

· 基础研究 ·

DOI: 10.13498/j.cnki.chin.j.ecc.2021.02.10

肺泡巨噬细胞来源的微囊泡对肺损伤的作用

张蓝予, 秦春妮, 梁 影, 陈书弘, 黑飞龙

[摘要]:目的 探究肺泡巨噬细胞来源微囊泡(microvesicles, MVs)对肺损伤的作用。方法 培养小鼠肺泡巨噬细胞,通过梯度离心法获取磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)或脂多糖刺激的肺泡巨噬细胞来源的 MVs,并经透射电镜、纳米粒径追踪技术及蛋白免疫印迹进行鉴定。经气管内给予肺泡巨噬细胞来源的 MVs,观察小鼠肺组织变化情况,并经蛋白免疫印迹探究肺组织中紧密连接相关蛋白的表达变化。结果 透射电镜发现 MVs 呈现 sharp 结构,纳米粒径追踪显示 MVs 粒径集中于 100~200 nm,并且其表达 CD63、CD68 及 ALIX 标志物。苏木精-伊红染色发现脂多糖刺激的肺泡巨噬细胞来源的 MVs 可刺激小鼠发生肺损伤,并降低紧密连接相关蛋白闭合小环蛋白、咬合蛋白及闭合蛋白的表达。结论 炎性肺泡巨噬细胞来源的 MVs 可导致肺损伤并降低肺部紧密连接相关蛋白的表达,肺泡巨噬细胞来源的 MVs 参与肺损伤的发生发展。

[关键词]: 肺泡巨噬细胞;肺损伤;微囊泡;紧密连接相关蛋白

The effect of alveolar microvesicles derived from macrophages on lung injury

Zhang Lanyu, Qin Chunni, Liang Ying, Chen Shuhong, Hei Feilong

Department of Cardiopulmonary Bypass, State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, National Center for Cardiovascular Diseases, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 100037 Beijing, China

Corresponding author: Hei Feilong, Email: heifeilong@126.com

[Abstract]: Objective To explore the effect of microvesicles (MV) derived from alveolar macrophages on lung injury. **Methods** Mouse alveolar macrophages were cultured. MVs derived from alveolar macrophages stimulated by PBS or lipopolysaccharide were obtained by gradient centrifugation and identified by transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA) and western blotting. MVs derived from alveolar macrophages were administered intratracheally to observe the changes in mouse lung tissue. The expressions of tight junction-related proteins in lung tissue were explored by western blotting. **Results** TEM showed that the MVs exhibited a sharp structure, and NTA showed that the MVs were concentrated in 100–200nm. The CD63, CD68 and ALIX markers were expressed on MVs. Hematoxylin-eosin staining showed that MVs derived from lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages could induce lung injury in mice and reduced the expressions of tight junction-related proteins ZO-1, Occludin and Claudin-5. **Conclusion** MVs derived from inflammatory alveolar macrophages could induce lung injury and reduce the expressions of tight junction-related proteins in lungs. MVs derived from alveolar macrophages participate in the development of lung injury.

[Key words]: Alveolar macrophage; Lung injury; Microvesicle; Tight junction-related protein

急性肺损伤发生率较高,感染、创伤、机械通气及体外循环等均可导致急性肺损伤^[1-3],中重度肺损伤的死亡率超过 40%^[4],新冠肺炎所致重度肺损

伤为致死的重要因素之一。然而肺损伤的发病机制仍不十分明确。

细胞外囊泡是细胞间的沟通桥梁,包括凋亡小体、微囊泡(microvesicles, MVs)及外泌体,其在机体中的作用得到越来越广泛的关注。新近研究表明肺损伤期间肺泡灌洗液中含有大量胞外囊泡^[5]。在肺损伤早期,巨噬细胞来源的胞外囊泡占据 60%^[5]。而其中, MVs 为巨噬细胞产生的主要胞外囊泡类型^[5-6]。但 MVs 对肺损伤的作用及机制仍待研究。因而本研究拟通过获取肺泡巨噬细胞来源

基金项目:国家自然科学基金(81670077);北京协和医学院创新基金(2019-1002-50)

作者单位:100037 北京,中国医学科学院 北京协和医学院 国家心血管病中心 心血管疾病国家重点实验室 阜外医院 体外循环中心[张蓝予、梁 影、陈书弘(研究生)]

通信作者:黑飞龙, Email: heifeilong@126.com

的 MVs 探究其对肺损伤的作用及潜在机制,拟为肺损伤提供基于胞外囊泡治疗新方向的参考。

1 材料与方法

1.1 肺泡巨噬细胞的培养 小鼠肺泡巨噬细胞系(mouse alveolar macrophage cell, MHS)(ATCC 公司),经 RPMI-1640 培养基中添加 10% 胎牛血清(Gibco, 美国)及 1% 双抗于 T225 培养瓶(Corning, 美国)中培养。培养箱条件:37℃, 5% CO₂。待细胞量长至 10⁸, 更换为去除囊泡的完全培养基并给予脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS, Sigma Aldrich, 美国) 100 μg/L 或等量磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)刺激 1 h。

1.2 提取肺泡巨噬细胞来源的 MVs^[6] 收集刺激后的细胞上清,放入离心机(赛默飞, 美国), 300 g 4℃ 离心 10 min 后,弃沉淀,上清液再次 2 000 g 4℃ 离心 20 min,弃沉淀,上清移入高速离心管中,放入高速离心机(贝克曼, 美国)继续 20 000 g 4℃ 离心 30 min,离心后弃上清,PBS 重悬沉淀于 20 000 g 4℃ 再次离心 30 min,重复一次 PBS 清洗,最终沉淀于 PBS 重悬保存。

1.3 肺泡巨噬细胞来源的 MVs 的鉴定 采用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察 MVs 形态,纳米粒径追踪技术(nanoparticle tracking analysis, NTA)观测 MVs 数量及粒径分布。

1.4 实验分组及处理 将 C57/BL6 小鼠随机分为三组:①PBS 组(PBS 气管内刺激,剂量为 50 μl, n=4);②Control-MV 组(PBS 刺激的肺泡巨噬细胞来源的 MVs 经气管内刺激小鼠,剂量为 50 μg/50 μl, n=4);③LPS-MV 组(LPS 刺激的肺泡巨噬细胞来源的 MVs 经气管内刺激小鼠,剂量为 50 μg/50 μl, n=4)。分别作用 4 h 后获取小鼠肺组织。

1.5 肺损伤评估 评分内容为肺间质水肿、肺泡水肿、肺泡充血、中性粒细胞浸润,病变程度为:0 分-无病变或极轻度病变;1 分-轻度病变;2 分-中度病变;3 分-重度病变;4 分-极重度病变。

1.6 蛋白免疫印迹 提取 MVs 蛋白和肺组织蛋白后,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,后将蛋白转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶(TBST 配制),封闭 1 h, TBST 清洗 3 次后孵育一抗 4℃ 过夜:CD63(1:800), CD68(1:800) 及 ALIX(1:1 000), 闭合小环蛋白(ZO-1, 1:800), 咬合蛋白(Occludin, 1:1 000), 闭合蛋白(Claudin-5, 1:800), 内参(GAPDH, 1:1 000); TBST 清洗 PVDF 膜三次后,孵育二抗 90 min; TBST 清洗后进行电化学发光法显影,采用 image J 对各蛋白进行含量分析。

1.7 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件处理数据,符合正态分布的数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺泡巨噬细胞来源的 MVs 提取与鉴定 经梯度离心获取 MVs, TEM 鉴定 MVs 形态(图 1), NTA 发现 MVs 粒径峰值集中于 100~200 nm(图 1), 蛋白免疫印迹发现 MVs 表达 CD63、CD68 及 ALIX(图 2)。

2.2 肺泡巨噬细胞来源的 MVs 致小鼠肺损伤 HE 染色显示,与 PBS 组及 Control-MV 组相比, LPS-MVs 刺激的肺组织呈现明显间质水肿及炎性细胞浸润,且肺损伤评分更高($P < 0.05$, n=4, 图 3)。

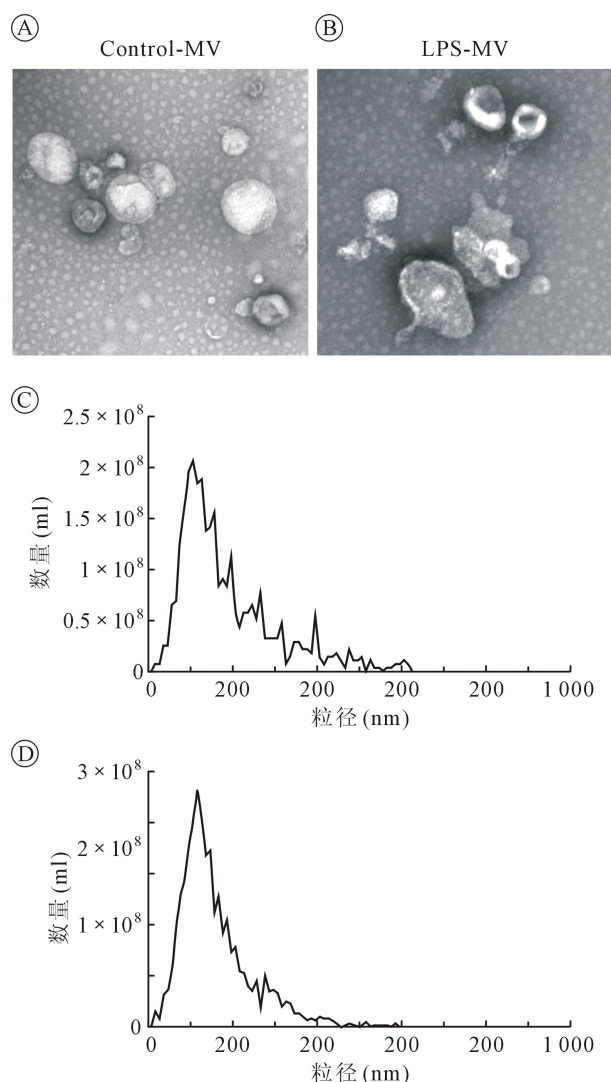


图 1 巨噬细胞来源的 MVs 的鉴定

注:A:Control-MV 组 MVs 电镜;B:LPS-MV 组 MVs 电镜;
C:Control-MV 组粒径分布;D:LPS-MV 组粒径分布

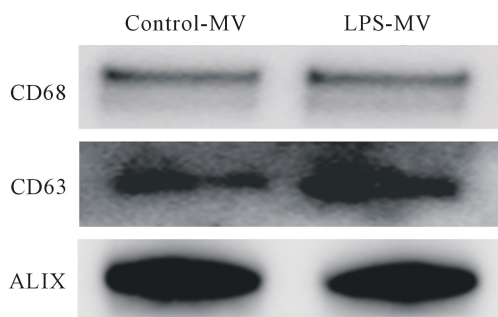


图2 巨噬细胞来源的 MVs 表面标志物表达

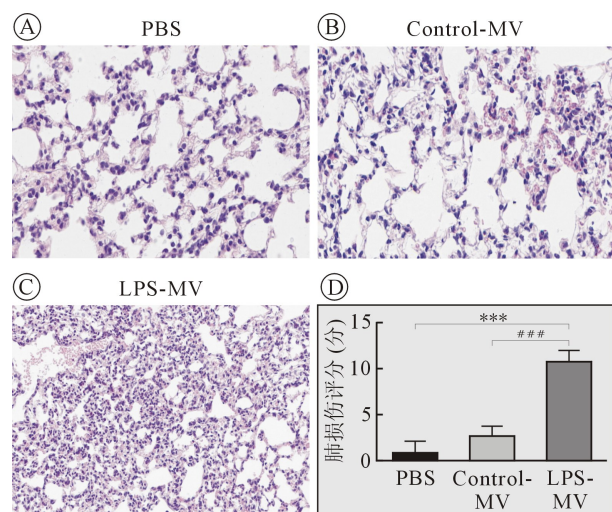


图3 巨噬细胞来源 MVs 对肺损伤的作用

注:A:PBS 组肺组织形态;B:Control-MV 组肺组织形态;
C:LPS-MV 组肺组织形态;D:与 PBS 组相比较^{***} $P < 0.001$;与 Control-MV 组相比较^{###} $P < 0.001$

2.3 肺部连接蛋白 (tight junction, TJ) 的表达 蛋白免疫印迹结果表明,相比 PBS 组及 Control-MV 组,LPS-MV 组的肺组织 TJ 的 ZO-1, Occludin 及 Claudin-5 的表达均降低 ($P < 0.05, n = 4$,图 4)。

3 讨论

炎性细胞在急性肺损伤的发展过程中占据重要地位,而肺泡巨噬细胞是肺部对抗刺激的第一道防线,也是肺组织中占主导地位的免疫细胞^[7]。肺损伤发生后,肺部细胞均可分泌胞外囊泡,例如肺泡巨噬细胞、肺上皮细胞、肺血管内皮细胞及中性粒细胞等^[8],研究发现肺泡灌洗液中存在大量上述细胞分泌的胞外囊泡^[5],但不同时期胞外囊泡的主要来源有所不同。在感染所致急性肺损伤早期,肺泡巨噬细胞激活,分泌大量 MVs,其作为生物介质载体,在肺部细胞间起着传递作用。

小鼠原代肺泡巨噬细胞难以大量获取,本项研

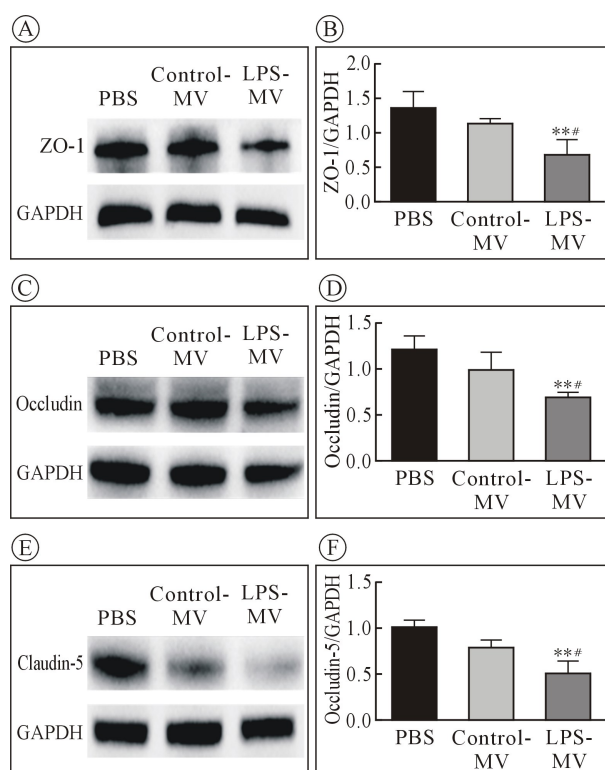


图4 巨噬细胞来源的 MVs 对紧密连接相关蛋白表达的影响

注:ZO-1:闭合小环蛋白;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;Occludin:咬合蛋白;Claudin-5:闭合蛋白;与 PBS 组相比较^{*} $P < 0.01$;与 Control-MV 组相比较[#] $P < 0.05$

究采用大量培养 MHS 以获取足量 MVs。本项研究发现 MHS 培养过程中可产生大量的 MVs,LPS 刺激肺泡巨噬细胞后产生的 MVs 可导致正常小鼠发生肺损伤。MVs 根据巨噬细胞的不同活性在胞内主动包裹较多生物活性物质,并将其携带进入其它细胞或组织。研究表明巨噬细胞来源的 MVs 早期携带较多肿瘤坏死因子蛋白及 microRNA 等^[6,9-10]。MVs 可被邻近的肺上皮细胞及肺血管内皮细胞等吸收,通过携带的活性介质影响其它细胞活性。Soni 等^[6]发现肺泡巨噬细胞来源的 MVs 可增加小鼠肺上皮细胞的细胞间黏附分子-1 及角化细胞来源细胞因子的表达,影响上皮细胞活性。而 Zhang 等^[10]通过对炎性肺泡巨噬细胞来源的 MVs 中 microRNA 的探究发现肺泡巨噬细胞来源的 miR-223/142 可抑制肺部炎性小体活性。表明炎性肺泡巨噬细胞来源的胞外囊泡包裹的生物活性物质既包括损伤性因子,也存在保护性物质。此外,巨噬细胞来源的胞外囊泡在各类疾病,如心肌损伤、肾损伤、关节炎等均扮演着重要角色^[6,9,11]。新近研究亦考虑将肺泡巨噬细胞来源的 MVs 作为肺损伤的标志

物^[10],因其作为细胞特异性载体,可促进蛋白及 miRNAs 的传递,为肺损伤的标志物探究提供可能性。此外,新近研究也发现干细胞来源的胞外囊泡对肺损伤存在治疗作用^[12]。

紧密 TJ 由 Occludin、Claudins-5 及 ZO-1 等组成,其在肺泡内皮屏障间起着重要作用^[13]。肺泡上皮细胞或内皮细胞 Occludin、ZO-1 等蛋白表达的减少通常导致肺血管通透性增加,导致肺损伤或水肿。本项研究中发现 LPS 刺激后的巨噬细胞来源的 MVs 减少了肺组织 Occludin、Claudin-5 及 ZO-1 的蛋白表达,但对照组 MVs 未对 TJ 蛋白的表达造成影响,这可能是炎性巨噬细胞来源的 MVs 引发肺损伤的原因之一。据报道肺组织的 TJ 的表达受到炎症反应的影响^[14]。巨噬细胞来源的 MVs 可携带炎症因子进入肺上皮细胞、血管内皮细胞及细胞间隙^[15],可能以此途径降低 TJ 的表达。

综上所述,炎性巨噬细胞可产生大量 MVs,影响肺部 TJ 的表达,并可对肺组织造成损伤。MVs 作为细胞间的沟通桥梁,其在肺损伤中的作用机制并未完全明确,仍待更深入地机制探讨。

参考文献:

- [1] Huffmyer JL, Groves DS. Pulmonary complications of cardiopulmonary bypass[J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2015, 29(2): 163-175.
- [2] Madahar P, Beitler JR. Emerging concepts in ventilation-induced lung injury[J]. F1000Res, 2020, 9(F1000 Faculty Rev):222.
- [3] 张晓阳,路丽明,李欣. 调节性 T 细胞和辅助性 T 细胞与体外循环后肺损伤相关性的研究[J]. 中国体外循环杂志, 2017, 15(2): 81-85.
- [4] Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries[J]. JAMA, 2016, 315(8): 788-800.
- [5] Lee H, Zhang D, Laskin DL, et al. Functional evidence of pulmonary extracellular vesicles in infectious and noninfectious lung inflammation[J]. J Immunol, 2018, 201(5): 1500-1509.
- [6] Soni S, Wilson MR, O'Dea KP, et al. Alveolar macrophage-derived microvesicles mediate acute lung injury[J]. Thorax, 2016, 71(11): 1020-1029.
- [7] Fan EKY, Fan J. Regulation of alveolar macrophage death in acute lung inflammation[J]. Respir Res, 2018, 19(1): 50.
- [8] Lee H, Abston E, Zhang D, et al. Extracellular vesicle: an emerging mediator of intercellular crosstalk in lung inflammation and injury[J]. Front Immunol, 2018, 9: 924.
- [9] Ye C, Li H, Bao M, et al. Alveolar macrophage-derived exosomes modulate severity and outcome of acute lung injury[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(7): 6120-6128.
- [10] Zhang D, Lee H, Wang X, et al. A potential role of microvesicle-containing miR-223/142 in lung inflammation[J]. Thorax, 2019, 74(9): 865-874.
- [11] Milbank E, Soleti R, Martinez E, et al. Microparticles from apoptotic RAW 264.7 macrophage cells carry tumour necrosis factor- α functionally active on cardiomyocytes from adult mice[J]. J Extracellular Vesicles, 2015, 4: 28621.
- [12] 鞠志海,王晨,马金辉,等. iPSC 外泌体载体肺血管内皮细胞及肺泡 II 型上皮细胞摄入研究[J]. 中国体外循环杂志, 2016, 14(1): 46-48.
- [13] Herrero R, Prados L, Ferruelo A, et al. Fas activation alters tight junction proteins in acute lung injury[J]. Thorax, 2019, 74(1): 69-82.
- [14] Wittekindt OH. Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation[J]. Pflugers Arch, 2017, 469(1): 135-147.
- [15] Kubo H. Extracellular vesicles in lung disease[J]. Chest, 2018, 153(1): 210-216.

(收稿日期:2020-11-04)

(修订日期:2020-12-10)

(上接第 107 页)

- [1] 王红,杨峰,贾明,等. 成人体外循环脱机困难的体外膜式人工肺氧合治疗单中心早期临床结果[J]. 心肺血管病杂志, 2014, 33(6): 844-848.
- [2] Lombard FW, Grichnik KP. Update on management strategies for separation from cardiopulmonary bypass[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2011, 24(1): 49-57.
- [3] Sherwin ED, Gauvreau K, Scheurer MA, et al. Extracorporeal membrane oxygenation after stage 1 palliation for hypoplastic left heart syndrome[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 144(6): 1337-1343.
- [4] Misfeldt AM, Kirsch RE, Goldberg DJ, et al. Outcomes of single

-ventricle patients supported with extracorporeal membrane oxygenation[J]. Pediatr Crit Care Med, 2016, 17(3): 194-202.

- [5] 曲志华,代萌,吴佳铭,等. 机械通气下肺血流灌注状况的电阻断层成像评估新方法研究[J]. 中国医疗设备, 2019, 34(1): 6-9.
- [6] Stephens EH, Shakoor A, Jacobs SE, et al. Characterization of extracorporeal membrane oxygenation support for single ventricle patients[J]. World J Pediatr Congenit Heart Surg, 2020, 11(2): 183-191.

(收稿日期:2020-10-20)

(修订日期:2021-01-21)