

绵羊皮肤成纤维细胞的分离培养和鉴定

胡馨予¹ 姚逸安¹ 俞可心¹ 胡情情¹ 姜俊芳² 蒋永清² 石国庆³ 万鹏程³ 代蓉³ 管峰^{1*}

(¹中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018; ²浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310021;

³新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 石河子 832000)

摘要 绵羊成纤维细胞的分离培养是羊毛发育相关基因功能研究及分子育种研究的重要基础技术和手段, 但是现有贴壁法和胰蛋白酶消化法分离培养所需时间长、效率低, 双酶消化法与差速贴壁筛选法对绵羊皮肤成纤维细胞的分离培养效果尚不清楚。该实验目的在于通过优化绵羊皮肤成纤维细胞分离培养过程, 提高培养效率和细胞纯度。采集新生羔羊的耳皮肤组织, 采用胰蛋白酶和I型胶原酶联合消化法进行绵羊皮肤成纤维细胞的原代分离培养, 培养2~3天后进行传代分离, 直至获得高纯度的成纤维细胞, 该过程用时约7天。免疫荧光鉴定结果表明, 获得的绵羊皮肤成纤维细胞纯度达100%。该实验采用优化的双酶消化法与差速贴壁筛选分离成纤维细胞, 提高了绵羊皮肤成纤维细胞分离培养效率, 大大缩短了培养周期, 提高了细胞纯度。

关键词 绵羊; 成纤维细胞; 皮肤组织; 分离培养; 双酶消化法

Isolation, Culture and Identification of Sheep Skin Fibroblasts

HU Xinyu¹, YAO Yian¹, YU Kexin¹, HU Qingqing¹, JIANG Junfang², JIANG Yongqing², SHI Guoqing³,
WAN Pengcheng³, DAI Rong³, GUAN Feng^{1*}

(¹College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China;

²Institute of Animal and Veterinary Science, Academy of Zhejiang Agriculture Science, Hangzhou 310021, China;

³Animal Husbandry and Veterinary Institute, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract The isolation and culture of sheep fibroblasts can provide a basic research platform for the functional studies of wool development related genes and molecular breeding. But the existing methods of isolation and culture by adhesion and trypsin digestion required long time and had low efficiency. The double enzyme digestion method and differential adherent screening method have not been applied in the separation of sheep skin fibroblasts. The aim of this study was to improve the efficiency and purity of sheep skin fibroblasts by optimizing the isolation and culture procedure. The ear skin tissue samples were taken from newborn lambs, and the primary skin fibroblasts were digested by trypsin and type I collagenase. After 2-3 days of culture, the cells were sub-cultured and isolated until the obtained fibroblasts had a high purity. This procedure takes about 7 days. The results of immunofluorescence identification showed that the purity of sheep skin fibroblasts was 100%. In this experiment, the optimized double enzyme digestion method and differential adhesion were used to isolate and purify sheep skin fibroblasts, which improved the isolation and culture efficiency of fibroblasts, greatly shortened the culture period

收稿日期: 2022-01-24 接受日期: 2022-03-07

浙江省科技厅十四五重大育种专项(批准号: 2021C02068-6)、国家自然科学基金(批准号: 31672394)、新疆兵团中青年科技创新领军人才计划专项(批准号: 2018CB025、2018CB027)和国家绒毛用羊产业技术体系(批准号: CARS-39)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-86835772, E-mail: guanfengzgj@163.com

Received: January 24, 2022 Accepted: March 7, 2022

This work was supported by Zhejiang Provincial Science and Technology Department the Fourteenth Five-Year Major Breeding Projects (Grant No.2021C02068-6), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31672394), the XPCC's Young and Middle-Aged Science and Technology Innovation Leading Talent Project (Grant No.2018CB025, 2018CB027), National Technical System of fine Wool Sheep Industry (Grant No.CARS-39)

*Corresponding author. Tel: +86-571-86835772, E-mail: guanfengzgj@163.com

and improved the cell purity.

Keywords sheep; fibroblasts; skin tissue; isolated culture; double enzyme digestion

成纤维细胞(fibroblasts, Fbs)是结缔组织的主要细胞成分,也被称为纤维母细胞,通常单个细胞呈长纺锤形或不规则扁平状,细胞核在细胞中清晰可见呈规则圆形,胞质突起生长呈放射状,在体外培养过程中成纤维细胞大多呈梭型、多角形和扁平星型^[1-5]。成纤维细胞体积大、数量多,具有较强的分裂增殖能力,活动旺盛,易培养,因此被广泛应用于动物基因功能研究、疾病模型建立、疫苗及医药开发和胚胎技术研究等多个领域^[6-10]。动物的成纤维细胞来源广泛,包括皮肤、腺体和睾丸组织等^[1-6],最广泛的来源是皮肤组织,已经从多种动物的皮肤组织(包括小鼠真皮、猪胎儿和人皮肤组织等^[2])中成功分离培养出成纤维细胞^[3,7,11-15]。随着后基因组时代的到来,对绵羊基因多功能的研究成为绵羊育种和基因工程研究的重要内容,其中细毛羊育种是我国绵羊育种的重要方向,国内外多个研究小组已在绵羊羊毛发育方面开展了多项研究^[16-21]。皮肤成纤维细胞与羊毛生长发育密切相关,还是羊毛生长发育诸多相关基因体外功能研究的重要载体,因此对绵羊皮肤成纤维细胞的分离培养研究是羊毛发育机制以及绵羊育种研究的重要基础^[7-8,10,22]。

绵羊成纤维细胞广泛存在于皮肤组织中,幼龄羔羊的成纤维细胞的增殖活性远高于成年绵羊,尤其是胚胎和刚出生的羔羊,其成纤维细胞的活力旺盛。一方面,绵羊相较于实验小鼠存在繁殖率低、取材损伤大和经济成本高等不利因素;另一方面,采取腹中胎儿组织培养细胞对母羊和胎羊存在极大的损伤,也提高了实验成本。取初生羔羊耳部组织获取细胞,可以降低对实验动物的个体损伤,且取材方便。组织块法是一直沿用的分离动物皮肤成纤维细胞的主要方法之一,原材料一般取自早期胚胎,分离细胞的效率远高于常用的耳组织。将组织剪碎后分散在培养皿中,待细胞从组织块中爬出后去除组织块,得到目的成纤维细胞。耳组织材料的原代皮肤成纤维细胞从组织块中爬出需6~9天,10~12天汇合完成P1代细胞铺板,建立细胞系时间约14天甚至更久,且细胞贴壁效率低,获得稳定细胞周期时间较长^[13,23-25]。研究表明,40天的绵羊胚胎皮肤组织进行分离和成纤维细胞培养,5~6天原代细胞可汇合成片,而30天

的胚胎皮肤组织分离培养3~4天原代细胞便可汇合,胚胎早期的细胞活力强、培养速度快,但该方法对绵羊个体损伤大^[26-28]。贴壁法和酶消化法也是分离成纤维细胞的常用方法,贴壁法操作复杂且相对酶消化法用时较长,存在组织块贴壁不牢、动物毛发处理不当容易造成污染等问题。消化法主要有胰蛋白酶消化法和胶原酶消化法,使用消化酶能够提高细胞分离时效,同时相较于传统贴壁法操作更为便捷且耗时短,但是消化时间和消化酶用量难以精准把控,时间过长或者浓度过高都会对细胞造成一定程度的损伤,活力下降,影响细胞生长^[25-26,29-31]。如胰蛋白酶容易消化过度导致细胞严重受损,使其无法贴壁生长;而I型胶原酶温和,但消化时间难以掌控,时间过长会导致细胞受损^[12]。将胰蛋白酶消化法和组织块法相结合可以提高细胞培养成功率^[29],使用双酶联合消化成功分离培养出人皮肤成纤维细胞^[32],这些研究为其他物种的成纤维细胞分离培养提供了方法参考。但是不同物种成纤维细胞的特性以及双酶消化效果可能存在差异,目前尚未有使用双酶联合消化法分离培养绵羊皮肤成纤维细胞的研究报道。

本研究探究联合使用胰蛋白酶和I型胶原酶分离绵羊皮肤成纤维细胞,并对具体的酶浓度、消化时间和培养条件等进行优化,建立用于绵羊皮肤成纤维细胞培养的最优方案。此外,还对耳皮肤成纤维细胞和上皮细胞的差速贴壁时间进行探究,目的在于能够得到两种细胞的精确分离时间。通过优化细胞选择和操作过程,减少培养时间,探求更为高效的分离培养方法,为绵羊育种技术提供材料和平台。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

绵羊皮肤组织取自于杭州临安罗塘湖羊养殖场,随机挑选出生12 h内羔羊6只。用手术刀片刮净羔羊耳尖部羊毛,酒精棉球反复擦拭,用手术剪剪取绵羊耳部组织0.5 cm×0.5 cm,迅速放入75%酒精中浸泡消毒3~5 min。将耳组织置于含1.5%青/链霉素和两性霉素的PBS中,冰袋保存,2 h内带回实验室。实验过程符合中国动物保护协会要求,经中国计量大学实验动物伦理委员会审查批准(批件号2021005)。

1.2 主要试剂

1× PBS、DMEM高糖培养基和胎牛血清购于TRAN公司;青霉素、链霉素、0.25%胰酶(含EDTA)、Hanks缓冲液(含Ca²⁺、Mg²⁺)购于浙江森瑞生物科技有限公司;两性霉素购于CAYMANCHEMICAL公司;DMSO二甲基亚砷购于Thermo Fisher公司;免疫荧光固定液-多聚甲醛、免疫荧光封闭液、一抗Vimentin Monoclonal Antibody、二抗IFkine Green Donkey Anti-Mouse-IgG和DAPI染色均购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 细胞原代分离

1.3.1 胰蛋白酶消化法 将带回的耳组织块放置培养皿中,加入Hanks缓冲液直至浸没组织块,快速洗去表面残留羊毛和杂质。洗涤后的耳组织块转移至含有少量Hanks液的洁净培养皿中,用剪刀和镊子去除软骨,并将组织块剪碎,用Hanks液再次清洗,加入0.25%胰蛋白酶(含EDTA)浸没组织块,置于37℃、5% CO₂培养箱中消化1 h。加入DMEM培养基终止消化后将细胞悬液均匀分布在含有20%胎牛血清、1%青霉素、1%链霉素和1%两性霉素的DMEM高糖培养基的6 cm培养皿上,37℃、5% CO₂培养箱培养24 h换液,每隔24 h进行观察。每组实验设置三个平行组,重复三次,下同。

1.3.2 胶原酶消化法 使用Hanks缓冲液反复清洗耳组织块后去软骨剪碎,加入Hanks液直至浸没,将组织块和缓冲液转移至50 mL离心管中,按照比例(按照缓冲液体积的2.5%)加入I型胶原酶,置于37℃、5% CO₂摇床培养箱中消化6 h。收集组织液,过200目筛,1 500 r/min离心10 min,弃上清,加入PBS洗涤一次,然后加DMEM培养基重悬,将细胞悬液均匀分布在1.3.1相同条件培养基中。37℃、5% CO₂培养24 h换液,每隔24 h进行观察。

1.3.3 双酶消化法 使用Hanks缓冲液反复清洗耳组织块后去软骨剪碎,加入Hanks液再次清洗组织碎块,加入0.25%胰蛋白酶(含EDTA)浸没组织块,置于37℃、5% CO₂培养箱中消化1 h。加入培养基终止消化,使用Hanks液反复冲洗组织块并浸没组织块,然后将组织块和缓冲液转移至50 mL离心管中,按照比例(按照缓冲液体积的2.5%)加入I型胶原酶,置于37℃、5% CO₂培养箱中摇床消化4 h。取得的组织液过筛,1 500 r/min离心10 min,弃上清,加入PBS洗涤一次后加DMEM培养基重悬,将细胞悬液均匀分

布在与1.3.1相同条件培养基中。37℃、5% CO₂培养24 h换液,每隔24 h进行观察。

1.4 传代纯化培养

细胞培养汇合度达到70%~80%即可进行传代纯化,传代时用PBS缓冲液清洗细胞两次,加入0.25%胰酶消化,镜下观察至大部分细胞变圆,加入DMEM培养基终止消化,微量移液器吹打培养皿内壁,培养液1 000 r/min离心5 min,收集细胞,加入培养基重悬接种,37℃、5% CO₂培养箱培养30 min后更换一次培养基,37℃培养,细胞汇合度达90%再次传代纯化。

获得的高纯度绵羊皮肤成纤维细胞可进行正常传代培养,培养过程如下:汇合度达90%时进行传代,吸取培养液,PBS缓冲液进行冲洗,若产生较多分泌物可进行多次冲洗,0.25%胰酶消化约2 min(镜下观察大部分细胞变圆),即可加入培养基终止消化。微量移液器吹打培养皿内壁,培养液1 000 r/min离心5 min收集细胞,弃上清加培养基重悬,细胞悬液接种至培养皿中于37℃、5% CO₂培养箱中培养,2~4天可进行下一次传代。

1.5 细胞鉴定

先用PBS缓冲液清洗细胞,加入0.25%胰酶消化,1 000 r/min离心5 min收集细胞,DMEM培养基重悬细胞液接种于15 mm爬片培养至密度60%时取出,PBS冲洗两次后多聚甲醛室温固定30 min后,每隔5 min PBS冲洗三次,加入免疫荧光封闭液室温孵育1 h后加入一抗Vimentin波形蛋白单克隆抗体4℃过夜,加入二抗室温避光孵育1 h后DAPI染色,封片,荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 原代分离

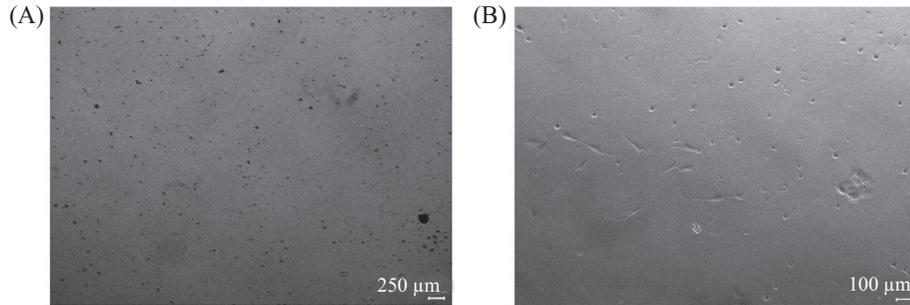
2.1.1 胰蛋白酶消化法 本实验所用胰酶消化法根据现有成年绵羊皮肤成纤维细胞分离法进行改进^[25],使用胰蛋白酶消化原代细胞,培养24 h后未见细胞,48 h后观察,发现细胞数量较少,甚至看不到细胞(图1)。再次培养48 h后观察,细胞数量仍较少,主要有少量成纤维细胞和少量上皮细胞。成纤维细胞呈长梭形,细胞体型较大,占培养皿面积较大;上皮细胞呈扁平圆形,成片连接向外生长。培养12天后细胞活力降低,贴壁能力较差,经PBS冲洗后大量细胞被洗脱。

2.1.2 胶原酶消化法 使用胶原酶消化6 h后,

DMEM培养基培养48 h后可观察到少量细胞,呈单个细胞,细胞与细胞之间分隔较远;培养72 h后换液,可见细胞向周围铺开生长,细胞呈梭型放射状,活性较好,但因细胞数量较少、增殖速率较慢;培养至第8天细胞群增多,增殖速率快;培养10~12天细胞长满培养皿呈长梭状,细胞相互紧贴呈旋涡状,可进行传代(图2)。原代分离的F1代细胞存在成纤维细胞和上皮细胞,

成纤维细胞纯度约60%,需纯化去除上皮细胞。

2.1.3 双酶消化法 本方法将胰蛋白酶和胶原酶法相结合进行绵羊皮肤成纤维细胞的原代分离,培养48 h后观察,发现该方法分离得到的细胞数量较多,汇合度达到70%,细胞间存在空隙,其中含有60%~70%成纤维细胞和30%~40%的上皮细胞,两者共同生长(图3)。在100倍显微镜下可以看出成纤维

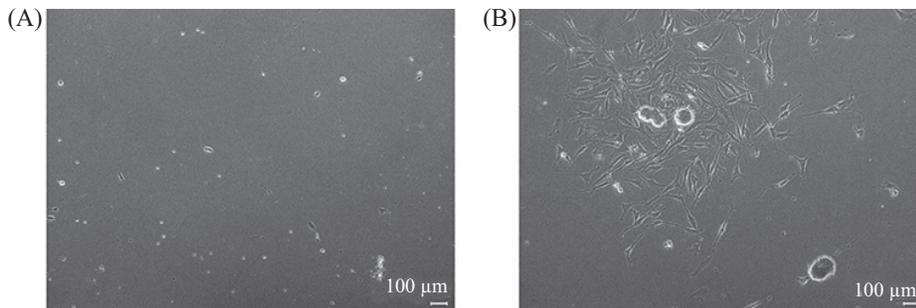


A: 40×倍镜下的成纤维细胞; B: 100×倍镜下的成纤维细胞。

A: fibroblasts at 40× magnification; B: fibroblasts at 100× magnification.

图1 胰蛋白酶消化法分离48 h后P1代细胞

Fig.1 The cells of P1 generation were separated by trypsin digestion for 48 h

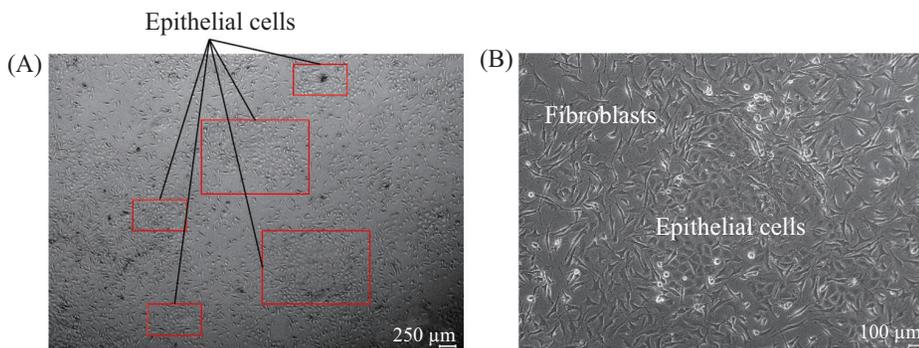


A: 消化后培养48 h的成纤维细胞; B: 消化后培养72 h的成纤维细胞。

A: fibroblasts were cultured after 48 h; B: fibroblasts were cultured after 72h.

图2 胶原酶消化法分离P1代细胞

Fig.2 The cells of P1 generation were separated by collagenase digestion



A: 与成纤维细胞竞争生长的上皮细胞,红色方框所指为上皮细胞; B: 被成纤维细胞包围的上皮细胞。

A: epithelial cells that grow in competition with fibroblasts, the red boxes indicate epithelial cells; B: epithelial cells surrounded by fibroblasts.

图3 双酶消化法分离48 h后P1代细胞

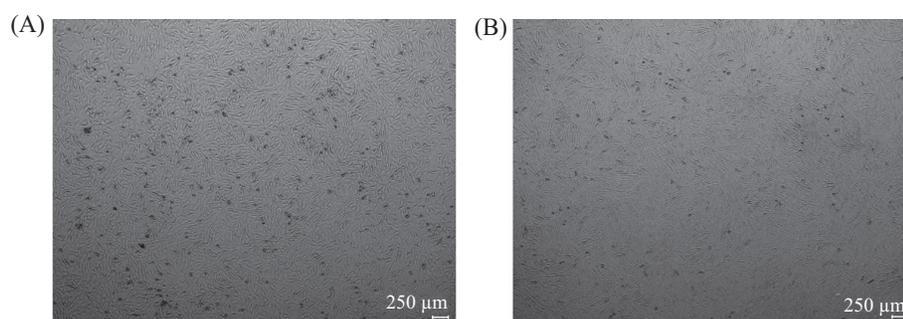
Fig.3 The cells of P1 generation were separated by double enzyme digestion for 48 h

细胞和上皮细胞之间明显的边界, 两者具有较大的形态学差异, 成纤维细胞呈长梭形放射状, 上皮细胞为扁圆形, 成纤维细胞形态较上皮细胞大, 单个细胞占培养皿面积广, 大量包围成片生长的上皮细胞(图3)。采用双酶消化法原代细胞生长2~3天汇合度可达70%~80%, 即能进行传代。重复实验得到结果一致。

2.2 传代纯化培养

当原代细胞长至70%~80%时进行第一次传代纯化, 采用差速消化法和差速贴壁法进行成纤维细胞和上皮细胞的分离。实验对传代分离的P2代和P3代细胞生长状况和纯度进行观察和记录, 一次纯化

后上皮细胞大部分被分离, 成纤维细胞纯度为90%, 仍存在少量上皮细胞; 经过两次传代纯化后P3代成纤维细胞密度纯度较高且成簇排列, 得到较高纯度的绵羊皮肤成纤维细胞(图4~图5), 显微镜下可见成纤维细胞轮廓清晰呈长梭形放射状, 该过程约7天左右。得到的高纯度细胞可用于进一步实验。成纤维细胞受胰酶消化时细胞变圆脱落, 消化时间通常在2 min左右, 而上皮细胞对胰蛋白酶耐受性强, 短时间消化吹打不易脱落; 成纤维细胞在20~30 min内可完成贴壁, 而上皮细胞经消化后不易贴壁(图6)。重复实验得到的结果一致。



A: 传代一次得到P2代细胞; B: 传代两次得到P3代细胞。

A: P2 generation cells were obtained after one passage; B: P3 generation cells were obtained after two passages .

图4 双酶消化法分离传代纯化细胞

Fig.4 The cells were separated and purified by double enzyme digestion

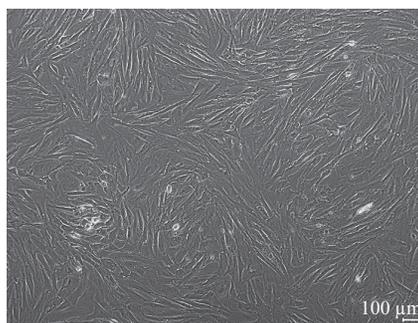


图5 双酶消化法分离纯化成纤维细胞

Fig.5 The fibroblasts were isolated and purified by double enzyme digestion

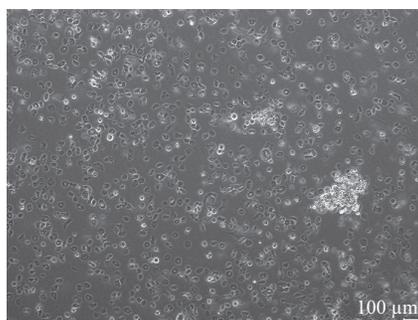
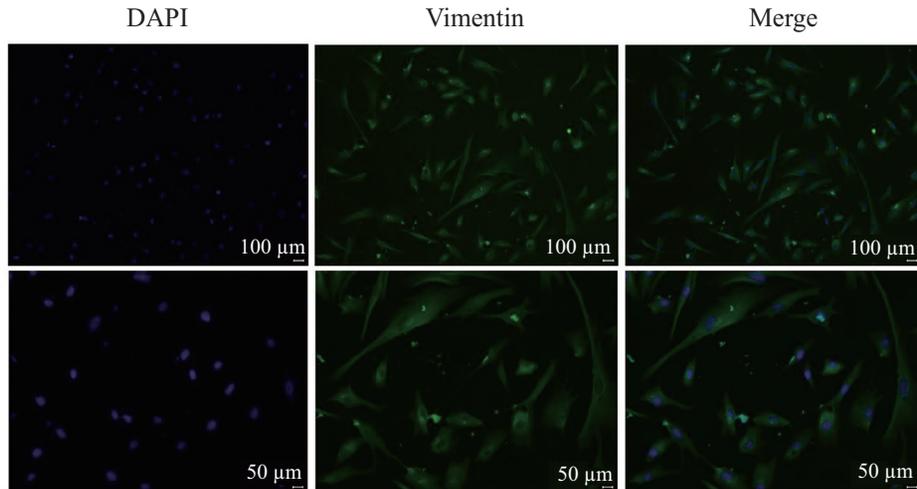


图6 未贴壁悬浮上皮细胞

Fig.6 Unadherent suspended epithelial cells



DAPI: 细胞核染色, 蓝色荧光蛋白; Vimentin: 波形蛋白染色, 绿色荧光蛋白; Merge: 重叠图。

DAPI: nuclear staining, blue fluorescent protein; Vimentin: staining, green fluorescent protein; Merge: overlapping figure.

图7 成纤维细胞鉴定

Fig.7 Identification of fibroblasts

2.3 成纤维细胞鉴定

成纤维细胞一般采用形态学方法和免疫荧光方法鉴定, 成纤维细胞的形态通常呈梭型或不规则三角形, 通过形态可以将成纤维细胞和大多数细胞进行区分^[33]。为验证双酶联合消化法分离得到的绵羊皮肤成纤维细胞以及细胞纯度, 对传代纯化两次后的P3代细胞进行免疫荧光鉴定, 选择在成纤维细胞中高表达的波形蛋白(Vimentin)为检测靶标, 一抗选择波形蛋白单克隆抗体。图7为免疫荧光蛋白作用后在荧光显微镜下观察结果, 绿色荧光为波形蛋白Vimentin, 蓝色荧光为DAPI染色的细胞核, 重叠后发现分离得到的细胞中Vimentin高表达, 几乎所有细胞中都出现绿色荧光。通过细胞质和细胞核染色对比证明, 双酶联合消化法得到的成纤维细胞纯度高达100%。重复实验得到的结果一致。

3 讨论

成纤维细胞具有很强的分裂繁殖能力, 容易进行分离培养, 同时也被广泛应用于动物研究的多个领域, 是多项动物生物技术研究的平台和材料之一。绵羊作为畜牧业重要的物种, 其成纤维细胞分离培养方法的建立有着重要意义, 可为羊毛和肌肉生长发育及相关研究提供技术支持和验证平台。

本研究选择剪取出生12 h内的羔羊耳部组织培养皮肤成纤维细胞, 绵羊的耳部组织较大, 完全能够

满足细胞培养的取材需求并用于后期实验, 且去除羊毛后耳部软骨及血管等多余组织容易剥离, 细胞数量多, 原代细胞纯度较高。相比胎儿成纤维细胞材料来源大大降低了对实验动物的损伤。

本研究中胰蛋白酶消化1 h后得到存活的细胞数量少, 培养24 h后大部分细胞未贴壁; 胶原酶消化6 h得到的存活细胞数量多于胰蛋白酶消化所得, 但传代所需时间长, 成纤维细胞纯度不高; 双酶联合消化仅需5 h就能得到大量活性较高的原代细胞。据此推测, 胰蛋白酶对细胞刺激较大, 细胞因长时间消化会失活甚至死亡, 不适宜高效地进行绵羊皮肤成纤维细胞原代分离及培养。本研究考虑将胰蛋白酶和I型胶原酶两种消化酶结合, 探究是否能够进一步提高细胞分离效率。结果证明, 双酶消化可以在较短的时间获得更多数量的细胞, 胰蛋白酶和I型胶原酶联合消化法明显优于单一酶消化法, 提高了分离效率。其中, 采用0.25%含EDTA的胰蛋白酶和按体积比2.5%加入I型胶原酶, 首先加入胰蛋白酶恒温37 °C消化1 h, 后加入I型胶原酶恒温37 °C摇床消化5 h。在剪碎的组织块消化过程中成纤维细胞和上皮细胞同时被消化分离, 因此需要筛选净化成纤维细胞, 本研究采用差速消化法和差速贴壁法进行细胞的纯化分离。成纤维细胞经胰蛋白酶消化后能在短时间内变圆且脱壁, 并且在20~30 min内胰蛋白酶消化后的成纤维细胞能再次快速贴壁; 而上皮细胞在相同时间内无法脱落, 且悬浮的上皮细胞无法在1 h内完成

贴壁^[31,34]。因此原代分离后的皮肤成纤维细胞能通过以上时间传代并筛选, 实现皮肤成纤维细胞高效纯化。

分离的原代细胞使用DMEM培养基, 37 °C、5% CO₂培养72 h后可进行传代, 经两次传代得到高纯度绵羊皮肤成纤维细胞。免疫荧光方法进一步确认细胞类型, 波形蛋白Vimentin在间充质细胞中部分表达, 在成纤维细胞内高表达, 是目前鉴定成纤维细胞的重要标志物^[35], 通过染色可对成纤维细胞和上皮细胞进行区分。FSP1/S100A4也是如今常用于鉴定成纤维细胞的新型特异性标志物, 但其使用成本较高, 部分实验室用作Vimentin鉴定材料的备选或验证实验。经两次纯化得到的P3代细胞纯度高, 活性高, 可以用于后续实验, 该过程耗时约7天, 相较于贴壁法和单酶消化法, 时间上有较大提升^[13,23-25]。实验主要筛选出胰蛋白酶和I型胶原酶作为联合消化绵羊皮肤成纤维细胞的消化酶, 优化了酶的浓度和消化时间过长导致的细胞受损、活性降低以及时间过短细胞数量较少的不足。与传统的贴壁法相比消化法过程操作简单、稳定性高, 且大大缩短了细胞培养周期。实验进一步精确了差速消化法和差速贴壁法的时间, 消化20~30 min和贴壁1 h为界限分离成纤维细胞和上皮细胞。本实验进行重复实验, 所得到的结果一致, 证明胰蛋白酶和I型胶原酶双酶消化法分离培养绵羊皮肤成纤维细胞成功率较高, 后续传代细胞活性好、增殖快。

4 结论

本研究通过比较不同酶消化组织块方式筛选优化了培养绵羊原代成纤维细胞的结果, 建立了一种稳定高效且完整的绵羊耳皮肤成纤维细胞的分离培养方法, 包括样品采集、原代细胞分离、培养纯化以及细胞鉴定, 为绵羊羊毛及生长发育相关基因的研究提供细胞来源和材料。本实验采用双酶消化法, 采集刚出生12 h羔羊耳部组织, 剪碎后使用胰蛋白酶和I型胶原酶联合消化, 采用20~30 min差速消化法和1 h差速贴壁法进行细胞纯化, P3代皮肤成纤维细胞经波形蛋白鉴定纯度高达100%, 整个过程用时7天即可得到稳定的、可用于后续实验的绵羊皮肤成纤维细胞。该方法缩短了细胞培养周期, 节约了人力和时间, 也降低了对取样绵羊的损伤, 为绵羊物种的多项生物技术研究奠定基础。

参考文献 (References)

- [1] 周正炜, 郭派派, 王曼曼, 等. 大鼠乳鼠颌下腺成纤维细胞的分离培养及鉴定[J]. 安徽医科大学学报(ZHOU Z W, GUO P P, WANG M M, et al. Isolation and identification of primary fibroblasts from salivary gland of neonatal rat [J]. Acta Univ Medicinalis Anhui), 2021, 56(5): 814-9.
- [2] 魏传飞, 王伟, 刘延明, 等. 人体皮肤成纤维细胞的快速分离及多向分化能力鉴定[J]. 中华细胞与干细胞杂志(WEI C F, WANG W, LIU Y M, et al. Isolation and identification of multidirectional differentiation of human skin fibroblasts [J]. Chin J Cell Stem Cell), 2019, 9(5): 267-75.
- [3] 张大鹏, 李跃民, 栗楠, 等. 广西巴马小型猪皮肤成纤维细胞的分离培养体系优化[J]. 生物学杂志(ZHANG D P, LI Y M, LI N, et al. Isolation and culture of skin fibroblasts in Guangxi Bama mini-pig [J]. Chin J Bio), 2017, 34(2): 99-103.
- [4] 叶荣, 陈学进, 杨利国. 牛成纤维细胞的分离与体外培养[J]. 细胞生物学杂志(YE R, CHEN X J, YANG L G. The dissociation and culture of bovine fibroblasts *in vitro* [J]. Chin J Cell Biol), 2005, 27(1): 93-7.
- [5] SU X H, LING Y, LIU C X, et al. Isolation, culture, differentiation, and nuclear reprogramming of mongolian sheep fetal bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Cell Reprogram, 2015, 17(4): 288-96.
- [6] 罗惠娜, 罗冬章, 詹小舒, 等. 金毛犬睾丸成纤维细胞的分离、培养及鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医(LUO H N, LUO D Z, ZHAN X S, et al. Isolation, culture and identification of testicular fibroblasts in golden retriever [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine), 2020, 63(11): 140-3.
- [7] 张梦瑶, 杨峰, 刘开东, 等. 敖汉细毛羊DKK1基因重组质粒的构建及其在成纤维细胞中表达量的研究[J]. 中国畜牧兽医(ZHANG M Y, YANG F, LIU K D, et al. Study on Construction of DKK1 gene recombinant plasmid in aohan fine wool sheep and its expression in fibroblasts [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine), 2018, 45(1): 131-9.
- [8] YAO Y Z, ZHANG Y Y, LIU W S, et al. Highly efficient synchronization of sheep skin fibroblasts at G₂/M phase and isolation of sheep Y chromosomes by flow cytometric sorting [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 9933.
- [9] PALAZZESE L, CZERNIK M, IUSO D, et al. Nuclear quiescence and histone hyper-acetylation jointly improve protamine-mediated nuclear remodeling in sheep fibroblasts [J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0193954.
- [10] GUO Y, ZHU H, LI X C, et al. Multiple functions of reversine on the biological characteristics of sheep fibroblasts [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 12365.
- [11] 冯延, 武文卿, 张静远, 等. 裸鼯鼠皮肤成纤维细胞外泌体的分离及鉴定[J]. 实验动物与比较医学(FENG Y, WU W Q, ZHANG J Y, et al. Isolation and identification of exosomes from skin fibroblasts of naked mole rats [J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine), 2020, 40(6): 506-12.
- [12] 白剑, 焦玲帅, 杨铭, 等. 树鼯原代皮肤成纤维细胞的分离培养技术[J]. 动物学杂志(BAI J, JIAO L S, YANG M, et al. Isolation and culture of primary skin fibroblasts from tree shrews [J]. Chin J Zoology), 2019, 54(1): 76-86.
- [13] 李希, 王曦, 吴苏君. 吕梁黑山羊耳缘成纤维细胞的分离及体外培养[J]. 山西农业科学(LI X, WANG X, WU S J. Separation and culture of the luliang black goat ear fibroblasts [J]. J Shanxi

- Agri Sci), 2018, 46(7): 1186-9.
- [14] 陈雪梅, 薛斯亮, 吴思思. 成年小鼠原代皮肤成纤维细胞的分离培养及其生物学特性[J]. 生物技术通讯(CHEN X M, XUE S L, WU S S. Separation and biological characteristics of primary skin fibroblasts from adult mice skin [J]. Letters in Biotechnology), 2017, 28(6): 823-7,70.
- [15] 晁天柱, 徐福意, 徐伟, 等. 分离培养适用于染色体分选的新生小鼠皮肤成纤维细胞[J]. 东华大学学报(CHAO T Z, XU F Y, XU W, et al. Isolation and culturing of fibroblasts from newborn mouse skin for chromosome sorting [J]. J Donghua Univ), 2016, 42(3): 390-4.
- [16] ZHAO H, GUO T, LU Z, et al. Genome-wide association studies detects candidate genes for wool traits by re-sequencing in Chinese fine-wool sheep [J]. BMC Genomics, 2021, 22: 127.
- [17] ZHAO M L, ZHOU H T, LUO Y Z, et al. Variation in a newly identified caprine KRTAP gene is associated with raw cashmere fiber weight in longdong cashmere goats [J]. Genes, 2021, 12(625): 1-11.
- [18] HE D, CHEN L, LUO F, et al. Differentially phosphorylated proteins in the crimped and straight wool of Chinese tan sheep [J]. J Proteomics, 2021, 235: 104115.
- [19] LIU Y X, SHI G Q, WAN P C, et al. Polymorphism of KAP6, KAP7 and KAP8 gene in four sheep breeds [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(2): 3438-45.
- [20] 胡馨予, 姚逸安, 胡情情, 等. 羊毛角蛋白基因家族及其启动子调控作用研究进展[J]. 中国细胞生物学学报(HU X Y, YAO Y A, HU Q Q, et al. Research progress of wool keratin gene family and its promoter regulation role [J]. Chin J Cell Biol), 2021, 43(8): 1705-13.
- [21] 石国庆, 管峰, 唐红, 等. 角蛋白HGTP及其对羊毛发育的影响[J]. 中国细胞生物学学报(SHI G Q, GUAN F, TANG H, et al. Keratin HGTP gene and its effects on wool fiber development [J]. Chin J Cell Biol), 2011, 33(3): 322-6.
- [22] LI Y, CANG M, LEE A S, et al. Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors [J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15947.
- [23] 李振, 靳辉, 黄洋, 等. 晋中绵羊耳成纤维细胞系建立[J]. 中国草食动物科学(LI Z, JING H, HUANG Y, et al. Establishment of fibroblast cell line in Jinzhong sheep [J]. Chin Herbivore Sci), 2012, 32(3): 9-12.
- [24] 李桂芳, 李岩, 赵宗胜, 等. 绵羊耳成纤维细胞的体外培养[J]. 中国草食动物科学(LI G F, LI Y, ZHAO Z S, et al. The fibroblast culture of sheep ear *in vitro* [J]. Chin Herbivore Sci), 2003, 23(4): 5-7.
- [25] 陈洋, 赵杰, 张红琴, 等. 成年绵羊皮肤成纤维细胞系的建立[J]. 内蒙古农业大学学报(CHEN Y, ZHAO J, ZHANG H Q, et al. Establishment of fibroblast line of adult sheep skin [J]. J Inner Mongolia Agri Univ), 2006, 27(2): 13-6.
- [26] 孟凡华, 肖红梅, 张东, 等. 蒙古绵羊胎儿皮肤成纤维细胞分离培养与特性分析[J]. 中国畜牧兽医(MENG F H, XIAO H M, ZHANG D, et al. Separation culture and characterization analysis of mongolian sheep fetal skin fibroblasts [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine), 2012, 39(3): 129-33.
- [27] 马玉珍, 扈廷茂, 王建国, 等. 绵羊胎儿成纤维细胞体外培养及转基因研究[J]. 中国实验动物学报(MA Y Z, HU T M, WANG J G, et al. Study on *in vitro* cell culture and transgene for sheep fetal fibroblasts [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica), 2003, 11(4): 195-8.
- [28] 黄兰兰, 石国庆, 白洁. 绵羊胚胎成纤维细胞的体外培养[J]. 黑龙江动物繁殖(HUANG L L, SHI G Q, BAI J. *In vitro* culture of sheep embryo fibroblasts [J]. Heilongjiang Journal of Animal Reproduction), 2006, 14(2): 4-5.
- [29] 戴振声, 陈宝安, 徐燕丽, 等. 人皮肤成纤维细胞原代培养方法的改良[J]. 东南大学学报(DAI Z S, CHEN B A, XU Y L, et al. Modification of the traditional method of fibroblast primary culture [J]. J Southeast Univ), 2004, 23(4): 236-8.
- [30] VEELKEN H, JESUITER H, MACKENSEN A, et al. Primary fibroblasts from human adults as target cells for ex vivo transfection and gene therapy [J]. Human gene therapy, 1994, 5(10): 1203-10.
- [31] 罗涛, 杨亚冬, 唐靓, 等. 胶原酶消化结合组织块培养法分离纯化兔肺成纤维细胞[J]. 现代医药卫生(LUO T, YANG Y D, TANG L, et al. Isolation and purification of rabbit lung fibroblasts by using collagenase digestion combined with tissue pieces culture method [J]. J Mod Med Health), 2017, 33(17): 2584-7.
- [32] 戴博, 聂苏秦, 郭康合, 等. 一种人皮肤组织来源成纤维细胞快速分离培养方法: CN201711281938.5[P]. 2018-3-9.
- [33] 刘爱军, 靳俊峰. 人皮肤成纤维细胞的高效分离培养及鉴定[J]. 广东医学(LIU A J, JING J F. Isolation and culture of human skin fibroblasts [J]. Guangdong Med J), 2008, 29(12): 1969-70.
- [34] 沈俊, 袁平, 唐俊明, 等. SD胚鼠心脏成纤维细胞的原代培养及鉴定[J]. 中国循证心血管医学杂志(SHEN J, YUAN P, TANG J M, et al. Primary culture and identification of embryonic rat cardiac fibroblasts [J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med), 2016, 8(12): 1441-4.
- [35] KOHTARO M, TETSUYA H, TAKASHI K, et al. Characterization of newly established bovine intestinal epithelial cell line [J]. Histochemistry and cell biology, 2010, 133(1): 125-34.