

不同月经周期人子宫内膜细胞的体外培养特性及鉴定

陈佳红, 宋晓萍, 孙雪荣(山东省青岛市妇女儿童医疗保健中心 266011)

【摘要】 目的 通过原代培养人子宫内膜细胞, 进而建立正常子宫内膜的体外模型, 同时观察不同月经周期内膜细胞的培养特性。**方法** 选择因子宫肌瘤而行子宫全切术的 12 例患者, 取子宫内膜细胞进行分离、纯化和培养。并用免疫细胞化学法进行鉴定。**结果** 12 例患者中 10 例培养成功, 在不同月经周期取材的内膜标本其培养细胞生长的数量、质量、成活率及形态上无明显差异; 免疫细胞化学法结果显示, 间质细胞 CK19 染色阴性, Vimentin 染色阳性, 阳性率 90%, 阳性细胞胞质呈棕黄色; 腺上皮细胞 CK19 染色阳性, Vimentin 染色阴性, 阳性率 85%, 阳性细胞胞质染成棕黄色。**结论** 本实验成功对子宫内膜细胞进行了体外的分离培养及鉴定, 为研究细胞的生长、分化和代谢以及性激素的作用机制提供了一个理想的实验模型, 同时认为内膜细胞的各种培养特性不存在明显的月经周期性改变。

【关键词】 人子宫内膜细胞; 月经周期; 体外培养; 免疫细胞化学法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.21.014

中图分类号: R711.51

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)21-2330-02

Exploration of the culturing characteristics and identification through the different menstrual cycle of endometrial cells in vitro CHEN Jia-hong, SONG Xiao-ping, SUN Xue-rong. Qingdao Medical Center for Women and Children, Shandong 266011, China

【Abstract】 Objective The human endometrial cells were cultured primarily to establish the normal endometrial model in vitro, so the different menstrual cycle characteristics of endometrial cells can be observed. **Methods** 12 cases of patients with uterine fibroids and hysterectomy were chosen, and then endometrial cells were separated, purified and cultured. And immunocytochemical identification method was used to identify it. **Results** 10 cases of 12 were cultured successfully. There is no significant difference in its quantity, quality, survival rate and patterns when they are in the menstrual cycle. The results of immunocytochemical showed that mesenchymal cells were negative when stained with CK19, and vimentin stain was positive, with the positive rate of 90%, and positive cells showed brown. On the contrary, Gland epithelial cells were stained by CK19, with the color showing brown, and the positive rate was 85%. **Conclusion** The isolation and identification of endometrial cells were tested successfully in vitro, which provide an ideal experimental model for the study of cell growth, differentiation and metabolism of endometrial cells, as well as sex hormone mechanism. At the same time, the culturing characteristics do not indicate any cyclical changes in menstruation.

【Key words】 human endometrial cells; menstrual cycle; in vitro; immunocytochemical method chinese library classification(CLC)

子宫内膜作为性激素作用的靶器官, 在女性生理的研究中占有重要地位^[1]。腺上皮和间质细胞均可受卵巢激素的影响产生周期性的变化, 且在子宫内膜中占有数量上的优势, 所以常说的子宫内膜的体外培养指的就是对腺上皮细胞和间质细胞的培养^[2]。由于这两种细胞在体外较难分离和纯化, 给建立子宫内膜细胞的体外模型带来一定的困难, 进而影响到相关研究的进行。因此本实验通过原代培养的方法对人子宫内膜细胞进行体外培养, 并对其进行分离纯化及鉴定, 旨在为研究细胞的生长、分化和代谢及性激素的作用机制提供一个理想的实验模型, 为建立正常子宫内膜的体外模型奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 人子宫内膜标本 人子宫内膜取自 2008 年 10 月至 2009 年 3 月青岛市妇幼保健院妇科因子宫肌瘤而行子宫全切术的患者, 共 12 例, 处于不同月经周期。年龄 30~45 岁, 平均 40 岁, 既往月经规律, 月经周期 28~30 d, 经期 5~7 d, 3 个月内未服用过激素类药物, 无全身内分泌疾病。

1.1.2 主要试剂 超级灭活胎牛血清购自 Hyclone 公司; DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司; 胶原酶 1A 购自 Sigma 公司; SP 试剂盒和 DAB/H₂O₂ 显色试剂盒购于北京中山生物工程公司; 鼠抗人细胞角蛋白、波形蛋白单克隆抗体购自北京中山生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 人子宫内膜细胞的分离、纯化和培养 子宫切除后立即在无菌操作下, 纵体剖开宫体, 刮取子宫前后壁内膜组织, 即刻置入装有 4℃ 无菌 D-HANKS 液 20 mL 的小瓶中, 立即送实验室培养。全部标本均留部分用 10% 甲醛液固定后送组甲织学检查, 以排除子宫内膜病变。参照 wolff 等^[3] 的细胞培养方法进行分离、研磨、消化、过滤, 然后不同转速离心分别培养腺上皮细胞和间质细胞, 常规进行传代及换液。

1.2.2 免疫细胞化学染色 以已知的阳性片为阳性对照, 同时设置阴性对照(用 PBS 液代替一抗)。取出细胞爬片, PBS 冲洗 5 min, 共 3 次, 浸入无水乙醇: 丙酮(1:1) 4℃ 固定 15 min。3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min, 蒸馏水洗, PBS 浸泡 5

min, 滴加封闭用血清, 室温孵育 10~15 min, 甩去多余的液体。滴加一抗(细胞角蛋白、波形蛋白抗体)50 μ L, 置于湿盒内 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 冲洗 5 min, 共 3 次, 滴加生物素标记的二抗工作液, 置于湿盒内 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 冲洗 5 min, 共 3 次。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 置于湿盒内 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。PBS 冲洗 5 min, 共 3 次。滴加 DAB 显色液, 并置于显微镜下观察, 适当着色后以流水冲洗终止反映。苏木素复染, 流水冲洗终止反映, 常规脱水, 透明, 中性树脂封片, 在光学显微镜下观察, 以细胞质中出现黄色或黄棕色的染色为阳性细胞。

2 结 果

2.1 细胞培养生长情况 12 例子宫内膜标本中 10 例培养成功, 2 例不成功的原因因为真菌污染。在不同月经周期取材的内膜标本, 其培养细胞生长的数量、质量、活率及形态上无明显差异, 但晚分泌期内膜的腺体产量高。只要最初的胶原酶消化得到足够的细胞数量, 就可成功地培养出腺上皮细胞和间质细胞。

2.2 细胞生长方式及形态学特点

2.2.1 腺上皮细胞 将分离的腺体接种培养, 24 h 后已贴壁生长, 3 d 后细胞长成旋涡状排列的致密单层细胞集落, 细胞呈类圆形或蝌蚪形, 边界清楚, 排列紧密, 胞质呈颗粒状, 胞核大而圆, 核仁明显(图 1)。约 7 d 时, 细胞伸长, 细胞集落扩大并相互融合成片。

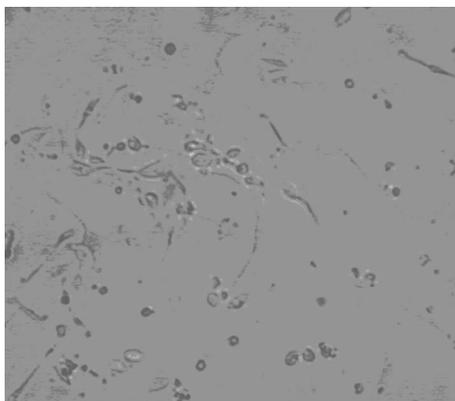


图 1 显微镜下原代培养的腺上皮细胞形态($\times 400$)

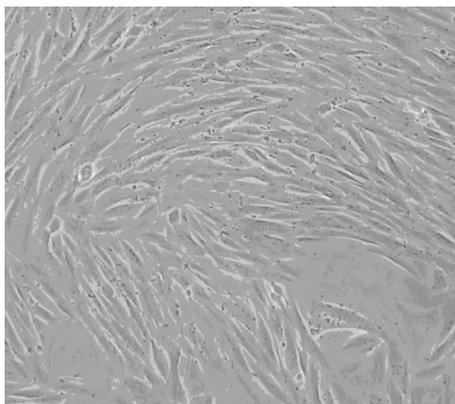


图 2 显微镜下原代培养的间质细胞形态($\times 400$)

2.2.2 间质细胞 将纯化后的单细胞接种培养, 2 h 已开始贴壁, 12 h 已开始生长, 细胞体向两端突起, 似出芽。细胞接种密度较小时, 约需 7~9 d 聚合成片, 细胞生长旺盛时 3~4 d 即聚合成片。培养出的间质细胞光镜下为多角形, 有多个短小

细胞突出, 胞质薄而透明, 核圆居中, 细胞排列无极性, 平铺生长。这种细胞是原代及早期代次培养中的主要细胞类型(见图 2)。

2.3 免疫组化染色法观察 用对腺上皮细胞特异的细胞角蛋白(CK19)和对间质细胞特异的波形蛋白(Vimentin)染色表明, 间质细胞 CK19 染色阴性, Vimentin 染色阳性, 阳性率 90%, 阳性细胞胞质呈棕黄色(图 3); 腺上皮细胞 CK19 染色阳性, Vimentin 染色阴性, 阳性率 85%, 阳性细胞胞质染成棕黄色(图 4)。

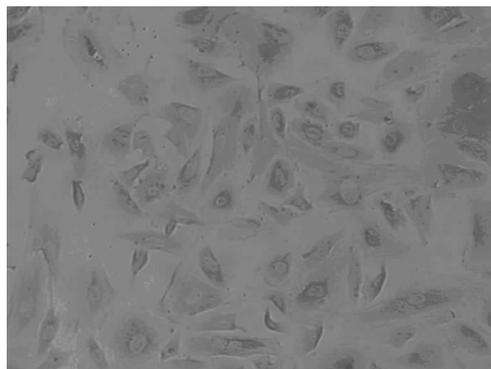


图 3 子宫内间质细胞波形蛋白染色($\times 400$)

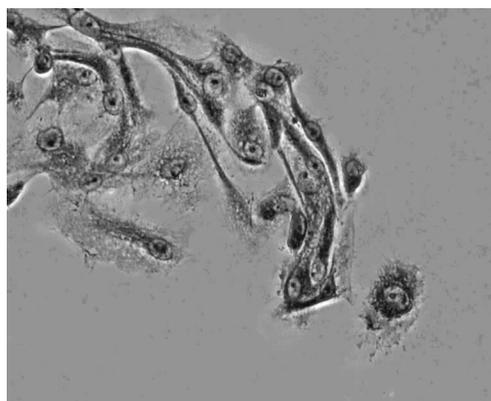


图 4 子宫内腺上皮细胞角蛋白染色($\times 400$)

3 讨 论

子宫内膜细胞体外培养技术可用于妇产科、生殖医学、细胞生物学及分子细胞学等多种研究领域^[2]。目前国外学者针对子宫内膜细胞体外培养模型, 已经开展了许多方面的研究, 但国内研究项目较少。本研究通过原代培养的方法建立正常子宫内膜的体外模型, 同时观察不同月经周期内膜细胞的培养特性, 旨在为研究细胞的生长、分化和代谢以及性激素作用的机制提供一个理想的实验模型, 同时进一步求证内膜细胞的各种培养特性在不同的月经周期是否存在明显的差异。

目前子宫内膜细胞分离及体外培养方法基本成熟, 再加上子宫内膜组织标本取材容易, 只要操作过程中能严格控制污染, 几乎所有标本均能成功培养。本实验成功对不同月经周期的子宫内膜细胞进行分离、培养。其中 12 例子宫内膜标本中 10 例培养成功, 2 例不成功的原因因为真菌污染。众所周知, 子宫内膜受卵巢激素的影响发生周期性变化。本实验在细胞培养中发现, 增生期间质细胞多于上皮细胞, 而分泌期则上皮细胞较间质细胞数量多。总体上在不同月经周期取材的内膜标本, 其培养细胞生长的数量、质量、成活率及形态上无明显差异。

(下转第 2334 页)