

水牛子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞的分离·培养和生物学特性研究

庄新杰, 段亚苹, 黄怡, 宁淑芳, 张明^{*} (广西大学动物繁殖研究所, 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西南宁 530005)

摘要 [目的] 建立一种高效的水牛子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞分离培养方法, 为胚胎着床和子宫内膜相关疾病的分子生物学机制研究奠定基础。[方法] 采用酶消化、刮取、系列过滤和差速贴壁相结合的方法分离水牛子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞, 用免疫细胞化学法和台盼兰染色法检测分离细胞的纯度和活率。[结果] 成功分离培养出子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞; 免疫荧光染色和细胞计数表明上皮细胞和基质细胞的纯度均达 90% 以上; 台盼兰染色结果显示, 上皮细胞的活率为 91%, 基质细胞的活率为 78%。[结论] 采用酶消化、刮取、过滤和差速贴壁相结合的方法可分离出高纯度的水牛子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞。

关键词 水牛; 子宫内膜腺上皮细胞; 基质细胞; 免疫细胞化学

中图分类号 S823.8⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08512-03

Isolation, Culture and Biological Characteristic Analysis of Stromal and Glandular Epithelial Cells of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Endometrium

ZHUANG Xin-jie et al (Animal Reproduction Institute, Guangxi University, Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract [Objective] The experiment aimed to set up a method for isolating and culturing endometrial stromal cells (BESC) and endometrial glandular epithelial cells (BEGEC) of buffalo as well as laid foundation for studying biological mechanism of embryo implantation and uterine diseases. [Method] The enzymatic digestion method, scraping method, serial filtration and differential velocity adherent technique were used to isolate BESC and BEGEC, then immunocytochemical method and TRY-PAN-Blue assay were used to determine the purity and survival rate of isolated cells. [Result] The BESC and BEGEC were successfully isolated and cultured while immunocytochemical method and cell count method demonstrated that the purification was over 90%. The result of TRY-PAN-Blue assay shown that survival rate of BESC and BEGEC was 91% and 78% respectively. [Conclusion] The enzymatic digestion method, scraping method, serial filtration and differential velocity adherent technique could isolate BESC and BEGEC with high purification.

Key words Buffalo; Endometrial epithelial cell; Stromal cell; Immunocytochemistry

子宫是人和动物胎儿生长发育的重要场所, 子宫内膜可在卵巢雌激素、孕激素和其他因素的作用下发生周期性的改变, 表现为子宫内膜上皮细胞和基质细胞的增生和脱落^[1]; 同时, 子宫内膜对胚胎的可容受状态又直接影响着胚胎植入的成功^[2-4]。因此, 胚胎和子宫内膜细胞之间的通讯、相互协调的作用机制和细胞分子机制等一直是当前研究的热点。有关小动物的子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞的培养研究已有报道^[5-6], 但在大型哺乳动物方面的研究较少, 特别是对于繁殖力相对低下的水牛, 其子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞的体外分离培养尚未见报道。笔者对水牛子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞的分离、培养和生物学特性进行了研究, 旨在建立一种水牛子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞体外培养模型, 为进一步研究子宫内胚胎着床和子宫内膜相关疾病的分子机制和抗原相关性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 孕早期成年水牛子宫由南宁某屠宰场提供。试剂: 一次性细胞培养皿购自美国 BD 公司; 新生牛血清购自杭州四季青公司; 雌二醇购自宁波市激素制品有限公司; 高糖型 DMEM 细胞培养液粉剂、DPBS 粉剂和胶原酶 I 购自美国 GIBCO 公司; 细胞角蛋白单抗和二抗购自广州深达生物制品有限公司。另外, 青霉素、链霉素、胰蛋白酶、表皮生长因子 (EGF)、乙二胺四乙酸、NaHCO₃ 和台盼蓝等为美国 Sigma 公司产品。

1.2 溶液配制 DMEM 培养液 (内含 10% 新生牛血清、

5 μg/LEGF、1 mg/L 雌二醇、66 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素); 用 NaHCO₃ 调节 pH 值至 7.2~7.4; 混合酶消化液 (0.25% 胰蛋白酶 + 0.1% I 型胶原酶): 用 DPBS 液配制, 过滤分装到 10 ml 小瓶, 于 -20 °C 保存备用。

1.3 方法

1.3.1 材料获取。 先用预温 37 °C 生理盐水冲洗预先截取的部分子宫, 再用 75% 酒精冲洗 30 s, 随后用 DPBS 冲洗 (去除酒精) 3 次, 每次 1 min。冲洗后将子宫材料放到灭菌纱布上, 用灭菌手术剪剪取一部分子宫, 放进灭菌的玻璃皿中, 移入超净工作台内。

1.3.2 子宫内膜腺细胞的分离和培养^[7-8]。

(1) 0.1% I 型胶原酶和 0.25% 胰蛋白酶组成的混合酶消化。将玻璃皿中的部分子宫, 用 DPBS 冲洗 3 次, 每次 1 min; 再用无菌手术剪剪成 3 mm³ 小块, 使之内壁向下贴在培养皿中, 随后加入混合酶消化液, 使之消化液覆盖子宫内壁层, 于 4 °C 消化 0.5 h, 中间反复吹打几次。

(2) 刮取子宫内膜功能层细胞。将 (1) 中的组织块翻转过来, 用无菌手术剪或锋利的刀片刮取子宫内壁未消化完全的子宫内膜功能层细胞, 然后将刮取的细胞继续放在混合酶消化液中于 4 °C 消化 0.5 h, 中间反复吹打几次。

(3) 将 (1) 中消化液中的细胞和 (2) 中刮取并消化后的细胞收集起来加入两倍体积含血清的新鲜 DMEM 培养液终止消化。1 000 r/min 离心 8 min, 然后用 PBS 洗涤 2 次; 再将细胞悬液经 200 μm 尼龙滤网过滤; 然后将滤网上的细胞 (主要是腺上皮细胞) 和滤液中的细胞 (主要是基质细胞) 分别用 PBS 洗涤 2 次后用 DMEM 培养液悬浮并将细胞浓度调整为 1 × 10⁶ 个/ml, 分别接种于一次性细胞培养皿中, 移入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

(4) 基质细胞贴壁时间要早于上皮细胞, 所以在腺上皮

基金项目 广西大学研究生创新项目 (2008105930905D001); 广西科技厅科技攻关项目 (桂科攻 0815008-2-4)。

作者简介 庄新杰 (1981-), 男, 山东临沂人, 博士研究生, 研究方向: 动物生殖生理与繁殖新技术。^{*} 通讯作者。

收稿日期 2009-03-17

细胞接种培养的 5 h 时,吸取未贴壁的上皮细胞转移于另一个新培养皿中继续培养。每 12 h 观察一次,细胞每 2~3 d 换一次液。

1.3.3 细胞免疫荧光染色鉴定。细胞爬片后,先用 T-BSA-PBS 洗液清洗 3 遍;再用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,阻断液清洗 3 次,每次 5 min;然后将细胞移入 1% Triton-X-100 溶液中于室温孵育 10 min,让其充分透化,随后用阻断液清洗 2 次,每次 5 min;用 1% BSA 溶液室温孵育 1 h,使之封闭非特异性位点;T-BSA-PBS 洗液清洗 3 次,每次 5 min;用 1% BSA 溶液稀释细胞角蛋白单抗(稀释 50 倍)1 ml 加入到细胞平皿中,于 4 ℃ 冰箱过夜^[9]。次日,将细胞平皿移入 37 ℃ 培养箱,继续孵育 20 min;随后用 T-BSA-PBS 洗液清洗 3 次,每次 5 min;再加二抗避光孵育 1.5 h, T-BSA-PBS 洗液清洗 3 次;封片,荧光显微镜观察。对照组:正常山羊血清代替一抗的血清。

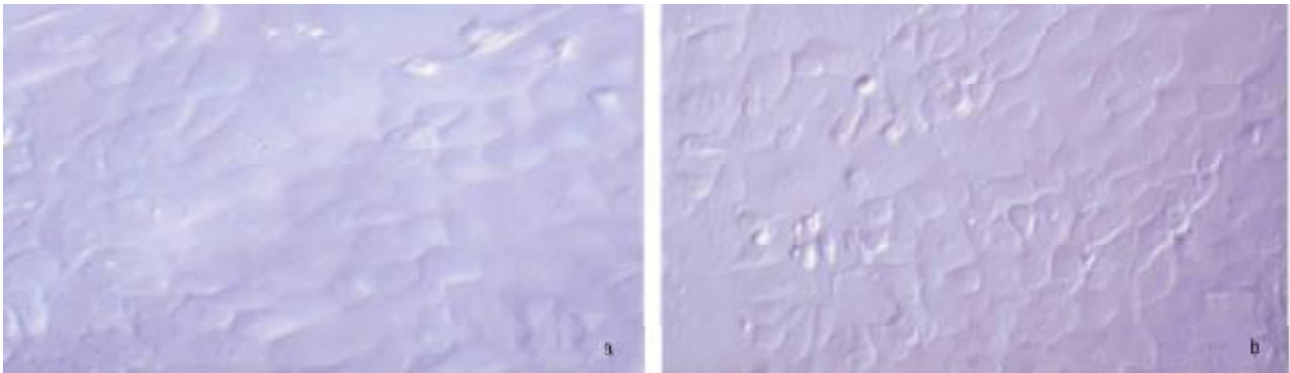
1.3.4 细胞纯度鉴定和活率评定。将上述培养和染色的上

皮细胞和基质细胞进行拍照,然后在每张细胞片上各取 10 个不同视野分别进行上皮细胞和基质细胞的计数来检测细胞的纯度。同时,将 1.2.1 和 1.2.2 所获得的细胞悬液,各取 0.3 ml 加等量的 4% 台盼兰溶液,混匀。立即取上述细胞悬液 6 μ l 滴于载玻片上,覆以盖玻片。用低倍镜至少计数 500 个细胞,计算其中蓝染的细胞数量。

1.3.5 细胞染色体的制备。根据染色体制备的常规方法制备第 3 代和第 5 代基质细胞染色体核型,观察并计染色体数。

2 结果与分析

2.1 子宫内腺上皮细胞的培养观察 从滤网上收集的子宫上皮细胞接种到一次性细胞培养皿中,里面既有小的细胞团块也有游离的单个细胞。4 h 后细胞开始贴壁,其中细胞团块比单个细胞更易贴壁。大多数细胞为不规则圆形或椭圆形,轮廓清晰,形态饱满(图 1a)。当细胞连成片时,可以看到细胞呈典型的“铺路石”样外观(图 1b)。当细胞长满时,可



注:a. 培养 3 d 的腺上皮细胞(200 \times); b. 培养 7 d 的腺上皮细胞(200 \times)。

Note: a. Glandular epithelial cells cultured for 3 days (200 \times); b. Glandular epithelial cells cultured for 7 days (200 \times).

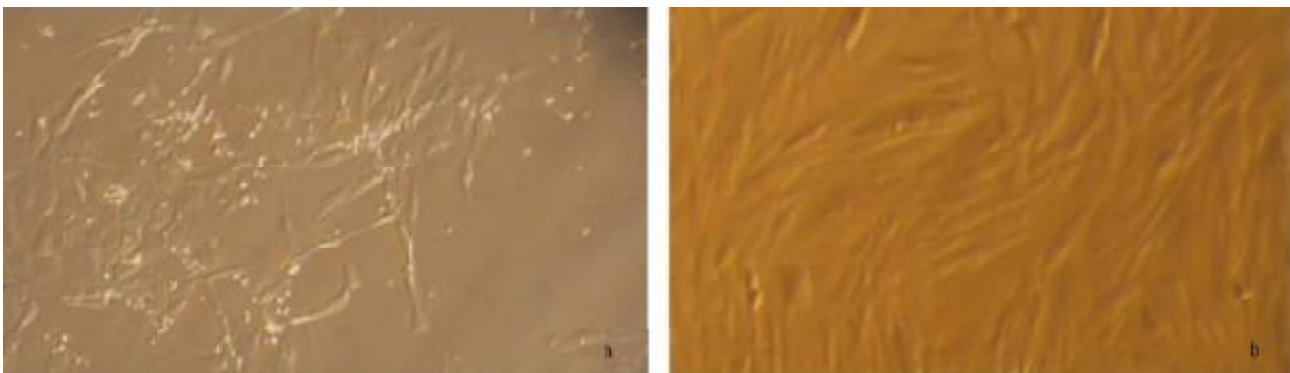
图 1 水牛子宫内腺上皮细胞的培养

Fig. 1 Culture of endometrial glandular epithelial cells of buffalo

以进行消化传代,但消化后的细胞贴壁率低,只能传 2 代。

2.2 子宫内腺基质细胞的培养观察 从滤液中获得基质细胞接种到细胞培养皿中,3 h 后有细胞贴壁伸展,大部分细胞呈梭型,少量细胞呈多角型和不规则形。12 h 时大部分细

胞已经贴壁(图 2a)。5 d 后细胞融合成片,在细胞密度大的地方可以看到细胞生长旺盛并呈放射型生长(图 2b)。当基质细胞长满后可以传代,随着传代次数的增多,基质细胞的纯度也越来越高。



注:a. 培养 2 d 的子宫内腺基质细胞(200 \times); b. 培养 5 d 的子宫内腺基质细胞(200 \times)。

Note: a. Endometrial stromal cells cultured for 2 days (200 \times); b. Endometrial stromal cells cultured for 5 days (200 \times).

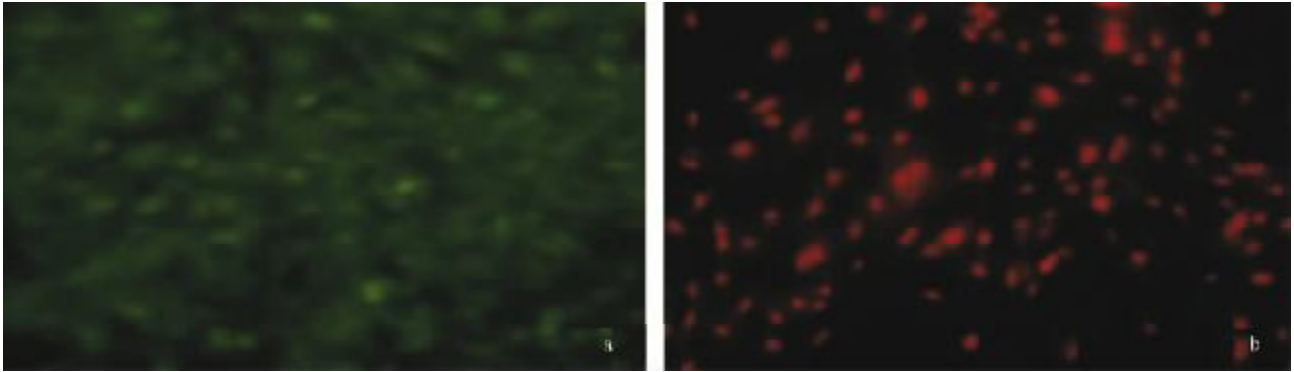
图 2 水牛子宫内腺基质细胞的培养

Fig. 2 Culture of endometrial glandular stromal cells of buffalo

2.3 上皮细胞免疫鉴定 上皮细胞抗角蛋白免疫荧光染色,胞质显示绿色,为阳性(图 3a),这说明滤网所分离的上

层细胞绝大部分是上皮细胞;同样用山羊血清代替一抗血清的子宫内腺上皮细胞对照组胞质不被染色,然后用 PI 复染

细胞核,只有核为红色,则为阴性(图3b)。



注:a.角蛋白染色呈阳性(200×);b.山羊血清替代一抗染色呈阴性(200×)。

Note:a. Positive cytokeratin staining (BEGEC 200×); b. Negative cytokeratin staining (BEGEC 200×).

图3 水牛子宫内膜腺上皮细胞的免疫化学染色

Fig.3 Immunocytochemical staining of endometrial glandular epithelial cells of buffalo

圆形或椭圆形,基质细胞呈梭形。因形状差异较大,容易区分。又因上皮细胞能够特异性表达角蛋白,能够被角蛋白抗体检测并被染色,而基质细胞不表达角蛋白,不会被染色。所以根据细胞计数显示上皮细胞的纯度为91%,基质细胞的纯度为93%。

根据蓝染细胞的数量计算判定,滤网上层所获得的上皮细胞的活率为91%,而滤液中所获得的基质细胞活率为78%。

2.5 基质细胞染色体核型分析 通过对30个第5代基质细胞染色体核型分析,结果表明,大部分细胞的染色体条数为48条($N=24$),依然保持正常的二倍体核型(图4)。

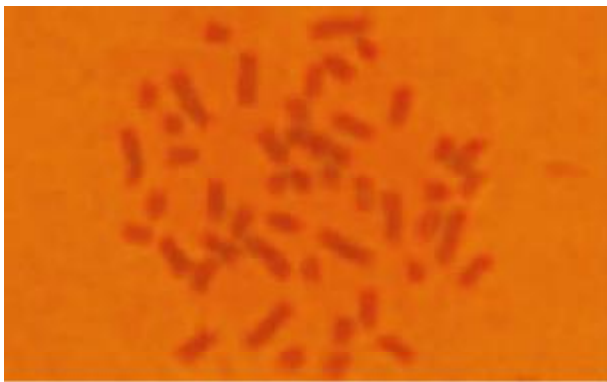


图4 水牛子宫基质细胞的染色体核型(1000×)

Fig.4 Karyotype of endometrial stromal cell of buffalo (1000×)

3 结论与讨论

(1)目前,子宫内膜细胞的分离主要采用酶消化法。由于不同物种或同一物种的不同个体对于酶的耐受力不同,所以消化酶的选择、消化时间的掌握各不相同。其中酶消化法又分胶原酶消化法^[10]、胰蛋白酶^[11]和混合酶(胰酶+胶原酶)消化法。虽都能培养出子宫内膜上皮细胞,但纯度不一。该试验采用混合酶消化法于4℃消化0.5h后再用机械法刮取子宫内膜功能层细胞,并将该功能层细胞在混合酶中继续4℃消化0.5h,可较易获得水牛子宫内膜细胞混合液;根据子宫内膜上皮细胞和基质细胞的体积不同采用尼龙滤网过滤法^[12]分离纯化细胞;然后再根据上皮细胞和基质细胞贴壁时间差异,再进行第二次分离纯化;该方法可获得高纯

2.4 细胞纯度鉴定和活率测定 因上皮细胞外型大都呈

度的水牛子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞;又因上皮细胞能够特异性的表达角蛋白,而基质细胞不表达该蛋白,通过角蛋白抗体检测和计数分析显示,其纯度均大于90%。

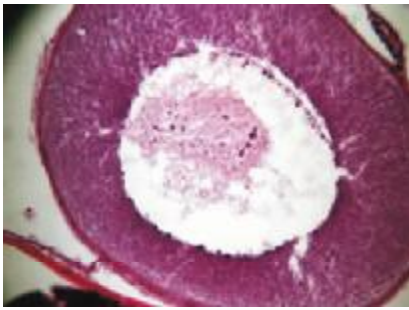
(2)子宫内膜周期性变化受下丘脑-垂体-卵巢-子宫轴的调节,主要表现为子宫腺上皮细胞和基质细胞周期性的分裂增生和坏死脱落,其中雌激素和孕激素起关键作用。有文献报道,雌激素对子宫内膜上皮细胞的增生有促进作用^[13-14]。然而,体外培养的原代子宫内膜上皮细胞常因缺少一些激素(如雌激素)、细胞因子以及基质细胞的支持和相互作用,无法进一步分化和继续生长,所以不能持续传代。该试验培养液中添加了与子宫内膜增值密切相关的激素(雌二醇)和有益于诱导和调节上皮细胞增殖的表皮生长因子,生长状况明显优于未添加组。有关筛选和添加激素的种类、浓度以及寻找抑制上皮细胞凋亡和分化的因子还需进一步研究。

(3)该试验采用混合酶消化、刮取、过滤和差速贴壁相结合的方法可分离培养出高纯度的水牛子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞。细胞体外的成功培养及其细胞模型的建立,为进一步研究子宫胚胎着床和子宫内膜相关疾病的分子机制、子宫内膜细胞间的相互通讯和应答以及寻找基于抗原相关性而有选择的调控雌性胚胎附植发育从而人为控制动物出生性别的理想靶点奠定基础。

参考文献

- [1] KODAMAN P H, TAYLOR H S. Hormonal regulation of implantation[J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2004, 31(4): 745-766.
- [2] LESSEY B A. Implantation defects in infertile women with endometriosis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 55: 265-280.
- [3] CHOBOTOVA K, KARPOVICH N, CARVER J, et al. Eparin-binding epidermal growth factor and its receptors mediate decidualization and potentiate survival of human endometrial stromal cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(2): 913-919.
- [4] PLOMONO W A, FUENTES A. Differential expression of endometrial integrins and progesterone receptor during the window of implantation in non-ovulatory women treated with clomiphene citrate[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(3): 587-593.
- [5] 陈思怀,朱周福,李小兰.氟化物对外体培养孕鼠子宫内膜上皮细胞的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2008, 25(5): 414-416.
- [6] 李瑞梅,陈秀荔,王海滨,等.家兔子宫内膜细胞和平滑肌细胞的分离培养及鉴定[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2007, 35(6): 19-23.

(下转第8517页)



注:核呈透明泡状。
Note: Nuclear shows transparent bubble appearance.

图 11 II 时相晚期卵母细胞 ×180
Fig. 11 Oocyte in late phase II ×180

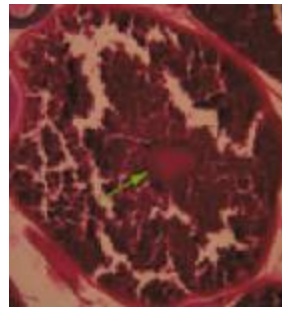


图 12 IV 时相中期卵母细胞示核居中的卵(箭头指向核) ×45
Fig. 12 Oocyte in the middle phase IV, arrow points to the nucleus ×45

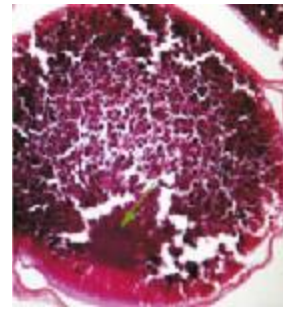


图 13 IV 时相晚期卵母细胞示核极化的卵(箭头所指) ×45
Fig. 13 Oocyte in the late phase IV, arrow points to the polarized nucleus ×45



图 14 VI 时相退化的卵母细胞(箭头所指) ×18
Fig. 14 Degenerate oocyte (arrow), ×18

3.2 精巢结构特点 硬骨鱼精巢结构分为管型和叶型。管状精巢没有壶腹结构,而且精原细胞只限于管的盲端^[4]。缺帘鱼精巢切片显示,精子细胞形成前,每个精小叶内具有精原细胞和精母细胞,成熟精子也可以存在于小叶的各处。因此可以认为,缺帘鱼的精巢结构不是管状结构,而是叶型结构。但和典型的叶型结构不尽相同,其小叶内不存在固定的中央管腔^[5],类似于金鱼的精巢结构^[4]。叶型结构又分为壶腹型和辐射型^[5],缺帘鱼精巢属于壶腹型。

3.3 性腺发育速度 虽然初步得到了卵子各期的形态结构,但由于样本较少不能准确地说明缺帘鱼的性腺发育速

度,只能说在水泥池内养殖 3 龄亲鱼已发育到 I ~ II 期,4 ~ 5 龄可以进行人工催产。

参考文献

[1] 张清靖,朱华,袁丁. 三种巴西土著淡水养殖鱼类[J]. 北京水产,2006(1):50-53.
[2] 刘筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京:农业出版社,1993:20-31.
[3] 徐绍刚,田照辉,朱华,等. 缺帘鱼全人工繁殖技术的研究[J]. 水产科技情报,2007,35(5):224-225,228.
[4] 管汀鹭,黄丹青,黄国屏. 金鱼精巢的细胞结构与精子的发生和形成[J]. 水生生物学报,1990,14(3):233-238.
[5] 楼允东. 组织胚胎学[M]. 2 版. 北京:中国农业出版社,1996:127-130.

(上接第 8514 页)

[7] AHERNE K M, DAVIS M R, SORDILLO L M. Isolation and characterization of bovine mammary endothelial cells[J]. Methods Cell Sci, 1995, 17: 41-46.
[8] RYAN I P, SCHRIOCK E, TAYLOR R N. Isolation, chracterization and comparison of human endometrial akd endometriosis cells in vitro[J]. J Clin Endocriol Metab, 1994, 78(2):642-649.
[9] 多曙光,吴应积,罗奋华,等. 牛乳腺上皮细胞的分离培养及其生物学特性[J]. 动物学研究,2006,27(3):299-305.
[10] BONGSO A, COJRA B, LIAN N P, et al. Establishment of human endometrial cell culture[J]. Hum Reprod, 1988, 6:705-713.
[11] CASSLEN B G, SLILER T M, HARPER J K. Progesterone regulation of

prolactin release from human endometrial cells in culture: protential bioassay for progestational activity[J]. Acta Endocrinol, 1990, 122(1):137-144.
[12] ARNOLD JULIA T, KAUFMAN DAVID G, MARKKU SEPPALA, et al. Endometrial seromal cells regulate epithelial cell growth in vitro; a new co-culture modle[J]. Human Reproduction, 2001, 16(5):836-845.
[13] BIGSBY R M, AIXIN L, LUO K, et al, Strain differences in the ontogeny of estrogen receptors in murine epithelium[J]. Endocrinology, 1990, 126: 2592.
[14] PIERRO E, MINICI F, ALESIANI O, et al. Stromal Epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium[J]. Biology of Reproduction, 2001, 64:831.