

# 不同性腺激素水平对子宫内膜细胞体外增殖的影响

宋宇轩<sup>1</sup>, 曹斌云<sup>1\*</sup>, 王建刚<sup>1</sup>, 李 胜<sup>2</sup>, 程雪妮<sup>1</sup>, 朱广琴<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 2. 陕西省畜牧兽医总站, 西安 710016)

**摘要:** 为探讨不同雌激素( $E_2$ )和孕激素( $P_4$ )水平对家兔子宫内膜细胞体外增殖和分化的影响。采用离心法获取家兔子宫内膜上皮细胞及基质细胞, 设不同雌激素和孕激素水平组合添加于培养液, 利用 MTT 法间接测定不同性腺激素水平对子宫上皮和基质细胞的体外增殖的影响; 利用免疫组织化学法检测传代细胞是否分化为其他类型细胞。结果表明利用离心法可获得纯度较高的子宫内膜上皮和基质细胞; 孕激素(100 nmol/L)对基质细胞的增殖有促进作用( $P < 0.05$ ), 雌激素(100 nmol/L)和少量孕激素(10 nmol/L)对上皮细胞增殖有促进作用( $P < 0.05$ ); 免疫组化结果表明, 经性腺激素刺激的子宫内膜上皮和基质细胞分别对上皮角蛋白抗体和波形蛋白抗体呈阳性。研究证实适宜的性腺激素水平对外体培养的子宫内膜细胞有促进增殖的作用, 而且不会促使其分化为其他类型细胞。

**关键词:** 子宫内膜; 上皮细胞; 基质细胞; 性腺激素

中图分类号: S829.1.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)10-0987-05

## Effect of Different Level of Sex Steroids on the Proliferation of Endometrial Cells *in vitro*

SONG Yu-xuan<sup>1</sup>, CAO Bin-yun<sup>\*1</sup>, WANG Jian-gang<sup>1</sup>,

LI Sheng<sup>2</sup>, CHENG Xue-ni<sup>1</sup>, ZHU Guang-qin<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. The General Station of Animal Husbandry and Veterinary of Shanxi Province, Xian 710016, China)

**Abstract:** To study the effect of different level of sex steroids on the proliferation and differentiation of endometrial cells, rabbit endometrial epithelial cells and stromal cells were isolated using centrifugation method. The different level and combination of progesterone ( $P_4$ ) and  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) were added in media, the proliferative capability of the cells *in vitro* was determined indirectly by MTT method. The specificity and homogeneity of the epithelial cells and stromal cell cultured in media containing sex steroids were determined by immunocytochemistry employing antibodies against cytokeratin and vimentin respectively. The results stated that high purity epithelial cells and stromal cells were isolated using centrifugation method. 100 nmol/L  $P_4$  in media can stimulate the proliferation of stroma cell, thus a combination of 100 nmol/L  $E_2$  and 10 nmol/L  $P_4$  in media can stimulate the proliferation of epithelial cell ( $P < 0.05$ ). Immunocytochemistry staining demonstrated that cytokeratin was positive in epithelial cells and vimentin was detectable in stromal cells. This study demonstrated that sex steroids can promote proliferation of endometrial cells *in vitro* and maintain its specificity and homogeneity.

**Key words:** endometrium; epithelial cell; stromal cell; sex steroids

收稿日期: 2005-08-22

基金项目: 国家“863”高新技术研究发展计划(2002AA242051)

作者简介: 宋宇轩(1971-), 男, 陕西凤翔人, 博士生, 助理研究员, 主要从事动物生殖生理调控研究, E-mail: syx98728@163.com

\* 通讯作者: 曹斌云, 教授, 博士生导师

子宫是雌性动物孕育胎儿的器官,在物种繁衍中具有重要的生理作用。正常子宫由里向外一般由上皮层,基质固有层和平滑肌3层构成。上皮层主要由具有分泌功能的腺上皮细胞组成,固有层主要由基质细胞、网状纤维等构成。上皮层与基质固有层形成子宫内膜,子宫的生理功能主要由子宫内膜执行。子宫内膜是胚胎发育的“温床”,同时也是许多子宫疾病易发的部位。

由于体内研究的局限性,近年来有人利用体外构建的子宫内膜三维模型对一些子宫疾病如子宫腺癌,子宫内膜异位症以及胚胎的发育等病理及生理现象进行体外研究<sup>[1~3]</sup>。但子宫组织体外三维结构的重建需要大量的种子细胞。子宫内膜上皮细胞在体外存活时间短,一般不能传代。因此内膜上皮及基质细胞的分离及体外扩增是构建三维模型的首要限制因素。子宫内膜在正常生理条件下受体内激素尤其是雌激素和孕激素的影响呈周期性变化。本研究拟在培养液中添加不同水平的雌激素及孕激素,观察其对子宫内膜上皮及基质细胞体外扩增的影响,以期快速大量扩增子宫内膜细胞提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

DMEM-F12 培养液(购自美国 Gibco 公司); PBS、D'Hanks 平衡液(自制);胎牛血清(FBS,购自北京元亨生物技术公司);PMSG、hCG、雌二醇和孕酮(均购自 Sigma 公司);0.25%胰酶(购自 Sigma 公司);上皮角蛋白抗体,波形蛋白抗体以及免疫组化试剂盒(购自武汉博士德公司)以及 MTT 试剂等。

### 1.2 试验动物及取样

采用5~6周龄新西兰大白兔,术前3d下午4:00肌肉注射100 IU PMSG,术前1d下午4:00耳缘静脉注射75 IU hCG,手术当日早上8:30耳缘静脉注射5 mL空气处死,消毒腹部,打开腹腔取双侧子宫,置D'Hanks平衡液中。

### 1.3 子宫内膜细胞的分离培养

在超净台剪开子宫,用手术刀轻刮子宫内膜于培养皿,0.25%胰酶作用5 min,少量FBS终止。转入10 mL离心管加入DMEM-F12培养液,600 r/min离心10 min,弃上清。加10 mL培养液重悬,然后300 r/min离心5 min,取8 mL上液转入一培养瓶,此为基质细胞;余2 mL转入另一培养瓶为上

皮细胞。将所获细胞于75 mm培养瓶加DMEM-F12培养液(含10%FBS)5%CO<sub>2</sub>、37℃饱和湿度培养,隔日换液。

### 1.4 试验设计

分别配成含E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>各0,10,100 nmol/L的培养液,按下表设计试验,探讨不同E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>组合对子宫内膜细胞体外培养效果的影响。取原代培养的子宫内膜上皮及基质细胞,以10<sup>4</sup>的密度接种于96孔培养板,分别以含不同E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub>浓度水平的培养液培养,每处理4孔,隔日换液,培养5 d后做MTT试验。试验前4 h在培养细胞的孔板每孔加20 μL MTT于培养液中,然后移去孔板内培养液,加150 μL DMSO,于酶标仪震动10 min后在492 nm波长处测吸光值。吸光值可间接反映细胞的增殖情况。

表1 试验处理

Table 1 The treatment of experiment	nmol/L				
处理 Treatment	1	2	3	4	5
雌激素(E <sub>2</sub> )β-estradiol	0	0	10	100	100
孕激素(P <sub>4</sub> )Progesterone	0	100	100	0	10

### 1.5 培养细胞的形态观察

对培养的细胞每日观察其形态并照相。

### 1.6 MTT 比色试验测细胞生长曲线

取传至第2代的细胞以10<sup>3</sup>/mL的密度接种至96孔板做MTT比色试验,方法同前。上皮细胞培养液含100 nmol/L雌激素以及10 nmol/L孕激素,基质细胞培养液含100 nmol/L孕激素。每天测9孔,连续测9 d直至细胞增殖达到平台期。取平均值绘制生长曲线。

### 1.7 免疫组化鉴定

将传至第2代的两种细胞接种于铺有盖玻片的24孔板内培养,待细胞在盖玻片上贴壁后取出。PBS漂洗5 min 3次,95%酒精固定30 min。PBS漂洗5 min 3次,以含0.1% Triton-100和0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的甲醇溶液室温作用10 min以封闭内源性过氧化物酶。PBS漂洗5 min 3次,加10%山羊血清室温15 min。倾去血清,滴加一抗,上皮细胞加入鼠抗兔上皮角蛋白CK18抗体,基质细胞加入鼠抗兔波形蛋白抗体,湿盒内4℃过夜。PBS漂洗5 min 3次,加生物素标记的二抗工作液,37℃孵育15 min。PBS漂洗5 min 3次,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育15 min。加

DAB 显色,镜下观察,5 min 后终止显色。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察并照相。

### 1.8 台盼蓝排斥试验

在由原代传至 2 代时制备单个细胞悬液稀释至  $10^6$ /mL,取 9 滴细胞悬液移入小试管中加一滴 0.4% 的台盼蓝溶液,混匀。在 3 min 内用血球计数板分别计活细胞和死细胞数,死细胞被染成淡蓝色而活细胞拒染。

表 2 不同雌激素和孕激素水平对子宫内膜细胞体外增殖的影响

Table 2 Effect of Different Level of  $P_4$  and  $E_2$  on the Proliferation of Endometrial Cells *in vitro* nmol/L

处理( $E_2/P_4$ ) Treatment	0/0	0/100	10/100	100/0	100/10
基质细胞 Stromal cell	0.84±0.11 <sup>a</sup>	1.15±0.08 <sup>b</sup>	1.01±0.10 <sup>ac</sup>	0.94±0.04 <sup>c</sup>	0.96±0.06 <sup>c</sup>
上皮细胞 Epithelial cell	0.34±0.01 <sup>b</sup>	0.37±0.04 <sup>ab</sup>	0.37±0.02 <sup>ab</sup>	0.35±0.03 <sup>b</sup>	0.41±0.02 <sup>c</sup>

同一行数据带不同字母者表示差异显著( $P<0.05$ )

The date with different letters in the same row differs significantly( $P<0.05$ )

### 2.2 两种细胞的传代培养与形态观察

上皮细胞经胰酶消化后呈管状或葡萄状,贴壁后长成致密单层细胞集落,细胞呈多角形,边界清楚,胞浆中有空泡,排列紧密时呈典型“铺路石”状(图 1);基质细胞是具有成纤维细胞形态的梭形细胞,胞浆丰富,核椭圆,易传代,长期培养后细胞延伸成梭形,相互平行排列成束,密度大的区域聚集成涡旋状(图 2)。

将上皮与少量基质细胞(15%)共培养并在培养液中加 100 nmol/L 雌激素和 10 nmol/L 孕激素后,可传 4~5 代,但随着传代次数的增加,上皮细胞的比例逐渐减少。基质细胞传 6~7 代开始死亡。

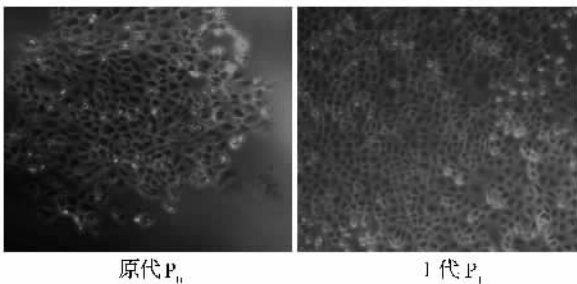


图 1 子宫内膜上皮细胞形态(50×)

Fig. 1 The morphology of the endometrial epithelial cells (50×)

### 2.3 子宫内膜细胞生长曲线

上皮细胞和基质细胞在接种后第 1 天为潜伏生

## 2 结果与分析

### 2.1 不同性腺激素对子宫内膜细胞体外增殖的影响

由表 2 可以看出,孕激素(100 nmol/L)对基质细胞增殖有显著的作用( $P<0.05$ );而 100 nmol/L 的雌激素和 10 nmol/L 的孕激素则对上皮细胞有显著的增殖作用( $P<0.05$ )。

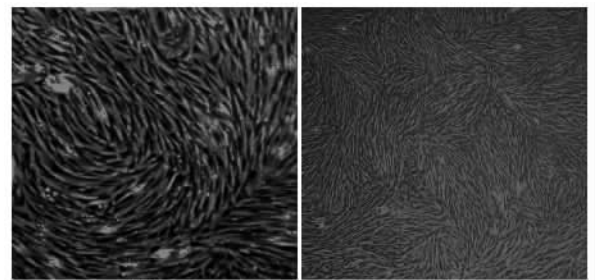


图 2 子宫内膜间质细胞形态(50×)

Fig. 2 The morphology of the endometrial stromal cells (50×)

长期,接着很快进入指数生长期,但上皮细胞在第 5 天开始就进入平台期;基质细胞则在第 7 天开始进入平台期。上皮细胞在第 7 天开始有死亡,基质细胞在第 9 天开始有明显的死亡(见图 3)。

### 2.4 子宫内膜细胞免疫组化结果

免疫组化结果表明,上皮细胞对上皮角蛋白抗体呈强阳性,胞浆呈棕色;间质细胞对波形蛋白抗体呈阳性,胞浆呈棕色(见图 4、5)。

### 2.5 台盼蓝排斥试验测活细胞比例

子宫内膜上皮细胞和基质细胞传至 2 代时 0.4% 台盼蓝染色,在 3 min 内用血球计数板分别计活细胞和死细胞数,死细胞被染成淡蓝色而活细胞拒染。经计数计算传代的上皮细胞活力在 90% 以上,基质细胞则在 95% 以上。



质中均有表达<sup>[9]</sup>。依据这些生理基础,对家兔在术前 3 d 注射 100U PMSG,术前 1 d 注射 75U hCG,调节家兔子宫生理至内膜“增殖期”,术后获得的基质和上皮细胞均可贴壁并生长。上皮表现出典型的“铺路石”形态,基质则表现为明显的梭形成纤维形态。

在体内  $E_2$  和  $P_4$  对子宫内膜的增殖具有调节作用,但就这两种激素对体外分离培养的子宫内膜细胞的作用如何,还未见报道。本研究采用单独使用  $E_2$ 、 $P_4$  或不同剂量  $E_2$  与  $P_4$  联合使用刺激体外培养的子宫内膜上皮或基质细胞,发现相对于其他组,孕激素(100 nmol/L)对基质细胞增殖有显著的作用 ( $P < 0.05$ );而 100 nmol/L 的雌激素和 10 nmol/L 的孕激素则对上皮细胞有显著的增殖作用 ( $P < 0.05$ )。通过免疫组化结果证明,虽然经过激素处理,上皮细胞仍然对其特异性抗体上皮角蛋白呈阳性(图 4),而基质细胞则对其特异性抗体波形蛋白呈阳性(图 5),说明细胞在激素的作用下并未分化为其他类型细胞。细胞生长曲线表明,上皮细胞和基质细胞在接种后第 1 天为潜伏生长期,接着很快进入指数生长期,但上皮细胞在第 5 天开始就进入平台期;基质细胞则在第 7 天开始进入平台期。上皮细胞在第 7 天开始有死亡,基质细胞在第 9 天开始有明显的死亡。

基质细胞在上皮细胞的发育、生长和功能方面发挥重要的调节作用<sup>[10]</sup>。子宫内膜基质细胞调节上皮细胞的生长和分化<sup>[11]</sup>。基质细胞及细胞外基质在维持腺上皮细胞的功能中发挥重要作用,尤为重要是基质细胞可能参与雌激素对体外培养的上皮细胞的调节<sup>[12]</sup>。子宫内膜上皮细胞在体外难以传代,考虑到基质细胞可通过旁分泌作用调节上皮细胞的生长,我们将 85% 上皮与 15% 基质细胞共培养并在培养液中加 100 nmol/L 雌激素和 10 nmol/L 孕激素后,可传 4~5 代,但随着传代次数的增加,上皮细胞的比例逐渐减少。基质细胞传 6~7 代则开始死亡。

本研究表明,家兔在经过促情激素和促排卵激素处理后分离其子宫内膜上皮和基质细胞,可在体外增殖生长。孕激素(100 nmol/L)对基质细胞的增殖有促进作用,雌激素(100 nmol/L)和少量孕激素(10 nmol/L)对上皮细胞增殖有促进作用。性腺激素不会促使子宫内膜细胞在体外分化为其他类型细胞。上皮细胞与少量基质细胞(15%)共培养并辅以 100 nmol/L 雌激素和 10 nmol/L 孕激素可促使上皮细胞在体外传更多代次。子宫内膜细胞在体外

的大量增殖可为子宫内膜的体外三维重建提供足量的种子细胞,从而为子宫生理、疾病以及胚胎的植入机理等提供理想的研究模型。

#### 参考文献:

- [1] Dong W P, Dong S C, Ryu H S, *et al.* A well-defined in vitro three-dimensional culture of human endometrium and its applicability to endometrial cancer invasion [J]. *Cancer Letters*, 2003, 195: 185~192.
- [2] Caetje R, Kotzian S, Herrmann G, *et al.* Invasiveness of endometriotic cells *in vitro* [J]. *Lancet*, 1995, 346 (2): 1 463.
- [3] Larry I, Barmat, M D, Liu H C, *et al.* Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium [J]. *Reproductive Biology*, 1998, 70 (6): 1 109~1 113.
- [4] Osteen K G, Hill G A, Hargrove J T, *et al.* Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens [J]. *Fertil Steril*, 1989, 52(6): 956~971.
- [5] 陈秀荔, 靳亚平, 利光辉, 等. 孕早期家兔子宫内膜细胞的分离培养与形态观察 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2004, 32(6): 1~4.
- [6] Bongso A, Gojra B, Lian N P, *et al.* Establishment of human endometrial cell culture [J]. *Hum Reprod*, 1988, 3(6): 705~713.
- [7] Fernandez-Shaw S, Shorter S C, Naish C E. Isolation and purification of human endometrial stromal and glandular cells using immunomagnetic microspheres [J]. *Hum Reprod*, 1992, 7(2): 156~161.
- [8] 钱菊汾. 家畜胚胎学 [M]. 中国: 中国科学文化出版社, 2003.
- [9] Bigsby R M, Aixin L, Luo K, *et al.* Strain differences in the ontogeny of estrogen receptors in murine uterine epithelium [J]. *Endocrinology*, 1990, 126: 2 592~2 596.
- [10] Donjacour A A, Cunha G R. Stromal regulation of epithelial function [J]. *Cancer Treat Res*, 1991, 53: 335~364.
- [11] Cunha G R, Bigsby R M, Cooke P S. Stromal-epithelial interactions in adult organs: review [J]. *Cell Differ*, 1985, 17: 137~148.
- [12] Arnold J T, Kaufman D G, Seppala M, *et al.* Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth *in vitro*: a new co-culture model [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16: 836.