

鸡胚小肠上皮细胞的分离 及原代培养研究

洪智敏¹, 贾永杰¹, 瞿明仁¹, 黎观红^{1*}, 刘思国^{2*}

(1. 江西农业大学/江西省高等学校动物营养与饲料重点实验室, 江西 南昌 330045; 2. 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:取 18 日龄的 SPF 鸡胚, 分别采用组织块培养法、胰蛋白酶、胶原酶 I 和嗜热菌蛋白酶消化法分离和体外培养小肠上皮细胞。结果表明: 组织块培养法所获得的上皮细胞纯度较低; 胰蛋白酶消化后多为单细胞, 细胞贴壁和生长能力较弱; 胶原酶 I 单独消化 50 min 或嗜热菌蛋白酶单独消化 110 min 以及胶原酶 I、嗜热菌蛋白酶联合消化后均可得到大量隐窝细胞团块, 经低速离心去除单细胞、差速贴壁除去成纤维细胞, 可获得较纯的上皮细胞。分离的细胞接种培养 12~24 h 贴壁, 48~72 h 细胞团中的细胞向四周蔓延, 形成一群群的细胞集落, 6~7 d 细胞汇合成片, 成“铺路石样”, 细胞多呈扁平多角状、椭圆状, 单层生长, 边界清晰, 互不重叠。经形态学观察、扫描电镜鉴定、碱性磷酸酶染色和免疫组化鉴定为上皮细胞。

关键词:鸡小肠上皮细胞; 分离; 原代培养; 鸡胚

中图分类号: S831.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)06-1164-07

Isolation and Primary Culture of Chicken Embryo Small Intestinal Epithelial Cells

HONG Zhi-min¹, JIA Yong-jie¹, QU Ming-ren¹, LI Guan-hong^{1*}, LIU Si-guo^{2*}

(1. Key Laboratory of Jiangxi University for Animal Nutrition and Feed/Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: Eighteen-day-old chicken embryos were used to investigate the method for isolation and primary culture of the chicken intestinal epithelial cells. Primary small intestinal epithelial cells from chicken embryo were isolated by means of tissue culture, trypsin digestion, collagenase I digestion and thermolysin digestion, respectively. The results indicated that the epithelial cells obtained by tissue culture method had low purity. They mostly became single cell after trypsin digestion. Cell adhesion and growth were weak. A large number of crypt cell clumps could be obtained by digesting small intestinal tissue with collagenase I for 50 min or thermolysin for 110 min or collagenase I, thermolysin protease co-digestion. Single cells and fibroblast cells were removed by low-speed centrifugation and differential velocity adherent, and thus purified intestinal epithelial cells were obtained. The isolated intestinal epithelial cells were inoculated into cell culture dishes and attached readily to culture dishes within 12-24 h, forming coalescing colonies of epithelium within 48-72 h.

收稿日期: 2011-05-11 修回日期: 2011-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800791)和江西省青年科学家培养对象计划项目(赣科发计字[2010]209号)

作者简介: 洪智敏(1984—), 女, 硕士生, 主要从事动物营养与饲料研究, E-mail: pczhimin@163.com; * 通讯作者: 黎观红, 副教授, 博士, 硕士生导师, E-mail: liguanh@163.com; 刘思国, 博士, 研究员, E-mail: siguo_liu@hvri.ac.cn。

Epithelial cells reached confluence within 6–7 days resembling paving stones. The cultured cells were identified as small intestinal epithelial cells by morphological observation, scanning electron microscope observation, alkaline phosphatase staining and immunohistochemical characterization.

Key words: small intestinal epithelial cells; isolation; primary culture; chicken embryo

肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IEC)作为体内更新最快的一类细胞,是肠道内外环境的媒介,又是机体免疫屏障的重要组成部分,具有消化、吸收、分泌、免疫等重要的生理功能^[1]。IEC在一定条件下可进行体外分离和培养。体外分离培养 IEC 对于研究肠道生物学功能、营养物质吸收机制及其调控以及肠上皮细胞增殖、分化和凋亡提供了简单、快速和准确的手段,并为研究营养素及其他外界因素对肠上皮的作用提供了理想的体外模型。但肠上皮细胞的分离培养难度较大,能成功建立单克隆肠上皮细胞系的报道较少。

长期以来,在研究 IEC 的生物学功能、细胞增殖和分化的调控因素,物质吸收与代谢等多采用肠道癌细胞系如 Caco-2、HT-29 和 T-84 为实验模型^[2-3]。然而肠道癌上皮细胞与正常上皮细胞在细胞基本结构、代谢和功能特性等方面存在一定的差异,以癌细胞系的研究结果来解释正常细胞的行为存在很大的局限性。所以,研究正常 IEC 的分离方法和培养条件就显得格外重要。目前,国内外学者对人、鼠、猪、兔等肠上皮细胞进行了分离培养研究,并成功建立了一些肠上皮细胞系^[4-7]。然而,有关鸡小肠上皮细胞分离和体外培养及成功建立细胞系则鲜见报道。为此,本实验采用鸡胚小肠,通过摸索鸡胚小肠上皮细胞分离方法和最适培养条件,并进行形态学观察和免疫组化鉴定,建立鸡小肠上皮细胞的体外原代培养方法,为研究外界因素对鸡小肠上皮细胞结构、功能变化及其调控提供研究模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 18 日龄无特定病原(specific pathogen free, SPF)鸡胚,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% Trypsin-EDTA 酶溶液,购自 Gibco 公司;表皮生长因子(EGF)、肝素钠、胰岛素、胶原酶 I、嗜热菌蛋白酶、青霉素-链霉素、二甲基亚砜(DMSO),购自 Sigma 公司;D-Hanks 液,购自北京索莱宝生物科技有限公司;细胞角蛋白鼠抗鸡角蛋白单克隆抗体,购自 Abcam 公司;SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒、多聚赖氨酸,购自武汉博士德公司。其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器与设备 生物安全柜(Thermo Scientific Forma 1200,美国 Thermo fisher 公司)、二氧化碳培养箱(HF90,香港 Heal Force 公司)、倒置显微镜(CKX31,日本 OLYMPUS 公司)、台式离心机(5804R,德国艾本德公司)、电热恒温水浴锅(DK-8D,上海森新实验仪器有限公司)、酶联免疫检测仪(ELX800,美国 BioTek 公司)。细胞培养瓶、培养板 0.22 μm 滤膜,购自美国 Costar 公司。

1.1.4 试剂配制 碱性磷酸缓冲液(PBS: NaCl 8.0 g, KH₂PO₄ 0.2 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g): 量取去离子水 900 mL 溶解以上,调 pH 值为 7.4 后定容至 1 L,121 °C 高压灭菌 20 min 后,室温保存。DMEM 完全培养液: φ = 5% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS),10 ng/mL EGF,100 μg/mL 肝素钠,5 μg/mL 胰岛素。D-Hank's 液: 添加青霉素-链霉素 终浓度为: 青霉素 200 U/mL,链霉素 200 U/mL。碱性磷酸酶孵育液: ρ = 2% β-甘油磷酸钠 2.5 mL, ρ = 2% 巴比妥钠 2.5 mL, ρ = 2% 氯化钙 2.5 mL, ρ = 2% 巴比妥钠硫酸镁 0.2 mL、蒸馏水 0.3 mL 一次混合后,调 pH 值为 9.2~9.4。四甲基偶氮唑盐(MTT)溶液: 0.5 g MTT 溶于 100 mL PBS 溶液中,在磁力搅拌机上搅拌至溶解,0.22 μm 滤膜过滤除菌,分装 4 °C 避光保存。分装后放 -20 °C 长期保存。4% 多聚甲醛固定液: 称取 4 g 多聚甲醛粉末,溶于 100 mL 去离子水中,放入 37 °C 恒温摇床中,16~24 h 完全溶解,调 pH 值为 7.2,0.22 μm 滤膜过滤除菌,固定液最好现配现用。ρ = 2% 硝酸钴水溶液: 硝酸钴 2 g,蒸馏水加至 100 mL。

1.2 方法

1.2.1 小肠上皮细胞的分离与培养 (1) 组织块培养法。将孵育 18 日龄 SPF 鸡胚用酒精棉擦拭,并

将大头朝上放置在蛋座上,用已消毒的金属器具轻轻将鸡蛋大头击破,用镊子夹去破碎的蛋壳,弯头镊子撕去气室膜,用镊子夹住鸡胚颈部,将其拖出放入干净无菌的培养皿中,备用。在无菌条件下取出整条小肠,小心去除肠系膜,用D-Hank's液清洗2~3次,将小肠剪成小于 1 mm^3 的组织块,加入D-Hank's液清洗,清洗液中加入浓度为 500 U/mL 左右的双抗(青霉素-链霉素),静置 1 min ,反复洗2~3次至上清液澄清,吸弃洗液,清洗干净的组织块备用。

将组织块均匀放置在瓶底,轻轻翻转培养瓶,使瓶底朝上,加入少量培养液,将培养瓶倾斜放置在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\varphi=5\%\text{ CO}_2$ 饱和湿度培养箱静置培养。培养2~4 h,待小块黏附后,再将培养瓶缓慢翻转平放,加入适量的培养液,动作要轻,以防由于晃动而使小块漂起,第2天再补足培养液,48 h后换液。以后每2 d换液。

(2) 酶消化法。采用3种消化酶4种消化法:5~10倍体积的胰蛋白酶消化15~30 min;20倍体积嗜热菌蛋白酶消化110 min;20倍体积胶原酶I消化50 min;嗜热菌蛋白酶及胶原酶I联合消化,其中胶原酶I消化20 min后离心再加嗜热菌蛋白酶消化60 min。4种消化法均是将消化酶液及肠组织移入三角瓶于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中慢速振荡消化,期间不断观察小肠粘膜的消化情况,小肠粘膜为蜂窝空泡状时终止消化,小心吸弃消化液,加入完全培养液反复吹打5~10次,吹打时要轻柔,尽量减少气泡的产生,气泡破碎时会对细胞产生较大的机械损伤。 $1\ 000\text{ r/min}$ 离心6 min,去除残余的消化液,沉淀用培养液悬浮,轻轻吹打5~10次, $1\ 000\text{ r/min}$ 离心6 min,重复1次,尽量离去单细胞,最终沉淀用完全培养液悬浮,并用4层纱布过滤,滤过未消化完全的组织块,收集隐窝细胞团块,液接种于 75 cm^2 培养瓶中,差速贴壁培养,成纤维细胞在培养10 min左右就开始贴壁,90 min后将细胞按一定浓度接种于 25 cm^2 及6孔板中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\varphi=5\%\text{ CO}_2$ 饱和湿度培养箱静置培养24~48 h后换液,以后每两天换液。

1.2.2 细胞生长与增殖 由于经消化得到的上皮细胞多为隐窝细胞团,无法在显微镜下计数,经过几次实验摸索得出一个鸡胚消化得到的隐窝细胞团接种于一个6孔板或96孔板较适宜。在培养不同的时间后,采用MTT比色法测定细胞活力,每次实验设3孔重复,用酶标仪于 490 nm 测定吸光度(OD值),以时间为横坐标,OD值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.3 小肠上皮细胞形态学观察 倒置相差显微镜观察:在细胞生长到一定阶段后,用相差显微镜观察细胞生长状况及形态变化,并拍照。透射电镜观察:将培养至第5天的细胞离心制成细胞团,用 $\rho=2.5\%$ 戊二醛磷酸盐缓冲液固定,超薄切片,透射电镜观察。

1.2.4 小肠上皮细胞鉴定 (1) 碱性磷酸酶活性鉴定。以一定浓度接种鸡胚小肠上皮细胞, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $\varphi=5\%\text{ CO}_2$ 培养箱中培养至铺满单层。取出盖玻片,PBS清洗3次,最后一次清洗时尽可能去除残余液体。用预冷的丙酮固定10 min,吸弃固定液,用PBS洗3次,室温晾干。将盖玻片放入碱性磷酸酶孵育液(预热至 $37\text{ }^\circ\text{C}$)于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育1~2 h。再用蒸馏水洗3次,每次1 min。 $\varphi=1\%$ 冰醋酸略洗,然后蒸馏水浸洗2次,每次1~2 min,再置入 $\rho=1\%$ 硫化铵溶液处理1 min,流水冲洗数分钟后,脱水,封固。

对照组处理方法:另配一碱性磷酸酶孵育液,其中 β -甘油磷酸钠用等量蒸馏水代替,其它操作方法同上。阳性细胞被染成棕黑色,阴性细胞则不着色。每张细胞爬片选择3个视野,每个视野计数100个细胞,选择3张细胞爬片进行计数,得出阳性细胞的百分率,即上皮细胞的百分比。

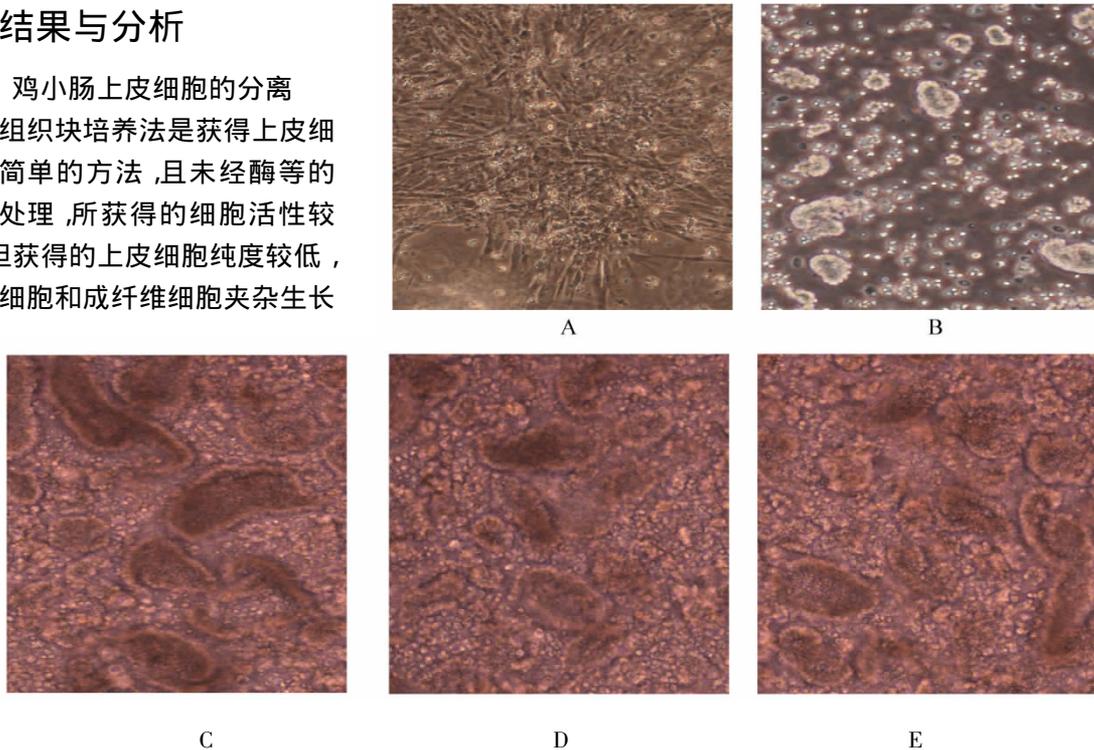
(2) 免疫组化法鉴定。细胞角蛋白为上皮组织的特征性抗原成分^[8],小肠黏膜消化分离下来的主要有上皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞,而成纤维细胞和平滑肌细胞角蛋白呈阴性,所以免疫组化检测到的阳性细胞即可鉴定为上皮细胞。免疫组化法鉴定按照博士德公司免疫组化试剂盒说明进行,步骤如下:

①小肠上皮细胞培养至铺满单层时取出盖玻片,PBS清洗3次,而后用 4% 多聚甲醛固定30 min,吸弃固定液,用PBS洗3次,室温晾干;②加入 $\varphi=3\%\text{ H}_2\text{O}_2$ 与无水甲醇的混合液(浓度比为1:50),室温浸泡30 min,PBS洗1~2次;③滴加 $\varphi=5\%\text{ BSA}$ 封闭液,室温封闭20 min,甩去多余液体,不洗;④加入1:150倍稀释的鼠抗鸡角蛋白单克隆抗体, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 1~2 h,PBS洗2 min \times 3次。空白对照滴加等量的PBS代替一抗,其余步骤相同;⑤加入生物素化山羊抗小鼠IgG,室温下20 min,PBS洗2 min \times 3次;⑥滴加试剂SABC,20~ $37\text{ }^\circ\text{C}$ 20 min,PBS洗5 min \times 4次;⑦DAB显色:取1 mL蒸馏水,加试剂盒中A、B、C试剂各1滴,混匀后加至切片。室温显色,镜下控制反应时间,一般在5~30 min,若无背景出现,则可继续选色;蒸馏水洗涤以终止反应;⑧脱水,透明,封片,显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 鸡小肠上皮细胞的分离

组织块培养法是获得上皮细胞最简单的方法,且未经酶等的反复处理,所获得的细胞活性较强,但获得的上皮细胞纯度较低,上皮细胞和成纤维细胞夹杂生长



A: 组织块培养 3 d IEC 倒置显微镜 (100 ×); B: 胰蛋白酶消化获得的 IEC 倒置显微镜图 (100 ×); C: 胶原酶 I 消化获得 IEC 倒置显微镜图 (100 ×); D: 嗜热菌蛋白酶消化获得 IEC 倒置显微镜图 (100 ×); E: 胶原酶 I + 嗜热菌蛋白酶联合消化获得 IEC 倒置显微镜图 (100 ×)。

A: Photograph of IEC obtained by tissue culture (100 ×); B: Photograph of IEC obtained by digestion with 0.25% Trypsin-EDTA at 37°C for 25 min under inverted phase contrast microscope (100 ×); C: Photograph of IEC obtained by digestion with collagenase I at 37 °C for 50min under inverted phase contrast microscope (100 ×); D: Photograph of IEC obtained by digestion with thermolysin at 37 °C for 110min under inverted phase contrast microscope (100 ×); E: Photograph of IEC obtained by digestion with collagenase I and thermolysin at 37°C for 80min under inverted phase contrast microscope (100 ×) .

图1 鸡胚小肠上皮细胞的分离

Fig.1 Isolation of chicken embryo intestinal epithelial cell (IEC)

(图1A)。本研究分别利用小肠组织块培养及3种消化酶对18-19日龄鸡胚小肠进行消化培养,其中胰蛋白酶37℃消化15~30 min,得到的多为单细胞,少量细胞团,细胞贴壁和生长能力较弱(图1B)。胶原酶I 37℃单独消化50 min、嗜热菌蛋白酶37℃单独消化110~120 min或胶原酶I 37℃消化20 min + 嗜热菌蛋白酶37℃消化60 min联合消化后均可得到大量细胞隐窝

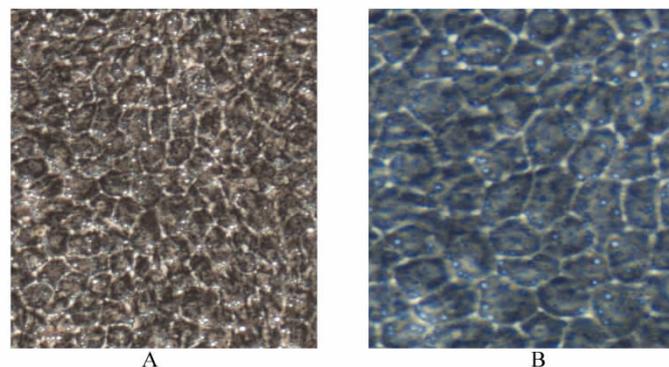


图2 鸡胚肠上皮细胞呈铺路石样生长(A: 200 ×; B: 400 ×)

Fig.2 Pavement growth of IEC isolated from chicken embryo A: 200 ×; B: 400 ×)

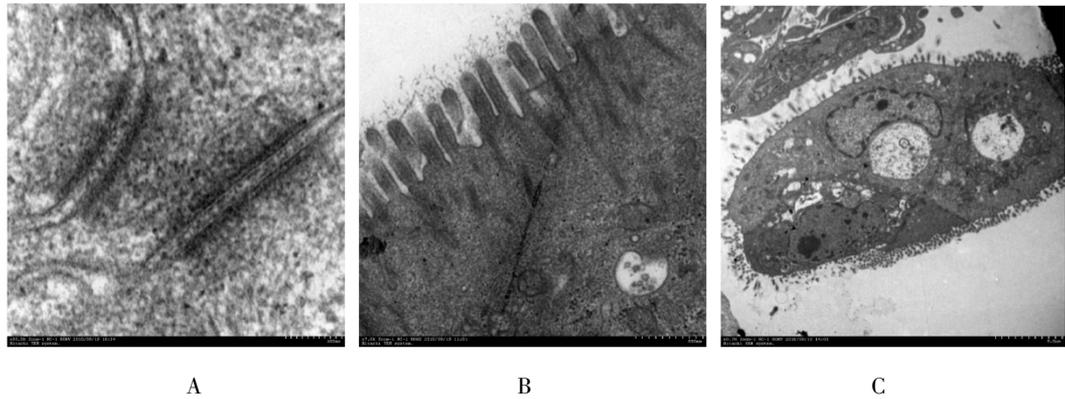
细胞团块,贴壁生长后增殖速度快,经纯化后主要为上皮细胞(图1C、D、E)。其中单独使用胶原酶I消化时间最短,获得上皮细胞活性强,并且避免多种酶联合消化过程中可能带来的污染问题,因此后期实验主要采用胶原酶I消化鸡胚小肠组织而获得肠上皮细胞。

2.2 鸡小肠上皮细胞形态特征

IEC 细胞在完全培养基中于 37 °C、 $\varphi = 5\% \text{CO}_2$ 条件下培养,倒置显微镜下观察上皮细胞在 12 ~ 24 h

贴壁 48 ~ 72 h 细胞团中细胞向四周蔓延 形成一群一群的细胞集落 5 ~ 6 d 细胞汇合成片成“铺路石样”细胞,多呈扁平多角状,卵石状、椭圆状,上皮细胞单层生长,边界清晰,互不重叠(图 2A 和 2B)。生长时呈膜状移动,处于膜边缘的细胞也和膜相连,很少单独生长。

透射电镜下观察培养 5 d IEC,具有典型的肠上皮隐窝细胞特征,可见细胞表面有大量的微绒毛,细胞内含有丰富的线粒体和内质网等;细胞紧密连接,可见中间连接(粘着小带)、桥粒等超微结构。相邻上皮细胞的侧面有多重形式的特化结构,如封闭小带、黏着小带、桥粒等,它们能加强细胞间的连接,保证上皮细胞的完整性。桥粒(desmosome)存在于脊椎动物的上皮细胞间,长度约 50 ~ 400 nm,相邻细胞之间的质膜紧密结合,没有缝隙(图 3)。



A: 透射电镜观察上皮细胞间紧密连接、桥粒(30 000 ×); B: 透射电镜观察肠上皮细胞表面微绒毛(7 000 ×); C: 透射电镜观察完整肠上皮细胞(700 ×)。

A: Intercellular tight junction of IEC under transmission electron microscope (30 000 ×); B: Microvilli of IEC surface from chicken embryo under transmission electron microscope (7 000 ×); C: Integrity IEC from chicken embryo under transmission electron microscope (700 ×) .

图 3 培养的鸡胚小肠上皮细胞透射电镜图

Fig. 3 Transmission electron microscope potographs of chicken embryo cultured intestinal epithelial cells

2.3 细胞的生长及增殖

细胞生长曲线如图 4 所示。从曲线中可以看出 48 h 内仍未贴壁的细胞未能存活下来,细胞数量较刚消化下来有所下降;第 2 天至第 6 天贴壁细胞大量增殖,呈指数式增长;第 6 天后细胞生长趋于平缓,进入平台期,细胞数量开始下降,第 10 天细胞开始卷曲,整片脱落,漂浮于细胞培养液中。

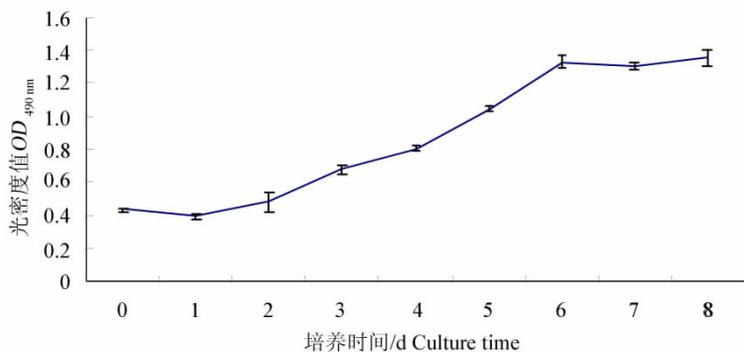


图 4 鸡胚小肠上皮细胞原代培养生长曲线

Fig. 4 The growth curve of primary culture of chicken embryo intestinal epithelial cell

2.4 上皮细胞鉴定结果

2.4.1 碱性磷酸酶鉴定结果 碱性磷酸酶是肠上皮细胞微绒毛上的标志性酶,将培养至第 5 天的细胞用碱性磷酸酶染色,结果显示阳性上皮细胞呈黑色,阴性对照不显色(图 5)。由此表明所获得细胞是分化完全,功能健全的成熟肠上皮细胞。3 张细胞爬片呈阳性反应的细胞分别为(87.29 ± 2.86) %、(86.71 ± 2.40) %、(86.18 ± 2.64) %。

2.4.2 免疫组化鉴定结果 细胞角蛋白是上皮组织中特异性的抗原,实验选用了鼠抗鸡角蛋白 18 单克隆抗体对培养的上皮细胞进行免疫组化鉴定,阳性细胞胞浆呈棕黄色,对照组(一抗滴加等量的 PBS)不显色,说明所培养的细胞为肠上皮细胞(图 6)。

3 讨论与结论

3.1 鸡小肠上皮细胞的分离

本试验采用的是 18 日龄的 SPF 鸡胚, 避免源头污染, 而且胚胎期的肠上皮细胞生长迅速, 增殖能力强。取材要注意新鲜, 细胞离体时间过长会影响细胞活力, 培养应在组织离体 12 h 内完成。若不能即时培养, 应将组织浸泡于培养液内, 于 4 °C 存放。整个操作过程应严格无菌, 实验中为确保无菌, 所取的鸡胚小肠在添加较高浓度青霉素 - 链霉素 (200 IU/mL) 的 D-hanks 液中清洗。取鸡胚小肠时用锋利器械, 尽量减少对细胞的机械损伤, 并在操作过程中避免组织干燥, 添加适量的清洗液或培养液。

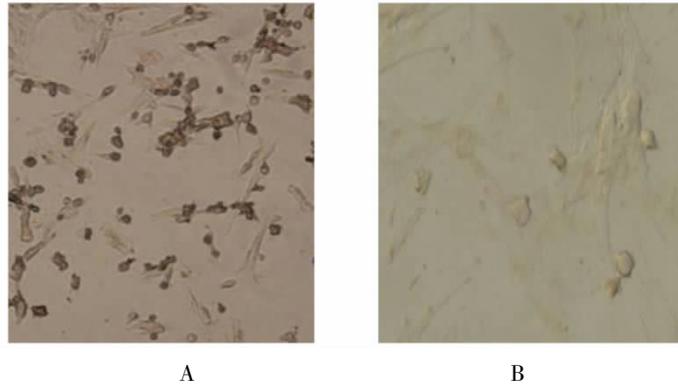
消化酶的消化分散作用主要是将妨碍细胞生长的细胞间质, 如基质、纤维等去除, 使细胞分散成细胞悬液。完整的肠隐窝细胞团是上皮细胞能否增殖的一个关键因素, 因此选择合适的消化酶以及适宜的消化时间至关重要^[9]。胰酶的作用机制在于断开肽键, 水解细胞间质中的蛋白, 影响细胞骨架从而使其分离^[10]。 $\rho = 0.25\%$ Trypsin-EDTA 溶液消化后, 细胞受损程度大, 消化后得到的多为单细胞, 少量细胞团, 细胞不易贴壁生长。本研究亦发现

用胰蛋白酶消化得到的多为单细胞, 少量细胞团, 细胞贴壁和生长能力较弱。胶原酶是从细菌中提取得到的, 其消化作用机理是使细胞间质的脯氨酸多肽水解, 消化细胞间质, 细胞离散, 得到完整的隐窝单位细胞, 对细胞骨架及细胞膜不会有影响^[10], 细胞的存活率及贴壁率较高。嗜热菌蛋白酶消化主要作用于肠黏膜基底膜特定分子^[11], 利用该酶消化分离出的细胞活力强, 间质细胞含量少, 隐窝细胞团块较多。本实验分别利用胶原酶 I 及嗜热菌蛋白对鸡胚肠上皮细胞进行消化分离, 均得到大量隐窝细胞团块, 贴壁生长后主要为上皮细胞且培养出的小肠上皮细胞活力强, 获得了良好的分离效果。有人曾经用多种酶的配合使用来消化组织^[12], 得到大量隐窝细胞细胞团块。本研究亦联合采用胶原酶 I + 嗜热菌蛋白酶消化, 分离效果同两种酶单独消化分离效果, 均得到大量隐窝细胞团块。

上皮细胞与成纤维细胞之间以及上皮细胞之间连接紧密, 消化时间难以掌握, 消化不充分细胞数量不足; 消化过度上皮细胞活力受到影响且成纤维细胞会被消化下来, 造成成纤维细胞污染^[13]。本研究中, 我们根据细胞的结构及综合考虑各因素后采用胶原酶 I 分离消化, 由于其消化时间远短于嗜热菌蛋白酶消化时间, 提高实验效率; 且一种酶单独消化可减少多种酶联合消化带来污染的可能性。胶原酶 I 消化 50 min 分离得到较多的隐窝细胞团, 细胞贴壁能力强, 生长良好, 纯度较高。

3.2 各添加因素对鸡胚小肠上皮细胞培养的影响

IEC 体外培养对外环境性质及培养基中各营养组分的添加要求严格。培养基的 pH 值在 7.3 左右

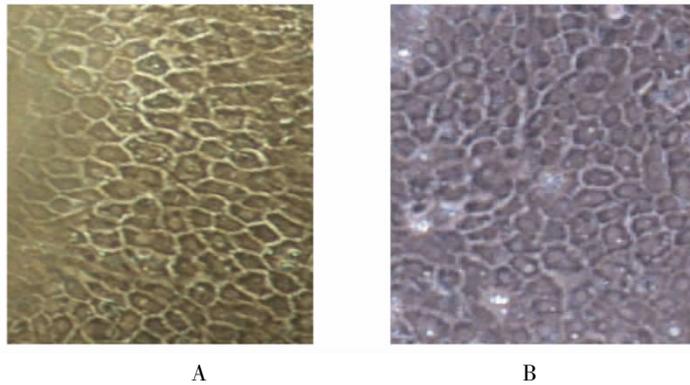


A: 上皮细胞碱性磷酸酶染色阳性 (50 ×); B: 上皮细胞碱性磷酸酶染色阴性 (200 ×)。

A: Intestinal Epithelial cells are positive by ALP staining (50 ×); B: Epithelial cells are negative by ALP staining (200 ×).

图5 鸡胚肠上皮细胞碱性磷酸酶鉴定结果

Fig. 5 Identification of chicken embryo intestinal epithelial cells by ALP staining



A: 上皮细胞免疫组化呈阳性 (100 ×); B: 上皮细胞免疫组化呈阴性 (100 ×)。

A: Intestinal Epithelial cells are positive by immunohistochemistry (100 ×); B: Epithelial cells are negative by immunohistochemistry (100 ×).

图6 鸡胚小肠上皮细胞免疫组化鉴定结果 (100 ×)

Fig. 6 Identification of chicken embryo intestinal epithelial cells by immunohistochemistry (100 ×)

较适宜。培养基中血清的浓度不宜过高,浓度过高上皮细胞会大量增殖,但同时存在的成纤维细胞及平滑肌细胞也会大量增殖,且成纤维细胞增殖速度大过于上皮细胞增殖速度;血清浓度过低,甚至低于2%时,成纤维细胞和上皮细胞的生长都受到抑制。因此国内外学者在进行上皮细胞体外培养时胎牛血清浓度一般控制在5%左右。本实验曾尝试添加 $\varphi = 10\%$ 胎牛血清,细胞大量增殖,2~3 d铺满瓶底,培养液1 d即变黄,上皮细胞和成纤维细胞夹杂生长,且成纤维细胞增殖速度明显占优势。培养基中可添加一些生长因子来促进上皮细胞的生长,如表皮生长因子(EGF)、胰岛素、肝素钠和谷氨酰胺均能促进上皮细胞的增殖,此外100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的肝素钠还可以有效抑制成纤维细胞的生长^[14]。培养基的pH值以7.3左右为宜,且培养液最好现配现用。本实验培养基为Gibco公司高糖培养基,添加谷氨酰胺等成分,并另行添加 $\varphi = 5\%$ 胎牛血清、10 ng/mL EGF、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 肝素钠、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素,分离的上皮细胞贴壁效果好,细胞增殖速度快。

接种密度对小肠上皮细胞的生长有重要影响,接种密度过大或过稀,都不利于上皮细胞生长。本实验经过多次摸索,得出1个鸡胚分离消化得到的细胞接种一个6孔细胞培养板为宜。

3.3 小肠上皮细胞的纯化

IEC培养中常混杂有成纤维细胞、平滑肌细胞,虽然少量的异源细胞存活对上皮细胞生长繁殖是必要的,但异源细胞的过度增长会影响IEC生长的优势状态,进而影响IEC的纯度^[15]。目前纯化IEC的方法主要有机械刮除法、相差贴壁法、相差消化等。机械刮除法对细胞有一定的机械损伤,且操作过程要小心,防止污染。本实验用机械消除法对IEC进行纯化,但由于实验条件等影响,纯化效果不理想而未被采用。本实验在肠组织经酶消化后利用低速(900 r/min)离心2~3次,每次5 min,去除上清中的单个上皮细胞及成纤维细胞,得到细胞主要为隐窝细胞团块;并利用成纤维细胞与上皮细胞贴壁时间差异进一步纯化,将离心后的IEC培养1~1.5 h后,轻晃细胞及培养液,加入一定比例培养液将其分别移入6孔板或细胞培养瓶静置培养。

本研究分别使用了组织块培养法、酶消化法分离鸡胚小肠上皮细胞。胰蛋白酶消化后得到细胞多为单细胞,贴壁增殖能力较差;嗜热菌蛋白酶、胶原酶I及两种酶联合消化均能获得健全的隐窝细胞团块,消化分离的IEC于37 $^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi = 5\%$ CO_2 饱和湿度培养箱静置培养。细胞12~24 h贴壁,3 d形成细胞集落,并出现细胞晕,向四周蔓延,6~7 d细胞汇合成片并呈“铺路石样”。经形态学观察、扫描电镜鉴定、碱性磷酸酶染色和免疫组化鉴定,所培养的细胞主要为肠上皮细胞。

参考文献:

- [1] Oswald I P. Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine [J]. *Vet Res* 2006, 37(3): 359-368.
- [2] 匡伟, 赵国琦. 几种特殊的肠上皮细胞系 [J]. *中国畜牧杂志* 2007, 43(13): 41-44.
- [3] 王海霞, 匡伟, 赵国琦. 小肠上皮细胞分离纯化方法的研究进展 [J]. *中国畜牧杂志* 2008, 44(1): 54-58.
- [4] 张安平, 刘宝华, 张连阳, 等. 正常人结肠上皮细胞体外培养和鉴定 [J]. *世界华人消化杂志* 2004, 12(8): 1966-1968.
- [5] Evans G S, Flint N, Somers A S, et al. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures [J]. *J Cell Sci* 1992, 101(1): 219-231.
- [6] 王静, 张彦明, 仝钢, 等. 新生仔猪小肠上皮细胞的分离培养和鉴定 [J]. *畜牧兽医学报* 2010, 41(1): 92-98.
- [7] Karam S M, Alexander G, Farook V, et al. Characterization of the rabbit gastric epithelial lineage progenitors in short-term culture [J]. *Cell Tissue Res* 2001, 306(1): 65-74.
- [8] Wise C. 上皮细胞培养指南 [M]. 段恩奎, 译. 北京: 科学出版社 2005: 114-115.
- [9] Bouhet S, Hourcade E, Loiseau N, et al. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells [J]. *Toxicol Sci* 2004, 77(1): 165-177.
- [10] 王静, 张彦明, 周宏超, 等. 猪小肠黏膜上皮细胞原代培养 [J]. *动物医学进展* 2009, 30(8): 46-49.
- [11] Hybbinette S, Bostrom M, Lindberg K. Enzymatic dissociation of keratinocytes from human skin biopsies for in vitro cell propagation [J]. *Exp Dermatol* 1999, 8(1): 30-38.
- [12] Gibson P R, Hermanowicz A, Verhaar H J, et al. Isolation of intestinal mononuclear cells: Factors released which affect lymphocyte viability and function [J]. *Gut* 1985, 26(1): 60-68.
- [13] Ziegelaar B W, Aigner J. The characterization of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: First steps towards a tissue engineered tracheal replacement [J]. *Biomaterials* 2002, 23(6): 1425-1438.
- [14] 古少鹏, 王敏霞, 赵素芬, 等. 鸡胚盲肠上皮细胞体外原代培养与鉴定 [J]. *畜牧兽医学报* 2009, 40(11): 1699-1074.
- [15] Keding M, Assmann P, Alexandre E, et al. Importance of a fibroblastic support for in vitro differentiation of intestinal endodermal cells and for their response to glucocorticoids [J]. *Cell Differ* 1987, 20(2/3): 171-182.