

# 孕兔子宫内膜淋巴细胞的制备及体外培养

沈文正<sup>1</sup>, 靳亚平<sup>2</sup>, 李引乾<sup>2</sup>, 马勇江<sup>2</sup>

(1. 杨凌职业技术学院, 陕西杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学畜牧兽医学院, 陕西杨陵 712100)

**摘要:** 对孕兔子宫内膜的对比消化及统计分析表明, 用浓度为 2.5 g/L 或 1.25 g/L 的胰酶 0~4℃ 消化 7 h 30 min 至 8 h 55 min, 可分离到正常的子宫内膜淋巴细胞 (EML); 培养条件单独作用或与酶浓度共同作用分别可极显著影响 ( $P < 0.01$ ) 或显著影响 ( $P < 0.05$ ) 孕兔子宫内膜淋巴细胞的活化作用。试验表明, 孕兔子宫内膜经 1.25 g/L 的胰酶 0~4℃ 消化 8~9 h, 所获淋巴细胞在体外培养 48 h 是孕兔子宫内膜淋巴细胞制备及体外培养的可行方案; 培养出的淋巴细胞适合用噻唑蓝 (MTT) 比色法进行活性检测。

**关键词:** 孕兔; 子宫内膜淋巴细胞 (EML); 消化; 体外培养

中图分类号: S829.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2001)02-0013-04

## Preparation and Culture in Vitro of Endometrium Lymphocytes from Pregnant Rabbit

SHEN Wen-zheng<sup>1</sup>, JIN Ya-ping<sup>2</sup>, LI Yin-qian<sup>2</sup>, MA Yong-jiang<sup>2</sup>

(1. Yangling Vocational and Technical College, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China)

**Abstract** Comparative digestion of endometrium lymphocytes (EML) from pregnant rabbits and variance analysis showed that intact EML could be isolated from endometria digested with trypsin (2.5 g/L or 1.25 g/L) for 7 h 30 min to 8 h 55 min (0~4℃) and the activation of the lymphocytes could be affected by culture condition ( $P < 0.01$ ) or by that and trypsin concentration together ( $P < 0.05$ ). It can be concluded that digestion of endometrium with 1.25 g/L trypsin for 8~9 h (0~4℃) was the optimal condition for preparation of EML from pregnant rabbit and the activation of EML obtained could be conveniently tested with MTT assay after 48 hours of culture in vitro.

**Key words** Pregnant rabbit; Endometrium lymphocyte (EML); Digestion; Culture in vitro

子宫内膜淋巴细胞 (EML) 的制备和体外培养是研究哺乳动物妊娠期母-胎界面细胞免疫的重要手段。体外研究 EML 的关键在于消化子宫内膜时所用酶的浓度、消化温度、消化时间, 以及 EML 的培养条件。目前, 对人、山羊和鼠等动物妊娠期子宫内膜淋巴细胞的获取途径、活性检测及影响因素已进行了较深入的研究<sup>[1~7]</sup>, 但对孕兔 EML 的研究尚未见报道。本研究旨在探索制备孕兔 EML 的理想途径和 EML 体外培养的基本参数, 为确定孕兔 EML 的体外培养及活性检测方

案提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验动物和试剂

选健康青年母兔 2 只, 1 岁公兔 2 只, 按文献 [8] 中的方法安排本交配种, 用于试验。

胰蛋白酶溶液 (分 A1、A2、A3 三个浓度)、无钙镁缓冲盐溶液 (CMFS)、RPMI 1640 培养液、完全培养液 (CM)、MTT 溶液、SDS-DMF 溶液、平衡盐溶液 (BSS)、PHA 等, 均按文献 [6] 中

\* 收稿日期: 2000-01-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 39970544)

作者简介: 沈文正 (1963-), 男, 陕西岐山县人, 在职硕士, 副教授, 主要从事动物免疫及生殖毒理学研究与教学。电话: (029) 7032491

的方法配制

1.2 方法

1.2.1 孕兔子宫内膜的获取和消化 分别在配种后第 9天和第 22天无菌取出胎儿或胚泡明显的子宫,置于盛有 0.05 mol/L pH 7.2 PBS液(含双抗)的灭菌平皿中。沿大弯剪开子宫体及子宫角,剥除孕体,移入另一灭菌平皿。仔细剪取子宫内膜,移入灭菌的 50 ml烧杯中。加入含双抗的 PBS液,巴氏吸管吹吸洗涤 2~ 3次至液体清亮。吸弃上清液,加入 20 ml 5 mol/L EDTANa<sub>2</sub>, 37℃ 孵育 20 min,吸弃上清,重复 2~ 3次,至吸出液清亮。将组织块移入灭菌青霉素瓶,用弯头剪刀剪成 1~ 2 mm<sup>3</sup>的碎块。组织块经 BSS反复洗涤至液体清亮,静置片刻。吸弃上清液,将组织块移入加有玻璃珠的灭菌三角瓶内。按表 1中不同方案加入胰酶溶液,其量以能完全淹没组织块后

再补加 3~ 5 ml为度。

1.2.2 细胞分离 消化结束后,吸弃消化液,加入适量 CMFS 用力振摇三角瓶使组织打散,再加入 5% (v/v)胎牛血清 (FCS),依次用 200目和 400目滤网过滤,剩余组织用玻璃注射器芯挤压过网。离心滤液,吸弃上清。用含 10% (v/v) FCS 的 CMFS 洗涤 (1 000~ 1 500 r/min离心 2~ 3次),CMFS 混悬细胞。用淋巴细胞分离液常规分离淋巴细胞,以含双抗的 CMFS 洗涤 2次, RPMI 1640培养液洗涤 1次,CM 混悬。台盼蓝染色检查活性,以 CM 调节细胞密度为  $\times 10^6$  /ml,细胞活率 > 85%。

1.2.3 细胞培养及活化 将细胞悬液加入 96孔培养板,每孔 100 $\mu$ l,按表 1中 B1 B2两种培养方案在 CO<sub>2</sub> 培养箱 (WJ- 6D型)中 37℃ 饱和湿度培养。

表 1 孕兔 EML 的制备及体外培养条件

Table 1 Schedule for preparation and in vitro culture of EML from pregnant rabbit

孕兔编号 Rabbit No.	孕期 (d) Pregnancy duration	酶浓度分组 Trypsin concentration (g/L)	消化时间 (min) Digestion duration		消化结果 Digestion results	培养方案 Schedule for culture	培养时间 (h) Culture duration
			0~ 4℃	37℃			
1	9	5.0 (A1)	600	0	无完整活细胞	-	-
		2.5 (A2)	0	45	活细胞极少	-	-
2	22	2.5 (A2)	525	0	有较多活细胞	B1	48
						B2	72
		1.25 (A3)	535	0	有足量活细胞	B1	48
					B2	72	

“-”: 表示无法培养和测定 Impossible for testing

培养期间,用倒置显微镜观察兔 EML 的活化情况。培养完毕,各孔加入等量 MTT 液作用 6~ 8 h, SDS- DMF 溶液作用 18 h,然后用酶标仪 (DG5030型)于 570 nm 波长测定 OD 值,并进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 消化结果

1号兔子宫内膜经 A1浓度的胰酶消化后,组织较清亮,未发现活的淋巴细胞,经 A2组浓度的胰酶消化后,组织稍混浊,发现极少量淋巴细胞,无法培养。2号兔子宫内膜经 A2或 A3胰酶组消

化后,组织较粘稠,但无拉丝或胶冻样液层出现,并分离到 4 ml 密度为  $\times 10^6$  /ml 的 EML,台盼蓝染色法测得细胞活率为 85% 以上。

2.2 孕兔 EML 的培养及活化结果

2号兔 EML 培养 35 h 后显微镜观察,淋巴细胞明显增殖,数量多而分散,有少量 4~ 5个细胞组成的细胞丛,细胞较密集。观察还发现,在同样条件下 A3胰酶组的细胞比 A2组更密集,个别孔有 18个细胞围成的细胞丛。

测得 2号兔 EML 的 OD 值见表 2,方差分析结果见表 3。

表 2 2号孕兔 EML 的体外培养活性 (OD)

Table 2 Activity (OD) of in vitro cultured EML from pregnant rabbit

胰酶浓度 Concentration of trypsin	培养方案 Schedule for culture	OD 值 OD value					水平组总合 (T <sub>AB</sub> ) Total of trypsin group	水平组合平均 ( $\bar{X}_{AB}$ ) Average of trypsin group
		1.184	1.144	1.195	1.206	1.201		
A2 (2.5 g/L) (作用 8h 45 min)	B1	1.184	1.144	1.195	1.206	1.201	5.93	1.186
	B2	1.176	1.176	1.160	1.165	1.173	5.85	1.17
A3 (1.25 g/L) (作用 8h 55 min)	B1	1.215	1.202	1.215	1.217	1.213	6.062	1.212
	B2	1.164	1.162	1.159	1.184	1.160	5.829	1.166

表 3 2号兔 EML活化影响因素(酶浓度和培养时间)的方差分析

Table 3 Variance analysis of trypsin concentration and culture schedule in rabbit

变异原因 Difference source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F值 F
酶浓度 Trypsin concentration	0.00043	1	0.00043	1.95
培养方案 Culture schedule	0.00471	1	0.00471	21.4 <sup>*</sup>
组间 Groups	0.00136	1	0.00136	6.18 <sup>*</sup>
误差 Error	0.0035	16	0.00022	

表 3证明,单纯的酶浓度并不引起孕兔 EML活化作用的显著变化,酶浓度与培养方案交互作用,可引起孕兔 EML的活化作用出现显著的统计学差异( $P < 0.05$ ),而培养方案单独作用就可引起孕兔 EML活化作用极显著地改变( $P < 0.01$ )。表 2与表 3综合分析结果证明,A3酶浓度与 B1培养方案的组合最为可行。

## 3 讨论

### 3.1 EML制备方案

酶浓度 组织中分离活细胞的关键在于对组织的消化。胰酶对多种组织的消化能力较强,而且比胶原酶廉价,因而被多数研究者用于消化人和动物的子宫内或胎盘组织<sup>[1-3]</sup>。但是,胰酶浓度不同,对同一组织有着截然不同的消化效果。

用浓度为 5.0 g/L的胰酶 37℃消化小鼠子宫内 15~ 30 min,可使组织周边疏松拉丝,振荡后液体混浊,仅有少量丝状剩余组织,组织块无聚集,消化率达 85%以上,但离心分离后淋巴细胞活率 < 20%<sup>[3]</sup>。本试验在 0~ 4℃下采用浓度为 5.0 g/L的胰酶消化 10 h,未能得到完整的活细胞,这与上述结果基本一致,说明浓度为 5g/L的胰酶不适合消化制备鼠及家兔的子宫内淋巴细胞。

另一方面,曾用浓度为 2.5 g/L的胰酶 0~ 4℃消化小鼠子宫内 10 h,消化率为 75%~ 80%,所分离到的淋巴细胞活率 70%~ 80%<sup>[3]</sup>。本试验用浓度为 2.5 g/L及 1.25 g/L的胰酶在 0~ 4℃冰箱中消化兔子宫内 8 h 45 min至 8 h 55 min,均得到了足量的淋巴细胞。因此,2.5 g/L及 1.25 g/L的胰酶浓度可用来消化制备鼠类及家兔子宫内淋巴细胞。

消化温度及时间 为了获得人子宫内上皮

细胞和间质细胞,曾在 37℃下用 2.5 g/L胰酶消化 30 min,取得了理想的分离效果;获得的子宫内细胞还可用作与啮齿类早期胚胎细胞共培养<sup>[2]</sup>;在 37℃水浴中用 2.5 g/L胰酶及低浓度胶原酶混合液振荡消化 50~ 100 min,也能分离到正常的间质细胞及上皮细胞<sup>[4]</sup>。

小鼠子宫内也在经 37℃下用 2.5 g/L胰酶消化 15~ 30 min后,组织周边疏松拉丝,振荡后液体明显混浊,剩余组织呈块状或长丝状,部分聚集,消化率为 75%~ 80%,所分离细胞活率为 70%~ 80%<sup>[5]</sup>。但是,本试验在 37℃下用 2.5 g/L胰酶消化 45 min未得到足量的活细胞,与上述结果不同。这就提示,适当浓度的胰酶在 37℃的温度下对家兔子宫内的消化作用明显强于其它动物,消化的时间不容易控制。

在 0~ 4℃下,小鼠子宫内经 2.5 g/L胰酶消化 10 h后,组织周边疏松拉丝,振荡后液体明显混浊,消化率也达到 75%~ 80%,所得细胞活率达 70%~ 80%<sup>[5]</sup>。本试验在 0~ 4℃下用 2.5 g/L及 1.25 g/L胰酶消化孕兔子宫内 8~ 9 h,得到了同样满意的效果,而且细胞活率较高,为 85%以上。因此,0~ 4℃的消化温度及 8~ 9 h的消化时间对制备家兔子宫内淋巴细胞是比较合适的。对 2号兔的研究还发现,在 0℃环境下,孕兔子宫内经过 2.5 g/L及 1.25 g/L两个不同胰酶浓度的消化效果及其对细胞活化作用的影响在统计学上无显著差异。

### 3.2 EML的体外培养时间

由于所制备子宫内细胞的种类不同,培养条件及时间也不同。要将人子宫内间质细胞培养到完整贴壁,一般需要 3~ 6 d<sup>[4]</sup>,而间质细胞与上皮细胞的混合细胞要培养到完整贴壁,则需要 5~ 6 d<sup>[2]</sup>。EML为非贴壁细胞,妊娠小鼠及山羊 EML体外培养 66 h<sup>[3,5]</sup>后能正常活化。本试验将兔 EML体外分别培养 48 h和 72 h,细胞都能正常活化。但是,培养 72 h不仅用时较长,而且所得淋巴细胞的活性稍低。相反,48 h培养方案既节省时间,所得淋巴细胞活性又极显著地高于前者,因此,妊娠家兔的 EML以培养 48 h更为可行。

综上所述,用浓度为 1.25 g/L的胰酶 0~ 4℃消化 8~ 9 h,所得淋巴细胞体外培养 48 h是孕兔 EML分离及培养的可行方案。

## 参考文献:

- [1] 黄邱朝,庄恭南,武建国.人子宫内膜抗原的纯化与鉴定[J].免疫学杂志,1992,8(3): 182~ 183.
- [2] 张丽凤,盖凌,王春霞,等.人子宫内膜早孕蜕膜单层细胞及其条件培养液对小鼠早期胚胎发育的作用[J].生殖与避孕,1999,19(5): 296~ 300.
- [3] 靳亚平,王爱华,武浩,等.小鼠和山羊子宫内膜淋巴细胞的制备[J].动物医学进展,2000,21(3): 43~ 45.
- [4] 郝敏,石一复,周彩云,等.人子宫内膜的体外培养及生物学特性比较[J].生殖与避孕,1999,19(5): 301~ 304.
- [5] 靳亚平. CD58对山羊 PBL及妊娠期 IEL的活化作用[D].西北农林科技大学 1999届攻读博士学位研究生学位论文(毕业)论文,陕西杨陵,1999.
- [6] 刘曼丽,黄邓平,唐良美,等.母兔妊娠和哺乳期雌二醇、孕酮、促乳素变化及与适时配种的关系[J].中国养兔杂志,1996(2): 25~ 26.
- [7] 陈少先,沈珠军,郭彩云.妊娠及某些与妊娠有关激素对自然杀伤细胞活性的影响[J].中国养兔杂志,1990,6(2): 103.
- [8] 马新武,陈树林主编.肉兔生产技术手册[M].北京:中国农业出版社,2000. 182~ 184.

(上接第 12页)

2.2 配方施肥 豫玉 27高产栽培和施肥量试验表明,在中等肥力地块,要使单产达 9 000 kg/hm<sup>2</sup>以上,每公顷应施纯 N 225~ 300 kg, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 120~ 150 kg, K<sub>2</sub>O~ 180 kg, S 90 kg, ZnSO<sub>4</sub> 15kg 其中 N肥要在播后 25天施全部氮量的 30%,播后 45天施全部氮量的 75%。注意 N肥一定要深施。

2.3 科学供水 在出苗后拔节前(即出苗后 20天内)不浇水以促进根系发育,提高植株吸水肥能力及后期抗倒伏能力。拔节后至灌浆中期,特别是开花期要确保水分供应,灌浆后期玉米对水分的要求已不迫切,应防止土壤湿度过大,引起植株早衰。每次灌水前要在无大风大雨天气时方可灌溉,以防止浇后土壤软化,遇到大风引起倒伏。

2.4 精心管理 虫害防治:播种前应用甲基 1605粉或咪喃丹颗粒剂进行土壤处理以防治地下害虫。出苗后用

甲基 1605乳剂兑水 800倍喷雾以防止玉米旋心虫、棉铃虫、蓟马等苗期虫害。在大喇叭口期应用咪喃丹颗粒剂丢心防治玉米螟。

及早定苗: 3叶期间苗, 5叶期间定苗。间、定苗时要注意去除弱苗,保留生长健壮、整齐一致的苗。遇到缺苗处两侧选留大小一致的双株。在定苗后如发现个别过弱苗也要拔掉,以促进弱苗四周正常株生长。

中耕除草:开花前每次浇后及时中耕,中耕时要掌握苗旁浅行间深的原则,同时要特别注意在玉米茎基部多培土以防止倒伏。注意中耕时不要损伤玉米叶片及根系。

2.5 适时收获 豫玉 27的主要特点是活秆成熟、灌浆期长、千粒重高,所以,应改变苞叶发黄就收玉米的不良习惯,而是在籽粒胚乳灌浆线消失后(苞叶发黄后 7~ 10天)再收获,这样可充分发挥该品种的高产潜力。