

大鼠胃 Cajal 间质细胞的分离和培养

刘 勇, 齐清会

刘勇, 天津医科大学附属肿瘤医院胃肠肿瘤科 天津市 300060
齐清会, 大连医科大学附属第一医院普外科 辽宁省大连市 116011
刘勇, 男, 1975-10-06 生, 天津市人, 汉族, 2004 年天津医科大学博士毕业.
项目负责人: 刘勇, 300060, 天津市, 天津医科大学附属肿瘤医院胃肠肿瘤科. libra_ly@163.com
收稿日期: 2004-12-13 接受日期: 2004-12-21

Isolation and Culture of Rat Gastric Interstitial Cells of Cajal

Yong Liu, Qing-Hui Qi

Yong Liu, Department of Gastrointestinal Tumor, Cancer Hospital of Tianjin Medical University, 300060, Tianjin, China
Qing-Hui Qi, Surgery Department, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 116011, Liaoning Province, China.
Correspondence to: Dr. Yong Liu, Department of Gastrointestinal Tumor, Cancer Hospital of Tianjin Medical University, 300060, Tianjin, China. libra_ly@163.com
Received: 2004-12-13 Accepted: 2004-12-21

Abstract

AIM: In order to investigate the pacing mechanism of the interstitial cells of Cajal (ICC), the method for isolation and culture of ICC from the Wistar rat stomach was explored.

METHODS: The gastric tissue of Wistar rat was dissected. Collagenase was used to isolate ICC. The cells were suspended in smooth muscle cell medium containing stem cell factor. The medium was changed every other day until the cells were used. The c-Kit antibody was applied to label ICC to distinguish them from smooth muscle cells.

RESULTS: ICC in culture maintained the intrinsic characteristics: multiple processes, large nuclei, and intercellular network. Fluorescent staining with c-Kit antibody confirmed that the culture ICC was successful.

CONCLUSION: ICC has been isolated by enzyme digestion method from Wistar rat stomach and cultured successfully.

Key Words: Wistar rat; Stomach; Interstitial cells of Cajal; Dissociation; Culture

Liu Y, Qi QH. Isolation and Culture of Rat Gastric Interstitial Cells of Cajal. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(4):495-498

摘要

目的: 探索 Wistar 大鼠胃 Cajal 间质细胞 (ICC) 的分离和培养方法, 为进一步研究其起搏机制提供条件.

方法: 取出 Wistar 大鼠的胃组织, 采用胶原酶酶解法分离细胞, 将细胞悬液接种于含干细胞因子的平滑肌细胞培养基中, 进行培养, 隔日换液. 用 c-Kit 特异性抗体标记细胞, 证实细胞类型.

结果: 培养后的 ICC 保持其固有特征, 多突起, 核大, 相互之间连接形成网络, c-Kit 抗体荧光染色证实细胞培养成功.

结论: 酶解法分离 Wistar 大鼠胃 ICC 并培养成功.

关键词: Wistar 大鼠; 胃; Cajal 间质细胞; 分离; 培养

刘勇, 齐清会. 大鼠胃 Cajal 间质细胞的分离和培养. 世界华人消化杂志 2005; 13(4):495-498
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/495.asp>

0 引言

Cajal 间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 作为胃肠运动的起搏细胞, 越来越受到关注, 多种胃肠运动障碍疾病均与之相关. 目前对其起搏机制还缺乏十分明确的认识. 因此, 从细胞学角度进行深入研究, 有助于了解 ICC 的起搏机制及信号传导途径, 有利于更深入地掌握疾病本质, 制定合理有效地防治措施. 目前国外学者只对 Balb/c 小鼠的胃肠 ICC 成功进行了分离和培养, 国内外尚未见对 Wistar 大鼠胃肠道 ICC 进行分离和培养的报道. 我们尝试进行了 Wistar 大鼠胃 ICC 的分离和培养, 并取得成功.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 3-4 月龄, 体质量 160-200 g, 雌雄兼有, 禁食不禁水 48 h, CO₂ 吸入麻醉后, 断颈处死. 腹部正中切口打开腹腔, 自贲门和幽门处离断组织, 取出胃 (包括胃底、胃体和幽门) 置于冷 KRB 液 (Krebs-Ringer bicarbonate solution: (mmol/L) Na⁺ 137.4, K⁺ 5.9, Ca²⁺ 2.5, Mg²⁺ 1.2, Cl⁻ 134, HCO₃⁻ 15.5, H₂PO₄⁻ 1.2, 葡萄糖 11.5, 37.5 ± 0.5 °C, pH 7.3-7.4, 970-30 m/L CO₂ 冒泡) 中. 小心去除系膜, 沿小弯缘剪开胃, 洗净内容物. 将胃组织钉固于蜡板上, 锐性去除黏膜和黏膜下层. 将分离出的肌肉组织剪成约 1-2 mm³ 小块.

1.2 方法 新鲜分离的肌条小块在酶解液中 37 °C 孵育

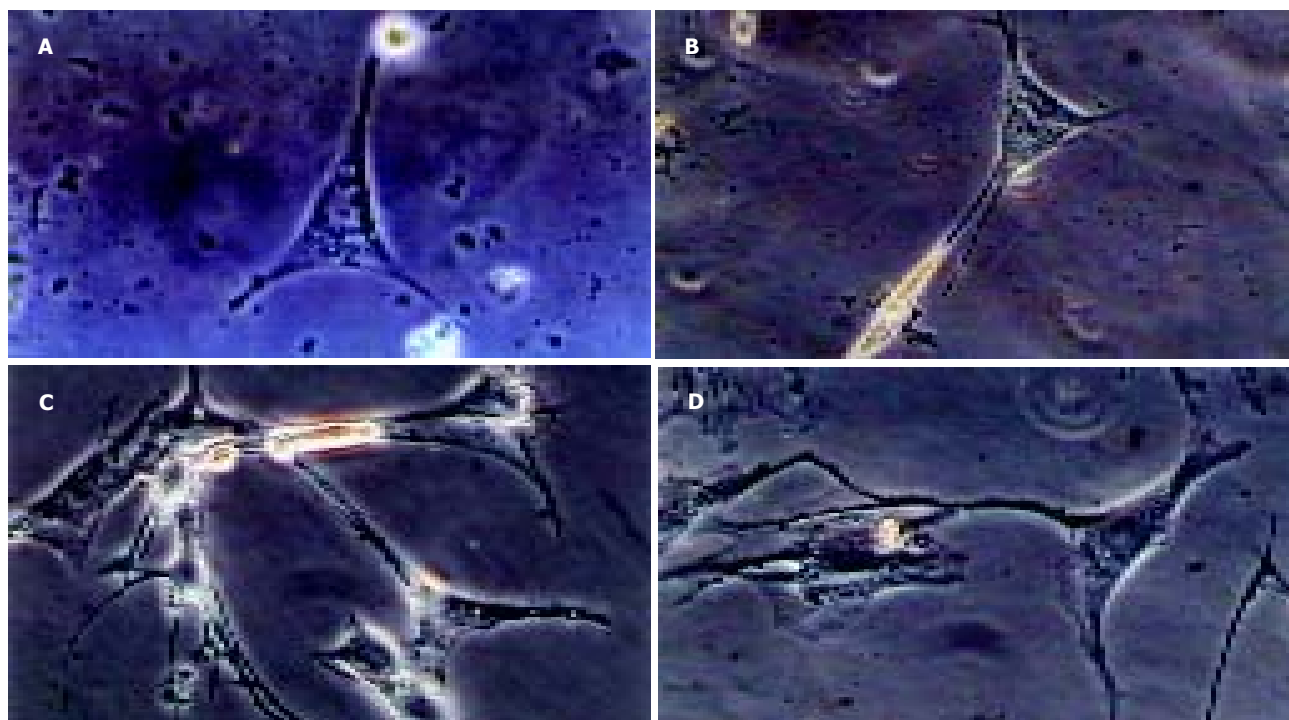


图1 培养后 ICC 的变化. A: 3 d, $\times 200$, 细胞胞体呈三角形, 突起伸展; B: 5 d, $\times 100$, 细胞突起伸出, 周围有平滑肌细胞; C: 7 d, $\times 100$, 细胞突起向不同方向伸出, 相邻 ICC 突起间有连接; D: 9 d, $\times 200$, 细胞突起向各方向伸出, 有次级突起, 与相邻 ICC 突起及邻近平滑肌细胞间有连接.

60 min, 轻微搅拌. 酶解液包括: DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco 公司, USA), 1.0 g/L II 型胶原酶 (Sigma 公司, USA). 30 min 更换 1 次酶解液, 吸出的上清酶液置于离心管内 4℃ 保存. 消化结束后, 将组织和前面的上清液一同经过 100 目筛网过滤. 收集滤液, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入含 200 g/L 胎牛血清 (Hyclone, USA) 的 SMGM (Smooth Muscle Grown Medium, Clonetics, Cambrex Bio Science Walkersville, USA) 5 mL, 吹打沉淀, 使细胞悬浮. 混悬液置于培养瓶中, 37℃ 贴壁 1 h. 再加入 7 mL 含 200 g/L 胎牛血清的 SMGM, 加入 20 g/L 抗菌素 (青霉素 G 钠 200 kU/L, 硫酸链霉素 200 g/L, 两性霉素 B 0.5 g/L)、2 mmol/L 谷氨酰胺、5 μ g/L SCF (stem cell factor from mouse, Sigma, USA), 吹打均匀, 轻轻吸取出上清, 平均加到带有圆形盖玻片的无菌六孔培养板 (Corning, USA) 中. 在 37℃、50 mL/LCO₂ 培养箱 (Jouan SA, France) 中孵育. 48 h 后, 培养基换为含有 SCF 的 SMGM, 加入 20 g/L 抗菌素和 2 mmol/L 谷氨酰胺. 培养基隔日更换. 取贴壁良好的细胞玻片, 弃去培养基, 用 40 g/L 多聚甲醛 (PBS 稀释) 溶液 4℃ 固定 30 min. 固定后, 标本在 PBS 液 (0.01 mol/L pH 7.4) 中冲洗 45 min (3 \times 15 min). 在含 100 mL/L 山羊血清 (北京中山试剂公司) 的 PBS 液中室温 (21–24℃) 孵育 60 min, 减少非特异性抗体的结合. 标本中加入兔抗大鼠 c-Kit 蛋白多克隆 IgG 抗体 (c-19, Santa Cruz, USA, 1:200, PBS 稀释) 37℃

温箱孵育 1 h, 4℃ 冰箱孵育过夜. 用 PBS 液冲洗 (3 \times 5 min), 加入次级抗体 FITC 结合山羊抗兔 IgG 抗体 (Sigma, USA, 1:50, PBS 稀释) 37℃ 温箱避光孵育 60 min. 阴性对照不加一抗, 只用 PBS, 余操作步骤相同. 将玻片置于 Chamber Slide (Molecular probes, USA) 上, 采用 Olympus 倒置显微镜 (CK40 型, Japan) 和 Bio-Rad Radiance 2000 激光扫描共聚焦显微镜 (USA) 观察结果并采集图像.

2 结果

培养 3 d 后, 可分辨出 ICC 形态, 胞体呈三角形, 可见大的细胞核, 核周胞质少, 突起伸展, 与平滑肌有显著不同 (图 1A). 培养 5 d 后, ICC 形态更加清晰, 大的胞核很清楚, 自胞体发出的突起向周围伸长; 相邻的平滑肌细胞呈梭形, 二者从形态上很容易区分 (图 1B). 培养 7 d 后, 相邻 ICC 突起间有连接形成, 部分 ICC 的细胞突起与邻近平滑肌细胞也形成连接 (图 1C). 培养 9 d 后, ICC 细胞突起向各方向伸出, 在初级分支上还可见二级分支, 与相邻 ICC 和平滑肌细胞间形成连接, ICC 突起交织, 形成小的、较为分散的网络 (图 1D). 在共聚焦显微镜下观察, 可见 ICC c-Kit 免疫荧光染色呈阳性 (图 2), 细胞间相互联系, 突起交织, 呈网络状. 同时培养的平滑肌细胞 c-Kit 染色为阴性.

3 讨论

ICC 的分离很困难. 他们与许多类型的细胞之间紧密相

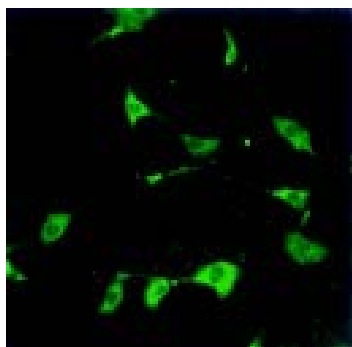


图2 ICC培养9 d后, 免疫荧光染色显示c-Kit阳性($\times 200$).

连, 如平滑肌细胞和神经纤维束. 同时, 成年动物的胃肠道 ICC 包埋在致密的结缔组织基质中, 尤其是胶原纤维^[1]. 有关犬结肠、小鼠和豚鼠胃肠道的 ICC 分离、培养至今已有报道, 但对 Wistar 大鼠胃肠道 ICC 细胞的分离、培养还未见报道. 我们参照 Koh *et al*^[2] 方法, 适当改进, 首次进行大鼠胃 ICC 的分离和培养. 实验只选用 II 型胶原酶进行酶解, 因为胶原酶具有很好的活性, 且对细胞损害最小^[3]. 细胞培养 2-3 d 后 ICC 的突起伸展出来, 胞体呈三角形或梭形, 核大而明显, 伴少量核周胞质, 可与平滑肌细胞明显区分. 细胞培养 4-5 d, 可见 ICC 的突起明显, 向周围的细胞伸展, 个别细胞与 ICC 或平滑肌细胞有接触. 细胞培养 7 d 后, 可见 ICC 相互之间及与平滑肌细胞之间有连接, 部分 ICC 形成小的网络状结构. 文献报道^[4-7], 培养 2-3 d 即可见到明显 ICC 网络或细胞团簇, 培养 ICC 的同时也会有平滑肌细胞生长, 二者很容易区分. 本实验的 ICC 生长缓慢, 平滑肌细胞生长较好, 3-5 d 即可见成团的平滑肌细胞, 其中间或有 ICC. 研究表明^[8-10]干细胞因子(stem cell factor, SCF)是 ICC 生长和发育所必需的, 也与 c-kit 基因表达密切相关. 实验中 ICC 浓度较低, 生长缓慢可能是由于培养中加入的干细胞因子(stem cell factor, SCF)是小鼠源性, 与实验大鼠有一定的种属差别, 导致 ICC 生长发育缓慢. 其次, 由于 ICC 对缺氧十分敏感, 我们实验的温箱环境与文献^[2, 11]不太一致, 氧浓度不足可能也是 ICC 生长发育迟缓的原因之一.

为取得良好的细胞分离和培养结果, 实验中应注意: (1) 在清洗组织、去除胃黏膜和黏膜下层过程中, 避免过度牵拉肌组织, 尽可能使用较小的机械性拉力, 使获得的 ICC 数量增加; (2) 在混悬细胞时, 快速吸取或吹打, 且使用的吸管口径偏小, 可降低随后培养细胞的成功率; (3) 由于 ICC 的细胞间连接紧密, 适宜的酶解浓度可有效使细胞分散, 且避免大量细胞因酶浓度过高而破裂; (4) 分散细胞尽量采用轻微振荡, 避免剧烈操作; (5) 酶消化时间应适中, 自剪切成肌条小块到最后接种培养的时间尽量缩短; (6)

尽可能选取鼠龄较短的大鼠作为实验对象, 细胞生长较快. 因为刚酶解后的 ICC 形态变圆, 突起消失, 失去了 c-Kit 免疫活性^[12], 在细胞悬液内难以与其他细胞区分出来. ICC 在培养 3-5 d 后, 具备了典型的细胞形态, 有利于在相差显微镜下与平滑肌细胞相区分; 且 c-Kit 免疫活性在培养 24 h 后恢复, 更利于标记和区分^[2]. 在培养细胞团和细胞网络中, 为了较好的区分出 ICC, 特异性免疫标记就更重要.

胃肠道中, c-Kit 免疫活性只在 ICC 中表达^[13]. 目前 c-Kit 抗体的免疫组化检测, 作为一种特异的 ICC 染色法, 用于研究 ICC 分布、密度、ICC 之间和 ICC 与其他类型细胞的关系及变化^[14-15]. c-kit 基因为原癌基因, 位于 5 号染色体 W 位点上, 编码具有酪氨酸激酶的细胞表面跨膜受体 c-Kit, 后者对 ICC 的发育和功能维持至关重要^[15-18]. 根据 ICC 的特性, 我们采用 c-Kit 抗体标记, 进行免疫荧光染色, 确定培养细胞的类型. 发现 c-Kit 免疫活性仍为 ICC 所特有, 平滑肌细胞无着色. 荧光显微镜下可见 ICC 细胞突起向各个方向伸展, 相互联系, 交织成网络状; 细胞呈梭形或三角形, 核大、核周胞质较少; 相差显微镜下可见 ICC 突起与平滑肌细胞之间也有联系. 分离的 ICC 需 2-3 d 培养才伸出分支, 且 ICC 在培养条件下有很高的形成网络特性^[2-3]. ICC 之间以及平滑肌细胞的相互连接是 ICC 发育的基础, 保持这些细胞类型之间的相互作用可维持 ICC 的正常功能. 我们采用的分离和培养方法简便易行, 操作并不复杂, 所需试剂也易于购置. 实验所得 ICC 细胞形态完整, 数量较多, 可以进行常规各种细胞学和细胞电生理研究. 大鼠胃 ICC 分离培养的成功有利于今后不断深入研究 ICC 的起搏机制, 发现和阐明各种离子通道和信号传导途径, 进一步研究 ICC 在各种胃肠运动功能障碍疾病中的作用机制和相关药物治疗作用的靶位点. ICC 的分离和培养方法日臻完善, 对其进行深入研究已成为可能.

4 参考文献

- 1 Faussone-Pellegrini MS. Histogenesis, structure and relationships of interstitial cells of Cajal (ICC): from morphology to functional interpretation. *Eur J Morphol* 1992;30:137-148
- 2 Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J Physiol* 1998;513(Pt 1):203-213
- 3 Lee JC, Thuneberg L, Berezin I, Huizinga JD. Generation of slow waves in membrane potential is an intrinsic property of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 1999;277(2 Pt 1):G409-423
- 4 Torihasi S, Fujimoto T, Trost C, Nakayama S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem* 2002;277:19191-19197
- 5 Kim YC, Koh SD, Sanders KM. Voltage-dependent inward currents of interstitial cells of Cajal from murine colon and small intestine. *J Physiol* 2002;541(Pt 3):797-810

- 6 Kim TW, Koh SD, Ordog T, Ward SM, Sanders KM. Muscarinic regulation of pacemaker frequency in murine gastric interstitial cells of Cajal. *J Physiol* 2003;546(Pt2):415-425
- 7 Zhu Y, Golden CM, Ye J, Wang XY, Akbarali HI, Huizinga JD. ERG K⁺ currents regulate pacemaker activity in ICC. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1249-1258
- 8 Mikkelsen HB, Malysz J, Huizinga JD, Thuneberg L. Action potential generation, Kit receptor immunohistochemistry and morphology of steel-Dickie(SI/Sld)mutant mouse small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 1998;10:11-26
- 9 Ordog T, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach. *J Physiol* 1999;518(Pt1):257-269
- 10 Rich A, Miller SM, Gibbons SJ, Malysz J, Szurszewski JH, Farrugia G. Local presentation of Steel factor increases expression of c-kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G313-320
- 11 Jun JY, Choi S, Chang IY, Yoon CK, Jeong HG, Kong ID, So I, Kim KW, You HJ. Deoxycholic acid inhibits pacemaker currents by activating ATP-dependent K⁺ channels through prostaglandin E2 in interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *Br J Pharmacol* 2004;29:1-10
- 12 Epperson A, Hatton WJ, Callaghan B, Doherty P, Walker RL, Sanders KM, Ward SM, Horowitz B. Molecular markers expressed in cultured and freshly isolated interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C529-359
- 13 Takaki M. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* 2003;39:137-161
- 14 Vannucchi MG. Receptors in interstitial cells of Cajal: identification and possible physiological roles. *Microsc Res Tech* 1999;47:325-335
- 15 Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jimenez M. Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G255-266
- 16 Wester T, Eriksson L, Olsson Y, Olsen L. Interstitial cells of Cajal in the human fetal small bowel as shown by c-kit immunohistochemistry. *Gut* 1999;44:65-71
- 17 Hirst GD, Ward SM. Interstitial cells: involvement in rhythmicity and neural control of gut smooth muscle. *J Physiol* 2003;550(Pt2):337-346
- 18 Daigo Y, Takayama I, Ponder BA, Caldas C, Ward SM, Sanders KM, Fujino MA. Differential gene expression profile in the small intestines of mice lacking pacemaker interstitial cells of Cajal. *BMC Gastroenterol* 2003;3:17

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005年全国胃病诊治研讨会征文通知

本刊讯 为了推动消化内镜及相关专业对各种胃病的诊断与治疗研究进展,中华医学会消化内镜学分会定于2005-06在大连召开全国胃病诊治研讨会.会议将安排专题报告,论文交流,图像演示及自由讨论等内容.现将征文内容及有关事宜通知如下:

1 征文内容

(1)各种胃病的内镜,病理诊断及分类;分型;(2)各种胃病与 *H pylori*;(3)各种胃病与胃肠激素;(4)各种胃病与胃肠动力学;(5)放大内镜对胃良性病变,癌前病变及早期胃癌的诊断应用;超声内镜对胃良性,恶性疾病的诊断应用;(6)各种胃病的药物治疗(胃黏膜保护剂,药物根除 *H pylori*,各种抗酸,抑酸剂,改善胃动力失常药剂及抗癌剂等);(7)内镜下对某些胃炎,溃疡病,早期胃癌的治疗;对各种胃病的诊断与治疗以及其他临床研究与基础研究.

2 稿件要求

全文及摘要(摘要800-1000字),均用中文打印(要求有光盘);截稿日期为2005年3月20日.

3 投稿地址及联系方式

地址:辽宁省沈阳市和平区砂阳路252号,中华医学会辽宁分会学术会务部(邮编:110015)

联系人:刘敏杰 电话:024-23391410,传真:024-23391410(稿件注明:“全国胃病学术会”)

主办:中华医学会消化内镜学分会

承办:中华医学会辽宁分会