

家兔卵巢间质细胞的分离培养与形态观察^{*}

利光辉, 陈秀荔, 王 赟, 林炜明, 靳亚平

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

[摘 要] 采用 0.1% XI型胶原酶和 2.5 g/L 胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA, 分别用热消化法和冷消化法消化分离家兔卵巢间质细胞, 以探讨其体外培养条件和生长特点。结果表明, 无论用热消化法还是冷消化法, 0.1% XI型胶原酶的消化效果均好于 2.5 g/L 胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 的消化效果, 前者的细胞活率在 90% 以上, 可用于体外培养; 经 74 μm 滤网过滤后的卵巢组织分离培养出梭形和不规则形的间质细胞, 且 2 种类型的细胞能在同一培养体系中贴壁生长。说明 0.1% XI型胶原酶可用于家兔卵巢间质细胞的分离。

[关键词] 卵巢间质细胞; 分离培养; 形态观察

[中图分类号] S829.11

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)08-0085-04

卵巢是产生卵子和分泌性激素的器官, 是脑垂体前叶分泌的促性腺激素的靶器官之一, 它不仅参与生殖并维持发情周期, 还对机体的内分泌功能和新陈代谢起着重要的调节作用, 在生殖生理研究中占有重要地位。卵巢在动物的发情周期和妊娠期均发生形态及生化变化。在卵巢发生这些变化的过程中, 不仅卵泡和黄体的形态及功能发生改变, 而且卵巢间质细胞的增殖及内分泌功能也发生改变。从理论上研究卵巢间质细胞的增殖及内分泌功能在发情周期和妊娠期发生变化的机理及调控因素, 对进一步研究卵泡发育的调控机理、排卵机理、黄体形成和退化机理、卵巢萎缩机理、卵巢间质细胞错构瘤等癌症发病机理, 以及参与这些过程的激素及细胞因子的作用机理均具有重要意义。本试验在体外条件下培养妊娠早期母兔卵巢间质细胞, 探讨其体外培养条件和生长特点, 为进一步研究其生理作用建立体外模型。

1 材料与方法

1.1 试验动物

成年母兔, 购自陕西扶风县揉谷乡家兔养殖户, 临床检查健康, 妊娠 7 d。

1.2 主要试剂配制及保存

DM EM /Ham's F-12 (1:1) (Hyclone), 按使用说明配制, 过滤除菌, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 备用; HEP-

ES (华美生物工程公司), 10~15 mmol/L, 过滤除菌, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 备用; 新生犊牛血清 (NBS), 自制, 过滤除菌, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用; 2.5 g/L 胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 消化液 (上海生工), 按参考文献 [1] 配制, 过滤除菌, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用; 0.1% XI型胶原酶, 活性为 1:265, 用 DM EM 溶液配成 0.2% 原液, 过滤除菌, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 使用时倍比稀释; 胰岛素 (Sigma), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 按参考文献 [1] 配制, 过滤除菌, 分装, 每瓶 1~2 mL, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3 组织消化与细胞分离

1.3.1 胰酶消化 用颈动脉放血法将母兔处死, 用消毒水清洗皮肤, 在无菌条件下打开腹腔, 取出卵巢, 置于盛有 D-Hanks' 液 + 双抗 (青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的烧杯中, 浸泡 20~30 min; 然后转入无菌平皿中除去卵巢周围的结缔组织及筋膜, 并反复冲洗; 再转入无菌青霉素瓶, 用眼科剪刀将修剪好的卵巢组织剪碎, 分别用热消化法和冷消化法消化。

热消化法 将上述处理的部分卵巢组织移入加有几粒玻璃珠的三角瓶, 加入 2.5 g/L 胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 消化液 5~8 mL (以能覆盖玻璃珠为宜), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 10~20 min, 每隔 3~5 min 摇动 1 次。当看到组织块的边缘不整齐时, 加入等体积含 15% NBS 的 DM EM /Ham's F-12 (1:1) 培养

^{*} [收稿日期] 2004-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (39770544)

[作者简介] 利光辉 (1977-), 男, 山东莱芜人, 在读硕士, 主要从事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, 博士, 主要从事家畜生殖内分泌与免疫学研究。

液终止消化。静置 2~3 min, 用吸管吸取上层液体(不要让组织块重新悬起), 弃去, 加入 15~20 mL 培养液, 剧烈摇动, 以打碎组织块, 所得细胞悬液过 74 μm 滤网, 收集滤液于离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min。加入培养液, 将细胞团重新悬起, 再离心洗涤 1~2 次。得到的细胞团用适当的培养液重新悬浮, 台盼兰拒染法检查细胞活率, 用培养液调整活细胞浓度至 $5 \times 10^5 \text{ cm}^{-3}$ 。制得的细胞悬液保存备用。

冷消化法 将上述处理的另一部分卵巢组织移入加有几粒玻璃珠的三角瓶, 加入适量的 2.5 g/L 胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 消化液, 置于 4℃ 冰箱中消化 4~5 h。消化完毕后的操作方法同热消化法。制得的细胞悬液保存备用。

1.3.2 胶原酶消化 用 0.1% XI 型胶原酶取代 2.5 g/L 胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 消化液, 按上述热消化法和冷消化法操作, 制得的细胞悬液保存备用。

1.4 细胞培养与染色

1.4.1 细胞培养 将用不同消化方法得到的细胞悬液移入培养瓶, 加入胰岛素, 于 37℃, 体积分数 5% CO_2 及饱和湿度条件下培养, 观察其生长特性。于 48~72 h 内首次换液, 以后每 48 h 换液 1 次, 约 7 d 后生长成单层。

1.4.2 光学显微镜标本的制备 培养瓶内事先放入处理的盖玻片, 当细胞在其上生长成单层后, 取出盖玻片, 用 Hank's 液冲洗, 再用体积分数 95% 乙醇固定 15 min, 作 HE 染色。

2 结果与分析

2.1 不同消化方法对卵巢组织的消化效果

试验发现, 不同消化方法对卵巢间质细胞的消

化效果不同。无论是 0.1% XI 型胶原酶消化液还是 2.5 g/L 胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 消化液, 用热消化法得到的细胞数量均较冷消化法多, 而细胞活率相对较低, 用热消化法时 2.5 g/L 胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA 消化液所得细胞活率低于 60%, 且细胞黏度大, 容易聚集成团, 不能用于体外培养; 用 0.1% XI 型胶原酶消化所得细胞活率均高于 90%, 适合于体外培养。无论用热消化法还是冷消化法, 均以 0.1% XI 型胶原酶的消化效果较好。用 0.1% XI 型胶原酶冷消化法可以制得足量细胞活率高的细胞悬液, 但耗时多, 不宜采用。因此, 最佳的消化方法是用 0.1% XI 型胶原酶热消化法。

2.2 细胞的体外生长方式与形态特征

细胞接种后于 18~24 h 开始贴壁, 48 h 内大部分贴壁, 生长成单层需 7~8 d。从形态上区分, 主要存在 2 种类型的细胞。一种是不规则形卵巢间质细胞, 此类细胞胞核明显, 边缘不整齐, 有多个突起, 细胞与细胞之间拉丝, 形成网状, 细胞之间界限不清楚(图 1)。在高倍镜下观察, 胞核居于细胞一侧, 突起更加明显, 细胞核周围还有一些小泡, 胞质多而明亮(图 2)。另一种是梭形卵巢间质细胞(图 3), 此类细胞看不到细胞核, 长成单层的细胞之间几乎没有空隙。HE 染色后, 卵巢间质细胞细胞核和细胞质更加分明(图 4), 细胞核浓染, 有的呈马蹄形, 多数呈椭圆形, 有的细胞内还有双核甚至多核, 在多核细胞的核周围有着色的空泡(图 5)。核仁清晰, 数目不等, 多数 4~5 个, 有的 7~8 个(图 6)。

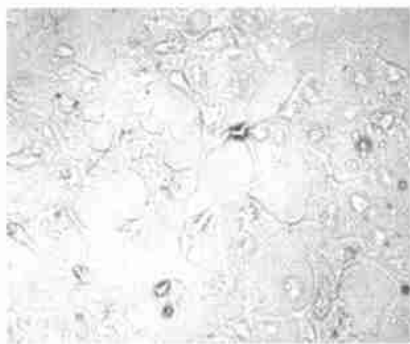


图 1 不规则形卵巢间质细胞 $\times 100$
Fig. 1 Irregular morphological OICs,
magnification $\times 100$

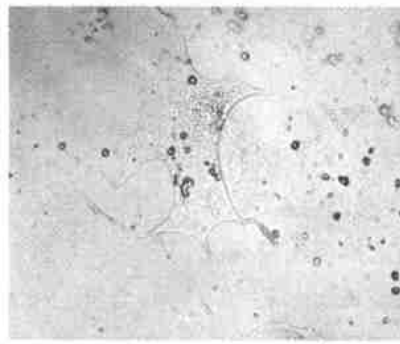


图 2 不规则形单个贴壁卵巢间质细胞 $\times 400$
Fig. 2 A single monolayer anchored OIC,
magnification $\times 400$

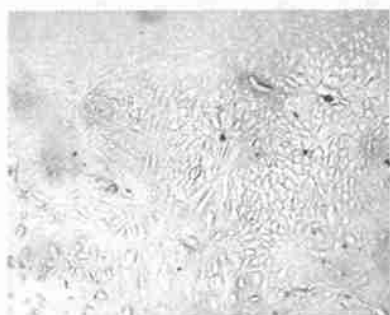


图 3 梭形单层卵巢间质细胞 $\times 40$
Fig. 3 Shuttle-like monolayer OICs,
magnification $\times 40$

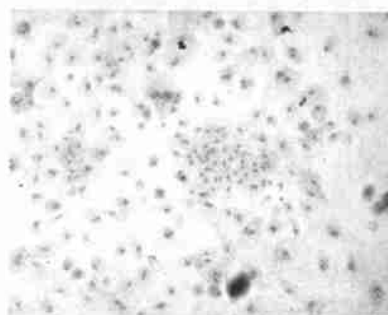


图 4 HE 染色后卵巢间质细胞 $\times 40$
Fig. 4 Monolayer anchored OICs after HE stain,
magnification $\times 40$



图 5 HE 染色后多核卵巢间质细胞 $\times 400$
Fig. 5 Polynucleous OICs after HE stain,
magnification $\times 400$

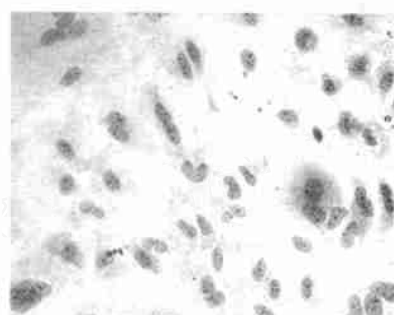


图 6 HE 染色后单层卵巢间质细胞 $\times 100$
Fig. 6 Monolayer anchored OICs after HE stain,
magnification $\times 100$

3 讨 论

本研究结果表明, 以 0.1% XI 型胶原酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 30 min 对卵巢间质细胞的消化效果最好, 与 0.1% XI 型胶原酶冷消化法相比, 可节约大量时间, 但细胞活率和细胞数量差异不大。而用胰蛋白酶-EDTA 消化卵巢组织, 不仅对细胞的损伤大, 而且细胞容易粘成团块。这可能是由于细胞被消化破碎后, 细胞内容物释放, 尤其是 DNA 裂解, 导致细胞发生粘连。Casslen 等^[2]在消化过程中加入 0.15 g/L DNA 酶以消化粘连细胞的透明胶状物质, 使更多的细胞消化。

本研究用 74 μm 尼龙滤网过滤法分离细胞, 效果较好。张芳婷等^[3]采用 74 和 40 μm 的滤网 2 次过滤, 能将子宫内膜间质细胞和腺体细胞分离开来, 间质细胞的纯度达 90% 以上。Magoffin 等^[4]用 Percoll 密度梯度离心法分离纯化金色叙利亚仓鼠的卵巢间质细胞, 纯度也可达 90% 以上。

卵巢是机体重要的内分泌器官, 其生殖生理活动具有一定的周期性。在周期的不同阶段, 由于受不同激素的影响, 卵巢内各种细胞具有不同的生理功

能。本研究所用的卵巢组织取自妊娠约 7 d 的成年母兔, 培养后细胞的生长状况良好, 在 24 h 内开始贴壁, 这种生长情况与有关报道一致^[5]。在试验期间也曾取未孕成年母兔的卵巢组织进行同样的试验, 在相同的条件下细胞的生长状况明显不如妊娠母兔。由此推测, 卵巢间质细胞的体外生长受卵巢所处生理阶段的影响。

卵巢中有多种间质细胞。目前, 至少有 4 种类型的间质细胞已经被鉴定, 如初级卵巢间质细胞 (primary interstitial cell)、膜间质细胞 (theca-interstitial cell)、次级卵巢间质细胞 (secondary interstitial cell) 和卵巢门间质细胞 (hilar interstitial cell)^[6]。本研究培养出的不规则形卵巢间质细胞在生长形态上与金色叙利亚仓鼠的初级卵巢间质细胞非常相似^[4]。据文献报道^[6], 这种不规则形卵巢间质细胞仅存在于人的胎儿卵巢髓质, 是一群暂时性的产生雄激素的细胞, 在妊娠的第 12 周出现, 而在妊娠的第 20 周又消失, 但该类型细胞对胎儿发育的功能还不清楚。还有文献报道^[7], 这种类型的细胞在出生不久的幼龄仓鼠的卵巢中也存在。本研究所用的试验动物为成年母兔, 也分离培养出这种细胞。但对这种细

胞的功能及特性仍需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001.
- [2] 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 Endocrinology, 1990, 122(1): 137- 144.
- [3] 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和鉴定[J]. 解剖学报, 2001, 32(3): 238- 240.
- [4] Magoffin D A, Erickson G F. Purification of ovarian theca-interstitial cells by density gradient centrifugation[J]. Endocrinology, 1988, 122(5): 2345- 2347.
- [5] James R S, Shyamal K R. *In vitro* culture of hamster ovarian primary interstitial cells: effect of serum[J]. Biology of Reproduction, 1998, 59: 1187- 1194.
- [6] Samuel S C, Yen R B J, Robet L B. Reproductive Endocrinology[M]. Fourth edition. 北京: 科学出版社, 2001. 153- 190.
- [7] Gondos B, Hobel C J. Interstitial cells in the human fetal ovary[J]. Endocrinology, 1973, 93: 736.

In vitro culture and morphological observation of ovarian interstitial cells in rabbit

L I Guang-hui, CHEN Xin-li, WANG Yun, L I N Wei-ming, J I N Ya-ping

(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: The primary goal of this research is to establish the conditions that the ovarian interstitial cells (OICs) can grow well *in vitro* and observe OICs' growth and morphology characteristics. We use different dissociating solutions (collagenase type XI and trypsin-EDTA) and methods (dissociation at 37 °C, 20- 30 min and at 4 °C, 4- 5 h respectively) to derive OICs from the treated ovarian tissue. Then the OICs are cultured in a humidified 95% air-5% CO₂ incubator at 37 °C supplemented insulin. We find the best dissociated condition is using collagenase at 37 °C for 30 min or so. The cell viability is more than 90% with trypan blue stain. The OICs are isolated with 74 μm filter. There are two types of cells, one type is shuttle-like, the other is irregular. The two types of cells are co-cultured under the same condition and anchored growing on tissue-culture dishes. As a result of our experiments, we conclude that using the 0.1% collagenase type XI is the best way to isolate the OICs.

Key words: OICs; isolation and culture; morphological observation