

长江江豚脐静脉细胞体外培养的初步研究

王京真^{1,2} 姬伟^{1,2} 肖武汉¹ 王丁¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

A PRELIMINARY STUDY OF CELL CULTURE *IN VITRO* DERIVED FROM YANGTZE FINLESS PORPOISE UMBILICAL VEIN

WANG Jing-Zhen^{1,2}, JI Wei^{1,2}, XIAO Wu-Han¹ and WANG Ding¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072;

2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

关键词: 江豚; 体外培养; 成纤维细胞; 胎盘

Key words: Finless porpoise; Culture *in vitro*; Fibroblast cell; Placenta

中图分类号: Q813.1+3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)02-0436-06

长江江豚(*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*)属齿鲸亚目鼠海豚科,是世界上唯一的江豚(*Neophocaena phocaenoides*)淡水亚种,主要分布于我国长江中下游干流和洞庭湖、鄱阳湖及其部分支流^[1-3]。1996年,国际自然保护联盟物种生存委员会(IUCN/SSC)红皮书将长江江豚列为濒危(EN C2b)物种,1998年《中国濒危红皮书-兽类》也将其列为濒危级^[4,5]。目前,由于人类直接或间接的影响,长江江豚的数量仍在迅速下降^[6-8]。鉴于其濒危状况,农业部已经建议将其升级为国家一级保护动物。对于这种长江珍稀濒危野生动物种,我们必须采取多种拯救和保护措施,以免其陷入像白鱀豚一样的濒临灭绝的局面。

细胞是生物体结构和功能的基本单位,具备生命个体固有的遗传信息和功能特性,是研究生物有机体的生长、分化、遗传、变异、衰老、死亡的有效工具。然而,受法律和保护地位的限制以及伦理等原因,显然不能对江豚进行伤害性的活体取样用于生化实验。随着体外细胞培养技术的发展以及与分子生物学、遗传学、毒理学的相互渗透,细胞培养作为一种技术手段已经广泛应用于各个领域。20世纪60年代始见对海洋哺乳类细胞培养的研究,目前,美国标准培养物收集所(American Type Culture Collection, ATCC)已经收集和保存了9种海洋哺乳动物的

细胞系,其中包括5种鲸类:斑点海豚(*Stenella plagiodon*)、太平洋瓶鼻海豚(*Tursiops gilli*)、太平洋真海豚(*Delphinus bairdi*)、长须鲸(*Balenoptera physalus*)、太平洋领航鲸(*Globicephala scammoni*),另有北露脊鲸(*Eubalaena glacialis*)、瓶鼻海豚(*Tursiops truncatus*)等的报道^[9-12]。利用这些体外建立的鲸类细胞系已开展了有关鲸类细胞遗传学、免疫学、环境毒理学、病毒学等方面的研究^[13-16]。但长江江豚等淡水哺乳动物细胞培养及建系的工作,目前尚未见报道。

为避免对长江江豚伤害的情况下,本研究选取长江江豚分娩时产出的胎盘为取样材料,对其脐带静脉细胞(Finless porpoise umbilical vein cell, FPUVC)进行了原代和传代培养,并进行了永生化转染实验。本项工作为进一步展开长江江豚组织培养奠定了一定基础。

1 材料与方法

1.1 培养基及主要试剂

DMEM培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO)、M199培养基(Medium 199, GIBCO)、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, Hyclone)、双抗(Penicillins-Streptomycin, Nalgene)、两性霉素B(Amphotericin B, Amresco)、胰酶(Trypsin-EDTA, Hyclone)。

收稿日期: 2009-03-23; 修订日期: 2009-11-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划973项目(2007CB411600); 国家自然科学基金(30730018)资助

作者简介: 王京真(1982—), 男, 山东泰安人; 博士研究生; 主要从事鲸类保护生物学研究。E-mail: wangjingzhen-1@163.com

通讯作者: 王丁, E-mail: wangd@ihb.ac.cn

1.2 材料来源

实验所用的脐带来自中国科学院水生生物研究所白鱔豚馆一母豚产子后所产下胎盘。从幼豚产出到胎盘产出约 8h，胎盘重约 0.75 kg，直径约 18 cm，胎盘上脐带长约 15 cm。

1.3 组织取样

由潜水员将胎盘从水中捞起，放入无菌托盘，使用终浓度为 200 U/mL 双抗和 5.0 μg/mL 两性霉素 B 的 PBS (phosphate-buffered solution, without Ca²⁺ and Mg²⁺) 粗洗 3 次，带回实验室；剪取脐带静脉近胎盘处约长 7 cm 的一段，用 PBS 冲洗干净，剪除破损或血肿部分，在添加抗生素的 PBS 中漂洗约 5—10min。

1.4 原代培养

(1)组织植块法：将血管纵向剪开，用添加抗生素的 PBS 液冲洗数次，将血管移入新的培养皿，内膜面朝上，将血管剪切成约 1 mm² 的小块，并移入 25 cm² 培养瓶中，分布均匀，放入 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中，待血管块与培养瓶贴牢后，加入培养液(盖过小的血管组织块为准)，放回培养箱继续培养。培养液选取常用的 DMEM 和 M199，分别添加终浓度为 15%的 FBS 和 100 U/mL 的双抗。

(2)酶消化法：将脐带组织块剪碎，移入 12 孔板的 4 个孔内，每孔加入 0.25%的胰酶，37℃消化 1—2h，而后每孔加入 3 mL 培养基，吹打混匀，以 1：2 平均分配入标记的孔中。使用上述 DMEM 和 M199 两种培养基作为对照，在 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下进行培养。视培养液颜色变化，每隔 4—7 天更换 50%的培养液。

1.5 传代培养

细胞生长至局部形成单层后，吸取培养液，加入 0.25%

的胰酶进行消化，显微镜下观察细胞回缩变圆时，加入含血清的培养液吹打，制成细胞悬液，按 1：2 的比例接种。

1.6 细胞转染

为了得到江豚静脉永生化细胞系，采用脂质体法对细胞进行基因转染实验。根据 Lipofectamine 试剂说明书的要求进行操作。原代细胞传代时转入 6 孔板，待细胞生长至 75%—80%融合时，转染的前一天换成不添加抗生素的培养液。在 2 个 Eppendorf 管中各加入 200 μL 无抗生素、无血清的 DMEM 培养基，后分别加入含 SV40 Large T antigen (LT)的表达质粒(实验室构建)及 LipofectamineTM 2000，摇匀。室温下 5min 后，将两者混合均匀。20min 后，吸除培养板中的培养液，将 DNA 与脂质体的混合液加入培养板，轻轻摇动使混合液与细胞充分接触；约 6h 后，将培养板中的培养液吸取，加入添加抗生素和血清的 DMEM 培养液。24h 后视细胞状况以 1：2 传代。

2 结 果

2.1 原代培养

原代培养至第 14 天，可见添加 DMEM 培养基的组织贴块有细胞游离；2d 后，添加 M199 培养液的组织贴块有细胞游离；两种情况下，经酶消化处理的在培养第 17 天出现细胞贴壁。在 Nikon TS100-F 倒置相差显微镜下观察和拍照。24d 后，两中不同培养基条件下，采用植块培养法的组织块附近都呈现细胞局部单层，细胞主要为椭圆形或多边形，细胞延伸到边缘稀疏区形态依次为漩涡状、放射状和单个梭形细胞；经酶消化法处理的细胞，刚分离下来为亮球形，单个或成团存在，贴壁后从球形变为梭形、扁形，细胞透明，早期很少联接成片，培养至第 25 天左右开始有细胞相互联合，但较为稀疏(表 1、图 1)。

表1 原代及传代培养中的细胞生长状况

Tab. 1 Cell growth state of primary cell culture and subculture

培养基 Culture media	植块培养法 Explant technique	酶消化法 Enzymatic digestion method
DMEM	原代培养： 接种组织块后14d有细胞从组织块周围游离；细胞游离组织块/接种组织块=6/17；细胞形态为多边形、不规则三角形、梭形；细胞群落呈漩涡状、放射状；细胞生长相对较快，30d形成约80%细胞单层，组织块附近开始有细胞脱落，进行传代。 传代培养： 胰酶消化传代3d后见细胞贴壁，23d后形成约70%的细胞单层，细胞透明，呈梭形，分散良好，生长至80%左右，部分细胞进行转染，部分继续传代。随传代次数增加，细胞贴壁时间延长，生长缓慢，培养液细胞碎片增加，细胞内部出现空泡，共传6代。	原代培养： 将小组织颗粒消化接种后17d见2 - 3个的细胞小群贴壁，细胞单个较多；常有几个伸长的细胞突起；培养25d有见联接成细胞单层，但较为稀疏，细胞生长缓慢。40d后细胞局部形成细胞单层，并见有细胞脱落，开始传代。 传代培养： 酶消化传代后，贴壁时间长，只有少数细胞贴壁，细胞呈多边形，伸展性较差，再次消化后与植块培养的细胞共培养。
M199	原代培养： 接种组织块后16d有细胞从组织块周围游离；细胞游离组织块/接种组织块=4/15；细胞形态为多边形、椭圆形、梭形；细胞群落呈铺路石状、漩涡状、放射状；30d约65%细胞单层，细胞达70%左右传代。 传代培养： 胰酶消化传代3d后见细胞贴壁，22d细胞达到约60%细胞单层时，开始有细胞脱落，培养液细胞碎片增加，细胞内部出现空泡；传代后细胞贴壁时间增加，生长速度缓慢，共传4代。	原代培养： 将小组织颗粒消化接种后17d见细胞贴壁，单个细胞较多；细胞呈圆形，多边形；培养25d局部形成细胞单层，稀疏，生长缓慢。40d后进行酶消化传代。 传代培养： 传代后细胞贴壁较慢，只有少数贴壁，难以形成细胞群落。消化后与植块培养法传代的细胞共培养。

2.2 细胞的传代及生长状况

细胞在 DMEM、M199 两种培养液中生长状况不同(表 1), 表现在出现游离细胞的组织块数量、细胞的形态、细胞单层的联合度、传代后细胞贴壁时间以及细胞传代次数的差异。在两种不同培养基培养下的原代细胞经酶消化传代后, 60h 左右即可见有细胞贴壁, 2 周后 50% 细胞群形成单层, 细胞较为伸展(图 2A)。细胞生长至 75%—80% 饱和度时, 部分细胞进行转染, 部分继续传代。但随细胞传代次数增加, 贴壁细胞数量减少, 贴壁时间增加, 细胞单层饱和度降低, 细胞脱落凋亡数量增加, 传至 4 代, 出现较多细胞碎片, 多数尚未脱落的细胞形状呈不规则状(图 2C)。

2.3 细胞转染

转染 24h 后部分细胞皱缩、脱落, 另有部分细胞形态亦发生改变, 细胞体积增大, 细胞内部出现空泡, 细胞周围出现颗粒物(图 3C)。酶消化传代后细胞伸展性较差, 透明度较低(图 3D)。7d 后更换 50% 培养液, 18d 后, 大部分细胞脱落死亡。

3 讨论

鲸类处在水生食物链的顶端, 通过食物链、体表渗

透等方式可在体内可积累大量的持久性污染物^[17—21], 已经有很多致死、致病的报道^[10,12,19,20]。Dong, *et al.*^[21]根据收集的死亡江豚的样本发现, 长江江豚的体内积累的汞的含量要高于海域鲸类体内汞的含量。由此可知, 长江江豚亦受到严重的环境威胁, 但这方面的研究相对较少。建立江豚的细胞系, 并作为一种新的研究工具(a non-lethal new investigation tool or “dolphins in test tubes”)^[20]来补充动物活体生化研究, 进而探索环境因子(Environmental stressor)的作用机制, 这将对长江江豚的保护具有重要的意义, 也将有利于长江江豚细胞遗传学、组织免疫学、生态毒理学、病毒学的研究。同时, 有助于发挥长江江豚这种“标志物种”对长江水环境的预警作用^[22]。

本研究对长江江豚胎盘脐静脉细胞培养进行了初步的研究, 参照文献[23, 24]提到的方法对组织块活性、细胞状态进行了评估, 对组织贴块与酶消化法的原代培养方法进行了比较, 结果显示组织贴块法在最早游离新生细胞和原代细胞生长方面占优势, 可能是酶对细胞或小的组织块有一定的损伤造成; 另外, 推测长江江豚细胞的群体依赖性(Population dependence)较强, 除细胞间相互作用促进细胞生长外^[25], 同时活的组织块可能改善了细胞培养液环境, 促进了细胞的生长^[26]。在组织贴块法中

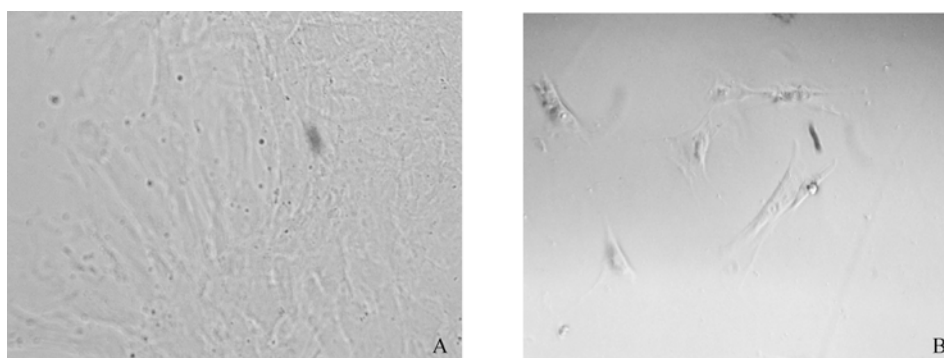


图 1 组织植块法和酶消化法培养的原代细胞

Fig. 1 Primary FPUVC cells

A. Tissue explant method ($\times 10$ objective); B. Enzyme digestion method ($\times 10$ objective)

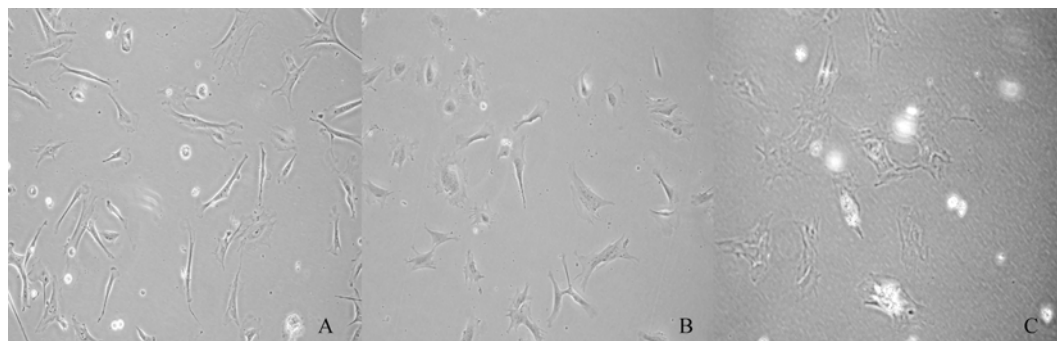


图 2 江豚脐带成纤维细胞的传代培养

Fig. 2 Subcultured cells of FPUVC

A. Secondary generation cells ($\times 10$ objective); B. Third-Generation cells ($\times 10$ objective); C. Fourth-generation cells ($\times 10$ objective)

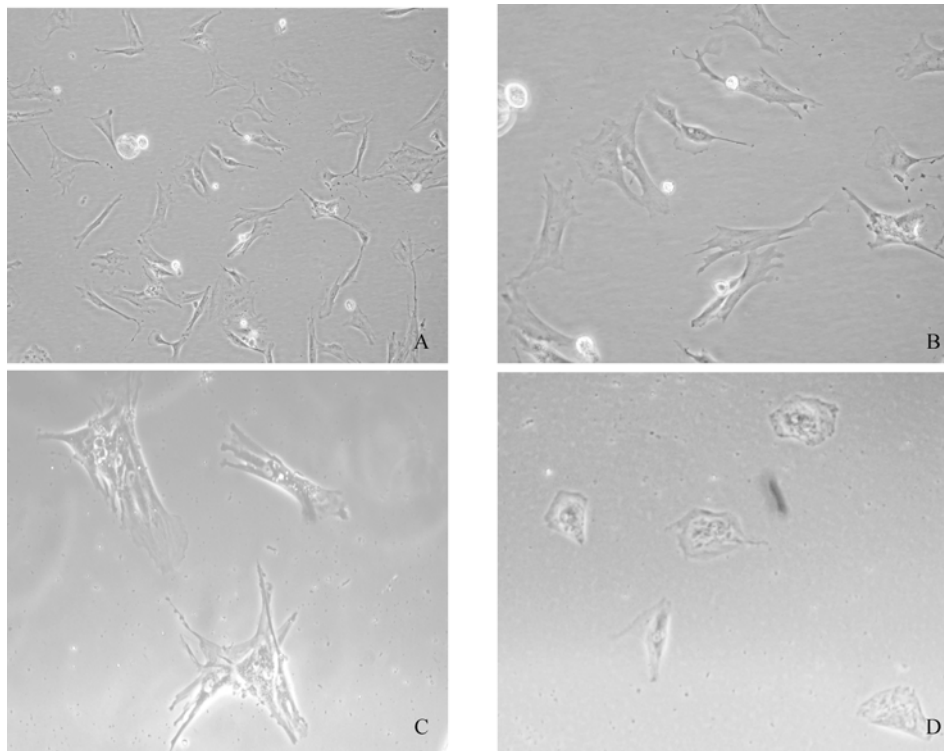


图 3 转染前后细胞形态及转染传代后细胞的形态

Fig. 3 Cell morphological changes after transfection

A. Cells before transfection ($\times 10$ objective); B. Cells before transfection ($\times 20$ objective); C. Cells after transfection ($\times 20$ objective); D. Subculture of transfected cells ($\times 20$ objective)

可以看到有两种细胞,一种内皮细胞,数量少,靠近组织块,呈多角形,“铺路石”状;另一种是成纤维细胞,呈梭形,放射状。随消化传代,内皮细胞减少,而成纤维细胞较多,主要是两种细胞耐消化力差异所致^[27]。在DMEM与M199的比较中,可见DMEM相对适合FPUVC的细胞生长,表现在存活组织块较多,组织块游离新生细胞的时间较短,细胞老化脱落的时间较长等方面。

张义兵等^[28]对白鱧豚(*Lipotes vexillifer*)的肾脏、肝脏、皮肤等组织的体外培养进行了初步研究,认为白鱧豚细胞难以生长,另有文献记载鲸类细胞难以培养^[29,30];本实验表明FPUVC原代细胞游离或贴壁的时间较长,最少也需14d;细胞传代后,贴壁难,生长速度慢。从原代细胞游离到第一次传代大约要30d的时间,接近白鱧豚33d^[28]。另有记载^[31,32],脐带细胞具有难以培养的特点,若不加任何生长物质,则只能传2—3代,添加L-谷氨酰胺可将人的脐带静脉细胞传至6—7代^[33],利用脂质体介导的方法,将SV40大T抗原导入原代人脐静脉内皮细胞,建立了可传代培养25代的细胞系^[34]。我们同样对FPUVC进行了脂质体介导的基因转染,但转染后细胞部分皱缩脱落,传代后细胞状态较差(图3C、D),并逐渐老化死亡。未转染的细胞在两代后还能传代,第3代尚能达到60%左右的细胞单层,培养中尝试加入2 mmol/L终

浓度的L-谷氨酰胺,细胞的状态稍有转好,表现为细胞伸展,透明度增加,但最终到第6代时细胞也大部分老化死亡。是不是长江江豚细胞具有难以体外培养的特性,还需要不同组织、不同培养条件的实验摸索。目前,哺乳动物细胞永生化的最常用手段是将SV40大T抗原基因或端粒酶逆转录酶导入到原代培养细胞,使原代细胞在体外得到增值并无限限制传代^[35—37]。但我们对FPUVC转染后,细胞的增殖能力并未增强,同时部分细胞皱缩脱落;传代后,细胞的伸展性变差,逐渐衰老死亡。对于这种状况文献^[38]有过报道,LT对正常的皮肤成纤维细胞的增殖能力有限,在转染后期甚至促进细胞的死亡,并推断是LT的功能发生了改变,诱导细胞的增殖抑制,甚至死亡,建议结合其他的转染方式。在正常的培养状况下,SV40T antigen能够引起22%—27% Z172和HaCaT细胞的凋亡,推测是由于c-jun蛋白的过量表达导致了T抗原诱导的细胞凋亡^[39]。FPUVC出现这种状况,是不是由于这些原因,我们还不能给出判断。此外,另一个原因可能是:由于细胞转染效率与细胞类型有关,我们采用的脂质体介导转染方法对FPUVC的转染效率太低,因此,很有必要进一步探索病毒介导的转染方法或结合其他多基因共转染,如端粒酶基因等。

Garrick, et al.^[40]利用体外培养的瓶鼻海豚的肾脏和

肺的内皮细胞开展了鲸类脉管系统(Vasculature)的毒理学研究,同时提出不同的脉管(皮肤、组织中的微血管,毛细血管、动脉、静脉)中 CYP1A1 (Cytochrome P4501A)的表达是不同的。在野外很难得到鲸类胎盘的情况下,利用室内圈养的良好条件,我们取长江江豚胎盘脐静脉进行组织培养的研究,是该领域研究一个有益的补充,对今后类似研究有一定指导作用。本实验虽未能成功建立长江江豚稳定的细胞系,却为下一步进行长江江豚体细胞的体外培养提供了一定的参考。

致谢:

在采样过程中得到水生生物研究所白鬃豚馆老师和同学的帮助和指导,在此表示诚挚的感谢!特别感谢张奇亚老师在实验和论文撰写过程中给予的宝贵的帮助,同时感谢肖武汉老师、张奇亚老师实验室各位老师和同学提供方便的实验条件。

参考文献:

- [1] Zhang X F, Liu R J, Zhao Q Z, *et al.* The population of finless porpoise in the middle and lower reaches of Yangtze River [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 1993, **13**(4): 260—270 [张先锋, 刘仁俊, 赵庆中, 等. 长江中下游江豚种群现状评价. 兽类学报, 1993, **13**(4): 260—270]
- [2] Wang P L. On the taxonomy of the finless porpoise in China [J]. *Fisheries Science*, 1992, **11**(6): 10—14 [王丕烈. 中国江豚的分类. 水产科学, 1992, **11**(6): 10—14]
- [3] Gao A L, Zhou K Y. Geographical variation of external measurements and three subspecies of *Neophocaena phocaenoides* in Chinese waters [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 1995, **15**(2): 81—92 [高安利, 周开亚. 中国水域江豚外形的地理变异和江豚的三亚种. 兽类学报, 1995, **15**(2): 81—92]
- [4] Reeves R R, Collins T, Jefferson T A, *et al.* 2008. *Neophocaena phocaenoides*. In: IUCN 2008. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 14 March 2009
- [5] Wang S. China Red Data Book of Endangered Animals [M]. Beijing: Science Press. 1998 [汪松. 中国濒危红皮书兽类. 北京: 科技出版社. 1998]
- [6] Wang D, Liu R J, Zhang X F, *et al.* Status and conservation of the Yangtze finless porpoise. Reeves R R, Smith B D, Kasuya T. Biology and Conservation of Freshwater Cetaceans in Asia [C]. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission, 2000, 81—85
- [7] Hao Y J, Wang D, Zhang X F. Review on breeding biology of Yangtze finless porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiatica*) [J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2006, **26**(2): 191—200 [郝玉江, 王丁, 张先锋. 长江江豚繁殖生物学概述. 兽类学报, 2006, **26**(2): 191—200]
- [8] Zhao X J, Barlow J, Taylor B L, *et al.* Abundance and conservation status of the Yangtze finless porpoise in the Yangtze River, China [J]. *Biological Conservation*, 2008, **141**(12): 3006—3018
- [9] Sweat J M, Dunigan D D, Wright S D. Characterization of kidney epithelial cells from the Florida manatee, *Trichechus manatus latirostris* [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal*, 2001, **37**(6): 386—394
- [10] Carvan III M J, Santostefano M, Safe S, *et al.* Characterization of a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) kidney epithelial cell line [J]. *Marine Mammal Science*, 1994, **10**(1): 52—69
- [11] Pine M, Schroeder M, Greer K, *et al.* Generation and partial characterization of a transformed cetacean cell line [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, **67**(2): 195—202
- [12] Godard C A J, Wise S S, Kelly R S, *et al.* Benzo[a]pyrene cytotoxicity in right whale (*Eubalaena glacialis*) skin, testis and lung cell lines [J]. *Marine Environmental Research*, 2006, **62**(S1): S20—S24
- [13] Kadoi K, Mochizuki A, Ikeda T, *et al.* Susceptibility of a line of dolphin kidney cell culture to several herpesviruses [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1992, **32**(4): 227—232
- [14] Hu W Y, Jones P D, Upham B L, *et al.* Inhibition of gap junctional intercellular communication by perfluorinated compounds in rat liver and dolphin kidney epithelial cell lines in vitro and Sprague-Dawley rats *in vivo* [J]. *Toxicological Sciences*, 2002, **68**(2): 429—436
- [15] Nielsen O, Kelly R K, Lillie W R, *et al.* Some properties of a finite cell line from beluga whale (*Delphinapterus leucas*) [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1989, **46**(9): 1472—1477
- [16] Wang A, Pfeiffer C J. Cytopathology induced by mercuric chloride and methylmercury in cultured renal cells of the Atlantic spotted dolphin (*Stenella plagiodon*) [J]. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 2001, **33**(1—2): 7—16
- [17] Wang A, Barber D, Pfeiffer C J. Protective effects of selenium against mercury toxicity in cultured Atlantic spotted dolphin (*Stenella plagiodon*) renal cells [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, **41**(4): 403—409
- [18] Wang H S. The effects of mercuric chloride on cultured Atlantic spotted dolphin (*Stenella plagiodon*) renal cells and the role of selenium in protection [D]. Thesis for Master of Science in Veterinary Medicine. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia. 2001
- [19] Jin Y, Kindy M S, Ellis B C, *et al.* Establishment of epidermal cell lines derived from the skin of the Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) [J]. *The Anatomical record part A*, 2005, **287** (2A): 1246—1255
- [20] Fossi M C, Marsili L, Casini S, *et al.* Development of new-tools to investigate toxicological hazard due to endocrine disruptor organochlorines and emerging contaminants in Mediterranean cetaceans [J]. *Marine Environment Research*, 2006, **62**(S1): S200—S204
- [21] Dong W W, Xu Y, Wang D, *et al.* Mercury concentrations in Yangtze finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides asiatica*) from Eastern Dongting Lake, China [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2006, **15**(5): 441—447

- [22] Wang D, Zhang X F, Wei Z, *et al.* Population status and progress of conservation and research of Baiji (*Lipotes vexillifer*) and the Yangtze finless Porpoise (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) [A]. In: Biodiversity conservation and regional sustainable development in China-Proceedings of the Fourth National Symposium on the Conservation and Sustainable Use of Biodiversity in China [C]. Beijing, China. 2002, 5: 3 [王丁, 张先锋, 魏卓, 等. 白鱀豚及长江江豚种群现状和保护研究进展. 生物多样性保护与区域可持续发展-第四届全国生物多样性保护与持续利用研讨会论文集. 北京, 中国. 2002, 5: 3]
- [23] Li Y. Fibroblast cell culture and heterogeneous embryo reconstruction in giant panda [D]. Thesis for Doctor of Science. Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling. 2001 [李煜. 大熊猫成纤维细胞体外培养与异质克隆胚的构建. 博士学位论文, 西北农林科技大学, 杨凌. 2001]
- [24] Caamaño N J, Rodriguez A, Muñoz M, *et al.* Cryopreservation of Brown bear skin biopsies [J]. *Cell Preservation Technology*, 2008, **6**(1): 83—86
- [25] Eagle H, Washington C L, Levy M, *et al.* The population-dependent requirement by cultured mammalian cells for metabolites which they can synthesize [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1966, **241**(21): 4994—4999
- [26] Wang Y, Pu Y Y, Fang L, *et al.* Modified tissue culture of human lung fibroblast and it's morphological observation [J]. *Journal of Jiangsu university (Medicine edition)*, 2008, **18**(2): 166—167 [王艳, 浦颖艳, 方琳, 等. 改良组织块培养人肺成纤维细胞及其形态学观察. 江苏大学学报(医学版), 2008, **18**(2): 166—167]
- [27] Hentzer B, Kobayasi T. Separation of human epidermal cells from fibroblasts in primary skin culture [J]. *Archives of Dermatological Research*, 1975, **252**(1): 39—46
- [28] Zhang Y B, Yu X M, Chen M R, *et al.* A preliminary study on the tissue culture of *Lipotes Vexillifer* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(2): 93—95 [张义兵, 俞小牧, 陈敏容, 等. 水生生物学报, 2000, **24**(2): 93—95]
- [29] Andrews J C, Dill F J, Masui S, *et al.* The chromosome complement of the narwhal (*Monodon monoceros*) [J]. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1973, **15**(2): 349—353
- [30] Smith A W, Skilling D E, Benirschke K, *et al.* Serology and virology of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*) [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 1987, **23**(1): 92—94
- [31] Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1973, **52**(11): 2745—2756
- [32] Zhang B G, Chen T Z, Wang T J, *et al.* The culture of endothelial cells derived from human umbilical veins and rat aorta [J]. *Chinese Journal of Cardiovascular Medicine*, 1985, **19**(2): 81—85 [张宝庚, 陈铁镇, 王铁吉, 等. 人脐带静脉及大鼠主动脉内皮细胞的培养. 中华心血管病杂志, 1985, **19**(2): 81—85]
- [33] Lü X H, Wang R S. Culture and identify the endothelial cells of human umbilical vein [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2001, **30**(3): 188—190 [吕晓华, 王瑞淑. 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定. 卫生研究, 2001, **30**(3): 188—190]
- [34] Yuan H F, Guo Z K, Liu X D, *et al.* Establishment of a human umbilical vein endothelial cell line supporting hematopoiesis *in vitro* [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2001, **9**(1): 42—47 [袁红丰, 郭子宽, 刘晓丹, 等. 一株能支持造血的人脐静脉内皮细胞系的建立. 中国实验血液学杂志, 2001, **9**(1): 42—47]
- [35] Park J K, Kim B H, Han Y S, *et al.* The effect of telomerase expression on the escape from M2 crisis in virus-transformed human retinal pigment epithelial cells [J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2002, **34**(2): 107—113
- [36] Counter C M, Meyerson M, Eaton E N, *et al.* Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase [J]. *Oncogene*, 1998, **16**(9): 1217—1222
- [37] Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [J]. *Science*, 1998, **279**(5349): 349—352
- [38] Wang X W, Jin Y, Liu Y, *et al.* Effects of SV40 large T gene transfection on biological behaviors of human skin fibroblasts [J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2003, **24**(6): 506—509 [王新文, 金岩, 刘源, 等. SV40 大 T 抗原对人皮肤成纤维细胞生物学行为的影响. 第四军医大学学报, 2003, **24**(6): 506—509]
- [39] Chen S L, Tsao Y P, Chen Y L, *et al.* The induction of apoptosis by SV40 T antigen correlates with c-jun overexpression [J]. *Virology*, 1998, **244**(2): 521—529
- [40] Garick R A, Woodin B R, Wilson J Y, *et al.* Cytochrome P4501A is induced in endothelial cell lines from the kidney and lung of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, **76**(3-4): 295—305