

与成纤维细胞共培养的肺泡 II 型上皮细胞的生物学特性

卢红艳 常立文* 汪 鸿 李文斌

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 武汉 430030)

摘要 建立胎鼠肺泡 II 型上皮细胞(AECII)与肺成纤维细胞(LF)共培养模型, 观察与 LF 共培养下 AECII 的生物学特性。倒置相差显微镜观察 AECII 形态和基本生长情况; RT-PCR 和流式细胞术分别检测肺泡表面活性蛋白-C(SP-C)、水通道蛋白 5(AQP5) mRNA 及蛋白质表达; 流式细胞术检测细胞周期及 Ki67 表达。结果显示, 与 LF 共培养时, AECII 能较好地保留其细胞形态, SP-C mRNA 及其蛋白质表达明显增加, 而 AQP5 mRNA 及其蛋白质表达则明显减少; LF 促进 AECII 增殖, 使 G₂/M、S 期细胞及表达 Ki67⁺ 细胞的比率明显增多。结果提示, AECII 与 LF 共培养时, 能更好地保留其细胞形态、分化及增殖特性。

关键词 肺泡 II 型上皮细胞; 肺成纤维细胞; 共培养; 生物学特性

胎肺由上皮组织和间质组织构成, 间质组织对于肺器官的发生、生长及其分化至关重要。在胎肺发育晚期, 上皮与间质组织中的主要细胞分别是肺泡 II 型上皮细胞(alveolar epithelial cell II, AECII)和肺成纤维细胞(lung fibroblast, LF)。AECII 与 LF 结构上紧密相连, 对 AECII 成熟、分化及肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)的合成均有重要作用。形态学研究发现^[1], AECII 与 LF 之间存在有特殊作用位点, 且集中于板层小体形成的部位, 并在上皮细胞开始分化、合成 PS 时迅速增加。与肺泡 I 型上皮细胞(alveolar epithelial cell I, AECI)相比, 分化成熟的 AECII 有更多这种细胞间相互作用的位点。本实验通过原代培养胎鼠 AECII 和 LF, 模拟体内微环境, 建立胎鼠 AECII 和 LF 共培养模型, 观察共培养下 AECII 的生物学特性, 为 AECII 和 LF 在肺发育及肺损伤中相互作用的研究提供可靠的实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与材料 MEM 培养基、胰蛋白酶、DNA 酶 I 及 Trizol 均为 Gibco 公司产品。胎牛血清(FCS)为浙江三利生物制品有限公司产品。Ki67 小鼠单克隆抗体为 BD 公司产品。羊抗 SP-C、AQP5 抗体为 Santa Cruz 公司产品, SP-C 和 AQP5 分别是 AECII 及 AEC I 特异的表型标志^[3,4]。FITC 标记的兔抗羊及兔抗鼠 IgG 为 Proteintech Group 公司产品。

M-MLV 逆转录酶为 Promega 公司产品。扩增大鼠 SP-C、AQP5 及 β 肌动蛋白的引物均由北京赛百胜基因有限公司合成。PCF 插入式 Millicell 培养皿(直径 30 mm, 孔径 0.4 μ m)由美国 Millipore 公司生产。1.1.2 实验动物 SD 成年雌鼠, 体质量 200~220 g; 成年雄鼠, 体质量 220~250 g, 均由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。雌雄鼠按 3:1 合笼交配, 次日晨取雌鼠阴道分泌物涂片, 镜检见精子, 当日记为妊娠第 1 天, 孕 19 天(预产期为 22 天)时, 在无菌条件下, 剖宫取出胎鼠。

1.2 方法

1.2.1 胎鼠 AECII 和 LF 的分离、纯化 按本研究室建立的方法分离、纯化并签定 AEC II 和 LF^[2]。无菌条件下取出胎鼠肺组织, 剪碎, D-Hanks 液漂洗, 以胰蛋白酶(含 0.02 g/L DNA 酶 I)、胶原酶消化, 4 $^{\circ}$ C 800 r/min 离心 8 min, 沉淀重悬在 10% FCS 的 MEM 中。将细胞悬液接种在 50 ml 玻璃培养瓶中, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 培养 40 min 后贴壁的为纯的 LF。未贴壁的大部分为上皮细胞, 吸出 4 $^{\circ}$ C 800 r/min 离心 8 min, 沉淀重悬接种至新的培养瓶, 如此反复贴壁 3 次, 最后未贴壁的细胞经 800 r/min 离心 8 min, 10% FCS MEM 重悬, 调细胞浓度为 $5 \times$

收稿日期: 2006-10-23 接受日期: 2006-12-28

国家自然科学基金(No.30471824)和国家“十五”科技攻关计划资助项目(No.2004BA720A)

* 通讯作者。Tel: 027-83663345, E-mail: lwchang@tjh.tjmu.edu.cn

10⁵ 个/ml, 接种至 6 孔板中, 37 °C 5 % CO₂ 培养箱培养 15~18 h, 弃除未贴壁细胞, 此时贴附在 6 孔板中的细胞即为纯的 AECII。采用免疫细胞化学 SP 法及透射电镜对两种细胞进行鉴定。

1.2.2 胎鼠 AECII 和 LF 共培养模型建立 AECII 贴附在 6 孔板并更换培养基后, 按 Millipore 公司说明, 用无菌镊子在 6 孔板中放入 PCF 插入式 Millicell 培养皿。用 0.25% 胰蛋白酶消化第 2 代至第 5 代的 LF, 制成 LF 的细胞悬液, 调整细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/ml, 接种到已预先在培养液中浸湿的套皿中, 置 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养, 以 6 孔板中不放入套皿单独培养的 AECII 为对照。单独培养和共培养组细胞每两天换液一次并用倒置显微镜观察 AECII 形态和基本生长情况。于单独培养、共培养后 2 天和 4 天, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 制备单细胞悬液, 进行以下实验。

1.2.3 直接细胞计数和细胞活力检测 显微镜下用血球计数板计数各组不同时间点细胞数。0.4% 台盼蓝染色检测细胞活力, 镜下观察, 死细胞被染成淡蓝色, 而活细胞拒染, 血球计数板计数死细胞和活细胞数。细胞计数由两人同时进行, 每份标本检测 5 次, 取均值作为该份样本的细胞数。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期和 Ki67 表达 将单细胞悬液以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。PBS 洗细胞一遍, 离心弃上清液, 75% 冷乙醇固定, -20 °C 至少 2 h。离心弃固定液, PBS 洗细胞一次。加入 450 μl PBS、150 μl 的 1% Triton X-100 作用 5 min, PBS 洗细胞一遍。加入 1 : 100 稀释的 Ki67 小鼠单克隆抗体, 37 °C 温育 50 min, PBS 洗细胞一遍。加入 FITC 标记的 1 : 100 稀释的兔抗鼠 IgG, 37 °C 避光温育 30 min, PBS 洗细胞一次。加入 10 μl 5 μg/ml RNA 酶、10 μl 100 μg/ml PI 及 480 μl PBS 室温作用 20 min, 应用 FACSsort 流式细胞仪(Becton Dickson, 美国)检测, 经 488 nm 的激光激发, 被标记细胞发射的红色 PI 和绿色 FITC 荧光分别被 FACSsort 流式细胞仪的标准透光镜接收, 应用 CellQuest 软件对上述细胞荧光强度进行分析。以 PBS 代替一抗为阴性对照。PI 的荧光强度直接反映了细胞内 DNA 含量, 可确定细胞的周期时相; FITC 的荧光强度反映 Ki67 表达, 以阳性细胞表达百分率(测试样品阳性率-对照样品阳性率)计量各组 Ki67 表达量。实验重复 5 次。

1.2.5 SP-C、AQP5 mRNA 表达的 RT-PCR 检测

采用 TRizol 一步法提取 AECII 总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和含量。cDNA 第 1 链的合

成按 M-MLV 逆转录酶说明书进行。扩增 SP-C 基因有义链的序列为: 5'-GAA ACT CAG AAA CGC CTC G-3', 反义链为: 5'-CCC AGA AGA ATC AGA ATC GG-3'; AQP5 有义链为: 5'-GCC ATC CTC TAT TTC TAC CTG C-3', 反义链为: 5'-GCT TCA AAC TCT TCG TCT TCC-3'; β 肌动蛋白有义链为: 5' -ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GGC TGC G-3', 反义链为: 5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3'。采用 50 μl 的反应体系进行 PCR, 反应条件为: 扩增 SP-C, 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 60 s; 扩增 AQP5, 94 °C 45 s, 53 °C 45 s, 72 °C 60 s, 均进行 35 个循环。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳后, 在 260 nm 波长的紫外灯下观察并采用凝胶成像分析系统对扩增产物条带进行扫描。以 SP-C/β 肌动蛋白和 AQP5/β 肌动蛋白条带吸光度 A 值, 分别作为 SP-C 和 AQP5 mRNA 的相对含量。实验重复 5 次。

1.2.6 流式细胞术检测 SP-C、AQP5 表达 将细胞悬液以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗细胞一遍, 离心弃上清液, 75% 冷乙醇固定, -20 °C 至少 2 h。离心弃固定液, PBS 洗细胞一次, 加入 1 : 100 稀释的羊抗 SP-C 或羊抗 AQP5 多克隆抗体, 室温温育 60 min, PBS 洗细胞一次, 加入 1 : 50 稀释的 FITC 标记的兔抗羊 IgG, 室温避光温育 30 min, PBS 洗 2 次, 上流式细胞仪检测, 以 PBS 代替一抗为阴性对照。以阳性细胞表达百分率计量各组 SP-C、AQP5 表达量。实验重复 5 次。

1.2.7 统计分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 软件进行统计学分析, 组间两样本均数比较采用 *t* 检验, 组内比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 AECII 形态和基本生长情况

AECII 和 LF 共培养 2 天, AECII 紧密相靠生长, 互相衔接, 呈铺路石状, 胞核呈圆形, 内有小颗粒, 其形态与 AECII 单独培养 2 天无明显区别。AEC II 单独培养 4 天, 胞核伸展体积变大, 核仁减少, AECII 分散生长, 少数细胞出现空泡样改变。AECII 和 LF 共培养 4 天, 细胞体积无明显增大, 胞核仍呈圆形, 细胞呈大的聚集样生长(图 1)。

2.2 共培养对 AECII 细胞增殖和细胞活力的影响

单独培养和共培养 2 天, AECII 较接种初期细胞数目均有明显增加, 细胞活力高。单独培养 4 天, 尽

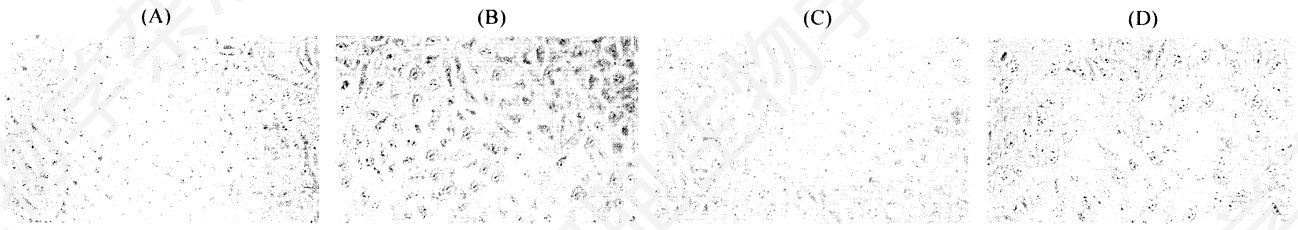


图1 AECII形态的倒置相差显微镜观察(200×)

A: AECII 与 LF 共培养 2 天, AECII 紧密相靠生长, 互相衔接, 呈铺路石状, 胞核呈圆形; B: AECII 单独培养 2 天, AECII 紧密相靠生长, 胞核呈圆形; C: AECII 与 LF 共培养 4 天, AECII 呈聚集样生长, 细胞体积无明显增大, 胞核呈圆形; D: AECII 单独培养 4 天, AECII 分散生长, 胞核伸展体积变大, 核仁减少。

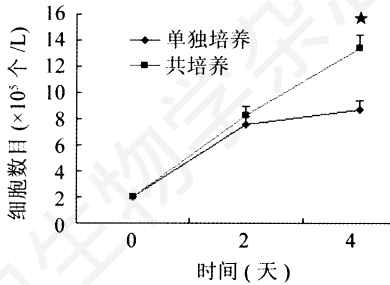


图2 共培养对 AECII 细胞增殖的影响
与单独培养组相比, * $P < 0.05$ 。

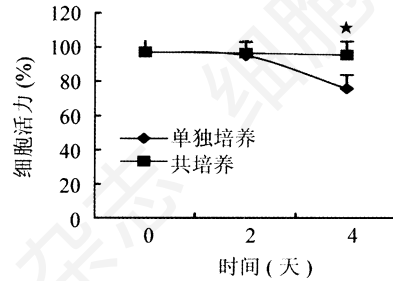


图3 共培养对 AECII 细胞活力的影响
与单独培养组相比, * $P < 0.05$ 。

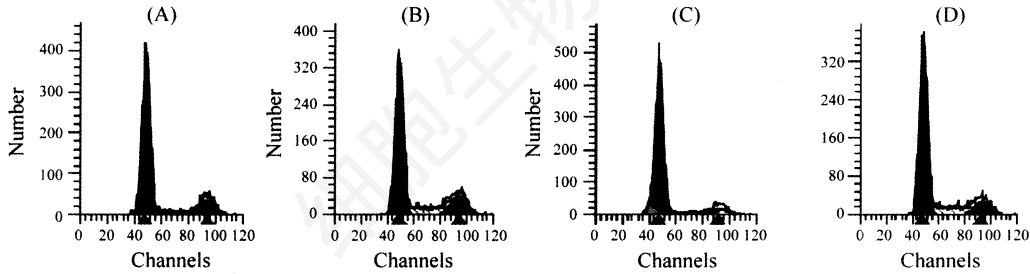


图4 AECII 的细胞周期分布

A: 单独培养 2 天; B: 共培养 2 天; C: 单独培养 4 天; D: 共培养 4 天。

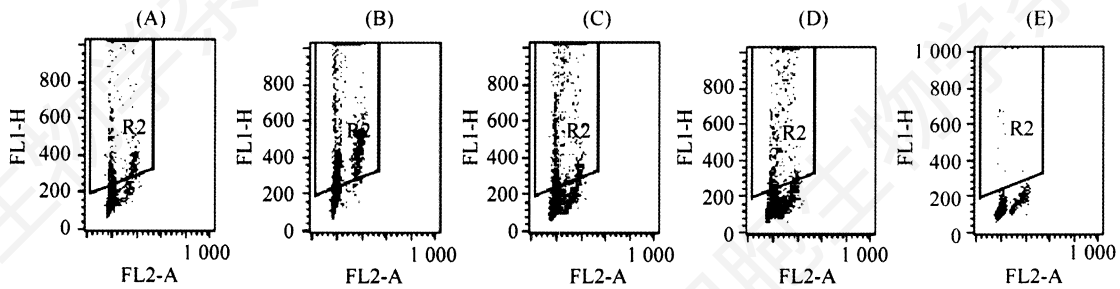


图5 Ki67 表达的流式细胞分析(以阴性对照框定 R2)

A: 单独培养 2 天; B: 共培养 2 天; C: 单独培养 4 天; D: 共培养 4 天; E: 阴性对照。

表1 共培养对 AECII 细胞周期分布及 Ki67 表达的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 2 天 | | | | 4 天 | | | |
|-------|------------------------------------|--------------|-----------------------|--------------|------------------------------------|--------------|-----------------------|--------------|
| | G ₀ /G ₁ (%) | S (%) | G ₂ /M (%) | Ki67 (%) | G ₀ /G ₁ (%) | S (%) | G ₂ /M (%) | Ki67 (%) |
| 单独培养组 | 77.85±4.13 | 13.27±2.00 | 8.42±2.15 | 20.75±4.22 | 88.97±5.59 | 5.01±2.50 | 6.03±3.19 | 10.06±2.62 |
| 共培养组 | 67.34±5.23 * | 17.39±2.85 * | 15.25±2.58 * | 38.30±7.18 * | 70.82±5.90 * | 17.77±2.56 * | 11.40±3.52 * | 25.99±6.08 * |

与单独培养组相比, * $P < 0.05$ 。

管 AECII 数目较单独培养 2 天仍有增加, 但增加幅度不明显, 且细胞活力明显下降, 而共培养 4 天 AECII 数目较单独培养 4 天有明显增加, 且(95.2 ± 4.9)% 的 AECII 台盼蓝仍拒染(图 2、图 3)。

2.3 共培养对 AECII 细胞周期分布及 Ki67 表达的影响

与 LF 共培养时, AECII 的增殖明显, 共培养 2 天及 4 天, G₀/G₁ 期细胞均较 AECII 单独培养组明显减少, 而 G₂/M、S 期细胞及表达 Ki67 阳性细胞的比率

明显增多(表 1、图 4 及图 5)。

2.4 共培养对 SP-C 和 AQP5 mRNA 及蛋白质表达的影响

与单独培养组相比, AECII 与 LF 共培养 2 天及 4 天, SP-C mRNA 的表达明显增加, 而 AQP5 mRNA 的表达明显降低, 两组 β 肌动蛋白表达的水平无差异, 表明上样量一致(图 6)。流式细胞术检测, 单独培养及共培养组 SP-C 及 AQP5 的蛋白水平变化趋势与其 mRNA 表达的趋势一致(表 2, 图 7, 图 8)。

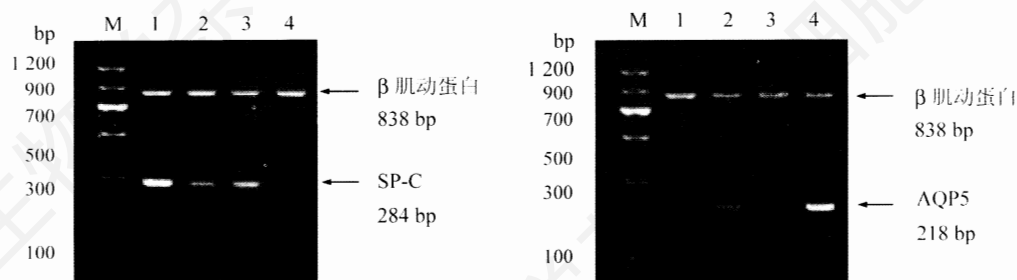


图 6 共培养对 SP-C 和 AQP5 mRNA 表达的影响

M: DNA marker; 1: 共培养 2 天; 2: 单独培养 2 天; 3: 共培养 4 天; 4: 单独培养 4 天。

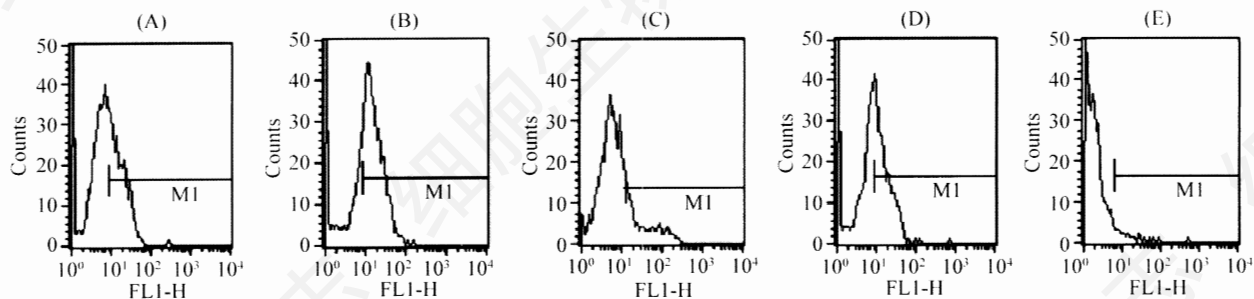


图 7 SP-C 表达的流式细胞分析(以阴性对照确定 M1)

A: 单独培养 2 天; B: 共培养 2 天; C: 单独培养 4 天; D: 共培养 4 天; E: 阴性对照。

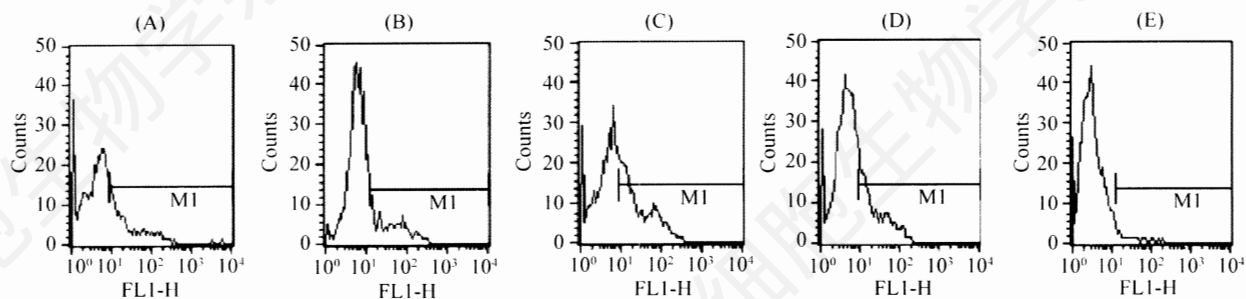


图 8 AQP5 表达的流式细胞分析(以阴性对照确定 M1)

A: 单独培养 2 天; B: 共培养 2 天; C: 单独培养 4 天; D: 共培养 4 天; E: 阴性对照。

表 2 共培养对 SP-C 和 AQP5 mRNA 及其蛋白质表达的影响(n=5, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 2 天 | | | | 4 天 | | | |
|-------|------------|--------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | SP-C mRNA | SP-C 细胞(%)* | AQP5 mRNA | AQP5 细胞(%)* | SP-C mRNA | SP-C 细胞(%)* | AQP5 mRNA | AQP5 细胞(%)* |
| 单独培养组 | 0.78±0.17 | 42.20±6.45 | 0.57±0.18 | 22.72±5.94 | 0.21±0.02 | 15.07±4.51 | 1.23±0.37 | 40.98±9.60 |
| 共培养组 | 1.42±0.30* | 71.57±11.32* | 0.10±0.01* | 13.40±4.13* | 1.02±0.36* | 49.76±8.95* | 0.29±0.10* | 23.05±3.96* |

与单独培养组相比, *P<0.05。

3 讨论

在肺发育和肺损伤修复过程中, AECII 通过“上皮足突”穿越基底膜的间隙与肺间质成纤维细胞紧密接触,并可影响这些细胞的代谢功能^[5,6]。与成年肺相比,发育中的肺泡壁含相对多的成纤维细胞,胎肺成纤维细胞与肺泡上皮细胞相互作用对保持 AECII 的生长分化及表型必不可少^[7]。由于 AECII 在体研究比较困难,体外分离培养是目前常用的研究方法;同时,在体外寻找一种 AECII 与 LF 的共培养系统,对研究 AECII 和 LF 在肺发育及肺损伤中的相互作用具有重要意义。本实验使用 PCF 插入式 Millicell 共培养装置, Millicell 培养皿中的滤膜含有细胞外基质(extracellular matrix, ECM),有利于 LF 的贴壁及其与 ECM 的相互作用;微孔滤膜的直径(0.4 μm)允许 LF 分泌的因子通过,发挥其对 AECII 的诱导作用;且 AECII 和 LF 由滤膜隔开,可对 AECII 和 LF 单独进行分析。因此,本实验模拟体内微环境,重建了细胞生长所需的细胞-细胞、细胞-基质的相互作用。有研究表明^[8], AECII 单独培养 4 天时,细胞伸展,体积变大,转分化为 AECI,失去了 AECII 的分化功能。我们的研究也发现, AECII 单独培养 4 天时同样具有类似的形态学改变;且随培养时间延长,表达 SP-C⁺ 细胞的比率逐渐减少,而 AQP5⁺ 细胞逐渐增加。由于 SP-C 仅在 AECII 上表达, AQP5 仅特异表达于 AECI,因此,上述形态学和细胞特异标志物检测结果提示, AECII 单独培养 4 天时,已失去其形态学特征及分化功能,转分化为 AECI。AECII 与 LF 共培养时, AECII 呈聚集样生长,细胞伸展不明显,细胞体积无明显增大,胞核仍呈圆形,且 SP-C mRNA 及其蛋白质表达较同时间点单独培养组明显增加,而 AQP5 mRNA 及其蛋白质表达则明显减少,说明 AECII 与 LF 共培养能更好地保留 AECII 的形态及分化功能。Shannon 等^[9]将 AECII 与 LF 共培养,发现共培养组较 AECII 单独培养组 AECII SP-A、SP-B、SP-C、SP-D mRNA 水平明显增加,肺表面活性物质中磷脂的生物合成增加了 10 倍,且保留了 AECII 良好的立方体结构。

细胞增殖是细胞生命活动的重要特征之一, AECII 与 LF 共培养时,其细胞数目及细胞活力较单独培养 4 天有明显增加,说明 LF 可促进 AECII 增殖。

细胞增殖有赖细胞周期活动,流式细胞仪可以检测所处细胞周期(sub-G₁, G₀/G₁, S, G₂/M)各期的细胞比例,是反映细胞增殖的可靠指标。本研究结果显示,共培养 2 天及 4 天, G₀/G₁ 期细胞较 AECII 单独培养组明显减少,而 G₂/M、S 期细胞明显增多。由于(S + G₂/M) % 为增殖指数,代表了细胞群体中增殖期细胞的数量,说明共培养时分裂增殖的细胞增多。Ki67 的表达与细胞周期密切相连,对细胞增殖必不可少。Ki67 在 G₁ 后期开始出现, S 期和 G₂ 期逐渐增高, M 期达到高峰,有丝分裂结束后,迅速降解消失, G₀ 期和 G₁ 早期细胞不被标记,被认为是较为理想的检测细胞增殖活性的抗体^[10]。AECII 与 LF 共培养时,其 Ki67 表达较 AECII 单独培养明显增加,进一步说明 LF 可促进 AECII 增殖。有研究表明, AECII 在含角化细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)的培养基中生长,可促进 AECII 增殖^[11]。LF 能产生 KGF,在我们这种共培养系统,由于 AECII 与 LF 并未直接接触,因此可推测这种增加的 AECII 增殖可能部分由 LF 产生的可溶性因子如 KGF 调节,但是否存在其他可溶性因子有待深入研究。

可见, AECII 与 LF 共培养时,重建了细胞生长所需的细胞-细胞的相互作用,因此能更好地保留其形态及分化功能,细胞增殖增加。本实验初步探讨了与 LF 共培养下 AECII 的生物学特性,为进一步研究 AECII 与 LF 在肺发育及肺损伤中的相互作用提供了实验基础。

参考文献(References)

- [1] Adamson IY et al. *Lab Invest*, 1984, **50**: 461
- [2] 祝华平等. *华中科技大学学报(医学版)*, 2003, **32**: 597
- [3] Mason RJ et al. *Am J Pathol*, 2000, **156**: 175
- [4] Verkman AS et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **278**: L867
- [5] Demayo F et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, **283**: L510
- [6] Shannon JM et al. *Annu Rev Physiol*, 2004, **66**: 625
- [7] Adamson IY et al. *Exp Lung Res*, 1991, **17**: 821
- [8] Clegg GR et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, **289**: L382
- [9] Shannon JM et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, **24**: 235
- [10] Lebe B et al. *Pathol Res Pract*, 2004, **200**: 389
- [11] Zhang F et al. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, **31**: 679

Biological Characteristics of Type II Alveolar Epithelial Cells Co-cultured with Lung Fibroblasts

Hong-Yan Lu, Li-Wen Chang*, Hong Wang, Wen-Bin Li

(Department of Pediatrics, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract To observe the biological characteristics of type II alveolar epithelial cells (AECII) co-cultured with lung fibroblasts (LF) *in vitro*, a co-culture model of AECII and LF from fetal rat lung was set up. The morphological change and growth of AECII were observed under inverted phase contrast microscope. The SP-C and AQP5 expressions in mRNA and protein levels were observed by RT-PCR and flow cytometry. Flow cytometry was also used to detect the cell cycle and Ki67 expression of AECII. When co-cultured with LF, AECII could keep its morphology well, and the SP-C expression in mRNA and protein levels increased markedly, while the AQP5 expression decreased. LF facilitated the proliferation of AECII by increased the percentage of cells in S and G₂/M phases and the expression rate of Ki67. The results showed that AECII can keep its morphology, differentiated and proliferation characteristics when co-cultured with LF.

Key words type II alveolar epithelial cell; lung fibroblast; co-culture; biological characteristics

Received: October 23, 2006 Accepted: December 28, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471824) and the National Key Technologies Research and Development Program of China during the 10th Five-Year Plan Period (No.2004BA720A)

*Corresponding author. Tel: 86-27-83663345, E-mail: lwchang@tjh.tjmu.edu.cn