

# 毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*) 肺细胞株的建立及其生物学特性研究

张锡然 王建华 陈玉泽

(中国科学院昆明动物研究所)

我们在进行毛冠鹿的染色体研究时,观察到不仅该动物染色体核型特殊,而且结构异染色质丰富,尤其是23号、24号、25号染色体几乎占长臂的3/4甚至全部(张锡然等,1983),这在其他哺乳动物的染色体中尚少见,建立该动物之细胞株,对进一步探讨鹿科动物的染色体进化,对研究结构异染色质的结构和功能,提供了一个较好的材料。

本文报道了毛冠鹿细胞株的建立,命名为KIZ-81A,并对其部分生物学特性进行了观察研究。

## 材 料 和 方 法

### 一、动物来源

1981年,从浙江开化县捕获的一头雄性幼年毛冠鹿,(版图a)体重13公斤,颈动脉放血处死,无菌取出肺组织,立即进行培养。

### 二、培养方法

(1) 培养液: RPMI-1640 培养液(西德),加15%小牛血清,加1%双抗(含青链霉素各1万单位/毫升),pH 7.0-7.4。

(2) 原代细胞培养和传代细胞培养方法参见赤麂细胞株一文(施立明等1981)。

当细胞传至 $F_2$ 、 $F_3$ 、 $F_4$ 、 $F_5$ 代时,分别进行了冻存。并对冻存132天的细胞进行了复苏再培养,冻存和复苏条件按常规方法进行。

### 三、生物学指标测定

(1) 生长速度测定(大星章一等,1979,Marjorie等1969)。

当细胞传至 $F_7$ 、 $F_{11}$ 、 $F_{30}$ 代时,分别按 $5.5 \times 10^4$ 、 $5.4 \times 10^4$ 、 $4.0 \times 10^4$ 万/毫升细胞,接种于同一规格的小试管中,38°C培养8-10天,每天取3支试管,0.25%胰酶将细胞消化下来,进行计数,取其平均值。

(2) 有丝分裂指数测定: 当传至  $F_{11}$  代和  $F_{30}$  代时的细胞, 在培养瓶内置小盖玻片, 接种后24、48、72、96、120、144、168小时取出, 甲醇固定, Giemsa 染色, 计数3000个细胞中分裂细胞的数目, 用%表示。

(3) 细胞有丝分裂周期测定: 在传代接种时, 按8微克/毫升加BRdU, 38°C避光培养, 于48、72小时制染色体标本片, 并将制得的标本片进行姊妹单体分化染色(贺维顺等1980), 观察100个分裂中期相, 统计其有丝分裂周期第一期  $M_1$ , 第二期  $M_2$ , 第三期  $M_3$  各占的比例。

(4) 其他: 染色体标本片的制备按常规方法, 温度 pH 值变化对细胞生长的影响见结果与讨论部分。

## 结果与讨论

### 一、细胞形态与寿命

KIZ-81A 细胞株, 在原代培养时, 细胞有多边形上皮细胞, 梭形细胞, 成纤维细胞, 随着传代数的增加, 细胞趋向成纤维细胞, 其他细胞被淘汰, 当细胞长成致密单层后, 呈束状漩涡式(版图b)。原代培养, 4天形成致密单层, 以后几代形成单层的时间延长到6—7天, 且产量逐渐降低, 这可能是细胞不适应新的环境, 部分细胞死亡所致。至  $F_7$  代后, 细胞生长良好, 平均4—5天长成单层, 此时细胞清晰, 透亮, 立体感强,  $F_{64}$  代以后, 形成单层的时间逐渐延长到一星期, 细胞颗粒增多, 边缘模糊, 逐渐变成“网状”传至  $F_{67}$  代, 一个多月未长成单层, 细胞逐渐脱落。原代细胞在体外培养历时一年零一个月, 细胞传至67代, 寿命结束。对冻存132天之细胞, 进行复苏再培养, 细胞传至64代寿命告终, 这和未经冻存的细胞寿命基本上一致。

### 二、细胞生长速度与有丝分裂指数

表 I KZI-81A 细胞株、不同传代数细胞生长速度比较

| 传代数      | 接种细胞密度<br>$\times 10^4$ /毫升 | 接种后天数 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 最大增长<br>倍数 |      |
|----------|-----------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|------|
|          |                             | 1     | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |            |      |
| $F_7$    | 5.5                         | 2.3   | 3.0 | 5.5 | 6.6 | 5.5 | 8.2 | 5.8 | 5.6 |     |     |            | 1.50 |
| $F_{11}$ | 5.4                         | 4.1   | 5.2 | 5.6 | 4.7 | 5.3 | 6.9 | 5.3 | 6.0 | 5.3 | 5.6 |            | 1.28 |
| $F_{30}$ | 4.0                         | 3.8   | 4.2 | 5.0 | 7.8 | 5.3 | 5.5 | 5.8 | 8.0 |     |     |            | 2.0  |

表 I 冻存132天后的  $F_{11}$  代和未冻存的  $F_{11}$  代细胞生长速度比较

| 代<br>数       | 细胞接种密度<br>$\times 10^4$ /毫升 | 接种后天数 |      |     |      |     |      |     |     |     |    | 最大增长<br>倍数 |      |
|--------------|-----------------------------|-------|------|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|----|------------|------|
|              |                             | 1     | 2    | 3   | 4    | 5   | 6    | 7   | 8   | 9   | 10 |            |      |
| $F_{11}$ (未) | 6.4                         | 4.1   | 5.2  | 5.6 | 4.7  | 5.2 | 6.9  | 5.3 | 6.0 | 5.3 |    |            | 1.28 |
| $F_{11}$ (冻) | 5.0                         | 4.0   | 6.75 | 6.0 | 5.75 | 7.0 | 5.75 | 5.0 | 2.4 |     |    |            | 1.4  |

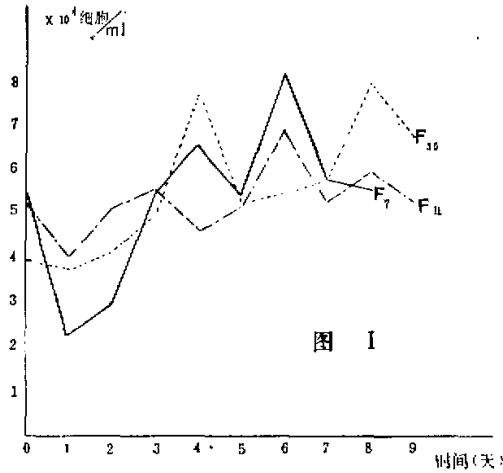


图 I

从表 I、图 I 可看, 细胞接种后第一天, 细胞数值均下降, 低于接种量, 这可能是由于细胞不适应新环境, 部分细胞死亡所致。以后随着时间逐渐回升, 第 5—6 天为最高值, 过后, 细胞又逐渐降低, 基本上符合细胞在体外生长的“滞缓—对数—滞缓”的生长模式。表 I、图 I 表明, 未经冻存的细胞同冻存 132 天后再培养的细胞, 传至同一个代数 ( $F_{11}$ ), 其细胞生长速度, 没有多大差异。说明液氮冻存, 对这个时期的细胞生长没有多大影响。另外, 从细胞增长的倍数及有丝分裂指数看 (表 II), 较赤麂 (施立明等 1981), 中国地鼠 (蔡有余等 1982) 低, 这是由于种的差异, 还是所用培养基不同, 值得进一步研究。

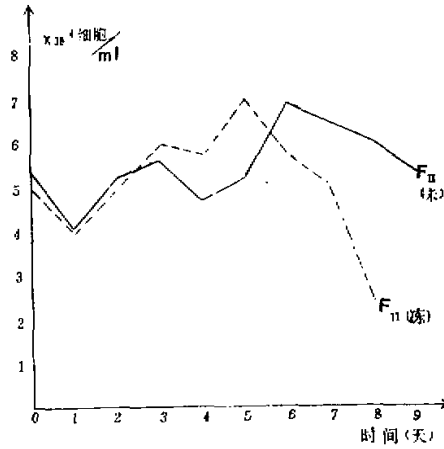


图 II

表 II KIZ—81A 细胞株不同代数细胞有丝分裂指数测定\* (%)

| 代 数      | 时间(天) |      |      |      |     |     |     |   |
|----------|-------|------|------|------|-----|-----|-----|---|
|          | 1     | 2    | 3    | 4    | 5   | 6   | 7   | 8 |
| $F_7$    | 0     | 0    | 7.0  | 8.0  | 3.0 | 1.0 | 2.5 |   |
| $F_{11}$ | 2.5   | 9.5  | 4.0  | 1.0  | 0   | 0   | 1.0 |   |
| $F_{30}$ | 0.3   | 18.0 | 13.0 | 11.3 | 1.6 | 0.6 | 0   |   |

\* 注: 计数3000个细胞

### 三、细胞有丝分裂周期

用SCE方法,测得 KIZ-81A,在培养后48小时,有43%的细胞已进入第二次有丝分裂,根据Crossen和Morgam (1977)的看法,推算出 KIZ-81A 细胞第一次有丝分裂的时间大约为24小时(细胞贴壁时间除外)。培养72小时,有73%的细胞进入第二次有丝分裂,10%的细胞已进入第三次有丝分裂,按上法推算第一次有丝分裂的时间为24—36小时(表IV)。

表 IV KIZ-81A 细胞株、细胞有丝分裂周期测定

| 培养时间<br>(小时) | 观 察<br>细胞数 | M <sub>1</sub> (%) | M <sub>2</sub> (%) | M <sub>3</sub> (%) |
|--------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 48           | 100        | 57.0               | 43.3               | 0                  |
| 72           | 100        | 17.0               | 73.0               | 10.0               |

从以上两个培养时间可看出, KIZ-81A 细胞的有丝分裂周期大致在24—36小时。

表 V KIZ-81A 细胞株不同代数染色体数目分布及形态观察

| 代 数             | 观 察<br>细胞数 | 二 倍 体 数 目 (%) |              |              | 多 倍 体 (%) |     | 结 构 异 常<br>(%) |
|-----------------|------------|---------------|--------------|--------------|-----------|-----|----------------|
|                 |            | 2n = 48       | 44 ≤ 2n < 48 | 48 < 2n ≤ 52 | 3n        | 4n  |                |
| F <sub>2</sub>  | 100        | 90.0          | 9.0          | 1.0          |           |     |                |
| F <sub>5</sub>  | 100        | 87.0          | 9.0          |              |           | 4.0 |                |
| F <sub>7</sub>  | 100        | 92.0          | 5.0          | 2.0          |           | 1.0 |                |
| F <sub>11</sub> | 100        | 85.0          | 12.0         |              |           | 3.0 |                |
| F <sub>14</sub> | 100        | 89.0          | 9.0          | 1.0          |           | 1.0 |                |
| F <sub>18</sub> | 100        | 85.0          | 10.0         | 1.0          |           | 4.0 |                |
| F <sub>21</sub> | 100        | 91.0          | 7.0          | 2.0          |           |     |                |
| F <sub>24</sub> | 100        | 84.0          | 12.0         | 1.0          |           | 3.0 |                |
| F <sub>28</sub> | 100        | 93.0          | 5.0          |              |           | 2.0 |                |
| F <sub>31</sub> | 100        | 92.0          | 7.0          | 1.0          |           |     |                |
| F <sub>36</sub> | 100        | 93.0          | 5.0          | 1.0          |           | 1.0 |                |
| F <sub>41</sub> | 100        | 84.0          | 12.0         | 4.0          |           |     |                |
| F <sub>46</sub> | 100        | 83.0          | 9.0          | 7.0          |           | 1.0 |                |
| F <sub>51</sub> | 100        | 67.0          | 3.0          | 22.0         |           | 8.0 |                |
| F <sub>56</sub> | 65         | 43.0          | 4.6          | 50.7         |           | 1.5 |                |
| F <sub>62</sub> | 100        | 23.0          | 1.0          | 74.0         |           | 2.0 |                |

### 四、染色体检查 (见表 V)

从表 V 可看, F<sub>51</sub>代以前,染色体众数较稳定(版图 f)而 F<sub>51</sub>代以后,染色体众数有增加的趋势,但增加的范围在 2—4 条之间,而且主要是小染色体数目的增加, F<sub>18</sub>代以后,在小染色体上有联合 (association) 现象出现。当细胞经冻存132天后再培养,染色体检查的结果见表 VI。

表 VI KIZ-81A 细胞冻存132天再培养各代染色体检查

| 代 数             | 观 察<br>细胞数 | 二 倍 体 数 目 (%) |              |              | 多 倍 体 |     | 结 构 异 常<br>(%) |
|-----------------|------------|---------------|--------------|--------------|-------|-----|----------------|
|                 |            | 2n = 48       | 44 ≤ 2n < 48 | 48 < 2n ≤ 52 | 3n    | 4n  |                |
| F <sub>15</sub> | 100        | 91.0          | 8.0          | 1.0          |       |     |                |
| F <sub>20</sub> | 100        | 87.0          | 10.0         | 2.0          |       | 1.0 |                |
| F <sub>25</sub> | 100        | 77.0          | 14.0         | 4.0          |       | 5.0 |                |
| F <sub>30</sub> | 100        | 47.0          | 8.0          | 43.0         |       | 2.0 |                |
| F <sub>35</sub> | 100        | 24.0          | 8.0          | 68.0         |       |     |                |
| F <sub>40</sub> | 70         | 31.4          | 5.7          | 62.9         |       |     |                |
| F <sub>45</sub> | 100        | 19.0          | 10.0         | 69.0         |       | 2.0 |                |
| F <sub>50</sub> | 120        | 12.5          | 9.2          | 78.3         |       |     | 13.3           |
| F <sub>54</sub> | 120        | 17.0          | 14.0         | 69.0         |       |     | 31.0           |
| F <sub>58</sub> |            |               |              |              |       |     |                |

从F<sub>30</sub>代起, 染色体众数就开始增加, 到F<sub>50</sub>代时, 2n = 48 仅占12.5%, 而且结构出现了异常, 主要变异发生在第一对末端着丝点染色体上, 其中一条同源染色体较之另一条明显加长, 且有二个次缢痕(版图c), 银染色显示, 该两处次缢痕, 均为核仁组织者活动区(版图d)到F<sub>54</sub>代这种变异染色体高达31%。另外还出现另一条最大的等臂染色体(版图e), C-带显示, 该染色体异染色质非常丰富, 看来是由两个25号染色体发生着丝点融合而成。

#### 五、温度对细胞生长的影响

(1) 将已长成单层的细胞, 置于室温(11—22°C)下, 细胞停止生长, 置15—20天, 细胞形态基本不变, 再回到38°C时, 细胞仍能正常生长, 但在室温下置20—30天后, 细胞则开始卷缩、脱落。

(2) 将在室温下24小时的细胞, 置入2°C冰箱, 经过12小时后检查, 细胞形态模糊, 变成“拉网状”, 再回到室温下经2小时, 置回38°C培养箱, 2天后检查, 部分细胞死亡, 部分细胞仍能生长, 当温度降至-3°C时, 经24小时, 则大部分细胞卷缩, 脱落。

(3) 将38°C正常生长的细胞, 温度升至39°C, 细胞生长旺盛, 2天便形成致密单层, 当温度升至40—41°C, 细胞卷缩, 脱落。

从上述可见, KIZ-81A 对温度的适应能力较强, 但高于39°C, 低于2°C时, 细胞开始死亡。这只对生长的细胞而言, 刚传代的细胞, 则对温度较敏感, 当温度降为20°C, 细胞贴壁不“伸腿”, 再回到38°C时, 细胞生长缓慢。

#### 六、pH值对细胞生长的影响

传代后的细胞, 将培养液的pH值分别调至pH6.7, 7.0, 7.6。48小时检查。在pH7.0中细胞生长较好, 在其他pH值中则游动细胞较多, 72小时检查, 在pH7.6较在pH6.7中细胞生长快。说明刚传代的细胞在贴壁时, 喜欢中性的环境, 一旦贴壁后, 则稍偏碱

一点的环境对细胞生长有利。

## 小 结

本文首次报道了毛冠鹿肺细胞株(命名为 KIZ-81A)的建立,并对其部分生物学特性进行了观察研究。结果如下:

1. KIZ-81A为成纤维细胞株,在体外培养一年零一个月,细胞传至67代,经液氮冻存132天后再培养的细胞,传至64代。

2. 细胞生长速度测定表明,该细胞株在体外生长,基本上符合“滞缓——对数——滞缓”的生长模式。

3. 用SCE方法,测定细胞有丝分裂周期大约在24—36小时。

4. 染色体分析表明,未经冻存的细胞,在  $F_{60}$  代以前,染色体的数目和形态是稳定的;  $F_{60}$  代以后,染色体数目有增加的趋势。而冻存后的细胞,从  $F_{30}$  代开始,染色体数目就有明显的增加,到  $F_{60}$  代后,结构也发生了变异,出现了新的核型。

本文还讨论了温度, pH 值对细胞生长的影响。

## 参 考 文 献

- 大星章一、官野清夫主编(吴政安等译)1979 人癌细胞培养。科学出版社。
- 施立明等 1981 赤鹿 (*Muntiacus muntjak*) 细胞株的建立及其生物学特性观察。动物学研究 2 (2) 105—112。
- 张儒然等 1983 毛冠鹿 (*Elaphodus cephalophus*) 体细胞染色体研究。动物学研究 4 (1) 89—93。
- 贺维顺等 1980 一种简便的姐妹染色单体分化方法—紫外线照射加Giemsa染色 (UPG)。自然杂志 8 : 638。
- 蔡有余等 1982 中国地鼠肺细胞系的建立及其部分生物学特性观察。动物学研究 3 (2) 117—122。
- Marjorie, L.F. et al. 1969 Biological characteristics and viral spectrum of serially cultivated fetal rhesus monkey kidney cell. *PSEBM* 131(3):1060—1067。
- Crossen, P. E. et al. 1977 Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. *Exp. cell Res.* 104(2):453—457。

## ESTABLISHMENT OF LUNG CELL STRAIN KIZ-81A OF TUFTED DEER (*ELAPHODUS CEPHALOPHUS*) AND STUDY OF ITS BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Zhang Xiran, Wang Jianhua and Chen Yuze

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

In this paper we present a cell strain (designated KIZ-81A) derived from lung tissue of a young male tufted deer (*Elaphodus cephalophus*). The animal was caught in southern China in 1981.

The results obtained from our observations on the biological characteristics of KIZ-81A strain are as follows,

1. The KIZ-81A cells were fibroblasts in morphology. The primary cells died at passage 67 after 13 months in vitro, while KIZ-81A cells, which had been frozen since passage 3 and kept in liquid nitrogen for 132 days before thawing, attained only 64 passages.

2. Growth rates of KIZ-81A cells were determined at passage 7, 11, 30. Comparison was made at generation 11 of primary cells and cells once frozen. The results showed that after a lag phase, all cultures entered the logarithmic growth phase and then the stationary phase again.

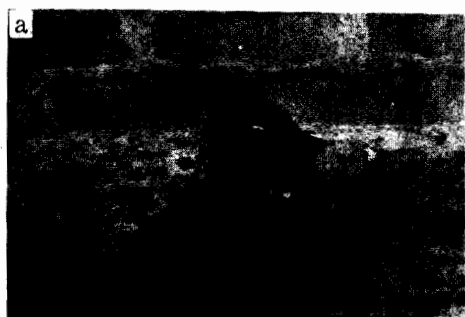
3. The range of cell cycle time, determined by BUdR-Giemsa method for detection of sister chromatid exchanges, was from 24 to 36 h.

4. Karyotype analysis revealed the chromosome number and construction in KIZ-81A cells (without being frozen and stored) were stabler than those of the cells once frozen in liquid nitrogen. In the former, the obvious increase of chromosome number and changes in construction started from the 51th generation and in the latter from the 30th generation. The cells with chromosome number from 49 to 52 greatly increased.

The effects of some experimental factors, including temperature and pH changes, on cell growth and division are also analysed and discussed.

# 张锡然等：毛冠鹿肺细胞株的建立及其生物学特性研究

Zhang Xiran et al.: Establishment of Lung Cell Strain-KIZ-81A of Tufted Deer (*Elaphodus cephalophus*) and Study of its Biological Characteristics



图a. 毛冠鹿 (*Elaphodus cephalophus*) 外观



图b. KIZ-81A活细胞形态 (6.3×12.5)

c



图c. KIZ-81A染色体新核型 (箭头所示)

d

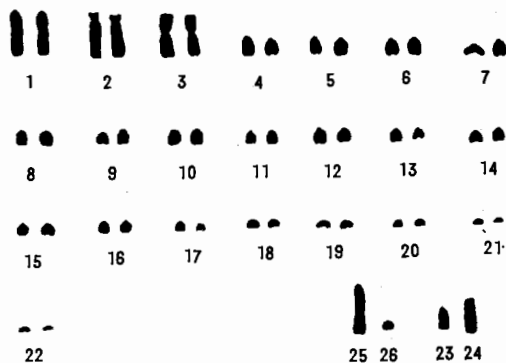


图d. 银染色显示核仁组织者

e



图e. KIZ-81A染色体新核型 (箭头所示)



f



图f. KIZ-81A染色体核型