

研究论文

胶原酶I消化法体外分离培养奶牛乳腺上皮细胞

徐丹丹 孙志鹏 张旭 刘东宇 许小楠 王乐 陈嘉 王建发 杨彬 武瑞*

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319)

摘要 为获得纯净的奶牛乳腺上皮细胞, 该研究采用胶原酶I消化法, 在不添加外源激素及生长因子的条件下培养奶牛乳腺上皮细胞。采用差时消化与差速贴壁方法, 对奶牛乳腺上皮细胞进行纯化。采用Western blot方法检测细胞中 β -酪蛋白(β -casein, CNS2)的水平。通过免疫荧光技术对细胞进行鉴定。结果显示, 纯化后的细胞呈现典型的“铺路石”或“鹅卵石”样。细胞角蛋白-18(cytokeratin-18, CK-18)反应呈阳性, 波形蛋白反应呈阴性。细胞传至15代冻存并复苏后生长状态依然良好。这提示, 胶原酶I消化法在不添加外源激素及生长因子的条件下可以获得奶牛乳腺上皮细胞, 以用于后续实验。

关键词 胶原酶I; 奶牛乳腺上皮细胞; 原代培养; 免疫荧光

Bovine Mammary Epithelial Cells Isolated and Cultured by Collagenase I Digestion Method *In Vitro*

Xu Dandan, Sun Zhipeng, Zhang Xu, Liu Dongyu, Xu Xiaonan, Wang Le, Chen Jia, Wang Jianfa, Yang Bin, Wu Rui*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract The aim of this study is to isolate and culture bovine mammary epithelial cells. We used the method of collagenase I digestion to culture bovine mammary epithelial cells without adding exogenous hormones and growth factors. Bovine mammary epithelial cells were purified by different time digestion method and different speed adherence method. The level of β -casein (CNS2) in cells were detected by Western blot. Cells were identified by immunofluorescence. The results showed that the cells had typical cobblestone-like morphology, and positively expressed cytokeratin-18 (CK-18), negative expressed vimentin. The cells of 15th passage were recovered, and still grown in good condition. This result indicated that collagenase I digestion method can be used to obtain bovine mammary epithelial cells without adding exogenous hormones and growth factors.

Keywords collagenase I; bovine mammary epithelial cells; primary culture; immunofluorescence

随着生活水平的不断提高, 人们对于乳及乳制品的需求量越来越大, 对乳品质量重视的程度日益增加。奶牛养殖业在追求高产的同时, 面临严峻的

奶牛乳房炎防治问题。因此, 奶牛泌乳调节机制、乳腺免疫及乳房炎防治等已成了研究热点。但由于体内实验干扰因素多、个体差异大、不便于操作及

收稿日期: 2016-04-14 接受日期: 2016-07-15

黑龙江八一农垦大学研究生创新项目(批准号: YJSCX2015-Y23)和国家自然科学基金(批准号: 31472249、31402157)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0459-6819191, E-mail: fuhewu@126.com

Received: April 14, 2016

Accepted: July 15, 2016

This work was supported by the Graduate Innovation Project of Heilongjiang Bayi Agricultural University (Grant No. YJSCX2015-Y23) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31472249, 31402157)

*Corresponding author. Tel: +86-459-6819191, E-mail: fuhewu@126.com

网络出版时间: 2016-09-19 11:03:43

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160919.1103.004.html>

实验动物昂贵等诸多因素,使得活体奶牛难以直接作为实验动物模型。

奶牛乳腺上皮细胞是乳腺中兼具乳汁分泌与免疫屏障功能的细胞^[1-2]。因此,获得与在体细胞差异较小的原代奶牛乳腺上皮细胞对奶牛乳腺的病理、生理、泌乳调节及免疫反应等一系列奶牛乳腺的相关研究具有重要意义。以往报道的奶牛乳腺上皮细胞培养方法,需要使用较多的激素及生长因子促进细胞的贴壁及生长。

因此,本研究采用胶原酶I消化法,在不添加外源激素及生长因子的条件下体外培养奶牛乳腺上皮细胞,分离纯化且鉴定该细胞,选择上皮细胞特征蛋白——角蛋白-18(cytokeratin-18, CK-18)及成纤维细胞的特征蛋白——波形蛋白为细胞类型及纯度鉴定的标志,并对细胞的乳蛋白—— β -酪蛋白(β -casein, CSN2)分泌功能进行检测,这是对奶牛乳腺上皮细胞传统培养方法的改良。

1 材料与方法

1.1 乳腺组织

实验所用乳腺组织取自黑龙江省某养殖场泌乳期健康荷斯坦奶牛。

1.2 主要试剂

本实验所用试剂主要有: DMEM F/12培养基(Gibco公司)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Hyclone公司)、胶原酶I(Invivogen公司)、胰蛋白酶(碧云天生物技术有限公司)、CK-18抗体(Abcam公司)、 β 微管蛋白(β -tublin)抗体(Abcam公司)、波形蛋白抗体(Neomarker公司)、CSN2抗体(Bioss公司)。

1.3 奶牛乳腺上皮细胞的培养

取新鲜奶牛乳腺组织,放入到DMEM F/12培养基(含青霉素100 IU/mL,链霉素100 μ g/mL)中,4 $^{\circ}$ C环境下迅速带回实验室。将大块组织放入盛有75%酒精的烧杯中,浸洗杀菌3 min后取出,转移到超净台内进行操作。

用灭菌的生理盐水清洗奶牛乳腺组织块若干次,修剪组织块,留下组织块内部大小适宜的组织;用添加双抗的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)或Hank's液清洗组织若干次,以减少污染。而后将组织剪成约1 mm³小块,加Hank's液混匀,1 000 $\times$ g离心3~5 min,弃上清。清洗数次后取小组织块适量放入到离心管中,加入DMEM F/12培养基

(含胶原酶I 300 U/mL),封闭管口,放入37 $^{\circ}$ C水浴锅中消化3~5 h,每隔5~10 min摇匀1次,直至大部分组织块被消化。细胞悬液经过细胞筛过滤,滤液1 000 $\times$ g离心3~5 min,弃上清。用DMEM F/12培养基(含10% FBS,青霉素100 IU/mL,链霉素100 μ g/mL)悬浮细胞并转移至培养瓶中置于恒温培养箱继续培养,每天观察。细胞贴壁后,每2 d换液1次。

1.4 奶牛乳腺上皮细胞的分离纯化

根据成纤维细胞与上皮细胞对胰蛋白酶的耐受能力以及贴壁时间的差异,采用差时消化和差速贴壁法分离纯化奶牛乳腺上皮细胞。采用0.05%胰蛋白酶对成纤维细胞进行消化,待大部分成纤维细胞回缩变圆甚至漂浮时终止消化。清洗剩余细胞,加入0.25%胰蛋白酶继续进行消化,待所有细胞回缩变圆轻轻晃动培养瓶使细胞漂浮,1 000 $\times$ g离心3~5 min后收集细胞;将细胞转移至培养瓶中,待成纤维细胞贴壁时,再将大多数为奶牛乳腺上皮细胞的悬浮液转移至另一培养瓶,如此重复2~3次。

1.5 奶牛乳腺上皮细胞的泌乳功能检测

分别将纯化后的第4~6代乳腺上皮细胞接种于6孔板,细胞长满后RIPA裂解液(RIPA lysis buffer)冰上裂解细胞,收集裂解液,4 $^{\circ}$ C条件下12 000 $\times$ g离心5 min,提取细胞总蛋白。取等量的蛋白质样品进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。再将蛋白质转移到NC膜上,脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C孵育2 h。CSN2抗体及 β -tublin抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS-T漂洗一抗;加入HRP标记的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1 h,PBS-T漂洗二抗。ECL显影。

1.6 奶牛乳腺上皮细胞的免疫荧光鉴定

将纯化后的细胞用PBS漂洗,加入预冷的4%多聚甲醛于4 $^{\circ}$ C条件下固定30 min,PBS漂洗;0.5%的Triton处理10~15 min,PBS漂洗。1% BSA封闭30 min;分别加入CK-18抗体、波形蛋白抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS漂洗。加入相应二抗,37 $^{\circ}$ C作用1 h,PBS漂洗。加入DAPI作用5~10 min。抗淬灭剂封片,荧光显微镜下观察结果。

1.7 奶牛乳腺上皮细胞的冻存

弃去细胞瓶内的培养基,PBS清洗后加入0.25%胰蛋白酶,消化数分钟,待所有细胞回缩变圆甚至脱落时加入培养基终止消化,1 000 $\times$ g离心3~5 min,弃上清收集细胞。在冻存管内按1:2:7的比例加入二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、FBS及细胞悬液,封口并做好标记。将冻存管放入冻存盒中置于-80 $^{\circ}$ C

过夜,第2 d转入液氮后可长期保存。

1.8 奶牛乳腺上皮细胞的复苏

在液氮中取出第15代的细胞冻存管,迅速放入37℃水浴锅中并轻轻晃动,直至细胞混合液彻底融化,1 000 ×g离心3~5 min,收集细胞;重新加入培养基后调整细胞密度分瓶培养。

2 结果

2.1 奶牛乳腺上皮细胞的培养

胶原酶I消化组织块后,消化液分瓶培养至数小时即有少量细胞贴壁。培养至第3 d时,可看到生长状态良好,且聚集成片的“鹅卵石”样细胞,其周围有排列疏松的梭形或多角形细胞,且两种细胞分界明显并不混杂生长(图1A)。培养至第5 d时,两种细胞长满至瓶底80%~90%,两种细胞交汇处有堆积现象,但界限清晰,应进行分离纯化(图1B)。

2.2 奶牛乳腺上皮细胞的分离纯化

奶牛乳腺上皮细胞的纯化结果如图2所示,在对细胞分离纯化3次以后,获得较为纯净的典型“铺路石”或“鹅卵石”样奶牛乳腺上皮细胞,该细胞多为多

角形,呈单层排列紧密,细胞核及核仁(多为多核仁)清晰可见,一些细胞胞质出现大小不一的空泡样结构,此为奶牛乳腺上皮细胞分泌的乳汁(图2)。

2.3 奶牛乳腺上皮细胞的泌乳功能检测

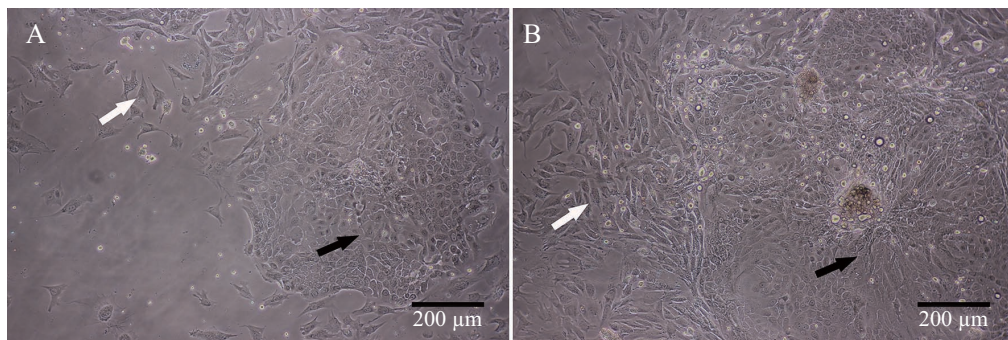
实验采用免疫印迹法以 β -tublin为内参,对纯化后的奶牛乳腺上皮细胞中CNS2蛋白质水平进行检测,以判断该细胞是否具有乳蛋白分泌功能。结果显示,4~6代奶牛乳腺上皮细胞有不同程度的CNS2蛋白质表达(图3)。

2.4 奶牛乳腺上皮细胞的免疫荧光鉴定

在检测泌乳功能的同时,实验采用免疫荧光技术对纯化后的奶牛乳腺上皮细胞进行了鉴定,结果显示,奶牛乳腺上皮细胞胞核DAPI染色为深蓝色,胞质产生绿色荧光,为CK-18阳性反应(图4A~图4D);而波形蛋白反应则为阴性,胞质无特异性荧光(图4E~图4H)。

2.5 奶牛乳腺上皮细胞的复苏

我们对传至15代冻存的奶牛乳腺上皮细胞进行复苏。复苏后0 h可见细胞呈圆形,多为团状,也有部分单个细胞,悬浮于培养基中,大部分细胞存活



A: 培养至第3 d的奶牛乳腺细胞; B: 培养至第5 d的奶牛乳腺细胞。黑色箭头所示为“鹅卵石”样细胞;白色箭头所示为梭形或多角形细胞。

A: cell cultured at day 3; B: cell cultured at day 5. The black arrows indicate cobblestone-like cells. The white arrows indicate fusiform or polygon cells.

图1 显微镜下奶牛乳腺细胞的形态观察

Fig.1 The observation of bovine mammary cells under the microscope

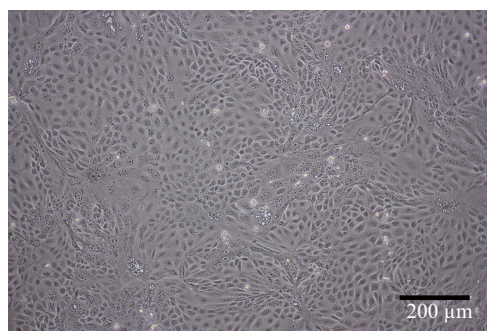


图2 纯化后的奶牛乳腺上皮细胞

Fig.2 The purified bovine mammary epithelial cells

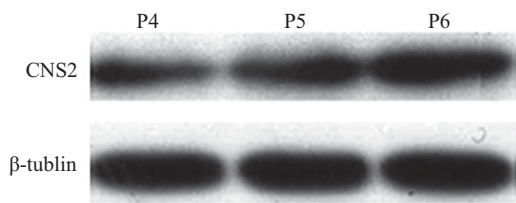
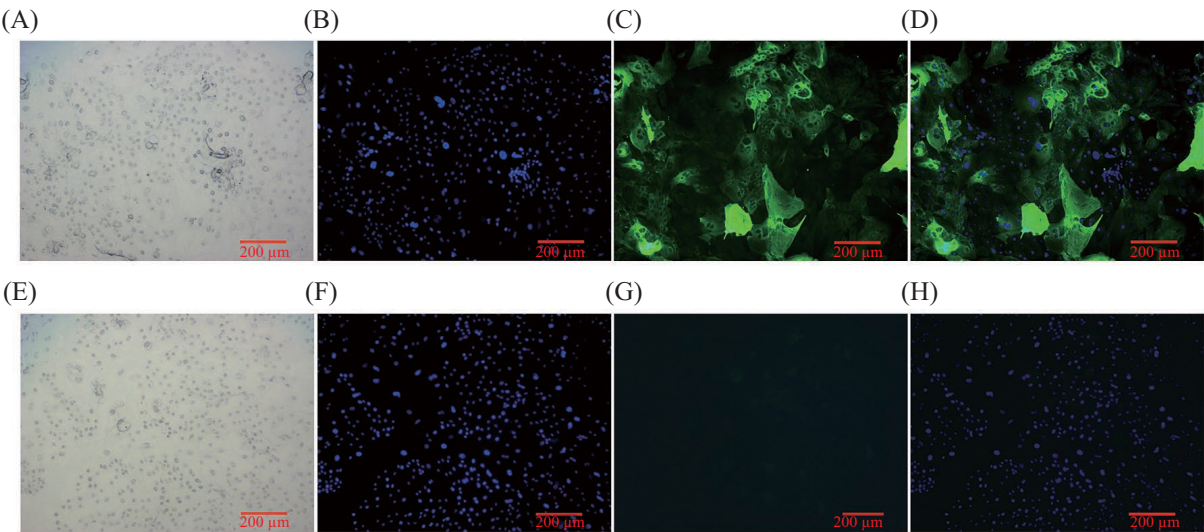
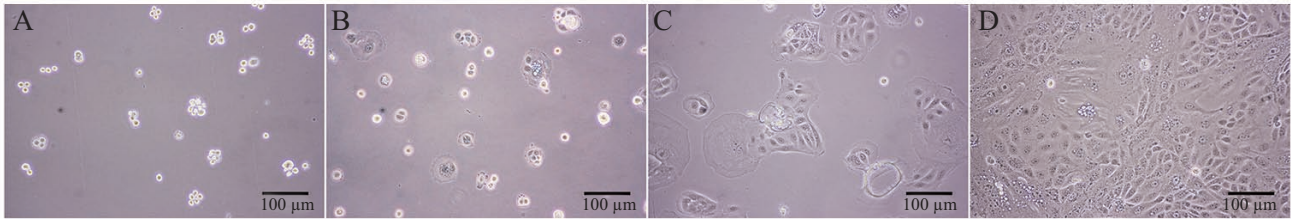


图3 4~6代奶牛乳腺上皮细胞中CNS2蛋白表达情况
Fig.3 The level of CNS2 protein in bovine mammary epithelial cells of 4th, 5th, 6th passages



A: CK-18组奶牛乳腺上皮细胞; B: DAPI核染色; C: 细胞CK-18阳性反应; D: B与C融合图; E: 波形蛋白组奶牛乳腺上皮细胞; F: DAPI核染色; G: 细胞波形蛋白阴性反应; H: F与G融合图。
A: bovine mammary epithelial cells of CK-18 group; B: nuclear staining by DAPI; C: CK-18 positive reaction of bovine mammary epithelial cells; D: merged figure B and figure C; E: bovine mammary epithelial cells of vimentin group; F: nuclear staining by DAPI; G: vimentin negative reaction of bovine mammary epithelial cells; H: merged figure F and figure G.

图4 奶牛乳腺上皮细胞的免疫荧光鉴定
Fig.4 Identification of bovine mammary epithelial cells by immunofluorescence



A: 细胞复苏后0 h; B: 细胞复苏后5 h; C: 细胞复苏后24 h; D: 细胞复苏后4 d。
A: cells resuscitated after 0 h; B: cells resuscitated after 5 h; C: cells resuscitated after 24 h; D: cells resuscitated after 4 d.

图5 复苏后的奶牛乳腺上皮细胞
Fig.5 The bovine mammary epithelial cells were resuscitated

(图5A); 复苏后5 h, 有部分单个细胞或细胞团块已经贴壁, 但仍有一部分细胞漂浮(图5B); 复苏后24 h, 细胞已迅速增殖, 成片生长, 出现圆饼样上皮细胞和空泡状结构, 有小部分细胞未能贴壁(图5C); 复苏后第4 d, 细胞几乎铺满瓶底, 空泡样结构增多, 并出现拉

丝样结构连接两端细胞, 细胞排列紧密, 形态无异常且较为纯净(图5D)。

3 讨论

乳腺上皮细胞的体外培养历史至今已有近60

年的历史^[3]。在此期间,各种营养物质、添加剂、激素及生长因子等的商品化,为上皮细胞的培养带来了极大的便利。

奶牛乳腺上皮细胞的培养方法有组织块培养法、机械破碎法、酶消化法、乳汁提取法、密度梯度离心法等^[4-9],其中常用的培养方法为组织块接种法和酶消化法。本研究采用胶原酶I消化法培养奶牛乳腺上皮细胞,与最常用的组织块培养法相比有4个优点。(1)不易污染。组织块法培养细胞时,需要使用牙科探针将剪碎的小块组织一块一块地接种于培养瓶底,在此过程中,单独的小块组织与空气接触的时间相对较长,增加了污染的风险;而酶消化法则避免了这一问题,相对于组织块培养法,污染的可能性更小。(2)培养周期短。组织块培养法中,成纤维细胞从组织中爬出的时间约为3~5 d,乳腺上皮细胞的爬出时间则更长^[10-11];而酶消化法中,组织块经酶消化后,直接成为细胞团块或单个细胞,与组织块法相比更易贴壁,且贴壁后数小时细胞就已经开始生长,至培养的第3 d,即可见到聚集生长的大片乳腺上皮细胞,显著地缩短了培养周期,同时也减少了培养所需试剂及耗材的使用。(3)更易获得上皮细胞。由于成纤维细胞生长速度较快,因此在组织块培养法中成纤维细胞先从组织块中爬出并大量增殖,而上皮细胞生长较慢,数量较少,且由于组织块自身的体积和重量原因,使其在操作中容易从瓶底脱落,这也相对增加了获得乳腺上皮细胞的难度;而胶原酶主要消化组织中的成纤维细胞,从而释放上皮细胞。因此在酶消化法中,尽管成纤维细胞的生长速度较快,但上皮细胞的比例仍然较高,且组织块被消化为细胞团块或单个细胞,使得这些细胞更易贴壁,不存在组织块易脱落的问题。(4)外源物质干扰较小。通常传统的组织块培养法与酶消化法需要使用鼠尾胶原(组织块法)、胰岛素、孕酮、催乳素、氢化可的松、转铁蛋白、表皮生长因子等一些外源物质,这些物质的添加会对实验结果产生一定的干扰^[12-13];而本研究在培养奶牛乳腺上皮细胞时,除使用基础物质(DMEM F/12培养基、FBS、青霉素、链霉素)外,并没有添加任何其他外源激素及生长因子,最大程度地减小了这些物质的使用。相关实验表明,乳腺的免疫功能受生殖激素的调控^[14-15],本研究也为激素与奶牛乳腺上皮细胞免疫功能之间的相关研究提供了较为科学的体外细胞培养方法。

已知酶消化法易破坏奶牛乳腺组织和细胞结构,不宜培养成功或即使培养成功传代次数也较少^[10,16]。但本实验的结果证明,酶消化法较易获得纯净的乳腺上皮细胞,且传至15代时,细胞没有发生形态变化。总结原因主要有以下几点:(1)健康的乳腺组织样本是实验成功的关键,组织采集时要剔除乳房炎(包括隐形乳房炎)、乳腺损伤及非泌乳期奶牛乳腺样本;(2)样本在进行简单无菌处理后迅速进行实验室操作,不可放置时间过长,否则影响细胞活性;(3)酶消化法时,需要根据组织状态以及酶的质量合理控制消化时间,避免消化过度对细胞造成损伤;(4)FBS的质量对细胞培养极为重要,必要时可对FBS进行检测后再使用。

总之,奶牛乳腺上皮细胞的培养及鉴定结果显示,本研究在尽可能减少外源激素和生长因子添加的情况下,采用胶原酶I消化法,经分离纯化后,成功获得了较为纯净的奶牛乳腺上皮细胞;纯化后的奶牛乳腺上皮细胞具有泌乳功能;对第15代细胞冻存并复苏后,细胞生长状态依然良好。本研究在对传统奶牛乳腺上皮细胞体外培养方法进行改良的同时,也为激素与奶牛乳腺上皮细胞间的相关研究建立了良好的细胞平台。

参考文献 (References)

- 1 Lacasse P, Lauzon K, Diarra MS, Petitclerc D. Utilization of lactoferrin to fight antibiotic-resistant mammary gland pathogens. *J Anim Sci* 2008; 86(13): 66-71.
- 2 González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: Structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 33(4): 1-8.
- 3 Lasfargues EY. Cultivation and behavior *in vitro* of the normal mammary epithelium of the adult mouse. *Anat Rec* 1957; 127(1): 117-29.
- 4 Yang ZT, Fu YH, Liu B, Zhou ES, Liu ZC, Song XJ, *et al.* Farrerol regulates antimicrobial peptide expression and reduces *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog* 2013; 65(6): 1-6.
- 5 Jedrzejczak M, Szatkowska I. Bovine mammary epithelial cell cultures for the study of mammary gland functions. *In Vitro Cell Dev Anim* 2013; 50(5): 389-98.
- 6 Li JX, Zhang Y, Ma LB, Sun JH, Yin BY. Isolation and culture of bovine mammary epithelial stem cells. *J Vet Med Sci* 2009; 71(1): 15-9.
- 7 Forouharmehr A, Harkinezhad T, Qasemi-Panahi B. Effect of aflatoxin B1 on growth of bovine mammary epithelial cells in 3D and monolayer culture system. *Adv Pharm Bull* 2013; 3(1): 143-6.
- 8 崔新洁, 王 婷, 刘秉春, 陶 林, 王 潇. 牛奶中乳腺上皮细胞

- 的分离培养及鉴定. 生物技术通报(Cui Xinjie, Wang Ting, Liu Bingchun, Tao Lin, Wang Xiao. Isolation, culture and identification of bovine mammary epithelial cell. Biotechnology Bulletin) 2013; 3(13): 107-13.
- 9 林 杰, 王旭荣, 李建喜, 王孝武, 杨志强. 奶牛乳腺上皮细胞原代培养、纯化及鉴定技术研究进展. 中国畜牧兽医(Lin Jie, Wang Xurong, Li Jianxi, Wang Xiaowu, Yang Zhiqiang. Research progress on primary culture, purification and identification technique of bovine mammary epithelial cells. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine) 2015; 42(8): 2109-15.
- 10 詹 康, 贡笑笑, 左晓昕, 陈银银, 占今舜, 赵国琦. 奶牛乳腺上皮细胞系的培养与鉴定. 动物营养学报(Zhan Kang, Gong Xiaoxiao, Zuo Xiaoxin, Chen Yinyin, Zhan Jinshun, Zhao Guoqi. Culture and identification of the bovine mammary epithelial cell line. Chinese Journal of Animal Nutrition) 2015; 27(8): 2544-50.
- 11 邢艳苹, 杨 峰, 王 瑜, 何伯萍, 李林溪, 朱 僧, 等. 奶牛乳腺上皮细胞的克隆与特性分析. 中国兽医学报(Xing Yanping, Yang Feng, Wang Yu, He Boping, Li Lianxi, Zhu Zeng, *et al.* Isolation and culture and molecular biological identification of bovine mammary epithelial cells. Chinese Journal of Veterinary Science) 2012; 32(4): 583-5.
- 12 王佳丽, 高学军, 李庆章, 黄建国, 陆黎敏, 乔 彬, 等. 蛋氨酸对体外培养奶牛乳腺上皮细胞泌乳能力的影响. 乳业科学与技术(Wang Jiali, Gao Xuejun, Li Qingzhang, Huang Jianguo, Lu Limin, Qiao Bin, *et al.* Effect of methionine on lactation ability of dairy cow mammary epithelial cells cultured *in vitro*. Journal of Dairy Science and Technology) 2012; 35(1): 8-10.
- 13 Zhao K, Liu HY, Zhou MM, Zhao FQ, Liu JX. Insulin stimulates glucose uptake via a phosphatidylinositol 3-kinase-linked signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci 2014; 97(6): 3660-5.
- 14 Kehrl ME, Shuster DE. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. J Dairy Sci 1994; 77(2): 619-27.
- 15 张向阳, 刘东文, 牛 惠, 查光明. 奶牛乳腺固有免疫的研究进展. 江西农业学报(Zhang Xiangyang, Liu Dongwen, Niu Hui, Zha Guangming. Research Progress on innate immunity of dairy cow mammary gland. Acta Agriculturae Jiangxi) 2011; 23(2): 140-3.
- 16 刘晓云, 郑家珍, 王艳青, 裴建秋, 樊爱萍. 牛乳腺上皮细胞的快速分离和培养. 河北大学学报: 自然科学版(Liu Xiaoyun, Zheng Jiazhen, Wang Yanqing, Pei Jiaqiu, Fan Aiping. Isolation and culture of bovine mammary epithelial cell. Journal of Hebei University: Natural Science Edition) 2015; 35(4): 385-9.