DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.031

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)11-1016-03

用嗜热菌蛋白酶进行人肠上皮细胞分离培养

Isolation and culture of human intestinal epithelial cells using dissociating enzyme thermolysin

张道杰,蒋建新,陈永华,熊健琼,段朝霞,朱佩芳 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨人肠上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC)的分离、培养及鉴定方法,为进一步研究IEC提供合适的细胞模型。方法 取4~6个月合法引产胎儿小肠,用嗜热菌蛋白酶消化分离IEC,接种于含多种促IEC生长的营养成分的DMEM培养液内,根据IEC和成纤维细胞贴壁时间的差异来纯化IEC,通过观察IEC生长状态、形态特征、超微结构及检测上皮细胞膜抗原对IEC进行鉴定。结果 嗜热菌蛋白酶消化2 h可分离出大量的健全绒毛隐窝单位,进一步培养获得的IEC,上皮细胞膜抗原均呈阳性。结论 选用嗜热菌蛋白酶作为分离IEC的消化酶,可获得较纯的IEC,完全可供相关实验研究之用。

肠道是人体重要的消化和吸收器官,同时也是表面积最大的免疫器官。肠上皮细胞(intestinal epithelial cell, IEC)处于机体与外界抗原接触的第一线,其表面表达一系列受体及免疫分子,在生理及病理情况下能分泌一系列细胞因子[1],在抗原提呈、感染防御等方面具有重要作用。近年来研究发现肠粘膜屏障功能下降和由此所致的肠源性细菌、内毒素移位与外科重症病人的脓毒血症、高代谢状态、继发性组织细胞损害、多器官功能障碍等并发症密切相关[2]。但由于没有人正常IEC细胞株,国内外对IEC生理功能、药物作用及各种致病因素作用下的病理生理改变的研究资料都来自培养实验动物细胞和人结肠癌细胞。很显然,上述两种细胞都有其局限性[3],用它们作为研究对象所获得的结果不能完全推论到人体。因此,原代培养人肠上皮细胞对把这方面的研究成果应用于临床具有重要意义。鉴于此,我们参照Perreault等[4]的培养方法,用嗜热菌蛋白酶(thermolysin)作为分离肠上皮细胞的消化酶,成功地进行了人胎儿肠上皮细胞的原代培养,并进行了传代与鉴定,现报告如下。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054203)
作者简介:张道杰(1969-),男,河南省淮阳县人,硕士,主管技师,主要从事严重创伤后失控性炎症反应机制方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68757444, E-mail: zhangdaojie7005@sina.com
通信作者:蒋建新,电话:(023)68757454
收稿日期:2003-01-30;修回日期:2003-08-15

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 合法引产胎儿 4~6个月,性别不限。利凡诺羊膜腔内注射引产法,娩出后立即取材。本研究从13例胎儿取胎儿标本13份,其中男6份、女7份。

1.1.2 主要仪器器材 二氧化碳培养箱为Shellab公司(美国)产品;超净工作台型号为BCM-1000(苏州);高速冷冻离心机为Beckman公司(美国)产品;倒置显微镜购自Olympus公司(日本);透射电子显微镜为Philips公司产品;25 cm^2 培养瓶、24孔培养板、50 ml离心管均为进口一次性灭菌塑料产品。

1.1.3 试剂与药品 DMEM培养基、胎牛血清(FCS)、液体丙酮酸钠为Hyclone公司(美国)产品;人表皮生长因子(EGF)购自PeproTech公司(英国);细胞培养用肝素、胰岛素、嗜热菌蛋白酶为Sigma公司(美国)产品;小鼠抗人上皮细胞膜抗原单克隆抗体购自Dako公司(丹麦);SABC免疫组化染色试剂盒及DAB显色试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供,其它试剂均为分析纯试剂。

1.1.4 主要试剂成分及含量 ①培养液:青霉素10万U/L;链霉素10万U/L;Hepes 20 mmol/L;$NaHCO_3$ 1.97 g/L;丙酮酸钠110 mg/L;表皮生长因子10 μg/L;胰岛素200 IU/L;肝素钠0.1 g/L;FCS 5%;DMEM培养基。②嗜热菌蛋白酶消化液:50 mg/L,溶于Hepes缓冲液中。

1.2 分离培养及纯化方法

无菌条件下,腹正中垂直切口,取出整段小肠,小心除去肠系膜,置于盛有Hanks液的有盖广口瓶中。在超净工作台内,将小肠移入9 cm培养皿中,用Hanks液将小肠内腔冲洗干净(将小肠剪成数段,分别用注射器吸取Hanks液从一端向另一端冲洗,反复进行,直到将肠内容物全部冲洗出),用眼科剪纵行剪开肠管,先剪成长约2~3 mm的小片,用Hanks液清洗2

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

min, 再剪成约 1 mm× 1 mm× 1 mm 的小块, 转入 50 ml 离心管中, 加 Hanks 液沉淀 1 min, 去上清。重复沉淀, 直至上清液清亮。把沉淀转入 150 ml 三角烧瓶中, 加入约 50 ml 嗜热菌蛋白酶消化酶液, 37 ℃震荡 2 h, 可见消化液变浑浊。用 10 ml 玻璃吸管反复吹打 5 min, 把消化上清液转入两只 50 ml 离心管中; 100× *g* 离心 7 min, 弃上清。将细胞沉淀悬浮于培养基中, 种植在 25 cm^2 塑料培养瓶中, 置 37 ℃、5% CO_2 孵箱内培养。90 min 后, 把培养液连同未贴壁的细胞转入新培养瓶中。然后, 每 48 h 更换培养液 1 次。约 15 d 融合成片。传代: 用 0.5% 的胰蛋白酶消化后, 接种到新的塑料培养瓶中, 种植密度: (1.0~6.5) × 10^6 /ml, 继续培养。

1.3　肠上皮细胞的鉴定

1.3.1　形态学观察　　在倒置显微镜下, 常规观察 IEC 生长状态、形态特征。

1.3.2　超微结构观察　　用胰蛋白酶消化肠上皮细胞后, 收集于离心管内, 500× *g* 离心 10 min, 去上清, 加入适量 2.5% 戊二醛固定, 行常规超薄切片, 用透射电镜进行超微结构观察。

1.3.3　免疫细胞化学鉴定　　把盖玻片切割成适当大小, 高压灭菌后, 放进 24 孔板孔内, 然后加入含 20% FCS 的培养液 2 ml, 留置 1~2 d 后, 吸弃培养液, 接种 IEC 细胞悬液, 待细胞长满后取出盖玻片, 按照 SABC 免疫组化染色试剂盒及 DAB 显色试剂盒说明书进行免疫细胞化学检测。一抗为小鼠抗人上皮细胞膜抗原单克隆抗体(稀释比例为 1∶100)。阴性对照: 一抗用 PBS 替代, 其余步骤相同。

2　结果

2.1　培养成功率

全部 13 例标本都可见到分离下的健全绒毛隐窝单位, 其中 10 例"长出"IEC, 培养成功, 成功率为 77%。

2.2　嗜热菌蛋白酶的分离效果

小肠组织剪成小块经嗜热菌蛋白酶消化 2 h 后, 可见到大量分离下的健全绒毛隐窝单位, 见图 1。

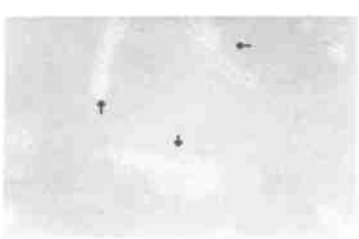


图 1　嗜热菌蛋白酶分离下来的绒毛隐窝单位　(×50)

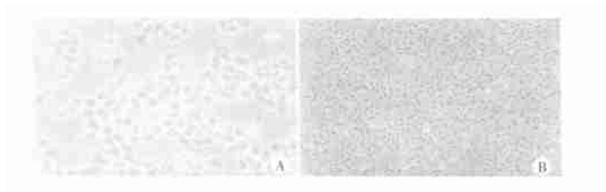
Fig 1　Villus crypts dissociated by thermolysin　(×50)

2.3　IEC 生长状态、形态观察

1~2 d 绒毛隐窝单位贴壁, 然后开始"长出"梭状细胞, 并向周围蔓延, 7 d 左右形成一团一团的细胞群落, 约 15 d 融合成片。光镜下, 原代培养 IEC 单层生长, 多呈扁平多角状、椭圆状, 或短梭状, 核仁 1~2 个, 胞浆丰富, 边界清楚, 见图 2。

2.4　电镜观察结果

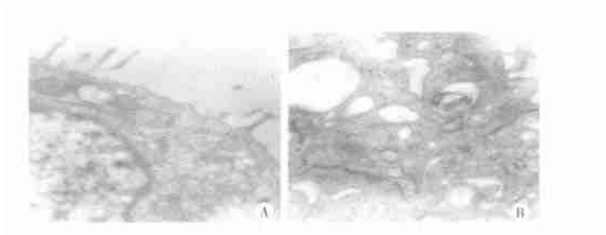
第 2 代 IEC 细胞表面可见微绒毛, 胞内含有丰富的线粒体、内质网等, 细胞贴壁期间形成紧密连接, 符合肠上皮细胞的特征, 见图 3。



A: Polygonal and ellipseform (12 d× 200); B: Short fusiform (15 d× 100)

图 2　培养的 IECs

Fig 2　Cultured IECs



A: Microvilli and mitochondria (TEM× 8 000); B: Tight junction (TEM× 25 000)

图 3　培养的 IEC 超微结构

Fig 3　Ultrastructure of cultured IECs

2.5　免疫细胞化学鉴定结果

第 2 代 IEC 上皮细胞膜抗原几乎 100% 呈阳性(图 4), 而阴性对照呈阴性(胞膜无染色)。

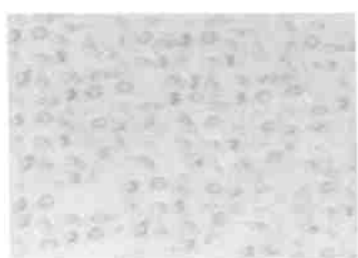


图 4　IEC 上皮细胞膜抗原表达　(SABC× 200)

Fig 4　Expression of epithelial membrane antigens of IECs　(SABC× 200)

3　讨论

3.1　关于分离肠上皮细胞消化酶的选择

分离肠上皮细胞的消化酶常用的是 Collagenase、Dispase、Pronase 等[5], 这几类酶分离效率虽高, 但分离培养的细胞多伴有成纤维细胞和间质细胞的污染。因

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

此，人们一直在寻找更合适的消化酶。嗜热菌蛋白酶被用于分离肺和支气管上皮细胞及真皮中角质形成细胞等[6,7]，具有分离产量高、分离下的细胞活力强等特点，因此可用于肠上皮细胞的分离[4]。本研究表明，它能分离下较多的健全绒毛隐窝单位，而健全绒毛隐窝单位分离是维持 IEC 体外生长繁殖的一个关键因素[5]，而且培养的 IEC 较纯。这可能与嗜热菌蛋白酶作用于肠粘膜基底膜特定分子有关[7]。

3.2 关于肠上皮细胞的生长环境

IEC 贴壁能力差，对营养和外界培养条件要求高，因此以下几方面应特别注意：①尽量选用塑料培养器皿，若使用玻璃培养器皿，则须用鼠尾胶原或牛皮胶原涂膜，或采用留置含高浓度血清培养液的方法（见材料与方法中所述）使 IEC 易于贴壁。②培养液的 pH 值以 7.3 左右为宜。培养液放置太久，pH 值下降，则不利 IEC 生长。③最好采用胎牛血清，若加入小牛血清，则 IEC 生长极为缓慢。FCS 浓度以 5%为佳。④培养液中需加入 EGF、肝素、胰岛素等促进 IEC 生长繁殖的营养成分。其中，EGF 是表皮类细胞共同的促生长因子；肝素不仅是平滑肌细胞的抑制剂，而且可促进 IEC 增殖[8]。

3.3 关于肠上皮细胞的纯化

用消化酶分离下来的上皮细胞中，成纤维细胞多与其混杂生长，因此一般需要进行纯化。常用的纯化方法是机械刮除法、反复贴壁法及胰蛋白酶消化排除法等[9]，这些方法都较为复杂。而用嗜热菌蛋白酶消化的肠上皮细胞纯化则较为简便，即原代培养接种 90 min 后把培养液连同未贴壁的细胞转入新培养瓶中继续培养。由于成纤维细胞具有贴壁快的特点，90 min 基本全部贴壁，而 IEC 贴壁需 12 ~24 h，这样新培养瓶中的细胞就是纯化的 IEC，免疫组化证实，如此纯化后的 IEC 上皮细胞膜抗原阳性率几乎 100%。

3.4 关于肠上皮细胞的鉴定

用消化酶分离培养的细胞仅凭光学显微镜形态学观察不能鉴定为肠上皮细胞，尚需其它较为特异的鉴定方法。常用的有碱性磷酸酶染色法、免疫细胞化学法及电镜法等[4,5]。碱性磷酸酶染色法试剂配制烦琐、影响因素多、阳性率低，因此尽量不要仅凭此法鉴定。免疫细胞化学法采用特异的抗人上皮细胞膜抗原抗体或抗人角蛋白抗体检测细胞的上皮细胞膜抗原或角蛋白，特异性强。因消化酶从小肠粘膜分离下来的细胞类型主要有 IEC、成纤维细胞和平滑肌细胞，不会有其它组织来源的上皮细胞，而成纤维细胞和平滑肌细胞上皮细胞膜抗原或角蛋白呈阴性，故免疫细胞化学检测阳性的细胞即可鉴定为 IEC。电镜法则从细胞的超微结构如微绒毛、细胞间连接等方面进一步鉴定 IEC。

综上所述，选用嗜热菌蛋白酶作为分离 IEC 的消化酶，改善 IEC 的生长环境，经过简便的纯化，即可获得较纯的 IEC，完全可供相关实验研究之用。

关键词：嗜热菌蛋白酶；肠上皮细胞；原代培养
中图法分类号：R329-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] Stadnyk A W, Dollard C D, Issekutz A C. Neutrophil migration stimulates rat intestinal epithelial cell cytokine expression during helminth infection [J]. J Leukoc Biol, 2000, 68(6): 821－827.

[2] Yu P, Martin C M. Increased gut permeability and bacterial translocation in Pseudomonas pneumonia-induced sepsis[J]. Crit Care Med, 2000, 28(7): 2573－2577.

[3] Beaulieu J F, Vachon P H. Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine[J]. Gastroenterology, 1994, 106(4): 829－839.

[4] Perreault N, Jean F B. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures[J]. Exp Cell Res, 1996, 224(2): 354－364.

[5] Aldhous M C, Shmakov A N, Bode J, *et al*. Characterization of conditions for the primary culture of human small intestinal epithelial cells[J]. Clin Exp Immunol, 2001, 125(1): 32－40.

[6] 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.

[7] Walzer C, Benathan M, Frenk E. Thermolysin treatment: a new method for dermo-epidermal separation[J]. J Invest Dermatol, 1989, 92(1): 78－81.

[8] Flint N, Cove F L, Evans G S. Heparin stimulates the proliferation of intestinal epithelial cells in primary culture[J]. J Cell Sci, 1994, 107(Pt 2): 401－411.

[9] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京：北京出版社，1995. 135－136.

（编辑 陈聪连）

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法（即从小数点算起，向左向右每3位分一节，节间留出一定空隙），废除千分撇分节法（如2,431改为2 431）。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net