论著

文章编号:1000-5404(2006)20-2050-04

人无排卵功血子宫内膜上皮细胞生物学特性初步研究

王 欣[1],程 湘[1],成 娅[1],陈波洁[1],刘 萍[1],王 智[1],林桂兰[1],杨合荣[2],王 惠[2] (第三军医大学:[1]新桥医院妇产科,重庆 400037,[2]西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨ADUB EEC的部分生物学特性。**方法** 采用电镜、MTT、磁酶免及免疫组化等方法了解ADUB EEC的超微结构、生长曲线、CA125分泌及PCNA、ER、PR表达情况,并与在体ADUB子宫内膜组织及培养的正常EEC进行比较。**结果** 体外培养的ADUB EEC基本保留了体内的结构特征,体外增生水平低,分泌异常。**结论** 原代培养的ADUB EEC为研究无排卵功血发病机制及治疗奠定了实验基础。

关键词:无排卵功血;子宫内膜;上皮细胞;原代培养

中图法分类号:R322.65;R329.28;R711.52 **文献标识码**:A

Primary study on biological properties of human endometrial epithelial cells from anovulatory dysfunctional uterine bleeding patients

WANG Xin[1], CHENG Xiang[1], CHNEG Ya[1], CHEN Bo-jie[1], LIU Ping[1], WANG Zhi[1], LIN Gui-lan[1], YANG He-rong[2], WANG Hui[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the biological properties of endometrial epithelial cells (EEC) from anovulatory dysfunctional uterine bleeding (ADUB) patients. **Methods** EEC were isolated from 30 diagnosed ADUB patients, and from 22 patients with normal menstruation. The growth curve, ultrastructure, CA 125 production, and the expressions of proliferative cell nuclear antigen (PCNA), estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) of those cells were respectively investigated with Metromethyl Thiazolyl Blue assay (MTT), electron microscopy, MAIA and immunocytochemistry. **Results** ADUB EEC *in vitro* retained pathologic configuration of *in vivo* cells such as retarded growth and abnormal secretion. **Conclusion** The isolation and primary culture of ADUB EEC can serve to be one of the *in vitro* models of ADUB.

Key words: abnormal dysfunctional uterine bleeding; endometrium; epithelial cell; primary cell culture

疾病的体外实验模型是研究其机制的重要手段,目前因无经济、方便的无排卵功血实验模型,致使其相关研究滞后。由于原代培养的细胞和组织刚刚离体,生物学特征未发生很大变化,最接近并能反映体内生长状态。因此,我们分离培养了无排卵性功能失调性子宫出血(anovulatory dysfunctional uterine bleeding, ADUB)子宫内膜上皮细胞(endometrial epithelial cells, EEC),并在体外观察其部分生物学特性,以期为探讨无排卵功血的发生机制与防治研究提供有力的实验手段。

作者简介:王 欣(1968-),女,陕西省西安市人,硕士,主治医师,主要从事妇科内分泌方面的研究,现在兰州军区乌鲁木齐总医院妇幼保健中心。电话:(0991)8344799

通讯作者:程 湘,电话:(023)68774542

收稿日期:2005-11-14;**修回日期**:2006-01-05

1 材料与方法

1.1 标本来源

留取2004年4-12月在本科室及西南医院妇产科接受诊断性刮宫术的月经过多30例患者的子宫内膜,排除了生殖系统器质性病变和全身血液系统疾病,为功血组;在本院妇科病房住院的月经正常、因其他疾病行子宫切除手术的患者22例,为正常组,经腹切除子宫后立即刮取内膜。患者年龄27~52岁。术前3个月内未用过激素治疗。所取的每例子宫内膜标本分为2份,一份以10%甲醛固定送病理,一份用于细胞培养。术后组织学证实功血组子宫内膜病理改变为增生期样子宫内膜16例,单纯性子宫内膜增生过长14例;正常组子宫内膜组织学类型为增殖期9例,分泌期13例。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM/F12培养基和胎牛血清(Hyclone公司产品);Ⅲ型胶原酶(Sigma公司产品);鼠抗人ER单抗、鼠抗人PR单抗、鼠抗人PCNA单抗和免疫组化试剂盒(S-P法)(北京中山生物公

司产品）；MTT（Amresco 公司产品）；透射电镜（TECNAI10）（PHILIPS 公司产品）。

1.3　方法

1.3.1　EEC 的分离和原代培养[1]　采用胶原酶梯度浓度消化、筛网分离、差速贴壁分离 EEC，以含 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养。

1.3.2　透射电镜观察超微结构　原代培养分离、纯化的 EEC，3% 戊二醛固定后常规方法制片。

1.3.3　MTT 法测生长曲线　将分离纯化的 EEC 以 2×10^4/ml的密度接种于 96 孔板培养，每个时间点设 6 个复孔，从接种后 24 h 开始，每隔 24 h，每组复孔内加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl，继续培养 4 h，吸弃培养液，加入 150 μl DMSO（二甲基亚砜），振荡 10 min，在酶标仪上以 490 nm 波长测定每孔吸光度 D(490)，用只加培养液的空白对照孔调零。重复至第 7 天结束。以时间为横坐标、D(490) 为纵坐标，绘制生长曲线。

1.3.4　磁酶免法（MAIA）检测 CA125 浓度　收集培养细胞的上清液，-20 ℃冻存。按说明书步骤以 BIOZYME-1 型测定仪测定。

1.3.5　免疫组织细胞化学（S-P 法）　标本制备：①细胞爬片：分离纯化的 EEC 接种于有玻片的培养板中培养，玻片长满后取出，4% 多聚甲醛固定。用角蛋白 19（Cytokeratin19，CK19）多抗进行 S-P 染色，以 PBS 代替一抗作为阴性对照。CK19 以细胞质呈棕黄色为阳性细胞。②组织切片：子宫内膜组织蜡块进行切片，常规脱蜡至水。将细胞爬片及组织切片用 ER、PR、PCNA 进行 S-P 法染色，PCNA 蛋白阳性染色位于细胞核，呈棕黄色至深棕色，细胞质未见染色。ER、PR 蛋白阳性染色主要位于细胞核，呈不同程度的棕黄色至深棕色，少数可见细胞质着色，较细胞核染色淡。未显棕黄色为阴性。用 PBS 代替一抗作阴性对照。采用 Leica-Qwin 图像分析系统，测定每张片上的阳性单位灰度值。

1.4　统计学分析

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 软件进行组间比较 t 检验，多组比较单因素方差分析和组间两两比较，配对资料采用配对样本 t 检验。

2　结果

2.1　细胞形态学观察

ADUB EEC 与正常 EEC 的外观特征相同（图 1），有共同的细胞骨架标志（CK19 阳性，图 2），并且都有分泌现象。随培养天数增加，细胞形状从蝌蚪状逐渐增大呈圆形或多角形，细胞质呈颗粒状，核圆而大，核仁明显。细胞之间有细丝状物连接。3 d 后细胞表面出现多房样分泌物。培养 5 ~ 6 d 后体积进一步增大呈不规则形，多数为双核或多核细胞，细胞质空泡密集，细胞膜皱缩，表面分泌物体积增大。

2.2　细胞超微结构

功血组 EEC 有正常的极性，细胞膜完整，微绒毛清晰，可见连接复合体，核膜清晰，细胞质内有液泡状结构，线粒体模糊或肿胀、嵴断裂，内质网扩张，溶酶体数量明显增加，高尔基体分布广泛。

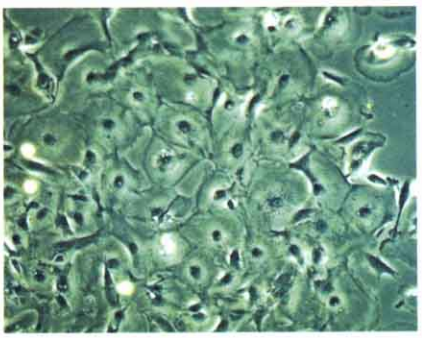


图 1　原代培养 3 d 的 ADUB EEC　（倒置显微镜 ×200）

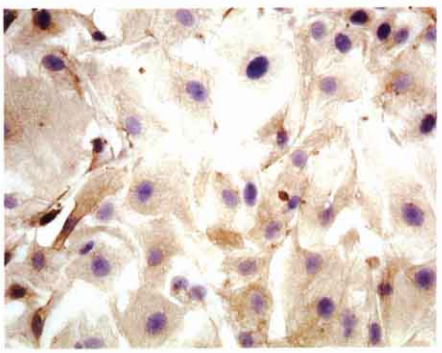
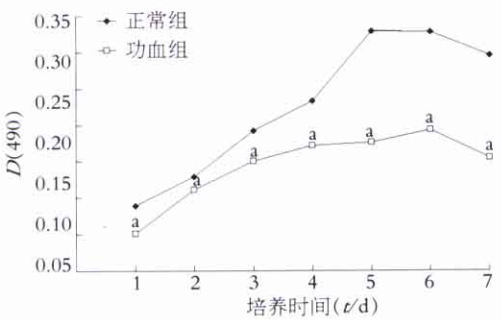


图 2　ADUB EEC 的 CK19 免疫组化鉴定　（S-P ×200）

2.3　EEC 生长曲线

功血组 EEC 的 D(490) 在培养第 2 天上升，自第 4 天开始上升幅度明显减小，第 6 天达高峰，第 7 天开始下降；正常组 EEC 的 D(490) 第 3 天上升，第 5 天达高峰，第 7 天开始下降（图 3）。在每一个时相点，功血组 EEC 的 D(490) 均显著低于正常组（$P<0.05$）。



a：$P<0.05$，与正常组比较

图 3　子宫内膜上皮细胞生长曲线

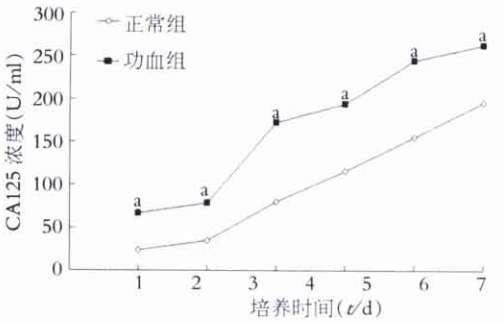
2.4　CA125 浓度的变化

随培养天数增加，正常组和功血组的 EEC 培养上清液中 CA125 的浓度均逐渐升高，在每一个时相点，功血组 CA125 浓度均显著高于正常组（$P<0.05$），功血 EEC 的 CA125 分泌在第 7 天仍呈上升趋势，而正常组第 7 天开始下降（图 4）。

2.5　免疫组织细胞化学染色结果

2.5.1　正常组和功血组子宫内膜组织 PCNA、ER 和 PR 的表达　从正常增生期、增生期样到单纯性增生过长子宫内膜，

PCNA 的表达依次显著升高($P<0.05$),ER 和 PR 的表达均依次显著下降($P<0.05$)。见表1。



a: $P<0.05$,与正常组比较

图4 子宫内膜上皮细胞 CA125 浓度变化趋势

表1 子宫内膜腺上皮 PCNA、ER、PR 灰度值比较

组别	ER	PR	PCNA
正常增殖期	209.53 ± 10.04	196.67 ± 15.43	162.78 ± 12.86
增生期样子宫内膜	196.31 ± 13.96[a]	177.87 ± 10.76[a]	185.67 ± 12.34[a]
单纯性增生过长	174.14 ± 12.77[ab]	143.92 ± 14.12[ab]	209.59 ± 13.54[ab]

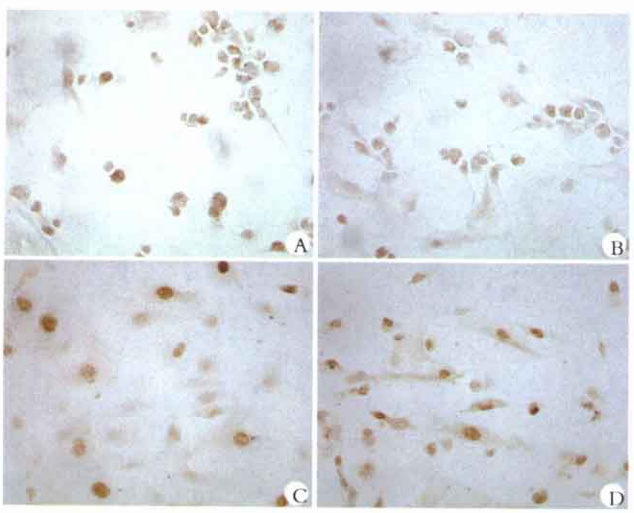
a: $P<0.05$,与正常增殖期组比较; b: $P<0.05$,与增生期样子宫内膜组比较

2.5.2 正常组和功血组 EEC 中 PCNA、ER、PR 的表达 与正常组 EEC 相比,功血组 EEC 的 PCNA、ER、PR 表达均低($P<0.05$)。见表2,图5。

表2 子宫内膜上皮细胞 PCNA、ER、PR 灰度值比较

组别	ER	PR	PCNA
正常组	190.57 ± 5.39	195.71 ± 12.56	197.67 ± 10.23
功血组	174.70 ± 8.19[a]	175.31 ± 8.15[a]	183.08 ± 6.75[a]

a: $P<0.05$,与正常组比较



A:功血组 EEC 的 ER 表达; B: 功血组 EEC 的 PR 表达; C: 正常组 EEC 的 ER 表达; D:正常组 EEC 的 PR 表达

图5 子宫内膜上皮细胞 ER 及 PR 表达情况 (S-P ×400)

3 讨论

在持续雌激素作用下,无排卵型功血子宫内膜局部微环境发生改变,上皮细胞及间质细胞产生的生长因子、细胞因子、酶类和功能蛋白等生物活性物质出现异常变化,共同影响着上皮细胞的功能和生长,使无排卵型功血子宫内膜呈现出与正常子宫内膜不同的病理表现。原代培养的细胞刚刚离体,生物学特征未发生很大变化。本实验将体外培养的无排卵型功血 EEC 与在体无排卵型功血子宫内膜腺上皮及体外培养的正常增殖期 EEC 进行比较,发现无排卵型功血 EEC 有其特有的一些生物学特性。

3.1 超微结构

透射电镜观察 ADUB 子宫内膜腺上皮排列密集,有正常的极性,腺腔表面微绒毛、纤毛明显增多,基底膜厚薄完整均匀。细胞质内细胞器,尤其是游离核糖体、粗面内质网、高尔基体、线粒体及初级溶酶体增多,形态较规则,并见较多微丝,多呈束状排列,常从基底部伸到核上区,大多数细胞核形态规则,少数细胞核增大,形态略不规则[2]。本实验光电镜结果显示体外培养的 ADUB EEC 具有上皮细胞的特征,细胞质内细胞器的改变与在体所观察的一致,说明培养的 EEC 保留了 ADUB 子宫内膜组织上皮细胞的结构特征,细胞膜及细胞器均有相似的病理改变,与分泌活动有关的细胞器增多,线粒体水肿。

3.2 生长增殖

MTT 法及 PCNA 表达的结果显示,在体外,脱离了子宫内膜局部微环境的作用,给予相同的培养条件后,ADUB EEC 的生长增殖能力较正常 EEC 低。而在体 ADUB 子宫内膜 PCNA 的表达较正常增殖期子宫内膜高。在体与体外细胞生长能力的不同,可能与 EEC 生长环境改变及其本身结构及功能异常有关。

3.3 分泌状态

CA125 是一种来源于体腔上皮细胞的表面抗原,存在于正常间皮组织及苗勒管上皮组织中。细胞培养中,CA125 常用来作为上皮细胞分泌功能的指标[3]。本研究结果显示体外分离培养的 ADUB EEC 也有分泌生物活性物质的功能,其 CA125 浓度高于正常 EEC。ADUB EEC 分泌 CA125 与正常 EEC 不同。正常组 CA125 分泌与细胞生长的趋势一致,第7天开始下降,而 ADUB 组 CA125 的分泌在第7天仍呈上升趋势。ADUB 组细胞数较正常组低,但 CA125 分泌较正常组高,可能与 ADUB EEC 的病理状态有关。

3.4 ER、PR 表达

无排卵型功血患者的激素生理功能往往不正常。

激素生理功能的异常可分别发生在激素进入细胞的过程、细胞质内激素-受体的活化过程及细胞质-激素受体复合物向胞内转化过程。受体改变可直接在细胞水平上引起激素生理功能异常。无排卵型功血子宫内膜组织ER、PR的表达，不同作者的研究结果不同。韩玉崑等[4]报道，增生过长子宫内膜ER、PR的含量依子宫内膜的增生程度呈下降趋势，单纯性增生＞复杂性增生＞不典型增生。Chakraborty等[5]的研究却显示增生过长的子宫内膜ER、PR增高。罗璐等[6]的结果为单纯性增生和复合性增生子宫内膜腺上皮PR显著高于正常增殖期内膜，ER表达无明显增高。而李红雨等[7]的结果则为正常增生期与不同类型增生过长的子宫内膜PR表达无差异。本研究结果显示，从正常增生期、增生期样到单纯性增生过长子宫内膜，腺上皮ER、PR的表达依次显著下降，与韩玉崑的研究结果一致。与正常EEC相比，体外培养的功血EEC的ER、PR表达低，与在体的表达相一致，表明体外细胞的分离和原代培养不影响其特异蛋白的表达。PR的表达依赖于ER的转录活性，因此，PR表达低提示ER的活性降低。ER的表达及活性降低，将影响与ER有关的信号传导，从而影响子宫内膜的一系列生理活动。推测ER的表达及活性降低可能是无排卵型功血子宫内膜生长修复障碍的机制之一。

通过对体外高纯度原代培养的功血EEC与正常EEC在超微结构、生长增殖、分泌及蛋白表达等方面进行的生物学特性的比较研究，我们初步了解了ADUB EEC的部分特性。体外培养的ADUB EEC基本保留了体内的结构和特征，体外增生水平低、分泌异常。进一步了解该细胞的特性及功能，研究不同因素对其的影响，有助于揭示无排卵型功血子宫内膜的生长修复机制。

参考文献：

[1] 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.

[2] 张文尧，许燕雪，张友忠，等. 子宫内膜增生及子宫内膜癌的内分泌特征、甾体激素受体及超微结构研究[J]. 现代妇产科进展，1994，3(4)：311－316.

[3] RYAN I P，SCHRIOCK E D，TAYLOR R N. Isolation，characterization，and comparison of human endometrial and endometriosis cells *in vitro*[J]. J Clin Endocrinol Metab，1994，78(3)：642－649.

[4] 韩玉崑，刘　丽，苏　菊. 子宫内膜增生性病变中Bcl-2、ER、PR表达及相关性研究[J]. 天津医药，2001，29(9)：523－525.

[5] CHAKRABORTY S，KHURANA N，SHARMA J B，*et al*. Endometrial hormone receptors in women with dysfunctional uterine bleeding[J]. Arch Gynecol Obstet，2005，272(1)：17－22.

[6] 罗　璐，朱凤川，曾耀英，等. 无排卵型功血患者子宫内膜VEGF和雌、孕激素受体的表达[J]. 基础医学与临床，2004，24(2)：196－200.

[7] 李红雨，任芬若，刘俊英，等. 孕酮受体、孕酮受体B亚型和增生细胞核抗原在子宫内膜增生过长组织中的表达[J]. 河南医学研究，2001，10(3)：233－236.

（编辑　薛国文）

欢迎订阅2007年《护理管理杂志》

《护理管理杂志》是经中华人民共和国新闻出版署批准公开发行的专科护理杂志，ISSN 1670-315X　CN11-4716/C，中国科技论文统计源期刊（中国科技核心期刊），《CAJ-CD规范》执行优秀期刊，获第四次全军医学期刊优秀编辑质量奖。本刊认真履行为国家旨，紧密学科发展动态，针对护理学科的热点、难点问题进行快捷追踪报道，得到了护理界专家及同仁的认可。开辟有院长看护理、论坛、论著、调查研究、综述、质量管理、专科护理管理、护理科研管理、护理教育、人力资源管理、信息管理、医院感染管理、社区护理管理、护理改革、护理工作与法、安全管理、护理经济管理、护理专家等栏目。

《护理管理杂志》推出可授继续教育学分项目，订阅本刊并进行学分注册者，根据注册登记情况和返回编辑部的有效答题卡，全年可获取Ⅰ类继续教育学分12分。

《护理管理杂志》为国际期刊标准大16开本，64页，月刊，每月10日出版。

订价：每本5元，全年定价60元人民币，全国各地邮电局均可订购，邮发代码82-926，也可破年、破季从编辑部直接订阅。编辑部自行装订了2002－2006年各年的杂志合订本，2002、2003年各年合订本（双月刊）每套38元，2004－2006年各年合订本（月刊）每套76元，如需订购直接从编辑部办理邮购（免邮费）。

地　址：北京市东城区南门仓5号《护理管理杂志》编辑部　　邮编：100700

电　话：（010）64048630，64043064，66721461　　传真：（010）66721265

E-mail：huguan@public3.bta.net.cn或hlgl@chinajournal.net.cn