



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.018
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3854.shtml

· 基础研究 ·

大鼠小肠 Cajal 间质细胞的体外分离、培养及鉴定

王曙逢, 仇广林, 赵志浩, 王康

(西安交通大学医学院第一附属医院 普通外科, 陕西 西安 710061)

摘要

目的: 探讨大鼠小肠 Cajal 间质细胞 (ICC) 的原代分离、培养及鉴定方法。

方法: 出生后 5~10 d 的 SD 乳大鼠, 颈椎脱臼处死。无菌条件下取出小肠, 在解剖显微镜下剥去小肠系膜、肠黏膜和黏膜下层, 将小肠平滑肌层组织剪成小块后接种于含有干细胞因子的 DMEM 培养基中进行培养。倒置显微镜下连续观察组织块周围细胞的游出情况及细胞的形态, 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 1 周后, 倒置显微镜下可见组织块周围长出细胞, 呈梭形、三角形, 有多个短突起; 随着培养时间的延长, 突起细长化并彼此相互连接形成网络。该类细胞 c-kit 抗体免疫荧光染色呈阳性。

结论: 该研究成功建立了一套由大鼠小肠平滑肌组织块原代培养 ICC 的方法, 为 ICC 的生物学特性及其与胃肠道动力障碍性疾病关系的研究奠定了基础。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(4):494-498]

关键词

小肠; Cajal 间质细胞; 大鼠; 细胞培养技术

中图分类号: R656.7

In vitro isolation, culture and identification of interstitial cells of Cajal from small intestine of rats

WANG Shufeng, QIU Guanglin, ZHAO Zhihao, WANG Kang

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Corresponding author: WANG Kang, Email: wangkang5754@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the method of in vitro isolation, culture and identification of interstitial cells of Cajal (ICC) from the small intestine of rats.

Methods: Neonatal SD rats at 5-10 d after birth were sacrificed by cervical dislocation, and their small intestinal segments were excised under sterile conditions. Under a dissecting microscope, the layers of smooth muscle of the small bowel were cut into small pieces after the mesentery, mucosal and submucosal layers were carefully stripped off, and then the tissue pieces were cultured in the DMEM medium containing stem cell factor. After that, cells emanating around the tissue blocks and their morphological characteristics were successively observed with an inverted microscope, and the cell phenotype was identified by immunofluorescence staining using specific antibody against receptor tyrosine kinase c-kit.

Results: One week after culture, cells were found growing from the tissue blocks under inverted microscope,

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目; 陕西省科技计划项目基金资助项目 (2010K15-07-02)。

收稿日期: 2013-05-22; **修订日期:** 2013-11-08。

作者简介: 王曙逢, 西安交通大学医学院第一附属医院副教授, 主要从事胃肠外科方面的研究。

通信作者: 王康, Email: wangkang5754@163.com

which took on a fusiform or triangular shape with several short processes. As the length of culture period increased, the cellular processes were gradually elongated and interconnected with those from other cells, forming a net-work structure. These cells were positive for immunofluorescence staining of c-kit antibody.

Conclusion: This study has successfully established a method for the primary culture of ICC from the small intestine of rats in vitro, which may provide a basis for research into the biological function of ICC and the relationship between the ICC and gastrointestinal motility disorders.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(4):494-498]

KEYWORDS Intestine, Small; Interstitial cells of Cajal; Rats; Small intestine; Cell Culture Techniques

CLC number: R656.7

Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 是以网络状分布在消化道肠神经系统末梢与平滑肌细胞之间的一类特殊细胞。胃肠道运动功能的产生和维持是 Cajal 间质细胞、肠神经系统以及平滑肌细胞三者协同作用的结果^[1]。由于 ICC 不仅能自发产生节律性慢波,而且亦能介导肠神经系统与平滑肌间的信号调节^[2-3]。因此目前认为 ICC 在产生和维持正常胃肠道动力中起着举足轻重的作用。研究^[4-6]发现,多种胃肠运动障碍性疾病与 ICC 结构、数目、功能或表型等的改变相关,所以探讨出一种稳定的 ICC 体外培养方法临床实际意义重大。目前,国内外普遍采用酶解法分离 ICC,少见单纯采用组织块培养法及从乳大鼠小肠中分离并培养 ICC 的研究。本实验采用组织块培养法,以乳大鼠小肠作为组织来源,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 及其与胃肠道动力障碍性疾病的关系奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和试剂

出生后 5~10 d 清洁级 SD 乳大鼠,雌雄及体质量不限(西安交通大学医学院实验动物中心)。DMEM 培养基(北京 Solarbio 公司),优等胎牛血清(FBS 英国 Hyclone 公司),大鼠重组干细胞因子(SCF,美国 Sigma 公司),兔抗大鼠 c-kit 抗体(美国 Santa Cruz 公司)及山羊抗兔 FITC 标记荧光抗体及细胞核抗体 DAPI(北京中杉金桥公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 小肠平滑肌层的分离及组织块的制备^[7]

禁母乳 12 h 后采取颈椎脱臼法处死乳大鼠,完全浸入 750 mL/L 乙醇溶液中约 5 min。无菌条件下

打开腹腔,取出自胃幽门下 1 cm 至距回盲部近端 1 cm 之间的小肠,放入 4 ℃ 的 D-Hank 液(含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL)中。在解剖显微镜下剥除小肠系膜、血管及小肠浆膜层,再将小肠剖开,用 4 ℃ 的 D-Hank 液反复冲洗肠内容物后放入该液中。解剖显微镜下锐性剥除小肠黏膜及黏膜下层,再将仅剩肌层的小肠置入 4 ℃ 的 D-Hank 液中,剪碎至组织块大小约为 (0.5~1.0) mm × (0.5~1.0) mm × (0.5~1.0) mm,静置 2~3 min 后移除上清液。

1.2.2 接种组织块 将组织块移至 50 mL 的培养瓶底并调整各组织块之间的距离;各组织块相距约 0.5 cm。将培养瓶翻转 180°,使瓶底面向上,保持此位置并向培养瓶中加入 5 mL DMEM 培养基(含 20% FBS,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 μg/mL,SCF 5 ng/mL 及 L-谷氨酰胺 2 mmol/L),无菌条件下拧紧瓶盖后放入温度为 37 ℃ 的 5% CO₂ 培养箱中。培养瓶在培养箱中静置约 3~4 h,待组织块贴壁良好后将培养瓶再次翻转 180°使底朝下并适当松开瓶盖,继续放入 5% CO₂ 培养箱中,37 ℃ 的条件下培养。

1.2.3 细胞活体观察及换液 培养 3~5 d,每天观察各培养瓶内培养基的颜色,注意观察培养基有无浑浊、颜色变淡、漂浮物、絮状物等。稳定培养 1 周后换液,冲去未贴壁组织块,加入相同培养基继续培养;此后每 1~2 周换液 1 次。期间在倒置显微镜下观察组织块周围细胞生长的范围、数量及形态学特征等,同时对组织块状况进行比较。每次观察最好不超过 30 min,观察的同时进行摄像。

1.2.4 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:去除培养瓶内培养基,用 0.01 mol/L 磷酸

盐缓冲液 (PBS) 漂洗 5 min × 3 次; 4% 多聚甲醛液室温下固定 20 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3 次; 用 5% 的山羊血清室温下封闭 30 min; 加入兔抗大鼠 c-kit 单克隆抗体 (用 0.01 mol/L PBS 稀释 1:100) 3 mL, 37 °C 条件下静置 30 min 后放入 4 °C 冰箱过夜; 次日取出后再于 37 °C 条件下静置 30 min, PBS 洗 5 min × 3 次; 加入山羊抗兔 FITC 标记的 IgG 二抗 (用 0.01 mol/L PBS 稀释 1:50) 3 mL, 37 °C 条件下避光作用 30 min 至 1 h, PBS 洗 5 min × 3 次; 加入细胞核荧光抗体 DAPI (用 0.01 mol/L PBS 稀释 1:2 000) 染核 5 min, PBS 洗 5 min × 3 次; 加入 50% 甘油封片; 在荧光显微镜下观察细胞并摄像。

2 结果

2.1 光镜下所见形态学变化

在倒置显微镜下观察, 培养约 1 周时可见细胞从组织块向周围呈放射状生长。细胞边界清晰, 呈梭形、椭圆形、三角形或星形, 细胞核大, 细胞质较少, 可见细胞有 2~3 个明显短突起, 突起之间彼此相互连接, 但 ICC 特有的网络状结构不太明显。随着培养时间延长至约 2~4 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 1)。

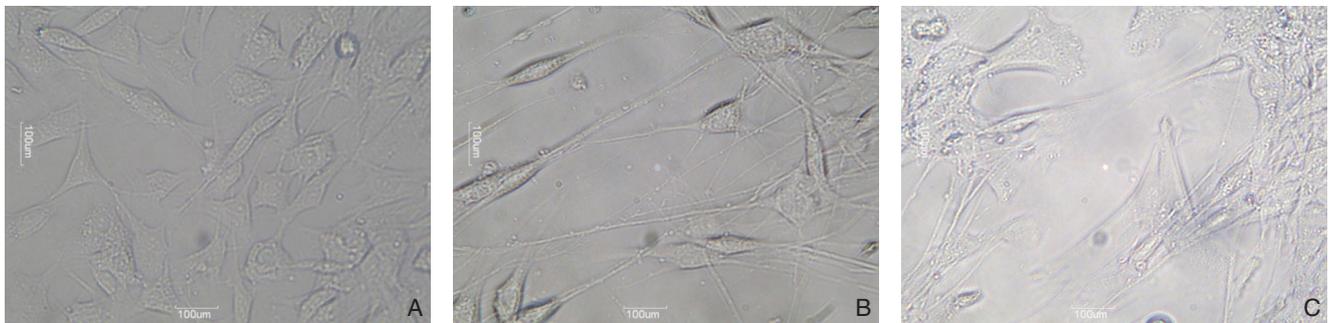


图 1 ICC 体外培养不同时期光镜下所见细胞形态 (×400) A: 1 周; B: 2 周; C: 4 周

Figure 1 The morphological features of ICC in different culture period under light microscope (×400) A: One week after culture; B: Two weeks after culture; C: Four weeks after culture

2.2 荧光显微镜下所见形态学变化

c-kit 阳性是目前确认细胞是否为 ICC 的重要指标。选择培养至 2 周的细胞使用免疫荧光双标对其进行表型分析。在荧光显微镜下可见细胞胞体呈

绿色荧光染色即 c-kit 阳性, DAPI 复染细胞核后可见细胞核呈蓝色荧光染色。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 (图 2)。

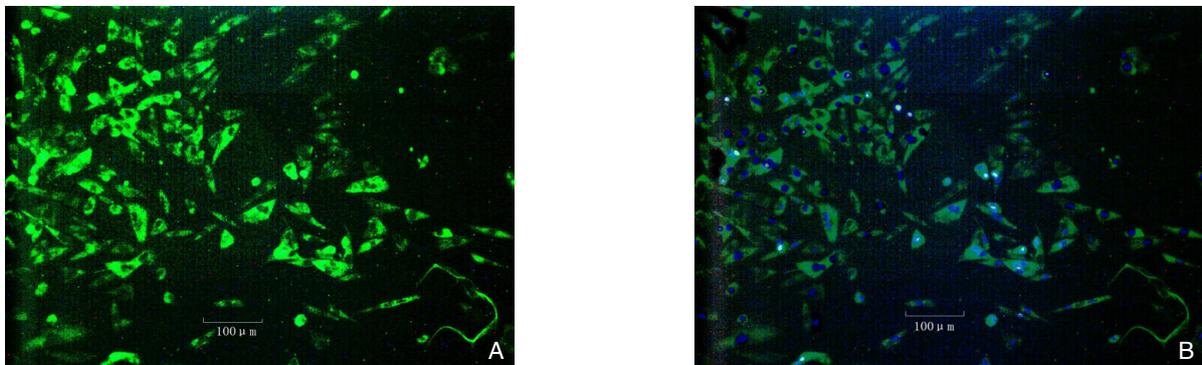


图 2 ICC 免疫荧光染色 (×200) A: c-kit 抗体荧光染色; B: c-kit 抗体荧光染色和 DAPI 染色合并图

Figure 2 Immunofluorescence staining of the ICC (×200) A: Immunofluorescence staining for c-kit antibody; B: Merged immunofluorescence images of c-kit antibody and DAPI

3 讨论

生理状态下肠神经系统、ICC和平滑肌细胞构成胃肠道运动的基本功能元件,ICC对该元件功能的发挥起着十分重要的作用^[8]。研究发现小肠移植术后移植肠运动功能障碍^[9]以及临床上常见的胃肠动力障碍性疾病如胃食管返流^[10]、胃轻瘫^[11]和慢传输型便秘^[12]等均与ICC的细胞数量减少,超微结构和网络结构破坏相关。为了阐明胃肠动力障碍性疾病的发病机制,探讨体外分离、培养及鉴定ICC的方法便显得具有临床实际意义。目前培养ICC的方法主要包括酶消化培养法和组织块培养法。胶原酶消化有可能造成ICC表面受体(尤其是c-kit受体)的损伤,从而影响细胞生长以及表型的维持^[13]。此外,酶消化法受诸多因素的影响(如严格的酶消化时间,尽可能短地暴露于无钙环境等),常导致实验的稳定性难以保证。而组织块培养法的优势在于能够最大程度地保持ICC的组织微环境,提供维持ICC生长和表型的多种信号刺激。由于新生大鼠消化道细胞增殖活跃,因此本研究采用组织块培养法,以乳大鼠小肠作为组织来源,成功建立了一套体外原代分离、培养ICC的方法。

参照Sanders和Ward的分类标准^[14-15],胃肠道的ICC被分为4种亚型,分别为肌间神经丛ICC(myenteric ICC, ICC-MY)、黏膜下ICC、深肌层丛ICC和肌内ICC。其中ICC-MY是大鼠小肠节律性慢波的起搏细胞,位于小肠环形肌和纵形肌之间,因此培养小肠平滑肌组织块的准备尤为关键。无菌条件下切取小肠,在解剖显微镜下将小肠的浆膜、肠系膜和周围的血管完全剥离,尽量做到袖套状剥脱,这样可减少对小肠的牵拉损伤。剖开小肠充分冲洗,在解剖显微镜下锐性完全刮除小肠的黏膜及黏膜下层。通过多次实验操作,笔者体会到使用注射器针头锐性刮除黏膜及黏膜下层既简便又快捷。此种方法在操作过程中几乎不需要对小肠进行牵拉或挤压,最大程度地减少了对组织内ICC的破坏和损伤。而以往采用钝性刮除或脱套式剥离肌条(固定小肠两端,于横径两侧经浆膜各剪一小切口,用镊子沿管壁将近端边缘轻轻提起牵拉)等方法均有可能由于对小肠反复的挤压或牵拉而损害或破坏了组织内的ICC。经上述一系列处理后,

所得的小肠平滑肌层不含浆膜、黏膜层及黏膜下层,因而减少了培养过程中黏膜上皮细胞、间皮细胞和肥大细胞的污染。

使用组织块法培养新生大鼠的小肠平滑肌时,笔者发现组织块对贴壁要求高。在组织块贴壁约1周后才有细胞从组织块的周围长出,而且此时的培养基颜色几乎无变化。这与文献^[16]研究结果一致。故笔者认为用组织块法培养ICC时最好在1周后再进行换液操作;这样既可避免因频繁移动培养瓶而引起组织块脱落悬浮,还可减少污染的机会。换液既能保证组织块及细胞有合适的生长环境,也能去除悬浮的组织块避免其对培养环境及细胞生长产生影响。

本研究结果发现,培养约1周时在倒置显微镜下可见细胞从组织块向周围呈放射状生长,呈梭形或星形,但ICC的网络状结构不太明显。此与文献中所描述的细胞形态相符合^[17-18]。随着培养时间至2~4周,细胞形态越来越清晰,突起相互连接形成明显的网络状结构。

c-kit受体是一种位于细胞膜上的III型酪氨酸蛋白激酶受体,由c-kit原癌基因所编码,表达于ICC、肥大细胞及造血干细胞等多种细胞^[19]。在本实验准备平滑肌组织块过程中,主要分布于小肠黏膜、黏膜下层中的肥大细胞在培养前即已被去除。本实验体外培养所得的细胞经免疫荧光双标表型分析,在荧光显微镜下观察可见细胞胞体呈绿色荧光染色即c-kit阳性,DAPI复染细胞核后可见细胞核呈蓝色荧光染色。由于小肠平滑肌细胞、神经纤维和成纤维细胞不表达c-kit受体,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。

综上所述,在借鉴前人研究的基础上,使用组织块培养法成功建立了一套由大鼠小肠平滑肌组织块原代培养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] Qi QH, Li Y, Yao CH, et al. Morphological changes in network of enteric nerve-interstitial cells of Cajal-smooth muscle cells in rats with multiple organ dysfunction syndrome and therapeutic effects of Dachengqi decoction[J]. Chin J Integr Med, 2010, 16(5):422-429.

- [2] Lee J, Kim YD, Park CG, et al. Neurotensin modulates pacemaker activity in interstitial cells of Cajal from the mouse small intestine[J]. *Mol Cells*, 2012, 33(5):509–516.
- [3] Zhang RX, Wang XY, Chen D, et al. Role of interstitial cells of Cajal in the generation and modulation of motor activity induced by cholinergic neurotransmission in the stomach[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 23(9):e356–e371.
- [4] Fukudo S, Kuwano H, Miwa H. Management and pathophysiology of functional gastrointestinal disorders[J]. *Digestion*, 2012, 85(2):85–89.
- [5] Oh JH, Pasricha PJ. Recent advances in the pathophysiology and treatment of gastroparesis[J]. *J Neurogastroenterol Motil*, 2013, 19(1):18–24.
- [6] Kilic A, Luketich JD, Landreneau RJ, et al. Alterations in the density of interstitial cells of Cajal in achalasia[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(6):1488–1492.
- [7] 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 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2011, 20(6):538–541.
- [8] Al-Shboul OA. The importance of interstitial cells of cajal in the gastrointestinal tract[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2013, 19(1):3–15.
- [9] Matsuura T, Masumoto K, Ieiri S, et al. Morphological and physiological changes of interstitial cells of Cajal after small bowel transplantation in rats[J]. *Transpl Int*, 2007, 20(7):616–624.
- [10] Woodman G, Cywes R, Billy H, et al. Effect of adjustable gastric banding on changes in gastroesophageal reflux disease (GERD) and quality of life [J]. *Curr Med Res Opin*, 2012, 28(4):581–589.
- [11] Vittal H, Farrugia G, Gomez G, et al. Mechanisms of disease: the pathological basis of gastroparesis--a review of experimental and clinical studies[J]. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2007, 4(6):336–346.
- [12] Lu J, Yik IY, Farmer P, et al. Loss of interstitial cells of Cajal (ICC) occurs in a small subgroup of children with slow transit constipation[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(S4):84–88.
- [13] Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine[J]. *J Physiol*, 1998, 513(Pt 1):203–213.
- [14] Sanders KM, Ordög T, Koh SD, et al. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 1999, 11(5):311–338.
- [15] Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation[J]. *Anat Rec*, 2001, 262(1):125–135.
- [16] 吴志轩, 余保平, 夏虹, 等. 小鼠空肠 cajal 间质细胞的分离与培养 [J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2005, 14(5):455–457.
- [17] Mikkelsen HB. Interstitial cells of Cajal, macrophages and mast cells in the gut musculature: morphology, distribution, spatial and possible functional interactions[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(4):818–832.
- [18] Xu WD, Jiang X, Lan L, et al. Long-term culture and cryopreservation of interstitial cells of Cajal[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2012, 47(1):89–98.
- [19] Choi KM, Gibbons SJ, Roeder JL, et al. Regulation of interstitial cells of Cajal in the mouse gastric body by neuronal nitric oxide[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2007, 19(7):585–595.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 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. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.018

Cite this article as: WANG SF, QIU GL, ZHAO ZH, et al. In vitro isolation, culture and identification of interstitial cells of Cajal from small intestine of rats [J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(4):494-498. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.018

本刊为《中国学术期刊网络出版总库》期刊

为了实现学术期刊媒体的数字化、网络化转型,更好地推进学术文献资源的广泛传播和深度开发利用,本刊已加入《中国学术期刊网络出版总库》。在我刊刊登的文章,该数据库可免费提供作者文章引用统计分析资料。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明或另投它刊。作者著作权使用费将在本刊稿酬中一次性给付。

《中国学术期刊网络出版总库》通过“中国知网”(www.cnki.net)和“中国期刊网”(www.chinajournal.net.cn)进行网络出版与信息服务。其集成整合和优化利用我国知识信息资源,向国内外读者提供动态信息服务,欢迎广大作者、读者浏览。

中国普通外科杂志编辑部