

SD 大鼠颌下腺腺泡细胞培养及胶原海绵的细胞相容性

罗小宁¹, 黄晓明^{2*}, 孙伟², 林秋雄³, 郑亿庆²

(1. 广东省人民医院耳鼻喉头颈外科, 广东 广州 510089; 2. 中山大学附属第二医院耳鼻喉头颈外科, 广东 广州 510120;

3. 广东省医学科学院, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】研究 SD 大鼠颌下腺腺泡细胞体外培养方法以及和胶原海绵的细胞相容性, 探讨胶原海绵应用于涎腺组织工程支架材料的可行性。【方法】取新生 SD 大鼠颌下腺组织, 胰酶消化后将细胞于适宜的体外环境培养、纯化、鉴定, 并将鉴定好的颌下腺腺泡细胞移植到胶原海绵上, 采用 DAPI 进行特异性的核染色, 荧光显微镜下观察腺泡细胞与胶原海绵的相容情况, 评价腺泡细胞与胶原海绵的相容性。【结果】体外培养的颌下腺腺泡细胞经纯化后能够分泌特异性的淀粉酶, 免疫细胞化学淀粉酶抗体阳性染色, 并能在胶原海绵上正常增殖。【结论】体外培养的颌下腺腺泡细胞具备腺泡细胞的生物学特征并与胶原海绵有很好的相容性, 有望将胶原海绵作为组织工程化涎腺组织的支架材料之一。

关键词: 颌下腺细胞; 体外培养; 组织工程; 胶原海绵

中图分类号: R349.34 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)02-0160-05

Cell Culture of Submandibular Gland from SD Rats and Its Compatibility with Collagen Sponge Scaffold

LUO Xiao-ning¹, HUANG Xiao-ming², SUN Wei², LIN Qiu-xiong³, ZHENG Yi-qing²

(1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510089, China; 2. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Guangdong Academy of Medical Science, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To study in vitro culture of submandibular gland acinar cells (SMGC) isolated from SD rats and the compatibility between SMGC and collagen sponges, and to investigate the feasibility of collagen sponges applied to the scaffold in salivary tissue engineering. 【Methods】The submandibular gland tissues isolated from neonatal SD rats were digested into SMGC by pancreatic enzyme. After cultured, purified, and identified in vitro, the identified SMGC were transplanted into the collagen sponges. Then the SMGC were stained in nuclear by 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride staining (DAPI) every week and observed under fluorescence microscope. The compatibility between SMGC and collagen sponges was evaluated. 【Results】The SMGC cultured in vitro could secrete specific amylase after purification. Positive immunocytochemical staining of amylase in SMGC could be observed. SMGC could proliferate well in collagen sponges. 【Conclusions】SMGC cultured in vitro have the biological characteristics of acinar cells and the compatibility with collagen sponges. Collagen sponge can be served as one of the salivary tissue engineering scaffolds.

Key words: submandibular gland cell; culture in vitro; tissue engineering; collagen sponge

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2):160-164]

放射性口干症是头颈肿瘤放疗的常见并发症, 射线导致了涎腺腺泡细胞的死亡, 因此病人有严重的口干、吞咽困难、频繁的龋齿和真菌感染

等, 严重影响了患者的生存质量。迄今为止, 还没有理想的治疗方法^[1]。组织工程学的发展, 使得人们希望构建有功能的涎腺组织, 达到治疗该病的

收稿日期: 2008-10-27

基金项目: 广东省自然科学基金博士启动项目(06300692)

作者简介: 罗小宁, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 头颈肿瘤, E-mail: luoxiaoning@sohu.com; * 通讯作者: 黄晓明, E-mail: xiaomingh@hotmail.com

目的。而组织工程的重要、基础的步骤就是构建增殖活跃、有功能的种子细胞及寻找合适的支架材料,目前,多数学者将涎腺细胞的体外分离培养作为种子细胞的研究方向^[2-4],但未有作者检测培养细胞分泌淀粉酶的功能,且仍未有理想的支架材料。我们通过本实验研究,期望获得有分泌功能的颌下腺腺泡细胞(submandibular gland acinar cells, SMGC),并探讨其与胶原海绵的相容性,为涎腺组织工程学研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料来源

8 d 龄新生 SD 大鼠,雌性,中山大学实验动物中心提供。胶原海绵(上海其胜),胎牛血清(四季清公司),DMEM-F12(GIB Co USA),胰蛋白酶,表皮生长因子、胰岛素、转铁蛋白、地塞米松(Sigma 公司),用于细胞鉴定的抗体:淀粉酶抗体(Amylase-G10),HRP 二抗(DAKO GK 500755),DAB 显色试剂盒,CO₂ 孵箱,6 孔培养板,位相差倒置显微镜,手术器械等。

1.2 腺泡细胞分离培养方法

取 8 d 龄的新生 SD 大鼠 CO₂ 窒息法处死,无菌状态下摘除双侧颌下腺,剪碎腺体为 1 mm³ 的小块,转移至 30 mL 无菌烧杯中,0.25% 的胰蛋白酶 37 °C 下消化 20 min,共 2 次。加血清终止胰酶反应,筛网(200 目)过滤后吸入离心管离心(900 r/min, $r = 5$ min)。去除上清液,用配好的腺细胞专用培养基(含:DMEM-F12,10%胎牛血清,5 μg/mL 胰岛素,5 μg/mL 的转铁蛋白,1 × 10⁻⁷ mol/L 地塞米松,表皮生长因子 0.1 μg/mL,青霉素 200 IU/mL,链霉素 100 μg/mL,两性霉素 B 0.25 μg/mL)将下层细胞制成细胞悬液。利用差速粘附法进行 SMGC 的分离纯化,将纯化后的 SMGC 用作进一步的细胞培养及特性分析。隔 2 日更换培养液。细胞长满单层后(6 ~ 8 d),即可进行传代,计数调整细胞密度为 1 × 10⁶,按 1:2 或 1:3 接种于型胶原包被的培养瓶^[3,4]。

1.3 腺泡细胞的鉴定

相差显微镜下观察细胞的形态,取接种于培养瓶后原代至第 5 代的 SMGC 培养基,采用淀粉酶试剂盒方法检测其淀粉酶含量。另外将培养细胞消化后配置的细胞悬液按 1 × 10⁴ 接种于底部

放置了 24 mm × 24 mm 玻片的 6 孔板培养(玻片预先用多聚赖氨酸处理过,并消毒),培养 2 d 后弃培养液,甲醇固定 15 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,加一抗(Amylase-G10),4 °C 湿盒孵育过夜。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。加 HRP 二抗(DAKO GK 500755),常温下孵育 1 h,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。加入新配置的 DAB 显色液,苏木素复染 1 min,清洗。乙醇依次脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,显微镜下观察并拍照。

1.4 腺泡细胞于胶原海绵上生长

胶原海绵灭菌后备用^[5],将鉴定好的第 2 代 SMGC 消化后配成细胞悬液,移植于无菌的胶原海绵上(1 cm × 1 cm × 1 cm)使胶原海绵呈饱和状态。并于 6 孔板上培养,每周对胶原海绵上细胞进行 DAPI 染色(终浓度 10 μL/mL),荧光显微镜下观察其与胶原海绵的相容性和生长情况。

1.5 统计学分析

各代 SMGC 培养基中的淀粉酶浓度利用 SPSS 13.0 统计软件包分析,采用单因素方差分析法,多重比较为 LSD 法,显著性水准为 0.05。

2 结果

2.1 颌下腺腺泡细胞的形态学特征

原代的 SMGC 于倒置显微镜下观察,约 48 h 后体外培养的细胞形成克隆,呈卵圆形,一般需要 6 ~ 8 d 长满单层,差速粘附法去除成纤维细胞后,可得到较为一致的颌下腺细胞,显微镜下观察呈圆形、椭圆形或多边形,排列密集,鹅卵石样外观,胞浆丰富,可见分泌性颗粒(图 1A)。

2.2 原代至第五代的颌下腺细胞的淀粉酶含量

我们将各代的 SMGC 培养基收集,淀粉酶试剂盒法检测其淀粉酶浓度(表 1),统计学显示,不同代之间的淀粉酶含量不同。另外,LSD 法多重比较显示,第 2、3 代的淀粉酶浓度与其他各代不同($P < 0.05$)。

2.3 免疫组织化学染色

取第 2 代 SMGC 爬片后固定,加淀粉酶抗体(Amylase-G10),DAB 显色结果强阳性,主要位于胞浆;对照组结果阴性(图 1B、C)。

2.4 荧光显微镜下观察

腺泡细胞于胶原海绵上增殖良好,腺泡细胞粘附于三维结构的胶原海绵上,细胞的生长成递

表 1 腺泡细胞分泌淀粉酶含量

Table 1 Amylase secreted by acinar cells ($\bar{x} \pm s$, U/L)

Passage (P0-5)	Amylase
P0	12.8 ± 9.4
P1	31.7 ± 7.6
P2	94.2 ± 20.8 ¹⁾
P3	52.5 ± 19.7 ²⁾
P4	9.0 ± 10.7
P5	1.5 ± 2.1
<i>F</i>	40.38
<i>P</i>	0.00

LSD-*t* test after analysis of variance (ANOVA), compared with other passage, $P < 0.05$

增状态(图 2A、B)。将胶原海绵从培养皿中取出再于镜下观察,仍可见腺泡细胞粘附(图 2C)。

3 讨论

组织工程化涎腺对于治疗放射性口干症及其他各种原因导致的涎腺分泌功能障碍,具有广阔的临床应用前景。目前,常用的种子细胞有 HSG 细胞株,取自病人放射后的涎腺组织。但 Aframian 等^[6]研究发现 HSG 细胞不能合成紧密连接相关蛋白 ZO-1, occludin, claudin-1 和 claudin-2, 因而不

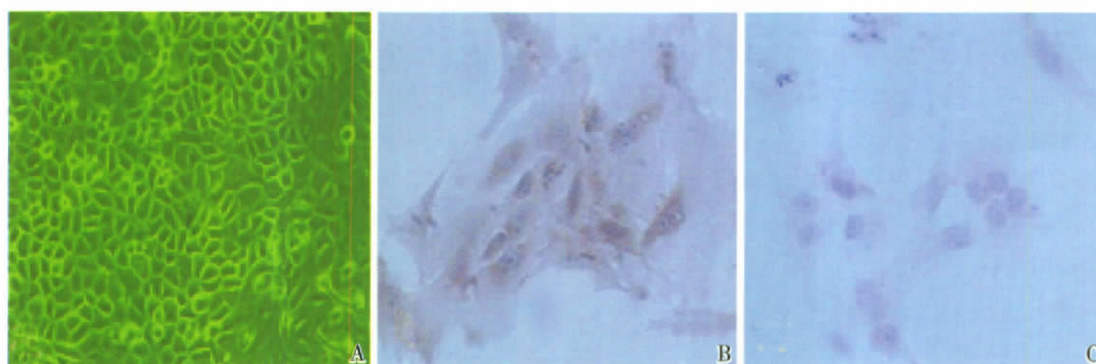


图 1 第 2 代颌下腺腺泡细胞及其免疫组化鉴定

Fig. 1 Photomicrography of cultured SMGC of passage 2 and their immunocytochemical staining

A: SMGC of passage 2, with abundant cytoplasm and cobblestone-like alignment, $\times 200$; B: Positive immunocytochemical staining of amylase in SMGC, $\times 400$; C: Negative immunocytochemical staining in control group, $\times 400$

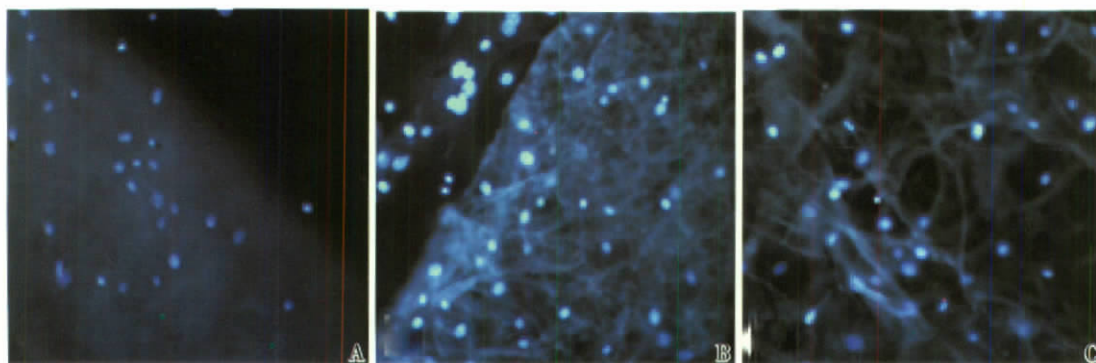


图 2 DAPI 染色显示颌下腺腺泡细胞在胶原海绵的增殖情况

Fig. 2 Photomicrography of SMGC proliferating in collagen sponges with DAPI staining

A: SMGC growing in collagen sponges for one week and cells with blue fluorescence can be observed in collagen sponges, $\times 200$; B: SMGC growing in collagen sponges for two weeks and more cells with blue fluorescence can be observed, $\times 200$; C: collagen sponges were dislodged from the culture dishes and cells with blue fluorescence also can be observed in collagen sponges, $\times 200$

能限制周围细胞的渗透,故认为 HSG 细胞不适用于涎腺组织工程的异源植入细胞,且具有恶性转化的可能。另外,也有学者用分子生物学技术,通过

SV40 突变体基因转染涎腺细胞,获得了永生化的涎腺细胞系,使涎腺生理、病理研究有了能长期传代的细胞系。但由于该细胞是异倍体,同样有成

瘤性可能^[7]。因此,我们认为现阶段的种子细胞研究,还是以分离培养方法得到的细胞更具有现实意义。

涎腺细胞是高度分化的上皮细胞,体外培养并保持其功能,还要传代培养,非常困难。因此,人们通过在培养基中加入一些有利于细胞生长和分化的因子和成分,来延长细胞于体外生存的时间,并且保持其分泌功能。有学者在培养液中加入表皮生长因子、胰岛素、转铁蛋白、氢化可的松等,使得颌下腺细胞在体外培养达到 5 周以上,传到第 6 代仍然分化较好,保持一定的增殖能力^[8]。本研究使体外培养的颌下腺细胞,一直保持分泌功能到第 5 代,并且具有良好的形态,培养时间达到 6 周。

获得纯化的腺泡细胞以用于下一步的实验非常重要,研究者采取无血清培养法,并加入有利于上皮细胞生长的因子。在无血清的条件下,成纤维细胞受到限制,上皮细胞具有较强的增殖和分化能力,但实践表明细胞难以传代^[9]。在本实验中,首先在分离新生 SD 大鼠颌下腺组织时就要尽可能的剔除包膜,减少成纤维细胞的混杂。原代细胞悬液植入培养瓶时采用差速粘附法,使得细胞悬液中粘附粘力较强的成纤维细胞先行粘附,然后采用弃去培养瓶的方法去除大部分的成纤维细胞。实验表明,首次差速粘附可去除约 80% 的成纤维细胞,之后在传代的过程再采用相同的方法,则可得到纯化的腺泡细胞,显微镜显示细胞比较单一的多角形,胞浆丰富,梭形的成纤维细胞很少看到。另外,合理调整胰蛋白酶的浓度也很重要,它保证了细胞传代后的增殖能力。胰蛋白酶是一种快速、有效、作用较强的蛋白水解酶,主要用于消化细胞间质,可在保留细胞活力的同时使细胞分离,从而可得到单一的细胞成分^[10]。然而,胰蛋白酶过度消化细胞也会给细胞带来较大的伤害^[11]。因此,必须控制酶浓度、消化时间长短和消化的温度。我们的经验是使用 0.25% 的胰蛋白酶,37℃ 下消化,消化时间不能超过 2 min。

有活力的腺泡细胞应该可以分泌淀粉酶,我们将各代的腺泡细胞培养基分别用淀粉酶试剂盒检测其淀粉酶的含量,结果表明原代至第 5 代细胞均可分泌淀粉酶,但第 5 代以后的细胞淀粉酶基本检测不到,而且细胞的形态改变,呈现老化的状态,增殖也减弱。实验表明,第 2、3 代的颌下腺

细胞分泌功能最强,与其他各代不同。因此认为这部分细胞活力较强,可用于下一步的实验研究。另外,我们也从免疫细胞化学的角度检测细胞内的淀粉酶抗体,实验结果显示结果呈强阳性,而未加一抗的颌下腺细胞 DAB 染色阴性。

涎腺组织工程的另外一个关键环节就是寻找适合的可降解的支架材料。目前组织工程化研究常用的是生物降解型高分子材料,有聚羟基乙酸(PGA)、聚乳酸(PLA)、聚-L-丙交酯(PLLA)等,研究者将颌下腺细胞接种在上述高分子材料,发现并不粘附,无法在支架上生长,只有在一定的细胞外基质成分的包被下才能粘附生长^[12]。而胶原海绵由一种天然蛋白质组成,该蛋白广泛存在于动物的皮肤、骨、肌腱韧带和角膜等组织中^[13,14]。具有良好的细胞诱导作用、组织相容性、低毒性^[15]。因此我们选择胶原海绵作为腺泡细胞的支架材料,通过体外实验探讨其与细胞的相容性。实验结果表明,颌下腺腺泡细胞能够在胶原海绵上正常增殖,并且呈现细胞生长的递增趋势。另外,我们将胶原海绵从培养皿中取出,排除培养皿细胞的干扰,仍可观察到腺泡细胞在胶原海绵三维结构上的粘附。据此可见,腺泡细胞是可以在该支架材料上生长的。

综上,我们认为通过颌下腺细胞的体外培养实验,得到了增殖良好,有功能的腺泡细胞,并发现胶原海绵与颌下腺腺泡细胞具有良好的细胞相容性,有望成为组织工程化涎腺的支架材料之一。

参考文献:

- [1] Nagler RM, Baum BJ. Prophylactic treatment reduces the severity of xerostomia following radiation therapy for oral cavity cancer [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003,129(2):247-250.
- [2] Joraku A, Sullivan CA, Yoo JJ, et al. Tissue engineering of functional salivary gland tissue [J]. Laryngoscope, 2005,115(2):244-248.
- [3] Kishi T, Takao T, Fujita K, et al. Clonal proliferation of multipotent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006,340(2):544-552.
- [4] Hiramatsu Y, Kagami H, Horie K, et al. Effect of basic fibroblast growth factor on cultured rat and human submandibular salivary gland cells [J]. Arch Oral Biol, 2000,45(7):593-599.

- [5] 刘爱军,黄锦桃,李海标. ES 细胞源性表皮干细胞与胶原海绵构建组织工程皮肤 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006,27(6):625-629.
- [6] Aframian DJ, Tran SD, Cukierman E, et al. Absence of tight junction formation in an allogeneic graft cell line used for developing an engineered artificial salivary gland [J]. *Tissue Eng*, 2002,8(5):871-878.
- [7] Azuma M, Tamatani T, Kasai Y, et al. Immortalization of normal human salivary gland cells with duct myoepithelial acinar or squamous phenotype by transfection with SV40 ori-mutant deoxyribonucleic acid [J]. *Lab Invest*, 1993,69(1):24-42.
- [8] Busch L, Sterin-BordaL, Borda E. Differences in the regulatory mechanism of amylase release by rat parotid and submandibular glands [J]. *Arch Oral Biol*, 2002, 47(10):717-722.
- [9] Okura M, Shirasuna K, Hiranuma T, et al. Characterization of growth and differentiation of normal human submandibular gland epithelial cells in a serum free medium [J]. *Differentiation*, 1993,54(2): 143-153.
- [10] Taga R, Sesso A. Cell population growth in the rat parotid gland during postnatal development [J]. *Arch Oral Biol*, 2001,46(10):909-918.
- [11] 张琦,胡建石,林玲,等. 体外培养的神经干细胞球几种离散方法的探讨 [J]. *中华神经医学杂志*, 2004,3(06):404-407.
- [12] Aframian DJ, Cukierman E, Nikolovski J, et al. The growth and morphological behavior of salivary epithelial cells on matrix protein-coated biodegradable substrata [J]. *Tissue Eng*, 2000,6(3):209-216.
- [13] 李容林,李春阳,张伟. 壳聚糖与型胶原制备组织工程复合支架材料的扫描电镜研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006,27(5):557-561.
- [14] 程树军,黄锦桃,李海标. ES 细胞源性表皮干细胞与胶原海绵体外构建组织工程皮肤 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006,27(1):4-6.
- [15] Chen G, Ushida T, Tateishi T, et al. Poly (DL-lactic-co-glycolic acid) sponge hybridized with collagen microsponges and deposited apatite particulates [J]. *J Biomed Mater Res*, 2001,57(1):8-14.

(编辑 刘清海)

(上接第 147 页 from page 147)

- stem cells with asymmetric cell division and rapid turnover: the case of the shiverer dysmyelinated mouse brain [J]. *Magn Reson Med*, 2007,58(2): 261-269.
- [17] Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2003, 107(18):2290-2293.
- [18] Neri M, Maderna C, Cavazzin C, et al. Efficient in vitro labeling of human neural precursor cells with superparamagnetic iron oxide particles: relevance for in vivo cell tracking [J]. *Stem Cells*, 2008,26(2):505-516.

(编辑 王晓鹰)