

# 野猪输卵管上皮细胞的原代培养与生物学特性研究

马红,刘娣

(黑龙江省农业科学院 畜牧研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**采用组织块贴壁培养法分离获得野猪输卵管上皮细胞,并进行传代、冻存和复苏,并对其生物学特性进行观察研究。结果表明:组织块在培养2 d开始有细胞爬出,7 d左右可长满全皿,原代细胞形态呈菱形,其中混有少量成纤维细胞。传代2~3次,细胞生长状态最好,4代后细胞退化;细胞经冷冻保存再解冻后细胞死亡率上升。通过此方法能够获得较纯的野猪输卵管上皮细胞,为野猪资源保存和进一步的研究提供技术支持。

**关键词:**野猪;输卵管上皮细胞;原代培养

**中图分类号:**S828

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2012)10-0069-03

野猪为猪属动物,现代家猪是在8 000年前由野猪驯化而成的。野猪的分布很广,在中国几乎每一个省都有分布<sup>[1]</sup>。我国在20世纪80年代开始引进人工养殖野猪的技术,经过多年的努力,对野猪资源的开发利用已经形成一套比较成熟的体系,但在其基础研究方面做得还比较少。尤其是在目前人类猎杀、耕地面积扩大和污染加剧等情况下,野猪的生存环境空间急剧减缩,数量急剧减少,这对于该物种的保护造成了一定困难。体细胞体外培养技术通过少量获取动物组织,在体外加以培养,构建出特定的体细胞系,为保存其遗传资源和进行更深入的基础研究提供了可能<sup>[2]</sup>。

输卵管在卵巢与子宫之间,卵巢排出的卵母细胞在输卵管中与精子结合形成胚胎。胚胎在输卵管停留数天,发育至早囊胚期后进入子宫,因此需要输卵管为胚胎早期发育提供适宜的环境。输卵管上皮细胞处于输卵管官腔中,能够分泌大量胚胎发育所需的生长因子、糖蛋白和免疫因子等物质<sup>[3]</sup>。该研究旨在探索一种适合野猪输卵管上皮细胞原代培养、传代和冷冻保存的方法,构建野猪的输卵管上皮细胞系,为保护野猪遗传资源和进行深入的基础研究提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试的2月龄雌性小野猪取自黑龙江省双峰养殖场,DMEM高糖购自Gibco公司,其它药品如无特别说明均购自Sigma公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 原代培养** 取雌性野猪,颈部放血致死,取出卵巢及部分与卵巢相连的子宫角,无菌PBS冲洗3次,无菌操作台中用镊子小心剥下包裹在卵巢外的输卵管伞,切开输卵管与子宫连接部位去除子宫角。将完整的含有伞部的输卵管整个浸泡在75%乙醇中杀菌5 min,无菌PBS反复冲洗4~5次。用灭菌手术剪将输卵管剪至2 mm小块。收集输卵管碎块至无菌离心管中,加DMEM培养液摇匀,1 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,弃去上清,沉淀用DMEM培养液重悬,再离心,去上清,反复2次。最后,将沉淀的输卵管碎块均匀铺在35 mm培养皿底部,加少量含20%胎牛血清的DMEM培养液,使培养皿保持湿润。培养皿置于38.5℃、5%CO<sub>2</sub>饱和蒸汽压的培养箱内进行培养过夜。次日在培养皿中轻轻加入1 mL全培养液,将未贴壁的碎块浮起吸出弃去,培养皿中加入2 mL全培养液,于38.5℃、5% CO<sub>2</sub>饱和蒸汽压的培养箱内对贴壁组织块进行培养,每日在显微镜下观察其生长情况。

**1.2.2 传代** 当原代细胞生长至接近90%汇合,弃去培养液,用PBS清洗2次,0.25 g·L<sup>-1</sup>胰酶消化至细胞收缩浮起,血清停止消化,将细胞液

收稿日期:2012-08-02

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08006-003)

第一作者简介:马红(1974-),女,黑龙江省虎林市人,博士,副研究员,从事动物遗传育种研究。E-mail: mahong\_ok@163.com。

通讯作者:刘娣(1963-),女,吉林省长春市人,博士,教授,博士研究生导师,从事动物遗传育种与繁殖研究。

收集至离心管中,  $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃去上清, 沉淀以含 20% FBS 的 DMEM 培养液重悬, 按 1:3 的比例进行传代, 继续培养备用。

1.2.3 细胞冻存 当细胞生长至 70%~80% 汇合, 弃去培养液, 用 PBS 清洗 2 次,  $0.25\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  胰酶消化至细胞收缩浮起, 血清停止消化, 将细胞液收集至离心管中,  $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃去上清, 沉淀中加入预混的冻存液 (70% DMEN 高糖培养液, 20% 胎牛血清, 10% DMSO) 重悬。将含细胞的冻存液转移至灭菌冻存管中。含细胞冻存管于  $4^{\circ}\text{C}$  放置 20 min,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 2 h,  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜, 次日将冻存管转移至液氮中长期保存。

1.2.4 细胞解冻复苏 液氮中取出冻存管迅速置于  $38^{\circ}\text{C}$  水浴中, 快速摇动冻存管使其中含细胞的冻存液解冻。无菌操作台中将冻存液转移至离心管中,  $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃去上清, 沉淀中加含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬。悬液加入 35 mm 培养皿中, 于  $38.5^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和蒸汽压的培养箱内进行培养。

1.2.5 细胞活率计算 将细胞悬液调整至  $5\times 10^4$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  的细胞密度, 将细胞悬液与 0.4% 台盼蓝溶液以 9:1 混合混匀 (终浓度 0.04%)。镜下观察, 死细胞被染成明显的蓝色, 而活细胞拒染呈无色透明状, 分别统计死活细胞数, 计算细胞活率。活细胞率/% = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数)  $\times 100$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 输卵管上皮细胞原代培养

野猪输卵管组织块贴壁过夜后加入 1~2 mL 全培养液可见大量未贴壁组织块浮起, 贴壁组织

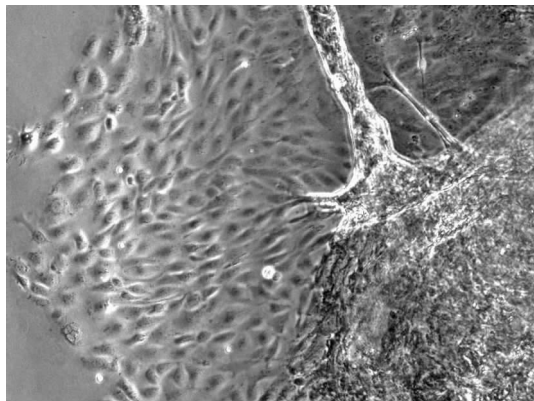


图 1 野猪输卵管上皮细胞原代培养 3 d ( $\times 10$  相差)

Fig. 1 Morphology of primary wild boar oviduct epithelial cells after 3 d

块周围出现少量膜状物。培养 2 d 后部分组织块周围可游离出少量菱形细胞, 72 h 后组织块周围细胞成片单层生长, 多数细胞呈菱形, 并杂有少量梭形细胞 (见图 1)。在倒置显微镜下观察可见细胞透明, 胞质突起丰满, 胞体呈菱形, 中央有圆形核, 核仁清晰。培养 7 d 左右各个组织块周围游离细胞汇合, 铺满皿底, 并开始出现生长抑制现象。

### 2.2 细胞传代培养

原代培养的输卵管上皮细胞经 2~3 次传代后, 细胞形态为更加均一的菱形, 细胞生长状态好, 增殖迅速。在经历 4 代以上的传代后, 细胞的贴壁速度和生长速度都开始变慢, 传代 8 次后, 细胞的胞质中出现空泡, 培养过程中细胞脱壁死亡现象增加, 细胞老化严重。

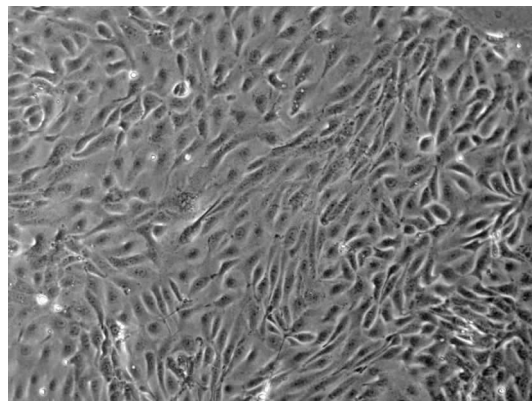


图 2 野猪输卵管上皮细胞第 4 代培养 5 d

Fig. 2 Morphology of P<sub>4</sub> wild boar oviduct epithelial cells after 5 d

### 2.3 解冻复苏后活性检测

细胞冻存前和复苏后细胞活率有所下降, 分别为 95.7% 和 82.9%。说明细胞在冻存和复苏过程中受到了某些因素如降温程序、保存过程中温度变化以及解冻温度和时间等的影响, 对细胞造成了化学或机械的损伤, 导致细胞死亡。

细胞在复苏 4 h 后开始出现贴壁, 24 h 后大部分细胞都已贴壁并变形。24 h 换液将死细胞和未贴壁细胞去除, 贴壁细胞经过分裂生长, 形成大量“细胞岛”, 6 d 后细胞岛连接成片达到 80%~90% 汇合, 可进行再次传代或冻存。

## 3 结论与讨论

输卵管上皮细胞是一种具有重要生理功能的成体细胞, 因其在胚胎发育过程中起到重要的作用而越来越受到研究者的重视。目前已获得

人<sup>[4]</sup>、小鼠、大鼠、牛、猪<sup>[5]</sup>等多种动物的输卵管上皮细胞系用于研究,但是野生动物这方面的研究还很少。

组织中分离细胞的最常用方法为组织块贴壁法和酶消化法。酶消化法是组织块在消化酶作用下,将所需细胞从组织块上分离下来再进行培养,此方法能够较早获得相对较纯的细胞,但赵晓娥等在用消化法建立小鼠输卵管上皮细胞系时发现,消化酶会对细胞活性产生影响,该研究采用的组织块贴壁法操作简单,获得的细胞活力好,细胞形态饱满,细胞边界清晰,但在大量输卵管上皮细胞中含有部分成纤维细胞。随着培养时间延长,输卵管上皮细胞和成纤维细胞都会大量增殖,因此,组织块在培养至 4 d 时进行消化传代可以最大程度降低成纤维细胞的污染。混杂有少量成纤维细胞的输卵管上皮细胞可在传代过程中利用上皮细胞与成纤维细胞对胰酶的敏感性不同、贴壁时间不同的特点加以纯化,经过 2~3 次传代后,基本可去除成纤维细胞,得到较纯的输卵管上皮细胞。

在该研究条件下,在传代过程中,细胞在传代后 1~2 d 生长速度较慢,3 d 后进入快速生长期,7 d 左右铺满整个培养皿。第 3、4 代的细胞生长状态最好,细胞形态和生长速度等处于最佳状态,

并且细胞相对较纯,此时,最适合用来进行各类研究。在不特别添加生长因子类物质的条件下,经过 5 次左右传代后,细胞开始发生退化,细胞形态变得扁平,胞质中出现空泡,如果继续进行传代,细胞的贴壁能力和增殖能力都会明显降低,退化凋亡的细胞增多。该结果与吕自力等在牛输卵管上皮细胞培养中的结果基本一致<sup>[6]</sup>。因此在实验时要根据最终的目的选择不同传代次数的细胞。

#### 参考文献:

- [1] 张保卫,张晨岭,陈建琴,等. 基于微卫星标记的中国大陆地区野猪种群结构分析与亚种分化[J]. 动物学报,2008(5): 753-761.
- [2] 关伟军,马月辉. 家养动物细胞体外培养原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2008:936-937.
- [3] 吕萍,刘景圣,蔡丹,等. 输卵管糖蛋白的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2010(9):31-32.
- [4] Ling L, Lee Y L, Lee K F, et al. Expression of human oviductin in an immortalized human oviductal cell line[J]. Fertil Steril, 2005, 2: 1095-1103.
- [5] Yaniz J L, Lopez-Gatius F, Hunter R H. Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa[J]. Anat Histol Embryol, 2006, 35(1): 28-34.
- [6] 赵晓娥,兰杰,王妍,等. 小鼠输卵管上皮细胞的原代培养及纯化方法研究[J]. 动物医学进展,2009,30(2):30-34.
- [7] 吕自力,石国庆,王亮. 牛输卵管上皮细胞的纯化培养与生长特性研究[J]. 中国畜牧杂志,2011,47(5):19-23.

## Research on Oviduct Epithelial Cells Primary Culture of Wild Boar and Its Biological Characteristics

MA Hong, LIU Di

(Animal Husbandry Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

**Abstract:** The method of tissue blocks adherent culture was used to isolate wild boar oviduct epithelial cells, and the cells were passed and cryopreservation and anabiosis, their biological characteristics were observed. The results showed that: the cells grew out from tissue blocks on the next day, and covered dish about 7 days. Primary cells were diamond and there were a few of fibroblast cells. The cells had fine growth state when they were passed 2 to 3 times, and degenerated after 4 times passed. The mortality rate increased when cells were cryopreserved and then thawed. The results showed that pure wild boar oviduct epithelial cells could be obtained by this method, and the method could provide technical support for the resource preservation and further study of wild boar.

**Key words:** wild boar; oviduct epithelial cell; primary culture