

- Mutagenesis*, 5: 371—374.
- [15] Fitzgerald, P. H. and Brehaut, L. A., 1970, *Exp. Cell Res.*, 59: 27—31.
- [16] Stubblefield, E., 1964, *Cytogenetics of Cells in Culture* (Academic Press, New York) pp. 223—248.
- [17] Hell, E. and Cox, D. G., 1963, *Nature*, 197: 287—288.
- [18] Williams, J. P. G., 1968, *Eur. J. Pharmacol.*, 3: 337—340.
- [19] Yamamoto, K. and Kikuchi, Y., 1980, *Mutat. Res.*, 71: 127—131.
- [20] Rainaldi, G., et al., 1987, *Mutat. Res.*, 177: 255—260.

C-MITOTIC EFFECTS OF COLCEMID (COM) ON MOUSE BONE MARROW CELLS

SHI Qing Hua et al.

(Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

ABSTRACT

Colcemid (COM) was tested for induction of increase of mitotic indices (MI) and c-mitotic effects in bone marrow cells of male(101/E1×C3H/E1) F1 mice post single injection (i.p.). The doses of 1 mg/kg of COM were used and sampled at 2,6,10,14 and 18 hour. At 2 h post COM treatment, the MI and c-mitotic effect reached the highest, then decreased from 6 h to 18 h. At 18 h, the MIs decreased to (1 mg/kg) or significantly below(3 mg/kg) the control level respectively; whereas, the corresponding frequencies of cells in class C—E were still significantly higher than in the controls. The possible mechanism by which COM induces increase of MI and the correlation between c-mitotic effects and induction of aneuploidy were discussed.

Key words: Mitotic Index(MI) C-mitotic effect Colcemid Mouse bone marrow cells

人胎盘滋养层细胞培养与体外 hCG 释放的研究

郑伟 石一复

(浙江医科大学附属妇产科医院 杭州 310006)

胎盘滋养层由两层形态不同的滋养上皮细胞组成,即细胞滋养层(Cytotrophoblast)和合体滋养层(Syncytiotrophoblast),参与胚胎发育过程中营养、代谢、内分泌和免疫等功能。绒毛膜促性腺激素(hCG)是由滋养层细胞合成与分泌的主要激素之一^[1]。已有研究表明,合体滋养层细胞分泌和释放hCG,但对于细胞滋养层细胞是否参与hCG的合成与分泌以及细胞滋养层细胞是通过有丝分裂或是通过细胞融合过程转化为合体滋养层细胞,至今看法仍不一致。我们采用酶消化和percoll密度梯

度离心对胎盘细胞滋养层细胞进行分离、纯化与培养。观察细胞滋养层细胞和合体滋养层细胞的生长与转化,并测定培养上清液hCG的含量。现将实验结果报道如下。

材料和方法

1. 细胞分离、纯化与培养

本实验取材于足月正常妊娠孕妇剖宫产和正常分娩的胎盘组织。无菌条件下,将胎盘小叶剪成约1—3 mm³的组织块,分别用PBS液和Ham's F10培养液(GIBCO产品)漂洗两次,用0.125%胰蛋白酶和0.1%胶原酶A(Sigma产品)混合液消化,并置于

37℃恒温振荡水浴箱中30分钟。用吸管轻轻吹打绒毛组织,以便分散细胞。加入Ham's F10培养液(含15%胎牛血清)中,将细胞洗两次。参照Kliman等^[2]方法并加以修改,即配制22.5%和45%两种不同浓度的Percoll细胞分离液(Sigma产品)。分别加入10 ml离心管内,形成两层Percoll密度梯度溶液,缓慢将消化后的细胞悬液加在Percoll密度梯度溶液之上层,离心(2000 rpm)20分钟。取三层分离液中的细胞在显微镜下进行鉴定。底层为红细胞和多核巨细胞,中层以单核细胞为主,上层则为细小绒毛片段及小血管等。吸取全部中层细胞,用Ham's F10液洗1次,离心(1000 rpm)10分钟,弃去上清液。用Chang氏培养液(购自德国Laboserv公司,含8%胎牛血清,青霉素100 μ/ml和链霉素100 μg/ml),将细胞悬液浓度调整至1—3×10⁵细胞/ml,置于6孔培养皿(Nunc产品)和37℃、5%CO₂培养箱中培养,采用OLYMPUS倒置显微镜观察并记录细胞生长情况。

2. hCG 的放免测定

隔日更换并收集细胞培养上清液,将收集的细胞培养上清液1000 rpm离心10分钟,吸取上清液,置于-20℃冰箱中待测。采用放射免疫分析法(RIA),对细胞培养上清液中hCG含量作定量分析。hCG放射免疫分析试剂盒为德普(DPC)公司产品,按试剂盒说明书操作,质控均符合要求。

结 果

1. 细胞滋养层细胞体外生长的观察

我们采用胰酶和胶原酶混合消化及Percoll密度梯度离心法,分离和纯化胎盘细胞滋养层细胞。在光学显微镜下鉴定经上述方法所收集到的细胞的形态。结果表明,中层Percoll分离液所收集到的细胞以单核的细胞滋养层细胞为主,多核的合体滋养层细胞则较少。经Chang氏培养基培养24小时后,细胞贴壁生长,并呈延展状。部分细胞可见分裂相(图版图A)。培养72小时后,具有多核和共同细胞膜的合体滋养层细胞增多(图版图B)。培养6天后,合体滋养层细胞明显增多并相互融合(图版图C)。培养10天后,合体滋养层细胞退变,细胞核固缩。成纤维细胞呈优势生长

(图版图D)。

2. 滋养层细胞体外释放 hCG 的变化

为了解体外培养所形成合体滋养层是否具有功能性,我们采用放免分析法测定了细胞培养上清液中hCG的含量。结果表明(图1),滋养层细胞培养4—6天,hCG含量迅速增高,并与合体滋养层细胞的形成相吻合。培养6天时,培养液中hCG含量达峰值,随后逐渐下降。培养12天时,hCG含量甚微。剖宫产和正常分娩胎盘滋养层细胞培养上清液中hCG含量的测定结果相似。

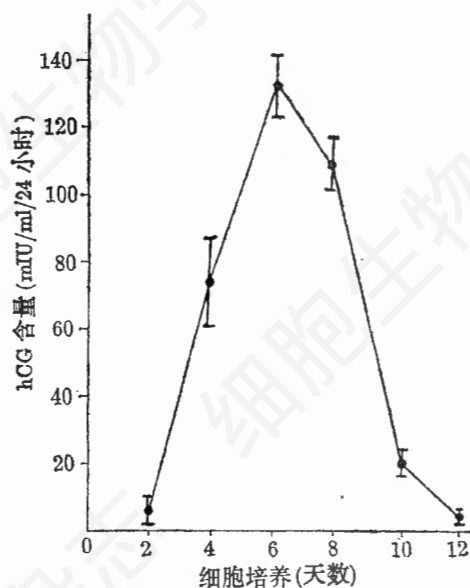


图1 培养液中hCG含量的变化

讨 论

胎盘滋养层细胞是参与体内多种生殖内分泌功能的细胞,其中合体滋养层细胞发挥尤其重要的作用^[2,3]。虽然目前已有不少有关滋养层细胞体外研究的报道,但仍缺乏较为理想的培养和研究技术。对合体滋养层形成的确切机制尚无定论。Kliman等^[2]认为细胞滋养层细胞通过细胞的移行并相互靠拢,形成聚合体,并进一步融合成为合体滋养层细胞。本研究观察的结果表明,细胞滋养层细胞在体外培养过程中,通过细胞分裂和相互融合形成合体滋养层细胞。此外,本研究采用酶消化和

Percoll 密度梯度离心方法, 分离和纯化细胞滋养层细胞, 并采用 Chang 氏培养基进行细胞培养。结果表明上述方法较适合细胞滋养层细胞的分离、纯化和体外生长。

人绒毛膜促性腺激素(hCG)属糖蛋白激素, 具有延长妊娠黄体寿命和调节胎盘甾体激素合成的功能^[4]。免疫组化结果显示, 合胞体滋养层抗 β -亚单位 hCG 抗体呈阳性反应, 细胞滋养层则呈阴性反应^[5]。本研究观察合胞体滋养层细胞的形成与 hCG 含量变化之间的关系, 表明合胞体滋养层细胞具有分泌 hCG 的功能。但对于正常妊娠和某些病理妊娠过程中 hCG 变化的机理, 至今仍不清楚, 胎盘病理学研究表明, 先兆子痫和胎儿宫内窘迫可引起合胞体滋养层细胞结节明显增多, 可能与缺氧所致合胞体滋养层反应性增生有关^[7,8]。因此, 本研究以及进一步的滋养层细胞生物学研究将有助于了解其反应机理。

摘 要

本研究的目的是了解细胞滋养层细胞和合胞体滋养层细胞体外分化和生物学特性。方法: 采用酶消化和 Percoll 密度梯度离心法, 对人足月胎盘细胞滋养层细胞进行分离、纯化和体外培养。采用放射免疫法(RIA)检测细胞培养上清液 hCG 含量的变化。结果: 经分离和纯化的细胞滋养层细胞在体外培养中生长良好, 通过细胞分裂和融合形成合胞体滋养层细胞,

随着合胞体滋养层细胞的生长, 细胞培养上清液中 hCG 含量显著升高。我们认为从胎盘中分离和纯化的细胞滋养层细胞在体外培养中可分化和融合形成合胞体滋养层细胞, 体外 hCG 含量的增加与合胞体滋养层细胞生长有关。

关键词: 胎盘 滋养层细胞 hCG 体外培养

图 版 说 明

胎盘细胞滋养层细胞的体外培养($\times 200$)

- A. 细胞培养 24 小时, 细胞滋养层细胞贴壁生长, 并可见细胞分裂, 形成多个细胞核(如箭头所示)。
- B. 细胞培养 3 天, 细胞滋养层细胞相互融合形成合胞体滋养层细胞(如箭头所示)。
- C. 细胞培养 6 天, 合胞体滋养层细胞明显增多。成纤维细胞亦开始生长。
- D. 细胞培养 10 天, 合胞体滋养层细胞核固缩, 退变。成纤维细胞呈优势生长。

参 考 文 献

- [1] Loke YW. et al., 1983, *Biology of Trophoblast*. Elsevier, New York 212—215.
- [2] Harvey JK. et al., 1986, *Endocrinology*, 118: 1567—1582.
- [3] Amemiya K. et al., 1994, *J Endocrin*, 143: 291—301.
- [4] Ringler GE. et al., 1990, *Endocr Rev.*, 11: 105—123.
- [5] Maruo T. et al., 1987, *Am J Obstet Gynecol.*, 156: 721—727.
- [6] Braunstein GD. et al., 1976, *Am J Obstet Gynecol.* 126: 678—681.
- [7] Del Valle GO. et al., 1993, *J Matern Fetal Invest.* 3: 137—140.
- [8] 唐敏一 编著, 1987, 胎盘病理学. 人民卫生出版社, 北京, 106—110.

STUDY ON TROPHOBLASTIC CELLS FROM HUMAN TERM PLACENTAE AND RELEASE OF HCG IN VITRO

Zheng Wei SHi Yi Fu

(Women's Hospital Affiliated to Zhejiang Medical University, HangZhou 310016)

The objective of this study was to determine the differentiation and biological characterization of cytotrophoblastic cells and syncytiotrophoblastic cells in vitro. Methods: We purified cytotrophoblastic cells isolated from human term placentae by enzymic digestion and percoll gradient centrifugation, hCG from culture media has been detected by RIA. Results: Cytotrophoblastic cells isolated and purified from human placentae growth in vitro and transformed into the functional syncytiotrophoblastic cells through a process of differentiation and cell fusion. hCG RIA of the culture media revealed a significant increase in secretion, paralleling the growth of syncytial cytotrophoblasts. We conclude that cytotrophoblastic cells isolated from human term placentae may differentiate and fuse to form functional syncytiotrophoblastic cells in vitro. The increase of hCG secretion is related to the growth of syncytiotrophoblastic cells.

Key Words: Placentae Trophoblast hCG In Vitro