

组织贴块法建立人气道平滑肌细胞体外培养模型的研究 *

刘 媛 黄 茂[△] 李 涛 刘 红

(南京医科大学第一附属医院呼吸科 江苏 南京 210029)

摘要 背景 :人气道平滑肌已被证实参与气道重塑 ,气道平滑肌的重塑已成为慢性呼吸道疾病的主要病理改变之一。人气道平滑肌细胞的培养对慢性呼吸道疾病的研究有重要意义。组织贴块法培养人气道平滑肌细胞是原代培养人气道平滑肌细胞的基本方法之一。目的 :采用组织贴块法建立人气道平滑肌体外培养模型。方法 :采集人气道组织 ,用组织贴块法进行人气道平滑肌细胞的原代培养 ,获得的细胞经形态学和免疫细胞化学染色鉴定。结果 :培养的细胞呈典型的 " 谷峰 " 状生长 ,胞浆内特异性的平滑肌肌动蛋白阳性表达 ,符合平滑肌细胞的形态学特征和生物学特性。结论 :组织贴块法易操作 ,结果可信 ,并可培养出高纯度活性好的人气道平滑肌细胞 ,成功建立了体外人气道平滑肌细胞增殖模型 ,提供了研究慢性呼吸道疾病的细胞培养模型。

关键词 :人气道平滑肌 组织贴块法 细胞培养

中图分类号 :R318.13 R56 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)11-2065-03

Construction of Model of Human Airway Smooth Muscle in Vitro
by Attachment-block Culture*

LIU Yuan, HUANG Mao[△], LI Tao, LIU Hong

(Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Objective: To establish the model of human airway smooth muscle in vitro by attachment-block culture. **Methods:** The human airway wall was separated from lung resection carefully and cut into small pieces about 1 mm³, and then these pieces were attached on the wall of culture bottle. After 3 hours, those tissue pieces were cultivated in DMEM with 20 % calf serum. **Results:** Cells had grown on the bottom of culture bottle like peak-valley in shape. All cells almost were smooth muscle cells identified through An-ti- α -actin immunohistochemistry stain. **Conclusion:** Attachment-block culture of human airway smooth muscle cells is simple to operate, reliable in result, high in purity and useful as a cellular model for study of respiratory diseases.

Key words: Human airway smooth; Attachment-block culture; Cell culture

Chinese Library Classification(CLC): R318.13, R56 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)11-2065-03

气道平滑肌(Airway smooth muscle, ASM)是气道的重要组成部分之一 ,能够保持气道张力 ,维持气管管状形态 ,从而有利于气体流通 ,保持肺部通气。近年来发现气道平滑肌参与慢性支气管肺疾病中很多病理生理变化 ,比如慢性炎症、气道重塑等 ,已成为支气管哮喘、慢性阻塞性肺病等疾病发病机制研究中的热点^[1-2]。气道平滑肌细胞(ASM cell ,ASMC)的体外培养为研究其细胞生物学行为提供了一个有效的平台。鉴于外购细胞株费用高昂 ,原代培养 ASMC 最能反映出体内生长特性 ,对于呼吸系统疾病的科研工作者具有重要意义。近年来鼠气道平滑肌细胞的体外培养技术已成熟^[3-6] ,人气道平滑肌细胞(Human ASMC ,HASMC)培养也已成为国内外呼吸系统疾病研究的热点 ,本实验采用组织贴块法进行 HASMC 的原代培养 ,从而在体外建立 HASMC 的增殖模型。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

DMEM/ 高糖培养基与 HBSS 液购自美国 Gibco 公司 ;胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司 ;0.25 %胰蛋白酶、青链霉素购自美国 Gibco 公司 ;人抗平滑肌 α -actin 购自北京中杉金桥公司 ;PDGF-BB 购自 Peprotech 公司 ;CO₂ 细胞培养箱为美国 Thermo Fisher Scientific 公司 ;超净台为日本 AIR TECH 株式会社 ;倒置显微镜为日本 Nikon 公司 ;离心机为 80-2T 低速台式离心机 ,其余试剂均为分析纯。

1.2 原代培养 HASMC

取南京医科大学第一附属医院胸外科同期肺叶切除术患者的正常肺叶、段支气管标本 ,采用组织贴块培养法^[7]。无菌条件下用 HBSS 液(加入青链霉素)洗标本四到五次 ,每次 20 ml ,去除血污 ,使用无菌器械从外膜表面分离结缔组织 ,纵向剖开支气管 ,用圆手术刀片刮去内膜 ,尽可能将平滑肌和软骨环分离 ,将分离的平滑肌剪成 1 mm³ 的小组织块 ,用无菌牙科探针送入培养瓶 ,贴于已预湿的底面 ,等距排列 ,翻转培养瓶加入含 20 %胎牛血清的 DMEM(高糖)约 2.5 ml ,勿使培养液接触

* 基金项目 国家自然科学基金资助(30700342)

作者简介 刘媛(1986-) ,女 ,硕士七年制 ,主要研究方向 :支气管哮喘气道重塑 ,

电话 13675144703 ,E-mail :fxz-112@126.com

[△] 通讯作者 黄茂 ,E-mail :hm6114@126.com

(收稿日期 :2010-11-01 接受日期 :2010-11-25)

底面。将培养瓶底面朝上,置于 CO₂ 细胞培养箱中绝对静置 3 h 左右,当组织块接近干涸时轻轻翻转培养瓶,使培养液刚好没过组织块表面,半开放绝对静置培养 3 天后将培养液添至 5 ml,第 6 天全换液,此后每 3 天换液一次。

1.3 传代培养 HASMC

倒置显微镜下观察,当细胞融合 80 %以上时,可行首次传代。吸弃旧培养液, PBS 液 3 ml 洗两遍,吸弃洗液,加入 0.25 % 胰酶 1.5 ml,轻晃培养瓶使其均匀分布于底面,置于 CO₂ 细胞培养箱中,镜下观察当细胞胞质回缩,由梭形变圆形时加入含 10 %胎牛血清的 DMEM 培养基 2 ml 终止消化,移液管轻轻吹打 2 遍,吸入无菌离心管中,配平好低速离心机 1500 转 / 分离心 5 分钟后弃上清,加入适量 PBS,轻轻吹打细胞使之分散开,再次 1500 转离心 5 分钟,弃上清,加入适量含 10 %胎牛血清的 DMEM,吹打均匀后按 1:2-1:3 加入新培养瓶中。传代后每三天换液。3-6 代细胞用于实验。

1.4 细胞的纯化

原代培养 HASMC 时,难免有其他细胞混杂其中,如成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞等,可利用下面三种方法去除。

1.4.1 优势纯化法 取材时已去除大部分的内外膜和结缔组织,虽原代培养时仍混有杂细胞,但平滑肌细胞占多数,此时平滑肌细胞的增殖优势会抑制杂细胞的生长,尤其是内皮细胞和上皮细胞,随着传代次数的增加,平滑肌的纯度进一步提高。实验用 3-6 代 HASMC 的纯度达 96 %以上。

1.4.2 人为机械刮除法 即原代培养中在倒置显微镜下观察,发现有不生长平滑肌的组织块和虽有细胞生长,但不是平滑肌细胞的组织块,用记号笔在瓶壁标出,在超净台内用无菌牙科探针在底部相应位置予以轻轻刮除,勿碰及周围区域,后用 PBS 冲洗两遍,加新培养液继续培养。

1.4.3 差速贴壁法 杂细胞中的内皮细胞和上皮细胞可通过生长优势去除,而与平滑肌细胞同属纤维样细胞的成纤维细胞,贴壁时间大约为 10-30 min,与平滑肌细胞的贴壁时间(1-4 小时以上)相比,其贴壁过程快,这一特性被利用为差速贴壁法来纯化 HASMC。具体操作:用胰酶消化 HASMC,待细胞变圆,折光度增加时加含 10 %FBS 的 DMEM 终止消化,并用滴管轻轻吹打形成细胞悬液,静置 15 分钟,使成纤维细胞先贴壁,将剩

余细胞悬液转移至另一培养瓶中继续静置 15 分钟,将余下的细胞悬液再转移至新培养瓶中静置培养^[8]。这样得到的最后的培养瓶中平滑肌细胞纯度最高。

1.5 HASMC 鉴定

1.5.1 形态学鉴定 倒置显微镜下观察细胞形态、大小、排列情况、生长态势等。

1.5.2 免疫细胞化学鉴定 取 3-5 代对数生长期的细胞胰酶消化后接种到放置盖玻片的培养皿中,细胞爬片生长至单层,待细胞融合至 80 %时取出盖玻片,做 α -actin 免疫细胞化学染色:将爬有细胞的盖玻片用 PBS 漂洗 5 min $\times$ 3 次后丙酮室温下固定 20 min, PBS 再次漂洗 5 min $\times$ 3 次,然后按照 SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒说明书逐条进行操作(一抗为抗人平滑肌 α -actin)。

2 结果

2.1 细胞培养

组织块接种后 1-2 天可有圆形小细胞爬出,5-7 天可见平滑肌细胞贴壁生长,细胞呈中间小圆形,两头细长型的梭形,大小不一,随着细胞增殖,细胞间相互融合,部分重叠,多集中于培养瓶底部局部区域。予胰酶消化重铺后细胞可大致均匀分布,密度低时呈网状,密度高时呈漩涡状,即典型“峰谷”状(图 1),逐渐铺满瓶底,当细胞融合达 80 %进行首次传代。本实验首次传代胰酶消化时间达 5 min,首次传代后 5-7 天细胞可再次爬满瓶底,再传代时胰酶消化 1.5 分钟即可使细胞变圆,终止消化。传代后的细胞与原代细胞生长方式和形态特点一致。

2.2 HASMC 鉴定

2.2.1 形态学鉴定 倒置显微镜下观察单个 HASMC 呈中间小圆形,两头细长型的梭形或不规则三角形,细胞突起锐利,胞质丰富,有 1-2 个细胞核,可向细胞密度低的方向伸出足突。细胞融合后细胞长梭形,平行生长,呈束状排列,相互穿插,起伏状生长呈现出典型“峰谷”状现象。

2.2.2 免疫细胞化学鉴定 对平滑肌细胞特异的 α -actin 进行免疫组化 SP 法染色,显微镜观察,95 %以上细胞呈强阳性染色,胞浆呈棕黄色或者棕红色,胞核呈蓝色(图 2)。

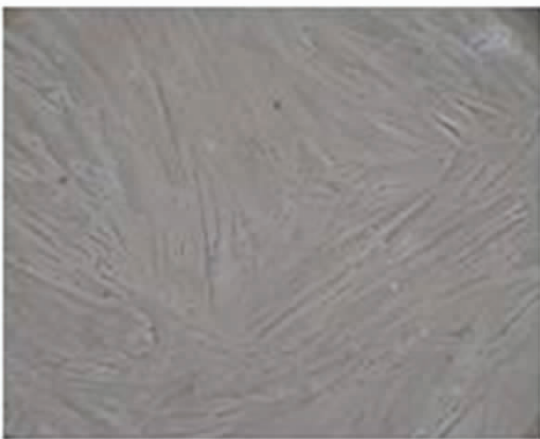


图 1 可见典型“峰谷”样结构(倒置显微镜, $\times$ 100)

Fig.1 HASMCs had grown like peak-valley in shape (invert microscope, $\times$ 100)

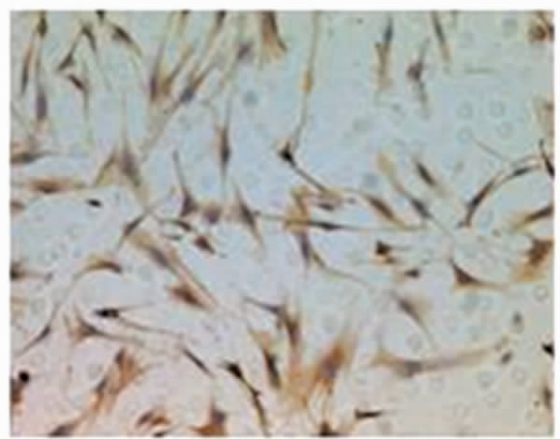


图 2 免疫细胞化学鉴定(倒置显微镜, $\times$ 100)

Fig.2 Immunohistochemical characterization of HASMCs (invert microscope, $\times$ 100)

3 讨论

HASMC 已被证实参与气道重塑,成为呼吸道疾病的主要病生改变之一。而临床上采集患者的 HASM 进行研究受到多种限制,多数研究人员仍选择采用动物模型来研究 ASM 参与的呼吸道疾病的发病机制。Woodruff PG.说不能获得足够的气道组织和将平滑肌细胞从组织中分离的困难是从事类似平滑肌研究较少的原因之一^[9]。故 HASMC 的培养具有重要意义。原代培养既节约费用,且组织和细胞刚离体,生物学性状还未发生改变,具有二倍体遗传特性,最能反映出体内生长特性,对药物和损伤刺激反应灵敏,尤其适合做药物测试和细胞分化等实验研究。目前 HASMC 的原代培养方法主要为组织贴块法和酶消化两种^[10-12]。酶消化与组织贴块法相比,虽然周期短,细胞纯度相对较好,但耗费多,且消化时间长短受消化酶的浓度大小难以掌握。而组织贴块法耗费少,操作简化,灵活运用文章中所提及纯化方法,所得的细胞纯度亦可在 98%以上,结果稳定。

原代培养 HASMC 的关键在于:1.严格无菌操作,否则一旦发生污染难以查找污染源,且会殃及培养箱内其他细胞。2.气道与外界相通,本不是无菌环境,所用 HBSS 和 DMEM 中均要加入青链霉素。但传代培养时可不加,以免影响细胞活性。3.取材部位是成功关键之一,气道越向下平滑肌含量越少,取标本时尽量取气道的膜部,此处平滑肌居多,培养的成功率高,气道软骨环处平滑肌数量不多,且分离干净较困难。4.取材时间不宜过长,过长组织块已干涸不易贴壁,且生物学性状不稳定,会发生变化。5.发现不长细胞或生长细胞为杂细胞的组织块尽早除去,以免产生的代谢产物影响平滑肌生长活性。6.组织块接种时加入的培养液刚好没过组织块即可,一般 1-2 ml,不可加多,否则静置时组织块易漂浮,不易贴壁。若发现培养液不够,可在组织块贴壁后缓慢沿瓶壁添加。7.传代时发现细胞已变圆,透亮度增加,但仍贴壁时不宜再将培养瓶放回孵箱继续消化,可轻轻晃动瓶身,细胞一般就会脱落下来。

本实验中组织贴块法原代培养获得的 HASMC 第三代时纯化达 99%,2-5 代均 1:4 传代,符合原代培养不伤细胞活性的情况下仍能获得高纯化的细胞的目的。

美国国立心肺血液中心 2006 年举办的专家研讨会上针对 ASM 提出后续研究方向:发生生物学、ASM 兴奋收缩耦联、细胞生长增殖和迁移、免疫学、ECM^[13]。目前研究发现支气管哮喘发病机制中 HASM 是调节支气管张力最重要的收缩单位,是控制气道直径的效应器,也是重要的免疫调节细胞,在表型、结构和功能上的改变具有动力性和可塑性,与其他炎症反应组分的关系非常复杂^[14]。而 Cox G 等研究发现作用于气道平滑肌的支气管热成形术能够进一步改善哮喘症状,降低急性发作频率^[15]。全球对 HASM 作用的研究越来越深入,原代培养 HASM 为广泛研究 HASM 奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Royce SG, Tang ML. The effects of current therapies on airway remodeling in asthma and new possibilities for treatment and prevention [J]. Curr Mol Pharmacol, 2009, 2(2):169-181
- [2] Clarke D, Damera G, Sukkar MB, et al. Transcriptional regulation of cytokine function in airway smooth muscle cells [J]. Pulm Pharmacol

Ther, 2009,22(5):436-445

- [3] 卢虹蓓,张维溪,李昌崇.哮喘大鼠气道平滑肌细胞培养方法探讨 [J]. 温州医学院学报,2009,03:264-266
Lu Hong-bei, Zhang Wei-xi, Li Chang-cong. The Study on Airway Smooth Cell Culture of Asthma Rats [J]. Journal of Wenzhou Medical College, 2009,03:264-266(In Chinese)
- [4] 白洪波,王超智,许继德.改良组织块消化法建立大鼠气道平滑肌细胞模型 [J]. 现代生物医学进展,2009,9(14):2631-2633+2648
Bai Hong-bo, Wang Chao-zhi, Xu Ji-de. An improved model of cultured rat airway smooth muscle cells By mixed tissue-piece digestion method [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009,9 (14): 2631-2633+2648(In Chinese)
- [5] 邱晨,李娜.气道平滑肌细胞培养方法探讨 [J].广东医学, 2008,29(11):1791-1793
Qiu Chen, Li Na. The Study on Airway Smooth Cell Culture Methods [J]. Guangdong Medical Journal, 2008,29(11):1791-1793(In Chinese)
- [6] 卓致远,黄茂,葛海燕,等.哮喘小鼠气道平滑肌细胞增殖及细胞周期蛋白 D1 表达的差异 [J].南京医科大学学报(自然科学版), 2007,27(01):43-46
Zhuo Zhi-yuan, Huang Mao, Ge Hai-yan, et al. Difference of cell proliferation and the expression of cyclin D1 in the airway smooth muscle cells of murine asthmatic model [J].Acta Univ Med Nanjing, 2007,27(01):43-46(In Chinese)
- [7] Freund V, Pons F, Joly V, et al. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions [J]. Eur Respir J, 2002, 20(2):458-463
- [8] 司徒镇强.细胞培养 [M].世界图书出版公司,2007:57-63
Situ-Zhenqiang. Cell Culture [M]. World Publishing Corporation, 2007:57-63(In Chinese)
- [9] Woodruff PG. Gene Expression in Asthmatic Airway Smooth Muscle [J]. Proc Am Thorac Soc, 2008,5(1):113-118
- [10] Moutzouris JP, Che W, Ramsay EE, et al. Proteasomal inhibition up-regulates the endogenous MAPK deactivator MKP-1 in human airway smooth muscle: Mechanism of action and effect on cytokine secretion [J]. Biochim Biophys Acta, 2010,1803(3):416-423
- [11] Rahman MS, Yamasaki A, Yang J, et al. IL-17A induces eotaxin-1/CC chemokine ligand 11 expression in human airway smooth muscle cells:role of MAPK(Erk1/2,JNK,and p38)pathways [J]. J Immunol, 2006, 177(6):4064-4071
- [12] Xie S, Sukkar MB, Issa R, et al. Regulation of TGF-beta 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005,288(1):L68-76
- [13] Panettieri RA, Murray RK, DePalo LR, et al. A human airway smooth muscle in bronchial tone, inflammation,and remodeling:basic knowledge to clinical relevance [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008,177: 248-252
- [14] 刘春涛,刘媛华.重新认识气道平滑肌在支气管哮喘中的地位[J].中华结核和呼吸杂志,2010,33(7):536-539
Liu Chun-tao, Liu Yuan-hua. New insight into the role of airway smooth muscles in asthma [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2010,33(7): 536-539(In Chinese)
- [15] Cox G, Thomson NC, Rubin AS, et al. Asthma control during the year after bronchial thermoplasty [J]. New Eng J Med, 2007,356: 1327-1337