

小鼠子宫内膜上皮细胞的分离和原代培养*

张勇法¹, 杨建英², 秦翠丽¹

(河南科技大学: 1. 食品与生物工程学院; 2. 医学技术与工程学院, 河南洛阳 471003)

摘要:目的 建立一种高效的子宫内膜上皮细胞分离和体外培养方法, 为子宫疾病的发病机制或治疗药物筛选的进一步研究提供一个比较理想和有价值的实验模型。方法 用酶消化、过滤、离心与差速贴壁纯化相结合的方法分离培养小鼠子宫内膜上皮细胞, 以上皮细胞角蛋白为抗原的免疫荧光法对分离培养的细胞进行纯度鉴定。结果 小鼠子宫内膜上皮细胞培养 4~5 h 后细胞可以贴壁生长; 24 h 时细胞即可生成单层, 排列紧密, 呈长、圆或多角形生长, 呈角蛋白阳性, 胞质呈棕色, 核呈蓝色, 纯度达 95% 以上。结论 该方法能够成功分离并得到高产量、高纯度、高增殖能力的子宫内膜上皮细胞。

关键词: 细胞培养技术; 子宫内膜; 上皮细胞; 小鼠

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)22-2236-02

Isolation and primary culture of uterus endometrial cells of mice

Zhang Yongfa¹, Yang Jianying², Qin Cuili¹

(1. College of Food and Bioengineering; 2. College of Medical Technology and Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: Objective To establish an efficient method of separation and culture of mouse uterus endometrial epithelial cell in vitro, and to provide an ideal and valuable experimental model for further study of the pathogenesis of uterine disease or drug screening. Methods Uterus endometrial epithelial cells were isolated and purified by digestion of trypsin, centrifugation and differential adherence, and observed by light microscope and identified by immunocytochemical stain, and the purity was also analyzed by immunofluorescence method with cytokeratin as the antigen. Results High purity epithelial cells (>95%) were obtained; the epithelial cells became adherent after 4-5 hours' culture, formed monolayer cell colony after culturing 24 hours and were positively stained by anti-cytokeratin antibody; the cells presented egg-shape, the cytoplasm showed red color, and the nucleus blue. Conclusion Mouse uterus endometrial cells of high outcome, high purity and high proliferation can be obtained by this method.

Key words: cell culture techniques; endometrium; epithelial cells; mice

子宫组织由上皮细胞、基质细胞以及平滑肌细胞组成, 是雌性哺乳动物孕育胎儿的器官, 在生殖活动中占有重要地位, 体外培养的子宫细胞可以作为胚胎和胚胎干细胞系的饲养层^[1-2]。随着组织工程学的发展, 体外构建组织工程子宫片层已成为现实^[3], 为进一步研究子宫疾病和胚胎着床提供了更理想的实验模型。而以上研究均需要大量的、高纯度的子宫细胞, 国内外学者对子宫细胞的分离、培养方法进行了大量研究。1989 年, Osteen 等^[4]根据细胞沉降速度不同分离得到子宫细胞; 张芳婷等^[5]采用 74 μm(200 目)和 35 μm(350 目)的滤网过滤 2 次, 获得纯度较高的人子宫细胞; Fernandez-Shaw 等^[6]将悬浮的子宫内膜细胞吸附在用抗体包被的免疫磁珠上, 也成功分离了子宫细胞, 但以上方法均有不足。为了建立一种更有效的子宫内膜上皮细胞分离、培养方法, 本实验采用酶消化、过滤、离心与差速贴壁纯化相结合的方法, 对小鼠子宫内膜上皮细胞进行了分离、培养及鉴定, 以期对子宫相关疾病及胚胎和胚胎干细胞的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 雌性昆明小鼠(体质量约 25 g, 临床健康)购于郑州大学实验动物中心, 动物合格证号: 医动字第 410116 号。适应性饲养 1 周后按实验要求处理。动物饲养环境: 光

照/黑暗时间比例是 12 h : 12 h, 自由饮水和采食。

1.1.2 试剂及仪器 细胞培养液为 DMEM-F12(Gibco, USA)、10%胎牛血清(杭州四季青生物工程公司)、青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 U/mL(华北制药有限公司); 10 μg/L 牛胰岛素(Sigma 公司产品); 5 μg/L 表皮生长因子(Sigma 公司产品); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS, 自配); 孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG, 宁波激素制剂有限公司产品); 兔抗人的角蛋白多克隆抗体工作液(Novacastra, UK); 1 g/L I 型胶原酶液为 I 型胶原酶(Gibco, USA)用无 Ca²⁺、Mg²⁺的 PBS 配成 1 g/L 质量浓度; CO₂ 培养箱(美国 Forma 公司产品); BX51 相差显微镜(日本 Olympus 公司产品); DMIRN 荧光显微镜(德国 Leica 公司产品); BD Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司产品)等。

1.2 小鼠子宫的采集 实验采用 2 月龄昆明雌性小鼠(体质量约 25 g), 饲养于光控(12 h/d, 8:00~20:00)和温控[(22±1)℃]的环境。动物可以自由饮水和采食。适应饲养 1 周后, 选发情间期或发情前期的小鼠腹腔注射 5 IU PMSG, 48 h 后注射 5 IU hCG 超排; 然后自然交配, 次日早检查阴栓(hCG 注射后 16~18 h), 有栓即为第 1 天(d1)。d4 早(8:30~9:30)颈椎脱臼处死, 用 75%酒精消毒腹部, 打开腹腔取双侧

* 基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目(112102310144); 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011B310004); 河南科技大学博士科研启动基金资助项目(09001404 & 09001285)。

子宫,置无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 中,备用。

1.3 小鼠子宫内膜上皮细胞的分离和原代培养 (1)颈部脱臼法处死妊娠第 4 天(d4)的孕鼠,在无菌条件下摘取小鼠的子宫;(2)在超净工作台上将子宫组织在无钙、镁的 0.01 M PBS 中洗去血块和黏液,在低倍解剖镜下用眼科剪去除组织周围的脂肪块和血管;(3)在解剖镜下沿子宫腔将其纵向切开,内膜面朝上展平于培养皿中。加入 1 g/L I 型胶原酶消化液,37 °C 消化 30 min,其间可振荡数次;(4)消化结束后轻轻敲打组织块,挑出大块组织,按 10% 的浓度加入胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)或培养液终止消化,将消化后的细胞悬液经 150 μm 筛网过滤,除去黏液和未消化的组织,将消化液转移至含 10 mL PBS 的离心管中静置 10 min;(5)弃去上层液,下层液 500 \times g 离心 10 min;离心结束后弃去上清液,而后血清培养液重新悬浮细胞,500 \times g 离心 10 min。重复此操作清洗细胞 2 次;(6)检查细胞悬液中细胞密度,并将其密度调整到 5×10^5 个细胞/mL;(7)以 0.5 mL/孔将细胞接种于 24 孔培养板中,置入 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培养。

1.4 细胞形态观察 用倒置显微镜观察细胞贴壁生长情况。

1.5 小鼠子宫内膜上皮细胞免疫组化纯度鉴定 (1)将子宫上皮细胞接种于多聚赖氨酸包被的盖玻片上,放入 CO_2 培养箱中培养;(2)待细胞单层形成以后取出盖玻片,用预冷的 PBS 漂洗 2 次;(3)在含有 4% 多聚甲醛的 PBS 液中室温下固定 30 min;(4)用含 3% H_2O_2 的 PBS 在室温下封闭 30 min;(5)取出盖玻片在 PBS 中洗 3 次,每次 5 min,擦去边缘多余水分;(6)添加 10% 的正常羊血清,室温下在湿盒内放置 40 min;(7)轻轻甩掉血清,添加一抗工作液,置于湿盒内 4 °C 孵育过夜;(8)次日将盖玻片在 PBS 中漂洗 3 次,每次 5 min,擦干边缘水分;(9)加稀释好的生物素标记的羊抗兔 IgG(GAR-B, 1:150),放于湿盒内室温孵育 2 h;(10)将盖玻片在 PBS 中漂洗 3 次,每次 5 min,擦干边缘水分;(11)加稀释好的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的链霉亲和素(SP-HRP, 1:200),放于湿盒内室温孵育 2 h;(12)将盖玻片在 PBS 中漂洗 3 次,每次 5 min,擦干边缘水分;(13)加入 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidin, DAB)显色液,显微镜下控制显色的强度;(14)苏木精染液进行复染,10 s 后,于自来水中漂洗 5 min;(15)用 30%、50%、70%、95%、100% 的梯度酒精脱水(组织块脱水时间:30%、50%、70% 各 2 min,100% 5 min),二甲苯透明后中性树胶封片。

2 结果

2.1 小鼠子宫内膜上皮细胞的形态特点及生物学特性 培养 4~5 h 后细胞可以贴壁生长,24 h 细胞即可生成单层,单层细胞排列紧密,呈长、圆或多角形生长(图 1)。

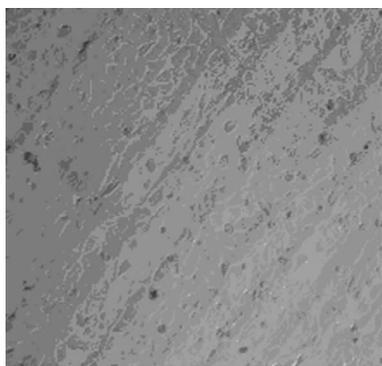


图 1 显微镜下小鼠子宫内膜上皮细胞形态($\times 20$)

2.2 小鼠子宫内膜上皮细胞免疫组化纯度鉴定结果 角蛋白阳性反应主要存在于细胞质,染色为棕色,主要分布在胞质区域,细胞核在苏木精复染后呈蓝色(图 2)。细胞纯度大于 95%。

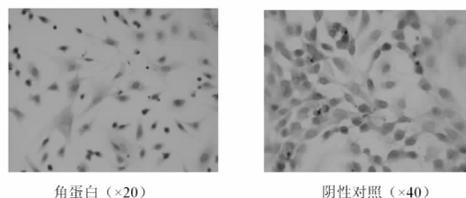


图 2 小鼠子宫内膜上皮细胞免疫组化鉴定结果

3 讨论

子宫细胞的分离方法有多种,常因研究目的不同而方法各异。对于纤维含量较高的子宫组织而言,常用的方法是酶消化法,一般多应用胶原酶^[7-10],也有学者加入 0.15 g/L DNA 酶^[9,11],在细胞纯化方面,只利用离心法分离上皮细胞和基质细胞,效果较差^[12]。戈一峰等^[13]利用基质细胞较上皮细胞贴壁早的特点纯化基质细胞和上皮细胞。然而,上述各方法所制备的细胞的纯度均有待提高。本实验参照上述方法,在此基础上进行改良,采用胶原酶消化、过滤、离心与差速贴壁纯化加以糅合,大大提高了培养细胞的纯度,纯度高达 95% 以上。

有文献报道上皮细胞不能传代^[14-15],本实验所获得的原代细胞均能传代,一般 3 代以内细胞活力最强,生长良好,7 代以后细胞开始老化或凋亡。主要原因可能在于消化时所用的酶不同、培养液配方不同等因素所致。

结果表明,本研究采用酶消化、过滤、离心与差速贴壁纯化相结合的方法,分离培养的小鼠子宫内膜上皮细胞生长良好,经角蛋白抗体鉴定纯度较高,提示该方法能够分离得到高产量、高纯度、高增殖能力的子宫内膜上皮细胞并成功实现体外原代培养。

本研究建立的子宫内膜上皮细胞分离和体外培养方法,能够成功获得高产量、高纯度的细胞。该方法的建立在临床中具有显著的意义,可用于妇产科、生殖医学等多种研究领域。通过子宫内膜上皮细胞体外培养系统,观察各种激素、细胞因子及药物对子宫内膜的作用,在妇产科疾病的诊疗研究中占有重要的地位。子宫内膜上皮细胞的体外培养模型为研究子宫内膜异常出血、胚胎不能正常着床等子宫疾病的发病机制及药物治疗提供了重要的理论依据。

参考文献:

- [1] Jung BL, Jeung EL, Jong HP, et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition[J]. Biol Reprod, 2005, 72 (1): 42-49.
- [2] Gargett CE, Chan RW, Schwab KE. Endometrial stem cells [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2007, 19(4): 377-381.
- [3] 王和平, 宋宇轩, 江红. 组织工程化子宫片层构建的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2006, 31(4): 342-345.
- [4] Osteen KG, Hill GA, Hargrove JT, 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.
- [5] 张芳婷, 宋天保, 王介东. 人子宫内膜基(下转第 2240 页)

区县由 2001 年的 47.50%(19/40) 提高到 2007 年的 95.00%(38/40)^[1], 2009 年和 2010 年上半年的合格碘盐食用率监测 40 区县均超过 90%, 达到考核评估要求, 显示防治工作取得显著成效。

尿碘作为评价人体碘营养状况的一项定量指标, 可通过尿碘监测反映本地区碘营养状况, 本调查结果显示, 儿童尿碘中位数为 247.20 $\mu\text{g/L}$, 与 2002 年 (238.75 $\mu\text{g/L}$) 和 2005 年 (266.65 $\mu\text{g/L}$) 的监测结果相似^[1-7], 说明人群碘营养充足。WHO 提出: 尿碘中位数 100~200 $\mu\text{g/L}$ 为适量碘摄入; >200~300 $\mu\text{g/L}$ 为超足量碘摄入; >300 $\mu\text{g/L}$ 为碘过量, 但是全市儿童尿碘大于 300 $\mu\text{g/L}$ 者占 37.10%, 有 7 个区县中位数大于 300 $\mu\text{g/L}$, 是否预示着盐碘加入过量, 有待进一步研究确定。

本次碘缺乏病评估表明, 重庆市合格碘盐食用率、尿碘中位数均达到国家消除碘缺乏病考核评估要求, 因此应该进一步加强碘盐供应和市场非碘盐的监督管理, 继续加强盐碘、尿碘监测, 保卫多年来所取得的胜利果实。食盐加碘是防治碘缺乏病经济、简便易行的措施, 我国实施全民食盐加碘后, 人群碘营养水平显著改善, 我国学者提出碘过量对儿童甲状腺肿和甲状腺功能亢进发病升高的影响值得高度重视^[8-9]。就碘缺乏病病因来讲, 不只是缺碘的问题, 还与蛋白质缺乏密切相关, 故认为我国碘缺乏病发病率的不断下降, 不仅是食盐加碘一方面的作用, 还与经济的发展、群众生活水平的提高、蛋白质营养的不断改善有着密切的关系。如尿碘中位数一直维持在较高水平, 居民生活水平不断提高, 蛋白质摄入量加大, 就应考虑降低盐中加碘浓度^[10-12], 以免造成碘营养过剩, 造成碘性甲亢等, 应通过流行病学调查建立符合本地居民的补碘体系^[13-14]。

参考文献:

- [1] 刘俊, 王润华, 肖邦忠, 等. 重庆市普供碘盐 8 年防治碘缺乏病效果评价[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(12): 1245-1248.
- [2] 肖邦忠, 廖文芳, 陈静, 等. 重庆市基本消除碘缺乏病评估结果分析[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(10): 1087-1091.
- [3] 国家质量技术监督局. GB/T13025. 7-1999 制盐工业通用试验方法碘离子的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 1-3.
- [4] 中华人民共和国卫生部. WS/T107-2006 尿中碘的铀钼催化分光光度法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006: 1-3.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB16006-2008 碘缺乏病消除标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008: 1-6.
- [6] 陈亚林, 罗兴建, 吴成果, 等. 重庆市 2001~2007 年碘盐监测分析[J]. 现代预防医学, 2006, 25(7): 94.
- [7] 肖邦忠, 廖文芳, 李心术, 等. 重庆市普供碘盐 5 年防治碘缺乏病效果观察[J]. 中国地方病学杂志, 2003, 22(5): 424-425.
- [8] 于志恒, 刘守军, 朱惠民, 等. 碘和甲状腺肿流行规律的发现、检验和建立[J]. 中国地方病学杂志, 2004, 23(3): 195-197.
- [9] 肖邦忠, 廖文芳, 李心术, 等. 重庆市人群甲状腺功能亢进发病情况调查分析[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(5): 602-605.
- [10] 王刚平, 张行钦, 张沛女. 舟山海岛女中学生碘营养状况监测分析[J]. 中国预防医学杂志, 2008, 9(5): 406-408.
- [11] 肖邦忠. 西部地区食盐加碘后碘缺乏病变化特点与影响因素[J]. 重庆医学, 2010, 39(14): 1787-1788.
- [12] 张婷, 肖邦忠, 李心术, 等. 重庆地区食盐加碘含量下调的可行性研究[J]. 广东微量元素科学, 2010, 17(6): 17-22.
- [13] 滕晓春, 滕笛, 单忠艳, 等. 碘摄入量增加对甲状腺疾病影响的 5 年前瞻性流行病学研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2006, 22(6): 512.
- [14] 滕晓春, 滕卫平. 碘过量与甲状腺疾病[J]. 实用医院临床杂志, 2007, 4(5): 5.

(收稿日期: 2010-12-03 修回日期: 2011-04-18)

(上接第 2237 页)

- 质细胞和腺体细胞的分离培养及鉴定[J]. 解剖学报, 2001, 32(3): 238-240.
- [6] Fernandez-Shaw S, Shorter SC, Naish CE. Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres[J]. Hum Reprod, 1992, 7(2): 156-161.
 - [7] 宿爱琴, 糜若然, 涂持坤, 等. 高纯度子宫内膜细胞分离和体外培养技术及其应用[J]. 医学研究生学报, 2002, 15(2): 115-117.
 - [8] 许艳丽, 杨卓, 陈英汉, 等. 人子宫内膜异位症在内膜间质细胞原代培养方法探讨[J]. 中国全科医学, 2009, 12(18): 1669-1672.
 - [9] Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, et al. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium[J]. Biol Reprod, 2009, 80(6): 1136-1145.
 - [10] 谯建, 令狐华, 姚紫薇. 子宫内膜异位症体外细胞模型的建立[J]. 重庆医学, 2007, 36(24): 2540-2543.
 - [11] Overton CE, Barolow DH, Fernandez, et al. In vitro culture of endometrial stromal and gland cells as a model for endometriosis: the effect of peritoneal fluid on proliferation[J]. Fertil Steril, 1997, 67(1): 51-56.
 - [12] 张宏, 赵昀, 李亚里, 等. 人离体子宫内膜细胞培养方法的建立[J]. 军医进修学院学报, 2002, 23(3): 192-194.
 - [13] 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.
 - [14] 王小青, 闫丽隽, 郭述真. 子宫内膜腺上皮及基质细胞的分离培养[J]. 山西医药杂志, 2004, 33(8): 637-639.
 - [15] Garewal HS, Leibovitz A, Sampliner RE, et al. Tissue culture of epithelial cells from esophageal specialized columnar epithelium (Barretts esophagus) [J]. Dig Dis Sci, 1992, 37(4): 532-536.

(收稿日期: 2010-10-12 修回日期: 2011-03-27)