不同年龄二狼山绒山羊耳组织成纤维细胞的生物学特性

奎　华[1]　Hoang Minh Thang[1]　曾璐瑶[1]　贾宝瑜[1]　成文敏[1]　郝志强[2]　李鸿辉[1]
赵红业[3]　魏红江[1]　王　文[4]　卿玉波[1*]
1.云南农业大学动物科学技术学院,昆明 650201;
2.内蒙古中科正标生物科技有限责任公司,内蒙古巴彦淖尔 015000;
3.云南农业大学植物保护学院,昆明 650201;
4.中国科学院昆明动物研究所,昆明 650201

摘要　采用胶原酶消化法建立细胞系,观察细胞形态、测定细胞冻存前和复苏后的存活率、绘制细胞生长曲线,并对染色体核型进行分析,研究不同年龄的二狼山绒山羊耳组织成纤维细胞的生物学特性,分析年龄对二狼山绒山羊耳组织成纤维细胞体外培养的影响。试验结果表明,年龄对细胞形态无影响;冻存没有降低细胞的存活率($P>0.05$);细胞的生长曲线呈典型的 S 型且年龄对细胞的生长无明显影响($P>0.05$);染色体核型分析显示,不同年龄的山羊耳组织成纤维细胞系的染色体数目均为 2 n=60(XY/XY),无染色体畸形。说明不同年龄,甚至年龄比较大的二狼山绒山羊个体(13 岁)都可以通过胶原酶消化法建成稳定的成纤维细胞系,本试验使二狼山绒山羊种质资源在细胞水平得到保存,为二狼山绒山羊成纤维细胞系的建立以及开展其种质资源的保存提供一定的参考。

关键词　二狼山绒山羊;成纤维细胞系;年龄;生物学特性

二狼山绒山羊是我国不可多得的绒用经济动物之一,其羊绒以细度细、长度长、强度大、光泽好、净绒率高等优良品质而闻名,成为中国羊绒品质最优的绒山羊品种之一,被列入国家首批发布的动物遗传资源一级保护品种名录[1]。近年来,随着绒毛市场对羊绒品质和量的需求急剧增加,增加羊绒的产量、提高其质量显得尤为重要[2]。但是,由于山羊绒收购未能体现以质论价、优质优价,为了增加羊绒产量,当地政府部门引进一些羊绒产量高但细度较粗的绒山羊品种与当地羊绒细度较细的二狼山绒山羊杂交,虽然产绒量有了显著提高,但使得羊绒质量下降[3],羊绒细度逐年变粗[4,5],优质二狼山绒山羊个体数目越来越少。

2015 年,在内蒙古自治区西部阿拉善右旗以及巴彦淖尔市杭锦后旗,发现了少数羊绒细度 12.80 ~ 13.89 μm 的二狼山绒山羊,其羊绒细度较细、经济价值较高,为选育出优质二狼山绒山羊提供了良好的材料。但是目前,羊的选育方法主要是“优胜劣汰”的模式,周期较长[6],且品种优良的二狼山绒山羊数目已较少,制约了选育改良的步伐。同时,有的优良个体被发现时已是较大年龄,无自然繁殖能力,如果采取传统的品种选育方式,很难选育出一个羊绒较细的群体。所以,采取其他方式(如体细胞克隆技术)保存优质二狼山绒山羊种质资源,快速扩繁出大量的优秀二狼山绒山羊显得尤为必要。建立并保存家畜成纤维细胞系属于细胞水平上的保种方法[7-8],耳组织成纤维细胞不仅拥有动物体完整的遗传信息,而且取材后对

收稿日期:2018-01-22
基金项目:国家转基因重大专项课题子课题“动物重要基因克隆及功能验证”(2016ZX08009-003-006)
* 通讯作者
奎　华,女,1991 年生,在读硕士研究生。

动物健康无明显影响，为研究珍稀动物的种质资源保存和快速扩繁提供了极大的方便。年龄会对耳组织成纤维体细胞系的建立及体外培养产生影响[9]。本研究选取不同年龄的二狼山绒山羊作为研究对象，建立耳组织成纤维细胞系，并对细胞的形态、冻存前和复苏后存活率、生长曲线、核型等一系列生物学特征进行比较，以探究不同年龄二狼山绒山羊成纤维细胞的生物学特性是否存在差异，为基础研究和实际生产中二狼山绒山羊耳组织成纤维细胞系的建立提供参考，同时为优质二狼山绒山羊资源保存及快速扩繁提供技术支撑。

1　材料与方法

1.1　耳组织成纤维细胞系建立

1）原代培养。取二狼山绒山羊耳缘组织约 1 cm^2，在超净工作台内将 3 个年龄分别为 1 岁（♂）、4 岁（♀）和 13 岁（♂）的二狼山绒山羊耳组织样品先放置于含双抗的 PBS（含 95% PBS，5%双抗）中清洗 3 遍，再放入不含双抗的 PBS 中清洗 3 遍，将组织充分剪碎。组织块放入细胞培养瓶中，加入 5 mL 胶原酶溶液（79% DMEM，20% FBS，1%双抗，0.1%胶原蛋白酶），放入培养箱中消化培养 2～4 h 后离心（1 500 r/min，5 min，下同）去除胶原酶，收集细胞，加入培养液（89% DMEM，10% FBS，1%双抗），于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中培养。

2）传代培养。荧光倒置显微镜下观察，细胞增殖至汇合度达到约 80%时，弃去原培养液，用 PBS 清洗 2 遍，向瓶内加入 2 mL 0.25%胰蛋白酶，消化 1 min 后，立即加入 8 mL 培养液（98% DMEM，2% FBS）终止消化，反复吹打使细胞从培养瓶壁上脱落，收集培养液，离心，弃上清液，重悬，按 5.0×10^4 个/mL 的密度传代培养，记录成纤维细胞贴壁和生长情况。

1.2　细胞冻存

取第 3 代细胞，按上述细胞传代培养的方法消化细胞后将细胞悬液离心，弃上清液，然后用冻存液（70% DMEM，20% FBS，10% DMSO）重悬细胞，并控制细胞密度约为 1×10^6 个/mL，将悬液以 0.5 mL/管分装于冻存管中。将冻存管放入细胞程序冷冻盒，置于 -80 ℃超低温冰箱，24 h 后将冻存的细胞移入液氮中保存。

1.3　细胞复苏

将上述细胞冻存管从液氮中取出后置于 37 ℃恒温水浴锅中，轻微晃动使其尽快融化，细胞悬液注入离心管并加入 5 mL 培养液（79% DMEM，10% FBS，1%双抗），低速离心后加入 5 mL 同样的培养液置于细胞培养瓶中，放入培养箱内继续培养。

1.4　细胞生物学特性

1）生长曲线绘制。MTT 法：取第 2 代细胞，消化后向 96 孔培养板内接种细胞，每孔接种约 1×10^3 个细胞，每种细胞各接种 12 个 96 孔板。从接种之日算起，每隔 24 h 取出 1 个 96 孔板测每孔的吸光值：在每个孔内加入 10 μL 5 mg/mL MTT，继续培养 4 h 后吸出培养液，每孔加 100 μL DMSO 后振荡 5 min，在 578 nm 无试剂对照条件下检测吸光值。细胞计数法：取第 2 代细胞，消化后向 24 孔培养板每孔内接种 1 mL 密度约为 1×10^3/mL 细胞，从接种之日算起，每隔 24 h 计数 2 个孔内的细胞密度，算出平均值，连续测定 12 d，以培养时间为横坐标，以细胞密度为纵坐标，绘制细胞生长曲线[10]。

2）细胞活力测定。将冻存前与复苏后的传代细胞制成细胞悬液，取 0.5 mL 放入离心管中，加入 0.1 mL 0.02 μg/mL 的台盼蓝染液充分混匀，2 min 后用血球计数板在显微镜下计数、测定细胞的存活率，凡着色为蓝色的细胞为死细胞，计数 3 组，每组 1 000 个细胞。

3）细胞染色体分析。将培养至第 3 代的成纤维细胞在指数生长期加秋水仙素 0.1 μg/mL，继续培养 1 h，用 0.25%胰蛋白酶消化、离心，用预温至 37 ℃的0.075 mol/L KCl 溶液低渗处理 15～20 min，后加新鲜固定液（甲醇∶乙酸 =3∶1）0.5～1.0 mL 预固定，1 000 r/min 离心 10 min，弃上清，加入固定液 5 mL，重复固定 3 次，每次 20 min，再以 1 000 r/min 离心 10 min，用少量新鲜固定液制成细胞悬液，滴 2～3 滴细胞悬液于预冷的干净载玻片上，冷风吹干，Giemsa 染色、水洗、干燥、镜检，低倍镜下选出染色体分散好、长度适中、染色体清晰的中期分裂相，油镜（×1 000）下拍照、分析。

1.5　统计分析

采用 SPSS 22.0 软件对本试验中细胞冻存前后的存活率进行 t 检验分析，采用 Kruskal-Wallis 非参数检验对细胞吸光度和密度进行分析，$P<0.05$ 视为差异显著。

2　结果与分析

1)细胞的形态学观察。耳组织经胶原酶分离培养 2 h 后,在显微镜下观察可见到只有少数细胞贴壁,大多数细胞单个悬浮在培养液中,此时贴壁的细胞仍呈圆形,尚未伸展。24 h 后,可观察到已有许多细胞贴壁并开始伸展出伪足,细胞形状变得不规则,后伪足逐渐伸长。48 h 后,3 个不同年龄羊的组织块边缘形成生长晕,细胞形态呈梭形或扁平星形,即典型的成纤维细胞形态[11]。当细胞生长至近 80%汇合时,细胞呈放射状走势,向培养瓶中加入胰蛋白酶,镜下观察可见细胞回缩呈圆形点状,传代后的细胞与原代细胞生长速度基本一致。1 岁羊、4 岁羊和 13 岁羊的细胞汇合度达到约 80%(图 1A-C)的时间均为 6 d。

2)成纤维细胞冻存前和复苏后的存活率。1 岁、4 岁和 13 岁羊成纤维细胞冻存前的存活率分别为 94.8%、96.9%、98.8%,复苏后的存活率分别为 94.3%、96.1%、98.0%。不同年龄的羊成纤维细胞冻存前与复苏后的存活率无显著差异($P<0.05$)(图 1D)。

3)生长曲线。3 个年龄的成纤维细胞的生长曲线均呈典型的 S 型(图 1E,F)。从细胞活力看,1~6 d 3 个年龄的耳组织成纤维细胞活力均较强,6 d 之后细胞活力不断减弱,减弱的速率从快到慢依次是:13 岁羊、4 岁羊、1 岁羊,年龄越大细胞活力减弱的速率越快($P>0.05$)。从生长曲线看,1~6 d 3 个年龄的羊耳组织成纤维细胞的密度不断增加,生长情况基本相似,6 d 后细胞处于衰亡期,3 个年龄的羊耳组织成纤维细胞的密度降低,且细胞密度下降的速率从快到慢依次是:13 岁羊、4 岁羊、1 岁羊,年龄越大细胞密度下降越快($P>0.05$)。

4)核型分析。图 2 所示为不同年龄的羊耳组织成纤维细胞中期分裂相染色体。染色体数目 2 n=60(XY/XX),均为稳定的二倍体细胞系。30 对染色体中有 29 对常染色体均为端着丝粒染色体,长度逐渐递减;性染色体 X、Y 均为中央着丝粒,X 染色体

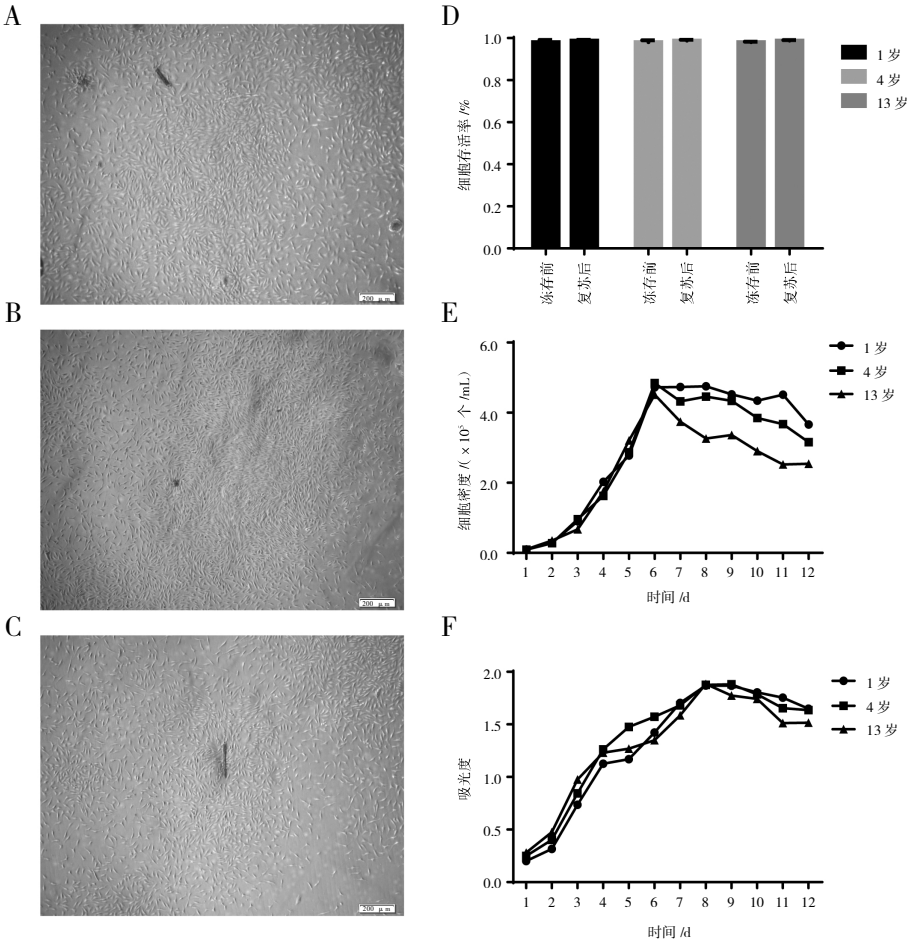

图 1　细胞生长情况

注:A、B、C 图分别为体外培养的 1 岁、4 岁、13 岁羊成纤维细胞(100×),D 为成纤维细胞冻存前和复苏后的存活率,E、F 为细胞生长曲线。

最大，Y 染色体最小。1 岁、4 岁、13 岁羊核型分析结果无明显差异。

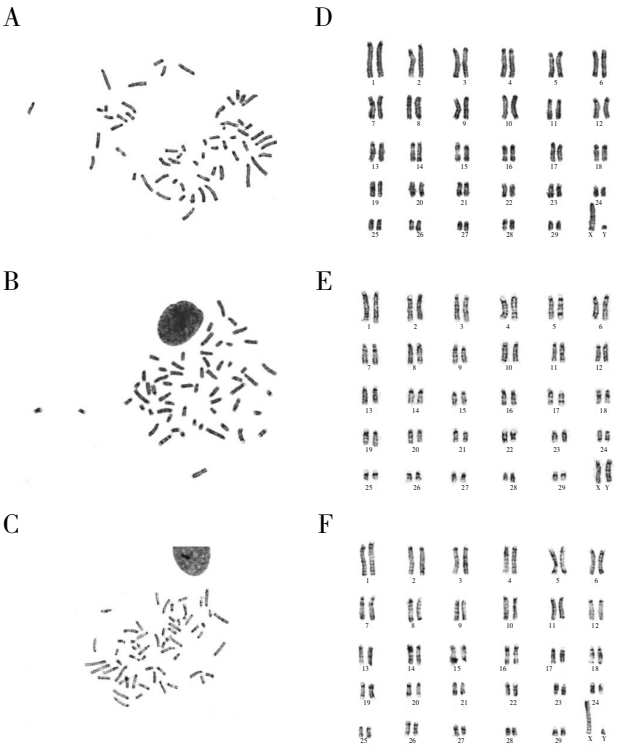

图 2　成纤维细胞中期分裂相染色体与核型（100×）

注：A、B、C 分别为 1 岁、4 岁、13 岁羊成纤维细胞中期分裂相染色体，D、E、F 分别为 1 岁（♂）、4 岁（♀）、13（♂）岁羊成纤维细胞核型图。

3　讨　论

1）取样个体和部位选择。在体细胞核移植中，除了有选择耳组织成纤维细胞作为供体细胞外，还有选择胎儿成纤维细胞、乳腺上皮细胞、肾脏细胞、心脏细胞、星形细胞、颗粒细胞等作为供体细胞[10-16]，但后者均需杀死动物或进行繁琐的手术，影响动物生命以及正常生长。试验中用于建立成纤维细胞系的材料取自于二狼山绒山羊耳缘皮肤组织（<1 cm^2），不影响供体动物的健康，取样方便，还可以进行再次取样，这种取样方法较适合于优质二狼山绒山羊越来越少的现状，同时也适合于其他珍稀物种与濒危动物[17-18]。所采样的二狼山绒山羊中，有公羊和母羊，为保存丰富的种质资源提供了技术支撑。

2）成纤维细胞分离方法的选择。原代细胞分离方法主要有组织块法和酶消化法。本试验采用的胶原酶消化法分离原代细胞，胶原酶可以特异性地分解组织细胞间质中的胶原蛋白，可以有效分离细胞，对细胞机械性损伤较小，也降低其被酶破坏的风险，相比组织块法可以获得更多均一的原代细胞，并且缩短了原代细胞培养的时间[19]，可为核移植提供量足质优的供体细胞。

3）年龄对细胞生物学特性的影响。前人研究表明，成纤维细胞增殖能力随年龄的增加而逐渐下降[20]。本研究对不同年龄的羊耳组织成纤维细胞系的生长曲线、冻存前和复苏后存活率以及核型分析 3 个生物学特性观察得出：年龄较大的个体的成纤维细胞生长速度、生长情况依然良好，冻存对其没有影响，且遗传特征稳定。这与前人研究结果不太一致，可能与动物种类和培养环境等因素有关。不同年龄的细胞在冻存前和复苏后存活率差异不显著（$P>0.05$），该结果与韦云芳等[21]研究的昆明犬胎儿成纤维细胞冻存前和复苏后存活率无显著性差异、许成盛等[17]研究的新生猪成纤维细胞冻存前和复苏后存活率无显著性差异的结论相一致。说明冻存和复苏的过程对细胞活力影响较小，本研究所采用的冻存和复苏的方法可行。

4）染色体核型分析。染色体分析可以鉴定该细胞系的种源、性别以及判断细胞是否正常或发生恶变，正常细胞系染色体数目趋于稳定[22]，二倍体稳定性对于种质资源保存也有重要意义。对本试验所建立的不同年龄的二狼山绒山羊耳组织成纤维细胞系核型进行分析，染色体数目和形态与国内外其它山羊[23-25]相比未发生变异，证实二狼山绒山羊成纤维细胞的遗传特征稳定，而且年龄对核型没有影响，可作为体细胞核移植的供体细胞，这与王娟等[26]研究的滩羊胎儿成纤维细胞的染色体分析相一致。

综上，在实际生产中，不同年龄，甚至年龄比较大的二狼山绒山羊个体，都可以通过胶原酶消化培养法建成稳定的耳组织成纤维细胞系，并且可以通过液氮冻存的方法进行长期保存。建立的成纤维细胞系可为优质二狼山绒山羊的批量克隆提供必需的供体细胞，增加优良品种的群体数目，还可进行种质资源保存，实现优质二狼山绒山羊的快速扩繁。

参　考　文　献

[1]　冯美玲，刘永录，张培艺，等.二狼山白绒山羊种质特性与品种资源保护[J].家畜生态学报，2010，31（4）：27-29.

[2]　阎思进，冯平，李福贵.羊绒产业现状与质检体制改革[J].中国纤

检,2016(2):32-35.
[3] 李福贵, 徐绚绚.2010/2011 年度内蒙古自治区山羊绒产业状况分析报告[J].中国纤检,2012(19):38-39.
[4] 田文亮. 中国山羊绒品质分析 (一)[J]. 中国纤检,2015(1):27-31a.
[5] 田文亮. 中国山羊绒品质分析 (一)[J]. 中国纤检,2015(1):27-31b.
[6] 谭晓山,李冰,赵永聚.我国绵、山羊育种工作现状与发展前景[J].中国畜牧杂志,2015,51(16):15-19.
[7] 陈守云,徐海涛,高海燕.畜禽遗传资源保护和利用的有效途径[J].浙江畜牧兽医,2010,35(6):10-11.
[8] 郝柱,王颖,彭静,等.金华猪胎儿成纤维细胞系的建立与生物学特性分析[J].农业生物技术学报,2012,20(5):536-542.
[9] 赵富生,武庚,武杨,等.不同年龄段大鼠骨髓基质干细胞生物学特性的比较[J].中国组织工程研究,2010,14(49):9147-9150.
[10] SHIN T,KRAEMER D,PRYOR J,et al.A cat cloned by nuclear transplantation[J].Nature,2002,415(6874):859.
[11] CHESNé P,ADENOT P G,VI GLIETTA C,et al.Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J].Nature Biotechnol,2002,20(4):366-369.
[12] ZHOU Q,RENARD J P,LE FRIEC G,et al.Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation[J].Science,2003,302(5648):1179.
[13] LEE B C,KIM M K,JANG G,et al.Dogs cloned from adult somatic cells[J].Nature,2005,436(7051):641.
[14] WANI N A,WERNERY U,HASSAN F A,et al.Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer[J].Biol Reprod,2010,82(2):373-379.
[15] KEEFER C L,KEYSTON R,LAZARIS A,et al.Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells[J].Biol Reprod,2002,66(1):199-203.
[16] GALLI C,LAGUTINA I,CROTTI G,et al.Pregnancy:a cloned horse born to its dam twin[J].Nature,2003,424(6949):635.
[17] 许成盛,魏红江,李红,等.版纳微型猪近交系新生猪成纤维细胞的体外培养及其生物学特征研究 [J]. 云南农业大学,2011,26(3):323-327.
[18] AMOLI A A,MOHEBALI N,FARZANEH P,et al.Establishment and characterization of Caspian horse fibroblast cell bank in Iran[J].Vitro Cell Dev Biol Anim,2017,53(4):337-343.
[19] 曹海峰,随刘才,季索菲,等.梅山猪胎儿成纤维细胞的分离培养及 SRY-PCR 法快速性别鉴定 [J]. 安徽农业大学学报,2011,38(6):907-910.
[20] 刘波,滕晓华,彭立辉,等.不同年龄大鼠成纤维细胞增殖能力和端粒长度的变化[J].医学临床研究,2008,25(8):1396-1400.
[21] 韦云芳,万九生,李静,等.昆明犬胎儿成纤维细胞系的建立及生物学特性分析[J].中国畜牧兽医,2014,41(12):161-166.
[22] MCCORMICK C,FRESHNEY R I.Activity of growth factors in the IL-6 group in the differentiation of human lung adenocarcinoma[J].British Journal of Cancer,2000,82(4):881-890.
[23] EDET O U,AIKPOKPODION P O.Karyotype Analysis of in South-Eastern Nigeria[J].American Journal of Plant Sciences,2014(1):126-131.
[24] 肖育华,詹纯列,张修彦,等.雷州山羊染色体核型研究及 C- 带分析[J].实验动物与比较医学,2013,33(5):361-364.
[25] 王桢,罗军,王伟,等.奶山羊乳腺上皮细胞的分离、培养及鉴定[J].生物工程学报,2010,26(8):1123-1127.
[26] 王娟,孙毅,程龙,等.滩羊胎儿成纤维细胞系的建立及其生物学特性研究[J].西北农林科技大学学报,2014(1):18-23.

蛋鸡产蛋后期的饲喂管理要点

从鸡只的生理角度出发,经过产蛋高峰期,即便饲喂再多的优质饲料,也无法生产更多的蛋,这时要根据产蛋率的下降情况,适当调整饲料,减少蛋白质的含量,并适当增加饲料中钙的含量。

产蛋高峰过后,每天下午 3:00-4:00 在饲料中额外添加贝壳砂或粗粒石灰石,可以加强夜间形成蛋壳的强度,有效地改变蛋壳品质,添加维生素 D_3 能促进钙磷的吸收。

这一时期还需要注意,不能有“产蛋减少就减少喂料量”这样一个错误观念。如果为了降低成本而盲目减少喂料量,反而会给鸡带来更大的负面影响,产蛋率会降得更快。建议产蛋高峰期过后,应根据鸡群的日龄结构、日耗以及产蛋情况,适当减少日粮中蛋白质的含量。

另外,日粮中蛋白质含量的比例与蛋重成正比关系,当代谢能水平恒定时,日粮蛋白水平越高,则蛋重越大,且在高峰后期尤为明显。显然,对于蛋种鸡养殖户,不希望出现此类情况,因为蛋重过大将直接导致种蛋合格率下降、受精率降低(由于蛋重过大,在孵化过程中破蛋数量将会增加),甚至会引起母鸡因脱肛死亡的比例上升,从而使得种蛋成本增加,给养殖户造成间接损失。

来源:中国禽病网