

山羊子宫内膜基质细胞的分离培养及鉴定

吴庆侠, 丰艳妮, 楚元奎, 吴 瑞, 崔贞亮, 靳亚平

(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)

[摘 要] 对山羊子宫内膜基质细胞进行分离与体外培养, 研究其生长特性, 并对其进行免疫细胞化学染色鉴定。结果表明, 山羊子宫内膜在 37 ℃ 条件下, 以 2 g/L 的胶原酶 I 型消化 3~4 h 效果最好; 采用过滤—低速离心—沉降相结合的方法分离山羊子宫内膜基质细胞效果较好, 所得细胞在培养后 0.5 h 开始贴壁, 培养 12 h 后, 可见梭形和多角形 2 种形态的细胞, 3~4 d 呈网状铺满皿底, 有明显的重叠生长现象; 免疫细胞化学染色显示这 2 种形态的细胞均表达波形蛋白, 阳性率可达 95% 以上, 不表达角蛋白。说明采用本文所述的消化和分离方法可获得高纯度的子宫内膜基质细胞。

[关键词] 山羊; 子宫内膜; 基质细胞; 免疫细胞化学

[中图分类号] Q813.1⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)04-0011-04

Isolation, culture and identification of goat endometrium stromal cells

WU Qing-xia, FENG Yan-ni, CHU Yuan-kui, WU Rui,
CUI Zhen-liang, JIN Ya-ping

(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)

Abstracts: This paper focuses on optimal condition of the isolation and vitro culture of stromal cells of endometrium in goat, and studies the growth characteristics and immunocytochemical staining. The results showed that the tissues presented best digested with Collagenase I of 2 g/L at 37 ℃ 3—4 h; stromal cells were isolated by filtering-brachytely centrifugalization-sedimentation, and became adherent after 0.5 h of culture; two shapes of cells with the forme of spindle and polygonal, were found after 12 h of culture. Immunocytochemical staining method showed that this 2 shapes of stromal cells were positive for vimentin, with 95% of positive rate, and negative for cytokeratin. The conclusion can be drawn that high purified stromal cell can be obtained by the digestion and separation method in suggested this article.

Key words: goat; endometrium; stromal cell; immunocytochemical

子宫内膜层是卵巢激素作用的靶组织, 也是胎儿与母体的接触部位, 其基质细胞在发情周期及妊娠期会发生形态及生物学特性变化。上述变化受多种因素的调节, 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。目前, 在人和小鼠上, 子宫内膜基质细胞的培养已被应用于卵巢激素作用机理^[1]及胚胎与子宫相互作用的研究中^[2], 但在家畜上, 子宫内膜基质细胞的分离培养研究尚不多见。

[收稿日期] 2006-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39770545); 西北农林科技大学青年骨干教师支持计划项目(01140305)

[作者简介] 吴庆侠(1973—), 女, 陕西城固人, 在读硕士, 主要从事家畜生殖内分泌研究。E-mail: goodwqx@163.com

[通讯作者] 靳亚平(1966—), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士生导师, 主要从事兽医产科学和家畜生殖内分泌研究。
E-mail: yappingjin@163.com

为此,本试验对山羊子宫内膜基质细胞进行了分离培养,并通过形态观察、免疫细胞化学等技术对其进行了鉴定,以期为进一步的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 7 月龄以上奶山羊购自陕西扶风县揉谷乡,临床检查健康。

1.1.2 生化试剂 合成培养基 DMEM 和 HamF12 为美国 Gibco 公司产品;HEPES 为美国 Sigma 公司产品;新生牛血清购自杭州四季青生物制品公司;青霉素和链霉素为哈药集团制药总厂生产;胶原酶 I 型为 Sigma 公司产品,活性 1:265;胰蛋白酶为上海生工产品,活性 1:250;角蛋白和波形蛋白为博士德公司产品;S-P 试剂盒为福州迈新生物技术开发有限公司产品;DAB 浓缩显色液为华美生物工程公司产品。

1.1.3 培养液 基础培养基为含 HEPES 10~15 mmol/L、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 IU/mL 的 DMEM/HamF12 ($m(\text{DMEM}):m(\text{HamF12})=1:1$)。在基础培养液中补加体积分数 10% 的新生牛血清即为培养用液。

1.2 山羊子宫内膜的采取

无菌采取山羊子宫,于 D-Hanks 平衡盐溶液中反复冲洗至子宫呈白色,剪取一段子宫角,纵向剪开,用 D-Hanks 平衡盐溶液冲洗 3~4 次,剪取子宫内膜层投入青霉素瓶,剪成 1 mm³ 左右小块,用 D-Hanks 平衡盐溶液冲洗 3~4 次,移入带有玻璃珠的三角瓶中,备用。

1.3 山羊子宫内膜的消化

1.3.1 胰蛋白酶消化 向上述三角瓶中加入 2.5 g/L 的胰酶,胰酶用量为 5 mL/g,于不同温度和时间条件下进行消化,比较不同温度和时间条件下的消化效果。

1.3.2 胰蛋白酶结合胶原酶 I 冷热消化 向上述三角瓶中加入 2.5 g/L 的胰蛋白酶,用量为 5 mL/g,4℃消化 2 h,小心吸出胰蛋白酶,加入 2 g/L 胶原酶 I (5 mL/g),37℃消化 1 h。

1.3.3 胶原酶 I 消化 向上述三角瓶中分别加入 1 和 2 g/L 的胶原酶 I,用量为 5 mL/g,于不同温度和时间条件下进行消化,比较不同温度和时间条件下的消化效果。

1.4 山羊子宫内膜基质细胞的分离与培养

消化结束后,向三角瓶中加入适量培养液(含血

清)以终止胰蛋白酶的作用。用力振荡三角瓶,使消化的组织成为混悬液,过 74 μm 滤网,滤液加入离心管,先 500 r/min 离心 6 min,收集上部悬液;再 1 200 r/min 离心 10 min,收集沉淀细胞,用 D-Hanks 液 10 mL 重悬,静置 10 min,收集上部悬液。1 200 r/min 离心 10 min,收集管底细胞,用 D-Hanks 液洗涤 2 次。加入适量培养液制成细胞悬液,台盼蓝拒染法检测细胞活率,调整活细胞浓度为 10⁶ mL⁻¹,按每孔 0.5 mL 移至 24 孔板或按每个培养皿 2 mL 移入 35 mm×10 mm 的培养皿,于 37℃、体积分数 5% CO₂、饱和湿度条件下培养。培养 15 h 时换液 1 次,以后每 2 d 换液 1 次,定期观察细胞贴壁和生长状况。

1.5 山羊子宫内膜基质细胞的鉴定

待培养皿中的细胞铺满皿底后,用体积分数 95% 酒精固定 15 min,用角蛋白和波形蛋白做一抗,按 S-P 免疫组化染色试剂盒说明做免疫组化染色,随后用 DAB 显色液显色,苏木素复染,显微镜下观察。凡细胞质染为深棕色的为阳性细胞,未显深棕色的为阴性细胞。

2 结果与分析

2.1 山羊子宫内膜不同消化方案的消化效果

2.1.1 胰蛋白酶消化效果 本试验结果显示,37℃条件下,胰蛋白酶消化 30 min 左右,消化效果较差,得到的细胞量很少;消化 1 h 左右,液体黏度加大,难以过滤,且细胞活率降低。4℃消化 6 h 消化效果差,消化 8 h 黏稠度加大。

2.1.2 胰蛋白酶结合胶原酶 I 冷热消化法消化效果 这种消化方法消化效果较好,液体黏度不大,易于过滤,但细胞悬液中含有大量的葡萄串状小团块,不利于单个细胞与成团细胞的分离。

2.1.3 胶原酶 I 消化效果 胶原酶 I 消化得到的细胞悬液黏度小,易过滤,显微镜下观察悬液中所含的葡萄串状团块体积较大,单个散在细胞易分离,细胞活率在 90% 以上。胶原酶 I 于不同温度和时间条件下的消化效果详见表 1。由表 1 可知,以 2 g/L 胶原酶 I 于 37℃消化 3~4 h 效果最好,因此后续试验均采用 2 g/L 胶原酶 I 于 37℃消化 3~4 h。

2.2 山羊子宫内膜基质细胞的分离效果

应用本文所述的过滤—低速离心—沉降法分离的山羊子宫内膜基质细胞,光镜下观察呈单个存在,基本不含细胞团块(图 1)。

表 1 胶原酶 I 对山羊子宫内膜的消化效果

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

酶浓度/(g·L ⁻¹) Enzyme concentration	消化温度/℃ Digestion temperature	消化时间/h Digestion time	结果 Results	酶浓度/(g·L ⁻¹) Enzyme concentration	消化温度/℃ Digestion temperature	消化时间/h Digestion time	结果 Results
2	37	2	++	1	37	2	-
2	37	3	+++	1	37	3	+
2	37	4	+++	1	37	4	++

注：-，组织块边缘整齐，不疏松，振荡后液体基本清亮；+，组织块边缘略疏松，发“毛”，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 filiform. After being shaken, the cultured medium appeared obviously turbid. Digestibility was 80 percent to 85 percent.

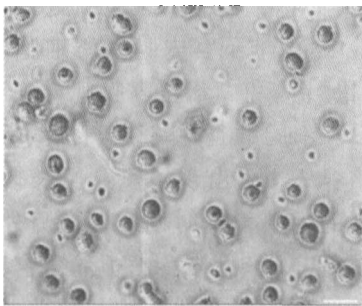


图 1 分离的山羊子宫内膜基质细胞(400×)

Fig. 1 Isolated goat stromal cells

2.3 山羊子宫内膜基质细胞的培养特性

分离的山羊子宫内膜基质细胞在培养 0.5 h 后开始贴壁，8 h 时开始生长，细胞体向两端突起，呈纺锤形。培养 12 h 的细胞在光镜下可见 2 种形态：多数为梭形，另一种为多角形(主要为三角形或星形)，有多个短小突起，核圆居中(图 2A)。培养 24 h 后，细胞交织成网状(图 2B)。培养 3 d，梭形细胞延伸，相互平行排列成束，三角形细胞变大，胞质更多而明亮，核明显增大，细胞有重叠生长现象，其中梭形细胞较三角形细胞更为明显(图 2C)。培养 3~4 d，细胞即长满皿底。

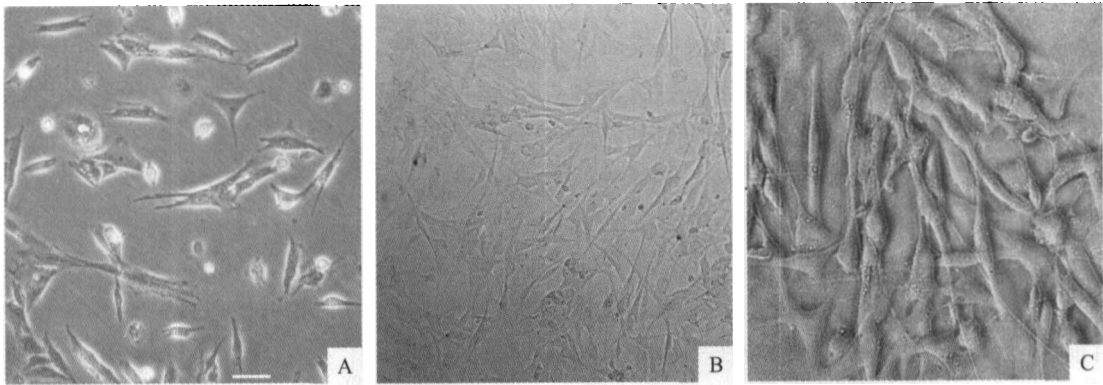


图 2 山羊子宫内膜基质细胞的培养特性

A. 培养 12 h 的山羊子宫内膜基质细胞(相差,400×); B. 培养 24 h 的山羊子宫内膜基质细胞(200×);

C. 成束状排列的山羊子宫内膜梭形基质细胞(相差,400×)

Fig. 2 Cultural character of goat stromal cells

A. On 12 h of goat stromal cells(phase-contrast, 400×); B. On 24 h of goat stromal cells(200×);

C. Sarciniform spindle goat stromal cells (phase-contrast, 400×)

2.4 山羊子宫内膜基质细胞鉴定结果

免疫细胞化学显示这 2 种细胞均呈角蛋白染色阴性(图 3A);而波形蛋白染色阳性，阳性率大于 95%。阳性细胞胞质染为深棕色，尤以核周色深，胞核不着色(图 3B)。提示本试验所分离得到的细胞具有子宫内膜基质细胞的特征。

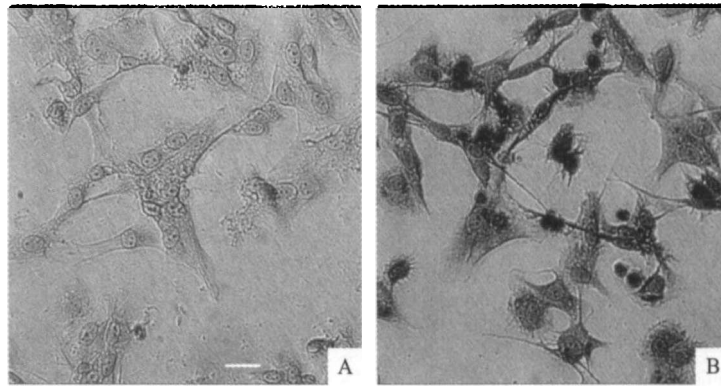


图 3 山羊子宫内层基质细胞的免疫组化染色结果

A. 角蛋白染色呈阴性(400×); B. 波形蛋白染色呈阳性的细胞(400×)

Fig. 3 The immunocytochemical staining result of goat stromal cells

A. Negative for cytokeratin (400×); B. Positive for vimentin (400×)

3 讨 论

子宫内膜的消化多采用胶原酶,因为腺体对胶原酶耐受,可借此分离基质细胞与腺细胞^[3]。Casslen 等^[4]使用胰蛋白酶消化人子宫内膜,在消化过程中同时加入 0.15 g/L DNA 酶,以消化 DNA 样物质所形成的胶状物,结果获得游离细胞,表明胰蛋白酶对建立子宫内膜基质单细胞悬液更为有效。王丽^[5]研究表明,在小鼠子宫内膜的消化中,胰蛋白酶结合胶原酶冷热消化的效果较好。无论采用何种消化方式,对于人^[6]、鼠^[7]、兔^[8]消化时间均不宜超过 2 h。本试验结果表明,由于山羊子宫内膜消化需要时间较长,使用胰蛋白酶消化会对细胞造成较大损伤,故不宜采用;胰酶、胶原酶 I 冷热结合法消化效果较好,但腺团小,不利于分离出高纯度的基质细胞;胶原酶 I 作用温和,对细胞的损伤小,本试验所采用的 2 种浓度均可使用,但以 2 g/L 胶原酶 I 37℃ 消化 3~4 h 为好。

子宫内膜消化液中含有大量的基质细胞和腺体细胞,目前,提取分离这 2 种细胞的方法一般多采用 2 次过滤法,即先将消化好的混悬液过 74 μm 滤网,以除去黏液和未消化组织,再过 38 μm 滤网,以除去腺团,滤液中富含基质细胞,离心收集^[6,9]。陈秀丽等^[8]报道,使用 74 μm 滤网即可分开兔子宫内膜基质细胞与腺细胞。Osteen 等^[7]根据细胞沉降速度的不同,采用沉降法分离 2 种细胞,获得了纯度较高的基质细胞和腺体细胞。本试验发现上述 2 种方法均不能得到高纯度的山羊子宫内膜基质细胞,采用过滤—低速离心—沉降相结合的细胞分离方法及高密度接种与提早第一次换液相结合的培养方

法,可获得纯度高于 95% 的基质细胞。

本试验中,山羊子宫内膜基质细胞的生长情况与人^[10-11]、鼠^[12]、兔^[8]子宫内膜基质细胞的生长情况基本一致。不同的是,本试验中山羊子宫内膜基质细胞在培养 3 d 后出现了重叠生长现象,这可能与子宫所处的生殖生理时期有关。另外,本试验前期的多次试验还发现,怀孕山羊的子宫内膜基质细胞较未孕的子宫内膜基质细胞长势差,怀孕山羊多见一种在贴壁后呈圆形的细胞,这种细胞在培养 2~3 d 后即空泡化,随后脱壁凋亡,这种现象还需进一步研究。

【参考文献】

- [1] Akoum A, Lemay A, Maheux R. Estradiol and interleukin21 beta exert a synergistic stimulatory effect on the expression of the chemokine regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted in endometriotic cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(12): 5785-5792.
- [2] Sakkas D, Trounson AO. Coculture of mouse embryo with oviduct and uterine cells prepared from mice at different days of pseudopregnancy[J]. Reprod Fertil, 1999, 90(1): 109-118.
- [3] Ian Freshney. Culture of animal cells; a manual of basic technique[M]. 北京: 科学出版社出版, 2004.
- [4] 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.
- [5] 王 丽. 胚胎着床三维模型的建立及子宫内膜容受性影响因素的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2003.
- [6] Julia T A, David G K, Markku S, et al. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model[J]. Human Reproduction, 2001, 16(5): 836-845.

(下转第 18 页)

娠小鼠黄体细胞分泌孕酮的作用随剂量的不同而有区别,在一定剂量范围内,对孕酮分泌有促进作用,但当 IFN- γ 大量存在时,对孕酮分泌则有一定的抑制作用^[5];并且黄体细胞的凋亡也受 IFN- γ 的调控^[8]。本研究发现,在发情期的三级卵泡和成熟卵泡颗粒细胞及妊娠 7 周粒黄体细胞中,IFN- γ 呈高水平表达,而在妊娠 12,16,20 周 IFN- γ 维持在一个较低水平;在妊娠 12 周时,个别膜黄体细胞呈 IFN- γ 阳性,在妊娠 16 周时阳性细胞增多,到 20 周几乎所有膜黄体细胞均呈阳性,这与上述研究结果相似,但也有不同。不同的原因是,本研究能区分体内正常妊娠状态下 IFN- γ 在 2 类黄体细胞中表达的不同之处,而上述体外试验不能区分 IFN- γ 在 2 种类型黄体细胞中表达的不同。因此可推测,IFN- γ 在粒黄体细胞中参与了妊娠维持,在膜黄体细胞中参与了黄体细胞的凋亡。

根据本试验的结果,笔者认为,IFN- γ 可能作为一种激素样物质经自分泌或旁分泌影响卵巢激素的合成和分泌,参与排卵、卵泡的黄体化、妊娠维持及黄体溶解,并且这些作用的发挥除了与 IFN- γ 的剂量有关外,还与靶细胞的类型有关。IFN- γ 对生殖的调控机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Subhasis B, Alan S, Jane M, et al. Placental expression of interferon- γ (IFN- γ) and its receptor IFN- γ R2 fail to switch from early hypoxic to late normotensive development in preeclampsia[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2005, 90 (2): 944-952.
- [2] Vanina F, Virginia C, Liliana V, et al. Exogenous interferon- γ alters murine inner cell mass and trophoblast development. Effect on the expression of ErbB1, ErbB4 and heparin sulfate proteoglycan (perlecan)[J]. Reproduction, 2004, 128: 717-725.
- [3] 陈鑫磊, 高洪娟, 魏 鹏, 等. IFN- γ 对溜类激素灵敏调节蛋白、转移生长因子 β 1 及其 II 型受体在妊娠恒河猴黄体中表达的调节作用[J]. 中国药理学报: 英文版, 2003, 24(5): 53-59.
- [4] Quirk S M, Cowan R C, Joshi S G, et al. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells[J]. Biol Reprod, 1995, 52(2): 279-287.
- [5] 姚 文, 庄临之. 干扰素- γ 对妊娠小鼠黄体细胞孕酮分泌的影响[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 1998, 21(3): 88-89.
- [6] Yasuda K, Fukuoka M, Fujiwara H, et al. Effects of interferon on the steroidogenic functions and proliferation of immature porcine granulosa cells in culture[J]. Biol Reprod, 1992, 47: 931-936.
- [7] 张 翔, 沈维雄, 孙志达, 等. 前列腺素和 γ -干扰素对人黄体细胞甾体激素生成的影响及相互作用[J]. 生殖与避孕, 1995, 16(5): 343-350.
- [8] 冷 颖, 曹 霖, 顾芝萍. 黄体退化中细胞凋亡的调控研究[J]. 生殖与避孕, 1999, 19(5): 268-272.
- [7] 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.
- [8] 陈秀丽, 靳亚平, 利光辉, 等. 孕早期家兔子宫内膜细胞的分离培养与形态观察[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(6): 1-4.
- [9] 陆品红, 刘嘉茵. 人子宫内膜基质细胞及腺上皮细胞的分离纯化和体外培养[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2005, 25(5): 334-336.
- [10] 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.
- [11] 闫丽隽, 王小青, 郭述真. 人子宫内膜细胞的分离培养及鉴定方法的探索[J]. 山西医科大学学报, 2004, 35(3): 241-243.
- [12] 王 丽, 周剑萍, 张 炜, 等. 小鼠容受性子宫内膜上皮细胞和基质细胞的共培养[J]. 生殖与避孕, 2002, 22(5): 259-262.

(上接第 14 页)