

西伯利亚狍成纤维细胞建系及其生物学特性分析

郭晓楠^① 李云霞^{②#} 郝晓丽^② 王茂俊^① 乌云毕力格^①
吴图雅^① 格根卓拉^② 张健^④ 宋永利^① 赵高平^②
曹贵方^{②③} 包斯琴^① 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;
④ 河套学院 巴彦淖尔 015000

摘要: 本研究以内蒙古大青山获得野生雄性和雌性西伯利亚狍 (*Capreolus pygargus*) 为实验材料, 利用组织块贴壁培养法进行气管、肺和耳 3 种组织成纤维细胞原代建系, 研究不同组织来源的细胞贴壁率、冷冻前及复苏后存活率、生长曲线, 进一步绘制狍成纤维细胞核型图并分析其 G 带特征。实验结果显示, 气管、肺和耳 3 种组织成纤维细胞增殖经历潜伏期、对数生长期、平台期三个阶段, 细胞形态为梭形、三角形或不规则形, 是典型成纤维细胞形态; 成纤维细胞呈漩涡状生长, 其中气管、耳成纤维细胞生长增殖能力最强、肺成纤维细胞增殖能力较弱, 气管和耳组织来源成纤维细胞呈典型“S”型细胞生长特征。染色体核型及 G 带分析结果显示, 雄性狍成纤维细胞染色体条数为 $2n = 70$, 其中有 34 对常染色体, 形态类型为 12 条近端着丝粒染色体 (st), 22 条亚中着丝粒染色体 (sm), 1 对性染色体, X 染色体为中着丝粒染色体 (m), Y 染色体为近端着丝粒染色体 (st), 5 条超数染色体 (B); 雌性狍成纤维细胞染色体条数为 $2n = 70$, 其中有 34 对常染色体, 其形态类型为 29 条亚中着丝粒染色体 (sm), 5 条近端着丝粒染色体 (st), 1 对为性染色体, X 染色体为亚中着丝粒染色体 (sm), 8 条超数染色体 (B)。本研究成功建立了雄性和雌性西伯利亚狍气管、肺和耳 3 种组织来源的成纤维细胞系, 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, 绘制了西伯利亚狍雄性和雌性染色体核型及 G 带图谱, 为将来更深入开展相关研究提供材料与基本技术支撑。

关键词: 西伯利亚狍; 成纤维细胞; 冷冻前及复苏后存活率; 生长曲线; 核型和 G 带

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 05-653-15

基金项目 内蒙古自治区科技成果转化引导项目 (No. 2020CG0078), 奶山羊、奶绵羊良种扩繁技术产业化应用项目 (No. 2019-自-戊=10);

* 通讯作者, E-mail: lixh@imu.edu.cn;

第一作者介绍 郭晓楠, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物学; E-mail: 1009426569@qq.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: 2021-11-19, 修回日期: 2022-08-09 DOI: 10.13859/j.cjz.202205002

***In Vitro* Culture of Fibroblasts and Analysis of Their Biological Characteristics in Siberian Roe Deer**

GUO Xiao-Nan^① LI Yun-Xia^{②#} HAO Xiao-Li^② WANG Mao-Jun^① Wuyunbilige^①
WU Tu-Ya^① Gegenzhuola^② ZHANG Jian^④ SONG Yong-Li^①
ZHAO Gao-Ping^② CAO Gui-Fang^{②③} BAO Si-Qin^① 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;* ④ *Hetao College, Bayannur 015000, China*

Abstract: [Objective] Siberian Roe Deer (*Capreolus pygargus*) is a kind of important wild animal with edible value, medicinal and ornamental value for scientific research. To understand the biological characteristics of Siberian Roe Deer fibroblasts, trachea, lung and ear tissues were collected for cell culture. **[Methods]** In this study, wild male and female Siberian Roe Deers were collected as experimental materials from Daqingshan, Inner Mongolia Autonomous Region, China. The primary fibroblasts of trachea, lung and ear were established by tissue block monolayer culture method. The cell adherence rate, survival rate before freezing and after resuscitation, growth curve of cells from different tissue sources were explored, and the karyotype and the G-band characteristics were analyzed. Unless otherwise noted, all analyses were performed in at least triplicate. Student's *t*-test was used to calculate difference using Graphpad (Version 5.0) **[Results]** The experimental results showed that spindle-shaped or triangular cells were newly grown along the tissue blocks in the trachea and ear tissues of male roe deer after 2 - 4 days of culture. After 8 - 10 days of culture, the convergence degree of cells in the flask reached 60%, and after 11 - 12 days of culture, the convergence degree of cells in the flask reached 80% (Fig. 1). The morphology and growth of fibroblasts from trachea, ear and lung of the female were basically the same as those of the male (Fig. 2). The most densely populated fibroblasts from the trachea, ears and lungs were observed at P20, P12 and P9, respectively (Fig. 3). The adherence rates of fibroblasts from the three tissues increased gradually with time, and grew rapidly within 6 - 12 h. After 24 h, the adherence rates of fibroblasts from the trachea and ears were over 95%. The adherence rate of P3 - P9 lung fibroblasts varied greatly, and the adherence rate reached more than 90% when the culture time was 24 h (Table 1). There was almost no difference in the cell survival rate of airway fibroblasts in different generations before cryopreservation, and the survival rates were all above 85%. There was little difference in cell survival rate between ear and lung fibroblasts in different generations before cryopreservation, and the survival rate was above 90%. The recovery rate of fibroblasts after freezing gradually decreased with the increase of cell passage times (Table 2). The growth curves of fibroblasts from the trachea, ears and lungs show a typical "S" shape (Table 3, Fig. 4). Mycoplasma test results were negative (Fig. 5). The results of H.E staining showed that the three kinds of fibroblasts grew in a spiral shape, with light blue-purple nuclei, light red cytoplasm and that long spindle-shaped or triangular cells were typical fibroblasts in morphology (Fig. 6). Karyotype and G-banding analysis showed that the number of chromosomes in male

deer fibroblasts was $2n = 70$ and $Bs = 5$, among which there were 34 pairs of autosomes, with the morphological type of 12 submetacentric + 22 submetacentric, one pair of sex chromosomes, with the morphological type of X being metacentric, Y being st and five B chromosomes (Fig. 7a, Fig. 8a, Table 4). The number of chromosomes in female fibroblasts was $2n = 70$ and $Bs = 8$, among which there were 34 pairs of autosomes, with morphological type was 29 submetacentric + 5 subacrocentric, one pair of sex chromosome with morphological type of X being submetacentric, and eight B chromosomes (Fig. 7b, Fig. 8b, Table 5). **[Conclusion]** In this study, three tissue-derived fibroblast cell lines from male and female roe deer were successfully established. When cultured in vitro, they grew well and maintained the stability of genetic stability. The karyotypes and G-banding atlas of male and female roe deer chromosomes were drawn. This study provides material and basic technical support for further related research in the future.

Key words: Siberian Roe Deer, *Capreolus pygargus*; Fibroblast; Survival rates before freezing and after resuscitation; Growth curve; Karyotype and G-band

西伯利亚狗 (*Capreolus pygargus*) 体型偏大, 体长达 1.4 m。分布于内蒙古大部分地区, 在大兴安岭、阴山山脉包头以东地区均有分布, 其中, 在阴山山脉的大青山段分布较为广泛, 在包头、呼和浩特以及和林格尔县境内的山体均有分布 (毕俊怀 2001)。近年来, 关于狗组织的转录组分析以及功能基因克隆的研究越来越多 (赵姬臣 2016, 于秀雨等 2017), 这些成果对于深入研究狗遗传功能调控具有重要的参考价值。

本研究通过采集西伯利亚狗 3 种组织, 利用细胞体外建系培养技术进行西伯利亚狗成纤维细胞系的建立及储存, 从而收集其遗传资源, 扩充内蒙古高原野生动物遗传资源库的物种。成纤维细胞在体外培养时能保持其生长状态稳定且增殖能力强, 成纤维细胞系的培养和建立, 可以使野生动物遗传资源在细胞层面上得到有效保护, 若该物种面临灭绝危险或已经灭绝, 则可以利用体细胞克隆技术使该物种重新展现出生命活力, 保护了物种的遗传信息及其多样性。本研究为西伯利亚狗胚胎干细胞、基因工程、细胞工程、分子生物学等研究提供资料。因此, 本研究建立了西伯利亚狗的 3 种组织成纤维细胞系, 并经过了生物学特性的检测, 以达到对其遗传资源的保护, 为深入研究西伯利亚狗提供宝贵的遗传资源。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

雌性、雄性西伯利亚狗各 1 只, 为来源于呼和浩特市大青山附近意外死亡个体。取西伯利亚狗气管、肺和耳部组织, 用 75% 的酒精 (利尔康) 消毒, 用含有 2% 青霉素和链霉素的无菌生理盐水冲洗 3 次, 放入装有 15 ~ 20 ml PBS (Gibco, cat.no. 14190-144) 的 50 ml 离心管内带回实验室。用 75% 的酒精再次消毒组织块, 然后用 PBS 清洗 3 次后浸泡在无菌生理盐水中, 按照组织贴壁培养方法进行无菌接种培养 (刘建 2018)。

1.2 实验方法

1.2.1 西伯利亚狗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西伯利亚狗组织块置于 35 mm 培养皿 (Corning, cat.no. 430165) 中, 用 75% 的酒精浸泡 30 s, 再用 PBS 缓冲液清洗 3 次。在 35 mm 培养皿中用眼科镊夹住组织块, 将其剪成 $0.5 \sim 1.0 \text{ mm}^3$ 的小组织块, 然后均匀地铺在 T25 培养瓶 (Corning, cat.no. 14190-144) 中, 倒置培养瓶并加入含有 1% 双抗 (青霉素和链霉素) 和 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (BI, cat.no. 04-001-1ACS) 的 MEM-Alpha 培养液 (Gibco, cat.no. 12561065) 5 ml, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、

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)。

原代细胞培养中通常含有多种类型细胞, 不仅有成纤维细胞还有上皮细胞和不贴壁悬浮细胞, 因此需要利用不同类型细胞贴壁速度和消化酶敏感性差异来纯化细胞(道日娜等 2013)。成纤维细胞极易贴附于培养瓶表面, 培养一段时间长出大量细胞后, 用 PBS 缓冲液洗去未贴壁的细胞。因成纤维细胞比上皮细胞被 0.25% 胰蛋白酶消化液(Gibco, cat.no. 25200056)消化的时间短, 故通过 3~5 min 的消化时间控制可得到相对纯化的成纤维细胞, 经过 3~5 次传代并以细胞形态特征判断获得纯化的成纤维细胞。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(Gibco, cat.no. 14190144) 轻轻晃动培养瓶, 冲洗细胞后弃掉废液, 再加入 1 ml 的 0.25% 胰蛋白酶消化液, 在培养箱中静置消化细胞 2 或 3 min。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 2 ml 预热到 37℃ 的培养液终止消化进程, 缓慢吹打细胞, 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(孔径 0.22 μm, Millex-GP) 将组织块过滤掉。将单细胞悬液 1 300 r/min 离心 3 min 后收集细胞沉淀。再加入 6 ml 与上述相同的培养液重悬细胞, 将细胞按传代比例 1:2 或 1:3 接种于 T25 培养瓶中, 置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后观察细胞生长情况, 并拍照记录。

1.2.2 西伯利亚狗组织成纤维细胞的贴壁率测定 本实验对西伯利亚狗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。在细胞呈形态完整、汇合度高的生长状态良好时, 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℃ 5% CO₂ 培养箱培养。分别在细胞培养 6 h、12 h、24 h

时统计未贴壁细胞数目。轻晃细胞培养板后均匀吸取 50 μl 培养液, 利用血球计数板重复计数 3 次。按以下公式计算细胞贴壁率, 贴壁率 = [(接种细胞数 - 未贴壁细胞数)/接种细胞数] 100%。

1.2.3 西伯利亚狗组织成纤维细胞冻存前、复苏后存活率测定 当细胞生长状态良好时, 按照常规细胞传代方法得到细胞悬液, 计算得到细胞总数。本实验取 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染色比例加入 10 μl 台盼蓝染液, 混匀静置 7 min(刘刚等 2013), 染色后死细胞呈蓝色, 观察并统计死细胞数目。将冻存 1 个月后的细胞解冻, 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。通过计算得到细胞冻存前、复苏后细胞总数与死细胞数目, 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 = [(细胞总数 - 死细胞数)/细胞总数] 100%。

1.2.4 西伯利亚狗组织成纤维细胞的生长曲线绘制 当细胞生长状态良好时, 按照常规细胞传代方法处理细胞以得到细胞悬液, 统计细胞总数。取 3.6×10^5 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 1.5×10^4 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℃ 5% CO₂ 培养箱培养。细胞培养 24 h 后每天定时统计一组细胞的数目, 通过计算获得对应生长天数的细胞总数。按相同方法计数 8 d 并统计数据。根据计算得到每天对应的细胞总数, 绘制细胞生长曲线图。依据以下公式计算成纤维细胞群体倍增时间, $T_D = t [\lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)]$, 式中, T_D 为细胞倍增时间, t 为细胞培养时间, N_t 为细胞培养 t 时的细胞数目, N_0 为细胞开始进入对数生长期第 1 天的细胞数。依据以下公式计算成纤维细胞群体倍增次数, $X = (\lg N_{II} - \lg N_I) / \lg 2$, N_I 接种时的细胞数目, N_{II} 生长至对数期末时的细胞数目。通过测定不同时间西伯利亚狗组织成

纤维细胞的数量，得到细胞数量与培养时间的关系，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 西伯利亚狗组织成纤维细胞支原体检测 本实验使用 EZ-PCR 支原体检测试剂盒检测细胞培养过程是否受到支原体污染。细胞培养 1 d 后，取 1 ml 细胞培养上清液 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。用检测试剂盒中缓冲液 50 μ l 重悬沉淀并充分混匀，于 95 $^{\circ}$ 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、阳性对照和阴性对照，检测体系配制仅参照物不同，其他体系相同。用 40 μ l 矿物油覆盖反应物，防止蒸发。PCR 反应参数，预变性 94 $^{\circ}$ C 30 s；变性 94 $^{\circ}$ C 30 s，退火 60 $^{\circ}$ C 2 min，延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min，35 个循环；后变性 94 $^{\circ}$ C 30 s，退火 60 $^{\circ}$ C 120 s，延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min；反应结束后 4 $^{\circ}$ C 保存。

使用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，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。

1.2.6 西伯利亚狗组织成纤维细胞苏木精-伊红染色法 (H.E) 染色 将细胞爬片提前进行高温灭菌处理后，轻轻放入 24 孔细胞培养板 (Corning, cat.no.3524) 中。在放置前可以在 24 孔细胞培养板中滴加少量 DPBS 溶液，可使细胞爬片接触更紧密。向 24 孔细胞培养板的每孔中接入 2.0×10^4 个西伯利亚狗组织细胞，在适宜条件下培养 2~3 d 至细胞汇合度达 80% 左右。苏木精-伊红染色 (H.E) 染色，取出细胞爬片用 1 ml DPBS 溶液轻轻漂洗 3 次，再用 4% 的多聚甲醛固定 5~10 min 后即可进行染色。染色结束后需用中性树脂、指甲油封片，在显微镜下观察拍照。

1.2.7 西伯利亚狗组织成纤维细胞染色体核型及 G 带分析 选取处于对数生长期的细胞，每 1 ml 原细胞培养液中添加 5 μ l 秋水仙素 (20 mg/L)，于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱培养 2.5 h。

秋水仙素处理细胞结束后，弃掉培养液，用 DPBS 缓慢冲洗 1 或 2 次，按常规细胞传代方法得到细胞沉淀。用 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 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中低渗 40 min。在低渗结束前 1 min 加入 1 ml 提前预冷的固定液进行预固定。预固定结束后 1 000 r/min 离心 10 min，收集细胞沉淀。加入 8 ml 固定液重悬细胞沉淀，轻轻混匀，置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中固定 30 min，1 000 r/min 离心 10 min 得到细胞沉淀。该步骤重复 3 次。加入 300~500 μ l 固定液重悬细胞沉淀，充分混匀。在距载玻片垂直距离约为 2 m 处使细胞悬液均匀滴落，再把载玻片放入烘箱中 70 $^{\circ}$ C 烘干 1 h，室温冷却。载玻片和片架需进行预冷处理。用 Giemsa 染液 (2.5 ml Giemsa 溶于 47.5 ml 超纯水中) 染色 10~15 min，洗去载玻片背面浮色，自然晾干后即可在显微镜下观察拍照，统计染色体数目。

将烘干冷却的载玻片放入 0.0125% 胰蛋白酶溶液中，在 37 $^{\circ}$ C 消化 30~50 s 后，快速转入 0.85% NaCl 溶液终止消化。按步骤 7 中的染色方法进行染色。在显微镜下观察拍照并进行 G 带分析。利用细胞遗传工作站测量染色体相关数值，并根据公式计算染色体相对长度、臂指数、着丝粒指数。染色体相对长度 = 每个染色体长度 / (单倍染色体总长度 + 性染色体总长度)，染色体臂比值 = 长臂长度 / 短臂长度，染色体着丝粒指数 = 短臂长度 / 该染色体总长度。

2 结果

2.1 西伯利亚狗组织成纤维细胞培养形态观察

图 1a、b 和 c 分别为雄性西伯利亚狗气管、耳和肺组织成纤维细胞原代建系培养的细胞形态图。雄性西伯利亚狗气管和耳组织在培养 2~4 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 8~10 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 11~12 d 后,培养瓶中细胞汇合度达到 80% 以上。雄性西伯利亚狗肺组织成纤维细胞比气管和耳组织成纤维细胞生长速度慢,在 5 d 后细胞沿组织块周围长出。雄性西伯利亚狗气管、耳、肺组织原代成纤维细胞分别在 11 d、11 d、18 d 时汇合度可达 80% 以上。图 2a、b、c 分别为雌性西伯利亚狗气管、耳、肺组织成纤维细胞原代建系培养的细胞形态图。雌性西伯利亚狗气管、耳、肺组织成纤维细胞形态及长势与雄性西伯利亚狗组织成纤维细胞基本相同,因此,在后续研究中选取雄性西伯利亚狗 3 种组织来源的成纤维细胞进行传代培养及生物学特性分析。

成纤维细胞与上皮细胞相比对酶消化液的敏感程度不同,因此,用 0.25% 胰蛋白酶消化液处理,经传代纯化培养后,得到较纯的成纤维细胞。西伯利亚狗气管成纤维细胞经过细胞

传代培养最多培养到 P20,耳成纤维细胞经过细胞传代培养最多培养到 P12,成纤维细胞均呈现三角形细胞形态,随着细胞培养代次的增加,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。西伯利亚狗肺成纤维细胞经过细胞传代培养最多培养到 P9,较其他两种细胞来说,西伯利亚狗肺成纤维细胞形态略微扁平,整体呈现长梭形。培养过程具体形态变化见图 3。

2.2 西伯利亚狗 3 种组织成纤维细胞不同代次、不同时间贴壁率对比

西伯利亚狗 3 种组织成纤维细胞的贴壁率随着时间的延长逐渐增加(表 1),6~12 h 内快速贴壁生长。气管成纤维细胞 24 h 后贴壁率均在 95% 以上,且较为稳定,说明其气管成纤维原代培养细胞系纯度较高;耳成纤维细胞 P3~P6 的贴壁率较高且较为稳定,24 h 后的细胞贴

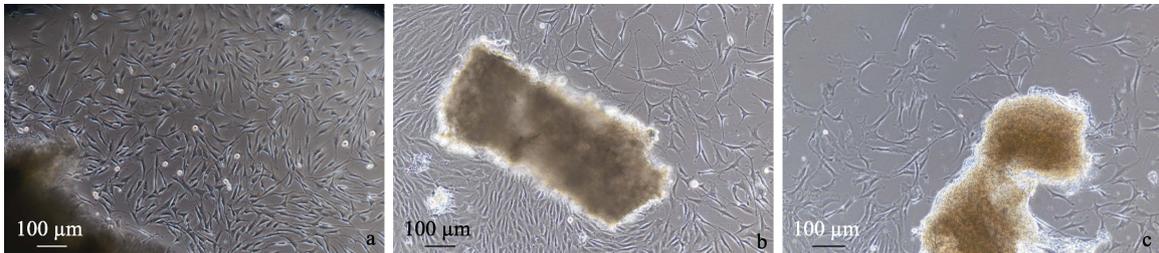


图 1 雄性西伯利亚狗原代成纤维细胞形态图

Fig. 1 Morphology of primary fibroblasts of male Siberian Roe Deer

a. 气管; b. 耳; c. 肺。a. Tracheal; b. Ear; c. Lung.

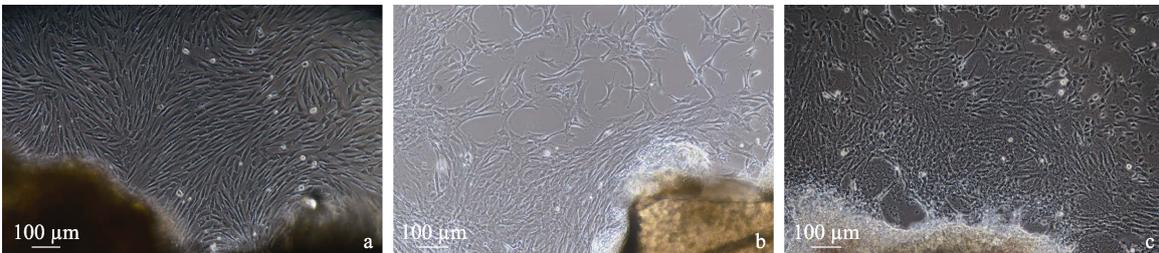


图 2 雌性西伯利亚狗原代成纤维细胞形态图

Fig. 2 Morphology of primary fibroblasts of female Siberian Roe Deer

a. 气管; b. 耳; c. 肺。a. Tracheal; b. Ear; c. Lung.

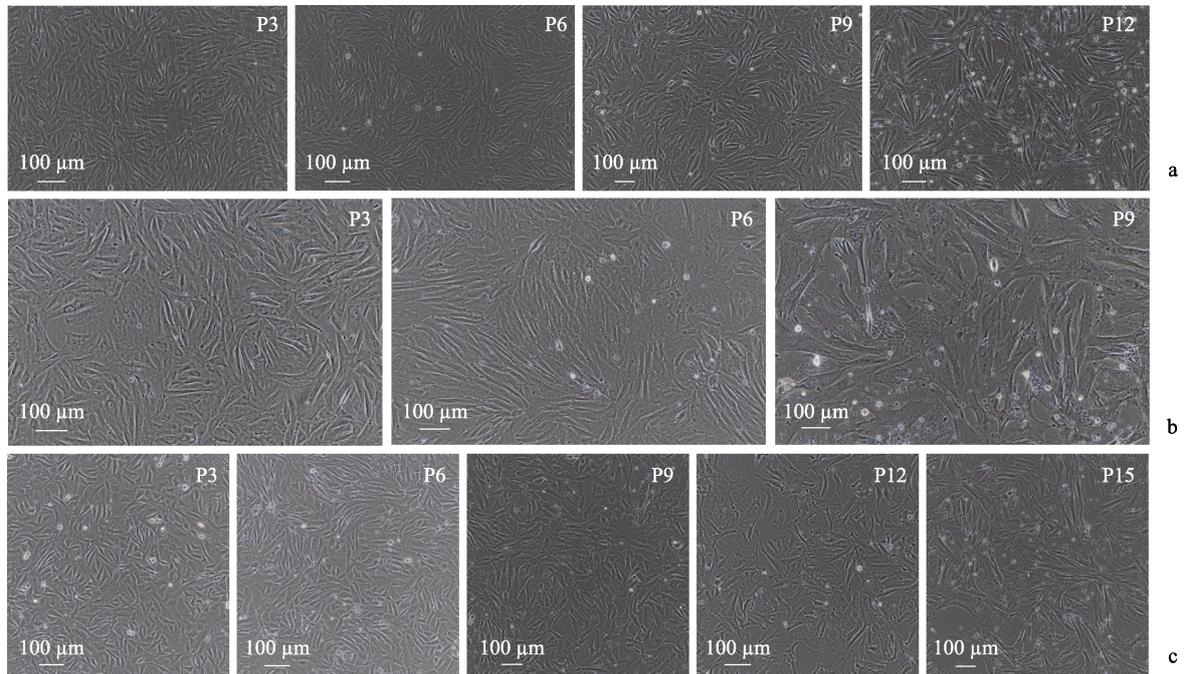


图 3 西伯利亚狗组织成纤维细胞传代培养的形态图

Fig. 3 Morphology of fibroblasts of Siberian Roe Deer

a. 气管成纤维细胞; b. 耳成纤维细胞; c. 肺成纤维细胞。a. Tracheal fibroblasts; b. Ear fibroblasts; c. Lung fibroblasts.

表 1 西伯利亚狗气管、耳、肺成纤维细胞贴壁率

Table 1 Tracheal, ear and lung fibroblasts attachment rate of Siberian Roe Deer

细胞培养代次 Cell passages		贴壁率 Attachment rate (%)		
		6 h	12 h	24 h
气管成纤维细胞 Tracheal fibroblast	3	98.06 ± 0.005	98.61 ± 0.010	98.06 ± 0.02
	6	97.22 ± 0.020	97.78 ± 0.005	98.06 ± 0.005
	9	95.00 ± 0.020	96.67 ± 0.010	98.61 ± 0.005
	12	87.50 ± 0.050	93.89 ± 0.020	98.06 ± 0.010
耳成纤维细胞 Ear fibroblast	15	86.94 ± 0.020	87.50 ± 0.030	97.22 ± 0.010
	3	95.28 ± 0.020	96.39 ± 0.010	99.72 ± 0.004
	6	94.44 ± 0.020	95.00 ± 0.001	98.06 ± 0.001
	9	93.33 ± 0.020	94.72 ± 0.030	96.11 ± 0.004
肺成纤维细胞 Lung fibroblast	12	92.78 ± 0.040	94.44 ± 0.010	94.17 ± 0.030
	3	88.89 ± 0.040	95.28 ± 0.010	98.89 ± 0.004
	6	92.78 ± 0.010	95.28 ± 0.001	98.61 ± 0.001
	9	86.94 ± 0.040	90.56 ± 0.010	97.22 ± 0.010

壁率均在 95% 以上, 说明低培养代次时的细胞活力较强且生长状况较为稳定; 肺成纤维细胞

P3 ~ P9 的贴壁率变化幅度较大, 培养 24 h 时贴壁率可达到 90% 以上。随着细胞培养代次的

增加, 细胞贴壁率稳定所需时间逐渐增加, 此时体外培养的成纤维细胞系已经逐渐老化。对比西伯利亚狍 3 种组织来源的成纤维细胞贴壁率, 气管成纤维细胞及耳成纤维细胞在较低培养代次时细胞的贴壁率稳定性最强, 肺成纤维细胞贴壁率稳定性最弱, 说明气管、耳成纤维细胞较肺成纤维细胞生长状态更好、更稳定。

2.3 西伯利亚狍组织成纤维细胞冻存前、复苏后存活率对比

气管成纤维细胞不同代次在冷冻保存前细胞存活率没有显著差异, 存活率均达到 85% 以上; 耳和肺成纤维细胞不同代次在冷冻保存前细胞存活率存在差异, 存活率均达到 90% 以上。成纤维细胞的冷冻后复苏率随着细胞传代次数的增加逐渐降低 (表 2)。比较气管、耳和肺 3 种组织来源的成纤维细胞的冷冻复苏后存活率, 发现气管成纤维细胞稳定性及活力均最强, 在后续实验中应尽量选择冷冻保存的低代次气管成纤维细胞进行解冻, 以便进行研究。

2.4 西伯利亚狍组织成纤维细胞的不同代次生长曲线对比

气管成纤维细胞在 P3 ~ P6 时细胞生长曲线呈典型的“S”型 (图 4a), 此时细胞增殖速度较高培养代次细胞快, 在 6 或 7 d 时细胞

增殖数目达到最大值。西伯利亚狍耳成纤维细胞在 P3 时细胞生长曲线呈典型的“S”型 (图 4b), 此时细胞增殖速度最快, 在 7 或 8 d 时细胞数目达到最大值 2.558×10^5 个。西伯利亚狍肺成纤维细胞在 P3 ~ P9 时细胞生长曲线整体走势平缓 (图 4c), 细胞最大增殖数仅为 5.444×10^4 个, 从细胞生长曲线来看, 肺成纤维细胞生长缓慢、活力较低。

气管、耳成纤维细胞生长曲线在培养代次较低时呈现典型“S”型, 细胞在生长过程中经历潜伏期、对数生长期、平台期三个时期。对比分析 3 种组织成纤维细胞生长曲线可知, P3 时气管、耳成纤维细胞生长增殖能力最强, 气管成纤维细胞稳定增值能力维持到 P6 时, 耳朵、肺成纤维细胞增殖能力随培养代次增加逐渐减弱, 其中肺成纤维细胞增殖能力最差, 原因可能是同一个体不同组织之间细胞增殖能力不同。

2.5 西伯利亚狍组织成纤维细胞支原体检测

在细胞培养过程中培养物非常容易污染, 从而对实验产生影响, 其中, 支原体污染较为普遍, 且不易被发现, 所以选取狍气管、耳、肺成纤维细胞 P4 时进行检测。支原体检测阳性模板条带为 270 bp 及 357 bp (图 5), 其中,

表 2 西伯利亚狍气管成纤维细胞冻存前和复苏后的存活率

Table 2 Survival rate of trachea fibroblasts of Siberian Roe Deer before and after cryopreservation

	细胞培养代次 Cell passages	冻存前 Before cryopreservation (%)	复苏后 After resuscitation (%)
气管成纤维细胞 Tracheal fibroblasts	P3	93.06 ± 0.03 ^a	75.00 ± 0.10 ^a
	P6	89.58 ± 0.02 ^a	73.61 ± 0.04 ^a
	P9	87.50 ± 0.00 ^b	61.81 ± 0.02 ^b
	P12	86.11 ± 0.03 ^c	30.56 ± 0.45 ^c
	P15	85.42 ± 0.02 ^c	18.75 ± 0.59 ^c
耳成纤维细胞 Ear fibroblasts	P3	96.53 ± 0.01 ^b	72.92 ± 0.06 ^b
	P6	95.83 ± 0.00 ^b	63.89 ± 0.10 ^b
	P9	93.06 ± 0.03 ^b	61.81 ± 0.08 ^b
	P12	93.75 ± 0.02 ^c	38.89 ± 0.22 ^c
肺成纤维细胞 Lung fibroblasts	P3	94.44 ± 0.01 ^b	72.22 ± 0.07 ^b
	P6	93.75 ± 0.02 ^c	30.56 ± 0.08 ^c
	P9	93.75 ± 0.02 ^c	13.89 ± 0.57 ^c

每组重复 3 次; a、b、c、d 代表不同代次之间差异显著 ($P < 0.05$)。n = 3; a, b, c, d represent significant differences ($P < 0.05$)

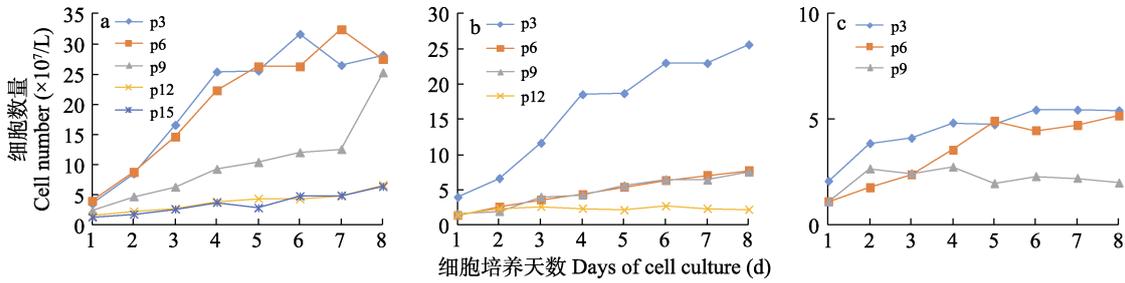


图 4 西伯利亚狗气管 (a)、耳 (b) 和肺 (c) 成纤维细胞不同代次生长曲线

Fig. 4 Growth curve of tracheal (a), ear (b) and lung (c) fibroblasts in different generation

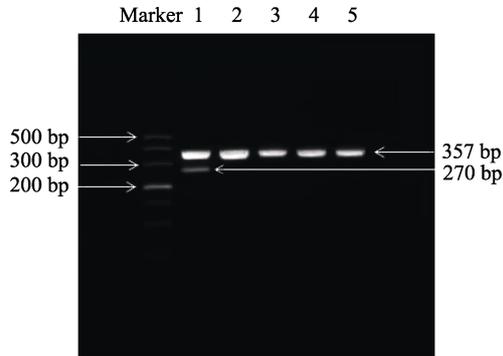


图 5 西伯利亚狗成纤维细胞支原体琼脂糖凝胶电泳检测图

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of mycoplasma detection in fibroblast of Siberian Roe Deer

Marker. 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. P4 气管成纤维细胞; 4. P4 耳成纤维细胞; 5. P4 肺成纤维细胞。

Marker. DNA marker; 1. Mycoplasma detection positive template; 2. Mycoplasma detection negative template; 3. P4 tracheal fibroblasts; 4. P4 ear fibroblasts; 5. P4 lung fibroblasts.

支原体条带为 270 bp, 阴性模板条带为 357 bp, 被检测的 3 种组织成纤维细胞均为单一 357 bp 条带, 说明西伯利亚狗气管、耳和肺成纤维细胞系均未受支原体污染。

2.6 西伯利亚狗组织成纤维细胞苏木精-伊红 (H.E) 染色

对西伯利亚狗气管、耳和肺成纤维细胞 P4 细胞进行 H.E 染色, 3 种成纤维细胞均呈漩涡状生长, 细胞核为淡蓝紫色、细胞质为淡红色, 细胞为长梭形或三角形, 是典型的成纤维细胞形态 (图 6)。

2.7 西伯利亚狗组织成纤维细胞染色体核型及 G 带分析

使用显微镜以及遗传工作站拍照测量及排列雄性和雌性西伯利亚狗气管成纤维细胞染色体, 并统计成纤维细胞核型, 从而判断成纤维细胞的遗传稳定性。体外培养的雄性西伯利亚狗成纤维细胞染色体条数为 $2n = 70$, $Bs = 5$,

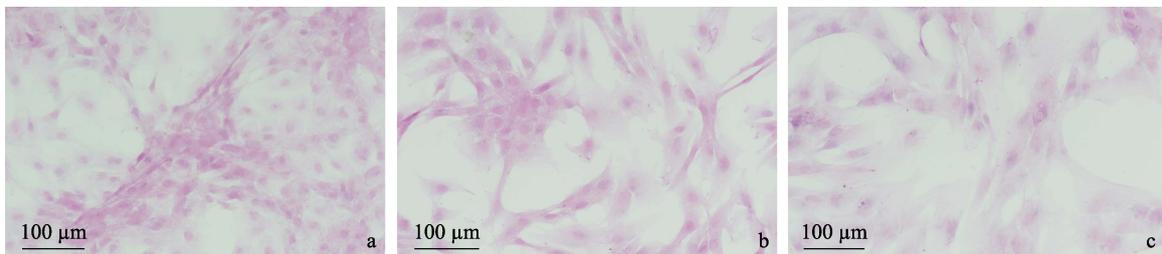


图 6 西伯利亚狗气管 (a)、耳 (b) 和肺 (c) 成纤维细胞 H.E 染色细胞形态

Fig. 6 Morphology of tracheal (a), ear (b) and lung (c) fibroblasts from Siberian Roe Deer by H.E staining

其中，有 34 对常染色体，形态类型为 12 条近端着丝粒染色体，22 条亚中着丝粒染色体，1 对为性染色体，其形态类型 X 染色体为中着丝粒染色体，Y 染色体为近端着丝粒染色体，5 条超数染色体（图 7a）。雌性西伯利亚狗成纤维细胞染色体条数为 $2n = 70$ ，Bs = 8，其中有 34 对常染色体，其形态类型为 29 条亚中着丝粒染色体，5 条近端着丝粒染色体，1 对为性染色体，其形态类型 X 为亚中着丝粒染色体，8 条超数染色体（图 7b）。本实验选取的雄性、雌性西伯利亚狗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。

根据雄性、雌性狗 G 带图谱（图 8），分

析染色体相关参数，包括近端着丝粒染色体、亚中着丝粒染色体、长染色体、中等染色体（表 3, 4）。将雄性狗成纤维细胞染色体分为四组：

- （1）A 组（第 1~5 号）：共 5 对染色体，相对长度在 2~3 之间，属于长染色体，均为近端着丝粒染色；
- （2）B 组（第 6~31 号）：共 26 对染色体，相对长度在 1~2 之间，属于中等染色体，为近端着丝粒染色体和亚中着丝粒；
- （3）C 组（第 32~43 号）：共 3 对染色体，相对长度小于 1，属于小染色体，均为亚中着丝粒；
- （4）性染色体 X+Y 组：X 染色体相对长度为 2.50，Y 染色体相对长度为 1.50。将雌性狗成纤维细胞染色体分为四组：（1）第 1

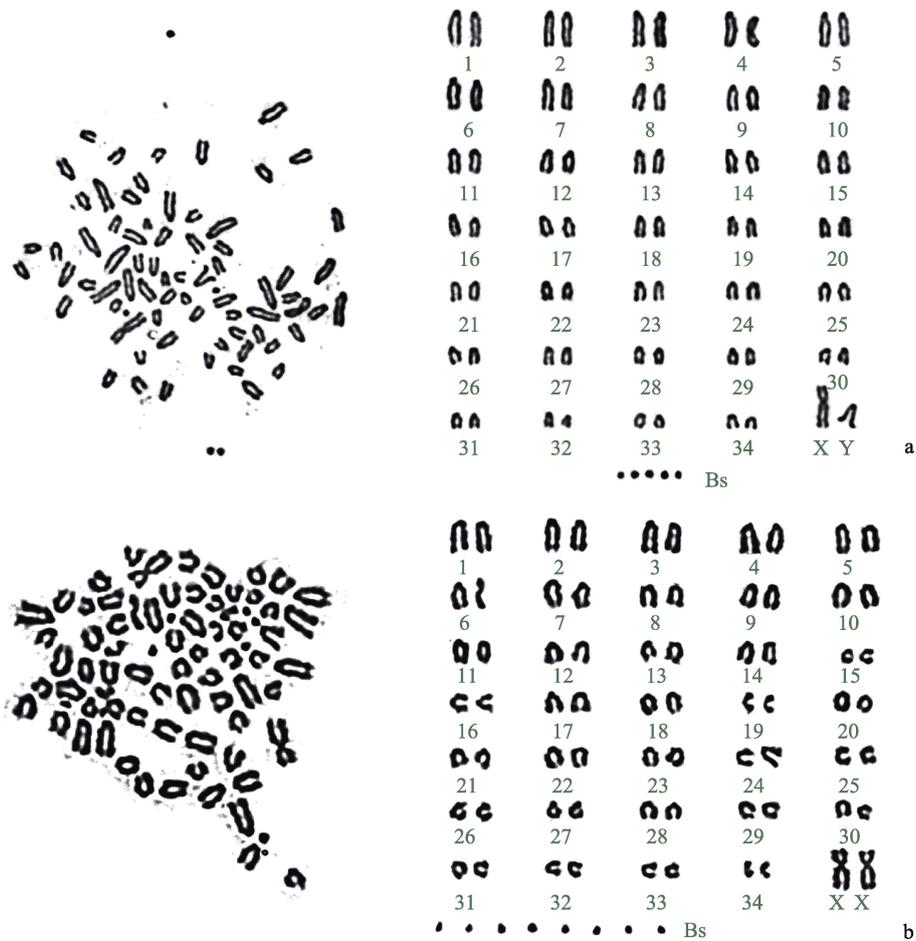


图 7 雄性 (a) 和雌性 (b) 西伯利亚狗成纤维细胞染色体中期分裂相 (左) 及核型 (右)

Fig. 7 Metaphase chromosomes (left) and karyotype (right) of fibroblasts from male (a) and female (b) Siberian Roe Deer

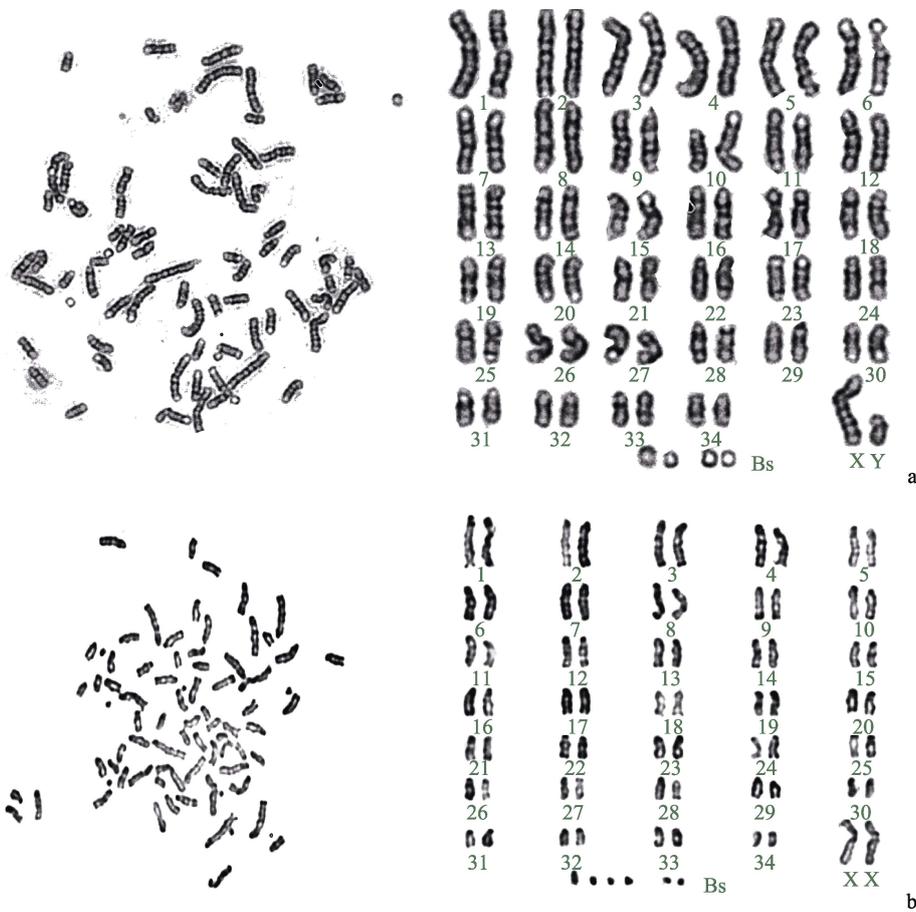


图 8 雄性 (a)、雌性 (b) 西伯利亚狗成纤维细胞染色体 G 带 (左) 和 G 带排列 (右)

Fig. 8 Chromosome G-band (left) and G-band arrangement (right) of fibroblasts from male (a) and female (b) Siberian Roe Deer

号：相对长度为 2.0 ± 0.21 ，属于长染色体，为亚中着丝粒染色体；(2) 第 2~31 号：共 30 对染色体，相对长度在 1~2 之间，属于中等长度染色体，染色体为近端着丝粒和亚中着丝粒染色体；(3) 第 32~34 号：共 3 对染色体，相对长度小于 1，属于小染色体，均为亚中着丝粒染色体；(4) 性染色体 X：相对长度为 2.3 ± 0.06 ，为亚中着丝粒染色体。

3 讨论

本实验成功建立了雄性和雌性西伯利亚狗的气管、耳及肺成纤维细胞系，选取雄性西伯利亚狗成纤维细胞系进行了相关的生物学特性分析，来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、细胞染色体核型与 G 带的分析、细胞系支原体污染的检测、细胞形态的观察以及细胞转染率的测定，为后续实验提供可靠的数据资料及稳定的实验材料。

在西伯利亚狗 3 种组织来源的成纤维细胞传代培养过程中，低代次的细胞贴壁率在 6 h 时即可达到 95% 以上，细胞生长曲线为典型的“S”型，冷冻复苏后存活率也可达 60% 以上。随着细胞培养代次的增加，细胞逐渐衰老，其生长曲线逐渐平缓，因此应选择低代次的细胞进行后续实验，这一研究结果与已有研究结果保持一致 (余思源等 2020)。查阅相关研究，

表 3 雄性西伯利亚狍成纤维细胞染色体分类及其核型 G 带分析

Table 3 Chromosome classification and karyotype G-band analysis of fibroblasts from male Siberian Roe Deer

染色体编号 Chromosome number	类别 Categories	相对长度 Relative length	臂比值 Arm ratio	着丝粒指数 Centromere index	G 带数 G-band number	形态类型 Morphological type
1		2.45 ± 0.20	4.33 ± 0.14	0.19 ± 0.11	35	st
2		2.05 ± 0.10	4.11 ± 0.01	0.20 ± 0.01	25	st
3	A	2.15 ± 0.03	3.75 ± 0.04	0.21 ± 0.03	32	st
4		2.10 ± 0.07	4.39 ± 0.25	0.19 ± 0.19	29	st
5		2.10 ± 0.00	4.69 ± 0.16	0.18 ± 0.13	27	st
6		1.95 ± 0.04	3.70 ± 0.02	0.21 ± 0.02	23	st
7		1.75 ± 0.12	3.29 ± 0.11	0.23 ± 0.08	26	st
8		1.70 ± 0.08	3.11 ± 0.10	0.24 ± 0.08	18	st
9		1.60 ± 0.00	2.96 ± 0.04	0.26 ± 0.03	20	sm
10		1.55 ± 0.05	3.43 ± 0.03	0.23 ± 0.02	23	st
11		1.45 ± 0.05	2.93 ± 0.01	0.26 ± 0.01	17	sm
12		1.50 ± 0.00	2.84 ± 0.01	0.26 ± 0.01	20	sm
13		1.50 ± 0.00	2.76 ± 0.01	0.27 ± 0.02	21	sm
14		1.45 ± 0.05	2.80 ± 0.01	0.26 ± 0.01	18	sm
15		1.45 ± 0.05	3.33 ± 0.16	0.23 ± 0.12	17	st
16		1.45 ± 0.05	2.69 ± 0.14	0.27 ± 0.10	17	sm
17		1.30 ± 0.00	2.86 ± 0.13	0.26 ± 0.09	17	sm
18	B	1.35 ± 0.05	2.60 ± 0.05	0.28 ± 0.03	16	sm
19		1.30 ± 0.11	2.76 ± 0.05	0.27 ± 0.03	14	sm
20		1.30 ± 0.00	2.54 ± 0.23	0.29 ± 0.16	16	sm
21		1.10 ± 0.00	3.32 ± 0.11	0.23 ± 0.09	13	st
22		1.20 ± 0.12	2.58 ± 0.09	0.28 ± 0.07	10	sm
23		1.00 ± 0.14	2.98 ± 0.05	0.25 ± 0.04	12	sm
24		1.20 ± 0.00	2.76 ± 0.06	0.27 ± 0.05	17	sm
25		1.15 ± 0.06	3.01 ± 0.06	0.25 ± 0.04	15	st
26		1.10 ± 0.00	2.33 ± 0.07	0.30 ± 0.04	14	sm
27		1.10 ± 0.00	2.46 ± 0.05	0.29 ± 0.03	13	sm
28		1.05 ± 0.07	2.80 ± 0.04	0.26 ± 0.03	12	sm
29		1.00 ± 0.00	2.22 ± 0.18	0.31 ± 0.12	13	sm
30		1.05 ± 0.07	2.61 ± 0.01	0.28 ± 0.01	13	sm
31		1.00 ± 0.00	2.48 ± 0.18	0.29 ± 0.14	10	sm
32		0.90 ± 0.00	2.77 ± 0.20	0.27 ± 0.15	11	sm
33	C	0.90 ± 0.00	2.66 ± 0.07	0.27 ± 0.05	14	sm
34		0.85 ± 0.08	2.77 ± 0.25	0.27 ± 0.20	10	sm
X		2.50	1.52	0.40	25	m
Y		1.50	3.83	0.21	22	st

m. 中着丝粒染色体; sm. 亚中着丝粒染色体; st. 近端着丝粒染色体。A. 染色体相对长度 2~3; B. 染色体相对长度 1~2; C. 染色体相对长度小于 1。

m. Metacentric chromosome; sm. Submetacentric chromosome; st. Acrocentric chromosome. A. Relative length 2 - 3; B. Relative length 1 - 2; C. Relative length < 1.

表 4 雌性西伯利亚狗成纤维细胞染色体分类及其核型 G 带分析

Table 4 Chromosome classification and karyotype G-band analysis of fibroblasts from female Siberian Roe Deer

染色体编号 Chromosome number	类别 Categories	相对长度 Relative length	臂比值 Arm ratio	着丝粒指数 Centromere index	G 带数 G-band number	形态类型 Morphological type
1	A	2.00 ± 0.21	2.61 ± 0.09	0.28 ± 0.06	20	sm
2		1.95 ± 0.04	2.83 ± 0.01	0.26 ± 0.01	25	sm
3		1.95 ± 0.04	3.23 ± 0.16	0.24 ± 0.12	26	st
4		1.80 ± 0.08	2.96 ± 0.11	0.25 ± 0.09	25	sm
5		1.65 ± 0.13	3.51 ± 0.11	0.22 ± 0.09	20	st
6		1.75 ± 0.12	2.68 ± 0.12	0.27 ± 0.09	25	sm
7		1.60 ± 0.09	2.83 ± 0.02	0.26 ± 0.01	26	sm
8		1.70 ± 0.33	2.48 ± 0.07	0.29 ± 0.05	21	sm
9		1.50 ± 0.09	2.77 ± 0.14	0.27 ± 0.11	17	sm
10		1.45 ± 0.05	2.91 ± 0.00	0.26 ± 0.00	16	sm
11		1.55 ± 0.14	2.73 ± 0.00	0.27 ± 0.01	18	sm
12		1.70 ± 0.33	2.60 ± 0.04	0.28 ± 0.02	22	sm
13		1.65 ± 0.21	2.80 ± 0.05	0.26 ± 0.04	18	sm
14		1.35 ± 0.05	2.73 ± 0.14	0.27 ± 0.10	16	sm
15		1.10 ± 0.13	2.03 ± 0.02	0.33 ± 0.00	10	sm
16		1.70 ± 0.17	2.62 ± 0.21	0.28 ± 0.15	13	sm
17	B	1.20 ± 0.12	2.81 ± 0.07	0.26 ± 0.06	19	sm
18		1.25 ± 0.06	3.04 ± 0.12	0.25 ± 0.09	14	st
19		1.10 ± 0.13	2.74 ± 0.00	0.27 ± 0.00	15	sm
20		1.25 ± 0.06	2.87 ± 0.04	0.26 ± 0.03	15	sm
21		1.85 ± 0.42	3.67 ± 0.34	0.22 ± 0.27	16	st
22		1.15 ± 0.06	2.60 ± 0.13	0.28 ± 0.08	26	sm
23		1.85 ± 0.11	3.13 ± 0.11	0.24 ± 0.09	16	st
24		1.15 ± 0.06	2.43 ± 0.10	0.29 ± 0.06	23	sm
25		1.15 ± 0.06	2.24 ± 0.34	0.32 ± 0.23	12	sm
26		1.10 ± 0.00	2.77 ± 0.08	0.27 ± 0.06	17	sm
27		1.10 ± 0.13	2.51 ± 0.04	0.29 ± 0.03	11	sm
28		1.10 ± 0.00	2.79 ± 0.01	0.26 ± 0.01	14	sm
29		1.05 ± 0.07	2.53 ± 0.05	0.28 ± 0.04	13	sm
30		1.10 ± 0.13	1.98 ± 0.54	0.36 ± 0.36	13	sm
31		1.05 ± 0.07	1.98 ± 0.49	0.35 ± 0.33	13	sm
32		0.95 ± 0.07	2.67 ± 0.06	0.27 ± 0.04	10	sm
33	C	0.85 ± 0.08	2.42 ± 0.14	0.29 ± 0.10	9	sm
34		0.50 ± 1.41	2.87 ± 0.07	0.26 ± 0.05	12	sm
X	性染色体	2.30 ± 0.06	1.79 ± 0.05	0.36 ± 0.03	27	sm

m. 中着丝粒染色体; sm. 亚中着丝粒染色体; st. 近端着丝粒染色体。A. 染色体相对长度 2~3; B. 染色体相对长度 1~2; C. 染色体相对长度小于 1。

m. Metacentric chromosome; sm. Submetacentric chromosome; st. Acrocentric chromosome. A. Relative length 2 - 3; B. Relative length 1 - 2; C. Relative length < 1.

对中华鼯鼠 (*Eospalax fontanierii*) 成纤维细胞生物学特性分析的研究 (穆瑶等 2019), 以及对沙狐 (*Vulpes corsac*) 成纤维细胞生物学特性分析的研究 (闫晓杰 2019) 中, 成纤维细胞的冷冻后复苏率也遵循此规律, 但其成纤维细胞的冷冻后复苏率均高于 40%, 但在本研究中出现成纤维细胞的冷冻后复苏率低于 40% 的现象, 结合西伯利亚狗 3 种组织来源成纤维细胞生长曲线推断, 气管成纤维细胞在 P12 之后、耳成纤维细胞在 P9 之后、肺成纤维细胞在 P6 之后均处于生长活力较差的状态, 没有继续培养的意义, 在后续的研究中应综合考虑多种因素进行实验设计及进行。依据穆瑶等 (2019)、刘建等 (2018)、闫晓杰等 (2019) 的相关研究可以看到, 不同组织来源的成纤维细胞的生长曲线存在差异, 本研究进一步验证了这一结果。对比西伯利亚狗 3 种组织细胞系生长状态发现, 同一个体的不同组织来源的细胞系有一定的差别 (穆瑶等 2019, 曾莹莹等 2021), 其中, 气管和耳组织来源的细胞系较肺组织来源的细胞系生长状态良好且稳定, 因此, 在之后的细胞建系中, 应优先选择气管、耳组织进行建系, 可为之后的研究提供稳定的实验材料。

制备细胞染色体的实验过程中, 秋水仙素处理细胞的时间和细胞低渗时间要根据物种、细胞类型、细胞生长状态进行摸索 (于漾等 2014, 卢文亮等 2021)。若秋水仙素处理时间过长, 制备得到的染色体会呈现短粗的形态; 若低渗时间过长, 细胞在操作过程中就会出现破裂, 导致染色体的丢失及大面积分散。染色体划分为中着丝粒 (m)、亚中着丝粒 (sm)、亚端着丝粒 (st) 及端着丝粒 (t) 4 种, 参考这个分类标准得到了雄性和雌性西伯利亚狗成纤维细胞染色体核型图谱, 其成纤维细胞染色体包含亚中着丝粒 (sm) 和亚端着丝粒 (st) 两种。西伯利亚狗有 70 条染色体, 其中, 包括 34 对常染色体和 1 对性染色体, 额外还有 B 染色体。经过查询资料得知, 西伯利亚狗的 B 染色体一般 1~14 个, 不同狗个体间 B 染色体数

目不同, 甚至同一个体来源的细胞中所含 B 染色体数目也是不同的 (Mladen et al. 2018)。染色体显带实验中, 要对制备好的细胞染色体标本进行酶消化处理, 酶消化时间要严格把控, 若消化时间过长则会出现染色体带型消失、染色体形态膨大等现象。在得到成纤维细胞染色体核型图谱时, 利用常规方法进行染色体的核型配对存在一定误差, 但是根据 G 带进行染色体配对得到的结果更为准确 (邹方东等 2004)。分析核型与 G 带可知, 雄性和雌性西伯利亚狗成纤维细胞系具有遗传稳定性。

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.
- Mladen V, Marija R, Jelena B. 2018. B chromosomes in populations of mammals revisited. *Genes*, 9(10): 487.
- 毕俊怀. 2001. 内蒙古鹿科动物分布现状和资源研究. *内蒙古师范大学学报: 自然科学汉文版*, 32(1): 52–56.
- 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.
- 刘刚, 道日娜, 王蓉蓉, 等. 2013. 毛脚鼯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.
- 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.
- 旭日干. 2016. 内蒙古动物志. 呼和浩特: 内蒙古大学出版社.
- 闫晓杰. 2019. 沙狐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.
- 于秀雨, 时枫, 梁运涛, 等. 2017. 狗茸顶端组织 *Anxa-1* 基因 cDNA 克隆及序列分析. *黑龙江畜牧兽医*, (8): 228–30.
- 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.

余思源, 温冬梅, 芮奎, 等. 2020. 三种培养原代支气管成纤维细胞方法的比较. 中国老年学杂志, 40(9): 1915-1922.

曾莹莹, 胡蔚萍, 左依慧, 等. 2021. 气道和肺泡部位成纤维细胞的原代分离和培养. 上海医药, 42(3): 68-72.

赵姬臣. 2016. 狗茸顶端组织转录组分析及功能基因克隆检测. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文.

邹方东, 岳碧松, 张义正, 等. 2004. 林麝染色体制备方法及其核型与 G-带带型研究. 兽类学报, 16(2): 115-120.