

倪黎纲,赵旭庭,王宵燕,等. 姜曲海猪肺泡巨噬细胞的分离培养与鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):163-165.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.045

# 姜曲海猪肺泡巨噬细胞的分离培养与鉴定

倪黎纲<sup>1</sup>, 赵旭庭<sup>1</sup>, 王宵燕<sup>2</sup>, 刘鹤鸣<sup>2</sup>, 陈章言<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

**摘要:**通过冷 PBS 气管灌洗法分离培养姜曲海猪肺泡巨噬细胞(PAM),进行了 PAM 纯度鉴定、细胞吞噬功能和存活率检测。从健康 20 日龄仔猪,分离得到 PAM。以 10% RPMI-1640 培养液对 PAM 进行培养,观察细胞形态,用墨汁吞噬和免疫荧光检测了 PAM 的吞噬功能和纯度,比较冻存前和复苏后细胞的活率和细胞吞噬功能,以获得一批高纯度的 PAM,用于猪体外呼吸道疾病发病机理的研究。

**关键词:**猪肺泡巨噬细胞(PAM);分离;培养;鉴定

**中图分类号:** S858.286.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0163-03

肺泡巨噬细胞是机体抵御外来微生物侵袭肺脏的第一道防线,一直是研究肺部抗感染模型的重要细胞类型<sup>[1]</sup>。猪肺泡巨噬细胞(porcine alveolar macrophages, PAM)是猪肺脏重要的功能细胞,它不仅可吞噬侵入肺脏的粒子,参与肺脏的防御和免疫,而且还能分泌大量的生物活性物质,维持肺脏和机体正常的生理活动<sup>[2]</sup>。目前,肺泡巨噬细胞的分离培养以小动物,如大鼠、小鼠、豚鼠居多,国内关于猪肺泡巨噬细胞的分离培养方法的报道很少。猪肺泡巨噬细胞属于不繁殖细胞群,为多代培养,难以在体外长期生存<sup>[3]</sup>。随着体外分离细胞技术的不断发展,巨噬细胞的提取方法有多种,又由于研究目的不同,在体内提取细胞的部位也不尽相同<sup>[4-5]</sup>,巨噬细胞在肝、脑等实质器官以及腹腔等空腔部位以不同的形式分布,不少文献报道从多种组织器官中分离和纯化巨噬细胞<sup>[6]</sup>。为获得存活率高,纯度高,吞噬功能强的 PAM,并节约试验材料、减少因细胞来源不同造成的试验误差,本试验对地方猪姜曲海猪 PAM 进行了分离、纯化、鉴定和冷冻保存,探索 PAM 生长和凋亡周期,观察生长过程中形态和吞噬能力的变化。为利用 PAM 在体外研究地方猪呼吸道疾病及其他肺部疾病的治病机理探究等奠定基础。

## 1 试验方法

### 1.1 试验材料

20 日龄健康姜曲海猪由江苏姜曲海种猪场提供。

### 1.2 试验试剂

RPMI-1640 培养液和胎牛血清 FBS 为 Gibco 公司产品, DMSO 为国产试剂,1:100 稀释的小鼠源抗 MAC387 单抗(abcam, ab22506),1:200 稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(Bioworld)。

收稿日期:2016-07-10

基金项目:江苏省农业三新工程(编号: SXGC[2015]301)。

作者简介:倪黎纲(1982—),男,江苏吴江人,博士研究生,研究方向为地方猪遗传资源的保护与利用。E-mail:117334955@qq.com。

通信作者:赵旭庭,硕士,教授,研究方向为地方畜禽遗传资源的保护与利用。E-mail:825587062@qq.com。

### 1.3 试剂的配制

RPMI-1640 完全培养液: RPMI-1640 培养液, 10% 胎牛血清(FBS)、1% 双抗(PS)、1% 非必需氨基酸(NEAA)、1% 丙酮酸;细胞冻存液: 70% RPMI-1640 培养基, 20% FBS, 10% DMSO;墨汁: 4.5 mL PBS 加入 0.5 mL 墨汁,均匀混合后高压灭菌。

### 1.4 试验方法

**1.4.1 PAM 的分离** 将试验仔猪置于无菌室内解剖台上,采取股动脉放血致死,剖开胸腔,小心剥离并结扎气管后连同心脏取出完整的肺脏,用 PBS 充分清洗肺脏表面,清洗血块污垢,从气管往肺脏注入双抗 PBS 50~100 mL,轻轻拍打表面,1~2 min 后回收支气管肺泡灌洗液,重复灌洗 2~3 次,直到共回收 200 mL 灌洗液,将灌洗液经 4 层无菌纱布过滤,去除脂肪组织块等。1 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清,用 PBS 重悬细胞,重复洗涤 2 次, RPMI-1640 培养液洗涤 1 次,离心去上清,得到肺泡巨噬细胞。

**1.4.2 原代 PAM 的培养** 用 RPMI-1640 完全培养液重悬细胞,调整细胞浓度至  $2 \times 10^6$  个/mL,吸取 2 mL 铺于 6 孔板,置于 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱,培养 2 h 后从细胞培养箱中取出细胞板,弃掉旧培养液,用 PBS 轻轻润洗 2 次,加入新的 RPMI1640 完全培养液。以后每 24 h 更换 1 次新鲜培养液。连续培养 20 d,观察记录细胞培养的全过程。

### 1.4.3 PAM 存活率和纯度鉴定

**1.4.3.1 台盼蓝染色检测 PAM 细胞的存活率** 将 0.4% 的台盼蓝染液与等体积的细胞悬液混合,染色 2~3 min,取 1 滴混合液加入细胞计数板内,在显微镜下计数着蓝色和未着色的细胞。计算细胞存活率,细胞存活率 = 未着色细胞数 / (着色细胞数 + 未着色细胞数) × 100%<sup>[1]</sup>。

**1.4.3.2 免疫荧光法检测 PAM** 吸去培养液,用磷酸盐缓冲液冲洗,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,经 0.2% Triton-100 穿透 20 min 后,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,加入一抗(1:100 稀释的小鼠源抗 MAC387 单抗),室温孵育 2 h,加入二抗(1:200 稀释的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG),室温孵育 1 h 后,加入终浓度为 10 μg/L 的 Hoechst33342,室温染色 3~5 min,荧光显微镜观察并拍照。试验每一步均需 PBS 充分

洗涤。

#### 1.4.4 PAM 的冷冻保存与复苏

**1.4.4.1 细胞冻存** 将培养皿中的细胞培养液弃掉,用 PBS 冲洗 2 遍后,加入 0.25% 胰酶消化 4 min 后加入完全培养基终止反应,用移液器轻轻吹吸使细胞脱落,将细胞悬液移至 15 mL 离心管中,1 000 r/min,离心 5 min,弃去上清。将 4 ℃ 预冷的冻存液加入 15 mL 离心管中,轻轻吹打,使细胞重悬于冻存液中,将细胞悬液分装于细胞冻存管中,1 mL/管,标记细胞名称和冻存日期。放入 4 ℃ 预冷的程序降温盒中,将程序降温盒放至 -70 ℃,第 2 天移至液氮中保存。

**1.4.4.2 细胞复苏** 从液氮中取出冻存管,迅速放到 37 ℃ 水浴箱中摇晃至解冻,完全解冻后,加入 2 mL 完全培养基,混匀后 1 500 r/min 离心 5 min。离心后弃去上清,加入 4 mL 完全培养基重悬细胞,将细胞悬液铺至新的细胞培养皿中,放置于 5% CO<sub>2</sub>、37 ℃ 培养箱中培养。

**1.4.4.3 墨汁吞噬试验** 将 PAM 接种至 24 孔板,接种的细胞量为  $1 \times 10^5$  个/孔,细胞培养 2 h 后,每孔加入 1 mL 墨汁,

对照组加入等量的 PBS,每组 3 个平行样。16 h 后更换新鲜的培养液,随机选择 5 个视野,每个视野观察 200 个细胞,单个视野的墨汁吞噬率 = 吞噬墨汁的细胞数/总细胞数  $\times$  100%,所有视野的平均值即为墨汁吞噬百分率。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离培养细胞 3 周内的形态学观察

从猪肺泡里分离出来的巨噬细胞大多呈圆形或者椭圆形,细胞大小不一,培养 2 h 后洗去未贴壁的细胞,加入新鲜培养液,PAM 细胞达到纯化、成圆形,继续培养至有伪足和突出生出,细胞活力较好。培养 24 h 后,在倒置显微镜下可见细胞贴壁生长,体积逐渐增大,有椭圆形、长梭形和不规则的形态,胞浆丰富。从 3 d 开始细胞周边或者两极可见伸展的伪足。培养 4 d,细胞生长依然良好。7~8 d,细胞开始出现萎缩,贴壁细胞逐渐减少,生长状态较差,悬浮于培养液中,细胞开始死亡。14 d 左右细胞大量死亡(图 1)。20 d 左右细胞全部死亡。

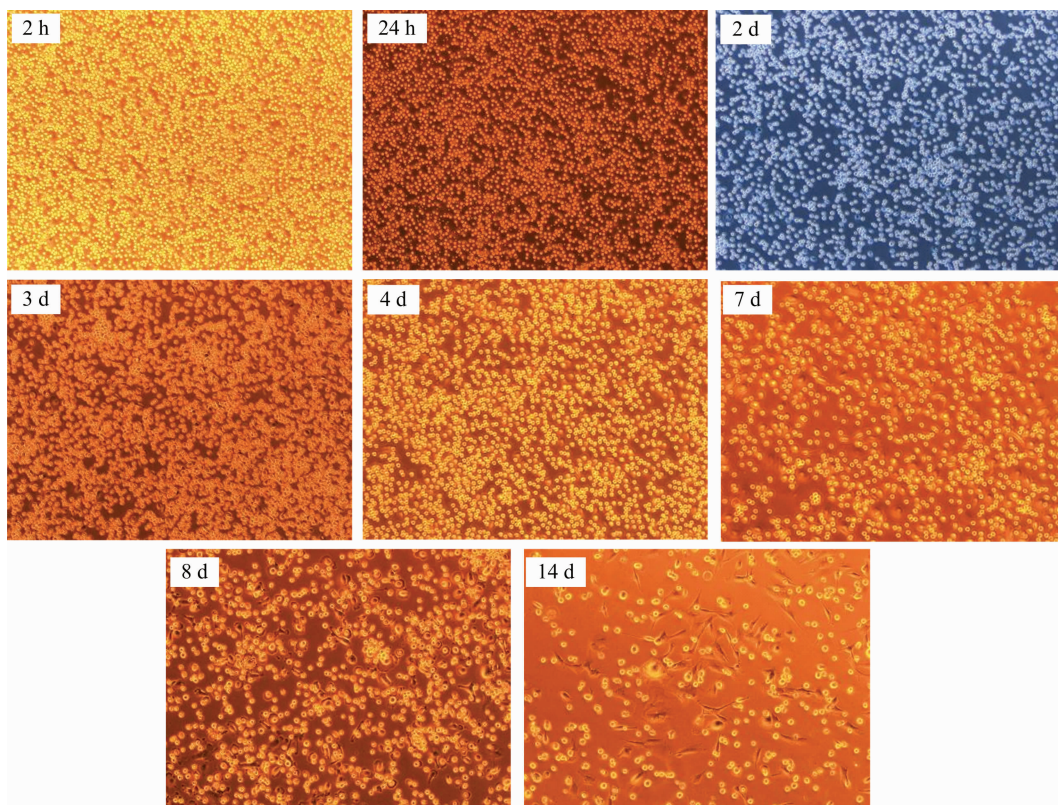


图1 培养各阶段的贴壁 PAM(20 $\times$ )

### 2.2 原代 PAM 存活率与纯度鉴定

体外分离得到原代 PAM 后,用台盼蓝染色检测其存活率,结果显示存活率较高,约为 99.50%。用间接免疫荧光检测 PAM 的纯度,即用免疫荧光法对纯化后 BALF 细胞中 PAM 进行鉴定,纯度约为 94.70%(图 2)。

### 2.3 细胞冷冻复苏对 PAM 存活率和吞噬功能的影响

**2.3.1 冷冻和复苏对 PAM 存活率的影响** 细胞冻存时细胞密度为  $1.51 \times 10^7$  个/mL,复苏后,细胞密度为  $1.48 \times 10^7$  个/mL,细胞的存活率较高,为 98.01%(图 3)。

**2.3.2 冷冻和复苏对 PAM 吞噬功能的影响** 猪肺泡巨噬细

胞的墨汁吞噬检测试验发现,胞质中有大量的墨汁颗粒,胞核形态不规则并有明显扭曲折叠,细胞吞噬试验结果显示墨汁吞噬率很高,冷冻前吞噬率约为 92.00%,复苏后吞噬率约为 93.10%(图 4),表明巨噬细胞对墨汁颗粒有很强的吞噬作用,并且冷冻保存和复苏对细胞的吞噬功能影响不大,复苏后的细胞吞噬功能略大于冷冻前( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论与结论

猪肺泡巨噬细胞属于不繁殖细胞群,难以在体外长期生存,多做原代培养,因此将猪肺泡巨噬细胞进行体外分离、纯



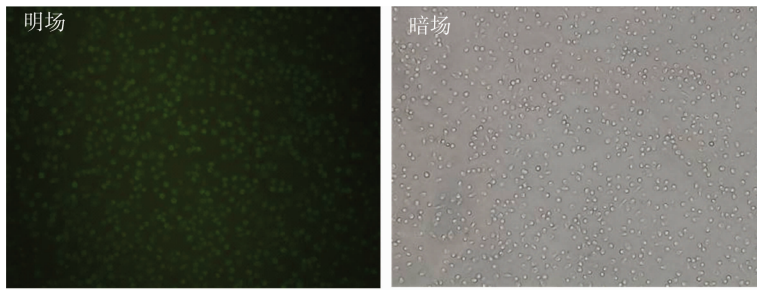


图2 PAM 免疫荧光鉴定(20×)

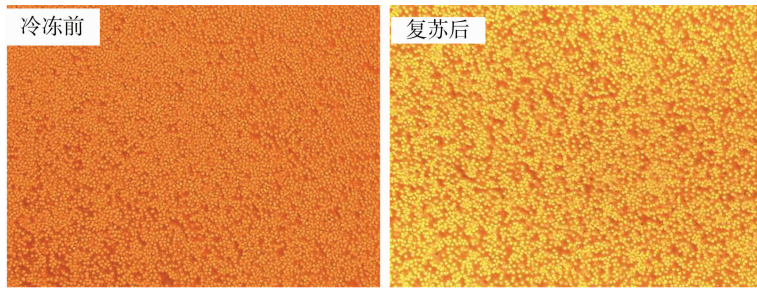


图3 冷冻前后贴壁 PAM(20×)

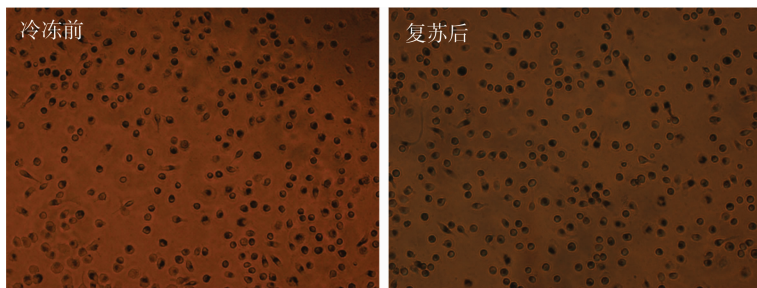


图4 PAM 吞噬墨汁(40×)

化、冷冻保存非常重要。预冷 PBS 灌洗法获得 BALF 是目前分离 PAM 通常采用的方法<sup>[3]</sup>, 该方法获取的细胞超过 90% 是贴壁细胞为 PAM。由 BALF 回收的细胞中除了 PAM 外, 还有 T、B 淋巴细胞、NK 细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞等细胞, 杂细胞的存在会影响试验效果, 本试验中利用贴壁速度的不同, 培养 2 h 后换液去除未贴壁的细胞获得了高纯度的 PAM。用免疫荧光法对巨噬细胞特异性表达标记的 MAC387 进行检测, 试验结果表明本试验中获得的 PAM 纯度较高。分离培养得到的 PAM 纯度越高, 越有利于后续相关试验的进行。

巨噬细胞是先天性免疫系统的重要组成部分, 吞噬、清除和呈递抗原异物的功能是其基本生物学功能和维持正常生理状态所必需的。PAM 对细菌和异物的吞噬作用, 测定其吞噬功能, 可作为机体免疫功能的一种指标, 墨汁吞噬试验是检测 AM 功能的一种简便易行的方法<sup>[1]</sup>。本试验检测了分离培养 16 h 和复苏后巨噬细胞的墨汁吞噬率, 得出复苏后细胞吞噬能力略微提高, 但是差异不显著, 与前人的试验结果基本一致。

原代培养的 PAM 存在增殖速度慢、难以传代和在体外长期生存的问题, 但为节约试验动物成本和获得均一的用于体外试验的 PAM, 需要将同批次的 PAM 细胞进行冻存。本试验中采用的冻存液和冻存方法较为合适, 70% 的 RPMI-1640, 20% 胎牛血清和 10% DMSO 配制成冻存液冻, 并用

4℃ 预冷的程序降温盒冻存细胞, 过夜后转移至液氮中长期冻存, 复苏后细胞的存活率在 97% 以上, 可以用于 PAM 的冷冻与保存。

综上所述, 本试验进行了 PAM 的分离、纯化、鉴定及冷冻保存, 获得了一批纯度较高, 吞噬能力较强的 PAM。本试验分离得到的 PAM 可以用于体外研究猪呼吸道疾病及其他肺部疾病的治疗机理探究等奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 孟春华, 曹少先, 苏磊, 等. 猪肺泡巨噬细胞的分离培养、纯化和冷冻保存研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 198-201.
- [2] 王贵平, 刘福林, 刘健, 等. 从屠宰猪肺中分离培养猪肺泡巨噬细胞[J]. 养猪, 2013(2): 123-124.
- [3] 杨克礼, 田永祥, 梁望旺, 等. 猪肺泡巨噬细胞的分离与原代培养[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2011, 31(4): 52-53.
- [4] 兰青, 尹美珍, 李世普. 大鼠腹腔巨噬细胞的分离培养与鉴定[J]. 武汉理工大学学报, 2009, 31(9): 41-43.
- [5] 李静, 王亚平. 大鼠骨髓巨噬细胞的分离、纯化以及鉴定[J]. 重庆医科大学学报, 2003, 28(4): 436-439.
- [6] 范仕郡, 刘鑫, 黄敏, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞的快速提取及培养[J]. 局解手术学杂志, 2015, 24(2): 130-131.