

网络出版时间:2019-09-09 17:25 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.03.002
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190909.1723.004.html>

鸡胚小肠上皮细胞的分离培养及其热应激效应

王菊花^a, 张栗子^a, 刘丹丹^a, 王佳明^a, 刘琦^a, 董静^a, 周杰^a, 薛秀恒^b

(安徽农业大学 a 动物科技学院, b 茶与食品学院, 安徽 合肥 230036)

【摘要】【目的】比较不同消化酶对鸡胚小肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)的分离和培养效果及细胞的热应激能力, 为后续研究提供依据。【方法】以 15 日龄鸡胚为研究对象, 分别使用 0.5 g/L 胰蛋白酶、胶原酶 I 与透明质酸酶联合及中性蛋白酶 II 消化分离其小肠上皮细胞。培养不同时间后, 观察 IECs 的生长状态, 测定细胞生长活性; 通过免疫荧光染色和免疫组化对所得 IECs 进行鉴定, 确定最佳的消化酶。对优化所得鸡胚 IECs 于 42 ℃ 分别进行 2, 3, 4 h 热应激处理, 以 37 ℃ 处理的 IECs 为对照, MTT 法和流式细胞测定 IECs 的相对活力和凋亡率。【结果】细胞形态学观察发现, 用胶原酶 I 与透明质酸酶联合消化分离得到了大量小肠绒毛隐窝团块, 易贴壁, 细胞生长快; 用 0.5 g/L 胰蛋白酶和中性蛋白酶 II 消化分离得到的细胞数量少, 贴壁慢。用 3 种酶消化方法分离的细胞生长曲线均呈“S”形, 但用胶原酶 I 与透明质酸酶联合消化分离的细胞生长曲线峰值较高, 细胞活性强; 联合消化所得 IECs 特异性标记抗原均为阳性, 免疫荧光阳性率达(92.7±7.9)%, 细胞膜质呈棕黄色, 而对照组细胞膜质无着色。42 ℃ 下热应激 3 h 后细胞活力极显著下降, 凋亡率为(35.96±1.57)%, 极显著高于对照组的(0.67±0.02)%, 可进行后续试验。【结论】采用胶原酶 I 与透明质酸酶联合消化可得到 IECs; 42 ℃ 下处理 3 h 是构建 IECs 热应激模型的条件。

【关键词】 鸡胚; 小肠上皮细胞; 酶消化法; 分离培养; 热应激

【中图分类号】 S831.1; Q813.1⁺1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2020)03-0009-07

Isolation, culture and heat stress effect of chicken intestinal epithelial cells

WANG Juhua^a, ZHANG Lizi^a, LIU Dandan^a, WANG Jiaming^a,
LIU Qi^a, DONG Jing^a, ZHOU Jie^a, XUE Xiuheng^b

(a College of Animal Science and Technology, b College of Tea & Food Technology,
Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036, China)

Abstract: 【Objective】 This study compared the isolation and culture effects of different digestive enzymes on intestinal epithelial cells (IECs) of chicken embryo and their heat stress ability to provide basis for further research. 【Method】 The intestinal tissues of 15-day-old chicken embryos were digested and separated by 0.5 g/L trypsin, collagenase I + hyaluronidase and neutral protease II. After culturing for different time periods, the growth status of IECs was observed by morphology and the growth activity was determined. The IECs were identified by immunofluorescence staining and immunohistochemistry, and the optimal digestive enzymes were determined. The chicken embryo IECs obtained by the optimized method was treated with heat stress for different time periods. The IECs of chicken embryos were treated with heat stress at 42 ℃ for 2, 3 and 4 h. The relative activity and apoptotic rate of IECs were determined by MTT and flow cytometry using those of IECs treated at 37 ℃ as control. 【Result】 Morphological observation

【收稿日期】 2019-02-05

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31001019); 安徽省自然科学基金项目(1708085MC81); 安徽省重点研发项目(1704a-07020069)

【作者简介】 王菊花(1975—), 女, 内蒙古锡盟人, 教授, 主要从事动物营养生理学研究。E-mail: wjhxxh@163.com

【通信作者】 薛秀恒(1975—), 男, 内蒙古乌兰察布人, 副教授, 主要从事动物食品质量安全研究。E-mail: xuexiuheng@126.com

showed that a large number of small intestinal villous recess masses were obtained by digestion and isolation with collagenase I and hyaluronidase, which were easy to adhere to and grew fast. Digestion and isolation with 0.5 g/L trypsin and neutral protease II obtained a small number of cells and slowed adherence. The growth curves of the cells digested and separated by three enzymes were in “S” type, but the peak value of the growth curves digested and separated by collagenase I and hyaluronidase was higher and the cell activity was stronger. The specific marker antigens of the intestinal epithelial cells digested by the three enzymes were positive, and the positive rate of immunofluorescence was $(92.7 \pm 7.9)\%$. The cell membrane and cytoplasm were brown and the cells in the control group were not stained. The cell viability was significantly decreased under 42 °C after 3 hours, and the apoptotic rate $(35.96 \pm 1.57)\%$ was significantly higher than that of the control group $(0.67 \pm 0.02)\%$. 【Conclusion】 The intestinal epithelial cells digested by collagenase I and hyaluronidase can be used in IECs heat stress model after heat stress treatment at 42 °C for 3 hours.

Key words: chicken embryo; intestinal epithelial cell; enzymatic digestion; isolation and culture; heat stress

动物小肠是营养物质消化与吸收的主要部位。小肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)作为肠道内重要的功能细胞,是肠道内外环境的媒介,也是机体免疫屏障的重要组成部分,具有消化、吸收、分泌、免疫等生理功能^[1-3]。有关 IECs 的体外分离培养和相关研究应用越来越受到研究者的重视。目前,国内外学者利用不同酶对人和多种动物的肠道上皮细胞进行了分离培养,并成功建立了肠上皮细胞系。Aldhous 等^[4]和 Brandsch 等^[5]分别使用胶原酶 IV 型及胶原酶和中性蛋白酶对人肠道上皮细胞进行了分离消化和培养; Hou 等^[6]使用 0.1% 胶原酶 I 和透明质酸酶分离得到小鼠肠上皮细胞;韩庆广等^[7]则用组织块培养法分离纯化出增殖能力较强的小鼠肠道上皮细胞,并进行了传代纯化;詹康等^[8]也曾使用组织块法获得生物学功能稳定的猪小肠上皮细胞系,并正常传代至 11 代;Li 等^[9]从新生猪空肠中分离培养出肠上皮细胞,并建立了稳定的细胞系;刘飞飞等^[10]用胶原酶 IV 消化分离培养了兔 IECs。鸡 IECs 难以获取,目前尚未商品化,阻碍了相关研究,有关鸡 IECs 分离和体外培养及细胞系建立的研究也鲜见报道。

随着全球气温的普遍升高,热应激所导致的生产性能下降和死亡率提高,对养鸡业集约化发展造成的影响已越来越严重^[11-12]。在各种应激过程中,胃肠道最早发生缺血缺氧,又最迟得到恢复,因此易较早受损或衰竭。在动物试验过程中采集样本进行动物个体热应激研究存在许多不确定性,而利用细胞模型进行热应激研究具有培养周期短、生理及细胞状态一致、热应激试验条件能够精确控制等优势,且细胞对温度的变化敏感^[13]。因此建立体外 IECs

热应激模型,将有助于研究热应激对肠道的损伤机制。

本研究拟采用不同消化酶对鸡胚 IECs 进行分离和培养,对其进行形态学观察和免疫荧光染色鉴定,确定鸡胚 IECs 的体外原代培养方法,并观察热应激对鸡胚 IECs 培养特性的影响,旨在为后期研究鸡 IECs 结构、功能变化及其调控细胞模型的建立提供借鉴,同时也为筛选抗热应激药物及其作用机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

15 日龄无特定病原(SPF)鸡胚,购自安徽合肥立华畜禽有限公司,共计 200 枚。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS)和 Penicillin-Streptomycin Solution 购自 Hyclone 公司,0.5 g/L Trypsin-EDTA 购自 Gibco 公司,二甲基亚砷(DMSO)、噻唑蓝(MTT)购自 Biosharp 公司,中性蛋白酶 II、胶原酶 I、透明质酸酶、DAPI 及 AN-NEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自索莱宝公司,细胞角蛋白 18(CK18)单克隆抗体、羊抗鼠 FITC 荧光二抗、鼠 IgG 免疫组化检测试剂盒、DAB 显色试剂盒、苏木素均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 不同消化酶作用下鸡胚 IECs 的分离

将孵化至 15 日龄的鸡胚用酒精棉球擦拭后在超净台内无菌解剖,取出鸡胚小肠,用含 1% (体积分数)双抗(100 IU/mL 青霉素+100 mg/mL 链霉素)的 PBS 清洗小肠数次,剔除脂肪组织和肠系膜,

将组织移至灭菌的培养皿中,加入含1%(体积分数)双抗的PBS清洗小肠3~5次。用剪刀将小肠剪成 1 mm^3 碎片,静置5 min后,弃上清液。继续剪碎,加入含1%(体积分数)双抗的PBS清洗小肠碎片3~5次, $1\ 200\text{ r/min}$ 离心3 min,弃上清,取沉淀,分别用以下几种酶消化。

1.3.1 0.5 g/L 胰蛋白酶 向沉淀中加入3 mL 0.5 g/L 胰蛋白酶, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化20 min,其间每5 min振荡1次, $1\ 200\text{ r/min}$ 离心3 min,弃上清,所得沉淀用适量完全培养液重悬,用孔径0.075 mm纱布过滤,取适量滤液接种于培养皿中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱内培养,48 h后换液。

1.3.2 胶原酶Ⅰ和透明质酸酶 向沉淀中加入3 mL 2 mg/mL 胶原酶Ⅰ和1 mg/mL 透明质酸酶(二者体积比1:1), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 消化1 h,其间每5 min振荡1次, $1\ 200\text{ r/min}$ 离心3 min,弃去上清液,所得沉淀用适量完全培养液重悬,用孔径0.075 mm纱布过滤,取适量滤液接种于培养皿中,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱内培养,48 h后换液。

1.3.3 中性蛋白酶Ⅱ 向沉淀中加入3 mL 中性蛋白酶Ⅱ,振荡和离心步骤同1.3.2。

1.4 体外培养鸡胚 IECs 的纯化

对1.3节分离所得鸡胚 IECs 依次用相差贴壁法和相差消化法纯化。

(1)相差贴壁法。根据IECs比成纤维细胞贴壁慢的特点,将细胞悬液接种到第一个培养瓶中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱中培养10 min,轻轻吸出全部培养液,再接种到新的培养瓶,反复多次,即可得到纯化的鸡胚 IECs。

(2)相差消化法。根据IECs和成纤维细胞对胰蛋白酶敏感性不同的特点,采用0.5 g/L 胰蛋白酶消化贴壁细胞,在倒置显微镜下观察细胞至皱缩发亮后,轻轻拍打培养瓶,一旦有细胞开始脱落,就用含10%(体积分数)胎牛血清的培养液终止消化,弃去培养液,继续用0.5 g/L 胰蛋白酶消化,即可得到纯化的鸡胚 IECs。

1.5 鸡胚 IECs 的鉴定

1.5.1 IECs 形态学观察 在倒置显微镜下观察各组鸡胚上皮细胞的生长状态及形态特征,并拍照记录。

1.5.2 IECs 生长曲线的绘制 用含10%(体积分数)胎牛血清的培养液配成单个细胞悬液,以每孔 $10^3\sim10^4$ 个细胞接种到96孔板,标好序号,每组6个复孔,每孔200 μL ;培养1,2,3,4,5,6,7 d时,每

孔加MTT溶液20 μL ,继续孵育4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,再加入150 μL DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解;490 nm波长下,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值,记录结果,以时间为横坐标、吸光度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.5.3 IECs 免疫组化鉴定 对1.3.2节所得的IECs进行免疫组化鉴定。在培养板中将已爬片的细胞用PBS浸洗3次,体积分数4%多聚甲醛固定10 min;体积分数0.5% Triton X-100室温通透20 min,滴加山羊血清室温封闭30 min;滴加稀释(1:200)的一抗(CK18单克隆抗体)并放入湿盒, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;PBS浸洗后,滴加稀释(1:200)的羊抗鼠FITC荧光二抗,湿盒中避光 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后,滴加DAPI避光孵育5 min,以不加一抗的处理作为阴性对照。然后在荧光显微镜下拍照记录,免疫荧光采用荧光检测,免疫组化采用DAB呈色。

1.6 热应激对 IECs 培养特性的影响

1.6.1 细胞活力 取对数期且生长良好的1.3.2节所得鸡胚 IECs,制成细胞悬液。分为 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热应激2,3和4 h组,以 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理的IECs为对照组,共4组细胞。标记后分别接种于96孔板中,边缘孔用无菌PBS填充。将接种好的96孔板放入 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱内分别培养2,3和4 h,对照组放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱内培养。MTT法检测细胞相对活力(细胞相对活力=处理组细胞 $\text{OD}_{490\text{ nm}}$ /对照组细胞 $\text{OD}_{490\text{ nm}}\times100\%$)。

1.6.2 IECs 凋亡率 采用流式细胞术 ANNEXIN V-FITC/PI双染法,将对照组和热应激3 h组的细胞继续在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5% CO_2 培养箱内培养24 h,对照组和热应激3 h组用ANNEXIN V-FITC/PI双染试剂染色后经流式细胞仪检测,并以不添加任何试剂的细胞作为空白组,记录各组细胞的十字门第四象限细胞百分比,以第四象限细胞百分比代表该组细胞凋亡率。

2 结果与分析

2.1 不同消化酶作用下鸡胚 IECs 的分离效果

2.1.1 0.5 g/L 胰蛋白酶 鸡胚小肠经0.5 g/L 胰蛋白酶消化分离培养后,从细胞形态和密度来看,24 h细胞贴壁生长,呈多角状或梭状(图1-A);3 d后,细胞夹杂大量梭状细胞(图1-B);5 d后,细胞活性明显降低,呈散在的单个细胞且夹杂梭状细胞生长,细胞贴壁和生长能力较弱(图1-C)。

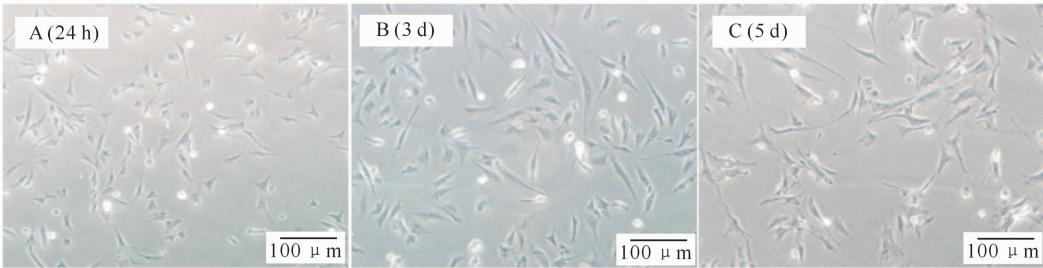


图 1 用 0.5 g/L 胰蛋白酶消化分离的鸡胚小肠上皮细胞
Fig. 1 Digestion and isolation of chicken embryo IECs by 0.5 g/L trypsin

2.1.2 胶原酶 I 和透明质酸酶 鸡胚小肠经胶原酶 I 和透明质酸酶联合消化分离培养后,得到大量健全隐窝单位,细胞培养 24 h 后即可贴壁(图 2-A)。细胞从分离得到的小肠隐窝团块处向外辐射,

细胞形态大多为扁平多角形或卵石状,且 3~5 d 细胞大量增殖,逐渐汇集成片,紧密相连,呈现出 IECs 典型的“铺路石状”(图 2-B,C)。

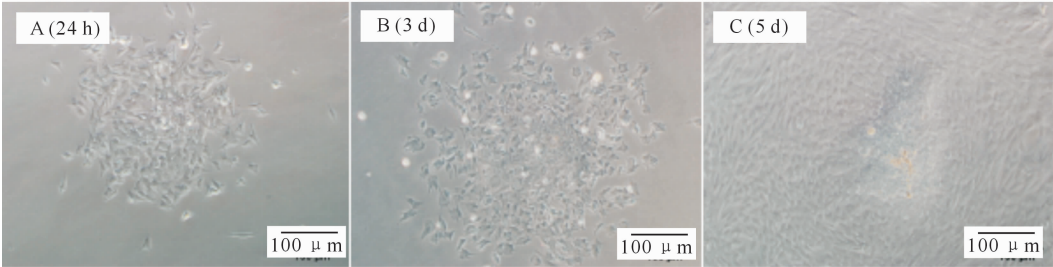


图 2 用胶原酶 I 和透明质酸酶联合消化分离的鸡胚小肠上皮细胞
Fig. 2 Digestion and isolation of chicken embryo IECs by collagenase I and hyaluronidase

2.1.3 中性蛋白酶 II 鸡胚小肠经中性蛋白酶 II 分离培养, 24 h 后细胞呈多角状或梭状,数量较少且无明显可见的小肠隐窝团块(图 3-A);3 d 后,细

胞多呈三角状或扁平多角状,梭状细胞较少(图 3-B);5 d 后仍无法汇集成片(图 3-C)。

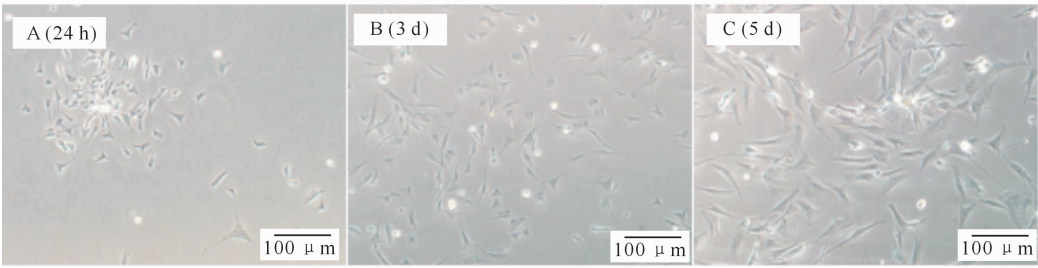


图 3 用中性蛋白酶 II 消化分离的鸡胚小肠上皮细胞
Fig. 3 Digestion and isolation of chicken embryo IECs by neutral protease II

2.2 3 种酶消化得到的鸡胚 IECs 的生长曲线

如图 4 所示,用 3 种酶消化培养的 IECs 生长曲线均呈现“S”形。1~3 d 细胞生长较缓慢;3~5 d 处于对数生长期,5 d 时到达顶峰;5~7 d 细胞退化衰亡。从细胞生长曲线峰值观察发现,3 种消化酶的分离效果表现为胶原酶 I 和透明质酸酶联合使用最优,中性蛋白酶 II 次之,0.5 g/L 胰蛋白酶最差。因此后续鉴定试验选择用胶原酶 I 和透明质酸酶联

合消化分离所得的细胞。

2.3 鸡胚 IECs 的鉴定

通过免疫荧光法,检测用胶原酶 I 和透明质酸酶联合消化培养 3 d 的鸡胚 IECs 发现,在荧光倒置显微镜下细胞有绿色荧光(图 5-A),细胞膜质均表达 CK18 特异性抗原,且 10 个视野中阳性细胞率可达 $(92.7\pm7.9)\%$;阴性对照组未见绿色荧光(图 5-D),阳性细胞率为 0。说明所分离细胞为 IECs。

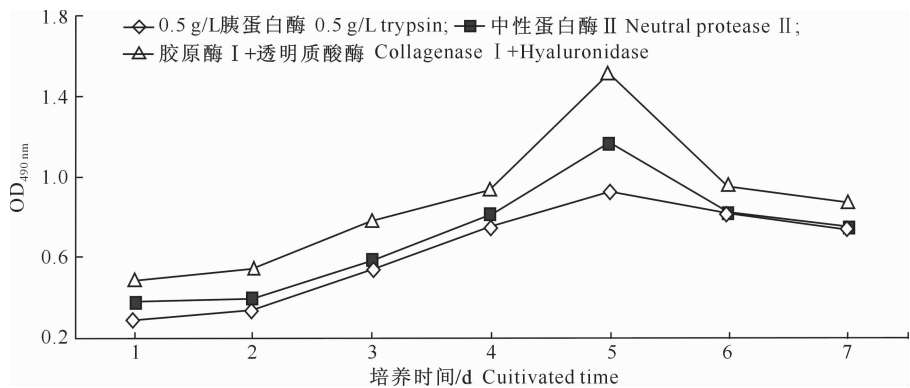
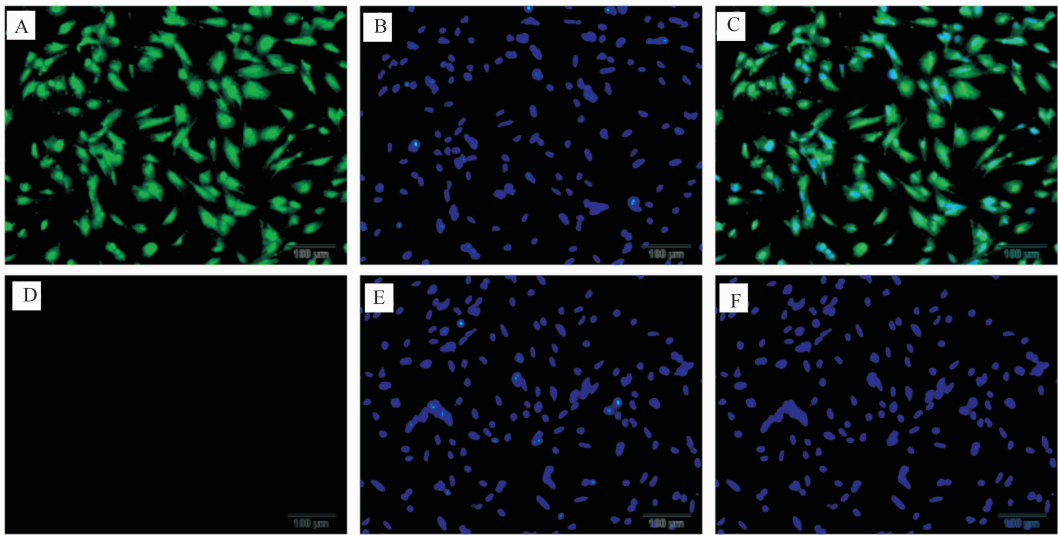


图 4 用 3 种酶消化得到的鸡胚小肠上皮细胞的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of chick IECs after digestion by three different enzymes

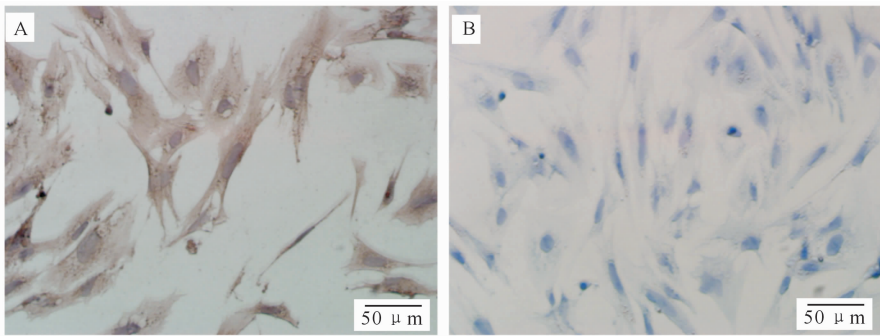


A. 细胞 FITC 染色;B. 细胞核 DAPI 染色;C. A、B 合成图;D. 对照组细胞 FITC 染色;E. 对照组细胞核 DAPI 染色;F. D、E 合成图
A. Cells stained by FITC;B. Cell nucleus stained by DAPI;C. Merged figure of A and B;D. Cells stained by FITC in control group;
E. Cell nucleus stained by DAPI in control group;F. Merged figure of D and E

图 5 鸡胚小肠上皮细胞的免疫荧光鉴定

Fig. 5 Immunofluorescence identification of chicken embryo IECs

对上述鸡胚 IECs 进行免疫组化检测,倒置显微镜下可见阳性细胞膜质呈棕黄色(图 6-A),而对照组细胞膜质无棕黄色着染,呈阴性(图 6-B)。



A. 细胞膜质染色阳性;B. 阴性对照
A. Positive result of cell membrane and cytoplasm staining;B. Negative control

图 6 鸡胚小肠上皮细胞的免疫组化鉴定

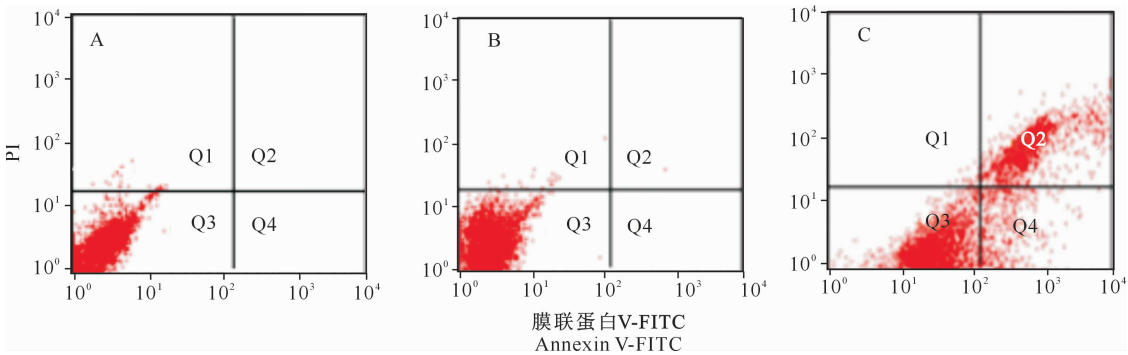
Fig. 6 Immunohistochemical identification of chicken embryo IECs

2.4 热应激对鸡胚 IECs 培养特性的影响

2.4.1 热应激时间对相对活力的影响 经检测发现,对照组细胞相对活力为 $(98.00 \pm 1.19)\%$,热应激 2, 3, 4 h 的细胞相对活力分别为 $(96.02 \pm 0.55)\%$, $(84.11 \pm 1.67)\%$ 和 $(78.46 \pm 1.61)\%$ 。可见 IECs 42 ℃ 热应激处理 2, 3 和 4 h 后,活力均呈下降趋势,热应激时间越长细胞活力越低。其中,热应激 2 h 组细胞相对活力与对照组无显著性差异($P > 0.05$);热应激 3 和 4 h 组细胞相对活力与对照组相

比均差异极显著($P < 0.01$)。表明细胞在 42 ℃ 下热应激处理大于 3 h 会导致其活力极显著下降,不利于后续试验。

2.4.2 热应激对凋亡率的影响 如图 7 所示,对照组 IECs 细胞凋亡率为 $(0.67 \pm 0.02)\%$,热应激 3 h 后,细胞在第四象限的比率显著提高,对应的凋亡率为 $(35.96 \pm 1.57)\%$,极显著高于对照组,说明热应激 3 h 时细胞凋亡率显著升高。



A. 空白组;B. 对照组;C. 热应激 3 h 组
A. Blank group;B. Control group;C. Heat stress 3 h group

图 7 热应激对鸡胚小肠上皮细胞凋亡率的影响

Fig. 7 Effect of heat stress on apoptosis rate of chicken embryo IECs

3 讨 论

3.1 鸡胚 IECs 的体外分离和培养

胚胎时期小肠黏膜组织较稚嫩,结构疏松,且肠道无内容物,可避免污染,易于肠上皮细胞的消化和体外分离培养,因此本研究选取 15 日龄鸡胚用于分离鸡 IECs。国内外许多研究表明,不同消化酶对 IECs 的分离效果不同。有研究者曾利用 2.5 g/L 胰蛋白酶分离消化人小肠组织,得到单细胞或较小的细胞团块,然而细胞生长能力较差^[14]。这可能是由于所用胰蛋白酶体积分数太高而导致细胞受损,进而出现细胞生长受阻。因此,本试验选用 0.5 g/L 胰蛋白酶分离消化鸡胚小肠组织,但得到的鸡胚 IECs 贴壁和生长能力仍较差,说明单一使用胰蛋白酶可能并不适合分离 IECs。有学者发现,用胰蛋白酶-EDTA 配合消化后,可获得生长状态良好的 IECs,并可用于后续试验^[15],相关原因仍有待进一步研究。

迄今有许多研究表明,用透明质酸酶和胶原酶单独或联合消化分离几种动物的 IECs,均取得良好的效果。利用透明质酸酶和胶原酶联合分别消化鸡^[16]和小鼠^[17]的小肠组织,均成功分离出 IECs,并

进行了细胞的原代培养。单独利用胶原酶对大鼠^[18]和牛^[19]肠道上皮细胞进行分离培养发现,用胶原酶单独消化可得到大量隐窝团块,细胞长势较好,但所需时间较长。本试验选用胶原酶 I 和透明质酸酶联合消化法,分离消化得到的鸡胚 IECs 活性高、细胞贴壁快、长势好、杂细胞少,3~5 d 即可汇集成片。因此,胶原酶 I 和透明质酸酶联合分离消化法适用于分离消化鸡胚 IECs。

此外,本研究团队曾使用 4 种方法分离小鼠 IECs 并培养,结果显示,嗜热菌蛋白酶消化法及胶原酶Ⅱ和中性蛋白酶 I 联合消化法均较适宜^[20],但利用这 2 种方法分离鸡胚 IECs 未取得理想效果。这可能是由于物种或组织来源的动物年龄不同所致,具体原因仍有待进一步探究。也有研究者发现,胶原酶Ⅱ和中性蛋白酶 I 联合消化培养得到的细胞大部分是小肠上皮细胞^[21]。因此,本试验选用中性蛋白酶Ⅱ消化培养鸡胚 IECs,但分离得到的细胞数量少、长势差,说明也不适用于分离鸡胚 IECs。

3.2 体外培养鸡胚 IECs 的鉴定

目前,鉴定 IECs 的方法主要有形态学、电镜观察、碱性磷酸酶染色法、免疫荧光和免疫组化鉴定等^[22]。其中最常用的是对上皮细胞的 CK18 抗原

进行检测。CK 主要分布于上皮细胞中,是角质细胞中的主要骨架蛋白,其主要功能是维持上皮组织的完整性及连续性。研究发现,CK 具有极高的保守性和组织分化特异性,与上皮细胞的增殖分化密切相关^[23]。本试验采用 CK18 单克隆抗体对鸡胚 IECs 进行了免疫荧光和免疫组化鉴定,结果显示,荧光显微镜下细胞发绿色荧光,对照组不显色;倒置显微镜下可观察到细胞膜质呈棕黄色,对照组细胞膜质不显黄色。说明本研究分离培养得到的是鸡 IECs。

3.3 鸡胚 IECs 的热效应

热应激可能会破坏细胞膜电位,同时热应激过程中产生的变性或聚合蛋白的积累,对细胞有毒害作用,阻滞细胞周期的正常进行,最终导致细胞活力降低^[24]。康玲等^[13]研究发现,42 ℃ 可能是影响细胞活力的临界点,当环境温度大于 42 ℃ 时,细胞活力无法恢复,最终引发细胞死亡。因此,本研究选取 42 ℃ 作为细胞热应激温度。秦士贞^[25]研究发现,热应激处理 2 和 4 h 为心肌细胞最佳热应激持续时间,据此本研究将热应激时间定为 2,3,4 h。结果表明,42 ℃ 下,随着热应激时间的延长,细胞活力逐渐降低,3 h 后细胞活力极显著下降,细胞凋亡率达 (35.96±1.57)%,极显著高于对照组的 (0.67±0.02)%。因此 42 ℃ 下处理 3 h 可作为后期建立细胞热应激模型的条件。

【参考文献】

- [1] 耿健,何刘,向志宇,等.应激对猪肠道免疫系统功能影响研究进展[J].动物医学进展,2017,38(12):107-110.
Geng J,He L,Xiang Z Y,et al. Progress on effect of stress on porcine intestinal immune system function [J]. Progress in Veterinary Medicine,2017,38(12):107-110.
- [2] 邹立军,熊霞,王小城,等.肠道隐窝-绒毛轴上皮细胞更新及调控机制研究进展[J].中国科学(生命科学),2017,47(2):190-200.
Zou L J,Xiong X,Wang X C,et al. Progress on intestinal recess-villi spinal epithelial cell regeneration and regulation mechanism [J]. Scientia Sinica (Vitae),2017,47(2):190-200.
- [3] Dirk H S,Inca H H,Claire A L,et al. Human small intestine is capable of restoring barrier function after short ischemic periods [J]. World Journal of Gastroenterology,2017,48(23):8452-8464.
- [4] Aldhous M C,Shmakov A N,Bode J,et al. Characterization of conditions for the primary culture of human small intestinal epithelial cells [J]. Clinical and Experimental Immunology,2001,125(1):32-40.
- [5] Brandsch C, Friedl P,Lange K,et al. Primary culture and transfection of epithelial cells of human small intestine [J]. Scandinavian Journal of Gastroenterology,1998,33(8):833-838.
- [6] Hou Q,Huang Y,Zhu S,et al. MiR-144 increases intestinal permeability in IBS-D rats by targeting OCLN and ZO1 [J]. Cell Physiol Biochem,2017,44(6):2256-2268.
- [7] 韩庆广,徐晓燕,赵国琦,等.小鼠小肠上皮细胞的分离培养研究[J].家畜生态学报,2009,30(1):48-51.
Han Q G,Xu X Y,Zhao G Q,et al. Studies on isolation and primary culture of mouse intestine epithelium [J]. Journal of Livestock Ecology,2009,30(1):48-51.
- [8] 詹康,左晓昕,陈银银,等.猪小肠上皮细胞分离培养与鉴定[J].动物营养学报,2015,27(5):1477-1484.
Zhan K,Zuo X X,Chen Y Y,et al. Isolation culture and identification of porcine intestinal epithelial cells [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition,2015,27(5):1477-1484.
- [9] Li W,Sun K J, Ji Y,et al. Glycine regulates expression and distribution of Claudin-7 and ZO-3 proteins in intestinal porcine epithelial cells [J]. The Journal of Nutrition,2016,146(5):964-969.
- [10] 刘飞飞,车东升,穆成龙,等.兔小肠上皮细胞体外分离培养[J].吉林农业大学学报,2011,33(4):429-432.
Liu F F,Che D S,Mu C L,et al. Isolation and primary culture of rabbit intestinal epithelial cell *in vitro* [J]. Journal of Jilin Agricultural University,2011,33(4):429-432.
- [11] 梁桂玲.肉鸡热应激的危害与综合防治[J].畜牧兽医科技信息,2018,1(10):135.
Liang G L. Damage and comprehensive control of heat stress in broilers [J]. Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,2018,1(10):135.
- [12] 李启黄,田佳迎,余哲琪,等.热应激对家禽 HPG 轴功能的影响及其缓解措施研究进展[J].动物医学进展,2018,39(9):87-91.
Li Q H,Tian J Y,Yu Z Q,et al. Progress on effects of heat stress on functions of HPG axis in poultry and its mitigation measures [J]. Progress in Veterinary Medicine,2018,39(9):87-91.
- [13] 康玲,胡丽蓉,李玮,等.冷热应激对牛 PBMC 和 MDBK 细胞活力及 HSP70 表达的影响[J].中国兽医学报,2018,38(7):1359-1365.
Kang L,Hu L R,Li W,et al. Effect of cold and heat stress on cell vitality and HSP70 expression in PBMC and MDBK of cattle [J]. Chinese Journal of Veterinary Science,2018,38(7):1359-1365.
- [14] 廖贤平,李敏.人类小肠上皮细胞原代培养方法探讨[J].武警医学,1998,9(5):251-253.
Liao X P,Li M. A method for primary culture of human intestinal epithelial cells [J]. Medical Journal of the Chinese People's Armed Police Forces,1998,9(5):251-253.
- [15] 杨文平,高峰,许辉堂,等.鸡肠上皮细胞体外原代培养研究[J].江西农业学报,2007,19(5):113-115.
Yang W P,Gao F,Xu H T,et al. Research on the primary culture of chicken intestinal epithelial cells *in vitro* [J]. The Journal of Jiangxi Agricultural University,2007,19(5):113-115.

- circular mRNAs [J]. RNA, 2015, 21(2): 172-179.
- [11] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(3): 256-264.
- [12] Lukiw W J. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD) [J]. Front Genet, 2013, 4: 307.
- [13] Bachmayr-Heyda A, Reiner A T, Auer K, et al. Correlation of circular RNA abundance with proliferation—exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues [J]. Sci Rep, 2015, 5: 8057.
- [14] Lu D, Xu A D. Mini review: circular RNAs as potential clinical biomarkers for disorders in the central nervous system [J]. Front Genet, 2016, 7: 53.
- [15] Guo J, Zhou Y, Cheng Y F, et al. Metformin-induced changes of the coding transcriptome and non-coding RNAs in the livers of non-alcoholic fatty liver disease mice [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(4): 1487-1505.
- [16] Gao Y, Wang J F, Zhao F Q. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for denovo circular RNA identification [J]. Genome Bio, 2015, 16: 4.
- [17] Li Y, Zheng Q P, Bao C Y, et al. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis [J]. Cell Res, 2015, 25(8): 981-984.
- [18] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140.
- [19] Michael, Catherine A, Judith A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology [J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 25-29.
- [20] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(Database Issue): D480-D484.
- [21] Lee S H, Park E W, Cho Y M, et al. Identification of differentially expressed genes related to intramuscular fat development in the early and late fattening stages of hanwoo steers [J]. J Biochem Mol Biol, 2007, 40(5): 757-764.
- [22] Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Tarca A L, et al. Characterization of visceral and subcutaneous adipose tissue transcriptome and biological pathways in pregnant and non-pregnant women; evidence for pregnancy-related regional-specific differences in adipose tissue [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0143779.
- [23] Leonardi R, Zhang Y M, Rock C O, et al. Coenzyme A; back in action [J]. Prog Lipid Res, 2005, 44(2/3): 125-153.
- [24] Li B, Qiao L, An L, et al. Transcriptome analysis of adipose tissues from two fat-tailed sheep breeds reveals key genes involved in fat deposition [J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 338.
- [25] Wang S, Song K, Srivastava R, et al. Nonalcoholic fatty liver disease induced by noncanonical Wnt and its rescue by Wnt3a [J]. FASEB J, 2015, 29(8): 3436-3445.
- [26] Qi X, Zhang D H, Wu N, et al. ceRNA in cancer: possible functions and clinical implications [J]. J Med Genet, 2015, 52(10): 710-718.

(上接第 15 页)

- [16] Kimmich G A. Isolation of intestinal epithelial cells and evaluation of transport functions [J]. Methods Enzymol, 1990, 192(22): 324-364.
- [17] Ren H J, Zhang C L, Liu R D, et al. Primary cultures of mouse small intestinal epithelial cells using the dissociating enzyme type I collagenase and hyaluronidase [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2017, 50(5): e5831.
- [18] Evans G S, Flint N, Somers A S, et al. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures [J]. Journal of Cell Science, 1992, 101(1): 219-231.
- [19] Follmann W, Weber S, Birkner S. Primary cell cultures of bovine colon epithelium; isolation and cell culture of colonocytes [J]. Toxicology in Vitro, 2000, 14(5): 435-445.
- [20] 王海霞, 匡伟, 赵国琦. 几种酶分离山羊小肠上皮细胞方法的比较 [J]. 家畜生态学报, 2007, 28(6): 9-12.
- Wang H X, Kuang W, Zhao G Q. Comparison of methods to generate viable goat intestinal epithelial cell by enzymes [J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2007, 28(6): 9-12.
- [21] 孙秀梅, 程帆, 刘维, 等. 4 种小鼠肠上皮细胞分离培养方法的比较 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(5): 25-31.
- Sun X M, Cheng F, Liu W, et al. Comparison of four primary culture methods for mouse intestinal epithelial cells [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2013, 41(5): 25-31.
- [22] 王静, 张彦明, 全钢, 等. 新生仔猪小肠上皮细胞的分离培养和鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(1): 92-98.
- Wang J, Zhang Y M, Tong G, et al. The isolation and identification of neonatal swine intestinal epithelial cells [J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2010, 41(1): 92-98.
- [23] Regezi J A, Deegan M J, Hayward J R. Lichen planus-immunologic and morphologic identification of the sub-mucosal infiltrate [J]. Journal of Dental Research, 1978, 46(1): 44-52.
- [24] Riezman H. Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? [J]. Cell Cycle, 2004, 3(1): 61-63.
- [25] 秦士贞. 锰对原代培养鸡胚心肌细胞的抗热应激效应及其分子机制研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- Qin S Z. Anti-heat stress effect of manganese on primary cultured chicken embryo cardiomyocytes and its molecular mechanisms [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.