

一种牦牛原代肺成纤维细胞分离培养与鉴定的方法

邢嘉仪¹,姜雨婷¹,白媛媛¹,麻志伟¹,蔡雯祎¹,兰道亮^{1,2,3},吉文汇¹

(1.西南民族大学畜牧兽医学院,四川成都610041;2.西南民族大学青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室,四川成都610041;3.西南民族大学青藏高原动物遗传资源保护与利用四川省重点实验室,四川成都610041)

摘要:旨在建立牦牛原代肺成纤维细胞(YLFS)体外分离培养、传代纯化及鉴定的方法。采用I型胶原酶和胰酶混合消化并结合差速消化法分离纯化YLFS;统计细胞冻存及复苏后活率;苏木精-伊红(HE)染色鉴定细胞形态;CCK8溶液检测细胞生长活力;免疫荧光、RT-PCR、Western blot法鉴定成纤维细胞标志性基因波形蛋白(Vimentin)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达; β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老。细胞在第2d逐渐贴壁生长,第4d贴壁范围呈漩涡状扩大;差速消化法重复2~3次即可纯化YLFS;冻存复苏后的细胞活力均维持在90%以上;HE染色YLFS,细胞形态多为树枝型、长梭形以及不规则四边形;细胞生长状态良好,生长曲线呈“S”型;Vimentin和 α -SMA在YLFS的基因及蛋白水平均高度表达;第13代YLFS细胞衰老染色结果呈阳性。本实验成功分离培养出大量活力良好的牦牛肺成纤维细胞,建立了成年牦牛肺成纤维细胞体外分离培养的方法,为进一步研究牦牛肺在单细胞水平的高原适应性机制提供生物材料。

关键词:牦牛;原代培养;肺成纤维细胞;分离;培养;鉴定;酶消化法

中图分类号:S823.85;R332

文献标志码:A

文章编号:2095-4271(2025)05-0493-07

A method for isolation, culture, and identification of primary yak lung fibroblasts

XING Jiayi¹, JIANG Yuting¹, BAI Yuanyuan¹, MA Zhiwei¹, CAI Wenyi¹, LAN Daoliang^{1,2,3}, JI Wenhui¹

(1. School of Animal and Veterinary Science, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;
2. Ministry of Education Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China; 3. Sichuan Provincial Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The objective of this study was to establish a method for isolation, culture, purification and identification of yak primary lung fibroblasts (YLFS) in vitro. YLFS was isolated and purified by mixed digestion of type I collagenase and pancrease combined with differential digestion. Cell viability after cryopreservation and resuscitation was measured. The cell morphology was identified by hematoxylin-eosin (HE) staining. Cell growth activity was detected by CCK8 solution. The expression of Vimentin and α -smooth muscle actin (α -SMA) were detected by immunofluorescence, RT-PCR and Western blot. Cell senescence was detected by β -galactosidase staining. The cells grew gradually on the second day, and the adherent range expanded in a whirlpool shape on the fourth day. YLFS could be purified by the differential digestion method repeated 2-3 times. After cryopreservation and recovery, the cell viability was maintained above 90%. The morphology of YLFS cells stained by HE was mostly tree fork, long spindle and irregular quadrilateral. The cell growth state was good, and the growth curve was “S” type. YLFS Vimentin and α -SMA were highly expressed in the gene and protein levels. The results of senescence staining of P13 generation YLFS cells were positive. This experiment successfully isolated and cultured a large number of energetic yak lung fibroblasts, and established a method for in vitro isolation and culture of adult yak lung fibroblasts, providing biological materials for further research on the

收稿日期:2024-10-20

通信作者:吉文汇(1983-),女,实验师,博士,研究方向:高原动物疫病防控。E-mail:somebody528@163.com

基金项目:国家重点研发计划(2021YFD1600200);西藏自治区科技计划项目(GZKJ-003);中央高校基本科研业务费专项基金自然科学基金项目(ZYN2023052)

high-altitude adaptation mechanism of yak lungs at the single-cell level.

Keywords: yak; primary culture; lung fibroblasts; isolation; culture; identification; enzyme digestion method

牦牛 (*Bos grunniens*) 主要生活在海拔 3 000 ~ 6 000 m 的青藏高原地区^[1], 为当地牧区提供了宝贵的生产和生活资源, 还享有“高原之舟”的美誉^[2]. 作为唯一一种在高海拔地区繁衍至今的珍稀牛种^[3], 牦牛肺脏为适应高原低氧环境, 具有肺容量大、肺泡数量多、薄壁、血管分布丰富等特点, 这些特点使其能在高海拔地区进行有效呼吸. 当肺脏执行呼吸系统功能时, 涉及肺泡和毛细血管等的参与^[4], 而肺成纤维细胞作为肺脏基质中最丰富的细胞类型^[5], 同样发挥着重要作用. 在正常情况下, 成纤维细胞在肺部组织中起着支持作用, 并具有多种生物学功能, 如增殖、收缩和迁移等^[5]; 在损伤修复过程中, 成纤维细胞从周边组织迁移到损伤部位, 合成和释放多种细胞外基质, 直接参与组织修复, 并通过释放多种细胞因子和生长因子来调节其他支气管肺组织内细胞的功能^[6-7]; 在病理条件下成纤维细胞会发生异常激活, 其主要通过分泌胶原蛋白和纤维蛋白参与组织纤维化, 影响多种肺部疾病的发生和发展过程^[8-9]. 近年来, 科学家们已成功将小鼠^[10]、绵羊^[11]、猕猴^[12]、树鼩^[13]、人^[14]、兔^[15]等的原代肺成纤维细胞分离培养出来, 当前关于成年牦牛肺成纤维细胞原代培养的研究还未见报道. 因此, 本研究利用胶原酶和胰酶混合消化并结合机械吹打的方法, 成功分离培养出了成年牦牛肺成纤维细胞, 旨在为后续研究牦牛肺部疾病发生及高原适应性分子机制研究提供生物材料.

1 材料与方 法

1.1 实验动物

样本采集自四川省阿坝州高原地区, 6 岁雄性牦牛屠宰后采集肺组织, 放入提前预冷加入 4×青链霉素和两性霉素三抗的 PBS 缓冲液中, 低温保存.

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12 培养基 (Gibco); 青链霉素-两性霉素 B 溶液 (Biosharp); 胎牛血清 (BI); 0.25% 胰酶-EDTA (Hyclon); I 型胶原酶 (Biosharp); HE 染色试剂盒 (Solarbio); ACTR1B 兔抗 (Bioss); Vimentin 兔抗

(Boster); 羊抗兔二抗 (Boster); CCK8 溶液 (Boster); 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒 (碧云天); 超净工作台; 倒置显微镜 (OLYMPUS); 免疫荧光显微镜; 二氧化碳培养箱 (Thermo); 60 mm 细胞培养皿.

1.3 方 法

1.3.1 混合酶消化法分离 YLFS

将采集到的牦牛肺组织放入预冷的含 2×三抗的 PBS 溶液中冲洗, 去除表面血污后, 浸泡在 75% 酒精中 30 s, 然后迅速转移到 2×三抗 PBS 缓冲液中, 使用无菌刀片尽量剔除组织被膜和细支气管后, 再用无菌剪刀快速剪碎至肉糜状. 提前配置 0.2% I 型胶原酶与 0.25% 胰酶 (2:1) 的混合酶, 在装有剪碎组织块的 50 mL 离心管中加入 5 倍体积的混合酶液后, 放在 37 °C 水浴锅中消化 45 min, 其间每隔 5 min 震荡 1 次. 使用 10% FBS 的 DMEM-F12 完全培养液终止消化, 反复吹打, 用 45 μ m 的细胞筛过滤混合液, 1 500 rpm 离心 5 min, 弃上清液, 用完全培养液重悬细胞, 最后接种至培养皿放入 37 °C、5% 二氧化碳恒温培养箱中培养.

1.3.2 差速消化法纯化 YLFS

显微镜下观察成纤维细胞中混合少量上皮细胞, 吸弃旧培养基, 用 2×三抗 PBS 缓冲液清洗 2 次, 用 0.25% 胰蛋白酶 37 °C 消化 2 min, 显微镜下观察成纤维细胞形态变圆而上皮细胞形态未发生改变, 加入 2 倍体积的完全培养基终止消化, 反复吹打皿底收集细胞悬液, 1 500 rpm 离心 5 min 后重悬接种到新的培养皿中继续培养观察.

1.3.3 YLFS 的冻存、复苏和活力检测

冻存前细胞活率检测: 选取处于对数生长期的第 3 代细胞, 消化离心后获得细胞沉淀. 重悬后将细胞数量稀释至 1×10^5 个/mL, 将细胞悬液与 0.4% 台盼蓝染料以 9:1 的体积比混合均匀, 室温孵育 5 min. 取 10 μ L 细胞悬液加入细胞计数板中, 利用细胞计数仪统计蓝色细胞数量后计算冻存前活率.

复苏后细胞活率检测: 冻存液比例为 DMEM/F12 : DMSO : FBS = 5:4:1, 用 1 mL 的冻存液重悬细胞沉淀

后转移至冻存管中,将冻存管放入细胞冻存盒后转移至 -80°C 冰箱12 h后立即放入液氮过夜.小心将冻存的细胞从液氮罐中取出,立即放入 37°C 水浴锅中快速摇晃至完全溶解,将细胞悬液转移至提前加入2 mL完全培养液的15 mL离心管中,离心弃上清,重悬稀释后对细胞进行染色,根据公式活细胞比率(%)=(总细胞数-蓝色细胞数)/总细胞数,计算细胞冻存、复苏后活率.

1.3.4 HE染色鉴定YLFS形态特征

调整细胞密度至 1×10^3 个/mL,制备细胞爬片.将细胞爬片放入6孔板中,PBS洗涤2次,用4%多聚甲醛常温固定15 min;将细胞爬片浸入苏木精染液中染色15 min,用自来水冲洗1 min,浸入1%盐酸乙醇溶液内分色2 s;自来水冲洗后将爬片放入伊红染液浸染5 min,再用自来水冲洗,自然晾干爬片.最后在载玻片上滴加中性胶封片,显微镜下观察并采集照片.

1.3.5 CCK8法检测YLFS增殖情况

取第3代对数生长期细胞,按每孔 2×10^3 个细胞接种到96孔板中,每孔加入100 μL 完全培养基.共设置了8个组别,每组包含6个复孔.每孔避光加入10 μL CCK8溶液与90 μL 基础培养基,放入 37°C 恒温培养箱中孵育2 h,孵育结束避光使用酶标仪测量450 nm波长处每孔OD值,取6个孔的平均值.连续测定8 d,以时间为横坐标,OD值为纵坐标绘制细胞生长曲线.

1.3.6 免疫荧光鉴定YLFS标志基因的表达

将第3代细胞以 6×10^5 个/mL接种到6孔板中,待细胞汇合生长至70%~80%后,吸弃旧培养基,PBS洗涤3次,加入4%多聚甲醛固定15 min后,再用PBS洗涤3次,每次5 min.加入0.2% TritonX-100 通透20 min,弃液后用PBS洗涤3次,每次5 min;加入5% BSA 封闭10 min后弃液;加入5% BSA 稀释的一抗(1:250), 4°C 湿盒中避光孵育过夜;PBS洗涤3次,加入5% BSA 稀释的二抗(1:200),室温孵育1 h;PBS洗涤3次后加入DAPI溶液进行染色,室温避光孵育5 min.荧光倒置显微镜下观察并拍照.

1.3.7 RT-PCR检测标志基因mRNA

表1所示,参照NCBI中牛的Vimentin和 α -SMA基因序列设计引物,引物由北京擎科生物技术股份有限公司合成.利用Trizol法提取第3代细胞总RNA,按

照去基因组DNA的反转录试剂盒(EXONGEN)说明书进行反转录,得到cDNA于 -20°C 保存备用.以cDNA为模板进行RT-PCR,反应程序设置为: 95°C 预变性30 s,1个循环; 98°C 变性10 s, 59°C 退火30 s, 72°C 延伸15 s,重复30个循环.最终产物进行琼脂糖凝胶电泳.

表1 基因引物信息

Table 1 Primer information of genes

基因名称	引物序列(5'→3')	目的片段长度/bp	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
Vimentin	F:AGCACTCTGCAGTCTTTTCAG	160	56
	R:CGTGCTGTTCTTGAATCTGG		
α -SMA	F:ACAACGTGCCATCTATGAGG	283	60
	R:AAACGCTCATTCCCGATGCTG		

1.3.8 Western blot鉴定标志基因蛋白表达

取第3代与第5代细胞,吸弃旧培养基后用预冷PBS清洗1遍,加入400 μL 细胞裂解液,冰上孵育30 min后用细胞刮刀将其收集至1.5 mL EP管中, 4°C ,14 000 rpm离心15 min.取上清液与5 \times loading buffer按4:1混合后 100°C 沸水中变性5 min, -20°C 冰箱保存.将变性后的蛋白进行SDS-PAGE分离,转至PVDF膜,5%脱脂奶粉常温封闭1 h,裁膜, 4°C 孵一抗过夜.洗去一抗后,常温孵育二抗1 h,洗掉二抗,避光滴加显影液后曝光拍照.

1.3.9 β -半乳糖苷酶染色法检测细胞衰老

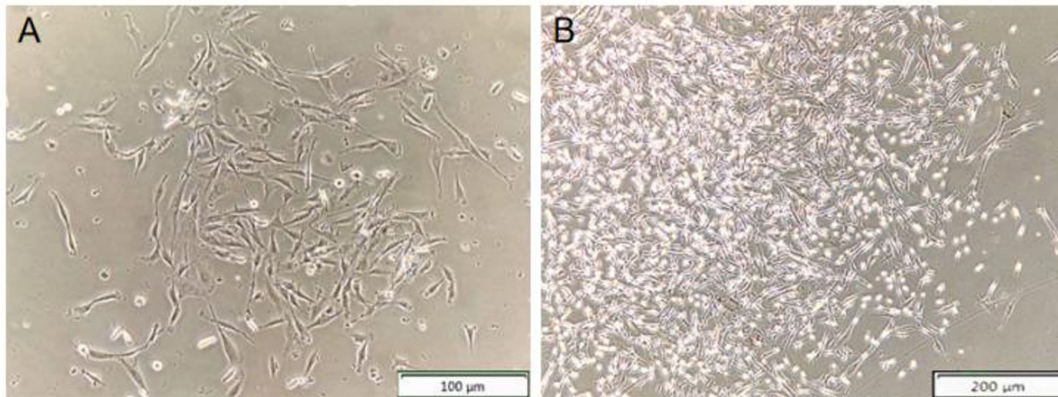
将第3代与第13代细胞,调整密度至 6×10^5 个/mL分别接种至6孔板中,待细胞密度生长至70%~80%,吸除旧培养基后用PBS洗涤2 min,加入1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液,室温固定15 min;吸除细胞固定液,用PBS洗涤细胞3次,每次3 min;每孔加入1 mL染色工作液后,在 37°C 无 CO_2 恒温培养箱中孵育过夜.光学显微镜下观察并拍照.

2 结果

2.1 混合酶消化法分离原代YLFS

混合酶消化结束后24 h倒置显微镜下观察到少量梭形细胞贴壁生长(见图1A);48 h后贴壁细胞数量增多,面积扩大,细胞呈漩涡状向四周生长(见图1B).细胞形态多样,除经典梭形及纺锤形之外,还有四边形等不规则状,符合成纤维细胞生长基本形态特

征;细胞间紧密贴合增殖能力强,细胞核多且大胞质透明,生长状态良好.



A. 培养 24 h 后的肺成纤维细胞;B. 培养 48 h 后的肺成纤维细胞

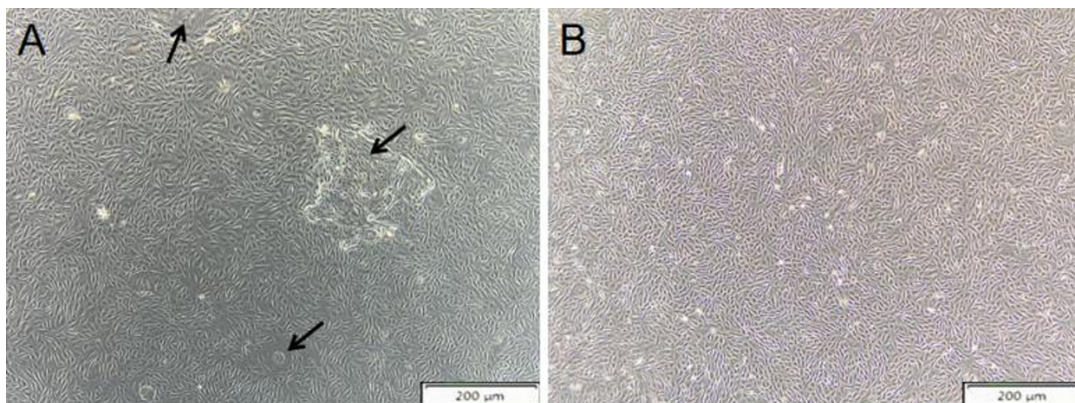
图 1 原代培养 YLFS 生长形态变化 (A. 10×10;B. 10×20)

Fig.1 Morphological changes in primary cultured YLFS(A. 10×10;B. 10×20)

2.2 差速消化法纯化 YLFS

由于初次消化所得的细胞中混杂少量上皮细胞,它们形态呈铺路状,小块聚集或单独生长,与成纤维

细胞形成明显边界(见图 2A). 因此,利用成纤维细胞对胰酶消化更敏感的原理,经过 2~3 次消化处理即可获得纯度较高成纤维细胞(见图 2B).



A. 第 1 代肺成纤维细胞与肺上皮细胞混合生长形态;B. 第 3 代纯化后肺成纤维细胞形态

图 2 差速贴壁消化法纯化 YLFS(10×20)

Fig.2 Purification of YLFS by differential adhesion digestion method(10×20)

2.3 YLFS 的冻存及复苏后细胞存活率比较

根据细胞计数仪统计冻存前及复苏后的染色结果,细胞冻存前活率为 97.8%,复苏后活率为 94.4%(见图 3). 冻存前与复苏后第 3 代肺成纤维细胞活率差异不显著.

2.4 HE 染色 YLFS 结果

倒置显微镜下观察成纤维细胞染色结果显示,细胞质呈淡粉色,细胞核着深紫色. 肺成纤维细胞形态为典型的梭形、树杈型及四边形,符合成纤维细胞基本形态特征(见图 4A,B).

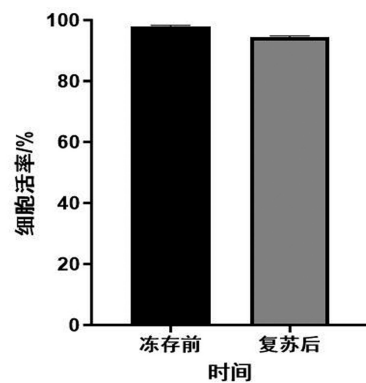


图 3 YLFS 冻存前与复苏后活率

Fig.3 Survival rates of YLFS before freezing and post resuscitation

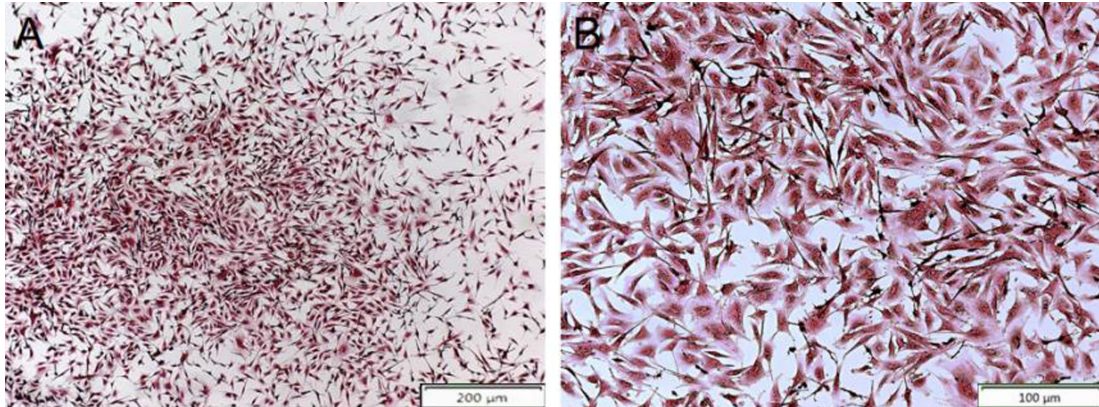


图 4 HE 染色 YLFS (A. 10×20;B. 10×10)

Fig.4 HE staining of YLFS (A. 10×20;B. 10×10)

2.5 CCK-8 检测 YLFS 活力

取第 3 代牦牛肺成纤维细胞,经过连续 8 d 的检测后绘制生长曲线.结果表明,生长曲线呈“S”型,成纤维细胞在第 1~3 d 为缓慢生长期,第 4~6 d 为对数生长期,第 7 d 细胞生长进入平缓期.说明所培养的 YLFS 可以正常分裂增殖,细胞活力良好(见图 5).

2.6 YLFS 的 Vimentin 和 α-SMA 表达及分布情况

免疫荧光结果显示,第 3 代细胞的 Vimentin 和 α-SMA 呈强阳性表达,细胞形态清晰,经 Vimentin 和 α-SMA 染色后的细胞质与 DAPI 染色的细胞核均可完全重合(如图 6A,B),表明该细胞为成纤维细胞.而阴性对照组中几乎无红色荧光(见图 6C),表明分离纯

化后的成纤维细胞纯度较高.

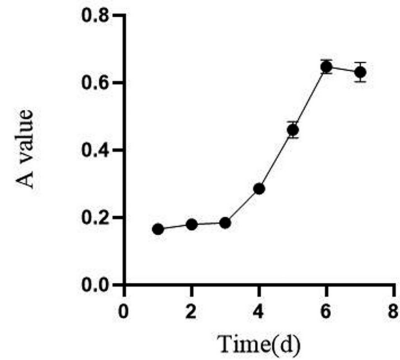
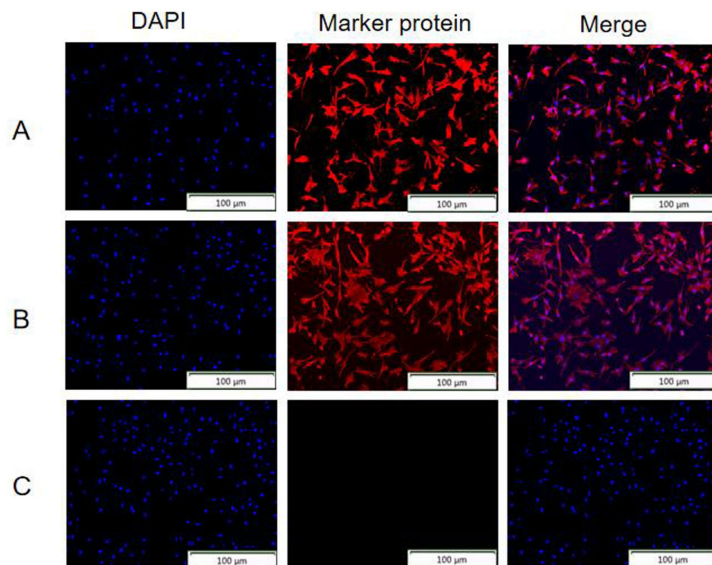


图 5 YLFS 生长曲线

Fig.5 Growth curve of YLFS



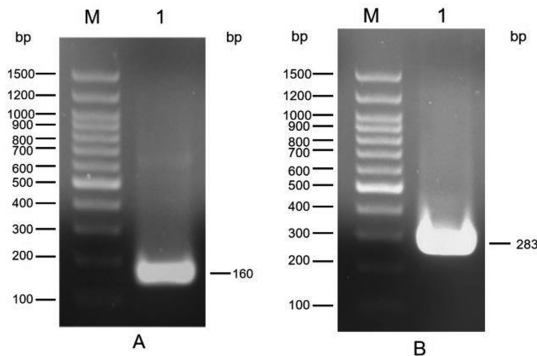
A. Vimentin 荧光分布图;B. α-SMA 荧光分布图;C.角蛋白荧光分布图

图 6 细胞免疫荧光鉴定 YLFS 标志性蛋白 (10×10)

Fig.6 Cellular immunofluorescence identification of YLFS marker proteins (10×10)

2.7 RT-PCR 检测 Vimentin 和 α -SMA 基因表达

以第 3 代牦牛肺成纤维细胞 cDNA 为模板,用 RT-PCR 扩增牦牛的 Vimentin 和 α -SMA 基因,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测.结果显示,扩增产物条带清晰可以检测出 Vimentin(见图 7A)与 α -SMA(见图 7B)的表达,证明该细胞为成纤维细胞.



A. Vimentin 电泳结果图;B. α -SMA 电泳结果图;
M:蛋白质分子量标准

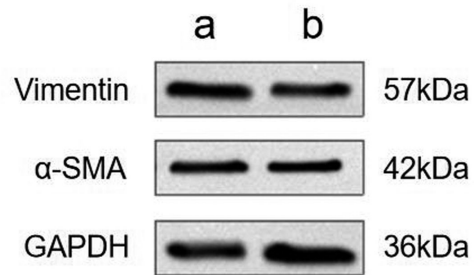
图 7 YLFS 基因 RT-PCR 结果

Fig.7 RT-PCR of YLFS genes

2.8 Western blot 检测 YLFS 的 Vimentin 和 α -SMA 蛋白表达

选取第 3 代和第 6 代的 YLFS 细胞进行 Western

blot 检测,分别以 Vimentin 和 α -SMA 为一抗,GAPDH 为内参蛋白.结果显示,第 3 代和第 6 代细胞中目标蛋白均有效表达,从而表明成功分离纯化获得牦牛肺成纤维细胞(见图 8).



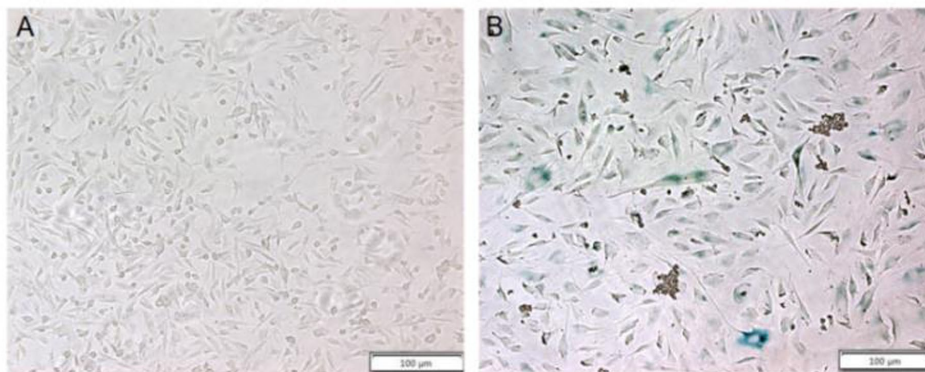
a:第 3 代 YLFS;b:第 6 代 YLFS

图 8 Western blot 检测 YLFS 中 Vimentin 和 α -SMA 蛋白

Fig.8 Western blot detection of
Vimentin and α -SMA proteins in YLFS

2.9 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老

将培养至第 3 代与第 13 代肺成纤维细胞分别进行衰老检测, β -半乳糖苷酶染色结果显示,第 3 代细胞染色呈阴性(见图 9A),第 13 代细胞染色结果呈阳性(见图 9B),细胞胞浆增大形状扁平且着深蓝色.结果表明第 13 代肺成纤维细胞已经逐渐发生细胞衰老.



A. 第 3 代 YLFS 细胞衰老染色;B. 第 13 代 YLFS 细胞衰老染色

图 9 β -半乳糖苷酶细胞衰老染色结果图(10 \times 10)

Fig.9 Staining results of aging β -galactosidase cells(10 \times 10)

3 讨论

牦牛作为高海拔低氧地区可生存的唯一牛属动物,其肺是研究低氧适应机制的代表性器官.目前国内外对成年牦牛肺成纤维细胞的分离与培养方法未见报道,仅有幼龄动物肺组织原代细胞分离培养报道^[16],此操作不仅会提高成本还不适用于培养成年

牦牛肺成纤维细胞.本实验采集健康成年牦牛的肺组织,利用 I 型胶原酶与胰酶混合消化的方法获取细胞.由于酶消化的关键是时间与浓度的控制,因此,通过参考李欣森^[17]的消化方法,使用 0.2%I 型胶原酶和 0.25%胰酶按 2:1 的比例在 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中消化 1 h,但在实际操作过程中发现消化结束后滤液中细胞数量虽多、组织块消化彻底但活细胞占比极少,推测可

能是消化时间过长导致细胞损伤,于是尝试减少混合酶消化液与组织块的体积比并缩短消化时间至45 min.最终,能稳定且高效地获得数量多且状态良好的牦牛肺成纤维细胞.

目前为止,体外培养细胞最大的困扰是污染问题,许振^[12]等在培养原代猕猴肺成纤维细胞时,采用预冷无菌的0.9%氯化钠溶液洗除血块、表面结缔组织和包膜;陈子同^[18]等用含4%双抗的PBS润洗3遍山羊软骨组织;曾莹莹^[19]等在培养小鼠原代气道和肺泡成纤维前,先将小鼠浸泡75%乙醇全身消毒5 s后再无菌摘取肺组织.对于牦牛这种大型哺乳动物,采集样本需在屠宰场中进行,在采集过程中需要做到无菌操作相对比较困难,一方面需要保证样本运输时的处理,另一方面当组织块带回实验室后如何更好地清理污染物也无统一方法.因此,在实际操作过程中,为保证组织块血污能完全清除干净,采样前用生理盐水冲洗表面血污后将组织块放入4%三抗的预冷PBS缓冲液中低温运输并快速带回,然后继续使用1 L容量4%预冷PBS缓冲液反复摇晃冲洗组织块直至组织块发白,溶液清亮后即可进行下一步操作.为防止培养过程中再次出现污染情况,采用梯度抗生素添加在培养基中,在p1代使用4%三抗的完全培养基,依据培养代数从高浓度逐渐降低至低浓度,最终将抗生素浓度稳定维持在1%.结合以上两种方法,很大程度避免YLFS原代培养过程中频繁出现的污染问题.

4 结论

本研究采用机械吹打与混合酶消化相结合的方法,成功分离并培养出大量活力良好、纯度高且能持续稳定传代培养的成年牦牛肺成纤维细胞,由此建立了一种高效稳定的成年牦牛原代肺成纤维细胞分离培养的方法.

参考文献

- [1]白玛措姆.牦牛养殖的环境适应性研究——以高寒地区为例[J].中国畜牧业,2024(15):58-59.
- [2]黄纯,阎萍,梁春年.中国牦牛种业现状与发展方向[J].中国畜禽种业,2023,19(7):121-127.
- [3]贾功雪,丁路明,徐尚荣,等.青藏高原牦牛遗传资源保护和利用:问题与展望[J].生态学报,2020,40(18):6314-6323.
- [4]MURRAY J F.The structure and function of the lung[J].The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease,2010,14(4):391-396.
- [5]杨迪,张家柱,隋鹏飞.肺成纤维细胞在肺损伤修复中的研究进展[J].中国细胞生物学学报,2024,46(5):935-945.
- [6]KLETUKHINA S,MUTALLAPOVA G,TITOVA A,et al.Role of mesenchymal stem cells and extracellular vesicles in idiopathic pulmonary fibrosis[J].International Journal of Molecular Sciences,2022,23(19):11212.
- [7]GAUCHERAND L,FALK B A,EVANKO S P,et al.Crosstalk between T lymphocytes and lung fibroblasts:Generation of a hyaluronan-enriched extracellular matrix adhesive for monocytes[J].Journal of Cellular Biochemistry,2017,118(8):2118-2130.
- [8]TSUKUI T,WOLTERS P J,SHEPPARD D.Alveolar fibroblast lineage orchestrates lung inflammation and fibrosis[J].Nature,2024,631(8021):627-634.
- [9]SONG L C,LI K,CHEN H Y,et al.Cell cross-talk in alveolar microenvironment:From lung injury to fibrosis[J].American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology,2024,71(1):30-42.
- [10]EDELMAN B L,REDEnte E F.Isolation and characterization of mouse fibroblasts[J].Methods in Molecular Biology,2018,1809:59-67.
- [11]刘腾,董丹丹,张莉,等.永生化绵羊肺成纤维细胞系的构建及鉴定[J].中国动物传染病学报,2018,26(2):54-58.
- [12]许振,蒋海峰,张磊,等.猕猴肺成纤维细胞的不同分离培养方法及鉴定比较[J].安徽医科大学学报,2022,57(7):1041-1047.
- [13]王文广,匡德宣,陆彩霞,等.树鼩肺成纤维细胞的分离、鉴定和传代培养[J].实验动物与比较医学,2019,39(2):105-110.
- [14]田玲.三株人胚肺成纤维细胞系的建立及检定[D].兰州:西北民族大学,2023.
- [15]罗涛,杨亚冬,唐靓,等.胶原酶消化结合组织块培养法分离纯化兔肺成纤维细胞[J].现代医药卫生,2017,33(17):2584-2587.
- [16]LIU B,ZHANG H,HAO M C,et al.Establishment and characterization of two fetal fibroblast cell lines from the yak[J].In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal,2012,48(10):619-662.
- [17]李欣森,张子敬,张格阳,等.牛成纤维细胞体外分离培养方法[J].中国畜禽种业,2023,19(11):85-90.
- [18]陈子同,徐小丽,徐亮,等.山羊原代软骨细胞的分离培养与鉴定研究[J].中国畜牧杂志,2024,60(4):197-201+206.
- [19]曾莹莹,胡蔚萍,左依慧,等.气道和肺泡部位成纤维细胞的原代分离和培养[J].上海医药,2021,42(3):68-72.

(责任编辑:和力新,殷锋,付强,张阳,肖丽;英文编辑:周序林,郑玉才)