

文章编号: 1674-5566(2013)01-0033-09

## 草鱼肠道粘膜上皮细胞的分离与原代培养

姚仕彬<sup>1</sup>, 叶元土<sup>1</sup>, 蔡春芳<sup>1</sup>, 姚林杰<sup>1</sup>, 许凡<sup>1</sup>, 刘猛<sup>1</sup>, 萧培珍<sup>2</sup>, 王丽宏<sup>2</sup>

(1. 苏州大学 医学部, 江苏 苏州 215123; 2. 北京市营养源研究所 系统营养工程技术研究中心, 北京 100069)

**摘要:** 以强化培育后草鱼的肠道粘膜为试验材料, 采用不同消化法和离心转速梯度分离肠道粘膜细胞团, 分别试验不同培养液与不同CO<sub>2</sub>浓度组合、胎牛血清浓度及细胞接种浓度时细胞生长效果, 并且观察草鱼原代肠道粘膜细胞生长过程, 同时采用3种细胞形态观察法、MTT检测法及相关酶活力系统评价细胞培养效果。结果表明: 采用机械刮取消除法, 分离转速为400 r/min, 在使用M199培养液、6% CO<sub>2</sub>、15%胎牛血清、接种浓度为 $2 \times 10^3$  (个/孔)条件下可批量复制草鱼原代肠道粘膜上皮细胞; 细胞增殖过程符合动物原代肠道粘膜上皮细胞生长分化规律, 采用荧光倒置显微镜与Giemsa染色法相结合、MTT检测法、AKP酶活力及LDH/MTT OD值可系统评价细胞培养效果。

**研究亮点:** 使用肠道肝胰脏强化修复饲料投喂试验鱼以保障试验的可重复性; 本文尝试建立一个规范的、可批量复制的草鱼原代肠道粘膜上皮细胞的操作方法, 同时探讨了细胞培养效果的系统评价指标体系。

**关键词:** 草鱼; 肠道粘膜细胞; 分离方法; 原代培养

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

肠道粘膜上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)是肠道的主要功能细胞, 其参与肠道食物的消化、吸收、免疫屏障等功能, 且与肠道内、外分泌功能关系十分密切<sup>[1]</sup>。目前, 由于饲料物质、药物、病原生物等对肠道粘膜结构与功能影响的研究日益受到重视, 所以建立离体的肠道粘膜上皮细胞试验平台在营养学、生理学、病理学等研究中具有重要的意义。因原代培养的肠道粘膜上皮细胞与体内的正常细胞接近, 能真实反映体内代谢情况<sup>[2-3]</sup>, 适宜做为鱼类肠道粘膜上皮细胞试验平台。因每次试验均需从试验鱼肠道获得粘膜细胞, 为了保障试验的可重复性, 如何保障每次试验的原代粘膜上皮细胞生理状态基本一致和试验材料鱼肠道健康? 因此, 规范的操作方法非常重要。目前, 肠道粘膜上皮细胞的原代培养在小鼠<sup>[4]</sup>和人<sup>[5-6]</sup>中应用较多, 而在鱼类上试验较少, 已发表文献中如牙鲆<sup>[7]</sup>、鲫<sup>[8]</sup>、鲤<sup>[9-12]</sup>, 主要参照小鼠IECs原代培养方法, 但操

作方法并不一致。因此, 规范鱼类IECs消化分离方法及原代培养的试验条件, 建立细胞生长、生理功能状态评价指标体系对于鱼类IECs原代培养非常重要。为此, 本文以草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)为试验材料, 进行了试验前期试验草鱼肠道功能强化培育、肠道粘膜上皮细胞分离方法、原代培养条件、细胞生长与生理功能指标体系的研究, 旨在建立规范的、可复制的草鱼IECs的消化分离方法与原代培养条件及细胞培养效果的系统评价指标体系。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料

##### 1.1.1 草鱼

试验鱼体重为 $(22.0 \pm 5.0)$  g, 购自苏州相城新时代养殖厂, 转入养殖系统, 使用自制的强化饲料<sup>[13]</sup>强化饲养2周, 之后饲养于苏州大学室内循环系统中, 在整个试验过程中均使用自制的含

收稿日期: 2012-02-13 修回日期: 2012-05-28

基金项目: 国家自然科学基金(31172417); 苏州市应用基础(农业)项目(N313401210)

作者简介: 姚仕彬(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产动物营养与饲料。E-mail: yaoshibin2006@163.com

通信作者: 叶元土, E-mail: yeyt@suda.edu.cn

蛋白质 28%、油脂 4% 的普通配合饲料饲养,每天投喂 2 次。水温为(24 ± 4.0)℃、溶解氧 > 6 mg/L。

### 1.1.2 主要试剂及配制

主要试剂: DMEM(高糖)、DMEM(低糖)、M199 培养液由赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司生产;胎牛血清(FBS)由维森特生物技术(南京)有限公司生产;胶原酶 I、胶原酶 IV、四甲基偶氮唑盐(MTT)由 Sigma-aldrich 公司生产;Giemsa 染液、AKP 及 LDH 酶试剂盒由南京建成生物工程研究所生产;鼠尾胶原 I 型由杭州生友生物技术有限公司生产;青霉素 G 钠盐、硫酸链霉素由上海三杰生物技术有限公司生产;其他试剂均为国产分析纯。

D-Hanks 清洗液:按文献[1]使用超纯水配制;完全培养液:M199,使用前添加 15% FBS;上述试验用液使用前临时加入 200 U/mL 青霉素,200 μg/mL 链霉素。胶原酶 I、IV 联合消化液:使用 D-Hanks 液配制成 0.1 mg/mL,0.22 μm 过滤,-20℃ 贮存。MTT 溶液:使用超纯水配制的 PBS 避光条件下溶解 MTT 粉末,配制成 5 mg/mL,0.22 μm 过滤,-20℃ 贮存。

### 1.1.3 主要仪器

主要仪器有:HF90/HF240 CO<sub>2</sub> 培养箱(力康生物医疗科技控股集团),SW-CJ-1FD 单人垂直单面净化工作台(上海博迅实业有限公司),IX70 荧光倒置显微镜(奥林巴斯公司),Biotek Synergy HT 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),TD5A-WS 型台式低速离心机(上海新诺仪器设备有限公司),SHA-C 型水浴恒温振荡器(江苏金坛宏凯仪器厂)。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 试验鱼肠道粘膜健康状况的强化

试验期间多次购入试验草鱼,随机抽取 10 ~ 20 尾进行常规解剖,观察鱼体肠道、肝胰脏状况,对有明显肠道和肝胰脏损伤的如炎症、绿色肝胰脏等不用于整个试验批次研究;对基本合格批次试验鱼在循环养殖系统中进行强化培育,自制强化培育饲料含有肉碱、牛磺酸、谷氨酰胺等物质。分别以未强化培育和经过 2 周强化培育的草鱼肠道为材料,并使用机械刮取消除法,在 400 r/min 转速下进行离心,在 M199 培养液中添加 15% 胎牛血清,在 27℃,6% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行 IECs 原代培养,荧光倒置显微镜下观察 2 种试验

鱼分离和原代培养 IECs 生长效果。

### 1.2.2 分离方法

取试验鱼,用超纯水冲洗体表 2 次,捣碎脑部致死,迅速置 75% 乙醇中浸泡 5 ~ 10 s。超净工作台上解剖,取出肠道中段,去除肠系膜,用注射器(10 mL)吸取 D-Hanks 清洗液冲洗肠段内腔 3 ~ 4 次,分别采用以下 3 种方法消化草鱼 IECs 细胞。机械剪碎消化法:将肠段剪成 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块,D-Hanks 清洗液反复清洗后备用;肠囊翻转消化法:将肠段翻转使肠道粘膜面朝外,再使用 D-Hanks 清洗液清洗肠道粘膜面后,肠段两端使用无菌棉线扎紧后待用;机械刮取消除法:将肠段翻转使肠道粘膜面朝外,用 D-Hanks 清洗液清洗肠道粘膜面后,放入培养皿中,用无菌载玻片一端刮取肠道粘膜层,使用清洗液反复清洗刮取下来的粘膜层,清除悬浮在液面上层多余的脂肪细胞后待用。

将处理后的粘膜组织转入细胞培养瓶(50 mL)中,加入胶原酶 I、IV 联合消化液,28℃ 震荡消化 30 min 后,按 V(消化液):V(胎牛血清) = 19:1 的比例立即加入 FBS 终止消化,玻璃吸管(10 mL)反复吹打 5 min 后,静置 1 min,吸取上清细胞悬液到细胞培养瓶中备用。

经联合消化酶消化后,800 r/min 离心 7 min,加入完全培养液悬浮沉淀,重复离心 2 次,接种于 96 孔板(胶原包被)。在 27℃,6% CO<sub>2</sub> 条件下培养,以消化后粘膜细胞团数量、细胞悬液中活细胞百分比及 48 h 细胞活性<sup>[1]</sup> 为指标,比较 3 种消化方法的效果。

经机械刮取法处理且联合消化酶消化后的草鱼肠道粘膜细胞团,将其平均分成 4 份,分别按 200 r/min、400 r/min、600 r/min、800 r/min 离心 7 min 后,在 96 孔板内分别计数每个转速梯度下单个细胞与细胞团比例,同时使用荧光倒置显微镜拍照。

### 1.2.3 原代培养条件

经机械刮取法处理,联合消化酶消化后 400 r/min 转速下离心 7 min,去上清,加入完全培养液悬浮,重复离心 2 次后,分别采取下列条件进行培养。培养液与 CO<sub>2</sub> 浓度组合:分别使用均含 15% FBS 的 DMEM(高糖)、DMEM(低糖)、M199 3 种培养液悬浮细胞沉淀,接种后放入 3%、6%、9%、12% CO<sub>2</sub> 浓度下培养;胎牛血清浓度:M199

悬浮沉淀,分别添加 FBS 至 0%、5%、10%、15%、20% 浓度,接种后放入 6% CO<sub>2</sub> 培养;细胞团接种浓度:完全培养液悬浮沉淀,计数大于 5 个细胞的粘膜细胞团,按照  $0.5 \times 10^3$ 、 $1.2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^3$ 、 $2.8 \times 10^3$ 、 $3.7 \times 10^3$  个/孔浓度,接种入 96 孔板后放入 6% CO<sub>2</sub> 培养。上述处理温度均控制在 27 °C,培养过程中观察细胞生长状态及测定 48 h 细胞活性<sup>[1]</sup>,比较不同培养条件下细胞生长效果。

#### 1.2.4 原代培养效果评价指标

使用机械刮取法、联合消化酶消化后的草鱼肠道粘膜细胞团经 400 r/min 转速下离心 7 min,重复离心 2 次后,调整细胞浓度为  $2 \times 10^3$  个/孔,接种后放入 27 °C、6% CO<sub>2</sub> 培养。测定不同时间点细胞活性<sup>[1]</sup>及细胞培养液中碱性磷酸酶 (AKP) 与乳酸脱氢酶 (LDH) 活力,同时使用荧光倒置显微镜、碱性磷酸酶 (AKP) 染色法、Giemsa 染色法观察细胞生长过程及细胞形态。AKP、LDH 酶活力测定和 AKP 染色、Giemsa 染色操作方法均参照南京建成生物工程研究所试剂盒说明。

#### 1.2.5 数据处理

数据以平均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示,结果用 SPSS 17.0 软件进行单因素分析,采用 Duncan 氏检验组间差异, $P < 0.05$  时,认为差异显著。

## 2 结果

### 2.1 试验鱼肠道粘膜健康状态的强化

本试验比较了强化培育与未强化培育试验鱼 IECs 原代培养的生长效果,结果发现试验鱼经过强化培育后,其肠道及肝脏均正常,经消化分离后发现未强化培育肠道粘膜细胞团数量明显少于强化培育后的试验鱼,细胞培养 24 h 时,强化培育后试验鱼肠道粘膜上皮细胞较未强化培育生长效果好,贴壁细胞数量较多 (图版 I - 1, 2)。

### 2.2 分离条件

本试验比较了 3 种消化方法及不同分离转速处理后效果 (表 1 ~ 2),结果显示:3 种消化方法获得的肠道粘膜细胞中活细胞比例均大于 99%,机械剪碎消化法组 MTT OD 值显著低于肠囊翻转消化法组与机械刮取消化法组 ( $P <$

0.05),机械刮取消化法组 MTT OD 值较肠囊翻转消化法组高。从获取的粘膜细胞看,机械剪碎消化法获得的大部分为单个细胞 (图版 I - 3),细胞培养 48 h 时部分培养孔有成纤维细胞生长 (图版 I - 6),肠囊翻转消化法与机械刮取消化法则获得大量的粘膜细胞团 (图版 I - 4, 5),培养后细胞无杂质细胞生长。

表 1 消化方法对草鱼原代 IECs 生长的影响

Tab.1 Effects of different digestion methods on proliferation of IECs in primary culture

消化方法处理组	样本数/孔	活细胞比例	MTT OD
机械剪碎消化法	20		0.432 ± 0.095 <sup>a</sup>
肠囊翻转消化法	20	> 99%	0.576 ± 0.101 <sup>b</sup>
机械刮取消化法	20		0.627 ± 0.102 <sup>b</sup>

注:组间肩注小写字母不同表示在 0.05 水平上显著,相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ),以下皆同。

采用不同离心转速处理后,随着转速的升高,粘膜细胞团与单个细胞数量逐渐增多 (图版 I - 7 ~ 10);从粘膜细胞团与单个细胞比值看出 (表 2),比值呈先升高后降低趋势,在 400 r/min 组比值最高,达到 1:4,在 800 r/min 组最低,为 1:12,200 r/min 转速组与 600 r/min 转速组比值相等,为 1:7。

表 2 不同离心转速对草鱼 IECs 细胞比例的影响

Tab.2 Effects of different centrifugal speeds on ratio of cell mass and single cell

离心转速/(r/min)	样本数/孔	细胞团:单个细胞
200	12	1:7
400	12	1:4
600	12	1:7
800	12	1:12

### 2.3 原代培养条件

比较了 DMEM (高糖)、DMEM (低糖)、M199 培养液分别与不同 CO<sub>2</sub> 浓度组合下 IECs 细胞生长的效果 (表 3),结果显示:随着 CO<sub>2</sub> 浓度的升高,DMEM (高糖) 组 12% CO<sub>2</sub> 浓度下 MTT OD 值最高,同时显著高于 3% CO<sub>2</sub> 浓度组 ( $P < 0.05$ ); DMEM (低糖) 组细胞 MTT OD 值呈增高趋势,12% CO<sub>2</sub> 浓度下 MTT OD 值显著高于其他浓度组 ( $P < 0.05$ ); M199 培养液组 MTT OD 值则呈先增高后降低趋势,在 6% CO<sub>2</sub> 浓度下 MTT OD 值显著高于其它浓度组 ( $P < 0.05$ ),12% CO<sub>2</sub> 浓

度下 MTT OD 值显著低于其它浓度组 ( $P < 0.05$ )。此外,6%  $\text{CO}_2$  浓度下 M199 培养液组 MTT OD 值显著高于 12%  $\text{CO}_2$  浓度下 DMEM(高糖)组、DMEM(低糖)组( $P < 0.05$ )。

表 3 不同培养液与  $\text{CO}_2$  浓度组合对草鱼 IECs 生长的影响

Tab.3 Effects of different mediums and concentrations of  $\text{CO}_2$  on proliferation of IECs in primary culture

培养液	$\text{CO}_2$ 浓度	样本数/孔	MTT OD 值
DMEM (高糖)	3%	20	0.235 ± 0.063 <sup>a</sup>
	6%	20	0.261 ± 0.062 <sup>ab</sup>
	9%	20	0.265 ± 0.052 <sup>ab</sup>
	12%	20	0.313 ± 0.106 <sup>bc</sup>
DMEM (低糖)	3%	20	0.250 ± 0.064 <sup>a</sup>
	6%	20	0.277 ± 0.059 <sup>ab</sup>
	9%	20	0.265 ± 0.063 <sup>ab</sup>
	12%	20	0.370 ± 0.111 <sup>de</sup>
M199	3%	20	0.345 ± 0.074 <sup>cd</sup>
	6%	20	0.560 ± 0.119 <sup>f</sup>
	9%	20	0.404 ± 0.067 <sup>e</sup>
	12%	20	0.238 ± 0.093 <sup>a</sup>

比较不同浓度胎牛血清细胞生长效果,结果显示(表 4):随着 FBS 添加浓度的增加,细胞 MTT OD 值逐渐增高,0% FBS 浓度组细胞 MTT OD 值显著低于其它 FBS 浓度组( $P < 0.05$ ),细胞未能汇合成片(图版 I - 11);5% 与 10% FBS 浓度组细胞活性无显著性差异,细胞在 48 h 内汇合成片;15%、20% FBS 浓度组细胞 MTT OD 值显著高于其它浓度组( $P < 0.05$ ),细胞均能在 24 h 内快速汇合成片(图版 I - 12)。

表 4 胎牛血清浓度对草鱼 IECs 生长的影响

Tab.4 Effects of different concentrations of serum on proliferation of IECs in primary culture

胎牛血清浓度/%	样本数/孔	MTT OD 值
0	12	0.283 ± 0.073 <sup>a</sup>
5	12	0.469 ± 0.087 <sup>b</sup>
10	12	0.509 ± 0.161 <sup>b</sup>
15	12	0.631 ± 0.121 <sup>c</sup>
20	12	0.677 ± 0.119 <sup>c</sup>

比较细胞团不同接种密度下 IECs 细胞生长效果,结果显示(表 5):随着接种浓度的增加,细胞 MTT OD 值逐渐增高,以  $3.7 \times 10^3$  个/孔浓度组最高,达到 1.055,当接种浓度在  $2 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^3$

个/孔时,OD 值介于 0.5 ~ 1.0 之间。从增殖细胞汇片时间看到,当接种量为 500 ~ 1 200 个/孔时,细胞在 48 h 内未能汇合成片;接种量为 2 000 ~ 2 800 个/孔时,48 h 内细胞能汇合成片(图版 II - 1,2);当接种量为 3 700 个/孔时,细胞 1 d 内即可汇合成片。

表 5 接种浓度对草鱼 IECs MTT OD 值的影响

Tab.5 Effects of different concentrations of seeding on proliferation of IECs in primary culture

细胞团接种浓度/(个/孔)	样本数/孔	MTT OD 值
$3.7 \times 10^3$	12	1.055 ± 0.160
$2.8 \times 10^3$	12	0.716 ± 0.083
$2.0 \times 10^3$	12	0.576 ± 0.063
$1.2 \times 10^3$	12	0.340 ± 0.081
$0.5 \times 10^3$	12	0.188 ± 0.037

## 2.4 IECs 原代培养效果评价指标结果

### 2.4.1 3 种细胞形态观察方法及细胞生长过程

采用荧光倒置显微镜观察到肠道粘膜上皮细胞生长过程(图版 II - 3 ~ 8)大致为:肠道粘膜上皮细胞从鱼体肠道消化分离后呈细胞团样,细胞团在接种 12 h 内贴壁,部分细胞团增殖卵圆形游离细胞环绕于细胞团周围,成功贴壁后呈梭状,36 ~ 60 h 期间细胞逐渐分化成熟,同时增殖细胞汇合成片,培养至 72 h,可部分看到增殖的粘膜细胞贴壁不牢,甚至凋亡萎缩。

通过对比荧光倒置显微镜、Giemsa 染色法及 AKP 染色法观察细胞形态及细胞生长过程,结果显示(图版 II - 9 ~ 12):荧光倒置显微镜能方便快速观察细胞外部形态,观察过程中不影响细胞生长;Giemsa 染色法与 AKP 染色法通过对细胞染色后观察到细胞边界清晰,细胞核着色较深,呈卵圆形,核仁可见,其中染色 AKP 染色法时间较长,染色程序较复杂且成功率低。

### 2.4.2 细胞活性及 AKP、LDH 活力

测定了不同时间点细胞活性及培养液中 AKP、LDH 酶活力,结果显示(图 1 ~ 2):随着培养时间增加,细胞 MTT OD 值逐渐降低,在 48 ~ 60 h 细胞 MTT OD 值相对稳定;AKP 与 LDH 活力在 12 ~ 60 h 间均波动不稳定;随培养时间增加,LDH/MTT OD 呈增高趋势,在 36 ~ 48 h 时无显著性差异。

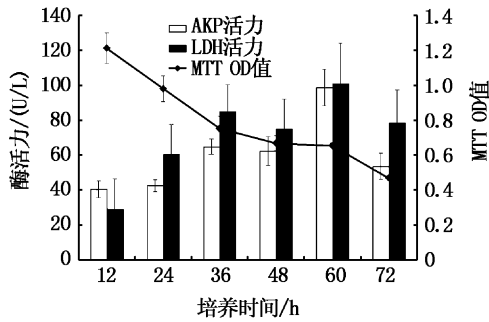


图1 不同时间细胞 MTT OD 值及 AKP、LDH 酶活力

Fig.1 MTT OD of cells, enzyme activity of AKP and LDH in different culture time

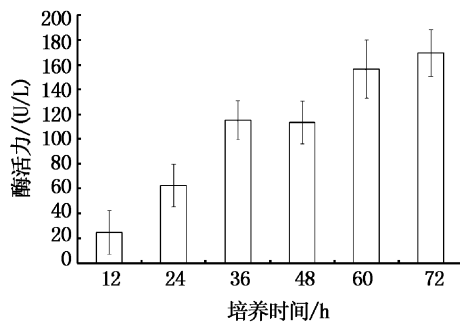


图2 不同时间 LDH/MTT OD 值

Fig.2 LDH/MTT OD of cells in different culture time

### 3 讨论

#### 3.1 草鱼肠道健康状态的强化

在实际养殖条件下,饲料物质、环境条件等多种因素可能影响到试验材料鱼的肠道及肝脏生理健康状态,导致试验结果不稳定。这就要求试验中需对提供肠道粘膜的试验鱼进行一段时间的强化饲养,以期对可能有肠道粘膜、肝脏损伤进行适度的修复和调整其生理状态,从而保障了原代培养试验的可重复性。这是进行肠道粘膜细胞分离原代培养工作非常重要的基础性保障条件。

#### 3.2 草鱼 IECs 分离方法及原代培养条件

原代 IECs 正常生长需诸多适宜条件,主要条件如消化分离方法、适宜的培养液及 CO<sub>2</sub> 浓度、胎牛血清浓度及接种浓度。目前在鱼类 IECs 原代培养过程中,相关培养条件并未规范,重复性不强,故批量复制草鱼 IECs 的规范操作方法非常

重要。

肠道粘膜组织主要包括绒毛结构与隐窝,其中隐窝具有增殖分化能力,能支持细胞持续增殖,是 IECs 原代培养成功的关键。消化酶将肠粘膜消化成大小不一的粘膜细胞团,其中包含隐窝,故消化分离过程粘膜细胞团的数量与质量对于试验成功非常重要,即以细胞团的数量多,细胞健全为好。从本试验结果可以看出 3 种消化法获得活细胞比例均大于 99%,但机械刮取消化法较机械剪碎消化法、肠囊翻转消化法获得较多的粘膜细胞团,且 48 h 后细胞生长活性最佳,也无杂细胞生长,故使用机械刮取消化法进行消化为宜。分离转速越高,会导致消化后细胞悬液中单个细胞、杂细胞、细菌沉降,挤占细胞团的生长空间,消耗营养,进行多次较低转速离心有利于细胞团与单个细胞的分离,也能有效去除细菌<sup>[14]</sup>。从本试验结果看出,在 400 r/min 时,粘膜细胞团的比例值最大,达到了细胞团与单个细胞的有效分离,不仅能提高培养液利用效率,减少细菌污染的机会,也便于细胞团接种浓度的确定。因此,肠道粘膜细胞的消化分离采用机械刮取消化法与 400 r/min 离心。

研究表明,pH 在 7.2 ~ 7.4 之间适宜动物 IECs 的增殖生长<sup>[3, 15-16]</sup>,为了保证培养液 pH 在正常范围内,需要不同浓度 CO<sub>2</sub> 来调节培养液 pH,本试验结果发现 M199 培养液在 6% CO<sub>2</sub>, DMEM(高糖)、DMEM(低糖)在 12% CO<sub>2</sub> 下草鱼 IECs 生长效果好,这同弗雷谢尼<sup>[17]</sup>论述一致;然而,6% CO<sub>2</sub> 下 M199 培养液组 OD 值显著高于 12% CO<sub>2</sub> 下 DMEM(高糖)组、DMEM(低糖)组 ( $P < 0.05$ ),可能原因是 M199 培养液中营养物质更为全面,适宜水生动物细胞的生长增殖<sup>[18]</sup>。胎牛血清是细胞原代培养中必不可少的营养物质之一,过高过低均可导致细胞生长不佳<sup>[2]</sup>,本试验中发现添加 15% 胎牛血清能显著促进细胞生长增殖,且无杂细胞生长。细胞团接种浓度直接影响到细胞团增殖汇合成片的速度,汇合后细胞间的接触能抑制细胞的继续增殖<sup>[17]</sup>,接种浓度过大,细胞还未分化成熟则由于接触抑制停止继续增殖,同时营养消耗过快,导致细胞生长受阻,接种浓度过小,细胞虽能分化成熟,但不能汇合成片,同时 MTT 检测法中适宜 OD 值范围为 0.5 ~ 1.0<sup>[19]</sup>,本试验结果显示细胞团接种在

2 000 个/孔时,细胞能在 48 h 内成功汇合成片,且利于 MTT 检测法进行测定细胞活性,适宜选择作为细胞的接种浓度。

因此,草鱼原代 IECs 培养条件宜采用机械刮取消化法消化,400 r/min 转速下离心,使用 M199 为培养液,添加 15% 胎牛血清,  $2 \times 10^3$  个/孔接种数量,在 27 ℃、6% CO<sub>2</sub> 条件下进行原代培养。

### 3.3 细胞形态观察方法、生长曲线及 AKP、LDH 酶活力

从结果观察到草鱼原代 IECs 增殖过程符合动物原代 IECs 的分化规律<sup>[15, 20]</sup>。在细胞生长增殖过程中,本试验从细胞的形态观察、生长活性及细胞结构功能酶出发,以期能系统地评价细胞培养效果。

从 3 种细胞形态观察方法对比结果可知,荧光倒置显微镜观察法的优点是直接、简便,但是不能观察到细胞内部结构;AKP 染色法与 Giemsa 染色法均能对细胞内部结构进行有效观察,但 Giemsa 染色法更为快捷简单,成功率高。因此,倒置显微镜观察法与 Giemsa 染色法相结合,能有效地观察细胞内外部形态。

活细胞的线粒体脱氢酶能将染料 MTT 转变为不可溶性的紫色甲臞(Formazan)颗粒,被溶剂溶解后呈现兰紫色(OD 值表示),显示了细胞增殖活力,且 OD 值与细胞数量呈线性关系<sup>[19]</sup>。然而,MTT 测定不能反映细胞结构完整程度。因 LDH 存在于细胞内,当细胞结构破坏时能迅速逸出到胞外,细胞外 LDH 已广泛作为细胞结构完整性的重要标志酶;肠型 AKP 存在于 IECs 刷状缘上,是其标志酶,显示了细胞的分化程度。从本试验对此两种酶的检测结果看,AKP 酶活力在 12~60 h 时处于持续增高的状态,说明细胞持续分化,但由于细胞的增殖与凋亡处于动态平衡中,LDH 活力有随着细胞数量的多少呈现波动的趋势,这不利于不同时间点结构完整性的比较,现已发现 LDH 酶活力大小与 MTT OD 显著相关<sup>[9-11]</sup>,当采用酶活力值与 MTT OD 值相比后发现 LDH/MTT OD 随时间增长趋势明显,符合细胞分化凋亡规律,更能准确反映细胞结构完整程度,利于不同时间点细胞状态的比较。

因此,使用倒置显微镜观察法与 Giemsa 染色法、MTT 检测法、AKP 酶活力及 LDH/MTT OD 值能系统评价草鱼 IECs 原代培养效果。

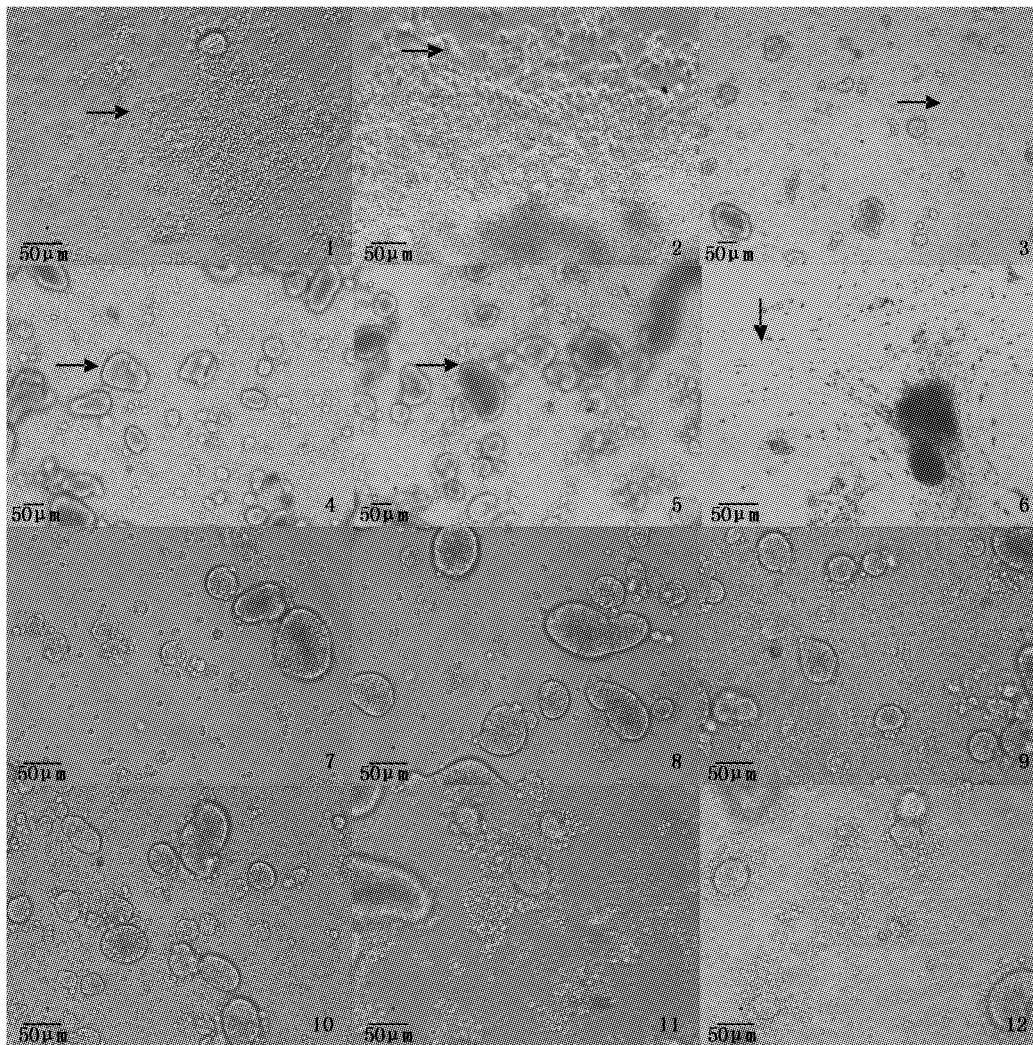
## 4 结论

采用机械刮取消化法进行肠道粘膜组织的消化,在离心转速 400 r/min,使用 M199 培养液、在 6% CO<sub>2</sub>、15% 胎牛血清、接种浓度为  $2 \times 10^3$  个/孔条件下可批量复制草鱼原代肠道粘膜上皮细胞,建立了规范的草鱼 IECs 试验操作方法。同时,采用荧光倒置显微镜观察法与 Giemsa 染色法相结合观察细胞形态,MTT 检测法描述细胞生长活性,采用 AKP 酶活力与 LDH/MTT OD 值评价细胞分化与结构完整程度,建立了细胞培养效果系统评价指标体系。

### 参考文献:

- [1] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [2] EVANS G S, FLINT N, SOMERS A S, et al. The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures[J]. *Journal of Cell Science*, 1992, 101 (1): 219 - 231.
- [3] 纪华英,陈其奎,曾晖. 小鼠小肠上皮细胞的体外原代培养[J]. *医学综述*, 2010(9):1417 - 1419.
- [4] 王莉,段相林. 大鼠小肠上皮细胞的体外原代培养[J]. *军事医学科学院院刊*, 2004(1):61 - 63.
- [5] 张文竹,戴定威,吴圣媚,等. 人胎小肠上皮细胞体外培养的研究[J]. *上海第二医科大学学报*, 1996(5):321 - 324.
- [6] 张安平,刘宝华,张连阳,等. 正常人结肠上皮细胞体外培养和鉴定[J]. *世界华人消化杂志*, 2004(8): 1966 - 1968.
- [7] 陈伟. 抗营养因子对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)利用大豆蛋白源的影响[D]. 青岛:中国海洋大学, 2009.
- [8] 宋增福,吴天星,潘晓东. 鲫肠道上皮细胞原代培养方法的研究[J]. *淡水渔业*, 2008(1):67 - 69.
- [9] 姜俊. 谷氨酰胺对鲤鱼肠上皮细胞生长和代谢的影响[D]. 成都:四川农业大学, 2005.
- [10] 冯琳. 大豆凝集素对鲤鱼肠道上皮细胞增殖分化及其功能的影响[D]. 成都:四川农业大学, 2006.
- [11] 郑婷. 维生素 E 对鲤鱼肠上皮细胞生长发育及抗氧化能力的影响[D]. 成都:四川农业大学, 2007.
- [12] 郭林英. 大豆 β-伴球蛋白提取物对鲤鱼肠上皮细胞增殖及其功能的影响[D]. 成都:四川农业大学, 2006.
- [13] 叶元土,蔡春芳,张宝彤,等. 一种强化鱼类肠道粘膜和肝脏细胞生理功能的配合饲料:中国,201010585756[P]. 2011-05-25.
- [14] 李莉,高淑静,张守全,等. 新生仔猪小肠上皮细胞体外培养的研究[J]. *仲恺农业工程学院学报*, 2010, 23(1): 30 - 33.
- [15] 张道杰,蒋建新,陈永华,等. 用嗜热菌蛋白酶进行人肠上

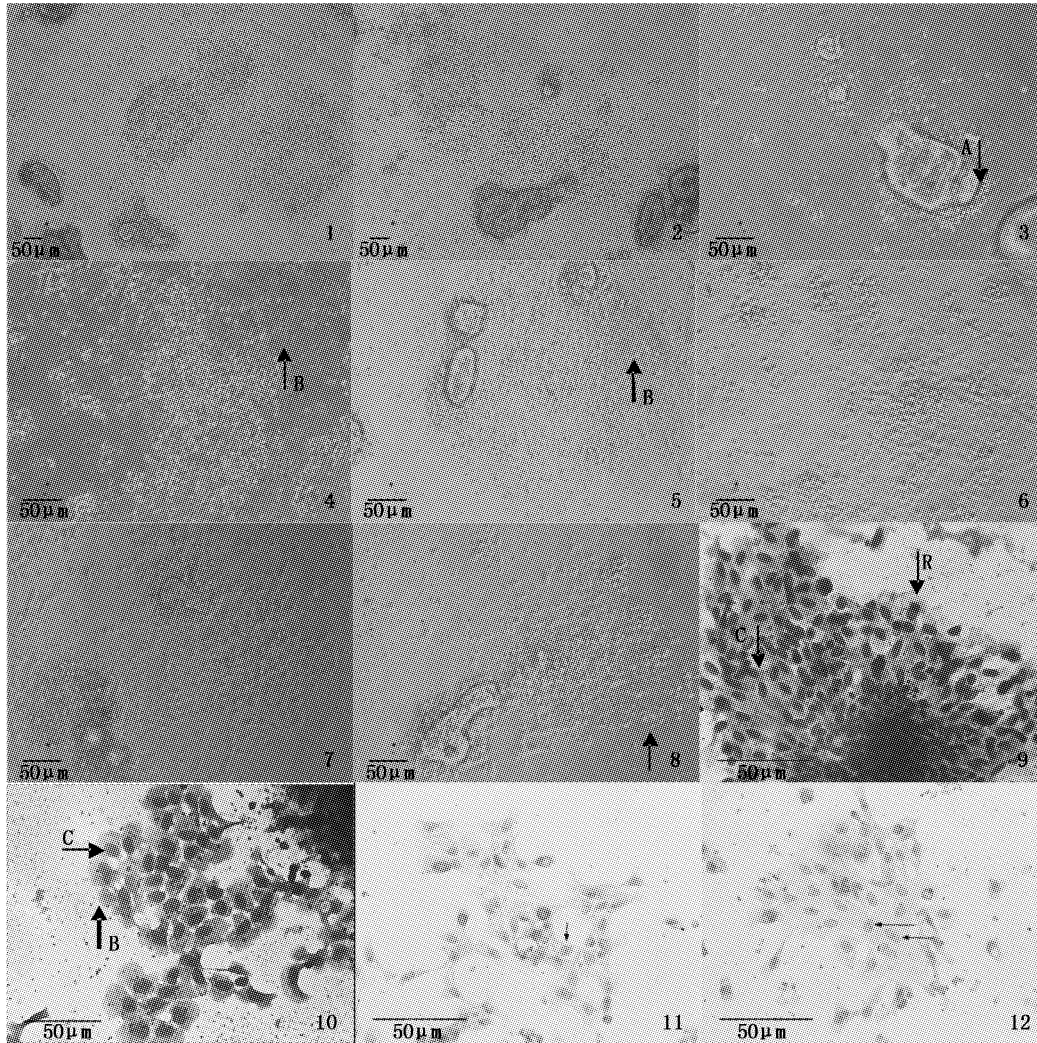
- 皮细胞分离培养[J]. 第三军医大学学报, 2004(11): 1016-1018.
- [16] 付文卓,魏萍. 组织块法培养鸡胚肠黏膜上皮细胞[J]. 现代畜牧兽医, 2010(6):65-66.
- [17] 弗雷谢尼 R I. 动物细胞培养:基本技术指南[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [18] 孔祥婷,沈颂东,姜德勋,等. 黄颡鱼吻端细胞培养研究[J]. 淡水渔业, 2009(2):19-25.
- [19] 赵承彦,靖志安,牛青霞. MTT 显色反应实验条件分析[J]. 河南医学研究, 2000(2):107-111.
- [20] 杨文平,高峰,许辉堂,等. 鸡肠上皮细胞体外原代培养研究[J]. 江西农业学报, 2007(5): 113-115.



图版 I 不同分离及原代培养条件下 IECs 细胞形态及生长

**Plate I Morphology and growth of IECs in different dissociation methods and primary culture conditions**

1. 投喂强化饲料前,取试验材料鱼肠道进行 IECs 原代培养 24 h 后细胞状态,增殖贴壁细胞(↑),×200; 2. 投喂强化饲料后,取试验材料鱼肠道进行 IECs 原代培养 24 h 后细胞状态,增殖贴壁细胞(↑),×200; 3. 机械剪碎消化法,单个细胞(↑),×100; 4. 肠囊翻转消化法,肠道粘膜细胞团(↑),×100; 5. 机械刮取消化法,肠道粘膜细胞团(↑),×100; 6. 机械剪碎消化法,培养 24 h,加入 MTT 2 h 后,成纤维细胞生长(↑),×200; 7. 200 r/min 转速离心,×200; 8. 400 r/min 转速离心,×200; 9. 600 r/min 转速离心,×200; 10. 800 r/min 转速离心,×200; 11. 添加 0% 浓度胎牛血清,培养 48 h 后,×200; 12. 添加 15% 浓度胎牛血清,培养 24 h 后,×200。



图版 II 细胞分化及 Giemsa、AKP 染色后细胞形态

Plate II Cellular differentiation and morphology of cells treated by Giemsa stain and AKP stain

1. 接种浓度  $2 \times 10^3$  个/孔, 48 h 后细胞汇片,  $\times 100$ ; 2. 接种浓度  $2.8 \times 10^3$  个/孔, 48 h 后细胞汇片,  $\times 100$ ; 3. 培养 12 h, 细胞团增殖的游离细胞 ( $\uparrow$  A),  $\times 200$ ; 4. 培养 24 h, 贴壁的 IECs 细胞 ( $\uparrow$  B),  $\times 200$ ; 5. 培养 36 h, 贴壁的 IECs 细胞 ( $\uparrow$  B),  $\times 200$ ; 6. 培养 48 h,  $\times 200$ ; 7. 培养 60 h,  $\times 200$ ; 8. 培养 72 h, 细胞凋亡萎缩 ( $\uparrow$ ),  $\times 200$ ; 9. 培养 24 h, Giemsa 染色, 细胞核 ( $\uparrow$  C), 贴壁的 IECs 细胞 ( $\uparrow$  B),  $\times 400$ ; 10. 培养 48 h, Giemsa 染色, 细胞核 ( $\uparrow$  C), 贴壁的 IECs 细胞 ( $\uparrow$  B),  $\times 400$ ; 11. 培养 24 h, AKP 染色, 贴壁的 IECs 细胞 ( $\uparrow$ ),  $\times 400$ ; 12. 培养 48 h, AKP 染色, 细胞核 ( $\uparrow$ ),  $\times 400$ 。



## Dissociation and primary culture of *Ctenopharyngodon idellus* intestinal epithelial cells

YAO Shi-bin<sup>1</sup>, YE Yuan-tu<sup>1</sup>, CAI Chun-fang<sup>1</sup>, YAO Lin-jie<sup>1</sup>, XU Fan<sup>1</sup>, LIU Meng<sup>1</sup>, XIAO Pei-zhen<sup>2</sup>, WANG Li-hong<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Aquatic Nutrition of Jiangsu Province, Suzhou University, Suzhou 215123, Jiangsu, China; 2. Beijing Nutrition Resources Institute, Open Laboratory for Aquatic Animal Nutrition, Beijing 100069, China)

**Abstract:** Intestinal epithelial cells (IECs) are important functional cells in intestine, while intestinal barrier, a complex system, is formed mostly by intestinal mucosa cells. Primary cultured intestinal epithelial cells is thus the effective cell model in research in nutrition, physiology and pathology. *Ctenopharyngodon idellus* is the freshwater fish with important economic and food value in China. No practical operation method and system evaluation method of primary culture intestinal epithelial cells from *Ctenopharyngodon idellus* were published. The aim of this study was to establish a method specification on dissociation of IECs from intestinal mucosa of *Ctenopharyngodon idellus*, as well as effective evaluation index of primary culture of IECs. In this study, three digestion methods and different centrifugal speeds were used on the intestinal mucosa. The combinations of three culture mediums and four concentration gradients of CO<sub>2</sub> were tested, as well as different concentration gradients of serum and cells seeded. After observing the growth process of IECs, we chose three observation methods, MTT method and enzyme activity interrelated system to evaluate the growth effect of primary cultured IECs. The results showed that the tested fish need to be intensified rearing to protect test repeatability. Using mechanical scrape plus collagens digestion and centrifugal speeds at 400 r/min, cells grew in M199 added 15% serum concentration at 27 °C in 6% CO<sub>2</sub> incubator, while the concentration of cells seeded was 2 000 clumps of cells in each plate hole, intestinal mucosa cells' growth was stable. The process of primary cultured IECs growth could be evaluated system of the combinations of inverted fluorescence microscope method and Giemsa staining method, as well as MTT method, enzyme activity of AKP and the ratio of LDH/MTT OD.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idellus*; intestinal epithelial cells; dissociation method; primary culture