

# 体外培养的牛乳腺上皮细胞形态研究<sup>\*</sup>

彭新荣, 郑月茂, 张 涌

(西北农林科技大学 生物工程研究所, 陕西 杨凌 712100)

**[摘 要]** 通过有效的细胞培养方法获得了牛乳腺上皮细胞系, 并系统观察了乳腺上皮细胞的长出、贴壁、聚集、迁移、分裂、分化、凋亡等一系列形态变化。结果发现, 原代培养的乳腺上皮细胞大多数呈卵圆形, 细胞之间连接成片, 单层生长, 如鹅卵石铺过路面, 乳腺上皮细胞和成纤维细胞混生时分区分区生长, 界线明显。传代的乳腺上皮细胞呈岛屿状聚集生长, 细胞核呈圆形或椭圆形, 核仁2~4枚; 在含雌激素的培养液中, 细胞出现双核或多核现象, 但仍表现一定的接触抑制现象。多次传代后的乳腺上皮细胞含不同的细胞类型, 通过光镜观察, 部分细胞仍保持较快的分裂增殖能力; 部分细胞渐渐分化, 出现长形细胞、三角形细胞。上皮细胞增殖分化可形成圆顶型结构, 乳腺上皮细胞可产生并分泌乳汁, 分泌到细胞外的乳汁流动形成网状结构。

**[关键词]** 体外培养; 牛; 乳腺上皮细胞; 细胞形态

**[中图分类号]** Q 813.1<sup>+</sup>1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2005)01-0013-05

培养原代或传代的牛乳腺上皮细胞在国内少见报道, 而有关牛乳腺上皮细胞的形态学资料更是寥寥无几。虽然国内学者<sup>[1]</sup>对山羊乳腺上皮细胞进行了研究, 但牛乳腺上皮细胞与人乳腺上皮细胞更为类似, 对牛乳腺上皮细胞进行体外培养, 可为乳腺癌的发病机制提供动物模型。而对于生产转基因动物, 转基因牛比转基因羊更具有生产意义, 因此有必要对牛乳腺上皮细胞作进一步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

从西安屠宰场选取泌乳期奶牛, 无菌手术切取乳腺实质组织, 置于预先加有培养液和青霉素、链霉素的小青瓶中, 尽快运回实验室。在无菌间, 用添加青霉素、链霉素的Hanks液洗3次, 将腺泡组织剪成1 mm<sup>3</sup>大小的块备用。培养液为DMEM/F12, 其中添加胎牛血清(100 mL/L)、青霉素(0.05 g/L)、链霉素(0.05 g/L)、胰岛素转铁蛋白硒钠(10 mL/L)、表皮生长因子(20 μg/L)。选择性添加17β雌二醇(5 mg/L)。

### 1.2 方 法

将修剪好的乳腺组织块用牙科探针轻轻贴于直径36 mm的培养皿中, 每个平皿15块左右, 植块间

距0.5 cm。加入培养液, 每3 d换液1次, 待细胞长满底壁70%时, 用弯头滴管掀掉全部组织块, 洗涤换液。当细胞长满底壁90%时传代。根据成纤维细胞和上皮细胞对胰蛋白酶的敏感性不同, 可将上皮样细胞分离纯化。传代时, 吸掉全部培养液, 在显微镜下, 用细胞刮刀轻轻刮去大部分成纤维细胞, 用D-Hanks液洗去刮掉的成纤维细胞, 加入少量成纤维细胞专用消化液, 待剩余成纤维细胞变圆后, 轻轻振荡, 立即倾倒入消化液, 改用上皮细胞专用消化液消化上皮细胞, 显微镜下控制消化。待上皮样细胞变圆后, 立即倾倒入消化液, 加入培养液, 用吸管微微吹打振荡制成细胞悬液, 计数, 传代。用倒置相差显微镜观察牛乳腺上皮细胞的结构及生长形态。

## 2 结 果

培养2 d后, 组织块周围开始长出成纤维细胞。成纤维细胞呈放射状、星状, 细胞间间隙较大, 分散生长。乳腺上皮细胞间排列紧密, 呈单层生长, 如鹅卵石铺过路面。在成纤维细胞长出后, 再培养8 d左右出现上皮样细胞, 细胞呈多角形, 从组织块周围长出, 细胞间排列紧密, 形成鹅卵石样的单层聚集(图1)。用选择性消化液消化传代2~3次后, 可分别得到纯化的成纤维细胞和乳腺上皮细胞(图2, 3)。纯化

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2004-12-24

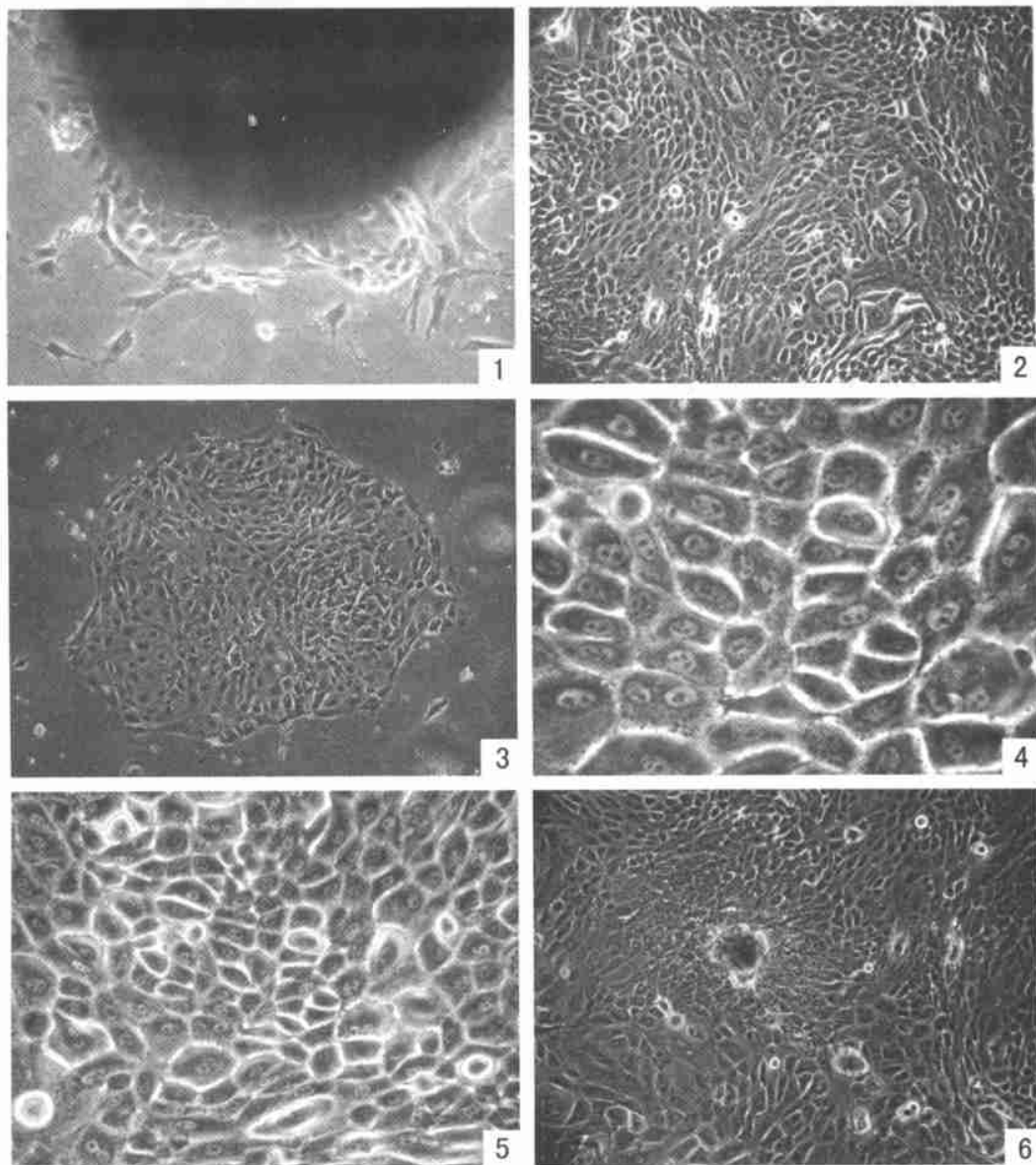
[基金项目] 国家“863”高技术研究发展计划项目(2001AA213081)

[作者简介] 彭新荣(1977-), 女, 新疆伊宁人, 在读硕士, 主要从事胚胎工程和细胞生物学研究。

[通讯作者] 张 涌(1956-), 男, 内蒙古和林格尔人, 教授, 博士生导师, 主要从事胚胎学与胚胎工程研究。

的乳腺上皮细胞通过单细胞悬浮后传代。乳腺上皮细胞铺展过程中首先由圆球形变为圆饼形,再由圆饼形逐渐铺开伸展,成为扁平的极性细胞(polarized cell),有的为梭形,有的为三角形,有的为不规则的多边形,呈岛屿状聚集生长(图3)。当细胞相互接触形成片层后,细胞的极性变得不明显。乳腺上皮细胞

核呈圆形或椭圆形,核仁2~4枚(图4)。多次传代后的乳腺上皮细胞含不同的细胞类型,通过光镜观察,部分细胞仍保持较快的分裂增殖能力,在每一个细胞的周围,有一圈亮的光晕,称为生长晕(growth hallow)(图5);部分细胞渐渐分化,细胞之间形态不均一,出现长形细胞、三角形细胞(图6)。



图版1~6 体外培养的牛乳腺上皮细胞形态观察

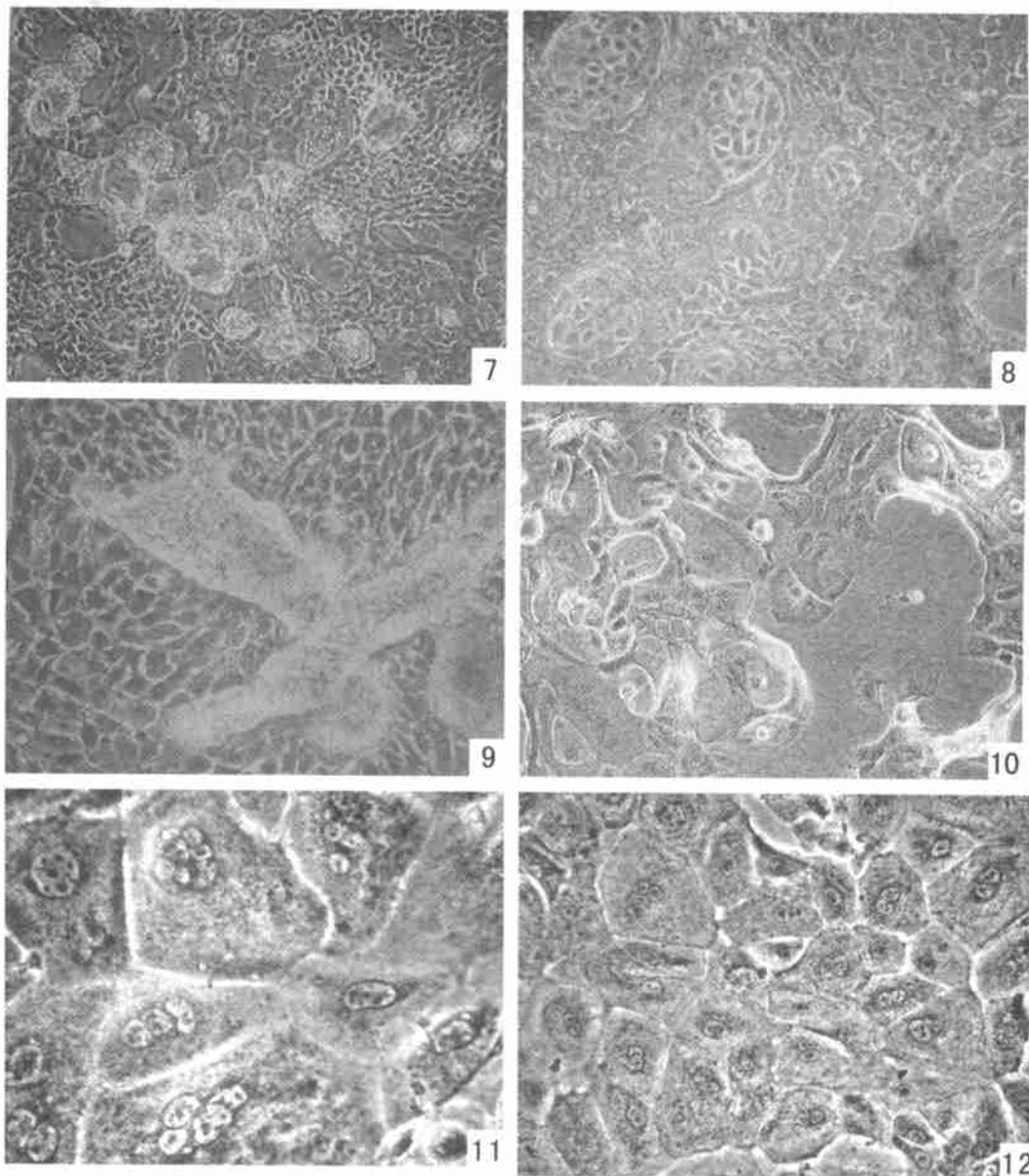
1. 原代, 乳腺上皮细胞从组织块中长出,  $\times 300$ ; 2. 3代, 纯化的乳腺上皮细胞,  $\times 300$ ; 3. 4代, 多次传代的乳腺上皮细胞, 有的为梭形, 有的为三角形, 有的为不规则多边形, 呈岛屿状聚集生长,  $\times 300$ ; 4. 5代, 乳腺上皮细胞核呈圆形或椭圆形, 核仁2~4枚,  $\times 600$ ; 5. 6代, 旺盛生长的细胞周围有生长晕,  $\times 500$ ; 6. 7代, 部分细胞渐渐分化, 细胞之间形态不均一, 出现长形细胞、三角形细胞,  $\times 300$

Plate 1-6 The appearance of bovine mammary epithelial cells which culture *in vitro*

1. 1st passage, the mammary epithelial cell emerge from tissue fragment,  $\times 300$ ; 2. 3th passage, the pure mammary epithelial cell,  $\times 300$ ; 3. 4th passage, majority of the cells are short shuttle-like or guboidal and formed island monolayer aggregates,  $\times 300$ ; 4. 5th passage, the cell nucleus are circular or oval which has 2-4 cores,  $\times 600$ ; 5. 6th passage, growth hallow around the cells,  $\times 500$ ; 6. 7th passage, part of cells develop into different cell appearance,  $\times 300$

有时候胞质内出现小的颗粒结构和泡状结构(图7), 分别为变形的线粒体及溶酶体。当乳腺上皮细胞融合后, 形成类似圆顶状(dome-like)的结构(图8)。乳腺上皮细胞可产生大小不等的乳滴, 并不断分泌到细胞外, 分泌到细胞外的乳汁流动形成网

状结构(图9)。部分细胞体积增大, 反差增大, 细胞色暗, 轮廓明显(图10)。在添加雌激素的培养液里, 细胞出现双核或多核现象, 细胞内核仁数增多(图11), 但仍表现出单层生长和一定的接触抑制现象(图12)。



图版 7~ 12 体外培养的牛乳腺上皮细胞形态观察

7. 8 代, 细胞胞质内出现小的颗粒结构和泡状细胞,  $\times 300$ ; 8. 9 代, 乳腺上皮细胞形成类似圆顶状的结构,  $\times 400$ ; 9. 10 代, 乳腺上皮细胞分泌到细胞外的乳汁流动形成网状结构,  $\times 500$ ; 10. 11 代, 部分细胞体积增大, 反差增大,  $\times 500$ ; 11. 8 代, 在添加雌激素的培养液里, 细胞体积增大, 出现双核或多核现象, 细胞内核仁数增多,  $\times 600$ ; 12. 9 代, 核型改变的细胞仍表现出单层生长和一定的接触抑制现象,  $\times 500$

Plate 7- 12 The appearance of bovine mammary epithelial cells which culture *in vitro*

7. 8th passage, granule-structure and vesicle-structure in cytoplasm,  $\times 300$ ; 8. 9th passage, dome-like structure of bovine mammary epithelial cells,  $\times 400$ ; 9. 10th passage, the milk secreted by the cells formed net-structure,  $\times 500$ ; 10. 11th passage, the volume of parts of cells is larger, the cells contrast distinctively,  $\times 500$ ; 11. 8th passage, in the medium with estrogen, the cells developed multi-nucleus,  $\times 600$ ; 12. 9th passage, the cells still remain the characters of monolayer growth and contact-restrain,  $\times 500$

### 3 讨 论

本研究用组织块法培养牛乳腺上皮细胞, 10 d 左右即长出乳腺上皮细胞。组织块法培养长出的牛乳腺上皮细胞比较整齐, 易于纯化, 而且操作方法比较简单。用乳腺上皮细胞消化液结合刮除法, 可以得到较纯的牛乳腺上皮细胞系。最先建立牛乳腺细胞系的是 Schmid 等(1983)<sup>[2]</sup>, 这些细胞系被命名为 BM GE+ HM, BM GE+ H 及 BM GE- H (BM GE 代表 Bovine Mammary Gland Epithelium; + H, - H 代表在细胞传代过程中加激素或不加激素)。这些细胞系是利用传代乳腺细胞单克隆的方法得到的, 细胞系 BM GE+ HM 没有上皮细胞多角形的典型形态特点, 而是具有较长突起的瘦长形。由于这个细胞系能够合成细胞角蛋白及桥粒蛋白, 证明这一细胞系是上皮型的。BM GE+ H 及 BM GE- H 均具有典型的上皮细胞的形态特点, 都能合成细胞角蛋白, 但都不形成圆顶或泡状结构。本研究从牛乳腺细胞原代培养开始, 系统观察了乳腺上皮细胞的长出、贴壁、聚集、迁移、分裂、分化、凋亡等一系列形态变化。随着细胞传代次数的增加, 培养的乳腺上皮细胞分化为不同形态类型的上皮细胞。而且部分细胞高度分化, 形成圆顶型结构。有研究<sup>[3,4]</sup>表明, 这些圆顶型结构与生长在塑料或玻璃底物上的细胞上皮层下的液体积聚有关, 许多乳腺细胞系生长在塑料底物上都形成类似圆顶型结构, 包括人原代乳腺上皮细胞系和山羊乳腺上皮细胞系<sup>[5]</sup>。

纯化的乳腺上皮细胞通过单细胞悬浮后传代, 传代的乳腺上皮细胞铺展过程中首先由圆球形变为圆饼形。圆饼形细胞被称为放射状铺展细胞(radial spread cell), 放射状细胞逐渐铺开伸展, 成为扁平的极性细胞。极性细胞多为三角形、长形、多边形, 即使接种的是单细胞悬液, 上皮细胞仍呈岛屿状聚集, 这一现象与细胞的运动有关。细胞运动与细胞质周边部分伸出的伪足有关, 这些伪足向外伸出后, 在适当的生长基质部位停留或者附着在某处, 细胞体内的微管微丝重新排列, 进一步引起胞质流动, 于是, 整个细胞发生移动。集聚成岛屿状的细胞通过桥粒连接、紧密连接进行细胞之间的信息通讯, 协调细胞之间的增殖与分化。当细胞相互接触形成片层以后, 细胞的极性变得不明显, 细胞厚度变高, 使 DNA 合成受到抑制, 此时细胞便不再分裂增殖。当细胞分裂停止后, 细胞数量发生“停滞”不再增加。在本研究过程中, 将牛乳腺上皮细胞培养在含雌激素的培养液里, 细胞的核型发生了显著变化。有报道<sup>[6]</sup>认为, 雌激素可诱发人乳腺癌, 乳腺癌受到表皮生长因子家族类型的调控, EGFR 基因及其相关基因的扩增及过度表达与细胞的恶性转化密切相关, 雌激素可以通过影响生长因子的合成来发挥促进增殖作用。但对于雌激素的致癌性, 仍有待进一步研究证实。本研究为雌激素可诱导体外培养的乳腺上皮细胞系向恶性细胞系转化提供了资料。这一现象未见其他学者有相关报道。

### [参考文献]

- [1] 欧阳五庆. 山羊乳腺上皮细胞培养体系的建立及 cAMP 对该细胞的影响[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 1999.
- [2] Schmid E, Schiller D L, Grund C. Tissue type-specific expression of intermediate filament proteins in a cultured epithelial cell line from bovine mammary gland[J]. Cell Biol, 1983, 96(1): 37- 50.
- [3] Panteschenko A G, Yang T J. Mitogenic responsiveness of caprine mammary epithelial cells to endocrine and cytokine factors[J]. Endocrine, 1999, 10(2): 123- 130.
- [4] Dale E. Synthesis of extracellular matrix proteins in bovine mammary epithelial cells[J]. In Vitro Cell Biol Anim, 2001, 37: 629- 632.
- [5] 郑月茂, 彭新荣, 张涌. 体外培养的山羊乳腺上皮细胞形态研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2004, 32(3): 35- 40.
- [6] 郑建涛, 林永, 曾金华, 等. 雌激素受体、表皮生长因子受体在乳腺癌中表达的意义探讨[J]. 福建医药杂志, 1998, 20(3): 99.

## Study on the appearance of *vitro*-cultured bovine mammary epithelial cells

PENG Xin-rong, ZHENG Yue-mao, ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Bovine mammary epithelial cell lines were obtained by culturing tissue fragment. Then the

appearance of these cells were studied by light microscope. The results are as follows: The fibroblast cell and the bovine mammary epithelial cells grow in different areas. The bovine mammary epithelial cells were cultured *in vitro* through single-cell afloat, which formed island monolayer aggregates, then the cells propagated and formed dome-like construction. The cell nucleus is circular or oval with 2-4 cores. In the culture medium with estrogen, the nucleus type changed. The mammary epithelial cells can be developed into many cell types, the majority of which are short shuttle-like or guboidal. The cells connected with each other properly and formed net-like construction.

**Key words:** *in vitro* culture; mammary epithelial cell; the appearance of cells

(上接第12页)

**Abstract ID:** 1671-9387(2005)01-0009-EA

## Study on culture characteristics of rat cardiomyocytes *in vitro*

LIU Jun-ping<sup>1,2</sup>, CAO Hong-guo<sup>1</sup>, AN Zhi-xing<sup>1</sup>,  
ZHAO Hui-yang<sup>1</sup>, WEN Ye-fei<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>

(1 Institute of Bio-engineering, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

**Abstract:** Rat cardiomyocytes were isolated to obtain cultured cardiomyocytes by means of tissue culture, which were cultivated and identified to study their biological characteristics so as to be used in heart cell engineering, seed cells tissue engineering and other research fields. Results indicated that cardiomyocytes isolated and cultivated had many shapes, most of which are like slabstone. Cardiomyocytes with pseudopod became star-like in their growth. Cardiomyocytes in culture on 4th day can interlace one another and became cell clusters with rhythmical beats; PAS glucogen staining of cardiomyocytes was positive, glucogen in cytoplasm were stained to purple; cardiomyocytes were negative with Hoechst cell apoptosis assay kit; Growth curve of 1st and 6th passage cardiomyocytes were S-shaped; Cardiomyocytes were strong positive and had high purity with  $\alpha$ -sarcomeric actin ( $\alpha$ -SA) immunohistochemistry assay. Above all, cardiomyocytes can be used in heart cell engineering and tissue engineering and in other fields as feed cells.

**Key words:** SD rat; cardiomyocytes; biological characteristics