

# 气液界面培养的鼻黏膜上皮细胞的纤毛分化

郭永清<sup>1</sup> 赵小冬<sup>2</sup> 杨占泉<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:建立培养人鼻黏膜上皮(HNE)细胞的纤毛分化模型。方法:HNE细胞培养在覆盖型胶原凝胶的支持膜上,采用无血清培养液,行气液界面(ALI)培养,用扫描电镜及图像分析技术对纤毛面积进行定量分析。结果:液面下培养2周的HNE细胞纤毛分化很差(0.31%),而行ALI培养2周的HNE细胞纤毛分化数量明显增加(8.62%),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论:采用ALI培养,提供细胞生长的极性环境,可以促进体外培养的鼻黏膜上皮细胞的纤毛分化。

**[关键词]** 细胞,培养的;鼻粘膜;纤毛

**[中图分类号]** R329.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-1781(2004)02-0088-03

## Ciliogenesis in human nasal epithelial cells cultured at the air-liquid interface

GUO Yongqing<sup>1</sup> ZHAO Xiaodong<sup>2</sup> YANG Zhanquan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, First Clinical Academy of Medical College of Xiamen University, Xiamen, 361004, China; <sup>2</sup>Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Third Clinical Academy of Medical College of Jinlin University)

**Abstract Objective:** In the present study, our aim was to develop a method to quantitative cell differentiation in cultures of human nasal epithelium (HNE) cells. **Method:** HNE cells were cultured on collagen-coated membranes at an air-liquid interface (ALI) in hormone and growth factor-supplemented medium. The percentage of the culture surface covered with ciliated cells was estimated using scanning electron microscope and image analysis. **Result:** In present study, if an ALI was not established and the cells were maintained in the submerged state, ciliated cell differentiation was poor, the average ciliated surface area was 0.3% when cultures were submerged for fourteen days. When HNE cells cultures in ALI, average ciliated surface area was 8.6%. **Conclusion:** Our study demonstrated increased ciliogenesis in ALI.

**Key words** Cells, cultured; Nasal mucosa; Cilia

以往的单层细胞培养往往造成细胞的脱分化现象,失去细胞原来具有的分化特征。近年来发现细胞外基质可以促进体外培养细胞的分化,而且模拟上皮细胞生长特点,发明了气液界面 (air-liquid interface, ALI) 培养的新技术<sup>[1]</sup>。本文采用这一最新的研究成果,试图建立培养人鼻黏膜上皮 (human nasal epithelial, HNE) 细胞纤毛分化模型,对纤毛分化的程度进行定量分析,为探讨呼吸道上皮细胞的生理及病理学特征提供一先进的研究手段。

### 1 材料和方法

#### 1.1 HNE 细胞分离及培养

标本来源于日本三重大学医学部耳鼻咽喉科行功能性鼻窦内镜手术切除的鼻息肉组织 9 例,术后立即放入 4 ℃ PBS 中冲洗,去除表面黏液,然后将完整的鼻息肉放入含有 0.05% 蛋白酶 XIV (Sigma, St. Louis, MO) 的 Ham F<sub>12</sub> 培养液中,4 ℃ 作用 12 h,培养液中含有 100 000 IU/L 青霉素,100 mg/L 链霉素,50 mg/L 庆大霉素,2.5 mg/L 二性霉素。消化后,加入小牛血清 (终浓度为 2.5%) 以

中和蛋白酶活性。经振荡使上皮细胞完全脱落,将细胞悬液离心,然后用 Ham F<sub>12</sub> 培养液洗 3 次。

将上述离心后获得的细胞加入 50% Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) 培养液和 50% Ham F<sub>12</sub> 培养液中;并加入以下激素及生长因子 (Sigma, St. Louis, MO): 10 mg/L 胰岛素、5 mg/L 转铁蛋白、20 μg/L 三碘甲状腺氨酸、0.36 mg/L 氢化可的松、7.5 mg/L 内皮细胞生长因子、25 μg/L 表皮生长因子、0.1 μmol/L 维生素 A 酸、20 μg/L 霍乱毒素,并含以下抗生素: 100 000 IU/L 青霉素,100 mg/L 链霉素,50 mg/L 庆大霉素,2.5 mg/L 二性霉素。经台盼蓝染色证明细胞活性 > 90%,将 6 ml 细胞悬液加入到 T<sub>25</sub> 细胞培养瓶中,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、95% 空气条件下培养 1 h,细胞悬液中的纤维母细胞首先贴壁 (目的是清除纤维母细胞),将未贴壁的上皮细胞取出,转入支持膜 (Falcon culture inserts) 上培养,支持膜直径 24.5 mm,孔径 0.4 μm,由多聚乙烯构成,供细胞生长的营养物质可以通过支持膜。胶原蛋白凝胶的制备过程如下 (材料来源于日本 Nitta Gellatin 公司提供的试剂盒): 将 8 份 I 型胶原蛋白溶液 (3.0 g/L, pH 3.0) 中加入 1 份 10 倍 Ham F<sub>12</sub> 培养液,1 份缓

厦门大学医学院第一临床学院耳鼻咽喉科 (福建厦门, 361004)  
吉林大学医学部第三临床学院耳鼻咽喉-头颈外科

冲液(0.2 mol/L HEPES,0.08 mol/L NaOH)在 0℃ 下充分混合,将混合液加入到 6 孔培养板内的支持膜上,每孔加入 1 ml,37℃ 下放置 30 min,使其凝固成胶原蛋白凝胶(collagen gels,CG)。将上述去除纤维母细胞的 HNE 细胞悬液 $0.5\text{ ml}$ (含  $2 \times 10^5$  个细胞)加入到覆盖 CG 处理的支持膜上,支持膜下方加入 2 ml 培养液,在 5%  $\text{CO}_2$ 、95% 空气条件下培养 12 h 后,去掉未贴壁的细胞及培养液,更换新的培养液。以后每 3 天换液 1 次。经 1 周左右细胞长满支持膜后,将支持膜上方的培养液完全去除,细胞生长所需的营养成分由支持膜下方供给,即 ALI 培养(图 1),对照组则不去除上方培养液,仍保持液面下培养(图 2)。对每例标本,ALI 组和对照组各用 2 个支持膜培养。

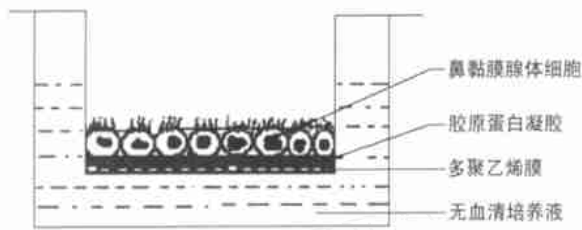


图 1 HNE 细胞的 ALI 培养

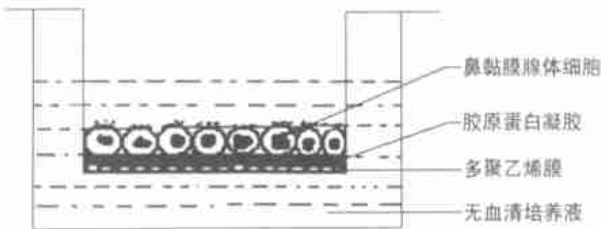


图 2 HNE 细胞的液面下培养

### 1.2 扫描电镜观察及纤毛面积定量分析

培养细胞表面用 PBS 冲洗去除黏液,2.5% 戊二醛 4℃ 下固定 1 h,0.1 mol/L PBS 4℃ 下冲洗

2 h,1% 锇酸 4℃ 下固定 2 h,梯度乙醇脱水,醋酸异戊酯置换 20 min,临界点干燥,喷镀金属导电层,扫描电镜观察。

对每个临界点干燥后的标本在扫描电子显微镜下观察,随机拍摄 3 张 1000 倍照片,用 IBAS-1000 图像分析仪(kontron electronics,德国)计算出每张照片纤毛面积的百分比,最后算出平均值。

### 1.3 抗人角蛋白单克隆抗体免疫组织化学染色

培养 1 周后完全长满支持膜的细胞,经胰酶-EDTA 消化后,做成单细胞悬液,将细胞离心于玻片上,自然干燥后,用丙酮固定。采用免疫组织化学 ABC 法:正常稀释血清作用 20 min,鼠抗人角蛋白单克隆抗体(AE<sub>1</sub>/AE<sub>3</sub>)60 min,PBS 洗 10 min,生物素标记的二次抗体作用 60 min,PBS 洗 10 min,ABC-AP 试剂作用 30 min,碱性磷酸酶底物作用 30 min,PBS 冲洗,对比染色,封片。

## 2 结果

### 2.1 HNE 细胞的纯化及生物学特性

分离的细胞悬液在培养瓶中 37℃ 放置 1 h,混入的大部分纤维母细胞首先贴壁。未贴壁的上皮细胞悬液放入到支持膜上断续培养,经 1 周左右细胞完全融合,融合后的细胞用胰酶-EDTA 消化后,经鼠抗人角蛋白单克隆抗体(AE<sub>1</sub>/AE<sub>3</sub>)染色,所有细胞均呈阳性反应(图 3),证明为上皮细胞。

12 h 后大部分细胞贴壁,呈现上皮细胞结构特征,经 1 周左右细胞长满支持膜。

### 2.2 HNE 细胞的纤毛分化

经扫描电镜观察,对照组培养 1 周的上皮细胞表面布满微绒毛;培养 2 周的上皮细胞只有少量纤毛生长,平均为(0.31 ± 0.12)%(图 4)。ALI 组培养 2 周的上皮细胞可见明显的纤毛细胞分化(图 5),平均纤毛面积为(8.62 ± 2.15)%,与对照组相

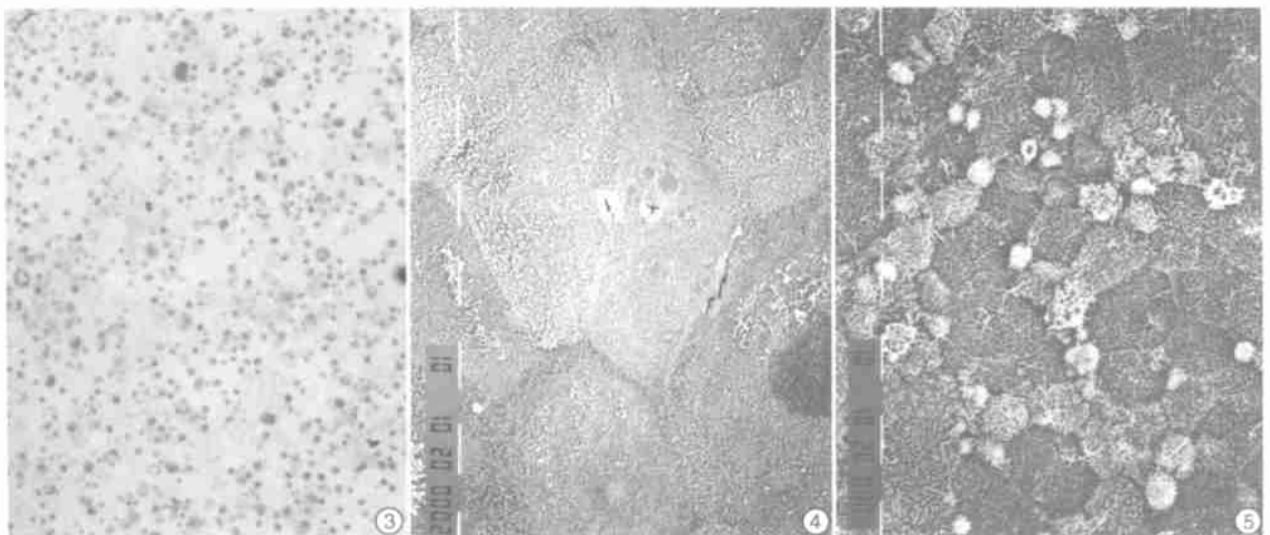


图 3 AE<sub>1</sub>/AE<sub>3</sub> 免疫组织化学染色,所有细胞均呈阳性反应 图 4 对照组培养 2 周的 HNE 细胞扫描电镜下可见少量纤毛生长 ×1000; 图 5 ALI 组培养 2 周的 HNE 细胞扫描电镜下可见明显的纤毛细胞分化 ×1000

比具有明显的促纤毛分化作用 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

关于呼吸道上皮细胞培养的研究较多<sup>[2]</sup>,但这些培养系统均缺乏纤毛及分泌表型的分化。培养的上皮细胞的增殖与分化受很多因素影响,包括细胞分离过程、细胞生长的支持物质、培养液构成以及培养方式等。近年来细胞培养技术发展很快,利用蛋白酶分离上皮细胞已得到广泛应用,其方法简单而且可以获得较多的细胞数。作为细胞的生长物质目前应用最多的是细胞外基质,如型胶原蛋白等可以促进上皮细胞的贴壁、增殖和分化。以往的上皮细胞培养主要是在玻璃或塑料的培养皿上进行单层贴壁培养,这种方法常常造成细胞的脱分化 (didifferentiation) 现象,失去细胞原来所具有的生理功能。为阻止这种现象的发生,人们不断地探索如何模拟体内的细胞生长环境促进细胞分化。型胶原蛋白是构成细胞外基质主要成分的纤维性蛋白,广泛存在于动物皮肤、骨骼肌腱等部位。这些组织经弱酸处理后,胶原纤维之间的结合受到破坏,胶原蛋白分子(分子量 300 000)可以溶解出来,将这种酸性溶液的 pH 值中和后,于 25 ~ 37 加温后,胶原蛋白分子之间可以结合,形成纤维状的 CG。最近的研究表明,CG 不仅可以促进细胞贴壁而且可以促进细胞分化。

从培养液来看,适用于上皮细胞的有 Ham F<sub>12</sub>、DMEM 等,而作为细胞培养添加剂的小牛血清有促进细胞老化的作用,在呼吸道上皮细胞培养中已很少应用,取而代之的是在培养液中加入生长因子、激素等成分,称为无血清培养。利用这些方法培养的呼吸道上皮细胞的形态特征和生理功能更接近

于正常机体细胞。但纤毛的分化仍较差。根据上皮细胞生长具有极性的特点,利用 ALI 培养系统,模拟正常上皮细胞的营养供应系统,从培养的细胞层下方供给培养液,上方暴露于空气,人为地造成细胞生长的极性,这一方法培养的气管上皮细胞呈现更多的分化特点,如纤毛、分泌颗粒,离子传输功能接近于正常机体细胞。

近年来关于呼吸道上皮细胞纤毛分化的研究多为动物及人的气管上皮,鼻黏膜上皮细胞研究较少。本文利用分离的鼻肉上皮细胞进行 ALI 培养,目的是建立一个合适的纤毛细胞分化模型。结果表明,经 1 周的液面下培养,细胞表面布满微绒毛,无纤毛细胞生长,培养 2 周的细胞表面仍覆盖微绒毛,只有少量纤毛细胞 (0.31%) ;而 ALI 培养 2 周的细胞表面纤毛明显增加,经定量图像分析,平均纤毛覆盖面积为 8.62% ,说明 ALI 培养对纤毛细胞分化有明显的促进作用。利用这一培养模型培养的细胞接近于正常生理状态,为探讨影响上皮细胞分化的各种因素,以及纤毛上皮的生理特点及病理机制提供了先进的研究手段。

### 参考文献

- Whitcutt M J, Adler K B, Wu R. A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultures respiratory tract epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1988, 24: 420 - 428.
- Beazar-Spuiban A, Romet S, Morean A, et al. Progress in outgrowth culture from rabbit tracheal explants: balance between proliferation and maintenance of differentiated state in epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, 27: 453 - 460.
- Kondo M, Finkbeiner W E, Widdicombe J H. Cultures of bovine tracheal epithelium with differentiated ultrastructure and ion transport. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1993, 29: 19 - 24.

(收稿日期:2003-01-22)

## 下咽部巨大金属异物 1 例

金峰<sup>1</sup> 王展平<sup>1</sup> 冯丹<sup>1</sup>

[关键词] 异物;下咽

[中图分类号] R649.4

[文献标识码] D

[文章编号] 1001-1781(2004)02-0090-01

患者,女,34岁。吞服金属异物 2 h,急诊送入我科。自述咽痛、呼吸费力。体检:神志清楚,度喉梗阻,咽黏膜光滑,略充血。间接喉镜:下咽部正中一金属异物,只露出部分,周围黏膜轻度充血水肿,声门窥不见。因异物巨大、坚硬,几次钳取均滑脱。患者呼吸困难逐渐加重,经肌肉注射地塞米松 10 mg,0.5 h 后喉梗阻加重,不能平卧。当即患者由门诊直接进入手术室,经面罩加压给氧后平

卧。常规气管切开,插入一次性 7 号硅胶气管套管,患者进入全麻状态。置开口器,用大号止血钳先将右侧扁桃体前弓推向后侧,用止血钳撬动异物露出一角,用手指抵住异物,再处理左侧。顺利取出铁锁 1 枚。铁锁长 7.5 cm,宽 5.0 cm。术后检查:右前弓黏膜少许破损,会厌披裂无肿胀。术后抗感染治疗,气管切开术后常规护理。术后第 10 天,堵管无异常,顺利拔管,出院。

(收稿日期:2003-12-22)

本溪市中心医院耳鼻咽喉科(辽宁本溪,117000)