

# 奶牛乳腺上皮细胞系的建立及高温对细胞超微结构的影响

## Establishment of a Bovine Epithelial Mammary Cell Line and its Ultrastructural Changes When Exposed to Heat Stress

杜娟, 狄和双, 王根林\*

DU Juan, DI He-Shuang and WANG Gen-Lin\*

南京农业大学动物科技学院, 南京 210095

College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**摘要** 应用差酶消化法和反复贴壁法在体外建立奶牛乳腺上皮细胞培养方法,以细胞流式术、免疫组化、免疫印迹、超微结构观察等方法对乳腺上皮细胞特性进行检测,并研究高温热刺激对乳腺细胞超微结构的影响。实验结果表明,运用本方法建立的奶牛乳腺上皮细胞系上皮特性及遗传特征完备,41℃ 1h 的高温热刺激可使乳腺细胞染色质浓缩、线粒体肿胀、空泡化,形成凋亡小体,说明高温可以诱发乳腺细胞凋亡。

**关键词** 奶牛, 乳腺细胞, 高温

中图分类号 Q813.7 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0471-06

**Abstract** A simple method of trypsin/collagenase I alternative digestion and iterative culture flask adherence to discard fibroblasts for bovine mammary cell culture was established in this study. By immunohistochemistry, flow cytometry, western blot, Electron microscopy analysis, the characteristics of bovine mammary cells were investigated *in vitro*. Effect of hyperthermia on the cell ultrastructures was also observed. The results showed that the mammary cells were diploid epithelia with intact 30 pairs chromatins, which could secrete alpha-casein into the medium. After exposed to hyperthermia, the cell condensed chromatin like crescent on the nuclei verges, mitochondria occurred expansion and vacuolization, and apoptotic bodies appeared, which suggested that heat stress could induce apoptosis of the mammary epithelia.

**Key words** bovine, mammary cells, heat stress

乳腺上皮细胞是特化的具有分泌性的功能细胞,是乳腺行使泌乳功能的细胞基础,亦是研究泌乳启动、功能维持、退化等生理过程中内外细胞因子调节、信号传导、功能基因的表达以及乳腺肿瘤形成、癌变必不可少的实验材料。现有的研究显示反刍动物与人、啮齿类动物泌乳调控机制存在很大的差

别<sup>[1,2]</sup>,并且相对与其他种类动物而言,反刍动物的乳腺细胞调控机理很多尚未充分阐明<sup>[3]</sup>,因此,建立体外乳腺细胞培养体系,可以为进一步开展乳腺细胞信号传导的研究提供较为理想的实验模型。乳腺上皮细胞培养一直存在技术难点,而反刍动物尤其是奶牛的乳腺细胞培养更是起步较晚。经过 40 年

Received: November 20, 2006; Accepted: December 19, 2006

This work was supported by the grants from the Key Projects for Dairy Industry from Ministry of Science and Technology of China (No. 2006BAD04A12) and the Grant-in-Aid for Innovatory Project to Train Graduated Students of Jiangsu Province.

\* Corresponding author. Tel: +86-25-84395045; E-mail: glwang@njau.edu.cn

国家科技部十五重大奶业专项 (No. 2006BAD04A12) 和 2005 年度江苏省研究生创新计划项目资助。

来的探索,研究者先后通过在培养液中添加生长因子、细胞单克隆、流式细胞器分离、SV40 大 T 抗原基因转染等方法建立了牛乳腺上皮细胞系<sup>[4,5]</sup>,但是传统的方法常出现上皮细胞被成纤维细胞取代、细胞单克隆难以获得、成本高等弊端,而转染 SV40 大 T 抗原构建永生乳腺细胞系似乎为解决该难题提供了新思路,但是外源基因的插入是否会影响乳腺细胞原有的生理学功能还需进一步验证;近年来国内也开始出现乳腺上皮细胞培养方法的报导,可是未对细胞的上皮特性和遗传学特征进行检测。因此,本实验的目的是建立简便易行的乳腺上皮细胞体外培养体系,对细胞上皮特征及遗传学特性进行检测,并通过改变细胞生长的外环境,对细胞进行高温热刺激,观察细胞亚结构的形态变化,为深入探讨高温对反刍动物乳腺细胞作用机理提供实验参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 奶牛乳腺上皮细胞的培养

采用组织块培养法获得乳腺上皮细胞。乳腺组织采自刚屠宰的健康荷斯坦奶牛,切开乳腺组织,选择脂肪较少且富含乳腺小叶的部位,尽量剔出脂肪,冲洗浸泡,剪成  $1 \sim 2 \text{mm}^3$  的小块,接种铺有鼠尾胶原的培养瓶,加入含有 10% 小牛血清(GIBICO)的 MEM-F12(Hyclone)培养液(培养液中添加  $0.1 \text{mg/L}$  胰岛素、 $0.1 \text{mg/L}$  氢化可的松、 $1 \text{mg/L}$  孕酮、 $1 \mu\text{g/L}$  雌激素、 $1 \mu\text{g/L}$  催乳素、 $0.1 \text{g/L}$  青霉素、 $0.05 \text{g/L}$  链霉素), $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{CO}_2$  环境培养。待细胞长满底壁 80%~90% 消化、传代。利用上皮细胞和成纤维细胞对胰酶、胶原酶敏感度和贴壁速度的不同,采用差酶消化法和反复贴壁法连续纯化上皮细胞。

### 1.2 细胞二倍体及核型检测

收集第 12 代乳腺细胞,利用流式细胞仪进行二倍体检测,标准对照为正常健康奶牛淋巴细胞,方法参照丁志杰<sup>[6]</sup>,DNA 指数(DI)=(样品  $G_0/G_1$  期 DNA 量平均值)/(标准二倍体 DNA 量平均值)。

收集第 12 代乳腺细胞进行染色体分析,方法参照司徒镇强<sup>[7]</sup>。

### 1.3 免疫组织化学染色

**1.3.1 角蛋白免疫组化染色** 对上皮细胞标志性蛋白进行检测。制成细胞爬片,进行角蛋白 8 和 18 免疫组化染色,按照 SABC 试剂盒(武汉博士德)说明书进行操作,一抗为单克隆角蛋白 8 和 18 抗体(北

京中衫金桥),二抗为羊抗小鼠 IgG,阴性对照组以 PBS 代替一抗。

**1.3.2 波形蛋白免疫荧光组织化学染色** 对细胞培养体系中成纤维细胞、间质细胞的分布进行检测。采用 Vimentin 免疫荧光染色法,实验步骤参照 Jha<sup>[8]</sup>,一抗 Vimentin 单克隆抗体(MAB # 1687 Chemicon),二抗 FITC 标记羊抗鼠 IgG。阴性对照组以 PBS 代替一抗,耳缘成纤维细胞为阳性组对照组。

### 1.4 Western blotting

对体外培养的乳腺细胞分泌功能进行检测。收集第二代乳腺细胞培养液,采用等电点法沉淀酪蛋白,进行 Western blotting 检测,方法参照 Jha<sup>[8]</sup>,一抗为兔抗奶牛  $\alpha$ -casein 免疫血清(1:100 稀释,新疆农科院李文蓉研究员惠赠),二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:500 稀释,武汉博士德)。

### 1.5 细胞超微结构观察

收集生长旺盛的乳腺细胞( $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  个), $1000 \text{r/min}$  离心 10min,去除上清液,用冷 2.5% 戊二醛  $4^\circ\text{C}$  进行固定,经过清洗,再用 1% 锇酸固定,后经脱水、包埋、聚合、切片、染色等步骤制成超薄切片,在 JEM-100CX II 型透射电镜下观察乳腺细胞的超微结构。

### 1.6 高温处理乳腺细胞

对数生长期的乳腺细胞进行梯度高温处理。将细胞培养瓶完全浸入  $40^\circ\text{C}$  和  $41^\circ\text{C}$  恒温水浴系统内,持续作用 1h,处理后立即置入  $37^\circ\text{C}$   $5\% \text{CO}_2$  的培养箱内进行恢复培养。在设定的时间内采用细胞刮收集乳腺细胞,进行细胞超微结构的观察,方法同 1.5。

## 2 结果

### 2.1 乳腺细胞形态观察

接种的乳腺组织块贴壁性良好,培养至 1 周时,可见有细胞从组织边缘处向外生长,细胞排列紧密形成生长晕圈,培养至 2 周时,可见在上皮细胞的周围有“火焰”状的成纤维细胞,但是两种细胞并不混杂生长,培养至第 3~4 周细胞长至 80% 汇合时可进行传代处理,结合反复贴壁法和酶交替消化法尽量去除成纤维细胞,纯化上皮细胞。传代后的细胞生长旺盛,细胞体积增大,细胞间界限不分明,出现上皮细胞特有拉网结构,在传代生长的过程中形成不同的细胞群形态(图 1)。

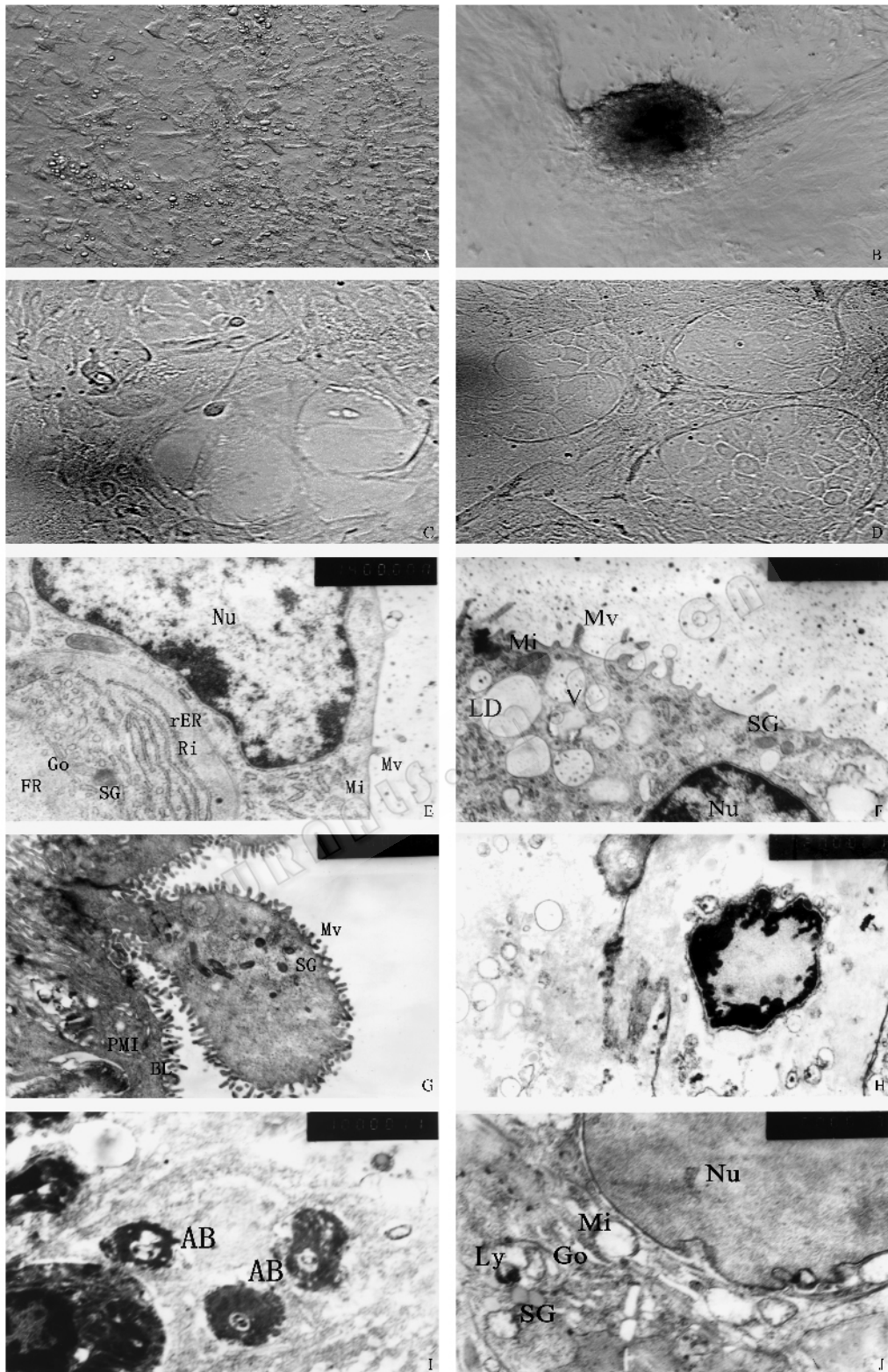


图1 细胞形态及超微结构

Fig.1 Cell morphous and ultrastructure of the bovine mammary cells

A: The culture mammary cells secreted dropwise substances ( $\times 100$ ). B: mammary cell colony ( $\times 100$ ). C: Typical net-balloon construction of the epithelial cell ( $\times 200$ ). D: acini-like aggregate ( $\times 200$ ). E: Ultrastructures of normal mammary epithelial cell ( $\times 14000$ ). Nu: nucleus; rER: Rough-surfaced endoplasmic-reticulum; Ri: ribosome; Go: Golgi complex; FR: free ribosome; Mi: mitochondria; Mv: microvilli. F: Coated and uncoated vesicles detected in the apical region of cell ( $\times 12000$ ). Mi: mitochondria; Mv: microvilli; V: vesicle; LD: Lipid droplet; SG: secretory granule; Nu: nucleus. G: Apocrine of mammary epithelia ( $\times 12000$ ). Mv: microvilli; SG: secretory granule; BL: basal lamina; PMI: plasma membrane infoldings. H: nucleus splintered (0h after  $41^{\circ}\text{C}$  heat treatment) ( $\times 3600$ ). I: The apoptotic cell (2h after  $41^{\circ}\text{C}$  heat treatment) ( $\times 10000$ ). AB: Apoptosis Body. J: mitochondria impairment (6h after  $41^{\circ}\text{C}$  heat treatment) ( $\times 10000$ ). Nu: Nucleus; Ly: Lysosome; Mi: mitochondria.

## 2.2 乳腺细胞 DNA 二倍体及核型分析

采用细胞流式术对外培养的乳腺细胞 DNA 整倍体进行分析,以正常的奶牛外周血淋巴细胞为参照,计算  $DI = 1.0 \pm 0.01$ ,  $0.9 \leq DI \leq 1.1$  符合二倍体 DI 值范围,说明该培养体系的乳腺细胞均为正常的二倍体。对染色体的分析表明,细胞分裂到第 12 代时仍然保持良好的染色体数,经比对分析,共 30 对 60 条,未发现突变和缺失的染色体,说明该细胞培养体系健康,细胞保持正常完整的遗传特征。

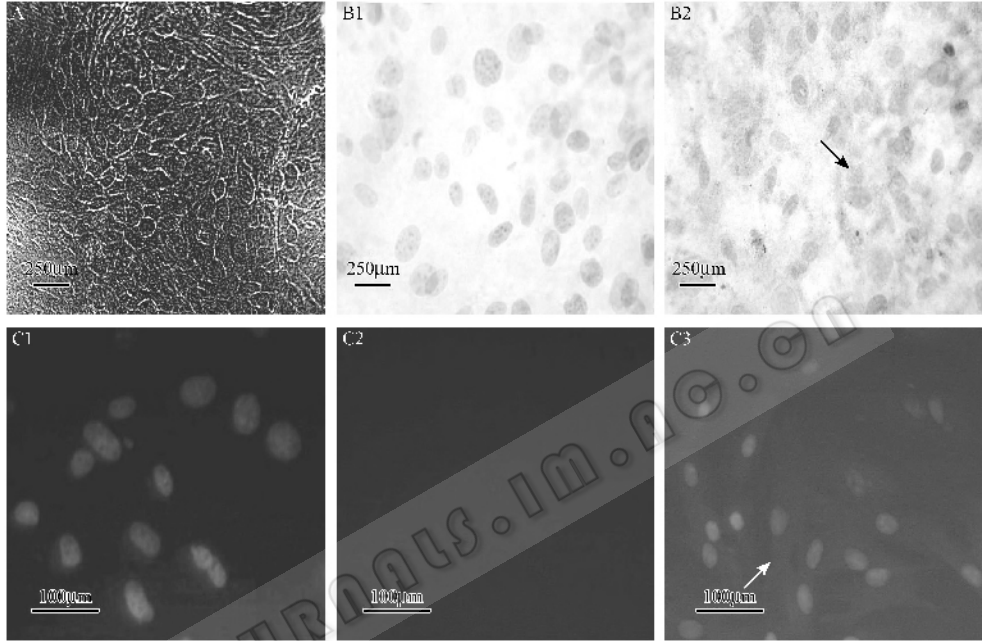


图 2 乳腺上皮细胞特征鉴定

Fig.2 Characterization of bovine mammary cells

(A) The culture mammary cells under light microscope. (B1) Negative control of Cytokeratin8&18 immunohistochemical staining. (B2) Positive staining of Cytokeratin8&18 in epithelial cells, as shown in arrow. (C1) Immunohistochemical staining of vimentin, cell nucleus; (C2) Negative staining of vimentin in epithelial cells. (C3) Positive staining of vimentin in fibroblast cells, FITC staining represented vimentin. The arrow indicates positive staining.

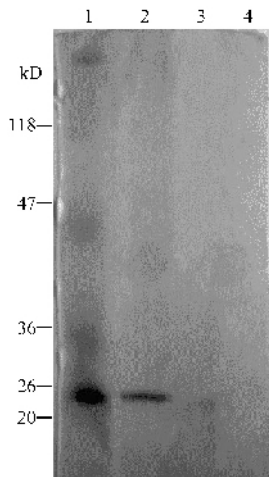


图 3 乳腺细胞  $\alpha$ -casein 表达的检测

Fig. 3 Mammary cells synthesized and secreted  $\alpha$ -casein to the culture.

Immunoblot of the proteins loaded in lanes 1-4, the standard pure bovine milk casein (lane 1), the cell medium extracts (lane 2), fetal bovine serum (lane 3), MEM/F12 culture medium without serum (lane 4) using antibodies raised against bovine  $\alpha$ -casein.

## 2.3 乳腺上皮细胞特性鉴定

本实验采用细胞免疫组织化学和免疫印迹法,对培养的奶牛乳腺细胞的上皮细胞特性及分泌性能进行鉴定。免疫细胞化学染色结果表明,在细胞浆内有大量的角蛋白 8 和 18 阳性颗粒,而 Vimentin 免疫荧光染色结果为阴性,说明该培养体系的细胞为上皮细胞,非成纤维和间质细胞(图 2)。用奶牛乳蛋白  $\alpha$ -casein 抗体进行免疫印迹测定,结果表明,第二代乳腺细胞仍具有一定的分泌功能(图 3)。

## 2.4 乳腺细胞亚结构的观察

乳腺上皮细胞核内常染色体均匀分布,胞质内有丰富的粗面内质网,成群排列,其上附有核糖体,此外还有丰富的游离核糖体,高尔基复合体也很发达,在其成熟面附近有中等密度的分泌颗粒,细胞表面有上皮细胞微绒毛结构(图 1E)。体外培养的乳腺细胞具顶质分泌的特征,高尔基分泌泡、脂肪滴等物质聚集在细胞顶部,形成富有微绒毛的顶质突起,内有聚集的核蛋白体和一些小泡,有些小泡有中等电子致密的无定形状物质(图 1G)。实验结果表明,体外培养的乳腺细胞生长状态良好,分泌上皮的细胞特征完备。

## 2.5 高温对细胞亚结构的影响

40℃和 41℃的高温热处理对细胞超微结构的作用相似,41℃作用略强。高温作用后细胞核出现凝集现象,染色质固缩边缘化,呈指环状分布(图

1H) 细胞质内出现大量的空泡状结构, 并观察到凋亡小体的产生(图 11), 凋亡小体的形成是细胞凋亡的典型特征。对细胞器的观察发现, 高尔基体发生膨胀, 线粒体形态变圆、膨胀, 内部的嵴断裂, 甚至空泡化, 在线粒体周围出现较多的次级溶酶体, 提示线粒体膜崩裂后释放的酶等内容物被溶酶体吞噬(图 1J)。

## 3 讨论

### 3.1 乳腺上皮细胞的形态学特征

本实验建立了简易的细胞培养方法, 利用胶原酶、胰酶对上皮细胞和成纤维细胞不同的消化敏感性, 以剔出成纤维细胞, 并利用上皮细胞和成纤维细胞所需贴壁时间的长短, 采用反复贴壁法, 进一步筛除成纤维细胞, 结果表明, 2~12 代内保持了良好的上皮细胞特征, 染色体未发生缺失和突变, 表明该体外培养体系稳定, 细胞生长性能良好, 形态正常。

细胞在生长的过程中呈典型的上皮样形态, 出现上皮细胞特有的拉网结构, 与山羊乳腺上皮拉网结构相同<sup>[9]</sup>。拉网的形成可能与分泌透明质酸酶有关, 使细胞间质发生液化, 导致细胞相互分离甚至脱落。细胞群在生长过程中出现各种形态, 如细胞呈多角形紧密连接成片生长, 与 Elvina 报道的奶牛乳腺原代上皮细胞形态极为相似<sup>[10]</sup>, 细胞群还形成乳腺泡状的结构, 呈腔体状, 这与 Zavizio(1996)和 Talhouk 等人描述的奶牛乳腺上皮细胞的形态相同<sup>[5, 11]</sup>。乳腺细胞培养时出现的滴状分泌物与 Warburton 对大鼠乳腺癌细胞单细胞克隆过程中观察到的现象相似<sup>[29]</sup>, 与孙丽翠对兔子乳腺细胞原代培养观察相一致<sup>[30]</sup>, 经 Western 分析, 证明体外培养的乳腺细胞仍具有一定的分泌性。

上皮细胞鉴定中使用了角蛋白(Cytokeratin, CK)、波形蛋白(Vimentin)两种细胞标志性蛋白抗体。CK 广泛应用于分辨不同组织来源及分化状态的上皮细胞<sup>[12, 13]</sup>。CK8 和 CK18 是上皮细胞的标志物, 应用于乳腺上皮细胞的鉴定。Vimentin 是间质细胞特异性表达的一种中间纤维蛋白, 与 CK 均属于中间纤维蛋白家族的成员, 参与细胞骨架的构成, 是间质细胞、成纤维细胞的标志蛋白之一。最初在细胞生物胚胎发育过程中, 发现某些上皮细胞在与其周围间质的相互作用过程中, 逐渐获得了一些间质细胞的特有性状, 表现为丧失部分上皮细胞特征(细胞间连接丢失, 某些粘附分子下调, 细胞极性丧失), 获得部分间质细胞特征(成纤维细胞样外形, 波形蛋白等间质细胞特有蛋白的表达), 这种现象被称

为“上皮-间质转化”(epithelial mesenchymal transition, EMT)<sup>[14]</sup>。而后, 在体外培养的很多上皮细胞中也发现存在 EMT 现象<sup>[15, 16]</sup>, 推测 Vimentin 与细胞的生长分化状态以及细胞游走迁移有关<sup>[17, 18]</sup>。在前列腺癌、乳腺癌、肺癌和结肠癌患者的转移灶肿瘤细胞中 Vimentin 高表达, 并认为这与增强癌细胞攻击行为密切相关<sup>[19-21]</sup>。本试验中未发现 Vimentin 的阳性表达, 说明该培养体系的乳腺上皮细胞未出现“上皮-间质转化”。

乳腺上皮细胞的结构与其功能密切相关。实验中发现高尔基体成熟面附近观察到中等密度的分泌颗粒(SG), 这与 Pauloin 等人的报道极为相似<sup>[22, 23]</sup>。此外还观察到体外培养的乳腺细胞具有顶质分泌的特征, 与授乳期所见的蛋白质分泌颗粒的结构非常类似, 与 Gloria 报道的乳腺细胞超微结构相似<sup>[24]</sup>。

### 3.2 高温对乳腺细胞亚结构的影响

检测细胞凋亡的方法很多, 但最权威的方法是对细胞超微结构的观察, 本实验采用透射电镜观察法研究高温对乳腺细胞的影响。实验表明, 高温诱导乳腺细胞核固缩, 核内常染色质浓缩为异染色质, 并聚集在核的边缘。每个细胞核内的 DNA 含量是十分恒定的, 它不依细胞类型和机能状态不同而改变, 但是常染色质和异染色质的含量, 常因细胞类型和机能状态不同而有差别, 凡是代谢活动旺盛的、进行多种合成机能的细胞, 需要从细胞核 DNA 转录大量信息运送到细胞质内, 常染色质多, 而异染色质少; 反之, 不需要从细胞核向细胞质运送大量信息, 异染色质多, 常染色质低少, 细胞代谢活动低<sup>[25]</sup>。本实验结果提示高温热刺激对细胞核的信息运送产生了抑制作用, 细胞代谢处于抑制状态。此外, 我们还观察到凋亡小体。凋亡小体是凋亡细胞内聚集的染色质块, 经核碎裂形成大小不等的染色质块(核碎片)释放到胞质中, 通过发芽、起泡等方式形成一个球形的突起, 并在其根部较窄而脱落形成一些大小不等, 内含胞质、细胞器及核碎片的膜包小体, 它是 Kerr 定义细胞凋亡的形态学基础。凋亡小体可被巨噬细胞或邻近细胞吞噬, 被溶酶体酶所降解。

细胞受到高温热刺激后, 细胞器结构发生改变, 尤其以线粒体的变化最为显著, 表现为嵴数目减少、排列紊乱、线粒体肿胀、线粒体膜解体、空泡化等, 这可能与钙离子重新分布后引起线粒体膜电位下降, 继而破坏线粒体蛋白转运及心磷脂的合成有关。本实验与李建明、陶梅、康可人等人观察上皮细胞凋亡过程中线粒体形态变化相类似<sup>[26-28]</sup>。许多研究表

明 线粒体损伤是导致细胞凋亡的中心环节,引发了细胞凋亡的级联反应。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Hovey RC, Trott JF, Vonderhaar BK. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2002, **7**(1): 17 - 38.
- [ 2 ] Ollivier-Bousquet M, Devinoy E. Physiology of lactation: Old questions, new approaches. *Livestock Production Science*, 2005, **98**: 163 - 173.
- [ 3 ] Lamote I, Meyer E, Massart-Leen AM, et al. Sex steroids and growth factors in the regulation of mammary gland proliferation, differentiation, and involution. *Steroids*, 2004, **69**: 145 - 159.
- [ 4 ] Gibson CA, Vega JR, Baumrucker CR, et al. Establishment and characterization of bovine mammary epithelial cell lines. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 1991, **27A**(7): 585 - 594.
- [ 5 ] Zavizion B. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cell Developmental Biology Animal*, 1996, **32**: 138 - 148.
- [ 6 ] Ding ZJ(丁志杰), Shan JX(单吉贤), Du SY(都姝妍). Simultaneous detection of CD44v6 expression and DNA content in rectal cancer and its clinical significance. *World Chin J Digestol*(世界华人消化杂志), 2003, **11**(9): 1382 - 1384.
- [ 7 ] Situ ZQ(司徒镇强), Wu JZ(吴军正). Cell Culture. Beijing: World Public Association(世界图书出版社), 1996, pp. 194 - 196.
- [ 8 ] Jha RK, Titus S, Saxena D, et al. Profiling of E-cadherin, b-catenin and Ca<sup>2+</sup> in embryo-uterine interactions at implantation. *FEBS Letters*, 2006, **580**: 5653 - 5660.
- [ 9 ] Li XC(李向臣), Ren FL(任芳丽), Zhang Y(张涌). Establishment and ultrastructural characterization of goat mammary epithelial cell line. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*(畜牧兽医学报), 2005, **36**(2): 121 - 126.
- [ 10 ] Matitashvili E, Bauman DE. Culture of primary bovine mammary epithelial cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 1999, **35**(8): 431 - 434.
- [ 11 ] Talhouk RS, Neiswander RL, Schanbacher FL. Effect of substratum on growth, cell morphology and lactoferrin synthesis and secretion in bovine mammary cell culture. *Tissue and Cell*, 1998, **30**(2): 226 - 235.
- [ 12 ] Xue Y, Smedts F, Debruyne FMJ, et al. Identification of intermediate cell types by keratin expression in the developing human prostate. *Prostate*, 1998, **34**: 292 - 301.
- [ 13 ] Owens DW, Lane EB. The quest for the function of simple epithelial keratins. *Biology Essays*, 2003, **25**: 748 - 758.
- [ 14 ] Hay ED. An overview of epithelio mesenchymal transformation. *Acta Anat*(Basel), 1995, **154**: 8 - 20.
- [ 15 ] Stoker M, Gherardi E, Perryman M, et al. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*, 1987, **327**: 239 - 242.
- [ 16 ] Boyer B, Tucker GC, Vallés AM, et al. Rearrangement of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. *Journal of Cell Biology*, 1989, **109**: 1495 - 1509.
- [ 17 ] Lang SH, Hyde C, Reid IN, et al. Enhanced expression of vimentinin motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate*, 2002, **52**: 253 - 263.
- [ 18 ] Singh S, Sadacharan S, Su S, et al. Overexpression of vimentin: Role in the invasive phenotype in an androgen independent model of prostate cancer. *Cancer Research*, 2003, **63**: 2306 - 2311.
- [ 19 ] Putz E, Witter K, Offner S, et al. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Research*, 1999, **59**: 241 - 248.
- [ 20 ] Gilles C, Thompson EW. The epithelial to mesenchymal transition and metastatic progression in carcinoma. *Breast*, 1996, **2**: 83 - 96.
- [ 21 ] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Review Cancer*, 2002, **2**: 442 - 454.
- [ 22 ] Pauloin A, Delpal S, Chanut E, et al. Differently affects basal and prolactin-situlated milk protein secretion in lactating rabbit mammary epithelial cells. *European Journal of Cell Biology*, 1997, **72**: 324 - 336.
- [ 23 ] Di HS(狄和双), Du J(杜娟), Wang LG(王利刚), et al. Comparative study on in vitro stationary culture system or superfusion culture system of cow mammary tissue. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2006, **22**(6): 1040 - 1046.
- [ 24 ] Chepko G, Smith GH. Mammary epithelial stem cells: our current understanding. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1999, **4**(1): 35 - 52.
- [ 25 ] Cheng LX(成令忠), Zhong CP(钟翠平), Cai WQ(蔡文琴). Contemporary Histology. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Publishing House(上海科学技术文献出版社), 2003, pp. 138 - 143.
- [ 26 ] Li JM(李建明), Cai X(蔡黔), Zhou H(周红), et al. Injury effect of hydrogen peroxide on mitochondria of intestinal epithelial cells in vitro. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*(第三军医大学学报), 2002, **24**(2): 142 - 145.
- [ 27 ] Tao M(陶梅), Zhang I(张沂), Zhang LX(张玲霞), et al. Ultra structural changes of gastric mucosa in chronic a trophic gastritis model caused by hot water in rats. *J Fourth MilMed Univ*(第四军医大学学报), 2005, **26**(14): 1264 - 1267.
- [ 28 ] Kang KR(康可人), Huang XR(黄秀榕), Qi MX(祁明信). Ultra structural changes of apoptosis in cultured lens epithelial cells induced by elemene and curcumin. *Chin Ophthal Res*(眼科研究), 2006, **24**(4): 382 - 284.
- [ 29 ] Warburton MJ, Head LP, Rudland PS. Redistribution of fibronectin and cytoskeletal proteins during the differentiation of rat mammary tumor cells in vitro. *Exp Cell Res*, 1981, **132**(1): 57 - 66.
- [ 30 ] Sun LQ(孙丽翠), Liu PF(刘朋朋), Yang GQ(杨国庆), et al. Culture of primary mouse and rabbit mammary epithelial cells. *Biotechnology*(生物技术) 2004, **14**(2): 22 - 35.