

食蟹猴肺上皮细胞株MFLE-001的建立及生物学特性研究

宋倩¹ 孙华¹ 陈艳¹ 唐新华² 程先硕¹ 袁露¹ 丛力³ 许良智³ 罗发高³ 董坚^{1*}

(¹云南省肿瘤医院/昆明医科大学第三附属医院, 肿瘤研究所, 昆明 650118; ²云南省第一人民医院, 遗传诊断中心, 昆明 650000; ³云南英茂生物科技有限公司, 昆明 650000)

摘要 该研究建立了食蟹猴肺上皮细胞株并鉴定其生物学特性。以食蟹猴肺部组织进行原代培养, 用差速贴壁法纯化细胞株, 并通过倒置显微镜、透射电镜、扫描电镜观察, 绘制生长曲线, 进行核型分析以及肺上皮标志物检测等方法研究其生物学特性。结果显示, 体外培养细胞生长均一、稳定, 细胞倍增时间为4.8天, 免疫组化CK(+), CK-7(+), 波形蛋白(+), 染色体分析表明, 具有正常2倍染色体数目(2n=42), 符合食蟹猴肺上皮细胞株特性。该研究成功建立第一株食蟹猴肺上皮细胞株, 命名为MFLE-001, 为肺部疾病研究和药物筛选提供了理想的体外实验模型。

关键词 食蟹猴; 肺上皮细胞株; 生物学特性

Establishment and Biological Characteristics of Lung Epithelial Cell Line MFLE-001 from *Macaca fascicularis*

Song Qian¹, Sun Hua¹, Chen Yan¹, Tang Xinhua², Cheng Xianshuo¹, Yuan Lu¹, Cong Li³,
Xu Liangzhi³, Luo Fagao³, Dong Jian^{1*}

(¹Yunnan Cancer Hospital & The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University Cancer Institute, Kunming 650118, China; ²The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650000, China; ³Yunnan Yingmao Biotechnology Co., Ltd., Kunming 650000, China)

Abstract In the present study, the lung epithelial cell line from *Macaca fascicularis* was established and its biological characteristics was identified. The cells derived from a pulmonary tissue of *Macaca fascicularis* were primarily cultured and purified by differential attachment technique. The biological characteristics of the cell line were studied by using optical microscope, electron microscopes, growth curve, karyotype analysis and lung epithelial marker. The results showed that the growth of cells were stable and uniform *in vitro*. The cell doubling time was 4.8 d and the results of immunohistochemistry showed the expressions of CK and CK-7. The vimentin was positive and the chromosome numbers were 2n=42, all of which were accorded with the characteristics of lung epithelial cell line from *Macaca fascicularis*. MFLE-001 has been proved to be the first lung epithelial cell line of *Macaca fascicularis* and is an ideal experimental model for lung disease research and drug screening.

Keywords *Macaca fascicularis*; lung epithelial cell line; biological characteristics

收稿日期: 2018-05-03 接受日期: 2018-06-29

云南省应用基础研究重大项目(批准号: 2016FC007)和昆明市科技计划项目(批准号: 2015-1-H-01053)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13888230968, E-mail: 3196259175@qq.com

Received: May 3, 2018 Accepted: June 29, 2018

This work was supported by the Major Project of Applied Basic Research of Yunnan (Grant No.2016FC007) and the Planning Project of Science and Technology of Kunming (Grant No.2015-1-H-01053)

*Corresponding author. Tel: +86-13888230968, E-mail: 3196259175@qq.com

网络出版时间: 2018-08-24 10:51:28

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180824.1051.006.html>

食蟹猴(*Macaca fascicularis*)也称长尾猕猴,产于缅甸、泰国、马来半岛、苏门答腊、爪哇、菲律宾和中国等区域。食蟹猴与人类基因组相似度高达97.5%^[1], 其与人类疾病直系同源基因和药物靶点显示高度的序列相似性^[2]。目前, 非洲绿猴肾细胞(Vero)为比较经典的灵长类细胞株^[3], 除此外的灵长类成熟稳定的细胞株鲜少报道; 而食蟹猴细胞系多为干细胞, 如精原干细胞、食蟹猴脐带间充质干细胞、食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞等^[4-8], 存在稳定传代及应用局限。食蟹猴组织原代培养过程中, 由于杂细胞难分离、竞争性抑制、传代次数受限等, 较难获得稳定的体细胞株。另外, 由于动物基因库差别、种族差别、市售生长因子抗体等不能通用, 食蟹猴体外细胞系建立存在很大困难。我们采用原代培养的方法, 成功建立第一株食蟹猴肺上皮细胞株, 对研究肺部损伤、炎症及肺部细胞恶变等相关疾病的发生发展机制、药物筛选以及药物安全性鉴定等提供了新的肺上皮细胞模型, 具有重要的理论及临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肺部组织来源 2016年11月30日昆明医科大学第三附属医院病理教研室手术切除的食蟹猴肺部组织。雄性食蟹猴, 18A, 编号984673, 由云南英茂生物科技有限公司提供[许可证号SCXK(滇)2014-0001], 动物实验获得云南省肿瘤医院/昆明医科大学实验动物伦理委员会的批准。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12、DPBS、三抗(青霉素、链霉素、两性霉素)、青链霉素双抗、0.25%胰蛋白酶购自以色列BI公司; FBS购自法国BioSum公司; III型胶原酶购自北京索来宝科技有限公司; DMSO购自美国Sigma公司; CK抗体、CK-7抗体及波形蛋白抗体购自美国BD公司。

1.1.3 主要仪器、设备 CO₂培养箱、生物安全柜、ST40离心机、恒温震荡水浴锅购自美国Thermo公司。CX51倒置显微镜购自日本Nikon公司。

1.2 方法

1.2.1 组织培养 获取新鲜无菌的食蟹猴肺部手术标本, 剪成1 mm³左右的组织小块, 加入30倍体积的III型胶原酶(1 mg/mL), 于37 °C水浴震荡消化30 min; 1 500 r/min离心5 min, 弃上清, DPBS洗涤, 以

(2~10)×10⁵/mL的密度接种于T-25细胞培养瓶, 37 °C、5% CO₂培养箱中培养。细胞长至培养瓶80%后胰酶消化, 差速贴壁培养细胞, 6 h后显微镜下观察成纤维状细胞大部分贴壁, 轻轻晃动培养瓶, 将未贴壁上层细胞悬液转移到新的培养瓶中, 原瓶添加适量完全培养基继续培养。P₁₀后细胞初步纯化完成, 即可进行常规传代。

1.2.2 形态学观察 倒置显微镜每日观察细胞形态及生长状态, 细胞初步纯化后, 按常规方法制备扫描电镜及透射电镜的观察标本, 观察细胞表面及内部超微结构。

1.2.3 生长曲线测定 按文献[9]的方法, 1×10⁴个/孔的密度接种于24孔板, 培养约10天, 每日消化计数3孔内细胞数量, 绘制生长曲线, 计算细胞倍增时间。倍增时间(Td)的计算公式: $Td = t \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$ 计算。t为培养时间, N₀为首次记下的细胞数, N_t为t时间后的细胞数。

1.2.4 核型分析 取对数生长期的细胞, 按照染色体G显带法^[10]进行染色体制备及结构显示, 对细胞进行种属、染色体结构分析。

1.2.5 免疫组化 将细胞消化计数, 按照(1~5)×10⁵个/片接种在黏附性载玻片上, 培养3~5天, 吸弃培养基, DPBS洗涤1~2次, 4%多聚甲醛固定, 检测细胞角蛋白(cytokeratin pan, 广谱CK)、CK-7(cytokeratin-7)和波形蛋白(vimentin)。

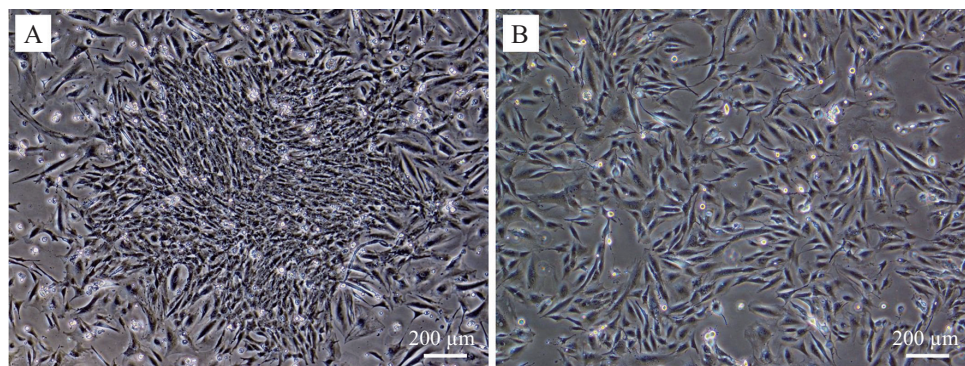
2 结果

2.1 原代及传代培养

原代培养细胞在液体培养基中黏附性聚集贴壁生长, 细胞混杂, 90%以上为成纤维样细胞、少量多边形或圆形细胞, P₂₀以后细胞均一, 多为上皮样细胞(图1A)。已在体外培养12个月, 50余代(图1B), 不依赖任何细胞因子, 细胞生长稳定; 液氮保存复苏后锥虫蓝染色, 细胞活率维持在95%以上。

2.2 形态学观察

倒置显微镜观察细胞多为上皮样细胞, 细胞直径为50~100 μm; 扫描电镜见细胞形状不规则, 细胞表面有很多丰富细密的微绒毛, 细胞接触黏连生长(图2); 透射电镜见细胞核仁明显, 核区占比约20%, 外泌小泡比较丰富, 胞质内大量糖原颗粒弥漫分布, 含有大量的粗面内质网、线粒体和高尔基体, 为生长旺盛的正常上皮细胞(图3)。



A: 原代细胞(P₀)聚集贴壁生长, 细胞混杂; B: 第56代细胞(P₅₆)均一, 多为上皮样细胞。

A: the cells concomitance and adherence in the primary culture, B: the fifty-sixth generation of cells were uniform and mostly epithelioid.

图1 食蟹猴肺上皮细胞形态学观察

Fig.1 Morphological observation of the lung epithelial cells from *Macaca fascicularis*

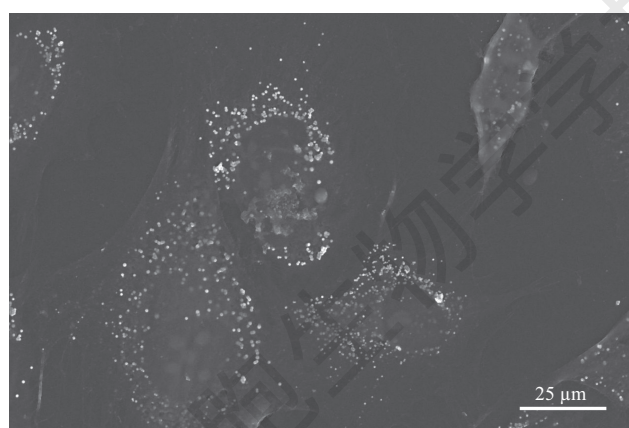


图2 食蟹猴肺上皮细胞P₃₀扫描电镜观察

Fig.2 The lung epithelial cells of *Macaca fascicularis* P₃₀ observed under scanning electron microscopy

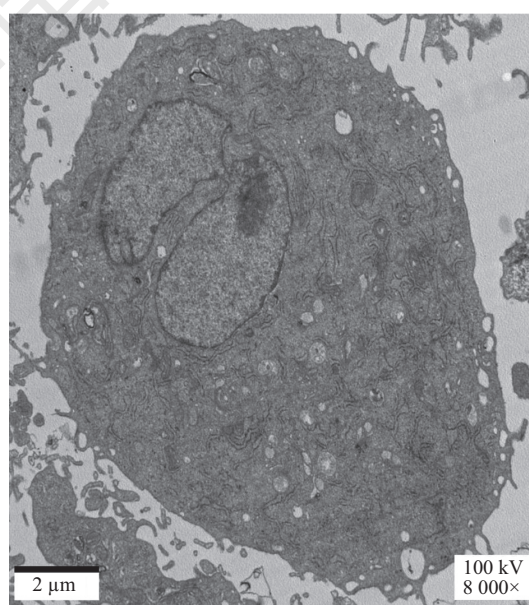


图3 食蟹猴肺上皮细胞P₃₀透射电镜观察

Fig.3 The lung epithelial cells of *Macaca fascicularis* P₃₀ observed under transmission electron microscopy

2.3 细胞增殖特性研究

接种后细胞增殖较慢, 第7天后细胞汇合度接近100%, 不能堆叠生长, 根据细胞计数结果, 绘制生长曲线(图4)。经公式计算, 食蟹猴肺上皮细胞 P_{56} 倍增时间为4.8天。

2.4 核型分析

选取染色体分散良好的分裂相进行分析, 计数100个分裂中期散开较好的染色体。染色体数目非整倍性, 但42条正常二倍体染色体数目出现频率高达66%, 可判定该细胞株染色体为 $2n=42$, 配成21对。其中, 常染色体20对, 性染色体1对, 根据着丝点指数

和形态进行染色体分类, 排列制成染色体组型图(图5), 综合分析该细胞为食蟹猴细胞株^[11]。

2.5 免疫组织化学

细胞爬片免疫组化结果显示, CK阳性率约为30%, 多在细胞核内表达(图6A); CK-7阳性率约为95%, 细胞核和细胞质均有不同程度表达(图6B); 波形蛋白阳性率接近100%, 主要在细胞质表达(图6C)。

3 讨论

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是

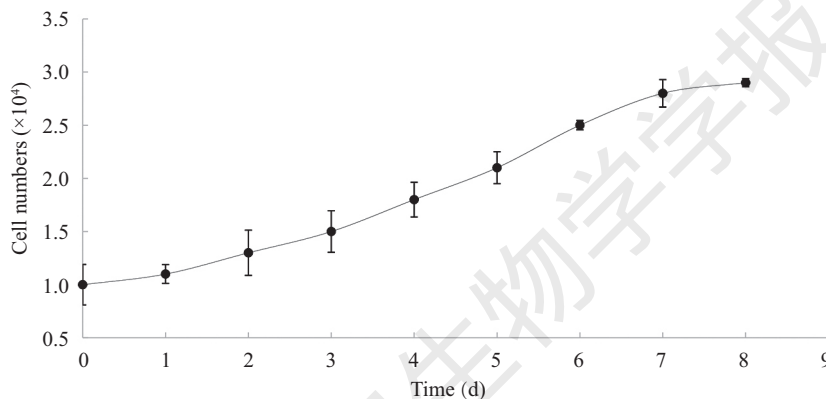


图4 食蟹猴肺上皮细胞生长曲线

Fig.4 The growth curve of the lung epithelial cells from *Macaca fascicularis*

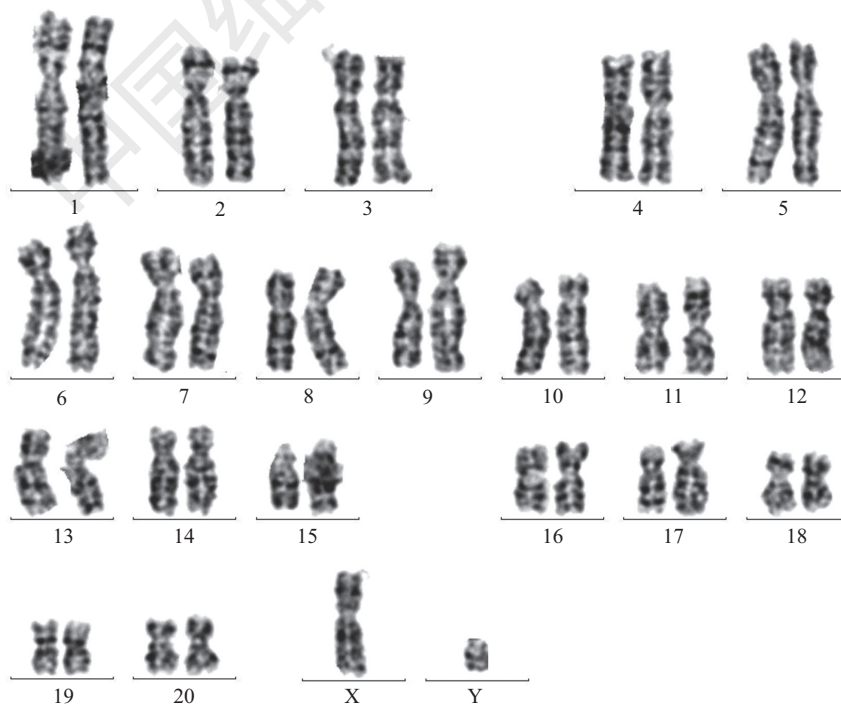
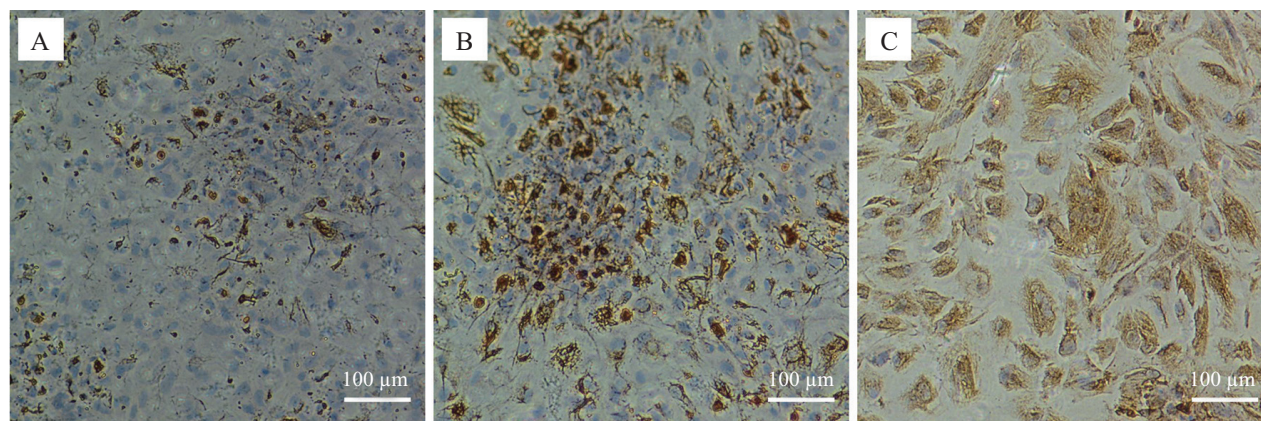


图5 食蟹猴肺上皮细胞染色体组型图

Fig.5 The chromosome of the lung epithelial cells from *Macaca fascicularis*



A: 细胞角蛋白CK免疫组化结果; B: CK-7免疫组化结果; C: 波形蛋白免疫组化结果。

A: immunohistochemical results of CK; B: immunohistochemical results of CK-7; C: immunohistochemical results of vimentin.

图6 食蟹猴肺上皮细胞免疫组化

Fig.6 The immunohistochemistry of the lung epithelial cells from *Macaca fascicularis*

由肺内外因素引起的肺部炎症反应, 肺泡上皮细胞以及毛细血管内皮细胞异常, 临床表现为呼吸频速、窘迫、进行性低氧血症, 最终结果为呼吸衰竭^[12]。ALI通常被认为是ARDS的早期表现, ARDS的发病率约为每年86.2/100 000人次, 有着相当高的病死率, 达35%~40%^[13]。多种临床药物及治疗手段对ARDS进行治疗, 无一证实能有效降低该病的死亡率。临床现实迫使我们对于ARDS发病机制进行深入研究, 发掘潜在的治疗靶点及手段, 降低死亡率。由此, 我们建立的食蟹猴肺上皮细胞株MFLE-001, 为探讨ALI/ARDS的发生、发展以及治疗提供了理想的体外研究模型。

本研究取食蟹猴新鲜肺部组织, 利用恒温震荡结合胶原酶消化的方法成功分离制备原代细胞; 该方法操作简单, 消化结果理想, 胶原酶接触时间短, 减少对原代细胞状态影响。采用差速贴壁法培养食蟹猴肺部组织细胞传代培养, 获得稳定均一的细胞株。细胞倍增时间为4.8天, 生长缓慢。在体外培养过程中, 透射电镜、扫描电镜观察细胞为正常上皮样细胞。免疫组化CK(+), CK-7(+), 波形蛋白(+). CK是角质细胞中的主要骨蛋白, 主要分布于上皮细胞, 具有极高的保守性和组织分化特异性; CK-7多为肺腺上皮抗体; 波形蛋白为细胞中间丝蛋白抗体, 肌纤维表达最为明显, 也常用于间叶和上皮鉴别的一线抗体; 结合染色体组型图, 该细胞株为国内外首株食蟹猴肺上皮细胞株。

迄今为止, 已有不同种属的多种肺上皮细胞株, 作为研究ALI/ARDS等相关肺部疾病的体外细胞模

型, 常用的为人正常肺上皮细胞株(BEAS-2B)、人肺腺癌上皮细胞(A549)、小鼠肺上皮细胞株(MLE-12)等^[14-15]。但因细胞株存在种属差异、个体差异等, 导致同一刺激不同细胞株表现的应激方式、相关基因以及蛋白的表达也不尽相同, 推及到不同的动物模型更是相去甚远。相较于体型较小的啮齿类动物以及兔、犬、猪、羊模型, 灵长类动物与人类疾病直系同源基因和药物靶点高度相似。本研究首次成功建立食蟹猴肺上皮细胞株, 丰富了食蟹猴稳定传代细胞系, 具有较大应用潜能。未来可利用食蟹猴肺上皮细胞株建立体外细胞模型, 对比正常肺上皮细胞株和肺腺癌上皮细胞株对药物应激方式的差别, 进行药物筛选及药理机制研究; 也可对食蟹猴正常的肺上皮细胞株永生化建立食蟹猴体外模型, 为进一步探索药物体内代谢机制及安全性研究提供基础资料等。此外, 也为急性肺部损伤、炎症等肺部疾病的基础研究和临床前应用提供了理论依据。

参考文献 (References)

- Hernandez RD, Hubisz MJ, Wheeler DA, Smith DG, Fergusson B, Rogers J, *et al.* Demographic histories and patterns of linkage disequilibrium in Chinese and Indian *Rhesus macaques*. *Science* 2007; 316(5822): 240-3.
- Yan G, Zhang G, Fang X, Zhang Y, Li C, Ling F, *et al.* Genome sequencing and comparison of two nonhuman primate animal models, the cynomolgus and Chinese *Rhesus macaques*. *Nat Biotechnol* 2011; 29(11): 1019-23.
- Fu SM, Luo FH, Chen XP, Xu BF, Zhang JY, Cai JH, *et al.* Long-term culture and identification of the spermatogonia stem cells from the testes of cynomolgus monkey. BIT'S 7th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell, 2014.

- 4 张秀娟, 李学家, 张守全, 饶军华, 张艳春, 季芳, 等. 食蟹猴精原干细胞体外培养体系的初步建立. 动物学杂志(Zhang Xiujuan, Li Xuejia, Zhang Shouquan, Rao Junhua, Zhang Yanchun, Ji Fang, *et al.* The preliminary establishment of *in vitro* culture system for spermatogonial stem cells of cynomolgus monkey. Chinese Journal of Zoology) 2011; 46(6): 46-52.
- 5 许丹娜, 许惠艳, 凌泽继, 卢晟盛, 谢莉萍, 卢克焕. 食蟹猴耳部成纤维细胞体外培养体系的初步建立. 安徽农业大学学报(Xu Danna, Xu Huiyan, Ling Zeji, Lu Shengsheng, Xie Liping, Lu Kehuan. *In vitro* cultivation of ear fibroblast cells from *Macaca fascicularis*. Journal of Anhui Agricultural University) 2009; 36(3): 469-75.
- 6 Suemori H, Tada T, Torii R, Hosoi Y, Kobayashi K, Imahie H, *et al.* Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. Dev Dyn 2001; 222(2): 273-9.
- 7 庞荣清, 何洁, 李瑞生, 赵晶, 朱慧, 朱向情, 等. 食蟹猴脐带间充质干细胞的分离与鉴定. 中国比较医学杂志(Pang Rongqing, He Jie, Li Ruisheng, Zhao Jing, Zhu Hui, Zhu Xiangqing, *et al.* Isolation and identification of cynomolgus monkey umbilical cord mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Comparative Medicine) 2005; 25(4): 66-9.
- 8 Yang H, Liu Z, Ma Y, Zhong CQ, Yin Q, Zhou CK, *et al.* Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. Cell Res 2013; 23(10): 1187-200.
- 9 Zhang Y, Zhao W, Zhang HJ, Domann FE, Oberley LW. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. Cancer Res 2002; 62(2): 1205-12.
- 10 鄂征. 组织培养技术及其在医学研究中的应用. 北京: 中国协和医科大学出版社(E Zheng. Beijing: Peking Union medical College Press), 2004, 298-325.
- 11 Ferguson J, Tomkins GA. Chromosome studies during long-term cultivation of epithelioid *Cercopithecus* and *Cynomolgus* monkey kidney cell lines. J Natl Cancer Inst 1964; 33(4): 619-30.
- 12 Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute lung injury: aclinical and molecular review. Arch Pathol Lab Med 2016; 140(4): 345-50.
- 13 Hayes M, Curley G, Ansari B, Laffey JG, *et al.* Clinical review: Stemcell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome-hope or hype. Crit Care 2012; 16(2): 205-19.
- 14 叶嘉. Nogo-B在急性肺损伤肺泡上皮细胞凋亡中的作用(博士论文). 第二军医大学(Ye Jia. A role of Nogo-B in the apoptosis of plumanry alveolar cells in acute lung injury. The Second Military Medical University), 2015.
- 15 吴晓芳, 王丽云, 易建华, 雷剑, 奥宇宏, 李建军, 等. 芍药苷对PM2.5诱导BEAS-2B细胞损害的保护作用. 南方医科大学学报(Wu Xiaofang, Wang Liyun, Yi Jianhua, Lei Jian, Ao Yuhong, Li Jianjun, *et al.* Protective effect of paeoniflorin against PM2.5-induced damage in BEAS-2B cells. Journal of Southern Medical University) 2018; 38(2): 168-73.