

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.025 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

马颖, 何援利. 人子宫内中膜中存在一群具有克隆增殖能力的细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(45):8496-8500.

人子宫内中膜中存在一群具有克隆增殖能力的细胞**☆

马颖, 何援利

南方医科大学珠江医院妇产科, 广东省广州市
510280马颖☆, 女, 1979年生, 陕西省西安市人, 汉族, 2008年南方医科大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤及子宫内中膜异位症的研究。
xxbcxh@sohu.com中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)45-08496-05收稿日期:2012-01-08
修回日期:2012-03-28
(20120108005/D·C)Department of
Gynecology and
Obstetrics, Zhujiang
Hospital, Southern
Medical University,
Guangzhou
510280, Guangdong
Province, ChinaMa Ying☆, Doctor,
Attending physician,
Department of
Gynecology and
Obstetrics, Zhujiang
Hospital, Southern
Medical University,
Guangzhou
510280, Guangdong
Province, China
xxbcxh@sohu.comSupported by:
Medical Research
Projects in
Guangdong Province,
No. B2010208*;
Ph.D. Scientific
Research Start-up
Projects of
Guangdong Natural
Science Foundation,
No.10451051501005
729*Received: 2012-01-08
Accepted: 2012-03-28

文章亮点: 采用机械和酶消化相结合的方法分离出人子宫内中膜细胞, 并采用有限稀释法体外培养子宫内中膜腺上皮细胞和基质细胞, 检测人子宫内中膜细胞克隆形成能力, 证实腺上皮细胞和基质细胞均可形成大、小克隆, 从而证实子宫内中膜中存在一群具有克隆增殖能力的细胞, 它们可能是子宫内中膜干细胞。

关键词: 子宫内中膜细胞; 克隆; 有限稀释法; 表面标记; 检测

摘要

背景: 克隆形成能力是干细胞的重要特性, 多项研究证明, 子宫内中膜在起源上具有单克隆性。

目的: 通过体外培养, 检测人子宫内中膜细胞克隆形成能力。

方法: 采用机械和酶消化相结合的方法分离出人子宫内中膜细胞, 培养腺上皮细胞和基质细胞, 观察细胞形态及生长特性并检测波形蛋白和角蛋白的表达, 采用流式细胞仪对细胞进行 CD133, CD34, CD45, CD90, CD73 及 CD29 表型鉴定; 观察细胞克隆生长特点、测量细胞克隆大小和计算克隆形成率。同时取人子宫肌细胞培养作为对照。

结果与结论: 经过 12 d 的原代培养后, 腺上皮细胞和基质细胞均可形成大、小两种克隆。角蛋白表达阳性为腺上皮细胞, 波形蛋白表达阳性为基质细胞。流式细胞术检测子宫内中膜细胞表达 CD90、CD29、CD73 等表面标记, 不表达 CD34、CD45、CD133。腺上皮细胞、基质细胞大克隆和小克隆大小及形成率比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$); 人子宫肌细胞用有限稀释法原代培养无细胞克隆生长。说明子宫内中膜细胞在体外培养中, 腺上皮细胞和基质细胞大克隆增殖能力均高于小克隆。这些细胞可能是子宫内中膜干细胞。

Cloning efficiency of human endometrial cells *in vitro*

Ma Ying, He Yuan-li

Abstract

BACKGROUND: Colony forming ability is an important characteristic of stem cells. Many studies have shown that the endometrium has monoclonal characteristics.

OBJECTIVE: To detect the cloning efficiency of human endometrial cells *in vitro*.

METHODS: Human endometrial cells were isolated and dissociated mechanically and enzymatically from human endometrium. Stromal and epithelial cells were separated by two series of filters. The cell morphology and growth characteristics were observed and the expressions of vimentin and keratin were detected. Flow cytometry was used to identify the expression of CD133, CD34, CD45, CD90, CD73 and CD29 markers in endometrial cells. The clone growth characteristics were observed, the size of clones was measured and the rate of cloning efficiency was calculated. Meanwhile, human uterine muscle cell was used as a control.

RESULTS AND CONCLUSION: After primary cultured for 12 days, glandular epithelial cells and stromal cells were divided into large and small clones by size and growth characteristics. The gland clone was positive for keratin and the stromal clone was positive for vimentin by immunohistochemistry. Results from flow cytometry showed that endometrial cells were positive for CD29, CD90 and CD73 but negative for CD34, CD45 and CD133. There was significant difference of the sizes and cloning efficiency of the large and little gland clones between glandular epithelial cells and stromal cells ($P < 0.05$). Human uterine smooth muscle cells were primary cultured by limiting dilution method. The endometrial cells can form glandular epithelial cells and stromal cells *in vitro* which included large and small clones. The proliferation efficiency of the large gland clone was higher than that of the small gland clone. These cells may be the endometrial stem cells.

Ma Y, He YL. Cloning efficiency of human endometrial cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(45): 8496-8500.

0 引言

人子宫内膜具有显著的增殖和自我修复的能力, 是一类少有的能够周期性脱落及快速再生的组织, 1978年PranishniKov^[1]据此提出子宫内膜干细胞存在的可能, 使子宫内膜功能层增生修复。

Chan等^[2]学者利用标签滞留技术证明了小鼠子宫内膜干细胞的存在。2007年Masuda等^[3]将人类子宫内膜上皮和基质混合群细胞移植到NOD/SCID小鼠肾包膜下, 证实部分子宫内膜细胞在异种移植体系中能够自我更新, 具有高度的增殖能力和一定的分化潜力, 符合干细胞的标准。克隆形成能力是干细胞的重要特性, 多项研究证明, 子宫内膜在起源上具有单克隆性, Tanake等^[4]学者的研究结果证实了人类子宫内膜腺体上皮的单克隆来源及小鼠子宫内膜的单克隆性。还有研究者将人类子宫内膜基质和腺体进行体外培养, 检测了子宫内膜细胞的克隆能力, 认为同一克隆的细胞可能起源于相同的前体细胞或祖细胞, 即可能的子宫内膜干细胞^[5-6]。有限稀释法是最常用单克隆细胞培养方法, 其原理是将细胞悬液连续倍数稀释至极低密度, 然后接种于培养板上, 培养一段时间后可能出现单个细胞克隆。它与软琼脂培养法、单细胞显微操作法和流式胞仪分离法等方法比较, 具有操作简单, 周期较短和费用较低的优点^[7]。

实验拟通过机械和酶消化相结合的方法分离出人子宫内膜细胞, 用两次滤网的方法分离出腺上皮细胞和基质细胞, 用有限稀释法培养腺上皮细胞和基质细胞, 并对细胞的克隆形成能力进行分析鉴定, 同时利用一些已知的干细胞表面标志物对细胞进行鉴定。

1 材料和方法

设计: 细胞鉴定实验。

时间及地点: 于2011年1至6月在南方医科大学珠江医院中心实验室完成。

材料: 子宫内膜来源于珠江医院妇产科因宫颈上皮内瘤变(CIN)III级行子宫切除的女性, 术前3个月内未使用过外源性激素, 30-50岁, 详细记录患者的信息, 并与患者签署知情同意书。所取样本包括5 mm子宫肌层的子宫内膜全层。对照组取子宫肌细胞来源于同一的患者, 余条件相同。患者对实验知情同意, 实验过程符合医学伦理学标准。

主要试剂:

试剂	来源
胎牛血清	杭州四季青
DMEM/F12 培养基	美国 Gibeo 公司
胶原酶 I 型、胶原酶 III 型	美国 Invitrogen 公司
鼠抗人细胞角蛋白单克隆抗体 Cytokeratin、鼠抗人波形蛋白单克隆抗体 Vimentin、羊抗鼠 FITC	武汉博士德生物有限公司
胶原酶 III 型	广州盈信有限公司
SP 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒	北京中杉金桥生物公司
锥虫蓝粉末、Giemsa 粉末	武汉大风生物公司
鼠抗人 CD29-PE、CD34-PE、 CD73-PE、CD45-FITC、CD90-FITC	ebioscience 公司
CD133-PE	miltenyi 公司

方法:

标本的处理: 将收集的子宫内膜标本放入无菌的青链霉素溶液中, 1 h送入实验室。用无Ca²⁺Mg²⁺的缓冲液PBS进行冲洗, 直到液体清亮。移入无菌的培养皿中, 用眼科剪切成1 mm×1 mm×1 mm。

有限稀释法子宫内膜细胞原代培养: 子宫内膜组织小块仔细去除子宫肌层(保留内膜和肌层交界)后, 剪切成1 mm×1 mm×1 mm。用含有300 g/L胶原酶III和40 g/L脱氧核糖核酸酶 I 的PBS, 在37 °C 150 r/min振荡培养箱内消化。消化后的细胞悬液用200目和400目的滤网两次过滤, 富含基质细胞的滤液离心后制成基质细胞悬液。用PBS冲洗滤网, 收集贴附其上的腺上皮细胞离心后制成腺上皮细胞悬液^[8], 0.4%锥虫蓝染色后计算活细胞数, 然后调整细胞密度, 按照活细胞数300个/cm²的密度接种到6孔板或50 mL一次性塑料培养瓶内, 轻轻吹打使其细胞分布均匀, 置体积分数CO₂培养箱中培养, 每天观察细胞, 对其生长情况进行追踪, 每三四换液1次, 并在培养瓶或培养皿上对克隆进行标记, 共培养12 d。

活细胞计数方法: 取消化后的细胞悬液, 0.4%锥虫蓝染色1 min, 加到细胞计数板中央的盖玻片上或下侧的计数板凹槽处, 至盖玻片被液体充满为止。置显微镜下计数四角大方格内的细胞数, 锥虫蓝拒染的细胞为活细胞。对于压线的细胞只计数在上线和左线者。按下式计数细胞悬液中活细胞的密度。

$$\text{细胞密度} = (\text{4个大格细胞总数} / 4) \times \text{稀释倍数} \times 10^7 \text{ L}$$

细胞克隆的组织来源鉴定: ①腺上皮细胞和基质细胞以5×10⁸ L⁻¹接种于6孔培养板(培养板内事先放有盖玻片), 于37 °C、体积分数5%CO₂恒温箱中培养。当细胞生长融合后, PBS洗5 min。②新鲜配制的含0.02%的TritonX-100的40 g/L多聚甲醛室温固定30 min, 5 min×3

次。③加入1:50稀释的波形蛋白(vimentin)和角蛋白(keratin)抗体中,在湿盒内4℃孵育过夜,PBS洗5 min×3次。④二抗1:50的羊抗鼠FITC37℃避光孵育45 min,PBS洗5 min×3次。⑤甘油封固,荧光显微镜观察。

流式细胞鉴定干细胞表面标记:选取生长状态良好的细胞集落,制浓度为 $1 \times 10^6 \text{ L}^{-1}$ 单细胞悬液,流式细胞仪检测CD29、CD45、CD90、CD34、CD73和CD133。

细胞克隆增殖能力的检测:①分别以基质细胞 $300/\text{cm}^2$ 和腺上皮细胞 $500/\text{cm}^2$ 接种在6孔培养板中培养。于37℃、体积分数5%CO₂培养箱培养,定期用倒置显微镜观察细胞生长情况,每三四天换液1次,每天观察细胞集落形成情况。②在培养的第12天,镜下观察计数克隆数,并用40 g/L多聚甲醛固定10 min后,用Giemsa染色或苏木精染色30 s,流水冲洗,甘油封固,克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。③在培养第12天用带刻度的显微镜,测量细胞克隆两个垂直径线,克隆大小(mm)=两个垂直径线的平均值(mm)/放大倍数。对Giemsa染色后肉眼可见细胞克隆用游标卡尺测量克隆直径^[9]。

主要观察指标:①子宫内膜细胞生长的一般情况。②细胞克隆的组织来源鉴定。③细胞克隆增殖能力的检测。

统计学分析:采用SPSS 16.0软件分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较采用LSD(least significant difference)检验,方差分析前对各组数据进行正态性检验(Shapiro-Wilk Test)和方差齐性检验(Levene's Test), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 子宫内膜细胞原代生长一般情况和克隆形态 在六孔板培养第一两天,有部分细胞贴壁,单个贴壁细胞生长缓慢。基质细胞在培养的第5-8天,发现有含有数十及几百个排列紧密细胞的较大克隆出现,也有仅有十几个细胞排列松散的小克隆的存在,见图1, 2。

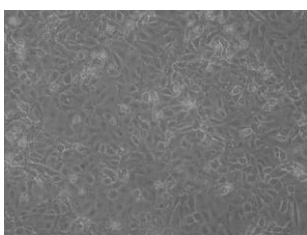


Figure 1 Large clones of endometrial epithelial cells (x200)
图1 子宫内膜腺上皮细胞大克隆(x200)

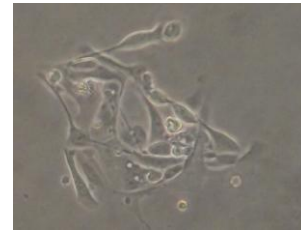


Figure 2 Small clones of endometrial epithelial cells (x400)
图2 子宫内膜腺上皮细胞小克隆(x400)

在培养的第8-10天,较大克隆增长迅速,有的小克隆生长缓慢,甚至会因为细胞脱落而导致细胞数减少。在12 d停止培养,可见有含百余个细胞组成的小克隆存在,也有数百个排列紧密细胞的较大克隆出现,见图3, 4。



Figure 3 Large clones of endometrial stromal cells (x200)
图3 子宫内膜基质细胞大克隆(x200)



Figure 4 Small clones of endometrial stromal cells (x200)
图4 子宫内膜基质细胞小克隆(x200)

2.2 细胞克隆的组织来源鉴定 角蛋白表达阳性,波形蛋白表达阴性的为腺上皮细胞,角蛋白表达阴性,波形蛋白表达阴性的为基质细胞,阳性表现为绿色荧光,见图5, 6。

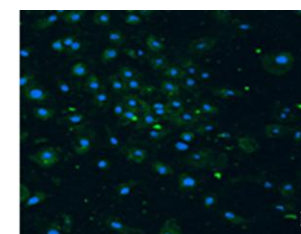


Figure 5 Immunofluorescence staining of epithelial cells (x200)
图5 子宫内膜腺上皮细胞免疫荧光染色(x200)

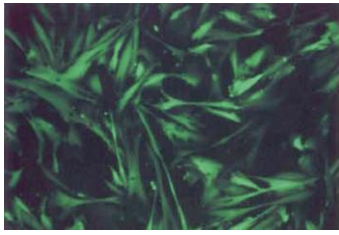


Figure 6 Immunofluorescence staining of stromal cells (x200)
图6 子宫内中膜基质细胞免疫荧光染色(x200)

2.3 流式细胞鉴定结果 对集落形成细胞进行流式细胞术检测, 结果发现子宫内中膜细胞表达 CD90、CD29、CD73 等表面标记, 但不表达 CD34、CD45, CD133, 见图 7。

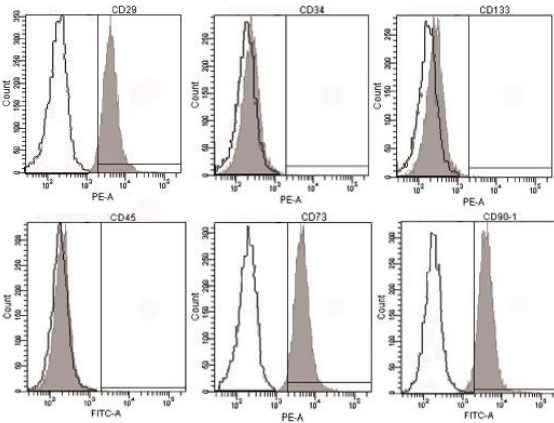


Figure 7 Detection of endometrial cell surface markers by flow cytometry
图7 子宫内中膜细胞表面标记物流式细胞仪检测结果

2.4 细胞克隆增殖能力的检测 见表1。

表1 腺上皮细胞和基质细胞的克隆大小及形成率比较
Table 1 Comparison of size and cloning efficiency of cell clone of glandular epithelial cells and stromal cells

Clone	Size of clone (mm)		Cloning efficiency (%)	
	Glandular epithelial cells	Stromal cells	Glandular epithelial cells	Stromal cells
Large	3.71±1.20	2.65±0.40	0.049±0.012	0.006±0.002
Small	0.49±0.21 ^a	0.39±0.11 ^a	0.12±0.05 ^a	0.42±0.03 ^a

^aP < 0.05, vs. large clone

腺上皮细胞和基质细胞, 均有大、小两种克隆: 大克隆细胞生长较为旺盛, 增殖迅速, 细胞数量较多, 细胞排列紧密, 克隆较大; 小克隆细胞生长较为缓慢, 细胞数较少, 排列疏松, 在第8-10天生长不明显, 甚至会因为细胞脱落而导致细胞数减少, 克隆较小。腺上皮细

胞及基质细胞大克隆和小克隆的大小及形成率比较, 差异具有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

近年有大量的研究均提示子宫内中膜可能存在具有高度增殖、自我更新和分化潜能的干细胞, 其来源可能是循环中的骨髓干细胞, 或者由内中膜部分残存的胚胎干细胞发育而来^[10], 这些细胞可能参与了多种病理生理过程。既往研究认为有干细胞活性的细胞可能存在于基层层^[11-12], 亦有文献报道在脱落的功能层即月经血中也发现子宫内中膜干细胞^[13-14], 故取子宫内中膜全层, 这保证了组织来源的质量和数量。

本研究首先分离子宫内中膜腺上皮细胞和基质细胞, 并采用了最常用的单克隆细胞培养法——有限稀释法进行细胞的体外培养, 获得了单个细胞起源的克隆。与单细胞显微操作法比较, 虽然有限稀释法没有单细胞显微操作时每个培养孔里加入一个细胞精确, 而且不同克隆的细胞通过自分泌和旁分泌产生细胞因子, 可能在培养中互相影响, 但是它操作更为简便、培养时间较短而且对于某些细胞可以不需要添加特殊的细胞生长因子及饲养层, 也可以获得单细胞克隆。在既往的研究中, 有些学者采用了免疫磁珠法, 先将腺上皮细胞和基质细胞进行分离后, 再进行体外培养, 分别检测腺上皮细胞和基质细胞的克隆形成率^[15]。也有学者采用200目和400目的尼龙网滤过细胞分离腺体上皮细胞和基质细胞^[16-17]。实验采用了后一种方法成功分离了子宫内中膜腺上皮细胞和基质细胞, 并用波形蛋白和角蛋白免疫荧光及流式细胞仪检测细胞表面标志物的方法对所得细胞进行了鉴定, 角蛋白表达阳性, 波形蛋白表达阴性的细胞为腺上皮细胞, 角蛋白表达阴性, 波形蛋白表达阳性为基质细胞^[18-20], 且可表达多个已知的干细胞表面标志物。在本研究中, 腺上皮细胞和基质细胞培养至12 d时, 均有大、小两种克隆: 大克隆细胞生长较为旺盛, 增殖迅速, 细胞数量较多, 细胞排列紧密, 克隆较大; 小克隆细胞生长较为缓慢, 细胞数较少, 排列疏松, 在第8-10天生长不明显, 甚至会因为细胞脱落而导致细胞数减少, 克隆较小。腺上皮细胞大克隆和小克隆大小分别约为(3.71±1.2) mm和(0.49±0.21) mm, 其差异具有显著性($P < 0.05$); 基质细胞大克隆和小克隆大小分别约为(2.65±0.40) mm和(0.39±0.11) mm, 其差异具有显著性($P < 0.05$)。腺上皮细胞大克隆和小克隆的形成率分别为(0.049±0.012)%和(0.12±0.05)%, 基质细胞大克隆和

小克隆的形成率分别为(0.006±0.002) %和(0.42±0.03) %。4种克隆的形成率比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。综上所述, 子宫内膜中确实存在有一类具有干细胞特性的细胞群, 这些实验结果均为后续人子宫内膜干细胞的研究奠定了基础。

4 参考文献

- [1] Prianishnikov VA. On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. *Contraception*. 1978;18(3):213-223.
- [2] Chan RW, Gargett CE. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells*. 2006;24(6):1529-1538.
- [3] Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, et al. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c(null) immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(6):1925-1930.
- [4] Tanaka M, Kyo S, Kanaya T, et al. Evidence of the monoclonal composition of human endometrial epithelial glands and mosaic pattern of clonal distribution in luminal epithelium. *Am J Pathol*. 2003;163(1):295-301.
- [5] Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, et al. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(6):2334-2338.
- [6] Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod*. 2004;70(6):1738-1750.
- [7] Wang CW, Wang H. Fangshe Minyixue Zazhi. 2005;18(02):146-147.
王从朱,王红.促甲状腺激素单克隆抗体的制备和应用[J].放射免疫学杂志,2005,18(02):146-147.
- [8] Meng X, Ichim TE, Zhong J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med*. 2007;5:57.
- [9] Lou H, Shen AR, Yang SL, et al. *Zhonghua Fuchan Linchuang Zazhi*. 2006;7(03):196-198.
娄华,申爱荣,杨淑玲,等.p27~(kip1)和ki-67在子宫内膜异位症中的表达与意义[J].中国妇产科临床杂志,2006,7(03):196-198.
- [10] Aghajanova L, Horcajadas JA, Esteban FJ, et al. The bone marrow-derived human mesenchymal stem cell: potential progenitor of the endometrial stromal fibroblast. *Biol Reprod*. 2010;82(6):1076-1087.
- [11] Cho NH, Park YK, Kim YT, et al. Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril*. 2004;81(2):403-407.
- [12] Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, et al. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod*. 2009;80(6):1136-1145.
- [13] Chan RW, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod*. 2004;70(6):1738-1750.
- [14] Qian K, Chen H, Wei YL, et al. *Shengzhi yu Biyun*. 2004;24(04):210-214.
钱坤,陈红,魏玉兰,等.离体异位子宫内膜细胞ki-67、钙粘素-E的表达及自发凋亡测定[J].生殖与避孕,2004,24(04):210-214.
- [15] Zeng W, Feng ZC. *Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi*. 1999;9(06):11-13.
曾卫,封志纯.人子宫内膜细胞的体外培养技术及鉴定[J].中国现代医学杂志,1999,9(06):11-13.
- [16] Chan RW, Ng EH, Yeung WS. Identification of cells with colony-forming activity, self-renewal capacity, and multipotency in ovarian endometriosis. *Am J Pathol*. 2011;178(6):2832-2844.
- [17] Schüring AN, Schulte N, Kelsch R, Röpke A, et al. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil Steril*. 2011;95(1):423-426.
- [18] Zemel'ko VI, Grinchuk TM, Domnina AP, et al. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium: isolation, characterization and use as feeder layer for maintenance of human embryonic stem cell lines. *Tsitologiya*. 2011;53(12):919-929.
- [19] Cervelló I, Mas A, Gil-Sanchis C, et al. Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. *PLoS One*. 2011;6(6):e21221.
- [20] Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, et al. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod*. 2009;80(6):1136-1145.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 广东省医学科研课题(B2010208); 广东省自然科学基金博士科研启动项目(10451051501005729)。

作者贡献: 第一作者马颖为实验设计及主要实验实施者, 并成文及对文章负责

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 本实验符合伦理要求。所有供者对实验过程完全知情同意, 在充分了解本治疗方案的前提下签署“知情同意书”。

本文创新性: 本实验通过采用机械和酶消化相结合的方法分离出人子宫内膜细胞, 并采用有限稀释法体外培养子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞, 检测人子宫内膜细胞克隆形成能力, 证实腺上皮细胞和基质细胞均可形成大、小克隆, 从而证实子宫内膜中存在一群具有克隆增殖能力的细胞, 它们可能是子宫内膜干细胞。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。