

## 山羊小肠上皮细胞分离培养与鉴定

李小芬<sup>1</sup> 詹康<sup>2</sup> 张响英<sup>1</sup> 陶勇<sup>1</sup> 杨晓志<sup>1</sup> 顾文婕<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏 泰州 225300;

2. 扬州大学 动物科学与技术学院,江苏 扬州 225009)

**摘要** 为研究山羊小肠上皮细胞营养吸收调控及其与肠道微生物之间的关系,提供原代细胞培养模型,采用组织块接种来获得山羊小肠上皮细胞,利用有限稀释法来克隆山羊小肠上皮细胞,并通过细胞形态学以及细胞角蛋白18、波形蛋白、肌间线蛋白和细胞生长曲线来鉴定山羊小肠上皮细胞。结果表明:1)采用组织块接种能够分离纯化得到山羊小肠上皮细胞并稳定传至大约10代;2)RT-PCR检测发现山羊小肠上皮细胞不能够表达波形蛋白和肌间线蛋白;3)在正置显微镜下观察到山羊小肠上皮细胞能够产生细胞角蛋白18绿色荧光。研究发现,培养至第8代的山羊小肠上皮细胞仍然保持着上皮细胞的特征,至10代山羊小肠上皮细胞质变大,细胞几乎无法增殖,细胞开始凋亡。综上所述,采用组织块接种能够获得山羊小肠上皮细胞并正常传至第10代,可为研究山羊小肠上皮细胞营养物质吸收和调控机理提供细胞素材。

**关键词** 山羊;小肠上皮细胞;细胞角蛋白18;波形蛋白;肌间线蛋白;细胞模型

中图分类号 S827

文章编号 1007-4333(2017)10-0091-06

文献标志码 A

## Isolation culture and identification of goat intestinal epithelial cells

LI Xiaofen<sup>1</sup>, ZHAN Kang<sup>2</sup>, ZHANG Xiangying<sup>1</sup>, TAO yong<sup>1</sup>, YANG Xiaozhi<sup>1</sup>, GU Wenjie<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China;

2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** The aim of this study was to establish a primary goat intestinal epithelial cell culture model *in vitro* and investigate goat intestinal nutrient absorption, immune regulation and relationship between enteric microorganism and intestinal epithelial cells. Intestinal tissue pieces were used to obtain goat intestinal epithelial cells *in vitro*. The cells isolated were further separated and purified by single clone method. These cells isolated were then identified by cell morphology, cytokeratin 18 immunofluorescence, vimentin, desmin and cell proliferation curve. The results showed that goat intestinal epithelial cells was successfully cultured and passaged generations 10 by tissue adherent method; No expressions of vimentin and desmin genes in goat intestinal epithelial cells were detected using RT-PCR; Positive reaction of goat intestinal epithelial cells against cytokeratine 18 antigen, green fluorescent under fluorescence microscope was discovered. The eighth generation cells still displayed characteristics of epithelial cells. To the tenth goat intestinal epithelial cells cytoplasm became bigger and started to senesce. In conclusions, the cells isolated were successfully passaged generation 10 by using the tissue adherent method, which provided cell model *in vitro* for understanding the mechanisms of nutrient substance absorption and regulation in goat intestinal epithelial cells.

**Keywords** goat; intestinal epithelial cell; cytokeratin 18; vimentin; desmin; cell model

山羊小肠上皮细胞是山羊体内最重要的营养吸收和转运营养因子场所,对山羊肠道微生物调控以及作为肠道免疫屏障发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。国内外研

究分离山羊乳腺上皮细胞较多,并且已经建立了一些山羊乳腺上皮细胞系<sup>[3-4]</sup>。已有研究表明,利用机械整合的方法能够快速获得大量的细胞,但是,这种

收稿日期:2016-09-01

基金项目:江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A083)

第一作者:李小芬,副教授,主要从事畜禽研究,E-mail:16193698@qq.com

机械法将不可逆的破坏细胞膜表面受体,最终会影响小肠上皮细胞对营养物质的吸收和转运<sup>[6-7]</sup>。国外分离小肠上皮细胞主要采用酶消化法分离了小鼠等模式动物的小肠上皮细胞<sup>[5]</sup>。尽管,国内已有报道原代山羊小肠上皮细胞的培养方法,但是对分离培养的原代山羊小肠上皮细胞鉴定方面还存在不足。匡伟等<sup>[8]</sup>利用细胞角蛋白18鉴定山羊小肠上皮细胞,然而,在羊乳腺的肌上皮细胞也发现细胞角蛋白18<sup>[9]</sup>,因此,不能仅仅通过细胞角蛋白18验证分离细胞源于小肠上皮细胞。波形蛋白和肌间线蛋白是肌上皮细胞最重要的标志<sup>[10-11]</sup>。组织分离出的细胞含有上皮细胞、成纤维细胞和肌上皮细胞,这些细胞夹杂生长。因此,可通过这些细胞表面的不同标志蛋白来进一步鉴定和区分上皮细胞。本研究拟建立功能性的山羊小肠上皮细胞系并进行鉴定,旨在为山羊小肠上皮细胞的营养物质转运吸收、肠道免疫屏障和其与肠道微生物间关系的研究提供细胞模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

DMEM/F12培养基、胎牛血清、1×ITS(胰岛素-转铁蛋白-硒)、0.25%胰酶(Invitrogen,美国);青霉素、链霉素、两性霉素、L-谷氨酰胺溶液(Sigma,美国);20 ng/mL的EGF(表皮生长因子)(Peprotech,德国);cDNA试剂盒和qPCR PreMix试剂盒(Roche,德国);Mouse anti-bovine cytokeratin18 monoclonal antibody (Abcam,美国);FITC-anti-mouse secondary antibody(Santa cruz,美国)。

### 1.2 山羊小肠上皮细胞分离与培养

在泰州牧校对怀孕150 d的母山羊进行屠宰,采集未吃初乳胎山羊空肠,立即将山羊小肠组织块放入含有500 U/mL青霉素、500 μg/mL链霉素和12.5 μg/mL两性霉素B的培养基中。在细胞室的生物安全柜进行无菌操作,将山羊小肠组织用含有500 U/mL青霉素、500 μg/mL链霉素和12.5 μg/mL两性霉素B的PBS缓冲液清洗小肠组织数次。将小肠片段浸没在含有二硫苏糖醇的PBS中,37℃振荡孵育5 min。离心弃上清液,再用PBS缓冲液清洗小肠组织数次。将组织移至无菌烧杯中,用培养基冲洗小肠内部,直至培养基上清液清亮。然后,转移至100 mL小烧杯中,用小剪刀将小肠组织剪成细小的组织块,静置5 min,使小肠组织块沉

淀,弃上清液。加DMEM/F12完全培养基悬浮组织块,再转移至10 mL的离心管中,1 000 r/min离心2 min,弃上清。反复清洗组织块,直至上清液清亮。加入适量的DMEM/F12完全培养基悬浮组织块,将组织块分别接种于6孔板和培养瓶内,放入37℃的5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

### 1.3 山羊小肠上皮细胞纯化和克隆

在传代过程中,利用相差贴壁法来纯化山羊小肠上皮细胞。细胞密度生长至80%时,消化细胞并用培养基终止,将细胞转移至新的培养皿中培养30 min。之后,将含有未贴壁细胞的培养基转移至新的培养皿进一步培养。待山羊小肠上皮细胞生长密度达到50%,这时可以利用0.05%的胰酶消化所有细胞,使细胞彻底地从培养皿底部分离,通过计数,使细胞密度为40个/mL。取100 μL细胞悬液加入96孔板中单克隆山羊小肠上皮细胞。接种6块96孔板,培养3 d之后弃上清并观察96孔板细胞。丢弃仍有成纤维细胞生长的孔,保留只有山羊小肠上皮细胞的孔,继续培养20 d。

### 1.4 山羊小肠上皮细胞的增殖特性

当第5代山羊小肠上皮细胞生长密度达到80%,通过胰酶消化细胞,细胞计数,每孔接种 $5 \times 10^3$ 个细胞,每隔24 h计数。加500 μL的PBS清洗,弃上清。再加200 μL胰酶消化4 min,之后加200 μL完全培养基终止消化,吹打细胞,计数3个复孔的细胞数,算平均值。操作至第7天结束。

### 1.5 山羊小肠上皮细胞鉴定

将山羊小肠上皮细胞接种于6孔板,细胞密度达到80%,吸弃培养基,每孔加1 mL的Trizol裂解液并吹打细胞。按照Invitrogen说明进行总RNA的提取,通过1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定提取总RNA的完整性。cDNA反转录:1 μg总RNA、2.5 μmol/L anchored-oligo (dT)<sub>18</sub>引物、60 μmol/L随机引物、1×反转录酶缓冲液、1×反转录酶、20 U的RNA酶抑制剂和1 mmol/L dNTP;cDNA反应程序:55℃ 3 min;25℃ 10 min;85℃ 5 min。qPCR反应体系:80 ng的cDNA、上游和下游引物各1 μL、qPCR PreMix为10 μL,灭菌超纯水3 μL,总体积20 μL。qPCR反应程序:预变性95℃ 600 s;变性95℃ 10 s;60℃ 10 s;72℃ 10 s,重复45个循环。利用2%的琼脂糖凝胶电泳检测目的基因。实时荧光定量PCR引物序列和参数见表1。

表 1 实时定量 PCR 引物序列和参数  
Table 1 Sequences and parameters of primers for RT-PCR

基因 Gene	序列 Sequence	长度/bp Length	GenBank 登录号 GenBank accession no.
肌间线蛋白 Desmin	F:5'-GACCTTCTCTGCCCTCAACT-3' R:5'-GCTTTAGGAGGCAGTGAGGA-3'	213	XM_013972881
波形蛋白 Vimentin	F:5'-AGAACAAGATCCTGCTGGCT-3' R:5'-CTCTCGGCTTCTCTCTCTG-3'	223	XM_013968477.1

## 1.6 山羊小肠上皮细胞角蛋白 18 鉴定

将山羊小肠上皮细胞按  $1 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 接种于 4 孔 Chamber Slide 中,待细胞密度至 60% 时,PBS 清洗细胞 2 次。接下来,用 4% 的多聚甲醛固定细胞 30 min,再用 PBS 轻轻洗 3 次。用 3% 马血清室温封闭 30 min,弃血清。加鼠抗牛细胞角蛋白 18 一抗,4 °C 冰箱孵育过夜。PBS 清洗 3 次,加抗鼠绿色荧光二抗,室温避光孵育 30 min。PBS 洗 3 次,DAPI 染色 5 min。蒸馏水洗 1 次,立即观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 山羊小肠上皮细胞原代培养

山羊小肠组织块在 36 h 内即可贴壁(图 1)。培养至第 7 天,小肠组织周围开始生长出小肠上皮细胞,细胞增殖较快(图 2)。山羊小肠上皮细胞形态呈现多角形或卵圆形,呈铺路石状形态排列生长。进一步培养至第 10 天,小肠组织块周围生长大量的成纤维细胞(图 3)。一些山羊小肠上皮细胞开始衰老(图 4),一些山羊小肠上皮细胞增殖活力较强。本研究利用组织块培养小肠上皮细胞,对山羊小肠上皮细胞每隔 3 天进行传代,传至第 10 代,大部分山羊小肠上皮细胞开始衰老和凋亡,细胞增殖缓慢。

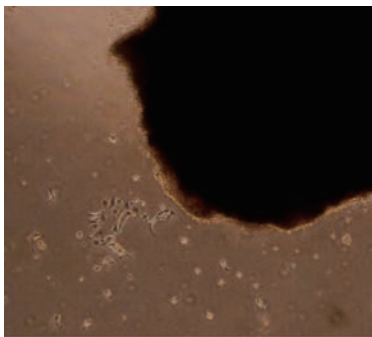


图 1 山羊小肠组织块接种 36 h 后发生贴壁(40×)

Fig. 1 Goat intestinal tissue are adherent after 36 h (40×)

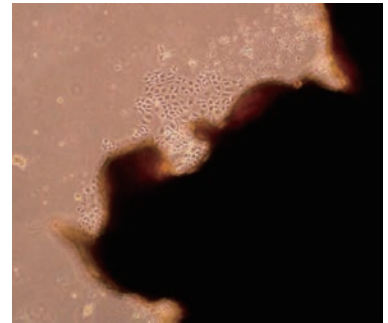


图 2 第 7 天后山羊小肠上皮细胞开始增殖(40×)

Fig. 2 Goat intestinal epithelial cells start proliferate after 7 days (40×)

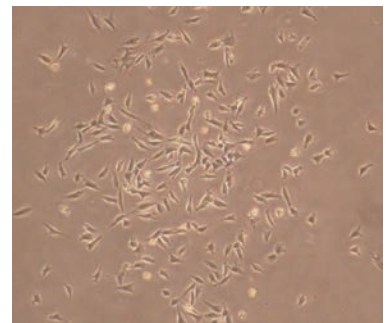


图 3 第 10 天成纤维细胞大量增殖(40×)

Fig. 3 Intestinal fibroblasts cells proliferate rapidly at day 10 (40×)

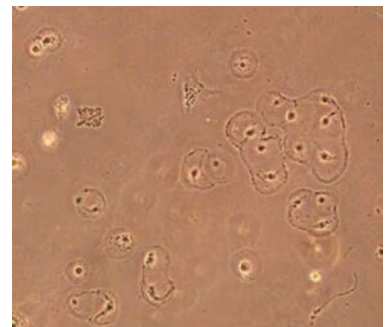


图 4 第 10 代山羊小肠上皮细胞开始衰老(40×)

Fig. 4 Detection of goat intestinal epithelial cell senescence after passages 10 (40×)

## 2.2 山羊小肠上皮细胞的纯化和克隆

由图5可知,通过有限稀释法能够成功克隆山羊小肠上皮细胞。克隆的过程中,96孔板内一些孔上皮细胞和成纤维细胞能够混合生长。随着培养时间增加,很多孔的山羊小肠上皮细胞开始凋亡,不能继续生长。也有一部分孔的上皮细胞继续增殖。细胞汇合至60%的密度,通过酶消化传代接种至6孔板,进一步扩大培养山羊小肠上皮细胞。

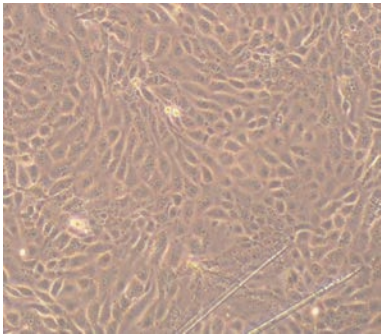


图5 山羊小肠上皮细胞扩大培养被克隆培养(100×)

Fig. 5 Clonal cell culture of goat intestinal epithelial cells (100×)

## 2.3 山羊小肠上皮细胞生长曲线的测定

培养24 h,山羊小肠上皮细胞并没有增长或出现细胞增殖下调;培养至1~4 d山羊小肠上皮细胞的增殖能力较强;培养至第4天,细胞增殖达到顶峰;4~7 d细胞出现无法增殖(图6)。

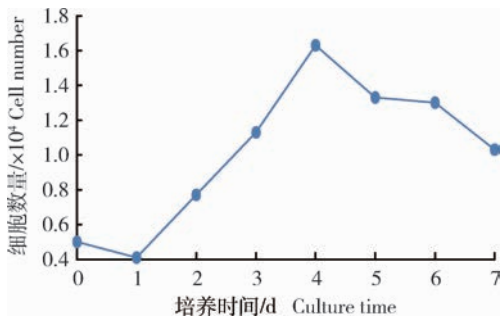


图6 山羊小肠上皮细胞生长曲线

Fig. 6 Growth curve of goat intestinal epithelial cells

## 2.4 山羊小肠上皮细胞角蛋白18的鉴定

由图7可知,通过显微镜荧光拍照视野下的所有细胞都发出绿色荧光,每个细胞表面都有细胞角蛋白18抗原表达,证明克隆的细胞为山羊小肠上皮细胞。

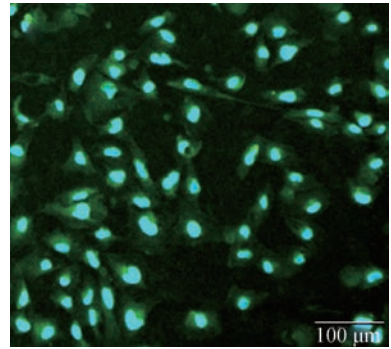
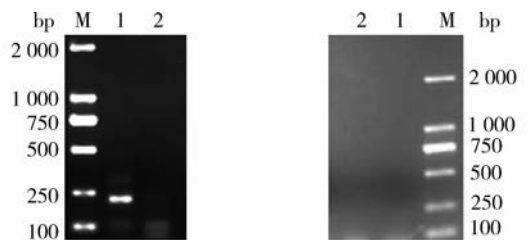


图7 山羊小肠上皮细胞角蛋白18免疫荧光

Fig. 7 Cytokeratin 18 immunofluorescence for goat intestinal epithelial cells

## 2.5 山羊小肠上皮细胞鉴定

本研究选择波形蛋白和肌间线蛋白来鉴定山羊小肠上皮细胞。波形蛋白是成纤维细胞重要的分化标志蛋白且波形蛋白是负责维持成纤维细胞骨架的完整性。肌间线蛋白是肌细胞重要的标志性蛋白,正常时可分布于平滑肌细胞、心肌细胞肌上皮细胞,然而,这种蛋白并不能够表达在上皮细胞中表达。由图8可知,山羊小肠成纤维细胞能够表达波形蛋白,然而,山羊小肠上皮细胞不能表达。同时,山羊小肠上皮细胞和成纤维细胞也不能够表达肌间线蛋白。结果表明,纯化的细胞并不是成纤维细胞和肌细胞,而是来自小肠上皮细胞。



(a) 波形蛋白 Vimentin protein (b) 肌间线蛋白 Desmin protein

M, 分子量标准; 1, 山羊小肠成纤维细胞; 2, 山羊小肠上皮细胞。  
M, molecular weight standard; 1, goat fibroblast cells; 2, goat intestinal epithelial cells.

图8 山羊小肠上皮细胞鉴定

Fig. 8 Identification of goat intestinal epithelial cells

## 3 讨论

### 3.1 山羊小肠上皮细胞分离纯化

目前国内外培养原代细胞主要通过酶消化和组织块贴壁法来获得原代细胞<sup>[12-13]</sup>。酶消化法获得原代细胞较快且获得上皮细胞比较纯,但是细胞活力

较弱,增殖缓慢。组织块贴壁法获得的原代细胞活力则较强。组织块在贴壁 3 d 之后,周围就会辐射出一些细胞。组织块培养原代细胞最大的缺点是含有成纤维细胞和一些肌细胞的污染。因此,纯化和克隆山羊小肠上皮细胞对于建立山羊小肠上皮细胞系至关重要。本研究尝试酶消化来培养山羊小肠上皮细胞,但未成功:酶消化小肠组织之后,获得大量的细胞,在接种培养皿之后,大量的细胞无法贴壁。这可能是由于细胞受到酶的消化之后,细胞膜表面一些受体或连接蛋白受到破坏,不能够与细胞底部发生贴壁。因此,在平皿底部铺一层胶原,可使细胞很好的贴壁。本试验也采用组织块贴壁法来获得山羊小肠上皮细胞,组织块贴壁 3 d 之后,能够生长出少量的上皮细胞。第 10 天之后,大量的小肠成纤维细胞从组织块周围辐射出来,小肠上皮细胞生长速度变慢,而成纤维细胞处于对数生长期,生长速度加快,大量的成纤维细胞包围着小肠上皮细胞生长,因此,接下来纯化小肠上皮细胞至关重要。本研究表明,利用组织块贴壁能够培养出活力较强的山羊小肠上皮细胞,可为获得山羊小肠上皮细胞提供基础。

### 3.2 山羊小肠上皮细胞生长曲线的测定

细胞增殖对细胞的生理功能具有重要作用。当原代细胞从组织块周围辐射出来之后,细胞增殖活力较强,细胞继续培养 10 代之后,一些上皮细胞开始衰老,细胞质明显变大。成纤维细胞增殖速率明显快于小肠上皮细胞,没有显示衰老的信号。因此,当山羊小肠上皮细胞和成纤维细胞夹杂生长至 10 代,成纤维细胞处于绝对优势生长。这可能是由于山羊小肠上皮细胞和成纤维细胞周期不同所引起的。原代上皮细胞培养至大约 5 代之后,细胞会经历 M0 期,这时细胞会停滞生长,但是也有一部分细胞会逃离 M0 期,继续增殖。接下来,细胞会进入 M1 期和 M2 期,这时大量的细胞无法增殖,对培养基内的一些生长因子无法反应,大量的上皮细胞开始凋亡,从平皿底部脱落<sup>[14]</sup>。一些致癌蛋白可使 pRb 的失活并可绕过 M1 期,细胞继续生长<sup>[14]</sup>。成纤维细胞周期与上皮细胞有着明显的不同,成纤维细胞并不会进入 M0 期,因此,成纤维细胞的增殖速率快于上皮细胞。但是,端粒的缩短会促使成纤维细胞进入 M0 期,随着细胞传代和端粒的进一步缩短,成纤维细胞最终进入细胞的危机期,仅仅很少的细胞由于端粒自身的稳定会使成纤维细胞自发的永生<sup>[15]</sup>。本研究所培养的山羊小肠上皮细胞未经

转化,符合细胞生理生长特性。

### 3.3 山羊小肠上皮细胞的鉴定

细胞角蛋白 18 对上皮细胞的骨架和形态保持具有重要的生理作用。细胞角蛋白 18 也是上皮细胞的特异性抗原,常用来鉴定上皮源细胞<sup>[16-17]</sup>。Schierack 等<sup>[6]</sup>利用波形蛋白和肌间线蛋白进一步鉴定猪小肠上皮细胞。本研究利用细胞角蛋白 18 来鉴定培养的细胞是否来自上皮源的细胞。细胞角蛋白 18 主要分布在上皮细胞的细胞膜表面,是上皮细胞的主要骨架蛋白。成纤维细和肌纤维细胞膜并不表达细胞角蛋白 18,因此,可以利用角蛋白 18 来鉴定山羊小肠上皮细胞。细胞角蛋白 18 也在山羊乳腺肌间上皮细胞被发现<sup>[9]</sup>,因此,本研究必须鉴定肌间线蛋白是否在山羊小肠上皮细胞中表达。国外研究利用波形蛋白来进行鉴定成纤维细胞<sup>[18]</sup>,这是由于波形蛋白是成纤维细胞重要标志性蛋白。本研究表明,在山羊小肠成纤维细胞中能够检测到波形蛋白的表达,但在铺路石形态的山羊小肠上皮细胞中并不能够检测到波形蛋白的表达,表明克隆的细胞不是来自于成纤维细胞。同时检测了肌间线蛋白的表达水平,在山羊小肠成纤维细胞和小肠上皮细胞中均不能检测到肌间线蛋白的表达,结果显示,克隆的细胞不是来自于肌细胞。综上所述,本研究表明,通过组织块能够培养出山羊小肠上皮细胞并通过单克隆法进一步纯化山羊小肠上皮细胞,为进一步研究山羊肠道营养吸收和免疫调控提供细胞素材。

## 4 结 论

本研究利用组织块细胞培养法成功培养了山羊小肠上皮细胞并通过相差贴壁法和 96 孔板进行纯化山羊小肠上皮细胞。山羊小肠上皮细胞能够传至第 10 代。克隆的细胞在显微镜下能够发出绿色荧光且不能表达波形蛋白和肌间线蛋白,进一步证明了本研究克隆的细胞是来自于山羊小肠上皮细胞,为山羊小肠上皮细胞的营养转运吸收、肠道免疫和微生物调控机制研究提供理想试验细胞模型。

## 参考文献 References

- [1] Boos A, Riner K, Hässig M, Liesegang A. Immunohistochemical demonstration of vitamin D receptor distribution in goat intestines[J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 186(2): 121-128

- [2] Liesegang A, Riner K, Boos A. Effects of gestation and lactation on vitamin D receptor amounts in goats and sheep [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2007, 33(2):190-202
- [3] Shi H, Shi H, Luo J, Wang W, Haile AB, Xu H, Li J. 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
- [4] Zhu J J, Luo J, Xu H F, Wang H, Looor J J. Short communication: Altered expression of specificity protein 1 impairs milk fat synthesis in goat mammary epithelial cells[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(7):5965
- [5] Iwamoto T, Yamada K, Shimizu M, Totsuka M. Establishment of intestinal epithelial cell lines from adult mouse small and large intestinal crypts [J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75(5):925-929
- [6] Schierack P, Nordhoff M, Pollmann M, Weyrauch K D, Amasheh S, Lodemann U, Jores J, Tachu B, Kleta S, Bliklager A, Tedin K, Wieler L H. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for *in vitro* studies of microbial pathogenesis in swine[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2006, 125(3):293-305
- [7] Petto C, Lesko S, Gäbel G, Böttner M, Wedel T, Kacza J, Pfannkuche H. Establishment and characterization of porcine colonic epithelial cells grown in primary culture [J]. *Cell Tissues Organs*, 2011, 194(6):457-468
- [8] 匡伟,王海霞,邵桃玉,赵国琦. 新生山羊小肠上皮细胞株的建立和鉴定[J]. 中国畜牧杂志, 2007, 43(19):11-14  
Kuang W, Wang H X, Shao T Y, Zhao G Q, Zhao G Q. Establishing and identification of neonate goat intestinal epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2007, 43(19):11-14 (in Chinese)
- [9] Li P, Wilde C J, Finch L M, Fernig D G, Rudland P S. Identification of cell types in the developing goat mammary gland[J]. *Histochemical Journal*, 1999, 31(6):379-393
- [10] Rusu D, Loret S, Peulen O, Mainil J, Dandriofosse G. Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures [J]. *BMC Cell Biology*, 2005, 6(12):42
- [11] Ehmann U K, Devries J T, Chen M S, Adamos A A, Guzman R C, Omary M B. An *in vitro* model of epithelial cell growth stimulation in the rodent mammary gland [J]. *Cell Proliferation*, 2003, 36(4):177-190
- [12] Wang M Z, Xu B L, Wang H R, Bu D P, Wang J Q, Looor J 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]. *PLOS One*, 2014, 9(5):e95985
- [13] 詹康,左晓昕,陈银银,贡笑笑,占今舜,赵国琦. 猪小肠上皮细胞分离培养与鉴定[J]. 动物营养学报, 2015, 27(5):1477-1484  
Zhan K, Zuo X X, Chen Y Y, Gong X X, Zhan J S, Zhao G Q. The isolation culture and identification of the porcine intestinal epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(5):1477-1484 (in Chinese)
- [14] Costa C, Santos M, Martínez-Fernández M, Lorz C, Lázaro S, Paramio J M. Deregulation of the pRb-E2F4 axis alters epidermal homeostasis and favors tumor development [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(46):75716-75728
- [15] Fridman A L, Tainsky M A. Critical pathways in cellular senescence and immortalization revealed by gene expression profiling[J]. *Oncogene*, 2008, 27(46):5975-5987
- [16] 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 X, Chen Y Y, Zhan J X, Zhao G Q. The culture and identification of the bovine mammary epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2015, 27(8):2544-2550 (in Chinese)
- [17] Zhan K, Lin M, Zhao Q M, Zhan J S, Zhao G Q. Biological characterization of bovine mammary epithelial cell lines immortalized by HPV16 E6/E7 and SV40T [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2016, 52(9):906-910
- [18] Miyazawa K, Hondo T, Kanaya T, Tanaka S, Takakura I, Itani W, Rose M T, Kitazawa H, Yamaguchi T, Aso H. Characterization of newly established bovine intestinal epithelial cell line[J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2010, 133(1):125-134

责任编辑:杨爱东