

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.11.007

游小燕, 何琦琳, 范骁玲, 等. 基于细胞体外培养筛选最适胎牛血清 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 43(11): 64-69.

基于细胞体外培养筛选最适胎牛血清

游小燕^{1,2,3}, 何琦琳², 范骁玲², 葛良鹏^{1,2,3}

1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 荣昌 402460; 2. 农业农村部养猪科学重点实验室, 重庆 荣昌 402460;
3. 养猪科学重庆市市级重点实验室, 重庆 荣昌 402460

摘要: 为了探索小鼠骨髓瘤细胞(Sp2/0)与猪胎儿成纤维细胞(PFF)对胎牛血清(FBS)的需求差异, 以期筛选出最适血清, 首先采用两种不同来源的 FBS 培养 Sp2/0 和 PFF, 观察细胞形态、克隆形成, 分析细胞活率与数量。结果显示: 无论采用国产 FBS1 还是进口的 FBS2 培养 Sp2/0, 其细胞克隆数、细胞数量和活率差异均无统计学意义($p>0.05$), 但进口 FBS2 培养的 PFF, 其细胞克隆数、细胞数量和活率均显著高于国产 FBS1($p<0.05$)。随后用进口 FBS2 的 3 个不同批号培养 PFF, 结果显示: 3 个批号的 FBS2 均能促进细胞生长, 细胞结构清晰, 呈梭形; 培养 7 d, 3 个批次的 FBS2 均有细胞克隆形成, 但 FBS2-1 形成的克隆小, 且细胞克隆数极显著低于 FBS2-2 和 FBS2-3($p<0.01$); 培养 10 d, FBS2-1 的细胞数量和细胞活率极显著低于 FBS2-2 和 FBS2-3($p<0.01$)。虽然 FBS2-2 的细胞克隆数极显著低于 FBS2-3($p<0.01$), 但是 FBS2-2 的细胞克隆大, 且细胞数量极显著高于 FBS2-3($p<0.01$)。结果表明: Sp2/0 与 PFF 对 FBS 的需求有差异, 无论是国产 FBS1 还是进口 FBS2, 均能满足 Sp2/0 体外培养的需要, 但 PFF 在进口 FBS2 中的生长性能极显著优于国产 FBS1, FBS2-2 是 PFF 体外培养的最适血清。

关键词: 胎牛血清; Sp2/0; 猪胎儿成纤维细胞;
细胞克隆; 细胞活率

中图分类号: Q813.1 文献标志码: A 开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

文章编号: 1673-9868(2023)11-0064-06

Screening the Optimal Fetal Bovine Serum Based on in vitro Cell Culture

YOU Xiaoyan^{1,2,3}, HE Qilin², FAN Xiaoling², GE Liangpeng^{1,2,3}

1. Chongqing Academy of Animal Science, Rongchang Chongqing 402460, China;
2. Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Ministry of Agriculture, Rongchang Chongqing 402460, China;
3. Chongqing Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: In order to explore the difference in the demand for fetal bovine serum (FBS) between mouse myeloma cells (Sp2/0) and porcine fetal fibroblasts (PFF), and screen the optimal serum for the two cells, in this study, Sp2/0 and PFF cells were cultured with two different sources of FBS. The cell viability and number were analyzed by observing the cell morphology and clone formation. The results showed that there was no significant difference in the number of cell clone, the number of cell and cell viability between domestic FBS1 and imported FBS2 ($p>0.05$). However, the number of cell clone, the number of cell and cell viability of PFF, which cultured with FBS2 were significantly higher than those of domestic FBS1 ($p<0.05$). Subsequently, PFF was cultured with three different batches of imported FBS2. The results showed that FBS2 of three batches could promote cell growth, and the cell structure was clear and spindle shaped. After 7 days of culture, cell clones were formed in three batches of FBS2, but the clones formed in FBS2-1 were small, and the number of cell clones was significantly lower than that of FBS2-2 and FBS2-3 ($p<0.01$). After 10 days of culture, the number of cell and cell viability of FBS2-1 were significantly lower than those of FBS2-2 and FBS2-3 ($p<0.01$). Although the number of cell clones of FBS2-2 was significantly lower than that of FBS2-3 ($p<0.01$), but the number of cell of FBS2-2 was significantly higher than that of FBS2-3 ($p<0.01$). The study reveals that there are differences in the demand for FBS between Sp2/0 and PFF. Both domestic FBS1 and imported FBS2 can meet the needs of Sp2/0 in vitro culture, but the growth performance of PFF in imported FBS2 is significantly better than that of domestic FBS1, and FBS2-2 is the optimal serum for PFF in vitro culture.

Key words: fetal bovine serum; Sp2/0; porcine fetal fibroblasts; cell clones; cell viability

相对动物模型来说, 体外培养的细胞模型排除了遗传、营养、环境等因素的影响, 实验结果重复性好^[1-2], 还减少了实验研究对动物模型的依赖^[3-4]. 自 20 世纪 50 年代以来, 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)作为最常用、最有效的添加物, 在世界范围内被广泛应用于体外细胞培养^[5]. 胎牛血清富含血浆蛋白、多肽、激素、生长因子等活性成分, 能改变培养基的黏度、渗透压、缓冲能力等理化性质^[6], 可促进细胞的生长与增殖^[7]. 细胞生长的好坏与胎牛血清密切相关, 在细胞体外培养过程中, 若血清选择不当, 不仅会导致实验结果不可用, 还造成人力、物力等资源的浪费.

胎牛血清是一种成分复杂的混合物, 虽然其组份大部分已知, 但仍有部分活性物质因浓度低无法检测或缺乏相关活性物质检测标准等因素至今仍不清楚^[8]. 目前尚不能通过检测胎牛血清活性成分组成与含量直接判断血清质量好坏, 也没有标准表明某类型细胞适合什么样的胎牛血清, 特别是不同来源的胎牛血清, 其补体、内毒素等含量差异较大, 会直接影响细胞的生长与死亡, 因此不同细胞类别选择合适的胎牛血清便成为一个重要的问题. 本文通过使用不同来源的胎牛血清培养小鼠骨髓瘤细胞(Sp2/0)与猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblasts, PFF), 探索细胞系与原代细胞对胎牛血清需求的差异, 以期筛选出这两种细胞的最佳血清, 为这两种细胞模型的研究与应用提供保障.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

Sp2/0 购自美国细胞培养物收藏中心(ATCC), PFF 来源于重庆市畜牧科学院自制的 35 胎龄荣昌猪胎儿成纤维细胞.

1.1.2 主要试剂

DMEM(Gibco, 10829-018), Advanced RPMI 1640(Gibco, 12633-012), GLutaMAX (Gibco, 35050-

061), NEAA (Gibco, 11140-050), Sodium Pyruvate (Gibco, 11360-070), Pen Step (Gibco, 15140-122), FBS1(赛业, 特级胎牛血清), FBS2 (BI, 04-002-1C), FBS2-1(BI, 04-002-1C, 2052257), FBS2-2 (BI, 04-002-1C, 2053268), FBS2-3(BI, 04-002-1C, 1826596), 0.05%胰酶(Gibco, 25300-062).

1.1.3 主要仪器

二氧化碳培养箱, Thermo fisher scientifle; 倒置荧光显微镜, Leica; 细胞计数仪, 上海睿钰生物科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 Sp2/0 复苏及培养

根据胎牛血清来源分别配制含 10%FBS, 1mmol/L Sodium Pyruvate, 1x GLutaMAX, 1x NEAA, 1x Pen Step 的 RPMI1640 完全培养基. 从液氮中取出 Sp2/0, 38.5℃水浴快速解冻, 加入预热的 RPMI1640 完全培养基 5 mL 混匀, 5 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞. 用 1 mL 预热的 RPMI1640 完全培养基重悬细胞, 将细胞接种至 6 孔板内, 置于 37℃, 5%二氧化碳培养箱中培养.

1.2.2 PFF 复苏及培养

根据胎牛血清来源和批次分别配制含 10%FBS, 1mmol/L Sodium Pyruvate, 1x GLutaMAX, 1x NEAA, 1x Pen Step 的 DMEM 完全培养基. 从液氮中取出 PFF, 38.5℃水浴快速解冻, 加入预热的 DMEM 完全培养基 5 mL 混匀, 5 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞. 用 1 mL 预热的 DMEM 完全培养基重悬细胞, 将细胞接种至 6 孔板内, 置于 38.5℃, 5%二氧化碳培养箱中培养.

1.2.3 Sp2/0 细胞克隆培养

Sp2/0 生长至 65%融合时, 用枪头轻轻吹打细胞, 收集细胞, 用 1 mL 预热的 RPMI 1640 完全培养基重悬细胞, 并利用细胞计数仪进行细胞计数, 将细胞按 100 个/孔, 接种至 6 孔板内, 根据血清来源分为 2 组, 每组 3 个重复孔, 6 孔板置于 37℃, 5%二氧化碳培养箱中培养.

1.2.4 PFF 细胞克隆培养

PFF 生长至 85%融合时, 用 0.05%胰酶消化收集细胞, 用 1 mL 预热的 DMEM 完全培养基重悬细胞, 并利用细胞计数仪进行细胞计数, 将细胞按 500 个/孔, 接种至 6 孔板内, 根据血清来源和批次分别分为 2 组和 3 组, 每组 3 个重复孔, 6 孔板置于 38.5℃, 5%二氧化碳培养箱中培养.

1.2.5 细胞克隆观察与计数

每天用倒置显微镜观察细胞生长情况和克隆大小, 在细胞接种培养的第 7 d, 拍照记录细胞克隆大小, 并在显微镜下用记号笔圈出细胞克隆, 进行细胞克隆计数.

1.2.6 细胞数量与活率检测

在细胞接种培养的第 10 d, 收集细胞, 5 000 r/min 离心 5 min, 用 1 mL 温热的完全培养基重悬细胞, 取 20 μL 细胞样本与 0.2%的 Trypan Blue 按 1:1 混合, 取 20 μL 混合样本自动检测细胞浓度与活率, 利用细胞计数仪检测细胞浓度, 按照公式换算出细胞数量(N):

$$N = D \times V$$

式中, D 表示细胞浓度, V 表示细胞体积.

1.2.7 统计分析

利用 SPSS V11 统计软件对各项数据进行方差分析. 差异显著时采用 Duncan's 方法对各组间平均数进行多重比较, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示.

2 结果与分析

2.1 不同来源血清对细胞生长性能的影响

由表 1 可知, 无论采用国产 FBS1 还是进口 FBS2 培养 Sp2/0, 其细胞克隆数、细胞数量和细胞活率差

异均无统计学意义($p>0.05$), 但进口 FBS2 培养的 PFF, 其细胞克隆数、细胞数量和细胞活率显著高于国产 FBS1, 差异有统计学意义($p<0.05$).

表 1 细胞生长性能测定

检测指标	胎牛血清	Sp2/0	PFF
细胞克隆数	FBS1	21.00±3.46a	52.00±3.06b
	FBS2	34.67±4.09a	105.00±2.89c
细胞数量(×10 ⁴)	FBS1	119.67±7.45a	6.68±0.31b
	FBS2	119.00±8.00a	492.00±33.41c
细胞活率/%	FBS1	78.27±4.14a	15.95±2.42b
	FBS2	79.04±2.53a	74.44±3.10c

注: 小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义.

2.2 不同批次血清对 PFF 细胞克隆的影响

PFF 细胞培养第 7 d, 通过倒置显微镜可以观察到: 每个批次的血清都有细胞克隆出现, 但 FBS2-1 的细胞克隆明显小于其他组(图 1 和图 2), 且 FBS2-1 的细胞克隆数极显著低于 FBS2-2 和 FBS2-3($p<0.01$), FBS2-2 培养的细胞克隆数极显著低于 FBS2-3($p<0.01$), 但 FBS2-2 的细胞克隆大.

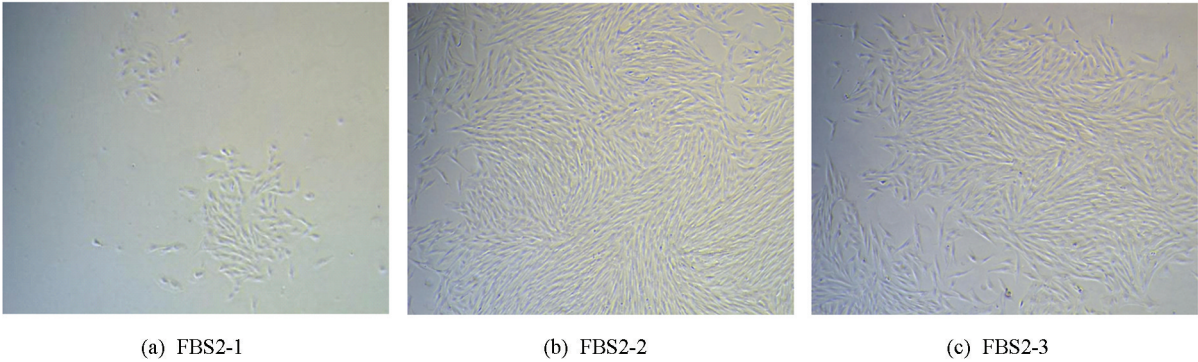


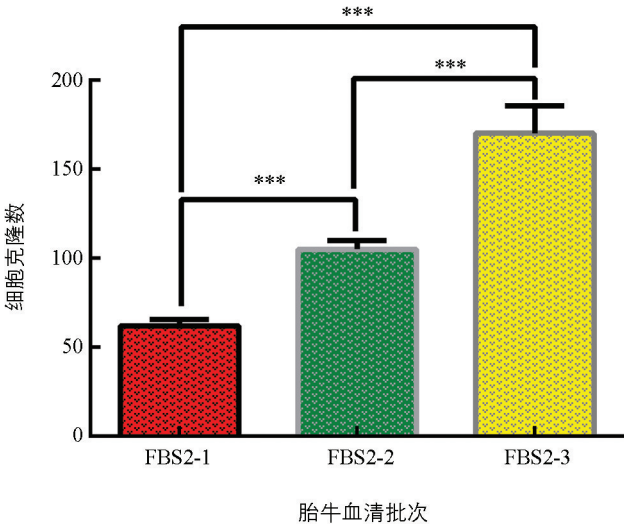
图 1 培养 7 d 的细胞克隆

2.3 不同批次血清对 PFF 细胞数量的影响

PFF 细胞培养 10 d, 消化收集细胞, 利用细胞计数仪检测细胞浓度, 并换算出细胞数量. 由图 3 可知, FBS2-1 培养的细胞数量极显著低于 FBS2-2 和 FBS2-3($p<0.01$), FBS2-3 培养的细胞数量极显著低于 FBS2-2($p<0.01$).

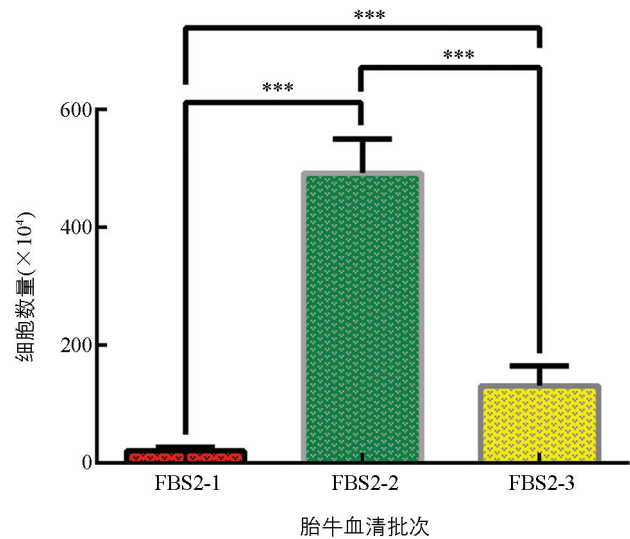
2.4 不同批次血清对 PFF 细胞活率的影响

PFF 细胞培养 10 d, 消化收集细胞, 台盼蓝染色, 细胞计数仪检测细胞活率. 由图 4 可知, FBS2-1 培养的细胞活率仅为 37.27%, 极显著低于 FBS2-2 和 FBS2-3 ($p<0.01$); FBS2-2 与 FBS2-3 培养的细胞活率差异无统计学意义($p>0.05$).



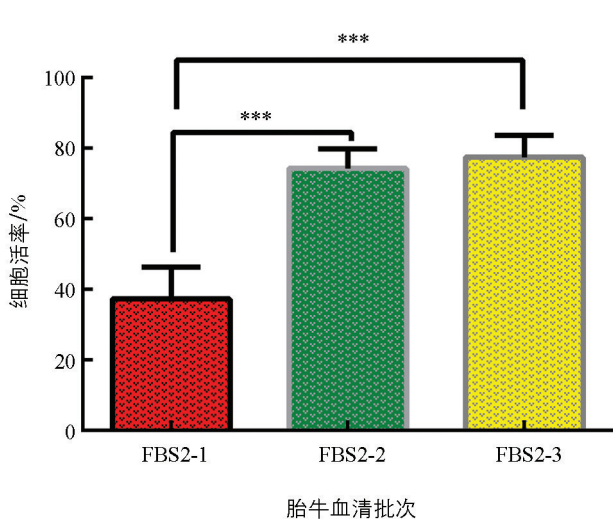
* * * 表示 $p<0.001$, 差异有统计学意义.

图 2 细胞克隆数统计图



*** 表示 $p < 0.001$, 差异有统计学意义.

图 3 细胞数量统计图



*** 表示 $p < 0.001$, 差异有统计学意义.

图 4 细胞活率统计图

3 讨论与结论

血清含有人工合成营养液所缺乏的生长激素、生长因子等,为体外细胞培养提供了赖以生存和增殖的物质基础,参与调控细胞生长、增殖、分化等多种生命活动,被广泛应用于细胞的体外培养.根据动物品种不同,血清可分为兔血清、马血清、牛血清等.牛属于大动物,血清来源较为丰富,根据牛日龄的差异,血清又可分为小牛血清、新生牛血清和胎牛血清,其中胎牛因未与外界接触,病原微生物少,血液中富含促生长因子,免疫球蛋白和补体因子(如 γ -球蛋白)等^[9-10].血清中还含有近 1 800 种蛋白^[11-12],4 000 余种代谢物^[13],且血清有助于提高培养基的 pH 缓冲能力,减少细胞因移液、吹打、消化等造成的物理损伤^[14].自 Puck 等^[15]将胎牛血清添加到培养基中以来,胎牛血清已广泛应用于人、动物以及昆虫的细胞培养.

在本次研究中,无论采用国产还是进口的胎牛血清培养 Sp2/0,其细胞克隆数、细胞数量和细胞活率差异均无统计学意义($p > 0.05$).这与李自良等^[16]的研究结果相类似.究其原因可能是 Sp2/0 与 MDCK 同属细胞系,部分遗传物质已发生改变,且带有癌变的特点,能在体外培养条件下无限制地传代,对血清的依赖降低,因此能在各类型血清中较好地生长增殖.研究中还发现:进口胎牛血清培养的猪胎儿成纤维细胞,其细胞克隆数、细胞数量和活率均极显著高于国产胎牛血清($p < 0.01$).刘瑞凤等^[17]利用不同来源胎牛血清培养骨髓间充质干细胞,发现在使用 FBS1 培养过程中,骨髓间充质干细胞逐渐死亡,而 FBS2 培养的骨髓间充质干细胞不但能很快贴壁和迅速增殖,而且传代培养后能保持很强的分裂增殖能力.推测可能是因为猪胎儿成纤维细胞与骨髓间充质干细胞属于原代细胞,保持了体内的生物学特性.因不同来源胎牛血清,其采集方式与生产加工工艺不同,所含促细胞生长因子等活性物质的组份与比例也有所不同,导致原代细胞的生长、增殖受血清来源影响较大.

不同来源胎牛血清质量差异大,即使同一品牌、同一货号,因供血动物性别、生理、营养等条件不同,也会存在批次间的差异^[18].本次研究利用猪胎儿成纤维细胞对同一品牌、同一货号,3 个不同批次的胎牛血清进行了测试,结果显示:FBS2-1 形成的细胞克隆小,且细胞克隆数极显著低于 FBS2-2 和 FBS2-3($p < 0.01$);培养 10 d 后,FBS2-1 的细胞数量和细胞活率极显著低于 FBS2-2 和 FBS2-3($p < 0.01$),虽然 FBS2-2 的细胞克隆数极显著低于 FBS2-3($p < 0.01$),但是 FBS2-2 的细胞克隆大,且细胞数量极显著高于 FBS2-3($p < 0.01$).本次实验筛选出 FBS2-2 是猪胎儿成纤维细胞的最适血清,可大量采购,为猪胎儿成纤维细胞的培养与应用提供物质保障.

参考文献:

- [1] PRINZ F, SCHLANGE T, ASADULLAH K. Believe it or Not: How much can we Rely on Published Data on Potential Drug Targets [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011, 10(9): 712.
- [2] BAKER M. Reproducibility: Respect your Cells [J]. *Nature*, 2016, 537(7620): 433-435.
- [3] WOLFENSOHN S. A Review of the Contributions of Cross-discipline Collaborative European IMI/EFPIA Research Projects to the Development of Replacement, Reduction and Refinement Strategies [J]. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, 2018, 46(2): 91-102.
- [4] DEL FAVERO G, KRAEGELOH A. Integrating Biophysics in Toxicology [J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1282.
- [5] GSTRAUNTHALER G, LINDL T, VAN DER VALK J. A Plea to Reduce or Replace Fetal Bovine Serum in Cell Culture Media [J]. *Cytotechnology*, 2013, 65(5): 791-793.
- [6] ZHENG X Y, BAKER H, HANCOCK W S, et al. Proteomic Analysis for the Assessment of Different Lots of Fetal Bovine Serum as a Raw Material for Cell Culture. Part IV. Application of Proteomics to the Manufacture of Biological Drugs [J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(5): 1294-1300.
- [7] 王梅珂, 张久威, 杨彪, 等. 国产与进口牛血清促进 Vero 细胞生长的比较 [J]. *国际生物制品学杂志*, 2019, 42(6): 270-273.
- [8] NIEDERSTAETTER L, NEUDITSCHKO B, BRUNMAIR J, et al. Eicosanoid Content in Fetal Calf Serum Accounts for Reproducibility Challenges in Cell Culture [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(1): 113.
- [9] 闫志强, 翟少钦, 付文贵, 等. 女黄扶正颗粒对大鼠体液免疫功能和抗氧化力的影响 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(10): 74-78.
- [10] GSTRAUNTHALER G, RAUCH C, FEIFEL E, et al. Preparation of Platelet Lysates for Mesenchymal Stem Cell Culture Media [J]. *J Stem Cells Res Rev Rep*, 2015(2): 1021.
- [11] ANDERSON N L, ANDERSON N G. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2002, 1(11): 845-867.
- [12] ANDERSON N L, POLANSKI M, PIEPER R, et al. The Human Plasma Proteome: a Nonredundant List Developed by Combination of Four Separate Sources [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3(4): 311-326.
- [13] PSYCHOGIOS N, HAU D D, PENG J, et al. The Human Serum Metabolome [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16957.
- [14] YAO T, ASAYAMA Y. Animal-cell Culture Media: History, Characteristics, and Current Issues [J]. *Reproductive Medicine and Biology*, 2017, 16(2): 99-117.
- [15] PUCK T T, CIECIURA S J, ROBINSON A. Genetics of Somatic Mammalian Cells. III. Long-Term Cultivation of Euploid Cells from Human and Animal Subjects [J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 1958, 108(6): 945-956.
- [16] 李自良, 王家敏, 赵彩红, 等. 不同类型牛血清对 MDCK 细胞培养效果研究 [J]. *生物学杂志*, 2020, 37(4): 21-25.
- [17] 刘瑞凤, 冯海燕, 尹国华, 等. 胎牛血清对骨髓间充质干细胞增殖的影响 [J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2010, 24(7): 602-604.
- [18] SUBBIAHANADAR C K, SELVAN C J D, RAJAGOPALAN K, et al. Alternative to FBS in Animal Cell Culture-an Overview and Future Perspective [J]. *Heliyon*, 2021, 7(8): e07686.

责任编辑 周仁惠