

· 基础研究 ·

小鼠子宫内膜基质细胞分离培养及鉴定

王庆跃, 李 丹, 魏莎莉[△], 张 丽

(重庆医科大学干细胞与组织工程研究室 400016)

摘 要:目的 寻求一种简便有效的早孕小鼠子宫内膜基质细胞的培养方法。方法 采用胰蛋白酶消化与机械振荡相结合分离小鼠子宫内膜基质细胞,接种后通过光镜观察其形态学特征,并采用免疫细胞化学进行细胞鉴定。结果 接种 24 h 后大部分细胞已贴壁,培养 3 d 后细胞排列紧密、形态为长梭形。经过免疫细胞化学鉴定,成功获得了小鼠子宫内膜基质细胞。结论 胰蛋白酶消化与机械振荡相结合可成功分离并原代培养小鼠子宫内膜基质细胞。

关键词:子宫内膜;间质细胞;胰蛋白酶;振动;小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.34.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)34-3472-02

Isolation, culture and identification of mouse endometrial stromal cells

Wang Qingyue, Li Dan, Wei Shali[△], Zhang Li

(Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To seek a simple and effective way to culture endometrial stromal cells from mice in early pregnancy. **Methods** Stromal cells from mouse endometrium were isolated by combination of trypsin digestion and mechanical vibration. Their morphological characteristic were observed by optical microscopy after seeding, and the cellular identification was performed using immunocytochemistry. **Results** Most cells became adherent 24 hours after seeding, and they were tightly packed with long spindle-shaped morphology after 3 days of culture. Mouse endometrial stromal cells were successfully cultivated which was indentified by immunocytochemistry. **Conclusion** Mouse endometrial stromal cells can be successfully isolated and primary cultured by means of combination of trypsin digestion and mechanical vibration.

Key words: endometrium; stromal cells; trypsin; vibration; mice

胚胎植入的各个阶段均涉及胚胎与母体子宫之间极其复杂精细的调控作用,包括胚胎植入、定位和附着于腔上皮、细胞外基质的广泛性降解和重塑、由滋养层细胞介导下侵入到母体子宫内膜细胞中和那些介导母体子宫内膜细胞间反应的分泌因子等^[1-3]。胚胎着床是妊娠成功的关键,其过程包括正常发育的胚泡脱去透明带,胚泡在子宫内膜的迁移、定位和黏附,胚泡滋养层向子宫内膜的侵入和子宫内膜的蜕膜化胎儿的免疫保护^[4],对其机制及调控研究是开展辅助生殖的技术基础,而建立胚胎着床的体外培养模型是研究着床机制及其影响因素必不可少的工具。正常的子宫内膜由单层柱状上皮细胞和固有层组成。柱状上皮主要有具有分泌功能的子宫内膜腺上皮细胞构成;固有层的结缔组织细胞称为子宫内膜基质细胞,与网状纤维和基质等构成间质^[5]。至今,国外已有不少关于建立动物胚胎与各种体细胞共培养系统的报道,但是很少有动物胚胎与基质细胞共培养系统的报道,尤其是小鼠胚泡与小鼠基质细胞共培养的报道。小鼠作为一种模式生物,具有繁殖快、周期短等特点,且其生殖过程与人类相似,因此研究其生殖变化有助于研究人类生殖过程的研究。基质细胞作为子宫内膜组织中一种细胞,在胚泡着床窗口期发挥着极其重要的作用。要研究基质细胞与胚泡之间的相互作用,就必须建立基质细胞和胚泡的共培养体系。但是由于小鼠基质细胞的分离比较困难及其培养方法尚有待改进,至今尚未建立基质细胞与胚泡的共培养体系。由于小鼠胚泡着床窗的时间是孕 4~5 d,因此,本研究选择孕 4 d 的小鼠子宫内膜进行基质细胞的分离和培养,

并对其分离困难、分离的数目少及活力低等进行了改进。

1 材料与方法

1.1 材料 动物:清洁级 NIH 小鼠,6~8 周龄,体质量 25~30 g,购自重庆医科大学动物实验中心,合格证号为 SCXK(渝)20070001。选择性成熟的雌鼠,前一晚与雄鼠合笼交配(每笼按雌:雄比例 2:1),次晨发现有阴栓者为妊娠第 1 天(D1)。试剂:DMEM/F12 固体粉末购自 GIBCOL,胎牛血清购自杭州四季青,Trypsin 购自 Sigma 公司,自配 PBS(1L 配方:NaCl 7 g,Na₂HPO₄ 9 g,NaH₂PO₄ 0.5 g)。免疫组化试剂购自晶美生物工程有限公司,基质细胞鉴定抗体波形蛋白购自中杉公司。主要仪器设备:超净工作台、离心机、倒置显微镜、CO₂ 恒温培养箱。

1.2 方法

1.2.1 子宫内膜基质细胞分离和原代培养 主要参照 Mc-Cormack 和 Glasser^[6]的分离及培养方法,并加以改良。取妊娠 D4 的雌鼠,采用颈部脱臼处死小鼠,迅速无菌取出子宫,放入培养皿中,去除子宫周围脂肪组织后,用 PBS 冲洗干净,去除血渍,随后在另一培养皿中沿子宫长轴剖开,用预冷(4℃) PBS 冲洗,冲洗完之后,放入含预冷(4℃)的 1 mL 0.25% 胰蛋白酶-0.05% EDTA 的离心管中,4℃ 消化 2 h,37℃ 消化 30 min,37℃ 消化时前 10 min 振荡 1 次,随后 20 min 每隔 5 min 振荡 1 次。加入预热 0.3 mL 胎牛血清终止酶反应,吹打 2 min,再静置 1 min,随后加入 8 mL PBS 并反复吹打后去除子宫组织,600 r/min 先离心 5 min,将液体转移至另一离心管中,

[△] 通讯作者, Tel: (023) 68485001; E-mail: zzw007cn@yahoo.com.cn.

再 1 000 r/min 离心 10 min。倒去上清液。调整细胞浓度为 1.0×10^6 /mL, 接种到 24 孔培养板中培养。置 37 ℃、0.5% CO₂ 饱和湿度条件下培养中培养。12 h 后换液, 去除未贴壁的杂细胞。

1.2.2 基质细胞的鉴定及纯度鉴定 将所提取的细胞种植到含有盖玻片的 24 孔培养板中培养, 待细胞爬满 80% 左右时, 进行免疫细胞化学染色。以 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, 一抗(1:50)4 ℃ 孵育过夜处理, 生物素标记二抗 37 ℃ 孵育 30 min, 辣根过氧化物酶(HRP)标记链亲和素 37 ℃ 孵育 20 min, 二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木精复染, 中性树胶封固。每组染色均以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。

2 结 果

2.1 子宫内膜基质细胞生长状况显微观察 倒置显微镜下观察发现, 酶消化后的子宫内膜明显变薄, 变得疏松, 消化液变得浑浊, 所获得的细胞大部分呈单个分散的圆形细胞, 几乎无细胞团。基质细胞于接种 0.5 h 后开始贴壁, 接种 24 h 后大部分细胞已贴壁, 细胞呈短梭形或多角形(封 3 图 1)。培养 3 d 后细胞生长旺盛, 大部分为长梭形, 几乎无多边形细胞, 基本上铺满培养板(封 3 图 2), 可以连续培养 5 d, 不可以传代。

2.2 基质细胞鉴定及纯度鉴定 采用对基质细胞特异的波形蛋白抗体和对上皮细胞特异的细胞角蛋白进行免疫细胞化学染色。波形蛋白的阳性染色为棕黄色, 主要分布在细胞质区域; 阴性对照的细胞区域均无阳性反应(封 3 图 3), 上皮细胞鉴定结果见封 3 图 4、5。显微镜下随机选取 5 个不同的区域, 计数不同区域内的细胞总数和免疫染色阳性细胞数, 统计结果表明, 提取的基质细胞纯度为 $(93.8 \pm 0.5)\%$ 。

3 讨 论

3.1 胰蛋白酶的消化时间 国内外学者多采用多酶(胶原酶加胰蛋白酶)消化子宫内膜^[7-9], 步骤繁琐, 消化时间不一, 细胞损失较多, 容易污染。本研究采用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 单酶消化并比较了不同消化时间后所获得的细胞情况。4 ℃ 消化 2 h, 37 ℃ 消化 20 min 后, 所得的消化液比较清亮, 子宫内膜比较完整, 细胞数较少, 但是活力高, 易贴壁, 生长较慢; 4 ℃ 消化 2 h, 37 ℃ 消化 30 min 后, 子宫内膜完全松弛, 所得的消化液较混浊, 细胞数较多, 活力高, 易贴壁, 生长较快; 4 ℃ 消化 2 h, 37 ℃ 消化 40 min 后, 子宫内膜已成糊状且出现许多零散的组织, 所得的消化液非常混浊, 细胞数非常多, 但是细胞活力低, 不易贴壁, 生长慢。

3.2 子宫内膜组织的处理 本研究通过对子宫内膜完整消化、剪碎消化和纵向剖开消化比较发现, 完整消化的时候, 细胞数目较少, 但是细胞活力较高, 贴壁比较早, 生长比较快; 而采用对子宫内膜剪碎消化时, 细胞数目比较多, 但是细胞活力低, 不易贴壁。产生这样的原因可能是由于机械剪切, 导致细胞损伤, 再过二次筛网后, 细胞又受到筛网的切割, 导致细胞活力低, 不易贴壁。采用纵向剖开消化时, 可以综合其他二者的优点。本研究采用子宫内膜纵向剖开消化后, 减少了细胞的机械损伤。在 37 ℃ 时, 定时振荡的目的是促使酶与组织充分接触、缩短胰蛋白酶的作用时间、提高细胞活力及增加胰蛋白酶对子

宫内膜深层的消化。

3.3 基质细胞的纯化 国内外大多数学者都采用过筛网来纯化, 但是在过筛网的过程中, 易使细胞破裂, 导致死细胞增多, 细胞活性下降, 且易污染。本研究采用分级离心(上皮细胞多为细胞团, 而基质细胞多为单个细胞, 二者离心即可分离), 分离出基质细胞, 这样既有利于纯化基质细胞, 还可减少基质细胞的机械损伤, 保持细胞活力。同时, 利用贴壁纯化技术(基质细胞和上皮细胞不同的贴壁时间: 基质细胞 30 min, 上皮细胞 2~24 h)进一步纯化细胞。

综上所述, 本实验采用胰蛋白酶消化法和分级离心法相结合的方法, 实验步骤简捷, 减少细胞污染、细胞的损失及细胞的机械损伤, 基质细胞的形态学及免疫细胞化学技术鉴定结果可靠^[7,10], 可获得了大量活力高且较纯的子宫内膜基质细胞, 这不仅为子宫内膜基质细胞的生物学研究打下基础, 而且还为胚胎体外共培养的研究提供大量的饲养层细胞。

参考文献:

- [1] Carson DD, Bagchi I, Dey SK, et al. Embryo implantation[J]. Dev Biol, 2000, 223(2): 217-237.
- [2] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation[J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(6): 731-746.
- [3] Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, et al. PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors[J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(5): 317-322.
- [4] 王琳. 白血病抑制因子与胚胎着床[J]. 重庆医学, 1999, 28(6): 468-469.
- [5] 史小林. 人类生殖学[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 41.
- [6] McCormack SA, Glasser SR. Differential response of individual uterine cell types from immature rats treated with estradiol[J]. Endocrinology, 1980, 106(5): 1634-1649.
- [7] Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, et al. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model[J]. Hum Reprod, 2001, 16(5): 836-845.
- [8] 宿爱琴, 糜若然, 张双革, 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.
- [9] 谭先杰, 刘东远, 郎景和, 等. 子宫内膜上皮及间质细胞分离培养作为子宫内膜异位症体外细胞培养模型的探索[J]. 现代妇产科进展, 2002, 11(1): 30-32.
- [10] 王丽, 周剑萍, 张炜, 等. 小鼠容受性子宫内膜上皮细胞和基质细胞的共培养[J]. 生殖与避孕, 2002, 22(5): 259-262.

(收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-07-12)