

乌珠穆沁白马成纤维细胞建系 及其生物学特性分析

郝晓丽^② 李云霞^{②#} 王茂俊^② 李超尧^① 王治任^①

宋永利^① 包斯琴^① 曹贵方^{②③} 李喜和^{①②*}

① 内蒙古大学生命科学学院蒙古高原动物遗传资源研究中心 呼和浩特 010020;

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; ③ 内蒙古农业大学兽医学院 呼和浩特 010018

摘要: 本研究以内蒙古乌珠穆沁白马 (*Equus caballus*) 雄性和雌性为实验材料, 利用组织块贴壁培养法进行耳组织成纤维细胞原代建系, 研究耳组织来源的细胞贴壁率、冷冻前及复苏后存活率、生长曲线, 进一步绘制乌珠穆沁白马成纤维细胞核型图。实验结果显示, 雌、雄乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞经组织贴壁法建系培养, 生长为典型的成纤维细胞形态, 并呈现“S”型生长曲线特征; 细胞冷冻前后存活率存在显著差异, 但仍具有较好的耐受冷冻性; 根据染色体核型分析, 雌、雄乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞染色体条数为 $2n = 64$, 其中 31 对常染色体, 1 对性染色体。本研究成功建立了雌、雄乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞系, 并且得到可稳定培养、具有良好遗传学特性的细胞系, 为后续的相关深入研究奠定了基础。

关键词: 乌珠穆沁白马; 成纤维细胞; 冷冻前及复苏后存活率; 生长曲线; 核型

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 06-898-10

Establishment of Ujimchin White Horse Fibroblast *in Vitro* and Analysis of Biological Characteristics

HAO Xiao-Li^② LI Yun-Xia^{②#} WANG Mao-Jun^② LI Chao-Yao^① WANG Zhi-Ren^①
SONG Yong-Li^① BAO Si-Qin^① CAO Gui-Fang^{②③} LI Xi-He^{①②*}

① Research Center for Animal Genetic Resources of Mongolia Plateau, College of Life Science, Inner Mongolia University, Huhhot 010020;

② Inner Mongolia Saikexing Institute of Breeding and Reproductive Biotechnology in Domestic Animal, Hohhot 011517;

③ College of Veterinary Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China

Abstract: [Objective] The present study aims to provide a basis for in-depth study of the biological

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32060176), 内蒙古自治区科技重大专项 (No. 2020ZD0007), “科技兴蒙”重点专项 (No. 2020-科技兴蒙-国创中心-12);

* 通讯作者, E-mail: lihx@imu.edu.cn;

第一作者介绍 郝晓丽, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: haoxiaoli_imau@163.com;

共同第一作者 李云霞, 女, 博士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: liyunxia831130@163.com.

收稿日期: 2022-12-17, 修回日期: 2023-05-25 DOI: 10.13859/j.cjz.202322323

characteristics of White Horse (*Equus caballus*) and the establishment of species resource. [Methods] In this study, using the male and female Ujimchin White Horse in Inner Mongolia as experimental materials, the primary lineage of ear tissue fibroblasts was established by tissue block adherent culture method, the cell adherent rate, survival rate and growth curve of ear tissue source were studied, and the karyotype map of Ujimchin White Horse was further generated. Data results are expressed as Mean \pm SD, Excel was used for data collation and analysis, and all graphs were drawn using GraphPad Prism 5. [Results] The results showed that female and male ear tissues of Ujimchin White Horse fibroblasts were cultured by tissue adhesion and grew into a typical fibroblast morphology, and showed the growth characteristics of "S". There was significant difference in cell survival rate before and after cell freezing (Fig. 5), but the cells still show good resistance to freezing. According to the karyotyping analysis, the number of chromosome strips of female and male Ujimchin White Horse hair tissue fibroblasts is $2n = 64$, of which 31 pairs of autosomes and 1 pair are sex chromosomes. [Conclusion] In this study, the fibroblast cell lines of female and male Ujimchin White Horse hair tissues were successfully established, and the cell lines with good genetic characteristics were obtained and stably cultured, which laid the foundation for subsequent in-depth research.

Key words: Ujimchin White Horse, *Equus caballus*; Fibroblast; Survival rates before freezing and after resuscitation; Growth curve; Karyotype

乌珠穆沁白马 (*Equus caballus*), 蒙古名为乌珠穆沁查干阿都, 是蒙古马中的优良品系, 主要繁殖于内蒙古锡林郭勒盟西乌珠穆沁旗草原上。西乌珠穆沁草原是具有代表性的中国温带典型草原, 总面积 22 960 km², 是唯一汇集内蒙古九大类型草原的地区, 也是中国北方草原最华丽、最壮美的地段, 素有“天堂草原”之称。

我国对于乌珠穆沁白马的研究主要对不同年龄段的体高、体长、体重等体尺性状和非遗传因素、毛色特征、肉品质三方面进行了研究 (敖敏 2019)。除此之外, 对乌珠穆沁白马马肉的营养成分测定和奶制品的营养成分的测定、分析以及与其他品种的比较分析 (旭仁其木格 2018, 赵雪妮 2021)。目前大量的马种资源处于数量下降、濒危或濒临灭绝状态, 同时, 目前是马种资源的保种和向非役用转型的关键时期 (韩国才 2014), 而细胞建系是物种遗传资源保护的重要途径, 可为未来深入研究奠定基础。

本研究利用乌珠穆沁白马雄性和雌性耳组织成纤维细胞体外培养建立乌珠穆沁白马体细胞系, 在此基础上对建成的体细胞系进行形态、

贴壁率、冻存率、生长速度、核型等生物学特性分析, 为其保护和开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

取雌 (32# 耳号 14798) 和雄 (18# 耳号 14250) 各一匹乌珠穆沁白马的耳部组织 (材料采集是在不影响动物个体健康状况的情况下进行的, 符合动物伦理) 用 75% 的酒精消毒, 装入含有青霉素-链霉素双抗的无菌生理盐水的 50 ml 离心管内, 带回实验室。再用 75% 的酒精再次消毒组织块, 然后浸泡在无菌生理盐水中用 PBS 清洗 3 次, 按照组织贴壁培养方法进行无菌接种培养 (刘建等 2018)。

1.2 实验方法

1.2.1 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞原代培养及传代纯化培养 将生理盐水中保存的乌珠穆沁白马耳组织块置于 30 mm 培养皿中用 75% 的酒精中浸泡 30 s, 再用 DPBS 缓冲液清洗 5 次。在 30 mm 培养皿中用眼科镊夹住组织块, 将其剪成 0.5 ~ 1 mm³ 的小组织块, 然后均匀地铺在 T25 培养瓶 (康宁) 中, 倒置培养

瓶并加入含有 1%青霉素-链霉素双抗和 10%特级胎牛血清 (foetal bovine serum, FBS) 的 MEM-Alpha 培养液 (gibco 赛默飞) 5 ml, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 6 ~ 8 h 后缓慢将 T25 培养瓶翻转进行原代建系培养 (穆瑶等 2019)。

当细胞培养 3 ~ 4 d 后, 培养液变黄时需要更换新的培养液继续培养。当原代细胞培养生长至汇合度大于 80% 时, 弃掉培养液, 加入 2 ml DPBS 轻轻晃动培养瓶冲洗细胞后弃掉废液, 再加入 2 ml 胰蛋白酶消化液在培养箱中静置消化细胞 2 ~ 3 min, 直至在显微镜下观察细胞形态变成圆形或呈漂浮状态时, 立即加入 4 ml 已预热的培养液终止消化, 反复吹打细胞使贴壁细胞脱落, 得到单细胞悬液。由原代细胞直接进行传代时单细胞悬液中有较多组织块, 需用过滤器将组织块过滤掉。将单细胞悬液 1 300 r/min 离心 3 min 后弃掉上清, 收集细胞沉淀。再加入 3 ml 预热培养液重悬细胞, 将细胞按传代比例接种于 T25 培养瓶中, 并用培养液补充至每瓶 5 ml, 置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 观察细胞生长情况并拍照记录。

1.2.2 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞支原体检测 本实验使用 BI-20-70020 支原体检测试剂盒进行检测。在细胞生长状态良好时, 取 1 ml 细胞培养液上清液 200 r/min 离心 3 ~ 5 min 收集上清液。将上清液 13 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀。用 50 μl 缓冲液重悬沉淀并充分混匀, 于 95 °C 干浴器上加热 3 min, 得到检测样本。按照说明书配制 PCR 体系, 包括检测样本 (H₂O 29 μl; 反应混合物 10 μl; 检测样本 5 μl; 内控 DNA 模板 1 μl; 内控引物混合物 5 μl)、阴性对照 (H₂O 29 μl; 反应混合物 10 μl; H₂O 5 μl; 内控 DNA 模板 1 μl; 内控引物混合物 5 μl)、阳性对照 (H₂O 33 μl; 反应混合物 10 μl; 内控 DNA 模板 1 μl; 内控引物混合物 5 μl; 阳性对照 DNA 模板 1 μl)。使用 40 μl 矿物油覆盖反应物, 防止蒸发。设置 PCR 反应参数: 预变性 94 °C 30 s; 变性 94 °C 30 s, 退火 60 °C 120 s, 延伸 72 °C 60 s, 35

个循环; 循环结束后变性 94 °C 30 s, 退火 60 °C 120 s, 延伸 72 °C 5 min; 反应结束后 4 °C 保存。

使用 2% 琼脂糖凝胶电泳对上述 PCR 产物进行检测分析, 使用凝胶成像仪拍照对比检测样本、阳性对照、阴性对照条带, 确定检测样本是否存在支原体污染。支原体检测阳性模板为 357 bp 和 270 bp 两条带, 其中 270 bp 为支原体污染后显示的条带, 支原体检测阴性模板条带为 357 bp, 如出现样品出现 270 bp 条带, 则认为存在支原体污染。

1.2.3 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞冻存前及复苏后存活率测定 当细胞生长状态良好时, 按照 1.2.1 中细胞传代方法得到细胞悬液, 通过计数得到细胞总数。取 40 μl 有 2.0×10^5 个细胞的细胞悬液, 按照台盼蓝染色计数说明书的染色比例加入 10 μl 已过滤的台盼蓝染液, 混匀静置 7 min (刘刚等 2013), 在显微镜下观察并统计死细胞数目 (死细胞呈蓝色), 将其余细胞在液氮中冻存保存 1 个月后解冻, 离心后获得细胞沉淀, 加入 5 ml 培养液制得细胞悬液, 并按上述染色方法进行染色, 计数统计细胞总数及死细胞数。通过统计得到细胞冻存前、复苏后细胞总数与死细胞数目, 并根据以下公式计算得到冻存前、复苏后的细胞存活率: 细胞存活率 = 100% [(细胞总数 - 死细胞数) / 细胞总数]。

1.2.4 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞的生长曲线绘制 当细胞生长状态良好时, 按 1.2.1 中细胞传代方法处理细胞以得到细胞悬液, 统计细胞总数。取 2.4×10^5 个细胞, 用 24 ml 培养液混匀后制成细胞悬液。24 孔细胞培养板每孔接种 1.0×10^4 个细胞, 每 3 孔细胞为一组, 共 8 组, 将 24 孔细胞培养板置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养。细胞培养 24 h 后每天相同时间统一计数一组细胞的数目, 通过计算得出对应生长天数的细胞总数: 细胞总数 = (细胞数/体积) × 总体积 × 稀释倍数。按相同方法计数 8 d 并统计数据。根据计算得到第 1 至第 8 天对应的

细胞总数, 绘制细胞生长曲线图。依据以下公式计算乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞群体倍增时间: $D_T = t [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$, 式中, D_T 为细胞倍增时间, t 细胞培养时间, N_t 细胞培养 t 时的细胞数目, N_0 细胞开始进入对数生长期第 1 天的细胞数; 依据以下公式计算乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞群体倍增次数: $X = (\lg N_2 - \lg N_1) / \lg 2$, 式中, N_1 细胞接种时的细胞数目, N_2 细胞生长至对数期末时的数目。

通过测定不同时间乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞的数量, 得到细胞总数与时间的关系, 据此绘制出细胞的生长曲线图, 实验重复 3 次。根据实验需要绘制每隔 3 代的细胞生长曲线图 (Li et al. 2020)。

1.2.5 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞的贴壁率测定 本实验对乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞进行细胞贴壁率测定, 以确定传代的成纤维细胞生长、增殖状态。在细胞生长状态良好时, 根据 1.2.1 中细胞传代方法对细胞进行处理, 得到细胞沉淀。1 ml 培养液充分混匀细胞, 统计细胞总数。6 孔细胞培养板每孔铺板处理后加入 2 ml 培养液, 均匀接种 2×10^5 个细胞, 重复 3 孔, 于 37°C 5% CO_2 培养箱培养。分别在细胞培养 6 h、12 h、24 h 时进行未贴壁细胞数目统计。轻晃细胞培养板后均匀吸取 100 μl 培养液, 利用血球计数板重复计数 3 次, 按以下公式计算得细胞贴壁率, 贴壁率 = 100% [(接种细胞数 - 未贴壁细胞数) / 接种细胞数]。

1.2.6 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞染色体核型 选取处于生长对数期的细胞, 每 1 ml 原细胞培养液中添加 5 μl 秋水仙素 (20 mg/L), 每瓶中加入 25 μl 秋水仙素并置于 37°C 5% CO_2 培养箱中处理 2.5 h 使细胞停在分裂中期 (郭晶营等 2018)。秋水仙素处理细胞结束后, 弃掉培养液, 按 1.2.1 中细胞传代方法得到细胞沉淀。加入 8 ml KCl 溶液 (0.075 mol/L) 重悬细胞沉淀, 充分混匀后将离心管放入 37°C 恒温水浴锅中低渗 40 min。在低渗结束前 1 min 加入 1 ml 提前预冷的固定液 (甲醛与冰乙酸体

积比为 3 : 1) 进行预固定。预固定结束后离心 (1 000 r/min, 10 min) 收集细胞沉淀。随后在离心管中加入 8 ml 已预冷的固定液重悬细胞沉淀, 轻轻颠倒混匀后置于 37°C 恒温水浴锅中固定 30 min, 离心 (1 000 r/min, 10 min) 得到细胞沉淀。该步骤重复 3 次。得到细胞沉淀后根据细胞量加入 300 ~ 500 μl 固定液重悬细胞沉淀, 吹打混匀。在距已预冷的载玻片垂直距离约为 1.6 m 处使细胞悬液均匀滴落, 再把载玻片放入烘箱中 70°C 烘干 2 h, 室温冷却或室温干燥 12 h。使用 Giemsa 染液 (2.5 ml Giemsa 母液溶于 47.5 ml 超纯水中并过滤) 染色 10 ~ 15 min, 冲洗掉载玻片背面浮色, 自然晾干后即可在显微镜下观察拍照, 统计染色体数目。

2 结果

2.1 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞培养形态观察

对雄性 (图 1a) 和雌性 (图 1b) 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞原代建系培养。雄性耳组织在培养 5 ~ 6 d 时沿着组织块附近新长出的纺锤形或三角形细胞, 确定为成纤维细胞, 也有部分细胞形态为扁平不规则多角形, 视为上皮细胞。培养 10 ~ 12 d 后, 培养瓶中细胞汇合度达到 60% 且成纤维细胞优势生长, 在显微镜下观察细胞间有空隙且呈现漩涡状生长。培养 13 ~ 15 d 后, 培养瓶中细胞汇合度达到 80% 以上。雌性耳组织细胞生长速度快于雄性耳组织成纤维细胞, 在 3 d 后细胞沿组织块周围长出。雌性耳组织成纤维细胞形态及长势与雄性耳组织成纤维细胞基本相同, 因此, 后续实验选用成纤维细胞进行细胞传代培养及生物学特性分析。

由于成纤维细胞与上皮细胞相比对酶消化液的敏感程度不同, 用 0.25% 胰酶消化液处理, 经传代纯化培养后, 得到较纯的成纤维细胞。雄性和雌性乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞经过细胞传代培养 (图 2), 均最多培养到 80 代 (P80)。细胞呈现三角形, 随着细胞培养代

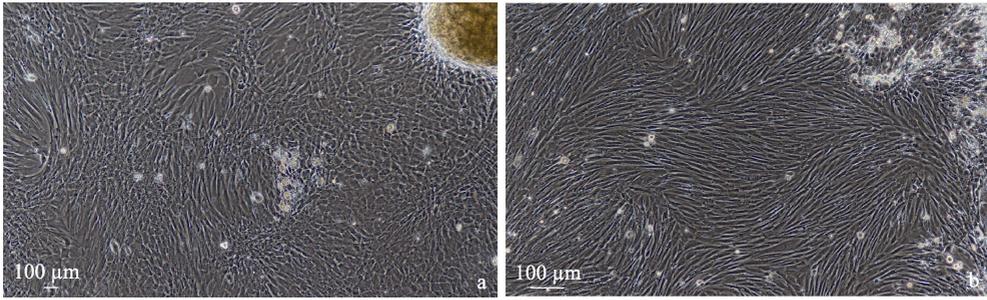


图 1 乌珠穆沁白马耳组织原代成纤维细胞形态

Fig. 1 Morphology of primary fibroblasts in Ujimchin White Horse ear tissue

a. 雄性; b. 雌性。a. Male; b. Female.

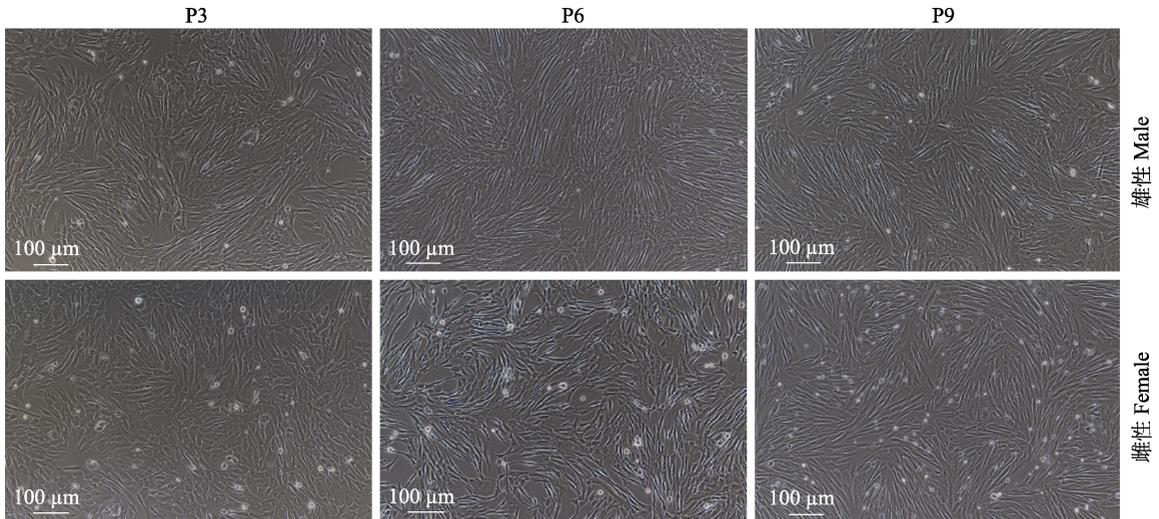


图 2 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞传代培养的形态

Fig. 2 Morphology of ear fibroblasts of Ujimchin White Horse in P3, P6, and P9

次的增加,细胞生长汇合度达到 80%以上需要的时间变长,且细胞形态由立体状三角形形态逐渐变为扁平不规则多边形形态。两种耳组织成纤维细胞经传代培养到后期,雄性耳组织成纤维细胞生长明显优于雌性耳组织成纤维细胞,且雌性耳组织成纤维细胞的形态略微扁平,整体呈现长梭形。

2.2 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞支原体检测

细胞培养过程对环境以及操作步骤的洁净度要求非常高,在细胞培养过程中培养物非常

容易因为操作不当等原因而受到污染,从而对之后的实验产生影响,其中,支原体污染较为普遍且不易被发现,因此选择培养的耳组织细胞 5 代 (P5) 时进行检测。被检测的雄性、雌性耳组织成纤维细胞均为 357 bp 的单一一条带,与支原体检测阴性模板一致 (图 3),说明雄性、雌性耳组织成纤维细胞培养过程中均未受到支原体的污染。

2.3 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞冻存前及复苏后存活率对比

冻存前后在显微镜下计数,死细胞呈蓝色,

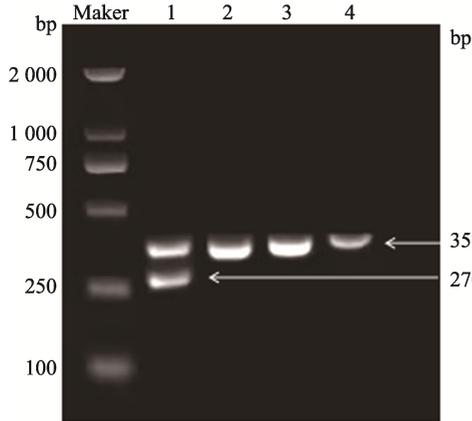


图 3 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞支原体琼脂糖凝胶电泳检测图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of mycoplasma detection in ear fibroblast of Ujimchin White Horse

Maker. 2 000 bp DNA 分子量标准; 1. 支原体检测阳性模板; 2. 支原体检测阴性模板; 3. 雄性耳组织成纤维细胞; 4. 雌性耳组织成纤维细胞。

Maker. 2 000 bp DNA marker; 1. mycoplasma detection positive template; 2. mycoplasma detection negative template; 3. male ear fibroblasts; 4. female ear fibroblasts.

活细胞呈透明（图 4），由于视野有限，仅挑选具有代表性的图片于文章中，并非全部图片。乌珠穆沁白马耳组织不同代次成纤维细胞在冷冻保存前细胞存活率差别很小，存活率均达到

98%以上，没有显著性差异；随着细胞冷冻保存时间的延长，细胞的存活率逐渐下降，复苏后细胞的存活率明显低于冻存前，存活率在 80%左右。但雌性乌珠穆沁白马耳组织 P9 细胞复苏后的存活率仍能达到 90%以上（图 5）。

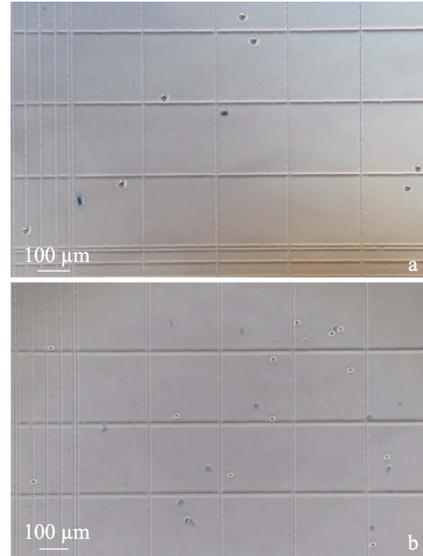


图 4 台盼蓝染色检测乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞冻存前 (a) 和复苏后 (b) 的存活率

Fig. 4 Trypan blue staining survival rate of ear fibroblasts of Ujimchin White Horse before (a) and after (b) cryopreservation

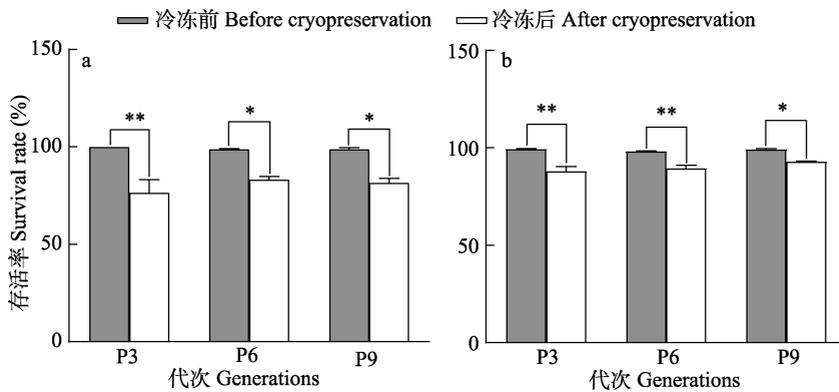


图 5 乌珠穆沁白马雄性 (a) 和雌性 (b) 耳组织成纤维细胞冻存前和复苏后的存活率

Fig. 5 Survival rate of male (a) and female (b) ear fibroblasts of Ujimchin White Horse before and after cryopreservation

每组重复 3 次；**、*代表差异显著 (** $P < 0.01$ 、* $P < 0.05$)。n = 3; **, * represent significant differences (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

2.4 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞的不同代次生长曲线对比

乌珠穆沁白马细胞倍增时间随着培养代次的增加而增加，而倍增次数则随培养代次的增加而减少（表 1），说明随着培养代次的增加，细胞增殖速度下降，活力降低。雄性乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞培养过程中细胞生长曲线呈典型的“S”型（图 6a），低代次细胞增殖速度较培养高代次细胞快，在培养 6 d 或 7 d 时细胞增殖数目达到最大值。雌性乌珠穆沁白

马耳组织成纤维细胞在 P3 ~ P6 时细胞生长曲线呈典型的“S”型（图 6b），生长速度最快，P9 时细胞生长曲线走势平缓，生长活力没有明显的变化。

2.5 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞不同代次及不同时间的贴壁率对比

乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞的贴壁率随着培养时间的延长逐渐增加，6 h 和 12 h 贴壁率均在较低的水平，24 h 后贴壁率快速上升，大部分保持在 90%左右（图 7）。

表 1 乌珠穆沁白马雄性和雌性耳组织成纤维细胞不同代次的倍增时间

Tab. 1 Multiplication time of ear fibroblasts in different generations of male and female Ujimchin White Horse

	细胞培养代次 Cell passages					
	雄性 Male (n = 3)			雌性 Female (n = 3)		
	3	6	9	3	6	9
倍增时间 Doubling time (h)	2.33 ± 0.07	3.08 ± 0.23	3.74 ± 0.02	2.06 ± 0.18	3.19 ± 0.15	4.33 ± 0.46
倍增次数 Times of multiplication	4.62 ± 0.11	4.23 ± 0.20	3.83 ± 0.01	5.42 ± 0.33	4.92 ± 0.12	3.39 ± 0.54

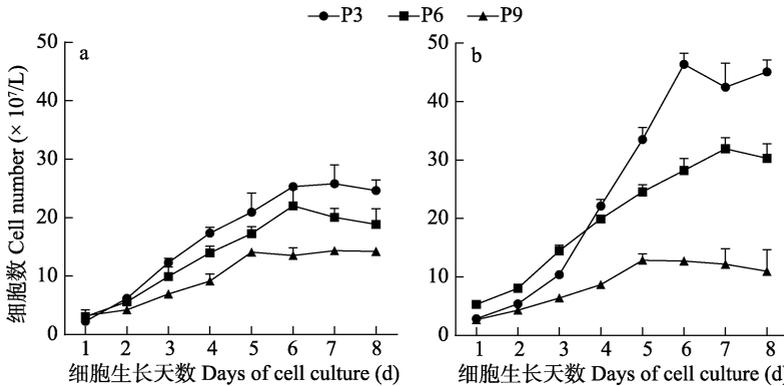


图 6 乌珠穆沁白马雄性 (a) 和雌性 (b) 耳组织成纤维细胞不同代次生长曲线

Fig. 6 Growth curve of ear fibroblasts in different generations of male (a) and female (b) Ujimchin White Horse

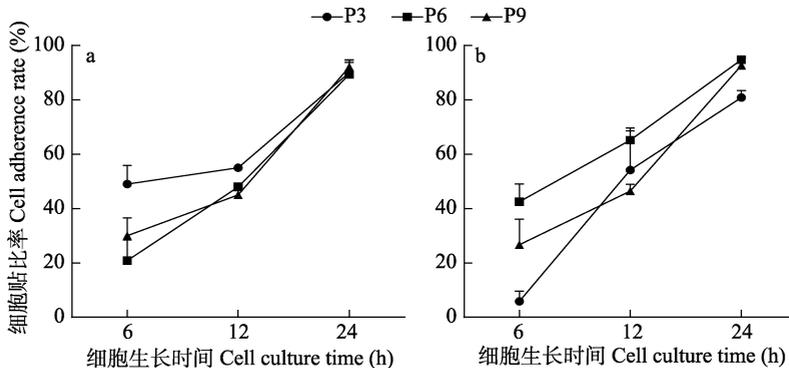


图 7 乌珠穆沁白马雄性 (a) 和雌性 (b) 耳组织成纤维细胞贴壁率

Fig. 7 Attachment rate of ear fibroblasts in different generations of male (a) and female (b) Ujimchin White Horse

2.6 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞染色体核型

使用显微镜以及遗传工作站拍照测量及排列雄性和雌性乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞染色体, 并统计成纤维细胞核型, 从而判断成纤维细胞遗传的稳定性。体外培养的雄性和雌性乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞染色体条数均为 $2n=64$, 其中, 31 对常染色体, 1 对性染色体 (图 8)。本实验选取的雄性、雌性乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞在体外培养时生长状态良好且维持了细胞的遗传信息稳定性。

3 讨论

本研究成功建立了雄性和雌性乌珠穆沁白马的耳组织成纤维细胞系, 并进行了相关的生物学特性分析, 以检测细胞系的生长状况、细胞活力及其遗传稳定性, 包括细胞贴壁率的测定、细胞生长曲线的绘制、细胞冷冻前及复苏后存活率的测定、细胞染色体核型的分析、细胞系支原体污染的检测, 为后续实验提供可靠的数据资料及稳定的实验材料。

细胞培养过程中, 雌性和雄性乌珠穆沁白

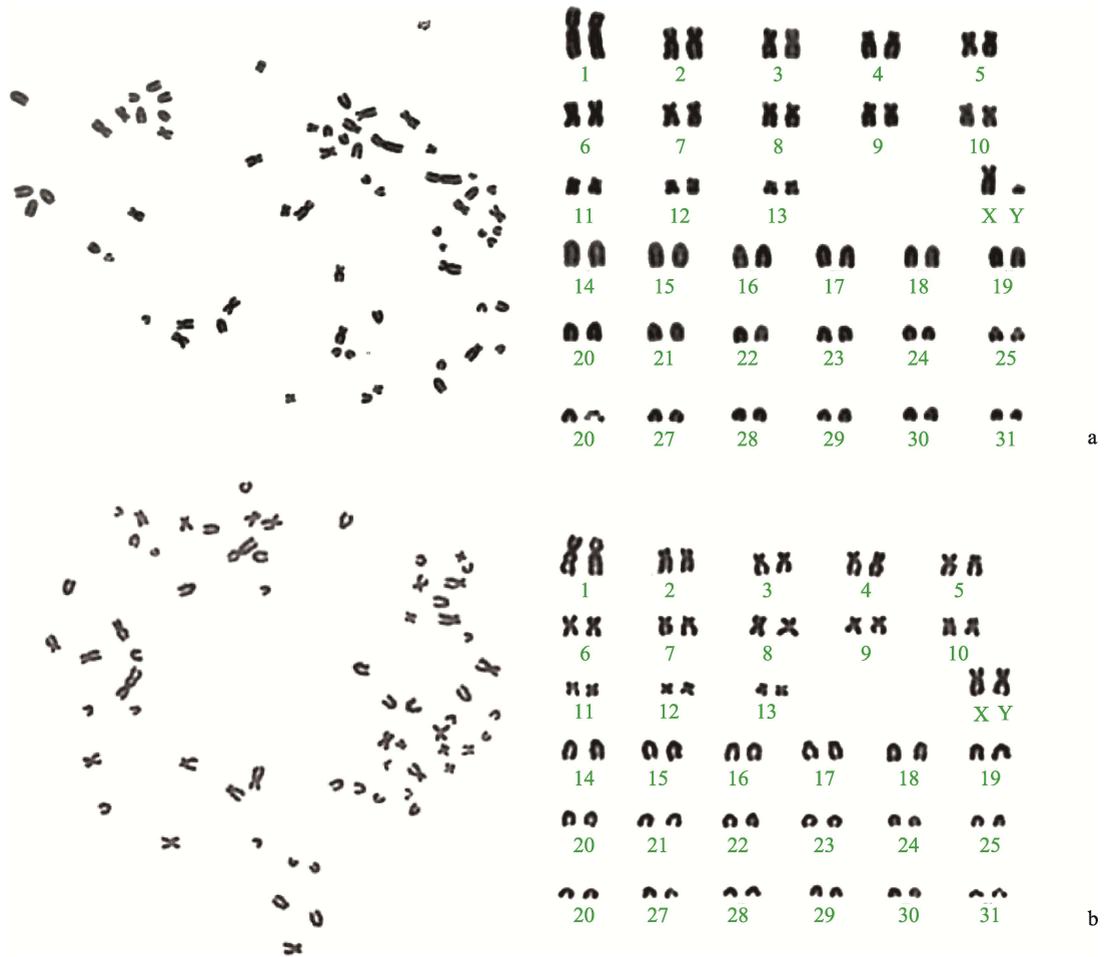


图 8 雄性 (a) 和雌性 (b) 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞染色体中期分裂相 (左) 与核型 (右)

Fig. 8 Chromosome metaphase (left) and karyotype (right) of ear fibroblasts of male (a) and female (b) Ujimchin White Horse

马耳组织成纤维细胞的形态及生长状态略有差别, 低代次时, 雌性耳组织成纤维细胞生长形态及时间等各方面优于雄性耳组织成纤维细胞, 细胞贴壁率整体呈现贴壁时间长, 短时间内贴壁率与其他物种细胞相比较低。研究显示, 狍 (*Capreolus gray*) (郭晓楠 2021) 以及驯鹿 (*Rangifer tarandus*) (王丹妮 2021) 的耳组织细胞在 6 ~ 12 h 内迅速贴壁, 而本实验中乌珠穆沁白马耳组织细胞的贴壁时间较长, 可能是与细胞本身分泌细胞外基质的能力以及细胞本身表达的黏附分子数量有关, 但培养 24 h 后乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞的贴壁率与其他物种无显著差异。雌性乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞低代次贴壁所需时间较长, 随着代次的增加, 贴壁所需时间减少, 说明细胞生长趋于稳定且状态良好; 雄性耳组织成纤维细胞随着细胞培养代次的增加, 细胞贴壁率稳定所需时间也逐渐增加, 在较低培养代次时细胞的贴壁率稳定性最强。乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞的生长曲线整体呈典型的“S”型, 其中雌性成纤维细胞在 P3 时最大增殖细胞数量为 46.38×10^4 个。对驯鹿耳组织成纤维细胞进行原代细胞建系培养并进行生物学特性分析, 通过对生长曲线的测定发现, P45 的最大增殖细胞数量为 37.1×10^4 个 (王丹妮 2021); 对兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 脾成纤维细胞进行原代建系培养并对其进行生物学特性分析, 通过生长曲线测定发现该成纤维细胞在 P67 的最大增殖细胞数量为 1.5×10^4 个 (罗怡琳等 2019)。乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞经冷冻复苏后细胞的存活率相对较好, 与穆瑶等 (2019) 对中华鼯鼠 (*Eospalax fontanierii*) 成纤维细胞存活率的研究结果相近。郭晓楠 (2021) 对狍成纤维细胞复苏后存活率的研究结果则略低于本研究, 且不同代次狍成纤维细胞复苏后细胞存活率存在显著性差异, 甚至于细胞复苏后的存活率低至 13%。根据比较分析可知, 乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞的存活率较强, 耐受冷冻性强, 适合冷冻保存。

染色体核型的制备前期需要用秋水仙素对细胞进行处理, 以获得更多处于中期分裂相的细胞, 而处理时间以及后续实验中对细胞的低渗时间需要根据细胞的类型及生长状况而定 (于漾等 2014, 卢文亮等 2021), 秋水仙素处理时间长短会直接影响染色体的形态, 若处理时间太长, 得到的染色体会呈现短粗型, 低渗时间若太长会导致细胞破裂, 制备得到的染色体大概率会出现丢失的情况 (郭晓楠 2021)。对阿巴嘎黑马耳组织成纤维细胞的染色体核型研究得到其染色体条数为 $2n = 64$ (王爱虹等 2013); 对阿拉伯马成纤维细胞的染色体核型研究得到染色体条数为 $2n = 64$ (张静南等 2011); 采用外周血淋巴细胞短期培养方法, 对蒙古马染色体进行了核型分析, 其二倍体细胞染色体数为 $2n = 64$ (晁玉庆等 1992)。本实验中乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞染色体条数为 $2n = 64$, 且据统计结果显示雄性、雌性乌珠穆沁白马耳组织细胞染色体中 $2n = 64$ 的比例占 80%、85%, 表明此研究培养得到的乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞可稳定遗传且具有良好的状态。

通过组织贴壁培养得到的乌珠穆沁白马耳组织成纤维细胞, 经过多项生物学特性分析可知, 细胞具有良好的形态结构, 纯度高、增殖能力强, 并且具有遗传稳定性, 可对其进行深入研究。

参 考 文 献

- Li X, Li Y, Yan X, et al. 2020. Establishment and biological characteristics of fibroblast cell lines obtained from wild corsac fox. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 56(10): 837–841.
- 敏敏. 2019. 乌珠穆沁白马不同年龄段非遗传因素研究及保种调查. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 20–22.
- 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*, 31(1): 104–108.
- 郭晶营, 韩红梅, 梁延峰, 等. 2018. 梅花鹿体细胞航天诱变后的生物学特性变化分析. *动物学杂志*, 53(2): 255–263.

- 郭晓楠. 2021. 狗成纤维细胞体外培养体系建立及其生物学特性分析. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 15–20.
- 韩国才. 2014. 马的起源驯化、种质资源与产业模式. 生物学通报, 49(2): 1–3, 63.
- 刘刚, 道日娜, 王蓉蓉, 等. 2013. 毛脚鹳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.
- 卢文亮, 孟卫京, 薛春梅, 等. 2021. 两种小鼠生精细胞染色体制备方法的探讨与评价. 解剖学杂志, 44(2): 104–107.
- 罗怡琳, 蒙正群, 周丽军, 等. 2019. 兔脾脏成纤维型细胞 RS-17 系的建立及其生物学特性. 江苏农业学报, 35(1): 130–135.
- 穆瑶, 李慧鹏, 杨济洲, 等. 2019. 中华鼯鼠成纤维细胞长期培养及其生物学特性分析. 动物学杂志, 54(3): 88–96.
- 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.
- 王丹妮. 2021. 驯鹿成纤维细胞建系及其生物学特性分析. 呼和浩特: 内蒙古大学硕士学位论文, 35–38.
- 旭仁其木格. 2018. 乌珠穆沁白马的遗传资源调查及生产性能的研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 25–30.
- 于漾, 毕志香, 揭鸿英, 等. 2014. DF-1 细胞染色体制备及核型分析. 中国家禽, 36(17): 44–46.
- 赵雪妮. 2021. 阿巴嘎黑马与乌珠穆沁白马鲜马奶发酵前后品质特性比较分析. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 36–39.
- 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.