

稳定表达牛催乳素基因的小鼠乳腺上皮细胞系的建立

方彧聃^{1,2}, 何佳平¹, 张斯敏¹, 王 娟^{1,2}, 任晓叶¹, 张金脉¹, 张敬之^{1,2*}

(1. 上海市儿童医院, 上海交通大学附属儿童医院, 上海交通大学医学遗传研究所, 中国上海 200040; 2. 卫生部医学胚胎分子生物学重点实验室暨上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 中国上海 200040)

摘 要: 在乳腺上皮细胞体外培养时, 为了使其状态接近泌乳期, 需要在培养基中添加催乳素. 由于催乳素价格昂贵, 使得乳腺上皮细胞的体外培养成本颇高. 建立在体外培养过程中不需要添加催乳素蛋白的乳腺上皮细胞系, 能为在细胞水平研究乳腺细胞相关基因提供诸多方便. 利用慢病毒载体的整合特性, 建立稳定整合了牛催乳素 cDNA (bPRL) 表达盒的小鼠乳腺上皮细胞系 (HC11 细胞系). 经 10 代次以上的传代以后, 通过定量 PCR 检测, 证明平均每个细胞中含有 2.6 个外源的 bPRL 基因, 其表达量为 HC11 细胞中管家基因 β -肌动蛋白 (β -actin) 表达量的 14% 左右. 另外, 先前的研究表明催乳素能在 HC11 和泌乳期的小鼠乳腺上皮组织中有效促进山羊 β -酪蛋白启动子启动外源基因的表达. 之后的实验证实整合了催乳素基因的 HC11 细胞 (bPRL-HC11 细胞系) 也有此功能. 因此, bPRL-HC11 细胞系可以为体外研究乳腺生物反应器提供良好的细胞模型.

关键词: HC11 细胞系; 催乳素; 慢病毒载体; 乳腺特异性基因; 乳腺生物反应器

中图分类号: Q291

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2013)02-0100-06

The Establishment of a Mouse Mammary Epithelial Cell Line in Which Bovine Prolactin Can be Stably Transcribed

FANG Yu-dan^{1,2}, HE Jia-ping¹, ZHANG Si-min¹, WANG Juan^{1,2}, REN Xiao-ye¹,
ZHANG Jin-mai¹, ZHANG Jing-zhi^{1,2*}

(1. Children's Hospital of Shanghai, Children's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai 200040, China; 2. Key Laboratory of Embryo Molecular Biology, Ministry of Health & Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China)

Abstract: The addition of prolactin is needed for mammary epithelial cell culture in order to maintain its lactogenic feature, though it is costly. Therefore, establishing a prolactin-expressing mammary epithelial cell line might be able to solve this huddle while maintains its lactogenic feature in culture. The establishment of a prolactin-expressing mammary epithelial cell line via Lentiviral vector mediation to integrate a bovine prolactin cDNA expression cassette (bPRL) into the mouse mammary epithelial (HC11) cell line was reported here. Using qPCR analysis, it was demonstrated that the bPRL-expressing cell line (bPRL-HC11) bore with 2.6 copies of bPRL gene/cell, as a whole. The cells transcribed bPRL mRNA efficiently which was accounted for 14% of β -actin mRNA detected by qRT-PCR. In addition, based on our previous finding of prolactin could enhance the transgene expression driven by a goat β -casein promoter both in HC11 cells and in murine mammary gland. And the bPRL-expressing HC11 cells could also appear the same function. There-

收稿日期: 2013-02-20; 修回日期: 2013-04-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81271690); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB945202); 上海市自然科学基金资助项目(11ZR1429900)

作者简介: 方彧聃(1978-), 男, 上海人, 助理研究员, 硕士, 主要从事慢病毒载体的研究; 何佳平(1987-), 男, 浙江人, 硕士研究生, 主要从事慢病毒载体的研究, 何佳平为本文共同第一作者; * 通讯作者: 张敬之(1959-), 男, 上海人, 上海医学遗传研究所副研究员, 博士, 主要从事慢病毒载体及基因治疗的研究, Tel: 021-62472308, E-mail: jzhang38@hotmail.com.

fore, the bPRL-HC11 cell line we generated can be a good cell model for the study of mammary gland bio-reactor *in vitro*.

Key words: HC11 cell line; prolactin; lentivirus vector; mammary specific genes; mammary gland bio-reactor (*Life Science Research*, 2013, 17(2): 100~105)

HC11 细胞系由 Ball 等^[1, 2]于 1988 年分离得到。作为一个小鼠乳腺上皮细胞系, HC11 细胞系是体外研究乳腺特异基因表达的良好模型。在催乳素的诱导下, HC11 细胞系显示出其泌乳期的一些特征^[3-5]。然而, 催乳素价格昂贵。2012 年, Sigma 公司的鼠源催乳素价格为 3 000 元人民币每 50 μg 蛋白。这些催乳素只够配制 50 mL 的 HC11 培养液。由此可见培养 HC11 的成本之高。为了降低培养成本, 我们希望通过在 HC11 细胞基因组中整合入催乳素基因并使其稳定表达, 以获得一个既能维持原有 HC11 细胞系的乳腺上皮细胞特征, 又不需要在培养基中额外添加催乳素的细胞系。

慢病毒载体具有将外源基因稳定整合入真核细胞基因组的特性^[6, 7]。而本研究所之前的实验表明, 牛催乳素和鼠源催乳素类似, 具有促进山羊 β -酪蛋白(β -casein)启动子启动下的外源基因在乳腺上皮细胞中有效表达的能力^[8]。本研究利用慢病毒载体将外源牛催乳素基因(*bPRL*)稳定地整合入 HC11 细胞基因组中, 建成 bPRL-HC11 细胞系。牛催乳素基因在该细胞系中能正常并稳定地转录, 推测牛催乳素蛋白被分泌到细胞外后作用于细胞表面受体, 介导 START5 等途径诱导 HC11 细胞使之更接近于泌乳状态^[9]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞株

感受态菌株 Top10 由本实验室保存。慢病毒载体三质粒系统中用到的载体 FUGW、pCMV Δ 8.9 和 VSVG 由 Johns Hopkins University 的王征宇博士提供。P1A3-LacZ、P1A3-EGFP 和 P1A3-hVWF 是在本所构建的山羊 β -酪蛋白启动子(P1A3)下分别克隆了报告基因 *LacZ* (β -半乳糖苷酶)或 *EGFP* (enhanced green fluorescence)或 *hVWF* (human von Willebrand factor) 获得的载体。293T 细胞系、HC11 细胞由中国科学院上海生化所提供。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶从 TaKaRa、NEB 和 Fermentas 公司购买; 质粒小提中量试剂盒从 Tiangen 购买; 胶回

收试剂盒购自 Biomiga; Trizol、M-Mlv RTase 和 DNase I 购自 TaKaRa 公司; 定量 PCR 引物及荧光探针(表 1)由华大基因公司和上海基康生物技术有限公司合成。

表 1 引物和探针序列

Table 1 List of primers and probes

Primer or Probe	Primer sequence (5'-3')
FP-2	TTTAAGACCAATGACTTACAAGGCA
RP-2	TTGTCTTCGTTGGGAGTGAATTAG
q-LTR	F-CTGTAGATCTTAGCCACTTTT-P
mBA-F	TCTGGCTCTAGCACCAT
mBA-R	GCTGATCCACATCTGCTGGAA
q-mBA	FATCAAGATCATTCCTCCTCTGAGCGCP
LacZ-qF	CGCTGGAGTGACGGCAGTTATC
LacZ-qR	ATCGCTGATTTGTGTAGTCGG
hVWF-F	GACTTCCAGAATGGCAAGAG
hVWF-R	TCACCGGACAGCTTGTAGTA
mBA-F2	CCAACCGTAAAAGATGACCC
mBA-R2	GGAGACCATAGCCCTCTAG

1.1.3 培养基

LB 琼脂糖培养基: 1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物和 1% NaCl, 高压蒸汽灭菌。293T 细胞培养基: 含 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM。HC11 细胞培养基: 含 10% FBS、青霉素-链霉素、10 ng/L EGF 和 4 $\mu\text{g/L}$ 人胰岛素的 DMEM-F12(Gibco BRL)。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

慢病毒载体 F-bPRL 的构建: *Bam*H I、*Hind* III 酶切 pcDNA3.1(-)/P1A3+bPRL 载体获得牛催乳素 cDNA 基因 (*bPRL*), FUGW 载体经 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切后与 *bPRL* 片段连接得到 F-bPRL 载体。我们所储存的 pcDNA3.1 (+)-dCMV-P1A3 载体是在 pcDNA3.1(+)-基础上删除 CMV 启动子, 并在多克隆位点 *Not* I 上插入 P1A3 启动子获得的载体。P1A3-LacZ 载体是在 pcDNA3.1(+)-dCMV-P1A3 载体的 P1A3 启动子下游 *Xho* I 位点插入 *LacZ* 基因获得。P1A3-EGFP 载体是在 pcDNA3.1(+)-dCMV-P1A3 载体的 P1A3 启动子下游 *Apa* I 位点插入 *EGFP* 基因获得。P1A3-hVWF 载体是在 pcDNA3.1 (+)-dCMV-P1A3 载体的 P1A3 启动子下游 *Apa* I 位

点插入 *hVWF* 基因获得. 载体结构见图 1.

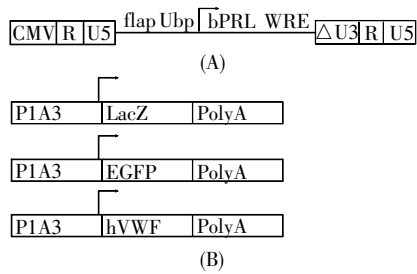


图 1 载体构建图

(A) F-bPRL, 用于慢病毒包装的转移载体; (B) P1A3-LacZ, P1A3-hVWF 和 P1A3-EGFP.

Fig.1 Schematic presents the constructs used in the experiments

(A) F-bPRL, lentiviral transfer vector; (B) Diagram of the vector of P1A3-LacZ, P1A3-hVWF and P1A3-EGFP.

1.2.2 携带 *bPRL* 基因的慢病毒载体包装

采用三质粒系统包装病毒. 转移质粒 F-bPRL、包装质粒 pCMVΔ8.9 和包膜质粒 VSVG 均用 EndoFree PlasmidMaxi kit (Qiagen) 进行纯化. 在 10 cm 细胞培养皿中, 3 种质粒按分子数量 1:1:1 转染事先铺好的 293T 细胞. 转染前一天, 细胞密度为 40% 左右. 具体转染步骤按照 ProFec-tion[®] Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate (promega) 试剂盒的使用说明书操作. 转染 8 h 后去除转染试剂, 加入 10 mL 新鲜的完全培养液. 继续培养 3 d 以后, 吸取培养液到 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 去除细胞碎片. 取上清, 用 0.4 μm 孔径的过滤器过滤后, 4 °C, 18 000 r/min 离心 2 h 将病毒离心下来. 去除上清, 在冰浴中加入 50 μL Hanks 液溶解并重悬病毒过夜. 第二天, 分装病毒重悬液, 并于 -80 °C 保存待用.

1.2.3 病毒颗粒感染 HC11 细胞

感染前一天将 HC11 细胞铺在 6 孔板中, 密度约 40%, 到感染当天细胞密度达到 80%~90% 左右. 从 -80 °C 中取出病毒置于冰上融化后, 用含有 1/1 000 polybrene (Sigma) 的 RPMI1640 培养液稀释至 800 μL, 将病毒稀释液加入到事先铺好的 HC11 细胞表面进行感染. 24 h 后去除病毒感染液, 加入 2 mL 新鲜的完全培养液. 继续培养 8 h 后, 用胰酶消化并转移到 10 cm 细胞培养皿中扩大培养. 在培养皿中传代并扩大培养 10 代以后, 收集并保存该细胞用于后续的实验.

1.2.4 定量 PCR 检测基因组中 *bPRL* 基因的拷贝数

分别取 3×10^6 个 HC11 细胞和 bPRL-HC11 细胞, 用 Genomic DNA Isolation Kit (Foregene) 纯化基因组 DNA. 采用绝对定量的方法对慢病毒特征序列 *LTR* 以及内参基因 β -actin 进行荧光定量. 定量探针 qLTR、mBA 和引物 FP-2、RP-2、mBA-F、mBA-R 由基康公司(上海)设计合成(见表 1). 每个整合入染色质中的原病毒含有 2 个 *LTR* 元件和 1 个 *bPRL* 基因, 因此每个细胞中含有的 *bPRL* 基因拷贝数是 *LTR* 分子个数的一半. 根据以下公式计算平均每个细胞中 *bPRL* 基因的拷贝数:

$$bPRL \text{ 基因拷贝数} = \frac{LTR \text{ 拷贝数}}{2} = \frac{LTR \text{ 分子个数}}{\beta\text{-actin 分子个数}}$$

1.2.5 定量 PCR 检测 *bPRL* 基因的转录水平

分别取 10^6 个 HC11 细胞和 bPRL-HC11 细胞, 用 Trizol RNA 抽提试剂抽提总 RNA, DNaseI 处理去除残留基因组 DNA 后, 以 Oligo dT 为引物进行反转录反应获得第一链 cDNA. 采用绝对定量的方法对 *LTR* 以及 β -actin 的 cDNA 进行定量. 每个 *bPRL* 基因的 mRNA 分子含有一个 *LTR* 序列, 计算获得 *bPRL* 相对于 β -actin 的表达量.

1.2.6 外源基因瞬时转染 HC11 细胞和 bPRL-HC11 细胞

提前 1 d 在 6 孔板或 12 孔板中铺细胞, 使得转染当天细胞密度达到 80%~90%. 转染试剂采用 Lipofectin[™] 2 000 (invitrogene), 转染量与操作参照使用说明书. 转染后 8 h 更换新鲜培养液, 继续培养 40 h 后可以直接进行 β -半乳糖苷酶原位染色(碧云天)检测 LacZ 的活性. 也可以胰酶消化细胞用流式细胞仪(FACS)检测 EGFP 阳性率和荧光强度. 或收集细胞进行 RNA 抽提.

1.2.7 用 β -半乳糖苷酶原位染色法在蛋白水平检测乳腺特异性表达载体 P1A3-LacZ 的活性

在 12 孔板中, P1A3-LacZ 分别瞬时转染至 HC11 细胞和 bPRL-HC11 细胞中, 使用 β -半乳糖苷酶原位染色试剂盒(碧云天 RG0039)进行染色试验, 表达 β -半乳糖苷酶的细胞将被染成蓝色. 细胞转染 48 h 后, 严格按照试剂盒使用说明书进行染色操作. 染色完成后, 在普通光学显微镜下观察, 并统计被染成蓝色的细胞数目.

2 结果与分析

2.1 整合入 HC11 细胞的催乳素基因拷贝数检测

提取病毒感染后的 HC11 细胞(bPRL-HC11 细胞)基因组 DNA, 以小鼠 β -actin 基因作为内参,

运用 qRT-PCR (Real time quantitative PCR) 对病毒特征序列 *LTR* 进行绝对定量. 每个实验样本做 3 个复孔, 以确保定量 PCR 的准确性. 同一样本中, *LTR* 分子数与 β -actin 分子数的比值乘以 2 即为每个细胞中 *LTR* 的拷贝数. 由于原病毒中每个 *bPRL* 外源基因两侧携带两个 *LTR* 序列, 因此 *bPRL* 的拷贝数为 *LTR* 序列拷贝数的一半. 计算获得平均每个细胞含有 *bPRL* 基因 2.6 个拷贝.

表 2 qRT-PCR 检测每个细胞的基因组中 *bPRL* 基因拷贝数

Table 2 *bPRL* copies in cell genomes were detected by qRT-PCR

<i>LTR</i> quantity	β -actin quantity	<i>LTR</i> copies/cell	<i>bPRL</i> copies/cell
1.02×10^6	3.92×10^6	5.2	2.6
$\pm 7.2 \times 10^4$	$\pm 3.2 \times 10^4$		

2.2 牛催乳素基因在 bPRL-HC11 细胞中的表达

提取 HC11 细胞和 bPRL-HC11 细胞的总 RNA, 经 DNase I 处理后, 以 Oligo dT 作为反转录引物进行反转录获得第一链 cDNA. 采用 Taq-Man 荧光探针对 cDNA 中 *LTR* 和 β -actin 的分子数进行绝对定量. 与基因组序列不同的是, 一条 *bPRL* 基因的 mRNA 链只含有一个 *LTR* 序列, 故 *bPRL* 的 mRNA 数量与 *LTR* 分子个数相同. 对定量结果进行分析以后发现, 在 bPRL-HC11 细胞中 *bPRL* 的 mRNA 数量达到了 β -actin mRNA 分子数的 14% 左右, 而在 HC11 细胞中几乎检测不到 *bPRL* 的转录本(图 2). 这一结果表明我们所建立的 bPRL-HC11 细胞能有效表达牛催乳素基因.

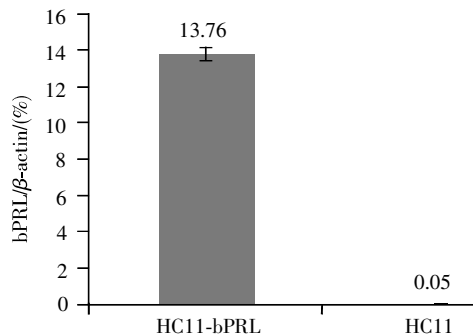


图 2 qRT-PCR 检测 *bPRL* 的 mRNA 水平

Fig.2 *bPRL* mRNA level detected by qRT-PCR

2.3 bPRL-HC11 细胞促进山羊 β -酪蛋白启动子启动的外源基因的转录

蒋和李等^[8,9]的研究表明牛的催乳素促进山羊 β -酪蛋白启动子下人转铁蛋白的表达. 为了检测 bPRL-HC11 细胞是否促进乳腺特异性启动子的转录, 我们构建了一系列由山羊 β -酪蛋白启动

子(P1A3)起始的外源基因表达^[10]. β 半乳糖苷酶基因(*lacZ*)、加强型绿色荧光蛋白基因(*EGFP*)和人类血管性血友病因子基因(*hVWF*)分别构建在 P1A3 下游获得真核表达载体 P1A3-*LacZ*、P1A3-*EGFP* 和 P1A3-*hVWF* (图 1, B). P1A3-*LacZ* 和 P1A3-*hVWF* 分别瞬时转染 HC11 细胞和 bPRL-HC11 细胞. 转染后提取 RNA, RT-PCR 比较各外源基因在两种细胞中的表达水平. 以 *LacZ*-qF 和 *LacZ*-qR 为引物扩增 *LacZ* 基因片段, 以 *hVWF*-F 和 *hVWF*-R 为引物扩增 *hVWF* 基因片段. 结果显示, 各基因在 bPRL-HC11 细胞中的表达水平均高于 HC11 细胞中的表达(图 3). 这说明牛催乳素基因在 bPRL-HC11 细胞中的表达能够有效促进乳腺特异 β -casein 启动子启动下外源基因的表达.

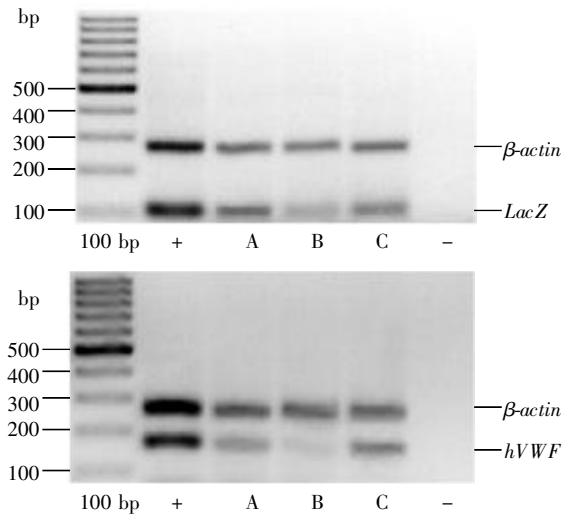


图 3 RT-PCR 检测 *LacZ* 和 *hVWF* 的 mRNA 水平

A: P1A3-*LacZ* 或 P1A3-*hVWF* 转染 bPRL-HC11 细胞; B: P1A3-*LacZ* 或 P1A3-*hVWF* 转染 HC11 细胞; C: P1A3-*LacZ* 或 P1A3-*hVWF* 与 F-bPRL 共转染 HC11 细胞; “+”: 阳性对照, 即以质粒作为模板的 PCR 产物; “-”: 阴性对照, 即以无菌水作为模板进行 PCR 的结果.

Fig.3 mRNA of *LacZ* and *hVWF* were detected by RT-PCR

A: bPRL-HC11 cells were transfected with P1A3-*LacZ* or P1A3-*hVWF*; B: HC11 cells were transfected with P1A3-*LacZ* or P1A3-*hVWF*; C: HC11 cells were co-transfected with F-bPRL and P1A3-*LacZ* or P1A3-*hVWF*; “+”: Positive control, PCR production with the template of plasmids; “-”: Negative control, PCR production without template.

2.4 在蛋白水平验证 bPRL-HC11 细胞能够促进山羊 β -酪蛋白启动子启动的外源基因的表达

质粒载体 P1A3-*LacZ* 分别瞬时转染 HC11 细胞(表 3)和 bPRL-HC11 细胞(表 3), 同时用 F-bPRL 和 P1A3-*LacZ* 共转染 HC11 细胞(表 3)作为阳性对照. 转染 48 h 后进行原位染色, 表达 β

半乳糖苷酶的细胞会被染成蓝色. 100 倍光学显微镜下计数被染成蓝色的细胞数量. 3 次实验结果(表 3)显示, bPRL-HC11 细胞表达 β -半乳糖苷酶的量是 HC11 细胞的 1.8 倍左右(表 3).

表 3 β -半乳糖苷酶原位染色结果

Table 3 Results of *in situ* β -galactosidase staining

Exp.	A	B	C	A/B
1	51	41	51	1.24
2	75	38	148	1.97
3	16	7	12	2.29
Mean				1.83±0.53

注: A: P1A3-LacZ 转染 HC11 细胞; B: P1A3-LacZ 转染 bPRL-HC11; C: F-bPRL 和 P1A3-LacZ 共转染 HC11 细胞.

Notes: A: HC11 cells transfected by P1A3-LacZ; B: bPRL-HC11 cells transfected by P1A3-LacZ; C: HC11 cells transfected by P1A3-LacZ and F-bPRL.

质粒载体 P1A3-EGFP 分别瞬时转染 HC11 细胞和 bPRL-HC11 细胞, 同时用 F-bPRL 和 P1A3-EGFP 共转染 HC11 细胞作为阳性对照. 转染 48 h 后, 胰酶消化收集细胞, 进行 FACS 检测. 结果显示(图 4), bPRL-HC11 细胞中 EGFP 阳性率最高. β 半乳糖苷酶原位染色实验和 EGFP Facs 检测结果均在蛋白水平上说明牛催乳素基因在 bPRL-HC11 细胞中的表达能够有效促进乳腺特异启动子启动下外源基因的表达.

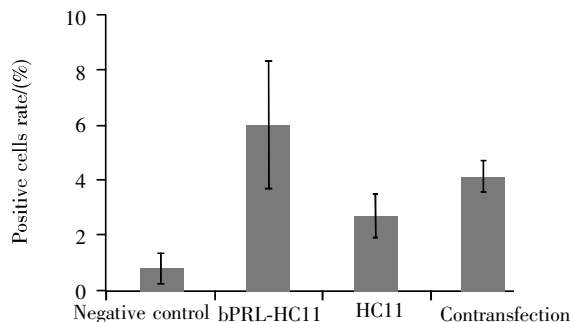


图 4 FACS 检测 EGFP 阳性率

Fig.4 EGFP positive rate detected by FACS

3 讨论与展望

在 RNA 水平和蛋白水平验证 bPRL-HC11 促进 β -酪蛋白启动子启动下外源基因的表达实验涉及到单个质粒转染细胞和两个质粒共转染细胞的比较. 由于单个质粒转染和两个质粒共转染的转染效率可能会存在一定的差异, 把单转和共转的实验结果进行比较虽然具有一定的参考价值, 但不是特别的严谨. 图 3、表 3 和图 4 中显示的实

验结果旨在比较外源基因在 bPRL-HC11 细胞和 HC11 细胞中的表达差异, 而共转染实验组并非本实验的重点, 仅供辅助参考.

大动物乳腺生物反应器是生产基因工程药物的新方法^[11-13]. 它具有成本低、产量高、效益好和稳定性强等优点. 大动物(如奶牛、山羊)生长发育周期较长, 研制大动物乳腺生物反应器需要投入大量人力和物力, 研发周期较长. 因此, 进入大动物实验之前, 必须使用乳腺上皮细胞体外培养来验证乳腺特异性表达载体的有效性. 我们的 bPRL-HC11 细胞能够在细胞水平上为研究乳腺特异启动子指导下的外源基因的表达及调控提供良好的细胞模型, 它降低了细胞培养的成本并且方便了实验操作, 为乳腺生物反应器提供了一个良好的细胞模型.

致 谢: 衷心感谢曾溢滔院士, 任兆瑞教授和蒋世忠博士对本文的悉心指导.

参考文献 (References):

- [1] BALL R K, FRIIS R R, SCHOENENBERGER C A, *et al.* Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line[J]. *Europe Molecular Biology Organization Journal*, 1988, 7(7): 2089-2095.
- [2] 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]. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 1984, 81(12): 3756-3760.
- [3] MERLO G R, GRAUS-PORTA D, CELLA N, *et al.* Growth, differentiation and survival of HC11 mammary epithelial cells: diverse effects of receptor tyrosine kinase-activating peptide growth factors[J]. *European Journal of Cell Biology*, 1996, 70(2): 97-105.
- [4] MITEV V, LEMNAOUAR M, PUISSANT C, *et al.* Protein kinase C is not necessary for beta-casein gene induction by prolactin in HC11 mouse mammary cells[J]. *Reproduction Nutrition Development*, 1995, 35(4): 437-442.
- [5] BUCK K, VANEK M, GRONER B, *et al.* Multiple forms of prolactin receptor messenger ribonucleic acid are specifically expressed and regulated in murine tissues and the mammary cell line HC11[J]. *Endocrinology*, 1992, 130(3): 1108-1114.
- [6] DROPULIC B. Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research[J]. *Human Gene Therapy*, 2011, 22(6): 649-657.
- [7] PAUWELS K, GIJSBERS R, TOELEN J, *et al.* State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations[J]. *Current Gene Therapy*, 2009, 9(6): 459-474.
- [8] JIANG Shi-zhong, REN Zao-rui, XIE Fei, *et al.* Bovine prolactin elevates hTF expression directed by a tissue-specific goat beta-casein promoter through prolactin receptor-mediated STAT5a activation[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(11): 1991-1999.

- [9] LI Song, GUO Xin-bing, GONG Xiu-li, *et al.* Bovine prolactin promotes the expression of human transferrin in the milk of transgenic mice[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(6): 787-793.
- [10] 黄赞, 颜景斌, 黄缨, 等. 山羊 β -酪蛋白基因启动子指导的转基因小鼠乳汁高效表达人凝血因子IX[J]. *遗传学报*(HUANG Zan, YAN Jing-bin, HUANG Ying, *et al.* High expression of human FIX(hFIX) in transgenic mice directed by goat beta-casein gene promoter[J]. *Journal of Genetics and Genomics*), 2002, 29(3): 206-211.
- [11] 白倩, 张焱, 汪音爵, 等. 乳腺生物反应器表达的重组人乳铁蛋白的分离纯化及生物活性鉴定[J]. *生物工程学报*(BAI Qian, ZHANG Yan, WANG Yin-jue, *et al.* Purification and characterization of recombinant human lactoferrin expressed in a cattle mammary bioreactor[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2010, 26(11): 1576-1583.
- [12] YANG P, WANG J, GONG G, *et al.* Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin[J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): 3453.
- [13] 沈伟, 杨正田, 邓继先. 体细胞基因打靶制备动物乳腺生物反应器的策略与应用[J]. *生物工程学报*(SHEN Wei, YANG Zheng-tian, DENG Ji-xian. Production of mammary gland bioreactor by gene targeting of somatic cells[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2003, 19(6): 767-770.

(上接第 99 页)

- [5] D'ASARO C N. Organogenesis, development, and metamorphosis in the queen conch, *Strombus gigas*, with notes on the breeding habits[J]. *Bulletin of Marine Science*, 1965, 15(2): 359-416.
- [6] 李国清, 靳家声. 甘肃省牧区椎实螺的个体发育观察[J]. *中国兽医科技* (LI Guo-qing, JIN Jia-sheng. Observation on the ontogenesis of *Lymnaea stagnalis* in pastoral area of Gansu province[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*), 1990, (1): 5-7.
- [7] 魏利平, 邱盛尧, 王宝钢, 等. 脉红螺繁殖生物学研究[J]. *水产学报* (WEI Li-ping, QIU Sheng-yao, WANG Bao-gang, *et al.* Studies on the reproductive biology of *Rapana venosa*[J]. *Journal of Fisheries of China*), 1999, 23(2): 150-155.
- [8] PAGE L R, PEDERSEN R V K. Transformation of phytoplanktivorous larvae into predatory carnivores during the development of *Polinices lewisii*(Mollusca, Caenogastropoda)[J]. *Invertebrate Biology*, 1998, 117(3): 208-220.
- [9] 张文香, 薛红玲, 王运芝, 等. 耳萝卜螺胚胎发育的初步观察[J]. *河北职业技术师范学院学报* (ZHANG Wen-xiang, XUE Hong-ling, WANG Yun-zhi, *et al.* A preliminary observation on the embryonic development of *Radix auricularia*[J]. *Journal of Hebei Vocation Technical Teachers College*), 2000, 14(2): 35-38.
- [10] 周永灿, 陈国华, 潘金培. 毛嵌线螺的研究 I. 繁殖及幼虫发生特征[J]. *海洋学报*(ZHOU Yong-can, CHEN Guo-hua, PAN Jin-pei. Study on the *Cymatium pileare* I. reproduction and larval development characteristics[J]. *Acta Oceanologica Sinica*), 2000, 22(2): 97-104.
- [11] 陈康贵, 谢嗣光. 折叠萝卜螺胚胎发育的初步研究[J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*(CHEN Kang-gui, XIE Si-guang. A preliminary study on the embryonic development of *R. plicatula*[J]. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science)*), 2003, 28(1): 130-133.
- [12] 郑怀平. 泥螺行为与繁殖生物学特征的初步研究[J]. *海洋科学* (ZHENG Huai-ping. Preliminary study on characteristics of behavior and reproductive biology for *Bullacta exarata* (Philippin)[J]. *Marine Sciences*), 2003, 27(1): 69-71.
- [13] 孙爱丽, 李太武, 苏秀榕, 等. 婆罗囊螺早期发育的初步研究[J]. *动物学杂志*(SUN Ai-li, LI Tai-wu, SU Xiu-rong, *et al.* Preliminary study on the early development of *Retusa borneensis*[J]. *Chinese Journal of Zoology*), 2004, 39(5): 89-90.
- [14] KINGSLEY-SMITH P R, RICHARDSON C A, SEED R. Growth and development of the veliger larva and juveniles of *Polinices pulchellus* (Gastropoda: Naticidae)[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2005, 85(1): 171-174.
- [15] 吴进锋, 张汉华, 陈利雄, 等. 台湾东风螺人工繁殖及苗种生物学的初步研究[J]. *海洋科学*(WU Jin-feng, ZHANG Han-hua, CHEN Li-xiong, *et al.* Preliminary studies on artificial propagation and biology of the seed of *Babylonia lutosa* (Lamarck)[J]. *Marine Sciences*), 2006, 30(9): 92-95.
- [16] KULIKOVA V A, KOLBIN K G, KOLOTUKHINA N K. Reproduction and larval development of the gastropod *Cryptonatica janthostoma* (Gastropoda: Naticidae)[J]. *Russian Journal of Marine Biology*, 2007, 33(5): 324-328.
- [17] 刘庆, 孙振兴. 扁玉螺早期发育的实验观察[J]. *动物学杂志* (LIU Qing, SUN Zhen-xing. Experimental observation on the early development of *Neverita didyma*[J]. *Chinese Journal of Zoology*), 2008, 43(5): 99-103.
- [18] 柳敏海, 彭志兰, 傅荣兵, 等. 黄口荔枝螺早期发育的初步研究[J]. *大连水产学院学报*(LIU Min-hai, PENG Zhi-lan, FU Rong-bing, *et al.* The early development of snail *Thais luteostoma*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*), 2010, 25(1): 24-28.
- [19] 郭恩棉. 捷拉邦囊螺早期发育研究[J]. *安徽农业科学*(GUO En-mian. Preliminary study on the early development of *Campyloceras jiraponi*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2012, 40(27): 13410-13414.
- [20] 楼允东. 组织胚胎学[M]. 北京: 中国农业出版社 (LOU Yundong. *Histology and Embryology*[M]. Beijing: China Agriculture Press), 1996:191.
- [21] PECHENIK J A. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1999, 177(1): 269-297.