

奶山羊乳腺组织发育不同时期乳糖的变化

曲波, 李庆章

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要: 哺乳动物乳腺组成成分中含有大量成分复杂、种类繁多的大分子物质, 包括糖类、脂类和蛋白质。其中大部分为乳的主要组成成分, 此外乳腺间质中也有大量贮存。本研究应用过碘酸-Schiff反应(PAS)直接检测乳腺组织, 希望在细胞水平上系统阐述奶山羊乳腺组织发育不同时期乳糖的变化规律。结果表明: 奶山羊乳腺发育中, 乳糖主要分布在腺泡腔内和腺泡上皮细胞中, 其表达水平在青春期和妊娠初期很低, 妊娠中期开始逐渐增加, 到泌乳期达到最高, 退化期迅速下降, 到退化晚期已恢复到青春期的水平。

关键词: 基础兽医学; 乳糖; 过碘酸-Schiff反应; 乳腺; 奶山羊

中图分类号: Q492.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-2850(2008)06-0297-5

Changes of lactose on the development of dairy goat mammary gland

QU Bo, LI Qingzhang

(Key Laboratory of Dairy Science of Education Ministry,
Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: There are a great deal of complex and various components including carbohydrates, lipids and proteins in mammalian mammary gland. Most of them are the major components of milk besides storing in the stroma. To formulate the changing rule of lactose in different period of dairy goat mammary gland on the cellular level, changes of lactose were detected with PAS by detecting the mammary gland directly. In this research, the results show that lactose is present inside the lumen and mammary gland epithelium during the developing of dairy goat mammary gland. The expression of lactose is very low in virgin, increases step by step after mid-pregnancy and reaches the peak in late-lactation, decreases quickly in involution and recovers to the level of virgin.

Key words: basic veterinary science; lactose; periodic acid-Schiff reaction; mammary gland; dairy goat

0 引言

乳腺(mammary gland)是一个具有重要经济价值的器官, 其生长发育和泌乳生理功能有着密切关系^[1~2]。乳腺中的糖类主要包括乳糖和糖复合物。乳糖是乳中糖类的主要组成, 不同动物乳中乳糖含量不同^[3]。奶山羊乳中的糖类物质有多种, 其中乳糖含量为99.8%^[4]。乳糖属于还原性二糖, 目前还原糖的检测方法有很多种, 包括HPLC法、滴定法、比色法、旋光法等。但这些方法都要求样品为糖类的提取液, 需经过澄清处理, 适用于食品、乳制品、饲料等乳糖的检测。本研究应用过碘酸-Schiff反应(PAS)直接检测乳腺组织, 希望在细胞水平上系统阐述奶山羊乳腺发育过程中乳糖产生和表达的变化情况。

基金项目: 国家自然科学基金(30671538)

作者简介: 曲波(1977—), 男, 博士研究生, 主要研究方向: 泌乳生物学与乳腺功能调控

通信联系人: 李庆章, 教授, 主要研究方向: 泌乳生物学与乳腺功能调控, E-mail: qingzhangli@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 实验动物与样品采集

采用青春期、妊娠期、泌乳期及退化期健康雌性关中奶山羊 30 只，经检测无乳腺炎及其它疾病。实验羊采用舍饲，舍温 18℃，通风干燥，采光良好，自由采食饮水。

根据奶山羊乳腺发育特点，采样时点分为：青春期 3 月、5 月；妊娠期 1 月、3 月、5 月；泌乳期 10 天、60 天；退化期 3 天、7 天、21 天，共计 10 个时点。每个采样时点选取 3 只奶山羊作平行，每次试验至少重复 3 次。奶山羊处死后，用灭菌手术刀分离乳腺组织，迅速转入冻存管中，液氮冻存后转入 -80℃ 冰箱保存。

1.2 PAS 染色操作流程

将 -80℃ 冻存乳腺组织修整为 1 cm³ 小块，冰冻切片 (7~8 μm)，4℃ 保存备用。

将标记好的乳腺组织冰冻切片置于 1% 过碘酸水溶液中游离醛基 5 min；Schiff 试剂避光染色 15 min；亚硫酸水漂洗 3×2 min，流水冲洗 10 min，ddH₂O 洗 5 s；Delafield 苏木精复染 1 min；乙醇梯度脱水；然后分别用 1/2 (二甲苯/无水乙醇) 透明处理 3 min、二甲苯透明处理 2×5 min；中性树脂封片；Leica DLMB-2 显微镜观察、照相。

对照片不经过碘酸处理，直接进入 Schiff 试剂染色流程，则反应呈阴性或明显减弱。

2 结果

2.1 青春期

青春期乳腺导管系统虽已经形成，但乳腺基本不发育。腺体内以脂肪和结缔组织为主，未检测到乳糖的分泌表达 (如图 1 所示)。

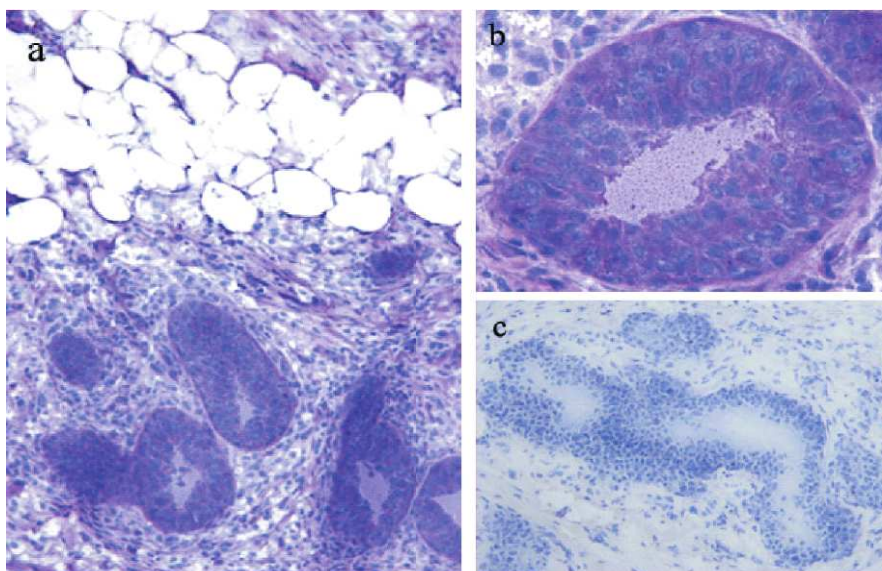


图 1 青春期奶山羊乳腺中乳糖的变化

Fig. 1 Changes of lactose in virgin mammary gland of dairy goat

a—青春期 3 个月 (200×)；b—青春期 5 个月 (400×)；c—青春期 5 个月 (阴性对照, 200×)

a—Virgin 3 months (200×)；b—Virgin 5 months (400×)；c—Virgin 5 months (negative control, 200×)

2.2 妊娠期

妊娠期 1 个月，未检测到糖类的表达 (如图 2a 所示)。妊娠 3 个月，很难判断有乳糖的表达，即便有分泌也是微量的 (如图 2b 所示)。妊娠 5 个月，腺泡腔内检测到乳糖的分泌表达，整个腺泡腔因

为乳糖、脂滴等分泌物的增加而膨胀变大（如图 2c 所示）。

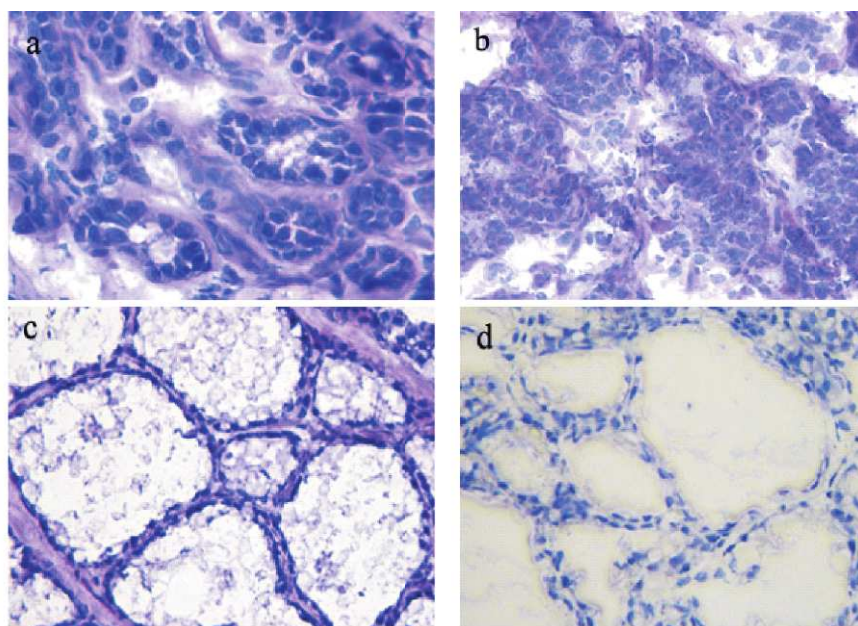


图 2 妊娠期奶山羊乳腺中乳糖的变化

Fig. 2 Changes of lactose in pregnant mammary gland of dairy goat

a—妊娠 1 个月 (200×); b—妊娠 3 个月 (100×);
c—妊娠 5 个月 (400×); d—妊娠 5 个月 (阴性对照, 400×)
a—Pregnant 1 months (200×); b—Pregnant 3 months (100×);
c—Pregnant 5 months (400×); d—Pregnant 5 months (negative control, 400×)

2.3 泌乳期

泌乳期乳腺的发育分化完全，腺泡上皮细胞分泌特征明显，腺体的大部分都是充盈饱满的腺泡腔（如图 3a 所示）。腺泡腔内有大量乳糖颗粒堆积（如图 3b 所示）。

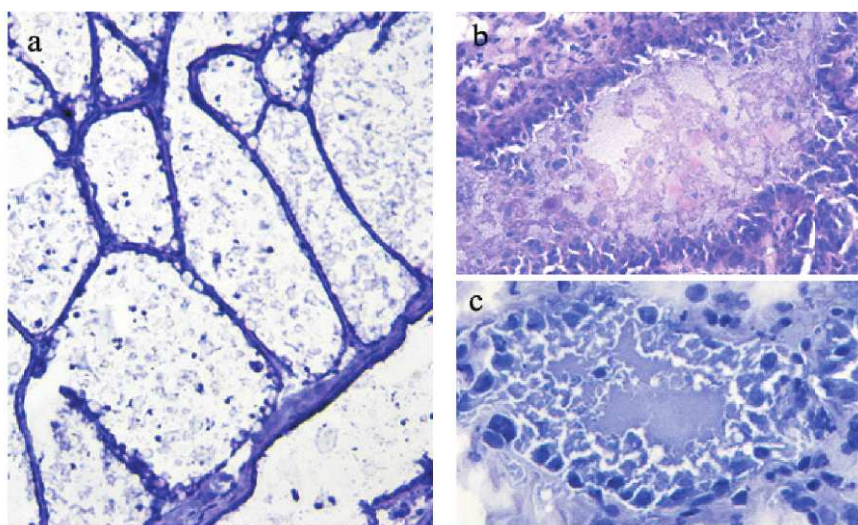


图 3 泌乳期奶山羊乳腺中乳糖的变化

Fig. 3 Changes of lactose in lactating mammary gland of dairy goat

a—泌乳 10 日 (200×); b—泌乳 60 日 (400×); c—泌乳 60 日 (阴性对照, 400×)
a—Lactating 10 days (200×); b—Lactating 60 days (400×); c—Lactating 60 days (negative control, 400×)

2.4 退化期

乳腺进入退化期，腺泡上皮细胞逐渐凋亡，其泌乳活动也逐步停止。退化3天，逐渐萎缩的腺泡腔内还可见少量乳糖颗粒（如图4a所示）。退化7天，只有小部分腺泡腔内还可见少量乳糖颗粒，腺泡腔内主要为大的脂肪颗粒（如图4b所示）。退化21天，腺体内已检测不到乳糖的分泌表达（如图4c所示）。

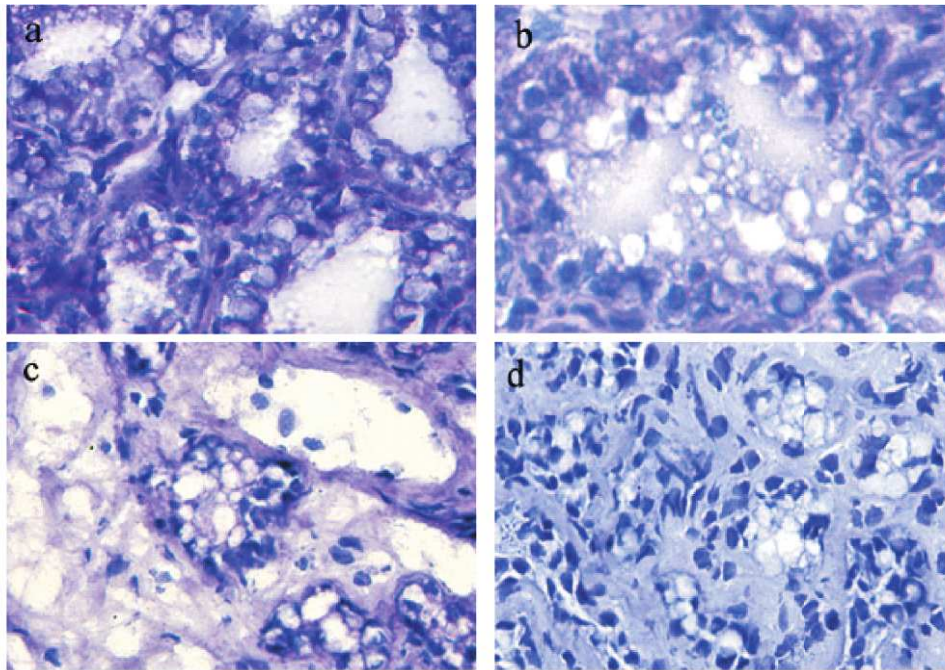


图4 退化期奶山羊乳腺中乳糖的变化

Fig. 4 Changes of lactose in involuting mammary gland of dairy goat

a—退化3天 (200×); b—退化7天 (400×); c—退化21天 (200×); d—退化7天 (阴性对照, 200×)
a—Involuting 3 days (200×); b—Involuting 7 days (400×);
c—Involuting 21 days (200×); d—Involuting 7 days (negative control, 200×)

3 结论

PAS是显示糖类最常用的组织化学方法，其反应基础是利用过碘酸氧化作用，打开C—C键，将二醇基(CHOH—CHOH)变成醛基，这种新生的醛基与Schiff试剂中的碱性品红形成紫色化合物，达到染色的目的。PAS反应同样对含有CHOH—CO、CHOH—COOH、CHOH—CHNH₂的多糖、蛋白聚糖等大分子具有氧化作用，释放醛基。值得注意的是，过碘酸和Schiff试剂的浓度、pH值、温度和作用时间等对PAS反应结果的强度都有影响^[5]。乳糖含有二醇基，可用PAS反应来检测。需要注意的是，乳腺细胞外基质中大量的糖蛋白成分也会呈PAS阳性反应，可能会对乳糖的检测带来一定的影响。本研究采用阴性对照和细胞核复染定位的方法来降低这种影响。同时结合HE染色结果，以乳腺基本的显微组织结构做对照，此外还优化了PAS反应的作用时间和温度，从实验结果看其效果还是不错的，可以近似地反映出乳糖表达的变化规律。

本研究中，青春期和妊娠期初期奶山羊乳腺内，均未检测到乳糖的分泌表达。尽管有报道显示合成乳糖所需的酶在妊娠中期就已开始出现^[6~7]，本研究妊娠中期很难判断有乳糖的表达，即便有分泌也是微量的。而到妊娠5个月，腺泡腔内检测到乳糖的分泌表达，光镜下可见腺泡腔部分内容物呈现紫色的PAS阳性反应。泌乳期乳腺腺泡腔内有大量乳糖颗粒堆积，光镜下可见腺泡腔内容物的PAS

阳性反应强度要大于妊娠晚期，表明乳糖的分泌表达逐渐达到顶峰。乳腺进入退化期后，腺泡上皮细胞的泌乳活动也逐步停止。本研究中，退化 3 天和退化 7 天乳腺内仍可检测到少量乳糖表达，但腺泡腔内容物的 PAS 阳性反应强度逐渐降低，表明乳糖的分泌也随着泌乳活动逐步停止。退化 21 天，腺体内已检测不到乳糖的分泌表达。

[参考文献] (References)

- [1] HURLEY W L. Lactation Biology Website[OL]. <http://classes.ansci.uiuc.edu/ansc438>
- [2] AKERS R M. Lactation and the mammary gland[M]. Iowa: Wiley-Blackwell, 2002.
- [3] ANDERSON S M, RUDOLPH M C, MCMANAMAN J L, et al. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis[J]. Breast Cancer Research, 2007, 9(1): 204~218.
- [4] KNIGHT C H, PEAKER M. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion[J]. J. Exp. Physiol., 1984, 69(2): 331~338.
- [5] 贲长恩, 李叔庚. 组织化学(第一版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
BEN C E, LI S G. Histochemistry(First Edition)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001. (in Chinese)
- [6] MATHER I H, KEENAN T W. Origin and secretion of milk lipids[J]. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 1998 (3): 259~273.
- [7] TUCKER H A. Symposium: hormonal regulation of milk synthesis hormones, mammary growth and lactation: a 41-year perspective[J]. J. Dairy Sci., 2000, 83(4): 874~884.