

人子宫内膜异位症在位和异位内膜细胞原代培养及形态学观察

俞超芹¹, 石书芳¹, 刘玉环², 王瑞霞¹, 宋艳华¹, 俞瑾³

(1. 第二军医大学长海医院中医科, 上海 200433; 2. 第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433; 3. 复旦大学妇产科医院, 上海 200011)

[摘要] 目的: 探讨子宫内膜异位症(endometriosis, EM)异位子宫内膜细胞原代培养方法, 并比较 EM 在位及异位子宫内膜细胞与正常对照在位子宫内膜细胞形态的差异。方法: 采用改良 EM 细胞原代培养方法, 免疫细胞化学法鉴定细胞类型, 在光学显微镜及电子显微镜下观察细胞形态差异。结果: 正常对照子宫内膜细胞及 EM 在位、异位子宫内膜细胞分离培养成功率分别为 91.67%、93.75% 和 75.00%。EM 异位、在位子宫内膜腺上皮细胞与正常在位子宫内膜腺上皮细胞大小相似, 但 EM 异位子宫内膜腺上皮细胞染色质增多, 核增大。EM 异位子宫内膜间质细胞较 EM 在位及正常在位子宫内膜间质细胞小, 且细胞膜表面有较多的微绒毛和胞浆突起。结论: 注意取材方式, 采用改良原代培养方法, 可以提高 EM 异位子宫内膜细胞培养成功率。EM 异位子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞超微结构与正常妇女及 EM 在位子宫内膜细胞有显著不同。

[关键词] 子宫内膜异位症; 原代培养; 腺上皮细胞; 间质细胞

[中图分类号] R711.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2006)02-0189-05

Primary culture and morphologic observation of eutopic and ectopic endometrial cells from patients with endometriosis

Chao-Qin YU¹, Shu-Fang SHI¹, Yu-Huan LIU², Rui-Xia WANG¹, Yan-Hua SONG¹, Jin YU³

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Gynecology and Obstetrics Hospital, Fudan University, Shanghai 200011, China)

ABSTRACT Objective: To explore the method of primary culture for endometriotic cells and to find out the differences in morphological manifestations among endometriotic cells and eutopic endometrial cells sampled from patients with endometriosis and endometriosis-free women. Methods: Endometriotic and eutopic endometrial cells were cultured by modified method of primary culture. The endometriotic cell types were observed and differentiated under optical and electron microscopes. Results: The success rates for culture of eutopic endometrial cells from endometriosis-free women and patients with endometriosis were 91.67% and 93.75% respectively. The success rate for culture of endometriotic cells was 75.00%. The size of endometriotic glandular cells was similar to those of eutopic endometrial glandular cells from endometriosis-free women and patients with endometriosis. The chromatin was manifold and the nucleus was augmented in the endometriotic glandular cells. The endometriotic stromal cells were smaller than the eutopic endometrial stromal cells from endometriosis-free women and patients with endometriosis. Many tiny villi and protuberances on plasma membrane could be seen in the endometriotic stromal cells. Conclusion: The success rate for culture of endometriotic cells can be elevated through improving the method of primary culture. The ultrastructures of endometriotic glandular and stromal cells are obviously different from those of eutopic endometrial glandular and stromal cells from endometriosis-free women and patients with endometriosis.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30371838)

Correspondence to: Prof. Chao-Qin YU. E-mail: chqyu81@gmail.com

KEY WORDS endometriosis; primary culture; glandular cells; stromal cells

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao J Chin Integr Med, 2006, 4(2):189-193

www.jcimjournal.com

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)是子宫内膜间质细胞和腺上皮细胞种植于子宫腔以外的雌激素依赖性疾病,具有侵袭性生长、广泛种植、易复发等恶性肿瘤样特性。虽然 EM 的发现已有一百多年的历史,但其病因尚不十分清楚,亦无有效的治疗方法。因此,EM 是目前妇科学界研究的热点之一。已有的大量研究表明,异位子宫内膜间质细胞与腺上皮细胞的功能及相互作用不同于在位内膜^[1,2],而原代培养细胞由于刚离开机体,因此能较好地反映体内细胞的生物学特性,故原代培养已成为 EM 体外研究的一个重要方法。实践表明,在位和异位内膜间质细胞及腺上皮细胞的分离培养成功率并不高,尤其是异位内膜细胞培养的成功率较低,故本研究对 EM 在位内膜细胞及异位内膜细胞的分离培养方法进行了探索,观察正常子宫内膜细胞、EM 在位内膜细胞及 EM 异位内膜细胞之间形态学的差异,从细胞形态学角度研究 EM 的发病机制,以期为 EM 的研究提供有价值的体外细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 (1)2002 年 12 月~2003 年 7 月在长海医院妇产科行手术治疗的 EM 患者共 16 例,年龄 23~47 岁,平均(41.13±2.78)岁;所有患者均无内科合并症,月经规律;术前 3 个月内未服用激素类药物;剖腹行全子宫切除术或子宫附件切除术后,分离子宫内膜、巧克力囊肿内皮及盆腔异位灶。(2)因子宫肌瘤行全子宫切除术患者共 12 例,年龄 23~47 岁,平均(41.83±2.79)岁;无内科合并症;术前 3 个月内未服用激素类药物;剖腹行子宫附件切除术后刮取子宫内膜。

1.1.2 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱(德国 Hereaus 公司产品);SW-CJ-2F 型净化工作台(江苏苏州安泰空气技术有限公司产品);微量可调移液器(法国 Glison 公司产品);倒置相差显微镜(上海光学仪器厂产品);KA-1000 台式离心机和 SH2-88 型 37 恒温水浴摇床(上海安亭科技仪器厂产品)。

1.1.3 主要试剂 F-12 培养基、达氏改良依氏培养基(Dulbeco's modified Eagle's Medium, DMEM)、谷氨酰胺(美国 Gibco 公司产品);I 型胶原酶、牛血清白蛋白、胎牛血清(美国 Sigma 公司产品);DNase 酶(华美生物工程技术有限公司产品);小牛血清(杭州四

季青生物工程材料有限公司产品);鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体、鼠抗人波形蛋白单克隆抗体(美国 Santa 公司产品);链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(streptavidin-biotin peroxidase, SP)免疫组织化学试剂盒(美国 DOKA 公司产品)。

1.2 实验方法 将组织标本用无菌 F-12/DMEM (FD)培养液冲洗后,按文献方法^[3,4]经不断实践后改良进行分离培养操作。具体实验步骤如下:将子宫内膜标本用无菌生理盐水冲洗后,放入冰浴的 FD 培养液中。用 FD 清洗后剪碎标本,加入 FD 培养液,再加入 I 型胶原酶(终浓度为 1 mg/ml),37 恒温水浴摇床中消化 60 min 后,加入 DNase (终浓度为 15 U/ml),继续消化 30 min。将消化后的组织吸入离心管中,700 r/min 离心 7 min,弃上清液,加入含 10% 胎牛血清的 FD 培养液,700 r/min,离心 7 min,弃上清液。加入 FD 培养液,用吸管将细胞吹打开,然后经 100 目(孔径 150 μm)和 200 目(孔径 74 μm)不锈钢细胞滤网依次过滤(在培养皿中进行)。200 目网上细胞团主要为腺上皮细胞。将滤液(主要为间质细胞)经 1 000 r/min 离心 7 min,用适量 FD 培养液悬浮细胞。制作 3.0% 和 1.5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)梯度,将间质细胞悬液铺于梯度层上,室温沉降 20~30 min。弃去上层 BSA 液,用 FD 培养液洗涤 1 遍(1 000 r/min 离心 7 min),将细胞按 5×10⁵/ml 的密度接种于含 10% 胎牛血清的 FD 培养液中,置于 37 5% CO₂ 培养箱中培养。用 FD 培养液冲洗 200 目滤网上的细胞(主要为腺上皮细胞),收集冲洗液,700 r/min 离心 5 min,弃上清,用适量 FD 培养液悬浮。将细胞悬液铺于装有 8 ml FD 培养液的 15 ml 玻璃离心管中,重力沉降 10 min,弃上清,反复操作 4 次,使腺上皮细胞团沉降到底层。用含 10% 胎牛血清的 FD 培养液悬浮腺上皮细胞团后,接种于玻璃培养皿中,待混杂其中的间质细胞贴壁,3 h 后吸出腺上皮细胞团,磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)离心洗 2 遍(700 r/min 离心 7 min)。用含 0.02% 依地酸(edetic acid, EDTA)的 0.025% 胰酶消化 5 min,使腺上皮细胞团分散成单个细胞,然后吸入离心管,700 r/min 离心 7 min。将细胞接种于含 10% 胎牛血清的 FD 培养液中,置于 37 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 细胞类型鉴定 细胞角蛋白(cytokeratin)

广泛存在于人类上皮组织及培养的上皮细胞内,而波形蛋白(vimentin)则主要位于间质细胞中^[5]。所以分别选择鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体和鼠抗人波形蛋白单克隆抗体作为第一抗体,以 SP 染色法进行染色,对分离获得的子宫内膜两种细胞进行鉴定。

1.3.2 光学显微镜观察 将无菌盖玻片放入六孔培养板中,消化分离后的间质细胞接种于六孔培养板盖玻片上,置于 37 5% CO₂ 培养箱中培养。从培养皿中取出间质细胞生长良好的载玻片,用 PBS 液洗去原培养液。消化分离后的腺上皮细胞予以常规涂片。间质细胞和腺上皮细胞用 95% 乙醇固定,常规 HE 染色,光学显微镜下观察。

1.3.3 细胞超微结构观察 将消化分离的正常对照子宫内膜间质细胞及腺上皮细胞,EM 在位和异位间质细胞及腺上皮细胞分别用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定,618 环氧树脂包埋,LKB- 型超薄切片仪切片,醋酸铀、枸橼酸铅双重染色,在 ECNAI-12 型透视电镜下进行观察并摄像。

2 结果

2.1 原代细胞分离培养情况 分离培养的 12 份正

常对照(子宫肌瘤)子宫内膜标本,成功 11 例,分离培养成功率为 91.67%;分离培养的 16 份 EM 在位子宫内膜标本,成功 15 例,分离培养成功率为 93.75%;分离培养的 16 份 EM 异位子宫内膜标本,成功 12 例,分离培养成功率为 75.00%。

2.2 细胞类型鉴定结果 腺上皮细胞角蛋白染色大多数呈阳性反应,细胞纯度达 85%;间质细胞波形蛋白染色呈阳性反应,细胞纯度达 80%,经 1 次传代后,纯度可达 85% 以上。见图 1。

2.3 细胞形态学观察结果

2.3.1 光学显微镜观察 (1)腺上皮细胞:正常对照、EM 在位和异位子宫内膜腺上皮细胞均呈团状排列生长,为致密细胞集落,细胞呈多角形或蝌蚪形,边界清楚,排列紧密,胞浆饱满,核圆大。(2)间质细胞:EM 在位和异位子宫内膜间质细胞接种 24 h 后基本都能贴壁。正常对照子宫内膜间质细胞与 EM 在位子宫内膜间质细胞体积均较大,呈多角形或梭形排列,胞浆薄而透明,核椭圆。细胞融合后类似成纤维细胞,贴壁后呈旋涡状生长。EM 异位子宫内膜间质细胞形态较在位间质细胞小,分散生长,呈伸展、挺直状,中间稍宽,两头尖,似纺锤状。见图 2。

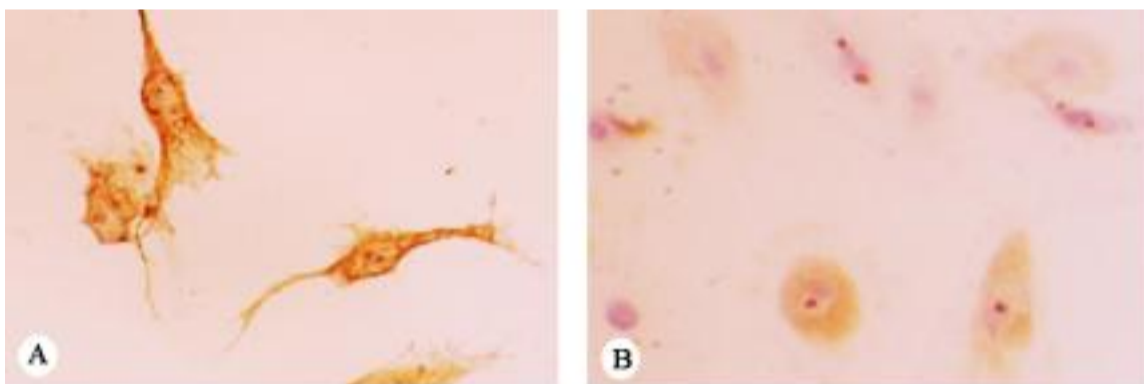
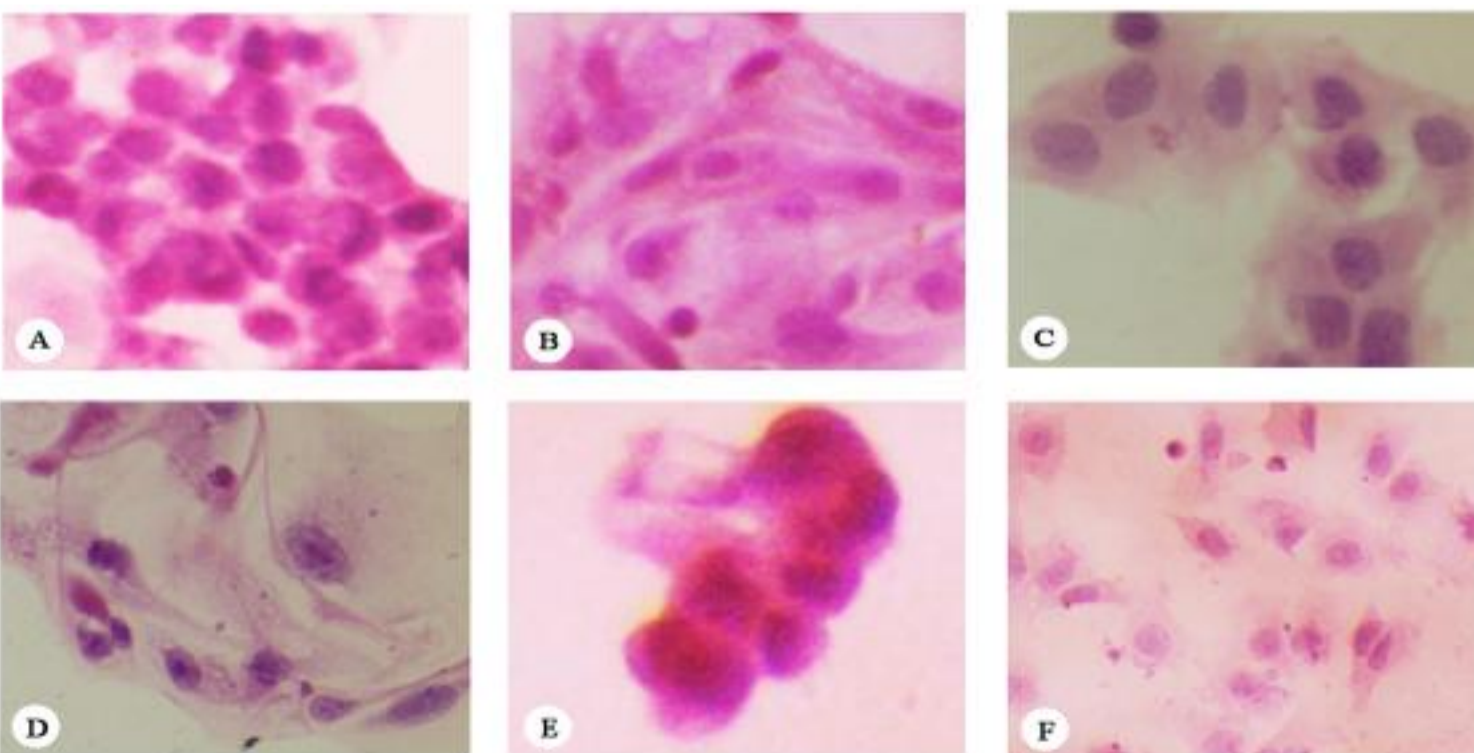


图 1 EM 异位子宫内膜间质细胞和腺上皮细胞形态鉴定(SP 染色, × 300)

Figure 1 Morphological identification of human endometriotic stromal and glandular cells (SP staining, × 300)

A: Endometriotic stromal cells; B: Endometriotic glandular cells.



A: Eutopic endometrial glandular cells from endometriosis-free women; B: Eutopic endometrial stromal cells from endometriosis-free women; C: Eutopic endometrial glandular cells from patients with endometriosis; D: Eutopic endometrial stromal cells from patients with endometriosis; E: Endometriotic glandular cells; F: Endometriotic stromal cells.

图 2 正常对照和 EM 在位、异位子宫内膜间质细胞和腺上皮细胞形态特征(HE 染色, × 300)

Figure 2 Morphological characterization of glandular and stromal cells from patients with endometriosis and endometriosis-free women (HE staining, × 300)

2.3.2 电子显微镜观察 (1)正常对照子宫内膜腺上皮细胞:细胞膜表面可见微绒毛,部分细胞膜表面有长绒毛,细胞间见紧密连接及桥粒连接,胞浆线粒体、核糖体、内质网较丰富,可见脂滴,核大,核仁明显。(2)正常对照子宫内膜间质细胞:一种是呈多角形的子宫内膜间质细胞,具有上皮样形态的细胞表面未见微绒毛,细胞间无连接结构,胞浆有散在核糖体及粗面内质网,可见溶酶体及一些囊泡,核膜平滑,核染色质均匀。另一种细胞呈梭形,电镜下见细胞无微绒毛,无连接结构,胞浆粗面内质网、核糖体和空泡较多,外周胞浆中有丰富的微丝。(3)EM 在位子宫内膜腺上皮细胞:细胞成团,有极性,圆形,胞膜表面有微绒毛,核大,呈椭圆形或有切迹,细胞间

见桥粒连接,胞浆线粒体、核糖体、粗面内质网较丰富,可见脂滴,核仁明显。(4)EM 在位子宫内膜间质细胞:电镜下见细胞表面无微绒毛,无连接结构,胞浆内有线粒体,粗面内质网、核糖体和空泡较多,溶酶体多见,核大,有不规则切迹、凹陷,核内染色体稀疏,核仁明显。(5)EM 异位子宫内膜腺上皮细胞:细胞游离,呈椭圆形,表面有细小微绒毛,细胞间有桥粒连接及紧密连接,核圆大,异染色质多,胞浆内多粗面内质网、核糖体、溶酶体及空泡。(6)EM 异位子宫内膜间质细胞:呈长梭形细胞,有较多微绒毛和胞浆突起,核大,椭圆形,核仁明显,细胞间少有桥粒连接,胞浆内有不规则线粒体和空泡,粗面内质网、核糖体可见。见图 3。

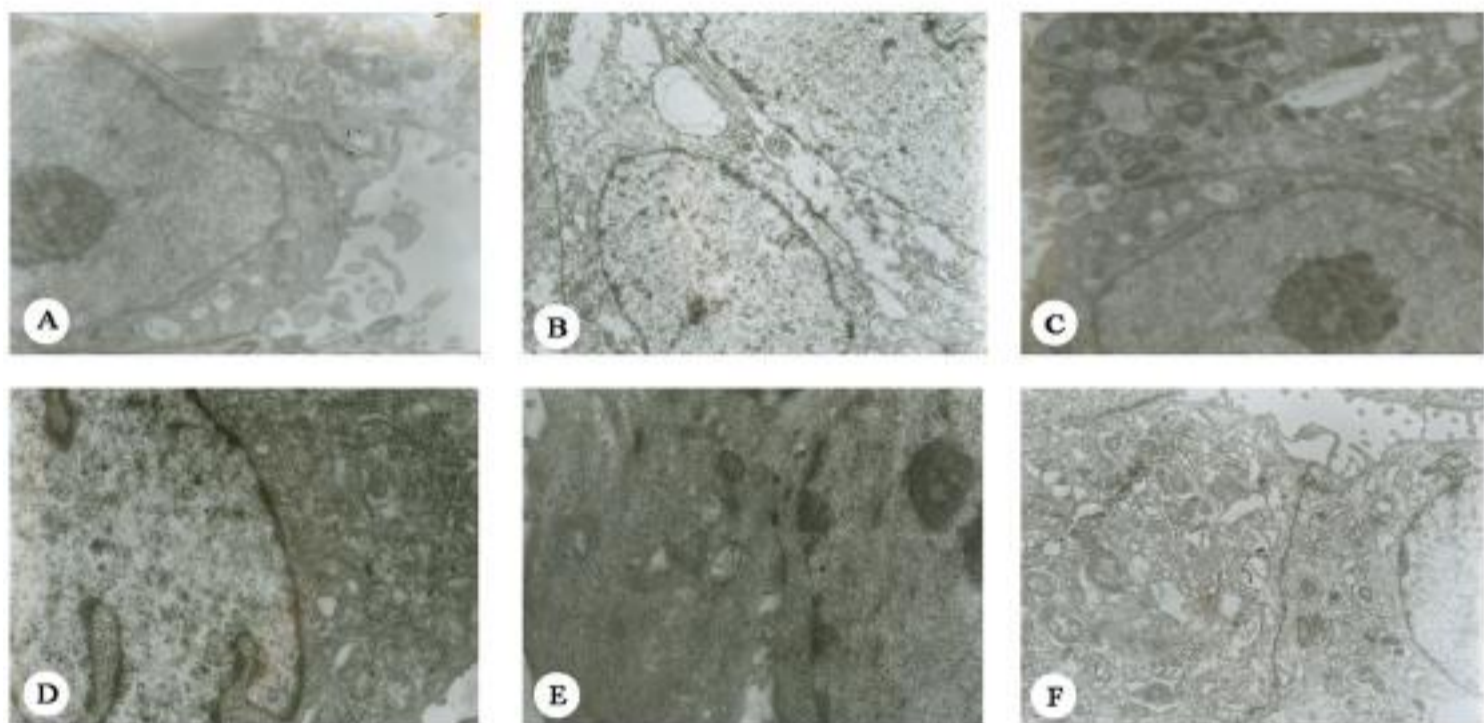


图 3 正常对照和 EM 在位、异位子宫内膜间质细胞和腺上皮细胞形态的电镜观察

Figure 3 Morphological characterization of glandular and stromal cells from patients with endometriosis and endometriosis-free women by electron microscope

A: Eutopic endometrial glandular cells from endometriosis-free women ($\times 11\ 000$); B: Eutopic endometrial stromal cells from endometriosis-free women ($\times 9\ 300$); C: Eutopic endometrial glandular cells from patients with endometriosis ($\times 11\ 000$); D: Eutopic endometrial stromal cells from patients with endometriosis ($\times 11\ 000$); E: Endometriotic glandular cells ($\times 13\ 000$); F: Endometriotic stromal cells ($\times 6\ 300$).

3 讨论

EM 的病因至今仍不清楚,较为经典并被广泛接受的是经血逆流学说。随着腹腔镜的广泛应用,发现经血逆流在生育期妇女十分普遍,但发展为 EM 的则只是少数。目前主要有两种观点:一种认为 EM 与免疫缺陷有关,由于 EM 患者存在免疫缺陷,不能清除随经血逆流的“异位”子宫内膜细胞,而导致其在盆腔内种植^[6,7];另一种观点则提出 EM 的发生与 EM 患者在位子宫内膜细胞的特性有关,由于其发生了某些类似肿瘤细胞样的改变,使之逃脱了免疫监视和清除而得以在盆腔内种植^[8]。有学者提出子宫内膜干细胞假说,即随经血逆流的具有分化潜能和自我更新特征的子宫内膜干细胞促使了

最初异位病灶的产生,并维持病灶的存在,促使病灶的进一步发展^[9]。无论何种学说,显然 EM 在位、异位子宫内膜细胞与正常生育期妇女在位子宫内膜细胞在基因、蛋白表达及生物学行为等方面均存在差异。因此,原代培养正常对照在位子宫内膜细胞和 EM 在位及异位子宫内膜细胞,对于研究细胞的生长、分化和代谢以及卵巢激素的作用机制,揭示 EM 的发病机制及临床治疗均具有重要意义。

但是,目前在位和异位子宫内膜间质细胞及腺上皮细胞的分离培养成功率并不高,尤其是异位子宫内膜细胞的培养成功率较低。本研究采用自行改良方法对正常对照子宫内膜和 EM 在位和异位子宫内膜中腺上皮细胞及间质细胞进行了体外原代培养,分别获得纯度较高的腺上皮细胞和间质细胞,正

常对照子宫内膜细胞分离培养成功率达 91.67% ; EM 在位子宫内膜细胞分离培养成功率达 93.75% ; EM 异位子宫内膜细胞分离培养成功率达 75.00% , 高于 Ryan 等^[10] 报道的 56% 和赫敏等^[11] 报道的 68.1% 。

EM 异位子宫内膜体外培养需注意以下几点: (1) 体积较大的卵巢巧克力囊肿, 其内皮分离培养后, 细胞数量很少, 不易分离培养成功。(2) 巧克力囊肿内壁有新鲜出血且囊肿体积较小(直径 < 3 cm), 分离培养后的细胞容易生长。(3) 子宫韧带异位结节以及腹膜异位灶的分离培养不易成功, 但取材时若能获取较大的紫红色异位结节, 亦可分离出数量较多的间质细胞和腺上皮细胞。(4) 本研究中内膜标本消化时使用的是 I 型胶原酶和 DNase I, 虽然价格较常用的胰酶贵, 但是经其消化后的间质细胞容易贴壁生长。可以适当延长 I 型胶原酶和 DNase I 的消化时间(一般为 2 h), 使内膜组织充分消化以获取更多的细胞。而胰酶消化时间过长会影响细胞的活性, 使间质细胞不易贴壁, 甚至造成细胞培养失败。(5) 在子宫内膜细胞分离培养过程中, 离心次数不宜过多, 离心转速不宜过高, 否则易造成细胞丢失, 并影响细胞活性。在本研究中, 间质细胞和腺上皮细胞的离心次数不超过 4 次, 而离心转速最高为 1 000 r/min。

离体在位和异位子宫内膜细胞的爬片, 排除了内膜组织中非内膜成分的干扰, 有利于进行各项指标的检测, 使免疫细胞化学检测定性、定位准确, 还能进行半定量分析^[12]。

在光镜及电镜下, 可对 3 种形态特征的细胞类型进行鉴别: (1) 腺上皮细胞; (2) 2 种形态的间质细胞, 其中一种是呈多角形的子宫内膜间质细胞, 另一种是呈梭形的子宫内膜间质细胞。透视电镜下 EM 异位子宫内膜腺上皮细胞中异染色质增多, 核增大, 这种形态与癌细胞基本相似, 可能与 EM 的恶性行为有关。而 EM 异位子宫内膜间质细胞的体积比正常对照及 EM 在位子宫内膜间质细胞小, 并且其细胞膜表面有较多的微绒毛和胞浆突起, 说明 EM 异位子宫内膜间质细胞的运动能力和侵袭能力增强。Caetje 等^[13] 用胶原凝胶体实验检测原代培养异位子宫内膜细胞的侵袭活性, 结果发现异位子宫内膜细胞的侵袭活性与转移性膀胱癌细胞株(E128)相似, 而正常在位子宫内膜细胞与非转移性癌细胞株(RT112)相似, 表明无侵袭性, 证实了 EM 具有恶性肿瘤样的侵袭特征。而本实验中所观察到 EM 异位子宫内膜间质细胞的形态改变, 也可能与这种恶性肿瘤样的侵袭特征有关。此外, EM 异位子宫内膜间质细胞胞浆内存在不规则线粒体, 是否与这种侵袭特征相关, 尚待进一步研究。

本研究中采取的内膜组织标本均为增生期内膜, 今后的研究中需注意补充分泌期的内膜标本, 以进一步完善对离体在位和异位子宫内膜的观察和监测, 为 EM 研究提供充分的理论依据。

[参考文献]

- 1 Harada T, Kaponis A, Iwabe T, *et al* . Apoptosis in human endometrium and endometriosis . *Hum Reprod Update*, 2004, 10(1): 29-38 .
- 2 Collette T, Bellehumeur C, Kats R, *et al* . Evidence for an increased release of proteolytic activity by the eutopic endometrial tissue in women with endometriosis and for involvement of matrix metalloproteinase-9 . *Hum Reprod*, 2004, 19(6): 1257-1264 .
- 3 谭先杰, 刘东远, 郎景和, 等 . 子宫内膜腺上皮及基质细胞分离、培养作为子宫内膜异位症体外细胞模型的探索 . *现代妇产科进展*, 2002, 11(1): 30-32 .
- 4 王小敏, 黄海鹏, 何福仙 . 简易人子宫内膜细胞培养法及其优点 . *赣南医学院学报*, 2002, 22(3): 256-258 .
- 5 Matthews CJ, Redfern CP, Hirst BH, *et al* . Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture . *Fertil Steril*, 1992, 57(5): 990-997 .
- 6 Sharpe-Timms KL, Zimmer RL, Ricke EA, *et al* . Endometriotic haptoglobin binds to peritoneal macrophages and alters their function in women with endometriosis . *Fertil Steril*, 2002, 78(4): 810-819 .
- 7 Dogan S, Machicao F, Wallwiener D, *et al* . Association of peroxisome proliferators-activated receptor gamma 2 Pro-12-Ala polymorphism with endometriosis . *Fertil Steril*, 2004, 81(5): 1411-1413 .
- 8 Koninckx PR, Barlow D, Kennedy S . Implantation versus infiltration: the Sampson versus the endometriotic disease theory . *Gynecol Obstet Invest*, 1999, 47 Supp 11: 3-9 .
- 9 Taylor HS . Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients . *JAMA*, 2004, 292(1): 81-85 .
- 10 Ryan IP, Schriock ED, Taylor RN . Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro . *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78(3): 642-649 .
- 11 郝敏, 石一复, 周彩云, 等 . 人子宫在位及异位内膜细胞的体外培养及生物学特性比较 . *生殖与避孕*, 1999, 19(5): 301-305 .
- 12 江静, 吴瑞芳, 王振海, 等 . 米非司酮对离体异位与在位子宫内膜雌、孕激素受体含量的影响 . *中华妇产科杂志*, 2001, 36(4): 218-221 .
- 13 Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, *et al* . Invasiveness of endometriotic cells in vitro . *Lancet*, 1995, 346 (8988): 1463-1464 .

[收稿日期] 2005-07-01