

树鼯原代皮肤成纤维细胞的分离培养技术

白剑^① 焦玲帅^{①#} 杨铭^① 王武^② 代解杰^{②*} 夏雪山^{①*}

① 昆明理工大学生命科学与技术学院 昆明 650500; ② 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所

树鼯标准化研究与疾病动物模型省创新团队 昆明 650118

摘要: 建立稳定的树鼯 (*Tupaia belangeri*) 皮肤成纤维细胞的体外培养体系, 可为有关此类细胞的实验和疾病树鼯细胞模型提供技术支持。取树鼯大腿内侧皮肤用组织块贴壁法和胶原酶 I 消化法分离皮肤细胞, 胰蛋白酶差别消化法纯化细胞; 用 MEM (10% FBS) 完全培养基和含低血清生长添加物 (LSGS) 的培养基培养细胞; 免疫荧光和蛋白印迹法鉴定细胞, 并测定细胞的生长、冻存和复苏特性。经树鼯皮肤细胞分离效果比较, 胶原酶消化法比组织块贴壁法更适合用于树鼯原代皮肤细胞分离; 对分离及冻存复苏后细胞生长状况观察比较发现, 添加了 LSGS 的 MEM 培养基更利于细胞存活、生长; 细胞形态观察、免疫荧光和蛋白印迹检测鉴定所分离的细胞为树鼯皮肤成纤维细胞。成功建立了树鼯原代皮肤细胞的分离、纯化方法, 并优化了该细胞的培养条件。

关键词: 树鼯; 原代皮肤成纤维细胞; 分离; 培养; 鉴定

中图分类号: Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 01-76-11

Isolation and Culture of Primary Skin Fibroblasts from Tree Shrews (*Tupaia belangeri*)

BAI Jian^① JIAO Ling-Shuai^{①#} YANG Ming^① WANG Wu^② DAI Jie-Jie^{②*} XIA Xue-Shan^{①*}

① Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500; ② Yunnan Provincial Innovation Group of Tree Shrew Standard Culture and Animal Model, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China

Abstract: To establish a stable culture system of skin fibroblasts from Tree Shrew (*Tupaia belangeri*), and provide a primary cell model for related experiment on this specific animal species, the inner thigh skin was scraped to isolate primary cells using tissue mass adherence and collagenase I digestion, respectively. The obtained cells were purified by using differential digestion with trypsin. MEM (with 10% FBS) and low Serum Growth Supplement added MEM (LSGS) were used for cell culture. The cells were identified by immunofluorescence and Western blot analysis, and the characteristics of cells' survival and replication were

基金项目 国家科技支撑计划项目 (No. 2014BAI01B01);

* 通讯作者, E-mail: oliverxia2000@aliyun.com, dj@imbcams.com.cn;

第一作者介绍 白剑, 男, 硕士研究生; 研究方向: 病毒的树鼯模型; E-mail: yrbaijian@163.com;

共同第一作者 焦玲帅, 男, 硕士研究生; 研究方向: 病毒的树鼯模型; E-mail: jiaolingshuai@163.com.

收稿日期: 2017-12-12, 修回日期: 2018-06-12 DOI: 10.13859/j.cjz.201901010

further assessed. The results showed that collagenase digestion was more suitable for isolation of primary skin cells than method of tissue adherence (Fig. 1, 2). According to the survival and growth characteristics of isolated cells (Fig. 5, 6), the LSGS may provide a better culture condition for isolated cells in comparing with that of MEM (Fig. 4). Immunofluorescence observation (Fig. 8 and Fig. 9) and Western blot (Fig. 10) detection revealed that the isolated cells were primary skin fibroblasts. This effective method for isolation of primary skin fibroblasts from Tree Shrews was successfully established and their culture conditions were optimized for further investigation.

Key words: Tree Shrew, *Tupaia belangeri*; Primary skin fibroblasts; Isolation; Culture; Identification

树鼯 (*Tupaia belangeri*) 属于攀鼯目树鼯科, 广泛分布在东南亚、南亚以及中国的南部地区。作为一种介于灵长目和食虫目之间的小型哺乳动物, 树鼯与狐猴等灵长类有共同的祖先, 共享许多灵长类特有的表型。树鼯具有体型小、脑和体重比高、生殖周期短和饲养成本较低等优势。树鼯的多种生理解剖特性与灵长类高度相似, 基因组解析 (Fan et al. 2013) 或转录本等进一步证实树鼯更接近于灵长类 (Zhou et al. 2015)。树鼯被认为可作为多种病毒性疾病的动物模型 (Tsukiyama-Kohara 2014), 例如甲型肝炎 (Hepatitis A virus, HAV)、乙型肝炎 (Hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎 (Hepatitis C virus, HCV) (陈瑾等 2008)、单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus, HSV) (崔照琼等 2016) 等。另外, 树鼯在神经系统发育以及心理应激等方面也呈现出与高等灵长类高度相似的特征, 作为一类具有潜在应用价值的新型实验动物 (徐林等 2013), 越来越引起关注。

原代细胞分离、纯化并建立培养体系 (胡素贤等 2011, 周结学等 2008), 是进行各类药理学以及其他体外细胞水平实验的重要基础, 也是支撑相关药物毒理实验和疾病发生发展机理研究的必要技术。成纤维细胞生长裂殖迅速, 可用于创伤模型和皮肤愈合的研究, 也可作为各种皮肤细胞因子的研究对象。此外, 动物皮肤细胞是理想的核供体细胞源, 可提供

完整的遗传物质。皮肤细胞在生长增殖的对数期可被用于进行各类病原微生物的感染机制和药理学研究, 为获得正常生长且稳定增殖的皮肤成纤维细胞, 目前已有较多原代成纤维细胞分离和培养方法的探究, 其中主要以组织块贴壁法和酶消化法为主。树鼯作为一种具有较大应用价值的实验动物, 其皮肤成纤维细胞的分离和培养, 对以该细胞为实验材料而开展的相关研究非常重要, 因此有必要建立有效分离培养树鼯皮肤成纤维细胞的方法和体系。

参考现有的实验动物皮肤成纤维细胞获取和培养方法, 本研究对树鼯原代皮肤细胞进行分离、培养, 选出最适合树鼯皮肤细胞的获取方式, 并且优化了培养条件, 测定细胞的生长特性, 证实了用于人皮肤细胞的低血清生长添加剂 (low serum growth supplement, LSGS) 同样适用于树鼯细胞, 最终获得了稳定增殖的树鼯原代皮肤成纤维细胞, 可为病毒感染原代细胞模型的建立以及相关研究奠定实验基础。

1 材料与amp;方法

实验用树鼯购自中国医学科学院医学生物学研究所树鼯种质资源中心 [SCXK (滇) 2013-0001] 人工繁育 F1 代, 3 月龄, 体重 130 ~ 145 g, 在昆明理工大学实验动物中心进行饲养。

1.1 树鼯原代皮肤的分离

树鼯肌肉注射 3% 的苯巴比妥 300 μ l 麻醉,

使用 70% 乙醇进行全身消毒后固定于解剖板上。刮除树鼩大腿内侧的毛发，露出皮肤，用解剖剪和镊子截取大约 $2.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ 的皮肤组织块。在盛有含两倍双抗的 D-Hank's 溶液的培养皿中反复刮洗皮肤组织块 2~3 次，用解剖剪将组织剪碎成约 1 mm^3 的块状。

1.2 树鼩原代皮肤细胞的分离

使用组织块贴壁法和胶原酶消化法对分离剪碎的树鼩皮肤组织块进行细胞的分离。

1.2.1 组织块贴壁法分离树鼩皮肤细胞 将剪碎的皮肤组织分为 3 份转移到 6 孔板中，加入 $500\ \mu\text{l}$ 完全培养基（10% FBS + 1% 青链霉素 + 90% MEM 培养基），保持组织块湿润，利于贴壁，用镊子将其均匀分散在孔中，倒置培养板于细胞培养箱中，贴壁 5~6 h 后，向孔板内各加入 1 ml 完全培养基，用于组织块贴壁后继续培养，在培养箱中培养 2 d 后，更换同种完全培养基，7~9 d 后观察贴壁的组织块边缘是否有细胞长出。待细胞沿组织块长出以后，除去皮肤组织块，再使用 0.1% EDTA-胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 胶原酶消化法分离树鼩皮肤细胞 使用 PBS 的配制 0.1% 胶原酶 I 溶液 20 ml， $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌后装入 50 ml 离心管，将剪碎的皮肤组织块转移至其中， $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴消化 45 min，期间每隔 10 min 振荡一次。消化后的细胞悬液用 100 目的钢网筛过滤， $1\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 10 min 后弃上清，离心管底的细胞使用完全培养基重悬， $1\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 5 min，再次重悬细胞后接入培养瓶， $37\ ^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养 2~3 d，期间根据细胞的生长状况更换同类完全培养基。

1.3 树鼩原代皮肤细胞培养条件的比较

上述两种方式分离得到的树鼩原代皮肤细胞使用添加低血清生长添加物的 LSGS 培养基（10% FBS + 1% 青链霉素 + 90% MEM + $1 \times$ LSGS 培养基）和完全培养基分别培养 7 d，观

察细胞增殖状态，即是否能够保持前期细胞状态，以及增殖状况，即不同培养基中的细胞密度，来确定哪种培养基更为适用。对生长良好的皮肤细胞按 3×10^4 个 / 孔接种于 96 孔板中，分别用两种培养基进行培养，12 d 内利用甲臆-CCK 法（全式金）检测每天的活细胞数量，利用酶标仪检测每孔细胞在 540 nm 的吸光度 A，并绘制树鼩皮肤细胞的增殖动力学曲线，了解细胞的生长特性和特点，以确定其最佳培养条件。

1.4 树鼩原代皮肤细胞的胰酶消化纯化

用 PBS 洗涤培养中的树鼩原代皮肤细胞 3 次，加入适量 0.1% 的胰蛋白酶铺满培养瓶底，室温放置 3~4 min，用移液枪吸走胰蛋白酶，吸取培养基反复吹打细胞，直到变圆的成纤维细胞全部吹打下来时，将吹打的细胞悬液转移到新的培养瓶中培养。

1.5 树鼩原代皮肤细胞的冻存复苏

对生长状况良好的树鼩皮肤细胞使用 90% FBS 的细胞悬浮液加 10% 的二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide, DMSO）进行冻存。然后复苏已冻存 1 月的细胞，再与刚分离的皮肤细胞进行比较，观察对比细胞形态，利用同样的甲臆-CCK 法绘制复苏后细胞的增殖动力学曲线，比较其与未经过冻存复苏的树鼩皮肤细胞的增殖曲线，判断细胞增殖的活力。

1.6 树鼩原代皮肤细胞的形态鉴定

通过树鼩皮肤细胞和人皮肤真皮成纤维细胞的形态特征比较，使用间接免疫荧光法和蛋白免疫印迹（western blot, WB）鉴定树鼩原代皮肤细胞内波形蛋白的表达，并利用免疫荧光检测细胞中是否存在角蛋白，排除上皮样细胞污染，进而确定其分离培养后的细胞为成纤维细胞。

1.6.1 Western blot 检测树鼩皮肤细胞波形蛋白表达 将分离培养的皮肤细胞以及作为对照参考的树鼩肺、肝和肾的原代细胞收集后加

细胞裂解液 400 μ l 冰上裂解 30 min, 13 000 r/min 离心 15 min 提取蛋白。蛋白经过定量后按 20 μ g 的量 SDS-PAGE 电泳转膜至 PVDF 膜, 5% BSA 室温封闭 1 h 后加入兔抗波形蛋白一抗 (anti-vimentin-rabbit IgG [ERP3776], Abcam 公司, 1:2 000 稀释) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 漂洗一抗 3 次后, 加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔二抗 (HRP-rabbit IgG [GR274562], Abcam 公司, 1:2 000 稀释), 室温孵育 2 h。TBST 洗膜 5 次后加入发光液显影。使用的内参蛋白为兔抗 β -actin 一抗 (anti-beta actin ab8227, Abcam 公司, 1:2 000 稀释)。

1.6.2 免疫荧光检测树鼯皮肤细胞波形蛋白和角蛋白的表达 设置树鼯皮肤细胞爬片 2 块, 用 PBS 清洗 1 次后, 甲醇固定, 1% Triton x-100 透化。透化后的细胞爬片 PBS 清洗 3 次后标记一抗, 2 块分别加入兔抗波形蛋白一抗和兔抗角蛋白一抗 (anti-cytokeratin 10 [EP1607IHCY], Abcam 公司, 1:200 稀释), 都加入鼠抗 β -actin 一抗 (β -actin mouse IgG, [GTX109639], Gene Tex 公司, 1:1 000 稀释), 室温孵育 3~4 h。标记好一抗的爬片 PBS 清洗 5 次, 加入羊抗兔 FITC 二抗 (FITC-rabbit IgG, ab6717, Abcam 公司, 1:2 000 稀释) 和抗鼠罗丹明二抗 (Rhodamine-mouse IgG, 31685, Thermo Fisher 公司, 1:2 000 稀释), 室温避光孵育 1 h, PBS 清洗 5 次, 期间加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 处理 10 min。载玻片封片, 利用激光共聚焦显微镜观察。

2 结果

2.1 树鼯原代皮肤细胞不同分离方式培养效果

接种于 6 孔板中的组织块培养 7 d 后可见沿着组织块边缘长出许多皮肤细胞。至第 11

天 (图 1a, b), 组织块周围看到细胞越长越密, 并呈现明显的纤维状, 多数呈不规则形, 而后以这些细胞为中心向外增殖生长, 呈现梭形, 并整体形成螺旋状集落, 细胞之间存在不均匀的间隙 (图 1c)。至第 13 天时大部分细胞已呈稳定贴壁生长状态 (图 1d), 而后增殖铺满整个培养孔。

使用 0.1% 的胶原酶 I 消化组织块所获得游离的细胞, 直接接种于培养瓶培养至第 4 天 (图 2a) 后, 可观察到少量细胞贴壁呈现树杈状; 第 5 天 (图 2b) 细胞增殖变多, 相互交集成网络状; 至第 6 天 (图 2c) 时细胞紧密排列生长且呈现典型的梭形, 纤维化明显, 第 7 天 (图 2d) 时已均匀排列成密集的状态, 铺满整个培养瓶。

组织块贴壁法和胶原酶消化法都能够成功从树鼯皮肤组织分离得到成纤维细胞, 初次生长的细胞使用胰酶消化传代培养 4~5 d 后, 可用于后续各项实验研究。但组织块贴壁法获取的原代成纤维细胞生长缓慢, 需要在 10~13 d 才可铺满培养孔, 去除组织块消化纯化后, 得到的细胞量较胶原酶 I 消化法的少, 相比之下, 胶原酶 I 消化法分离获取的细胞生长速度更快, 并且得到的初始细胞量也更大。

2.2 树鼯原代皮肤细胞的冻存复苏

使用胶原酶 I 消化法获取的细胞至第 6 天时生长状态良好 (图 3a), 经过常规梯度降温后冻存于液氮。1 月后复苏细胞, 与新分离获得培养的细胞平行培养, 比较观察细胞生长状态 (图 3b)。冻存后复苏的细胞状态比刚分离培养的细胞差, 主要表现为冻存复苏的单个细胞伸展更宽更长, 细胞间距相对更大, 生长比较缓慢且呈现衰老的特征 (图 3)。

2.3 树鼯原代皮肤细胞培养条件的优化

将获取的树鼯皮肤细胞采用两种培养方式进行培养, 即使用完全培养基 (10% FBS + 1% 青链霉素 + 90% MEM 培养基) 和添加低血清

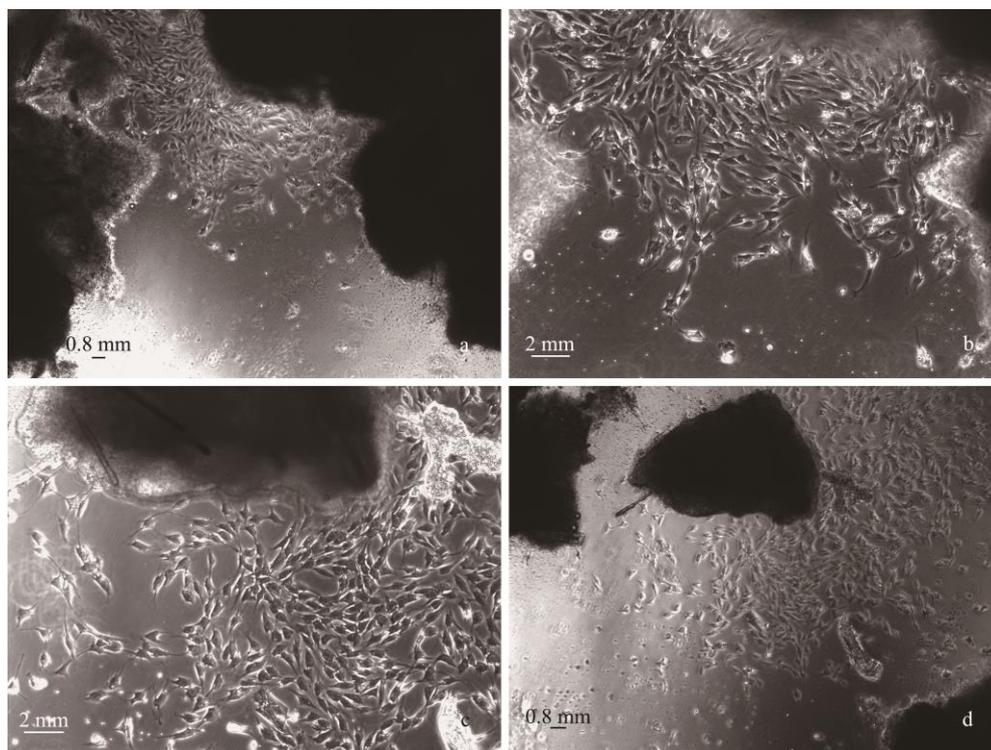


图 1 组织块贴壁法分离树鼯原代皮肤细胞

Fig. 1 Separation of tree shrew primary skin cells using the method of tissue block sticking

a. 组织块贴壁第 11 天, 40 ×; b. 组织块贴壁第 11 天, 100 ×; c. 组织块贴壁第 12 天, 100 ×; d. 组织块贴壁第 13 天, 40 ×。

a. Tissue block adhesion at the eleventh day of culture, 40 ×; b. Tissue block at the eleventh day of culture, 100 ×; c. Tissue block adhesion at twelfth day of culture, 100 ×; d. Tissue block adhesion at the thirteenth day of culture, 40 ×.

生长添加物的 LSGS 培养基(10%的 FBS + 90% MEM + 1%青链霉素 + 1 × LSGS 培养基)分别进行培养观察。通过胶原酶 I 消化法获取树鼯原代皮肤细胞后, 接入 4 个 T75 培养瓶, 分别利用两种培养体系进行对比实验, 每组 2 瓶。在培养 7 d 之后, 比较两种不同培养体系培养的细胞, LSGS 培养基培养的细胞呈现饱满的纤维状, 生长活力较好; 完全培养基培养的细胞生长缓慢, 单个细胞呈现瘦削的趋势, 且延展较宽伴有明显老化的特点(图 4)。传代培养时, 树鼯原代皮肤细胞会逐渐发生变化, 最终变长, 贴壁的单细胞延展变宽, 细胞增殖变密后平行排列呈现一定的纹理状。

生长状况良好的树鼯皮肤细胞进行冻存和

复苏, 测定细胞的增殖动力学曲线(图 5), 比较不同培养条件的增殖曲线(图 6)。未经过冻存复苏培养的细胞在第 7 天 A 值达 1.8, 吸光度的值高且曲线趋于平缓, 证实细胞量多且稳定, 而冻存复苏的细胞培养第 2 到 5 天 A 值升高较快, 而后下降, 证实细胞增殖能力变弱且有细胞死亡, A 值最高只达 1.3, 且呈现极端不稳定的变化。而未经过冻存复苏且使用 LSGS 培养基培养的细胞增殖能力更强, A 值最高可达 2.2, 证实可增殖得到更多细胞。综合考虑, 用于实验的树鼯皮肤成纤维细胞不建议冻存, 且建议采用 LSGS 培养基扩大培养。

2.4 树鼯原代皮肤细胞的鉴定

观察树鼯原代皮肤细胞的特征, 发现生长

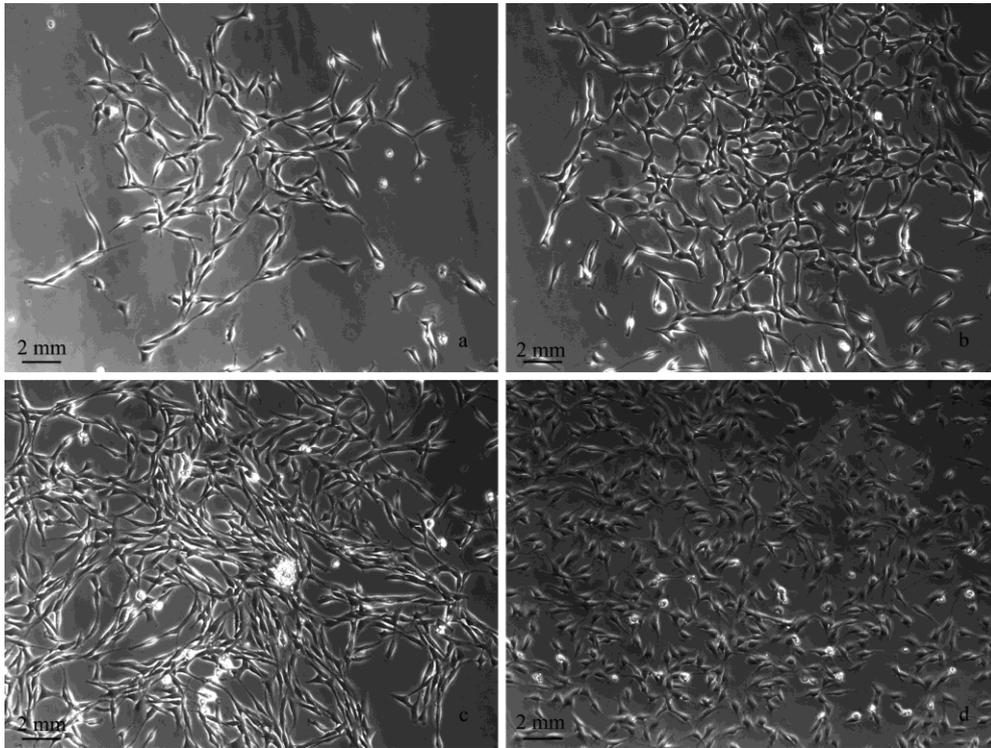


图 2 胶原酶消化法分离树鼯原代皮肤细胞 (100 ×)

Fig. 2 Isolation of tree shrew primary skin cells using collagenase digestion (100 ×)

a. 胶原酶消化法分离培养第 4 天的细胞；b. 胶原酶消化法分离培养第 5 天的细胞；c. 胶原酶消化法分离培养第 6 天的细胞；d. 胶原酶消化法分离培养第 7 天的细胞。

a. Cultured cells at the 4th day post collagenase digestion; b. Cultured cells at the 5th day post collagenase digestion; c. Cultured cells at the 6th day post collagenase digestion; d. Cultured cells at the 7th day post collagenase digestion.

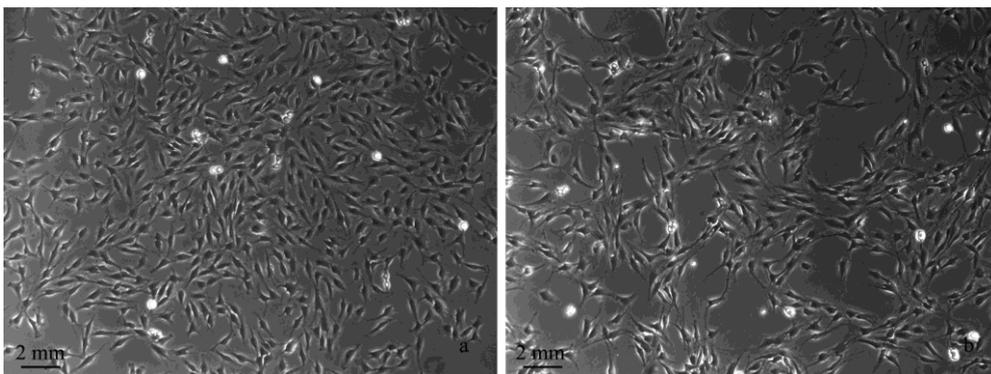


图 3 树鼯皮肤细胞的冻存复苏比较 (100 ×)

Fig. 3 Comparison of tree shrew skin cells after cryopreservation and resuscitation (100 ×)

a. 未冻存培养第 6 天的细胞；b. 冻存后复苏培养至第 2 天的细胞。

a. Cultured cells without cryopreservation at the 6th day post collagenase digestion; b. Cells cultured at the 2nd day after cryopreservation and resuscitation.

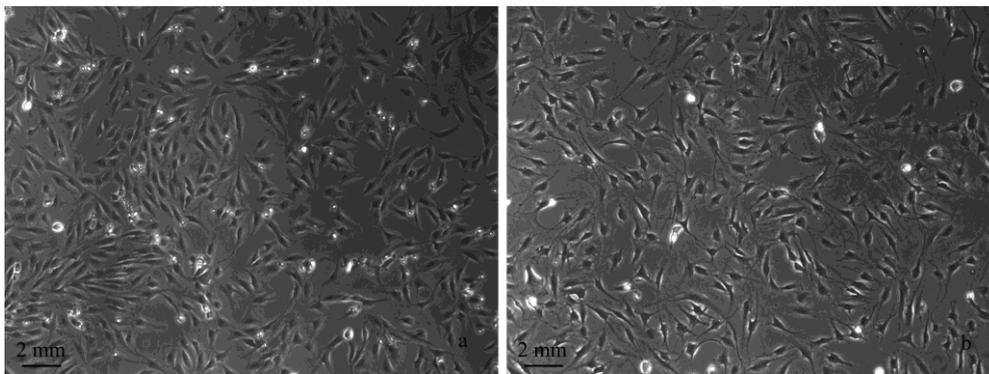


图 4 两种培养条件下的树鼯原代皮肤细胞 (100 ×)

Fig. 4 Primary skin cells of tree shrew in two kinds of culture media (100 ×)

a. LSGS 培养基(10%的 FBS + 90% MEM + 1%青链霉素 + 1 × LSGS)培养的细胞; b. 完全培养基(10% FBS + 1%青链霉素 + 90% MEM)培养的细胞。

a. Culture medium: 10% FBS + 90% MEM + 1% penicillin-streptomycin + 1 × LSGS; b. Culture medium: 10% FBS + 1% penicillin-streptomycin + 90% MEM.

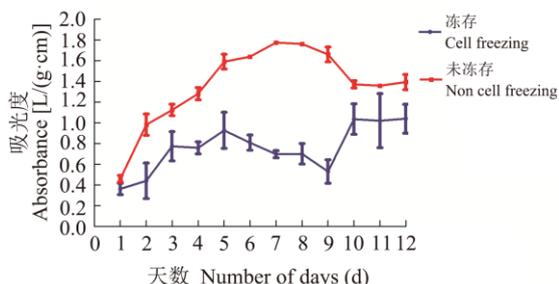


图 5 树鼯原代皮肤细胞冻存后增殖动力学曲线比较

Fig. 5 Proliferation curves of Tree Shrew skin primary cells

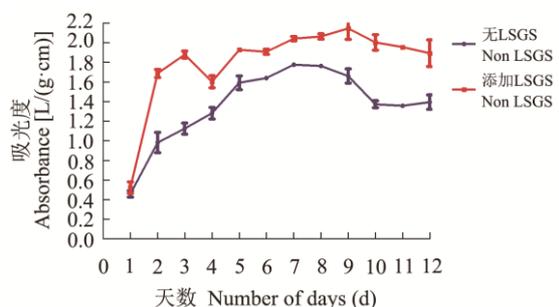


图 6 不同培养条件下树鼯原代皮肤细胞的增殖动力学曲线

Fig. 6 The proliferation curve of tree shrew primary skin cells in different culture media

状态较好的皮肤细胞呈现梭形的纤维状结构, 局部较密平行排列, 纹理走向一致清晰, 通过与人真皮成纤维细胞 (图 7a ~ c, Cascade Biologics 2009) 比较发现, 树鼯皮肤细胞在不同生长阶段的形态与人真皮成纤维细胞极为类似, 都呈现出明显的多角纤维状, 细胞生长较密时, 逐渐排列成纹理状。因此, 从形态学上分析所分离得到的树鼯皮肤细胞属于成纤维细胞 (图 7d ~ f)。

为了进一步证实分离获取的树鼯皮肤细胞为成纤维细胞, 对培养的皮肤成纤维细胞进行波形蛋白免疫荧光鉴定。结果发现, 树鼯皮肤细胞内存在波形蛋白的高表达 (呈现绿色荧光部分), 分布在以 DAPI 染色后呈现蓝色荧光的细胞核周围, 由于波形蛋白属于细胞骨架蛋白的一部分, 所以在和红色荧光为背景的骨架蛋白 β -actin 进行重叠以后呈现出黄色荧光 (图 8)。几乎所有的细胞都出现绿色荧光波形蛋白荧光的高表达。相同方式检测细胞中是否有角蛋白的表达 (绿色荧光染色), 只发现有蓝色荧光的细胞核和红色荧光的 β -actin, 并无绿色荧光 (图 9)。确保获得的树鼯皮肤细胞无上皮样细胞污染。

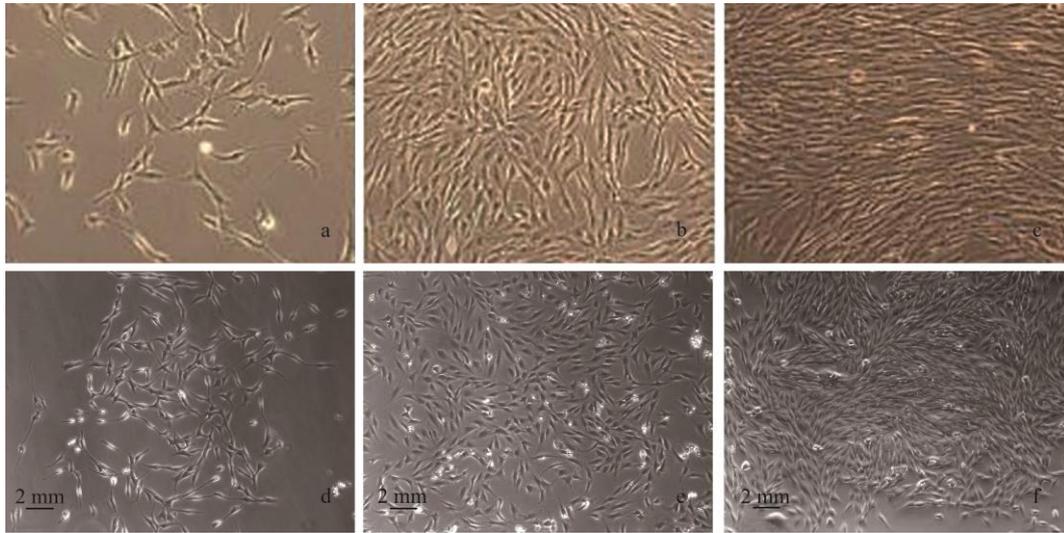


图 7 人和树鼩原代皮肤成纤维细胞的形态学比较

Fig. 7 Morphological comparison of primary skin fibroblasts from human and tree shrews

a ~ c. 引自 Thermo Fisher M106 培养基说明书 (Cascade Biologics 2009) 中的人真皮成纤维细胞; d ~ f. 树鼩原代皮肤成纤维细胞的培养图。

a - c. Human dermal fibroblasts from Thermo Fisher M106 culture medium (Cascade Biologics 2009); d - f. Culture of Tree Shrew primary skin fibroblasts.

为证实波形蛋白在不同细胞中的表达差异,又通过 Western blot 检测比较了树鼩皮肤成纤维细胞和树鼩的肺细胞、肝细胞、肾细胞以及人胚肺成纤维细胞 (human embryonic lung fibroblast, HEL) 中波形蛋白的表达差异。在细胞内参 β -actin 基本一致的前提下,树鼩皮肤成纤维细胞和 HEL 均有明显的波形蛋白的高表达,而在其余 3 种细胞中的表达量较少,从而进一步证实获取的树鼩皮肤细胞具有典型的成纤维细胞特性 (图 10)。

3 讨论

与啮齿类的小型实验动物相比,树鼩与人的亲缘关系更近,生殖周期短、饲养成本低,更适合于作为人类医学病毒研究的模型动物。树鼩各种原代细胞的分离培养,是研究各类病毒相关模型的重要技术平台。本研究针对树鼩的原代皮肤细胞,从分离提取到稳定培养建立

了完整的技术方法,可为成纤维细胞的相关研究如病毒的感染机制、疫苗研发和药物筛选等方面的研究提供技术支撑,并为病毒性动物模型,尤其是为成纤维细胞易感的疱疹病毒的研究提供稳定的细胞源。此外,皮肤成纤维细胞作为皮肤组织受损后的修复细胞,也可用于医学中的皮肤修复研究 (Kocic et al. 2017),例如伤口愈合、紫外线引发的损伤 (Kuo et al. 2017, Wu et al. 2017) 硬皮病 (Gentile et al. 2017)、皮肤相关炎症、细胞纤维化 (Choi et al. 2017) 等相关研究。

人类以及不同种动物皮肤成纤维细胞的分离和培养都已相继成功,以往多数动物皮肤成纤维细胞的分离都是采用组织块贴壁法 (洪城等 2010, 李雅钗等 2010, 赵志敏等 2017),存在组织块贴壁不牢、易脱落、动物毛发残留致使污染的隐患,以及细胞生长缓慢且容易衰老等问题。本研究比较了组织块贴壁法和胶原

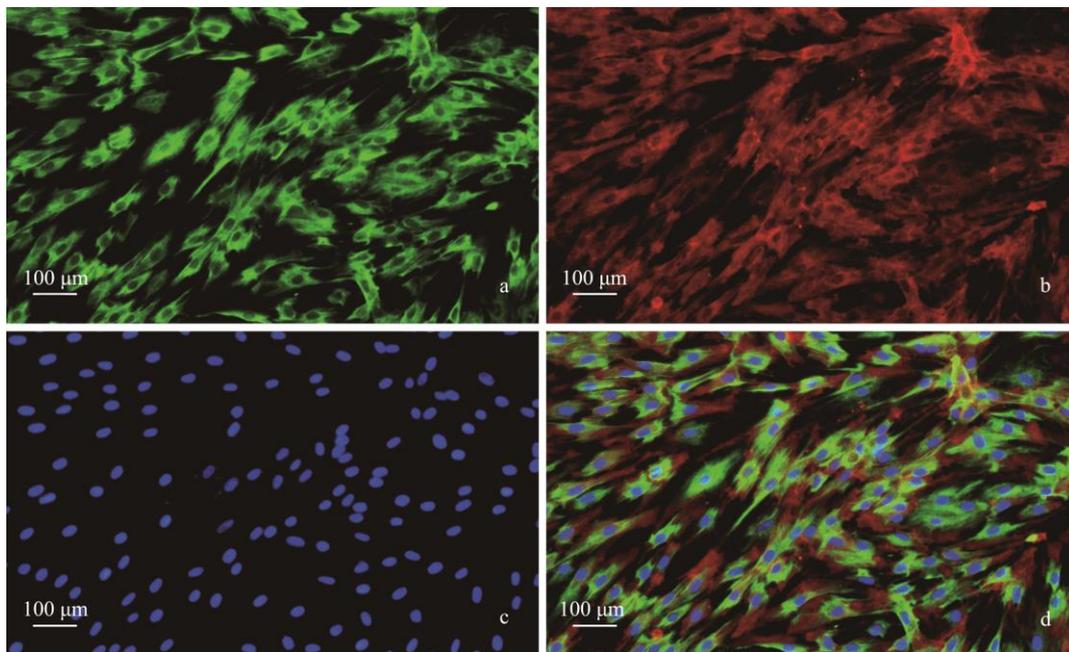


图 8 树鼯皮肤成纤维细胞波形蛋白的免疫荧光鉴定

Fig. 8 Identification of tree shrew primary skin fibroblasts by immunofluorescent staining of vimentin

a. 绿色荧光波形蛋白; b. 红色荧光 β -actin; c. 蓝色荧光细胞核; d. 重叠图。

a. Green fluorescence of vimentin; b. Red fluorescence of β -actin; c. Blue fluorescence of nucleus; d. Merged image.

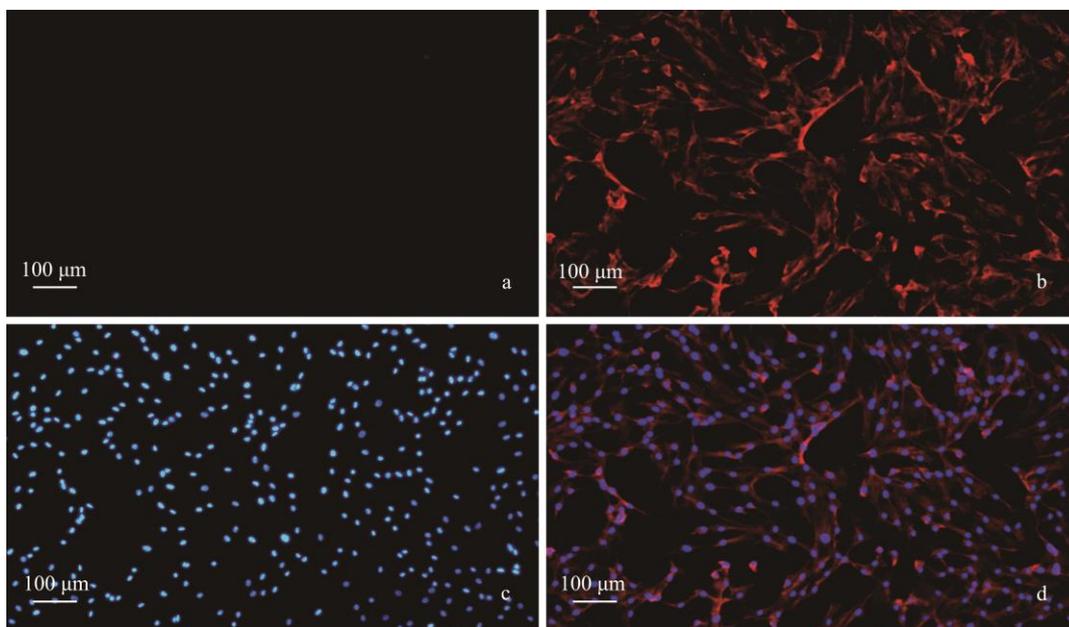


图 9 树鼯皮肤成纤维细胞的角蛋白免疫荧光鉴定

Fig. 9 Identification of tree shrew primary skin fibroblasts by immunofluorescent staining of keratin

a. 绿色荧光角蛋白; b. 红色荧光 β -actin; c. 蓝色荧光细胞核; d. 重叠图。

a. Green fluorescence of keratin; b. Red fluorescence of β -actin; c. Blue fluorescence of nucleus; d. Merged image.



图 10 树鼩皮肤成纤维细胞波形蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 10 Western blot analysis of Tree Shrew primary skin fibroblasts

Vimentin. 波形蛋白; β -actin. 内参蛋白; 肺. 树鼩肺细胞; 肝. 树鼩肝细胞; 肾. 树鼩肾细胞; HEL. 人胚肺成纤维细胞; TSSF. 树鼩皮肤成纤维细胞。

β -actin. Internal reference protein; 肺. Tree Shrew lung cells; 肝. Tree Shrew hepatocyte; 肾. Tree Shrew kidney cells; HEL. Human embryonic lung fibroblasts; TSSF. Tree Shrew skin fibroblasts.

酶 I 消化法分离树鼩皮肤成纤维细胞的优缺点, 进而发现组织块贴壁法不易成功, 而如果采用胰蛋白酶消化法则容易消化过度而导致细胞严重受损, 难以贴壁生长。综合考虑, 最终选择较温和的胶原酶 I 消化法, 克服了现有文献报道方法的缺陷, 成功分离培养并鉴定了树鼩的皮肤细胞, 并且尝试利用添加人皮肤成纤维细胞生长因子 LSGS 的培养体系, 促使树鼩皮肤成纤维细胞更加快速和稳定地增殖。此方法需要注意皮肤组织要彻底刮洗干净, 可二次酶消化促进细胞分离, 更换培养基需在有明显细胞贴壁后, 生长状况良好的细胞及时用于各项实验是保证实验质量的关键。

综上所述, 本研究通过尝试不同的分离和培养方法, 从树鼩大腿内侧成功分离培养了皮肤成纤维细胞, 并优化了该细胞的培养条件, 同时进行了细胞的形态学鉴定, 进而为皮肤成纤维细胞相关的各项研究和深入了解树鼩提供了新的实验材料。

参 考 文 献

Cascade Biologics. 2009. Phase contrast images of human dermal fibroblasts, neonatal (HDFn cells) in culture. Thermo Fisher, <http://www.invitrogen.com>.

Choi E W, Seo M K, Woo E Y, et al. 2017. Exosomes from human adipose derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts. *Experimental Dermatology*, 2017: 1 - 3. [J/OL] [2017-9-23]. <http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/exd>.

Fan Y, Huang Z Y, Cao C C, et al. 2013. Genome of the Chinese tree shrew. *Nature Communications*, 4: 1426. doi: 10.1038/ncomms2416.

Gentile D, Lazzarini P E, Gamberucci A, et al. 2017. Searching novel therapeutic targets for Scleroderma: P2X7-Receptor is up-regulated and promotes a fibrogenic phenotype in Systemic sclerosis fibroblasts. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 638. doi: 10.3389/fphar.2017.00638.

Kocic H, Arsic I, Stankovic M, et al. 2017. Proliferative, anti-apoptotic and immune-enhancing effects of L-arginine in culture of skin fibroblasts. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 31(3): 667-672.

Kuo Y H, Wu P Y, Chen C W, et al. 2017. N-(4-bromophenethyl) caffeamide protects skin from UVB-induced inflammation through MAPK/IL-6/NF-kappaB-Dependent signaling in human skin fibroblasts and hairless mouse skin. *Molecules*, 22(10): 1-14.

Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. 2014. Tupaia belangeri as an experimental animal model for viral infection. *Experimental Animals*, 63(4): 367-374.

Wu Z, Zhang L. 2017. Polycomb group proteins: Novel molecules associated with ultraviolet A-induced photoaging of human skin. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(3): 2554-2562.

Zhou X, Sun F, Xu S, et al. 2015. The position of tree shrews in the mammalian tree: Comparing multi-gene analyses with phylogenomic results leaves monophyly of Euarchonta doubtful. *Integrative Zoology*, 10(2): 196-198.

陈瑾, 代解杰, 孙晓梅. 2008. 树鼩肝炎动物模型的研究进展. *中国比较医学杂志*, 18(2): 59-62.

崔照琼, 杨卫, 李艳琼, 等. 2016. 树鼩 HSV-1 感染模型的建立. *中国病原生物学杂志*, 11(4): 325-333.

洪城, 王健, 李冰, 等. 2010. 分次胶原酶消化法分离、培养成人肺微动脉平滑肌细胞. *中国病理生理杂志*, 26(6): 1240-1243.

胡素贤, 倪晓妍, 王嘉逊, 等. 2011. 新生小鼠皮肤成纤维细胞的

- 分离培养与鉴定. 中国医药导报, 8(29): 5-7+26+193.
- 李雅钗, 黄向华, 宋淑霞. 2010. 组织块法和酶消化法体外培养原代鼠阴道上皮细胞的研究. 中国细胞生物学学报, 32(5): 758-761.
- 徐林, 张云, 梁斌, 等. 2013. 实验动物树鼩和人类疾病的树鼩模型研究概述. 动物学研究, 34(2): 59-69.
- 赵志敏, 王国坤, 王杨, 等. 2017. 胶原酶消化法、组织块贴壁法培养的大鼠 RASMCs 生长、增殖及分化对比观察. 山东医药, 57(28): 33-36.
- 周结学, 刘东, 郑克立, 等. 2008. 鼠胚成纤维细胞的培养条件及滋养层制备. 中国组织工程研究与临床康复, 12(34): 6607-6611.