

参环毛蚓肠上皮细胞体外培养及其生物学特性

陈立红 李 薇* 卢瑞珊 侯雪芹 林小桦 龚 玲

(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

摘要 该研究采用混合酶消化法获得参环毛蚓(*Pheretima aspergillum*)肠上皮细胞(intestine epithelial cell, IEC), 并进行体外培养, 成功传代培养至第8代, 命名为IEC-P.A.。通过光学显微镜和透射电镜技术对IEC-P.A.细胞形态、超微结构进行了鉴定, 采用MTT法绘制了细胞生长曲线, 应用流式细胞术检测了DNA含量并分析其细胞周期和增殖活性。体外培养的参环毛蚓肠上皮细胞汇合后呈典型的“铺路石样”形态, 细胞直径为 $8\pm 2\ \mu\text{m}$, 表面具有大量的微绒毛, 胞质内含丰富的线粒体及粗面内质网。细胞周期检测结果显示, G_0/G_1 期细胞约占总细胞数的93%。染色体核型分析结果表明, 参环毛蚓肠上皮细胞为二倍体, $2n=22$, 核型为 $n(\♂)=x=6m+3sm+2st$ 。该研究成功获得了离体培养的参环毛蚓肠上皮细胞及其生物学特性的相关资料。

关键词 参环毛蚓; 肠上皮细胞; 生物学特性; 细胞培养

Culture and Characterization of Intestine Epithelial Cells from *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) *In Vitro*

Chen Lihong, Li Wei*, Lu Ruishan, Hou Xueqin, Lin Xiaohua, Gong Ling

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

Abstract The intestine epithelial cell (IEC), designated IEC-P.A., was digested by complex enzyme from *Pheretima aspergillum* (E. Perrier), which has been continuously subcultured 8 times *in vitro*. IEC-P.A. was identified by morphological and ultrastructure observation under inverted microscope and transmission electron microscope. The growth curve of IEC-P.A. was determined by MTT assay. Cell cycle and cell proliferation were observed by flow cytometry. IEC-P.A., cultured *in vitro*, was about $8\pm 2\ \mu\text{m}$ in diameter, and appeared some distinct typical morphological characteristics of epithelial cells, such as cobblestone-like appearance, numerous microvilli, rough endoplasmic reticulum and mitochondria. Flow cytometric test result showed that more than 93% IEC-P.A. was in G_0/G_1 phase. Chromosome typing of IEC-P.A. revealed that the diploid chromosome number was $2n=22$, and the chromosomal karyotype was $n(\♂)=x=6m+3sm+2st$. IEC-P.A. was successfully cultured *in vitro* and its basic information on biological characteristics was investigated in this study.

Keywords *Pheretima aspergillum*; intestine epithelial cell; cell culture; biological characteristics

参环毛蚓*Pheretima aspergillum*(E. Perrier)隶属于环节动物门寡毛纲钅蚯蚓科环毛蚓属, 是《中国药典》收载中药地龙的四种原动物之一, 习称“广地

龙”, 是著名的道地药材, 具有清热定惊、通络、平喘、利尿的功效。现代研究也证实, 蚯蚓富含蛋白质、维生素和多种生物活性成分, 是创新药物、保健食

收稿日期: 2014-11-12 接受日期: 2015-01-16

国家自然科学基金(批准号: 81374035)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-39358065, E-mail: liwei-li@163.com

Received: November 12, 2014 Accepted: January 16, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81374035)

*Corresponding author. Tel: +86-20-39358065, E-mail: liwei-li@163.com

网络出版时间: 2015-03-26 15:42 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150326.1542.002.html>

品、化妆品理想的天然原材料^[1]。由此可见,参环毛蚓是一种开发潜力巨大的动物资源。然而,参环毛蚓养殖业尚处在起步阶段,关于参环毛蚓种质资源、病害防治等问题都有待于深入研究。离体组织建立细胞系是动物养殖相关的营养学、病毒学以及资源保护等方面研究的必要前提^[2],所以亟需建立参环毛蚓的细胞系,以便今后进行种群繁育、疾病防治、遗传背景分析等研究。

肠上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC)是肠道主要的功能性细胞,具有消化、吸收、分泌和免疫等重要的生理功能。体外分离培养IEC为研究肠道生物学功能、营养物质吸收机制及其调控提供了简单、快速和准确的手段,并为研究营养素及其他外界因素对肠上皮的作用提供了理想的体外模型^[3]。目前,国内外学者已经进行了人^[4]、鼠^[5]、山羊^[6]、兔^[7]、鸡^[8]等种属肠上皮细胞的分离培养,并成功建立了一些肠上皮细胞系。但迄今为止,关于环节动物门细胞培养的研究资料十分稀少,国内外尚无成功建立蚯蚓种属肠上皮细胞系的报道。本团队曾对参环毛蚓原代细胞的灭菌方法进行筛选^[9],并优化了参环毛蚓体外培养细胞的组织类别^[10]及所用培养基、血清浓度、接种密度^[11]等培养条件。基于以上实验基础,本文针对参环毛蚓的肠上皮细胞进行离体培养,成功建系并命名为IEC-P.A.,同时选取细胞形态、超微结构、生长曲线、细胞周期和染色体核型等细胞生物学特性进行研究,为今后利用分子生物学等现代科学技术进行参环毛蚓科学饲养、疾病防治、遗传育种等基础研究提供了必要的实验材料,同时也丰富了环节动物门的细胞资源及相关生物学特性资料。

1 材料与方法

1.1 动物

参环毛蚓活体采自广州市南沙区大岗镇,经广州中医药大学中药鉴定教研室李薇教授鉴定为钜蚓科参环毛蚓*Pheretima aspergillum*(E. Perrier)。选用湿重为8~10 g、生殖环带明显的健康个体。

1.2 试剂

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)购自Peprotech公司; Triton X-100、胰岛素(insulin)、嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、I型胶原酶(collagenase type I)均购自Sigma公司;染色体试剂盒购自南京

建成科技有限公司; DMEM/F12培养基、施耐德的果蝇培养基(Schneider's *Drosophila* medium)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、抗生素、碘化丙啶(propidium iodide)、RNA酶(RNase)、秋水仙素等试剂及药品均购自Gibco公司。

1.3 前期处理

将野外采集的参环毛蚓经蒸馏水清洗后,置于烧杯中,杯底垫有1片经蒸馏水润湿的滤纸,用纱布封住杯口,防止其逃离。在28 °C下,避光清肠48 h。每天换滤纸1次。

1.4 原代培养

取前期处理过的参环毛蚓,75%乙醇进行体表消毒,眼科剪解剖取肠道中段,用LBSS缓冲液^[12]反复冲洗至液体澄清,移至超净台。将肠组织剪碎至约1 mm³的组织块,加入抗生素组合液^[9],洗涤3~4次,弃去洗液,加入适量的混合酶液(25 μg/mL嗜热菌蛋白酶+0.2 mg/mL I型胶原酶),于37 °C消化30 min,期间每5 min振荡1次,加足量含10% FBS的培养基终止消化,200目筛网过滤,离心收集细胞,用完全培养基重悬,调整细胞密度为1×10⁵/mL接种于培养板中,于28 °C、含体积分数5% CO₂的培养箱中进行原代培养。48 h内禁止移动培养板。48 h后,逐日观察细胞状态,每3 d更换1次细胞培养液。

完全培养基含有1% EGF(20 ng/mL)、1%胰岛素(2 μg/mL)、2%抗生素组合(200 U/mL青霉素+400 μg/mL链霉素+400 μg/mL庆大霉素+5.0 μg/mL两性霉素B)、10% FBS和86%基础培养基(Schneider's *Drosophila* medium:DMEM/F12培养基=1:1)。

1.5 分离纯化与传代培养

待原代细胞生长至85%~90%汇合时,弃去培养基,以0.05%胰蛋白酶-EDTA为消化液,采用相差消化法和相差贴壁法分离纯化参环毛蚓肠上皮细胞,按1:2或1:3的比例进行传代培养。

1.6 细胞鉴定

用置倒相差显微镜对原代及传代细胞的生长状况及形态变化进行定时观察,拍照记录。依据细胞形态对参环毛蚓肠上皮细胞进行初步鉴定。

收集处于对数生长期的第3代肠上皮细胞,加入适量2.5%戊二醛(4 °C预冷)固定,然后依次进行脱水、渗透、包埋、聚合、修块、超薄切片、切片染色等步骤,制备细胞的超薄切片,最后在透射电镜下观察细胞的超微结构并拍照。

1.7 细胞生长曲线

采用MTT法绘制细胞生长曲线。取第7代近融合的肠上皮细胞, 消化并调整细胞密度, 得到 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 接种于96孔板中, 每孔接种100 μL , 接种15板, 每3 d更换1次细胞培养液。每天于相同时间取出1板细胞, 每孔加入MTT溶液(5 mg/mL) 20 μL , 培养4 h后, 吸出孔内上清, 每孔加入二甲基亚砜150 μL , 震荡10 min后于酶联免疫检测仪以490 nm波长测吸收值。共测定15 d, 以时间作为横坐标, 光吸收值(D)作为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.8 流式细胞术(flow cytometry, FCM)分析细胞周期

常规方法收集第7代近融合的肠上皮细胞, PBS洗涤2次, 在离心管中留约0.5 mL的PBS, 向细胞悬液中缓慢加入75%冰乙醇, -20°C 固定过夜。检测前, 1 000 r/min离心3 min以去除乙醇, PBS清洗1次, 加入适量碘化丙啶染液(0.1% TritonX-100, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase), 室温避光染色30 min, 上机检测, 计数10 000个细胞, 用Muticycle AV软件进行DNA细胞周期拟合分析。增殖指数(proliferative index, PI)指增殖细胞占总周期细胞的比例, S期细胞指数(S-phase fraction, SPF)指细胞周期中处于S期细胞所占的比例。采用PI和SPF分析细胞的增殖活性, $\text{PI}(\%) = (\text{S} + \text{G}_2/\text{M}) / (\text{S} + \text{G}_2/\text{M} + \text{G}_0/\text{G}_1) \times 100\%$, $\text{SPF}(\%) = \text{S} / (\text{G}_0/\text{G}_1 + \text{S} + \text{G}_2/\text{M}) \times 100\%$ 。

1.9 染色体核型分析

参考已报道的方法^[3], 稍作修改。传代细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种至96孔板。48 h后换液, 给予浓

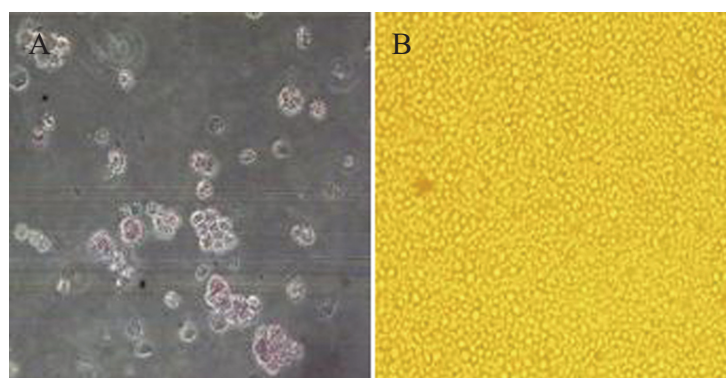
度为2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 秋水仙素处理3 h; 消化收集细胞, 37°C 低渗(0.075 mol/L KCl)处理20 min; 用新鲜配制(4°C 预冷)的卡诺固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)预固定20 min, 离心去除上清, 再视细胞量加入新鲜固定液0.5~1 mL, 以移液枪重悬沉淀; 取出 -20°C 预冷的玻片, 30 cm高度滴片; 空气干燥, 吉姆萨工作液染色10 min, 脱色, 在显微镜下选择分散良好、形态清晰的染色体中期分裂相进行拍照, 用Photoshop软件进行染色体核型分析。

2 结果

2.1 IEC-P.A.的细胞形态与超微结构

用嗜热菌蛋白酶和I型胶原酶联合消化参环毛蚓肠组织, 获得的大量隐窝单位和散在细胞。隐窝单位培养48 h即能贴壁, 72 h开始辐射出零星细胞; 而散在的肠上皮细胞贴壁所需时间较长, 接种一周才可形成少量的细胞集落(图1A), 15 d开始贴壁, 但附着不稳定, 稍振动即浮起。约28~30 d细胞生长至85%~90%汇合, 可进行传代培养。原代培养时有较多的细胞碎片, 且上皮细胞与成纤维细胞夹杂生长, 传至第3代以后, 细胞碎片明显减少, 类圆形上皮细胞数量增多, 形态较一致。传代后细胞生长稳定, 培养13~15 d可见肠上皮细胞汇合成细胞单层, 呈典型的“铺路石样”镶嵌排列, 边界清晰, 互不重叠(图1B)。

透射电镜下观察培养的肠上皮细胞, 可见细胞结构完整, 直径为 $8 \pm 2 \mu\text{m}$, 具有典型的肠上皮隐窝细胞特征。微绒毛从细胞表面伸出, 排列整齐(图2A), 近绒毛端胞质中分布丰富的线粒体, 其嵴清晰

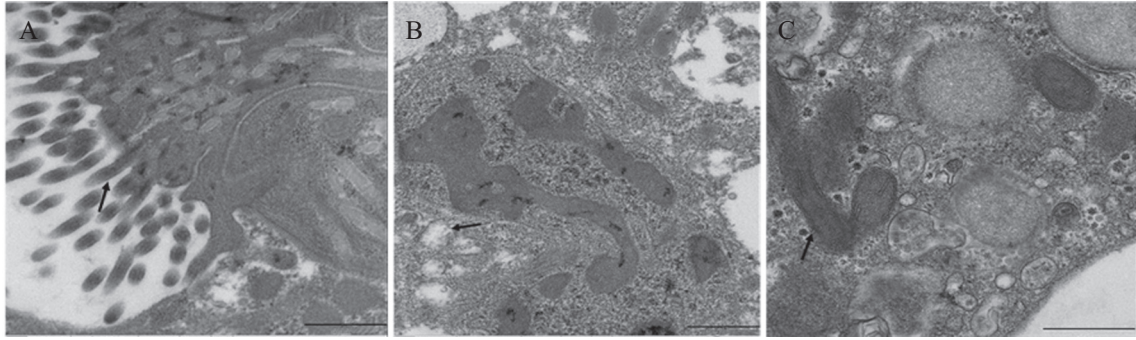


A: 原代培养7 d的IEC-P.A., 由散在细胞形成的细胞集落(400 \times); B: 传代培养的第5代肠上皮细胞(100 \times)。

A: primary culture of IEC-P.A. on the 7th day, colony formed by scattered cells (400 \times); B: subculture of IEC-P.A. at the 5th passage (100 \times).

图1 体外培养IEC-P.A.的细胞形态

Fig.1 Morphological characterization of IEC-P.A. cultured *in vitro*



A: 微绒毛(Mic)(箭头示); B: 线粒体(Mit)(箭头示); C: 粗面内质网(RER)(箭头示)。标尺=500 nm。

A: microvilli (Mic) (arrow showed); B: mitochondrion (Mit) (arrow showed); C: the rough endoplasmic reticulum (RER) (arrow showed). Scale bars=500 nm.

图2 透射电镜观察IEC-P.A.的超微结构

Fig.2 Ultrastructure of IEC-P.A. under transmission electron microscope

可见(图2B), 细胞核周区域有大量的粗面内质网(图2C)。

2.2 IEC-P.A.的生长曲线

第7代参环毛蚓肠上皮细胞的生长曲线见图3, 体外培养的肠上皮细胞存在着明显的潜伏期, 接种培养7~9 d后才能进入对数生长期, 经过大约4 d的对数生长期后, 至13~15 d开始进入平台期, 且能较长时间维持在这一时期。

2.3 FCM分析IEC-P.A.细胞周期

参环毛蚓肠上皮细胞的细胞周期检测结果见图4, 细胞各个时期的分布状态是 G_0/G_1 期为 $(93.13 \pm 0.12)\%$, S

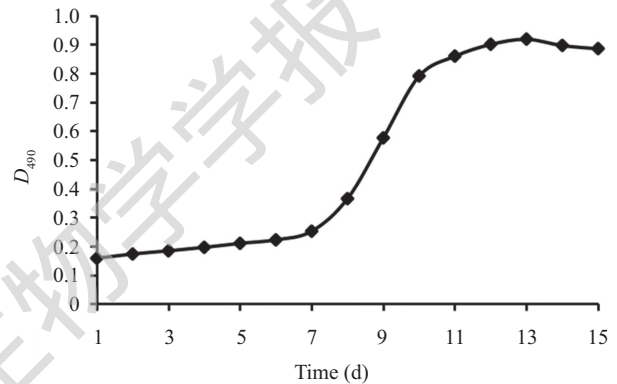


图3 第7代IEC-P.A.的生长曲线

Fig.3 Growth curve of IEC-P.A. at the 7th passage

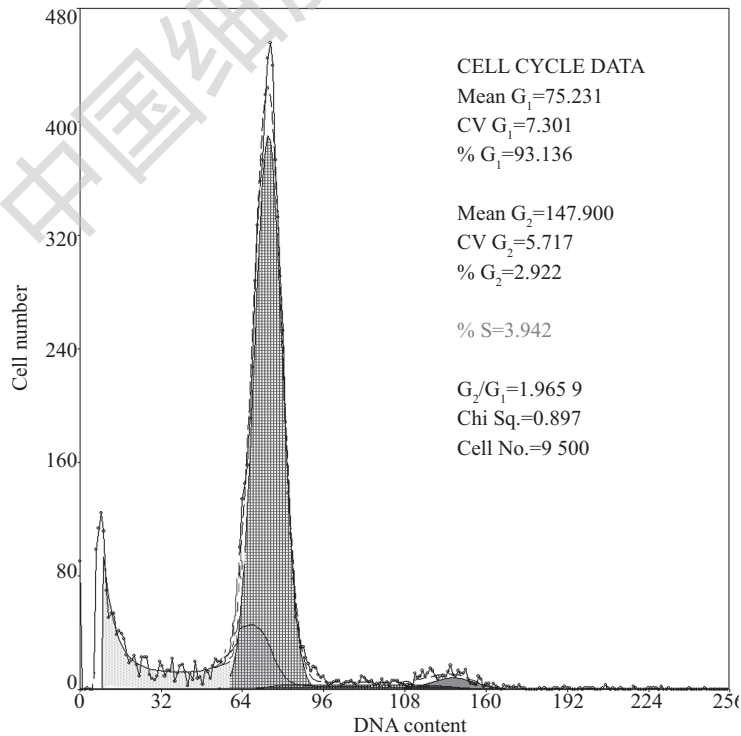
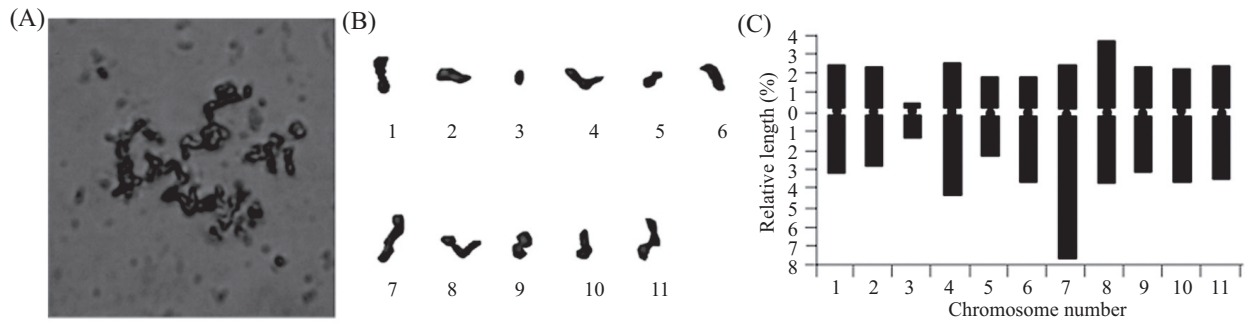


图4 流式细胞仪检测IEC-P.A.的细胞周期DNA直方分布图

Fig.4 DNA histograms of the cell cycle distribution of IEC-P.A. by FCM



A: 随机选取的中期分裂相(1 200×); B: 染色体核型; C: IEC核型模式图。

A: metaphase chromosome selected randomly (1 200×); B: the chromosomes karyotype; C: idiogram of IEC.

图5 第3代IEC-P.A.的染色体数目分析

Fig.5 Analysis of karyotype for IEC-P.A. at 3th passage

表1 第3代IEC-P.A.染色体的着丝粒指数及类型

Table 1 Centromere index and the types of chromosome of IEC-P.A. at 3th passage

染色体序号 Chromosome number	着丝粒指数 Centromere index	类型 Type
1	42.83	m
2	45.35	m
3	15.37	st
4	37.55	sm
5	46.88	m
6	23.54	st
7	33.62	sm
8	48.97	m
9	42.15	m
10	36.87	sm
11	40.56	m

m: 中部着丝粒染色体; sm: 亚中部着丝粒染色体; st: 亚端部着丝粒染色体。

m: metacentric chromosome; sm: submetacentric chromosome; st: subtelocentric chromosome.

期为(3.73±0.23)%, G₂/M期为(3.14±0.17)%, 细胞的增殖活性指标PI为6.87%, SPF为3.73%。由此可见, 体外培养的肠上皮细胞接种后, 相对较长时间处于静止期, 尚未进行增殖分裂活动。

2.4 IEC-P.A.染色体核型分析

本实验所培养的肠上皮细胞来源于环节动物门的参环毛蚓, 具有一定的特殊性, 与常规哺乳动物的细胞差异较大。处于中期分裂相的肠上皮细胞所占比例较少, 且处于分散状态的染色体臂常常出现部分重叠(图5A), 但尚可应用Photoshop软件进行核型分析。根据所拍摄的20个细胞的中期分裂相, 可以得出, 参环毛蚓肠上皮细胞的染色体数为2n=22, 其中第1、2、5、8、9、11号染色体为中部着丝粒

染色体, 第4、7、10号染色体为亚中部着丝粒染色体, 第3、6号染色体为亚端部着丝粒染色体, 其染色体核型可表示为n(♂)=x=6m+3sm+2st(图5和表1)。整体来说, 第3代参环毛蚓肠上皮细胞染色体没有异常表现, 基因组相对稳定。

3 讨论

体外培养的肠上皮细胞对于研究营养物质的吸收代谢机制、药物作用以及各种致病因素作用下的生理病理改变具有重要意义, 所取得的研究成果可以为人工养殖活动提供科学指导, 从而带来巨大的经济效益^[14]。目前, 蚯蚓种属肠上皮细胞培养与生物学特性研究尚未见报道。本研究采用混合酶消化法对参环毛蚓肠上皮细胞进行分离培养, 稳定传至第8代, 并研究了细胞形态、超微结构、生长曲线、细胞周期和染色体核型等生物学特性, 成功获得参环毛蚓肠上皮细胞系(IEC-P.A.)。因此, 本研究不仅丰富了环节动物门的细胞资源及相关生物学特性资料, 而且所建立的细胞培养技术及生物学特性检测方法可以为蚯蚓种属细胞培养及研究提供参考。

分离肠上皮细胞常用的消化酶包括胰蛋白酶、胶原酶、嗜热菌蛋白酶及中性蛋白酶。由于来源动物不同, 关于各种消化酶的分离效果有不同的报道, 其中嗜热菌蛋白酶分离肠上皮细胞可获得大量的健全绒毛隐窝单位, 且传代后增殖能力比较稳定^[15-17]。本实验参考上述条件, 对消化酶进行了适当调整, 选取了嗜热菌蛋白酶和I型胶原酶的混合酶液来分离参环毛蚓肠上皮细胞。所得细胞悬液可见大量肠上皮细胞特有的隐窝单位。

细胞鉴定是肠上皮细胞培养过程中一个重要的内容。除了观察形态特征外, 常用的有碱性磷酸

酶染色法、电镜法及免疫荧光染色法^[18]。由于碱性磷酸酶染色法影响因素复杂,阳性率低;又因亲缘性的关系,参环毛蚓肠上皮细胞缺少特异性标记物,而无法使用免疫学鉴定,所以本研究选取了透射电镜观察参环毛蚓肠上皮细胞的超微结构。细胞表面可见大量微绒毛,胞内含有丰富的线粒体和粗面内质网,符合肠上皮细胞的特征。

应用流式细胞技术对核酸染料标记的DNA进行检测,能够得到细胞各个时期的分布状态,通过计算G₀/G₁、S、G₂/M期的百分数,可以进行细胞周期分析,了解细胞的增殖能力^[19]。常规测定时多选用碘化丙啶染料对DNA染色,但本实验中发现碘化丙啶不能对75%冰乙醇固定的参环毛蚓肠上皮细胞的DNA进行染色。分析其原因可能是碘化丙啶无法进入参环毛蚓的细胞内所致。为此,本团队通过添加不同浓度的Triton X-100进行破膜,最终选取的染色液组分为0.1% Triton X-100+10 μg/mL碘化丙啶+50 μg/mL RNase,使FCM分析参环毛蚓IEC细胞周期的检测得以顺利进行。不过所得结果中变异系数(coefficient of variation, CV)值、细胞碎片含量(% Debris)较高,表明此破膜染色方法还有待于进一步优化。S期细胞比率(SPF)和增殖指数(PI)均可以反映细胞群体的增殖状态和DNA的合成速度,因此常用来表示细胞增殖活性的高低^[20]。本研究中参环毛蚓的PI为6.87%, SPF为3.73%,客观证实了体外培养的参环毛蚓IEC具有漫长的DNA准备期,接种初期增殖分裂能力相对较低,与该细胞生长曲线中潜伏期较长(7~9 d)相符。

国内外关于寡毛纲动物的染色体研究报道较少,国内仅许智芳等^[21-22]报道了赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)、正方拟爱胜蚓(*E. tetraedra typical*)、夹杂带丝蚓(*L. variegatus*)的染色体核型分析;国外的相关研究也只限于寡毛纲的少数物种^[23-24],但这些都未涉及参环毛蚓。本研究首次对体外培养的参环毛蚓肠上皮细胞进行染色体数目分析,发现其染色体为二倍体,2n=22,与许智芳等^[21]报道的赤子爱胜蚓、大平二号(Ohira 2)、北星二号(Kitoshi 2)的染色体数目一致。此外,本文按着丝点的位置对染色体进行了命名和分类,其中第1、2、5、8、9、11号染色体为中部着丝粒染色体,第4、7、10号染色体为亚中部着丝粒染色体,第3、6号染色体为亚端部着丝粒染色体,而赤子爱胜蚓、大平二号、北星二号均为

端部着丝粒染色体,造成这种差异可能是因为参环毛蚓与赤子爱胜蚓的种属不同,但也不排除研究者所用方法以及测量误差的影响。雌雄同体的寡毛纲中,多倍体是常见的^[25-27],而本研究中未发现多倍体,因此关于参环毛蚓是否存在多倍体,尚有待于展开更深入和系统的研究。

本研究首次建立了参环毛蚓肠上皮细胞系IEC-P.A.,获得了相关的生物学特性资料,不仅填补了国内外关于环节动物门蚯蚓种属肠上皮细胞离体培养的研究空白,而且为今后在细胞和分子水平进行参环毛蚓生理功能、遗传育种、疾病防治等方面的研究奠定了坚实的基础。

参考文献 (References)

- 1 彭 芙. 蚯蚓(地龙)综合利用的现状与展望. 中药与临床(Peng Fu. The comprehensive utilization of earthworms. Pharmacy and clinics of Chinese material medica) 2012; 3(3): 56-9.
- 2 欧阳高亮,肖 俐,李祺福,洪水根. 分子生物学技术在水产养殖中的应用. 海洋科学(Ouyang Gaoliang, Xiao Li, Li Qifu, Hong Shuigen. The application of molecular biological techniques in the aquaculture. Marine sciences) 2000; 24(3): 31-4.
- 3 洪智敏,贾永杰,瞿明仁,黎观红,刘思国. 鸡胚小肠上皮细胞的分离及原代培养研究. 江西农业大学学报(Hong Zhimin, Jia Yongjie, Qu Mingren, Li Guanhong, Liu Siguo. Isolation and primary culture of chicken embryo small intestinal epithelial cells. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis) 2011; 33(6): 1164-70.
- 4 Chopra DP, Dombkowski AA, Stemmer PM, Parker GC. Intestinal epithelial cells *in vitro*. Stem Cells Dev 2010; 19(1): 131-42.
- 5 王 莉,段相林. 大鼠小肠上皮细胞的体外原代培养. 军事医学(Wang Li, Duan Xianglin. *In vitro* primary culture of rat intestinal epithelial cells. Military Medical Sciences) 2004; 28(1): 61-3.
- 6 匡 伟,王海霞,邵桃玉,赵国琦. 新生山羊小肠上皮细胞株的建立及鉴定. 中国畜牧杂志(Kuang Wei, Wang Haixia, Shao Taoyu, Zhao Guoqi. Establishing and identification of neonate goat intestinal epithelial cells. Chinese Journal of Animal Science) 2007; 43(19): 11-4.
- 7 刘飞飞,车东升,穆成龙,张海全,王 波,孙泽威,等. 兔小肠上皮细胞体外分离培养. 吉林农业大学学报(Liu Feifei, Che Dongsheng, Mu Chenglong, Zhang Haiquan, Wang Bo, Sun Zewei, *et al*. Isolation and primary culture of rabbit intestinal epithelial cell *in vitro*. Journal of Jilin Agricultural University) 2011; 33(4): 429-32.
- 8 杨文平,高 峰,许辉堂,施传信,赵国刚,周光宏. 鸡肠上皮细胞体外原代培养研究. 江西农业学报(Yang Wenping, Gao Feng, Xu Huitang, Shi Chuanxin, Zhao Guogang, Zhou Guanghong. *In vitro* primary culture of intestinal epithelial cells of chicken. Acta Agriculturae Jiangxi) 2007; 19(5): 113-5.
- 9 林小桦,李 薇,侯雪芹,李巧容,韦建红,李 维. 参环毛蚓细胞原代培养灭菌方法的研究. 广州中医药大学学报(Lin

- Xiaohua, Li Wei, Hou Xueqin, Li Qiaorong, Wei Jianhong, Li Wei. Disinfection methods for primary cell culture of *Pheretima aspergillum*. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine) 2011; 28(3): 264-7.
- 10 侯雪芹, 林小桦, 李 薇. 参环毛蚓不同部位细胞原代培养及鉴定. 辽宁中医药大学学报(Hou Xueqin, Lin Xiaohua, Li Wei. Study on primary culture and identification of different organizations cells from *Pheretima aspergillum*. Journal of Liaoning University of TCM) 2011; 13(4): 38-40.
- 11 Gong L, Lin X, Lu R, Yu L, Hou X, Li W. establishment of an *in vitro* culture system for intestinal epithelial cells from *Pheretima aspergillum* (E. Perreir). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2014; 50(1): 16-21.
- 12 Fugère N1, Brousseau P, Krzystyniak K, Coderre D, Fournier M. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different *in vitro* sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* 1996; 109(2-3): 157-66.
- 13 熊良伟, 王建国, 封 琦, 黄爱军. 中华鳖太湖种群淋巴细胞培养及染色体核型分析. 中国农学通报(Xiong Liangwei, Wang Jianguo, Feng Qi, Huang Aijun. The lymphocytic cell culture and chromosome karyotype of *Trionyx sinensis* in Taihu lake population. *Chinese Agricultural Science Bulletin*) 2013; 29(5): 68-70.
- 14 王海霞. 山羊小肠上皮细胞系的建立及其对氮素的利用(硕士论文). 扬州大学(Wang Haixia. Establishment of goat intestinal epithelial cell line and nitrogen metabolism of IEC. Yangzhou University) 2008.
- 15 Perreault N, Beaulieu JF. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 1996; 224(2): 354-64.
- 16 张道杰, 蒋建新, 陈永华, 熊健琼, 段朝霞, 朱佩芳. 用嗜热菌蛋白酶进行人肠上皮细胞分离培养. 第三军医大学学报(Zhang Daojie, Jiang Jianxin, Chen Yonghua, Xiong Jianqiong, Duan Zhaoxia, Zhu Peifang. Isolation and culture of human intestinal epithelial cells using dissociating enzyme thermolysin. *Acta Academiae Medicinæ Militaris Tertiæ*) 2004; 26(11): 1016-8.
- 17 孙秀梅, 程 帆, 刘 维, 孙 涛, 薛秀恒, 李培英, 等. 4种小鼠肠上皮细胞分离培养方法的比较. 西北农林科技大学学报(自然科学版)(Sun Xiumei, Cheng Fan, Liu Wei, Sun Tao, Xue Xiuheng, Li Peiying, *et al.* Comparison of four primary culture methods for mouse intestinal epithelial cells. *Journal of Northwest A & F University, Natural Science Edition*) 2013; 41(5): 25-31.
- 18 王晓亮, 顾宪红, 郑冬梅. 鸡小肠上皮细胞的分离及体外培养研究进展. 中国畜牧兽医(Wang Xiaoliang, Gu Xianhong, Zheng Dongmei. The advance on isolation and primary culture of chicken intestine epithelial cell *in vitro*. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*) 2010; 37(8): 34-8.
- 19 贾永蕊. 流式细胞术在DNA检测中的应用. 中国医学装备(Jia Yongrui. Application of flow cytometer in detection of DNA. *China Medical Equipment*) 2010; 7(4): 4-6.
- 20 Tan X, Chen G. DNA content and cell cycle phase analysis in uterine sarcomas and its clinical significance. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1999; 34(9): 551-4.
- 21 许智芳, 张德宁, 陈 钢, 张 会. 三种蚯蚓染色体组型的初步研究. 南京大学学报(自然科学版)(Xu Zhifang, Zhang Dening, Chen Gang, Zhang Hui. On karyotype of the earthworms. *Journal of Nanjing University, Natural Sciences*) 1983; 2: 308-16.
- 22 许智芳, Brinkhurst RO, 张德宁. 两种水栖寡毛类染色体核型的研究. 南京大学学报(自然科学版)(Xu Zhifang, Brinkhurst RO, Zhang Dening. The aryotype of *Lumbriculus variegates* (Muller) and *Elsenella tetraedra typica* (Savigny) (Lumbriculidae, Lumbricidae, Oligochaeta). *Journal of Nanjing University, Natural Sciences*) 1990; 26(4): 675-82.
- 23 Bakhtadze NG, Bakhtadze GI, Sh E. The chromosome numbers of Georgian earthworms (Oligochaeta: Llumbricidae). *Comp Cytogenet* 2008; 2(1): 79-83.
- 24 Kashmenskaka MN, Polyakov AV. Karyotype analysis of five species of earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae). *Comp Cytogenet* 2008; 2(2): 121-5.
- 25 Murchie WR. Chromosome numbers of some diplocardian earthworms (Megascolecidae-Oligochaeta). *Am Midl Nat* 1967; 78(2): 534-7.
- 26 Muldal S. The chromosomes of the earthworms I. The evolution of polyploidy. *Heredity* 1952; 6: 55-76.
- 27 Vlasenko RP, Mezherin SV, Garbar AV, Kotsuba Y. Polyploid races, genetic structure and morphological features of earthworm *Aporrectodea rosea* (Savigny, 1826) (Oligochaeta: Lumbricidae) in Ukraine. *Comp Cytogenet* 2011; 5(2): 91-103.