

鸡气管黏膜上皮基底细胞的分选与鉴定研究

孙 裴¹, 杨 榕¹, 魏建忠¹, 李 郁¹, 王桂军¹, 张彦明², 郭抗抗²
(1. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036; 2. 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

摘 要: 鸡气管黏膜上皮细胞是 IBV 和其他禽病原体感染的重要靶细胞。气管黏膜上皮细胞种类多样, 不同细胞对病原感染敏感性有差异, 研究与比较 IBV 感染不同种类气管黏膜上皮细胞特性有助于弄清 IBV 分子感染机制。利用流式细胞仪技术, 使用基底细胞特异性抗体从鸡气管黏膜上皮细胞中分选出基底细胞。通过基底细胞培养形态的观察、生长曲线的绘制和特异性免疫荧光的鉴定, 成功获得能够稳定生长繁殖的高纯度的鸡气管黏膜基底细胞, 为今后 IBV 或其他相关研究奠定技术基础和提供了良好的种子细胞。

关键词: 鸡气管黏膜上皮; 基底细胞; 流式细胞仪; 分选; 鉴定

中图分类号: Q954.6-333; S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)01-0001-05

Sorting and identification of basal cells of chicken tracheal mucosa

SUN Pei¹, YANG Rong¹, WEI Jianzhong¹, LI Yu¹, WANG Guijun¹, ZHANG Yanming², GUO Kangkang²
(1. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;
2. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100)

Abstract: Chicken tracheal epithelial cells are important target cells by infected with IBV or other poultry pathogens. Tracheal epithelial cells include different types of cells, each of which has different susceptibility to pathogenic infection. Researching and comparing infection characters of different types of tracheal epithelial cells by IBV helps to clarify IBV molecular infection mechanism. In this study, by using flow cytometry technology and basal cell specific antibody, chicken basal cells of chicken tracheal mucosa were sorted out; by observing the morphology of cultured basal cell, mapping growth curves and specific immunofluorescence identification, high purity chicken tracheal mucosa basal cells with stable growth and reproduction were successfully obtained, which lays a technical foundation for future IBV or other relevant research and providing good seed cells.

Key words: chicken tracheal epithelium; basal cells; flow cytometry; sorting; identification

病毒受体是引发宿主受病毒感染的主要决定因素。宿主的组织及细胞表面特定受体是决定病毒入侵途径、扩散方式及决定宿主发病特点的主要因素。Winter^[1-2]等报道, IBV 感染细胞对细胞表面分子 α -2,3-唾液酸受体具有一定的依赖性。鸡的气管组织能表达 α -2,3-唾液酸, 鸡的气管黏液中也含有丰富的游离的唾液酸^[3-4]。IBV 宿主感染动力学研究表明, IBV 最初是通过眼、鼻等途径进入机体, 而呼吸道上皮是 IBV 定植和增殖的最先位置, 鸡气管上皮细胞是 IBV 感染机制研究的重要靶细胞^[5-6]。

气管黏膜上皮组织是假复层单层细胞结构, 气管黏膜上皮细胞按其功能和结构特点主要可以分

为, 纤毛细胞、杯状细胞(分泌细胞)、基底细胞 3 种^[7-8]。研究结果发现, IBV 可以感染纤毛细胞和杯状细胞, 但不感染基底细胞, 这被推测可能与基底细胞天然不表达 α -2, 3-唾液酸受体有关。那么, 基底细胞不被 IBV 感染是否只是因为缺乏 α -2,3-唾液酸受体? 或是基底细胞另有抗 IBV 感染的其他机制? 这尚不清楚, 也尚未见到相关报道。因此, 本研究拟体外通过细胞培养技术、流式细胞仪技术^[9], 将基底细胞分选出来, 为 IBV 感染性研究, 甚至其他其他禽呼吸道病原致病机制的研究, 提供种子细胞。迄今为止, 尚未见到从鸡气管黏膜上皮细胞中将基底细胞分离与培养的相关报道。

收稿日期: 2013-12-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31001071)资助。

作者简介: 孙 裴, 博士, 副教授。E-mail: sunpei1979@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物来源 1日龄非免疫健康雏鸡,由安徽农业大学动物医院提供。

1.1.2 培养基和血清 DMEM/F12 培养液, Invitrogen 公司产品;胎牛血清(FBS),浙江四季青生物公司产品;雏鸡血清, Gibico 公司产品。

1.1.3 细胞生长因子 胰岛素(Insulin, INS), 转铁蛋白(Transferrin, TF), 人表皮生长因子(Human Epidermal growth factor, HEGF), 牛垂体提取物(Bovine pituitary extract, BPE), 氢化可的松(Hydrocortisonum, HC), 均为 Sigma 公司产品, 使用时分别配制成 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰岛素、 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 转铁蛋白、 $25 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 人表皮生长因子、 $20 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 牛垂体提取物; 谷氨酰胺(Glutamine)为 Merck 公司产品, 使用时配制成谷氨酰胺 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。参考文献[10]方法, 上述生长因子使用时, 均按培养液: 生长因子=100:1 比例添加。

1.1.4 抗生素与消化液 庆大霉素、两性霉素 B、青霉素和链霉素, 均为 Invitrogen 公司产品, 使用时配制成青霉素 $100 \text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、链霉素 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、两性霉素 B $500 \text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、庆大霉素 $100 \text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$; 参考文献[11]方法, 上述抗生素使用时, 均按培养液: 抗生素=100:1 比例添加。XIV型链酶蛋白酶、ATV(Antibiotic trypsin versen), 均为 Sigma 公司产品。

1.1.5 免疫荧光鉴定和流式细胞仪分选抗体 抗基底细胞 SNA 特异性单克隆抗体和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 均购自 Sigma 公司。0.01%伊文氏蓝溶液用来稀释基底细胞免疫荧光鉴定抗体稀释。

1.1.6 主要仪器设备 200目无菌滤筛, 一次性24孔和6孔细胞培养板, 一次性90mm细胞培养皿, 普荧光倒置显微镜, 二氧化碳培养箱, 高速台式离心机。多色荧光流式细胞仪(MoFlo XDP 细胞分选, 美国 Beckman 公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 气管黏膜上皮细胞的分离与培养 按文献[12,13]方法消化分离鸡气管黏膜上皮细胞。按照 1×10^3 个 $\cdot\text{cm}^{-2}$ 接种在90mm细胞培养皿中进行细胞培养, 分别于6h、12h、24h、36h、48h及72h观察细胞生长情况, 设置重复一个, 第2个细胞培养皿中一孔放置7mm \times 22mm盖玻片, 待细胞铺满盖玻片70%时进行基底细胞免疫荧光的鉴定^[14]。

1.2.2 气管黏膜上皮细胞中基底细胞免疫荧光的鉴

定 待盖玻片上的细胞铺满至70%时, 取出盖玻片, 使用无菌 PBS 轻柔冲洗3遍, 然后用醋酸/甲醇固定20min。将固定的细胞玻片置入盖片染色缸, 用 PBS 振洗5min, 取出吹干。滴加抗 SNA 单克隆抗体, 在湿盒中37℃保温30min, PBS 振洗2次, 每次5min, 然后用蒸馏水振洗1次。再滴加0.01%伊文氏蓝溶液按操作说明稀释的 FITC-IgG 二抗, 在湿盒中37℃保温45min。PBS 振洗2次, 每次5min, 然后用蒸馏水振洗1次。用50%缓冲甘油封片, 使用荧光显微镜观察有无特异性荧光出现, 且阳性细胞应该是细胞膜和细胞浆被着色^[15-16]。

1.2.3 流式细胞仪分选基底细胞 分别对原代气管黏膜上皮细胞及分选后并培养到第3代的基底细胞进行目的细胞的初分选和进一步分选。参考文献[17,18]方法, 简述如下。待分选细胞制成悬液, 每管含有 1×10^5 个细胞。1500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心, 5min, 再加入100 μL 按说明要求稀释的 SNA 单克隆抗体, 震荡混匀, 置冰浴中30min, 然后用冷细胞洗涤液(含2%胎牛血清和0.01%叠氮钠的 PBS)离心洗去游离单克隆抗体, 再用100 μL 以1:40稀释的 FITC-IgG 复染。用细胞洗涤液洗去游离的 FITC-IgG 后, 每管加入0.5mL细胞重悬液(含0.01%叠氮钠的 PBS), 振荡混匀。立即送往中国科技大学在 MoFlo XDP 型流式细胞仪上进行分选^[19]。激发光波长为488nm, 分选速度设定为 $1\times 10^6\sim 2\times 10^6$ 个 $\cdot\text{min}^{-1}$ 。分选后的细胞再按照气管黏膜上皮细胞培养技术进行培养。

1.2.4 基底细胞纯培养与生长曲线的绘制 将上述流式细胞仪分选出的目的细胞, 按 1×10^2 个 $\cdot\text{cm}^{-2}$ 接种24孔细胞培养板。待细胞铺满培养孔90%以上时, 使用 ATV 消化液进行消化, 38℃, 2~5min, 然后加含10%胎牛血清的培养液终止消化, 按 1×10^3 个 $\cdot\text{cm}^{-2}$ 接种6孔细胞培养板, 分别于1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d、9d和10d观察细胞生长情况, 按照文献[20]方法, 绘制细胞生长曲线。其中一个培养孔放置7mm \times 22mm盖玻片, 待细胞铺满盖玻片70%时进行基底细胞免疫荧光的鉴定。

1.2.5 分选后培养的基底细胞免疫荧光鉴定 如同1.2.2方法, 对1.2.4盖玻片上的生长细胞进行基底细胞免疫荧光鉴定, 观察荧光阳性细胞数并应观察到细胞膜和细胞浆着色。

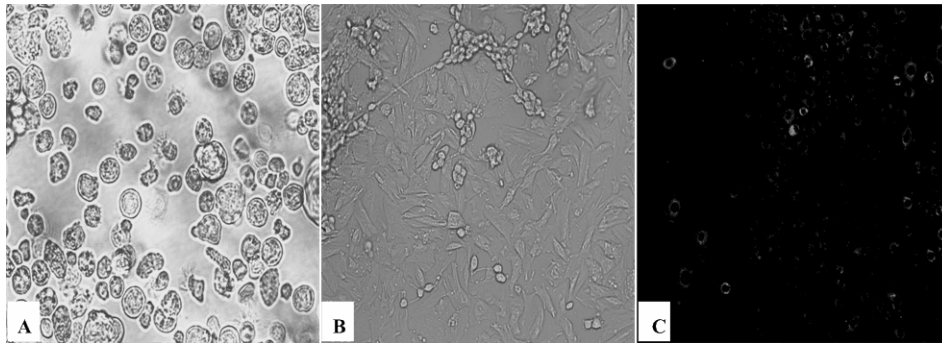
2 结果与分析

2.1 气管上皮细胞分离培养观察及基底细胞鉴定

如图1-A所示, 消化分离到形态不一的气管黏

膜上皮细胞, 视野多个部位能够清晰看到纤毛细胞。图 1-B 显示, 气管上皮细胞培养 48 h 后, 细胞基本能够铺满整个培养皿底, 细胞形态不一。图 1-C 显示, 盖玻片上约有 10% 视野的细胞发出绿色荧光,

荧光阳性细胞的细胞膜和细胞浆着色。上述结果表明, 气管黏膜上皮细胞被成功分离, 且利用免疫荧光法成功鉴定基底细胞, 基底细胞数量约为 10%。

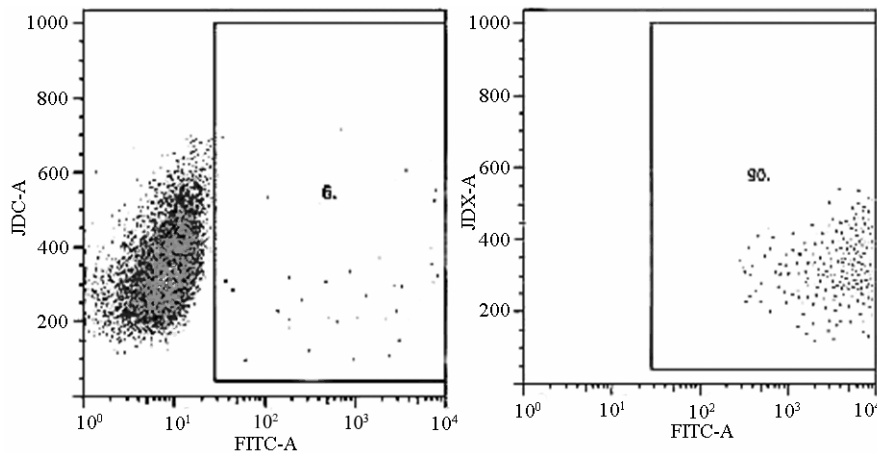


A. 消化后分离到的气管黏膜上皮细胞: 细胞形态不一, 可清晰观察到纤毛细胞; B. 培养 48 h 后气管黏膜上皮细胞; C. 免疫荧光鉴定基底细胞: 荧光阳性细胞零星散在视野中

A. After digestion the isolated tracheal epithelial cells: observation of different shapes and clearly observed ciliated cells; B. Tracheal epithelial cells after 48 h culture; C. Immunofluorescence test of base cells: few fluorescence positive cells scattered in the visual field

图 1 气管上皮细胞分离培养及基底细胞免疫荧光鉴定 ($\times 100$)

Figure 1 Isolated and cultured tracheal epithelial cells and basal cells immunofluorescence test ($100\times$)



JDC-A: 原代气管黏膜上皮细胞被分选出的基底细胞约占 6%; JDX-A: 初选后再培养传到第 3 代的细胞分选出基底细胞约占 90%

JDC-A: 6% basal cells sorted from primary tracheal epithelial cells; JDX-A: 90% basal cells sorted from the third generation of firstly selected cells

图 2 基底细胞流式细胞仪分选图

Figure 2 Map of basal cell sorting by flow cytometry

2.2 流式细胞仪分选基底细胞

图 2 流式细胞仪分选结果显示, 原代气管黏膜上皮细胞仅能够分选出约 6% 的基底细胞 (JDC-A); 而分选后继续培养的基底细胞在传到第 3 代的时候再用同样方法分选, 能够分选出约占 90% 的基底细胞 (JDX-A), 结果表明, 利用流式细胞仪技术和基底细胞特异性单克隆抗体, 可以使基底细胞得到有

效富集和纯化。

2.3 绘制基底细胞生长曲线

从图 3 可以看出, 分选后的气管黏膜基底细胞接种培养第 3 代以上生长曲线基本稳定, 第 1~2 天生长较为缓慢, 第 3 天生长速度迅速加快, 进入对数生长期, 大约持续 3 d 后进入平台期, 到了第 7 天, 细胞开始脱落死亡。结合细胞形态学观察 (图

4-A), 生长曲线结果反映, 分选后的基底细胞连续传代3代以上后, 就能够正常生长和增殖, 可为下游试验提供种子细胞。

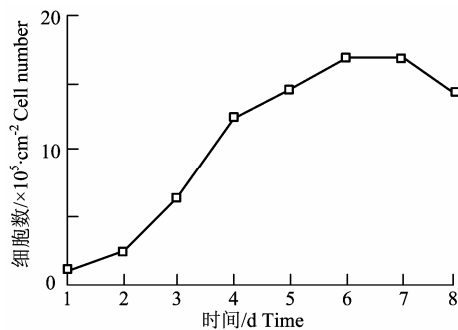
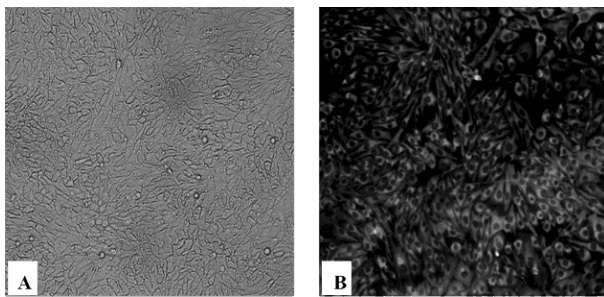


图3 基底细胞生长曲线
Figure 3 Basal cell growth curve



A. 分选后基底细胞贴壁形态较均一; B. 免疫荧光阳性细胞基本铺满整个视野

A. Sorted basal cell being uniform; B. Immunofluorescence positive cells basically covering the entire vision field

图4 分选后的基底细胞培养及免疫荧光鉴定(100 \times)

Figure 4 Basal cell cultured after sorting and its' immunofluorescence test

2.4 分选后基底细胞培养形态及鉴定结果

图4-A显示, 分选后基底细胞连续传代3代以上, 培养皿中贴壁细胞形态显示均一, 胞浆清亮, 细胞生长旺盛。比较图1-C, 图4-B显示分选后的基底细胞纯度高, 视野中几乎都是荧光阳性细胞, 细胞膜和细胞浆着色, 发出绿色荧光。结果显示, 通过流式细胞仪技术, 从气管黏膜上皮上皮总细胞中已成功分选出基底细胞, 且基底细胞得到纯化和富集, 生长状况良好。

3 小结与讨论

本研究利用流式细胞技术, 成功从原代气管黏膜上皮细胞中分选出基底细胞, 分选后的基底细胞生长状态良好, 并能稳定生长增殖, 细胞纯度高, 可为IBV感染机制研究及其他呼吸道病原致病相关研究提供种子细胞。

气管黏膜上皮是假复层结构, 至少可以包括纤毛细胞、杯状细胞(分泌细胞)和基底细胞等3种细胞。利用流式细胞术对细胞进行分选, 一方面, 可以利用形态学的差异分选, 另一方就是本研究用的特异性抗体分选。两者各有优缺点。前者操作简单, 不需要对细胞进行抗体反应处理, 从而减少细胞损失, 然而气管上皮细胞种类较多, 且消化下来的细胞还会混有成纤维细胞的污染, 所以利用形态学差异分选难以有效纯化基底细胞。后者操作较为复杂, 需要对细胞进行抗体反应, 容易造成细胞死亡, 另外细胞分选出来后存在抗体干扰细胞正常生长繁殖的可能。然而因为抗体筛选特异性强, 容易分选到高纯的目的细胞。结合文献报道, 本研究选择了基底细胞特异性抗原SNA^[21], 该抗原与其特异性抗体结合后不会影响基底细胞正常增长繁殖, 并且会随着细胞传代, 抗体结合的细胞逐渐死亡被新生细胞替代。

气管黏膜上皮直接与外界进行气体交换, 气管上皮是机体第一道重要防线。气管黏膜上皮不同细胞具有不同的功能, 并且对病原也有不同的敏感性。气管上皮是IBV或其他禽类呼吸道疫病原感染的靶细胞, 然而IBV分别感染上述不同类型的气管黏膜上皮细胞的感染特性还没有完全弄清楚, 所以研究IBV单独感染上述各类细胞有助揭示病原体致病机理。本研究利用基底细胞特异性抗体首次将细胞分选, 接下来将要做IBV感染基底细胞特性的研究, 了解IBV在基底细胞上的增殖特性, 比较纤毛细胞感染特性, 进一步探讨IBV感染机制。然而, 比较哺乳动物的气管黏膜上皮细胞培养, 鸡的气管黏膜上皮细胞培养较为困难, 所以是否容易获得大量足够的鸡气管黏膜上皮种子细胞供其他研究所用, 就变得很重要。本研究虽然成功获得气管黏膜上皮基底细胞, 但是如同其他正常原代细胞一样, 它的传代次数是有限的, 所以气管黏膜上皮细胞永生, 为相关研究提供源源不断的种子细胞, 成为必要。

参考文献:

- [1] Winter C, Schwegmann W C, Cavanagh D, et al. Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian infectious bronchitis virus [J]. Journal of General Virology, 2006, 87: 1209-1216.
- [2] Winter C, Herrler G. Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent[J]. Microbes and Infection, 2008, 10(4): 367-373.
- [3] Gambaryan A S, Tuzikov A B. H5N1 chicken influenza viruses display a high binding affinity for Neu5Ac alpha

- 2-3Gal beta 1-4(6-HSO₃)GlcNAc-containing receptors[J]. *Virology*, 2004, 326(2): 310-316.
- [4] Rubner F, Gudjonsson A J, Halldorsson T, et al. Establishment of three human breast epithelial cell lines derived from carriers of the 999del5 BRCA2 Icelandic founder mutation[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2005, 41(10): 337-342.
- [5] Shen C I, Wang C H. The infection of primary avian tracheal epithelial cells with infectious bronchitis virus[J]. *Veterinary Research*, 2010, 41(1): 220-229.
- [6] Rahman A E, El-Kenawy S A. Comparative analysis of the sialic acid binding activity and the tropism for the respiratory epithelium of four different strains of avian infectious bronchitis virus[J]. *Avian Pathol*, 2009, 38(1): 41-45.
- [7] Musah S, Chen J, Hoyle G W, et al. Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury[J]. *Respiratory Research*, 2012, 13: 311-318.
- [8] Rowe, R K, Brody S L. Differentiated cultures of primary hamster tracheal airway epithelial cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2004, 40(10): 303-311.
- [9] Mengarelli I, Fryga A, Barberi T, et al. Use of multicolor flow cytometry for isolation of specific cell populations deriving from differentiated human embryonic stem cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 12(04): 3-6.
- [10] 洪海霞, 张彦明, 孙裴, 等. 猪脐静脉血管内皮细胞的分离与培养[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(5): 1-4.
- [11] 克莱尔·怀斯. 上皮细胞培养指南[M]. 段恩奎, 王莉, 译. 北京: 科学出版社, 2005: 10-13.
- [12] 孙裴, 张彦明, 张浩, 等. 鸡气管上皮细胞分离培养及传支病毒在其培养特性研究[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(3): 861-867.
- [13] 孙裴, 张彦明, 杨晓云, 等. 猪支气管黏膜上皮细胞的分离培养和传代研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(6): 771-777.
- [14] 孙裴, 张彦明, 杨小云. 鸡胚成纤维细胞与鸡气管黏膜上皮细胞共培养体系的建立[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2010, 38(3): 40-46.
- [15] Cheng, C L, Djajadi H. Cell-specific markers for the identification of retinal cells by immunofluorescence microscopy[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 935: 185-199.
- [16] Manos P D, Ratanasirintrao S, Loewer S, et al. Live-cell immunofluorescence staining of human pluripotent stem cells[M]// *Curr Protoc Stem Cell Biol*. Chapter 1: Unit 1C 12, 2011: 56-59.
- [17] Juan-Garcia, Manyes A L. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: a review[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 56: 40-59.
- [18] AlMahri A J, Holgersson J, Alheim M. Detection of complement-fixing and non-fixing antibodies specific for endothelial precursor cells and lymphocytes using flow cytometry[J]. *Tissue Antigens*, 2012, 80(5): 404-415.
- [19] Nedosekin D A, Sarimollaoglu M, Galanzha E I, et al. Synergy of photoacoustic and fluorescence flow cytometry of circulating cells with negative and positive contrasts[J]. *J Biophotonics*, 2013, 6(5): 425-434.
- [20] Talbot N C, Blomberget A. Feeder-independent continuous culture of the PICM-19 pig liver stem cell line[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2010, 46(9): 746-757.
- [21] Musah S, Chen J, Hoyle G W, et al. Repair of tracheal epithelium by basal cells after chlorine-induced injury[J]. *Respiratory Research*, 2012, 13: 107.