

兔羊膜上皮细胞的体外培养和增殖

金玲 陈剑* 吴静¹ 周清 刘小勇 赵芳 徐锦堂¹ 赵松滨¹(暨南大学附属第一医院眼科, 广州 510632; ¹暨南大学医学院眼科研究室, 广州 510632)

摘要 研究妊娠晚期兔羊膜上皮细胞(amniotic epithelial cells, AECs)在体外生长和增殖特性。取妊娠晚期兔(27-28E) AECs 进行体外培养, 光镜、扫描电镜下观察后, 利用免疫组化单克隆抗体 AE1/AE3、AE5 检测培养的 AECs 中细胞角蛋白的表达, 并采用流式细胞仪检测表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和血清对 AECs 细胞周期的影响。结果表明妊娠晚期兔 AECs 在体外培养条件下生长良好、增殖旺盛; 单克隆抗体 AE1/AE3、AE5 染色阳性; 血清组、EGF 组和联合应用组分别与对照组比较, 各周期细胞比例发生变化, G₀/G₁ 期减少, S 期、G₂/M 期增加, 细胞增殖指数(PI)增加, $P < 0.01$, 联合应用组分别与血清组、EGF 组比较, $P < 0.05$ 。说明妊娠晚期兔 AECs 表达细胞角蛋白 CK3, 血清和 EGF 均能通过改变妊娠晚期兔 AECs 的细胞周期而促进 AECs 增殖, 两者联合应用对促进 AECs 的增殖更为显著。

关键词 兔; 羊膜上皮细胞; 体外培养; 细胞周期

羊膜上皮细胞(amniotic epithelial cells, AECs)很少表达人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)-A、-B、-C、-DR 等, 移植后不易产生免疫排斥反应^[1]。AECs 在不同生长因子和微环境的调节下, 能分别分化成神经胶质细胞^[2]、神经元细胞^[3]、肝细胞^[4]和毛发细胞^[5]等, 说明 AECs 在理论上可以分化成各种组织细胞。本实验对妊娠晚期新西兰大白兔 AECs 在体外培养条件下的形态变化和其生长特性进行了研究, 应用免疫组化方法检测其细胞角蛋白的表达, 并探讨表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和血清对兔 AECs 生长和增殖性的影响, 为进一步组织工程技术和临床应用打下实验基础。

1 材料与方法

1.1 取材

取妊娠晚期新西兰大白兔(27-28E), 麻醉后在无菌条件下破开腹部、剪下子宫, 置于含庆大霉素的冷 PBS 液中漂洗; 然后剪开子宫、剥下胎盘和包被有胎膜的胚胎, 沿胎盘边缘剪开胎膜并完整分离出胎膜, 在体视显微镜下剥下胎膜内层的羊膜, 将羊膜剪成 1 mm² 的小块, 加入含 0.025% DNAase (Sigma) 和 0.125% 胰蛋白酶(Hyclone)的普通消化液消化 5 min, 并用吸管不断吹打, 终止消化后, 用 200 目的筛网过滤, 收集细胞悬液, 以 800 r/min 的速度离心 5 min, 收集 AECs。

1.2 AECs 的原代和传代培养

在收集的 AECs 中加入含 20 ng/ml EGF

(Peprotech)、10% 胎牛血清(杭州四季青公司)、4 mmol/L 谷氨酰胺(Sigma)、10 万单位/L 青霉素和 2.5 mg/L 链霉素(Sigma)的 DMEM/F12 (Gibco) 培养液, 以细胞数为 1×10⁶ 个/ml 的密度接种到培养瓶中, 置 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中静置培养, 每天观察细胞的生长情况。在培养 72 h 后, 80%~90% 的细胞生长增殖至汇合时传代。倒出培养液后用 PBS 液清洗 2 遍, 加入 0.25% 胰蛋白酶(Hyclone) 和 0.01% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA) (Promega) 传代消化液, 室温下消化 3~5 min, 在倒置显微镜下观察胞质收缩、细胞间隙增大后终止消化, 收集细胞, 加入含 EGF 和血清的 DMEM/F12 培养液, 以 1×10⁶ 个/ml 的密度分别接种到新的培养瓶中, 置 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中静置培养, 每天观察细胞的生长情况, 同时将 AECs 放在不含 EGF 和血清的 DMEM/F12 培养液中培养作为对照。

1.3 细胞形态学观察

1.3.1 倒置显微镜观察 每 12~24 h 动态观察细胞形态变化及生长增殖情况。

1.3.2 HE 染色观察 将生长状态好的细胞接种到消毒的盖玻片上, 分别培养 12 h、24 h、48 h 后, 用 pH 7.4 的 PBS 液清洗, 4% 多聚甲醛固定后, HE 染色、封片, 光镜下观察。

1.3.3 扫描电镜观察 取生长有 AECs 的盖玻片,

收稿日期: 2007-10-24 接受日期: 2008-01-16

广东省重大科技计划基金(No.2003A3020104)、国务院侨办重点学科基金(No.51205004)资助项目

* 通讯作者。Tel: 020-38688003, E-mail: Drchenj@163.com

用 pH 7.4 的 PBS 液清洗后, 用 2.5% 戊二醛固定, 脱水、干燥、喷金后, 进行扫描电镜观察。

1.4 兔 AECs 角蛋白单克隆抗体 AE1/AE3、AE5 免疫组化检测

将 2~3 代妊娠晚期兔 AECs 制成细胞爬片, 用冰的丙酮固定后, 加 3% H_2O_2 , 室温作用 15 min, 灭活内源性过氧化物酶, 加正常动物血清封闭液, 室温作用 20 min, 减少非特异性背景, 滴加 1:150 稀释的一抗 AE1/AE3 (mouse anti-cytokeratin 3/12 monoclonal antibody, Sigma) 或 AE5 (mouse anti-cytokeratin 3/12 monoclonal antibody, Chemicon), 37 °C 湿盒内温育 45 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 2 min, 滴加与一抗相对应的生物素化二抗(羊抗小鼠 IgG, 福建迈新公司), 37 °C 作用 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 2 min, 滴加抗生物素蛋白-过氧化物酶(SABC)溶液, 37 °C 作用 30 min, PBS 冲洗 5 次, 每次 2 min, DAB 显色, 蒸馏水洗涤, 苏木素复染, 水洗, 光学显微镜下观察。

1.5 流式细胞仪检测 EGF 和血清对兔 AECs 细胞周期的影响

1.5.1 实验分组 分别取 2~3 代妊娠晚期兔 AECs, 用不含血清的 DMEM/F12 培养液调整细胞密度为 1×10^6 个/ml, 分组培养。A 组: 对照组, 只加不含血清或 EGF 的 DMEM/F12 基础培养液; B 组: 血清组, 含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液; C 组: EGF 组, 含 20 ng/ml EGF 的 DMEM/F12 培养液; D 组: 血清和 EGF 联合应用组, 含 20 ng/ml EGF、10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液。

1.5.2 流式细胞仪检测细胞周期变化 兔 AECs 培养 48 h 后, 加入传代消化液(0.25% 胰蛋白酶+0.01% EDTA) 消化上述各组细胞, 离心、收集、固定, 24 h 后除去固定液, 加 RNase (MBI) 和染色剂碘化丙啶(Sigma), 流式细胞仪上监测标记细胞并分析其生长周期。

1.5.3 数据统计学分析 全部数据使用 SPSS11.5 统计软件包进行分析, 将各组处于细胞周期各时相的 AECs 比例进行析因分析, 以 $P < 0.05$ 定为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长特性

在原代和传代培养时, 妊娠晚期兔 AECs 在接种 12 h 内开始贴壁生长, 24~48 h 后, 细胞进入指数增长期。无 EGF 和血清培养基中的 AECs 自第 5 代起细胞增长缓慢, 增殖速度下降, 甚至生长停滞而死亡; 在含 EGF 和血清的培养基中培养的 AECs, 生长增殖

旺盛, 形态良好, 可传 9~10 代。

2.2 光镜观察结果

在原代培养时, 妊娠晚期兔 AECs 接种 12 h 后, 细胞完全伸展开, 胞质有突起、核大呈圆形或椭圆形(图 1), 培养 24~48 h 后, 细胞增殖旺盛, AECs 形态呈多形性、核体积变大、核仁明显、可见各期核分裂像(图 2); 培养 48~72 h 后 AECs 汇合成片。

2.3 扫描电镜观察结果

体外培养 12 h 的 AECs 表面有许多脊样胞浆突起和微绒毛, 核大呈圆形或椭圆形(图 3); 培养 24 h 后的 AECs, 细胞间有大量微丝结构, 形成网状, 核仁清晰可见, 细胞之间连接紧密(图 4), 培养 48 h 后, 细胞紧贴培养面, 立体感不强。

2.4 兔 AECs 细胞爬片免疫组化结果

用妊娠晚期兔 AECs 制成的细胞爬片均呈细胞角蛋白 CK3/12 单克隆抗体 AE1/AE3、AE5 染色阳性, 其细胞浆呈褐色染色(图 5、图 6), 其阴性对照片即没加一抗的兔 AECs 不显色, 其阳性对照片即正常兔角膜上皮细胞胞浆呈褐色染色。

2.5 流式细胞仪检测结果

体外培养的妊娠晚期兔 AECs, 血清组、EGF 组和联合应用组分别与对照组比较, 各周期细胞比例发生变化, G_0/G_1 期减少, S 期、 G_2/M 期增加, 细胞增殖指数(PI)增加, $P < 0.01$, 差异具有统计学意义; 联合应用组分别与血清组和 EGF 组比较, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义; 结果提示血清、EGF 单独或联合应用均可通过改变细胞周期而促进妊娠晚期兔 AECs 增殖, 其中 EGF 和血清联合应用对促进 AECs 的增殖作用更为显著(表 1)。

3 讨论

AECs 的最大优点是容易获得、取材方便, 而又不引起任何伦理争议, 有着丰富的来源。经研究表明, AECs 拥有和胚胎干细胞同样的表面标记蛋白^[6], 也拥有“OCT-4”和“Nanog”基因, 这两个基因是使细胞保持分化潜力的关键基因, 而此前只在胚胎干细胞中发现过。最近的研究还证实, AECs 能分泌多种免疫抑制因子^[7], 在体外培养时能抑制 T、B 淋巴细胞的增殖, 而且 AECs 的免疫原性很低, 异体移植反应很小, 现已有学者开始探讨应用 AECs 治疗各种原因引起的神经损伤或羊膜早破等多种疾病^[3,8], 说明 AECs 可能是组织工程技术一种新的细胞来源和临床理想的细胞移植来源。近些年对 AECs 的研究多局限在对 AECs 本身或原代培养后分泌的神经递质

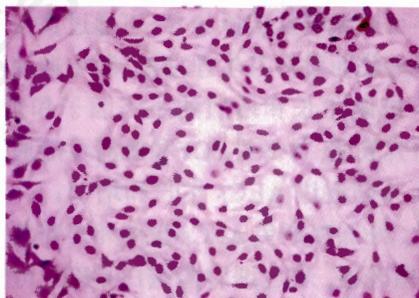


图1 体外培养 12 h 的妊娠晚期兔 AECs, 细胞完全贴壁并展开(HE, 200×)

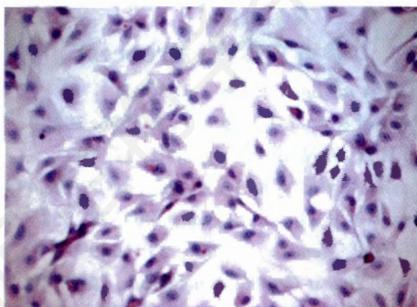


图2 体外培养 24 h 的妊娠晚期兔 AECs, 核体积变大、核仁明显、可见各期核分裂像(HE, 200×)

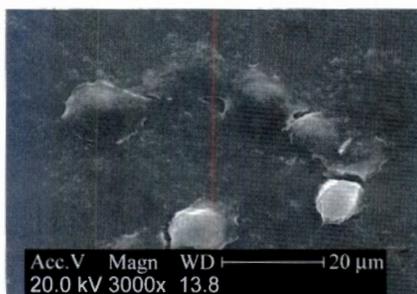


图3 体外培养 12 h 的兔 AECs, 细胞开始向周围扩展开, 表面有许多脊样胞浆突起(SEM, 3 000×)

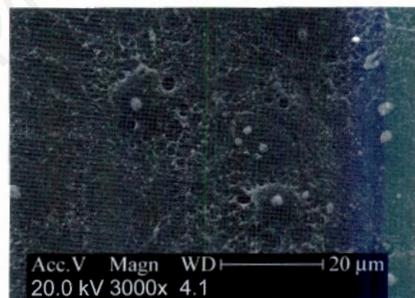


图4 体外培养 24 h 的兔 AECs, 细胞间有微丝样伪足连接, 形成网状, 核仁清晰可见(SEM, 3 000×)

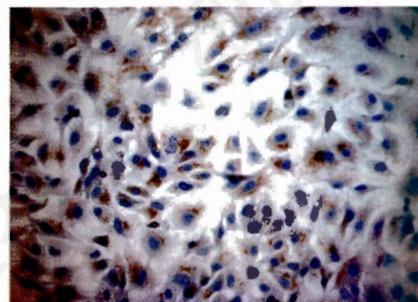


图5 培养的第3代兔 AECs AE1/AE3 表达阳性, 细胞浆呈褐色着色(光镜, 200×)

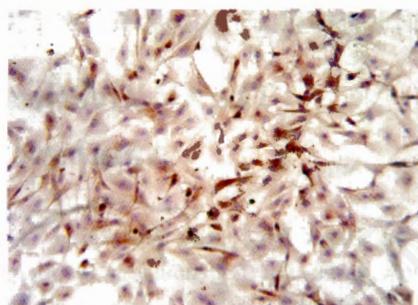


图6 培养的第3代兔 AECs AE5 表达阳性, 细胞浆呈浅褐色着色(光镜, 200×)

表1 EGF和血清单独及联合应用对妊娠晚期兔 AECs 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	G ₀ /G ₁ 期(%)	S期(%)	G ₂ /M期(%)	增殖指数(PI)
A组(对照组)	81.57±6.78	11.15±5.76	7.16±6.73	18.35±6.14
B组(血清组)	58.42±7.68	17.52±8.37	24.06±7.61	41.62±7.96
C组(EGF组)	41.92±12.41	30.93±8.65	27.15±5.78	58.06±7.18
D组(联合应用组)	32.85±10.24	37.53±8.56	29.62±6.46	67.23±7.69

B组(血清组)、C组(EGF组)、D组(联合应用组)分别与对照组比较, $P < 0.01$, 差异具有统计学意义。D组(联合应用组)分别与B组(血清组)、C组(EGF组)比较, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义。

(如儿茶酚胺、多巴胺等)或细胞因子的研究^[2,3,9]等方面, 对 AECs 体外培养和增殖的研究报道较少。因此我们对妊娠晚期兔 AECs 进行离体培养研究, 结果发现细胞在离体条件下生长良好, 增殖旺盛, 在含有 EGF 和血清的培养基中可传 9~10 代, 这和我们前期对妊娠晚期鼠 AECs 的研究结果相似^[10]。

AECs 主要表达分子量为 45 kDa 的细胞角蛋白 CK18, 这种角蛋白也可在其他单层上皮中表达。角蛋白 CK3 是一种分子量为 64 kDa 的碱性蛋白, 角蛋白 CK12 是另一种随后发现的分子量为 48 kDa 的酸性蛋白, 两者往往以特异的“配对”方式共同表达, 现已把 CK3/12 作为分化度较高的角膜上皮细胞的标

志蛋白。单克隆抗体 AE1/AE3 可同时识别包括 48 kDa 的一组酸性蛋白和 64 kDa 的一组碱性蛋白, 但在某些角蛋白的免疫交叉反应, 在角化上皮、复层鳞状上皮、增生的角化细胞和单层上皮细胞如肠上皮细胞等组织中单克隆抗体 AE1/AE3 常表达阳性。单克隆抗体 AE5 可特异性识别 64 kDa 的碱性蛋白 CK3, 且不存在交叉反应。本实验在培养的兔 AECs 中发现单克隆抗体 AE1/AE3 表达阳性, 单克隆抗体 AE5 也表达阳性, 表明 AECs 中一定含有角蛋白 CK3, 这与 Debus 等^[11]的实验结果相一致。CK3 与 CK12 常配对出现, 可推测 AECs 中可能含有角膜上皮细胞特异角蛋白 CK3/CK12。

我们在实验中还发现, AECs 能在无血清的 DMEM/F12 培养液中生长增殖。经研究证实, AECs 能自生分泌 EGF 等生长因子^[12], 故在无血清培养液中 AECs 也能生长增殖, 但增殖速度较慢, 凋亡速度较快。同时我们应用流式细胞仪技术研究了胎牛血清、EGF 对妊娠晚期兔 AECs 细胞周期的影响, 结果显示 10% 胎牛血清和 20 ng/ml EGF 能减少妊娠晚期 AECs 的 G₀/G₁ 期细胞比例, 增加 S 期及 G₂/M 期的细胞比例而促进细胞的生长和增殖。EGF 是细胞分

裂增殖不可或缺的丝裂原信号, 可通过直接诱导特殊核蛋白磷酸化而发挥其生理功能, 胎牛血清中含有许多有利于细胞生长和增殖的生长因子和营养物质。本实验研究表明, 外源性 EGF 和血清可能通过改变细胞周期而共同促进 AECs 生长和增殖。

总之, 妊娠晚期兔 AECs 在体外培养条件下生长良好, 增殖旺盛, 表达细胞角蛋白 CK3, 可能含有角膜上皮细胞特异角蛋白 CK3/CK12, 但 AECs 是否能真正成为组织工程技术一种新的细胞来源还有待进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Akle CA *et al.* *Lancet*, 1981, 2: 1003
- [2] Sakuragawa N *et al.* *Neurosci Lett*, 1996, 209: 9
- [3] Okawa H *et al.* *Neuroreport*, 2001, 12: 4003
- [4] Takahashi N *et al.* *Cell Transplant*, 2002, 11: 443
- [5] Fliniaux I *et al.* *Differentiation*, 2004, 72: 558
- [6] Miki T *et al.* *Stem Cells*, 2005, 23: 1549
- [7] Li H *et al.* *Invest Ophthalmol Vis Sic*, 2005, 46: 900
- [8] Bilic G *et al.* *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190: 87
- [9] Elwan MA *et al.* *Neuroreport*, 1997, 8: 3435
- [10] 金玲等. *中国病理生理杂志*, 2006, 22: 1036
- [11] Debus E *et al.* *EMBO J*, 1982, 1: 1641
- [12] McKenna DS *et al.* *J Soc Gynecol Investig*, 1998, 5: 25

The Cultivation and Proliferation of Rabbit's Amniotic Epithelial Cells *in Vitro*

Ling Jin, Jian Chen*, Jing Wu¹, Qing Zhou, Xiao-Yong Liu, Fang Zhao, Jing-Tang Xu¹, Song-Bin Zhao¹
 (Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China;
¹Ophthalmology Laboratory, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Rabbit's amniotic epithelial cells (AECs) were obtained from rabbits at the late trimester of pregnancy (27-28E) and cultured *in vitro*. The AECs were observed under the light microscope and the scanning electron microscope. By using immunohistochemical staining, the AECs were examined to evaluate the expression of cytokeratin with monoclonal antibody AE1/AE3 and AE5. The influence of EGF and fetal bovine serum (FBS) on the cell cycle of AECs was determined by using flow cytometry. Rabbits' AECs at the late trimester of pregnancy grew well and proliferated actively *in vitro*. Immunohistochemical staining showed that the expression of AE1/AE3 and AE5 of the cultured AECs was positive. Compared with the control group, the percentage of cells at different phase changed. Those at the G₀/G₁ phase decreased, while cells at the S phase and G₂/M phase increased. The cell proliferation index (PI) increased, $P < 0.01$. The co-application of EGF and serum group was compared with the EGF group and FBS group respectively, $P < 0.05$. The AECs had cytokeratin CK3. Both of EGF and FBS could promote the proliferation of AECs and the influence of the co-application of EGF and serum on the proliferation was more significant.

Key words rabbit; amniotic epithelial cells; *in vitro*; cell cycle

Received: October 24, 2007 Accepted: January 16, 2008

The work was supported by the Technology Plan Item Foundation of Guangdong Province (No.2003A3020104) and the Important Subjects Foundation of the Overseas Chinese Foreign Office of the State Council (No.51205004)

Corresponding author. Tel: 86-20-38688003, E-mail: drchenj@163.com