

调经孕育方药服用者血清对人子宫内膜体外培养细胞早孕相关因子表达和诱导间质细胞蜕膜化的免疫组织化学观察

陈秋梅¹, 张树成², 贺 斌², 沈明秀³

(1 新加坡同济医院 中国中医研究院, 北京 100091; 2 国家人口和计划生育委员会科学技术研究所, 北京 100081; 3 中国中医研究院西苑医院, 北京 100091)

摘要: 目的: 研究服用调经孕育方药者血清对人子宫内膜体外培养细胞 5 种早孕相关因子和诱导间质细胞蜕膜化的观察。方法: 人子宫内膜体外培养细胞, 加入服用方药前后的 LH-2 LH+ (7+ 10) 实验血清作用 6d 后, 进行免疫组织化学染色, 比较分析不同血清的表达强度。结果: 5 种观察因子中, 服药后血清作用的细胞 LN TGF LIF VEGF 表达强度明显增强, 而 FGF 的表达无明显变化; 间质细胞蜕膜化的特异性 PRL 染色证实, 发生蜕膜化的细胞占 10% ~ 15%。结论: 服用方药后的实验血清, 可明显促进体外培养的内膜细胞在生长和分化过程中 4 种早孕相关因子的表达, 诱导间质细胞发生蜕膜化。

关键词: 不孕; 子宫内膜; 细胞培养; 蜕膜化; 补肾药

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)06-0055-03

中医对不孕症认识的研究, 虽然在多方面不断地深入, 但利用人子宫内膜体外细胞培养技术进行直接研究方面目前尚属空白。性周期中的子宫内膜呈规律的周期性变化, 这种变化是胚泡着床的基础。子宫内膜组织的主要功能表现, 由上皮和间质细胞的增殖、分化、分泌和蜕膜化等实现。中药口服后进入体内, 首先进入血液并通过血循环达到靶器官而发挥作用, 子宫是该方药归经的主要靶器官之一。因此, 利用服用中药者的血清进行相关观察研究, 对反映中药的作用机理更具客观性。本实验的目的在于: 观察服用方药者血清对体外培养的人子宫内膜细胞直接作用后, 对早孕相关 5 种因子表达的影响, 确证体外诱导间质细胞发生蜕膜化的可能, 以期对该复方中药促进子宫内膜向有利于妊娠方向发展(排卵前主要促进内膜的增生和分化、排卵后主要促进内膜的分泌和蜕膜化) 提供直接证据。

1 材料

1.1 主要试剂和培养条件 使用 RPMI 1640 培养基和胎牛血清(Hyclone 公司), 0.25% IV 型胶原酶液和 0.25% 胰酶液(Sigma 公司), PBS(Gibco 公司), HistostainTM-SP(链霉卵白素-过氧化物酶)免疫组化检测试剂盒和相关因子抗体(Santa Cruz 和 Zymed 公

司)。培养用液超纯水配制, pH 为 7.2, 加青霉素 100IU/mL, 链霉素 100μg/mL, 4℃保存备用。培养条件为无菌层流室、使用 5% CO₂ 37℃恒湿恒温培养箱。

1.2 人子宫内膜取材及处理 6 例年龄 34~46 岁、月经周期基本规律的子宫肌瘤患者, 近期内未服用任何激素类药物。子宫全切术后立即刮取子宫内膜, PBS 洗去血迹, 于 RPMI1640 培养基中 4℃备用。其中 4 例为增生中期内膜, 2 例为分泌中期内膜。

1.3 实验血清来源和处理 实验血清来源于临床排卵障碍者服用调经孕育方药治疗病例^[1]。调经孕育方药, 组方以《傅青主女科》中“养精种玉汤”为基础, 由菟丝子、熟地、山萸肉、肉苁蓉、枸杞子、当归、淮山药、白术、鸡血藤、香附等 16 味中药组成(临床结合辨证加减 ≤2 味药), 功能为补肾填精、养血活血、调经助孕, 每日 1 剂, 分 2 次服, 月经周期第 5 天开始服药, 经期停药, 第 2 个月经周期第 5 天开始继续服药, 连服 3 个月经周期。于服药第 3 周期的排卵前 2 天(LH-2) 和排卵后 7、10 天(LH+7 LH+10) 分别按各自分组时相静脉取血, 制备血清, 不同病例的血清按各自分组混合为 LH-2 和 LH+(7+10) 2 组实验血清, 56℃水浴灭活, 无菌滤膜除菌, -70℃保存备用。

2 实验方法

按文献方法^[24]加以改良进行。

2.1 内膜细胞的分离 取材的内膜组织剪成 1~2mm³ 的小块,经 0.25% 胶原酶,37℃ 摇床中缓慢振荡 2h 后,用 200 和 350 目的滤网将细胞过滤 2 次,由滤过的细胞悬液中得到间质细胞,冲洗滤网得到贴附其上的腺体细胞(上皮细胞),分别加入培养液。

2.2 细胞接种、原代培养和传代 分离的上皮和间质细胞分别接种,细胞存活率 > 85%,间质细胞以 5 × 10⁴ 个细胞/cm² 接种,上皮细胞以 400 个细胞/cm² 接种。均使用含 10% 胎牛血清培养液进行原代培养。细胞贴壁后更换培养基以去除未贴壁的血细胞,2 种细胞均培养 24h 换培养液,以后每 2 天更换 1 次。当细胞生长铺满平皿或培养瓶时,用 0.25% 胰酶消化进行细胞传代。

2.3 实验血清的作用和分组 传代的细胞生长时在培养皿中放入盖玻片,当盖玻片长满细胞后,根据分组情况分别加入含 10% 实验血清的培养液继续培养 6d。共用含 5 种不同血清的培养液分别培养,进行 PRL 的观察,即取材于增殖期的内膜细胞加入排卵前 LH-2 组服药前和服药后实验血清培养液,取材于分泌期的内膜细胞加入排卵后 LH+ (7+ 10) 组服药前和服药后实验血清培养液,平行对照血清继续用 10% 胎牛血清培养液。5 种早孕相关因子,仅进行取材于分泌期的内膜细胞加入排卵后 LH+ (7+ 10) 组服药前和服药后 2 种实验血清培养液观察。

2.4 培养细胞的观察和评价指标 分别进行细胞角蛋白(CK₁)和波形蛋白(Vim)的组化染色以判断细胞的纯度,上皮细胞对 CK₁ 特异性着色,间质细胞对 Vim 特异性着色,2 种细胞纯度均 > 90% 以上。取长满细胞的盖玻片,进行早孕相关因子纤维连接蛋白(FN)、转化生长因子(TGF)、白血病抑制因子(LIF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血管内皮生长因子(VEGF)等 5 种因子和细胞蜕膜化的特异性检测指标——泌乳素(PRL)的免疫组织化学染色。

2.5 免疫组织化学染色 采用 SP 法。从培养皿中取出长满细胞的盖玻片,用 PBS 洗 2 遍,浸入丙酮/甲醇(1/1)溶液中,-20℃ 固定 20~30min,3% H₂O₂-PBS 液以消除内源性过氧化物酶活性,2% 羊血清封闭,所用一抗分别为 Vim(1:400)、CK₁(1:400)、LIF(1:100)、FN(1:200)、TGF(1:100)、FGF(1:100)、VEGF(1:100)及 PRL(1:100)工作液,通用型生物素标记的二抗工作液,S-A/HRP 工作液,DAB 显色,逐级酒精脱水,二甲苯透明,封片。阴性对照一抗为正常羊血

清。特异性着色强度以阴性(-)、弱阳性(±)、阳性(+)、强阳性(++)、极强阳性(+++)、++++ 表示。阳性细胞率为每组化染片观察 200 个细胞。

3 结果

3.1 免疫组化染色观察 CK₁ 和 Vim 染色分别显示上皮细胞特异性着色而间质细胞阴性和间质细胞特异性着色而上皮细胞阴性,且阳性细胞率均 > 95%,表明细胞纯度符合设计要求。其它 5 种细胞因子组化染色的定性、定位和不同血清作用后的比较见表 1。可以看出:培养细胞经服用中药前后病人血清作用后,服药后比服药前血清组对 FGF、VEGF 2 种因子细胞特异性着色强度无明显区别,阳性细胞率 FGF 无差异,达到 95% 以上,而 VEGF 的阳性细胞率虽然也均达到 95% 以上,但强阳性(+++)服药后(55%~60%)明显高于服药前(20%~25%);TGF 细胞特异性着色强度和阳性细胞率虽无明显区别,但表达极强阳性(++++)的细胞数目明显增加(服药前 < 5%、服药后 20%);LIF、FN 2 种因子细胞特异性着色强度均为服药后明显高于服药前,但阳性细胞率无差异,均达到 85% 以上。表明中药有促进细胞因子 VEGF、TGF、LIF 和 FN 表达强度的作用,而仅对 FGF 表达无影响。

表 1 对细胞因子表达定性的影响

因子	表达 定位	服药前		服药后	
		表达强度	阳性细胞(%)	表达强度	阳性细胞(%)
FN	细胞浆	+ ~ ++	> 85	++ ~ +++	> 85
LIF	细胞浆	+	> 85	++ ~ +++	> 85
TGF	细胞核	##	5	## ~ ###	20
FGF	细胞核	++ ~ +	> 95	++ ~ +	> 95
VEGF	细胞膜	+ ~ ++	20~25	+ ~ ++	55~60

3.2 PRL 染色观察 用免疫组化方法对 5 种血清作用的细胞进行 PRL 染色,3 批的实验结果显示:LH+ (7+ 10) 服药后实验血清组有阳性细胞产生,定位于细胞浆中,在核周围可见棕黄色呈颗粒状细小絮状物,阳性细胞率为 10%~15%;LH+ (7+ 10) 服药前实验血清组也有阳性细胞产生,但着色浅,阳性细胞率 < 1%~2%;而 LH-2 组服药前和服药后实验血清组、对照胎牛血清组 3 种血清 PRL 着色阴性。表明服用中药后病人排卵后 LH+ (7+ 10) 天的分泌中期血清可诱导产生蜕膜化(形成真正的蜕膜细胞)。说明中药对着床、妊娠、健黄体等方面有积极的直接作用。

4 讨论

本实验研究是应用服用调经孕育方药前、后病人的血清对体外培养的人子宫内膜细胞进行血清药理学初步观察,目的在于通过对血清中药物有效成份对靶细胞直接作用的观察(口服中药进入血中由血循环运输到达靶器官发挥作用),进一步评价中药促进内膜向有利于接受着床的方向发育提供证据。

4.1 内膜细胞体外培养的技术 人子宫内膜含大量的间质细胞和腺上皮细胞,提取分离纯化通常采用酶解和滤网过滤的方法。高纯度、高密度的间质细胞和上皮细胞往往有利于体外生长和传代培养。本实验采用逐次换液法除去不贴壁的血细胞,效果良好,接种后 24h 即表现出正常生长旺盛细胞的形态特征^[5,6],为观察中药血清的作用提供了基础。

4.2 促进早孕相关因子的表达 服用中药后的血清中所具有的刺激促进细胞增殖分化的活性物质,我们尚不清楚(国内外尚未见与本实验类似的研究工作,对中药在此方面的相关认识以往未见报告)。但是,中药进入体内通过血循环到达靶器官发挥作用是由血清做为“载体”实现的,血清中所含的活性物质是通过多因素、多因子、整体协调作用实现其功能表现的。本实验的初步研究表明:服用方药后的实验血清具有明显促进 FN、LIF、TGF、VEGF 4 种早孕相关因子表达强度的作用,而对 FGF 表达无影响。

4.3 方药诱导促进间质细胞蜕膜化的作用 在对人子宫内膜的研究中,间质细胞蜕膜化是热点之一。蜕膜细胞可合成和分泌 PRL, PRL 做为蜕膜细胞的标记蛋白,可特异性地鉴定蜕膜细胞^[5,6]。体外培养的间质细胞可在激素诱导作用下发生蜕膜化^[7,8]。本实验结果表明:LH+ (7+ 10) 组服药后血清可明显促进体外培养的内膜间质细胞向前蜕膜细胞分化,血清作用 3d 即达到高峰(90%)并聚集形成功能区,并随作用时间延长继续向蜕膜化方向分化,诱导形成与蜕膜细胞形态完全相同的细胞,并可特异性表达 PRL,发生蜕膜化的细胞为 10%~15%。说明方

药具有激素样作用,或通过诱导产生其它某些活性物质,实现促进内膜细胞向有利于早孕的方向发展。

本实验建立了人子宫内膜体外培养细胞的中药血清药理学研究新方法,在今后可开展更深入的研究。本实验是在对中医药助孕作用的研究中,首次得到中药具有明确诱导促进内膜间质细胞蜕膜化作用的实验资料,对认识中药促进着床、早孕发生的作用机理提供了直接客观的证据。

参考文献:

- [1] 陈秋梅,张树成,沈明秀. 调经孕育方药对排卵障碍性不孕者同步测试的卵泡和子宫内膜生长发育、血流特性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(2): 58.
- [2] 徐立康,王介东. 早孕蜕膜组织血管内皮细胞的分离与培养[J]. 生殖与避孕, 1993, 13: 345.
- [3] Bentin LU, Pedersen B, Lindenberg S, et al. Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system[J]. J Reprod Fertil, 1994, 101: 327.
- [4] Matthews CJ, Redfem PF, Hirst BH, et al. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture[J]. Fertil Steril, 1992, 57: 990.
- [5] Meuris S, Soumenkoff G, Malengreau A, et al. Immunoenzymatic localization of prolactin-like immunoreactivity in decidual cells of the endometrium from pregnant and nonpregnant women[J]. J Histochem Cytochem, 1980, 28: 1347.
- [6] Rosenberg SM, Bhatnagar AS. Sex steroid and human chorionic gonadotropin modulation of *in vitro* prolactin production by human term decidua[J]. Am J Obstet Gynecol, 1984, 148: 461.
- [7] Huang NR, Tseng L, Bischof P, et al. Regulation of prolactin by progesterone, estrogen and relaxin in human endometrial stroma cells[J]. Endocrinology, 1987, 121: 2011.
- [8] Song JY, Fraser IS. Effects of progestogens on human endometrium[J]. Obstet Gynecol Surv, 1995, 50: 385.