

## 胎鼠肺泡 Ⅱ型上皮细胞分离、原代培养与鉴定

陈 慧, 王振花, 张建平, 杨冬梓

( 中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120 )

**摘 要:**【目的】探讨胎鼠肺泡 Ⅱ型细胞原代培养及鉴定方法, 建立肺泡 Ⅱ型细胞培养模型, 为体外研究肺泡 Ⅱ型细胞及胎儿肺发育提供实验手段。【方法】采用低浓度胰酶消化 20 d 胎鼠肺组织, 经差速离心和特异性免疫吸附后, 分离、纯化胎鼠肺泡 Ⅱ型细胞, 进行原代培养; 根据细胞生长特点、形态特征、细胞表型和肺表面活性特异蛋白 A 的分泌, 用免疫细胞化学染色、透射电镜及酶联免疫吸附法对分离的细胞进行形态学和功能鉴定。【结果】原代培养的肺 Ⅱ型细胞 12 h 开始贴壁, 外观呈多边形, 岛状生长。培养的 24~48 h, 细胞连接成单层, 胞浆内颗粒明显, 培养的 6~7 d 细胞内颗粒大量减少; 免疫细胞化学鉴定细胞肺表面活性特异蛋白 A (surfactant protein A, SP-A) 染色阳性, 透射电镜可见观察到细胞内板层小体, 培养液中 SP-A 含量随培养时间延长逐渐增多, 于培养 36 h 达峰值, 为 80 ng/mL; 细胞纯度达(92±2)%, 产量为(18.6±7)×10<sup>6</sup>。【结论】差速离心和免疫黏附法是一种高效的分离和纯化胎鼠肺 Ⅱ型细胞的方法, 所得细胞产量大、纯度高, 可以用于体外研究肺泡 Ⅱ型细胞和晚期胎肺发育的研究。

**关键词:**胎鼠; 肺泡 Ⅱ型细胞; 原代培养; 分离; 鉴定

中图分类号: R714

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0496-04

## An Enhanced Method for Isolation, Primary Culture, and Identification of Type II Alveolar Epithelial Cells from Fetal Rats

CHEN Hui, WANG Zhen-hua, ZHANG Jian-ping, YANG Dong-zi

( Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China )

**Abstract:**【Objective】The aims of this study were to develop the primary culture technology and identification method for alveolar type II cells (AEC II). Providing experiment means for investigating AEC II and fetal lung development in vitro by establishing AEC II culture model.【Methods】Low density trypsin was taken to digest lung tissues, which were obtained from 20-day fetal rats. Differential centrifugation and specific immunosorption were used to demesh and purify AEC II. Immunocyto-chemistry, electron micrograph, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to identify the morphology and function of the cultured cells, according to the cells growth feature, morphologic characteristics, phenotypic characteristics and the secretion of surfactant protein A.【Results】AEC II adhered after cultured for 12 h, the shape of cell was polygon under microscope. And cells connected like islands. Following 24-48 h in culture, cells formed confluent monolayers. There were fine particles in intracytoplasm. On days 6-7 in culture, fine particles decreased. The expression of SP-A in AEC II was positive and lamellarbodies were revealed under electron micrography. The quantity of SP-A in culture solution was 80 ng/mL when cultured for 36 hours. The cells purify was (92±2)% and quantity was (18.6±7)×10<sup>6</sup> every fetal lung.【Conclusions】Differential centrifugation and specific immunosorption were the efficient methods to isolate, purify, and culture rat AEC II cells. Cells with high quantity and purity make use to study functions of AEC II cells and the development of fetal lung.

**Key words:** fetal rat; type II alveolar epithelial cell; primary cell culture; isolation; identification

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):496-499,505]

收稿日期: 2006-03-05

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2003B30505)

作者简介: 陈 慧(1979-), 女, 河南开封人, 博士生, 杨冬梓, 导师, 通讯作者; 张建平, 教授, 项目负责人. E-mail: zheling76@163.com

胎肺发育晚期肺组织主要由肺泡型上皮细胞(type alveolar epithelial cell, AEC)和肺成纤维细胞组成。AEC细胞在肺发育和肺功能调节中有重要作用,它能分裂、增殖并转化为型细胞,同时参与机体免疫调节、水和电解质平衡等,与肺组织生理功能密切相关。因此,从肺复杂的成分中得到高纯度高产量的细胞并建立体外细胞模型,对研究AEC细胞功能和晚期胎儿肺发育以及早产儿、新生儿乃至成年期某些肺部疾病有重要意义。目前,AEC细胞原代培养主要采用密度梯度离心、贴壁选择、流式细胞仪分离等方法,但是AEC易损伤,分离纯化困难,且不能进行传代培养,因此,目前的诸多方法有操作复杂,时间长,细胞损伤较大,细胞形态功能易发生变化等缺点,且细胞的产量和纯度有限,影响体外有关AEC的研究。本研究根据胎鼠晚期肺发育特点、细胞组成和特性采用差速离心和免疫黏附的方法成功分离、纯化并培养高纯度、高产量的胎鼠AEC。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与实验试剂

SD成年大鼠购自中山大学医学院实验动物中心,雌鼠体质量220~260 g,雄鼠体质量260~300 g。雌雄按3:1,于第1天下午合笼,第2、3天晨检查雌鼠,见阴道阴栓计为孕0 d。第3天检查雌鼠后,将未受孕鼠与雄鼠分笼喂养,休息4 d后再合笼,并观察雌鼠受孕情况。孕鼠于孕20 d行剖宫取胎。大鼠IgG、多聚赖氨酸、SP-A标准品(Sigma公司),胰蛋白酶(Anresco公司),胎牛血清、DMEM(GIBCO公司),DNaseI、兔抗鼠SP-A抗体(Santa Cruz公司),羊抗兔IgG、SABC试剂盒、DAB显色试剂(武汉博士德生物工程公司)。

### 1.2 大鼠IgG包被培养皿

0.5 g/L大鼠IgG溶液按5 mL/90 cm<sup>2</sup>培养皿铺板,轻晃使溶液完全覆盖培养皿底,22℃静置3 h,倒出大鼠IgG溶液,10 mL PBS轻轻冲洗培养皿,重复5次,再用10 mL无血清DMEM冲洗2次后待用。

### 1.3 胎肺型上皮细胞的分离

孕20 d SD大鼠,100 g/L水合氯醛0.3 mL/100 g腹腔注射,约5~10 min后大鼠麻醉,无菌条件下剖宫取出胎鼠,置于含有少量无血清冰冷的

DMEM无菌培养皿中,取出胎肺,于预冷PBS液中,去除气管、支气管、血管等,将肺组织移至无菌青霉素小瓶,PBS液清洗2次,将肺组织剪成大小约1 mm<sup>2</sup>碎块,Hank's吹打清洗,吸弃上清,重复2次。按照每只胎鼠1 mL加入1.25 g/L胰酶(37℃预温),37℃消化20 min,消化时可以轻轻搅拌。加入与消化液等量含100 mL/L胎牛血清的DMEM终止消化,用吸管反复吹打均匀,200目尼龙筛网过滤细胞悬液。滤液1 500 r/min(r=10 cm)离心5 min,弃上清,用10 mL DMEM培养液重悬沉淀。

### 1.4 胎肺型上皮细胞的纯化与培养

将DMEM细胞悬液移入上述大鼠IgG包被的培养皿中,37℃含体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱培养进行免疫黏附,2 h后吸取培养液移入无菌离心管,800 r/min(r=10 cm)离心5 min,弃上清,DMEM重悬沉淀后调细胞浓度为1×10<sup>6</sup>/mL接种在90 cm<sup>2</sup>一次性培养皿和6孔培养板中,CO<sub>2</sub>培养箱培养,2~3 d换液,用倒置显微镜(XDS-1B,重庆)观察其形态和基本生长情况。

大鼠IgG包被的培养皿中未贴壁的胎肺AEC被转移后,向培养皿中添加含有(50~100) mL/L胎牛血清DMEM,37℃含体积分数5%CO<sub>2</sub>继续培养免疫黏附细胞,作为胎肺AEC的对照。

### 1.5 胎肺型上皮细胞的鉴定

1.5.1 免疫细胞化学鉴定 盖玻片置于6孔培养板内,使用1:10稀释多聚赖氨酸浸泡2 h,吸出多聚赖氨酸,6孔板放无菌台彻底吹干。纯化后的AEC接种于盖玻片并培养12 h,取盖玻片用4 g/L多聚甲醛固定30 min,按SABC法进行免疫细胞化学操作,并分析AEC的纯度。

1.5.2 透射电子显微镜鉴定 取长满培养皿皿底的AEC,弃去培养液,25 g/L戊二醛固定2 h,使用细胞刮子将细胞刮下,2 500 r/min(r=10 cm)离心10 min,细胞沉淀结块,进行后固定、丙酮脱水、包埋及超薄切片,H-600透射电镜(日本,HITACHI)观察。

1.5.3 台盼蓝染色判断细胞活力 取对数生长期细胞,调整细胞浓度为1×10<sup>6</sup>/L,接种于96孔培养板,每孔180 μL,培养24 h后加4 g/L台盼蓝每孔20 μL,用血球计数板在光镜下计活细胞数,计数500个细胞,拒染的为活细胞,计算活细胞的百分比,以判断细胞存活状况。

### 1.6 酶联免疫吸附法检测细胞培养液中SPA含量

原代培养 24 h 的 AEC 以  $10^6$ /mL 加入 96 孔培养板中, 于培养 6、12、24、36、48 h 收集培养液标本,  $-20^\circ\text{C}$  保存待测。兔抗鼠 SPA 使用 0.1 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  作 1:2 000 稀释后包被 96 孔板, 4 过夜。0.01 mol/L PBS-BSA 封闭,  $37^\circ\text{C}$  30 min。加入 0.1 mL 系列稀释的 SP-A 标准品、1:50 稀释的培养液,  $37^\circ\text{C}$  60 min。PBS 洗板, 加入 0.1 mL 含  $2 \times 10^{-6}$  g 羊抗兔 IgG 的二抗,  $37^\circ\text{C}$  60~90 min。PBS 洗板, 0.1 mol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液 (含 0.2 g/L TMB, 0.03 g/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  $37^\circ\text{C}$  显色 10 min。2 mol/L 硫酸 0.05 mL 终止反应。自动酶标仪 (CODA 全自动酶免分析仪, 美国 BIORAD 公司) 测量并计算 SP-A 含量。

## 2 结 果

### 2.1 光镜下原代培养胎鼠 AEC 细胞形态学特征及变化

通过免疫黏附纯化的胎鼠 AEC 细胞在接种后的 12~18 h 见贴壁, 岛状生长方式, 18~24 h 大量贴壁并进入对数生长期。培养 24 h 接近融合, 细胞平展呈圆形、立方形或多边形, 相互连接形成单层, 胞浆内有大量反差明显的细胞小颗粒, 细胞核明显 (图 1A、B)。培养 72 h 后, 细胞内颗粒有所减少, 第 6~7 天颗粒明显减少, 无法辨认 型细胞特征。

免疫黏附纯化后剩余细胞培养 24 h 后大量贴壁, 多数呈梭形或不规则三角形, 相互联结成网状 (图 1C、D), 其形态和生长方式与 AEC 细胞差异明显。

### 2.2 透射电镜观察原代培养胎鼠 AEC 细胞浆内板层小体

原代培养 24~48 h 的胎肺 AEC, 电镜下可见细胞内特征性结构: 板层小体, 大小不一, 呈同心圆或平行排列, 直径  $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m}$ , 电子密度高, 在胞浆中分布不均匀, 数量 2~10 个不等。还可见到粗面内质网、高尔基体等细胞器 (图 2), 胞浆较多, 胞核明显。

### 2.3 免疫细胞化学鉴定胎肺 AEC 细胞 SP-A 表达

进行 SP-A 免疫组化见棕黄色颗粒定位于胞浆, AEC 表达阳性 (图 3)。每只胎肺免疫纯化、贴壁后可获 AEC 细胞  $(18.6 \pm 7) \times 10^6$ , 纯度达  $(92 \pm$

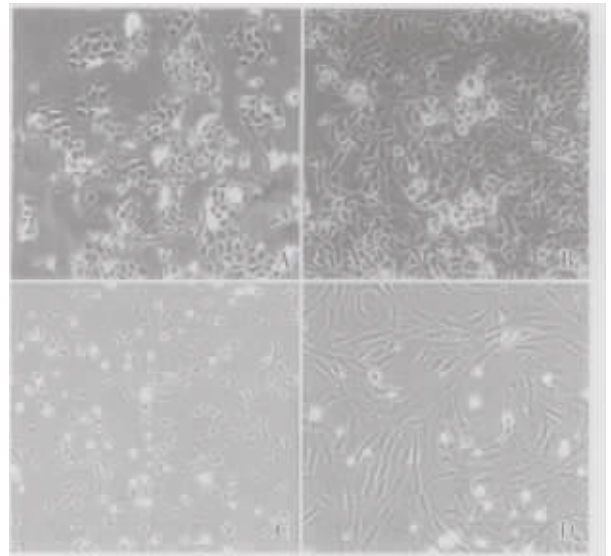


图 1 普通光镜观察原代培养胎鼠 AEC

Fig. 1 Primary culture type alveolar epithelial cells ( $\times 160$ )  
A: Purification AEC were cultured in vitro for 12 h; B: Purification AEC were cultured in vitro for 24 h, C: Mixed cells were cultured in vitro for 0 h, D: Mixed cells were cultured in vitro for 24 h

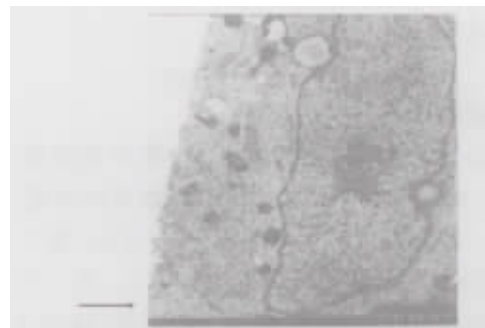


图 2 透射电镜下观察原代培养 AEC 细胞内板层小体  
Fig. 2 Lamellar bodies of AEC were revealed under electron microscopy ( $\times 12\ 000$ )

2)% , 台盼蓝拒染实验检测细胞活力为  $(96.5 \pm 2.1)\%$ 。



图 3 免疫组织化学鉴定胎肺 AEC 细胞 SP-A 表达  
Fig. 3 Immunocytochemistry was used to identify AEC cells showed positive immunocytochemistry stain for SP-A ( $\times 320$ )

## 2.4 原代培养胎鼠 AEC 细胞功能学鉴定结果

采用 ELISA 方法检测细胞培养液中的 SP-A 的数量来反映细胞的功能状态。在细胞培养后的 2 h 就可以检测到培养液中的 SP-A, 其数量随体外培养时间延长而增多, 培养 36 h 左右达到峰值, 约为 80 ng/ml, 此后逐渐减少(图 4)

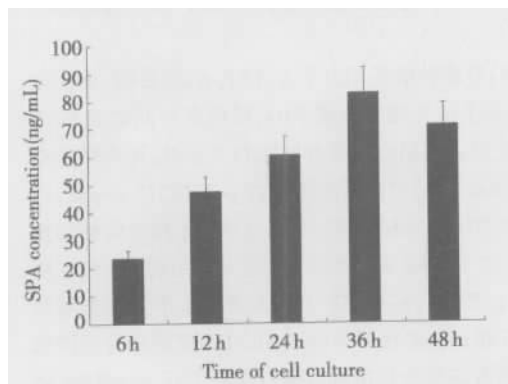


图 4 酶联免疫吸附法定量分析胎肺 AEC 细胞 SPA 表达

Fig.4 Distribution of surfactant protein A (SP-A)

SP-A in culture solution was detected with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, and 48 h

## 3 讨 论

肺泡 型上皮细胞是肺泡上皮细胞的“干细胞”,能增殖成新的 AEC,还可以分化为其他上皮细胞如肺泡 型上皮细胞。AEC 胞浆内的板层小体,通过胞吐方式释放磷脂等表面活性物质,发挥降低肺泡表面张力、稳定肺泡直径的作用。另外,AEC 跨膜运输能力对于维持正常肺水转运,保证正常气体交换有重要作用。AEC 还参与氧化代谢、免疫调节,还是某些激素的靶细胞<sup>[1,2]</sup>。因此体外培养胎鼠 AEC 常常用于研究胎儿肺发育、呼吸功能及相关疾病。

19~20 d 胎鼠肺的发育时期与人类胎肺发育的小管期向囊性期过渡阶段一致,是肺发育的关键时期,因此 19~20 d 胎鼠 AEC 是研究晚期胎儿肺发育的理想材料,能较好反映此阶段胎儿肺的功能特点和发育特征。根据胎儿起源学说,胎儿出生后肺功能不全及成年后呼吸系统疾病的发生与此期密切相关<sup>[3,4]</sup>。19~20 d 胎鼠肺组织中肺泡上皮细胞大量增殖,其中 95%以上为 AEC,间质细胞则以成纤维细胞为主。因此,采用 19~20 d 的

胎鼠肺分离纯化 AEC,所得细胞产量大,纯度高,易于分离纯化。

常用的 型细胞纯化方法有密度梯度离心法、贴壁选择法、流式细胞仪分离法等,这些方法具有操作繁琐,所得细胞数量有限,且损伤细胞等缺点。本研究采用的是差速离心和免疫黏附法,利用了 AEC 和成纤维细胞之间的比重差异,800 r/min 离心 2~3 次,使 AEC 沉淀,进行初步纯化。同时,由于胎鼠肺组织中非肺泡 型上皮细胞如成纤维细胞和巨噬细胞等,其细胞表面有 Fc 片段受体,能与鼠 IgG 进行特异性结合,吸附到培养介质上,而 AEC 不能与铺有鼠 IgG 的培养介质结合,洗脱收集后可以得到高纯度、高浓度细胞<sup>[5]</sup>。本实验用低浓度胰蛋白酶消化肺组织,用大鼠 IgG 黏附纯化 2 h,可除去绝大多数的非 型细胞,简便易行。SP-A 免疫细胞化学法测定 AEC 纯度高达 (92±2)%,采用 ELISA 方法分析细胞培养液中 SP-A 数量及其变化特征表明此方法培养的 AEC 功能状态良好。

鉴定 AEC 的方法较多,包括电镜法、丹宁酸染色法、巴氏染色法等。电镜观察能够直接显示 AEC 细胞特征性结构板层小体,是鉴定 AEC 的“金标准”,但观察前准备步骤繁琐、耗时长、要一定量细胞方能满足制片需要,不适合作为常规方法。肺表面活性蛋白 A (surfactant protein A, SP-A) 免疫细胞化学鉴定是一种新方法,SP-A 是构成肺表面活性物质的重要成分之一,能特异性表达于 AEC,且含量多,易于检出,特异性敏感性均高<sup>[6]</sup>。本实验即采用 SP-A 免疫细胞化学法,鉴定时间仅需 20 h,大大短于电镜检查所需的 2 周。为保证 SP-A 鉴定的可靠性,同时使用了电镜观察,镜下见到 AEC 内特征性结构板层小体,及粗面内质网、高尔基体等细胞器。

原代培养第 2 d 肺泡 型上皮细胞进入对数生长期,适于做体外研究。随着体外培养时间的延长 AEC 在形态学上经历 3 个阶段:贴壁生长期、生长高峰期和退化期,而后转变为肺泡 型上皮细胞,逐渐脱落失去培养,3 个阶段共 10 d 左右。这可能与细胞失去了体内环境无法完成增殖、传代有关,目前条件下上皮细胞只适合短期培养不适合做长时间的体外研究<sup>[7,8]</sup>。如能改进培养条件,使 AEC 在体外更长时间生长甚至传代将有利于

(下转第 505 页 to page 505)

- adipokine[J]. *Drug News Perspect*, 2006, 19(1): 21- 26.
- [4] JUGE- AUBRY C E, HENRICHOT E, MEIER C A. Adipose tissue: a regulator of inflammation[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2005, 19(4): 547- 566.
- [5] FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(5): 911- 919
- [6] LOFFREDA S, YANG S Q, LIN H Z, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses[J]. *FASEB J*, 1998, 12(1): 57- 65.
- [7] CAO Q, MAK K M, REN C L, et al. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase- 1 in human hepatic stellate cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(6): 4292- 4304.
- [8] BJORBACK C, EL- HASCHIMI K, FRANTZ J D, et al. The role of SOCS- 3 in leptin signaling and leptin resistance[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(42): 30059- 30065.
- [9] FIGENSCHAU Y, KNUTSEN G, SHAHAZEYDI S, et al. Human articular chondrocytes express functional leptin receptors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(1): 190- 197.
- [10] MACHINAL- QUELIN F, DIEUDONNE MN, LENEVEU MC, et al. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(4): C853- C863.
- [11] TANABE K, OKUYA S, TANIZAWA Y, et al. Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen- activated protein kinase[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241(3): 765- 768.
- [12] BOULOUMIE A, MARUMO T, LAFONTAN M, et al. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells[J]. *FASEB J*, 1999, 13(10): 1231- 1238.
- [13] TAKEKOSHI K, ISHII K, NANMOKU T, et al. Leptin stimulates catecholamine synthesis in a PKC- dependent manner in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells[J]. *Endocrinology*, 2001, 142(11): 4861- 4867.
- [14] GRUNFELD C, ZHAO C, FULLER J, et al. Weight- reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene[J]. *Science*, 1995, 269(5223): 543- 546.
- [15] FRANCHIMONT D, ROLAND S, GUSTOT T, et al. Impact of infliximab on serum leptin levels in patients with Crohn's disease[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(6): 3510- 3516.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 499 页 from page 499)

深入研究 AEC 增殖、分化、液体转运、合成分泌的功能, 在肺发育成熟等生理过程中的作用机制及其在肺损伤、修复等病理生理情况下的改变情况等。这可能需要寻找能够刺激上皮细胞的生长因子, 或者在不断发现 AEC 表面某些特异标记的基础上, 结合免疫学技术研究新的提取方法达到纯度更高、细胞损伤更小。

参考文献:

- [1] 毛宝龄, 钱桂生, 陈正堂. 急性呼吸窘迫综合征[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 58- 59.
- [2] LI Y, YANG T, LIU Q, ET A L. Effect of isoflurane on proliferation and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase activity of alveolar type II cells injured by hydrogen peroxide [J]. *Drug Metabol Drug Interact*, 2004, 20(3): 175- 183.
- [3] DE MOURA E G, PASSOS M C. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism[J]. *Biosci Rep*, 2005, 25(3- 4): 251- 269.
- [4] PETRY C J, OZANNE S E, HALES C N. Programming of intermediary metabolism [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 185(1- 2): 81- 91.
- [5] DOBBS L G, GONZALEZ R, WILLIAMS M C. An improved method for isolating type II cells in high yield and purity [J]. *Rev Respir Dis*, 1986, 134(32): 141- 145.
- [6] M C HENSON, K F SWANL, D E EDWARDS, et al. Receptor expression in fetal lung increases in late gestation in the baboon: a model for human pregnancy [J]. *Reproduction*, 2004, 127(3): 87- 94.
- [7] GONZALEZ R, YANG Y H, GRIFFIN C, et al. Freshly isolated rat alveolar type II cells, type II cells, and cultured type II cells have distinct molecular phenotypes[J]. *Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(1): 179- 189.
- [8] CHANG L W, ZHU H P, LI W B, et al. Protective effects of amygdalin on hyperoxia-exposed type II alveolar epithelial cells isolated from premature rat lungs in vitro[J]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2005, 43(2): 118- 123.

(编辑 张恩健)