

奶牛乳腺上皮细胞的二维和三维培养及培养后酪蛋白基因的表达

王秀美¹ 侯先志^{1*} 高爱武² 考桂兰¹ 高 民³ 李大彪¹
兰儒冰¹ 张 楠¹ 张艳明¹ 黄清瑞¹

(1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018; 3. 内蒙古农牧业科学院, 呼和浩特 010010)

摘 要: 本试验研究了二维和三维培养对奶牛乳腺上皮细胞(BMEC)形态与 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α s1-酪蛋白基因表达的影响。试验采用内蒙古地区3头5岁泌乳期健康荷斯坦奶牛的乳腺组织,将BMEC经3代培养纯化后分别进行二维和三维培养,观察不同培养模式下细胞的生长形态,测定 β -酪蛋白、 κ -酪蛋白、 α s1-酪蛋白基因的表达量。结果表明:2种培养模式下的BMEC呈现不同的细胞形态,二维培养的BMEC呈典型铺路石样细胞形态,三维培养的BMEC则形成了类腺泡的聚集物和管腔结构。利用三维培养的BMEC的 α s1-酪蛋白基因的表达量显著地高于二维培养($P < 0.05$),三维培养的BMEC的 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白基因的表达量极显著地高于二维培养($P < 0.01$)。结果提示,三维培养的BMEC3种酪蛋白基因的表达量均高于二维培养,三维培养的BMEC在形态上呈现的特点与在体内更加接近。

关键词: 奶牛乳腺上皮细胞;二维培养;三维培养;酪蛋白

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2012)06-1157-08

奶牛的乳腺自出生4周后开始发育,逐渐形成管腔结构,最终在怀孕期间完成腺泡的分化,在各种激素的调节下才具有泌乳功能^[1]。奶牛乳腺上皮细胞(bovine mammary epithelial cell, BMEC)是乳腺腺泡的核心组成,能以血液中各种营养物质为原料,合成并分泌乳汁。因此乳腺上皮细胞是研究奶牛泌乳调控的有效生物模型。

起初研究者们利用二维培养的模式培养乳腺上皮细胞,通过二维培养细胞可以快速分裂,进而获得大量的均一的细胞,因此在定量分析、特征鉴定和标本复制等方面有许多优点,但却缺失了乳腺上皮细胞的许多组织学特征,即:细胞的极化形态、特殊的细胞间的相互作用及细胞和基质之间的相互作用。而乳腺上皮细胞极化结构的发育和

维持在乳腺上皮细胞功能的发挥中起着极其重要的作用^[2-4]。有研究表明传统的二维培养无法使细胞极化,经过几代的培养对生长因子和催乳素的响应缺失,也检测不到分化所产生的蛋白质,如乳清蛋白和 β -酪蛋白^[5]。在同时利用二维培养和三维培养研究信号通路的机制时却得到不一致的结果^[3,6-8],这使的研究者们越来越关注培养模式对细胞代谢功能的影响。虽然在医学领域细胞高密度重构的三维培养已广泛应用于癌症的研究^[9-12],但在国内外利用三维培养研究乳腺上皮细胞中营养物质调控乳蛋白合成机理的却较少,在国外利用三维培养进行乳蛋白合成及分泌调控的研究主要是以鼠的乳腺上皮细胞为模型,且主要研究基质及激素在乳腺上皮细胞分化和蛋白质

收稿日期:2011-12-28

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助;内蒙古自然科学基金项目“奶牛乳腺上皮细胞三维培养体系的建立及其对酪蛋白合成的影响”(2010MS0406);国家973项目“牛奶重要营养品质形成与调控机理研究”(2011CB100803)

作者简介:王秀美(1983—),女,内蒙古呼和浩特人,博士研究生,从事奶牛营养调控与分子营养学研究。E-mail: yl-2007136148@163.com

*** 通讯作者:**侯先志,教授,博士生导师,E-mail: houxz05@sina.com

合成中的调控作用^[13-16]。在国内奶牛乳腺上皮细胞的研究热点主要涉及氨基酸、肽、脂肪酸、激素等对乳腺上皮细胞泌乳的调控及奶牛异常代谢产物对奶牛乳腺上皮细胞的影响。但这些研究还是处于初步阶段,只是停留在利用传统的二维培养模式进行研究^[17-19],在国内尚未见利用三维培养模式进行乳腺上皮细胞相关机能研究的报道。基于此,本试验旨在比较研究乳腺上皮细胞在二维和三维培养系统中的细胞形态和酪蛋白基因表达量的异同,为针对不同的试验目的选择不同的培养模式提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 乳腺组织

乳腺组织取自 3 头健康的 5 岁泌乳荷斯坦奶牛。

1.1.2 试剂及仪器

细胞培养基础培养基为 DMEM/F12 (美国 Gibco 公司);根据试验需要,向其中添加胰岛素转铁蛋白 (ITS, 美国 Sigma 公司)、表皮生长因子 (EGF, 美国 Sigma 公司)、氢化可的松 (hydrocortisone, He, 美国 Sigma 公司)、催乳素 (prolactin, 美国 Sigma 公司)、标准胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司)和基质 (matrigel, 美国 Gibco 公司)。

二维培养所用的培养基为生长培养基和终止培养基,三维培养所用的培养基为贴壁培养基和分化培养基,培养基组成见表 1。

组织及细胞消化所用试剂为:Ⅱ型胶原酶、胰蛋白酶 (trypsin)、乙二胺四乙酸 (EDTA, 北京康倍斯科技有限公司)、磷酸盐缓冲液 (PBS, 西安百灵鸟有限公司)、双抗 (青霉素-链霉素) (美国 HyClone 公司)。使用时,将Ⅱ型胶原酶制成终浓度为 0.5% 的溶液。胰蛋白酶溶液和 EDTA 溶液浓度分别为 0.25% 和 0.02%。

表 1 培养基组成
Table 1 Composition of culture media mL

项目 Items	生长培养基 Proliferation medium	终止培养基 Termination medium	贴壁培养基 Attachment medium	分化培养基 Differentiation medium
DMEM/F12 基础培养基				
DMEM/F12 basal culture medium	865	900	950	950
胎牛血清 FBS	100	100	20	
表皮生长因子 EGF (1 μg/mL)	5			
胰岛素转铁蛋白硒钠 ITS (500 μg/mL)	10			10
氢化可的松 He (1 mg/mL)	10			10
双抗 Double resistant (10 000 U/mL)	10		10	10
基质 Matrigel			20	20

酪蛋白基因表达的测试试剂为:总 RNA 提取试剂盒 (RNAiso Plus, 日本 TaKaRa 公司)、反转录 PCR 试剂盒 (PrimeScript[®] RT Reagent Kit, 日本 TaKaRa 公司)、实时定量 PCR 试剂盒 (SYBR Premix DimerEraser[™], 日本 TaKaRa 公司)、细胞回收液 (美国 BD 公司)、氯仿、异丙醇、75% 无酶乙醇 (天津市登科化学试剂有限公司)等。

试验所用仪器为:倒置相差显微镜 (香港麦克迪公司)、CO₂ 培养箱 (香港力康公司)、超净工作台 (江苏苏净公司)、匀浆机 (Fastprep[®]-24, 美国 MP 公司)、实时定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)等。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计

本试验采用 3 头健康的 5 岁泌乳荷斯坦奶牛的乳腺细胞进行重复试验,每头牛的乳腺细胞分别进行二维和三维培养,每个培养模式每头牛设 2 个重复。

1.2.2 乳腺组织的取样

奶牛屠宰后立即选取乳腺组织,经 75% 酒精处理后,用灭菌的手术刀、手术剪和镊子于乳腺组织中上部取样。取样时,剪取约 50 g 腺泡丰富、较少导管和脂肪的乳腺组织,将其立即投入含 3 × 双

克隆抗体的灭菌 PBS 中冲洗,随后置于冰盒内迅速带回实验室,进行后续试验操作。

1.2.3 奶牛乳腺上皮细胞的原代培养

将带回的乳腺组织用 75% 酒精浸泡约 30 s,然后用 1 × 双抗的灭菌 PBS 清洗 3 次,用灭菌手术剪去除表面部分,取内部新鲜组织样品,剔除脂肪和结缔组织,然后剪为直径 1 ~ 2 mm 的微粒。将剪碎的乳腺组织用 1 × 双抗的灭菌 PBS 清洗 2 ~ 3 次,去除组织中牛奶等杂质,然后取适量剪碎的乳腺组织移入 10 mL 锥底刻度离心管中,加入 3 倍体积的 0.5% II 型胶原酶溶液,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和的培养箱中,消化处理 1 ~ 1.5 h,以使组织块消化为单细胞悬液。

消化好的组织样品用 100 目(孔径)的灭菌尼龙滤网过滤,收集细胞滤液于 10 mL 锥底刻度离心管中,用 1 × 双抗的灭菌 PBS 稀释至最大刻度处,于 128 × g 离心 8 min,弃去上清液,用生长培养基悬浮所得细胞沉淀,然后接种于 75 cm² 一次性细胞培养瓶中,于 37 °C、5% CO₂ 饱和的培养箱中进行培养,用倒置相差显微镜观察细胞生长情况。

1.2.4 奶牛乳腺上皮细胞的分离纯化

奶牛乳腺上皮细胞的分离纯化参照王秀美等^[20]的方法进行,本试验中二维和三维接种的细胞为经分离纯化的第 3 代奶牛乳腺上皮细胞。

1.2.5 奶牛乳腺上皮细胞的二维和三维培养

1.2.5.1 三维培养基质胶原的准备

将基质按说明书要求进行处理,然后用移液器将基质加入 6 孔细胞培养板内,每孔加入 1 mL,上述操作均于冰浴进行。然后将 6 孔板置于 37 °C 约 30 min 使胶凝固,在胶凝固期间进行乳腺上皮细胞悬液的制备,待胶凝固后接种细胞。

1.2.5.2 乳腺上皮细胞的准备

三维培养所用乳腺上皮细胞的准备:将 1.2.4 所述纯化的第 3 代奶牛乳腺上皮细胞用 PBS 制成单细胞悬液,然后进行细胞计数,将所需数量的细胞移至新的离心管内,于 128 × g 离心 8 min,弃去上清液。加入贴壁培养基对细胞进行稀释,制成 1×10^6 个/mL 的细胞悬液,备用。

二维培养所用乳腺上皮细胞的准备:将 1.2.4 所述纯化的第 3 代奶牛乳腺上皮细胞制成单细胞悬液,进行细胞计数,采用生长培养基对细胞进行

稀释,制成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,备用。

1.2.5.3 乳腺上皮细胞的接种

奶牛乳腺上皮细胞的三维培养参照 Debnath 等^[21]的方法进行。

将上述浓度为 1×10^6 个/mL 的细胞悬液接种于包被了基质的 6 孔板中,每孔加样量为 2 mL,接种 2 孔作为重复样品。然后将 6 孔板置于 37 °C、5% CO₂ 饱和的培养箱中进行培养,开始培养时为第 0 天,每 2 天换液 1 次,换液所用培养基为分化培养基,同时用倒置相差显微镜观察细胞生长状况,第 8 天结束培养。

奶牛乳腺上皮细胞的二维培养参照弗雷谢尼^[2]的方法进行。

取上述浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液 10 mL 接种于 75 cm² 的培养瓶内,然后置于 37 °C、5% CO₂ 饱和的培养箱中培养至细胞汇合 80% ~ 90% 时,进行酪蛋白基因表达量的测定。

1.2.6 奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白基因的表达量的测定

1.2.6.1 总 RNA 提取

将二维细胞从培养瓶中分离消化下来,经 PBS 清洗、离心,加入适量 RNAiso Plus,将细胞和裂解液混合物转移至 1.5 mL 离心管内,按照 RNAiso Plus 产品说明书提取总 RNA,提取的总 RNA 经紫外分光光度计和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定纯度和浓度后, -70 °C 储存备用。

三维培养的细胞待生长至第 8 天进行总 RNA 的提取,首先进行三维培养细胞的回收,回收方法参见细胞回收液的说明书。总 RNA 的提取及纯度鉴定与二维的方法相同。

1.2.6.2 反转录及实时定量 PCR

将二维、三维培养的细胞中提取的总 RNA 分别以相同的浓度进行反转录,反转录过程按照反转录 PCR 产品说明书进行操作,反应体系总体积为 25 μL: 5 × PrimeScript Buffer 5 μL, PrimeScriptTM RT Enzyme Mix 1.25 μL, Oligo dT Primer 1.25 μL, Random Primer 1.25 μL, 总 RNA 2.5 μL, RNase-free water 13.75 μL。反应条件设置为:37 °C 15 min,然后 85 °C 5 s。

根据 NCBI 中牛(bovine)的基因序列设计引物,交由上海英俊生物技术有限公司部合成。实时定量 PCR 引物序列见表 2。

表 2 实时定量 PCR 引物序列
Table 2 Sequences of primers for real-time PCR

项目 Items	GenBank 登录号 Accession No. in GenBank	引物序列 Primer sequences (5'—3')
β-酪蛋白 β-casein	CSN2 NM_181008	上游:TCTGCCTCTGCTCCAGTCTT 下游:AGGAGGGGGCATTCACTTT
κ-酪蛋白 κ-casein	CSN3 NM_174294	上游:CACCCACACCCACATTTATC 下游:GACCTGCGTTGTCTTCTTTG
αs1-酪蛋白 αs1-casein	CSN1S1 NM_181029	上游:CCTGTCTTGTGGCTGTTGCTC 下游:CATCTTCCTTTTGAATGTGCTT
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GAPDH	NM_001034034.1	上游:GTTTGTGATGGGCGTGAACC 下游:CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT

实时定量 PCR 反应按照实时定量 PCR 试剂盒说明书进行。20 μL 反应体系:SYBR Premix DimerEraser™ (2 ×) 10 μL、上游引物 (10 μmol/L) 0.6 μL、下游引物 (10 μmol/L) 0.6 μL、ROX Reference Dye II (50 ×) 0.4 μL、Template(<100 ng) 2 μL、灭菌蒸馏水 6.4 μL。扩增条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,共 45 个循环。扩增结束后自动分析融解曲线,确定 PCR 产物的特异性。将各基因的实时定量 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,进一步验证扩增片段的特异性和扩增片段长度。

1.3 数据统计与分析

实时定量 PCR 的数据统计参见 French 等^[22]的方法进行。数据用阈值循环(Ct)计算,表达量以 ΔCt 表示,公式如下:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$$

所得的 ΔCt 经 SPSS 10.0 进行 t 检验统计分析。

2 结 果

2.1 二维和三维培养的乳腺上皮细胞形态

经二维和三维培养的细胞用倒置相差显微镜 (100 ×) 进行观察,各培养体系细胞生长状态良好,其中二维培养的细胞边缘圆润,呈典型的上皮细胞铺路石样形态,细胞没有颗粒、空泡、平展、体积变大等不良状态 (图 1)。三维培养的奶牛乳腺上皮细胞与二维培养的呈现形态显著不同。三维培养的乳腺上皮细胞形成高密度的类腺泡聚集物 (图2)。不同类型的上皮细胞在三维培养不同时

间内逐渐形成各自的形态结构。管腔上皮细胞在第 6 天时显微镜下观察形成不完全清晰的管腔结构 (图 3),到第 7 天形成了完全清晰可见的管腔结构 (图 4),而腺上皮细胞的类腺泡结构在接种后第 2 天显微镜下便可观察到清晰的类腺泡结构 (图 2)。

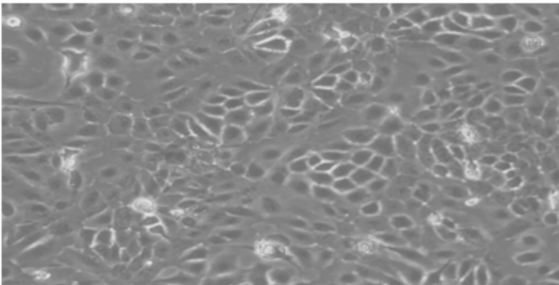


图 1 二维培养分离纯化后的奶牛乳腺上皮细胞
Fig.1 The purified bovine mammary epithelial cells cultured by two-dimensional cultivation

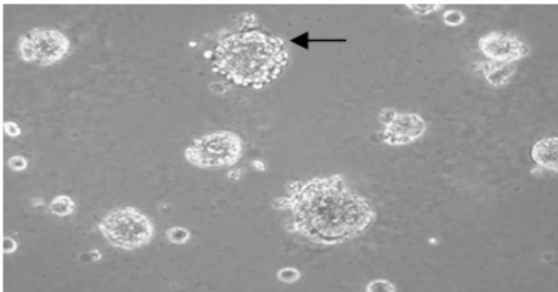


图 2 三维培养第 2 天的奶牛乳腺上皮细胞
Fig.2 Bovine mammary epithelial cells cultured by three-dimensional cultivation for 2 days

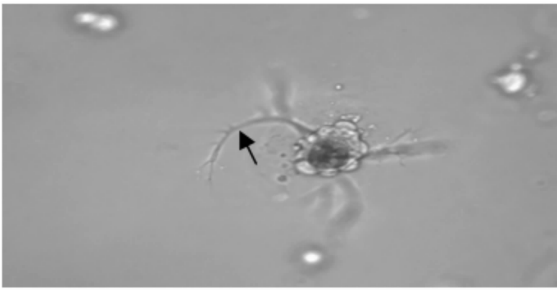


图3 三维培养第6天的奶牛乳腺上皮细胞
Fig.3 Bovine mammary epithelial cells cultured by three-dimensional cultivation for 6 days

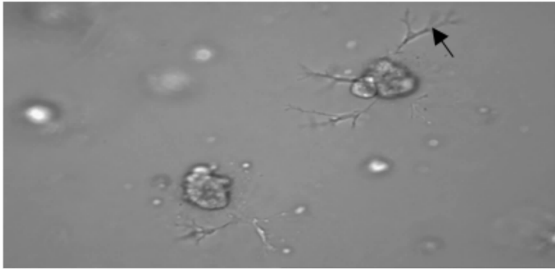


图4 三维培养第7天的奶牛乳腺上皮细胞
Fig.4 Bovine mammary epithelial cells cultured by three-dimensional cultivation for 7 days

2.2 二维和三维培养的奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白基因的表达量

由表3可见,利用三维培养的乳腺上皮细胞的αs1-酪蛋白的基因的表达量显著地高于二维培养($P < 0.05$)。三维培养的乳腺上皮细胞的β-酪蛋白和κ-酪蛋白基因的表达量均极显著地

高于二维培养($P < 0.01$)。

3 讨 论

3.1 二维和三维培养对奶牛乳腺上皮细胞形态的影响

二维和三维培养条件下,乳腺上皮细胞在形态上最显著的不同就是三维培养乳腺上皮细胞最终形成高密度的类腺泡聚集物(这种结构与相关文献报道的三维细胞培养结果相似^[3,21]),而二维培养的乳腺上皮细胞形成典型的铺路石样细胞形态,这是多数研究者达成的共识。但是在机体内的乳腺上皮细胞是由肌上皮细胞、管腔上皮细胞和腺上皮细胞所组成的。管腔上皮细胞最终形成管腔导管不具有分泌的功能,肌上皮细胞包裹着管腔上皮细胞,以隔离基底膜和管腔上皮细胞,而腺上皮细胞直接与基底膜相连接^[23-24]。这些细胞是不能独立存在而行使其功能的,三维培养条件下使得细胞在一个接近体内微环境的基质条件下,在一个三维空间内生长和分化,从而使细胞各自按照体内的功能形成特定的空间结构,本试验的结果(图3、图4)显示形成了类腺泡结构和管腔结构。本试验三维培养的乳腺上皮细胞更接近机体的组织特点。但二维培养条件下由于缺乏基质的作用,使得不同类型的上皮细胞最终形成均一的铺路石样形态。乳腺上皮细胞分别培养在二维和三维培养下形成不同的形态结构,形态与功能之间是密不可分的,这种形态的不同可能导致最终合成乳蛋白相关基因表达量的不同。

表3 二维和三维培养对奶牛乳腺上皮细胞αs1-酪蛋白、β-酪蛋白和κ-酪蛋白基因表达量的影响
Table 3 Effects of two- and three-dimensional cultivation on gene expressions of αs1-casein, β-casein and κ-casein in bovine mammary epithelial cells

项目 Items	αs1-酪蛋白 αs1-casein	β-酪蛋白 β-casein	κ-酪蛋白 κ-casein
二维培养 Two-dimensional cultivation	12.92 ± 0.52 ^b	14.26 ± 0.48 ^B	14.70 ± 1.04 ^B
三维培养 Three-dimensional cultivation	6.37 ± 1.13 ^a	9.37 ± 0.26 ^A	3.47 ± 0.15 ^A

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。
Values in the same column with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean significant difference ($P < 0.01$).

3.2 二维和三维培养对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白基因表达量的影响

起初研究者们利用胞外基质(EHS)的单一成分来建立三维模型,在体内分化的上皮细胞和基底膜成分层粘连蛋白相连接,有报道称层粘连蛋

白对于细胞的黏附起着重要的作用^[25],且其在EHS中的含量占到80%,但是在体内,上皮细胞的分化还受到Ⅳ胶原、内毒素、类肝素和蛋白多糖的影响。研究者们发现并不是层粘连蛋白或是EHS中的任何一种单独成分可以诱导细胞分化的,这

需要它们之间的相互作用^[26]。本试验采用的基质与 EHS 的组成相似,而这些成分之间以及和细胞表面特殊的受体之间的相互作用在细胞的分化调控中起着重要的作用,细胞的极化还与基质的物理特性有直接的关系,基质是富有弹性的,它允许细胞通过改变微膜区而进行重组,进而形成类腺泡的聚集物,使细胞之间的相互作用更加紧密;同时,基质的多孔性允许营养物质的进入,这与细胞的极化机能有着密切的关系^[27-28]。在本试验中三维培养的模式使得细胞极化的特性得以实现,而二维培养由于缺乏 EHS 的作用,因此在二维培养的条件下细胞只是不断地增殖而无法完成细胞的分化。细胞的分化与其功能的维持有着直接的关系,分化的上皮细胞使其表面的受体及内部的生物分子行使其各自的职能,上皮细胞内各基因的表达受到胞内、胞外营养物质及周围微环境的影响,这种影响通过信号传递的方式实现。信号的传递是通过细胞表面的跨膜受体识别 EHS 内的分子而实现的,细胞表面这些受体的变化和触发是通过受体与配体的结合,从而依次引起细胞骨架网络的重排和胞内的一系列信号转导,最终引起基因表达量的变化^[29-30]。本试验三维培养模式下,细胞和细胞之间以及细胞和基质之间的相互作用得以实现,使得细胞的信号转导途径和营养物质吸收通道得以改变,而二维培养的模式下,虽然和三维培养提供相同的营养条件,但是其与体内的环境相差较远,细胞和基质之间的相互作用缺失,使得胞内外的信号传递无法实现,这是导致二维培养条件下乳腺上皮细胞基因表达量显著低于三维培养条件下乳腺上皮细胞基因表达量的可能原因。基因的表达还受到其他因素的影响,培养模式是否是最主要的影响因素还有待进一步研究,但本研究表明在相同的营养物质及激素提供的条件下,三维培养模式下乳腺上皮细胞的基因表达量显著地高于二维培养。

4 结 论

① 相同的营养物质及激素环境下,三维培养的乳腺上皮细胞酪蛋白基因的表达量高于二维培养。

② 三维培养的乳腺上皮细胞在形态上呈现的特点与乳腺上皮细胞在体内所呈现的组织学特征更加接近。同二维培养相比,三维培养在研究营

养物质调控奶牛乳腺上皮细胞合成乳蛋白时是更有效的模型。

参考文献:

- [1] MAILLEUX A A, OVERHOLTZER M, BURGGE J S. Lumen formation during mammary epithelial morphogenesis[J]. The Journal of Landes Bioscience, 2008, 7(1): 57-62.
- [2] 弗雷谢尼 R I. 动物细胞培养——基本技术指南[M]. 张静波, 徐存拴, 译. 北京: 科学出版社, 2008.
- [3] DEBNATHA 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: 256-268.
- [4] BISSELL M J, RADISKY D. Putting tumours in context[J]. Nature Reviews Cancer, 2001, 1(1): 46-54.
- [5] ANDERS M, HANSEN R, DING R X, et al. Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(4): 1943-1948.
- [6] BISSELL M J, RIZKI A, MIAN I S. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2003, 15(6): 753-762.
- [7] WANG F, HONDA R K, RADISKY D, et al. Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts[J]. Journal of the National Cancer Institute 2002, 94(19): 1494-1503.
- [8] WANG F, VALERIE M W, OLE W P, et al. Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95: 14821-14826.
- [9] CUKIERMAN E, PANKOV R, STEVENS D R, et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension[J]. Science, 2001, 294: 1708-1712.
- [10] DEMOU Z N, MCINTIRE L V. Fully automated three-dimensional tracking of cancer cells in collagen gels: determination of motility phenotypes at the cellular level[J]. Cancer Research, 2002, 62: 5301-

- 5307.
- [11] YAMADA K M, CUKIERMAN E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D[J]. Cell, 2007, 130 (4): 601–610.
- [12] WEAVER V M, PETERSEN O W, WANG F, et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and *in vivo* by integrin blocking antibodies[J]. Journal of Cell Biology, 1997, 137(1): 231–245.
- [13] JECHLINGER M, PODSYPANINA K, VARMUS H. Identifies cells that survive deinduction mouse mammary cells demonstrates oncogene dependence and Regulation of transgenes in three-dimensional cultures of primary[J]. Genes Development, 2009, 23(14): 1677–1688.
- [14] LEE E Y, LEE W H, KAETZEL C S, et al. Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: Regulation of casein gene expression and secretion[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985, 82: 1419–1423.
- [15] CHRISTIAN S, BISSELL M J, CONNIE A M, et al. Extracellular matrix and hormones transcriptionally regulate bovine beta-casein 5' sequences in stably transfected mouse mammary cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87: 9118–9122.
- [16] LIN C Q, DEMPSEY P J, COFFEY R J, et al. Extracellular matrix regulates whey acidic protein gene expression by suppression of TGF- α in mouse mammary epithelial cells: studies in culture and in transgenic mice[J]. The Journal of Cell Biology, 1995, 129(4): 1115–1126.
- [17] 杨金勇, 吴跃明, 刘建新. 蛋氨酸和蛋氨酸二肽对奶牛乳腺上皮细胞酪蛋白 α s1 基因表达的影响[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(1): 24–27.
- [18] 胡茵, 王加启, 李发弟, 等. 游离亚麻酸对奶牛乳腺上皮细胞脂肪酸代谢相关基因 mRNA 转录的影响[J]. 动物营养学报, 2010, 22(5): 1342–1349.
- [19] 王亨, 孟霞, 邱昌伟, 等. 脂多糖诱导奶牛乳腺上皮细胞先天性免疫反应[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(3): 398.
- [20] 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, 2009, 30(4): 9–13.
- [21] KOZLOWSKI M, GAJEWSKA M, MAJEWSKA A, et al. Differences in growth and transcriptomic profile of bovine mammary epithelial monolayer and three-dimensional cell cultures[J]. Journal of Physiology and Pharmacology, 2009(Suppl. 1): 5–14.
- [22] FRENCH M C, LITTLEJOHN R P, GREER G J, et al. Growth hormone and ghrelin receptor genes are differentially expressed between genetically lean and fat selection lines of sheep[J]. Journal of Animal Science, 2006, 84: 324–331.
- [23] WARBURTON M J, MITCHELL D, ORMEROD E J, et al. Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the resting, pregnant, lactating, and involuting rat mammary gland[J]. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 1982, 30(7): 667–676.
- [24] WARBURTON M J, MONAGHAN P, FERNS S A, et al. Distribution of entactin in the basement membrane of the rat mammary gland: evidence for a non-epithelial origin [J]. Experimental Cell Research, 1984, 152(1): 240–254.
- [25] HYNES R O. Integrins: a family of cell surface receptors[J]. Cell, 1987, 48(4): 549–554.
- [26] BARCELLOS-HOFF M H, AGGELER J, RAM T G, et al. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane [J]. Development, 1989, 105: 223–235.
- [27] EMERMAN J T, BURWEN S J, PITELKA D R, et al. Substrate properties influencing ultrastructural differentiation of mammary epithelial cells in culture [J]. Tissue and Cell, 1979, 11(1): 109–119.
- [28] GORDON P, BETSEY C, CHARLOTTE S K, et al. Regulation of differentiation and polarized secretion mammary epithelial cells maintained in culture: extracellular matrix and membrane polarity influences[J]. The Journal of Cell Biology, 1987, 105(5): 2043–2051.
- [29] BISSELL M J, HALLH G, PARRY G. How does the extracellular matrix direct gene expression? [J]. Journal of Theoretical Biology, 1982, 99(1): 31–68.
- [30] BISSELL M J, AGGELER J. Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression? [J]. Progress in Clinical and Biological Research, 1987, 249: 251–262.

Two- and Three-Dimensional Cultivation of Bovine Mammary Epithelial Cells and Gene Expression of Casein after Cultured

WANG Xiumei¹ HOU Xianzhi^{1*} GAO Aiwu² KAO Guilan¹ GAO Min³ LI Dabiao¹
LAN Rubing¹ ZHANG Nan¹ ZHANG Yanming¹ HUANG Qingrui¹

(1. College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

3. Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry, Hohhot 010010, China)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of two- and three-dimensional cultivation on cell morphology and gene expressions of β -casein, κ -casein and α s1-casein of bovine mammary epithelial cells (BMECs). Mammary parenchymal tissue was obtained from three healthy Holstein dairy cows aged 5 years. BMECs were purified after cultured for three generations, and then were cultured in two- and three-dimensional system, respectively. Cell morphology and gene expression levels of α s1-casein, β -casein and κ -casein of BMECs cultured in the two systems were compared. The results showed as follows: BMECs cultured in different systems displayed different cell morphologies, and those by two-dimensional cultivation displayed the classical cobblestone morphology, while those by three-dimensional cultivation formed mammospheres-forming aggregates and tubular structures. Gene expressions of α s1-casein ($P < 0.05$), β -casein ($P < 0.01$) and κ -casein ($P < 0.01$) of BMECs by three-dimensional cultivation were significantly higher than those by two-dimensional cultivation. The results indicate that gene expressions of the three caseins of BMECs by three-dimensional cultivation are higher than those by two-dimensional cultivation, and morphological characteristics of three-dimensional cultured BMECs are closely similar to those *in vivo*. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(6):1157-1164]

Key words: bovine mammary epithelial cells; two-dimensional cultivation; three-dimensional cultivation; casein