

胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞生长状况及 ABCA3 表达变化的初步研究

张盼, 张晓群, 邱洁, 杨洋, 周晓玉*, 周晓光

(南京医科大学附属南京儿童医院新生儿科, 江苏 南京 210008)

[摘要] **目的:**观察原代培养胎鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(type Ⅱ alveolar epithelial cell, AEC Ⅱ)的生长状况及 AEC Ⅱ特异性蛋白 ATP 结合盒转运蛋白 A3(ATP binding cassette transporter A3, ABCA3)的表达变化,为有关新生儿肺发育及肺部疾病的研究奠定一定基础。**方法:**采用胰酶联合胶原酶消化肺组织,差速离心及差速贴壁法纯化细胞;电子显微镜鉴定 AEC Ⅱ细胞;倒置相差显微镜观察不同时间点细胞生长状态;MTT 法绘制细胞生长曲线;免疫荧光技术观察 ABCA3 动态表达变化。**结果:**电镜下观察到 AEC Ⅱ特征性板层小体,大小及数量不等,胞膜外缘分布有刺状微绒毛;MTT 法测得铺板后第 24、36、48、72、96、120 h 的吸光度值分别为 0.177 ± 0.009 , 0.193 ± 0.011 , 0.212 ± 0.019 , 0.253 ± 0.019 , 0.243 ± 0.012 , 0.192 ± 0.011 。光学显微镜下细胞形态逐渐拉长,变扁平,细胞内颗粒逐渐减少。免疫荧光示 ABCA3 表达逐渐下降。**结论:**原代培养的胎鼠 AEC Ⅱ在培养早期生长状况最佳,ABCA3 表达最丰富,故在早期(即培养 72 h 以内)进行肺发育疾病相关机制的研究较为理想。

[关键词] 胎鼠;肺泡Ⅱ型上皮细胞;原代培养;细胞增殖;ATP 结合盒转运蛋白 A3

[中图分类号] R332.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)11-1488-05

Preliminary study of the fetal rat alveolar type Ⅱ epithelial cell growth and ABCA3 expression changes

ZHANG Pan, ZHANG Xiao-qun, QIU Jie, YANG Yang, ZHOU Xiao-yu*, ZHOU Xiao-guang

(Department of Neonate, Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the growth of type Ⅱ alveolar epithelial cell(AEC Ⅱ) and dynamic expression of AEC Ⅱ specific protein ATP binding cassette transporter A3 (ABCA3) *in vitro*. **Methods:** Lung tissues of 19-day fetal rats were digested with trypsin and collagenase, then screened for AEC Ⅱ with different centrifugal force and repeated attachment. AEC Ⅱ was identified by electron microscopy. Growth status and shape of attached cells in different time were observed with inverted phase contrast microscope, and the cell growth was assayed by MTT assay. The dynamic expression of ABCA3 in AEC Ⅱ was detected by immunofluorescence. **Results:** The characteristic lamellar bodies of ACE Ⅱ with varying size and amount were observed under electron microscopy. The absorbance value of AEC Ⅱ cells by MTT at 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h was 0.177 ± 0.009 , 0.193 ± 0.011 , 0.212 ± 0.019 , 0.253 ± 0.019 , 0.243 ± 0.012 , 0.192 ± 0.011 respectively. Cell morphology under microscope gradually became elongating and flattening, and the intracellular particles gradually reduced. Simultaneously, the immunofluorescence assay result showed that ABCA3 expression in AEC Ⅱ cells gradually decreased with the culture time prolonged. **Conclusion:** Primary cultured AEC Ⅱ has the best growth status and the most abundant ABCA3 expression in the early culture time, therefore this period (primary culture for 72 hours or less) is optimum time to research mechanism of diseases associated with lung development.

[Key words] fetal rat; type Ⅱ alveolar epithelial cell; primary culture; cell proliferation; ATP binding cassette transporter A3

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(11): 1488-1492]

已知肺泡Ⅱ型上皮细胞(type Ⅱ alveolar epithelial cell, AEC Ⅱ)是胎肺发育晚期肺组织的主要构成细胞,其增殖、分化机制与肺发育不良相关疾病

(bronchopulmonary dysplasia, BPD)、新生儿呼吸窘迫综合征(neonatal respiratory distress syndrome, NRDS)等过程都有着密切联系。就其功能而言,一方面 AEC Ⅱ可通过分泌肺表面活性物质,降低肺泡张力,防止肺泡萎陷,从而保持肺的顺应性;另一方面,其还可作为干细胞在肺损伤修复等必要过程中增殖

[基金项目] 国家自然科学基金(81270725)

*通讯作者, E-mail: xyzhou161@163.com

转分化为肺泡 I 型上皮细胞(type I alveolar epithelial cell, AEC I); 另外, AEC II 还具有维持肺泡内外电解质、液体平衡及免疫调节等多种功能^[1]。

本课题组曾对不同孕龄胎鼠肺组织形态学及 miRNA 的差异性表达做过较为深入的研究^[2-3], 与此同时, 现今也有文献报道多个 miRNA(如 miR-17-92, miR-155, miR-127 等)参与了肺发育和肺部疾病的调控过程^[4-6], 但以上这些研究均较少涉及细胞水平。另外, AEC II 尚没有可供传代的细胞系, 因而有关肺发育及肺损伤的研究主要依赖 AEC II 的原代培养。而 AEC II 在体外培养生长的过程中, 其数目、形态、特异性标志物均有可能发生较大变化, 且最终可产生凋亡。因此, 有必要对体外培养的 AEC II 生长情况及相应特异性分子 ATP 结合盒转运蛋白 A3(ATP binding cassette transporter A3, ABCA3) 的表达变化等做进一步研究, 以期对肺发育、肺损伤及相关疾病的机制研究提供一定的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

健康成年 SD 大鼠购自南京医科大学实验动物供应中心, 其中雄性 5 只, 雌性 5 只, 饲养于 SPF 环境中, 并按雌雄 1:1 合笼交配, 次日晨查找阴栓, 找到阴栓日计为妊娠第 0 天。待雌鼠孕期满 19 d 时, 行无菌剖宫产术取出胎鼠肺脏。

1.2 方 法

1.2.1 胎鼠 AEC II 的原代分离、纯化与培养

取孕 19 d 大鼠, 以 10%水合氯醛(每 100 g 体重 1 ml)腹腔注射麻醉, 于无菌条件下快速剖宫取出胎鼠, 分离胎肺, 置于预冷的 PBS 液中, 去除气管等非肺组织, 清洗数次后将肺组织剪至 1 mm³ 大小, 用 PBS 液洗涤至溶液澄清。0.25%胰酶(含 0.04 g/L DNA 酶)洗组织块 1 次后, 按每只胎鼠加入 0.25%胰酶 1 ml, 消化 20 min, 完全培养基(含有 10%胎牛血清的 DMEM)终止消化。经 100 目和 200 目筛网过滤, 滤液 800 r/min 离心 5 min。弃上清, 沉淀用培养基重悬, 1 200 r/min 离心 5 min 后加入 0.1%的胶原酶 I 继续消化 15 min。完全培养基终止消化后离心, 重悬沉淀。细胞按 5 × 10⁶ 个/ml 接种于培养瓶, 培养 40 min 后贴壁的为成纤维细胞, 未贴壁的大部分为肺泡上皮细胞。吸出培养液, 离心, 重悬沉淀后重复上步操作 1~2 次。最后未贴壁的细胞利用血球计数板计数细胞总量, 并按 1 × 10⁶ 个/ml 的细胞浓度接种至相应的培养容器, 置于 37℃、5% CO₂ 培养

箱中培养, 次日换液, 弃除未贴壁的细胞, 此时贴附在瓶底的细胞即为纯化后的 AEC II 细胞, 每孔挑取少量细胞用台盼蓝染色法判断细胞活力。

1.2.2 透射电镜鉴定胎鼠 AEC II

0.25%的胰酶消化培养 36 h 的 AEC II, 完全培养基终止消化, 1 500 r/min 离心 5 min, 0.01 mol/L PBS 清洗, 再离心, 吸弃上清, 向沉淀加入 2.5%戊二醛 1 ml, 固定 2 h, 按常规电镜样品制备程序进行固定、脱水、渗透、包埋、超薄切片、铀铅染色, JEM-1010 透射电镜观察细胞内特征性板层小体及其他细胞器结构特征。

1.2.3 倒置相差显微镜观察细胞生长状态

分别取培养第 24、48、72、96 h 的 AEC II, 在倒置相差显微镜下观察 AEC II 生长状态及其形态结构变化, 并随机选取 6 个视野摄片。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖

将细胞以 1 × 10⁶ 个/ml 浓度接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100 μl。次日换液, 加培养基 180 μl。将细胞分为 24、36、48、72、96、120 h 组, 每组设 6 个复孔。分别在相应时间点加入 5 mg/ml MTT 溶液(每孔 20 μl), 反应 4 h 后去除培养液。每孔加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl, 经振荡作用 10 min 混匀, 多功能酶标仪检测 492 nm 的吸光度值。以细胞培养时间为 X 轴, 相应时间点的平均吸光度值为 Y 轴, 绘制细胞生长曲线。

1.2.5 免疫荧光法检测 ABCA3 的表达变化

分别在培养的第 24、72、120 h 取出细胞爬片, 用 4%的多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗。0.1% Triton X-100 通透 15 min, PBS 洗涤。再以 3%BSA 室温封闭 1 h, 滴加 1%BSA 稀释的小鼠抗 ABCA3 一抗(1:200)置于湿盒内 4℃过夜, PBS 漂洗后滴加 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:100)37℃孵育 2 h, PBS 充分洗涤后用 Antifade Mounting Medium 封片, 采用倒置相差荧光显微镜观察; 同时设阴性对照; 以抗体稀释液代替一抗。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两样本均数的比较采用 SNK-q 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞产量和纯度

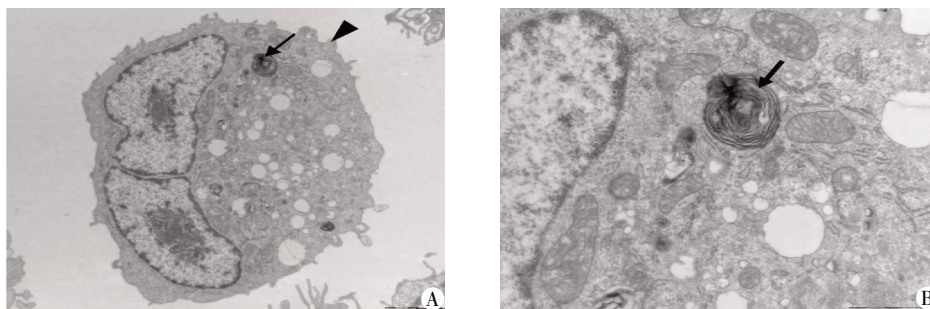
平均每 5 只 19 d 胎龄鼠的胎肺可分离获得的

AEC II 细胞数为 $(38.3 \pm 3.6) \times 10^6$ 个,台盼蓝拒染法检测接种后的细胞活力为 $(94.0 \pm 2.4)\%$ 。

2.2 透射电镜观察

原代培养 36 h 的细胞,电镜下可见典型的 AEC II 细胞结构:大小不一的板层小体,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,从数个到数十个不等。胞膜外可见微绒毛,呈棘状分布,胞浆内可见丰富的内质网、线粒体、高尔基体等细胞器,胞浆较多,胞核明显,部分可见双核(图 1)。



A:透射电镜下 AEC II 的整体结构,胞膜外缘可见棘状微绒毛(三角箭头所示),同时胞浆内可见数个大小不等的板层小体(黑色箭头所示, $\times 8000$);B:透射电镜下板层小体结构,可见其电子密度高,小体排列成同心圆状(黑色箭头所示, $\times 30000$)。

图 1 AEC II 超微结构在透射电镜下的观察

Figure 1 The observation of AEC II ultrastructure under transmission electron microscopy

2.3 光镜观察

通过胰酶消化、差速离心及反复贴壁法纯化的胎鼠 AEC II 在接种 18~20 h 后贴壁。培养 24 h 细胞呈圆形或立方形,立体感强,岛状分布,胞内含有丰富的遮光性强的颗粒,细胞器丰富,胞核明显;48 h 细胞变扁平,细胞数目增多;72 h 细胞形状开始变化,有拉长趋势;96 h 细胞已呈长梭形,细胞间有桥状连接,并有脱颗粒现象,胞内颗粒减少(图 2)。

2.4 细胞生长曲线

MTT 法测得细胞贴壁后第 24、36、48、72、96、120 h 的吸光度值分别为 0.177 ± 0.009 , 0.193 ± 0.011 , 0.212 ± 0.019 , 0.253 ± 0.019 , 0.243 ± 0.012 , 0.192 ± 0.011 。单因素方差分析示组间差异有统计学意义 ($F = 28.386, P = 0.000$);经 SNK-*q* 法多重比较,48 h 组与 24 h 组、72 h 与 48 h 组、120 h 与 72 h 组吸光度值差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),其中吸光度值在 72 h 最高,至 96、120 h 吸光度值逐渐下降(图 3)。

2.5 ABCA3 表达变化

体外培养 24 h 时可见 AEC II 的特异性蛋白 ABCA3 表达丰富,定位于胞浆膜上;72 h 时表达较 24 h 时明显减少;至 120 h 时其表达进一步减少(图 4)。

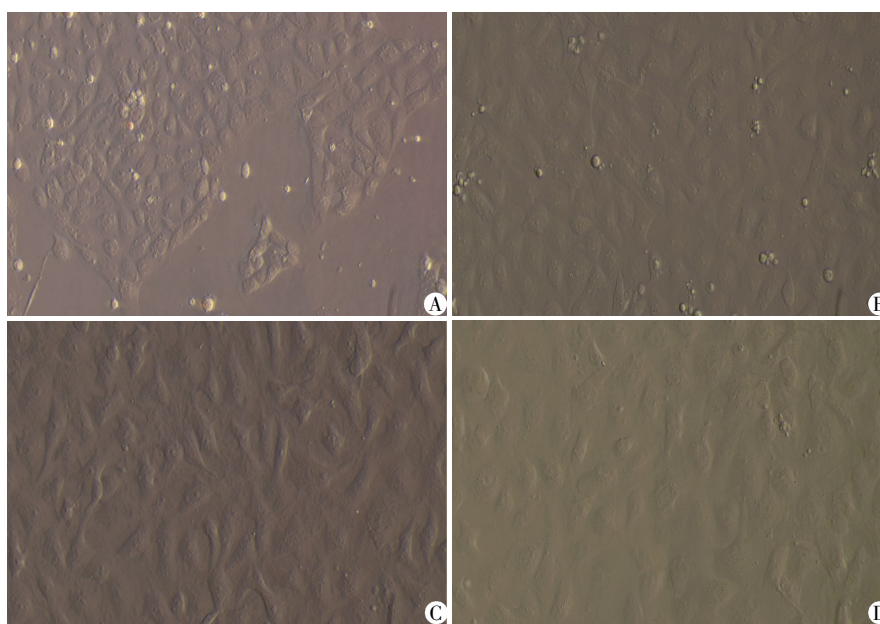
3 讨论

肺上皮细胞包括 AEC II 和 AEC I 两种,其中 AEC II 具有增殖、合成、分泌以及转分化等多种重要

功能,既往一直被认为是肺上皮的干细胞,因而在肺发育及肺损伤修复过程中有着重要作用。已知孕 19~20 d 时胎鼠肺发育尚处于囊泡期阶段,人类 27~34 周胎儿的肺发育进程与之十分类似,此时的肺组织细胞构成以 AEC II 为主,细胞生长较为活跃,表面活性物质形成并逐渐成熟,同时少量肺泡样结构开始形成^[7]。因次,理论上从 19~20 d 胎鼠肺组织分离 AEC II 产量大、纯度高、较易于纯化,且其生物学特点符合对晚期胎儿肺发育及肺部疾病研究的需要。另外,相比从新生鼠及成年鼠体内取样,从胎鼠体内取肺组织减少了污染机会。综合上述原因,选取 19 d 胎龄胎鼠提取 AEC II 能够较好地观察及研究胎肺发育。

电镜历来是鉴定 AEC II 的“金标准”,AEC II 细胞在电镜下的特异性结构主要表现为同心圆状板层小体及胞膜外缘微绒毛样突起^[8]。在本实验中也分别观察到了这两种标志性结构,这说明了 19 d 胎鼠的肺上皮细胞已经开始分化成熟,具有板层小体样结构及表面活性物质分泌功能,这也与本课题组之前对不同胎龄胎鼠肺组织的形态学观察结果相一致^[2]。另外,本研究还观察到电镜下可见大量的双核细胞(图 1),提示处在这个时期的 AEC II 具有较强的分裂增殖能力,较为适合进行肺发育相关机制的研究。

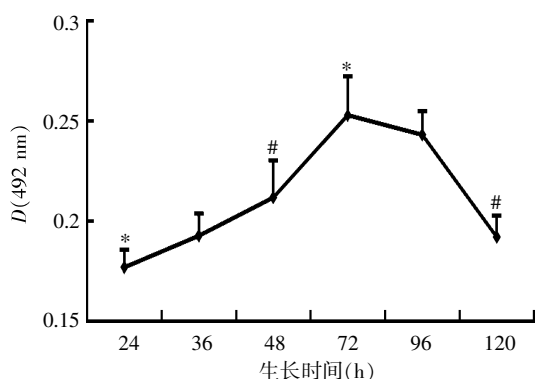
本实验发现细胞在培养 72 h 内处于持续增殖阶段,且统计分析提示 24 h 与 48 h 组、48 h 与 72 h 组、72 h 与 120 h 组 MTT 吸光度值差异均有统计学



A:培养 24 h 的 AEC II 细胞呈圆形或立方形,立体感强,岛状分布,胞内含有丰富的遮光性强的颗粒;B:培养 48 h 的 AEC II 细胞变扁平,细胞数目增多;C:培养 72 h 的 AEC II 细胞形状有拉长趋势;D:培养 96 h 的 AEC II 细胞呈长梭型状,细胞间有桥状连接,并有脱颗粒现象,胞内颗粒减少。

图 2 倒置相差显微镜观察不同时间点 AEC II 形态学变化($\times 200$)

Figure 2 Observation of morphological changes of AEC II at different time points under inverted phase contrast microscope ($\times 200$)



与 48 h 组比较, $*P < 0.05$; 与 72 h 组比较, $#P < 0.05$ 。

图 3 MTT 法测量 AEC II 生长曲线

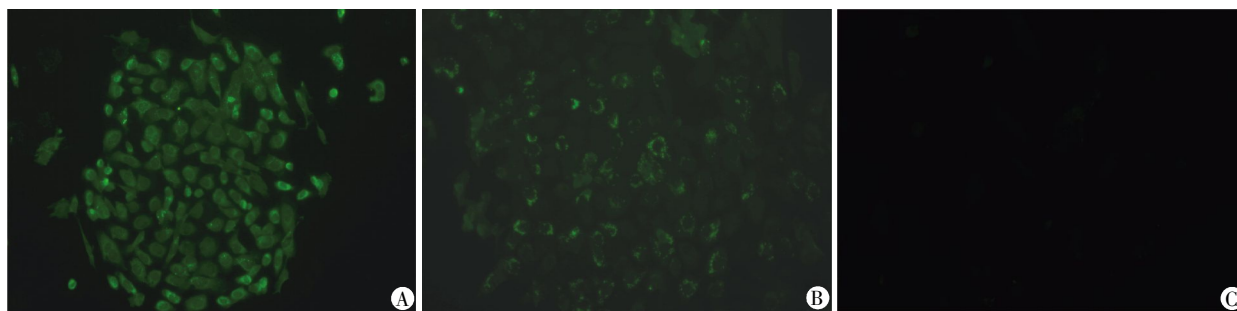
Figure 3 The growth curve of AEC II drawn by MTT assay

意义($P < 0.05$)。光学显微镜下则显示 72 h 组细胞形态变化最大,细胞被拉长变成扁平状,胞内空泡增多,这与 MTT 结果相一致,说明 AEC II 在原代培养的前 3 天增殖最为旺盛、活力最强,适合进行体外实验。而 3 d 后细胞活力、形态则出现明显变化,不再具有 AEC II 特征。但本实验与刘秀香等^[9]研究结果有一定差异,她们观察到细胞在第 2~4 天时增殖分化能力最强。本研究推测这可能与分离纯化细胞的方法不一样或培养条件不一致有关。因为体外培养的 AEC II 增殖状况和表型变化受多种因素影响,包括 AEC II 的培养基质、上皮细胞与成纤维细胞的相互作用、AEC II 的接种密度、机械因素及一些生长因

子等^[10]。

ABCA3 是 ABC 转运子家族中 ABCA 亚家族的成员,它在肺组织中一般呈高表达水平。超微结构分析发现肺 ABCA3 蛋白仅在 AEC II 内板层小体膜的表面表达^[11]。ABCA3 基因突变不但会导致板层小体生成障碍及表面活性物质生成减少,而且 ABCA3 突变可以加剧内质网应激并启动肺上皮细胞凋亡^[12-13]。另外,ABCA3 蛋白表达缺失会造成严重的 NRDS 的发生,同时增加肺间质性疾病的发生^[14]。最近有研究揭示了这方面的部分机制,研究者发现 A549 细胞中 ABCA3 基因突变可引起 A549 细胞表型改变,即上皮向间质改变^[15]。在临床上,ABCA3 基因突变也是一些新生儿重症呼吸窘迫综合征的重要原因之一^[16]。ABCA3 在原代培养的胎鼠 AEC II 中的研究鲜有报道,本研究则初步探索了 ABCA3 在胎鼠 AEC II 细胞中的表达情况。结果表明初始培养的胎鼠 AEC II 中 ABCA3 表达丰富,但是随着培养时间的延长,ABCA3 表达量逐渐减少,这可能与 AEC II 在培养过程中板层小体逐渐外排丢失有关,也可能是 AEC II 出现转分化现象,AEC II 特征性分子表达减少所造成。因此,倘若需对 ABCA3 进行研究应在初始培养 3 d 内进行,而不宜做长期研究。

总之,本研究对胎鼠 AEC II 体外培养时的生长状况及 ABCA3 的表达变化进行了初步研究,发现



A:培养 24 h 的 AEC II 细胞 ABCA3 表达丰富,定位于胞浆膜;B:培养 72 h 的 AEC II 细胞 ABCA3 表达较 24 h 时下降;C:培养 120 h 的 AEC II 细胞 ABCA3 表达微弱。

图 4 免疫荧光法观察 ABCA3 表达变化($\times 200$)

Figure 4 The observation of ABCA3 expression in AEC II by immunofluorescence microscopy ($\times 200$)

原代培养的胎鼠 AEC II 生长过程经历了增殖、停滞、凋亡 3 个时期,增殖期即细胞培养的早期是体外实验的良好时间段,此时 ABCA3 表达最为丰富,随后逐渐减少,故其研究应最好在初始培养 3 d 内进行。

[参考文献]

- [1] 柳琪林,胡森,盛志勇. 肺泡 II 型上皮细胞形态与功能的研究进展[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(7):445-446
- [2] 杨洋,周晓玉,郭凯,等. 大鼠胚胎肺泡发育形态学观察研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2011,31(9):1282-1284
- [3] Yang Y,Kai G,Pu XD,et al. Expression profile of microRNAs in fetal lung development of Sprague-Dawley rats [J]. Int J Mol Med,2012,29(3):393-402
- [4] Carraro G,El-Hashash A,Guidolin D,et al. miR-17 family of microRNAs controls FGF10-mediated embryonic lung epithelial branching morphogenesis through MAPK14 and STAT3 regulation of E-Cadherin distribution [J]. Dev Biol,2009,333(2):238-250
- [5] Williams AE,Larner-Svensson H,Perry MM. MicroRNA expression profiling in mild asthmatic human airways and effect of corticosteroid therapy [J]. PloS One,2009,4(6):e5889
- [6] Bhaskaran M,Wang Y,Zhang H,et al. MicroRNA-127 modulates fetal lung development[J]. Physiol Genomics,2009,37(3):268-278
- [7] Copland I,Post M. Lung development and fetal lung growth[J]. Paediatr Respir Rev,2004,5(4):259-264
- [8] Chen J,Chen Z,Narasaraju T. et al. Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type II cells from rat lungs [J]. Lab Invest,2004,84(6):727-735
- [9] 刘秀香,张海鸿,万彬,等. 肺泡 II 型上皮细胞的生长状况及其转分化的鉴定[J]. 实用儿科临床杂志,2011,26(16):1287-1291
- [10] 卢红艳,常立文. 肺泡 II 型上皮细胞转分化[J]. 细胞生物学杂志,2006,28(1):25-28
- [11] Yamano G,Funahashi H,Kawanami O,et al. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells [J]. FEBS Letters,2001,508(2):221-225
- [12] Cheong N,Madesh M,Gonzales LW,et al. Functional and trafficking defects in ATP binding cassette A3 mutants associated with respiratory distress syndrome [J]. J Biol Chem,2006,281(14):9791-9800
- [13] Weichert N,Kaltenborn E,Hector A,et al. Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells [J]. Respir Res,2011,12(1):4
- [14] Wert SE,Whitsett JA,Nogee LM. Genetic disorders of surfactant dysfunction[J]. Pediatr Dev Pathol,2009,12(4):253-274
- [15] Kaltenborn E,Kern S,Frixel S,et al. Respiratory syncytial virus potentiates ABCA3 mutation-induced loss of lung epithelial cell differentiation[J]. Hum Mol Genet,2012,21(12):2793-2806
- [16] 周熙惠,惠智艳,李媛,等. 新生儿呼吸窘迫综合征 ABCA3 基因遗传缺陷的研究[J]. 中华儿科杂志,2012,50(2):111-116

[收稿日期] 2012-07-05