

新生大鼠小肠上皮细胞分离培养研究*

戴定威 吴圣楫 李 敏 廖贤平** 刘再涌

(上海第二医科大学附属新华医院、上海市儿科医学研究所 200092)

体外培养小肠上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC)对于研究 IEC 生长、分化、代谢及各种致病因素所致肠粘膜病理改变的发病机制都有重要意义。组织培养技术发展虽然很快,但对正常 IEC 培养仍存在很多困难^[1]。Kondon 等都强调很难维持 IEC 体外增殖,IEC 存活时间短^[2]。有学者采用来自人类结肠腺癌上皮细胞株作为研究模型^[3,4],但腺癌 IEC 与正常 IEC 存在许多差异。最近 Evans 等建立了大鼠 IEC 原代培养方法,能使 IEC 的结构和功能得到较好的保持^[5],为应用 IEC 细胞模型创造了条件。国内尚无 IEC 培养的报道,我们参考 Evans^[5]和 Gibson^[6]介绍的方法,成功地建立了新生大鼠 IEC 分离培养方法。

材 料 和 方 法

1. 动物和组织

雌性或雄性 Wistar 大鼠,出生后 6 天内,购自中科院上海实验动物中心。拉颈或断头处死大鼠,在无茵条件下,取下整个小肠,去除肠系膜,将肠管置于无钙镁的 Hanks 液中,备用。

2. 试剂和药品

胶原酶 I 型、粗胶原酶 II 型、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、肝素为 Sigma 公司产品, Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)、胎牛血清(FCS)、谷氨酰胺(GLN)、丙酮酸钠等为 Gibco 公司产品,中性蛋白酶 I 型(Boehringer mannheim, 西德),山梨醇(上海试剂二厂)、青霉素(上海第二制药厂),链霉素(上海第三制药厂)。

3. 培养器皿

玻璃培养瓶、24 孔培养板、盖玻片用 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 牛皮胶原(Vitrogen 胶原公司)或鼠尾胶原 I 型(Sigma)涂膜,即将溶液保存于瓶或孔内置孵箱内过夜,而后弃去,空气干燥备用。

4. 培养液配制

在 DMEM 中加入 10%FCS、20 ng/ml EGF、1 mmol/L GLN、2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 胰岛素、1 mmol/L 丙酮酸钠、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肝素、100 IU/ml 青霉素、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素。用 0.22 μm 微孔滤膜正压滤过灭菌,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

5. IEC 分离和培养

①纵行剪开肠管、再剪成 2—3mm 长小片,用 Hanks 液洗 4 次。②将肠组织片剪成 1 mm^3 大小,加入 50 ml 酶液(以粗胶原酶加中性蛋白酶为例),见表 1,震荡 20 分钟,溶液变混浊,在倒置显微镜下观察,至少有 25%肠绒毛分离。③用滴管轻轻吹打 3—5 分钟后,镜检可见大约 50%肠绒毛已分离。④将溶液转入 50 ml 塑料离心管中,再加入 15 ml C 液(含 5%FCS、2%山梨醇的 DMEM 培养液),混匀,静置 1 分钟,吸取上清液,上清液含细胞团和细胞碎屑,再在原离心管中加入 15 ml C 液,重复上述步骤 4 次,收集上清液,最后弃去沉淀(含大量环形肌和未消化的肠组织)。⑤上清液离心(200—300 rpm)2 分钟,得沉淀;沉淀物再次悬浮于 30 ml C 液中,重复上述过程 6 次。⑥将细胞沉淀悬浮于培养液内,种植于培养瓶或 24 孔培养板中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。48 小时后更换培养液,以后每 72 小时换液一次。

6. 形态学检查

①在倒置显微镜下活体观察 IEC 生长状态、形态变化。②甲醇固定玻片上 IEC, Giemsa 染色、镜检、摄影。③电镜标本用 2.5%戊二醛、四氧化锇固定、脱水, Epon 812 包埋, LKB 型超薄切片机切片,乙酸铀和柠檬酸铅双重染色, H-500 型透射电子显微镜下观察、摄影。

7. 生长曲线绘制

按常规方法^[7]。

8. 免疫组化检查

吸出 24 孔板孔内培养液,用无血清培养液清洗两

* 上海市高等学校科学技术发展基金资助项目

** 博士研究生,现在广东省武警总队医院工作。

表 1 IEC 分离方法及效果

分离方法	温度℃	时间(min)	结 果
0.125%胰蛋白酶	20	60	绝大部分为单细胞, 很少细胞团, 少量细胞生长, 不能增殖。
526 u/ml 胶原酶 I 型	37	100	绝大部分为细胞团, 少量上皮单位, 细胞贴壁良好。
263 u/ml 胶原酶 I 型 + 0.1 mg/ml 中性蛋白酶 I 型	25	90	大多为细胞团, 细胞贴壁能力强, 生长好。
300 u/ml 胶原酶 XI 型 + 0.1 mg/ml 中性蛋白酶 I 型	20	25	含完整上皮单位, 极少单细胞, 细胞贴壁能力强, 生长良好。

次, 然后用 95%乙醇固定, 滴加 1:20 兔血清、1:100 细胞角质蛋白或上皮细胞膜抗原抗血清(Dako 公司、丹麦)、1:400 生物素化兔抗鼠免疫球蛋白、1:400 SA-HRP (链霉菌抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶), DAB(3, 3-二氨基联苯胺 Tris 缓冲液)显色、苏木精复染、脱水、透明、封固、镜检。阳性部位有棕色沉淀。对照试验: 不滴加抗血清或应用肺成纤维细胞和血管内皮细胞。

9. 碱性磷酸酶显示

用 Hanks 液洗细胞 3 次, 冷丙酮固定, 放入酶反应基质液(2% 巴比妥钠 5 ml、3%β-甘油磷酸钠 5 ml、2% 硝酸钙 10 ml、2% 硫酸镁 5 ml、蒸馏水 25 ml, pH 9.2—9.4), 蒸馏水洗细胞, 置入 2% 硝酸钙中 2 分钟, 再入硝酸钴中 2 分钟, 蒸馏水洗、干燥、封固、镜检。

结 果

1. IEC 分离

见表 1。联合应用粗胶原酶和中性蛋白酶消化新生大鼠小肠组织块可获得最好的分离效果, 所用酶浓度低、消化时间短, IEC 以健全绒毛隐窝单位分离(图版图 1, 2), 细胞贴壁生长良好。消化分离 1 只新生大鼠小肠组织所获细胞可种植 1 块 24 孔培养板。

2. IEC 生长状态和形态特征

在倒置显微镜下观察原代培养 IEC, 可见培养细胞 1—2 天贴壁、7—8 天明显增殖、10—14 天汇合成片(图 1、图版图 3)。IEC 呈单层生长, 互不重叠, 细胞呈多角形或卵石状, 边界清楚, 胞浆丰富, 核为圆形或卵圆形, 核内染色质稀疏空亮, 核仁 1—2 个。显微镜下还可见少量平滑肌细胞、成纤维细胞和神经胶质细胞。透射电镜下可见 IEC 表面有

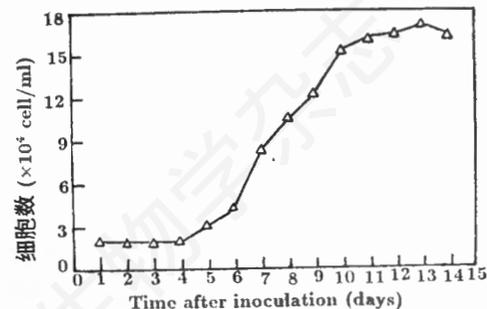


图 4 原代培养新生大鼠 IEC 生长曲线图
培养时间(天)

大量微绒毛, 细胞内有丰富的线粒体和内质网(图版图 4 A、4 B)。体外培养两天, 细胞间的紧密联结已不明显。

3. 免疫组化及组化检查

在培养第 4 天、第 10 天, 细胞角质蛋白、上皮细胞膜抗原染色, 90% 以上细胞呈阳性(图版图 5), 而抗血清空白对照细胞、肺成纤维细胞及血管内皮细胞染色均为阴性。碱性磷酸酶显示, 90% 以上细胞呈黑色反应(图版图 6)。

讨 论

本研究选用新生 Wistar 大鼠的小肠组织。采用刚出生、未吃奶或饮水的最好, 因为此时肠腔内无微生物, 避免了主要的感染来源, 在分离过程中可减少最后离心沉淀次数(步骤⑤)离心 2—3 次即可。而采用已进食过的大鼠, 在 Hanks 清洗液, C 液和培养液中加入适量抗生素, 最后增加低速离心沉淀次数(5—6 次), 清除悬浮的微生物和单细胞, 也可防止微生物污染, 使培养易于成功。

分离 IEC 有酶消化法和机械收集法。在

酶消化法中,常用的酶有胶原酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶,前两种酶对细胞毒性小,能获得较多细胞,是比较理想的消化酶。用胰蛋白酶虽然也能获取较多细胞,但对细胞毒性大,IEC存活时间短不增殖。本研究中,以胶原酶Ⅱ型与中性蛋白酶Ⅰ型联合应用分离IEC效果最好,见表1。单用胶原酶Ⅰ型虽然也能取得良好效果,但消化时间长。出生6天的大鼠肠道已形成钝绒毛,隐窝尚未发育好(图版图1)。在联合酶消化后再轻轻吹打,即可释放大量绒毛隐窝单位,并有少量间质细胞附着(图版图2)。我们认为:IEC以完整绒毛隐窝单位分离是纤维IEC体外生长增殖的一个关键因素,因为细胞间存在相互作用^[2,8]。实验中我们还体会到,掌握酶的浓度和消化时间很重要。不同公司出品的酶活力也有差异,应在实验中摸索最适浓度和消化时间。提高酶浓度或延长消化时间虽然能获取更多细胞,但同时增加了损伤细胞的机会,并易使肠组织其他细胞混入,使IEC培养不纯。对活力较低的酶,联合应用可缩短消化时间,取得更佳的分选效果。

IEC体外培养对培养液质量、成分和外环境条件要求较高。我们的体会是:1. 培养液中血清质量很重要,小牛血清不能维持原代培养IEC生长增殖。FCS以2.5—5%为宜,浓度过低不能维持IEC生长,过高则促进异源性细胞(平滑肌细胞和成纤维细胞)增殖。2. 在培养液中加入适量细胞生长因子可促进IEC生长。EGF对于促进IEC贴壁很重要,它与胰岛素合用对促进IEC生长增殖有协同作用^[5]。GLN对IEC有特殊营养作用,EGF促进IEC增殖必须有GLN参与^[9]。我们在培养液中加入EGF 20 ng/ml、GLN 1 mmol/L能很好维持IEC生长。3. IEC生长最适pH值为7.2—7.4,我们的体会是,如开始时pH稍低一点(7.2左右),更利于细胞贴壁生长。4. IEC贴壁生长对细胞外基质要求甚高。盖玻片或未使用过的新玻璃培养瓶经胶原涂膜后,表面性状得以改善,有利于IEC贴壁生长。未经涂

膜者IEC贴壁生长不良。如没有鼠尾胶原或牛皮胶原,我们在玻璃培养瓶或已放置盖玻片的24孔培养板内加入适量含20%FCS培养液,留置1—2天,使用前吸出培养液,再种植细胞,这也是促进细胞贴壁生长十分有效的方法,因为血清中含有玻璃体结合蛋白和纤维结合素,这两者均促进IEC贴壁。使用塑料培养瓶或培养板,IEC易于贴壁生长,可省去涂膜。

IEC鉴定有如下依据^[1,2,5,10]: 1. 倒置显微镜下,细胞呈多角形、单层排列。2. 电镜下,细胞表面可见大量微绒毛。3. 免疫组化检查,细胞角质蛋白染色阳性。4. 组化检查显示有IEC标志酶——碱性磷酸酶表达。我们的培养如实验结果中所述与上述文献报告结果一致,可确定为IEC。

IEC单层培养技术可以探讨某一因子对IEC的作用,本实验结果为研究IEC的功能、代谢及病理变化提供了一个良好的实验模型。

摘 要

本实验比较了4种分离大鼠IEC的方法,结果显示联合应用粗胶原酶和中性蛋白酶分离效果最好,细胞贴壁生长能力强。胶原涂膜改善玻璃培养瓶或盖玻片表面的性状有利于细胞贴壁生长。细胞的增殖依赖于培养液的质量、成分及细胞间的相互作用。培养细胞一般1~2天贴壁,7~8天明显增殖,10~14天汇合成片。培养细胞细胞角质蛋白、碱性磷酸酶染色阳性,光镜和电镜检查均显示为IEC。本文所建立的新生大鼠IEC体外培养方法为研究IEC生理和病理提供了一个十分有用的实验模型。

关键词: 小肠上皮细胞 分离技术 原代培养 大鼠

参 考 文 献

[1] Kedinger M, Hafen K, and Simon AP,

- 1987, *Differentiation*, 36: 71—85.
- [2] Kondon Y, Rose I, Young GP, et al., 1984, *Exp Cell Res.*, 153: 121—134.
- [3] Hu M, Borchardt RT., 1992, *Biochim Biophys Acta.*, 1135: 233—244.
- [4] Sanderson IP and He Y., 1994, *J. Nutr.*, 124: 131s—137 s.
- [5] Evans GS, Flint N, Somers AS, et al., 1992, *J. Cell Sci.*, 101: 219—231.
- [6] Gibson PR, Vande, PEL, Maxwell LL, et al., 1989, *Gastroenterology*, 96: 283—291.
- [7] 鄂征主编, 1993年, 组织培养技术, 第153—154页, 北京: 人民卫生出版社, 第2版。
- [8] Kedinger M, Simon AP, Alexandre E, et al., 1987, *Cell Differ.*, 20: 171—182.
- [9] Ko TC, Daniel BR, Townsend CM, et al., 1993, *Surgery.*, 114: 147—154.
- [10] Negrel R, Pampal P, Nano JL, et al., 1983, *Exp Celi Res.*, 143: 427—437.

STUDIES ON ISOLATION AND PRIMARY CULTURE OF NEONATE RAT INTESTINAL EPITHELIAL CELL

DAI Ding Wei, WU Sheng Mei, LI Min, LIAO Xian Ping, LIU Zai Yong

(Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092)

ABSTRACT

Trypsin, collagenase I and combined dispase (grade I) and collagenase I or collagenase XI were used to isolate neonate rat intestinal epithelial cell (IEC) and the results were compared and the optimal culture conditions were determined. We developed the technique of isolation and primary culture of neonate rat IEC. The results showed that satisfactory isolation of the epithelia and good attachment were achieved by using the collagenase XI dispase (grade I) digestion. Coating the glass culture flasks with bovine dermal collagens or rat tail tendon collagens I was beneficial to the attachment of IEC in culture. IEC proliferation in vitro is initially dependent upon the factors produced by heterogeneous mesenchymal cells, also critically dependent upon the quality of the culture medium and constituents used. IEC attached within 1—2 days, proliferated obviously at 7—8 days. Cultures reached confluence within 10—14 days. Immunocytochemical characterization showed that more than 90% attached cells were positive for cytokeratin and epithelial cell membrane antigen. Histochemical staining for alkaline phosphatase (AKP) revealed that AKP activity was expressed in more than 90% attached cells. Electronmicroscopy confirmed apical microvilli in IEC. The results provide a very useful experimental model to study physiology and pathology of IEC.

Key words, Intestinal epithelial cell Isolation Primary culture Rat

产品介绍

DNA 序列合成——PCR 引物, DNA 探针、接头、随机引物等

为了进一步满足众多的科研和临床检验人员对各种寡聚核苷酸的要求, 本所癌基因室(ONCO-LAB)在国内首家购进了世界上先进的德国 ECOSYN 系列 DNA 合成仪, 合成效率高、质量绝对保证、价格合理(14元/碱基, 10 OD₂₆₀左右, 纯化)、短期交货(3—7天)。

聚合酶链式反应(PCR)和定点突变技术的发明, 给现代生物学及医学注入了全新的活力, 本所癌基因室(ONCO-LAB)雄厚的DNA合成技术力量和丰富的经验将为您的临床诊断、目标基因克隆、突变分析、反义战略研究及新型药物开发提供全新服务。另有 DD-PCR(差异显示PCR)全套引物盒及通用测序引物供应。

联系人: 胡拥军 徐链史 璨 联系地址: 上海市岳阳路320号上海细胞生物研究所605室
邮编: 200031 联系电话: 021-64336896(直线) 传真(FAX): 021-64331090(请注明本室联系人, 以免延误)