

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000410

小鼠胚胎成纤维细胞对体外培养肺泡上皮 II 型细胞干性的维持作用

余 静¹, 曾 灵², 李 勇², 邓婷婷¹, 蒋建新², 王继红¹

(1. 重庆医科大学实验教学中心生物化学与分子生物学实验室、分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016;

2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所, 创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室第四研究室, 重庆 400042)

【摘要】目的:探讨小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast cell, MEF)作为滋养细胞对体外培养肺泡上皮 II 型细胞(alveolar epithelial type II cells, AT II)干性的维持作用。**方法:**通过分散酶(Dispase)、分散酶/胶原酶(collagenase/disapase)和脱氧核糖核酸酶(DNase I)联合消化小鼠肺组织, 制备肺单细胞悬液, 通过免疫黏附法纯化 AT II。高糖 DMEM 添加 10%FBS、双抗(青霉素 20 U/ml, 链霉素 20 U/ml); 将传代后的 AT II 接种至丝裂霉素处理的 MEF(inactivated MEF, iMEF)培养, 并以肺泡表面活性蛋白 C(surfactant protein C, SPC)和水通道蛋白 5(aquaporins 5, AQP5)为标记蛋白进行鉴定。**结果:**平均每只成年小鼠可得到总有核细胞数为 $(1.7\sim 2.0) \times 10^7$ 。AT II 细胞传代接种于滋养细胞前 3 代都能维持在未分化状态, 第 4 代分化成为肺泡上皮 I 型细胞(alveolar epithelial type I cells, AT I); 而传代后没有接种在滋养细胞上的 AT II 细胞在第 1 代就分化成 AT I 细胞。**结论:**小鼠胚胎成纤维细胞在一定时段能够维持 AT II 的干性。

【关键词】滋养细胞; 肺泡上皮 II 型细胞; 细胞培养**【中图分类号】**R781.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-01-06

Role of mouse embryonic fibroblast cells in maintaining undifferentiated state of alveolar epithelial type II cells in vitro

Yu Jing¹, Zeng Ling², Li Yong², Deng Tingting¹, Jiang Jianxin², Wang Jihong¹

(1. Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Molecular Medicine and Tumor Research Center,

Experiment Teaching Center, Chongqing Medical University; 2. State Key Laboratory of Trauma,

Burns and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University)

【Abstract】Objective: To identify the maintenance of an undifferentiated state of mouse alveolar epithelial type II (AT II) cells by the co-culture of feeder cells (mouse embryonic fibroblast cells, MEFs). **Methods:** The mouse lung single cells were prepared by the combination use of dispase, collagenase and DNase I. AT II cells were purified by immune adherence. The culture medium was high glucose dulbecco modified eagle medium (HG/DMEM) addicted with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. AT II cells were co-cultured with MEFs and were identified by immunofluorescence staining of pulmonary surfactant protein C (SPC) and Aquaporins 5 (AQP5). **Results:** $(1.7\sim 2.0) \times 10^7$ cells per mouse lung was obtained. AT II cells can maintain their undifferentiated state until the fourth generation when being cultured on feeder cells, but will differentiate into alveolar AT I cells when being cultured alone. **Conclusion:** MEF cells can maintain the undifferentiated state of AT II.

【Key words】feeder cells; alveolar type II cells; cell culture

肺泡 II 型上皮细胞(type II alveolar epithelial cell, AT II)作为一种肺泡上皮的祖细胞作用非常复

杂,除了具有分泌肺泡表面活性蛋白 C (secreted proteins-C, SPC)、增殖、分化等功能以外,还能够参与各种肺损伤后肺泡上皮的修复^[1]。而 AT II 容易分化成为肺泡 I 型上皮细胞(alveolar epithelial type I, AT I)样细胞^[2],从而失去增殖能力。在各种原因造成的急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)中,AT II 造成了损伤,而在 ARDS

作者介绍:余 静, Email: fish712@126.com,

研究方向:生物化学与分子生物学。

通信作者:王继红, Email: 446912026@qq.com。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(编号: 2012CB518104)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000410.html>

中后期,AT II 又能够参与肺泡的修复,促进预后。本研究使用小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts,MEF)作为滋养层细胞培养 AT II,通过分析肺泡表面 SPC 和水通道蛋白 5(aquaporin 5,AQP5)的表达,观察 MEF 作为滋养层细胞维持 AT II 未分化状态的作用,探讨小鼠胚胎成纤维细胞作为滋养细胞对体外培养 AT II 干性的维持作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 8 周龄 C57BL/6 小鼠,体质量约 25 g/只;孕 13.5 d C57BL/6 孕鼠。实验动物均由第三军医大学附属大坪医院动物实验中心提供。动物饲养和实验遵守中国实验动物管理条例(1998 年卫生部第 55 号文件)对实验动物管理和使用的规定。实验在 25℃左右条件下进行。

1.1.2 主要试剂 Dispase(BD),colleganase/disapase(Roche),DNase I (Promega),FBS(Invitrogen)均-20℃保存;丙酮酸盐,高糖 DMEM(Hyclone),0.25%胰酶+0.02%EDTA(Hyclone),SPC(Abcam),AQP5(Abcam),Goat anti-rat(SantaCruz),均 4℃保存。消化液 1:0.25%胰酶/0.02%EDTA,37℃水浴预热。消化液 2:1.5 ml Dispase(终浓度为 50 U/ml);消化液 3:2 ml Dispase(终浓度为 50 U/ml),25 μl Colleganase/Dispase(终浓度 2 μg/ml)及 25 μl DNase I(终浓度为 0.001%)。配好后 37℃水浴预热。细胞培养基:高糖 DMEM,10%FBS,青霉素-链霉素(20 U/ml)。

1.2 实验方法

1.2.1 MEF 制备 操作步骤:取孕 12.5~14.5 d C57BL/6 小鼠 1 只,剖腹后用镊子提起子宫两端,剪断子宫韧带取出子宫,用无菌 PBS 漂洗 3 次。剪破子宫取出胚胎,去掉孕鼠胚胎的头尾、四肢和内脏,将剩下的组织充分剪碎,加入 37℃消化液摇动消化 15 min^[3]。将悬液分别用 100 μm、70 μm 滤网各过滤 1 次,收集滤液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。用培养基重悬细胞团,并接种至培养瓶中培养。制备滋养细胞的目的是使 MEF 不能进行有丝分裂增殖,同时又能够保持细胞的活力。2 代至 5 代间的 MEF 可以用来处理作为滋养细胞^[4]。

1.2.2 丝裂霉素 C 处理 MEF 操作步骤:吸弃培养基,加入 10 ml 含有 10 μg/ml 丝裂霉素 C(mitomycin C,MMC)的培养基,置于 37℃,5% CO₂ 孵箱中孵育 2.5 h。用 0.1%明胶包被即将接种细胞的培养瓶,在室温下孵育 1 h 然后去掉包被液。用足量的无菌 PBS 漂洗细胞 7 次,充分去除 MMC^[5]。向培养瓶中加入 1.5 ml 0.25%胰酶/EDTA,孵育 2 min。加等量含有 10%FBS 的培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。重悬细胞,并细胞计数。以 2.5×10^4 个/cm² 接种于明胶包被的培养瓶中。

1.2.3 分离与纯化 AT II 操作步骤:取 8 周龄 C57BL/6 小鼠 1 只(雄性,约 25 g),2%戊巴比妥钠,45 mg/kg 腹腔麻醉,3 000 U/kg 肝素腹腔注射抗凝。固定小鼠四肢和头部,剪开腹部皮

肤。打开颈部,暴露游离气管。于气管后方穿丝线,气管上剪口插入气管套管并结扎。开腹后暴露肺和心,并剪破腹主动脉。在右心室最粗的冠状动脉和心室底部形成的三角顶端剪一约 1.5 mm 的口,右心室置管,针尖与动物的左肩水平方向呈 45°进针^[6]。肺循环血液灌洗完毕后游离出肺和气管,通过气管套管打入消化液 2。结扎后放入消化液 3,37℃摇动(120 r/min)^[7]消化 10 min。将消化后的组织取出剪碎,分别用 70 μm、40 μm 滤网过滤,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用培养基重悬细胞。将细胞悬液加入培养瓶,37℃5%CO₂ 培养箱中孵育 45 min,移除未贴壁细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入培养基重悬细胞,将悬液加入 IgG 包被的培养皿中,37℃孵育 1 h,移出未贴壁的细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。培养基重悬细胞,并细胞计数调整细胞浓度至 $(1 \sim 1.5) \times 10^7$ 个/ml,加入培养瓶中 37℃5%CO₂ 培养。

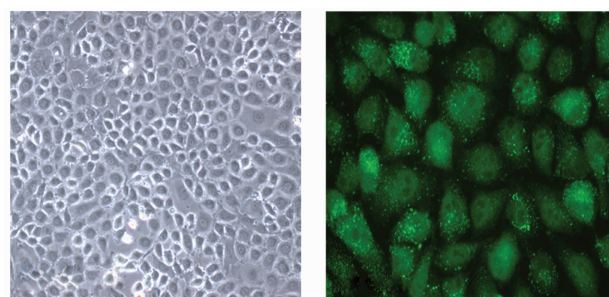
1.2.4 AT II 传代和在滋养细胞上培养 操作步骤:AT II 细胞培养 4~5 d,达到 80%~90%融合进行传代。加入 0.25%胰酶/0.02%EDTA,置于 37℃孵箱内消化 3 min,加入等量含 10%FBS 培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min。培养基重悬细胞,将一半细胞接种至 iMEF 包被的培养瓶中,另一半细胞接种至未使用 iMEF 包被的培养瓶中,隔天更换培养基。

1.2.5 SPC 和 AQP5 免疫荧光染色 操作步骤:取原代细胞爬片,PBS 清洗 3 次,4%多聚甲醛室温固定 30 min,用 10%山羊血清封闭液在 37℃封闭 1 h,加入一抗 4℃过夜孵育;同时用 PBS 代替一抗作空白对照。次日将细胞爬片放置在 37℃孵箱中复温 30 min^[8]。吸弃一抗,用 PBS 清洗 4 遍。加入二抗孵育液覆盖爬片,37℃孵育 1.5 h。吸弃二抗,加入 5 μg/ml DAPI 覆盖爬片孵育 1 min,吸弃 DAPI,PBS 清洗,抗荧光淬灭封片剂封片。

2 结果

2.1 AT II 培养结果

相差显微镜下可见纯化后的原代 AT II 呈铺路石样克隆生长,细胞形态较规则,呈圆形或椭圆形,直径约 10~20 μm(图 1A),荧光显微镜下可观察到表达 SPC 绿色荧光的 AT II 连接成片,胞浆内含有较多的 SPC 颗粒围绕细胞核分布(图 1B)。表明 AT II 成功分离纯化并培养。



A. 原代 AT II 培养第 5 天

(100×)

B. 原代 AT II SPC 染色阳性

(200×)

图 1 原代 AT II 克隆及其免疫荧光鉴定结果

Fig.1 AT II primary cell clone and immunofluorescence results

2.2 传代后 AT II 的鉴定

将 AT II 传至 3 代后观察,第 3 天接种在 iMEF 滋养层上的 AT II 已经形成克隆,克隆内细胞较规则,呈圆形或三角形(图 2)。经免疫荧光染色,SPC 和 AQP5 鉴定呈现克隆内细胞表达 SPC 而不表达 AQP5(图 3)。同时观察传代后未接种在灭活的小鼠胚胎成纤维细胞(inactivated, iMEF)滋养层上的 AT II 则没有克隆形成(图 4),并同样染色 SPC 和 AQP5 后观察到细胞高表达 AQP5 而 SPC 几乎没有阳性信号。

原代 AT II 生长至第 5 天开始出现克隆;第 7 天时克隆已

经连接成片,传代后接种在 iMEF 上进行培养,传代后细胞在第 3 天开始形成克隆样生长,细胞可传至第 3 代。

上述实验方法已经成功分离并纯化小鼠肺 AT II,并且经免疫荧光鉴定,AT II 在传代后接种在丝裂霉素 C 处理后的 iMEF 滋养层细胞上能够在传代 3 代以内维持其未分化状态,而传代后未接种在 iMEF 上的 AT II 细胞则分化成为 AT I 样细胞,表达 AT I 细胞标志物 AQP5。说明经过丝裂霉素 C 处理后的 iMEF 在作为滋养层对 AT II 细胞的体外培养有能够在一定程度上维持 AT II 未分化状态的作用。

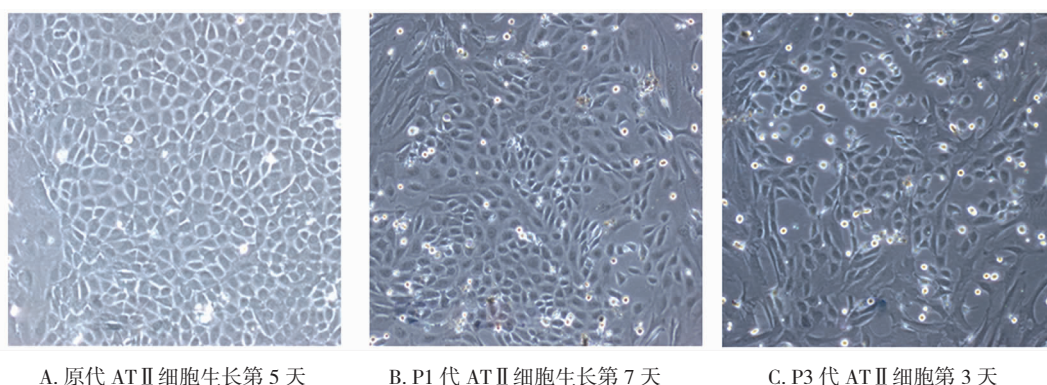


图 2 P0、P1 以及 P3 的 AT II 生长情况 (100 ×)

Fig.2 AT II growth of P0, P1 and P3 (100 ×)

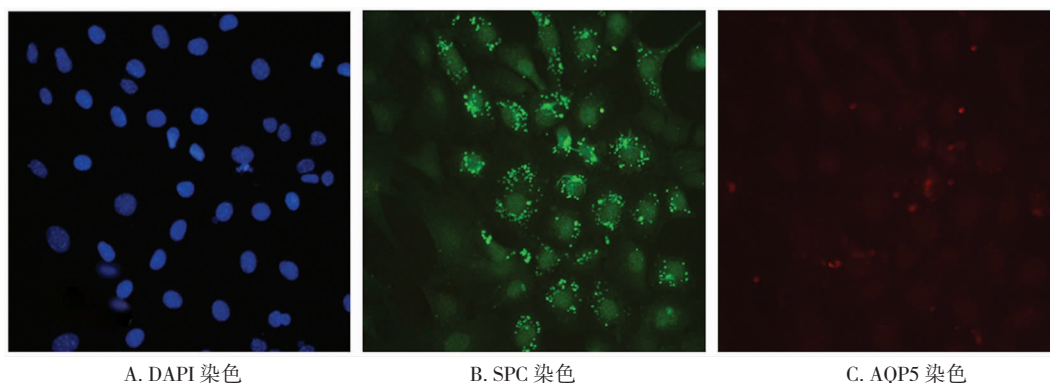


图 3 第 3 代接种在滋养层上的 AT II SPC 和 AQP5 免疫荧光共染结果 (200 ×)

Fig.3 SPC and AQP5 immunofluorescence staining results of P3 AT II cells seeded on feeders (200 ×)

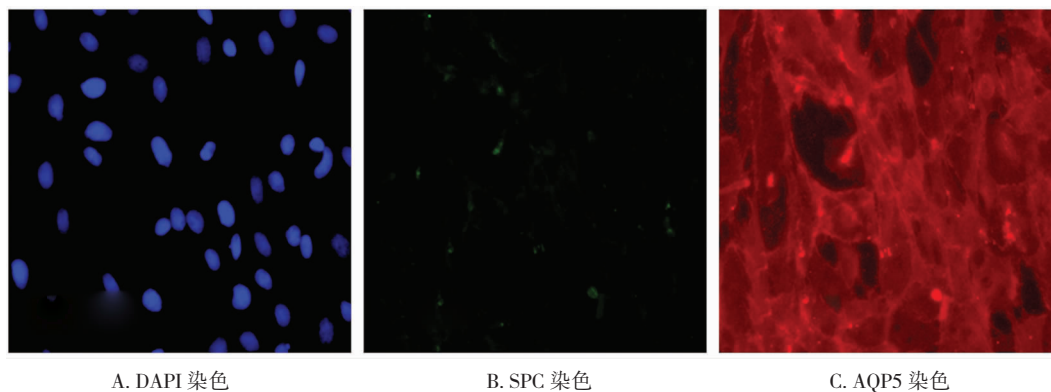


图 4 传代后的未接种在滋养层上的 AT II SPC 和 AQP5 免疫荧光染色结果 (200 ×)

Fig.4 SPC and AQP5 immunofluorescence staining results of passaged AT II cells cultured alone (200 ×)

3 讨 论

本实验参考 Dobbs 等^[7]分离 AT II 的方法进行操作,平均每只成年小鼠肺可得到有核细胞总数 $(1.7\sim 2.2) \times 10^7$ 个。同时在实验操作过程中发现,将肺从胸腔取出前使用肝素以及经肺动脉灌洗非常重要。充分的灌洗能够冲走心脏和大血管里的红细胞和肺泡里的大部分巨噬细胞,对 AT II 的纯化非常有意义。免疫黏附法得到的肺单细胞悬液中大多数非 II 型细胞如淋巴细胞、巨噬细胞等表面含有免疫球蛋白 IgG 的 Fc 段受体,能与 IgG 的 Fc 段结合,而 AT II 则缺乏这样的去除非 II 型细胞的方法^[9]。本实验参考 Nolen-Walston 等^[10]方法对 AT II 进行 SPC 和 AQP5 免疫荧光染色,用荧光显微镜观察,发现传代后没有接种在 iMEF 滋养层上培养的 AT II 不表达 AT II 标志物 SPC,而表达 I 型细胞标志物 AQP5,说明 AT II 在传代后已分化为 AT I 样细胞,而接种在 iMEF 滋养层上的 AT II 在第 3 代仍然表达 SPC。在传代培养 AT II 时使用和不使用 iMEF 细胞作为滋养层,在一定程度上能够影响 AT II 的分化,说明 iMEF 细胞在一定程度上能够维持 AT II 的未分化状态。

尽管滋养层细胞被广泛运用于干/祖细胞的培养中,但其作用机制仍然不明确^[4]。有文献报道,滋养层细胞能够产生细胞外基质和大量的可溶性因子,它们对于干细胞干性的维持非常重要。初步检测 MEF 条件培养基中有 136 种蛋白在干细胞培养中对维持细胞干性有重要作用^[11],包括胞内蛋白、细胞外基质以及表面膜蛋白,其中发挥主要作用的细胞因子可能是白细胞抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF)。同样,MEF 的质量对于干细胞的干性维持也很重要。MEF 必须要在严格无菌的条件下制备获得,并且要进行支原体污染的检测,确保没有细菌以及支原体等微生物污染之后才能够进行后续实验。原代 MEF 制备后体外培养有时会出现生长缓慢的情况,这可能是由于组织没有充分剪碎,或者胰酶消化不足,或过度所导致的。小鼠胚胎过小或太大也会导致这种情况的出现,建议小鼠的孕龄不要低于 12.5 d。MEF 要以合适的密度传代接种,用于作为滋养细胞的 MEF 代数最好不要超过 5 代^[12],

因为细胞传代次数过高可能会影响干细胞的生长。

利用 MMC 处理后的 MEF 作为滋养细胞来给体外培养的 AT II 提供支持,小鼠胚胎成纤维细胞不仅利于上皮干细胞的贴壁,而且还可以通过分泌细胞因子如 LIF 等,维持干细胞的增殖和保持未分化状态^[11]。可将 II 型细胞向 I 型细胞转化的时间推迟,能够更好的维持 II 型细胞的干性。

本研究不仅为小鼠 AT II 细胞的培养、鉴定建立了技术平台,而且有助于为后续肺干/祖细胞的相关生物学特性研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Shu LH, Wu XQ, Wei KL, et al. Temporal changes of pulmonary surfactant protein D in young rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(6): 483-488.
- [2] Conner DA. Mouse embryo fibroblast (MEF) feeder cell preparation[J]. Curr Protoc Mol Biol, 2001. doi:10.1002/0471142727.mb2302s51.
- [3] Bertoncello I, McQuilter JL. Endogenous lung stem cells: what is their potential for use in regenerative medicine? [J]. Expert Rev Respir Med, 2010, 4(3): 349-362.
- [4] E Michalska A. Isolation and propagation of mouse embryonic fibroblasts and preparation of mouse embryonic feeder layer cells[J]. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2007.
- [5] Kaur J, Tilkins ML. Methods for culturing human embryonic stem cells on feeders[J]. Methods Mol Biol, 2013(997): 93-113.
- [6] Gadepalli VS, Vaughan C, Rao RR. Isolation and characterization of murine multipotent lung stem cells[J]. Methods Mol Biol, 2013(962): 183-191.
- [7] Dobbs LG, Gonzalez RF. Isolation and culture of pulmonary alveolar epithelial type II cells[J]. Culture of Epithelial Cells, 2002: 277-301.
- [8] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer[J]. Cell, 2005, 121(6): 823-835.
- [9] 梅红霞, 金胜威, 连庆泉. 大鼠肺泡 II 型上皮细胞的体外培养以及内毒素攻击模型的建立[J]. 浙江医学, 2010, 32(3): 349-352.
- [10] Nolen-Walston RD, Kim CF, Mazan MR, et al. Cellular kinetics and modeling of bronchioalveolar stem cell response during lung regeneration[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(6): L1158-L1165.
- [11] 钱 莘, 安江洪, 敖绪军, 等. 小鼠支气管肺泡干细胞的培养鉴定和分选[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(9): 775-778.
- [12] Lim JW, Bodnar A. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells[J]. Proteomics, 2002, 2(9): 1187-1203.

(责任编辑: 冉明会)