DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.009
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
1248 2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)14-1248-04

早孕绒毛细胞滋养层细胞分离培养的实验研究

蒋立艳[1],李 真[1],成 娅[1],陈波洁[1],王 智[1],林桂兰[1],刘 萍[1],杨合荣[2] (第三军医大学:[1]新桥医院妇产科,重庆 400037,[2]西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 改善体外分离和培养人早孕绒毛细胞滋养层细胞(cytotrophoblast, CTB)的方法,探讨CTB的一些生物学特性。方法 取人工流产6~8周妊娠绒毛,机械法分离,酶消化,经Ficoll分离介质离心得到单个核细胞进行培养并鉴定,测定其生长曲线并观察其体外转化、细胞周期和激素合成。结果 分离培养的CTB经免疫细胞化学染色鉴定,接种后2 h开始贴壁,第5天融合90%以上,细胞周期显示约有79%细胞处于G_0/G_1期,激素分泌表现出随CTB的转化而变化。结论 成功分离培养了人早孕绒毛CTB,方法简便易行,获得的细胞形态单一、生长稳定、定向转化,为进一步研究CTB在生殖生理中的作用提供了实验基础。

关键词:细胞滋养层细胞;细胞培养;生物学特性
中图法分类号:R321.4;R329.2 文献标识码:A

In vitro culture of human cytotrophoblasts isolated from early pregnancy villi

JIANG Li-yan[1], LI Zhen[1], CHENG Ya[1], CHEN Bo-jie[1], WANG Zhi[1], LIN Gui-lan[1], LIU Pin[1], YANG He-rong[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To improve the methods for isolation and culture of human cytotrophoblasts (CTBs) from early pregnancy villi and to investigate its partial biological properties. **Methods** Human villi from 6—8 weeks legal voluntary interruption pregnancy were mechanically isolated, enzyme-digested and dispersed into mononuclear cells by Ficoll gradient centrifugation. The mononuclear cells were cultured and identified, and their growth curve was determined. Other biological properties such as transition *in vitro*, cell cycle, and hormone synthesis were observed. **Results** Immunocytochemistry revealed that CTBs began to adhere to the wall at 2 h after inoculation, while more than 90% cells fused at 5 d. Cell cycle revealed that 79% cells were at G0/G1. The secretion of E2, β-HCG, and PROG increased in a CTB-dependent manner. **Conclusion** We have successfully cultured human cytotrophoblasts isolated from early pregnancy villi and obtained monomorphic cells with stable growth, which provides a useful experimental technique for the studies of the roles of CTBs in reproductive physiology.

Key words: cytotrophoblast; cell culture; biological characterization

人早孕绒毛中除了滋养层细胞(cytotrophoblast, CTBs)外,还有成纤维细胞、子宫基质细胞、蜕膜细胞等。滋养层细胞分位于漂浮绒毛表面参与母胎物质交换的合体滋养层细胞(syncytiotrophoblast, STB);位于其内层的单个核滋养层细胞前体—细胞滋养层细胞;可迁移入蜕膜、子宫螺旋动脉的中间型滋养层细胞(intermedia trophoblast, ITB)[1]。而多潜能的CTB是各型滋养层细胞的备用库,由于其在胎盘中所处的位置,采用不同的方法所得的细胞数及纯度不同。研究和利用CTB有望为胚胎植入、滋养层细胞的增殖、调节及妊娠相关疾病的发生、发展的研究提供有力的实验手段。我们采用酶消化、Ficoll密度梯度离心和差速贴壁法对早孕绒毛CTB进行分离、纯化与培养并在体外观察其部分生物学特性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

dMEM培养粉、标准胎牛血清:Hyclone;胰酶:Gibco;dNase Ⅰ:华美生物工程有限公司;青、链霉素:华北制药厂;MTT:Amersha;dAPI、Ficoll:Sigma;NICON-TMS倒置显微镜;荧光显微镜:

作者简介:蒋立艳(1966—),女,四川省蓬溪县人,博士研究生,主治医师,主要从事生殖医学方面的研究。电话:(023)65209787

收稿日期:2003-03-10;修回日期:2003-11-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

OLYMPUS; 流式细胞仪: BECTON Dickinson (BD); 酶标仪: BIOZYME Ⅲ(北京); CO_2 孵箱: Heraeus(上海)。

1.2 标本来源

取自第三军医大学新桥、西南医院门诊自愿人工流产 6~8 周绒毛组织, 孕妇健康无合并症。

1.3 实验方法

1.3.1 CTB 的分离、培养和鉴定

1.3.1.1 分离培养　参照文献[1~5], 略作改进。无菌条件下, 取妊娠 6~8 周人工流产术后的绒毛, 机械法剪碎, 0.125% 胰酶和 0.1% dNaseⅠ 1∶1 混合液 30 ml 消化 40 min, 剩余组织反复同法消化几次, 收集上清液, 70 μm 的尼龙筛网过滤。洗涤, 重悬。沿管壁缓慢加入装有预冷 Ficoll 的离心管中, 4 ℃ 1 200 × g 离心 20 min, 取中间云雾状细胞层, DMEM/F-12(1∶1)3 ml 洗两次, 2% 台盼蓝染色计数, 稀释成 6×10^5/ml, 接种于 24 孔细胞培养板中, 每孔加培养基补足 1 ml(含 100 U 青霉素, 100 μg 链霉素), 放入 37 ℃, 5% CO_2 ~95% 空气饱和湿度培养箱中孵育。反复差速贴壁以除去贴壁的成纤维细胞等杂细胞。2 h 后观察细胞贴壁情况, 以后每隔 24 h 观察。每 3 d 全量换液 1 次, 共 9 d。

1.3.1.2 光、电镜及免疫细胞化学鉴定　①倒置显微镜下观察分离的 CTB 并照相; ②电镜: 原代培养分离、纯化的 CTB3% 戊二醛固定后送透射电镜检测; ③采用 S-P 法免疫组化检测贴壁细胞中细胞角蛋白-7(cytokeratin-7, CK-7)、波形蛋白(vimentin)、人绒毛膜促性腺激素(β-HCG)的表达。

1.3.2 CTB 的纯度和活力测定

1.3.2.1 原代培养 48 h 的 CTB 贴壁爬片, S-P 法免疫组化图像分析 CTB 中 CK-7 阳性细胞数鉴定纯度。

1.3.2.2 细胞活力测定　台盼蓝排出实验: 1 滴细胞悬液与 2 滴台盼蓝混合后滴入细胞计数板, 2 min 后, 显微镜下计数至少 200 个细胞, 计算活细胞百分比。

1.3.3 CTB 周期测定　取分离纯化后的 CTB, 吹打制成单细胞悬液, 70% 乙醇固定后流式细胞仪检测。

1.3.4 CTB 荧光标记示踪其细胞形态分化　在 6 孔板内置细胞培养处理过的盖玻片, 将无菌 dAPI 原液加入培养基中使其终浓度达 50 μg/ml。8 h 后即取出玻片, 荧光显微镜下照像, 每隔 24 h 照像 1 次。

1.3.5 CTB 的生长曲线　将分离纯化的 CTB 单细胞悬液, 计数, 调整浓度为 1×10^4/孔, 接种 96 孔培养板, 每孔 200 μl 细胞悬液, 培养。从第 2 天起, 固定时间加入 5 mg/ml 的 MTT(四甲基偶氮唑)20 μl, 继续培养, 4 h 后吸弃培养液, 加入等量 0.04~0.1 mol/L 盐酸异丙醇溶液显色, 在酶标仪上以 595 nm 波长测定每个孔吸光度。每隔 24 h 测活细胞吸光度值, 至第 7 天结束。取同一时相点 3 个孔吸光度的平均值, 以时间(d)为横坐标, 吸光度(A)值为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.3.6 激素分泌测定　培养的 CTB 自第 2 天起每天取培养液 100 μl, 磁性分离酶联免疫测定法测 CTB、E2(estradiol)、β-HCG(β-human gonadotropin)、PROG(prolactin chorionic gonadotropin)含量。连续 7 d。

2 结果

2.1 CTB 的分离、培养与分化

原代培养分离纯化的 CTB 形态单一(图 1), 接种 2 h 后细胞开始贴壁, 24 h 明显贴壁并可见细胞聚集, 融合现象, 2~3 d 开始有 STB 形成, 5 d 后 STB 逐渐增多, 6 d 左右融合 90% 以上。光电镜及荧光示踪表明 CTB 大多为幼稚未分化细胞, 体外培养由单个核的细胞向多核、巨核细胞定向分化。

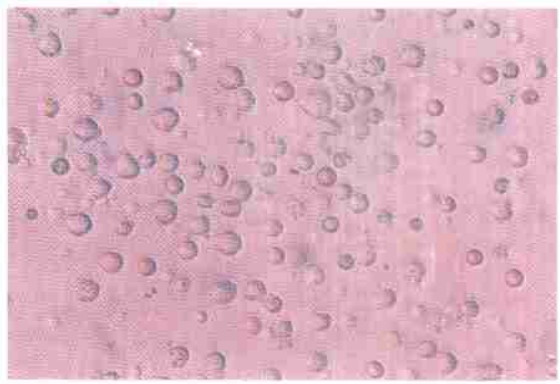


图 1　原代培养分离纯化的 CTB　(×200)

Fig 1　Isolated and purified CTBs of primary culture　(×200)

2.2 CTB 的鉴定及纯度和活力

2.2.1 鉴定　①倒置显微镜下观察: 贴壁的 CTB 呈立方多角或卵圆形, 核较圆, 核分裂常见, 胞界清楚。随着其分化, 逐渐形成多个核, 体积大的滋养层巨细胞和/或 STB; ②透射电镜: 细胞核膜清晰, 核仁明显, 见核间孔, 常染色质丰富, 细胞质中有大量散在游离核糖体, 内质网较少, 高尔基复合体不发达, 有板层状嵴的线粒体(图 2)。

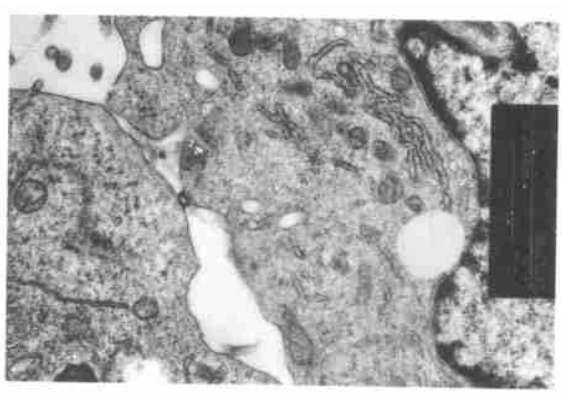


图 2　分离纯化的 CTB 透射电镜观察　(分辨率 00005Å)

Fig 2　Transmission electron microscope photograph of the isolated and purified CTBs　(resolving power 00005Å)

2.2.2 纯度和活力　①免疫细胞化学图像分析: 染色结果 CK-7 强阳性, 胞浆胞膜着色, 对上皮型的 CTB 较为特异, 着色

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

细胞数量占该类细胞总数的 91%，即 CTB 的纯度达 91%；而 vimentin 阴性，说明分离培养的细胞中无间质细胞生长；β-HCG（±），说明β-HCG 阴性的 CTB 已开始分化，部分形成的 STB 可分泌β-HCG。② 台盼蓝排出实验，活细胞的百分比为 96.5%。换 3 个视野算平均值为 96.3%。

2.2.3 CTB 细胞周期 CTB 中 S＋G_2＋M 期的细胞有 21%活跃于增殖期，而处于 G_0/G_1 期的细胞占 79%（图 3）。

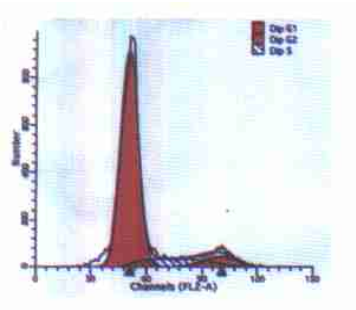


图 3 CTB 细胞周期

Fig 3 Cell cycles of CTBs

2.2.4 CTB 生长曲线 24 h 后吸光度值锐减，为细胞开始分化，3 d 后吸光度值变化不大，细胞定向转化，第 5 天吸光度值出现一个小的峰值，遂又下降，为 STB 形成，然后衰退死亡。

2.2.5 E_2、HCG、PROG 分泌 CTB 培养 24 h 后，3 种激素开始分泌并逐渐升高。孕酮于第 3 天迅速升高，然后趋于平缓至第 4 天时达高峰，随后渐下降。雌二醇在 24 h 后逐渐升高，至第 4 天达高峰，随后锐减，第 5 天后下降又趋于缓和。β-HCG 的分泌缓慢升高，约于第 5 天达高峰，然后陡然下降。

3 讨论

CTB 是各种类型胎盘滋养层细胞的前体，具有多种分化潜能，具有“干细胞”样特性。虽然目前已建株[6,7]，但经体外载体转染传代，是否仍具有 CTB 的各种特性尚不清楚。原代培养的各种方法均有偏颇之处。从最初的胰酶消化到胰酶、DNaseⅠ、胶原酶、EDTA 等交叉混合使用，只是所用试剂、剂量不同。纯化细胞有 BSA 梯度法、percoll 非连续密度梯度法等，均存在着梯度液制备繁琐，细胞获得量少，纯度不高，活力差等问题，故如何获取纯度较高的 CTB 一直是人们关注的问题。

目前常用的分离 CTB 的方法均是在胰酶消化的基础上采用：密度梯度离心、贴壁分离筛选和流式细胞仪分离。Tarrade 等[3]采用更为温和的胰酶消化条件，使滋养层细胞从绒毛上逐步脱离。对胰酶消化分离早孕滋养层细胞的方法做出了有意义的贡献。流式细胞仪是目前最客观最有效地分离纯化滋养层细胞的方法，可同时检测 2～3 个参数，但在所选抗体特异性不高的情况下会出现假阳性结果。而且对仪器、试剂要求较高，代价高昂。BSA 梯度法所耗费的时间长，细胞获得量少。Kliman 等[1]最早采用 percoll 非连续密度梯度法分离纯化 CTB，后得到广泛推广，但密度梯度离心分离法均存在者梯度液制备繁琐、需预冷等问题。Choy 等[2]利用 Ficoll 分离液（γ 在 1.077 g/ml）也获得了均一性较高的 CTB，因此我们也选用此密度的分离介质进行分离。由于胰酶消化作用的非特异性，导致原代培养的滋养层细胞在纯化前含有较多的成纤维细胞、子宫基质细胞、蜕膜细胞等其它杂细胞，这些杂细胞污染在纯化后尽管去除了不少，但依然存在。根据 CTB 在接种后 2 h 开始贴壁，而成纤维细胞等杂细胞先于 2 h 贴壁的特性，我们应用反复差速贴壁法以去除杂细胞，此种方法早已应用于肿瘤及其它一些细胞的原代培养，避免了细胞贴壁变形后再标记去除的繁琐及污染的风险。文献[4]首次报道经胰酶消化后所得的单核细胞很有可能是 STB 破裂后，细胞膜碎片包裹细胞核所形成的。因为它们不能贴壁，可于 8 h 后换液以除去之。经以上方法得到的 CTB 纯度相对较高，达 90%以上，细胞形态单一，生长稳定，定向转化。经光电镜观测及免疫细胞化学鉴定证实为 CTB，图像分析表明细胞纯度达 91%，细胞活力测定活细胞百分比为 96.3%。说明上述方法较适合 CTB 的分离、纯化和体外生长。

培养的 CTB 细胞周期分析表明，在我们的培养条件下，只有少数细胞处于活跃的增殖期。其超微结构也显示我们分离培养的 CTB 具有早期细胞的形态学特点，生长曲线也显示其活细胞数的递减。而且，在体外观察中，我们注意到 CTB 经历了由单核－单核细胞聚集－小多核细胞－多核巨细胞和/或 STB 的过程，即单个核 CTB 分化为具有激素合成功能的 STB 及分化为具有远处迁移、浸润功能的绒毛外细胞滋养细胞。随着其形态分化、合胞体的形成，出现功能分化，激素开始合成并随其功能、形态的变化而变化呈一定的曲线[8]。其中以β-HCG 为代表性标志物，PROG、E_2 的合成分泌也类似于β-HCG。说明 CTB 形态与功能分化的统一性，dAPI 荧光标记示踪及激素合成变化为其强有力的佐证。

当前胚胎着床成为胚胎发育学研究的热点之一，对胎盘滋养细胞的研究是一种重要手段，而最佳的体外分离培养 CTB 的方法是研究的关键。在此基础上，可进一步研究滋养层细胞的增殖、分化、浸润及其在生殖生理和免疫及妊娠相关疾病中的作用。本研究成功

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

改善了分离培养人早孕绒毛 CTB 方法，简便易行，获得的细胞形态单一、生长稳定、定向转化，为进一步研究 CTB 在生殖生理中的作用提供了实验基础。

参考文献：

[1] Kliman H J, Nestler J E, Sermasi E, *et al*. Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae [J]. Endocrinology, 1986, 118(4): 1567－1582.

[2] Choy M Y, Maryonda I T. The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast[J]. Human Reprod, 1998, 13(10): 2941－2949.

[3] Tarrade A, Lai Kuen R, Laurendeau I, *et al*. Ultrastructural aspects and gene pattern expression of villous and extravillous human cytotrophoblasts [J]. Plcenta, 1999, 20: A65.

[4] Sedlmayr P. Report from the IFPA meeting in conjunction with the 8th PG-meeting, Schladming, Austria, September 26-29, 1999[J]. J Reprod Immunol, 2000, 46(1): 59－62.

[5] Clarson L H, Roberts V H J, Greenwood S L, *et al*. ATP-stimulated Ca^{2+}-activated K^+ efflux pathway and differentiation of human placental cytotrophoblast cells[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 282(4): R1077－1085.

[6] Choy M Y, St Whitley G, Manyonda I T. Efficient, rapid and reliable establishment of human trophoblast cell lines using poly-L-ornithine[J]. Early Pregnancy, 2000, 4(2): 124－143.

[7] Li R H, Shu Y L, Zhuang L Z, *et al*. Establishment and characterization of a cytotrophoblast cell line from normal plcenta of human origin[J]. Human Reproduction, 1996, 11(6): 1328－1333.

[8] 王雁玲，庄临之. 人胎盘滋养层细胞的功能分化及其调节[J]. 生殖与避孕，1999，19(6)：335－341.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2004)14-1251-02

个案与短篇

rHuEPO 对慢性肾衰患者红细胞膜带 3 蛋白的影响

Effects of recombinant human erythropoietin on band 3 protein of red blood cell in patients with chronic renal failure

叶自林[1]，王红勇[2]　（第三军医大学：[1] 新桥医院肾内科，全军肾脏病中心，重庆 400037，[2] 大坪医院野战外科研究所心血管内科，重庆 400042）

贫血是终末期病(ESRF)的常见症状，也是 ESRF 心血管系统合并症及酸碱电解质紊乱的重要原因。重组人促红细胞生成素(rHuEPO)是治疗 ESRF 肾性贫血的有效方法。红细胞阴离子转运蛋白(band 3 protein，带 3 蛋白)是红细胞膜主要蛋白质，分子量约为 90 000～100 000。它的主要功能是阴离子转运、识别和清除衰老红细胞、稳定红细胞膜骨架及调控红细胞糖酵解活性[1]。本研究旨在探讨慢性肾衰患者红细胞带 3 蛋白变化及 rHuEPO 对红细胞带 3 蛋白的影响，并探讨其意义。

1　资料与方法

分组及标准：患者组(50 例)：Cr＞ 442 μmol/L，BUN＞ 7.1 mmol/L，男性 28 例，女性 22 例，年龄 21～65 岁，平均(41.7±7.2)岁；rHuEPO 治疗前 Hb＜ 80 g/L，治疗后 Hb 上升＞ 2.0 g/L；于治疗前、后抽血检测下述指标。对照组(50 例)：健康男性 28 例，女性 22 例，年龄 20～63 岁，平均(40.2±6.8)岁，亦抽血检测下述指标。

红细胞膜带 3 蛋白相对含量测定：参照张龙翔[2]的方法制备红细胞膜样本，用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，0.25％考马斯亮蓝 G250 染色，在 CS-910 型双波薄层扫描仪上扫描、波长 550 nm，CRI-B 型数据处理仪(日本岛津)记录扫描图谱，显示各区带相对含量。

统计学处理：数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS10.0 统计软件行配对 t 检验和两均数间 t 检验。

2　结果

rHuEPO 治疗前，带 3 蛋白相对含量为(28.73±5.09)，较对照组(26.14±4.51)有显著升高($t=2.69$，$P<0.005$)；rHuEPO 治疗后，带 3 蛋白相对含量为(27.54±5.48)，较治疗前有显著降低($t=2.57$，$P<0.01$)。

3　讨论

慢性肾衰多有不同程度的代谢性酸中毒，对慢性肾衰代谢性酸中毒的呼吸代偿，既往对肺的研究较多，如呼吸运动、肺组织的结构变化等；对红细胞转运 CO_2 结构基础变化的研究较

（下转 1254 页）

作者简介：叶自林(1965－)，男，湖北省蕲春县人，博士，主治医师，讲师，主要从事肾小球疾病方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(023)68755290

收稿日期：2003-11-05；修回日期：2004-03-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net