

人子宫内膜异位症异位及在位内膜间质细胞分离与培养*

黄冬花, 张晓玲[△], 陈美红
(江西省妇幼保健院, 南昌 330006)

[摘要] 目的 建立子宫内膜异位症(EMs)异位、在位内膜间质细胞的体外细胞模型, 实时观察间质细胞形态变化。方法 胶原酶消化异位、在位内膜组织, 二次筛网过滤结合低速离心法分离纯化间质细胞, 应用免疫细胞化学染色进行细胞鉴定, 并进行传代培养, 观察细胞生长状况及细胞形态差异。结果 培养成功率 91.3%, 间质细胞纯度达 95%; 异位间质细胞 9 代内、在位及对照组间质细胞 11 代内, 细胞形态及活性并无明显改变。结论 子宫内膜间质细胞可为子宫内膜异位症研究提供较好的细胞模型。

[关键词] 子宫内膜异位症; 间质细胞; 细胞培养; 二次筛网过滤法

[中图分类号] R329.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)15-2084-03

Isolation and culture of human ectopic and eutopic endometrial stromal cells

Huang Donghua, Zhang Xiaoling[△], Chen Meihong

(Jiangxi Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To establish the in vitro cell model of ectopic and eutopic endometrial stromal cells in endometriosis (EMs) for conducting the real time observation on the morphological changes of stromal cells. **Methods** The ectopic and eutopic endometrial stromal cells were digested by collagenase, isolated and purified by the quadratic sieve filtration combined with the low speed centrifugation. The cells were identified by the immunohistochemistry staining. The cells passage culture was performed. The cells growth condition and differences in cell morphology were observed. **Results** The culture success rate of endometrial stromal cells was 91.3%. The stromal cells purity reached 95%. The cell morphology and activity had no obvious changes for the ectopic endometrial stromal cells within 9 generations, and the eutopic endometrial stromal cells and the control stromal cells within 11 generations. **Conclusion** The endometrial stromal cells can provide better cell model for the research of EMs.

[Key words] endometriosis; stromal cells; cell culture; quadratic sieve filtration method

子宫内膜异位症(EMs)是指具有生长活性的子宫内膜组织在子宫腔被覆内膜、肌层以外的其他部位。从发现 EMs 至今,关于其发病机制有多种理论,但尚无一个满意的解释。对 EMs 的研究仍任重道远,一个好模型对其研究必不可少。近年来由于动物及人体模型存在较大差异且受到伦理学的限制,体外模型已成为 EMs 研究的热点。本研究目的是分离培养 EMs 患者异位、在位内膜间质细胞,为进一步探讨 EMs 发病机制和治疗药物筛选提供一个有价值的实验模型。

1 资料与方法

1.1 一般资料 卵巢子宫内膜异位症(OEMs)组:2012 年 9 月至 2013 年 1 月在江西省妇幼保健院妇科住院接受腹腔镜手术的 OEMs 患者,年龄 20~39 岁,取患者子宫内膜及囊壁各 8 例(子宫内膜病理为正常增生期、囊壁病理确诊为 OEMs)。对照组:本院同期确诊为非 EMs 的卵巢良性畸胎瘤的患者,年龄 21~40 岁,取患者的子宫内膜 7 例(子宫内膜病理为正常增生期)。所有患者月经规律,术前 6 个月无甾体类激素治疗史,排除肿瘤病史,无生殖道炎症和放置宫内节育器史,非妊娠或哺乳期。本研究经本院伦理委员会批准,受试者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 DMEM 培养基(赛默飞),胎牛血清(四季青),胶原酶 IV、多聚甲醛(Solarbio),青霉素链霉素混合液(Notlas),0.25%胰蛋白酶(Biotopped),鼠抗波形蛋白单抗、鼠

抗人角蛋白单抗、免疫组化检测试剂盒及 DAB 试剂盒(中杉金桥)。SW-CJ-IF 型净化工作台, MCO-15AC 型二氧化碳培养箱, Olympus 倒置显微镜, 水浴箱, 低速离心机, 细胞计数板。

1.3 方法

1.3.1 取材 将术中取得的组织放入预冷的装有无菌 PBS 液的广口瓶中, 放置冰盒内, 立即送回实验室(30 min 内)处理。

1.3.2 细胞原代培养 将组织用 PBS 液清洗 3 次, 去除血块; 在培养皿中用眼科剪剪碎, 约 1 mm³; 加入 9 mL 无血清培养基, 反复吹打, 移至离心管中, 加入 1 mL 0.1% IV 型胶原蛋白酶, 37℃ 水浴箱中消化 60 min, 每 10~15 分钟摇晃 1 次; 见组织呈絮状, 即加入含血清的培养基终止消化, 充分吹打; 分别用 80 目(孔径 220 μm)、300 目(孔径 50 μm)筛网过滤 1 次, 将最终过滤液放入离心管内, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 加入含 15% 胎牛血清的培养基充分混匀后置于培养瓶中, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养; 2 h 后进行第 1 次细胞换液; 第 2 天再次换液, 以后每隔 1 日换液。每日在倒置显微镜下观察细胞形态。

1.3.3 传代培养 当培养瓶细胞长满 80%~90% 时, 行传代培养。去除培养基, PBS 洗 2 遍; 加入 700 μL 0.25% 胰蛋白酶, 37℃ 消化 1~2 min, 显微镜见 70%~80% 细胞变圆形, 加入 5 mL 含血清的培养液终止消化; 充分吹打, 细胞计数, 约

5×10⁵/mL 接种至新瓶,放入培养箱中培养。

1.3.4 内膜间质细胞鉴定 将细胞按 1×10⁶/mL 接种于 6 孔板中培养;细胞长满 70%~80%,行细胞鉴定。4%多聚甲醛 4℃固定 30 min;3% H₂O₂ 室温封闭 10 min;分别加入波形蛋白单抗、角蛋白单抗、空白对照加入 PBS 液,37℃ 1 h;滴二抗;滴加试剂 A,37℃ 15 min,滴加剂 B,37℃ 15 min;滴加 DAB 显色 5 min;用 dddH₂O 充分清洗,洗到空白孔无色为止;以细胞质或核呈现棕黄色为阳性细胞,在倒置显微镜低倍镜下随机取 5 个视野,采用本实验室开发的加方网 Gundersen 测试系统计数阳性表达细胞数目及总细胞数目,计算分离得到的内膜间质细胞纯度。

2 结 果

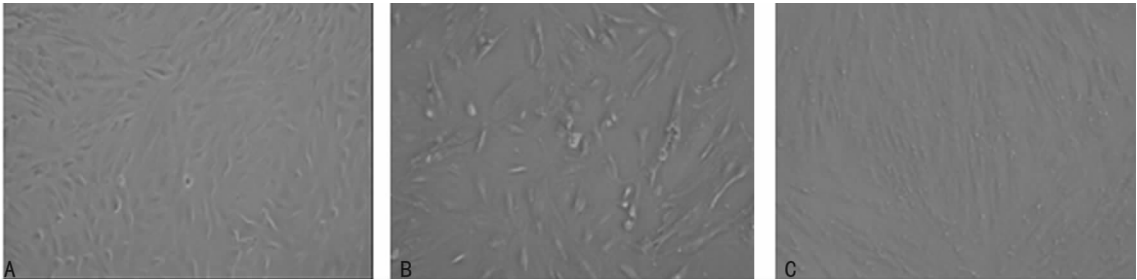
2.1 原代细胞培养结果 23 例标本中,21 例(91.3%)标本培养成功,1 例异位和 1 例对照组标本因细菌污染失败。

2.2 间质细胞形态学特点 新分离的 3 组内膜间质细胞外观特征相似,悬浮液中呈单个细胞,形态呈圆形或椭圆形;贴壁后

呈梭形生长,少部分呈星形生长,细胞质薄且透明,细胞核圆形居中,细胞平铺生长,无明显极性。细胞培养过程中见异位间质细胞比在位、正常细胞稍大,形态仍是梭形或星形。

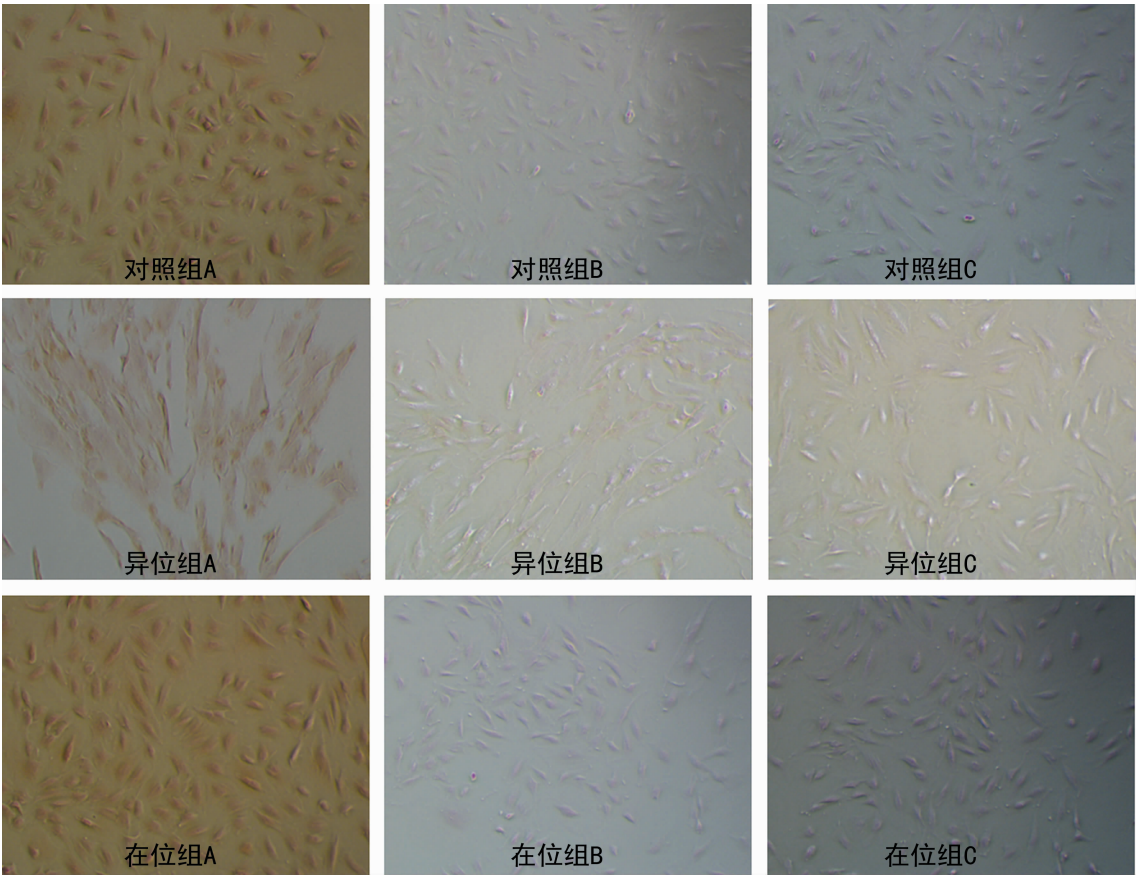
2.3 间质细胞生长情况 分离的内膜间质细胞 30 min 后部分细胞开始贴壁,24 h 后大部分间质细胞已贴壁。在位、对照组间质细胞生长速度较快,2~3 d 传代 1 次;异位间质细胞生长速度相对较慢,4~5 d 传代 1 次(细胞传代后生长形态见图 1)。在位、对照组间质细胞 11 代内,异位间质细胞 9 代内,细胞形态及活性并无明显改变,若继续传代,发现细胞形态增大,胞质中含有颗粒,细胞出现崩解现象,在相同的消化条件下,裂解的细胞数目较多。

2.4 间质细胞鉴定 间质细胞表面特异性标志分子为波形蛋白,腺上皮细胞的特异性标志分子为细胞角蛋白。细胞化学染色结果示:内膜间质细胞波形蛋白阳性着色(棕黄色),角蛋白及空白对照未着色,间质细胞纯度达 95%(图 2)。



A:对照组;B:异位组;C:在位组。

图 1 各组间质细胞传代后生长形态



A:波形蛋白组;B:角蛋白组;C:空白组。

图 2 各组细胞化学免疫鉴定结果

3 讨 论

3.1 体外培养内膜间质细胞对 EMs 研究的意义 近年来,细胞培养技术已应用于生物学、医学等研究领域。通过体外细胞培养,可以观察细胞生长分化、增生、侵袭及转移等情况,还能进行细胞化学、超微结构、生物学特性、分子生物学方面及药物作用机制方面的研究。建立体外 EMs 异位、在位间质细胞模型,可对 EMs 的发病机制进行基础研究,并可为研究其药物治疗作用机制提供有效手段。

3.2 EMs 异位、在位细胞体外培养方法 间质细胞生长活性及传代与间质细胞数量及纯度密切相关^[1],国内外子宫内间质细胞的分离纯化方法却不尽相同。间质细胞的获取主要利用化学分离和物理分离法。化学分离即酶消化法:有胰蛋白酶和胶原酶消化两种,胰蛋白酶消化可裂解大部分内膜组织,但消化过程中可观察到细胞悬液中有絮状物,细胞悬液黏度大,影响所得细胞数量。胶原酶一般消化 30~90 min,不影响细胞悬液黏滞度,但消化时间较为关键,消化不完全时,难以获得完全单细胞悬液,而消化过度所得细胞活性差,不易细胞培养。物理分离法则包括离心法、重力沉降法及筛网过滤法。最初学者们利用低速离心或重力沉降法,但所得细胞纯度较低^[2],目前此法较少单独应用。筛网过滤法有一次滤网过滤和二次筛网过滤法^[3-5]。人子宫内膜间质细胞直径约 40 μm ,腺上皮细胞直径约 70 μm ,筛网过滤法是根据这两种细胞大小的差异来过滤分离。许艳丽等^[6]发现经筛分离的间质细胞单层汇聚时间短于离心分离。李妍等^[7]利用筛网分离和离心分离两种方法结合发现可以有效地把细胞分离纯化。

本研究在总结众多分离方法的基础上进行改良,采用消化、二次筛网过滤、低速离心和选择性贴壁 4 步法,间质细胞获得率和纯度令人满意。采用 0.1% 胶原酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 60 min,每间隔 15 min 摇匀 1 次。水浴 37 $^{\circ}\text{C}$,可提高胶原酶活性,联合间歇性将消化液与组织充分混匀,使细胞消化完全,该酶消化下的细胞活性较好,细胞纯度更高,方法较王海燕等^[8]报道的精简。随后利用 80 目(孔径约 220 μm)的滤网除先去未消化完的组织团块,再过滤 300 目(孔径约 50 μm)筛网将腺上皮细胞与间质细胞分开;之后将滤液低速离心;最后利用间质细胞分离 30 min 开始贴壁、腺上皮细胞分离 2 h 开始贴壁,以及红细胞不贴壁的性质,将细胞重悬培养 2 h 后进行首次换液,去除腺上皮及红细胞,提高细胞纯度,并为间质细胞营造良好的生长环境。最终所得间质细胞纯度达 95%,细胞活性好,在位、对照组间质细胞 2~3 d 传代 1 次,异位间质细胞 4~5 d 传代 1 次。且发现异位细胞 9 代内,在位组、对照组间质细胞传到 11 代内,细胞形态及活性并无明显改变,结果优于廉红梅等^[9]的报道。说明本实验联合改良法在获得足够细胞数量的同时保证了较高的细胞纯度,有助于细胞的培养和传代进行。

3.3 EMs 异位、在位细胞体外培养注意事项 目前异位、在位子宫内间质细胞的体外培养成功率并不高,尤其是异位内间质细胞的培养成功较低,所以要成功建立体外培养模型,除了选择一个好的分离纯化方法外,在标本的选择及分离操作细节上也尤为重要。(1)月经周期:子宫内膜组织中含更多间质细胞的患者易发生 EMs^[10]。不同月经周期中,细胞含量不同,增殖期以间质细胞为主,分泌期以上皮细胞为主。要获取足够间质细胞数量,应选择月经增殖期内膜组织。(2)取材:腹膜红色病变处内膜细胞含量高,但标本难以取得,目前较多是选 OEMs 囊壁。OEMs 囊肿大,细胞含量少;褐色处的囊壁组

织一般为陈旧性出血灶,而淡黄色处囊壁组织相对新鲜,尤其是肉眼可见绒毛样组织标本,细胞数量多。故最好选择 4~5 cm 囊肿,取淡黄色处的囊壁或肉眼见绒毛样的组织。(3)去除红细胞:标本中混杂的红细胞破裂后释放的酶会影响培养液环境,取材时应尽量刮除内膜表面的黏液及血块,并用 PBS 液清洗 3 次,尽可能去除血块。接种 2 h 后进行细胞换液,也可去除不贴壁的红细胞。(4)消化时间短于 30 min,获得细胞数目少;细胞消化时间过长、消化酶浓度过高均会损伤细胞。本实验应用 0.1% 胶原酶消化 60 min,间质细胞含量高,细胞纯度较高。(5)离心:离心次数过多、转速过高,均可导致细胞破裂、细胞丢失及影响细胞活性。本研究中,离心次数不超过 2 次,离心转速不超过 1 000 r/min。(6)抗生素使用:标本在采取的过程中可能存在污染,尤其是在位内膜和对照组内膜,故在培养液中加入一定量的抗生素,避免细菌污染。

总之,本研究采用胶原酶消化、二次筛网过滤法和离心法相结合获得较高纯度和较多数量的 EMs 异位、在位间质细胞,可为 EMs 的研究提供满意的体外细胞模型。

参考文献

- [1] 杨新园,陈藏,李旭. 子宫内膜基质干细胞培养方法的比较研究[J]. 山西大学学报,2011,42(8):624-628.
- [2] 张宏,赵昶,李亚里,等. 人离体子宫内膜细胞培养方法的建立[J]. 军医进修学院学报,2002,23(3):192-194.
- [3] Okada H, Okamoto R, Tsuzuki T, et al. Progesterone inhibits estradiol-induced vascular endothelial growth factor and stromal cell-derived factor 1 in human endometrial stromal cells[J]. Fertil Steril, 2011, 96(3):786-791.
- [4] Tan XJ, Lang JH, Zheng WH, et al. Ovarian steroid hormones differentially regulate thrombospondin-1 expression in cultured endometrial stromal cells: implications for endometriosis[J]. Fertil Steril, 2011, 96(1):328-331.
- [5] Salih SM, Salama SA, Fadl AA, et al. Expression and cyclic variations of catechol-O-methyl transferase in human endometrial stroma[J]. Fertil Steril, 2008, 90(3):789-797.
- [6] 许艳丽,杨卓,陈英汉,等. 人子宫内膜异位症在位内间质细胞原代培养方法探讨[J]. 中国全科医学,2009,12(18):1669-1672.
- [7] 李妍,李迅. 子宫内膜异位症在位内膜腺上皮及基质细胞的分离培养和鉴定[J]. 解剖科学进展,2008,14(3):244-248.
- [8] 王海燕,薛晓鸥,姜恩魁,等. 人子宫内膜腺上皮细胞及基质细胞分离方法的研究[J]. 锦州医学院学报,2003,24(4):36-39.
- [9] 廉红梅,刘义,吕立群,等. 人子宫在位和异位内间质细胞的分离纯化和体外培养[J]. 中国妇幼保健,2010,25(35):5280-5282.
- [10] Lucidi RS, Witz CA, Chrisco M, et al. A novel in vitro model of the early endometriotic lesion demonstrates that attachment of endometrial cells to mesothelial cells is dependent on the source of endometrial cells[J]. Fertil Steril, 2005, 84(1):16-21.