

# 小鼠味蕾细胞分离及体外培养方法

秦玉梅 张根华<sup>1</sup> 石锦芹 王腾浩 邓少平\*(浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310035; <sup>1</sup>常熟理工学院生物工程系, 常熟 215500)

**摘要** 以ICR小鼠的味觉上皮为材料, 优化味觉上皮及味蕾细胞分离方法, 将分离的味细胞置于I型鼠尾胶原包被的含有IMDM培养基的培养板上培养, 相差显微镜下观察味蕾细胞形态变化。免疫组织化染色和荧光染色用于鉴定味蕾细胞。结果显示味蕾细胞离体培养一段时间后形态异于体内, 但仍具味蕾细胞特有的与细胞骨架和细胞内信号相关的分子标记如:  $\alpha$ -gustducin、细胞角蛋白8。由此证明这是一种有效的小鼠的味蕾细胞分离及体外培养方法, 为离体研究味蕾细胞生理生化特性提供了更好的途径。

**关键词** 味蕾细胞; 原代培养; 味乳头;  $\alpha$ -gustducin; 细胞角蛋白8

味蕾是味觉的主要感受器官, 分布于哺乳动物的舌、上腭和咽部黏膜上<sup>[1]</sup>。味蕾细胞能够识别食物中的化学成分, 每个味蕾中包含了50~150个细胞, 这些细胞根据其超微结构可分为四种类型: 基细胞(basal)、I型细胞(dark)、II型细胞(light)、III型细胞(intermediate)<sup>[2,3]</sup>。味蕾细胞是特化的上皮细胞, 细胞在形成之后平均每十天更新一次<sup>[4]</sup>。由于味蕾细胞对于微环境的要求比较严格, 研究者无法使动物味蕾细胞在离体受控制的实验室环境下存活, 所以味蕾细胞的原代培养成功很少, 对味觉细胞增殖、分化和发育的认识也一直停滞不前, 导致很长一段时间以来人们都是在体测量, 或者从舌头上分离整个舌上皮进行味蕾与味觉细胞的离体研究。因此为了从分子和细胞水平上更好的认识和理解味蕾细胞的分子结构和细胞生理, 细胞培养技术将是一个非常有价值的手段。本实验通过优化味觉上皮及味蕾细胞分离方法、选择对细胞存活和附着有效的培养基和试剂初步建立一种小鼠味蕾细胞的分离及体外培养方法, 为离体研究味蕾细胞生理生化特性, 及本实验室今后开展的味觉细胞传感器与味觉细胞的热动力学研究打下基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 4~8周ICR小鼠购自浙江省医学科学院实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 IMDM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素与链霉素均购自Gibco公司; I型鼠尾胶原(rat tail collagen type I)、MCDB 153、链霉蛋白酶(pronase)、胶原酶II(collagenase II)、中性蛋白酶II(dispace II)、胰岛素(insulin)均

购自Sigma公司; 弹性蛋白酶(elastase)购自Worthington公司、SABC-Cy3试剂盒及即用型SABC免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司、HEPES购自北京鼎国生物技术有限公司; Anti- $\alpha$ -gustducin购自Santa Cruz生物技术公司、细胞角蛋白(cytokeratin, CK8)购自Epitomics公司, 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基及主要试剂的配制 参考Ozdener等<sup>[5]</sup>的培养基配置方法, IMDM培养基中添加10% FBS, 1:5 MCDB 153, 50 ng/ml胰岛素, 100 U/ml青霉素与100  $\mu$ g/ml链霉素。

Tyrode溶液: NaCl 7.65 g, KCl 0.37 g, CaCl<sub>2</sub> 0.89 g, MgCl<sub>2</sub> 0.20 g, HEPES 2.38 g, 葡萄糖 1.80 g, 丙酮酸钠 1.10 g, NaHCO<sub>3</sub> 0.42 g, pH 7.4。无钙Tyrode溶液省略CaCl<sub>2</sub>。

### 1.2 方法

1.2.1 培养板的处理 实验前用0.1 mg/ml I型鼠尾胶原包被六孔培养板, 每孔250  $\mu$ l。置4  $^{\circ}$ C冰箱过夜, 后将未干的液体吸出, 过夜干燥。接种前用已灭过菌的超纯水清洗两次, 并用IMDM培养液浸润。

1.2.2 味蕾细胞的分离及原代培养 取4~8周ICR小鼠CO<sub>2</sub>致死, 断头后取舌, 舌剪至轮廓状乳头边缘处。Tyrode溶液清洗舌头表面的血迹, 清洗完毕放入无钙Tyrode溶液中。用5 ml一次性注射器将0.1~0.3 ml的混合酶液注入舌上皮与其下的肌肉层之间, 注射器针头要一直伸至舌尖边缘后缓慢地注射酶液至舌肿胀, 舌背面和侧面少量多次注射酶液, 混合酶

收稿日期: 2008-06-24 接受日期: 2008-09-28

国家自然科学基金资助(No.30770536)和浙江工商大学研究生科研创新基金资助项目

\* 通讯作者。Tel: 0571-88071024-8593, E-mail: spdeng@zjgsu.edu.cn

液为 1:1 混合的胶原酶 II (1 mg/ml) + 中性蛋白酶 II (3 mg/ml)。无钙 Tyrode 溶液中温育 4~6 min, 用眼科镊将上皮与肌肉层轻轻剥离, 使轮廓状乳头保持完整。实验中还使用了和 1:1 混合的链霉菌蛋白酶 (1.5 mg/ml) + 弹性蛋白酶 (1.5 mg/ml) 与前者进行比较。将剥离的上皮迅速放入新的 Tyrode 溶液中, 用眼科剪将含有轮廓状乳头的区域剪下, 置于冰浴中的 Tyrode 溶液中备用。将所有含有轮廓状乳头的上皮切成大约 1 mm<sup>2</sup> 的小碎片, 放入含有 0.25% 胰蛋白酶和 0.05% EDTA 消化液的培养皿内, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内消化 5~10 min, 消化后得细胞悬液, 光学显微镜下观察, 苔盼蓝染色检测细胞存活率。后接种于包被的 6 孔板 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内静置培养。48 h 后换培养液, 换半量, 此后每隔 5~7 天换一次培养液。倒置显微镜下观察记录培养过程中味蕾细胞的形态变化。每只小鼠大约可以获得 (1~3) × 10<sup>5</sup> 个味蕾细胞。

### 1.3 鉴定

**1.3.1 α-gustducin 的荧光免疫组化** 荧光免疫组化过程: 制作细胞爬片, 4% 多聚甲醛 4 °C 固定 30 min, PBS 冲洗。0.3% Triton X-100 4 °C 温育 15 min, PBS 冲洗。10% 山羊血清 37 °C 封闭 1 h, 不冲洗直接加入一抗 37 °C 2 h 或 4 °C 过夜, PBS 冲洗。加入二抗 (羊抗兔 IgG) 37 °C 避光 1 h, PBS 冲洗; 最后加入 SABC-Cy3 (1:100), 避光温育 30 min 后 PBS 冲洗 4 次, 每次 5 min; 封片。激光共聚焦扫描显微镜 (LCSM Leica SP2, 德国) 进行信号记录。兔抗 α-gustducin 的多克隆抗体 1:200 稀释作为一抗。实验设阴性对照, 一抗用 PBS 代替。

**1.3.2 CK8 ABC 免疫组化** 制作细胞爬片, 4% 多聚甲醛 4 °C 固定 60~90 min。室温 1 份 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 50 份纯甲醇的混合液中浸泡 30 min, 以灭活内源性过氧化物酶, 蒸馏水 1~2 次。后按博士德购买的即用型 SABC 免疫组化试剂盒说明操作。DAB 显色封片后普通光学显微镜下观察。所使用一抗为兔抗 CK8 的单克隆抗体, 稀释度 1:500。实验设阴性对照, 一抗用 PBS 代替。

## 2 结果

### 2.1 味觉上皮分离

通过采用了不同组合的两种混合酶液, 1:1 混合的胶原酶 II (1 mg/ml) + 中性蛋白酶 II (3 mg/ml) 和 1:1 混合的链霉菌蛋白酶 (1.5 mg/ml) + 弹性蛋白酶 (1.5 mg/ml)。经过比较最后本实验采用胶原酶 II + 中性蛋白酶 II 的混合酶液分离舌上皮, 消化时间和酶液用量分别为 4~6 min 和 0.1~0.3 ml, 分离的包含有

三种类型乳头的舌上皮见图 1。

### 2.2 培养过程中味蕾细胞培养的形态变化及 CK8 ABC 免疫酶标染色

小鼠味蕾细胞在短时间培养过程中形态的变化 (图 2)。细胞接种 2 h 后细胞开始贴壁, 24 h 后大部分细胞形态开始变化, 从圆形开始伸展, 72 h 后细胞开始汇集且形态变化明显且部分圆形细胞开始脱壁。培养第 7 天后细胞呈平伸状大部分圆形细胞脱壁。苔盼蓝染色细胞存活率达 90%。7 天后对培养的细胞进行 CK8 ABC 免疫组化, 发现大量细胞仍具有免疫反应, 阳性细胞占细胞总数 30%~40%, 实验时阴性对照无着色。

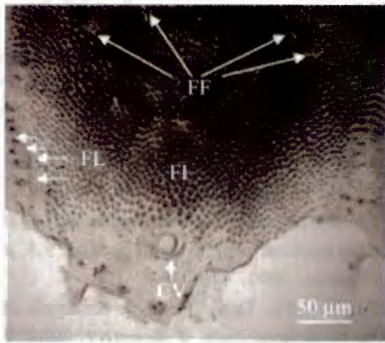
### 2.3 α-gustducin 免疫荧光染色

细胞培养 11 天后进行免疫荧光染色, 结果表明, 部分伸展的梭形细胞呈阳性 (图 3)。粗略计数, 阳性细胞数占细胞总数的 10% 左右, 阴性对照细胞不着色。

## 3 讨论

味觉细胞从基底细胞分化而来, 一般只能存活约 10~14 天, 之后就会被新的细胞替换。很久以来, 由于无法使动物味觉细胞在受控制的实验室环境下存活, 因而味觉细胞的原代培养成功很少, 人们对于味觉细胞分化、成长和转换的认识也一直停滞不前。近几年的味觉细胞培养研究发现给予分离出的味蕾一些特定的培养基, 同时味觉细胞培养基经过特殊处理后, 味觉细胞能够存活 3 天以上。在味觉细胞短期培养中, 去神经支配不会对味觉细胞存活和生理特性有太大的影响。2001 年, Ruiz 等<sup>[6]</sup>分离出大鼠味蕾, 在去神经支配下原代培养。研究结果表明味觉细胞在 37 °C 培养下能够存活 3~4 天。同年, Kishi 等<sup>[7]</sup>采用角化细胞生长培养基 (mKGM), 体外培养了大鼠的味蕾细胞, 体外存活超过 3 天。并且证明了体外培养的味蕾细胞保留有在体味觉细胞的分子和生理特征。2006 年, Ozdener 等<sup>[8]</sup>通过分离大鼠味蕾的基细胞进行味蕾长期培养。但目前鲜有关于小鼠味蕾细胞培养的报道。本实验室通过采用酶消化法分离单细胞对小鼠味蕾细胞进行培养, 获得了较好的效果, 分离的味蕾细胞能够在 37 °C 存活一周以上。与大鼠味蕾细胞培养的结果一致, 小鼠味蕾细胞在培养过程中也不丢失与味觉功能相关联的信号分子和蛋白骨架标记。

本实验中, 采用了胶原酶 II + 中性蛋白酶 II 的混合酶分离上皮, 大大缩短了上皮的温育时间, 减少了对味蕾细胞的活性的影响。先前的味上皮分离过程中酶液的消化时间为 30~70 min。实验中我们也使



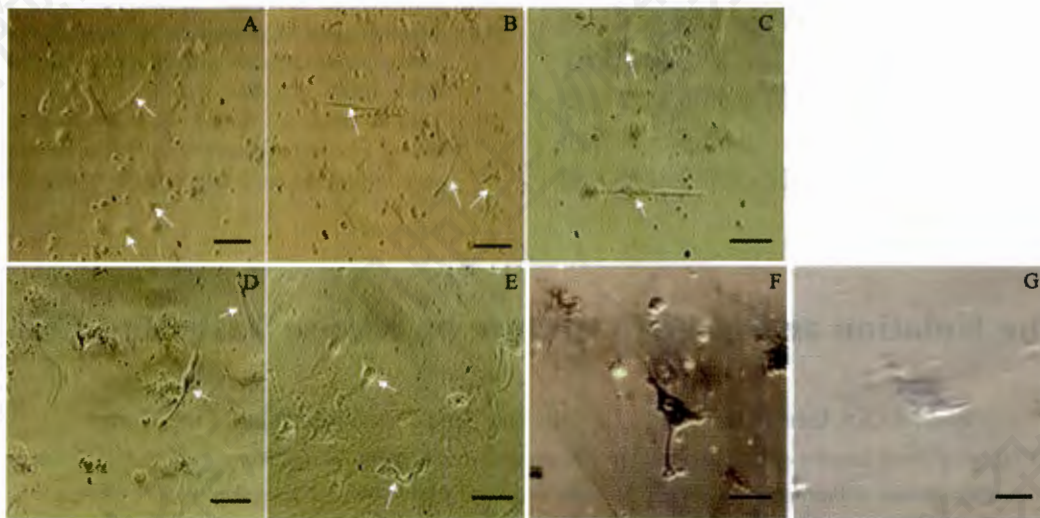
**Fig.1 Structure of lingual epithelium under stereo microscopy**

There are four kinds of papillae in it: fungiform papilla (FF), foliate papilla (FL), circumvallate papilla (CV), filiform papilla (FI).

用链霉菌蛋白酶 + 弹性蛋白酶进行味觉上皮分离两种方法时间上差别较小, 链霉菌蛋白酶 + 弹性蛋白酶液消化的时间较胶原酶 II + 中性蛋白酶 II 稍短。但从消化状态来看, 后者的消化效果更温和, 更利于以后的

味蕾细胞培养。前者消化时皮下会连有其他组织, 这样会造成以后培养中杂细胞的干扰。实验中发现小鼠的年龄的大小和乳头所在的位置的不同, 味觉上皮进行分离所需的时间也不不同, 轮廓状乳头分离需要的时间最长, 并且年龄越小需要的时间越长。

先前人们分离味觉上皮后, 主要通过用 70~100  $\mu\text{m}$  毛细玻璃管扎取味蕾或味觉细胞, 此种方法获取的一次获取的味蕾数量较少, 有时难于满足一次需要大量细胞的实验。本试验用 0.25% 胰蛋白酶与 0.05% EDTA 37  $^{\circ}\text{C}$  联合细胞消化味觉上皮并控制消化时间在 5~10 min 之间获取大量健全的上皮细胞, 苔盼蓝染色计数细胞悬液中细胞存活率达 90%。但胰蛋白酶和 EDTA 联合使用时若消化时间太长, 则会严重影响细胞活力, 导致贴壁和生长能力很差。胰蛋白酶对细胞有较大毒性, 但从经济的角度考虑, 也不失为一种理想的消化酶, 只是在消化过程中要严格控制消化时间, 减少对细胞的毒害。细胞培养获得成



**Fig.2 Morphology of short-term cultured taste bud cells and CK8 in the taste bud cells**

Live taste bud cells (indicated arrowheads) were imaged after 1 d (A), 2 d (B), 3 d (C), 5 d (D), 7 d (E) under microscopy (200 $\times$ ). F and G are the positive and negative immunohistochemistry image of CK 8, respectively. Scale bar A-E=20  $\mu\text{m}$ , F-G=10  $\mu\text{m}$ .



**Fig.3 Results of  $\alpha$ -gustducin immunofluorescence (200 $\times$ )**

A and C the positive and negative image, respectively; cytoplasm of the cells are intensely labeled. B and D phase contrast image. Scale bar A and B=50  $\mu\text{m}$ , C and D=30  $\mu\text{m}$ .

功的另一关键技术就是有效贴壁,我们用大鼠鼠尾胶原包被培养板,大大增加了细胞贴壁效率和接种后的稳定性。

细胞经消化后形态趋于圆形,培养后味蕾细胞的形态异于体内形态。为了证明培养的细胞为味蕾细胞,需要通过味蕾细胞的特异性标记物如 CK8、 $\alpha$ -gustducin 等对其进行鉴定。组化结果表明 CK8 阳性和  $\alpha$ -gustducin 阳性味蕾的细胞数分别为 30%~40% 和 10% 左右。细胞的阳性反应一方面证实了我们培养的细胞为味蕾细胞。另一方面 CK8 阳性细胞个数多于  $\alpha$ -gustducin 阳性个数,是因为 CK8 被认为是成熟和正在成熟味蕾细胞的分子标记<sup>[8]</sup>,而  $\alpha$ -gustducin 是味觉特异性 G 蛋白 gustducin 一个亚基,一种重要的细胞内信号分子,只在味觉细胞的 II 型细胞表达<sup>[9]</sup>。

总之,我们已经初步建立了一种有效的小鼠味蕾细胞分离及体外培养方法,并通过组化染色对其进行鉴定。但为了进一步建立一种小鼠味蕾细胞体外培养体系,我们接下来还将对培养的味蕾细胞的功能特性进行检测,主要通过如下方法:钙影像技术检测味觉物质刺激引起细胞内钙的变化、膜片钳检测动作电位变化以及我们实验室正在开展的用 ITC 检测味觉刺激引起的微热量变化。进一步建立一种小鼠味蕾细胞外培养模型体系,为其在生理生化等方面

的应用打下基础。

### 参考文献(References)

- [1] Jung HS, Akita K, Kim JY. Spacing patterns on tongue surface-gustatory papillae, *Int J Dev Biol*, 2004, 48(2-3): 157-161
- [2] Yee CL, Yang R, Böttger B, et al. "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin, *J Comp Neurol*, 2001, 440(1): 97-108
- [3] Stone LM, Tan SS, Tam PP, et al. Analysis of cell lineage relationships in taste buds, *J Neurosci*, 2002, 22(11): 4522-4529
- [4] Farbman AI. Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae, *Cell Tissue Kinet*, 1980, 13(4): 349-357
- [5] Ozdener H, Yee KK, Cao J, et al. Characterization and long-term maintenance of rat taste cells in culture, *Chem Senses*, 2006, 31(3): 279-290
- [6] Ruiz CJ, Stone LM, Mcpheeters M, et al. Maintenance of rat taste buds in primary culture, *Chem Senses*, 2001, 26(7): 861-873
- [7] Kishi M, Emori Y, Tsukamoto Y, et al. Primary culture of rat taste bud cells that retain molecular markers for taste buds and permit functional expression of foreign genes, *J Neurosci*, 2001, 106(1): 217-225
- [8] Asano-Miyoshi M, Hamamichi R, Emori Y, et al. Cytokeratin 14 is expressed in immature cells in rat taste buds, *J Mol Hist*, 2008, 39(2): 193-199
- [9] Yang R, Tabata S, Crowley HH, et al. Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cells in the rat, *J Comp Neurol*, 2000, 425(11): 139-151

## The Isolation and *in Vitro* Culture of Mouse Taste Bud Cells

Yu-Mei Qin, Gen-Hua Zhang<sup>1</sup>, Jin-Qin Shi, Teng-Hao Wang, Shao-Ping Deng\*

(College of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China;

<sup>1</sup>Department of Biological Science, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

**Abstract** The lingual epithelium of ICR mouse was utilized for this study. The isolated taste bud cells were cultured in rat tail collagen type I-coated cultured plate with IMDM. Phase contrast microscopy was used to record their morphological changes during culture. Immunohistochemistry and immunofluorescent staining was performed to identify taste bud cells. Results showed that taste bud cells changed their morphology after culturing for more than one week, but still retained such molecular markers as: 1)  $\alpha$ -gustducin which is involved in intracellular signaling, 2) cytokeratin 8 which is a component of cytoskeleton. These results demonstrated that a primary method might be thus established to separate taste bud cells from the circumvallate of ICR mouse and to culture them *in vitro* so as to provide an effective way to study their physiological and biochemical characteristics.

**Key words** taste bud cells; primary culture; taste papillae;  $\alpha$ -gustducin; cytokeratin 8

Received: June 24, 2008 Accepted: September 28, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30770536) and the Scientific Research and Innovation Foundation of Zhejiang Gongshang University

\*Corresponding author. Tel: 86-571-88071024-8593, E-mail: spdeng@zjgsu.edu.cn