

子宫内膜类器官三元共培养模型构建及其在生殖免疫相关药物研究中的应用价值^Δ

刘本娟^{1,2*}, 朱一萍³, 包俊华⁴, 杨云云², 高帆^{5#1}, 王卓^{1,2#2} (1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 海军军医大学第一附属医院药剂科, 上海 200433; 3. 同济大学医学院附属上海市第一妇幼保健院生殖外科, 上海 200092; 4. 海军军医大学第一附属医院生殖医学中心, 上海 200433; 5. 海军军医大学第一附属医院医务处, 上海 200433)

中图分类号 R965.1;R318.1

文献标志码 A

文章编号 1672-2124(2026)08-0903-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2026.08.002



摘要 目的:构建人子宫内膜类器官-基质细胞-外周血单核细胞(PBMC)三元共培养模型,优化PBMC与类器官的适配共培养比例,建立贴近体内生理及免疫微环境的体外模型,并初步探讨其在生殖免疫相关研究及药物评价中的应用价值。方法:构建仅含上皮细胞的子宫内膜类器官,并采用免疫荧光法鉴定其模拟月经周期的能力;以1:3比例构建子宫内膜类器官-基质细胞二元共培养模型,通过Western blot及透射电镜观察纤毛标记物乙酰化- α -微管蛋白表达及纤毛结构形态;通过CCK-8检测不同浓度白细胞介素-2对PBMC细胞活力的影响,并采用流式细胞术对PBMC进行分型鉴定;使用Cell Titer-Glo 3D试剂检测类器官与基质细胞的活力,以评估不同比例PBMC对其活力的影响。最终建立三元共培养模型并筛选不损伤体系细胞活力的PBMC共培养比例。结果:本研究成功构建可模拟人体子宫内膜周期性激素应答的类器官模型,并构建出三元共培养模型,筛选得到子宫内膜类器官与PBMC的适宜共培养比例为1:10~1:40;但液下浸没培养的二元共培养体系无法诱导子宫内膜上皮产生成熟纤毛结构。结论:本研究建立的三元共培养模型弥补了传统类器官缺乏免疫微环境的缺陷,可为生殖免疫相关疾病机制研究、免疫调节药物体外评价及个体化用药方案优化提供稳定可靠的药效研究平台。

关键词 子宫内膜类器官;共培养模型;免疫微环境;个体化用药;药物筛选

Construction of Ternary Co-Culture Model of Endometrial Organoids and its Application Value in Reproductive Immunity-Related Drug Research^Δ

LIU Benjuan^{1,2}, ZHU Yiping³, BAO Junhua⁴, YANG Yunyun², GAO Fan⁵, WANG Zhuo^{1,2} (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Dept. of Reproductive Surgery, Shanghai First Maternity and Infant Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China; 4. Reproductive Medicine Center, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 5. Dept. of Medical Affairs, the First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To construct a ternary co-culture model of human endometrial organoids, stromal cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMC), optimize the suitable co-culture ratio of PBMC and organoids, establish an *in vitro* model close to the *in vivo* physiological and immune microenvironment, and preliminarily explore its application value in reproductive immunity-related research and drug evaluation. **METHODS:** Endometrial organoids containing only epithelial cells were constructed, and their ability to simulate the menstrual cycle was identified by immunofluorescence assay. A binary co-culture model of endometrial organoids and stromal cells was established at a ratio of 1:3, and the expression of ciliary marker acetylated α -tubulin and ciliary structure morphology were observed by Western Blot and transmission electron microscopy. The effect of different concentrations of interleukin-2 on PBMC viability was detected by CCK-8 assay, and PBMC were typed and identified by flow cytometry. Cell Titer-Glo 3D reagent was used to detect the viability of organoids and stromal cells to evaluate the effect

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 82304619);上海青年药学人才能力提升项目(No. SPAQNRC2025A01)

* 硕士研究生。研究方向:临床药学。E-mail: lbenjuan@163.com

通信作者 1: 讲师。研究方向:临床合理用药与医疗质量。E-mail: 13916001851@163.com

通信作者 2: 主任药师。研究方向:临床药学。E-mail: wztgyx223@163.com

of different ratios of PBMC on their viability. Finally, a ternary co-culture model was established, and the co-culture ratio of PBMC that did not damage the viability of system cells was screened. RESULTS: In this study, an organoid model that can simulate the periodic hormonal response of human endometrium was successfully constructed, and a ternary co-culture model was established. The suitable co-culture ratio of endometrial organoids to PBMC was screened as 1 : 10-1 : 40. However, the submerged binary co-culture system could not induce the endometrial epithelium to produce mature ciliary structures. CONCLUSIONS: The ternary co-culture model established in this study makes up for the deficiency of the lack of immune microenvironment in traditional organoids, and can provide a stable and reliable pharmacodynamic research platform for the study of the mechanism of reproductive immunity-related diseases, *in vitro* evaluation of immunomodulatory drugs and optimization of individualized medication regimens.

KEYWORDS Endometrial organoid; Co-culture model; Immune microenvironment; Personalized medication; Drug screening

子宫结构与功能的完整性是其发挥正常生理功能的基础^[1]。子宫内膜是子宫发挥生殖功能的核心功能层,其周期性的增殖、分泌与脱落依赖于上皮细胞、基质细胞、免疫细胞及其他辅助细胞的相互调控^[2],同时也是雌二醇(estradiol, E₂)、孕酮(progesterone, P₄)及免疫调节类药物发挥作用的主要靶组织^[3]。在月经周期中,子宫内膜受 E₂ 的影响显著增殖^[4],主要表现为增殖细胞标记物 Ki67、雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)表达水平的增加。进入分泌期后, P₄ 通过拮抗 E₂ 的促增殖效应抑制子宫内膜过度增生,使 Ki67、ER、PR 表达水平显著下降^[5]。此外,子宫内膜腺体纤毛会随月经周期发生形态适应性改变,且分泌期 P₄ 可诱导腺体分泌糖蛋白,纤毛通过定向运输分泌物优化宫腔微环境,为胚胎着床提供营养支持^[6-8]。子宫内膜局部免疫稳态失衡是引发多种生殖免疫疾病的核心诱因,其中子宫微环境内 Th1/Th2 细胞因子失衡、免疫细胞异常活化等病理改变与反复种植失败、不明原因不孕等不良生殖结局密切相关^[9]。临床常采用免疫调节剂、激素类药物干预此类患者^[10],但因缺乏可精准模拟子宫内膜生理及局部免疫微环境的体外评价模型,导致生殖免疫疾病的药物作用机制、最佳给药剂量等关键科学问题难以被系统阐明^[11]。传统子宫内膜类器官仅含单一上皮细胞组分,无法模拟外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)-基质细胞-上皮细胞的相互作用,难以真实复刻体内生理病理状态,限制了药物药效评价与安全性分析^[12]。基于此,本研究以子宫内膜类器官为基础,整合基质细胞及 PBMC,构建三元共培养模型,旨在建立更贴近体内真实微环境的体外药理学评价体系,为生殖免疫相关疾病的机制研究、药物筛选及个体化治疗提供实验基础与技术平台。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 子宫内膜组织获取:本研究所采用的子宫内膜组织由海军军医大学第一附属医院生殖科提供,共收集 12 例患者的子宫内膜组织样本。子宫内膜组织样本取自因输卵管阻塞、胚胎质量异常、子宫内膜容受性下降或免疫相关因素,采用 IVF-ET 治疗失败而行宫腔镜检查的患者。研究排除子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征、恶性肿瘤、急性感染及子宫内膜组织样本采集前 3 个月使用激素类药物的患者。本研究获海军

军医大学第一附属医院医学伦理委员会批准(CHEC2025-346),所有患者均签署知情同意书。

1.1.2 主要仪器:SpectraMax[®] Paradigm[®] 多功能微孔板读板机(酶标仪)——型号 SpectraMax Paradigm,美国 Molecular Devices 公司;透射电镜——型号 Hitachi HT-7800,日本日立高新技术公司;石蜡切片机——型号 PM-24;化学发光成像仪——型号 SCG-W3000 PLUS,武汉塞维尔生物科技有限公司;流式细胞仪——型号 CytoFLEX,美国 Beckman Coulter;倒置荧光显微镜——型号 MF52-N,广州市明美光电有限公司;大号蛋白垂直电泳仪——型号 DYC-SCZ6Plus,中国圣尔生物公司。

1.1.3 主要试剂:ITS(00-102-10 mL)、GlutaMAX(35050061)、Hepes(15630106)、Advanced DMEM/F12(12634010)、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)(25200072)、TrypLE(12604021)购自 Gibco 公司;N-2 添加剂(17502048)、IV 型胶原酶(17104019)购自 Thermo 公司;烟酰胺(M4896)、A8301(M5037-5 mg)、N-乙酰-L-半胱氨酸(M58483)、SB 202190(M2062)、B-27 添加剂(12587010)、Y-27632(M1817-10 mg)、环磷酸腺苷(cAMP)、雌激素、孕激素购自 Abmole 公司;EGF(AF-100-15-100UG)、Human Noggin(120-10C-50)、Wnt 3A(HZ-1296)、FGF-10(100-26-100)、Human R-spondin-1(120-38-100)购自 PeproTech 公司;IL-2(GMP-C013)、anti-Human CD3/CD28 Beads(GMP-B016)购自近岸蛋白;Matrigel(356231)购自 Corning 公司、Dispase(07913)购自 STEMCELL 公司;Collagen(5074-35 mL)购自 Sigma 公司;一步法 PAGE 彩色凝胶试剂盒(SKV0055)、BCA 试剂盒(SB-WB013)、蛋白上样缓冲液(P1040)购自圣尔公司。E-cadherin(60335-1-Ig)、ER(sc-8002)、PanCK(26411)、FOXA2(22474)、PR(ab32085)、Vimentin(60330-1-1 g)购自 Proteintech 公司;APC anti-human CD3(300412)、PE anti-human CD4(357404)、FITC anti-human CD45(368508)购自 BioLegend 公司;RPMI-1640 培养基(E600028-0500)、特级胎牛血清(E600001-0500)购自生工生物工程股份有限公司;BSA(4240GR100)购自 BioFroxx 公司、Triton X-100(C03-03001)购自 bioess 公司、人外周血淋巴细胞分离液(C0025-200 mL)、免疫组化笔(P0139-1pc)、DAPI 染色液(C1006-10 mL)购自碧云天、细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8, ES7011)购自 ESscience 公司;Cell Titer Glo 3D Cell Viability Assay(G9681)购自 Promega 公司;抗荧光淬灭封片剂(G1401-5 mL)、电镜固定

液(G1102-1.5 mL)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;柠檬酸钠 1×抗原修复液(C1040)购自索莱宝公司。

1.1.4 扩增培养基(ExM)的配置:每 20 mL Advanced DMEM/F12 中添加以下终浓度成分:1×Glutamax、1 mmol/L Hepes、1×ITS、1×含青霉素-链霉素-两性霉素 B 的三抗、10 μmol/L Y-27632、1×N-2 添加剂、1×B-27 添加剂、1 mmol/L 烟酰胺、50 ng/mL EGF、100 ng/mL Noggin、200 ng/mL Wnt 3A、100 ng/mL FGF-10、500 nmol/L A8301、200 ng/mL Human R-spondin-1、1.25 mmol/L N-乙酰-L-半胱氨酸、10 μmol/L SB202190。

1.2 方法

1.2.1 子宫内膜类器官的构建及鉴定:(1)子宫内膜类器官的构建。新鲜子宫内膜组织经 PBS 洗净后剪至约 0.5 mm³ 小块,1.25 U/mL dispase 及 2.5 mg/mL IV 型胶原酶于 37 ℃ 消化子宫内膜组织 1 h,将单细胞重悬于 Matrigel,37 ℃ 固化 1 h,加入 ExM 培养基。置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养。培养 24 h 后,使用 10 nmol/L E₂ 处理子宫内膜类器官 4 d,诱导其进入增殖期,换含有 10 nmol/L E₂、1 μmol/L P₄ 和 0.5 mmol/L 环磷酸腺苷(cAMP)的 ExM 继续处理 4 d 刺激类器官进入分泌期,观察类器官模型对雌激素、孕激素及 cAMP 的反应性。

(2)HE 染色及免疫荧光染色鉴定子宫内膜类器官。收集患者子宫内膜组织及经激素诱导至增殖期及分泌期的子宫内膜类器官,加入 6 mL 4%多聚甲醛室温下固定 1 h,石蜡包埋、切片,切片依次浸入环保型透明脱蜡液中脱蜡 2 次,20 min/次;经无水乙醇 I (5 min)、无水乙醇 II (5 min)、95%乙醇(3 min)、85%乙醇(3 min)、75%乙醇(3 min)、蒸馏水(2 min)水化,蒸馏水洗涤。对于 HE 染色,苏木素染核 5~8 min,伊红复染,切片依次经过 75%乙醇(1 min)、85%乙醇(1 min)、95%乙醇(1 min)、100%无水乙醇 2 次(3 min)脱水,二甲苯透明 2 次,每次 5 min,抗荧光淬灭剂封片。倒置荧光显微镜下观察并采集图像。对于免疫荧光染色,以柠檬酸钠 1×抗原修复液(pH 6.0)浸没切片,95 ℃微波加热 15 min,室温冷却 20 min, PBS 清洗 2 次,每次 3 min。免疫组化笔圈定区域后,用 OWB (3% BSA+0.3% Triton X-100)室温透膜封闭。加入一抗(E-cadherin 1:50、ER 1:50、PanCK 1:200、FOXA2 1:200、PR 5 μg/mL、Ki67 1:100、Vimentin 1:500),4 ℃ 孵育过夜,PBST (0.1% Tween 20)洗涤。荧光二抗(山羊抗兔-488 及山羊抗鼠-594,稀释比 1:200)室温孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次,每次 10 min。以 DAPI 作为对照,室温避光孵育 10 min,PBST 清洗后,于倒置荧光显微镜下采集图像。

1.2.2 子宫内膜类器官与基质细胞二元共培养模型构建及纤毛分化研究:(1)基质细胞培养。将子宫内膜组织消化为单细胞后,经 70 μm 滤网过滤。加入基质细胞培养基(RPMI-1640+10%FBS+1%三抗溶液)重悬细胞,置于培养皿中,于 5% CO₂、37 ℃ 恒温箱中贴壁培养,首次接种后的 24 h 内观察基质细胞的贴壁情况。

(2)子宫内膜类器官与基质细胞二元共培养模型的建立。基质细胞密度达 80%~90%时以 1:2 的比例传代。使用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化 3 min 并计数。类器官经 TrypLE 消化 10 min 后,常温下 1 500 r/min 离心 5 min,经类器官培养

基重悬后计数。将子宫内膜类器官单细胞与基质细胞以 1:3 的数量比混合,使用 Matrigel-Advanced DMEM/F12-Collagen (MAC)以 1:1:1 的体积比重悬,37 ℃ 固化 1 h 后加入 350 μL ExM 于 5% CO₂ 培养箱中培养。

(3)Western Blot 检测纤毛标记物的表达。收集诱导后的二元共培养模型及增殖期、分泌期子宫内膜组织(依据末次月经日期结合血清激素水平确认为增殖期及分泌期组织),用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞,4 ℃ 离心获取蛋白样品,经 BCA 法蛋白定量后,加入 5×loading buffer,100 ℃ 10 min 煮沸变性。配置 10%的彩色 PAGE 凝胶,以每孔 20 μg 蛋白电泳,湿转法转膜后室温封闭 1 h,加入一抗稀释液(acetylated α-tubulin 1:2 000、β-Actin 1:100 000),4 ℃ 摇床孵育;TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。随后使用二抗(山羊抗兔、山羊抗鼠,1:5 000)室温孵育 1 h 后洗涤 3 次,每次 10 min,滴加 ECL 发光液显影成像。

(4)透射电镜观察纤毛结构。收集基质细胞与类器官二元共培养模型,使用电镜固定液室温下固定 2 h,固定后使用 PBS 漂洗;1%锇酸再固定 1~2 h,30%~100%乙醇梯度脱水,丙酮置换 2 次,经丙酮与包埋剂 1:1、1:3 逐步渗透后,纯包埋剂过夜。70 ℃ 聚合 24 h,制备超薄切片,经醋酸双氧铀与柠檬酸铅染色后,于透射电镜下观察纤毛结构。

1.2.3 子宫内膜类器官与基质细胞及 PBMC 三元共培养模型的构建:(1)PBMC 的提取。取新鲜静脉血加入等体积 PBS 稀释并缓慢叠加于人外周血淋巴细胞分离液上方,室温下 1 500 r/min 离心 30 min,缓升缓降 5 min。吸取 PBMC 层至新管,PBS 重悬,1 200 r/min 离心 5 min,重复洗涤 2 遍,于 PBMC 培养体系中悬浮培养(1640 培养基+10%FBS+1 nmol/L IL-2)。

(2)PBMC 的激活。将 CD3/CD28 磁珠以 1×10⁶ 个 PBMC 加入 1.0×10⁶ 个 beads/mL 的密度于 PBMC 培养体系、5%CO₂ 培养箱中激活 24 h,收集激活后的 PBMC 至 1.5 mL Ep 管,置于磁力架上 1 min 撤去 CD3/CD28 磁珠。

(3)CCK-8 检测 IL-2 对 PBMC 增殖的影响。经磁珠激活后的 PBMC,以每孔 4×10⁴ 个 PBMC 进行 CCK-8 实验,设置空白对照组及溶剂对照组,并加入 0、0.1、1、100 nmol/L 的 IL-2,于 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱中培养,每孔于检测前加入 10 μL CCK-8 试剂,使用酶标仪于 450 nm 处检测第 0、5、9 日的吸光度值。

(4)流式细胞检测。将 PBMC 经 40 μm 滤网过滤后离心。取 1×10⁶ 个 PBMC,加入 CD45、CD3、CD4 抗体(抗体工作浓度:2 μg/mL)室温避光孵育 20 min;1 300 r/min 离心 3 min, PBS 洗涤 2 次,以 300 μL PBS 重悬后使用 CytoFLEX 流式细胞仪上机检测。

(5)不同比例 PBMC 对三元共培养模型细胞活力的影响。取扩增至第 3 代的子宫内膜类器官及基质细胞,按 1.2.2(2)中方法传代。将子宫内膜类器官单细胞密度调整至约 6 000 个/孔,按类器官与基质细胞数量比为 1:3 混匀,使用 MAC(体积比为 1:1:1)重悬,每孔 5 μL 接种于 96 孔板,37 ℃ 固化 1 h。取经 CD3/CD28 磁珠预激活的 PBMC,按类器官与 PBMC 细胞数量为 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 的比例,用含 1 nM IL-2 的 ExM 重悬,并设置仅含有子宫内膜类器官及基

质细胞的二元共培养模型作为对照组。于每孔加入含不同比例 PBMC 的 100 μ L ExM 混悬液,期间每 48 h 半量换液。在三元共培养模型共培养 5 d 后,使用倒置荧光显微镜观察细胞状态并拍照,随后轻柔洗去三元共培养模型中未侵入基质胶的 PBMC。使用 TrypLE 消化液消化 10 min,将二元共培养模型及三元共培养模型中的类器官消化为单细胞,按 $DT = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ 计算细胞倍增时间 (DT 为倍增时间, t 为培养时长, N_0 为初始细胞数, N_t 为 t 时刻细胞数)。每孔依次加入 100 μ L advanced DMEM/F12 及 100 μ L Cell Titer Glo 3D 试剂,剧烈振荡 5 min,37 $^{\circ}$ C 孵育 25 min,室温平衡后于酶标仪检测化学发光信号。

(6) 三元共培养模型的建立。类器官与基质细胞的二元共培养模型的建立步骤参考上述 1.2.2(2),并将该二元共培养模型接种至 24 孔板下方。将 8 μ m Transwell 置于孔板上部,上室加入细胞数量为 1 : 20 的 PBMC,随后在 Transwell 上室及下室中加入 350 μ L ExM 培养基及 1 nmol/L IL-2 建立类器官三元共培养模型。

1.2.4 数据处理:采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。Shapiro-Wilk 检验评估数据是否符合正态分布,符合正态分布的实验数据均以均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD) 表示;所有实验均重复 3 次;Levene 检验判断方差齐性,若数据不符合正态分布且方差不齐则采用 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

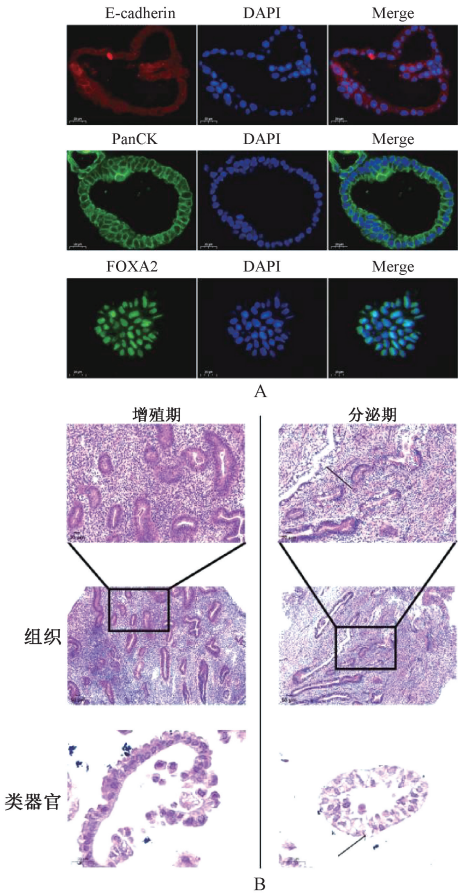
2.1 子宫内膜类器官的鉴定及月经周期的模拟

子宫内膜类器官表达上皮细胞标记物 E-cadherin、PanCK,表明子宫内膜类器官上皮细胞间存在粘附连接,上皮细胞层呈现环形管腔结构(图 1A)。子宫内膜类器官表达腺上皮特有标记物 FOXA2(图 1A)。增殖期患者子宫内膜组织及类器官细胞核排列紧密,核仁不明显(图 1B),分泌期受 P_4 的影响,腺体分泌大量糖蛋白,腺上皮细胞质内出现核下空泡,核淡染(图 1B)。

免疫荧光结果表明,增殖期子宫内膜类器官 PAEP 的荧光强度为 (21.27 $\pm$ 7.48)%,而分泌期 PAEP 的荧光强度为 (61.7 $\pm$ 2.52)% (图 2A、C);MUC1 的荧光强度为 (48.88 $\pm$ 1.69)%,MUC1 的荧光强度为 (58.56 $\pm$ 4.36)% (图 2B、D),表明子宫内膜类器官增殖期仅分泌少量 MUC1 及 PAEP,而分泌期能够大量分泌 MUC1 及 PAEP,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。子宫内膜类器官经 E_2 诱导进入增殖期后,月经周期标记物 Ki67、ER、PR 表达增加,经 E_2 、 P_4 及 cAMP 诱导子宫内膜类器官进入分泌期后,标记物显著降低(图 2E-G)。

2.2 子宫内膜类器官与基质细胞二元共培养模型的鉴定及纤毛分化状态分析

免疫染色结果表明,在二元共培养模型中,子宫内膜基质细胞表达波形蛋白标记物 Vimentin(图 3A)。子宫内膜基质细胞单独贴壁培养时形态为长梭形、纤维状(图 3B)。在以 MAC 包埋的二元共培养模型中子宫内膜类器官及基质细胞生长状态良好,基质细胞及类器官无明显形态改变(图 3C)。Western Blot 结果显示,患者月经周期处于增殖期时,子宫内膜组织高



A. 子宫内膜类器官中 E-cadherin、PanCK、FOXA2 的表达;B. 增殖期及分泌期患者子宫内膜组织及子宫内膜类器官 HE 染色图(图中黑色箭头所指为分泌期腺上皮细胞质内核下空泡)。

图 1 子宫内膜类器官 HE 染色及免疫荧光染色

表达乙酰化- α -微管蛋白,而处于分泌期时患者子宫内膜组织中乙酰化- α -微管蛋白表达显著降低(图 3D、E)。而在本研究构建的子宫内膜类器官中,增殖期与分泌期均未检测到该蛋白表达(图 3D、F)。透射电镜进一步观察显示类器官上皮仅见密集微绒毛,无成熟纤毛结构(图 3G)。

2.3 子宫内膜类器官与基质细胞及 PBMC 共培养比例的优化

流式细胞术检测结果显示,PBMC 中可检测到大量 T 细胞群(图 4A)。CCK-8 结果显示,未用 CD3/CD28 磁珠激活时,PBMC 在培养的 1~8 d 处于非增殖低代谢的未活化状态(图 4B)。PBMC 经 CD3/CD28 磁珠激活后,未添加 IL-2 组第 9 日与其第 0 日相比,细胞活力无明显变化。添加 1 nmol/L IL-2 组在第 5 日细胞活力显著升高,第 9 日时 PBMC 细胞活力与第 5 日相比降低(图 4C)。

类器官活力检测结果表明,第 5 日时,在不同比例 PBMC 的三元共培养模型中,子宫内膜类器官与 PBMC 数量比在 1 : 10、1 : 20、1 : 40 条件下其细胞活力与二元共培养模型相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5A)。该三元共培养模型细胞倍增时间与对照组相比无统计学差异(图 5B)。其中,对照组的类器官细胞倍增时间为 (23.7 $\pm$ 3.6)h,1 : 10、1 : 20、1 : 40 的三元共培养组类器官细胞为 (26.12 $\pm$ 2.53)h、(19.87 $\pm$

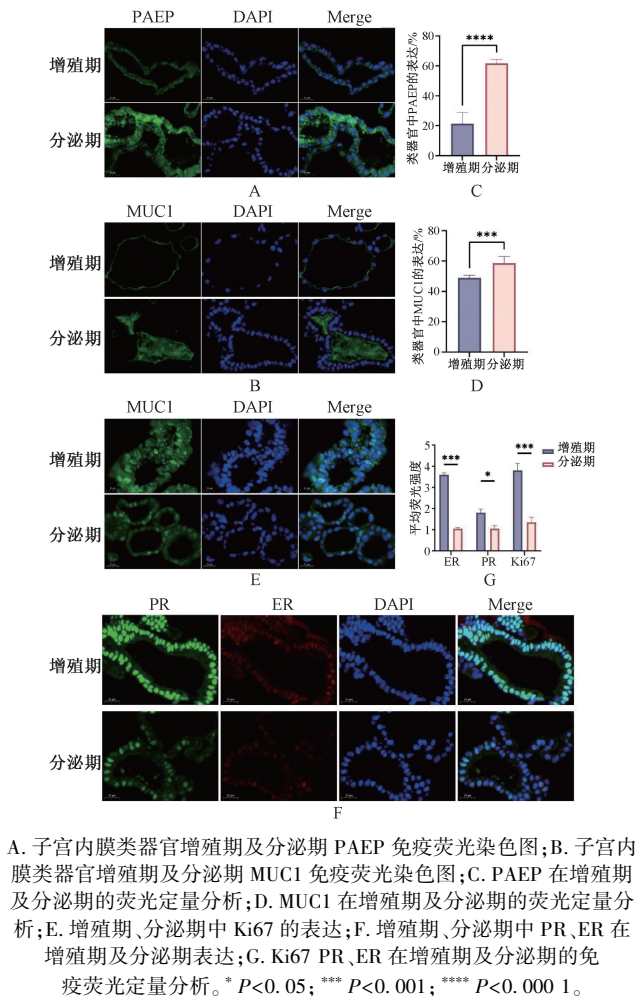


图2 子宫内类器官月经周期的模拟

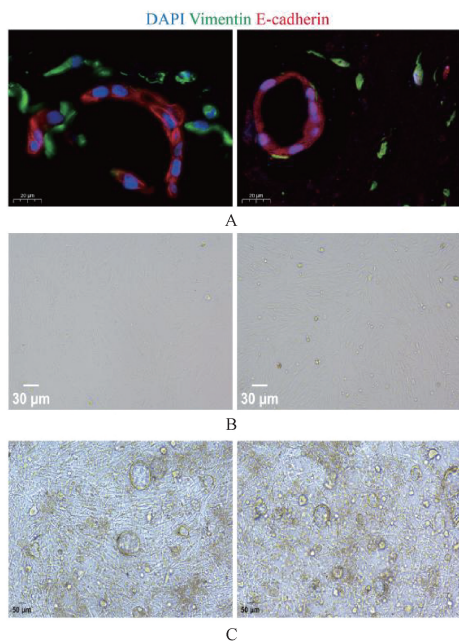


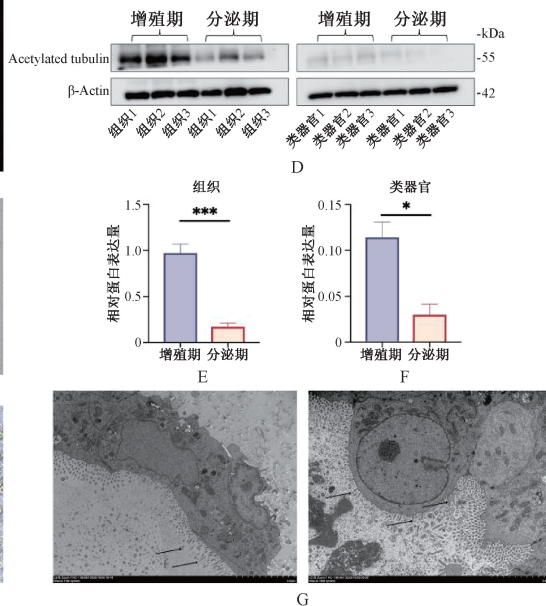
图3 二元共培养模型的鉴定

3.26)h、(20.03 $\pm$ 4.41)h。在共培养模型构建的第5日,PBMC 透亮、无明显衰竭状态(图5C)。而当比例为1:80及1:160时该三元共培养模型中子宫内膜类器官变为囊性状态,中央发黑(图5C),其中1:80组相较于对照组细胞活力下降37.60%,1:160组细胞活力下降58.69%,差异有统计学意义($P<0.05$)(图5A)。

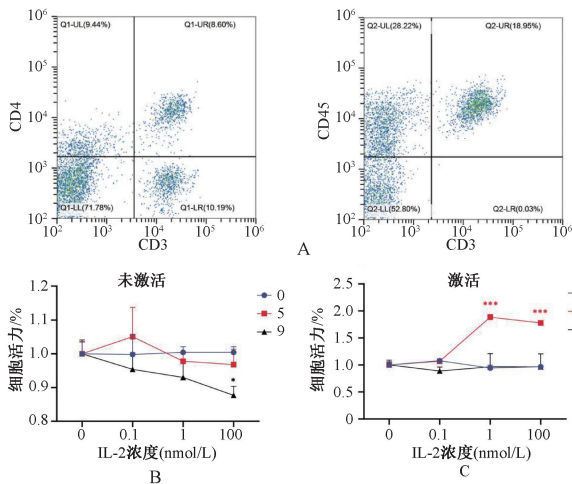
3 讨论

类器官模型可高度保留患者源性组织的遗传异质性^[13]。近年来,类器官模型药效实验已广泛应用于临床研究^[14]。在肿瘤领域,患者来源类器官可依托个体生物学特征快速筛选敏感药物,检测准确率可达80%,能够有效适配进展快、预后差的肿瘤患者的精准诊疗需求^[15]。相较于成熟的肿瘤类器官研究体系,多数生殖免疫相关疾病发病机制尚不明确,临床常采用环孢素A等免疫抑制剂开展干预治疗,但相关药物作用靶点及调控机制仍不明确^[16-18]。尽管目前已有研究基于子宫内类器官与基质细胞共培养模型,筛选子宫内类器官相关反复种植失败的候选治疗药物^[19],但此模型中缺乏免疫细胞,无法精准模拟患者子宫内局部免疫微环境,难以精准模拟生殖免疫疾病的病理状态。基于此,本研究构建的三元子宫内类器官共培养模型中,同时整合上皮细胞、基质细胞与PBMC三大核心组分,可有效模拟临床患者子宫局部免疫微环境^[20]。该模型适用于环孢素A、他克莫司等临床常用免疫抑制剂的体外药效验证、作用机制探究、药物浓度优化等研究,弥补了当前生殖免疫疾病临床依赖经验用药、缺乏个体化免疫微环境体外评价模型的不足,为探究PBMC与子宫内膜之间的动态互作提供了可靠的体外实验平台。

免疫荧光结果表明,子宫内类器官高表达子宫内类器官

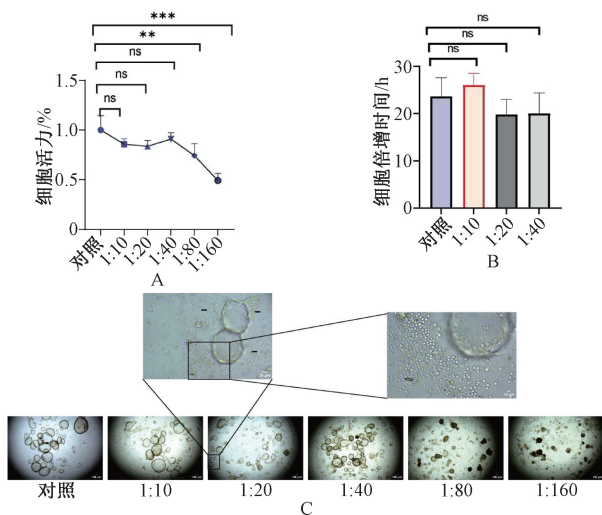


A. 二元共培养模型免疫荧光染色图; B. 子宫内类器官基质细胞明场图; C. 二元共培养模型明场图; D. Western Blot 检测子宫内类器官及类器官在增殖期及分泌期中乙酰化- α -微管蛋白的表达; E. 子宫内类器官中 acetylated α -tubulin 与 β -Actin 的蛋白条带及灰度值统计 ($n=3$, *** $P<0.001$); F. 子宫内类器官中 acetylated α -tubulin 与 β -Actin 的蛋白条带及灰度值统计 ($n=3$, * $P<0.05$); G. 透射电镜明场图 ($\times 30\,000$, 图中黑色箭头所指为绒毛)。



A. 流式细胞术鉴定免疫细胞标志物的表达;B. CD3/CD28 磁珠激活时不同浓度 IL-2 对 PBMC 细胞活力的影响;C. CD3/CD28 磁珠激活后不同浓度 IL-2 对 PBMC 细胞活力的影响。*** $P<0.001$ 。

图 4 PBMC 的鉴定及活力检测



A. 不同比例 PBMC 对该共培养体系细胞活力的影响;B. 细胞倍增时间定量统计分析;C. 三元共培养模型第 5 日的明场图(图中黑色箭头所指为基质细胞)。ns 为无统计学意义, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 5 三元共培养模型的建立

上皮标记物 FOXA2,证明其上皮来源;子宫内膜类器官能够对 E_2 、 P_4 及 cAMP 产生应答,具备用于激素药效评价的基础条件,也可用于激素类药物诱导子宫内膜异位症类器官恶变模型的构建。PBMC 经活化后可稳定用于子宫内膜类器官共培养;1 nmol/L IL-2 可有效维持 PBMC 活力,适合长期免疫相关药效实验的探究。在该三元共培养模型中类器官与 PBMC 的细胞数量比在 1:10~1:40 时,细胞活力与倍增时间与对照组无显著差异,体系稳定,可作为后续免疫相关生殖疾病个体化用药筛选的共培养比例。当类器官与 PBMC 的细胞数量比大于 1:80 时,类器官活力显著降低,不适用于药物评价模型。参照以往研究,本研究在类器官培养过程中将子宫内膜类器官与基质细胞以 1:3 的细胞数进行共培养,在传统 Matrigel 基质基础上,引入胶原以优化细胞外基质硬度^[21],使子宫内膜类器官的生理微环境更贴合体内子宫内膜生理微环境,有效缩小体外药

物实验结果与临床实际疗效的偏差,提升模型药物评价的准确性与可靠性。

然而,本研究存在一定的局限性。首先,本研究尚未验证该三元共培养模型与体内子宫内膜组织在遗传特征、分子表达谱上的差异,模型与体内的一致性仍需进一步验证;其次,本研究采用液下浸没培养体系,该培养模式无法有效诱导子宫内膜上皮纤毛分化,缺失子宫内膜纤毛相关生理结构与功能特征。因此,后续研究可考虑采用气液界面培养法,诱导子宫内膜上皮细胞极性分化、形成成熟纤毛结构,进一步完善模型生理功能,拓展其在生殖生理及药物研发领域的应用范围^[22-23]。

综上,本研究成功构建了可模拟子宫内膜激素应答特性与局部免疫微环境的三元共培养模型,可为生殖免疫相关疾病机制研究、免疫调节药物筛选、个体化用药效果评价提供稳定的体外研究平台,为临床反复种植失败、不明原因不孕等生殖免疫疾病的临床治疗与用药优化提供实验参考依据。

参考文献

- [1] Gasner A, P A A. Physiology, uterus[M]//StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- [2] Critchley H O D, Maybin J A, Armstrong G M, et al. Physiology of the endometrium and regulation of menstruation[J]. Physiol Rev, 2020, 100(3): 1149-1179.
- [3] Nagy B, Szekeres-Barthó J, Kovács G L, et al. Key to life: physiological role and clinical implications of progesterone[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 11039.
- [4] Chan R W S, Kaitu'u-Lino T, Gargett C E. Role of label-retaining cells in estrogen-induced endometrial regeneration[J]. Reprod Sci, 2012, 19(1): 102-114.
- [5] Boretto M, Cox B, Noben M, et al. Development of organoids from mouse and human endometrium showing endometrial epithelium physiology and long-term expandability[J]. Development, 2017, 144(10): 1775-1786.
- [6] Haider S, Gamperl M, Burkard T R, et al. Estrogen signaling drives ciliogenesis in human endometrial organoids [J]. Endocrinology, 2019, 160(10): 2282-2297.
- [7] Jiang Yanyu, Palomares A R, Munoz P, et al. Proof-of-concept for long-term human endometrial epithelial organoids in modeling menstrual cycle responses[J]. Cells, 2024, 13(21): 1811.
- [8] Saito M, Otsu W, Miyadera K, et al. Recent advances in the understanding of cilia mechanisms and their applications as therapeutic targets[J]. Front Mol Biosci, 2023, 10: 1232188.
- [9] Kargar R, Yahoo Z, Rafiemanesh H, et al. Evaluation of Th1-Th2 balance in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion: a systematic review and Meta-Analysis[J]. Am J Reprod Immunol, 2025, 94(1): e70125.
- [10] Azizi R, Ahmadi M, Danaii S, et al. Cyclosporine a improves pregnancy outcomes in women with recurrent pregnancy loss and elevated Th1/Th2 ratio[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 19039-19047.
- [11] Xin Qiliang, Kong Shuangbo, Yan Junhao, et al. Polycomb subunit BMI1 determines uterine progesterone responsiveness essential for normal embryo implantation[J]. J Clin Invest, 2018, 128(1): 175-189.

(下转第 914 页)