

网络出版时间:2014-02-28 13:13

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.03.023

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.03.023.html

家兔子宫平滑肌细胞的体外分离培养

毕台飞^{1,2}, 宋宇轩³, 窦 铖⁴

(1 榆林学院 生命科学学院, 陕西 榆林 719000; 2 陕西省绒山羊工程技术研究中心, 陕西 榆林 719000;

3 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 4 北京中地种畜股份有限公司, 北京 100028)

【摘 要】 【目的】研究家兔子宫平滑肌层细胞的体外培养和扩增方法。【方法】应用酶解消化法对新西兰大白兔的子宫平滑肌细胞进行体外分离和培养,并研究不同水平性腺激素对其生长的影响。【结果】酶解消化法可成功进行家兔子宫平滑肌细胞的体外培养和传代。子宫平滑肌细胞在体外的增殖受卵巢性腺激素的影响,100 nmol/L 雌二醇对其体外增殖有促进作用,而 100 nmol/L 孕酮则有抑制作用。免疫组织化学结果表明,体外培养的子宫平滑肌细胞在激素作用下仍可维持其特性,在体外可传 9~10 代。【结论】建立了家兔子宫平滑肌细胞的体外培养和扩增方法,可为构建子宫三维结构提供充足的种子细胞。

【关键词】 家兔;子宫平滑肌细胞;雌二醇;孕酮;体外培养

【中图分类号】 Q813.1⁺1;S829.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)03-0051-05

Isolation and culture of rabbit uterine myometrial cell *in vitro*

BI Tai-fei^{1,2}, SONG Yu-xuan³, DOU Cheng

(1 The College of Life Science, Yulin College, Yulin, Shaanxi 719000, China; 2 Shaanxi Province Engineering Technology

Center of Cashmere Goats, Yulin, Shaanxi 719000, China; 3 College of Animal Science and Technology,

Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 4 Beijing Sino farm Stud Livestock Co. Ltd, Beijing 100028, China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated the isolation and culture of uterine myometrial cell *in vitro*. 【Method】 In this study, tissue isolation and trypsin digestion method was used to isolate and culture uterine myometrial cell from New Zealand White rabbits *in vitro*, and effects of β -estradiol (E_2) and progesterone (P_4) levels on the proliferation of myometrial cells were investigated. 【Result】 The uterine myometrial cells were successfully prepared by tissue cutting and 0.25% trypsin solution digested. The proliferation of the uterine myometrial cells was largely affected by E_2 and P_4 . 100 nmol/L E_2 increased the proliferation, while 100 nmol/L P_4 inhibited the proliferation ($P < 0.05$). Immunocytochemistry staining demonstrated that the uterine myometrial cells could maintain their behaviors with the help of hormones for 9—10 generations *in vitro*. 【Conclusion】 The established culture and proliferation of uterine myometrial cells could provide enough seeding cells for the construction of 3D uterine structure.

Key words: rabbit; uterine myometrial cell; β -estradiol; progesterone; culture *in vitro*

子宫肌层比较厚,由成束或成片的平滑肌组成,肌束间以结缔组织分隔。子宫平滑肌具有收缩功能,收缩受激素的调节,其收缩活动有助于精子向输

卵管运送、经血排出以及胎儿娩出。掌握子宫平滑肌细胞的体外分离培养方法,可以籍此开展一系列的研究工作,比如进行体外药物试验、研究细胞的增

【收稿日期】 2013-09-26

【基金项目】 西北农林科技大学博士科研启动基金项目(Z111020721)

【作者简介】 毕台飞(1971—),男,陕西榆林人,副教授,主要从事动物生产研究。E-mail: btf88709@sohu.com

【通信作者】 宋宇轩(1971—),男,陕西凤翔人,讲师,博士,主要从事动物生殖生理研究。E-mail: syx98728@163.com

殖与遗传、了解平滑肌细胞的动力学效应、研究子宫肌瘤的病理模型、探讨子宫平滑肌细胞与子宫内膜基质和上皮细胞的相互作用等。Tang 等^[1]通过体外培养人子宫平滑肌细胞和内膜基质细胞,研究了不同生殖阶段子宫不同类型细胞分泌胰岛素生长因子及其受体等多种生长因子的规律。Korita 等^[2]应用覆有 I 型胶原的弹性硅树脂作为人子宫平滑肌细胞体外培养的支持面并施以周期性拉伸,研究外力作用对平滑肌分泌能力的影响,结果发现周期性机械拉伸可使子宫平滑肌细胞分泌前列腺素(Prostaglandin)的能力增强。Mitchel 等^[3]在体外将小鼠子宫平滑肌细胞培养在覆有 I 型胶原的 Flex I 细胞培养板上,培养至第 4 天时施以 25% 静态拉伸,发现机械拉伸可刺激 AP-1 转录因子家族基因的表达,而孕激素对这些基因的表达有抑制作用。Dal-lot 等^[4]将子宫平滑肌细胞接种在硅树脂橡胶片上,研究了内皮素对平滑肌收缩性的影响。Young 等^[5]将子宫平滑肌细胞接种在一种生物材料 Vicryl 筛上,研究了平滑肌细胞在三维结构下的力学特性。子宫平滑肌细胞的体外大量增殖,可为体外构建子宫三维结构提供充足的种子细胞,并为研究子宫及其他组织器官的形成及细胞体外培养提供依据^[6]。家兔是进行生理研究理想的动物模型,本研究就家兔子宫平滑肌层细胞的体外培养和扩增方法进行了研究,以期建立体外三维子宫组织模型提供充足的种子细胞。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 试验动物采用新西兰大白兔,由西北农林科技大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM-F12 培养基购自 Gibco 公司, PBS 磷酸盐平衡液自配, 胎牛血清(Fetal calf serum, FBS)购自北京元亨圣马生物技术公司, 孕马血清促性腺激素(Pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin, hCG)、雌二醇(Estradiol, E_2)、孕酮(Pregesterone, P_4)、胰酶、噻唑蓝(Thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)等均购自 Sigma 公司, α -平滑肌肌动蛋白抗体由武汉博士德公司生产, 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(3,3',4,4'-Biphenyltetramine tetrahydrochloride, DAB)工作液自配, SP-9000 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 台盼蓝染液为北京拜尔迪生物技术

有限公司产品。

75 cm² 培养瓶由美国 Nuck 公司生产, 3100 CO₂ 培养箱由美国 Thermo Forma 公司生产, 酶标仪由美国 TECAN 公司生产, MPS30 荧光倒置显微镜由德国 Leica 公司生产。

1.2 原代子宫平滑肌细胞的分离培养

取 5~6 周龄新西兰大白兔做超排处理, 超排程序为: 术前 3 d 下午 16:00 肌肉注射 PMSG 100 IU/只, 术前 1 d 下午 16:00 耳缘静脉注射 hCG 75 IU/只。手术当日早上 08:30 耳缘静脉注射 5 mL 空气处死, 消毒腹部, 打开腹腔取双侧子宫, 置于 D'Hanks 平衡液(含庆大霉素 100 U/mL, 两性霉素 B 5 U/mL)中。将子宫内外用手术刀用力刮数遍, 除去里面黏膜层和外面浆膜层, 在 PBS 中漂洗若干次, 除净血渍, 然后用眼科剪剪成 1 mm³ 大小的碎块。用 2.5 g/L 胰酶 37℃ 消化 5 min, 滴数滴 FBS 终止消化, 将消化液转入 10 mL 加有 DMEM-F12 培养液的离心管中, 重复 4 次, 充分收集细胞。将离心管中的消化液 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 DMEM-F12 培养液重悬后移入 75 cm² 培养瓶中, 于 37℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.3 子宫平滑肌细胞的传代和形态观察

每日观察培养细胞的形态并照相。待原代培养的细胞生长至约 80% 融合时进行传代。传代时首先倾去培养液, 用 PBS 充分冲洗 2~3 遍, 加消化酶用吸管反复抽吸, 于 37℃ 作用 5 min 后在倒置显微镜下观察, 待细胞从培养瓶底部脱离后终止消化, 将细胞消化液转入离心管中加 DMEM-F12 后 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, DMEM-F12 重悬后分至 3 个培养瓶中培养。

1.4 E_2 和 P_4 对子宫平滑肌细胞体外增殖的影响

取原代培养的子宫平滑肌细胞, 以 1×10^4 mL⁻¹ 的密度接种于 96 孔培养板, 分别以含不同浓度 E_2 、 P_4 (表 1) 的培养液培养, 每处理 4 孔, 隔日换液, 培养 5 d 后进行 MTT 试验。结束培养前 4 h 向细胞培养板每孔加 20 μ L MTT 于培养液中, 培养结束后移去孔内培养液, 加 150 μ L DMSO, 于酶标仪振动 10 min 后在 490 nm 波长处测吸光值(OD₄₉₀), 比较各处理子宫平滑肌细胞的增殖情况。

1.5 子宫平滑肌细胞生长曲线的绘制

取原代培养的子宫平滑肌细胞, 以 1×10^3 mL⁻¹ 的密度接种至 96 孔培养板, 进行 MTT 比色试验, 每天测 9 孔, 连续测 11 d 直至细胞增殖达到

平台期并明显减少时停止。以每天所测的吸光值平均值为纵坐标、培养时间(d)为横坐标绘制细胞生长曲线。

表 1 家兔子宫平滑肌细胞体外增殖培养液中雌激素(E₂)和孕激素(P₄)的不同配比
Table 1 The levels of β-estradiol (E₂) and progesterone (P₄) in the culture medium of rabbit uterine myometrial cell *in vitro*

处理 Treatment	nmol/L				
	A(CK)	B	C	D	E
雌激素(E ₂) β-estradiol	0	0	10	100	100
孕激素(P ₄) Progesterone	0	100	100	0	10

1.6 子宫平滑肌的鉴定

将传至第 2 代的子宫平滑肌细胞接种于铺有盖玻片的 24 孔板内,用含 100 nmol/L E₂ 的 DMEM-F12 培养液培养 2~3 d,待细胞在盖玻片上贴壁后取出,采用 α-平滑肌肌动蛋白抗体^[2-3]进行免疫组织化学鉴定,具体操作程序按 SP-9000 试剂盒操作说明进行。试验同时以 PBS 液替代抗体设阴性对照。

1.7 子宫平滑肌细胞活力的检测

在细胞由原代传至 2 代时制备单个细胞悬液稀释至 1×10⁶ mL⁻¹,取 9 滴细胞悬液移入小试管中,加 1 滴 4 g/L 的台盼蓝溶液,混匀,在 3 min 内用血球计数板分别计数活细胞和死细胞数,死细胞被染成淡蓝色而活细胞拒染。

2 结果与分析

2.1 家兔子宫平滑肌细胞的形态

家兔原代和传代子宫平滑肌细胞培养结果见图 1。兔子宫平滑肌细胞在体外较易生长,原代细胞培养一般 24~30 h 可见细胞贴壁,形成明显成簇的细胞集落,5~7 d 融合成片。最初贴壁的细胞集落中央部位会由于细胞过于密集而死亡。经过一次传代,酶消解的单个细胞均匀地分散在传代培养瓶瓶底,细胞密度均匀,不再出现死亡现象。子宫平滑肌细胞呈长梭形,部分细胞有数个突起,胞核呈椭圆形,胞浆丰富。细胞密集生长后呈放射状或涡状交错排列,成束的细胞平行排列。细胞可单层生长,也可层叠成典型的“峰—谷”状生长(图 1-P4),体外可传9~10 代。

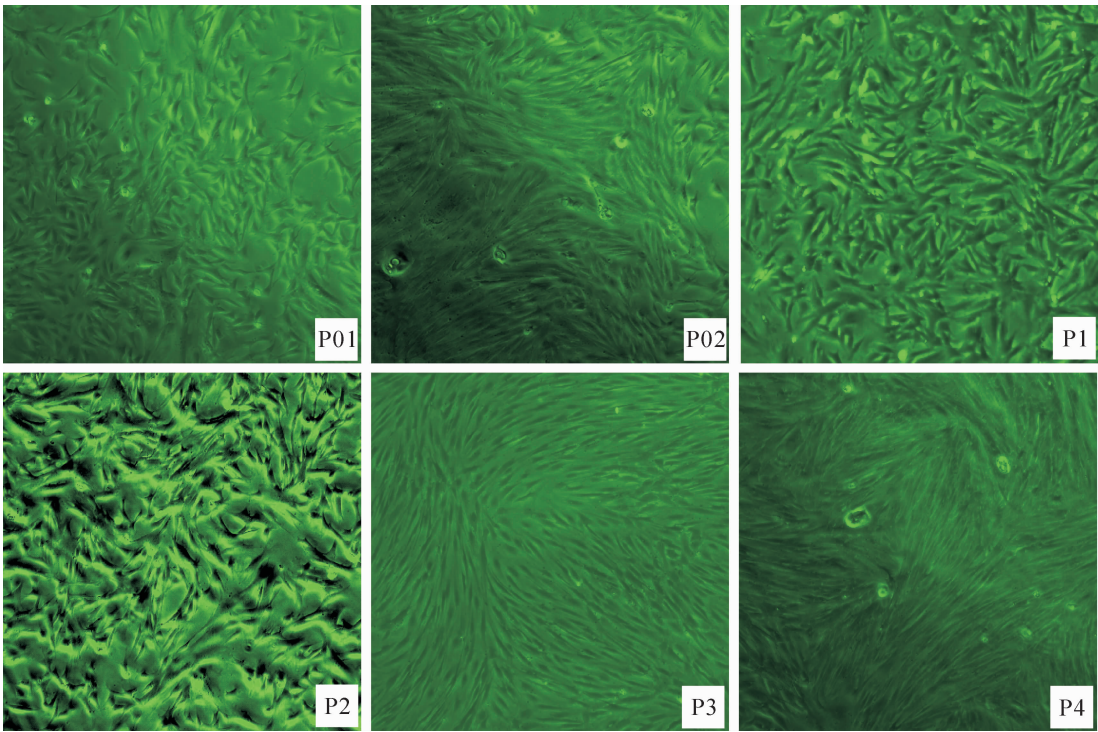


图 1 体外培养的家兔子宫平滑肌细胞的形态(50×)
P01. 培养 32 h 的原代平滑肌细胞;P02. 培养 48 h 的原代平滑肌细胞;P1~P4. 分别为传 1、2、3、4 代的平滑肌细胞
Fig. 1 Morphology of the rabbit uterine myometrial cells cultured *in vitro* (50×)
P01. Primary myometrial cell after 32 hours culture;P02. Primary myometrial cell after 48 hours culture;
P1—P4 are the 1,2,3,and 4 generations myometrial cell, respectively

2.2 E₂ 和 P₄ 对家兔子宫平滑肌细胞体外增殖的影响

雌激素 E₂ 和孕激素 P₄ 对家兔子宫平滑肌细胞的体外增殖有显著影响。从表 2 可以看出,与 CK 相比,100 nmol/L 的雌激素(处理组 D)对子宫平滑肌细胞有显著的促增殖作用($P<0.05$),而 100

nmol/L 的孕激素(处理组 B)则对子宫平滑肌细胞增殖有显著抑制作用($P<0.05$),10 nmol/L E₂ + 100 nmol/L P₄ (处理组 C)和 100 nmol/L E₂ + 10 nmol/L P₄ (处理组 E)对家兔子宫平滑肌细胞的增殖影响不显著。

表 2 不同雌激素和孕激素水平对家兔子宫平滑肌细胞体外增殖的影响
Table 2 Effect of E₂ and P₄ levels on the proliferation of rabbit uterine myometrial cells *in vitro*

处理 Treatment	A(CK)	B	C	D	E
子宫平滑肌细胞 Uterine myometrial cell	0.88±0.11 a	0.72±0.08 b	0.83±0.10 a	1.12±0.04 c	0.92±0.06 a

注:同行数据后标不同小写字母者差异显著($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters in the same row indicate significantly different ($P<0.05$).

2.3 家兔子宫平滑肌细胞的生长曲线

由图 2 可以看出,子宫平滑肌细胞在接种后1~2 d 为潜伏生长期;随着细胞的增殖,很快进入指数生长期;到第 6~7 天细胞汇合后增殖速度减慢,进入平台期;第 8 天以后细胞有明显死亡。

2.4 家兔子宫平滑肌细胞的免疫组织化学鉴定

免疫组织化学鉴定结果(图 3)表明,子宫平滑肌细胞对 α-平滑肌肌动蛋白抗体呈强阳性,胞浆内有棕黄色丝状结构物;PBS 阴性对照胞浆则不显色。对同一视野内的细胞分别进行计数,发现纯度在 96%以上。

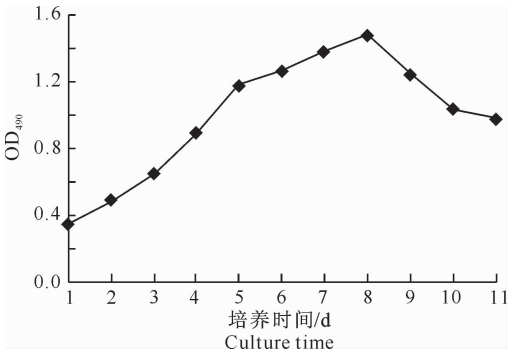


图 2 家兔子宫平滑肌细胞的生长曲线(MTT 法)
Fig. 2 The growth curve of rabbit uterine myometrial cells by MTT

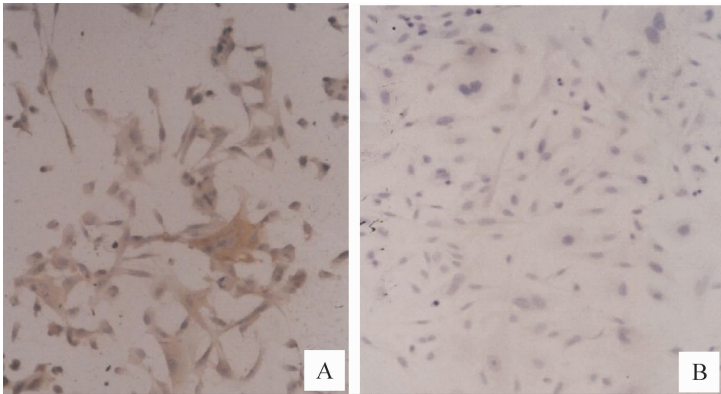


图 3 家兔子宫平滑肌细胞抗 α-平滑肌肌动蛋白的免疫组织化学鉴定结果
A. 阳性结果(100×);B. 阴性对照(100×)

Fig. 3 The immunocytochemical staining results of anti-α-smooth muscle actin in rabbit uterine myometrial cells
A. Positive(100×);B. Negative control(100×)

2.5 家兔子宫平滑肌细胞活力的鉴定

经台盼蓝排斥试验检测,家兔子宫平滑肌细胞活力在 97%以上,符合试验研究要求。

3 讨论

Casey 等^[7]首次报道了人原代子宫平滑肌细胞

的培养方法。子宫平滑肌细胞的分离方法比较简单,本试验采用常规的组织分离和消化方法获得了较好的分离培养效果,原代细胞贴壁快,贴壁后围绕集落迅速向周围扩展,细胞活力好,细胞可单层生长,也可层叠成典型的“峰-谷”状生长。子宫平滑肌细胞比较容易传代,在体外可连续传 9~10 代,这

可为构建子宫三维组织提供充足的种子细胞。

子宫平滑肌细胞的分裂增殖受性腺激素的影响^[8-11]。子宫肌瘤是一种常见的妇科疾病,发病机理是由于子宫平滑肌细胞在高水平雌激素作用下过度增殖形成的。雌、孕激素在子宫肌瘤的发生和发展中发挥着重要的作用^[12-14]。本研究发现,100 nmol/L 的雌二醇对家兔子宫平滑肌细胞有显著的促增殖作用($P<0.05$),而 100 nmol/L 的孕酮则对家兔子宫平滑肌细胞增殖有显著抑制作用($P<0.05$)。

α -平滑肌肌动蛋白是平滑肌细胞表达的特异蛋白。本试验免疫组织化学鉴定结果表明,经过雌激素处理的体外培养的家兔子宫平滑肌细胞对 α -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体呈阳性,说明细胞在体外培养并经过激素处理后仍然维持平滑肌细胞的特性,可用于有关平滑肌生理的研究。

形态观察、免疫组织化学以及活力检测结果表明,采用本试验所建立的子宫平滑肌细胞培养方法所获细胞纯度高、活力强,应用 100 nmol/L 雌二醇刺激后对其体外增殖具有明显的促进作用而不改变其生物学特性。该方法为研究子宫生理建立了一个有效的技术平台。

[参考文献]

- [1] Tang X M, Rossi M J, Masterson B J, et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-I receptors, and IGF binding proteins 1-4 in human uterine tissue; Tissue localization and IGF-I action in endometrial stromal and myometrial smooth muscle cells *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 1994, 50(5): 1113-1125.
- [2] Korita D, Sagawa N, Itoh H, et al. Cyclic mechanical stretch augments prostacyclin production in cultured human uterine myometrial cells from pregnant women; Possible involvement of up-regulation of prostacyclin synthase expression [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002, 87(11): 5209-5219.
- [3] Mitchel J A, Shynlova O, Langille B L, et al. Mechanical stretch and progesterone differentially regulate activator protein-1 transcription factors in primary rat myometrial smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(3): E439-E445.
- [4] Dallot E, Pouchelet M, Gouhier N, et al. Contraction of cultured human uterine smooth muscle cells after stimulation with endothelin-1 [J]. *Biology of Reproduction*, 2003, 68: 937-942.
- [5] Young R C, Schumann R, Zhang P. Three-dimensional culture

of human uterine smooth muscle myocytes on a resorbable scaffolding [J]. *Tissue Engineering*, 2003, 9(3): 451-459.

- [6] 陈秀荔, 赵永贞, 靳亚平, 等. 家兔子宫内膜细胞和平滑肌细胞的分离培养 [J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(11): 1242-1247.
Chen X L, Zhao Y Z, Jin Y P, et al. The separation and cultivation of rabbit endometrial cells and smooth muscle cells *in vitro* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(11): 1242-1247. (in Chinese)
- [7] Casey M L, MacDonald P C, Mitchell M D, et al. Maintenance and characterization of human myometrial smooth muscle cell in monolayer culture [J]. *In vitro*, 1984, 20(5): 396-403.
- [8] Nowak R A, Rein M S, Heffner L J, et al. Production of prolactin by smooth muscle cells cultured from human uterine fibroid tumors [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 76(5): 1308-1313.
- [9] Lee B S, Margolin S B, Nowak R A. Pirfenidone: A novel pharmacological agent that inhibits leiomyoma cell proliferation and collagen production [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(1): 219-223.
- [10] 马 勤, 李红芳, 金 姗, 等. 17 β -雌二醇对大鼠子宫平滑肌自发和激发收缩活动的抑制作用 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2013, 29(4): 305-309.
Ma Q, Li H F, Jin S, et al. Inhibitory effects of 17 β -estradiol on spontaneous and activated contraction of rat uterus smooth muscle [J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2013, 29(4): 305-309. (in Chinese)
- [11] Ren M S, Barbieri R L, Friedman A J, et al. Progesterone: A critical role in the pathogenesis of uterine myomas [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, 172(1): 14-18.
- [12] 赵扬玉, 乔 杰, Chen Bertha. 雌激素上调体外培养的子宫肌瘤平滑细胞中原纤维蛋白-1 的表达 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2007, 8(2): 125-128.
Zhao Y Y, Qiao J, Chen B. Upregulated expression of Fibrillin-1 mRNA and protein by estrogen in cultured human uterine leiomyomata cells [J]. *Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2007, 8(2): 125-128. (in Chinese)
- [13] 纪 巍, 辛晓燕, 陈必良. IGF-1 及其受体在子宫平滑肌瘤中的表达以及与雌、孕激素关系 [J]. *临床军医杂志*, 2009, 37(6): 1062-1064.
Ji W, Xin X Y, Chen B L. Expression of IGF-1 and IGF-1R in uterine leiomyoma and their relation with estrogen and progesterone [J]. *Clinical Journal of Military Medicine*, 2009, 37(6): 1062-1064. (in Chinese)
- [14] 黄毅娜, 程薇波, 徐培渝, 等. 子宫营养试验检测对-壬基酚的雌激素样活性 [J]. *现代预防医学*, 2003, 30(5): 660-662.
Huang Y N, Cheng W B, Xu P Y, et al. Estrogen-like active of P-nonylphenol assessed by immature SD rat uterotrophic assay [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2003, 30(5): 660-662. (in Chinese)