

孕早期家兔子宫内膜细胞的分离培养与形态观察^{*}

陈秀荔, 靳亚平, 利光辉, 王 赟, 林炜明

(西北农林科技大学 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为探讨子宫内膜细胞的分离与体外培养条件、生长特点及其增殖过程, 采用不同消化方法进行了孕早期家兔子宫内膜细胞的消化和分离培养试验。结果表明, 多数情况下采用胰蛋白酶消化获得的细胞数量少且活率低于60%, 而采用1 g/L 胶原酶I型消化获得的细胞数量多达 $1 \times 10^6/\text{cm}^3$, 且活率大于90%。经74 μm (200目) 滤网过滤分离培养出多角形和梭形2种形态的基质细胞及铺路石状的腺上皮细胞, 并均能在体外培养和传代。

[关键词] 子宫内膜; 体外培养; 基质细胞; 腺上皮细胞

[中图分类号] Q 954 6-32⁺ 2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)06-0001-04

子宫是孕育胚胎的器官, 子宫内膜是卵巢激素作用的靶组织, 子宫内膜在生殖生理研究中占有重要地位^[1]。已知子宫内膜细胞在发情周期及妊娠期均发生形态及生物化学变化, 而且还发生增殖及分泌的改变。上述改变受多种因素的调节, 研究其调节机制对于深入了解胚胎附植的机理具有重要意义。本试验通过对孕早期家兔子宫内膜细胞的体外培养, 探讨其纯化方法和传代培养条件, 以期为进一步研究其生长、分化和代谢以及卵巢激素作用机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验用母兔购自陕西扶风揉谷乡家兔养殖户, 临床检查健康, 性成熟。

1.2 主要试剂

DM EM /Han's F-12 (Gibico); HEPES 10~15 mmol/L (Sigma); 新生牛血清 (NBS); 胰蛋白酶 (serve), 活性为1 250, 用D-Hank's液配成2.5和1.25 g/L的溶液; 胶原酶I型 (Gibico), 活性为1 265, 用DM EM液配成1 g/L的原液, 过滤除菌, -20℃保存。

1.3 组织消化与细胞分离

1.3.1 胰酶消化 无菌采取怀孕5~6 d的子宫, 于含有双抗的D-Hank's平衡盐溶液中反复冲洗至子宫呈白色, 将2个子宫角剪成数段, 采用以下2种

方法进行消化: (1) 将子宫内膜翻出, 结扎两端, 分别放入2.5和1.25 g/L胰蛋白酶消化液中, 37℃水浴消化5~15 min。消化完毕后, 加入NBS以终止胰蛋白酶活性, 用载玻片轻轻刮取细胞, 再将未消化完全的子宫重复消化1次, 并刮取细胞, 然后将2次获得的细胞混合, 过74 μm (200目) 滤网, 收集滤液于离心管中, 加入适量8 g/L的氯化氨溶液崩解去除血细胞, 再加入D-Hank's液洗涤3次, 每次1 000 r/min离心10 min, 得细胞组份I。冲洗滤网上面的细胞并收集到另一离心管中, 如前述方法离心洗涤得细胞组份II。获得的细胞用适量的培养液悬浮, 台盼兰染色法检查细胞活率, 并计数活细胞, 将活率在95%以上的细胞, 用含血清的培养液调整其浓度为 $6 \times 10^5/\text{cm}^3$ 。(2) 将子宫内膜翻出, 结扎两端, 分别放入2.5和1.25 g/L的胰蛋白酶消化液中, 置4℃冰箱分别冷消化10 h和24 h。消化完毕后, 按方法(1)分离获取细胞。

1.3.2 胶原酶消化 用上述方法将子宫内膜翻出, 结扎两端, 放入1 g/L胶原酶消化液中, 于37℃水浴消化, 取出后刮取细胞, 过74 μm (200目) 滤网, 分离细胞。另外用D-Hank's液冲洗滤网上的细胞, 离心洗涤, 加入适量的培养液悬浮细胞。

2 结果与分析

2.1 不同消化方案对家兔子宫内膜的消化效果

试验结果表明, 采用不同消化方法对子宫内膜

^{*} [收稿日期] 2003-11-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39770544)

[作者简介] 陈秀荔 (1977-), 女, 内蒙古赤峰市人, 在读硕士, 主要从事产科病理与家畜生殖内分泌研究。

[通讯作者] 靳亚平 (1966-), 男, 陕西宝鸡人, 副教授, 主要从事产科病理与家畜生殖内分泌研究。

细胞的消化效果不同。比较发现,胰酶消化后所得的消化液均呈粘液状,以 2.5 g/L 胰蛋白酶热消化组的粘度最大,细胞活率在 60% 左右。低浓度的胰蛋白酶或冷消化所获得的细胞活率均在 95% 以上,且消化后消化液粘度较小,易于吸弃,细胞易分离和洗涤。对最终分离的细胞数量及活率分析结果表明,几种消化方法都可采用,但以低浓度的胰蛋白酶和冷消化的细胞易生长贴壁,说明其活力较强。

应用胶原酶消化后,消化液粘度小,获得的细胞数量大,细胞活率在 90% 以上,因此后续试验均采用 1 g/L 胶原酶 I 型于 37 ℃ 水浴消化 20~ 25 min。结果详见表 1。

表 1 不同消化方案对家兔子宫内膜的消化效果

Table 1 Digestion results of rabbit endometrial cells by different digestion methods

消化酶 Digestion enzyme	酶浓度/(g · L ⁻¹) Enzyme concentration	消化时间/min in Digestion time		结果 Results
		37	4	
胰蛋白酶 Trypsinase	2.5	5	0	+++
胰蛋白酶 Trypsinase	1.25	20	0	++
胰蛋白酶 Trypsinase	2.5	0	300	+
胰蛋白酶 Trypsinase	2.5	0	600	+++
胰蛋白酶 Trypsinase	1.25	0	1440	+++
胶原酶 Collagenase	1	20~ 25	0	+++
胶原酶 Collagenase	1	5	0	-

注: - . 组织块边缘整齐,不疏松,用力振荡后,液体基本清亮; + . 组织块边缘略疏松,发“毛”,用力振荡后,液体轻度混浊,消化率为 25%~ 30%; ++ . 组织块边缘疏松,振荡后液体中度混浊,消化率为 50%; +++ . 组织块边缘疏松拉丝,振荡后液体明显混浊,消化率为 80%~ 85%。

Note: - . The edge of the clumps was regular, It didn't break down. After being shaken, the cultured medium was clear; + . The edge of the clumps began to break down, appeared "loose". After being shaken, the cultured medium appeared lightly turbid. Digestibility was 25 percent to 30 percent. ++ . The edge of the clumps continued to break down, After being shaken, the cultured medium appeared turbid. Digestibility was 50 percent. +++ . The edge of the clumps broke down and appeared filamentous. After being shaken, the cultured medium appeared obviously turbid. Digestibility was 80 percent to 85 percent.

2.2 细胞的体外生长方式及其形态特征

细胞组份 I 于培养 10 h 后开始贴壁,24 h 后大部分已贴壁,48 h 后基本长成单层,大部分为具有成纤维细胞形态的细胞,胞浆丰富,核椭圆;长期连续培养后,细胞延伸为长梭形,相互平行排列成束(图 1),密度大的区域聚集成堆,呈发散式生长(图 2),其中多角形细胞有多个短小的突起,核居中;连续几天培养后,细胞变大,胞质多而明亮,核明显增

大,突起拉长。

细胞组份 II 接种 24 h 后部分腺体贴壁,并可见细胞从腺体向外生长;3 d 后,原接种的腺体细胞长成漩涡状排列的致密单层细胞集落(图 3,4);约 5 d 时,细胞集落扩大并相互融合成片,细胞密度达 $1.5 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^5/\text{cm}^2$ 。

HE 染色后,细胞核为紫蓝色,细胞质为粉红色。

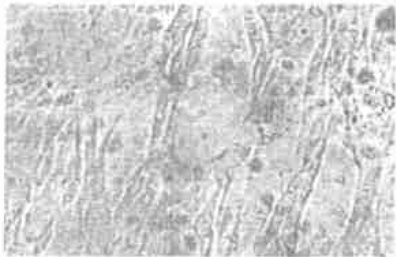


图 1 培养 4 d 的子宫内膜基质细胞 (× 40)

Fig 1 Separated early pregnant rabbit endometrial stromal cells on 4th day of primary culture. A bundle colony is formed by polygonal cells. Inverted microscopy (× 40)

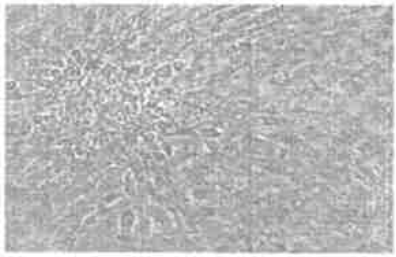


图 2 培养 2 d 的基质细胞(倒置显微镜 × 25)

Fig 2 On 2nd day of primary stromal cells culture, stromal cells exhibit a characteristic divergent appearance (Inverted microscopy × 25)

2.3 传代细胞的体外生长方式及其形态特征

细胞组份 I 经传代后,具有成纤维细胞形态的

梭形细胞增多(图 5),传 2~ 3 代后细胞生长活力增加。24 h 基本长成致密的细胞单层(图 6)。

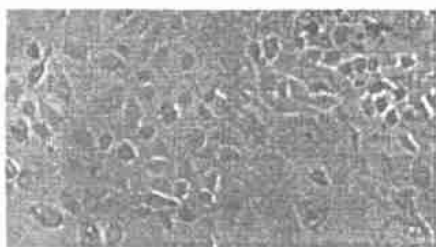


图3 培养3 d的腺上皮细胞($\times 40$)

Fig 3 On 3rd day of Separated endometrial epithelial cells exhibit a characteristic "flattened" appearance ($\times 40$)



图4 培养3 d的腺上皮细胞($\times 100$)

Fig 4 On 3rd day of Separated endometrial epithelial cells exhibit a characteristic "flattened" appearance ($\times 100$)

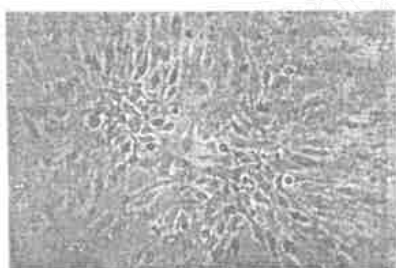


图5 传1代后培养24 h的基质细胞($\times 25$)

Fig 5 Subculture stromal cells at passage 1 These cells were cultured for 24 h ($\times 25$)



图6 传2代后培养24 h的基质细胞($\times 40$)

Fig 6 Subculture stromal cells at passage 2

These cells formed confluent cultures within 24 h ($\times 40$)

细胞组份II经传代后细胞生长缓慢,且随着传代次数的增加,细胞的胞体膨大,胞浆空泡化;若继续培养,细胞就会逐渐从瓶壁上脱落。

3 讨论

子宫内膜中含有大量的基质细胞和腺体细胞,因研究目的不同,从子宫内膜中提取这2种细胞的方法也各异^[2,3]。对于内膜组织来说,用酶消化法获取细胞是最常用的方法。一般采用的是胶原酶,酶含量为 $1\sim 10\text{ g/L}$ ^[4-6],消化时间为 $40\sim 120\text{ min}$ 不等。据Casslen B G等^[7]报道,在消化过程中可加入 0.15 g/L DNA酶,以消化DNA样物质所形成的胶状物,从而使更多的细胞游离出来^[8,9]。本试验结果表明, 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化对细胞损伤较大,热消化比冷消化对细胞损伤大,但如果消化时间掌握得好,活细胞率仍可达90%以上。将细胞以 $6\times 10^5/\text{cm}^3$ 接种于培养瓶中,约24 h后内膜细胞基本贴壁。应用 1 g/L 胶原酶I型消化 $15\sim 20\text{ min}$ 的效果最好,所用的时间明显少于资料报道的时间,分析可能与采取组织所处的生理时期不同有关,或者与动物种类不同有关。试验期间曾对未孕兔进行消化试验,在同样时间内消化效果较差。

根据子宫内膜细胞直径大小的不同,可以通过

过滤的方法将基质细胞和腺上皮细胞分离。Osteen等^[10]根据细胞沉降速度不同,静止后吸取细胞悬液,分离出2种细胞,获得了纯度较高的基质细胞和腺体细胞。蒋洲梅等^[11]采用低速离心及高密度接种,能够得到80%以上纯度较高的人的腺上皮细胞,但基质细胞的纯度有所下降。张芳婷等^[12]采用 $74\text{ }\mu\text{m}$ (200目)和 $35\text{ }\mu\text{m}$ (350目)的滤网2次过滤,获得纯度较高的人的基质细胞和腺体细胞。本试验采用 $74\text{ }\mu\text{m}$ (200目)滤网过滤,将滤过的细胞(组份I)和滤网上的细胞(组份II)分别培养,证明该法可分别获得基质细胞和腺上皮细胞,不过腺上皮细胞纯度不是很高。据报道^[2,13,14],腺体细胞贴壁后成漩涡状生长,但本次试验未见到此现象,而是呈现发散式生长,这可能与获取细胞的方式不同有关。本试验只采用了 $74\text{ }\mu\text{m}$ (200目)的滤网,而有学者采用了 $74\text{ }\mu\text{m}$ (200目)和 $35\text{ }\mu\text{m}$ (350目)的滤网获取细胞,比本试验分离的细胞纯度高,这可能是贴壁生长方式不同的主要原因之一,此外也可能与接种密度和培养时间有关。传代后的腺体细胞空泡化可能与培养基营养成分不足、细胞老化有关。

本试验对孕早期兔子宫的膜细胞进行了体外培养,分别获得了基质细胞和腺上皮细胞。基质细胞有2种形态:一种呈多角形,一种呈梭形,光镜下具有

成纤维细胞形态,这与蒋洲梅等^[11]、张芳婷等^[12]培养的结果相同。Walton 等^[15]报道,多角形间质细胞能传代 20 次而保持其形态不变。但在本次试验中,细胞传代 2~3 次后即伸长成梭形,形态类似于成纤维细胞,在体外继续培养时,细胞变圆变大,连成片状,显示蜕膜细胞样转化。这种现象可能是由于细胞在活体内曾受到雌激素、孕激素的作用而导致其继续分化。而腺体细胞培养后呈铺路石状生长,传代后

细胞胞体膨大,胞浆空泡化,最后从瓶壁上脱落,这与蒋洲梅等^[11]报道的不同,可能与细胞的纯度有关。

本试验通过孕早期家兔子宫内膜细胞的分离与培养发现,采用 1 g/L 的胶原酶 I 型消化获得的细胞再经 74 μm (200 目)滤网过滤,能成功地分离并培养子宫内膜基质细胞和腺上皮细胞,可为进一步研究胚胎附植机理提供实验模型。

[参考文献]

- [1] 陈北亨. 兽医产科学[M]. 兰州: 农业出版社, 1988: 5-8.
- [2] 徐立康, 王介东. 早孕蜕膜组织血管内皮细胞的分离与培养[J]. 生殖与避孕, 1993, 13(5): 345-348.
- [3] Fernandez S, Shorter S C, Naish C E, et al. Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres[J]. Hum Reprod, 1992, 7(2): 156-161.
- [4] Bong So A, Gojra B, Lian N P, et al. Establishment of human endometrial cell culture[J]. Hum Reprod, 1988, 3(6): 705-713.
- [5] Osteen K G, Hill G A, Hargrove J T, et al. Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cell from human endometrial biopsy specimens[J]. Fertil Steril, 1989, 52(6): 965-972.
- [6] Ricketts A P, Hagensee M, Bullock D W. Characterization in primary monolayer culture of separated cell types from rabbit endometrium[J]. Reprod Fertil, 1983, 67(2): 151.
- [7] Casslen B G, Siler T M, Harper J K. Progesterone regulation of prolactin release from human endometrial stromal cells in culture: potential bioassay for progestational activity[J]. Acta Endocrinol, 1990, 122(1): 137-144.
- [8] Akoum A, Doillon C J, Koutsilieris M, et al. Human endometrial cells cultured in a type I collagen gel[J]. Reprod Med, 1996, 41(8): 555-559.
- [9] 李荣皓, 庄临之. 人细胞滋养层细胞的无血清培养与生长因子的作用[J]. 中国科学(B 辑), 1990, (9): 963-965.
- [10] Osteen K G, Hill G A, Hargrove J T, et al. Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens[J]. Fertil Steril, 1989, 52(6): 965-972.
- [11] 蒋洲梅, 黄玉珠, 洪淡华, 等. 人子宫内膜细胞培养及形态观察[J]. 生殖与避孕, 1994, 14(4): 271-274.
- [12] 张芳婷, 宋天保, 王介东. 人子宫内膜基质细胞和腺体细胞的分离培养及鉴定[J]. 解剖学报, 2001, 32(3): 238-240.
- [13] Irwin J C, Quigley M M, Kirk D, et al. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: *in vitro* model for decidualization[J]. Fertil Steril, 1989, 52(5): 761-768.
- [14] Shupe K L, Zimmer R L, Griffin W T, et al. Polypeptides synthesized and released by human endometrium in cell and tissue explant culture[J]. Fertil Steril, 1993, 60(5): 839-851.
- [15] Walton L A, Kevin G, George A, et al. Endometrial stromal cells in culture: an attempt to understand the genesis and biologic activity of uterine sarcomas[J]. Gynecol Oncol, 1986, 24: 247.

Isolation, culture and morphological observation of early pregnant rabbit

CHEN Xiu-li, JIN Ya-ping, LI Guang-hui, WANG Yun, LIN Weiming

(Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Ministry of Agriculture,

Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This paper focuses on optimal condition of the isolation and *in vitro* culture of endometrium cells of early pregnant rabbit, which were also dealt with the morphological modality growth and proliferation characteristics. Different digestion methods and isolation methods used to prepare the cells were estimated by the cell culture. The results show that in most conditions, the number of cells was small and the viability ratio was lower than 60% using trypsin to digest cells, while using the density of 1 g/L to digest cells, the number of cells was up to $1 \times 10^6/\text{mL}$ and the viability ratio was 90%. The stromal cell and the epithelial cell were able to be separated through 74 μm filter. Two kinds of the cells could be cultured to a full monolayer and regenerated *in vitro*.

Key words: endometrium; culture *in vitro*; stromal cells; epithelial cells