

本文引用:张程程,彭艳,陈海交,杨建文,刘薇薇,刘丽.成年SD大鼠胃窦Cajal间质细胞分离、培养及鉴定[J].湖南中医药大学学报,2017,37(11):1226-1230.

成年SD大鼠胃窦Cajal间质细胞分离、培养及鉴定

张程程,彭艳*,陈海交,杨建文,刘薇薇,刘丽

(湖南中医药大学针灸推拿学院针灸生物信息分析重点实验室,湖南长沙410208)

[摘要] **目的** 探讨成年SD大鼠胃窦起搏细胞Cajal间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)的原代分离、培养及鉴定方法,为深入研究其生理功能提供条件。**方法** 8~9周龄SD成年大鼠,禁食24 h,乙醚吸入麻醉,颈椎脱臼处死。无菌条件下采用精细解剖方法快速取出胃窦平滑肌组织,将其剪成1~2 mm³小块后,使用II型胶原酶消化法于37℃培养箱内消化60 min,离心后过200目筛,接种于DMEM/F12完全培养基(含5 ng/mL干细胞因子)中进行培养。用酪氨酸蛋白激酶受体c-kit特异性抗体免疫荧光染色鉴定细胞类型。**结果** 培养72 h后,于倒置显微镜下观察,可见细胞贴壁,呈不规则三角形、星形或梭形,有多个突起;随着培养时间的延长,各突起彼此相互连接形成网络;此原代培养细胞c-kit抗体免疫荧光染色呈阳性。**结论** 成功建立了一套由成年SD大鼠胃窦组织采用II型胶原酶消化法原代培养ICC的方法,为ICC的生理功能、病理改变以及胃肠道生理与病理关系的研究奠定了基础。

[关键词] 胃窦;Cajal间质细胞;细胞培养技术

[中图分类号]R965.2 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.11.014

Isolation, Culture and Identification of Interstitial Cells of Cajal in Gastric Antrum of Adult Rats

ZHANG Chengcheng, PENG Yan*, CHEN Haijiao, YANG Jianwen, LIU Weiwei, LIU Li

(Key Acu-Moxibustion Laboratory of Biological Information Analysis, Institute of Acupuncture, Moxibustion and Massage, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** In order to provide the conditions for further study of its physiological function, the method of isolation, culture and identification of interstitial cells of Cajal (ICC) in the gastric antrum of adult SD rats was investigated. **Methods** SD rats at 8-9 weeks, were anesthetized with ether and killed by cervical dislocation. The specimens were cut into 1-2mm³ small pieces, digested with collagenase type II in a 37℃ incubator for 60 min, centrifuged and passed through a 200-mesh sieve. The tissues were inoculated in DMEM / F12 complete medium (containing 5 ng/mL stem cell factor). Cell type was identified by immunofluorescence staining using tyrosine protein kinase receptor c-kit specific antibody. **Results** After culture for 72 h, the cells adhered to the wall under the inverted microscope, which were irregular triangular, star-shaped, or spindle-shaped, with multiple protrusions. With the prolongation of culture period, the protrusions were connected to each other to form a network. The cells were positive for immunofluorescence staining of c-kit antibody. **Conclusion** This study established a method for primary culture of ICC from type II collagenase digestion of gastric antral smooth muscle in adult SD rats. It laid a foundation for the study of the relationship between ICC and gastrointestinal tract in physiological function and pathologic changes.

[Keywords] gastric antrum; interstitial cells of Cajal; cell culture techniques

[收稿日期]2016-11-24

[基金项目]国家自然科学基金项目(81403487);湖南省教育厅青年基金(14B128)。

[作者简介]张程程,女,在读博士研究生,研究方向:针灸治病机制的研究。

[通讯作者]*彭艳,女,博士,副教授,E-mail:penyatcm@126.com。

良好生命活动的维持是以机体通过胃肠道正常消化吸收营养物质为生理基础。而胃肠道神经元、平滑肌细胞以及 Cajal 间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC) 的协调作用是维持正常的胃肠消化吸收的必要条件^[1]。研究证实, ICC 是胃肠运动的自发性起搏细胞, 主要分布于消化道自主神经末梢和平滑肌细胞之间, 具有产生并传播慢波、介导神经递质的传递以及调节某些胃肠激素的功能^[2-4]。因此目前认为 ICC 在产生和维持正常胃肠生理功能中扮演着非常重要的角色。研究发现, 多种胃肠运动障碍性疾病如慢传输型便秘、糖尿病胃轻瘫、功能性消化不良等均可见 ICC 的病理改变, 包括 ICC 数量的减少、超微结构及表型等的改变^[5-7]。故此探讨一种稳定、持续的体外培养 ICC 的方法无论对基础研究或是临床治疗胃肠运动障碍相关疾病均有重大的意义。目前, 国内外普遍采用幼年动物分离 ICC, 而且常见于小肠组织, 少见从成年大鼠胃窦中分离并培养 ICC 的研究。本实验采用 II 型胶原酶消化法, 以成年 SD 大鼠胃窦作为组织来源, 成功建立一套体外原代分离、培养 ICC 的方法, 拟为进一步研究 ICC 的生理功能、病理改变及胃肠道生理与病理关系的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 正常 8~9 周龄清洁级 SD 成年大鼠, 雌雄不限, 体质量 220~250 g, 由湖南中医药大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(湘)2011-0003。饲养温度 25 ℃, 相对湿度 50%~70%, 自由摄食、饮水。

1.1.2 主要仪器设备 IX2-ILL100 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; TCL16M 型高速冷冻离心机, 长沙湘仪贝克仪器仪表公司; CBV-1500A 型超净工作台, 上海瑞仰净化设备厂; DW-86L26 型超低温冰箱, 海尔公司; 外科手术器械, 上海医疗器械厂。

1.1.3 主要试剂及药品 DMEM/F12 培养基、II 型胶原酶(100 mg/支)、鼠尾胶原蛋白 I 型(2 mL:10 mg), 均购自北京 Solarbio 公司; 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L PBS, pH=4, 500 mL/瓶)购自武汉博士德生物工程有限公司; D-Hanks 缓冲液(500 mL/瓶)购自天津灏洋生物

公司; 胎牛血清(FBS, 100 mL/瓶)、双抗(青霉素 10 000 U/mL, 链霉素 10 000 U/mL), 均购自英国 Hyclone 公司; 大鼠重组干细胞因子(SCF, 1 μg/支)购自美国 Peprotech 公司; PE 标记的兔抗大鼠 CD117(c-kit) 荧光抗体(1 mL:0.2 mg)购自 eBioscience 公司; 胰酶抑制剂(100 mg/支)、台盼蓝(5 g/瓶)、牛血清白蛋白(BSA, 5 g/支), 均购自 sigma 公司; ATP(2 mL:20 mg) 购自湖北天药公司等。

1.1.4 主要溶液的配制 (1) II 型胶原酶、胰蛋白酶抑制剂均以 PBS 缓冲液配制成终浓度为 10 mg/mL 的工作液, 并以 0.22 μm 真空滤菌器除菌, 分装, -20 ℃冻存备用; (2) 牛血清白蛋白(BSA) 以 PBS 缓冲液配制成终浓度为 4 mg/mL 的工作液; (3) 干细胞因子(SCF) 以无菌水配制成终浓度为 1 ng/μL 的工作液; (4) 配制 5 mL II 型胶原酶消化液(含 II 型胶原酶 1.2 mg/mL、ATP 0.27 mg/mL、BSA 2 mg/mL、胰蛋白酶抑制剂 2 mg/mL), 将消化液过滤除菌, 4 ℃保存备用; (5) 配制 20 mL DMEM/F12 完全培养基(含 DMEM/F12 培养基, 2% 双抗, 10% FBS, 5 ng/mL SCF), 4 ℃保存备用; (6) 台盼蓝溶液: 台盼蓝 4.0 g, 溶于 100 mL 超纯水, 4 ℃保存, 使用时用 PBS 稀释至 0.4%, 室温下保存; (7) 鼠尾胶原溶液: 用 0.006 mol/L(0.36 g/L) 无菌乙酸将胶原蛋白稀释到 2.5 μg/mL, 4 ℃保存备用。

1.2 方 法

1.2.1 ICC 细胞分离 大鼠禁食不禁水 24 h 后采取乙醚吸入麻醉, 颈椎脱臼法处死, 完全浸入 75% 乙醇溶液中 1 min; 无菌条件下打开腹腔, 自贲门、幽门剪切开, 取出胃组织, 放入盛有 0.01 mol/L PBS(含 2% 双抗)的无菌平皿里; 在解剖显微镜下用眼科剪、眼科镊锐性剥除血管及胃浆膜层, 将胃组织沿胃小弯剖开, 剪取胃窦部, 用 4 ℃的 D-Hanks 液反复冲洗胃内容物 3~4 次; 解剖显微镜下锐性剥除胃窦部黏膜、黏膜下层及浆膜层, 再将仅剩肌层的胃窦组织置入 4 ℃的 D-Hanks 液中, 漂洗两次, 用眼科剪将组织剪碎至大小约为 1~2 mm³。将组织块移至离心管内, 加入 3~4 倍于组织体积的 II 型胶原酶消化液, 放入培养箱内 37 ℃消化 60 min, 期间每隔 15 分钟轻轻吹打 10 次, 加入等体积的 DMEM/F12 完全培养基终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上

清,DMEM/F12重悬,1 000 r/min离心5 min,弃上清,DMEM/F12重悬,反复轻轻吹打3~5 min,过200目筛网。并以0.4%台盼蓝染色鉴定细胞状态并计数,倒置显微镜下观察,死细胞被染成蓝色,活细胞未被染色,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/cm^2$ 。

1.2.2 ICC细胞培养 用DMEM/F12完全培养基将细胞接种至6孔培养板(预先放置包被鼠尾胶原蛋白的爬片)中,然后放入培养箱内,37℃,5% CO₂条件下培养。72 h后换为不含有青霉素和链霉素的DMEM/F12培养基。此后每3天换液一次,倒置显微镜下观察细胞生长状况,每次观察不超过30 min,观察的同时进行摄像。

1.2.3 ICC免疫荧光染色 为确定培养的细胞是否为ICC,采用国际通用的c-kit免疫荧光抗体对所培养的细胞进行免疫荧光染色鉴定。染色主要步骤:去除培养板内培养基,用0.01 mol/L PBS漂洗3次,每次5 min;4%多聚甲醛液室温下固定20 min,0.01 mol/L PBS漂洗3次,每次5 min;用5%的山羊血清室温下封闭30 min;加入PE标记的兔抗大鼠c-kit单克隆抗体(用0.01 mol/L PBS稀释1:100)3 mL,37℃条件下静置30 min后放入4℃冰箱过夜;次日取出后再于37℃条件下静置30 min,PBS漂洗3次,每次5 min;在荧光显微镜下观察细胞并摄像。

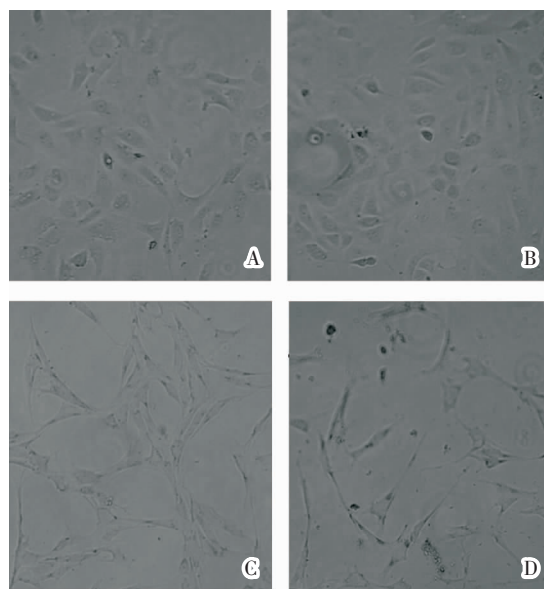
2 结果

2.1 倒置显微镜下所见ICC形态学变化

在倒置显微镜下观察,培养72 h后,细胞稳定贴壁,细胞边界清晰,细胞透亮度可,呈梭形、三角形或星形,细胞核大,细胞质较少,可见部分细胞有2~3个明显短突起,但突起之间未见明显连接,而且ICC特有的网络状结构不太明显(图1A)。培养1周时细胞的形态未见明显变化,可能与成年大鼠细胞呈高分化状态有关,生长缓慢(图1B)。随着培养时间延长至约2周时可见细胞形态愈来愈清晰,突起也逐渐由粗短变为细长,并相互连接形成明显的网络状结构,具备ICC的形态特点(图1C)。到第4周以后,细胞逐渐呈凋亡状态,细胞核皱缩,透亮度降低,网络结构稀疏(图1D)。

2.2 荧光显微镜下所见ICC形态学变化

c-kit阳性是目前确认细胞是否为ICC的重要



注:A.培养72 h后;B.培养1周后;C.培养2周后;D.培养4周后
图1 ICC体外培养不同时期倒置显微镜下细胞形态($\times 400$)

指标。选择培养至2周的细胞使用免疫荧光法对其进行鉴定。在荧光显微镜下可见细胞胞体呈红色荧光染色即c-kit阳性。据免疫表型分析可证实培养所得c-kit阳性细胞为ICC,而不是平滑肌细胞(见图2)。并且根据细胞形态,可排除肥大细胞可能。

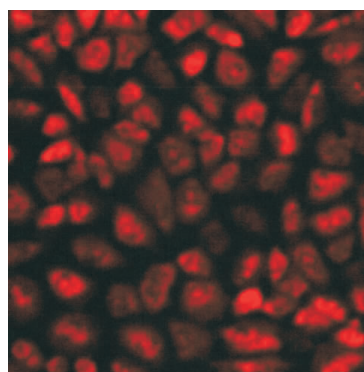


图2 Cajal间质细胞的免疫荧光染色($\times 400$)

3 讨论

根据ICC的形态以及其在胃肠道的分布位置将其分为肌间、肌内、深肌丛及黏膜下四种类型,其中肌间ICC和黏膜下ICC主要参与胃肠起搏活动^[8]。ICC不仅可自发性去极化,产生慢波,是胃肠道的起搏细胞,ICC尚在胃肠神经和胃肠平滑肌之间扮演着中间媒介角色,胃肠生理功能的正常运行同时受迷走神经、内脏神经和肠神经系统的共同支配,其中肠神经系统起主导作用^[9],而肠神经末梢神经元通过与ICC形成的突触连接将信号传递给ICC,后者

通过与平滑肌细胞形成的缝隙连接将信号传递给平滑肌细胞,故此胃肠神经-ICC-平滑肌细胞网络引起并调节胃平滑肌节律性的相位收缩活动,在胃运动的调节中发挥至关重要的作用。研究发现,ICC 的病理改变如其数量的减少、形态结构的异常等可导致临床上多种胃肠动力障碍性疾病^[10-12]。

为了研究胃肠动力障碍性疾病的发病机制,探讨 ICC 细胞功能及起搏特性,建立一种体外分离、培养 ICC 的方法便显得具有重要意义。而以成年大鼠为模型,则更贴近于临床。培养 ICC 的方法主要包括组织块培养法和酶解法。而组织块培养法适用于细胞增殖活跃的幼年动物^[13],成年大鼠细胞已呈高度分化状态,故不适用。成年大鼠胃窦 ICC 与平滑肌细胞、结缔组织及胶原纤维等连接紧密,分离难度很大,刘勇等^[14]应用 II 型胶原酶消化法分离成年 Wistar 大鼠胃窦 ICC,获得成功,本实验以其为参考,并采用成年 SD 大鼠胃窦为组织来源,根据文献^[15-16],采用 II 型胶原酶消化法培养成年 SD 大鼠胃窦 Cajal 间质细胞,为今后基础研究提供了一种体外原代分离、培养胃窦 ICC 的方法。

胃肠道内几乎所有 ICC 都特异性表达酪氨酸激酶受体(c-kit),其配体为干细胞因子(stem cell factor, SCF)。SCF、c-kit 特异性结合,形成二聚体,活化酪氨酸激酶,启动了一系列酸化过程,调节细胞的生长、发育和分化^[17]。近年来 c-kit 免疫组化染色法成功应用于 ICC 的研究当中,成为 ICC 细胞表型的一种特异性标志物,本实验体外分离培养所得的 Cajal 间质细胞经藻红蛋白免疫荧光表型分析,在荧光显微镜下观察可见细胞胞体呈红色荧光染色即 c-kit 阳性。c-kit 广泛表达于多种组织细胞,如各种造血细胞、生殖细胞、肝细胞、肿瘤细胞等,但在胃肠道,只有 ICC 和肥大细胞特异性表达 c-kit,而且肥大细胞主要分布于胃黏膜、黏膜下层,在准备平滑肌组织过程中绝大部分已被去除,可忽略不计,且肥大细胞形状为圆形,可与 ICC 鉴别。因此培养所得 c-kit 阳性细胞为 ICC。根据其细胞形态和免疫学特性,表明 ICC 在体外原代分离培养成功。

笔者经过反复实验,认为在实验中应注意以下方面:(1)树立严格的无菌观念:提前将试剂分装,并过滤除菌,于合适温度下储存备用,实验前 24 h,大

鼠禁食不禁水,为避免大鼠饥不择食,需清除笼内垫料,使胃组织处于相对洁净状态。乙醚吸入麻醉后,将大鼠全部浸入 75%乙醇溶液中 1 min,不宜时间过长,以免大鼠吸入乙醇,影响实验;(2)因成年大鼠细胞呈高分化状态,培养难度大,在 ICC 的分离接种以及镜下观察时应尽量缩短时间,有利于细胞的存活;(3)相比于刘勇只选用 II 型胶原酶进行酶解^[14],本实验在酶解液中加入胰蛋白酶抑制剂、BSA、ATP,并控制好酶浓度及消化时间,以求将细胞损害降到最小;(4)制作细胞爬片很重要,决定其贴壁成功与否,应提前用无菌 2.5 μg/mL 鼠尾胶原包被玻片,于培养箱中烘干待用;(5)培养 72 h 后 ICC 细胞贴壁,培养基颜色改变,提示可进行换液,这与文献相符^[2]。故认为使用 II 型胶原酶消化法培养 ICC 时可在 72 h 后进行换液操作,这样既可避免因频繁移动培养皿而引起贴壁不牢,还可减少污染的机会,换液既能保证细胞有合适的生长环境,也能去除未贴壁的细胞,避免其对培养环境及细胞生长产生影响;(6)考虑抗生素会减缓细胞生长,故 72 h 后换为不含抗生素的 DMEM/F12 培养基;(7)尽量减少机械损伤:笔者使用眼科镊锐性刮除黏膜及黏膜下层,避免了对胃窦组织过度的牵拉或挤压,减少了对组织内 ICC 的破坏和损伤;(8)吹打细胞时动作应轻柔,宜选用口径较大的吸管缓慢吹打;(9)SCF 是 ICC 生长发育所必需的,参照国外相关文献^[18-19],本实验在培养基中加入 5 ng/mL 的 SCF,此浓度下 ICC 细胞可稳定地发育。

综上所述,在借鉴前人研究的基础上,使用 II 型胶原酶消化法成功建立了一套由成年 SD 大鼠胃窦原代培养 ICC 的方法,为研究 ICC 的生物学特性及其与胃肠道动力障碍性疾病的关系提供了细胞模型。

参考文献:

- [1] 王曙逢,仇广林,赵志浩,等.大鼠小肠 Cajal 间质细胞的体外分离、培养及鉴定[J].中国普通外科杂志,2014,23(4):494-498.
- [2] 刘登群,龙爽,王军平,等.成年 C57BL/6 小鼠空肠 Cajal 间质细胞的分离、培养及鉴定.胃肠病学和肝病杂志[J].2011,20(6):538-541.
- [3] 柳利明,农晰婷,秦榕,等.体外分离培养小鼠胃 Cajal 间质细胞的实验方法研究[J].昆明医学院学报,2010,31(3):11-13.
- [4] 田姣,王宝西,江逊.胃肠道 Cajal 间质细胞与干细胞因子/c-

- kit 信号系统的研究进展[J].临床儿科杂志,2013,31(4):385-388.
- [5] Battaglia E, Bassotti G, Bellone G, et al. Loss of interstitial cells of Cajal network in severe idiopathic gastroparesis. *World J Gastroenterol*[J]. 2006, 12(38): 6172-6177.
- [6] Negreanu LM, Assor P, Mateescu B, et al. Interstitial cells of Cajal in the gut—a gastroenterologist’s point of view. *World J Gastroenterol*[J]. 2008, 14(41): 6285-6288.
- [7] Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, et al. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology* [J]. 2007, 50(2): 176-189.
- [8] Chen J, Du L, Xiao YT, et al. Disruption of interstitial cells of Cajal networks after massive small bowel resection. *World J Gastroenterol*[J]. 2013, 19(22): 3415-3422.
- [9] 李泽培,邱野,彭燕.Cajal 间质细胞与胃肠动力关系的研究进展[J].胃肠病学和肝病学杂志,2014,23(9):983-986.
- [10] 王红梅,张立平,陈丽如,等.基于胃食管反流病的胃肠动力与脾虚实质探究[J].中国中西医结合消化杂志,2015,23(3):196-198.
- [11] 周恒,郭璇,王小娟,等.舒胃汤对功能性消化不良大鼠胃肠动力、血清干细胞因子及 Cajal 间质细胞修复与再生的影响[J].中华中医药杂志,2015,30(3):863-867.
- [12] 张旭,徐华.Cajal 间质细胞与慢传输型便秘之间关系研究进展[J].临床消化病杂志,2011,23(3):188-191.
- [13] 祝炼,余保平,吴志轩,等.小鼠空肠 Cajal 间质细胞的分离、培养和亚甲蓝活染选择性标记 [J]. 世界华人消化杂志,2007,15(32): 3439-3442.
- [14] 刘勇,齐清会.大鼠胃 Cajal 间质细胞的分离和培养[J].世界华人消化杂志,2005,13(4):73-76.
- [15] Shahi PK, Choi S, Jeong YJ, et al. Basal cGMP regulates the resting pacemaker potential frequency of cultured mouse colonic interstitial cells of Cajal[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*[J]. 2014, 387(7): 641-648.
- [16] Han S, Kim JS, Jung BK, et al. Effects of ginsenoside on pacemaker potentials of cultured interstitial cells of Cajal clusters from the small intestine of mice[J]. *Mol Cells*, 2012, 33(3): 243-249.
- [17] Li X, Xue H, Kang Q, et al. Alterations of the interstitial cells of Cajal and the microstructure of the gastrointestinal tract in KIT distal kinase mutant mice[J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 355(1): 49-58.
- [18] Zuo DC, Choi S, Shahi PK, et al. Inhibition of pacemaker activity in interstitial cells of Cajal by LPS via NF- κ B and MAP kinase[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(8): 1210-1218.
- [19] Gong YY, Si XM, Lin L, et al. Mechanisms of cholecystokinin-induced calcium mobilization in gastric antral interstitial cells of Cajal[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(48): 7184-7193.

(本文编辑 杨 瑛)