

# 组织块法和酶消化法体外培养原代鼠 阴道上皮细胞的研究

李雅钗<sup>1</sup> 黄向华<sup>1\*</sup> 宋淑霞<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>河北医科大学第二医院妇产科, 石家庄 050000; <sup>2</sup>河北医科大学实验动物中心, 石家庄 050000)

**摘要** 为探讨更佳的阴道上皮细胞体外培养技术, 为组织工程化阴道动物模型提供种子细胞, 分别应用组织块法和酶消化法原代培养大鼠阴道上皮细胞, 观察两种方法细胞生长所需时间、细胞形态和生长特性, 免疫组化进行鉴定。结果表明, 两种细胞培养方法均能获得不规则圆形或多边形的阴道上皮细胞, 其传代后增殖特性和生长曲线基本一致, 角蛋白染色阳性, 但酶消化法较组织块法细胞贴壁快、生长时间短、产量大、细胞纯度高、能较迅速获得较多细胞用于组织工程阴道的构建。

**关键词** 细胞培养; 阴道上皮; 组织块法; 酶消化法

组织工程学原理是以少量的种子细胞经体外扩增后, 与生物材料复合, 修复较大的组织或器官缺损, 重建生理功能。目前组织工程化阴道的研究尚处于起步阶段, 多选用阴道上皮细胞和平滑肌细胞作为种子细胞, 如何通过细胞培养技术在短时间内获得足够数量且增殖力强的接种细胞, 是阴道组织工程研究的重要内容之一。本研究分别采用组织块法和酶消化法体外培养鼠阴道上皮细胞, 对比研究后期望建立一种可靠、稳定获得大量阴道上皮细胞的培养方案, 为进一步采用组织工程技术构建人工阴道提供种子细胞。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验动物

雌性SD清洁级大鼠18只, 体质量200~230g, 购自河北医科大学实验动物中心。动物合格证编号1002024。

### 1.2 主要试剂和器材

角化细胞无血清培养基(含表皮生长因子, 牛垂体提取物, 胰岛素5 μg/ml, 青、链霉素100 U/ml, Invitrogen公司), DMEM/F12(美国Gibico公司), 胎牛血清, 0.25%胰酶(美国Gibico公司), Dispase酶(美国Gibico公司), 兔抗鼠广谱角蛋白抗体(Rabbit Anti-P-CK, 北京博奥森), SP蛋白免疫组化试剂盒(北京中杉), 2.5%戊二醛, 4%多聚甲醛, 台式高速离心机(SORVALL), CO<sub>2</sub>培养箱(日本Yamato), 倒置显微镜(日本OLYMPUS公司), 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

### 1.3 原代培养

**1.3.1 取材** 随机取2只大鼠断颈处死后, 提尾倒放于75%酒精中浸泡20 s, 注意避免酒精进入阴道。置于超净工作台中, 自阴道前壁向上剪开下腹部, 暴露阴道, 取阴道全层组织, 修剪成1×0.5 cm大小, 4℃含双抗的PBS彻底清洗6遍, 分别采用组织块法和酶消化法进行原代培养。组织块法培养8次, 酶消化法培养10次。

**1.3.2 组织块法** 用眼科镊尽量将黏膜下层组织清理干净, 将组织置于青霉素小瓶的一角, 剪切成0.5~1 mm<sup>3</sup>小块, 用解剖镊均匀地接种于6 cm培养皿中, 组织块间的间隔约5 mm, 然后直接放入37℃ 5% CO<sub>2</sub>饱和湿度细胞培养箱中静置培养3 h, 待组织块贴壁牢固后, 补加角化细胞无血清培养液(Keratinocyte Serum-Free Medium, K-SFM), 继续培养。组织块接种后1~3 d, 粘附不牢固, 在观察和移动过程中一定要轻稳, 尽量不要引起液体的震荡而产生对组织块的冲击力使其漂起。第五天首次换液, 以后大约每3d换液一次。2周左右换液时去掉组织块。倒置显微镜观察细胞形态及生长情况。

**1.3.3 酶消化法** 将阴道组织置于0.6 U/ml Dispase酶中4℃冰箱过夜。用眼科镊分离黏膜上皮层, 0.25%胰酶37℃消化阴道上皮组织30 min, 含10%胎牛血清的DMEM/F12终止消化, 用吸管吹打后轻轻

收稿日期: 2010-04-22 接受日期: 2010-09-08

\* 通讯作者。Tel: 13333015981, E-mail: huangxh2003@163.com

吸出细胞悬液, 1 000 r/min 离心5分钟, 弃上清, 加入 K-SFM, 接种于 6 cm 塑料培养皿中, 置 37℃ 细胞培养箱中培养。

**1.3.4 传代培养** 在细胞生长达 80% 融合时进行传代培养。传代时, 弃去旧培养基, 加入 2~3 ml PBS 液漂洗细胞皿 2 次, 以去除未贴壁细胞。加入适量的 0.25% 胰蛋白酶消化液, 37℃ 孵育约 15 min, 倒置显微镜下观察到细胞间隙增大、大部分细胞呈圆球形、细胞成片收缩、部分悬浮于消化液中时向培养皿内加入体积分数为 0.1 的胎牛血清终止消化。用吸管有序的吹打皿底细胞, 将细胞悬液离心(1 000 r/min, 5 min), 弃上清, 加 K-SFM, 混匀。以 1:2 比例转移至新培养瓶中继续培养。

#### 1.4 细胞计数和细胞生长曲线测定

细胞计数板计数第一次传代时的细胞悬液, 计算两种方法获得的细胞产量。将第二代细胞悬液进行细胞计数, 调整细胞浓度  $1 \times 10^8$ /ml, 接种于 96 孔板上, 加入等量培养液。每天取 3 个孔计数, 计算平均值, 持续 8 天。以培养时间为横轴, 细胞值均数为纵轴, 绘制细胞生长曲线。

#### 1.5 上皮细胞角蛋白免疫组化鉴定

取第 2 代生长良好的细胞, 用抗鼠上皮细胞角蛋白抗体对 95% 乙醇固定的细胞爬片进行免疫组织化学染色, 用 0.01% 磷酸盐缓冲液漂洗, 再以含生物素标记的第二抗体进行反应, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水、透明后, 中性树脂封固, 镜检。光镜下观察阳性染色细胞, 并随机选取 5 个  $10 \times 20$  的视野, 计数阳性细胞所占的百分比数目, 即为细胞纯度。

#### 1.6 统计分析

采用 SPSS13 统计软件处理数据, 结果以  $\bar{x} \pm S$  表示。组间比较采用 *t* 检验和卡方检验, 小样本资料采用 Fisher 概率法。  $P < 0.05$  认为差异有显著性。

## 2 结果

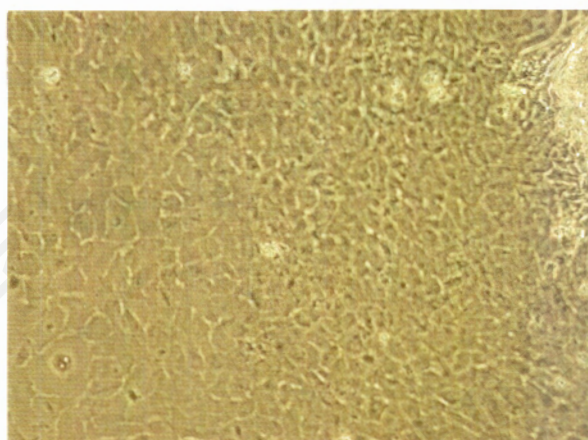
### 2.1 阴道上皮细胞体外生长特性

**2.1.1 组织块培养法** 第 3~5 d 约有 60% 的贴壁组织块周围开始有少量细胞爬出, 呈不规则多边形, 轮廓清晰, 折光性强, 细胞核较大, 圆形或椭圆形。10 d 后细胞增殖较快, 至 3~4 周左右细胞融合约 80%, 成片细胞似铺路石样, 中央部细胞形态小, 连接紧密, 边缘区细胞形态较大, 见图 1。

**2.1.2 酶消化法** 消化后细胞大部分为体积较小的圆形细胞, 胞浆均匀、透亮, 混有部分成熟的多

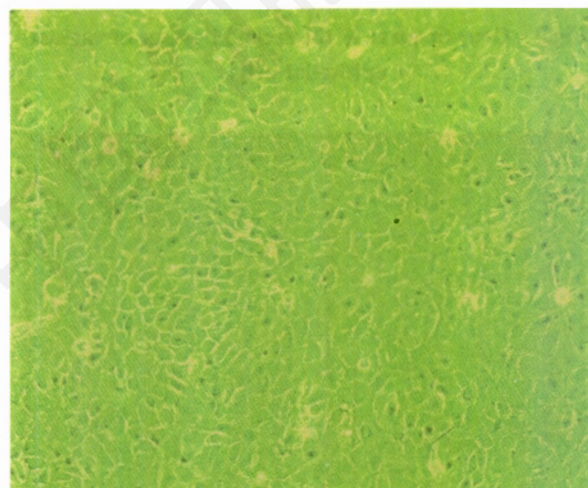
角形细胞。8~12 h 悬浮细胞下沉, 24~36 h 后细胞开始贴壁, 胞体逐渐伸展出多个触角, 细胞宽大扁平, 折光性减弱, 胞核清晰可见, 完全铺展后细胞大小为贴壁前的 2~3 倍。3~5 d 后细胞增殖显著, 呈集落式生长, 7~10 d 后细胞连接成片, 基本无成纤维细胞混合生长, 如图 2。

**2.1.3 传代细胞生长特性** 传代细胞 24 h 左右贴壁, 72 h 后细胞进入指数生长期, 5~7 d 后细胞融合成片, 出现接触性抑制。组织块法 4 代后细胞贴壁增殖能力下降, 胞浆内出现空泡和黑色小颗粒, 胞核散大, 细胞间连接松散, 部分区域呈片脱落、凋亡, 消



**Fig.1 Vaginal epithelial cells morphology**

At 10 days of primary culture by the explant method, vaginal epithelial cells have great reproductive activities (Phase contrast microscope, 100 $\times$ ).



**Fig. 2 Vaginal epithelial cells morphology**

At 7 days of primary culture by the enzyme digestion methods, vaginal epithelial cells show appearances of "paving stone"(Phase inversion microscope, 100 $\times$ ).



化法可传至 5~6 代。

## 2.2 细胞培养成功率

组织块法培养大鼠阴道组织 8 例, 6 例培养 3~5 d 均可见细胞自组织块周围爬出, 2 例培养 15 d 未见细胞生长, 视为失败, 传代成功 3 次, 成功率为 37.5%。酶消化法培养 10 例, 成功 7 例, 污染 2 例, 未见细胞贴壁 1 例, 传代成功 5 例, 成功率为 50%, 高于组织块法 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 细胞产量

组织块法细胞产量为  $2.67 \pm 0.23 (\times 10^6/L)$ , 酶消化法为  $2.89 \pm 0.94 (\times 10^6/L)$ , 两组间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

## 2.4 生长曲线测定

第 1~2 d 为静止期, 细胞贴附、伸展, 增殖缓慢, 第 3~6 d 增殖显著, 呈对数生长, 以后渐平缓进入平台期, 其曲线近似“S”形(图 3)。

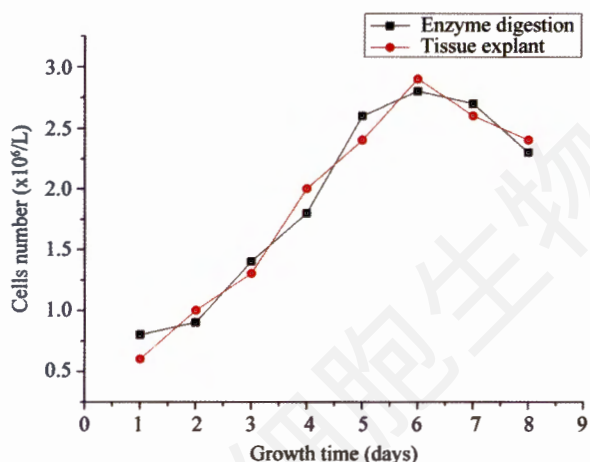


Fig.3 Growth curve of the second passage of vaginal epithelial cells



Fig.4 The result of immunocytochemistry

Immunohistochemical staining showed that P-CK was positive; cytoplasm was yellow (Optical microscope, 200 $\times$ ).

## 2.5 免疫组化鉴定

普通光学显微镜下观察, 阴道上皮细胞呈多角形, 胞浆棕黄色, 广谱角蛋白免疫组织化学染色阳性(图 4)。组织块法细胞纯度为 92%, 酶消化法纯度为 98%。

## 3 讨论

成功的培养阴道上皮细胞对于构建组织工程化阴道至关重要, 其培养方法主要有组织块法和酶消化法, 国内外研究对这两种方法均有报道。De Filippo 等<sup>[1]</sup>用 IV 型胶原酶和 Dispase 酶消化分离新西兰雌兔阴道上皮细胞, 成功培养后用于组织工程化阴道研究。吴文湘等<sup>[2]</sup>用组织块法培养人阴道上皮细胞需要 4 周时间才能传代。周佳等<sup>[3]</sup>采用 IV 型胶原酶和胰酶联合消化分离兔阴道上皮细胞进行培养同样获得成功。

理论上组织块法简单易行、操作方便、成功率高, 但原代细胞生长时间长, 难以适应组织工程构建人工阴道的需要; 酶消化法操作繁琐, 污染机率大, 而且消化时间难以掌握, 对细胞损伤大。在本实验中, 组织块法原代培养时间较长, 细胞需 3~5 天才能自部分组织块边缘萌出, 整个原代培养时间需要 3~4 周左右。酶消化法将组织分散成细胞团或单个细胞, 便于其摄取或排除代谢产物, 细胞生长较快, 24 小时后开始贴壁, 7~10 天即可传代, 远远短于前者。组织块法未分离上皮层, 原代培养时易有成纤维细胞混杂生长, 酶消化法培养的上皮细胞纯度较高, 但分离酶的应用提高了实验成本。组织块法培养的细胞生长 4 代后开始出现衰老细胞, 增殖能力逐渐下降, 细胞法则可传 5~6 代, 考虑可能因为组织块法原代细胞生长时间长, 分裂次数多, 从而缩短了其传代次数。本实验中两种培养方法获得的第一代细胞产量无明显区别, 但酶消化法传代细胞培养成功率高于组织块法。

在倒置显微镜下观察两种方法培养的上皮细胞, 细胞呈多角形, 胞核较大, 圆形或椭圆形, 融合后呈典型的铺路石样外观, 符合上皮细胞生长形态。传代细胞贴壁较快, 前两天增殖缓慢, 3~6 天进入对数生长期, 此后生长速度逐渐减慢, 两种方法培养的细胞生长曲线基本一致, 说明其生长特性无明显差别。角蛋白是上皮细胞的一种中间丝, 构成细胞骨架, 在细胞内形成广泛的网状结构, 常用于标记上皮和上皮来源的肿瘤, 随着分化程度的不同, 细胞表达的角蛋白不同。本实验培养的细胞用广谱角蛋白抗体免疫

组化染色呈阳性,证实为阴道上皮细胞。

阴道上皮细胞体外繁殖能力低,对培养环境要求高。根据本实验体会在培养过程中需注意如下细节:(1)首先选择年轻、生长能力旺盛的动物,为减少污染机率,取材前酒精消毒,但避免接触阴道以损伤组织,取材后立即用含双抗的PBS彻底清洗,可不必添加两性霉素B预防真菌污染<sup>[2]</sup>,降低实验费用;(2)尽量使用一次性塑料培养瓶或皿,有助于组织或细胞黏附,若使用玻璃培养瓶,可预先用多聚赖氨酸处理增加黏附性;(3)组织块法前三天绝对静置,防止组织漂浮,细胞法则注意胰酶消化时间,以较大细胞密度接种成活率高;(4)采用K-SFM,添加表皮生长因子、牛垂体提取物和胰岛素,有助于促进上皮细胞生长,抑制成纤维细胞,提高细胞纯度<sup>[4]</sup>。

在本实验条件下,组织块法和酶消化法均可成功培养鼠阴道上皮细胞,但酶消化法培养时间短,成功率高,可在短期内获得大量纯度较高的细胞用于实验

研究,优于组织块法。阴道上皮培养技术的优化为组织工程化阴道研究奠定了物质基础,有助于推进该领域的深入研究,为临床上建立结构和功能更接近于正常的新阴道开辟了新途径。

#### 参考文献(References)

- 1 吴文湘,李颖,刘朝晖,廖秦平.人阴道上皮鳞状细胞的体外培养及其生物学特征.中华妇产科杂志 2007; 42: 711-2.
- 2 De Filippo RE, Bishop CE, Filho LF, Yoo JJ, Atala A. Tissue engineering a complete vaginal replacement from a small biopsy of autologous tissue. Transplantation 2008; 27(2): 208-14.
- 3 周佳,刘伟,刘德伍.阴道黏膜上皮细胞的分离培养和鉴定.组织工程与重建外科杂志 2005; 1: 272-4.
- 4 Moriyama T, Asahina I, Ishii M, Oda M, Ishii Y, Enomoto S. Development of composite cultured oral mucosa utilizing collagen sponge matrix and contracted collagen gel: a preliminary study for clinical applications. Tissue Eng 2001; 7: 415-27.

## Compariation of Tissue Explant and Enzyme Digestion Method for Rat Vaginal Epithelial Cells *in vitro*

Ya-Chai Li<sup>1</sup>, Xiang-Hua Huang<sup>1\*</sup>, Shu-Xia Song<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Second Hospital of Hebei Medical University, Department of Obstetrics and Gynecology, Shijiazhuang 050000, China;

<sup>2</sup>Hebei Medical University, Department of Experimental Animal, Shijiazhuang 050011, China)

**Abstract** Vaginal epithelial cells from Sprague-Dawley rats were primary cultured by tissue explant and enzyme digestion method respectively to explore the better culture technique *in vitro* and provide seed cells for engineering of vaginal tissue. Time of primary culture, the cell morphology and proliferation characteristics were observed under light microscopic. The cells were identified with P-CK anti by immunohistochemistry staining. The results indicated that the vaginal epithelial cells which were obtained by the two methods were polygon-like or irregular globular, and their morphology and growth characteristics were essentially consistent. The expression of pan-cytokeratin staining of the cultured cells were positive. However, compared with explant method, the culture cells using enzyme digestion method displayed more faster adhesion, shorter growth time, and higher cells productivity and purity. The larger number of epithelial cells were rapidly obtained to construct engineering of vaginal tissue by enzyme digestion method.

**Key words** cell culture; vaginal epithelium; tissue explant; enzyme digestion method

Received: April 22, 2010 Accepted: September 8, 2010

\*Corresponding author. Tel: 13333015981, E-mail: huangxh2003@163.com