DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.027

经验交流

鼠肺泡II型上皮细胞的分离、鉴定和培养*

A modified method for isolating, identifing and culturing the alveolar typeII cells from rat lungs

崔社怀** (第三军医大学附属西南医院呼吸内科) 重庆, 400038
郭先健 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 400037

提 要 目的: 探讨肺泡II型上皮细胞的分离, 鉴定和培养。方法: 采用改良法(酶消化与碳铁颗粒相结合)、分离、鉴定和培养了肺泡II型上皮细胞。结果: 使用上述方法分离的肺泡II型上皮细胞, 经流式细胞仪、鞣酸染色和电子显微镜鉴定, 其纯度达70%以上。结论: 经改良法分离的肺泡II型上皮细胞, 可满足一般试验需求。

肺泡II型上皮细胞是肺脏的重要结构细胞, 一般认为具有修复已损伤的上皮细胞、合成与分泌表面活性物质的功能。资料表明, 肺泡上皮细胞损伤后, 若延迟修复, 可影响上皮细胞对肺胞壁成纤维细胞的抑制作用, 从而导致成纤维细胞增生。由于其具有合成、分泌、调节肺表面活性的功能, 因而与急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发病机理和治疗关系密切, 晚近颇受临床关注[1~2]。为了对急性肺损伤更深入了解, 探讨表面活性物质在急性肺损伤中的作用及机理, 我们分离、纯化并鉴定了大鼠肺胞II型上皮细胞, 并对其进行了初步观察。

1 材料与方法

主要参照 Dobbs和 Cunningham等[3,4]方法稍加修改。

1.1 肺泡II型上皮细胞的分离

雄性 Wistar大鼠 180~200 g, 腹腔内注射 3%戊巴比妥钠 10 mg/kg, 和肝素 400 u/kg, 气管切开并插管, 放血活杀。放入 75%乙醇 3~5 min, 在超净工作台中, 用溶液 I灌洗肺 8次(5毫升/次), 以除去肺泡巨噬细胞。(溶液 I: 140 mmol NaCl, 5 mmol KCl, 2.5 mmol磷酸氢钠缓冲液, 10 mmol HEPES, 6 mmol葡萄糖, 0.2 mmol EGTA, pH 7.4, 均用灭菌双蒸水配制, 使用时加热到37℃), 再用溶液II (组成: 溶液 I中加入 2.0 mmol $CaCl_2$, 1.3 mmol $MgSO_4$混匀, 使用时加热到 37℃)灌洗两次, 0.25%胰蛋白酶(DIF进口分装)和 0.1%胶原酶(美国, Sigma)的混合液灌注一次。快速取出肺脏, 放37℃静置 30 min, 充分消化, 除去气管和大气道。在含有 DNAse 250μg/ml, 总量 4 ml的溶液中将肺脏切成 1 mm^3小碎块片, 小牛血清灭活胰蛋白酶。切碎的肺组织小块倒入 250 ml三角烧瓶中, 溶液II 补足 20 ml/肺, 放入 37℃水浴晃动 130次/min, 约 5 min。悬液经过滤后, 放入 30 ml尖底离心管中, 400× g离心 8~10 min, 弃上清。用 RPMI-1640培养液重悬。

1.2 肺泡II型上皮细胞的纯化

RPMI-1640培养液重悬的混合细胞液加入 0.5 g碳铁颗粒(Carbonyl iron) 37℃孵育 1 h, 放在磁力搅拌器上, 除去巨噬细胞。0.4%台盼蓝染色, 判断细胞活力。用 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM·GIBCO)培养基培养, 含 10%小牛血清, 2 mmol谷氨酰胺, 10 mmol HEPES, 100 U/ml青霉素, 100μg/ml连霉素等添加剂。细胞密度为(20~30)× 10^6/皿, 10% CO_2培养箱中培养。实验用细胞培养 24~48 h。

1.3 肺泡II型上皮细胞的鉴定

1.3.1 流式细胞仪鉴定 采用 Cunningham等[4]方法, 已分离和纯化的肺泡II型上皮细胞悬液 3 ml(50000个细胞), 加入肺泡II型上皮细胞单克隆抗体(HEA-125) 100μl, 混匀, 4℃冰箱 30 min。PBS漂洗 3次, 加入山羊抗鼠 IgG联接异硫氰胍荧光素(IgG-FITC) 50μl, 混匀, 4℃冰箱 30 min, PBS漂洗后, 流式细胞仪(53 nm)测定荧光强度。(HEA-125, 山羊抗鼠 IgG-FITC均系 Newcastle大学 Cunningham教授惠赠)。

1.3.2 鞣酸染色鉴定 按 Mason等[5]方法加以改进。已分离和纯化的肺胞II型上皮细胞悬液, 涂载玻片, 自然干燥, 2%戊二醛固定 15 min。PBS冲洗 2次后, 1%四氧锇酸染色 1.5 h, 1%鞣酸染色过夜, PBS漂洗, 双蒸水冲洗。自然干燥, 封片, 光学显微镜检查肺泡II型细胞内板层体。

1.3.3 电子显微镜鉴定 迄今为止, 电子显微镜是鉴定肺

* 国家自然科学基金资助项目, No, 39670336 全军"八五"攻关项目
** 崔社怀, 男, 42岁, 副主任医师, 副教授, 博士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

泡II 型上皮细胞的最好方法。经离心沉淀(400× g;8 min)的纯化肺泡II 型上皮细胞,3% 戊二醛固定,PBS漂洗,丙酮脱水,1% 四氧锇酸后固定,环氧树脂 618包埋,钻石刀超薄切片,枸橼酸铅染色,透射电镜(日立— 300型)下观察。

2 结果

使用上述方法分离的肺泡II 型上皮细胞悬液,经碳铁颗粒纯化后,鞣酸染色证实细胞悬液中约 70% 的细胞是肺泡II 型上皮细胞,见图 1,与国外文献报道结果一致。活性染料排出实验表明,0.4% 台盼蓝染色,90% 的细胞为活细胞。证明碳铁颗粒去除混合细胞悬液中的巨噬细胞相当有效,可满足一般实验的需要。原代培养 1 d的肺泡II 型上皮细胞,在倒置显微镜下细胞为 10~ 20μm,可见明显的核仁,胞浆内较多颗粒。细胞常常聚集在一起,形成小岛样结构。

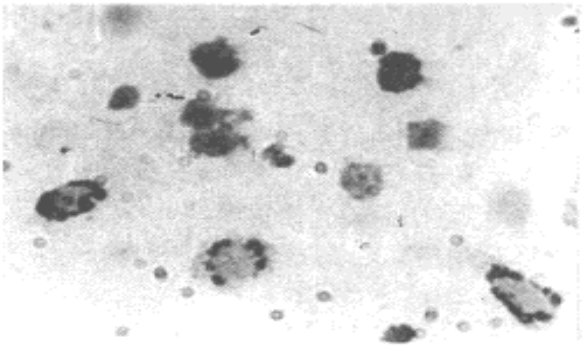


图 1　肺泡II 型上皮细胞嗜锇颗粒　(鞣酸染色× 800)

流式细胞仪结果证明,分离纯化或培养 24h 的肺泡II 型细胞呈单一的细胞群体峰,在 540 mm 处荧光较弱,表明肺泡II 上皮细胞几乎没有杂细胞污染,见图 2 鞣酸染色法表明,肺泡II 型上皮细胞的胞浆内含较多的嗜锇小体,其围绕细胞核分布,大小不一,周围可见白晕,每个肺泡II 型上皮细胞内含几个至数十个不等,同时观察阴性对照外周血白细胞的染色,无嗜锇小体的出现。说明鞣酸染色的方法鉴定肺泡II 型细胞具有较高的特异性。

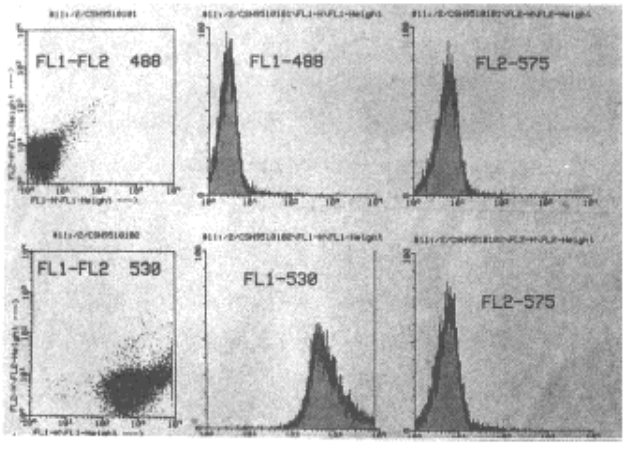


图 2　肺泡II 型上皮细胞的流式细胞仪图

电子显微镜结果,分离纯化或培养的肺泡II 型上皮细胞较规则,胞浆较多,胞核明显,胞浆内含较多大小不一的洋葱样结构的嗜锇小体即板层体。

3 讨论

肺泡II 型上皮细胞具有合成和分泌肺表面活性的功能,促进肺泡表面液体和电解质的跨上皮运输,补充和分化肺泡 I型上皮细胞等[6]。近年分离肺泡II 型上皮细胞的方法已有报道,目前多趋向于用光学显微镜直接鉴定肺泡II 型上皮细胞[7],但国内少有文献。肺泡II 型上皮细胞的分离、纯化、鉴定和培养的关键和难点在于纯化鉴定和培养。本研究通过添加特殊物质(碳铁颗粒),使用特殊的染色技术(鞣酸染色),简化和改善了肺胞II 型上皮细胞的纯化和鉴定步骤,采用鞣酸染色技术直接用光学显微镜观察细胞内板层小体的染色,肺泡II 型上皮细胞可见胞浆内含较多的板层小体,形态规则,清晰易辨,特异性强。

为了进一步确定经纯化和培养的肺泡II 型上皮细胞,除用鞣酸染色光学显微镜直接鉴定外,采用电子显微镜对该类细胞进行了鉴定,结果表明经分离纯化和培养的细胞绝大多数为肺泡II 型上皮细胞。与光学显微镜下该类细胞胞浆内含较多嗜锇小体的结果一致。流式细胞仪的结果也表明,经分离纯化和培养的细胞为一个细胞群体。所以我们认为用改良的肺泡II 型上皮细胞分离技术、经碳铁颗粒纯化、鞣酸特殊染色的方法是一种实用而方便的鉴定肺泡II 型上皮细胞的好方法,可满足一般实验和培养需要,为进一步探讨肺泡II 型上皮细胞的功能和表面活性物质的合成分泌,以及在肺损伤中的作用奠定了基础。

关键词　肺泡II 型上皮细胞;细胞培养;分离
中图法分类号　R329.2

参考文献

1 Arias D J, Vara E, Garcia C *et al*. Tumour necrosis factor-α inhibits synthesis of surfactant by isolated human type II pneumocytes. Eur J Surg, 1993, 159(10): 541
2 Pinkerton K E, Lewis J F, Rider E D *et al*. Lung parenchyma and type II cell morphometrics: effect of surfactant treatment on preterm ventilated lamb lungs. J Appl Physiol, 1994, 77(4): 1953
3 Dobbs L G, Gonzalez R, Williams M C. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. Am Rev Respir Dis, 1986, 134(1): 141
4 Cunningham A C, Milne D S, Wilkes J *et al*. Constitutive

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

expression of MHC and adhesion molecules by alveolar epithelial cells (type Ⅱ pneumocytes) isolated from human lung and comparison with immunocytochemical findings. J Cell Sci, 1994, 107(2): 443

5 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. Am Rev Respir Dis, 1985, 131(5): 786

6 Cott G R. Stimulation of net active ion transport across alveolar type Ⅱ cell monolayers. Am J Physiol, 1986, 250(2): C222

7 丁自强.肺泡Ⅱ型上皮细胞的分离培养及其应用.生理科学进展, 1990, 21(1): 45

(收稿: 1996-11-15;修回: 1997-05-25)

(编辑 汪勤俭)

DHBV的检测及雏鸭感染试验的探讨

A study on the identification of DHBV and duckling infection test

熊鸿燕* 张 凌 李 莉 孙华明 (第三军医大学预防医学系流行病学教研室)重庆, 400038

提 要 目的: 建立特异、敏感、方便的鸭乙肝病毒(DHBV)检测方法。方法: 通过免疫电镜、PCR组织原位杂交及ELISA等技术观察病毒的颗粒形态及表面抗原与DNA的活性,并通过静脉途径感染一日龄麻鸭,了解动物感染实验的规律。结果: 透射电镜下,DHBV约为40 nm大小的圆形颗粒,其包膜完整、清晰,有的颗粒还见明显的多刺状核壳体;所选用的引物,能使DHBV阳性样本的DNA扩增产物电泳区有一232 bp的条带出现;光镜下DHBV阳性肝组织的原位杂交片中多处呈现明显的阳性显色区,区域内主要为肝细胞结果;DHBV的感染性越高,雏鸭被感染的比例就高,且指标转阳的时间越短;感染潜伏期约为7~21 d。结论: 研究所涉及的4种检测方法均有特异、敏感的特点。

鸭乙肝病毒(DHBV)是目前较好的替代HBV的试验病毒[1,2]。用同位素渗入法测定DHBV-DNA多聚酶(DNA-P)活性是国内外研究报道中常用的检测DHBV活性的方法,简便、快速,但缺乏特异性,结果的稳定性也较差。为建立特异、敏感、方便的DHBV检测方法,探索重庆麻鸭作为感染试验动物的可行性,本研究通过免疫电镜、PCR组织原位杂交及ELISA等技术观察了DHBV的颗粒形态及DHBsAg与DNA的活性,并初步探讨了DHBV阳性血浆对一日龄麻鸭的静脉感染方法。

1 材料和方法

1.1 DHBV阳性血浆的准备

从农贸市场分别收集新鲜重庆麻鸭血,枸橼酸钠抗凝,离心取上层血浆,分别用ELISA法测DHBsAg,用^{3}H-dTTP渗入法[3]测DNA-P,将DHBsAg强阳性,且DNA-P在500~700 cpm的血浆作为试验阳性血浆,将DHBsAg阴性,DNA-P在200 cpm以下的血浆作为阴性血浆。分别在-70℃保存,同时在5%甲醛液中保存相应的鸭肝组织。

1.2 DHBV的检测

1.2.1 透射电镜观察DHBV的形态 将10倍稀释的兔抗DHBsAg血清(军事医学科学院5所提供)0.1 ml与等体积待观察的鸭血浆样品混合,37℃水浴1 h,取1滴混合液,按负染色法制备样品,2%磷钨酸染色,用日本JEM-200EM电子显微镜观察。

1.2.2 ELISA测DHBsAg 按常规方法进行ELISA试验。鼠抗DHBsAg和HRP-羊抗兔血清由军事医学科学院5所提供。用酶标仪在490 nm波长处测定(OD)值。

1.2.3 PCR测定DHBV-DNA 按常规PCR方法[4]提取样本DNA反应模板,进行PCR扩增反应并电泳观察扩增产物。以含完整DHBV-DNA重组质粒的DNA样本为阳性对照,人血浆为阴性对照。PCR引物由军事医学科学院5所张文福博士提供。正向引物使于DHBV-DNA X/C区、基因图谱位置2657 bp,反向引物使于该区的2889 bp。PCR所用试剂购自华美生物试剂公司。

* 熊鸿燕,女,35岁,讲师,博士

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