论著

文章编号:1000-5404(2007)20-1972-04

异位和正常子宫内膜间质细胞对上皮细胞间隙连接细胞间通讯的影响

刘志能,姚珍薇,唐良茜,令狐华,谯 建 (重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

提 要:目的 研究体外异位和正常子宫内膜间质细胞对内膜上皮细胞间隙连接细胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)功能的不同影响。**方法** 取24例卵巢处子宫内膜异位灶以及10例正常子宫内膜,分离、纯化上皮细胞和间质细胞,建立体外上皮细胞单独培养、上皮细胞与间质细胞共培养模型。在激光共聚焦显微镜下采用荧光漂白后恢复技术分别检测各组上皮细胞的GJIC功能。**结果** ①异位内膜上皮、间质细胞纯度分别为92%、95%,对照组内膜上皮、间质细胞纯度分别为95%、98%;②单独培养的异位内膜上皮细胞与单独培养的正常内膜上皮细胞的GJIC功能无显著性差异($P>0.05$);③与正常间质细胞共培养后,上皮细胞中GJIC功能明显上调,而与异位内膜间质细胞共培养的上皮细胞中GJIC功能未见明显变化。**结论** 异位间质细胞丧失了调节上皮细胞GJIC的能力,这种调节能力的异常可能与子宫内膜异位症发生有关。

关键词: 子宫内膜异位症;细胞培养;间隙连接细胞间通讯;荧光漂白后恢复技术;激光扫描共聚焦显微镜

中图法分类号: R322.65;R329.27;R711.710.2 **文献标识码:** A

Influence of ectopic and normal endometrial stromal cells on GJIC in epithelial cells *in vitro*

LIU Zhi-neng, YAO Zhen-wei, TANG Liang-dan, LINGHU Hua, QIAO Jian (Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the different influences of ectopic and normal endometrial stromal cells on gap junctional intercellular communication (GJIC) in endometrial epithelial cells *in vitro*. **Methods** The epithelial and stromal cells were isolated and purified from samples including 24 endometriotic tissues located in ovaries and 30 normal endometria. The model of epithelial cells cultured alone and the model of endometrial epithelial cells cocultured with endometrial stromal cells were established *in vitro*. Laser scanning confocal microscopy (LSCM) was applied to determine the functions of GJIC in epithelial cells among different groups by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). **Results** The purity of epithelial and stromal cells was 92%, 95% in ectopic endometrial group respectively, and was 95%, 98% in control group respectively. No significant difference was found on GJIC between ectopic endometrial epithelial cells cultured alone and normal endometrial epithelial cells cultured alone ($P>0.05$). GJIC was up-regulated in epithelial cells cocultured with control endometrial stromal cells, but not in the epithelial cells cocultured with ectopic endometrial stromal cells. **Conclusion** That ectopic endometrial stromal cells lost ability to regulate GJIC in endometrial epithelial cells may be related to the pathogenesis of endometriosis.

Key words: endometriosis; cell culture; gap junctional intercellular communication; fluorescence recovery after photobleaching; laser scanning confocal microscopy

间隙连接细胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)是相邻细胞间进行信息和能量交换的重要方式,它调控着细胞的新陈代谢、增殖和分化等生理过程,对机体的代谢平衡和生长发育起着重要的作用。研究证实在宫颈癌、子宫内膜癌、子宫平滑肌肉瘤等妇科肿瘤中均存在GJIC功能及调节异常;GJIC的调节作用对胚胎植入、分娩发动、滋养层细胞的融合与分化等诸多生理过程至关重要[1-4]。近来发现正常宫内膜间质细胞可调节上皮细胞GJIC功能,从而对子宫内膜的整体生物学行为起着重要的影响[5]。而子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)中异位内膜

作者简介:刘志能(1975-),男,湖北省黄冈市人,博士,主治医师,主要从事妇科肿瘤及子宫内膜异位症的治疗方面的研究。电话:(023)89013625, E-mail: znliu88@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-01-22;修回日期:2007-03-15

间质细胞对上皮细胞 GJIC 的调节作用是否异常，国内外少见文献报道。因此本课题通过分离培养 EMs 异位内膜、正常内膜的上皮细胞和间质细胞，体外建立上皮细胞独立培养、间质——上皮细胞共培养模型，采用荧光漂白后恢复技术（fluorescence recovery after photobleaching，FRAP），分析 EMs 异位内膜和正常内膜的间质细胞对上皮细胞 GJIC 的调节作用，探讨这种调节作用的异常在 EMs 发病中的意义。

1　材料与方法

1.1　研究对象及取材

实验组：选取我院妇产科 2006 年 2 月至 2007 年 1 月住院行手术治疗的 EMs（卵巢巧克力囊肿）患者 24 例，年龄（35.80 ±3.27）岁；取同期因子宫肌瘤行子宫全切术的患者 10 例作为正常对照组，年龄（36.30 ±4.06）岁。对照组与实验组患者年龄无差异显著性（$P>0.05$）。所有病例均在剖腹行子宫、附件全切术后，无菌条件下刮取靠近子宫底部的内膜组织或剥取卵巢巧克力囊肿的内壁，放入无菌 D-HBSS 液中，20 min 内送至实验室。所有病例无其他内外科疾病，手术前 6 个月未接受激素治疗或化疗，均经开腹手术及术后病理确诊。采取标本均得到患者的同意，并签署了知情同意书。

1.2　主要试剂及设备

FD 培养基（不含酚红）、胶原酶-Ⅰ、DNase Ⅰ、胰酶均购自 Gibco 公司；胎牛血清购自杭州四季青生物制品有限公司；E_2（17β-Estradiol）、P（progesterone）为 Sigma 公司产品；cytokeratin、vimentin 鼠抗人单克隆抗体、FITC 标记的二抗均系进口分装；6-CFDA 购自 Fluka BioChemika 公司，使用前先用二甲基亚砜（DMSO）配成浓度为 1 mg/ml 的储存液，分装后置 -20 ℃保存；100 目、400 目的不锈钢丝细胞滤网购自重庆恒益仪器有限公司；激光共聚焦显微镜为德国 Leica TCS-SP5 型。

1.3　方法

1.3.1　细胞的分离、培养和鉴定　　在位子宫内膜及异位内膜组织的细胞分离、培养参考文献[6-8]并加以改良：宫内膜组织经胶原酶-Ⅰ、DNase Ⅰ消化后，1 000 r/min 离心 5 min，用不含血清的培养液洗涤 2 次，洗涤后的细胞悬液依次过 100 目、400 目的细胞滤网，最后所得滤液中主要为间质细胞；反向冲洗 400 目滤网，收集未滤过的腺细胞团，加入 0.25% 胰酶消化数分钟，腺细胞团已分散成单个细胞。两种细胞均按 1×10^5/ml 的密度分别接种于铺有盖玻片的 6 孔板内，放入细胞培养箱。3 h 后将未贴壁的腺细胞轻轻吸出，转入空的 6 孔板中培养。原 6 孔板中已贴壁者主要为间质细胞，加入含 10% 胎牛血清 FD 培养基（无酚红）继续培养。第 1 次 24 h 后换液，以后每隔 2 d 换液 1 次。因无法同时获得 EMs 异位内膜和正常内膜组织，故我们将最初获得的 3 例 EMs 异位内膜和 3 例对照内膜的纯化上皮细胞收集后，按照文献[9]的方法置 -80 ℃分装冻存，用于细胞共培养体系的建立。细胞鉴定采用间接免疫荧光法常规操作，将 cytokeratin 染色阳性视为上皮细胞，vimentin 染色阳性为间质细胞。

1.3.2　细胞实验的分组培养　　将上述纯化后的细胞分为 6 组进行培养：①单独的异位内膜上皮细胞（ectopic endometrial epithelial cells，EE）；②单独的对照内膜上皮细胞（normal endometrial epithelial cells，NE）；③异位内膜间质细胞（ectopic endometrial stromal cells，ES）与异位内膜上皮细胞共培养（ES + EE）；④异位内膜间质细胞与对照组上皮细胞共培养（ES + NE）；⑤对照组内膜间质细胞（normal endometrial stromal cells，NS）与异位内膜的上皮细胞共培养（NS + EE）；⑥对照组内膜的间质细胞与对照组上皮细胞共培养（NS + NE）。③、④、⑤、⑥组共培养体系中的上皮细胞来自早期冻存的细胞，与间质细胞均按 1∶1 的比例接种到 6 孔板的盖玻片上。用于 GJIC 功能检测的细胞加入生理剂量 E_2、P 进行培养 5 d（E_2 终浓度为 170 pg/ml、P 终浓度为 200 pg/ml）。

1.3.3　用 FRAP 法检测间质细胞的 GJIC 功能　　参考文献[10]的方法。细胞在生理剂量的 E_2、P 中生长 5 d 后，取出细胞爬片，HBSS 液清洗 3 次，转入空的 6 孔板中，加入 10 μg/ml 6-CFDA 1 ml（将储存液用含有 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 HBSS 缓冲液稀释而成），置 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 10～15 min。取出后用 HBSS 液洗涤 3 次，再加入少量不含血清的培养液，上机检测。实验中选择 3 种细胞：①周围与其他细胞紧密连接，需用激光去淬灭的细胞，作为漂白细胞；②孤立于其他细胞，也需用激光去淬灭的细胞，作为对照细胞；③周围与其他细胞紧密连接的，但不需要激光淬灭的细胞，作为未漂白细胞，用于背景校正。用光标分别描绘出上述 3 种细胞的 ROI（regions of interest）区域（每个视野可同时选取 1～5 个漂白细胞）。整个光漂白实验采用 FRAP Wizard 程序在 30 min 内完成，监测 3 种细胞 4 min，观察其荧光变化及恢复情况。仪器参数设置参照厂商说明书。通过 ROI 漂白后不同时间的各次扫描图像（共 9 帧），获取漂白细胞荧光恢复及相邻接触未漂白细胞荧光的变化。数据通过 FRAP quantify 子程序获得。荧光漂白恢复率按照文献[10]中的公式计算。

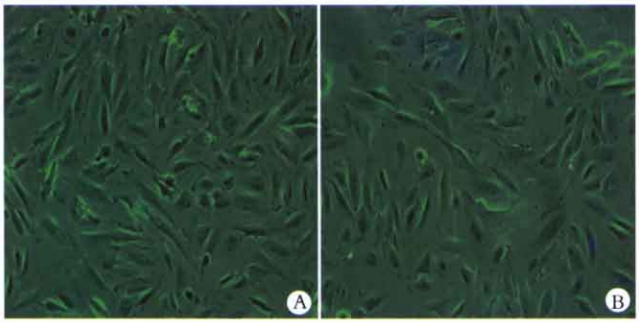
1.4　统计学处理

采用 SAS 9.0 统计软件包处理，计量资料的数值以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两样本比较采用 t 检验，多组间比较运用方差分析。

2　结果

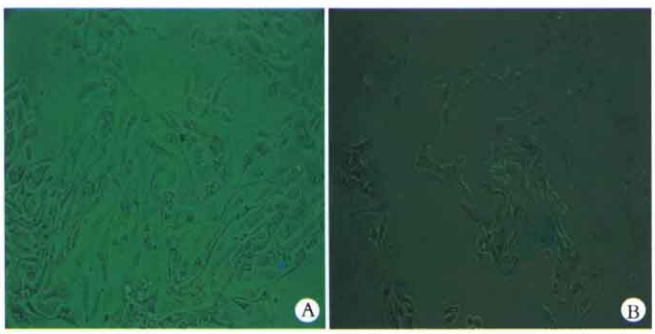
2.1　细胞的分离、培养及纯度鉴定

24 例 EMs 异位内膜标本成功分离培养出间质细胞 11 例、上皮细胞 10 例，8 例同时获得间质细胞和上皮细胞；10 例对照组内膜均获得间质细胞和上皮细胞。正常和异位内膜间质细胞接种 30 min 后开始贴壁，24 h 后已完全贴壁；正常内膜间质细胞体积稍大，多呈梭形排列，细胞质薄而透明，核椭圆，贴壁后易呈平行排列状生长，异位内膜间质细胞形态较对照组间质细胞略小，接种 24 h 内可见分散生长，3 d 后形态与对照组极为相似。EMs 异位内膜上皮细胞与对照组上皮细胞于接种后 3 h 始缓慢贴壁，二者形态接近，细胞边界清楚，细胞质饱满，核圆大，多呈多角形或蝌蚪样，易集聚成团、漩涡状生长，见图 1、2。间接免疫荧光实验显示，异位内膜间质细胞纯度为 95%，上皮细胞纯度 92%；对照组内膜间质细胞纯度达 98%，上皮细胞纯度为 95%。



A:正常子宫内膜; B: EMs 异位子宫内膜

图1 培养4 d的间质细胞形态观察 (倒置相差显微镜×200)

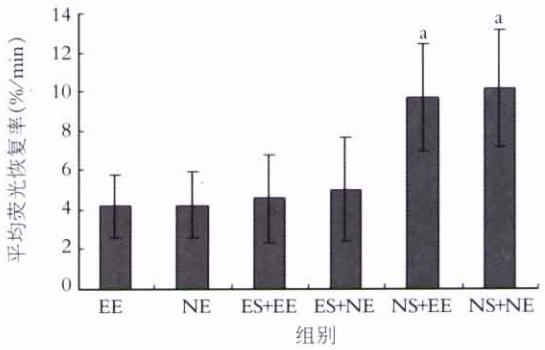


A:正常子宫内膜; B: EMs 异位子宫内膜

图2 培养3 d的上皮细胞形态观察 (倒置相差显微镜×100)

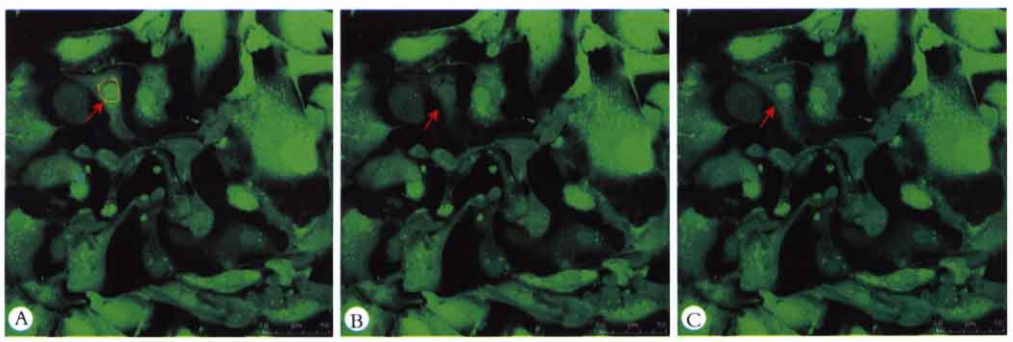
2.2 不同实验组中上皮细胞的 GJIC 功能

体外培养的各组内膜上皮细胞经激光漂白后均有不同程度的荧光恢复。单独培养的 EE 组和 NE 组以及共培养的 ES + EE 组和 ES + NE 组的平均荧光恢复率均较低,四组间两两比较,P 值均大于 0.05,观察至 4 min 时其荧光强度恢复均不足 60%。与正常内膜间质细胞共培养的 NS + NE 组、NS + EE 组上皮细胞平均荧光恢复率明显高于前面 4 组,且差异均有统计学意义($P<0.01$),NS + NE 组与 NS + EE 组间差异无显著性($P>0.05$);漂白后 4 min,NS + NE 组与 NS + EE 组的荧光强度可恢复至漂白前的 75% ~85%,见图 3、4。



a: $P<0.01$,分别与 EE、NE、ES + EE、ES + NE 组比较

图3 各组上皮细胞平均荧光恢复率



A: 漂白前; B: 漂白后; C: 漂白后 4 min; ↑:需漂白的上皮细胞

图4 NS + EE 组 EMs 异位内膜上皮细胞 FRAP 实验

3 讨论

以往关于 EMs 的研究多在人工诱导的动物模型上进行,但在动物体内诱导出的 EMs 样变化不是自然发生的疾病,不能完全代表人体内的情况。体外培养的内膜细胞不仅接近人体内的生长、分泌等特性,而且能在一定程度上反映间质——上皮细胞间的相互作用。因此进行异位内膜和正常内膜上皮、间质细胞体外原代培养,能够提供细胞在组织原位的部分信息,为进一步研究 EMs 的发病机制提供了相对理想的实验模型。本研究联合酶法消化、细胞滤网过滤、不同细胞贴壁时间存在差异而将间质细胞与上皮细胞分离开。实验得到上皮细胞和间质细胞纯度均高于文献[6-8]报道。故本研究获得的细胞纯度能满足进一步实验的要求。

GJIC 的结构基础是间隙连接(gap junction,GJ),GJ 中央有一直径为 1.5 ~2 nm 的亲水管道,允许相对分子质量小于 1 000 的 cAMP、IP_3、Ca^{2+} 等第二信使及小分子物质自由通过。以前研究细胞 GJIC 功能多采用划痕标记染料示踪及显微注射荧光分子,这两种方法对活细胞均有一定的创伤。随着激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)的应用,FRAP 技术可用于活细胞 GJIC 功能进行动态、定量的测定,且重复性好。该技术采用的荧光染料 6-

CFDA 对细胞无毒性，并有良好的膜通透性，它本身不发光，进入细胞后水解成 6-CF，6-CF 可被波长为 488 nm 的激光激发出黄绿色荧光且无膜通透性，因此荧光物质进入细胞后无法通过细胞膜出来，只有通过 GJ 通道相互交换；经激光漂白后，细胞内荧光恢复速度与程度能较好地反映细胞的 GJIC 功能[11-13]。

GJIC 功能受性激素水平影响，故本实验以相同浓度 E_2、P 培养细胞，模拟人月经周期 10～15 d 的性激素水平，消除取材时患者体内性激素水平差异对 GJIC 功能的影响。结果显示单独培养的 EMs 异位内膜上皮细胞与正常内膜上皮细胞的 GJIC 功能并无区别，正常内膜间质细胞与异位内膜上皮或正常内膜上皮细胞共培养后，两类上皮细胞的 GJIC 功能均显著上调，异位内膜间质细胞却不能改善异位内膜或正常内膜上皮细胞的 GJIC 功能，这提示正常内膜间质细胞对上皮细胞 GJIC 功能具有良好的调节作用，异位内膜间质细胞则丧失了这种调节能力。Regidor 等[14]曾对 EMs 患者异位内膜组织中与 GJIC 功能密切相关的连接蛋白（connexins，Cxs）进行研究，发现异位内膜间质细胞中缺少 Cxs 表达；由于间质细胞中 Cxs 表达与其 GJIC 功能密切相关，因此该结果提示异位内膜间质细胞的 GJIC 功能异常。故笔者推测，在 EMs 内膜中，由于部分间质细胞本身 GJIC 功能减弱或异常，信号分子在间质细胞与上皮细胞间传递受阻，间质细胞对上皮细胞 GJIC 的调节作用减弱或受抑，结果造成间质——上皮细胞间失去了原有的生长调控；这些内膜细胞随经血逆流至宫腔外，最终出现异位种植、局部侵袭等类似恶性肿瘤细胞的生物学行为。

目前有关 GJIC 的研究大多局限在癌细胞方面，虽已阐明多条细胞信号转导途径参与了癌细胞的 GJIC 调控，但 EMs 异位内膜细胞中 GJIC 的调节机制尚不清楚，有待进一步研究。

有研究人员[15]发现，GJIC 功能正常的大鼠肝脏上皮细胞与 GJIC 功能异常的肿瘤细胞共培养可抑制肿瘤细胞的生长。因此恢复 EMs 异位内膜间质细胞对上皮细胞 GJIC 的调节，可能是治疗 EMs 的新思路。

参考文献：

[1] Aasen T, Hodgins M B, Edward M, *et al*. The relationship between connexins, gap junctions, tissue architecture and tumour invasion, as studied in a novel *in vitro* model of HPV-16-associated cervical cancer progression[J]. Oncogene, 2003, 22(39): 7969-7980.

[2] Nishimura M, Saito T, Yamasaki H, *et al*. Suppression of gap junctional intercellular communication *via* 5′ CpG island methylation in promoter region of E-cadherin gene in endometrial cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2003, 24(10): 1615-1623.

[3] Cronier L, Defamie N, Dupays L, *et al*. Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human first trimester trophoblast[J]. Mol Hum Reprod, 2002, 8(11): 1005-1013.

[4] Trosko J E, Ruch R J. Gap junctions as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy[J]. 2002, 3(6): 465-482.

[5] Schlemmer S R, Kaufman D G. Endometrial stromal cells regulate gap-junction function in normal human endometrial epithelial cells but not in endometrial carcinoma cells[J]. Mol Carcinog, 2000, 28(2): 70-75.

[6] 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.

[7] Khan K N, Masuzaki H, Fujishita A, *et al*. Interleukin-6- and tumour necrosis factor alpha-mediated expression of hepatocyte growth factor by stromal cells and its involvement in the growth of endometriosis[J]. Hum Reprod, 2005, 20(10): 2715-2723.

[8] 石书芳，俞超芹，刘玉环，等. 人在位和异位子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞的原代培养[J]. 第二军医大学学报，2004，25(11)：1228-1231.

[9] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司，2004：84-88.

[10] Wade M H, Trosko J E, Schindler M. A fluorescence photobleaching assay of gap junction-mediated communication between human cells [J]. Science, 1986, 232(4749): 525-528.

[11] 周逢海，王养民，宋　波，等. 18β-GA 对逼尿肌不稳定缝隙连接介导细胞间通讯功能影响[J]. 中华实验外科杂志，2006，23(3)：369.

[12] 史惠蓉，任　芳，乔玉环. 卵巢上皮性肿瘤组织中 EphA2 和 E-钙黏素测定[J]. 郑州大学学报：医学版，2007，42(1)：94-97.

[13] 赵　倩，边爱平，吴惠琰. 子宫内膜异位症异位内膜组织中 TNF-α、MMP-2 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报：医学版，2007，42(3)：535-537.

[14] Regidor P A, Regidor M, Schindler A E, *et al*. Aberrant expression pattern of gap junction connexins in endometriotic tissues[J]. Mol Hum Reprod, 1997, 3(5): 375-381.

[15] Esinduy C B, Chang C C, Trosko J E, *et al*. In vitro growth inhibition of neoplastically transformed cells by non-transformed cells: requirement for gap junctional intercellular communication[J]. Carcinogenesis, 1995, 16(4): 915-921.

（编辑　汪勤俭）