

## 骨髓间充质干细胞抗肺泡上皮细胞凋亡作用研究

邵文琳<sup>1)</sup>, 董昭兴<sup>2)</sup>, 徐益恒<sup>1)</sup>, 李劲榆<sup>1)</sup>, 瞿晓媛<sup>1)</sup>, 陆信<sup>3)</sup>

(1) 昆明医科大学第二附属医院检验科, 云南省分子诊断研究中心; 2) 呼吸科; 3) 院务部, 云南昆明 650101)

**[摘要]** **目的** 研究骨髓间充质干细胞对 LPS 诱导的肺泡上皮细胞凋亡的影响及作用。 **方法** 用人肺泡上皮细胞株 (A549 细胞株) 与人骨髓间充质干细胞株 (第 3 代 hBMMSC 株) 建立 Transwell 非接触分层共培养体系, 分 4 组: (1) 空白对照组; PBS+A549; (2) LPS 诱导组; LPS+A549; (3) BMMSC 对照组: BS + A549 + BMMSC; (4) BMMSC 干预组: LPS+A549+BMMSC. 采用 Annexin V/PI 双染色流式细胞仪检测 A549 细胞凋亡率; Western blotting 检测 caspase 3、bcl-2 和 bax 蛋白表达。 **结果** 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS 可体外诱导 A549 细胞凋亡; BMMSC 干预组 A549 细胞凋亡率、caspase-3 与 bax 蛋白表达水平明显低于 LPS 诱导组、空白对照组和 BMMSC 对照组 ( $P < 0.01$ ); bcl-2 蛋白表达水平显著高于 LPS 诱导组、空白对照组和 BMMSC 对照组 ( $P < 0.01$ )。 **结论** 与 LPS 诱导的 A549 细胞共培养, BMMSC 能促进 A549 细胞表达抗凋亡蛋白 bcl-2 和抑制促凋亡蛋白 caspase-3 和 bax 的表达, 具有抗细胞凋亡作用。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞; 肺泡上皮细胞; 凋亡

**[中图分类号]** R563.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 12-0029-05

## Anti-apoptosis Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Alveolar Epithelial Cells

TAI Wen-lin<sup>1)</sup>, DONG Zhao-xing<sup>2)</sup>, XU Yi-heng<sup>1)</sup>, LI Jin-yu<sup>1)</sup>, QU Xiao-yuan<sup>1)</sup>, LU Xin<sup>3)</sup>

(1) Dept. of Clinical Laboratory; 2) Dept. of Respiratory Medicine; 3) Dept. of Administration, Yunnan Molecule Diagnostic Centre, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan, 650101)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of bone marrow mesenchymal stem cells on LPS-induced apoptosis of alveolar epithelial cells. **Methods** Human alveolar type II epithelial cell (A549) and human bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSC) were cocultured on cell-cell noncontact transwell system in vitro. there are 4 cell experiments groups: (1) negative control group, PBS+A549; (2) LPS-induced group, LPS+A549; (3) BMMSC control group, PBS+A549+BMMSC; (4) BMMSC interference group, LPS+A549+BMMSC. The apoptotic percentage of A549 was quantified by flow cytometry staining with annexin V/PI. Caspase 3, Bcl-2 and Bax protein expression in A549 was assayed by Western blotting. **Results** 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS can induce A549 apoptosis in vitro appropriately. A549 in BMMSC interference group had a significantly increased bcl-2 expression, a decreased level of caspase 3 and bax, compared with the other groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Cocultured with A549, BMMSC can increase expression of anti-apoptosis protein bcl-2 in A549, decrease the level of pro-apoptosis protein caspase 3 and bax expression. BMMSC can inhibit apoptosis of alveolar type II epithelial cell

**[Key words]** Bone marrow mesenchymel stem cell; Alveolar epithelial eall; Apoptosis

**[基金项目]** 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2011FB194)

**[作者简介]** 邵文琳 (1970~), 女, 湖北宜昌市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事肺损伤机制研究工作。

**[通讯作者]** 陆信. E-mail: Lllxx@163.com

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 起病急剧, 发展迅速, 预后恶劣, 目前缺乏有效的治疗措施. 因此, 急需寻找新的治疗方法.

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC) 是一种具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞. 新近研究表明, 干细胞 (stem cells) 能定植在损伤的肺组织, 参与受损肺组织的修复和重构. 然而, 干细胞治疗肺损伤疾病的作用机制尚不清楚.

肺泡上皮细胞的丧失和过度凋亡是 ALI 发展过程中的重要事件, 决定 ALI 发生、发展和预后. 因此, 抑制肺泡上皮细胞凋亡被认为是目前治疗 ALI 的重要作用靶点. 笔者采用 LPS 诱导肺泡上皮细胞 (A549) 细胞凋亡, 通过 A549 细胞与 BMSC 共培养, 研究 BMSC 对肺泡上皮细胞凋亡的作用机制, 为临床应用 BMSC 治疗急性肺损伤提供新的实验和理论依据.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1 细胞株** 人肺泡上皮细胞株 (A549 细胞株) 由中国科学院昆明动物研究所; 人骨髓间充质干细胞株 (第 3 代 hBMSC 株) 由广州赛业生物有限公司.

### 1.2 主要试剂

优质胎牛血清 (FBS)、0.25% 的胰蛋白酶-EDTA 消化液、青链霉素混合液 (Solarbio 公司), DMEM 培养基 (Thermo Fisher 公司), LPS (E.coli serotype055:B5) (Sigma 公司), Annexin V/PI 凋亡试剂盒 (Beckman 公司), caspase 3、bcl-2、bax 抗体 (英国 Abcam 公司), TBST 缓冲液、封闭液、化学发光试剂、PVDF 膜 0.22  $\mu\text{m}$ 、蛋白分子量标准 (北京天根生化公司)

### 1.3 主要仪器设备

CO<sub>2</sub> 培养箱 (德国 Hereaus 公司), OLYMPUS

倒置相差显微镜 (奥林巴斯公司), 流式细胞仪 (FC500 美国贝克曼库尔特公司), Transwell (美国 Corning 公司), 全自动凝胶图像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)

### 1.4 方 法

**1.4.1 A549 细胞株的复苏、传代培养及鉴定** A549 细胞复苏后 80% 融合时加入 0.25% 胰蛋白酶 1 mL 消化 5 min, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液终止. 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清液加入 5 mL 培养液, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养. 取对数生长期 A549 细胞倒置显微镜下鉴定.

**1.4.2 hBMSC 的复苏、传代培养与鉴定** 取复苏培养后对数生长期 hBMSC 倒置显微镜鉴定. 消化 5 min 后 1 000 r/min 离心 5 min 弃上清液, 用 PBS 调整细胞浓度  $1 \times 10^6/\text{mL}$ . 加入 FITC 标记的兔抗人 CD45、CD34、CD90、CD105 各 10  $\mu\text{L}$ , 流式细胞仪检测鉴定.

**1.4.3 LPS 致 A549 细胞凋亡模型** 取 A549 细胞  $5 \times 10^6/\text{mL}$  接种于 24 孔板, DMEM 培养液中加入 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS, 培养 24 h, 流式细胞仪分析凋亡率.

**1.4.4 BMSC 与 A549 细胞 Transwell 非接触分层共培养体系** A549 细胞预处理: 取 A549 细胞悬液 500  $\mu\text{L}$  接种于 Transwell 小室. (1) PBS 预处理 A549 细胞: 培养液中加入 10  $\mu\text{L}$  PBS, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h. (2) LPS 预处理 A549 细胞培养液中加入 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPS, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h. (3) BMSC 预培养: 取 hBMSC 悬液 500  $\mu\text{L}$ , 细胞密度  $5 \times 10^6/\text{L}$  接种于 6 孔培养板孔, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h.

**1.4.5 实验分组** (1) 空白对照组: PBS + A549; (2) LPS 损伤组: LPS + A549; (3) BMSC 对照组: PBS + A549 + BMSC; (4) BMSC 干预组: LPS + A549 + BMSC, 见图 1.

**1.4.6 AnnexinV/PI 双染色流式细胞仪检测早期细胞凋亡** 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬 A549 细胞, 加入 2  $\mu\text{L}$

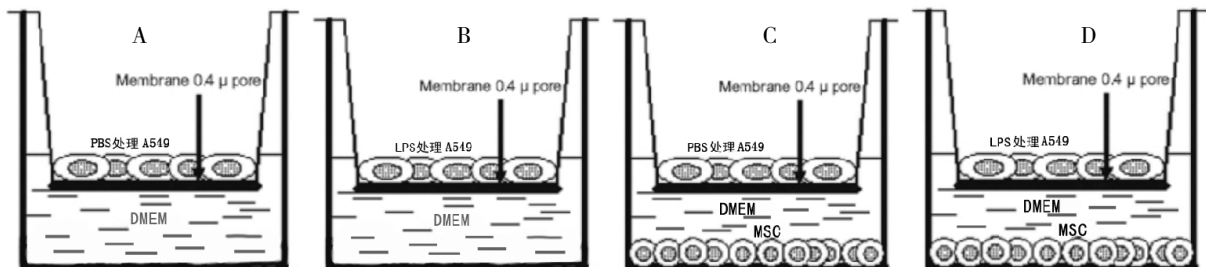


图 1 Transwell 非接触分层共培养体系

Fig. 1 Cell-cell noncontact transwell system

A:空白对照组; B:LPS 损伤组; C:BMSC 对照组; D:BMSC 干预组.

AnnexinV-FITC 和 5  $\mu$ L PI, 轻轻混匀, 避光反应 15 min. 用流式细胞仪检测分析细胞凋亡情况.

**1.4.7 Western blotting 检测 caspase 3、bcl-2 和 bax 蛋白表达** 取名组 A549 细胞裂液经 SDS-PAGE 凝胶电泳后转膜, 加入特异性抗体, 化学发光显影.

### 1.5 统计学方法

数据采用 SPSS 统计软件进行分析, 计量数据资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析方法, 两两比较采用 LSD 检验.  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 传代培养 A549 细胞形态

A549 细胞大小不一, 形态多样, 主要以梭形、多角形为主, 呈鹅卵石样外观, 符合肺泡上皮细胞的形态特点 (图 2).

### 2.2 体外培养显微镜下人骨髓间充质干细胞形态

hBMMSC 培养 12 h 即开始贴壁生长, 大多数细胞为长梭形, 核呈椭圆形, 呈现出典型的成纤维细胞样外观 (图 3A); 培养 24 h 可见细胞形成多个细胞克隆样生长 (图 3B); 48 h 后细胞开始大量生长, 进入对数生长期 (图 3C). 符合 BMMSC

的形态学和生长特征.

### 2.3 hBMMSC 表面标志物表达

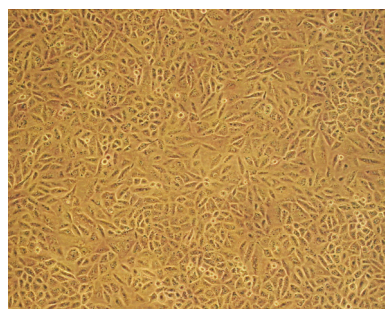
流式细胞检测结果显示: 第 3 代 hBMMSC 表面标志物 CD90+、CD105+ 阳性而 CD34-、CD45- 阴性 (图 4).

### 2.4 A549 细胞凋亡率

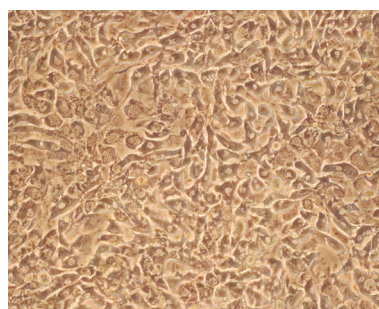
空白对照组 A549 细胞凋亡率为 ( $3.3 \pm 0.4$ ) %; LPS 损伤组显著高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ); BMMSC 干预组明显低于损伤组 ( $P < 0.01$ ), 但高于空白对照组和 BMMSC 对照组 (图 5、图 6).

### 2.5 Western blot 分析 A549 细胞 caspase-3、bax、bcl-2 蛋白表达

LPS 损伤组 A549 细胞促凋亡蛋白 caspase-3、bax 蛋白表达水平高于空白对照组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), BMMSC 干预组 A549 细胞 caspase-3、bax 蛋白表达水平显著低于 LPS 损伤组 ( $P < 0.01$ ), 但仍高于空白对照组和 BMMSC 对照组; LPS 损伤组 A549 细胞 bcl-2 蛋白表达水平低于空白对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), BMMSC 干预组 A549 细胞 bcl-2 蛋白表达水平显著高于 LPS 损伤组、空白对照组和 BMMSC 对照组 (图 7).



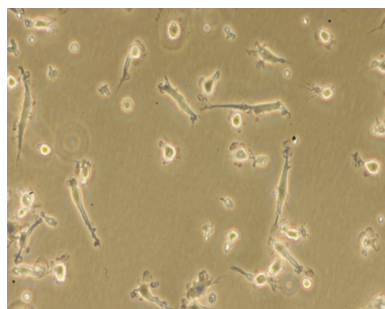
$\times 100$



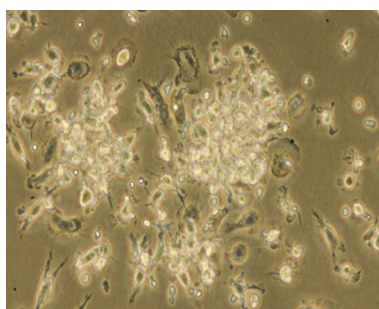
$\times 400$

图 2 倒置显微镜下 A549 细胞形态

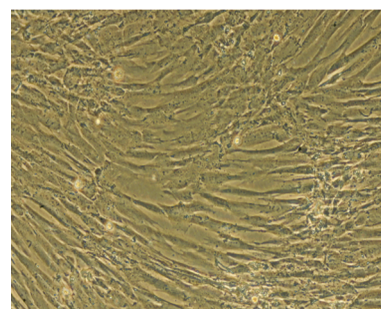
Fig. 2 The morphology of A549 cells under inverted microscope



A (12 h)  $\times 200$



B (24 h)  $\times 100$



C (48 h)  $\times 200$

图 3 不同时间体外培养显微镜下 hBMMSC 形态

Fig. 3 Representative micrographs of hBMMSC cultured at different time point

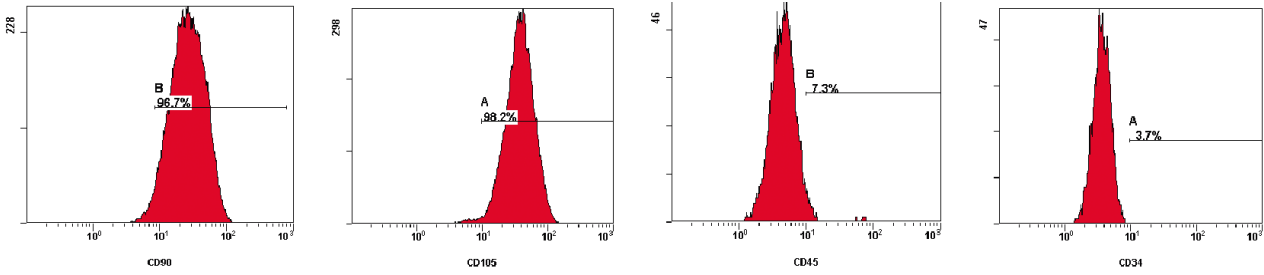


图 4 第 3 代 hBMMSC 表面标志物

Fig. 4 Surface marker expression of P3 hBMMSC

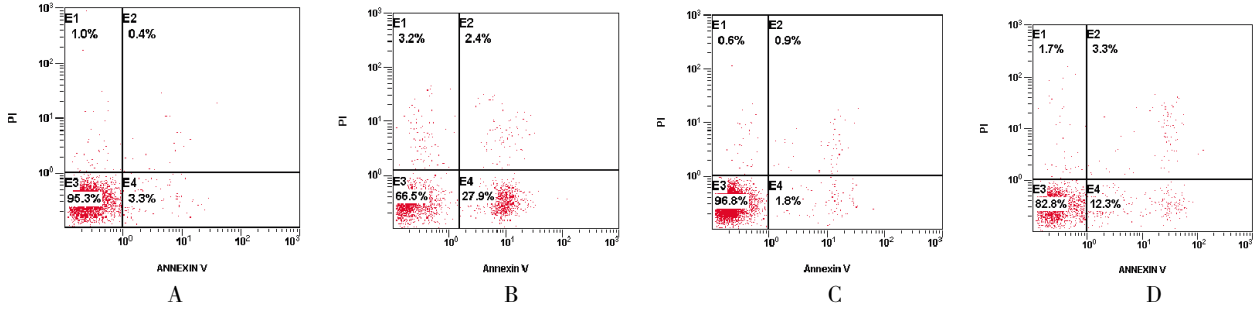


图 5 Annexin V/PI 流式细胞检测 A549 细胞凋亡率

Fig. 5 The percentage of apoptotic A549 cells by Annexin V/PI flow cytometry analysis

A:空白对照组; B:LPS 损伤组; C:BMMSC 对照组; D:BMMSC 干预组.

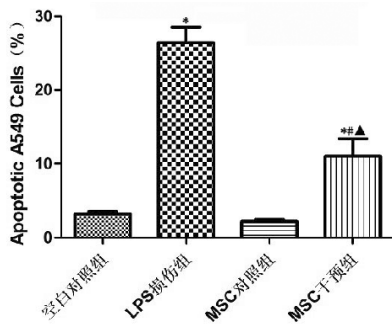


图 6 Annexin V/PI 流式细胞检测 A549 细胞凋亡率

Fig. 6 The percentage of apoptotic A549 cells by Annexin V/PI flow cytometry analysis

与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 LPS 损伤组比较, # $P < 0.01$ ; 与 MSC 对照组比较, ^ $P < 0.01$ .

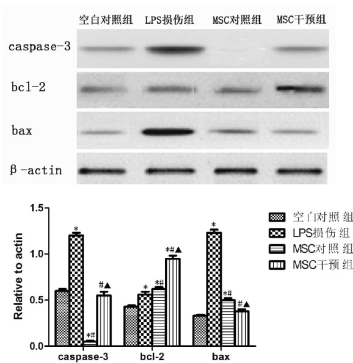


图 7 Western blotting 分析 A549 细胞 caspase-3、bax、bcl-2 蛋白表达

Fig. 7 The expression of caspase-3, bax and bcl-2 proteins in A549 cells by Western blotting

与空白对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 LPS 损伤组比较, # $P < 0.01$ ; 与 MSC 对照组比较, ^ $P < 0.01$ .

### 3 讨论

肺泡上皮细胞丧失和过度凋亡是 ALI 发展过程中的重要事件, 被认为是 ALI 除过度炎症反应外的另一重要病理机制. 研究证明, 在早期和中后期 ALI 患者以及气管内滴注 LPS 的动物模型中均发现有肺泡上皮细胞凋亡的组织学改变<sup>[1-4]</sup>. 但是, ALI 发生肺泡上皮细胞凋亡的机制尚未完全阐明.

目前研究发现, BMMSC 在特定的微环境下能分泌多种细胞生长因子, 包括 VEGF、HGF、IGF-1 和 KGF 等<sup>[5-7]</sup>, 这些细胞外旁分泌因子可以通过组织间隙作用于周围细胞, 通过调节细胞内信号转导通路而延缓细胞凋亡, 促进细胞增殖, 这可能是其减轻组织损伤和发挥修复作用的重要机制. Barazzone 等<sup>[8]</sup>和 Ware 等<sup>[9]</sup>研究发现: KGF 和 HGF 可激活 P13K 依赖的 Akt 激酶, 对 Fas 诱发的肺泡上皮细胞凋亡有抑制作用, 其作用呈剂量和时间依赖性. 因此, 笔者认为 BMMSC 可能在 ALI 炎症环境中, 通过与损伤的肺泡上皮细胞、血管内皮细胞以及炎症细胞相互作用, 释放旁分泌因子, 发挥其抗肺泡上皮细胞凋亡作用, 促进肺泡上皮细胞修复, 减轻炎症反应, 进而改善肺水肿, 减轻肺损伤.

为了探讨 BMMSC 对肺泡上皮细胞凋亡的作用, 笔者建立了 BMMSC 与 A549 细胞 Transwell 非接触分层共培养体系. Transwell 共培养体系是由 Transwell 小室嵌入外面的培养室中组成, 内外培养

室可分别培养不同的细胞, 培养的不同细胞不能直接接触, 处于一种非接触培养环境中. 在 Transwell 小室底部是一张有通透性的带有微孔 (孔径  $0.4 \mu\text{m}$ ) 的聚碳酸酯膜, 培养液及溶于其中的生物分子可以自由透过, 使培养的不同细胞可以共同利用及交换一些培养液中营养物质及相互作用因子, 从而可以研究培养液中的成分对细胞生长的影响. Transwell 共培养体系的优点是可以充分地模拟体内环境, 易于分离获取待研究细胞, 实验结果分析简便易行.

本研究结果表明: 当 hBMMSC 与 LPS 预处理的 A549 细胞共培养时, BMMSC 能促进 A549 细胞抗凋亡蛋白 bcl-2 表达, 抑制促凋亡蛋白 caspase-3 和 bax 蛋白表达. 提示 BMMSC 在与 LPS 预处理的 A549 细胞相互作用的微环境中能通过调节 A549 细胞内凋亡信号通路蛋白的含量, 即减少凋亡蛋白 caspase-3、bax 的表达, 增加抗凋亡蛋白 bcl-2 表达, 使 bcl-2/bax 异源二聚体增加, 减少 A549 细胞凋亡减少, 对 A549 细胞具有保护作用.

综上所述, 笔者认为 BMMSC 早期减轻急性肺损伤作用可能存在着多种机制, BMMSC 通过旁分泌机制调控肺泡上皮细胞凋亡是其中重要的机制之一. BMMSC 通过抑制肺泡上皮细胞凋亡, 促进肺泡上皮细胞增生, 减少肺泡上皮细胞的损伤, 恢复上皮细胞功能, 修复肺泡上皮细胞屏障, 改善肺水肿, 减轻肺损伤.

#### [参考文献]

- [1] BACHOFEN M, WEIBEL E R. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome [J]. *Clin Chest Med*, 1982, 3(1):35 - 56.
- [2] BARDALES R H, XIE S S, SCHAEFER R F, et al. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury [J]. *Am J Pathol*, 1996, 149(3):845 - 852.
- [3] VERNOOY J H, DENTENER M A, VAN SUYLEN R J, et al. Intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice induces apoptosis in bronchial epithelial cells: no role for tumor necrosis factor- $\alpha$  and infiltrating neutrophils [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(5):569 - 576.
- [4] KITAMURA Y, HASHIMOTO S, MIZUTA N, et al. FasFasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(3 Pt 1): 762 - 769.
- [5] LEE J W, FANG X, GUPTA N, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E.coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(38):16 357 - 16 362.
- [6] WANG M, ZHANG W, CRISOSTOMO P, et al. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6):1 009 - 1 015.
- [7] XU J, WOODS C R, MORA L, et al. Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(1):131 - 141.
- [8] BARAZZONE C, DONATI YR, ROCHAT A F, et al. Keratinocyte growth factor protects alveolar epithelium and endothelium from oxygen induced injury in mice [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(5):1 479 - 1 487.
- [9] WARE L B, MATTHAY M A. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(5):L924 - 940.

(2014 - 10 - 07 收稿)