

· 论 著 ·

大鼠肺泡 II 型上皮细胞的培养、鉴定及体外特性初步研究*

符跃强¹, 蒋 静², 陈 娟², 陈 聪², 方 芳², 卢仲毅², 许 峰^{2△}

(1. 南京医科大学附属南京儿童医院急诊科, 江苏 210008; 2. 重庆医科大学附属儿童医院急诊科 400014)

摘要:目的 建立成年大鼠肺泡 II 型上皮细胞(AT II 细胞)分离、纯化、原代培养和鉴定的技术方法,并观察其体外生长特性及 SP-A 表达情况。**方法** 将 0.08% 胰蛋白酶消化液从气管注入肺组织,消化分离 AT II 细胞。将大鼠 IgG 包被的培养皿免疫吸附纯化后,进行原代培养。用倒置相差显微镜观察细胞生长情况,透射电镜(TEM)鉴定细胞,改良巴氏染色法鉴定并计算细胞纯度,MTT 法检测细胞增殖情况,Western blot 检测细胞表达 SP-A 动态变化。**结果** 细胞产量约为 2.2×10^7 个/只大鼠。电镜下观察到 AT II 细胞特征性结构——板层小体;纯度大于 90%。体外培养 36~72 h 时细胞生长良好,细胞质内有较多颗粒;96 h 后细胞呈长索形,细胞内颗粒减少,并出现空泡。AT II 细胞表达 SP-A 在 36 h 左右达高峰,之后表达减弱。**结论** 利用 0.08% 胰蛋白酶消化分离和大鼠 IgG 免疫吸附纯化可获得满意的原代 AT II 细胞。培养 36~72 h 时细胞增殖旺盛,生长良好,SP-A 表达丰富,是进行体外实验的良好时期。

关键词:肺泡 II 型上皮细胞;细胞培养;改良巴氏染色;板层小体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.021

中图分类号:R329.2;R322.35

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)15-1988-03

Isolation, purification, culture and identification of primary rat alveolar type II epithelial cells in vitro*FU Yue-qiang¹, JIANG Jing², CHEN Juan², et al.

(1. Department of Emergency, Nanjing Children's Hospital Affiliated to Nanjing Medical

University, Nanjing 210008, China; 2. Department of Emergency, Children's Hospital,

Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

Abstract: Objective To establish the primary culture technology and identification method for alveolar type II epithelial (AT II) cells. Further, to observe AT II cells in vitro and detected the expression of SP-A. **Methods** The lungs were instilled with 0.08% trypsin solution to isolate AT II cells from lung tissue. The cell pellet was panned on an IgG-coated plastic dish at 37 °C to purify, and seeded culture plates for primary culture. The cells were identified under TEM. The purity of the culture cells was assayed with modified papanicolaou staining and the morphological changes of AT II cells after culturing various times (36, 72, 96, 120 h) were observed in vitro. The growth curve was measured by MTT method. The expression of SP-A was detected by western blot. **Results** About 2.2×10^7 cells were obtained from one adult rat. The lamellar body of AT II cells was observed under transmitting electron microscopy (TEM) and the purity of the culture cells was > 90% assayed with modified papanicolaou Staining. Cells grown well and there were many granules in cytoplasm after 36 to 72 h of culture. Cells became rhomboid, the number of granules was decreased and vacuoles presented in cytoplasm after more than 96 h of culture. The expression of SP-A was abundant after 24 h to 72 h of culture and reached peak at 36 h. **Conclusion** 0.08% trypsin digestion and specific immunosorption to plates coated with IgG is the efficient method to isolate, and purify AT II cells. AT II cells exhibit excellent growth property and the expression of SP-A is abundant after 36 to 72 h of culture and this term is good for in vitro study.

Key words: alveolar type II epithelial cells; cell culture; modified papanicolaou Staining; lamellar body

肺泡 II 型上皮细胞(alveolar type II epithelial cells, AT II 细胞)是肺泡上皮细胞的干细胞,除了能增殖成新的 AT II 细胞,还可分化为肺泡 I 型上皮细胞,具有修复受损肺泡上皮的功能^[1-3]。另外,AT II 细胞具有合成、分泌和循环利用肺泡表面活性物质、参与水和离子的转运、合成免疫调节因子等重要功能^[4],对肺发育、肺功能的调节和肺组织的损伤修复有重要作用。

应用原代 AT II 细胞开展相应研究,对认识肺的正常生理功能和多种肺部疾病均有重要意义。但该细胞的分离、培养步骤较多,操作难度高,而且体外培养时不能传代,细胞易变性,表型丧失快,从而局限了原代 AT II 细胞的使用。本研究参考国内外相关研究,以改良的技术方法,从肺组织中分离、纯化得到高纯度、高产量的 AT II 细胞,进行原代培养,并观察其生长

变化及 SP-A 表达情况,以满足体外实验需要。

1 材料与方

1.1 主要材料 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180~200 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。胰蛋白酶为美国 BBI 公司产品,脱氧核糖核酶 I (DNase I) 为北京鼎国生物技术有限责任公司产品,DMEM/F12 培养基为美国 Gibco 公司产品,大鼠 IgG 为北京中杉金桥生物技术有限公司产品,特级胎牛血清为天津 TBD 公司产品,MTT 为美国 Amresco 公司产品,SP-A 抗体为美国 Santa 公司产品。

1.2 实验方

1.2.1 AT II 细胞分离、培养 予水合氯醛麻醉大鼠,打开胸腔行肺动脉插管,以生理盐水冲净肺血。整体取出心、肺和气管,予气管插管,以缓冲液(NaCl 140 mM、KCl 5 mM、

* 基金资助:国家自然科学基金面上资助项目(30370618)。△ 通讯作者,E-mail:xufeng9899@yahoo.com.cn.

Na₂HPO₄ 7 mM、H₂O 8 mM、EGTA 0.2 mM、HEPES 10 mM、葡萄糖 6 mM、pH 7.4) 灌洗肺泡腔 10 次。将 0.08% 胰蛋白酶消化液从气管注入肺泡,使肺充分膨胀,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱,每隔 5 分钟添加适量消化液,20 min 后去除气管及肺门周围结缔组织,置于 250 μg/mL DNase I 和终止血清混合液中,快速剪肺至 1 mm³ 小块,筛网过滤,1 500 r/min 离心 10 min 收集细胞,DMEM/F12 培养基重悬细胞并转移至大鼠 IgG 包被的培养皿中,吸附纯化 2 h,用含 20% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基重悬细胞,台盼蓝拒染法测定细胞活力。细胞接种培养板后 24 h 换液,继续培养 12 h 备用。

1.2.2 细胞活性检测 纯化后取 100 μL 细胞悬液与 100 μL 0.4% 台盼蓝液混合后,滴入血球计数板置于显微镜下观察。不着色、发亮者为存活细胞;蓝色、胞体膨大者为死亡细胞,共计数 400 个细胞,计算存活细胞占细胞总数百分比。

1.2.3 倒置相差显微镜观察 在相差显微镜下观察不同培养时间后细胞贴壁生长情况和形态特征变化,并照相记录。

1.2.4 改良巴式染色法 制作细胞爬片,细胞体外生长 36 h 后用 PBS 轻洗细胞爬片,快速干燥细胞,滴入苏木精,染色 5 min。水洗 2 次,碳酸锂液(2 mL 饱和碳酸锂液加 158 mL 双蒸水)染色 2 min。水洗 1 次。乙醇逐级脱水,二甲苯/无水乙醇 1:1 混合液作用 30 s,二甲苯作用 60 s,干燥,封片。显微镜下观察胞浆内有蓝紫色颗粒(板层小体)的细胞为阳性,计算细胞纯度,至少计数 400 个细胞。

1.2.5 鉴定 AT II 细胞 体外生长 36 h 后,收集细胞,4% 戊二醛固定 2 h 后换成 0.01 mol/L PBS,经戊二醛和锇酸双重固定、丙酮脱水、环氧树脂包埋、超薄切片和醋酸枸橼酸电子双重染色等处理程序后制备为电镜细胞标本。通过透射电镜(transmitting electron microscopy, TEM)观察细胞的结构特征。

1.2.6 AT II 细胞的生长曲线 用 MTT 法检测细胞存活情况,将细胞以 1×10⁶/mL 浓度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL,体外培养一定时间后,吸去孔内液体,加入 5 mg/mL MTT 溶液(每孔 20 μL)和培养基(每孔 180 μL),反应 4 h 后,快速去除培养液,每孔加入二甲亚砷(DMSO)150 μL,经振荡器作用 10 min 混匀,用多功能酶标仪检测 492 nm 吸光度(A₄₉₂),空白孔调零。OD 值越高表示活细胞越多。

1.2.7 Western blot 检测 SP-A 表达 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法定量蛋白,取 45 μg 蛋白质上样,12% SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜,TBS 洗涤 3 次,用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,TBST 洗涤 3 次,分别与 SP-A (1:1 000)、4℃ 孵育过夜,与辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (1:2 000) 37℃ 孵育 1 h,用 ECL 法检测。

2 结 果

2.1 AT II 细胞产量与活力 统计 6 次实验结果,原代培养的 AT II 细胞平均可收获约(2.2±0.3)×10⁷ 个/只大鼠;经台盼兰染色法检测细胞活力平均为(89.5±5.3)%。

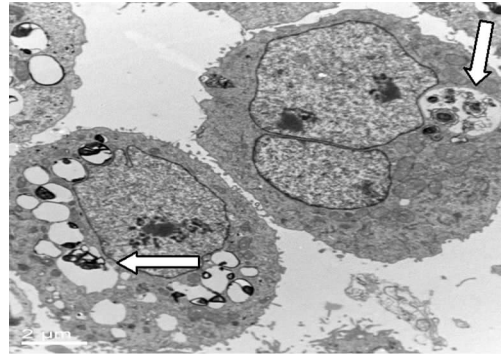
2.2 鉴定 AT II 细胞 TEM 下可见体外生长 36 h 的 AT II 细胞体积较大,细胞质中分布有 AT II 细胞特征性结构——板层小体,呈“洋葱皮”状,细胞膜上有明显微绒毛(图 1)。

2.3 改良巴式染色法鉴定细胞与细胞纯度 原代培养 36 h 后进行改良巴式染色,显微镜下可见改良巴式染色后 AT II 细胞浆内含有丰富的深蓝色颗粒——板层小体(图 2),细胞纯度大于 90%。

2.4 倒置相差显微镜下观察 AT II 细胞形态 原代培养 18 h 后 AT II 细胞在密度低处细胞呈岛状生长,在密集处细胞可相

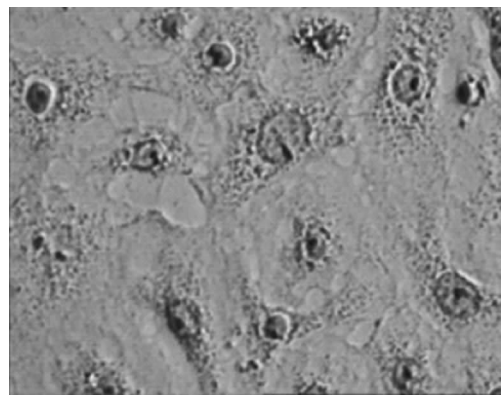
互连接成单层,细胞质内可见细小颗粒。36 h 左右细胞伸展呈多边形,相互连接成细胞单层,胞核明显,细胞核周围有丰富的小颗粒(图 3A)。培养 72 h 左右,细胞形态变化不大,细胞内颗粒数目较前稍有减少(图 3B);培养 96 h 左右,细胞颗粒数目较 72 h 时减少,细胞内出现较多空泡,细胞形态发生改变,部分细胞呈条索状(图 3C);培养 120 h 左右,细胞内颗粒稀少,较多细胞呈条索状,甚至细胞间连接成圆形空泡(图 3D)。

2.5 AT II 细胞生长曲线 体外培养 24 h 后 AT II 细胞增殖明显,36~72 h 增殖旺盛,72 h 后细胞逐渐进入生长平台期,96 h 后细胞数不断减少(图 4)。



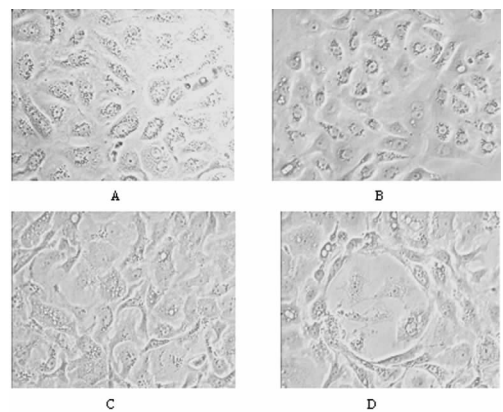
⇨: 膜上有微绒毛。

图 1 TEM 观察 AT II 细胞内含板层小体(×8 000)



细胞质中含有丰富的深蓝色颗粒。

图 2 改良巴式染色法鉴定 AT II 细胞(×400)



A: AT II 细胞在体外培养 36 h; B: AT II 细胞在体外培养 72 h; C: AT II 细胞在体外培养 96 h; D: AT II 细胞在体外培养 120 h。

图 3 在体外培养不同时间后 AT II 细胞的形态变化(×250)

2.6 AT II 细胞 SP-A 表达变化 原代培养的 AT II 细胞表达

SP-A 蛋白,体外培养 36 h 左右是 SP-A 表达的高峰阶段,以后随培养时间延长而减少,体外培养 120 h 后 SP-A 表达甚为微弱(图 5)。

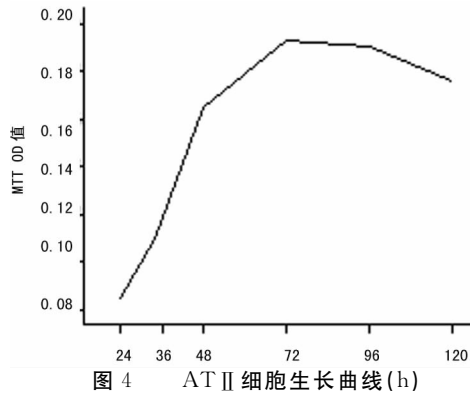


图 4 AT II 细胞生长曲线 (h)

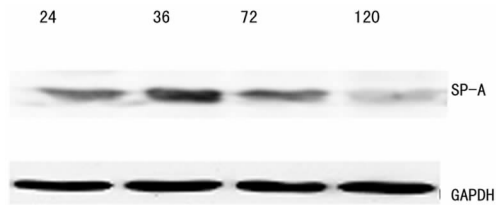


图 5 体外不同时间 SP-A 的表达情况 (h)

3 讨 论

由于 AT II 细胞特殊的生物学特性,目前尚无理想的细胞株替代供体外研究。在国内外研究中,广泛采用 A549 细胞和 L2 细胞作为 AT II 细胞的替代者,但是这两种细胞并不完全具备 AT II 细胞形态、脂质和分子标记等显性特征。MLE12、MLE15 等细胞株也仅具备 AT II 细胞的少数特性,因此有必要建立经济、高效的 AT II 细胞分离、纯化和培养方法。

AT II 细胞分离可采用弹性蛋白酶^[5]、胰酶^[6],或两者联合使用^[7],或胰酶联合胶原酶^[8]。弹性蛋白酶分离所得细胞纯度高,但是该酶昂贵,且性状不稳。胰酶价格便宜,性状稳定,在经济因素制约的条件下,采用胰酶仍是可行的方法。胰酶浓度及作用时间是获得足够数量且活性高的 AT II 细胞的关键。作者将 Dobbs^[9]和 Oreffo 等^[6]的方法进行适当改良,经气管内灌注适量 0.08% 胰酶液,在 37 °C 消化 20 min,这样既能保证得到足够的 AT II 细胞,又能避免过高浓度胰酶和过久的消化对细胞活力的破坏。纯化后的细胞经 TEM 和改良巴式染色法证实为 AT II 细胞,产量约 2.2×10^7 个/只大鼠,细胞纯度和活力均在 90% 左右。

AT II 细胞纯化的方法除免疫吸附法外,还有密度梯度离心法、流式细胞仪筛选^[10]和单克隆抗体技术等^[11]。密度梯度离心法只能得到细胞亚型中特定密度和大小的细胞,并因密度重叠而影响纯度。流式细胞术筛选受仪器限制。而单克隆抗体技术难度高,尚无商业抗体供应。免疫吸附法原理是巨噬细胞和中性粒细胞表面有 IgG 的 Fc 受体,很快黏附于覆被有 IgG 的培养皿壁上,而 AT II 细胞无 Fc 受体,贴壁速度缓慢。该法利用细胞贴壁速度的差异进行纯化,难度低,无仪器限制,纯化效率高^[5]。值得注意的是在进行免疫纯化时需观察细胞贴壁情况,当比巨噬细胞体积小的圆形细胞开始贴壁时,应中止纯化,以防 AT II 细胞过多贴壁。

通过 TEM 观察板层小体是鉴定 AT II 细胞的金标准,但此法所需细胞量大,费用高,操作繁琐,费时久。改良巴式染色法操作简便,HE 染色试剂即能满足实验要求,耗时短,染色后

即可在光镜下直接观察细胞质内蓝色颗粒,鉴定细胞,并可计算细胞纯度。

体外培养 AT II 细胞 18 h 左右细胞已大量贴壁,36 h 左右细胞明显增多,细胞质内可见丰富颗粒,说明本研究培养条件适合 AT II 细胞的生长。培养 24~72 h 阶段细胞生长旺盛,其后细胞生长渐停滞。培养超过 96 h 后细胞形态随时间的延长逐渐丧失 AT II 细胞原有的特性。除细胞形态变化外,通过检测 AT II 细胞特征性蛋白 SP-A 发现其表达也在不断变化,细胞培养 36 h 后 SP-A 表达最为丰富,此后随时间的延长而减弱,在 120 h 时其表达进一步减弱,说明体外培养超过一定时间后 AT II 细胞表达肺泡表面活性物质的内在功能也逐步丧失。

利用 0.08% 胰蛋白酶消化分离和 IgG 免疫吸附纯化可获得满意的原代 AT II 细胞,改良巴式染色法鉴定细胞简便、快速。体外培养 36~72 h 阶段 AT II 细胞生长良好,细胞浆颗粒丰富,SP-A 表达丰富,是进行体外实验的良好时期。

参考文献:

- [1] Geiser T, Jarreau PH, Atabai K, et al. Interleukin-1 β augments in vitro alveolar epithelial repair[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(6): L1184.
- [2] Sugahara K, Tokumine J, Teruya K, et al. Alveolar epithelial cells: differentiation and lung injury [J]. *Respirology*, 2006, 11 Suppl: S28.
- [3] Mason RJ. Biology of alveolar type II cells[J]. *Respirology*, 2006, 11 Suppl: S12.
- [4] Mager E, Vanderbilt J, Dobbs L. Differential gene expression by rat alveolar type I and type II cells determined by differential display-PCR[J]. *Am J Resp Crit Care Med*, 1999, 159: A175.
- [5] Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1986, 134(1): 141.
- [6] Oreffo VI, John RA, Richards RJ. Diamine uptake by rat lung type II cells in vitro[J]. *Biochem Pharmacol*, 1991, 41(8): 1209.
- [7] Peers C, Kemp PJ, Boyd CA, et al. Whole-cell K⁺ currents in type II pneumocytes freshly isolated from rat lung: pharmacological evidence for two subpopulations of cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, 1052(1): 113.
- [8] 史雪梅, 张惠兰, 熊盛道, 等. 肺泡 II 型上皮细胞的原代培养及生物学特性比较研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(11): 2284.
- [9] Dobbs LG. Isolation and culture of alveolar type II cell [J]. *Am J Physiol*, 1990, 258(4 Pt 1): L134.
- [10] Leary JF, Finkelstein JN, Notter RH, et al. Isolation of type II pneumocytes by laser flow cytometry[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1982, 125(3): 326.
- [11] Chen J, Chen Z, Narasaraaju T, et al. Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs[J]. *Lab Invest*, 2004, 84(6): 727.