

# 小鼠气管平滑肌原代细胞的分离、培养与鉴定

叶致豪, 许文豪, 刘庆华, 沈金花, 彭勇波\*

(中南民族大学生命科学学院医学生物研究所, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用  
湖北省重点实验室, 武汉 430074)

**【摘要】** 目的 建立一种可靠的通过组织块贴壁法分离培养原代小鼠气管平滑肌细胞及免疫组化鉴定的方法。方法 体视显微镜下立体分离小鼠气管平滑肌组织, 组织块贴壁法培养原代细胞, 对分离培养细胞通过免疫组化方法进行鉴定, 并用 MTT 法对其增殖特性进行检测。结果 从 BALB/c 雄性小鼠分离气管平滑肌组织, 剪碎为  $1\text{ mm}^3$ , 用含 1% 青-链霉素的 PBS 及培养液漂洗, 使组织块贴于培养皿底, 并加入 5 mL 培养液, 放入  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱培养, 3~5 d 后有明显梭状细胞从组织块爬出, 5~6 d 后, 细胞可见明显“峰-谷”结构。经免疫荧光鉴定, 在传代、纯化后, 可得纯度为 99% 以上的气管平滑肌细胞。用 MTT 法测量其生长曲线。结论 本方法操作简单、经济, 获得的气管平滑肌细胞具有较好增殖能力, 细胞数量和纯度能够满足后续细胞生物学实验研究的需要。

**【关键词】** 气管平滑肌细胞; 原代培养; 组织块贴壁法; 免疫荧光; MTT 法; 小鼠

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)04-0364-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.04.006

## Isolation, culture and identification of primary airway smooth muscle cells from mice

YE Zhi-hao, XU Wen-hao, LIU Qing-hua, SHEN Jin-hua, PENG Yong-bo\*

(Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, Institute of Medical Biology, School of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**【Abstract】 Objective** To develop a reliable method for the primary culture of airway smooth muscle cells (ASMCs) from mice by adherent tissue culture and to identify them by immunofluorescence microscopy. **Methods** Airway smooth muscle (ASM) tissue was isolated from BALB/c mice under dissecting microscope, and cut into  $1\text{ mm}^3$  pieces. These tissue blocks were washed with PBS with 1% penicillin and streptomycin, and adhered on 6 cm culture dish with 5 mL culture media. The dishes were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in an incubator with 5%  $\text{CO}_2$ . The obtained primary ASMCs were identified by immunofluorescence microscopy, and the cell proliferation was measured by MTT assay. **Results** We observed that obvious fusiform cells grew out from tissue blocks within 3 to 5 days. After 5 to 6 days, “hill-valley” structure was observed. After cell passage and purification, the immunofluorescence microscopy showed that the purity of isolated ASMCs reached up to 99%. The growth curve of ASMCs was constructed by MTT assay. **Conclusions** Obtained ASMCs from this simple and economical method show a preferable proliferation ability, density and purity, and can satisfy the need for cell biology research.

**【Key words】** Airway smooth muscle cells, SMCs; Primary culture; Tissue section adherence; Immunofluorescence; MTT assay; Mice

Corresponding author: PENG Yong-bo. E-mail: pyb1980@mail.scuec.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30900816, 31371307); 湖北省自然科学基金项目(2014CFC116)。

[作者简介] 叶致豪(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 气管平滑肌细胞及哮喘相关功能基因分析。

[通讯作者] 彭勇波, 研究方向: 气管平滑肌细胞及哮喘相关功能基因分析。E-mail: pyb1980@mail.scuec.edu.cn

哮喘是一种常见的气道慢性炎症性疾病,目前我国有约 2000 万人罹患哮喘<sup>[1, 2]</sup>。近些年,由于雾霾等空气质量与环境污染程度的日益恶劣,呼吸系统疾病也逐渐成为了全世界范围影响人类健康最严重的慢性疾病之一,据世界卫生组织预测,到 2025 年,世界上将会有 4 亿人患上哮喘<sup>[3, 4]</sup>。

哮喘发病症状众多,早期表现为过敏性炎症<sup>[5]</sup>,后期由于气管平滑肌增生<sup>[6, 7]</sup>,阻塞气管,导致气道狭窄、气道高反应<sup>[8]</sup>及气道重塑<sup>[8, 9]</sup>,患者出现胸闷、气喘等症状,严重时危及生命。因此,对哮喘的发病机理与治疗的研究是至关重要的。

在对哮喘发病机制的研究中,气管平滑肌是针对气道阻塞性症状的主要研究目标之一<sup>[10, 11]</sup>,针对气管平滑肌细胞 (airway smooth muscle cells, ASMCs) 的形态学观察与细胞增殖速率的测量是在细胞生物学水平研究哮喘发病机制的常用手段。因此,成功建立 ASMCs 的原代培养技术十分关键。原代细胞培养的方法通常有酶消化法<sup>[12, 13]</sup>与组织块贴壁法<sup>[14, 15]</sup>,但对于不同特性的不同组织,两种方法并不是都适用。尤其是对于气管平滑肌细胞,尽管已有文献采用上述两种方法分离原代 ASMCs 的报道,但气管平滑肌组织量较少,使用酶消化法时酶解时间与酶浓度不好控制<sup>[16]</sup>,组织贴壁法也存在原代细胞密度不均、细胞爬出慢等问题<sup>[17]</sup>。本研究针对现有气管平滑肌细胞原代分离培养中存在的问题,旨在建立一种简单经济的 ASMCs 原代培养与鉴定的方法,为获得足够数量、较高纯度的 ASMCs 用于后续哮喘发病机制的研究及治疗哮喘疾病的药物筛选奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

5~6 周龄 SPF 级 BALB/c 雄性小鼠 10 只,22 g 左右,购自湖北省疾病预防控制中心实验动物中心【SCXK(鄂)2015-0018】,购回后饲养在中南民族大学生命科学院医学生物研究所【SYXK(鄂)2014-0078】,环境温度维持在 20℃~24℃,光照时间为 08:00~20:00。

#### 1.1.2 试剂耗材

维纳斯镊子,维纳斯剪,超净工作台,二氧化碳恒温细胞培养箱,体视显微镜,恒温水浴锅,酶标仪,激光共聚焦显微镜 (LSM-700)。0.25% 胰蛋白酶,

75% 乙醇,95% 乙醇,酒精灯,圆形盖玻片,0.22 μm 滤膜,6 cm 培养皿,6 孔板,96 孔板,二甲基亚砜 (DMSO)、牛血清白蛋白 (BSA)、甘氨酸 (glycine)。  
①培养液:100 mL: 78 mL DMEM (high-glucose, Hyclone)、20 mL 胎牛血清 (FBS, Hyclone)、1 mL 青-链霉素 (Hyclone)、1 mL 200 mmol/L L-谷氨酰胺 (L-Glu)。②一抗: Anti-α-smooth muscle actin [EPR5368] (Abcam)。③二抗: Goat Anti-Rabbit IgG, FITC Conjugated (康为世纪)。④PBS: NaCl 10 g, KCl 0.25 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O 3.62 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g, 调 pH = 7.4。⑤MTT 母液: 5 mg/mL MTT 溶于 PBS, 调 pH = 7.4。⑥MTT 工作液: MTT 母液: DMEM = 1: 9。Propidium iodide (PI, Biosharp)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 气管平滑肌的分离

用断颈法处死小鼠后,除口鼻部之外全身浸泡在 75% 乙醇中片刻,避免乙醇进入呼吸道而损伤气管平滑肌。将小鼠从乙醇中取出,用大头针固定在解剖板上,用 75% 乙醇浸泡过的手术器械从小鼠的胸腹部剪开皮肤至下颚,再从正中间剪开肋骨,暴露胸腔内部,除去心脏及其余组织,小心取出完整的气管与肺组织。把取出的组织放置在体视显微镜下,浸泡在含有 1% 青-链霉素的 PBS 中,用维纳斯剪与镊子精准地剪去食管及其余组织。从软骨环的一侧剖开气管,可见中部平行条纹的气管平滑肌组织,并将其分离出来。

#### 1.2.2 原代细胞培养

将分离出的气管平滑肌组织剪碎为 1 mm<sup>3</sup> 的小块,放入内盛 1% 青-链霉素的培养皿中,转入超净工作台中心漂洗片刻;将组织块转至培养液中漂洗片刻,再放置在干燥的 6 cm 培养皿。放入的组织块按合适的间隔密集地铺满皿底。随后将培养皿放入 37℃ 的恒温培养箱中,倒置放置 20~30 min,组织块会因干涸而贴在皿底。从培养箱取出培养皿,加入 5 mL 培养液,放入恒温培养箱继续培养,3~5 d 后即会有细胞爬出,之后每两天换 1 次培养液。

#### 1.2.3 细胞传代

组织块周围细胞生长至逐渐融合 80% 左右时,即可传代。吸净培养皿中的培养液,加入 5 mL PBS,轻轻晃动培养皿,将 PBS 吸净。向培养皿中加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶,覆盖整个皿底,轻轻晃动,片刻后吸出大部分胰酶。将培养皿放入 37℃ 培养箱中

放置 1~2 min 左右,取出培养皿,轻轻拍打,在显微镜下观察到绝大部分细胞浮起。用 1 mL 的培养液收集细胞,均匀滴入两个含有 4.5 mL 培养液的培养皿中,前后、左右轻晃分散细胞,显微镜观察到细胞均匀分散后,放入 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱中培养。

#### 1.2.4 细胞纯化

经原代培养所得的细胞中会含有少部分的气管上皮细胞及成纤维细胞,气管上皮细胞及成纤维细胞一般在半小时内就可以贴壁,而气管平滑肌细胞一般至少需 1~4 h 贴壁<sup>[18]</sup>。利用气管平滑肌细胞与其他细胞贴壁时间不同的特性,就可以将培养皿中的气管平滑肌细胞进行纯化。利用上述细胞传代的方法,将一皿中融合率达 80% 左右的细胞经 0.25% 胰酶消化制备成细胞悬液,1:1 传入一新的培养皿;30~60 min 后,小心地吸出上层细胞悬液(此悬液即含有还未贴壁的气管平滑肌细胞),转入另一培养皿中。反复几次,即可得到较纯的气管平滑肌细胞。

#### 1.2.5 细胞免疫荧光

将一皿生长至 80% 左右的细胞经胰蛋白酶消化后用 1 mL 培养液收集细胞。取经过乙醇消毒后的干净的圆形盖玻片,逐一放入六孔板中,每个盖玻片上滴 1~2 滴细胞悬液,随后小心地放入培养箱培养过夜,细胞将会贴附于盖玻片上。接下来,PBS 洗 2~3 次,每次 1 min;4% 多聚甲醛固定 30 min;PBS 洗 2~3 次,每次 1 min;0.5% TritonX-100 孵育 20 min;PBS 洗 2~3 次,每次 1 min;50 mmol/L glycine 孵育 20 min;PBS 洗 2~3 次,每次 1 min;20 g/L BSA 封闭 30 min。转入湿盒中。一抗 anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (1:300)孵育 1 h;20 g/L BSA 洗 3 次,每次 5 min;二抗 FITC (1:50)孵育 1 h;20 g/L BSA 洗 3 次,每次 5 min;PI 染料(50  $\mu$ g/mL)孵育 30 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min。在共聚焦显微镜下观察。

#### 1.2.6 细胞增殖

将细胞消化后所得的细胞悬液按照  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度种入 96 孔板,每个孔内加入细胞悬液 100  $\mu$ L,96 孔板的最外圈全部加入 100  $\mu$ L 的 PBS,防止蒸发。培养 1 d 后,开始用于实验。将待测孔中的培养液全部吸出,加入 MTT 工作液 100  $\mu$ L。37℃ 培养 4 h 后,吸尽 MTT 工作液,加入 150  $\mu$ L DMSO,放入 37℃ 恒温的酶标仪中测量其在 492 nm 的吸光度<sup>[19,20]</sup>。每一天测量一列细胞的吸光度,连续测量。培养中的细胞也需要按时换液。

## 2 结果

### 2.1 ASM 原代细胞

建立原代培养的 3~5 d 后,通过显微镜观察,可见组织块周围有少许细胞爬出,细胞呈梭形或多角梭形(图 1A)。继续培养,组织块周围的细胞会生长至融合,呈现出原代气管平滑肌细胞典型的“峰-谷”样结构(图 1B)。经传代、纯化后,可以得到比较纯的气管平滑肌细胞(图 1C)。传代细胞与原代细胞的表现特性与生长特性基本相同。

### 2.2 细胞免疫荧光

通过对平滑肌内特异性表达的  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 进行细胞免疫荧光实验,激光共聚焦显微镜下观察,细胞内绿色荧光所示与细胞纵轴方向平行的纤维即为  $\alpha$ -SMA,红色荧光为 PI 染料显示出的细胞核(图 2)。可见气管平滑肌细胞的纯度可达 99% 以上。

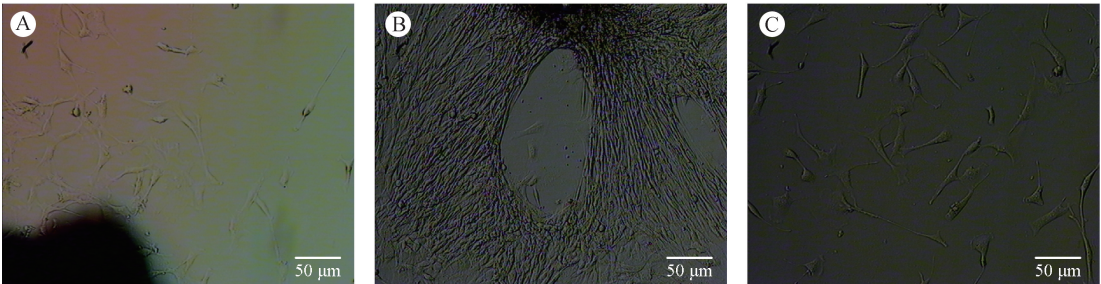
### 2.3 ASMCs 增殖曲线

气管平滑肌在传代后生长速度逐渐加快,在 3~4 d 到达对数生长期,生长最为迅速;5 d 之后到达生长的平台期,细胞间发生接触抑制,细胞生长逐渐停滞,并出现略微的细胞凋亡现象(图 3)。

## 3 讨论

细胞原代分离培养技术主要包括组织块贴壁法和单酶(胰酶<sup>[21]</sup>或胶原酶<sup>[22]</sup>)或酶联消化法<sup>[23]</sup>,但消化法非常难以控制所运用酶的浓度、浓度比例及消化时间,很容易造成细胞消化过度而损伤细胞或并不能完全消化而使细胞分散<sup>[16]</sup>,比较适合于大块的组织<sup>[22]</sup>;其次,各种酶也都价格不菲。与此相对的是,组织块贴壁法<sup>[14,15]</sup>能较好避免上述酶消化法的问题。本文采用的经改进后的组织块贴壁法十分方便、经济,细胞自由地从组织块游出也不会损伤细胞的活性;组织块爬出的速度也较快,适当的组织块间隔保证了细胞的数量与生长的状态;同时,经  $\alpha$ -SMA 免疫荧光鉴定,培养出的细胞纯度也较高,不需要多代传代培养纯化,且分离细胞可多次传代,表现出较好增殖特性。因此,针对气管平滑肌的原代细胞培养,组织块贴壁法是更为合适的一种方法。

在本实验中,我们主要通过做到以下几点提高气管平滑肌细胞分离培养的成功率。①选择年龄较小的小鼠(5~6 周为宜)。因为年龄较小的小鼠还处于生长发育时期,细胞的生长还比较旺盛,原代气

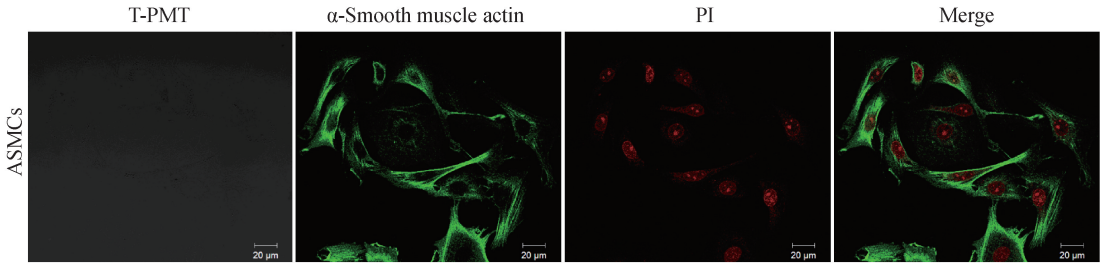


注:A: 建立原代培养后 3 d 左右,气管平滑肌细胞从组织块爬出。B: 5 ~ 6 d 后,组织块周围的细胞逐渐生长,部分融合,呈现出原代气管平滑肌细胞生长的典型“峰-谷”样结构。C: 经传代、纯化后的气管平滑肌细胞,细胞呈梭形或长梭形,部分为多角形,并含有一个或数个足突。

图 1 气管平滑肌原代细胞

Note. A. Cells grew out from tissue pieces within 3 to 5 days. B. Cells cultured after 5 to 6 days, “hill-valley” structure can be observed. C. ASMCs after cell passage and purification are fusiform or long-fusiform, some of which have one or more projections.

Fig. 1 Primary ASMCs

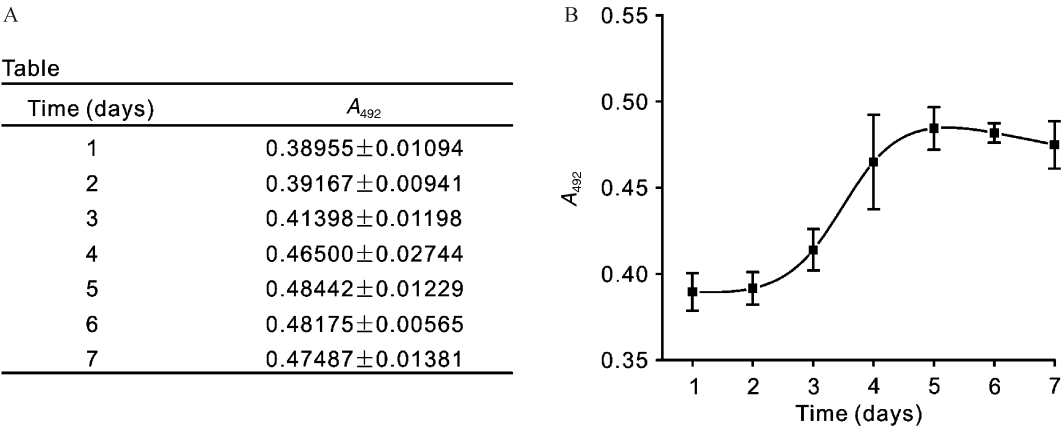


注:T-PMT;透射光;绿色荧光为 α-SMA;红色荧光为细胞核。

图 2 气管平滑肌细胞的免疫荧光鉴定

Note. T-PMT. Transmission light; Green fluorescence; α-SMA; Red fluorescence. Nucleus.

Fig. 2 Identification of ASMCs by immunofluorescence microscopy.



注:A: 接种细胞后的第 1 ~ 7 天,通过 MTT 法处理细胞后,利用酶标仪测量其在 492 nm 处的吸光度 ( $A_{492}$ ,  $n = 6$ , Mean  $\pm$  SEM)。B:通过 MTT 法所得吸光度,绘制气管平滑肌细胞的生长曲线。

图 3 气管平滑肌细胞生长曲线

Note. A. Day 1 to 7 after cell seeding, measuring the absorbance of 492 nm after MTT treatment ( $A_{492}$ ,  $n = 6$ , Mean  $\pm$  SEM).

B. The growth curve of ASMCs was constructed with absorbance by MTT assay.

Fig. 3 The growth curve of the ASMCs.

管平滑肌更易爬出。②解剖小鼠所用的实验器械都需经 75% 乙醇浸泡消毒,在超净工作台使用的器械还需经酒精灯火焰灼烧,以防止原代培养细胞污染。③在解剖小鼠的过程中都必须尽量避免气管平



滑肌组织的过度牵拉,以保证气管平滑肌组织的活性,提高细胞爬出率。④组织块转入干燥的培养皿的时候可将组织块稍稍沥干,这样组织块会更快地干涸,使组织块暴露在无培养液的环境下的时间尽可能的短。⑤组织块在培养皿中的排列间隔需要合适。组织块的排列不宜太密,细胞太密集会有接触抑制现象;也不宜太稀疏,细胞密度太低会导致细胞生长缓慢,甚至停滞。⑥在原代细胞培养的前 3 d 都不需要换液,使培养皿在细胞培养箱中静置,以免影响细胞爬出。

总之,本文提供了一种经济又方便的以组织块贴壁法为基础的气管平滑肌原代细胞培养方法,能在短时间内获得数量较多且较纯的原代气管平滑肌细胞,可满足在细胞水平上针对气管平滑肌细胞相关实验的需要,为哮喘等与气管平滑肌相关呼吸道疾病的研究奠定了基础。

#### 参 考 文 献

- [1] 姚秀娟,李艳,吕喆等.不同剂量过敏原对滴鼻制备急性和亚急性小鼠哮喘模型的影响[J].中国医学装备,2012,9(3):4-8.
- [2] 钟南山.我国支气管哮喘防治研究重点及努力方向[J].中华结核与呼吸杂志,2005,28(12):809-811.
- [3] Masoli M, Fabian D, Holt S, et al. The global burden of asthma; executive summary of the GINA Dissemination Committee report [J]. Allergy, 2004, 59(5): 469-478.
- [4] Akinbami LJ, Moorman JE, Liu X. Asthma prevalence, health care use, and mortality: United States, 2005-2009 [J]. Natl Health Stat Report, 2011, (32): 1-14.
- [5] Matusovsky OS, Kachmar L, Ijpma G, et al. Peripheral airway smooth muscle but not the trachealis is hypercontractile in an equine model of asthma [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016, 54(5): 718-27.
- [6] Plant PJ, North ML, Ward A, et al. Hypertrophic airway smooth muscle mass correlates with increased airway responsiveness in a murine model of asthma [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 46(4): 532-540.
- [7] Chen M, Lv Z, Huang L, et al. Triptolide inhibits TGF- $\beta$ 1-induced cell proliferation in rat airway smooth muscle cells by suppressing Smad signaling [J]. Exp Cell Res, 2015, 331(2): 362-368.
- [8] West AR, Syong HT, Siddiqui S, et al. Airway contractility and remodeling: links to asthma symptoms [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013, 26(1): 3-12.
- [9] Berair R, Saunders R, Brightling CE. Origins of increased airway smooth muscle mass in asthma [J]. BMC Med, 2013, 11: 145.
- [10] Hershenov MB, Brown M, Camoretti-Mercado B, et al. Airway smooth muscle in asthma [J]. Annu Rev Pathol, 2008, 3: 523-555.
- [11] Wright DB, Trian T, Siddiqui S, et al. Phenotype modulation of airway smooth muscle in asthma [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013, 26(1): 42-49.
- [12] Abe MK, Chao TS, Solway J, et al. Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes; implications for human airway disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994, 11(5): 577-585.
- [13] 蔺鹏翔,张焕萍,张爱芝. TGF- $\beta$ 1 对不同阶段哮喘模型大鼠气道平滑肌细胞增殖的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(7): 44-48.
- [14] Johnson PR, Black JL, Carlin S, et al. The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(6): 2145-2151.
- [15] Pang L, Knox AJ. PGE2 release by bradykinin in human airway smooth muscle cells: involvement of cyclooxygenase-2 induction [J]. Am J Physiol, 1997, 273(6 Pt 1): L1132-1140.
- [16] 刘志洋,姚平,佟文革.豚鼠支气管平滑肌细胞的分离 [J]. 第四军医大学吉林军医学院学报, 2001, 23(1): 26-27.
- [17] 吴海亚,戴元荣,尹娟.改良组织贴块法培养大鼠气道平滑肌细胞 [J]. 温州医学院学报, 2010, 40(6): 571-573.
- [18] 卓致远,黄茂,崔学范,等.组织贴块法培养小鼠气道平滑肌细胞 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 12(2): 247-250.
- [19] 马荣,王意忠,郭姗姗,等. BN 大鼠和豚鼠对卵清白蛋白致主动过敏反应的免疫学特性比较 [J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(3): 7-12.
- [20] 徐元基,周涛,杜芝燕,等.采用活体成像技术监测肿瘤生长及转移模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(1): 19-22.
- [21] 徐妍,张焕萍. TNF- $\alpha$  对哮喘模型大鼠气道平滑肌细胞增殖及 ERK1/2 活性的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(7): 23-28.
- [22] 吴建芳.小鼠血管平滑肌细胞原代培养方法的改良 [J]. 青海医学院学报, 2008, 29(1): 52-53.
- [23] 卢虹蓓,张维溪,李昌崇.哮喘大鼠气道平滑肌细胞培养方法探讨 [J]. 温州医学院学报, 2009, 39(3): 264-266.

[收稿日期] 2016-01-25