

牛乳腺上皮细胞体外分离培养模式、方法及其应用进展

母 童 虎红红 顾亚玲* 张 娟

(宁夏大学农学院,银川 750105)

摘 要: 乳腺由具有泌乳功能的腺泡组成,乳腺上皮细胞(MEC)以单层方式排列在腺泡外围,是乳腺对外界病原进行免疫保护的重要组分,负责将血液中的营养物质通过一系列复杂生化过程转化为乳汁。牛乳腺上皮细胞(BMECs)的体外分离培养在很大程度上解决了活体试验条件不可控、操作困难、成本高及个体差异大等诸多问题,还可以为体外研究乳腺组织生长发育规律、泌乳机制、乳房疾病等提供良好的细胞模型。本文总结了 BMECs 的分类和作用、培养方法、模式及其在基因表达机理研究和组学中的应用进展,以期为 BMECs 体外培养及相关研究提供有价值的参考和新思路。

关键词: 牛;BMECs;体外培养;模式;应用

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2021)01-0056-12

乳腺作为给犊牛提供生长所需的营养物质和抗体的外分泌腺体,其内部汇集有大量具有泌乳功能的腺泡。腺泡周围的乳腺上皮细胞(mammary epithelial cells, MECs)以单层而紧密的方式排列,它是乳腺中合成和分泌乳汁的基本单元,也是乳腺对外界病原进行免疫保护的重要组分。乳汁正是在 MECs 内由血液中的各类营养物质经过一系列复杂生化过程而形成,经过腺泡腔、乳腺导管和乳头管 3 个部位,最后从乳头排出体外^[1]。长期以来由于试验设计和操作等方面的需求,体外培养技术不断成熟,牛乳腺上皮细胞(bovine mammary epithelial cells, BMECs)体外分离培养技术也得到了迅速发展和应用,在很大程度上解决了活体试验条件不可控、操作困难、周期长、成本高及个体差异大等诸多问题,还可以为体外研究乳腺组织生长发育规律、泌乳机制、乳房疾病等提供良好的细胞模型^[2-4]。因此,建立稳定的 BMECs 体外培养技术具有重要的实践应用价值^[5]。虽然

BMECs 的研究已经历半个多世纪,但越来越多的学者们利用 BMECs 开展的研究方向表现出多元化,体外分离培养的 BMECs 依然存在很多新的问题和缺陷。本文主要从 BMECs 的分类和作用、培养方法、模式及其在基因表达机理研究和组学中的应用进展进行简要阐述和总结,以期为 BMECs 体外分离培养相关研究提供有价值的参考和新思路。

1 BMECs 的分类和作用

作为泌乳系统专有的腺体组织,乳腺的发育大多发生在出生后^[6],实质为高度分枝的树状结构,以腺泡为功能单位。Capuco 等^[7]研究表明,在整个生物体的生殖生命中乳腺经历周期性的重塑,在每个发情周期中,尤其是在怀孕期间,上皮细胞数量显著增加,组织中可以检测到更多的腺泡,之后乳腺渐渐发生退缩,重新恢复至刚开始的稳定状态。动物出生后乳腺自外胚层逐渐开始发

收稿日期:2020-06-16

基金项目:宁夏自治区农业种专项优质高产奶牛选育资助项目(2019NYYZ05)

作者简介:母 童(1995—),男,宁夏银川人,博士研究生,从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: mtlv3h@163.com

* 通信作者:顾亚玲,教授,博士生导师,E-mail: guayaling@sina.com

育、生长,外胚层的小叶-腺泡结构包含形成导管和腺泡基层的肌上皮细胞、排列在导管管腔内的导管上皮细胞以及合成牛奶蛋白的BMECs^[8-9],一般体外培养的BMECs均含有以上3种细胞。Martignani等^[10]指出差速贴壁法和差时消化法很难分离BMECs,只有经过梯度离心等处理才可将其分开。BMECs由单层细胞组成并合成和分泌乳汁进入中央管腔,在导管的中下部形成腺泡,妊娠期分化增殖,临近分娩时才具有分泌功能,且在干乳期存在退化现象^[11]。Green等^[12]和Barnes等^[13]研究表明,家畜泌乳期过后上皮细胞的退化程度较啮齿类动物小,反刍家畜产犊后在整个产奶期及干奶期乳腺会发生有节制的轮回变化,当奶牛到达干奶期或腺泡发生破裂后乳腺的恢复机制会明显加快,之后乳房内的脂肪细胞会占据腺泡退化后腾出的空间。肌上皮细胞是围绕腺泡和小叶内导管且由分支细胞编织的篮子,主要通过收缩作用于催产素,从而迫使乳汁经腺泡进入导管来促使其排出^[14-16]。Rudland等^[17]研究还发现,转化生长因子C、碱性成纤维细胞生长因子及表皮生长因子等的受体均可由肌上皮细胞形成。此外,越来越多的证据显示肌上皮细胞在乳腺肿瘤进展中的重要性^[18-20]。

2 BMECs体外分离培养、纯化及鉴定技术

2.1 BMECs的体外分离培养技术

目前实验室常见的BMECs体外分离培养措施分别为直接通过活体或体外采集乳腺组织进行细胞培养;利用胰蛋白酶和胶原酶等对剪碎的新鲜乳腺组织样进行消化,离心后分离培养;将新鲜乳腺组织剪成更小的碎肉后通过沉淀和过滤等方法进行体外培养,或采集牛的新鲜乳汁通过反复离心进行分离、培养^[21]。就试验取材而言,对试验样品要求最严格的是乳汁分离法,首先整个取样过程必须严格消毒,确保无菌操作,乳汁中体细胞数要求少于200 000个/mL,这样会减少免疫细胞的污染;其次对采集的新鲜乳汁必须保持和牛体内相近的温度(37℃左右),以免BMECs活力降低或出现死亡。对BMECs体外分离培养影响较大的因素除样本要求外,采样时牛所处的妊娠或泌乳时期也是最关键的一点。反刍动物分娩后具备泌乳能力,乳腺内部的腺泡结构在泌乳后期趋于萎缩、退化,泌乳能力降低,经过组织重塑乳腺

组织恢复到干奶期结构。因此,乳腺腺泡发育和分化速度最快的时期处于妊娠中晚期和哺乳期,同样是BMECs数目较多且泌乳功能最活跃的时期,在这个时间段进行取样最为合适。有研究利用产犊在6胎左右且没有乳房及其他疾病的牛为研究对象,采集处于产奶中期或高峰期的乳腺组织进行BMECs的体外培养,结果表明BMECs有较高的活性和成活率^[22-23]。在实际应用中不同的体外培养方法根据试验设计和需求均可灵活选择。

大多数文章报道的BMECs体外分离培养均采用牛的乳腺组织^[24-27],然而乳腺组织内的腺泡结构并不是孤立的,其外围还包被有较多的结缔组织、脂肪组织和淋巴结等。由于腺泡和附属组织的界限不是很明显,在取材时一定要刻意避开肉眼可见的非腺泡组织^[2]。组织块培养法最关键的问题在于培养体系条件的控制,虽然培养出来的BMECs具有较高的增殖能力,培养的整个过程中没有过高的成本,操作也不繁琐,但消耗的时间是几种方法里最长的,而且在后期较难将BMECs完全纯化出来。成纤维细胞培养3~4 d在培养瓶中已清晰可见,而BMECs在培养7~8 d才会陆续出现^[28]。Jedrzejczak等^[29]研究表明,从小母牛身上采集的乳腺样本是启动原代培养最有效的材料,且第2代细胞是分析乳腺功能和基因表达活性的最佳模型。Lu等^[30]以产高脂肪、高蛋白质乳和产低脂肪、低蛋白质乳的奶牛乳腺组织作为BMECs系的来源,建立了高脂肪、高蛋白质乳和低脂肪、低蛋白质乳BMECs系,为研究乳脂肪、蛋白质的基因功能及脂肪代谢机制提供了有利模型。机械破碎法除兼具组织块培养法的优势外,还具有分离出的BMECs数目较高、有较快的增殖速度的优势^[31],然而此方法对细胞整体具有一定破坏性,同样存在纯化难度大的问题^[2]。酶消化法由于加快了组织裂解的速度,因此获得细胞的速度明显较前2种方法快且纯化后成纤维细胞污染较少,国内外研究均有报道^[25,32-33]。Chen等^[34]利用酶消化法在BMECs的分离中发现乳滴和空泡结构。组织细胞分离中酶的选择及消化的适时程度是培养的关键因素,因此运用酶消化法分离BMECs时研究人员对酶浓度和消化时间的把控至关重要^[35-36]。由于在泌乳期乳汁中会经常性地脱落BMECs,因此也可从乳汁中进行体外分离。该

方法简便、易于操作,最大的特点是采样不受限制且分离的细胞无成纤维细胞污染,BMECs 的纯度较高,在体外具有较快的增殖速度,给研究者节省更多宝贵的时间。但该技术对无菌操作要求较高,分离 BMECs 难度稍高,因为免疫细胞在乳汁中的数量较大,而具有活性的 BMECs 数量较少,因此在实际操作中应用的不多,尽管如此,目前有很多文献报道已成功从乳汁中分离出 BMECs,且纯度较高^[37-38]。

2.2 BMECs 的纯化技术

牛乳腺由不同的细胞组成,包括乳房中的上皮细胞、结缔组织中的成纤维细胞、脂肪细胞以及血管内皮细胞^[10]。试验中经常可能遇到的主要问题之一是成纤维细胞的携带,这些成纤维细胞能够以更高的速度增殖并很大程度影响 BMECs 的正常生长。自 1961 年乳腺细胞体外培养成功以来,研究人员经常会被 BMECs 中成纤维细胞的污染而困扰^[2]。为解决这一难题,近年来有研究陆续报道了各种纯化方法,包括刮除法、差速贴壁法、差时消化法、密度梯度离心法、组织块转培法、D-缬氨酸或霍乱毒素的培养基法等,不同的纯化方法各有特点。在分离培养初期,BMECs 长势较成纤维细胞缓慢,从而导致 2 种细胞的边界较为明显,无用的成纤维细胞能够用细胞刮刀或无菌枪头通过刮除的方法分离^[39-40]。刮除法虽不会对 BMECs 造成伤害,但纯化效率较低。有学者利用成纤维细胞和 BMECs 对消化酶敏感性的差异将成纤维细胞分离(BMECs 需要 5 min,成纤维细胞则只需 1~2 min),进而培养出有较高纯度的 BMECs^[41]。差速贴壁法也是实验室纯化 BMECs 的重要手段,由于 BMECs 与成纤维细胞在细胞培养瓶底部贴壁的时间存在差异,成纤维细胞一般在 20 min 内基本上可完成贴壁过程,而 BMECs 在同样的生长环境中可能需要更长的时间才能完成附着^[42]。在实际应用中研究人员多数会结合差速贴壁法与差时消化法,将 2 种方法同时用于 BMECs 的纯化,即回避了消化酶对细胞的伤害又使得纯化效率有明显提高^[43]。另外,李震等^[44]和 Martignani 等^[14]分别使用组织块转培法和单克隆法也实现了 BMECs 的纯化。林杰等^[2]通过在完全培养液中添加 D-缬氨酸或霍乱毒素也可以得到纯度较高的 BMECs,但目前以上 3 种方法应用相对较少。上述方法均能有效分离出成纤维细

胞,但由于试验需求想要分离出 BMECs、导管上皮细胞和肌上皮细胞时却达不到预期效果,这时就需要通过密度梯度离心法才能够完成^[45]。

2.3 BMECs 的鉴定技术

体外分离培养、纯化后会得到肉眼可见且具有一定形态特征的 BMECs,但这并不意味着培养的 BMECs 具备牛体内 BMECs 特有的增殖分化、基因或蛋白表达的功能。利用 BMECs 为模型进行分子水平方面的研究前,必须对培养的 BMECs 有比较明确的形态认识,目前 BMECs 鉴定最简便、直接的方法是形态学观察法。Buehring 等^[46]研究表明,体外培养 BMECs 在不同的生长阶段会表现出特有的形态特征。BMECs 在原代培养初期表现为单层且紧密排列,5~7 d 后,细胞铺满整个瓶底,汇集程度达 90% 以上,视野中可见鹅卵石样、圆饼样、多角样具有典型 BMECs 形态的细胞^[25,34]。细胞在进一步传代过程中,由之前的圆饼状慢慢伸展开来,形成岛屿状聚集生长的不同形态(三角形、不规则多边形和长方形)且扁平的极性细胞^[29]。尽管 BMECs 在不同生长阶段有自己独特的形态特征,但形态学观察法的可靠性仍然较差且细胞纯度无法检测。

实验室常用的鉴定技术为标志性骨架蛋白检测。肌动蛋白纤维、中等纤维及微管蛋白是哺乳动物细胞骨架的重要组成部分,主要用于促使 BMECs 抵抗理化应激和维持正常组织更新。在 BMECs 中表达量最高的为具有组织特异性的中等纤维,其理化性质基本不受外界因素影响且容易检测,是标准的角蛋白纤维,因此可作为 BMECs 的首选鉴定标志物。目前用于 BMECs 鉴定的有角蛋白 7、角蛋白 8、角蛋白 18,其中在实践中广泛应用的是角蛋白 18^[47-49]。通常 BMECs 还会分泌很多特异性蛋白,如 κ -酪蛋白、 α_{s1} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 α_{s2} -酪蛋白,这些特异性蛋白的表达情况也可以作为 BMECs 的鉴定指标,进行泌乳能力和细胞类型的评价^[2]。由于所有酪蛋白中 β -酪蛋白占有的比例最高,为 48%,试验中常作为 BMECs 培养成功的标志^[50]。目前对于细胞骨架蛋白和分泌蛋白所采用的鉴定方法主要有逆转录 PCR(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹(Western blot)及酶联免疫吸附试验(ELISA)等。RT-PCR 法主要用于检测 BMECs 中特异表达目标基因的量^[51]; BMECs 分泌的特异性蛋白(如酪蛋白)常用 West-

ern blot 法进行检测,最大的优点是具有较高的灵敏度和特异性,然而不适于大样本量的检测;ELISA 法同样具有很强的特异性,能够弥补 Western blot 法的缺陷,但灵敏度不够理想。

3 体外培养物的添加对 BMECs 泌乳的调控

试验操作过程中为了保证体外分离培养的 BMECs 维持正常的泌乳生理活性,实现其应用价值,研究人员便尝试建立有效的 BMECs 体外培养体系。完全培养液中除了含有基础培养基与胎牛血清外,另外需添加各种激素、微量元素和小分子物质。其中雌激素、孕酮、催产素、胰岛素和肾上腺糖皮质激素等与乳腺发育及泌乳密切相关^[52]。段安琴等^[53]在基础培养基中通过添加雌二醇和孕酮等激素成功建立了水牛乳汁分离 BMECs 的新方法。催乳素具有促进 BMECs 生长和分化的重要作用,在生物体内催乳素能够与非受体型酪氨酸蛋白激酶 2 受体特异结合,刺激腺泡发育,进而对乳汁、乳蛋白质和乳糖的合成与分泌具有促进作用,同时可以维持泌乳机能的正常进行,而乳脂的分泌基本不受影响^[54]。Wu 等^[55]研究发现,在怀孕期间,未修饰的催乳素促进乳腺生长,而磷酸化后催乳素的增加抑制其生长。催乳素对乳腺发育的积极作用还受到胰岛素和糖皮质激素的正向促进,其次配体约束力和自动磷酸化诱导作用可以促使胰岛素受体蛋白位点的生成,使得胰岛素亚基受体 I 被激活,加快 BMECs 乳汁的生物合成。有研究发现胰岛素对体外培养的细胞贴壁生长具有促进作用^[56]。张燕等^[40]研究表明,完全培养液在添加胰岛素和催乳素的基础上继续添加氢化可的松后会产生更加明显的泌乳现象,并且对 β -乳球蛋白和 β -酪蛋白的表达有一定的积极响应。此外,乳腺自身分泌的激素也会影响 BMECs 的分泌活动,在含有催乳素的培养基中添加瘦素可以促进 α -酪蛋白和 β -乳球蛋白表达升高,脂肪酸分泌增加^[57]。Accornero 等^[58]研究还发现肝细胞生长因子也可以促进 BMECs 系的增殖和诱导细胞的运动和扩散。

随着泌乳的持续进行,BMECs 数量的减少可能部分是由于氧化应激所致。硒是几种抗氧化酶的组成部分^[59],也是一种必需的矿物质营养素,动物体内缺乏硒是一个全球性的问题,导致对各种

疾病的易感性和生产性能的下降^[60]。Miranda 等^[61]研究发现,补充硒蛋氨酸可保护 BMECs 免受过氧化氢(H_2O_2)诱导的凋亡,提高 BMECs 的抗氧化应激能力。Zou 等^[62]进行无机和有机硒对热应激 BMECs 的保护作用研究表明,42.5 $^{\circ}C$ 热休克 1 h 可触发热休克反应,降低细胞存活率,亚硒酸钠蛋氨酸或亚硒酸钠预处理细胞可有效减轻热休克对细胞的负面影响。然而,细胞受亚硒酸钠处理的影响较大,但对亚硒酸钠蛋氨酸的耐受性更强。乳汁中的主要渗透成分葡萄糖是牛奶体积的重要决定因素,更是乳糖的主要前体物质,Lin 等^[63]研究表明,葡萄糖具有诱导 BMECs 乳糖合成的能力,并对细胞活力和增殖能力有明显提高。12 mmol/L 葡萄糖浓度是诱导 BMECs 生长和乳糖合成的最佳浓度。在体外,12 mmol/L 葡萄糖增加了乳糖含量,并增加了参与葡萄糖转运和乳糖生物合成途径的相关基因表达。

4 BMECs 二维和三维培养模式的建立

1907 和 1912 年蛙胚神经纤维和鸡的结缔组织体外培养标志着动物细胞体外二维培养方法的建立^[64]。二维细胞培养的优点在于易操作、成本低、样品重复性高及环境可控(pH、温度、渗透压等)等^[65]。目前,很多实验室都在使用二维培养模式体外培养 BMECs,进行奶牛泌乳调控机理及奶牛疾病的预防与治疗等方面的研究。徐丹丹等^[66]和欧阳五庆等^[67]分别利用二维培养的方法对奶牛和山羊的 MECs 进行成功分离、培养及鉴定。在奶牛泌乳调控方面,研究多集中于 BMECs 泌乳代谢相关调控因子,如乳成分合成前体物、激素对 BMECs 增殖、凋亡及泌乳相关基因表达的影响^[30,68-69]。在奶牛疾病方面,主要探究 BMECs 炎症标志物的影响因素及各种致病菌对 BMECs 生长和程序性死亡的影响^[70-71]。但二维培养模式在常规试验中也存在一些不足之处,如体外生长的 BMECs 不能重现生物体内乳房的腺体结构,也不能提供最佳的系统来充分了解增殖、细胞死亡和分化的调节^[72-73],尽管二维培养在 BMECs 培养中应用广泛,但学者们在实践研究过程中发现二维培养的 BMECs 其培养环境还达不到体内环境的特殊性,并且 BMECs 组织学特性会随着传代次数的增加逐渐丢失,功能特性得不到完全发挥,如二维培养的 BMECs 并不能诱导表达 κ -酪蛋白

等^[66]。生物体内的组织和器官行使其重要功能离不开特定的环境和细胞自我平衡稳态,体外培养的细胞更是如此,拥有和体内生存环境相似的培养体系是研究细胞功能和基因表达机理的先决条件,更是试验成功的重要前提,因此,模拟体内特殊环境的体外三维培养模式逐渐运用而生。

与二维培养不同,三维培养模式能够提供细胞生长所需的类似体内环境的多孔支架,类腺泡结构可以在这种高仿的体外培养系统里面存活半个月或更久。三维生长的 BMECs 表现出体内乳腺上皮的许多特征,包括形成具有中空管腔的腺泡样球,组成这些腺泡的细胞顶端基底极化,基底膜成分(IV型胶原和层黏连蛋白 V)的基底沉积,在某些情况下有乳蛋白的产生^[65,74]。三维培养技术应用较多的有凝胶和海绵技术、中空纤维技术、球体技术等,但胶原凝胶技术是目前最为方便、经济的培养方法^[75]。在胶原凝胶中不同种类的细胞能够以特有的方式移动和汇集,到达一定时间后,经过不断增殖和分化形成特定的组织样结构。细胞在凝胶中的接种方式有埋植培养和顶部培养,其中顶部培养对于气体和营养物质的转运更加灵活。目前有关三维培养的研究已是国内外的热点领域^[76-77],Hillreiner 等^[78]首次建立了从鲜奶中分离出的具有生理功能的原代 BMECs 三维细胞培养模型,有望揭开泌乳生理过程的基本分子机制,如乳蛋白生产、细胞分化、免疫反应以及代谢紊乱等。有研究表明,三维培养的 BMECs 为 κ -酪蛋白、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(*mTOR*)和蛋白激酶 B α (*AKT1*)基因在体内表达的相关研究提供了较好的模型^[79],且能够改变 BMECs 在培养基中的生存状态、样式及其作用,促使 κ -酪蛋白的表达^[66]。Zhan 等^[75]研究也表示在三维培养中,可在一定传代范围内检测到 α S1-酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白的表达,但检测不到 α S2-酪蛋白的表达,提示三维培养系统是长期研究体外泌乳机制的重要工具,但三维培养得到的 BMECs 与牛体自身细胞的特性仍然存在一定差异。目前,三维培养技术在 BMECs 培养中的研究是一个热点话题,在医学领域的研究已较为广泛^[80-82]。

5 BMECs 体外培养在基因表达机理研究及组学中的应用

BMECs 作为经典的模型一直以来被广泛应用

于乳腺组织的生理功能等多方面的研究。李喜艳等^[83]已对体外培养的 BMECs 建立乳腺生物反应器细胞模型和在奶牛乳房疾病中的应用进行了详细的概述,本文收集了近年最新文献,重点对体外培养的 BMECs 在基因表达机理研究及组学中的研究进行详细阐述,为大数据和组学时代 BMECs 模型的应用提供有价值的基础资料。

甾醇调节元件结合蛋白 1(*SREBP1*)作为一种重要的转录调节物,参与调节乳脂合成酶和蛋白的表达和活性,从而影响 BMECs 甘油三酯的合成与分泌。Xu 等^[25]以酶消化法成功分离的 BMECs 为模型,研究证明了 *SREBP1* 基因是调控乳脂合成的中心转录因子,*SREBP1* 基因可能作用于细胞外信号调节蛋白激酶 1/2(*ERK1/2*)信号通路来调控过氧化物酶体增殖体激活受体 γ (*PPAR* γ)的基因表达,且固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白能够增加细胞核中 *SREBP1* 蛋白的表达,对硬脂酰辅酶 A 去饱和酶基因的转录过程具有激活效果^[84]。黄牛分娩后整个泌乳过程乳腺中 *SREBP* 都具有很强的活性,对 BMECs 合成乳脂起着重要的作用^[85]。Li 等^[86]基于基因功能研究发现 *SREBP-1c* 基因在乳腺组织中的表达依赖于脂肪酸结合蛋白 5(*FABP5*)正向调节,促进乳脂的合成,并证实了 *FABP5* 是蛋氨酸(*Met*)和雌二醇(*E2*)诱导的 *SREBP-1c* 基因表达和乳脂合成所必需的。Kadegowda 等^[87]研究发现,过氧化物酶体增殖体激活受体失活和长链脂肪酸在不同程度上也会改变 BMECs 脂肪生成基因网络。Chen 等^[88]研究发现,极长链脂肪酸延长酶 7 通过转录因子 *SP1* 调控而参与 BMECs 的脂质积累。Chen 等^[34]又通过 qRT-PCR 检测细胞特异性基因的表达,证明乳脂肪球的总 RNA 主要来源于 BMECs,可用于研究 BMECs 的功能基因表达,解决了哺乳动物乳腺组织不易获得,乳腺中基因表达水平较难检测的问题。二酰基甘油转移酶 1(*DGAT1*)几乎在所有组织中表达,包括乳腺。Lu 等^[89]通过下调 BMECs 内源性 *DGAT1* 表达,结果同样显著降低了 BMECs 中甘油三酯的含量。Wang 等^[90]以 BMECs 系为模型发现黄芪甲苷预处理 BMECs 可有效抑制细胞内活性氧水平和细胞凋亡率的升高,抑制氨水诱导的炎症反应,挽救细胞活力的下降,进一步说明黄芪甲苷对氨诱导的 BMECs 损伤有保护作用。Chen 等^[91]研究发现转化生长因子-

$\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 通过 TGF- $\beta 1$ /Smad 信号通路诱导 BMECs 上皮-间质转化。BMECs 过表达细胞色素 P4501A1 能够减轻脂多糖诱导的上皮细胞增殖抑制,降低了脂多糖诱导的炎性细胞因子和肿瘤坏死因子^[92]。

牛乳中不仅含有多种营养成分,还含有被认为是由 BMECs 分泌的 microRNAs (miRNA)。Muroya 等^[93]将 BMECs 经催乳素 (DIP) 处理后,发现 miR-148A 表达水平升高可能与其泌乳期乳量增加有关。为了确定 miRNA 水平上如何调控牛奶中脂质的合成和代谢,Shen 等^[94]采用组织块培养法体外分离培养了 2 头乳脂含量差异极大的中国荷斯坦奶牛的原代 BMECs,分别构建小 RNA 文库,通过二代测序和生物信息学技术共检测到 292 个已知 miRNAs 和 116 个新的 miRNAs。长链非编码 RNA (lncRNAs) 已知转录调节多种疾病。Wang 等^[95]通过 RNA-Seq 技术在牛乳腺炎 BMECs 模型中筛选可能具有功能的 lncRNA,结果发现 lncRNA-TUB 在接受促炎刺激的 BMECs 中的表达高于正常细胞。Ma 等^[96]研究发现, LncRNA XIST (调控 X 染色体失活) 介导 BMECs 炎症反应通过核因子- κ B/炎性小体 3 (NF- κ B/NLRP3) 途径完成。Xu 等^[97]利用脂多糖刺激 BMECs 后进行转录组学分析,提示白细胞介素-1 (IL-1) 介导的 BMECs 通透性增加是通过 IL-1 β -ERK1/2-肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 轴途径来实现的。Li 等^[98]将 BMECs 暴露在热应激下,并将它们与对照组进行比较,使用液相色谱-串联质谱进行相对和绝对定量,与对照组相比,热处理组鉴定出 104 个差异升高的蛋白质 (>1.3 倍) 和 167 个差异降低的蛋白质 (<0.77 倍)。大多数差异表达的蛋白质与细胞-底物连接组装、分解代谢过程和代谢过程相关。目前国内外利用体外分离培养的 BMECs 进行组学分析的报道还相对较少,更多的是通过乳腺组织直接测序分析^[92,99-100]。然而 BMECs 是乳腺的基本功能单位,体外培养的原代 BMECs 较好地保留了乳腺组织原有的合成和分泌特性,因此是探讨乳腺泌乳特性和代谢调控机制的重要辅助研究手段。

6 小 结

BMECs 体外二维培养技术目前日趋成熟,通常以乳腺组织分离培养和酶消化法连用,操作简

单且效果最佳,然而不可避免会受到成纤维细胞的影响。乳汁分离法恰好可以弥补这个缺陷,分离的 BMECs 纯度较高,需要注意的是试验过程中特别注重规范的无菌操作。在分离培养初期为了使体外培养的 BMECs 具有和体内细胞尽可能相同的性状和功能,会添加一些激素和小分子,使得细胞具有正常泌乳生理活性和分化状态,且效果也得到了证实。尽管如此,二维培养的 BMECs 其生长和增殖的环境还达不到生物体自身条件的特殊性,并且 BMECs 组织学特性会随着传代次数的增加逐渐丢失,功能特性得不到完全发挥,因此,三维细胞培养作为一项新兴的细胞培养技术逐渐被人们所重视,其最大的优势在于能够提供细胞生长所需的类似体内环境的多孔支架,类腺泡结构可以在这种高仿的体外培养系统里面存活半个月或更久,因而具有极大的可开发性。然而目前三维培养得到的细胞生存和分化能力有限,与牛体自身细胞的特性仍然存在一定差异,且受到成本的制约,还有待科研人员更深入地探索和研究。虽然细胞体外培养技术还在不断地改进和完善,但体外分离培养的 BMECs 已在牛乳房疾病和基因表达机理研究中广泛应用。不仅如此,目前已有研究报道将 BMECs 和组学关联起来进行差异基因、非编码序列及蛋白的筛选,寻找调控泌乳或和疾病相关的新基因和蛋白,因此是探讨乳腺泌乳特性和代谢调控机制的重要研究手段,具有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] NAYLOR M J, OAKES S R, GARDINER-GARDEN M, et al. Transcriptional changes underlying the secretory activation phase of mammary gland development [J]. *Molecular Endocrinology*, 2005, 19 (7): 1868-1883.
- [2] 林杰, 王旭荣, 李建喜, 等. 奶牛乳腺上皮细胞原代培养、纯化及鉴定技术研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42 (8): 2109-2115.
LIN J, WANG X R, LI J X, et al. Research progress on primary culture, purification and identification technique of bovine mammary epithelial cell [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 42 (8): 2109-2115. (in Chinese)
- [3] HARVATINE K J, BOISCLAIR Y R, BAUMAN D E. Liver x receptors stimulate lipogenesis in bovine

- mammary epithelial cell culture but do not appear to be involved in diet-induced milk fat depression in cows[J]. *Physiological Reports*, 2014, 2(3): e00266.
- [4] KAUSHIK R, SINGH K P, KUMARI A, et al. Construction of a recombinant human insulin expression vector for mammary gland-specific expression in buffalo (*Bubalus bubalis*) mammary epithelial cell line[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(9): 5891–5902.
 - [5] SUN Y L, LIN C S, CHOU Y C. Gene transfection and expression in a primary culture of mammary epithelial cells isolated from lactating sows[J]. *Cell Biology International*, 2013, 29(7): 576–582.
 - [6] MEYER M J, CAPUCO A V, ROSS D A, et al. Developmental and nutritional regulation of the prepubertal bovine mammary gland: II. Epithelial cell proliferation, parenchymal accretion rate, and allometric growth[J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89(11): 4298–4304.
 - [7] CAPUCO A V, ELLIS S E, HALE S A, et al. Lactation persistency: insights from mammary cell proliferation studies[J]. *Journal of Animal Science*, 2003, 15(Suppl.3): 13–15.
 - [8] DONTU G, AL-HAJJ M, ABDALLAH W M, et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer[J]. *Breast Cancer Research*, 2003, 36(Suppl. 1): 59–72.
 - [9] HENNIGHAUSEN L, ROBINSON G W. Signaling pathways in mammary gland development[J]. *Developmental Cell*, 2001, 1(4): 467–475.
 - [10] MARTIGNANI E, ACCORNERO P, MIRETTI S, et al. Bovine mammary organoids: a model to study epithelial mammary cells[M]//BARATTA M. *Epithelial cell culture*. New York: Humana Press, 2018, 1817: 137.
 - [11] CUI Y J, LIU Z Y, SUN X, et al. Thyroid hormone responsive protein spot 14 enhances lipogenesis in bovine mammary epithelial cells[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2015, 51(6): 586–594.
 - [12] GREEN K A, STREULI C H. Apoptosis regulation in the mammary gland[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61(15): 1867–1883.
 - [13] BARNES D, SATO G. Serum-free cell culture: a unifying approach[J]. *Cell*, 1980, 22(3): 649–655.
 - [14] MARTIGNANI E, CRAVERO D, MIRETTI S, et al. Clonogenic assay allows for selection of a primitive mammary epithelial cell population in bovine[J]. *Experimental Cell Research*, 2015, 338(2): 245–250.
 - [15] CAPUCO A V, ELLIS S, WOOD D L, et al. Postnatal mammary ductal growth; three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves[J]. *Tissue and Cell*, 2002, 34(3): 143–154.
 - [16] JAMIESON P R, DEKKERS J F, RIOS A C, et al. Derivation of a robust mouse mammary organoid system for studying tissue dynamics[J]. *Development*, 2016, 144(6): 1065–1071.
 - [17] RUDLAND P S, BARRACLOUGH R, FERNIG D G, et al. Growth and differentiation of the normal mammary gland and its tumours[J]. *Biochemical Society Symposium*, 1998, 63: 1–20.
 - [18] MIN K H, BYUN J H, LIM J S, et al. Chondroid syringoma on face[J]. *Archives of Craniofacial Surgery*, 2016, 17(3): 173–175.
 - [19] CARTER E P, GOPSILL J A, GOMM J J, et al. A 3D *in vitro* model of the human breast duct: a method to unravel myoepithelial-luminal interactions in the progression of breast cancer[J]. *Breast Cancer Research*, 2017, 19(1): 50.
 - [20] URANO M, NAKAGURO M, YAMAMOTO Y, et al. Diagnostic significance of HRAS mutations in epithelial-myoepithelial carcinomas exhibiting a broad histopathologic spectrum[J]. *American Journal of Surgical Pathology*, 2019, 43(7): 984–994.
 - [21] 宫平, 刘凤华. 奶牛乳腺上皮细胞的原代培养[J]. *北京农学院学报*, 2017, 32(1): 48–50.
GONG P, LIU F H. Primary culture of bovine mammary epithelial cells[J]. *Journal of Beijing University of Agriculture*, 2017, 32(1): 48–50. (in Chinese)
 - [22] HOU X M, LI Q Z, HUANG T Y. Microarray analysis of gene expression profiles in the bovine mammary gland during lactation[J]. *Science China Life Sciences*, 2010, 53(2): 248–256.
 - [23] SORG D, DANOWSKI K, KORENKOVA V, et al. Microfluidic high-throughput RT-qPCR measurements of the immune response of primary bovine mammary epithelial cells cultured from milk to mastitis pathogens[J]. *Animal*, 2013, 7(5): 799–805.
 - [24] 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 cells[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2014, 59(1): 59–64.

- [25] XU W W, CHEN Q M, JIA Y H, et al. Isolation, characterization, and SREBP1 functional analysis of mammary epithelial cell in buffalo [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(11): e12997.
- [26] TONG H L, LI Q Z, GAO X J, et al. Establishment and characterization of a lactating dairy goat mammary gland epithelial cell line [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2012, 48(3): 149–155.
- [27] SHI H P, SHI H B, LUO J, et al. Establishment and characterization of a dairy goat mammary epithelial cell line with human telomerase (hT-MECs) [J]. *Animal Science Journal*, 2014, 85(7): 735–743.
- [28] 林杰, 王旭荣, 王磊, 等. 荷斯坦奶牛乳腺组织冻存及乳腺上皮细胞原代培养技术改进 [J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(5): 1067–1074.
- LIN J, WANG X R, WANG L, et al. Cryopreservation of the mammary gland and improvement on the culture of the primary epithelial cells in holstein dairy cows [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(5): 1067–1074. (in Chinese)
- [29] JEDRZEJCZAK M, SZATKOWSKA I. Bovine mammary epithelial cell cultures for the study of mammary gland functions [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2014, 50(5): 389–398.
- [30] LU C Y, YANG R J, LIU B Y, et al. Establishment of two types of mammary epithelial cell lines from Chinese Holstein dairy cow [J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(8): 1166–1172.
- [31] 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.
- LIN G J, WANG T, CHEN C Y. A study on primary culture of cow mammary epithelial cell separated directly [J]. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2004, 36(7): 4–6. (in Chinese)
- [32] GERMAN T, BARASH I. Characterization of an epithelial cell line from bovine mammary gland [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2002, 38(5): 282–292.
- [33] ANAND V, DOGRA N, SINGH S, et al. Establishment and characterization of a buffalo (*Bubalus bubalis*) mammary epithelial cell line [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40469.
- [34] CHEN Q M, WU Y J, ZHANG M Y, et al. Milk fat globule is an alternative to mammary epithelial cells for gene expression analysis in buffalo [J]. *Journal of Dairy Research*, 2016, 83(2): 202–208.
- [35] ROSE M T, ASO H, YONEKURA S, et al. *In vitro* differentiation of a cloned bovine mammary epithelial cell [J]. *Journal of Dairy Research*, 2002, 69(3): 345–355.
- [36] HAN H, WANG J Q, BU D P, et al. *In vitro* culture and characterization of a mammary epithelial cell line from Chinese Holstein dairy cow [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7636.
- [37] HÉBERT A, SAYASITH K, SÉNÉCHAL S, et al. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 193(1): 57–62.
- [38] BHAT S A, AHMAD S M, IBEAGHA-AWEMU E M, et al. Comparative transcriptome analysis of mammary epithelial cells at different stages of lactation reveals wide differences in gene expression and pathways regulating milk synthesis between Jersey and Kashmiri cattle [J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0211773.
- [39] 李艳, 徐凯, 赵国琦. 奶牛乳腺上皮细胞的培养与鉴定 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2014(1): 8–11.
- LI Y, XU K, ZHAO G Q. Culture and identification of cow mammary epithelial cells [J]. *Shanghai Animal Husbandry and Veterinary Journal*, 2014(1): 8–11. (in Chinese)
- [40] 张燕, 杜卫华, 郝海生, 等. 哺乳动物乳腺上皮细胞体外培养研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(10): 34–38.
- ZHANG Y, DU W H, HAO H S, et al. Progress of mammary epithelial cells culture *in vitro* [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2011, 38(10): 34–38. (in Chinese)
- [41] SUN Y L, LIN C S, CHOU Y C. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized porcine mammary epithelial cell line [J]. *Cell Biology International*, 2006, 30(12): 970–976.
- [42] CHOUDHARY R K, CAPUCO A V. *In vitro* expansion of the mammary stem/progenitor cell population by xanthosine treatment [J]. *BMC Cell Biology*, 2012, 13: 14.
- [43] 丁旭娜, 王凤龙, 丁玉林, 等. 奶牛乳腺上皮细胞和成纤维细胞的体外培养与鉴定 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2012(3): 1–5.
- DING X N, WANG F L, DING Y L, et al. Identification and *in vitro* culture of bovine mammary epithelial cells and fibroblast [J]. *Heilongjiang Animal Science*

- and Veterinary Medicine, 2012(3):1-5. (in Chinese)
- [44] 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.
- LI Z, WANG Y, LIU H L, et al. Study on isolation and culture of bovine mammary epithelial cells[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2000, 16(3):25-28. (in Chinese)
- [45] ZAVIZION B, VAN DUFFELEN M, SCHAEFFER W, et al. Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 1996, 32(3):138-148.
- [46] BUEHRING G C. Culture of human mammary epithelial cells; keeping abreast with a new method[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1972, 49(5):1433-1434.
- [47] RAUNER G, BARASH I. Xanthosine administration does not affect the proportion of epithelial stem cells in bovine mammary tissue, but has a latent negative effect on cell proliferation[J]. Experimental Cell Research, 2014, 328(1):186-196.
- [48] HAN Z Y, MU T, YANG Z. Methionine protects against hyperthermia-induced cell injury in cultured bovine mammary epithelial cells[J]. Cell Stress and Chaperones, 2015, 20(1):109-120.
- [49] KAUSHIK R, SINGH K P, KUMARI A, et al. Isolation, characterization, and *EGFP* expression in the buffalo (*Bubalus bubalis*) mammary gland epithelial cell line[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2013, 49(1):1-7.
- [50] FU M, CHEN Y B, XIONG X R, et al. Establishment of mammary gland model *in vitro*; culture and evaluation of a yak mammary epithelial cell line[J]. PLoS One, 2014, 9(12):e113669.
- [51] TONG J J, LI Y, LIU R, et al. Effect of *Semen vaccariae* and *Taraxacu mogono* on cell adhesion of bovine mammary epithelial cells[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(12):2043-2050.
- [52] NEVILLE M C, MCFADDEN T B, FORSYTH I. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion[J]. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 2002, 7(1):49-66.
- [53] 段安琴, 庞春英, 朱鹏, 等. 水牛乳汁中乳腺上皮细胞的分离培养及鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(11):3243-3249.
- DUAN A Q, PANG C Y, ZHU P, et al. Isolation, culture and identification of buffalo mammary epithelial cells from milk[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2017, 44(11):3243-3249. (in Chinese)
- [54] AKERS R M. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(4):1222-1234.
- [55] WU W, CHEN Y H, UEDA E, et al. Different forms of prolactin have opposing effects on the expression of cell cycle regulatory proteins in differentiated mammary epithelial cells[J]. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 2006, 16(2):75-84.
- [56] 郝明超, 刘犇, 樊江峰, 等. 乳腺上皮细胞体外培养的研究进展[J]. 中国奶牛, 2011(14):39-43.
- HAO M C, LIU B, FAN J F, et al. Research progress on culture of mammary gland epithelial cells *in vitro* [J]. China Dairy Cattle, 2011(14):39-43. (in Chinese)
- [57] FEUERMANN Y, MABJEESH S J, SHAMAY A. Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in the bovine mammary gland[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(9):2941-2946.
- [58] ACCORNERO P, LUVARÀ S, FAVOLE A, et al. Biological role of the HGF/MET ligand/receptor couple in bovine mammary epithelial cells[J]. Veterinary Research Communications, 2007, 31(Suppl.1):161-164.
- [59] CAO L, TANG J Y, LI Q, et al. Expression of selenoprotein genes is affected by heat stress in IPEC-J2 cells[J]. Biological Trace Element Research, 2016, 172(2):354-360.
- [60] ZWOLAK I, ZAPOROWSKA H. Selenium interactions and toxicity: a review[J]. Cell Biology and Toxicology, 2012, 28(1):31-46.
- [61] MIRANDA S G, PURDIE N G, OSBORNE V R, et al. Selenomethionine increases proliferation and reduces apoptosis in bovine mammary epithelial cells under oxidative stress[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(1):165-173.
- [62] ZOU Y X, SHAO J J, LI Y X, et al. Protective effects of inorganic and organic selenium on heat stress in bovine mammary epithelial cells[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019:1-10.
- [63] LIN Y, SUN X X, HOU X M, et al. Effects of glucose on lactose synthesis in mammary epithelial cells from dairy cow [J]. BMC Veterinary Research, 2016, 12:81.

- [64] 王秀美,考桂兰,高爱武,等.奶牛乳腺上皮细胞三维培养的形态观察[J].内蒙古农业大学学报(自然科学版),2009,30(4):8-14.
WANG X M, KAO G L, GAO A W, et al. The three-dimensional cultures of bovine mammary epithelial cells[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition), 2009, 30(4): 8-14. (in Chinese)
- [65] XU K, BUCHSBAUM R J. Isolation of mammary epithelial cells from three-dimensional mixed-cell spheroid co-culture[J]. Journal of Visualized Experiments, 2012(62): 3760.
- [66] 徐丹丹,孙志鹏,张旭,等.胶原酶 I 消化法体外分离培养奶牛乳腺上皮细胞[J].中国细胞生物学学报,2016,38(9):1060-1065.
XU D D, SUN Z P, ZHANG X, et al. Isolation and culture of bovine mammary epithelial cells by collagenase I digestion *in vitro* [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2016, 38(9): 1060-1065. (in Chinese)
- [67] 欧阳五庆,钱菊汾.山羊乳腺上皮细胞培养体系的建立[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(3):31-34.
OU YANG W Q, QIAN J F. Establishment of culture system in goat mammary epithelial cell[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2003, 31(3): 31-34. (in Chinese)
- [68] 刘畅,赵锋,李庆章.不同泌乳相关激素和生长因子对奶牛乳腺上皮细胞增殖的影响[J].中国畜牧兽医,2012,39(5):102-106.
LIU C, ZHAO F, LI Q Z. Influence of different hormone and cytokine related lactation on the proliferation of mammary epithelial cells of dairy cow[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 39(5): 102-106. (in Chinese)
- [69] OHTANI Y, YONEZAWA T, SONG S H, et al. Gene expression and hormonal regulation of adiponectin and its receptors in bovine mammary gland and mammary epithelial cells[J]. Animal Science Journal, 2011, 82(1): 99-106.
- [70] YU C, SHI Z R, CHU C Y, et al. Expression of bovine granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2) in neutrophils and a mammary epithelial cell line (MAC-T) in response to various bacterial cell wall components[J]. The Veterinary Journal, 2010, 186(1): 89-95.
- [71] REZAMAND P, MCGUIRE M A. Short communication: effects of *trans* fatty acids on markers of inflammation in bovine mammary epithelial cells[J]. Journal of Dairy Science, 2011, 94(1): 316-320.
- [72] YAMADA K M, CUKIERMAN E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D[J]. Cell, 2007, 130(4): 601-610.
- [73] DEBNATH J, MUTHUSWAMY S K, BRUGGE J S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures[J]. Methods, 2003, 30(3): 256-268.
- [74] HSIAO A Y, TUNG Y C, KUO C H, et al. Micro-ring structures stabilize microdroplets to enable long term spheroid culture in 384 hanging drop array plates[J]. Biomedical Microdevices, 2012, 14(2): 313-323.
- [75] ZHAN K, LIN M, LIU M M, et al. Three-dimensional culture system can induce expression of casein in immortalized bovine mammary epithelial cells[J]. Animal Science Journal, 2017, 88(5): 817-825.
- [76] LEE G Y, KENNY P A, LEE E H, et al. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells[J]. Nature Methods, 2007, 4(4): 359-365.
- [77] MROUE R, BISSELL M J. Three-dimensional cultures of mouse mammary epithelial cells[M]//RANDELL S, FULCHER M. Epithelial cell culture protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2012, 945: 221-250.
- [78] HILLREINER M, MÜLLER N I, KOCH H M, et al. Establishment of a 3D cell culture model of primary bovine mammary epithelial cells extracted from fresh milk[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2017, 53(8): 706-720.
- [79] 邢媛媛,李大彪,李子南,等.不同浓度亚油酸对二维和三维培养模式下奶牛乳腺上皮细胞形态及乳蛋白合成相关基因表达的影响[J].动物营养学报,2019,31(10):4667-4674.
XING Y Y, LI D B, LI Z N, et al. Effects of different concentrations of linoleic acid on expression of milk protein synthesis related gene in two-dimension and three-dimension cultured bovine mammary epithelial cells[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(10): 4667-4674. (in Chinese)
- [80] LARSEN M C, BRAKE P B, POLLENZ R S, et al. Linked expression of ah receptor, ARNT, CYP1A1, and CYP1B1 in rat mammary epithelia, *in vitro*, is each substantially elevated by specific extracellular matrix interactions that precede branching morphogenesis[J]. Toxicological Sciences, 2004, 82(1): 46-61.
- [81] OGAWA R, OKI K, HYAKUSOKU H. Vascular tis-

- sue engineering and vascularized 3D tissue regeneration [J]. *Regenerative Medicine*, 2007, 2 (5): 831–837.
- [82] SODUNKE T R, TURNER K K, CALDWELL S A, et al. Micropatterns of matrigel for three-dimensional epithelial cultures [J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (27): 4006–4016.
- [83] 李喜艳, 王加启, 魏宏阳, 等. 奶牛乳腺上皮细胞的体外培养方法及其应用概述 [J]. *华北农学报*, 2010, 25 (增刊2): 31–35.
- LI X Y, WANG J Q, WEI H Y, et al. Bovine mammary epithelial cells culture methods *in vitro* and its application [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25 (Suppl.2): 31–35. (in Chinese)
- [84] 韩立强, 孙宇, 付彤, 等. 奶牛乳腺上皮细胞中 SCAP 和 SREBP1 蛋白调控 *SCD* 基因表达的作用研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49 (3): 652–658.
- HAN L Q, SUN Y, FU T, et al. Effect of SCAP and SREBP1 proteins on regulation of *SCD* gene expression in dairy mammary epithelial cells [J]. *Journal of Animal Husbandry and Veterinary Science*, 2018, 49 (3): 652–658. (in Chinese)
- [85] WEN G, PACHNER L I, GESSNER D K, et al. Sterol regulatory element-binding proteins are regulators of the sodium/iodide symporter in mammary epithelial cells [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99 (11): 9211–9226.
- [86] LI P, YU M M, ZHOU C J, et al. FABP5 is a critical regulator of methionine- and estrogen-induced *SREBP-1c* gene expression in bovine mammary epithelial cells [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234 (1): 537–549.
- [87] KADEGOWDA A K G, BIONAZ M, PIPEROVA L S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents [J]. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92 (9): 4276–4289.
- [88] CHEN S, HU Z G, HE H, et al. Fatty acid elongase7 is regulated via SP1 and is involved in lipid accumulation in bovine mammary epithelial cells [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2017, 233 (6): 4715–4725.
- [89] LU C Y, YANG R J, SHEN B L, et al. RNA interference-mediated knockdown of *DGAT1* decreases triglyceride content of bovine mammary epithelial cell line [J]. *Gene Expression*, 2013, 15 (5/6): 199–206.
- [90] WANG F G, ZHAO Y, CHEN S X, et al. Astragaloside IV alleviates ammonia-induced apoptosis and oxidative stress in bovine mammary epithelial cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20 (3): 600.
- [91] CHEN Q, YANG W, WANG X X, et al. TGF- β 1 induces EMT in bovine mammary epithelial cells through the TGF β 1/smad signaling pathway [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 43 (1): 82–93.
- [92] ZHANG W Y, HAO W, QI S P, et al. CYP1A1 relieves lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in bovine mammary epithelial cells [J]. *Mediators of Inflammation*, 2018, 2018: 4093285.
- [93] MUROYA S, HAGI T, KIMURA A, et al. Lactogenic hormones alter cellular and extracellular microRNA expression in bovine mammary epithelial cell culture [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2016, 7: 8.
- [94] SHEN B L, ZHANG L Y, LIAN C J, et al. Deep sequencing and screening of differentially expressed microRNAs related to milk fat metabolism in bovine primary mammary epithelial cells [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17 (2): 200.
- [95] WANG H, WANG X X, LI X R, et al. A novel long non-coding RNA regulates the immune response in MAC-T cells and contributes to bovine mastitis [J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286 (9): 1780–1795.
- [96] MA M R, PEI Y F, WANG X X, et al. LncRNA XIST mediates bovine mammary epithelial cell inflammatory response via NF- κ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Cell Proliferation*, 2018, 52 (1): e12525.
- [97] XU T, DONG Z J, WANG X X, et al. IL-1 β induces increased tight junction permeability in bovine mammary epithelial cells via the IL-1 β -ERK1/2-MLCK axis upon blood-milk barrier damage [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119 (11): 9028–9041.
- [98] LI L, WANG Y R, LI C M, et al. Proteomic analysis to unravel the effect of heat stress on gene expression and milk synthesis in bovine mammary epithelial cells [J]. *Animal Science Journal*, 2017, 88 (12): 2090–2099.
- [99] CAI X Y, LIU Q Y, ZHANG X X, et al. Identification and analysis of the expression of microRNA from lactating and nonlactating mammary glands of the Chinese swamp buffalo [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100 (3): 1971–1986.
- [100] GOLAN-GERST R, SHIFF Y E, MOSHAYOFF V, et al. Characterization and biological function of milk-de-

rived miRNAs [J]. Molecular Nutrition & Food Re-

search, 2017, 61(10): 1700009.

Isolation and Culture Mode, Method and Application of Bovine Mammary Epithelial Cells *in Vitro*

MU Tong HU Honghong GU Yaling* ZHANG Juan
(Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan 750105, China)

Abstract: The mammary gland is composed of acini with lactation function. Mammary epithelial cells (MECs) are arranged in a single layer around the acinus, which is an important part of the innate immune barrier of the mammary gland. It is also responsible for transforming nutrients in the blood into milk through a series of complex biochemical processes. The separation and culture of bovine mammary epithelial cells (BMECs) *in vitro* can solve many problems, such as uncontrollable conditions, difficult operation, high cost and large individual differences *in vivo* test, and also provide a good cell model for *in vitro* study of the growth and development of mammary tissue, the mechanism of lactation and breast diseases. This paper mainly summarized the classification and function of BMECs, culture methods, mode and their application in gene expression mechanism and omics, in order to provide valuable reference and new ideas for the *in vitro* culture and related research of BMECs. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(1): 56-67]

Key words: cattle; BMECs; *in vitro* culture; mode; application

* Corresponding author, professor, E-mail: guyaling@sina.com