

牛乳腺上皮细胞的分离培养及其生物学特性

多曙光, 吴应积*, 罗奋华, 旭日干

(内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要: 采用胶原酶消化法和胰蛋白酶选择性消化法分离、培养和纯化牛乳腺上皮细胞。形态学观察表明, 培养的细胞具有典型的上皮细胞形态特征; 染色体分析结果表明, 培养的细胞具有正常的染色体数目。通过荧光免疫细胞染色方法鉴定了培养的细胞表达上皮细胞特异的角蛋白 5 和 8。该细胞在添加胰岛素、氢化可的松以及羊催乳素的无血清培养液中诱导培养时, 用 RT-PCR 方法检测到了 β -酪蛋白基因的转录。这些结果表明, 分离培养的细胞是乳腺上皮细胞, 这些细胞在诱导培养的条件下能够转录表达 β -酪蛋白。

关键词: 牛乳腺上皮细胞; 细胞培养; 核型分析; β -酪蛋白转录

中图分类号: Q819 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 5853 (2006) 03 – 0299 – 07

Isolation, Culture and Biological Characteristics of Bovine Mammary Epithelial Cells

DUO Shu-guang, WU Ying-ji*, LUO Fen-hua, BOU Shorgan

(Key Laboratory of China Education Ministry for Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract: Bovine mammary epithelial cells were isolated and purified by using collagenase digestion of the mammary gland tissue for the primary cell culture, and subsequently using trypsin-selected digestion of the cultured cells for cell purification. Morphological observation revealed that the cultured cells possessed the typical character of epithelial cells. Karyotyping analysis showed the normal chromosome number in cultured cells. The tissue-specific expression of cytokeratin 5 and 8 genes in mammary epithelial cells was identified by immunofluorescent cytochemical staining. The transcription of the beta-casein gene was detected by RT-PCR, when the purified cells were induced with insulin, hydrocortisone and prolactin in the culture medium without serum. The above results indicate that the purified cells are mammary epithelial cells, which can transcript beta-casein mRNA in the induction condition.

Key words: Bovine mammary epithelial cell; Cell culture; Karyotype analysis; Beta-casein transcription

乳腺生物反应器的制备是生物工程领域研究的热点 (Houdebine, 2000)。但因其研究和开发的周期长、成本大、风险高等问题, 因此, 在制备转基因动物之前, 对乳腺特异性表达载体构建的合理性和有效性进行检测是非常必要的 (Sun et al, 2005)。目前, 国内外普遍采用受精卵显微注射技术制作转基因小鼠, 对转基因的表达水平、组织特

异性和产生蛋白的活性进行分析, 为家畜乳腺反应器的制备提供科学依据。但其技术繁琐、难度大、周期长, 而且一定的基因构件在转基因小鼠模型中的表达量与大动物中的表达量并不一致, 从而使这种方法的可行性受到一定的限制 (Velander et al, 1992; Paleyanda et al, 1994)。乳腺上皮细胞具有合成和分泌乳汁的特殊功能, 是制作乳腺生物反应

* 收稿日期: 2006 – 12 – 03; 接受日期: 2006 – 03 – 09

基金项目: 内蒙古大学特聘教授科研启动费资助项目 (203059); 内蒙古自治区自然科学基金 (200408020402); 国家高科技项目 (2005AA206110) 子课题资助项目

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: yingji.wu@yahoo.com

第一作者简介: 多曙光 (1971 –), 男, 2002 级博士研究生。

器的靶细胞,因此,可以利用体外培养的、能合成和分泌乳蛋白的乳腺上皮细胞来检测乳腺特异性表达载体的功能,具有方便、快捷且能够真实反映乳腺表达载体在体内表达水平等优点(Xu et al, 2003)。

乳腺上皮细胞培养的研究起步较早。Ebner et al (1961)第一次在体外成功地培养了牛乳腺上皮细胞。其后,许多研究者相继分别以器官培养(Goodman et al, 1983; McGrath et al, 1987)或是以细胞培养(Schmid et al, 1983)的方式培养了乳腺上皮细胞,并以它们为模型对乳汁的合成和分泌机制进行了研究。由于乳腺上皮细胞是一种高度分化的细胞,必须不断地摸索体外培养的最佳条件及添加因子的作用,同时乳腺细胞在培养过程中容易脱离分化,必须培养在适宜条件下,才可维持其分化状态(Thordarson et al, 1989)。因此,乳腺上皮细胞的体外培养比较困难。目前已培养成功的、能够用于乳腺特异表达载体功能检测的细胞系并不多见。因此,建立乳腺上皮细胞分离培养方法,了解体外培养细胞的形态特征和生物学特性,对进一步了解泌乳的调控机理以及作为一个检测系统验证乳腺表达载体的功能都具有重要意义(Zheng et al, 2004)。

本研究采用胶原酶消化和胰酶选择性消化法,分离培养了牛乳腺上皮细胞,并对其生长特性、细胞遗传和 β -酪蛋白表达等相关特性进行了分析和鉴定。拟为进一步研究牛乳蛋白基因表达调控机制以及检测乳腺表达载体构建的合理性和有效性提供有利的条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及耗材 DMEM/F12 培养基为 Gibco 产品; cDNA 第一链合成试剂盒为 Invitrogen 公司产品; 胰蛋白酶 (Trypsin)、胶原酶 I (Collagenase type I)、链霉蛋白酶 (Pronase)、氢化可的松 (Hydrocortisone)、羊催乳素 (Prolactin) 为 Sigma 产品; DNase 为 Promega 公司产品; 标准胎牛血清为 TBD 产品; 胰岛素购自江苏万邦制药公司; 无机盐类及 D-PBS 为日本和光试剂; 其余试剂为国产分析纯。

1.1.2 培养液 乳腺上皮细胞生长培养液: DMEM/F12 + 10% FBS + 5 ng/mL EGF; 乳腺上皮

细胞诱导培养液: DMEM/F12 + 0.4 U/mL Insulin + 1 μ g/mL Hydrocortisone + 4 μ g/mL Prolactin。

1.2 方法

1.2.1 牛乳腺上皮细胞的分离与纯化培养 取本地屠宰的健康黑白花奶牛乳腺组织,置于 4 $^{\circ}$ C 冰盒中带回实验室。乳腺组织经 75% 酒精浸泡消毒,分离去除脂肪和结缔组织后剪碎。加入 0.5% 胶原酶 I 溶液于 37 $^{\circ}$ C 和 120 r/min 条件下消化处理 3 h。消化液用孔径 200 μ m 的细胞滤器过滤,收集细胞滤液,100 g 离心 3 min,吸弃上清。在沉淀中加入含 0.05% 蛋白酶 (Pronase) 的消化液悬浮细胞,于 37 $^{\circ}$ C 和 120 r/min 条件下消化 30 min,100 g 离心 3 min,吸弃上清。用含有 5% FBS 的 PBS 溶液悬浮细胞,1 500 g 离心 15 s,吸弃上清,重新悬浮细胞,此操作重复 6 次。细胞计数后,用乳腺上皮细胞培养液悬浮细胞,以 3×10^4 细胞/ cm^2 的密度接种于直径 6 cm 的培养皿中,于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO_2 ,在饱和湿度培养箱中原代培养。每日观察细胞的生长情况。待细胞生长至 80%—90% 汇合时,使用 0.05% 胰蛋白酶/EDTA 和 37 $^{\circ}$ C 条件下消化,待少量污染的成纤维细胞变圆后即中止消化,轻轻吹吸几次后,吸弃消化液,再用 PBS 洗 3 遍,加入生长培养液,继续培养细胞至 80%—90% 汇合度,重复上述操作 3—4 次后,即可去除少量污染的成纤维细胞,得到高纯度乳腺上皮细胞。

1.2.2 牛乳腺上皮细胞冻存和解冻复苏培养 用 0.05% 胰蛋白酶/EDTA,在 37 $^{\circ}$ C 条件下,消化细胞 10 min,2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞;加入 1 mL 新鲜的培养液重悬细胞,台盼蓝染色和血球计数板计数后,用冷冻保护液(含 20% FBS、10% DMSO 的 DMEM/F12 培养液)调整细胞数至 1×10^6 细胞/mL,每个冷冻管中分装 1 mL, -80 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,然后放入液氮罐中长期保存。

从液氮罐中取出冻存管,在 37 $^{\circ}$ C 的水浴中保温 1—2 min,使其完全融化。加入 5 mL 培养液悬浮细胞,2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞;再加入 5 mL 生长培养液重悬细胞,将其接种于 6 cm 细胞培养皿中,于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO_2 ,在饱和湿度条件下培养,当细胞生长至约 70%—80% 汇合度,传代扩大培养。

1.2.3 生长曲线的绘制 将培养至第 5 代乳腺上皮细胞以 2×10^4 细胞/mL 的密度接种于 12 孔细胞培养板中,每孔加入 0.5 mL,于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO_2 ,

在饱和湿度的培养箱中培养。每天同一时间用胰蛋白酶消化 3 孔细胞，血球计数板分别计数后，求平均值。连续 8 天。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 中期分裂相染色体的制备与核型分析 牛乳腺上皮细胞中期分裂相染色体的制备方法见 Hou et al (2005)。

1.2.5 用荧光免疫细胞染色法鉴定乳腺上皮细胞 采用免疫组化方法检测培养的细胞角蛋白 5 和 8 的表达。待检测的细胞在室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 min，再用含 0.2% TritonX-100 的 PBS 通透处理细胞 5 min，PBS 清洗 3 次，每次 5 min。用含 10% 山羊血清的 PBS 封闭处理 30 min。然后用鼠抗人的细胞角蛋白 5 和 8 单克隆抗体 (1:50 稀释) 于室温下振荡孵育 1 h，PBS 清洗 3 次，每次 5 min。加入 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (1:50)，室温下避光振荡孵育 30 min，PBS 清洗 3 次，每次 5 min。再加入含碘化丙锭 (propidium iodide, PI) 10

$\mu\text{g/mL}$ 的 PBS，室温下染核 10 min。用荧光显微镜观察结果，同时用牛成纤维细胞作阴性对照。

1.2.6 鼠尾胶原的制备与铺板 鼠尾胶原的制备与铺板方法参见文献 (OuYang & Qian, 2003)。

1.2.7 RT-PCR 检测 β -酪蛋白 mRNA 水平的表达 正常培养的、诱导乳蛋白表达以及转基因后，再诱导乳蛋白表达培养的牛乳腺上皮细胞，用快速 RNA 抽提试剂盒提取 RNA，再经无 RNA 酶的 DNA 酶处理，然后以此 RNA 为模板，用 cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA 第一链。根据 Bonsing et al (1988) 发表的牛 β -酪蛋白基因序列和 Baev et al (1987) 发表的牛 β -酪蛋白 mRNA 序列设计 PCR 引物 (表 1)，检测 β -酪蛋白基因在 mRNA 水平上的表达。选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 作为 RT-PCR 检测基因在 mRNA 水平表达的标准化内参。根据 GAPDH mRNA 序列 (U85042) 设计引物 (表 1)。

表 1 PCR 引物序列和反应条件

Tab. 1 Primer sequence and reactive condition of PCR

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	PCR 反应条件 Reactive condition of PCR	PCR 产物长度 Length of PCR product (bp)
牛 β -酪蛋白 Bovine beta-casein	F 5'AGGAACAGCAGCAAACAG 3' R 5'TTCCAGTCGCAGTCAAT 3'	94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min	579
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	F 5'ACGGCACAGTCAAGGCAGA 3' R 5'GTGATGGCGTGGACAGTGG 3'	94 °C 变性 30 s, 56 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min	376

2 结果

2.1 牛乳腺上皮细胞的分离和纯化培养

分离剪碎的乳腺组织，经过胶原酶消化 3 h 后，成为由 100—200 个细胞组成的细胞团，再经过蛋白酶作用 30 min 后，大多数的细胞团被消化成单细胞。因此，接种培养的细胞是大多数的单细胞和少量的较小的细胞团的混合液，接种 4—5 h 后，细胞贴壁，培养 2 天后，几个至十几个细胞聚集在一起生长，大多数细胞为鹅卵石状，呈典型的上皮细胞特征 (图 1a)。继续培养 4 天后，每个聚集生长的上皮细胞团被少量污染的成纤维细胞分隔 (图 1b)。然后，用 0.05% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 和 37 °C 条件下消化 3 min，多数的成纤维细胞变圆脱壁，再通过轻轻的吹打，吸弃消化液后，大部分的成纤维细胞便被去除，加入新鲜的生长培养液继续培养。如此操作重复 3 或者 4 次后，即可得到比较纯

净的上皮细胞 (图 1c)。之后，用 0.05% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 在 37 °C 条件下消化 10 min，加入 10% FBS 的培养液终止消化。离心收集纯化后的乳腺上皮细胞，重新接种培养，以扩大培养，用于进一步的实验。

2.2 牛乳腺上皮细胞解冻复苏培养

冻存的牛乳腺上皮细胞解冻后，培养 2 h 贴壁。生长过程中仍旧保持几个至十几个细胞聚集生长的特性，细胞形态良好 (图 2)。这一结果表明，常规的细胞冷冻保存及解冻复苏培养的方法也同样适于牛乳腺上皮细胞。

2.3 牛乳腺上皮细胞生长曲线

以培养天数为横坐标，3 孔细胞数的平均值为纵坐标绘制了牛乳腺上皮细胞生长曲线图 (图 3)。生长曲线显示：牛乳腺上皮细胞生长滞留期为 0—2 d，对数生长期为 2—6 d，7 d 后进入平台期。结果表明，培养的牛乳腺上皮细胞具有正常的分裂增殖

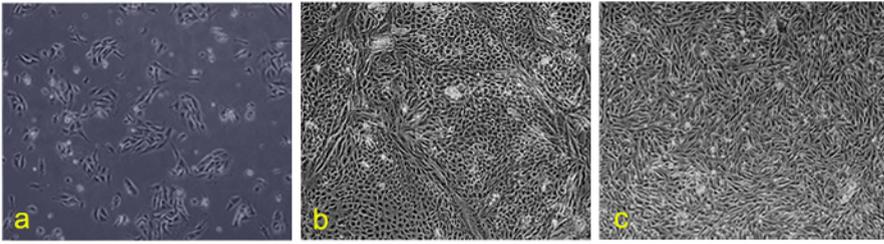


图 1 分离和纯化培养的牛乳腺上皮细胞 (相差显微镜图, $\times 100$)

Fig. 1 Bovine mammary epithelial cells in isolated and purified culture (Contrast microscope, $\times 100$)

a. 分离培养 2 天的牛乳腺上皮细胞; b. 分离培养 6 天的牛乳腺上皮细胞; c. 经胰蛋白酶选择性消化, 得到比较纯净的牛乳腺上皮细胞。

a. The bovine mammary epithelial cells in isolated culture for 2 days; b. The bovine mammary epithelial cells in isolated culture for 6 days; c. The purified bovine mammary epithelial cells from selective digestion with trypsin.

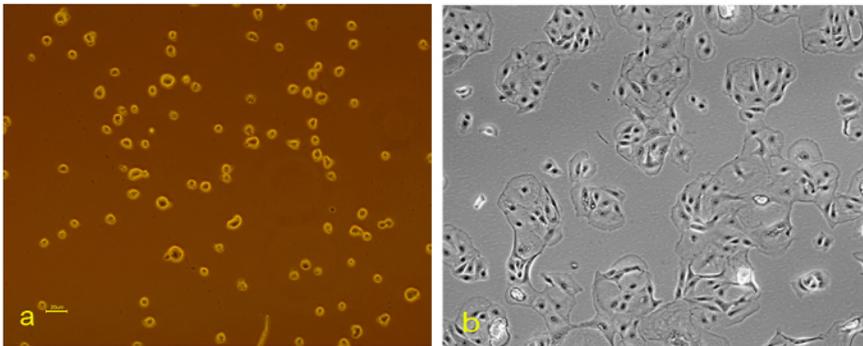


图 2 解冻培养的牛乳腺上皮细胞 (相差显微镜图, $\times 100$)

Fig. 2 Bovine mammary epithelial cells in culture after thawing (Contrast microscope, $\times 100$)

a. 解冻后接种于培养皿中的牛乳腺上皮细胞; b. 解冻培养 2 天的牛乳腺上皮细胞。

a. The bovine mammary epithelial cells were replated in dish after thawing; b. The bovine mammary epithelial cells were cultured in dish for two days after thawing.

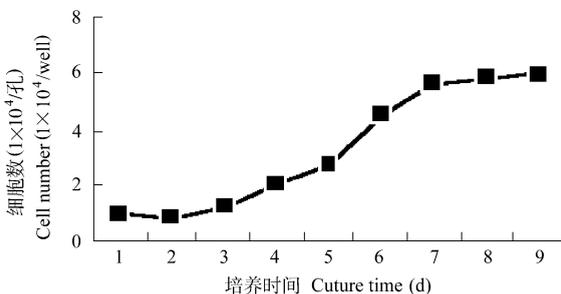


图 3 牛乳腺上皮细胞的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of bovine mammary epithelial cells

特性。

2.4 核型分析

选择分散良好和轮廓清晰的 30 个分裂相进行统计分析, 结果表明 27 个细胞具有正常的染色体数目 ($2n = 60$), 正常率 90% (27/30)。图 4 为其

中 1 个分裂相。

2.5 荧光免疫细胞染色分析细胞角蛋白 5 和 8 的表达

应用荧光免疫细胞染色分析了分离培养并经过纯化后的乳腺上皮细胞的骨架蛋白——角蛋白 5 和 8 表达情况, 结果分离培养的乳腺上皮细胞几乎全部呈强阳性 (图 5: a, b), 而作为阴性对照的牛成纤维细胞则呈阴性 (图 5: c, d)。这一结果证明: 分离培养的细胞来源于乳腺上皮。用 RT-PCR 方法也检测到细胞角蛋白 5 和 8 的 mRNA 在分离培养的乳腺上皮细胞中表达 (未出示结果)。

2.6 RT-PCR 检测 β -酪蛋白 mRNA 水平的表达

培养的细胞在正常的生长培养液中生长至完全汇合后, 分成两组, 一组加入诱导培养液进行诱导培养; 另一组则继续加入正常的生长培养液培养。

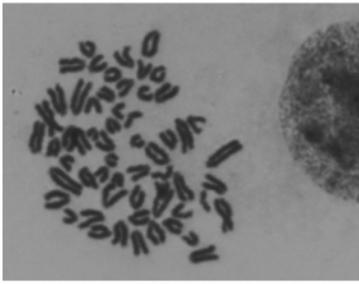


图 4 牛乳腺上皮细胞的染色体 ($2n = 60$)
Fig. 4 Chromosome of bovine mammary epithelial cells ($2n = 60$)

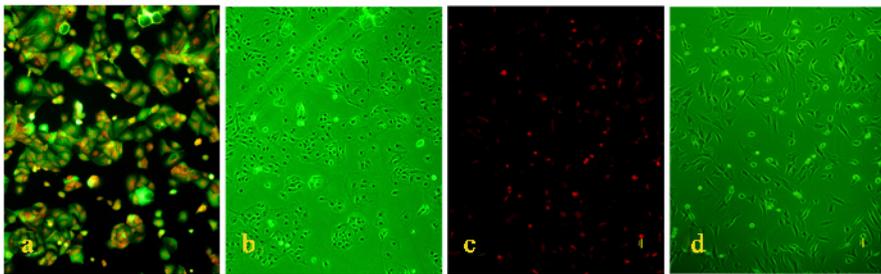


图 5 细胞免疫荧光染色法分析体外培养的牛乳腺上皮细胞角蛋白 5 和 8 表达
Fig. 5 Cytokeratin 5 & 8 expression in bovine mammary epithelial cells cultured *in vitro* by Immunofluorescence staining analysis

一抗：小鼠抗人细胞角蛋白 5 和 8 单克隆抗体；二抗：FITC 标记山羊抗小鼠 IgG。
a, b：用抗体染色的纯化的牛乳腺上皮细胞 ($\times 100$)；c, d：阴性对照，用抗体染色的牛成纤维细胞 ($\times 100$)。其中 a, c 为荧光显微镜图；b, d 为相差显微镜图。

First antibody: Monoclonal mouse anti-cytokeratin 5 & 8; Second antibody: a Mo IgG (H+L)/FITC.
a, b. The purified bovine mammary epithelial cells stained with the antibodies, $\times 100$; c, d. Negative control, the bovine fibroblast stained with the antibodies $\times 100$. a, c. Fluorescent microscope; b, d. Contrast microscope.

3 讨论

乳腺细胞的培养已有半个多世纪的历史，在这个过程中，人们主要是培养混合的乳腺细胞，这一方面是由于乳腺细胞的分离纯化十分困难；另一方面，复合的细胞组成有利于上皮细胞的分化状态的维持。然而，混杂的乳腺细胞在传代过程中往往把上皮的成分损失掉，这样便给上皮细胞分化增殖研究带来极大不便。因此，许多人试图通过乳腺细胞的分离培养得到纯化的乳腺上皮细胞系，但往往得不到好的结果 (Li et al, 2000)。本研究发现，要想通过分离培养得到较纯的乳腺上皮细胞，取材是最关键的一步。由于乳腺组织与其他组织的颜色、界限的分辨不是十分清晰，所以取材过程中一定要特别注意避免误取淋巴结、肌腱等非乳腺组织，从

两组均分别培养 24、48 和 72 h，提取两组细胞的总 RNA，应用 RT-PCR 检测两组培养的细胞 β -酪蛋白 mRNA 的表达，其结果 (图 6) 表明：诱导培养 24、48 和 72 h 的细胞均检测到了 β -酪蛋白 mRNA 的表达；而非诱导培养的细胞只有 72 h 的才有极少量的 β -酪蛋白 mRNA 表达。此外，我们在实验中还比较了用鼠尾胶原处理过的培养皿和未处理的培养皿对诱导乳腺上皮细胞 β -酪蛋白 mRNA 表达的影响，其结果 (图 7) 表明：培养皿是否使用鼠尾胶原处理对酪蛋白 mRNA 的表达没有明显的影响。

而避免培养过程中淋巴细胞和成纤维细胞的污染。另外，在妊娠的中晚期或是哺乳期，乳腺腺泡数量最多，是乳腺上皮细胞取材的最佳时期。

Ahn 等采用低浓度 (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 细胞组成的牛乳腺上皮细胞团 (Ahn et al, 1995)。Novaro 等应用较高浓度 (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 (Novaro et al, 2003)。本研究应用较高浓度 (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

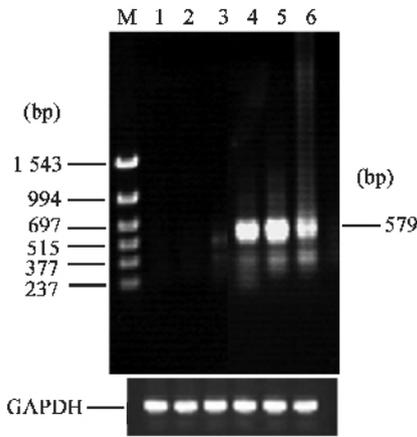


图 6 RT-PCR 检测牛乳腺上皮细胞 β -酪蛋白 mRNA 表达

Fig. 6 Detection of beta-casein mRNA expression in bovine mammary epithelial cells by RT-PCR

M: PCR Marker; 1, 2 和 3 分别为在生长培养液中培养 24、48 和 72 h 的牛乳腺上皮细胞; 4、5 和 6 分别为在诱导培养液中培养 24、48 和 72 h 的牛乳腺上皮细胞。

M: PCR Marker; 1, 2, 3: Bovine mammary epithelial cells cultured in growth media at 24, 48 and 72 h, respectively; 4, 5, 6: Bovine mammary epithelial cells cultured in induction media at 24, 48 and 72 h, respectively.

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。体外培养的乳腺上皮细胞鉴定通常是鉴别细胞的特异性标志物, 其中细胞骨架, 如角蛋白, 是上皮细胞重要的标志蛋白。本研究中所使用的鼠抗人细胞角蛋白 5 和 8 单克隆抗体具有对上皮来源的细胞呈阳性反应的特性。应用此抗体对分离培养细胞的免疫组化染色几乎全部呈阳性的结果表明, 分离培养的细胞是乳腺上皮细胞。

体外培养的乳腺上皮细胞在诱导培养时能够表达分泌乳蛋白, 这对研究乳蛋白的调控机理及应用它检测乳腺表达载体构建的合理性和有效性都具有重要意义。乳腺上皮细胞生物学功能的分化取决于细胞与胞外基质的相互作用, 在泌乳激素存在的条件下也是如此。Emerman et al (1977) 首先报道了这一现象之后, 许多研究者也相继发表了许多重要的细胞与胞外基质相互作用的实验结果。应用鼠尾胶原处理过的培养皿进行小鼠乳腺上皮细胞的原代培养已经成为一种普遍采用的方法 (Talhouk et al, 1993; Shannon & Pitelka, 1981; Sasaki & Enami,

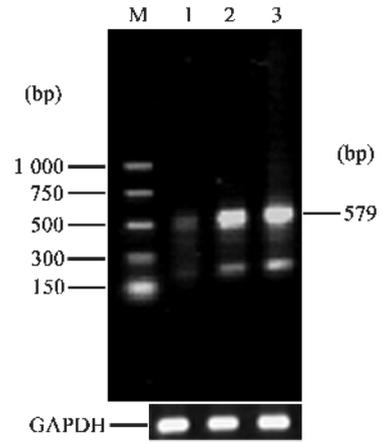


图 7 鼠尾胶原处理的培养皿对 β -酪蛋白 mRNA 表达的影响

Fig. 7 Effect of treatment of the culture dish with Rat collagen type I on expression of beta-casein mRNA

M: DNA 分子量标准; 1: 在生长培养液中 72 h 的牛乳腺上皮细胞; 2: 在未处理的培养皿中诱导培养 72 h 的牛乳腺上皮细胞; 3: 在鼠尾胶原处理的培养皿中诱导培养 72 h 的牛乳腺上皮细胞。

M: DNA marker; 1: Mammary epithelial cells cultured in growth media for 72 h; 2: Bovine mammary epithelial cells cultured in induction media on the dish without treatment with rat collagen type I for 72 h; 3: Mammary epithelial cell cultured in induction media on the dish with rat collagen type I for 72 h.

1996)。另外, 体内多种激素成分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, 其他激素也会部分或全部地失去作用 (Bullock et al, 1975)。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的功能方面的作用已得到公认。

本实验中使用含有胰岛素、氢化可的松和催乳素的诱导培养液, 对体外培养的牛乳腺上皮细胞进行了乳蛋白诱导表达实验, 用 RT-PCR 方法在 mRNA 水平检测到了 β -酪蛋白的表达。这个结果表明: 本实验中分离培养的牛乳腺上皮细胞在胰岛素、氢化可的松和催乳素同时存在的条件下, 具有在 mRNA 水平表达 β -酪蛋白的能力。同时在实验中我们也对比了鼠尾胶原对分离培养的牛乳腺上皮细胞的 β -酪蛋白 mRNA 表达的影响, 结果表明, 鼠尾胶原的存在与否对 β -酪蛋白 mRNA 表达的影响不明显, 这与 Ahn et al (1995) 报道的研究结果相一致。本实验只对 β -酪蛋白的 mRNA 的表达进行了检测, 而鼠尾胶原是否会对其他的乳蛋白的表达产生影响, 还有待于进一步探讨。

参考文献：

- Ahn JY, Aoki N, Adachi T, Mizuno Y, Nakamura R, Matsuda T. 1995. Isolation and culture of bovine mammary epithelial cells and establishment of gene transfection conditions in the cell [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, **59** (1): 59 - 64.
- Baev AA, Smirnov IK, Gorodetskii SI. 1987. Primary structure of cDNA for bovine beta-casein [J]. *Mol Biol*, **21** (1): 255 - 265.
- Bonsing J, Ring JM, Stewart AF, Mackinlay AG. 1988. Complete nucleotide sequence of the bovine beta-casein gene [J]. *Aust Biol Sci*, **41** (4): 527 - 537.
- Bullock LP, Barthe PZ, Mowazowicz I, Orth DN, Bardin W. 1975. The effects of progestins on submaxillary gland epidermal growth factor, demonstration of androgenic, synandrogenic and antiandrogenic actions [J]. *Endocrinology*, **97**: 189.
- Ebner KE, Hoover CR, Hageman EC, Larson BL. 1961. Cultivation and properties of bovine mammary cell cultures [J]. *Exp Cell Res*, **23**: 373 - 385.
- Emerman JT, Enami J, Pitelka DR, Nandi S. 1977. Hormonal effects on intracellular and secreted casein in cultures of mouse mammary epithelial cells on floating collagen membranes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74** (10): 4466 - 4470.
- Goodman GT, Akers RM, Friderici KH, Tucker HA. 1983. Hormonal regulation of alpha-lactalbumin secretion from bovine mammary tissue cultured *in vitro* [J]. *Endocrinology*, **112** (4): 1324 - 1330.
- Hou Y, Tan LX, Li WR, Niu ZG, Guo ZQ. 2005. A novel method for increasing the number of metaphase cells cultured *in vitro* [J]. *Hereditas* (Beijing), **27** (3): 457 - 460. [侯颖, 谭立新, 李文蓉, 牛志刚, 郭志勤. 2005. 一种提高体外培养细胞中期分裂相的新方法. *遗传*, **27** (3): 457 - 460.]
- Houdebine LM. 2000. Transgenic animal bioreactors [J]. *Transgenic Res*, **9** (4 - 5): 305 - 320.
- Li Z, Wang Y, Liu HL, Zhang DF. 2000. Study on isolation and culture of bovine mammary epithelial cells [J]. *Acta Agricul Shang-hai*, **16** (3): 25 - 28. [李震, 王英, 刘惠莉, 张德福. 2000. 牛乳腺上皮细胞的分离和培养. *上海农业学报*, **16** (3): 25 - 28.]
- McGrath MF. 1987. A novel system for mammary epithelial cell culture [J]. *J Dairy Sci*, **70** (9): 1967 - 1980.
- Novaro V, Roskelley CD, Bissell MJ. 2003. Collagen-IV and laminin-1 regulate estrogen receptor alpha expression and function in mouse mammary epithelial cells [J]. *J Cell Sci*, **116** (14): 2975 - 2986.
- OuYang WQ, Qian JF. 2003. Establishment of culture system in goat mammary epithelial cell [J]. *Northwest Sci-tech Univ Agricul For (Nature Science)*, **31** (3): 30 - 34. [欧阳五庆, 钱菊汾. 2003. 山羊乳腺上皮细胞培养体系的建立. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, **31** (3): 30 - 34.]
- Paleyanda RK, Zhang DW, Hennighausen L, McKnight RA, Lubon H. 1994. Regulation of human protein C gene expression by the mouse WAP promoter [J]. *Transgenic Res*, **3** (6): 335 - 343.
- Sasaki T, Enami J. 1996. Hormone-dependent expression of gamma-casein mRNA in mouse mammary epithelial cells cultured on floating collagen gels [J]. *Zool Sci*, **13** (4): 587 - 591.
- Schmid E, Franke WW, Grund C, Schiller DL, Kolb H, Paweletz N. 1983. An epithelial cell line with elongated myoid morphology derived from bovine mammary gland. Expression of cytokeratins and desmosomal plaque proteins in unusual arrays [J]. *Exp Cell Res*, **146** (2): 309 - 328.
- Shannon JM, Pitelka DR. 1981. The influence of cell shape on the induction of functional differentiation in mouse mammary cells *in vitro* [J]. *In Vitro*, **17** (11): 1016 - 1028.
- Sun YL, Lin CS, Chou YC. 2005. Gene transfection and expression in a primary culture of mammary epithelial cells isolated from lactating sows [J]. *Cell Biol Int*, **29** (7): 576 - 582.
- Talhok RS, Neiswander RL, Schanbacher FL. 1993. Morphological and functional differentiation of cryopreserved lactating bovine mammary cells cultured on floating collagen gels [J]. *Tissue Cell*, **25** (6): 799 - 816.
- Thordarson G, Ogren L, Day JR, Bowens K, Fielder P, Talamantes F. 1989. Mammary gland development and alpha-lactalbumin production in hypophysectomized, pregnant mice [J]. *Biol Reprod*, **40** (3): 517 - 524.
- Velander WH, Johnson JL, Page RL, Russell CG, Subramanian A, Wilkins TD, Gwazdauskas FC, Pittius C, Drohan WN. 1992. High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89** (24): 12003 - 12007.
- Xu MN, Li SG, Zhao JY, Cheng GX. 2003. The detection method of mammary gland bioreactor expression vector [J]. *Biotechnol Bull*, **5**: 23 - 26. [徐曼妮, 厉曙光, 赵建阳, 成国祥. 2003. 乳腺生物反应器表达载体的检测方法. *生物技术通报*, **5**: 23 - 26.]
- Zheng YM, Peng XR, Xu YP, Shi YQ, Zhang Y. 2004. Study on appearance of goat mammary epithelial cells which cultured *in vitro* [J]. *J Northwest Sci-tech Univ Agricul For (Nature Science)*, **32** (3): 37 - 41. [郑月茂, 彭新荣, 徐永平, 石玉强, 张涌. 2004. 体外培养的山羊乳腺上皮细胞形态研究. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, **32** (3): 37 - 41.]

本刊编委 Alexei P. Kryukov 博士简介

Alexei Petrovich Kryukov, 男, 1949 年生。1972 年毕业于国立新西伯利亚大学 (Novosibirsk State University) 自然科学系遗传学专业; 1982 年于国立莫斯科大学 (Moscow State University) 动物学专业获得副博士 (Ph. D.) 学位; 2001 年于俄罗斯科学院远东分院生物学与土壤科学研究所获得科学博士 (D. Sc., 正博士) 学位。1987 年至今任俄罗斯科学院远东分院生物学与土壤科学研究所 (位于海参崴 Vladivostok) 进化动物学与遗传学实验室主任。

Alexei Kryukov 研究的领域涉及鸟类和哺乳动物的分类学、细胞遗传学、进化生物学、分子系统学和生物地理学等。曾多次与日本和中国的相关科学家合作, 开展东亚杂交带哺乳动物的遗传多样性、分子系统学和物种分化的研究。