

奶山羊乳腺上皮细胞的分离、培养及鉴定

王桢, 罗军, 王伟, 赵旺生, 林先滋

西北农林科技大学动物科技学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

摘要: 应用组织块培养法高密度培养、连续传代法建立西农萨能奶山羊乳腺上皮细胞体外培养体系, 通过生长曲线绘制、核型分析、免疫荧光染色 (角蛋白、上皮膜抗原、波形蛋白、 β -酪蛋白)、油红染色及 β -酪蛋白基因的 RT-PCR 分析进行培养细胞鉴定。实验结果表明细胞生长曲线为典型的 S 型, 染色体数目众数为 60, 细胞角蛋白、上皮膜抗原、波形蛋白、 β -酪蛋白表达均呈阳性, 油红染色后可见细胞质内的脂滴, 且细胞表达酪蛋白 mRNA。说明运用本方法培养的细胞为正常的乳腺上皮细胞, 并具有一定的泌乳功能。

关键词: 奶山羊, 乳腺上皮细胞, 原代培养

Characterization and culture of isolated primary dairy goat mammary gland epithelial cells

Zhen Wang, Jun Luo, Wei Wang, Wangsheng Zhao, and Xianzi Lin

College of Animal Science and Technology, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: Based on the *in vitro* culturing system developed for epithelial cells in mammary gland of Xinong Saanen dairy goats using tissue explants culture, high density cultivation, and continuous passaging, the cultured epithelial cells were evaluated by growth curve fitting, karyotype analysis, immunofluorescence staining (keratin, epithelial membrane antigen (EMA), vimentin, β -casein), oil red staining and RT-PCR of β -casein gene. The results showed that the growth of epithelial cells with the model number of chromosome of 60 demonstrated a typical 'S' shape curve, the positive gene expression of keratin, EMA, vimentin and β -casein was detected, the cytoplasmic lipid droplets were observed following the oil red staining, the cultured cells expressed the mRNA of β -casein. In conclusion, the current *in vitro* culturing system can obtain the normal mammary gland epithelial cells with the function of secretion.

Keywords: dairy goat, mammary gland epithelial cell, primary culture

乳腺是哺乳动物少数可以重复经历生长、功能分化和退化过程的器官之一。由于乳腺较强的分泌功能, 可以使外源基因在乳腺中表达后随乳汁流出, 乳腺上皮细胞成为转基因研究中重要的靶细胞。奶

Received: January 13, 2010; **Accepted:** April 12, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA10z135), Key Special Project for Breeding and Cultivation of GMO Varieties (No. 2009ZX08009-162B), R&D Special Fund for Public Welfare Industry (Agriculture) (No. 3-45).

Corresponding author: Jun Luo. Tel: +86-29-87082891; E-mail: luojun1@yahoo.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2008AA10z135), 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-162B), 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (No. 3-45) 资助。

山羊是转基因动物研究的良好模型。根据羊奶与牛奶成分不同^[1-2] (如: 羊奶短中链脂肪酸含量比牛奶高且脂肪球直径小), 推测山羊乳腺上皮细胞的乳成分合成及调控机制与牛不同, 然而目前关于山羊泌乳的分子调控机制尚不清楚。乳腺上皮细胞的体外培养对于研究乳腺生长发育及阐明泌乳机制有重要意义, 同时也为转基因研究中构建乳腺上皮细胞特异性表达载体提供有效模型。

本试验首次采用高密度培养、连续传代法对山羊乳腺上皮细胞进行体外培养, 克服了常规培养过程中出现的难消化、潜伏期长等问题, 获得了大量的乳腺上皮细胞, 通过生长曲线绘制、核型分析、免疫荧光染色、酪蛋白检测、油红染色等鉴定了所培养细胞的生物学特性, 为进一步在奶山羊乳腺上皮细胞中研究脂肪酸、乳糖代谢等网络调控机制及建立转基因打靶细胞模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 乳腺组织

以西北农林科技大学萨能羊原种场健康的纯种西农萨能羊 (泌乳天数为 40 d) 为实验材料, 手术法采集乳腺腺泡组织样品。

1.1.2 主要试剂

DMEM/F-12、胰蛋白酶、表皮生长因子 (EGF)、Trizol 购自美国 Invitrogen 公司; 胎牛血清(FBS) 购自天津灏洋生物制品技术有限公司; 胰岛素、氢化可的松、催乳素购自 Sigma 公司; 角蛋白(Keratin) 抗体、波形蛋白(Vimentin) 抗体、上皮膜抗原 (EMA) 抗体、 β -酪蛋白(β -Casein) 抗体、SABC-Cy3 免疫细胞化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 其他常规药品及试剂均为国产。

1.1.3 主要仪器

CO₂ 培养箱 (Thermo); 荧光相差显微镜 (Leica); 冷冻离心机 (Thermo); 普通倒置显微镜 (国产) 等。

1.2 方法

1.2.1 乳腺上皮细胞原代培养

采用组织块培养法, 具体参见曹艳红等^[3]的研究。

1.2.2 乳腺上皮细胞的纯化及传代培养

利用成纤维细胞和乳腺上皮细胞消化和贴壁的速率不同进行纯化, 具体方法参考郑月茂等^[4-5]的研究。经过 4~6 代即可得到纯化的乳腺上皮细胞。

纯化的乳腺上皮细胞的连续传代培养, 具体方法: 当 60 mm 皿培养的细胞生长汇合至 95% 左右 (约 $1.6 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 个) 时, 将培养基吸出, 加入消化液, 置培养箱内 37°C 消化 3~5 min, 在倒置显微镜下观察, 待大部分细胞回缩变圆、将要脱落时将消化液吸出, 加入培养基, 反复吹打使大部分细胞脱落, 吸出 2/3 左右的培养基 (约 $0.7 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^6$ 个细胞), 离心后冻存 (90% 血清, 10% DMSO)。在原皿中补足新鲜培养基继续培养。第 2 天, 细胞可生长汇合至 95% 左右, 重复上述过程。

1.2.3 细胞生长曲线

取第 20 代乳腺上皮细胞以 3.2×10^4 个细胞/孔的量接种于 24 孔细胞培养板中, 于 37°C、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。每天同一时间对 3 孔细胞分别计数, 求平均值, 连续 9 d。以培养时间为横坐标, 3 孔细胞的平均数为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.4 染色体核型分析

待细胞 (20 代) 生长汇合至 50% 时, 秋水仙素处理 6 h, 消化为单细胞悬液, 0.1 mol/L 的 KCl 溶液低渗处理 20 min, 离心后用醋酸/甲醇 (1:3) 固定, 滴片后 50°C 烤片 2 h, 吉姆萨染液染色。

1.2.5 免疫荧光染色

将细胞接种到 24 孔板中, 分别进行角蛋白、波形蛋白、上皮膜抗原、 β -酪蛋白免疫荧光染色, 具体方法参照试剂盒说明书, 操作完成后用 Hoechst33342 染核。一抗为单克隆鼠抗羊角蛋白抗体、单克隆鼠抗羊波形蛋白抗体、单克隆兔抗人上皮膜抗原抗体, 单克隆兔抗羊 β -酪蛋白抗体, 二抗为羊抗小鼠 IgG、羊抗兔 IgG。

1.2.6 RT-PCR 检测 β -酪蛋白表达

Trizol 法提取细胞总 RNA, 反转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增 (扩增长度 300 bp)。上游引物: 5'-ACAGCCTCCCACAAAACATCC-3'; 下游引物:

5'-TGAGAAAGGGACAGCCACGGA-3'。扩增条件如下: 95°C 4 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min。产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 油红染色

在 35 mm 皿接种适量细胞, 培养至第 8 天进行油红染色。方法如下: 10% 福尔马林预固定、40% 福尔马林固定 1 h 以上, 用超纯水、60% 异丙醇漂洗。干燥后加入 1 ml 油红染液室温孵育 15 min, 超纯水洗数次, 最后用 Hoechst33342 染核, 在倒置荧光显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 乳腺上皮细胞的原代培养和纯化

原代培养至第 10 天有大量乳腺上皮细胞迁出, 胰酶消化, 镜下可见细胞收缩变圆, 与组织块分离 (图 1A)。经过 3~5 代的纯化培养, 可以初步分离得到较纯的乳腺上皮细胞 (图 1B)。有的可形成闭合型细胞群, 呈岛屿状生长 (图 1C)。60 代依然保持增殖活力及良好的细胞形态 (图 1D)。90 代左右开始凋亡, 镜下可见细胞由于细胞质融合而出现大量多核现象 (图 1E)。

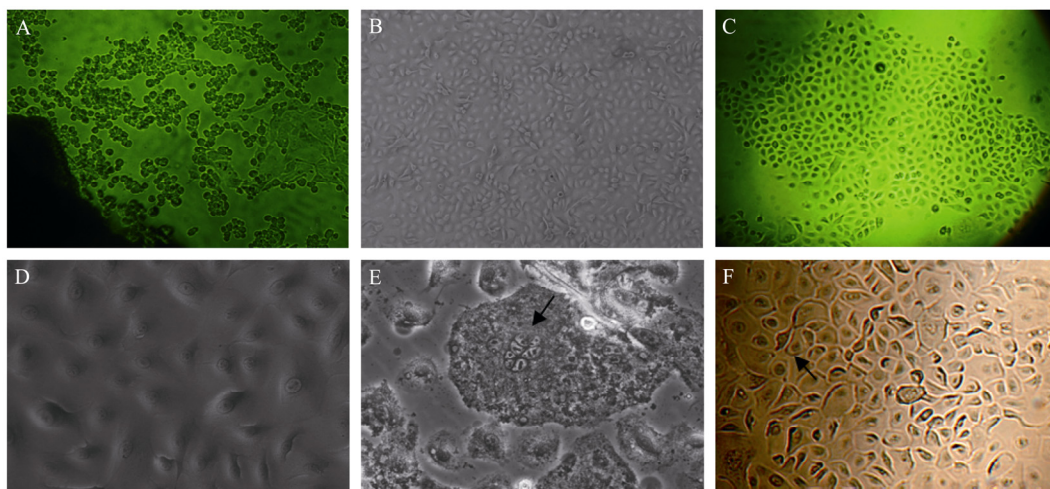


图 1 奶山羊乳腺上皮细胞形态观察

Fig. 1 Morphological observation of the cultured mammary epithelial cells. (A) Mammary epithelial cells digested from the tissue fragment (50 \times). (B) Purified mammary epithelial cells (50 \times). (C) The island monolayer aggregate of mammary epithelial cells (50 \times). (D) 60th passage mammary epithelial cell (200 \times). (E) 90th passage mammary epithelial cell, the arrow indicates the multiple nucleuses in one cell (200 \times). (F) The fried-egg shape mammary epithelial cell in low density, as indicated by arrows (50 \times).

2.2 细胞生长曲线

以培养天数为横坐标, 三孔细胞数的平均值为纵坐标绘制山羊乳腺上皮细胞生长曲线 (图 2)。结果显示: 山羊乳腺上皮细胞生长延滞期 0~3 d, 对数生长期 4~7 d, 7 d 后进入平台期, 呈典型的 S 型, 符合细胞生长的一般生物学规律。

2.3 染色体核型分析

对第 20 代的乳腺上皮细胞进行核型分析, 大多数细胞染色体数目为 60。其核型与山羊染色体图谱一致, 说明所培养的细胞染色体未发生明显的变异 (图 3)。

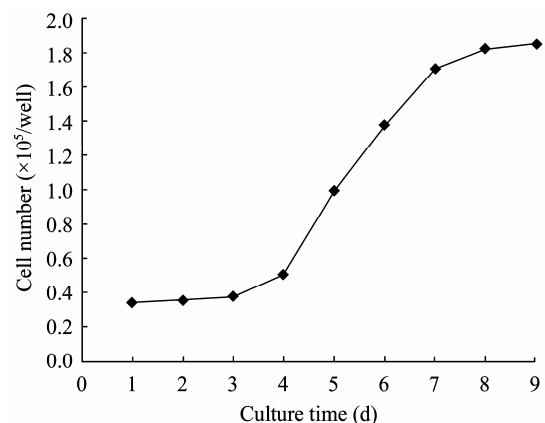


图 2 奶山羊乳腺上皮细胞生长曲线

Fig. 2 Mammary gland epithelial cell growth curve of dairy goat.

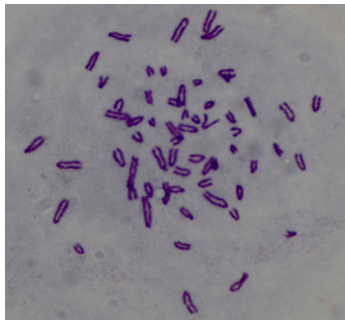


图3 奶山羊乳腺上皮细胞染色体核型 (1 000×)
Fig. 3 Karyotype of mammary gland epithelial cell (1 000×).

2.4 免疫荧光染色

荧光显微镜观察结果显示：培养的乳腺上皮细胞角蛋白、上皮膜抗原、 β -酪蛋白的表达均呈红色阳性，细胞核为蓝色；与国内多数报道不同，波形蛋白的表达亦呈阳性，且呈丝状均匀分布在细胞质内 (图4)。

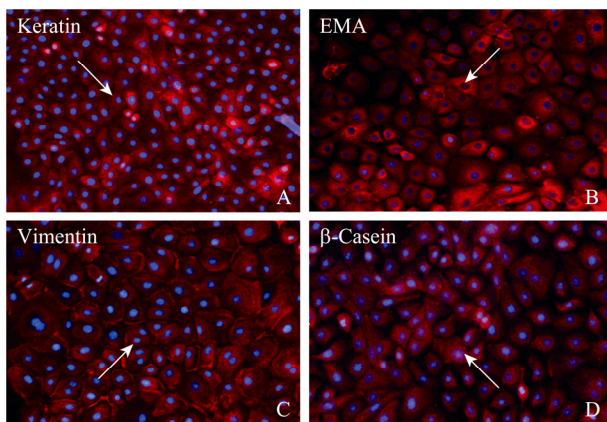


图4 乳腺上皮细胞免疫荧光鉴定 (200×)
Fig. 4 Immunofluorescence of the mammary gland epithelial cell monolayer (200×). (A) Positive staining of Keratin, as shown in arrow. (B) Positive staining of EMA, as indicated in arrow. (C) Positive staining of Vimentin, the arrow indicates positive staining. (D) Positive staining of β -Casein, the arrow shows positive staining.

2.5 酪蛋白检测

电泳结果显示在 300 bp 处出现了目的条带，说明细胞表达了 β -酪蛋白基因 (图5)。

2.6 油红染色

显微镜下可见大量大小不等的脂滴弥散于整个细胞质内 (图6A); 细胞生长密集的地方还可观察到乳球体，每个乳球体含较多脂滴，Hoechst33342 染核后可见乳球体由大量细胞聚集而成 (图6B)。

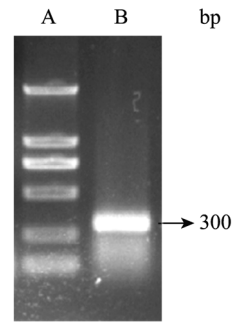


图5 β -酪蛋白电泳检测
Fig. 5 RT-PCR analysis of β -casein gene. A: DL2000 marker; B: PCR product of β -casein gene.

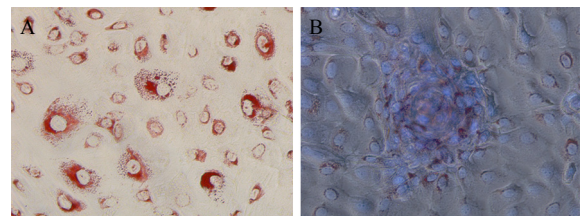


图6 乳腺上皮细胞油红染色 (200×)
Fig. 6 Oil red staining of the mammary gland epithelial cell (200×). (A) Monolayer stained with oil red, lipid droplets in cytoplasm is stained red. (B) Dome structure stained with oil red and Hoechst33324, lipid droplets is stained red, the nucleus is stained blue.

3 讨论

尽管一般来讲，细胞培养的 2 个连续代次之间应间隔至少 2 d，使细胞在被胰酶损伤后得到充分的恢复^[6]。但体外培养的乳腺上皮细胞贴壁非常牢固，且随着传代间隔时间的延长，所需消化时间越长。长时间的消化不仅会对细胞产生损伤，而且使终止消化的时机难以掌握。另一方面，据笔者观察，传代的乳腺上皮细胞在低密度培养时常体积变大，呈煎蛋形 (图 1F)，而以高密度培养时细胞保持铺路石状，形态变化明显得到改善，且在 200 倍镜下可见细胞之间形成的连接 (图 4)，这与国外的相关报道一致^[7-8]。有报道高密度培养对原代软骨细胞去分化有抑制作用^[9]，然而在乳腺上皮细胞上的相关研究还未见报道。笔者用这种方法培养的乳腺上皮细胞不仅形态整齐良好，而且具有很强的增殖活力，与低密度培养、3~5 d 传代一次的乳腺上皮细胞 (20 代左右凋亡，历时约 80 d) 相比，这些细胞可在体外连续培养 120 d 左右 (60 代以前可每天传代，60 代以后随着细胞走向衰老传代间隔时间相应延长)。

角蛋白是上皮细胞的标志, 波形蛋白是成纤维细胞的标志^[10]。正常的乳腺上皮细胞同时表达角蛋白和波形蛋白的报道十分少见。国外 Mark C 等^[11]用添加霍乱毒素、表皮生长因子、胰岛素、氢化可的松等的培养液培养乳腺上皮细胞, 36%的细胞同时表达波形蛋白和角蛋白。Dairkee 等^[12]则发现, 在乳腺上皮细胞培养早期 (第 4 天), 所有的乳腺上皮细胞同时表达波形蛋白和角蛋白。这些报道限于培养的乳腺上皮细胞中的某一小部分或某一时期。在本实验中, 所有乳腺上皮细胞可长期表达角蛋白和波形蛋白。从形态来看, 细胞呈典型的铺路石状, 与成纤维细胞明显不同; 从免疫组化的结果来看, 细胞表达上皮细胞特有的角蛋白、膜表面抗原; 此外, 细胞合成酪蛋白, 可形成乳球体, 且油红染色可见细胞内脂滴, 说明细胞有一定的泌乳特性, 这些都是成纤维细胞所不具有的。因此认为高密度培养、连续传代法适用于山羊乳腺上皮细胞的培养。采用这种培养方法可以获得足够数量的、增殖活力良好的种子细胞, 为进一步研究泌乳机制和建立转基因打靶细胞模型提供参考。

REFERENCES

- [1] Sanz MR, Amigo L, Ares JL, *et al.* The use of diets with different protein sources in lactating goats: composition of milk and its suitability for cheese production. *Small Ruminant Res*, 1998, **31**(1): 37–43.
- [2] Babayan VK. Medium chain length fatty acid esters and their medical and nutritional applications. *J Amer Oil Chem Soc*, 1981, **58**(1): 49–51.
- [3] Cao YH, Luo J, Zhang M, *et al.* Morphological observation of mammary epithelial cells of goats *in vitro*. *Chin J Vet Med*, 2008, **44**(5): 20–21. 曹艳红, 罗军, 张蒙, 等. 体外培养奶山羊乳腺上皮细胞的形态学观察. *中国兽医杂志*, 2008, **44**(5): 20–21.
- [4] Zheng YM, An ZX, Peng XR, *et al.* Growth characteristics of goat mammary epithelial cells. *Chin J Vet Sci*, 2007, **27**(3): 403–407. 郑月茂, 安志兴, 彭新荣, 等. 山羊乳腺上皮细胞的生长特性. *中国兽医学报*, 2007, **27**(3): 403–407.
- [5] Chen JH, Tong HL, Li QZ, *et al.* Establishment of dairy cow mammary gland epithelial cell line. *Acta Vet Zootech Sin*, 2009, **40**(5): 743–747. 陈建晖, 佟慧丽, 李庆章, 等. 奶牛乳腺上皮细胞系的建立. *畜牧兽医学报*, 2009, **40**(5): 743–747.
- [6] Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th ed. Beijing: Science Press, 2008: 270–290. 弗雷谢尼. *动物细胞培养基本技术指南*. 5 版. 北京: 科学出版社, 2008: 270–290.
- [7] Gibson CA, Vega JR, Baumrucker CR, *et al.* Establishment and characterization of bovine mammary epithelial cell lines. *In Vitro Cell Dev Bio-Animal*, 1991, **27A**(7): 585–594.
- [8] Pantschenko AG, Woodcock-mitchell J, Bushmich SL, *et al.* Establishment and characterization of a caprine mammary epithelial cell line (CMEC). *In Vitro Cell Dev Bio-Animal*, 2000, **36**(11): 26–37.
- [9] Zhou GS, Li XF, Guan GH, *et al.* Biological characteristics of rabbit articular chondrocytes in high density culture. *Zhejiang Med J*, 2008, **30**(7): 669–674. 周国顺, 李雄峰, 管国华, 等. 兔软骨细胞的高密度培养及生物学特征. *浙江医学*, 2008, **30**(7): 669–674.
- [10] Wang MR, Xue SB, Liu HT. *Cell Biology*. 2nd ed. Beijing: Beijing Normal University Press, 2001: 278–287. 汪堃仁, 薛绍白, 柳惠图. *细胞生物学*. 2 版. 北京: 北京师范大学出版社, 2001: 278–287.
- [11] Mark C, Van DB, Petersen O, *et al.* Regulation of vimentin expression in cultured human mammary epithelial cells. *Differentiation*, 1990, **43**(2): 146–156.
- [12] Dairkee SH, Blayney CM, Asarnow DM, *et al.* Early expression of vimentin in human mammary cultures. *In Vitro Cell Dev Bio-plant*, 1985, **21**(6): 321–327.