维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)12-1276-03

分离培养子宫内膜腺上皮和间质细胞方法的改进

王 佳[1],姚珍薇[1],唐良茜[1],钟梁[2],令狐华[1],谯建[1],刘北忠[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016;2. 重庆医科大学检验系,重庆 400016)

【摘 要】目的:探索一种获得高产量、高纯度子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞的分离培养方法。方法:通过高浓度胶原酶和DNase联合消化、过滤及贴壁纯化等技术,分离培养30例子宫内膜腺上皮和间质细胞,并拟传代。结果:29例标本培养成功,每1g子宫内膜组织约可分别得到(40~50)×10⁶个腺上皮细胞和(40~50)×10⁶个间质细胞,细胞产量高。并且腺上皮细胞纯度率约96%,间质细胞纯度率达98%以上。间质细胞可以有限传代,腺上皮细胞不能传代。结论:通过改良步骤,可提高腺上皮和间质细胞产量,同时保证了其纯度及活性,不失为一种较理想的子宫内膜细胞分离培养方法。

【关键词】子宫内膜;腺上皮细胞;间质细胞;细胞培养

【中国图书分类法分类号】R711.74 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-04-10

Improvement on isolation and culture of human endometrial glandular epithelial cells and stromal cells in vitro

WANG Jia, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the isolation and culture of a better yield of purified human endometrial glandular epithelial cells and stromal cells. *Methods*: Digestion with high concentrated collagenase and DNase, filtration and adhesion purification were used to isolate, purify human endometrial glandular epithelial cells and stromal cells in 30samples. And the two kinds of cells were reproduced. *Results*: The endometrial cell culture was successfully established in 29 of 30 endometrium samples. From one gramme of endometrial tissue, the yields of glandular epithelial cells and stromal cells were (40~50) × 10^6 and (40~50) × 10^6 respectively. The purities of glandular epithelial cells and stromal cells were 96% and 98% respectively. Stromal cells could be reproduced into several passage. However, glandular epithelial cells could not be reproduced. *Conclusion*: A better yield of purified human endometrial glandular epithelial cells and stromal cells can be obtained by the modified culture procedure.

【Key words】 *Endometrium*; *Glandular epithelial cells*; *Stromal cells*; *Cell culture*

子宫内膜是卵巢激素作用的靶组织,在生殖生理的研究中占有重要地位。对子宫内膜细胞进行体外培养,可为研究细胞生长、分化、代谢及激素作用机制提供一种体外实验模型。对此,国内外学者不断地进行了探索。但是,子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞的分离培养成功率却不容乐观。本研究拟进一步探索子宫内膜细胞的分离培养方法,以提高子宫内膜细胞分离培养成功率,为研究子宫内膜细胞的生殖生理提供有价值的体外实验模型。

1 材料与方法

作者介绍:王 佳(1969-),女,博士,主治医师,主要研究方向:妇科肿瘤及子宫内膜异位症。

1.1 组织标本的获取

选择2005年8月至2005年12月在重庆医科大学附属第一医院妇产科因子宫肌瘤行全子宫切除的患者30例,年龄37~49岁,平均年龄43岁,所有患者术前3个月均未用过激素治疗。在剖腹行全子宫切除术后,无菌条件下刮取子宫内膜,置于灭菌的含青霉素、链霉素的生理盐水中,30min内冰盒运往实验室进行分离培养。

1.2 主要试剂

DMEM/Ham's-F12培养液、Serva胶原酶NB4(德国Serva公司)、DNase Ⅰ(美国Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青生物制品公司),抗人角蛋白(Cytokeratin)、抗人波形蛋白(Vimentin)、SP试剂盒及DAB均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方 法

维普资讯 http://www.cqvip.com

参照 Ryan 等[1]及唐雪莲等[2]的方法,并加以改进。

1.3.1 子宫内膜细胞分离培养方法 无菌条件下获取子宫内膜组织,无菌操作下生理盐水洗涤,尽量除去血块及粘液,将其剪成 1mm × 1mm × 1mm 左右的小块,置入刻度离心管中,1000 r/min 离心 5min,弃上清。测量组织体积,按胶原酶与组织体积之比为 10 : 1 的比例加入 0.2% Serva 胶原酶 NB4,置于 37℃,含 5%CO_2 的恒温孵箱内消化 30min。加入 DNase,至终浓度为 15 U/ml,置于 37℃,含 5%CO_2 的恒温孵箱内继续消化 30min。用 400 目的不锈钢筛网过滤消化后的细胞悬液。

(1)腺上皮细胞的培养:

将滤膜上组织及细胞漂洗收集后,1200r/min 离心 5min,弃上清,生理盐水洗涤 2 次。沉淀中加入含 15%胎牛血清的 FD 培养液,调成细胞悬液,以 0.5 × 10^6/ml 的浓度接种于培养瓶内,置于 37℃,含 5%CO_2 的恒温孵箱内培养。接种后 3h,将悬浮的细胞及上皮细胞团吸出转移到另一培养瓶中,加入培养液,置于 37℃,含 5%CO_2 的恒温孵箱内培养。

(2)间质细胞的培养:

滤液以 1600r/min,离心 5min,弃上清,生理盐水洗涤 2 次。沉淀中加入含 15%胎牛血清的 FD 培养液,调成细胞悬液,以 0.5 × 10^6/ml 的浓度接种于培养瓶内,置于 37℃,含 5%CO_2 的恒温孵箱内培养。接种后 2h,将悬浮的细胞及上皮细胞团吸出弃之,重新加入培养液,置于 37℃,含 5%CO_2 的恒温孵箱内培养。

两种细胞第 1 次换液均于 2 天后,以后隔 2~3 天更换培养液 1 次,培养到细胞几乎聚合成片,大约需 7 天。

1.3.2 子宫内膜腺上皮和间质细胞的形态及纯度鉴定

(1)倒置相差显微镜观察腺上皮和间质细胞,比较二者的形态学差异。

(2)免疫细胞化学鉴定:用细胞角蛋白及波形蛋白抗体对腺上皮和间质细胞进行免疫组化 SP 染色。一抗:鼠抗人细胞角蛋白 19 单克隆抗体(工作液),鼠抗人波形蛋白单克隆抗体(工作液)。二抗为生物素标记羊抗小鼠 IgG。以上试剂及 SP 试剂盒均为北京中杉金桥生物技术有限公司提供。实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 子宫内膜腺上皮和间质细胞的传代 当细胞生长铺满瓶底后,用含 0.03%EDTA 的 0.25%胰酶进行消化传代。

2 结 果

2.1 子宫内膜腺上皮和间质细胞生长情况

30 例子宫内膜标本中 29 例培养成功,1 例失败,细胞存活率≥97%。这 1 例因细菌污染失败。每 1g 子宫内膜组织约可分别得到(40~50) × 10^6 个腺上皮细胞和(40~50) × 10^6 个间质细胞。原代培养的子宫内膜腺上皮和间质细胞均在接种后 5~7 天接近铺满。

2.2 子宫内膜腺上皮和间质细胞的形态学特点

子宫内膜腺上皮细胞呈蝌蚪形,轮廓清晰,胞核大而圆,胞浆呈颗粒状,旋涡状排列生长,见图 1。间质细胞较扁平,细胞体向两端突起,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,细胞之间放射状排列或平行排列,见图 2。

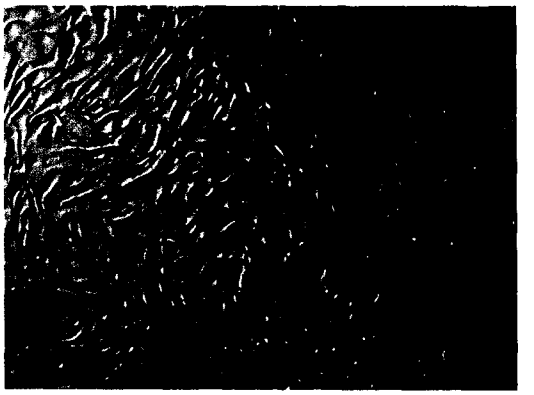


图 1 子宫内膜腺上皮细胞(100×)



图 2 子宫内膜间质细胞(100×)

2.3 子宫内膜腺上皮和间质细胞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)抗体进行免疫组化 SP 染色。结果表明:原代培养的子宫内膜腺上皮细胞中,细胞角蛋白染色阳性占绝大多数,波形蛋白染色阳性细胞很少,纯度率约 96%,见图 3。原代培养的间质细胞中,细胞角蛋白染色阴性,波形蛋白染色阳性,纯度率达 98%以上,见图 4。

2.4 子宫内膜腺上皮和间质细胞的生物学特点

原代培养的间质细胞可传 2~3 代,3 代以后其细胞形态会发生改变。原代培养的上皮细胞未能成功传代。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 3 子宫内膜腺上皮细胞免疫组化染色(200×)



图 4 子宫内膜间质细胞免疫组化染色(200×)

3 讨 论

子宫内膜细胞是性激素作用的靶细胞,在月经周期中发生着形态与功能的变化。妊娠时,子宫内膜受生殖激素、细胞因子及免疫细胞的调节,其变化影响着胚泡着床。体外分离培养子宫内膜细胞可避开在体子宫内膜的不同成分对刺激反应的不一致及研究的局限性,是分析这些细胞功能及其相互作用的基础,在研究月经生理、妊娠等的机制中具有重要意义。子宫内膜异位症是临床常见病,但其发病机制目前仍不清楚。异位内膜组织不易获取,而在位内膜腺上皮及间质细胞的体外培养,可作为研究子宫内膜异位症的较好的模型,可为研究该病的发病机制及筛选临床治疗药物提供有用的手段。因此,子宫内膜细胞体外培养已广泛应用于妇产科、生殖医学、分子生物学等多种研究领域。

关于子宫内膜腺上皮和间质细胞的分离培养有较多文献报道,各家报道的方法不一。Arici 等[3]认为 200 目孔径过滤可直接培养间质细胞,但其纯度不够。Osteen 等[4]报道的方法间质细胞纯度达 80%~95%,但腺上皮细胞纯度远不及间质细胞。以上方法简单者细胞纯度均不高。Overton 等[5]将间质细胞经 360 目筛网过滤,滤液通过含 peroll 梯度纯化细胞,并高速离心裂解红细胞,过程较为繁杂。谭先杰等[6]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,多次过滤及重力沉降等方法增加了污染的可能性,并多次过滤对细胞的存活力也有一定影响。唐雪莲等[2]选择 400 目孔径的细胞筛仅过滤一次,并根据间质细胞与上皮细胞贴壁时间的不一致进行第二次分离,提高了间质细胞及上皮细胞的纯度,但获得的细胞数量少,尤其是间质细胞数量损失较多。本研究在此基础上作了进一步改进,采用 Serva 胶原酶 NB4 和 DNase Ⅰ联合消化。Serva 胶原酶 NB4 含Ⅰ类和Ⅱ类胶原酶,具有均衡的蛋白水解活性。我们将胶原酶浓度提高至 0.2%,同时增加其用量,即按胶原酶与组织体积之比为 10∶1 的比例加入胶原酶,可使内膜组织充分消化,并可缩短胶原酶消化时间,由通常的 1~2h 缩短至 30min。在胶原酶消化后加入 DNase Ⅰ继续消化,可使内膜组织消化更加完全,获得更多的细胞,保证了细胞的高产率。在分离细胞时,我们同样采用 400 目孔径的细胞筛过滤一次,根据间质细胞体积小、质量轻的特点,在滤液离心时提高离心转速至 1600r/min,可获得多量间质细胞。通过改良步骤,每 1g 子宫内膜组织约可分别得到(40~50)×10^6 个腺上皮细胞和(40~50)×10^6 个间质细胞,大大提高了腺上皮细胞和间质细胞的产量。并且两种细胞纯度及活性均高,腺上皮细胞纯度率约 96%,间质细胞纯度率达 98%以上。我们的研究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[7]报道一致。

本实验采用 Serva 胶原酶 NB4 和 DNase Ⅰ联合消化,分离过程仅使用筛网一次,可减少操作复杂带来污染的可能性并降低了成本,获得的子宫内膜腺上皮和间质细胞数量多,其细胞纯度及活性均高。方法简便易行,提高了两种细胞产量,同时保证了其纯度及活性,不失为一种较理想的子宫内膜细胞分离培养方法。

参 考 文 献

[1] Ryan IP, Schriock E, Taylor RN. Isolation, characterization and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro[J]. Clin Endocrinol Metab, 1994; 78(3): 642-649.

(下转第 1346 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

vated protein kinase pathway can inhibit TRAIL-induced apoptosis by prohibiting association of truncated Bid with mitochondria[J]. Cell Death Differ,2006;13(11):1857-65.

[23] Kim YH,Lee YJ. TRAIL apoptosis is enhanced by quercetin through Akt dephosphorylation[J]. J Cell Biochem,2007;100(4):998-1009.

[24] Shrader M,Pino MS,Lashinger L,et al. Gefitinib reverses TRAIL resistance in human bladder cancer cell lines via inhibition of AKT-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression [J]. Cancer Res,2007;67(4):1430-5.

[25] Koschny R,Ganten TM,Sykora J,et al. TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis within a therapeutic window[J]. Hepatology,2007;45(3):649-658.

(上接第 1278 页)

[2] 唐雪莲,谢梅青,张凤丽. 高纯度分离子宫内膜腺上皮及间质细胞和体外培养技术[J]. 中山大学学报(医学科学版),2003; 24(6):589-592.

[3] Arici A,Senturk LM,Seli E,et al. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial stromal cells by estrogen and progesterone[J]. Biol Reprod,1999;61:85-90.

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

[5] Overton CE,Barolow DH,Fernanaez-Shaw S,et al. In vitro culture of endometrial stromal and gland cells as a model for endometriosis:the effect of peritoneal fluid on proliferation[J]. Fertil Steril,1997;67(1):51-56.

[6] 谭先杰,刘冬远,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] Pierro E,Minici F,Alesisni O,et al. Stromal-epithelial interactions modulate estrogen responsiveness in normal human endometrium[J]. Biol Reprod,2001;64(3):831-838.

(上接第 1281 页)

ized children[J]. Pediatr Infect Dis J,2003;22:789-794.

[5] Souza LS,Ramos EA,Carvalho FM,et al. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil[J]. Pediatr Pulmonol,2003;35(3):184-191.

[6] 朱汝南,邓 洁,王 芳,等. 2000 年秋冬至 2002 年夏北京地区急性呼吸道感染病毒病原学研究[J]. 临床儿科杂志,2003;21(1):25-28.

[7] Openshaw PJ,Yamaguchi Y,Tregoning JS. Childhood infections,the developing immune system,and the origins of asthma[J]. J Allergy Clin Immunol,2004;114(6):1275-1277.

(上接第 1328 页)

working group myocardial and pericardial disease of the european society of cardiology and of the scientific council on cardiomyopathies of the international society and federation of cardiology[J]. Br Heart J,1994;71(3):215-218.

[2] Yoerger DM,Marcus F,Sherrill D,et al. Echocardiographic findings in patients meeting task force criteria for arrhythmogenic right ventricular dysplasia new insights from the multidisciplinary study of right ventricular dysplasia[J]. J Am Coll Cardiol,2005;45(6):860-865.

[3] Gemayel C,Pelliccia A,Thompson PD. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol,2001;38(7):1773-1781.

[4] Vignaux O,Lazarus A,Varin J,et al. Right ventricular MR abnormalities in myotonic dystrophy and relationship with intracardiac electrophysiologic test findings:initial results[J]. Radiology,2002;224(1):231-235.

[5] Tandri H,Saranathan M,Rodriguez ER,et al. Noninvasive detection of myocardial fibrosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy using delayed-enhancement magnetic resonance imaging [J]. J Am Coll Cardiol,2005;45(1):98-103.

[6] Corrado D,Basso C,Leoni L,et al. Three-dimensional electroanatomic voltage mapping increases accuracy of diagnosing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia[J]. Circulation,2005;111(23):3042-3050.

(上接第 1336 页)

面。

参 考 文 献

[1] Ropper AH. Unsual clinical variants and signs in Guillain-Barré syndrome[J]. Arch Neural,1986;43:1150-1152.

[2] 赵燕玲,站丽萍,孙晓南,等.类截瘫型格林—巴利综合征 1 例报道[J]. 中风与神经疾病杂志,1999;16:302.

[3] 李光勤,秦宪忠,董为伟.变异型格林—巴利综合征 4 例临床报道及文献复习[J]. 重庆医科大学学报,1997;22:370-371.

[4] Asbury AK,Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome[J]. Arch Neural,1990;27(Suppl):S21-S24.

[5] 李光勤,彭国光.伴有感觉平面的截瘫型吉兰—巴雷综合征 1 例报道[J]. 重庆医科大学学报,2004;29:265、291.