

翟雨薇, 刘超凡, 王飞燕, 等. 猪乳腺上皮细胞的分离与鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (8): 36-42.

ZHAI Y W, LIU C F, WANG F Y, et al. Isolation and identification of porcine mammary epithelial cells [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (8): 36-42.

猪乳腺上皮细胞的分离与鉴定

翟雨薇¹, 刘超凡¹, 王飞燕¹, 刘佳薇¹, 王卫¹, 石晓静², 袁晨^{1*}, 宋勤叶^{1*}

(1. 河北农业大学动物医学院/河北省兽医生物技术创新中心, 河北保定 071000;

2. 河北省邯郸市乡村振兴促进中心, 河北邯郸 056004)

摘要: 旨在建立猪乳腺上皮细胞 (PMEC) 的原代培养方法, 为猪乳腺发育、分化及泌乳机制研究和病原体感染提供生物材料和细胞模型。以 9 月龄未孕健康母猪的乳腺组织为研究对象, 利用胶原酶 I 型和透明质酸酶联合消化法分离 PMEC, 通过形态学观察、生长曲线测定、间接免疫荧光试验 (IFA)、聚合酶链式反应 (PCR)、免疫印迹试验 (Western blot) 对其进行鉴定。结果: 经酶消化组织块法获得的 PMEC 呈现鹅卵石状、上皮样形态并形成单层聚集形岛屿, 冻存复苏后细胞生长状态良好, 且纯化后的 PMEC 具备正常的“S”型生长周期; 经浓度为 0.2 mg/L 与 2 mg/L 的催乳素刺激 PMEC 后, 采用 PCR、Western blot 方法检测发现细胞中 β -酪蛋白 (CNS2) 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 且升高趋势与催乳素的浓度呈正相关; IFA 结果显示分离的 PMEC 表达特异性标记物细胞角蛋白 18 (CK-18), 且表达紧密连接蛋白 (ZO-1), 表明该细胞形成良好的紧密连接。本研究成功建立了 PMEC 的分离、培养及鉴定体系, 为进一步研究乳腺生物学及相关机制奠定了基础。

关键词: 猪乳腺上皮细胞; 分离; 鉴定; 角蛋白 18; β -酪蛋白

中图分类号: S858.28 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)08-0036-07

Isolation and identification of porcine mammary epithelial cells

ZHAI Yuwei¹, LIU Chaofan¹, WANG Feiyan¹, LIU Jiawei¹, WANG Wei¹, SHI Xiaojing²,
YUAN Chen^{1*}, SONG Qinye^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University/Hebei Veterinary Biotechnology
Innovation Center, Baoding 071000, China;

2. Hebei Province Handan Rural Revitalization Promotion Center, Handan 056004, China)

Abstract: This study was to establish a primary culture method for porcine mammary epithelial cells (PMEC), in order to provide biomaterials and cell models for research on mammary gland development, differentiation, lactation mechanisms, and pathogen infection in pigs. The mammary gland tissue of 9-month-old non-pregnant healthy sows was used as the research object. PEMC was isolated using a combined digestion method involving collagenase type I and hyaluronidase. Morphological observation, growth curve determination, immunofluorescence assay (IFA), polymerase chain reaction (PCR), and Western blot were used to identify PMECs. The results were as follows: The mammary epithelial cells obtained from enzymatic digestion exhibited a cobblestone-like and epithelioid morphology, forming single-layer clustered islands. After cryopreservation and recovery, the cells demonstrated good growth, and the purified porcine mammary epithelial cells had a normal “S”-shaped growth cycle. After stimulating mammary epithelial cells with prolactin concentrations of 0.2 mg/L and 2 mg/L, PCR and Western blot methods were used to detect a significant increase in the expression level of β -casein (CNS2) in the cells ($P < 0.05$), and the increasing trend was positively correlated with the concentration of prolactin. The IFA results showed that the isolated porcine mammary epithelial cells expressed the specific marker cytokeratin 18 (CK-18) and tight junction protein (Zonula Occludens 1, ZO-1), indicating that the cells formed good tight junctions. In summary, in this study, a system for isolating, culturing, and identifying porcine mammary epithelial cells was successfully established, laying the foundation for further research on mammary biology and related mechanisms.

Keywords: porcine mammary epithelial cells; isolation; characterization; cytokeratin 18; CNS2

收稿日期: 2024-10-21; 修回日期: 2025-06-10

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目 (226Z6601G); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32202843); 河北省省属高等学校基本科研业务费研究项目 (KY2022042)

第一作者: 翟雨薇, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 袁晨, 博士, 副教授, 主要从事动物传染病致病机制和动物黏膜免疫研究, E-mail: yuanchen060624@163.com; 宋勤叶, 博士, 教授, 主要从事动物传染病与新型生物制品研究, E-mail: songqinye@126.com。

乳腺作为哺乳动物体内独有的腺体组织,承载着新生动物获取宝贵初乳的重任^[1]。乳腺上皮细胞(MEC)可合成并分泌乳蛋白、乳糖和脂类^[2],是机体黏膜免疫系统的一部分,是抵御病原体的第一道屏障^[3]。MEC具有分泌特异性 β -酪蛋白(CNS2)的特性^[4],这一特性进一步强调了其在乳汁合成过程中的核心地位。在妊娠与哺乳这一生命循环的关键阶段,MEC在催乳素的精密调控下,经历了从增殖到分化的精妙转变^[5]。这种激素不仅是启动产乳过程的“钥匙”,更是维持整个哺乳期间乳汁持续分泌的“引擎”。通过调节MEC的活性与功能,催乳素确保了哺乳动物能够顺利地进行哺乳,为后代的健康成长提供坚实的营养保障。

已报道多种病毒可经乳汁进行垂直传播,如寨卡病毒(ZIKV)^[6-7]、人类免疫缺陷病毒(HIV)^[8]、巨细胞病毒(CMV)^[9]、猪流行性腹泻病毒(PEDV)^[10-11]、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)^[12]等。尽管有研究者试图对病毒经乳汁垂直传播的机制进行研究,但由于难以在围生期母体内获取组织样本以及合适的实验动物模型的缺乏限制了对其研究。因此,当前亟需开发并建立一种可靠的细胞模型,以模拟并解析病毒经乳汁垂直传播的复杂过程,这对于理解病毒传播机制、评估公共卫生风险以及制定有效的防控策略具有至关重要的意义。

在本研究中,首先通过酶消化组织块法分离出猪乳腺上皮细胞(PMEC),其次通过连续传代对细胞进行纯化,并进行生长曲线的测定。最后通过间接免疫荧光试验(IFA)、聚合酶链式反应(PCR)和免疫印迹试验(Western blot)从分子水平和蛋白水平对PMEC进行鉴定,结果表明本研究成功分离出PMEC,对阐明营养物质和激素刺激猪乳腺合成乳汁的潜在机制具有重要的生物意义,同时为病原体经乳汁传播的机制研究提供工具。

1 材料与方 法

1.1 试验动物及组织采集

选择健康的9月龄未怀孕、未妊娠长白母猪(来源于保定某猪场),将其麻醉后,使用75%酒精将母猪发育良好的乳房及其周围进行消毒,使用高压灭菌的手术器械割开表皮组织,沿筋膜表面分离乳腺组织,切除乳腺,半径为2~3 cm,深度约为皮下3 cm,将切割下来的组织放入含75%酒精的烧杯中,3~5 min后,将组织放入含2%双抗的PBS溶液中浸泡5 min左右,便于分离PMEC。

1.2 主要试剂

DMEM/F12培养基、0.25%胰蛋白酶、青-链霉

素(双抗)、胎牛血清(FBS),购自Gibco公司(美国);氢化可的松、无动物成分重组人表皮生长因子(EGF)蛋白、细胞角蛋白18(CK-18)多克隆抗体,购自Bioss公司(北京);ECL化学发光超敏显色试剂盒、牛胰岛素,购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;庆大霉素、胶原蛋白酶A、透明质酸酶,购自泰克兰博公司(北京);催乳素购自Med Chem Express 生物科技公司(美国);细胞裂解液、100%甲醇、抗CNS2单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)、HRP标记的山羊抗兔IgG,购自索莱宝科技有限公司(北京);兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体购自Servicebio公司(武汉);Protein Marker购自上海雅酶生物医药科技有限公司;细胞计数试剂盒(CCK-8检测试剂盒)购自APEX-BIO公司(美国);紧密连接蛋白(ZO-1)抗体购自Invitrogen公司(美国);YF488山羊抗鼠IgG、YF594山羊抗兔IgG,购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 猪乳腺的采集与PMEC的分离

为从9月龄非怀孕、非妊娠期母猪的乳腺中分离PMEC,采用高压灭菌后的手术器械将母猪发育良好的乳腺(上层皮肤、中间组织及下层肌肉)取下,放入含75%医用酒精的烧杯中消毒5 min左右,再将其转入含2%双抗的PBS中洗涤10遍左右,用高压灭菌的手术器械将乳腺的上层皮肤及下层肌肉剥离,并将其剪切为约1 mm³的组织块,移入含30 mL添加有5% FBS、2%双抗溶液、50 mg/L庆大霉素、500 mg/L胶原酶A及0.05%透明质酸酶DMEM消化培养基的50 mL离心管中,置于37℃、5% CO₂的培养箱中消化12 h。消化完毕后,将悬液经70 nm过滤器过滤到50 mL离心管中,离心2 000 r/min,8 min。弃去上清液,再用含2%双抗溶液的DMEM培养液重悬沉淀,共洗涤2次,离心2 000 r/min,8 min。最后用1 mL含5 mg/L牛胰岛素、5 mg/L氢化可的松、10 ng/mL EGF、50 mg/L庆大霉素、10% FBS和2%双抗的DMEM培养液重悬沉淀,将其转移到T25细胞培养瓶中,补充营养液至6 mL。根据细胞生长情况适当换液。

1.3.2 PME C的传代和冻存

弃去细胞瓶中的营养液,用PBS洗涤2次,洗去残留营养液,加入胰酶-EDTA消化,边消化边拍打,待细胞脱壁后,加入含胎牛血清的营养液终止消化,然后根据细胞生长情况对细胞进行1:3传代。将生长情况良好的细胞保存在冻存液中,放入液氮罐长期保存。

1.3.3 PMEC 生长曲线的绘制

采用 CCK-8 法进行 PMEC 生长曲线的绘制。将生长状态良好的第 9 代 PMEC 常规消化后进行细胞计数，以 1×10^4 个/mL 的浓度接种到 96 孔板中，共分为 6 个组，每组 5 个重复，每孔中加入 100 μ L 完全培养基，置于 37 $^{\circ}$ C，5% CO_2 的培养箱中培养，分别于接种后 1、3、5、7、8 d 加入 10 μ L CCK-8 试剂，同时设阴性对照，用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (OD) 值，以培养时间为横坐标，OD 值为纵坐标，绘制 PMEC 的生长曲线。

1.3.4 IFA 检测 ZO-1 蛋白分布

免疫荧光检测 PMEC 之间 ZO-1 蛋白的分布，具体步骤：将生长状态良好的第 9 代 PMEC 常规消化后进行细胞计数，以 3×10^5 个/mL 的浓度接种到 Transwell 小室的上室中，并加入 200 μ L 完全培养基，下室中加入 800 μ L 完全培养基，培养 6~8 d 后，使用手术刀片和眼科镊将小室中的聚碳酸酯膜撕下并贴于载玻片上，随后将载玻片上的聚碳酸酯膜用免疫组化笔圈出并滴加无水甲醇于 -20 $^{\circ}$ C 固定 10 min，200 μ L PBS 洗涤 3 次后，滴加 200 μ L 2% 牛血清白蛋白 (BSA)-PBS 溶液于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱封闭 1 h，进一步滴加 200 μ L (用 1% 的 BSA-PBS 溶液稀释) ZO-1 抗体 (1 : 100)，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；洗去一抗并在圈内的膜中滴加 200 μ L (用 1% 的 BSA-PBS 溶液稀释) AF594 山羊抗兔 IgG (1 : 200)，室温孵育 45 min 后，200 μ L PBS 洗涤 3 次；加入 100 μ L (用 1% 的 BSA-PBS 溶液稀释) 核染液 Bisbenzimide (1 : 2 000)，室温避光显色 10 min，200 μ L PBS 洗涤 3 次后拍照。

1.3.5 催乳素刺激 PMEC

将消化下来的 PMEC 进行细胞计数，分为对照组及 0.2 mg/L 和 2 mg/L 催乳素刺激组，将细胞接种在 12 孔板上，每组 3 个重复孔，每孔加 1 mL 含 10% FBS、2% 抗生素溶液、50 mg/L 庆大霉素、5 mg/L 牛胰岛素、5 mg/L 氢化可的松的 DMEM 营养液 (不含 EGF)，观察细胞生长状况，当每孔细胞达到 70% 聚集时，对各孔细胞进行换液，对照组的营养液与原营养液相同，催乳素刺激组的营养液为 1 mL 含 10% FBS、2% 抗生素溶液、50 mg/L 庆大霉素、5 mg/L 牛胰岛素、5 mg/L 氢化可的松、0.2 mg/L 或 2 mg/L 催乳素的 DMEM 溶液 (不含 EGF)。最后培养 3 d，每天换一次营养液。72 h 后收样，加入 TRIzol 或细胞裂解液提取核酸或蛋白。

1.3.6 IFA 鉴定 CK-18 表达

将 PMEC 均匀铺在 96 孔板上，分为阴性对照组和试验组，每组 8 个重复，验证 PMEC 中 CK-18 的

表达，待孔中细胞长到 90% 聚集时，弃去孔内培养液，常温 PBS 洗涤细胞 2 次并弃去。每孔加入预冷的无水甲醇，-20 $^{\circ}$ C 固定 10 min，200 μ L PBS 洗涤 3 次，弃去后每孔加入 100 μ L 的 2% BSA-PBS 封闭液于 37 $^{\circ}$ C，封闭 1 h。弃去每孔液体，试验组每孔加入 100 μ L (用 1% 的 BSA-PBS 溶液稀释) CK-18 抗体 (1 : 200)；对照组每孔加入 100 μ L 1% BSA-PBS 稀释液，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。200 μ L PBS 洗涤 3 次后，每孔加入 100 μ L (用 1% 的 BSA-PBS 溶液稀释) 由 YF488 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 200)，于 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min。200 μ L PBS 洗涤 3 次后，每孔加入 50 μ L (用 1% 的 BSA-PBS 溶液稀释) 核染液 Bisbenzimide (1 : 2 000)，室温避光显色 10 min，200 μ L PBS 洗涤 3 次后，置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.7 RT-PCR 检测 CNS2 基因的转录

使用 TRIzol 总 RNA 提取试剂从猪乳汁和 PMEC 中提取总 RNA，并将其反转录为 cDNA。采用 PCR 检测 CNS2 基因 (GenBank 登录号: GU827390.1) 的表达。引物序列：F: 5'-ATTGTTCCCAAGCGTAA-3'，R: 5'-GAGACTGGAGCAGAGGC-3'。PCR 体系 (20 μ L)：10 μ L 2 \times Es Taq MasterMix (Dye)，7 μ L ddH₂O，25 μ mol/L 上下游引物各 0.5 μ L，2 μ L cDNA (100 ng/ μ L)。反应程序：94 $^{\circ}$ C 3 min 预变性；94 $^{\circ}$ C 30 s 变性，46 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 30 s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3.8 Western blot 鉴定 CNS2 蛋白的表达

将 PMEC 均匀铺在 12 孔板，分别用 0.2 μ g/mL 和 2 μ g/mL 催乳素处理 3 d 后，收取样品，在细胞中加入细胞裂解液，4 $^{\circ}$ C 离心 1 500 r/min，10 min，取上清液。加入 5 \times SDS 上样缓冲液混匀后，105 $^{\circ}$ C 变性 10 min，蛋白样品即制备完毕。同时提取猪乳汁蛋白作为阳性对照。

配制 12% SDS-PAGE，电泳完毕后，将滤纸、分离胶浸泡于转膜液中 20 min。将 PVDF 膜放于 100% 甲醇中浸泡 5 min，20% 甲醇中浸泡 2 min。处理完毕后，将三明治结构放于半干转膜装置上，从负极开始依次是：滤纸、分离胶、PVDF 膜、滤纸，盖上电极，接通电源，23 V 电压 30 min。

转膜完毕后，将 PVDF 膜置于平皿中，用 10 mL TBST 稀释的 5% 脱脂奶封闭 PVDF 膜，室温 2 h。封闭完毕后，将 PVDF 膜置于平皿中，加入 1 : 500 稀释的抗 CNS2 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。孵育完成后，使用 TSBT 洗膜 3 次，每次 10 min。最后加入 1 : 5 000 稀释的山羊抗兔酶标二抗，室温孵育 2 h。TSBT 洗膜 3 次，每次 10 min。用 ECL 化学发光超敏显色 A 液和 B 液等比例混合，均匀滴加到目的条带处，曝光

30 s, 观察结果。

1.3.9 统计分析

所有数据使用 GraphPad Prism 8.0 软件对试验数据进行作图。使用 SPSS 26.0 软件的单因素方差分析 (ANOVA) 检查组间显著性。结果以“平均值±标准误差”表示。以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 PMEC 的形态学观察

经组合酶消化组织块法分离 PMEC, 第 1 代细胞

大小不等, 种类较为杂乱, 但能观察到有部分细胞贴壁 (图 1A); 在培养第 3 代时 PMEC 与成纤维细胞混杂生长形态多为梭状与多角形 (图 1B); 当传至第 8 代时, 大部分成纤维细胞已被去除, 保留了较纯的 PMEC, 其形态多为鹅卵石状, 表现为单层、上皮样形态, 形成单层聚集形岛屿 (图 1C); 重新复苏后的 PMEC 生长状态良好 (图 1D)。

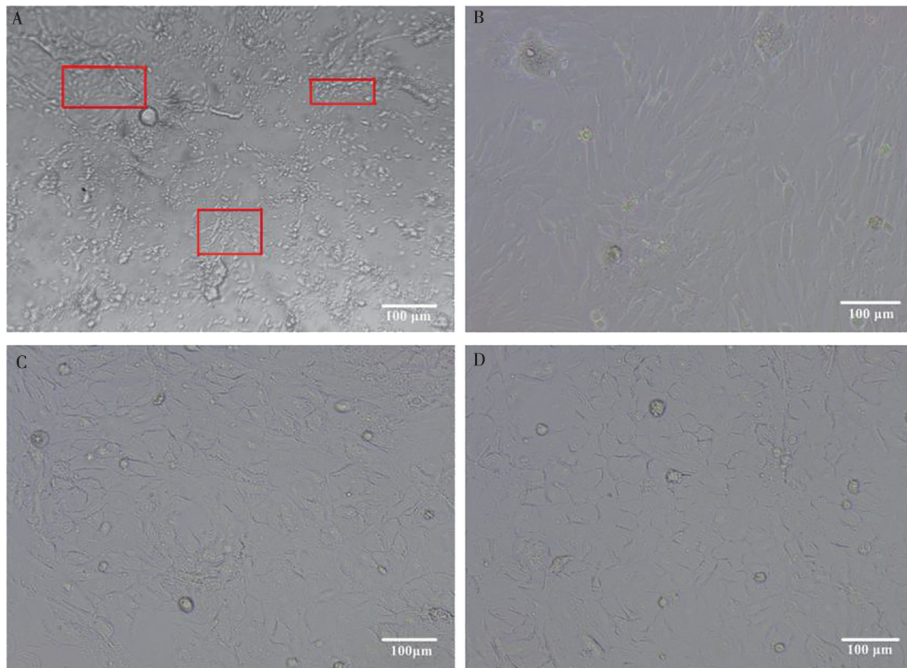


图 1 PMEC 的形态学观察

2.2 PMEC 生长曲线的测绘

如图 2 所示, PMEC 生长曲线呈“S”型, 培养 1~3 d 时处于潜伏期, 细胞生长较为缓慢; 培养 3~5 d 时为对数生长期, 细胞增殖速度明显提高; 培养 7~8 d 后进入平台期, 细胞增殖速度大幅度降低。上述结果表明, 本试验条件下分离培养的 PMEC 生长状态良好。

2.3 PMEC 中 ZO-1 蛋白的表达

IFA 结果可见, ZO-1 抗体可与蛋白特异性结合, 细胞与细胞之间出现了红色荧光信号, 表明 PMEC 之间形成良好的紧密连接 (图 3)。

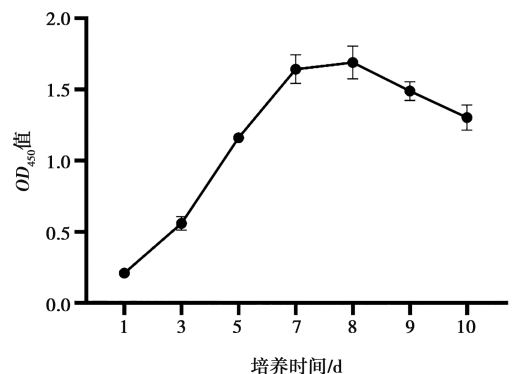


图 2 PMEC 生长曲线

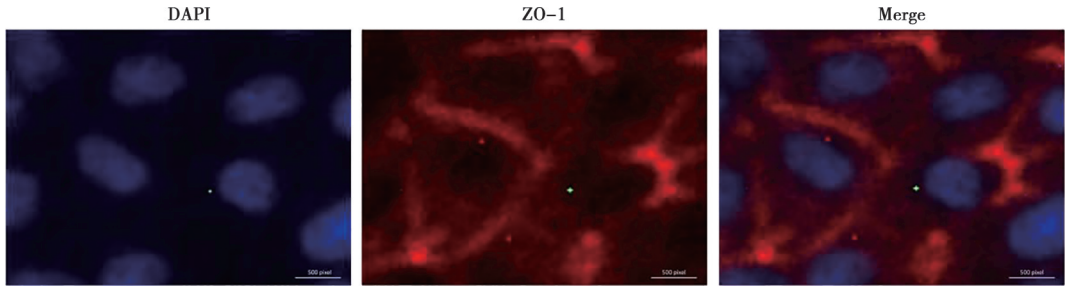


图3 PMEC 中 ZO-1 的表达

2.4 PMEC 中 CK-18 蛋白的表达

IFA 结果可见, CK-18 抗体可与该细胞特异性结

合, 细胞胞浆出现了绿色荧光信号, 表明该细胞表达 CK-18 (图 4)。

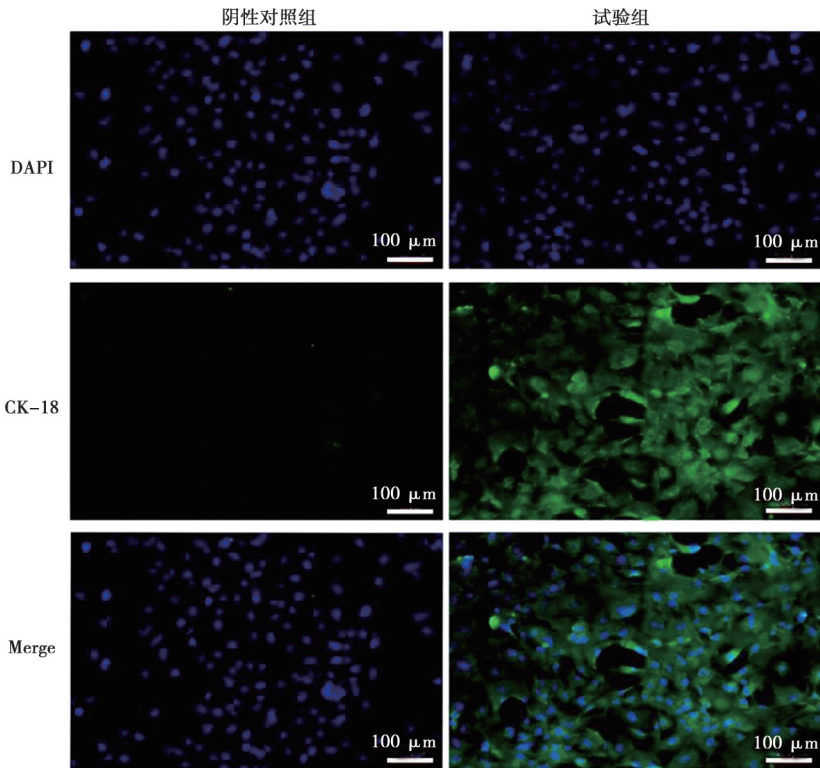


图4 PMEC 中 CK-18 的表达

2.5 PMEC 中 CNS2 基因的转录

对 PMEC 标志基因 CNS2 进行 RT-PCR 检测, 结果可见该细胞转录 CNS2 基因, 且 PMEC 经 0.2 mg/L 与 2 mg/L 的催乳素刺激后, CNS2 基因的转录相比对照组均有升高的趋势。(图 5)。

2.6 PMEC 中 CNS2 蛋白的表达

Western blot 检测结果如图 6 所示, 未经催乳素

刺激的 PMEC 表达的 CNS2 较少, 而催乳素刺激后 PMEC 表达的 CNS2 增多, 且随着催乳素浓度的增大 CNS2 表达增加 (图 6A)。将催乳素刺激组与阴性对照组蛋白的内参归一化后灰度值统计结果显示, 催乳素刺激组与阴性对照组相比, CNS2 蛋白表达极显著增加, 且随着催乳素浓度的增加, 该蛋白的表达也存在显著的增加 (图 6B)。

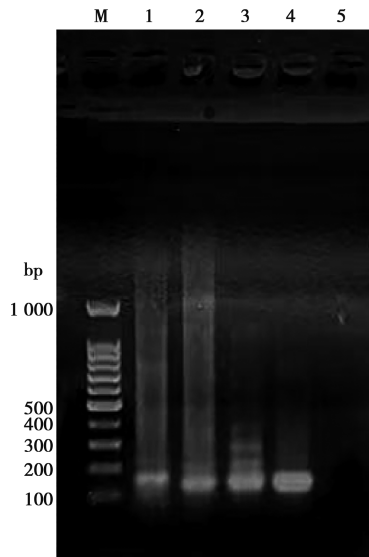


图5 催乳素刺激后 CNS2 基因的转录
M. DL 100 DNA Marker; 1. 未经催乳素刺激的 PMEC; 2. 0.2 mg/L 催乳素刺激的 PMEC; 3. 2 mg/L 催乳素刺激的 PMEC; 4. 从母猪乳汁中提取的总 RNA (阳性对照); 5. 阴性水对照。

图5 催乳素刺激后 CNS2 基因的转录

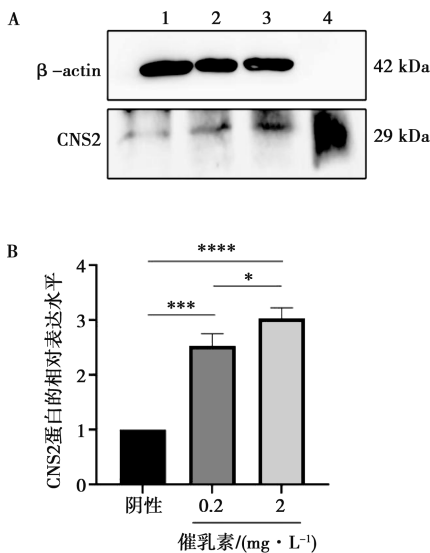


图6 催乳素刺激后 CNS2 蛋白的表达
1. 未经催乳素刺激的 PMEC; 2. 经 0.2 mg/L 催乳素刺激的 PMEC; 3. 经 2 mg/L 催乳素刺激的 PMEC; 4. 母猪乳汁中提取的蛋白。* 表示 $P < 0.05$, *** 表示 $P < 0.001$, **** 表示 $P < 0.0001$ 。

图6 催乳素刺激后 CNS2 蛋白的表达

3 讨论

近几年来,国内外学者已成功培养出了多种动物的 MEC,如人^[13]、小鼠^[14]、奶牛^[15-16]、水牛^[17]、绵羊^[18-19]、山羊^[20]等,但是国内对于 PMEC 分离与培养的研究还比较少。本研究采用组合酶消化组织块

的方法对 PMEC 进行了分离培养,并通过形态学观察、生长曲线测定、IFA、PCR 等多种手段对其进行鉴定,结果表明本研究成功分离了 PMEC,且细胞间形成紧密连接,可用于体外共培养模型的建立。

本研究分离和培养 PMEC 所用的组合酶消化组织块法是基于从啮齿动物身上获得 MEC 的方案^[21]以及 Dahanayaka 等^[22]分离母猪 MEC 的方法所制定。组合酶消化组织块法是使用透明质酸酶和胶原蛋白酶联合消化猪乳腺组织后获得 PMEC 的方法。此方法用时短,采取的组织腺泡发育越好获得的上皮细胞数目越多,虽会掺杂少量成纤维细胞,但因成纤维细胞与 PMEC 对胰酶的敏感性不同,可在每次传代时使用胰酶消化的时间不同进行纯化,进而得到纯度较高的 PMEC。由于庆大霉素可诱导成纤维细胞凋亡(程序性细胞死亡)^[23],但 MEC 对庆大霉素具有高度耐药性^[24]。本研究方法在组织消化液和初始培养液中使用庆大霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)来培养从新鲜猪乳腺组织分离的 PMEC,以利于去除分离细胞中的成纤维细胞。

MEC 的鉴定主要以检测 CK-7、CK-8 和 CK-18 为主,其中检测 CK-18 较为普遍^[25]。CK-18 是一种上皮细胞特有的中间细丝蛋白,是细胞骨架的组成成分,该蛋白是上皮细胞谱系的特异性标记物^[26],其广泛地应用于多种动物 MEC 的鉴定。本研究采用 IFA 对细胞中 CK-18 进行鉴定,发现分离的细胞高表达 CK-18。ZO-1 作为特征性紧密连接分子的完整膜蛋白,在细胞间形成单层屏障的过程中起到尤为重要的作用^[27]。本研究采用 IFA 对分离的 PMEC 进行 ZO-1 检测,结果发现细胞间高表达 ZO-1,表明 PMEC 间可以形成紧密连接,为体外共培养模型的建立奠定基础。CNS2 是 PMEC 的特异性标志物,CNS2 的表达与哺乳期乳腺产生催乳素有关^[28]。本研究发现在不同浓度催乳素刺激下,可以检测到 CNS2 的表达,且其表达量与催乳素呈剂量依赖性。

本研究成功分离并培养出原代 PMEC,可以用于实验室研究,为未来研究猪乳腺疾病以及人乳腺类疾病提供了可靠的模型。

参考文献:

- [1] INMAN J L, ROBERTSON C, MOTT J D, et al. Mammary gland development; cell fate specification, stem cells and the microenvironment [J]. *Development*, 2015, 142 (6): 1028-1042.
- [2] MANJARÍN R, STEIBEL J P, KIRKWOOD R N, et al. Transcript abundance of hormone receptors, mammalian target of rapamycin pathway-related kinases, insulin-like growth factor I, and milk proteins in porcine mammary tissue [J]. *J Anim Sci*, 2012, 90 (1):

- 221–230.
- [3] 赵悦, 童津津, 熊本海, 等. 奶牛乳腺免疫细胞防御机理研究进展 [J]. 动物营养学报, 2020, 32 (4): 1563–1569.
- [4] PARRY G, CULLEN B, KAETZEL C S, et al. Regulation of differentiation and polarized secretion in mammary epithelial cells maintained in culture: extracellular matrix and membrane polarity influences [J]. J Cell Biol, 1987, 105 (5): 2043–2051.
- [5] MALEWSKI T, GAJEWSKA M, ZEBROWSKA T, et al. Differential induction of transcription factors and expression of milk protein genes by prolactin and growth hormone in the mammary gland of rabbits [J]. Growth Horm IGF Res, 2002, 12 (1): 41–53.
- [6] BESNARD M, LASTERE S, TEISSIER A, et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014 [J]. Euro Surveill, 2014, 19 (13): 20751.
- [7] MELLO A S, PASCALICCHIO BERTOZZI A P A, RODRIGUES M M D, et al. Development of secondary microcephaly after delivery: possible consequence of mother–baby transmission of Zika virus in breast milk [J]. Am J Case Rep, 2019, 20: 723–725.
- [8] Breastfeeding and HIV International Transmission Study Group, COUTSODIS A, DABIS F, et al. Late postnatal transmission of HIV-1 in breast-fed children: an individual patient data meta-analysis [J]. J Infect Dis, 2004, 189 (12): 2154–2166.
- [9] JACKSON S E, MASON G M, WILLS M R. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion [J]. Virus Res, 2011, 157 (2): 151–160.
- [10] SUN R Q, CAI R J, CHEN Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18 (1): 161–163.
- [11] LI R F, TIAN X Q, QIAO S L, et al. Complete genome sequence of the porcine epidemic diarrhea virus variant CH/HNYF/2014 [J]. Genome Announc, 2015, 3 (6): e01486–15.
- [12] KANG I, HA Y, KIM D, et al. Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary glands of experimentally infected sows [J]. Res Vet Sci, 2010, 88 (2): 304–306.
- [13] ETHIER S P. Human breast cancer cell lines as models of growth regulation and disease progression [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1996, 1 (1): 111–121.
- [14] DANIELSON K G, OBORN C J, DURBAN E M, et al. Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis *in vivo* and functional differentiation *in vitro* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81 (12): 3756–3760.
- [15] CHEN S, HU Z, HE H, et al. Fatty acid elongase7 is regulated via SP1 and is involved in lipid accumulation in bovine mammary epithelial cells [J]. J Cell Physiol, 2018, 233 (6): 4715–4725.
- [16] JEDRZEJCZAK M, SZATKOWSKA I. Bovine mammary epithelial cell cultures for the study of mammary gland functions [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2014, 50 (5): 389–398.
- [17] CAI X, LIU Q Y, ZHANG X, et al. Identification and analysis of the expression of microRNA from lactating and nonlactating mammary glands of the Chinese swamp buffalo [J]. J Dairy Sci, 2017, 100 (3): 1971–1986.
- [18] DÜCHLER M, SCHMOLL F, PFNEISL F, et al. OMEC II: a new ovine mammary epithelial cell line [J]. Biol Cell, 1998, 90 (2): 199–205.
- [19] 宣超莹, 段景龙, 刘茂军, 等. 绵羊乳腺上皮细胞的分离鉴定及炎性模型的建立 [J]. 中国兽医学报, 2021, 41 (10): 2009–2014.
- [20] 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 Cell Dev Biol Anim, 2012, 48 (3): 149–155.
- [21] QU X, METZ R P, PORTER WW, et al. The clock genes period 1 and period 2 mediate diurnal rhythms in dioxin-induced Cyp1A1 expression in the mouse mammary gland and liver [J]. Toxicol Lett, 2010, 196 (1): 28–32.
- [22] DAHANAYAKA S, REZAEI R, PORTER W W, et al. Technical note: isolation and characterization of porcine mammary epithelial cells [J]. J Anim Sci, 2015, 93 (11): 5186–5193.
- [23] SERVAIS H, VAN DER SMISSEN P, THIRION G, et al. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 206 (3): 321–333.
- [24] MURTAGH J, MCARDLE E, GILLIGAN E, et al. Organization of mammary epithelial cells into 3D acinar structures requires glucocorticoid and JNK signaling [J]. J Cell Biol, 2004, 166 (1): 133–143.
- [25] 曹琪娜. 采用自制培养基培养奶牛乳腺上皮细胞可行性研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2012.
- [26] BARTEK J, DURBAN E M, HALLOWES R C, et al. A subclass of luminal epithelial cells in the human mammary gland, defined by antibodies to cytokeratins [J]. J Cell Sci, 1985, 75: 17–33.
- [27] 孙志鹏. 脂磷壁酸对乳腺上皮紧密连接蛋白表达的影响 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2017.
- [28] PANTSCHENKO A G, BARBER M R, WOODCOCK-MITCHELL J, et al. Establishment and characterization of a caprine mammary myoepithelial cell line (CMMyoEC) [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2000, 36 (6): 351–356.