

呼吸与危重症

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001787

PBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞的影响及
对 ARDS 发病机制的研究王熙宇¹, 周发春¹, 罗子国², 刘欣¹, 刘畅¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院重症医学科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨前 B 细胞克隆增强因子(pre-B cell colony enhancing factor, PBEF)在急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)发病机制中的作用。**方法:**体外培养人肺微血管内皮细胞株(HPMEC)和人肺泡 II 型上皮细胞株(A549), 采用不同浓度(0、50、100、500、1 000、2 000 ng/mL)重组人 PBEF(rPBEF)分别作用于细胞, 采用四甲基偶氮唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法检测细胞活性。选用 100 和 1 000 ng/mL rPBEF 刺激细胞, 并设置空白对照组, 采用流式细胞术法检测细胞周期和细胞凋亡率; 采用透射电子显微镜观察细胞凋亡的形态学变化; 采用蛋白印迹法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B-cell lymphoma/leukemia-2 gene, Bcl-2)的蛋白表达水平; 采用实时荧光定量 PCR 法和蛋白印迹法检测水通道蛋白-1(aquaporin 1, AQP1)、白细胞介素-8(interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的 mRNA 和蛋白表达情况。**结果:**100、500、1 000、2 000 ng/mL rPBEF 组相比空白对照组明显抑制了细胞活性($P<0.05$)。流式细胞仪检测可见, 与对照组[HPMEC: (19.347 $\pm$ 2.052)%; A549: (17.297 $\pm$ 0.800)%]比较, 100 和 1 000 ng/mL rPBEF 组细胞 S 期百分比[HPMEC: (43.847 $\pm$ 1.272)%、(63.300 $\pm$ 2.102)%; A549: (36.247 $\pm$ 2.045)%、(46.400 $\pm$ 1.346)%]明显增多($P=0.000$); 与对照组[HPMEC: (8.433 $\pm$ 0.600)%; A549: (3.877 $\pm$ 0.666)%]相比, 100 和 1 000 ng/mL rPBEF 组细胞凋亡率[HPMEC: (11.317 $\pm$ 0.533)%、(15.227 $\pm$ 0.637)%; A549: (6.120 $\pm$ 0.439)%、(8.633 $\pm$ 0.497)%]明显升高($P_{\text{HPMEC}}=0.001$, $P_{\text{HPMEC}}=0.000$; $P_{\text{A549}}=0.002$, $P_{\text{A549}}=0.000$)。1 000 ng/mL rPBEF 处理细胞后透射电子显微镜下可见典型凋亡细胞和凋亡小体。同时, 与对照组[HPMEC: (1.279 $\pm$ 0.077); A549: (2.824 $\pm$ 0.129)]相比, 100 和 1 000 ng/mL rPBEF 组 Bcl-2 蛋白表达水平[HPMEC: (0.418 $\pm$ 0.043)、(0.190 $\pm$ 0.012); A549: (1.276 $\pm$ 0.212)、(0.601 $\pm$ 0.164)]明显下调(均 $P=0.000$), 而 caspase-3 蛋白表达水平[HPMEC: (0.763 $\pm$ 0.030)、(1.170 $\pm$ 0.056); A549: (0.217 $\pm$ 0.010)、(0.375 $\pm$ 0.032)]较对照组[HPMEC: (0.459 $\pm$ 0.032); A549: (0.114 $\pm$ 0.007)]明显升高($P_{\text{HPMEC}}=0.000$, $P_{\text{HPMEC}}=0.000$; $P_{\text{A549}}=0.001$, $P_{\text{A549}}=0.000$); AQP1 mRNA 和蛋白表达水平明显下降[mRNA: HPMEC (0.543 $\pm$ 0.113)、(0.287 $\pm$ 0.093) vs. (1.050 $\pm$ 0.155) ($P=0.002$, $P=0.000$); A549 (0.823 $\pm$ 0.104)、(0.463 $\pm$ 0.184) vs. (1.317 $\pm$ 0.215) ($P=0.013$, $P=0.001$); 蛋白: HPMEC (0.494 $\pm$ 0.038)、(0.233 $\pm$ 0.030) vs. (0.824 $\pm$ 0.067) (均 $P=0.000$); A549 (0.850 $\pm$ 0.157)、(0.484 $\pm$ 0.118) vs. (1.344 $\pm$ 0.136) ($P=0.005$, $P=0.000$)], 而 IL-8、IL-1 β 基因和蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。**结论:**PBEF 可能通过下调 Bcl-2 基因表达, 使 caspase-3 表达水平增加, 从而诱导 HPMEC 和 A549 细胞凋亡, 并通过下调 AQP1 表达参与急性呼吸窘迫综合征的发生发展。**【关键词】**前 B 细胞克隆增强因子; 急性呼吸窘迫综合征; 细胞凋亡; 水通道蛋白-1

【中图分类号】R563

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-10-23

Effects of PBEF on HPMEC and A549 cells and the pathogenesis of ARDS

Wang Xiyu¹, Zhou Fachun¹, Luo Ziguo², Liu Xin¹, Liu Chang¹

(1. Department of Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Institute of Life Science, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the role of pre-B-cell colony enhancing factor(PBEF) in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome(ARDS). **Methods:** Human pulmonary microvascular endothelial cell line(HPMEC) and human type II alveolar epithelial cell line(A549) were constructed by increasing human recombinant PBEF(rPBEF) concentrations(0, 50, 100, 500, 1 000,

2 000 ng/mL) in a stepwise manner. The cell viabilities to rPBEF were tested by MTT assay. And then the cells were stimulated with 100 and 1 000 ng/mL rPBEF while the blank control group was set up. The cell cycle and cell apoptosis were analyzed using flow cytometry(FCM). Morphological changes of apoptosis were observed by transmission electron microscopy. The expres-

作者介绍: 王熙宇, Email: 363508618@qq.com,

研究方向: 急性呼吸窘迫综合征。

通信作者: 周发春, Email: zfc88@126.com。

基金项目: 重庆市卫生局重点资助项目(编号: 2013-1-007)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180608.1531.004.html>

(2018-06-08)

sions of caspase-3, B-cell lymphoma/leukemia-2 gene were detected by Western blot. The expressions of aquaporin 1, interleukin-8 and interleukin-1 β were detected using RT-PCR and Western blot. **Results:** The cell viabilities were significantly inhibited in the rPBEF group with 100, 500, 1 000, 2 000 ng/mL rPBEF compared with those in blank control group ($P<0.05$). FCM showed that the percentage of S phase in 100 and 1 000 ng/mL rPBEF groups [HPMEC: $(43.847 \pm 1.272)\%$, $(63.300 \pm 2.102)\%$; A549: $(36.247 \pm 2.045)\%$, $(46.400 \pm 1.346)\%$] were significantly higher than those in the blank control group [HPMEC: $(19.347 \pm 2.052)\%$; A549: $(17.297 \pm 0.800)\%$] (all $P=0.000$) and the apoptotic rate in 100 and 1 000 ng/mL rPBEF groups [HPMEC: $(11.317 \pm 0.533)\%$, $(15.227 \pm 0.637)\%$; A549: $(6.120 \pm 0.439)\%$, $(8.633 \pm 0.497)\%$] were significantly higher than those in the control group [HPMEC: $(8.433 \pm 0.600)\%$; A549: $(3.877 \pm 0.666)\%$] ($P_{\text{HPMEC}}=0.001$, $P_{\text{HPMEC}}=0.000$; $P_{\text{A549}}=0.002$, $P_{\text{A549}}=0.000$). Transmission electron microscopy showed typical apoptosis, such as heterochromatin concentrated which was set in the nuclear membrane and visible apoptotic bodies in 1 000 ng/mL rPBEF group. The expressions of Bcl-2 protein in 100 and 1 000 ng/mL rPBEF groups [HPMEC: (0.418 ± 0.043) , (0.190 ± 0.012) ; A549: (1.276 ± 0.212) , (0.601 ± 0.164)] were significantly decreased (all $P=0.000$) and the expressions of caspase-3 protein were significantly increased in 100 and 1 000 ng/mL rPBEF groups [HPMEC: (0.763 ± 0.030) , (1.170 ± 0.056) ; A549: (0.217 ± 0.010) , (0.375 ± 0.032)], respectively, compared with those of blank control group ($P_{\text{HPMEC}}=0.000$, $P_{\text{HPMEC}}=0.000$; $P_{\text{A549}}=0.001$, $P_{\text{A549}}=0.000$). The expressions of AQP1 gene and protein in 100 and 1 000 ng/mL rPBEF groups were statistically lower than blank control group [mRNA: HPMEC (0.543 ± 0.113) , (0.287 ± 0.093) vs. (1.050 ± 0.155) ($P=0.002$, $P=0.000$), A549 (0.823 ± 0.104) , (0.463 ± 0.184) vs. (1.317 ± 0.215) ($P=0.013$, $P=0.001$); protein: HPMEC (0.494 ± 0.038) , (0.233 ± 0.030) vs. (0.824 ± 0.067) (all $P=0.000$), A549 (0.850 ± 0.157) , (0.484 ± 0.118) vs. (1.344 ± 0.136) ($P=0.005$, $P=0.000$)] while the expressions of IL-8 and IL-1 β gene and protein were statistically higher than blank control group in 100 and 1 000 ng/mL rPBEF groups ($P<0.05$). **Conclusion:** PBEF may induce the apoptosis of HPMEC and A549 by down-regulating the expression of Bcl-2 and up-regulating the expression of caspase-3 and PBEF could induce low expression of AQP1 which suggests that PBEF may play an critical role in the development of ARDS.

[Key words] pre-B cell colony enhancing factor; acute respiratory distress syndrome; cell apoptosis; aquaporin 1

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是临床重症患者死亡的主要原因之一^[1]。已知肺间质和肺泡弥漫性水肿、广泛炎症反应是 ARDS 主要病理生理过程^[2-3], 而肺微血管内皮细胞和肺泡 II 型上皮细胞凋亡能够促进 ARDS 的发生发展^[4], 且水通道蛋白-1 (aquaporin 1, AQP1) 作为与肺脏液体跨膜转运密切相关的膜蛋白, 在 ARDS 中的表达明显下调^[5], 但其具体作用机制尚不明确。HPMEC 细胞和 A549 细胞是人肺微血管内皮细胞株和人肺泡 II 型上皮细胞株, 可在一定程度上模拟人体内肺泡-毛细血管屏障炎症损伤过程, 常用其观察 ARDS 发病过程中细胞凋亡的改变和炎症因子的表达^[6-8]。

前 B 细胞克隆增强因子 (pre-B-cell colony enhancing factor, PBEF) 又名内脂素, 主要由激活的炎症细胞和内脏脂肪组织合成。PBEF 作为 ARDS 潜在的生物标志物, 在 ARDS 患者的血清中上升明显, 且血清高水平 PBEF 提示 ARDS 患者有不良预后^[9]。本课题组前期研究发现, PBEF 能促进肺部核转录

因子 (nuclear transcription factor, NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 和粘附因子表达, 表明 PBEF 作为一种促炎因子参与 ARDS 的多个关键环节^[10-11]。但 PBEF 诱导肺微血管内皮细胞和肺泡 II 型上皮细胞凋亡, 调控 AQP1 表达的机制尚不十分清楚。

本实验选用 HPMEC 细胞株和 A549 细胞株为研究对象, 从分子机制水平探讨 PBEF 对 2 种细胞凋亡及对 AQP1 表达的可能调控作用, 为研究 ARDS 的发病机制提供更多实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人肺微血管内皮细胞株 (HPMEC) 购自美国 ScienCell 公司, 人 II 型肺泡上皮细胞株 (A549) 购自中国科学院上海细胞库。重组人 PBEF 购自美国 PEPROTECH 公司; 1640 培养基购自美国 Hyclone 公司, 胎牛血清购自德国 PAN 公司; TRIzol、PrimeScript 逆转录试剂盒、SYBR 购自日本 Takara 公司; AQP1、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、白细胞介素-1 β

(interleukin-1 β , IL-1 β)和 β -肌动蛋白(β -actin)引物购自上海生物工程有限公司;兔抗人半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B-cell lymphoma/leukemia-2 gene, Bcl-2)、AQP1、IL-8、IL-1 β 抗体、超敏 ECL 化学发光试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司;兔抗人 β -actin 一抗购自北京博奥龙免疫技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程有限公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;流式细胞仪FACSVan-tage 购自美国 BD 公司;qRT-PCR 仪和凝胶成像仪购自美国 BioRad 公司;核酸浓度测定仪器 NanoDrop 2000 购自美国 Thermo 公司;BX51 型显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞及其培养 HPMEC 细胞和 A549 细胞常规培养于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,放置在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育箱中培养细胞,每 2~3 d 换液,待细胞生长至 90%时用 0.25%胰蛋白酶将贴壁生长的细胞消化后传代培养。

1.2.2 药物处理分组 HPMEC 细胞和 A549 细胞贴壁培养至融合度达 80%时,分别用经 1640 培养液稀释的 50、100、500、1 000、2 000 ng/mL rPBEF 溶液处理细胞 24 h,同时用同体积的 1640 培养液处理细胞,作为空白对照,采用 MTT 法检测细胞活性。然后,选用细胞生长率分别约为 80%和 50%的 100 ng/mL 及 1 000 ng/mL rPBEF 处理细胞,rPBEF 作用 24 h 后,收集各组细胞,用于后续实验。

1.2.3 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞活性 HPMEC 细胞和 A549 细胞以 10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中,置于 CO₂ 孵育箱中培养 24 h 待细胞贴壁后,加入不同浓度的 rPBEF (50、100、500、1 000、2 000 ng/mL)孵育 24 h,PBS 洗 2 次,每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μ L,孵育 4 h 后弃上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μ L,避光摇床摇匀 15 min,于 570 nm 波长测定吸光度(absorbance, A)值。细胞抑制率=1-(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{空白对照组}-A_{空白组}) $\times$ 100%。

1.2.4 FCM 法检测细胞生长周期 PBS 清洗各组细胞 2 次,用 0.25%的胰蛋白酶消化,加入 PBS 中和,离心沉淀并重悬细胞并调整细胞密度。取 1 mL 细胞离心去上清,加入预冷的 70%乙醇 500 μ L 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。染色前 PBS 洗涤 2 次,加 100 μ L RnaseA 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,加入 PI 400 μ L 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,上机检测。

1.2.5 FCM 法检测细胞凋亡率 PBS 清洗各组细胞 2 次,用 0.25%胰蛋白酶消化细胞后,加入 PBS 中和,离心沉淀并重悬细胞,调整细胞密度为 1 $\times$ 10⁶ 个/mL。各组细胞中分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶,混匀后,置于室温、避光条件下反应 15~20 min。30 min 内上流式细胞仪,检测细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=(早期凋亡细胞数+晚期调

亡细胞数)/细胞总数 $\times$ 100%。

1.2.6 透射电子显微镜法检测细胞形态 培养细胞至 1 $\times$ 10⁶ 个/mL,PBS 清洗各组细胞 2 次,用 0.1%胰蛋白酶消化,加入培养基中和,将细胞悬液转移至 2 mL EP 管,以 1 200 r/min 离心沉淀 10 min,吸取上清,沿管壁加入 2 mL 4%戊二醛预固定 2 h,1%四氧化钨后固定 2 h,酒精、丙酮脱水,环氧树脂浸透包埋,制备超薄切片,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色,日本电子 7500 plus 透射电镜观察拍照。

1.2.7 RT-PCR 法检测 AQP1、IL-8、IL-1 β mRNA 表达 HPMEC 和 A549 细胞按 2.0 $\times$ 10⁵ 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL,待细胞生长至 75%~85%时,更换为不含青霉素-链霉素的培养基,按分组加入 rPBEF 作用 24 h,采用 Trizol 法提取各组细胞的总 RNA,核酸浓度测定仪测定各组 RNA 浓度,取 1 μ g RNA 逆转录为 cDNA。应用 qRT-PCR 检测 AQP1、IL-8、IL-1 β 的转录水平。AQP1 上游引物:5'-CCGCAAC-TTCTCAAACCACT-3',下游引物:5'-CATCAGGTCATACTC-CTCCA-3';IL-8 上游引物:5'-CACAAACTTTCAGAGAC-AGCAGAG-3',下游引物:5'-ACACAGTGAGATGGTTCCTTCC-3';IL-1 β 上游引物:5'-TGGCTTATTACAGTGGCAATG-3',下游引物:5'-GTGGTGGTCGGAGATTTCG-3';内参 β -actin 引物上游:5'-CCGGTGAAGTAGATCCCCAC-3',下游引物:5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'。扩增条件:预变性 (95 $^{\circ}$ C,30 s);PCR 反应 (95 $^{\circ}$ C,5 s;60 $^{\circ}$ C,30 s;40 个循环)。用 BIO-RAD CFX96 荧光定量 PCR 仪进行检测和分析,以 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法算得各目的基因相对表达量。

1.2.8 Western blot 检测 Bcl-2、caspase-3、AQP1、IL-8、IL-1 β 蛋白表达 HPMEC 和 A549 细胞接种、培养以及干预同 1.2.7。用蛋白裂解液裂解细胞,提取细胞的总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度。每组取等量蛋白(上样量 50 μ g)行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转移凝胶至 PVDF 膜,室温封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗膜,二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗膜,化学发光溶液曝光,凝胶成像系统显影。用 Fusion FX7 软件进行目的条带灰度值分析,以 β -actin 表达水平作为内参照,计算目的与内参的灰度值比值作为目标蛋白的表达量。

1.3 统计学处理

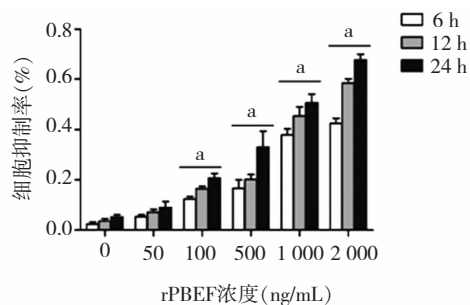
采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验(方差齐)或 Dunnett *T*3 检验(方差不齐)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

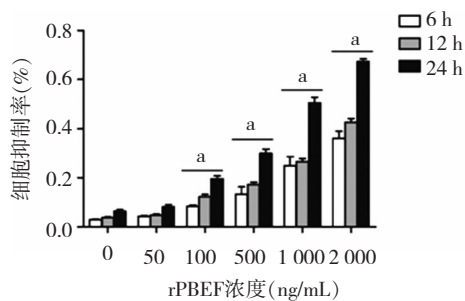
2.1 PBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞活性的影响

PBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞活性的影响呈浓度依赖关系。不同浓度 rPBEF 刺激细胞 6、12、24 h 后,相比空白对照组,rPBEF 50 ng/mL 对 HPMEC 和 A549 细胞活性无显著

影响[HPMEC 6 h: (0.054 ± 0.008) vs. (0.024 ± 0.008) , 12 h: (0.071 ± 0.012) vs. (0.036 ± 0.009) , 24 h: (0.089 ± 0.024) vs. (0.052 ± 0.010) ($P=0.087, P=0.056, P=0.199$); A549 6 h: (0.043 ± 0.003) vs. (0.030 ± 0.002) , 12 h: (0.048 ± 0.004) vs. (0.038 ± 0.004) , 24 h: (0.081 ± 0.011) vs. (0.064 ± 0.001) ($P=0.484, P=0.214, P=0.190$)], 而 rPBEF 100、500、1000、2000 ng/mL 组相比空白对照组明显抑制了 HPMEC 和 A549 细胞活性[HPMEC 6 h: (0.123 ± 0.010) 、 (0.166 ± 0.033) 、 (0.379 ± 0.024) 、 (0.424 ± 0.021) ($F=217.641$, 均 $P=0.000$); 12 h: (0.164 ± 0.010) 、 (0.202 ± 0.019) 、 (0.454 ± 0.037) 、 (0.585 ± 0.018) ($F=366.279$, 均 $P=0.000$); 24 h: (0.206 ± 0.019) 、 (0.329 ± 0.064) 、 (0.506 ± 0.034) 、 (0.676 ± 0.024) ($F=154.997$, 均 $P=0.000$); A549 6 h: (0.085 ± 0.004) 、 (0.133 ± 0.030) 、 (0.250 ± 0.036) 、 (0.359 ± 0.031) ($F=97.654, P=0.012, P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 12 h: (0.123 ± 0.010) 、 (0.173 ± 0.010) 、 (0.267 ± 0.012) 、 (0.426 ± 0.015) ($F=659.354$, 均 $P=0.000$); 24 h: (0.197 ± 0.012) 、 (0.299 ± 0.018) 、 (0.504 ± 0.024) 、 (0.673 ± 0.011) ($F=805.478$, 均 $P=0.000$)]. 由此可见,随着 rPBEF 浓度的增高,细胞抑制率逐渐上升,当浓度为 100 ng/mL 和 1 000 ng/mL 时,细胞抑制率约达 20%和 50%(图 1)。



A. HPMEC 细胞



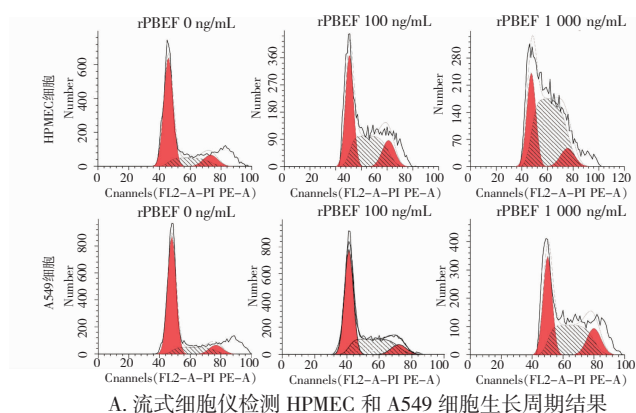
B. A549 细胞

a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$

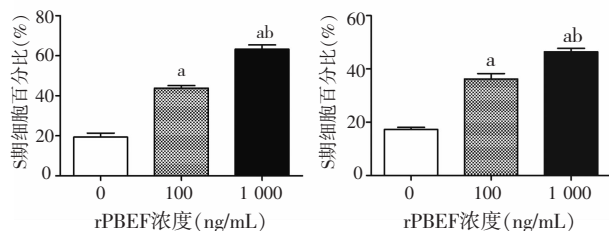
图 1 不同浓度 rPBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞活力的影响

2.2 PBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞生长周期的影响

HPMEC 和 A549 细胞经 100、1 000 ng/mL rPBEF 处理后,均引起细胞周期阻滞,表现为 S 期细胞比例升高。与空白对照组相比,差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),且以 1 000 ng/mL 最明显(图 2,表 1)。



A. 流式细胞仪检测 HPMEC 和 A549 细胞生长周期结果

a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 rPBEF 100 ng/mL 组比较, $P < 0.05$

B. HPMEC 细胞和 A549 细胞 S 期细胞百分比

图 2 2 种浓度 rPBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞生长周期的影响

表 1 FCM 检测 HPMEC 及 A549 细胞 S 期百分比 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	S 期细胞百分比 (%)	
	HPMEC 细胞	A549 细胞
0 ng/mL 组	19.347 ± 2.052	17.297 ± 0.800
100 ng/mL 组	43.847 ± 1.272^a	36.247 ± 2.045^a
1 000 ng/mL 组	63.300 ± 2.102^{ab}	46.400 ± 1.346^{ab}
F 值	426.197	296.084
P 值	0.000	0.000

注: a, 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 rPBEF 100 ng/mL 组比较, $P < 0.05$

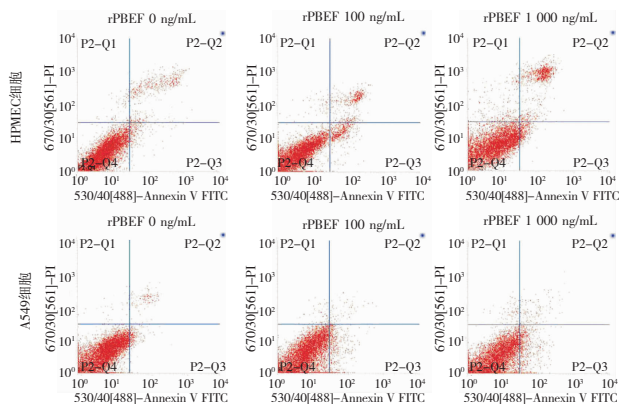
2.3 PBEF 诱导 HPMEC 和 A549 细胞发生凋亡

FCM 检测结果显示,与未经 rPBEF 处理的空白对照组[HPMEC: $(8.433 \pm 0.600)\%$; A549: $(3.877 \pm 0.666)\%$]相比,100、1 000 ng/mL rPBEF 处理后,HPMEC 和 A549 细胞凋亡率明显升高,分别为 HPMEC 细胞: $(11.317 \pm 0.533)\%$ 、 $(15.227 \pm 0.637)\%$; A549 细胞: $(6.120 \pm 0.439)\%$ 、 $(8.633 \pm 0.497)\%$,各组间差异有统计学意义 ($F_{HPMEC}=99.606, P_{HPMEC}<0.05$; $F_{A549}=57.620, P_{A549}<0.05$) (图 3,表 2)。

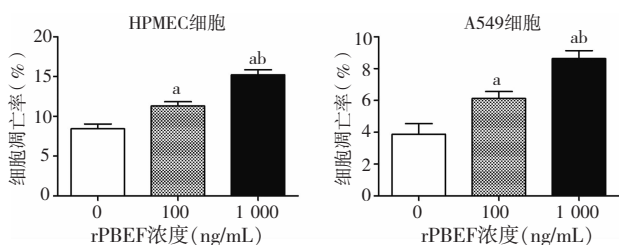
2.4 透射电子显微镜检测细胞凋亡结果

HPMEC 和 A549 细胞的空白对照组分别呈长梭形和椭圆形,细胞核核膜完整,常染色质丰富,核仁大,胞浆呈中等电子密度,可见散在内质网和线粒体等细胞器(图 4A、D)。经 rPBEF 1 000 ng/mL 处理 2 种细胞 24 h 后观察到,细胞核缩小,异染色质边集,直至核固缩和(或)核碎裂;胞浆电子密度变深,细胞膜皱缩(图 4B、E),A549 细胞还可见细胞膜形成

突起,可见其部分与胞浆分离(图 4E)。可见直径 2~3 μm 甚至更大的凋亡小体,电子密度深,凋亡小体可见脂滴及凝固染色质块(图 4C、F)。



A. 流式细胞仪检测 HPMEC 和 A549 细胞凋亡率结果



a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 rPBEF 100 ng/mL 组比较, $P < 0.05$

B. HPMEC 和 A549 细胞凋亡率柱状图

图 3 2 种浓度 rPBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞凋亡率的影响

表 2 FCM 检测 HPMEC 及 A549 细胞凋亡率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	总凋亡率 (%)	
	HPMEC 细胞	A549 细胞
0 ng/mL 组	8.433 $\pm$ 0.600	3.877 $\pm$ 0.666
100 ng/mL 组	11.317 $\pm$ 0.533 ^a	6.120 $\pm$ 0.439 ^a
1 000 ng/mL 组	15.227 $\pm$ 0.637 ^{ab}	8.633 $\pm$ 0.497 ^{ab}
F 值	99.606	57.620
P 值	0.000	0.000

注: a, 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 rPBEF 100 ng/mL 组比较, $P < 0.05$

2.5 PBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞 IL-8、IL-1 β 、AQP1 mRNA 表达的影响

经 rPBEF 干预后,应用 RT-PCR 检测细胞各组 IL-8、IL-1 β 、AQP1 mRNA 水平,结果显示,HPMEC 和 A549 细胞的 AQP1 mRNA 水平在空白对照组、100、1 000 ng/mL 组中的表达逐渐降低 ($P < 0.05$),而 IL-8、IL-1 β mRNA 水平依次升高 ($P < 0.05$),提示 rPBEF 可能抑制 HPMEC 和 A549 细胞中 AQP1 的表达而促进炎症因子(IL-8、IL-1 β)的表达(图 5, 表 3)。

2.6 PBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞 Bcl-2、caspase-3、IL-8、IL-1 β 、AQP1 蛋白表达的影响

经 rPBEF 干预后,Western blot 检测 HPMEC 和 A549 细胞 Bcl-2、caspase-3、IL-8、IL-1 β 、AQP1 蛋白水平。结果显示,HPMEC 和 A549 细胞的 Bcl-2 蛋白水平在空白对照组、100 ng/mL 组和 1 000 ng/mL 组中的表达逐渐下降 ($P < 0.05$),而 caspase-3 蛋白水平依次升高 ($P < 0.05$);AQP1 蛋白水平在

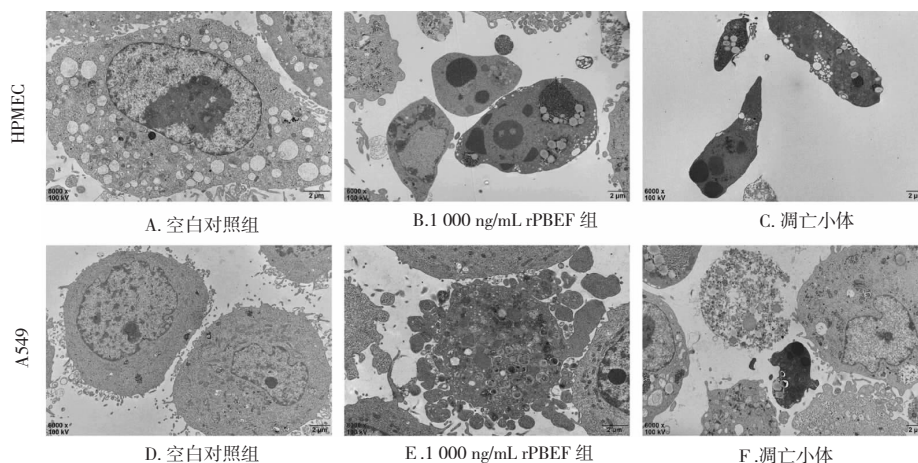
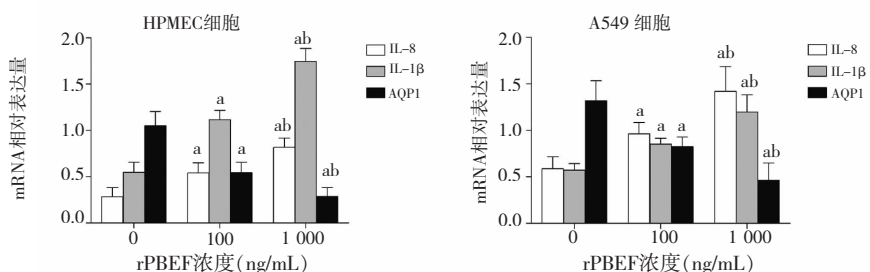


图 4 透射电子显微镜观察 HPMEC 和 A549 细胞超微结构



a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 rPBEF 100 ng/mL 组比较, $P < 0.05$

图 5 2 种浓度 rPBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞 IL-8、IL-1 β 、AQP1 mRNA 相对表达量的影响

表 3 RT-PCR 检测 HPMEC 及 A549 细胞 IL-8、IL-1 β 、AQP1 mRNA 表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-8 mRNA 相对表达量		IL-1 β mRNA 相对表达量		AQP1 mRNA 相对表达量	
	HPMEC细胞	A549细胞	HPMEC细胞	A549细胞	HPMEC细胞	A549细胞
0 ng/mL 组	0.285 $\pm$ 0.098	0.586 $\pm$ 0.127	0.545 $\pm$ 0.111	0.570 $\pm$ 0.072	1.050 $\pm$ 0.155	1.317 $\pm$ 0.215
100 ng/mL 组	0.539 $\pm$ 0.110 ^a	0.962 $\pm$ 0.121 ^a	1.114 $\pm$ 0.105 ^a	0.851 $\pm$ 0.065 ^a	0.543 $\pm$ 0.113 ^a	0.823 $\pm$ 0.104 ^a
1 000 ng/mL 组	0.816 $\pm$ 0.100 ^{ab}	1.417 $\pm$ 0.269 ^{ab}	1.744 $\pm$ 0.141 ^{ab}	1.196 $\pm$ 0.184 ^{ab}	0.287 $\pm$ 0.093 ^{ab}	0.463 $\pm$ 0.184 ^{ab}
F 值	19.900	15.037	75.188	20.470	29.948	18.176
P 值	0.002	0.005	0.000	0.002	0.001	0.003

注:a,与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与 rPBEF-L 组比较, $P<0.05$

表 4 Western blot 检测 HPMEC 及 A549 细胞 Bcl-2、caspase-3、IL-8、IL-1 β 、AQP1 蛋白表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 蛋白相对表达量		caspase-3 蛋白相对表达量		IL-8 蛋白相对表达量		IL-1 β 蛋白相对表达量		AQP1 蛋白相对表达量	
	HPMEC细胞	A549细胞	HPMEC细胞	A549细胞	HPMEC细胞	A549细胞	HPMEC细胞	A549细胞	HPMEC细胞	A549细胞
0 ng/mL 组	1.279 $\pm$ 0.077	2.824 $\pm$ 0.129	0.459 $\pm$ 0.032	0.114 $\pm$ 0.007	0.177 $\pm$ 0.011	0.188 $\pm$ 0.009	0.110 $\pm$ 0.011	0.088 $\pm$ 0.006	0.824 $\pm$ 0.067	1.344 $\pm$ 0.136
100 ng/mL 组	0.418 $\pm$ 0.043 ^a	1.276 $\pm$ 0.212 ^a	0.763 $\pm$ 0.030 ^a	0.217 $\pm$ 0.010 ^a	0.296 $\pm$ 0.036 ^a	0.355 $\pm$ 0.053 ^a	0.249 $\pm$ 0.017 ^a	0.209 $\pm$ 0.014 ^a	0.494 $\pm$ 0.038 ^a	0.850 $\pm$ 0.157 ^a
1000 ng/mL 组	0.190 $\pm$ 0.012 ^{ab}	0.601 $\pm$ 0.164 ^{ab}	1.170 $\pm$ 0.056 ^{ab}	0.375 $\pm$ 0.032 ^{ab}	0.519 $\pm$ 0.081 ^{ab}	0.749 $\pm$ 0.054 ^{ab}	0.502 $\pm$ 0.019 ^{ab}	0.523 $\pm$ 0.074 ^{ab}	0.233 $\pm$ 0.030 ^{ab}	0.484 $\pm$ 0.118 ^{ab}
F 值	373.642	132.024	228.371	136.739	34.239	128.112	501.051	79.383	114.826	29.261
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

注:a,与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与 rPBEF-L 组比较, $P<0.05$

空白对照组、100 ng/mL 组和 1 000 ng/mL 组中的表达逐渐降低($P<0.05$),而 IL-8、IL-1 β 蛋白水平依次升高($P<0.05$)。这进一步提示 rPBEF 可能抑制 HPMEC 和 A549 细胞中 AQP1 表达而促进炎症因子(IL-8、IL-1 β)的表达,且可能下调 Bcl-2 的表达而上调 caspase-3 的表达参与细胞凋亡的发生(图 6,表 4)。

3 讨论

ARDS 是肺泡-毛细血管内皮屏障通透性增加所致的非心源性肺水肿,它是以弥漫性肺泡损伤伴透明膜形成为主要特征的临床综合征。其发病率在全球为 30%,是 ICU 病人死亡的主要原因之一^[1]。研究表明^[12],过度释放的炎症因子损伤肺微血管内皮细胞和肺泡上皮细胞,使细胞凋亡增加,同时使肺水清除能力下降,肺泡腔内液体含量增加,最终发展为肺水肿。

PBEF 是近年来发现的一种重要的炎症因子,它作为具有多种生物活性的促炎因子,可能与肺血管内皮细胞及肺泡上皮细胞损伤、中性粒细胞凋亡进程延迟、免疫应答和氧化应激密切相关,在肺部广泛炎症反应的进程中扮演着不可或缺的角色^[13]。但 PBEF 对肺损伤的促进作用是否与肺微血管内皮细胞和肺泡上皮细胞凋亡以及与水通道蛋白-1 密切相关,目前尚不清楚。IL-8 和 IL-1 β 作为炎症早期促炎介质,可介导肺部炎性浸润。IL-8、IL-1 β 募集并激活中性粒细胞,诱导大量细胞毒性物质分泌,介导瀑布样级联炎症反应的发生,进而破坏肺泡-毛细血管屏障,进一步促进 ARDS 的发生^[14]。而在本实验中,采用 HPMEC、A549 细胞模拟肺泡-毛细血管屏障中的肺微血管内皮细胞和 II 型肺泡上

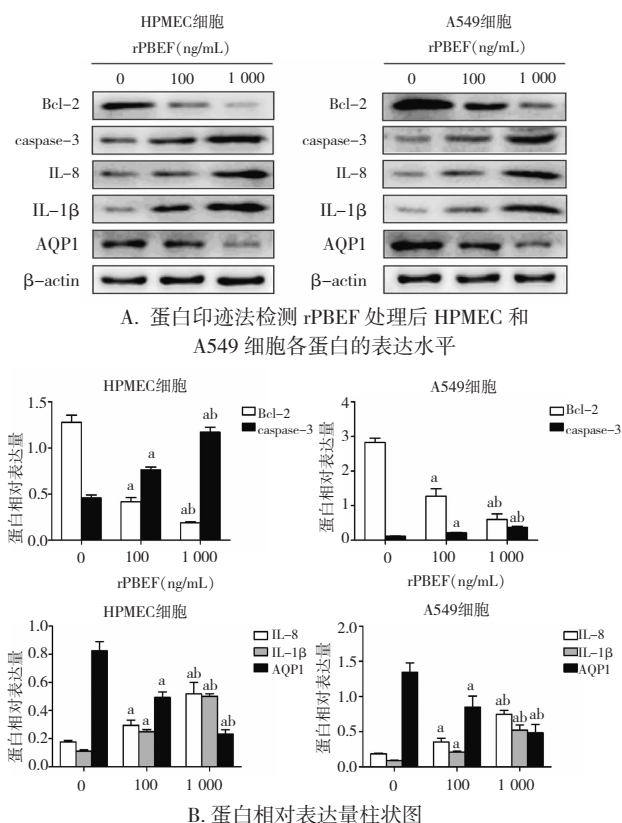


图 6 2 种浓度 rPBEF 对 HPMEC 和 A549 细胞 Bcl-2、caspase-3、IL-8、IL-1 β 、AQP1 蛋白相对表达量的影响

皮细胞。实验结果显示,相比空白对照组,HPMEC 和 A549 细胞 100、1 000 ng/mL rPBEF 组 IL-8、IL-1 β 表达水平明显增高,提示 PBEF 可能造成急性肺损伤。结果表明:在没有感染性因素参与的情况下,PBEF 可能直接诱导肺部急性炎症反应的发生,高水平的 PBEF 可能更易激活炎性细胞因子的产生和分泌,加重肺血管内皮、肺泡上皮细胞的炎性损伤。

肺泡-毛细血管屏障由肺微血管内皮细胞及肺泡上皮细胞构成,其中肺泡上皮细胞释放肺表面活性物质,能减少肺表面张力;肺微血管内皮细胞参与毛细血管壁的形成,可防止蛋白逸出。研究证实,肺泡-毛细血管屏障功能异常是 ARDS 发生的关键环节^[15],中性粒细胞等炎症细胞、炎症调节因子浸润肺泡腔后导致屏障通透性增加^[16-17],血管外富含蛋白质的水肿液增多,水肿液经肺泡-血管间隙进入肺泡腔,进而影响肺通气和换气功能,加重了 ARDS 的进程^[18]。因此,肺微血管内皮细胞及肺泡上皮细胞可参与维持肺部稳定的通透性,其凋亡将导致肺泡-毛细血管屏障的完整性遭到破坏,凋亡的细胞积累在同一部位,可能进一步加重 ARDS 的进程^[4]。该实验透射电子显微镜结果显示:rPBEF 刺激 2 种细胞后均发生了典型细胞凋亡表现,即细胞核皱缩、破损,核内异染色质浓缩、边集于核膜,细胞质电子密度增加,可见较多空泡。另外可见凋亡小体,电子密度深,形成脂滴及凝固染色质块。这一系列改变从形态学角度说明了 PBEF 可导致 HPMEC 和 A549 细胞发生凋亡。Caspase-3 作为一种凋亡标志物,介导细胞内源性和外源性凋亡。研究表明,相比未发生 ARDS 的死亡患者,发生 ARDS 的死亡患者肺组织中 caspase-3 表达更高^[19-20];Bcl-2 作为抗凋亡基因,可避免细胞色素 C 从线粒体中分泌,抑制 caspase-3 的激活,进而阻止细胞凋亡的发生^[21]。本实验结果表明,0、100、1 000 ng/mL rPBEF 组细胞凋亡率和 caspase-3 表达逐渐增加,而 Bcl-2 表达依次下降,表明 PBEF 具有一定促凋亡作用,其机制可能是通过调控 caspase-3、Bcl-2 的表达参与 ARDS 发病时肺泡-血管屏障的损伤,诱导肺微血管内皮细胞和肺泡上皮细胞凋亡,使屏障通透性增加,加快了肺水肿的发生发展。

水通道蛋白(aquaporins, AQP)作为维持肺部

液体平衡的细胞膜蛋白,许多研究表明其对肺泡腔和血管腔之间快速的液体转运具有重要作用^[22],AQP1 在肺微血管内皮细胞和肺泡上皮细胞上均有表达,负责清除肺间质和肺泡的多余水分,与 ARDS 发生时肺水转运异常密切相关^[23-24]。有研究发现,AQP1 在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的急性肺损伤中下调明显,上调 AQP1 的表达可改善肺水肿和肺损伤^[25-26]。本课题组前期研究表明,LPS 诱导大鼠发生 ARDS 时肺组织的 AQP1 转录和翻译水平均下调,大鼠肺部病理学改变显示肺泡渗出液增加,促进了 ARDS 发生^[5]。与空白对照组对比,100、1 000 ng/mL rPBEF 组 AQP1 表达量均降低,且 1 000 ng/mL rPBEF 组最低,说明在 PBEF 刺激下,肺微血管内皮细胞和肺泡 II 型上皮细胞的 AQP1 表达受到抑制,导致肺部水肿液聚集增多而转运减少。Ming 等^[6]在对人肺微血管内皮细胞的研究中也发现,质粒转染过表达 PBEF 可抑制 AQP1 的表达,削弱 AQP1 对肺水运输的调节作用进而导致液体转运功能下降;同时,沉默 PBEF 基因后能增加 AQP1 的表达水平并降低白细胞介素(IL-1 β 、IL-6、IL-8)浓度。究其机制,可能与 p38 丝裂原活化蛋白激酶、细胞外信号调节激酶和 c-Jun 氨基末端激酶的活化有关。但其具体作用机制尚待更深入的探究。

综上所述,PBEF 可能通过对肺泡-毛细血管屏障和 AQP1 表达的影响,促进肺微血管内皮细胞和肺泡 II 型上皮细胞凋亡和促进炎性因子的分泌,同时使细胞膜上水通道转运蛋白表达下降。这提示了 PBEF 在肺泡-毛细血管屏障的炎症反应、细胞凋亡、肺部水肿液转运中均发挥着重要作用,为进一步研究 ARDS 的发病机制提供了更多实验依据,为 ARDS 的治疗提供了一定的思路。然而 ARDS 发病机制复杂,肺水肿的形成涉及多个关键环节,有关 PBEF 在 ARDS 中的具体作用机制仍需更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Sweeney RM, McAuley DF. Acute respiratory distress syndrome[J]. Lancet, 2016, 388(10058): 2416-2430.
- [2] Millar FR, Summers C, Griffiths MJ, et al. The pulmonary endothelium in acute respiratory distress syndrome: insights and therapeutic opportunities[J]. Thorax, 2016, 71(5): 462-473.

- [3] Wittekindt OH. Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation[J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(1): 135–147.
- [4] Galani V, Tatsaki E, Bai M, et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review[J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(3): 145–150.
- [5] 陈 懿, 毛 蕊, 肖 玲, 等. 川芎嗪对脂多糖诱导肺损伤大鼠肺组织水通道蛋白 1、5 表达影响的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2017, 42(1): 27–32.
- [6] Ming GF, Ma XH, Xu DM, et al. PBEF promotes the apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells and regulates the expression of inflammatory factors and AQP1 through the MAPK pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3): 890–896.
- [7] Liu X, Shao K, Sun T. SIRT1 regulates the human alveolar epithelial A549 cell apoptosis induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(1): 92–101.
- [8] Jiang Y, Zeng Y, Huang X, et al. Nur77 attenuates endothelin-1 expression via downregulation of NF- κ B and p38 MAPK in A549 cells and in an ARDS rat model[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(6): L1023–1035.
- [9] Lee K, Huh JW, Lim CM, et al. Clinical role of serum pre-B cell colony-enhancing factor in ventilated patients with sepsis and acute respiratory distress syndrome[J]. *Scand J Infect Dis*, 2013, 45(10): 760–765.
- [10] 刘 畅, 张 虹, 程鹏雁, 等. 前 B 细胞克隆增强因子对急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征大鼠肺组织细胞黏附分子的影响[J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(3): 159–163.
- [11] 刘 畅, 张 虹, 程鹏雁, 等. 前 B 细胞克隆增强因子在急性呼吸窘迫综合征大鼠肺组织中表达及对炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B p65 表达影响的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39(9): 1226–1230.
- [12] Huang B, Wang DX, Deng W. Protective effects of dexamethasone on early acute lung injury induced by oleic acid in rats[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(12): 4698–4709.
- [13] Agrawal A, Zhuo H, Brady S, et al. Pathogenetic and predictive value of biomarkers in patients with ALI and lower severity of illness: results from two clinical trials[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(8): L634–639.
- [14] Williams AE, Chambers RC. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(3): L217–L230.
- [15] Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8): 2731–2740.
- [16] Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(11): 1225–1234.
- [17] Gonzales JN, Lucas R, Verin AD. The acute respiratory distress syndrome: mechanisms and perspective therapeutic approaches[J]. *Austin J Vasc Med*, 2015, 2(1): 1009.
- [18] Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(4): 319–327.
- [19] Lu Q, Harrington EO, Rounds S. Apoptosis and lung injury[J]. *Keio J Med*, 2005, 54(4): 184–189.
- [20] Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, et al. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(5): 1783–1796.
- [21] Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 304(3): 437–444.
- [22] Agre P. Aquaporin water channels: from atomic structure to clinical medicine[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2006, 2(4): 266–267.
- [23] Matthay MA. Resolution of pulmonary edema. Thirty years of progress[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189(11): 1301–1308.
- [24] Verkman AS, Matthay MA, Song Y. Aquaporin water channels and lung physiology[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 278(5): L867–879.
- [25] Han G, Ma L, Guo Y, et al. Hyperbaric oxygen therapy palliates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats by upregulating AQP1 and AQP5 expression[J]. *Exp Lung Res*, 2015, 41(8): 444–449.
- [26] Dong C, Wang G, Li B, et al. Anti-asthmatic agents alleviate pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in the lungs of mice with OVA-induced asthma[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012, 181(1): 21–28.

(责任编辑: 张辉洁)