文章编号:1000-5404(2008)09-0775-04

论著

小鼠支气管肺泡干细胞的培养鉴定和分选

钱 莘,安江洪,敖绪军,孙建国,陈正堂 (第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所,重庆 400037)

摘 要:**目的** 对正常成年小鼠肺内支气管肺泡干细胞(bronchoalveolar stem cell,BASC)进行克隆培养、鉴定和流式细胞仪分选。**方法** 用胶原酶和分散酶联合消化小鼠肺组织制备肺单细胞悬液,并经免疫磁珠分选 Sca-1$^+$ 细胞;胶原蛋白和小鼠 Swiss-3T3 成纤维细胞系包被培养板;无血清乳腺上皮细胞培养基培养 Sca-1$^+$ 细胞;双重免疫荧光染色 Clara 细胞抗原(CCA)和肺泡表面活性蛋白 C(SP-C)鉴定 BASC,并用流式细胞仪分选 BASC。**结果** 通过胶原酶和分散酶联合消化小鼠肺组织,平均每只成年小鼠可得到有核细胞总数(1.6~1.8)×10^7;经磁珠分选后的 Sca-1$^+$ 细胞纯度明显高于未经分选的肺 Sca-1$^+$ 细胞[分别为(87.3±5.9)%、(9.6±1.8)%,$P<0.05$];在无血清乳腺上皮细胞培养基中 Sca-1$^+$ 细胞在第4天可形成 BASC 克隆和其他不表达 CCA、SP-C 的细胞克隆;流式细胞仪检测 $CD45^-CD31^-Sca\text{-}1^+CD34^+$ 细胞占肺细胞总数的0.7%~1.1%,根据此分子标记能够分选出高纯度的 BASC。**结论** 通过胶原酶和分散酶联合消化,免疫磁珠分选的 Sca-1$^+$ 细胞在无血清乳腺上皮细胞培养基中能够形成非纯化的 BASC 克隆,而流式细胞仪可以分选出高纯度的 BASC。

关键词:干细胞;Clara 细胞抗原;肺泡表面活性蛋白 C;流式细胞术
中图法分类号:R322.3;R329.2;R329.24 **文献标识码**:A

Cultivation, identification and sorting of bronchoalveolar stem cells derived from mouse lung

QIAN Shen, AN Jiang-hong, AO Xu-jun, SUN Jian-guo, CHEN Zheng-tang (Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To cultivate, identify and sort bronchoalveolar stem cells (BASC) derived from normal adult mouse lung. **Methods** After enzymatic digestion of lung tissue with dispase and collagenase in combination, the Sca-1$^+$ cells were isolated from the obtained pulmonary cells by magnetic cell sorting. These Sca-1$^+$ cells were cultured in dishes coated with collagen and mouse fibroblast cell line Swiss-3T3 under a serum-free culture system for BASC, which were identified by the dual-color immunofluorescent staining clara cell specific antigen (CCA) and surfactant protein C (SP-C). Finally, these pure BASC were isolated by the flow cytometry. **Results** One lung of normal adult mouse could yield (1.6−1.8)×10^7 nucleated cells in this enzyme digestion procedure. The percentage of Sca-1$^+$ cells we sorted from lung tissue was much higher than the unsorted [(87.3±5.9)% and (9.6±1.8)%, $P<0.05$]. On the 4th day of culture, the Sca-1$^+$ cells grew into BASC and other cell colonies. The $CD45^-CD31^-Sca\text{-}1^+CD34^+$ cells accounting for (0.7−1.1)% of the total number of pulmonary cells were isolated by flow cytometry. **Conclusion** Sca-1$^+$ cells derived from adult mice pulmonary cells can grow into BASC in serum-free culture system, and BASC can be purified by flow cytometry. The established platform provides implications for the research of the lung tumor stem cells from human.

Key words: stem cells; clara cell antigen; pulmonary surfactant protein C; flow cytometry

近年来关于干细胞的研究已在血液系统、神经系统、骨骼肌肉系统、皮肤组织、恶性肿瘤等方面取得了令人惊喜的成果,但肺干细胞的研究进展缓慢。2005年,肺干细胞的研究取得了重大突破。Kim 等[1]在原癌基因 K-ras 诱导的小鼠肺腺癌模型中发现位于肺内支气管肺泡连接区(bronchoalveolar duct junction, BADJ)的一群细胞共表达 Clara 细胞抗原(clara cell specific antigen,CCA)和肺泡表面活性蛋白 C(surfactant protein C,SP-C)。$CCA^+SP\text{-}C^+$ 双阳性细胞(double

基金项目:国家高技术研究发展计划("863"项目)(2007AA02Z129);国家自然科学基金(30672076)
Supported by the National High Technology Research &Development Program(2007AA02Z129) and the National Natural Science Foundation of China (30672076)
作者简介:钱 莘,女,陕西省西安市人,博士研究生,医师,主要从事肺癌早期诊断、治疗方面的研究。电话:(023)68755626, E-mail:qianshen7@yahoo.com.cn
通信作者:陈正堂,电话:(023)68755626, E-mail:zhengtangchen@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-12-25;修回日期:2008-01-30

positive cells，DPCs）被称为支气管肺泡干细胞（bronchoalveolar stem cell，BASC），其表面标记是 $CD45^-CD31^-Sca\text{-}1^+CD34^+$。BASC 具有典型的自我更新和多向分化的潜能，因此 BASC 被认为是远端肺上皮的干细胞。

我们对肺干细胞展开了相关的研究，分别在成年鼠（小鼠、大鼠）和新生鼠的正常肺组织中验证了 BASC 的存在，并在人的肺癌组织中发现了 $CCA^+SP\text{-}C^+$ 细胞的存在，推测在人的肺癌组织中很可能也存在与鼠类似的肺癌干细胞[2]。本研究拟建立 BASC 的体外培养体系，以期得到纯化的 BASC，从而为进一步研究 BASC 的相关特性奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 昆明小鼠，4 周龄，体质量 18～20 g，购于第三军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 小鼠 Swiss-3T3 成纤维细胞系（中科院上海细胞所），分散酶（美国 Sigma 公司），胶原酶（瑞士罗氏公司），丝裂霉素 C（MMC，日本 Kyowo Hakko Koglo 公司），白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor，LIF，上海欣百诺生物公司），乳腺上皮细胞培养基（加拿大 Stem Cell 公司），小鼠 Sca-1 Easy Sep 磁珠分选系统（加拿大 Stem Cell 公司），CCA 羊抗鼠多克隆抗体、SP-C 羊抗鼠多克隆抗体、驴抗羊 IgG-异硫氰酸荧光黄（fluorescein isothiocyanate，FITC）、驴抗羊 IgG-四甲基异硫氰酸罗达明（tetramethylrhodamine isothiocyanate，TR，美国 Santa Cruz 公司），FITC 标记大鼠抗小鼠 CD34 抗体、对照抗体大鼠 IgG1、phycoerthrin-cy5（PE-Cy5）标记大鼠抗小鼠 CD45 抗体、phycoerthrin-cy7（PE-Cy7）标记大鼠抗小鼠 CD31 抗体（美国 eBioscience 公司），对照抗体大鼠 IgG2-PE（美国 eBioscience 公司）。激光扫描共聚焦显微镜，型号为 Leica TCS SP5，由第三军医大学基础医学部中心实验室提供，流式细胞分选仪（美国 BD 公司），由第三军医大学全军免疫学研究所提供。

1.2 MMC 处理 Swiss-3T3 成纤维细胞系

取对数生长期 3T3 成纤维细胞系，加入 10 μg/ml 的 MMC，处理 2.5 h，使 3T3 成纤维细胞失去增殖能力。PBS 漂洗后，用 0.05% 胰蛋白酶消化 2～3 min，1 000 r/min 离心 4 min，按 $1\times10^4\ cm^{-2}$ 的细胞数将 3T3 成纤维细胞接种于已包被好胶原蛋白的含有无菌玻片的 12 孔培养板中，37 ℃、5% CO_2 孵育，待用。

1.3 制备小鼠肺组织单细胞悬液

参照文献[1]，取 4～5 只昆明小鼠处死，将肺组织剪成 1 mm^3 大小的碎块，PBS 反复漂洗 加入 0.25% 分散酶 1.5 ml、0.4% 胶原酶 0.5 ml、50 μl FCS 消化，4 ℃过夜 12～16 h，再置于 37 ℃孵箱中消化 50～60 min；400 目尼龙筛网过滤，5% FCS 的 PBS 悬浮细胞；1 000 r/min 离心 5 min，调整有核细胞数为 $1\times10^8\ ml^{-1}$。

1.4 磁珠分选小鼠肺单细胞悬液中 $Sca\text{-}1^+$ 细胞

采用小鼠 Sca-1 Easy Sep 磁珠分选系统进行细胞分选，按照说明书进行操作。用 DMEM/F12 培养基悬浮 $Sca\text{-}1^+$ 细胞，台盼蓝染色活细胞。流式细胞仪检测分选前后 $Sca\text{-}1^+$ 细胞纯度。

1.5 小鼠肺 $Sca\text{-}1^+$ 细胞培养

将上述分选出的 $Sca\text{-}1^+$ 细胞按 $3\times10^4\ cm^{-2}$ 的细胞数接种于已包被好胶原蛋白和 3T3 成纤维细胞的 12 孔培养板中，加入含有 5% FCS 和氢化考的松的乳腺上皮细胞培养基，每孔 0.5 ml，37 ℃、5% CO_2 孵箱中孵育 24 h，使细胞贴壁。24 h 后吸出培养基去除未贴壁细胞，加入含有 LIF 和氢化考的松的无血清乳腺上皮细胞培养基，每孔 1.5 ml，继续培养。每天观察，以每个细胞团超过 4 个细胞为 1 个克隆，隔天半量换液，至第 7 天。

1.6 细胞形态观察

倒置相差显微镜动态观察细胞形态变化、生长及增殖状况，直至细胞死亡，共 6～7 d。

1.7 双重免疫荧光染色法鉴定 BASC

分别取贴壁后 4、6 d 的细胞爬片，行免疫荧光染色。由于所购一抗均为同一来源，故采用间接二步法进行免疫荧光染色：第 1 天，加入 SP-C 抗体（1∶100），37 ℃孵育 1 h，4 ℃过夜；第 2 天，加入荧光二抗 IgG-FITC（1∶100），37 ℃孵育 1 h，PBS 漂洗，羊血清封闭 30 min，加二标一抗 CCA（1∶100），37 ℃孵育 1 h，4 ℃过夜；第 3 天，加二标荧光二抗 IgG-TR（1∶50），37 ℃孵育 1 h，PBS 漂洗，加 DAPI（1∶1 000）复染细胞核，缓冲甘油封片；用 PBS 代替一抗作为阴性对照，激光扫描共聚焦显微镜观察染色结果。在染色结果中绿色荧光标记的是 SP-C 蛋白，代表Ⅱ型肺泡上皮细胞（alveolar type Ⅱ epithelial cell，AECⅡ）；红色荧光标记的是 CCA 蛋白，代表 Clara 细胞；而黄色荧光代表同时表达 SP-C 和 CCA 蛋白的细胞，即 BASC。

1.8 流式细胞仪分选 BASC

制备小鼠肺组织单细胞悬液，方法同 1.3。取 4×10^7 制备好的肺单细胞加入 BD 公司专用试管中，加入抗体 Sca-1-PE 20 μl、CD34-FITC 80 μl、CD31-PE/CY7 100 μl、CD45-PE/CY5 12 μl，混匀，4 ℃避光孵育 30 min，PBS 漂洗后，流式细胞分选仪分选 $CD31^-CD45^-Sca\text{-}1^+CD34^+$ 细胞，即 BASC，收集待用；WinMdi 2.9 软件分析流式数据。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 磁珠分选小鼠肺 $Sca\text{-}1^+$ 细胞情况

通过对小鼠肺组织采用胶原酶和分散酶联合消化的方法，平均每只成年小鼠可得到有核细胞总数（1.6～1.8）$\times10^7$。流式细胞仪检测磁珠分选前后 $Sca\text{-}1^+$ 细胞纯度，结果显示经磁珠分选后 $Sca\text{-}1^+$ 细胞纯度明显高于未经分选的肺单细胞悬液中 $Sca\text{-}1^+$ 细胞[分别为（87.3±5.9）%、（9.6±1.8）%，$P<0.05$]，说明采用小鼠 Sca-1 Easy Sep 磁珠分选系统可大量富集肺组织中 $Sca\text{-}1^+$ 细胞。

2.2　小鼠肺 Sca-1$^+$ 细胞培养结果

将磁珠分选出的 Sca-1$^+$ 细胞按 3×10^4 cm^{-2} 的细胞数接种于已包被好胶原蛋白和 3T3 成纤维细胞的 12 孔培养板中,光镜下观察细胞大小均一,呈透亮小圆形.接种后 12 h,部分细胞下沉贴附于培养孔底(图 1A)。第 2 天贴壁细胞数量逐渐增多,并形成数个上皮样细胞群,每群内细胞数为 15 ~ 35 个.细胞呈扁平卵圆形,类似于铺路石,细胞核清晰(图 1B)。去除未贴壁细胞后,更换培养基为含有 LIF 和氢化考的松的无血清乳腺上皮细胞培养基,继续培养。第 4 天可见已形成的上皮样细胞群逐渐消失,开始出现聚集样生长的小细胞克隆,细胞为折光性强的小圆形或类圆形,细胞质均匀、透亮,倒置相差显微镜下有立体感(图 1C)。至第 6 天,小细胞克隆明显增多,平均每个培养孔里有细胞克隆 5 ~ 10 个,每个克隆中细胞数为 20 ~ 45,最大的克隆里有细胞 200 个左右。第 7 天,小细胞克隆逐渐减少、消失,部分细胞克隆的周边细胞开始变大呈扁平形,细胞质内有大小不一的颗粒,折光性明显减弱(图 1D)。

2.3　双重免疫荧光染色法鉴定 BASC

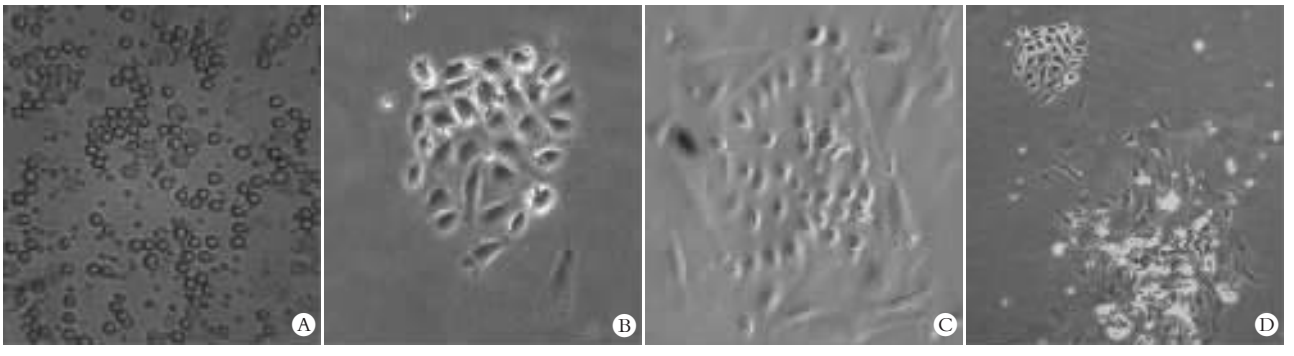
分别取克隆培养第 4、6 天的细胞爬片进行 CCA、SP-C 的免疫荧光染色。在克隆培养第 4 天,可见克隆群中大部分细胞的细胞质中有呈点状分布的红色荧光,围绕在细胞核周边,而在克隆群中未见绿色荧光和黄色荧光,说明大多数细胞为 CCA 阳性的 Clara 细胞,而未见 AEC Ⅱ 和 BASC。在克隆培养第 6 天,可见少数克隆群中的细胞细胞质有黄色荧光,呈均一性,说明第 6 天时 BASC 细胞克隆已形成,但数量稀少;而其他克隆群的细胞未见黄色荧光,可见培养出的细胞克隆中还有一些并不是 BASC(图 2)。在 PBS 作为免疫组化的阴性对照组中均只有蓝色标记的细胞核,而未见红色、绿色和黄色荧光。

2.4　流式细胞仪分选 BASC 的情况

进行电压调节和荧光补偿后开始分选细胞,通过前向角和侧向角射门选定待研究细胞群 R1,再根据 CD45$^-$ CD31$^-$ 设定细胞门 R2,再从 R2 细胞群中设定 Sca-1$^+$ CD34$^+$ 细胞群 R4 和 Sca-1$^-$ CD34$^-$ 细胞门 R3。分别把分选出来的 CD45$^-$ CD31$^-$ Sca-1$^+$ CD34$^+$ 和 CD45$^-$ CD31$^-$ Sca-1$^-$ CD34$^-$ 收集待用。独立 3 次重复实验后结果均相似,在小鼠肺单细胞悬液中 CD45$^-$ CD31$^-$ 细胞占肺细胞总数的 11.2% ~ 16.4%,其中 CD45$^-$ CD31$^-$ Sca-1$^+$ CD34$^+$ 细胞和 CD45$^-$ CD31$^-$ Sca-1$^-$ CD34$^-$ 细胞各占肺细胞总数的 0.7% ~ 1.1% 和 1.7% ~ 2.0%。

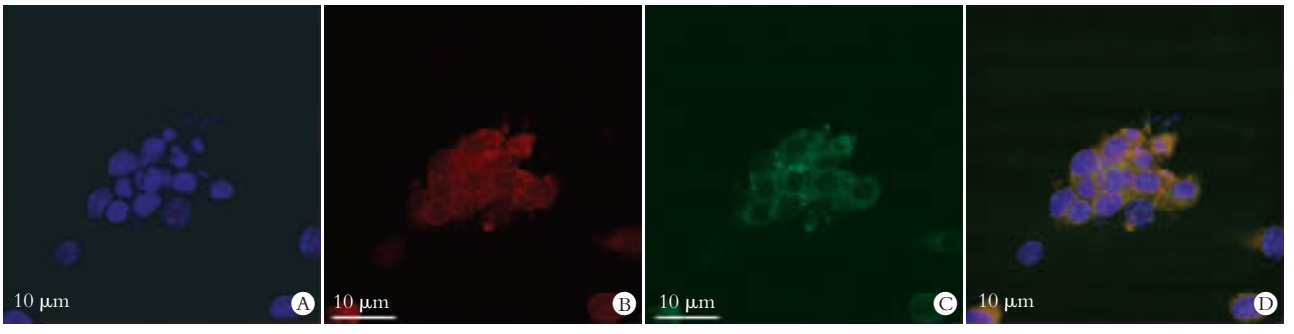
3　讨论

在制备小鼠肺单细胞悬液时,我们采用分散酶和胶原酶混合消化的方式,分散酶具有纤维结合素酶和Ⅳ型胶原酶的活性,是一种快速、温和、有效的分离上皮和上皮下组织的中性蛋白酶,在分离上皮时它作用于基底膜选择性地分解纤维结合素和Ⅳ型胶原,而保存上皮细胞活力和细胞连接,减少成纤维细胞的污染[3]。胶原酶是一种由细菌中提取的酶,适于消化纤维性的组织、上皮组织,上皮细胞本身对胶原酶有一定的耐受性,但胶原酶对细胞间质有很好的消化作用,可使上皮细胞与胶原分离而不受损伤。因此,通过分散酶和胶原酶混合消化的方式,不仅能够能够得到活性好、纯



A:培养前(×100);B:培养第 2 天(×200);C:培养第 4 天(×200);D:培养第 6 天(×100)

图 1　倒置相差显微镜下观察小鼠肺 Sca-1$^+$ 细胞克隆培养结果



A:DAPI 抗体标记的细胞核;B:CCA 抗体标记细胞克隆中表达 CCA 蛋白的细胞;C:SP-C 抗体标记细胞克隆中表达 SP-C 蛋白的细胞;D:CCA、SP-C 抗体标记细胞克隆中共表达 CCA、SP-C 蛋白的细胞

图 2　激光共聚焦显微镜观察小鼠肺 Sca-1$^+$ 细胞克隆培养第 6 天结果

度高的肺组织单细胞悬液,而且不损伤肺上皮细胞,利于后续的肺上皮细胞培养。我们在前期的实验中已分别在成年鼠(小鼠、大鼠)和新生鼠的正常肺组织中证实了 BASC 的存在,其数量很少,位于 BADJ 区[2],但如何能够得到这群肺干细胞就成为亟需解决的问题。

本研究通过免疫磁珠富集肺组织中的 Sca-1$^+$ 细胞,希望通过干细胞培养体系得到 BASC。但是,通过 Sca-1 磁珠富集的小鼠肺细胞不仅包括 BASC,还包括造血干细胞、内皮祖细胞等其他干细胞和部分分化的前体细胞,可能会影响 BASC 的培养,如果能选择适于上皮干细胞生长的培养体系很可能会通过优势生长而选择性排除其他细胞的干扰。在本实验中我们选用商品化的人鼠通用的乳腺上皮干细胞克隆生长培养基,其以 DMEM/F12 为基础培养基,添加了人源转铁蛋白、牛血清白蛋白、胰岛素、表皮生长因子、三碘甲状腺氨酸和氢化考的松这一类促进上皮细胞生长的因子,以利于乳腺上皮干细胞的克隆形成和扩增。而肺上皮干细胞并无现成的培养基可用,考虑到乳腺上皮和肺上皮同为上皮组织,而乳腺上皮干细胞培养体系已经成熟,所以在本实验中借鉴该培养体系。

在细胞接种前,我们预先用胶原蛋白Ⅳ包被培养板,以利于上皮干细胞的快速黏附和干细胞克隆形成[4]。同时借鉴胚胎干细胞培养体系和表皮干细胞培养体系[5,6],采用经 MMC 处理失去增殖活性的小鼠 Swiss-3T3 成纤维细胞系作为肺上皮干细胞的滋养层。3T3 成纤维细胞不仅利于上皮干细胞的贴壁,而且还可以通过分泌细胞因子如 LIF、干细胞生长因子(stem cell factor, SCF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等维持干细胞的增殖和保持未分化状态[4]。在细胞贴壁时添加低浓度胎牛血清以利于干细胞更好的贴壁,24 h 后更换无血清的培养基,以防止在有血清条件下干细胞发生分化[7];同时加入 LIF,进一步抑制干细胞的分化。在精原干细胞培养的研究中发现,LIF 对维持精原干细胞的未分化状态及其存活可能有重要作用,但对其更新性增殖和分化性增殖均没有明显作用[8]。

在肺 Sca-1$^+$ 细胞长出克隆后,分别取克隆培养第4、6天的细胞进行免疫荧光染色鉴定,发现在第4天时只有 CCA 阳性的 Clara 细胞出现,而未见 AEC Ⅱ 和 BASC 的出现;而在克隆培养第6天时出现了同时表达 CCA 和 SP-C 的 BASC 细胞克隆,说明干细胞克隆的出现具有时间顺序。AEC Ⅱ 具有自我更新的能力,在一系列的研究中都证实 AEC Ⅱ 是 AEC Ⅰ 的前体细胞。文献[9]报道 Clara 细胞是比 AEC Ⅱ 更前体的细胞,Clara 细胞可以分化为 AEC Ⅱ。本研究也表明是先出现 Clara 细胞,然后出现 BASC 细胞,说明 BASC 与 Clara 细胞相比可能是分化逐渐成熟的终末期细胞,可能在肺组织中还存在着比 BASC 更原始的干细胞。

在本研究中虽然能够通过对小鼠肺 Sca-1$^+$ 细胞的克隆培养得到 BASC,但单凭体外的克隆培养无法得到纯化的 BASC,更不能得到高纯度的 BASC,由此限制了后续研究的开展。而 BASC 有明确的表面分子标记,可以通过流式细胞仪分选得到纯化的 BASC,但流式分选设备要求高,成本昂贵,而且只适于分选一些表面分子明确的干细胞,限制了其广泛应用。克隆培养、纯化不失为一个切实可行的方法,但其具体的培养条件需要进一步摸索研究。

通过本实验我们认为在 BASC 的研究中应该首先通过流式细胞仪分选出高纯度的 BASC,然后再将分选出来的细胞接种在由胶原蛋白和 Swiss-3T3 成纤维细胞包被的培养板中,用含有 LIF 的无血清乳腺上皮细胞培养体系对 BASC 进行克隆培养、扩增、传代,只有这样才能得到纯化的并能连续传代的 BASC。本研究不仅对小鼠 BASC 的培养、鉴定和流式分选建立了技术平台,更重要的是为后续研究人肺癌干细胞的相关生物学特性建立了实验平台。

参考文献:

[1] Kim C F, Jackson E L, Woolfenden A E, *et al*. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer[J]. Cell, 2005, 121(6):823-835.

[2] 钱 莘,敖绪军,安江洪,等. 双重免疫荧光染色法鉴定肺组织内 CCA$^+$ SP-C$^+$ 细胞[J]. 肿瘤,2008,28(1):32-35.

[3] Costea D E, Johannessen A C, Vintermyr O K. Fibroblast control on epithelial differentiation is gradually lost during *in vitro* tumor progression[J]. Differentiation, 2005, 73(4):134-141.

[4] Jones P H, Watt F M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. Cell, 1993, 73(4):713-724.

[5] 常 静,雷 寒,陈建斌,等. 与胎儿心肌细胞共同培养诱导人胚胎干细胞发生心肌样分化[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(15):1465-1468.

[6] Metcalfe A D, Ferguson M W. Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair:Skin stem and progenitor cells:using regeneration as a tissue-engineering strategy[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(1):24-32.

[7] Stingl J, Eaves C J, Zandieh I, *et al*. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue[J]. Breast Cancer Res Treat, 2001, 67(2):93-109.

[8] McLean D J, Friel P J, Johnston D S, *et al*. Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice[J]. Biol Reprod, 2003, 69(6):2085-2091.

[9] Rawlins E L, Hogan B L. Epithelial stem cells of the lung:privileged few or opportunities for many?[J]. Development, 2006, 133(13):2455-2465.

(编辑 吴培红)