

# 不同浓度奶牛乳腺上皮细胞和奶牛脐带间充质干细胞共培养对细胞增殖作用的研究

王立文, 邵 伟, 赵艳坤, 李 杨, 林 静, 余 雄\*

(新疆农业大学 动物科学学院 新疆肉乳用草食动物营养实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

**[摘 要]** 研究在不同浓度下奶牛脐带间充质干细胞和奶牛乳腺上皮细胞共培养对共培养体系细胞增殖的影响。将 P3 代 UC-MSCs 与 P3 代 BMECs 按照浓度比例为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:50、1:100、1:1000、2:1 等不同比例随机混合培养, 同时设立 UC-MSCs 与 BMECs 单纯培养组为对照组, 并分别于 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h 和 144 h 时观察各组细胞的形态变化, 用 MTT 法检测细胞增殖。将 UC-MSCs 和 BMECs 按照不同浓度比混合共培养后, 细胞生长状态良好, 无抑制作用; MTT 检测增殖发现各组 OD 值在 72 h 时均达到最大, 其中 1:2 浓度组 OD 值最大, 细胞增殖最快。UC-MSCs 和 BMECs 混合共培养, 两种细胞之间无抑制作用, 生长状态良好, 同时能够促进共培养体系的细胞增殖。

**[关键词]** 脐带间充质干细胞; 乳腺上皮细胞; 细胞共培养; 细胞增殖

**[中图分类号]** S811.5

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1005-5228(2016)1-0041-05

间充质干细胞(Umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)由于其具有多向分化潜能、自我更新能力强以及支持造血和促进造血干细胞植入、调节免疫以及分离培养操作简便等优点<sup>[1]</sup>, 受到了人们的广泛关注, 成为研究的热点。随着间充质干细胞和相关技术的逐渐成熟, 许多国家都已经开展了多项临床研究。临床上一些疑难性疾病现已开始用间充质干细胞治疗, 如脊髓损伤<sup>[2]</sup>、脑瘫<sup>[3]</sup>、肌萎缩侧索硬化症<sup>[4]</sup>、系统性红斑狼疮<sup>[5]</sup>、系统性硬化症<sup>[6]</sup>、克隆氏病<sup>[7]</sup>、中风<sup>[8]</sup>、糖尿病<sup>[9]</sup>、糖尿病足<sup>[10]</sup>、肝硬化<sup>[11]</sup>等。间充质干细胞的临床应用给未来的再生医学带来了新的希望, 但在畜牧生产上的研究应用还较少。秦小惠<sup>[12]</sup>通过将 BMSCs 移植到乳腺炎模型大鼠的体内, 来探究 BMSCs 对乳腺炎模型大鼠乳腺修复的作用, 研究发现, 移植 BMSCs 后乳腺炎模型大鼠的乳腺组织逐渐恢复, 试验 7 d 时移植 BMSCs 组乳腺组织已恢复到正常水平, 这为寻找高效、安全、绿色的奶牛乳腺炎防制方法提供新的

思路, 具有非常重要的意义; 邵伟<sup>[13]</sup>将脐带间充质干细胞通过颈静脉移植入哈萨克羔羊体内, 发现注射脐带间充质干细胞能够极显著的增加哈萨克羔羊生长发育速度, 有效的增加其生产性能和抗逆性, 这为间充质干细胞在畜牧生产中的应用提供了强有力的理论依据; 古再丽努尔·艾买提<sup>[14]</sup>将 BMSCs 从尾静脉和乳腺基底部注射移植到不同生长发育期的大鼠体内, 并初步探讨 BMSCs 对大鼠乳腺发育影响及其作用机理, 研究结果表明: 不同生长发育期的大鼠体内以尾静脉和乳腺基底部注射移植 BMSCs 后, 能够增加大鼠机体代谢水平, 进而促进妊娠大鼠体重、子宫和乳腺重增加, 并促进乳腺组织形态发育进而增加泌乳量, 为今后研发提高奶牛产奶量的技术做了前期的基础研究, 具有重要意义。本试验在前人研究的基础上, 利用干细胞共培养技术, 将脐带间充质干细胞与乳腺上皮细胞(Bovine mammary epithelial cells, BMECs)共培养, 更加直观、清晰的研究脐带间充质干细胞对乳腺上皮细胞的增殖及分

\* [收稿日期] 2015-07-15 修回日期: 2015-09-08

[基金项目] “现代农业(奶牛)产业技术体系专项资金资助”(CARS-37); “十二五”国家科技支撑项目(2012BAD12B09, 2011BAD47B02, 2012BAD45B01); 自治区重大专项(20101230694); 2015 年度新疆研究生科研创新项目(XJGRI2015083); 新疆肉乳用草食动物营养实验室开放课题资助

[作者简介] 王立文(1988—), 女, 河南人, 在读博士研究生, 研究方向: 动物营养与饲料科学。E-mail: 393123508@qq.com

\* [通讯作者] 余 雄(1958—), 男, 四川邻水人, 教授, 博士生导师, 长期从事动物营养与饲料的教学与研究。

E-mail: yuxiong8763601@126.com

化的调控作用,为未来畜牧生产中提高奶产量、促进奶产业发展提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间和地点

试验于 2012 年 6 月至 2013 年 12 月在新疆农业大学生物楼干细胞实验室完成。

### 1.2 试验细胞

UC-MSCs:提取新生犊牛脐带,分离培养出原代 UC-MSCs,并传至 P3 代。BMECs 细胞购自广州吉妮欧生物科技有限公司,复苏后传至 P3 代。

### 1.3 主要试验试剂和仪器

台式低速离心机,TD5A-WS 型;倒置显微镜,型号:MotiC-AE31;二氧化碳培养箱,型号:HF151UV;Benchmark 酶标仪,Bio-Rad 公司,美国;六孔板,Cyagen 产;高糖 DMEM 培养基,Hyclone 公司;胎牛血清,Gibco 公司;0.25%胰蛋白酶+EDTA,Hyclone 公司;0.01%PBS,Hyclone 公司;MTT

### 1.4 试验方法

1.4.1 UC-MSCs 细胞的鉴定 将培养出的 UC-MSCs 进行成骨诱导分化、成脂诱导分化、细胞碱性磷酸酶染色鉴定<sup>[15]</sup>。

1.4.2 BMECs 的复苏 从液氮罐中取出冻存管,迅速置于 37℃ 水浴锅中解冻,不断晃动,时间不超过 1 min,注意不能将整个冻存管都浸入到水浴中,要将冻存管盖口露出水面,以免污染。当冻存管内的晶体基本融化完全时,用酒精棉球快速擦净冻存管外壁的水,转移到 10 mL 离心管中,加入 5 mL LPBS,1 200 rpm 离心 5 min 后加入完全培养基制成单细胞悬液将细胞接种至培养皿中,放入 37℃,5%CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养。24 h 后换液继续培养。

1.4.3 BMECs 的传代培养 在倒置显微镜下观察细胞的生长情况,待贴壁细胞约 80%融合成片后,吸取培养液,用无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 的 PBS 冲洗细胞 3 次,加入 0.05%胰蛋白酶和 0.02%EDTA 消化液消化细胞,放入培养箱中消化 5 min,不断在倒置显微镜下观察细胞,待大多数细胞回缩,变圆,细胞间隙扩大时,轻拍培养皿壁,使细胞从培养皿上脱落,然后迅速加入完全培养基终止消化;再用移液器反复吹打细胞,使其分散成为单个细胞,用培养液按 1:2 的比例稀释并重新接种细胞,置 37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中培养,隔日换液。

1.4.4 UC-MSCs 和 BMECs 共培养 将复苏后的 P3 代生长状态良好的 BMECs 细胞和培养至 P3 代的 UC-MSCs 分别按照 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、1:50、1:100、1:1000、2:1 等不同比例接种于六孔板中培养,细胞总数维持在 1×10<sup>5</sup>/孔,单纯 UC-MSCs 和单纯 BMECs 对照组每皿接种 1×10<sup>5</sup> 个细胞,保持接种细胞密度相同。37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵育箱连续培养 7 d,每天换液并收集各组上清保存于-80℃ 冰箱以便进一步检测。

1.4.5 用 MTT 检测细胞的增殖 收集各浓度组细胞,调整细胞悬液浓度为 1×10<sup>4</sup>/孔,接种于 96 孔板,每组浓度设定 3 个复孔,共接种 6 板,每隔 24 h 取一板进行检测。置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 恒温培养箱使细胞贴壁。24 h 后加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL,即 0.5%MTT),继续培养 4 h。终止培养,缓慢的吸尽孔内的培养液。每孔加入 150 μL DMSO,放置于摇床上低速振荡 10 min,使孔内的结晶物逐渐充分溶解。用酶联免疫检测仪在 490 nm 处测量各孔样品的吸光值。同时设置调零孔(MTT、培养基、DMSO),每组同时设定 3 个复孔。

1.4.6 统计学处理 试验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,组间差异采用 t 检验,SPSS 16.0 软件进行统计学分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 UC-MSCs 细胞的鉴定

UC-MSCs 细胞成骨诱导分化 21 d 可见细胞内钙结节形成明显,经茜素红染色呈红色结节;UC-MSCs 细胞成脂诱导分化约 2 周后脂滴数量增加并相互融合,细胞由长梭形变为圆形或多边形,油红 O 染色显示有大量脂质沉淀;UC-MSCs 细胞经碱性磷酸酶染色后可见细胞呈深棕红色<sup>[15]</sup>。

### 2.2 BMECs 的复苏与传代

复苏后的第一代 BMECs 生长状态良好,为圆形和多角形,经过两次传代后,细胞形态均一,成纤维样细胞基本除去,细胞之间排列紧密,呈现典型的鹅卵石样结构(图 1)。

### 2.2 UC-MSCs 和 BMECs 混合培养的形态观察

将 UC-MSCs 和 BMECs 按照不同浓度比混合共培养后,细胞之间能够共同生长,无接触抑制,无相互排斥以及相互吞噬现象。UC-MSCs 主要呈成纤维样的长梭形分布于整个视野,BMECs 主要呈鹅卵石样聚集成团,边缘呈多角形。倒置显微镜下观

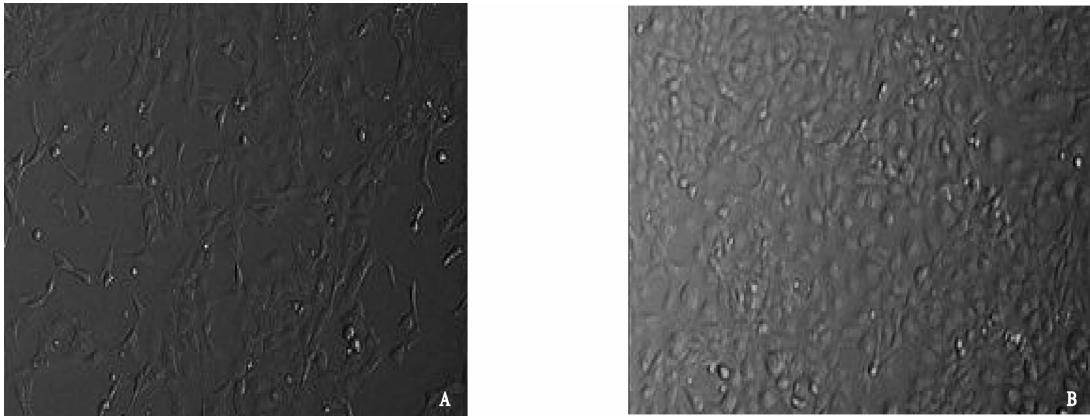


图 1 复苏后的 BMECs 形态(×40)

A. 复苏后 P1 代 BMECs;B. 复苏后 P2 代 BMECs

Fig. 1 The cell morphology of BMECs after recovery

A. BMECs of P1 generation after resuscitation;B. BMECs of P2 generation after resuscitation

察共培养体系后发现,UC-MSCs 浓度高的组细胞数量更多,生长状态更好,其中 1 : 2 浓度组细胞生长状态最好,共培养 72 h 后,各组细胞生长状态均达到最佳,随后细胞开始凋亡,细胞收缩、体积变小,细胞数量逐渐减少,144 h 时,混合共培养组贴壁细胞数量较多,但单纯 UC-MSCs 组和单纯 BMECs 组

贴壁细胞较少,仅能观察到少量细胞。

2.3 MTT 检测细胞增殖

用 MTT 检测细胞增殖,测定结果见表 1。由表 1 可知,将 UC-MSCs 和 BMECs 按照不同浓度比混合共培养后,1 : 2 浓度组 OD 值最高,显著高于对照组( $P<0.05$ ),其余各组之间 OD 值差异较小,

表 1 不同浓度 UC-MSCs 和 BMECs 混合共培养后在不同时间点的 OD 值(490 nm)

Table 1 The OD values of the co-culture at different time (490 nm)

项目 Items	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
1	0.37	0.44	0.56	0.46	0.42	0.41
2	0.40	0.49	0.63	0.57	0.52	0.46
3	0.36	0.45	0.54	0.51	0.49	0.43
4	0.34	0.43	0.50	0.48	0.48	0.41
5	0.33	0.42	0.46	0.44	0.48	0.38
6	0.31	0.41	0.45	0.43	0.46	0.36
7	0.30	0.39	0.43	0.43	0.43	0.36
8	0.28	0.39	0.43	0.41	0.44	0.34
9	0.27	0.38	0.43	0.40	0.38	0.34
10	0.36	0.41	0.50	0.45	0.42	0.39
11	0.27	0.35	0.43	0.42	0.39	0.28
12	0.28	0.34	0.43	0.40	0.37	0.33
2/12 增殖率	42.86%	44.12%	46.51%	42.50%	40.54%	39.39%

注:1~12 分别为 UC-MSCs 和 BMECs 浓度比为 1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 10、1 : 50、1 : 100、1 : 1000、2 : 1、UC-MSCs 单纯培养组和 BMECs 单纯培养组;2/12 增殖率表示 1 : 2 浓度组与 BMECs 单纯培养组相比的增殖率。

Note:1~12 are UC-MSCs and BMECs concentration ratio of 1 : 1,1 : 2,1 : 3,1 : 4,1 : 5,1 : 10,1 : 50,1 : 100,1 : 1000,2 : 1, UC-MSCs pure group and BMECs pure culture group; 2/12 proliferation rate is the rate between 1 : 2 concentration group and BMECs pure culture group.

但也均高于对照组,UC-MSCs 单纯培养组和 BMECs 单纯培养组的 OD 值均低于共培养组,说明将 UC-MSCs 和 BMECs 共培养能够促进共培养体

系的细胞增殖,其中 1 : 2 浓度组促进作用最强;在 72 h 时各组 OD 值均达到最高,随后下降,说明将 UC-MSCs 和 BMECs 共培养的最佳作用时间为

72 h; 1 : 2 浓度组在各时间点与 BMECs 单纯培养组相比,增殖率分别为 42.86%、44.12%、46.51%、42.50%、40.54%、39.39%。

### 3 讨 论

#### 3.1 UC-MSCs 和 BMECs 共培养的形态学观察

本试验中,将 UC-MSCs 和 BMECs 混合共培养后,发现细胞之间能够共同生长,无接触抑制,无相互排斥以及相互吞噬现象。说明 UC-MSCs 和 BMECs 能够共同培养,相互之间无抑制作用。倒置显微镜下观察细胞形态,UC-MSCs 主要呈成纤维样的长梭形分布于整个视野,BMECs 主要呈鹅卵石样聚集成团,边缘呈多角形。这与两种细胞本身的形态一致,说明两种细胞共培养后生长状态良好。倒置显微镜下观察共培养体系后发现,UC-MSCs 浓度高的组细胞数量更多,生长状态更好,其中 1 : 2 浓度组细胞生长状态最好;共培养 72 h 后,各组细胞生长状态均达到最佳,随后细胞开始凋亡,细胞收缩、体积变小,细胞数量逐渐减少,144 h 时,混合共培养组细胞数量较多,但单纯 UC-MSCs 组和单纯 BMECs 组贴壁细胞较少,仅能观察到少量细胞。说明 UC-MSCs 能够促进共培养体系细胞生长,其作用机制可能是由于间充质干细胞的自分泌和旁分泌作用分泌的细胞因子作用对细胞生长有影响。

#### 3.2 MTT 法检测共培养体系细胞增殖

MTT 是一种能接受氢原子的染料,活细胞线粒体中的琥珀脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物并且沉积在细胞内,而死细胞并无此功能<sup>[16]</sup>。使用二甲基亚砷能够溶解细胞中的紫色结晶物,用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值,能够间接的反映出细胞的数量。在一定的细胞数范围内,MTT 结晶物形成的量与细胞数成正比<sup>[17]</sup>。MTT 测定已有效地应用于许多生物学和医学研究中,如淋巴毒素、生长因子、白细胞介素-2 等。对贴壁生长的细胞,用胰酶消化法直接进行细胞计数,由于消化时间不好掌控,且细胞堆积在一起,不容易均匀分散开来,误差较大,MTT 法避免了人为因素的干扰,计数较为准确。本研究利用 MTT 法检测共培养体系中细胞的增殖,结果发现将 UC3MSCs 和 BMECs 按照不同浓度比混合共培养后,1 : 2 浓度组共培养体系细胞增殖最快,最快增殖时间为 72 h 时,这与倒置显微镜下对共培养体系细胞的形态观察的结果一致,说明用 MTT 法检测细胞增殖情况结果可靠。

由上可见,结合 MTT 检测细胞增殖以及细胞形态学观察的结果分析,UC-MSCs 与 BMECs 混合共培养能够促进细胞增殖,且其作用强度与 UC-MSCs 浓度有关,其中 1 : 2 浓度组增殖作用最强,UC-MSCs 与 BMECs 混合共培养具有一定的时效性,在 72 h 作用最强。这可能是由于随着时间的延长,细胞密度不断增加,细胞分泌的各种细胞因子增多,从而抑制了外源性生长因子的作用。

间充质干细胞共培养的作用机制是由细胞间相互接触、干细胞的自分泌和旁分泌作用以及缝隙连接等参与的,本试验将 UC-MSCs 和 BMECs 直接共培养,未做非直接接触共培养对照,因此细胞间相互接触作用及缝隙连接作用对共培养体系中细胞的增殖作用的影响尚不明确,待下一步研究。

### 4 结 论

UC-MSCs 和 BMECs 混合共培养能够促进共培养体系的细胞增殖,最佳培养浓度比为 UC-MSCs 浓度和 BMECs 浓度比值为 1 : 2,最佳作用时间为 72 h,1 : 2 浓度组在 72 h 的增殖率为 46.51%。

#### 参考文献:

- [1] 韩 冰,付小兵. 间充质干细胞的研究进展与临床应用前景[J]. 中国修复重建外科杂志, 2006, 20(12):1 257-1 261.
- [2] 窦慧慧,于 丽,郭文君. 人脐血单个核细胞和脐带间充质干细胞移植用于大鼠脊髓损伤的实验研究[J]. 中国康复医学杂志, 2010 (2): 104-108.
- [3] 李昀. 人脐血单个核细胞, 脐带间充质干细胞移植治疗新生大鼠脑瘫模型的研究[D]. 长沙:中南大学, 2011.
- [4] 李 敏,滑蓉蓉,于爱学,等. 脐带间充质干细胞移植治疗肌萎缩侧索硬化症的疗效分析[J]. 中国医药导报, 2012(12):52-54.
- [5] 戚 燕. 脐带间充质干细胞移植治疗系统性红斑狼疮的临床运用与研究[D]. 昆明:昆明医科大学, 2012.
- [6] 白 炜,李梦涛,侯 勇,等. 间充质干细胞在系统性硬化的应用前景[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2011(1):58-61.
- [7] Zhang Deshuang, Chen Juan. The Latest Application Progress of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells (hUC-MSCs) in Neurological Diseases [J]. International Journal of Psychiatry and Neurology, 2012,1(3):17-21.
- [8] 居胜红,滕皋军,毛 曦,等. 脐血间充质干细胞磁探针标记和 MR 成像研究[J]. 中华放射学杂志, 2005, 39(1): 101-106.
- [9] 钟晓红,王明刚,赵李平,等. 骨髓间充质干细胞在糖尿病模型创面中向表皮细胞分化的初步研究[J]. 中国美容医学, 2010 (1): 65-67.
- [10] 陈 兵,陆德宾,梁自文,等. 自体骨髓间充质干细胞体外

扩增后移植治疗糖尿病足[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(32): 6 227-6 230.

[11] 于 宏,王更银,孙殿兴,等. 脐带间充质干细胞经肝动脉灌注治疗失代偿期肝硬化患者[J]. 肝脏, 2011, 16(3): 185-189.

[12] 秦小惠. 移植骨髓间充质干细胞对乳腺炎模型大鼠乳腺作用的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2013.

[13] 邵 伟. 颈静脉注射脐带间充质干细胞对哈萨克羔羊生长发育及血清生化指标的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2012.

[14] 古再丽努尔·艾买提. 不同生长发育阶段两种途径移植骨髓间充质干细胞对大鼠乳腺发育的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2013.

[15] 王立文,邵伟,赵艳坤,等. 奶牛脐带间充质干细胞的体外培养与鉴定.[J]. 新疆农业科学,2014,51(11):2 099-2 104.

[16] 张 俊,朱正纲,刘风华,等. MTT 法检测 94 例胃癌体外药敏[J]. 上海医学,2002(4):241-243.

[17] 黄立坤,杜 鹏,霍贵成. MTT 法测定乳酸菌活菌数的研究[J]. 食品工业,2008(3):62-65.

Study on Different Concentrations of Bovine Mammary Epithelial Cells with Bovine Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Co-culture in vitro on Cell Proliferation and Adherence Rate Mechanism

WANG Li-wen, SHAO Wei , ZHAO Yan-kun, LI Yang, LIN Jing, YU Xiong\*  
(Xinjiang Key Laboratory of Meat-Milk Production Herbivore Nutrition, College Of Animal Science, Xinjiang Agricultural University , Urumqi 830052)

**Abstract:** The objective of the research is to study the impact of different concentrations of UC-MSCs and BMECs co-culture on cell proliferation. In this study, the P3 generation of UC-MSCs and P3 generation of BMECs with the concentration proportion of 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5, 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 1000 and 2 : 1 etc. were cultivated randomly, and taking UC-MSCs and BMECs pure culture as the control group. The morphological changes of each group were observed at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h and 144 h respectively by MTT cell proliferation assay. The results show the cell growth was in good condition, no inhibition occurred when the UC-MSCs and BMECs co-cultured with different concentrations according to the mixing ratio; MTT proliferation detection reveals OD values reached the peak at 72 h for each group, among which the group with a concentration of 1 : 2 was the highest and its cell proliferation was significantly other groups. Therefore, it is concluded that co-culturing UC-MSCs and BMECs can promote the proliferation system, in which UC-MSCs and BMECs do not inhibit each other and grow in a good condition.

**Key words:** UC-MSCs; BMECs; cells co-culture;cells co-culture;cell proliferation

本 刊 声 明

近期,本刊编辑部发现一些网站和论文中心,盗用或伪造《家畜生态学报》名义征集稿件,收取作者版面费,严重影响了本刊声誉,并给广大作者造成损失。为保证本刊学术质量,维护本刊声誉,保障广大作者、读者的合法权益,为此,本刊郑重声明:本刊从未委托代理机构进行组稿、征稿活动,任何冒用或盗用编辑部名义进行的此类活动均属非法行为。在此,恳请广大读者、作者提高警惕,谨防上当受骗。