

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.35.003

原代人子宫内膜细胞分离及培养鉴定*

刘妍¹,李卫红^{1△},韦尉元²

(1. 广西中医药大学妇科教研室, 南宁 530001; 2. 广西医科大学研究院, 南宁 530021)

[摘要] **目的** 探究原代人子宫内膜细胞分离及培养的简易方法, 并对其纯度及生物活性进行鉴定。**方法** 采用胶原酶消化人子宫内膜组织, 经 2 次筛网过滤、离心及贴壁纯化技术, 分离、纯化培养人子宫内膜间质细胞(ESC)和腺上皮细胞(EEC), 用细胞角蛋白(cytokeratin)和波形蛋白(vimentin)免疫细胞化学染色法和免疫荧光方法对所分离的细胞进行鉴定。**结果** ESC 呈平行生长, 细胞呈梭形或多角形, 波形蛋白抗体免疫细胞化学染色呈阳性, 纯度达 95% 以上。EEC 呈漩涡状生长, 细胞呈多角形或蝌蚪形, 细胞角蛋白抗体免疫细胞化学染色呈阳性, 纯度可达 90%。**结论** 应用胶原酶消化法及二次筛网过滤法成功分离并培养数量、活力和纯度高的子宫内膜细胞, 可操作性强, 可供具备基本细胞培养条件的实验室进行推广。

[关键词] 子宫内膜; 间质细胞; 腺上皮细胞; 细胞培养**[中图分类号]** R329**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)35-4904-03

The method of isolation, culture and identification of primary human endometrial cells*

Liu Yan¹, Li Weihong^{1△}, Wei Weiyuan²

(1. Teaching and Research Section of Gynaecology, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. Research Institute of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

[Abstract] **Objective** To study the isolation method and the culture method of primary human endometrial cells and to identify the purity and biological activity. **Methods** We digested human endometrial tissue by collagenase at first, and then to separate, purify and culture the human glandular stromal cells(ESC) and endometrial epithelial cells(EEC) by differential centrifugation, dabble screen filtration and adhesion purification technology. Ultimately, we identified the isolated cells with cytokeratin and vimentin immunocytochemical staining and immunofluorescence method. **Results** Stromal cells showed a parallel growth. The cells were spindle or polygonal, and the vimentin antibody showed a positive immunohistochemical staining, the purity was more than 95%. At the same time, glandular epithelial cells grew in whorls. The cells were polygonal or tadpole shaped, and the cytokeratin antibody immunohistochemical staining, the purity were up to 90%. **Conclusion** The successful isolation and culture of high quantity, viability and purity by collagenase digestion and dabble screen filter method of endometrial cells make a strong operability. The laboratory which has the basic cell culture conditions can develop the experiment.

[Key words] endometrial; stromal cells; epithelial cells; cell incubation

子宫内膜是性激素作用的靶器官, 其功能细胞在月经、妊娠及子宫内膜疾病等生理与病理方面的作用机制尚未完全阐明。随着分子生物学技术的发展, 子宫内膜细胞的体外培养为研究细胞生长“分化”代谢以及激素作用机制提供一个理想的试验模型^[1]。因此, 建立一种可获得高纯度子宫内膜细胞的体外培养体系尤为重要, 既可用于其生理功能的研究, 也可用于子宫内膜异位症、功能失调性子宫出血、子宫内膜癌等多种疾病发病机制的进一步研究。子宫内膜细胞, 即间质细胞(endometrial stromal cell, ESC)和腺上皮细胞(endometrial glandular epithelial cell, EEC)的分离纯化方法众多, 当前国外最常用且操作相对较简单的是二次筛网过滤法^[2-3]。本研究通过在二次筛网过滤法的基础上根据自身试验条件对之加以改良, 以探索一种相对简单易行的人子宫内膜细胞分离方法, 并对分离人子宫内膜细胞的存活率和纯度进行判定, 为子宫内膜细胞相关课题研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 标本来源和采集 本试验所采集的 10 例子宫内膜组织均来自广西中医药大学附属瑞康医院妇科因“子宫内膜异位症或子宫腺肌症”行开腹或经腹腔镜下全子宫切除术的患者。患者年龄 38~49 岁, 平均(42.26±3.58)岁, 术前 3 个月均未经激素药物治疗。术中取得子宫内膜组织后, 立刻投入无菌生理盐水中快速清洗, 初步洗去血污及杂质, 然后放入含无菌预冷 DMEM/F-12 培养液(含双抗)中, 于 30 min 内送往实验室进行分离培养。本试验涉及的全部子宫内膜均经病理检查证实为增生期或分泌期子宫内膜, 并排除子宫内膜增生症、子宫内膜炎性病变等。子宫内膜组织标本的留取经过医院伦理委员会批准, 且征得其本人同意并签署了知情同意书。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要试剂 D' hanks 液(捷瑞生物工程有限公司, 上海); DMEM/F-12(赛默飞世尔公司, 北京); 青霉素、链霉素混

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260548)。 作者简介: 刘妍(1988—), 在读硕士, 主要从事中医药防治妇科疾病的研究。 △

通讯作者, Tel: 13006913206; E-mail: 794431024@qq.com。

合液、0.25%胰蛋白酶、4.00%多聚甲醛(均来自索莱宝公司,北京);胎牛血清(天杭生物科技公司,浙江);0.25% I 型胶原酶(Sigma 公司,美国);细胞角蛋白抗体、波形蛋白抗体(均为 Boster 公司,武汉);SP-9000 免疫组织化学试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司,北京);FITC 标记的羊抗鼠抗体、两步法抗兔/鼠通用型免疫组织化学试剂盒(中山生物技术有限公司,北京)。

1.2.2 仪器 水套式二氧化碳培养箱(2323-2, SHEL LAB 生产);电热恒温水浴箱(SHH. W21. 600S, 上海跃进医疗厂生产);洁净工作台(SW-CJ-IF, 苏州安泰空气技术公司生产);倒置式生物显微镜(CKX41SF, Olympus 生产);高速冷冻离心机(Centrifuge 5430 R, Eppendorf 生产)。

1.3 方法

1.3.1 人子宫内膜细胞的分离、纯化及传代 所取到的内膜组织参照文献[4]的方法加以改良,具体步骤如下。(1)清洗:用 D'hanks 液将新鲜刮取的内膜组织清洗 3 次,尽量将血污及杂质清除干净,将清洗后的组织剪碎约为 1 mm^3 ,肉眼呈糊状;(2)消化:加入 0.25% I 型胶原酶 $400\ \mu\text{L}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴 8 min 左右,期间适度振荡 4~5 次。加入 3 倍体积 DMEM/F-12 培养液终止消化;(3)纯化:细胞悬液依次过 100 目及 400 目细胞过滤网并用培养液冲洗细胞网,收集其表面的腺上皮细胞团。得到的 2 种细胞悬液分别进行离心($1\ 000\ \text{r}/\text{min}\times 10\ \text{min}$),弃上清液,保留细胞沉淀;(4)培养和传代:按细胞密度为 $10^5/\text{mL}$ 接种于 $25\ \text{cm}^2$ 细胞培养瓶内, $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中孵育。次日换液,之后每 48~72 小时进行细胞换液。待细胞铺满瓶底后,用 0.25%胰蛋白酶(含 0.02%EDTA)进行消化传代^[2]。传代后的细胞平均分成 2 瓶继续培养。

1.3.2 细胞形态学观察 每天于倒置相差显微镜下观察 2 种内膜细胞的形态与生长规律。

1.3.3 免疫细胞化学法染色 (1)细胞爬片:以细胞浓度为 $10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液接种于放有无菌盖玻片的 6 孔板内,于细胞培养箱内孵育 24 h,待细胞长满 90%后,取出细胞爬片。 4.0% 多聚甲醛固定细胞, $0.1\% \sim 0.2\%$ 聚乙二醇辛基苯基醚通透细胞。 5.0% 正常山羊血清孵育 30 min 后弃血清;(2)分别加入角蛋白抗体、波形蛋白抗体(工作浓度均为 1:50),同时设立阴性对照(用 PBS 代替一抗), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 湿盒内过夜。次日复温后滴加稀释的二抗, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min,采用 SP 法进行染色(滴加辣根酶标记链酶乳白素工作液)。中性树脂封片,光学显微镜下观察。

1.3.4 免疫细胞荧光 (1)细胞爬片:同免疫细胞化学;(2)加入一抗(此步骤同免疫细胞化学),(避光)加入荧光标记二抗,即 FITC 标记的羊抗鼠抗体, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h 后, DAPI 复染细胞核 10 min。 $50\% \sim 90\%$ 甘油封片,指甲油封片的四周,光学显微镜下观察。

2 结 果

2.1 培养结果 所取 10 例标本成功分离并培养出 ESC 和 EEC 的例数为 8 例,其余 2 例均为培养过程中真菌污染。结果证实此方法有效、可行且简便。

2.2 细胞生长情况及形态观察 (1)ESC:接种后约 2 h 左右开始贴壁,此时,可观察到 2 种形态的细胞:梭形细胞占多数,

少量呈多角形。ESC 细胞质饱满,核居中且圆,细胞呈平铺生长。ESC 易传代,连续培养 3~4 d 后,细胞逐渐延伸成长梭形,平行排列成束,密度大的区域则成团生长(图 1),最长可存活数月;(2)EEC:一般于接种后 24 h 左右开始贴壁,细胞呈蝌蚪形或多角形,细胞质丰富,核圆而大,细胞边界清楚,排列紧密(图 2),约 4 d 后呈漩涡状排列生长。EEC 平均生长时间约为 6 周。在 EEC 培养过程中会掺杂少量 ESC。子宫内膜原代细胞经首次传代后生长力旺盛,大约 5~6 d 可再次传代。与文献[5-6]报道相符合。

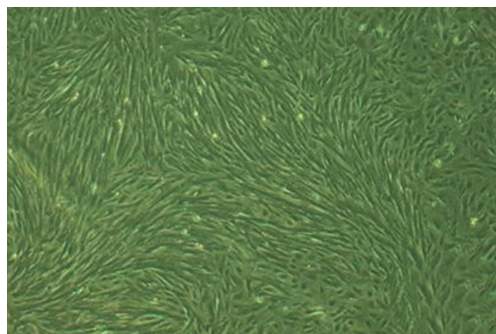


图 1 光学显微镜下 ESC 细胞影像学表现($\times 100$)

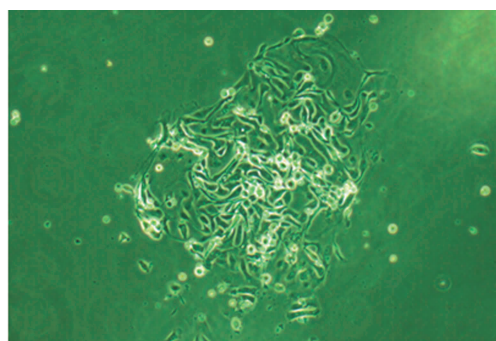


图 2 光学显微镜下 EEC 细胞影像学表现($\times 100$)

2.3 子宫内膜细胞的纯度鉴定 ESC 的特异性标志分子为波形蛋白,EEC 的特异性标志分子为细胞角蛋白。阳性结果判定:ESC 与 EEC 均为细胞质染色,棕黄色视为阳性染色;方法为:在低倍镜下每张盖玻片随机选取 10 个视野计数染色阳性细胞数和染色阴性细胞数。免疫细胞化学染色结果显示,ESC 角蛋白染色阴性,波形蛋白染色阳性,阳性率 95%,阳性细胞质呈棕黄色,核为蓝色(图 3);EEC 角蛋白染色阳性,波形蛋白染色阴性,阳性率 90%,阳性细胞质染成棕黄色,核为蓝色(图 4)。

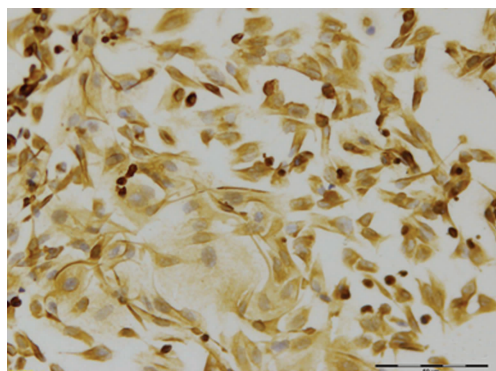


图 3 ESC 细胞染色影像学表现($\times 200$)

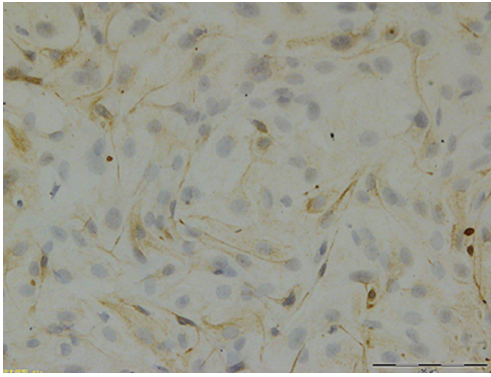


图 4 EEC 细胞染色影像学表现($\times 200$)

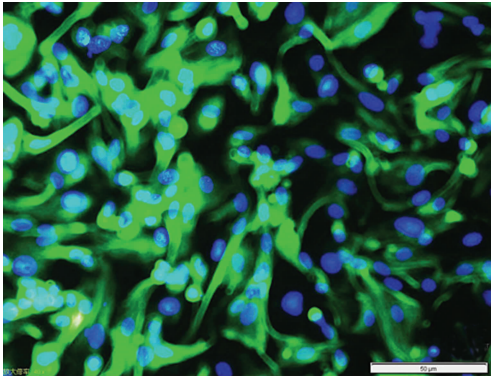


图 5 ESC 细胞免疫荧光染色结果($\times 200$)

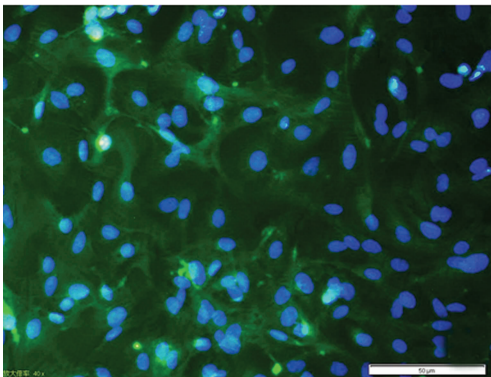


图 6 EEC 细胞免疫荧光染色结果($\times 200$)

2.4 细胞免疫荧光结果 (1)ESC 角蛋白染色阴性,波形蛋白染色阳性,阳性率 95%,阳性细胞质呈荧光反应,核为蓝紫色(图 5);(2)EEC 角蛋白染色阳性,波形蛋白染色阴性,阳性率 90%,阳性细胞质呈荧光反应,核为蓝紫色(图 6)。

3 讨论

3.1 成功建立高纯度子宫内膜细胞体外培养系统的重要意义

目前,子宫内膜细胞体外培养是研究子宫内膜相关疾病公认的一种有效途径,应用子宫内膜细胞分离纯化及培养技术,建立人子宫内膜细胞体外培养系统,可对胚胎着床,月经调节机制和子宫内膜异位症的产生机制等进行基础研究,并且可为研究药物作用机制及肿瘤发生等提供有效的手段^[7-8]。

3.2 人子宫内膜原代细胞体外培养的主要影响因素 子宫内膜原代细胞能否成功培养与以下因素密切相关:细胞的活力、纯度及细胞的接种密度^[9]。目前,有文献主张应用复合酶进行组织的消化,经过多次试验,最终认为 I 型胶原酶对细胞的活

力影响较小,性价比较高,与许艳丽等^[10]研究结论相符。本研究采用的标本均来自无菌条件下刮取的子宫内膜组织,并立即放入含双抗的培养液中,最大程度避免了污染。此外,有研究表明,适当增加冲洗组织标本的次数有利于将血污及黏液的进一步去除,并可清除病原体^[11]。消化后得到的悬液中包括 ESC、EEC 及红细胞等其他杂质细胞,其中,ESC 和 EEC 可分别通过 400 目及 100 目细胞筛网,而红细胞及其他杂质细胞则极少能通过 100 目细胞筛网。故本研究采用分次筛网进行过滤,离心后可得到较纯的 ESC 悬液及 EEC 悬液。Arnold 等^[12]认为,若在接种时细胞的密度过稀,则可因为细胞之间失去相互支持,而最终导致培养失败。作者认为在接种细胞时 ESC 以 10^5 /mL 浓度,EEC 则以 500/mL 的浓度进行接种比较适宜。在进行原代培养的过程中,还有国外学者采用 2 种细胞混合培养作为体外细胞模型^[13-14],此种方法有待进一步探索。此外,人子宫内膜原代细胞分离、培养过程不改变细胞特异蛋白的表达,可通过特异性抗体免疫标记离体细胞以鉴定培养结果^[4]。本试验中角蛋白与波形蛋白进行细胞鉴定的成功充分说明了这一点。

在本试验的探索过程中,可总结以下经验:(1)消化时采用终浓度为 0.1% I 型胶原酶,消化时间为 8 min 左右得到的细胞较多、活力较好;(2)低速单次离心(1 000 r/min \times 10 min)细胞的损伤较小;(3)取材时尽量去除血污及杂质,并在次日换液,能更好地去除混杂的红细胞,以减少红细胞破裂死亡后释放的酶对子宫内膜细胞产生的影响;(4)细胞消化传代时用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶效果佳,因 EDTA 为一种螯合剂,可对贴壁细胞起到一定的解离作用^[15]; (5)原代细胞在分离培养过程中易被污染,需严格遵守无菌操作要求。

总之,本方法采用单酶(胶原酶)消化和细胞筛网 2 次过滤并低速离心,成功分离获取高纯度的子宫内膜 ESC 和 EEC 且没有改变其细胞特征。本方法具备操作简单、费用较低、所需试剂少等优点,且分离培养的细胞纯度高,可为进一步研究子宫内膜细胞相关生理病理机制提供满意的体外细胞平台。

参考文献

- [1] Herrler A, Von Rango U, Beier HM. Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation [J]. *Reprod Biomed Online*, 2003, 6 (2): 244-256.
- [2] Bilotas M, Meresman G, Buquet R, et al. Effect of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta on apoptosis in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and controls [J]. *J Reprod Immunol*, 2010, 84 (2): 193-198.
- [3] Shimizu Y, Mita S, Takeuchi T, et al. Dienogest, a synthetic progestin, inhibits prostaglandin E2 production and aromatase expression by human endometrial epithelial cells in a spheroid culture system [J]. *Steroids*, 2011, 76 (1/2): 60-67.
- [4] 李春霞, 王蕊, 柴奇, 等. 人子宫内膜细胞纯化方法的研究 [J]. *中国全科医学*, 2010, 13(9): 964-966.
- [5] 鲍远红, 王秀霞. 一种新的子宫内膜腺(下转第 4909 页)

58(5):549-557.

- [5] Zhang XY, Liu ZM, Wen SH, et al. Dexmedetomidine administration before, but not after, ischemia attenuates intestinal injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats[J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(5):1035-1046.
- [6] Tasdogan M, Memis D, Sut N, et al. Results of a pilot study on the effects of propofol and dexmedetomidine on inflammatory responses and intraabdominal pressure in severe sepsis [J]. *J Clin Anesth*, 2009, 21(6):394-400.
- [7] Taniguchi T, Kurita A, Kobayashi K, et al. Dose- and time-related effects of dexmedetomidine on mortality and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats [J]. *J Anesth*, 2008, 22(3):221-228.
- [8] Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock[J]. *Nature*, 2001, 410(6832):1103-1107.
- [9] Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, et al. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response [J]. *J Immunol*, 2003, 170(7):3812-

3818.

- [10] Radsak MP, Salih HR, Rammensee HG, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival[J]. *J Immunol*, 2004, 172(8):4956-4963.
- [11] 陆立仁, 张良清, 卢燕. 异丙酚对内毒素诱导人单核细胞系 THP-1 细胞 TREM-1 表达的影响 [J]. *天津医药*, 2014, 42(8):759-761, 785.
- [12] Unoshima M. Therapeutic effect of anti-HMGB1 antibody and anti-RAGE antibody on SIRS/sepsis[J]. *Nippon Rinsho*, 2004, 62(12):2323-2329.
- [13] Ornatowska M, Azim AC, Wang X, et al. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(6):L1377-1384.
- [14] 闫东来, 于泳浩, 刘宏伟, 等. 右美托咪定对脂多糖诱导大鼠外周血单核细胞 Toll 样受体 4 mRNA 表达的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2011, 31(1):115-117.

(收稿日期:2015-05-28 修回日期:2015-07-16)

(上接第 4906 页)

上皮细胞和基质细胞的分离纯化及培养方法的探讨[J]. *中国医科大学学报*, 2007, 36(5):608-610.

- [6] 俞超芹, 石书芳, 刘玉环, 等. 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[J]. *中西医结合学报*, 2006, 4(2):189-193.
- [7] Schickling BM, Aykin-Burns N, Leslie KK, et al. An inhibitor of K^+ channels modulates human endometrial tumor-initiating cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2011, 11(1):25.
- [8] Guo X, Liu G, Schauer IG, et al. Overexpression of the β subunit of human chorionic gonadotropin promotes the transformation of human ovarian epithelial cells and ovarian tumorigenesis[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3):1385-1393.
- [9] 陈诚, 常青, 梁志清, 等. 人子宫内膜细胞原代培养方法的改良[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(6):507-509.
- [10] 许艳丽, 杨卓, 陈英汉, 等. 人子宫内膜异位症在位内膜间质细胞原代培养方法探讨[J]. *中国全科医学*, 2009, 12(18):1669-1672.

- [11] 王欣, 成娅, 程湘, 等. 人子宫内膜腺上皮细胞原代培养方法的改进[J]. *重庆医学*, 2005, 34(5):702-703, 705.
- [12] 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.
- [13] Akoum A, Lawson C, Herrmann-Lavoie C, et al. Imbalance in the expression of the activating type I and the inhibitory type II interleukin 1 receptors in endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(5):1464-1473.
- [14] Gazvani R, Smith L, Fowler PA. Effect of interleukin-8 (IL-8), anti-IL-8, and IL-12 on endometrial cell survival in combined endometrial gland and stromal cell cultures derived from women with and without endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2002, 77(1):62-67.
- [15] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001:94-95.

(收稿日期:2015-05-22 修回日期:2015-07-17)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号:ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。