

一种新的子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞的分离纯化及培养方法的探讨

鲍远红, 王秀霞

(中国医科大学附属盛京医院生殖中心, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的: 建立一种简捷的分离纯化培养子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞的方法。方法: 选择子宫全切育龄妇女的新鲜子宫内膜组织, 经单酶消化、二次筛网过滤及贴壁纯化技术分离纯化培养人子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞, 光镜及免疫细胞化学染色鉴定细胞纯度。结果: 腺上皮细胞漩涡状生长, 细胞呈蝌蚪形或类圆形, 细胞角蛋白 19 免疫组化染色阳性, 纯度可达 92%。基质细胞呈平行状生长, 细胞呈梭形或多角形。波形蛋白免疫组化染色阳性, 纯度达 95% 以上。每例子宫肌瘤切除标本可获得 (10~25)×10⁶ 原代基质细胞和 (4~6)×10⁶ 原代腺上皮细胞。结论: 该培养方法可获得高产量的纯化的子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞。

[关键词] 子宫内膜; 上皮细胞; 基质细胞; 细胞培养

[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)05-0608-03

A new method for isolating, purifying, and culturing human endometrial glandular epithelial and stromal cells

BAO Yuan-hong, WANG Xiu-xia

(Reproductive Center, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

[Abstract] Objective: To establish a new simple method for isolating, purifying, and culturing human endometrial glandular epithelial and stromal cells. Methods: Enzymatic digestion, double filtration, and adherence purification were performed to obtain the endometrial glandular epithelial and stromal cells from the endometrial tissues of women undergoing total hysterectomy. These 2 types of cells were observed under light microscope and identified by immunocytochemical staining. Results: The glandular epithelial cells grew in whorls and stained positively for cytokeratin 19 (CK19), and the purity was above 92%. The stromal cells were spindle-shaped or polygonal-shaped and stained positively for vimentin, and the purity was above 95%. The numbers of stromal and glandular epithelial cells obtained from 1 endometrium sample were about 10×10⁶ to 25×10⁶ and 4×10⁶ to 6×10⁶, respectively. Conclusion: A better yield of purified human epithelial and stromal cells can be obtained by using this modified culture method.

[Key words] endometrium; epithelial cell; stromal cell; cell culture

月经生理、子宫内膜疾病及肿瘤发病机制、胚胎植入机制等均未完全阐明。人子宫内膜细胞体外培养在上述研究中占有重要的地位。为建立子宫内膜细胞单培养、共培养模型, 高质量、高纯度的子宫内膜上皮细胞及基质细胞是必须的。为此国内外学者对体外子宫内膜分离纯化培养进行了研究^[1-6], 方法概括为多酶消化法、系列过滤法及梯度沉降法。这些方法因步骤繁琐、易污染、细胞损失较多, 导致进一步的培养发生困难。因此探讨一种步骤简单、细胞损失少但纯度高的新的细胞分离技术非常必要。本文介绍一种相对简捷的分离纯化培养子宫内膜腺上皮细胞及基质细胞方法。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及仪器

试剂: DMEM-F12 培养基 (Gibco), Trypsin-ED-

TA 酶 (Sigma), 胎牛血清 (中科院生物技术研究 所), 鼠抗人细胞角蛋白 19 (cytokeratin 19) 抗体、鼠抗人波形蛋白 (vimentin) 抗体、链霉生物素-过氧化物酶标记的羊抗小鼠抗体购自北京中山生物公司。

1.2 标本来源

留取 2006 年 2~6 月在我院 12 例因子宫肌瘤行全子宫切除术妇女的子宫内膜 (增生中晚期), 年龄 35~42 岁, 无内科并发症, 月经周期规律 (25~35 d), 术前 3 个月无激素服用史, 病理证实内膜无病变, 均为增生期。留取子宫内膜得到盛京医院医学科许可, 征得患者本人同意并签署知情同意书。用刮匙刮取子宫内膜, 放入冰浴 DMEM-F12 培养液中, 迅速送往实验室。

1.3 子宫内膜腺上皮细胞及基质细胞的分离培养与纯化

子宫内膜标本主要参照文献 [1]、[2] 的培养方法并加以综合改良。将内膜放入培养皿中, 用 0.9% 生理盐水 (含 1% PS) 洗涤 3 次, 去除血污。然后加 2~3 ml 培养液 (DMEM:F12 和 HEPES 含 1% PS) 入培

[作者简介] 鲍远红 (1968 -), 女, 主治医师, 硕士研究生。

E-mail: baoyh606@163.com

养皿中,用剪刀剪碎。在剪碎的组织中加入 5 ml 0.25% trypsin-EDTA 酶,37 ℃下消化 40 min。然后加入等量含 10%胎牛血清培养液,终止酶反应,同时滤过 100 目和 400 目的细胞滤网,收集滤网下的细胞入离心管中(主要为基质细胞),待离心。弃去 100 目滤网上未消化组织。反冲 400 目滤网,收集腺上皮细胞团,放入另一离心管中。离心(600 r/min, 10min)。离心后洗涤 1 次,将腺上皮细胞团及基质细胞沉淀分别加入培养液混悬,放入 60 mm 培养皿中培养,培养 1 h 后将基质细胞上清吸入另皿培养,原皿加入培养液继续培养。培养液中含有 1%青、链霉素和 10%胎牛血清。每 2 d 细胞换液,每天观察细胞生长情况,照相。

1.4 子宫内膜腺上皮细胞及基质细胞的形态学及生物学特性观察

HE 染色,Olympus 倒置显微镜对细胞进行形态学观察。

1.5 培养细胞鉴定及纯度检测

免疫细胞化学技术鉴定细胞,并进行纯度检测,分别对每种细胞进行细胞角蛋白及波形蛋白抗体免疫染色,一抗细胞角蛋白 19 抗体及波形蛋白抗体浓度为 1:100,二抗链霉素生物素-过氧化物酶标记的羊抗小鼠的浓度为 1:200,阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,阳性对照用子宫内膜组织。

1.6 原代细胞产量测定

基质细胞长满培养皿后,根据底面积及容量估算。腺上皮细胞往往不能完全融合铺满皿底,采用 0.25% 的胰酶消化,收集细胞,计数板计数,计算获得结果。

2 结果

2.1 增生期子宫内膜腺上皮细胞及基质细胞的形态学特点与生物学特性

倒置显微镜观察,酶消化后的子宫内膜腺体呈葡萄串状或管状;基质细胞呈单个分散细胞。腺体接种 24 h 贴壁生长,48 h 出现特征性的漩涡状生长,细胞呈蝌蚪形或类圆形。3 d 后细胞生长迅速,呈单层细胞集落状生长,约 5~6 d 后细胞相互融合成片状。持续培养 3 周左右,细胞逐渐从皿底脱落、崩解。腺上皮细胞不耐受传代。基质细胞接种后 30 min 贴壁,24 h 时细胞呈梭形或多角形,2 d 后生长活跃,3~4 d 铺满皿底,融合,需传代培养。基质细胞传代后存活率高,细胞以梭形细胞为主(图 1,图 2)。

图 1 原代培养的腺上皮细胞 ×400

Fig.1 Primary cultured endometrial glandular cells ×400

图 2 原代培养的基质细胞 ×400

Fig.2 Primary cultured endometrial stromal cells ×400

2.2 细胞鉴定及纯度检测

采用对上皮细胞特异的细胞角蛋白 19 抗体和对基质细胞特异的波形蛋白抗体进行免疫细胞化学染色。结果:子宫内膜腺上皮细胞角蛋白染色阳性,胞质被染成棕色,核呈蓝色,以核周胞质染色最强,阳性率约 92%。基质细胞波形蛋白染色胞质也呈棕色,阳性率达 95%(图 3,图 4)。

2.3 原代子宫内膜腺上皮细胞及基质细胞的产量

12 例标本 10 例培养成功,2 例因为腺上皮细胞量少未生长。每例子宫切除留取的内膜标本可得到(10~25)×10⁶的基质细胞和(4~6)×10⁶的腺上皮细胞。

图 3 腺上皮细胞细胞角蛋白 19 染色阳性 ×400

Fig.3 Glandular cells immunohistological stain positive ×400

图 4 基质细胞波形蛋白染色阳性 × 400

Fig.4 Stromal cells immunohistological stain positive × 400

3 讨论

3.1 体外培养增生期子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞的意义

可以利用该体外模型在细胞和分子水平上研究子宫内膜的各种功能及调节,不仅可以消除复杂的影响因素,还可以模拟细微的激素改变,增进对内膜在胚胎着床和发育中作用的了解,进一步弄清不孕及流产的病因。因此,应用于子宫内膜细胞分离及培养技术,建立人子宫内膜细胞体外培养模型,不仅能为子宫内膜细胞生物学特性、胚胎着床与月经机制、子宫内膜疾病等基础研究提供有用的手段,而且可直接用于人工助孕技术,为进一步探查有关不孕、避孕、流产及月经病的病因和药物作用机制,对于正确合理有效的治疗具有重要意义。

3.2 子宫内膜腺上皮细胞及基质细胞分离培养步骤的改进

本研究综合了 YANG H^[1]与 ARNOLD^[2]培养方法并加以改进。国内外学者多采用多酶(胶原酶加 DNA 酶)消化子宫内膜^[2-4],步骤繁琐,需要时间长(消化 1~2 h),细胞损失较多。本研究用 0.25% Trypsin-EDTA 单酶消化,对组织的消化结果好,简化实验步骤,节省时间(消化 40 min),细胞损失少,存活率高;利用基质细胞体积小,腺上皮细胞体积大且成团的特点,应用过滤法分离细胞^[2],本实验应用 100 目滤网滤除未消化组织及黏液,400 目滤网分离上皮及基质细胞,加以贴壁纯化的技术(利用基质细胞与上皮细胞不同的贴壁时间特点:基质细胞 30 min,上皮细胞 2~24 h)进一步纯化细胞,优于梯度离心法(多次离心细胞,细胞损失增多)^[4]; ARNOLD、OVERTON^[2,5]利用 percoll 去除血细胞, OVERTON 等^[5]且高速离心裂解红细胞,过程较为

复杂,且 peroll 可能对细胞有损伤。本实验只利用血细胞不贴壁的特点,经多次换液去除血细胞,效果良好,滤网上反冲回收的腺体细胞可直接接种,腺上皮生长良好,而不再消化成单细胞悬液,因为此步操作可减少腺上皮细胞的产量。单酶消化法结合过滤法使细胞的产量大大提高,且实验步骤简捷,减少了细胞污染及细胞损失。腺上皮细胞及基质细胞生长形态及免疫细胞化学技术鉴定结果与国外结果一致^[2],优于国内方法^[3]。

3.3 影响原代培养的增生期子宫内膜细胞产量的因素

子宫内膜获取途径可影响原代细胞的产量,子宫切除留取的子宫内膜多,获取的原代细胞数多。月经周期影响腺上皮细胞的产量,增生中晚期至分泌期获得的原代腺上皮细胞数较多。酶消化时间亦影响腺上皮细胞的产量,过短残留未消化组织增多,过长对细胞有损伤,不利于腺上皮细胞生长,另外本实验的体会是消化过程中不宜振荡,振荡后细胞悬液呈胶冻状,不利于其后过滤分离及细胞生长。

3.4 传代问题

基质细胞可以传代且传代后性状不变,腺上皮细胞不能传代,但污染在基质细胞中的腺上皮细胞传代后生长良好,有时在 2~3 次传代后仍存活。腺上皮细胞的传代问题是子宫内膜细胞培养的难点,需要进一步研究解决。

(感谢感染科实验室马力老师在细胞培养中给予的悉心指导)

参考文献:

- [1] YANG H, HAN S, KIM H, et al. Expression of integrins, cyclooxygenases and matrix metalloproteinases in three-dimensional human endometrial cell culture system[J]. *Exp Mol Med*, 2002, 34(1): 75-82.
- [2] ARNOLD JT, KAUFMAN DG, SEPPALA M, et al. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(5): 836-845.
- [3] 宿爱琴, 糜若然, 张双革, 等. 高纯度子宫内膜细胞分离和体外培养技术及其应用[J]. *医学研究生学报*, 2002, 15(2): 115-117.
- [4] 谭先杰, 刘东远, 郎景和, 等. 子宫内膜腺上皮及间质细胞分离培养做为子宫内膜异位症体外细胞模型的探索[J]. *现代妇产科进展*, 2002, 11(1): 30-32.
- [5] OVERTON CE, FERNANDEZ-SHAW S, HICKS B, et al. In vitro culture of endometrial stromal and gland cells as a model for endometriosis: the effect of peritoneal fluid on proliferation [J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(1): 51-56.

[收稿日期] 2006-10-23