

家兔子宫内膜细胞和平滑肌细胞的 分离培养及鉴定

李瑞梅^{1,2}, 陈秀荔^{1,2}, 王海滨², 靳亚平¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院 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;

2 军事医学科学院 组织工程中心, 北京 100850)

[摘 要] 为了建立一种高效的子宫细胞分离培养方法, 用酶消化、过滤、离心与差速贴壁纯化相结合的方法分离培养家兔子宫细胞, 分别以上皮细胞角蛋白、波形蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白等为抗原的免疫荧光对分离培养的细胞进行鉴定, 并采用流式细胞仪分析细胞纯度。结果表明, 家兔子宫内膜上皮细胞培养 24 h 后大部分贴壁, 培养 3 d 左右形成单层细胞集落, 呈角蛋白阳性, 细胞圆形或椭圆形, 胞质呈红色, 核呈蓝色, 纯度达 96 % 以上; 子宫内膜基质细胞培养 0.5 h 后即有贴壁, 培养 2 d 后呈单层细胞集落状生长, 呈波形蛋白阳性, 细胞多边形或梭形, 胞质呈红色, 核呈蓝色, 纯度达 95 % 以上; 平滑肌细胞培养 24 h 后大部分贴壁, 6 ~ 7 d 融合成片, 呈 α -平滑肌肌动蛋白阳性, 细胞大都长梭形, 胞质呈红色, 核呈蓝色, 纯度达 98 % 以上。说明该方法能够成功分离并得到高产量、高纯度、高增殖能力的子宫内膜细胞及平滑肌细胞。

[关键词] 动物细胞培养; 子宫内膜上皮细胞; 子宫内膜基质细胞; 子宫平滑肌细胞; 家兔

[中图分类号] S829.1; Q813.1⁺1

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2007)06-0019-05

Culture and identification of uterus endometrial cells and smooth muscle cells of rabbit

LI Rui-mei^{1,2}, CHEN Xiu-li^{1,2}, WANG Hai-bin², JIN Ya-ping¹

(1 Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology, Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Academy of Military Medical Sciences, Tissue Engineering Center, Beijing, 100850, China)

Abstract : The purpose of this study was to set up a method of cultivating highly purified rabbit uterus endometrial cells and smooth muscle cells. Rabbit uterus endometrial epithelial cells, stromal cells and smooth muscle cells were isolated and purified by digestion of trypsin, centrifugation and difference tempo adherence, and observed by light microscope and identified by immunocytochemical stain, and the purity was also analyzed by flow cytometry. The results showed that high purity epithelial cells (95 %), stromal cells (96 %) and smooth muscle cells (98 %) were obtained; the epithelial cells became adherent after 24 h of culture, formed monolayer cell colony after culturing 3 days and were positively stained by anti-cytokeratin antibody; the cells presented egg-shape, the cytoplasm showed red color, and the nucleus blue; the stromal cells became adherent after 0.5 h of culture, form monolayer cell colony after culturing 2 days and were positively stained by anti-vimentin antibody, the cells showed polygon or fusiform shape, the cytoplasm was

[†]收稿日期] 2006-11-09

[基金项目] 全军“十五”医疗卫生科研基金项目(06MA318)

[作者简介] 李瑞梅(1981-), 女, 山东潍坊人, 在读硕士, 主要从事家畜生殖内分泌研究。E-mail: lrm001008@sina.com

[通讯作者] 靳亚平(1966-), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士生导师, 主要从事家畜生殖内分泌和产科病理研究。

E-mail: yapingjin@163.com

red, and the nucleus blue; the smooth muscle cells became adherent after 24 h of culture, formed monolayer cell colony after culturing 6 - 7 days and were positive stained by smooth muscle actin antibody, the cells presented fusiform shape, the cytoplasm showed red, and the nucleus blue. It is evident that, rabbit uterus endometrial cells and smooth muscle cells of high outcome, high purity and high proliferation can be obtained by using this method.

Key words: animal cell culture; uterus endometrial epithelial cell; uterus endometrial stromal cell; uterus smooth muscle cell; rabbit

子宫组织由上皮细胞、基质细胞以及平滑肌细胞组成,是雌性哺乳动物孕育胎儿的器官,在生殖活动中占有重要地位。体外培养的子宫内膜细胞及平滑肌细胞可以作为胚胎和胚胎干细胞系的饲养层^[1-2]。随着组织工程学的发展,体外构建组织工程化子宫片层已成为现实^[3],为进一步研究子宫疾病和胚胎着床提供了更理想的试验模型。而以上研究均需要大量的、高纯度的子宫细胞。国内外学者对子宫内膜细胞及平滑肌细胞的分离培养方法进行了大量研究。1989年,Osteen等^[4]根据细胞沉降速度不同分离得到子宫内膜的两种细胞;张芳婷等^[5]采用74 μm (200目)和35 μm (350目)的滤网过滤2次,获得纯度较高的人子宫内膜基质细胞及腺上皮细胞;Fernandez等^[6]将悬浮的子宫内膜细胞吸附在用Thy-1抗体包被的免疫磁珠上,也成功分离了子宫内膜上皮细胞与基质细胞,但以上方法均有不足。为了建立一种更有效的子宫细胞分离培养方法,本试验采用酶消化、过滤、离心与差速贴壁纯化相结合的方法,对家兔子宫细胞进行了分离培养及鉴定,以期为子宫相关疾病及胚胎和胚胎干细胞的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 选用5~6周龄雌性性成熟新西兰大白兔,质量2~2.5 kg,临床健康,由军事医学科学院动物中心提供。

1.1.2 试剂及仪器 细胞培养液:DMEM-F12 (Gibco公司产品),体积分数10%胎牛血清(Hyclone公司产品),青霉素100 U/mL和链霉素100 U/mL,10 $\mu\text{g/L}$ 牛胰岛素(Sigma公司产品),5 $\mu\text{g/L}$ 表皮生长因子(Sigma公司产品),100 nmol/L雌二醇和10 nmol/L孕酮(Sigma公司产品);PBS(自配);孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(hCG)(宁波激素制剂有限公司产品);鼠抗人上皮细胞角蛋白抗体、鼠抗人波形蛋白抗体和鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白抗体(北京中杉生物公

司产品);异硫氰酸荧光素(FITC)标记的IgG抗体(武汉博士德公司产品);2.5 g/L胰蛋白酶液:胰蛋白酶(Gibco公司产品)用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的PBS配成2.5 g/L质量浓度;1 g/L I型胶原酶液:I型胶原酶(Sigma公司产品)用培养基配成1 g/L质量浓度。

CO_2 培养箱(美国Forma公司产品),BX51相差显微镜(日本Olympus公司产品),DMIRN荧光显微镜(德国Leica公司产品),BD-Calibur流式细胞仪(美国BD公司产品)。

1.2 家兔子宫的采集

于术前3 d下午16:00对新西兰大白兔肌肉注射PMSG(100 U/只),术前1 d下午16:00耳缘静脉注射hCG(75 U/只),手术当日上午8:30耳缘静脉注射空气处死后,用体积分数75%酒精消毒腹部,打开腹腔取双侧子宫,置无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的PBS中,备用。

1.3 家兔子宫细胞的分离培养

1.3.1 家兔子宫内膜细胞的分离培养 将取出的家兔子宫在超净台上用无菌PBS冲洗数次,用手术刀在子宫组织的内面轻轻刮取子宫内膜组织,至发白为止(剩下平滑肌组织),将刮取的内膜组织剪成1 mm^3 的小块,加入适量1 g/L I型胶原酶液,于37

温箱中消化60 min,其间可振荡数次,然后加入胎牛血清终止消化,将消化后的细胞悬液经150 μm 筛网过滤,除去黏液和未消化的组织。再将滤过液过48 μm 筛网,收集滤液(主要为基质细胞),离心(1 200 r/min,5 min),以 $6 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于培养瓶中,加入配好的DMEM-F12培养液,于37、体积分数为5% CO_2 的细胞培养箱中培养。反冲洗48 μm 筛网,收集其上的细胞(主要为腺上皮细胞),离心(1 200 r/min,5 min),以 $6 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 接种于培养瓶中,加入DMEM-F12培养液,于37、体积分数为5% CO_2 的细胞培养箱中培养。由于基质细胞接种0.5 h后大部分贴壁,上皮细胞接种24 h后贴壁,于接种后2 h吸出培养液,将培养液重新接种于另一培养瓶内培养,隔天换液,可纯化基质细胞和

上皮细胞。

1.3.2 家兔子宫平滑肌细胞的分离培养 充分刮除家兔子宫内膜,用无血清 DMEM-F12 培养液清洗,将所剩的子宫肌层用眼科剪充分剪碎(约为 1 mm^3 组织块),用新鲜的 2.5 g/L 胰蛋白酶液在 37°C

消化 5 min 后,加入胎牛血清终止消化,再用 2.5 g/L 胰蛋白酶液在 37°C 消化剩余组织块 5 min ,用胎牛血清终止消化,重复消化直到组织块消化殆尽,将消化液离心($1\ 200\text{ r/min}$, 5 min),用培养液重悬细胞,以 $6 \times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 接种于培养瓶中,于 37°C 、体积分数 $5\%\text{CO}_2$ 的培养箱中培养,隔天换液,以去除血细胞,以后每 3 d 换液 1 次。

1.4 家兔子宫细胞的鉴定

1.4.1 细胞形态观察 每天用倒置显微镜观察细胞贴壁生长情况。

1.4.2 细胞免疫荧光鉴定 分别制备家兔子宫内膜上皮细胞、基质细胞和平滑肌细胞爬片,用体积分数 4% 多聚甲醛溶液固定,体积分数 5% 山羊血清封闭,然后分别滴加 $1\ 100$ 稀释的鼠抗人上皮细胞角蛋白抗体、鼠抗人波形蛋白抗体和鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白抗体,于湿盒内 37°C 孵育 1 h 后,置于 4°C 冰箱过夜。PBS 漂洗后,加入 Cy3 标记的荧光二抗,于室温中孵育 1 h ,PBS 漂洗, Hoechst33258 室温孵育 20 min ,荧光显微镜下观察并拍照记录。阴性对照均用 PBS 代替一抗。

1.5 家兔子宫细胞纯度分析

将细胞收集到 1 mL 的 EP 管中, PBS 洗 2 次,

离心($1\ 200\text{ r/min}$, 5 min),用体积分数 70% 酒精固定, -20°C 过夜;离心($1\ 200\text{ r/min}$, 5 min), PBS 洗 2 次,用体积分数 0.1% Triton 处理 10 min ;离心($1\ 200\text{ r/min}$, 5 min), PBS 洗 2 次,室温条件下用体积分数 10% 山羊血清封闭 20 min ;离心($1\ 200\text{ r/min}$, 5 min), PBS 洗 2 次,加入一抗(鼠抗人上皮细胞角蛋白抗体($1\ 100$ 稀释)、鼠抗人波形蛋白抗体($1\ 200$ 稀释)和鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白抗体($1\ 100$ 稀释)),室温放置 30 min ,离心($1\ 200\text{ r/min}$, 5 min), PBS 洗 2 次,加入 FITC 标记的二抗($1\ 50$ 稀释),室温放置 30 min ,避光。离心($1\ 200\text{ r/min}$, 5 min), PBS 洗 2 次,用 $200\text{ }\mu\text{L}$ PBS 重悬细胞,流式细胞仪检测。

2 结果与分析

2.1 家兔子宫细胞的形态特点及生物学特性

家兔子宫内膜上皮细胞在接种 24 h 后大部分贴壁,培养 3 d 左右形成单层细胞集落,细胞多为圆形或椭圆形,边界清晰,排列紧密,胞浆饱满,核圆而大、位于细胞中央(图 1-A)。家兔子宫内膜基质细胞接种 0.5 h 后即有贴壁,培养 2 d 后呈单层细胞集落状生长,细胞呈多边形或梭形,边界清楚,排列紧密,相互平行呈束状排列,胞质薄而透明,核居中,呈椭圆或圆形(图 1-B)。家兔子宫平滑肌细胞接种 24 h 后大部分贴壁, $6\sim 7\text{ d}$ 融合成片,细胞呈长梭形、放射状或旋涡状排列,成束的细胞平行排列,细胞可单层生长,也可层叠排列呈典型“峰谷”状生长(图 1-C)。

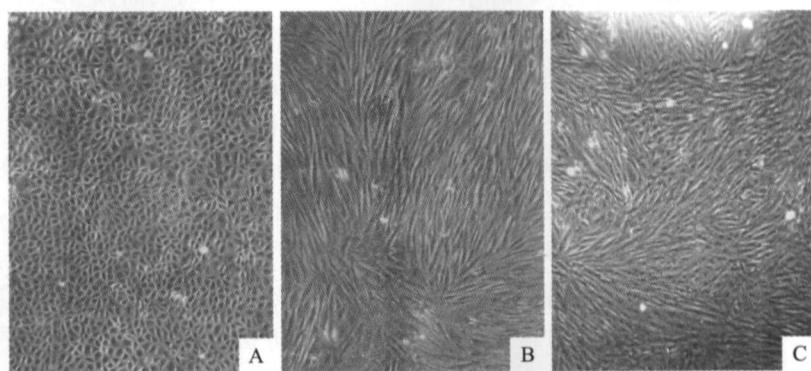


图 1 相差显微镜下家兔子宫内膜细胞及平滑肌细胞形态($\times 100$)

A. 上皮细胞;B. 基质细胞;C. 平滑肌细胞

Fig. 1 Rabbit uterine endometrial cells and smooth muscle cells under phase contrast microscope ($\times 100$)

A. Epithelial cells;B. Stroma cells;C. Smooth muscle cells

2.2 家兔子宫细胞免疫荧光鉴定结果

家兔子宫内膜上皮细胞角蛋白染色呈阳性,细

胞呈圆形或椭圆形,胞质呈红色,核呈蓝色(图 2-A);基质细胞波形蛋白染色呈阳性,细胞多边形或

梭形,胞质呈红色,核呈蓝色(图 2-B);平滑肌细胞质呈红色,核呈蓝色(图 2-C)。
 α -平滑肌肌动蛋白染色呈阳性,细胞大都长梭形,胞

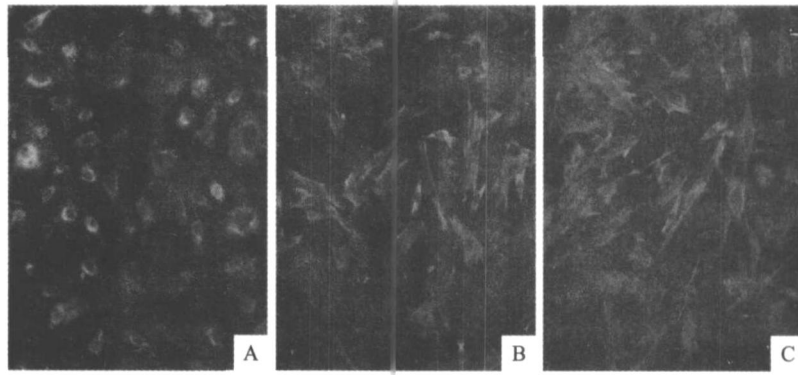


图 2 家兔子宫内膜细胞及平滑肌细胞免疫荧光鉴定结果

A. 上皮细胞;B. 基质细胞;C. 平滑肌细胞

Fig. 2 Immunofluorescence identification of rabbit uterine endometrial cells and smooth muscle cells

A. Epithelial cells;B. Stromal cells;C. Smooth muscle cells

2.3 家兔子宫细胞的纯度

流式细胞仪检测结果显示,96.5%的家兔子宫内膜上皮细胞呈角蛋白阳性,95.36%的基质细胞呈波形蛋白阳性,98.47%的平滑肌细胞呈 α -平滑肌肌动蛋白阳性。

3 讨 论

子宫细胞的分离方法有多种,常因研究目的不同而方法各异。对于纤维含量较高的子宫组织而言,常用的方法是酶消化法。一般多应用胶原酶^[7-9],也有学者加入 0.15 g/L DNA 酶^[10]。本试验选用 1 g/L I 型胶原酶,在 37℃ 消化 60 min,对家兔子宫组织消化效果好,细胞存活率高,进一步利用基质细胞体积小、腺上皮细胞体积大的特点,应用过滤法分离两种细胞,获得了良好的效果。在细胞纯化方面,有人试用离心法分离上皮细胞和基质细胞^[11],即 500 r/min 离心 3 min,上清液主要为基质细胞,沉淀物主要为上皮细胞,但效果较过滤法差,原因是离心分离法对细胞损伤较大,随着离心次数增加,细胞丢失较多。本试验参照戈一峰等^[12]的方法,利用基质细胞较上皮细胞贴壁早的特点纯化基质细胞和上皮细胞,纯度达 95%以上。

一般组织块越大获得的细胞数量越多;生殖周期不同也会影响细胞的产量,子宫内膜增生中晚期至分泌期获得的细胞较多;获取原代细胞的方法不同产量也不同,如离心法较过滤法产量低;组织块消化时间不同产量也不同,消化不足时只有少量细胞

被消化,而消化过度会使细胞活力下降。

本试验所获得的原代细胞均能传代,一般 3 代以内细胞活力最强,7 代以后细胞开始老化或凋亡。有文献报道上皮细胞不能传代^[13],但本试验中家兔子宫上皮细胞传至第 10 代时仍生长良好。这可能有两方面的原因:一是操作方法不同,如消化时所用的酶不同,胰蛋白酶消化的细胞较胶原酶消化的细胞差;二是细胞培养环境不同,本试验在培养液中添加了一定量的激素,能更好地模拟体内环境,有利于细胞的生长。

子宫内膜是卵巢激素作用的靶组织,在体内受到雌孕激素等的共同调节。有文献报道激素能促进子宫内膜细胞的增殖^[14],并提出了子宫内膜中存在干细胞的假设,证明了激素能够启动子宫内膜的周期性再生^[15-17]。本试验在细胞培养过程中,添加了一定质量浓度的雌激素和孕激素模拟体内环境,为子宫内膜细胞体外生长提供了良好条件,而两种激素对平滑肌细胞影响不大。

本研究建立的子宫内膜细胞及平滑肌细胞的分离培养方法,能够成功获得高产量、高纯度的细胞,同时培养系统能够模拟体内环境,有利于细胞的生长,能显著提高细胞产量,为进一步研究胚胎和胚胎干细胞及子宫疾病提供了良好的条件。

致谢:本试验得到了军事医学科学院基础医学研究所王常勇研究员的帮助和支持,在此表示感谢。

[参考文献]

- [1] Jung B L, Jeoung E L, Jong H P, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(1): 42-49.
- [2] Lakshmanan Y, Frimberger D, Gearhart J D, et al. Human embryoid body-derived stem cells in co-culture with bladder smooth muscle and urothelium [J]. *Urology*, 2005, 65(4): 821-826.
- [3] 王和平, 宋宇轩, 江红. 组织工程子宫构建的实验研究[J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(4): 342-345.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Fernandez-Shaw S, Shorter S C, Naish C E. Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres[J]. *Hum Reprod*, 1992, 7(2): 156-161.
- [7] Akoum A, Doillon C J, Koutsilieris M, et al. Human endometrial cells cultured in a type collagen gel [J]. *J Reprod Med*, 1996, 41(8): 555-559.
- [8] 苑春莉, 韩丽英, 胡静, 等. 人总内膜间质细胞的体外培养[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2004, 30(2): 267-269.
- [9] 宿爱琴, 糜若然, 涂持坤, 等. 高纯度子宫内膜分离和体外培养技术及其应用[J]. *医学研究生学报*, 2002, 15(2): 115-117.
- [10] Overton C E, Barolow D H, Fernandez, et al. *In vitro* culture of endometrial stromal and gland cells as a model for endometriosis: the effect of peritoneal fluid on proliferation [J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(1): 51-56.
- [11] 张宏, 赵昀, 李亚里, 等. 人离体子宫内膜细胞培养方法的建立[J]. *军医进修学院学报*, 2002, 23(3): 192-194.
- [12] 戈一峰, 黄宇烽, 胡毓安, 等. 人子宫内膜细胞的纯化和培养[J]. *医学研究生学报*, 2005, 18(6): 496-498.
- [13] 王小青, 闫丽隽, 郭述真. 子宫内膜腺上皮及基质细胞的分离培养[J]. *山西医药杂志*, 2004, 33(8): 637-639.
- [14] 石书芳, 俞超芹, 刘玉环, 等. 人在位和异位子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞的原代培养[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25(11): 122-123.
- [15] Chan R W S, Caroline E G. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium [J]. *Stem Cells*, 2006, 24: 1529-1538.
- [16] Schwab K E, Chan R W S, Caroline E G. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle [J]. *Fertil Steril*, 2005, 84 (Sup2): 1124-1130.
- [17] Caroline E G. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells [J]. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2006, 46: 250-253.

(上接第 18 页)

- [8] Lazaro C, Estivill X. Mutation analysis of genetic diseases by asymmetric PCR-SSCP and ethidium bromide staining: application to neurofibromatosis and cystic fibrosis [J]. *Mol Cell Probes*, 1992, 6(5): 357-359.
- [9] Isabelle T. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(16): 3909-3910.
- [10] Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations [J]. *Hum Mutat*, 1993, 2(5): 404-414.
- [11] Bhide M R, Mikula I. Asymmetric PCR-SSCP: a useful tool for detection of OLA-DRB1 (MHC class II) gene polymorphism in slovak improved valachian sheep [J]. *Acta Vet Brno*, 2005, 74: 275-278.
- [12] Makino R, Kaneko K, Kurahashi T, et al. Detection of mutation of the p53 gene with high sensitivity by fluorescence-based PCR-SSCP analysis using low-pH buffer and an automated DNA sequencer in a large number of DNA samples [J]. *Mutation Research*, 2000, 452(1): 83-90.
- [13] Boutin P, Hani E H, Vasseur F, et al. Automated fluorescence-based screening for mutation by SSCP: use of universal M13 dye primers for labeling and detection [J]. *Biotechniques*, 1997, 23(3): 358-362.
- [14] Kozłowski P, Krzyżosiak W J. Optimum sample medium for single-nucleotide polymorphism and mutation detection by capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(8): 990-998.
- [15] Nishimura A, Tshako M. Single strand conformation polymorphism analysis of ras oncogene by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detector [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(6): 774-778.