

绵羊绒毛膜滋养层细胞与子宫内膜腔上皮细胞共培养体系的建立

张洁¹, 陈大勇², 赵娟¹, 王晓娟¹, 杨惠¹, 刘淑英^{1,3*}

(1. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古赛诺种羊科技有限公司, 呼和浩特 010018;
3. 农业部动物临床诊疗技术重点实验室, 呼和浩特 010018)

摘要: 本研究旨在探索绵羊绒毛膜滋养层细胞 (sheep trophoblast cells, STCs) 和子宫内膜腔上皮细胞 (endometrial luminal epithelial cells, ELECs) 的共培养条件, 为绵羊胎盘绒毛膜滋养层多核细胞的形成提供试验依据。在屠宰场采集妊娠 45~60 d 的健康绵羊子宫及胎盘组织, 用酶消化法体外分离培养 STCs 和 ELECs, 并进行细胞免疫荧光鉴定, 同时利用姬姆萨氏染色法确定 STCs 和 ELECs 最佳的共培养条件; 然后转染空质粒 pEGFP-C1 到 ELECs 48 h 后, 与 STCs 共培养, 并利用激光共聚焦显微镜观察滋养层多核细胞的形态。结果显示: STCs CK-7 与 ELECs CK-18 均呈阳性; 当 STCs 与 ELECs 细胞数量比值为 2:1, 共培养 48 h, 多核细胞数量最多, 且与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$); CK-7 在 STCs 中表达呈红色荧光, 且细胞中有 pEGFP-C1 标记的绿色荧光, 胞核蓝染, 3 种荧光共表达呈现出了白光。综上表明, 本研究建立了 STCs 和 ELECs 共培养条件, ELECs 参与绵羊滋养层多核细胞的形成。

关键词: 绵羊; 滋养层细胞; 子宫内膜腔上皮细胞; 共培养; 绒毛膜滋养层多核细胞

中图分类号: S826.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2019)03-0562-08

The Establishment of Co-culture System of Sheep Trophoblast Cells and Endometrial Luminal Epithelial Cells

ZHANG Jie¹, CHEN Dayong², ZHAO Juan¹, WANG Xiaojuan¹,
YANG Hui¹, LIU Shuying^{1,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2. Inner Mongolia Sainuo Sheep Pasture Corporation, Hohhot 010018, China;
3. Key Laboratory of Clinical Diagnosis and Treatment Technology in Animal Disease, Ministry of Agriculture, Hohhot 010018, China)

Abstract: The study aims to explore the co-culture conditions of sheep trophoblast cells (STCs) and the endometrial luminal epithelial cells (ELECs), and provides experimental basis for chorionic trophoblastic coenocyte formation. Harvesting healthy sheep uterus and placental tissue from 45 to 60 days of gestation at the slaughter house, and the enzyme digestion method has been used to isolate and culture the STCs and ELECs *in vitro*, and they were identified by cellular immunofluorescence. Simultaneously, the optimal co-culture conditions for STCs and ELECs were determined by Giemsa staining. Then, the empty plasmid pEGFP-C1 was transfected into ELECs for 48 h, and then co-cultured with STCs. The morphology of chorionic trophoblastic coenocyte was observed by confocal laser scanning microscopy. The results showed that STCs CK-7 and ELECs

收稿日期: 2018-07-09

基金项目: 国家自然科学基金(31760721); 内蒙古草原英才创新团队项目(20151031); 内蒙古科技应用研究项目(2018)

作者简介: 张洁(1993-), 女, 内蒙古包头人, 硕士生, 主要从事病毒病理学研究, E-mail: zj1060356734@163.com

* 通信作者: 刘淑英, 主要从事生殖内分泌与病毒病理学研究, E-mail: liushuying_imau@126.com

CK-18 were positive. When the ratio of STCs to ELEC cells was 2 : 1, the number of multinucleated cells reaches the maximum when the co-culture time was 48 h, and it was significantly different from the control group ($P < 0.05$). The results of immunofluorescence showed that CK-7 expressed red fluorescence in STCs, and there were pEGFP-C1 labeled green fluorescence in the cells, and the nucleus was blue-stained, and the 3 fluorescent co-expressions showed white light. This study established the conditions for co-culture of STCs and ELECs, and showed that ELECs were involved in the formation of polynuclear cells in sheep trophoblasts.

Key words: sheep; trophoblast cells; endometrial luminal epithelial cells; co-culture; chorionic trophoblastic coenocyte

胎盘在体内是维持哺乳动物胎儿正常发育的重要器官,同时对动物机体又是一种暂时的、必不可少的特殊器官^[1]。它不仅为胎儿提供了适宜的生长发育环境,还通过胎盘屏障起到保护胎儿的作用^[2-3]。Kaufmann^[4]甚至将胎盘比喻为胎儿的脑器官。而哺乳动物的胎盘是由胚胎滋养层细胞和母体的子宫内膜细胞构成的,绵羊绒毛膜滋养层细胞(STCs)可以侵入母体子宫内膜组织进行营养物质、气体和激素的有效交换^[5]。在孕体植入过程中涉及到孕体滋养层对合、附着和黏附到子宫内膜腔上皮细胞(ELECs)上^[6]。在孕体外胚层内为绒毛膜,绒毛膜中的双核滋养层细胞,被称为滋养层巨型双核细胞(trophoblast giant binucleate cells, BNCs)。单核滋养层细胞(mononuclear trophoblast cells, MTCs)通过核分裂而胞质不分裂的有丝分裂产生BNCs^[7],此后BNCs与ELECs发生融合形成3个细胞核的多核细胞^[8]。BNCs再和三核的滋养层细胞融合,形成有20~25核的多核合胞体,最终形成胎盘^[9-10]。

Dunlap等^[11]研究发现,BNCs形成三核滋养层细胞的过程中,ELECs的透明质酸酶2(hyaluronoglucosaminidase 2, HYAL-2)受体与STCs中的内源性绵羊肺腺瘤病毒的囊膜蛋白结合,从而形成了三核的滋养层细胞。Weier等^[12]研究发现,人滋养层细胞(villous cytotrophoblasts, vCTB)分化为侵袭表型时获得非整倍体,而非整倍体是正常胎盘的重要组成部分,其限制了细胞滋养层细胞在子宫内的增殖和侵袭。在反刍动物孕体着床时期,STCs会产生多种激素和蛋白酶来降解子宫肉阜上皮,滋养外胚层细胞随后附着在肉阜,并分化形成子叶,与子宫肉阜共同形成胎盘瘤。其中一些滋养外胚层细胞发生分化,形成BNCs,同时它们在整个妊娠期的不同阶段与ELECs融合^[13]。

缺少ELECs在绒毛膜滋养层多核细胞中分布的数据,但可以推测ELECs参与了绒毛膜滋养层多核细胞的形成。为此本试验从共培养角度展开研究,为细胞融合改进方案提供新思路,以STCs为基础探讨了在绒毛膜滋养层多核细胞形成中是否受到ELECs的调控以及在ELECs的参与下是否促进绒毛膜滋养层多核细胞的形成,从而确定获得较高融合率的各项指标的数据范围,进一步探究绒毛膜滋养层多核细胞形成的过程。

1 材料与方法

1.1 试验动物与试验分组

在呼和浩特市某屠宰场采集妊娠45~60 d的健康绵羊子宫及胎盘组织;所获得细胞按照以下样品分为3组^[14],12孔板每孔的STCs数都固定为 5×10^3 ,ELECs数分别为 5×10^3 、 1×10^3 和 5×10^2 ;将其区间具有显著差异性的缩小比例,筛选最佳共培养浓度,根据最佳浓度设置时间梯度,每组重复3次。利用姬姆萨氏染色法观察绒毛膜滋养层多核细胞的数量。

1.2 试剂与仪器

胶原酶I型购自Solarbio公司;D-PBS购自Hyclone公司、DMEM培养基、(0.25%)胰蛋白酶、Opti-MEM培养基均购自Gibco公司;真核细胞转染试剂LipofectamineTM3000购自Invitrogen公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 按照马欣等^[15]培养ELECs的方法,对子宫角部位消毒,进行子宫内膜的剥离,将剥离后的组织剪碎后经胶原酶I型消化5~7 h,消化下来的细胞经200目细胞筛过滤, $1200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min后,弃上清,用含有双抗的PBS清洗4~5次,接种在 25 cm^2 的培养瓶中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CO}_2$ 的条件下培养。

按照刘慧等^[16]培养 STCs 方法,采集妊娠中期的绵羊子宫,将绒毛膜滋养层从子宫肉阜中挑出,经含有双抗的 PBS 进行清洗后剪碎,并用 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的胰蛋白酶 37°C 恒温消化 10 min,再用胶原酶 I 型 37°C 恒温消化 20 min,将消化下来的细胞经 100 目细胞筛过滤,同上述 ELEC 培养方法进行细胞培养。

1.3.2 细胞免疫荧光鉴定 细胞接种 12 孔板,待细胞生长密度达到 70% 左右时,经 PBS 清洗后,用 4% 多聚甲醛固定 20~25 min,0.2% Triton X-100 通透 15~20 min,5% BSA 室温封闭 30~60 min,孵育一抗 CK-7 或 CK-18 (1:200 稀释或 1:300 稀释) 4°C 8~12 h,经 PBST 清洗后,避光孵育荧光二抗均为 AF-555 (1:400 稀释) 37°C 1 h,经 PBST 清洗后,DAPI 染色 5 min,用 50% 甘油封片。

1.3.3 共培养条件筛选 细胞数的确定:将细胞悬液吹打均匀后,吸取 $1 \mu\text{L}$ 统计其数量,并重复 3 次取其平均值,按各组细胞数量计算其吸取细胞悬液的量于 12 孔板中,用 15% 的完全培养基加至 1 mL,使得每孔的总体系均为 1 mL。

待 24 h 细胞贴壁后,按照 36、48、60、72 h 的时间梯度进行共培养。取出细胞爬片进行姬姆萨氏染色,并记录绒毛膜滋养层多核细胞(细胞核数 3 或 3 以上)的数量,使用倒置显微镜进行拍照观察试验组

与正常组绒毛膜滋养层多核细胞数量的变化,将每组数据作独立样本进行 *T* 检验。

1.3.4 绒毛膜滋养层多核细胞的验证试验 瞬时转染空质粒 pEGFP-C1 到 ELEC 中,48 h 后添加原代 STCs,在最佳共培养条件下进行培养,利用 CK-7 标记 STCs, PBST 清洗后,移入荧光二抗 AF-555 中进行孵育,并且采用激光共聚焦显微镜观察。

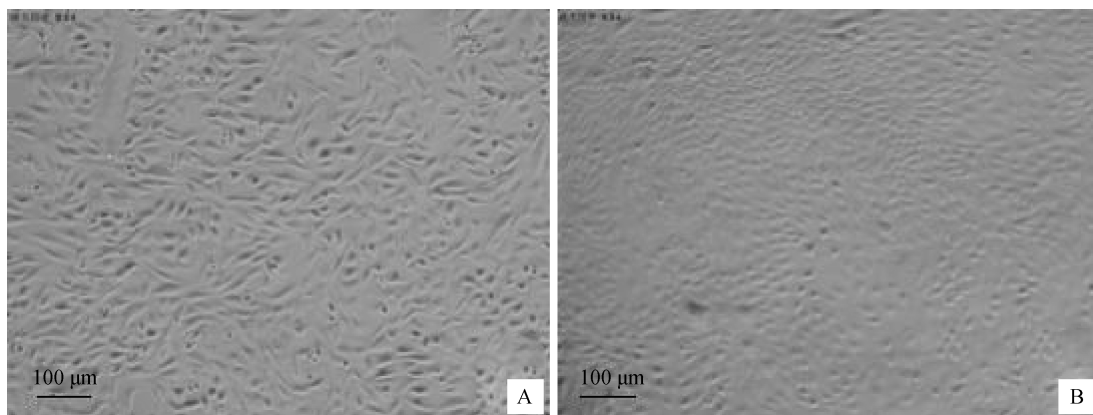
1.4 数据处理

ELEC 和 STCs 共培养的试验组与 STCs 正常组的绒毛膜滋养层多核细胞数采用 GraphPad Prism 5 软件 ANOVA 程序进行显著性比较, $P < 0.05$ 表示差异显著,结果以“平均数±标准差”表示。融合率的计算为统计绒毛膜滋养层多核细胞核的数量,占细胞总数的百分比,其公式:融合率=融合细胞核数/总细胞核数 $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 绵羊 STCs 和 ELEC 体外培养

倒置显微镜下,STCs 呈多角形,片状生长,核大呈卵圆形,第 3 天,细胞生长至培养瓶的 20% 左右,第 6 天,细胞长满培养瓶的 90% 左右(图 1A); ELEC 呈卵圆形“铺路石状”生长,第 5 天,细胞贴壁 30% 左右,第 9 天,细胞长满培养瓶的 90% 左右(图 1B)。



A. 绒毛膜滋养层细胞;B. 子宫内腔上皮细胞

A. STCs; B. ELEC

图 1 原代细胞体外培养(100 \times)

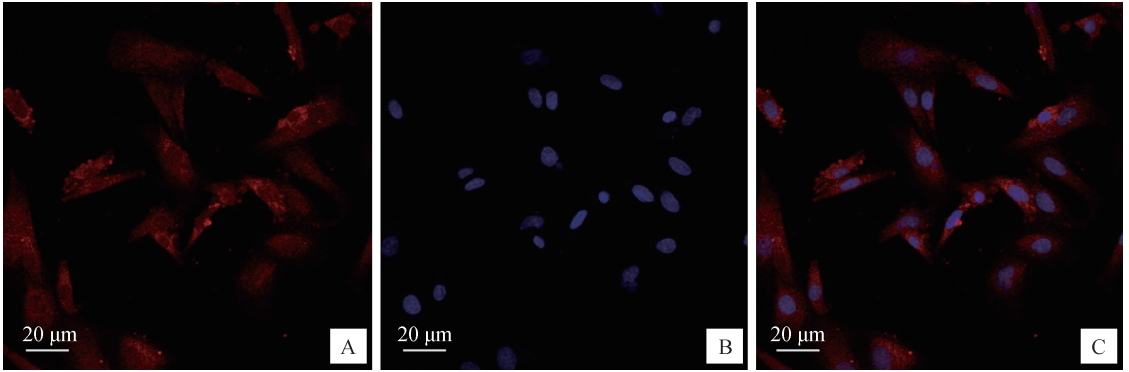
Fig. 1 The primary cells *in vitro* cultured (100 \times)

2.2 绵羊 STCs 和 ELEC 的细胞免疫荧光鉴定

角蛋白-7(cytokeration, CK-7)是鉴定 STCs 的蛋白质,以 CK-7 抗体标记细胞,在激光共聚焦显微镜下,细胞呈现红色的阳性信号,细胞核蓝染,证明该培

养的原代细胞为 STCs,且纯度较高;角蛋白-18(cytokeration, CK-18)是鉴定 ELEC 蛋白质(图 2)。以 CK-18 抗体标记细胞,在激光共聚焦显微镜下,细胞呈现红色的阳性信号,细胞核蓝染,证明该培养

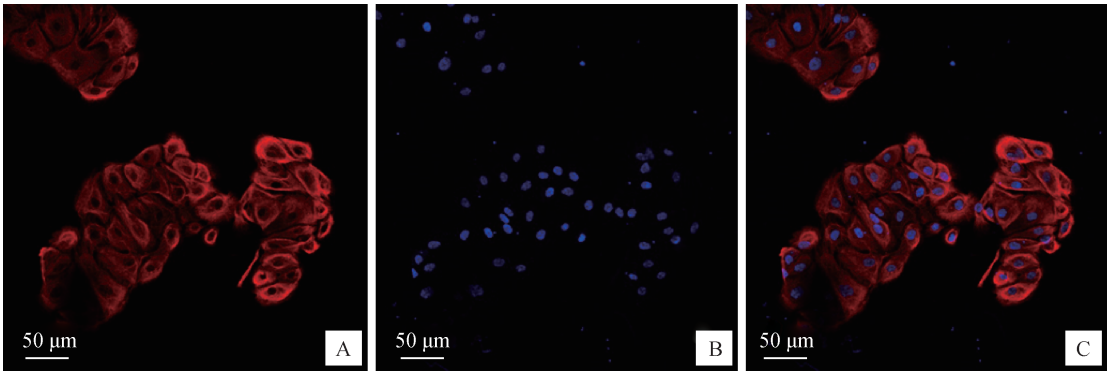
的原代细胞为 ELECs,且纯度较高,可以进行后续 试验(图 3)。



A. CK-7; B. 细胞核; C. CK-7+细胞核
A. CK-7; B. Cell nucleus; C. CK-7+Cell nucleus

图 2 细胞免疫荧光鉴定(CK-7)(400×)

Fig. 2 Cytoimmunochemistry of CK-7 (400×)



A. CK-18; B. 细胞核; C. CK-18+细胞核
A. CK-18; B. Cell nucleus; C. CK-18+Cell nucleus

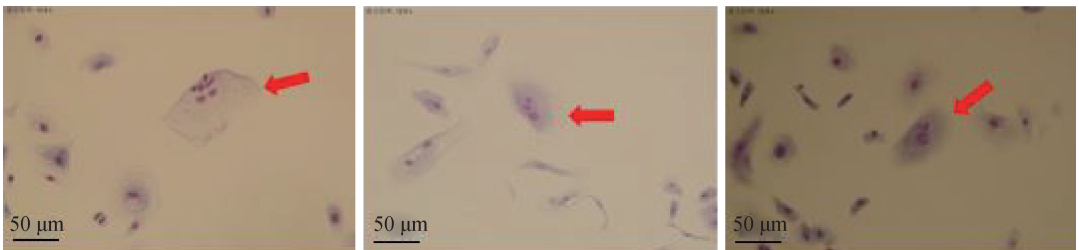
图 3 细胞免疫荧光鉴定(CK-18)(200×)

Fig. 3 Cytoimmunochemistry of CK-18 (200×)

2.3 绵羊不同数量的 ELECs 对绒毛膜滋养层多核细胞数的影响

在共培养体系中,将每孔 STCs 数都固定为 5×10^3 ,ELECs 数分别为 1.00×10^3 、 1.25×10^3 、 1.67×10^3 、 2.50×10^3 、 5.00×10^3 ($5 : 1$ 、 $4 : 1$ 、 $3 : 1$ 、 $2 : 1$ 、

$1 : 1$);在相差显微镜下,姬姆萨氏染色显示绒毛膜滋养层多核细胞呈“圆饼状”,具有 3 个以上的细胞核(图 4)。当 ELECs 的数量逐渐增多时,绒毛膜滋养层多核细胞的数量表现出了先增多后减少的趋势,将其结果作独立样本 *T* 检验(表 1)。结果显示,



箭头所示为绒毛膜滋养层多核细胞
The arrow shows chorionic trophoblastic coenocyte

图 4 绒毛膜滋养层多核细胞的形态(200×)

Fig. 4 The morphology of chorionic trophoblastic coenocyte (200×)

试验组与正常组相比滋养层多核数量明显增多,差异显著($P<0.05$),当 STCs 与 ELECs 的数量比值为 2:1 (STCs 数为 5×10^3 , ELECs 数为 2.5×10^3) 时,绒毛膜滋养层多核细胞的数量最多,说明此时是最佳的共培养细胞数比;融合率与统计学结果相似。

表 1 不同 ELECs 数量对绒毛膜滋养层多核细胞数的影响
Table 1 Effects of different amounts of ELECs on the number of chorionic trophoblastic coenocyte

STCs 与 ELECs 比值 STCs to ELECs	多核细胞数 The number of multinucleated cells	融合率/% Fusion rate
5:1	7.67 ± 0.41^c	0.35
4:1	12.33 ± 0.94^a	0.62
3:1	15.33 ± 0.94^a	0.79
2:1	18.00 ± 0.82^b	0.90
1:1	13.67 ± 2.05^a	0.46
对照 Control	5.00 ± 0.82^c	0.10

同列数据后所标字母相异表示差异显著($P<0.05$),所标字母相同表示差异不显著($P>0.05$)。下表同

Different letters in the same row mean significant difference between the treatments($P<0.05$), same letter in the same row mean not significant difference between the treatments($P>0.05$). The same as below

2.4 不同共培养作用时间对绵羊绒毛膜滋养层多核细胞数量的影响

在共培养体系中,将每孔 STCs 数都固定为 5×10^3 ,ELECs 数为 2.5×10^3 (2:1),分析不同作用时间(36、48、60、72 h)对绒毛膜滋养层多核细胞数量的影响。当共培养时间逐渐增加时,绒毛膜滋养层多核细胞数和融合率表现为先增多后减少的趋势,当

共培养 48 h 时,绒毛膜滋养层多核细胞数显著增加($P<0.05$)。说明此时是最佳的共培养时间(表 2)。

表 2 不同作用时间对绒毛膜滋养层多核细胞数量的影响
Table 2 Effect of different action time on the number of chorionic trophoblastic coenocyte

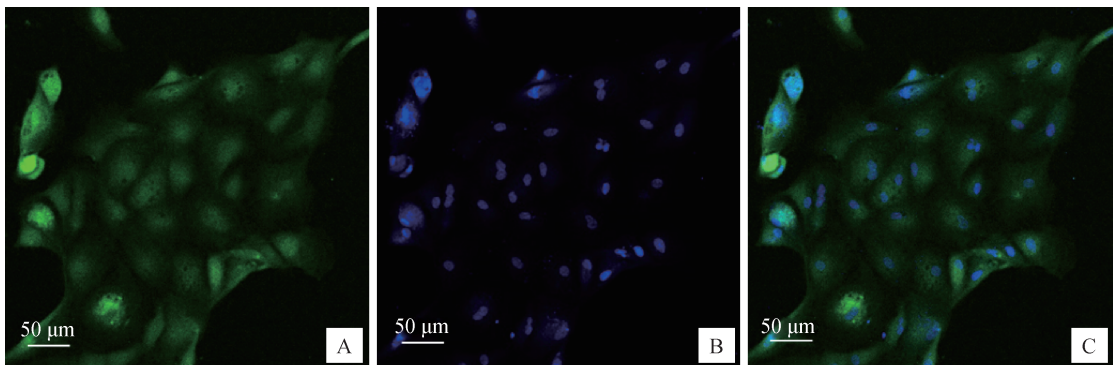
时间/h Time	多核细胞数 The number of multinucleated cells	融合率/% Fusion rate
36	10 ± 0.82^a	0.40
48	14 ± 1.63^b	0.56
60	11 ± 0.82^a	0.44
72	10 ± 1.25^a	0.43

2.5 瞬时转染绿色荧光质粒 pEGFP-C1 到绵羊 ELECs 的形态观察

在 ELECs 瞬时转染绿色荧光空质粒(pEGFP-C1)48 h 后,激光共聚焦显微镜下可见 ELECs 细胞中弥漫大量的绿色荧光蛋白(图 5A),经细胞核染色可见蓝色荧光(图 5B),空质粒成功转染 ELECs,可用于后续研究(图 5C)。

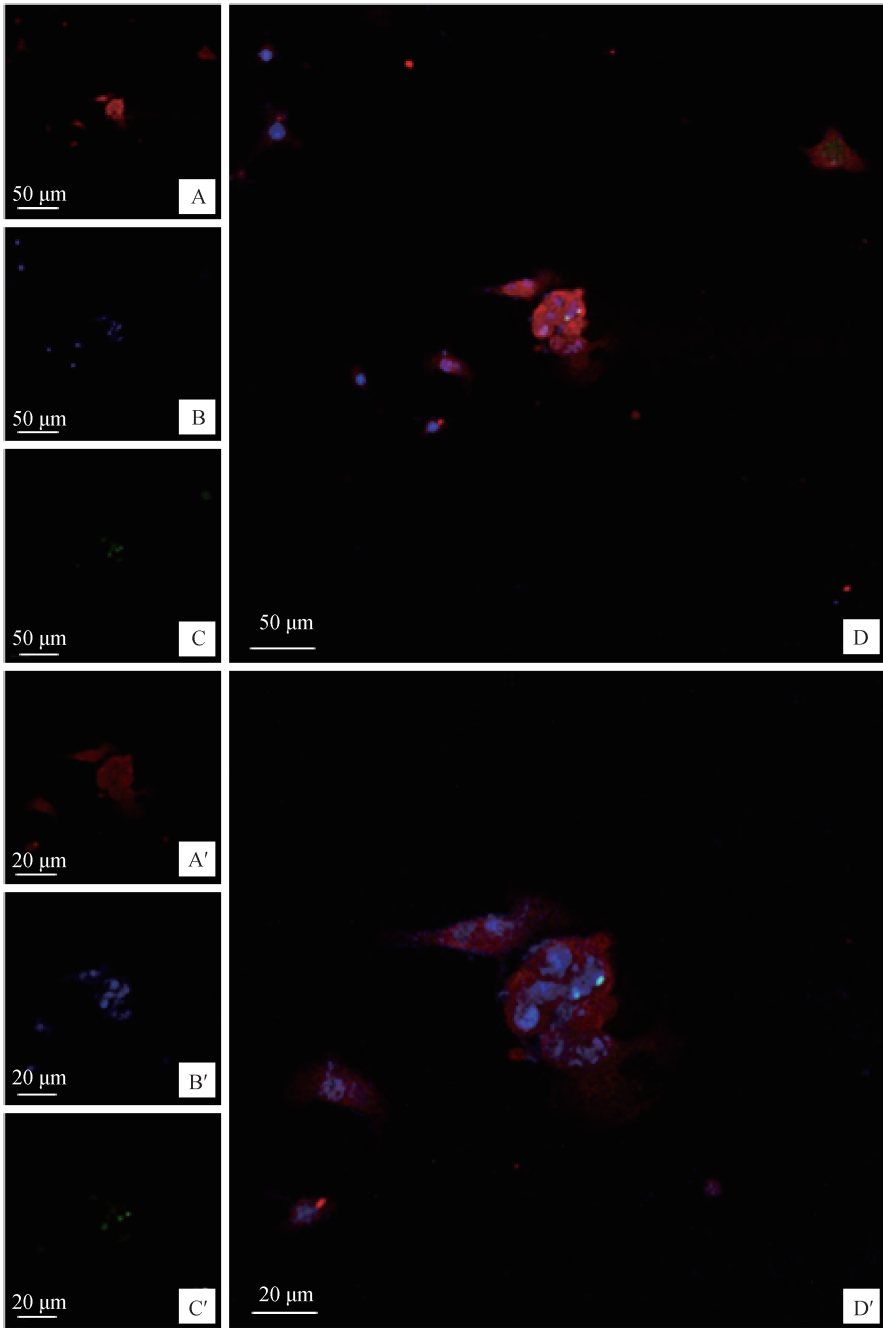
2.6 绵羊 ELECs 在绒毛膜滋养层多核细胞中的表达

将转染空质粒 pEGFP-C1 的 ELECs 与 STCs 在最佳共培养条件下培养,并用 CK-7 标记,在激光共聚焦显微镜下,绒毛膜滋养层多核细胞经二抗 AF-555 标记后呈现特有的红色荧光(图 6A, A'),CK-7 表达呈阳性,且在细胞中有转染 pEGFP-C1 的 ELECs 特有的绿色荧光(图 6C, C'),细胞核 3 个及以上呈蓝色荧光(图 6B, B'),3 种荧光共表达呈现了白光(图 6D, D')。证明 ELECs 参与了绵羊滋养层多核细胞的形成。



A, 绿色荧光 pEGFP-C1 蛋白; B, 上皮细胞 DAPI 核染色; C, A, B 融合
A, Green fluorescent protein of pEGFP-C1; B, DAPI nuclear staining; C, A, B merge
图 5 转染 pEGFP-C1 质粒的 ELECs (200×)

Fig. 5 pEGFP-C1 plasmid in transfected ELECs (200×)



A, A'. CK-7; B, B'. 细胞核; C, C'. pEGFP-C1; D, D'. CK-7 + 细胞核 + pEGFP-C1。A~D 200 \times ; A'~D' 400 \times
 A, A'. CK-7; B, B'. Cell nucleus; C, C'. pEGFP-C1; D, D'. CK-7 + Cell nucleus + pEGFP-C1。A~D 200 \times ; A'-D' 400 \times
 图 6 共聚焦检测 CK-7 与 pEGFP-C1 蛋白的共定位情况

Fig. 6 Confocal microscope examination of CK-7 with pEGFP-C1 protein

3 讨论

胚胎着床是生殖过程中的关键步骤,而胚胎滋养层细胞侵袭到子宫内膜的过程在胚胎着床及胎盘形成过程中又至关重要^[17-18]。大量具有侵袭性的胚胎滋养层细胞与母体子宫内膜细胞直接接触,从

而为胎盘形成及胚胎的营养物质供应做好准备^[19]。目前的试验多以单一的 STCs 或 LEs 展开研究,而对于两者之间的作用关系存在局限性。据研究报告,共培养技术能最大程度地模拟体内微环境,利于研究两细胞间的相互作用^[20]。但目前共培养技术主要应用于药物防治方向,对于生理机制的研究较

少^[21]。本试验采用共培养的方式能最大程度模拟 STCs 合胞体化过程,并探讨了绒毛膜滋养层多核细胞的形成与 ELECs 的关系,为以后体外建立共培养体系提供了试验依据,同时也为绵羊胚胎发育的机制研究奠定了基础。

查雨锋等^[22]采用间接法建立了大鼠脑微血管内皮细胞与周细胞、星形胶质细胞的共培养模型,与本试验所构建的共培养体系相比,本试验更简单易操作,且讨论了细胞数量、培养时间对于共培养体系的影响。本试验发现 ELECs 与 STCs 共培养的绒毛膜滋养层多核细胞数量同只有 STCs 的对照相比增加了 2.7 倍,该结果与 Spencer 和 Palmarini^[10]所提到的假说结果相一致。本研究在 ELECs 的参与下,绒毛膜滋养层多核细胞数量出现了先增多后减少的趋势,其中,比较典型的是 ELECs 数量超过 2.5×10^3 时,可以看到绒毛膜滋养层多核细胞的数量有所下降。因此,笔者猜测共培养体系中 ELECs 数量过多抑制了 STCs 的生长,可能造成绒毛膜滋养层多核细胞数量的下降。

韩翠萍等^[23]将骨髓间充质干细胞与肝细胞进行共培养,结果发现,随着共培养时间的延长,越来越多的干细胞从长梭形变为与肝细胞形态相似的多角形。高大宽等^[24]用脂肪干细胞和神经干细胞共培养 8~12 d 后发现脂肪干细胞在体外能够促进神经干细胞向神经元的转化。本研究发现在共培养时间体系中,随着共培养时间的增加,绒毛膜滋养层多核细胞的数量出现了先增多后减少的趋势,而在共培养 48 h 时,滋养层多核数量达到峰值。由此可以推测,随着共培养时间的增加,细胞可能受到分化的影响造成绒毛膜滋养层多核细胞的减少。

本试验通过免疫荧光染色等方法证明了在绒毛膜滋养层多核细胞中,除了 STCs 自身进行有丝分裂和细胞融合形成的多个核外,ELECs 也参与了细胞融合的过程。同样,Wang 等^[25]研究表明,在怀孕期间 CTBs 形成侵袭性绒毛膜滋养层细胞与母体子宫建立循环或者 CTBs 通过合胞体化过程形成多核合胞体来建立母胎屏障。说明 ELECs 参与了细胞合胞体化过程。

4 结 论

利用体外培养的绵羊 STCs 和 ELECs,从共培养角度初步探讨绵羊滋养层多核细胞的形成机制。在激光共聚焦显微镜下,观察到绒毛膜滋养层多核

细胞中有转染 pEGFP-C1 的 ELECs 特有的绿色荧光,因此,证明在 ELECs 的参与下促进了绵羊滋养层多核细胞的形成。本试验通过质粒转染技术和角蛋白免疫荧光标记,能够分别准确的定位两种不同细胞,从而达到细胞融合示踪的目的,利用免疫荧光技术为绒毛膜滋养层多核细胞的形态和发展过程提供了有价值的信息。

参考文献(References):

- [1] GERBAUD P, PIDOUX G. Review: an overview of molecular events occurring in human trophoblast fusion[J]. *Placenta*, 2015, 36(S1): S35-S42.
- [2] LI Y, ZHENG R, WANG R. Involvement of nephrin in human placental trophoblast syncytialization[J]. *Reproduction*, 2015, 149(4): 339-346.
- [3] 周跃华, 陆 琴. miR-29a 在胎盘滋养细胞中的功能[J]. *中华保健医学杂志*, 2018, 20(2): 113-116.
ZHOU Y H, LU Q. The function of miR-29a in placental trophoblasts[J]. *Chinese Journal of Health Care and Medicine*, 2018, 20(2): 113-116. (in Chinese)
- [4] KAUFMANN P. Functional anatomy of the non-primate placenta[J]. *Placenta*, 1981, 1(S1): 13-28.
- [5] 葛利江, 田文儒, 崔 琳, 等. 细胞因子对小尾寒羊胎盘成熟的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2004, 40(1): 7-10.
GE L J, TIAN W R, CUI L, et al. Effect of some cytokines on placenta maturation in the small fat tail sheep[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2004, 40(1): 7-10. (in Chinese)
- [6] 刘丽珍, 刘淑英. 妊娠早期蒙古绵羊子宫内膜 enJSRV 及 IFN- τ 基因表达水平的分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(6): 979-984.
LIU L Z, LIU S Y. Analysis of the expression of enJSRV and IFN- τ in endometrium of Mongolian sheep in early pregnancy[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(6): 979-984. (in Chinese)
- [7] GUILBERT L, ROBERTSON S A, WEGMANN T G. The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network[J]. *Immunol Cell Biol*, 1993, 71(1): 49-57.
- [8] LEROUX C, GIRARD N, COTTIN V, et al. Jaagsiekte sheep retrovirus (JSRV): from virus to lung cancer in sheep[J]. *Vet Res*, 2007, 38(2): 211-228.
- [9] FU J J, LÜ X Y, LIN H Y, et al. Ubiquitin ligase cullin 7 induces epithelial-mesenchymal transition in human choriocarcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(14): 10870-10879.
- [10] SPENCER T E, PALMARINI M. Application of next generation sequencing in mammalian embryogenom-

- ics: lessons learned from endogenous betaretroviruses of sheep [J]. *Anim Reprod Sci*, 2012, 134 (1-2): 95-103.
- [11] DUNLAP K A, PALMARINI M, ADELSON D L, et al. Sheep endogenous betaretroviruses (enJSRVs) and the hyaluronidase 2 (HYAL2) receptor in the ovine uterus and conceptus [J]. *Biol Reprod*, 2005, 73 (2): 271-279.
- [12] WEIER J F, WEIER H U G, JUNG C J, et al. Human cytotrophoblasts acquire aneuploidies as they differentiate to an invasive phenotype [J]. *Dev Biol*, 2005, 279(2): 420-432.
- [13] NAKAYA Y, MIYAZAWA T. The roles of syncytin-like proteins in ruminant placentation [J]. *Viruses*, 2015, 7(6): 2928-2942.
- [14] 刘 猛, 樊凤娇, 石璞洁, 等. 不同浓度牛乳铁蛋白对成骨细胞与破骨细胞共培养的影响 [J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(24): 1-6.
LIU M, FAN F J, SHI P J, et al. Effects of different concentrations of bovine lactoferrin on osteoblast/osteoclast co-cultures [J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(24): 1-6. (in Chinese)
- [15] 马 欣, 邢书涵, 刘云海, 等. 绵羊子宫内腔上皮细胞的纯化培养与鉴定 [J]. *中国农学通报*, 2015, 31(11): 63-67.
MA X, XING S H, LIU Y H, et al. Cultivation, purification and characterization of ovine endometrial epithelial cells [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(11): 63-67. (in Chinese)
- [16] 刘 慧, 刘淑英, 刘丽珍, 等. 绵羊胎盘滋养层细胞的体外培养与鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2012, 42(3): 309-313.
LIU H, LIU S Y, LIU L Z, et al. Culture and identification of sheep trophoblast cells *in vitro* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2012, 42(3): 309-313. (in Chinese)
- [17] BUKUR J, JASINSKI S, SELIGER B. The role of classical and non-classical HLA class I antigens in human tumors [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(4): 350-358.
- [18] 吴晓莉, 齐景伟, 刘淑英, 等. Real-Time PCR 和组织原位杂交法检测 enJSRV 在绵羊胎儿免疫器官及肺脏中的表达 [J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(8): 1018-1023.
WU X L, QI J W, LIU S Y, et al. Expression of enJSRV in immune organs and lung of the fetus by *in situ* hybridization and real-time PCR [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2010, 41(8): 1018-1023. (in Chinese)
- [19] 张宇飞, 石 晶, 刘淑英. enJSRV 囊膜蛋白及其受体的瞬时表达与绵羊绒毛膜滋养层细胞融合的诱导研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(11): 1924-1933.
ZHANG Y F, SHI J, LIU S Y. Study on the transient expression of enJSRV envelope protein and its receptor and the induction of trophoblast cell fusion in sheep [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(11): 1924-1933. (in Chinese)
- [20] 廖乃顺, 陈文列, 黄云梅, 等. 成骨细胞与破骨细胞共培养及其应用研究进展 [J]. *中国骨伤*, 2013, 26(4): 349-353.
LIAO N S, CHEN W L, HUANG Y M, et al. Research progress of co-culture system of osteoblast with osteoclast and its applications [J]. *China Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2013, 26(4): 349-353. (in Chinese)
- [21] 秦燕勤, 陈玉龙, 李建生. 细胞共培养方法的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28(8): 765-768.
QIN Y Q, CHEN Y L, LI J S. Research progress of cell co-culture method [J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2016, 28(8): 765-768. (in Chinese)
- [22] 查雨锋, 傅晓钟, 张 顺, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞与周细胞、星形胶质细胞共培养建立体外血脑屏障模型 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(5): 730-735.
ZHA Y F, FU X Z, ZHANG S, et al. Establishment of an *in vitro* blood-brain barrier model by co-culturing rat brain microvascular endothelial cells, pericytes and astrocytes [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2015, 31(5): 730-735. (in Chinese)
- [23] 韩翠萍, 刘吉勇, 高 蕾, 等. 人脐血间充质干细胞向类肝细胞分化: 人肝细胞共培养诱导法的可行性? [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(1): 48-52.
HAN C P, LIU J Y, GAO L, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells differentiate into hepatocyte-like cells: Feasibility of co-culture with human hepatocyte line LO2 *in vitro* [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2010, 14(1): 48-52. (in Chinese)
- [24] 高大宽, 章 翔, 费 舟, 等. 脂肪干细胞诱导神经干细胞分化的体外实验研究 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2010, 9(2): 120-123.
GAO D K, ZHANG X, FEI Z, et al. Study of differentiation of neural stem cells induced by adipose tissue derived stromal cells *in vitro* [J]. *Chinese Journal of Neurosurgical Disease Research*, 2010, 9(2): 120-123. (in Chinese)
- [25] WANG R, DANG Y L, ZHENG R, et al. Live cell imaging of *in vitro* human trophoblast syncytialization [J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(6): 117.