

山羊子宫内腺上皮细胞的分离培养和鉴定

丰艳妮, 吴庆侠, 吴 瑞, 楚元奎, 靳亚平*

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

摘要: 为了探讨山羊子宫内腺上皮细胞的分离、生长条件以及纯度鉴定, 通过 2 g/L 的 I 型胶原酶置于水浴消化 4 h, 200 目的滤网过滤后进行低速离心, 收集沉淀物, 沉降洗涤 3~5 次, 将细胞移至 24 孔培养板置 37℃ 细胞培养箱中进行培养。12 h 后开始贴壁生长, 腺团开始向外部扩散, 生长 2~3 d, 细胞扩散并出现明显的铺路石状, 4~5 d 腺团基本扩散开来并呈一定走向继续生长。经免疫组织化学方法进行细胞染色, 细胞表达角蛋白的阳性率达 90% 以上。

关键词: 子宫内膜; 腺上皮细胞; 免疫组织化学; 鉴定

中图分类号: S827

文献标识码: A

文章编号: 1004 1389(2006)06 0012 03

Isolation, Culture and Identification of Endometrium Glands in Goats

FENG Yan ni, WU Qing xia, WU Rui, CHU Yuan kui and 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)

Abstract: This paper focus on find the method of endometrium glands' isolation, growth conditions and identification. Chipped the tissues into 1mm³, then digested 4 h with Collagenase I of 2g/L at 37. After filtered with 200 Sieve, gently centrifugalized and collected the sediments. Washing 3~5 times, then transfer them into 24 plate, cuture in 37℃. After 12 h, the glands begin to growth and extend, and become cobblestone 2~3 d later. For 4~5 d the glands fully extended and grow along certain way. Verified by immunocytochemical staining method, the results showed that the cells were positive for cytokeratin more than 90% of positive rate.

Key words: Endometrium; Glands; Immunocytochemical; Identification

子宫内膜腺上皮在胚胎发育过程中起着重要作用。啮齿类子宫腺体所分泌的白细胞抑制因子和降血钙素等因子是建立子宫容受性和胚胎附植所必需的^[1]。而其生长和分化也是在白血病抑制因子、血管内皮生长引子、表皮生长因子等作用下进行的^[2]。获得高纯度的子宫内膜腺上皮细胞是研究其在胚胎附植过程中所发挥作用的基础。为了进一步探讨山羊子宫内腺细胞的分离培养方法, 笔者对山羊子宫内腺上皮细胞进行体外培养并通过形态观察、免疫细胞化学等技术鉴定培养的内腺细胞, 以期能为胚胎附植、子宫局部免疫与

母体免疫系统的协调等机制研究提供试验基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

试验用山羊购自陕西省宝鸡市扶风县揉谷乡, 性成熟, 临床检查健康, 常规饲养, 发情周期正常。

1.2 主要试剂

合成培养基: DMEMP/HamF12 (Gibco), 加 HEPES 10~15 mmol/L (Sigma), 5% 的新生牛血清(四季青), 青霉素 200 IU/mL, 链霉素

收稿日期: 2006 04 28 修回日期: 2006 06 01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(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: 丰艳妮(1979-), 女, 山东日照人, 在读硕士, 主要从事家畜生殖内分泌方面的研究。

*通讯作者。

200 IU / mL pH 7.2~7.4, 过滤除菌, 4℃保存。胶原酶 I 型(Gibco), 活性 1:265, 用含 2% 血清的 DMEM / HamF12 液配成 2 g/L 的浓度, 过滤除菌, -20℃保存。胰酶(上海生工), 活性 1:250, 用不含血清的 RPMI1640 配成 2.5 g/L 的浓度, 过滤除菌, -20℃保存。固定液, 95% 的乙醇加入 1% 的冰醋酸, 常温保存。

Cytokeratin(角蛋白)和 Vimentin(波形蛋白)为博士德公司产品。SP 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。

1.3 组织消化

胶原酶消化 无菌采取山羊的子宫, 取一段子宫角, 置含有双抗的 D Hank's 平衡盐溶液中反复冲洗至子宫呈白色, 纵向剪开, 剪取子宫内腺层, 用 D Hank's 平衡盐溶液反复冲洗 3~4 次, 直至液体清亮。将其投入青霉素瓶, 剪成 1 mm³ 左右小块, D Hank's 平衡盐溶液冲洗 3~4 次, 移入带有玻璃珠的三角瓶中, 加入 2 g/L 的胶原酶 I, 37℃水浴消化 4 h。

胶原酶与胰酶结合消化 先加入 2.5 g/L 的胰酶 4℃消化 6 h, 小心吸出胰酶, 然后加入 2 g/L 胶原酶 I, 置 37℃消化 30 min。

1.4 细胞分离与培养

消化完毕, 用力振荡三角瓶, 使消化的组织成为混悬液, 过 200 目滤网, 过滤所得液体加入离心管, 500 r/min 离心 5 min, 收集沉淀物, 加入 10 mL D Hank's 液吹起细胞, 500 r/min 离心 3 min, 收集沉淀, 再加入 10 mL D Hank's 液吹起细胞, 使其自然沉降 5~8 min, 收集沉淀物, 如此反复沉降洗涤两次, 最后一次用无血清的 DMEM/P/HamF12 进行洗涤。最后加入适量培养液制成 1 mL 细胞悬液, 胎盼兰拒染法检测腺团的细胞活率, 调整活腺团浓度为 1600 个/mL, 移至 24 孔板, 每孔 0.5 mL, 用以观察其生长情况; 另外, 移至 35×10(mm) 的培养皿中, 每个培养皿 2 mL 用以进行免疫组化鉴定。将 24 孔板和培养皿置 37℃ 5%CO₂ 饱和湿度条件下培养。定期观察细胞贴壁和生长状况。培养 2~3 d 换液一次, 以后每 3 d 换液 1 次。

1.5 细胞鉴定

待培养皿中的细胞铺满皿底后, 用固定液将其固定 15 min, 分别用 Cytokeratin 和 Vimentin 做一抗, 按 SP 免疫组化染色试剂盒说明进行免

疫组化染色, 随后用 DAB 显色液进行显色, 苏木素复染, 显微镜下观察。凡细胞质呈深棕色的为阳性细胞, 否则为阴性细胞。

2 结果与分析

2.1 细胞分离结果

两种消化方式不同, 结果有所差异。应用 2 g/L 胶原酶进行热消化, 所得的腺细胞团比较大, 单个细胞比较少(图 1); 应用胶原酶和胰酶结合的冷热消化法, 得到的腺细胞团比只用胶原酶进行热消化所得的要小, 而且单个细胞比较多(图 2)。

2.2 细胞在体外的生长情况及其形态特点

细胞在接种 12 h 后, 开始贴壁生长, 2~3 d 后, 腺团向外扩散生长, 呈明显的铺路石状(图 1); 当其生长到第 4~5 d 后, 腺团基本上扩散开来, 并沿着一定的走向继续生长, 最后铺成单层细胞, 直至覆盖平皿底面。

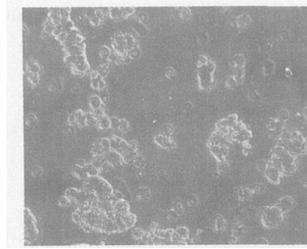


图 1 胶原酶消化(相差 400)

Fig. 1 Digested by collagenase (phase contrast 400×)

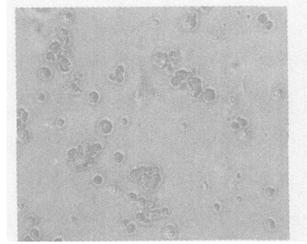


图 2 胶原酶和胰酶混合消化(相差 400)

Fig. 2 Digested by collagenase and enzyme (phase contrast 400×)

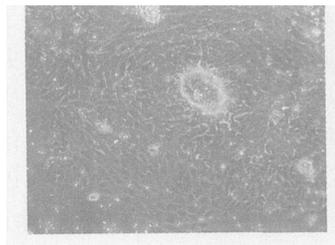


图 3 培养 3 d 的腺上皮(相差 200)

Fig. 3 3 days of glands (phase contrast 200×)

2.3 细胞鉴定结果

免疫细胞化学显示所培养的细胞均为角蛋白染色阳性(图 5), 而波形蛋白染色为阴性(图 6), 其阳性率大于 90%。阳性细胞胞质染为深棕色, 尤以核周色深, 胞核不着色。由此可见, 本试验所分离得到的细胞具有子宫内膜腺上皮细胞的标志特征。

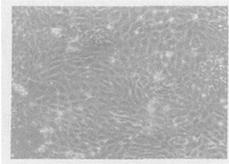


图 4 培养 5 d 的腺上皮(相差 200)

Fig. 4 5 days of glands (phase contrast 200×)

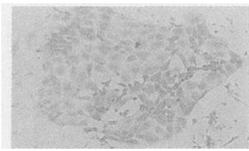


图 5 角蛋白染色阳性(400×)

Fig. 5 Positive for cytokeratin (400×)



图 6 波形蛋白染色阴性(400×)

Fig. 6 Negative for vimentin (400×)

3 讨论

为了研究胚胎在子宫内附植的机理, 人们对子宫内膜细胞的分离培养极为重视, 并且通过不同的方法进行人、鼠以及兔的子宫内膜的纯化, 为进一步的研究奠定基础。本试验根据山羊子宫内膜的特点, 结合其他子宫内膜培养方法, 对消化分离和纯化方面进行摸索, 得到纯度较高的子宫内膜腺体细胞。

首先, 本试验对消化方法加以筛选, 并选择了较好的分离纯化方法。胶原酶主要用于水解结缔组织中的胶原蛋白成分, 而胰蛋白酶主要用于消化细胞间质^[3], 因此, 腺团对胶原酶耐受可借此将其与其他细胞分离开来^[4]。另外, 也有人使用胰酶与 EDTA 共同来消化人子宫内膜, 以用于基质细胞和腺上皮细胞的共同培养^[5]。除此以外, 还有用胶原酶消化分离到腺上皮后, 再使用含 EDTA 的胰酶进行消化, 以建立单细胞悬液^[6]。本

试验结果表明, 用胰酶、胶原酶冷热结合法消化效果较好, 但腺团小, 不利于两种细胞的分离; 应用胶原酶于 37℃ 消化 4h 效果最好。

关于基质细胞和腺体上皮细胞的分离, 目前多采用 2 次过滤法, 即先将消化的混悬液过 100 目滤网, 除去粘液和未消化组织, 再过 400 目滤网, 反冲滤网获得腺团^[7]。也有报道说用 200 目滤网即可将兔的子宫内膜基质细胞与腺细胞分开^[8]。早在 1989 年, Osteen 根据细胞沉降速度不同来分离子宫内膜的两种细胞^[9]。本试验在前人的基础上加以改进, 用过滤和细胞沉淀相结合的方法来进行细胞分离, 可获得纯度高于 90% 的腺上皮细胞。

本试验中山羊子宫内膜腺上皮细胞的生长情况随着山羊所处的不同生理时期有所差异, 这主要是由于机体内的细胞因子和激素等因素作用的结果, 至于其如何发挥作用, 还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Allison Gray C, Frank F Bartol, Becky J Tarleton, *et al.* Developmental Biology of Uterine Glands[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 65: 1311~1323.
- [2] Joanne Hempstock, Tereza Cindrova Davies, Eric Jauriaux, *et al.* Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: A morphological and immunohistochemical study[J]. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2004, 2: 58.
- [3] 薛庆善主编. 体外培养的原理与技术(第 1 版)[M]. 北京: 科技出版社, 2001. 94~95.
- [4] Ian Freshney. *Culture of Animal cells: a Manual of Basic Technique*[M]. 北京: 科学出版社出版, 2004.
- [5] 王小敏, 黄海鹏, 何福仙. 简易人子宫内膜细胞培养法及其优点[J]. *赣南医学学报*, 2002, 22(3): 256~258.
- [6] 王小青, 闫丽隽, 郭述真. 子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞的分离培养[J]. *山西医药杂志*, 2004, 33(8): 637~639.
- [7] Julia T Arnold, David G Kaufman, Markku Seppala, *et al.* Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co culture model[J]. *Human Reproduction*, 2001, 16(5): 836~845.
- [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*, 2004, 32(6): 1~4.
- [9] 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.