

技术与方法

基于细胞三维培养的气道平滑肌细胞收缩效应 检测方法的建立与应用

徐玉东 尹磊淼 王宇 王文倩 倪娜 杨永清*

(上海中医药大学, 上海市针灸经络研究所, 上海 200030)

摘要 气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)是引起哮喘患者气道收缩狭窄、呼吸阻力增加的主要效应细胞。ASMCs收缩效应检测是研究哮喘病理生理机制、评估或研发新的支气管舒张药物的重要实验依据。而常用的活体组织张力检测以及单层培养ASMCs显微镜形态观察等方法存在样品取材或测量误差等问题。该研究利用胶原蛋白凝胶构建气道平滑肌细胞的三维立体培养模型,将凝胶与培养孔壁分离,在不同的时间点记录细胞收缩力作用下凝胶面积的变化值,以此反映ASMCs的收缩效应。结果显示,0.1, 1, 10 mmol/L的乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)刺激后,凝胶面积均显著缩小,随着剂量增加ASMCs的收缩反应增强。提前加入肌球蛋白ATP酶抑制剂BDM(butanedione monoxime),能明显抑制Ach诱导的ASMCs收缩反应,说明该方法的可重复性和准确性好。

关键词 气道平滑肌细胞; 三维培养; 胶原凝胶

Establishment and Application of the Contraction Assay System Based on 3-dimension Culture of Airway Smooth Muscle Cells

Xu Yudong, Yin Leimiao, Wang Yu, Wang Wenqian, Ni Na, Yang Yongqing*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Research Institute of Acupuncture & Meridian, Shanghai 200030, China)

Abstract Airway smooth muscle cells (ASMCs) have been regarded as the main effector cells responsible for bronchoconstriction and increased respiratory resistance in asthma. The detections of the contractile responses of ASMCs provide important experimental evidences for investigation of the pathophysiological mechanisms of asthma, evaluation and development of new bronchodilator drugs. The routine studies to measure the tension changes of excised tissue and morphological changes of monolayer cultured ASMCs were frequently limited by the intermittent supply of viable samples and measurement error. In this study, we established a gel contraction assay, which employed 3-dimension cultured ASMCs in collagen I substrate. Collagen gels were released from the wells in which they were fabricated, and the decreases in gel surface area caused by cell shortening at different time points were recorded to estimate ASMCs contraction. The results showed that gel area decreased significantly to the stimuli of 0.1, 1, 10 mmol/L of acetylcholine (Ach) in a dose-dependent manner. However, myosin ATP inhibitor BDM (butanedione monoxime) could inhibit the Ach-induced contractile response of ASMCs, which demonstrated the high reproducibility and accuracy of this assay.

Keywords airway smooth muscle cells; 3-dimension culture; collagen gel

收稿日期: 2014-09-13 接受日期: 2014-10-30

国家自然科学基金(批准号: 81201753、81173332、81173341、81473760)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54592134, E-mail: yyq@shutcm.edu.cn

Received: September 13, 2014 Accepted: October 30, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81201753, 81173332, 81173341, 81473760)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54592134, E-mail: yyq@shutcm.edu.cn

网络出版时间: 2015-01-20 16:22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150120.1622.004.html>

支气管哮喘是一种严重影响人类健康的呼吸系统疾病,由气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)收缩引起的广泛多变的可逆性气流受阻(多表现为喘息、气急、胸闷、咳嗽等)为其主要临床特征^[1]。机体接触过敏原、环境变化以及神经刺激等均可使肥大细胞脱颗粒,诱发速发型哮喘反应,表现为ASMCs的过度收缩引起的气道狭窄,呼吸困难。ASMCs持续收缩反应会进一步导致气道重塑,引发不可逆的气道阻塞,并发展成为顽固性哮喘^[2]。ASMCs是气道狭窄主要效应细胞,也是哮喘治疗的重要靶细胞之一,深入探讨ASMCs收缩的生物学机制,寻找有效的舒张ASMCs的化合物或药物,是哮喘基础研究中值得关注的重要环节^[3]。

建立一种准确有效、可重复的ASMCs收缩效应检测方法,对于探索气道平滑肌收缩反应的病理生理机制以及筛选细胞收缩调控分子和新的抗哮喘药物具有十分重要的作用。手术分离支气管条组织,可以利用张力传感器测量收缩力的改变^[4-5]。但是,由于临床样本不易获取,该方法不能广泛应用于人平滑肌组织张力的检测。相对于组织样品检测,以往研究多通过显微镜下观察ASMCs形态学(形状、长度、面积)改变分析细胞收缩能力^[6-7]。但是这种方法使用的单层培养细胞并不能真实地反映ASMCs在组织内的收缩特性,而且在实际应用中,常常会因为镜下可视范围、后期形态学测量精度以及操作便利性等因素影响,导致其使用受限。本研究在ASMCs单层培养的基础上,制备ASMCs三维培养模型,建立一种更接近体内生长微环境的ASMCs离体收缩分析方法,并验证了该方法的可行性,对关键实验参数进行优化,为进一步研究ASMCs在体内微环境条件下对各种刺激因子和信号分子的收缩反应提供准确、可重复性强的检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要材料

雄性SD大鼠,SPF级,6周龄,体重 200 ± 10 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号:2007000547260,常规饲养于清洁级实验动物中心。I型胶原酶(Sigma公司),高糖DMEM培养液(Hyclone公司),胎牛血清(Cellgro公司),胰蛋白酶(Gibco公司),小鼠抗大鼠-平滑肌肌动蛋白(α -actin)单克隆抗体(Abcam公司),FITC标记荧光二抗(KPL

公司),鼠尾胶原蛋白(杭州生友生物技术公司),乙酰胆碱ACh、肌球蛋白ATP酶抑制剂Butanedione monoxime(Sigma公司)。二氧化碳培养箱(Binder公司),IX-81荧光倒置显微镜(Olympus公司),Geldoc凝胶成像系统(BioRad公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠ASMCs的分离与培养 大鼠脱颈处死后放入75%乙醇浸泡10 min以消毒表皮,迅速分离气管及肺部组织,置入含青/链霉素的4 °C预冷D-Hanks液中。去除肺组织、支气管动静脉、脂肪和残存结缔组织,用眼科虹膜剪在培养皿中将气管段剪成约1 mm×1 mm大小的组织块,将其装入15 mL离心管中,加入0.2% I型胶原酶1 mL(用D-Hanks液配制成2 mg/mL),再加入0.25%胰蛋白酶1 mL(双酶1:1混合)。吸管轻轻吹打混匀,置入37 °C、5% CO₂培养箱中消化25 min。然后用含胎牛血清的培养液终止消化,1 000 r/min离心5 min,弃上清液。加入高糖DMEM培养液(含15%胎牛血清、青霉素100 U/mL、链霉素100 μg/mL, pH7.2),轻轻吹打分散细胞。吸取细胞悬液加入100 mm细胞培养皿中,置入37 °C、5% CO₂培养箱中培养,待细胞达80%融合后进行细胞传代。

1.2.2 大鼠ASMCs的免疫荧光鉴定 将消毒灭菌过的盖玻片置于6孔板底部。用胰酶消化制备细胞悬液,调整细胞密度为 $(0.5\sim 1.0)\times 10^5$ /mL。往6孔板内滴加细胞悬液2 mL,混匀后置于37 °C、5% CO₂的培养箱中培养。待细胞达到70%融合时取出爬片,吸弃培养液,PBS漂洗3次,加入1 mL 4%多聚甲醛固定液固定30 min,PBS漂洗5 min×3,加入0.3% Triton X-100透化10 min。用封闭液(5% BSA) 37 °C封闭30 min,加入小鼠抗大鼠-平滑肌肌动蛋白单克隆抗体室温孵育1 h,用PBS洗涤5 min×3,加入FITC标记的荧光二抗室温反应1 h,用PBS洗涤5 min×3。最后加入DAPI染色液室温反应15 min,用PBS洗涤5 min×3。滴加抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴附有细胞的盖玻片,在荧光显微镜下进行观察。

1.2.3 ASMCs三维培养模型构建 胰酶消化ASMCs后,调整细胞悬液的浓度为 1.2×10^5 /mL。将400 μL鼠尾胶原蛋白I型(5 mg/mL)加到15 μL 0.1 mol/L NaOH中,立即混匀。再加入25 μL 10×PBS并混匀。加入560 μL的细胞悬浮液并混匀,形成ASMCs-胶原混合液后,将此溶液注入24孔板,每孔加入0.5 mL(每孔细胞数量约 3×10^4)。将培养板在37 °C放置30 min待

胶凝固后,每孔加入500 μL 的高糖DMEM细胞培养液(含10%胎牛血清),转移到培养箱中培养。

1.2.4 ASMCs收缩效应检测 在上述的ASMCs三维培养24 h后,更换新鲜细胞培养液,并加入不同剂量的ACh诱导ASMCs收缩,或提前加入BDM抑制ASMCs收缩。用注射器针头轻轻将胶原凝胶与培养孔壁分离,使凝胶收缩并漂浮在培养液中,在不同的时间点通过凝胶成像系统观察并记录细胞收缩力作用下凝胶块的形态学变化。每个时间点的凝胶面积用NIH image J图像分析软件进行计算,以(初始凝胶面积-各时间点凝胶面积)/初始凝胶面积 $\times 100\%$ 表示细胞收缩效率。每个实验组设4个复孔,并分别使用第4、6、8代ASMCs进行3次相同实验,取重复3次的检测均值进行统计分析。

1.2.5 数据处理及统计学分析 实验数据表达为 $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ 。不同组间ASMCs收缩效率的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠ASMCs鉴定

(1)细胞形态学鉴定:用倒置相差显微镜观察,完全伸展的ASMCs多呈梭形或不规则三角形,有多个细胞突起,内有1~2个圆形细胞核,细胞伸出较长的突起并相互接触,融合后部分区域可见典型的“峰-谷”样结构(图1A)。(2)细胞免疫荧光鉴定:对平滑肌细胞特异的 α -actin蛋白进行免疫荧光染色,用倒置荧

光显微镜观察,95%以上细胞呈强阳性染色,胞浆内可见绿色荧光,与细胞纵轴平行的纤维肌丝,即平滑肌 α -actin,胞核在DAPI复染下呈蓝色(图1A~图1C)。

2.2 ASMCs三维培养模型建立

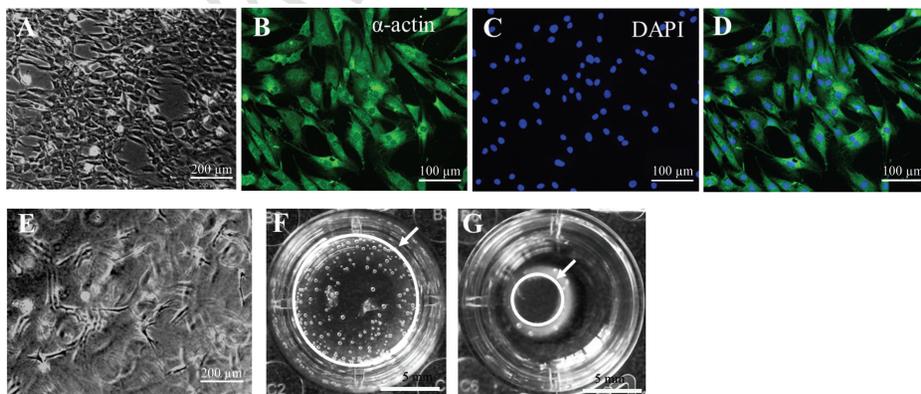
细胞三维培养胶原溶液呈透明状,室温放置30 min后固化为无色透明状的胶原凝胶,紧密附着在培养皿的底部及孔壁上,凝胶由胶原原纤维构成立体的网状结构,有一定的抗张力性能。倒置显微镜下观察,约4~6 h后呈圆形的ASMCs表面逐渐伸展延长形成多个星状胞质突起,表明ASMCs已经开始附着于胶原纤维网,12 h后胞质突起继续伸展,大部分细胞呈现梭形或纺锤形,并分布于不同的层次,在镜下没有固定的焦平面(图1E)。

2.3 基于三维培养的ASMCs收缩反应

在凝胶与培养皿孔壁分离前细胞在凝胶内生长无特定的方向性。当凝胶与培养皿孔壁分离时,由于ASMCs产生的收缩张力作用于胶原纤维网,使之发生重排或改构,凝胶块产生朝向中心部位的收缩,胶原凝胶的表面积随之减小(图1F和图1G)。通过凝胶分离后,表面积缩小百分比可以客观地对ASMCs收缩反应进行量化评估。

2.4 乙酰胆碱促进ASMCs凝胶收缩反应

乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)常被用于哮喘支气管激发实验,它能够与毒蕈碱受体结合,诱发支气管平滑肌产生收缩反应。我们在分离胶原凝胶之前分别加入0.01, 0.1, 1, 10 mmol/L的ACh溶液反应15 min,在凝胶与培养皿分离后的0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h各拍

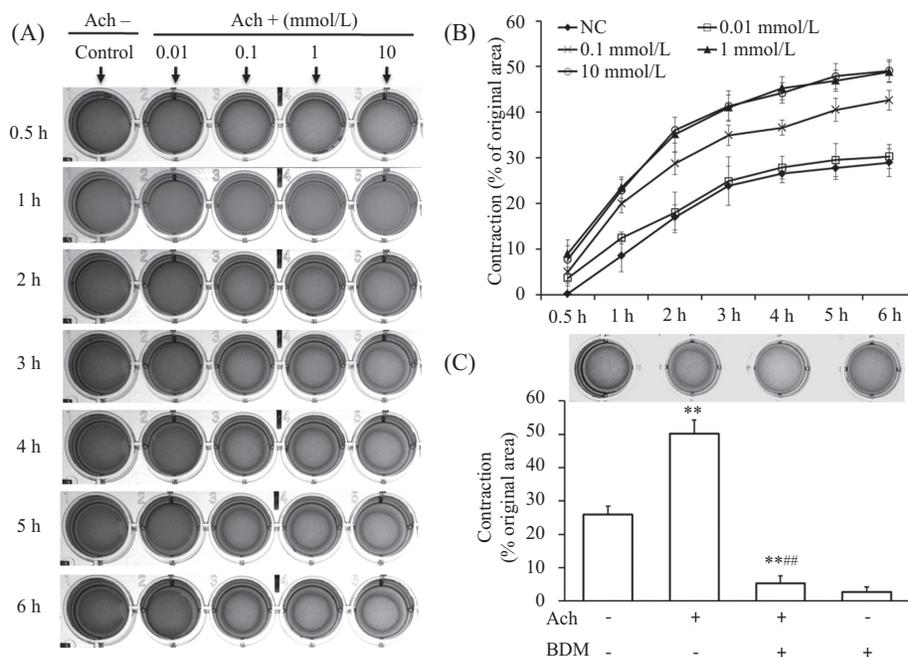


A: 单层培养的ASMCs; B: 用小鼠抗 α -actin抗体对ASMCs做免疫荧光检测(绿色); C: DAPI染细胞核(蓝色); D: B、C合并后图像; E: 嵌入胶原凝胶中的ASMCs; F: 凝胶与培养皿孔壁分离前的胶体面积; G: 凝胶与培养皿孔壁分离12 h后的胶体面积。

A: monolayer cultured ASMCs; B: immunofluorescence detection of primary ASMCs stained with mouse anti-alpha smooth muscle actin antibody (Green); C: nuclei were stained with DAPI (Blue); D: the merged image of B and C; E: ASMCs embedded in collagen I substrate; F: the surface area of the collagen gel top; G: the surface area of the collagen gel released from the wells for 12 h.

图1 ASMCs免疫荧光鉴定及三维立体培养

Fig.1 Immunofluorescence detection of primary cultured rat ASMCs and three-dimension cultured ASMCs



A、B: 0.01, 0.1, 1, 10 mmol/L Ach刺激15 min后, 0.5~6 h凝胶收缩反应; C: 肌球蛋白ATP酶抑制剂BDM对1 mmol/L Ach诱导的ASMCS收缩效应抑制作用。每个实验组设4个复孔, 并分别使用第4、6、8代细胞进行3次重复实验。** $P < 0.01$, 与正常对照组比较; $^{##}P < 0.01$, 与Ach刺激组比较。A,B: effect of 0.01, 0.1, 1, 10 mmol/L of Ach on collagen gel contraction at 0.5~6 h; C: myosin ATP inhibitor BDM inhibited the ASMCS contractile response induced by 1 mmol/L of Ach. There were 4 replicate wells per group, and 3 parallel experiments were performed using ASMCS at passage 4, 6 and 8. ** $P < 0.01$ vs control group, $^{##}P < 0.01$ vs Ach-treated group.

图2 Ach诱导的ASMCS收缩反应检测

Fig.2 The detection of ASMCS contraction effect induced by Ach

照记录一次凝胶收缩状态, 按照本文前面所述公式计算细胞收缩效率。结果显示, 0.1, 1, 10 mmol/L剂量Ach刺激均能诱导ASMCS的收缩反应, 与正常细胞(NC)相比, 1~6 h各时间点凝胶收缩率的差异均有统计学意义($P < 0.01$)。1, 10 mmol/L剂量Ach的凝胶收缩率优于100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量Ach($P < 0.01$); 1 mmol/L Ach与10 mmol/L Ach相比, 两者的凝胶收缩率差异无统计学意义($P > 0.05$)。1 mmol/L Ach组胶原凝胶面积收缩率于1~6 h分别为(23.4 \pm 2.3)%、(35.2 \pm 3.7)%、(41.0 \pm 2.7)%、(45.3 \pm 2.5)%、(46.9 \pm 2.3)%、(48.8 \pm 2.3)%, 并于第6 h达到收缩峰值, 其后收缩状态呈持续平稳趋势(图2A和图2B)。

在加入1 mmol/L Ach刺激之前加入1 mmol/L肌球蛋白ATP酶抑制剂BDM反应30 min, 检测BDM对Ach诱导ASMCS收缩的抑制作用。结果显示, 6 h后BDM+ Ach组的凝胶收缩率为(5.3 \pm 2.1)%, 与Ach组(50.1 \pm 4.2)%比较有显著统计学差异($P < 0.01$, 图2C)。

3 讨论

气道平滑肌细胞(ASMCS)是呼吸道的重要组成部分, 哮喘病理过程中参与气道收缩、气道炎症、

气道高反应性与气道重塑的发生发展。受气道内各类免疫细胞所释放的细胞因子和炎症介质的调节ASMCS产生收缩反应, 是引起呼吸困难的主要效应细胞^[8]。在基础研究中, 对ASMCS收缩效应的检测是研究哮喘气道收缩生物学机制、评估或研发新的支气管舒张药物的关键实验方法^[9]。

通过手术分离的支气管条组织, 在体外组织培养环境中利用张力传感器测量就可以直观、准确地反映收缩力的改变, 是一种十分有效的ASMCS收缩效应检测方法^[4-5]。但是, 该方法所需的临床活体组织标本极难获取, 而且由于捐献者个体差异, 不同的气管条组织反应性差异明显, 实验结果不易复制。为了克服上述实验限制, 研究者开始利用易于在体外扩增培养的平滑肌细胞代替气管条组织。同时, 三维立体细胞培养技术可以让细胞聚集生长, 形成组织样结构, 有助于细胞之间紧密连接, 促进细胞之间的信息交流, 形成接近于活体组织环境的实验体系^[10]。

胶原是动物体内含量最丰富的蛋白质, 主要由成纤维细胞、软骨细胞、成骨细胞及某些上皮细胞合成并分泌到细胞外, 约占人体蛋白质总量的30%以上。胶原遍布于体内各种器官和组织, 是细胞

外基质最基本的结构,它以支架形式为细胞和其他细胞外基质成分提供结合部位^[11]。本研究中用于ASMCS三维立体培养的鼠尾胶原蛋白在结构和抗原性方面与人体组织的I型胶原基本相同,其来源广泛、成分较为单一、且制备较方便,ASMCS在该基质中能长时间地保持活力,故被选用作为培养基质。在建立起ASMCS三维立体培养模型后,将胶原凝胶与培养皿孔壁分离,由于ASMCS产生的张力作用于胶原纤维网支架,促使其发生重排或改构,凝胶产生朝向中心部位的收缩,胶原凝胶的表面积随之减小,ASMCS收缩反应越大,胶原凝胶的面积则更小,通过该方法能够简单直观地对ASMCS的收缩反应进行客观量化的分析。虽然国外已有研究利用本方法进行细胞收缩反应检测,但是国内少见相关报道,且该实验中的关键参数有待进一步优化。

我们应用Ach作为ASMCS收缩的刺激药物,对该实验方法的有效性和准确性进行检验,并优化部分实验参数。结果显示,0.1, 1, 10 mmol/L Ach刺激下,凝胶面积均显著缩小,随着剂量增加收缩反应逐渐增强,且使用不同传代代数的细胞进行的3批实验均获得相似的实验结果。而提前加入肌球蛋白ATP酶抑制剂BDM,能明显抑制Ach诱导的ASMCS收缩反应,说明该方法具有较高的灵敏性、可重复性和准确性。胶原凝胶的浓度以及ASMCS的生长密度是影响本实验体系的主要实验参数。通过与前期预实验对比,在24孔培养板中,选用2 mg/mL的胶原浓度和 3×10^4 /孔的细胞密度,我们获得了较好的实验结果。研究者应该根据胶原的来源、细胞的种类、培养体系大小等因素优化参数以获取最佳的实验结果。利用该方法检测ASMCS收缩反应主要有以下优点:(1)不需要张力转换记录仪等特定的实验仪器,常规的细胞培养平台即可开展本实验;(2)体外培养ASMCS(包括人ASMCS)易于获取,并且可以长期保存,研究者不受时间限制,可以根据研究需要灵活安排实验计划;(3)在该实验体系中,研究者可以自主调整ASMCS的培养条件,根据实验设计,加入不同的细胞因子、趋化因子、生长因子以及化合物或药物进行干预,比较不同条件下ASMCS收缩反应的变化;(5)与常规单层培养ASMCS相比,本方法更接近ASMCS体内生长微环境,且实验结果更加客观精确,不同批次实验结果均一性和重复性更高。我们的研

究显示,不同实验组的组内变异系数和组间变异系数均小于3%,并且第4代至第8代ASMCS都能够获得相同的实验结果。

总之,我们的研究表明,基于细胞三维立体培养的凝胶收缩法是检测ASMCS收缩反应的有效实验方法,该方法具有较好的灵敏度、可重复性和准确性,对于探索气道平滑肌收缩反应的病理生理机制以及筛选细胞收缩调控分子和新的抗哮喘药物,是一种可靠实用的实验体系。

参考文献 (References)

- 1 Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, *et al.* Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008; 31(1): 143-78.
- 2 Bergeron C, Al-Ramli W, Hamid Q. Remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6(3): 301-5.
- 3 Baroffio M, Crimi E, Brusasco V. Airway smooth muscle as a model for new investigative drugs in asthma. *Ther Adv Respir Dis* 2008; 2(3): 129-39.
- 4 Roscioni SS, Prins AG, Elzinga CR, Menzen MH, Dekkers BG, Halayko AJ, *et al.* Protein kinase A and the exchange protein directly activated by cAMP (Epac) modulate phenotype plasticity in human airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 2011; 164(3): 958-69.
- 5 Gosens R, Bromhaar MM, Tonkes A, Schaafsma D, Zaagsma J, Nelemans SA, *et al.* Muscarinic M(3) receptor-dependent regulation of airway smooth muscle contractile phenotype. *Br J Pharmacol* 2004; 141(6): 943-50.
- 6 Govindaraju V, Michoud MC, Al-Chalabi M, Ferraro P, Powell WS, Martin JG. Interleukin-8: Novel roles in human airway smooth muscle cell contraction and migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(5): C957-65.
- 7 Rosenfeldt HM, Amrani Y, Watterson KR, Murthy KS, Panettieri RA Jr, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate stimulates contraction of human airway smooth muscle cells. *FASEB J* 2003; 17(13): 1789-99.
- 8 Noble PB, Pascoe CD, Lan B, Ito S, Kistemaker LE, Tatler AL, *et al.* Airway smooth muscle in asthma: Linking contraction and mechanotransduction to disease pathogenesis and remodelling. *Pulm Pharmacol Ther* 2014; 29(2): 96-107.
- 9 Wright D, Sharma P, Ryu MH, Risse PA, Ngo M, Maarsingh H, *et al.* Models to study airway smooth muscle contraction *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro*: Implications in understanding asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2013; 26(1): 24-36.
- 10 West AR, Zaman N, Cole DJ, Walker MJ, Legant WR, Boudou T, *et al.* Development and characterization of a 3D multicell microtissue culture model of airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 304(1): L4-16.
- 11 Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem* 2002; 277(6): 4223-31.