

肺泡上皮细胞促进肺动脉平滑肌细胞增殖

魏冠平¹ 张森¹ 黄煜² 何庆^{1,2}

(1. 西南交通大学医学院, 四川 成都 610036; 2. 西南交通大学附属医院 成都市第三人民医院, 四川 成都 610036)

【摘要】目的 观察低氧条件下肺泡上皮细胞对肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)的作用。**方法** 首先,低氧条件下培养肺泡上皮细胞 48 h,采用 WB 法检测细胞中 CX3CL1 蛋白的表达,ELISA 法检测细胞上清液中 CX3CL1 的浓度;其次,采用 Transwell 小室共培养肺泡上皮细胞和 PASMCs 48 h,采用 MTT 法检测 PASMCs 增殖;最后利用 siRNA 沉默 PASMCs 的 CX3CR1,采用 MTT 法检测 PASMCs 增殖。**结果** 与对照组比较,肺泡上皮细胞在低氧处理 48 h 后,CX3CL1 蛋白表达、细胞上清液中 CX3CL1 浓度明显增加($P<0.05$);与对照组相比,PASMCs 与肺泡上皮细胞共培养 48 h 后,PASMCs 增殖明显增加($P<0.05$);siRNA 沉默后的 PASMCs 与大鼠肺泡上皮细胞共培养 48 h 后,PASMCs 增殖无明显增加($P>0.05$)。**结论** 低氧条件下肺泡上皮细胞通过 CX3CL1 促进 PASMCs 增殖。

【关键词】 低氧;CX3CL1;肺泡上皮细胞;肺动脉平滑肌细胞

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.10.025

Hypoxia-induced Alveolar Epithelial Cells Triggers Lung Smooth Proliferative Expansion

WEI Guanping¹, ZHANG Miao¹, HUANG Yu², HE Qing^{1,2}

(1. Southwest Jiaotong University College of Medicine, Chengdu 610036, Sichuan, China; 2. The Affiliated Hospital of Southwest Jiaotong University, The Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610036, Sichuan, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of pulmonary alveolar epithelial cells (AECs) on pulmonary artery smooth cells (PASMCs) under hypoxic conditions. **Methods** First, under hypoxic conditions, rat AECs were cultured for 48 h, and the expression of CX3CL1 protein in the cells was detected by WB, while the concentration of CX3CL1 in the cell supernatant was detected by ELISA. Second, Transwell compartment co-cultured rat AECs and PASMCs for 48 h. MTT assay was used to detect the proliferation of PASMCs. Finally, siRNA was used to silence CX3CR1 PASMCs, and MTT method was used to detect the proliferation of PASMCs. **Results** Compared with the control group, the expression of CX3CL1 protein and the concentration of CX3CL1 in cell supernatant increased significantly after hypoxic treatment for 48 h in rat AECs ($P<0.05$). Compared with the control group, the proliferation of PASMCs increased significantly after 48 h co-culture of AECs and PASMCs ($P<0.05$). After 48 h of co-culture of PASMCs and rat AECs after siRNA silencing, there was no significant increase in the proliferation of PASMCs ($P>0.05$). **Conclusion** Hypoxia-induced AECs CX3CL1 triggers lung smooth proliferative expansion.

【Key words】 Hypoxia; CX3CL1; Pulmonary alveolar epithelial cells; Pulmonary artery smooth muscle cells

低氧性肺动脉高压的病理机制主要包括肺实质变化、低氧性肺血管收缩和肺血管重构^[1]。趋化因子 CX3CL1 及 CCL2 等参与低氧性肺动脉高压的发生^[2]。CX3CL1 又称 Fractalkine, 是趋化因子 CX3C 家族中唯一的成员^[3,4], 主要在肺、肾和肠等组织的上皮细胞表达, 在炎症条件下, 也在内皮细胞和平滑肌细胞中表达。CX3CR1 是 CX3CL1 的特异性受体, 它是 G 蛋白偶联受体家族中的成员^[5]。低氧可刺激肺动脉内皮

细胞呈现时间依赖性分泌 CX3CL1^[6-7], 并与肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs) 膜上的 CX3CR1 受体结合, 参与调控 PASMCs 增殖以及表型转换^[7]。肺泡作为气体交换的首要场所, 肺泡上皮细胞 (alveolar epithelial cells, AECs) 是呼吸膜的组成部分, 是最早感知肺泡内氧分压变化的细胞。在肺泡缺氧时, AECs 氧化应激, 细胞内活性氧产生增加, 作用于肺血管, 引起肺血管重

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81501640)

通信作者: 何庆, E-mail: 123hq@163.com

构^[8]。本研究拟用 MTT、Western 印迹法和 ELISA 等方法,探讨 AECs 能否通过趋化因子 CX3CL1 作用于 PASMCs,进而为研究低氧性肺动脉高压的发病机制提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 材料

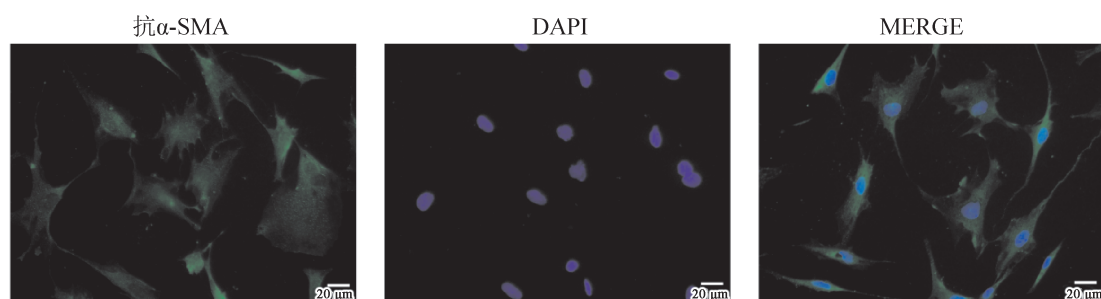
250 g SD 大鼠 2 只(购买于湖北省疾控中心)、大鼠 II 型 AECs 完全培养基、大鼠 PASMCs 完全培养基购买于普诺赛。大鼠 CX3CL1 ELISA 试剂盒购买于 Elabscience 厂家。 α -SMA 抗体购买于武汉博士德生物工程有限公司,货号为 55135-1-AP。兔多抗

CX3CL1 购买于 Abcam 厂家,货号为 ab25088。siRNA-NC/CX3CR1 siRNA 由武汉巴菲尔生物技术服务有限公司设计合成。

1.2 方法

1.2.1 原代大鼠肺动脉平滑肌细胞分离培养与鉴定

无菌条件下,用 10% 水合氯醛 1 mL 麻醉 SD 大鼠,分离大鼠肺动脉干和二、三级肺动脉。除去外膜,刮掉内膜。将分离的动脉条带切成 1 mm³ 大小的组织块并置于培养瓶中,加入完全培养基后放入培养箱。采用平滑肌特异性抗体抗 α -SMA 进行免疫荧光鉴定,胞浆呈现绿色荧光(图 1)。



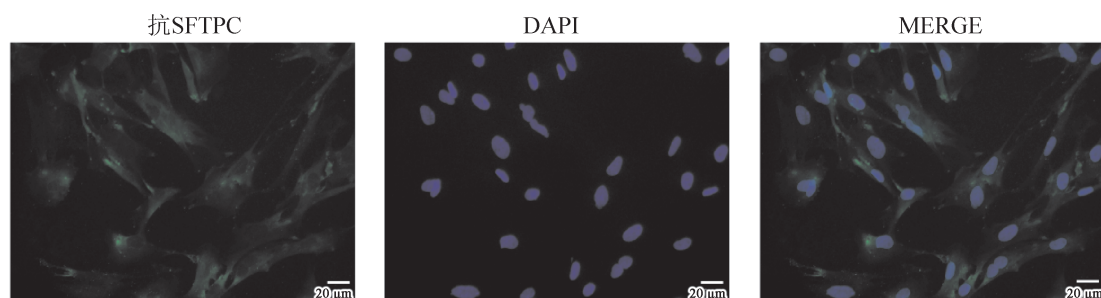
注:左侧图绿色荧光表示 α -SMA 阳性;中间图 DAPI 为核荧光染色;右侧图为前两幅图的融合图像;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吲哚;MERGE:融合。

图 1 免疫荧光大鼠肺动脉平滑肌细胞($\times 400$)

1.2.2 原代大鼠 AECs 分离培养与鉴定

无菌条件下,用 10% 水合氯醛 1 mL 麻醉 SD 大鼠,切开主支气管,用注射器吸 50 mL 磷酸盐平衡生理盐水灌注肺,直至肺变白,分离肺组织,并将肺组织切成 1 mm³ 片段后放入含血清培养基中。震荡离心过滤后,

将肺组织接种于 IgG 包被一次性无菌培养基中,孵育 2 h。离心后取上清液,收集细胞接种于 6 孔培养板上,放入培养箱。采用 AECs 特异性抗体抗(表面活性物质相关蛋白 C)SFTPC 进行免疫荧光染色,胞浆呈现绿色荧光(图 2)。



注:左侧图绿色荧光表示 SFTPC 阳性;中间图 DAPI 为核荧光染色;右侧图为前两幅图的融合图像;DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吲哚;MERGE:融合。

图 2 免疫荧光大鼠 AECs($\times 400$)

1.2.3 Western 印迹法检测细胞 CX3CR1 含量

首先提取总蛋白,检测总蛋白浓度。经水浴变性后,取 20 μ g 变性蛋白涂于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶孔上进行电泳。蛋白凝胶经湿法转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,在含 5% 脱脂奶粉的密封液中 4℃ 孵育过夜。用磷酸盐平衡生理盐水冲洗 3 次后,加入一抗,4℃ 孵育过夜。用磷酸盐吐温缓冲液清洗膜 3 次

后,加入二抗,37℃ 孵育 1 h,经化学发光显影,计算靶蛋白的相对表达量。

1.2.4 ELISA 法检测 AECs 培养上清液中 CX3CL1 浓度

收集各组细胞上清液,离心后去除沉淀,按照 CX3CL1 ELISA 试剂盒说明书操作步骤进行测定。

1.2.5 MTT 实验

选用 3~5 代的 PASMCs,经酶消化后离心进行细

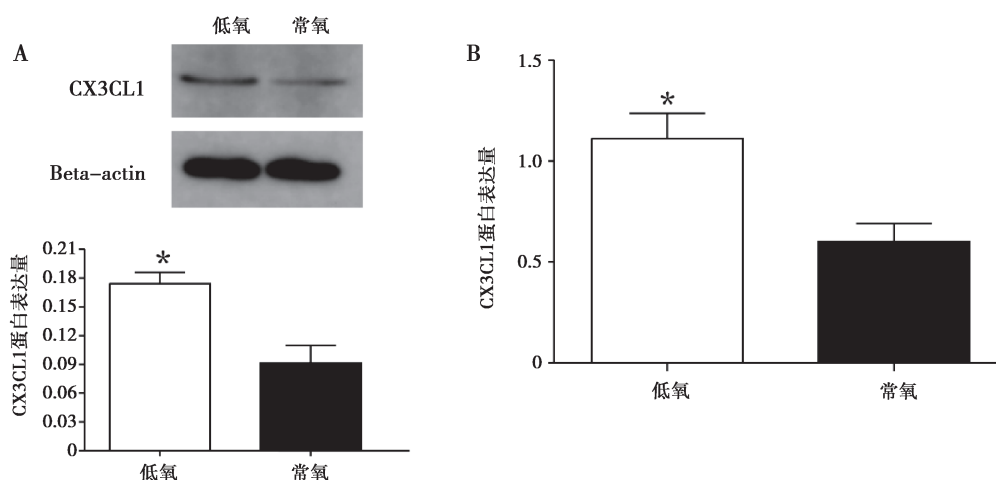
胞计数,以适当密度接种到 96 孔板,按分组置于不同氧浓度培养箱内培养 48 h 后,加 MTT 溶液,继续培养 4 h。选择 490 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光吸收值,记录检测结果。

1.2.6 细胞转染

待细胞长至 80% 融合度,以适当密度接种至 6 孔细胞板中,按照 Lipofectamine™2000 转染试剂说明书,将 miR-NC、miR-CX3CL1 转染至细胞,并设置空白细胞作为对照。

1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 6 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,在比较两组之间的差异时,采用 t 检验,多组变量比较则采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。



注:A图:各组 AECs 培养 48 h,采用 WB 法检测 CX3CL1 表达量;B图:收集各组培养液上清液,采用 ELISA 法检测 CX3CL1 含量

图3 低氧促进 AECs 表达和分泌 CX3CL1

2.4 大鼠 AECs 对 PSMCs 增殖有影响

为了探讨 AECs 是否能够促进 PSMCs 的低氧性增殖,本实验采用 Transwell 小室共培养两种细胞(AECs 置于上室,PSMCs 置于下室),分别于常氧与低氧环境下共培养 48 h,之后采用 MTT 法检测 PSMCs 的活性。与对照组相比,大鼠 AECs 和 PSMCs 共培养 48 h 后,PSMCs 增殖明显增加(如图 4)。

2.5 沉默 PSMCs 的 CX3CL1 后,大鼠 AECs 对 PSMCs 增殖无影响

采用 CX3CR1 siRNA 沉默 PSMCs 上的 CX3CR1,实验分为三组:空白组(PSMCs 与 AECs 共培养)、实验组(PSMCs 转染 CX3CR1 siRNA+AECs 共培养)、对照组(PSMCs 转染 CX3CR1 Si-NC+AECs 共培养),分别于低氧环境下培养 48 h 并采用 MTT 检测细胞活性。实验结果表明低氧条件下转染 CX3CR1 siRNA 干预后的 PSMCs 与 AECs 共培养 48 h 后,细胞增殖活

2 结果

2.1 PSMCs 体外培养与鉴定

利用免疫荧光染色,观察原代培养的平滑肌细胞 α -SMA 的表达情况,如图 1 所示,原代培养的细胞 α -SMA 表达阳性,证明是平滑肌细胞。

2.2 AECs 体外培养与鉴定

利用免疫荧光染色,观察原代培养的平滑肌细胞 SFTPC 的表达情况,如图 2 所示,原代培养的细胞 SFTPC 表达阳性,证明是 AECs。

2.3 低氧对大鼠 AECs 表达 CX3CL1 有影响

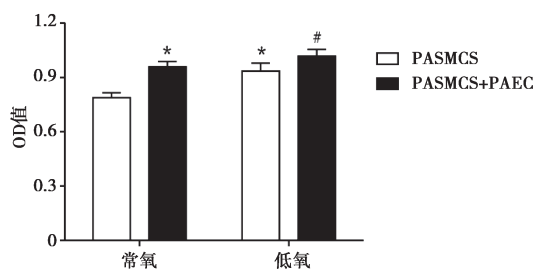
本实验选取 2~3 代 AECs,分别于常氧与低氧环境下培养 48 h,采用 WB 检测 AECs CX3CL1 表达量,采用 ELISA 法检测培养上清液 CX3CL1 含量。与常氧组比较,大鼠 AECs 经低氧处理 48 h 后,CX3CL1 蛋白表达、细胞上清液中 CX3CL1 浓度明显增加(图 3)。

性明显下降(图 5),与空白组及对照组相比,差异均有显著性差异($P < 0.05$);空白组与对照组之间无显著性统计学差异($P > 0.05$)。

3 讨论

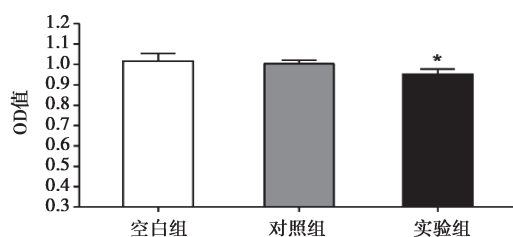
肺动脉高压指任何原因引起的平均肺动脉压升高 ≥ 25 mm Hg(1 mm Hg = 0.133 3 kPa),最近被更改为平均肺动脉压升高 ≥ 20 mm Hg^[9]。世界卫生组织根据潜在的病因、病理和血流动力学特征,将肺动脉高压分为五类。其中第Ⅲ组(由肺部疾病和/或缺氧引起的肺动脉高压)是仅次于心脏病之后引起肺动脉高压的第二大常见原因^[10]。该组疾病包括慢性阻塞性肺疾病、间质性肺病和睡眠呼吸暂停综合征等疾病^[11],其病理机制主要包括肺实质变化、低氧性肺血管收缩和肺血管重构。肺动脉高压是一组致死率和致残率相对较高的疾病,举例来说平均肺动脉压 > 40 mm Hg 的慢性阻塞性肺疾病患者,3 年生存率 $\leq 33\%$ ^[10,12-13]。因

此,迫切需要新的方法来治疗这些患者,以改善预后。低氧性肺动脉高压的病理机制主要包括肺实质变化、低氧性肺血管收缩和肺血管重构^[1]。在细胞水平上,小血管重构主要表现为 PASMCs 增殖、迁移增加和凋亡减少^[14]。



注: * 表示与常氧 PASMCs 组相比较, $P < 0.05$;
表示与低氧 PASMCs 组相比较, $P < 0.05$ 。

图 4 AECs 促进 PASMCs 增殖



注: * 表示与空白组 (PASMCs+AECs 组) 相比, $P < 0.05$ 。

图 5 CX3CR1 的 siRNA 逆转 AECs 对 PASMCs 细胞的低氧增殖性作用

AECs 是呼吸膜的重要组成部分,主要参与肺泡气体交换,能够最早感知肺泡内氧分压变化。AECs 具有高度可塑性和自我再生能力,主要负责修复受损组织, AECs 的消耗可能导致各种肺部疾病^[15]。例如, AECs 的损伤在特发性肺纤维化的发病机制中起关键作用;移植 AECs 可恢复上皮再生能力,从而减弱甚至逆转特发性肺纤维化的进展^[16]。近年来多个研究发现, AECs 通过多种途径参与低氧性肺动脉高压的形成。王艳霞^[8]研究发现在肺泡缺氧时, AECs 内活性氧产生增加,引起肺血管的收缩和重构。此外, Oczypok 等^[17]推测 AECs 通过调节 NO 合成与释放参与低氧性肺动脉高压的形成,其主要观点如下: (1) AECs 表达一氧化氮合酶; (2) 当氧分压降低时, NO 合成和释放量减少,肺血管收缩。由此,推测 AECs 还可以通过其他途径促进 PASMCs 增殖。

根据 N 末端两个保守的 Cys 排列方式,趋化因子可以分为 4 个亚家族, C 家族、CC 家族、CXC 家族和 CX3C 家族。趋化因子 CX3CL1 是 CX3C 家族中唯一的成员^[3,4],与其他趋化因子不同, CX3CL1 具有膜结合型和可溶型两种。膜结合型 CX3CL1 主要在肺、肾和肠等组织的上皮细胞表达,在炎症条件下, CX3CL1

也在内皮细胞和平滑肌细胞中表达。由此推测 AECs 同样也表达 CX3CL1,但是缺乏相应的证据,因此本实验首先在低氧条件下培养 AECs,采用 WB 及 ELISA 检测 CX3CL1 表达与否。实验结果证实 AECs 可以表达与分泌 CX3CL1。

CX3CR1 为 K^+ 敏感的 7 层跨膜蛋白,主要在 T 细胞、肥大细胞和自然杀伤细胞等表达^[18-19]。CX3CR1 为 CX3CL1 的特异性受体,两者结合形成 CX3CL1-CX3CR1 轴^[4]。通过促进单核细胞、淋巴细胞、自然杀伤细胞和肥大细胞迁徙,参与白细胞的活化和游走,参与多种病理生理过程。以往研究表明 CX3CL1 促进动脉粥样硬化和冠状动脉疾病的发展^[20-21],参与冠心病进展,是动脉粥样硬化的危险因素^[22]。因此实验后期采用 CX3CR1 siRNA 沉默 PASMCs 上的 CX3CR1,以阻断 CX3CL1 的作用,用以判断 AECs 是否可以通过 CX3CL1-CX3CR1 轴对 PASMCs 增殖产生影响。

此外,肺动脉高压患者血浆 CX3CL1 浓度和肺组织中 CX3CL1 mRNA 及蛋白的表达较对照组明显增加^[7,23],提示 CX3CL1 与肺动脉高压有关。慢性低氧可以导致 PASMCs 表达 CX3CL1 增加^[6,7],提示 CX3CL1 含量与氧浓度有关。低氧可刺激内皮细胞呈现时间依赖性分泌 CX3CL1,并与平滑肌细胞膜上的受体结合,参与调控平滑肌细胞增殖以及表型转换,进而参与调节肺动脉血管重构^[7],表明内皮细胞可以通过分泌 CX3CL1 促进 PASMCs 增殖与表型转换。同理,推测 AECs 是否可以通过分泌 CX3CL1 促进 PASMCs 增殖。

为了探讨 AECs 促进 PASMCs 的低氧性增殖的可能机制,笔者查阅文献了解到 CX3CL1 可以促进 PASMCs 的增殖,鉴于上述实验结果,得知 AECs 可以表达与分泌 CX3CL1,推测 AECs 是通过 CX3CL1 促进 PASMCs 增殖的。笔者还了解到, CX3CL1 只有与其特异性受体 CX3CR1 结合形成 CX3CL1-CX3CR1 轴,才能够在体内发挥作用。因此,采用 CX3CR1 siRNA 沉默 PASMCs 上的 CX3CR1 以阻断 CX3CL1 的作用。

本实验通过体外培养 AECs,发现低氧条件下其分泌和表达 CX3CL1 增多;通过体外共培养 PASMCs 与 AECs,发现 AECs 可以促进 PASMCs 的低氧性增殖;采用 siRNA 沉默 PASMCs 表面的 CX3CL1 特异性受体 CX3CR1 后,再与 AECs 共培养,发现 AECs 对 PASMCs 的低氧性增殖作用明显减弱。因此,推测低氧可以促进 AECs 表达分泌 CX3CL1 增多, CX3CL1 与位于 PASMCs 表面的特异性受体 CX3CR1 相互作用,促进 PASMCs 增殖。

4 结论

低氧可以促进 AECs 表达分泌 CX3CL1 增多, CX3CL1 与位于 PASMCs 表面的特异性受体 CX3CR1 相互作用,促进 PASMCs 增殖,除此之外, AECs 是否可以

通过其他途径调节 PASMCs 增殖尚未可知,因此深入研究 AECs 参与大鼠 PASMCs 增殖过程的机制,可以为临床治疗低氧性肺动脉高压提供新的思路。

参考文献

- [1] 张国振,何庆. 活性氧对高原性肺动脉高压的影响[J]. 心血管病学进展, 2018,39(4):576-579.
- [2] Amsellem V, Abid S, Poupel L, et al. Roles for the CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2 chemokine systems in hypoxic pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017,56(5):597-608.
- [3] 王领,赵一蔚,任培乐,等. FKN 浓度对人脐静脉内皮细胞中 CX3CR1 表达的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2018,41(4):468-471.
- [4] Liu W, Liang Y, Chan Q, et al. CX3CL1 promotes lung cancer cell migration and invasion via the Src/focal adhesion kinase signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2019,41(3):1911-1917.
- [5] Fernández-Prieto M, Fernández-Aceñero MJ, López-Palacios N, et al. CX3CL1-CX3CR1 axis: a new player in coeliac disease pathogenesis[J]. *Nutrients*, 2019, 11(11):2551.
- [6] Yang XP, Mattagajasingh S, Su S, et al. Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway[J]. *Circ Res*, 2007,101(10):1001-1008.
- [7] Zhang J, Hu H, Palma NL, et al. Hypoxia-induced endothelial CX3CL1 triggers lung smooth muscle cell phenotypic switching and proliferative expansion[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012,303(10):L912-L922.
- [8] 王艳霞. AECs 在低氧性肺动脉高压中的作用及机制研究[D]. 中国人民解放军空军军医大学, 2018.
- [9] Galie N, McLaughlin VV, Rubin LJ, et al. An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(1):1802148.
- [10] Strange G, Playford D, Stewart S, et al. Pulmonary hypertension: prevalence and mortality in the Armadale echocardiography cohort[J]. *Heart*, 2012, 98(24):1805-1811.
- [11] Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, et al. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2019,53(1):1801913.
- [12] Gall H, Felix JF, Schneck FK, et al. The Giessen pulmonary hypertension registry: survival in pulmonary hypertension subgroups[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2017,36(9):957-967.
- [13] Hurdman J, Condliffe R, Elliot CA, et al. Pulmonary hypertension in COPD: results from the ASPIRE registry[J]. *Eur Respir J*, 2013,41(6):1292-1301.
- [14] Wilkins MR, Ghofrani HA, Weissmann N, et al. Pathophysiology and treatment of high-altitude pulmonary vascular disease[J]. *Circulation*, 2015,131(6):582-590.
- [15] Mason RJ. Biology of alveolar type II cells[J]. *Respirology*, 2006,11 Suppl: S12-15.
- [16] Serrano-Mollar A, Gay-Jordi G, Guillaumat-Prats R, et al. Safety and tolerability of alveolar type II cell transplantation in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Chest*, 2016,150(3):533-543.
- [17] Oczypok EA, Perkins TN, Oury TD. Alveolar epithelial cell-derived mediators: potential direct regulators of large airway and vascular responses[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017,56(6):694-699.
- [18] Umehara H, Bloom E, Okazaki T, et al. Fractalkine and vascular injury[J]. *Trends Immunol*, 2001,22(11):602-607.
- [19] Singh SK, Mishra MK, Singh R. Hypoxia-inducible factor-1 α induces CX3CR1 expression and promotes the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in ovarian cancer cells[J]. *J Ovarian Res*, 2019,12(1):42.
- [20] McDermott DH, Colla JS, Kleeberger CA, et al. Genetic polymorphism in CX3CR1 and risk of HIV disease[J]. *Science*, 2000,290(5499):2031.
- [21] Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2003,111(3):333-340.
- [22] Zhang X, Feng X, Cai W, et al. Chemokine CX3CL1 and its receptor CX3CR1 are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability[J]. *Thromb Res*, 2015,135(6):1147-1153.
- [23] 陈小菊,程德云,樊莉莉. 低氧对大鼠 PASMCs 和肺微血管内皮细胞表达及分泌 Fractalkine 的影响[J]. 四川大学报(医学版), 2012,43(5):661-665.

收稿日期:2020-01-10

欢迎投稿 · 欢迎订阅