乳动物细胞均具有机械感受功能——即将力学刺激转变为细胞内的电化学信号的机制[4]，但目前对于细胞机械感受器或称机械受体的本质了解甚少。90年代以来，国外在模拟装置研究方面有较大进展[2]，但其仪器价格昂贵。

我们参照国外报道自行设计建立了一套培养细胞牵张刺激装置，即可作细胞线性拉长实验，也可作球面牵张。与国外装置比较，该装置结构简单，制作方便，不仅价格低廉，而且操作定量化。初步应用表明，模拟心脏生理情况的20%牵张对培养细胞贴壁及存活均无影响，而且证实这种牵张刺激可显著诱导心肌细胞蛋白质合成(即心肌细胞肥大反应)和成纤维细胞的增殖反应。该装置为一次性静态牵张，若需进一步改为循环牵张，只需加装一个负压发生器和时间控制电路即可达到目的。

关键词：牵张刺激；细胞培养

中图法分类号：R-331 文献标识码：B

参考文献：

[1] Vandenburg H H, Kaufman S. *In vitro* model for stretch-induced hypertrophy of skeletsl muscle[J]. Science, 1979, 203(4 377): 265-268.

[2] Banse A J, Gilbert J, Taylor D. *et al*. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells *in vitro*[J]. J Cell Sci, 1985, 75(1): 35-42.

[3] Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines[J]. Circ Res, 1982, 51(6): 787-801.

[4] 冯 兵. 心肌肥大的细胞外信号机制[J]. 心血管病学进展, 1997, 18(1): 24-26.

(编辑 薛国文)

技术方法

文章编号：1000-5404(2000)05-0500-02

大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞体外培养和鉴定

Culture and identification of rat alveolar type Ⅱ cell *in vitro*

郝 嘉[1]，李永旺[2]，肖颖彬[1] (第三军医大学附属新桥医院：[1]心血管外科；[2]麻醉科，重庆 400037)

提 要：目的 建立大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(简称AT-Ⅱ)的改良体外原代培养法，并比较其鉴定方法的优劣。方法 AT-Ⅱ分离、用胰蛋白酶消化法并用IgG包被的培养瓶粘附纯化，原代培养后通过鞣酸多彩、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)、肺表面活性物质相关蛋白A(SP-A)免疫组化三种染色法和电镜鉴定AT-Ⅱ。结果 胰酶消化加IgG粘附纯化后所得的AT-Ⅱ纯度为90%，AKP染色鉴定最好。结论 采用IgG粘附纯化能提高AT-Ⅱ纯度，AKP染色简便实用。

AT-Ⅱ对维持正常的肺功能发挥着极重要的作用。体外培养AT-Ⅱ是研究其特性的重要手段，由于它培养后表型丧失快，基本不传代，并且培养难度较大，不易获得较高纯度，故本研究采用一种改良方法培养并比较了四种鉴定方法的优劣。

1 材料和方法

1.1 原代培养

参照Dobbs[1]的方法加以改进。Wistar大鼠麻醉、抗凝，气管插管，放血活杀。经肺动脉用溶液Ⅱ(液Ⅰ、Ⅱ配法见文献[1])灌洗肺，气管通气8次，用溶液Ⅰ、Ⅱ分别经气管插管灌洗肺，用溶液Ⅱ灌洗胸腔。取出心肺、气管，经气管插管注入0.25%胰蛋白酶20 ml，37℃水浴20 min。去大气道、心脏，在含有4 ml DNase的小烧杯中剪碎肺。5 ml小牛血清灭活胰酶，补足溶液Ⅱ20 ml后倒入烧瓶，37℃水浴并晃动5 min。120、200目滤网过滤，离心后弃上清，细胞重悬并计数。将悬液加入已用大鼠IgG包被的培养瓶中培养。1 h后倒出培养液，离心后弃上清，取少量细胞行电镜鉴定。培养23 h换培养液。

1.2 细胞鉴定

1.2.1 鞣酸多彩染色 参照Mason等[2]的方法略加改进：取出培养有AT-Ⅱ的盖玻片，PBS冲洗，1.5%戊二醛固定15 min，PBS(pH 6.8)冲洗2次，1%锇酸(校电镜室)固定1.5 h，PBS(pH 6.8)冲洗2次，1%鞣酸中过夜，用PBS(pH 6.8)和水各洗涤2次，将蓝染液(蓝染液和红染液配法见文献[2])与水按1∶4稀释后染色8 s。1% NaOH洗涤30 s，红染液染色2 s，酸乙醇液洗涤3次，用红染液染2 s，水洗3次，干燥后封片。

1.2.2 AKP染色 参照Cunningham等[3]的方法略加改进：

作者简介：郝 嘉(1973-)，男，四川省荣县人，硕士研究生，医师，助教，主要从事体外循环肺保护方面的研究。电话：(023)65218768

收稿日期：1999-10-05；修回日期：2000-01-03

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

取出盖玻片后用 TBS 液洗涤 5 min× 4 次; 在 1 mlTBS 浓缩缓冲液中加 20 μl BCIP/NBT 显色盒(博士德公司)并混匀, 待标本风干后加至标本上, 室温避光显色 20 min, 水洗后核固红复染 1 min, 梯度脱水, 干燥封片。

1.2.3　肺表面活性物质相关蛋白 A(Pulmonary surfactant A, SP-A)免疫组化染色　　按中山公司 SP 免疫组化试剂盒说明书操作, SP-A 抗体浓度为 1∶800(美国 Sheldon I. Feinsein 教授惠赠)。

1.2.4　电镜　　用 3%戊二醛固定细胞后行透射电镜检查。

2　结果

2.1　细胞产量、纯度

原代培养 AT-Ⅱ可收获 3× 10^7 个/鼠, 纯度可达 90%。

2.2　细胞鉴定

鞣酸多彩染色、AKP 染色和 SP-A 免疫组化染色结果见图 1、2。



图 1　培养 5 d 的 AT-Ⅱ　(鞣酸染色×400)
可见不均匀地分布在核周的大小不一的褐色的嗜锇小体(板层小体), 细胞聚集成小岛状

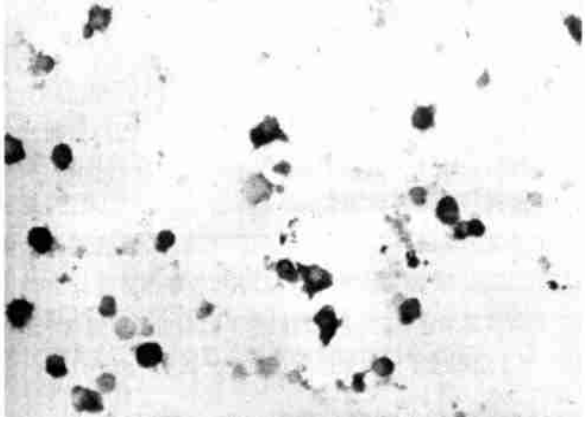


图 2　培养 2 d 的 AT-Ⅱ　(AKP 染色×400)
胞浆中有较多分布不均, 大小不一的蓝色颗粒

3　讨论

尽管国外对 AT-Ⅱ分离和培养的报道较多, 但国内此方面的工作仍较少。较常用的密度梯度离心法因细胞间密度重叠使细胞产量下降。我们的体会如下: ①使用 IgG 后细胞纯度可提高 10%, 产量提高 12%。由于 IgG 可与含 IgGFc 受体的淋巴细胞、肺泡巨噬细胞和中性粒细胞牢固结合, 因此绝大多数杂细胞被粘附清除。但此方法清除肺泡Ⅰ型细胞和支气管上皮细胞仍较困难; ②培养时用小牛或胎牛血清培养效果类似; ③有人在过滤肺剪碎块时先用四层纱布过滤[4], 然后用铜网过滤, 我们认为纱布吸收过多细胞悬液而造成细胞量损失, 本研究定做了 120、200 目不锈钢滤网, 效果好且易操作。鉴定方法少有使用 SP-A 免疫组化鉴定该细胞的报道[5]。电镜鉴定仍为最可靠方法, 但因其价格贵而应用受限。鞣酸多彩染色法最常用, 其嗜锇小体较为特异, 但 AM 也可着色, 且该法耗时长, 试剂繁多且价格与 AKP 染色相似。SP-A 免疫组化鉴定法为一种新颖的方法, 国内尚无类似报道。因 AT-Ⅱ中 SP-A 含量最多, 易于检出, 但该抗体来源困难, 故而推广受限。AKP 是Ⅱ型细胞分化的特异标志物, 也是膜标志酶。AKP 染色明显优点是耗时短, BCIP/NBT 显色盒还可在本实验的原位杂交中综合利用, 从而节约试剂, 值得推荐。

关键词: 大鼠; 肺泡Ⅱ型上皮细胞; 培养; 鉴定
中图法分类号: R329　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Dobbs L G, Gonzalez R, Williams M C. An improved method for isolating type Ⅱ cells high yield and purity[J]. Am Rev Respir Dis, 1986, 134(1): 141—145.

[2] Mason R J, Walker S R, Shields B A, *et al*. Identification of rat alveolar type Ⅱ epithelial cells with a tannic acid and polychrome stain[J]. Am Rev Respir Dis, 1985, 131(5): 786—788.

[3] Cunningham A C, Milne D S, Wilkes J, *et al*. Constitutive expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelials (type Ⅱ pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findings[J]. J Cell Sci, 1994, 107(Pt 2): 443—447.

[4] 崔社怀, 郭先健, 钱桂生. 鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的分离、鉴定和培养[J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(6): 548—550.

[5] 刘新民. 肺泡上皮 AT-Ⅱ研究进展[J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 1994, 14(2): 88—91.

(编辑　刘　鹏)

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