

肺泡 II 型上皮细胞转分化

卢红艳* 常立文

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 武汉 430030)

摘要 哺乳动物肺泡上皮细胞主要由肺泡 II 型上皮细胞(AECII)和肺泡 I 型上皮细胞(AECI)组成。在肺发育和肺损伤修复过程中, AECII 可转分化为 AECI, 体外原代培养的 AECII 有这种转分化的特性。现对 AECII 转分化的标志、影响及调控因素及其在肺损伤中的作用进行综述。

关键词 肺泡 II 型上皮细胞; 肺泡 I 型上皮细胞; 转分化

细胞在特定生理和病理情况下发生的细胞形态、结构和功能改变称细胞表型转化, 包括去分化(defifferentiation)和转分化(transdifferentiation)。病理情况下发生的细胞表型转化对机体具有修复损伤或加重病变的双重细胞生物学意义。在各类细胞中, 肺泡 II 型上皮细胞(alveolar epithelial cell II, AECII)转分化为肺泡 I 型上皮细胞(alveolar epithelial cell I, AECI)不仅与肺发育有关, 而且在肺损伤修复过程中具有重要作用。在早产儿肺损伤中, AECII 转分化居于肺发育受阻及损伤修复的中心位置^[1]。关于 AECII 转分化的标志、影响及调控因素及其在肺损伤中的作用一直受到国内外学者广泛关注。

1 转分化的一般理论

一种已分化细胞转变为另一种正常分化细胞的现象称转分化。在分子水平上, 转分化发生在关键发育基因表达改变的基础上, 一些基因被诱导激活开放, 而另一些基因关闭, 这些基因决定胚胎的各个区域发育为成体的不同部分。通常转分化的研究对象具有以下特点^[2]: (1)能够明确转分化前后具有稳定表型的两种分化状态; (2)明确两种类型细胞之间的谱系关系; (3)被诱导分化的细胞易于形成克隆; (4)为能确定转分化前后细胞在新环境中的功能, 宜选择能被跟踪的细胞作为研究对象。在转分化研究中, 最重要的是需要有精确的方法跟踪细胞的变化, 包括细胞的分化状态、表型特征改变及表型转化现象等。在体外培养系统中, 可采用形态学如电镜直接观察, 当然最好用生物化学和分子生物学的实验依据, 如免疫荧光标记细胞特异性蛋白、分子探针等, 体内研究则需要有效的遗传标记。

2 AECII 转分化现象及转分化标志

2.1 AECII 转分化现象

高度分化的 AECII 转变为另一种高度分化细胞 AECI 的现象称 AECII 转分化。体外原代培养的 AECII 有这种转分化的特性, 随着培养时间推移, AECII 逐渐获得 AECI 样外观, 也开始表达 AECI 的特异标志, 同时失去了其板层体和 AECII 表型的标志。

在急性肺损伤修复过程中, AECII 可转分化为 AECI。Evans 等^[3]采用 ³H 标记的脱氧胸腺嘧啶(³H-T)掺入技术观察了 NO₂ 造成大鼠急性肺损伤后不同上皮细胞数量的改变。在注射 ³H-T 后 1 h, 上皮层内被标记的细胞 88% 为 AECII, AECI 不足 1%; 24 h 后, 标记的 AECII 减少到 60% 以下, 介于 AECII 和 AECI 之间的细胞占到 40% 左右; 至第 3 天, AECI 明显增多, 同时伴有中间细胞数量锐减。这种细胞数量上的消长提示: 在急性肺损伤修复过程中, 存在 AECII 向 AECI 转分化。Clegg 等^[4]在金葡菌诱导的大鼠急性肺损伤模型中, 发现一种中间细胞, 这种细胞不仅表达 AECII 的特异标志, 而且表达 AECI 的特异标志, 这种双阳性细胞可以用来鉴定肺损伤后 AECII 向 AECI 的转分化。

在肺发育过程中是否存在 AECII 转分化现象尚有分歧。卢晓晔等^[5]在小鼠肺泡发育与肺上皮细胞分化的电镜观察中了解到: 胚胎 19 天小鼠肺内形成大量原始肺泡, 原始肺泡上皮细胞内出现含板层小体的 AECII, 且大部分原始肺泡细胞为 AECII。小

收稿日期: 2005-07-08 接受日期: 2005-08-12

国家自然科学基金资助项目(No 30471824)。

* 通讯作者。Tel: 027-62745962, E-mail: lhy5154@163.com

鼠出生时, 由于肺的膨胀, 宫内外环境急骤改变, 肺泡上皮细胞系列调整, 出现一些较 AECII 略扁的中间细胞, 且随肺的发育其数量逐渐减少, 而 AECI 数目逐渐增加, 提示在肺发育过程中可能存在向 AECI 转变的 AECII。宫内向宫外转变过程中这种肺泡上皮细胞的表型转换, 有利于机体形成具有气体交换功能的气血屏障, 以适应出生后呼吸功能需要。然而孔祥永等^[6]的报道与上述结果并不一致, 他们在胎儿胎肺的发育过程中未发现向 AECI 转变的 AECII, 两种肺泡上皮细胞在胎肺发育过程中几乎同时出现, 提示这两种上皮细胞可能来源于同一种祖细胞或干细胞。由此可见, 肺发育过程中是否存在 AECII 转分化尚有待进一步研究。

2.2 AECII 转分化的标志

研究 AECII 转分化, 必需明确 AECII 转分化前后两种类型细胞的谱系关系及细胞表型特征。哺乳动物肺泡上皮细胞主要由 AECII 和 AECI 组成。在正常细胞更新和损伤修复过程中, AECII 可分化为 AECI, 也可通过有丝分裂补充自身的数量, 因此 AECII 被认为是肺泡上皮细胞的干细胞^[7]; AECI 由于其形态上的限制, 一般认为无分裂增殖能力, 但近年有报道发现: 体外培养时, AECI 也可反分化为 AECII^[8]。

AECII 转分化的标志可概括为以下几点: (1) 细胞形状改变: AECII 胞体较小, 呈圆形或立方形, 胞核圆, 电镜下观察, 细胞游离面有少量微绒毛, 胞质内细胞器丰富, 核上方有较多分泌颗粒, 即板层体。AECI 宽大扁薄, 呈鳞形, 胞核伸展, 细胞器少, 胞质内有较多吞饮小泡。AECII 转分化时, 其胞体逐渐伸展表现为 AECI 样外观; (2) AECII 特征性板层小体消失; (3) 表达 AECI 的特异标志: 如 T1 α ^[9]、RT1₄₀^[10]、AQP5^[11]、小窝蛋白 (caveolin)-1^[12]等。(4) AECII 特异标志减弱或消失: 完全分化的 AECII 最有特征的表型标志是表达表面活性蛋白 (SP-A、SP-B、SP-C、SP-D)^[13], 其他 AECII 的表型标志还有 RTII70^[14]、Lbm180^[15]等。

AECII 转分化为 AECI 后, 其形态、表型及功能均已发生改变。

3 调控 AECII 转分化的因素

目前 AECII 转分化实验主要在体外进行, 多种因素可影响 AECII 表型转换, 主要包括 AECII 的培养基质、上皮细胞与成纤维细胞的相互作用、

AECII 的接种密度、机械因素及一些生长因子等。

3.1 AECII 与基质的相互作用

上皮-基质相互作用调控了胎肺的形态发生和分化。以前研究调控 AECII 的分化功能一直是在纯的 AECII 中进行, 这些研究中比较一致的结论是: AECII 在塑料基底中培养很快失去了其分化功能标志, 开始表达 AECI 的表型标志。在这种培养环境下, 失去了细胞所需细胞-基质的相互作用, AECII 转分化为 AECI。可见哺乳动物上皮细胞体外培养时要保留它们的细胞表型, 高度依赖于细胞培养的基质。AECII 在鼠尾胶中培养可保留其特异的细胞表型; 在肿瘤基底膜中培养, 培养的第 4 天, AECII 形态与板层体结构保留完好, 含更多分化 AECII 的特性, AECII 中磷脂合成及 SP-A、SP-B、SP-C mRNA 水平增加^[16]; AECII 在 Matrigel 包被的细胞培养基中生长也能保留其立方体结构并克隆样生长^[17]。Matrigel 含丰富的层黏连蛋白、IV 型胶原和其他基质成份, AECII 在 Matrigel、肿瘤基底膜、鼠尾胶中培养, 重建了细胞所需的细胞-基质的相互作用, 因此 AECII 保留了活性的立方体结构和细胞表型, 由此可见, AECII 表型转换受细胞外基质调节。

3.2 AECII 与成纤维细胞相互作用

在肺发育和修复过程中, 肺上皮细胞与肺成纤维细胞 (lung fibroblast, LF) 通过基底膜间隙紧密接触。正常肺组织的超微结构研究证实, AECII 通过上皮足突穿越基底膜与肺间质成纤维细胞相联系。AECII 与 LF 直接接触可能是调控肺上皮细胞表型转化的重要前提。为了观察上皮细胞和成纤维细胞的紧密接触是否影响了 AECII 的代谢和表型, Shannon 等^[18]将 AECII 与 LF 共培养, 发现共培养组较 AECII 单独培养组 AECII SP-A、SP-B、SP-C、SP-D mRNA 水平明显增加, 肺表面活性物质中磷脂的生物合成增加了 10 倍, 且保留了 AECII 良好的立方体结构。这说明, 上皮细胞与成纤维细胞相互作用, 有助于保留 AECII 的功能及表型, 抑制 AECII 转分化。

3.3 AECII 接种密度对 AECII 转分化的影响

为了明确 AECII 接种密度是否影响 AECII 转分化, Reynolds 等^[19]将 AECII 以 5×10^4 、 2×10^5 、 4×10^5 、 8×10^5 、 12×10^5 等接种密度分别接种于 96 孔板, 发现: 在培养的第 8 天, 4×10^5 接种密度的 AECII 能较好保留其细胞形状、板层体结构、碱性磷酸酶 (远端气道和肺泡上皮的标志) 和 γ 谷氨酰转肽酶 (AECII 和 Clara 细胞的标志) 活性, 仅低表达

RT1₄₀, 认为低密度接种有利于 AECII 伸展, AECII 向 AECI 转分化, 但高于 4×10^5 的接种密度对保留 AECII 表型及活性并无益。

3.4 机械因素对 AECII 表型转换的影响

Flecknoe 等^[20]采用气道梗阻的方式使胎羊形成机械性肺膨胀, 用电镜观察 AECII 和 AECI 比例, 发现随梗阻时间延长, AECII 逐渐减少, 而形态介于 AECII 和 AECI 的中间细胞增多, 并逐渐向 AECI 转变, 而减轻肺膨胀即机械收缩可增加 AECII 比例, 减少 AECI 比例, 且 SP-A、SP-B、SP-C mRNA 水平增加^[21], 提示机械因素也影响 AECII 转分化。

3.5 其他调控因素

角化细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)是上皮丝分裂素, 在许多不同组织可通过旁分泌调节基质与上皮的相互作用。AECII 在无 KGF 的培养基中生长, 培养第 8 天, AQP5 表达明显增加, SP-A、SP-B、SP-C 表达明显减少, AECII 丧失其板层体并向 AECI 转变, 而 AECII 在含 KGF 的培养基中生长情形恰好相反, 说明 KGF 具有调节 AECII 表型转换的作用^[22]。

转铁蛋白在下呼吸道抗菌抗氧化中有重要作用, 其在肺黏膜上皮表面含量高于血浆。原代培养的 AECII 其转铁蛋白受体水平较高, 随着培养时间延长, AECII 向 AECI 转分化, AECII 表面转铁蛋白受体减少。用 I¹²⁵ 标记该受体, 发现其受体定位于 AECII 表面, 而 AECI 表面无此受体表达, 表明转铁蛋白受体可能参与 AECII 转分化^[23], 但具体机制并不清楚。

与 AECII 不同, AECI 下的基底层含高度硫酸化的硫酸乙酰肝素蛋白多糖(proteoglycans, PGs)。研究表明^[24]: PGs 抑制剂氯酸钠抑制 AECII 转分化, 而这种抑制可由硫酸钠逆转。硫酸乙酰肝素在合成过程中, 需要 N-脱乙酰/磺基转移酶(N-deacetylase/sulfotransferase, NST), 上调 NST 导致培养的 AECII 伸展, 说明 NST 调控的高度硫酸化的 PGs 与 AECII 向 AECI 转分化密切相关。

其他如甲状旁腺激素相关蛋白、糖皮质激素、小窝蛋白-1 等也调控了 AECII 转分化。

4 AECII 转分化的细胞信号转导调控

正常上皮细胞形态功能的维持有赖于适当的细胞内信号传递与细胞间通讯。研究发现, 不同程度的上皮细胞表型转化或转分化都是由精确的细胞内

信号转导机制调控。尽管不同疾病的病理改变各异, 缺血、缺氧、高氧等应激及辐射等病理生理过程不同, 然而, 调控上皮细胞表型转化的信号通路是基本相似的。各种启动信号与细胞膜表面的特异受体结合, 或经过特殊结构整合将启动信号转入细胞内, 而细胞内的 Ras、Rho、Src、PI₃、Smad、Wnt、激酶等信号转导通路均参与上皮细胞表型转化过程的调控, 不同信号通路活化不同的核内转录因子, 最终调节特异基因的表达。近年发现, Notch 受/配体信号系统可决定肺泡上皮细胞转分化方向, 从而在肺发育及肺损伤修复中起重要作用^[25]。Notch 信号途径介导的细胞间相互作用的本质特征在于相邻细胞受、配体表达不同: 由同型细胞组成的细胞群中, 使某些细胞定向分化, 周围细胞向另一方向分化或保持未分化状态(即侧向分化或抑制作用); 由不同型细胞组成的细胞群中, 使细胞进入下一分化阶段(即信号诱导作用)。尽管各种细胞信号转导调控上皮细胞转分化的机制已有较深入的研究, 但它们如何调控 AECII 转分化? 这方面的研究国内外仍较少。

5 AECII 转分化与肺损伤修复

在肺泡上皮损伤情况下, AECII 能通过分裂、脱颗粒而转化为 AECI, 从而修复损伤的肺泡上皮^[26]。有效的肺泡上皮修复能抑制肺纤维化的发展, 因为完整的肺上皮层抑制了肺成纤维细胞的增殖和基质的沉积, 而肺损伤后肺上皮化受阻则导致肺纤维化增加。在肺损伤后的上皮修复过程中, AECII 通过增殖再生肺泡上皮细胞, 然而 AECII 增殖需要 2 天后起作用, 因此, 在损伤早期应有其他的修复机制。体外研究表明: 原代培养的 AECII 通过伸展转化为 AECI 来弥补受损的 AECI, 完成有效的上皮损伤修复, 这可能是肺损伤修复的早期机制。若 AECII 向 AECI 转变受阻, 肺泡表面 AECI 缺乏, 肺泡上皮分布异常, 导致肺泡功能障碍。慢性肺损伤由于致病因素持续作用, AECII 不断增殖, AECII 向 AECI 转分化失去调控, 导致细胞过度增殖肥大, 并产生细胞因子、炎症趋化因子、细胞黏附分子等, 这一过程中同时也可发生脂成纤维细胞向肌成纤维细胞的转分化, 进一步促进肺纤维化形成^[27]。

目前, 对 AECII 转分化在发育期肺损伤修复中的作用研究甚少, 基质和信号转导通路调控胎肺

AECII 转分化的分子机制尚有待进一步研究。但随着细胞生物学、分子生物学的进展和人们对 AECII 转分化认识的不断提高, AECII 转分化在肺发育肺损伤中的作用会日见明朗。

参考文献 (References)

- [1] Bishop AE. *Cell Prolif*, 2004, **37**: 89
- [2] Slack JM *et al.* *Curr Opin Genet Dev*, 2001, **11**: 581
- [3] Evans MJ *et al.* *Am J Pathol*, 1973, **70**: 175
- [4] Clegg GR *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, **289**: L382
- [5] 卢晓晔等. *解剖学研究*, 2000, **22**: 10
- [6] 孔祥永等. *第一军医大学学报*, 2004, **24**: 72
- [7] Uhal BD. *Am J Physiol*, 1997, **272**: L1031
- [8] Flecknoe SJ *et al.* *J Physiol*, 2002, **542**: 245
- [9] Borok Z *et al.* *Am J Physiol*, 1998, **275**: 155
- [10] McElroy MC *et al.* *Am J Physiol*, 1997, **273**: L1228
- [11] Verkman AS *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **278**: L867
- [12] Campbell L *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **262**: 744
- [13] Weaver TE *et al.* *Biochem J*, 1991, **273**: 249
- [14] Boylan GM *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, **280**: L1318
- [15] Zen K *et al.* *Am J Physiol*, 1998, **275**: L172
- [16] Demayo F *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, **283**: L510
- [17] Isakson BE *et al.* *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, **281**: C1291
- [18] Shannon JM *et al.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, **24**: 235
- [19] Reynolds LJ *et al.* *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, **31**: 951
- [20] Flecknoe SJ *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **287**: L1207
- [21] Gutierrez JA *et al.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, **29**: 81
- [22] Borok Z *et al.* *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, **18**: 554
- [23] Widera A *et al.* *Cell Tissue Res*, 2003, **312**: 313
- [24] Li ZY *et al.* *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **279**: L292
- [25] Dang TP *et al.* *Oncogene*, 2003, **22**: 1988
- [26] Neuringer IP *et al.* *Respir Res*, 2004, **5**: 6
- [27] Torday JS *et al.* *Pediatr Pathol Mol Med*, 2003, **22**: 189

Alveolar Epithelial Cell II Transdifferentiation

Hong-Yan Lu*, Li-Wen Chang

(Department of Pediatrics, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan430030, China)

Abstract The mammalian pulmonary alveolar epithelium is comprised of two types of cells, called alveolar epithelial cell II (AECII) and alveolar epithelial cell I (AECI). AECII can transdifferentiate into AECI to repair damaged epithelium after lung injury or during fetal lung development. AECII grown in primary culture can be observed to undergo such a transition *in vitro*. This review hereby summarizes the presentation, influences and regulation of AECII transdifferentiation and its roles in lung injury.

Key words alveolar epithelial cell II; alveolar epithelial cell I; transdifferentiation

Received: July 8, 2005 Accepted: August 12, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471824)

*Corresponding author. Tel: 86-27-62745962, E-mail: lhy5154@163.com