细胞生长十分重要, 接种时组织块以大小 $\sim 1\text{ mm}^3$, 间隔 $\sim 0.5\text{ cm}$ 为宜, 培养温度需严格控制在 $39.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

3.2 细胞培养体系及保存

本实验后续采用了 4 种不同的培养体系, 基本培养基分别为 M199、DMEM、DMEM/F12 及 MEM alpha, 并分别添加了 10% 胎牛血清及 4 U/mL 速效胰岛素, 结果发现, 毛脚鹳 3 种不同组织来源的细胞在 M199、DMEM/F12 及 MEM alpha 中的各项生

生物学特性基本一致。目前,本研究获得的气管来源、肺来源及输卵管来源细胞在 MEM α 体系中已分别传至 33、18 及 13 代,且生物学特性基本保持不变。能够在如此高传代数下仍保持其生物学特性在禽类细胞培养过程中是比较罕见的,可以充分说明本研究所采用的培养体系成功保存了毛脚鹳 3 种组织来源细胞。

3.3 染色体分析

在国内,由于材料难以获得,故罕见猛禽类的染色体研究报道。本研究探索了毛脚鹳细胞染色体分析制备方法。细胞处于对数生长期时,更换培养液,12 h 后向培养液中添加终浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的秋水仙素,处理 3 h。若处理时间过长,染色体将严重浓缩,油镜下不能辨认微小染色体,而若处理

时间不足,则会导致分裂中期的细胞数据较少。低渗处理可使细胞膨胀,有利于染色体分散,减少或避免染色体重叠现象,便于观察。低渗液一般采用 0.075 mol/L KCl,根据本研究结果,室温下低渗处理 40~60 min 足以裂解细胞。

大多数鹰科猛禽动物核型相似,染色体条数主要集中在 66 或 68 条,具有 3~5 对微小染色体和较多均匀长度染色体 (Amaral & Jorge, 2003)。目前已有核型报道的九种鹳属动物中,除红尾鹳 ($2n=70$) 外,核型均为 $2n=68$ 。

本研究结果表明,新构建的毛脚鹳肺源、气管源及输卵管源细胞在体外的稳定培养、传代保存以及培养体系的建立将进一步展开其细胞生物学、遗传学等研究提供可靠的资料平台。

参考文献:

- Amaral KF, Jorge W. 2003. The chromosomes of the Order Falconiformes: a review. *Ararajuba*, 11(1): 65-73.
- Hou Y, Zhang DM, Chen L. 2004. Effect of different types of serum on the passage of goat fibroblasts. *Journal of Huaibei Industry Teachers College: Natural Sciences Edition*, 25(4): 62-65. [侯颖, 张大铭, 陈亮. 2004. 不同血清对山羊成纤维细胞传代的影响. 淮北煤炭师范学院学报, 25(4): 62-65.]
- Hu JC. 2002. Diversity of terrestrial vertebrates in Minshan Mountains. *Zoological Research*, 23(6): 521-526. [胡锦鑫. 2002. 岷山山系陆栖脊椎动物多样性. 动物学研究, 23(6): 521-526.]
- Huang ZH, Liu B, Chen D, Chen PJ, Xi ZF. 2008. Bird diversity of Gan River in Ji'an, Anhui Province. *Sichuan Journal of Zoology*, 27(4): 610-617. [黄族豪, 刘宾, 陈东, 陈佩君, 习志富. 2008. 安徽赣江吉安段鸟类多样性研究. 四川动物, 27(4): 610-617.]
- Jia SB, Yan HC, Liu T, Ji XL. 2008. Ecological distribution of raptors in west Shandong. *Sichuan Journal of Zoology*, 27(5): 897-899. [贾少波, 闫华超, 刘涛, 冀相伦. 2008. 山东西部地区猛禽的生态分布. 四川动物, 27(5): 897-899.]
- Liu XB, Guan WJ, Zhang HH, Li H, Li LF. 2005. Conservation of genetic resources of the endangered animals. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 7(5): 34-38. [刘希斌, 关伟军, 张洪海, 李晗, 李林凤. 2005. 濒危动物遗传资源的保存. 中国农业科技导报, 7(5): 34-38.]
- Liu Z, Yang CW, Tian HJ, Jin JL, Jin ZM, Ju YF. 2010. Phylogenetic relationship among 12 falconiformes based on CHD Gene sequences. *Biotechnology Bulletin*, (6): 179-184. [刘铸, 杨春文, 田恒久, 金建丽, 金志民, 鞠永富. 2010. 基于 CHD 基因序列的隼形目 12 种鸟系统发育关系. 生物技术通报, (6): 179-184.]
- Lu TF, Liu CQ, Wu HM, Zhang YY, Liu S, Bao AD, Zhang WX, Guan WJ, Ma YH. 2008. An research of the growth rule of cells cultured in vitro of livestock and poultry. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 35(11): 65-69. [陆涛峰, 刘长青, 吴宏梅, 张艳艳, 刘帅, 包阿东, 张文秀, 关伟军, 马月辉. 2008. 畜禽体外细胞生长规律研究. 中国畜牧兽医, 35(11): 65-69.]
- MacKinnon J, Phillipps K. 2000. A Field Guide to the Birds of China. Changsha: Hunan Education Press. [马敬能, 约翰, 菲利普, 卡伦. 2000. 中国鸟类野外手册. 长沙: 湖南教育出版社.]
- Meng DR, Wang CJ, Cao CH, Zhang L. 2008. A preliminary survey of the raptors in Cangzhou, Hebei. *Chinese Journal of Zoology*, 43(6): 127-130. [孟德荣, 王春杰, 曹春辉, 张莉. 2008. 河北沧州地区猛禽初步调查. 动物学杂志, 43(6): 127-130.]
- Qiao L. 2009. Study on time activity budget of rough-legged buzzard *Buteo lagopus* in spring in 2008. *Natural Science Journal of Harbin Normal University*, 25(1): 89-92. [乔良. 2009. 2008 年春季毛脚鹳活动节律的研究. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 25(1): 89-92.]
- Tai DP, Liu K, Terigele, Hou DX, Li Y, Li Y. 2011. The biological characteristic analysis on three different chicken embryo tissue cells cultured in vitro. *Chinese Journal of Cell Biology*, 33(9): 988-993. [邵大鹏, 刘坤, 特日格乐, 侯东霞, 李瑶, 李煜. 2011. 鸡胚三类组织体外培养细胞的生物学特性分析. 中国细胞生物学学报, 33(9): 988-993.]
- Xiao YX, Qiu YX. 2001. The histological studies on the ovary of *Buteo lagopus*. *Chinese Journal of Zoology*, 36(3): 19-22. [肖义秀, 邱幼祥. 2001. 毛脚鹳卵巢的组织学观察. 动物学杂志, 36(3): 19-22.]
- Zhang JN, Liu YB, Zhang JD, Su J, Li YX, Sun W, Zhao LX, Guo JT, Li XH. 2011. Karyotyping of Arab horse by G-banding technique. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 26(2): 101-106. [张静南, 刘永斌, 张金吨, 苏杰, 李云霞, 孙伟, 赵丽霞, 郭继彤, 李喜和. 2011. 阿拉伯马染色体 G 带核型分析. 华北农学报, 26(2): 101-106.]