

研究报告

山羊肺泡巨噬细胞永生化建立与表型鉴定

张文鑫^{1,2,3}, 丁一格^{1,2,4}, 孙嘉媛^{1,2,4}, 王欣慧^{1,2,5}, 刘真¹, 丁家波^{*1,2}

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

2 农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室(北方), 北京 100193

3 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018

4 西北农林科技大学 动物科技学院 动物生物育种国际农业联合研究中心, 陕西 杨凌 712100

5 中国农业大学 动物医学院, 北京 100083

张文鑫, 丁一格, 孙嘉媛, 王欣慧, 刘真, 丁家波. 山羊肺泡巨噬细胞永生化建立与表型鉴定[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 822-832.

ZHANG Wenxin, DING Yige, SUN Jiayuan, WANG Xinhui, LIU Zhen, DING Jiabo. Establishment and phenotypic characterization of an immortalized goat alveolar macrophage line[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 822-832.

摘要: 【背景】尽管已有多种人和鼠细胞系可以作为布鲁氏菌(*Brucella*)的体外侵染模型, 但目前仍缺乏能够准确模拟其在体内感染过程的大动物体外细胞模型。【目的】获得具有单一克隆特性的、能稳定传代的山羊肺泡巨噬细胞系, 优化布鲁氏菌体外侵染山羊细胞系模型。【方法】在无菌环境下用 PBS 灌洗山羊肺脏, 分离得到原代山羊肺泡巨噬细胞; 采用转染 SV40 大 T 抗原(SV40 large T antigen, SV40LT)、嘌呤霉素抗性筛选的方法建立了永生化山羊肺泡巨噬细胞系; 使用细胞免疫荧光和流式细胞术检测单核巨噬细胞表面特征性标志物分化抗原簇 14 (cluster of differentiation antigen 14, CD₁₄), 利用鸡红细胞吞噬实验检测其吞噬能力; 随后将布鲁氏菌(*Brucella*) M5 疫苗株侵染该细胞系, 在不同时期统计胞内活菌数。【结果】成功分离并构建了山羊肺泡巨噬细胞系, 并且具有典型的巨噬细胞形态学特征, 呈现不规则形状, 有伪足伸出, 胞体较大, 吞噬能力强; 体外培养 10 d, 有 95.40%原代细胞特异性表达 CD₁₄, 永生化后仍有 92.4%的细胞特异性表达 CD₁₄; 相较于另外 3 种细胞, 永生化后的肺泡巨噬细胞对布鲁氏菌敏感性与 RAW264.7 细胞近似, 高于绵羊间质睾丸细胞(sheep testicular interstitial cell, STIC)。【结论】成功建立永生化山羊肺泡巨噬细胞系, 该细胞系为研究布鲁氏菌的致病机制及免疫逃逸机制提供了体外试验对象。

关键词: SV40LT; 慢病毒; 布鲁氏菌; 攻毒模型; 流式细胞术

资助项目: 中国农业科学院科技创新工程重点任务(CAAS-CSLPDCP-202403); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2024JC36)

This work was supported by the Key Tasks of Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-CSLPDCP-202403) and the Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (Y2024JC36).

*Corresponding author. E-mail: dingjiabo@126.com

Received: 2024-08-29; Accepted: 2024-09-23; Published online: 2024-10-25

Establishment and phenotypic characterization of an immortalized goat alveolar macrophage line

ZHANG Wenxin^{1,2,3}, DING Yige^{1,2,4}, SUN Jiayuan^{1,2,4}, WANG Xinhui^{1,2,5}, LIU Zhen¹, DING Jiabo^{*1,2}

1 Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 Key Laboratory of Animal Biosafety Risk Prevention and Control (North) of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100193, China

3 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

4 International Joint Agriculture Research Center for Animal Bio-breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

5 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100083, China

Abstract: **[Background]** Although a variety of human and murine cell lines have been utilized as models for *Brucella* infection *in vitro*, there remains a lack of large animal cell models that can accurately simulate the infection process. **[Objective]** To obtain a stable passable goat alveolar macrophage line with single cloning characteristics and optimize the goat cell infection model of *Brucella* infection. **[Methods]** Goat alveolar macrophages were isolated by perfusing goat lungs with PBS under sterile conditions. An immortalized goat alveolar macrophage cell line was established by transfection with SV40 large T antigen (SV40LT) and puromycin resistance screening. The characteristic surface marker of mononuclear macrophages, CD₁₄, was detected by immunofluorescence and flow cytometry. The phagocytic ability of the established cell line was assessed with chicken red blood cells. Subsequently, the cell line was infected with *Brucella* vaccine strain M5, and the intracellular bacteria were counted at different time points. **[Results]** The alveolar macrophage cell line of goat was successfully isolated and constructed, and it had typical macrophage morphological characteristics, showing an irregular shape, pseudopodium protruding, large cells, and strong phagocytosis. After 10 d of cultivation, 95.40% of the primary cells specifically expressed CD₁₄, and 92.4% of the cells specifically expressed CD₁₄ after immortalization. Compared with the other three cell lines, the immortalized alveolar macrophage cells were sensitive to *Brucella*, with the sensitivity similar to that of RAW264.7 cells and higher than that of sheep testicular interstitial cell (STIC). **[Conclusion]** An immortalized goat alveolar macrophage cell line was successfully established, providing an *in vitro* experimental object for studying the pathogenicity and immune escape mechanism of *Brucella*.

Keywords: SV40LT; lentivirus; *Brucella*; cell challenge model; flow cytometry

巨噬细胞(macrophages)是先天免疫的重要组成部分之一^[1],广泛存在于机体的各个组织,在防御病原微生物入侵等方面发挥重要作用^[2]。布鲁氏菌病(brucellosis)又称马耳他热(Malta fever)、地中海弛热(Mediterranean remittent

fever),是一种全球常见的重要人畜共患传染病^[3]。该疾病病原为布鲁氏菌(*Brucella*),主要寄生于淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、胎盘滋养细胞及树突状等细胞内^[4-5],能够感染人和多种哺乳动物,其中包括绵羊、山羊、牛、猪、马等

在内的常见家畜^[6]。然而作为其重要的天然宿主,山羊、绵羊仍无合适的体外细胞模型。因此,构建永生化山羊巨噬细胞系并进一步制备布鲁氏菌体外大动物细胞侵染模型,对于深入理解布鲁氏菌入侵巨噬细胞过程并由此引发的动物慢性感染的作用机制具有重要意义。

不同组织的巨噬细胞在功能与结构上表现出特异性^[7-8],如脾脏中的边缘区巨噬细胞特异性的表达 SIGN-R1,从而在免疫反应中发挥重要作用;肺泡巨噬细胞表面则会分泌代谢表面活性剂^[9-10]。相较于其他巨噬细胞群体,肺泡巨噬细胞与环境直接接触^[11],是最先接触到空气传播病原微生物的细胞之一^[12-14]。肺泡巨噬细胞能够清除进入机体的异物和病原体,同时为了避免肺部过度的组织损伤,并保障气体交换,机体需要控制肺部免疫反应。细菌和病毒会利用肺泡巨噬细胞的相对低反应性使其能够在组织内持续存在和传播^[15-16]。结核病通常是一种肺部疾病,通过活动性感染者的气溶胶传播^[17],布鲁氏菌作为常见的人畜共患传染病同样会经过呼吸道途径感染^[18]。布鲁氏菌通过其毒力因子[脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、T4SS 分泌系统、BvrR/BvrS 系统和外膜蛋白],可以与宿主细胞表面相互作用,形成早期、晚期布氏小体(*Brucella* containing vacuole, BCV),从而介导其逃避免疫系统攻击^[19]。作为肺脏抗病原感染的首道防线,肺泡巨噬细胞是研究细菌感染的良好模型^[20]。

建立永生化细胞的方法有很多种,包括物理、化学和生物学方法^[21]。目前应用最多的为 SV40 大 T 抗原(SV40 large T antigen, SV40LT)转染和端粒酶催化亚基(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)转染两种方式^[22]。hTERT 的功能是在细胞中维持足够的端粒长度,已被观察到在肿瘤细胞中具有选择性表达^[23]。

本研究在分离纯化山羊肺泡巨噬细胞的基础上,利用 SV40LT 慢病毒稳定转染的方式获得一株永生化的山羊肺泡巨噬细胞,以期布鲁氏菌等人畜共患传染病病原在大动物体外模型研究中填补空缺。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞系和质粒

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7、人单核细胞白血病细胞株 THP-1、绵羊间质睾丸细胞(sheep testicular interstitial cell, STIC)、人胚肾细胞 HEK 293T 和羊种布鲁氏菌 M5 均由本实验室保存; pBABE-puro SV40LT 质粒载体购自湖南丰晖生物科技有限公司; pMD2.G 质粒和 psPAX2 质粒由本实验室保存。

八周龄健康白绒公山羊,山东某种羊场提供。本研究实验过程符合动物伦理要求,通过中国农业科学院北京畜牧兽医研究所实验动物福利伦理委员会审批(审批编号为 IAS2024-84)。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

TSB 培养基、TSA 培养基, Oxoid 公司; DMEM 完全培养基和 1640 细胞培养基, Gibco 公司。TSA 培养基配方:胰酪蛋白胨 15 g, 大豆蛋白胨 5.0 g, 氯化钠 5.0 g, 琼脂粉 15 g。

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), NSERA 公司; 0.25% trypsin-EDTA、PBS、羊外周血单核细胞分离液试剂盒、4%鸡红细胞(无菌)、瑞氏-吉姆萨复合染色液、多聚甲醛(PFA)、TC 处理细胞爬片(24 孔板用,直径 14 mm)、青链霉素混合液(100×)、庆大霉素、嘌呤霉素、Triton X-100, Solarbio 公司; T25、T75 细胞培养瓶, Corning 公司; 血球计数板, Marienfeld 公司; 细胞培养孔板, 上海卧宏生物科技有限公司; 兔抗内毒素受体抗体分化抗原簇 14 (cluster of differentiation antigen 14, CD₁₄), Bioss 公司;

Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 荧光二抗, Proteintech 公司; Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Cy5[®]) preadsorbed Ab6564 荧光二抗, abcam 公司; Fluoromount-G 荧光封片剂, SouthernBiotech 公司; jetPRIME[®]、Jet Prime Buffer, PolyPlus-transfection 公司。

生物安全柜, 济南鑫贝西生物技术有限公司; CO₂ 细胞培养箱, 上海博迅实业有限公司; 荧光倒置显微镜, Nikon 公司; 高速冷冻离心机, Thermo Fisher 公司。

1.3 山羊肺泡巨噬细胞的分离培养

将山羊处死后提起肺脏, 结扎气管, 取出新鲜肺脏并快速转移至实验室生物安全柜中。打开气管, 用 50 mL 无菌 PBS 清洗肺脏内部, 并轻轻按压肺叶, 使肺巨噬细胞释放, 重复 4-5 次。收集上述肺泡冲洗液, 用无菌纱布过滤杂质, 依照外周血单核细胞分离液试剂盒说明从冲洗液中分离肺单核巨噬细胞。随后按照 1×10^6 个/mL 的细胞密度重悬于含有 10% FBS 和 1% P/S 的 DMEM 完全培养基中, 将细胞瓶置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 静置培养 2 h 后更换 DMEM 完全培养基, 去除未贴壁的细胞。

1.4 细胞免疫荧光鉴定

将 2×10^4 个细胞接种到预先放置有处理过的盖玻片的 24 孔细胞板中, 37 °C 细胞培养箱中静置培养 12-15 h, 细胞爬片后, 吸出培养基, 用 PBS 洗 1 遍, 加入 4% PFA, 4 °C 固定 30 min, PBS 洗 3 次后, 除去水分, 取 50 μL 破膜封闭液滴于防水膜上, 将玻片上有细胞的一面盖上, 培养箱中静置 2 h。破膜封闭后, 取 50 μL 兔抗内毒素受体抗体于防水膜上, 将玻片有细胞一面盖上, 4 °C 条件下孵育过夜, 使用 PBS 洗涤 3 次后, 避光条件下加入 cy5 荧光标记二抗, 室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次。用 DAPI 室温染 5 min 后用 PBS 洗涤 3 次, 在玻片上滴 1 滴 Fluoromount-G, 将

有细胞的一面盖上, 于荧光倒置显微镜上观察。

1.5 细胞免疫流式鉴定

取分离后培养 10 d 的原代山羊肺泡巨噬细胞或永生化细胞, 弃掉培养基后用 PBS 清洗细胞, 加入 0.25% trypsin-EDTA 将细胞消化, 待细胞分散悬浮, 终止反应收集细胞, $300 \times g$ 离心 5 min, 弃去上清, 用 5 mL PBS 重悬, 再次离心弃上清, 重复 2 次, 最后用 0.1 mL PBS (含 2% FBS) 重悬细胞。在重悬液中加入 10 μL 兔抗内毒素受体抗体混匀, 室温避光孵育 30 min, PBS 再次洗涤细胞 2 遍, 随后用 0.1 mL PBS 重悬细胞, 加入 FITC 荧光标记二抗混匀, 避光孵育 30 min, PBS 再次洗涤, 弃上清, 0.1 mL PBS 重悬细胞, 对照为经相同处理的肺成纤维细胞, 检测细胞表面 CD14 抗体表达水平。

1.6 肺泡巨噬细胞吞噬鸡红细胞试验

将分离培养 10 d 的原代细胞或永生化细胞按照 1×10^6 个细胞铺于 6 孔板, 4% 的鸡红细胞用 DMEM 完全培养基洗涤 2 次后, 用 0.5 mL 的培养液重悬, 加入含巨噬细胞的培养板中, 5% CO₂、37 °C 培养箱中孵育。1 h 后轻轻吹打, 收集细胞, 将细胞悬液涂片, 晾干后使用瑞氏-吉姆萨复合染色液染细胞, 染色后置于显微镜下观察细胞吞噬情况。

1.7 稳转细胞系构建与传代

1.7.1 嘌呤霉素最低致死浓度确立

将原代细胞按照每孔 5×10^4 个铺到 24 孔板中, 37 °C 细胞培养箱培养 12 h, 第 2 天去除旧培养基, 将含不同浓度嘌呤霉素(1、2、3、4、5、6、7 μg/mL) 的新鲜培养基分别加入铺有细胞的 24 孔板中, 每 2 d 更换新鲜的筛选培养基。每天观察细胞存活比例, 以 4 d 内杀死所有细胞的最低浓度作为最佳筛选工作浓度。实验共重复 3 次。

1.7.2 慢病毒包装

从液氮中取 HEK 293T 细胞复苏, 状态稳

定后进行后续操作。细胞铺板, 6孔板接种密度为 7×10^5 个/孔, 培养 24–36 h 后, 此时细胞汇合度为 70%–80%。转染前弃去原培养液, 更换为含 2% FBS 的无抗 DMEM, 随后用移液枪吸取 200 μ L Jet Prime Buffer 至 1.5 mL 离心管中, 向管中按照 1:2:3 的比例加入 PMD2.G、psPAX2 及慢病毒载体质粒, 质粒总质量为 3.3 μ g, 随后按照 jetPRIME[®]说明书进行慢病毒包装。

1.7.3 细胞慢病毒转染

将分离的原代肺泡巨噬细胞按照 1×10^6 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 过夜贴壁后更换新鲜 DMEM 完全培养基, 随后加入 500 μ L SV40 过表达慢病毒上清液, 摇晃混匀, 12 h 后观察细胞状态, 并将转染细胞按照每孔 5×10^4 铺入 24 孔板, 同时铺入未转染细胞作为对照, 继续培养, 第 2 天去除 24 孔板中旧的培养液, 加入含嘌呤霉素(2 μ g/mL)的 DMEM 完全培养基, 孵育。每隔 2 d 更换新鲜的筛选培养基, 每天观察细胞存活比例, 在同一时间点(4 d)存活的细胞, 即为转染成功的细胞。

1.7.4 细胞传代扩增

对筛选后的细胞进行扩增, 将长成单层的细胞瓶从培养箱中取出, 弃掉旧培养基, 加入 3 mL PBS 清洗细胞, 加入 2 mL 0.25% trypsin-EDTA 静置 3–5 min 将细胞消化, 待细胞分散悬浮, 加入相同体积 DMEM 完全培养基终止反应, 收集细胞, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加入 3 mL 完全培养基将细胞重悬, 将重悬细胞加入新细胞瓶中继续培养。筛选后的细胞记为 P1 代, 重复扩增至 P12 代。将永生化细胞命名为永生化山羊肺泡巨噬细胞(imortalized goat alveolar macrophages, GAMs)。

1.8 布鲁氏菌感染永生化细胞模型构建

1.8.1 细菌培养

吸取 3 mL TSB 至 15 mL 离心管中, 取复

苏后培养 1 d 至对数生长期的 M5 布鲁氏菌, 按照 1%的接种量接种至 TSA 培养基中, 封口膜密封。37 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养约 20 h, 此时 OD_{600} 约为 0.8, 取 100 μ L 菌液梯度稀释涂板, 计算 CFU, 此过程中菌液保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱。以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=100 条件进行细胞感染实验。

1.8.2 布鲁氏菌感染模型构建

按照 2.5×10^5 个/孔, 将 RAW264.7、THP-1、STICs、GAMs 铺于 24 孔细胞板, 以 2% FBS、无抗 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 15 h, 按照 MOI=100 计算菌液 CFU, 加入铺板后的细胞中, 400 \times g 离心 10 min, 孵育 1 h, 感染完成后, 弃掉上清, PBS 洗涤 3 遍, 加入含 50 μ g/mL 庆大霉素、2% FBS 的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}$ C 杀菌 1 h。杀菌完成后, 再次弃上清, PBS 清洗 1 遍, 更换为含 25 μ g/mL 庆大霉素、2% FBS 的 DMEM 培养基维持培养。

在 M5 感染后分别于第 24、48、72、96 h 收集细胞样品, 进行胞内存活计数。具体操作为: 使用预热过的 PBS 清洗细胞板细胞, 加入 500 μ L 0.1% Triton X-100 37 $^{\circ}$ C 裂解细胞 10 min, 轻微吹打, 取 100 μ L 梯度稀释, 涂布于 TSA 固体培养平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养, 48 h 后进行菌落计数, 每组 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 山羊原代肺泡巨噬细胞形态学观察

分离的原代细胞铺板后在显微镜下观察, 可见细胞形态饱满圆润, 大小均一(图 1A)。细胞培养 6 d 后, 细胞密度有所减少, 部分细胞伸出伪足, 细胞体积变化不大, 贴壁能力增强(图 1B)。继续培养至 10 d, 细胞密度进一步减少, 伸出伪足细胞比例增加, 绝大部分细胞变得不规则, 部分细胞伸出较长伪足(图 1C)。

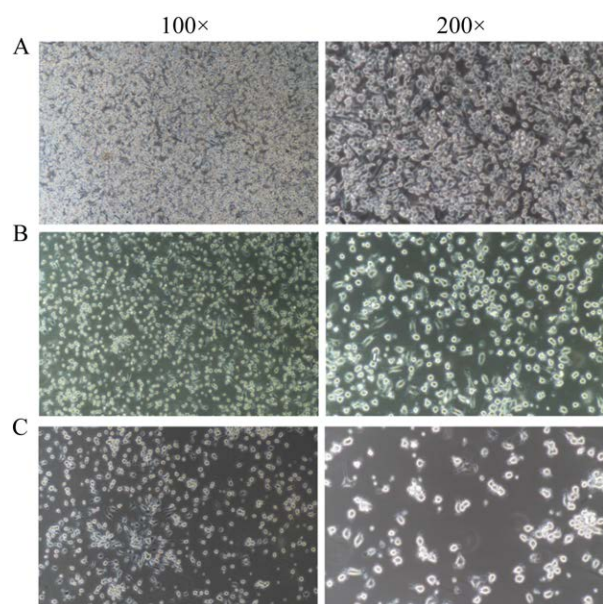


图 1 体外培养的山羊原代肺泡巨噬细胞不同时期形态 A: 体外培养 1 d, 细胞形态圆润; B: 体外培养 6 d, 部分细胞伸出伪足; C: 体外培养 10 d, 细胞形态趋于不规则。

Figure 1 Morphology of primary alveolar macrophages from goats cultured *in vitro* at different periods. A: After 1 d of culture *in vitro*, cell morphology was round; B: After 6 d of culture *in vitro*, some cells extended pseudopods; C: After 10 d of culture *in vitro*, cell morphology tended to be irregular.

2.2 山羊原代肺泡巨噬细胞表面抗原 CD₁₄ 免疫荧光鉴定结果

收集原代山羊肺泡巨噬细胞, 与抗羊 CD₁₄ 抗体共孵育, 分别再与 cy5 荧光二抗、FITC 荧光二抗共孵育, 分别进行免疫荧光鉴定及流式细胞术分析。在荧光显微镜下观察, 结果如图 2 所示, 在细胞核周围有大量红色荧光呈现, CD₁₄ 呈阳性反应。用流式细胞仪进一步分析鉴定, 山羊原代肺泡巨噬细胞 CD₁₄ 的表达比例达到 95.40%, 而作为对照的肺成纤维细胞表面 CD₁₄ 的表达比例仅为 0.73% (图 3), 这与免疫荧光检测的细胞 CD₁₄ 表达情况相符, 表明本实验分离到高纯度的山羊肺泡巨噬细胞。

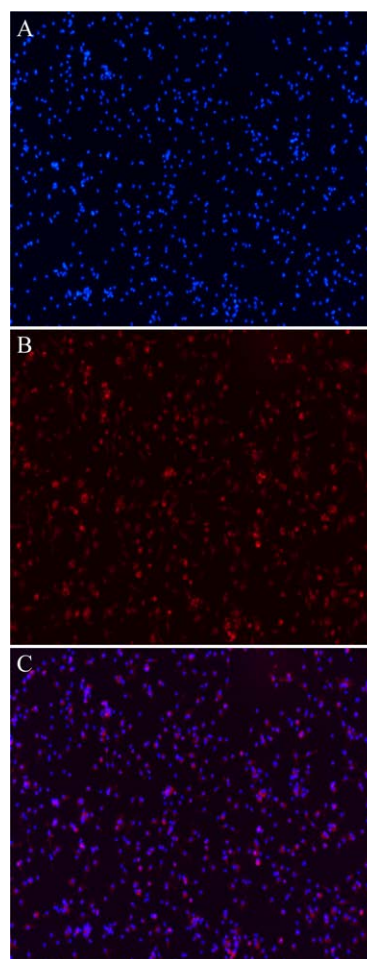


图 2 山羊原代肺泡巨噬细胞免疫荧光图

Figure 2 Immunofluorescence of primary goat alveolar macrophages (100×). A: DAPI; B: Fluorescence; C: Immunological fluorescence assay (IFA) merge.

2.3 山羊原代肺泡巨噬细胞吞噬能力检测

体外培养 10 d 的肺泡巨噬细胞, 铺板后, 加入鸡红细胞孵育 1 h, 收集细胞后, 采用瑞氏-吉姆萨复合染色液染色, 在油镜下观察。如图 4 所示, 细胞涂片中清晰可见较为明亮的鸡红细胞, 羊肺泡巨噬细胞整体更加暗淡, 在吞噬多个鸡红细胞后胞体也变得明亮; 有些鸡红细胞正在被巨噬细胞消化, 细胞形态消失, 有些红细胞附着在巨噬细胞膜周围, 仍保留正常细胞

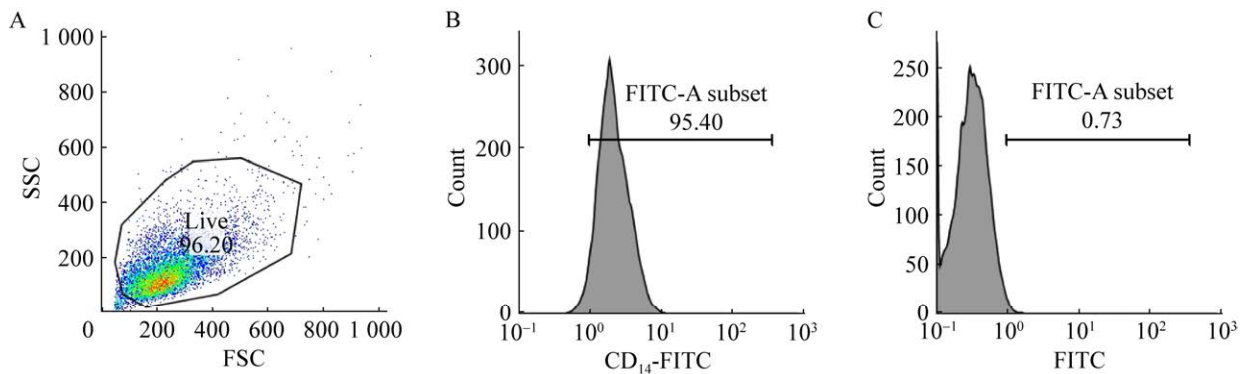


图 3 山羊原代肺泡巨噬细胞表面 CD_{14} 表达情况 A: 流式细胞收集散点图, 前向散射光(FSC), 侧向散射光(SSC); B: 流式检测肺泡巨噬细胞 CD_{14} 的表达; C: 流式检测肺成纤维细胞 CD_{14} 的表达。

Figure 3 CD_{14} expression on the surface of goat primary alveolar macrophages. A: Flow cytometric collection of scatter plots, forward scattered (FSC), side scattered (SSC); B: Flow assay for alveolar macrophage CD_{14} expression; C: Flow assay for lung fibroblast CD_{14} expression.

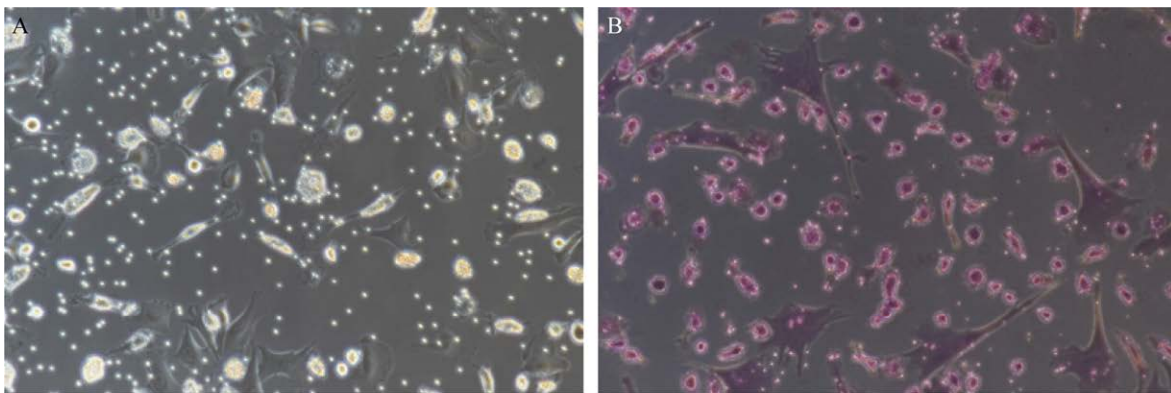


图 4 山羊原代肺泡巨噬细胞吞噬鸡红细胞(100 \times) A: 肺泡巨噬细胞吞噬鸡红细胞-明场; B: 肺泡巨噬细胞吞噬鸡红细胞-瑞氏-吉姆萨复合染色液染色。

Figure 4 Goat primary alveolar macrophages phagocytose chicken erythrocytes (100 \times). A: Alveolar macrophage phagocytosis of chicken erythrocytes-bright field; B: Alveolar macrophage phagocytosis of chicken erythrocytes- Giemsa staining.

形态。结果表明分离得到的山羊肺泡巨噬细胞具有很强的吞噬能力, 但仍有部分伸出伪足分化严重的细胞已经丧失了吞噬能力。

2.4 山羊肺泡巨噬细胞永生化建立及传代扩增

在原代细胞中分别加入不同浓度的嘌呤霉素, 确定最佳筛选浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。利用 SV40LT 过表达慢病毒转染细胞, 在 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素

压力筛选下, 将存活细胞收集起来进行传代培养, 扩增至 P12 代, 即为永生化细胞。所得细胞在显微镜下观察, 如图 5 所示, 永生化细胞形态不规则, 多有伪足, 贴壁牢固, 细胞体积增大, 能够稳定传代。

2.5 永生化山羊肺泡巨噬细胞免疫荧光鉴定与流式检测结果

将永生化肺泡巨噬细胞与荧光标记的抗羊

CD₁₄ 抗体共孵育，分别进行免疫荧光鉴定及流式细胞术分析。如图 6 所示，在荧光显微镜下，清晰可见细胞膜表面绿色荧光。通过流式细胞术分析，如图 7 所示，细胞表面特征性标志物 CD₁₄ 阳性率为 92.40%，结合 2.2 结果，原代细胞表面特征性标志物 CD₁₄ 阳性率为 95.40%，进一步证实永生化细胞系为高纯度的山羊肺泡巨噬细胞系(goat alveolar macrophage, GAM)。

2.6 布鲁氏菌感染永生化细胞模型构建

采用 4 种不同类型的细胞，同时使用 MOI=100 的布鲁氏菌感染 1 h，对感染后 24、

48、72、96 h 进行胞内存活计数用以比较布鲁氏菌在不同细胞系中的存活情况。结果如图 8 所示，在感染 24 h 后，THP-1 中布鲁氏菌胞内菌最多；随着时间推移，24–48 h 进入复制型布鲁氏菌囊泡(repetitive brucella-containing vacuole, rBCV)周期，RAW264.7、STIC、GAM 细胞胞内菌均有所升高；72 h 后为自噬相关型布鲁氏菌囊泡(autophagic-like Brucella-containing vacuole, aBCV)形成周期，胞内菌数量均有所减少。其中 GAM 胞内存活曲线与 RAW264.7 细胞近似，并且敏感性高于 STIC 细胞。

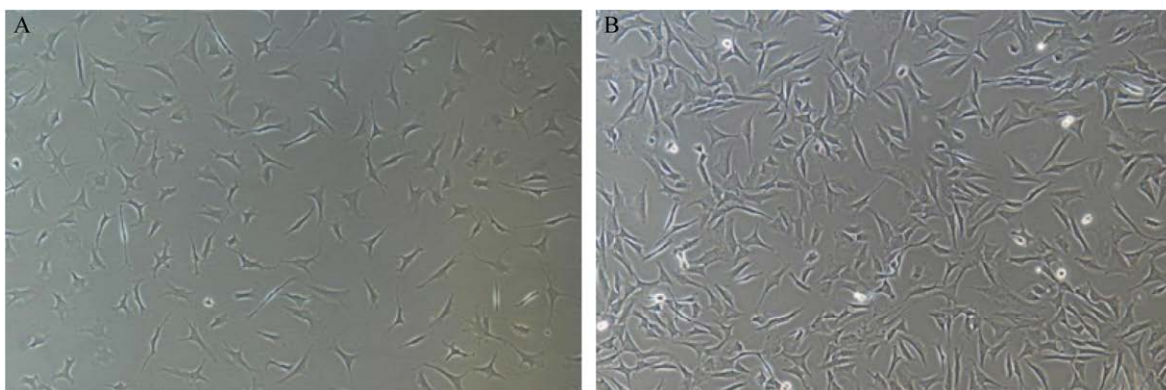


图 5 永生化山羊肺泡巨噬细胞形态图(100×) A: P4 代肺泡巨噬细胞形态图; B: P12 代肺泡巨噬细胞形态图。

Figure 5 Morphology of alveolar macrophages in immortalized goats (100×). A: Morphology of alveolar macrophages of P4 generation; B: Morphology of alveolar macrophages of P12 generation.

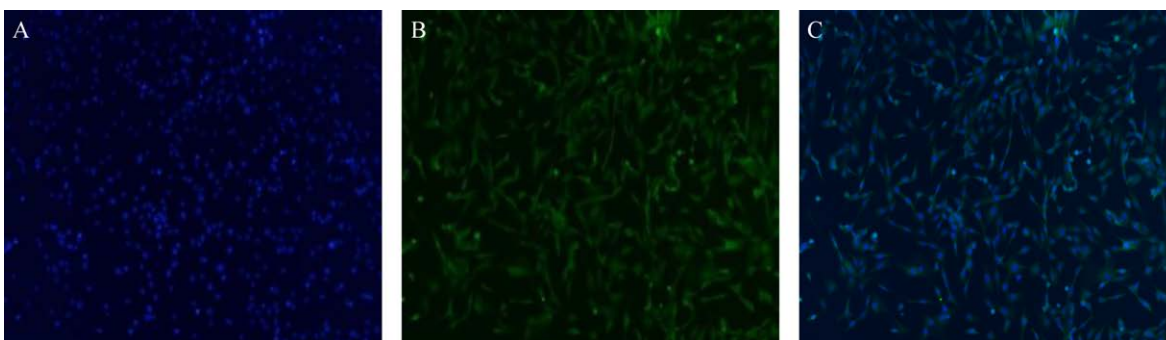


图 6 永生化山羊肺泡巨噬细胞免疫荧光图

Figure 6 Immunofluorescence of immortalized goat alveolar macrophages (100×). A: DAPI; B: Fluorescence; C: IFA merge.

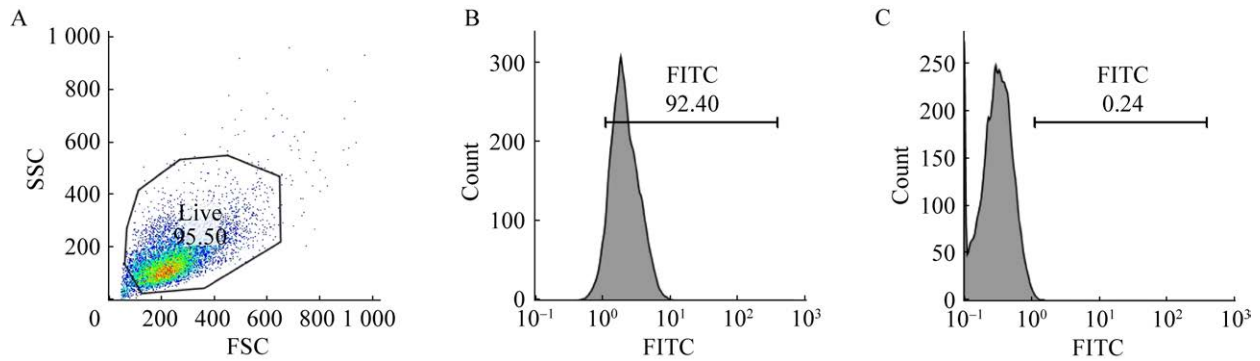


图 7 永生化山羊肺泡巨噬细胞表面 CD₁₄ 表达情况 A: 流式细胞收集散点图, 前向散射光(FSC), 侧向散射光(SSC); B: 流式检测肺泡巨噬细胞 CD₁₄ 的表达; C: 流式检测肺成纤维细胞 CD₁₄ 的表达。

Figure 7 CD₁₄ expression on the surface of immortalized goat alveolar macrophages. A: Flow cytometric collection of scatter plots, forward scattered (FSC), side scattered (SSC); B: Flow assay for alveolar macrophage CD₁₄ expression; C: Flow assay for lung fibroblast CD₁₄ expression.

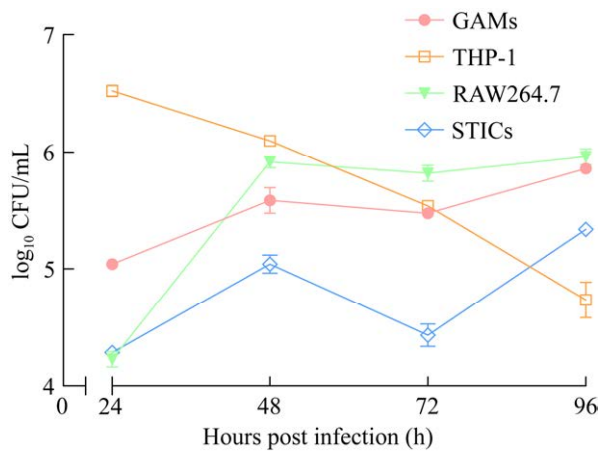


图 8 布鲁氏菌在 4 种细胞系中胞内存活情况
Figure 8 Intracellular survival of *Brucella abortus* in four cell lines.

3 讨论

肺泡巨噬细胞存在于独特的气管微环境中, 这种独特的环境对肺泡巨噬细胞的表型、功能和周转的许多方面都有较大的影响^[24]。近年来, 已有研究人员尝试分离山羊肺泡巨噬细胞用作体外试验, 但并未进行细胞永生化的构建^[20,25]。

CD₁₄ 是一种位于单核细胞和巨噬细胞表面

的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)受体, 被广泛用来作为鉴定单核巨噬细胞的标志物^[26-28]。本研究分离得到的原代肺泡巨噬细胞经免疫荧光鉴定及流式细胞术分析, CD₁₄ 阳性率达到了 95% 以上; 永生化后, CD₁₄ 阳性率仍然在 90% 以上, 证明该永生化细胞系为高纯度的肺泡巨噬细胞。同时, 鸡红细胞吞噬实验表明, 该细胞系具有良好的异源物质吞噬能力, 这对于布鲁氏菌体外侵袭试验是极为重要的。

在此前的研究报道中, 马耳他布鲁氏菌 (*B. melitensis*) 感染模型的研究都是基于细胞系 RAW264.7 或 THP-1^[29-30]。布鲁氏菌侵染试验表明, GAM 对布鲁氏菌具有较强的易感性, 优于上皮状细胞系 STIC, 与经典布鲁氏菌侵染细胞模型 RAW264.7 易感性相当。以上实验结果表明, 山羊肺泡巨噬细胞被成功永生化, 细胞表面标志物清晰, 吞噬功能良好, 是良好的布鲁氏菌体外侵染细胞模型。该永生化细胞系的建立为研究布鲁氏菌、口蹄疫病毒等以羊为宿主的病原菌的致病机制及免疫逃逸机制提供了便利。

然而, 本研究仍存在局限性: (1) 虽然山羊肺泡巨噬细胞系被成功永生化, 检测到细胞表

面标志物 CD₁₄, 吞噬能力良好, 但与原代细胞相比, 细胞形态发生较大改变, 由圆润变为伸出多对伪足的树突状细胞形态。后续, 需要进一步通过实验讨论细胞形态改变对细胞极化、免疫应答等指标的影响。(2) 本研究在永生细胞建立的基础上, 重点探究了该细胞系在不同侵染时期对布鲁氏菌的易感性, 仍需要对布鲁氏菌在该细胞系的免疫逃逸机制进行充分解析; 同时, 补充其他羊源病原对该细胞系的易感性研究。

4 结论

本研究创建了一株永生化的山羊肺泡巨噬细胞系, 所构建永生山羊肺泡巨噬细胞具备巨噬细胞特性, 能够稳定传代, 并且对布鲁氏菌易感, 对于解析相关病原在大动物的致病机制提供了便利。

REFERENCES

- [1] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, TAGHADASI M, ESMAEILI SA, MARDANI F, SEIFI B, MOHAMMADI A, AFSHARI JT, SAHEBKAR A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [2] RUSSO R, SHOEMAKER CA, PANANGALA VS, KLESZIUS PH. *In vitro* and *in vivo* interaction of macrophages from vaccinated and non-vaccinated channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 26(3): 543-552.
- [3] FOSGATE GT, CARPENTER TE, CHOMEL BB, CASE JT, DeBESS EE, REILLY KF. Time-space clustering of human brucellosis, California, 1973-1992[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8(7): 672-678.
- [4] De FIGUEIREDO P, FICHT TA, RICE-FICHT A, ROSSETTI CA, ADAMS LG. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions[J]. *The American Journal of Pathology*, 2015, 185(6): 1505-1517.
- [5] WANG Y, LI YX, LI HJ, SONG HX, ZHAI NC, LOU LX, WANG F, ZHANG KY, BAO WG, JIN X, SU LS, TU ZK. *Brucella* dysregulates monocytes and inhibits macrophage polarization through LC3-dependent autophagy[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 691.
- [6] EISENBERG T, HAMANN HP, KAIM U, SCHLEZ K, SEEGER H, SCHAUERTE N, MELZER F, TOMASO H, SCHOLZ HC, KOYLASS MS, WHATMORE AM, ZSCHÖCK M. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(10): 3753-3755.
- [7] TAN SYS, KRASNOW MA. Developmental origin of lung macrophage diversity[J]. *Development*, 2016, 143(8): 1318-1327.
- [8] NOURSHARGH S, ALON R. Leukocyte migration into inflamed tissues[J]. *Immunity*, 2014, 41(5): 694-707.
- [9] SHIBATA Y, BERCLAZ PY, CHRONEOS ZC, YOSHIDA M, WHITSETT JA, TRAPNELL BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1[J]. *Immunity*, 2001, 15(4): 557-567.
- [10] Den HAAN JM, KRAAL G. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen[J]. *Journal of Innate Immunity*, 2012, 4(5/6): 437-445.
- [11] AEGERTER H, LAMBRECHT BN, JAKUBZICK CV. Biology of lung macrophages in health and disease[J]. *Immunity*, 2022, 55(9): 1564-1580.
- [12] 张王芝, 舒相华, 张莹, 黄鑫, 储宗秀, 宋春莲. 伪狂犬病毒感染猪肺泡巨噬细胞和小肠上皮细胞的转录组动态分析[J]. *畜牧与兽医*, 2024, 56(8): 59-69. ZHANG WZ, SHU XH, ZHANG Y, HUANG X, CHU ZX, SONG CL. Transcriptome dynamics of pseudorabies virus-infected porcine alveolar macrophages and small intestinal epithelial cells[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 56(8): 59-69 (in Chinese).
- [13] BAIN CC, MacDONALD AS. The impact of the lung environment on macrophage development, activation and function: diversity in the face of adversity[J]. *Mucosal Immunology*, 2022, 15(2): 223-234.
- [14] ABERDEIN JD, COLE J, BEWLEY MA, MARRIOTT HM, DOCKRELL DH. Alveolar macrophages in pulmonary host defence the unrecognized role of apoptosis as a mechanism of intracellular bacterial killing[J]. *Clinical and Experimental Immunology*, 2013, 174(2): 193-202.
- [15] GUILLIAMS M, SVEDBERG FR. Does tissue imprinting restrict macrophage plasticity?[J]. *Nature Immunology*, 2021, 22(2): 118-127.
- [16] 高小臣. 流感病毒影响肺泡巨噬细胞稳态的机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2022. GAO XC. The mechanisms of alveolar macrophage homeostasis during influenza virus infection[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [17] KEISER TL, PURDY GE. Killing *Mycobacterium tuberculosis in vitro*: what model systems can teach us[J]. *Microbiology Spectrum*, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbtb2-0028-2016>.
- [18] PERKINS SD, SMITHER SJ, ATKINS HS. Towards a *Brucella* vaccine for humans[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(3): 379-394.
- [19] MYENI S, CHILD R, NG TW, KUPKO JJ 3rd, WEHRLY TD, PORCELLA SF, KNODLER LA, CELLI J. *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(8): e1003556.
- [20] 惠文巧, 班谦, 汤继顺, 侯宏艳, 陈胜. 山羊肺泡巨噬细胞分离培养及脂多糖诱导形态学观察[J]. *中国*

- 草食动物科学, 2014, 34(5): 46-48.
HUI WQ, BAN Q, TANG JS, HOU HY, CHEN S. Isolation and culture of goat alveolar macrophages and morphological observation of lipopolysaccharide induction[J]. China Herbivore Science, 2014, 34(5): 46-48 (in Chinese).
- [21] SHAY JW, WRIGHT WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2000, 1(1): 72-76.
- [22] 张震宇, 靳莉武, 王婧尊, 田玲, 乔自林, 杨迪, 阿依木古丽·阿不都热依木. 动物细胞永生研究进展[J]. 生物技术通报, 2024, 40(7): 78-89.
ZHANG ZY, JIN LW, WANG JZ, TIAN L, QIAO ZL, YANG D, AYIMUGULI·ABUDUREYIMU. Research progress of animal cell immortalization[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(7): 78-89 (in Chinese).
- [23] FODDIS R, de RIENZO A, BROCCOLI D, BOCCHETTA M, STEKALA E, RIZZO P, TOSOLINI A, GROBELNY JV, JHANWAR SC, PASS HI, TESTA JR, CARBONE M. SV40 infection induces telomerase activity in human mesothelial cells[J]. Oncogene, 2002, 21(9): 1434-1442.
- [24] HUSSELL T, BELL TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context[J]. Nature Reviews Immunology, 2014, 14(2): 81-93.
- [25] 吉小芳, 俞慧清, 岳亮亮, 徐旭俊, 陈建泉, 成国祥, 刘宗平. 山羊肺泡巨噬细胞的分离、培养与鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 75-79.
JI XF, YU HQ, YUE LL, XU XJ, CHEN JQ, CHENG GX, LIU ZP. Isolation, culture and identification of goat alveolar macrophages[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2017, 27(8): 75-79 (in Chinese).
- [26] CHENG SM, CHANG SJ, TSAI TN, WU CH, LIN WS, LIN WY, CHENG CC. Differential expression of distinct surface markers in early endothelial progenitor cells and monocyte-derived macrophages[J]. Gene Expression, 2013, 16(1): 15-24.
- [27] ERBEL C, RUPP G, HELMES CM, TYKA M, LINDEN F, DOESCH AO, KATUS HA, GLEISSNER CA. An *in vitro* model to study heterogeneity of human macrophage differentiation and polarization[J]. Journal of Visualized Experiments, 2013(76): e50332.
- [28] 王烁瓔. 溶血磷脂酸(LPA)通过 p38 α 介导骨髓源巨噬细胞 CD14 蛋白表达[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2023.
WANG LY. Lysophosphatidic acid (LPA) mediates the expression of CD14 protein in bone marrow-derived macrophages through p38 α [D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2023 (in Chinese).
- [29] JIMÉNEZ de BAGÜES MP, TERRAZA A, GROSS A, DORNAND J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(4): 2429-2433.
- [30] LECÁROZ C, BLANCO-PRIETO MJ, BURRELL MA, GAMAZO C. Intracellular killing of *Brucella melitensis* in human macrophages with microspherencapsulated gentamicin[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(3): 549-556.