

# 环腺苷酸对山羊乳腺上皮细胞增殖的影响\*

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]** 为研究环腺苷酸(cAMP)对乳腺上皮细胞增殖的影响,建立了山羊乳腺上皮细胞培养体系。将细胞分为8个组,分别用 $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  pmol/mL cAMP刺激细胞,从中选出效果明显、组间差异显著的2组作为试验的高剂量组( $1 \times 10^7$  pmol/mL)和低剂量组( $1 \times 10^6$  pmol/mL)。从细胞群体倍增时间、细胞生长曲线和细胞分裂指数3个方面研究了cAMP对山羊乳腺上皮细胞增殖的影响。结果表明,低浓度的cAMP有促进细胞增殖的作用,高浓度cAMP有抑制细胞增殖的作用。

**[关键词]** 山羊; 乳腺上皮细胞; 增殖; 环腺苷酸

**[中图分类号]** S827.1; Q813.1<sup>+</sup>1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2003)04-0049-05

环腺苷酸(cAMP)是最早发现的胞内信使。但近20年来的研究发现<sup>[1]</sup>,cAMP不仅仅存在于细胞内,同时还存在于细胞外,并可能作为第一信使对细胞的生命活动发生影响。20世纪90年代初,王秋芳等<sup>[2]</sup>对山羊的泌乳机理进行了一系列研究,发现cAMP使乳房明显增大,并可显著增加泌乳后期山羊的泌乳量。这表明外源cAMP对山羊的泌乳性能具有调控作用,能够促进乳腺发育和乳汁的合成与分泌。乳房体积的增大与细胞数量的增加直接相关。但cAMP对体外培养的山羊乳腺上皮细胞(goat mammary epithelial cell, GM EC)的增殖有何影响,尚未见报道。为此,本研究在建立了GM EC培养体系的基础上,研究了cAMP对GM EC增殖的影响。

## 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7d临床观察,未见任何异常。手术前连续3d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 $1 \text{ mm}^3$ 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

( $10 \mu\text{g/L}$ )、胰岛素( $0.1 \text{ mg/L}$ )、氢化可的松( $0.1 \text{ mg/L}$ )、孕酮( $1 \text{ mg/L}$ )、 $\text{E}_2$  ( $1 \text{ g/L}$ )、青霉素( $0.1 \text{ g/L}$ )、链霉素( $0.05 \text{ g/L}$ )、胎牛血清( $150 \text{ mL/L}$ )培养液搅拌溶解混合, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,4℃冰箱保存。2 g/L胰蛋白酶溶液用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,4℃冰箱保存。标准山羊酪蛋白和标准分子质量蛋白均按说明书要求配制,cAMP为 $20 \text{ mmol/L}$ 。上述试剂及药品均购自Sigma公司。

### 1.3 鼠尾胶原制备

取体重250g左右大白鼠1只,从尾根部切断鼠尾,置 $750 \text{ mL/L}$ 乙醇中浸泡30min;无菌条件下将鼠尾切成1.5cm的小段,剔除皮毛,抽出尾腱置平皿中;取1.5g尾腱剪碎浸入 $150 \text{ mL } 0.1 \text{ mol/L}$ 醋酸溶液中,置4℃冰箱中,并不时摇动,48h后移入灭菌离心管中;以 $4000 \text{ r/min}$ 离心30min,吸取上清液, $13.8 \text{ kPa/cm}^2$  115℃高压灭菌10min后分装入小瓶中,-20℃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。将培养板敞开置于超净台上,紫外线照射30min以上,备用。

### 1.5 培养用设备

$\text{CO}_2$ 培养箱,倒置相差显微镜,美国Bio-Rad小型垂直板电泳仪等。

### 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

\* [收稿日期] 2003-03-17

[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。

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 CO<sub>2</sub> 培养箱中 4~5 h,待组织块贴牢后加培养液至高孔 1/2 处,置 37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub> 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  $5 \times 10^4$  个细胞,加培养液 1 mL,置 37℃,50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.7 cAMP 试液浓度的确定与细胞分组

为了深入考察 cAMP 对 GM-EC 增殖的影响,试验设计为单因素多水平处理,试验统一用 24 孔培养板,细胞共分为 8 个组,每组 4 孔。1~7 组为试验组,用不同剂量的 cAMP 处理细胞,第 8 组为对照组,不加 cAMP。各组在处理的时间、频率、持续时间、施加方法等条件方面完全一致。第 1 组为生理剂量的 cAMP 浓度  $1 \times 10^6$  pmol/mL,第 2~7 组依次按 10 倍生理剂量间隔递增。以接种后 120 h 细胞群体倍增时间为指标,从中选出效果明显,组间差异显著的 2 组作为本次试验的高剂量组 ( $1 \times 10^7$  pmol/mL) 和低剂量组 ( $1 \times 10^6$  pmol/mL)。

### 1.8 cAMP 影响细胞增殖的观察指标

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。

1.8.1 细胞群体倍增时间 每孔按  $1.5 \times 10^4$  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 120 h 考察点消化细胞并计数。按下式计算细胞群体倍增时间:

$$T_D = t \log_2 / (\log N_t - \log N_0)$$

式中,  $T_D$  为细胞群体倍增时间,  $t$  为培养时间 (h),  $N_0$  为接种细胞数,  $N_t$  为培养  $t$  小时后的细胞平均数。

1.8.2 细胞生长曲线 每孔按  $5 \times 10^4$  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 和 8 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。

1.8.3 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:

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

### 1.9 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。

1.9.1 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,以标准山羊酪蛋白为标准对照,细胞培养液为空白对照,标准分子质量蛋白为 Marker,按电泳技术常规操作。

1.9.2 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。

### 1.10 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 10, 20, 30, 40, 50 d 加强免疫 5 次,末次免疫后 2 周采血分离血清。

## 2 结果与分析

### 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 cAMP 对细胞群体倍增时间的影响

细胞群体倍增时间反映细胞的增殖能力。在 cAMP 刺激下,接种后 120 h 细胞群体倍增时间由 31.4 h 缩短至 22.0 h,表明细胞增殖能力增强(表 1)。

表 1 cAMP 对细胞群体倍增时间的影响

Table 1 Effect of cAMP on the cell population doubling time

组别 Groups	cAMP 浓度/(pmol · mL <sup>-1</sup> ) Concentration of cAMP	倍增时间/h Doubling time
1	1 × 10	31.4
2	1 × 10 <sup>2</sup>	29.8
3	1 × 10 <sup>3</sup>	27.8
4	1 × 10 <sup>4</sup>	25.6
5	1 × 10 <sup>5</sup>	23.8
6	1 × 10 <sup>6</sup>	22.0
7	1 × 10 <sup>7</sup>	26.5
8	0	30.6

2.4 cAMP 对细胞生长曲线的影响

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。在 cAMP 刺激下, 细胞生长曲线左移, 细胞提前进入对数生长期, 低剂量组更明显。

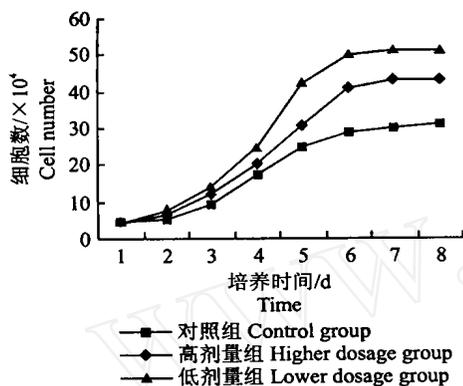


图 1 细胞生长曲线

Fig. 1 Cell growth curve

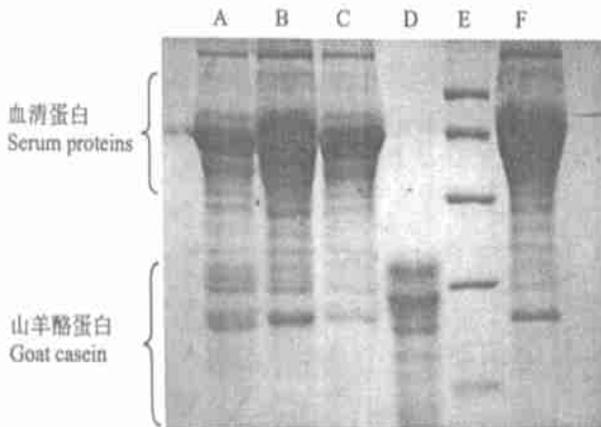


图 2 细胞培养第 7 天上清液电泳图谱

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

Fig. 2 Electrophoretogram of the products of the cell after being cultured for 7 d

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

2.5 cAMP 对细胞分裂指数的影响

细胞指数考察细胞增殖的旺盛程度。各组细胞的分裂指数在接种后 120 h 均达到最高值, 低剂量和高剂量组均显著高于对照组, 表明 cAMP 使细胞增殖活动增强(表 2)。

表 2 cAMP 对细胞分裂指数的影响

Table 2 Effect of cAMP on the cell division index

培养时间/h Cultured time	对照组 Control group	高剂量组 Higher dosage group	低剂量组 Lower dosage group
24	0.44	0.51	0.74
48	2.08	2.16	2.21
72	3.11	3.29	3.81
96	3.81	4.34	5.15
120	4.12	5.17	6.06
144	2.61	2.02	2.10
168	1.01	0.78	0.36
192	0.52	0.32	0.21

2.6 细胞产物电泳结果

由图 2 可见, 细胞培养上清液 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。

2.7 细胞产物印迹分析

由图 3 可见, 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。

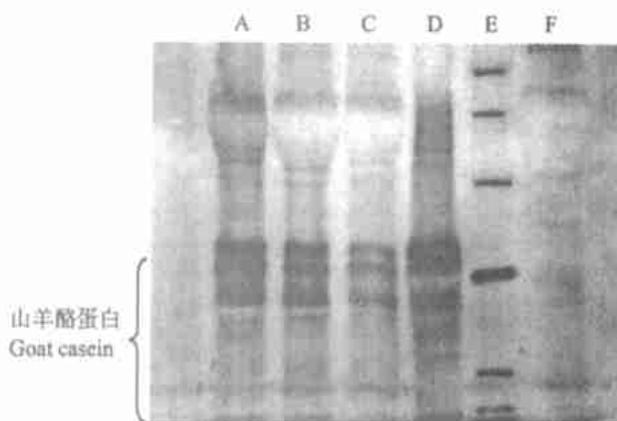


图 3 细胞产物印迹分析

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

Fig. 3 Western blot of the cell products

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

## 3 讨 论

### 3.1 细胞系的建立及确认

本研究建立了山羊正常乳腺上皮细胞培养体系。细胞来源于山羊泌乳期乳腺,基础培养基为 RPM 11640 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。结果表明,在这个体系中,山羊乳腺上皮细胞生长良好,细胞纯度高。酪蛋白是乳腺上皮细胞的特异表达产物,同时,它又是一个蛋白家族,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 外源 cAMP 对 GM EC 增殖的影响及作用机理

细胞增殖是细胞通过细胞周期,完成细胞分裂而使细胞数量不断增加的生命现象。细胞通过增殖以维持生物的生长、发育、繁衍后代。即使动物到了成年也还要通过细胞增殖补充体细胞的耗损及满足生理活动的需要。

众所周知,cAMP 是最早发现的胞内信使。20 世纪 60 年代初期,Konijn 和 Bonner 在研究粘菌遭受饥饿刺激时的聚集行为和聚集因子时,就已发现 cAMP 还存在于细胞外并在真核盘基网柄菌 (*Dicostyostelium discoideum*) 的整个生活史中起极重要的生长、发育调节作用<sup>[1]</sup>。20 世纪 80 年代末以来,胞外 cAMP 的信号转导机理取得了突破性的进展,最重要的是发现胞外 cAMP 受体 (cAMP receptor, cAR)。首先是光亲和技术鉴定出 cAMP 受体,继而将其纯化制备了抗体和分离成功 cAR cDNA。根据 cDNA 推断的受体模型,表明它是一个由 392 个氨基酸组成的,具有 7 次跨膜结构的蛋白质<sup>[3,4]</sup>。

cAR 并不是细胞生来就有的,而是在细胞发育的一定阶段才表达,也只有表达了 cAR 的细胞才能进入发育的下一阶段。现已明确,胞外 cAMP 结合受体后引起的跨膜及胞内信号转导途径至少包括以下 3 条:环鸟苷酸 (cGMP)、双信使  $IP_3$  与 DG 及环腺苷酸。胞外 cAR 都通过 G 蛋白与鸟苷酸环化酶和磷脂酶 C 偶联。它还参与 G 蛋白对 cAMP 环化酶的激活。产生胞内 cAMP 后,cAMP 一方面分泌到胞外作用于第二波细胞,起信号接转作用;另外也可能通过激活依赖 cAMP 的蛋白激酶和 cAMP 反应元件影响基因表达。G 蛋白还参与 cAR 和所有 3 种

信号转导途径的偶联<sup>[5]</sup>。此外,胞外 cAMP 还能引起胞外  $Ca^{2+}$  内流。

cAMP 信号在高等和低等动物细胞中具有非常广泛的细胞反应生理调节功能,这些调节功能都是通过依赖 cAMP 的蛋白激酶起作用的<sup>[6]</sup>。

本次试验中,cAMP 对 GM EC 的增殖有显著促进作用,从细胞群体倍增时间来看,当 cAMP 浓度达到  $1 \times 10^6$  pmol/mL 时,缩短为 22.0 h,此时对照组为 30.6 h。而 cAMP 浓度进一步提高,达到  $1 \times 10^7$  pmol/mL 时,倍增时间反而延长,达到 26.5 h。这点与激素(胞外第一信使)调节中普遍存在的负反馈机制一样,当浓度过高时,反而起抑制作用。细胞生长曲线显示,cAMP 使生长曲线左移,使细胞提前进入对数生长期,对细胞增殖有促进作用。从细胞分裂测定结果看,cAMP 使 GM EC 分裂指数显著提高,培养 120 h 后高剂量组达到 5.17,低剂量组达到 6.06,而对照组为 4.12。生长曲线和分裂指数均显示,GM EC 增殖对 cAMP 具有剂量依赖性特点,但当浓度超过一定值后,出现抑制结果,这表明在 cAMP 转导的复杂机制中,也可能存在着负反馈机制。

根据目前文献积累的资料,在胞外起作用的胞内信号分子,已不仅仅是 cAMP,还包括多种经典的或近年来发现的胞内信号分子。存在这种兼性信号分子的生物体,也不仅仅是盘基网柄粘菌,而且包括了许多高等动物、植物和微生物<sup>[7]</sup>。因此认为,兼性胞外信号分子的存在,可能是具有普遍意义的,是一种规律性的生物现象。

### 3.3 cAMP 对细胞增殖与分化的双重作用

已有的大部分实验认为,cAMP 对细胞的作用主要是促进分化,只有少数实验认为 cAMP 对细胞增殖有促进作用。这些表面上看起来似乎矛盾的结果,实际上反映了 cAMP 作用的复杂性。在不同的生理条件下,对不同种类的细胞,cAMP 可能表现出不同的作用,这种差异可能与 cAMP 受体在不同的时空条件下的表达与分布有关<sup>[8]</sup>。另外,在胚胎发育的早期,已检测到 cAMP 的存在,并一直伴随动物生命的全过程。由受精卵到成体,细胞种类由 1 种演变为 200 多种,细胞在增殖中分化,在分化中增殖,分化中有增殖,增殖中有分化。在个体发育中,增殖与分化这两个相辅相成的生物学过程,互为前提,并按照严格的时空顺序进行。而作为兼性信号分子的 cAMP 始终存在于每个细胞的内外,并在每种细胞、组织、器官中保持着动态变化。因此很难笼统地、静

止地、绝对地说 cAMP 的作用是以促进增殖为主, 还是以促进分化为主。在所有信号分子中, cAMP 是最先被发现的, 也是研究的最广泛、最深入的。cAMP 的发现者 Sutherland 也因此获得诺贝尔奖, 由此可见 cAMP 对细胞的重要性。但 cAMP 复杂的

作用和作用机理, 无论对于体内实验还是体外细胞培养实验, 尚有许多问题在探索之中, 远远没有达到可以做结论的时候。因此, 欲阐明 cAMP 在不同条件下对不同细胞的不同作用和作用机理, 仍需做大量的研究工作。

### [参考文献]

- [1] Klein P S, Sun T J, Saxe H C L, et al. A chemoattractant receptor controls development in *D. discoideum* [J]. Science, 1989, 241: 1467- 1472.
- [2] 王秋芳, 欧阳五庆, 李创宏. 外源环核苷酸对山羊泌乳性能的影响[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21: 99- 103
- [3] Dekker C A, Segal A W. Signals to move cell[J]. Science, 2000, 287: 982- 985.
- [4] Endl I, Konzck A, Nellen W. Antagonistic effects of signal transduction by intracellular and extracellular cAMP on gene regulation in *D. discoideum* [J]. Mol Biol Cell, 1996, 7: 17- 24
- [5] Firtel R A. Signal transduction pathways controlling multicellular development in *D. discoideum* [J]. TIG, 1991, 7(11/12): 381- 388
- [6] Parent C A, Devreotes P N. A cell's sense of direction[J]. Science, 1999, 284: 765- 769.
- [7] Hunter T. Signaling-2000 and beyond[J]. Cell, 2000, 100: 113- 127.
- [8] Bolger G B. Molecular biology of cyclic AMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes[J]. Cell Signal, 1994, 6(8): 851- 859.

## Effect of cAMP on proliferation in goat mammary epithelial cell

OUYANG Wu-qing, QIAN Ju-fen

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

**Abstract:** Culture system in goat mammary epithelial cell for studying the effect of cAMP on proliferation in mammary epithelial cell was established. The cell was divided into 8 groups and stimulated by cAMP in  $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^7$  pmol/mL respectively. The two groups with tangible results and remarkable difference among the groups were selected from the results. Then the two groups served as the higher dosage group ( $1 \times 10^7$  pmol/mL) and lower dosage group ( $1 \times 10^6$  pmol/mL) in this study. The effect of cAMP on proliferation in goat mammary epithelial cell was studied from the cell population doubling time, the cell growth curve and the cell division index. The results showed that the lower concentration of cAMP can promote the cell proliferation and the higher concentration of cAMP can inhibit the cell proliferation.

**Key words:** goat; mammary epithelial cell; culture system; cAMP