

人脐带间充质干细胞对感染状态下人肺泡Ⅱ型上皮细胞的影响

杨淑梅¹, 郑璇儿¹, 杨浩鸣¹, 卢春敏², 赖卫明², 饶韵蓓¹, 任竹潇¹, 杨杰¹
(广东省妇幼保健院 1. 新生儿科, 2. 检验科, 广东 广州 511442)

摘要:【目的】探讨人脐带间充质干细胞(hUCMSC)对感染铜绿假单胞菌(PA)状态下人肺泡Ⅱ型上皮细胞(A549)的影响。【方法】人肺泡Ⅱ型上皮细胞A549(1×10^5 /mL) 2 mL与PA(3×10^4 CFU/mL) 2 mL共培育6 h后,加入hUCMSC(1×10^6 /mL) 2 mL为实验组,加入等量磷酸缓冲液(PBS)为感染组,A549与PBS及培养基共培育为对照组。比较组间A549细胞形态学改变(透射电镜),A549细胞存活率(CCK-8新型细胞增殖检测试剂盒),A549细胞凋亡率(Annexin V-FITC/PI双染色流式细胞仪)以及A549肺表面活性物质A(SP-A)表达量(Western Blot)。【结果】电镜细胞形态学观察显示,感染组A549细胞受损明显,胞质出现空泡变性,染色质高度凝集,可见凋亡小体;实验组细胞包膜结构完整,核膜完整,核仁明显,核染色质电子密度低,染色质均一,未见凋亡小体;对照组A549细胞结构完整,细胞膜表面微绒毛丰富,核膜完整,核周间隙结构正常,染色质均一;感染组与对照组相比,感染组A549细胞细胞存活率显著降低[(70.35 ± 2.89)%与(97.37 ± 2.07)%, $n=3$, $P<0.01$],凋亡率显著增加[(8.63 ± 0.16)%与(2.55 ± 0.11)%, $n=3$, $P<0.01$],SP-A表达显著降低[(0.105 ± 0.01)与(0.232 ± 0.015), $n=3$, $P<0.01$];实验组与感染组相比,实验组细胞存活率显著增加[(85.69 ± 3.07)%与(70.35 ± 2.89)%, $n=3$, $P<0.01$],凋亡率显著下降[(6.34 ± 0.12)%与(8.63 ± 0.16)%, $n=3$, $P<0.01$],感染组中,PA可能损伤A549细胞,使其SP-A表达量显著减少($n=5$, $P<0.05$),实验组中,hUCMSC可能对感染后A549细胞的保护作用,其SP-A表达量增加($n=5$, $P<0.05$)。【结论】hUCMSC能抑制感染状态下的A549细胞凋亡,保护A549细胞分泌SP-A。

关键词:人脐带间充质干细胞;人肺泡Ⅱ型上皮细胞(A549);细胞凋亡;SP-A

中图分类号:R722.13 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2017)06-0842-06

Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Infected State of Human Alveolar type II Epithelial Cells

YANG Shu-mei¹, ZHENG Xuan-er¹, YANG Hao-ming¹, LU Chun-min², LAI Wei-ming²,
RAO Yun-bei¹, REN Zhu-xiao¹, YANG Jie¹

(1. Department of Neonatology, 2. Department of Laboratory, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511442, China)

Corresponding to: YANG Jie, E-mail: jieyang0830@163.com

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells on infected state of human alveolar type II epithelial cells. 【Methods】Human alveolar type II epithelial cells A549 (1×10^5 /mL) 2 mL and PA (3×10^4 CFU/mL) 2 mL has grown after 6 hours, add hUCMSC (1×10^6 /mL) 2 mL as the experimental group, add equal amounts of phosphate buffer (PBS) for infection, A549 and PBS and the medium has grown as the control group. A549 cells morphological changes between the compared groups (Transmission electron microscope, TEM), A549 cell viability (new CCK-8 cell proliferation assay Kit), A549 cells apoptosis (Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry) and the expression of A549 pulmonary surfactant A (SP-A) (Western blot). 【Results】Transmission electron microscope cell morphology observation displayed, infection group A549 cell damaged obviously, cell quality appeared empty bubble degeneration, chromatin height agglutination, visible apoptosis bodies; experiment group cell package film structure full, nuclear film full, nucleolus obviously, nuclear chromatin electronic density low, chroma-

收稿日期: 2017-05-31

基金项目: 广州市科技计划项目(2013J4100008)

作者简介: 杨淑梅, 硕士, 住院医师, E-mail: 234815987@qq.com; 杨杰, 通信作者, 主任医师, 博士生导师, E-mail: jieyang0830@163.com

tin uniform, no apoptotic bodies; control group A549 cell structure full, membrane surface micro-fluff rich, nuclear film full, nuclear week clearance structure normal, chromatin uniform; infection group and control group compared, Infection group A549 cell survival significantly reduced [(70.35±2.89)% and (97.37±2.07)%, $n=3$, $P<0.01$], apoptosis rate significantly increased [(8.63%±0.16)% and (2.55±0.11)%, $n=3$, $P<0.01$], In the infected group, PA could damage A549 cells and decrease the amount of SP-A expression ($n=5$, $P<0.05$). In the experiment group, the protective effect of hUCMSC on the A549 cells after infection may increase the expression of SP-A ($n=5$, $P<0.05$); [Conclusions] HUCMSC inhibits the infection of A549 cells apoptosis and protection of A549 cells secrete SP-A.

Key words: human umbilical cord mesenchymal stem cells; human alveolar type II epithelial cells (A549); apoptosis; SP-A

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(6):842-847]

人肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type II epithelial cell, AT-Ⅱ)具有合成和分泌肺泡表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)的功能,在维护新生儿气道稳定性方面起着重要的作用。人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUCMSC)具有降低其全身及肺部炎症,提高存活率的作用,也通过分泌抗菌肽具有广谱的抗菌作用。医院感染是新生儿重症监护病房(neonatal intensive care unit, NICU)住院新生儿的严重并发症,治疗困难,是新生儿死亡的主要原因之一。其中医院感染以呼吸道感染为主,约占23.3%~53.74%^[1],铜绿假单胞菌(pseudomonas aeruginosa, PA)是医院感染的最常见条件致病菌之一,由其引起的急性或慢性感染往往治疗难度大,具有多种耐药机制,是引起院内获得性肺炎多重耐药革兰阴性菌的代表。铜绿假单胞菌近年来在新生儿呼吸道标本的分离率高达86.3%,新生儿,尤其是早产儿,机械辅助通气及住院时间长、免疫力低下,是铜绿假单胞菌感染的高危人群。本研究的目的是研究感染对AT-Ⅱ凋亡的影响,以及hUCMSC对此感染状态下AT-Ⅱ的保护作用。希望为新生儿医院感染,找到新的治疗方法,提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 A549细胞、hUCMSC的培养

将A549细胞(广州莱德联康生物有限公司)及hUCMSC(天津卫凯生物有限公司)分别培养于含10% FBS的培养基,置37℃、体积分数5% CO₂饱和湿度的培养箱中生长,细胞生长至70%~80%时,以1×10⁵个细胞/孔传代至6孔板中,24 h后换新鲜培养基,每次实验均采用同一代细胞,并用不

同批次的细胞重复实验。A549细胞株传代至10~20代用于实验,hUCMSC传代至5~10代。

1.2 铜绿假单胞菌悬液的制备

将培养24 h的PA ATCC27853(卫生部临床检验中心)从培养箱中取出,用无菌棉签挑取生长良好的菌落,用PBS配成0.5麦氏浓度的菌悬液。再用PBS将上述菌悬液进行1:5 000稀释后备用,稀释后菌悬液浓度约为3×10⁴ CFU/mL。

1.3 细胞形态的观察

采用H-600型透射电镜(日本日立公司,×8000倍)观察、照相。其步骤为①取材:三组细胞分别共培养6 h后,2 000 r/min($r=10$ cm)离心5 min,弃去上清液,加入1 mL PBS 2000 r/min离心5 min,弃去上清液,加入1 mL 2.5%戊二醛固定液,4℃保存;②固定:4℃,2.5%戊二醛固定液,固定2 h或以上。再经过脱水、包埋、固化、超薄切片机切片50~60 nm、3%醋酸铀~枸橼酸铅双染色,透射电镜观察,拍片。

1.4 A549细胞存活率测定

CCK-8新型细胞增殖检测采用比色法进行检测,试剂盒购自南京凯基生物工程有限公司,操作方法见参考文献[2]。

1.5 A549细胞凋亡率测定

应用Annexin V-PI双染法检测细胞凋亡。将A549细胞以1×10⁵个/mL接种于6孔板,37℃、体积分数5% CO₂条件下培养;按照上述分组处理相应时间后,操作方法见参考文献[3]。

1.6 SP-A的水平检测

采用Western blot方法检测。用12% SDS-PAGE进行凝胶电泳,然后在300 mA恒流的条件下将其转移到硝酸纤维素膜上,用8%的牛奶封闭2 h,过夜孵一抗(SP-A),用抗体洗涤液(PBST)充分洗膜后,加入相应的二抗(兔抗鼠

IgG-HRP)孵育 2 h。然后使用发光液,按照试剂说明,进行化学发光显影。

1.7 统计学分析

使用 SPSS19.0 软件进行统计数据计算,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,对计量资料进行正态性检验,若符合正态分布,采用单因素方差分析;如不符合正态分布,则采用两独立样本的秩和检验进行两两比较(Wilcoxon法),当 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组间 A549 细胞形态的比较

电镜观察所见:对照组 A549 细胞结构完整,细胞膜表面微绒毛丰富,核膜完整,核周间隙结构正常,染色质均一;感染组细胞受损明显,胞质出现空泡变性,染色质高度凝集,可见凋亡小体(图 1,箭头所示为凋亡小体);实验组细胞包膜结构完整,核膜完整,核仁明显,核染色质电子密度低,染色质均一,未见凋亡小体。

2.2 组间 A549 细胞存活率的比较

通过比色法测定 A549 细胞存活率, CCK-8 细胞增殖法检测结果提示感染组细胞存活率明显降低 [$(70.35 \pm 2.89)\%$ 与 $(97.37 \pm 2.07)\%$, $n=3$, $P < 0.01$]; 实验组细胞存活率明显增加 [$(85.69 \pm 3.07)\%$ 与 $(70.35 \pm 2.89)\%$, $n=3$, $P < 0.01$]; 图 2]。

2.3 组间 A549 细胞凋亡率的比较

通过流式细胞仪测定 A549 细胞凋亡率,感染组 A549 细胞凋亡率明显增加 [$(8.63 \pm 0.16)\%$ 与 $(2.55 \pm 0.11)\%$, $n=3$, $P < 0.01$]; 实验组细胞凋亡率明显降低 [$(6.34 \pm 0.12)\%$ 与 $(8.63 \pm 0.16)\%$, $n=3$, $P < 0.01$]; 图 3]。

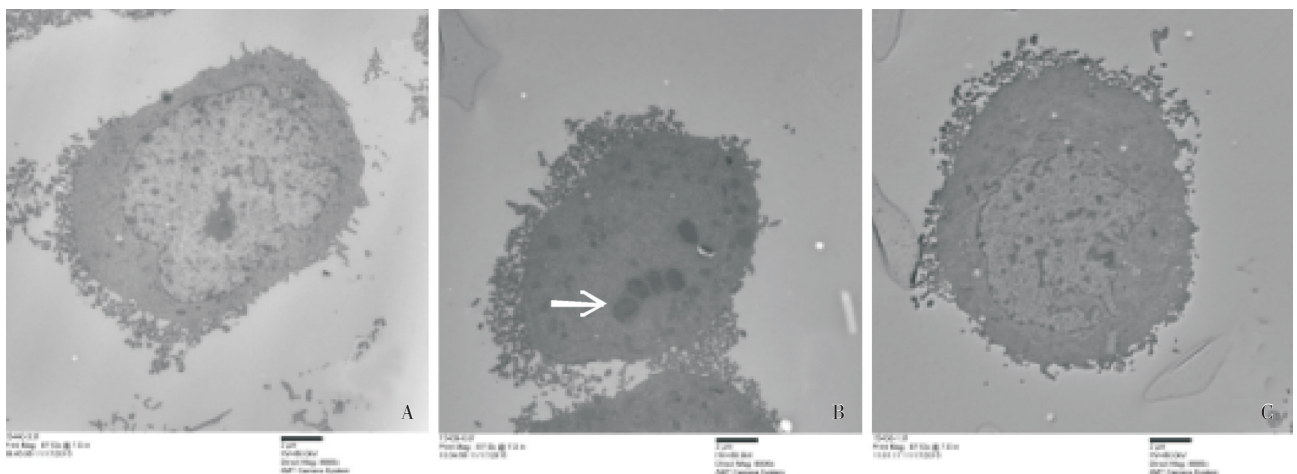
2.4 组间 SP-A 表达量的比较

Western blot 对 SP-A 表达的检测,感染组中,PA 可能损伤 A549 细胞,使其 SP-A 表达量显著减少 ($n=5$, $P < 0.05$, 图 4), 实验组中, hUCMSC 可能对感染后 A549 细胞的保护作用,其 SP-A 表达量增加 ($n=5$, $P < 0.05$, 图 4)。

3 讨论

本研究结果发现,感染组 A549 细胞体积变小,细胞质浓缩,凋亡小体形成;与对照组相比,感染组 A549 细胞细胞存活率显著降低,凋亡率显著增加,SP-A 分泌降低。显示细菌感染导致肺泡 II 型上皮细胞凋亡,分泌 SP-A 减少。本研究结果与之前研究结果一致^[3]。本研究的这一结果,与临床医院感染肺炎(如呼吸机相关肺炎等)肺泡萎陷,通气功能降低,发生低氧血症等症状,并需要肺表面活性物质治疗这些临床表现相一致^[4]。

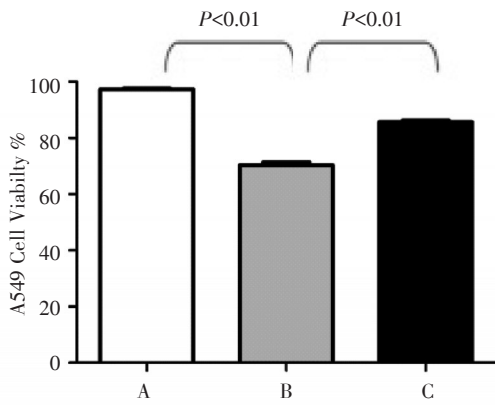
此外,本研究还发现实验组(hUCMSC组)细胞包膜结构完整,核膜完整,核仁明显,核染色质电子密度低,染色质均一,未见凋亡小体。从形态学证实了 hUCMSC 可保护 AT-II 免受凋亡。同时,



A: Control group, B: Infection group, C: Experiment group.

图 1 组间 A549 细胞形态的比较

Fig.1 Comparison of A549 cell morphology between the groups



A : Control group, B : Infection group, C : Experiment group.

Error bar: +SD

图2 组间A549细胞存活率的比较

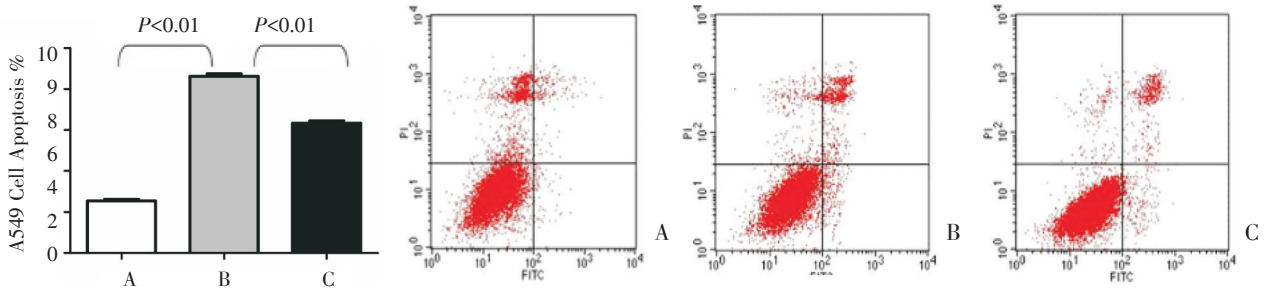
Fig.2 Comparison of A549 cell viability between the groups

实验组与感染组比较,细胞凋亡率有所下降,细胞存活率升高,说明人肺泡II型上皮细胞在hUC-MSC作用下存活时间延长。其可能增强人肺泡II型上皮细胞的功能,促进PS的合成及分泌。关于间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)对炎性状态下肺损伤的保护作用相关研究显示:Gupta等^[5]使用MSC治疗大肠埃希菌内毒素引起的急性肺损伤小鼠,其生存率得到显著提高。Mei等^[6]发现小鼠MSC能减轻脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)致急性肺损伤小鼠的肺水肿程度,其作用机制是MSC具有调节炎症介质的能力,能旁分泌促血管生成素1(angiotensin 1)促进肺泡上皮细胞、血管内皮细胞的修复,恢复肺泡上皮细胞-血管内皮细胞膜的通透性,增强了肺泡液体清除能

力。相关研究发现人MSC能减轻内毒素致离体人肺的炎症损伤^[7-10]。

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, 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。BMMSC可通过肺循环定植于肺受损部位,能不同程度地减轻肺部炎症反应,提高生存率^[11-12]。骨髓MSC在损伤的肺组织中可以分化为AT-I、AT-II,内皮细胞和成纤维细胞,补充替代受损的上皮细胞,促进肺上皮屏障的恢复^[13-14]。这些研究均证实了MSC对于促进肺泡上皮细胞的分化与炎性损伤保护作用,但之前研究均为骨髓间充质干细胞的研究,对于脐带间充质干细胞对于肺泡II型上皮细胞保护作用的研究,仍未见报道。

SP-A是最早被发现且在AT-II中表达最强烈,信号最丰富的蛋白,是PS中最重要的蛋白成分。本研究中感染组SP-A的表达量减少,提示感染对SP-A的分泌有抑制作用;实验组SP-A的表达量明显增加,提示hUCMSC对感染状态下SP-A的分泌有一定的促进作用。相关研究证实,严重肺部感染、全身性炎症反应引起肺内炎症细胞聚集等,可直接或间接损伤AT-II,干扰PS的合成和代谢,导致肺内PS含量、组分和功能的改变,包括PS总量的减少,SP的减少或缺失,体外活性明显降低^[15-17]。本研究结果感染组SP-A的表达量减少,其可能的原因为感染对A549细胞的损伤,



A : Control group, B : Infection group, C : Experiment group. Error bar: +SD

图3 组间A549细胞凋亡率的比较

Fig.3 Comparison of A549 cell apoptosis between the groups

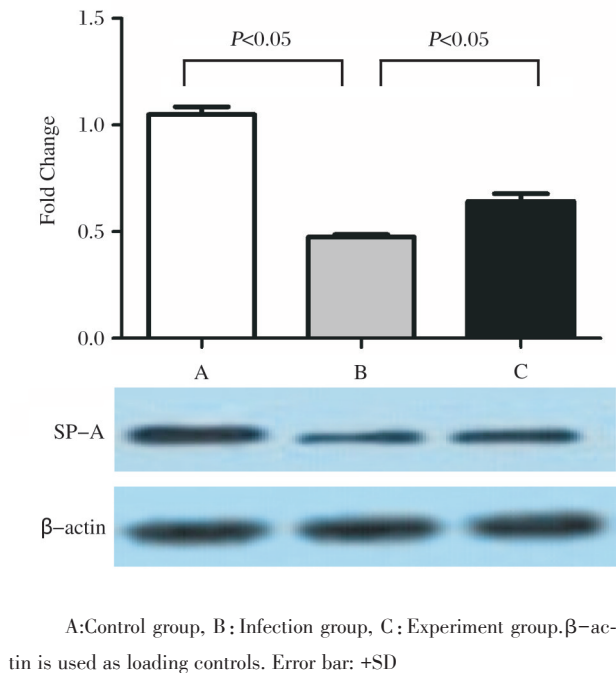


图4 组间SP-A表达量的比较

Fig.4 Comparison of SP-A expression between the groups

干扰PS的合成,从而导致SP-A的表达减少。研究发现对于LPS造成的肺损伤,hUCMSC具有降低肺部炎症,提高存活率,本研究实验组SP-A的表达量增加,可能的原因为hUCMSC对感染的抑制作用,对A549细胞的保护作用,从而促进SP-A的分泌,SP-A的表达量增加。

呼吸道感染性疾病是导致新生儿死亡的重要疾病之一,据国内学者报道早产儿的死亡率高达12.7%~20.8%,其中细菌性感染是造成其死亡的重要原因^[18]。目前关于hUCMSC对感染状态下人肺泡II型上皮细胞(A549)保护作用的研究尚未见报道,本文通过分析hUCMSC对感染状态下人肺泡II型上皮细胞(A549)凋亡的作用研究,具有一定的创新性,为新生儿呼吸道感染的防治提供新的思路和方法。本研究结果提示hUCMSC对感染状态下人肺泡II型上皮细胞(A549)的有保护作用,由此可推断hUCMSC可能对新生儿呼吸道感染性疾病具有保护作用,从而为减少抗生素的滥用,为新生儿呼吸道感染性疾病提供新的方法,有望应用于临床。hUCMSC来源广泛,易于获得,方便取材,对母体和婴儿均无痛苦而且可以长期

储存,不受伦理道德方面的争议,为其最终应用于临床治疗感染疾病奠定基础,有望作为临床抗生素的替代治疗。

参考文献

- [1] 尹丹萍,何多多,张玉强,等. 医院感染患者相关危险因素分布特点研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(8):1785-1788.
Yin DP, He DD, Zhang YQ, et al. Study on the distribution characteristics of related risk factors in hospital infection [J]. Chin J hosp infect, 2017, 27(8): 1785-1788.
- [2] Chowdhury SR, Sengupta S, Biswas S, et al. Low fucose containing bacterial polysaccharide facilitate mitochondria-dependent ROS-induced apoptosis of human lung epithelial carcinoma via controlled regulation of MAPKs-mediated Nrf2/Keap1 homeostasis signaling [J]. Clin Pharmacol Ther, 2014, 54(12):1636-1655.
- [3] Bouglé A, Foucrier A, Dupont H, et al. Impact of the duration of antibiotics on clinical events in patients with Pseudomonas aeruginosa ventilator-associated pneumonia: Study protocol for a randomized controlled study [J]. Trials, 2017, 18(1): 37.
- [4] Ahmed GF, Elkhatib WF, Noreddin AM. Inhibition of pseudomonas aeruginosa PAO1 adhesion to and invasion of A549 lung epithelial cells by natural extracts [J]. J Infect Public Health, 2014, 7(5):436-444.
- [5] Gupta N, Su X, Popov B, et al. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. J Immunol, 2007, 179(3): 1855-1863.
- [6] Mei SH, Haitisma JJ, Dos Santos CC, et al. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(8): 1047-1057.
- [7] Herzmann N, Salamon A, Fiedler T, et al. Lipopolysaccharide induces proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro via TLR4 activation [J]. Exp Cell Res, 2017, 350(1):115-122.
- [8] Feng LX, Peng S, Tian MI, et al. Agglutinin isolated from Arisema heterophyllum, blume induces apoptosis and autophagy in A549 cells through inhibiting PI3K/Akt pathway and inducing ER stress [J]. Chin J Nat Med, 2016, 14(11):856-864.

- [9] Gurnathan S, Jeong JK, Han JW, et al. Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells [J]. *Nanoscale Res Lett*, 2015, 10(1):35.
- [10] Haczku A. Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(5):861-879.
- [11] Cheng X, Wang B, Jin Z, et al. *Pseudomonas aeruginosa*-mannose-sensitive hemagglutinin inhibits pancreatic cancer cell proliferation and induces apoptosis via the EGFR pathway and caspase signaling [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47):916-925.
- [12] Herzmann N, Salamon A, Fiedler T, et al. Analysis of migration rate and chemotaxis of human adipose-derived mesenchymal stem cells in response to LPS and LTA in vitro [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 342(2):95-103.
- [13] Li JW, Wu X. Mesenchymal stem cells ameliorate LPS-induced acute lung injury through KGF promoting alveolar fluid clearance of alveolar type II cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2015, 19(13):2368-2378.
- [14] Yu X, Wang Y, Lin J, et al. Lipopolysaccharides-induced suppression of innate-like B cell apoptosis is enhanced by CpG oligodeoxynucleotide and requires toll-like receptors 2 and 4 [J]. *Plos One*, 2016, 11(11):e0165862.
- [15] Hou YS, Liu LY, Chai JK, et al. Lipopolysaccharide pretreatment inhibits LPS-induced human umbilical cord mesenchymal stem cell apoptosis via upregulating the expression of cellular FLICE-inhibitory protein [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(2):2521-2528.
- [16] Viličić J, Novaković I, Stanojković T, et al. Synthesis and biological activity of amino acid derivatives of avarenone and its model compound [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(21):6930-6942.
- [17] Tang J, Wu T, Xiong J, et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides regulate functions of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Cell Proliferat*, 2015, 48(2):239-248.
- [18] 邵肖梅. 实用新生儿学 [M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2011:307.
Shao XM. *Practical Neonatology* [M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 307.
(编辑 孙慧兰)

(上接第807页 from page 807)

- [44] Yan Q, Ruan JW, Ding Y, et al. Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2011, 63:151-156.
- [45] Ding Y, Yan Q, Ruan JW, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells and electro-acupuncture downregulate the inhibitor molecules and promote the axonal regeneration in the transected spinal cord of rats [J]. *Cell Transplant*, 2011, 20(4):475-491.
- [46] Yang XH, Ding Y, Li W, et al. Effects of electroacupuncture and the RXR signaling pathway on oligodendrocyte differentiation in the demyelinated spinal cord of rats [J]. *Acupunct Med*, 2017, 35(2):122-132.
- [47] Kumar S, Kahn MA, Dinh L, et al. NT-3-mediated TrkC receptor activation promotes proliferation and cell survival of rodent progenitor oligodendrocyte cells in vitro and in vivo [J]. *J Neurosci Res*, 1998, 54(6):754-765.
- [48] McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, et al. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(14):5354-5365.
- [49] Rubio N, Rodriguez R, Arevalo MA. In vitro myelination by oligodendrocyte precursor cells transfected with the neurotrophin-3 gene [J]. *Glia*, 2004, 47(1):78-87.
(编辑 刘清海)