

人胸膜间皮细胞的分离和培养

王洪峰 曲文秀 刘宏博 何平 李胜岐*

(中国医科大学附属第二医院(盛京医院)呼吸内科, 沈阳 110004)

摘要 利用两种取材方法建立人胸膜间皮细胞(HPMC)体外培养模型, 一是用胰蛋白酶-EDTA 消化法, 从人肺脏胸膜及壁胸膜上分离胸膜间皮细胞; 二是从胸腔积液中分离胸膜间皮细胞; 进行胸膜间皮细胞的培养。用形态学和免疫组化 S-P 法对培养所得细胞进行鉴定。光镜下可见细胞汇合后呈多角形铺路石样, 电镜下可见丰富的微绒毛和内质网, 免疫组化染色结果显示表达角蛋白、波形蛋白, 而抗 VIII 因子相关单克隆抗体、抗人白细胞 CD₄₅ 表达阴性; 证实为人的胸膜间皮细胞。两种取材方法均可以成功建立间皮细胞体外培养模型, 方法学上均有可行性; 手术标本所得细胞有较高的细胞纯度, 取材上胸腔积液更易于得到。

关键词 胸膜; 人胸膜间皮细胞; 培养

临床上胸膜疾病有较高的发病率, 胸膜间皮在维持胸膜的正常生理功能和胸膜疾病发生、发展、预后中起着重要的作用, 胸膜间皮细胞的分离与培养对研究胸膜疾病的发病机制及防治有重要意义^[1-3], 且对恶性肿瘤胸膜转移的防治有重要意义^[4,5]。目前人胸膜间皮的分离与培养只有一种方法报道^[6,7], 即从胸腔积液中分离与培养胸膜间皮细胞; 本研究应用活体手术标本消化分离胸膜间皮细胞和胸腔积液分离间皮细胞两种方法进行人胸膜间皮细胞培养, 并比较两种取材方法的优缺点, 为胸膜间皮细胞的分离培养提供方法学依据。

1 材料与方法

1.1 人胸膜间皮细胞的分离和培养

方法一: 取肺切除择期手术患者的肺脏标本, 剪取肺脏表面的脏胸膜及胸膜下组织, 约 4 cm×4 cm, 同时剪取 0.5 cm×2 cm 壁胸膜; 将标本浸泡于高浓度抗生素中 5 min, 无菌 PBS 洗数次, 脏胸膜包于 1 ml 注射器外面, 手术缝线结扎, 胸膜面向外, 防止断端接触消化液; 壁胸膜剪成小块。将上述标本放入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA (购于 Hyclone 公司), 37 °C 水浴中不断震荡, 消化 25 min; 用含胎牛血清的 RPMI1640 (购于 Hyclone 公司) 培养液终止消化, 滤网过滤, 4 °C 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液后, 加入培养液重复离心一次, 细胞沉淀用含有 15% 胎牛血清 (购于 Hyclone 公司) 的 RPMI1640 培养液重悬, 调整细胞数为 1×10⁵

个/ml 接种于 25 cm² 的一次性培养瓶 (购于 Corning costar 公司) 中。补充青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml; 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

方法二: 取良性胸腔积液 10 ml, 4 °C 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 RPMI1640 培养液重复离心一次, 吸出上清液后, 细胞沉淀用 5 ml 培养液重悬, 接种于 25 cm² 的一次性培养瓶中; 放入培养箱 30 min, 待部分细胞贴壁后, 轻轻转动培养瓶使不贴壁的红细胞和白细胞悬浮, 吸出培养液, 加入 5 ml 培养液培养。倒置显微镜下可见胸膜间皮细胞和少量的巨噬细胞。补充青霉素 100 U/ml, 链霉素 100 μg/ml; 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 和第三天各换液一次。每次换液轻轻转动培养瓶, 洗去不贴壁的红细胞和白细胞。巨噬细胞在 4~5 天后开始出现裂解, 可以得到较高纯度的胸膜间皮细胞。

1.2 传代

细胞生长汇合成单层, 铺满瓶壁 80% 时; 每瓶加入 2 ml 0.125% 胰蛋白酶, 转动培养瓶使消化液流过瓶底面, 吸出消化液, 重新加入 0.5 ml 0.125% 胰蛋白酶, 镜下见间皮细胞变圆、轻轻摇动见细胞脱落, 终止消化, 消化时间约为 5 min; 加入含有 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 轻轻吹打, 将瓶内液体汇集于离心管, 4 °C 1 000 r/min 离心 5 min, 用 RPMI1640 培养液重悬细胞沉淀并调整细胞

收稿日期: 2006-03-07 接受日期: 2006-08-08

* 通讯作者。Tel: 024-83955098, E-mail: LXN-1999@sohu.com

数为 1×10^5 个/ml, 接种于 25 cm^2 一次性培养瓶中。

1.3 冻存与复苏

暂不使用间皮细胞时可以冷冻保存, 在细胞没有形成致密单层前冻存, 冻存前一天换液一次, 用 0.125% 胰蛋白酶消化使细胞脱落, 离心后细胞沉淀中加入含 10 g/L 二甲基亚砜和 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液, 调整细胞数为 5×10^6 个/ml, 分成二管冻存, 每管 1~1.5 ml; 冻存顺序为 4°C 冻存 3~4 h, -70°C 冻存过夜, 再转至液氮中冻存。复苏时冻存的细胞在 37°C 水浴中迅速解冻, 吸入含有 15% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液的离心管内, 4°C 1 000 r/min 离心 5 min, 吸出上清液, 然后重复离心一次, 细胞沉淀加入 RPMI1640 培养液重悬细胞, 调整细胞数为 1×10^5 个/ml, 接种于 25 cm^2 一次性培养瓶。

1.4 纯化

手术标本消化所得原代细胞中有少量的成纤维细胞; 纯化方法: 将细胞悬液接种于培养瓶内(间皮细胞贴壁较成纤维细胞慢)静止 20 min, 镜下观察见有部分细胞贴壁、稍加摇荡不浮起时, 将营养液连同未贴壁细胞吸入另一培养瓶, 传代时重复上述操作便可以去除成纤维细胞。胸腔积液中提取的胸膜间皮细胞, 主要有红细胞和白细胞, 因红细胞和白细胞不贴壁, 可经反复换液去除; 巨噬细胞虽贴壁, 但经 4~5 天培养, 自行裂解而去除。两种方法得到的第二代细胞爬片行角蛋白免疫组化染色, 每百个细胞查着色阳性细胞, 观察其纯度。

1.5 鉴定及活力观察

鉴定方法: 倒置相差显微镜下观察活细胞的形态, 第二代细胞进行扫描电镜和透射电镜观察细胞的微结构。二代细胞爬片进行免疫组化 S-P 法(streptavidin peroxidase conjugated method)染色, 分别做抗人波形蛋白、抗人角蛋白、抗人白细胞 CD_{45} 、抗 VIII 因子相关抗原的单克隆抗体 4 种染色(免疫组化试剂均购于博士德公司)。活力观察: 细胞消化脱落后离心, 制备细胞悬液, 调整细胞数为 1×10^5 个/ml, 吸取 100 μl 细胞悬液移入 0.5 ml 的 eppendorf 管中, 加入等量的 0.4 g/L 台盼蓝溶液, 混匀; 在 5 min 内用血球计数板分别计数活细胞和死细胞, 计算活细胞率。

2 结果

2.1 人胸膜间皮细胞的形态学鉴定

倒置相差显微镜下可见: 人胸膜间皮细胞呈多形性, 星状、多角形占多数, 细胞汇合后呈多边形铺路石样(图 1A、图 1B); 透射电镜下可见: 细胞表面有微绒毛, 细胞浆内丰富的内质网和线粒体, 未见 Weibel-Palade 小体(图 2)。

2.2 免疫组化鉴定

采用免疫组化 S-P 法, 分别做抗人波形蛋白、抗人角蛋白、抗人白细胞 CD_{45} 、抗 VIII 因子相关抗原的单克隆抗体 4 种染色; 染色结果为抗人波形蛋白、抗人角蛋白染色阳性(图 1C、图 1D), 抗人白细胞 CD_{45} 、抗 VIII 因子相关抗原的单克隆抗体阴性。

2.3 细胞活力和纯度

消化分离间皮细胞的活细胞率在 97% 以上; 胸腔积液得到间皮细胞的活细胞率为 95%。消化分离

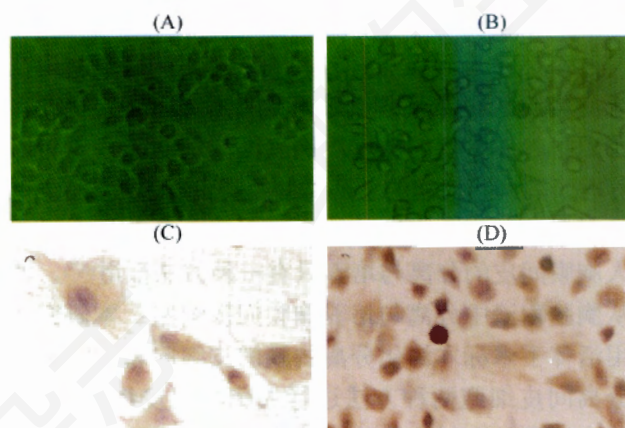


图 1 光镜下细胞特征及免疫组化染色结果

A: 光镜下传代后人胸膜间皮细胞特征(20 \times); B: 光镜下原代人胸膜间皮细胞特征(20 \times); C: 人胸膜间皮细胞免疫组化 S-P 法抗人波形蛋白染色(40 \times ; 胞浆内棕色着色为阳性, 胞核呈蓝色淡染); D: 人胸膜间皮细胞免疫组化 S-P 法抗人角蛋白染色(20 \times ; 胞浆内棕色着色为阳性, 胞核呈蓝色淡染)。

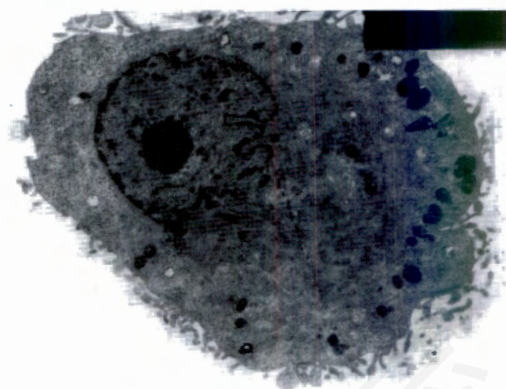


图 2 透射电镜下人胸膜间皮细胞的特征(430 \times)

的间皮细胞纯度在98%以上,胸腔积液分离的间皮细胞纯度在94%左右。

3 讨论

近期对间皮及间皮细胞的研究,认识到它在维持浆膜腔的完整性和功能中具有重要作用。间皮细胞可以对微环境中的一些信号作出反应和应答,可以分泌葡萄糖胺聚糖和表面活性物质减少脏与壁的摩擦,参与转运液体和微粒进出浆膜腔,参与炎症反应,可以通过释放生长因子和胶原来进行损伤的修复,可以释放蛋白酶和纤溶酶而防止纤维化和黏连^[1,8~10];然而对间皮细胞的认识还有很多不足,还要做大量的研究工作,如胸腔积液患者小腔形成原因等;因此间皮细胞的体外培养具有重要的意义。Devin等^[11]用消化液注入兔胸腔内消化分离培养了胸膜间皮细胞;人间皮细胞的分离培养只有从胸腔积液中分离的报道,Kalomenidis等^[6]用良性胸腔积液分离细胞成功建立人胸膜间皮细胞的体外培养模型。人胸膜间皮细胞的分离培养尚无消化法分离法培养的报道。本研究从人脏胸膜和壁胸膜消化分离胸膜间皮细胞,进行培养;并和胸腔积液中分离胸膜间皮细胞的方法作以比较。

本研究两种取材方法均成功的建立了人胸膜间皮细胞体外培养模型,根据形态学:呈多边形铺路石样,电镜下见细胞表面有大量的微绒毛,细胞浆内丰富的内质网和线粒体,未见Weibel-Palade小体;免疫组化染色结果抗人波形蛋白、抗人角蛋白阳性,抗人白细胞CD₄₅、抗VIII因子相关抗原的单克隆抗体阴性,排除了成纤维细胞、内皮细胞、白细胞,证实为人胸膜间皮细胞^[12]。细胞的纯度均达95%以上。为了提高人胸膜间皮细胞培养的成功率,要注意以下几个方面。(1)注意标本细菌污染情况,手术标本取材后要用高浓度的抗生素浸泡,并反复用无菌生理盐水冲洗;胸腔积液患者由于临床抗生素的应用,个别胸腔积液中真菌生长,培养液中可加入大扶康。培养瓶最好用进口的一次性培养瓶,细胞贴壁较好;(2)给予含不同浓度的血清对比后,胎牛血清的浓度以10%~20%较为适宜,良好培养液也是细胞生长的重要条件,本实验应用Hyclone公司生产的RPMI1640培养液,胸膜间皮细

胞生长良好。(3)正确确定换液的时间,手术标本消化分离的原代细胞换液时间为第4~5天,避免过早换液,以更利于细胞的贴壁;对于从胸腔积液中分离得到的原代间皮细胞,可以增加换液次数,以纯化胸膜间皮细胞,分离后0.5h换液一次,可以去除大量的红细胞和白细胞,于24h和第三天各换液一次,换液时轻轻转动培养瓶,使不贴壁的细胞悬浮;传代后便可得到较纯的人胸膜间皮细胞。传代细胞每三天换液一次。(4)为提高胸膜间皮的纯度,在取得脏胸膜后,包于注射器上胸膜面向外,消化时避免断端接触消化液,反复冲洗,以减少红细胞,37℃水浴中消化,25~30min为宜,可以得到纯度较高的间皮细胞,且有较好的细胞活性,消化时间不要大于35min,少量的成纤维细胞可以经反复贴壁法去除。(5)取得标本的患者年龄最好低于55岁,对于胸腔积液中得到的间皮原代细胞传代时间5天左右,以免细胞老化,不以长满瓶壁80%为准。第2~3代细胞用于实验为宜,胸腔积液得到的间皮细胞于第4代活力下降,第6代完全丧失增殖活力。手术标本消化的间皮细胞可以传至第6代,第7代失去增殖活力。

两种取材方法最终结果一致,但各有优缺点。标本获得上:胸腔积液易于得到,手术标本获取有一定的难度。从手术标本得到的间皮细胞活力好,纯度较高,更符合实验要求;胸腔积液得到的间皮细胞活力稍差,纯化费时费试剂。根据细胞活力和镜下观察生长状况等,两种取材方法得到的细胞都能满足实验要求。

参考文献 (References)

- [1] Mutsaers SE. *Respirology*, 2002, 7: 171
- [2] Huggins JT et al. *Respirology*, 2004, 9: 441
- [3] Felekis VA. *Respirology*, 2005, 10: 402
- [4] Sharma RK et al. *Chest*, 2003, 124: 682
- [5] Nasreen N et al. *Oncol Res*, 2003, 14: 155
- [6] Kalomenidis I et al. *Chest*, 2005, 127: 1335
- [7] Xie C et al. *Respirology*, 2005, 10: 567
- [8] Asano T et al. *BJU Int*, 2005, 96: 1409
- [9] Bird SD et al. *Cell Biol Int*, 2004, 28: 151
- [10] Herrick SE et al. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 621
- [11] Devin CJ et al. *Chest*, 2003, 123: 202
- [12] Mutsaers SE. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 9

Isolation and Culture of Human Pleural Mesothelial Cells

Hong-Feng Wang, Wen-Xiu Qu, Hong-Bo Liu, Ping He, Sheng-Qi Li*

(Department of Respiratory Medicine, Second Hospital (Shengjing Hospital), China Medical University, Shenyang 110004, China)

Abstract Use two methods to establish human pleural mesothelial cells (HPMCs) culture reproducible model *in vitro* and compare the advantage and disadvantage of them. Mesothelial cells were isolated from human pleura by trypsin EDTA disaggregation and pleural effusion fluid. HPMCs were identified by morphology and immunohistochemistry: Streptavidin peroxidase conjugated method. Confluent HPMCs appeared multipolar and like cobblestone; Numerous surface microvilli and abundant endoplasmic reticulum were observed under electron microscopy. HPMCs expressed cytokeratin and vimentin; VIII factor associated antigen and CD₄₅ were negative. Two methods achieved success in establishment of reproducible model for culture of HPMCs. Those methods were feasibility in methodology. The cells isolated from human pleura had higher purity quotient. Pleural effusion fluid was easier to obtain.

Key words pleura; human pleural mesothelial cell; culture

Received: March 7, 2006 Accepted: August 8, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-24-83955098, E-mail: LXN-1999@sohu.com

细胞生物学杂志

双月刊 1979年创刊

第28卷 第6期 2006年12月

Chinese Journal of Cell Biology

Bimonthly Established in 1979

Vol. 28 No. 6 December 2006

主办 中国科学院上海生命科学研究院
生物化学与细胞生物学研究所
中国细胞生物学学会

协办 南方医科大学珠江医院肿瘤中心

编辑 《细胞生物学杂志》编辑委员会
岳阳路319号31B楼405室, 上海200031
电话: 021-54920950
传真: 021-54922810
电子信箱: cjcb@sibs.ac.cn
网址: //www.cjcb.org

主编 郭礼和

出版 上海科学技术出版社
上海瑞金二路450号 邮政编码: 200020

印刷 上海图宇印刷有限公司

发行 上海市报刊发行局

订阅 全国各地邮局

广告代理 上海高精广告有限公司
广告经营许可证: 沪工商广字3101031000061

Sponsored by Institute of Biochemistry and Cell Biology
Shanghai Institutes for Biological Sciences,
Chinese Academy of Sciences
Chinese Society for Cell Biology

Joint-sponsored by Oncology Center, Zhujiang Hospital,
The Southern Medical University

Edited by Editorial Board of Chinese Journal of Cell Biology
Room 405, Building 31B, 319 Yue-Yang Road,
Shanghai 200031, China
Tel: 86-21-54920950 Fax: 86-21-54922810
E-mail: cjcb@sibs.ac.cn Http: //www.cjcb.org

Editor-in-Chief Li-He Guo

Published by Shanghai Scientific and Technical Publishers
450 Rui-Jin Er Road, Shanghai 200020, China

Distributed by Shanghai Bureau for Distribution of
Newspapers and Journals

Subscribed by Domestic Local Post Offices