

奶山羊不同发育时期乳腺上皮细胞中内质网和线粒体的变化

曲 波 闫宏博 佟慧丽 李庆章 *

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 为研究奶山羊乳腺的胚后形态发育, 采用活细胞荧光标记法结合激光共聚焦显微技术, 观察奶山羊乳腺发育中内质网和线粒体的变化。结果显示: 腺上皮细胞内质网和线粒体在妊娠初期和中期数量较少, 妊娠晚期开始逐步增加, 泌乳中期达到高峰并维持在一个较高的水平上, 退化期迅速下降, 逐渐恢复到妊娠前状态; 退化期乳腺上皮细胞内仍保持一定数量的细胞器, 以维持细胞的正常机能和活动。

关键词 奶山羊; 乳腺上皮细胞; 内质网; 线粒体

在乳腺生物学研究中, 结构与功能从来都是密不可分的^[1]。乳腺发育过程中腺泡细胞的结构分化和细胞器变化有力地支持了这一点。目前, 乳腺基础研究, 尤其是奶山羊乳腺胚后发育的形态学研究甚少。本文采用活细胞荧光标记法结合激光共聚焦显微技术, 研究奶山羊乳腺发育中腺上皮细胞中内质网和线粒体等主要细胞器的变化, 旨在完善奶山羊乳腺胚后发育的形态学资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

采用妊娠期、泌乳期及退化期健康雌性关中奶山羊 30 只, 经检测无乳腺炎及其他疾病。实验羊采用舍饲, 舍温 18 °C, 通风干燥, 采光良好, 自由采食饮水。

根据奶山羊乳腺发育特点, 采样时点分为: 妊娠期 1 月、3 月、5 月; 泌乳期 10 日、30 日、60 日、120 日; 退化期 3 日、7 日、21 日, 共计 10 个时点。

1.2 主要试剂及耗材

DMSO 购自 Sigma 公司; 优质胎牛血清(FBS)、DF12 培养基、I 型胶原酶均购自 Gibco 公司; 内质网荧光探针(E-34251, 激发/发射波长为 504/511 nm)、线粒体荧光探针(M-7512, 激发/发射波长为 579/599 nm)、Hoechst 33258 均购自 Invitrogen 公司。Confocal 专用细胞培养皿购自北京博蕾德科技公司。

1.3 奶山羊乳腺上皮细胞的分离培养

无菌切取 1~3 g 乳腺组织, 胶原酶消化法进行乳

腺上皮细胞的分离培养。对胶原酶浓度及消化时间进行优化, 确定最适酶浓度为 400 U/ml, 消化时间为 3.5 h。以 1×10^6 个/ml 的密度铺于 Confocal 专用细胞培养皿中, 置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养, 并观察细胞生长情况。2~3 天更换培养液, 观察细胞生长 80%~90% 汇合度时, 进行细胞器荧光检测。

1.4 乳腺上皮细胞中内质网和线粒体的检测

取出细胞培养皿, 加入 37 °C 预热、终浓度为 50 nmol/L M-7512 工作液, 37 °C 染色 40 min; DF-12 培养液轻轻洗一次后, 加入 37 °C 预热、终浓度为 1 μmol/L E-34251 工作液, 37 °C 染色 30 min; 终浓度 10 μg/ml Hoechst 33258 复染 5 min, 激光扫描共聚焦显微镜观察、照像。

1.5 图像采集与数据处理

激光扫描共聚焦显微镜使用三通道(PMT)检测。激发谱线分别为 405 nm (激发 Hoechst 33258 标记的蓝色荧光, 染核)、488 nm (激发 E-34251 标记的绿色荧光, 染内质网)和 543 nm (激发 M-7512 标记的红色荧光, 染线粒体)。扫描模式为 xyz, 以 0.4 μm 的 Z 轴步距逐层扫描, 点平均 2 次, 面平均 4 次, PMT 序列扫描成像, overlay 处理后采图保存。激光功率和 PMT 增益恒定。所有图像分辨率为 1 024×1 024, 存储格式为 TIF。每个实验重复 3 次, 每张切

收稿日期: 2008-05-21 接受日期: 2008-07-10

黑龙江省国际合作项目资助(No.WB07A06)

* 通讯作者。Tel: 0451-55190999, Fax: 0451-55103336, E-mail:

qingzhangli@hotmail.com

片选取 5 个视野观察。用 Image-pro plus 6.0 (IPP) 软件处理图片, 计算面积积分光密度(AIOD)。数据分析采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。原始数据采用平方根反正弦转换, 使其符合正态分布。

2 结果

2.1 妊娠期

妊娠初期奶山羊乳腺内, 腺泡上皮细胞染色质较均匀, 胞质内可见较多的内质网和线粒体(图 1a)。妊娠中期, 腺泡分泌性变化增强。腺泡上皮细胞有较规则的核型, 胞质内内质网逐渐发达, 线粒体数量增多(图 1b)。妊娠晚期, 腺泡已分化成独立结构, 上皮细胞胞质中的内质网和线粒体急剧增多(图 1c)。图 1d 为妊娠 5 个月奶山羊乳腺上皮细胞培养结果。

2.2 泌乳期

泌乳期乳腺的分泌活动达到顶峰。腺泡上皮细胞分泌特征明显, 胞质内内质网丰富且发达, 同时可见大量的线粒体(图 2a、图 2b、图 2c、图 2d)。图 2e、图 2f 为泌乳期奶山羊乳腺上皮细胞培养结果。

2.3 退化期

奶山羊乳腺进入退化期后, 胞质内的细胞器都呈下降趋势, 尤其是涉及到乳合成和分泌的内质网、线粒体等主要细胞器。激光共聚焦显微镜观察下, 随着退化时间的增加, 内质网和线粒体的数量下降趋势非常明显, 到退化 21 日, 腺泡上皮细胞内仅保持少量完整的细胞器(图 3a、图 3b、图 3c)。图 3d 为退化 3 日奶山羊乳腺上皮细胞培养结果。

2.4 奶山羊乳腺上皮细胞中内质网和线粒体的变化

采用 Image-pro plus 6.0 (IPP) 软件处理奶山羊乳腺内质网和线粒体荧光标记图片, 并计算 AIOD。本文中, AIOD 为积分光密度(IOD)与荧光面积总和的比值。以此近似反映奶山羊乳腺中内质网和线粒体的变化情况(表 1、图 4)。数据分析采用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。原始数据采用平方根反正弦转换, 使其符合正态分布。

表 1 和图 4 的结果显示, 妊娠初期和中期, 奶山羊乳腺上皮细胞中内质网和线粒体数量较少, 直到妊娠晚期开始大量增加。泌乳期细胞器发育水平和数量逐渐升高, 到泌乳中期达到顶峰, 此后虽逐步降低, 但仍维持在一个较高的水平上。例如, 泌乳晚期的

线粒体发育水平仍然显著高于妊娠晚期。进入退化期后, 细胞器发育水平和数量下降趋势开始非常迅速, 退化 3 日的内质网发育水平已经显著低于妊娠中期, 但此后下降趋势减缓。至退化 21 日, 细胞器发育水平已显著低于妊娠初期。

3 讨论

乳的生成是在腺泡上皮细胞内进行的, 包括新物质的合成和由血液中吸收两个过程。新合成的物质主要为蛋白质、乳糖和乳脂。而激素、维生素、无机盐等乳汁成分则由血浆中选择性吸收而来^[2-5]。乳腺上皮细胞内与乳合成和分泌相关的细胞器主要为内质网、高尔基体、线粒体、核糖体等^[3]。

乳蛋白的合成场所在粗面内质网(RER)上的核糖体^[3]。新合成的蛋白质首先累积在内质网腔中, 然后转移到高尔基体内进行加工修饰, 再包装成分泌小泡运输到细胞顶膜^[6]。值得注意的是, 大部分分泌性蛋白都在内质网腔中进行糖基化形成糖蛋白。乳糖在高尔基体合成, 最终以胞吐方式释放到腺泡腔^[7]。乳脂合成的主要场所为内质网。有研究证实, RER 和滑面内质网(SER)都能合成脂质, 但合成的量有差异。此外, 乳脂三酰甘油主要在 SER 合成并形成脂滴^[8]。另外, 线粒体的氧化呼吸作用为乳腺上皮细胞的各种活动提供能量, 是腺上皮细胞的动力站, 线粒体的数量和状态随乳腺功能状况的改变而变化^[9]。本文选取内质网和线粒体作为研究对象, 采用活细胞荧光标记法结合激光共聚焦显微技术, 研究其在奶山羊乳腺发育中的变化情况, 实验结果与有关资料报道相符^[10-16]。

妊娠初期和中期, 奶山羊乳腺上皮细胞中内质网和线粒体数量较少, 直到妊娠晚期开始大量增加。从形态学上看, 共聚焦显微镜下可见细胞核周围的内质网和线粒体其荧光强度和面积都随着时间的推移而增加。IPP 分析结果也证实了这一趋势。泌乳期乳腺上皮细胞分泌特征异常明显, 胞质内内质网丰富且发达, 同时可见大量的线粒体。镜下可见内质网和线粒体荧光信号清晰明亮, 紧紧包围甚至覆盖着细胞核。IPP 分析结果显示泌乳期细胞器发育水平逐渐升高, 到泌乳中期达到顶峰, 此后虽逐步降低, 但仍维持在一个较高的水平上。例如, 泌乳晚期的线粒体发育水平仍然显著高于妊娠晚期。这种变化与乳腺上皮细胞的分泌状态相吻合。奶山羊乳腺进入退化期后, 胞质内的与分泌活动有关的细胞器都呈下降

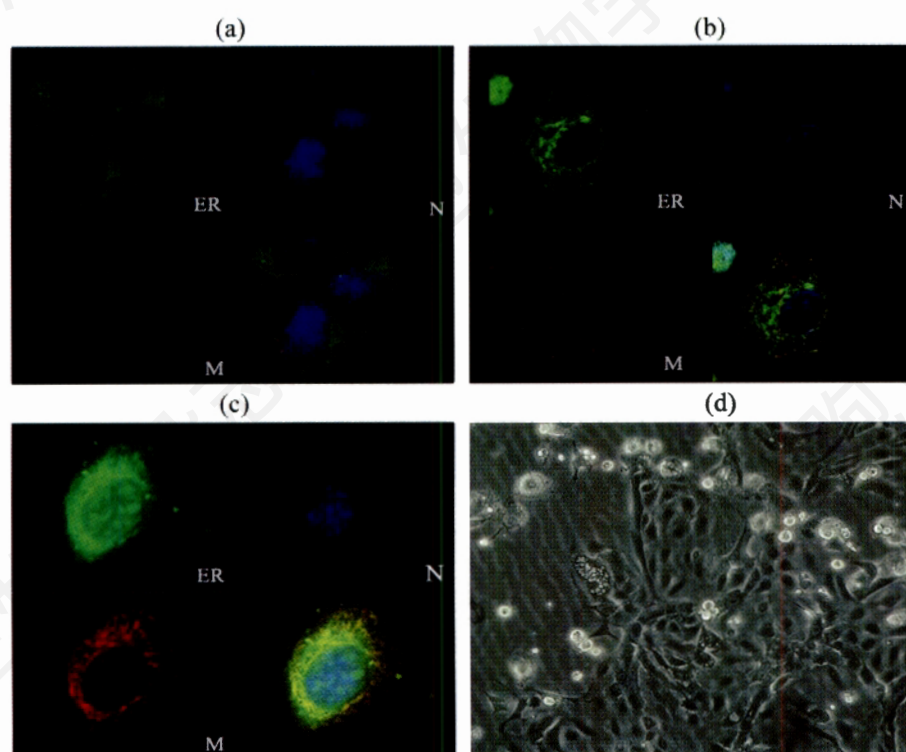


图1 妊娠期奶山羊乳腺上皮细胞中内质网和线粒体的变化

a: 妊娠期1个月; b: 妊娠期3个月; c: 妊娠期5个月; d: 细胞培养结果(妊娠期5个月)。ER: 内质网; M: 线粒体; N: 核。

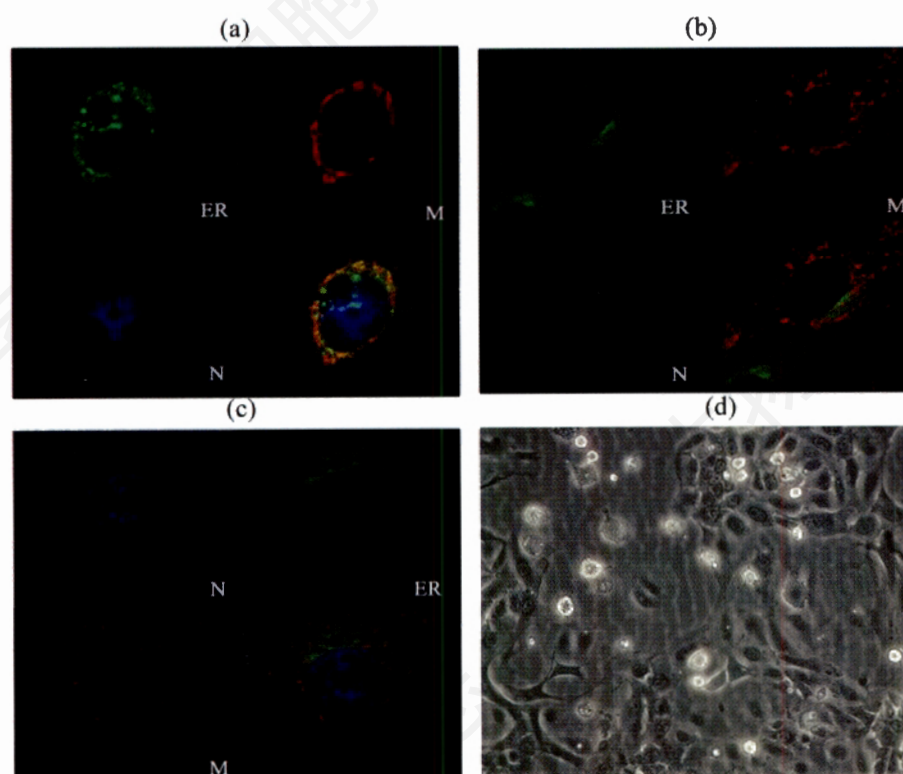


图3 退化期奶山羊乳腺上皮细胞中内质网和线粒体的变化

a: 退化3日; b: 退化7日; c: 退化21日; d: 细胞培养结果(退化3日)。ER: 内质网; M: 线粒体; N: 核。

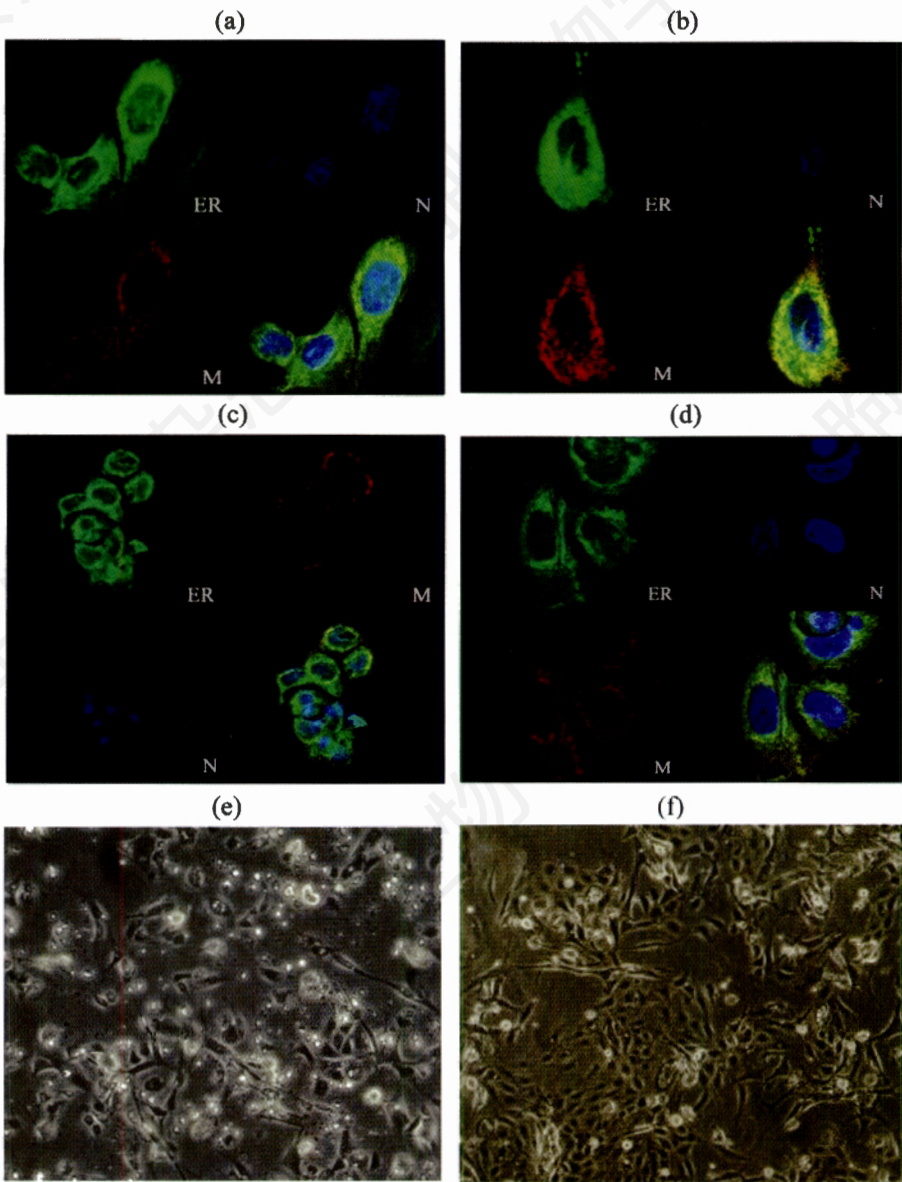


图2 泌乳期奶山羊乳腺上皮细胞中内质网和线粒体的变化

a: 泌乳 10 日; b: 泌乳 30 日; c: 泌乳 60 日; d: 泌乳 120 日; e: 细胞培养结果(泌乳 60 日); f: 细胞培养结果(泌乳 120 日)。ER: 内质网; M: 线粒体; N: 核。

表1 奶山羊乳腺上皮细胞中内质网和线粒体的变化

检测时点	AIOD	
	内质网	线粒体
妊娠期 1 月	2.2814 ± 0.0409 ^b	1.6042 ± 0.0130 ^b
妊娠期 3 月	2.5375 ± 0.0228 ^f	1.8079 ± 0.0198 ^f
妊娠期 5 月	3.4829 ± 0.0396 ^d	1.9411 ± 0.0226 ^e
泌乳期 10 日	3.7345 ± 0.0196 ^b	1.9740 ± 0.0122 ^d
泌乳期 30 日	4.1004 ± 0.0237 ^a	2.2591 ± 0.0135 ^a
泌乳期 60 日	3.6564 ± 0.0383 ^c	2.1440 ± 0.0178 ^b
泌乳期 120 日	3.2215 ± 0.0466 ^e	2.0055 ± 0.0119 ^c
退化期 3 日	2.4600 ± 0.0171 ^g	1.7997 ± 0.0063 ^f
退化期 7 日	2.1725 ± 0.0227 ⁱ	1.7047 ± 0.0207 ^g
退化期 21 日	2.0230 ± 0.0149 ^j	1.5437 ± 0.0089 ⁱ

n=30; 小写字母不同差异显著(P<0.05)。

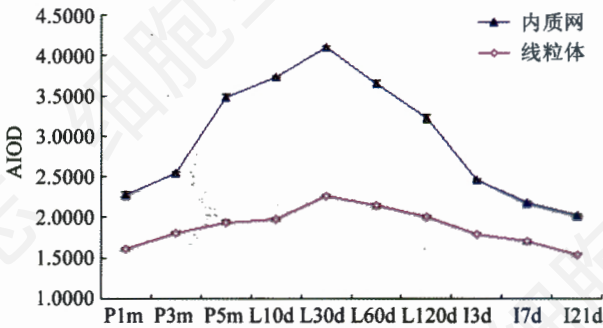


图4 奶山羊乳腺上皮细胞中内质网和线粒体的变化

P: 妊娠期; L: 泌乳期; I: 退化期。m: 月; d: 日。

趋势。激光共聚焦显微镜观察下,随着退化时间的增加,内质网和线粒体的数量下降趋势非常明显,其信号强度和面积都逐步减少。IPP 分析结果显示,退化期细胞器下降趋势开始非常迅速,退化3日的内质网发育水平已经显著低于妊娠中期,但此后下降趋势减缓。退化21日,奶山羊乳腺上皮细胞中细胞器发育水平已显著低于妊娠初期,这与组织学研究中退化期乳腺恢复到妊娠前状态的结论相符合^[17~18]。细胞器保持这一发育水平可能是维持细胞正常机能和活动所必需的。

参考文献(References)

- [1] Geddes DT. *J Midwifery Womens Health*. 2007, **52**: 556
- [2] McManaman JL *et al. Adv Drug Deliv Rev*, 2003, **55**: 629
- [3] Mather IH *et al. J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1998, **3**: 227
- [4] Larson BL. *lactation*, Iowa: The Iowa State University Press, 1985
- [5] Kumar S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 6138
- [6] Lkhider M *et al. J Cell Sci*, 2001, **114**: 1883
- [7] Markéta B *et al. Czech J Food Sci*, 2005, **23**: 41
- [8] Mather IH *et al. J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1998, **3**: 259
- [9] Hurley WL. <http://classes.ansci.uiuc.edu/ansc438>
- [10] Knight CH *et al. Q J Exp Physiol*, 1984, **69**: 331
- [11] Brooker BE. *J Anat*, 1984, **138**: 287
- [12] Gordon JR *et al. Dev Biol*, 1980, **74**: 118
- [13] Silberstein GB. *Microsc Res Tech*, 2001, **52**: 155
- [14] Richert MM *et al. J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2000, **5**: 227
- [15] Masso-Welch PA *et al. J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2000, **5**: 165
- [16] Ji F *et al. J Anim Sci*, 2006, **84**: 579
- [17] Sordillo LM, *et al. Int J Biochem*, 1984, **16**: 1265
- [18] Tatarczuch L *et al. J Anat*, 1997, **190**: 405

Changes of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria in Mammary Epithelium Cells during Mammogenesis of Dairy Goat

Bo Qu, Hong-Bo Yan, Hui-Li Tong, Qing-Zhang Li*

(Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract To consummate the study of postembryonic morphological development of dairy goat mammary gland, the changes of endoplasmic reticulum and mitochondria during mammary growing were observed with live cell fluorescent labeling and laser confocal microtechnique on the subcellular level. The results showed that the quantity of endoplasmic reticulum and mitochondria of mammary epithelium cells were fewer in early and mid-pregnancy, increased step by step after late pregnancy, reached the peak in mid-lactation and retained in the high level, decreased quickly in involution and recovered to the level of pre-pregnancy. To maintain the normal activity and function of cells, there were still a certain proportion of organelles in involuting epithelium cells.

Key words dairy goat; mammary epithelium cell; endoplasmic reticulum; mitochondria

Received: May 21, 2008 Accepted: July 10, 2008

This work was supported by the International Cooperation Item of Heilongjiang (No.WB07A06)

*Corresponding author. Tel: 86-451-55190999, Fax: 86-451-55103336, E-mail: qingzhangli@hotmail.com