

牛乳腺上皮细胞研究进展

李忠秋

(黑龙江省农业科学院畜牧研究所, 哈尔滨 150086)

摘要: 主要介绍了牛乳腺上皮细胞培养方法、所建细胞系的研究进展, 以及激素等调节因子和细胞外基质对乳腺上皮细胞分化及增殖的调控。

关键词: 牛; 乳腺; 上皮细胞

中图分类号: S852 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)05-0130-04

Progress of the Bovine Mammary Epithelial Cells

LI Zhong-qiu

(Animal Husbandry Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: This paper mainly introduced progress of culture method and cell lines of bovine mammary epithelial cell. At the same time, regulation of hormones and extracellular substrates on mammary epithelial cell differentiation and proliferation were also introduced.

Key words: bovine; mammary; epithelial cells

收稿日期: 2008-02-18
基金项目: 哈尔滨市青年科技创新人才专项基金项目 (2006RFQYN111)
作者简介: 李忠秋(1974-), 女, 黑龙江省宾县人, 硕士, 助理研究员, 从事动物遗传育种与繁殖研究。Tel: 13244625892; E-mail: lizhongqiu1974@163.com.

第一次成功的分离培养牛乳腺上皮细胞是在1961年。从那时起, 许多科研工作者都成功的培养了牛乳腺上皮细胞, 最初乳腺上皮细胞主要用于研究生乳机制, 乳房炎的防治和微生物感染机理的研究, 在体外培养条件下药物和激素等对乳腺上皮细

3 蛋鸡的光照管理

3.1 光照管理以雏鸡开始为最好, 最迟不能超过育成期, 否则达不到理想效果^[4]。

3.2 根据不同时期蛋鸡的光照需求, 通过调整控制器来自动开关灯, 保证光照时间准确而有规律。若鸡的性成熟较预期快, 则减慢光照时间增加速度; 若较迟, 可加快光照时间的增加。

3.3 不能突然改变光的颜色和光照时间, 尤其对产蛋鸡, 补充光照的时间应该由短到长, 且在早、晚补充为佳, 以便增加鸡的采食量。同时初期每周增加的时间不能超过 1 h, 以免导致脱肛。对于光线强度应渐明或渐暗, 从育成期光照方案过渡到产蛋期方案也要逐步进行, 若突然关灯或缩短光照时间, 则可能引起惊群、换羽、产畸形蛋或休产等现象^[5]。

3.4 开产后, 绝对不可以减少光照时间, 到产蛋期的最后 2~3 周, 可适当再增加光照 1 h, 以刺激其多产蛋。

3.5 灯泡设置要合理, 分布要均匀, 不要有暗区。若鸡舍内有多排灯泡, 则每排灯泡应交错分布, 灯泡与鸡舍沿壁的距离应只有灯泡间距的一半为宜。并安装反射灯罩, 保持灯泡、灯管、灯罩光亮清洁^[6]。

3.6 光照管理必须要与完善的饲养管理体系相配合, 合理的光照才能明显提高鸡的生产性能。

参考文献:

[1] 王新学. 浅谈光照在养鸡业上的应用[J]. 养禽业, 1998(4): 31-32.

[2] 戴四发, 朱夕婷, 黎观红. 蛋鸡舍光照的控制与应用[J]. 家畜生态, 2003(4): 69-72.

[3] 鲁纯养. 农业生物环境原理[M]. 北京: 农业出版社, 1994: 98-102.

[4] 李辉. 光照强度对笼养罗曼蛋鸡产蛋性能的影响[J]. 甘肃畜牧兽医, 1999(5): 16-17.

[5] Proudfoot F G, HuLan H W. Interrelationship among lighting, ambient temperature, and dietary energy and broiler chicken performance[J]. Poultry Science, 1997, 66: 1744-1749.

[6] 施正香. 高密度叠层笼养鸡场工艺设计及设备配置[J]. 农业工程学报, 2001, 17(增刊): 55-59.

胞的分泌功能影响的研究。随着转基因和克隆技术的发展,动物乳腺生物反应器成为近年来研究的热点。动物乳腺生物反应器是获得具有生物活性药用蛋白的理想工具,成功的基础和关键在于使用合适的乳汁蛋白调控元件,构建合理有效的乳腺组织特异性表达载体。在这种调控成分的控制下,外源基因能特异地在乳腺中表达,表达产物随乳汁泌出,表达效率较高。转基因家畜乳腺生物反应器的研制周期长,成本较高;同时,人们对乳腺上皮细胞的各种生理特性及其基因表达调控的分子机制了解得不够深入,因此在乳腺组织特异性表达载体构建好以后,需要一个检测系统,以验证乳腺组织特异性调控元件的有效性,外源目的基因在乳汁中分泌表达的可行性以及特异载体构建的合理性,这对于减少研制工作的盲目性、节约人力物力、提高效率具有重要意义。

1 乳腺上皮细胞培养方法的研究进展

1957 年, Lasfargues 利用胶原酶消化法将乳腺细胞从乳腺组织中分离出来,第一次实现了乳腺细胞的直接培养。1961 年, Ebmer 等首先利用胶原酶消化法长期培养了牛乳腺细胞,但随传代的不断进行,上皮细胞逐渐被生长较快的成纤维细胞取代,并失去了原来所具有的组织能力。1980 年, Medina 在培养液中加入胰岛素、转铁蛋白、纤粘连蛋白、表皮生长因子、内皮生长因子等促进上皮细胞生长,抑制基质细胞的增殖,来纯化上皮细胞。1984 年, Danielson^[1] 利用胰酶/EDTA 轻微消化法,去除成纤维细胞。1987 年, McGrath^[2] 利用密度梯度离心法,去除成纤维细胞、脂肪颗粒、细胞碎片、DNA 纤维等成分,可以得到较为纯化的乳腺上皮细胞。1989 年, Chaslam 等试图通过细胞克隆得到纯净的乳腺上皮细胞,但正常乳腺上皮细胞的克隆率极低,要获得上皮细胞的单细胞克隆非常困难,即使有克隆出现,这些克隆极易老化,失去增殖能力。1994 年, Frdshney 利用细胞刮刀或放射性射线照射的方法去除成纤维细胞,用小片铅板挡住需保留的上皮细胞片,以射线照射上皮细胞片外的区域,这样未受到射线照射的细胞便存活下来,照射过的细胞便失去增殖能力,逐渐衰退、死亡。1995 年 Ahn 等^[3] 采用低浓度(0.05%)的胶原酶 I 长时间(14 h)的消化后,再用蛋白酶消化的方法分离了牛的乳腺上皮细胞,得到了 50~100 个细胞组成的牛乳腺上皮细胞团。2003 年 Novaro 等^[4] 应用较高浓度(0.2%)的胶原酶 A 短时间(3 h)消化结合高速短时间离心的方法分离纯化了小鼠的乳腺上皮细胞。2006 年

多曙光等^[5] 应用较高浓度(0.5%)的胶原酶 I 消化 3 h 后,再应用蛋白酶处理并结合反复 6 次高速(1 500 g)短时间(15 s)离心的方法分离并初步纯化了乳腺上皮细胞,得到了较为理想的结果;经过初步纯化的细胞培养后,再采用贴壁培养的上皮细胞和成纤维细胞对胰蛋白酶的敏感性的差异进一步去除污染的成纤维细胞,得到了较为纯净的乳腺上皮细胞。

2 牛乳腺上皮细胞系的研究进展

细胞系有有限细胞系及无限细胞系两种。有限细胞系多属二倍体细胞系,正常情况下具有有限生命期,是由正常组织的细胞分离培养传代后得到的^[6]。无限细胞系过去多是由癌细胞建立而成,多为类上皮型细胞,可无限传代,并具有不死性和异体接种致癌性^[7-8]。近年来,随着分子生物学的发展,可以通过基因转移等分子生物学技术,将外源基因转入原代细胞中,从而获得无限的转化细胞系^[9]。经过多年的实验探索,人们发现猿猴病毒获取早期基因转染的细胞系不仅可以获得永生性,还在不同程度上保持了原组织细胞的分化特点与功能。

最先建立牛乳腺细胞系是 Schmid 等,1983 年他们利用传代乳腺细胞单克隆的方法得到的,这些细胞系被命名为 BMGE+HM, BMGE+H 及 BMGE-H (BMGE 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)。细胞系 BMGE+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。BMGE+H 及 BMGE-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^[10]。

1991 年, Gibson 等^[11] 采用无血清培养基原代培养,用密度梯度离心法富集上皮细胞,同时用胰酶消化去除成纤维细胞,然后用流式细胞计数器分离细胞,将细胞分成单个的或一组 10 个进行培养,等到第 3 代再进行细胞其他特性检验,建立了牛 PS-BME-CI 乳腺细胞克隆及 PS-BME-L6 和 PS-BME-L7 两个细胞系。这些细胞系或克隆都有上皮细胞的典型特征,并能表达乳脂球膜蛋白(PAS-11),用塑料瓶培养可形成圆顶型。用胶原作基质时则形成腺泡样聚集体(acinilike aggregates),这些都是乳腺上皮细胞的典型特征。不仅如此,该细胞系在胰岛素、催乳素、皮质醇的诱导下还可合成和分泌 α -乳白蛋白和 α S2-酪蛋白。将这种细胞注入雌鼠乳腺的脂肪垫中,8 周内可形成非侵袭性的有波动感的细胞团,说明这几个细胞系或克隆是未癌化的正常细胞。

1991年, Shay等通过SV40LTA稳定整合诱导的永久细胞系包括ET-C、BME-UV、MAC-T三个牛乳腺上皮细胞系。同年, Huynh等^[12]利用SV40病毒温度敏感突变株的T抗原基因转染牛原代乳腺腺泡样细胞建立了MAC-T细胞系, 该细胞系外形亦呈现上皮细胞的典型特征, 而且在催乳素的诱导下可以产生 β -酪蛋白。

1995年, Huynh等建立了永生化牛乳腺细胞系HH2A, 该细胞系可产生来源乳腺的生长抑制剂。1996年, zavizion等通过SV40LTA转染法建立了牛乳腺上皮细胞系BME-UV, 该细胞系在IGF及EGF的作用下增殖加快, 而且可表达低水平的特殊泌乳蛋白。由于外源基因在宿主细胞染色体上整合的位点不同, 所以该细胞系的两个亚系对不同的生长因子反应有所不同, 并且具有不同核型。

3 激素等调节因子对乳腺上皮细胞分化及增殖的调控

乳腺组织在动物体内的增殖、分化、组织结构的重塑、泌乳的启动和维持受许多因素的影响和作用, 这些因素也同样影响体外培养乳腺细胞的增殖、分化、泌乳等功能的表现^[13]。由于乳腺细胞的增殖和分化始终贯穿于乳腺发育及泌乳过程的两个重要方面, 因此, 在细胞水平上进行了大量的乳腺上皮细胞增殖及分化的调控研究。

3.1 激素等调节因子对乳腺上皮细胞生长的影响

在体内, 多种激素成份共同作用于乳腺组织, 促进上皮细胞的生长及分化, 缺乏任何一种因子或激素, 其它激素也会部分或全部地失去作用^[14]。为此人们利用体外培养的乳腺细胞研究各种激素及其它调控因子的调节作用。雌激素对乳腺合成酪蛋白及乳糖是必需的, 但体外培养的乳腺组织乳糖的合成不依赖于雌激素^[15]。E₂对山羊乳腺上皮细胞有一定增殖作用, 但须与T3(三碘甲腺原氨酸)结合使用; 孕酮或T3单独或结合对该细胞均无效^[16]。催乳素和胰岛素是两种主要的生乳激素, 这两种激素在诱导乳腺细胞分化及维持这些细胞功能方面的作用已得到公认。但不同动物得到的结果不一致。Feldman等报道妊娠期小鼠的乳腺细胞在胰岛素存在情况下可合成少量酪蛋白, 但酪蛋白的产生量并不依赖添加考的松、催乳素、雌激素及孕酮的量, 它们只会使小鼠乳腺细胞合成特定蛋白的能力出现暂时性加强。Devinoy等实验证明兔和人的酪蛋白生成就不一定需要胰岛素的存在。Wamer等证明原代培养的小鼠乳腺组织, 乳白蛋白的产生不依赖催乳素的作用。Atwood等^[17]报道孕酮单独可以诱导青春小鼠乳腺三级腺小管分支的形成, 而除了E₂和孕

酮外其它因子可以诱导初级或次级管的发育。林桂娟等^[18]报道孕酮可以促进乳腺上皮细胞生长, 抑制成纤维细胞生长。Katigar等报道, 生长激素可以代替催乳素在细胞分化上的作用, 而Akers等认为牛乳腺上皮细胞缺乏生长激素的受体, 同时, Romagnofo等也认为生长激素对牛乳腺上皮细胞无促进增殖的作用。Woodward等^[19]报道, EGF和IGF-I对小鼠乳腺上皮细胞有协同增殖作用, 但孕酮及E₂和孕酮减少了体外EGF和IGF-I对小鼠乳腺上皮细胞的增殖反应, 同时表明, 孕酮可能对体外IGF-I诱导的细胞增殖具有抑制作用。

3.2 细胞外基质对乳腺上皮细胞生长的影响

上皮细胞和细胞外基质之间的关系十分密切, 其生长和分化的因子主要来源于细胞外基质^[20]。在动物机体内, 上皮细胞位于基膜表面, 基膜含有大量的胶原蛋白、附着蛋白和氨基多糖; 在体外培养时, 上皮细胞和细胞外基质之间的依存关系仍然存在^[21]。Emerman等于1977年首先利用从鼠尾制备的悬浮胶原作为基质, 培养怀孕中期的小鼠乳腺上皮细胞。在鼠尾悬浮胶原作为基质的培养基中细胞可维持分化状态或被诱导进入分化状态; 同时证明悬浮胶原使细胞处于极化状态, 顶端微绒毛出现, 基板形成, 葡萄糖代谢类型发生变化, 腔形成, 大部分乳蛋白合成及分泌增加等上皮细胞功能的特点^[22,23]。由此, 人们开始重视胶原等细胞外基质的作用。实际上, 胶原只是细胞外基质的一种, 通常胶原蛋白或弹性蛋白以纤维形式发挥作用, 蛋白多糖则在纤维与细胞或组织之间介导他们相互粘连^[24]。目前, 细胞外基质对细胞功能调节的重要性已得到公认, 但其作用机理还不十分清楚^[25]。

悬浮胶原的使用是细胞培养方法的一大进步, 但生长在胶原上的乳腺细胞其分化状态并未完全恢复; 增殖能力及分化程度均有限, 而且不能合成乳糖^[26]。Yang等^[27]把细胞培养在基质胶之中时, 细胞增殖能力加强, 但其分化程度未改善。为了更好地模拟细胞生存的内环境, wicha等^[28]利用基膜胶原(IV型胶原)做乳腺细胞培养的基质, 细胞在这种基质上容易贴壁、增殖, 其作用比I型和IV型胶原效果都好。但这种胶原对细胞维持分化状态并不比其他类型的胶原更有效, 细胞的寿命也不能因此而延长。乳腺上皮细胞培养成功说明了乳腺细胞生物学功能的分化取决于细胞与底物的相互作用, 在泌乳激素存在的条件下也是如此。胶原底物的应用, 特别是悬浮胶原凝胶的应用, 已经成为一种普遍采用的方法用于牛乳腺上皮细胞原代培养的研究。

近年来, 对乳腺细胞研究, 大大方便了乳腺上皮

细胞乳蛋白基因表达及调控、细胞形态学及乳腺生物反应器的研究工作, 为进一步研究各种因素对乳腺发育及泌乳过程的影响奠定了基础。 尽管有了有效的建立细胞系的方法, 但乳腺细胞系的数量和种类还远远不够, 并且一些已报道建立的细胞系还没得到他人的检验, 一些细胞系在使用过程中发生性质变化而不稳定, 所以在建立乳腺上皮细胞系方面还应继续进行研究, 掌握乳腺细胞增殖和分化的规律, 建立更多有实用价值的细胞系。

参考文献:

[1] Danielson K G, Oborn C J, Durban E M, et al. Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis in vitro and functional differentiation in vitro proc[J] . Natl Acad Sci. USA, 1984, 81: 3756-3760.

[2] McGrath M F. A novel system for mammary epithelial cell culture[J] . J Dairy Sci., 1987, 79: 1967-1980.

[3] Ahn J Y, Aoki N, Adachi T, et al. Isolation and culture of bovine mammary epithelial cells and establishment of gene transfection conditions in the cell [J] . Biosci Biotechnol Biochem, 1995, 59(1): 59-64.

[4] Novaro V , Roskelley C D , Bissell M J . Collagen2IV and laminin21 regulate estrogen receptor alpha expression and function in mouse mammary epithelial cells [J] . J Cell Sci., 2003, 116(14): 2975-2986.

[5] 多曙光, 吴应积, 罗奋华, 等. 牛乳腺上皮细胞的分离培养及其生物学特性[J] . 动物学研究, 2006, 27 (3): 299-305.

[6] Reilly C F, Kindy M S, Brown K E, et al. HeParin Prevents vascular smooth muscle cell Progression through the G1 Phase of the cell cycle[J] . Biol Chem., 1989, 264: 6990-6995.

[7] Evans M J, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J] . Nature, 1981, 292: 151-156.

[8] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M] . 北京: 北京出版社, 1995

[9] 陶谦, 黄洪章. SV40 与细胞永生性转化[J] . 癌症, 2001, 20 (3): 332-334.

[10] 彭新荣, 郑月茂, 张涌. 体外培养的牛乳腺上皮细胞形态研究 [J] . 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005 33 (1): 13-17.

[11] Gibson C A, Vega J R, Baumrucker C R, et al. Establishment and characterization of bovine mammary epithelial cell lines [J] . In Vitro Cell Dev Biol, 1991, 27A(7): 585-594.

[12] Huynh, Robitaille G, Turner J. Establishment of bovine mammary epithelial cell line(MAC-T): An in vitro model for bovine lactation[J] . Exp Cell Res., 1991, 197: 191-199.

[13] Ehmann V L, Peterson W D. To grow mouse mammary epithelial cell in culture[J] . J Cell Biol, 1984, 98: 1026-1032.

[14] Bullock L P, Barthe P Z, Mowazowicz I, et al. The effects of progestins on submaxillary gland epidermal growth factor, demonstration of androgenic synandrogenic and antiandro-

genic actions[J] . Endocrinology, 1975, 97: 189.

[15] Hayran E G, Barnes D, Pierschacher M, et al. Serum spreading factor is a major attachment protein in fetal bovine serum and the active principle in attachment-promoting fetuin[J] . J. Cell Biol., 1977, 95: 121.

[16] Pantschenko A G, Woodcock-Mitchell J, Bushmich S L, et al. Establishment and characterization of a caprine mammary epithelial cell line (CMEC)[J] . In Vitro Cell Dev Biol Anim., 2000, 36(1): 26-37.

[17] Atwood C S, Hovey R C, Glover J R, et al. Progesterone induces side branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice[J] . J Endocrinol, 2000, 167(1): 39-52.

[18] 林桂娟, 王恬, 陈才勇. 机械破碎法分离奶牛乳腺上皮细胞的体外培养研究[J] . 畜牧与兽医, 2004, 36(7): 4-6

[19] Woodward T L, Xie J, Fendrick J L, et al. Proliferation of mouse mammary epithelial cells in vitro: interactions among epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, ovarian hormones, and extracellular matrix proteins[J] . Endocrinology, 2000, 141(10): 3578-3586.

[20] Zhang H Z, Bennett J M, Smith K T, et al. Estrogen mediates mammary epithelial cell proliferation in serum-free culture indirectly via mammary stroma-derived hepatocyte growth factor[J] . Endo, 2002, 143(9): 3427-3434.

[21] Woodward T L, Mienaltowski A S, Modi R R, et al. Fibronectin and the alpha beta integrin are under developmental and ovarian steroid regulation in the normal mouse mammary gland[J] . Endo, 2001, 142(7): 3214-3222.

[22] Katiyar V N, Enami J, Nandi S. Effect of polypeptide hormones on stimulation of casein secretion by mouse mammary epithelial cells grown on floating collagen gels[J] . In Vitro, 1978, 14: 771-774.

[23] Lee T, Drohan W N, Lubon H. Proteolytic processing of human protein C in swine mammary gland[J] . J Biochem (Tokyo), 1995, 118(1): 81-87.

[24] Bolander F F, Nicholas K R, Topper Y J. Retention of glucocorticoid by isolated mammary tissue may complicate interpretation of results from in vitro experiments[J] . Biochem Biophys Res Commun, 1979, 91: 247.

[25] Bohmer F D, Lehman W, Schmidt H E, et al. Purification of a growth inhibitor from ascites mammary carcinoma cells from bovine mammary gland [J] . Exp Cell Res., 1984 150: 466-476

[26] Burwen S J, Pitelka D. Secretory function of lactating mouse mammary epithelial cells culture on collagen gels. Exp[J] . Cell. Res., 1980, 126: 249-262.

[27] Hamamoto S, Imagawa W, Yang J, et al. Morphogenesis of mouse mammary epithelial cells growing within collagen gels: ultrastructural and immunocytochemical characterization[J] . Cell Differ, 1988, 22(3): 191-201.

[28] Blum J L, Wicha M S. Role of the cytoskeleton in laminin induced mammary gene expression[J] . J Cell Physiol, 1988, 135(1): 13-22.