

# 利用实时细胞分析系统检测 人和大鼠气道平滑肌细胞倍增时间的研究\*

王文倩, 王宇, 徐玉东, 杨永清, 尹磊森 (上海中医药大学, 上海 201203)

**摘要:**目的 利用 xCELLigence 实时细胞检测系统快速有效检测人和大鼠气道平滑肌细胞的倍增时间。方法 将用胶原酶-胰酶消化法分离获得并用免疫荧光鉴定的大鼠气道平滑肌细胞以及购买获得的人类气道平滑肌细胞, 按照 3 000 个/孔的密度种植于 xCELLigence 检测系统布满芯片的 E-plate 培养板内, 记录增殖情况 100 h 后, 用 RTCA Software Package 2.0 软件计算细胞倍增时间。结果 利用 xCELLigence 实时细胞检测系统获得人气道平滑肌细胞的倍增时间为  $23.96 \pm 0.47$  h, 与文献资料提供的数据一致, 大鼠气道平滑肌细胞的倍增时间为  $18.62 \pm 0.15$  h, 计算过程简单省时。结论 细胞实时分析系统可以有效便捷检测贴壁细胞的倍增时间, 为以气道平滑肌细胞为主要研究对象的呼吸疾病基础研究提供实验参考数据和方法。

**关键词:** 倍增时间; 气道平滑肌细胞; 细胞实时分析

中图分类号: R-332 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)03-028-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.03.008

## Research on Detecting Doubling Time of Human and Rat Airway Smooth Muscle Cells with A Real Time Cellular Analyzer

WANG Wen-qian, WANG Yu, XU Yu-dong, YANG Yong-qing, YIN Lei-miao

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** **Objective** To detect the doubling time of airway smooth muscle cells of human and rat by the xCELLigence instrument, a real time cellular analyzer. **Methods** The airway smooth muscle cells were separated by collagenase-pancreatin digestion from the rat airway. Then, added to the different holes of E-plate of xCELLigence instrument with the planting destiny of 3 000 cells/well, and so were the human airway smooth muscle cells. The E-plate was then placed on the xCELLigence instrument to monitor cell proliferation for 100 hours to calculate the doubling time by using the RTCA Software Package 2.0 software. **Results** The doubling time of human airway smooth muscle cell calculated by the real time cellular analyzer was  $23.96 \pm 0.47$  h, which was consistent with the data provided by the reference. The doubling time of rat airway smooth muscle cell was  $18.62 \pm 0.15$  h, and the computational process was simple, time-saving and also effective. **Conclusion**

The xCELLigence instrument can be used to calculate doubling time of airway smooth muscle cells of human and rat, which provides experimental methods and reference data for the basic respiratory disease research.

**Keywords:** doubling time; airway smooth muscle cells; real time cellular analysis

细胞群体倍增时间又称细胞倍增时间(doubling time),是指细胞在对数生长期增加一倍所需要的时间,是不同来源细胞生长特性的重要评价指标。倍增时间在临床医学检测和生物医药研究方面应用广泛,可用于评价细胞移植潜力,描述耐药细胞特点,优化细胞培养条件,还可以辅助区分细胞品系。

气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cell, ASMC)是呼吸道的主要组成部分,其增殖是哮喘气道重构的关键环节<sup>[1,2]</sup>,其异常变化是呼吸道疾病的重要病理表现,因此 ASMC 是呼吸系统疾病的重要研究工具,计算其倍增时间<sup>[3,4]</sup>也是哮喘评定和相关研究的重要指标之一<sup>[5~7]</sup>。本研究将根

据 ASMC 贴壁的特性,利用 xCELLigence RTCA 系统实时检测并比较人和大鼠 ASMC 的倍增时间,以期以 ASMC 为主要研究对象的呼吸疾病基础研究提供实验参考数据和方法。

### 1 材料与方法

1.1 细胞来源 大鼠的气道平滑肌细胞取材于 SD 雄性大鼠,利用胶原酶-胰酶消化法分离纯化并培养待用。人气道平滑肌细胞购自 ScienCell Research Laboratories (human Bronchial Smooth Muscle Cells, 货号 3400)。

1.2 材料和试剂 DMEM 高糖液体培养基、Hank's 平衡液,青霉素-链霉素混合液,胎牛血清,磷酸盐缓冲液购自美国 Hyclone 公司;台盼蓝购自

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(8117334;81173332;81473760);上海市卫生系统优秀青年人才培养计划(XYQ2013081);上海市中医药事业发展三年行动计划重大项目(ZYSNXD-CC-ZDYJ039)。

作者简介:王文倩(1988—),女,博士研究生,主要研究方向:针灸效应物质基础研究,Tel:021-54592134,E-mail:wqwang1988@163.com。

通讯作者:杨永清,E-mail:yyq@shutcm.edu.cn;尹磊森,E-mail:collegelym@shutcm.edu.cn。

美国 Life technology 公司;胰酶细胞消化液, I 型胶原酶均购自美国 Sigma 公司;细胞核染色剂 Hoechst 33342 购自上海碧云天公司;培养皿购自美国 Corning 公司。

1.3 主要实验仪器 实时细胞分析系统: xCELLigence 实时细胞检测系统, 包括配套 E-plate 96 孔购自杭州艾森生物有限公司, 垂直双人单面超净工作台购自上海博讯实业, CO<sub>2</sub> 培养箱购自德国 BINDER 公司, 高速台式低温离心机购自美国 Beckman 公司, 光学显微镜购自日本 OLYMPUS 公司, 移液器购自德国 Eppendorf 公司, 细胞计数板购自上海求精公司。

1.4 方法 按照文献[8]方法, 将分离出的大鼠气管置于 4℃ 预冷无菌且含 100 U/ml 青链霉素的 Hanks 平衡液中, 用眼科虹膜剪在培养皿中将气管段剪成 1 mm 或更小的组织块, 加入配制好的胶原酶消化溶液(含 I 型胶原酶 2 mg/ml 的 Hank's 平衡液), 吹打混匀, 置入细胞培养箱中消化 30 min。取出后用培养液终止消化, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。加入 10 ml 的 DMEM(高糖)细胞培养液(含 1 ml 胎牛血清, 1 000 U 青霉素, 1 000 μg 链霉素)分散细胞, 并继续培养, 每 2~3 日换液一次, 当细胞达 80% 融合后进行细胞传代待用。大鼠的 ASMC 经光学显微镜观察并通过免疫组化证实, 超过 95% 的初代培养细胞表达气管平滑肌特定标记的收缩蛋白 SM $\alpha$ -actin。

人的 ASMC 用 10 ml 培养液培养, 每 2~3 日换液一次, 当细胞达 80% 融合后进行传代待用。

取大鼠和人的 ASMC 细胞各一盘, 分别用 2 ml 胰酶消化, 1 ml 培养液重悬, 取 90 μl 台盼蓝和 10 μl 细胞悬液进行细胞计数。按每孔 3 000 cells(体积为 100 μl)计算细胞悬液用量, 并用培养液补足体积待用, 即 E-plate 每孔种植密度为 9 375 cells/cm<sup>2</sup>。

E-plate 每孔加入 100 μl 细胞培养液测定基线。待基线测定完毕, 分别将计算好的大鼠和人 ASMC 细胞悬液接种于 E-plate 中, 并将 E-plate 安置于 xCELLigence RTCA 仪器上。为防止 ASMC 贴于 E-plate 96 孔板的侧壁生长, 将仪器在室温下静置 30 min, 待细胞沉降于孔底, 再移置于培养箱中培养, 全程检测细胞增殖数据, 记录 100 h。

## 2 结果

2.1 大鼠气管 ASMC 分离、培养、验证 利用酶分离法分离大鼠 ASMC, 根据 ASMC 沉降贴壁速度慢于成纤维细胞等杂细胞这一特性, 采用差速贴壁法进行细胞纯化, 并利用 ASMC 膜标记物  $\alpha$ -肌

动蛋白( $\alpha$ -actin)和细胞核染色剂 Hoechst 33342 对分离所得的细胞进行免疫荧光检测鉴定工作, 见图 1。平滑肌细胞免疫荧光结果提示: 分离的气管平滑肌细胞纯度已经超过 95%, 可以用于下游实验。

大鼠 ASMC 实时检测获得的细胞增殖曲线, 见图 2。记录结果显示出明显的对数生长期和平台期( $n=14$ )。

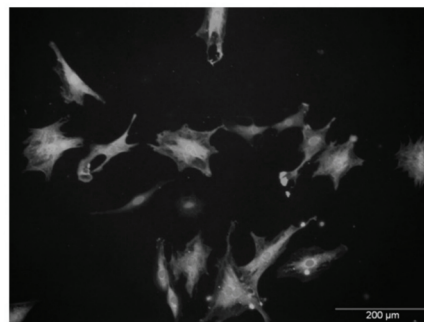


图 1 大鼠 ASMC 免疫荧光检测

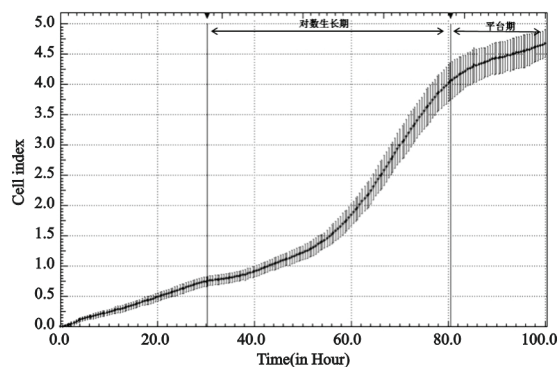


图 2 大鼠 ASMC 增殖曲线

人 ASMC 实时检测获得的细胞增殖曲线, 见图 3。记录结果显示出明显的对数生长期和平台期( $n=14$ )。

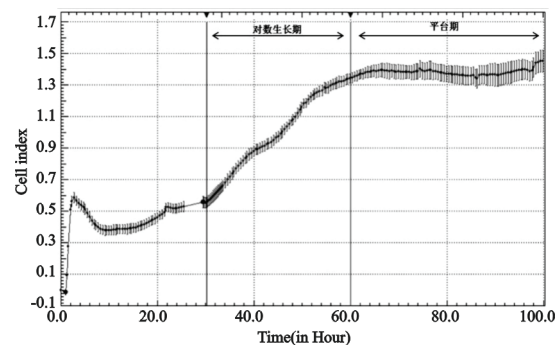


图 3 人 ASMC 增殖曲线

选取数据中细胞增殖对数生长期的部分曲线, 使用 RTCA Software Package 2.0 软件系统分析获得 ASMC 的倍增时间数据。

大鼠 ASMC 在种植密度为 9 375 cells/cm<sup>2</sup>(每孔 3 000 个细胞)的情况下, 生长平台期时细胞指数接近 5, 倍增时间为  $18.62 \pm 0.15$  h。人 ASMC 在种植密度为 9 375 cells/cm<sup>2</sup> 的情况下,

生长平台期时细胞指数接近 1.5, 倍增时间为  $23.96 \pm 0.47$  h, 与 Applied Biological Materials (ABM) 公司提供的倍增时间 23.6 h 数据基本一致(种植密度为  $7\,500 \sim 10\,000$  cells/cm<sup>2</sup>)。

3 讨论 有效测量细胞倍增时间可以把握细胞群体的生长状况, 是至关重要的细胞增殖动力学指标; 在进行间充质干细胞移植特性评价时发现, 脂肪来源间充质干细胞比骨髓来源的倍增时间短 11 h, 提示脂肪组织是种更有前景的干细胞来源<sup>[9]</sup>; 耐药细胞机制研究发现, 耐博来霉素的癌细胞特点是倍增时间较长, 比普通癌细胞增加 147%<sup>[10]</sup>; 细胞培养条件的研究发现, 脂肪来源间充质干细胞在内皮细胞生长培养基比 DMEM 培养基增殖更快<sup>[11]</sup>, 成纤维母细胞在添加了胎牛血清的培养基中倍增时间明显短于马血清<sup>[12]</sup>, 为体外细胞培养条件提供优化参考; 研究不同物种来源的同种细胞时发现, 倍增时间具有明显差异, 如人源脂肪间充质细胞倍增时间为 98.0 h, 明显长于小鼠来源的 52.5 h<sup>[13]</sup>, 与本研究大鼠 ASMC 倍增时间短于人 ASMC 相符。在哮喘气道改变的研究中, 倍增时间可以量化气道平滑肌细胞增殖效应, 有助于了解其增生的细胞机制<sup>[14]</sup>。

另外, 平滑肌细胞倍增时间数据与多种因素密切相关, 如培养基中 FBS 的含量、细胞因子含量、种植密度及细胞供体情况<sup>[14]</sup>。在 FBS 含量为 1.25%~10% 时人 ASMC 的倍增时间为 36~48 h<sup>[15~17]</sup>; 有研究报道平均年龄 56 岁的人脂肪间充质干细胞的倍增时间为  $88.6 \pm 6.7$  h, 明显长于平均年龄 34 岁的  $55.1 \pm 4.5$  h<sup>[18]</sup>。

计算细胞倍增时间常用的方法有染色法、流式法等, 都是通过对细胞进行标记而获得细胞计数数据: 比如用台盼蓝染细胞后, 显微镜下人工识别剔除死细胞和非目的细胞并计数<sup>[6]</sup>; 用噻唑蓝 (MTT)<sup>[14]</sup> 标记细胞后, 通过酶标仪检测; 用 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU)<sup>[19]</sup> 或特异性抗体标记细胞后通过流式细胞仪获得数据。获得细胞计数数据后, 根据绘制的生长曲线确定倍增时间<sup>[16]</sup>, 或将细胞计数数据带入既定的计算公式计算倍增时间<sup>[20]</sup>。流式细胞法获得非计数数据可以通过分析细胞周期变化情况并结合数学建模直接获得细胞倍增时间<sup>[21,22]</sup>。还有人利用显微镜观察并拍摄细胞, 通过分析一序列的图像的时间窗计算细胞倍增时间<sup>[23]</sup>。

本研究利用 xCELLigence 实时细胞检测法 (real time cellular analysis, RTCA), 在接近生理状态下<sup>[24,25]</sup> 简单有效的获得 ASMC 倍增时间, 省略上述传统计算方法中分时段多次进行的细胞计

数, 无需选择复杂的抗体, 减少试剂和劳动力成本, 避免细胞计数过程中存在细胞损失。且 RTCA 使用的 E-plate 和 96 孔板规格一致, 孔与孔之间相互独立, 可以同时做多个副本, 在同一时间获得不同细胞系在细胞实验中最优的种植密度, 以及确定细胞毒性实验的合适周期<sup>[10]</sup>。同样培养条件下, 不同细胞在 RTCA 仪器上都有其固定的生长曲线, 根据其贴壁程度呈现不同的细胞指数, 如本实验人 ASMC 生长平台期时细胞指数接近 1.5, 而大鼠的细胞指数接近 5。另外, RTCA 还能测定反应动力学的指标, 使用天然受体的能力, 捕获参与多个第二信使通路的生物学反应的几率<sup>[24]</sup> 等。充分说明 RTCA 是种有效描述细胞的增殖状态、计算细胞倍增时间的方法, 有助于探索 ASMC 增生肥大的相应机制。目前文献尚未报道大鼠细胞倍增时间的相关数据, 我们的结果可以为以 ASMC 为主要研究对象的呼吸疾病基础研究提供实验参考数据和方法。

#### 参考文献:

- [1] Ijpma G, Lauzon AM, Martin JG. Airway remodeling: the clinical significance[J]. Shortness of Breath, 2013, 2(3): 111-118.
- [2] 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.
- [3] Halayko AJ, Salari H, Ma X, et al. Markers of airway smooth muscle cell phenotype[J]. Am J Physiol, 1996, 270(6 Pt 1): L1040-L1051.
- [4] Brown JK, Tyler CL, Jones CA, et al. Tryptase, the dominant secretory granular protein in human mast cells, is a potent mitogen for cultured dog tracheal smooth muscle cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995, 13(2): 227-236.
- [5] Triantafyllidis T, Benard G, Begueret H, et al. Bronchial smooth muscle remodeling involves calcium-dependent enhanced mitochondrial biogenesis in asthma[J]. J Exp Med, 2007, 204(13): 3173-3181.
- [6] Johnson PR, Roth M, Tamm M, et al. Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(3): 474-477.
- [7] Florio C, Martin JG, Styhler A, et al. Antiproliferative effect of prostaglandin E2 in cultured guinea pig tracheal smooth muscle cells[J]. Am J Physiol, 1994, 266(2 Pt 1): L131-L137.
- [8] Yin LM, Wei Y, Wang Y, et al. Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(1): 68-72.
- [9] Zhu XS, Shi W, Tai WP, et al. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells[J]. Cell Tissue Res, 2012, 350(2): 277-287.
- [10] Wang Q, Cui KP, Espin-Garcia O, et al. Resistance to bleomycin in cancer cell lines is characterized by prolonged doubling time, reduced DNA damage and

- evasion of G2/M arrest and apoptosis [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82363.
- [11] Suga H, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency [J]. Cytotherapy, 2007, 9(8): 738-745.
- [12] Franke J, Abs V, Zizzadoro C, et al. Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts [J]. BMC Vet Res, 2014, 10(1): 119.
- [13] Danoviz ME, Bassaneze V, Nakamuta JS, et al. Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures [J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(4): 661-670.
- [14] Hirst SJ, Barnes PJ, Twort CH. Quantifying proliferation of cultured human and rabbit airway smooth muscle cells in response to serum and platelet-derived growth factor [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992, 7(6): 574-581.
- [15] Belleau JT, Gandhi RK, McPherson HM, et al. Research upregulation of CD23 (FcεpsilonRII) expression in human airway smooth muscle cells (huA-SMC) in response to IL-4, GM-CSF, and IL-4/GM-CSF [J]. Clin Mol Allergy, 2005(3): 6.
- [16] West AR, Zaman N, Cole DJ, et al. Development and characterization of a 3D multicell microtissue culture model of airway smooth muscle [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 304(1): L4-L16.
- [17] Bourke JE, Li X, Foster SR, et al. Collagen remodeling by airway smooth muscle is resistant to steroids and beta(2)-agonists [J]. Eur Respir J, 2011, 37(1): 173-182.
- [18] Gruber HE, Somayaji S, Riley F, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence [J]. Biotech Histochem, 2012, 87(4): 303-311.
- [19] Torricelli A, Bisiach M, Spinelli L, et al. From flow cytometric BrdUrd data to cell population growth and doubling time [J]. Cytometry, 1997, 29(3): 222-232.
- [20] Kim DK. Estimating doubling time of cells in vitro [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1995, 31(6): 419-420.
- [21] Daukste L, Basse B, Baguley BC, et al. Mathematical determination of cell population doubling times for multiple cell lines [J]. Bull Math Biol, 2012, 74(10): 2510-2534.
- [22] Daukste L, Basse B, Baguley BC, et al. Using a stem cell and progeny model to illustrate the relationship between cell cycle times of in vivo human tumour cell tissue populations, in vitro primary cultures and the cell lines derived from them [J]. Journal of Theoretical Biology, 2009, 260(4): 563-571.
- [23] Korzynska A, Zychowicz M. A method of estimation of the cell doubling time on basis of the cell culture monitoring data [J]. Biocybernetics and Biomedical Engineering, 2008, 28(4): 75-82.
- [24] Pham PV, Nguyen NT, Nguyen HM, et al. A simple in vitro method for evaluating dendritic cell-based vaccinations [J]. Onco Targets Ther, 2014(7): 1455-1464.
- [25] Limame R, Wouters A, Pauwels B, et al. Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays [J]. PloS one, 2012, 7(10): e46536.