

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.010

hUC-MSCs 在 LPS 诱导肺上皮细胞线粒体损伤中的作用*

宋航,陈霞[△],杨艳,姜晓芳,冯静

(中国人民解放军第三二四医院,重庆 400020)

[摘要] **目的** 探明脐带间充质干细胞(hUC-MSC)对脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)细胞模型中肺泡上皮细胞(AEC)线粒体功能的影响。**方法** LPS刺激A549细胞建立ALI细胞模型。A549和hUC-MSCs直接共培养后用流式细胞仪分选,分选后细胞行线粒体提取及免疫荧光标记。测定细胞腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)、活性氧(ROS)水平,线粒体膜电位,Western blot测定线粒体融合相关蛋白(Mfn1)、线粒体移动基因蛋白(NRF1)、线粒体呼吸相关蛋白(Miro1)表达水平。**结果** A549与hUC-MSCs直接混合培养后,采用流式细胞仪对ACE成功分选,分选后A549线粒体染色呈明亮的强荧光。hUC-MSCs可提高LPS刺激下A549的ATP及线粒体膜电位水平,降低ROS。hUC-MSCs可影响A549线粒体Mfn1、NRF1、Miro1蛋白水平。**结论** hUC-MSCs可保护LPS诱导下A549线粒体膜电位、能量代谢及调控线粒体融合-分裂、移动等功能。

[关键词] 间质干细胞;脐带;肺泡上皮细胞;线粒体;呼吸窘迫综合征,成人**[中图分类号]** R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)08-1302-04

Role of hUC-MSCs in LPS-induced mitochondrial damage in lung epithelial cells*

SONG Hang, CHEN Xia[△], YANG Yan, JIANG Xiaofang, FENG Jing

(The 314th Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400020, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) on mitochondrial function of lung epithelial cells (AEC) in a lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury cell model. **Methods** LPS stimulated A549 cells to establish a cell model of acute lung injury. A549 and hUC-MSCs were directly co-cultured and sorted by flow cytometry. After sorting, the cells were subjected to mitochondrial extraction and immunofluorescence labeling. ATP, ROS levels, mitochondrial membrane potential of cells were measured, and the expression of Mfn1, NRF1, Miro1 proteins were detected by Western blot. **Results** After A549 and hUC-MSCs were directly co-cultured, the ACE were successfully sorted by flow cytometry. After sorting, the A549 mitochondria stained brightly and strongly. hUC-MSCs could increase the ATP and mitochondrial membrane potential levels of A549 stimulated by LPS, and reduce ROS level. hUC-MSCs could affect the expression of Mfn1, NRF1, Miro1 protein. **Conclusion** hUC-MSCs can protect the mitochondrial membrane potential, energy metabolism and mitochondrial fusion-splitting and migration of A549 induced by LPS.

[Key words] mesenchymal stem cells; umbilical cord; alveolar epithelium cells; mitochondria; respiratory distress syndrome, adult

严重感染、有毒气体吸入、休克等均可导致急性肺损伤,组织学上可表现为不同程度的肺水肿和肺不张等^[1]。现临床治疗手段有限,预后差。而间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植急性肺损伤模型的体内、体外实验取得了较大成功^[2]。前期课题组也证实了人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)对内毒素诱导的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)小鼠模型的治疗作用,但是目前治疗机制不明。近年来发现MSCs治疗成功的关键在于肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cell, AEC)的修复^[3]。因此探索MSCs修复

AEC损伤的主要作用部位意义重大。多项研究表明AEC线粒体功能异常在ALI中起着关键作用^[4]。但是目前MSCs对ALI患者AEC线粒体功能的影响,国内外相关报道较少。因此,本研究选择A549细胞作为AEC的代表,希望通过本研究探明hUC-MSC修复脂多糖(LPS)诱导的ALI细胞模型中,hUC-MSC对人II型肺泡上皮细胞素A549细胞线粒体功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 hUC-MSCs为课题组前期由人脐

带组织成功分离获得, A549 细胞株购自南京科佰生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12、澳洲胎牛血清(美国 Gibco), 二甲基亚砜(DMSO, 美国 Sigma-Aldrich), 增强型 CCK-8 试剂盒、增强型腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)检测试剂盒、活性氧(ROS)检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、细胞线粒体分离试剂盒、Western blot 制胶试剂盒、脱脂奶粉(杭州碧云天生物技术有限公司), 兔多克隆线粒体融合相关蛋白(Mfn1)抗体、兔多克隆线粒体呼吸相关蛋白(Miro1)抗体(英国 Abcam 公司), 兔多克隆线粒体移动基因蛋白(NRF1)抗体(北京博奥森公司), TBS 缓冲液(武汉博士德生物制品公司), 无水甲醇(重庆川东化工有限公司)。

1.1.3 主要实验仪器 超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司), 电子天平(Storiosis 公司), CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific), 细胞计数板(上海求精生化试剂仪器公司), 倒置显微镜(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 LPS 诱导 ALI 模型的建立 取 A549 细胞 5×10^6 /mL 接种于 6 孔板, 待细胞长至 80% 融合时, DEME 培养液中加入 10 μ g/mL 的 LPS 继续培养 24 h, 建立 ALI 细胞模型。

1.2.2 A549 和 hUC-MSCs 直接共培养及实验分组 取 hUC-MSCs 悬液 500 μ L, 细胞密度 5×10^6 /mL 直接加入已加入 LPS 的 A549 培养瓶中, 5% CO₂ 培养箱中培养 48~72 h。实验分为 4 组: A549+PBS、A549+LPS、A549+MSCs、A549+MSCs+LPS。

1.2.3 流式细胞分选术 无菌条件下采用流式细胞分选术, 将混合共培养 A549 和 hUC-MSCs 相互分离。上机分选时将共培养的细胞按体积大小明显分为两群, 分选出体积小的细胞群。再利用增强型绿色荧光蛋白(EGFP)标记, 分选出其中 EGFP 阴性表达的 A549, 在激光共聚焦显微镜下观察, 证实分选出的细胞为 EGFP 阴性, 并且呈现出上皮细胞特征性的大小均一的短梭形状。分选出的 A549 用于线粒体提取、免疫荧光标记、功能测定等实验。

1.2.4 细胞线粒体荧光探针染色 加入 Mito-Tracker Green 染色工作液, 与细胞 37 $^{\circ}$ C 共孵育 15~45 min。然后去除染色工作液, 加入 37 $^{\circ}$ C 预温育的新鲜细胞培养液。用荧光显微镜或激光共聚焦显微镜进行观察。

1.2.5 线粒体提取 首先收集 A549 细胞并洗涤细胞, 通过预处理后匀浆, 并对匀浆效果进行鉴定。细胞匀浆 1 000 \times g 离心 10 min 后, 小心把上清液转移到另一离心管中继续 3 500 \times g 离心 10 min, 小心去除

上清液。沉淀即为分离得到的细胞线粒体。在分离得到的线粒体样品中可以加入 150~200 μ L 线粒体储存液, 重悬线粒体。

1.2.6 细胞 ATP 及 ROS 测定

1.2.6.1 细胞 ATP 测定 吸除培养液裂解细胞。裂解后 4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g 离心 5 min, 取上清液, 用于后续的测定。每孔加入 100 μ L ATP 检测工作液及 20 μ L 样品或标准品, 迅速混匀后, 用液闪仪测定 RLU 值。根据标准曲线计算出样品中 ATP 的水平。

1.2.6.2 细胞 ROS 测定 收集细胞后装载探针, 稀释 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)使终浓度为 10 μ mol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 细胞浓度为 1×10^6 /mL, 继续孵育 20 min。收集细胞后用荧光分光光度计检测。

1.2.7 线粒体膜电位测定 配制 JC-1 染色工作液后设置阳性对照, 把配制好的 JC-1 染色工作液再用 JC-1 染色缓冲液(1 \times)稀释 5 倍。加入 0.1 mL 总量为 10~100 μ g 纯化的线粒体。用荧光分光光度计或荧光酶标仪检测。

1.2.8 Western blot 方法测定线粒体功能因子(Mfn1、Drp1、Miro1)表达水平 制胶后加样及电泳, 然后转膜封闭, 一抗孵育后二抗孵育, 确保抗体均匀孵育在聚偏氯乙烯(PVDF)膜上。并行显影及图像分析, 以 GAPDH 作为内参进行标准化, 用 ImageQuant TL 对图像进行灰度值半定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间的比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 分选后 A549 行荧光探针染色标记 分选后 A549 细胞在荧光显微镜下满视野可见明亮的强荧光染色, 证实提取后的细胞线粒体活性可, 见图 1。

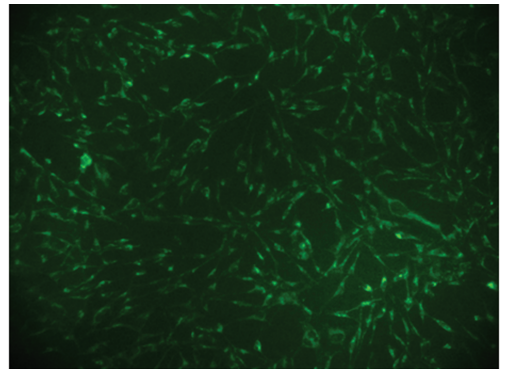
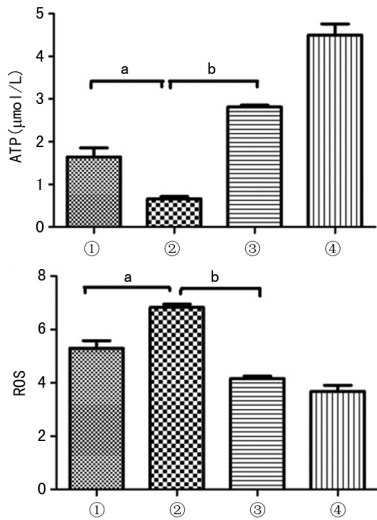


图 1 分选后 AEC 线粒体荧光探针染色

2.2 混合培养后 A549 细胞的 ATP 及 ROS 变化 A549+PBS 组与 A549+LPS 组比较, ATP 与 ROS 水平差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); A549+

LPS 组与 A549+MSCs+LPS 组比较, ATP 与 ROS 水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 A549+MSCs+LPS 组与 A549+PBS 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。可以看出, LPS 刺激下 A549 细胞单独培养组 ATP 下降, ROS 升高; 而与 hUC-MSCs 混合培养后, 细胞 ATP 升高, ROS 下降, 见图 2。

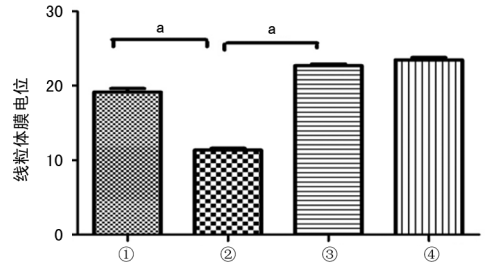


①: A549+MSCs+LPS 组; ②: A549+LPS 组; ③: A549+PBS 组; ④: A549+MSCs 组; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$

图 2 LPS 诱导下 A549 的 ATP 及 ROS 水平

2.3 混合培养后 A549 线粒体膜电位变化 A549+PBS 组线粒体膜电位与 A549+LPS 组比较, 差异有

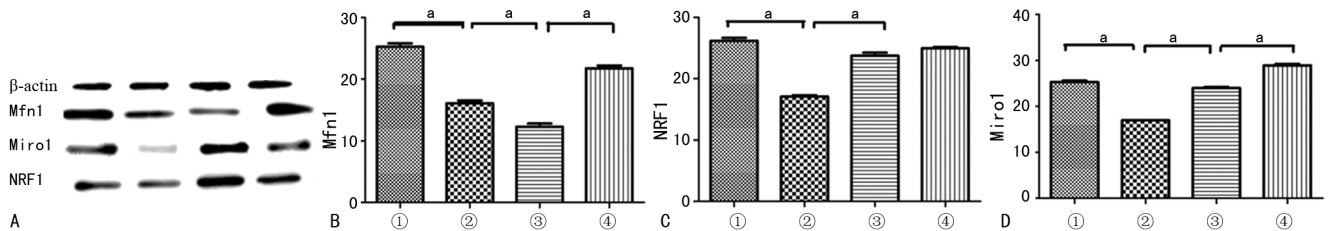
统计学意义 ($P < 0.05$), 而 A549+MSCs+LPS 组与 A549+PBS 组比较, 差异无统计学意义 ($P < 0.01$); A549+LPS 组与 A549+MSCs+LPS 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。证实 LPS 刺激下 AEC 线粒体膜电位显著下降, hUC-MSCs 可有效提高 AEC 线粒体膜电位, 见图 3。



①: A549+MSCs+LPS 组; ②: A549+LPS 组; ③: A549+PBS 组; ④: A549+MSCs 组; ^a: $P < 0.01$

图 3 LPS 诱导下 A549 的线粒体膜电位

2.4 Western blot 测定混合培养后 AEC 线粒体功能因子的变化 与 A549+PBS 组比较, LPS+A549 组 Mfn1, Miro1, NRF1 明显降低 ($P < 0.01$)。A549+LPS 组 Mfn1, NRF1, Miro1 表达水平显著低于 A549+MSCs+LPS 组 ($P < 0.01$)。A549+PBS 组与 A549+MSCs 组比较 Mfn1, Miro1 蛋白表达水平显著减低 ($P < 0.01$), 而 NRF1 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



A: Western blot 结果; B: Mfn1 定量分析; C: NRF1 定量分析; D: Miro1 定量分析; ①: A549+MSCs+LPS 组; ②: A549+LPS 组; ③: A549+PBS 组; ④: A549+MSCs 组

图 4 LPS 刺激下 AEC 线粒体相关功能蛋白变化

3 讨 论

近年来有关 ALI 致病机制的研究及治疗手段都取得较大进步, 但是其发病率及病死率仍然很高。ALI 主要表现为肺血气交换屏障破坏, 伴有体内炎症因子和趋化因子水平明显升高^[5]。AEC 作为肺泡壁的重要组成部分, 主要构筑肺血管内皮-肺泡上皮屏障, 在 ALI 进程中起着稳定肺泡结构, 减轻全身炎症反应, 维持凝血/纤溶平衡, 促进肺泡内液体的清除及免疫调节的作用。因此 AEC 的完整性与 ALI 的预后和生存密切相关^[6]。而线粒体做为一个结构和功能复杂的重要细胞器, 在细胞能量代谢和信号通路传导

等方面发挥关键作用^[7]。研究发现 AEC 在 ALI 进程中线粒体发生酶活性改变, 钙超载及通透性转换等, 随之线粒体融合/分裂、移动、能量代谢等功能受到严重影响, 加重 AEC 的损伤^[8]。由此可见, ALI 触发的炎症反应与 AEC 线粒体功能完整性明确相关, 修复 AEC 线粒体的功能将成为 ALI 治疗的新目标^[9]。

截止目前, 针对 AEC 修复的临床治疗策略非常有限, 主要集中在 MSCs 移植治疗^[10]。MSCs 治疗肺损伤的疗效及安全性已得到了国内外学者一致认可^[11]。多项研究认为 MSCs 治疗 ALI 的机制主要为 3 个方面: 抗炎作用、旁分泌作用及免疫调节作用^[12]。

但是 MSCs 对 AEC 线粒体功能的影响尚不明确。

研究已证实线粒体通过融合和分裂实现动态变化,融合和分裂间的平衡与氧自由基产生量有关^[13]。介导机体线粒体融合的蛋白主要包括 Mfn1、Mfn2,其中以 Mfn1 最常见,位于线粒体外膜^[14]。核呼吸因子 NRF1 的表达受到 PRAR-1 共激活因子-1 α (PGC-1 α)的诱导,而且 PGC-1 α 和 NRF1 二者结合能够直接调控 DNA 编码过程线粒体氧化磷酸化复合物的表达^[15]。另 Miro1 通过支持膜突出和病灶黏附性的稳定,调节线粒体在前缘位置,以提供局部能量生成促进细胞移动。故认为 Miro1 做为线粒体动力学相关蛋白,可调控线粒体移动促进细胞修复^[16]。

本研究发现:A549 细胞与 hUC-MSCs 直接混合培养后,采用流式细胞仪对 A549 成功分选,分选后 A549 细胞线粒体染色呈明亮的强荧光。hUC-MSCs 可以调控 A549 线粒体的能量代谢功能,保护 LPS 刺激下 A549 线粒体膜电位,可明显提高 A549 线粒体 Miro1 水平,而且此作用与 LPS 刺激无关,且 hUC-MSCs 对 A549 线粒体损伤的修复是多方面的,包括移动、融合分裂、呼吸链功能。

本研究证实了 hUC-MSCs 可能通过调控 AEC 的线粒体功能,修复 LPS 诱导的 AEC 损伤,但其调节机制还需进一步研究探索。

参考文献

- [1] YADAV H, THOMPSON B T, GAJIC O. Fifty years of research in ARDS. is acute respiratory distress syndrome a preventable disease? [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(6):725-736.
- [2] CRUZ F F, WEISS D J, ROCCO P R. Prospects and progress in cell therapy for acute respiratory distress syndrome[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(11): 1353-1360.
- [3] HAEGER S M, LIU X, HAN X, et al. Epithelial heparan sulfate contributes to alveolar barrier function and is shed during lung injury[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 59(3):363-374.
- [4] MORRISON T J, JACKSON M V, CUNNINGHAM E K, et al. Mesenchymal stromal cells modulate macrophages in clinically relevant lung injury models by extracellular vesicle mitochondrial transfer[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 196(10):1275-1286.
- [5] PREVOTAT A, ROUYER C, GOSSET P, et al. Biphasic lung injury during *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine model[J]. *Med Mal Infect*, 2018, 48(2): 103-113.
- [6] HENDRIX A Y, KHERADMAND F. The Role of Matrix Metalloproteinases in Development, Repair, and Destruction of the Lungs[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148:1-29.
- [7] SANCHEZ P G, PASRIJA C, MULLIGAN M J, et al. A novel large animal model of acute respiratory distress syndrome induced by mitochondrial products[J]. *Ann Surg*, 2017, 266(6):1091-1096.
- [8] SULIMAN H B, KRAFT B, BARTZ R, et al. Mitochondrial quality control in alveolar epithelial cells damaged by *S. aureus* pneumonia in mice[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 313(4):L699-709.
- [9] CHEN Q, ZHENG R, WANG H. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: new hope of the treatment for ARDS[J]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2017, 29(9):774-777.
- [10] CRUZ F F, WEISS D J, ROCCO P R. Prospects and progress in cell therapy for acute respiratory distress syndrome[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(11): 1353-1360.
- [11] WANG H, ZHENG R, CHEN Q, et al. Mesenchymal stem cells microvesicles stabilize endothelial barrier function partly mediated by hepatocyte growth factor (HGF) [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1):211.
- [12] MATTHAY M A, PATI S, LEE J W. Concise review: mesenchymal stem (Stromal) cells; biology and preclinical evidence for therapeutic potential for organ dysfunction following trauma or sepsis[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(2):316-324.
- [13] LI P A, HOU X, HAO S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration[J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(10): 2025-2029.
- [14] HUANG X, ZHOU X, HU X, et al. Sequences flanking the transmembrane segments facilitate mitochondrial localization and membrane fusion by mitofusin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(46):E9863-9872.
- [15] HA B G, JUNG S S, SHON Y H. Effects of proton beam irradiation on mitochondrial biogenesis in a human colorectal adenocarcinoma cell line[J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(3):859-866.
- [16] AHMAD T, MUKHERJEE S, PATTNAIK B, et al. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy[J]. *EMBO J*, 2014, 33(9):994-1010.