

临床细胞生物学

不同浓度TGF- β 1对肺泡II型细胞系MLE-12 表型及功能的影响

刘芳君 宋思思 邓 春 郭春宝 符 州 刘恩梅 刘 莎 谭 利 龚财惠*

(重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆市儿童发育重大疾病诊治与
预防国际合作基地, 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 400014 重庆)

摘要 探讨不同浓度及不同时间点TGF- β 1对肺泡II型上皮细胞(AECII)表型及功能的影响。小鼠肺泡II型细胞系MLE-12, 随机分为: 对照组(0 ng/mL)、低浓度组(0.1 ng/mL)、中浓度组(1 ng/mL)和高浓度组(10 ng/mL)。应用细胞免疫荧光双标法及荧光定量PCR法观察各组12, 24, 48, 72 h细胞形态变化、AECII标记(肺表面活性物质蛋白B, SP-B)及成纤维细胞标记(成纤维细胞特异性蛋白1, FSP-1)蛋白及mRNA的表达情况。结果表明, 随着TGF- β 1干预时间的延长及浓度的升高, AECII逐渐由鹅卵石样变成纺锤体形状, 获得成纤维细胞样外观。蛋白水平, AECII标记SP-B表达逐渐减弱, 成纤维细胞标记FSP-1表达逐渐增强, 48 h中浓度组及24 h高浓度组两者可见明显的共表达, 同时, 其SP-B mRNA表达较同时间对照组下调, 而FSP-1 mRNA表达较同时间对照组上调。低浓度组各时间点上述表现不明显。TGF- β 1促使AECII向成纤维细胞转化(EMT), 且具有时间及浓度依赖性。

关键词 TGF- β 1; 肺泡II型细胞; 间质细胞; 表型; 功能

The Effect of Different Concentrations TGF- β 1 on Phenotype and Function of Type II Alveolar Epithelial Cell Line MLE-12

Liu Fangjun, Song Sisi, Deng Chun, Guo Chunbao, Fu Zhou, Liu Enmei, Liu Sha, Tan li, Gong Caihui*

(Children's Hospital of Chongqing Medical University, Department of Respiratory Medicine, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing 400014, China)

Abstract To investigate the phenotype and function of type II alveolar epithelial cells induced by TGF- β 1 with different concentrations and times, the type II alveolar epithelial cell line MLE-12 cells were randomly divided into following groups, control group (0 ng/mL), low concentration group (0.1 ng/mL), middle concentration group (1 ng/mL), and high concentration group (10 ng/mL). The morphological changes of each group, the protein and mRNA expressions of AEC II -specific marker (lung surfactant protein B, SP-B) and fibroblast-specific marker (fibroblast-specific protein 1, FSP-1) were observed at 12, 24, 48, 72 h by Double-labeled immunofluorescence and Real-time PCR, respectively. The results demonstrated that with the time and concentration of exposure to TGF- β 1,

收稿日期: 2013-11-06 接受日期: 2014-01-06

国家自然科学基金(批准号: 30770950)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63631510, E-mail: fu_zhou79@yahoo.com.cn

Received: November 6, 2013 Accepted: January 6, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30770950)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63631510, E-mail: fu_zhou79@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2014-03-17 14:18

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0364.html>

the shape of AECII cells were gradually changed the pebble-like sharp into spindle, and gained some fibroblast appearance. With their morphological changes, the protein expression of SP-B in AECII cells were decreased, while the expression of FSP1 were increased, co-expressed were observed in 48 hours of middle concentration group and 24 hours of high concentration group. In parallel with the changes, the mRNA expression of SP-B were decreased markedly, but compared with control group for the same time the mRNA expression of FSP1 increased significantly. Nevertheless, different results with low concentration group had not been observed. TGF- β 1 can induce type II alveolar epithelial cells transition to fibroblast (EMT) in a time and concentration dependent manner.

Key words TGF- β 1; type II alveolar epithelial cells; mesenchymal; phenotype; function

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是早产儿长期高压机械通气及高浓度氧疗后常见的并发症之一,以肺泡和肺内血管发育受阻及肺纤维化为主要特征^[1]。BPD等慢性纤维化性疾病中成纤维细胞/成肌纤维细胞的来源尚未明确。肺泡II型上皮细胞(type II alveolar epithelial cells, AECII)被认为是肺上皮细胞损伤后修复的前体细胞,具有自我更新及转化为肺泡I型上皮细胞(type I alveolar epithelial cells, AECI)的功能^[2]。近年来,上皮类细胞包括肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AECs)具有极大的表型可塑性已被越来越多的接受。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),是完全分化的上皮细胞转化为具有间质表型的成纤维细胞/成肌纤维细胞的过程,其对肺损伤后纤维化进程的贡献是目前研究的热点^[3]。TGF- β 1是一种具有多种生物学活性的细胞因子,在细胞和多种组织包括肺组织中被认为是导致纤维化的“总开关”,是诱导EMT的关键细胞因子^[4]。本研究应用不同浓度的TGF- β 1对肺泡II型上皮细胞(AECII)进行体外干预,观察不同时间点AECII的表型及功能的影响,为损伤后的异常修复提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠肺泡II型细胞MLE-12来自ATCC,由重庆医科大学附属儿童医院研究所急救研究室保存。所用材料及来源如下:DMEM/12培养液、胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶(Gibco);TGF- β 1抗原(R&D);山羊抗小鼠SP-B多抗(Santa Cruz);兔抗小鼠FSP1多抗(Abcam);CY3标记的抗山羊IgG及DAPI(碧云天);Alexa Fluor[®] 488标记抗兔IgG(中杉金桥);总RNA快速提取试剂盒(Bioteke);PrimeScript RT Reagent Kit(TaKaRa);SYBR Green(天根);SP-B及

FSP1引物(生工);密闭氧仓、CO₂培养箱(Therm Forma);CY100型数字测氧仪(杭州立华仪器有限公司);激光扫描共聚焦显微镜(Nikon)。

1.2 方法

1.2.1 TGF- β 1干预细胞模型的建立及实验分组 MLE-12以每孔 3.5×10^5 细胞铺于6孔板内,在含有10% FBS的DMEM/12培养基中于37 °C、5% CO₂孵箱常规培养,贴壁24 h后换液,加入含TGF- β 1的溶液,使其终浓度达到0, 0.1, 1, 10 ng/mL,即随机将细胞分为:对照组(0 ng/mL)、低浓度组(0.1 ng/mL)、中浓度组(1 ng/mL)、高浓度组(10 ng/mL)。各组细胞均于37 °C、5% CO₂孵箱中继续培养,每24 h更换相应的培养基,各组培养12, 24, 48, 72 h后进行检测。

1.2.2 倒置显微镜观察细胞形态学变化 在各观察时间点弃板内培养基, PBS洗2遍,倒置相差显微镜观察各浓度组细胞形态的变化。

1.2.3 荧光定量PCR检测SP-B及FSP1 mRNA的动态变化 于各时间按说明书提取各浓度组细胞总RNA,测定RNA浓度和纯度并根据总RNA浓度按说明书逆转合成cDNA,共20 μ L。引物序列由上海生工生物工程有限公司设计并合成,SP-B: F: 5'-TGC CCC TGG TTA TTG ACT ACT T-3', R: 5'-CCT GGA TTC TGT TCT GGC TTA G-3'; FSP1: F: 5'-TGT GTC CAC CTT CCA CAA ATA C-3', R: 5'-ACT TCA TTG TCC CTG TTG CTG T-3'; β -actin: F: 5'-CAC ACC GCC ACC AGT TCG-3', R: 5'-GTC CTT CTG ACC CAT TCC CAC C-3'。反应条件:第一步:95 °C 3 min;第二步:95 °C 10 s, 60 °C 30 s,共40个循环。溶解曲线分析:以0.5 °C/s变化速度从65 °C到95 °C每隔5 s计算一次荧光值。采用相对定量法,测定目的基因、校对基因及 β -actin的PCR产物的Ct值,代入公式 $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$ 。实验重复5次。

1.2.4 细胞免疫荧光双标法检测SP-B及FSP1蛋白的

动态变化 于各时间点取出各浓度组细胞爬片,4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS洗5 min×3次, 0.03% Triton X-100室温透膜10 min, PBS洗5 min×3次, 无关血清封闭45 min。甩掉血清后滴加山羊抗鼠SP-B(1:200)湿盒内4 °C过夜, PBS洗5 min×3次, 滴加CY3标记的抗山羊IgG(1:200), PBS洗5 min×3次, 无关血清封闭45 min。甩掉血清滴加兔抗鼠FSP1(1:400), 湿盒内4 °C过夜, PBS洗5 min×3次后滴加Alexa Fluor® 488标记抗兔IgG(1:100); PBS洗5 min×3次, DAPI(1:500)复染10 min, 漂洗, 抗淬灭封片剂封片。实验重复5次。激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照, SP-B结果显示红色荧光及FSP1显示绿色荧光为阳性细胞。

1.2.5 统计学分析 采用Graph Pad Prism 5.01统计学软件分析, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 数据组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AECII的形态学变化

对照组细胞伸展呈多边形或立方形, 细胞核明显, 细胞质内有大量反差明显的细小颗粒(AECII细胞特征性的板层小体), 细胞之间连接紧密; 24 h高浓度组及48 h中浓度组细胞变得较细长, 细胞内颗粒

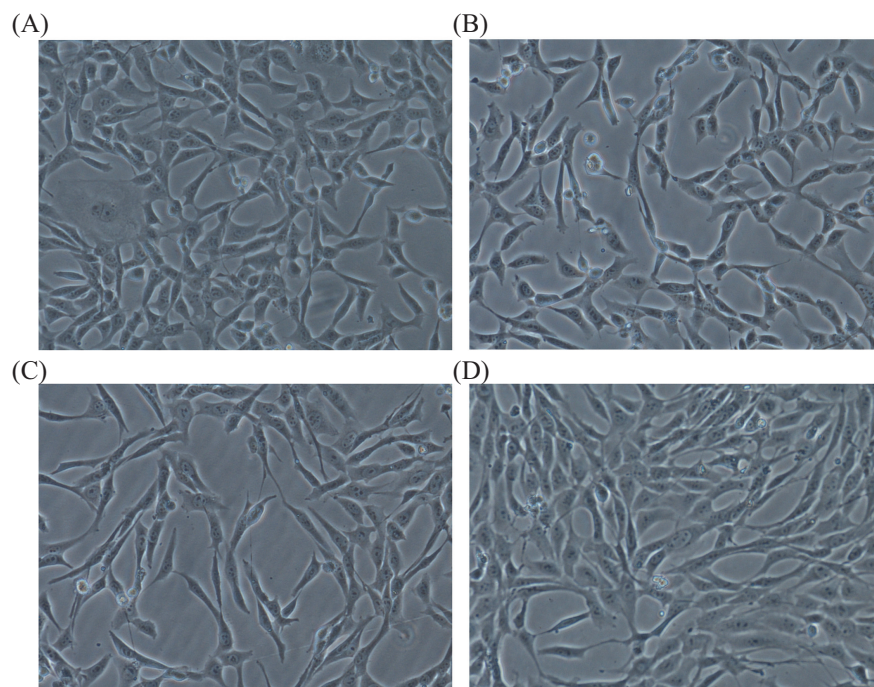
减少, 逐渐丧失AECII细胞特征性的板层小体; 72 h中、高浓度组细胞呈纺锤状或星形, 细胞之间连接不紧密; 低浓度组各时间点与对照组比较细胞形态变化不明显(图1)。

2.2 SP-B及FSP1 mRNA的动态变化

与对照组相比, 24 h高浓度组及48 h中浓度组SP-B mRNA表达显著下调($P<0.05$), 且随暴露时间的延长, SP-B mRNA表达下调更加明显($P<0.01$); 与低浓度组比较, 48, 72 h高浓度组及72 h中浓度组SP-B mRNA表达显著下调($P<0.05$)。同时, 24 h高浓度组及48 h中浓度组FSP1 mRNA表达较对照组显著上调($P<0.05$), 暴露时间延长至72 h, FSP1 mRNA表达上调明显($P<0.01$), 与低浓度组比较, 48, 72 h高浓度组及72 h中浓度组FSP1 mRNA表达显著上调($P<0.01$)。低浓度组与对照组、中浓度组与高浓度组比较各时间点SP-B及FSP1 mRNA的表达无统计学差异($P>0.05$)(图2)。

2.3 SP-B及FSP1蛋白免疫荧光的动态变化

对照组各时间点可见较强SP-B红色荧光的表达; 低浓度组各时间点SP-B表达较对照组变化不明显; 24 h高浓度组及48 h中浓度组SP-B的表达明显减弱, 72 h后其表达很微弱。对照组各时间点均见较

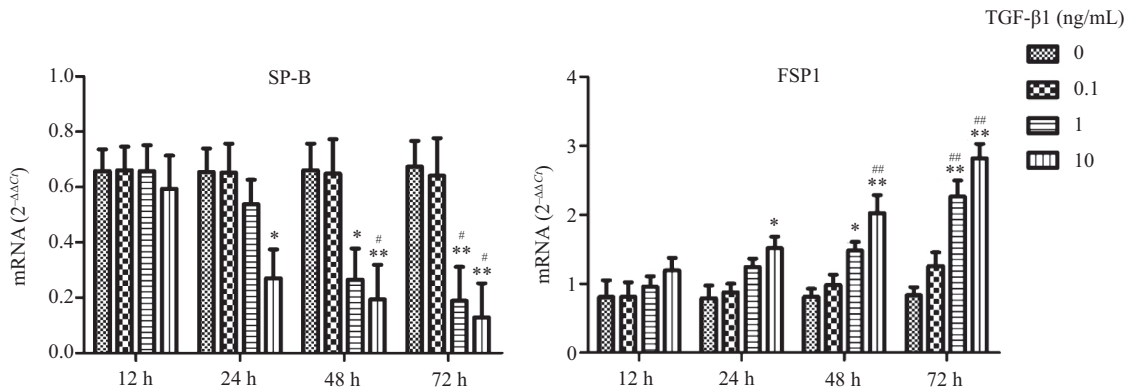


A: 对照组; B: 低浓度组; C: 中浓度组; D: 高浓度组。

A: control group; B: low concentration group; C: middle concentration group; D: high concentration group.

图1 48 h各浓度组AECII形态变化(200×)

Fig.1 The morphological changes of AECII in all groups for 48 hours (200×)



* $P < 0.05$, 与对照组比较; ** $P < 0.01$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与低浓度组比较; ## $P < 0.01$, 与低浓度组比较。

* $P < 0.05$ vs control groups; ** $P < 0.01$ vs control groups; # $P < 0.05$ vs low concentration group; ## $P < 0.01$ vs low concentration group.

图2 各浓度组各时间SP-B及FSP1 mRNA的表达情况

Fig.2 The expressions of SP-B and FSP1 mRNA in all groups

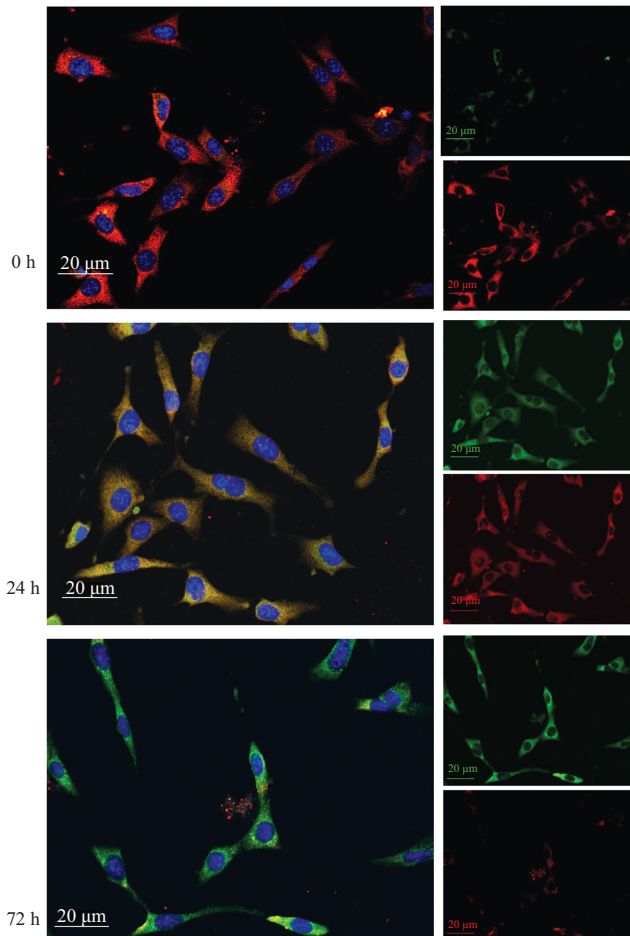


图3 0, 24, 72 h高浓度组SP-B及FSP1蛋白的免疫荧光观察

Fig.3 The double-labeled immunofluorescence expressions of SP-B and FSP1 protein with high concentration group for 0, 24 and 72 hours

弱的FSP1表达, 24 h高浓度组及48 h中浓度组FSP1表达较对照组增强, 72 h后FSP1的表达明显高于对照组。24 h高浓度组及48 h中浓度组可见明显的SP-B与FSP1共表达, 而对照组相应时间点未见SP-B及FSP1共表达存在(图3)。

3 讨论

随着围产医学的发展, 早产儿存活率提高, BPD的发病率也逐渐增加, 成为婴幼儿时期最常见的慢性呼吸系统疾病之一^[1]。BPD等慢性肺纤维化疾病中, 最重要的结构细胞为成纤维细胞, 它是细胞外基质异常沉积的最主要参与者, 但其来源尚未明确。上皮细胞具有极强的表型可塑性, 被认为是纤维化形成的主要参与者, 其面对外界刺激依据损伤的性质及程度选择不同的途径, 可以通过表皮细胞再生恢复正常的结构, 或发生细胞凋亡及纤维化的形成^[5]。上皮-间质转化(EMT), 是指在特定的病理、生理条件下完全分化的上皮细胞转化为具有间质表型的成纤维细胞/成肌纤维细胞的过程, 其对发育过程中的细胞分化及肿瘤的侵袭具有重要作用, 但其在肺损伤及纤维化中的确切作用目前仍不清楚^[3,6]。TGF-β是一种具有多种生物学活性的细胞因子, 通过影响细胞的增殖、分化、凋亡、运动及细胞外基质的产生来调节组织的形成和分化。其中, TGF-β在许多体外实验中证实能诱导多种上皮细胞发生EMT, 包括肾脏近端小管、晶状体及最近被认识的AECs^[7]。本研究结果显示, AECII在TGF-β1的干预下, 细胞形态逐渐变成纺锤体形状, 获得成纤维细胞样外观, 同

时,其自身标记SP-B表达逐渐减弱,成纤维细胞标记FSP1表达逐渐增强,研究中观察到不同来源的两类细胞共同表达,说明TGF- β 1在体外能诱导上皮类细胞AECII转变为成纤维细胞,即发生EMT。

TGF- β 1在多种细胞和组织包括肺组织中调节细胞外基质的重建,参与肺损伤和修复。Aoyagi-Ikeda等^[8]等研究显示,其主要是通过Smad依赖的方式发挥作用(主要是Smad3),也与非Smad依赖信号通路及特定的细胞环境有关。最近认为,在肺内AECs作为关键性的细胞类型调节病理性纤维化的形成,其通过释放各种调节性细胞因子改变细胞的形态及基因表达以适应损伤,从而调节纤维化的进程,其中,AECII被认为是肺泡上皮的干细胞。EMT主要表现为上皮细胞失去极性,丢失上皮标记物,并获得间质标记及侵袭表型,细胞黏附力下降,迁移和运动能力增加。通过检测SP-A、SP-B等表面活性蛋白、甲状腺转录因子(TTF-1)、连接相关的蛋白(ZO-1、E-cad),细胞角蛋白(cytokeratins)及 β -连环蛋白(β -catenin)等来标记AEC II及其他上皮类细胞^[9]。间质细胞表型标记物主要有N-钙黏蛋白(N-cadherin, N-cad)、波形蛋白(vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、成纤维细胞特异性蛋白1(fibroblast-specific protein 1, FSP-1)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)等^[10]。本研究观察不同浓度TGF- β 1作用下,AECII标记SP-B及间质细胞标记FSP-1的表达情况。结果显示,随着TGF- β 1浓度的提高及时间的延长,AECII发生EMT现象,且低浓度组与对照组、中浓度组与高浓度组比较各时间点SP-B及FSP1 mRNA的表达无统计学差异($P>0.05$),说明TGF- β 1对AECII的影响在一定浓度及时间范围内存在时间及浓度的依赖性,同时也说明TGF- β 1对细胞发挥何种作用(促进或抑制作用)主要与浓度阈值有关。Perez等^[11]研究

指出,TGF- β 1对细胞的作用可能与细胞种属类别及状态等有关。但EMT在纤维化疾病中的具体贡献及其转化的成纤维细胞/成肌纤维细胞的功能仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Steinhorn RH, Shaul PW, deRegnier RA, Kennedy KA. Inhaled nitric oxide and bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2011; 128(1): e255-6.
- 2 Sugahara K, Tokumine J, Teruya K, Oshiro T. Alveolar epithelial cells: Differentiation and lung injury. *Respirology* 2006; 11 Suppl: S28-31.
- 3 Sharma AK, Hubmayr RD. Epithelial to mesenchymal transition: A new twist to biotrauma? *Crit Care Med* 2012; 40(2): 682-3.
- 4 Kao HF, Chang-Chien PW, Chang WT, Yeh TM, Wang JY. Propolis inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human alveolar epithelial cells via PPAR γ activation. *Int Immunopharmacol* 2013; 15(3): 565-74.
- 5 Kalluri R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1417-9.
- 6 Cannito S, Novo E, di Bonzo LV, Busletta C, Colombatto S, Parola M. Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12(12): 1383-430.
- 7 Kolosova I, Nethery D, Kern J A. Role of Smad2/3 and p38 MAP kinase in TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of pulmonary epithelial cells. *J Cell Physiol* 2011; 226(5): 1248-54.
- 8 Aoyagi-Ikeda K, Maeno T, Matsui H, Ueno M, Hara K, Aoki Y, *et al.* Notch induces myofibroblast differentiation of alveolar epithelial cells via transforming growth factor- β -Smad3 pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45(1): 136-44.
- 9 Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, *et al.* E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 567305.
- 10 Willis B C, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: Mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(3): L525-34.
- 11 Perez RE, Navarro A, Rezaiekhalthigh MH, Mabry SM, Ekekezie II. TRIP-1 regulates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition of human lung epithelial cell line A549. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 300(5): L799-807.