

人鼻黏膜上皮细胞的原代培养及传代

胡秀娟^{1,2}, 刘海兵¹, 贺广湘²

(1. 成都大学附属医院 耳鼻咽喉头颈外科, 四川 成都 610081; 2. 中南大学湘雅三医院 耳鼻咽喉头颈外科, 湖南 长沙 410013)

摘 要: **目的** 探讨人鼻黏膜上皮细胞的原代培养及传代方法。**方法** 取鼻内镜下行鼻中隔手术时切除的正常下鼻甲黏膜。以 DMEM/F12 培养基及 Keratinocyte-SFM (K-SFM) 培养基先后培养及传代, 同时培养鼻咽上皮细胞 NP69 作参照。于倒置显微镜下进行细胞形态学观察, 以台盼蓝染色观察细胞活力, 免疫细胞化学进行上皮细胞鉴定。**结果** 鼻黏膜上皮细胞呈鹅卵石样生长, 传代后形态一致性提高, 细胞活力达 88.1%, 纯度达 92.97%, 免疫组织化学证实为上皮细胞。**结论** 此方法培养的鼻黏膜上皮细胞活力及纯度高, 并可进行一定程度的传代, 是获得人鼻黏膜上皮细胞的一种有效方法。

关 键 词: 鼻黏膜; 上皮细胞; 原代培养
中图分类号: R765 文献标识码: A [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2017, 23(1): 28-32]

Primary culture and subculture of human nasal mucosa epithelial cell

HU Xiu-juan^{1,2}, LIU Hai-bing¹, HE Guang-xiang²

(1. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To explore a primary culture and subculture system of human nasal mucosa epithelial cell. **Methods** Normal infratubinal mucosa was obtained during endoscopic nasal septum operation. The tissue block was primarily cultured in DMEM/F12 and subcultured in Keratinocyte-SFM (SFM) medium respectively. Meanwhile, nasopharyngeal epithelial cells NP69 were cultured as control. Cell morphology was observed under inverted microscope. Cell vitality was determined via Trypan blue staining, and cells were identified with immunohistochemical method. **Results** The epithelial cells of nasal mucosa showed cobblestone-like growth. After passage, their morphological consistency was improved. The cell viability was 88.1% and the purity was up to 92.97%. Immunohistochemistry confirmed that they were epithelial cells. **Conclusion** This method is effective to obtain human nasal epithelial cells, which have high activity and purity, and can produce sub-generation in a certain extent.

Key words: Nasal mucosa; Epithelial cell; Primary culture
[Chinese Journal of Otorhinolaryngology-Skull Base Surgery, 2017, 23(1): 28-32]

目前细胞模型的建立是体外实验主要的研究方式之一, 药物转运代谢的研究、受体表达、离子通道等分子作用机制的研究都有赖于细胞模型的建立。本研究在前期研究的基础上, 进一步对人鼻黏膜上皮细胞进行原代培养及传代进行研究, 并与细胞系的鼻咽上皮细胞 NP69 进行对照, 取得了满意的效

果, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

所有患者知情同意并签署知情同意书, 经由中南大学湘雅三医院耳鼻咽喉头颈外科手术中取得的下鼻甲黏膜, 主要来自于鼻中隔偏曲手术患者, 排除鼻炎、鼻息肉、鼻腔鼻窦肿瘤、变态反应性疾病、糖尿病及全身性疾病。取材前 1 个月均无局部及全身使用糖皮质激素及其他细胞生长抑制剂史。鼻咽上皮

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (14JJ2038); 湖南省长沙市科技项目 (K1203050-31)。
作者简介: 胡秀娟, 女, 硕士, 医师。
通信作者: 贺广湘, Email: hegx2000@163.com

细胞:同期培养由湘雅三医院中心实验室保存的鼻咽上皮细胞 NP69。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

1.2.1.1 鼻黏膜上皮细胞培养 将术中取下的下鼻甲于无菌条件下,生理盐水浸洗,去除黏附的鼻甲骨、坏死组织及黏液、血液,放入4℃的保存液(胎牛血清75 ml,100 mg/L 氟康唑5 ml,1 000 mg/L 庆大霉素5 ml,1 万 U/L 青-链霉素5 ml, DMEM: Ham'sF12(1:1)410 ml)中转运到细胞培养室,并在4 h内于无菌超净台上,将下鼻甲黏膜周围的黏膜下组织用无菌眼科剪、镊清除干净,尽量只留下表面的黏膜层,用现配的冲洗液(100 mg/L 氟康唑、1 000 mg/L庆大霉素、0.9%氯化钠溶液按1:1:8临用前配置)反复冲洗下鼻甲黏膜3~5遍后,将下鼻甲黏膜剪成1 mm³大小组织块,参照王振霖等^[1]的方法并略作改动,以组织块30~50倍体积的0.1%胶原酶37℃消化30 min,吸出酶液,继续加入等量0.25%胰蛋白酶消化5 min,加入适量含15%血清的DMEM/F12培养基终止消化,并吹打漂洗1次,静置后组织块沉于无菌玻璃皿底时,吸去上清,以1 ml无菌注射器挑起组织块,均匀种植于35 cm²瓶底,翻转培养瓶,在对侧加入5 ml含15%血清的DMEM/F12培养基,37℃,5% CO₂,95% O₂培养箱中培养24 h后翻转培养瓶,48 h后更换Keratinocyte-SFM(K-SFM)培养基(GIBCO公司)培养,每4 d换液,并于倒置显微镜下进行细胞形态学观察。

1.2.1.2 鼻咽上皮细胞培养 打开孵育箱,调至36~37℃,从液氮罐中取出冻存的NP69鼻咽上皮细胞,快速放入孵育箱中复温,待冻存管中冻存液差不多溶解后尽快进入细胞培养间,将冻存管中液体倒入离心管,加入5~10 ml PBS后,1 000 r离心5 min,去上清,摇匀后加入5 ml K-SFM培养基转入培养瓶中培养。

1.2.2 细胞传代

1.2.2.1 鼻黏膜上皮细胞传代 待到第10天左右,细胞呈对数生长时,弃去培养液,用PBS液漂洗1次,加入0.25%胰蛋白酶0.3 ml于37℃消化,倒置相差显微镜下观察到细胞收缩变圆并开始漂浮时,加入含15%血清的DMEM/F12培养基(Hyclone公司)消化,移液管轻轻吹打,使细胞完全脱离培养瓶底呈悬浮状态,将细胞悬液移至15 ml离心管,1 000 r离心5 min,弃去上清,加入K-SFM培养基,按1:3的比例接种到35 mm²培养皿中。

1.2.2.2 鼻咽上皮细胞传代 复苏后的鼻咽上皮细胞贴壁生长后迅速融合,一般3~4 d左右即可传代1次,传代步骤基本同上。

1.2.3 细胞活力检测 将0.4%的台盼蓝液与细胞悬液按1:9的比例混匀,使台盼蓝终浓度为0.04%,取10 μl滴入放有盖玻片的细胞计数板中,1 min后在显微镜下计数,被染成蓝色的为死细胞,未着色的是活细胞。成活率=活细胞数/细胞总数×100%,重复3次取平均值。

1.2.4 上皮细胞鉴定及纯度检测 用倒置显微镜,分别在物镜为10、20及40倍下观察鼻黏膜上皮细胞及NP69细胞的生长状态、形态学变化,摄相记录。用克隆号为AE1/AE3的鼠抗人细胞角蛋白(广谱)单克隆抗体(福州迈新)通过SP法进行免疫组化鉴定,阴性对照组采用PBS替代一抗。在显微镜下随机选取3个视野,记数阳性着色细胞,进行细胞纯度计算:阳性着色细胞数/细胞总数×100%,重复3次取平均值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件包对数据进行统计分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。细胞成活率及细胞纯度比较用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态特征及生长状态

2.1.1 鼻黏膜上皮细胞 接种1 d时,组织块贴壁牢固,2 d时组织块边缘疏松,有少数分散细胞,3 d时边缘见少量细胞生长,以组织块为中心逐渐向四周分裂增殖(图1a)。7 d时组织块边缘发生出数量较多细胞,呈鹅卵石状(图1b),形成细胞集落,核大居中,分裂相明显,可见2~3个核仁,胞浆透明,无颗粒,细胞间排列紧密,稀疏处细胞呈梭形。约10 d时细胞集落相互融合。

融合后的细胞进行传代,24 h贴壁,7~10 d融合为单层细胞。传代后的细胞形态与原代相似,但细胞形状一致性较前提高,均呈现短梭形,近似NP69细胞形态(图1c)。细胞生长至第20天开始,出现老化细胞,胞界模糊,胞质流失,细胞生长停滞甚至凋亡,培养液中可见漂浮死细胞(图1d)。

2.1.2 鼻咽上皮细胞(NP69) 复苏后24 h贴壁,单个细胞呈均匀分布(图1e),2~3 d融合成片(图1f),呈现典型的铺路石样(图1g),4 d长满培养瓶底(图1h),进行传代,传代后细胞生长稳定。

2.2 上皮细胞免疫细胞化学鉴定结果

免疫细胞化学鉴定鼻黏膜细胞及 NP69 细胞角蛋白(AEI/AE3)染色均为阳性,胞核蓝染,胞浆呈棕黄色(图 2a、b),证实为上皮细胞。而用 PBS 替代一抗的阴性对照组则胞浆为半透明状(图 2c、d)。

2.3 细胞成活率及纯度比较

由表 1 可见,鼻黏膜上皮细胞的成活率显著低于 NP69 细胞的成活率($P<0.01$),但其细胞纯度明显高于 NP69 细胞纯度($P<0.01$)。

表 1 鼻黏膜上皮细胞及 NP69 细胞成活率及纯度比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	细胞成活率	纯度
鼻黏膜上皮细胞	88.10 $\pm$ 1.24	92.97 $\pm$ 2.57
NP69 细胞	94.11 $\pm$ 2.58	81.80 $\pm$ 1.73
χ^2	7.895	13.802
P	0.005	0.0002

3 讨论

鼻黏膜上皮细胞属不稳定细胞,且与外界相通,行原代培养时易污染,生长周期短,不易传代,不利于后续的进一步研究。本研究综合以往原代细胞培养方法并加以改进,试图寻找到比较高效的原代培养方法并进行细胞传代。

王振霖等^[1]通过比较组织块培养方案和分离细胞培养方案的鼻黏膜上皮细胞体外培养成功率发现分离细胞法优于组织块培养法,但预实验时通过比较两种方法,发现两种方法差异无统计学意义。为便于观察,本实验选择组织块培养法结合 Li 等^[2]的方法进行了改进,增加了 0.25% 胰蛋白酶消化,其主要目的在于先用 I 型胶原酶进行上皮细胞的柔和分离,以免损伤上皮细胞,然后利用胰蛋白酶较强

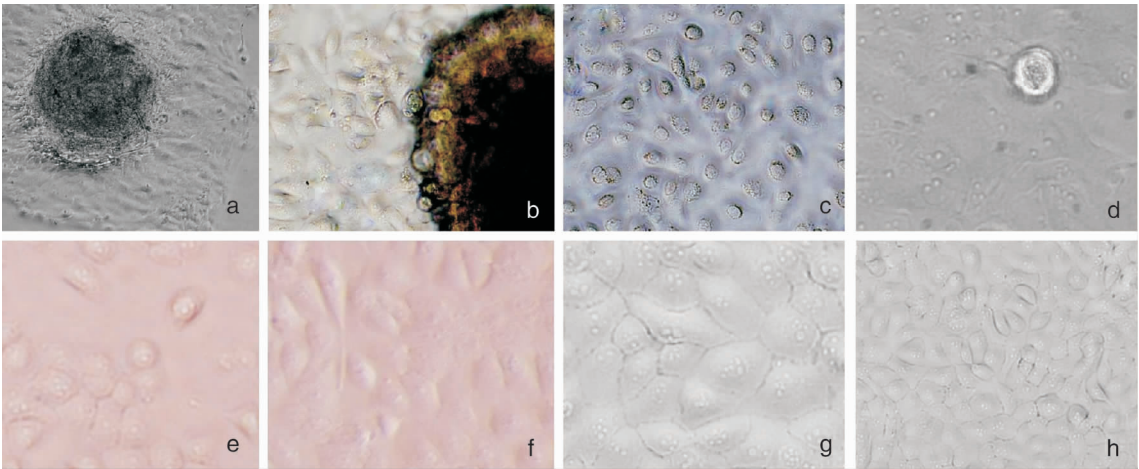


图 1 鼻黏膜上皮细胞和 NP69 在倒置显微镜下的形态观察
满瓶底 d、g(台盼蓝 $\times 200$);a、b、c、e、f、h(台盼蓝 $\times 100$)
a~d:鼻黏膜上皮细胞从生发到凋亡;e~h:NP69 从贴壁到铺

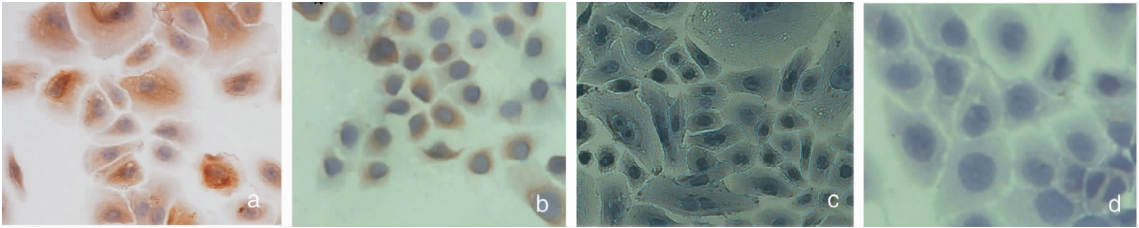


图 2 鼻黏膜上皮细胞及 NP69 细胞免疫化学
角蛋白(AEI/AE3)在鼻黏膜上皮细胞(a)及 NP69 细胞(b)中均呈阳性表达,主要位于胞浆,鼻黏膜上皮细胞(c)和 NP69 细胞(d)的阴性对照组胞浆成半透明状 a、c(SP $\times 200$);b、d(SP $\times 400$)

的解离作用将组织块中剩余的粘附较紧的上皮细胞分离出来,提高上皮细胞的分离率。张茹等^[3]即是通过改变原代取材时的消化酶及培养基,从而克服成纤维细胞的污染,使食管黏膜上皮的原代及传代培养获得成功。另外,改进的组织块培养法将组织块干贴壁于培养瓶底有利于组织块尽快贴壁,而其对侧加入含血清培养基,待24 h后翻转培养瓶,则是因为组织块干贴壁需要的时间在24 h左右,过早地翻转培养瓶会造成组织块贴壁不牢从而漂浮起来。现有研究发现,血清中除含有促进细胞增殖的因子外,尚有TGF β_1 等能刺激成纤维细胞生长、竞争性抑制上皮细胞的因子^[4],因此早期予以含血清培养基是因为血清中的成分有利于细胞贴壁生长,但是长期使用含血清培养基势必会影响上皮细胞的生长,因此,48 h后待组织块和细胞贴壁牢靠时更换为无血清K-SFM培养基。K-SFM培养基为无血清角质细胞培养液,其为Gibco公司设计的上皮细胞所使用的无血清培养基,其中除了细胞生长所需常规营养物质外,还加入了人重组表皮生长因子和牛脑垂体提取物等适合上皮来源细胞生长的细胞因子^[5],能有效地促进上皮细胞的生长。实验结果证实,改进的组织块培养法培养的上皮细胞的分离率、存活率及生长状态均较好。

原代培养还需要注意的一个问题就是细胞纯化的问题。原代细胞绝大多数都是呈混合性生长,既有上皮样细胞又有纤维样细胞。混杂细胞可直接影响实验结果,因此,需要从混杂细胞中分离出所需细胞,纯化细胞。常用的细胞纯化方法有:①细胞时间差酶消化法。这种方法比较常用,适合于贴壁和半贴壁细胞以及黏附细胞的分离纯化;②细胞培养机械刮除法。这种方法适合于上皮细胞与成纤维细胞区分片生长时,但操作不慎,则易污染;③细胞反复贴壁法。利用成纤维细胞比上皮细胞早贴壁的特性进行反复贴壁以达到纯化细胞的目的。但此操作过程繁杂,且浪费培养瓶;④细胞电烙筛选法。该法和机械刮除法相似,也是容易污染。蒋明等^[6]应用阿糖胞苷抑制非神经节细胞的生长以达到神经细胞的纯化。但用其抑制成纤维细胞的生长效果不甚理想,可能与其在抑制成纤维细胞生长的同时也抑制了上皮细胞的生长有关。此外,也使用5-溴脱氧尿嘧啶核苷抑制成纤维细胞,效果根据培养细胞种类不同而异。本实验所用K-SFM是一种无血清角质细胞专用培养基,对目的细胞的培养更具有针对性,在抑制成纤维细胞增殖的同时,促进目的细胞生

长。本实验细胞纯度检测也证实该法培养出的鼻黏膜上皮细胞纯度较高,达90%以上,与夏忠芳等^[7]以ABC反复贴壁法获得鼻黏膜上皮细胞纯度不相上下,甚至更高。由此可见,本实验法成纤维细胞污染率低,降低了纯化难度,使培养过程更为简便。而本实验中所用细胞系NP69所做角蛋白鉴定结果表明,其纯度约为81.8%,较鼻黏膜上皮细胞低,可能与细胞系传代次数过多、细胞生长发生变异、细胞生长状态欠佳等有关。

早在1985年Wu等^[8]就通过加入多种促生长因子制成无血清培养基对人类鼻黏膜上皮细胞进行培养和繁殖,并在试验中观察到这些促生长因子(胰岛素、转铁蛋白、上皮细胞生长因子、氢化可的松、霍乱毒素、三碘甲状腺原氨酸和牛下丘脑提取物)必不可少。而王丰等^[9]通过胶原酶消化分离法建立的人鼻黏膜呼吸区上皮细胞原代培养模型中则额外加入了内皮细胞生长因子。陈振振等^[10]证实富含添加因子的BEGM培养基更利于人鼻黏膜上皮细胞的生长,但其添加因子较多。Ishinaga等^[11]的基础培养基里补充了18种添加物,Miyata等^[12]无血清培养基中补充了12种添加物,Fischer等^[13]更是加入了25种之多。本实验采用的K-SFM仅需加入两种必须营养因子(重组表皮细胞生长因子和牛脑垂体提取物)便可很好地促进上皮细胞的生长,使用这种培养基亦不需要反复去除混杂细胞,避免了操作的繁杂性,降低了污染率,不失为原代上皮细胞等角质细胞培养的最佳选择。

另外,最近文献报道^[14-15]的人鼻黏膜上皮细胞培养,用组织块法或专有的冲洗刷刷取鼻黏膜,最终都选择气液界面法进行细胞培养及分化,但其周期相对较长,约需35~45 d。而本方法所培养的鼻黏膜上皮细胞生长对数期基本在10 d左右,时间相对较短,有利于尽快进行后续研究。

此方法培养的鼻黏膜上皮细胞活力及纯度均较高,并可进行一定程度的传代,是目前获得人鼻黏膜上皮细胞的一种有效方法。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Li HB, Shi JB, Cao F, et al. Hypertonic saline solution stimulated CLC-3 production in primary cultured human nasal epithelial cells. J Auris Nasus Larynx, 2008,35(1):47-51.

- [3] 张茹, 龚均, 王晖, 等. 人正常食管黏膜上皮细胞的纯化分离和传代培养[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(16): 1468 - 1471.
- [4] 柯朝阳, 吴展元, 肖伯奎. 人喉上皮细胞的原代培养[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2008, 7(1): 23 - 25.
- [5] 张志强, 王玉杰, 木拉提·热夏提, 等. 角质细胞无血清培养基促进大鼠毛囊干细胞的增殖[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(45): 7918 - 7923.
- [6] 蒋明, 张永全, 贺广湘, 等. 阳离子脂质体介导小鼠原代螺旋神经节细胞 NT-3 基因转染的实验研究[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2006, 12(1): 10 - 13.
- [7] 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.
- [8] Wu R, Yankaskas J, Cheng E, et al. Growth and differentiation of human nasal epithelial cells in culture. Serum-free, hormone-supplemented medium and proteoglycan synthesis[J]. Am Rev Respir Dis, 1985, 132(2): 311 - 320.
- [9] 王丰, 苏振伦, 黄靖香, 等. 鼻粘膜呼吸区上皮细胞原代培养模型的建立和纤毛运动频率的测量[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2000, 14(8): 370 - 372.
- [10] 陈振振, 贡欣, 陆洋, 等. 免疫磁珠纯化人鼻黏膜上皮细胞的实验研究[J]. 重庆医学, 2014, 43(20): 2609 - 2612.
- [11] Ishinaga H, Takeuchi K, Kishioka C, et al. Effects of dexamethasone on mucin gene expression in cultured human nasal epithelial cells[J]. J Laryngoscope, 2002, 112(8): 1436 - 1440.
- [12] Miyata R, Kakuki T, Nomura K, et al. Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells[J]. J European Journal of Pharmacology, 2015, 761(15): 375 - 382.
- [13] Fischer WA, King LS, Lane AP, et al. Restricted replication of the live attenuated influenza A virus vaccine during infection of primary differentiated human nasal epithelial cells[J]. J Vaccine, 2015, 33(36): 4495 - 4504.
- [14] Yan Y, Tan KS, Li C, et al. Human nasal epithelial cells derived from multiple subjects exhibit differential responses to H3N2 influenza virus infection in vitro[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 138(1): 276 - 281.
- [15] Jumar MR, Yan Y, Ravi LI, et al. Morphogenesis of respiratory syncytial virus in human primary nasal ciliated epithelial cells occurs at surface membrane microdomains that are distinct from cilia[J]. Virology, 2015, 484: 395 - 411.

(收稿日期: 2016 - 10 - 17)

· 消息 ·

敬请关注《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》官方微信平台



《中国耳鼻咽喉颅底外科杂志》官方微信已正式上线启动(微信号: ebyhld2016), 通过微信平台, 可在线浏览杂志官方网站、当期杂志摘要、目录索引、过刊内容、投稿须知等信息, 敬请关注!

请扫描二维码, 或是搜索“中国耳鼻咽喉颅底外科杂志”即可进入我刊官方微信平台。