373-375
维普资讯 http://www.cqvip.com
(15)

文章编号：0253-3626(2000)04-0373-03

子宫内膜间质细胞模型的建立

R711.71

辛云碧，徐小蓉，令狐华
（重庆医科大学临床学院妇产科 重庆 400016）

摘 要：目的 为进一步实验需要，建立子宫内膜间质细胞模型。**方法** 胶原酶消化联合应用差速离心和密度梯度离心以分离纯化目的细胞；恒温孵箱培养细胞；倒置显微镜观察细胞形态；台盼兰染色计数细胞存活率；免疫组化鉴定细胞。**结果** 该方法分离纯化子宫内膜间质细胞的存活率高，形态与子宫内膜腺上皮细胞易区别。体外培养的间质细胞具有一定分裂增殖能力，传代培养的形态特征与原代细胞一致。免疫组化显示Vimentin(+) Keratin(-)是鉴定间质细胞的标志。**结论** 该方法分离子宫内膜间质细胞高效、简便、省时。

关键词： 子宫内膜；细胞模型；分离；鉴定
中国图书分类法分类号： R711.71 **文献标识码：** A **收稿日期：** 1999-12-14

Establishment of endometrial stromal cellls model

XIN Yun-bi, et al
(Department of Obstetrics and Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University, 400016)

Abstracts: Objective The endometrial stromal cell model was established for further experimentation. **Methods** Digestion with collagenase Ⅰ A, combined with centrifugation according to different sedimentation velocity and density , was used to separate and purify cells wanted. These isolated cells were cultured in vitro. The inverted microscope was used for morphologic observation and trypanblue staining was used for judging their survival rate. The endometrial stromal cells were identified by histoimmunologic method. **Results** The survival rate of stromal cells purified by this method was as high as 95%, while the morphologic characteristics of these cells were not similar to those of epithelium of endometrial gland . The stromal cells cultured in vitro had an ability to proliferate . Moreover, it was demonstrated that the positive expression of vimentin and negative expression of keratin is key biochemical characteristics of stromal cells. **Conclusion** This method of isolating endometrial cells is efficient, brief and time-saving.

Key Words: Endometrium; Cell model; Isolation; Identification

目前对子宫内膜异位症(endometriosis，EM)研究分三种类型：人体试验、动物模型以及新近发展起来的组织和细胞模型。前两者不能区分各种因素的独立作用，而且面临伦理障碍[1]。

组织细胞模型研究克服了这些缺点，可通过形态学、生物化学、免疫学、分子生物学手段全方位地研究各种因素单独或共同作用对目的细胞的影响：包括生长繁殖规律、物质代谢水平、细胞合成分泌活动，细胞对性激素及其拮抗剂调节的反应，各种药物处理引起细胞各方面的改变等；藉此发现EM与正常对照组间的差别，发现病因，掌握发病机理，寻求更好的诊断指标与治疗措施，故受到普遍关注。为研究需要，我们借鉴了国外一些作者的方法，并加以改进，在国内首先建立了纯化的子宫内膜间质细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器

CO_2孵箱 SHELLAB，Model 2300 购自美国；倒置显微镜NIKON 购自日本；显微相机 Olympus 购自日本

1.1.2 主要试剂

DMEM，购自美国Gibco公司；Ham's F12，购自美国Gibco公司；Collagenase Ⅰ A，购自美国Sigma公司；淋巴细胞分离液(Ficoll hypaqus)购自北京邦定生物医学公司；鼠抗人波形蛋白单抗(MAH anti-vimentin MAb，IgG)购自美国Zymed公司；鼠抗人白蛋白单抗(MAH anti-keratin MAb，

作者介绍：辛云碧（1971- ），男，硕士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

IgG)购自美国Zymed公司；ABC试剂购自北京邦定生物医学公司

1.2 方法

1.2.1 组织来源

所有9例子宫内膜取自生育年龄子宫内膜异位患者手术切除子宫。所有标本均经病检证实为增殖期内膜。内膜于无菌状态下从子宫底刮下，放入含100u/ml青霉素，100μg/ml链霉素的无钙镁Hank's平衡盐溶液(CMF-HBSS)置冰上立即送往实验室处理。

1.2.2 细胞分离与纯化

尽量去除组织表面血凝块，测量组织体积后，将内膜剪碎至1mm³大小，CMF-HBSS反复冲洗以去除红细胞。按0.05%胶原酶溶液体积：内膜组织体积=20，加入0.05%胶原酶溶液于半径为6cm的培养皿内，于37℃，5%CO_2静置孵育约1h左右，至酶消化液中出现单个腺上皮片段时终止消化。消化液过100μm滤网，离心500g×5min，弃上清，沉淀悬于DMEM/F12(1:1)中，离心100g×30s×2次(由于内膜间质细胞沉降系数较小，将滞留于上清液中，沉降系数较大的红细胞及腺上皮细胞，将沉淀于管底)，弃沉淀，加等量Ficoll hypaque于上清液管底，离心400g×20min，取中间层细胞加CMF-HBSS离心100g×5min，弃上清，沉淀悬于含15% FCS DMEM/F12(1:1)培养液，调整细胞浓度至5×10^5/ml，台盼兰染色测细胞生存率。

1.2.3 细胞培养及鉴定

将细胞悬液置恒温孵箱内，36.5℃，5%CO_2饱和湿度孵育。细胞鉴定用免疫组化ABC法；间质细胞涂片或培养单层细胞用丙酮固定，子宫内膜组织切片常规脱蜡至水。

加3%H_2O_2室温孵育5min，PBS洗5min×3次；加10%正常山羊血清37℃，10min，0.01M，pH7.4PBS洗5min×3次；加鼠抗人Vimentin，Keratin单抗，4℃过夜，PBS冲洗5min3次；加Biotin标记抗IgG单抗，37℃30min，PBS洗5min×3次；加辣根过氧化物酶标记avidin，37℃，30min，PBS洗5min×3次，DAB-H_2O_2显色；自来水冲洗，苏木素复染，自来水冲洗，封片，镜检。

2 结 果

2.1 细胞存活率 台盼兰染色计数，子宫内膜间质细胞存活率为95.3～97.8%。

2.2 子宫内膜间质细胞形态学

2.2.1 新分离的子宫内膜间质细胞大小不一、形态不规则，可呈圆形、多角形、锥形（见图1）。

2.2.4 体外培养24h，子宫内膜间质细胞梭形仍可保持椭圆，48h后细胞全部梭形变，出现细胞伪足，特别在细胞密度较低时明显（见图2）。体外培养2～3周后，细胞数量增多，胞体变得细长细胞伪足不再明显，排列更加紧密，呈辐射状或交织状。培养1月左右，原代子宫内膜间质细胞单层铺满瓶底，未发现细胞分层生长现象。

2.3 细胞涂片免疫组化鉴定

鉴定结果表明新分离细胞为间质细胞。

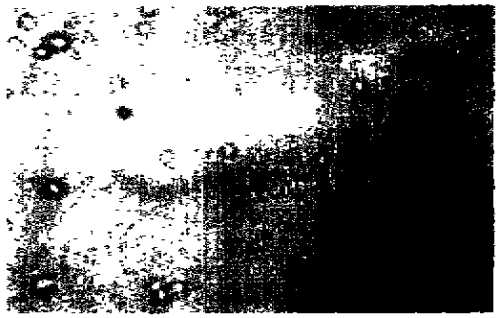


图1 新分离纯化的子宫内膜间质细胞大小不一，形态不均呈多角形，圆形，锥形。倒置显微镜×200

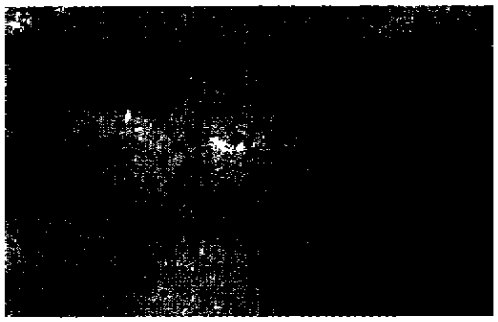


图2 培养48h，间质细胞梭形变，细胞伪足较多。倒置显微镜×200

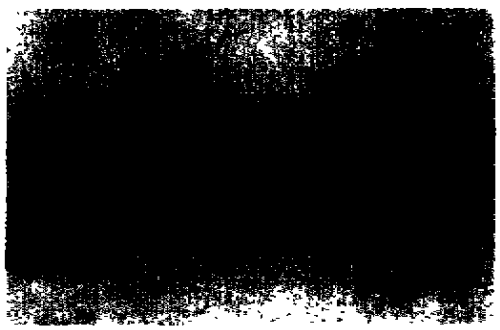


图3 新分离纯化间质细胞涂片anti-Vimentin染色(+)，×200



图4 子宫内膜组织切片 anti-Keratin 染色，间质细胞(-)腺上皮(+)，×200

维普资讯 http://www.cqvip.com

新分离细胞及子宫内膜切片染色涂象见图3，图4。

3 讨 论

3.1 关于细胞分离与纯化

本研究所用方法，在两个方面为纯化了宫内膜间质细胞提供了保障。其一，酶的类型及作用时间的选择。胶原酶作用温和，分离间质细胞时胶原酶使用浓度范围广泛(0.02%～0.25%)[2,3]，我们采用0.05%胶原酶，消化1h，细胞存活率95%以上。其二，充分利用酶消化液中各种结构沉降系数的差异，联合应用差速离心和密度梯度离心，获得目的细胞。与其他细胞分离方法相比，具有无需特殊设备，一次分离，纯化成功，存活力高，简便且省时的优点。

3.2 细胞形态

新分离的子宫内膜间质细胞形态不规则，大小不一。可见圆形、多角形、锥形、与以前研究结果相同[4]。贴壁生长后即呈梭形变，随细胞增多，排列渐趋紧密，呈典型放射状和交织状，从而与腺上皮的漩涡状排列相区别。我们未观察到细胞分层现象，可能因缺乏雌、孕激素所致[5]。

3.3 细胞生长繁殖

体外培养的子宫内膜间质细胞具有一定分裂繁殖能力。体外培养的子宫内膜间质细胞很容易传代，其形态与原代培养一致。

3.4 子宫内膜间质细胞的免疫组化鉴定

最近多采用免疫组化方法检测不同细胞具有的特殊抗原及抗原组合对子宫内膜间质细胞加以鉴定，C. Jase Matthews研究发现Vimentin同时表达于子宫内膜间质细胞和腺上皮细胞，而keratin仅表达于腺上皮，即间质细胞表型为Vimentin(-)、Keratin(-)[4]。而periwal等却报告Vimentin仅表达于间质细胞，不见于腺上皮细胞。因而将Vimentin作为间质细胞与腺上皮细胞鉴别的唯一指标[2]。本研究证实Vimentin确实同时表达于间质细胞和腺上皮细胞，只是腺上皮中Vimentin表达水平低于间质细胞，因此Vimentin不能作为唯一鉴别间质细胞与腺上皮细胞的依据，必须强调Vimentin(+)、keratin(-)才能作为间质细胞鉴定的标志。

4 结 论

本研究采用机械分离，胶原酶消化，过滤，差速离心、密度梯度离心等综合手段，快速分离纯化得到大量高纯度子宫内膜间质细胞。在国内首次建立起子宫内膜异位症研究的间质细胞模型，为在细胞水平研究了宫内膜异位症的病因和发病机理奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Kathy L, Sharpe T. Basic research in endometriosis[J]. Obstet Gynecol Nor Am. 1997, June :281-314.

[2] Periwal SB, Bhargava VL, Vij U, et al. Rapid isolation of human endometrial stromal cells with high yield and purity[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim 1995; 31: 744-748.

[3] Sugawara J, Fukaya T, Murakami T, et al. Hepatocyte growth factor stimulates proliferation ,migration , and lumen formation of human endometrial epithelial cells in vitro[J] . Biol Reprod . 1997; 57:936-942.

[4] Mathews CJ, Redfern CP, Hirst BH, et al. Characterization of human purified epithelial and stromal cell, from endometrium and endometriosis in tissue culture[J] . Fertil Steril . 1992; 57: 990-997.

[5] Irwin J, King RJ, Kirk D, et al. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization [J]. 1989; 52:761-768.