

# 高纯度分离子宫内膜腺上皮及间质细胞和体外培养技术

唐雪莲, 谢梅青, 张凤丽

(中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】探索一种简便、高纯度分离在位子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞的方法, 建立高纯度体外子宫内膜细胞培养模型。【方法】选择正常的新鲜子宫内膜组织 20 例, 通过酶解, 过滤及贴壁纯化等技术, 每例均用 Ryan 方法(对照组)及改良的新方法(改良组)分离、纯化及培养子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞, 并进行传代。【结果】18 例标本获得成功, 对照组分离的间质细胞纯度为(84.22 ± 5.17)% , 腺上皮细胞纯度为(62.11 ± 6.23)% ; 改良组分离的间质细胞纯度达(97.89 ± 0.96)% , 腺上皮细胞纯度(95.12 ± 2.11)% , 与对照组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ )。【结论】改良方法简便, 可高纯度分离子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞。在体外建立高纯度子宫内膜细胞培养模型, 更利于在细胞和分子水平上研究子宫内膜的各种功能及干预调节。

关键词: 子宫内膜; 上皮细胞; 间质细胞

中图分类号: R329-35

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)06-0589-04

## A Method to Isolate and Culture Highly Purified Populations of Glandular Epithelial and Stromal Cells from Human Endometrial Specimens

TANG Xue-lian, XIE Mei-qing, ZHANG Feng-li

(Department of Obstetric and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate an improved method for simple and highly purified isolation of endometrial glandular epithelial cells and stromal cells for *in vitro* culture.【Methods】20 fresh endometrial specimens were collected from the operating theater and transferred to the tissue culture laboratory which were histologically normal. In investigated group and control group, Enzymolysis, filtration and pasted wall purification were used to isolate, purify and culture the endometrial stromal and glandular cells and reproduce.【Results】The endometrial cell cultures were successfully established in 18 of 20 endometrium samples. The stromal cells purity was(97.89 ± 0.96)% and glandular epithelial cells (95.12 ± 2.11)% by the improved method in investigated group, while the purities of control were(84.22 ± 5.17)% and(62.11 ± 6.23)% respectively ( $P < 0.01$ ).【Conclusion】An improved method is successfully developed for simple and highly purified isolation of endometrial glandular epithelial cells and stromal cells for *in vitro* culture. Culture of these cell populations will help study their functions and molecular regulations.

**Key words:** endometrium; glandular epithelial cell; stromal cell

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(6): 589 ~ 592]

人子宫内膜由黏膜上皮、腺体、间质和血管等组成, 是卵巢激素作用的靶组织。通过子宫内膜细胞体外培养系统, 观察子宫内膜对激素、各类药物、细胞因子的作用, 在妇产科疾病的研究中占有重要

的地位。子宫内膜间质细胞及上皮细胞的分离及培养, 各家报道的方法不一, 方法简单者细胞纯度尤其是上皮细胞纯度不高, 方法复杂者多次过滤等操作增加了污染的可能性。本研究旨在探索建立一种

收稿日期: 2003-05-07

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(A002001010)

作者简介: 唐雪莲(1971 - ), 女, 广西荔浦人, 硕士研究生, 主治医师。

简便、高纯度分离子宫内膜腺上皮和间质细胞的体外培养方法,为今后研究子宫内膜细胞生长、分化、代谢及激素作用机制提供一种理想的体外实验模型。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本来源

选择2002年9月至2002年12月在我院因子宫肌瘤行全子宫切除的患者16例,4例因不孕症做诊断性刮宫术,年龄28~48岁,平均年龄44岁,术前3个月未用激素,月经周期规律(28~32d)。术中获取子宫内膜,之后立即投入盛有5 mL PBS的无菌青霉素瓶内,低温条件下迅速转移到实验室进行分离培养。术后病理诊断未发现子宫内膜存在病变,其中增生期内膜14例,分泌期内膜6例。

### 1.2 主要试剂及配剂

①生长培养液:DMEM/F-12(Dulbecco's modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, GIBCO产品)加HEPES 3.7 g/L, 100 mL/L灭活胎牛血清,青霉素50 U/mL,链霉素50 U/mL, pH 7.2~7.4。②细胞消化液:胶原酶IA (Sigma产品)用Hanks液配成1 mL/L的溶液,胰蛋白酶液含1.25 mL/L胰酶及0.2 mL/L EDTA。细胞角蛋白抗体和波形蛋白抗体购于武汉博士德公司。

### 1.3 方法

参照Ryan等<sup>[1]</sup>的方法并作改进,将Ryan的方法作为对照组,经改进的方法作为改良组。将1例标本分为2份,用两种方法进行培养。

1.3.1 子宫内膜细胞分组分离培养方法 对照组:将子宫内膜组织在无菌操作下用PBS液冲洗3次,除去血块及黏液,剪成0.5~1 mm<sup>3</sup>大小的碎块,置入15 mL离心管中,100×g离心5 min,弃上清,加入2.5~5倍的1 g/L胶原酶IA,混匀37℃水浴60 min,隔15~20 min搅拌一下,消化后的细胞悬液含单个间质细胞及葡萄串状上皮细胞,用38 μm(400目)的不锈钢筛网过滤,将滤液(主要含单个间质细胞)经100×g离心5 min,弃上清,沉淀物主要为间质细胞;将滤膜上组织及细胞漂洗收集后,离心弃上清,沉淀物主要为上皮细胞团。将2种沉淀物各用PBS漂洗2次,再用生长培养液调成细胞悬液,经台盼蓝染色细胞计数,调整细胞浓度,间质细胞以0.5×10<sup>6</sup>/mL,上皮细胞团以400个团/

cm<sup>2</sup>接种于培养瓶内,置37℃,体积分数5% CO<sub>2</sub>的孵箱内培养,第一次换液于2 d后,以后隔2~3 d更换培养液1次。

改良组:接种及接种前的步骤均一样,利用间质细胞与上皮细胞贴壁时间差异,间质细胞接种90~120 min后将悬浮的细胞及上皮细胞团吸出弃之,重新加入培养液,此时间质细胞已贴壁;上皮细胞接种150~180 min后将悬浮的细胞及上皮细胞团吸出转移到另一培养瓶中,原培养瓶加入新的生长培养液(转移后培养的细胞为上皮细胞,转移前已贴壁的细胞大部分为间质细胞)。均放置37℃,体积分数5% CO<sub>2</sub>的孵箱内培养,第1次换液于2 d后,以后隔2~3 d更换培养液1次。培养到细胞几乎聚合成片,大约需要3~7 d时间。培养期间每天在倒置显微镜下观察每瓶细胞生长情况至少一次,详细记录细胞变化用数码相机及时摄影。改良组和对照组每瓶细胞取十个不同的视野计数细胞,统计上皮细胞和间质细胞的比例。

1.3.2 子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞纯度鉴定 在6孔培养板中放入盖玻片,分别按上述培养条件培养间质细胞和腺上皮细胞。当细胞基本长满后取出盖玻片,以PBS液洗涤3次,用40 g/L多聚甲醛固定20 min,两种细胞均用鼠抗人细胞角蛋白和波形蛋白抗体作用,并设阴性对照(用PBS代替I抗)4℃过夜,加生物素标记的II抗,加辣根过氧化物酶标记的Avidin, DAB显色液,再用苏木素复染。凡细胞胞浆被染成棕黄色的为阳性细胞。改良组和对照组每张片取10个不同的视野计数细胞,统计上皮细胞和间质细胞的比例。

1.3.3 子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞的传代 当细胞铺满瓶底后,用消化液(1.25 g/L胰酶加0.2 g/L EDTA)进行消化传代。

1.3.4 统计学方法 采用t检验。

## 2 结果

### 2.1 细胞培养生长情况

20例子宫内膜标本中18例培养成功(两种方法均成功)2例失败(对照组和试验组均失败)。此2例中有1例因细菌污染失败,1例因细胞数量少,上皮细胞未存活。原代培养的子宫内膜腺上皮细胞接种后4~7 d和间质细胞在接种后3~7 d接近铺满。在分泌期子宫内膜分离得到的细胞中腺上皮细

胞比例较多,增殖期子宫内膜分离得到的细胞中间质细胞比例较多,细胞存活率 $\geq 90\%$ 。

## 2.2 培养细胞形态学特点及生长方式

间质细胞:接种的单细胞培养30 min后开始贴壁,2 h后大部分已贴壁。12 h开始生长,细胞较扁平,细胞体向两端突起。镜下见多数呈纺锤状,少数呈三角形,外形轮廓不甚清楚,折光性强,核不明显,细胞之间平行排列或放射状排列,细胞之间较独立。细胞铺满瓶底后用消化液传代。传代后细胞外形多呈梭形,贴壁快,活性高,3~7 d铺满瓶底,对照组原代培养间质细胞间散在上皮细胞小团生长,其比例约10%~20%。传代后间质细胞逐渐纯化,上皮细胞团因不能耐受传代而越来越少,传代3~4代后间质细胞纯度达99%以上。改良组原代培养的间质细胞纯度相当高(图1A),几乎找不到上皮细胞团,偶见的小团样生长上皮细胞经传代1~2代亦可去除纯化。两组间质细胞均可传代10~20代,10代以内其形状基本不变。

上皮细胞:对照组将分离的腺上皮细胞团接种培养,1~2 h开始逐渐贴壁,24 h贴壁良好。细胞长成旋涡状排列致密单层细胞集落,间质细胞插入性生长,5~7 d铺满瓶底。腺上皮细胞呈蝌蚪形,轮廓清晰,胞核大而圆,胞浆呈颗粒状。间质细胞及上皮细胞团交错分布,上皮细胞约占50%~70%。随着培养时间的延长,间质细胞逐渐增多密集,上皮细胞团常被挤压缩小。用消化液消化传代后上皮细胞呈拉网状生长,贴壁率较低,生长缓慢,间质细胞贴壁率高,生长迅速。传代2~3代后上皮细胞逐渐减少消失,间质细胞明显增生,传3代后间质细胞纯度达98%以上,腺上皮细胞几乎消失。改良组经接种后2 h后开始逐渐贴壁,24 h后贴壁良好。细胞长成旋涡状排列的致密单层细胞集落(图1B),偶见间质细胞插入性生长,较散在。4~7 d细胞团块铺满瓶底,平铺旋涡状排列的上皮细胞团偶见散在的间质细胞。上皮细胞约占92%~98%以上,用消化液消化传代后上皮细胞贴壁率约60%~70%,细胞呈拉网状生长,细胞间距拉大,死细胞增多,细胞增长缓慢,无法铺满瓶底,随着培养时间的延长,死细胞逐渐增多,活细胞减少,但未见间质细胞明显增生现象。

## 2.3 子宫内膜间质细胞及腺上皮细胞纯度的免疫细胞化学鉴定

用对上皮细胞特异的细胞角蛋白(cytokeratin)

抗体及对间质细胞特异的波形蛋白(vimentin)抗体进行染色。结果表明:对照组原代培养的子宫内膜间质细胞波形蛋白染色阳性,角蛋白阴性,纯度率约 $(84.22 \pm 5.17)\%$ ;原代培养的子宫内膜腺上皮细胞中,细胞角蛋白染色阳性,波形蛋白染色阴性,细胞纯度率约 $(62.11 \pm 6.23)\%$ 。改良组原代培养的间质细胞角蛋白染色阳性细胞纯度率达 $(97.89 \pm 0.96)\%$ (图1C),腺上皮细胞角蛋白染色阳性率达 $(95.12 \pm 2.11)\%$ (图1D),二者比较差异具有显著性( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

### 3.1 子宫内膜细胞体外培养的意义

子宫内膜细胞体外培养用于妇产科、生殖医学、分子生物学等多种研究领域,可避开在体子宫内膜的不同成分对刺激的反应的不一致及研究的局限性以及用人体实验和动物模型进行研究所带来的伦理学问题。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,可对胚胎着床,月经调节机制进行基础研究,并且可为研究药物作用机制及肿瘤发生等<sup>[2,3]</sup>提供有用的手段。

### 3.2 子宫内膜细胞体外培养现状

为研究细胞之间的自分泌和旁分泌作用,以及性激素等药物对子宫内膜细胞的影响,需要对子宫内膜腺上皮及间质细胞进行分离培养,才能在细胞水平上更好的对药物的作用机理进行研究。子宫内膜标本取材容易,培养易于成功,子宫内膜间质细胞及上皮细胞的分离及培养有较多文献报道<sup>[4]</sup>,各家报道的方法不一,方法简单者细胞纯度尤其是上皮细胞纯度不高,Osteen等<sup>[5]</sup>报道的方法和宿爱琴等<sup>[6]</sup>报道的方法间质细胞纯度达80%~95%,但腺上皮细胞纯度不及间质细胞。谭先杰等<sup>[7]</sup>报道的方法腺上皮细胞纯度约90%,间质细胞纯度达95%以上,但操作步骤较复杂,多次过滤及用重力沉降方法增加了污染的可能性。根据间质细胞体积较小的特点,多次细胞筛过滤可达到纯化的目的,但对细胞的存活力有影响。Arici等<sup>[8]</sup>认为如果只须培养间质细胞,在胶原酶酶解子宫内膜后,用73 $\mu\text{m}$ 孔径的细胞筛过滤一次即可,在培养过程中,原来纯度虽不高的间质细胞因可以传代,经过数次传代后可纯化,纯度可达98%以上。在传代过程中上皮细胞因不能耐受传代、红细胞等血细胞不会贴壁因

而可除去。腺上皮细胞经消化后成细胞团,接种后团状,旋涡状生长,因而可与子宫内膜表皮细胞区分<sup>[9]</sup>。

### 3.3 培养方法改进及意义

本研究采用 Ryan 等的方法加以改良,采用酶消化、过滤及根据成纤维细胞具有快速贴壁的特性而采用选择性贴壁分离法,分离的间质细胞纯度达 98%,上皮细胞纯度达 92% 以上。我们仅选择 38  $\mu\text{m}$  孔径的细胞筛过滤一次,根据间质细胞具有快速贴壁的特点,接种 2 h 左右大部分细胞已贴壁,而上皮细胞多于 2 h 后贴壁,在初步分离出的间质细胞培养至 90 ~ 120 min 时吸出培养液,将未贴壁细胞弃去,重新加入新的培养液继续培养,间质细胞纯度明显提高。间质细胞接种时细胞密度宜较大,达  $0.5 \times 10^6$  个/mL 贴壁效果较好,在清洗时尽量将血块和血细胞除去,可减少对接壁细胞贴壁的影响。细胞过筛时,筛上细胞团反复用 PBS 冲洗后间质细胞会减少,但很难完全除去,因而接种后待间质细胞基本贴壁而上皮细胞仅有极少贴壁时将未贴壁的细胞转移接种后基本可除去间质细胞,上皮细胞在 24 h 内贴壁,可达到理想的细胞纯度。我们的试验过程还发现子宫内膜间质细胞可以有限传代,腺上皮细胞不能传代,与 Pierro 等<sup>[10]</sup>报道一致。本试验方法简便,分离过程使用筛网次数少,可减少操作复杂带来污染的可能性并可降低成本,获得的子宫内膜腺上皮及间质细胞纯度及活性均高,可用于体外建立较理想的子宫内膜细胞培养模型。

(本文图 1A ~ D 见插页 2. Fig. 1A ~ D shown in back coloured page 2)

#### 参考文献:

- [1] Ryan I P, Schriock E, Taylor R N. Isolation, characterization and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro[J]. Clin Endocrinol Metab, 1994, 78(3): 642.
- [2] Huang H Y, Raga F, Wen Y, et al. Interleukin-1beta regulation of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in cultured human endometrial stromal cells[J]. Fertil Steril, 2003, 79(2): 399.
- [3] Bentin-Ley U, Lopata A. In vitro models of human blastocyst implantation[J]. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000, 14(5): 765.
- [4] Matthews C J, Redfern C F, Hirst B H, et al. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture [J]. Fertil Steril, 1992, 57: 990.
- [5] Osteen K G, Hill G A, Hargrove J T, et al. Development of a method to isolate and culture highly purified population of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens [J]. Fertil Steril, 1989, 52(6): 965.
- [6] 宿爱琴, 糜若然, 涂持坤, 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.
- [7] 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探索 [J]. 现代妇产科进展, 2002, 11(1): 30.
- [8] Arici A, Senturk L M, Seli E, et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone [J]. Biol Reprod, 1999, 61(1): 85.
- [9] Mylonas I, Speer R, Makovitzky J, et al. Immunohistochemical analysis of steroid receptors and glycodefin A (PP14) in isolated glandular epithelial cells of normal human endometrium[J]. Histochem Cell Biol, 2000, 114(5): 405.
- [10] Pierro E, Minici F, Alesiani O, et al. Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium[J]. Biol Reprod, 2001, 64(3): 831.

(编辑 张恩健)

脑活素激发细胞内钙升高介导大脑皮质神经元死亡 (正文见第 528 页)  
 Cerebrolysin Induces Cultured Rat Cortical Neuronal Death by Increasing Intracellular Calcium (Text in page 528)

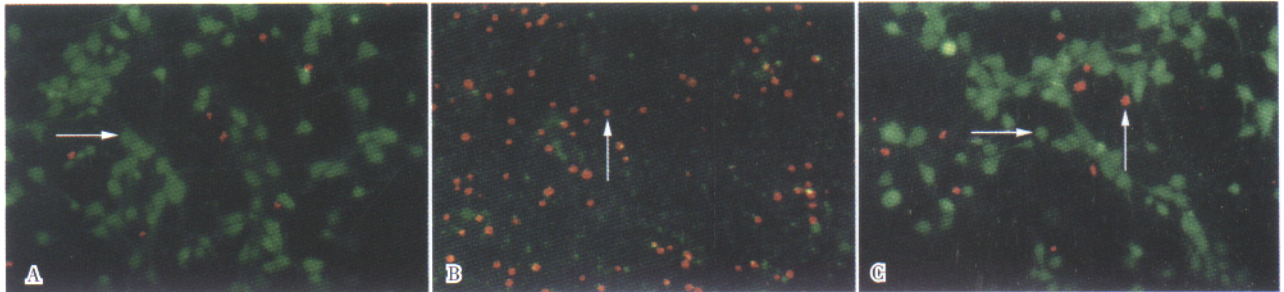


图 2 脑活素的神经毒性及 MK-801 的保护作用

Fig. 2 Neuroprotection of MK-801 on neurotoxicity induced by cerebrolysin

A: Control; B: Cerebrolysin 10 mL/L; C: MK-801 + Cerebrolysin) 10 mL/L). →: living cells were stained green; ↑: dead cells were stained red. (× 400)

高纯度分离子宫内膜腺上皮及间质细胞和体外培养技术 (正文见第 589 页)  
 A Method to Isolate and Culture Highly Purified Populations of Glandular Epithelial and Stromal Cells from Human Endometrial Specimens (Text in page 589)

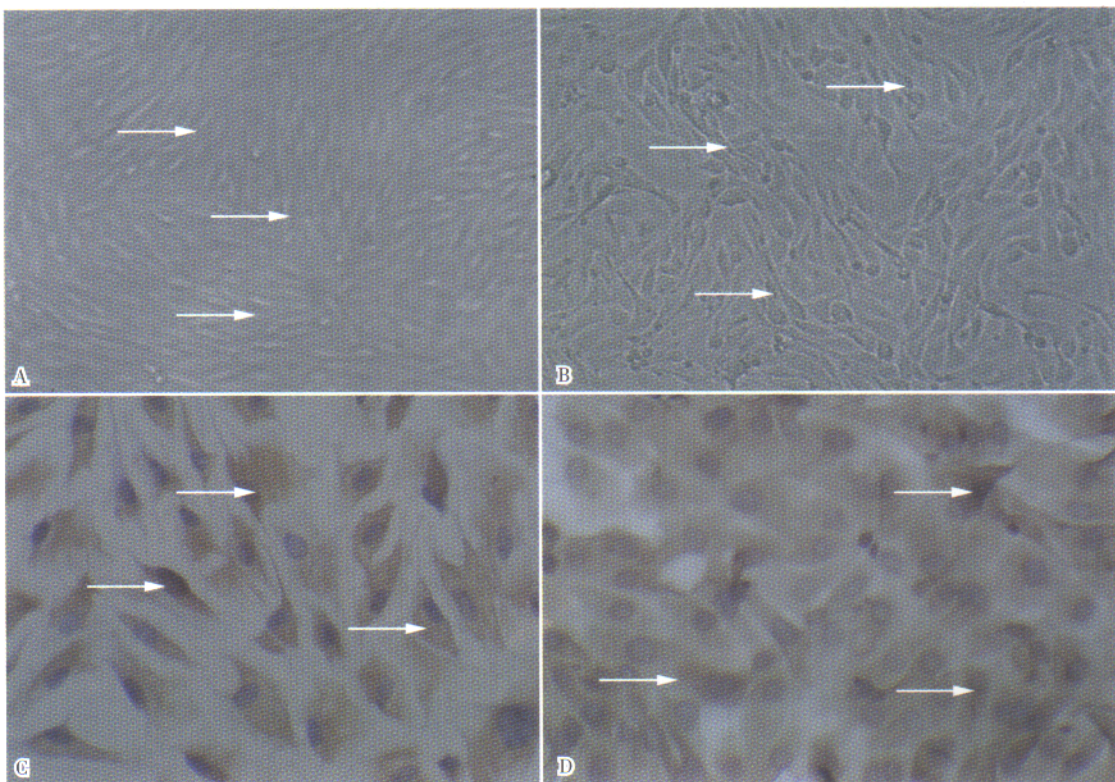


图 1 培养 5 天的子宫内膜细胞

Fig. 1 Primary endometrial cells cultured for 5 d

A: Primary endometrial stromal cells inverted microscopy (×100); B: Primary endometrial epithelial cells inverted microscopy (×100); C: Endometrial stromal cells show positive immunocytochemistry stain for vimentin (×200); D: Endometrial epithelial cells show positive immunocytochemistry stain for keratin (×200)