

中华鼯鼠成纤维细胞长期培养及其生物学特性分析

穆瑶^① 李慧鹏^① 杨济洲^① 李云霞^{①②} 曹贵方^{②③}
包斯琴^① 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有限公司 呼和浩特 011517; ③ 内蒙古农业大学生命科学学院 呼和浩特 010018

摘要: 中华鼯鼠 (*Eospalax fontanierii*) 为蒙古高原代表性动物遗传资源, 本研究采集中华鼯鼠心、肝、脾、肺、肾、肌肉、气管、剑状软骨和尾尖皮肤共 9 种组织用于实验, 其中气管、肺和剑状软骨 3 种组织成功建立成纤维细胞系, 传了 8 代, 并分析了这些细胞的生物学特性。主要实验方法是通过细胞计数法计算细胞的贴壁率、冻存前及复苏后的存活率、绘制细胞生长曲线; 制备常规染色体标本分析染色体核型。实验结果显示, 中华鼯鼠气管、肺、软骨 3 种组织在体外条件下培养, 第 3~4 天出现成纤维样细胞, 原代细胞分别在培养第 11 天、第 16 天、第 17 天, 达到 90% 以上汇合。3 种组织来源体细胞均显示成纤维细胞特征, 气管成纤维细胞贴壁能力最强, 24 h 贴壁率最高能达到 98.10%, 肺成纤维细胞与剑状软骨成纤维细胞贴壁能力较弱, 24 h 贴壁率最高, 分别为 95.28% 和 94.88%。3 种来源成纤维细胞生长曲线测定结果显示, 气管成纤维细胞的增殖能力最强、肺成纤维细胞次之、剑状软骨成纤维细胞最弱。气管成纤维细胞和肺成纤维细胞在接种后的第 6~7 天, 进入对数生长期。剑状软骨成纤维细胞在接种后第 2~3 天进入对数生长期。3 种成纤维细胞的生长曲线均呈“S”型, 其中气管成纤维细胞增殖能力最强, 在 24 孔板的每个孔中, 其最大增殖数目为 2.435×10^4 个, 肺成纤维细胞最大增殖数目为 1.813×10^4 个, 剑状软骨成纤维细胞最大增殖数目为 1.521×10^4 个。核型分析结果显示, 中华鼯鼠的成纤维细胞染色体数目为 $2n = 62$, 30 对为常染色体, 1 对为性染色体。综上所述, 本研究成功建立了中华鼯鼠成纤维细胞体外培养体系, 并揭示了该物种成纤维细胞的基本生物学特性, 为深入研究中华鼯鼠适应低氧高二氧化碳洞道生境的分子生物学和生理学机制提供了条件, 为进一步研究其遗传及物种进化提供了实验材料和参考。

关键词: 中华鼯鼠; 成纤维细胞; 细胞生长曲线; 核型

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 03-395-09

Establishment of Long-term Culture System for Fibroblast Cells of Chinese Zokor and Analysis of Their Biological Characteristics

MU Yao^① LI Hui-Peng^① YANG Ji-Zhou^① LI Yun-Xia^{①②}

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31560335);

* 通讯作者, E-mail: lixh@life.imu.edu.cn;

第一作者简介 穆瑶, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: 7843237711@qq.com。

收稿日期: 2018-10-25, 修回日期: 2019-02-19 DOI: 10.13859/j.cjz.201903009

CAO Gui-Fang^{②③} BAO Siqin^① 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 Animals, Hohhot 011517;*^③ *Inner Mongolia Agricultural University College of Life Science, Huhhot 010018, China*

Abstract: At present there is no research on the establishment of Chinese zokor's (*Eospalax fontanierii*) fibroblast cell lines and their biological characteristics. In this study, we selected 9 kinds of the tissues of Chinese Zokor, a representative animal genetic resource in the Mongolian Plateau, for the experiment. Fibroblast cell lines were successfully established from three tissues, including trachea, lung and xiphoid cartilage, and their biological characteristics were analyzed. The attachment rate and survival rate of the cells were calculated before cryopreservation and after resuscitation, and their chromosome karyotypes were analyzed. The fibroblast-like cells derived from primary culture of trachea, lung and xiphoid cartilage tissues were found in the third or fourth day of culture, and there was more than 90% confluence of adherent cells on the 11th, 16th and 17th day of culture, respectively. The morphology of these three kinds of somatic cells showed fibroblast characteristics (Fig. 1 - 4). The attachment ability of the trachea fibroblast cells was the greatest, and the attachment rate was 98.10% when cultured for 24 h, and the attachment ability of the lung fibroblast cells and xiphoid cartilage fibroblast cells were 95.28% and 94.88% respectively (Fig. 5 - 7). The analysis of the growth curve of fibroblast cells from three sources showed that the proliferative capacity of tracheal fibroblast cells was the best, the pulmonary fibroblast cells were the second and the xiphoid chondro fibroblast cells were the weakest. Tracheal fibroblast cells and pulmonary fibroblast cells entered the logarithmic growth stage (Fig. 8, Fig. 9) on the 6th to 7th day after inoculation. Xiphoid chondro fibroblast cells entered the logarithmic growth stage on day 2 - 3 (Fig. 10). The survival rate of cryopreserved fibroblasts from three different tissue sources decreased significantly. The growth curves of three fibroblasts are all in an "S" type. The multiplication capacity of the trachea fibroblast cells was the strongest, and the maximum proliferation number was 2.435×10^4 per well of a 24-well plate; the maximum proliferation numbers of lung fibroblast cells and xiphoid cartilage fibroblast cells were 1.813×10^4 and 1.521×10^4 , respectively. The results of karyotype analysis showed that the chromosome number of fibroblast was $2n = 62$ in Chinese Zokor (Fig. 11). To sum up, this study successfully established the fibroblast cells lines from Chinese zokor. The basic biological characteristics of fibroblast cells in this species were revealed, which provided basis for further studying molecular biology and physiological mechanism of Chinese zokor to adapt to the low oxygen and high carbon dioxide tunnel habitat, and provided important experimental materials and references for the further study of its heredity and species evolution.

Key words: Chinese Zokor, *Eospalax fontanierii*; Fibroblast cells; Cell growth curve; Karyotype

内蒙古地区地域广阔, 物种丰富, 野生动物资源种类繁多(白力军 1989)。近些年, 对动物遗传资源多样性的保护工作在不断进行。在生物多样性中, 最为基础和重要的环节就是遗传多样性(胡志昂等 1998), 因此, 遗传

资源的保护与收集工作无论对于濒危物种, 还是对于非濒危物种来说都十分必要。中华鼯鼠(*Eospalax fontanierii*)主要分布在内蒙古、河北、北京、山东、山西、河南、陕西、宁夏、甘肃、青海和四川(蒋志刚等 2015)。本文以

中华鼯鼠的气管、肺和软骨组织为材料, 采用组织块贴壁培养法, 通过原代培养、传代培养以及细胞冻存等技术, 分离中华鼯鼠这 3 种组织细胞, 初步建立了其体外培养方法, 并分析了这 3 种组织来源细胞的形态、生长速度、贴壁率、存活率及核型, 为今后中华鼯鼠细胞的利用及遗传资源信息的保存提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雌性中华鼯鼠 1 只, 来源于内蒙古呼和浩特市和林格尔县。活体状态下带回实验室, 处死后, 用 75% 的酒精 (山东利尔康消毒科技有限公司) 消毒, 采集其肺、气管、剑状软骨组织, 浸泡在无菌的生理盐水 (浙江京新药业股份有限公司) 中, 在超净工作台 (上海智城分析仪器制造有限公司) 内进行接种培养。

1.2 实验方法

1.2.1 中华鼯鼠 3 种组织的原代培养 无菌操作取出气管、肺、剑状软骨组织, 在 75% 酒精中浸泡 3 ~ 4 s, PBS (Gibco by life technologies, cat. no. 14190-144) 冲洗 3 次; 用眼科剪将组织剪成约 0.5 ~ 1.0 mm³ 的小块, 将其均匀铺在 T25 (Corning Incorporated-lif Sciences, cat. no. 430599) 培养瓶中, 加入 8 ml MEM-alpha (Gibco by life technologies, cat. no. 12561-056) 完全培养液后, 倒置放入 36 °C 的 5% CO₂ 培养箱 (Thermo-Forma 311) 中培养。

1.2.2 成纤维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, 除了成纤维细胞还有上皮细胞, 经过几次传代后可以成纤维细胞得到纯化。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 by life technologies, cat. no. 25200-056) 消化 3 min, 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 Incorporated-lif Sciences, cat. no. 3516), 放到 36 °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或培养液变黄, 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 成纤维细胞的冷冻保存 培养的细胞生长状态较好时, 为了便于细胞资源的保存和运输, 需要对细胞进行冻存处理。细胞应保存在液氮中, 其新陈代谢在液氮的温度下会受到抑制, 从而降低老化速度。在细胞冻存时通常使用二甲亚砜 (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。本实验所采用细胞冻存液的配方为 DMSO 与胎牛血清 (BI, cat. no.04-001-1ACS) 按 1 : 9 的体积比混合。将培养细胞上清液弃掉, 用磷酸盐缓冲液 DPBS (Gibco by life technologies, cat. no. 4190-144) 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 3 ~ 4 min 后加入 2 ml 培养液终止消化, 轻轻吹打后收集细胞, 1 500 r/min 离心 5 min。用提前配制好的细胞冻存液重悬离心细胞, 并将细胞调整到冷冻要求浓度 2×10^2 个/L, 按照每管 0.5 ml 分装, 并标记物种、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。过夜后将细胞转入液氮中保存。

1.2.4 成纤维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 使冰晶全部融化, 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。细胞冷冻处理前检测存活率, 先取 50 μ l 细胞悬液计数细胞总数, 重复 3 次; 另取 40 μ l 细胞悬液加入 10 μ l 台盼蓝染液, 静置 3 min 后计数死细胞数, 重复 3 次。细胞冷冻处理后检测存活率, 将 100 μ l 细胞悬液加入 25 μ l 台盼蓝

染液, 静置 3 min 后计数死细胞数, 重复 3 次。本实验取每代 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。细胞存活率 = $[(\text{细胞总数} - \text{死细胞数}) / \text{细胞总数}] \times 100\%$ 。

1.2.5 成纤维细胞的贴壁率测定 分别选取每代细胞以一定浓度接种至 6 孔板中, 放入 36 °C 的 5% CO₂ 培养箱中, 之后每间隔 6 h、12 h、24 h 分别从 3 孔中吸取 50 μl 的上清液计数细胞数量, 每孔细胞计数 3 次。计算 3 个时间段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 = $[(\text{接种细胞数} - \text{上清细胞数}) / \text{接种细胞数}] \times 100\%$ 。

1.2.6 成纤维细胞的生长曲线绘制 分别选取每代细胞数量为 2.4×10^5 个且生长状态旺盛的气管、肺、成纤维细胞, 采用细胞传代的方法, 将 3 种细胞分别以 1×10^4 个/孔的密度接种到 24 孔板 (Corning, 3524) 的每个孔中, 放入 36 °C 5% CO₂ 培养箱中, 每间隔 24 h 选择 3 孔细胞, 胰蛋白酶消化收集细胞, 离心弃旧液, 新的培养液重悬细胞, 分别吸取 100 μl 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、标准差, 然后绘制 3 种细胞生长曲线图。

1.2.7 成纤维细胞核型分析 选取生长密度约为 80% ~ 90% 的体细胞, 在培养液中添加 20 mg/L 秋水仙素 (BI, cat. no. 12-004-1D), 培

养 2 h 50 min 后, 胰蛋白酶 1 消化收集细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液。在细胞沉淀中加入 8 ml 38 °C 预热的 0.075 mol/L KCl 低渗液, 用吸管吹打均匀。置于 38 °C 恒温水浴箱中低渗处理 55 ~ 60 min, 低渗结束前 1 min, 缓缓加入 1 ml 提前放入 -20 °C 冰箱预冷的新鲜甲醇/冰醋酸固定液 (体积比为 3 : 1 的混合液), 用吸管轻轻吹打均匀, 预固定 1 min 后 1 000 r/min 离心 10 min, 小心弃上清; 向离心所得的沉淀中缓慢加入 8 ml 固定液, 轻轻吹打细胞使其重悬, 置 38 °C 恒温水浴箱中固定 30 min, 然后 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 固定重复 3 次; 然后距载玻片 1.5 m 以上缓慢滴片, 放入 70 °C 烘箱中干燥 1 h; Giemsa 染液处理 10 ~ 15 min, 用水缓慢冲洗。最后在遗传分析工作站 (Nikon ECLJPSE 50i) 下观察中华鼯鼠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。

2 结果

2.1 中华鼯鼠 3 种组织成纤维细胞原代培养形态观察

中华鼯鼠气管组织块在培养 3 d 时出现纤维样细胞, 在 11 ~ 12 d 铺满培养瓶 (图 1a)。肺组织块在培养 4 d 时出现纤维样细胞, 在 15 ~ 16 d 铺满培养瓶 (图 1b)。剑状软骨组织在培养 4 d 时出现纤维样细胞, 在 17 d 铺满培养瓶

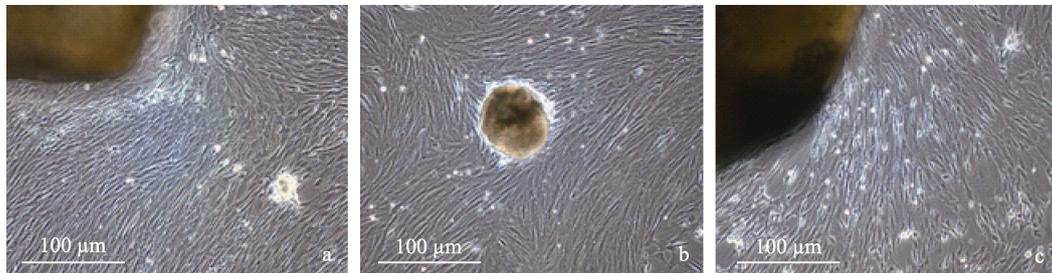


图 1 中华鼯鼠组织原代细胞的培养

Fig. 1 Chinese zokor tissue of primary cell culture

a. 气管源细胞原代; b. 肺源细胞原代; c. 剑状软骨源细胞原代。

a. Source of trachea cells; b. Source of lung cells; c. Source of xiphoid cartilage cells.

(图 1c)。在显微镜下观察 3 种成纤维细胞均呈长梭形或纺锤形，成群的细胞呈旋涡状，螺旋状走向。

2.2 中华鼯鼠 3 种组织成纤维细胞传代培养形态观察

整体来看，3 种成纤维细胞在 P3 时细胞形

态立体感较强，随着传代次数的增加，细胞逐渐趋于平面感生长，立体感较弱，单个细胞呈扁平发散状(图 2~4)。气管成纤维细胞贴壁时形态呈不规则三角形或多角形；肺成纤维细胞整体呈长梭形；剑状软骨成纤维细胞呈尖端向外发散的多角状、放射状形态，在 P7 时生

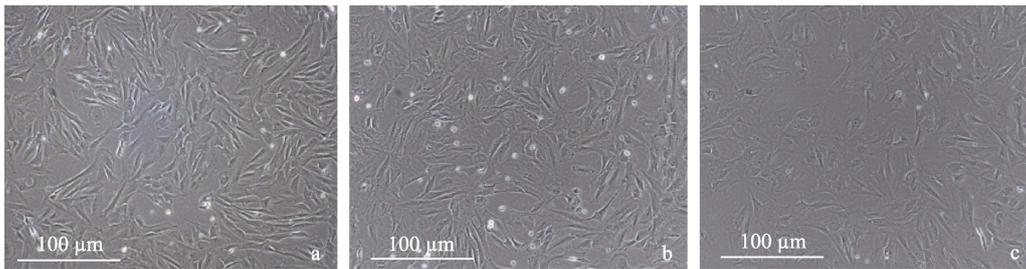


图 2 气管成纤维细胞 P3、P5、P7 形态

Fig. 2 Trachea fibroblast cell types of P3, P5, P7

a. 气管成纤维细胞 3 代; b. 气管成纤维细胞 5 代; c. 气管成纤维细胞 7 代。
a. Trachea fibroblast cells in P3; b. Trachea fibroblast cells in P5; c. Trachea fibroblast cells in P7.

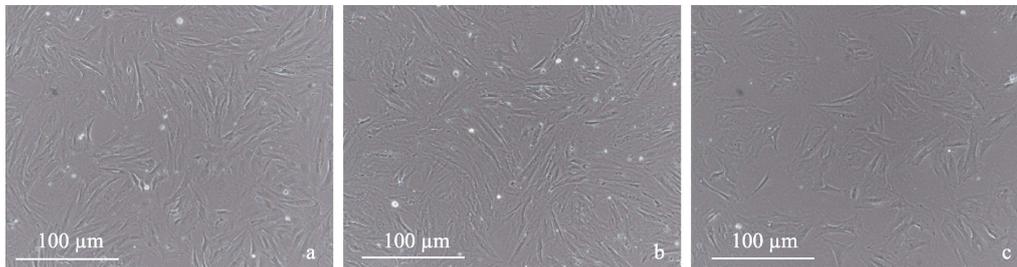


图 3 肺成纤维细胞 P3、P5、P7 形态

Fig. 3 Lung fibroblast cell types of P3, P5, P7

a. 肺成纤维细胞 3 代; b. 肺成纤维细胞 5 代; c. 肺成纤维细胞 7 代。
a. Lung fibroblast cells in P3; b. Lung fibroblast cells in P5; c. Lung fibroblast cells in P7.

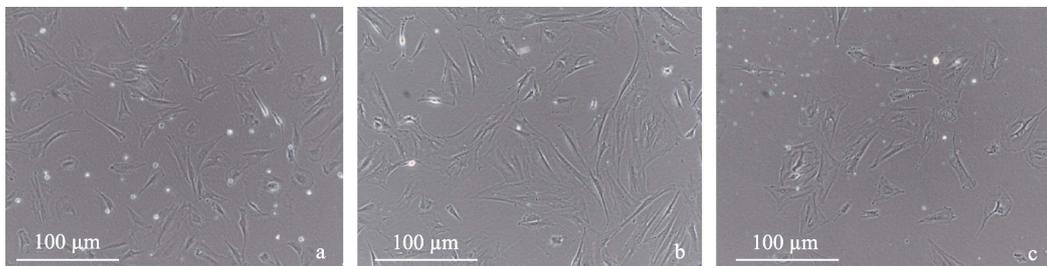


图 4 剑状软骨成纤维细胞 P3、P5、P7 形态

Fig. 4 Xiphoid cartilage fibroblast cell types of P3, P5, P7

a. 剑状软骨成纤维细胞 3 代; b. 剑状软骨成纤维细胞 5 代; c. 剑状软骨成纤维细胞 7 代。
a. Xiphoid cartilage fibroblast cells in P3; b. Xiphoid cartilage fibroblast cells in P5; c. Xiphoid cartilage fibroblast cells in P7.

长速度缓慢, 不能达到传代所需的密度(图 4)。

2.3 中华鼯鼠 3 种组织成纤维细胞不同代次、不同时间的贴壁率对比

3 种来源成纤维细胞贴壁率统计结果显示, 气管成纤维细胞最易贴壁、肺成纤维细胞次之、剑状软骨成纤维细胞最弱(图 5~7)。

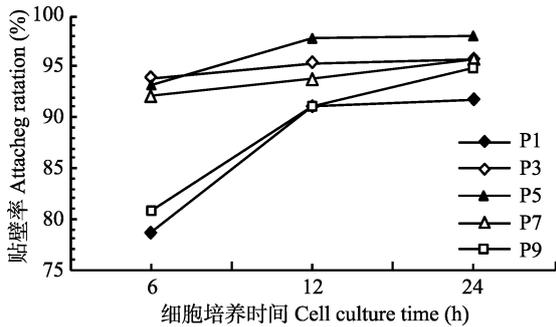


图 5 气管成纤维细胞不同代次、不同时间的贴壁率
Fig. 5 The line chart comparison of the attached ration of trachea fibroblast cells in different generations and culture times

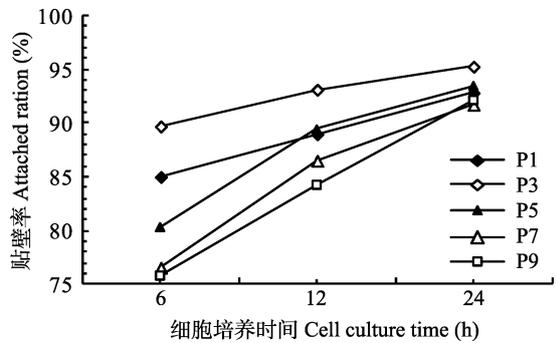


图 6 肺成纤维细胞不同代次、不同时间的贴壁率
Fig. 6 The line chart comparison of the attached ration of lung fibroblast cells in different generations and culture times

2.4 中华鼯鼠 3 种组织成纤维细胞生长曲线

3 种来源成纤维细胞生长曲线测定结果显示, 气管成纤维细胞的增殖能力最强、肺成纤维细胞次之、剑状软骨成纤维细胞最弱。气管成纤维细胞和肺成纤维细胞在接种后的第 6~7 天, 进入对数生长期(图 8, 9)。剑状软骨成纤维细胞在第 2~3 天进入对数生长期(图 10)。

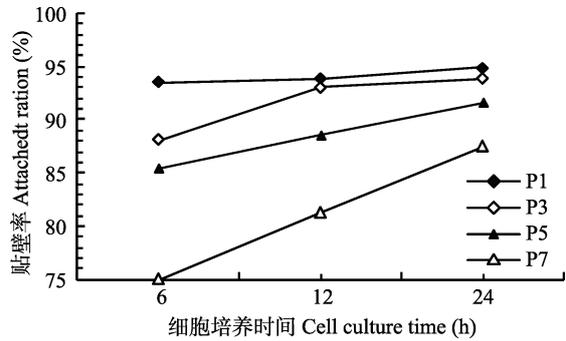


图 7 剑状软骨成纤维细胞不同代次、不同时间的贴壁率
Fig. 7 The line chart comparison of the attached ration of xiphoid cartilage fibroblasts in different generations and culture times

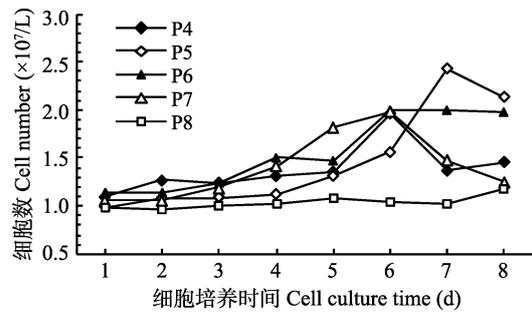


图 8 气管成纤维细胞不同代次生长曲线
Fig. 8 The growth curves comparison of trachea fibroblast cells in different generations

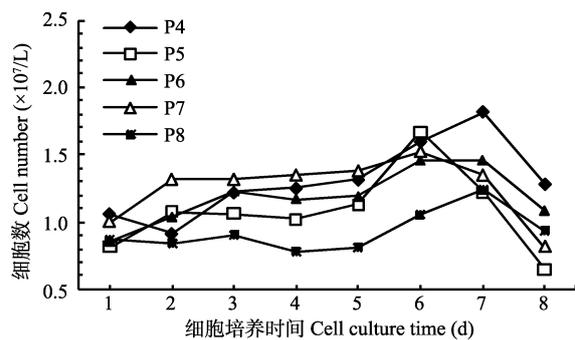


图 9 肺成纤维细胞不同代次生长曲线
Fig. 9 The growth curves comparison of lung fibroblast cells in different generations

2.5 中华鼯鼠 3 种组织成纤维细胞冻存前、复苏后的存活率对比

3 种不同来源成纤维细胞复苏后存活率,

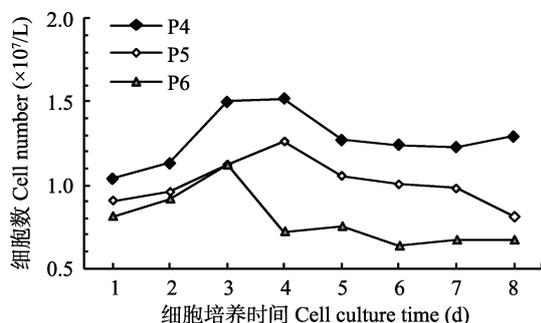


图 10 剑状软骨成纤维细胞不同代次生长曲线

Fig. 10 The growth curves comparison of xiphoid cartilage fibroblast cells in different generations

较冻存前存活率均显著下降, 且细胞传代次数越高存活率越低, 气管成纤维细胞 P4 ~ P8 存活率, 冻存前 98.92% ~ 93.20%, 复苏后 91.57% ~ 73.25%, $P < 0.05$; 肺成纤维细胞 P4 ~ P8 存活率, 冻存前 98.45% ~ 89.33%, 复苏后 89.97% ~ 70.21%, $P < 0.05$; 剑状软骨成纤维细胞 P4 ~ P6 存活率, 冻存前 98.52% ~ 82.91%, 复苏后 88.23% ~ 69.06%, $P < 0.05$ (表 1)。

2.6 中华鼯鼠细胞染色体核型

选择能够稳定传代培养的第 6 代气管源细

胞制备染色体标本, 获得多组染色体分裂相, 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。统计结果显示, 本实验体外培养的中华鼯鼠细胞染色体条数 $2n = 62$, 30 对为常染色体, 1 对为性染色体 (图 11)。本实验所选取统计的中华鼯鼠 50 个中期染色体分裂细胞中有 45 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中华鼯鼠细胞系遗传特性相对稳定。

3 讨论

3.1 中华鼯鼠成纤维细胞建系关键技术

在原代培养的几次实验中发现, 铺板时组织块的大小是影响原代成纤维细胞能否长出的一个重要因素。组织块太大, 会使其不易贴壁, 在挪动培养瓶的过程中容易掉落。因此在处理组织块的过程中, 要尽量将组织块剪到小于 1 mm^3 , 铺板时组织块间隔约 0.5 cm (Jenkins 1999), 这样有利于组织块贴壁和原代成纤维细胞的汇合。剪碎的组织块要用 DPBS 多次冲洗, 去除组织块中残留的组织液, 例如肺组织块中有大量血管, 如不将其中的血液和组织液

表 1 中华鼯鼠 3 种组织来源细胞冷冻存活率对比

Table 1 The comparison of the frozen survival rate of fibroblast cells from three tissues of the Chinese Zokor

细胞类型 Cell type	细胞传代数 Cell passages	冻存前 Cryopreservation before (%)	复苏后 Post-resuscitation (%)
气管成纤维细胞 Trachea fibroblast cells	4 代	98.11 ± 0.87 ^a	89.79 ± 1.00 ^a
	5 代	98.92 ± 0.30 ^a	91.57 ± 2.68 ^a
	6 代	94.11 ± 0.91 ^b	84.94 ± 0.87 ^b
	7 代	94.44 ± 1.32 ^b	74.38 ± 4.10 ^c
	8 代	93.20 ± 1.35 ^b	73.25 ± 1.78 ^c
肺成纤维细胞 Lung fibroblast cells	4 代	98.45 ± 1.60 ^a	87.23 ± 0.76 ^b
	5 代	98.37 ± 1.02 ^a	89.97 ± 0.75 ^a
	6 代	93.57 ± 0.69 ^c	81.94 ± 0.92 ^c
	7 代	91.51 ± 0.36 ^d	79.77 ± 1.18 ^c
	8 代	89.33 ± 1.34 ^d	70.21 ± 0.33 ^d
剑状软骨成纤维细胞 Xiphoid cartilage fibroblast cells	4 代	98.52 ± 0.70 ^a	88.23 ± 0.63 ^a
	5 代	96.87 ± 0.67 ^b	86.53 ± 0.60 ^b
	6 代	82.91 ± 1.07 ^c	69.06 ± 2.01 ^c

每组重复 3 次。同列中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

$n = 3$; Letters in the same column denote level of significance at $P < 0.05$.

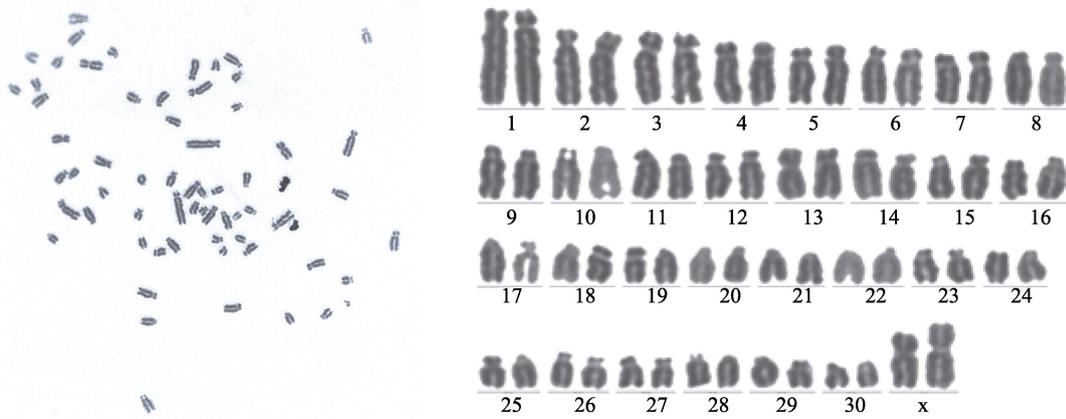


图 11 中华鼯鼠第 6 代气管细胞的染色体中期分裂相 (左) 和核型 (右)

Fig. 11 The metaphase phase chromosomes (left) and karyotype (right) of P6 trachea fibroblast cells from Chinese Zokor

洗净, 则不利于后续原代成纤维细胞的长出。摆放组织块时不可携带过多液体, 若液体过多, 可进行离心, 弃掉上清。铺板后, 在没有组织块的瓶壁一侧缓慢添加培养液, 不可以冲起组织块, 然后竖直置于培养箱中放置 6 h, 待组织块贴壁后再放平培养瓶, 使培养液浸没组织块。中华鼯鼠成纤维细胞对生长温度要求较高。在前期预实验的摸索中发现, 3 种组织成纤维细胞在按照中华鼯鼠的平均体温 34.7 °C (王祖望等 1979) 设置的培养箱中生长速度过于缓慢, 而在一般哺乳动物适合的 37 ~ 38 °C 条件下的生长状况也不理想, 最终本实验将培养温度设置为 36 °C。

3.2 中华鼯鼠 3 种组织来源成纤维细胞贴壁率和细胞生长曲线分析

从 3 种组织细胞体外培养的 P1 代开始, 便对其进行隔代次的贴壁率测定, 直至其不能传代, 用于分析细胞生长活力及细胞纯化情况。结果显示, 气管成纤维细胞和肺成纤维细胞在 P1 时均出现了 6 h 和 12 h 贴壁率较低的情况, 说明 P1 的成纤维细胞系含有其他不易贴壁的细胞, 不能够在 6 h 内全部完成贴壁。气管成纤维细胞的贴壁能力最强, P3 ~ P7 代的 24 h

贴壁率均在 95% 以上。肺成纤维细胞的贴壁能力较弱, 仅 P3 的 24 h 贴壁率在 95% 以上。剑状软骨成纤维细胞的贴壁能力最弱, P1 的 24 h 贴壁率最高, 为 94.88%。并且 P1 细胞的 6 h、12 h 和 24 h 的贴壁率均在 90% 以上, 说明其原代建系时长出的成纤维细胞纯度较高, 均为易于贴壁的成纤维细胞。总体来看, 3 种组织源细胞的贴壁能力均随着传代次数的增加而减弱。对 3 种组织成纤维细胞进行生长曲线测定, 发现其体外继代生长速度趋缓, 最大增殖细胞数量为 2.5×10^4 个。成钢等 (2012) 对东方田鼠 (*Microtus fortis*) 皮肤成纤维细胞进行了原代分离建系培养, 并分析了其生物学特性, 发现东方田鼠的皮肤成纤维细胞仅能在体外传代 2 ~ 3 次, 最大增殖细胞数量约为 1.5×10^4 个, 并且使用不同培养基培养对其增殖速度的影响并无显著差异。季索菲等 (2011) 建立的安庆六白猪 (*Sus domestica*) 和梅山猪成纤维细胞系在对数期的最大增殖数量约为 4.5×10^4 个, 韦云芳等 (2014) 培养的昆明犬 (*Canis lupus familiaris*) 胎儿成纤维细胞在对数期的最大增殖数量约为 100×10^4 个, 王艳萍等 (2017) 培养的驴 (*Equus asinus*) 皮成纤维细胞在对数期

最大增殖数量约为 70×10^4 个。说明不同种类动物的原代细胞培养生长增殖能力有较大差异, 这与原代培养方法, 取材动物年龄, 取材部位, 培养条件等都有一定关系。

3.3 中华鼯鼠 3 种组织来源成纤维细胞冷冻存活率分析

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 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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(刘建等 2018)。本研究中中华鼯鼠组织体细胞冻存时采用在胎牛血清(FBS)中加二甲基亚砜(DMSO)的冷冻保护剂, 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)。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。

本研究成功建立了中华鼯鼠成纤维细胞建系技术及体细胞系, 并揭示了该物种成纤维细胞的基本生物学特性, 对深入研究中华鼯鼠适应低氧高二氧化碳洞道生境的分子生物学和生理学机制提供了很好的条件, 为进一步研究其遗传及物种进化提供了重要的实验材料和参考依据。

参 考 文 献

- Jenkins N. 1999. *Animal Cell Biotechnology Methods and Protocols*. New Jersey: Humanna Press Inc, 132–138.
- Odriozola 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.
- 白力军. 1989. 内蒙古野生动物资源及其分布. *内蒙古林业*, 1(9): 22–23.
- 成钢, 王文彬, 王京仁, 等. 2012. 东方田鼠皮肤成纤维细胞的分离培养及生物学特性. *中国实验动物学报*, 20(3): 78–80.
- 胡志昂, 王洪新. 1998. 遗传多样性的定义、研究新进展和新概念 // 中国科学院生物多样性委员会. 生物多样性与人类未来——第二届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集. 北京: 中国林业出版社.
- 季索菲, 包文斌, 曹鸿国, 等. 2011. 安庆六白猪和梅山猪成纤维细胞体外培养与生物学特性. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 32(3): 24–29.
- 蒋志刚, 马勇, 吴毅, 等. 2015. *中国哺乳动物多样性及地理分布*. 北京: 科学出版社.
- 刘建, 徐晓荣, 李云霞, 等. 2018. 豹猫体细胞建系及其生物学特性分析. *动物学杂志*, 53(3): 427–438.
- 王祖望, 曾缙祥, 韩永才, 等. 1979. 高原鼠兔和中华鼯鼠气体代谢的研究. *动物学报*, 25(1): 75–85.
- 韦云芳, 万九生, 李静, 等. 2014. 昆明犬胎儿成纤维细胞系的建立及生物学特性分析. *中国畜牧兽医*, 41(12): 161–166.
- 王艳萍, 高帅, 刘迥, 等. 2017. 驴皮成纤维细胞的体外培养研究. *中国畜牧兽医*, 44(8): 2255–2260.