

# 豹猫体细胞建系及其生物学特性分析

刘建<sup>①</sup> 徐晓荣<sup>①</sup> 李云霞<sup>①②</sup> 李慧鹏<sup>①</sup> 高原<sup>②</sup> 李瑶<sup>①</sup>

曹贵方<sup>②③</sup> 包斯琴<sup>①</sup> 李喜和<sup>①②\*</sup>

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有限公司 呼和浩特 011517; ③ 内蒙古农业大学生命科学院 呼和浩特 010018

**摘要:** 研究体外培养豹猫 (*Prionailurus bengalensis*) 细胞的形态、细胞贴壁率、冷冻存活率、生长曲线及细胞核型等生物学特性, 为深入开展豹猫基因组学及濒危野生动物保护提供依据。本实验选择豹猫 3 种组织, 即剑状软骨、心和肺, 采用组织块贴壁培养法进行体细胞的原代培养; 酶消化法完成细胞的传代培养; 程序降温完成细胞的冷冻保存; 通过细胞计数法计数细胞冷冻存活率; 绘制细胞生长曲线; 采用常规染色体标本制备技术, 对豹猫的染色体核型及 G 带进行分析。细胞原代培养结果显示, 剑状软骨组织在培养第 3 天出现纤维样细胞、培养 6~7 d 铺满培养瓶; 心组织在培养第 5 天出现上皮样细胞、12 d 铺满培养瓶; 肺组织在培养 4 d 后出现成纤维细胞、8~9 d 铺满培养瓶。3 种来源体细胞均显示成纤维细胞特征, 剑状软骨源细胞最易贴壁、肺源细胞次之、心源细胞最弱。对比 3 种不同来源体细胞从 6 代 (P6) 至 12 代 (P12) 冷冻存活率, 剑状软骨源细胞冷冻存活率显著下降 (冻存前 91.0%~97.6%, 冻存后 76.8%~85.5%,  $P < 0.05$ ), 心源细胞冷冻存活率亦显著下降 (冻存前 82.7%~88.1%, 冻存后 43.7%~80.5%,  $P < 0.05$ ), 肺源细胞冷冻存活率有下降趋势, 但无显著差异 (冻存前 83.4%~96.8%, 冻存后 73.9%~93.3%,  $P > 0.05$ )。生长曲线分析显示, 3 种体细胞均呈“S”型, 其中剑状软骨源细胞增殖最快、肺源细胞次之、心源细胞最慢。核型分析结果显示, 3 种不同来源的成纤维体细胞染色体数目均为  $2n = 38$ , 18 对为常染色体, 形态类型为  $6m + 10sm + 2st$ , 1 对为性染色体, X 染色体形态类型为 m。本研究建立了 3 种组织来源的豹猫成纤维细胞建系技术及体细胞系, 揭示了该物种成纤维细胞的基本生物学特性, 为动物遗传信息研究及豹猫保护提供了重要的实验材料和基础信息。  
**关键词:** 豹猫; 成纤维细胞; 细胞生长曲线; 冷冻存活率; 核型

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2018) 03-427-12

## Establishment of Fibroblast Cell Lines from Leopard Cat and Their Biological Characteristics

LIU Jian<sup>①</sup> XU Xiao-Rong<sup>①</sup> LI Yun-Xia<sup>①②</sup> LI Hui-Peng<sup>①</sup> GAO Yuan<sup>②</sup> LI Yao<sup>①</sup>

CAO Gui-Fang<sup>②③</sup> BAO Siqin<sup>①</sup> LI Xi-He<sup>①②\*</sup>

① Research Center for Animal Genetic Resources of Mongolia Plateau, Inner Mongolia University, Huhhot 010021; ② Inner Mongolia

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 刘建, 男, 硕士; 研究方向: 动物学; E-mail: bdmgyw@163.com。

收稿日期: 2017-08-18, 修回日期: 2018-01-11 DOI: 10.13859/j.ejz.201803011

Saikexing Institute of Breeding and Reproductive Biotechnology in Domestic Animal, Hohhot 011517; ③ Inner Mongolia Agricultural University College of Life Science, Huhhot 010018, China

**Abstract:** In order to study Leopard Cat (*Prionailurus bengalensis*) genomics and protect endangered Leopard Cat, the biological characteristics including the morphology, the adherence rate, the frozen survival rate, the growth curve and the cell karyotype of *in vitro* cultured fibroblast cells were investigated. Three types of Leopard Cat tissues of cartilage, heart and lung were collected. The adhesive culture with tissue block was carried out for the primary culture of somatic cells, and then subculture was conducted after digestion by the trypsin. The frozen cell viability was calculated by cell counting method and the growth curve was made. The chromosome karyotype and G band were analyzed by normal chromosome specimen preparation technology. Fibroblast cells were observed from D3 of cartilage tissue block primary culture and they overspread all the bottom surface of cultured flask by Day 6 - 7, while these events took place by D5 and D12 of heart tissue culture, and by D4 and D8 - 9 of lung tissue culture (Fig. 1). The cells derived from three organs or tissues all exhibited characteristics of fibroblast cells (Fig. 2, 3). The adherence speed following culture showed lowest to fastest from the heart-derived cells, lung-derived cells and cartilage-derived cells, respectively (Fig. 4). Comparing the frozen survival rates of three different sources of somatic cells, we showed significant reduction from P6 to P12 in both cartilage-derived cells (P6 - P12: 91.0% - 97.6% vs. 76.8% - 85.5%,  $P < 0.05$ ) and the heart-derived cells (P6 - P12: 82.7% - 88.1% vs. 43.7% - 80.5%,  $P < 0.05$ ). Lung-derived cells also showed similar trend but no significant difference was observed from P6 to P12 (P6 - P12: 83.4% - 96.8% vs. 73.9% - 93.3%,  $P > 0.05$ ) (Table 2). The growth curve analysis of three types of fibroblast cells showed an "S-model", the cartilage-derived cells proliferated faster, next by the lung-derived cells, and the cardiac-derived cells proliferated slower (Fig. 5). The results of karyotype analysis showed that the number of chromosomes of all three different sources of fibroblast cells were  $2n = 38$  (Fig. 6), including 18 pairs of autosomes with  $6m + 10sm + 2st$  types, one pair of sex chromosomes, and X chromosome was m type (Fig. 7, Table 3). This study established three fibroblast cell lines derived from three tissues of leopard cat, and analyzed their biological characteristic and karyotype. The results provide important biological information for future genetic research and species protection of leopard cat.

**Key words:** Leopard Cat, *Prionailurus bengalensis*; Fibroblast cells; Cell growth curve; Frozen survival rate; Karyotype

随着地球环境破坏和生存环境变化,许多物种面临濒危化。因此我们对物种资源的特性进行深入研究便越来越迫切,对物种遗传多样性的深入研究在物种保护中具有无可替代的地位(张步翀等 2006)。豹猫(*Prionailurus bengalensis*),是产于亚洲的猫科动物,又名石虎、铜钱猫、山鸡虎等。豹猫也以其适应人类改良和耕种环境的能力而闻名(Vigne et al. 2015),其被《濒危野生动植物种国际贸易公

约》列为濒危物种,而《中国濒危动物红皮书》也将豹猫列为易危种(汪松 1998)。本研究所选实验材料豹猫属于分布于内蒙古锡林郭勒盟的北方亚种。对于豹猫的研究,国外的报道比较多(Andrews et al. 1992, Anta 1992, Tatara 1994, Pukazhenthi et al. 2000),由于豹猫实验材料不易获得,如今我国对豹猫的研究也仅仅停留在组织形态学方面的探讨(寿振黄 1955, 王培潮等 1977),对豹猫细胞遗传信息方面研

究的报道还很少, 没有建立豹猫体细胞系, 更未见有对豹猫体细胞生物学特性进行分析研究。本研究尝试采用哺乳动物体细胞培养基本技术建立豹猫 3 种组织来源的体细胞系, 并在此基础上分析其生物学特性, 主要包括细胞形态、细胞贴壁率、冷冻存活率、生长曲线及细胞核型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

雌性豹猫 1 只, 来源于内蒙古四子王旗, 由于天气寒冷, 被冻死在野外, 冰冻状态下带回实验室, 38 °C 下解冻, 用 75% 的酒精 (利尔康) 消毒, 取出其心、肺、剑状软骨组织, 浸泡在无菌的生理盐水 (京新药业) 中, 在超净工作台 (上海智城-ZHJH) 内进行接种培养。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 豹猫 3 种组织的原代培养** 无菌操作取出心肌、肺、剑状软骨组织, 在 75% 酒精中浸泡 2 ~ 3 s, PBS (Gibco, cat. no. 14190-144) 冲洗 5 次; 用眼科剪将组织剪成约 0.5 ~ 1 mm<sup>3</sup> 的组织小块, 将其均匀铺在 T25 (Corning, cat. no. 430599) 培养瓶中, 加入 8 ml MEM- $\alpha$  (Gibco, cat. no. 12561-056) 完全培养液后, 倒置放到 38 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo-Forma 311) 中培养。

**1.2.2 体细胞传代和纯化培养** 原代培养的体细胞多数情况下细胞类型多, 经过几次传代后可以使得组织源细胞得到纯化。具体操作步骤: 当组织块边缘长出单层细胞、细胞汇合度达到 70% ~ 80% 时, 用 0.25% 的胰蛋白酶 (Gibco, cat. no. 25200-056) 对其进行消化 3 min 后, 用 MEM- $\alpha$  完全培养液终止消化、离心收集; 然后将细胞接种到 6 孔细胞培养板 (Corning, cat. no. 3516), 放到 38 °C 培养箱中继续培养; 次日观察, 若培养液表面的死细胞过多和培养液变黄, 则应换培养液继续培养, 对细胞的生长状态拍照记录。

**1.2.3 体细胞的冷冻保存** 动物细胞在液氮中

超低温冷冻保存, 是保存动物遗传信息的有效方法, 可以在几十年甚至上百年后取出再用。在细胞冻存时通常使用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma, cat. no. D2650) 作为渗透压保护剂, 把冷冻对细胞的伤害降到最低。本实验所采用的细胞冻存用液配方为 DMSO 与胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (BI, cat. no.04-001-1ACS) 按 1 : 9 的体积比例混合。将培养细胞上清液弃掉, 用磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS) (Gibco, cat. no. 14190-144) 清洗后再加入适量 0.25% 胰蛋白酶处理, 胰蛋白酶的量以覆满培养瓶底为限, 消化 1.5 ~ 2 min 后加入 2 ml 培养液终止消化, 轻轻吹打后, 收集培养细胞, 1 500 r/min 离心 5 min。用提前配制好的细胞冻存液重悬离心管中的细胞, 并将细胞调整到冷冻要求浓度  $2 \times 10^5$  个/ml, 每管 0.5 ml 分装, 并标记动物品种、培养代次、日期等相关信息, 再将冻存管放到程序降温盒 (Nalgene, 5100-0001) (需提前在 4 °C 冰箱中存放), 然后移入 -80 °C 冰箱 (Thermo-991) 缓慢降温。次日将细胞转入液氮中保存。

**1.2.4 体细胞解冻后的冷冻存活率测定** 解冻必须遵循的原则是使细胞快速融化, 2 min 内需要恢复到常温, 以保证细胞外部的冰晶能够快速融化。具体操作步骤为: 将实验所需的培养液和相关试剂放到 38 °C 金属干预器 (上海一恒-DKT200) 上预热; 将冻存管从液氮中取出后迅速投入 38 °C 水浴锅中, 适度晃动冻存管 8 ~ 10 s 使冰晶全部化解, 然后将冻存管中细胞移入装有 3 ml MEM- $\alpha$  完全培养液的 15 ml 离心管中, 1 500 r/min 离心 5 min; 弃掉上清, 用培养液重悬, 传代、计数、观察。在检测体细胞冷冻处理前的存活率时, 先取 100  $\mu$ l 细胞悬液计数细胞总数, 重复 3 次; 另取 100  $\mu$ l 细胞悬液加入 25  $\mu$ l 台盼蓝染液, 静置 3 min 后计数死细胞数, 重复 3 次; 在检测体细胞冷冻处理后的存活率时, 将 100  $\mu$ l 细胞悬液加入 25  $\mu$ l 台盼蓝染液, 静置 3 min 后计数

死细胞数, 重复 3 次。本实验取 6 代 (passage 6, P6)、9 代 (passage 9, P9)、12 代 (passage 12, P12) 的 3 种细胞系, 分别计算冻存前后细胞存活率, 取 3 次计算的平均值, 分别计算标准偏差, 冻存前细胞存活率 =  $[(\text{细胞总数} - \text{冻存前死细胞数}) / \text{细胞总数}] \times 100\%$ , 解冻后细胞存活率 =  $[(\text{细胞总数} - \text{解冻后死细胞数}) / \text{细胞总数}] \times 100\%$ 。

**1.2.5 体细胞的贴壁率和生长曲线绘制** 分别选取第 6 代细胞数量为  $2.4 \times 10^5$  个且生长状态旺盛的剑状软骨源、肺源、心源成纤维体细胞, 采用细胞传代的方法, 将 3 种细胞分别以  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种到 24 孔板 (Corning, 3524) 的每个孔中, 放入  $38.5^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养箱中, 之后每间隔 24 h 分别从 3 孔中吸取  $100 \mu\text{l}$  的上清液计数细胞数量, 每孔细胞计数 3 次, 共计数 8 d。计算 8 d 细胞贴壁率的标准偏差, 然后绘制 3 种细胞的贴壁率折线图。贴壁率 =  $[(\text{接种细胞数} - \text{上清细胞数}) / \text{接种细胞数}] \times 100\%$ 。

将培养细胞的上清液用于贴壁率测定, 而贴壁的细胞用于测定和绘制其生长曲线。每间隔 24 h 分别从 3 孔中吸取  $100 \mu\text{l}$  的细胞悬浮液, 每孔细胞计数 3 次、连续计数 8 d。计算每天细胞生长的平均数、标准偏差, 然后绘制 3 种细胞生长曲线图。

**1.2.6 体细胞核型分析** 选取生长密度约为  $80\% \sim 90\%$  的体细胞, 在培养液中添加  $20 \text{ mg/L}$  秋水仙素 (BI, cat. no. 12-004-1D), 培养 2 h 50 min 后, 胰酶消化收集细胞,  $1500 \text{ r/min}$  离心 5 min, 弃上清液。在细胞沉淀中加入  $8 \text{ ml}$   $38^\circ\text{C}$  预热

的  $0.075 \text{ mol/L}$  KCl 低渗液, 用吸管吹打均匀。置于  $38^\circ\text{C}$  恒温水浴箱中低渗处理  $55 \sim 60 \text{ min}$ , 低渗结束前  $1 \text{ min}$ , 缓缓加入  $1 \text{ ml}$  提前放入  $-20^\circ\text{C}$  冰箱预冷的新鲜的甲醇/冰醋酸固定液 (即甲醇与冰乙酸体积比为  $3:1$  的混合液), 用吸管轻轻吹打均匀, 预固定  $1 \text{ min}$  后  $1000 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ , 小心弃上清; 向离心所得的沉淀中缓慢加入  $8 \text{ ml}$  固定液, 轻轻吹打细胞使其重悬, 置  $38^\circ\text{C}$  恒温水浴箱中固定  $30 \text{ min}$ , 然后  $1000 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ , 弃上清, 固定重复 3 次; 然后距载玻片  $1.5 \text{ m}$  以上缓慢滴片, 放入  $70^\circ\text{C}$  烘箱中干燥  $1 \text{ h}$ ; Giemsa 染液处理  $10 \sim 15 \text{ min}$ , 用水缓慢冲洗。G 带实验中, 用已提前  $37^\circ\text{C}$  水浴锅预热的  $0.025\%$  胰蛋白酶消化  $55 \sim 60 \text{ s}$  后迅速将片子放入  $0.85\% \text{ NaCl}$  溶液中漂洗 2 次, 放入 Giemsa 染液中  $10 \sim 15 \text{ min}$ 。最后在遗传分析工作站 (Nikon ECLJPSE 50i) 下观察豹猫细胞染色体中期分裂相、 $100$  倍拍照并统计染色体条数, 并配对等。

### 1.2.7 染色体臂比值与着丝粒位置的确定

根据 1960 年召开的 Denver 会议和 1964 年提出的 Leven 标准, 用遗传工作站仪器测量、计算并统计豹猫细胞染色体的相对长度、短臂长度、长臂长度、臂比值 (臂比值 = 长臂长度/短臂长度)、着丝粒指数 [着丝粒指数 = (短臂长度/染色体长度)  $\times 100$ ] 和 G 带数。实验中我们选取分散良好且清晰的染色体 G 带图, 统计其平均数、标准偏差后, 再依据臂比值确定着丝粒位置, 进而将染色体分类和排列。臂比值和着丝粒位置的确定标准见表 1。

表 1 臂比值和着丝粒位置的确定  
Table 1 The arm ratio and centromere of chromosomes

臂比值 Arm ratio	着丝粒的位置 The position of the centromeres	着丝粒类型 Centromeres morphology
1.00 - 1.70	中着丝粒区域 Metacentric centromere region	中着丝粒 Metacentric, m
1.71 - 3.00	亚中着丝粒区域 Submetacentric centromere region	亚中着丝粒 Submetacentric, sm
3.01 - 7.00	近端着丝粒区域 Acrocentric centromere region	近端着丝粒 Acrocentric, st
7.01 - $\infty$	端着丝粒区域 Telocentric centromere region	端着丝粒 Telocentric, t

## 2 结果

### 2.1 豹猫组织原代体细胞的建系及形态

原代培养后, 剑状软骨源组织在培养 3 d 出现纤维样细胞, 6~7 d 铺满培养瓶(图 1a); 心源组织在培养 5 d 出现上皮样细胞, 12 d 铺满培养瓶(图 1b); 肺源细胞组织在培养 4 d 出现成纤维细胞, 8~9 d 铺满培养瓶(图 1c)。三种来源细胞均显示成纤维细胞特征, 剑状软骨源细胞最易贴壁、肺源细胞次之、心源细胞最弱。

### 2.2 豹猫三种组织体细胞的形态观察

豹猫细胞传代纯化到第 6 代, 细胞形态基本单一且呈成纤维细胞样生长。剑状软骨源细胞呈长梭形; 心源细胞呈不规则三角形; 肺源细胞呈梭形(图 2)。

实验中发现, 心源、肺源细胞在第 9 代后出现细胞增殖缓慢, 第 12 代有大量细胞死亡的现象, 不能达到传代所需求的细胞密度(图 3a、b); 剑状软骨源细胞在 12 代后增殖速度也明显变慢, 但仍可以达到传代密度(图 3c)。三种组织源细胞 12 代时形态较 6 代时没有明显变化。

### 2.3 豹猫组织体细胞冻存前、复苏后存活率

对比 3 种不同来源体细胞 6 代(P6)至 12 代(P12)冷冻存活率, 剑状软骨源细胞冷冻存活率显著下降( $P < 0.05$ ), 心源细胞冷冻存活

率亦显著下降( $P < 0.05$ ), 肺源细胞冷冻存活率从 6 代(P6)至 12 代(P12)有下降趋势, 但没有显著差异( $P > 0.05$ )(表 2)。

### 2.4 细胞贴壁率

3 种来源体细胞贴比率统计结果显示, 剑状软骨源细胞最易贴壁、肺源细胞次之、心源细胞最弱(图 4)。

### 2.5 细胞生长曲线

从 3 种体细胞的总体生长情况来看, 剑状软骨源细胞增殖的最快, 肺源细胞次之, 心源细胞最慢。心源细胞在接种后的第 2 天, 进入对数生长期。肺源细胞和剑状软骨源细胞在第 5 天进入对数生长期, 第 6 天达到细胞数目最大值(图 5)。

### 2.6 豹猫细胞染色体核型和 G 带分析

选择能够稳定传代培养的剑状软骨源细胞 6 代、9 代、12 代的细胞制备染色体标本, 获得多组染色体分裂相与 G 带图, 每个样本分别选取 50 个染色体分散良好且分裂指数较高的染色体分裂相, 统计染色体条数。选取 6 组 G 带图, 测量染色体长度, 由长到短排列, 记录为染色体编号。计算 6 组染色体的相对长度、臂比值、着丝粒指数、G 带数的平均值, 和其相对偏差。将 19 对染色体分为 4 个类别即 A、B、C 和性染色体, A、B、C 与染色体长度分类的最大、中等、最小相对应。所选豹猫中期分裂细胞中, 染色体  $2n = 38$ , 其含有 19 对即

表 2 豹猫三种组织来源细胞冷冻存活率对比

Table 2 The comparison of the frozen survival rates of cells from three tissues of leopard cat

细胞传代数 Cell passages	冻存情况 Cell cryopreservation	剑状软骨源细胞 Sword-shaped cartilage cells	心源细胞 Heart cells	肺源细胞 Lung cells
6	冻存前 Before cryopreservation (%)	97.3 ± 1.3**	87.6 ± 11.3	93.4 ± 2.4
	复苏后 After cryopreservation (%)	84.8 ± 3.7**	80.5 ± 13.3	91.9 ± 4.6
9	冻存前 Before cryopreservation (%)	91.0 ± 2.9*	88.1 ± 5.2**	96.8 ± 2.8
	复苏后 After cryopreservation (%)	85.5 ± 6.1*	48.2 ± 8.0**	93.3 ± 5.8
12	冻存前 Before cryopreservation (%)	97.6 ± 4.1*	82.7 ± 5.3*	83.4 ± 6.3
	复苏后 After cryopreservation (%)	76.8 ± 10.5*	43.7 ± 2.7*	73.9 ± 2.2

\* 差异显著,  $P < 0.05$ ; \*\* 差异极显著,  $P < 0.01$ 。

\* Significant difference,  $P < 0.05$ ; \*\* Extremely significant difference,  $P < 0.01$ .

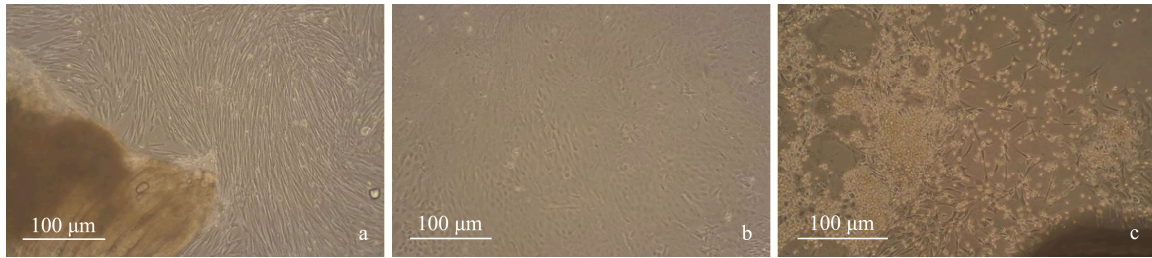


图 1 豹猫组织原代细胞的培养

Fig. 1 Primary cell culture of Leopard Cat tissue

a. 剑状软骨源细胞原代; b. 心源细胞原代; c. 肺源细胞原代。

a. Source of sword cartilage cells P0; b. Source of heart cells P0; c. Source of lung cells P0.

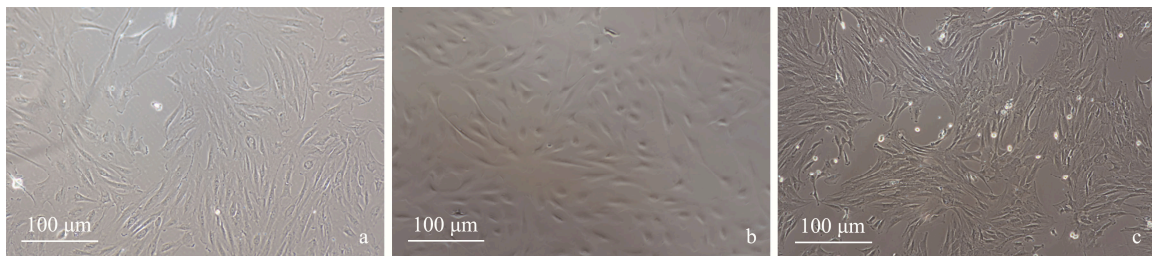


图 2 豹猫 3 种细胞第 6 代的形态

Fig. 2 Vell morphology of 3 kinds of Leopard Cat cells at passage 6

a. 剑状软骨源细胞 6 代; b. 心源细胞 6 代; c. 肺源细胞 6 代。

a. Sword source of cartilage cells P6; b. Source of heart cells P6; c. Source of lung cells P6.

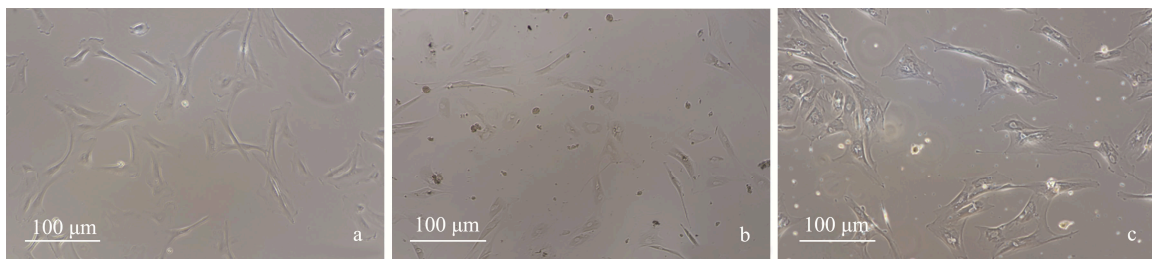


图 3 豹猫 3 种细胞第 12 代的形态

Fig. 3 Cell morphology of 3 kinds of Leopard Cat cells at passage 12

a. 剑状软骨源细胞 12 代; b. 心源细胞 12 代; c. 肺源细胞 12 代。

a. Sword source of cartilage cells P12; b. Source of heart cells P12; c. Source of lung cells P12.

38 条正常二倍体染色体 (图 6)。18 对为常染色体, 其形态类型为  $6m + 10sm + 2st$ , 即 6 对中着丝粒染色体、11 对亚中着丝粒染色体和 2 对近端着丝粒染色体, 1 对为性染色体, X 染色体为中着丝粒染色体 (m) (图 7、表 3)。由于所选

取的实验材料为雌性豹猫, 所以未能获得 Y 染色体的形态类型。在本实验中我们所选取统计的豹猫 50 个中期染色体分裂细胞中有 44 个分裂相的染色体有正常二倍体的特性, 说明本实验所建立的豹猫细胞系遗传特性相对稳定。

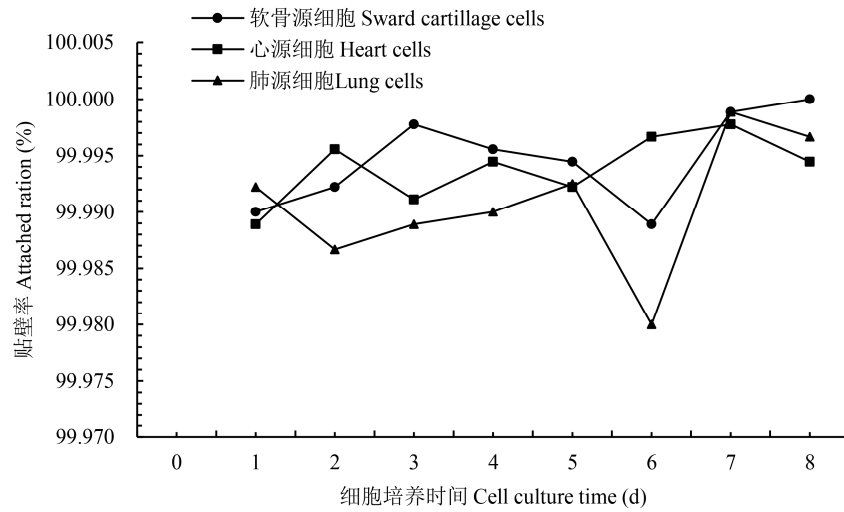


图 4 3 种细胞的贴壁率比较 (P6)

Fig. 4 Attachment ratios of 3 kinds of cells at passage 6

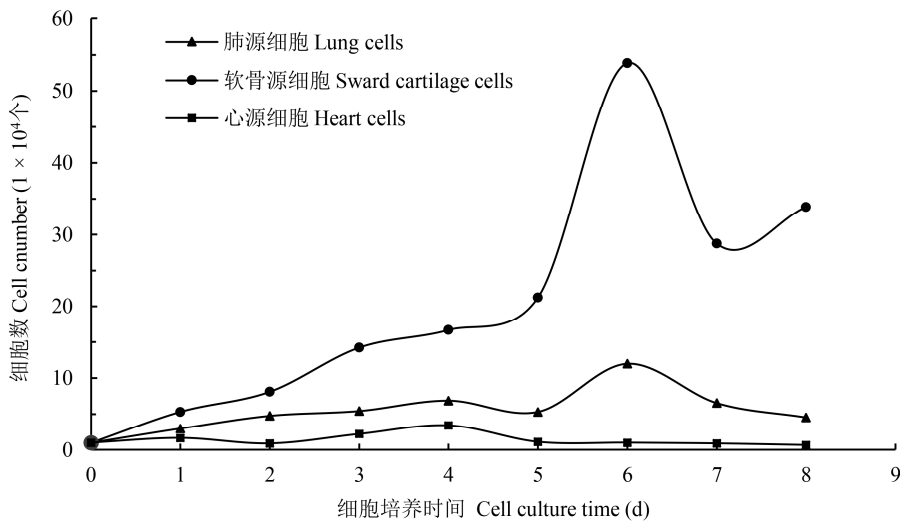


图 5 豹猫第 6 代剑状软骨、肺、心源细胞生长曲线图

Fig. 5 The growth curve of cartilage-, lung- and heart-derived cells at passage 6

### 3 讨论

#### 3.1 豹猫体细胞建系关键技术

动物体细胞培养建系成功与否主要与原代细胞的取材、分离、培养有关。因此有效分离细胞，并保持其相应的生物学特性，找到适合其生长的环境就显得尤为重要。

取材是原代细胞培养成功的首要条件，是进行细胞培养的第一步，现阶段我们用于细胞

建系组织样品主要来自于活体和尸体。活体采样一般采集耳组织和血样，尸体采样可以取到全身各组织，通常尸体取样要取新鲜样品，本实验尝试从冰冻的豹猫尸体上取样，完成细胞建系，由于天气寒冷食物缺乏，豹猫冻死在野外，以冰冻状态运回实验室，38℃下缓慢解冻，无菌取样。实现豹猫心、肺、剑状软骨的原代建系。

原代细胞的分离方法有机械性分离法、螯

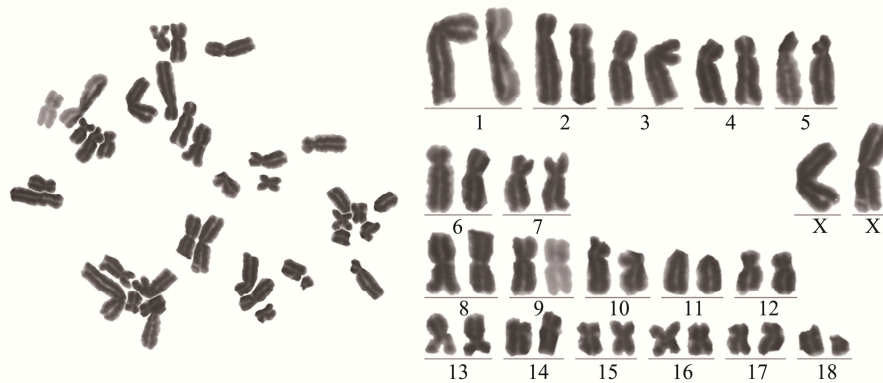


图 6 豹猫第 12 代剑状软骨细胞的染色体中期分裂相（左）和核型（右）

Fig. 6 The metaphase chromosomes and karyotype of cartilage-derived cells at passage 12

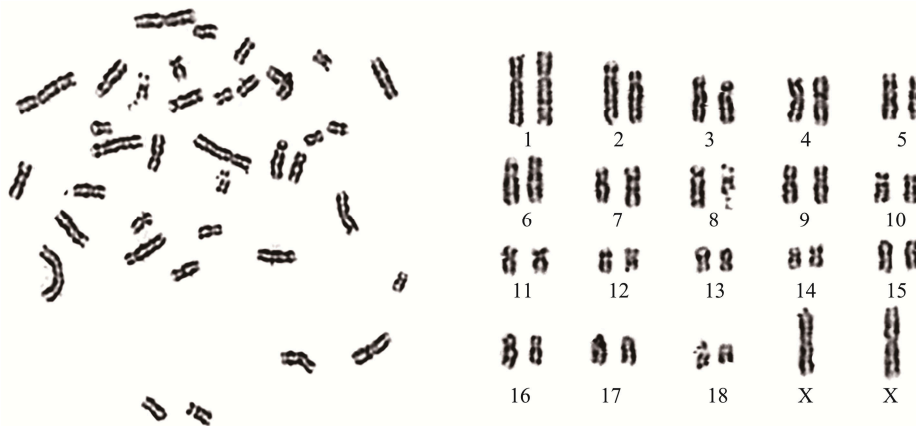


图 7 豹猫第 12 代剑状软骨细胞的 G 带分析图

Fig. 7 Chromosome G band analysis of cartilage-derived cells at passage 12

合作用分离法、酶消化法和两种或多种分离方法联合应用(宋丹等 2015)。机械分离法是分离上皮细胞最简单的方法,且分离的原代上皮细胞由于未经过酶处理其活性较好、增殖能力也较强。该方法的缺点是获得的原代细胞容易被成纤维细胞污染,需要进行严格的纯化。使用该法成功建立细胞系的野生动物有天山马鹿(*Cervus elaphus songaricus*) (刘韬等 2008)、东北虎(*Panthera tigris altaica*)和孟加拉虎(*P. tigris tigris*) (关伟军等 2009)、猞猁(*Felis lynx*) (道日娜等 2013)、东北野猪(*Sus scrofa*) (李忠秋等 2013)和阿巴嘎黑马(*Equus caballus caballus*) (王爱虹等 2013)。Sato 等(2013)

采用反复吹打剪成小片段的小肠组织来分离小肠隐窝,进行培养,以减少细胞的凋亡。Lawrenson 等(2013)采用机械刮取法来获得输卵管上皮细胞以进行体外三维培养。近年来,学者们多采用酶消化法分离原代细胞。胶原酶仅对细胞间质有消化作用,而对上皮细胞的影响不大,适用于消化分离纤维性组织、上皮组织等。该酶能使上皮细胞有效分离而不损害细胞,是分离上皮细胞最常用的酶。如在分离肾小管上皮细胞时最常用胶原酶消化法(Marquez et al. 2014),常用的主要为 I、II 和 IV 型胶原酶。Zhao 等(2014)在分离肾时采用含肝素的 PBS 对肾进行原位灌注,以去除血液,然后再



表 3 豹猫第 12 代剑状软骨细胞染色体分类及其核型特性分析  
 Table 3 Analysis of karyotype characteristics and classification of Leopard Cat cartilage-derived cells at passage 12

类别 Category	染色体长度 Chromosome length	染色体编号 Chromosome number	相对长度 Relative length	臂比值 Arm ratio	着丝粒指数 Centromere index	G 带数 G-banding pattern	形态类型 Morphotype
A	最大 Maximum	1	3.40 ± 0.86	1.84 ± 0.36	0.35 ± 0.13	23 ± 1	sm
		2	4.55 ± 0.45	1.78 ± 0.30	0.30 ± 0.14	17 ± 2	sm
		3	3.40 ± 0.31	1.90 ± 0.34	0.38 ± 0.33	15 ± 3	sm
		4	3.35 ± 0.17	1.98 ± 0.28	0.35 ± 0.07	4 ± 4	sm
		5	3.65 ± 0.22	1.62 ± 0.27	0.36 ± 0.08	19 ± 1	m
		6	3.30 ± 0.70	2.01 ± 0.25	0.29 ± 0.10	11 ± 3	sm
B	中等 Medium	7	2.60 ± 0.22	2.33 ± 0.22	0.38 ± 0.10	14 ± 1	sm
		8	2.95 ± 0.15	1.58 ± 0.52	0.40 ± 0.08	14 ± 2	m
		9	2.35 ± 0.08	2.25 ± 0.46	0.36 ± 0.12	20 ± 5	sm
		10	2.10 ± 0.34	2.21 ± 0.46	0.33 ± 0.07	9 ± 1	sm
		11	2.35 ± 0.17	1.78 ± 0.74	0.40 ± 0.13	9 ± 3	sm
		12	2.30 ± 0.38	4.54 ± 0.42	0.31 ± 0.08	12 ± 1	st
C	最小 Minimum	13	2.20 ± 0.15	1.55 ± 0.55	0.40 ± 0.09	13 ± 3	m
		14	1.60 ± 0.26	2.75 ± 0.28	0.37 ± 0.12	10 ± 1	sm
		15	1.50 ± 0.26	3.81 ± 0.53	0.33 ± 0.14	12 ± 4	st
		16	1.35 ± 0.20	1.33 ± 0.29	0.36 ± 0.09	9 ± 2	m
		17	1.75 ± 0.30	1.42 ± 0.20	0.32 ± 0.11	10 ± 3	m
		18	1.55 ± 0.28	1.41 ± 0.23	0.33 ± 0.08	10 ± 2	m
性染色体(X) Sex chromosome	最大 Maximum	19	3.02 ± 0.59	1.69 ± 0.32	0.35 ± 0.17	12 ± 6	m

Sm. 亚中着丝粒染色体; m. 正中或中部着丝粒染色体; st. 近端着丝粒染色体。

sm. Submetacentric chromosome; m. Metacentric chromosome; st. Acrocentric chromosome.

用IV型胶原酶多次消化切碎的肾皮质, 能达到较理想的分离效果。用胶原酶还可消化分离汗腺上皮细胞 (Gao et al. 2014)、输卵管上皮细胞 (Kasperczyk et al. 2012) 等其他上皮细胞, 杜鹃等 (2011) 采用该方法建立白唇鹿 (*Gervus albirostris*) 细胞系。在实际研究过程中, 常常将上述不同方法联合应用, 以期获得更佳的分​​离效果。Macheiner 等 (2014) 联合使用酶消化法和组织块培养法来分离培养绵羊 (*Ovis aries*) 食管上皮细胞。先用分散酶与胶

原酶的混合消化液短时间预处理组织, 然后再采用组织块培养法来分离培养上皮细胞。通过分散酶作用以去除基底膜, 胶原酶进一步分离细胞间的桥连, 这样细胞就能更容易地从组织块周围迁移出。Tominaga 等 (2013) 将牙周韧带进行组织块培养, 待细胞长出后, 用被胰酶/EDTA 浸过的滤纸直接置于上皮细胞处来分离上皮细胞, 即“钩细胞”, 发现此法分离培养的细胞纯度较高。与胰酶消化法相比, 机械分离法具有操作简便、对细胞损害小等特点,

且生长出来的细胞整齐有序（刘刚等 2013），本实验采用机械分离法实现豹猫细胞的原代建系。

原代培养方法很多，最基本的有两种，即组织块培养法和单层细胞培养法（李煜等 2007）。动物体细胞培养最常用的培养液为 DMEM、DMEM/F12 等，其中还会添加抗生素，如常用的青霉素/链霉素、庆大霉素或两性霉素 B 等，还可根据需要选择加入不同的添加剂，如血清、表皮生长因子（epidermal growth factor, EGF）、胰岛素、氢化可的松等。一般认为 RPMI-1640 营养全面，对各种组织生长都适用；Eagle'S MEM 适合于细胞株的传代培养；DMEM 有利于细胞的分裂增殖；Ham's F12 能促进细胞的分化。也有学者将不同培养基混合应用，从而得到较好的培养效果（张忠等 2001），本研究选择适用于多种组织基础培养的 MEM-Alpha 完全培养液完成豹猫原代细胞的培养。

### 3.2 豹猫 3 种组织来源体细胞形态、细胞贴壁率和细胞生长曲线分析

本研究中我们对豹猫 3 种组织来源的培育 6 代、9 代、12 代细胞形态观察发现，增殖的豹猫细胞形态基本单一且呈成纤维样细胞生长。剑状软骨源培育的细胞呈长梭形、心源培育细胞呈不规则三角形、肺源培育细胞呈梭形，观察到的细胞形态与任芳丽等（2002）的描述一样。在细胞的传代培养过程中，剑状软骨源细胞相对于其他两种细胞更易于增殖。

在 3 种体细胞传代至第 6 代时，我们对其进行了贴壁率和生长曲线检测，剑状软骨源细胞最易增殖及传代，心源、肺源细胞在第 9 代后出现增殖缓慢，第 12 代有大量细胞死亡的现象，不能达到传代所需细胞密度。在进行细胞传代培养操作时，应把握好时机。如果传代过早，细胞接种密度较低，从而导致细胞生存力减弱。这种现象可能与培养细胞之间机能上的相互依存或自泌性有关（王捷 2004）。而传代过晚，随着培养基中营养物质被逐渐耗尽，pH

会降低，可能导致代谢产物积累引起细胞中毒，包括形态上发生改变，甚至出现细胞汇合成片，从培养瓶底或皿底脱落死亡的情况，且还会因生长面积不足引起细胞接触抑制，导致细胞生长缓慢或停止（道日娜等 2013）。

三种体细胞生长曲线均呈“S”型，其中剑状软骨源细胞增殖最快、肺源细胞次之、心源细胞最慢。以上现象与贴壁率检测结果一致。细胞培养基的选择是体外细胞培养技术的关键。不同组织来源的细胞呈现出生长速度的差异，推测与我们使用的基础培养基有关，细胞培养基不仅是培养细胞中供给细胞营养和促使细胞生长、增殖的基础物质，也是培养细胞生长和增殖的生存环境。合适的培养基可维持渗透压和控制酸碱度的平衡（王秀卿等 2010），有利于细胞的快速生长和增殖，并能达到预期结果，反之则不然。本研究使用的是 MEM-alpha 基础培养液，该培养基适合于软骨源细胞培养，而其他两种细胞出现的传代困难现象，我们推测是本研究所使用的培养液不适合脏器源细胞的培养，更合适的培养液需进一步摸索。

### 3.3 豹猫 3 种体细胞冷冻存活率

细胞冻存是细胞保存的主要方法之一。利用冻存技术将细胞置于 -196 °C 液氮中低温保存，可以使细胞暂时脱离生长状态而将其细胞特性保存起来，这样在需要的时候再复苏细胞用于实验。而且适度地保存一定量的细胞，可以防止因正在培养的细胞被污染或其他意外事件而使细胞丢种，起到了细胞保种的作用。本研究中豹猫组织体细胞冻存时采用在胎牛血清（FBS）中加二甲基亚砷（DMSO），该冷冻保护剂可以使溶液冰点降低，采用程序降温盒在缓慢冷冻条件下，细胞内水分透出，减少了冰晶形成，从而避免细胞损伤。采用“慢冻快融”的方法能较好地保证细胞存活（Odriozola et al. 2000）。本实验采用 10%DMSO + 90% FBS 作为豹猫 3 种组织来源细胞冷冻保护剂，复苏后的细胞与冻存前相比，细胞存活率有所下降，表明细胞在冷冻、复苏过程中可能受到一定的

损伤。

### 3.4 豹猫体细胞染色体分析及染色体特征

本实验主要采用低渗滴片法(刁英 2004)制备染色体标本。为积累较多的中期细胞,并使染色体形态良好,秋水仙素的用量是制备染色体标本的关键。秋水仙素量过多,会导致染色体过分收缩、短粗甚至破碎。秋水仙素量不足,会使染色体中期分裂相过少(晁玉庆等 1992)。同时,还应控制适宜的低渗时间。低渗时间过长,则细胞破裂,看不到完整的分裂相。低渗时间不够,染色体铺展不好(晁玉庆等 1992)。另外,将载玻片提前泡入 4 ℃水中,滴片时确保载玻片上有一层水膜,也可提高分裂相的分散程度。

本研究建立了三种组织来源的豹猫成纤维细胞建系的技术及体细胞系,揭示了该动物成纤维细胞的基本生物学特性,为动物遗传信息研究及豹猫保护提供了重要的实验材料和基础信息。

### 参 考 文 献

- Andrews J C, Bavister B D, Howard J G et al. 1992. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopard cat (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona pellucida penetration assay. *Molecular Reproduction & Development*, 31(3): 200–207.
- Anta X L. 1992. Experimental infection to domestic cats with *Arthrostoma humanensis* Derived from the feces of Tsushima Leopard Cats (*Felis bengalensis euphilura*). *Japanese Journal of Parasitology*, 41(6): 498–504.
- Gao Y, Li M, Zhang X, et al. 2014. Isolation, culture and phenotypic characterization of human sweat gland epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(4): 997–1003.
- Kasperczyk K, Bajek A, Joachimiak R, et al. 2012. *In vitro* optimization of the *Gallus domesticus* oviduct epithelial cells culture. *Theriogenology*, 77(9): 1834–1845.
- Lawrenson K, Notaridou M, Lee N, et al. 2013. *In vitro* three-dimensional modeling of fallopian tube secretory epithelial cells. *BMC Cell Biology*, 14(1): 43–58.
- Macheiner T, Kuess A, Dye J, et al. 2014. A novel method for isolation of epithelial cells from ovine esophagus for tissue engineering. *Biomedical Materials and Engineering*, 24(2): 1457–1468.
- Marquez L B, Velazquez N, Repetto H A, et al. 2014. Effects of *Escherichia coli* subtilase cytotoxin and Shiga toxin 2 on primary cultures of human renal tubular epithelial cells. *PLoS One*, 9(1): e87022.
- Odrozola J, Ramos P, Villalon L, et al. 2000. An amplified scope of concentrations and Dimethyl Sulphoxide (DMSO) percentages for the cryopreservation of Peripheral Blood stem cells (PBSC). *Bone Marrow Transplantation*, 25(1): 253–261.
- Pukazhenthil B, Noiles E, Pelican K, et al. 2000. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. *Cryobiology*, 40(2): 139–150.
- Sato T, Clevers H. 2013. Primary mouse small intestinal epithelial cell cultures. *Methods in Molecular Biology*, 945(945): 319–328.
- Tatara M, Doi T. 1994. Comparative analyses on food habits of Japanese marten, Siberian weasel and leopard cat in the Tsushima islands, Japan. *Ecological Research*, 9(1): 99–107.
- Tominaga N, Nakahara T, Nasu M, et al. 2013. Isolation and characterization of epithelial and myogenic cells by “fishing” for the morphologically distinct cell types in rat primary periodontal ligament cultures. *Differentiation*, 85(3): 91–100.
- Vigne J D, Evin A, Cucchi T, et al. 2015. Earliest “Domestic” Cats in China Identified as Leopard Cat (*Prionailurus bengalensis*). *PLoS One*, 11(1): e0147295.
- Zhao Y, Zhao H, Zhang Y, et al. 2014. Isolation and epithelial co-culture of mouse renal peritubular endothelial cells. *BMC Cell Biology*, 15(1): 40–50.
- 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.
- 道日娜, 刘刚, 王蓉蓉, 等. 2013. 猞猁 3 类组织体外培养细胞的生物学特性分析. *中国畜牧兽医*, 40(6): 14–18.
- 刁英. 2004. 染色体核型研究的方法及应用. *渝西学院学报: 自然科学版*, 3(2): 55–58.
- 杜娟, 张生, 刘海军. 2011. 白唇鹿皮肤成纤维细胞的分离与培养. *上海畜牧兽医通讯*, 4(4): 43–43.
- 关伟军, 刘长青, 李林凤, 等. 2009. 东北虎与孟加拉虎群体细胞

- 库构建与体外培养技术平台的建立. 南充: 野生动物生态与资源保护全国学术研讨会, 15-17.
- 李煜, 邢万金, 李瑶, 等. 2007. 生物技术实验指导. 呼和浩特: 内蒙古大学出版社, 62-64.
- 李忠秋, 刘春龙, 马红, 等. 2013. 东北野猪耳皮成纤维细胞系的建立及生物学特征. 中国兽医学报, 33(3): 428-431.
- 刘刚, 道日娜, 王蓉蓉, 等. 2013. 毛脚葛细胞体外培养体系建立及三种组织来源细胞特性分析. 动物学研究, 34(3): 244-248.
- 刘韬, 赛务加甫, 彭新荣, 等. 2008. 天山马鹿皮肤细胞体外培养和凋亡. 长沙: 第二届中国生物产业大会, 56-57.
- 任芳丽, 李煜, 张涌. 2002. 牛皮肤成纤维细胞的体外培养与冻存. 黄牛杂志, 28(1): 8-10.
- 寿振黄. 1955. 中国毛皮兽的分布. 地理学报, (4): 405-421.
- 宋丹, 徐海燕. 2015. 上皮性原代细胞培养的研究进展. 医学信息, 28(44): 442-443.
- 汪松. 1998. 中国濒危动物红皮书: 兽类. 北京: 科学出版社, 128-130.
- 王爱虹, 韩红梅, 刘永斌, 等. 2013. 阿巴嘎黑马染色体核型及 G 带分析. 华北农学报, 28(4): 69-74.
- 王捷. 2004. 动物细胞培养技术与应用. 北京: 化学工业出版社, 1-9.
- 王培潮, 钱国桢, 盛和林, 等. 1977. 貉与豹猫的冬季食性. 动物学杂志, (2): 45-37.
- 王秀卿, 勾凌燕, 王志玲, 等. 2010. 细胞体外培养工作中存在的问题及预防. 临床合理用药, 3(8): 80.
- 张步舫, 李凤民, 黄高宝. 2006. 生物多样性对生态系统功能及其稳定性的影响. 中国生态农学报, (04):12-15.
- 张忠, 杨德斌, 章培军, 等. 2001. 浅谈神经细胞的培养技术. 大同医学专科学校学报, 22(3): 19-20.