

红耳龟胚胎成纤维细胞体外培养

曹代男 段好冉 魏玉峰 葛研 龚世平*

广东省生物资源应用研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室 广州 510260

摘要: 红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*) 是世界上最危险的 100 种入侵物种之一, 该种对环境适应能力极强。目前尚未见有关红耳龟细胞体外培养的研究报道, 本研究旨在探索和建立快速稳定的红耳龟胚胎成纤维细胞分离培养体系, 为进一步从细胞层面研究红耳龟对极端环境的耐受机制提供材料和方法支撑。本研究取发育至 13 或 14 期的红耳龟胚胎, 采用酶消化法和差速贴壁法获得红耳龟胚胎成纤维细胞, 在体外进行原代培养和传代培养; 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法分别绘制红耳龟胚胎成纤维细胞在不同温度、接种浓度和血清浓度下的生长曲线; 采用反转录 PCR 对培养的红耳龟胚胎成纤维细胞进行分子水平的鉴定; 采用脂质体转染法对红耳龟胚胎成纤维细胞进行基因转染。结果表明: 1) 红耳龟胚胎成纤维细胞呈典型的梭形、不规则星形或多边形, 达到一定密度时呈多层生长, 排列紊乱, 随着传代次数的增加, 细胞体积增大, 梭形细胞有拉长趋势, 细胞可至少传至 15 代; 2) 红耳龟胚胎成纤维细胞在 30 ~ 34 °C 条件下的生长状态良好, 其生长速率随着温度的升高而增高; 其接种密度不宜低于 1.25×10^4 个/cm²; 其最佳血清浓度为 10%; 3) 反转录 PCR 检测到成纤维细胞标记基因 *vim* 和 *acta2* 在红耳龟胚胎成纤维细胞中表达; 4) 脂质体转染法可以介导外源绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白进入到红耳龟胚胎成纤维细胞内表达, 转染效率约为 30%。本研究成功地在体外分离培养了红耳龟胚胎成纤维细胞, 该细胞系可应用于外源基因转染和表达。

关键词: 红耳龟; 胚胎成纤维细胞; 原代培养; 细胞培养

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 05-733-09

In Vitro Culture of Red-eared Slider Embryonic Fibroblasts

CAO Dai-Nan DUAN Hao-Ran WEI Yu-Feng GE Yan GONG Shi-Ping*

Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China

Abstract: The Red-eared Slider (*Trachemys scripta elegans*) is one of the world's top 100 worst invasive alien species and has a strong ability to adapt to the environment. This study aims to establish a rapid and stable *in vitro* culture system of Red-eared Slider embryonic fibroblasts, and to provide material and method support for further study on the tolerance mechanism of Red-eared Slider to extreme environment at the

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2016YFC1201100), 广东省科技计划项目 (No. 2017A020219004), 广东省科学院科技发展专项 (No. 2017GDASCX-0107)

* 通讯作者, E-mail: gongsp@giabr.gd.cn;

第一作者介绍 曹代男, 女, 博士; 研究方向: 动物遗传学; E-mail: caodn@giabr.gd.cn。

收稿日期: 2017-11-13, 修回日期: 2018-04-12 DOI: 10.13859/j.cjz.201805008

cellular level. Red-eared Slider embryonic fibroblasts were isolated from stage 13 - 14 Red-eared Slider embryo by trypsin enzyme digesting and differential adherence, then were primarily cultured and subcultured *in vitro*. The growth curves of Red-eared Slider embryonic fibroblasts under different temperatures, different inoculation densities and different serum concentrations were drawn by MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) method. The cultured Red-eared Slider embryonic fibroblasts were identified using reverse transcription-PCR (RT-PCR). Red-eared Slider embryonic fibroblasts were transfected using Lipofectamine 3000. The results showed that: 1) Red-eared Slider embryonic fibroblasts were typical spindle-shaped, irregular star or polygons. When reached to a certain density, they grew in multiple layers and arranged in a disorderly manner. With the increase of passage times, the cell volume increased and the spindle-like cells elongated. Red-eared Slider embryonic fibroblasts could be cultured for at least 15 generations (Fig. 1). 2) The growth state of Red-eared Slider embryonic fibroblasts was good at 30 - 34 °C, and the growth rate increased with the increase of temperature. The inoculation density of Red-eared Slider embryonic fibroblasts should not be less than 1.25×10^4 cells/cm² and the optimum serum concentration of the cell culture was 10% (Fig. 2). 3) The expression of *vim* and *acta2*, two fibroblast markers, were detected in the cultured Red-eared Slider embryonic fibroblasts by RT-PCR (Fig. 3). 4) Liposomes could successfully mediate the expression of exogenous green fluorescent protein and red fluorescent protein in Red-eared Slider embryonic fibroblasts, and the transfection efficiency was about 30% (Fig. 4). This study successfully isolated and cultured Red-eared Slider embryonic fibroblasts *in vitro* and the cells could be used for the transfection and expression of exogenous genes.

Key words: Red-eared Slider, *Trachemys scripta elegans*; Embryonic fibroblasts; Primary culture; Cell culture

红耳龟 (*Trachemys scripta elegans*) 又名巴西龟, 原产于美国中部至墨西哥北部, 因其具有极强的环境适应能力, 近年来已在欧洲、非洲、澳洲、亚洲以及美洲等世界范围内成功入侵 (Rödder et al. 2009, Rhodin et al. 2017), 被列为世界最危险的 100 种外来入侵物种之一 (Lowe et al. 2004)。目前红耳龟已在中国野外普遍存在, 全国 34 个省级行政区均有野外分布记录, 形成严峻的入侵态势 (龚世平等 2018)。研究表明, 红耳龟对温度变化 (Cadi et al. 2004)、饥饿 (魏朝军等 2012)、高盐胁迫 (张珂等 2014) 和酸胁迫 (傅丽容等 2012) 的耐受性均比入侵地龟类强, 然而这些研究主要涉及生理生化和表型性状层面, 很少深入至细胞学和分子机制, 其原因可能是相对其他脊椎动物, 龟类细胞的体外培养研究相对滞后, 已建系的细胞相对匮乏。目前已报道的体外培养的

龟类细胞包括卡罗来纳箱龟 (*Terrapene carolina*) 心细胞 (Clark et al. 1967), 西部锦龟 (*Chrysemys picta bellii*)、蛇鳄龟 (*Chelydra serpentina*)、美国鳖 (*Apalone mutica*) 的肝和脾细胞 (Rund et al. 1998), 绿海龟 (*Chelonia mydas*) 心、肝等 13 种细胞 (Lu et al. 1999), 红海龟 (*Caretta caretta*)、鹰嘴海龟 (*Eretmochelys imbricata*)、多盾海龟 (*Lepidochelys olivacea*) 成纤维细胞 (Fukuda et al. 2012) 和中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 心细胞 (Guo et al. 2016) 等。本研究旨在建立稳定的红耳龟胚胎成纤维细胞分离培养体系, 为进一步从细胞水平深入研究红耳龟对逆境胁迫的耐受机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 红耳龟胚胎收集

红耳龟受精卵采自广东佛山龟类养殖场, 采集时间为 6 月上旬。将采集的龟卵埋入蛭石 (蛭石与水的质量比为 1:0.8), 并于 24 h 之内转移至实验室恒温恒湿培养箱中孵化, 孵化温度为 32 °C, 相对湿度 75%~85%。孵化 5~6 d 后, 弃去无明显受精斑的龟卵, 其他受精卵继续孵化。

1.2 红耳龟胚胎成纤维细胞的分离和原代培养

用 6% 新洁尔灭浸泡红耳龟卵 3 min 对蛋壳进行消毒, 去壳取红耳龟胚, 参照黄腹彩龟 (*Trachemys scripta*) 的正常发育图谱 (Greenbaum 2002), 在体视显微镜下观察龟胚的发育状况, 确定发育阶段。取孵化至 13 或 14 期的红耳龟胚, 放入无菌平皿中, 弃头、四肢及内脏, 用含 5 × 青霉素-链霉素 (青霉素 10 U/L, 链霉素 10 g/L, 生工生物工程股份有限公司) 溶液的 PBS 冲洗 3 遍以上至无明显血迹, 然后移入 2 ml 离心管中, 加入 0.3~0.5 ml 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco 公司), 用眼科剪反复剪成小块, 置 37 °C 水浴锅中消化 20 min 左右, 期间每隔 5 min 用 1 ml 移液枪反复吹打, 使组织块散开。镜下观察当大部分组织块分散成单细胞状态时, 加入 1 ml 完全培养基终止消化, 完全培养基包含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, Gibco 公司)、90% 细胞培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM, Gibco 公司) 和 1 × 青霉素-链霉素, 吸打混匀后于 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加适量完全培养基重悬后接种于细胞培养皿。每一株红耳龟胚胎成纤维细胞来源于同一个胚胎。置于饱和湿度, 32 °C 5% CO₂ 培养箱中静置培养 30 min。镜下观察细胞贴壁情况, 当细胞部分贴壁且稍加振荡也不浮起时, 将培养液连同尚未贴壁的细胞一起吸到另一培养皿中, 剩下的贴壁成纤维细胞加入新的完全培养基后继续培养。

1.3 红耳龟胚胎成纤维细胞的传代培养

从培养箱中取出红耳龟胚胎成纤维细胞,

显微镜下观察细胞密度, 当细胞汇合度达到 90% 以上, 吸出原培养液, 用 PBS 清洗细胞 1 次, 尽量除去残余的血清。加入适量 0.25% 胰蛋白酶, 轻摇几次, 使胰蛋白酶流过所有细胞表面, 吸出消化液, 室温消化 3~5 min, 置于显微镜下观察消化程度。待贴壁细胞趋于圆形, 并有部分飘起时加适量的完全培养基终止消化, 用移液管反复轻轻吹打混匀后移入离心管中 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用适量的完全培养基将细胞重悬。按照母代细胞和子代细胞的面积比为 1:2 或 1:3 的比例将细胞传代。

1.4 红耳龟胚胎成纤维细胞的冻存

配制适量细胞冻存液, 冻存液为 10% 二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO) + 20% FBS + 70% DMEM, 于 4 °C 预冷。取生长到对数期细胞, 吸除原培养液后用 PBS 清洗细胞 1 次, 尽可能除去残余的血清; 用与传代培养相同的方法消化收集细胞, 终止消化后将细胞液吸出移至 15 ml 离心管中 1 000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 加入适量细胞冻存液重悬细胞沉淀, 分装到细胞冻存管中, 放入 CoolCell 程序降温盒中, -80 °C 冻存过夜, 次日放入液氮中长期保存。

1.5 红耳龟胚胎成纤维细胞的复苏

首先分装出 8 ml 的完全培养基于 15 ml 离心管。再从液氮罐中取出冻存的细胞, 用止血钳夹住管口, 快速置于 37 °C 水浴锅中并快速摇动冻存管, 使其迅速解冻, 待细胞刚好完全溶解时, 将冻存细胞转移至预先准备好的 8 ml 的完全培养基中轻轻混匀, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用适量新鲜的完全培养基重悬细胞, 转移到细胞培养皿中, 置于饱和湿度, 32 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.6 噻唑蓝 (MTT) 比色法检测细胞生长曲线

将第 2 代红耳龟胚胎成纤维细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μl 细胞悬液, 每组设置 4 个复孔, 分别在不同培养温度、不同接种密度和

不同血清浓度条件下连续培养。随后每孔中加入 5 g/L MTT 溶液（生工生物工程股份有限公司）10 μ l，培养箱中孵育 4 h 后弃去孔内培养基，加入 DMSO 溶液 100 μ l，振荡溶解 10 min。酶标仪（Perkin Elmer Victor3，珀金埃尔默仪器有限公司）540 nm 处测定吸光度（ A_{540} ）。以时间为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制红耳龟胚胎成纤维细胞生长曲线。

1.7 红耳龟胚胎成纤维细胞总 RNA 的提取

待培养在 6 孔板的红耳龟胚胎成纤维细胞汇合度为 90%~100%时，移弃培养基，用 PBS 洗两次后，每孔加 1 ml TRIzol（宝生物工程有限公司），摇匀，室温裂解 10 min。将各孔内的细胞裂解液吸到 DEPC 处理过的 1.5 ml EP 管中，加氯仿 0.2 ml，充分混匀，室温静置 10 min 后，12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。取上清无色水相到一新的 DEPC 处理过的 EP 管，加等体积异丙醇，充分混匀，室温静置 10 min 后，12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。弃去上清，用 DEPC 水新配制的 1 ml 75%乙醇洗涤白色 RNA 沉淀，7 500 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min。去上清，室温干燥沉淀 5 min，加入 DEPC 处理水 30 μ l 溶解 RNA。

1.8 反转录 PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)

参照 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书（宝生物工程有限公司）配制 10 μ l 混合液 I，其中包含 2 μ l 5 \times gDNA Eraser Buffer、1 μ l gDNA Eraser、5 μ l 总 RNA 和 2 μ l RNase Free ddH₂O，于 42 $^{\circ}$ C 反应 2 min，去除基因组 DNA。然后在冰上配制 20 μ l 反转录混合液，其中包含 10 μ l 上述混合液 I、1 μ l PrimeScript RT Enzyme Mix I、1 μ l RT Primer、4 μ l 5 \times PrimeScript Buffer 2 和 4 μ l RNase Free ddH₂O，于 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min，85 $^{\circ}$ C 反应 5 s，反转录获得 cDNA。以上述 cDNA 为模板，按以下体系进行 PCR 扩增：反应总体积为 25 μ l，cDNA 1 μ l，上下游引物各 2 μ l (25 μ mol/L)，2 \times Premix TaqTM 12.5 μ l，ddH₂O 7.5 μ l。PCR 扩

增程序为：98 $^{\circ}$ C 预变性 5 s；98 $^{\circ}$ C 变性 10 s，58 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s，35 个循环；最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.9 细胞转染

接种红耳龟胚胎成纤维细胞至 24 孔板中，当细胞汇合度为 50% 以上时，参照 Lipofectamine 3000 说明书，在 1.5 ml EP 管中使用 25 μ l Opti-MEM 培养基（Gibco 公司）稀释 0.75 μ l Lipofectamine 3000 Reagent，充分混匀，室温静置 5 min；在另一个 EP 管中使用 25 μ l Opti-MEM 培养基稀释 1 μ g 质粒 DNA，加入 2 μ l P3000 Reagent，充分混匀，室温静置 5 min；将两种溶液混合均匀，制备 DNA-脂质体复合物，室温孵育 15 min 后，直接将其均匀滴加至培养的细胞中，转染后 24 h、48 h 和 60 h 观察转染结果。

1.10 统计学方法

对于 MTT 细胞增殖实验，每组实验重复 4 次，记录各孔吸光度，使用 GraphPad prism 7 软件计算每组吸光度的平均值和标准差并绘制细胞生长曲线。

2 结果

2.1 红耳龟胚胎成纤维细胞的生长特征和形态学观察

红耳龟胚胎成纤维细胞接种至培养皿中 30 min 开始贴壁，且贴壁较牢，稍加冲洗也不会掉落；培养 72 h 后可见绝大部分贴壁细胞呈典型的梭形、不规则星形或多边形，细胞体积较小，杂细胞较少，胞浆颗粒较少，胞质均匀；第 2~4 代细胞增殖速度较快，呈典型成纤维细胞形态特征，与原代细胞形态一致，细胞逐渐增大；第 5 代细胞体积明显增大，胞浆内颗粒增多；传代 5 次后，可观察到扁平状、胞质空泡明显增大、细胞间空隙加大、呈现老化状态的细胞；细胞达到一定密度时呈多层生长，梭形拉长，排列紊乱；红耳龟胚胎成纤维细胞可至少传至 15 代，此时细胞形态明显拉长（图 1）。

当细胞汇合达到 90%时，进行消化冻存，

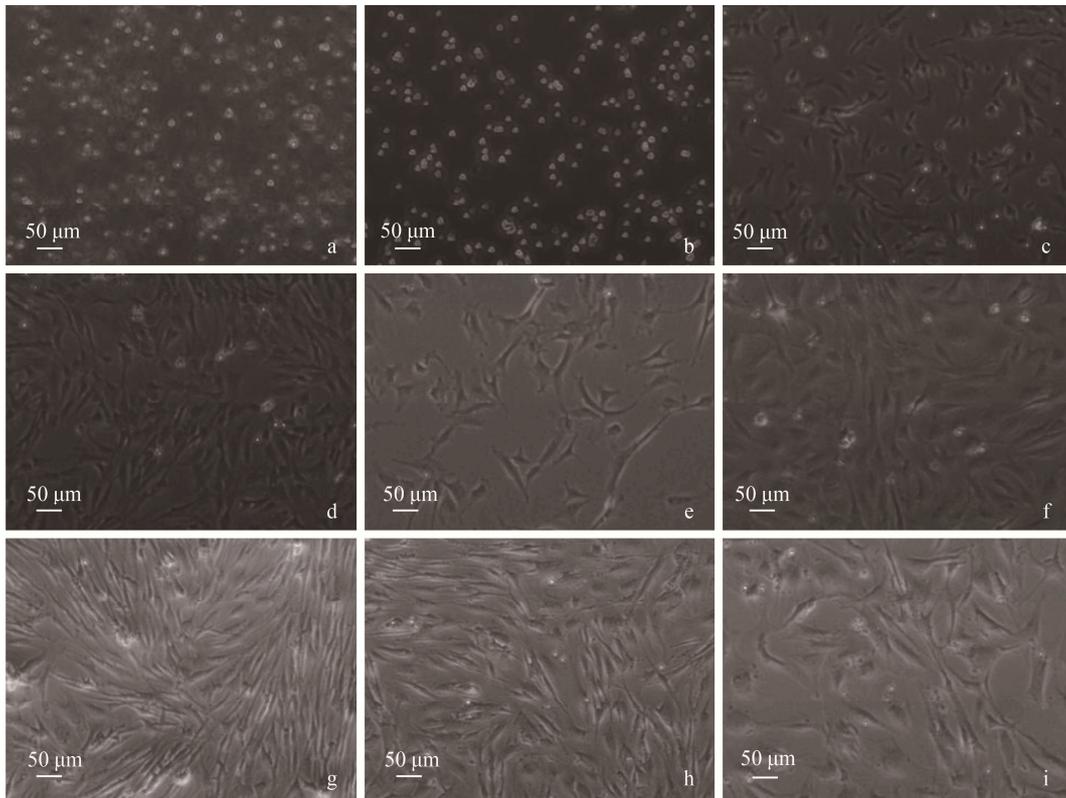


图 1 不同培养阶段红耳龟胚胎成纤维细胞的观察

Fig. 1 The observation of the Red-eared Slider embryonic fibroblasts in different periods

a. 原代红耳龟胚胎成纤维细胞刚接种至培养皿中；b. 培养箱中静置 30 min 后，吸弃培养液和未贴壁细胞；c、d、e 分别为培养 24 h 后，培养 72 h 后和第一次传代 12 h 后的红耳龟胚胎成纤维细胞，细胞呈梭形、不规则星形或多边形，胞浆颗粒少，胞质均匀；f. 第 5 代红耳龟胚胎成纤维细胞，细胞体积增大，胞浆内颗粒增多；g. 红耳龟胚胎成纤维细胞达到一定密度时呈多层生长，梭形拉长，排列紊乱；h. 第 15 代红耳龟胚胎成纤维细胞，梭形细胞明显拉长 1.5 ~ 2.0 倍；i. 第 6 代红耳龟胚胎成纤维细胞，从第 6 代起可观察到扁平状、胞质空泡明显增大、呈老化状态的细胞。

a. Primary Red-eared Slider embryonic fibroblasts were just inoculated into the culture dish; b. After incubation for 30 min in the incubator, the culture medium and non-adherent cells were discarded; c, d, e showed that Red-eared Slider embryonic fibroblasts cultured for 24 h, cultured for 72 h and after 12 h of the first passage, respectively. Red-eared Slider embryonic fibroblasts were in spindle-shaped, irregular stars or polygons, less cytoplasm particles, cytoplasmic uniform; f. 5th generation Red-eared Slider embryonic fibroblasts, cell volume increased, intracellular granules increased; g. When Red-eared Slider embryonic fibroblasts reach a certain density, were multi-layer growth, spindle elongated, arranged disorder; h. 15th generation Red-eared Slider embryonic fibroblasts, cells were significantly (1.5 to 2 times) elongated; i. 6th generation Red-eared Slider embryonic fibroblasts, cells grew larger, flatten shape and the roundish cytoplasmic vacuoles became senescent and larger after 5 passages.

将细胞用冻存液制成悬液装入冻存管中，冻存管放入 CoolCell 程序降温盒中直接置于 -80 °C 冰箱，次日转入液氮中长期保存。细胞复苏时，在 37 °C 水浴快速解冻冻存的细胞，复苏的细胞接种至培养皿后会快速再次贴壁，复苏前后

细胞的生长速度与形态无明显差异，细胞活率为 90% 左右。

2.2 温度、接种密度、血清浓度对红耳龟胚胎成纤维细胞生长的影响

将红耳龟胚胎成纤维细胞按 2.5×10^4 个/cm²

的密度接种于 96 孔培养板中连续培养 8 d, 利用 MTT 法绘制不同温度下的细胞生长曲线。在 30 °C、32 °C 和 34 °C 三个温度条件下, 红耳龟胚胎成纤维细胞均能进入指数生长期, 其生长速度随着温度的升高而增高 (图 2a)。

将红耳龟胚胎成纤维细胞分别按 2.500×10^4 个/cm²、 1.250×10^4 个/cm²、 6.250×10^3 个/cm²、 3.125×10^3 个/cm² 的密度梯度接种于 96 孔培养板中, 置于 34 °C 培养箱中连续培养 8 d, 利用 MTT 法绘制不同接种密度条件下的细胞生长曲线。接种密度为 2.500×10^4 个/cm² 和 1.250×10^4 个/cm² 条件下的红耳龟胚胎成纤维细胞生长状态良好, 可顺利进入对数生长期, 接种密度为 6.250×10^3 个/cm²、 3.125×10^3 个/cm² 条件下的红耳龟胚胎成纤维细胞生长缓慢, 难以增殖 (图 2b)。结果表明, 红耳龟胚胎成纤维细胞的接种密度不宜低于 1.250×10^4 个/cm²。

将红耳龟胚胎成纤维细胞分别在血清浓度为 5%、10%、15% 和 20% 的培养基中连续培养 6 d, 利用 MTT 法绘制不同血清浓度条件下的

细胞生长曲线, 红耳龟胚胎成纤维细胞在血清浓度为 10% 的条件下生长速率最快 (图 2c)。

2.3 红耳龟胚胎成纤维细胞的分子鉴定

根据 GenBank 公布的西部锦龟、绿海龟和中华鳖的 *vim* 及 *acta2* mRNA 序列, 这 3 物种 *vim* mRNA 的 Gen Bank 登录号分别为 XM_005282441.1、XM_007058504.1 和 XM_006119549.1, *acta2* mRNA 的 Gen Bank 登录号分别为 XM_005292510.1、XM_007071571.1 和 XM_006121447.2, 在其保守区域设计特异性引物 (图 3a)。对培养的红耳龟胚胎成纤维细胞进行 RT-PCR 扩增, 可以检测到成纤维细胞标记基因 *vim* 和 *acta2* mRNA 的表达 (图 3b)。对 RT-PCR 产物进行双向测序并去除两端测序不准确的序列, 获得一段长 544 bp 的红耳龟 *vim* mRNA 序列 (GenBank 登录号为 MH208240) 和一段长 628 bp 的红耳龟 *acta2* mRNA 序列 (GenBank 登录号为 MH208241), 在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 扩增产物序列与西部锦龟 *vim* 和 *acta2*

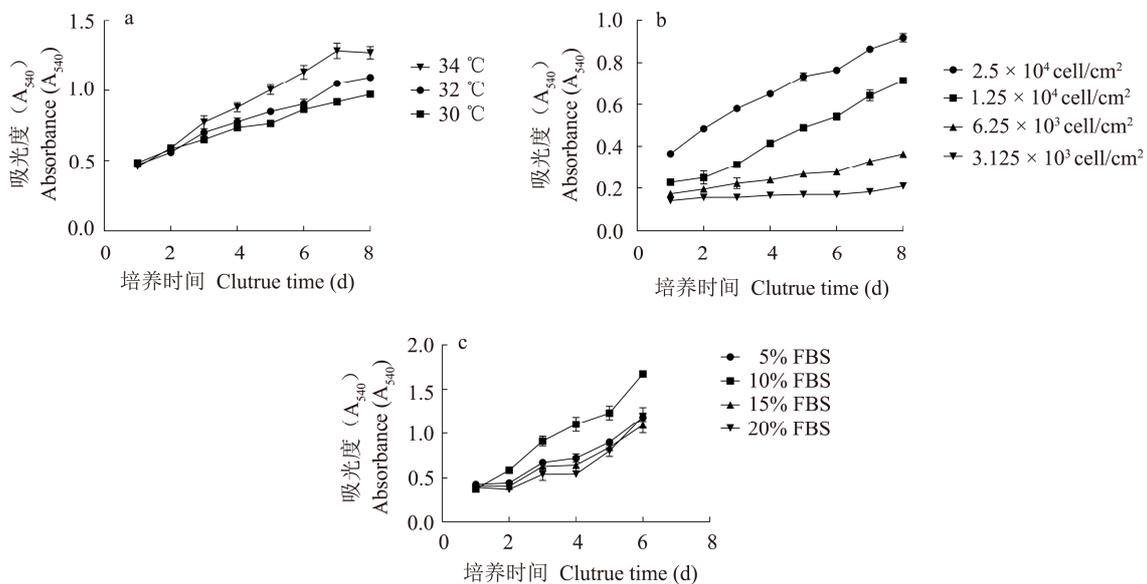


图 2 红耳龟胚胎成纤维细胞生长曲线

Fig. 2 The growth curve of Red-eared Slider embryonic fibroblasts

a. 不同培养温度; b. 不同接种密度; c. 不同血清浓度。

a. Different culture temperatures; b. Different inoculation densities; c. Different serum concentrations.

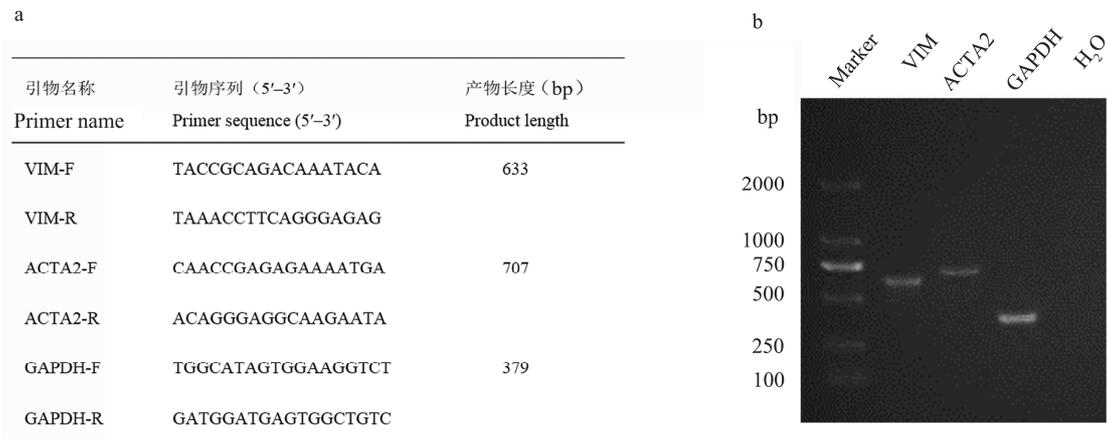


图3 红耳龟胚胎成纤维细胞的分子鉴定

Fig. 3 The molecular identification of Red-eared Slider embryonic fibroblasts

a. 引物列表; b. 红耳龟胚胎成纤维细胞的 RT-PCR 扩增结果; Marker. DNA 分子量标准, VIM. *vim* 基因 RT-PCR 扩增结果, ACTA2. *acta2* 基因 RT-PCR 扩增结果, GAPDH. 持家基因对照, H₂O. 阴性对照。

a. Showed the primers used in RT-PCR; b. Showed the RT-PCR results of Red-eared Slider embryonic fibroblasts, Marker: DNA marker, VIM: RT-PCR of *vim* gene, ACTA2: RT-PCR of *acta2* gene, GAPDH: The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as internal control, H₂O: Negative control.

mRNA 序列同源性均为 99%。

2.4 红耳龟胚胎成纤维细胞的转染

利用脂质体 Lipofectamine 3000 将编码红色荧光蛋白的质粒 pDsRed2-N1 和编码绿色荧光蛋白的质粒 pEGFP-C1 转染至红耳龟胚胎成纤维细胞, 观察发现, 转染 24 h 时仅有少量的细胞能够表达荧光蛋白, 48 h 可观察到较多荧光蛋白, 60 h 可观察到更高密度和亮度的荧光蛋白, 转染效率在 30% 左右 (图 4)。转染后的细胞形态较转染前有所不同, 有拉长变细的趋势。

3 讨论

胚龄对胚胎成纤维细胞的状态影响很大。若胚龄太短, 胚胎很小而且太柔软, 操作极不方便, 难以完全去除胎儿的头、尾、四肢及所有内脏, 致使获得的成纤维细胞内容易混有杂细胞, 从而影响所培养成纤维细胞的质量。而胚龄太长的胚胎已经分化出背甲, 不易于胚胎剥离, 细胞之间的连接也难以消化。家兔

(*Oryctolagus cuniculus*) 配种后 12~18 d 的胎儿均可作为兔胚胎成纤维细胞的来源 (魏如雪等 2016), 小鼠 (*Mus musculus*) 胚胎成纤维细胞的最佳获取时间为交配后 13.5 d (胡三强等 2014)。本研究探索发现, 发育至 13 或 14 期的红耳龟均可作为红耳龟胚胎成纤维细胞的来源, 此阶段的胚胎长度为 1~2 cm, 头、尾、四肢、内脏清晰可辨, 易剥除, 每个胚胎可获得 $(3\sim6)\times 10^6$ 个原代细胞, 细胞量大且纯度高。

原代细胞培养防止细胞污染很关键。取样前, 应首先做好准备工作, 将红耳龟卵浸泡在 6% 洁尔灭液中消毒 3 min, 防止表面污染, 胚胎分离过程宜在超净台中进行, 且应尽量减少胚胎暴露在空气中时间。本研究采用眼科剪先在离心管中剪碎组织, 然后用胰酶消化, 利用成纤维细胞的贴壁速度比其他细胞贴壁速度快来纯化细胞。整个过程快速简单、细胞污染概率小、成功率高。

红耳龟为变温动物, 对温度的耐受范围广

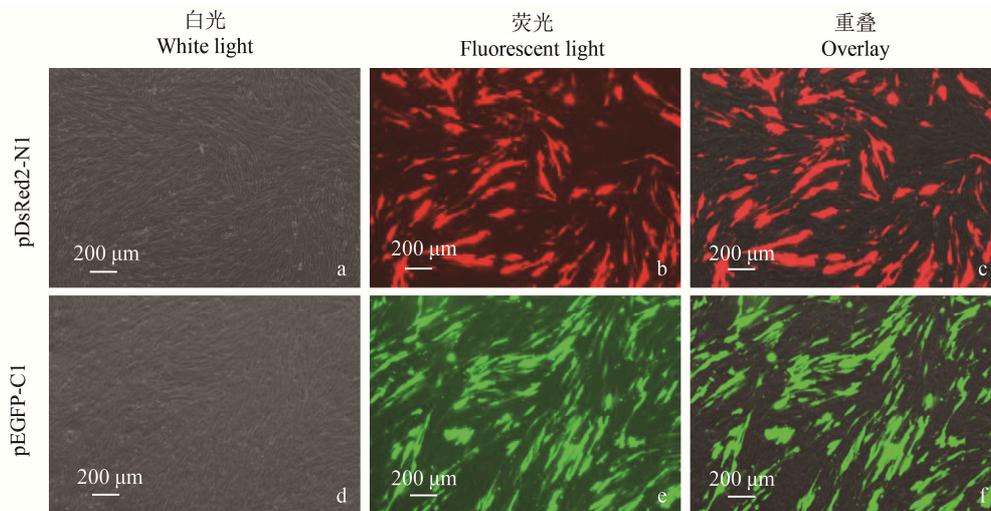


图 4 脂质体介导 pDsRed2-N1 和 pEGFP-C1 质粒转染红耳龟胚胎成纤维细胞

Fig. 4 Liposome-mediated transfection of plasmids pDsRed2-N1 and pEGFP-C1 into Red-eared Slider embryonic fibroblasts

a、b、c 为红耳龟胚胎成纤维细胞转染 pDsRed2-N1 质粒 60 h 后，荧光显微镜下可观察到大量红色荧光蛋白的表达；d、e、f 为红耳龟胚胎成纤维细胞转染 pEGFP-C1 质粒 60 h 后，荧光显微镜下可观察到大量绿色荧光蛋白的表达。

a, b, c showed that Red-eared Slider embryonic fibroblasts were transfected with plasmid pDsRed2-N1, RFP abundantly expressed 60 h after transfection; d, e, f showed that Red-eared Slider embryonic fibroblasts were transfected with plasmid pEGFP-C1, GFP abundantly expressed 60 h after transfection.

泛，在水温 1 ~ 40 °C 都能够生存，在 25 ~ 30 °C 间活动能力最强（马凯 2013）。和哺乳动物相比，红耳龟胚胎成纤维细胞体外培养对温度的要求不高，具有一定的弹性范围。本研究结果表明，红耳龟胚胎成纤维细胞在 30 ~ 34 °C 之间均能正常生长和增殖，生长速率在 34 °C 最高。前人的研究表明，同为龟鳖目的绿海龟、鹰嘴海龟和中华鳖，其细胞培养也表现出对温度要求具有弹性范围：绿海龟细胞在 20 ~ 30 °C 均能增殖，生长速率在 30 °C 最高（Lu et al. 1999）；鹰嘴海龟胚胎细胞在 25 ~ 33 °C 均能增殖，生长速率在 33 °C 最高（Takeshita et al. 2013）；中华鳖心细胞在 25 ~ 35 °C 均能增殖，最佳生长温度为 30 °C（郭海杰 2016）。然而，本研究并未检测红耳龟胚胎成纤维细胞在 30 ~ 34 °C 范围之外的增殖情况。此外，接种密度对红耳龟胚胎成纤维细胞的生长影响很大，较低接种密度的细胞更容易出现老化现象，过低的

接种密度会直接导致红耳龟胚胎成纤维细胞传代失败。

对于有限细胞系，在体外培养时经过多次传代后易发生遗传性状的改变。小鼠的胚胎成纤维细胞通常只能良好生长 5 代，5 代之后的细胞急剧衰亡（胡三强等 2014）。家兔胚胎成纤维细胞在 10 代以后出现衰老迹象，胞体平铺，伪足增多，生长速度慢（魏如雪等 2016）。本研究实验结果表明，5 代之前的红耳龟胚胎成纤维细胞生长迅速，代谢旺盛，细胞形状规则，部分细胞株 5 代之后出现衰老现象。大部分细胞株可至少传至 15 代以上，但此时的细胞出现明显衰老现象，形态较原代细胞已经有所不同，细胞明显拉长。

本研究成功地建立了红耳龟胚胎成纤维细胞体外分离培养体系，胚胎成纤维细胞具有生长快、分化程度相对较低、体外传代次数相对较高等特点。红耳龟胚胎成纤维细胞可用脂质

体介导法进行细胞转染, 转染率约为 30%, 高于中华鳖心细胞系 16% 的转染率 (郭海杰 2016), 为进一步利用红耳龟胚胎成纤维细胞进行基础理论和实验研究奠定了基础。

参 考 文 献

- Cadi A, Joly P. 2004. Impact of the introduction of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*). *Biodiversity and Conservation*, 13(13): 2511–2518.
- Clark H F, Karzon D T. 1967. Terrapene heart (TH-1), a continuous cell line from the heart of the box turtle *Terrapene carolina*. *Experimental Cell Research*, 48(2): 263–268.
- Fukuda T, Kurita J, Saito T et al. 2012. Efficient establishment of primary fibroblast cultures from the hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 48(10): 660–665.
- Greenbaum E. 2002. A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Canadian Journal of Zoology*, 80(8): 1350–1370.
- Guo H, Xia Z, Tang W et al. 2016. Establishment and characterization of a cell line from the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 52(6): 673–682.
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S et al. 2004. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. A selection from the Global Invasive Species Database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), 12pp.
- Lu Y, Nerurkar V R, Aguirre A A, et al. 1999. Establishment and characterization of 13 cell lines from a green turtle (*Chelonia mydas*) with fibropapillomas. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 35(7): 389–393.
- Rödter D, Schmidlein S, Veith M, et al. 2009. Alien invasive slider turtle in unpredicted habitat: a matter of niche shift or of predictors studied? *PLoS One*, 4(11): e7843.
- Rhodin A G J, Iverson J B, Bour R, et al. 2017. *Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status*. 8th ed. Chelonian Research Monographs, 7: 67–68.
- Rund C R, Christiansen J L, Johnson J C. 1998. *In vitro* culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: comments on melanomacrophage morphology. *Pigment Cell Research*, 11(2): 114–119.
- Takeshita S, Matsuda N, Kodama S, et al. 2013. *In vitro* thermal effects on embryonic cells of endangered hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata*. *Zoological Science*, 30(12): 1038–1043.
- 傅丽容, 贺斌, 王娅玲, 等. 2012. 硝酸盐胁迫对红耳龟和中华条颈龟胚胎的毒性效应. *水产科学*, 31(11): 683–686.
- 龚世平, 杨江波, 葛研, 等. 2018. 外来物种红耳龟在中国野外分布现状及扩散路径研究. *野生动物学报*, 39(2): 373–378.
- 郭海杰. 2016. 中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 心脏源成纤维细胞系的建立、鉴定以及应用研究. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 37.
- 胡三强, 王妍妍, 马永宾, 等. 2014. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离培养及饲养层制备. *中国组织工程研究*, 18(45): 7306–7311.
- 马凯. 2013. 海南万泉河外来物种红耳龟的活动节律和活动区. 海南: 海南师范大学硕士学位论文, 10.
- 魏朝军, 杨志兵, 洪美玲, 等. 2012. 外来种红耳龟和本地种中华条颈龟耐饥饿能力比较研究. *四川动物*, 31(3): 430–434.
- 魏如雪, 赵学明, 郝海生, 等. 2016. 兔胎儿成纤维细胞的分离培养和鉴定. *畜牧兽医学报*, 47(6): 1272–1279.
- 张珂, 洪美玲, 史海涛, 等. 2014. 盐度胁迫对红耳龟 Na^+/K^+ -ATP 酶及消化酶活性的影响. *水产科学*, 33(8): 520–524.