

发情期家兔输卵管上皮细胞和基质细胞的分离培养与鉴定

赵永贞^a, 陈秀荔^a, 张彦明^b, 曹斌云^a, 马云^a, 王利心^a

(西北农林科技大学 a. 动物科技学院; b. 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】探讨输卵管上皮细胞和基质细胞的体外分离培养方法及在激素刺激下基质细胞对上皮细胞的作用。【方法】通过差速贴壁法体外分离纯化兔输卵管上皮细胞和基质细胞;免疫组织化学染色和免疫荧光染色方法鉴定上皮细胞和基质细胞的类型和纯度;并在无胎牛血清的 DMEM/F12 培养液和含体积分数 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,分别添加不同浓度的雌激素($17\beta\text{-E}_2$)和孕激素(P_4),比较上皮细胞和基质细胞的增殖情况及其对上皮细胞/基质细胞共培养的影响。【结果】体外成功地分离到兔输卵管上皮细胞和基质细胞;兔输卵管上皮细胞经鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体(anti-CK18)免疫组织化学染色后呈阳性,细胞质呈棕色,免疫荧光染色检测其纯度在 98% 以上;兔输卵管基质细胞经鼠抗人波形蛋白单克隆抗体(anti-Vimentin)免疫组织化学染色后呈阳性,细胞质呈棕色,免疫荧光染色检测其纯度在 95% 以上。 $17\beta\text{-E}_2$ 和 P_4 均能促进兔输卵管上皮细胞和基质细胞的增殖,使其数量明显增加。基质细胞与上皮细胞共培养,上皮细胞增殖较快。【结论】差速贴壁法能够获得纯度较高的输卵管上皮细胞和基质细胞,在 $17\beta\text{-E}_2$ 和 P_4 共同作用下,少量基质细胞能促进上皮细胞生长。

【关键词】 输卵管;上皮细胞;基质细胞;共培养;免疫组化和免疫荧光;家兔

【中图分类号】 Q954.633⁺.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)02-0027-07

Isolation, culture and Identification of rabbit oviductal epithelial cells and stromal cells during oestrus

ZHAO Yong-zhen^a, CHEN Xiu-li^a, ZHANG Yan-ming^b, CAO Bin-yun^a,
MA Yun^a, WANG Li-xin^a

(a. College of Animal Sci-Tech; b. College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract:【Objective】The research is to study methods for isolation and culture of epithelial cells and stromal cells from rabbit oviduct, and stromal contribution to epithelial functions in the stimulation of estrogen.【Method】*In vitro* rabbit oviductal epithelial cells and stromal cells were isolated and purified through differential attachment technique. Immunocytochemical staining and immunofluorescence staining were used to identify types of epithelial cells and stromal cells and the purification. Different concentration of 17β -estrogen($17\beta\text{-E}_2$) and progesterone (P_4) were added respectively to the fetal bovine serum-free DMEM/F12 medium and DMEM/F12 medium including the volume fraction 15% fetal bovine serum, compared with proliferation of epithelial cells and stromal cells, and whose effected on the cocultured epithelial cells stromal cells.【Result】Rabbit oviduct epithelial cells and stromal cells, immunocytochemistry of rab-

* [收稿日期] 2007-03-08

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAD04A00)

[作者简介] 赵永贞(1978—),男,甘肃张掖人,在读博士,主要从事家畜遗传育种与繁殖研究。

E-mail: fisher1152002@yahoo.com.cn

[通讯作者] 曹斌云(1957—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事动物生殖生理与调控研究。

bit oviductal epithelial cells, the cytoplasm show brown(+) to anti-cytokeratin 18, the purification of epithelial cells reach over 98% through immunofluorescence staining; immunocytochemistry of rabbit oviductal stromal cells, the cytoplasm show brown(+) to anti-vimentin, the purification of stromal cells reach over 95% through immunofluorescence staining. $17\beta\text{-E}_2$ and P_4 could accelerate the proliferation of rabbit oviductal epithelial cells and stromal cells, whose quantity distinctly increased. Epithelial cells were co-cultured in stromal cells, epithelial cells proliferate quickly. 【Conclusion】 This study demonstrates that differential attachment technique can receive more high purity of oviductal epithelial cells and stromal cells. Under the combined action of $17\beta\text{-E}_2$ and P_4 , a small quantity of stromal cells could accelerate the growth of epithelial cells.

Key words: oviduct; epithelial cells; stromal cells; co-culture; immunocytochemistry and immunofluorescence; rabbit

输卵管是哺乳动物受精和早期胚胎发育的场所,其在配子转运、受精及早期胚胎发育过程中起着重要的作用。在输卵管和胚胎间发生相互作用时,为了适应胚胎的发育,雌性生殖道的微环境会发生生物化学和组织学变化^[1],这种改变是通过类固醇激素和旁分泌因子实现的。这些因子可以调节早期胚胎发育微环境的变化,在胚胎发育过程中起关键性的作用,并且有利于胚胎的植入^[2]。因此,体外培养输卵管内膜细胞,不但可以深入地了解影响生殖微环境变化的因素,而且可以建立输卵管上皮细胞与胚胎共培养体系,研究输卵管上皮细胞对胚胎体外发育的影响。

Reischi 等^[3]采用直接冲洗法、刮除法、挤压法和酶消化法,对输卵管内膜细胞进行了分离培养,并分别比较了几种方法获得的细胞数量和细胞存活率,结果发现,应用刮除法获得的细胞数量多并且细胞存活率高,贴壁快;输卵管上皮细胞体外培养可以用于与胚胎共培养,克服胚胎的发育阻滞现象^[4-6]。本研究对激素超排处理的兔输卵管上皮细胞和基质细胞进行了分离和培养,并研究了不同浓度雌激素和孕激素对输卵管上皮细胞和基质细胞体外培养的影响,以期为促进上皮细胞的增殖、提高胚胎体外发育率及克服胚胎发育阻滞现象提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 性成熟的大耳兔,购自陕西扶风县养殖农户,常规饲养,每天保证 12 h 光照。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司;胰蛋白酶购自 Sigma 公司,活性为 1:250;雌激素($17\beta\text{-E}_2$)、孕激素(P_4)和 Hoechst33258 均购自 Sigma 公司;鼠

抗人的细胞角蛋白单克隆抗体(anti-CK18)、鼠抗人的波形蛋白单克隆抗体(anti-Vimentin)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)试剂盒、山羊抗小鼠 IgG、Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG,均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品;DAB 显色剂购自福州迈新公司。

1.2 兔输卵管的采取

试验兔于下午 16:00 臀部肌肉注射 100 U 孕马血清促性腺激素(PMSG,天津市华孚高生物技术公司),于 48 h 后耳缘静脉注射 100 IU 的人绒毛膜促性腺激素(hCG,购自南京动物激素厂),并于次日早晨 08:00 空气栓塞法处死兔,无菌条件下取出输卵管,置于无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的 PBS 液中。

1.3 兔输卵管上皮细胞和基质细胞的分离与培养

在无菌的条件下用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子的 PBS 反复冲洗输卵管至白色,用眼科剪和眼科镊剔除脂肪组织和其他多余的生殖道组织,纵向剪开输卵管,用不含血清的 DMEM/F12 培养液洗涤 1 次。将其平铺在组织培养皿中,输卵管内膜朝上,用无菌的载玻片轻轻刮取输卵管内膜,吸取 2 mL 左右 DMEM/F12 培养液冲洗载玻片,将冲洗液收集到 10 mL 的玻璃离心管中。取 2 mL DMEM/F12 培养液冲洗组织培养皿,将其收集到同一个 10 mL 玻璃离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 5 mL 含体积分数 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞,将其接种到 25 cm² 的塑料培养瓶中,37 ℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养。一般基质细胞在 2 h 左右就会贴壁,而上皮细胞在 10 h 左右贴壁,培养 4 h 后吸出培养液置于一个灭菌的 25 cm² 塑料培养瓶中(主要为上皮细胞),原培养瓶中(主要为基质细胞)添加 3 mL 含体积分数 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液,在同样的培养条件培养 2 h

后,再将第2个培养瓶重复上述步骤,采用反复差速贴壁法纯化输卵管上皮细胞和基质细胞,每2 d更换1次培养液。

1.4 兔输卵管上皮细胞和基质细胞的传代

吸弃原培养液,用PBS洗涤单层细胞,再添加2 mL 2.5 g/L胰蛋白酶消化30 s,用2 mL含体积分数15% FBS的DMEM/F12培养液终止消化,将其收集到离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,用含体积分数15% FBS的DMEM/F12培养液重悬细胞,用40 g/L台盼蓝按1:10(体积比)的比例稀释细胞,细胞计数板计数,并观察细胞存活率,最后将浓度为 5×10^5 mL⁻¹细胞接种到25 cm²的塑料培养瓶中,37℃、体积分数5% CO₂、饱和湿度的培养箱培养,每2 d更换1次培养液。

1.5 兔输卵管上皮细胞和基质细胞染色

1.5.1 免疫组织化学染色 分别取浓度为 5×10^5 mL⁻¹上皮细胞和基质细胞悬液0.5 mL,接种到4孔板中,4孔板内放有经过洗液处理的灭菌盖玻片,当观察到4孔板底部80%贴满细胞时,用PBS冲洗1次;用40 g/L多聚甲醛固定细胞爬片10 min, PBS洗3次,每次10 min;Triton X-100作用10 min,再用PBS洗3次,每次10 min;加入体积分数5%山羊血清封闭15 min;吸弃血清直接添加鼠抗人的细胞角蛋白单克隆抗体(anti-CK18)(1:100稀释)和鼠抗人的波形蛋白单克隆抗体(anti-Vimentin)(1:500稀释),并设立对照组(用PBS代替一抗);4℃过夜,吸弃抗体,用PBS洗3次,每次10 min;添加SP试剂盒中的C液(生物素标记二抗工作液),37℃作用30 min,用PBS洗3次,每次10 min;再添加SP试剂盒中的D液(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,PBS稀释),37℃孵育20 min, PBS冲洗3次,每次10 min,用新配制的显色剂(DAB)显色数秒钟;普通光学显微镜下观察显色情况,终止显色,自来水充分冲洗;苏木素复染;脱水、透明、封片。普通光学显微镜下观察,阳性细胞的细胞质呈棕色,细胞核呈蓝色;阴性细胞的细胞核呈蓝色,细胞质不着色。

1.5.2 免疫荧光染色 添加二抗以前的具体方法与免疫组织化学染色相同,并设立对照组(用PBS代替一抗),之后二抗添加的是Cy3标记的山羊抗小鼠IgG(1:100稀释),避光室温作用1 h, PBS冲洗3次,每次10 min,添加Hoechst33258(1:80稀释),避光室温放置20 min, PBS冲洗3次,每次10 min,石蜡油覆盖,荧光显微镜下观察,阳性细胞的

细胞核呈蓝色,细胞质呈红色;阴性细胞的细胞核呈蓝色,细胞质不着色。

1.6 17β-E₂和P₄对兔输卵管上皮细胞和基质细胞的影响

1.6.1 对上皮细胞和基质细胞增殖的影响 将兔输卵管上皮细胞和基质细胞分别培养在含体积分数15% FBS DMEM/F12培养液中,待其长成单层后,用2.5 g/L胰蛋白酶消化,PBS离心洗涤2次,去除残留的胰蛋白酶和血清,台盼蓝染色进行细胞存活率鉴定。为探讨17β-E₂和P₄对输卵管上皮细胞和基质细胞增殖的影响,分别用不同的培养液培养上皮细胞和基质细胞,培养液1:DMEM/F12培养液+100 nmol/L 17β-E₂;培养液2:DMEM/F12培养液+100 nmol/L 17β-E₂+10 nmol/L P₄;培养液3:含体积分数15% FBS的DMEM/F12培养液+100 nmol/L 17β-E₂;培养液4:含体积分数15% FBS的DMEM/F12培养液+100 nmol/L 17β-E₂+10 nmol/L P₄;培养液5(对照1):DMEM/F12培养液;培养液6(对照2):含体积分数15% FBS的DMEM/F12培养液。分别取稀释浓度为 5×10^5 mL⁻¹的上皮细胞和基质细胞悬液1 mL接种到4孔板中,每个处理重复3次,24 h后终止培养,台盼蓝法染色,观察细胞的存活率。

1.6.2 对上皮细胞和基质细胞共培养的影响 取1.6.1中6种培养液分别培养的上皮细胞和基质细胞,然后分别重悬上皮细胞和基质细胞,取 5×10^5 mL⁻¹上皮细胞与 5×10^5 mL⁻¹基质细胞各0.5 mL,等体积混合,接种到4孔板中,每处理重复3次,24 h后终止培养,用40 g/L多聚甲醛固定,免疫荧光染色观察上皮细胞和基质细胞的比例。

2 结果与分析

2.1 兔输卵管上皮细胞和基质细胞的形态观察

差速贴壁法能获得较纯的兔输卵管上皮细胞和基质细胞。基质细胞是混合细胞,细胞呈“梭形”,且细胞贴壁较快,2 d基本长成细胞单层,相互排列成束(图1);上皮细胞分为纤毛细胞和分泌细胞两种,形态多为多角形,排列紧密时类似于“铺路石”状,原代分离的细胞贴壁较慢,与基质细胞在同等的浓度条件下,一般6 d长成细胞单层(图2)。兔输卵管上皮细胞和基质细胞均能够传代。

2.2 兔输卵管上皮细胞和基质细胞染色的结果

2.2.1 免疫组织化学染色的结果 用鼠抗人的细胞角蛋白单克隆抗体 anti-CK18 染色观察发现,对

照组细胞和基质细胞均呈阴性,细胞核呈蓝色,细胞质不着色;输卵管上皮细胞呈强阳性,细胞核呈蓝色,细胞质呈棕色(图 3)。用鼠抗人的波形蛋白单

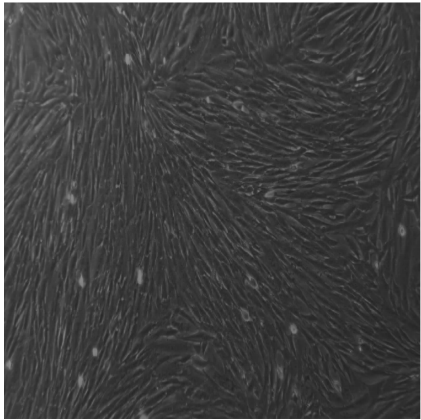


图 1 兔输卵管原代基质细胞(×100)

克隆抗体 anti-Vimentin 染色观察发现,输卵管基质细胞呈阳性,细胞核呈蓝色,细胞质呈棕色(图 4);上皮细胞呈阴性,细胞核呈蓝色,细胞质不着色。

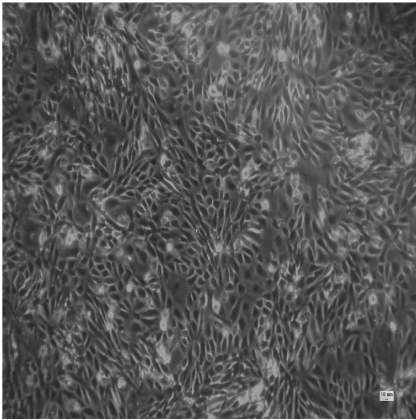


图 2 兔输卵管原代上皮细胞 (×100)

Fig.1 Primary stromal cells of rabbit oviduct(×100)

Fig.2 Primary epithelial cells of rabbit oviduct (×100)

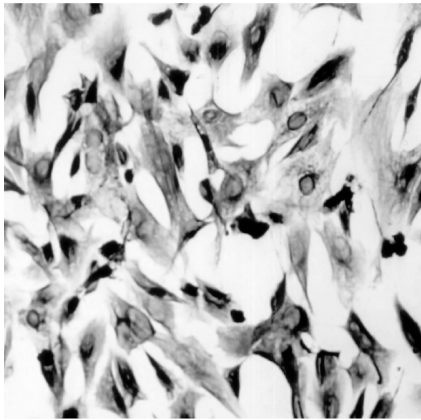


图 3 兔输卵管上皮细胞 anti-CK18 免疫组织化学染色的结果(×200)

Fig.3 Epithelial cells of rabbit oviduct anti-CK18 immunocytochemist(×200)

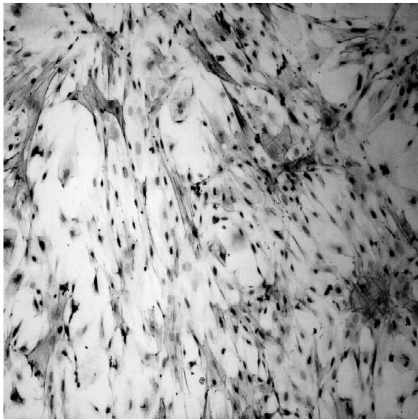


图 4 兔输卵管基质细胞 anti-Vimentin 免疫组织化学染色的结果(×100)

Fig.4 Stromal cells of rabbit oviduct anti-Vimentin immunocytochemistry(×100)

2.2.2 免疫荧光染色的结果 经 Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG 和 Hoechst33258 染色后观察发现,对照组细胞呈阴性,细胞核呈蓝色,细胞质不着色;输卵管上皮细胞和基质细胞均呈阳性,细胞核呈蓝色,细胞质呈红色,但是也有部分细胞质不着色(图 5)。分别统计 4 孔板中每种细胞 3 个阳性孔的细胞总数以及阳性细胞数,计算阳性细胞数占细胞总数的比例并取平均值,则为细胞的纯度。经计算,兔输卵管上皮细胞的纯度在 98%以上,基质细胞的纯度在 95%以上。

2.3 17β-E₂ 和 P₄ 对兔输卵管上皮细胞和基质细胞的影响

2.3.1 对上皮细胞和基质细胞增殖的影响 观察发现,在 DMEM/F12 培养液中,添加 100 nmol/L 17β-E₂或 100 nmol/L 17β-E₂ + 10 nmol/L P₄ 均能

促进兔输卵管上皮细胞和基质细胞的增殖,且上皮细胞增殖较为明显,细胞增殖速度较快;与对照 1 (DMEM/F12 培养液)相比,培养液 1(DMEM/F12 培养液 + 100 nmol/L 17β-E₂)中的上皮细胞数增加 40%左右;而培养液 2 (DMEM/F12 培养液 + 100 nmol/L 17β-E₂ + 10 nmol/L P₄)中的上皮细胞数增加 51%。对照 1(DMEM/F12 培养液)中的上皮细胞和基质细胞存活率最差,且细胞数未增加。在含体积分数 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液中,添加 100 nmol/L 17β-E₂ 或 100 nmol/L 17β-E₂ + 10 nmol/L P₄ 均能促进细胞的增殖。对照 2 中(含体积分数 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液)的上皮细胞和基质细胞在血清的作用下增殖速度比对照 1 组的快,但比在激素处理组的细胞生长速度慢。

2.3.2 对上皮细胞和基质细胞共培养的影响 研究 17β-E₂ 及 P₄ 对上皮细胞和基质细胞的共培养的影响,结果发现,无论在 DMEM/F12 培养液中还是在含体积分数 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液中,

添加 100 nmol/L 17β-E₂ 或 100 nmol/L 17β-E₂ + 10 nmol/L P₄ 均能影响培养液中上皮细胞数与基质细胞数,由于上皮细胞增殖快,故其数量明显增加。

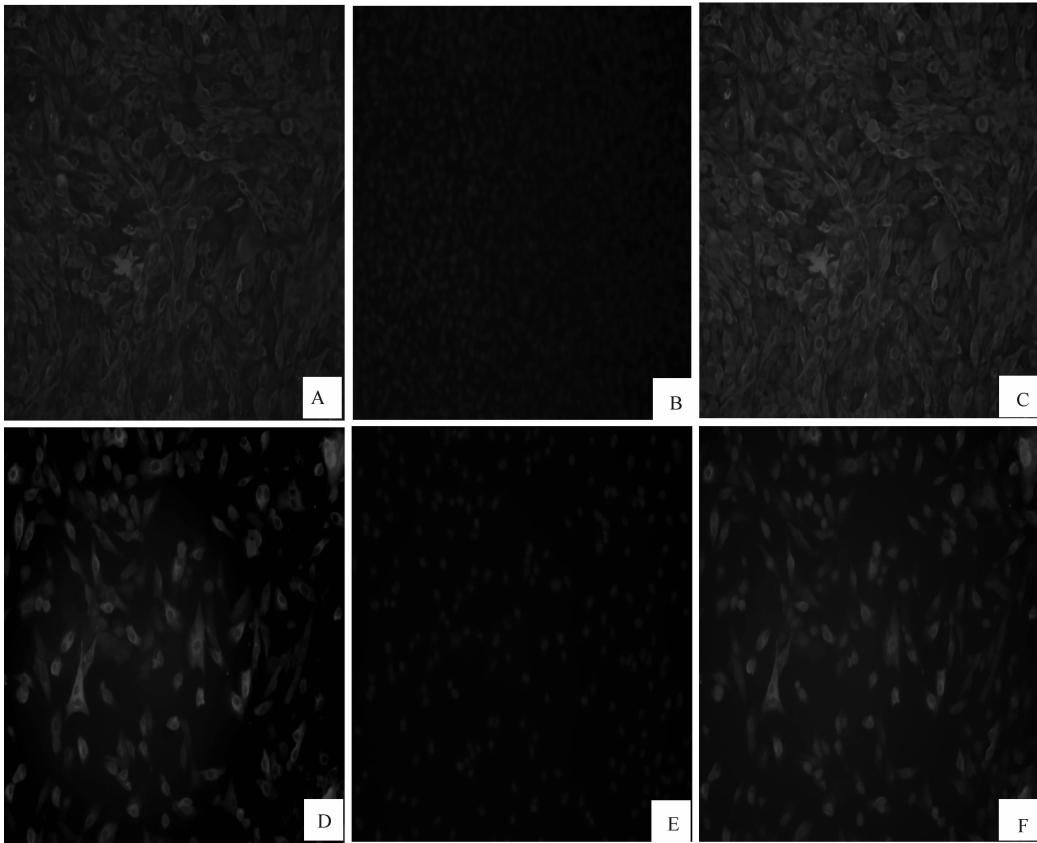


图 5 兔输卵管上皮细胞和基质细胞的免疫荧光染色结果(×100)

A. Cy3 染色呈阳性的上皮细胞(anti-CK18 阳性); B. Hoechst33258 染色呈阳性的上皮细胞(anti-CK18 阳性);
C. Cy3/Hoechst33258 染色呈阳性的上皮细胞; D. Cy3 染色呈阳性的基质细胞(anti-Vimentin 阳性); E. Hoechst33258 染色呈阳性的基质细胞(anti-Vimentin 阳性); F. Cy3/Hoechst33258 染色呈阳性的基质细胞

Fig. 5 Immunofluorescence staining of epithelial cells and stromal cells of rabbit oviduct(×100)

A. Epithelial cells positive by Cy3 staining (anti-CK18 positive); B. Epithelial cells positive by Hoechst33258 staining(anti-CK18 positive);
C. Epithelial cells positive by Cy3/Hoechst33258; D. Stromal cells positive by Cy3 staining (anti-Vimentin positive);
E. Stromal cells positive by Hoechst33258 staining(anti-Vimentin positive); F. Stromal cells positive by Cy3/Hoechst33258

3 讨论与结论

3.1 输卵管上皮细胞和基质细胞的分离与培养方法

哺乳动物输卵管为受精提供了一个理想的微环境,其分泌物对早期胚胎的生长和分化具有重要作用。因为体内研究输卵管的生理作用非常有限,所以研究者们建立了体外细胞培养体系^[7-9]。研究者们不但应用这种培养体系研究影响输卵管上皮细胞功能的重要的生长因子^[10],而且还应用其与胚胎共培养,以提高胚胎移植过程中的早期胚胎发育率和体外受精率^[7-8]。输卵管内膜由上皮细胞和基质细

胞两种主要细胞组成^[11]。它们都很容易被收集和培养,但研究的目的不同,分离培养的方法也有差异。Walter^[12]采用机械法和酶消化法分离牛输卵管上皮细胞,将其分别在玻璃瓶、渗透膜上培养或者悬浮培养,并通过免疫组织化学和透射电镜鉴定细胞,为输卵管上皮细胞的分离培养和鉴定提供了依据。Rottmayer 等^[13]建立了一个短期(24 h)培养牛输卵管上皮细胞的培养体系,并研究了其形态特点、标记基因的表达及激素的作用,为功能性输卵管上皮细胞在早期母胎界面中的作用研究提供了大量数据。本试验在前人分离培养上皮细胞方法的基础

上,分离和纯化了兔输卵管上皮细胞和基质细胞,采用载玻片刮除法获得内膜组织,胰蛋白酶消化法分离获得细胞,通过差速贴壁法纯化以上两种细胞,这种将机械刮取法和酶消化法结合起来获得输卵管内膜细胞的方法简单易行,而且减少了细胞与外界接触的机会和时间,是一个简单快速的分离培养方法。

3.2 输卵管上皮细胞和基质细胞的鉴定

分别用鼠抗人的细胞角蛋白单克隆抗体 anti-CK18 和鼠抗人的波形蛋白单克隆抗体 anti-Vimentin 进行输卵管上皮细胞和基质细胞免疫组织化学染色和免疫荧光染色。结果表明,免疫组织化学染色可以鉴定细胞类型,anti-CK18 染色后细胞质呈棕色阳性的是上皮细胞,anti-Vimentin 染色后细胞质呈棕色阳性的是基质细胞。免疫荧光染色发现,通过差速贴壁法获得的上皮细胞纯度高于 98%,基质细胞纯度高于 95%,表明差速贴壁法能容易地获得较纯细胞。本研究的输卵管上皮细胞和基质细胞共培养试验表明,基质细胞在上皮细胞的生长、发育和功能方面起着重要的作用,它可能与雌激素共同调节上皮细胞的生长和分化^[14-16]。Umez 等^[17]认为,输卵管上皮细胞和基质细胞共培养能增强髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(mogp-1)和叉头蛋白 3-T 细胞转录因子(foxj1)的表达,同时指出基质细胞能够促进上皮细胞的生长,它们之间的相互作用是由分泌细胞因子调节的。

3.3 $17\beta\text{-E}_2$ 和 P_4 对输卵管上皮细胞和基质细胞的影响

输卵管的生理功能是受卵巢激素调节的,例如雌激素($17\beta\text{-E}_2$)和孕激素(P_4),雌激素和孕激素协同作用控制输卵管内自分泌/旁分泌因子的合成,进而间接地影响输卵管的功能以及受精过程^[18]。输卵管上皮细胞和基质细胞在离开动物体内之后不是在任何时候都能增殖的,本试验结果表明,在无激素 $17\beta\text{-E}_2$ 和 P_4 处理的情况下,在 DMEM/F12 培养液和含体积分数 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液中,兔输卵管上皮细胞和基质细胞及其混合细胞贴壁均较慢,而且增殖速度慢;在无血清的 DMEM/F12 培养液中添加激素 $17\beta\text{-E}_2$ 和 P_4 ,基质细胞和上皮细胞的增殖速度加快;在含体积分数 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液中添加激素 $17\beta\text{-E}_2$ 和 P_4 ,在相同的培养时间内,培养的上皮细胞数比在含体积分数 15% FBS 的 DMEM/F12 培养液中多,可知激素具有促进细胞增殖的作用。因为在生理状态下, $17\beta\text{-E}_2$ 具有促进上皮细胞增生的作用, P_4 不但能够

促进基质细胞分泌活动的增加,而且能够促进子宫基质细胞的蜕膜化^[14]。所以不但雌激素和孕激素协同作用促进上皮细胞的增殖,而且输卵管基质细胞分泌的部分因子也能促进上皮细胞的增殖。

总之,通过差速贴壁法能够获得较纯的兔输卵管基质细胞和上皮细胞,且细胞的活力均比较高;在雌激素和孕激素共同的作用下,少量的基质细胞能促进上皮细胞的生长,可能是由于基质细胞通过分泌部分的生长因子影响基因的表达,进而有利于上皮细胞的生长。

[参考文献]

- [1] Buhi W C, Alvarez I M, Kouba A J. Secreted proteins of the oviduct [J]. Cells Tissues Organs, 2000, 166(2): 165-179.
- [2] Dubeyl R K, Rosselli M, Imthurn B, et al. Vascular effects of environmental oestrogens; implications for reproductive and vascular health [J]. Hum Reprod Update, 2000, 6(4): 351-363.
- [3] Reischl J, Prella K, Schol H, et al. Factor affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells *in vitro* [J]. Cell Tissue Res, 1999, 296(2): 371-383.
- [4] Way A L. Isolation and culture of bovine oviductal epithelial cells for use in the anatomy and physiology laboratory and undergraduate research [J]. Adv Physiol Educ, 2006, 30(4): 237-241.
- [5] Joo B S, Kim M K, Na Y J, et al. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components [J]. Fertil Steril, 2001, 75(1): 193-199.
- [6] Fukaya T, Chida S, Murakami T, et al. Is direct cell-to-cell contact needed to improve embryonic development in co-culture [J]. J Exp Med, 1996, 180(3): 225-232.
- [7] Minami N, Bavister B D, Iritani A. Development of hamster two-cell embryos in the isolated mouse oviduct in organ culture system [J]. Gamete Res, 1988, 19(3): 235-240.
- [8] Ellington J E, Iqnotz G G, Ball B A, et al. De novo protein synthesis by bovine uterine tube (oviduct) epithelial cells changes during co-culture with bull spermatozoa [J]. Biol Reprod, 1993, 48(4): 851-856.
- [9] Joshi M S. Growth and differentiation of the cultured secretory cells of the cow oviduct on reconstituted basement membrane [J]. J Exp Zool, 1991, 260(2): 229-238.
- [10] Einspanier R, Kettler A, Gabler C, et al. The mammalian oviduct: aspects on auto- and paracrine mechanisms [J]. Reprod Dom Anim, 2000, 35(3): 125-128.
- [11] Abe H. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells [J]. Histol Histopathol, 1996, 11(3): 743-768.
- [12] Walter I. Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC) [J]. Anat Rec, 1995, 243(3): 347-356.
- [13] Rottmayer R, Ulbrich S E, Kolle S, et al. A bovine oviduct ep-

- ithelial cell suspension culture system suitable for studying embryo-maternal interactions; morphological and functional characterization [J]. *Reproduction*, 2006, 132(4): 637-648.
- [14] Donjacour A A, Cunha G R. Stromal regulation of epithelial function; Review [J]. *Cancer Treat Res*, 1991, 53: 335-364.
- [15] Arnold J T, Kaufman D G, Seppala M, et al. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth *in vitro*: a new co-culture model [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(5): 836-845.
- [16] Cunha G R, Bigsby R M, Cooke P S, et al. Stromal-epithelial interactions in adult organs; Review [J]. *Cell Differ*, 1985, 17(3): 137-148.
- [17] Umez T, Tomooka Y. An evidence of stromal cell populations functionally linked with epithelial cell populations in the mouse oviduct [J]. *Zoolog Sci*, 2004, 21(3): 319-326.
- [18] Reinhart K C, Dubey R K, Cometti B, et al. Differential effects of natural and environmental estrogens on endothelin synthesis in bovine oviduct cells [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(4): 1430-1436.
-
- (上接第 26 页)
- [4] 刘珠果, 尚书江, 阎新龙, 等. IGF- I、TGF- α 、bFGF 对猪卵母细胞体外成熟和卵裂的影响 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(10): 2111-2116.
- Liu Z G, Shang S J, Yan X L, et al. Effects of IGF- I, TGF- α , bFGF on porcine oocytes maturation *in vitro* and oocytes cleavage [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(10): 2111-2116. (in Chinese)
- [5] Dianne M S, Smith A E S. Uptake and incorporation of amino acids by cultured mouse embryos; estrogen stimulation [J]. *Biology of Reproduction*, 1971, 4: 66-73.
- [6] Pelton R W, Saxena B, Jones M, et al. Immunohistochemical localization of TGF-1, TGF-2, and TGF-3 in the mouse embryo; expression patterns suggest multiple roles during embryonic development [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1991, 115(4): 1091-1105.
- [7] Allan G J, Flint D J, Patel K. Insulin-like growth factor axis during embryonic development [J]. *Reproduction*, 2001, 122: 31-39.
- [8] Harvey M B, Kaye P L. Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos *in vitro* [J]. *Mol Reprod Dev*, 1992, 31(3): 195-199.
- [9] Matthew D, Anway, Janet F, et al. Isolation of sertoli cells from adult rat testes; an approach to *Ex Vivo* studies of sertoli cell function [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68: 996-1002.
- [10] Raychoudhury S S, Thompson E W, Blackshaw, A W, et al. Sertoli cells as paracrine modulators of DNA synthesis in rat peritubular myoid cells in culture [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1993, 99: 513-518.
- [11] Suarez-Pinzon W, Korbitt G S, Power R, et al. Testicular sertoli cells protect islet beta-cells from autoimmune destruction in NOD mice by a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism [J]. *Diabetes*, 2000, 49(11): 1810-1818.
- [12] Nasr-Esfahani M H, Johnson M H. How does transferrin overcome the *in vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo? [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1992, 96: 41-48.
- [13] Palma G A, Muller M, Brem G. Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro* [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1997, 110: 347-353.
- [14] Lee H M, Oh B C, Lim D P, et al. Establishment and characterization of porcine Sertoli cell line for the study of xenotransplantation [J]. *Xenotransplantation*, 2007, 14(2): 112-118.