

叶幼荣, 张璐, 孙杰, 等. 蛋鸡子宫内膜细胞的分离培养与鉴定及性腺激素对其增殖的影响[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 834-839.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.020

## 蛋鸡子宫内膜细胞的分离培养与鉴定及性腺激素对其增殖的影响

叶幼荣, 张璐, 孙杰, 桑永明, 赵宗胜  
(石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832003)

**摘要:** 为探讨蛋鸡子宫内膜细胞的形态学特点、生长规律, 本试验采用 I 型胶原酶消化的方法获取蛋鸡子宫内膜上皮细胞和基质细胞, 采用免疫组织化学法进行细胞鉴定, 采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐比色(MTT)法测得细胞生长曲线, 并研究不同浓度水平的性腺激素对子宫内膜上皮细胞和基质细胞体外增殖的影响。结果显示, 该方法培养的上皮细胞和基质细胞分别对角质蛋白 ck18 单克隆抗体和波形蛋白抗体呈阳性; 蛋鸡子宫内膜上皮细胞和基质细胞在接种后第 2 d 开始进入对数生长期, 第 7 d 进入平台期; 孕酮(100 nmol/L)能显著促进子宫内膜上皮细胞和基质细胞体外增殖; 孕酮(100 nmol/L)和 10 nmol/L、100 nmol/L 雌激素组合对子宫内膜上皮细胞和基质细胞体外增殖均有显著促进作用。表明本研究成功培养了蛋鸡子宫内膜上皮细胞和基质细胞, 并证实这 2 种细胞的细胞周期均为 7 d, 一定浓度的孕酮和雌激素及其组合对子宫内膜上皮细胞和基质细胞的体外增殖均有促进作用。

**关键词:** 蛋鸡; 子宫内膜; 上皮细胞; 基质细胞; 性激素; 体外增殖

**中图分类号:** Q38 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)04-0834-06

## Culture and identification of endometrial cells of laying hen and effects of sex hormones on the proliferation

YE You-rong, ZHANG Lu, SUN Jie, SANG Song-ming, ZHAO Zong-sheng

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

**Abstract:** Endometrial epithelial and stromal cells were isolated and identified by type I collagenase digestion and immunohistochemistry, respectively. The growth curves were constructed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. The effects of different concentrations of sex hormones, estrogen ( $E_2$ ) and progesterone ( $P_4$ ), on the proliferation of the endometrial epithelial and stromal cells *in vitro* was studied. The epithelial and stromal cells were tested positive to keratin ck18 and vimentin antibody. The growth rates of chicken endometrial epithelial and stromal cells began to increase logarithmically on day 2,

reaching the plateau phase on day 7. The endometrial cells and stromal cells treated with 100 nmol/L  $P_4$  proliferated at a significantly higher rate than the control. However, the endometrial epithelial cells and stromal cells treated with 100 nmol/L or 10 nmol/L  $E_2$  plus 100 nmol/L  $P_4$  proliferated at a significantly higher rate than the control.

收稿日期: 2015-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060305); 教育部高校博士点基金项目(201065181200003)

作者简介: 叶幼荣(1989-), 女, 河南信阳人, 硕士, 研究方向为动物遗传育种与繁殖。(Tel) 13279932993; (E-mail) 648510013@qq.com

通讯作者: 孙杰, (E-mail) sunjie\_shzu@126.com

**Key words:** laying hen; endometrium; epithelial cell; stromal cell; sex hormone; proliferation *in vitro*

蛋鸡的子宫为囊状,是输卵管的一部分,含管状腺,分泌蛋白质、钙质和色素,其主要生理功能是形成蛋壳。子宫内膜由单层柱状上皮和固有层构成,而上皮主要由具有分泌功能的腺上皮构成;固有层则由子宫内膜基质细胞与间质构成,子宫内膜的腺上皮细胞可受卵巢激素的影响产生周期性的变化。在不同的生理周期,孕酮( $P_4$ )和雌激素( $E_2$ )的联合作用使子宫内膜细胞发生形态及生物化学的变化,这种变化不仅表现在内膜细胞形态学上的变化,同时还表现在其增殖及分泌活性的改变。性激素由受体介导调控生殖细胞的生长分化和功能。受体是通过调节不同的转录因子和目标基因来驱动生理变化的<sup>[1-2]</sup>。性激素对子宫内膜细胞的体外增殖也有影响,Pierro等<sup>[3]</sup>研究结果指出雌激素对子宫内膜上皮细胞的体外增殖有促进作用。

对于哺乳动物(如大鼠<sup>[4]</sup>、猪<sup>[5]</sup>、兔<sup>[6]</sup>、猴<sup>[7]</sup>、人<sup>[8]</sup>)以及反刍动物<sup>[9-10]</sup>已有子宫内膜细胞的分离培养及纯化的报道,而蛋鸡子宫内膜细胞的体外培养和纯化国内未有明确报道。为了探讨蛋鸡子宫内膜细胞的分离培养方法及性激素对其体外增殖的影响,本研究采用I型胶原酶消化的方法对蛋鸡子宫内膜细胞进行分离培养,测定不同浓度的孕酮和雌激素对子宫内膜细胞体外增殖的影响,为今后蛋鸡子宫内膜细胞的增殖、分化及代谢的研究提供理想的体外模型,也为性激素对子宫内膜细胞的调节作用机理的研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 选择处于产蛋高峰期,生长良好,产蛋率达80%以上的海兰褐壳蛋鸡作为试验动物,试验动物来自石河子大学动物科技学院实验站。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12混合培养液(HyClone公司)、无支原体胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司生产)、I型胶原酶(索莱宝公司生产)、青链霉素混合液(Solarbio公司生产)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)试剂(Solarbio公司生产)、二甲亚砜(DMSO)(Biosharp公司生产)、孕酮( $P_4$ , Sigma)、雌激素( $E_2$ , Sigma)、角蛋白ck18(Cytokeratin 18, 北京中杉公司生产)单

克隆抗体、波形蛋白质单克隆抗体(北京中杉公司生产)、SP免疫组化试剂盒及DAB显色液(北京中杉公司生产)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 子宫内膜上皮细胞和基质细胞的获取

(1)剪碎法:无菌取出蛋鸡子宫,剔除血管、结缔组织和子宫内膜表皮层,于超净台内撕取子宫内膜,用无菌的PBS清洗3~5次,剪碎成 $1\text{ mm}^3$ 左右的小块,加入终浓度为 $1\text{ mg/ml}$ 的I型胶原酶,置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化60 min,加血清终止消化,并用200目的细胞筛过滤,滤液以 $1\ 000\text{ r/min}$ 离心5 min,弃上清液,如此重复离心洗涤2次。离心管中的细胞沉淀加入含有10%胎牛血清的培养液重悬,反复轻轻吹打混合均匀。用0.1%台盼蓝检查细胞存活率,当细胞存活率达90%以上进行后续试验。分离的细胞以 $1\text{ cm}^3$   $6\times 10^5$ 个培养于培养皿,待细胞贴壁长满后进行传代,纯化后的基质细胞分别接种于培养皿(直径5 cm)、6孔培养板,置5%  $\text{CO}_2$ 的细胞培养箱中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下培养,其中6孔培养板中放有处理过的盖玻片(细胞爬片),隔天换液,观察细胞的生长情况,该法分离培养的细胞为子宫内膜基质细胞,鉴定后进行后续试验。(2)刮取法:无菌取出蛋鸡子宫,用手术刀片刮取子宫内膜上皮细胞,加入终浓度为 $1\text{ mg/ml}$ 的I型胶原酶于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化60 min,之后处理方法同剪碎法,该法分离培养的细胞为子宫内膜上皮细胞,鉴定后进行后续试验。

1.2.2 细胞爬片及免疫组织化学鉴定 培养到第3 d或4 d,6孔板中的细胞在盖玻片上完全贴壁后,取出盖玻片进行免疫组化试验,用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3遍,吸干后用4%的多聚甲醛室温固定20 min,对刮取法和剪碎法得到的细胞爬片分别做链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法(SP法)鉴定,分别用细胞角蛋白ck18单克隆抗体和波形蛋白质单克隆抗体作为一抗,二氨基联苯胺(DAB)显色液显色后在荧光显微镜下观察试验结果,凡细胞质呈棕褐色,细胞核呈蓝紫色的为阳性细胞,用PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.3 细胞生长情况观察及生长曲线测定 每天用倒置显微镜观察细胞生长情况。MTT法测细胞生长曲线:2种方法得到的细胞以每孔 $1\times 10^4$ 个细

胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积为 200  $\mu\text{l}$ ,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。每隔 24 h 更换培养液并选择 8 个孔,每孔加入 20  $\mu\text{l}$  MTT 溶液 (5 mg/ml),37  $^{\circ}\text{C}$  继续孵育 4 h 后终止培养,吸弃孔内培养液,各孔加入 150  $\mu\text{l}$  二甲亚砜 (DMSO) 溶液,微量振荡器上震动 10 min 后在酶标仪上于 490 nm 处测定各孔 OD 值,记录结果。连续测定 8 d,以时间为横轴,光吸收值 (OD 值) 为纵轴绘制生长曲线。

表 1 处理组的雌激素 ( $\text{E}_2$ ) 和孕酮 ( $\text{P}_4$ ) 浓度

Table 1 The concentrations of estrogen ( $\text{E}_2$ ) and progesterone ( $\text{P}_4$ ) in the experimental treatments

激 素	处理组 1	处理组 2	处理组 3	处理组 4	处理组 5	处理组 6	处理组 7	处理组 8	处理组 9
雌激素 (nmol/L)	10	50	100	—	—	—	100	10	100
孕酮 (nmol/L)	—	—	—	10	50	100	10	100	100

### 1.3 数据处理

试验数据用 SPSS 17.0 统计分析软件进行单因素方差分析和显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 子宫内膜细胞培养结果

细胞生长情况:2 种方法获取的细胞接种 36 h 后 80% 的贴壁。采用刮取法培养 48 h 的细胞大多数为子宫内膜上皮细胞,掺杂着极少量基质细胞,上皮细胞呈多角形或椭圆形,边界清楚,排列紧密,胞浆饱满,核圆大,呈旋涡状生长 (图 1)。采用剪碎法培养 48 h 的细胞多数为子宫内膜基质细胞,基质细胞形态为梭形或多边形,呈平行束状或放射状排列,核明显 (图 2)。

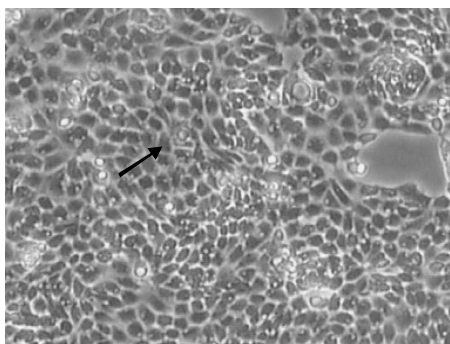


图 1 刮取法培养 48 h 的子宫内膜上皮细胞 ( $\times 100$ )

Fig. 1 The morphology of chicken endometrial epithelial cells cultured for 48 h by scraping ( $\times 100$ )

1.2.4 性腺激素对子宫内膜细胞增殖的影响 96 孔培养板中的细胞培养 24 h 后进行分组,分为空白组 (没有细胞,只加 PBS)、对照组 (不添加激素) 和试验组,试验组共分为 9 组,各组培养液中雌激素 ( $\text{E}_2$ ) 和孕酮 ( $\text{P}_4$ ) 浓度见表 1,每个浓度 5 个重复。隔天换液,重新加入含相同浓度激素的培养液,并观察细胞生长状态。若细胞状态良好,3 d 后做 MTT 实验,于 492 nm 波长处测 OD 值。

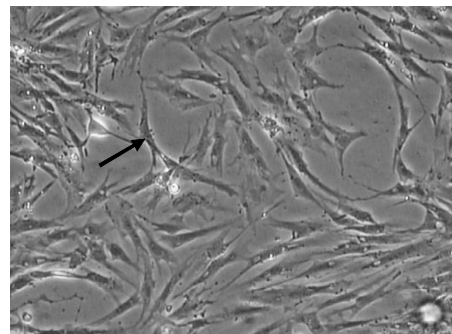


图 2 剪碎法培养 48 h 的子宫内膜基质细胞 ( $\times 100$ )

Fig. 2 The morphology of chicken endometrial stromal cells cultured for 48 h by cutting ( $\times 100$ )

### 2.2 细胞爬片的免疫组化结果

2 种细胞爬片进行 SP 法免疫组化鉴定后,结果显示上皮细胞对角蛋白质抗体呈阳性,基质细胞对波形蛋白质抗体呈阳性,阳性率达 95%。

### 2.3 MTT 法测定细胞的生长曲线

分离培养的子宫内膜上皮细胞在接种后最初 24 h 生长缓慢,培养的第 2~5 d 是对数生长期,之后生长缓慢,第 7 d 开始进入平台期;子宫内膜基质细胞最初的生长趋势同上皮细胞,在培养的第 2~6 d 是对数生长期,之后生长缓慢进入平台期 (图 3)。

### 2.4 雌激素 ( $\text{E}_2$ )、孕酮 ( $\text{P}_4$ ) 对蛋鸡子宫内膜细胞体外增殖的影响

96 孔板中培养的 2 种细胞在加入不同浓度的

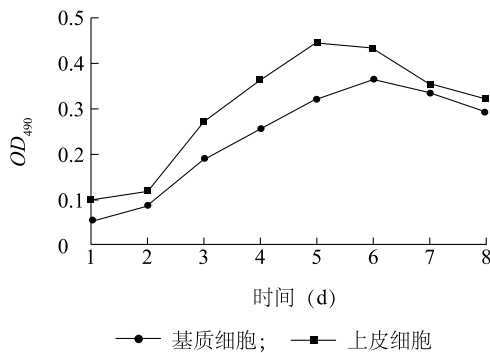


图3 蛋鸡子宫内膜上皮细胞和基质细胞 MTT 生长曲线

Fig. 3 Growth curves of endometrial epithelial and stromal cells isolated from laying hens by MTT assay

$E_2$  和  $P_4$  后出现了不同的增殖变化(表2)。由表2可知:与对照相比,高浓度的雌激素(100 nmol/L)和孕酮(100 nmol/L)能够显著促进子宫内膜上皮细胞的体外增殖;10 nmol/L、100 nmol/L的雌激素分别和100 nmol/L孕酮合用对上皮细胞的体外增殖有显著促进作用。高浓度的孕酮(100 nmol/L)能显著促进基质细胞的体外增殖;100 nmol/L孕酮和10 nmol/L、100 nmol/L雌激素的组合对基质细胞体外增殖也有显著促进作用。这表明高浓度的孕酮和雌激素对子宫内膜上皮细胞和基质细胞体外增殖均有显著促进作用。

表2 不同浓度雌激素( $E_2$ )和孕酮( $P_4$ )对蛋鸡子宫内膜细胞增殖的影响Table 2 Effects of  $E_2$  and  $P_4$  on the proliferation of epithelium and stromal cells isolated from chicken endometrium

处 理	上皮细胞	基质细胞
对照(不添加激素)	0.442±0.083a	0.359±0.018a
10 nmol/L雌激素	0.488±0.060ab	0.383±0.056a
50 nmol/L雌激素	0.519±0.032ac	0.460±0.093ab
100 nmol/L雌激素	0.562±0.058bcd	0.468±0.101ac
10 nmol/L孕酮	0.487±0.062a	0.449±0.054a
50 nmol/L孕酮	0.514±0.016a	0.462±0.061a
100 nmol/L孕酮	0.549±0.046bcd	0.553±0.052bcd
100 nmol/L雌激素+10 nmol/L孕酮	0.553±0.065bcd	0.469±0.064a
10 nmol/L雌激素+100 nmol/L孕酮	0.554±0.054bcd	0.577±0.040cd
100 nmol/L雌激素+100 nmol/L孕酮	0.615±0.030d	0.648±0.074d

同列数值后不同小写字母表示处理间差异达0.05显著水平。

### 3 讨 论

蛋鸡的子宫实质是个蛋壳腺,蛋壳在此形成,影响蛋鸡子宫内膜生理功能的因素有很多,由于体内研究受多种条件的限制,成功培养蛋鸡子宫内膜细胞成为开展多项相关研究的基础,但目前国内对蛋鸡子宫内膜细胞的培养未见明确报道。前人的研究已获得高纯度的牛<sup>[11]</sup>、犬<sup>[12]</sup>、马<sup>[13]</sup>和兔<sup>[14]</sup>等哺乳动物的子宫内膜上皮细胞和基质细胞,关于人的子宫内膜上皮和基质细胞的培养也有大量研究<sup>[15-16]</sup>。本研究采用刮取法和I型胶原酶消化法分离子宫内膜上皮细胞,去掉子宫内膜表层后,剪碎法和消化法分离得到基质细胞,由于在胰蛋白酶的作用下,基质细胞较上皮细胞更易脱落,因此将培养的贴壁细胞

用0.25%的胰蛋白酶在37℃消化后,进行传代培养以纯化细胞。

细胞角蛋白质ck18是表皮细胞内的一种蛋白质,而波形蛋白质广泛存在于间充质细胞,经免疫组化试验鉴定所培养的上皮细胞和基质细胞分别对角蛋白质抗体和波形蛋白质抗体呈阳性,这一结果与陈秀荔等<sup>[17]</sup>鉴定家兔子宫内膜细胞的结果相同。细胞生长曲线的测定结果表明,上皮细胞和基质细胞在接种后第1d为潜伏生长期,从第2d开始进入对数生长期,第5d到6d生长逐渐缓慢下来,第7d进入平台期。这一结果与宋宇轩等<sup>[18]</sup>关于家兔子宫内膜细胞生长曲线的测定结果相一致。我们的研究结果发现蛋鸡子宫内膜上皮细胞和基质细胞的体外生长趋势是相似的,这为蛋鸡子宫内膜细胞的进



一步相关研究提供了基础。

子宫内膜在体内受到雌激素、孕酮等的共同作用,子宫局部的微环境随发情周期及生殖周期有规律的变化,大量的研究结果证明性腺激素对子宫内膜上皮细胞和基质细胞的增殖<sup>[16,19]</sup>、分化以及激素受体表达都具有重要调节作用<sup>[20-21]</sup>。有研究结果<sup>[22]</sup>表明鹅体内孕酮、雌激素分泌水平从性成熟后开始增高,一直到产蛋高峰期达到峰值,这种变化对鹅的产蛋有重要影响。关于激素对体外培养的蛋鸡子宫内膜细胞增殖的影响还没有广泛研究。但是在哺乳动物中,性腺激素对体外分离培养的子宫内膜细胞的作用已有大量研究,阿依木古丽等<sup>[23]</sup>发现  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 和  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 17  $\beta$ -雌激素均能显著增加牦牛子宫内膜上皮细胞和基质细胞的增殖;Fałkowska 等<sup>[24]</sup>研究结果表明,高浓度的孕酮 ( $10^{-5}$  mol/L) 可显著提高牛基质细胞生长;Slayden 等<sup>[25]</sup>用雌激素作用于猕猴子宫内膜可促进子宫内膜上皮细胞大量增殖。本研究采用不同浓度的雌激素和孕酮作用于体外培养的蛋鸡子宫内膜上皮细胞和基质细胞,结果与对照相比,雌激素 (100 nmol/L) 和孕酮 (100 nmol/L) 能够显著促进子宫内膜上皮细胞的体外增殖,孕酮 (100 nmol/L) 能显著促进基质细胞的体外增殖,与宋宇轩等<sup>[18]</sup>利用孕酮和雌激素作用于家兔子宫内膜细胞的研究结果一致。10 nmol/L 和 100 nmol/L 的雌激素和 100 nmol/L 孕酮组合对上皮细胞和基质细胞的体外增殖有显著促进作用,与以往关于哺乳动物类似研究的结果有所不同。本研究所使用的试验动物是蛋鸡,Bar<sup>[26]</sup>认为雌激素调控蛋鸡卵的形成和排出,雌激素和孕酮参与钙代谢从而影响蛋壳的形成。雌激素在维持蛋鸡输卵管的功能上也是至关重要的,它促进管状腺的形成和上皮细胞的分化,表明性腺激素对蛋鸡生殖过程的作用与哺乳动物不同,我们的研究结果也反映了蛋鸡和其他物种子宫间的生理差异。

## 参考文献:

- [1] EDSON M A, NAGARAJA A K, MATZUK M M. The mammalian ovary from genesis to revelation[J]. *Endocrine Reviews*, 2009, 30(6): 624-712.
- [2] HALL J M, MCDONNELL D P. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens[J]. *Endocrinology*, 1999, 140(12): 5566-5578.
- [3] PIERRO E, MINICI F, AIESIAN I, et al. Stmmal-Epithelial interaction smodulate estrogen responsiveness in normal human endometrium[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64: 831.
- [4] HOL S, TSANG L L, CHUNG Y W, et al. Establishment of a mouse primary co-culture of endometrial epithelial cells and peripheral blood leukocytes: effect on epithelial barrier function and leukocyte survival[J]. *Cell Biolint*, 2006, 30(12): 977-982.
- [5] 赵诚悦, 马红, 郭镇华, 等. 猪子宫内膜基质细胞和腺上皮细胞的分离培养[J]. *吉林农业大学学报*, 2013, 35(4): 471-474.
- [6] CHERNY R A, FIMDLAY J K. Separation and culture of ovine endometrial epithelial and stromal cells: evidence of morphological and functional polarity[J]. *Biol Reprod*, 1990, 43(2): 241-250.
- [7] WEI P, JIN X, TAO S X, et al. Fas, FasL, Bcl-2 and Bax in the endometrium of rhesus monkey during the menstrual cycle[J]. *Mol Reprod*, 2005, 70(4): 478-484.
- [8] 戈一峰, 黄宇烽, 胡毓安, 等. 人子宫内膜细胞的纯化和培养[J]. *医学研究生学报*, 2005, 18(6): 496-498.
- [9] FORTIER M A, GUILBAULT L A, GRASSO F. Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows[J]. *J Reprad Fertil*, 1988, 83(1): 239-248.
- [10] 陈利平, 朴学娇, 罗永, 等. 奶牛和绵羊子宫内膜细胞体外培养方法的研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(14): 99-104.
- [11] SLONINA D, KOWALIK M K, SUBOCZ M, et al. The effect of ovarian steroids on oxytocin-stimulated secretion and synthesis of prostaglandins in bovine myometrial cells[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2009, 90(3-4): 69-75.
- [12] BARTEL C, TICHY A S, SCHOENKYPL C, et al. Effects of steroid hormones on differentiated glandular epithelial and stromal cells in a three dimensional cell culture model of the canine endometrium[J]. *BMC Veterinary Research*, 2013, 9(1): 1-16.
- [13] SZÓSTEK A Z, GALVÃO A M, FERREIRA-DIAS G M, et al. Ovarian steroids affect prostaglandin production in equine endometrial cells *in vitro*[J]. *J Endocrinol*, 2014, 220(3): 263-276.
- [14] 陈秀荔, 靳亚平, 利光辉, 等. 孕早期家兔子宫内膜细胞的分离培养与形态观察[J]. *西北农林科技大学学报*, 2004, 32(6): 1-4.
- [15] PARK D W, CHOI D S, RYU H S, et al. A well-defined *in vitro* three-dimensional culture of human endometrium and its applicability to endometrial cancer invasion[J]. *Cancer Lett*, 2003, 195(2): 185-192.
- [16] BLÄUER M, HEINONEN P K, MARTIKAINEN P M, et al. A novel organotypic culture model for normal human endometrium: regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(4): 864-871.
- [17] 陈秀荔, 赵永贞, 张彦明, 等. 家兔子宫内膜细胞和平滑肌细胞的分离培养[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(11): 1242-1247.
- [18] 宋宇轩, 曹斌云, 王建刚, 等. 不同性腺激素水平对子宫内膜细胞体外增殖的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(10): 987-

- 991.
- [19] RIDER V. Isolation of hormone responsive uterine stromal cells; an *in vitro* model for stromal cell proliferation and differentiation [J]. *Methods Mol Med*, 2006, 121: 57-67.
- [20] KING A E, CRITCHLEY H O. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory process in the human endometrium [J]. *J Steroid Biochem*, 2010, 120(2-3): 116-126.
- [21] RUSSO L A, PEANO B J, TRIVEDI S P, et al. Regulated expression of matrix metalloproteinases, inflammatory mediators and endometrial matrix remodeling by 17 beta-estradiol in the immature rat uterus[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 124(7): 1-19.
- [22] 黄发才, 吴科榜, 满初日噶, 等. 定安鹅繁殖期不同生殖激素水平变化规律的研究[J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(21): 5255-5257.
- [23] 阿依木古丽, 蔡 勇, 马忠仁, 等. 牦牛子宫内膜细胞的分离培养及性腺激素对其增殖的影响[J]. *中国兽医科学*, 2011, 41(11): 1187-1192.
- [24] FAŁKOWSKA-PODSTAWKA M, BOBOWIEC R, RZESKI W, et al. The effect of interferon-tau and ovarian steroids on the proliferation of bovine endometrial cells *in vitro* [J]. *Pol J Vet Sci*, 2006, 9(4): 239-246.
- [25] SLAYDEN O D, BRENNER R M. Hormonal regulation and localization of estrogen, progesterone and androgen receptors in the endometrium of nonhuman primates: effects of progesterone receptor antagonists[J]. *Arch Histol Cytol*, 2004, 67(5): 393-409.
- [26] BAR A. Differential regulation of calbindin in the calcium-transporting organs of birds with high calcium requirements[J]. *J Poult Sci*, 2009, 46(4): 267-285.

(责任编辑: 袁 伟)