

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.20.024

免疫磁珠纯化人鼻黏膜上皮细胞的实验研究*

陈振振¹, 贡欣², 陆洋¹, 杜守颖^{1△}, 蔡程博¹, 尚可心¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学东方医院妇科, 北京 100078)

摘要:目的 建立高纯度人鼻黏膜上皮细胞(HNEC)的体外培养方法,为鼻制剂的评价提供良好的细胞模型。方法 采用酶消化法分离细胞、进行无血清培养。磁珠分选法选择 HNEC 群,流式细胞仪鉴定纯化前后上皮细胞纯度,扫描电镜下进行形态学观察。结果 分离培养的细胞光镜下呈铺路鹅卵石状,电镜下可见丰富的微绒毛和纤毛分化,经流式细胞仪检测鉴定分选后所得细胞纯度达到 99% 以上。结论 磁性分选系统可以直接分离得到高纯度的 HNEC,该模型可为鼻制剂的药物基础性研究提供实验基础。

关键词:鼻黏膜;上皮细胞;原代培养;免疫磁珠

中图分类号:R945

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)20-2609-04

Purification of human nasal epithelial cells by using immunomagnetic beads*

Chen Zhenzhen¹, Gong Xin², Lu Yang¹, Du Shouying^{1△}, Cai Chengbo¹, Shang Kexin¹

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Department of Gynaecology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

Abstract: Objective To establish a high purity primary culture methods of human nasal epithelial cells (HNEC) in vitro and to provide a successful primary culture model for evaluation experiments of the nasal preparation. **Methods** Primary culture of human nasal epithelial cells were performed with enzymatic dissociation of isolated tissue and cultured in serum-free medium. HNEC were separated through magnetic field by immunomagnetic beads. We determined the purity of the separated cells by light microscopy and flow cytometry. The morphology of HNEC was observed with a scanning electron microscope. **Results** Under an inverted phase microscope, the cells morphology was paving stone shaped. Under the scanning electron microscopy, abundant microvilli and cilia differentiation were observed. Flow cytometry showed the epithelial cells accounted for 99%. **Conclusion** The highly purified HNEC can be directly isolated by the magnetic cell sorting system. The cell model can be used for the basic research of nasal cavity preparation.

Key words: nasal mucosa; epithelial cells; primary culture; immunomagnetic beads

鼻腔给药可以在鼻腔起局部治疗作用或经鼻吸收后向脑内递药发挥中枢治疗作用,还可以起到治疗全身性疾病的作用^[1-2]。鼻腔给药具有避免肝脏首过效应、吸收快以及生物利用度高等优点,因此越来越多的研究者开始关注鼻制剂的研发^[3]。鼻黏膜上皮细胞模型取材于人鼻腔组织,不存在种属差异性,适合于药物转运途径和吸收机制的研究,利于药物快速筛选。因此,鼻黏膜上皮细胞模型在药物研发中的应用越来越多^[4]。目前,人鼻黏膜上皮细胞(HNEC)原代培养多采用酶消化分离细胞、差速贴壁法去除大部分成纤维细胞,再进行无血清培养,虽然可以在短时间内得到大量的细胞,但很难得到高纯度的目标细胞^[5-6]。作者拟采用免疫磁珠技术对 HNEC 进行分离纯化,探讨高纯度细胞的原代体外培养方案,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 二氧化碳培养箱(series II 型, Thermo), 倒置显微镜(CKX-41 型, Olympus), 微量移液器(Biohit), 电子天平(BS224S 型, Sartorius), 台式离心机(TDL80-2B 型, 上海安亭

科学仪器厂), 制冰机(SIM-F124 型, SANYO), FBS(Gibco), DMEM/F12 培养基(Macgene), BEGM 培养基(Lonza), D-Hanks 液(Macgene), 蛋白酶(XIV 型, Sigma), PBS (Macgene), 30 目筛网, 12 孔培养板(corning), 青霉素-链霉素(Macgene), 免疫磁珠(invitrogen Dynabeads, 16203), 鼠抗人上皮细胞角蛋白抗体 C11(PE Conjugate)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞取材和前处理 HNEC 材料来源于广安门医院耳鼻喉科鼻息肉患者经手术得到的下鼻甲组织。将鼻黏膜组织在超净台中以 D-Hanks 液(含 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素)反复冲洗,以去除表面附着的黏液、血液和坏死组织,小心去除黏膜下组织,保留黏膜层,并将组织剪成 4 mm×4 mm 大小,再以 D-Hanks 液冲洗组织 2~3 次。

1.2.2 消化法分离鼻黏膜上皮细胞^[7-8] 组织块以 0.1% 蛋白酶(XIV 型)37℃消化 1 h,酶量为组织块体积的 3~5 倍。加入 DMEM/F12 培养基(含 10% FBS、1% 双抗)终止消化,用吸管轻轻吹打组织块,使上皮细胞脱落,将细胞悬液通过 30 目

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81073057);教育部博士点基金(20090013110007);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXTD-13)。
作者简介:陈振振(1986—),在读博士,主要从事中药有效成分经鼻入脑转运机制研究。 △ 通讯作者, E-mail: dushouying@263.net。

筛网滤过,滤液转入离心管中,800 r/min 离心 5 min 后弃上清液,加入含 10%胎牛血清的 DMEM/F12(1 : 1)培养基,置培养箱中培养。1 h 后轻轻倾斜培养瓶,让液体集中到瓶角后慢慢吸出全部培养液,接种到新的培养瓶,利用不同细胞的贴壁时间差异,去除鼻黏膜上皮原代细胞中大部分成纤维细胞、内皮细胞。鼻黏膜上皮细胞以含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基常规培养 24 h 后,更换为无血清 BEGM 培养基培养,该培养基含有:氢化可的松(0.5 μg/mL),胰岛素(5 μg/mL),转铁蛋白(10 μg/mL),肾上腺素(0.5 μg/mL),三碘甲状腺氨酸(6.5 μg/mL),庆大霉素(50 μg/mL),两性霉素 B(50 μg/mL),维甲酸(0.1 ng/mL),表皮生长因子(0.5 ng/mL)。原代培养 5~7 d,每天在倒置相差显微镜下观察、记录细胞形态、增殖及生长状况、有无污染。当细胞达到 90%以上汇合时,进行分离纯化。

1.2.3 免疫磁珠纯化 HNEC^[9] 0.25%胰酶消化细胞,离心后以 PBS (pH 7.4)重悬细胞得单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,每个试管装 1 mL 细胞悬液。取 50 μL 磁珠于 5 mL 流式管中,以 PBS 冲洗 2 次以除去游离的抗体。取 1 mL 细胞悬液加入到预处理过的磁珠中,均匀混合后 2~8 ℃孵育 30 min。将结合了磁珠的细胞悬液放入高强磁场中静置 2 min,轻轻吸去试管中的液体,加入缓冲液 1 mL 吹打 2~3 次清洗磁珠,重复 2 次。加入解离缓冲液,轻轻摇动,室温下反应 15 min,吹打使细胞和磁珠解离。将流式管放入磁场中静置 2 min,轻轻吸取细胞悬液进行细胞纯度鉴定。

1.2.4 流式细胞仪分析细胞纯度 将纯化后得到的 HNEC 细胞,制成 1×10^5 个/mL 细胞悬液。取 100 μL 细胞悬液,按 1 : 50 加入鼠抗人上皮细胞角蛋白抗体(C11),混匀,室温避光孵育 15 min。800 r/min 离心 5 min,以 PBS 清洗 2~3 次。以未染色细胞为对照,用流式细胞仪进行细胞纯度鉴定。

1.2.5 不同培养基对 HNEC 生长分化的影响^[10] 将纯化后得到的 HNEC 细胞,以不培养基重悬细胞,制成 5×10^4 个/mL 细胞悬液接种于 12 孔板上。分别比较 BEGM、BEGM : DMEM/F12(1 : 1)、DMEM/F12 中添加因子对 HNEC 细胞贴壁、生长、分化的影响,隔天换液,观察并记录其贴壁生长状态。

1.2.6 扫描电镜观察细胞表面形态^[11] 为进一步对鼻黏膜上皮细胞形态及分化情况进行研究,对培养 7 d 的标本进行扫描电镜观察。将细胞 5×10^4 个/mL 接种于细胞爬片,在 12 孔板中以 BEGM 培养 7 d。戊二醛 4 ℃固定 4~6 h,1%四氧化锇后固定 30 min,采用梯度乙醇脱水法逐步取代样品中的水分。70%乙醇脱水过夜,90%乙醇脱水 15 min,无水乙醇脱水 3 次,第 1 次 15 min,第 2 次 30 min,第 3 次 45 min。脱水后的上皮细胞组织经醋酸异戊酯:无水乙醇(1 : 1)置换 30 min 处理置换乙醇,HCP-2 型临界点干燥仪干燥,E-102 型真空离子溅射仪进行镀膜处理 120 s,日立 5800 型扫描电镜观察观察并拍摄照片。

2 结 果

2.1 细胞分离培养 细胞接种后第 2 天即贴壁生长,小的上皮组织碎片周围有少量细胞游离,第 3 天时开始呈岛状快速生长(图 1)。该方法采用消化法得到细胞,并以差速贴壁法去除了大部分的成纤维细胞,可以得到较纯的 HNEC,方法成熟,

操作简便,能在较短时间内得到大量的细胞,但仍有部分成纤维细胞与 HNEC 共同生长(图 2),在得到一定数量细胞后,需要对其进一步纯化。

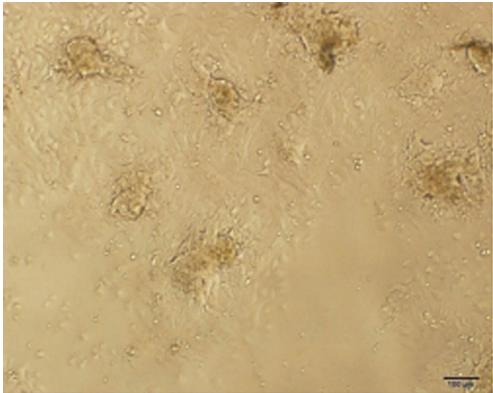


图 1 细胞呈岛状快速生长(×200)

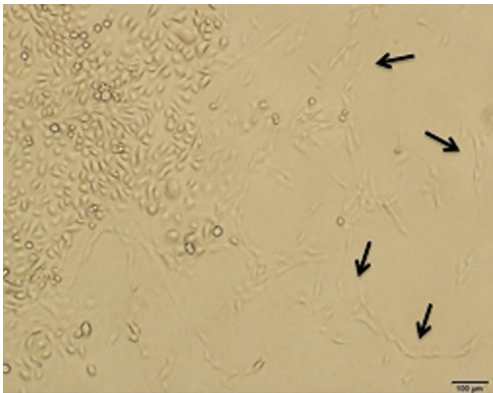


图 2 成纤维细胞的干扰(×200)

2.2 免疫磁珠纯化 HNEC 细胞 采用免疫磁珠纯化后的 HNEC 去除了成纤维细胞的干扰,得到了纯度更高的细胞。细胞呈多角形,形态更加均一,折光性强,单个散在或粘连聚集成小片,细胞逐渐汇合呈“铺路石”状,见图 3。

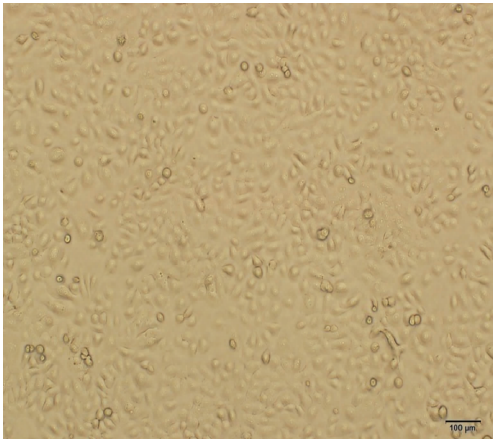


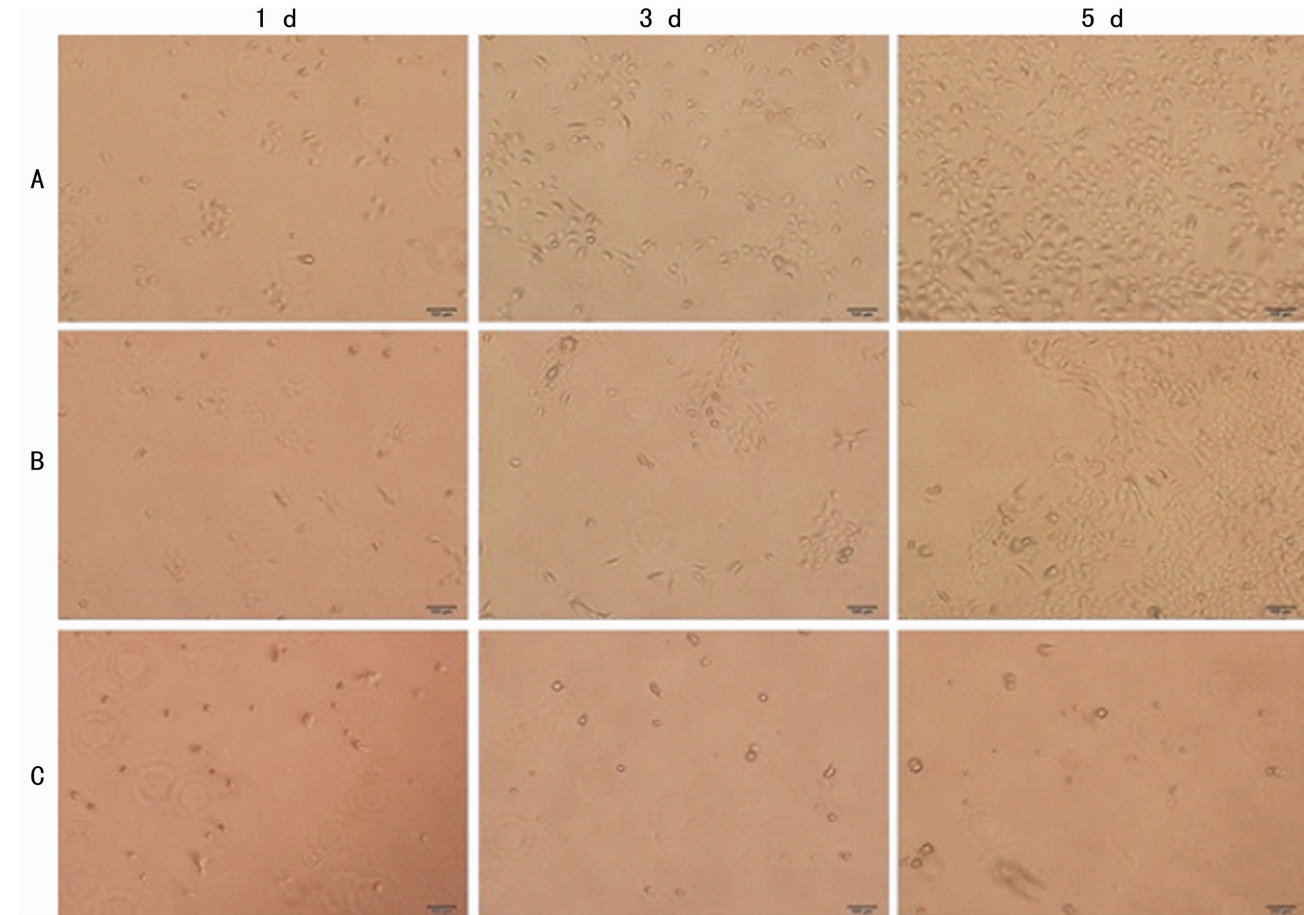
图 3 纯化后 HNEC 细胞(×200)

2.3 细胞纯度鉴定 人鼻黏膜细胞和 C11 结合后,经流式细胞仪检测、鉴定,结果显示 99%以上细胞为上皮细胞,说明本方法可以得到高纯度的 HNEC 细胞,可以用于进一步的实验研究。见图 4。

2.4 不同培养基对 HNEC 生长分化的影响 以 DMEM/F12 无细胞添加因子培养基进行培养,HNEC 细胞在 5 d 内的增殖

分化没有明显差异,随着培养时间延长,3~5 d 时细胞逐渐脱落死亡,数目减少,与 BEGM 含有添加因子培养基比较,不利于 HNEC 细胞培养。BEGM 和 BEGM : DMEM/F12(1 : 1) 含有细胞添加因子培养基对细胞生长有明显促进作用,细胞形态均一规则,在第 5 天时接近汇合,其中 BEGM 组细胞多扁平状散在生长,均匀分布,BEGM : DMEM/F12(1 : 1) 组细胞呈不规则“铺路石”状,细胞连接成片,细胞间的连接更为紧密,故可以选用 BEGM 和 BEGM : DMEM/F12(1 : 1) 培养基进行 HNEC 细胞培养。见图 5。

2.5 扫描电镜观察细胞表面形态 BEGM 培养基培养 HNEC 7 d,经扫描电镜观察,鼻黏膜上皮细胞形态规则,表面有大量微绒毛覆盖,纤毛分化良好,形态和功能与体内类似。



A:BEGM 组;B:BEGM : DMEM/F12(1 : 1)组;C:DMEM/F12 组。

图 5 不同培养基对 HNEC 生长分化的影响(×200)

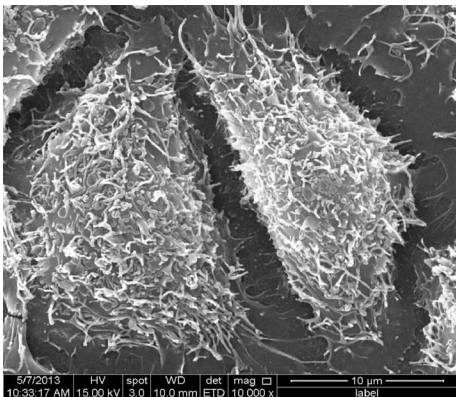
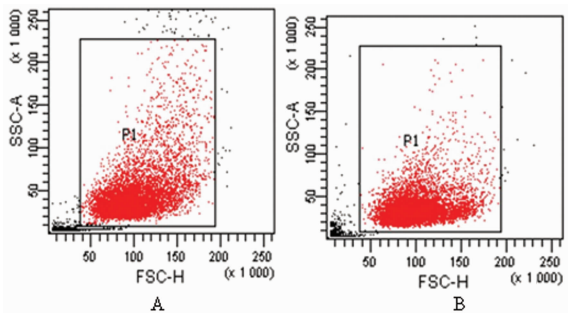


图 6 扫描电镜观察细胞表面形态(×10 000)

见图 6。



A:纯化前;B:纯化后。

图 4 流式细胞仪鉴定 HNEC 细胞纯度

3 讨 论

HNEC 模型在一定程度上可模拟体内真实条件,因而被人们广泛用于药物转运代谢的研究、药物及辅料纤毛毒性的研究、鼻黏膜上皮受体表达的研究、离子通道的研究,以及其他生理机制的研究等^[12-13]。目前,文献报道多采用组织块培养法和酶消化法培养得到鼻黏膜上皮细胞。组织块培养法由于存在组织块易漂浮,游出细胞数少,培养时间长,且各种细胞混合生长,不易纯化等诸多不利因素,在实际操作中并不常用。酶消化法最大的优势即可以在短时间内得到大量的细胞,并且可以根据细胞贴壁时间的不同去除大部分成纤维细胞的干扰,得到纯度较高的鼻黏膜上皮细胞。上皮细胞和成纤维细胞对消化酶的耐受性不同,常是成纤维细胞先脱壁,上皮细胞要消化

稍长时间才脱壁,可利用这种消化差异,同时使用无血清培养基,将上皮细胞进一步的纯化。由于这种“被动分离”方法只能控制成纤维细胞的数目,得到的细胞纯度最高达到 80%左右,很难得到更高纯度的细胞^[14]。

免疫磁珠细胞分选方法可以在几分钟内从复杂的细胞混合物中分离出很高纯度的细胞。其主要原理是利用包被了单克隆抗体的免疫磁性微粒与靶细胞特异性结合,使结合后的磁珠细胞复合体具有磁顺应性,在外加磁场的作用下被滞留在磁场中,从而与其他非磁性成分分离,达到富集纯化的目的^[15]。本实验采用阳性法提纯,以包被在磁珠表面的抗体小鼠 IgG1,与已存在于 HNEC 表面的抗原结合形成细胞磁珠复合体,经过磁场作用与其他成分分开。分选出的细胞群,经流式细胞仪检测由磁珠分离法提纯的 HNEC 占细胞总数的 99%以上,可用于细胞生物学和分子生物学后续实验研究。

目前,在酶消化法分离鼻黏膜上皮细胞过程中,以单个细胞接种还是允许有部分细胞团块,存在一定的争议。为了得到单个游离的上皮细胞而增加吹打次数,可能对细胞造成损伤导致活力下降,过大的细胞团也会影响贴壁生长。实验中发现,消化后的细胞以 30 目筛网滤过,可以得到散在的单个细胞及小的上皮组织碎片,由于这些小碎片保留了在体的生长特性,贴壁率高,且活性较单个细胞好,呈集落状快速增殖,可以在短时间得到大量的细胞。

本实验选用了鼻黏膜上皮细胞常用的培养基,比较了 BEGM、BEGM:DMEM/F12(1:1)、DMEM/F12 中添加因子对 HNEC 细胞贴壁、生长、分化的影响,细胞添加因子对细胞生长有明显促进作用,并且可以增加细胞的传代次数。BEGM 培养的细胞多呈扁平状散在生长,适合进行受体表达、离子通道等分子作用机制的研究。BEGM:DMEM/F12(1:1)培养的细胞连接成片,细胞间的连接更为紧密,更适合进行药物转运代谢的研究。

综上所述,作者建立了免疫磁珠分离纯化 HNEC 的原代培养方案,所获得的鼻黏膜上皮细胞纤毛分化良好,形态和功能与体内类似,且操作简便、高效、重复性好。原代鼻黏膜上皮细胞本身具有一定寿命,使用含有添加因子的培养基可以促进细胞的增殖并防止老化死亡,可将细胞培养延长至 10 代左右。本实验建立的鼻黏膜上皮细胞培养方法,为鼻腔制剂的药物基础研究提供了良好的体外模型。

参考文献:

[1] 王光明,潘艳,孔秋玲,等.细辛脑羟丙基-β-环糊精溶液剂鼻腔给药脑内释药可行性[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(3):16-18.
[2] 邬伟魁,张海燕,宋伟,等.中药经鼻腔给药研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(20):288-293.

[3] 陈新梅.人參皂苷 Rg1 鼻腔喷雾剂的药效学研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(10):219-222.
[4] 谢悦良,张毕奎.鼻黏膜上皮细胞模型的建立及在鼻腔给药系统评价中的应用[J].药物生物技术,2009,16(6):582-586.
[5] 杨继红,张革化,魏燕,等.酶消化分离法原代培养人鼻黏膜上皮细胞的改进[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2009,23(23):1066-1068.
[6] 王振霖,张秋航,李源,等.人鼻黏膜上皮细胞 2 种原代体外培养方案的比较研究[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2008,22(17):776-779.
[7] Yoo JW, Kim YS, Lee SH, et al. Serially passaged human nasal epithelial cell monolayer for in vitro drug transport studies [J]. Pharmaceut Res, 2003, 20(10):1690-1696.
[8] Mattinger C, Nyugen T, Schafer D, et al. Evaluation of serum-free culture conditions for primary human nasal epithelial cells[J]. Int J Hyg Environ Health, 2002, 205(3):235-238.
[9] 柳丽娟,吴玉水.免疫磁珠法分选 P75NTR 阳性的人脑胶质瘤细胞[J].细胞与分子免疫学杂志,2011,27(10):1146-1147.
[10] Dimova S, Brewster ME, Noppe M, et al. The use of human nasal in vitro cell systems during drug discovery and development[J]. Toxicol Vitro, 2005, 19:107-122.
[11] 申迹,洪苏玲.鼻黏膜炎症血清 IL-12 和 IL-4 水平及扫描电镜观察[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2010,24(20):913-917.
[12] Agu RU, Vu DH, Jorissen M, et al. Metabolism and absorption enhancement of methionine enkephalin in human nasal epithelium[J]. Peptides, 2004, 25(4):563-569.
[13] Shin JH, Son EJ, Lee HS, et al. Molecular and functional expression of anion exchangers in cultured normal human nasal epithelial cells[J]. Acta Physiologica, 2007, 191(2):99-110.
[14] 夏忠芳,孔维佳,乐建新,等.人正常鼻黏膜及鼻息肉黏膜上皮细胞的原代培养及鉴定[J].华中科技大学学报:医学版,2008,37(4):541-543.
[15] Onlamoon N, Boonchan M, Unpol P, et al. Influence of cell isolation method on the optimization of CD4⁺ T cell expansion using anti-CD3/CD28 coated beads[J]. Asian Pac J Allergy Immunol, 2013, 31(2):99-105.

(收稿日期:2014-02-08 修回日期:2014-03-12)

欢迎投稿

欢迎订阅