

罗怡琳, 蒙正群, 周丽军, 等. 兔脾脏成纤维型细胞 RS-17 系的建立及其生物学特性[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 130-135.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.019

兔脾脏成纤维型细胞 RS-17 系的建立及其生物学特性

罗怡琳¹, 蒙正群², 周丽军¹, 王 印^{1,3}, 姚学萍¹, 杨泽晓¹, 罗 燕¹, 耿 毅¹

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 温江 611130; 2. 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司, 贵州 贵阳 550000; 3. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 温江 611130)

摘要: 采用胰酶消化法培养技术, 对兔脾脏组织的细胞进行原代培养, 从脾脏组织中分离出 1 株成纤维型细胞, 命名为 RS-17。通过对细胞传代培养条件优化, 细胞标志性蛋白检测, 细胞生长曲线分析, 细胞核型以及细胞致瘤性等测定, 结果显示, RS-17 细胞具有血清依赖性, 成纤维细胞标志性蛋白检测阳性, 具有正常的核型, 无致瘤性, 且目前细胞传至 95 代仍可稳定生长。这为 RHDV(兔出血症病毒)感染机制等相关研究提供了细胞材料。

关键词: 乳兔; 脾脏组织; 细胞系; 生物学特性;

中图分类号: S829.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)01-0130-06

Establishment and biological characteristics of rabbit spleen fibroblast cell line RS-17

LUO Yi-lin¹, MENG Zheng-qun², ZHOU Li-jun¹, WANG Yin^{1,3}, YAO Xue-ping¹, YANG Ze-xiao¹,
LUO Yan¹, GENG Yi¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China; 2. Guizhou Qin Bang Food Safety Science and Technology Co. Ltd., Guiyang 550000, China; 3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Wenjiang 611130, China)

Abstract: The cells of the spleen tissue of the rabbit were primary cultured by trypsin digestion technique, and a fibroblast-like cell was isolated from the spleen tissue and named as RS-17. The subculture conditions was optimized, cellular marker proteins were detected by immunofluorescence, and the growth curve was analyzed, karyotype and tumorigenicity of the RS-17 were detected. The results showed that the RS-17 was fibroblast cell and had the normal karyotype, normal growth characteristic, no tumorigenicity. The cell has been passaged stably to the 95 generations. These results provide cellular material for studies related to the infection mechanism of rabbit hemorrhagic disease virus(RHDV).

Key words: neonatal rabbit; spleen tissue; cell line; biological characteristics

家兔是具有重要毛用和肉用价值的传统经济动物^[1], 在中国畜牧业生产中具有重要地位。兔也是传统的试验模式动物, 与小鼠、猴、猪等试验动物相比, 体型适中, 易操作, 且生理结构和调控机制与人

类接近, 尤其适用于人类心脑血管疾病等研究^[2]。

RHDV(兔出血症病毒)从爆发以来, 国内外学者相继对该病毒开展了深入研究, 在病原学、诊断技术、免疫防控等多方面取得了卓越的进展。但有一个很棘手的问题就是目前对于该病毒尚无稳定的培养细胞系统, 国内外的研究者曾用 60 余种动物的原代细胞和传代细胞培养 RHDV, 但是均未获得成功。RHDV 培养细胞系的缺乏影响着 RHDV 的细胞感染机理和防控等方面的研究, 所以探寻出 1 株合适的细胞系会是研究 RHDV 感染机制以及防控该病

收稿日期: 2018-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31402222); 四川省科技支撑计划项目(2016N20002)

作者简介: 罗怡琳(1995-), 女, 广东兴宁人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学研究。蒙正群为共同第一作者。

通讯作者: 杨泽晓, (E-mail) yzxyang2003@126.com

的重要突破。近年来,随着细胞生物学以及肿瘤的大量研究,永生化细胞因为有着培养的均一性、稳定性和操作简便性等一系列的优点逐渐进入人们视野。本研究偶然获得 1 株可稳定传代的兔脾脏成纤维型细胞,对其培养以及建系,为 RHDV 的侵染研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 动物

2 日龄乳兔,25 g 6 周龄 Balb/c 小鼠购自成都达硕实验动物有限公司。

1.2 主要试剂

干粉 DMEM、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司,胰酶、曲拉通 X-100 透化液、Hoechst33342 购于索莱宝公司,青霉素、链霉素、碳酸氢钠、氯化钾、氯化钠、牛血清白蛋白 BSA 等购自博大万利有限公司,MTT 细胞增殖试剂盒、吉姆萨染色液、秋水仙素购自生工生物工程(上海)股份有限公司,波形蛋白一抗购自武汉博士德公司,角蛋白一抗购自 Novus 公司,羊抗鼠 Alexa Fluor 488 二抗购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 主要仪器与设备

高速微量离心机、高速台式冷冻离心机(Eppendorf 公司产品)、低速离心机(安徽中科中佳科学有限公司产品),细胞培养板、细胞培养瓶(Eppendorf 公司产品),5% CO₂ 培养箱(Thermo 公司产品),超纯水仪(Millipore 公司产品),酶联免疫检测仪、细胞计数仪(BioRad 公司产品),光学显微镜、荧光倒置显微镜、荧光显微镜(Nikon 公司产品)。

1.4 溶液的配制

细胞培养基 DMEM(1 L) 配制:DMEM 干粉 1 包,NaHCO₃ 3.7 g,去离子水 1 L,在无菌环境下用过滤器过滤除菌,置于 4 ℃ 保存。

青霉素链霉素溶液:配成含青霉素 10 000 IU/ml、链霉素 10 mg/ml 的溶液,置于 -20 ℃ 保存,用时每 100 ml 培养液加入 1 ml 青霉素链霉素溶液使培养液含青霉素 100 IU/ml,链霉素 100 μg/ml。

PBS 液(1 L):NaCl 8.00 g,Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.95 g,KH₂PO₄ 0.20 g,KCl 0.20 g,加去离子水定容至 1 L,高压灭菌 40 min,常温保存。

细胞培养基的配制:根据使用要求配制含相应浓度的胎牛血清培养基,加入 1% 的双抗。

1.5 乳兔脾脏原代细胞的培养

原代细胞培养采用酶消化法,在超净工作台处死乳兔,并在 75% 酒精中浸泡 1~5 min,在无菌条件下取出脾脏,放置于装有 PBS 溶液的培养皿中涮洗,尽量除去组织的血液,转移到有滤网的无菌培养皿,在滤网上用剪刀剪碎组织,加入适量 0.25% 胰酶消化,用完全培养液进行冲洗,将液体全部吸入 15 ml 离心管中,放置 10 min 使大的组织块自然沉降,然后将上层培养液转移至底面积为 25 cm² 细胞培养瓶,于 5% CO₂ 培养箱中培养。根据细胞贴壁情况以及生长状态更换培养液,选择生长状态稳定的细胞进行传代培养。

1.6 乳兔脾脏细胞的传代培养

待细胞铺满培养瓶 80%~90% 时,弃掉培养液,用 PBS 液清洗 3 次,加入胰酶消化,在显微镜下观察,待细胞回缩变圆时,加入完全培养基进行终止,轻微吹打使细胞完全从壁上脱离,按 1:2 进行传代培养,观察细胞生长状况以及形态,选取生长状态良好的细胞继续传代培养,每传 2 代保存一批细胞。在乳兔脾脏细胞进行传代培养的过程中,发现 1 株生长状态良好的细胞,细胞培养至八代时细胞生长缓慢,将细胞传代转移到另一个细胞培养瓶,细胞继续生长,且生长速度加快,将该细胞株命名为 RS-17,并对细胞继续传代培养。

1.7 RS-17 的保存

待细胞贴壁达到 90% 以上时,弃培养液,加入 PBS 液洗涤 3 次,加入 0.25% 的胰酶 1 ml,在显微镜下观察,待细胞开始回缩变圆时,立即加入传代用培养液终止消化,用吸管轻轻吹打成细胞悬液,将细胞悬液吸入 10 ml 的无菌离心管,1 000 r/min 离心 8 min,弃上清液。将 DMEM、胎牛血清、二甲基亚砷按 7:2:1 配制细胞冻存液,向离心管加入细胞冻存液进行反复轻柔吹打,吸入 2 ml 细胞悬液加入冻存管,做好标记,采用逐步降温法先将细胞置入 4 ℃ 冰箱中 1~2 h,再移至 -20 ℃ 冰箱内 2~4 h,然后 -70 ℃ 冰箱过夜,再吊入液氮容器颈端气态部分存放 2 h,最后沉入液氮中保存。

1.8 RS-17 的复苏

从液氮罐中取出细胞冻存管,迅速将冻存管投入到 37 ℃ 的水浴锅中解冻,并不断的摇动,待融化后将细胞液转入 10 ml 离心管中,加入 10 ml 10% 血清的培养液,混匀,放入离心机中 1 000 r/min 离心 8

min, 弃上清液, 向离心管内加入 10 ml 培养液, 吹打制成细胞悬液, 将细胞悬液分装入培养瓶内, 置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱进行培养观察。

1.9 MTT 法检测血清依赖性

血清依赖性按照 MTT 细胞增殖试剂盒说明书进行。(1) 传至 60 代的细胞, 将细胞消化并按每孔 3 000 个接种于 96 孔板, 接种后 24 h, 分别用无血清培养液、3%、5%、10%、15%、20% 的培养液更换细胞液。按照细胞增殖试剂盒说明书, 每个梯度做 5 个重复孔, 置 37 °C 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中孵育 14 h。(2) 用 MTT Solvent (组分 B) 溶解 MTT Reagent (组分 A), 配制成 5 mg/ml 的 MTT 溶液。配制后放于 -20 °C 避光保存。(3) 每孔加入 10 μ l MTT 溶液, 使每个孔中的 MTT 终质量浓度为 0.5 mg/ml。轻轻混匀后, 5% CO₂, 37 °C 培养箱中孵育 4 h。(4) 小心吸取每个孔中的培养基以防止细胞单层破裂。每孔加入 100 μ l Formazan solubilization solution (甲臜溶液)。(5) 将 96 孔板放在振荡器上轻轻震荡 10 min, 直至在普通光学显微镜下观察到甲臜全部溶解。在酶标免疫检测仪 570 nm 测定吸光度。

1.10 RS-17 标志性蛋白的免疫荧光检测

选择传至 65 代的 RS-17 细胞进行细胞波形蛋白和角蛋白的检测, 取对数生长期且生长状态良好的培养细胞, 铺于含有无菌盖玻片的 12 孔板中, 观察细胞生长状态, 制作融合度达到 80% 左右的细胞爬片。4% 多聚甲醛 37 °C 固定细胞 30 min, 0.1% PBST 洗 3 次。每孔加入 0.25% 的透化液在 4 °C 透化 20~30 min, PBST 洗 3 次, 加入 5% BSA PBS 封闭液在 37 °C 封闭 1 h, PBST 洗 3 次。用 1% BSA PBS 稀释过的一抗 37 °C 孵育 1 h, PBST 每隔 3 min 洗 1 次, 洗 3 次。用 1% BSA PBS 稀释过的羊抗鼠二抗 37 °C 孵育 1 h, PBST 每隔 3 min 洗 1 次, 洗 3 次。加入核染工作液核染 10 min, 洗 3 次, 然后将盖玻片取出用甘油封片, 放入荧光显微镜下观察荧光。

1.11 RS-17 细胞生长曲线的测定

将传至 67 代的 RS-17 细胞以胰酶消化, 以每孔细胞数量为 1×10^4 接种于 24 孔板, 使用细胞计数仪每天计数 3 孔, 求其平均值, 绘制生长曲线。

1.12 RS-17 细胞染色体观察

参考詹康等^[3]的研究方法, 取 28 代、70 代对数生长期细胞, 加秋水仙素至质量浓度 0.1 μ g/ml 继续培养 3~4 h。用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 用无

血清培养基洗涤细胞 1 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液加入预热至 37 °C 0.075 mol/L 氯化钾 (KCl) 溶液 7 ml, 轻轻吹打均匀, 37 °C 水浴 17 min, 悬液中加入甲醇/冰醋酸 (3:1, 体积比) 固定液 1 ml, 轻轻吹打混匀, 将悬液以 1 400 r/min 离心 10 min 去上清液, 加入新鲜固定液 7 ml 吹打混匀, 室温静置 30 min, 1 400 r/min 离心 10 min 弃上清液, 重复上个步骤固定 1 次, 视细胞量加入适量固定液, 吹打均匀。取出预冷的载玻片, 将载玻片倾斜 45°, 在载玻片上方 50 cm 处用吸管迅速滴上 2~3 滴细胞悬液, 用嘴轻轻吹散使细胞分散均匀, 室温干燥。吉姆萨 (Giemsa) 工作液染色 15 min, 冲洗, 空气干燥。先用低倍镜寻找良好的分裂相, 再使用高倍镜观察。

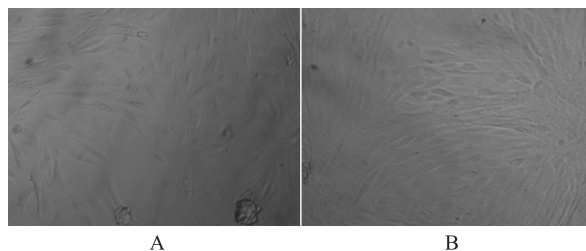
1.13 RS-17 细胞致瘤性

取传至 72 代的 RS-17 细胞, 用生理盐水重悬调整细胞密度为 $1 \text{ ml } 1 \times 10^6$ 个, 以 SP2/0 骨髓瘤细胞为阳性对照, 生理盐水为阴性对照, 6 周龄 Balb/c 小鼠背部皮下无菌接种细胞悬液 0.2 ml, 定期观察小鼠生长状态, 并制作病理切片。

2 结果与分析

2.1 兔原代细胞观察

乳兔脾脏细胞在放入培养箱 3 d 后开始贴壁 (图 1A), 细胞形态主要为多边形, 梭形, 以岛屿状逐渐向四周扩大, 7 d 后细胞贴壁达到 90% 以上 (图 1B), 细胞中央核明显, 常有 2 个以上的核仁, 无重叠生长现象。



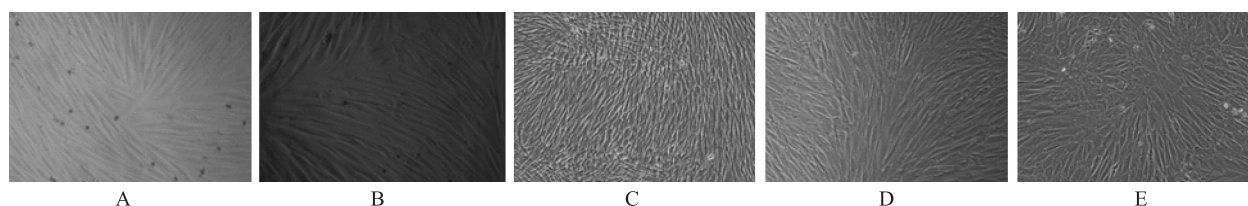
放大倍数: 100 倍; A: 培养 3 d; B: 培养 7 d。

图 1 脾脏原代细胞培养

Fig.1 Primary culture cells of spleen

2.2 RS-17 细胞的传代

RS-17 细胞主要呈梭形, 由一个中心向四周放射生长, 似典型的成纤维型细胞形状, 细胞在传代后 4~6 h 贴壁生长, 3~4 d 细胞铺满细胞瓶底。该细胞已传至 95 代且生长状态稳定良好 (图 2)。



放大倍数:100 倍;A:20 代;B:30 代;C:50 代;D:80 代;E:95 代。

图 2 RS-17 细胞形态

Fig.2 Micrograph of RS-17

2.3 RS-17 的冻存与复苏

RS-17 细胞在经过逐渐降温法冻存于液氮后,第 3 d 将其从液氮中取出,快速解冻后培养过夜,细胞贴壁,生长状态良好,细胞呈长梭形,与未冻存细胞生长一致,3~4 d 细胞铺满瓶底,且能稳定地继续传代培养。

2.4 RS-17 血清依赖性

60 代细胞 MTT 比色结果经统计学分析如图 3 所示,RS-17 细胞的生长对血清有依赖性,在无血清的培养基中,细胞生长较缓慢,有血清培养基对细胞有极显著促生长作用($P<0.01$),5%、10%血清培养基与 3%血清培养基相比促进细胞增殖作用无显著差异($P>0.05$),15%、20%血清培养基与 3%血清培养基相比有极显著促进作用($P<0.01$),5%、15%、20%血清培养基之间的促进作用差异显著($P<0.05$),10%、15%、20%血清培养基之间对细胞的促进作用差异不显著($P>0.05$)。根据各质量浓度血清的促生长作用以及细胞的培养状态,细胞生长的最优血清质量浓度为 10%。

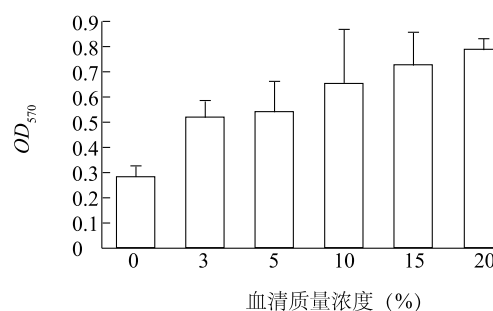
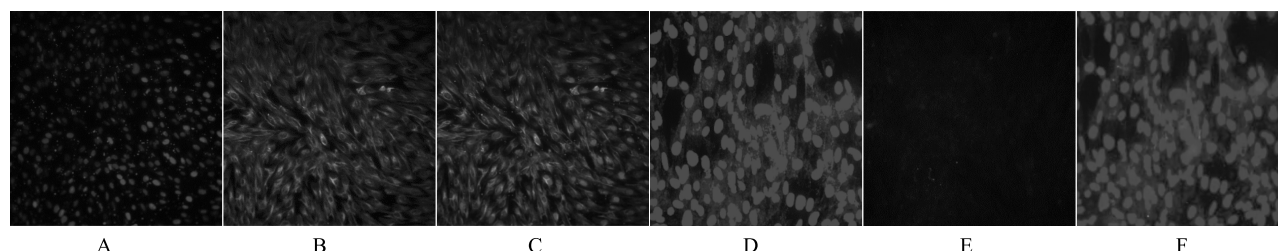


图 3 RS-17 细胞对血清的依赖性

Fig.3 Dependence of RS-17 for serum

2.5 RS-17 细胞标志性蛋白的免疫荧光检测

按照方法 1.10 所示的方法选用波形蛋白、角蛋白 2 种标记蛋白对 65 代 RS-17 细胞进行鉴定。其中波形蛋白是成纤维细胞的标志,角蛋白是上皮细胞标志。免疫荧光染色结果见图 4 所示。试验结果表明,波形蛋白阳性(图 4A、图 4B、图 4C),角蛋白阴性(图 4D、图 4E、图 4F),说明该细胞为成纤维型细胞。



放大倍数:200 倍;A、B、C:波形蛋白核染和特异性反应;D、E、F:角蛋白核染和特异性反应。

图 4 细胞免疫荧光鉴定

Fig.4 Immunofluorescence identification of the RS-17

2.6 RS-17 细胞的生长曲线

取传至 67 代的 RS-17 细胞,以约每孔 1×10^4 个接种于 24 孔板,24 h 后对消化细胞进行计数,如图 5 所示,细

胞在 2 d 后增殖旺盛,3~5 d 为对数增长期,6 d 细胞进入平台期,细胞老化脱落死亡,细胞生长曲线为 S 形。以上数据表示 RS-17 细胞符合细胞生长的一般规律。

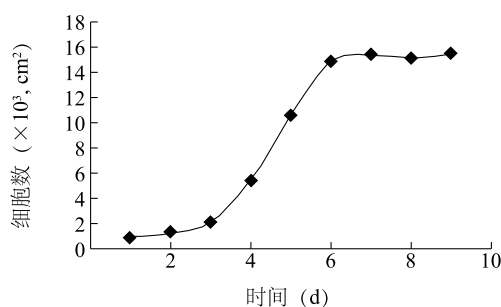


图 5 RS-17 细胞生长曲线

Fig.5 Growth curve of the RS-17 cells

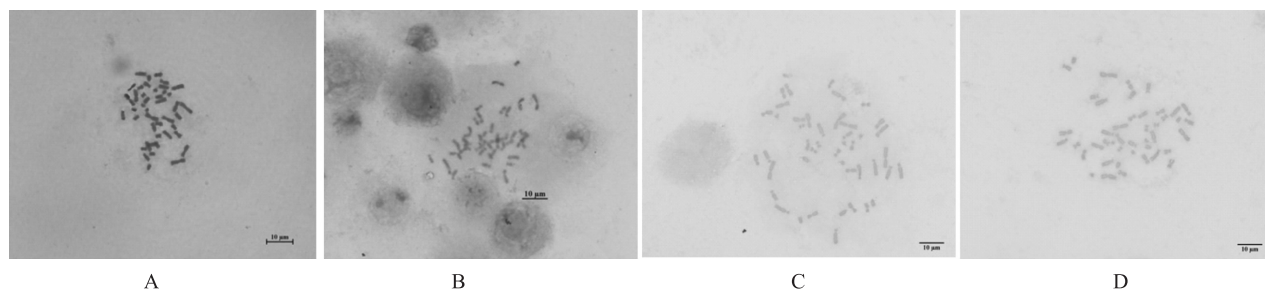
2.7 RS-17 细胞的染色体观察

通过对细胞染色体进行染色,镜下观察第 28 代(图 6A、图 6B)和第 70 代 RS-17 细胞(图 6C、图 6D),细胞染色体条数均为 44 条,染色体形态结构

正常,以上数据表明传至第 70 代的 RS-17 细胞具有稳定的生物学功能。

2.8 RS-17 细胞致瘤性

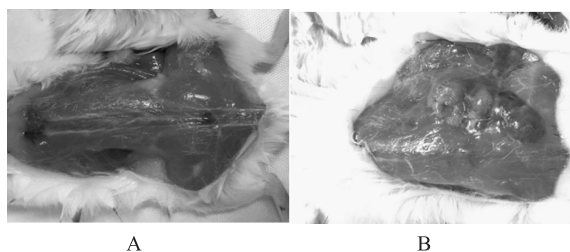
取 72 代 RS-17 细胞与小鼠骨髓瘤细胞分别接种 Balb/c 小鼠后,接种 RS-17 细胞的小鼠生长状态良好,背部接种部位无明显变化,背部无肿物形成;接种小鼠骨髓瘤细胞的小鼠 10 d 后在背部接种部位有小结节生长,随着时间延长,小结节逐渐变大,小鼠精神状态变差,逐渐消瘦,毛色脏乱,49 d 后小鼠死亡。解剖注射 RS-17 细胞的小鼠皮下正常(图 7A),而注射 SP2/0 的小鼠在背部形成结节(图 7B),病理切片如图 8 所示,接种 RS-17 细胞的小鼠背部肌肉纹路清晰,而接种 SP2/0 的小鼠可明显看到很多核分裂相的细胞,且细胞排列紊乱。



A、B:28 代细胞;C、D:72 代细胞。

图 6 RS-17 细胞染色体分析

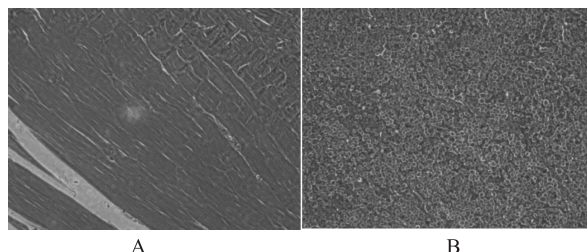
Fig.6 Karyotype analysis of RS-17



A:注射 RS-17 细胞小鼠;B:注射 SP2/0 小鼠。

图 7 balb/c 小鼠解剖病变

Fig.7 The anatomy of the balb/c



A:注射 RS-17 细胞;B:注射 SP2/0 细胞。放大倍数:100 倍。

图 8 病理切片

Fig.8 Pathological section

3 讨论

长期以来,永生化细胞的建立主要运用于攻克动物疾病研究以及人类医学上的相关难题。辐射以及病毒转染会促使永生的细胞在生长特性以及生物学特性上都会有所改变,而通过端粒酶转染的细胞

保持着正常细胞的特点,所以近 20 年通过端粒酶建立了大量的人类器官的永生化细胞,如人的视网膜上皮细胞、输卵管上皮细胞、神经干细胞、成纤维细胞等^[4-7]。同时,大量的动物永生化细胞也通过该方法进行建立,Veitonmaki 等^[8]将 hTERT 转入牛毛细管内皮细胞,将细胞内源性的 p16INK4a/p Rb 灭

活,而使细胞发生永生化。洪海霞等^[9]、苏正元等^[10]通过转染 hTERT 质粒构建了猪的血管内皮细胞。本研究中的细胞在培养至 8 代后,细胞在 14 d 内基本停止增殖,当把细胞通过胰酶消化转移到新的培养瓶时,细胞开始生长,且生长速度加快,生长能力以及形态随着细胞的继续传代未有明显改变。而培养了几批次的原代细胞都在传至 7~9 代就开始生长缓慢,传至 10~11 代细胞停止生长开始脱落。目前 RS-17 细胞已传至 95 代仍形态稳定,完全超过了细胞正常的生长周期以及传代次数,说明 RS-17 细胞在体外培养的过程中经过自发或外界因素的影响从增殖衰老危机中逃离而达到了永生化。啮齿类动物细胞自发永生化的几率为 $10^{-6} \sim 10^{-5}$ 、 $0 \sim 10^{-6}$,这不是第 1 个乳兔细胞在自然状态下达到永生化的案例,1992 年,吉传义等^[11]在培养乳兔肾原代细胞的过程中,也偶然获得了 1 株转化的上皮细胞系。

RS-17 细胞在培养过程中,贴壁后前期细胞密度小,细胞多为突起的纺锤形以及扁平星形,后期细胞增殖变多后形态主要为梭形,根据形态可初步认定其为成纤维型细胞,进行免疫荧光染色显示细胞波形蛋白阳性,参照相关研究结果^[12-13],鉴定该细胞属于成纤维型细胞。在细胞生长曲线测定中,可见随着细胞增殖密度加大,有细胞脱落死亡,同时细胞无重叠生长状态出现,显示细胞具有正常的生长特性,且具有接触抑制性,MTT 检测血清依赖性试验中,3%的血清培养基相对于无血清培养基有着极显著的促进生长作用,而与 5%、10%的血清培养基之间促进作用无显著差异,说明 3%、5%血清培养基可以作为 RS-17 细胞的培养基;核型观察细胞染色体为 44 条,这与家兔的染色体条数一致,且选取了 2 个传代次数的细胞,在染色体数目上没有明显变化,说明 RS-17 细胞具有正常的染色体,细胞在注射小鼠后没有体现出致瘤性。以上试验结果表明该细

胞已经建系成功,为后续 RHDV 侵染相关研究提供了科学材料。

参考文献:

- [1] 洪霞芳. 中国兔产业发展研究[D]. 北京:北京林业大学, 2011.
- [2] HONDA A, HIROSE M, HATORI M, et al. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine.[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(41):31362.
- [3] 詹康,左晓听,陈银银,等.猪小肠上皮细胞分离培养与鉴定[J].动物营养学报,2015,27(5):1477-1484.
- [4] 刘学强. 转染 hTERT 基因建立人永生化神经干细胞系的实验研究[D].重庆:第三军医大学,2005.
- [5] 高雯,臧荣余,王雁,等.人类输卵管上皮永生化细胞系的建立及鉴定[J].中国癌症杂志,2013,23(4):241-247.
- [6] 袁文斌. 人源性成纤维细胞系的建立及其生物学特性初步研究[D].杭州:浙江大学,2004.
- [7] SMITH J L, LEE L C, READ A. One-step immortalization of primary human airway epithelial cells capable of oncogenic transformation [J]. Cell Biosci, 2016, 6:57.
- [8] VEITONMAKI N, FUXE J, HULTDIN M. Immortalization of bovine capillary endothelial cells by hTERT alone involves inactivation of endogenous p16INK4A/pRb [J]. FASEB J, 2003, 17(6):764-766.
- [9] 洪海霞. 永生化猪脐静脉血管内皮细胞系的建立及其生物学特征分析[D].西安:西北农林科技大学,2007.
- [10] 苏正元,张彦明,洪海霞,等.应用端粒酶逆转录酶基因使猪血管内皮细胞永生化的初步研究[J].畜牧兽医学报,2007,38(4):407-411.
- [11] 吉传义,杜念兴,徐为燕,等.兔出血症病毒细胞培养的初步研究[J].病毒学报,1992,8(8):252-256,293.
- [12] 莫国艳,田代志,张丽萍,等.兔 Tenon's 囊组织原代成纤维细胞分离培养与鉴定[J].武汉大学学报(医学版),2017,38(6):973-977.
- [13] 魏如雪,赵学明,郝海生,等.兔胎儿成纤维细胞的分离培养和鉴定[J].畜牧兽医学报,2016,47(6):1272-1279.

(责任编辑:陈海霞)