

# 奶牛乳腺上皮细胞的原代培养

吴娟, 王凤龙<sup>1</sup>, 王申元 (内蒙古农业大学动物科学与医学学院病理研究室, 内蒙古呼和浩特 010018)

**摘要** [目的] 探讨在生化培养箱中进行奶牛乳腺上皮细胞原代培养的可行性。[方法] 采用组织块法, 在体外进行乳腺上皮细胞的分离培养, 探索其在生化培养箱中合适的培养条件。用倒置显微镜观察、细胞爬片吉姆萨染色和角蛋白免疫组织化学染色的方法对培养细胞进行形态学观察和鉴定。[结果] 通过倒置显微镜观察发现, 上皮细胞呈多角形, 长满后呈上皮细胞特有铺路石样。细胞染色可见上皮细胞胞体较大, 胞核深蓝色, 圆形或椭圆形, 核仁清晰可见, 一般为 2~4 个。免疫组化鉴定结果显示, 培养的细胞表达上皮细胞特异的角蛋白 14 和 18。[结论] 原代奶牛乳腺上皮细胞可以在生化培养箱中成功培养。

**关键词** 奶牛乳腺上皮细胞; 原代培养; 细胞爬片; 免疫组织化学

**中图分类号** S823.9<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)06-02497-03

## Primary Culture of Bovine Mammary Epithelial Cells

WU Juan et al (Department of Pathology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018)

**Abstract** [Objective] To investigate the feasibility of culturing primary bovine mammary epithelial cells in biochemical incubator. [Method] *In vitro*, bovine mammary epithelial cells were isolated and cultured by the tissue explant method in order to investigate the optimal culture conditions. The morphology observation and identification of the cultured cells were performed by inverted microscope observation, Giemsa staining and cytokeratin immunohistochemistry. [Result] Observed with inverted microscope, most of the bovine mammary epithelial cells were polygonal and had typical "slab stone" appearance. As it can be seen from cell staining results, the cell body was big and the nucleus, was stained dark blue and was round or oval in shape, with clearly visible nucleoli, generally 2-4 nucleoli. The tissue-specific expression of cytokeratin 14 and cytokeratin 18 in mammary epithelial cells was identified by cytokeratin immunohistochemistry. [Conclusion] Primary bovine mammary epithelial cells were successfully cultured in biochemical incubator.

**Key words** Bovine mammary epithelial cells; Primary culture; Cells growing on cover slip; Immunohistochemistry

奶牛乳腺炎是奶牛四大疾病之一, 其造成的经济损失仅次于不孕症而高于肢蹄病和代谢病。美国每年因奶牛乳腺炎造成的损失达 20 亿美元, 我国也超过了 3.16 亿元。导致奶牛发生乳腺炎的主要病原为葡萄球菌属、链球菌属和一些 G-菌。世界各国对乳房炎进行了广泛的研究, 主要集中在病原菌的分离鉴定及治疗上。近几年来, 奶牛乳腺炎的发病机理和诊断技术逐渐成为人们关注的焦点。

奶牛乳腺疾病主要起源于乳腺各级导管和腺泡上皮的变化。体外培养的原代乳腺上皮细胞具有二倍体遗传特性, 最能反映和接近体内生长状况, 并具有乳腺细胞的一些功能。建立原代乳腺上皮细胞培养方法, 利用体外模型研究病原菌及其毒力成分与乳腺上皮细胞相互作用的机理, 从细胞水平上阐述其致病原因已成为迫切需要。该试验拟对奶牛乳腺上皮细胞原代培养方法进行探讨, 旨在为上述研究奠定基础, 并为人类乳腺癌的研究提供动物细胞模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 乳腺组织。**从屠宰场选取健康的泌乳期奶牛, 无菌手术切取乳腺实质组织, 置于 DMEM/F12 完全培养液 (含 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 IU/ml 链霉素) 中, 尽快运回实验室。

**1.1.2 主要试剂。**DMEM/F12 (美国 Gibco 公司)、胎牛血清 (TBD 公司)、胰蛋白酶 (Trypsin, 1:250) (美国 Gibco 公司)、青霉素 100 IU/ml、链霉素 100 IU/ml 等, 配制后采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌; 鼠抗人细胞角蛋白 14、18 单克隆抗体

(Sigma 公司)、兔/鼠通用型 SA-HRP 试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司), 丙酮等其他试剂为国产分析纯。按要求 4℃ 或 -20℃ 保存备用。

**1.1.3 主要仪器。**HPS-250 生化培养箱 (哈尔滨市东明医疗仪器厂), IX71 倒置相差显微镜 (OLYMPUS, 日本), Axiovert 200M 显微操作仪 (ZEISS, 德国), 普通显微镜 (Nikon), 恒温水浴锅 (山西省文水医疗器械厂)。

## 1.2 方法

**1.2.1 乳腺上皮细胞的原代培养和纯化。**要做细胞爬片吉姆萨染色和免疫组化鉴定, 需在原代培养前于培养瓶内放置清洁的小盖玻片, 一同高压灭菌。在植入组织块前先用 1 滴培养液湿润小盖玻片底部, 使之与瓶底固定。

用 37℃ 预热的生理盐水反复冲洗乳腺组织, 直到冲洗液清亮为止。用眼科镊子剔除结缔组织和脂肪组织, 选取发育良好的腺泡, 于青霉素小瓶中剪碎 (1 mm × 1 mm × 1 mm)<sup>[1]</sup>, 用牙科探针轻轻铺于培养瓶中, 植块间距 0.5 cm。加入培养液, 塞紧胶塞, 于 37℃ 生化培养箱中培养。每 3 d 换液 1 次, 待细胞长满底壁 80% 时, 用牙科探针掀起组织块, 冲洗换液。每日观察细胞的生长情况。待细胞生长至 80%~90% 汇合时, 根据成纤维细胞和乳腺上皮细胞对胰蛋白酶的耐不同耐受时间去除成纤维细胞, 富集乳腺上皮细胞。用 0.05% 胰蛋白酶/EDTA 在 37℃ 条件下消化<sup>[2]</sup>, 待混有的少量成纤维细胞变圆后即中止消化, 轻轻吹打几次后, 吸弃消化液, 再用 PBS 洗 3 遍, 加入新鲜的生长培养液继续培养细胞至 80%~90% 汇合度, 如此操作重复 2~3 次后, 即可得到比较纯净的上皮细胞。

**1.2.2 培养的乳腺上皮细胞的形态学观察。**①用倒置显微镜每天观察细胞形态变化及其生长、增殖状况。②将培养在盖玻片上的原代细胞用平衡盐溶液 (PBS) 漂洗 3 次, 中性福

**基金项目** 内蒙古自然科学基金资助项目 (200711020407); 中国农业大学与内蒙古农业大学合作项目。

**作者简介** 吴娟 (1982-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生, 研究方向: 动物病理解剖学。\*通讯作者。

**收稿日期** 2008-12-01

尔马林固定 15 min, 吉姆萨染色, 树胶封片, 光镜观察。

**1.2.3 乳腺上皮细胞的鉴定。**角蛋白是上皮细胞特有的细胞骨架蛋白。采用免疫组化方法观察鉴定培养的乳腺上皮细胞和乳腺组织中的上皮细胞, 同时判断培养的乳腺上皮细胞纯化的程度。乳腺上皮细胞的免疫组化: 将纯化后的原代上皮细胞进行消化, 接种于盖玻片上培养 4 d, 取出盖玻片用 PBS (pH 7.4) 漂洗, 纯丙酮固定 15 min。乳腺组织的免疫组化: 将组织用中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋、切片。一抗为鼠抗人 CK-14、CK-18, 用兔/鼠通用型 SA-HRP 试剂盒进行免疫组化染色, DAB 显色, 胞浆染成棕黄色者为阳性。阴性对照均以 PBS 代替细胞角蛋白抗体。

**1.2.4 原代乳腺上皮细胞冻存和解冻复苏培养。**在 37 °C 条件下, 用 0.05% 胰蛋白酶/EDTA 消化细胞 15 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞; 加入 1 ml 新鲜培养液重悬细胞, 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  $1 \times 10^7$  个/ml, 分装于 2 ml 冷冻管中, 每管 1 ml, 4 °C 平衡 15 min, -20 °C 平衡 20 min, 液氮气态表面平衡 1 h, 然后沉入液氮罐中长期保存。

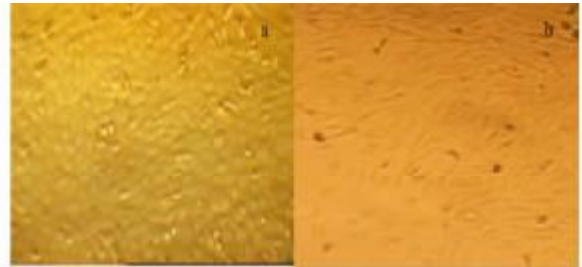
从液氮罐中取出冻存管, 立即投入 37 °C 水浴中晃动, 使其在 1 min 内完全融化。加入 5 ml 培养液悬浮细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 收集细胞; 再加入 5 ml 生长培养液重悬细胞, 将其接种于细胞培养瓶中, 于 37 °C 生化培养箱中密闭培养。

## 2 结果与分析

**2.1 牛乳腺上皮细胞的原代培养和纯化** 接种的乳腺组织块一般 2~3 d 贴壁, 贴壁性良好, 培养第 4 天可见有成纤维细胞从组织边缘处向外游出, 未达到融合前, 排列疏松, 第 7 天时, 组织块周围溢出片状的、如铺路石样、排列紧密的上皮

细胞。在上皮细胞外围有成纤维细胞, 单层生长, 分布均匀, 呈漩涡状或放射状排列。细胞生长旺盛的状态可持续 2 周左右, 此后细胞生长趋缓, 逐渐老化。

原代培养的上皮细胞混杂有其他细胞, 经 2~3 次纯化可去除杂细胞。分别富集纯化乳腺上皮细胞和成纤维细胞, 纯化后的乳腺上皮单层细胞呈现典型的铺路石样结构, 成纤维单层细胞呈典型的放射状排列 (图 1)。



注: a. 乳腺上皮细胞; b. 成纤维细胞。

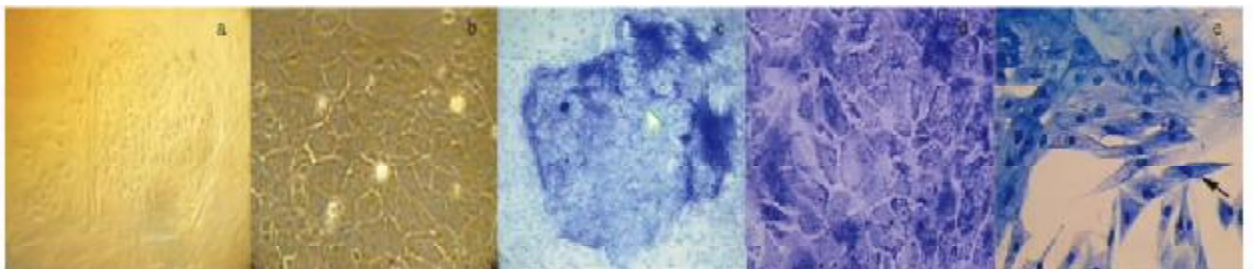
Note: a. Mammary epithelial cells; b. Fibroblasts.

图 1 纯化后的牛乳腺细胞 (200 ×)

Fig. 1 Bovine mammary cells after purification (200 ×)

**2.2 培养的乳腺上皮细胞的形态学观察** 原代乳腺上皮细胞呈片状生长, 排列紧密。成纤维细胞围绕其周围, 呈放射状或伪足状游出, 2 种细胞界限明显 (图 2a、c)。

大多数上皮细胞呈短梭形或多角形, 细胞之间紧密相靠, 互相衔接, 连接成片, 呈铺路石样 (图 2b)。吉姆萨染色结果显示, 乳腺上皮细胞呈多角形, 胞核深蓝色, 圆形或椭圆形, 核仁清晰可见, 一般 2~4 个。部分细胞体积较大, 可见核分裂相 (图 2d)。与上皮细胞不同, 成纤维细胞放射状生长, 胞体为长梭形或星形, 胞浆丰富且突起较长, 细胞核为椭圆形, 位于细胞中央, 一般可见核仁 (图 2e)。



注: a~b. 倒置显微镜观察结果 (a. 100 ×, b. 400 ×); c~e. 细胞爬片吉姆萨染色结果 (c. 100 ×, d~e. 400 ×)。a、c 示乳腺上皮细胞与成纤维细胞边界明显; b、d 示乳腺上皮细胞呈典型的铺路石样; e 箭头示成纤维细胞, 上方椭圆形细胞为乳腺上皮细胞。

Note: a - b. Observation results with inverted microscope (a. 100 ×, b. 400 ×); c - e. Cells growing on cover slip detected by Giemsa staining (c. 100 ×, d - e. 400 ×). Fig. a and Fig. c show that mammary epithelial cells and fibroblast cells are clearly separate; Fig. b and Fig. d show mammary epithelial cells of typical "slab stone" appearance; the arrow in Fig. e stands for the fibroblast cells, and the oval cells are mammary epithelial cells.

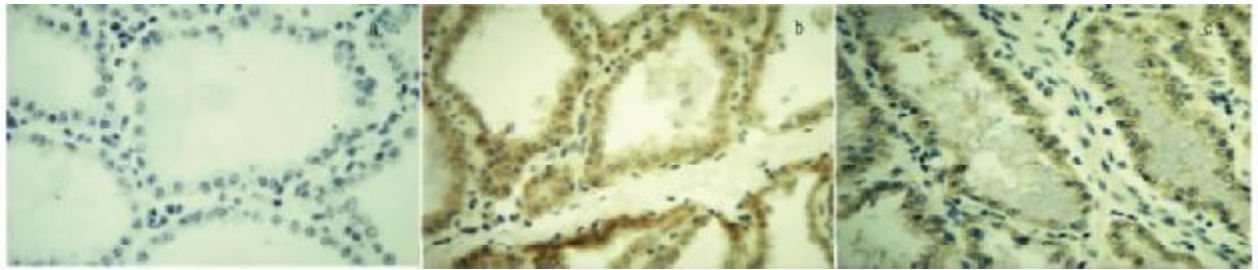
图 2 培养的牛乳腺上皮细胞的形态学观察

Fig. 2 Morphological observation of the cultured mammary epithelial cells

**2.3 乳腺上皮细胞的免疫组化法鉴定结果** 以细胞角蛋白 14 和角蛋白 18 作为一抗, 对奶牛乳腺组织和培养的乳腺上皮细胞进行细胞角蛋白免疫组化鉴定, 结果显示, 乳腺腺泡上皮细胞胞浆内可见棕黄色的细胞角蛋白着色 (图 3 b、c)。培养的乳腺上皮细胞呈多边形, 且呈单层成簇生长, 细胞核阴性, 有的细胞呈双核; 细胞质丰富, 胞浆内可见围绕核的棕黄色角蛋白颗粒, 为角蛋白染色阳性细胞 (图 4 b、c); 不同细

胞之间染色深浅有所差异。以 PBS 代替一抗的阴性对照未见任何棕黄色染色颗粒 (图 3 a, 图 4 a)。证明所培养的细胞为奶牛乳腺上皮细胞。

**2.4 原代乳腺上皮细胞冻存和解冻复苏培养** 冻存的原代乳腺上皮细胞 37 °C 快速解冻后, 3 h 贴壁, 但贴壁数量较少, 3 d 后可长到 90%。生长过程中细胞仍然呈几个至几十个聚集生长的特性 (图 5)。表明常规的细胞冷冻保存及解冻复

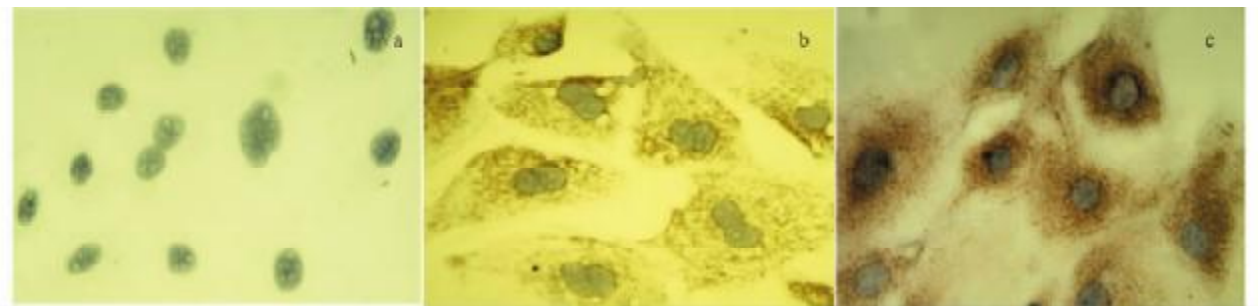


注: a. 乳腺组织腺泡上皮细胞角蛋白免疫组化阴性对照; b. 乳腺组织腺泡上皮细胞角蛋白 14 阳性; c. 乳腺组织腺泡上皮细胞角蛋白 18 阳性。

Note: a. Immunohistochemical negative control of cytoke- ratin in mammary epithelial cells of breast tissue; b. Cytoke- ratin 14 is expressed in mammary epi- thelial cells of breast tissue; c. Cytoke- ratin 18 is expressed in mammary epithelial cells of breast tissue.

图 3 组织中乳腺上皮细胞角蛋白免疫组化鉴定 (400 ×)

Fig. 3 Identification of cytoke- ratin in mammary epithelial cells of tissue by immunohistochemical method (400 ×)



注: a. 培养的乳腺上皮细胞角蛋白免疫组化阴性对照; b. 培养的乳腺上皮细胞角蛋白 14 阳性; c. 培养的乳腺上皮细胞角蛋白 18 阳性。

Note: a. Immunohistochemical negative control of cytoke- ratin in the cultured mammary epithelial cells; b. Cytoke- ratin 14 is expressed in the cultured mam- mary epithelial cells; c. Cytoke- ratin 18 is expressed in the cultured mammary epithelial cells.

图 4 培养的乳腺上皮细胞角蛋白免疫组化鉴定 (400 ×)

Fig. 4 Identification of cytoke- ratin in the cultured mammary epithelial cells by immunohistochemical method (400 ×)



图 5 复苏的原代乳腺上皮细胞 (100 ×)

Fig. 5 Primary mammary epithelial cells after recovery (100 ×)

苏培养方法也同样适用于奶牛乳腺上皮细胞。

### 3 讨论

体外培养的细胞需在恒定温度下才能生存,多数情况下最适温度为  $(37 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 。细胞在  $40 ^\circ\text{C}$  以上将很快死亡,因此需要能控制温度的培养箱,如恒温培养箱和  $\text{CO}_2$  培养箱。目前很多细胞培养实验室已使用  $\text{CO}_2$  培养箱,其优点是能恒定地提供所需的温度和一定量(通常为 5%)的  $\text{CO}_2$ ,从而使培养液的 pH 值保持稳定,适用于开放或半开放培养;但是,这种培养方法培养器皿内部与外界相通,使细胞在培养过程中极易受到污染。而生化培养箱适用于密闭式培养<sup>[3]</sup>,不易因与外界气体交换而污染,适合于大多数实验室进行细胞培养。该试验中培养的奶牛乳腺上皮细胞贴壁、生长速度及细胞形态均未出现明显改变。与李震等<sup>[4]</sup>和郑月茂等<sup>[5]</sup>用  $\text{CO}_2$  培养箱培养的研究结果基本一致。可见,只要掌握好细胞培养的方法,在普通生化培养箱中进行奶牛乳腺上皮细胞

的原代培养是可行的。

奶牛乳腺上皮细胞体外培养的关键在于原代培养,即从供体取得组织后在体外进行的首次培养。由于原代细胞刚刚和组织分离,生物学特性未发生很大改变,仍具有二倍体遗传特性,最接近体内生长状况,很适合做药物测试、细胞分化等研究。原代培养能否成功在很大程度上取决于能否获得足够数量活力好的上皮细胞。在组织形态上,泌乳期的乳腺组织高度发育,上皮细胞功能活跃,眼观容易分辨组织成分,易取材。原代培养分为组织块培养和酶消化法培养,用酶消化法进行牛乳腺细胞原代培养<sup>[6]</sup>时容易损害细胞,特别是对上皮细胞损伤更大,且消化时需每隔半小时回收 1 次细胞,费时费力。该试验采用组织块法<sup>[7]</sup>,虽然上皮细胞从组织块中迁出的速度较慢,所需时间较长,但操作方便、细胞生长整齐,获得率高,而且不影响乳腺细胞的活力,易于收集并进行体外培养。

采用活细胞形态观察结合细胞化学染色的方法,可更直观地对奶牛乳腺上皮细胞进行观察鉴别。细胞爬片染色方法不仅方便、快捷,而且在染色过程中,奶牛乳腺上皮细胞爬片贴壁较好,无需用粘附剂处理盖玻片即可生长,染色过程中也未出现掉片现象,这与李震等<sup>[4]</sup>的报道相反。可见,粘附剂的存在与否对细胞形态和增殖率均无显著影响。该方法观察贴壁培养细胞,真实地反映了贴壁细胞的形态特征,这在以往的细胞制片中是难以做到的。为了验证所选取的细胞角蛋白是否适合,选取 CK-14 和 CK-18 共同鉴定,并用

(下转第 2513 页)

重为:臂型草杂种 I 组 > 精料组 > 臂型草杂种 II 组 > 矮象草组。经检测 3 种伺草的干物质含量为:臂型草杂种 I > 臂型草杂种 II > 矮象草,粗蛋白含量为:臂型草杂种 II > 矮象草 > 臂型草杂种 I,粗纤维含量为:臂型草杂种 II > 臂型草杂种 I > 矮象草,这说明鹅的生长增重与日粮中的干物质营养含量及成分息息相关。鹅的正常生长增重与日粮中干物质营养含量一定程度上呈正相关,这与相关资料报道相一致<sup>[10]</sup>。用臂型草杂种 I 混合精料作日粮对乌鬃鹅的生长和增重效果最佳。

**3.2 不同草料配比日粮对乌鬃鹅胴体品质的影响** 试验在饲养过程中,4 种日粮对清远乌鬃鹅的屠宰率、半净膛率、全净膛率、腿肌率、胸肌率、腿肌重和胸肌重等胴体指标的影响均不显著,说明用矮象草、臂型草杂种 I、臂型草杂种 II 混合精料养鹅代替全精料养鹅并不会显著影响仔鹅的发育和胴体品质,但在腹脂率和腹脂重上,用草养鹅的腹脂重与腹脂率均低于用精料饲养的鹅,而且矮象草和臂型草杂种 I 与全精料饲养的鹅差异明显,这与草料中所含的粗纤维有关,这个结果与杨玉芬等和赵新全的研究结果一致<sup>[12-16]</sup>,他们在研究中均发现,较高的粗纤维有降低脂肪沉积的作用。在活重、屠体重、半净膛重上,试验组中最高都为精料组,其次为臂型草杂种 I 组,最低分别为矮象草组和臂型草杂种 II,这可能于不同草种的干物质营养含量及粗纤维比例有关,臂型草杂种 I 干物质营养丰富且粗纤维含量适中,而矮象草适口性固然较好,采食量也高,但其含水量过高,干物质营养含量低,故矮象草养鹅不如臂型草杂种 I 效果好。

**3.3 不同草料配比日粮对乌鬃鹅血清生化指标的影响** 各试验组 80 日龄鹅的血清 TG、HDL 差异不显著,但组 III 与组 IV 血清的 TC 有显著差异,最高组为精料组;最低组为臂型草杂种 II。组 I 与组 IV 血清的 LDL 有显著差异,其中最高为精料组,最低为矮象草组。即矮象草、臂型草杂种 II 和臂型草杂种 I 饲养的鹅,其 TC、LDL 都一定程度上低于精料组的鹅,这也可能与青绿草料中的粗纤维有关,因为据相关报道,高水平的粗纤维 CF 日粮可降低血脂<sup>[11,17]</sup>。80 日龄后用全精料再饲养 22 d 后血清检测结果,TG 和 HDL 等指标上 4 个试验组差异仍不显著,但组 I 与组 II 血清的 TC 有显著差异,其中最高为矮象草组,最低为臂型草杂种 I 组;组 I 与组 III 的血清的 LDL 有显著差异,最高为矮象草组,最低为臂型草杂种 II 组。对比 2 次变化,TC 和 LDL 的最高组由精料组变为

矮象草组,原因可能是日粮营养干物质和生长增重正相关性,在饲养过程中由于矮象草含干物质营养很低,该组鹅营养供应明显低于其他各组,其生长增重滞后,故体重最低,后来改为全精料饲养 22 d,其获得充分干物质精饲料,生长育肥加速,从精料中沉积了大量 TC 和 LDL。这说明高 TC 和 LDL 沉积可能与精饲料有关,而用青绿伺草混和精料代替全精料养鹅能一定程度上降低血清中的 TC 和 LDL。

**3.4 不同草料配比日粮对乌鬃鹅消化系统的影响** 试验中,在肌胃和小肠相对重上,用矮象草和臂型草杂种 II 饲养的鹅均显著大于用全精料饲养的鹅 ( $P < 0.05$ ),这和青绿伺草中含有的粗纤维有关,粗纤维能显著刺激消化系统发育,增加其肌胃相对重,增长小肠,提高鹅消化粗纤维和营养吸收的功能。王余良也指出,米糠日粮可显著增加雏鹅的胰腺、肝脏、肌胃、腺胃和小肠的相对重量<sup>[14,18]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 刘伟信,王继文. 中国养鹅业的发展前景 [J]. 牧业论坛,1998,92 (4): 8-9.
- [2] 黄绍荣. 广东养鹅业 1997 年情况及 1998 年态势 [J]. 广东饲料,1998 (1): 7-8.
- [3] 张子仪. 我国跨世纪畜牧业对饲料资源的需求分析与对策 [J]. 国外畜牧科技,1999,26 (1): 2-3.
- [4] 尹兆正,余东游,祝春雷. 养鹅手册 [M]. 北京: 中国农业大学出版社,2001: 26-29.
- [5] 王继文. 鹅无公害养殖综合技术 [M]. 北京: 中国农业出版社,2002: 2.
- [6] 王继文. 养鹅关键技术 [M]. 成都: 四川科学技术出版社,2002: 4-5, 21.
- [7] 徐银学,谢庄. 肉用鹅饲养法 [M]. 北京: 中国农业出版社,1997: 20-21, 24-25.
- [8] 吴素琴. 养鹅生产指南 [M]. 北京: 农业出版社,1992: 46-47, 307-309.
- [9] 陈勇,卢小良,黄亦彬,等. 草料混合养鹅与精料养鹅效益比较 [J]. 安徽农业科学,2008,36 (25): 10875-10877.
- [10] 廖玉华,李卫芬. 日粮纤维的营养功能及其应用 [J]. 饲料博览,2000 (2): 20-22.
- [11] 杨凤. 动物营养学 [M]. 北京: 农业出版社,1993: 45.
- [12] 王瑞晓. 肉鹅对高纤维饲料的利用 [J]. 中国饲料,1999 (4): 20-22.
- [13] 杨曙明,杨志源,张甫山,等. 生长龄鹅对富含纤维饲料利用率的研究 [J]. 中国农业科学,1995,28 (S1): 171-176.
- [14] 陈朝江,侯水生,高玉鹏. 日粮纤维对鹅消化生理功能的影响 [J]. 饲料博览,2005 (3): 33-34.
- [15] 党国华,王恬. 鹅对富含纤维类饲料的利用 [J]. 中国家禽,2005,25 (3): 26-28.
- [16] 高新,吴金亮,周家富,等. 日粮纤维对鹅脂肪代谢的影响 [J]. 云南畜牧兽医,2003 (2): 1-3.
- [17] 陈金文,杨山,莫棣华,等. 日粮能量和蛋白水平对肉鸡腹脂和血脂的影响 [J]. 动物营养学报,1998,10 (1): 20-28.
- [18] 王余良. 日粮纤维对家禽消化功能的影响 [J]. 四川畜牧兽医,2000,27 (11): 36.

(上接第 2499 页)

奶牛乳腺组织切片做细胞角蛋白的免疫组织化学染色,阳性结果显示乳腺组织腺泡的上皮细胞内有棕黄色的颗粒着色,与培养的细胞阳性结果一致。应用免疫组织化学方法,从组织和细胞角度均证明该试验所培养的细胞为奶牛乳腺上皮细胞。

#### 参考文献

- [1] Tania Geman, Itamar Barash. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland [J]. In Vitro Cell Dev Bio, 2002; 38: 282-292.

- [2] 任芳丽. 山羊乳腺上皮细胞的体外分离和培养. 西北农林科技大学 2002 界硕士论文, 陕西杨凌.
- [3] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1995: 153.
- [4] 李震, 王英, 刘惠莉, 等. 牛乳腺上皮细胞的分离培养 [J]. 上海农业学报, 2000, 16 (3): 25-28.
- [5] 郑月茂, 彭新荣, 张涌. 体外培养的山羊乳腺上皮细胞形态研究 [J]. 西北农林科技大学学报, 2004, 32 (3): 35-40.
- [6] Institute of Animal Science. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland [J]. In Vitro Cell Biol Anim., 2002, 38: 282-292.
- [7] 彭新荣. 牛乳腺上皮细胞的体外分离与培养. 西北农林科技大学 2004 界硕士论文, 陕西杨凌.