



23. JUNI

NR. 666

### Undersøgelser over laktosesyntese i cellekulturer af yvervæv fra lakterende ko

Merete Press Christiansen<sup>1)</sup>, Allan Danfær<sup>1)</sup>, Niels Agergaard<sup>1)</sup>,  
Hans Otto Hansen<sup>2)</sup>, Jens Knudsen<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Afdelingen for dyrefysiologi og biokemi

<sup>2)</sup> Biokemisk Institut, Odense Universitet

Ved opsætning af mælkekirtlepitheelceller i cellekulturer er det søgt at belyse om hormonerne prolaktin, væksthormon og somatomedin C har nogen direkte effekt på syntesen af laktose. Mælkekirtlepitheelcellerne er isoleret fra yvervæv fra en ko sent i laktationen. Resultaterne af forsøg med suspensionskultur viste, at ingen af de ovennævnte hormoner havde effekt på syntesen af laktose. Langtidsforsøg, hvor cellerne præinkuberes med hormon i 5 døgn viste, at prolaktin fremmer cellekulturens vækst, og at disse celler, har signifikant højere kapacitet for syntese af laktose end celler uden tilsætning af prolaktin.

#### Indledning

Opsætning af cellekulturer er et værdifuldt supplement til fysiologiske undersøgelser. I cellekulturer er det muligt at observere den levende celle under fuldt kontrollerede betingelser, og derved undersøge enkelte faktoreres indflydelse på cellens funktion. F.eks. kan cellens optagelse af enkelte næringstoffer måles, samt i hvilket omfang hormoner har direkte effekt på cellens metabolisme. Desuden kan de enkelte komponenter, der syntetiseres af cellen, måles. Dette er udnyttet i forbindelse med undersøgelser over den hormonale regulering af mælkeydelsen hos køer. Ved at udtage biopsier af yvervæv er det muligt at isolere mælkekirtlepitheelceller, og syntesekapaciteten af de vigtigste mælkekomponenter kan undersøges. Tilsætning af forskellige stoffskiftehormoner til mælkekirtlepitheelcellernes næringsmedium viser, om hormonerne har effekt på cellernes syntesekapacitet. Specielt er det hormonernes effekt

på syntesen af laktose der er undersøgt, idet laktose betragtes som begrænsende for mælkemængden. I de her udførte forsøg er anvendt suspensionskultur, hvor cellerne findes frit i næringsmediet, og primær kultur, hvor cellerne dyrkes i collagengeler. I suspensionskultur er det kun muligt at måle kortere tids effekt af hormoner, da cellerne har begrænset levetid. Fordelen ved suspensionskultur er formentlig, at cellernes syntesekapacitet er meget nær de oprindelige i selve yvervævet. Ved dyrkning i collagengeler kan cellerne holdes i live i ugevis og derved kan langtidseffekt af hormoner undersøges. Ved optimal dyrkning bevarer cellen sine genskaber, men syntesekapaciteten er i reglen lavere end i suspensionskultur.

Udenlandske undersøgelser har vist, at injektion af væksthormon til lakterende køer giver øget mælkeydelse. Det har ikke ved in vitro undersøgelser været muligt at påvise en stimulerende effekt af væksthormon på mælkekirtelvæv.

Endvidere er der ikke fundet væksthormonreceptorer på overfladen af mælkekirtlepitheleceller. Man antager derfor, at væksthormon ikke virker direkte på mælkekirtlen, men muligvis via en insulin-lignende vækstfaktor, somatomedin C. Formålet med egne undersøgelser har derfor været, at undersøge om væksthormon og somatomedin C har nogen direkte effekt på laktosesyntesen. Desuden er undersøgt om en eventuel effekt af somatomedin C kan stimuleres eller hæmmes af insulin, f.eks. ved at insulin bindes til somatomedin C receptorer. Endelig er undersøgt om prolaktin har nogen direkte effekt på laktosesyntesen. Andre har ved in vitro undersøgelser vist, at prolaktin blandt andet stimulerer caseinsyntesen.

### Materialer og metoder

Mælkekirtlepithelecellerne, der indgår i forsøget, stammer alle fra samme ko. Koen er slagtet sent i laktationen, og cellerne er isoleret fra yvervævet ved enzymbehandling. Enzymblandingen består af collagenase, hyaluronidase, deoxyribonuclease, elastase samt trypsin inhibitor, og nedbrydningen foregår ved 37°C under gennembobling med 5% CO<sub>2</sub> og 95% atmosfærisk luft. Cellerne vaskes i buffer for at fjerne enzymer og nedfryses herefter gradvis i næringsmedium tilsat 12% dimethyl sulfoxide (DMSO) for at undgå krystaldannelse i cellerne. Cellerne opbevares i flydende kvælstof indtil brug. Når cellerne skal anvendes optøes de direkte i 37°C vandbad, og vaskes øjeblikkelig for at fjerne DMSO. For at fjerne eventuelle cellerester fra ødelagte celler, filtreres gennem Krebs Ringer bicarbonat buffer tilsat 5% bovine serum albumin (BSA). Teknikken til isolering af mælkekirtlepitheleceller er udførligt beskrevet af H. O. Hansen, D. Tornchave og J. Knudsen (1986). Cellerne præinkuberes i 2 timer i næringsmedium inden de anvendes i forsøg. Det fuldt definerede medium er medium M199 og F12 tilsat BSA, dexamethasone, epidermal growth factor, prostaglandin E<sub>1</sub> og insulin. Af hormoner er anvendt kvæghormon, kvæganalog væksthormon, humananalog somatomedin C samt human analog insulin.

I forsøget med suspensionskultur blev anvendt 200.000–400.000 celler pr. inkuberingsglas og der udførtes tredobbelte bestemmelser. Forsøget

blev startet ved at tilsætte 5  $\mu$ Ci isotopmærket glukose samt et eller flere hormoner, og inkubationen foregik ved 37°C under 5% CO<sub>2</sub> + 95% atmosfærisk luftblanding. Inkubationen blev stoppet ved at sonikere celler og medium, hvorved cellerne slås itu. Der blev foretaget bestemmelse af deoxyribonucleinsyre (DNA) hvis indhold er konstant i cellen, samt bestemmelse af syntetiseret isotopmærket laktose. Mængden af isotopmærket laktose angives i disintegrationer pr. minut (dpm). For at undersøge hvor længe syntesehastigheden af laktose er konstant under de givne forsøgsbetingelser, blev opsat et forsøg hvor inkubationen blev stoppet efter forskelligt tidsrum. Effekten af prolaktin blev undersøgt dels ved konstant koncentration af prolaktin på 20  $\mu$ g/ml inkuberet i forskelligt tidsrum, dels ved forskellig koncentration af prolaktin fra 1  $\mu$ g/ml til 40  $\mu$ g/ml alle inkuberet i 8 timer. For at undersøge effekten af væksthormon, og om der var en sammenhæng mellem effekten af væksthormon og somatomedin C, blev opsat en serie forsøg hvor der til næringsvæsken blev tilsat væksthormon alene og somatomedin C samtidig med væksthormon. Desuden blev undersøgt om en eventuel effekt af somatomedin C blev hæmmet eller stimuleret af insulin, da det vides at somatomedin er en insulinlignende vækstfaktor. Alle prøver blev inkuberet i 8 timer.

I forsøgene med primær kultur, blev de optøede celler indstøbt i et tyndt lag collagengel, oven på et underlag af collagengel, i en lille petriskål. Cellerne blev påhældt 2 ml medium, tilsat serum eller fuldt defineret medium med eller uden hormon, og inkuberet 5 døgn. Efter 5 døgn blev påhældt 2 ml af pågældende medium tilsat 5  $\mu$ Ci isotopmærket glukose, og der blev inkuberet 25 timer. Det ovenstående medium blev suget af og koncentrationen af isotopmærket laktose blev bestemt. Cellerne blev opslemmet i medium og herpå blev bestemt DNA.

### Resultater

I det første forsøg blev undersøgt dels hvor længe syntesehastigheden af laktose er konstant og dels prolaktins effekt på laktosesyntese. Af figur 1 ses, at middelværdierne ligger på en ret linje, hvilket viser at syntesehastigheden er konstant

i de 23 timer forsøget er udført. Ud fra dette er valgt en inkubationstid på 8 timer, idet kortere tid vil give de tilsatte hormoner mindre tid til at virke i. Ved længere tids inkubation er i egne tidligere forsøg observeret, at kurven for syntesehastighed af laktose bøjer af efter 20-24 timers inkubation.

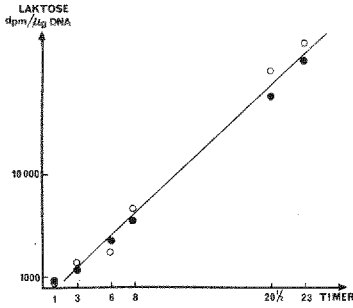


Fig. 1. Sammenhæng mellem inkubationstid og mængden af syntetiseret isotopmærket laktose. Cellerne inkuberet i fuldt defineret medium med eller uden prolaktin.

- Fuldt defineret medium.
- Fuldt defineret medium + 20  $\mu\text{g}$  prolaktin pr. ml.

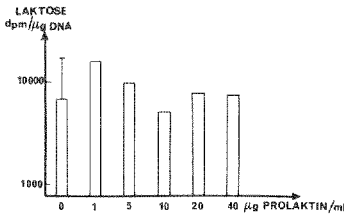


Fig. 2 Sammenhæng mellem stigende prolaktin koncentration og mængden af syntetiseret isotopmærket laktose.

Fig. 1 viser desuden at tilsætning af prolaktin i denne koncentration ikke har nogen signifikant ( $P < 0,05$ ) effekt på syntesen af laktose. Resultatet af tilsætning af stigende mængde prolaktin og inkubation i 8 timer ses i figur 2. Prolaktin har ingen signifikant ( $P < 0,05$ ) effekt i nogen af de anvendte koncentrationer. På ubehandlede prøver, d.v.s. celler der er inkuberet i fuldt defineret medium, er på denne og de følgende figurer angivet Least Significant Difference (LSD), der er den mindste afvigelse mellem middelværdien for kontrol og middelværdien for behandlede prøver, for at der er signifikant ( $P < 0,05$ ) forskel. Resultatet af den serie forsøg der blev udført med væksthormon, somatomedin C og insulin ses i fig. 3, 4 og 5.

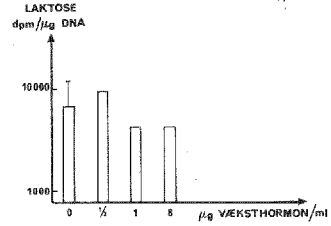


Fig. 3. Sammenhæng mellem stigende væksthormon koncentration og mængden af syntetiseret isotopmærket laktose.

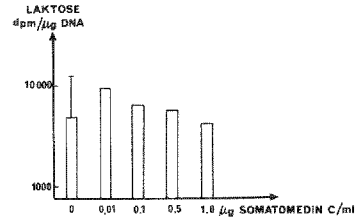


Fig. 4. Sammenhæng mellem stigende koncentration af somatomedin C og mængden af syntetiseret isotopmærket laktose. Mediet med hormon er tilsat konstant koncentration af 1  $\mu\text{g}$  væksthormon pr. ml.

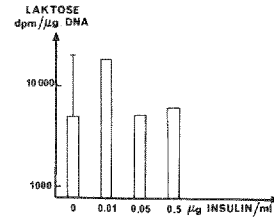


Fig. 5. Sammenhæng mellem stigende koncentration af insulin og mængden af syntetiseret isotopmærket laktose. Mediet med hormon er tilsat konstant koncentration af 1  $\mu\text{g}$  væksthormon + 0,05  $\mu\text{g}$  somatomedin C pr. ml.

Ingen af de nævnte behandlinger afviger signifikant ( $P < 0,05$ ) fra de ubehandlede prøver.

Resultatet af forsøg med primærkultur ses i tabel 1. Det totale antal  $\mu\text{g}$  DNA angiver, hvor stor vækst der er i cellekulturen. Der er ingen forskel på væksten ved medium tilsat serum og ved fuldt defineret medium. Det fuldt definerede medium må derfor være sammensat så det svarer til de vækstfremmende komponenter, der findes i serum. Tilsætning af 40  $\mu\text{g}$  prolaktin øger signifikant ( $P < 0,05$ ) væksten. Tilsætning af 10  $\mu\text{g}$  prolaktin giver en vækst, der ikke adskiller sig fra fuldt defineret medium eller fra medium tilsat 40  $\mu\text{g}$  prolaktin. Mængden af radioaktivt mærket laktose der er udskilt i næringsmedium, relateret

**Tabel 1. Laktosesyntesen i primær kultur, relateret til total  $\mu\text{g}$  DNA**

Behandling	DNA total $\mu\text{g}$	Laktose dpm pr.
		$\mu\text{g}$ DNA
Medium + serum	2,5 b	$5,5 \cdot 10^4$ c
Fuldt def. medium	3,1 b	$5,5 \cdot 10^4$ c
Fuldt def. medium + 10 $\mu\text{g}$ Prolaktin pr. ml	9,8 ab	$12,0 \cdot 10^4$ b
Fuldt def. medium + 40 $\mu\text{g}$ Prolaktin pr. ml	9,3 a	$16,3 \cdot 10^4$ a

a-c Gennemsnitsværdier, i samme søjle, der er mærket med forskelligt bogstav, er signifikant ( $P < 0,05$ ) forskellige.

Beregnet ved ensidig variansanalyse.

til total  $\mu\text{g}$  DNA, er derimod forskelligt. Ved tilsætning af både 10  $\mu\text{g}$  og 40  $\mu\text{g}$  prolaktin øges mængden af laktose signifikant ( $P < 0,05$ ). Der er ingen forskel på mængden af laktose ved medium med serum og fuldt defineret medium. Desuden viser dette forsøg, at den producerede laktose udskilles fra cellen også selvom cellen findes indstøbt i collagenengel.

### Diskussion

De anvendte hormoner prolaktin, væksthormon, somatomedin C og insulin havde ingen effekt på laktosesyntesen i forøgene med suspensionskultur. Nyeste undersøgelser, C. R. Baumrucker (1986), har vist, at der findes insulinreceptorer og somatomedin C receptorer i mælkekirtelvæv. Samtidig blev vist at somatomedin C i en koncentration på 50-300 ng/ml stimulerer DNA syntesen i yvervævsnit fra lakterende køer, og at 100 ng-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin havde samme effekt. At der i egne undersøgelser ikke blev fundet en effekt på laktosesyntesen ved tilsætning af insulin eller somatomedin C kan derfor undre. Årsagen til

dette kunne være, at cellerne er isoleret fra yvervæv, der stammer fra en ko sent i laktationen, og cellerne derfor giver langt mindre respons. At væksthormon ingen direkte effekt havde på laktosesyntesen, var som tidligere nævnt, ventet. Reproducerbarheden af disse forsøg kan ses ved sammenligning af kontrolprøver fra figur 1 efter 8 timers inkubation, og kontrolprøver fra figur 2 og figur 3. Spredningen er på 12% i disse forsøg og meget større reproducerbarhed kan nok ikke forventes.

I forsøget med primærkultur havde prolaktin stimulerende effekt på væksten. Desuden stimuleres syntesen af laktose ved tilsætning af både 10  $\mu\text{g}$  og 40  $\mu\text{g}$  prolaktin. Denne øgning af syntesen kan skyldes, at disse celler er i større vækst og dermed har højere generel syntese kapacitet. Da der er signifikant forskel på tilsætning af 10  $\mu\text{g}$  og 40  $\mu\text{g}$  prolaktin, og denne ikke afspejles i det totale DNA, kan det tyde på at prolaktin har haft en stimulerende effekt på laktosesyntesen i primærkulturen. Det kan så diskuteres om mælkekirtel epithelceller i primærkultur, hvor der sker betydelig celledeling, er meget forskellige fra de vævsceller, som de stammer fra. Man ved, at i cellekulturer har de nydannede celler ofte få af vævets særlige egenskaber og får et mere embryonalt præg. Mælkekirtel epithelceller i primær kultur har muligvis derfor, mere egenskaber som et yver udner udvikling eller i tidlig laktation, end i et yver i sen laktation, som cellerne oprindeligt stammer fra.

### Litteratur

- Baumrucker, C. R. (1986) J. Dairy Science vol 69 sup 1 p 120.  
Hansen, H. O., Tornehave, D. Knudsen, J. (1986) Biochem. J. 238 167-172.