

奶牛瘤胃上皮细胞分离培养与鉴定

姜茂成¹ 詹康¹ 严康^{1,2} 赵倩明¹ 赵国琦^{1*}

(1.扬州大学 动物科学与技术学院,扬州 225009;

2.江苏省畜牧总站,南京 210000)

摘要 在体外分离培养奶牛瘤胃上皮细胞,可为奶牛瘤胃生理功能和吸收机制研究和永生化的奶牛瘤胃上皮细胞奠定基础。通过胰蛋白酶消化法从奶牛瘤胃组织中分离出瘤胃上皮细胞,并通过免疫细胞化学的方法检测细胞角蛋白,CCK-8检测细胞生长曲线, β -半乳糖苷酶染色鉴定细胞的衰老以及细胞染色体核型分析来鉴定瘤胃上皮细胞。结果表明:1)利用胰蛋白酶消化法可以稳定的培养出瘤胃上皮细胞并且能够在体外传代大约5代;2)通过在显微镜下进行细胞形态的观察呈单层“岛屿状”;3)在荧光显微镜下细胞角蛋白抗原能够发出绿色荧光;4)奶牛瘤胃上皮细胞传至第5代, β -半乳糖苷酶被染成蓝色,同时,细胞出现衰老和停滞生长;5)染色体核型分析表明奶牛瘤胃上皮细胞的染色体数为60条。研究发现通过酶消化奶牛瘤胃组织能够获得奶牛瘤胃上皮细胞,但只能传至5代。

关键词 奶牛瘤胃上皮细胞;永生化的;细胞角蛋白18;染色体核型

中图分类号 Q2-33

文章编号 1007-4333(2018)01-0080-07

文献标志码 A

Culture and identification of the bovine rumen epithelial cell line

JIANG Maocheng¹, ZHAN Kang¹, YAN Kang^{1,2}, ZHAO Qianming¹, ZHAO Guoqi^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Jiangsu Provincial Station of Animal Husbandry, Nanjing 210000, China)

Abstract The aim of this study was to isolate bovine rumen epithelial cells *in vitro* to lay foundation for, the absorption of rumen physiological function for bovine mechanism research and rumen epithelial cells immortalized cows. Bovine rumen epithelial cells were isolated from the rumen tissue by trypsin digestion, and identification of cell protein were identified by immunocytochemistry test, cell growth curve of CCK-8 cell angle was detected, by β -galactosidase staining and to identify the rumen epithelial cells were identified by aging cell karyotype analysis. The results showed: 1) Rumen epithelial cells could be cultured stably by trypsin digestion method and used for about 5 generations *in vitro*; 2) Observation of the morphology of cells under the microscope revealed that the monolayer was “Island shaped”; 3) Fluorescent protein emitted green fluorescence under fluorescence microscope; 4) The rumen epithelial cells transferred to fifth generation were β -galactosidase dye blue, at the same time, cell senescence and stagnant growth occurred; 5) Karyotype analysis showed that the number of chromosomes in the rumen epithelial cells was 60. In summary, rumen epithelial cells tissue could be obtained through enzymatic digestion, however the cells could only be transferred to fifth generation.

Keywords bovine rumen epithelial cells; immortalize; cytokeratin 18; karyotype

收稿日期: 2017-00-00

基金项目: 现代农业奶牛产业技术体系专项资金资助(CARS-36); 国家自然科学基金项目(31572430); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX17_0630); 农业三新工程(SXGC[2016]326)

第一作者: 姜茂成, 硕士研究生, E-mail: 593245397@qq.com

通讯作者: 赵国琦, 教授, 博士生导师, 主要从事反刍动物微生态营养及分子营养研究, E-mail: gqzhao@yzu.edu.cn

反刍动物瘤胃是饲料消化吸收的重要场所,也是反刍动物最独特的消化器官。瘤胃是反刍动物四个胃中最大的胃,占复胃总体积的 80%,其对营养物质的消化和吸收产生至关重要的作用。瘤胃是反刍动物参与消化代谢及营养吸收的第一个环节,瘤胃中含有大量的细菌、真菌以及原虫等微生物,因此还具有发酵功能。正由于这些功能决定了反刍动物瘤胃上皮具有着重要的生理功能,如:养分吸收与运输、挥发性脂肪酸代谢及对瘤胃壁的保护^[1]。反刍动物摄入 70%~80%营养物质在瘤胃内经微生物发酵,生成短链脂肪酸等代谢产物,被瘤胃上皮细胞吸收的短链脂肪酸所提供的能量约占反刍动物生命活动所需能量的 70%。因此,瘤胃上皮细胞的发育对反刍动物生理功能起重要调节作用^[2]。

近年来,关于对瘤胃上皮细胞机理的研究和应用主要集中在营养学和病理学方面。早在 1980 年就有关于反刍动物瘤胃上皮细胞体外培养技术的报道^[3]。Gálfi 等^[3]通过胰蛋白酶消化法从瘤胃组织成功获得瘤胃上皮细胞。目前已有体外培养瘤胃上皮细胞的技术但所获得的瘤胃上皮细胞存在不能稳定传代的问题^[4-6]。Inooka 等^[7]发现利用胰酶消化 2 h 之后,上皮细胞和成纤维细胞出现了分离现象,因此可用胰酶消化法分离培养瘤胃上皮细胞。Baldwin 和 Jesse^[8]利用胰酶消化法,建立了一种新的分离方法,这种分离方法可以在短时间内培养和获得大量细胞。

目前,大部分研究者对反刍动物瘤胃上皮细胞的培养,多是从牛和绵羊的瘤胃组织上获得,而且目前瘤胃上皮细胞培养技术在其他反刍动物上的应用还比较少见^[9]。更为重要的是培养的瘤胃上皮细胞仅仅只能有限的传代,之后细胞出现衰老和凋亡。因此,本研究拟利用 0.25%胰蛋白酶分离消化方法,以期获得纯化的瘤胃上皮细胞,为奶牛瘤胃上皮细胞的永生研究奠定细胞基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

DMEM/F12 完全培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(trypsin-EDTA)、PBS、胰岛素-转铁蛋白-硒-乙醇胺溶液(Gibco 公司);100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 两性霉素 B、4 mmol/L L-谷氨酰胺溶液

(Sigma 公司);15 ng/mL 表皮生长因子(EGF)(Peprotech 公司);细胞衰老 β -半乳糖苷酶检测试剂盒(碧云天公司);CCK-8(Dojindo 公司);秋水仙素(索莱宝公司);细胞角蛋白 18 单克隆抗体、羊抗鼠荧光二抗(Santa cruz 公司)。

1.2 奶牛瘤胃上皮细胞分离

在扬州大学奶牛屠宰场进行瘤胃的采集,剪取部分瘤胃组织并清除瘤胃中的内容物,用 PBS(含 500 U/mL 青霉素、500 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 两性霉素 B)反复清洗瘤胃组织,然后放入含有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中立即带回实验室;取瘤胃上皮组织块,用 PBS 溶液清洗 3 次并且使用无菌剪刀剪碎,PBS 溶液清洗数次至上清液透澈,离心除上清液;再加入 0.25%胰酶消化液 10 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡消化 30 min,先用 1 mm 的滤网过滤,弃滤液;后将瘤胃组织移至 50 mL 离心管中,再加入 0.25%胰酶消化液 10 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 气浴振荡消化 15 min,消化 6 次,前 3 次弃去滤液,后 3 次收集消化液并且用完全培养基终止消化,250 g 离心 5 min,弃上清;最后用完全培养基悬浮细胞并接种培养皿中。

1.3 奶牛瘤胃上皮细胞纯化和传代培养

借助显微镜观察,将标记瘤胃上皮细胞集落,用细胞刮刀刮除成纤维细胞后,再用 PBS 清洗 3 次。后用胰酶消化培养皿中细胞。观察成纤维细胞集落发亮立即用完全培养基终止消化,弃液体,再用 PBS 清洗数次直至没有细胞悬浮为止。再用完全培养基进行培养,其间更换几次培养液,以获得纯化的瘤胃上皮细胞。纯化的奶牛瘤胃上皮细胞保存在扬州大学动物培养物保藏应用研究所。

1.4 奶牛瘤胃上皮细胞生长活性检测

取第 2 代奶牛瘤胃上皮细胞,接入 96 孔板中,接种的细胞数目约为 2×10^3 个。24 h 之后,取 5 个孔,每个孔加入 20 μL 的 CCK8 溶液,然后再放入培养箱中继续培养 1.5 h 左右,这时将 96 孔板放入酶标仪中,450 nm 吸光度(OD)值,连续测 7 d,并绘制生长曲线图。

1.5 奶牛瘤胃上皮细胞免疫荧光鉴定

弃去细胞培养液,并且在 8 孔腔室玻片中接种 1×10^4 个/ cm^2 左右密度的该细胞。至细胞密度达到腔室面积的 80%左右时,此时再用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次。加入 4%多聚甲醛,按照每孔 500 μL 加入腔室内,固定 30 min,然后用 PBS 清洗细胞

3次,3%鸡血清封闭液封闭,每孔加400 μL ,放入4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,然后去除封闭液。加鼠源细胞角蛋白18一抗后,放入4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,孵育1 h后,用PBS清洗3次,再向每个孔中加200 μL 绿色荧光羊抗鼠二抗,室温避光条件下,再孵育1 h。同上清洗3次,再向每个孔中加入200 μL 二脒基苯基吡啶(DAPI)染色液,室温避光7 min后,用PBS清洗3次后,再用蒸馏水洗1次。最后用荧光显微镜进行免疫荧光拍摄。

1.6 奶牛瘤胃上皮细胞核型分析

在培养的第2代奶牛瘤胃上皮细胞中添加秋水仙素,并且使其浓度达到0.1~0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,再放入37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养3~4 h之后,用胰蛋白酶消化,将分离的细胞全部转移到15 mL离心管中,250g,4 $^{\circ}\text{C}$,离心3 min,收集细胞。将0.075 mol/L氯化钾溶液预热至37 $^{\circ}\text{C}$,吸去上清液加入7 mL氯化钾溶液,吹打均匀,再放入37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育17 min。再向管中加入1 mL现配的固定液,混匀。250g离心10 min后,弃上清。再加入7 mL固定液,混匀。置于室温条件下,静置30 min。同上操作,弃上清后再加入0.5 mL固定液,混匀。用吸管在倾斜45 $^{\circ}$ 的预冷载玻片上迅速滴加2~3滴细胞悬液,并用洗耳球轻轻吹散均匀,然后使其在室温条件下干燥。之后用吉姆萨(Giemsa)工作液染色,15 min后用水清洗,待其晾干镜检。

1.7 奶牛瘤胃上皮细胞衰老分析

取第3代的奶牛瘤胃上皮细胞,弃去培养基,再用PBS清洗1次。向细胞中添加1 mL的 β -半乳糖苷酶染色固定液,在室温条件下固定15 min。之后弃去固定液,使用PBS清洗细胞3次,每次3 min。最后1次清洗完并向其中加入1 mL染色工作液。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜处理,再用保鲜膜封住,防止蒸发。最后在显微镜下观察。

1.8 数据分析

数据结果用SPSS 16.0统计分析软件中的 t 检验单因素方差分析(ANOVA)进行分析,结果表示用LSD法, $P<0.05$ 表示显著性差异, $P<0.01$ 表示极显著差异。

2 结果与分析

2.1 奶牛瘤胃上皮细胞的分离结果

适当细胞密度下培养的奶牛瘤胃上皮细胞经培

养48 h后,在光学显微镜下可观测到细胞贴壁现象,大多呈扁平多角型,形态充盈清晰(图1)。进入对数期后,细胞形态呈岛屿状。7~9 d时,各细胞相互连接,呈铺路石样生长,该形态是典型的上皮形态(图2)。

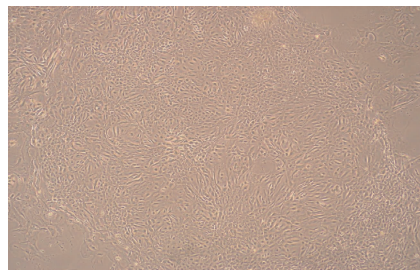


图1 48 h后奶牛瘤胃上皮细胞出现贴壁现象($\times 40$)

Fig. 1 Bovine rumen epithelial cells adherence appeared after 48 h ($\times 40$)

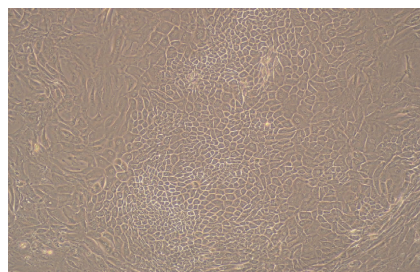


图2 奶牛瘤胃上皮细胞呈“岛屿状”形态($\times 100$)

Fig. 2 Bovine rumen epithelial cells appeared “Island-shaped” type ($\times 100$)

2.2 奶牛瘤胃上皮细胞生长活性检测结果

培养1~4 d奶牛瘤胃上皮细胞生长较为缓慢,培养至4~6 d奶牛瘤胃上皮细胞处于对数生长期,增殖较快。培养6~7 d细胞增殖缓慢,达到平台期(图3)。

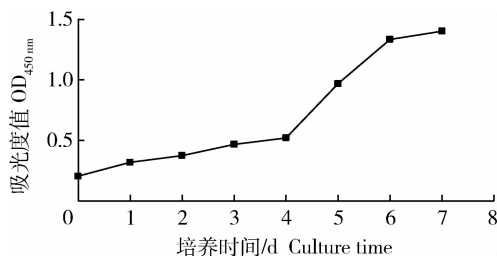


图3 奶牛瘤胃上皮细胞生长曲线

Fig. 3 Growth curve of bovine rumen epithelial cells

2.3 奶牛瘤胃上皮细胞角蛋白 18 的鉴定

细胞角蛋白 18 是上皮细胞中细胞骨架的组成蛋白之一。通过免疫荧光鉴定观察奶牛瘤胃上皮细胞阳性表达细胞角蛋白 18, 被检测的细胞周围都发出绿色荧光, 可证明该细胞阳性染色后, 可正常表达细胞角蛋白 18, 证实所分离的细胞为奶牛瘤胃上皮细胞(图 4)。

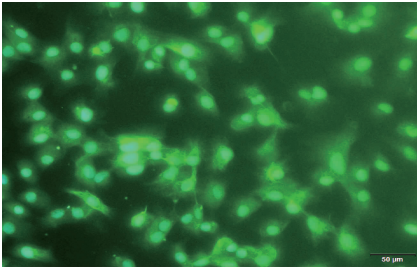


图 4 奶牛瘤胃上皮细胞角蛋白 18 免疫荧光鉴定(标尺=50 μm)

Fig. 4 Identification of bovine rumen epithelial cells by cytokeratin 18 immunofluorescence (Scale bar=50 μm)

2.4 奶牛瘤胃上皮细胞核型分析

将培养至第 5 代的奶牛瘤胃上皮细胞进行染色体核型分析(图 5)。培养至第 5 代的奶牛瘤胃上皮细胞染色体数是 60 条, 具有哺乳动物细胞的二倍体核型。试验结果证明培养至第 5 代的奶牛瘤胃上皮细胞仍然保持着生物学功能, 细胞没有发生变异。

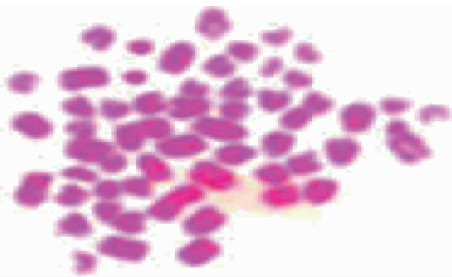


图 5 奶牛瘤胃上皮细胞核型分析(×60)

Fig. 5 Karyotype analysis of bovine rumen epithelial cells (×60)

2.5 奶牛瘤胃上皮细胞衰老分析

本试验采用细胞衰老 β-半乳糖苷酶染色试剂盒来对奶牛瘤胃上皮细胞进行衰老分析(图 6)。第 5 代的细胞体积变大和变宽, 而且在衰老状态下特异性 β-半乳糖苷酶催化下生成深蓝色产物, 结果显示

第 5 代的奶牛瘤胃上皮细胞出现衰老和凋亡且细胞停止分裂。

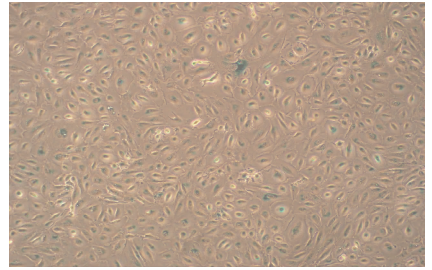


图 6 奶牛瘤胃上皮细胞衰老分析(×100)

Fig. 6 Analysis of bovine rumen epithelial cell senescence (×100)

3 讨论

3.1 原代奶牛瘤胃上皮细胞的分离与培养

本试验利用胰蛋白酶消化瘤胃上皮组织, 能获得增殖较好的奶牛瘤胃上皮细胞。国内外在体外获得细胞主要通过组织块和酶消化法^[10-12], 但是用胰蛋白酶消化法会损坏细胞膜表面的部分受体、配体和转运蛋白。在细胞信号转导和营养物质的转运过程中, 细胞膜上的部分跨膜受体蛋白至关重要。一旦遭到破坏, 该过程将会受阻, 从而导致细胞无法的发挥生物学功能。本试验利用正常消化细胞 0.25% 的胰蛋白酶多次消化瘤胃上皮组织, 能够减少对瘤胃上皮细胞膜的破坏。在分离培养瘤胃上皮细胞中最重要的是避免奶牛瘤胃组织被污染, 由于瘤胃液中含有大量且不同种类微生物, 包括细菌、真菌、原虫和厌氧菌等微生物, 因此, 避免微生物污染细胞对于成功培养奶牛瘤胃上皮细胞至关重要。本试验中加入了青霉素、链霉素和两性霉素 B, 青霉素和链霉素能够有效杀死细菌污染, 两性霉素 B 能够有效防止真菌的污染。在利用酶消化法消化瘤胃组织过程中, 消化时间对于细胞活力至关重要: 一旦酶消化时间过长, 在接种细胞过夜或者 24 h 之后, 由于长时间胰酶消化破坏了细胞膜表面的钙粘蛋白和层黏蛋白, 使细胞无法与培养皿发生接触, 导致大多数细胞不能够贴壁, 最终死亡。因此, 本研究中利用低浓度的胰酶消化瘤胃上皮组织且每次间隔 15 min 收集细胞 1 次, 能够很好地促进瘤胃上皮细胞贴壁和生长。结果表明利用 0.25% 胰酶和每次间隔 15 min 消化能够获得增殖稳定的奶牛瘤胃上皮细胞。

3.2 奶牛瘤胃上皮细胞的纯化

利用组织块和酶消化法培养细胞都不能避免成纤维细胞混杂,因此纯化奶牛瘤胃上皮细胞是关键。目前,相差贴壁法、相差消化法和单克隆法是最普遍的纯化细胞的方法。本研究利用逐步刮除法来纯化原代奶牛瘤胃上皮细胞。首先,在显微镜下确定视野中部分上皮细胞的位置,再将其余位置的杂细胞刮除,然后用DPBS清洗3次,进而去除杂细胞。若镜检时发现仍有其他细胞生长,为纯化奶牛瘤胃上皮细胞,本试验则利用上皮细胞的贴壁速率比成纤维细胞贴壁慢^[13]的原理,采用相差消化法来纯化:将培养瓶放入培养箱中30 min,大部分成纤维细胞贴壁,而上皮细胞此时没有贴壁,这时再将培养基转至另一培养瓶中,此时培养瓶里大部分都是上皮细胞。由于原代细胞会出现衰老,一般无法通过有限稀释法来单克隆瘤胃上皮细胞^[13],本研究通过逐步刮除法能够获得较纯的奶牛瘤胃上皮细胞,可为奶牛瘤胃上皮细胞的永生生化研究奠定基础。

3.3 奶牛瘤胃上皮细胞的生长曲线的测定

为了调查原代奶牛瘤胃上皮细胞的增殖特征,利用CCK-8来研究原代奶牛瘤胃上皮细胞的增殖情况。结果表明原代奶牛瘤胃上皮细胞增殖7 d左右可以完成细胞的增殖过程。然而,培养至第5代的瘤胃上皮细胞会进入衰老期和死亡期。进入衰老期后,细胞的生长受到抑制,其形态,体积等都会发生显著变化。衰老期之后,细胞进入死亡期,出现凋亡现象,从培养皿底部脱落。原代的奶牛瘤胃上皮细胞能够传至5代之后,无法继续生长。为了解决原代瘤胃上皮细胞衰老问题,已有研究结果发现一些病毒基因会使原代细胞永生生化并拥有无限增殖的能力^[14-19]。本研究中原代奶牛瘤胃上皮细胞没有导入病毒基因,可以传至5代,因此,后续研究应关注如何培养永生生化奶牛瘤胃上皮细胞。

3.4 奶牛瘤胃上皮细胞角蛋白18的鉴定

细胞角蛋白是上皮细胞内细胞骨架蛋白,具有多个表型。本研究通过免疫荧光来鉴定上皮细胞表面特异性抗原细胞角蛋白18。由于细胞角蛋白18是上皮细胞表面特有的标志蛋白,因此,可被用来鉴定分离的细胞是否为上皮细胞。在体外分离的细胞主要是污染的成纤维细胞,波形蛋白是被认为是成纤维细胞中的特异性蛋白,同时,也是肌上皮细胞的特异性抗原^[20]。本研究结果表明原代奶牛瘤胃上皮细胞在荧光显微镜下能够发出绿色荧光,这与已

有研究结果一致^[21],表明分离的细胞是来自于瘤胃上皮细胞。也有研究利用该方法来对仔猪小肠黏膜上皮细胞^[22]和肾小管上皮细胞^[23]进行鉴定。

3.5 奶牛瘤胃上皮细胞核型分析

细胞在传代的过程中会丢失染色体或者增加染色体,从而使细胞成为单倍体和多倍体,对细胞的生理功能产生破坏作用,可能会使体外的瘤胃上皮细胞无法发挥在体内的正常功能。因此,染色体核型的鉴定是必不可少关键步骤。如果位于转录区染色体丢失,会阻碍细胞的活性功能,使抑癌基因的表达发生变化^[24-26],从而改变将影响瘤胃上皮细胞的营养吸收功能。细胞的功能基因若不能被正常表达,细胞将不能用于在体外模拟体内瘤胃上皮细胞的生理功能。本研究中体外培养的细胞染色体数目仍是60条,是典型的二倍体核型,具有较为稳定的细胞生物学功能。

3.6 原代奶牛瘤胃上皮细胞衰老分析

奶牛瘤胃上皮细胞是增殖能力良好的分化细胞,但是体外增殖具有局限性,增殖能力一般^[13]。细胞衰老一般伴随有细胞分裂停止、细胞内色素增加、新陈代谢较为缓慢、细胞质增大以及细胞内酶的活性显著降低的特征。本研究发现衰老细胞能够表达衰老标志性 β -半乳糖苷酶。Dimri等^[27]在进行细胞培养时发现在衰老细胞上 β -半乳糖苷酶的上调表达。不同类型的衰老细胞均能表达 β -半乳糖苷酶^[28]。因此, β -半乳糖苷酶表达是细胞衰老特有的生物标志。在pH在6.0时,第5代的奶牛瘤胃上皮细胞能够稳定表达 β -半乳糖苷酶。

4 结论

本研究通过0.25%胰蛋白酶消化奶牛瘤胃上皮组织,能够在体外分离获得具有稳定染色体功能的奶牛瘤胃上皮细胞,为体外研究奶牛瘤胃上皮细胞的生理功能和永生生化奶牛瘤胃上皮细胞奠定基础。然而,本试验中奶牛瘤胃上皮细胞传至第5代后发生细胞衰老,有待进一步研究。

参考文献 References

- [1] Gillis R C, Klotz J L, Baldwin R L, Heitmann R N. Evaluation of primary rumen epithelial cell incubation techniques in sheep [J]. *Small Ruminant Research*, 2002, 45(3): 291-300
- [2] 沈赞明. 日粮营养对动物生长和生理功能的调节; 反刍动物瘤

- 胃上皮研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(S1): 34-35
- Shen M Z. Effects of diet nutrition on animal growth and regulation of physiological function: Research progress on rumen epithelium of ruminants [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2006, 38(S1): 34-35 (in Chinese)
- [3] Gálfi P, Neogrády S, Kutas F. Culture of epithelial cells from bovine ruminal mucosa [J]. *Veterinary Research Communications*, 1980, 4(1): 295-300
- [4] 沈赞明, 陈杰, 陈伟华. 五肽胃泌素对体外原代培养牛瘤胃上皮细胞 DNA 合成的影响[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(2): 63-66
- Shen M Z, Chen J, Chen W H. Effect of pentagastrin on rumen epithelial DNA synthesis *in vitro* [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2003, 26(2): 63-66 (in Chinese)
- [5] 汪水平, 王文娟, 谭支良. 离体瘤胃上皮细胞在瘤胃代谢中的研究进展[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(2): 1-4
- Wang S P, Wang W J, Tan Z L. Advance of isolated ruminal epithelial cells in the study of rumen metabolism [J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2006, 27(2): 1-4 (in Chinese)
- [6] 范燕茹, 王佩, 金鑫, 王冠玉, 邱凯, 王秀芳, 苏日古格, 余兴邦, 杨银凤. 中国驯鹿瘤胃上皮细胞的体外分离培养[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, 6(11): 8-10
- Fan Y R, Wang P, Jin X, Wang G Y, Yue K, Wang X F, Suriguge, Yu X B, Yang Y F. The *in vitro* isolation and culture of rumen epithelial cells in Chinese reindeer [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2014, 6(11): 8-10 (in Chinese)
- [7] Inooka S, Ohwada S, Tamate H. Cell cultivation of bovine rumen mucosa tissues [J]. *Canadian Journal of Animal Science*, 1984, 64(5): 110-111
- [8] Baldwin R L VI, Jesse B W. Technical note concerning the isolation and characterization of sheep rumen epithelial cells [J]. *Journal of Animal Science*, 1991, 69(9): 3603-3609
- [9] Gálfi P, Gabel G, Martens H. Influences of extracellular matrix components on the growth and differentiation of ruminal epithelial cells in primary culture [J]. *Research in Veterinary Science*, 1993, 54(1): 102-109
- [10] Wang M Z, Xu B L, Wang H R, Bu D P, Wang J Q, Looor J. Effects of arginine concentration on the *in vitro* expression of casein and mTOR pathway related genes in mammary epithelial cells from dairy cattle [J]. *The Public Library of Science One*, 2014, 9(5): 95985
- [11] 李文清, 王加启, 南雪梅. 奶牛乳腺上皮细胞的不同培养方法比较及激素和细胞因子对 β -酪蛋白 mRNA 表达的诱导 [J]. 动物营养学报, 2014, 26(9): 2607-2614
- Li W Q, Wang J Q, Nan X M. Comparison on culture methods of bovine mammary epithelial cells and induction of hormones and cytokines on β -casein mRNA expression [J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26(9): 2607-2614 (in Chinese)
- [12] Kaeffer B. Mammalian intestinal epithelial cells in primary culture; A mini-review [J]. *In Vitro Cellular and Developmental Biology: Animal*, 2002, 38(3): 123-134
- [13] 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 [J]. 动物营养学报, 2015, 27(8): 2544-2550
- Zhan K, Gong X X, Zuo X Q, Chen Y Y, Zhan J S, Zhao G Q. Culture and identification of the bovine mammary epithelial cell line [J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(8): 2544-2550 (in Chinese)
- [14] Balducci L, Blasi A, Saldarelli M, Soleti A, Pessina A, Bonomi A, Coccè V, Dossena D, Tosetti V, Ceserani V, Navone S E, Falchetti M L, Parati E A, Alessandri G. Immortalization of human adipose-derived stromal cells: Production of cell lines with high growth rate, mesenchymal marker expression and capability to secrete high levels of angiogenic factors [J]. *Stem Cell Research and Therapy*, 2014, 5(3): 63
- [15] Zhao Y G, Li Y, Wang L, Yang H, Wang Q T, Qi H Y, Li S D, Zhou P, Liang P, Wang Q W, Li X W. microRNA response elements-regulated TRAIL expression shows specific survival-suppressing activity on bladder cancer [J]. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 2013, 32(1): 10
- [16] Tsao S W, Wang X H, Liu Y, Liu Y, Cheung Y C, Feng H C, Zheng Z, Wong N, Yuen P W, Lo A K, Wong Y C, Huang D P. Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16 E6/E7 viral oncogenes [J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research*, 2002, 1590(1): 150-158
- [17] Kim R H, Kang M K, Shin K H, Oo Z M, Han T, Baluda M A, Park N H. Bmi-1 cooperates with human papillomavirus type 16 E6 to immortalize normal human oral keratinocytes [J]. *Experimental Cell Research*, 2007, 313(3): 462-472
- [18] Karantzis-Wadsworth V, White E. Mouse mammary epithelial cell model to identify molecular mechanisms regulating breast cancer progression [J]. *Methods in Enzymology*, 2008, 446: 61-76
- [19] Wong S Y, Seol A D, So P L, Ermilov A N, Bichakjian C K, Jr, E H E, Dlugosz A A, Reiter J F. Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis [J]. *Nature Medicine*, 2009, 15(9): 1055-1061
- [20] Ehmman U K, DeVries J T, Chen M S, Chen M S C, Adamos A A, Guzman R C, Omary M B, Adamos A A, Guzman RC. An *in vitro* model of epithelial cell growth stimulation in the rodent mammary gland [J]. *Cell Proliferation*, 2003, 36(4): 177-190
- [21] Pantschenko A G, Barber M R, Woodcock-Mitchell J,

- Bushmich S L, Yang T J. Establishment and characterization of a caprine mammary myoepithelial cell line [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2000, 36 (6): 351-356
- [22] 陈杰, 刘红林, 姜志华, 吴彦宁. 二花脸猪 FSHR 座位 PCR-SSCP 标记与产活仔数的关系[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(3): 53-56
- Chen J, Liu H L, Jiang Z H, Y L Wu. Relationship between PCR-SSCP at FSHR locus and litter size in Erhualian pigs[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, 25(3): 53-56 (in Chinese)
- [23] 宋美玲, 马向明, 王建民. 波尔山羊 FSHR5 端序列的 SNP 多态性及超排效果分析[J]. 家畜生态学报, 2006, 27(4): 25-28
- Song M L, Ma X M, Wang J M. Single nucleotide polymorphism in goat FSHR gene and its association with superovulation[J]. *Acta Ecologiae Animalis Domastici*, 2006, 27(4): 25-28 (in Chinese)
- [24] Huang D P, Lo K W, Choi P H K, Ng A Y T, Tsao S Y, Yiu G K C, Lee J C K. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1991, 54(1): 91-99
- [25] Deng L W, Jing N, Tan G L, Zhou M, Zhan F H, Xie Y, Cao L, Li G Y. A common region of allelic loss on chromosome region 3p 25.3-26.3 in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Genes Chromosomes and Cancer*, 1998, 23(1): 21-25
- [26] Chan A S C, To K F, Lo K W, Mak K F, Pak W, Chiu B, Gary M K, Tse G M, Ding M, Li X H, Lee J C K, Huang D P. High frequency of chromosome 3p deletion in histologically normal nasopharyngeal epithelia from southern Chinese [J]. *Cancer Research*, 2000, 60(19): 5365-5370
- [27] Dimri G P, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano E E, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, 92(20): 9363-9367
- [28] Pendergrass W R, Lane M A, Bodkin N L, Hansen B C, Ingram D K, Roth G S, Yi L, Bin H, Wolf N S. Cellular proliferation potential during aging and caloric restriction in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1999, 180(1): 123-130

责任编辑: 杨爱东