

山羊乳腺上皮细胞培养体系的建立^{*}

欧阳五庆, 钱菊汾

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 为研究乳腺上皮细胞增殖和分化特性及其基因表达的分子机制, 建立了山羊乳腺上皮细胞培养体系。用无菌手术法从健康第二胎泌乳期山羊乳腺取得组织块, 在体外条件下用组织块法进行原代培养。基础培养液用 RPMI 1640, 含胎牛血清 150 mL/L, 添加 EGF (10 μ g/L)、胰岛素 (0.1 mg/L)、E₂ (1 μ g/L)、氢化可的松 (0.1 mg/L)、孕酮 (1 mg/L)、青霉素 (0.1 g/L) 及链霉素 (0.05 g/L), 在铺有胶原的塑料培养板上培养。从细胞接种存活率、细胞群体倍增时间、细胞生长曲线和细胞分裂指数 4 个方面考察了乳腺上皮细胞的生物学性状。结果表明, 在此培养体系中, 山羊乳腺上皮细胞生长良好, 增殖旺盛。细胞产物电泳及蛋白印迹分析结果表明, 培养的细胞为山羊乳腺上皮细胞, 并具有表达山羊酪蛋白的功能。

[关键词] 山羊; 乳腺上皮细胞; 培养体系

[中图分类号] Q 813.1⁺; S827

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0030-05

乳腺是转基因动物技术的一个主要研究对象, 因为通过遗传操作可改变乳汁成分, 获得具有活性成分的重要外源蛋白质产物^[1]。近年来, 乳腺生物反应器研究成功的例子屡有报道^[2], 但通过乳腺生物反应器生产的蛋白质, 能达到商品化所需浓度的却为数不多, 其中一个重要原因是对乳腺上皮细胞的各种生物学特性及其基因表达调控的分子机制了解得不够深入^[3,4]。为此, 本研究建立了山羊乳腺上皮细胞 (goat mammary epithelial cell, GMEC) 培养体系, 为进一步研究 GMEC 增殖和分化特性及其基因表达调控的分子机制提供了有利条件。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

培养用的乳腺组织块来自健康第二胎泌乳期萨能奶山羊。经 7 d 临床观察, 未见任何异常。手术前连续 3 d 每日 1 次隐性乳房炎检查, 均为阴性。取材按一般手术常规消毒乳房中部, 切取少量乳腺组织块, 置于含有培养液的小瓶中, 在超净台上分离修剪, 洗净血凝块, 尽量剥离脂肪组织和结缔组织, 将呈白色颗粒状的腺泡组织剪成 1 mm³ 大小的组织块备用。

1.2 试剂与药品

RPMI 1640 培养液, 按产品说明配制。添加

EGF (10 μ g/L)、胰岛素 (0.1 mg/L)、氢化可的松 (0.1 mg/L)、孕酮 (1 mg/L)、E₂ (1 μ g/L)、青霉素 (0.1 g/L)、链霉素 (0.05 g/L)、胎牛血清 (150 mL/L) 培养液搅拌溶解混合, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。2 g/L 胰蛋白酶溶液, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。标准山羊酪蛋白和标准分子量蛋白均按说明书要求配制。上述试剂及药品均购自 Sigma 公司。

1.3 鼠尾胶原制备

取体重 250 g 左右大白鼠 1 只, 从尾根部切断鼠尾, 置 750 mL/L 乙醇中浸泡 30 min; 无菌条件下将鼠尾切成 1.5 cm 的小段, 剔除皮毛, 抽出尾腱置平皿中; 取 1.5 g 尾腱剪碎浸入 150 mL 0.1 mol/L 醋酸溶液中, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中, 并不时摇动, 48 h 后移入灭菌离心管中; 以 4 000 r/min 离心 30 min, 吸走上清液, 在 13.8 kPa/cm² 高压和 115 $^{\circ}$ C 下灭菌 10 min 后分装入小瓶中, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.4 铺胶原

取少量胶原溶液加入 6 孔培养板中, 使胶原铺满底壁, 倾斜培养板, 吸掉多余胶原。将培养板敞开放置于超净台上, 紫外线照射 30 min 以上, 备用。

1.5 培养用设备

CO₂ 培养箱, 倒置相差显微镜, 美国 Bio-Rad 小型垂直板电泳仪等。

^{*} [收稿日期] 2003-01-21

[基金项目] 国家教委博士点基金资助项目 (7914087)

[作者简介] 欧阳五庆 (1960-), 男, 陕西凤翔人, 教授, 博士, 主要从事乳腺细胞及泌乳生理研究。

1.6 细胞培养及传代

将修剪好的乳腺组织块用牙科探针移入处理好的培养板中,使组织块均匀分布,块间距约0.5 cm。为防止组织块干燥,每孔加入1滴培养液,置37 50 mL/L CO₂培养箱中4~5 h,待组织块贴牢后加培养液至孔高1/2处,置37 50 mL/L CO₂培养箱中培养,3 d后每日观察1次。从第6天起,每2 d换液1次。当细胞长满底壁达70%时,用弯头滴管掀掉全部组织块,洗涤换液。当细胞长满达底壁90%时传代。

首次传代时,先吹打洗涤细胞,吸掉全部培养液,加少量胰酶,以刚好覆盖细胞为宜,吸掉,重复2次,第3次加酶后,在室温下消化5 min,镜下观察,发现细胞质回缩,细胞间隙增大后,加培养液终止消化。反复吹打制成细胞悬液,计数,细胞接种于24孔培养板中,每孔 5×10^4 个细胞,加培养液1 mL,置37 50 mL/L CO₂培养箱中培养。

1.7 培养细胞生物学性状检测

待细胞长出后,用倒置相差显微镜逐日进行常规观察,记录细胞生长状况及特点。在此基础上,检测以下指标。

1.7.1 细胞接种存活率 取出对数生长期细胞,用消化法制成细胞悬液,计数后按每孔接种 2×10^4 个细胞接种于24孔培养板中,每组3孔。每2 h消化并计数1组已贴壁细胞,用下式逐个计算每个时间组的贴壁率,共观察24 h,分12次进行。

接种存活率/% = (贴壁存活细胞数/接种细胞数) × 100%。

1.7.2 细胞群体倍增时间 每孔按 1.5×10^4 个细胞接种于24孔培养板中,培养板事先铺好胶原并经紫外线照射灭菌。于接种后24, 48, 72, 96, 120和144 h分别消化细胞并计数。按下式计算细胞群体倍增时间:

$$T_D = t \log 2 / (\log N_t - \log N_o)$$

式中, T_D 为细胞群体倍增时间, t 为培养时间(h), N_o 为接种细胞数, N_t 为培养 t 小时后的细胞平均数。

1.7.3 细胞生长曲线 每孔按 5×10^4 个细胞接种于24孔培养板中,共分8组,每组4孔。分别于接种后1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9和10 d消化计数细胞平均数。以培养时间为横坐标,以细胞数为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.7.4 细胞分裂指数 将细胞接种在胶原处理过的盖玻片上,每隔24 h取出1组盖玻片,连续8次

对生长在盖玻片上的细胞进行HE染色,封固于载玻片上。将封固好的载玻片置镜下计数,观察和记录1 000个细胞中处于分裂相的细胞数,按下式计算细胞分裂指数:

$$\text{细胞分裂指数} = (\text{分裂相细胞数} / 1\,000) \times 100$$

1.8 细胞鉴定

山羊乳腺上皮细胞的特异表达产物为山羊酪蛋白。

1.8.1 细胞表达产物电泳分析 收集细胞培养第7天上清液作为样品,标准山羊酪蛋白为标准对照,细胞培养液为空白对照,标准分子量蛋白为Marker,按电泳技术常规操作。

1.8.2 细胞表达产物印迹分析 一抗为兔抗山羊酪蛋白抗体,二抗为碱性磷酸酶标记的山羊抗兔IgG抗体,按印迹分析技术规范操作。

1.9 抗体制备

标准山羊酪蛋白用注射用水稀释为4 g/L,与弗氏完全佐剂等体积混合后,乳化成油包水型乳剂。新西兰公兔6只,8~12月龄,体重2~2.5 kg,采用皮下多点注射法免疫。于首次免疫后第10, 20, 30, 40, 50天再加强免疫5次,末次免疫后2周采血分离血清。

2 结果

2.1 原代细胞生长状态

培养第5天,组织块周围有游离出的个别细胞。第6天大部分组织块周围长出细胞。第7天细胞已在组织块周围长出晕圈,形成生长膜,膜边缘整齐光滑,向周围扩展铺开,细胞形态呈短梭形,细胞界限清楚,连接紧密,分布密集。第8天部分生长膜汇合,细胞密度增加,细胞形态向多角形转化,增殖旺盛。第9天细胞生长膜进一步汇合,细胞间联系更紧密。第10天细胞生长膜已大部分汇合,达底壁面积的90%,细胞形态均一,均为上皮样细胞,未见成纤维细胞生长,细胞纯度高。

2.2 传代细胞生长状态

传代后次日,第2代细胞已开始生长增殖。细胞生长旺盛,增殖活力高。细胞呈多角形,形态均一,均为上皮样细胞,未见成纤维细胞生长,细胞纯度高。

2.3 细胞接种存活率

由表1可知,细胞接种后2 h,存活率达到

20%, 22 h 后达到 76%, 表明细胞有较强的生存能力, 也表明底物有较好的生物相容性。

表 1 细胞接种存活率

Table 1 Cell planting survival efficiency			
接种时间/h Planting time	接种细胞数/ $\times 10^4$ Planting cell number	贴壁细胞数/ $\times 10^4$ Adhered cell number	细胞存活率/% Cell survival efficiency
2	0.8	0.16	20
4	0.8	0.29	36
6	0.8	0.42	53
8	0.8	0.46	58
10	0.8	0.50	63
12	0.8	0.53	66
14	0.8	0.55	69
16	0.8	0.57	71
18	0.8	0.58	73
20	0.8	0.59	74
22	0.8	0.61	76
24	0.8	0.61	76

2.4 细胞群体倍增时间

细胞群体倍增时间反映细胞的增殖能力, 接种后 48~ 144 h, 细胞群体倍增时间由 50.7 h 缩短至 31.2 h, 表明细胞增殖能力较强(表 2)。

表 2 细胞群体倍增时间

Table 2 Cell population doubling time						
测定时间 Determine time	24	48	72	96	120	144
倍增时间 Doubling time	-	50.7	38.1	34.3	30.6	31.2

2.5 细胞生长曲线

由图 1 可见, 细胞生长曲线呈典型的“S”形, 符合细胞生长的一般生物学规律。

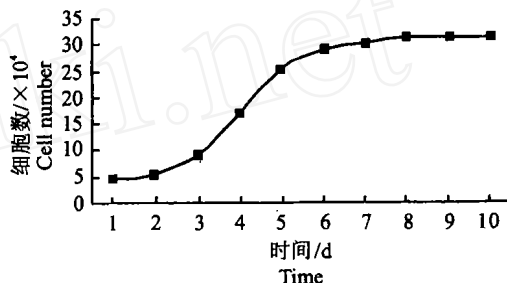


图 1 细胞生长曲线

Fig. 1 Cell growth curve

2.6 细胞分裂指数

细胞分裂指数可考察细胞增殖的旺盛程度, 细胞接种后 120 h, 分裂指数达到 4.12(表 3), 表明细胞增殖活动十分旺盛。

表 3 细胞分裂指数

Table 3 Cell division index								
培养时间/h Cultured time	24	48	72	96	120	144	168	192
分裂指数 Division index	0.44	2.08	3.11	3.81	4.12	2.61	1.01	0.52

2.7 细胞产物电泳结果

由图 2 可见, 上清液 A、B、C 泳道中, 有部分条带与标准山羊酪蛋白重合, 表明细胞表达了山羊酪蛋白。A、B、C 及 F 中染色较深的部分是血清蛋白。

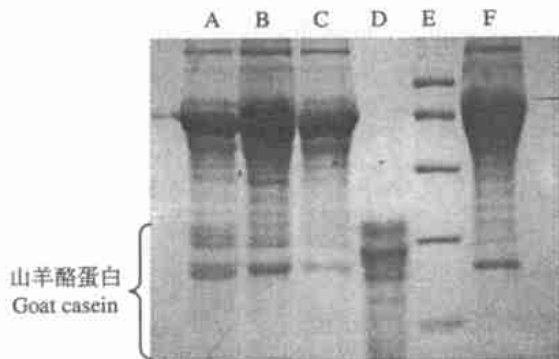


图 2 细胞培养第 7 天上清液电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis of the products of the cell from cultured 7 d

2.8 细胞产物印迹分析

由图 3 可以看出, 杂交后, 细胞培养上清液 A、B、C 泳道中山羊酪蛋白家族与 D 泳道中标准山羊酪蛋白家族完全一致。

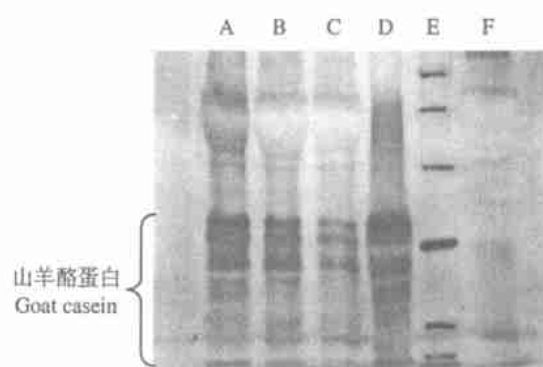


图 3 细胞产物印迹分析

Fig. 3 Western blot of the cell products

A, B, C. 细胞上清液; D. 标准山羊酪蛋白; E. M Marker; F. 细胞培养液

A, B, C. Products of the cell; D. Standard goat casein; E. M marker; F. Medium

3 讨 论

3.1 培养体系的建立

本研究建立了山羊正常乳腺上皮细胞(GM EC)培养体系。这个体系的建立有2个目标: 最大程度地促进 GM EC 的生长增殖, 保持细胞的活力; 最大限度地抑制成纤维细胞的生长增殖, 保持细胞的纯度。为此, 对培养底物、基础培养基、血清、不同生理时期来源的细胞以及添加物进行了比较研究。此培养体系包括以下内容: 细胞来源于泌乳期乳腺, 基础培养基为 RPM I1640, 添加 E_2 、孕酮、EGF、胰岛素和氢化可的松, 培养器皿为铺有胶原的塑料培养板, 血清为犏次牛胎牛血清。从细胞接种存活率、细胞群体倍增时间、细胞生长曲线和细胞分裂指数4个方面考察了乳腺上皮细胞的生物学性状, 结果表明, 在这个体系中, 山羊乳腺上皮细胞生长良好, 增殖旺盛。对 GM EC 经6次原代培养和传代培养, 证明其是一种稳定的适合于乳腺上皮细胞原代培养和传代培养的培养体系。酪蛋白是乳腺上皮细胞的特异表达产物, 同时, 又是一个蛋白家族^[5], 检查培养物中是否有酪蛋白存在, 是鉴别乳腺上皮细胞最有力的证据。本研究中 GM EC 均表达了山羊酪蛋白, 不仅鉴定了细胞, 而且证明 GM EC 在这个体系中具有表达和分泌酪蛋白家族的功能。

3.2 胶原及添加物的作用

许多研究发现, 在含有胶原的基质上培养的细胞生长较好。细胞与胶原通过高亲和力的受体相连^[6], 因而细胞能在胶原上黏附、伸展。无论是盖玻片还是塑料培养板, 只要铺一层胶原, 乳腺上皮细胞就能较好地生长, 可见胶原对分化程度很高的乳腺上皮细胞是不可缺少的。胶原, 特别是IV型胶原, 主要存在于各种基膜中, 是乳腺上皮细胞胞外基质的

主要成分之一。在体内条件下, 乳腺上皮细胞生长在基膜上。在体外条件下, 胶原作为乳腺上皮细胞黏附和生长的支架, 并作为细胞迁移的附着基质, 对乳腺上皮细胞黏附、铺展、增殖、生长以及组织特异性乳蛋白基因的转录、翻译和细胞分化具有诱导作用^[7], 此外, 乳腺上皮细胞间相互接触对乳腺上皮细胞极性的建立和乳蛋白分泌的方向也具有重要作用^[8]。

在体内, 乳腺上皮细胞的增殖、分化和组织结构重塑受许多因素的影响和作用, 这些因素也同样影响体外培养的乳腺上皮细胞的增殖、分化和功能表现^[9]。胰岛素和氢化可的松能促进细胞的贴壁和伸展, EGF 可刺激细胞的生长, E_2 和孕酮能促进细胞的增殖和生长^[10]。

3.3 建立乳腺上皮细胞的意义

乳腺上皮细胞是制作乳腺生物反应器的靶细胞, 可产生医疗价值很高的药用蛋白。对于开发动物乳腺生物反应器来说, 建立永久乳腺上皮细胞系十分关键, 有了动物乳腺上皮细胞系, 可以直接检测目标基因在细胞中的表达, 不必等到细胞变成动物个体。建立永久乳腺上皮细胞系虽是一种难度较大的技术, 但也并不是高不可攀。有限细胞系的建立, 已为建立永久细胞系打下了基础, 也积累了经验。此外, 这个细胞系可用来研究细胞通讯与信号转导、细胞增殖、细胞分化、细胞衰老演变等规律; 可作为泌乳模型, 研究乳蛋白基因表达及乳汁分泌的机制, 探索提高奶畜产奶量的方法和途径; 可作为检测系统, 评价新药及化学产品的毒性及效能; 在干奶期是研究细胞凋亡及乳腺退化的宝贵材料; 还可用来研究乳腺上皮细胞恶变及乳腺癌发生的机制。

该研究下一步应重点探索建立永久乳腺上皮细胞系的方法和条件。

[参考文献]

- [1] 孙宪如, 卢一凡. 转基因动物乳腺作为生物反应器生产药用蛋白——影响表达水平分析[J]. 中国兽医学报, 1994, 14(4): 409- 413
- [2] Brink M F, Bishop M D, Pieper F R. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk[J]. Theriogenology, 2000, 53: 139- 148
- [3] Polejava IA, Campbell K H. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in ansgenesis[J]. Theriogenology, 2000, 53: 117- 126
- [4] Mc Greath K, Howcroft J, Campbell K H, et al. Production of gene targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cell[J]. Nature, 2000, 405: 1066- 1069
- [5] Dureood B R, Iris A H, Robert W J, et al. Prolactin, corticosterone, insulin and triiodothyronine effects on α -lactalbumin production[J]. Endocrinology, 1981, 108(2): 584- 590
- [6] Hung T H, Gilles R, Jeffrey D T. Establishment of mammary epithelial cells(MAC-T): an *in vitro* model for bovine lactation[J]. Exp Cell

- Res, 1991, 197: 191- 199
- [7] Boris Z, Marilyn V D, Warren S, et al Establishment and characterization of bovine mammary epithelial cell line unique properties *in vitro* cell[J]. Dev Biol, 1996, 32: 138- 148
- [8] Hung T H, Michael P. HH2A, an immortalized bovine mammary epithelial cell line, expresses the gene encoding mammary derived growth inhibitor (MDGI) *in vitro* cell[J]. Dev Biol, 1995, 31 A: 25- 29
- [9] Ehmman V L, Peterson W D, M isfeldt D S To grow mouse mammary epithelial cells in culture[J]. J Cell Biol, 1984, 98: 1026- 1032
- [10] Guzman R C, Osborn R C, Bartley J C, et al *In Vitro* transformation of mouse mammary epithelial cells grown serum free inside collagen gels[J]. Cancer Res, 1987, 47: 275- 279

Establishment of culture system in goat mammary epithelial cell

OUYANG Wu-qing, QIAN Ju-fen

(College of Animal Sciences and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Culture system in goat mammary epithelial cell was established to study the proliferation and differentiation and molecular mechanism of gene express in mammary epithelial cell. The mammary tissues from healthy goat second born duration of lactation have been cultured *in vitro*. The basic medium is RPM 1640 and 15% fetal calf serum, and EGF ($10 \mu\text{g/L}$), insulin (0.1 mg/L), E_2 ($1 \mu\text{g/L}$), hydrocortisone (0.1 mg/L), P (1 mg/L), penicillin (0.1 g/L) and streptomycin (0.05 g/L) were added. The cell cultured on the plastics that covered collagen. The cell biological properties were observed and investigated from the cell planting survival efficiency, cell population doubling time, cell growth curve and cell division index. The results showed that the goat mammary epithelial cell grows well and proliferates vigorously in this culture system. The electrophoresis and western blot of the products of the cell showed that the cultured cell is goat mammary epithelial cell, and it has a function that expresses the goat casein.

Key words: goat; mammary epithelial cell; culture system

(上接第 29 页)

Research progress on induced differentiation of embryonic stem cells

MA Yong-jiang, YANG Xue-yi, DOU Zhong-yong

(State Cell Engineering Technology Research Center of Shaanxi Province,
Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Embryonic stem cells were derived from the inner cell masses of cultured blastocysts in mammal and capable of unlimited, undifferentiated proliferation *in vitro*. At the same time, embryonic stem cells could also be directly induced to differentiate in culture into a variety of cell types under appropriate conditions. Homogeneous populations of cells produced by directed differentiation *in vitro* could be applied to study the cell replacement therapies of disease, etc. This paper elaborated signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation on induced differentiation of embryonic stem cells, methods of induced differentiation of embryonic stem cells, research progress and prospects on induced differentiation of embryonic stem cells.

Key words: embryonic stem cells; induced differentiation; signaling mechanisms