

# 人子宫内膜基质细胞的分离纯化和体外培养方法研究\*

高红艳<sup>1,2</sup>, 陈继明<sup>2</sup>, 何援利<sup>1△</sup>

(1. 南方医科大学附属珠江医院妇产科, 广州 510280; 2. 苏州大学附属第三医院妇产科, 江苏常州 213003)

**摘要:**目的 分离和纯化人子宫内膜基质细胞用于宫腔粘连发病机制的研究。方法 通过二次酶消化、一次网筛和差时贴壁等方法, 分离和纯化人子宫内膜基质细胞, 体外培养传代, 通过免疫组织化学法进行细胞表型鉴定。结果 基质细胞在接种后 30 min 开始贴壁, 可见梭形和多角形 2 种形态的细胞。免疫组织化学显示这 2 种细胞具有波形蛋白免疫反应性, 反应率可达 95% 以上, 而细胞角蛋白无免疫反应性, 提示其为来源于内膜基质的基质细胞。分离出的子宫内膜基质细胞可以在体外进行增殖。结论 采用二次酶消化、一次网筛和差时贴壁纯化等方法, 可成功分离人子宫内膜基质细胞, 且基质细胞可以有有限的传代。

**关键词:** 子宫内膜基质细胞; 细胞培养技术; 荧光免疫测定; 宫腔粘连

中图分类号: R711

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)34-4634-03

## Isolation, purification and culture in vitro of stromal cells of human endometrium\*

Gao Hongyan<sup>1,2</sup>, Chen Jiming<sup>2</sup>, He Yuanli<sup>1△</sup>

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510280, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou, Jiangsu 213003, China)

**Abstract: Objective** To isolate, purify human endometrial stromal cells, and culture these cells in vitro, for the further research of pathogenesis of intrauterine adhesions. **Methods** Human endometrial stromal cells were separated and purified by enzymolysis, mesh filtration and pasted wall, then the stromal cells of purification were cultured. Phenotype of stromal cells was identified by immunohistochemistry. **Results** The stromal cells became adherent 30 min after culture. Two types of stromal cells were found. One was spindle and the other was polygonal. Immunocytochemical staining method revealed that vimentin was positive in both types of stromal cells, and the positive rate was above 95%; meanwhile, cytokeratin was negative in both types of stromal cells, which indicated that these cells were endometrial stromal cells. The isolated endometrial stromal cells can be cultured in vitro. **Conclusion** Highly purified stromal cells of human endometrium could be obtained by enzymolysis, mesh filtration and pasted wall purification, and the cultured stromal cells could passage to limited generations.

**Key words:** stromal cells of endometrium; cell culture techniques; fluoroimmunoassay; intrauterine adhesions

宫腔粘连 (intrauterine adhesions, IUA) 是子宫内膜损伤后发生的纤维化病变<sup>[1]</sup>, 其治疗是临床工作的一大难题。子宫内膜由 2 层组成, 即单层柱状上皮与固有层。柱状上皮主要由具有分泌功能的子宫内膜腺上皮细胞 (endometrial epithelial cell, EEC) 构成; 固有层的结缔组织细胞主要为子宫内膜基质细胞 (endometrial stromal cell, ESC), 属于成纤维细胞<sup>[2-6]</sup>。为研究 ESC 的生理功能, 细胞间相互作用的应答机制, 建立 ESC 体外培养体系进行分析是最理想的试验模型。本研究采用二次酶消化、一次网筛和差时贴壁纯化等方法成功分离和纯化了人 ESC, 建立了一种简单高效的 ESC 原代培养方法, 为进一步深入研究 IUA 的机制奠定了基础, 并提供了可靠的体外细胞试验研究平台。现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2013 年 12 月至 2014 年 3 月苏州大学附属第三医院妇产科因子宫肌瘤行全子宫切除术的患者 10 例, 年龄 40~45 岁。10 例患者术前 3 个月均未用过激素治疗, 无内分泌疾病及全身性疾病, 在开腹行全子宫切除术后, 2 例于无菌条件下刮取部分子宫内膜, 8 例切取部分子宫内膜, 术后经病理学确诊均为增生期子宫内膜, 于 2 h 内用冰盒运往

试验室进行分离培养。

## 1.2 方法

**1.2.1 试验仪器及试剂** (1) 仪器: 二氧化碳培养箱 (3111 型), 购自 Thermo 公司; 倒置荧光显微镜 (EcellSens19), 购自 Olympus 公司; 净化工作台 (SW-CF-2FD), 购自苏州净化设备有限公司; 台式低速离心机 (80-2 型), 购自上海医疗器械 (集团) 有限公司; 细胞培养瓶, 购自 Fisher Scientific 公司; 细胞培养孔板, 购自 Fisher Scientific 公司; 冰箱 (BCD-216 型), 购自青岛海尔股份有限公司; 电热恒温培养箱 (DRP-9082 型), 购自上海森信试验仪器有限公司; 微量移液器, 购自 Thermo 公司。(2) 试剂: DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; FBS 购自 Hyclone 公司; I 型胶原酶购自 Sigma 公司; SP 免疫组织化学染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司; Triton X-100 购自 Sigma Aldrich 公司; 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 苏木素染液 (批号: 041M0014V) 购自 Sigma 公司; PBS 柠檬酸缓冲液 (pH=7.4) 购自福州迈新生物技术有限公司; DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司; 波形蛋白抗体: santa, sc-32322; 角蛋白抗体: sc-8018; 羊抗兔辣根过氧化物酶标记抗体: abcam, ab136817。

**1.2.2 ESC 分离** 收集临床手术子宫内膜及刮取的子宫内膜立即放入盛有 Dmem-F12 培养基 (DMEM 培养基与 F12 培养基 1:1 混合, 含 10% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 0.2 mg/mL 链霉素, 以下简称 D-F 培养基) 的无菌平皿中, 2 h 内进行分离培养。于超净台中无菌操作, 用 PBS 液洗涤 3 次, 剔除血块及黏液, 剪碎至糊状, 转移至 15 mL 离心管, 加入 0.125 mg/mL 胰酶, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中消化 5~10 min。1 000 r/min, 离心 3 min, 弃上清液。向组织沉淀中加入 0.8 mg/mL 的 I 型胶原酶 (体积比 1:5), 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中消化约 60 min, 每 15 min 震荡离心管 1 次。反复吹打消化悬液, 静置, 待剩余糊状组织沉淀后, 小心吸取细胞悬液, 经 400 目筛网过滤。滤液 1 000 r/min, 离心 8 min, 沉淀获得较高纯度的基质细胞及少量腺上皮细胞和红细胞。60 min 大部分基质细胞贴壁后换液, PBS 漂洗 2 次后置入新鲜培养液, 即获得较高纯度的腺上皮细胞。24 h 后换液除去未贴壁的死细胞和血细胞。

**1.2.3 细胞培养** 将分离所得的 ESC 分别用血细胞计数板计数后, 在 100 mL 培养瓶中按  $(2\sim5)\times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 的密度进行接种, 放置在 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 培养箱进行培养, 每 48 h 观察并换液 1 次。

**1.2.4 传代培养** 在倒置显微镜下进行观察, 可见细胞在约 5~6 d 后长满培养瓶底, 即可传代。吸去培养上清液后, 加入 2.5 mg/mL 的胰蛋白酶进行消化, 在显微镜下观察到细胞收缩变圆后, 再吸去消化液, 重新加入培养液, 然后用吸管吹打使细胞从培养瓶壁吹打下来, 按  $(2\sim5)\times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 扩大培养。

**1.2.5 ESC 表型纯度免疫组织化学鉴定** 细胞爬片培养后,

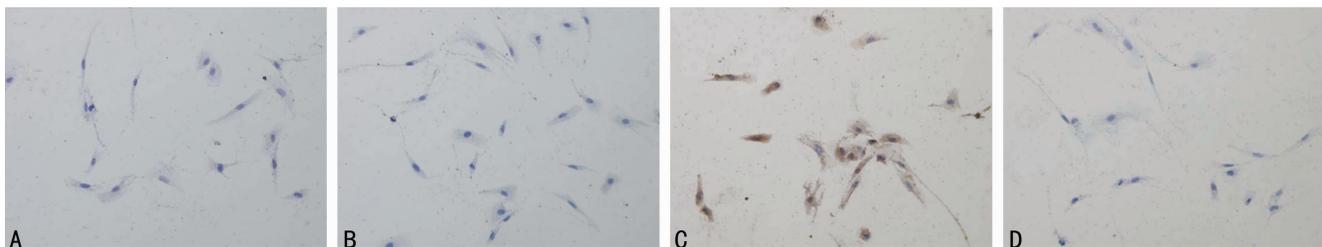
用 4% 甲醛固定 15 min, 加入鼠抗人波形蛋白单抗和细胞角蛋白单抗 (PBS 代替一抗作空白对照), 4 °C 过夜, 加入经生物素标记的二抗, 严格按照说明书进行操作, 以 DAB 显色后, 采用苏木精进行复染, 放置光镜下观察。阳性结果为细胞质被染成棕黄色染色, 而阴性结果为细胞质未被染色。

## 2 结果

**2.1 细胞培养结果** 10 份子宫内膜组织标本中, 7 份培养成功, 培养未成功的 3 份标本均为分离得到的基质细胞过少所致, 其中 2 例为刮宫手术获得, 另 1 例从切取的子宫标本中获得。本研究中, 细胞培养液及运送液中均加入 100 U/mL 青霉素及 0.2 mg/mL 链霉素, 未发生真菌或其他细菌感染, 但冻存细胞复苏后发现 70% 有细菌污染。

**2.2 形态学观察** 分离所得的间质细胞为单个细胞, 细胞在接种 30 min 后开始出现贴壁, 2 h 贴壁基本完成。间质细胞初贴壁时为多边形, 在 4~6 d 后爬满瓶壁的细胞变为长梭形或是纺锤形, 胞体较小, 具有成纤维细胞形态。本研究获得了纯度超过 95% 的 ESC, 间质细胞中偶见上皮细胞团出现 (<5%), 培养至 P5 代基本停止增殖。间质细胞传代的次数越多, 其纯度就越高。

**2.3 免疫组织化学方法鉴定结果** 波形蛋白在 ESC 中呈阳性表达, 其细胞质显棕黄色颗粒 (图 1), 而 EEC 表达角蛋白, PBS 空白对照细胞质均未着色。随机取 5 个  $\times 200$  倍视野, 计算波形蛋白着色细胞即基质细胞比例。在原代培养的人子宫内膜上皮细胞中, 波形蛋白在 95% 以上的基质细胞的细胞质区域为强阳性表达, 同时角蛋白为阴性表达。见图 1。



A: 波形蛋白阴性对照 ( $\times 200$ ); B: 角蛋白阴性对照 ( $\times 200$ ); C: 波形蛋白阳性表达 ( $\times 200$ ); 角蛋白阴性表达 ( $\times 200$ )。

图 1 免疫组织化学鉴定结果

## 3 讨论

IUA 是子宫内膜损伤后发生的纤维化病变。子宫内膜主要由基质细胞和腺上皮细胞组成, 基质细胞属于成纤维细胞。因此, 为研究 ESC 的生理功能及细胞间的相互作用的应答机制, 建立 ESC 体外培养体系进行分析是最理想的试验模型。

有研究发现, 分离的细胞活力、纯度及接种密度直接关系到 ESC 原代培养的成功与否<sup>[7]</sup>。在增生期, 子宫内膜以基质细胞为主<sup>[8]</sup>, 根据这一特点, 本研究在分离细胞时, 收集增生期子宫内膜, 从而提高了原代细胞的产量。正常的子宫内膜由单层柱状上皮和固有层组成。本研究分离基质细胞的子宫内膜有 2 个来源, 分别是手术切除后的子宫刮取和切取获得。10 份子宫内膜组织标本中, 7 份培养成功, 培养成功率与 Ryan 等<sup>[3]</sup>的研究结果相似。试验中发现, 2 例刮取的子宫内膜组织经消化后取得的细胞主要为腺上皮细胞, 基质细胞较少而失败, 另 1 例从子宫标本切取的内膜组织也因基质细胞较少而失败。总结以上的经验教训, 后试验改为切取组织至少厚度达 5 mm, 面积大于 1.5 cm<sup>2</sup>, 余下的所有 7 例均获成功。这与相关

研究通过刮宫取材即可成功高效分离 ESC 的经验不同<sup>[9-10]</sup>。

据文献报道, ESC 易受到阴道细菌的污染而可能导致培养失败<sup>[4]</sup>。在本研究中, 培养液及运送液中都加了 100 U/mL 青霉素及 0.2 mg/mL 链霉素, 没有发生真菌或其他细菌感染。但冻存细胞复苏后发现 70% 有细菌污染, 有待后续试验进一步改进。对于纤维较多的内膜组织来说, 酶法是最常用的方法。大多数研究者选用胶原酶, 酶浓度为 0.1%~1.0%, 消化时间为 40~120 min<sup>[8,11-13]</sup>。本研究先用 0.125 mg/mL 胰酶消化 5~10 min, 再用 0.8 mg/mL 的 I 型胶原酶 (体积比 1:5) 消化约 60 min, 在较短的时间内消化获得了较多的组织细胞, 降低了对细胞的破坏。Osteen 等<sup>[5]</sup>学者使用二次过滤法分离 EEC 和 ESC, 获得的 ESC 纯度较高, 但 EEC 生长不良。蒋洲梅等<sup>[6]</sup>通过低速离心与高密度接种的方法分离此 2 种细胞, 提高了 EEC 的纯度, 但降低了 ESC 的纯度。本试验目的仅分离基质细胞, 根据基质细胞体积小, 腺上皮细胞体积大且易成团的特点, 仅行一次 400 目网筛法, 有效降低了细胞的丢失。分离所得的体积小的间质细胞多在 2 h 内完成贴壁; 而体

积较大的腺上皮细胞则相互聚集,无法通过 400 目的筛网,在 2 h 后才开始贴壁。本研究有效利用这种差异,采用一次性的 400 目筛网进行过滤及分时段贴壁方法成功纯化细胞,同时对混染在子宫内膜中的大量红细胞,采用逐次换液的方法进行清除,取得了良好的效果,且将其他干预因素对培养细胞的影响有效排除,获得了纯度超过 95% 的 ESC,此与谭先杰等<sup>[4]</sup>的试验结果相类似。此外,细胞特异性蛋白的表达不随原代细胞的分离过程而改变,因而在鉴定培养结果时,可采用针对在体细胞抗原的特异抗体对离体细胞进行免疫标记<sup>[14-16]</sup>。本试验细胞鉴定中波形蛋白成功免疫染色,证明采用本试验方法培养所得的原代细胞并未改变其固有的细胞免疫特征,可进一步满足将来的研究需要。但原代细胞培养至 P5 代基本停止增殖,如何提高细胞活性及细胞传代有待进一步探索。

本研究通过合理取材,使用二次酶消化,降低了对细胞的破坏,一次网筛和差时贴壁纯化,在较短的时间内获得了较多的组织细胞,成功分离和纯化了人 ESC,为进一步研究 IUA 的发病机制及女性不孕不育体外细胞研究治疗奠定了体外细胞学水平试验基础。

#### 参考文献:

[1] Panayotidis C, Weyers S, Bosteels J, et al. Intrauterine adhesions (IUA) has there been progress in understanding and treatment over the last 20 years[J]. *Gynecol Surg*, 2009, 6(3): 197-211.

[2] Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells[J]. *Bio Reprod*, 2004, 70(6): 1738-1750.

[3] 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.

[4] 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[J]. *现代妇产科进展*, 2002, 11(1): 30-32.

[5] Osteen KG, Hill GA, Hargrove JT, 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): 965-972.

[6] 蒋洲梅, 黄玉珠, 洪淡华, 等. 人子宫内膜细胞培养及形态学观察[J]. *生殖与避孕*, 1994, 14(4): 271-274.

[7] Saleh L, Otti GR, Fiala C, et al. Evaluation of human first trimester decidual and telomerase-transformed endometrial stromal cells as model systems of in vitro decidualization[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 9: 155.

[8] Zhang L, Guo W, Chen Q, et al. Adam12 plays a role during uterine decidualization in mice[J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 338(3): 413-421.

[9] 陈晓岚, 黄仁彬, 欧海燕, 等. 人子宫内膜细胞的体外纯化和培养[J]. *生殖与避孕*, 2006, 26(9): 530-532.

[10] 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.

[11] Krishnaswamy N, Chapdelaine P, Tremblay JP, et al. Development and characterization of a simian virus 40 immortalized bovine endometrial stromal cell line [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(1): 485-491.

[12] Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, et al. Endometrial decidualization of mice and men [J]. *Semin Reprod Med*, 2010, 28(1): 17-26.

[13] Mori M, Kitazume M, Ose R, et al. Death effect or domain-containing protein (DEDD) is required for uterine decidualization during early pregnancy in mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 318-327.

[14] Das SK. Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation [J]. *Reproduction*, 2009, 137(6): 889-899.

[15] Itoh H, Kishore AH, Lindqvist A, et al. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) and Progesterone Regulate Matrix Metalloproteinases (MMP) in Human Endometrial Stromal Cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(6): E888-897.

[16] Matsumoto K, Yamauchi N, Watanabe R, et al. In vitro decidualization of rat endometrial stromal cells[J]. *Cell Tissue Res*, 2009, 335(3): 575-583.

(收稿日期: 2014-05-08 修回日期: 2014-07-19)

(上接第 4633 页)

gratings on graphite and diamond[J]. *Phys Rev, B: Condens*, 2009, 79(12): 188-192.

[12] Higashi Y, Jitsuiki D, Chayama K, et al. Edaravone (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a novel free radical scavenger, for treatment of cardiovascular diseases[J]. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 2006, 1(1): 85-93.

[13] Yoshida H, Yanai H, Namiki Y, et al. Neuroprotective effects of edaravone; a novel free radical scavenger in cerebrovascular injury[J]. *CNS Drug Rev*, 2006, 12(1): 9-20.

[14] Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, et al. The specific free radical scavenger edaravone suppresses fibrosis in the bleomycin-induced and tight skin mouse models of systemic

sclerosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(10): 3086-3097.

[15] Fujita M, Mizuta Y, Ikegame S, et al. Biphasic effects of free radical scavengers against bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2008, 21(5): 805-811.

[16] Tajima S, Bando M, Ishii Y, et al. Effects of edaravone, a free-radical scavenger, on bleomycin-induced lung injury in mice[J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(5): 1337-1343.

[17] Kim SJ, Gil HW, Yang JO, et al. The clinical features of acute kidney injury in patients with acute paraquat intoxication[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24(4): 1226-1232.

(收稿日期: 2014-07-11 修回日期: 2014-10-08)