

组织灌流与贴壁法体外培养奶牛乳腺组织的比较研究

Comparative Study on *in vitro* Stationary Culture System or Superfusion Culture System of Cow Mammary Tissue

狄和双 杜 娟 王利刚 杨媛媛 王根林*

DI He-Shuang, DU Juan, WANG Li-Gang, YANG Yuan-Yuan and WANG Gen-Lin*

南京农业大学动物科技学院, 南京 210095

College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

摘 要 采用组织灌流和组织块贴壁法体外培养奶牛乳腺组织,通过 LDH 活力测定、台盼蓝染色、琼脂糖凝胶电泳、透射电镜技术比较两种培养方法对奶牛乳腺组织活性及组织超微结构的影响,建立奶牛乳腺组织的培养体系。结果表明,以 1 mL/h 的速度灌流培养的奶牛乳腺组织在 DMEM + 10% 小牛血清培养基中 12 ~ 60h 内保持良好的组织活性和超微结构,贴壁培养的奶牛乳腺组织在 DMEM + 10% 小牛血清的培养基中 60 ~ 108h 内保持良好的组织活性和超微结构,两种培养方法各有优缺点。

关键词 灌流,乳腺组织,LDH,超微结构

中图分类号 Q813.7 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-1040-07

Abstract Dairy cow mammary tissue was cultured in superfusion system or stationary system, and the influence of these two methods in the activity and ultrastructure of tissue was investigated according to LDH vigor, trypan blue dying, agrose gel electrophoresis, transmission microscope observation. The results showed that the mammary tissue cultured in superfusion system could keep normal tissue activity and ultrastructure within 12 ~ 60h in DMEM plus 10% calf serum, while mammary tissue stationary culture could keep normal tissue activity and ultrastructure within 60 ~ 108h. Both culture systems had some advantages and disadvantages.

Key words superfusion, mammary tissue, LDH, ultrastructure

目前为止,乳腺的泌乳机制、乳蛋白的调控机理及不同激素或生长因子在乳腺中的信号通路研究主要集中在上皮细胞水平上,实际上乳腺发育和泌乳的不同时期,乳腺上皮细胞和周围的基质间存在密切的信号连接与相互作用^[1],因此,建立体外培养乳腺组织体系可以为更好地揭示乳腺的各种调控机理提供方便的研究方法。组织培养方法的优点是能保

持细胞之间及与细胞基质之间的相互作用,可以从整体水平上研究组织的分泌等功能,在某种程度上能真实反映器官对药物的反映^[2]。近年来不少国内外学者利用体外培养的乳腺组织进行乳腺的上述机理研究^[3,4],但所用组织培养方法不一。1967 年至今,虽然其他组织的灌流培养方法得到了广泛应用,但用于培养乳腺组织的试验未见研究报道。本文的

Received: June 26, 2006; Accepted: August 8, 2006.

This work was supported by the grants from the Key Projects for Dairy Industry from Ministry of Science and Technology of China (No. 2002BA518A12) and Department of Science and Technology of Jiangsu Province (No. BG2003303).

* Corresponding author. Tel: 86-25-84395045; E-mail: glwang@njau.edu.cn

国家科技部奶业重大研究专项(No. 2002BA518A12)和江苏省“十五”科技攻关项目(No. BG2003303)资助

© 2006 中国微生物菌种保藏委员会编辑部 http://journals.im.ac.cn

目的是建立奶牛乳腺组织的体外灌流培养体系,并与常规的贴壁培养法相比较,观察两种方法的培养效果,为体外研究乳腺组织代谢及信号传导机能建立一个平台。另外,体外培养的乳腺组织是获得原代乳腺上皮细胞或上皮细胞系的前提,从而可以用于乳腺细胞转基因和乳腺生物反应器定位表达载体的评估^[5],对于牛、羊等大动物乳腺生物反应器的研究有重要意义。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂

DMEM(GIBCO),小牛血清(杭州四季青),LDH试剂盒(南京建成,20051208),Tris-饱和酚(北京双翔生化,20060413),蛋白酶K(CALBIOCHEM),其他试剂均为分析纯级别。

1.2 仪器

自动体外组织灌流系统由美国(Colo Parmer)产冷水柜、12通道恒流泵、恒温水浴锅、自制培养室、及空气泵等组成(装置图参见王根林的实验)^[6],灌流液置于冷水柜中,经恒流泵,连续灌流培养乳腺组织,通过输出管收集样本,所有培养液中均通入经0.25 μm 过滤器滤过的新鲜空气。

CO_2 培养箱、无菌操作台、高速低温离心机、透射电子显微镜、分光光度计等。

1.3 方法

1.3.1 奶牛乳腺组织块制备:乳腺组织采自健康屠宰奶牛,切取乳腺组织,选择脂肪较少而富含乳腺小叶的部位,尽量剔出脂肪,用PBS(含有1g/L青霉素、0.5g/L链霉素)冲洗组织块,放入4℃PBS中暂存。在超净工作台上,于含有少量PBS(含有0.1g/L青霉素、0.05g/L链霉素)的培养皿中用眼科剪反复剪切成大小约2mm³的小块,将组织块连同PBS倒入离心管中,再补加PBS,用吸管轻轻吹打,静置2~3min,吸除上清再加入PBS如此反复洗涤组织块3~5次,吸除上清,组织块用于体外培养。

1.3.2 灌流培养:将组织块装入自制的灌流小室中,培养基中通入新鲜空气,37℃进行灌流培养。

(1)最适培养基的选择:三种培养基:Hanks、DMEM、DMEM+10%小牛血清(含有0.1mg/L胰岛素、0.1mg/L氢化可的松、1mg/L孕酮、1 μg /L雌二醇、0.1g/L青霉素、0.05g/L链霉素),每组3个重复,以4mL/h的速度(参考王根林^[6]的实验)灌流培养奶牛乳腺组织24h,灌流结束后取组织和灌流液进行组织活性检测,确立最适合的培养基。

(2)最适灌流速度的选择:采用(1)确立的最适培养基以8mL/h、4mL/h、1mL/h三种速度分别灌流组织24h,检测组织活性来确立较适合的灌流速度。

(3)培养时间对奶牛乳腺组织活性的影响:采用(1)和(2)确立的最适培养基和最适速度连续灌流培养乳腺组织72h,每隔12h采组织样和灌流液进行活性检测,观察灌流不同时间乳腺组织活性变化。

1.3.3 贴壁培养:将组织块培养在铺有鼠尾胶原(按林桂娟的方法制备鼠尾胶原,2004)^[7]的6孔培养板(Corning公司)上,用含有10%小牛血清的DMEM培养液(培养液中添加:0.1mg/L胰岛素、0.1mg/L氢化可的松、1mg/L孕酮、1 μg /L雌二醇、0.1g/L青霉素、0.05g/L链霉素。)入 CO_2 培养箱37℃进行贴壁培养。贴壁组织块连续培养120h,每隔12h收集培养上清和组织块进行活性检测。

1.3.4 活性指标检测:

(1)收集的培养液中LDH活力测定:收集灌流液和贴壁培养上清液,直接取原液按试剂盒说明测定LDH活力。计算公式:收集的培养液中LDH活力(u/L)=(测定管OD值-测定空白管OD值)/(标准管OD值-标准空白管OD值) $\times 0.380 \times 1000\text{mL/样品取样量}(\text{mL}) \times$ 测试前样品稀释倍数。

(2)培养后的组织细胞活力测定:取培养后的组织块置入2.5g/L胰蛋白酶溶液在室温下消化2~3h,加入少量营养液终止消化,300目尼龙网过滤,滤液经1500r/min离心10min,去上清液,洗涤2次,1500r/min离心10min,去上清液,制备成 5×10^6 左右的细胞悬液,加入20g/L台盼蓝,滴入血细胞计数器,光镜下计数4个大格内的着色细胞和拒染细胞(即活细胞),根据下式计算细胞活力:细胞活力=[拒染细胞数/(着色细胞数+拒染细胞数)] $\times 100\%$

(3)DNA完整性检测:培养后组织加入3mL裂解缓冲液(加入20 μL Proteinase K)混匀,50℃水浴摇床振摇过夜;先加入2mL Tris饱和酚混匀10min,10000r/min 4℃离心10min,移出上层水相至新离心管中,加入酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)等体积(1mL酚,1mL氯仿/异戊醇)轻柔颠倒混匀,10000r/min 4℃离心10min,取出上清液,再加入另一离心管内,加氯仿:异戊醇(24:1)1mL混匀10min,10000r/min 4℃离心10min;取上清,上清液中加入适量无水乙醇沉淀DNA,挑取DNA至1.5mL EP管,用75%预冷乙醇洗涤DNA 2次;撇开离心管口在超净工作台上干燥,使残留的乙醇挥发,加入TE缓冲液和RNase A使DNA充分溶解,用1%琼脂糖凝胶电泳

检测并照像。

(4)亚细胞结构观察 培养后的组织用冷 2.5% 戊二醛 4℃ 进行固定 ,清洗 ,再用 1% 锇酸固定 ,后经脱水、包埋、聚合、切片、染色等步骤制成超薄切片 ,在透射电镜下观察乳腺组织细胞的亚结构。

2 数据统计

实验中各处理组内设置 3~5 个重复 ,每个实验独立重复 5 次。数据以“ 平均数 ± 标准差 ”表示 ,采用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析 ,差异显著表示为 $P < 0.05$,差异极显著表示为 $P < 0.01$ 。

3 实验结果

3.1 灌流方法对奶牛乳腺组织活性的影响

3.1.1 不同培养基对奶牛乳腺组织活性的影响 :用 Hanks、DMEM、DMEM + 10% 小牛血清 3 种培养基灌流培养 24h ,测得三个组收集灌流液中的 LDH 活力差异显著($P < 0.05$) ,Hanks 组显著高于 DMEM 和 DMEM + 10% 小牛血清组($P < 0.05$) ,DMEM 组显著高于 DMEM + 10% 小牛血清组($P < 0.05$)。台盼蓝检测三组间组织细胞活力差异显著 ,Hanks 组显著低于后两组和对照组($P < 0.05$) ,DMEM 组显著低于 DMEM + 10% 血清组和对照组($P < 0.05$) ,DMEM + 10% 小牛血清组低于对照组但差异不显著($P > 0.05$,见表 1)。

Hanks 组组织基因组 DNA 不完整有刷状死亡条

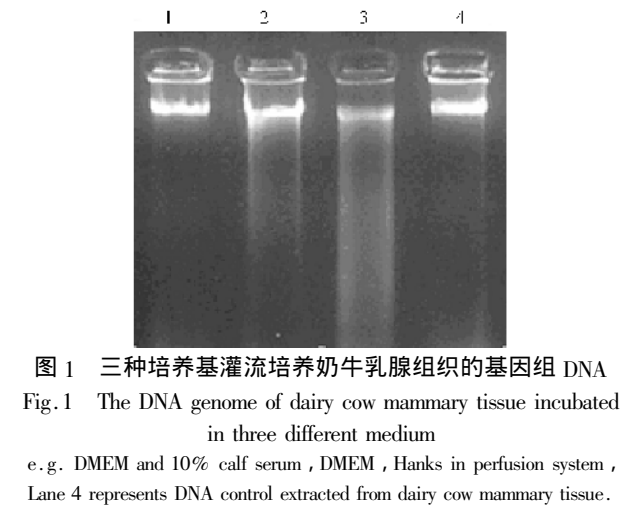


图 1 三种培养基灌流培养奶牛乳腺组织的基因组 DNA
Fig.1 The DNA genome of dairy cow mammary tissue incubated in three different medium
e.g. DMEM and 10% calf serum , DMEM , Hanks in perfusion system , Lane 4 represents DNA control extracted from dairy cow mammary tissue.

带出现 ,DMEM 和 DMEM + 10% 血清组基因组 DNA 完整(图 1)。新鲜采取的乳腺组织电镜观察可见常染色体均匀分布 ,在其成熟面附近有大量中等密度的分泌颗粒(SG) ,细胞表面有上皮细胞微绒毛(Mv) 结构并且可见细胞胞吐现象(图 2)。Hanks 培养的乳腺组织超微结构呈现明显的凋亡特征 ,异染色质(Hc)浓缩在细胞核边缘、核膜破裂(图 3)。DMEM 组细胞超微结构基本正常但异染色质(Hc)浓缩在细胞核边缘有轻微凋亡特征(图 4) ,DMEM + 10% 小牛血清组上皮细胞完整 ,线粒体(Mi)丰富 ,分泌颗粒(SG)较多 ,细胞微绒毛(Mv)明显(图 5)。结果表明体外灌流培养乳腺组织采用 DMEM + 10% 小牛血清对于保持乳腺组织活性与结构优于 Hanks 和 DMEM。

表 1 不同培养基对灌流培养的奶牛乳腺组织活性的影响				
Table 1 Effects of different medium on the activity of cow mammary tissue cultured in perfusion system				
Group	Control	Hanks	DMEM	DMEM + 10% serum
LDH vigor(μ L)		336.568 ± 3.978 ^a	284.017 ± 3.358 ^b	202.396 ± 4.307 ^c
Cell viability/ %	97.143 ± 1.160 ^A	78.003 ± 2.166 ^B	86.660 ± 1.607 ^C	93.080 ± 1.475 ^A

Note : Values in the same line with the different superscript letters differ significantly($P < 0.05$).

3.1.2 不同灌流速度对奶牛乳腺组织活性的影响 :采用 DMEM + 10% 小牛血清以 8mL/h、4mL/h、1mL/h 三种速度分别灌流培养组织 24h ,台盼蓝染色检测组织细胞活力 ,因为不能采取三种速度同时灌流组织 ,因此每种速度灌流 24h 后组织的细胞活力与对照组织细胞活力的比值作为三种速度的比较。由表 2 可见 4mL/h 与 1mL/h 组细胞活力高于 8mL/h 组差异显著($P < 0.05$) ,但 4mL/h 与 1mL/h 组两组间组织细胞活力差异不显著($P > 0.05$)。三种速度培养奶牛乳腺组织 DNA 基本保持完整 ,8mL/h 略有刷状条带出现(图 6)。

表 2 不同灌流速度对组织细胞活力的影响	
Table 2 Effects of different speeds on the activity of cow mammary tissue cultured in perfusion system	
Speed(mL/h)	Cell viability/ %
8	88.166 ± 1.127 ^a
4	91.383 ± 0.552 ^b
1	92.134 ± 1.327 ^b

Note : Values in the same column with the different superscript letters differ significantly($P < 0.05$).

3.1.3 不同培养时间对乳腺组织活性的影响 :DMEM + 10% 小牛血清以 1mL/h 的速度连续灌流培养乳腺组织 72h 后检测组织活性 ,发现灌流 60h 的

组织超微结构正常,分泌颗粒(SG)较多,微绒毛明显(Mv)(图7);灌流24h后LDH活性显著下降36h开始趋于平稳(图8);组织细胞活力12h后显著升高($P < 0.05$),12~60h之间细胞活力处于增殖期(图9)60h后细胞活力下降;72h内组织DNA较完整没有明显凋亡或死亡条带出现(图10),说明72h内组织能保持较高活性,12~60h内活性最好。

3.2 组织块贴壁法对奶牛乳腺组织活性的影响

贴壁培养的组织上清LDH活力24h后显著下降($P < 0.01$),60~108h之间LDH活力最低处于平台期60h、72h、84h和96h四组间LDH活力差异不

显著($P > 0.05$),108h后LDH活力又升高(图11);组织细胞活力12h~96h细胞呈现增殖期,96h后活力下降但120h细胞活力仍保持在90%(图12);120h内各时间点基因组DNA基本完整(图13);贴壁培养60h的组织电镜观察超微结构正常,核染色质分布均匀,可见细胞释放分泌颗粒(SG)(图14),培养120h的组织线粒体含量较丰富(图15);倒置显微镜下观察组织在48h完全贴壁,组织开始增殖在组织周围长出新的透明细胞,均说明贴壁培养的乳腺组织在60~108h内活性最高。

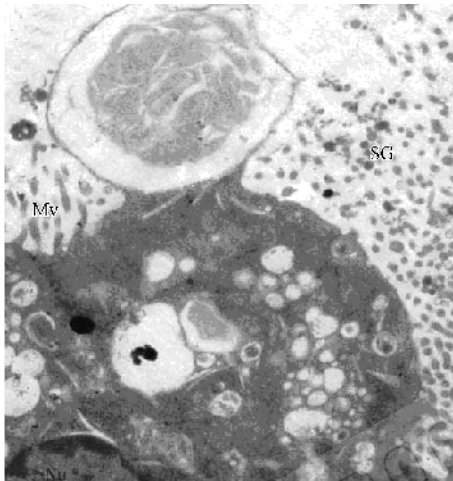


图2 正常的乳腺组织亚细胞结构

Fig.2 Ultrastructure of normal mammary tissue cells($\times 7500$)
Nu :nucleus ; SG : secretory granule ; Mv : microvilli.

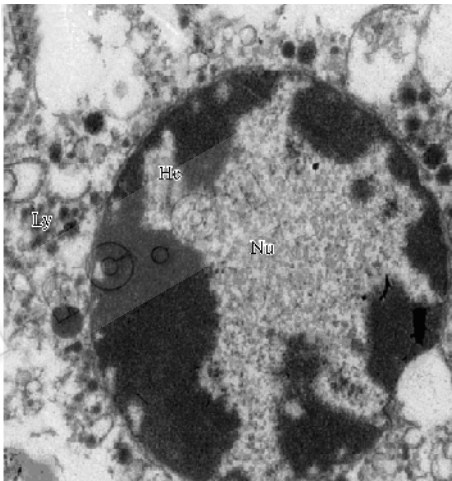


图3 Hanks 灌流培养24h的乳腺组织亚细胞结构

Fig.3 Ultrastructure of mammary tissue cells
incubated in Hanks for 24h($\times 15\,000$)
Nu :nucleus ; Hc : heterochromatin ; Ly : lysosome.

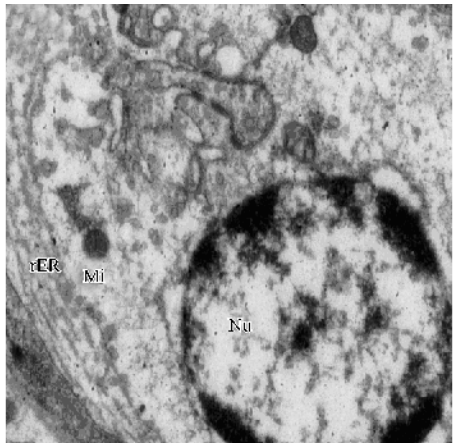


图4 DMEM 培养基灌流培养24h的乳腺组织亚细胞结构

Fig.4 Ultrastructure of mammary tissue cells
incubated in DMEM for 24h($\times 15\,000$)

Nu :nucleus ; Mi : mitochondrion ; rER : rough endoplasmic reticulum.

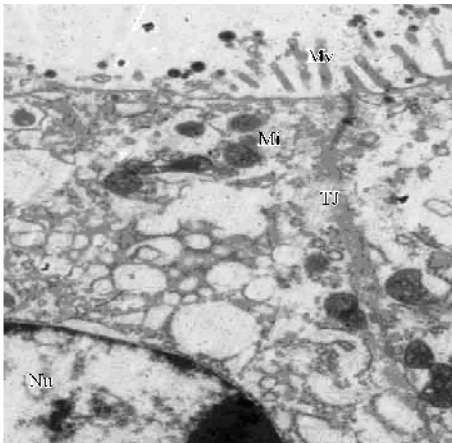


图5 DMEM + 10%小牛血清灌流培养24h的乳腺组织亚细胞结构

Fig.5 Ultrastructure of mammary tissue cells
incubated in DMEM and 10% calf serum for 24h($\times 10\,000$)

Nu :nucleus ; Mi : mitochondrion ; Mv : microvilli ; TJ : tight junction.

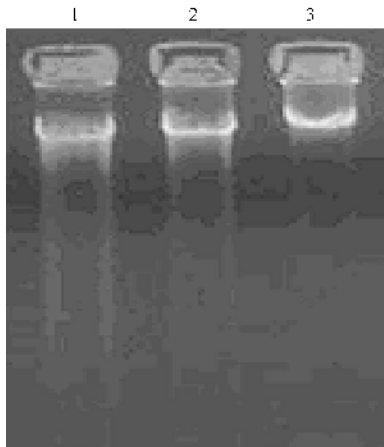


图 6 不同灌流速度培养奶牛乳腺组织的基因组 DNA
DNA genome of dairy cow mammary tissue incubated in perfusion system at the speed of 8mL/h ,4mL/h and 1mL/h (lanes1 ~ 3 , respectively)

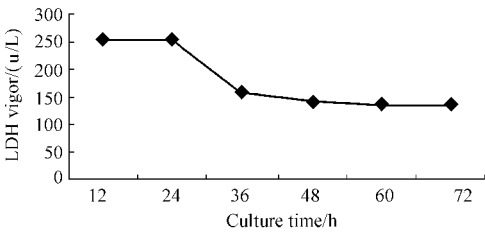


图 8 灌流培养不同时间上清液中 LDH 活性
Fig.8 The activity of LDH in perfusion system (n = 3 , the results represent mean \pm SD).

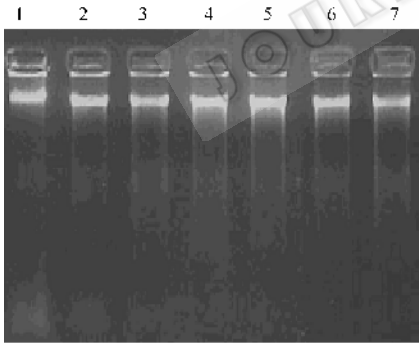


图 10 灌流培养不同时间对奶牛乳腺组织基因组 DNA 的影响

Fig.10 The effects of culture time in perfusion system on the DNA genome of dairy cow mammary tissue
Lanes 1 ~ 7 represents DNA genome of the tissue extracts at 12h , 24h , 36h , 48h , 60h , 72h after perfusion.

4 讨论

4.1 灌流培养对奶牛乳腺组织活性的影响

关于体外灌流培养乳腺组织的试验研究尚未见报道 ,灌流培养其他组织实验中所用培养基由最初的 KRB 缓冲液到 M199 等完全培养基^[8]。本实验发现体外灌流培养乳腺组织采用 DMEM + 10% 小牛血

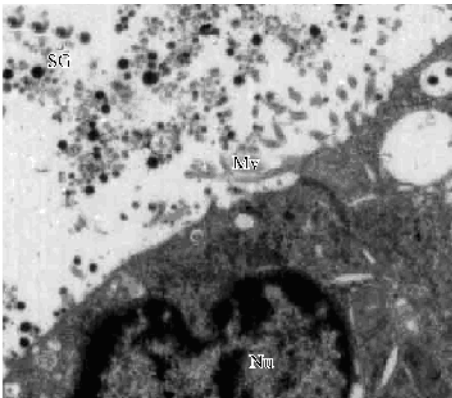


图 7 灌流 60h 的乳腺组织亚细胞结构

Fig.7 Ultrastructure of mammary tissue cells incubated for 60h ($\times 10\,000$)
Nu :nucleus ; Mv :microvilli ; SG :secretory granule.

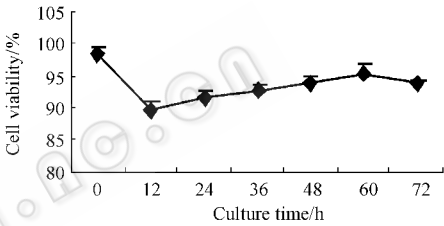


图 9 灌流培养不同时间乳腺组织细胞活力
Fig.9 The viability of mammary tissue cells in perfusion system n = 3 ,the results represent mean \pm SD .

清对于保持乳腺组织活性与结构优于 Hanks 和 DMEM。因为 Hanks 成分简单是与组织细胞等渗的离子平衡盐溶液 ,没有营养成分供应给组织细胞 ,因此只能用于短时间保存组织 ,不能长时间保持组织的活性与代谢功能。DMEM 属于完全培养基 ,包含组织细胞生长所需的各种基本营养成分 ,因此对于组织细胞培养来说是常用的培养基 ,但目前进行细胞培养均要在 DMEM 等完全培养基中添加血清 ,血清是细胞、组织培养中用量最大的天然培养基 ,含有丰富的细胞、组织生长所需要的营养成分(激素、蛋白质、多肽、结合蛋白及其它生长因子) ,其主要功能是能促进贴壁组织的贴壁、伸展和生长 ,对体外培养组织能够维持组织的基本活性和功能 ,另外血清在培养基当中还具有酸碱缓冲、解毒等作用^[9]。因此添加 10% 小牛血清的 DMEM 培养基灌流培养的乳腺组织活性较高。

关于灌流速度说法不一 ,有 4mL/h、27mL/h、70 μ L/min、2.5 mL/min 等不同水平的灌流速度^[6,8,10]。灌流速度大小可能与对组织的压力有关 ,组织在体内是处于一定压力状态下 ,因此不同灌流

速度对于组织活性可能有一定影响。本实验发现奶牛乳腺组织在 1mL/h 与 4mL/h 中组织细胞活力较显著高于 8mL/h 组,但 1mL/h 与 4mL/h 两组间差异不显著,可能是 1mL/h 与 4mL/h 这两种速度能基本保持组织的生理压力,而灌流速度过快时可能压力偏

大,也可能是组织不能充分吸收营养物质导致组织活性降低,同时灌流速度过快也浪费培养基,因此建议使用 1mL/h ~ 4mL/h 的速度对奶牛乳腺组织进行灌流培养。

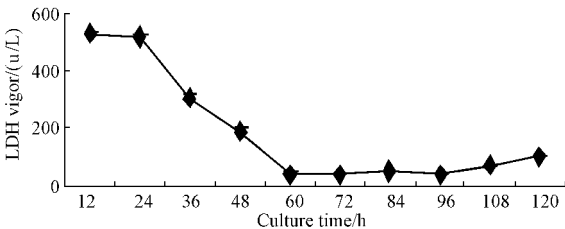


图 11 贴壁培养不同时间上清液中 LDH 活性
Fig.11 The activity of LDH in supernatant at different adherent culture time
n = 3, the results represent mean ± SD.

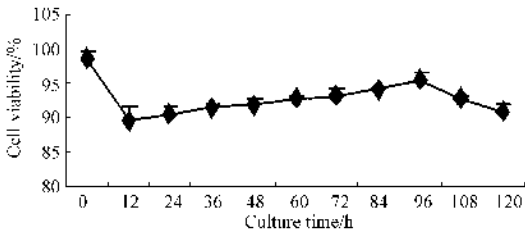


图 12 贴壁培养不同时间乳腺组织细胞活力
Fig.12 The viability of mammary tissue cells at different adherent culture time
n = 3, the results represent mean ± SD.



图 13 组织块贴壁培养不同时间对奶牛乳腺组织基因组 DNA 的影响
Fig.13 The effect of different adherent culture time on the DNA genome of dairy cow mammary tissue
Lanes 1 ~ 10 represents DNA genome of the tissue extracts at 12h, 24h, 36h, 48h, 60h, 72h, 84h, 96h, 108h and 120h after culturing.

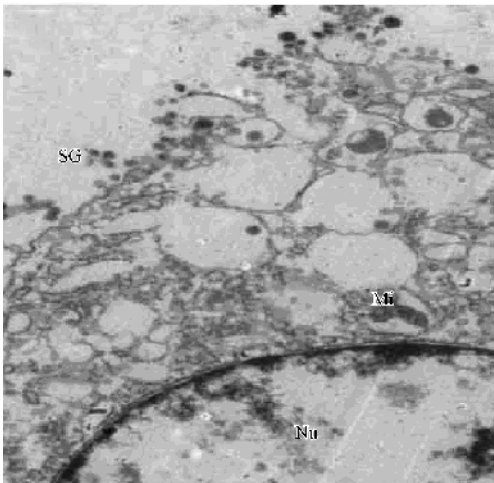


图 14 贴壁培养 60h 的乳腺组织亚细胞结构
Fig.14 Ultrastructure of mammary tissue cells incubated in adherent culture for 60h(× 10 000)
Nu :nucleus ; Mv : microvilli ; SG : secretory granule.

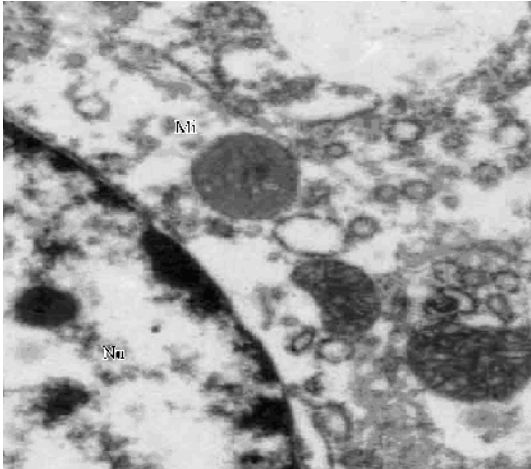


图 15 贴壁培养 120h 的乳腺组织亚细胞结构
Fig.15 Ultrastructure of mammary tissue cells incubated in adherent culture for 120h(× 20 000)
Nu :nucleus ; Mi : mitochondrion.

LDH 为乳腺上皮细胞胞浆内所含酶之一,而 LDH 活性升高通常做为乳腺损伤程度的一个重要

指标。在正常情况下,细胞内酶由于细胞膜的屏障作用不易逸出,但当细胞受到损伤,细胞膜的通透性

加大便会释放出来,其活性明显升高^[11]。灌流乳腺组织 72h,发现上清液中 LDH 活力 24h 前活性较高,可能是由于组织由采集到培养过程中受到剪切冲洗等操作,导致组织块外周部分细胞受到损伤,膜通透性增加,分泌 LDH 较多,24h 后组织适应了新环境开始进行新陈代谢,因此 LDH 活力下降并趋于平稳,说明组织活性保持良好。同时检测组织细胞活力、基因组完整性和超微结构结果均说明 72h 内组织活性良好,但 60h 后细胞活力下降说明组织活性随培养时间的进一步延长而下降,但 72h 组织细胞活力仍能达到 90%。

4.2 贴壁培养对奶牛乳腺组织活性的影响

本实验发现,贴壁培养的乳腺组织 60~108h 内 LDH 活力最低,细胞活力 12~96h 内较高,60h 时组织分泌性较好均说明组织细胞活性良好,108h 后 LDH 活力升高同时 96h 后细胞活力也开始下降,说明组织随培养时间的进一步延长,活性开始降低。可见组织贴壁后开始代谢增殖,保持良好的组织活性,保持良好组织活性一段时间后组织活性开始下降,与赵学军报道的实验结果相符^[12]。但与之报道不同的是,本实验所用组织为新鲜采取的乳腺组织,而非液氮冻存的组织,所以组织培养到 120h 组织细胞活力仍能达到 90%。研究表明胶原可以促进体外培养的乳腺组织块和上皮细胞的附着和生长,培养基中添加胰岛素和氢化可的松也可以促进组织细胞的贴壁,本实验中应用了胶原和激素可能是组织活性保持良好的一个因素。

4.3 两种培养方法的优缺点比较

灌流培养奶牛乳腺组织方法操作比较简单,培养 24h 后即可对组织进行试验处理,试验周期短,可以减弱组织代谢底物对培养组织的反馈调节作用,培养基处于不断流动状态不易污染,比贴壁法更接近与体内的环境,而组织块贴壁培养的奶牛乳腺组织 48h 完全贴壁后才具有良好状态,一般在培养后 60h 才可进行处理,实验周期较长,培养过程中要及时更换培养基增加了污染机会。但是,贴壁方法一次培养的组织量大于灌流法培养的组织量,可以满足对组织需求多的试验。总之两种培养方法在一定时间内均能较好的保持组织的活性,各有优缺点,应该根据不同实验加以选择。

本实验建立了体外培养奶牛乳腺组织的体系,对于利用乳腺组织研究乳腺的功能机理提供了组织

模型。该体系也是研究乳腺转基因与乳腺生物反应器过程中建立乳腺上皮细胞的前提,对于建立奶牛乳腺生物反应器的研究有实验意义。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Neville MC, Medina D, Monks J *et al.* The mammary fat pad. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1998, **3**: 109–116
- [2] Zhao F(赵芳), Luo WX(罗文祥), Ma KR(马魁榕) *et al.* The effect of interferon- α and - γ on the function of corpora lutea in perfused pseudopregnant rat ovary. *Acta Zoologica Sinica*(动物学报), 1996, **42**(4): 401–407
- [3] Lin Y(林叶), Li QZ(李庆章). Study on signal transduction pathway of leptin in mammary gland of mouse. *Journal of Northeast Agricultural University*(东北农业大学学报), 2006, **37**(1): 58–63
- [4] Accorsi PA, Pacioni B, Pezzi C *et al.* Role of prolactin, growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. *J Dairy Sci*, 2002, **85**(3): 507–513
- [5] Kumura H, Tanaka A, Abo Y *et al.* Primary culture of porcine mammary epithelial cells as a model system for evaluation of milk protein expression. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, **65**(9): 2098–2101
- [6] Wang GL(王根林), Chen J(陈杰), Parvizi N. Effect of daidzein on LH secretion in the superfusion system of anterior pituitary tissue from goettingen miniature gilts. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报), 1997, **20**(4): 48–53
- [7] Lin G(林桂娟), Wang T(王恬), Chen CY(陈才勇). A Study on primary culture of cow mammary epithelial cell separated directly. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*(畜牧与兽医), 2004, **36**(7): 4–6
- [8] John Watson, Pauline M, Wrigglesworth. Progesterone synthesis by pig corpus luteum tissue during superfusion. *Biochem*, 1979, **150**: 301–304
- [9] Zhang H(张浩). Functions of ox-serum in cell culturing and quality requirements. *Sci/Tech Information Development and Economy*(科技情报开发与经济), 2001, **11**(3): 46–47
- [10] Mapk M, Foreman, John C Porter. Prolactin augmentation of dopamine and norepinephrine release from superfused medial basal hypothalamic fragments. *Endocrinology*, 1981, **108**(3): 800–804
- [11] Wang I(王林), Guo YJ(郭艳杰), Wan LX(宛林兴) *et al.* Study on the relationship between of production of alcohol positive milk and heat stress. *Acta Ecologiae Animalis Domestica*(家畜生态学学报), 2005, **26**(5): 68–71
- [12] Zhao XJ(赵学军), Wu HH(吴慧慧), Zhang CQ(张才乔) *et al.* Comparison of methods for culturing lactating cattle mammary gland *in vitro*. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2005, **13**(4): 512–515