

# 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

石书芳<sup>1</sup>, 俞超芹<sup>1\*</sup>, 刘玉环<sup>2</sup>, 崔英<sup>2</sup>, 惠宁<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学长海医院中医科, 上海 200433; 2. 长海医院妇产科)

**[摘要]** 目的: 探讨在位和异位子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞分离培养方法, 为研究子宫内膜异位症的发病机制提供体外细胞模型。方法: 通过消化、过滤、沉降等方法, 分离培养正常对照子宫内膜以及子宫内膜异位症在位、异位子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞, 模拟人体内雌激素水平研究促进细胞生长的方法, 光学显微镜观察离体细胞形态。结果: 正常对照子宫内膜细胞分离培养成功率达 91.7% (11/12), 子宫内膜异位症在位子宫内膜细胞成功率为 93.8% (15/16), 子宫内膜异位症异位子宫内膜细胞成功率为 75.0% (12/16)。间质细胞传代 2 次后, 生长缓慢, 经雌激素作用后, 生长明显改善; 腺上皮细胞不能传代, 经雌激素作用后, 生长改善不明显。结论: 体外分离培养的人子宫内膜细胞比子宫内膜异位动物模型更接近于人体的特点, 在位和异位子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞分离培养可作为研究子宫内膜异位症的体外细胞模型之一。

**[关键词]** 子宫内膜异位症; 子宫内膜; 腺上皮细胞; 间质细胞; 细胞培养

**[中图分类号]** R 711.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X (2004) 11-1228-04

## Primary culture of human eutopic and ectopic endometrial glandular epithelial cells and stromal cells

SHI Shu-Fang<sup>1</sup>, YU Chao-Qin<sup>1\*</sup>, LIU Yu-Huan<sup>2</sup>, CUI Ying<sup>2</sup>, HU Ning<sup>2</sup> (1. Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To explore the way to separate and culture eutopic and ectopic endometrial glandular cells and their stromal cells, providing an *in vitro* cell model of endometriosis for study of its mechanism. **Methods:** Digestion, filtration and sedimentation were used to isolate and culture the eutopic and ectopic endometrial glandular cells and their stromal cells. The estrogen level was imitated to study the way of promoting cell growth. Morphological characters of eutopic and ectopic endometrial cells were examined using optical microscope. **Results:** The success rate of separation and culture of normal control endometrial glandular cells and its stromal cells was 91.7% (11/12); of eutopic endometrial glandular cells and its stromal cells of endometriosis was 93.8% (15/16); of ectopic endometrial glandular cells and its stromal cells of endometriosis was 75.0% (12/16). **Conclusion:** The cultured eutopic and ectopic endometrial cells is more like human body feature than the endometriosis model of animals. So the isolation and culture of eutopic and ectopic endometrial glandular cells and their stromal cells may serve as an *in vitro* experimental model.

**[KEY WORDS]** endometriosis; endometrium; glandular epithelial cell; stromal cell; cell culture

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(11): 1228-1231]

\* 子宫内膜异位症(内异症)体外模型是研究其发病机制的重要工具, 国内外学者不断地对此进行了探索。由于人子宫内膜间质细胞及腺上皮细胞尚未成功建系, 所以其原代培养成为内异症体外研究的一个重要方法。但是, 在位和异位内膜间质细胞及腺上皮细胞的分离培养成功率, 尤其是异位内膜细胞培养的成功率却不容乐观。本研究拟进一步探索正常的在位子宫内膜细胞、内异症在位内膜细胞以及内异症异位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, 为子宫内膜异位症的发病机制提供有价值的体外细胞研究模型。

月在本院妇产科手术的内异症患者 16 例, 年龄 23~47 岁, 平均(41.13±2.78)岁; 因子宫肌瘤行子宫全切术的患者 12 例, 年龄 23~47 岁, 平均(41.83±2.79)岁。所有患者无内科合并症, 术前 3 个月内未用过激素治疗, 均在剖腹行子宫、附件全切术后, 无菌条件下刮取子宫内膜。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 F12 和 DMEM 培养液, 胶原酶 IV 型, 新生牛血清(美国 Sigma 公司), DNase I (华美生物工程有限公司), 小牛血清清蛋白(BSA) (晶美

## 1 材料和方法

1.1 组织标本的获取 2002 年 12 月至 2003 年 6

\* [基金项目] 国家自然科学基金(30070942).  
[作者简介] 石书芳(1974-), 女(汉族), 硕士生, 住院医师  
\*Corresponding author. E-mail: yucq81@hotmail.com

生物工程有限公司), 鼠抗人波形蛋白(vimentin)抗体、鼠抗人细胞角蛋白(cytokeratin)抗体(DAKO 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 分离培养方法 将分离的组织标本用无菌 F12/DMEM 培养液洗净血液后, 按谭先杰等<sup>[1]</sup>方法进行分离培养操作: 将洗净的内膜组织剪碎至约 < 1 mm (肉眼呈糊状), 置入 0.1% 胶原酶溶液于 37 °C 消化 60~90 min 后, 再加入 DNase I 消化 30~40 min。消化后的细胞悬液含单个间质细胞及腺上皮细胞团, 40 μm 的细胞滤网过滤, 所得的滤液经 3.0% 和 1.5% 的 BSA 溶液梯度沉降, 可得到较纯的间质细胞; 滤网上冲洗所得的溶液里含较纯腺上皮细胞<sup>[2]</sup>。过滤后将间质细胞和腺上皮细胞分别置入 F12/DMEM 培养液中, 置培养瓶于 5% CO<sub>2</sub> 37 °C 孵箱中培养。

1.3.2 活细胞观察 用倒置显微镜直接观察生长于培养瓶壁的活细胞。

1.3.3 光学显微镜标本制备 将无菌盖玻片放入 6 孔培养板内。当间质细胞在其上生长后, 取出盖玻片, PBS 液洗涤后固定, 行 H-E 染色; 将腺上皮细胞用 0.02% EDTA 和 0.025% 的胰酶消化为单个细胞后, 涂片, 固定, 行 H-E 染色。

1.3.4 免疫组织化学标本制备 现已证明角蛋白广泛存在于人类的上皮组织及培养的上皮细胞内, 而波形蛋白则主要位于间质细胞中<sup>[3,4]</sup>。为了对细胞进行鉴定, 将长满间质细胞的盖玻片以及腺上皮细胞涂片, 用甲醇固定过夜。分别用单克隆抗体细胞角蛋白 1:100 和人波形蛋白 1:100 作 S-P 法染色(DAKO 公司), 再用苏木精复染。凡细胞质染成棕黄色的为细胞角蛋白阳性细胞或人波形蛋白阳性细胞, 未显棕黄色为阴性细胞。每次染色取 1 例子宫内腺组织片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.3.5 在位和异位子宫内腺间质细胞的传代和培养 细胞生长铺满瓶壁时即可传代。传代时, 弃去培养瓶中的培养液, 加 0.02% EDTA 4 ml, 于室温下消化 5~8 min, 在显微镜下观察, 见到细胞收缩变圆时, 倒掉消化液, 加入培养液, 用吸管将细胞自瓶壁吹打下来, 接种于新培养瓶。在位间质细胞经 2 次传代后, 细胞贴壁能力减弱, 生长缓慢, 遂参照人体内雌激素水平, 分别加入浓度为 0.3、0.25、0.2、0.15、0.1 μg/ml 的雌激素, 光学显微镜观察细胞生

长情况。腺上皮细胞不能传代, 培养 1 周后细胞数逐渐减少, 形态发生改变, 同样加入浓度为 0.3、0.25、0.2、0.15、0.1 μg/ml 的雌激素, 光学显微镜观察细胞生长情况。

## 2 结果

2.1 细胞分离培养情况 (1) 分离培养的 12 例正常对照的子宫肌瘤的子宫内腺标本, 成功 11 例, 分离成功率为 91.7%。(2) 分离培养的 16 例内异症在位子宫内腺标本, 成功 15 例, 分离培养成功率为 93.8%。(3) 分离培养的 16 例内异症异位子宫内腺标本, 成功 12 例, 分离成功率为 75.0%。

### 2.2 细胞形态特点

2.2.1 倒置显微镜观察 在位和异位间质细胞接种 24 h 后基本都能够贴壁, 间质细胞多呈梭形排列, 胞质薄而透明, 核椭圆, 正常对照和内异症在位内腺间质细胞体积较大, 贴壁后呈旋涡状生长, 而内异症异位内腺间质细胞形态较在位间质细胞小, 分散生长。24 h 后可观察到上皮细胞少量贴壁, 细胞呈团状排列生长, 为致密细胞集落, 细胞呈多角形或蝌蚪形, 边界清楚, 排列紧密; 异位内腺腺上皮细胞胞质饱满, 核圆大, 如图 1 和图 2 所示。

2.2.2 免疫细胞化学类型鉴定 如图 3 所示, 腺上皮细胞行人波形蛋白染色大多数呈阳性反应, 细胞纯度率可达 85%; 间质细胞行细胞角蛋白染色呈阳性反应, 细胞纯度率达 80%, 经 1 次传代后, 纯度率可达 85% 以上。

### 2.3 细胞传代后培养情况

2.3.1 间质细胞 经显微镜每日观察, 细胞经雌激素刺激后, 生长速度有不同改变, 浓度为 0.3、0.25、0.1 μg/ml 时, 细胞生长情况改善不显著, 而在浓度为 0.15 和 0.2 μg/ml 的雌激素刺激下, 细胞生长明显改善。异位间质细胞生长速度较在位间质细胞快, 经雌激素刺激后, 其生长也呈加快趋势。加入雌激素 5 d 后间质细胞铺满培养瓶底, 2 次传代后, 细胞生长又逐渐缓慢, 有的细胞从瓶底脱落, 出现空泡, 加入雌激素后, 生长无明显改善。

2.3.2 腺上皮细胞 在位和异位腺上皮细胞生长均缓慢, 1 周后细胞数逐渐减少, 形态发生改变, 经 H-E 染色后可观察到, 细胞萎缩, 胞质出现大量空泡; 经锥虫蓝染色可见活细胞数减少。而加入不同浓度的雌激素后, 细胞生长情况也无明显变化。

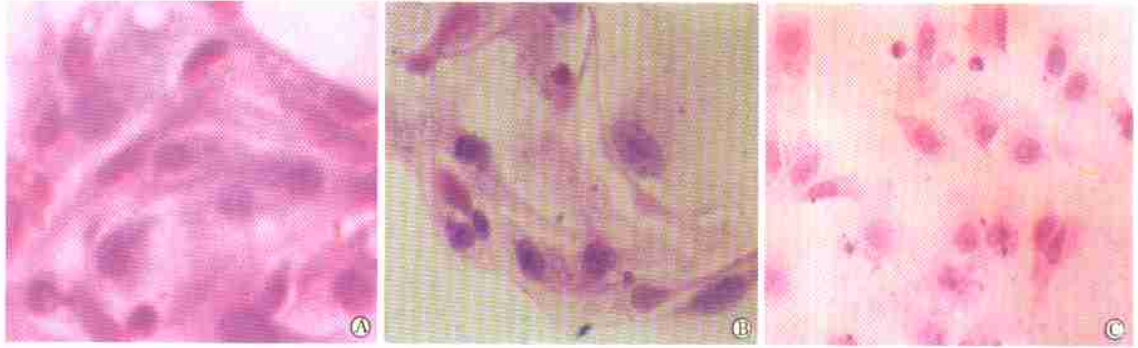


图 1 在位和异位子宫内膜间质细胞形态

Fig 1 Cytomorphological examination of eutopic and ectopic endometrial stromal cell(H-E, × 300)

A: Normal stromal cell; B: Eutopic stromal cell of endometriosis;  
C: Ectopic stromal cell of endometriosis

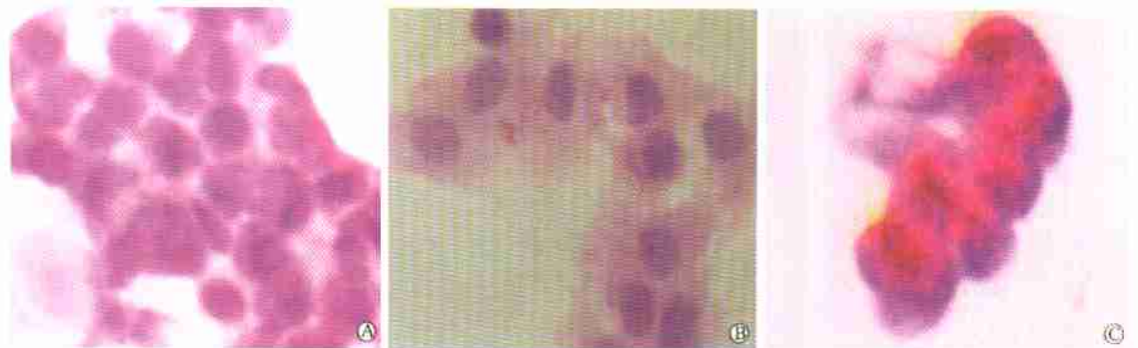


图 2 在位和异位子宫内膜腺上皮细胞形态

Fig 2 Morphological examination of eutopic and ectopic endometrial glandular epithelial cell(H-E, × 300)

A: Normal glandular epithelial cell; B: Eutopic glandular epithelial cell  
of endometriosis; C: Ectopic glandular epithelial cell of endometriosis

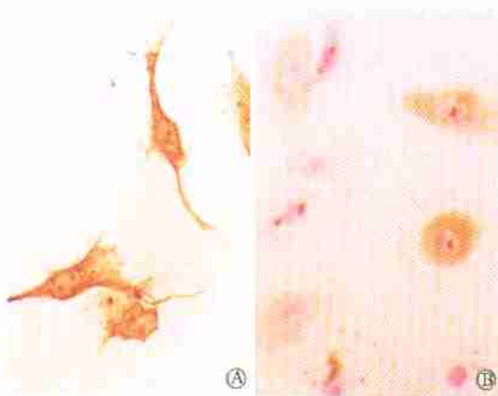


图 3 内异症异位内膜间质细胞类型鉴定

Fig 3 Identification of ectopic endometrial cell of endometriosis(S-P, × 300)

A: Ectopic stromal endometrial cell;  
B: Ectopic glandular epithelial endometrial cell

### 3 讨论

体外分离培养人子宫内膜腺上皮与间质细胞比子宫内膜异位动物模型更接近于人体的特点。异位

内膜间质与上皮细胞的功能及相互作用不同于在位内膜,而非内异症在位内膜细胞也有可能异于内异症内膜细胞,故于体外进行正常对照在位内膜细胞、内异症在位及异位内膜细胞的原代培养,能够提供细胞在组织原位的某些信息,有助于进一步研究正常对照在位子宫内膜细胞、内异症在位内膜细胞和内异症异位内膜细胞的功能和相互作用,找到它们之间的差异,观察其生长特征、受体表达、生物活性及药物动力学影响,对子宫内膜细胞进行体外培养,为研究细胞生长、分化和代谢以及卵巢激素作用机制提供了一个可实用的实验模型,为揭示内异症的发病机制及内异症的临床治疗提供重要的理论依据<sup>[5-7]</sup>。

本研究中正常对照子宫肌瘤的子宫内膜细胞原代培养的成功率略低于内异症在位子宫内膜细胞的分离培养成功率,这是因为子宫肌瘤患者月经周期不规律,内分泌紊乱,增生期的内膜增生不良,所以获取的标本较少,致使内膜分离后的细胞数极少而分离培养失败。异位子宫内膜分离培养的成功

率达 75.0%, 高于 Ryan 等<sup>[8]</sup>报道的 56% 和浙江大学医学院<sup>[9]</sup>报道的 68.1%。根据经验, 本课题组认为异位内腺体外培养需注意以下几点: (1) 体积较大的卵巢巧克力囊肿, 其内皮分离培养后, 细胞数量很少, 不易分离培养成功。(2) 巧克力囊肿内壁有新鲜出血且囊肿体积较小 (< 3 cm) 的, 分离培养后的细胞容易生长。(3) 子宫韧带异位结节以及腹膜异位灶的分离培养不易成功, 但是取材时, 若能获取量较多的紫红色异位结节, 也可以分离出数量较多的间质细胞和腺上皮细胞。本研究中内腺标本消化时使用的是胶原酶 IV 和 DNase I, 虽然价格较常用的胰酶贵, 但是经其消化后的间质细胞容易贴壁生长。根据作者的细胞培养经验, 可以适当延长胶原酶 IV 和 DNase I 的消化时间(一般延长为 2 h), 可以使内腺组织充分消化, 获取更多的细胞。而胰酶消化时间过长就会影响细胞的活性, 间质细胞不易贴壁, 甚至造成细胞培养失败。

在子宫内腺细胞分离培养中, 离心的次数越多, 细胞丢失亦越多, 也会影响细胞活性; 而离心转速较高时, 同样会影响细胞的活性; 均可导致细胞损伤增强, 造成培养成功率的下降。所以在本研究中, 间质细胞和腺上皮细胞的离心次数不超过 4 次, 而离心转速最高为 900 r/min, 尽量减少对细胞的损伤, 提高分离培养成功率, 而所得细胞的纯度也达 90% 以上。

子宫内腺是卵巢激素作用的靶组织, 在体内受雌激素、孕激素等的共同作用, 在位和异位子宫内腺细胞分离培养后失去这些激素的作用而表现出生长缓慢等特征, 所以本研究在细胞分离培养后, 立即加入不同浓度的雌激素, 探索子宫内腺细胞体外生长的最佳条件, 为以后的研究提供实验支持。研究证实, 女性体内血清雌激素水平在月经第 11~13 天最高, 可达 1 100 pmol/L (300 pg/ml)。以此为据, 加入不同浓度的雌激素后, 观察到雌激素浓度为 0.15 和 0.2 μg/ml 时, 细胞生长速度明显加快。细胞生长加快, 有利于进行细胞各项指标的研究。但在雌激素作用下, 离体子宫内腺细胞特性是否有所改变, 还需进一步的研究。

离体在位和异位子宫内腺细胞的爬片, 排除了内腺组织中非内腺成分的干扰, 有利于各项检测指标的进行, 能够使免疫细胞化学检测表达定性、定位准确, 还能进行半定量分析<sup>[10]</sup>。另外, 本次研究的内腺组织标本采取的均为增生期的内腺, 尚需充分

泌期的内腺标本, 以进一步完善对离体在位和异位子宫内腺的观察和监测, 为内腺研究进程提供充分的理论依据。

## [参考文献]

- [1] 谭先杰, 刘东远, 郎景和, 等. 子宫内腺上皮及基质细胞分离、培养作为子宫内腺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  
Tan XJ, Liu DY, Lang JH, et al. The exploration of the isolation and culture of eutopic endometrial glandular epithelial cell and its stromal cell as an *in vitro* model of endometriosis[J]. *Xiandai Fuchanke Jinzhan (Prog Obstet Gynecol)*, 2002, 11(1): 30-32
- [2] Gilmore SM, Aksel S, Hoff C, et al. *In vitro* lymphocyte activity in women with endometriosis—an altered immune response[J]? *Fertil Steril*, 1992, 58(6): 1148-1152
- [3] Matthews CJ, Redfern CP, Hirst BH, et al. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture[J]. *Fertil Steril*, 1992, 57(5): 990-997
- [4] 张宏, 赵昀, 李亚里, 等. 离体子宫内腺细胞培养方法的建立[J]. 军医进修学院学报, 2002, 23(3): 192-194  
Zhang H, Zhao Y, Li YL, et al. Isolated cell cultures of human endometrium *in vitro*[J]. *Junyi Jinxue Xueyuan Xuebao (Acad J PLA Postgrad Med Sch)*, 2002, 23(3): 192-194
- [5] Classen-Linke I, Afler J, Krusche CA, et al. Progestins, progesterone receptor modulators, and progesterone antagonists change VEGF release of endometrial cells in culture[J]. *Steroids*, 2000, 65(10-11): 763-771
- [6] Classen-Linke I, Kusche M, Knauth R, et al. Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells[J]. *Cell Tissue Res*, 1997, 287(1): 171-185
- [7] 蒋洲梅, 黄玉珠, 洪淡华, 等. 人子宫内腺培养及形态学观察[J]. 生殖与避孕, 1994, 14(4): 271-274
- [8] Ryan IP, Schrock ED, Taylor RN. Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells *in vitro*[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78(3): 642-649
- [9] 石一复 主编. 子宫内腺异位症[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 59
- [10] 江静, 吴瑞芳, 王振海, 等. 米非司酮对离体异位与在位子宫内腺雌、孕激素受体含量的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2001, 36(4): 218-221  
Jiang J, Wu RF, Wang ZH, et al. Effects of mifepristone on expression of estrogen receptor and progesterone receptor in cultured human eutopic and ectopic endometria[J]. *Zhonghua Fuchanke Zazhi (Chin J Obstet Gynecol)*, 2001, 36(4): 218-221

[收稿日期] 2004-03-01

[修回日期] 2004-07-08

[本文编辑] 曹静