

山羊卵巢间质细胞分离方法的比较

权富生,余 源,苏会敏,华 松,郑月茂,刘 军,张 涌

(西北农林科技大学 动物医学院 动物生殖生理与胚胎工程农业部重点实验室,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】比较体外条件下不同分离山羊卵巢间质细胞(ovarian interstitial cells)方法的效果。【方法】采用热消化法、冷消化法、单一酶消化法(热消化法,用 I 型、IV 型、XI 型胶原酶和 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA)及 2 步酶消化法分离山羊卵巢间质细胞。【结果】热消化法得到的细胞数量较冷消化法多,且试验所用时间缩短,但细胞活率降低。单一酶热消化法中,以 1 g/L XI 型胶原酶效果最佳,适合体外培养。2 步酶消化法以先胰蛋白酶后 XI 型胶原酶组的效果最佳,卵巢组织消化时间及体外培养首次换液时间均较短,适合于体外培养。【结论】采用 1 g/L XI 型胶原酶单一酶热消化法或先胰蛋白酶后 XI 型胶原酶 2 步酶消化法,分离山羊卵巢间质细胞的效果均较好,可作为试验用卵巢间质细胞的理想分离方法。

【关键词】 山羊;卵巢间质细胞;细胞分离;细胞培养

【中图分类号】 S827.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)11-0013-06

Comparison of the methods for isolating goat ovarian interstitial cells

QUAN Fu-sheng, YU Yuan, SU Hui-min, HUA Song, ZHENG Yue-mao,

LIU Jun, ZHANG Yong

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 Different methods for isolating goat ovarian interstitial cells (OICs) were compared in order to obtain adequate cells for *in vitro* culture in this study. 【Method】 The effect of isolation was investigated in different temperature(dissociation at 37 °C and at 4 °C respectively); methods of isolating goat OICs were compared by a single enzyme digestion treatment (collagenase type I, IV, XI and trypsinase + EDTA, at 37 °C) and two-step enzymatic digestion treatment. 【Result】 The results showed that dissociation at 37 °C could obtain adequate cells and save an amount of time than at 4 °C, but remained low cell viability rates; as a single enzyme digestion treatment, 1 g/L collagenase type XI was most suitable for culture *in vitro*; as a two-step enzymatic treatment, Group II (trypsinase 15 min first, then collagenase type XI 15 min) could obtain adequate cells with high viability rates, the digestion time and the time of first exchange of the total volume medium were shortened, and also suitable for culture *in vitro*. 【Conclusion】 The two methods of isolating goat OICs were satisfactory for experimental use by 1 g/L collagenase type XI digestion treatment and two-step enzymatic treatment (trypsinase 15 min first, then collagenase type XI 15 min) at 37 °C.

Key words: goat; ovarian interstitial cell; cell isolation; cell culture

卵巢既是卵子产生、生长并成熟的器官,也是脑垂体前叶分泌促性腺激素的靶器官之一,不仅具有

分泌生殖激素,维持雌性动物发情周期和妊娠的功能,而且还影响机体的内分泌、代谢及正常生理功能

* [收稿日期] 2009-03-24

[基金项目] 陕西省重点攻关项目“干细胞与家畜胚胎工程示范”(2006KZ05-G1)

[作者简介] 权富生(1964—),男,陕西扶风人,副教授,硕士,主要从事家畜胚胎工程及发育生物学研究。

[通信作者] 张 涌(1958—),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士,博士生导师,主要从事家畜胚胎工程及发育生物学研究。

的维持^[1]。在动物的发情周期和妊娠期,卵巢均会发生形态及生化变化^[2],在这些变化过程中,不仅卵泡和黄体的形态及功能发生改变^[3],而且卵巢间质细胞的增殖及内分泌功能也发生改变^[4-5]。从理论上探明卵巢间质细胞的增殖及内分泌功能,在发情周期和妊娠期发生变化的机理及调控因素,对进一步研究卵泡发育的调控、排卵、黄体形成和退化、卵巢萎缩、卵巢间质细胞瘤发病机理,以及在这些生理和病理过程中参与其中的激素及细胞因子作用机理均具有重要意义^[6-7]。卵巢间质区提供卵泡生长和发育的环境^[8],体外分离培养卵巢间质细胞对进一步研究卵泡募集、选择和优势化的机制,生殖激素对卵巢间质细胞分泌活动及体外生长的影响,优化其培养条件,探讨如多囊卵巢综合征、卵巢间质细胞瘤、卵巢上皮细胞癌等病理过程与卵巢间质细胞的关系具有重要意义^[9]。

利光辉等^[10]研究了家兔卵巢间质细胞的分离纯化方法,但到目前为止,对山羊卵巢间质细胞进行体外分离培养的研究还未见到。本试验对山羊卵巢间质细胞体外分离技术进行了初步研究,以期获得纯化的、有较高生长活性的山羊卵巢间质细胞,为进一步阐明山羊卵巢间质细胞的增殖、分化调节机制及生理作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

DMEM/F-12 培养液(体积比为 1:1),Gibco BRL 公司产品;D-Hank's 液和无钙镁 PBS 缓冲液,按使用说明配制,过滤除菌,于 4℃ 冰箱保存,备用;胰蛋白酶(1:250)、EDTA、新生牛血清(NBS),Gibco BRL 公司产品;青霉素及硫酸链霉素,哈尔滨制药总厂产品。其他试剂没有特殊说明均为 Sigma 的产品。

1.2 山羊卵巢的获取

山羊卵巢采自于西安市三桥肉联厂,山羊宰杀后 30 min 内取出卵巢,置于 20~38℃ 的保存液中,于 6 h 内运回实验室。卵巢保存液为含有青霉素、链霉素的灭菌生理盐水。

1.3 卵巢组织消化与间质细胞分离

1.3.1 卵巢的准备 将卵巢置于盛有 D-Hank's 液(含青霉素 100 μg/mL,链霉素 100 μg/mL)的烧杯中,浸泡 20~30 min;然后转入无菌平皿中除去卵巢周围的结缔组织及筋膜,并反复冲洗;再转入无菌青霉素瓶,用眼科剪刀将修剪好的卵巢组织剪碎。

1.3.2 卵巢组织消化与间质细胞的分离 (1)冷消化法。将 1.3.1 中处理好的卵巢组织移入装有消化液的 5 mL 离心管中,置于 4℃ 冰箱中消化至组织块边缘不整齐时,计时,收集中间层云雾状细胞计数,台盼蓝拒染法检查细胞活率。

(2)热消化法。将 1.3.1 中处理好的部分卵巢组织移入装有消化液的 5 mL 离心管中,置于 37℃ 消化,每隔 3~5 min 摇动 1 次。当观察到组织块的边缘不整齐时,加入等体积含体积分数 15% 新生牛血清(NBS)的 DMEM/F-12 培养液终止消化。然后静置 2~3 min,用吸管吸去上层液体(不要让组织块重新悬起),再加满 DMEM/F-12 培养液,剧烈摇动并用吸管吹打,分散组织块,收集滤液于离心管中,1 000 r/min 离心 10 min。加入 DMEM/F-12 培养液,将细胞团重新悬浮,再离心(条件同上)洗涤 2~3 次。收集中间层云雾状细胞并计数,台盼蓝拒染法检查细胞活率。

(3)单一酶消化法。只用 1 种消化液对 1.3.1 中处理好的卵巢组织进行消化。

(4)2 步酶消化法。将 1.3.1 中处理好的部分卵巢组织移入装有一种消化液的 5 mL 离心管中,约 15 min 后吸出消化的上清液,加少量 DMEM/F-12 培养液离心;再加入等量另一种消化液消化 15 min 后,1 000 r/min 离心 10 min,离心 2~3 次。收集中间层云雾状细胞并计数,台盼蓝拒染法检查细胞活率,最后用培养液调整活细胞浓度至 $5 \times 10^5 \text{ cm}^{-3}$,将制得的细胞悬液接种于加入 DMEM/F-12 培养液的培养皿中,置于光镜下观察消化效果。

1.4 试验设计

1.4.1 试验 1 取 5 g 处理好的卵巢组织,用 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA 消化液和 1 g/L XI 型胶原酶,分别按上述方法进行热消化和冷消化,当观察到组织块边缘不整齐时,记录总的消化时间,对所得细胞悬液中的细胞计数,台盼蓝拒染法检查细胞活率。

1.4.2 试验 2 取 5 g 处理好的卵巢组织,分别用 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA 消化液、1 g/L I 型胶原酶、1 g/L IV 型胶原酶和 1 g/L XI 型胶原酶进行热消化,当观察到组织块边缘不整齐时,记录总的消化时间,对所得细胞悬液中的细胞计数,台盼蓝拒染法检查细胞活率。

1.4.3 试验 3 取 5 g 处理好的卵巢组织采用 2 步酶消化法。2 步酶消化法分为 I 和 II 2 组试验。I 组为先加入 1 g/L XI 型胶原酶消化液热消化约 15

min 后,吸出消化的上清液,加少量 DMEM/F-12 培养液,1 000 r/min 离心 10 min;再加入等量 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA 消化液热消化 15 min 后,1 000 r/min 离心 10 min,离心 2~3 次,收集离心的细胞。Ⅱ组先加入 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA 消化液热消化,然后加入 1 g/L Ⅺ型胶原酶消化液,同上述方法进行热消化。收集中间层云雾状细胞并计数,台盼蓝拒染法检查细胞活率。

1.5 卵巢间质细胞的培养

将用不同消化方法得到的细胞用培养液调整活细胞浓度至 $5 \times 10^5 \text{ cm}^{-3}$,将悬液移入平衡好的 DMEM/F-12 培养基中,置于光镜下观察消化效果,并于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养,观察其生长情况,检验消化效果。

1.6 检测指标与方法

1.6.1 细胞计数^[11] 用血细胞计数板进行分离细胞的计数。

1.6.2 细胞活率的测定^[11] 制备细胞悬液并作适

当稀释,按 10 μL/mL 量加入体积分数 0.1% 台盼蓝溶液,混合均匀,静置 10 min(用台盼蓝染细胞时时间不宜过长,否则部分活细胞也会着色,从而干扰记数)。吸取混合液,滴入红细胞计数板内,3 min 内在显微镜下观察计数。凡折光性强而不着色者为活细胞,染蓝色者为死细胞,计数 1 000 个细胞,计算细胞活率。细胞活率/%=(视野中活细胞总数/视野中细胞总数)×100%。

2 结果与分析

2.1 不同消化条件对卵巢间质细胞分离的影响

2.1.1 冷消化法和热消化法 由表 1 可以看出,冷消化法和热消化法对卵巢间质细胞的消化效果不同。无论是用 1 g/L Ⅺ型胶原酶还是用 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA,热消化法得到的细胞数量均较冷消化法多,而细胞活率相对较低。冷消化法虽然可以制得细胞活率高的细胞悬液,但耗时多。

表 1 冷消化法和热消化法对卵巢间质细胞分离的影响

Table 1 Results of cold digestion and heating digestion

消化液 Concentration and type of digestive juice	方法 Method	时间/min	细胞计数/ ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) Cell count	细胞活率/% Cell viability
2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA 2.5 g/L Trypsinase +0.2 g/L EDTA	冷消化法 Cold digestion	480	2.21±0.48 B	60.00±5.50 a
	热消化法 Heating digestion	30	2.43±0.37 A	45.31±6.32 a
1 g/L Ⅺ型胶原酶 1 g/L Collagenase type Ⅺ	冷消化法 Cold digestion	720	1.95±0.53 B	95.25±2.74 b
	热消化法 Heating digestion	60	2.10±0.41 B	90.77±3.12 b

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$),标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$)。下表同。

Note: Values with different small letters within the same line have significant difference ($P<0.05$), values with different capital letters within the same line have extremely significant difference ($P<0.01$). The same as below.

2.1.2 单一酶消化法 单一酶消化法对卵巢间质细胞分离的影响见表 2。

表 2 单一酶消化法对卵巢间质细胞分离的影响

Table 2 OICs digestion results of single enzyme digestion

消化液 Concentration and type of digestive juice	热消化时间/min Time of heating digestion	细胞计数/($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) Cell count	细胞活率/% Cell viability
2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA 2.5 g/L Trypsinase + 0.2 g/L EDTA	30	2.43±0.37 A	45.31±6.32 c
1 g/L I 型胶原酶 1 g/L Collagenase type I	45	1.51±0.23 C	70.32±4.75 b
1 g/L IV 型胶原酶 1 g/L Collagenase type IV	60	1.34±0.12 C	86.74±3.71 a
1 g/L Ⅺ型胶原酶 1 g/L Collagenase type Ⅺ	60	2.10±0.41 B	90.77±3.12 a

由表 2 可知,用热消化法时,2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA 消化液所得的细胞数量较多,但细胞活率平均为 45.31%,低于 60%,且细胞黏度大,易聚集成团,不能直接用于体外培养;用 1 g/L

I 型胶原酶消化所得细胞活率为 70.32%,完整细胞数目较少,也不适合直接用于体外培养;用 1 g/L IV 型胶原酶消化所得细胞数量最低,活率为 86.74%,接近 90%可培养,首次换液时间可延长至

48 h;用 1 g/L XI 型胶原酶消化所得细胞数量较多,细胞活率平均为 90.77%,适合于体外培养,首次换液时间为 24 h,相对于 1 g/L IV 型胶原酶短。可知以 1 g/L XI 型胶原酶分离卵巢间质细胞效果最佳。

2.1.3 2 步酶消化法 采用 2 步酶热消化法所得

表 3 2 步酶消化法对卵巢间质细胞分离的影响

Table 3 OICs digestions results of two step digestion

2 步酶消化法 Two-step enzymatic digestion	热消化时间/min Time of heating digestion	细胞计数/($\times 10^6$ mL $^{-1}$) Cell count	细胞活率/% Cell viability
I 组 Group I	30	2.00 $\pm$ 0.35 A	86.35 $\pm$ 3.75 a
II 组 Group II	30	1.83 $\pm$ 0.23 B	90.12 $\pm$ 3.43 a

2.2 卵巢间质细胞的体外生长方式与形态特征 见图 1。

不同方法分离的卵巢间质细胞的显微观察结果

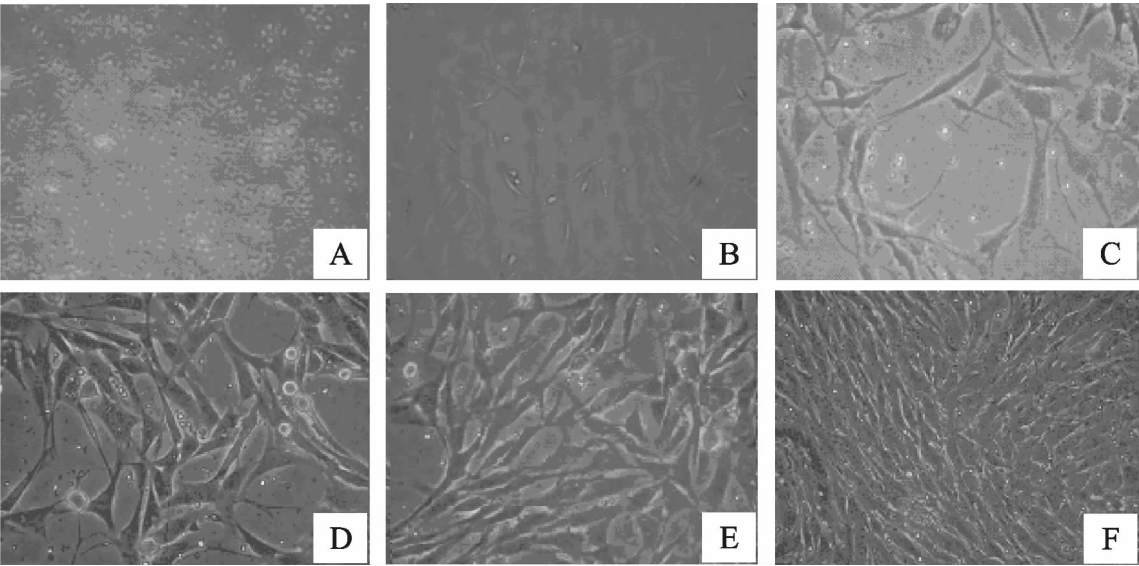


图 1 光镜下不同方法分离的卵巢间质细胞形态的显微观察

A. 未贴壁的卵巢间质细胞($\times 100$);B. 贴壁的卵巢间质细胞($\times 100$);C. 光镜下胰蛋白酶消化,以 5×10^5 cm $^{-3}$ 细胞密度接种后 72 h 贴壁的卵巢间质细胞($\times 200$);D. XI 型胶原酶消化,以 5×10^5 cm $^{-3}$ 细胞密度接种后 72 h 贴壁的卵巢间质细胞($\times 200$);E. 2 步酶消化法(先 XI 型胶原酶,后胰蛋白酶)消化,以 5×10^5 cm $^{-3}$ 细胞密度接种后 72 h 形成的贴壁卵巢间质细胞($\times 200$);F. 2 步酶消化法(先胰蛋白酶,后 XI 型胶原酶)消化,以 5×10^5 cm $^{-3}$ 细胞密度接种后 72 h 形成的贴壁卵巢间质细胞($\times 200$)

Fig.1 Microscopic observation on morphology of OICs isolated by different methods at light microscopic level

A. Unattached OICs($\times 100$);B. Attached OICs($\times 100$);C. Attached OICs at light microscopic level,cultured at the density of 5×10^5 cm $^{-3}$, 72 h after digestion by trypsinase($\times 200$);D. Attached OICs at light microscopic level,cultured at the density of 5×10^5 cm $^{-3}$, 72 h after digestion by collagenase type XI($\times 200$);E. Attached OICs at light microscopic level,cultured at the density of 5×10^5 cm $^{-3}$, 72 h after two-step enzymatic digestion by collagenase type XI 15 min first,then trypsinase 15 min($\times 200$);F. Attached OICs at light microscopic level,cultured at the density of 5×10^5 cm $^{-3}$, 72 h after two-step enzymatic digestion by trypsinase 15 min first,then collagenase type XI 15 min($\times 200$)

显微镜下,刚接种于 DMEM/F-12 培养液还未贴壁的卵巢间质细胞(图 1-A)呈卵圆形,散在时常呈梭形,接种后 18~24 h 开始贴壁,48 h 内大部分贴壁(图 1-B),生长成单层需 7~8 d。体外培养的贴壁卵巢间质细胞呈不规则形状,细胞核明显,有的细胞内还有双核甚至多核(图 1-C)。边缘不整齐,有多个突起,形成网状,细胞之间界限不清楚(图 1-

细胞活率均较高,且可获得足量的完整细胞,相对于单一酶消化法耗时较短,用先胶原酶后胰蛋白酶组首次换液时间需延长至 48 h;而先胰蛋白酶后胶原酶组首次换液时间为 24 h,相对较短。

D),有的核仁清晰,数目不等,多数 3~4 个核仁,有的更多(图 1-E);有的呈梭形(图 1-F),此类细胞看不到细胞核,长成单层的细胞之间几乎没有空隙。在同一细胞密度下(5×10^5 cm $^{-3}$)接种培养 72 h 后,用 2 步酶消化法(先胰蛋白酶,后 XI 型胶原酶)可获得足量的完整细胞,而得到的细胞较胰蛋白酶消化法、XI 型胶原酶消化法和 2 步酶消化法(先 XI 型胶原

酶,后胰蛋白酶)得到的细胞贴壁生长情况更好,适合培养(图 1-E,F)。

3 讨论与结论

本试验发现,采用 1 g/L XI 型胶原酶和 2.5 g/L 胰蛋白酶 + 0.2 g/L EDTA 消化液,用热消化法得到的细胞数量较冷消化法多,但细胞活率较低;不论冷消化法还是热消化法,采用 XI 型胶原酶消化液,均可以得到足量的、细胞活率高的细胞悬液,但冷消化法耗时多,用热消化法分离出细胞能够很好地贴壁,适于细胞培养,所以采用热消化法分离卵巢间质细胞比较理想。另外,本研究发现,热消化过程中,每隔 3~5 min 摇动 1 次消化用离心管,对促进胶原网架的解离降解及细胞完全脱落和缩短消化时间非常重要。

在细胞分离过程中,胶原酶的主要作用是使细胞间质的脯氨酸多肽水解,从而使细胞离散^[11-12]。胰蛋白酶在水解蛋白质时,作用于由赖氨酸或精氨酸羧基形成的肽键,除去细胞间粘蛋白及糖蛋白,影响细胞骨架,从而使细胞分离^[13]。本试验中,用热消化法及 2.5 g/L 胰蛋白酶 + 0.2 g/L EDTA 消化液所得细胞数量较多,但细胞活率低于 60%,且细胞黏度大,容易聚集成团,不能直接用于体外培养,这可能是由于细胞被消化破碎后,细胞内容物释放,尤其是 DNA 裂解,导致细胞发生粘连^[14-15]。Casslen 等^[16]在消化过程中加入 0.15 g/L DNA 酶,以消化粘连细胞的透明胶状物质,使更多的细胞消化。本试验中,用 1 g/L XI 型胶原酶在 37 ℃ 消化 60 min 左右可较好地分离卵巢间质细胞,对细胞的损伤小,可获得适合于培养的卵巢间质细胞,且培养时贴壁率高。2.5 g/L 胰蛋白酶 + 0.2 g/L EDTA 与 1 g/L XI 型胶原酶相比,结合细胞吹打,前者更适合于卵巢间质细胞的消化传代。本试验结果表明,胰蛋白酶消化后获得的细胞数目多,但活力差。因胶原酶消化的是细胞间质,不如胰蛋白酶对细胞的活力影响大,故获得的细胞活率高。

组织细胞分离中,酶消化程度是一个关键因素,消化程度不足,很难获得足量细胞用于接种;消化过度则对细胞的活性损伤较大,并有部分细胞漂浮,消化细胞随弃去的胰蛋白酶流失^[17-18]。鉴于此,除了试验中密切观察组织块的边缘是否整齐外,还应待边缘出现模糊时即取上清液置于光镜下观察消化效果,防止消化程度不足或过度。笔者在反复试验的基础上,摸索出了采用 2 步酶消化法(先胰蛋白酶,

后 XI 型胶原酶)在体外条件下对山羊卵巢间质细胞进行体外分离:第 1 步利用胰蛋白酶的非特异性消化作用,破坏蛋白质大分子间的键连接结构,以提高后续消化的效果^[11];第 2 步利用胶原酶针对性消化胶原网架,获得活率较高的山羊卵巢间质细胞。采用 2 步酶热消化法所得细胞活率高,也可获得足量的完整细胞,而且相对于单一酶消化法耗时短(只有 30 min),其中先 XI 型胶原酶后胰蛋白酶组首次换液时间延长至 48 h,提示胰蛋白酶影响了细胞的贴壁和生长,而先胰蛋白酶后 XI 型胶原酶组首次换液时间为 24 h,相对较短,可作为本试验的最佳消化方案。

卵巢间质由多种细胞组成,不同的生理时期,卵巢间质的形态、组成和功能等不同,表现出很大的异质性。卵巢间质细胞详细分类又可分为初级间质细胞(PIC)、膜间质细胞(TICS)、次级间质细胞(SICS)及卵巢间质细胞(HICS) 4 类^[17-18]。不同生理阶段、年龄及细胞类型的分离纯化方法,还有待于进一步研究。

本研究结果表明,单一酶热消化法中,以 1 g/L XI 型胶原酶分离卵巢间质细胞的效果较佳,适合体外培养;2 步酶消化法以先胰蛋白酶后胶原酶组分离出的细胞活力好,贴壁快,适合体外培养。

[参考文献]

- [1] Liu D L, Zhu C. Regulation of ovarian function by the matrix metalloproteinase system [J]. Chinese Science Bulletin, 2002, 47(14): 1145-1149.
- [2] Walter E. Physiology and pharmacology of female reproduction under the aspect of fertility control [J]. Biochemistry and Experimental Pharmacology, 2004, 35(67): 459-463.
- [3] Francois M, Glen V D K. Inhibition of gonadotropin-stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleost fish [J]. Lipids, 1995, 30(6): 79-87.
- [4] Marlen L, Daniel E R, Andrew E B, et al. Effects of ovarian hormones and aging on respiratory sinus arrhythmia and breathing patterns in women [J]. Clinical Autonomic Research, 2008, 18(3): 174-181.
- [5] Mitchell W R, Lindburg D G, Shideler S E, et al. Sexual behavior and urinary ovarian hormone concentrations during the lowland Gorilla menstrual cycle [J]. International Journal of Primatology, 1985, 6(2): 226-237.
- [6] Jessica W, McAllister J. Ovarian steroidogenic abnormalities in PCOS [J]. Endocrine, 1999, 11(3): 219-227.
- [7] Kalashnikov V V, Borisenko S A, Tatarinov Y S. Immunohistochemical identification of a new embryonic antigen in ovarian tumor tissue [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1976, 81(6): 362-365.

[8]

Andrea L V,Linda F C,Ramakrishnan S. Phenotypic variations and differential migration of NIH;OVCAR-3 ovarian carcinoma cells isolated from athymic mice [J]. Clinical and Experimental Metastasis,1995,13(3):163-169.

[9]

Seval T,Cem F,Serap Y,et al. The effect of metformin treatment to ovarian response in cases with PCOS [J]. Archives of Gynecology and Obstetrics,2004,269(2):1125-1131.

[10]

利光辉,陈秀荔,靳亚平,等. 家兔卵巢间质细胞的分离培养与形态观察 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(8):85-88.
Li G H,Chen X L,Jin Y P,et al. *In vitro* culture and morphological observation of ovarian interstitial cells in rabbit [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2004, 32(8): 85-88. (in Chinese)

[11]

司徒镇强. 细胞培养 [M]. 西安:世界图书出版公司,2007:49-65.
Situ Z Q. Cell culture [M]. Xi'an: World Publishing Corporation,2007:49-65. (in Chinese)

[12]

孙锡金,胡志奇,易 斌. 两步酶消化法分离培养大鼠触须毛囊上皮细胞 [J]. 中国比较医学杂志,2006,16(10):621-624.
Sun X J,Hu Z Q,Yi B. Isolate and culture follicular epithelial cells from rat vibrissa follicles by two-step digestion treatment [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine,2006,16(10): 621-624. (in Chinese)

[13]

Aquilano D R,Dufau M L. Functional and morphological studies on isolated Leydig cells;Purification by centrifugal elutriation and metrizamide fractionation [J]. Endocrinology,1984,114(2):499-510.

[14]

Fraser C A,Hall M R. Studies on primary cell cultures derived from ovarian tissue of *Penaeus monodon* [J]. Methods in Cell Science,1999,12(4):462-471.

[15]

Dirami G,Poulter L W,Cooke B A. Separation and characterization of macrophages and leydig cells from rat testes [J]. Journal of Endocrinology,1988,119 (Suppl.):132.

[16]

Casslen B G,Siler T M,Harper J K. Prongestron regulation of prolaction release from human endometrial stromal cells in culture;potential bioassay for progestational activity [J]. Acta Endocrinology,1990,122(1):137-144.

[17]

Magoffin D A,Erickson G F. Purification of ovarian theca-interstitial cells by density gradient centrifugation [J]. Endocrinology,1988,122(5):2345-2347.

[18]

Austyn J M,Hankins D F,Larsen C P,et al. Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney [J]. Journal of Immunology,1994,152(5):2401-2410.

(上接第 12 页)

[13]

刘伯华,刘湘涛,韩雪清,等. 急、慢性猪瘟病毒分离株和疫苗株 E2 基因的序列分析 [J]. 畜牧兽医学报,2001,32(6):568-575.
Liu B H,Liu X T,Han X Q, et al. Analysis of E2 genes nucleotide sequences of prevalent virulent from acute and chronic viral strains and C-strain from cell culture of Hog Cholera Virus [J]. Acta Veterinariaet Zootechnica Sinica,2001,32(6): 568-575. (in Chinese)

[14]

张永国,张彦明,邢福珊,等. 猪瘟流行野毒株 E2 基因编码的 gp55 蛋白模拟分析 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2003,31(5):128-132.
Zhang Y G,Zhang Y M,Xing F S,et al. Simulation analysis of Ea gene code gp55 protein of classical swine fever virus [J]. Jour of Northwest A&F Univ:Nat Sci Ed,2003,31(5):128-132. (in Chinese)

[15]

王 琴,王在时,赵 耘,等. 12 株猪瘟病毒 E2 基因主要抗原区域的序列差异分析 [J]. 微生物学报,2000,40(6):614-621.
Wang Q,Wang Z S,Zhao Y,et al. Nucleotide sequence analysis of E2 major protective antigen encoding region of 12 strains of hog cholera virus (HCV) [J]. Acta Microbiologica Sinica,2000,40(6):614-621. (in Chinese)

[16]

韩雪清,李红卫,刘湘涛,等. 中国猪瘟兔化弱毒株(C 株)兔脾组织毒主要保护性抗原 E2(gp55)基因序列分析 [J]. 畜牧兽医学报,2001,32(1):52-57.
Han X Q,Li H W,Liu X T,et al. Sequence analysis of major protective antigen E2(gp55)gene of chinese hog cholera lapinised virus directly from rabbit spleen tissue(C strain) [J]. Acta Veterinariaet Zootechnica Sinica,2001,32(1):52-57. (in Chinese)

[17]

赵 耘,王在时,王 琴,等. 22 株猪瘟病毒 E2 基因部分编码序列的序列分析 [J]. 微生物学通报,2001,28(5):42-48.
Zhao Y,Wang Z S,Wang Q,et al. Sequence analysis of the piratical coding of E2 gene of 22 hog cholera virus strains [J]. Microbiology Bulletin,2001,28(5):42-48. (in Chinese)