

家兔子宫内膜细胞和平滑肌细胞的分离培养

陈秀荔, 赵永贞, 靳亚平, 张彦明*

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

摘要: 本试验旨在体外分离培养兔子宫内膜细胞(腺上皮细胞和基质细胞)和平滑肌细胞, 并且探讨纯化子宫内膜上皮细胞和基质细胞的方法。用差速离心法和差速贴壁法获得纯化的子宫内膜上皮细胞和基质细胞, 用滤网法分离得到子宫平滑肌细胞, 分别在添加 20% 胎牛血清(FBS)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛胰岛素、63.5 nmol/L 雌二醇(E_2)、7.14 nmol/L 孕酮(P_4)的 DMEM/F12(1:1)培养液和 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的饱和湿度条件下培养; 用免疫组化和免疫荧光法鉴定细胞并检测分离的细胞纯度。结果表明用该方法成功地分离培养了兔子宫内膜上皮细胞和基质细胞, 且 2 种细胞纯度都达 98% 左右, 基质细胞出现蜕膜化; 子宫平滑肌细胞的纯度为 97% 左右, 而且出现横纹状的生长。本研究表明子宫内膜细胞和平滑肌细胞能够在体外成功培养; 在含 20% FBS、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛胰岛素、63.5 nmol/L E_2 、7.14 nmol/L P_4 的 DMEM/F12(1:1)培养液和 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养条件下最有利于体外培养的子宫内膜细胞和平滑肌细胞的生长。

关键词: 子宫内膜细胞; 平滑肌细胞; 免疫组织化学; 免疫荧光; 蜕膜化

中图分类号: S852; Q813.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)11-1242-06

The Separation and Cultivation of Rabbit Endometrial Cells and Smooth Muscle Cells *in vitro*

CHEN Xiu-li, ZHAO Yong-zhen, JIN Ya-ping, ZHANG Yan-ming*

(Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology of Agriculture Ministry of China, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In this paper, rabbit endometrial cells (epithelial cells and stromal cells) and smooth muscle cells were successfully isolated and cultured, and the ways used in purifying endometrial epithelial cells and stromal cells were discussed. The ways of differential centrifugal speed and differential sticking on the wall were applied to obtain the purified epithelial cells and stromal cells, the way of sieve was chosen to harvest smooth muscle cells, separately. The cells were cultured in the medium that consist of a 1:1 mixture of DMEM:F12 media supplemented with 20% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin, 63.5 nmol/L estrogen, 7.14 nmol/L progesterone, at 37 $^\circ\text{C}$ humidified atmosphere of 5% CO_2 in air. Immunohistochemistry and immunofluorescence assay were used to identify the three kinds of cells and their purification. Results showed that rabbit endometrial epithelial cells and stromal cells were successfully separated and cultured, the purification of the two kinds of cells reached about 98%. Decidualization was observed in stromal cells. The purification of smooth muscle cells reached about 97%, cells showed lateral-cut growth. The research indicated that endometrial cells and smooth muscle cell could be cultured successfully *in vitro*; The DMEM/F12(1:1) culture medium supplemented with 20% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin, 63.5 nmol/L estrogen, 7.14 nmol/L progesterone and the incubation under condition of 37 $^\circ\text{C}$ humidified atmosphere of 5% CO_2 were optimal to support the growth of endometrial cells and

收稿日期: 2006-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770544)

作者简介: 陈秀荔(1975-), 女, 内蒙古赤峰市人, 博士生, 主要从事家畜生殖内分泌与生殖免疫研究, E-mail: chenxiuli2001@163.com

* 通讯作者: 张彦明(1956-), 男, 陕西南郑人, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究, E-mail: zhangyanming@nwsuaf.edu.cn

smooth muscle cells.

Key words: endometrial cells; smooth muscle cells; immunohistochemistry; immunofluorescence; decidualization

子宫内膜作为性激素作用的靶器官,在生殖生理研究中占有重要的地位。对子宫内膜细胞进行体外培养,为研究细胞的生长、分化和代谢以及性激素作用的机理提供了理想的实验模型;着床期子宫内膜在胚泡黏附后发生蜕膜化反应,子宫内膜基质细胞逐渐转化为蜕膜基质细胞,影响滋养层细胞的侵入,一方面蜕膜组织中细胞外基质处于不断更新代谢的动态平衡中,另一方面,蜕膜组织能够产生多种细胞因子、生长因子以及金属蛋白酶,调节滋养层细胞的多种基因表达,因此体外研究基质细胞的蜕膜化现象对进一步研究胚胎植入机理十分必要^[1~4]。子宫平滑肌细胞的体外培养为研究子宫内以及其他组织器官的血管的形成以及体外构建血管模型提供了依据。目前对子宫内膜细胞和平滑肌细胞的分离方法主要有两种,一种是滤网法^[5],另一种是离心法^[6]。本实验室曾应用滤网法分离子宫内膜细胞^[7],但其操作繁琐,因此,本研究对子宫内膜细胞的体外培养加以改进,采用离心法获得细胞后再经过差速贴壁法获得纯化的子宫内膜细胞,探讨更为简单有效的纯化方法,为进一步的体外研究激素及生长因子对子宫内膜细胞和平滑肌细胞增殖的影响提供依据;同时为体外模拟正常子宫模型的建立奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

试验用母兔来自军事医学科学院实验动物中心,临床检查健康,性成熟。

1.2 主要试剂

孕马血清促性腺激素(PMSG,北京奶牛中心),人绒毛膜促性腺激素(hCG,北京奶牛中心),DMEM/F12培养基(Gibico BRL公司),胎牛血清(FBS,百灵克公司),孕酮(P₄,Sigma),雌二醇(E₂,Sigma),牛胰岛素(Sigma),rhEGF(Promega),鼠抗人的角蛋白CK18(Cytokertin 18,北京中杉公司)多克隆抗体,波形蛋白(Vimentin,北京中杉)多克隆抗体,平滑肌肌动蛋白(α -actin,北京中杉)多克隆抗体,Hoechst33258(Sigma公司,分析纯),SP免疫组化试剂盒及DAB显色液以及相应的罗丹明荧光二抗(北京中杉公司)。

1.2 方 法

1.2.1 子宫内膜细胞的分离 雌性大耳白兔,性成熟,体质量为2 kg。16:00肌肉注射100 IU的PMSG超排处理,48 h后耳缘静脉注射100 IU的hCG,于第2天08:00空气栓塞处死超排处理兔,无菌条件下取出子宫,用含双抗的PBS冲洗子宫至白色,纵向剪开子宫,刮取子宫内膜,用0.25%的胰蛋白酶室温消化0.5~1 min,用吸管反复吹打几次,将其收集到盛有培养液(含血清)的离心管中,吹打均匀,采取以下的几种方法进行分离纯化:一种是滤网法,用200目不锈钢网筛过滤,收集滤液,1 000 r/min离心5 min,得基质细胞;用完全培养基冲洗滤网上的细胞,得到的液体进行离心,1 000 r/min离心5 min,得上皮细胞^[7]。另一种分离纯化的方法是差速离心法,将消化获得的子宫内膜细胞1 000 r/min离心5 min,弃去上清,然后再加入10 mL完全培养液将其重悬,再经过300 r/min离心5 min,取其上2/3的悬液接种于培养瓶中得基质细胞,取下1/3悬液接种于培养瓶中得上皮细胞,因为这样获得的细胞不是很纯,笔者尝试用反复差速贴壁法对2种细胞进行纯化,从而获得纯度较高的子宫内膜细胞。方法如下:将接种的2种细胞放置于37℃,5%的CO₂孵箱内培养1 h后,吸取培养液于离心管中离心,下层贴壁的为基质细胞(因其属于成纤维样细胞所以易于贴壁),再重复以上操作2次,每次计数未贴壁的细胞数量,再离心收集未贴壁的细胞,重新接种到瓶中进行培养得到上皮细胞。

1.2.2 子宫平滑肌细胞的分离 在以往报道的基础上加以改进^[8,9],将刮去子宫内膜的子宫用PBS冲洗几次,每次冲洗的液体收集到离心管中(内含基质细胞和上皮细胞),用差速离心法和差速贴壁法分离纯化2种细胞,将冲洗过的子宫用眼科剪修剪边缘,再将剩余部分剪成1 mm³的小块,加入适量的0.25%胰蛋白酶室温消化5 min,用200目不锈钢网筛过滤。将滤液收集至离心管中,再向离心管中加入等量含血清的完全培养基终止消化,滤网上的组织刮下来继续用0.25%胰蛋白酶消化,直至消化完全为止,1 000 r/min离心5 min,收集细胞。

1.2.3 子宫内膜细胞和平滑肌细胞的体外培养

将分离纯化的子宫内膜细胞和平滑肌细胞吹打均匀后以 1×10^6 /mL 接种到 T75 的培养瓶中,设立对照组:一种培养液为含有 63.5 nmol/L E_2 、7.14 nmol/L P_4 、100 μ g/mL 牛胰岛素,20% FBS 的 DMEM/F12;另一种为含有 63.5 nmol/L P_4 、7.14 nmol/L E_2 、100 μ g/mL 牛胰岛素,20% FBS 的 DMEM/F12,将其培养瓶置于 37 $^{\circ}$ C,5%的 CO_2 培养箱内培养,2 d 后更换相应的培养液,每天在倒置显微镜下观察细胞的生长情况。

1.2.4 细胞爬片 用 0.125% 胰蛋白酶和 0.01% EDTA 消化长成单层的子宫内膜细胞,然后用含血清的培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,重悬细胞并计数,以 10^4 /mL 接种到 4 孔培养板(内置盖玻片)上,静置 15 min,添加足量的培养液,置于 37 $^{\circ}$ C 饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养,约 20 h 后细胞已经铺满瓶底 80% 左右,细胞密度适中,细胞间存在一定的空隙,适宜做免疫组化和免疫荧光试验。

1.2.5 细胞免疫组织化学染色 用 PBS 洗细胞爬片 3 次,再用 4% 的多聚甲醛室温固定 15 min,以链霉素生物素蛋白-过氧化物酶 (Streptavidin-peroxidase, SP) 进行免疫组织化学染色。鉴定 3 种细胞的抗体:鉴定上皮细胞的抗体为小鼠抗人的细胞角蛋白 (Cytokerotin 18),1 : 100 稀释;鉴定基质细胞的抗体为小鼠抗人的波形蛋白 (Vimentin),1 : 500 稀释;鉴定平滑肌细胞的抗体为小鼠抗人的 α -肌动蛋白 (α -actin),以 PBS 为阴性对照,4 $^{\circ}$ C 过夜,加生物素标记的 SP 试剂盒二抗工作液进行染色,最后 DAB 显色,再用苏木素复染,凡细胞质染成棕黄色的为阳性,未呈棕黄色的为阴性,每张爬片取 10 个不同的视野计数阳性细胞,统计阳性细胞率。

1.2.6 细胞免疫荧光染色 将 4 孔培养板中长成单层的细胞用 4% 的多聚甲醛室温固定 15 min,进行免疫荧光染色,用 1.2.5 中叙述的 3 种细胞的抗体染色,PBS 代替一抗作阴性对照。用罗丹明以 1 : 50 稀释(北京中杉公司)标记细胞的胞质, Hoechst 33258 以 1 : 80 稀释标记胞核。细胞质呈红色的为阳性结果,细胞质不着色的是阴性结果,统计细胞质和细胞核的数量计算细胞的纯度。

2 结果与分析

2.1 子宫内膜细胞的生长情况

在添加 20% FBS,100 μ g/mL 牛胰岛素、63.5 nmol/L E_2 、7.14 nmol/L P_4 的 DMEM/F12 (1 : 1) 培养液和 5% CO_2 的饱和湿度条件下培养,子宫内

膜上皮细胞较基质细胞难贴壁,培养 24 h 后发现贴壁伸展成小圆形,基质细胞培养 12 h 观察发现其长成小星星形的细胞,两种细胞在 48 h 基本长成单层,细胞纯度达 90%,上皮细胞呈铺路石状,基质细胞多呈多角形,而在添加 20% FBS、100 μ g/mL 牛胰岛素,63.5 nmol/L P_4 、7.14 nmol/L E_2 的 DMEM/F12 (1 : 1) 培养液中培养的上皮细胞和基质细胞较前一种培养液中生长的细胞状况差。平滑肌细胞贴壁较快,12 h 后将观察到伸展的长梭形细胞,48 h 后可见到形成横纹状的细胞单层,有时可见“峰谷”样的结构。如图 1~3 所示。

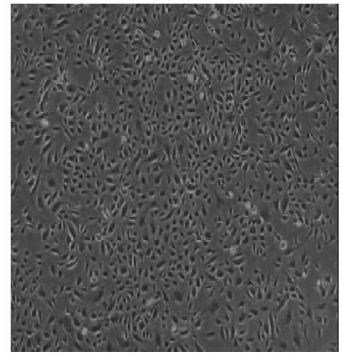


图 1 培养 2.5 d 的单层子宫内膜上皮细胞(倒置相差显微镜 $\times 100$)

Fig. 1 Cultured epithelial cells on two and a half days of endometrium (Inverted microscopy $\times 100$)

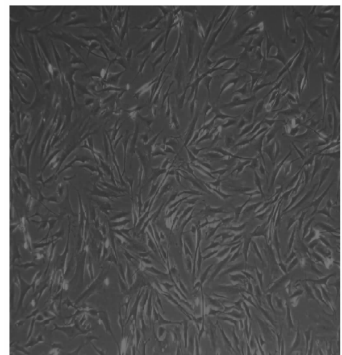


图 2 培养 2 d 的单层子宫内膜基质细胞(倒置相差显微镜 $\times 100$)

Fig. 2 Cultured stromal cells on 2 days of endometrium (Inverted microscopy $\times 100$)

2.2 细胞爬片的免疫组化染色

分别对 3 种细胞进行免疫组化染色,上皮细胞 CK18 阳性,胞质呈棕褐色(图 4),阳性率达 95%;基质细胞 Vimentin 阳性,胞质呈棕褐色,而且还见到膨大的蜕膜化的基质细胞(图 5),阳性率达 89%;平滑肌细胞 α -actin 阳性,胞质呈棕褐色,出现横纹

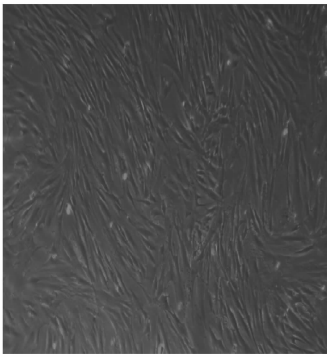


图 3 培养 2 d 的单层子宫平滑肌细胞(倒置相差显微镜 $\times 100$)

Fig. 3 Cultured smooth muscle cells on 2 days of endometrium (Inverted microscopy $\times 100$)

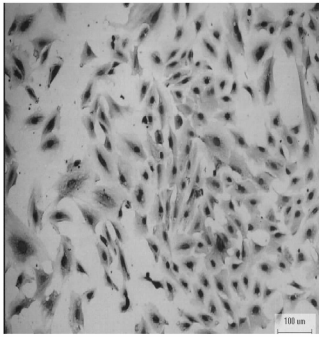


图 4 上皮细胞 CK18 阳性,胞质呈棕褐色,胞核呈蓝色($\times 200$)

Fig. 4 Endometrial cells CK18 positive, cytoplasm staining brown, nuclei staining blue ($\times 200$)

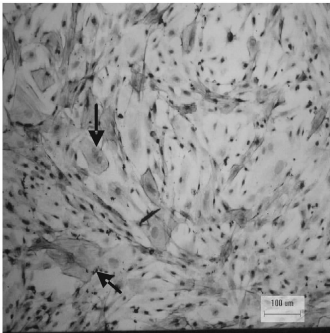


图 5 基质细胞 Vimentin 阳性,胞质呈棕黄色,胞核呈蓝色($\times 100$)

Fig. 5 Stromal cells Vimentin positive, cytoplasm staining brown, nuclei staining blue ($\times 100$)

状的生长方式(图 6),细胞阳性率达 90%。

2.3 细胞爬片的免疫荧光

分别对 3 种细胞进行免疫荧光染色,罗丹明染胞质呈红色, Hoechst33258 染胞核呈蓝色,通过统计胞质和胞核的数量计算细胞的纯度发现,上皮细胞的纯度为 98%,基质细胞的纯度为 98%,平滑肌

细胞的纯度为 97%,如图 7 所示。

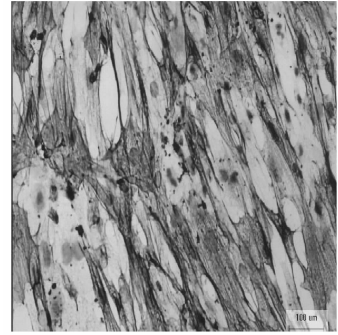


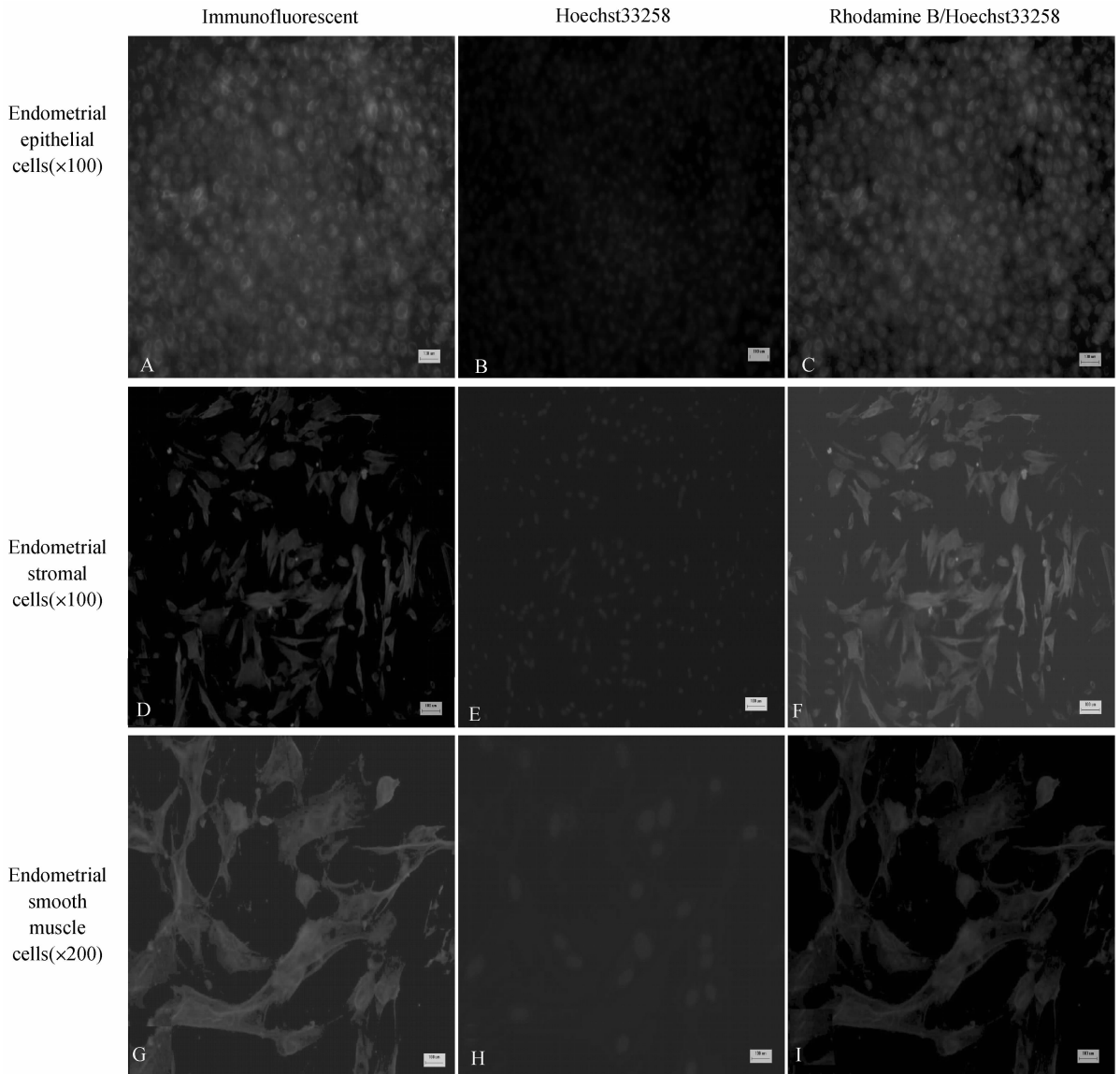
图 6 平滑肌细胞 α -actin 阳性,胞质呈棕褐色,胞核呈蓝色($\times 200$)

Fig. 6 Smooth muscle cells α -actin positive, cytoplasm staining brown, nuclei staining blue ($\times 200$)

3 讨论

子宫内膜细胞的分离与培养方法各异^[10,11],子宫内膜在体内受雌激素、孕激素等的共同作用,在体子宫内膜细胞分离培养后失去这些激素的作用而表现出生长缓慢等特征,而且大量的研究证明性腺激素对上皮细胞和基质细胞的作用是不可忽视的^[12,13]。笔者通过差速离心法和反复差速贴壁法成功地在体外分离和培养了子宫内膜细胞,并且通过滤网法获得平滑肌细胞,3 种细胞的形态比较均一。笔者分别用不同浓度的 P_4 和 E_2 培养上皮细胞和基质细胞,结果发现在高浓度 E_2 情况下 2 种细胞的增殖能力强,这也符合在体的激素浓度变化。笔者还观察了在此培养条件下培养了 10 代以后的上皮细胞,研究它的生长情况,结果发现上皮细胞形态正常,增殖能力很强,并且通过免疫荧光的方法鉴定细胞的纯度,每种细胞的纯度达到 90%左右。而且本研究在细胞培养基中加入一定浓度的雌激素和孕激素,探索子宫内膜细胞体外生长的条件,为以后的研究提供支持。

子宫内膜基质细胞发生蜕膜化是指成纤维样的基质细胞在形态和功能上向蜕膜细胞转变的过程,蜕膜细胞在胚胎着床和发育等方面起重要的作用^[14,15]。Hess 等^[16]报道的蜕膜细胞对来自于滋养层细胞的旁分泌的信号的反应,证明了蜕膜细胞对胚胎植入的重要意义;妊娠早期,类固醇激素 E_2 (Estrogen) 和 P_4 (Progesterone) 通过控制子宫上皮细胞和基质细胞的增殖和分化作用来调节一系列复杂的胚胎与母体子宫间的相互作用,它们间的协同



A、D、G. CK18、Vimentin、 α -actin 免疫荧光染色, 罗丹明染胞质, 阳性胞质呈红色; B、E、H. Hoechst33258 非特异性染核, 细胞核呈蓝色; C. A、B 的重叠图; F. D、E 的重叠图; I. G、H 的重叠图

A、D、G. CK18、Vimentin、 α -actin immunofluorescent staining, Rhodamine B staining for the cytoplasm, positive cytoplasm showed red; B、E、H. Hoechst33258 non-specificity staining for nuclei, nuclei showed blue; C. Merge picture of A and B; F. Merge picture of D and E; I. Merge picture of G and H

图7 子宫内膜第3代上皮细胞、基质细胞和平滑肌细胞免疫荧光染色

Fig. 7 Immunofluorescent double staining of the 3rd generation endometrial cells and smooth muscle cells

作用保持子宫内膜的蜕膜化程度, 促进胚胎的植入, 已经证实类固醇激素可通过调节基因来控制这些作用^[17~19]。本研究在前期研究的基础上进一步调整激素浓度观察基质细胞的变化, 结果发现基质细胞在受到合适的激素的刺激下由以前梭形、分化能力差、多能性的间充质细胞向两个方向分化, 其中约一半的细胞增大变成大而圆的蜕膜细胞, 另一半分化为小而圆的颗粒细胞, 这和以前的报道相一致^[20]。

体外研究子宫内膜细胞的蜕膜化的调节机制可以了解体内激素的调节水平, 有助于正确地了解子宫内膜的容受性及其与胚胎间的作用机理。

子宫平滑肌层含有大量的血管, 如果平滑肌层细胞过度生长, 势必造成血管壁的增厚, 管腔堵塞, 体外培养平滑肌细胞有利于研究子宫和其他富含血管器官的血管形成机制^[21]。子宫平滑肌细胞也表达金属蛋白酶 MMP-2 及其抑制剂 TIMP-2, 而雌激

素和孕激素对 MMPs 的表达有调控作用,它们之间的不协调表达会造成子宫肌瘤^[22]。本试验以兔子子宫组织为材料,通过滤网法分离得到纯度较高的平滑肌细胞,所培养的细胞呈横纹状生长,部分区域可见典型的“峰-谷”样, α -actin 免疫组织化学染色阳性,纯度较高。该方法的建立为进一步研究平滑肌的功能、代谢以及病理变化提供了新的试验模型,为研究子宫方面的生理变化和疾病的发生提供资料。

参考文献:

- [1] Giudice L C. Elucidating endometrial function in the post-genomic era[J]. Hum Reprod Update, 2003, 9 (3): 223~235.
- [2] Aplin J D. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence *in vivo* and *in vitro*[J]. J Cell Sci, 1991, 99 (Pt 4): 681~692.
- [3] Fisher S J, Damsky C H. Human cytotrophoblast invasion[J]. Semin Cell Biol, 1993, 4(3): 183~188.
- [4] Hampton A L, Salamonsen L A. Expression of messenger ribonucleic acid encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors is related to menstruation[J]. J Endocrinol, 1994, 141(1): 1~3.
- [5] Pierro E, Minici F, Alesiani O, *et al.* Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium[J]. Biol Reprod, 2001, 64(3): 831~838.
- [6] Bongso A, Gojra B, Lian N P, *et al.* Establishment of human endometrial cell culture [J]. Hum Reprod, 1988, 3(6): 705~713.
- [7] 陈秀荔, 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.
- [8] Rifas L, Fant J, Makman M H, *et al.* The characterization of human uterine smooth muscle cells in culture[J]. Cell Tissue Res, 1979, 196(3): 385~395.
- [9] Casey M L, MacDonald P C, Mitchell M D. Maintenance and characterization of human myometrial smooth muscle cells in monolayer culture [J]. *In vitro*, 1984, 20(5): 396~403.
- [10] 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.
- [11] Chan R W, Schwab K E, Gargett C E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells[J]. Biol Reprod, 2004, 70(6): 1 738~1 750.
- [12] Blauer M, Hinonen P K, Martikainen P M, *et al.* A novel organotypic culture model for normal human endometrium; regulation of epithelial cell proliferation by estradiol and medroxyprogesterone acetate [J]. Hum Reprod, 2005, 20(4): 864~871.
- [13] Rider V. Isolation of hormone responsive uterine stromal cells; an *in vitro* model for stromal cell proliferation and differentiation[J]. Methods Mol Med, 2006, 121: 57~67.
- [14] Brosens J J, Pijnenborg R, Brosens I A. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187(5): 1 416~1 423.
- [15] Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair[J]. J Endocrinol, 2003, 178(3): 357~372.
- [16] Hess A P, Hamilton A E, Talbi S, *et al.* Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast; amplification of immune and angiogenic modulators[J]. Biol Reprod, 2007, 76(1): 102~117.
- [17] Mantena S R, Kannan A, Cheon Y P. C/EBPbeta is a critical mediator of steroid hormone regulated cell proliferation and differentiation in the uterine epithelium and stroma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(6): 1 870~1 875.
- [18] 陈秀荔, 靳亚平, 张彦明. 分离培养兔子宫内膜细胞的鉴定及性激素对子宫内膜间质细胞形态的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(11): 1 226~1 231.
- [19] Tan Y, Tan D M, He M Z, *et al.* A model for implantation: coculture of blastocysts and uterine endometrium in mice[J]. Biol Reprod, 2005, 72(3): 556~561.
- [20] Kearns M, Lala P K. Life history of decidual cells: a review[J]. Am J Reprod Immunol, 1983, 3(2): 78~82.
- [21] Mahabeshwar G H, Somanath P R, Bvzova T V. Methods for isolation of endothelial and smooth muscle cells and *in vitro* proliferation assays[J]. Methods Mol Med, 2006, 129: 197~208.
- [22] Wolanska M, Sobolewski K, Bankowski E, *et al.* Matrix metalloproteinases of human leiomyoma in various stages of tumor growth[J]. Gynecol Obstet Invest, 2004, 58(1): 14~18.