

罗盘山猪脂肪间充质干细胞体外培养及生物学特性研究

王仲发^{1,2}, 李旻娟^{1,2}, 刘晏辰¹, 何玉楠^{1,3}, 刘文忠^{2*}, 关伟军^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 山西农业大学动物科学学院, 山西太谷 030801;
3. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 试验旨在通过体外分离培养罗盘山猪脂肪间充质干细胞 (Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, ADSCs), 探究其生物学特性和诱导分化潜能。采用 I 型胶原酶消化法体外获得罗盘山猪 ADSCs, 通过 RT-PCR 和免疫荧光技术鉴定 ADSCs 表面标志物的表达; 通过生长曲线绘制、划痕试验和克隆团形成试验, 探究其体外增殖趋势和生长发育规律; 通过成骨细胞、成脂细胞和成软骨细胞诱导, 探究其体外分化能力; 通过染色体核型分析, 探究其在体外环境中遗传物质的稳定性。RT-PCR 和免疫荧光结果表明, ADSCs 能够表达 CD29、CD44、CD73、CD90, 不表达与造血干细胞相关的 CD34; 通过胰蛋白酶消化法分离出的 ADSCs, 随着细胞代次的增加, 细胞活力逐渐降低; 细胞划痕和克隆结果表明, 随着代次的升高, 细胞体外增殖能力不断下降, 生长曲线呈“S”型; 体外诱导罗盘山猪 ADSCs, 能够诱导出成骨细胞、成脂肪细胞和成软骨细胞; 染色体核型分析结果表明, 在体外增殖过程中 ADSCs 能够保持稳定的染色体形态, 染色体基因组未发生改变 (2n=38)。本研究在体外成功分离出罗盘山猪 ADSCs, 且 ADSCs 具有较强的体外增殖和分化潜能, 研究结果可为罗盘山猪种质资源的保护和保存提供方法、为组织工程学研究提供参考依据。

关键词: 罗盘山猪; 脂肪; 间充质干细胞; 生物学特性

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

DOI 编号: 10.19556/j.0258-7033.20250217-06

罗盘山猪因产自重庆罗盘山一带而得名, 具有适应性强、母性好、遗传稳定、抗逆性强、耐粗饲等特点^[1]。

收稿日期: 2025-02-17; 修回日期: 2025-04-22

资助项目: 国家重点研发计划 (2021YFD1200303)

作者简介: 王仲发 (1997-), 男, 甘肃定西人, 硕士研究生, 主要从事干细胞研究, E-mail: 2812539972@qq.com; 李旻娟 (2000-), 女, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事干细胞研究, E-mail: 2171264303@qq.com

* 通信作者: 刘文忠 (1968-), 男, 山西沁水人, 博士, 教授, 主要从事动物遗传资源的分子评价与种质创新, E-mail: tglwzyc@163.com; 关伟军 (1966-), 男, 北京人, 博士, 教授, 主要从事畜禽遗传资源保存与应用研究, E-mail: guanweijun@caas.cn

但因各种原因导致罗盘山猪数量急剧减少, 在 2021 年, 罗盘山猪被列入《国家畜禽遗传资源品种名录》^[2]。罗盘山猪作为地方优良品种, 种质资源的保护和保存尤为重要, 而干细胞保存作为一种资源保存方式, 在畜禽种质资源保护和保存、组织工程学方面发挥了重要作用^[3]。罗盘山猪的养殖方式主要以农户散养为主, 没有形成集约化、规模化养殖, 保种方式还是以划定保护区、降低近交系数为主, 此种方式年限较长, 需要花费较大人力物力^[4-5]。有研究通过罗盘山猪体细胞克隆技术成功复原出 2 头健康、状态良好的罗盘山猪仔猪, 体细胞保存和克隆技术不仅能够大大缩短育种年限, 还能提高育种效率^[6]。另外体细胞在冷冻环境中能够

imputation of parental genotypes improves estimates of direct genetic effects[J]. Nat Genet, 2022, 54(6): 897-905.

[25] Zheng W G, Ma W L, Chen Z L, et al. DPlmpute: a genotype imputation framework for ultra-low coverage whole-genome sequencing and its application in genomic selection[J]. Adv Sci, 2025, 12(16): e2412482.

[26] Adcock B, Hientzsch B, Narayan A, et al. Hybrid least squares

for learning functions from highly noisy data[J]. [2025-07-03]. <https://doi.org/10.48550/arXiv.2507.02215>.

[27] Xiang T, Li T, Li J L, et al. Using machine learning to realize genetic site screening and genomic prediction of productive traits in pigs[J]. FASEB J, 2023, 37(6): e22961.

(责任编辑: 石丽丹)

存放很长时间,细胞复苏后还能维持原有活力^[7-9]。体细胞保存与克隆技术能够为罗盘山猪品种资源保护提供新的参考方案^[10]。

间充质干细胞来源广、易获得,具有较强的体外增殖、诱导分化和组织修复能力^[11],但是以间充质干细胞为资源的保种方式鲜有报道^[12-13]。鉴于罗盘山猪目前的保种形势和间充质干细胞的生物学特性,本研究通过体外分离罗盘山猪脂肪间充质干细胞(Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, ADSCs),并对其干细胞特性鉴定、资源保存以及体外诱导分化,以期罗盘山猪种质资源的保护和保存提供方案,为罗盘山猪组织工程学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 罗盘山猪脂肪间充质干细胞采自断奶 2 天后的健康罗盘山猪,由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所昌平实验基地提供。

1.1.2 主要试剂 H-DMEM 基础培养基和胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)由赛默飞世尔生物化学制品有限公司提供;I 型胶原酶、胰蛋白酶和二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)由北京索莱宝科技有限公司提供;秋水仙素和磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)由武汉赛维尔生物科技有限公司提供;封闭用山羊血清 Goat Serum 和山羊抗兔标记二抗(FITC-Goat Anti-Rabbit IgG)由北京博奥森生物技术有限公司提供;兔源一抗 CD29、CD44、CD73、CD90 和 CD34 购自北京索莱宝科技有限公司;RNA 反转录试剂盒由宝日医生物技术(北京)有限公司提供;阿利新蓝染色试剂盒(Alcian Blue Stain Kit)、油红 O 染色试剂盒(Oil Red O Stain Kit)、茜素红染色试剂盒(Alizarin Red S Solution)、姬姆萨染色液(Giemsa Stain Solution)均由北京索莱宝科技有限公司提供。

1.1.3 试验仪器 细胞培养箱(BB5060UV, Heraus 公司);低速多管架自动平衡离心机(TDZ5-WS, 湘仪离心机仪器有限公司);台式高速冷冻离心机(H1-16KR, 湖南可成仪器设备有限公司);琼脂糖凝胶电泳仪(DYY-7C, 北京市六一仪器厂);激光共聚焦显微镜(TCS SP8, 德国徕卡有限公司);普通倒置显微

镜(ckx-53, 奥林巴斯有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9203A, 上海精宏实验设备有限公司);超级洁净工作台(DL-CJ-2N, 北京东联哈尔仪器制造有限公司);梯度 PCR 仪(Veriti, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司);凝胶成像系统(GelDoc XR+, 美国 Bio-Rad Laboratories 公司)。

1.1.4 诱导液配制 成脂肪细胞诱导液:H-DMEM 基础培养基+10% FBS+1% 青链霉素+0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-Isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)+10 mg/L 胰岛素+1.0 μmol/L 地塞米松+200 μmol/L 吡哆美辛。成骨细胞诱导液:H-DMEM 基础培养基+2.5% FBS+1% 青链霉素+0.1 μmol/L 地塞米松+10 mmol/L β-磷酸甘油钠+50 μg/mL 抗坏血酸。成软骨细胞诱导液:H-DMEM 基础培养基+2.5% FBS+1% 青链霉素+1% 胰岛素+50 μg/mL L-脯氨酸+0.1 μmol/L 地塞米松+0.9 mmol/L 丙酮酸钠+10 ng/mL Transforming Growth Factor-beta 3 (TGF-β3)+50 mg/mL Vc+1% 胰岛素-转铁蛋白-硒(Insulin-Transferrin-Selenium, ITS)。

1.2 方法

1.2.1 罗盘山猪 ADSCs 分离培养 罗盘山猪断奶 2 天后颈动脉放血处死,在无菌环境下取肾周脂肪,将脂肪组织在 75% 酒精中浸泡 15 s 左右,用 PBS 清洗 3 遍后转移至超净工作台,将其剪碎至 1 mm³ 的小块组织,加入 I 型胶原酶于 37℃、5% CO₂ 培养箱中消化 20 min,显微镜下观察有大量细胞漂浮时,用 H-DMEM 完全培养基终止消化,用 70 μm 细胞过滤器过滤悬液。将过滤后的细胞悬液在 1 200 r/min 条件下离心 5 min,弃上清后用 H-DMEM 完全培养基重悬,制成细胞悬液后转移至培养皿,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。观察细胞生长情况,待细胞汇合度达 90% 以上,进行传代培养。

1.2.2 罗盘山猪 ADSCs 传代与冻存 显微镜下观察 ADSCs 汇合度达 95% 以上时,进行细胞传代。弃掉旧培养液后用 PBS 清洗 2 遍,加入 0.25% 胰蛋白酶,置于细胞培养箱中消化 5 min,镜下观察有大量细胞变圆、呈游离状态时,加入等体积完全培养基终止消化,将其全部转移至 15 mL 离心管中,1 200 r/min 离心 5 min,弃掉上清后用完全培养基重悬,将细胞悬液按照 1:2 或 1:3 的比例进行传代,置于细胞培养箱中继续培养。ADSCs 传代至第 3 代(P3)逐渐纯化,按照细胞传代程序进行细胞消化,将离心后的细胞用细胞冻存液

(DMSO+H-DMEM)重悬,将细胞悬液分装于细胞冻存管内,转移至细胞程序性降温冻存盒,于4℃环境中放置1 h后,转移至-20℃环境下5 h,结束后在-80℃环境中放置过夜,最后将其转移至液氮长期保存。

1.2.3 免疫荧光检测 ADSCs 表面标志物 将罗盘山猪第4代(P4)ADSCs接种于共聚焦小皿中,待细胞汇合度达90%以上时,弃去培养液,用PBS清洗3遍,4%多聚甲醛固定液固定30 min,PBS清洗2遍后加入0.25% TritonX-100 通透液20 min,PBS洗去TritonX-100 通透液,加入1:100 稀释后的封闭用山羊血清,在室温环境中放置30 min,用PBS洗去山羊血清后加入兔源一抗(CD29、CD44、CD73、CD90 和 CD34),4℃环境下避光过夜。将过夜后的细胞除去一抗后,加入山羊抗兔二抗(FITC),室温环境下放置1 h,PBS清洗2次,DAPI 孵育30 min,PBS清洗干净DAPI后,将细胞置于激光共聚焦显微镜下观察结果。

1.2.4 RT-PCR 检测 ADSCs 表面标志物基因表达 将罗盘山猪第4代(P4)ADSCs接种于6孔板中,待细胞汇合度至90%以上时,使用Trizol法提取总RNA,Takara 反转录试剂盒合成cDNA,反应体系20 μL。反转录条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃保存。在NCBI 数据库中查找ADSCs 表面标志物基因,利用RT-PCR 检测表面标志物基因的表达量,使用Primer premier5.0 软件设计引物(表1),包括内参基因(*GAPDH*)、间充质干细胞特异性基因(*CD29*、*CD44*、*CD73*、*CD90*)、造血干细胞相关基因(*CD34*)、成脂肪细胞特异性基因(*PPAR-γ*、*LPL*)、成软骨特异性基因(*AGC1*、*Col2a1*)、成骨特异性基因(*Col1a1*、*ALP*)序列,引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。PCR 反应体系20 μL:2×Fast Pfu PCR Master Mix 10 μL,cDNA 0.8 μL,上下游引物(12.5 μmol/L)各0.8 μL,ddH₂O 补至20 μL。反应条件:95℃预变性2 min;95℃变性15 min,55℃退火30 min,72℃延伸35 s,35个循环;72℃终延伸5 min。2.0%琼脂糖对PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳0.5 h,观察表面标志物基因的表达。

1.2.5 ADSCs 不同代次生长曲线及群体倍增时间 取第4代(P4)、第10代(P10)、第16代(P16)罗盘山猪ADSCs,待细胞汇合度达到90%时,胰蛋白酶消化传代,制成细胞悬液,对悬液进行细胞计数,按照每孔 1×10^4 个的数量进行24孔板铺板,从第二天开始计

数,连续计数7 d,统计不同代次ADSCs 体外生长规律,绘制生长曲线图,计算群体倍增时间(Population Doubling Time, PDT)。PDT=($t-t_0$)lg2/(lgN_t-lgN₀),其中:t为细胞对数生长期结束时间;t₀为细胞对数生长期开始时间;N为细胞对数生长期结束时的细胞数量;N₀为细胞对数生长期开始时的细胞数量。

1.2.6 ADSCs 不同代次克隆形成能力检测 取P4、P10、P16 罗盘山猪ADSCs,按照每皿100个细胞的数量进行传代接种,连续生长10天后,观察细胞所形成的细胞团个数,并对其进行染色,计算克隆形成率。克隆形成率(%)=(形成细胞团个数/接种细胞数)×100%。

1.2.7 ADSCs 伤口愈合能力检测 取生长状态较好的P4 罗盘山猪ADSCs,用1 mL 移液器枪头对其进行划痕,观察划痕伤口愈合情况,记录0 h和12 h细胞划痕面积,根据划痕面积计算细胞迁移率。细胞迁移率=(0 h 划痕面积-12 h 划痕面积)/0 h 划痕面积×100%

1.2.8 ADSCs 体外诱导分化能力检测 取生长状态良好、细胞汇合度达90%以上的P4 罗盘山猪ADSCs,设置不添加诱导液的对照组和添加诱导液的诱导组。分别加入1.1.4中的成脂肪细胞、成骨细胞和成软骨细胞诱导液,定期换液和观察细胞形态,当观察到细胞形态发生变化、诱导特征显现后,分别对对照组和诱导组进行染色,成脂肪细胞进行油红O染色、对成骨细胞进行茜素红染色、对成软骨细胞进行阿利新蓝染色。通过RT-PCR 检测与成脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞有关的特异性基因表达量。

1.2.9 ADSCs 染色体数量及形态观察 取生长状态良好、细胞汇合度达70%以上的P4 罗盘山猪ADSCs,胰蛋白酶消化后按照1:2的比例进行传代,将传代后细胞置于细胞培养箱,观察细胞刚刚贴壁时的状态,加入50 μL 已经提前37℃预热、浓度为10 μg/mL的秋水仙素和7 mL H-DMEM 完全培养基,继续培养24 h。培养结束后用胰蛋白酶消化细胞,1 500 r/min 条件下离心5 min,弃上清后加入1 mL 0.075 mol/L KCL 溶液,37℃水浴0.5 h,加入1 mL 固定液(冰醋酸:甲醇=1:3),1 200 r/min 条件下离心8 min,弃上清。重复此步骤3次。加入1 mL 固定液制成细胞悬液,距离载玻片上方2 mm处进行滴片,待干燥后用Giemsa 染色液染色,洗去浮色,干燥后拍照观察染色体数量和形态,计算不同染色体类

型占比。

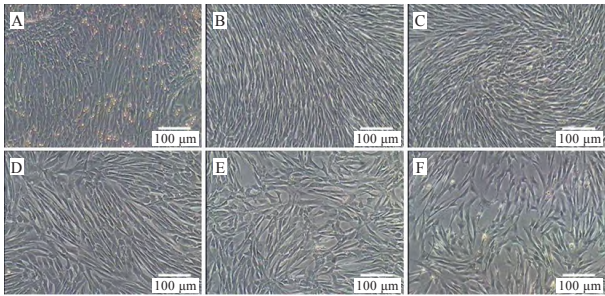
1.3 数据处理 使用 Excel 和 ImageJ 进行数据统计，使用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行数据处理，单因素方差分析和邓肯多重比较用于分析数据，结果表示为平均值 ± 标准误。P<0.05 表示差异显著，P<0.01 表示差异极显著。使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件作图。

2 结果与分析

2.1 罗盘山猪 ADSCs 分离培养 胶原酶消化法体外分离、培养罗盘山猪 ADSCs，P0 细胞混杂有其他类型细胞，P3 以后逐渐纯化。细胞呈长梭形涡旋状生长，随着代次的增加，细胞逐渐出现空泡化、传代间隔不断延长。相比于低代次细胞，P20 以后的细胞开始变得稀疏、细胞活力开始降低、细胞形态发生变化、细胞体积变大、细胞周围出现黑点，细胞表现出衰老特征（图 1）。

2.2 免疫荧光检测 ADSCs 表面标志物 免疫荧光检测 ADSCs 表面标志物结果显示，CD29、CD44、CD73、CD90 阳性表达，CD34 不表达（图 2）。

2.3 RT-PCR 检测 ADSCs 表面标志物基因表达 RT-PCR 检测结果显示，罗盘山猪 ADSCs 表达 CD29、CD44、CD73 和 CD90，不表达 CD34（图 3）。



A~F：罗盘山猪 ADSCs P0、P5、P10、P15、P20、P23 细胞形态。
图 1 罗盘山猪 ADSCs 形态图（40×）

2.4 不同代次 ADSCs 生长曲线及群体倍增时间 P4、P10、P16 细胞生长曲线计数结果显示，细胞生长经过潜伏期、对数增长期、平缓期和衰老期。细胞代次越低，对数增长期细胞密度越大、细胞活力越好，细胞代次越高，细胞活力也较弱。在整个细胞生长期内，低代次细胞的密度始终大于高代次（图 4A）。计算群体倍增时间结果显示，P4、P10、P16 群体倍增时间分别为 32.21±0.68 h、42.09±1.12 h 和 54.22±1.88 h，细胞代次越低，群体倍增时间越短；低代次细胞在对数增长期内的细胞增长数量要大于高代次细胞的细胞增长数量（图 4B）。

2.5 不同代次 ADSCs 克隆形成能力检测 P4、P10、

表 1 引物序列			
基因名称	引物序列（5'→3'）	长度，bp	退火温度，℃
GAPDH（>NM_001289745.3）	F: AGGTCGGAGTGAACGGATT R: CCATTGATGACAAGCTTCCCG	199	59
CD29（>XM_013994425.2）	F: TCTCTAGCAACCCGAGGAT R: TGGTGTGGTTGAAATGGTGC	437	59
CD34（>NM_214086.2）	F: TGGCCAAACGGAACAGAACTT R: ATAAGGGTCTTCGCCCAGC	248	59
CD44（>XM_001927095.4）	F: CCTTTTCTCTCAAATCCAGGAAC R: TCCATTTCAAAACCAGAATGTCCC	134	58
CD73（>XM_001927095.4）	F: AGCAGCATTCTGAAGATCCA R: TCCTGAGGGGCTCGTAAC TG	532	59
CD90（>NM_001146129.1）	F: CTCTCTTGCTAACAGTCTTGCAG R: GTGGTATTCTCATGGCGGCAG	109	60
PPAR-γ（>XM_013981982.2）	F: CCAGGACTACCAAAGTGCCAT R: CCCACAGACACGGCATTCA	133	60
LPL（>NM_214286.1）	F: CGACGACGAGATTTGTAGAC R: GAGCTGGTCCACATCTCCAAG	190	59
AGC1（>XM_021098299.1）	F: TCAGGAGAAGAGATGCCAACAG R: CTCACACAGCTTCTGGTCTGC	120	59
Col2a1（>XM_021092611.1）	F: TGGACGCCATGAAGGTTTCT R: ACTTACCGGTGTGTTTCGTG	411	58
Colla1（>XM_021067155.1）	F: TCTGACTGGAAGAGCGGAGA R: AGTGACGCTGTAGGTGAAGC	435	59
ALP（>NM_213870.1）	F: TGGGAAGGTGCTGAAAATGCTTTGA R: ATAGACCACTGGACACTTCCC	212	58

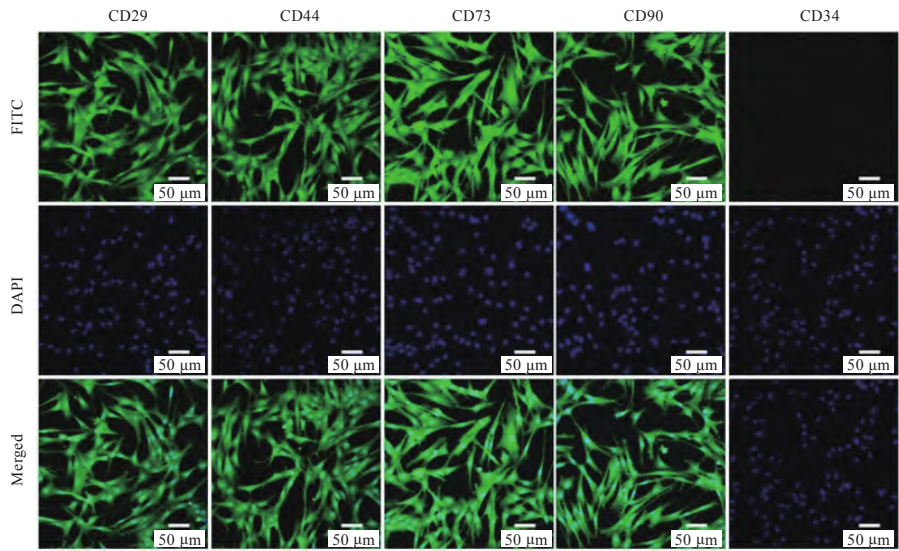
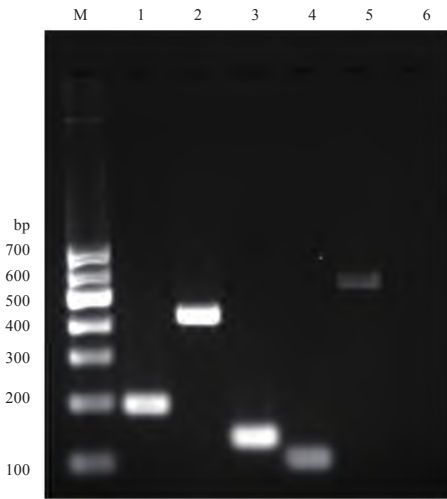


图2 免疫荧光检测罗盘山猪 ADSCs 表面标志物 (100×)

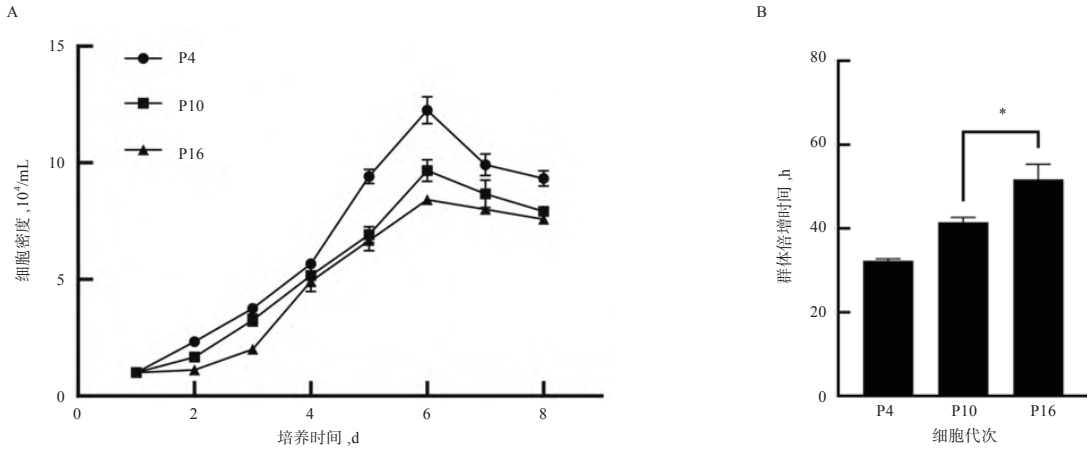


M: DL700 DNA 相对分子质量标准; 1: GAPDH; 2: CD29; 3: CD44; 4: CD73; 5: CD90; 6: CD34。

图3 RT-PCR 检测罗盘山猪 ADSCs 标志基因表达

P16 细胞克隆结果显示,低代次细胞在相同培养条件下形成的细胞团数量比高代次细胞形成的细胞团数量多,并且细胞在形成克隆团的过程中形态未发生变化;P10和P16细胞在形成克隆团后,形态和体积发生变化,细胞克隆团的密度较稀疏(图5A~C)。细胞克隆形成率计算结果显示,细胞代次越低,克隆形成率越高、克隆团数量越多、细胞活力越好,P4、P10、P16 迁移率分别为 $60\% \pm 1.15\%$ 、 $44.33\% \pm 2.60\%$ 和 $31.33\% \pm 1.45\%$,3 个代次间克隆形成率存在显著差异(图5D)。

2.6 ADSCs 伤口愈合能力检测 细胞划痕结果显示,细胞代次越低,伤口愈合时间越短、速度越快,P4 细胞在 12 h 基本完全愈合,P10 和 P16 细胞在 12 h 时还未完全愈合,且高代次细胞在划痕 12 h 后变得较稀疏,伤口愈合能力下降(图6A)。细胞迁移率计算结果显示,P4、



A: 罗盘山猪 ADSCs 生长曲线; B: 罗盘山猪 ADSCs 群体倍增时间, * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图4 罗盘山猪 ADSCs 生长能力测定

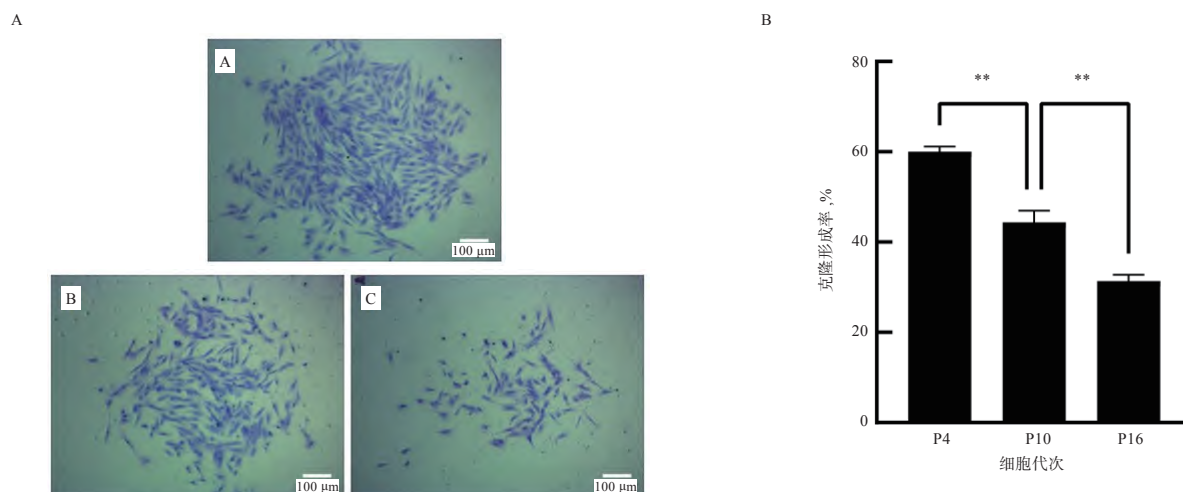
P10、P16 细胞迁移率分别为 $81.63\% \pm 0.34\%$ 、 $73.23\% \pm 0.91\%$ 和 $42.02\% \pm 0.88\%$ ，不同代次间的细胞迁移率存在极显著差异，代次越低，细胞迁移率越大、迁移能力越强（图 6B）。

2.7 ADSCs 体外诱导分化能力检测

2.7.1 成骨细胞诱导分化 对罗盘山猪 ADSCs 加入 1.1.4 中成骨细胞诱导液，21 d 后只有诱导组细胞形态发生变化，细胞聚集成团；用茜素红染色试剂进行染色，对照组未被着色，诱导组被染色液染成红色（图 7A、7B）。RT-PCR 检测结果显示，诱导组细胞表达与成骨细胞有关的标志基因 *Col1a1* 和 *ALP*，对照组不表达 *Col1a1* 基因和 *ALP* 基因（图 7C）。

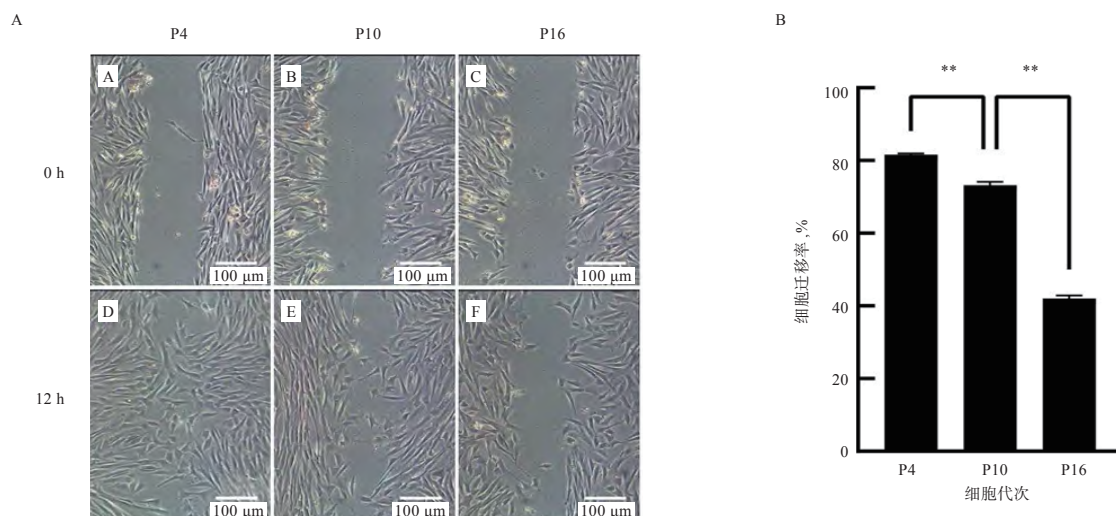
2.7.2 成软骨细胞诱导分化 对罗盘山猪 ADSCs 加入 1.1.4 中成软骨细胞诱导液，观察细胞形态变化，21 d 后细胞形态发生变化，细胞聚集、有细胞团出现。用阿利新蓝染色试剂进行染色，诱导组细胞被染成蓝色，对照组未着色（图 8A、8B）。RT-PCR 检测结果显示，诱导组表达与成软骨细胞有关的 *AGC1* 基因和 *Col2a1* 基因，对照组不表达 *AGC1* 基因和 *Col2a1* 基因（图 8C）。

2.7.3 成脂肪细胞诱导分化 对罗盘山猪 ADSCs 加入 1.1.4 中成脂肪细胞诱导液，14 d 后用油红 O 染色试剂进行细胞染色，对照组未出现染色反应，诱导组被染成橘红色（图 9A、9B）。RT-PCR 检测结果显示，诱导



A~C: 罗盘山猪 ADSCs 第 4、10、16 代克隆团形态 (40 $\times$)；D: 罗盘山猪 ADSCs 克隆形成率，** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 5 罗盘山猪 ADSCs 克隆形成能力检测



A: 罗盘山猪第 4、10、16 代 ADSCs 划痕变化 (40 $\times$)；B: 罗盘山猪第 4、10、16 代 ADSCs 迁移率，** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 6 罗盘山猪 ADSCs 伤口愈合能力检测

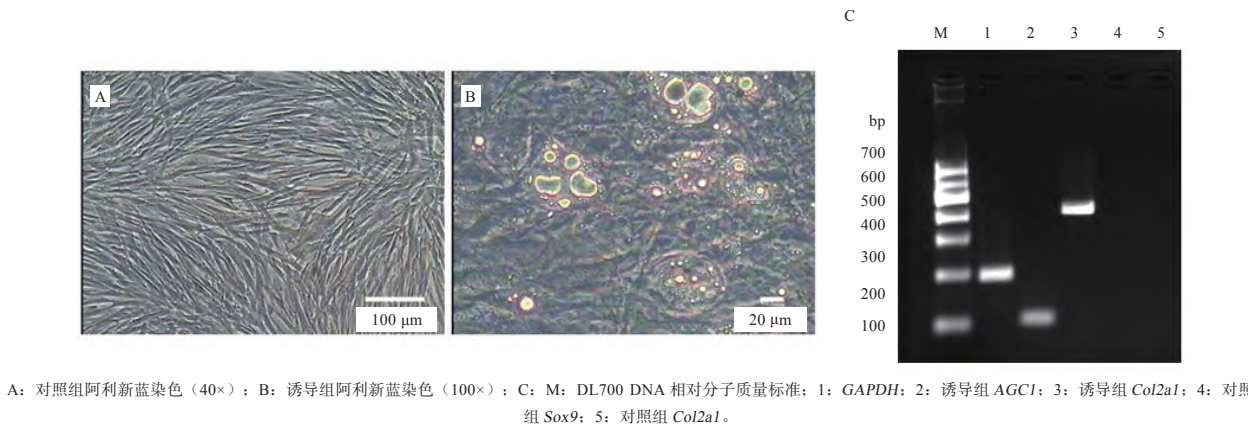


图 8 罗盘山猪 ADSCs 成软骨细胞诱导分化

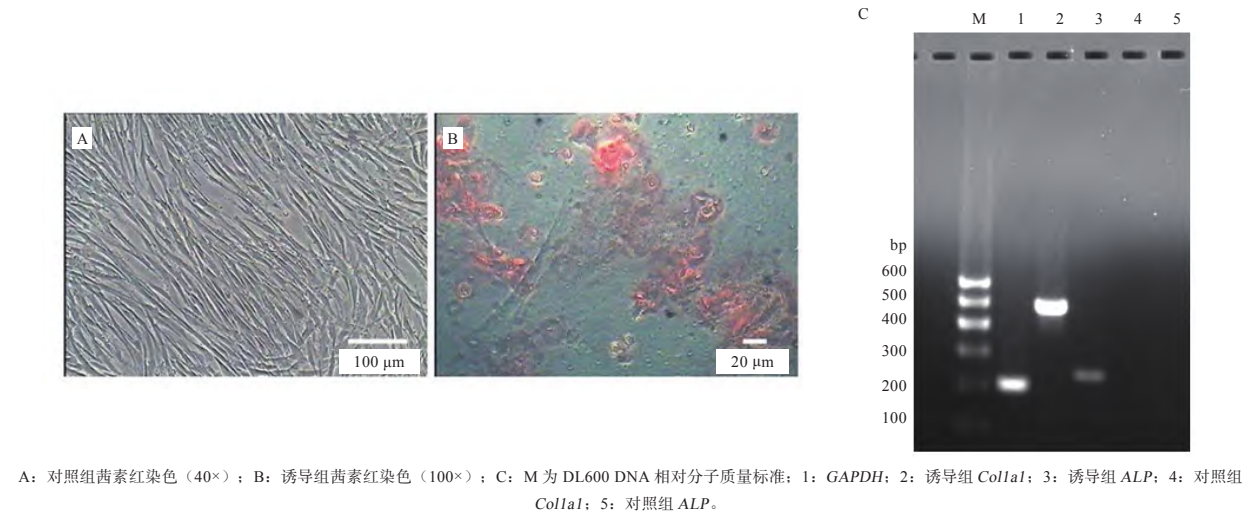


图 7 罗盘山猪 ADSCs 成骨细胞诱导分化

组表达成脂细胞相关基因 *PPAR-γ* 和 *LPL*, 对照组不表达 *PPAR-γ* 和 *LPL* (图 9C)。

2.8 ADSCs 染色体数量及形态观察 罗盘山猪 ADSCs 染色体数量观察结果显示, 染色体数量为 38 条, 其中包含 18 对常染色体和一对性染色体 (图 10A)。罗盘山猪 ADSCs 染色体形态观察结果显示, 罗盘山猪 ADSCs 染色体数目为 $2n=38$ 。分裂后期染色体形态有中着丝粒染色体 (M)、近中着丝粒染色体 (SM)、近端着丝粒染色体 (ST) 和端着丝粒染色体 (T), 4 种不同类型染色体占比分别为 42.11%、26.32%、15.79%、15.79% (图 10B)。

3 讨论

本研究通过胶原酶消化法体外分离罗盘山猪 ADSCs, 发现 ADSCs 形态呈螺旋式, 低代次细胞生长状态较好、传代间隔短, 随着细胞代次的不断增加, 细

胞形态由长梭形逐渐转变为短圆形, 细胞密度显著降低, 20 代以后细胞空隙增大, 并有黑色斑点出现。有研究利用 I 型胶原酶, 使用组织块贴壁法成功体外分离出猪 ADSCs, 接种 24 h 后的细胞形态呈梭形或者长三角形, 3 d 后细胞形态转变为纺锤形^[14], 本研究结果与前人研究具有一致性。

Dariolli 等^[15]通过分离猪皮下脂肪来源间充质干细胞 (Porcine Subcutaneous Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, pASCs), 使用流式细胞术分析猪脂肪间充质干细胞表面标志物, 结果表明脂肪间充质干细胞能够表达 *CD29*、*CD44*、*CD90*、*CD31*, 不表达与造血干细胞相关的 *CD34*、*CD45* 基因。有研究对猪脂肪组织和脐带华通胶来源的间充质干细胞进行了比较分析, 利用流式细胞术鉴定间充质干细胞表面标志物, 结果显示, 猪脂肪组织和脐带华通胶来源的间充质干细胞均表达阳性标志物 *CD73*、*CD90*、*CD105*, 不表达阴性标

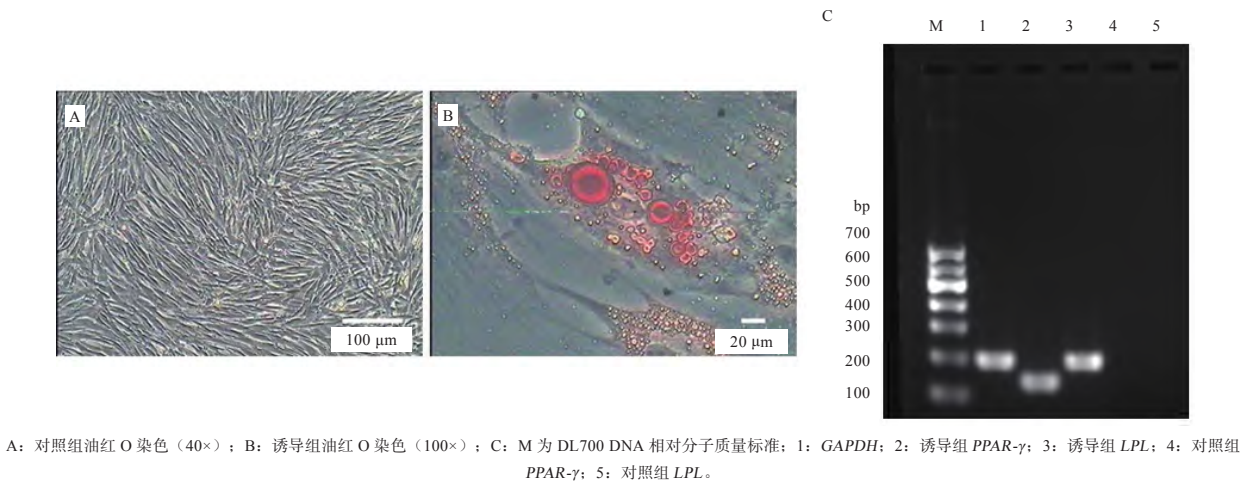


图 9 罗盘山猪 ADSCs 成脂肪细胞诱导分化

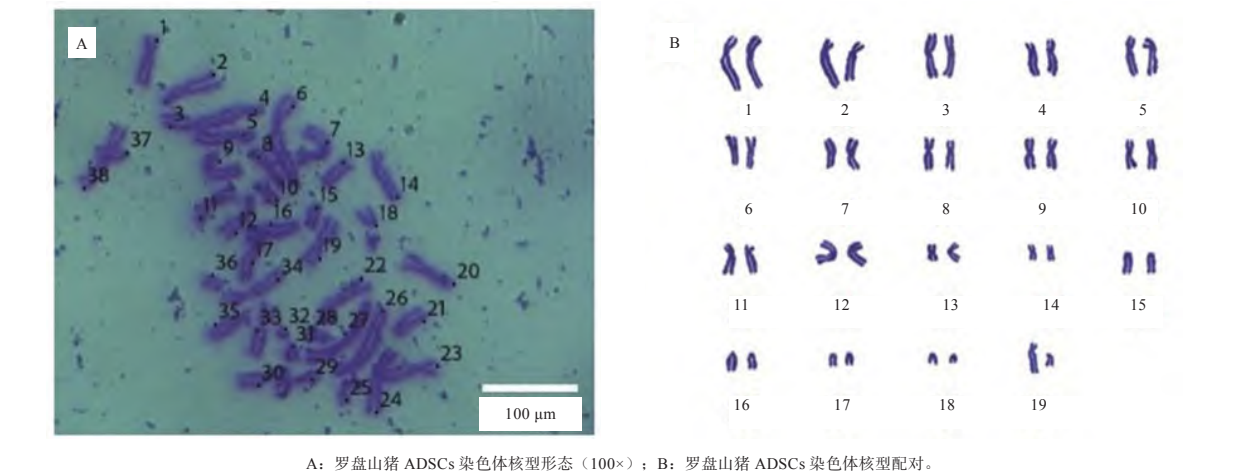


图 10 罗盘山猪 ADSCs 染色体核型分析

志物 CD34、CD45^[16-17]。本研究通过胶原酶消化体外分离罗盘山猪 ADSCs，利用免疫荧光技术和 RT-PCR 检测罗盘山猪 ADSCs 表面标志物，结果显示，罗盘山猪 ADSCs 能够表达阳性表面标志物 CD29、CD44、CD73、CD90，不表达阴性标志物 CD34，本研究结果与前人研究结果一致，表明体外成功分离出罗盘山猪脂肪 ADSCs。

本研究通过生长曲线计数、细胞克隆形成率和细胞划痕伤口愈合试验鉴定罗盘山猪 ADSCs 体外增殖能力，结果表明罗盘山猪 ADSCs 在体外具有较强的增殖能力，随着代次的不断增加，ADSCs 增殖能力逐渐降低。有研究通过对比猪和人类 ADSCs 生物学特性，发现低代次猪和人类 ADSCs 的增殖能力以及细胞活力均高于高代次^[18]，高元慧等^[19]、黄邓高等^[20]在对近交系五指山猪脂肪间充质干细胞分离培养后发现，低代次细胞形态

为成纤维样细胞样、细胞涡旋式生长、增殖效率较高、状态良好，细胞传至 P13 后，形态逐渐转变为不规则状、长梭形状消失、细胞折光率下降、细胞出现衰老症状。本研究发现罗盘山猪 ADSCs 体外增殖特性在 P20 以后逐渐下降，这与前人研究基本一致。

本研究在体外环境下对罗盘山猪 ADSCs 添加成脂细胞、成骨细胞和成软骨细胞诱导液，分别在 7、14、21 d 后出现特征性变化，使用油红 O 染色液、茜素红染色液和阿利新蓝染色液后，表现出颜色反应，表明罗盘山猪在体外具有较强的诱导分化能力。有研究对来源于皮下脂肪细胞的间充质干细胞进行诱导分化，成脂诱导 9 d、成骨诱导 14 d、成软骨诱导 14 d 后，出现特征性表现，成脂分化率达 90% 以上^[21-22]。Farooqui^[23]等研究了低氧环境下猪脂肪间充质干细胞的体外增殖与分化潜能，在诱导一定时间后分别用油红 O 染色液和茜

素红染色液对其进行染色,细胞呈现较强的成脂、成骨诱导特征,表明在低氧环境下猪脂肪间充质干细胞也具有较强的分化潜力。

综上,猪ADSCs具有较强的体外增殖能力和诱导分化潜能,建议在猪ADSCs生物学特性研究以及组织工程学研究时,以低代次细胞为主要研究对象,具有较高的研究价值。

4 结论

本试验成功分离出罗盘山猪ADSCs,并对其生物学特性进行了有效鉴定。ADSCs在体外环境下具有较强的增殖能力和多向分化潜能,能够分化为脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞。核型分析结果表明,ADSCs具有正常二倍体核型,能够保持遗传稳定性。本试验为罗盘山猪种质资源的保护与保存、罗盘山猪ADSCs鉴定以及组织工程学研究提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 陈燕. 罗盘山猪利用现状及发展思路[J]. 中国畜禽种业, 2014, 10(8): 21.
- [2] 赵思思, 贾青, 胡慧艳, 等. 西南型地方猪品种资源的变化[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(10): 91-94.
- [3] 邓娟. 湖川山地猪(罗盘山猪)的保护和开发利用[J]. 中国猪业, 2013, 8(S1): 132-133.
- [4] 郭梓洋, 黄雷, 李奎. 畜禽种质资源的创新与利用研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2023, 25(4): 14-22.
- [5] 张德福, 冯景松, 吴彩凤, 等. 国内外畜禽基因库保种现状及应用前景[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2021(4): 1-4.
- [6] Qi X H, Wang Z, Zhang P Y, et al. Protection and utilization of germplasm resources for turpan black sheep in toksun county[J]. Hans J Agric Sci, 2015, 5(3): 96-100.
- [7] Al Hakim R R, Saputro T A. Development of somatic cell nuclear transfer biotechnology for cloning of animals: a mini-review[J]. J Biol Instr, 2021, 1(1): 20-27.
- [8] Gavin-Plagne L, Perold F, Osteil P, et al. Insights into species preservation: cryobanking of rabbit somatic and pluripotent stem cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7285.
- [9] Song Z, Cong P, Ji Q, et al. Establishment, differentiation, electroporation and nuclear transfer of porcine mesenchymal stem cells[J]. Reprod Domest Anim, 2015, 50(5): 840-848.
- [10] 孙清漪, 房晓欢, 李俊杰. 体细胞冷冻保存技术及其在动物遗传资源保护中的应用研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60(1): 1-5.
- [11] Yao Z L, Niu Y J, Li B C, et al. Mechanisms of embryonic stem cell pluripotency maintenance and their application in livestock and poultry breeding[J]. Animals, 2024, 14(12): 1742.
- [12] Mummery C, Anthony E. New guidelines for embryo and stem cell research[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(12): 773-774.
- [13] 季新澎, 金诗宇, 滕海龙, 等. 间充质干细胞在畜牧业中应用研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51(3): 955-966.
- [14] 屈长青, 张国华, 杨公社. 猪脂肪间充质干细胞分离培养及成骨诱导[J]. 自然科学进展, 2007(2): 182-187.
- [15] Dariolli R, Bassaneze V, Nakamura J S, et al. Porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells retain their proliferative characteristics, senescence, karyotype and plasticity after long-term cryopreservation[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e67939.
- [16] Garcia G A, Oliveira R G, Dariolli R, et al. Isolation and characterization of farm pig adipose tissue-derived mesenchymal stromal/stem cells[J]. Braz J Med Bio Res, 2022, 55(1): e1220.
- [17] Kim G Y, Choi G T, Park J, et al. Comparative analysis of porcine adipose-and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells[J]. Animals, 2023, 13(18): 2947.
- [18] Bukowska J, Słowińska M, Cierniak P, et al. The effect of hypoxia on the proteomic signature of pig adipose-derived stromal/stem cells (pASCs)[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 20035.
- [19] 高元慧, 向杨, 曹卉, 等. 两种月龄近交系五指山小型猪脂肪间充质干细胞生物学特性的比较[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(19): 2988-2993.
- [20] 黄邓高, 曹卉, 王顺兰, 等. 近交系五指山小型猪脂肪间充质干细胞分离培养及生物学特性[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(3): 297-306.
- [21] 朱淑芳, 曲泽澎, 陆赢, 等. 转基因猪骨髓间充质干细胞的分离及与猪胰岛的共培养研究[J]. 器官移植, 2024, 15(1): 55-62.
- [22] 樊懿莹, 张艳丽, 杨岳, 等. 梅山猪骨髓间充质干细胞的分离培养及生物学特性分析[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(6): 115-120.
- [23] Farooqui N, Mohan A, Isik B, et al. Effect of hypoxia preconditioning on the regenerative capacity of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in a model of renal artery stenosis[J]. Stem Cells, 2023, 41(1): 50-63.

(责任编辑: 石丽丹)