

梅花鹿体细胞航天诱变后的生物学特性变化分析

郭晶莹^① 韩红梅^{①②#} 梁延峰^② 范丽红^② 王子馨^② 赵丽霞^{①②}
张金吨^{①②} 李云霞^② 李喜和^{①②*}

① 内蒙古大学蒙古高原动物遗传资源研究中心 呼和浩特 010021; ② 内蒙古赛科星家畜种业与繁育生物技术研究院
呼和浩特 011517

摘要: 本研究以自主研发的聚偏二氟乙烯膜(PVDF)细胞培养技术进行了梅花鹿(*Cervus nippon*)体细胞的航天培养及生物诱变,并分析了其细胞在航天诱变后的生长曲线和核型特性。采用耳缘皮肤组织块贴壁培养的方法进行体细胞的原代培养;胰蛋白酶消化的方法完成细胞的传代培养;依照程序降温的方法完成细胞的冷冻保存;每天计数24孔板每孔的活细胞数并利用Excel 97-2003绘制出细胞的生长曲线,采用IBM SPSS Statistics 23统计软件回归分析程序中的非线性回归分析子程序Logistic曲线模型分析细胞生长曲线的拟合度;以常规染色体标本制备技术,利用细胞遗传工作站(AI)软件对梅花鹿体细胞的染色体核型进行分析。实验结果表明,新开发的PVDF膜细胞培养技术可有效保持梅花鹿体细胞在太空飞行过程中的存活并成功回收、传代建系。通过细胞传代培养观察发现,该体细胞经航天诱变后保持正常的成纤维细胞特征,生长曲线呈“S”型,航天诱变组体细胞在培养4 d进入对数生长期,与对照组体细胞在培养2 d进入对数生长期相比其细胞增殖速度减慢。拟合生长曲线分析表明,航天诱变组细胞生长拟合度值与对照组相似,但细胞增殖拐点时间、拐点细胞量分析结果证明,航天诱变后的体细胞增殖速度减慢。核型分析显示,航天诱变梅花鹿体细胞染色体数保持 $2n=66$,染色体形态正常,核型为 $66(XX)$,其中32对常染色体,1对性染色体。本研究建立了哺乳动物在航天运行条件下的细胞培养PVDF新技术,并分析了航天诱变对于梅花鹿细胞生物学特性变化的影响,为以后进行相关研究提供了基础信息和技术支持。

关键词: 航天诱变;梅花鹿体细胞;生长曲线;核型

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2018)02-255-09

Biological Characteristic Changes of Somatic Cells Following Space Mutagenesis in *Cervus nippon*

GUO Jing-Ying^① HAN Hong-Mei^{①②#} LIANG Yan-Feng^② FAN Li-Hong^② WANG Zi-Xin^②

基金项目 蒙古高原动物遗传资源库建立与利用项目内蒙古重点科技项目(No. 20130216);

* 通讯作者, E-mail: lixh@life.imu.edu.cn;

第一作者介绍 郭晶莹,女,硕士研究生;研究方向:哺乳动物生殖生物学;E-mail: 1027037223@qq.com;

共同第一作者介绍 韩红梅,女,博士研究生;研究方向:哺乳动物生殖生物学;E-mail: hongmei1120@163.com。

收稿日期: 2017-08-15, 修回日期: 2018-01-05 DOI: 10.13859/j.cjz.201802011

ZHAO Li-Xia^{①②} Zhang Jin-Dun^{①②} LI Yun-Xia^② LI Xi-He^{①②*}

① Research Center for Animal Genetic Resources of Mongolia Plateau, Inner Mongolia University, Huhhot 010021; ② Inner Mongolia Saikexing Institute of Breeding and Reproductive Biotechnology in Domestic Animal, Hohhot 011517, China

Abstract: In this study, we for the first time carried out Sika Deer (*Cervus nippon*) somatic cell culture in the space by using self-developed polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane culture method, and analyzed the biological characteristic changes of these cells, including cell growth curve and karyotype characteristics. Ear skin tissue was collected for primary adherent culture of somatic cells, and these cells were then subcultured after trypsin digestion. The cells were cryopreserved by using a traditional procedure cooling system. The cell number was counted every day in the 24-well plates and the cell growth curve was made by applying Excel 97-2003. Non-linear regression analysis subroutine Logistic curve model from the IBM SPSS Statistics 23 statistical software was used to analyze growth curve fitting degree, and normal chromosome specimen preparation technology and cytogenetic workstation (AI) software were used to analyze chromosome karyotype of space-treated cells. The results showed that new technology of developed PVDF membrane for cell culture (Fig. 1) could effectively maintain the survival of the *C. nippon* somatic cells in the space and the cells successfully proliferated after recovery. The somatic cells were still showing normal fibroblast morphology after the space-mutagenesis (Fig. 2). The growth curve of somatic cells showed “S” model which was similar to that of control somatic cells. The space-treated group of cultured somatic cells entered the logarithmic growth phase by 4 days after the cultivation, while it took 2 days in the control group (Fig. 3). The rates of fitting growth curve were similar between two the groups, however, the cell inflexion time and cell volume of somatic cells were significantly changed in space-treated cells (Table 1). Karyotype analysis showed that the chromosome number was still $2n = 66$ (XX), and chromosome morphology was normal, 32 of which were autosomes and one pair of sex chromosome (Fig. 4). This study established a new technology of somatic cell culture for domestic animals in the space condition, and also analyzed the effect of the space conditions on biological characteristics of *C. nippon* somatic cells, which provided some basic and important information and technique for future studies of animal genetics.

Key words: Space-mutagenesis; *Cervus nippon* somatic cell; Growth curve; Karyotype

梅花鹿 (*Cervus nippon*) 主要分布在亚洲东部, 是东亚季风区特产的珍贵经济动物之一, 已列为国家 I 级重点保护野生动物。梅花鹿属于哺乳纲 (Mammalia) 偶蹄目 (Artiodactyla) 鹿科 (Cervidae) 花鹿属。在公元前 14 世纪至公元前 12 世纪中国就开始对野生梅花鹿进行驯养化利用, 是世界上最早养殖梅花鹿的国家 (胡鹏飞等 2015)。

我国作为目前世界上仅有的 3 个 (美国、俄罗斯、中国) 掌握返回式卫星技术的国家之一, 近些年来在航天生物育种领域取得了一系

列开创性研究成果。2016 年 4 月 6 日凌晨升空的“实践十号”卫星, 搭载了来自内蒙古赛科星家畜种业与繁育生物技术研究提供的牛 (*Bos taurus*)、绵羊 (*Ovis aries*)、梅花鹿等大型动物和野生动物的体细胞 (somatic cell)、精子 (sperm) 等材料, 这是我国首次在太空进行大型动物航天生物诱变实验。

本研究以雌性梅花鹿体细胞为材料, 开发了哺乳动物体细胞在太空的培养新技术, 与对照组比较分析了航天诱导的梅花鹿体细胞的细胞生长、染色体变化等生物学特性, 为动物的

航天生物育种技术建立提供了基础资料和相关信息。本研究同时对于丰富我国动物品种资源库、提升梅花鹿产业竞争力具有重要战略性意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2016年3月在内蒙古赛科星家畜种业与繁育生物技术研究院实验基地选取19月龄健康的雌性梅花鹿,编号为NCH32,剪取其耳缘皮肤组织用于实验。

1.2 雌性梅花鹿 NCH32 成纤维细胞系的建立

剪取雌性梅花鹿 NCH32 的耳缘皮肤组织约 1 cm^2 ,用手术刀片剔除耳毛,并用含有青霉素和链霉素双抗的 PBS 清洗3次,24 h 内送回实验室进行原代细胞建系培养。在超净工作台中,用75%酒精浸泡采取的组织样品30 s,再用 Dulbecco 磷酸盐缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)(GIBCO 公司)冲洗3次,用手术刀片剔除皮肤间的结缔组织,将其剪成 1 mm^3 左右的小块,用无菌玻璃管将组织碎块均匀分布于培养瓶中,加入5 ml 含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(GIBCO 公司)的 MEM-Alpha ($1\times$) (α -MEM) 培养液(GIBCO 公司),在 $37.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱(RS Biotech 311)中倒置培养4~6 h 后,正置培养瓶继续培养。

连续培养12 d 以后,耳皮成纤维细胞生长至约90%汇合度时,按常规方法传代培养(Li et al. 2006)。弃去原有培养液,用 DPBS 冲洗细胞后,加入0.25%胰蛋白酶(Sigma 公司)消化2~3 min。细胞脱壁后加入含10% FBS 的 α -MEM 培养液终止消化。离心并收集细胞,按照1:3比例分瓶传代培养。成纤维细胞传至6~8代时用于染色体标本制备。

1.3 梅花鹿体细胞的航天培养方法

根据实验经费和实验材料的特殊性,此次实验按照本实验室自主研发的新型成纤维细胞在太空环境的聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene

fluoride, PVDF) 培养方法,将梅花鹿体细胞搭载于实践10号返回式科学实验卫星上,并在太空中飞行12 d 后进行回收、培养和保存。具体实验方法参照用于航天生物育种的家畜成纤维细胞培养方法(内蒙古赛科星家畜种业与繁育生物技术研究院有限公司 2016),实验流程见图1。

1.3.1 培养基配制 实验中共使用了2种培养基,具体配制方法如下。

$1\times$ 液体培养基,5 ml 胎牛血清(FBS),0.5 ml 青霉素/链霉素双抗,用 MEM-Alpha($1\times$) 培养液定容至50 ml。

琼脂固体培养基,首先配制1%琼脂,称取5.0 g 琼脂并加入50 ml 蒸馏水,微波炉加热融化后,进行高压灭菌。之后配制 $2\times$ 液体培养基,20 ml 胎牛血清(FBS),1 ml 青霉素/链霉素双抗,1 ml 非必须氨基酸(essential amino acid, NEAA),用 $2\times$ MEM 定容至50 ml。最后,将1%琼脂灭菌后冷却至 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右,与 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的 $2\times$ 液体培养基按1:1混合配制成0.5%琼脂固体培养基。

1.3.2 具体实施方式

(1) PVDF 膜软化:将 PVDF 膜剪成 $3.5\text{ cm}\times 3.1\text{ cm}$ 的长方形小块后,放入洁净烧杯中进行高压灭菌。然后将 PVDF 膜置于10 cm 培养皿中,加入适量 Alpha-MEM 培养液浸泡4~5 d。

(2) PVDF 膜铺板:用灭菌的手术镊将软化的 PVDF 膜铺到6孔板中,并贴于孔底。

(3) 接种细胞于 PVDF 膜培养:将细胞以 $(2\sim 3)\times 10^6$ 的数目接种到铺有 PVDF 膜的6孔板中,加入含有 FBS 的 $1\times$ 液体培养基,并置于5% CO_2 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养2~3 d。

(4) “细胞-PVDF 膜”导入冻存管:弃掉液体培养基,将贴附生长成纤维细胞的 PVDF 膜卷入2 ml 细胞冻存管中,并加入2 ml 尚处于液体状态下的0.5%琼脂培养基。于室温放置5 min 后,液态琼脂培养基凝结为固体培养基。

(5) 气相平衡处理:将冻存管盖在松弛状态下放入5% CO_2 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中平衡过夜,使冻存

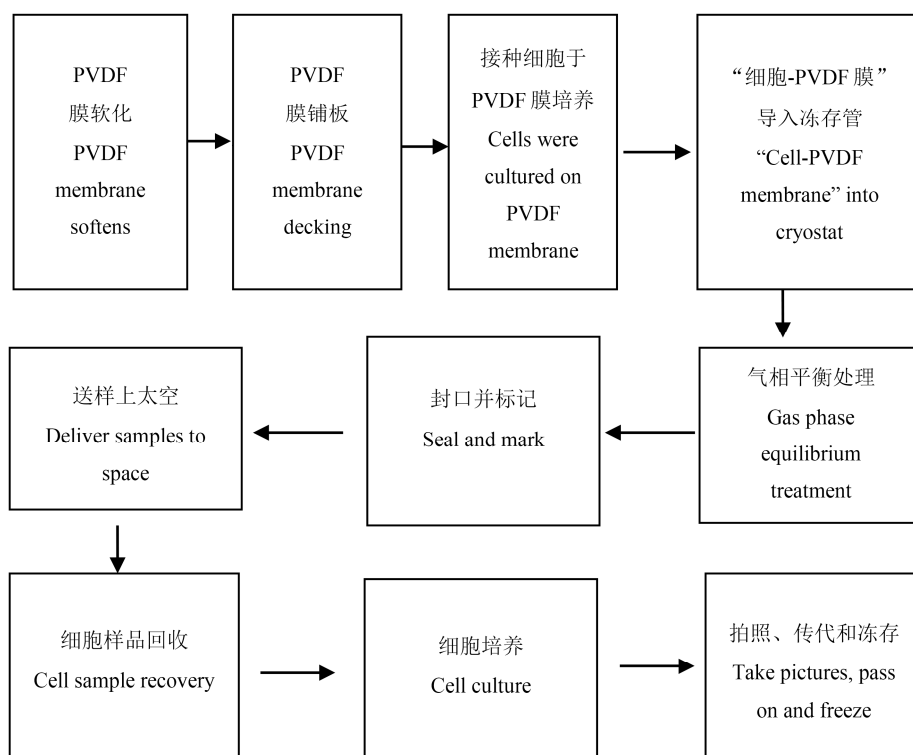


图1 航天培育梅花鹿体细胞处理流程

Fig. 1 The culture process of *Cervus nippon* somatic cells in the space

管中的气相环境与培养箱相同。

(6) 封口并标记: 第2天取出冻存管, 盖子拧紧后, 用石蜡进行密封封口。贴上标记细胞种类等详细信息的标签并装管。

(7) 送样上太空: 将样品送达指定地点, 并在太空中 (5 ~ 40 °C, 距地 100 ~ 300 km) 飞行 12 d 左右。

(8) 细胞样品回收: 待返回舱落地后取回各细胞样品, 并带回实验室进行回收处理。将每个冻存管用酒精擦拭后放入超净台, 取出 PVDF 膜, PBS 冲洗 2 次后, 加入 3 ml 0.25% 胰酶消化 2 次, 每次 5 min。加入同体积的 1 × 液体培养基终止消化。冲洗用的 PBS、消化和终止的液体培养基均收集到 15 ml 离心管中, 1 500 r/min 离心 5 min。

(9) 细胞培养: 弃上清, 加入 1 ml 液体培养基重悬, 于 5% CO₂ 37 °C 培养箱中进行培养。

(10) 拍照、传代和冻存: 细胞生长到 80% 汇

合度后进行拍照, 其中一部分用于传代培养, 其余全部进行冷冻保存。

本实验设计初衷, 是要获得可以稳定遗传的航天诱导变异细胞系, 这样的细胞系才能用于育种材料。

1.4 对照组梅花鹿体细胞的培养方法

同样按照本实验室自主研发的新型成纤维细胞 PVDF 膜培养方法, 即提供一种利用聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜和琼脂固体培养基, 把梅花鹿体细胞放入细胞冻存管, 在室温 (25 °C) 避光条件下放置 12 d 作为对照组。

1.5 航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞生长曲线的测定

本实验所用方法是台盼蓝染色计数法。将航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞分别在 24 孔板中传代培养到 6 ~ 12 代时, 取 3 孔进行生长曲线计数。具体操作是, 弃去原有培养液, 用 DPBS 冲洗细胞后, 加入 0.25% 胰蛋白酶消

化 2 ~ 3 min。细胞脱壁后加入含 10% FBS 的 α -MEM 培养液终止消化, 用 0.4% 的台盼蓝溶液 (GIBCO 公司) 与各种细胞悬浮液以 1 : 9 体积混合均匀, 然后在倒置显微镜 (Nikon TS100) 下用 XB-K-25 血球计数板 (中外合资上海求精生化试剂仪器有限公司) 计数, 在 3 min 之内记下活细胞数, 并计算各样品均值。按照上述实验步骤对每个细胞样品 3 次重复计数, 每次实验共统计 8 d。根据以上生长曲线检测数据, 应用 Logistic 生长模型进行拟合生长曲线分析。

1.6 航天诱变组和对照组雌性梅花鹿体细胞的拟合生长曲线分析

采用 IBM SPSS Statistics 23 统计软件回归分析程序中的非线性回归分析子程序 (戴国俊等 2006), 得到相应各个参数 (parameter) 的估计值 (estimated value) 与拟合度 (degree of fitting) (R^2 值) (张乐超等 2017), 参数 A 为极限细胞生长量, 即达到平台期的细胞量, B 为常数尺度 (constant scale), k 为瞬时相对生长率 (instantaneous relative growth rate), t 为细胞生长时间 (cell growth time), Y 为细胞量 (cell volume)。然后计算相关参数, 包括初始细胞量、拐点细胞量 (inflexion cell volume) 和拐点时间 (infiltration time)。根据初步模拟分析, 选用 Logistic 数学模型拟合航天诱变组和对照组雌性梅花鹿体细胞生长过程, 模型表达式为 $Y = A / (1 + B \cdot e^{-kt})$ 。比较生长差异, 即初始细胞量、拐点细胞量和点时间这的差异。曲线拟合度指标用相关指数衡量所拟合曲线的拟合度 (R^2) (刘旭光等 1997): $R^2 = 1 - \Sigma(Y - \hat{Y})^2 / \Sigma(Y - \bar{Y})^2$, 式中, Y 表示实验所得细胞量, $\hat{Y}$ 表示拟合曲线估计细胞量, $\bar{Y}$ 表示实验所得细胞量的平均值。

1.7 航天诱变组和对照组梅花鹿染色体标本的制备和核型分析

参照张静南等 (2011) 的方法, 取培养在 6 孔培养板中处于对数期生长的航天诱变组和对照组雌性梅花鹿体细胞, 在培养液中加入新

鲜配制的 20 g/L 的秋水仙素 (Sigma), 即在 6 孔培养板每孔 2 ml 的培养液中加入 0.02 ml 的秋水仙素。之后把细胞样品再放入培养箱中继续培养 2.5 ~ 3.0 h, 取出培养板用 0.25% 胰酶消化 3 min, 加入含 10% FBS 的 MEM-Apha 培养液终止消化。1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 在离心管中收集细胞, 用注射器在细胞沉淀中缓慢滴加 37 °C 预热好的 0.075 mol/L KCl (Amresco) 低渗液 8 ml, 用吸管吹打均匀。把细胞置于 37 °C 恒温水浴中低渗处理 40 min。在低渗结束前 1 min 加入 1 ml 新鲜配制的固定液, 即 3 : 1 体积比的甲醇 (西陇化工股份有限公司) 与冰醋酸 (天津化学试剂有限公司) 混合液, 对检测细胞进行预固定, 用吸管轻轻吹打均匀, 1 000 r/min 离心 10 min, 然后弃去上清液。用注射器在预固定的细胞沉淀中再次缓慢滴入 8 ml 固定液, 混匀后置 37 °C 恒温水浴固定处理 30 min, 之后 1 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 再次重复上述的固定程序 2 次。最后在细胞沉淀物中加入固定液 0.5 ml, 用吸管轻轻吹打均匀, 制成细胞悬液。将细胞悬液从 1 m 高处滴在冰水浸泡过的洁净玻片上, 自然晾干, 即为常规染色体 (chromosomes) 标本。染色体标本用 Giemsa 液染色 10 ~ 15 min, Giemsa 液为 Giemsa 原液 (Sigma) 与纯水按 1 : 9 的比例稀释, 之后, 自来水轻轻正反面冲洗后自然晾干、镜检。

航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞染色体标本经 Giemsa 染液染色完成后, 运用细胞遗传工作站 (applied imaging, AI) 软件分析结果。

2 结果与分析

2.1 航天诱变梅花鹿体细胞的回收与体外培养

由于航天诱变条件下的动物体细胞培养还没有成熟的方法, 本次实验采用自主研发的 PVDF 膜培养法, 梅花鹿体细胞样品在太空飞行 12 d 后成功回收建系。其细胞经过航天诱变处理后生长状态良好, 基本保持成纤维细胞特性 (图 2)。回收后的体细胞生长到 80% 汇合度

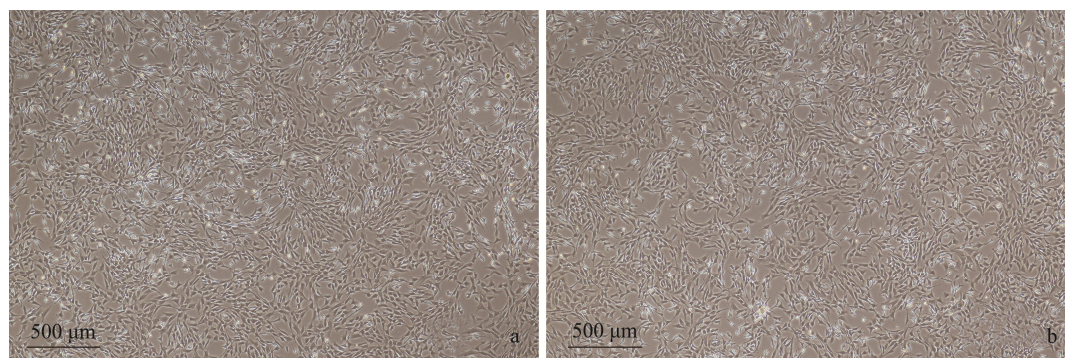


图2 航天诱变前后梅花鹿体细胞形态比较

Fig. 2 Comparasion of *Cervus nippon* somatic cell morphology before and after space mutagenesis

a. 诱变前：体细胞培养呈明显的成纤维细胞特征；b. 诱变后：回收的体细胞培养仍然呈明显的成纤维细胞特征。

a. Before space-mutagenesis: cultured somatic cell showed peculiar characteristics of fibroblasts; b. After space-mutagenesis: recycled somatic cells following cultivation showed similar characteristics of fibroblasts.

后，其中一部分用于传代培养，其余全部进行冷冻保存。

2.2 航天诱变组梅花鹿体细胞的生长曲线分析

根据3次实验重复数据平均值得到的航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞的生长曲线，总体均呈“S”型生长趋势，对照组梅花鹿体细胞经培养2 d后进入对数生长期，航天诱变组梅花鹿体细胞经培养4 d后进入对数生长期。两个体细胞系的细胞都在培养7 d后出现生长速度减慢的现象。由此得出航天诱变的梅花鹿体

细胞能够在体外培养生长正常。通过3次实验重复结果来看，每个细胞系生长曲线分析结果稳定（图3）。

2.3 航天诱变组和对照组雌性梅花鹿体细胞的拟合生长曲线分析

Logistic 曲线模型能很好地拟合3组航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞的生长曲线（表1），拟合度（ R^2 ）均接近1，说明其生长曲线的拟合度很好。拐点时间是细胞量增加速度由快到慢的转折点，梅花鹿航天诱变组体细胞的

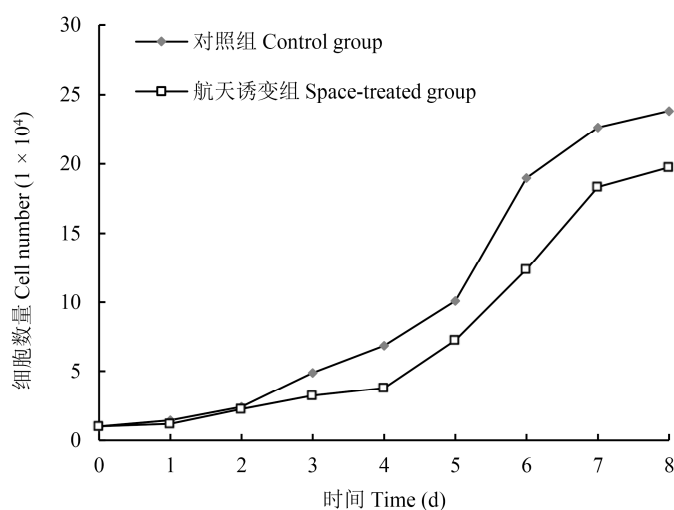


图3 3次实验重复的梅花鹿体细胞0~8 d的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of somatic cells following 0-8 days cultivation in three repeated experiments

表 1 Logistic 生长模型分析的参数估计和各指标计算值

Table 1 Parameters and calculated values for each index as evaluated by Logistic growth model analysis

项目		航天诱变组梅花鹿体细胞	对照组梅花鹿体细胞
Project		Experiment group with space-mutagenesis	Control group of untreated somatic cell
		somatic cell	
模型参数 Model parameters	<i>A</i>	25.521	27.818
	<i>B</i>	82.641	63.289
	<i>k</i>	0.728	0.778
拟合度 Fitting degree (<i>R</i> ²)		0.986	0.986
拐点时间 Inflection point time (d)		6.063	5.331
拐点细胞量 Inflection point cells (× 10 ⁴)		12.760	13.910

拐点时间大于对照组拐点时间，即对照组梅花鹿体细胞早于航天诱变组样品到达生长拐点。而从拐点细胞量来看，梅花鹿体细胞对照组的生长速度大于航天诱变组。

2.4 航天诱变梅花鹿体细胞的核型

航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞的细胞中期分裂相分析结果显示，染色体数目 2n 为 66 的分裂相分别占 90%和 94%。利用细胞遗传工作站（AI）软件根据其染色体的形态结构对染色体序列进行排列。实验观察记录了各 100 个航天诱变和对照组的梅花鹿体细胞染色体的形态，选择分散良好且形态较好的中期分裂相进行显微摄影、放大、比对、排列（图 4）。梅花鹿染色体核型（karyotype）2n = 66，其中，32 对常染色体，1 对性染色体，X 染色体为最大的染色体。其中航天诱变的梅花鹿体细胞未出现异常，且染色体形态正常。

3 讨论

3.1 梅花鹿体细胞的航天诱变及细胞样品回收培养技术

动物体细胞的正常培养条件是用液体培养基，其基础营养成分中需要进一步添加血清并控制 95%空气和 5% CO₂ 的气相条件，同时需要保持细胞渗透压（osmotic pressure）在 260 ~ 320 mOsm/kg（mOsm 为 milliosmol 的缩写，即毫渗量，是渗透压的单位，1 mOsm/kg = 2.575 kPa）

和 pH 7.2 左右的酸碱度（power of hydrogen）。但是航天实验从安全角度考虑，载物舱内不能使用液体培养基，也没有正常细胞培养的气相控制条件，同时还伴有短时（10 ~ 20 min）高温冲击（温度高于 40 ℃），这些都是航天条件下进行动物细胞培养所面临的主要问题。基于以上情况我们研制了 PVDF 膜培养基技术，基本保证细胞生长所需营养、pH 和渗透压等基本条件。

实验结果显示，利用自主研发的 PVDF 膜动物细胞培养法，可以使鹿体细胞样品在太空舱内飞行 12 d 后，保持细胞活力并成功回收建系。其细胞经过航天诱变处理后生长状态良好，基本保持成纤维细胞特性。这种动物体细胞太空培养方法的开发为以后进行相关实验提供了基础技术支撑。

3.2 生长曲线及拟合生长特点

本实验采用台盼蓝染色直接计数法测定航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞的生长曲线。实验步骤中最关键的是，确定所有组接种的细胞量要一致，即每孔接种细胞量为 1 × 10⁴；向血球计数板中加入培养液时要匀速缓慢；确保计数准确，从而避免不必要的人为因素导致实验结果不可信。通过 3 次重复的生长曲线测定实验结果表明，本实验的细胞计数板法计数结果稳定性较好。Logistic 模型参数在航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞间存在差异，其中代表

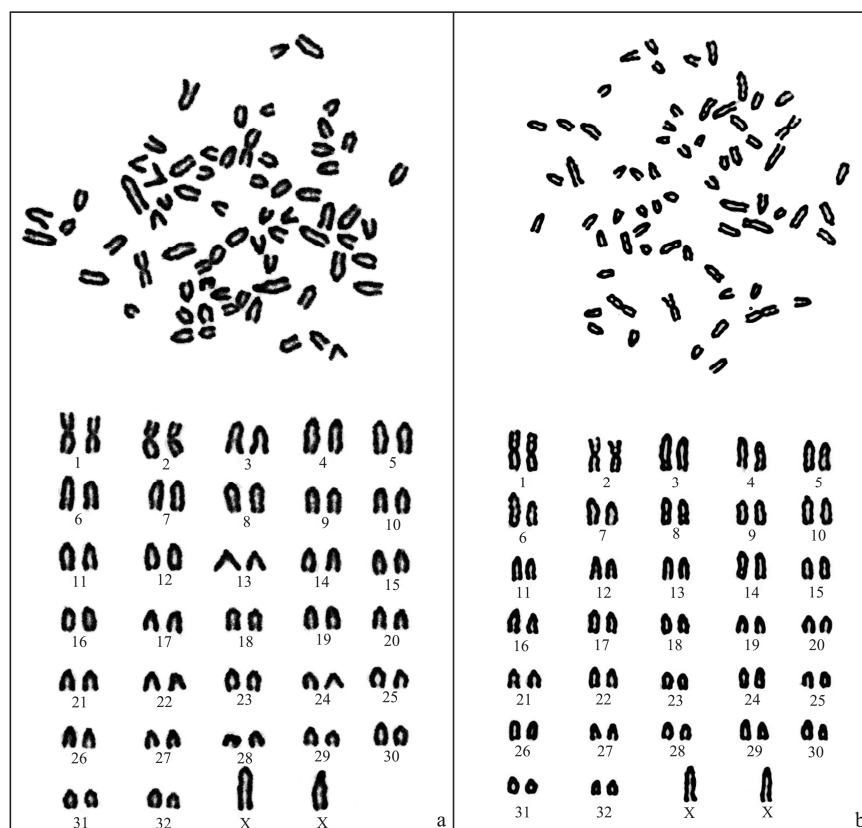


图4 梅花鹿体细胞染色体组成和核型排列

Fig. 4 Chromosome composition and karyotype of *Cervus nippon* somatic cells

a. 对照组的梅花鹿体细胞染色体组成和核型；b. 航天诱变后梅花鹿体细胞染色体组成和核型。

a. Chromosome composition and karyotype of untreated control cells; b. Chromosome composition and karyotype of space mutagenesis cells.

极限细胞量的 A 值有较小差异，这说明航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞有差异；Logistic 模型中 B 值（代表达到最大生长速率的参数）也存在差异，即航天诱变组梅花鹿体细胞最大生长速率出现得较对照组梅花鹿体细胞迟。航天诱变组和对照组梅花鹿体细胞生长速率参数差异很小。实验数据结果证明了对照组体细胞的生长速度大于航天诱变组生长速度。虽然航天诱变组体细胞生长速度不如对照组生长速度快，但其生长特性正常且良好。拟合生长曲线分析表明，与对照组相比航天诱变组细胞生长拟合度值相似，但细胞增殖拐点时间、拐点细胞量分析结果证明，航天诱变后的体细胞增殖速度减慢。增殖速度减慢有极大可能与细胞生

长周期相关基因的表达有关（李莹辉 2003）。近几年来，很多科研工作将较多的精力致力于细胞骨架系统中不同因素对细胞骨架分子聚合、解聚组装的影响、细胞骨架调节的信号传导途径和基因表达研究。同时也有结果表明，重力可直接影响微管分子自组装过程（Tabony et al. 2002）；微重力或模拟失重引起的细胞外基质或整合素表达变化可影响 ERK 信号传导途径（Shiba et al. 2003）。因此后期实验将以航天诱变处理的梅花鹿体细胞回收后生长速度减慢为依据，筛选出与细胞生长周期相关基因 *CCNE1*、*CDC34*、*CDK6*、*CKS2* 及 *ABL1*，比较它们在对对照组和航天诱变组梅花鹿体细胞中的表达量，从而为进一步了解航天诱变对梅花

鹿体细胞影响提供理论依据。

3.3 航天诱变梅花鹿体细胞核型

本实验采用低渗滴片法(刁英 2004)制备染色体标本。实验步骤中最关键的是,控制适宜的低渗时间,低渗时间过长导致细胞破裂。低渗时间不够使得染色体铺展不好(晁玉庆等 1992);另外将玻片提前 20 ~ 30 min 放入 -20 ℃ 的冰箱中,使用前 5 min 放入 4 ℃ 冰柜中,确保在滴片时玻片上有一层水膜,也可提高中期分裂相的分散程度并得到理想的核型分析图。

本研究获得了大量清晰的梅花鹿体细胞中期染色体相,观察结果表明,航天诱变并没有导致梅花鹿体细胞染色体形态和数量的变化,也没有引起梅花鹿体细胞在细胞水平的遗传学变化。由此推断航天诱变过程中微重力(microgravity)、太空电磁波、太空辐射等与地球表面不同的物理条件可能导致梅花鹿体细胞在基因水平或基因表达水平上的某些变化。有关这一方面的研究,下一步我们将通过基因组和转录组测序技术进一步研究其中的原因。

致谢 感谢同仁的技术支持。

参 考 文 献

Li X, Zhou S G. 2006. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. *Stem Cells & Development*, 15(4): 523-531.

Shiba D, Gytoku J, Takaoki M. 2003. Relationship between cell surface integrin and continuous ERK activation during osteoblast differentiation. *Gravitational and Space Biology Bulletin*, 17(1): 7.

Tabony J, Glade N, Papaseit C, et al. 2002. Gravity dependence of microtubule preparation. *Gravitational and Space Biology Bulletin*, 9(1): 245-248.

晁玉庆, 国向东, 赖双英, 等. 1992. 蒙古马染色体核型初步分析. *内蒙古农牧学院学报*, 13(1): 104-108.

戴国俊, 王金玉, 杨建生, 等. 2006. 应用统计软件 SPSS 拟合生长曲线方程. *畜牧与兽医*, 38(9): 28-30.

刁英. 2004. 染色体核型研究的方法及应用. *渝西学院学报*, 3(2): 55-58.

胡鹏飞, 刘华森, 邢秀梅, 等. 2015. 中国家养梅花鹿种质资源特性及其保存与利用的途径分析. *中国畜牧兽医*, 42(10): 2732-2738.

李莹辉. 2003. 21 世纪的航天医学细胞分子生物学. *航天医学与医学工程*, (16): 588-591.

刘旭光, 高丽, 赵益贤, 等. 1997. 淮南麻黄鸡生长曲线分析与拟合的研究. *安徽农业大学学报*, 24(4): 362-365.

内蒙古赛科星家畜种业与繁育生物学技术研究院有限公司. 2016. 用于航天生物育种的家畜成纤维细胞培养方法. 中国专利: 201610690957.2, 2016-9-8.

张静南, 刘永斌, 张金吨, 等. 2011. 阿拉伯马染色体 G 带核型分析. *华北农学报*, 26(2): 101-106.

张乐超, 张秀玲, 刘春杨, 等. 2017. 快慢羽太行鸡生长规律和 Logistic 生长曲线拟合分析. *科学技术*, 53(1): 17-20.