



四种显微技术观测大鼠颌下腺细胞与丝素-壳聚糖体外共培养的形态学特点

刘焱¹, 谭学新^{1,2}, 李波¹, 易新¹, 矫贞涛², 何洋洋¹

(1. 中国医科大学口腔医学院口腔解剖生理教研室; 2. 中国医科大学口腔医学院口腔颌面外科, 沈阳 110001)

【摘要】 目的 采用倒置显微镜、扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM)、荧光显微镜和激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)技术对大鼠颌下腺细胞(rat submandibular gland cells, RSMGs)与丝素-壳聚糖(silk fibroin-chitosan, SFCs)的体外复合培养进行形态学观察。为观测、评估种子细胞在三维支架的内部生长情况提供技术支持。**方法** 取0~8 d龄SD大鼠的颌下腺,对大鼠颌下腺细胞进行原代培养、分离纯化并传代;用抗细胞角蛋白单克隆抗体(CK8)及淀粉酶抗体的免疫细胞化学染色鉴定细胞来源。选取传至第二代的对数生长期的RSMGs作为种子细胞,选取SFCs共混膜(5×5×2)mm作为支架材料构建组织工程化涎腺样结构。将种子细胞与支架材料复合培养并分别于倒置显微镜、SEM、荧光显微镜和LSCM下观察二者复合生长情况。**结果** 倒置显微镜可以直接观察活细胞与支架复合生长情况,方法简单易行。SEM可以较精确的展示细胞支架复合生长的表面超微结构。经过荧光染料着色,荧光显微镜和LSCM都可以观察到支架上锚定的种子细胞。荧光显微镜可见细胞核的荧光信号均匀的分布在支架孔隙内。LSCM通过层扫描及三维重建技术对较厚的标本获取图像;并可以通过旋转图像,从不同角度观察细胞支架复合物的三维剖面或整体结构,得到更为准确的定位信息。**结论** 四种显微技术均可应用于RSMGs与SFCs体外共培养的形态学观测。LSCM的三维重建技术结合荧光染料标记可以较好地获得RSMGs与SFCs复合生长的情况,有着较广泛的应用价值。

【关键词】 组织工程; 颌下腺; 丝素-壳聚糖; 显微技术

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)02-0070-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.02.016

Morphological Characteristics of Rat Submandibular Gland Cells Co-Cultured with Silk Fibroin-Chitosan Observed by Four Types of Microscopic Techniques

LIU Yan¹, TAN Xue-xin^{1,2}, LI Bo¹, YI Xin¹, JIAO Zhen-tao², HE Yang-yang¹

(1. Department of Oral Anatomy and Physiology; 2. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China)

【Abstract】 Objective To observe the morphological characteristics of rat submandibular gland cells (RSMGs) co-cultured with silk fibroin-chitosan, (SFCs) by inverted microscopy, scanning electron microscopy (SEM), fluorescence microscopy and laser scanning confocal microscopy (LSCM), and provide technical support for observation and evaluation of cell growth on three-dimensional (3D) scaffolds. **Methods** The submandibular glands were excised from SD rats at age

[基金项目] 辽宁省教育厅高等学校科研项目(2008843)。

[作者简介] 刘焱, E-mail: liuyan5124047@163.com。

[通讯作者] 谭学新, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 颌下腺组织工程, E-Mail: tanxueincmu@126.com。

of 0 to 8-days and RSMGs were primarily cultured, purified and subcultured. The origin of cells were identified by immunocytochemistry (CK8 and amylase). Then RSMGs were chosen for the further studies when cells reached 75% to 80% confluence. Meanwhile SFCs blend membranes (5 mm x 5 mm x 2 mm) were prepared. RSMGs cultured on the scaffolds were monitored for 3, 5 to 7 days. The morphological appearance of the seeded scaffolds was observed by inverted microscopy, SEM, fluorescence microscopy and LSCM. **Results** Living cells that were seeded on SFCs medium of 3D scaffolds could be observed directly under the invert microscope. SEM showed the surface ultrastructure of the complex growth situation more clearly. After fluorescent staining, cells anchoring on scaffolds were observed by fluorescence microscopy and LSCM. The fluorescent signals of cell nuclei were evenly distributed in the pores of scaffolds. Through layer scanning and 3D LSCM reconstruction technique, images of thick specimens could be obtained. By rotating the images, 3D profile or whole structure could be observed from different angles and more accurate information of positioning could be obtained. **Conclusions** All four kinds of microscopic techniques can be used in examining the co-cultivation of RSMGs and SFCs. Images can be observed more distinctly through 3D LSCM reconstruction technique combined with fluorescent staining technique. It has a wide application value in this research field.

【Key words】 Tissue engineering; Submandibular gland; Silk fibroin-chitosan; Microscopy techniques

种子细胞、支架材料和细胞-支架复合物的构建与培养是组织工程技术^[1]的三大要素^[2]。组织工程化涎腺样结构的修复重建,就是利用这一技术解决目前临床上治疗困难的涎腺分泌障碍性疾病(头颈肿瘤放疗后唾液腺功能丧失、先天性唾液腺缺失、干燥综合征等)。准确观测和客观评估细胞在支架上的黏附、分布和生长状况至关重要。倒置显微镜和 SEM 在组织工程产物的形态学观测中较常用。由于大鼠颌下腺细胞(rat submandibular gland cells, RSMGs)与丝素-壳聚糖(silk fibroin-chitosan, SFCs)复合物标本规格为 5 mm x 5 mm x 2 mm; 本实验还选择了将标本通过冰冻切片处理后经荧光显微镜观察。另一方面也应用了激光共聚焦扫描显微镜(LSCM)技术进行观察。LSCM 是断层扫描的无损性连续光学切片及三维重建技术^[3],同时具有较高的横向和纵向的分辨率^[4]。通过以上四种显微技术分别对 RSMGs 与 SFCs 体外共培养的形态学进行了观测,旨在探索适宜的显微技术对于观察评估体外构建组织工程化涎腺样结构的应用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

实验用 0~8 d 龄 SD 大鼠,雌雄不限,体重约 8~10 g,由中国医科大学实验动物中心提供(SCXK(辽)2003—0009)。DMEM/F12(Hyclon, USA),胎牛血清(Hyclon, USA),胰蛋白酶(Hyclon, USA),抗细胞角蛋白单克隆抗体(CK8, Sigma, USA),抗淀粉酶抗体(anti-amylase antibody, Sigma, USA),羊抗兔 IgG(博士德,中国),DAB 呈色试剂盒(博士

德,中国),荧光染料 Hoechst33258(Sigma, USA),蚕丝(山东农业大学林学院),壳聚糖(脱乙酰度 > 90%,江苏通兴成生物制品厂),倒置相差显微镜及照相系统(Olympus, Japan),JSM-T300 型扫描电子显微镜(岛津公司,日本),荧光显微镜(BX61 + DP-71, Olympus, Japan),激光扫描共聚焦显微镜(FV1000S-SIM/IX81, Olympus, Japan)。

1.2 方法

1.2.1 RSMGs 体外培养、分离纯化及鉴定:取 0~8 d 龄 SD 大鼠,断颈法处死、消毒。自大鼠的颈部至胸部“工”字型剪开,完全暴露并完整取出双侧颌下腺。分离颌下腺表面薄膜、血管和纤维结缔组织;再将组织剪碎成 0.5 mm³ 小块,并均匀地平铺于预先血清包被的培养瓶底部。翻转、倒置培养瓶,在 37 °C CO₂ 培养箱中孵育 4 h,待组织块贴壁,加入适量含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基正置培养瓶继续培养。24 h 后补加培养基 1 mL,继续培养。4 d 后首次全量换液,弃去大量悬浮细胞,以后每 2~3 d 换液。待细胞长满单层后,结合酶消化法、差速贴壁法分离纯化 RSMGs 并传代培养,取对数成长期的第 2 代细胞用于实验^[5]。倒置显微镜观察细胞形态学变化。

取第 2 代 RSMGs, PBS 溶液洗 3 次,用含 0.25% 胰蛋白酶,0.01% (w/v) EDTA 的溶液消化制成单细胞悬液。制作细胞爬片,使用免疫细胞化学 SABC 法进行 CK8 及 amylase 染色^[6]。其中一抗为抗细胞角蛋白单克隆抗体(CK8)及抗淀粉酶抗体,二抗为山羊抗兔 IgG。

1.2.2 丝素-壳聚糖支架的制备与预处理:首先将蚕丝剪碎、脱胶、溶解,获得丝素溶液。将其过滤后

注入透析袋(截流分子量为 3500 D)中透析,再使用聚乙二醇浓缩备用。同时将壳聚糖溶解于 2% 的醋酸溶液中,得到壳聚糖溶液备用。然后将制取好的丝素溶液和壳聚糖溶液按照 75:25 (v/v) 充分混合,置于真空冷冻干燥机中冷冻干燥过夜,获得丝素-壳聚糖的海绵状的冻干支架^[7]。使用前放入 75% 酒精中结合紫外光照射 12 h 灭菌,最后再用无菌 PBS 溶液调节 pH 至 7.0,待用。

1.2.3 组织工程化涎腺样结构的体外构建:在超净工作台将无菌丝素-壳聚糖支架(5×5×2) mm 放入 24 孔板中,加入 DMEM/F12 基础培养基浸泡。尽量置换出支架孔隙内的 PBS 溶液,直到培养液不再变浅为止吸出培养基。将支架置于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基孵育 12 h,第 2 天倒置显微镜下观察确定无菌后接种细胞。使用 0.25% 胰蛋白酶消化 RMSGs 细胞,计数,按 1×10^5 个/mL 密度^[8]均匀接种于丝素-壳聚糖支架上,每块支架正反面分别接种 0.1 mL 细胞悬液,间隔时间 2 h。4 h 后补加培养基,每隔 1 d 换 1 次液。

1.3 种子细胞-支架材料复合培养形态学检测

1.3.1 倒置显微镜:将接种了 RMSGs 的丝素-壳聚糖支架细胞复合物继续培养。分别在第 3、5、7 天直接利用倒置显微镜观察。

1.3.2 扫描电镜(SEM):选取部分共培养 3、5、7 d 的标本以 3% 戊二醛溶液固定,PBS 洗 3 次,乙醇分级脱水后将样品浸泡于醋酸异戊酯内。临界点干燥后,喷金镀膜,SEM 镜下观察细胞与支架复合生长的超微结构。

1.3.3 荧光显微镜:选取部分共培养 3、5、7 d 的标本直接粘着在涂有 OCT 的样品台上,于冷冻切片(箱体温度在 -20 °C 以下)上制取厚度为 6 μm 的冰冻切片^[9]。将冷冻切片室温放置 10 min,待切片回温并干燥,浸于 PBS 中 10 min 洗去 OCT。荧光染料 Hoechst33258 用双蒸水配制成质量浓度为 10 mg/L 溶液,滴染组织切片室温下放置 10 min,用 PBS 溶液浸洗 3 次每次 5 min。反应在避光湿盒中进行,反应结束时用抗荧光淬灭剂封片。在荧光显微镜下进行图像采集。

1.3.4 LSCM:最后选部分细胞支架复合物(5×5×2)mm 不经切片处理^[10],同荧光显微镜观察所采取的方法染色,经过 LSCM 层扫描三维重建技术观察体外构建的组织工程化颌下腺上细胞黏附和生长情况。

2 结果

2.1 RMSGs 的生长状况观察及鉴定

RMSGs 原代培养情况的倒置显微镜下观察可见,24~48 h 后大部分组织块贴壁。原代细胞从组织块边缘游出,折光性良好;3~7 d 后细胞呈现以组织块为中心的放射状排列(图 1A)。经分离纯化并传代后,第 2 代细胞长满单层后细胞排列整体均匀,主要呈 3 种形态,即圆形亮细胞、多角形暗细胞和梭形暗细胞三种形态,其中多角形细胞数目相对多(图 1B)。CK8 免疫细胞化学染色呈阳性(图 1C),淀粉酶免疫细胞化学染色呈阳性(图 1D);提示体外培养的颌下腺腺细胞保持了其生物学特性。

2.2 体外构建的组织工程化颌下腺形态学及细胞生长状态的观察

2.2.1 倒置显微镜观察:RMSGs 在丝素-壳聚糖共混膜支架上生长第 3 天时,可在支架边缘表层观察到部分细胞粘附长入支架内,细胞呈圆形边界较清晰。支架内部微环境无法准确观察(图 2A)。第 5 天时支架表浅层细胞量有所增加,然而细胞在支架内伸展、粘附和生长方式仍不能准确观察(图 2B)。第 7 天时与支架材料复合生长的细胞数量增长明显,且细胞在支架上呈均匀地生长,支架深层复合生长情况尚不易观察评估(图 2C)。

2.2.2 SEM 观察:RMSGs 在丝素-壳聚糖共混膜支架上生长第 3 天时可观察到,已有部分细胞表面呈现出微绒毛的超微结构,细胞向支架材料伸出伪足,有扁平生长的趋势;还有部分细胞表面呈现圆球形,尚未向支架伸出足丝。细胞在支架材料上生长状态较好(图 3A)。第 5 天时细胞表面可见明显凸起的微绒毛样改变提示细胞分泌出大量促进粘附的细胞外基质。细胞在支架表面向各个方向伸展,呈现平铺状生长,状态良好(图 3B)。第 7 天时材料表面的细胞量明显增多,而且细胞与细胞间彼此伸出伪足相连,还可见到完全平铺伸展在支架表面呈片状的细胞,提示细胞生长状态佳(图 3C)。

2.2.3 荧光显微镜观察:在丝素-壳聚糖共混膜支架上生长的 RMSGs 的细胞核用荧光染料 Hoechst33258 染色。在 460 nm 激发光源下采图显示,细胞核呈现蓝色;但由于支架材料在荧光显微镜下受到激发光源照射也会产生继发荧光图像,为对二者加以区分,故同一视野下在 620 nm 激发光源

下再次采图。此时图象显示支架材料呈现红色,并将两图用软件处理合成。合成后图像中细胞核为蓝染,支架材料为蓝色与红色混合色。观察可见复合培养第 3 天时,RSMGs 细胞核边界清楚、形态呈圆形或椭圆形,核仁清晰可见。细胞较均匀的散布生长在支架材料上。第 5 天时支架表面细胞量明显增加,生长良好。第 7 天时大量细胞粘附生长与支架材料表面,分布均匀(图 4)。

2.2.4 LSCM 观察:同荧光显微镜所见类似,图中仅呈现蓝染的部分为 RSMGs 细胞核,呈现蓝染混合红染的部分为支架材料。经过 LSCM 层扫描三维重建技术后可见,RSMGs 在丝素-壳聚糖共混膜支架上生长较好。细胞核的形态为边界清楚且较为规则的圆或椭圆形,核仁明显。对 LSCM 层扫描三维重建技术而言,即使较厚的光学切片也可以不行组织切片处理,而且能够从任意角度观察标本的三维剖面或整体结构,图像的反差和分辨率也较高(图 5)(图 1~3 见文后彩插 4,图 4,5 见封三)。

3 讨论

临床上由于各种原因(舍格伦综合征、干燥综合征、放射性涎腺炎、药物过敏或自身免疫性疾病等)引起的涎腺分泌功能的障碍,导致唾液量降低,并产生一系列口腔疾病或不适,严重影响患者的生活质量。组织工程化涎腺样结构^[11-12]的构建是指利用组织工程技术,在体外培植具有生物活性,且在结构和功能上与自体涎腺相类似的涎腺细胞^[13]和支架材料^[14]的复合物;培养一段时间后将复合物植入体内,最终形成预定的涎腺样组织并发挥其正常生理功能。这一技术已成为最有希望修复涎腺缺损的策略^[15]。丝素蛋白(SF),是一种纤维状蛋白质,具有如下的生物学特性:对于氧气和水具有很高的通透性、低炎症反应性、蛋白酶的敏感性、良好的生物相容性(支持细胞粘附和生长)和高抗拉强度的灵活性。壳聚糖(Cs)是一种具有类似糖胺结构的结晶多糖;以其良好的伤口愈合的特性、无毒性以及低异物反应性成为了一种理想的天然医用高分子材料。综合以上二者的优势,Gobin AS 等将 SF 与 Cs 共混,旨在建立一种与自然组织类似的具有较好的组织相容性,生物可降解性和可比的力学性能的支架材料^[7]。She Z. 等通过傅立叶变换红外光谱(FTIR)和 X-射线衍射曲线证实了 SFCs 是

一种具有均匀多孔结构以及纳米尺度兼容性的自然衍生聚合物。通过改变二者共混的比例,SFCs 支架的压缩模量和抗压强度都是可以控制的。MTT 法检测表明,SFCs 支架可以促进肝癌细胞增殖,生物相容性较好^[16]。

LSCM 是以电信号的形式记录图像的,并可以采用各种模拟的和数字的电子技术进行图像处理^[17];LSCM 还可以准确的对细胞或组织厚片进行类似 CT 断层扫描的无损性连续光学切片及三维重建处理^[3],而且同时具有较高的横向和纵向分辨率^[4]。目前生物医学领域中 LSCM 已较广泛用于荧光定量测量、共聚焦图像分析、三维图像重建、活细胞动力学参数分析和胞间通讯研究等方面^[18-19],有着广阔的应用前景。本文应用 LSCM 对 RSMGs 与 SFCs 体外共培养情况进行层扫描三维重建。作为分子影像学的方法之一^[20],LSCM 可以获得立体感较强的高清晰形态图像,从三维立体角度了解和认识了细胞支架复合物的内部超显微结构。

本实验证明,四种显微技术均可展示 RSMGs 与 SFCs 体外共培养的形态学特征。倒置显微镜操作简单、快捷、经济,能迅速观察到活细胞与支架复合情况,观察的清晰度略低。SEM 可以清晰、直观地观察细胞支架复合物的表面超微结构,无法观察到内部形态结构。经过组织切片处理后,荧光显微镜可以较准确的观测细胞在支架上的锚定和生长情况。对于厚组织标本,采用 LSCM 结合三维重建技术,可以不经组织学切片处理,直接获得清晰、精准的细胞在支架表面及深层生长的超微形态结构,有着十分广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 杨志明. 组织工程的发展与未来[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(2):228-229.
- [2] Ingber DE, Mow VC, Butler D, et al. Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic[J]. Tissue Eng, 2006, 12(12):3265-3283.
- [3] Hoppe AD, Shorte SL, Swanson JA, et al. Three-dimensional FRET reconstruction microscopy for analysis of dynamic molecular interactions in live cells[J]. Biophys J, 2008, 95(01):400-418.
- [4] Debailleul M, Georges V, Simon B, et al. High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples[J]. Optics letters, 2009, 34(01):79-81.
- [5] 黄巍巍, 谭学新, 李波, 等. 组织块法培养大鼠颌下腺细胞的实验研究[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(3):194

- 196.
- [6] Hokari S, Miura K, Koyama I, et al. Expression of α -amylase isozymes in rat tissues [J]. *Comp Biochem Physiol. Part B, Biochem Mol Biol*, 2003, 135(01):63 - 69.
- [7] Gobin AS, Froude VE, Mathur AB. Structural and mechanical characteristics of silk fibroin and chitosan blend scaffolds for tissue regeneration [J]. *J Biomed Materials Res, Part A*, 2005, 74(03):465 - 473.
- [8] Altman AM, Yan Y, Matthias N, et al. IFATS collection: human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model [J]. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2008, 27(01):250 - 258.
- [9] Kazama JJ. Application of confocal laser scanning microscopy to the observation of bone biopsy specimens [J]. *Bone*, 1993, 14(06):885 - 889.
- [10] Zarrinkalam KH, Kuliwaba JS, Martin RB, et al. New insights into the propagation of fatigue damage in cortical bone using confocal microscopy and chelating fluorochromes [J]. *Eur J Morphol*, 2005, 42(1 - 2):81 - 90.
- [11] 俞光岩, 华红, 郭丽宏. 涎腺疾病及唾液的研究进展 [J]. *中国实用口腔科杂志*, 2008, 1(3):129 - 132.
- [12] Yang TL, Young TH. The specificity of chitosan in promoting branching morphogenesis of progenitor salivary tissue [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(4):466 - 470.
- [13] Tran SD, Wang J, Bandyopadhyay BC, et al. Primary culture of polarized human salivary epithelial cells for use in developing an artificial salivary gland [J]. *Tissue Eng*, 2005, 11(1 - 2):172 - 181.
- [14] Thimm BW, Wüst S, Hofmann S, et al. Initial cell pre-cultivation can maximize ECM mineralization by human mesenchymal stem cells on silk fibroin scaffolds [J]. *Acta Biomater*, 2011, 7(5):2218 - 2228.
- [15] Maria OM, Maria O, Liu Y, et al. Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(4):622 - 631.
- [16] She Z, Jin C, Huang Z, et al. Silk fibroin/chitosan scaffold: preparation, characterization, and culture with HepG2 cell [J]. *J Mater Sci. Mater Med*, 2008, 19(12):3545 - 3553.
- [17] Soleimani R, De Vos W, Van Oostveldt P, et al. Two novel techniques to detect follicles in human ovarian cortical tissue [J]. *Human Reprod*, 2006, 21(7):1720 - 1724.
- [18] Deng Z, Zink T, Chen HY, et al. Impact of actin rearrangement and degranulation on the membrane structure of primary mast cells: a combined atomic force and laser scanning confocal microscopy investigation [J]. *Biophys J*, 2009, 96(4):1629 - 1639.
- [19] Johnson JE, Perkins GA, Giddabasappa A, et al. Spatiotemporal regulation of ATP and Ca^{2+} dynamics in vertebrate rod and cone ribbon synapses [J]. *Molec Vision*, 2007, 13:887 - 919.
- [20] 李颖, 董伟, 张连峰. 人胰腺癌裸鼠异种移植瘤模型的生物发光成像和超声成像比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(7):13 - 16.

[修回日期] 2011-09-09