· 综述 ·

肺泡上皮细胞培养与鉴定的研究进展

陈力(综述) 黎檀实(审校)

【关键词】 肺泡上皮细胞; 生长; 分化; 培养

肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AECs)主要由 I 型肺泡上皮细胞 (type I alveolar epithelial cell, AT I) 和 I 型 肺泡上皮细胞(type I alveolar epithelial cell, AT I)构成。AT I 表面光 滑、宽大而扁薄,覆盖约95%肺泡表面 积,是气体交换的功能性细胞。ATI与 肺泡表面液体层、基底膜、薄层结缔组 织、毛细血管基底膜和内皮一起构成气 血屏障。AT I 呈圆形或立方形,位于肺 泡壁上,散在嵌于 AT I 之间,数量较 ATI 多,但覆盖面积仅为肺泡表面积的 5%左右。胞内富含许多分泌颗粒,颗粒 大小不一, 直径 0.1~1.0 um, 电子密度 高,内含同心圆或平行排列的板层结构, 位于核上方,称嗜锇性板层小体。AT I 以胞吐方式将颗粒内物质释放出,小体 的磷脂主要是二棕榈酰卵磷脂,铺展于 肺泡内面,称作肺泡表面活性物质 (PS)。AT I 不仅参与生物活性物质代 谢、免疫调节、转运水和电解质(1),同时 可以自我更新,还能分化成 AT I,故被 认为是 AECs 的祖细胞(progenitor)[2]。

体外培养 AT I 是研究其特性的重要手段,由于它培养后表型丧失快,基本不传代,并且培养难度较大,不易获得较高纯度、理想的 AT I 系。Chen 等⁽³⁾报道改良提纯方法:首先用不同浓度的弹性蛋白酶消化肺组织,使之释放 AT I、AT I,然后通过鼠 IgG 筛选和抗鼠白细胞共同抗原抗体清除巨噬细胞和白细胞。用多克隆家兔抗 T1-α抗体提纯的免疫 磁性阳性选择 AT I,同时分离AT I。AT I、AT I 的纯度分别可达到(91±4)%、(97±1)%。每只大鼠可产大约33×10°AT I、2×10°AT I。这些细基金项目:全军"十五"计划指令性科研

基金资助项目(2004LX043)

作者单位:100853 北京,解放军总医院 急诊科

责任作者:黎檀实,教授,博士生导师,主 任医师

作者简介: 陈力(1981-),男(汉族),福 建省人,博士研究生。 胞活性大于 96%。AT I 分离方法同样适用于从氧中毒损伤后修复的肺组织中的纯化,可达 93%~95%。

尽管目前 AT I 提纯、分离、培养的 具体实验手段尚无突破性进展,但是体 内生长或体外培养过程中,如何介导 AT I 细胞的增殖、分化依然是广为关注 的热点。

1 载体选择

上皮细胞在体外培养过程中难以有 足够倍增传代的次数,并对培养条件要 求高,这是正常上皮细胞体外长期培养 失败的主要因素。目前最常用的方法是 通过病毒介导。

1.1 SV40 病毒: SV40 病毒的 T 基因 常被用来不完全转化细胞并获得延长细 胞生命过程。故人们采用 SV40 病毒、 含 SV40T基因的反病毒感染或质粒转 染方法使正常细胞不断增殖而不凋亡 (immortalized)。SV40 病毒早期区大 T 基因迄今已被广泛应用于上皮细胞系的 建立。它的功能是在转染宿主细胞后表 达 T 抗原启动宿主细胞 DNA 合成,大 T 抗原可与 P53 及 Rb 蛋白结合促进细 胞获得永生性而突破细胞分化衰老。大 多上皮细胞在持续增殖后并不具有恶性 转化表型。SV40T 转染 H-2K(b)-tsA58 鼠肺培育 T7 细胞系。T7 表型类似正常 AT I:细胞融合形成极化细胞形态,含 有紧密连接和顶端微绒毛。另外含有不 同的胞质板层小体,当细胞生长不受限 时增大并明显。合成、分泌磷酸卵磷酯和 PS-A、PS-B、PS-C。其独特之处在于非 肿瘤来源细胞系,但可合成、分泌 PS⁽⁴⁾。 1.2 腺病毒12 S:利用逆转录病毒表达 腺病毒 12S 的 E1A 基因生成不凋亡的 鼠ATI。既往实验已经证实该系细胞 对于 AECs 的体外培养有重要意义,可 用于研究 AT I 功能,但是该细胞系未 表现出已分化 AT I 特性,如板层小体、 SP-A 和高比例的饱和卵磷脂(5-6)。然而 近期实验进一步发现:保留 AT I 在原 位培养 250 d,细胞出现包括板层小体、 SP-A,甚至磷脂状表面活性物质的超微 结构特质。细胞系同样是二倍体染色体组,接触抑制地生长,在软琼脂中不生长,该细胞系同时表达间充质细胞特性,如生成弹性蛋白(vimentin)⁽⁷⁾。

1.3 逆转录过程中磷脂的作用: Zsengellér 等⁽⁶⁾报道,在鼠白血病病毒(murine leukemia virus,MuLV)逆转录病毒转导的体外实验研究中,MuLV被PS 纯化、灭活,阻碍转导进行。但是,Balakireva等⁽⁹⁾实验证实,对于腺病毒而言,脂质体可以不依赖病毒特异性蛋白受体,而通过 AECs 表面的二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC),亦即 PS,可作为病毒穿越载体,介导病毒进入细胞,穿越细胞。PS 在病毒介导转染中的作用是否为"病毒特异性"尚待进一步探讨。

1.4 其他作用:病毒是目前主要的转基因载体,但是存在一定风险性,国内外学者也进行了相关研究。Machado-Aranda等⁽¹⁰⁾通过无创性电穿孔法进行 Na⁺-K⁺-ATP 酶基因转移,他将提纯质粒(100~600[']μg)通过气管送入麻醉鼠肺内,并由胸前电极予以一系列方形脉冲波。结果:AECs、气道平滑肌细胞、血管内皮细胞均呈剂量-脉冲长度依赖性反应,同时没有测得炎症反应。实验后肺泡内水、钠的有效清除增加。

2 培养中的分化问题

体外培养 AECs,不仅存在胞内基因调控、胞外细胞因子等相关因素作用,同培养基基质同样密切相关。当分离培养 AT II 在胶原凝胶基质上,并暴露于空气时,AT II 密度增加,呈结节状聚集,同时胞质 PS 增加。Olsen 等^{CD}检测在胶原、纤维粘连蛋白/层粘连蛋白-5(Ln5)基质上,分离培养的大鼠 AT II 形态学特质和特异性蛋白标记物对于所有的表达均减少,而从 3 d 开始 AT II 的特异性表达均减少,而从 3 d 开始 AT I 特异性表达均加,至少持续到第 5 日。当培养基细胞表现型(在胶原/纤维蛋白原、胶原/纤维蛋白原、胶原/红度,从 1~1 样的细胞表现型(在胶原/

纤维粘连蛋白/Ln5,或胶原/Ln5),或者同时具备 AT I、AT I 的细胞表现型(在胶原/纤维粘连蛋白基质,亚饱和剂量的Ln5)。基质间转移的细胞,4 d 仍保持其表现型,7 d 则改变。由此得出结论:①AT I 在 7 d 展现表现型的可塑性,包括同时具备 AT I、AT I 特质的过渡型细胞形态;②胶原和 Ln5 对于促进 AT I 样表现型形成是必需的;③细胞外基质(ECM)成分对于培养基中细胞表现型的转换起作用。

3 AECs 体外培养鉴别问题

目前,区分ATI和ATI的金标准 仍为细胞内存在板层小体,顶端微绒毛 及细胞外形为立方形。现有的文献报道 以ATI的标记物为多。例如组织型纤溶 酶 原激活物抑制剂-1(PAI-1)、P2X4、 P15INK4B 基因^[12]和成纤维细胞生长因 子受体激动蛋白-1、水通道蛋白-5、干扰 素诱导蛋白、P2X7 和 Bcl-2 相关蛋白。 亦有 AT I 标记物基因报道,如 γ-氨基 丁酸受体亚基(GABRP)。其中 GABRP 和 P2X7 蛋白分别是 AT I、AT I 特异 表达[13]。就其他常见标记物分述如下。 3.1 TSC-36:TSC-36 是一种转化生长 因子-β1(TGF-β1)诱导基因,编码一种 多肽,和富含半胱氨酸分泌型蛋白 (SPARC)、卵泡抑制素有显著的相似 性。TSC-36 mRNA 在人的多种肿瘤细 胞中无法测得。但可在鼠的多种气管中 测得,肺脏中的水平最高。在原位培养 中,其转录可在 AECs 中测得,但支气管 上皮则否。因此可鉴定 AECs 和支气管 上皮印。

3.2 多克隆抗体(MMC4)抗原:MMC4 抗原是一种对热敏感、蛋白水解酶 K 易降解的膜内在蛋白。可分为 10.1 S、 1.66 S两种 MMC4,表明这种抗原或许 是一种多蛋白复合物。曾经有观点认为 MMC4 抗原是 AT I、Clara 细胞相关蛋 白。但是近来研究发现鼠发育期(孕期 16 d~成年),肺中增加 12 叠,肾中增加 200 叠,小肠绒毛状上皮细胞产后增加 150 叠,成年后减少,说明其并不具有特 异性,但可以作为上皮细胞形态的标记 物⁽¹⁶⁾。

3.3 $T1-\alpha$ 基因: $T1-\alpha$ 基因在成年鼠肺、胎肺、早期胎脑大量表达,经 MMC4 证实是 AT I 表达的特异性抗原。其在成年鼠肺 cDNA 为 1.85 kb,最长的开放读码框 498 bp,编码大约 18 000 的蛋

白。T1-α蛋白大约有 C 端跨膜区,但是 缺乏 N 端糖基化共同序列。体外培养 时,表达于新鲜分离的 AT I (50%~ 60%的纯度),在高度提纯的 AT I 或其 他细胞则无。

AT 1 的形态分化以构建气血屏障 开始于妊娠末期,并且不断进行。尽管 T1- α 在肺芽形成的内胚层前肠分化即 开始,其 mRNA 和蛋白水平在胚胎晚期 严格表现为 AT 1 时大量增加。T1- α 缺 失的纯合子大鼠,AT 1 分化被阻断,死 于呼吸衰竭。病理示其远端肺形态被改 变,肺无法扩充至正常容量;而狭小肺泡 腔里足量的 PS、正常水平的 PS mRNA、 表达 PS-B 正常形态、数量的细胞表明 AT I 分化是正常的^{C163}。

3.4 P-糖蛋白(P-gp): 多重耐药性 (MDR)转运体 P-gp 在正常组织结构性 表达,其空间分布使其作为减少系统性 暴露或局部吸收潜在有害物质的重要成分。免疫组化分析显示,P-pg 可定位于人或鼠的 AT I 腔膜上。用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹法(Western blotting)、免疫流式细胞技术等分析原代鼠细胞培养模型,当其表现为 AT I 形态时,培养基中 $mdr-1\alpha/mdr-1\beta/P-gp$ 是阴性的 $^{(17)}$ 。

3.5 细胞膜顶端蛋白(RTI40):RTI40 是来自正常肺发育过程中的 AT I 特异 性蛋白。RTI40基因有 35 个碱基对,包 括 6 个外显子和至少 6 个重复确定因 子。3个外显子编码 RTI40 胞外区,1个 编码跨膜区,最后一个编码终止密码的 氨基酸。RTI40基因转录从TATA同源 系下游开始。H441 细胞转染中,有2个 区域促进活性:-1247~-795、-163~ -81。异源启动子融合实验表明,这些区 域的协同相互作用促进转录。在金黄色 葡萄球菌(金葡菌)诱导急性肺损伤 (ALI)大鼠模型中,肺泡壁增厚,ATI 增生肥大,共聚焦显微镜观察到,肺泡壁 区域被 AT I 细胞膜标记物 MMC4/ RT I 70染色者增加了 5 倍以上, RTI40 共表达相关细胞区域则减少;在转化为 AT I 样细胞之前,在培养的 AT I 中出 现 RTI40/MMC4 阳性细胞,表明损伤 后转分化时,RTI40及其蛋白可被用来 确定 AT I 分化的开始[18]。

3.6 受体糖基化末端产物(RAGE):尽管是平展的形态,ATI仍是极化的。

RAGE 是分化良好的 AT 1 基底膜标志,通过纤维电镜观察显示,RAGE 定位于 AT I 基底膜外侧,其表达增强;在 AT 1 内分化和 AT I 原代培养中,RAGE、 T_1 - α 分别定位于基底膜和顶端;在 AT I 体内培养时,RAGE 表达后于 T_1 - $\alpha^{(19)}$ 。

3.7 白细胞三烯 A4(LTA4):正常大

鼠、人类的肺脏中,免疫组化染色定位 LTA 水解酶在 AT I 核内而非 AT I 。 体外模拟的 AT I 分化成 AT I 的过程 中,LTA。明显从核内向胞质再分配。经 博来霉素诱导的 ALI 大鼠,修复过程中 LTA。水解酶出现明显核聚集。在特发 性肺纤维化的患者纤维化肺组织中肥大 增生的 AT I 亦有相同表现。实验结果 表明 LTA, 水解酶最先聚集在 AT I 核 内,当ATI分化为ATI时,酶再分布 至胞质。核内的 LTA、水解酶活性或许 对促进肺泡上皮生长起了重要作用[20]。 3.8 细胞角蛋白-18(CK-18): Schli chenmaier 等[21] 观察不同时期胎猪的 肺,发现在妊娠早期假腺管期,所有柱状 上皮在细胞顶层都强烈表达 CK-18;在 囊泡期, CK-18 在扁平的 AT I 和立方 形的 AT I 均可检测到;肺泡成熟时,分 化的 AT I 不再表达 CK-18, 而 AT I 仍 然表达。因此,CK-18 细胞表型在 AT Ⅱ 成熟过程中有重要意义,可以被认为是 胎猪肺成熟时,ATI分化的可供选择标 志之一。

3.9 Toll 样受体(TLR)家族:天然免疫中,宿主对病原微生物有一种特殊的识别能力,称为病原相关的分子模式,而TLR 家族在这一识别过程中起着重要的作用。实验证明,AT II 表达 TLR2、TLR4 的 mRNA 和功能性蛋白,并可被脂多糖(LPS)和肿瘤坏死因子(TNF)调节。TLR4 主要识别革兰阴性细菌表面的 LPS,而 TLR2 主要识别革兰阳性细菌肽聚糖等成分,这提示了 AT II 有潜在抵御细菌的宿主防御机制⁽²²⁾。

4 自然发育和损伤修复过程中的分化

目前对胎儿时期 AT I、AT I 的关系报道较少。有证据表明,在肺泡上皮损伤情况下,AT I 能够通过分裂脱去颗粒而转化为 AT I,从而修复损伤的肺泡上皮,故认为 AT I 可能是 AECs 的干细胞。但通过对胎儿肺泡发育和上皮细胞分化的透射电镜观察,没有发现向AT I 转化中的 AT I,两种细胞在胎肺

发育过程中几乎同时出现,提示它们可能来源于同一种祖细胞或于细胞,即被覆于终末细支气管和原始肺泡内胚层来源的上皮细胞;也提示 AECs 的细胞发育过程和肺泡损伤后的修复过程是不完全相同的,可能因为细胞所处的微环境和调节机制存在差异⁽²³⁾。这种差别有待进一步研究探讨。

5 结 语

综上所述,在细胞培养过程中,众多因素参与上皮细胞的增殖、分化,尤其是ATI向ATI分化,但是何者为主,如何进行有效调控使其生长发育成为所需的细胞,具体机制尚待研究。因此,在基因水平和分子水平等方面进一步探讨AECs分化,必将为实验方法的改进,以及最终运用于临床治疗肺损伤提供理论依据。

参考文献

- [1] 潘芳,李文志. 肺泡 I 型上皮细胞的体 外培养及其在麻醉学研究领域的应用 [J]. 国外医学麻醉学与复苏分册, 2000,21(6):368-371.
- Crandall E D, Matthay M A. Alveolar epithelial transport, basic science to clinical medicine (J). Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(4):1021-1029.
- (3) Chen J, Chen Z, Narasaraju T, et al. Isolation of highly pure alveolar epithelial type I and type I cells from rat lungs (J). Lab lnvest, 2004, 84(6): 727-735.
- (4) deMello D E, Mahmoud S, Padfield P J, et al. Generation of an immortal differentiated lung type I epithelial cell line from the adult H-2Kb-tsA58 transgenic mouse(J). In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2000, 36(6): 374-382.
- (5) Mallampalli R K, Floerchinger C S, Hunninghake G W. Isolation and immortalization of rat pre-type I cell lines (J). In Vitro Cell Dev Biol, 1992, 28A(3 Pt 1):181-187.
- (6) Steele M P, Levine R A, Joyce-Brady M, et al. A rat alveolar type I cell line developed by adenovirus 12SE1A gene transfer (J). Am J Respir Cell Mol Biol, 1992, 6(1):50-56.
- [7] Pasternack M. Floerchinger C S. Hunninghake G W. E1A-induced immortalization of rat type I alveolar epithelial cells (J). Exp Lung Res, 1996, 22 (5): 525-539.
- (8) Zsengellér Z K, Halbert C, Miller A D, et al. Keratinocyte growth factor stimu-

- lates transduction of the respiratory epithelium by retroviral vectors (J). Hum Gene Ther, 1999, 10 (3); 341-353.
- (9) Balakireva L, Schoehn G. Thouvenin E, et al. Binding of adenovirus capsid to dipalmitoyl phosphatidylcholine provides a novel pathway for virus entry(J). J Virol, 2003, 77 (8): 4858-4866.
- (10) Machado-Aranda D, Adir Y, Young J L, et al. Gene transfer of the Na⁺, K⁺-ATPase betal subunit using electroporation increases lung liquid clearance (J). Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(3):204-211.
- (11) Olsen C O, Isakson B E, Seedorf G J, et al. Extracellular matrix-driven alveolar epithelial cell differentiation in vitro (J). Exp Lung Res, 2005, 31 (5): 461-482.
- [12] Qiao R, Zhou B, Liebler J M, et al. Identification of three genes of known function expressed by alveolar epithelial type I cells (J). Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 29(1):98-105.
- (13) Chen Z, Jin N, Narasaraju T, et al. Identification of two novel markers for alveolar epithelial type I and I cells (J). Biochem Biophys Res Commun, 2004,319(3):774-780.
- (14) Mashimo J, Maniwa R, Sugino H, et al.

 Decrease in the expression of a novel
 TGF betal-inducible and ras-recision
 gene, TSC-36, in human cancer cells
 (J). Cancer Lett, 1997, 113 (1-2); 213219.
- (15) Boylan G M, Pryde J G, Dobbs L G, et al. Identification of a novel antigen on the apical surface of rat alveolar epithelial type I and Clara cells (J). Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001,280(6):L1318-1326.
- (16) Ramirez M I, Millien G, Hinds A, et al. Tlalpha, a lung type J cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth (J). Dev Biol, 2003, 256 (1): 61-72.
- [17] Campbell L, Abulrob A N, Kandalaft L E, et al. Constitutive expression of p-glycoprotein in normal lung alveolar epithelium and functionality in primary alveolar epithelial cultures (J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304 (1): 441-452.
- (18) Clegg G R, Tyrrell C, McKechnie S

- R,et al. Coexpression of RTI40 with alveolar epithelial type I cell proteins in lungs following injury; identification of alveolar intermediate cell types (J). Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(3); L382-390.
- (19) Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells (J). Genes Cells, 2004,9(2):165-174.
- [20] Brock T G, Lee Y J, Maydanski E, et al. Nuclear localization of leukotriene A4 hydrolase in type I alveolar epithelial cells in normal and fibrotic lung CJJ. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(2); L224-232.
- (21) Schlichenmaier H, Steffl M, Sinowatz F, et al. Expression of cytokeratin 18 during pre-and post-natal porcine lung development(J). Anat Histol Embryol, 2002,31(5):273-277.
- (22) Armstrong L, Medford A R, Uppington K M, et al. Expression of functional toll-like receptor-2 and-4 on alveolar epithelial cells (J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 31(2):241-245.
- 〔23〕 孔祥永,安靓,封志纯. 国人胎儿肺泡发育与上皮细胞分化的透射电镜观察 〔J〕. 第一军医大学学报,2004,24(1):72-74.

(收稿日期:2007-10-01 修回日期:2007-11-07) (本文编辑:李银平)

・广告目次・

②天津生化制药:琥珀氢可	(插页)
③恩华药业:力月西 ·············	(插页)
④日本旭化成株式会社:全自动	
和持续徐缓式血液净化装置。	
	(插页)
⑤广东天普药业:天普洛安	(插页)
⑥珠海丽珠:丽珠血液灌流器…	•••••
	(插页)
⑦天津红日药业:血必净注射液	
	(插页)
⑧廊坊爱尔:炭肾	(插页)
⑨德尔格:SmartCare TM 智能化	
自动脱机系统	(插页)
⑩瑞士雅培:i-STAT 血液分析仪	(•••••

.....(封底)

①深圳迈瑞: 监护仪 ……… (封二)