

·论著·

人 II 型肺泡上皮细胞的分离培养及表型维持研究

吴松林 毛璞 傅威 莫红樱 何为群 刘晓青 黎毅敏

【摘要】 目的 建立人 II 型肺泡上皮细胞(AT II)分离、纯化、原代培养及鉴定的方法,探索体外培养的表型维持情况。方法 取手术切除的边缘肺组织,用胰酶、弹性蛋白酶联合消化分离人 AT II 细胞粗悬液,经过滤、差速贴壁、密度梯度分离、磁珠分选纯化。用肺表面活性蛋白 C 前体(pro-SP-C)免疫荧光、溶酶体绿色荧光染料(Green DND-26)荧光探针染色以及透射电镜鉴定人 AT II 细胞;用 pro-SP-C 免疫荧光法和 Green DND-26 荧光探针染色法评估细胞纯度;锥虫蓝染色法评估细胞活性;并运用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测体外培养过程中肺表面活性蛋白(SP-A、SP-B、SP-C、SP-D)的表达情况。结果 人 AT II 细胞产量为 $(5 \sim 10) \times 10^5/g$;锥虫蓝染色细胞活性为 $(93 \pm 2)\%$;pro-SP-C 免疫荧光、Green DND-26 荧光探针鉴定、评估细胞纯度一致,为 98%左右,透射电镜下观察 AT II 细胞特有的板层小体结构清晰可见。SP-A、SP-C 表达持续时间在 24 d 左右(SP-A 16 d: 0.52 ± 0.03 , 20 d: 0.35 ± 0.02 , 24 d: 0.26 ± 0.01 , 28 d: 0.10 ± 0.08 ; SP-C 16 d: 0.68 ± 0.16 , 20 d: 0.31 ± 0.04 , 24 d: 0.18 ± 0.06 , 28 d: 0.14 ± 0.09),SP-B、SP-D 表达持续时间可在 28 d 左右(SP-B 16 d: 1.05 ± 0.17 , 20 d: 0.76 ± 0.35 , 24 d: 0.55 ± 0.15 , 28 d: 0.36 ± 0.19 ; SP-D 16 d: 0.52 ± 0.19 , 20 d: 0.33 ± 0.12 , 24 d: 0.31 ± 0.04 , 28 d: 0.23 ± 0.02)。结论 成功建立了一种分离、纯化及鉴定人 AT II 细胞的方法,此方法能较持久维持 AT II 细胞表型。

【关键词】 肺泡上皮细胞, II 型; 原代细胞培养; 表面活性物质; 板层小体; 人

Isolation and characterization of human alveolar type II cells and phenotypes maintaining study WU Song-lin, MAO Pu, FU Wei, MO Hong-ying, HE Wei-qun, LIU Xiao-qing, LI Yi-min. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou Institute of Respiratory Disease, Guangzhou 510120, Guangdong, China
Corresponding author: LI Yi-min, Email: lyimin98@gmail.com

【Abstract】 Objective To establish a method of isolate, purify, primary culture and identify human alveolar type II cells (AT II) in vitro, as well as its possible maintaining phenotype characteristics. **Methods** The marginal lung tissue was collected. AT II cells were isolated with trypsin and elastase, purified by a series of steps, such as, cell sieve filtration, differential adhesion, gradient separation and anti-CD14 beads separation. AT II cells were identified with immunofluorescence of human pro-surfactant-associated protein C (pro-SP-C), Green DND-26 probe and electron microscope. The purity of AT II cells was measured by immunofluorescence of human pro-SP-C and Green DND-26 probe. The viability of AT II cells was measured by trypan blue staining. The phenotypes (SP-A, SP-B, SP-C, SP-D) were monitored with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at different time points. **Results** The output of AT II cells from lung tissue was $(5-10) \times 10^5/g$, and the cell viability was $(93 \pm 2)\%$ with trypan blue staining, the cell purity was about 98% with pro-SP-C immunofluorescence and Green DND-26 fluorescent probe, the lamellar bodies were clearly observed with transmission electron microscope. In the aspect of phenotypes maintaining, the time of surfactant expression was about 24 days [SP-A: 0.52 ± 0.03 (day 16), 0.35 ± 0.02 (day 20), 0.26 ± 0.01 (day 24), 0.10 ± 0.08 (day 28); SP-C: 0.68 ± 0.16 (day 16), 0.31 ± 0.04 (day 20), 0.18 ± 0.06 (day 24), 0.14 ± 0.09 (day 28)], and the longest one was more than 28 days [SP-B: 1.05 ± 0.17 (day 16), 0.76 ± 0.35 (day 20), 0.55 ± 0.15 (day 24), 0.36 ± 0.19 (day 28); SP-D: 0.52 ± 0.19 (day 16), 0.33 ± 0.12 (day 20), 0.31 ± 0.04 (day 24), 0.23 ± 0.02 (day 28)]. **Conclusion** We successfully established a procedure to separate, purify, identify of AT II cells, which retain primary phenotypic characteristics over long period.

【Key words】 Alveolar type II cell; Primary cell culture; Surfactant; Lamellar body; Human

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者通常需要机械通气辅助治疗,而机械通气经常会伴发呼吸机

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.07.003

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81000005);广东省产业技术研究与开发基金资助项目(2010B031600148)

作者单位:510120 广东,广州医学院第一附属医院,广州呼吸疾病研究所

通信作者:黎毅敏,Email:lyimin98@gmail.com

相关性肺损伤(VILI)^[1],且病死率高达 34%~60%^[2]。

II 型肺泡上皮细胞(AT II)是机械通气损伤的主要靶点之一,是机械力造成肺部生物伤的始动环节^[3]。AT II 细胞是一种组织干细胞,具有十分重要的功能,如增殖、分化、液体转运、合成分泌等^[4-5]。目前,VILI 防治策略中,主要针对其发生机制采取保护性通气策略。虽然在一定程度上降低了 ARDS 的病死

率,但长时间的小潮气量通气也会导致肺不张和进行性的肺泡萎缩^[6]。可见探索其他有效的治疗手段迫在眉睫,深入研究 AT II 细胞在 VILI 发生中的调节作用,有望成为新的防治手段。然而,体外培养人 AT II 细胞受诸多因素的限制,国内尚未见这方面的报道。自 1979 年 Dobbs 和 Mason^[7]首次报道大鼠 AT II 细胞的提取方法以来,体外培养的 AT II 细胞无论是鼠源性还是人源性,其表型都难以维持^[8-9],易分化为 I 型肺泡上皮细胞(AT I)^[10-11]等。本研究中通过改进已有方法,培养得到的 AT II 细胞纯度高、表型维持时间长,克服了以上不足,为研究 AT II 细胞在 VILI 发生中的功能变化奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 研究设计:采用体外研究方法,用手术切除的边缘肺组织进行实验,征得患者知情同意,并获得广州医学院第一附属医院伦理委员会审核批准。

1.2 主要材料:胰酶、DNA 酶 I 型(DNase I,美国 Sigma 公司),弹性蛋白酶(美国 Worthington 公司),小气道上皮细胞生长培养基(SAGM,瑞士 Lonza 公司),胎牛血清(FBS,美国 HyClone 公司),TRIzol、DMEM/F-12、溶酶体绿色荧光染料(LysoTracker® Green DND-26,美国 Invitrogen 公司),抗 CD14 磁珠(德国 Miltenyi 公司),细胞分离液(Percoll,美国 Pharmacia 公司),肺表面活性蛋白 C 前体(pro-SP-C,美国 Millipore 公司),组织消化液(胰酶 100 kU/ml 2~3 ml,弹性蛋白酶 300 μl),抑制液(DMEM/F-12 30 ml, FBS 10 ml, DNase I 10 kU/ml 2 ml),黏附培养基(DMEM/F-12 22.5 ml, SAGM 22.5 ml, FBS 5 ml, DNase I 10 kU/ml 1 ml),细胞分离液(轻:1.040 g/ml,重:1.089 g/ml)。

1.3 人 AT II 细胞的分离、纯化:主要参照 Ehrhardt 等^[12]和 Elbert 等^[13]的方案,并在纯化部分进行了重要调整。具体调整内容如下:运用胰酶(0.05%)、弹性蛋白酶(2 U/ml)联合消化;在黏附培养基中加入 10%FBS;将差速贴壁时间由 1.5~2.0 h^[13-14]改为 2.5 h;去掉采用抗纤维原细胞磁珠分选去除成纤维细胞的步骤;将 SAGM + 1%FBS 作为人 AT II 细胞

的培养基。

1.4 人 AT II 细胞的鉴定

1.4.1 pro-SP-C 免疫荧光鉴定:参照 Bove 等^[10]的方法进行。

1.4.2 Green DND-26 荧光探针染色鉴定:将人 AT II 细胞原培养基换成 37 °C 含 Green DND-26 (150 nmol/L) 荧光探针培养基培养 30 min, 25 °C 平衡盐溶液(BSS)洗 3 次, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染核, 室温 3 min, 25 °C 的 BSS 洗 3 次, 激光共聚焦显微镜下观察、拍片。

1.4.3 透射电镜观察:刮取培养的人 AT II 细胞,离心, 3%戊二醛固定 20 min, 再次离心, 经 2%四氧化锇后固定、丙酮梯度脱水、环氧树脂包埋、超薄切片、锇酸染色后,透射电镜下观察、拍照。

1.5 人 AT II 细胞纯度与活性评估:用 pro-SP-C 免疫荧光法和 Green DND-26 荧光探针染色法, 随机多次计数 5 个不同视野中阳性着色细胞数以评估细胞的纯度;锥虫蓝染色评估细胞活性^[15-16]。对于刚分离得到的细胞,即刻进行活性评估;而培养过程中则取对数生长期细胞,用血细胞计数板在光镜下计数 500 个细胞,着色的为死细胞,计算活细胞的百分比,判断细胞存活状况。

1.6 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞培养过程中表面活性物质表达:TRIzol 试剂收集裂解不同培养时间的细胞样品,并提取细胞总 RNA,经紫外分光光度法测定纯度和浓度后,取 1 μg mRNA,按照 TaKaRa 逆转录试剂盒(DRR037A)说明书的要求和步骤进行操作,肺表面活性蛋白(SP-A、SP-B、SP-C、SP-D)、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物和扩增产物大小见表 1。按收取细胞时间先后顺序,对各基因扩增产物进行凝胶电泳、扫描成像、分析其表达的趋势,并用灰度分析软件 Gel-pro 4.0 进行定量分析。

2 结果

2.1 人 AT II 细胞的产量、活性、生长特点及形态观察:人 AT II 细胞产量为(5~10) × 10⁵/g (n=15);锥虫蓝染色评估刚分离得到的细胞活性为(93 ± 2)%

表 1 人 II 型肺泡上皮细胞表面活性物质引物设计

基因名称	序列号	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)	位置(NT)
SP-A	NM_005411.4	正义链 CGACTTTAGACATCAAAATCCTGC;反义链 CTCGGTACCAGTTGGTGTAGTTT	305	474~496, 756~778
SP-B	NM_000542.3	正义链 AGAGCAGGAGCCAGGGATGT;反义链 AGCAGGATGACGGAGTAGCG	324	586~605, 890~909
SP-C	NM_003018.3	正义链 CTCATCGTCTGGTGATTGTG;反义链 TGGAGAAGGTGGCAGTGGT	154	291~311, 426~444
SP-D	NM_003019.4	正义链 AGGAGCAAAGGGAGAAAGTGG;反义链 GCTGTGCCTCCGTAATGGT	197	682~702, 858~878
GAPDH	NM_002046.3	正义链 TCCTCCACCTTTGACGCT;反义链 TCTTCTCTTGTGCTCTTGC	177	976~993, 1133~1152

注:SP:肺表面活性蛋白,GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶,NT:核苷酸;所有引物均为跨外显子设计

(n=15)。起初 AT II 细胞生长缓慢,接种 48 h 后才开始延展,60 h 才能初步判断出呈圆形或立方形,胞质中含有大量颗粒状物质,呈小岛状生长(图 1),培养 5~6 d 达对数生长期,平均传代周期 7~10 d (n=15)。按 1:2 进行传代,可传 3~4 代(约 35 d),第 4 代时细胞活性下降至(60±8)%(n=15),表现为生长停滞、失培养。

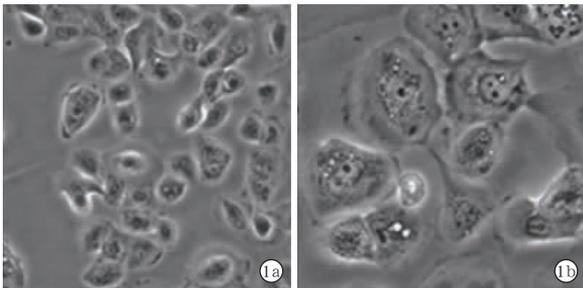


图 1 倒置相差显微镜下观察分离培养的人 II 型肺泡上皮细胞呈圆形或立方形,细胞呈小岛状生长(a,低倍放大);胞质中充满大量颗粒状物质(b,中倍放大)

2.2 人 AT II 细胞的鉴定及纯度评估

2.2.1 pro-SP-C 免疫荧光鉴定人 AT II 细胞(图 2):激光共聚焦显微镜下可见 pro-SP-C 呈红色颗粒状分布于胞质中;在微分干涉相差显微镜(DIC)模式下可见细胞呈圆形或立方形。

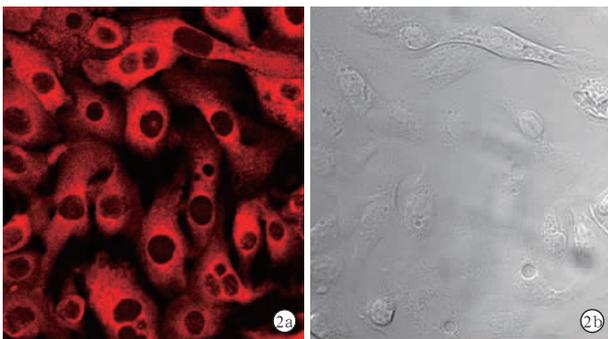


图 2 人 II 型肺泡上皮细胞体外培养 12 d 时激光共聚焦显微镜下观察可见肺表面活性蛋白 C 前体(pro-SP-C)呈红色颗粒状,分布于胞质中(a);微分干涉相差显微镜模式下观察可见细胞呈圆形或立方形(b) 免疫荧光 中倍放大

2.2.2 Green DND-26 荧光探针染色鉴定人 AT II 细胞(图 3):Green DND-26 荧光探针染色可见板层小体呈颗粒状的绿色荧光,定位于胞质中,细胞核被 DAPI 染成蓝色。AT II 细胞的纯度在 98%左右 (n=15),与 pro-SP-C 评估结果一致。

2.2.3 透射电镜下观察人 AT II 细胞(图 4):体外培养 21 d 时,透射电镜下可见到人 AT II 细胞呈同心圆排列的板层小体和微绒毛(n=3)。

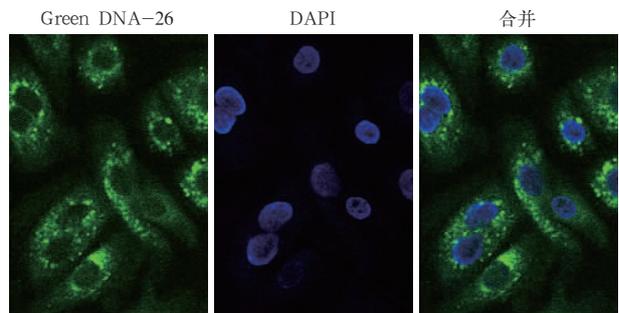


图 3 激光共聚焦显微镜下观察人 II 型肺泡上皮细胞体外培养 19 d 时进行溶酶体绿色荧光染料(Green DND-26)荧光探针染色可见 Green DND-26 呈颗粒状绿色荧光,聚集于胞质中,即板层小体所在位置;细胞核被 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染成蓝色 中倍放大

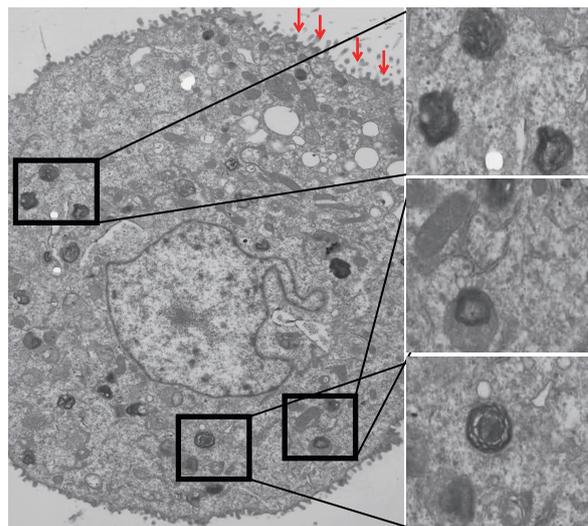
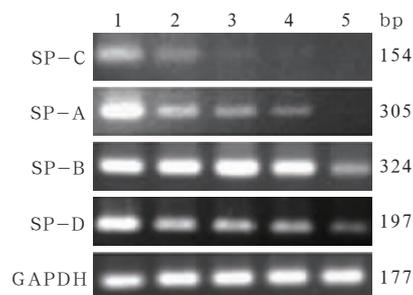


图 4 透射电镜下观察体外培养 21 d 时人 II 型肺泡上皮细胞黑色矩形框示部分板层小体所在位置,并且右侧对其进行 2 倍放大,红色箭头示部分微绒毛 高倍放大

2.3 人 AT II 细胞表面活性物质表达的维持情况(图 5;表 2): SP-A、SP-C 表达时间平均可维持在 24 d 左右,SP-B、SP-D 平均表达时间可持续在 28 d 左右,表达量均占肺组织中表达量的 20%以上。



RT-PCR:逆转录-聚合酶链反应;SP:肺表面活性蛋白; 1:人肺组织;2~5:人 II 型肺泡上皮细胞培养 16、20、24、28 d
图 5 RT-PCR 检测人 II 型肺泡上皮细胞表面活性物质表达

表 2 人 II 型肺泡上皮细胞培养不同时间表面活性物质的 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

时间	样本数	SP-A mRNA	SP-B mRNA	SP-C mRNA	SP-D mRNA
16 d	3	0.52 ± 0.03	1.05 ± 0.17	0.68 ± 0.16	0.52 ± 0.19
20 d	3	0.35 ± 0.02	0.76 ± 0.35	0.31 ± 0.04	0.33 ± 0.12
24 d	3	0.26 ± 0.01	0.55 ± 0.15	0.18 ± 0.06	0.31 ± 0.04
28 d	3	0.10 ± 0.08	0.36 ± 0.19	0.14 ± 0.09	0.23 ± 0.02

注:SP:肺表面活性蛋白

3 讨论

目前培养人 AT II 细胞的困难主要在于组织来源有限、表型维持时间较短,难以满足大多数体外研究的需要,限制了人 AT II 细胞的体外培养及研究。然而,AT II 细胞具有十分重要的功能,如其转分化功能在肺损伤修复中起重要作用^[17],有利于维持正常肺水的转运^[18]。因此,为了研究人 AT II 细胞的功能,建立分离、纯化、培养人 AT II 细胞的方法及探索表型维持的方法十分必要。本研究中在参阅 Ehrhardt 等^[12]、Elbert 等^[13]分离、培养方法的基础上进行了重要改进,一定程度上弥补了以上不足。本研究中采用胰酶(0.05%)、弹性蛋白酶(2 U/ml)联合消化法,一方面能减少高浓度胰酶对细胞的损伤,另一方面弹性蛋白酶的用量降低了 80%~90%,节省了分离成本。成纤维细胞的去除是细胞纯化的关键,否则在后续培养过程中容易形成优势细胞群,导致细胞分离培养失败。在 Ehrhardt 等^[12]应用多种磁珠分选去除成纤维细胞和巨噬细胞的基础上,本研究中仅运用磁珠去除巨噬细胞,同时将差速贴壁时间由 1.5 h^[13]、2.0 h^[14]改为 2.5 h,黏附培养基由无 FBS 改为 10%FBS,成功地去除了成纤维细胞,省去了应用磁珠分选去除成纤维细胞的步骤,进一步降低了分离成本,获得了与 Ehrhardt 等^[12]应用磁珠分选相当的细胞产量和纯度。本研究中利用细胞筛过滤、差速贴壁、密度梯度离心、抗 CD14 磁珠分选,获得的 AT II 细胞纯度在 98%左右,明显优于 Elbert 等^[13]的方法获得的细胞纯度(81 ± 1)%。

在细胞鉴定方面,本研究中主要采用 pro-SP-C 免疫荧光染色、Green DND-26 荧光探针染色以及透射电镜技术来鉴定 AT II 细胞。AT II 细胞能合成、分泌 4 种肺表面活性蛋白,其中 SP-C 是 AT II 细胞特异表达的肺表面活性蛋白,SP-A、SP-B、SP-D 虽然主要在 AT II 细胞中表达,但是也表达于其他类型的细胞^[19-20],如细支气管上皮细胞。因此,本研究中选用 pro-SP-C 免疫荧光鉴定 AT II 细胞是十分可靠的,同时应用 RT-PCR 检测 SP-A、SP-B、SP-D 表达,从分子水平鉴定证实该细胞生物学特性。用碱

性磷酸酶染色用来鉴定 AT II 细胞操作简易,但是该方法也存在较大局限性,因为纯化过程中需要去除的肺泡巨噬细胞也表达碱性磷酸酶^[21]。板层小体是 AT II 细胞特有的结构^[8],故本研究中应用对板层小体特异性着色的荧光染料 Green DND-26^[22-24]来鉴定、评估细胞纯度。

细胞原代培养生物学特性维持的好坏是决定培养的细胞是否可用的关键因素。目前国外研究表明,即使在改良体外培养条件的情况下,表面活性物质表达仅维持在 4 d^[11]、5 d^[25]、7 d^[9]。然而采用同样的检测方法,本研究中分离、培养的表面活性物质表达维持时间在 24 d 以上,最长可达 28 d,打破了体外培养 AT II 细胞不能传代、表型维持时间较短的局限^[26],为研究 AT II 细胞在各种病理生理条件下的调节功能创造了条件。目前所用的培养基主要有高蛋白无血清培养基(DCCM) + 10% FBS、低蛋白杂交瘤培养基(LPHM) + 10% FBS、SAGM + 1% FBS、DMEM + 10% FBS、RPMI-1640 + 10% FBS。本研究中选用的 SAGM + 1% FBS 培养基能较好维持细胞表型,可能由于 SAGM 中添加了 10 种有利于细胞分裂、繁殖、表型维持的细胞因子,如重组人表皮生长因子、转铁蛋白、肾上腺素等,再配以 1% FBS,既可以提供一个适于 AT II 细胞生长营养条件、防止其向 AT I 细胞分化,又可抑制成纤维细胞的生长。虽然本研究所使用的方法使体外培养的人 AT II 细胞能满足绝大部分体外研究的需要,但是如果能够建立表型稳定的人 AT II 细胞株,则能解决人肺组织来源有限、分离纯化过程复杂、耗时长的问题,这是本课题组下一步的研究方向。目前已有大鼠 AT II 细胞株建立的报道^[5],但是本研究的结果将会为国内外人 AT II 细胞株建立起到较大的推动作用。

综上所述,本研究中成功建立了一套分离、培养及鉴定人 AT II 细胞的方法,并对用该方法培养的 AT II 细胞的生物学特性维持情况进行了评估,证实该培养方法能够较持久地维持 AT II 细胞生物学特性。为研究人 AT II 细胞在 VILI 发生发展中的功能变化奠定了基础。

参考文献

- [1] 赵文静, 胡伟伟. 血红素加氧酶-1 表达对大鼠呼吸机相关性肺损伤的作用及机制研究. 中国危重病急救医学, 2010, 22: 410-413.
- [2] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med, 2000, 342: 1334-1349.
- [3] 邱海波, 陆晓曼. 呼吸机相关性肺损伤的炎症反应机制. 基础医学与临床, 2003, 23: 589-594.

- [4] Mason RJ. Biology of alveolar type II cells. *Respirology*, 2006, 11 Suppl: S12-15.
- [5] Driscoll KE, Carter JM, Iype PT, et al. Establishment of immortalized alveolar type II epithelial cell lines from adult rats. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1995, 31: 516-527.
- [6] 詹庆元, 王辰. 呼吸机所致肺损伤与肺保护性通气策略. *中华医学杂志*, 2001, 81: 635-637.
- [7] Dobbs LG, Mason RJ. Pulmonary alveolar type II cells isolated from rats, release of phosphatidylcholine in response to beta-adrenergic stimulation. *J Clin Invest*, 1979, 63: 378-387.
- [8] Dobbs LG. Isolation and culture of alveolar type II cells. *Am J Physiol*, 1990, 258: L134-147.
- [9] Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, et al. Primary human alveolar type II epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30: 500-509.
- [10] Bove PF, Grubb BR, Okada SF, et al. Human alveolar type II cells secrete and absorb liquid in response to local nucleotide signaling. *J Biol Chem*, 2010, 285: 34939-34949.
- [11] Bates SR, Gonzales LW, Tao JQ, et al. Recovery of rat type II cell surfactant components during primary cell culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282: L267-276.
- [12] Ehrhardt C, Kim KJ, Lehr CM. Isolation and culture of human alveolar epithelial cells. *Methods Mol Med*, 2005, 107: 207-216.
- [13] Elbert KJ, Schäfer UF, Schäfers HJ, et al. Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies. *Pharm Res*, 1999, 16: 601-608.
- [14] Chan MC, Cheung CY, Chui WH, et al. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res*, 2005, 6: 135.
- [15] 张明凤, 张彦定, 王昕, 等. 小鼠胎肺 II 型上皮细胞的分离纯化及原代培养. *福建师范大学学报 (自然科学版)*, 2009, 25: 82-86, 97.
- [16] 陈慧, 王振花, 张建平, 等. 胎鼠肺泡 II 型上皮细胞分离、原代培养与鉴定. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2006, 27: 496-499, 505.
- [17] 卢红艳, 常立文. 肺泡 II 型上皮细胞转分化. *细胞生物学杂志*, 2006, 28: 25-28.
- [18] 张秋金, 李银平, 黎檀实. 肺泡上皮细胞功能特性与内毒素急性肺损伤. *中国危重病急救医学*, 2005, 17: 382-384.
- [19] Rooney SA, Young SL, Mendelson CR. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J*, 1994, 8: 957-967.
- [20] Batenburg JJ, Haagsman HP. The lipids of pulmonary surfactant: dynamics and interactions with proteins. *Prog Lipid Res*, 1998, 37: 235-276.
- [21] 田艳霞, 高俊玲, 郑玉华. 灌洗的大鼠肺泡巨噬细胞碱性磷酸酶组化显示. *中国煤炭工业医学杂志*, 2000, 3: 518.
- [22] Haller T, Ortmayr J, Friedrich F, et al. Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 1579-1584.
- [23] Wemhöner A, Jennings P, Haller T, et al. Effect of exogenous surfactants on viability and DNA synthesis in A549, immortalized mouse type II and isolated rat alveolar type II cells. *BMC Pulm Med*, 2011, 11: 11.
- [24] Fang X, Song Y, Hirsch J, et al. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290: L242-249.
- [25] Wang J, Edeen K, Manzer R, et al. Differentiated human alveolar epithelial cells and reversibility of their phenotype in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36: 661-668.
- [26] 陈力, 黎檀实. 肺泡上皮细胞培养与鉴定的研究进展. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 382-384.

(收稿日期: 2012-05-23)

(本文编辑: 李银平)

·学术活动预告·

《中国危重病急救医学》杂志天津生化杯有奖征文通知

《中国危重病急救医学》杂志编辑委员会与天津生物化学制药有限公司拟于 2012 年共同举办《中国危重病急救医学》杂志天津生化杯有奖征文活动, 现将有关事项通知如下。

- 1 征文内容: 有关注射用氯化可的松琥珀酸钠在急诊、危重症领域的临床应用经验总结和基础研究。可为论著或病例报告形式, 具体书写要求和格式请参考本刊稿约 (刊登于每年第 1 期第 63~64 页和第 7 期第 447~448 页), 以及在本刊刊出的论著和病例报告类论文。
- 2 首次征文时间: 2012 年 4 月开始, 2012 年 8 月 30 日截止。
- 3 征集方式: 稿件请以“第一作者姓名 + 论文题目”命名, 发送至 cccm@em120.com 或 tjbp-xueshuzu@163.com, 邮件主题请注明“琥珀氢可征文”。本活动只接受电子邮件投稿。
- 4 注意事项: ①尚未公开发表的论文; ②内容须具有科学性、先进性和实用性, 数据须准确无误; ③为方便联系, 稿件上请注明: 单位、地址、邮编、电话、邮箱以及所有作者姓名。
- 5 评审办法: 征文结束后由本活动专家委员会对征文进行评审, 论文第一作者视为获奖者, 获奖名单刊登于《中国危重病急救医学》杂志上。
- 6 奖项设置: 一等奖 2 名, 赞助参加国际重要学术会议 1 次; 二等奖 3 名, 赞助参加国内重要学术会议 1 次; 三等奖 5 名, 赞助参加省内学术会议 1 次; 凡参与者均可获得精美纪念礼品 1 份。
- 7 联系人: 徐津鹏; 电话: 022-24891391, 13820882016。