

文章编号: 1001-411X(2002)01-0089-01

猪骨骼肌卫星细胞培养方法的建立

王继新, 江青艳, 高淑静, 傅伟龙

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

Establishment of *in vitro* Culture for Porcine Myogenic Satellite Cells

WANG Ji-xin, JIANG Qing-yan, GAO Shu-jing, FU Wei-long

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

关键词: 猪; 骨骼肌; 卫星细胞; 体外培养

Key words: pig; skeletal muscle; satellite cell; *in vitro* culture

中图分类号: S831.1

文献标识码: A

提高商品猪的胴体瘦肉率是养猪生产中的重要目标之一。瘦肉率的提高有赖于骨骼肌的生长。为了研究各种调控物质对猪骨骼肌生长的作用机制, 有必要建立猪骨骼肌卫星细胞的体外培养方法。本试验采用胶原酶消化法从猪半膜肌分离出骨骼肌卫星细胞, 建立了猪骨骼肌卫星细胞的培养方法。

1 材料与方法

1.1 材料

试验动物采用 1 日龄杜长大仔猪(由华南农业大学种猪场提供)。主要试剂包括 DMEM 培养基(Gibco 公司), D Hanks 液, 胶原酶 II(Sigma 公司), 胎牛血清(Sigma 公司), 鸡胚浸出液。

1.2 方法

将仔猪颈动脉放血致死, 无菌条件下分离半膜肌, 经 D Hanks 液清洗 3 次, 将肌肉组织剪成 1 mm^3 左右的组织块, 加入 1 g/L 胶原酶 II, 置入 37°C 、饱和湿度、含 $\varphi(\text{CO}_2)=5\%$ 的培养箱(美国 Nuair)中消化 24 h, 用吸管吹打使组织分散, 将细胞悬浮液移入离心管内, 1200 r/min 离心 5 min, 去上清液, 用含 $\varphi(\text{胎牛血清})=10\%$ 、 $\varphi(\text{鸡胚浸出液})=2\%$ 的 DMEM 培养液重悬细胞, 在倒置显微镜(Olympus IX-70)下计数后, 以 2×10^5 个/mL 的细胞密度接种在 25 cm^2 培养瓶(Conline 公司生产)中, 置入 CO_2 培养箱中静置培养, 待细胞贴壁后, 采用 2.5 g/L 胰蛋白酶、 0.1 g/L EDTA 于 37°C 消化 1 h, 将已贴壁的细胞重悬并清洗 3 次, 采用差速贴壁法除去非肌细胞^[1], 将细胞悬液重新接种在 25 cm^2 培养瓶中, 隔天换液, 在倒置显微镜下观察细胞生长、融合情况。

2 结果与分析

2.1 肌肉卫星细胞的分离

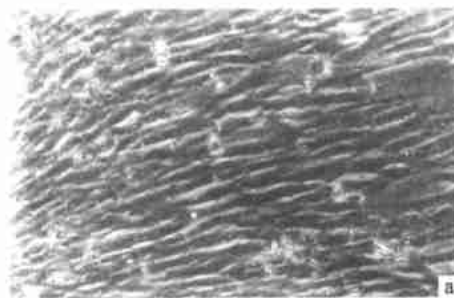
肌肉卫星细胞因其位于基膜和肌细胞膜之间, 紧贴肌细胞表面而得名。用机械分离方法无法获得肌肉卫星细胞, 必须依赖消化酶的作用, 使卫星细胞从基膜上释放出来。本试验采用胶原酶消化法, 37°C 消化 24 h, 镜下可见大量的卫星细胞释放出来, 获得了比较满意的消化效果。

2.2 肌肉卫星细胞的纯化及培养

在分离肌肉卫星细胞培养时, 经常混杂有少量非肌源性细胞(成纤维细胞)。以往采用 Percoll 不连续等密度梯度离心来分离非肌源性细胞和卫星细胞, 但获得的细胞数量明显减

少。采用流式细胞仪筛选法, 所得卫星细胞的纯度虽然很高, 但需要针对某种动物卫星细胞的单克隆抗体^[2]。本试验结果表明, 采用差速贴壁法, 在接种 2 h 后, 成纤维细胞已贴壁, 此时将悬浮细胞取出进行第 2 次接种, 可以获得大量均一的肌肉卫星细胞。

本试验所分离出的肌肉卫星细胞, 经台盼兰染色, 成活率为 95%, 第 2 次接种 24 h 后, 大部分卫星细胞已贴壁, 48 h 后可见大量的梭形、纺锤形的单核细胞出现。随着培养时间的延长, 梭形细胞的数量逐渐增加, 培养 6 d 后, 卫星细胞相互融合成为多核的肌管(图 1a), 培养 15 d 后, 肌管数量进一步增加, 并排列成束(图 1b)。本试验所建立的猪骨骼肌卫星细胞的培养方法可用于对骨骼肌细胞生长与增殖的体外研究。



a 培养 6 d

a 6 days after inoculation



b 培养 15 d

b 15 days after inoculation

图 1 不同培养时间的猪骨骼肌卫星细胞 140×

Fig. 1 Porcine myogenic satellite cells at different time of culture

(下转第 91 页)

收稿日期: 2001-05-25 作者简介: 王继新(1975-), 硕士研究生。

通讯作者: 江青艳(1966-), 男, 副教授, 博士。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39830290); 广东省自然科学基金项目(990731)

表 1 4 种植物杀虫剂对玉米螟赤眼蜂的毒性

Tab. 1 Toxicity of four botanical insecticides against wasps of *T. ostrinae*

药剂 insecticide	LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	直线回归方程 linear regression (Y= A+ BX)	95% 置信区间 confidence	相关系数 correlation coefficient (r)	相对毒力 relative toxicity
印楝素 azadirachtin	> 20 000				< 1.9× 10 ⁻⁶
川楝素 toosendanin	> 20 000				< 1.9× 10 ⁻⁶
鱼藤酮 rotenone	118.967 6	3.548 9+0.699 2X	68.532 3~206.519 7	0.974 1 **	3.0× 10 ⁻⁴
烟碱 nicotine	0.410 6	5.391 1+0.990 7X	0.283 8~0.572 0	0.868 8 *	9.2× 10 ⁻²
高效氯氰菊酯 beta-cypermethrin(CK)	0.037 8	5.826 1+0.580 9X	0.024 3~0.058 9	0.945 1 **	

试验中发现, 烟碱对玉米螟赤眼蜂的出蜂率影响很大(表 2), 出蜂率随烟碱浓度的增加而迅速下降. 当烟碱浓度为 0.1 mg·L⁻¹时, 出蜂率为 88.97%, 而当浓度达到 10.0 mg·L⁻¹时, 则没有蜂从卵内羽出. 显微镜下观察发现, 赤眼蜂不能羽化出蜂是由于在突破米蛾卵壳前已经死亡. 据此推测, 烟碱对赤眼蜂有较强的熏杀作用.

表 2 烟碱对玉米螟赤眼蜂出蜂数的影响

Tab. 2 Effects of nicotine on emergence of *T. ostrinae*

药剂 insecticide	浓度 concentration /(mg·L ⁻¹)	平均出蜂数 average emergence / 头	出蜂率 emergence rate / %
烟碱 nicotine	10.0	0	0
	5.0	1.3	2.76
	2.5	9.0	18.62
	1.0	14.3	29.66
	0.5	42.7	88.28
	0.1	43.0	88.97
CK(丙酮)	0	48.3	100

3 讨论

天敌是害虫综合治理中重要的控制因子之一, 如何协调农药使用与保护天敌的关系是国内外一直关注的课题. 相对于常规杀虫剂而言, 植物杀虫剂对瓢虫等捕食性天敌很安

全^[4,5]. 本研究结果则证明, 植物杀虫剂对赤眼蜂的急性毒性比高效氯氰菊酯低几个数量级, 尤其象印楝素和川楝素对赤眼蜂非常安全. 但是, 也应注意到植物杀虫剂之间的急性毒性也存在较大差异. 同时, 有必要进一步研究植物杀虫剂对天敌的其他作用, 如生长发育影响, 以及对种群的影响, 包括对其寄生能力和生殖力的影响, 以对其天敌安全性作出更客观的评价.

致谢: 实验得到华南农业大学昆虫毒理研究室刘新清实
验师、硕士研究生张善学和方剑锋的帮助, 特此致谢!

参考文献:

[1] 郝 斌, 戈巧英. 中国植物源杀虫剂的研制与应用[J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 495—503.

[2] 王玉玲, 肖子清. 中国赤眼蜂研究与应用进展[J]. 中国农学通报, 1998, 14(1): 43—45.

[3] 詹根祥, 梁广文. 中国赤眼蜂研究和应用的历史与现状[J]. 江西农业学报, 1999, 11(2): 39—46.

[4] 杨崇珍, 王兴林, 张 兴, 等. 菊酯类杀虫剂对几种赤眼蜂的毒力测定[J]. 西北农业大学学报, 1995, 23(3): 108—110.

[5] 杨崇珍, 王兴林, 张 兴, 等. 几种农药对瓢虫的安全性评价[J]. 农药科学与管理, 1998, 68(4): 24—26.

【责任编辑 周志红】

(上接第 89 页)

参考文献:

[1] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1999. 53—54.

[2] WEBSTER C. Temm—Grove C. SHEEHAN S. Isolation of human myoblasts with the fluorescence—activated cell sorter [J]. Exp Cell Res 1988, 174(1): 252—265.

【责任编辑 柴 焰】