

# 子宫内膜细胞分离培养方法的改良及其雌二醇分泌水平评价

李 傲\* 徐晓玉<sup>1</sup>

(重庆理工大学化学与生物工程学院, 重庆 400050; <sup>1</sup>西南大学药学院与中医药学院, 重庆 400716)

**摘要** 本研究对现有子宫内膜腺上皮和基质细胞的培养方法加以改良, 并对分离与混合培养的子宫内膜细胞分泌的雌二醇水平进行比较, 探讨子宫内膜异位症(简称内异症)子宫内膜局部高浓度雌二醇的生成来源。通过高浓度胶原酶和 DNase 联合消化、筛网过滤及贴壁纯化法, 分离纯化 25 例子宫内膜腺上皮和基质细胞, 通过形态学观察和细胞免疫荧光法鉴定, 22 例分离成功的内膜细胞中腺上皮细胞和基质细胞的纯度均在 95% 以上。电化学发光免疫法检测内膜细胞培养液上清液中的雌二醇水平, 结果显示, 内异症在位内膜细胞混合培养组的分泌水平最高, 明显高于其它各组( $P < 0.01$ ), 而经过分离培养后的内异症在位内膜腺上皮细胞组明显高于基质细胞组( $P < 0.01$ )。在非内异症内膜细胞的混合和分离培养组中, 细胞分泌雌二醇的水平极低, 接近最低检测值。显示内异症患者从其发病的源头——“在位内膜”就已表现出高分泌雌激素的特征。

**关键词** 子宫内膜异位症; 腺上皮细胞; 基质细胞; 细胞培养; 雌激素

子宫内膜异位症(以下简称为内异症, endometriosis, EMS)是一类雌激素依赖性疾病, 异位子宫内膜类似于肿瘤的恶性生物学行为受到血液及病灶局部雌激素的调节<sup>[1]</sup>。目前, 培养异位子宫内膜细胞时存在量少和成功率不高等问题, 根据 Sampson 的经血逆流种植学说, 异位病灶的子宫内膜组织来源于在位内膜<sup>[2]</sup>。越来越多的资料表明<sup>[3]</sup>, 内异症患者在位内膜的遗传和功能特性与异位内膜相似, 但与正常内膜差异较大。因此, 国内有学者提出了“在位内膜决定论”假说, 对种植学说进行了极为重要的修正和完善<sup>[4]</sup>。本实验对既往在位内膜细胞的培养方法加以改进, 建立纯度高、数量大的在位内膜混合及单一细胞培养模型, 并分别对其分泌的雌二醇水平进行检测, 其结果不仅为“在位内膜决定论”提供新的佐证, 同时也为研究内异症的发病机制和治疗药物提供良好的体外模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织来源

25 例子宫内膜标本取自 2006 年 5 月~2007 年 1 月重庆医科大学附属第一医院妇产科因内异症或子宫肌瘤而手术切除的子宫。患者年龄 26~46 岁, 术前 3 个月未用过激素。其中内异症 15 例, 子宫肌瘤 10 例, 均根据末次月经和病理组织学检查证实为增生

期在位内膜子宫。术中切除子宫, 纵形切开子宫肌层, 暴露宫腔, 用无菌手术刀刮取内膜组织, 所有标本均使用预冷的无菌生理盐水漂洗 3 次后, 置于冰浴的 DMEM/F-12 (D/F) 培养基中, 2 h 内进行分离培养操作。

### 1.2 试剂及仪器

无酚红 DMEM/F-12 (D/F) 培养基、胶原酶 I (Gibco 公司); 胰蛋白酶、Triton X-100 (Amresco 公司); 雄烯二酮(Sigma 公司); DNA 酶(Worthington Bio-chemical 公司); 胎牛血清(杭州四季青生物公司); 鼠抗人波形蛋白(vimentin)、鼠抗人角蛋白(cytokeratin)抗体(Santa Cruz 公司)、封闭用正常羊血清、FITC 标记羊抗小鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); 雌二醇发光免疫测试盒(Roche 公司); YCP-200 型细胞培养箱(上海易亮医疗器械有限公司); 倒置显微镜(TE2000-U, 日本 Nikon 公司); 激光共聚焦显微镜(TCS SP2, 德国 Leica 公司); Elecsys 2010 型自动电化学发光免疫分析仪(美国 Roche 公司)。

### 1.3 子宫内膜细胞的分离培养

参照 Ryan 等<sup>[5]</sup>方法进行的操作, 并加以简化: 将内膜组织置于冰上, PBS 洗涤并剔除血块, 剪碎至小于

收稿日期: 2009-05-11 接受日期: 2009-09-10

重庆市科委应用基础研究项目(渝科发计字[2002]18 号)资助

\* 通讯作者。Tel: 023-68666409, E-mail: ao\_li@cqut.edu.cn

1 mm<sup>3</sup> 的小块(肉眼呈糊状);加入 D/F 培养基 1 ml, 0.2% 胶原酶(胶原酶与组织体积比为 5:1)。吹打混匀后,置于 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中温育 1 h, 中间 30 min 时取出吹打 1 次。随后加入 2 ml 20 U/ml DNAase, 吹打混匀后继续消化 20 min。1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。加入 D/F 培养基洗涤 1 次后, 连续通过 100 目(150 μm)和 400 目(38 μm)筛网, 滤液中主要含基质细胞, 台盼蓝染色细胞活性大于 90%, 以 5×10<sup>5</sup> 个/ml 的密度接种于 100 ml 培养瓶中, 2 h 后换含血清培养基, 去除未贴壁的腺上皮细胞。400 目筛网上主要为腺上皮细胞, 翻转筛网后, 用 D/F 培养基冲洗, 所有冲洗液合并后, 1 000 r/min 离心 5 min。取细胞沉淀, 同样用台盼蓝染色法检测细胞活力, 并以 5×10<sup>6</sup> 个/ml 的密度接种于培养瓶中。1 h 后混杂其中的基质细胞贴壁, 重新吸出悬浮的腺上皮细胞团, PBS 冲洗后离心 1 次。用 2 ml 含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化 5~10 min, 使细胞团分散成为单个细胞。立即加入等体积的含血清培养基终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min 后, 将腺上皮细胞以 5×10<sup>5</sup> 个/ml 的密度, 接种于含 15% FBS 的 D/F 培养基中, 继续培养 24 h 后更换培养基, 去除红细胞, 以后每 2~3 天更换 1 次培养基。

#### 1.4 子宫内膜细胞的混合培养

基本操作步骤同 1.3, 仅在 100 目细胞筛网过滤后, 直接将滤液用 1 000 r/min 离心, 无血清的 D/F 培养基洗涤 2 次, 混悬于含有 15% FBS 的 D/F 培养基中, 按照 5×10<sup>5</sup> 个/ml 接种于 100 ml 培养瓶中。

#### 1.5 细胞免疫荧光鉴定

原代培养的细胞计数, 以 1×10<sup>4</sup> 个/ml 的密度接种于 24 孔培养板中, 预先在每个培养孔中放置一张 1 cm×1 cm 的小盖玻片。待 24~48 h 细胞贴壁后, 将爬满基质、腺上皮或混合培养细胞的小玻片用 PBS 冲洗 3 次, 晾干。95% 乙醇固定 20 min。10% 封闭用羊血清中加入 0.3% Triton, 透膜 10 min。正常山羊血清工作液室温封闭 30 min。滴加一抗(鼠抗人波形蛋白、鼠抗人角蛋白工作液), 磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照, 4℃温育过夜。滴加 FITC 标记羊抗小鼠二抗(1:100 稀释), 常温下避光温育 2 h。PBS、甘油(1:1)封片, 激光共聚焦显微镜下观察。

#### 1.6 电化学发光免疫法分析内膜细胞分泌雌二醇水平

将原代培养的内异症和非内异症(子宫肌瘤)子

宫内膜, 按照 1.3 和 1.4 的方法进行分离和混合培养, 首次传代后的内膜细胞以 5×10<sup>5</sup> 个/ml 的密度接种于 6 孔板中, 2.0 ml/孔, 培养 24 h 后换为无血清的 D/F 培养基进行同步化处理。同步化 24 h 后, 重新换为含 15% FBS 的 D/F 培养基继续培养, 同时加入终浓度 1×10<sup>-7</sup> mol/L 的雄烯二酮进行刺激。共分 6 组: 内异症在位内膜组, 分离后培养的内异症在位内膜腺上皮组和基质组; 非内异症内膜组, 分离后培养的非内异症内膜腺上皮组和基质组。另设空白对照组(即只加完全培养基, 不加细胞)。刺激 48 h 后收集各组培养基, 5 000 r/min 低温离心 5 min, 上清液以电化学发光免疫法测定雌二醇浓度。雌二醇的最终浓度须减去空白对照值。

## 2 结果

### 2.1 细胞培养成功率

分离或混合培养的非内异症子宫内膜 10 例, 成功 9 例, 成功率为 90.0%; 子宫内膜异位症在位内膜 15 例, 成功建模 13 例, 成功率为 86.67%。

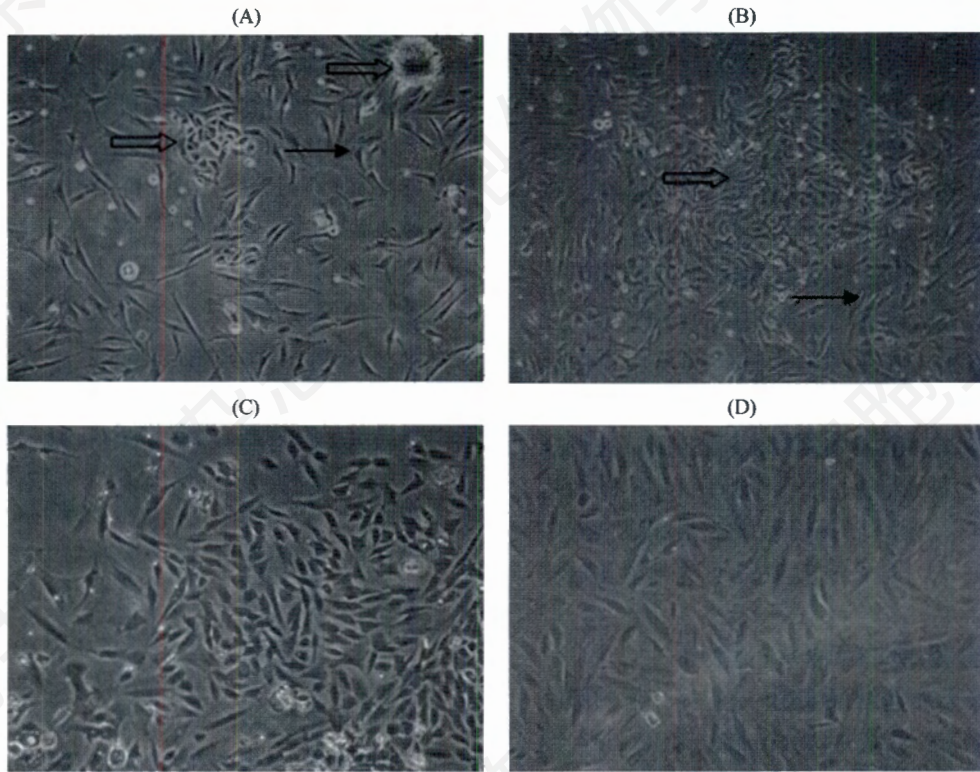
### 2.2 细胞形态学特点

在倒置显微镜下观察, 内异症和非内异症在位内膜细胞形态相似。混合接种的基质细胞大约数分钟后开始贴壁, 24 h 后已经完全贴壁, 形态较扁平, 呈梭形或纺锤形, 外形轮廓不太清楚, 核不明显, 培养 3~4 天后细胞与细胞之间呈平行排列; 腺上皮细胞培养 24 h 后可见大部分贴壁, 常呈蝌蚪形或多角形, 漩涡状成团排列, 并逐渐向外生长, 核较大而明显, 细胞间常出现丝状连接。因此在显微镜下已能够基本区分腺上皮和基质细胞(图 1A、图 1B)。

分离培养的基质细胞数分钟即可贴壁, 1~2 h 贴壁基本完成; 初贴壁的细胞呈三角形, 星空样分布; 4~6 天即可贴满瓶壁, 呈梭形编织样排列。基质细胞中偶见腺上皮细胞, 但比例小于 5%。而分离所得腺上皮细胞呈团状聚集, 2 h 左右方开始贴壁; 初贴壁的细胞呈蝌蚪形, 拉网式生长; 5~7 天细胞贴满瓶壁后, 呈多角形或椭圆形, 巢团样分布。偶见长梭状基质细胞穿插其中, 但比例小于 5%。镜下观察两种细胞分离成功, 能够满足后续实验要求(图 1C、图 1D)。

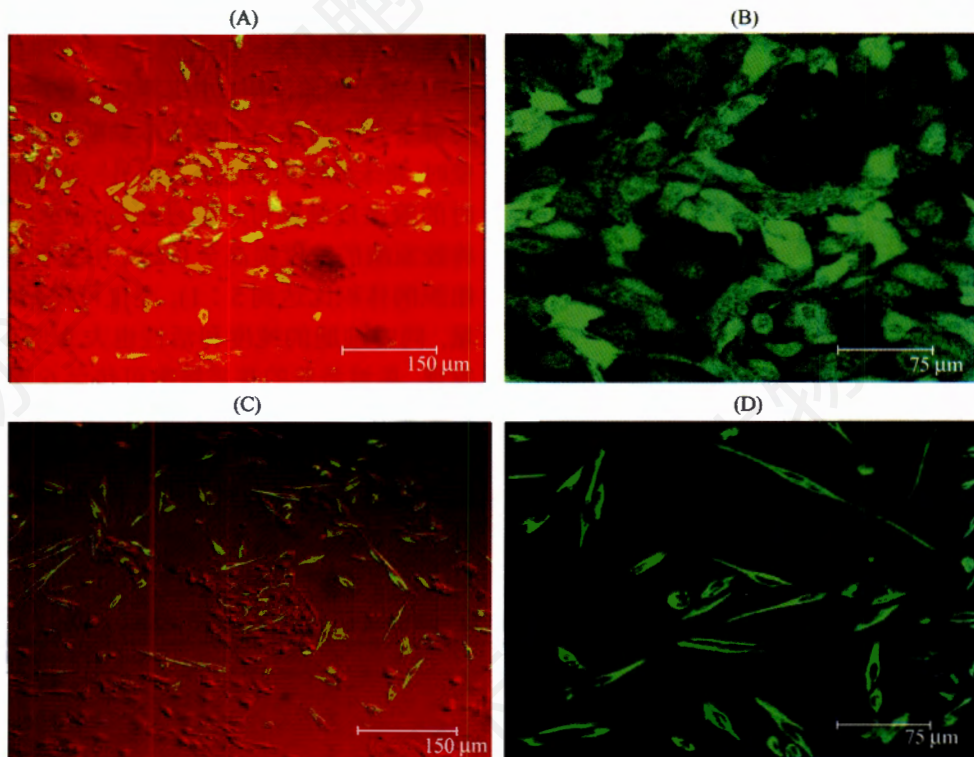
### 2.3 细胞传代及细胞生物学特点

混合培养的子宫内膜细胞在接种后 5~15 天接近铺满, 并可传代, 基质细胞接种 10 代以内形态基本不变, 但如果子宫内膜腺上皮细胞数量多, 而基质细胞较少时, 随着混合培养的时间延长, 内膜腺上皮逐渐



**Fig.1 Cell morphology**

A: glandular epithelium cells (⇐ show) and stromal cells (→ show) of eutopic endometrium of endometriosis at 24 h (100×); B: at 5 d (100×); C: isolated and purified eutopic glandular epithelial cells of endometriosis (200×); D: isolated and purified eutopic stromal cells of endometriosis (200×).



**Fig.2 The identification of indirect immunofluorescence staining for cytokeratin and vimentin in isolated and incorporated cultural endometrial cells**

A: incorporated and B: isolated eutopic glandular epithelial endometrial cells of endometriosis staining for cytokeratin; C: incorporated and D: isolated eutopic stromal endometrial cells of endometriosis staining for vimentin.

从瓶壁上脱落死亡,而基质细胞无此现象。如果不对混合培养的细胞进行传代,细胞铺满后形态会发生变化,5天后外形难以辨认。

分离培养的基质细胞至少可以稳定传4代,体外生存30天以上,细胞传代次数越多,细胞越纯。而分离的腺上皮细胞体外存活10天左右死亡。

#### 2.4 子宫内膜腺上皮及基质细胞免疫荧光鉴定

为进一步鉴定所培养的细胞类型及纯度,采用上皮细胞特异的角蛋白和基质细胞特异的波形蛋白抗体进行免疫反应,并用荧光物质染色标记。结果腺上皮细胞团角蛋白染色阳性(图2A、图2B),波形蛋白阴性;基质细胞波形蛋白染色阳性(图2C、图2D),而角蛋白染色阴性,分离培养的基质细胞及腺上皮细胞纯度均在95%以上,与倒置显微镜下形态学观察结果一致。

#### 2.5 内膜细胞分泌雌二醇水平的检测

电化学发光免疫法结果表明,内异症在位内膜细胞组雌二醇的分泌水平最高,为(16.57±1.25) pg/ml,明显高于其余各组,组间比较差异有极显著性( $P<0.01$ )。而内异症在位内膜细胞经过分离纯化后,培养的腺上皮细胞分泌雌二醇水平为(12.37±1.62) pg/ml,高于同时进行分离的基质细胞,但显著低于两种细胞混合培养组( $P<0.01$ ) (表1)。当细胞总数在同一数量级的前提下,混合培养细胞分泌雌二醇的含量远高于其中任何一种分离的细胞。而非内异症的内膜细胞无论是混合培养,还是分离培养,细胞雌二醇的分泌水平都极低,接近检测的最低限度。提示内异症患者在其发病的源头——“在位内膜”,分泌雌二醇的水平就已远高于非内异症患者。

### 3 讨论

人体子宫内膜组织由基质细胞、腺上皮细胞、血管平滑肌细胞和炎症细胞等构成,绝大部分为腺上皮和基质细胞<sup>[6]</sup>。原代培养的细胞和组织因刚离开机体,生物学特征未发生较大变化,仍具有二倍体遗

传特性,最接近体内生长状态,并且可以避免用人体实验进行研究时带来的伦理学问题。通过研究发现,体外培养的子宫颈内膜细胞仍可表现出极性、腺样功能及雌孕激素受体<sup>[7]</sup>,并分泌CA125及PRL<sup>[8]</sup>,说明其在分离和培养过程中仍保持细胞特异蛋白的表达,受到激素的调节,这为研究子宫内膜细胞自身的分化、变异和再生提供了一个理想的模型,同时也为研究子宫内膜异位症的发生机制和治疗药物的作用机制提供了良好的工具。

根据Sampson的经血逆流致病学说,内异症的发生组织仍是子宫内膜,用在位子宫内膜进行体外培养,使之贴附于培养器皿生长,可在一定程度上模仿逆流内膜在腹膜上的种植。Matthws等<sup>[9]</sup>研究表明,体外培养的在位和异位的子宫内膜细胞在形态和生物学特性等方面基本一致,在位子宫内膜不仅易于获取并且标本量足够。因此,本实验采用Ryan等<sup>[5]</sup>的方法加以改良,首先采用胶原酶I和DNAase的混合酶消化,随后采用两次筛网过滤,如若分离基质和腺上皮细胞,可根据二者贴壁时间的差别来纯化细胞。基质细胞具有贴壁快速的特点,接种1h左右大部分细胞已贴壁,而上皮细胞则在2h后贴壁,故在分离的基质细胞培养1h后吸出培养基,未贴壁细胞弃去,重新加入新的培养基继续培养,基质细胞的纯度就会明显提高。若欲得到较纯的腺上皮细胞,可在细胞过筛时,筛上细胞团用D/F培养基反复冲洗后进行接种,待混杂其中的基质细胞基本贴壁而上皮细胞极少贴壁时,将未贴壁的细胞转移至另一新瓶中继续培养,此时的腺上皮细胞可达到理想的纯度。同时,本实验将胶原酶的浓度提高至0.2%,用量也加大(酶与内膜组织的体积比达到5:1),不仅可提高两类细胞的产量,同时细胞的纯度和活性也大为增高。本研究还发现,单纯培养的基质细胞可传至6代左右,而腺上皮细胞仅可勉强传至第2代。当采取混合培养内膜细胞的方式,如果培养过程中及时换液,清除细胞分泌的代谢物,可在培养至第3代时仍能观察到明显的腺上皮细胞团和基质细胞,上述发现这也为细胞间的

Table 1 The levels of estradiol production in cultured endometrial cells ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=8$ )

Group	<i>n</i>	Estradiol concentration (pg/ml)
Eutopic incorporated endometrial cells without endometriosis	8	1.48±1.69
Eutopic stromal endometrial cells without endometriosis	8	0.68±1.26**
Eutopic glandular epithelial endometrial cells without endometriosis	8	0.97±1.36**
Eutopic incorporated endometrial cells of endometriosis	8	16.57±1.25▲▲
Eutopic stromal endometrial cells of endometriosis	8	6.02±1.95**▲▲
Eutopic glandular epithelial endometrial cells of endometriosis	8	12.37±1.62**▲▲

\*\* $P<0.01$  vs incorporated cells group; ▲▲ $P<0.01$  vs corresponding endometrial cells group without endometriosis.

相互支持作用提供了实验依据。

子宫内膜异位症主要累及生育期妇女, 偶见于少数雌激素水平很高的绝经后妇女, 因此内异症的发生发展与雌激素水平有着密切关系。临床上常根据内异症的雌激素依赖性进行控制与治疗。例如, 利用促性腺激素释放激素类似物(GnRHa)抑制垂体卵巢轴, 最终使卵巢雌激素分泌水平下降, 内膜萎缩形成药物性绝经。来自临床的数据也证实, 雌激素在内异症病灶局部的合成对于其发生发展起着关键作用<sup>[9~11]</sup>。因此, 有学者提出内异症的在位和异位细胞中存在着雌激素的“细胞内分泌和旁分泌机制”<sup>[12,13]</sup>, 即雌激素可以经由异位内膜 P450 arom 催化合成, 并直接与同一细胞或临近细胞内的雌激素受体(EP<sub>2</sub>)相结合而发挥作用。Noble 等<sup>[13]</sup>发现, 在正常的内膜组织和平滑肌中未见 P450 arom 的表达。同样的雌激素旁分泌和自分泌机制也出现在临床乳腺癌患者中<sup>[14,15]</sup>。

目前, 研究内异症雌激素生成的数据多源于临床组织标本, 但分析手段和方法较为单一。本实验培养原代的内异症子宫内膜细胞, 获得内异症混合及单一细胞的培养上清液, 通过电化学发光免疫法进行检测发现, 内异症在位内膜细胞中分泌雌二醇的水平为(16.57±1.25) pg/ml, 远远高于非内异症对照组( $P < 0.01$ ), 这说明内异症患者的在位内膜已经存在与非内异症患者迥然不同的生物学特性。因此, 当“经血逆流”等客观条件存在时, 可能发生、发展为内异症, 这有力地支持了“在位内膜决定论”假说。对同一数量级细胞进行比较时发现, 混合培养组分泌的雌二醇水平高于其中任何一种分离培养的细胞( $P < 0.01$ ), 这表明无论是腺上皮细胞还是基质细胞, 都参与了内异症局部高浓度雌激素的生成, 从而提示从雌激素生成的角度探讨内异症治疗药物的作用机制时, 以混合培养的内膜细胞模型作为研究对象为佳。

#### 参考文献(References)

- [1] Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects, *Hum Reprod Update*, 2006, 12(1): 49-56

- [2] Sampson JA. Metastasis of embolic endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation, *Am J Pathol* 1927, 3(2): 93-109
- [3] Matthews CJ, Redfern CP, Hirst BH, et al. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture, *Fertil Steril*, 1992, 57(5): 990-997
- [4] 郎景和. 子宫内膜异位症基础与临床研究的几个问题, *中国实用妇科与产科杂志*, 2002, 18(3): 129-130
- [5] Ryan IP, Schriock ED, Taylor RN. Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells *in vitro*, *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78(3): 642-649
- [6] Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells, *Biol Reprod*, 2004, 70(6): 1738-1750
- [7] Mylonas I, Speer R, Makovitzky Z, et al. Immunohistochemical analysis of steroid receptors and glycodefin A (PP14) in isolated glandular epithelial cells of normal human endometrium, *Histochem Cell Biol*, 2000, 114(5): 405-411
- [8] Krikun G, Sehatz F, Taylor R, et al. Endometrial endothelial cell steroid receptor expression and steroid effects on gene expression, *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 90(3): 1812-1818
- [9] Fang ZJ, Yang S, Gurates G, et al. Genetic or enzymatic disruption of aromatase inhibits the growth of ectopic uterine tissue, *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(7): 3460-3466
- [10] Gurates B, Sebastian S, Yang S, et al. WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells, *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(9): 4369-4377
- [11] Sun HS, Hsiao KY, Hsu CC, et al. Transactivation of steroidogenic acute regulatory protein in human endometriotic stromal cells is mediated by the prostaglandin EP2 receptor, *Endocrinology*, 2003, 144(9): 3934-3942
- [12] Bulun SE, Chen D, Lu M, et al. Aromatase excess in cancers of breast, endometrium and ovary, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, 106(1-5): 81-96
- [13] Noble LS, Takayama K, Zeitoun KM, et al. Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells, *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(2): 600-606
- [14] Amin SA, Huang CC, Reierstad S, et al. Paracrine-stimulated gene expression profile favors estradiol production in breast tumors, *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 253(1-2): 44-55
- [15] Geisler J, Berntsen H, Lonning P. A novel HPLC-RIA method for the simultaneous detection of estrone, estradiol and estrone sulphate levels in breast cancer tissue, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 72(5): 259-264

## Improvement on Isolation and Culture of Human Eutopic Endometrial Cells and Evaluation on the Production of Estradiol in Isolated and Incorporated Cultural Endometrial Cells Respectively

Ao Li\*, Xiao-Yu Xu<sup>1</sup>

(College of Chemistry and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China;

<sup>1</sup>College of Pharmaceutical and Traditional Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract** A better yield of isolated and purified human endometrial glandular epithelial cells and stromal cells was obtained by a modified culture procedure, and the level of estradiol production in their cultural supernatant was measured by electrochemiluminescence immunoassay in order to explore the histological origin of high concentration of estradiol in local endometrium of endometriosis. 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 25 samples. The endometrial cell culture was successfully established in 22 of 25 endometrium samples which was observed under the inverted microscope. Cytokeratin and vimentin were detected by indirect immunofluorescence staining to identify the glandular epithelial cells and stromal cells respectively, and the purities of the cells were both higher than 95%. The level of estradiol production in the incorporated cultural eutopic endometrial cells group was higher than that of any other group ( $P < 0.01$ ), and the level of glandular epithelial cells was higher than that of stromal cells in two isolated groups ( $P < 0.01$ ). Both incorporated and isolated endometrial cells without endometriosis showed an extremely low concentration of estradiol production which was almost up to the limit of detection. These findings suggest that eutopic endometrium of patients shares alterations with the ectopic tissue at a higher concentration of estrogen production.

**Key words** endometriosis; glandular epithelial cells; stromal cells; cell culture; estrogen

Received: May 11, 2009 Accepted: September 10, 2009

This work was supported by the Natural Science Foundation Project of Chongqing (No.[2002]18)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-68666409, E-mail: ao\_li@cqut.edu.cn