

山羊腺垂体细胞的分离培养与鉴定

尹慧勇,赵晓娥,马保华

(西北农林科技大学 动物医学院,农业部家畜生殖生理和胚胎工程重点开放实验室,陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】探讨山羊腺垂体细胞的分离和培养方法,为其体外分泌特性研究奠定基础。【方法】采集山羊腺垂体,分别用胰蛋白酶、胶原酶、胰蛋白酶和胶原酶混合、胰蛋白酶和透明质酸酶混合对其进行消化,所获细胞培养后采用免疫细胞化学法进行鉴定,评价细胞消化结果和腺垂体细胞的生长特性。【结果】山羊腺垂体组织在 37 ℃ 条件下,以 1 g/L IV 型胶原酶和 1 g/L 透明质酸酶混合消化 2.5~3 h,消化效果较好;所得细胞在培养 24 h 开始贴壁,72 h 后细胞主要呈多角形或梭形,连接成片,培养 6 d 左右细胞即可铺满培养器皿的细胞生长面。免疫细胞化学鉴定结果显示,FSH 阳性细胞胞质呈蓝色,PRL 阳性细胞胞质呈蓝褐色;放射免疫分析法测定表明,分离、培养的腺垂体细胞具有激素分泌活性。【结论】采用筛选的消化和分离方法可获得山羊腺垂体细胞,所获腺垂体细胞体外培养体系,可用于体外研究腺垂体细胞的功能和内分泌调控作用。

【关键词】 腺垂体细胞;免疫细胞化学;放射免疫分析;山羊

【中图分类号】 Q813.1⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)01-0011-06

Isolation, culture and identification of goat anterior pituitary cells

YIN Hui-yong, ZHAO Xiao-e, MA Bao-hua

(Key Laboratory of Animal Reproductive Physiology and Embryo Biotechnology, Ministry of Agriculture,
College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This paper focuses on the establishment of a method of the goat anterior pituitary cells *in vitro*. It can set a basis for the study of secretion characteristics *in vitro*. 【Method】 The effects of different enzymes, including trypsin, collagenase IV, trypsin plus hyaluronidase, collagenase IV plus hyaluronidase on anterior pituitary in goat were discussed. Immunocytochemical staining identification was conducted and growing characters evaluated. 【Result】 The results showed that the tissues presented best digestion by 1 g/L collagenase IV plus 1 g/L hyaluronidase, at 37 ℃ 2.5—3 h; anterior pituitary cells became adherent after 24 h of culture; the form of spindle or polygonal cells were found after 72 h of culture; they covered petri dish after 6 d of culture. Immunocytochemical staining showed that the cytoplasm of positive FSH cells showed blue color, and the cytoplasm of PRL positive cells showed blue brown color, radioimmunoassay showed secrete activity. 【Conclusion】 The conclusion can be drawn that anterior pituitary cells can be obtained by the digestion and separation method suggested in this article. The system is a useful model for the study of function and endocrine regulation of goat anterior pituitary cells *in vitro*.

Key words: anterior pituitary cell; immunocytochemical; radioimmunoassay; goat

腺垂体是机体重要的内分泌腺体,由生长激素 细胞、促乳素细胞、促甲状腺细胞、促性腺激素细胞

* 【收稿日期】 2009-05-04

【基金项目】 陕西省科学技术研究发展计划(农业攻关)项目(2005K02-G4-1);农业部农业结构调整重大技术研究专项(05-07-03B)

【作者简介】 尹慧勇(1983—),男,河南驻马店人,在读硕士,主要从事动物胚胎工程和生殖内分泌研究。

E-mail: yinhuiyong830102@yahoo. com. cn

【通信作者】 马保华(1965—),男,陕西城固人,教授,博士,硕士生导师,主要从事动物胚胎生物技术与动物生殖毒理研究。

E-mail: mabh@nwsuaf. edu. cn

和促肾上腺皮质激素细胞等细胞构成^[1],在机体的生长发育、生命活动、内分泌调节以及衰老死亡过程中均具有重要意义。Vale 等^[2]建立了大鼠腺垂体细胞的单层培养模型,由于该模型在一定时间内保持了细胞的活力和功能,能在体外研究腺垂体细胞对促性腺激素释放激素的反应,因而被用于人和家畜的研究中。Krsmanovic 等^[3]用大鼠研究 GnRH 刺激促黄体素(Luteinizing hormone, LH)合成和分泌的机理, Farnworth 等^[4]用大鼠研究了肿瘤坏死因子 α 对垂体促性腺激素细胞的增殖作用, Baratta 等^[5]用绵羊研究了激活素和雌激素对促卵泡素(Follicle stimulating hormone, FSH)分泌的调节, Kawakami 等^[6]在猴上研究了卵泡抑素对 FSH 分泌的调节作用,但目前对山羊腺垂体细胞体外培养模型的研究鲜见报道。为了探讨山羊垂体促乳素(Prolactin, PRL)和 FSH 的分泌生理及其相互关系,本研究对山羊腺垂体细胞进行了分离培养,通过形态观察、免疫细胞化学、放射免疫分析等技术对其进行了鉴定,并根据其特定时期的分泌特性,建立了山羊腺垂体细胞的体外无血清培养模型,以期为进一步研究山羊腺垂体细胞体外分泌特性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 山羊垂体 山羊垂体来源于陕西杨凌示范区屠宰场秋冬季的成年母山羊,山羊临床检查健康,用肉眼观察其卵巢上黄体的有无,以判定其所处的生殖时期。

1.1.2 主要试剂 DMEM/Ham's F12 培养液、新生牛血清(Gibco), IV 型胶原酶、胰蛋白酶、透明质酸酶、HEPES、胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸盐、牛血清白蛋白 V 片段(Sigma),兔抗鼠 FSH 抗体、兔抗鼠 PRL 抗体、SABC 试剂盒、SABC-AP 试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司产品), PRL、FSH 和 LH 放射免疫测定试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司)。

1.1.3 培养液 基础培养液为添加 HEPES 10~15 mmol/L、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 IU/mL 的 DMEM/Ham's F12。在基础培养液中补加新生牛血清即为细胞生长培养液。无血清培养液为基础培养液加入胰岛素 5 μ g/mL、转铁蛋白 5 μ g/mL、亚硒酸盐 25 nmol/L、牛血清白蛋白 V 片段 0.003 g/mL。

1.2 山羊腺垂体的采集

无菌采集 3 个山羊垂体,置于无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的

磷酸盐缓冲液(PBS)中,在超净工作台内,用 PBS 冲洗数次,用眼科剪分离腺垂体,再用 PBS 冲洗数次洗净血迹,将腺垂体剪碎成约 1 mm³ 的小块,移入平皿中,用基础培养液吹洗数次。静置片刻待组织沉淀后,吸弃上清,再用基础培养液洗 2 次,以尽可能除去红细胞,备用。

1.3 山羊腺垂体组织的消化

1.3.1 胰蛋白酶消化 向上述平皿中加入 2.5 g/L 胰蛋白酶液 15 mL,于不同温度(37 $^{\circ}\text{C}$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$)和时间(37 $^{\circ}\text{C}$ 分别消化 0.5 和 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 分别消化 8 和 10 h)下进行消化,比较不同温度和时间下的消化率和细胞活率。

1.3.2 IV 型胶原酶消化 向上述平皿中加入 1 g/L IV 型胶原酶液 15 mL,于不同温度(37 $^{\circ}\text{C}$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$)和时间(37 $^{\circ}\text{C}$ 分别消化 1, 2 和 2.5 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 分别消化 8 和 10 h)下进行消化,比较不同温度和时间下的消化率和细胞活率。

1.3.3 IV 型胶原酶结合胰蛋白酶混合消化 向上述平皿中加入 1 g/L IV 型胶原酶和 2.5 g/L 胰蛋白酶的混合消化液 15 mL,于不同温度(37 $^{\circ}\text{C}$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$)和时间(37 $^{\circ}\text{C}$ 分别消化 0.5, 1 和 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 分别消化 8 和 10 h)下进行消化,比较不同温度和时间下的消化率和细胞活率。

1.3.4 IV 型胶原酶结合透明质酸酶混合消化 向上述平皿中加入 1 g/L(或 1.5 g/L) IV 型胶原酶和 1 g/L 透明质酸酶的混合消化液 15 mL,于不同温度(37 $^{\circ}\text{C}$ 和 4 $^{\circ}\text{C}$)和时间(37 $^{\circ}\text{C}$ 分别消化 2, 2.5 和 3 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 分别消化 8 和 10 h)下进行消化,比较不同温度和时间下的消化率和细胞活率。

1.4 山羊腺垂体细胞的分离与培养

1.4.1 分离 消化结束后,向平皿中加入适量培养液(含体积分数 10% 血清)终止胰蛋白酶的作用。吹打混匀后,将细胞悬液经 150 μm 筛网过滤,除去粘液和未消化的组织,收集滤液,100 g 离心 10 min;含 IV 型胶原酶的滤液于 100 g 离心 8 min,弃上清,沉淀中加适量的培养液,用移液器头轻轻吹吸,100 g 离心 8 min,重复以上操作 3 次。

1.4.2 培养 收集沉淀细胞,加入适量细胞培养液(含体积分数 10% 血清)制成细胞悬液。台盼蓝检测细胞活率,调整活细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,按每孔 1 mL 接种到 24 孔培养板,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 、饱和湿度条件下培养。接种后 2 h 连同细胞吸出,并重新接种于另一 24 孔培养板内培养,培养 2 d 时更换为含体积分数 10% 血清的细胞培养液

继续培养,第 4 天更换为含体积分数 5% 血清的细胞培养液,第 5 天更换为含体积分数 2.5% 血清的细胞培养液,第 6 天更换为无血清细胞培养液。每隔 12 h 观察细胞贴壁和生长情况。

1.5 山羊腺垂体细胞的鉴定

待培养皿中的细胞铺满皿底后,用体积分数 4% 的多聚甲醛固定,以备鉴定。

1.5.1 FSH 细胞染色 以免抗鼠 FSH-β 抗体作为一抗,按 SABC 免疫组化染色试剂盒的说明进行免疫细胞化学染色,DAB 显色,核固红复染,显微镜下观察。凡细胞质染成蓝色者判为阳性细胞,未显蓝色者判为阴性细胞。

1.5.2 PRL 细胞染色 以免抗鼠 PRL 抗体为一抗,按 SABC-AP 免疫组化染色试剂盒说明进行免疫细胞化学染色,BCIP/NBT 显色,核固红复染,显微镜下观察。凡细胞质染为蓝褐色者判为阳性细胞,未显蓝褐色者判为阴性细胞。

1.6 山羊腺垂体细胞分泌功能的检测

细胞培养至第 7 天时,用 PBS 冲洗 3 次,用无血清培养液培养 6 h,收集培养液,在陕西省杨凌示范区医院,用放射免疫分析法测定培养液中 FSH、LH 和 PRL 的含量。测定 FSH 的灵敏度为 0.9 mIU/mL,批内变异系数为 5.5%,批间变异系数为 8.7%;测量 LH 的灵敏度为 1.0 mIU/mL,批内变异系数为 5.4%,批间变异系数为 7.5%;测量 PRL

的灵敏度为 0.9 ng/mL,批内变异系数为 5.4%,批间变异系数为 11.5%。重复测定 3 次,每次 3 孔。

1.7 数据处理

试验数据用“平均值±标准差(Mean±SEM)”表示,用 SPSS 13.0 for Windows 软件处理数据。

2 结果与分析

2.1 山羊腺垂体不同消化方案的消化效果

2.1.1 胰蛋白酶消化 在 37 ℃ 条件下,胰蛋白酶消化 30 min 左右的消化效果较差,得到的细胞量很少;消化 1 h 左右,所获得的细胞很少,液体粘性加大。在 4 ℃ 消化 10 h 消化效果差,液体粘性加大。

2.1.2 IV 型胶原酶消化 消化获得的细胞数量多,但液体粘性加大,不易过滤。

2.1.3 IV 型胶原酶结合胰蛋白酶混合消化 消化所获得的细胞数量多,但液体粘性加大,不易过滤,细胞活率低。

2.1.4 IV 型胶原酶结合透明质酸酶混合消化 消化所获细胞悬液粘度小,易过滤,镜下观察可见细胞大多单个存在,少量细胞聚成小团,细胞悬液中混杂有少量的红细胞(较腺垂体细胞小)。1 g/L 台盼兰染色表明,细胞活率在 92% 以上。IV 型胶原酶与透明质酸酶混合,于 37 ℃ 消化不同时间对山羊腺垂体的消化效果见表 1。

表 1 IV 型胶原酶与透明质酸酶混合消化对山羊腺垂体的消化效果

Table 1 Digestion results of goats anterior pituitary cells by collagenase IV plus hyaluronidase

IV 型胶原酶 质量浓度/(g·L ⁻¹) Enzyme concentration	消化温度/℃ Digestion temperature	消化时间/h Digestion time	消化率 Digestibility	细胞活率/% Cell motility
1.0	37	2	+	94
		2.5	++	92
		3	++	92
1.5	37	2	+	93
		2.5	++	92
		3	++	92

注:+,组织块边缘疏松,吹打后液体中度浑浊,消化率为 50%;++,组织块边缘疏松拉丝,吹打后液体明显浑浊,消化率为 85%~90%。
Note:+. The edge of the clumps continued to break down,after being blowed,the cultured medium appeared turbid. Digestibility was 50 percent;++. The edge of the clumps broke down and appeared filiform,after being suction,the cultured medium appeared obviously turbid. Digestibility was 85 percent to 90 percent.

由表 1 可知,1.0 和 1.5 g/L IV 型胶原酶与 1 g/L 透明质酸酶混合后,于 37 ℃ 消化 2.5~3 h 的效果较好,因此后续试验均采用 1.0 g/L 的 IV 型胶原酶和透明质酸酶混合后,于 37 ℃ 消化 2.5~3 h。

2.2 山羊腺垂体细胞的培养特性

用酶消化后的山羊腺垂体细胞呈圆形,遮光性较强。培养 24 h 后开始贴壁,48 h 后大多数细胞贴

壁生长,变平,向四周伸展,细胞周围伸出大量的突起(图 1A);72 h 后细胞主要呈多角形或梭形,连接成片,相邻细胞间重新建立了联系,可见圆形细胞核,核膜界限清晰,核仁分叶(图 1B);培养 4 d 左右细胞铺满皿底 80% 左右(图 1C);逐渐降低培养液中的血清浓度后,细胞生长缓慢,6 d 左右细胞可铺满皿底(图 1D)。

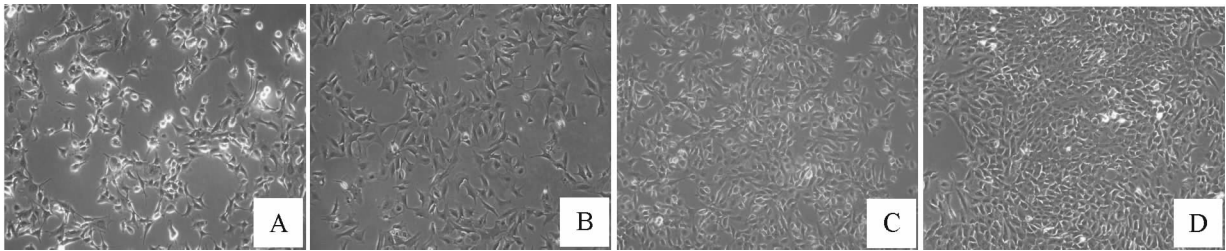


图 1 山羊腺垂体原代细胞的形态观察(×100)

A. 培养 48 h;B. 培养 72 h;C. 培养 4 d;D. 培养 6 d

Fig. 1 Investigation of goat anterior pituitary cells' morph cultured *in vitro* (phase-contrast, ×100)

A. The goat anterior pituitary cells on 48 h *in vitro* cultrue;B. The goat anterior pituitary cells on 72 h *in vitro* culture;

C. The goat anterior pituitary cells on 4 d *in vitro* cultrue;D. The goat anterior pituitary cells on 6 d *in vitro* cultrue

2.3 山羊腺垂体细胞的鉴定

免疫细胞化学染色结果显示,FSH 阳性细胞质

呈蓝色,核周染色尤重。PRL 阳性细胞胞质呈蓝褐色,阳性细胞聚集在一起呈团状生长。

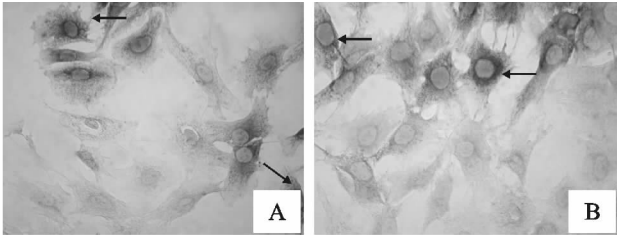


图 2 山羊腺垂体细胞的免疫细胞化学染色(×400)

A. FSH 染色; B. PRL 染色

Fig. 2 Immunocytochemical staining result of goat anterior pituitary cells(×400)

A. Positive for FSH;B. Positive for PRL

2.4 山羊腺垂体细胞分泌 FSH、LH 和 PRL 的含量

由表 2 可见,FSH 的分泌值为(8.81±0.21) mIU/mL,LH 的分泌值为(7.52±0.04) mIU/mL,

PRL 的分泌值为(29.05±3.20) ng/mL。表明无血清培养时,山羊腺垂体细胞在第 7 天具有较强的分泌能力。

表 2 山羊腺垂体细胞分泌 FSH、LH 和 PRL 的含量

Table 2 FSH,LH and PRL concentrations of goat anterior pituitary cells in culture

重复 Repeat	FSH/(mIU · mL ⁻¹)	LH/(mIU · mL ⁻¹)	PRL/(ng · mL ⁻¹)
1	8.87±0.11 a	7.55±0.15 a	29.97±2.71 a
2	8.99±0.66 a	7.63±0.60 a	27.69±3.16 a
3	8.58±0.25 a	7.39±0.19 a	29.48±2.53 a
平均 Average	8.81±0.21	7.52±0.04	29.05±3.20

注:同列数据后标注不同小写字母者表示差异显著(P<0.05)。

Note; Values in columns with different uperscripts differ significantly (P<0.05) .

3 讨 论

由于机械分散细胞的方法对腺垂体细胞损伤较大,故目前主要采用酶消化法分散腺垂体细胞^[7-8]。但不同动物采用的酶不同,在小鼠^[9]和大鼠^[2]上,常采用胰蛋白酶消化腺垂体;在牛^[10]和猪^[11]上,常采用胶原酶消化腺垂体;在绵羊上,Huang 等^[12]先用 3 g/L 的胶原酶,然后用 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化绵羊腺垂体细胞;马友记等^[13]用胰蛋白酶对绵羊腺

垂体进行消化。笔者参考 Gregory 等^[14]的方法,用不同种类的酶对绵羊的腺垂体细胞进行消化,并比较了不同酶和消化时间对消化效果的影响。结果表明,山羊腺垂体细胞消化需要的时间较长,使用胰蛋白酶消化对细胞的损伤较大,故不宜采用;而Ⅳ型胶原酶作用温和,对细胞的损伤小。本试验所采用的Ⅳ型胶原酶的 2 种质量浓度均可使用,但以采用 1 g/L Ⅳ型胶原酶和 1 g/L 透明质酸酶混合后、于 37℃消化 2.5~3 h 的效果较好。

单用胶原酶进行山羊腺垂体组织消化时,会出现大量的黏性胶状物质,而在使用胶原酶配合透明质酸酶混合消化时,这种现象消失。笔者认为,这种胶状物质主要是透明质酸,其能稳定胶原网状结构,保护和润滑腺垂体细胞免受破坏。笔者在培养皿底部平铺胶原蛋白Ⅰ对山羊腺垂体细胞进行培养,结果细胞贴壁和生长的速度远大于未铺胶原蛋白的山羊腺垂体细胞,表明山羊腺垂体细胞间质填充的物质主要是胶原。胶原酶和透明质酸酶混合使用,能快速溶解山羊腺垂体细胞间质,使细胞分离出来。

酶消化获得的腺垂体细胞经3~5 d培养后,还可见到形态不规则的成纤维细胞^[15],笔者依据这2种细胞贴壁速度的不同,对腺垂体细胞进行了纯化。腺垂体细胞含有多种细胞类型,为了后续研究的需要,本试验只选择性地鉴定了其中的促乳素细胞和促性腺激素细胞。在培养第1周,随着培养时间的延长,阳性细胞的数量增加,表明培养细胞分泌FSH和PRL的量可能在增加。本试验还发现,FSH和PRL阳性细胞率随山羊不同生理时期而有所差异,这主要是受到机体内各种细胞因子、激素反馈和负反馈等因素作用的结果,至于其具体机制还有待进一步研究。

单纯体外培养的腺垂体细胞,在一定时期内具有分泌激素的功能。Goodyer等^[16]在小鼠上测定了单纯体外培养时,在促分泌因子和抑制分泌因子作用下,腺垂体细胞的动态分泌值,认为LH、FSH在第6~7天的分泌量达到高峰,而PRL的分泌量变化较特殊,开始时下降,转而又持续上升。杨地等^[17]研究表明,体外培养的大鼠腺垂体细胞在第7天分泌功能最强,GH、LH分泌值最高;Noda等^[18]、Henderson等^[19]分别在大鼠和绵羊腺垂体细胞体外培养的第7天,研究某些因子对其分泌功能的影响。依据以上文献,笔者在培养的第7天,对腺垂体细胞进行了鉴定,并对培养液中的激素含量进行测定,这样就保证了鉴定时阳性细胞的数量;鉴定之前培养液中不含血清,可避免培养液中激素对鉴定结果的干扰,也为后续研究某一因子或多因子对腺垂体分泌功能的调控作用提供了保证。

本研究所建立的腺垂体细胞的分离培养方法,能够获得高产量的细胞,利用腺垂体细胞的体外分泌特点建立的培养模型,可以在体外研究垂体细胞的分泌特性。

[参考文献]

- [1] Ooi G T, Tawadros N, Escalona R M. Pituitary cell lines and their endocrine applications [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, 228: 1-21.
- [2] Vale W, Grant G, Amoss M, et al. Culture of enzymatically dispersed anterior pituitary cells: functional validation of a method [J]. *Endocrinology*, 1972, 91: 562-572.
- [3] Krsmanovic L Z, Martinez-Fuentes A J, Arora K K, et al. Local regulation of gonadotroph function by pituitary gonadotropin-releasing hormone [J]. *Endocrinology*, 2000, 141: 1187-1195.
- [4] Farnworth P E, Thean E, Robertson D M, et al. Transforming growth factor-beta3 stimulates lactotrope cell growth by increasing basic fibroblast growth factor from folliculo-stellate cells [J]. *Endocrinology*, 2000, 141: 859-867.
- [5] Baratta M, West L A, Turzillo A M, et al. Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cells [J]. *Biol*, 2001, 64: 714-719.
- [6] Kawakami S, Fujii Y, Okada Y, et al. Paracrine regulation of FSH by follistatin in folliculostellate cell-enriched primate pituitary cell cultures [J]. *Endocrinology*, 2002, 143: 2250-2258.
- [7] Guillemin R, Rosenberg B. Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures [J]. *Endocrinology*, 1955, 57: 599-607.
- [8] Das G D, Houle J D, Brasko J, et al. Freezing of neural tissues and their transplantation in the brain of rats: technical details and histological observations [J]. *Neurosci Methods*, 1983, 8: 1-15.
- [9] Turgeon J L, Shyamala G, Waring D W. PR localization and anterior pituitary cell populations *in vitro* in ovariectomized wild-type and PR-knockout mice [J]. *Endocrinology*, 2001, 142: 4479-4485.
- [10] Denniston D J, Thomas M G, Kane K K, et al. Effect of neuropeptide Y on GnRH-induced LH release from bovine anterior pituitary cell cultures derived from heifers in a follicular, luteal or ovariectomized state [J]. *Anim Reprod Sci*, 2003, 78: 25-31.
- [11] 周 虚, 董 伟, 庄临之. 猪垂体细胞单层培养 [J]. *黑龙江动物繁殖*, 2001, 9(2): 4-5.
Zhou X, Dong W, Zhuang L Z. Monolayer culture of porcine pituitary cells [J]. *Heilongjiang Journal of Animal Reproduction*, 2001, 9(2): 4-5. (in Chinese)
- [12] Huang E S, Miller W L. Effects of estradiol-17 β on basal and luteinizing hormone releasing hormone-induced secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone by ovine pituitary cell culture [J]. *Biology of Reproduction*, 1980, 23: 124-134.
- [13] 马友记, 张 勇, 李发弟, 等. 褪黑素对体外培养绵羊垂体细胞分泌FSH和LH的影响 [J]. *家畜生态学报*, 2005, 26(3): 17-20.
Ma Y J, Zhang Y, Li F D, et al. Effects of melatonin on FSH and LH production by hypophysis cells of ewes *in vitro* [J].

- Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2005, 26(3): 17-20. (in Chinese)
- [14] Gregory S J, Townsend J, McNeilly A S, et al. Effects of prolactin on the luteinizing hormone response to gonadotropin-releasing hormone in primary pituitary cell cultures during the ovine annual reproductive cycle [J]. Biol Reprod, 2004, 70: 1299-1305.
- [15] Wilfinger W W, Larsen W J, Downs T R, et al. An *in vitro* model for studies of intercellular communication in cultured rat anterior pituitary cells [J]. Tissue-Cell, 1984, 16(4): 483-497.
- [16] Goodyer C G, Hall C S, Guyda H, et al. Human fetal pituitary in culture; hormone secretion and response to somatostatin, luteinizing hormone releasing factor, thyrotropin releasing factor and dibutyryl cyclic AMP [J]. Clin Endocrinol Metab, 1977, 45(1): 73-85.
- [17] 杨 地, 吕 文, 郭 伟, 等. 培养鼠腺垂体细胞的形态和分泌功能实验研究 [J]. 现代临床医学生物工程学杂志, 2004, 10(2): 91-93.
- Yang D, Lü W, Guo W, et al. The experimental study on cultured pituitary cells of SD rats [J]. Journal of Modern Clinical Medical Bioengineering, 2004, 10(2): 91-93. (in Chinese)
- [18] Noda T, Kikuchi M, Kaidzu S, et al. Rat anterior pituitary cells *in vitro* can partly reconstruct *in vivo* topographic affinities [J]. Anat Rec, 2003, 272: 548-555.
- [19] Henderson H L, Hodson D J, Gregory S J, et al. Gonadotropin releasing hormone stimulates prolactin release from lactotrophs in photoperiodic species through a gonadotropin-independent mechanism [J]. Biology of Reproduction, 2008, 78: 370-377.

(上接第 10 页)

- [14] 薛庆善. 体外培养的原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- Xue Q S. The principle and principle of culture *in vitro* [M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [15] Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, et al. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo [J]. Theriogenology, 2009, 71(1): 30-38.
- [16] 孔庆学, 张 涌. 大鼠睾丸支持细胞的分离纯化与鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(8): 39-43.
- Kong Q X, Zhang Y. Isolation, purification and identification of testis Sertoli cells in prepubertal rats [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Nat Sci Ed, 2006, 34(8): 39-43. (in Chinese)
- [17] 杨君杰, 刘善荣, 杨 玲, 等. 小鼠睾丸支持细胞的分离培养与鉴定 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(7): 741-744.
- Yang J J, Liu S R, Yang L, et al. Isolation and identification of Sertoli cells from mouse testis [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2006, 27(7): 741-744. (in Chinese)
- [18] 孙祥宙, 邓春华, 郭海彬, 等. 成人睾丸间质细胞的培养和鉴定 [J]. 中华男科学杂志, 2005, 11(5): 356-358.
- Sun X Z, Deng C H, Guo H B, et al. Culture and identification of human adult Leydig Cells [J]. National Journal of Andrology, 2005, 11(5): 356-358. (in Chinese)
- [19] Skinner M K. Sertoli cell biology [M]. California: Elsevier Academic Press, 2005.
- [20] Joseph D R. Mutagenesis of essential functional residues of rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin [J]. Molecular Endocrinology, 1993, 7(4): 488-496.