

肺泡巨噬细胞原代提取

1. 麻醉

1.1 使用20%乌拉坦麻醉大鼠（1-1.5 g/kg）。麻醉后将大鼠浸泡至75%的酒精中消毒。

2. 插管

2.1 在颈部开口，暴露气管
2.2 在气管中插管

3. 灌洗

3.1 用2 mL冰冷的加入三抗的PBS缓冲液通过插管注射到肺中，按摩3分钟后收集灌洗液。重复10次，所有的灌洗液都收集到同一个离心管中。

4. 收集

4.1 将离心管中的细胞4°C, 300 g, 10 min离心，收集底部沉淀细胞

5. 洗涤

5.1 用2 mL冰冷的PBS缓冲液重悬细胞沉淀，离心弃上清（4°C, 300 g, 10 min），重复一次后使用2ml完全培养基重悬。

6. 计数

6.1 取1 uL原细胞+100 uL PBS，重悬后用台盼蓝染色，在自动细胞计数仪上进行细胞计数和活力检测

7. 富集

7.1 将细胞接种到T25细胞培养瓶中。置于37°C，5% CO₂培养箱中孵育2小时。弃上清，用预温的培养基轻柔洗涤贴壁细胞1次，彻底去除未贴壁细胞。加入5 mL的完全培养基培养。

8. 鉴定

8.1 流式细胞术检测肺泡巨噬细胞表面标志物

肺间质巨噬细胞原代提取

1.麻醉

1.1 使用20%乌拉坦麻醉大鼠，1-1.5g/kg。麻醉后将大鼠浸泡至75%的酒精中消毒。

2.插管

2.1 在颈部开口，暴露气管
2.2 在气管中插管

3.灌注

3.1 心尖灌注：在心尖插管，心耳剪小口，连接输液装置，输入PBS，大鼠大约200 mL，至肺脏呈苍白色，去除肺泡巨噬细胞和血细胞。

4.取肺

4.1 完整取出肺组织，用冰冷的PBS洗涤，后将肺组织转移到培养皿中，用锋利剪刀将其剪成非常细小的碎片。

5.消化

5.1 加入含有I型胶原酶（0.5 mg/mL）、DNA酶I（50 μ g/mL）的PBS，浓度可根据不同品牌的酶浓度微调，37 $^{\circ}$ C摇床中孵育60分钟。

6.终止

6.1 加入完全培养基终止消化反应。通过70 μ m细胞滤网过滤，得到单细胞悬液。用培养基冲洗滤网和残留组织。

7.洗涤

7.1 用2 mL冰冷的PBS缓冲液重悬细胞沉淀，离心弃上清（4 $^{\circ}$ C，300 g，10 min），重复一次后使用2ml完全培养基重悬。

8.计数

8.1 取1 uL原细胞+100 uL PBS，重悬后用台盼蓝染色，在自动细胞计数仪上进行细胞计数和活力检测

9.富集

9.1 将细胞接种到T25细胞培养瓶中。置于37 $^{\circ}$ C，5% CO₂培养箱中孵育2小时。弃上清，用预温的培养基轻柔洗涤贴壁细胞1次，彻底去除未贴壁细胞。加入5 mL的完全培养基培养。

10.鉴定

10.1 流式细胞术检测肺泡巨噬细胞表面标志物

常见问题解析

1、细胞不贴壁或者贴壁很少？

原代培养时间需控制，一般原代贴壁培养90 min-120 min较好，其实要检查血清批次活性或培养瓶表面涂层（如用多聚赖氨酸）。

2、细胞数量越来越少？

首先细胞培养时，初始细胞接种量应不少于每 5×10^4 个/cm²。其次巨噬细胞属于不增值细胞，培养时间过长数量会逐渐减少，鉴定后应尽快开展试验。

3、污染预防应该怎么做？

操作过程严格遵循无菌操作，所有的试剂耗材都应保证无菌，原代时添加抗生素，待细胞稳定后去除，但避免长期使用。

4、形态异常是什么原因，怎么办？

激活状态可能致细胞形态改变。模型鼠可能是受炎症刺激，正常鼠可能是采取细胞时有机械刺激，因此操作时要动作轻柔避免机械刺激。

参考文献

- [1]Ge Z, Chen Y, Ma L, et al. Macrophage polarization and its impact on idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Immunol* [J]. 2024, 15: 1444964.
- [2]Bajpai G, Schneider C, Wong N, et al. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions [J]. *Nat Med*. 2018, 24(8): 1234-45.
- [3]Gschwend J, Sherman SPM, Ridder F, et al. Alveolar macrophages rely on GM-CSF from alveolar epithelial type 2 cells before and after birth [J]. *J Exp Med*. 2021, 218(10).