

引文格式: 奎秀莹, 王文广, 金亮子, 等. 树鼩永生生化皮肤成纤维细胞株的建立及鉴定[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2022, 37(3): 478–484. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).202108034

树鼩永生生化皮肤成纤维细胞株的建立及鉴定*

奎秀莹¹, 王文广¹, 金亮子², 邓 伟³, 仝品芬¹, 陆彩霞^{1**}, 代解杰^{1**}

(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南 昆明 650031;

2. 昆明医科大学 医学生物学研究所, 云南 昆明 650031;

3. 云南大学 医学生物学研究所, 云南 昆明 650031)

摘要:【目的】建立永生生化树鼩皮肤成纤维细胞, 为探究真皮层中皮肤成纤维细胞和其产生的细胞外基质在其中所发挥的作用提供新的试验材料。【方法】通过酶消化法从树鼩腿部皮肤分离纯化出皮肤成纤维细胞, 利用携带 SV40T 基因的慢病毒转染细胞, 挑取单克隆后进行传代培养; 对传至 50 代以上的细胞进行形态学观察、免疫荧光鉴定以及核型鉴定。【结果】传代培养后得到的细胞形态一致, 且与原代细胞相比未发生改变, 均为梭形和多角形纤维状, 到第 58 代时细胞状态仍较好。生长曲线测定结果显示: 细胞生长旺盛, 第 2~3 天为细胞对数生长期, 第 5 天进入平台期; 免疫荧光可检测到皮肤成纤维细胞标志蛋白 Vimentin 和永生生化 SV40T 强荧光信号。细胞核型分析显示: 染色体数与中缅树鼩染色体一致, 即所得细胞为永生生化树鼩皮肤成纤维细胞。【结论】本研究成功构建 1 株能够稳定传代的永生生化树鼩皮肤成纤维细胞, 为皮肤损伤修复及其他皮肤相关疾病的研究提供了试验材料。

关键词: 树鼩; 皮肤成纤维细胞; 分离; 永生生化细胞株

中图分类号: S865.19

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2022) 03-0478-07

Establishment and Identification of Immortalized Skin Fibroblast Cell Line of Chinese Tree Shrew

KUI Xiuying¹, WANG Wenguang¹, JIN Liangzi², DENG Wei³,

TONG Pinfen¹, LU Caixia¹, DAI Jiejie¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650031, China; 2. Institute of Medical Biology, Kunming Medical University, Kunming 650031, China;

3. Institute of Medical Biology, Yunnan University, Kunming 650031, China)

Abstract: [Purpose] To provide a new experimental material to explore the role of skin fibroblasts and their extracellular matrix in dermis, the immortalized skin fibroblast line of Chinese tree shrew was established. [Methods] The skin fibroblasts were separated and purified by digestion with trypsin from leg ministry skin of Chinese tree shrew. The skin fibroblasts were immortalized by simi-

收稿日期: 2021-08-19

修回日期: 2022-02-10

网络首发日期: 2022-04-28

*基金项目: 昆明市科技创新团队 (2019-1-R-24483); 云南省科技人才和项目 (2018HB071, 2017HC019); 云南省高层次卫生计生技术人才培养 (D-2018026); 云南省基础研究计划面上项目 (202101AT070291)。

作者简介: 奎秀莹 (1995—), 女, 云南玉溪人, 在读硕士研究生, 主要从事人类疾病动物模型的建立及疾病机理研究。E-mail: 2659634944@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 陆彩霞 (1979—), 女, 云南陆良人, 博士, 副主任技师, 主要从事干细胞及人类疾病动物模型建立研究。E-mail: lcx@imbcams.com.cn; 代解杰 (1961—), 男, 云南昆明人, 学士, 研究员, 主要从事人类疾病动物模型建立研究。E-mail: djj@imbcams.com.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20220427.1907.004.html>



an virus 40 large T antigen (*SV40T*) transduction, and the immortalized cells were identified by morphological observation, immunofluorescence and karyotype identification after picked monoclonal subculture and propagated to more than 50 generations of cells. [Results] The immortalized cells showed a similar morphology to that of the Chinese tree shrew primary skin fibroblasts with unaltered form, spindle and polygonal fibrous. The 58th generation cells were still in good condition. The growth curve showed immortalized cells grew vigorously. The cells were in the logarithmic growth phase on the 2nd or 3rd day, and entered the plateau phase on the 5th day. High fluorescence representing protein of tree shrew Vimentin and SV40T were detected by immunofluorescence. Karyotype analysis showed that the number of chromosomes was consistent with that of Chinese tree shrew, which means the cells obtained as immortalized tree shrew skin fibroblasts. [Conclusion] A tree shrew skin fibroblasts cell line was successfully established, which could provide an experimental material for the study of damages and repairing about skin and other skin related diseases.

Keywords: Chinese tree shrew; skin fibroblast; separating; immortalized cell line

皮肤成纤维细胞是网状真皮层中较为常见的细胞^[1],能够在结缔组织中分泌和沉积大量整合素和细胞外基质(extracellular matrix, ECM),包括胶原蛋白、弹性纤维和结合蛋白等^[2]。由于能够分泌一系列的ECM,皮肤成纤维细胞在皮肤的衰老、光老化^[3-4]、炎症、烧伤或机械损伤^[5]、瘢痕形成^[6]和肿瘤及其他皮肤相关疾病等多种皮肤修复过程中起至关重要的作用。目前,已有研究者成功分离出小鼠皮肤成纤维细胞^[7]、大鼠皮肤成纤维细胞^[8]、人皮肤成纤维细胞^[9]、裸鼯鼠皮肤成纤维细胞^[10]和驴皮成纤维细胞^[11],并基于不同物种的皮肤成纤维细胞开展了皮肤疾病相关研究。树鼩属攀鼩目小型哺乳动物,具有体型小、繁殖快的特点,进化上比啮齿类更接近非人灵长类。FAN等^[12]研究显示:树鼩在神经系统、视觉系统和免疫系统上与人相似,已被用于眼部^[13]、视神经和脑部神经发育相关疾病以及多种肝炎病毒^[14-17]、寨卡病毒^[18]、单纯疱疹病毒^[19]和流感病毒^[20]等疾病的模型研究中。已有研究对树鼩进行肺纤维化诱导,建立了与临床患者出现相似症状的肺纤维化模型^[21]。ZHANG等^[22]对树鼩皮肤结构进行解析,发现其与恒河猴及人的皮肤结构极为相似,有丰富的汗腺和皮脂腺,且汗腺分布在毛球顶部周围,与毛囊皮脂腺等共同组成与人类相似的附属皮肤单位,而小鼠汗腺和皮脂腺并不明显,表明树鼩是皮肤相关疾病研究的潜在非人灵长类替代实验动物。

课题组前期分离出原代树鼩皮肤成纤维细

胞^[23],然而,原代细胞往往只能稳定增长几个代次,传代次数过多细胞便会出现各种问题,如细胞形态发生改变和细胞增殖变缓,试验过程中很容易错过细胞的最佳生长时期,阻碍了皮肤相关疾病细胞模型的构建和相关机制的研究。此外,对于需要反复验证的试验,原代细胞几乎无法再次重复,每一批次分离出的细胞难免会有差异,并且耗时长,试验效率会受到很大影响。因此,建立能够连续多次传代的永生细胞可弥补原代细胞的不足。本研究通过优化分离树鼩原代皮肤成纤维细胞的方法,再利用携带*SV40T*的慢病毒转染细胞,经过50代以上的传代,以期获得永生树鼩皮肤成纤维细胞,为皮肤相关疾病的发病机制研究提供新材料。

1 材料与方法

1.1 试验动物和慢病毒

供试树鼩为滇西亚种中缅树鼩(*Tupaia belangeri chinensis*),由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供,雄性,1岁,生产许可证号为SCXK(滇)K2018-0002,使用许可证号为SYXK(滇)K2018-0002。本研究遵循试验动物使用3R原则和福利伦理原则。

携带*SV40T*基因的慢病毒由汉恒生物科技(上海)有限公司构建,病毒滴度为 1×10^9 TU/mL。

1.2 树鼩成纤维细胞的酶消化法分离纯化

本试验在白剑等^[23]的酶消化法基础上稍作改进。取约1岁的树鼩腹腔注射3%戊巴比妥钠

0.5 mL 麻醉后处死, 用 75% 酒精进行皮肤消毒, 刮除树鼩大腿内侧的毛发, 剪下约 $2.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ 的皮肤组织块, 在含 2% 青霉素—链霉素 (美国 Gibco) 的 PBS (美国 Hyclone) 中反复刮洗 3 次, 将组织块剪碎为约 1 mm^3 的块状, 置于 50 mL 离心管中, 加入 0.1% I 型胶原酶 (PBS 配制), 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中消化 45 min, 每 15 min 振荡 1 次, 使组织块与 I 型胶原酶充分接触。消化完成后用 100 目的钢网筛过滤细胞悬液, $1\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 弃上清后加入完全培养基 [配方为: MEM 基础培养基 (以色列 Biological Industries) + 10% FBS (以色列 Biological Industries) + 1% 青霉素—链霉素 + 1% NaHCO_3 + 1% 非必需氨基酸 (美国 Gibco)] 重悬细胞, $1\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 用完全培养基再次重悬后转至 6 孔板中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 每天观察细胞生长状况。待细胞铺满皿底时, 用 PBS 清洗原代细胞 3 次, 每孔加入 0.25% Trypsin-EDTA 胰蛋白酶 (美国 Gibco) 500 μL , 室温消化 3 min 后吸弃胰蛋白酶, 加入完全培养基反复吹打, 待变圆的皮肤成纤维细胞脱落后, 将细胞悬液转至培养瓶中培养。

1.3 慢病毒转染树鼩成纤维细胞

将生长状态良好的皮肤成纤维细胞以 $1 \times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 的密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养; 待细胞汇合度达到 80% 以上时, 用 PBS 清洗 2 次, 加入含 4 $\mu\text{g/mL}$ 助转剂的培养液 1 mL, 以感染复数 (MOI) 为 30 接种携带 SV40T 基因的慢病毒, 并设不接种的空白对照孔, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 4 h 后补加含 4 $\mu\text{g/mL}$ 助转剂的培养液 1 mL, 培养 24 h 后更换为新鲜且不含助转剂的完全培养液继续培养 24 h。之后, 将培养液更换为含 4 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的培养液继续培养, 2 d 更换 1 次培养液, 直至空白对照孔的细胞完全死亡。

1.4 有限稀释法挑取单克隆

细胞汇合度达到 80% 以上时, 用 0.25% Trypsin-EDTA 胰蛋白酶消化并计数, 将细胞稀释至密度为 10^3 mL^{-1} , 再进行 10 倍梯度稀释, 直至约 10 mL^{-1} , 每个密度梯度接种 16 孔 (2 排) 96 孔板, 每孔 100 μL , 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 每隔 1 d 观察并标记由单个细胞增殖形成的单个细胞群。待细胞长满后, 消化转至

24 孔板中继续培养, 并逐步扩大培养, 每消化 1 次记为 1 代。

1.5 树鼩成纤维细胞传代

细胞汇合度达 80% 以上时, 弃去培养液, PBS 清洗 2 次, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 1.5 min 后吸弃胰蛋白酶, 待大部分细胞变圆、培养瓶底部变成毛玻璃状时加入培养液终止消化, 以 1:6 的比例传代培养, 定期拍照保存。

1.6 树鼩永生皮肤成纤维细胞生长曲线的测定

取第 52 代细胞用胰蛋白酶消化后, 稀释至密度为 $5 \times 10^4\text{ mL}^{-1}$, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 按照 CCK-8 试剂盒 (上海东仁) 说明书测定细胞生长曲线, 检测 6 d 的细胞增殖情况, 并以 6 d 的吸光度值绘制细胞增殖动力曲线图。

1.7 免疫荧光鉴定

取第 52 代细胞, 经消化后将其稀释至密度为 $1 \times 10^5\text{ mL}^{-1}$, 接种于 24 孔板, 每孔 500 μL , 同时用树鼩原代脑内皮细胞作对照。待细胞贴壁后, PBS 清洗 2 次; 用 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 4% 多聚甲醛于室温固定细胞 20 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 0.5% Triton X-100 (PBS 稀释) 室温通透 20 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 用 0.01 mmol/L PBS 稀释至 20% 的山羊血清封闭液封闭 30 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 加入 1:500 的鼠抗波形蛋白单克隆抗体和 1:50 的兔抗 SV40T 单克隆抗体 (一抗稀释液稀释, 每个抗体 2 个复孔), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 分别加入 1:500 的羊抗鼠二抗和驴抗兔二抗 (用 0.01 mmol/L PBS 稀释), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 加入 5 $\mu\text{g/mL}$ DAPI 染色液, 室温避光孵育 5 min, 对标本进行染核, PBS 漂洗 4 次, 每次 5 min, 在荧光显微镜下观察。

1.8 细胞核型分析

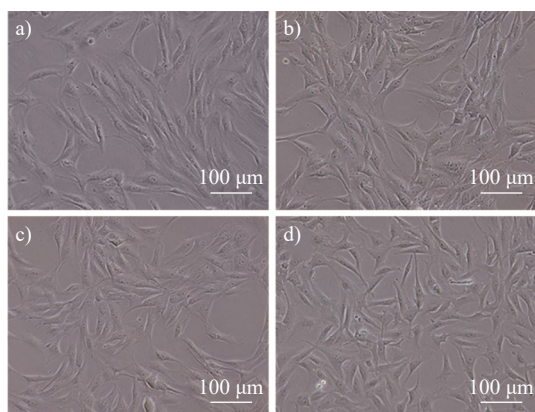
取第 53 代细胞消化转至新的培养瓶中, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h; 加入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的 80 $\mu\text{g/mL}$ 秋水仙素 (美国 Sigma) 200 μL 继续培养 4 h, 吸弃上清液, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞并转至 15 mL 离心管中, $1\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 5 min, 弃上清; 加入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的 0.075 mol/L KCl 溶液 7 mL, 轻轻吹散细胞, 室温低渗 25 min, 期间若有沉淀时需要轻轻吹打, 使细胞与 KCl 低渗液充分接触,

1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入现配卡诺固定液 ($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$) 7 mL, 固定 5 min 后沿管壁轻轻吹打, 使沉淀的细胞翻转, 固定 5 min 后, 轻轻吹散细胞, 继续固定 20 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 再次以 7 mL 固定液以同样方式固定 25 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清后重新加入适量固定液, 重悬细胞。取 4 ℃ 预冷的载玻片, 吸管吸取混匀的细胞液悬空 30 cm 垂直滴 3 滴至载玻片上, 斜靠载玻片流掉多余细胞液, 自然风干 12 h; 将载玻片放入染缸中, 加入 Giemsa 染液 (北京索莱宝) 染色 2 h, 之后流水冲洗载玻片, 自然风干 12 h 后封片, 在显微镜下用油镜观察。

2 结果与分析

2.1 不同代次的树鼯皮肤成纤维细胞

由图 1 可知: 树鼯皮肤成纤维细胞形态总体较均一, 为梭形, 较胖, 细胞增殖速度较快。以 1:6 传代后, 2 d 便长满培养瓶, 可继续传代; 培养 2 d 后细胞上清中出现少许死细胞漂浮, 45 代后细胞增殖有所减慢, 约 3 d 可长满培养瓶, 细胞状态也有所变化, 部分细胞出现拉丝, 细胞两端拉长, 但大部分细胞仍能维持原有形态。



注: a) 第 20 代; b) 第 30 代; c) 第 38 代; d) 第 52 代。

Note: a) the 20th generation; b) the 30th generation; c) the 38th generation; d) the 52th generation.

图 1 不同代次的树鼯皮肤成纤维细胞 (200×)

Fig. 1 Skin fibroblasts of Chinese tree shrew in different generations

2.2 生长曲线测定

由图 2 可知: 细胞数量在第 2~3 天时明显增加, 处于对数生长期, 之后缓慢增长, 在第 5 天时达到高峰, 进入平台期。

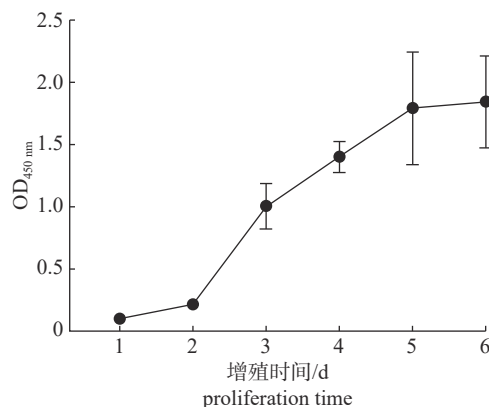


图 2 第 53 代树鼯皮肤成纤维细胞生长曲线

Fig. 2 The growth curve of Chinese tree shrew skin fibroblasts in the 53th generation

2.3 免疫荧光鉴定

由图 3 可知: 树鼯皮肤成纤维细胞细胞质中有明显的成纤维细胞特异性蛋白 Vimentin 信号, 而原代脑内皮细胞无该信号, 结合树鼯原代皮肤成纤维细胞的分离方法及细胞形态学分析^[23], 判定分离得到的细胞是树鼯皮肤成纤维细胞。

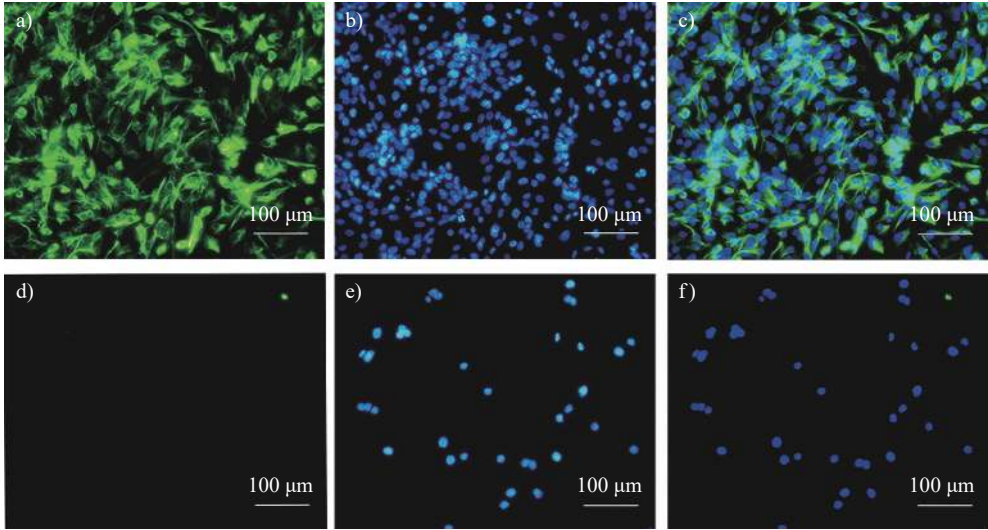
由图 4 可知: 树鼯皮肤成纤维细胞细胞核处有明显的 SV40T 信号, 而原代脑内皮细胞无该信号, 说明 SV40T 已成功导入到所获得树鼯皮肤成纤维细胞中。

2.4 核型分析

选取 53 代树鼯皮肤成纤维细胞进行核型分析, 对细胞分裂相进行观察, 结果 (图 5) 显示: 所获得的树鼯永生生化皮肤成纤维细胞染色体数为 62 条, 与滇西亚种中缅树鼯的染色体数^[24]一致, 说明试验所得细胞是树鼯来源细胞。

3 讨论

本研究参考白剑等^[23]的酶消化法分离得到的细胞确定为树鼯皮肤成纤维细胞。本研究针对细胞培养基进行了改良优化, 在基础培养基中加入 10% 血清、1% 双抗、1% 非必需氨基酸和 1% NaHCO_3 , 但没有添加低血清生长添加物。使用改良后的培养基细胞增殖能力仍然较强, 生长状态也较好, 即使数十次传代后细胞的生长状态也未出现差异, 可提高试验的重复性、准确性和稳定性; 此外, 还避免了血清未知成分对细胞的损伤, 提高了细胞质量和试验效率, 一方面节省了细胞培养成本, 另一方面减少了人为添加生长因

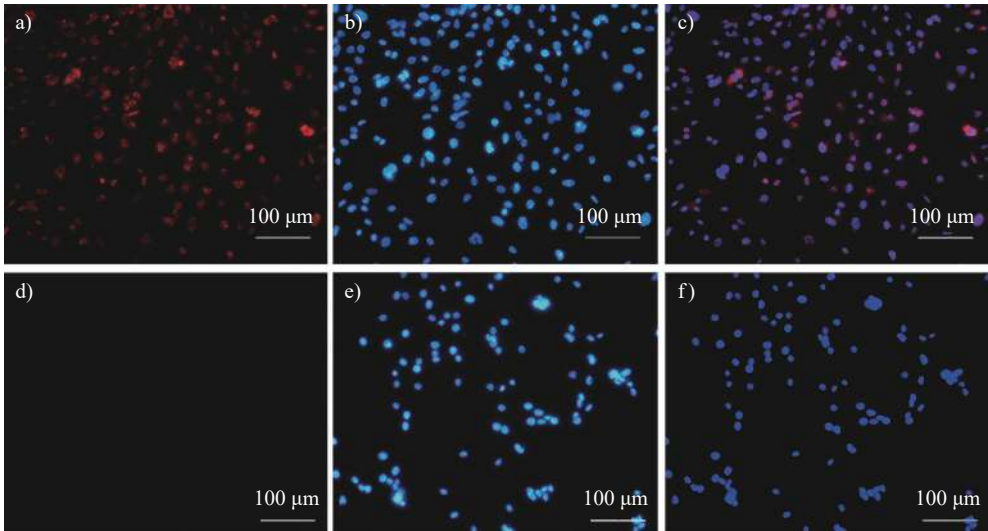


注：a) 皮肤成纤维细胞波形蛋白 (绿色); b) 皮肤成纤维细胞核 DAPI (蓝色); c) 皮肤成纤维细胞波形蛋白与细胞核重叠; d) 原代脑内皮细胞 (无绿色); e) 原代脑内皮细胞核 DAPI (蓝色); f) 原代脑内皮细胞与细胞核重叠。

Note: a) Vimentin expression of skin fibroblasts (green); b) DAPI of skin fibroblasts (blue); c) merged by a) and b); d) Vimentin expression of brain endothelial cells (without green); e) DAPI of brain endothelial cells (blue); f) merged by d) and e).

图 3 第 52 代树鼩皮肤成纤维细胞波形蛋白免疫荧光鉴定 (200×)

Fig. 3 Vimentin identification of Chinese tree shrew skin fibroblasts in the 52th generation by immunofluorescence



注：a) 皮肤成纤维细胞 SV40T (红色); b) 皮肤成纤维细胞核 DAPI (蓝色); c) 皮肤成纤维细胞 SV40T 与细胞核重叠; d) 原代脑内皮细胞 (无红色); e) 原代脑内皮细胞核 DAPI (蓝色); f) 原代脑内皮细胞与细胞核重叠。

Note: a) SV40T expression of skin fibroblasts (red); b) DAPI of skin fibroblasts (blue); c) merged by a) and b); d) SV40T expression of brain endothelial cells (without red); e) DAPI of brain endothelial cells (blue); f) merged by d) and e).

图 4 第 52 代树鼩皮肤成纤维细胞永生生化基因 SV40T 免疫荧光鉴定 (200×)

Fig. 4 SV40T identification of Chinese tree shrew skin fibroblasts in the 52th generation by immunofluorescence

子对细胞生长微环境的改变和影响。

本研究分离所得的细胞生长状态较好，不同代次之间细胞整体形态一致，均为梭形纤维状和多角纤维状结构，细胞间排列紧密，有典型的成纤维细胞特性。这与人及大鼠^[25]永生化后的皮肤成纤维细胞形态类似，且与原代细胞没有明显区

别。成纤维细胞特异性波形蛋白 (Vimentin) 鉴定结果证实所获得的细胞为成纤维细胞，与人体皮肤成纤维细胞的鉴定结果^[9]一致；永生生化基因 SV40T 检测证实已经将该基因成功导入成纤维细胞，在细胞传代培养过程中，其能够在维持细胞状态的同时无限增殖。永生化的成纤维细胞染色

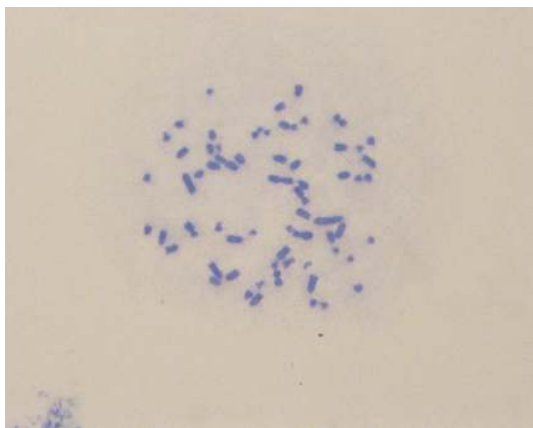


图5 第52代树鼯皮肤成纤维细胞核型分析

Fig. 5 Karyotype identification of Chinese tree shrew skin fibroblasts in the 52th generation

体数为62条,与滇西亚种中缅树鼯^[24]一致,证实所得细胞为树鼯源细胞。树鼯永生生化皮肤成纤维细胞的建立为人类皮肤相关疾病的体外研究提供了新材料,也为体内皮肤治疗药物的研究奠定了基础。

目前广泛用于永生生化细胞建立的方法主要有病毒转染诱导(包括人乳头瘤病毒、人类疱疹病毒和猴肾病毒SV40等)、化学致癌物诱导射线、基因自发突变和端粒—端粒酶激活诱导产生。病毒诱导主要是病毒感染细胞后,通过改变细胞基因使细胞度过致死期,从而能够无限增殖,以成功诱导永生生化细胞^[26]。其中,SV40的应用机制为SV40基因被导入细胞核后,细胞内的抑癌基因P53和pRb及相应蛋白能够与其大T抗原特定结合域结合,导致抑癌基因无法正常表达,细胞得以无限增殖并出现肿瘤相关的转变^[27]。而病毒在感染细胞时,感染效率与细胞种类有极大的关系,慢病毒由于转染效率较高而被广泛应用。化学和射线诱导均是将细胞进行癌变诱导^[28],而这个过程会导致细胞出现无法预测的其他基因突变,对构建目的细胞模型造成困扰。自发突变则是在细胞的培养过程中,自发的基因突变引起细胞不断增殖,出现细胞永生生化现象,但这一方式随机性极强,突变后的基因型极不稳定,或许已经丢失了细胞的原本特性,用于试验时易出现多种不确定因素。端粒—端粒酶激活主要是通过活化细胞内的端粒酶,使其相对高水平地发挥催化端粒复制和维持端粒长度的功能^[29],以保证细胞无限分裂。本研究采用慢病毒包装SV40T基因,

在确保细胞基因能够往所需方向突变的基础上,大大提高了目的基因被导入细胞基因组的效率,对细胞的永生生化建立起到很好的效果。

皮肤成纤维细胞是结缔组织的重要组成部分,对维持皮肤弹性和韧性具有重要作用。本研究获得的永生生化树鼯皮肤成纤维细胞是可以稳定传代的细胞,试验时能够即取即用,省去了每次试验需要重新分离纯化细胞的步骤,并且不同代次间的细胞状态差别较小,试验重复性高,能够有效排除试验结果的偶然性,保证试验数据的可靠性。已有研究表明:树鼯皮肤结构与恒河猴及人类皮肤极为相似^[22];但小鼠和人类皮肤结构明显不同,如人类皮肤表皮内陷,出现网脊,表皮和真皮层均较厚,而小鼠网脊不突出,皮层均较薄^[30],且小鼠的汗腺皮脂腺不发达。因此,建立树鼯永生化的皮肤成纤维细胞系,并利用该细胞开展人类皮肤疾病的致病机理研究和相关药物研发具有重要意义。

4 结论

转染含SV40T永生生化基因后的树鼯皮肤成纤维细胞,经过53代以上的传代培养仍能维持原有状态,不同代次间细胞整体形态一致且排列紧密,有典型的成纤维细胞特性;细胞增殖能力旺盛且其永生生化特性得以稳定表达;细胞的核型鉴定结果证明所得细胞确为树鼯源细胞。本研究成功建立1株树鼯永生生化皮肤成纤维细胞,为人类皮肤相关疾病的体外研究提供了新材料。

[参考文献]

- [1] WATT F M, FUJIWARA H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011, 3(4): a005124. DOI: 10.1101/cshperspect.a005124.
- [2] DRISKELL R R, WATT F M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin[J]. Trends in Cell Biology, 2015, 25(2): 92. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.10.001.
- [3] FARAGE M A, MILLER K W, ELSNER P, et al. Functional and physiological characteristics of the aging skin[J]. Aging Clinical and Experimental Research, 2008, 20(3): 195. DOI: 10.1007/bf03324769.
- [4] MAKRANTONAKI E, ZOUBOULIS C C. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2007, 1119: 40. DOI: 10.1196/annals.1404.027.
- [5] 李文殊, 许宇皎, 卓雅婷, 等. 成纤维细胞在皮肤创伤修复中的作用研究进展[J]. 药学研究, 2021, 40(3): 191.

- DOI: [10.13506/j.cnki.jpr.2021.03.011](https://doi.org/10.13506/j.cnki.jpr.2021.03.011).
- [6] WERNER S, KRIEG T, SMOLA H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2007, 127(5): 998. DOI: [10.1038/sj.jid.5700786](https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700786).
 - [7] 胡素贤, 倪晓妍, 王嘉逊, 等. 新生小鼠皮肤成纤维细胞的分离培养与鉴定[J]. *中国医药导报*, 2011, 8(29): 5. DOI: [10.3969/j.issn.1673-7210.2011.29.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-7210.2011.29.003).
 - [8] 胡澜. 不同浓度过氧化氢致大鼠皮肤成纤维细胞衰老作用的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
 - [9] 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(电子版)*, 2019, 9(5): 267.
 - [10] 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*, 2020, 40(6): 506.
 - [11] 张媛, 王艳萍, 刘迺, 等. 芒硝对驴皮成纤维细胞增殖、凋亡的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(7): 2159. DOI: [10.16431/j.cnki.1671-7236.2020.07.021](https://doi.org/10.16431/j.cnki.1671-7236.2020.07.021).
 - [12] FAN Y, YU D, YAO Y G. Tree shrew database (Tree-shrewDB): a genomic knowledge base for the Chinese tree shrew[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7145. DOI: [10.1038/srep07145](https://doi.org/10.1038/srep07145).
 - [13] PETRY H M, BICKFORD M E. The second visual system of the tree shrew[J]. *Journal of Comparative Neurology*, 2019, 527(3): 679. DOI: [10.1002/cne.24413](https://doi.org/10.1002/cne.24413).
 - [14] GUO W N, ZHU B, AI L, et al. Animal models for the study of hepatitis B virus infection[J]. *Zoological Research*, 2018, 39(1): 25. DOI: [10.24272/j.issn.2095-8137.2018.013](https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2018.013).
 - [15] LU C X, FENG Y, SUN X M, et al. Tree shrew bone marrow-derived mesenchymal stem cells express CD81, OCLN, and miR-122, facilitating the entire hepatitis C virus life cycle[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(12): 3465. DOI: [10.1002/jmv.25710](https://doi.org/10.1002/jmv.25710).
 - [16] XIAO J, LIU R, CHEN C S. Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model[J]. *Zoological Research*, 2017, 38(3): 127. DOI: [10.24272/j.issn.2095-8137.2017.033](https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.033).
 - [17] YAN H, ZHONG G C, XU G W, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus[J]. *Elife*, 2012, 1: e00049. DOI: [10.7554/eLife.00049](https://doi.org/10.7554/eLife.00049).
 - [18] ZHANG N N, ZHANG L, DENG Y Q, et al. Zika virus infection in *Tupaia belangeri* causes dermatological manifestations and confers protection against secondary infection[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(8): e01982. DOI: [10.1128/jvi.01982-18](https://doi.org/10.1128/jvi.01982-18).
 - [19] 韩建保, 张高红, 段勇, 等. 中缅树鼯自然感染六种病毒的血清流行病学[J]. *动物学研究*, 2011, 32(1): 11.
 - [20] YANG Z F, ZHAO J, ZHU Y T, et al. The tree shrew provides a useful alternative model for the study of influenza H1N1 virus[J]. *Virology Journal*, 2013, 10: 111. DOI: [10.1186/1743-422x-10-111](https://doi.org/10.1186/1743-422x-10-111).
 - [21] CHE P L, WANG M M, LARSON-CASEY J L, et al. A novel tree shrew model of pulmonary fibrosis[J]. *Laboratory Investigation*, 2021, 101: 116. DOI: [10.1038/s41374-020-00476-3](https://doi.org/10.1038/s41374-020-00476-3).
 - [22] ZHANG J, LUO R C, MAN X Y, et al. The anatomy of the skin of the Chinese tree shrew is very similar to that of human skin[J]. *Zoological Research*, 2020, 41(2): 208. DOI: [10.24272/j.issn.2095-8137.2020.028](https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.028).
 - [23] 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*, 2019, 54(1): 76. DOI: [10.13859/j.cjz.201901010](https://doi.org/10.13859/j.cjz.201901010).
 - [24] 刘瑞清, 施立明, 陈玉泽. 树鼯 (*Tupaia belangeri* Wagner) 三个亚种的染色体比较研究[J]. *动物学研究*, 1989(3): 195.
 - [25] 李晓航, 张佳林, 康铁利, 等. Cre/LoxP系统联合SV40 LTag诱导可复性永生化大鼠皮肤成纤维细胞系的建立[J]. *中国医科大学学报*, 2011, 40(11): 979.
 - [26] KARLSSON J, LILLJEBJÖRN H, MENGELBIER L H, et al. Activation of human telomerase reverse transcriptase through gene fusion in clear cell sarcoma of the kidney[J]. *Cancer Letters*, 2015, 357(2): 498. DOI: [10.1016/j.canlet.2014.11.057](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.057).
 - [27] CHEN Y, HU S S, WANG M M, et al. Characterization and establishment of an immortalized rabbit melanocyte cell line using the SV40 large T antigen[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(19): 4874. DOI: [10.3390/ijms20194874](https://doi.org/10.3390/ijms20194874).
 - [28] CHILDS B G, BAKER D J, KIRKLAND J L, et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates?[J]. *EMBO Reports*, 2014, 15(11): 1139. DOI: [10.15252/embr.201439245](https://doi.org/10.15252/embr.201439245).
 - [29] WANG L M M, XIAO H W, ZHANG X, et al. The role of telomeres and telomerase in hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2014, 7: 61. DOI: [10.1186/s13045-014-0061-9](https://doi.org/10.1186/s13045-014-0061-9).
 - [30] LYNCH M D, WATT F M. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128(1): 26. DOI: [10.1172/jci93555](https://doi.org/10.1172/jci93555).

责任编辑: 何承刚