DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.007
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
1242 2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)14-1242-03

# 大鼠肺泡和间质巨噬细胞的形态功能差异

张 伟[1],蒋耀光[2],郭德玉[3],胡承香[4],李 磊[4] (第三军医大学:[1]西南医院心胸外科,重庆 400038,[2]大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042,[3]西南医院病理科,重庆 400038,[4]大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要:目的 观察正常大鼠肺泡与间质巨噬细胞形态结构及吞噬功能差异。方法 支气管肺泡灌洗获取肺泡巨噬细胞,肺组织机械处理结合酶消化法(DNA酶、胶原酶)分离间质巨噬细胞;电镜下比较两种细胞的形态、结构差异,并以无色孔雀绿显色法比较两种细胞吞噬功能以及LPS攻击对它们的不同影响。结果 肺内两种巨噬细胞亚群在形态、结构上有明显不同;在功能上,肺泡巨噬细胞的吞噬能力显著强于间质巨噬细胞,体外复合LPS攻击能明显增强间质巨噬细胞的吞噬能力,而肺泡巨噬细胞未受影响。结论 肺内两种巨噬细胞亚群间存在异质性,肺间质巨噬细胞不应被单纯看作是肺泡巨噬细胞的前体细胞。

关键词:肺泡巨噬细胞;间质巨噬细胞;LPS;电镜;吞噬功能
中图法分类号:R322.35;R392.12 文献标识码:A

# Functional and morphological differences between rat alveolar and interstitial macrophages

ZHANG Wei[1], JIANG Yao-guang[2], GUO De-yu[3], HU Cheng-xiang[4], LI-Lei[4] ([1]Department of Thoracic Surgery, Southwest Hospital, [2]Thoracic Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [3]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Chongqing 400038, [4]State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To observe the difference of morphology and phagocytosis between alveolar macrophages (AMs) and pulmonary interstitial macrophages (IMs). Methods AMs were collected by lung lavage and IMs by treatment of the lung tissue with DNAse and collagenase. The two cell populations were analyzed with respect to morphology by transmission electron microscopy, and the variation of these macrophages of phagocytosis were tested by malachite green colorimetry. Results There were great differences in morphology between AMs and IMs. The phagocytosis of AMs was much stronger than that of IMs. Conclusion There is functional and morphological heterogeneity between AMs and IMs. IMs should not be regarded as the precursors to AMs.

**Key words**: pulmonary macrophage; electron microscope; phagocytosis; rat

巨噬细胞来源于骨髓单核细胞系列,血中单核细胞移行进入肺组织成为间质巨噬细胞(IM),进一步发育至终末期肺泡巨噬细胞(AM)。因此,IM常被看作是一个细胞发育期间的中间物[1]。但最近有资料表明,肺泡和间质巨噬细胞是肺内最重要的两个巨噬细胞亚群,正常情况下两者存在明显的异质性,表现在形态、结构、功能及表型等方面[2];另一方面,肺内巨噬细胞在抵抗病原微生物的入侵中具有极为重要的地位,而在抗感染的免疫防御反应中,其吞噬杀菌活性是其最基本的功能。目前由于IM取材困难,使得大部分的研究局限于AM。为此,本研究在建立了这两种细胞分离纯化方法的基础上,观察它们在形态、结构及功能上的差异,为进一步研究肺内巨噬细胞亚群间的异质性提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

健康雄性Wistar大鼠20只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量150~200 g。腹腔注射20%乌拉坦(1 mg/kg)麻醉,麻醉前动物自由饮水进食。

### 1.2 肺泡巨噬细胞(AM)与间质巨噬细胞(IM)的分离培养[3]

正中切开胸腔,充分暴露心肺,经右心室将一导管插入主肺动脉并固定,于肝脏上方切断主动脉。活体状态下迅速将4 ℃冷PBS经导管注入肺血管床,反复灌洗5~8次,速度为20 ml/min,直到肺表面呈苍白色胶冻状。从胸腔取出气管及肺脏,PBS(无$Ca^{2+}$、$Mg^{2+}$,pH 7.4,37 ℃)行支气管肺泡灌洗,反复15

基金项目:全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA167)
Supported by the "Tenth Five-year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (01MA167)
作者简介:张 伟(1966-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事创伤免疫方面的研究。电话:(023)68765330
通信作者:李 磊,电话:(023)68757431
收稿日期:2003-11-26;修回日期:2004-02-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

~20 次, 直到镜下偶见肺泡巨噬细胞。将灌洗后的肺组织剪碎至 1 $mm^3$ 以下, 加入 20 ml 酶消化液中(含胶原酶Ⅳ140 U/ml, DNAseⅠ 50 U/ml), 在 37 ℃恒温震荡水浴箱中消化 60 min, 200 目钢网过滤。肺泡灌洗液用酶消化液作同样处理。将收集到的灌洗液及组织消化液分别离心 1 000 r/min, 10 min, RPMI1640 培养基重悬, 于 37 ℃、5% $CO_2$、饱和湿度条件下孵育 2 h, 洗去未贴壁细胞; 台盼蓝染色, 贴壁细胞存活率> 99%。

### 1.3　巨噬细胞纯度鉴定

以巨噬细胞特异性 ED1 单克隆抗体行免疫组化鉴定巨噬细胞及计算纯度。

### 1.4　透射电镜标本制备

电镜样本取材, 2.5%戊二醛磷酸缓冲液固定, 1%锇酸后固定, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂 812 包埋, 醋酸钠和柠檬酸铝双染, JEM 1200 电镜观察, 测定细胞直径、核浆比。

### 1.5　吞噬功能测定

将制备好的细胞悬液 1 ml(细胞浓度为 1× $10^5$/ml)加入 24 孔培养板中, 加入 0.1 ml/孔 RPMI1640 完全培养液[分 LPS(－)组及 LPS(＋)组, LPS 终浓度为 100 ng/ml], 继续培养 2 h, 再加入 0.1 ml/孔绵羊红细胞悬液(1× $10^8$ 个/ml)作用 40 min, 倾去上清, PBS 洗涤两次, 然后加入 1 ml 无色孔雀绿显色液, 室温作用 20 min。取 100 μl 反应液转入 96 孔微培养板内, 于 620 nm 波长下比色, 检测各孔 $A$ 值。

### 1.6　主要仪器和试剂

酶标仪(MODEL450, BIO-RAD, USA), LPS(Escherichia coli. O111:B4)、胶原酶和 DNAse 购自 Sigma 公司, RPMI 1640 购自 Hyclone 公司。

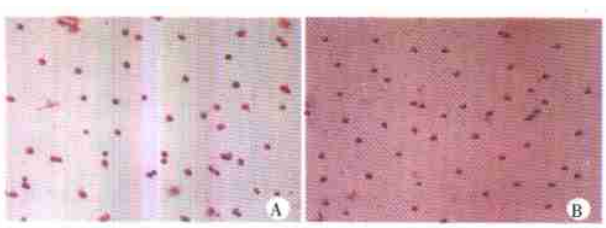
### 1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, SPSS10.0 统计软件行 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　光镜观察

光镜下, 肺泡灌洗液获取的样本中 99% ~ 100% 为 AM; 机械方法处理后的肺组织, 经酶消化后仍可获取大量细胞, 细胞种类繁多, 包括巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞和淋巴细胞等, 贴壁纯化后, 经免疫组化证实 IM 的纯度为 90%以上。光镜下见 AM 直径较大, 大小不一, 细胞可呈圆形、椭圆形或不规则形, 而 IM 体积明显小于 AM, 形态均一, 多为圆形。HE 染色 AM 胞质呈浅粉红色, 细胞核呈肾形或卵圆形, 偏向胞浆一侧, 核质较松散, 胞核小; IM 胞浆呈绛红色, 胞核呈圆形或半圆形, 占据胞浆绝大部分, 核质深染致密(图 1)。



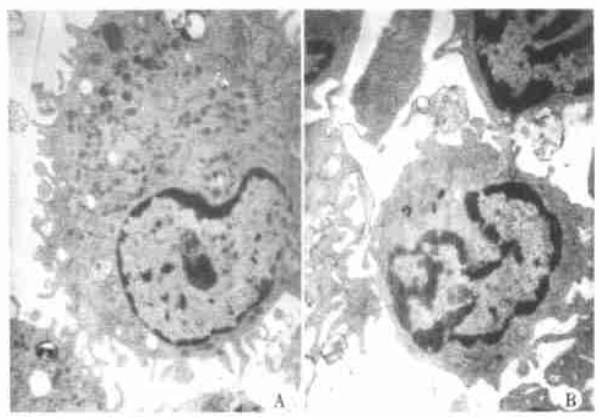

A: Alveolar macrophages; B: Interstitial macrophages

图 1　肺巨噬细胞光镜观察　(HE× 100)

**Fig 1　Pulmonary macrophages under microscope**　(HE× 100)

### 2.2　电镜观察

图 2 显示, 与 AM 相比, IM 细胞表面较光滑, 几乎没有突起, 胞浆内含有很少的初级、次级 溶酶体, 核内异染色质丰富, 其细胞直径为(9.3±1.1)μm, 显著小于 AM (12.1±1.16)μm, 两者相比有非常显著性意义($P$< 0.01); IM 的核占有细胞较大部分, 核浆比为 0.87±0.038, AM 为 0.23±0.025, 两者相比差异非常显著($P$< 0.01)。




A: Alveolar macrophages; B: Interstitial macrophages

图 2　肺巨噬细胞电镜观察　(TEM× 5 000)

**Fig 2　Pulmonary macrophages under transmission electroscope**　(TEM× 5 000)

### 2.3　吞噬功能比较

AM 吞噬功能明显强于 IM, 两者相比有显著差异; 体外复合 LPS 攻击能明显增强间质巨噬细胞的吞噬能力($P$< 0.05), 而肺泡巨噬细胞未受影响(表 1)。

表 1　AM 与 IM 的功能比较($A$, $\bar{x}\pm s$)

**Tab 1　Comparison of phagocytosis between AM and IM ($A$, $\bar{x}\pm s$)**

| G($n$= 10) | LPS(－) | LPS(＋) |
|---|---|---|
| AM | 0.073 5±0.002 7 ** | 0.077 2±0.003 8 |
| IM | 0.027 5±0.002 1 | 0.036 8±0.004 0△ |

**: $P$< 0.01, *vs* IM; △: $P$< 0.05, *vs* LPS(-)

## 3　讨论

肺巨噬细胞按照不同的解剖位置可分为若干亚群, 最大的两个亚群是 AM 与 IM。AM 位于气道和肺泡内, 易于从肺泡灌洗液中获得, 是呼吸道非特异性防御反应的第一道防线, 能有效地溶解、吞噬水溶性差的有机颗粒, 释放炎症介质, 提呈抗原, 表达不同的膜受体, 是重要的杀微生物效应细胞[4]。IM 位于肺间质内, 在局部免疫防御中发挥作用, 是重要的免疫功能调节细胞[5]。肺组织由于在解剖上存在免疫分隔(immunologic compartmentalization), AM 与 IM 分别反映肺泡炎与间质炎。由于 IM 分离方法复杂, 获取较困难, 使大

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

部份研究局限于AM，有关IM的研究资料报道很少[6]。但仅对AM免疫功能的研究不能真实反应整体肺的免疫状态，甚至有时可能会得出错误的结论[7]。近几年国外对这个细胞越来越重视，对它的研究越来越多。最近研究提示在表型方面，两者有所不同，AM表面高表达CD45和CD71，而IM表面表达的MHC-Ⅱ及CD54却比AM高[3]；而且IM可能在肺损伤中具有更重要作用，与AM相比，尽管产生的反应性氧代谢产物(ROI)、TNF-α和NO量相对较少，但IM存在于肺间质中，它所释放的细胞毒性介质和炎症介质能更直接引起肺组织损伤[7]。

许多细胞有相互交叉的生物学特性，获取高纯度的单一细胞群是研究细胞生物学行为的基本手段。IM的分离是一项困难的工作，它在整个肺组织中仅占各种细胞总数的3%～5%。既往多以单纯机械分离方法获取IM，其数量及纯度均不能满足对功能分析要求的条件。近年来，IM的分离逐渐采用机械分离加酶消化的方法，通过耗竭性灌洗支气管肺泡及肺血管床，能充分去除AM及血内单核细胞，纯化后IM纯度可达90%以上，且IM中AM的混杂率低于5%[8]。我们的结果显示，肺泡灌洗液获取的样本中99%～100%为AM；机械方法处理后的肺组织，经酶消化后仍可获取大量细胞，细胞种类繁多，包括巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞和淋巴细胞等，贴壁纯化后，经免疫组化证实IM的纯度为90%以上。病理证实，AM体积明显大于IM，形态具多形性，而IM形态较均一，细胞核占据细胞较大部分，核内异染色质丰富；AM细胞表面突起较多，胞浆内含有较多的溶酶体，两者在形态及结构上的不同决定了两者在功能上的差异。

巨噬细胞是体内最重要的免疫效应及吞噬细胞之一，专司吞噬销毁入侵的病原体、异物、自身衰颓死亡的细胞及代谢产物，其趋化、吞噬在启动和诱导免疫反应过程中起着承上启下的关键作用[9]。因此，吞噬是巨噬细胞最基本的功能。研究显示，AM吞噬异物的能力强于IM，两者相比差异显著。Fathi等[10]研究显示，IM粘附微粒的能力弱于AM，推测与其体积小、细胞表面光滑有关，这与我们的结果类似；另外，AM细胞内含有丰富的溶酶体，这些因素可能是导致这两类巨噬细胞亚群吞噬能力显著不同的重要因素。实验结果还提示，体外复合LPS刺激后能进一步增强IM的吞噬功能，但AM未受LPS攻击的影响。LPS是革兰阴性细菌细胞壁重要组成部分，是巨噬细胞的重要激活剂。Wizemann[11]证实大鼠体内注射LPS后，吞噬绵羊红细胞的细胞总数和单个巨噬细胞的吞噬量均增加，而AM没有显著变化，这与我们结果类似。另外，从细胞的发生学看，AM为巨噬细胞的终末期，而IM可能是血单核细胞发育为AM的中间物，两者对LPS的反应不同是否与其受激活化空间的差异相关，值得进一步探讨。不仅如此，我们的后续研究还显示AM与IM在抗原提呈、分泌细胞因子等其他免疫功能方面也存在差异，因此，IM并不单纯是AM的前体细胞。

总之，巨噬细胞亚群间在形态、结构及功能等方面存在异质性，这种异质性决定了它们在机体免疫反应过程中所发挥的不同作用。AM与IM是肺组织内最为重要的两类巨噬细胞亚群，目前有关IM的研究报道较少，进一步加深对IM的研究，有助于更深地认识在不同刺激因素下肺组织内产生不同免疫反应变化的机制。

参考文献：


[1] Sebring R J, Lehnert B E. Morphometric comparisons of rat alveolar macrophages, pulmonary interstitial macrophages and blood monocytes[J]. Exp Lung Res, 1992, 18(4): 476－496.

[2] Ravasi T, Wells C, Forest A, *et al*. Generation of diversity in the innate immune system: macrophage heterogeneity arises from gene-autonomous transcriptional probability of individual inducible genes[J]. J Immunol, 2002, 168(1): 44－50.

[3] Johansson A, Lundborg M, Skold C M, *et al*. Functional, morphological, and phenotypical differences between rat alveolar and interstitial macrophages[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 16(5): 582－588.

[4] Lohmann-Matthes M L, Steinmüller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages[J]. Eur Respir J, 1994, 7(9): 1678－1689.

[5] Zetterberg G, Elmberger G, Johansson A, *et al*. Rat alveolar and interstitial macrophages in the fibrosing stage following quartz exposure[J]. Hum Exp Toxicol, 2000, 19(7): 402－411.

[6] Prokhorova S, Lavnikova N, Laskin D L, *et al*. Functional characterization of interstitial macrophages and subpopulation of alveolar macrophages from rat lung[J]. J Leukocyte Boil, 1994, 55(2): 141－146.

[7] Steinmüller C, Franke-Ullmann G, Lohmann-Matthes M L, *et al*. Local activation of nonspecific defense against a respiratory model infection by application of interferon-γ. Comparison between rat alveolar and interstitial lung macrophages[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22(4): 481－490.

[8] Sjöstrand M, Absher P M, Hemenway D R, *et al*. Comparison of lung alveolar and tissue cells in silica-induced inflammation[J]. Am Rev Respir Dis, 1991, 143(1): 47－52.

[9] 李 磊，王正国，胡承香，等. 创伤血清异常蛋白对巨噬细胞功能作用的研究[J]. 中国危重病急救医学，1998，10(8)：494－496.

[10] Fathi M, Johansson A, Lundborg M, *et al*. Functional and morphological differences between human alveolar and interstitial macrophages[J]. Exp Mol Pathol, 2001, 70(2): 77－82.

[11] Wizemann T M, Laskin D L. Enhanced phagocytosis, chemotaxis, and production of reactive oxygen intermediates by interstitial lung macrophages following acute endotoximia[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994, 11(3): 358－365.


（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net