

冻存对罗盘山猪成纤维细胞生物学特性的影响

周旗^{①#} 龙熙^{②#} 张亮^② 涂志^② 潘红梅^② 邓娟^③ 王瑶^③
任素碧^① 孔莎莎^① 王勇胜^{①*}

① 西北农林科技大学, 家畜生物学国家重点实验室 杨凌 712100; ② 重庆市畜牧科学院 重庆 402460;

③ 重庆市潼南区农业科技推广中心 潼南 402660

摘要: 以濒危品种罗盘山猪 (*Sus scrofa domestica*) 耳缘组织为材料, 利用组织块贴壁法建立罗盘山猪耳缘成纤维细胞系, 并对低代次 (第 3 代) 及高代次 (第 9 代) 成纤维细胞冻存前与复苏后相关生长特性进行分析。研究表明: 罗盘山猪耳缘成纤维细胞生长状态良好, 第 3 代成纤维细胞纯化程度高于 98%; 细胞遗传学分析显示细胞具有 18 对常染色体和 1 对性染色体, 证明该细胞系为稳定二倍体细胞系; 细胞支原体检测为阴性, 表明该细胞系无支原体污染; 第 3 代及第 9 代细胞冻存前与复苏后生长曲线均呈现“S”型; 第 3 代细胞冻存前与复苏后活率分别为 $92.56\% \pm 1.23\%$ 和 $90.36\% \pm 1.29\%$, 复苏后细胞周期中 DNA 合成前期 (G_1) 细胞比例显著增加, 但 DNA 合成后期 (G_2) 期和 DNA 合成期 (S) 细胞占比、细胞凋亡率、活性氧水平与衰老水平与冻存前差异不显著; 第 9 代细胞冻存前与复苏后活率分别为 $83.66\% \pm 3.18\%$ 和 $72.83\% \pm 0.59\%$, 复苏后细胞周期中 G_2 期细胞比例未出现显著变化, 而 G_1 期与 S 期细胞占比、细胞凋亡率、活性氧水平与衰老水平与冻存前差异均显著。本研究成功建立了罗盘山猪耳缘成纤维细胞系, 通过测定第 3 代与第 9 代细胞冻存前与复苏后相关生长特性, 证明低代次的罗盘山猪耳缘成纤维细胞在经过冻存后的生长特性更加稳定, 更适合长期超低温保存, 为后续遗传学等研究提供稳定和优良的材料。

关键词: 罗盘山猪; 成纤维细胞; 细胞冷冻保存; 细胞凋亡; 核型

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 02-247-16

Effects of Cryopreservation on the Cellular Characteristics of Fibroblasts Isolated From Luopanshan Pigs

ZHOU Qi^{①#} LONG Xi^{②#} ZHANG Liang^② TU Zhi^② PAN Hong-Mei^② DENG Juan^③
WANG Yao^③ REN Su-Bi^① KONG Sha-Sha^① WANG Yong-Sheng^{①*}

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2021YFD1200303), 重庆市技术创新与应用发展专项重点项目 (No. cstc2021jscx-dxwtBX0004), 重庆市自然科学基金面上项目 (No. cstc2021jcyj-msxmX0800);

* 通讯作者, E-mail: wangyongsheng01@nwsuaf.edu.cn;

第一作者介绍 周旗, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物医学; E-mail: 1250284070@qq.com;

龙熙, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物遗传育种与繁殖; E-mail: 13618288075@163.com.

收稿日期: 2023-07-03, 修回日期: 2024-09-23 DOI: 10.13859/j.cjz.202423129 CSTR: 32109.14.cjz.23129

① Northwest A&F University, Key Laboratory of livestock Biology, Yangling 712100; ② Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460; ③ Agricultural Science and Technology Extension Center, Tongnan 402660, China

Abstract: [Objectives] The Luopanshan Pig *Sus scrofa domestica*, an indigenous local breed of China, is found mainly in the Tongnan region of Chongqing. The population of purebred Luopanshan Pigs has significantly declined due to the widespread impact of African swine fever and intense competition from other breeds, putting them at risk of endangerment. To conserve this invaluable genetic resource, the establishment of a somatic cell genetic resource bank is essential. **[Methods]** In this study, we successfully established a fibroblast cell line from the ear margin of Luopanshan Pigs using the tissue block adhesion method. Fluorescent staining was utilized to detect mycoplasma contamination and to identify the fibroblast marker vimentin protein. Chromosomal karyotype analysis and G-banding were conducted to assess genetic stability. In addition, flow cytometry was employed to evaluate key cell characteristics, including apoptosis rate, cell cycle distribution, reactive oxygen species levels, and cellular senescence. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 9.5), with one-way ANOVA, two-way ANOVA and Student's *t*-test being used to determine significant differences. **[Results]** The study showed that primary fibroblasts migrated from tissue blocks within 2 to 5 d, exhibited an elongated, spindle-shaped morphology (Fig. 1). After 8 to 12 d of continued cultivation, the cell density reached 90%, allowing successful passaging. The first five generations exhibited robust growth, forming a dense monolayer within 2 to 3 d post-passage. However, from the sixth generation onwards, cell volume gradually increased, leading to an irregular morphology characterized by enhanced lamellipodia and filopodia formation, alongside a significant decrease in growth rate. Cell fusion was observed after approximately 4 to 5 d. (Fig. 2). To assess cell purity, fluorescent staining for vimentin (a fibroblast marker) and nuclear DNA was performed, revealing a fibroblast purity exceeding 98% in the third passages (Fig. 3). Hoechst staining confirmed the absence of mycoplasma DNA, indicating no contamination (Fig. 4). The Luopanshan Pig fibroblasts have a chromosome number of $2n = 38$, comprising 18 pairs of autosomes. Specifically, there are five pairs of submetacentric chromosomes (chromosomes 1 - 5), two pairs of subtelocentric chromosomes (chromosomes 6 and 7), five pairs of metacentric chromosomes (chromosomes 8 - 12), and six pairs of telocentric chromosomes (chromosomes 13 - 18). In addition, there is one pair of sex chromosomes, which are classified as metacentric chromosomes (Fig. 5). The relative lengths of each chromosome are detailed in Table 2. The viability of the third-generation cells before cryopreservation and after recovery exceeded 85%, with no significant differences observed. The ninth generation showed a viability surpassing 80% before cryopreservation, the viability remained above 70% after recovery. Before cryopreservation and after recovery, the proliferation rate of third generation cells showed a rapid increase, following a standard "S" shaped growth curve. In contrast, the growth curve of the senescent cells of the ninth-generation cells showed a gradual increase in an "S" shape (Fig. 6). The results of the flow cytometry analysis showed a significant increase in the proportion of cells in the gap 1 phase (G_1) phase after the third generation, compared to the conditions before cryopreservation, there was a slight decrease in the proportion of cells in the gap 2 phase (G_2) and synthesis phase (S), but this difference was not statistically significant. Although there was a slight increase in the rate of apoptosis after recovery, this did not reach statistical significance. After the recovery of the ninth generation, there was a significant increase in the proportion of cells in G_1 phases and a significant decrease in the percentage of cells in S phase. There was also

a slight increase in the proportion of cells in G₂ phase, but this difference did not reach statistical significance. Furthermore, a significant increase in the apoptosis rate was also observed (Fig. 7). Finally, compared to third generation cells, significantly increased levels of reactive oxygen species (ROS) and senescence were observed in ninth generation cells, with marked increases after recovery (Figs. 8, 9). **[Conclusion]** In this study, we successfully established a cell line of marginal fibroblasts from the ear tissue of Lopangshan pigs. By comparing the growth characteristics of third- and ninth-generation fibroblasts before cryopreservation and after recovery, we found that low-generation fibroblasts exhibited greater stability in terms of growth after recovery. Therefore, low-generation fibroblasts are more suitable for long-term ultra-low temperature preservation and provide stable and excellent materials for subsequent genetic studies compared to high generation fibroblasts.

Key words: Luopanshan Pig; Fibroblasts; Cell freezing; Apoptosis; Karyotype

罗盘山猪 (*Sus scrofa domestica*), 又名毫杆猪, 主要分布于重庆市潼南区的罗盘山地区 (陈燕 2014)。该品种猪耐粗饲, 食欲旺盛, 抗病力强, 遗传性能稳定, 具有很高的进化潜力, 被誉为珍贵的遗传资源之一 (邓娟 2013)。近年来, 由于非洲猪瘟的影响以及养户饲养意愿的降低, 罗盘山猪的饲养规模逐年减少。根据 2021 年第三次全国遗传资源普查结果显示, 种母猪存栏 155 头, 种公猪 3 头, 处于濒危状态 (重庆市畜牧科学院畜牧经济与信息技术研究所 2021)。血缘鉴定结果显示, 现存罗盘山猪仅存 7 个家系, 且有 3 个家系仅存有 1 头种猪。为了保护这一珍贵的地方猪种质遗传资源, 延续其优良的遗传特性, 采取的保种方法主要包括活体原位保存, 精子、卵母细胞、胚胎、体细胞和 DNA 的超低温保存以及 DNA 保存 (Comizzoli 2015)。相较于冷冻保存猪的精子、卵母细胞或者胚胎, 体细胞同样具有不受时间、地域限制和方便运输的特点, 并且包含着供体动物完整的基因组 (Nagamura et al. 2023), 不仅可用于评估不同猪品种的遗传多样性, 还可以通过体细胞克隆技术复原濒危物种 (Cordova et al. 2017)。同时, 利用体细胞进行基因编辑和改良, 还可以改良猪的遗传性状, 提高猪的抗病性 (Lee et al. 2003)。

但长期以来, 濒危品种猪的原代细胞面临多种挑战, 例如来源稀缺、数量少、易受污染、

在连续传代培养后生物学特性不稳定以及复苏后活性显著降低等问题 (Sun et al. 2022)。这些问题不仅影响了细胞的使用效率, 也增加了科研成本。成纤维细胞是原代培养物中最常见和最容易获得的细胞, 并具有较强的增殖能力、适应能力、重编程能力与稳定性, 因此被广泛应用于体外培养和各类细胞实验中 (Thangapazham et al. 2014, Deng et al. 2023)。然而, 无论是成纤维细胞还是其他类型的细胞, 目前使用的原代培养方法所获得的细胞都存在数量少、增殖率低并且易衰老等问题。虽然通过连续传代培养可以解决原代细胞数量不足的问题, 但细胞的遗传稳定性往往会随之降低 (Lago et al. 2019)。

将细胞进行冷冻保存是解决上述问题, 减少浪费和保证后期实验应用的一种方法。研究表明, 许多细胞类型, 如干细胞 (Xu et al. 2010)、卵细胞 (Vining et al. 2021) 和精子细胞 (Cheng et al. 2022) 等在经过程序性冷冻后会出现细胞膜损伤、细胞内环境紊乱以及细胞凋亡信号的激活, 严重影响了细胞的活力和后续的实验应用。早期研究中关于罗盘山猪耳缘成纤维细胞的原代培养以及冷冻保存对细胞功能特征影响的数据很少。因此, 本研究首先从罗盘山猪耳缘组织中分离出了耳缘成纤维细胞, 在对细胞进行纯度与遗传鉴定后, 利用超低温冷冻技术将耳缘成纤维细胞保存在液氮

中, 成功建立了濒危猪种罗盘山猪体细胞资源库。此外, 还探究了低代次(第3代)和高代次(第9代)成纤维细胞在冻存前与复苏后的生物学特性, 包括细胞活率、生长曲线、细胞凋亡与周期、活性氧水平与细胞衰老水平, 提供了濒危罗盘山猪成纤维细胞资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

10 头雌性罗盘山猪来源于重庆市潼南区新胜镇, 其编号及年龄信息详见表 1, 分别采集其耳缘组织样本约 0.5 ~ 1.0 cm³, 经过消毒与清洗后置于 4 °C 保存。6 h 内带回实验室, 在无菌条件下分离细胞。

表 1 罗盘山猪编号及年龄统计

Table 1 Identification and age distribution statistics of Luopanshan Pigs *Sus scrofa domestica*

罗盘山猪编号 Identification number	年龄(岁) Age (years)
28	13
186	13
30	13
190	7
52	7
164	6
141	5
16	3
65	3
67	2

1.2 实验方法

1.2.1 罗盘山猪成纤维细胞的原代培养与传代培养 原代培养: 无菌操作除去耳缘组织的毛发、表皮层、软骨与脂肪组织, 保留真皮层, 使用 75%酒精消毒 30 s。用含 1%青霉素-链霉素-两性霉素 B (PB180121, 武汉普诺赛生命科技有限公司) 的杜氏磷酸盐缓冲液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS) 清洗组织 20 次。将洗净的组织块转移至培养皿中, 加入适量细胞完全培养基, 该培养基含 15%胎牛血清

(10099141C, 赛默飞世尔科技公司)、1%青霉素-链霉素-两性霉素 B 与 84% MEM-alpha (32561037, 赛默飞世尔科技公司)。将组织剪碎成 0.5 ~ 1.0 mm³ 碎块, 均匀铺于皿底。使用移液枪将组织碎块周围的培养基吸走, 将培养皿倒置于 38.5 °C 5% CO₂ 培养箱中 4 ~ 6 h, 待组织贴壁后, 加入 4 ml 细胞完全培养基后正置培养。

传代培养: 当细胞密度为 80% 时, 用 0.25% 胰酶 (15050065, 赛默飞世尔科技公司) 消化细胞约 2 ~ 4 min, 终止消化后以 1 000 r/min 离心 5 min, 使用新鲜细胞完全培养基重悬细胞沉淀, 按照 1 : 2 的传代比例接种在培养皿中。

1.2.2 成纤维细胞的鉴定 将第 3 代成纤维细胞接种于 24 孔板中, 待细胞贴壁后使用 DPBS 清洗细胞 1 次。加入 4%多聚甲醛 (P0099, 上海碧云天生物有限公司) 固定细胞 15 min。加入 Triton X-100 (P0096, 上海碧云天生物有限公司) 室温透化破膜 20 min。加入封闭液 (D3308B, 上海碧云天生物有限公司) 封闭细胞 60 min。加入 500 倍稀释的抗-波形蛋白抗体 [RV202]-细胞骨架标记 (ab8978, 艾博抗上海贸易有限公司), 4 °C 孵育细胞 24 h。取出细胞复温 1 h, 并加入 500 倍稀释的 Goat Anti-Mouse IgG H & L (ab150113, 艾博抗上海贸易有限公司), 38.5 °C 避光条件下孵育细胞 4 h。最终使用 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI) (C1005, 上海碧云天生物有限公司) 染色 5 min 以标记细胞核, 阴性对照 (不加抗-波形蛋白抗体) 进行相同处理。波形蛋白阳性细胞会在在荧光显微镜下显示出与波形蛋白抗体结合的清晰绿色荧光信号。阴性对照为仅显示 DAPI 的蓝色荧光, 而没有绿色荧光信号。每次加入新的试剂处理细胞时, 需要使用 DPBS 清洗细胞 3 ~ 5 次。最后在荧光倒置显微镜上随机选取 5 个视野, 统计每个视野中波形蛋白阳性细胞总数, 并根据下列公式计算成纤维细胞纯化率。

成纤维细胞纯化率 (%) =

$$\left(\frac{\sum \text{视野中波形蛋白阳性细胞数}}{\sum \text{视野中总细胞数}} \right) \times 100\%$$

1.2.3 细胞支原体检测 将细胞接种于 24 孔板, 培养细胞至密度为 80%。使用 DPBS 清洗细胞 1 次, 每孔加入免疫荧光染色固定液 (C0296, 上海碧云天生物有限公司) 固定细胞 15 min, 随后弃去固定液并晾干。每孔加 10 倍稀释的 Hoechst 染色液 (C0296, 上海碧云天生物有限公司) 于室温条件下避光染色 20 min。在荧光显微镜下观察细胞核周围区域, 如有显著的絮状物或颗粒状荧光信号, 表明存在支原体污染。若仅有细胞核显示均匀的蓝色荧光则表明无支原体污染。

1.2.4 染色体核型分析 为了观察细胞中染色体的形态结构并统计其相对长度, 制备了染色体滴片并进行 G 显带分析, 染色体制备方法参考李志惠等 (2012), G 显带处理方法参考李志惠 (2007)。

1.2.5 成纤维细胞冻存、复苏与生长特性分析

细胞冻存: 按照常规方法消化细胞, 保留细胞沉淀, 使用细胞冷冻液 (PB180436, 武汉普诺赛生命科技有限公司) 重悬细胞, 调整细胞密度为 1×10^{10} 个/L, 分装于冻存管中, 放入 Mr. Frosty™ 梯度降温盒 (5100-0050, 赛默飞世尔科技公司) 置于 -80°C 冰箱中过夜, 隔天转移至液氮罐中长期储存。

细胞复苏: 取出冻存管, 立即放入 37°C 水浴锅中摇晃, 使细胞在 1 ~ 2 min 内融化。以 1 000 r/min 离心 5 min, 并用新鲜培养液重悬细胞沉淀, 接种在培养皿中, 于细胞培养箱中静置恒温培养。

随机选取 3 个细胞系, 收集第 3 代与第 9 代冻存前与复苏后的成纤维细胞, 使用台盼蓝染色液 (C0011, 上海碧云天生物有限公司) 与细胞悬液混合染色 4 min, 吸取 10 μl 细胞悬液于细胞计数板。台盼蓝染色液会将死亡细胞的膜穿透而染成蓝色, 而活细胞则保持透明。染色结束后在显微镜下统计活细胞数和死细胞数,

并按下列公式计算细胞活率。

细胞活率 (%) =

$$\left(\frac{\sum \text{视野中蓝染细胞总数}}{\sum \text{视野中总细胞数}} \right) \times 100\%$$

生长曲线测定: 随机选取 3 个细胞系, 收集第 3 代与第 9 代冻存前与复苏后的成纤维细胞, 调整细胞密度, 使每孔细胞数量为 2×10^3 个, 将细胞接种于 96 孔板中。连续 7 d 在固定时间向每孔细胞中加入 10 μl CCK-8 (C0038, 上海碧云天生物有限公司) 溶液, 在培养箱内避光孵育 2 h 并使用酶标仪在 450 nm 处测定每孔吸光度。

随机选取 3 个细胞系, 分别收集细胞密度为 80% 的第 3 代与第 9 代冻存前与复苏后的细胞约 1×10^6 个于流式管中, 染色步骤与时间参考于珍珠 (2003)。1 h 内通过流式细胞术分析细胞周期。细胞周期中各期分别为 DNA 合成前期 (gap 1 phase, G_1)、DNA 合成期 (synthesis phase, S)、DNA 合成后期 (gap 2 phase, G_2) 与分裂期 (mitosis phase, M)。

随机选取 3 个细胞系, 分别收集第 3 代与第 9 代冻存前与复苏后的细胞约 1×10^6 个于流式管中, 染色步骤与时间参考刘奕伶等 (2022), 1 h 内通过流式细胞术分析细胞凋亡。

随机选取 3 个细胞系, 收集第 3 代与第 9 代冻存前与复苏后的细胞约 1×10^6 于离心管中, 染色方法参考史俊等 (2015), 1 h 内通过流式细胞术分析细胞活性氧水平。

随机选取 3 个细胞系, 收集第 3 代与第 9 代冻存前与复苏后的细胞约 1×10^6 个于离心管中, 在室温下使用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 10 min。使用细胞衰老缓冲液 (cell event senescence buffer) 稀释细胞衰老探针 (cell event senescence green probe) (C10851, 赛默飞世尔科技公司) 500 倍并重悬细胞沉淀, 于 37°C 无 CO_2 培养箱中孵育 120 min。孵育结束后将细胞在含 1% BSA 的 DPBS 中洗涤 1 次, 并在 1 h 内通过流式细胞术分析。由于该探针以衰老相关- β -半乳糖苷酶为荧光底物, 衰老相关- β -

半乳糖苷酶的激活通常用作衰老细胞的生物标记物,因此细胞衰老水平与荧光强度成正相关。

1.3 数据分析

所有数据结果均以平均值 ± 标准差 (mean ± SD) 形式表示, 每项实验至少重复 3 次, 使用 GraphPad Prism 9.5 对数据进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)、双因素方差分析 (two-way ANOVA) 或 *T* 检验 (Student's *t*-test) 并在每项实验中标明。统计学显著性报告为 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$ 。

2 结果

2.1 罗盘山猪耳缘成纤维细胞形态观察

耳缘组织贴壁后, 原代成纤维细胞约 2 ~ 5 d 后从组织块周围迁出, 细胞形态均为典型的纺锤形或长梭形, 有伪足。细胞核呈规则的卵圆形, 核仁大而明显。细胞间排列紧密, 整体呈现漩涡形或放射状 (图 1)。当细胞密度达到 90% 时 (约 8 ~ 12 d), 传代培养。通过观察传代细胞的形态变化发现, 第 1 代至第 5 代成纤维细胞生长状态良好, 形态均为长梭形, 细胞间紧密排列, 传代后 2 ~ 3 d 内可汇合成致密的单层细胞。第 6 代后的成纤维细胞随着传代次数的增加, 细胞体积逐渐增大, 形态呈现扁平状或不规则状, 细胞片状伪足与丝状伪足增多, 细胞折光性减弱, 胞质中出现空泡。同时, 细胞生长速度明显下降, 传代后经过 4 ~

5 d 才可汇合 (图 2)。

2.2 罗盘山猪成纤维细胞的纯化及鉴定

由于上皮组织和真皮层连接紧密, 在耳缘组织真皮层分离过程中常会残留上皮组织, 导致原代成纤维细胞中常混有上皮细胞。利用两种类型细胞对胰酶的敏感性差异, 可经过 2 或 3 次传代获得纯化的成纤维细胞。本实验随机选取了 3 个细胞系对成纤维细胞的标志物波形蛋白和细胞核 DNA 进行荧光染色, 第 3 代成纤维细胞中波形蛋白经过免疫荧光染色呈现绿色荧光 (图 3a, b), 细胞核 DNA 经过 DAPI 染色呈现蓝色荧光 (图 3c, d), 两图通过 Image J 进行合并 (图 3e, f)。随机选取 5 个视野进行统计, 在第 3 代成纤维细胞中, 波形蛋白阳性细胞率超过 98%, 可被确认为纯化的成纤维细胞。

2.3 细胞支原体检测

细胞核 DNA 经 Hoechst 标记后发出蓝色荧光, 细胞核轮廓清晰, 周围无蓝色云絮状物质, 未出现被 Hoechst 标记的支原体 DNA, 表示细胞无支原体感染 (图 4)。

2.4 染色体核型分析

选择处于对数生长期的成纤维细胞制备染色体标本, 获得多组染色体分裂相与 G 带图 (图 5)。按照染色体的数目、相对长度和着丝粒的位置等形态特征对染色体进行配对、分组和归类。罗盘山猪耳成纤维细胞的染色体数目均为

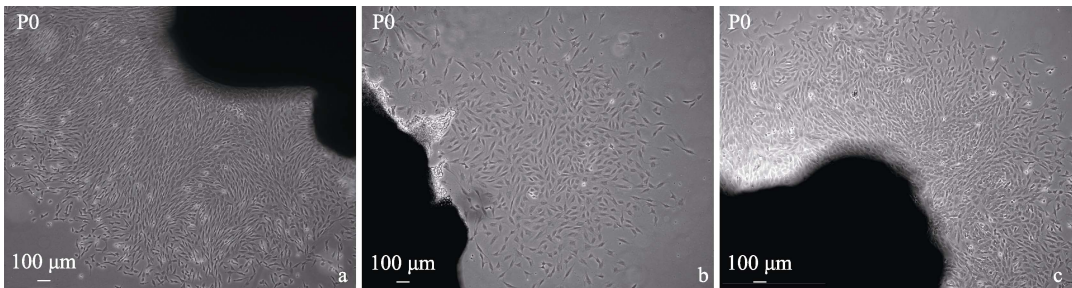


图 1 罗盘山猪原代耳缘成纤维细胞形态图

Fig. 1 The morphology of primary cells from ear margin fibroblasts of Luopanshan Pigs *Sus scrofa domestica*

a, b 和 c 分别为 186 号、52 号和 16 号罗盘山猪原代成纤维细胞。

a, b and c represent the morphology of primary cells from Luopanshan Pig number 186, 52 and 16.

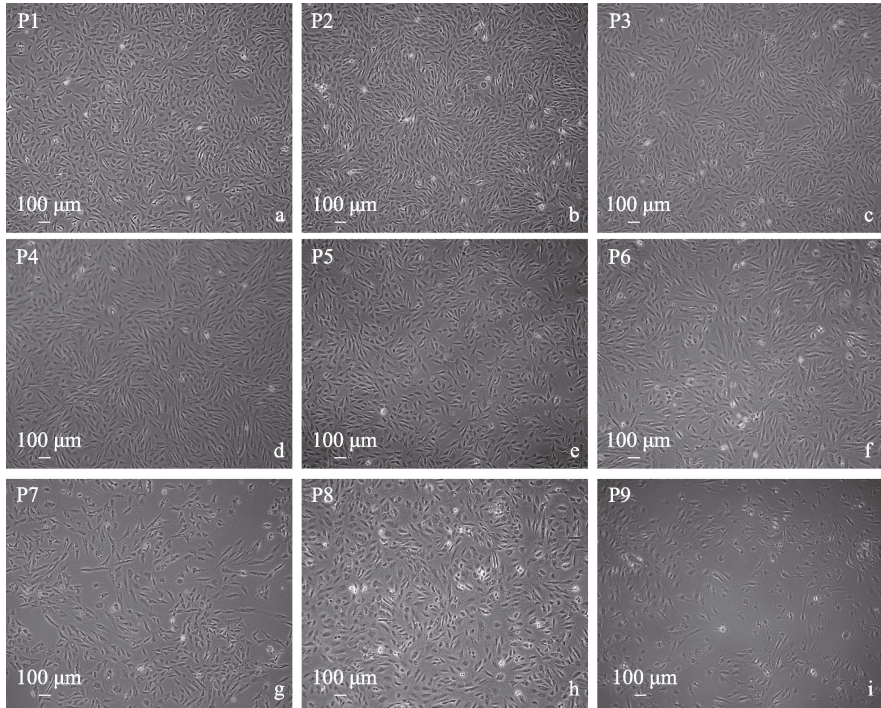


图 2 罗盘山猪耳缘成纤维传代细胞形态图

Fig. 2 The morphology of passaged ear margin fibroblasts of Luopanshan Pigs *Sus scrofa domestica*

a ~ i 依次表示第 1 代 (P1) 至第 9 代 (P9) 罗盘山猪耳缘成纤维细胞。

a - i illustrate the morphology of Luopanshan Pig ear margin fibroblasts from the first generation (P1) to the ninth generation (P9).

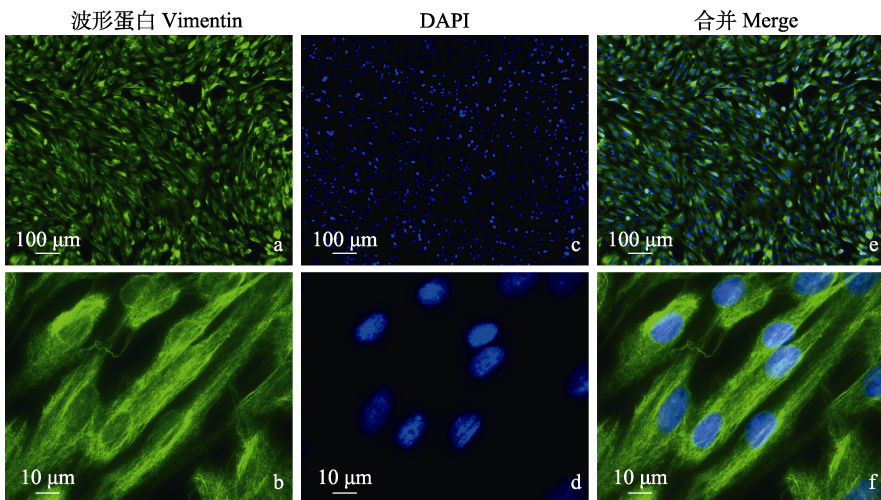


图 3 成纤维细胞中波形蛋白及细胞核 DNA 荧光染色图

Fig. 3 The fluorescent staining images of vimentin and nuclear DNA in fibroblasts

a, b. 成纤维细胞中波形蛋白经波形蛋白抗体[RV202]-细胞骨架标记为绿色; c, d. 细胞核 DNA 用 DAPI 标记为蓝色; e, f. 图片经过 ImageJ 合并。DAPI. 4',6-二脒基-2-苯基吲哚

a, b. The vimentin protein in fibroblasts is labeled green using the vimentin antibody [RV202]-Cytoskeleton Marker; c, d. Cellular nuclear DNA is labeled blue with DAPI; e, f. The images are merged using ImageJ. DAPI. 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

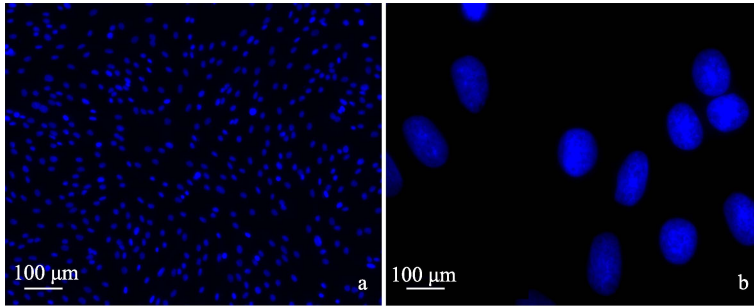


图 4 细胞核与支原体 DNA 荧光染色图

Fig. 4 The fluorescent staining images of nuclear and mycoplasma DNA

a. 低倍镜下 (10×); b. 高倍镜下 (100×)。a. At low magnification (10×); b. At high magnification (100×).

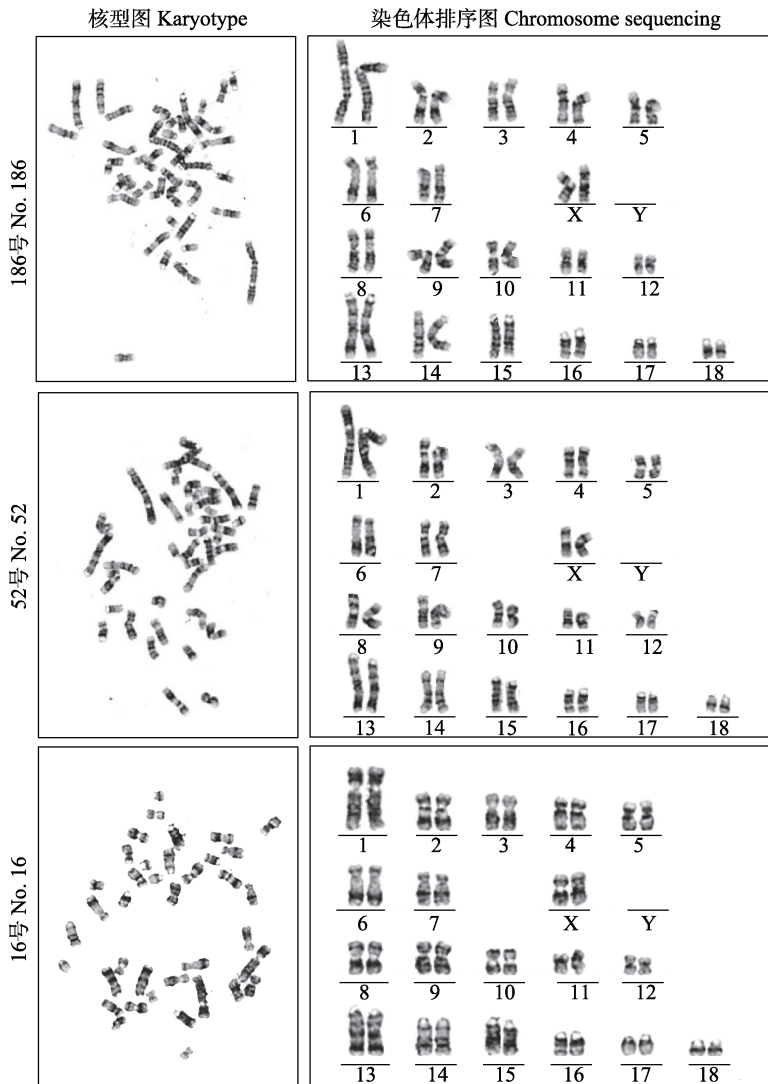


图 5 罗盘山猪第 3 代耳缘成纤维细胞核型分析图

Fig. 5 The karyotype analysis of the third-generation ear margin fibroblasts of Luopanshan Pigs *Sus scrofa domestica*

$2n = 38$, 其中常染色体为 18 对, 第 1~5 号染色体为 5 对近中着丝粒染色体 (sm); 第 6 和 7 号染色体为 2 对近端着丝粒染色体 (st); 第 8~12 号染色体为 5 对中着丝粒染色体 (m); 第 13~18 号染色体为 6 对端着丝粒染色体 (t); 性染色体 1 对, 其形态为中着丝粒染色体 (m)。1~18 号染色体及性染色体相对长度详见表 2。由于选取的实验材料均为雌性罗盘山猪, 所以未获得 Y 染色体的形态类型。分裂相的染色体具有正常二倍体的特性, 说明本实验所建立的罗盘山猪耳缘成纤维细胞系遗传特性相对稳定。

2.5 细胞活率测定

不同代次细胞在冻存与复苏过程中的活率存在显著差异。第 3 代细胞在冻存前活率为

$92.56\% \pm 1.23\%$, 复苏后活率为 $90.36\% \pm 1.29\%$; 第 9 代细胞在冻存前活率为 $83.66\% \pm 3.18\%$, 复苏后活率降低至 $72.83\% \pm 0.59\%$ 。通过配对 T 检验对数据进行分析, 第 9 代细胞与第 3 代细胞活率差异不显著 ($t = 3.874$, $df = 2$, $P > 0.05$)。第 3 代细胞在复苏后的活率下降, 但该变化未达到统计学显著性 ($t = 1.515$, $df = 2$, $P > 0.05$); 相比之下, 第 9 代细胞经历冻存和复苏后活率显著降低 ($t = 5.741$, $df = 2$, $P < 0.05$)。因此, 细胞传代次数对细胞冻存及复苏后的存活能力具有重要影响。

2.6 细胞生长曲线分析

第 3 代细胞冻存前与复苏后状态均良好, 增殖速度较快, 生长曲线均呈现标准“S”形。即第 1 和 2 d 细胞处于适应期, 生长速度较慢,

表 2 第 3 代罗盘山猪耳缘成纤维细胞染色体分类及其相对长度

Table 2 The chromosome classification and relative length in third-generation ear margin fibroblasts of Luopanshan Pigs *Sus scrofa domestica*

染色体编号 Chromosome number	短臂相对长度 Relative length of the short arm of chromosome	长臂相对长度 Relative length of the long arm of chromosome	染色体全长 Full length of chromosome (μm)	形态类型 Type of morphology
1	62.33 ± 14.84	121.33 ± 25.32	12.54 ± 2.74	sm
2	33.33 ± 4.62	68.33 ± 16.26	6.78 ± 1.69	sm
3	32.33 ± 9.07	61.66 ± 12.34	6.41 ± 1.44	sm
4	30.00 ± 9.00	59.33 ± 1.69	6.10 ± 1.34	sm
5	24.00 ± 3.46	52.00 ± 9.17	5.18 ± 0.85	sm
6	25.33 ± 1.53	83.67 ± 17.62	7.44 ± 1.25	st
7	24.33 ± 0.58	69.00 ± 15.87	6.39 ± 1.11	st
X	35.33 ± 8.02	50.00 ± 7.94	6.52 ± 0.74	m
8	40.33 ± 8.62	55.67 ± 16.26	6.55 ± 1.66	m
9	33.33 ± 7.77	44.00 ± 9.54	5.28 ± 1.10	m
10	34.00 ± 4.58	43.00 ± 9.54	5.26 ± 9.60	m
11	27.33 ± 4.62	32.33 ± 10.12	4.07 ± 0.90	m
12	21.33 ± 3.51	28.33 ± 6.66	3.39 ± 0.69	m
13	13.33 ± 1.53	130.00 ± 43.49	9.78 ± 2.86	t
14	8.33 ± 1.15	98.33 ± 24.68	7.28 ± 1.63	t
15	9.33 ± 0.58	88.33 ± 21.50	6.46 ± 1.48	t
16	7.33 ± 1.53	61.33 ± 14.01	4.69 ± 1.02	t
17	6.33 ± 0.58	48.00 ± 11.36	3.72 ± 0.80	t
18	5.67 ± 1.53	45.00 ± 2.00	3.32 ± 0.66	t

m. 中着丝粒染色体; sm. 近中着丝粒染色体; st. 近端着丝粒染色体; t. 端着丝粒染色体。数据均以平均值 \pm 标准差表示。

m. Metacentric chromosome; sm. Submetacentric chromosome; st. Acrocentric chromosome. t. Telocentric chromosome. Data are presented as mean \pm SD.

曲线较为平缓；第 2~6 d 为对数生长期，细胞分裂旺盛，生长曲线呈现快速上升趋势，第 6~8 d 细胞接近汇合，进入平台期，生长曲线较为平直。第 9 代细胞由于传代次数较多，细胞出现衰老现象，增殖速度减慢。并且复苏后细胞适应能力较差，死细胞增多，活细胞数量减少，因此冻存前与复苏后生长曲线均呈现缓慢上升的“S”形（图 6）。

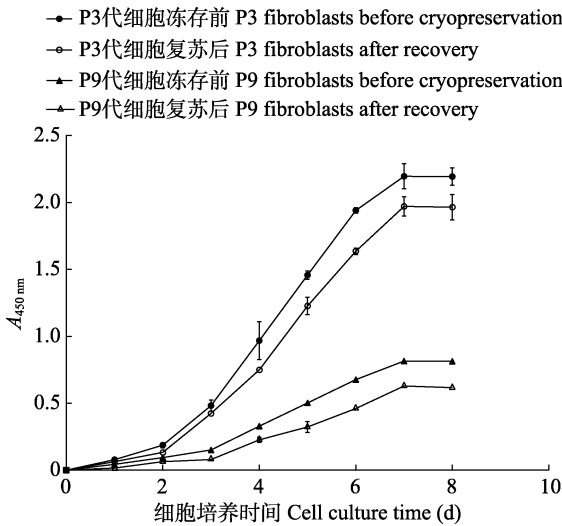


图 6 第 3 代与第 9 代成纤维细胞冻存前和复苏后生长曲线

Fig. 6 Growth curves of the third- and ninth-generation fibroblasts before cryopreservation and after recovery

2.7 细胞周期与凋亡分析

依据流式细胞术结果（图 7），与冻存前相比，复苏后的第 3 代成纤维细胞周期中 G₁ 期比例由 43.36% ± 1.29% 增加至 51.57% ± 2.94%，差异显著 ($t = 3.521, df = 12, P < 0.05$)；G₂ 期比例由 27.63% ± 4.19% 减少至 23.26% ± 2.05%，差异不显著 ($t = 1.875, df = 12, P > 0.05$)；S 期比例由 24.97% ± 4.03% 减少至 21.53% ± 0.75%，差异不显著 ($t = 1.474, df = 12, P > 0.05$)；而细胞凋亡率由 4.16% ± 1.38% 增加至 5.47% ± 0.45%，差异不显著 ($t = 1.566,$

$df = 4, P > 0.05$)。

与冻存前相比，复苏后的第 9 代成纤维细胞周期中 G₁ 期比例由 65.1% ± 2.62% 增加至 73.30% ± 5.34%，差异显著 ($t = 2.540, df = 12, P < 0.05$)；G₂ 期比例由 5.20% ± 1.33% 增加至 5.53% ± 4.35%，差异不显著 ($t = 0.102, df = 12, P > 0.05$)；S 期比例由 28.77% ± 2.08% 减少至 17.67% ± 5.78%，差异非常显著 ($t = 3.439, df = 12, P < 0.01$)；细胞凋亡率由 10.93% ± 1.04% 增加至 29.15% ± 3.28%，差异极显著 ($t = 9.161, df = 4, P < 0.0001$)。

2.8 细胞活性氧水平分析

为了探究细胞在传代和冷冻复苏过程中氧化应激水平的变化，利用流式细胞仪检测了第 3 代和第 9 代细胞在冻存前与复苏后的活性氧水平（图 8）。在细胞冻存前，第 3 代细胞的相对活性氧水平较低，随着传代次数的增加，第 9 代细胞的相对活性氧水平显著上升，较第 3 代细胞增加了 82.96%，差异极显著 ($t = 31.190, df = 2, P < 0.0001$)。第 3 代细胞在复苏后的相对活性氧水平增加了 23.88%，但与冻存前相比差异不显著 ($t = 26.11, df = 2, P > 0.05$)。第 9 代细胞在复苏后相对活性氧水平增加了 47.40%，与冻存前相比具有极显著的差异 ($t = 10.67, df = 2, P < 0.0001$)。

2.9 细胞衰老水平分析

为了评估细胞在传代和冷冻复苏过程中的衰老情况，使用细胞衰老探针针对冻存前与复苏后的第 3 代和第 9 代细胞分别进行了标记，并通过流式细胞术检测（图 9）。在冻存前，第 3 代细胞的相对平均衰老水平较低，随着传代次数的增加，第 9 代细胞的相对平均衰老水平增加了 74.42%，差异极显著 ($t = 19.330, df = 2, P < 0.0001$)。在经过冻存并复苏后，第 3 代细胞的相对平均衰老水平增加了 8.8%，但与冻存前相比无显著差异 ($t = 3.451, df = 2, P > 0.05$)。而第 9 代细胞的相对平均衰老水平增加了 13.3%，与冷冻前相比有极显著的差异 ($t = 3.988, df = 2, P < 0.0001$)。

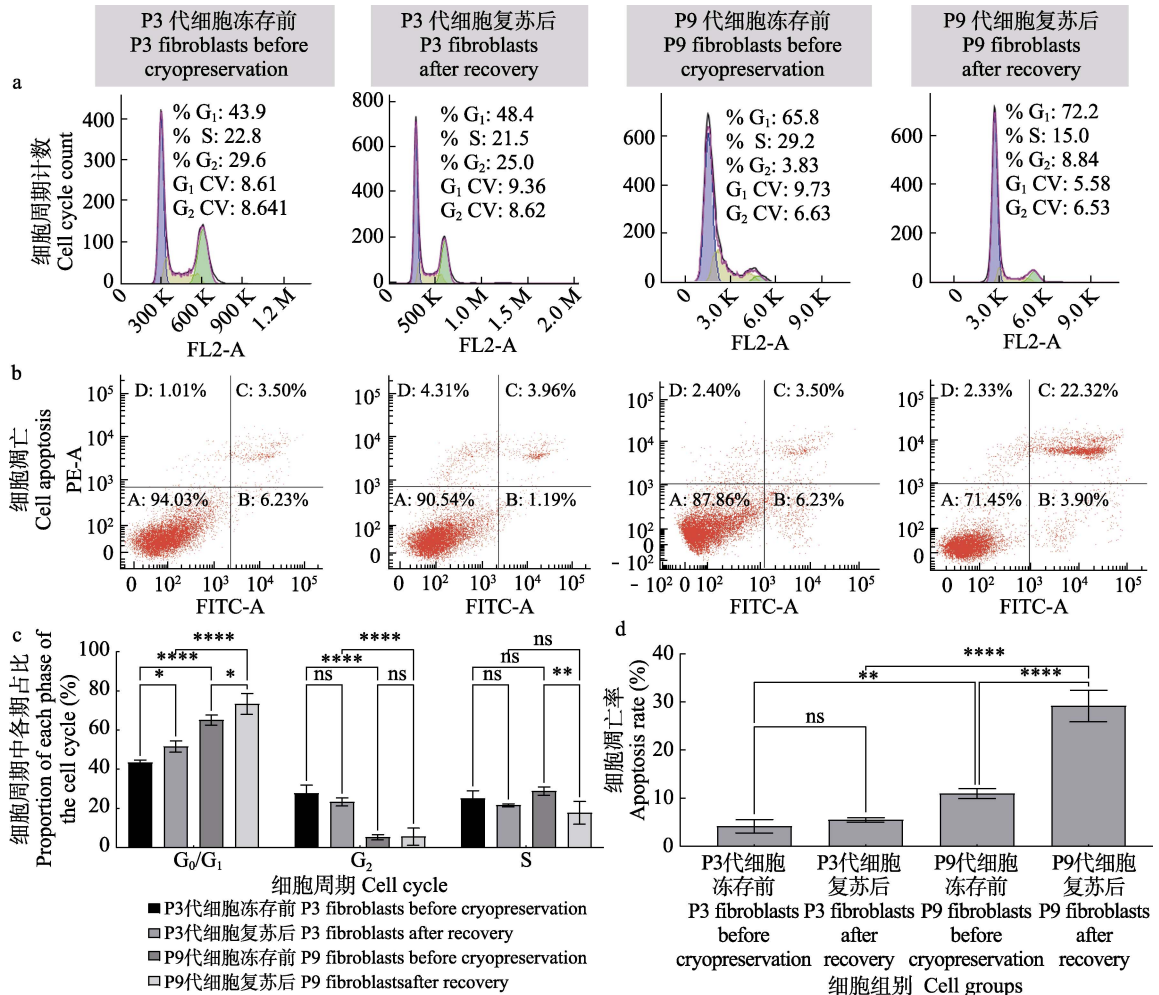


图 7 第 3 代与第 9 代成纤维细胞冻存前和复苏后细胞周期与细胞凋亡流式细胞术分析

Fig. 7 Flow cytometric analysis of cell cycle and apoptosis in third- and ninth-generation fibroblasts before cryopreservation and after recovery

a. 流式细胞术检测第 3 代与第 9 代成纤维细胞在冻存前与复苏后的细胞周期分布; b. 使用 AnnexinV-FITC/PI 并通过流式细胞术检测第 3 代与第 9 代成纤维细胞在冻存前与复苏后的活细胞率 (A)、早期细胞凋亡率 (B)、晚期细胞凋亡与死细胞率 (C) 与细胞碎片 (D); c. 与细胞周期流式图所对应的第 3 代与第 9 代成纤维细胞在冻存前与复苏后的细胞周期分布统计图; d. 与细胞凋亡流式图所对应的第 3 代与第 9 代成纤维细胞在冻存前与复苏后的细胞凋亡率统计图。G₀ 期表示细胞暂时脱离细胞周期、G₁ 表示 DNA 合成前期、S 表示 DNA 合成期、G₂ 表示 DNA 合成后期、CV 表示变异系数, 正常范围应小于 10。使用 Graphpad Prism 9.5 对试验数据进行 one-way ANOVA 显著性分析, ns. $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

a. Flow cytometry was employed to assess the cell cycle distribution of the third and ninth generation fibroblasts before cryopreservation and after recovery; b. The live cell rate (A), early apoptosis rate (B), late apoptosis and dead cell rate (C), and cell debris (D) of the third and ninth generation fibroblasts before cryopreservation and after recovery were evaluated using Annexin V-FITC/PI through flow cytometry. c. The bar chart illustrates the statistical distribution of the cell cycle for the third and ninth generation fibroblasts before cryopreservation and after recovery, corresponding to the cell cycle flow cytometry data; d. The bar chart represents the statistical analysis of the apoptosis rates for the third and ninth generation fibroblasts before cryopreservation and after recovery, corresponding to the apoptosis flow cytometry results. G₀. Cells temporarily exit the cell cycle; G₁. DNA synthesis preparation phase; S. DNA synthesis phase; G₂. Post-DNA synthesis phase; CV. Coefficient of Variation, normal range < 10. One-way ANOVA was performed using GraphPad Prism 9.5 for significance analysis. Statistical significance is reported as ns. $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

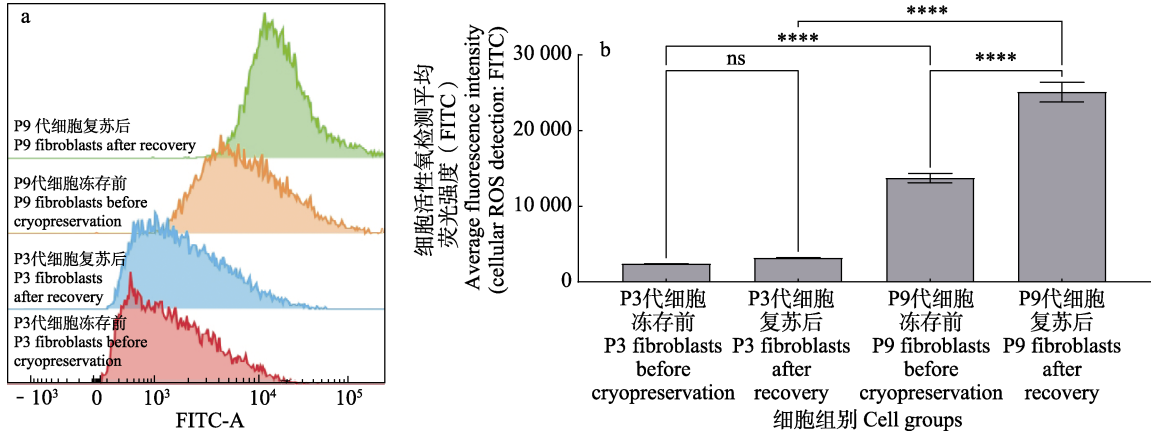


图 8 第 3 代与第 9 代成纤维细胞冻存前和复苏后细胞活性氧水平流式细胞术分析

Fig. 8 Flow cytometric analysis of reactive oxygen species levels in third and ninth generation fibroblasts before cryopreservation and after recovery

a. 通过流式细胞术检测第 3 代、第 9 代成纤维细胞在冻存前与复苏后的活性氧水平; b. 细胞 FITC 平均荧光强度统计图, 通过 Graphpad Prism 9.5 进行双因素方差分析 (由于 DCF 的荧光光谱和 FITC 非常相似, 使用 FITC 的参数设置检测 DCF)。

a. Detection of reactive oxygen species levels in the third and ninth generation fibroblasts before cryopreservation and after thawing, utilizing flow cytometry; b. Statistical chart illustrating the mean fluorescence intensity of FITC in the cells, with data analyzed using two-way ANOVA in GraphPad Prism 9.5. Notably, due to the similarity between the fluorescence spectra of DCF and FITC, parameters set for FITC were employed to detect DCF.

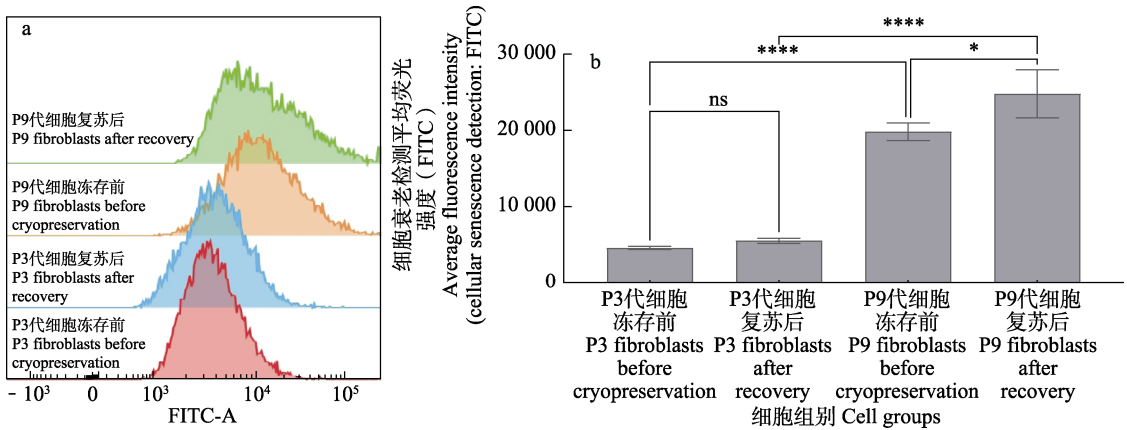


图 9 第 3 代与第 9 代成纤维细胞冻存前和复苏后细胞衰老水平流式细胞术分析

Fig. 9 Flow cytometric analysis of cellular senescence levels in third and ninth generation fibroblasts before cryopreservation and after recovery

a. 通过流式细胞术检测第 3 代、第 9 代成纤维细胞冻存前与复苏后的衰老水平; b. 细胞 FITC 平均荧光强度统计图, 数据通过 Graphpad Prism 9.5 进行双因素方差分析 (由于该探针以 β -半乳糖苷酶为荧光底物, 荧光强度与细胞衰老水平成正相关)。

a. Detection of senescence levels in the third and ninth generation fibroblasts before cryopreservation and after thawing, utilizing flow cytometry. b. Statistical chart illustrating the mean fluorescence intensity of FITC in the cells, with data analyzed using two-way ANOVA in GraphPad Prism 9.5. Notably, this probe employs a β -galactosidase fluorescent substrate, resulting in a positive correlation between fluorescence intensity and cellular senescence levels.

3 讨论

建立濒危品种的体细胞资源库为该品种的种群复原提供了重要的基因来源 (Fan et al. 2021)。体细胞冷冻保存能够有效维持细胞的年轻生理状态和遗传稳定性,但在冷冻过程中,细胞可能会遭受机械损伤、渗透损伤和氧化损伤三种主要影响 (Xie et al. 2022)。在理想情况下,避免这些不良影响是大多数冷冻保存研究的目标。本研究成功建立了罗盘山猪耳缘成纤维细胞系,有效保存了该濒危猪种的遗传信息,同时对细胞的遗传特性以及低代次和高代次细胞在冻存前与复苏后的生长特性进行了对比,比较了不同代次细胞在冷冻保存过程中的生物学差异,可为优化细胞的质量提供参考。

在成纤维细胞的长期储存和应用过程中,确保细胞的纯化程度和防止细胞污染是提高下游实验准确性的关键。通过形态观察,在原代和前几次传代细胞中,同时存在上皮细胞与成纤维细胞。与早期研究一致,罗盘山猪耳缘成纤维细胞在加入 0.25%胰蛋白酶 3~4 min 内就能够全部脱壁,而上皮细胞需要 6~10 min (Basso et al. 2018)。因此,通过 2 或 3 次传代就能获得纯化的成纤维细胞。核型分析不仅有助于研究系统发育关系,也为该物种的细胞研究提供了基础 (He et al. 2023)。通常情况下,细胞染色体数目异常会影响细胞的遗传稳定性 (Fiser et al. 1993)。用于体细胞克隆时,染色体状态异常还会导致胚胎发育失败 (Eun et al. 2017)。研究表明,猪体细胞核型的标准是 38 条染色体,包括 18 对常染色体和 1 对性染色体 (Skinner et al. 2016)。本研究中罗盘山猪的染色体数目符合标准,其染色体核型指数式为 $2n = 10sm + 4st + 12m + 12t$,与早期研究中高坡猪 (李志惠等 2012) 以及久仰香猪、剑白香猪、从江香猪 (班兆侯等 1985) 和巴马小型猪 (郭亚芬等 1994) 的核型指数式一致,但与我国部分猪种具有一定的差异,如环江香猪 (宾石玉等 2006) 和松辽黑猪 (曹阳等

2007), 引进猪种如长白猪、杜洛克和汉普夏 (那森等 1988), 培育的新品种青海白猪 (许生成 2003)、甘肃黑猪瘦肉型 I、II 系 (魏彩虹等 2003) 等。造成这种差异的原因可能是由于引进猪种和本土猪种存在的地理隔离,在长时间的繁育和自然选择过程中形成了不同的染色体特征,并且人为选择对猪种的遗传结构有重大影响 (Fei et al. 2019)。

细胞生长指标的检测是体细胞库建立和利用的重要环节,也是评估细胞在不同条件下增殖和存活能力的重要依据 (Chen et al. 2017)。本研究通过观察细胞活率与生长曲线发现,第 3 代细胞在经过冻存与复苏后,其活率与增殖速度均未发生显著的变化,而第 9 代细胞不仅表现为活率显著下降,生长曲线的平台期也提前。进一步分析显示,细胞周期分布和凋亡水平与细胞代数的增加密切相关。随着细胞代数的增加, G_1 期细胞比例显著增加, S 期细胞比例显著减少,这种现象在细胞经过冷冻复苏后更为明显。相关研究指出, G_1 期停滞的分子基础是由于 DNA 损伤反应 (Gire et al. 2015)。在细胞周期中, G_1 期和 S 期的 DNA 损伤检查点起到关键作用,防止细胞在 DNA 损伤未修复的情况下进入 S 期或完成 DNA 复制 (Xu et al. 2019)。细胞凋亡是保证细胞增殖和质量的重要机制,当 DNA 损伤严重且难以修复时,p53 蛋白会诱导细胞凋亡。由于第 9 代细胞经历了过多的传代,其在 DNA 复制过程中可能出现错误,加之外部环境因素 (如冷冻应激、渗透压应激和化学物质) 的影响,导致 DNA 损伤逐渐累积。因此,第 9 代细胞在经历冷冻和复苏后表现出 G_1 期停滞以及凋亡细胞显著增多的现象。

随着细胞传代次数的增加,细胞代谢活动的增加和抗氧化系统的负担加重可能会导致活性氧的积累 (Luo et al. 2013, Pu et al. 2021),因此第 9 代细胞相对于第 3 代细胞表现出更高的活性氧水平。经过冷冻处理后,细胞活性氧水平的积累更加明显,表明冷冻和复苏过程促

进了细胞内活性氧的生成 (Len et al. 2019)。当活性氧积累过多并超过细胞抗氧化防御系统的清除能力时, 会直接攻击 DNA 分子, 引起 DNA 链的断裂、碱基损伤和交联。这些损伤激活 p53-p21 信号通路, 诱导细胞周期停滞和细胞衰老 (Finkel et al. 2000, Campisi et al. 2007)。衰老相关- β -半乳糖苷酶是一种由 *GLB1* 基因编码的溶酶体酶, 随着溶酶体含量的增加, 它在衰老细胞中特异性积累 (Decottignies et al. 2011)。在体外, 无论是经历复制性衰老还是应激诱导的早期衰老的细胞, 均显示出衰老相关- β -半乳糖苷酶表达的上调 (Lin et al. 2020, Chang-Chien et al. 2021)。本研究中使用以衰老相关- β -半乳糖苷酶为底物的探针检测细胞的衰老水平, 与早期研究一致, 随着细胞传代次数的增加, 细胞的衰老水平显著升高 (Lee et al. 2006)。第 9 代细胞在经过冷冻与复苏后, 衰老水平也显著增加。因此, 相比于低代次的细胞, 高代次细胞在经历冷冻与复苏的过程后, 更容易出现细胞死亡以及高水平的氧化应激和衰老水平。因此, 体细胞遗传资源库中成纤维细胞的连续传代培养应限制在 3 代以内, 并及时将其冷冻保存在液氮中以保持其良好的质量和活性 (穆瑶等 2019)。

本研究成功建立了生物学特性正常和遗传稳定的罗盘山猪耳缘成纤维细胞系, 可作为遗传学、生物医学、细胞与分子生物学、免疫学等的生物材料。将体细胞遗传材料冷冻保存在液氮中, 有效防止了罗盘山猪遗传物质的丢失或变异。在未来研究中, 冻存的成纤维细胞是克隆动物生产的重要资源 (刘洋洋等 2017)。通过体细胞核移植技术, 可以利用这些细胞产生遗传上与供体动物相同的克隆猪, 对于稀有或经济价值高的品种保护具有重要意义 (Wei et al. 2013)。此外, 猪成纤维细胞可以被用来生成诱导多能干细胞, 这些干细胞具有转化为任何其他类型细胞的潜力 (Lagutina et al. 2013)。随着基因编辑技术的进步, 还可以通过编辑猪成纤维细胞的基因来生成组织相容性

更高的猪器官, 用于人类器官移植, 解决器官短缺的问题 (Griffith et al. 2022, Zhou et al. 2023)。综上所述, 本研究不仅为罗盘山猪体细胞遗传资源的保护和利用提供了科学依据, 也为未来相关领域的研究和应用开辟了广阔的前景。

参 考 文 献

- Basso F G, Pansani T N, Soares D G, et al. 2018. Influence of bisphosphonates on the adherence and metabolism of epithelial cells and gingival fibroblasts to titanium surfaces. *Clinical Oral Investigations*, 22(2): 893–900.
- Campisi J, d'Adda di Fagagna F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9): 729–740.
- Chang-Chien J, Huang J L, Tsai H J, et al. 2021. Particulate matter causes telomere shortening and increase in cellular senescence markers in human lung epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222: 112484.
- Chen C, Wang D, Moshaverinia A, et al. 2017. Mesenchymal stem cell transplantation in tight-skin mice identifies miR-151-5p as a therapeutic target for systemic sclerosis. *Cell Research*, 27(4): 559–577.
- Cheng Q, Li L, Jiang M, et al. 2022. Extend the survival of human sperm *in vitro* in non-freezing conditions: damage mechanisms, preservation technologies, and clinical applications. *Cells*, 11(18): 2845.
- Comizzoli P. 2015. Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian Journal of Andrology*, 17(4): 640–645.
- Cordova A, King W A, Mastromonaco G F. 2017. Choosing a culture medium for SCNT and iSCNT reconstructed embryos: from domestic to wildlife species. *Journal of Animal Science and Technology*, 59: 24.
- Decottignies A, d'Adda di Fagagna F. 2011. Epigenetic alterations associated with cellular senescence: a barrier against tumorigenesis or a red carpet for cancer? *Seminars in Cancer Biology*, 21(6): 360–366.
- Deng Q, Liu L, Tang R, et al. 2023. A newly improved method of

- primary cell culture: Tissue block with continuous adhesion subculture in skin fibroblast. *Acta Histochemica*, 125(7): 152090.
- Eun K, Hwang S U, Jeong Y W, et al. 2017. SV40 large T antigen disrupts embryogenesis of canine and porcine somatic cell nuclear transfer embryo. *Biological Procedures Online*. 19(1): 1–11.
- Fan B S, Liu Y, Zhang J Y, et al. 2021. Principles for establishment of the stem cell bank and its applications on management of sports injuries. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1): 307.
- Fei X, Shi J, Liu Y, et al. 2019. The steps from sexual reproduction to apomixis. *Planta*, 249(6): 1715–1730.
- Finkel T, Holbrook N J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809): 239–247.
- Fiser P S, Fairfull R W, Hansen C, et al. 1993. The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Molecular Reproduction and Development*, 34(2): 190–195.
- Gire V, Dulić V. 2015. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle*, 14(3): 297–304.
- Griffith B P, Goerlich C E, Singh A K, et al. 2022. Genetically modified porcine-to-human cardiac xenotransplantation. *New England Journal of Medicine*, 387(1): 35–44.
- He Z, Lei Y, Gong W, et al. 2023. Karyotype and phylogenetic relationship analysis of five varieties and cultivars of *Zanthoxylum armatum* based on oligo-FISH. *Genes*, 14(7): 1459.
- Lago J C, Puzzi M B. 2019. The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. *PLoS One*, 14(7): e0219165.
- Lagutina I, Fulka H, Lazzari G, et al. 2013. Interspecies somatic cell nuclear transfer: advancements and problems. *Cellular Reprogramming*, 15(5): 374–384.
- Lee B Y, Han J, Im J S, et al. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Ageing Cell*, 5(2): 187–195.
- Lee G, Hyun S, Kim H, et al. 2003. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*, 59(9): 1949–1957.
- Len J S, Koh W S D, Tan S X. 2019. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Bioscience Reports*, 39(8): BSR20191601.
- Lin X, Dai Y, Tong X, et al. 2020. Excessive oxidative stress in cumulus granulosa cells induced cell senescence contributes to endometriosis-associated infertility. *Redox Biology*, 30: 101431.
- Luo H, Yang A, Schulte B A, et al. 2013. Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage. *PLoS One*, 8(3): e60065.
- Nagamura-Inoue T, Nagamura F. 2023. Umbilical cord blood and cord tissue banking as somatic stem cell resources to support medical cell modalities. *Inflammation and Regeneration*, 43(1): 59.
- Pu L, Meng Q, Li S, et al. 2021. Icariin arrests cell cycle progression and induces cell apoptosis through the mitochondrial pathway in human fibroblast-like synoviocytes. *European Journal of Pharmacology*, 912: 174585.
- Skinner B M, Sargent C A, Churcher C, et al. 2016. The pig X and Y chromosomes: structure, sequence, and evolution. *Genome Research*, 26(1): 130–139.
- Sun Y, Li Y, Zong Y, et al. 2022. Poultry genetic heritage cryopreservation and reconstruction: advancement and future challenges. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13(1): 115.
- Thangapazham R L, Darling T N, Meyerle J. 2014. Alteration of skin properties with autologous dermal fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5): 8407–8427.
- Vining L M, Zak L J, Harvey S C, et al. 2021. The role of apoptosis in cryopreserved animal oocytes and embryos. *Theriogenology*, 173: 93–101.
- Wei H, Qing Y, Pan W, et al. 2013. Comparison of the efficiency of Banna miniature inbred pig somatic cell nuclear transfer among different donor cells. *PLoS One*, 8(2): e57728.
- Xie J, Ekpo M D, Xiao J, et al. 2022. Principles and protocols for post-cryopreservation quality evaluation of stem cells in novel biomedicine. *Frontiers in Pharmacology*, 13: 907943.
- Xu X, Cowley S, Flaim C J, et al. 2010. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnology*

- Progress, 26(3): 827–837.
- Xu X, Lai Y, Hua Z C. 2019. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1): BSR20180992.
- Zhou J, Zhang K, Gao J, et al. 2023. Effect of *Poria cocos* mushroom polysaccharides (PCPs) on the quality and DNA methylation of cryopreserved Shanghai white pig spermatozoa. *Cells*, 12(11): 1456.
- 班兆侯, 余应淮. 1985. 贵州香猪染色体核型的研究. *贵州农业科学*, 13(6): 43–44, 58.
- 宾石玉, 石常友. 2006. 环江香猪染色体核型的研究. *湖南畜牧兽医*, (2): 7–9.
- 曹阳, 梁桂英, 张树敏, 等. 2007. 松辽黑猪染色体组型及显带的研究. *吉林畜牧兽医*, 28(1): 7–9.
- 陈燕. 2021. 雅南猪遗传资源保护及开发利用研究. 成都: 四川农业大学硕士学位论文.
- 重庆市畜牧科学院畜牧经济与信息技术研究所. 2021. 2021 年第三次全国遗传资源普查.
- 邓娟. 2013. 湖川山地猪(罗盘山猪)的保护和开发利用. *中国猪业*, 8(增刊 1): 132–133.
- 郭亚芬, 王爱德, 兰干球, 等. 1994. 巴马小型猪染色体核型. *上海实验动物科学*, 14(1): 21–30.
- 李志惠. 2007. 高坡猪的染色体核型及带型研究. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文.
- 李志惠, 张依裕. 2012. 高坡猪染色体核型及其 C-带多态性研究. *黑龙江畜牧兽医*, (15): 46–48.
- 刘洋洋, 贾青, 尹彦开, 等. 2017. 深县猪保种群遗传多样性简化监测方法研究. *中国畜牧兽医*, 44(10): 3001–3008.
- 刘奕伶, 唐丽辉, 赵文星, 等. 2022. 乌头碱致 HT22 细胞凋亡的研究. *动物医学进展*, 43(8): 69–72.
- 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): 395–403.
- 那森, 韩建林. 1988. 甘肃白猪、杜洛克、汉普夏及其杂交猪的染色体研究. *甘肃农大学学报*, 23(1): 14–31.
- 史俊, 杨柳, 黄强, 等. 2015. 检测破骨细胞内活性氧水平方法的实验探究与应用. *中国骨质疏松杂志*, 21(5): 519–523.
- 魏彩虹, 刘丑生, 赵兴波. 2003. 杜洛克猪与甘肃黑猪杂交后代染色体遗传变异的特征. *遗传*, 25(1): 27–29.
- 许生成. 2003. 培育中的青海白猪染色体核型分析. *黑龙江畜牧兽医*, (8): 11–12.
- 于珍珠. 2003. 小鼠和猪成纤维细胞培养方法及细胞周期调控的研究. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文.