技术方法 文章编号:0253-3626(2009)05-0586-04

胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的分离及原代培养

付红敏,许 峰,黄 波,杨 鸣,符跃强,方 芳,匡凤梧
(重庆医科大学附属儿童医院儿科重症监护室,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(Alveolar epithelial cell type Ⅱ,AECⅡ)的分离、纯化及原代培养方法,为有关胎儿肺发育及新生儿肺部疾病的研究奠定基础。方法:采用胰酶结合胶原酶的消化方法,分离肺组织细胞成份,然后经差速离心和差速贴壁的方法纯化 AECⅡ,进行原代培养;通过台盼蓝染色检测细胞活力,倒置相差显微镜观察细胞生长特点及形态特征,透射电镜鉴定,改良巴氏染色检测细胞纯度以及免疫荧光技术检测表面蛋白 C(Surfactant protein c,SPC)的表达。结果:每 3~5 只胎鼠可获得 AECⅡ(36±5)×10⁶,活力 98%±2%。镜下观察原代 AECⅡ呈岛状生长,外观呈多边形或立方形。透射电镜可见特征性的板层小体,改良巴氏染色见胞质内有较多颗粒,纯度为 96%±3%,呈现 SPC 绿色免疫荧光的细胞占 96%以上。结论:利用胰酶和胶原酶消化,以及差速离心和差速贴壁的方法可成功分离出高产量、高纯度的胎鼠 AECⅡ,能满足体外进一步实验的需要。

【关键词】胎鼠;肺泡Ⅱ型上皮细胞;原代培养;分离
【中国图书分类法分类号】R714.5;R714.7;Q813.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-08-28

Isolation and primary culture of type Ⅱ alveolar epithelial cells from fetal rat lung

FU Hong-min, et al
(*Pediatrics Intensive Care Unit, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To develop the isolation and purification technology for type Ⅱ alveolar epithelial cells(AECⅡ)of fetal rat, in order to provide experimental means for the study of lung development or neonatal lung disease. *Methods*: Lung tissues of 19-day fetal rats were digested with trypsin and collagenase, then purified for AECⅡ with different centrifugal force and repeated attachment. Cell viability was evaluated by typran inclusion dying before plated into six-well flask. Growth status and shape of attached cells were observed with inverted phase contrast microscope. AECⅡ were identified by electron microscopy and its percentage was assessed by modified Papanicolaou dying and immunofluorescence, the latter aiming to detect expression of surfactant protein C(SPC)in AECⅡ. *Results*: The total amount of cells we harvested from 3 to5 fetal rat was (36±5)×10⁶ with a viability of 98%±2%. Cells were like polygonal and connected like island under microscope. AECⅡ was ascertained by lamellar bodies found in cytoplasma under electron microscope and its percentage was 96%±3% identified by modified Papanicolaou dying, the same as the result by immunofluorescence for SPC. *Conclusion*: Highly Purified and viable AECⅡ could be achieved by our methods and the cell model could be used in further study.

【Key words】Fetal rat; Alveolar epithelial cell type Ⅱ; Primary culture; Isolation

建立胎鼠肺上皮细胞体外培养模型是研究胎儿肺发育及新生儿某些肺部疾病的重要条件。目前有关胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(Alveolar epithelial cell type Ⅱ,AECⅡ)分离纯化的技术要求高,操作繁琐,不易掌握,开展的单位很少。本文综合国内外相关技术特点,反复改良、摸索,成功分离培养出高产量、高纯度和高活力的胎鼠 AECⅡ,现介绍如下。

作者介绍:付红敏(1974-),男,主治医师,博士,研究方向:高氧肺损伤。
通讯作者:许 峰,男,教授,E-mail: xufeng9899@yahoo.com.cn
基金项目:国家自然科学基金面上项目(30670931);重庆市自然科学基金(CSTC,2006BB5035)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年 SD 大鼠购自第三军医大学大坪医院实验动物中心,雌雄按 1:1 合笼交配,次日晨查找阴栓,找到阴栓日计为妊娠第 1 d。孕期满 19 d 时,行剖宫产术取出胎鼠。

1.2 主要试剂和设备

胰蛋白酶（美国 BBI 公司）；*DNase* Ⅰ（北京鼎国生物技术有限责任公司）；胶原酶Ⅰ（sigma 公司）；DMEM/F12 培养基（美国 Gibco 公司）；D-Hanks 液、特级胎牛血清（天津 TBD 公司）；进口羊血清工作液及山羊抗兔 IgG/FITC（北京中杉金桥）；兔 SPC 多克隆抗体（santa cruz 公司）；CO_2 培养箱（Therm For-ma，美国）；HITACHI-600 透射电镜（日本日立公司）；XDL-1B 型倒置显微镜（重庆光电仪器总公司）；荧光显微镜（BX51 型，olympus 公司）；台式低速离心机（上海）；Image Pro-Plus 5.1 图像分析系统（Media Cybernetics 公司）。

1.3 胎鼠 AECⅡ的原代分离、纯化与培养

孕 19 d 大鼠，用 10%水合氯醛 1 ml/100 g 腹腔注射麻醉，无菌条件下剖宫取出胎鼠，分离胎肺，置于预冷 D-Hanks 液中，去除气管、支气管等非肺组织，清洗数次后将肺组织剪至 1 mm^3 大小，D-Hanks 混悬，0.25%胰酶洗组织块 1 次后，按每只胎鼠加入 0.25%胰酶 1.5~2 ml（含 0.04 g/L *DNase* Ⅰ），消化 20~30 min，完全培养基（含 10%胎牛血清的 DMEM/F12）终止消化，振荡后经 100 目和 300 目筛网过滤，滤液800~1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀用完全培养基重悬，离心后加入 0.1%的胶原酶Ⅰ继续消化 15 min，终止消化后离心，沉淀重悬，按（1～2）×10^7 个 /ml 接种在玻璃培养瓶，培养 30~40 min 后贴壁的为成纤维细胞，未贴壁的为肺泡上皮细胞，吸出培养液，离心，沉淀重悬后继续贴壁，重复 3 次。最后未贴壁的细胞按浓度 1×10^6 个 /ml，接种至 6 孔培养板，置于 37℃ 5%CO_2 培养箱培养 24 h 后换液，弃除未贴壁的细胞，此时贴附在瓶底的细胞即为纯的 AECⅡ细胞。

1.4 胎鼠 AECⅡ的鉴定

1.4.1 台盼蓝染色判断细胞活力 取接种到 6 孔培养板时的细胞悬液 200 μl 稀释至 800 μl，再加 200 μl 0.4%台盼蓝溶液，充分混匀。取上述细胞悬液少许滴于血球计数仪，覆以盖玻片，低倍镜计数 400 个细胞，其中蓝染细胞为死细胞，拒染细胞为活细胞。

1.4.2 改良巴式染色 PBS 洗板 2 次、风干，加入苏木精溶液孵育 4~5 min，蒸馏水漂洗 2～3 次，碳酸锂溶液中孵育 2 min，蒸馏水漂洗 1 次，梯度脱水（50%乙醇×90 s→80%乙醇×15 s→95%乙醇×15 s→100%乙醇×30 s）、透明（二甲苯/无水乙醇的 1:1 混合液×30 s→二甲苯×60 s）。光镜下分类，AEC 细胞特征是胞浆内含丰富的深色颗粒，颗粒周围有白晕。计数 400 个细胞，计算 AEC 细胞的百分比。

1.4.3 透射电镜鉴定 培养 24 h 的细胞予 0.25%的胰酶消化收集，完全培养基终止消化，离心，磷酸盐缓冲液（PBS）清洗后，向沉淀加入 4%戊二醛，并继续予 1%锇酸行后固定，按常规电镜样品制备程序脱水、渗透、包埋、超薄切片、铀铅染色，HITACHI-600 透射电镜观察细胞内特征性的嗜锇板层小体。

1.4.4 免疫荧光技术检测 AECⅡ中表面蛋白 C（Surfactant protein C，SPC）的表达 将 AECⅡ细胞按密度 1×10^6 接种于预先放置盖玻片的 6 孔板内，培养 24 h 后取出盖玻片，PBS 洗涤 2 次，丙酮固定 15 min，PBS 冲洗 5 min×3 次，小羊血清封闭，滴加 1:200 稀释的兔抗鼠 SPC 一抗，4℃过夜，PBS 冲洗后，滴加 1:200 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗，室温避光孵育 2 h，PBS 洗涤 3 次，50%缓冲甘油封片，荧光显微镜观察照相，以胞浆出现绿色荧光为 AECⅡ阳性细胞，镜下数 400 个细胞，计算阳性细胞百分比。

2 结 果

2.1 倒置相差显微镜观察原代培养胎鼠 AECⅡ细胞生长变化

形态学观察发现，19 d 胎鼠 AECⅡ体外培养 15 h 左右贴壁生长，呈多边形或立方形岛状生长，透亮度高，细胞之间连接紧密，胞核明显，胞浆内有大量反差明显的细小颗粒（图 1）。培养 24~36 h 后细胞接近融合，细胞内出现空泡，为部分板层小体排出现象。培养 72 h 后，AECⅡ细胞形态逐渐发生变化。

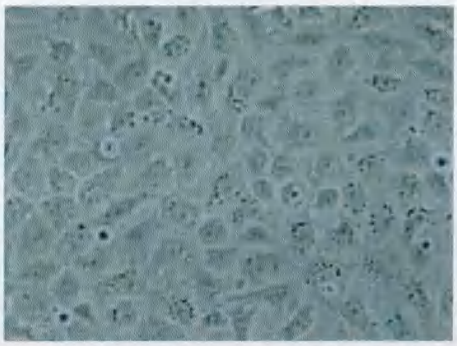


图 1 培养 24 h 的胎鼠 AECⅡ细胞，呈岛状生长 相差显微镜（×250）

2.2 细胞产量和纯度

每 3~5 只 19 d 胎龄胎鼠肺组织可分离获得 AECⅡ细胞数平均为（36±5）×10^6 个，台盼蓝拒染法检测接种细胞的活力为 98%±2%。原代培养 24 h 左右行改良巴式染色，镜下观察可见胞质内含较多深色颗粒，此为 AECⅡ细胞，占全部细胞的 96%±3%，如图 2 所示。

2.3 电镜观察

透射电镜下可见 19 d 胎鼠 AECⅡ体积较大，胞浆内有特征性嗜锇板层小体，呈黑色，数量不等，细胞膜上有明显的微绒毛，如图 3 所示。

2.4 免疫荧光鉴定 AECⅡp SPC 的表达

AECⅡ胞浆中的 SPC 呈现绿色荧光，主要沿核周分布，荧光强弱不等，表达绿色荧光的细胞占全部细胞的比例为 96%以上，如图 4 所示。

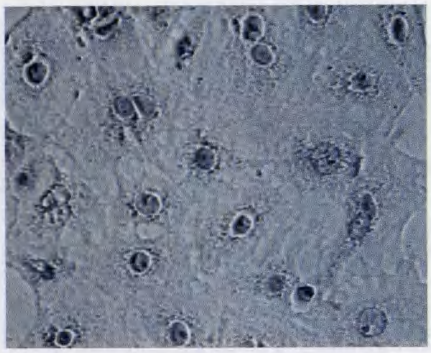


图 2　改良巴氏染色 AECⅡ细胞质内有较多细小的深色颗粒（普通显微镜×400）

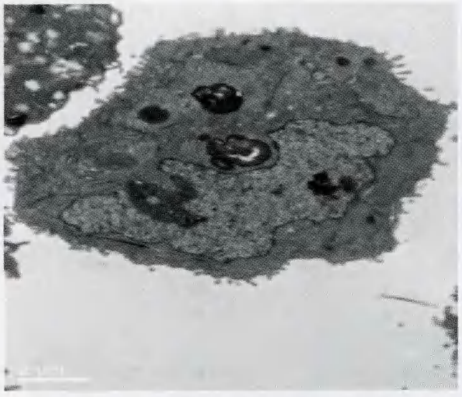


图 3　AECⅡ透射电镜观察胞浆有黑色的板层小体，胞膜上有微绒毛（×7 000）



图 4　免疫荧光染色：AECⅡ胞浆中 SPC 呈绿色荧光（荧光显微镜 ×200）

3　讨　论

AECⅡ具有分裂增殖、合成和分泌以及转分化等多种功能，被认为是肺上皮的干细胞，在肺发育和损伤修复过程中有重要作用[1]。与人及其它哺乳动物一样，大鼠胎肺发育成熟须经历 5 个阶段：胚胎期、假腺期、小管期、囊泡期和肺泡期。孕 19~20 d 胎鼠肺发育处于囊泡期阶段，与人 27~34 周胎儿的肺发育进程类似。此期的细胞成份以 AECⅡ和成纤维细胞为主，细胞生长活跃，表面活性物质逐渐成熟，并开始形成少量的肺泡[2]。因此，从 19~20 d 胎鼠肺组织分离 AECⅡ时产量大，纯度高，易于分离纯化，且其生物学特点符合对晚期胎儿肺发育以及新生儿肺部疾病研究的需要。

要得到 AECⅡ，首先要将肺组织消化成单细胞悬液。常用的消化酶有胰蛋白酶、弹性蛋白酶和胶原酶等。国外大多选用弹性蛋白酶，其优点是对细胞损伤小，功能影响不大，但由于弹性蛋白酶价格昂贵，不易获得，在国内很难推广使用[3]。我们选用胰蛋白酶和胶原酶联合消化的方法，先将剪碎的胎肺组织在 37℃消化 25~30 min，使肺组织中的细胞大部分脱落，但此时成纤维细胞较多，AEC 数量少，大多 AECⅡ仍未分散，继续用胶原酶消化 15 min，此步可将肺上皮细胞绝大部分分散成单细胞悬液。

消化下来的多种细胞成份须进行纯化以获得高纯度的 AECⅡ。常用的 AECⅡ纯化方法有差速离心法、差速贴壁法、流式细胞仪分离法等。根据胎肺组织中的细胞成份特点，本实验参照 Thome 和 Buckley 的方法，采用差速离心和差速贴壁法来纯化 AECⅡ[4-6]。利用 AECⅡ和成纤维细胞之间的比重差异，当转速在 800 ~1 000 r/min 时，可使部分成纤维细胞不能沉淀，以此去除少量的成纤维细胞；根据成纤维细胞贴壁时间短（培养 30~40 min 就能贴壁）的特点，将细胞悬液反复贴壁，使 AECⅡ进一步纯化。最后培养 24 h 后换液，可去除掺杂的红细胞、淋巴细胞及其它未贴壁细胞，此时瓶底生长的细胞即为纯化后的 AECⅡ。每 3~5 只胎鼠经纯化后可获得细胞数为 $(36\pm5)\times10^6$ 个，台盼蓝染色证实细胞活力在 98%以上。

鉴定 AECⅡ的方法主要有电子显微镜法、特殊染色法及单克隆抗体技术等，其中以电镜下观察到胞质内特征性的板层小体作为鉴定 AECⅡ的金标准[7,8]。本实验分离纯化的细胞经透射电镜鉴定均可见到板层小体，改良巴氏染色可见 96%以上的细胞胞浆内含丰富的深色颗粒，这些颗粒即为 AECⅡ的板层小体。SPC 仅在 AECⅡ上表达，是 AECⅡ特异的分化标志物，可用来鉴定 AECⅡ[9]。本实验用免疫荧光技术检测了 SPC 的表达，发现最后贴壁的细胞表达 SPC 绿色荧光的占 96%以上，纯度与 Buckley S 的研究相一致[5]。

AECⅡ体外培养要经历 3 个自然过程：贴壁生长期、对数生长期和退化期，整个过程持续 10 d 左

右。本实验观察到胎鼠 AECⅡ在培养第 24~72 h 内处于最佳生长状态,此时适于做体外研究。随着培养时间延长,AECⅡ会逐渐变大,外形扁平,并表达一些Ⅰ型细胞的生物学标志[10,11]。由于这种特殊的生物学特性,AECⅡ不适合做长时间体外研究,亦不能传代或形成细胞株以供使用,给研究工作带来诸多不便。

总之,我们通过上述方法从胎鼠分离出了高产量、高纯度的 AECⅡ,该方法易于掌握,价格不贵,缺点是耗时长,每次需 6~7 h 才能完成,故应严格注意无菌操作,以防污染并最好低温下进行,避免细胞在体外时间过长而导致活力下降。

参 考 文 献

[1] 柳琪林,胡 森,盛志勇.肺泡Ⅱ型上皮细胞形态与功能的研究进展[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(7):445-446.

[2] Copland I, Post M. Lung development and fetal lung growth[J]. Paediatr Respir Rev, 2004, 5 (SA): 259-264.

[3] Lei J, Wendt C H, Fan D, et al. Developmental acquisition of T3-sensitive Na-K-ATPase stimulation by rat alveolar epithelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(1): 6-14.

[4] Thome U H, Davis I C, Nguyen S V, et al. Modulation of sodium transport in fetal alveolar epithelial cells by oxygen and corticosterone[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 284(2): 376-385.

[5] Buckley S, Driscoll1 B, Shi1 W, et al. Migration and gelatinases in cultured fetal, adult, and hyperoxic alveolar epithelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(2): 427-434.

[6] 赫 嘉,李永旺,肖颖彬. 大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞体外培养和鉴定[J]. 第三军医大学学报,2000,22(5):500-501.

[7] Mason R J. Biology of alveolar type Ⅱ cells[J]. Respirology, 2006, 11 Suppl: 12-15.

[8] 符跃强,许 峰,卢仲毅,等.氧化应激对肺泡Ⅱ型上皮细胞的损伤作用及 JNK 信号转导机制[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(11):1150-1153.

[9] Hamvas A, Cole F S, Nogee L M. Genetic disorders of surfactant proteins[J]. Neonatology, 2007, 91(4): 311-317.

[10] Wang J, Wang S, Manzer R, et al. Ozone induces oxidative stress in rat alveolar type Ⅱ and type I-like cells[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40 (11): 1914-1928.

[11] Gonzale Z R, Yang Y H, Griffin C, et al. Freshly isolated rat alveolar type I cells, type Ⅱ cells, and cultured type Ⅱ cells have distinct molecular phenotypes[J]. Physio Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(1): 179-189.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》对一稿两投和重复发表问题处理的声明

为维护本刊的声誉和广大读者的利益,尊重审稿专家和编辑工作者的劳动,坚决杜绝学术不端行为,我刊编辑部在加强稿件初审和刊用前查重工作的基础上,受编委会的委托,就一稿两投和重复发表问题的处理声明如下:

1. 凡属原始研究的报告,同语种一式两份(或多份)投寄不同的杂志,或主要数据和图表相同、只是文字表达可能存在某些不同之处的两篇文稿,分别投寄不同的杂志,属一稿两投;一经两个(或多个)杂志刊用,则为重复发表。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志,以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一种杂志,不属一稿两投。但作者若要重复投稿,应向本刊及相关期刊编辑部作出说明。

2. 作者在接到收稿回执后满 3 个月未接到退稿通知,表明稿件仍在处理中,若欲投他刊,应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或重复发表嫌疑时,我们将认真收集有关资料并仔细核对后通知作者,在作出处理决定前请作者就此问题作出书面解释。若作者对编辑部的认定和处理有异议,可书面申诉,由编辑部上报校学术规范委员会进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实,立即退稿,由供稿编辑书面通知作者退稿原因给予警示;对该作者作为第一作者及通讯作者所撰写的论文,5 年内拒绝在本刊发表;供稿编辑汇总该文稿所有材料,就处理情况提交书面报告,编辑部留存备案。

重复发表一经证实,将择期在期刊中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告;对该作者作为第一作者及通讯作者所撰写的论文,5 年内拒绝在本刊发表;向作者所在单位科研管理部门和相关期刊通报情况。

特此声明。

本刊编辑部

2009 年 5 月