

# 间充质干细胞条件培养基对炎症介导的肺动脉血管平滑肌细胞增殖调控的研究\*

牛志浩<sup>1</sup>, 刘庆<sup>2</sup>, 刘俊峰<sup>1,3</sup>, 吴西军<sup>3,4\*\*</sup>, 何志旭<sup>3,5\*\*</sup>

(1. 华北石油管理局总医院 检验科, 河北 任丘 062552; 2. 贵州医科大学附院 呼吸与危重症医学科, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学 免疫学教研室, 贵州 贵阳 550004; 5. 贵州医科大学附院 儿童血液肿瘤科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨间充质干细胞条件培养基(MSC-CM)对炎症介导的肺动脉血管平滑肌细胞(PASMC)增殖的调控机制。方法: 取4~6代处于对数生长期人脐带MSC, 建立体外细胞培养体系, 分为对照组(PASMC)、T淋巴细胞刺激组(PASMC + T淋巴细胞)、MSC-CM干预组(PASMC + T淋巴细胞 + MSC-CM); 分别于培养第3天时, 检测3组培养上清中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 含量、PASMC的增殖、钙调神经磷酸酶(CaN)活性及活化的T淋巴细胞核因子2(NFATc2)活化情况。结果: 与T淋巴细胞刺激组比较, MSC-CM干预组TNF- $\alpha$ 的生成显著减少( $P < 0.01$ ); 与对照组和T淋巴细胞刺激组比较, MSC-CM干预组的PASMC内CaN的磷酸酶活性降低、NFATc2的活化减少, PASMC的增殖降低( $P < 0.01$ )。结论: MSC-CM可能通过CaN/NFAT信号通路抑制炎症介导的PASMC增殖。

**[关键词]** 间充质干细胞; 肺动脉高压; 平滑肌; 增殖; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; T淋巴细胞核因子2; 钙调神经磷酸酶

**[中图分类号]** R456 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)06-0641-05

**DOI:**10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.06.005

## Regulation of Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Proliferation of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Mediated by Inflammation

NIU Zhihao<sup>1</sup>, LIU Qing<sup>2</sup>, LIU Junfeng<sup>1,3</sup>, WU Xijun<sup>3,4</sup>, HE Zhixu<sup>3,5</sup>

(1. Clinical Laboratory, North China Petroleum General Administration Hospital, Renqiu 062552, Hebei, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Department of immunology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 5. Department of Child Blood Oncology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the regulatory mechanism of Mesenchymal Stem Cell conditioned medium (MSC-CM) on proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) mediated by inflammation. **Methods:** In vitro cell culture system was established by taking MSC from human umbilical cord at logarithmic growth stage and divided into control group (PASMC), T lymphocyte stimulation group (PASMC + T lymphocyte) and MSC-CM intervention group (PASMC + T lymphocyte + MSC-CM). On the third day of culture, the levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in culture supernatant, proliferation of PASMC, CaN activity and activated NFATc2 were assessed. **Results:** The production of TNF- $\alpha$  in MSC-CM intervention group was significantly lower than that in T-lymphocyte

\*[基金项目] 国家自然科学基金项目(30560159); 贵州省“125计划”重大科技专项[黔教合重大专项字(2013)021]; 贵阳市-贵州医科大学联合科技计划项目[筑科合同(20151001) 03]

\*\*通信作者 E-mail: 498682999@qq.com; hzx@gmc.edu.cn

网络出版时间: 2018-06-18 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180618.1502.026.html>

stimulation group( $P < 0.01$ ). Compared with control group and T lymphocyte stimulation group, the activity of CaN phosphatase in PASMCM of MSC-CM intervention group was decreased, activation of NFATc2 was reduced, and the proliferation of PASMCM was reduced( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** MSC-CM inhibits the proliferation of PASMCM mediated by inflammation through the CaN/NFAT signaling pathway.

[**Key words**] mesenchymal stem cell; pulmonary arterial hypertension; smooth muscle; proliferation; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; nuclear factor of activated T-cells; calcineurin

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一类严重危害人类健康和生命的疾病,其主要的特征表现为肺动脉压力的持续性增高及由此导致的右心室负荷的增加和心力衰竭的发生。炎症及钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)依赖的活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)信号途径在肺动脉血管平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCM)过度增殖中发挥了重要的作用,并有可能成为治疗PH的一个靶点<sup>[1-4]</sup>。课题组前期研究证实,间充质干细胞条件培养基(mesenchymal stem cell conditioned media, MSC-CM)对PH模型大鼠具有良好的疗效<sup>[5]</sup>,为进一步探讨其作用机制,本研究通过建立大鼠PASMCM和T淋巴细胞的体外共培养体系,观察培养上清液中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 含量、PASMCM的增殖情况及钙调神经磷酸酶(CaN)活性和NFATc2,评估MSC-CM对炎症介导的PASMCM过度增殖的调控作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

人脐带间充质干细胞(hUC-MSC)为本室保存,DMEM/F12培养基、胎牛血清(美国GIBICO公司)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  ELISA试剂盒(美国eBioscience公司)、小鼠抗大鼠NFATc2单克隆抗体(美国Novus Biologicals公司)、FITC标记的山羊抗小鼠IgG(美国Proteintech公司)、超净工作台(苏州净化)、恒温培养箱(美国Thermo Forma公司)、倒置光学显微镜(日本尼康公司)、多功能酶标仪(香港基因公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 人脐带MSC-CM的制备** 取4~6代处于对数生长期达80%左右融合的人脐带MSC,将培养上清液吸弃后加入新鲜的DMEM/F12完全培养基,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中

培养24 h。收集培养上清液,经3 000 r/min室温条件下离心20 min,收集上清液,于-80℃保存备用。

**1.2.2 大鼠PASMCM的体外培养** 取Sprague-Dawley大鼠(雌性,体质量200 g),麻醉状态下给予脱颈椎处死,并置于75%酒精中浸泡消毒10 min;于超净工作台内分离主肺动脉,将外膜剥除、内皮细胞刮除后,用眼科剪尽可能的将其剪成细小的组织块,移至T75细胞培养瓶中贴壁2 h后,加入DMEM/F12完全培养基,于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱内培养;每隔4~5 d常规换液,当细胞生长达70%~80%融合时传代培养,采用小鼠抗大鼠 $\alpha$ -actin单克隆抗体免疫荧光染色对PAMC进行鉴定。

**1.2.3 大鼠脾脏T淋巴细胞分离** 取Sprague-Dawley大鼠(雌性,体质量100 g),麻醉状态下给予脱颈椎处死,并置于75%酒精中浸泡消毒10 min,移至超净工作台内,分离脾脏,用1 mL注射器反复点刺脾脏,并吸取Hanks液对其进行冲洗。将冲出的细胞收集至离心管中;经红细胞裂解后,PBS反复洗涤离心2次,以PBS重悬细胞并调整密度为 $5.0 \times 10^{11}$ 个/L;将细胞悬液过2遍尼龙毛柱,收集滤出的细胞悬液,予2 000 r/min室温条件下离心10 min,弃上清液,以DMEM/F12完全培养基(含10%胎牛血清、100 U青霉素/链霉素)重悬细胞并调整密度为 $1.0 \times 10^9$ 个/L。

**1.2.4 体外共培养体系构建** 共培养体系共分为对照组(PASMCM)、T淋巴细胞刺激组(PASMCM + T淋巴细胞)、MSC-CM干预组(PASMCM + T淋巴细胞 + MSC-CM),每组设3个复孔;取处于对数生长期的PASMCM制备单细胞悬液,并调整密度为 $1.0 \times 10^7$ 个/L,加入24孔板中(1.0 mL/孔),置于37℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱内培养24 h;将上清液吸弃,对照组加入1 mL新鲜的DMEM/F12完全培养基。T淋巴细胞刺激组加入细胞密度为 $10^8$ 个/L总体积为900  $\mu$ L的T淋巴细胞悬液,同时加入终浓度为10 mg/L刀豆蛋白A

(ConA),补齐培养基至 1 mL。MSC-CM 干预组加入同 T 淋巴细胞刺激组相同的 T 淋巴细胞悬液和 ConA,同时以 MSC-CM 补齐至 1 mL;置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱内培养。

1.3 观测指标

1.3.1 肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)-α 检测 细胞培养第 3 天时,收集上清液至 EP 管中,10 000 r/m 离心 5 min,收集上清液,采用酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA),应用美国 Peprotech 公司的 TNF-α 检测试剂盒检测 TNF-α 水平。

1.3.2 PASC 的增殖情况 细胞培养第 3 天时,将上清液移除后,用 PBS 对贴壁生长的 PASC 反复冲洗 3 遍。每孔中加入新鲜的 DMEM/F12 完全培养基 300 μL 及 MTS 15 μL,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱内培养 4 h。培养结束后收集上清至 EP 管中,10 000 r/m 离心 5 min,收集上清液至 96 孔板中,孵育 2 h,应用 MTS(Promega 公司)法,酶标仪在 490 nm 时,检测收集上清液的 OD 值。

1.3.3 CaN 活性检测 细胞培养第 3 天时,将上清液移除,PBS 冲洗 2 遍,每孔加入细胞裂解液 300 μL 反复吹打细胞使其完全裂解。应用南京建成生物工程研究所的 CaN 测试盒对 PASC 的 CaN 活性进行检测。

1.3.4 NFATc2 免疫荧光检测 细胞培养第 3 天时,将上清液移除,PBS 冲洗 2 遍,经 4% 多聚甲醛于固定、PBS 浸洗 3 遍后,以 5% BSA 室温封闭 10 min。将 BAS 弃去后,滴加小鼠抗大鼠 NFATc2 单克隆抗体(1:Biologicals 公司)200 μL,于 4 ℃ 条件下孵育过夜。PBS 浸洗 3 遍,滴加 FITC 标记的兔抗小鼠 IgG 200 μL,于 4℃ 条件下避光孵育 2 h。PBS 浸洗 3 遍后,加入 1mg/L DAPI 50 μL 瞬染 10 s,经 PBS 反复浸洗 3 遍后于荧光显微镜下进行观察。

1.4 统计学处理

正态分布计量数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学处理。2 组样本之间的比较采用 *t* 检验,多组样本之间的比较采用单因素方差分析,组间比较采用 *LSD* 法,*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PASC 的形态学观察

采用组织块贴壁法对 PASC 进行体外培养,

培养至第 5 天时,在组织块周围可以见到零星的细胞爬出,细胞呈多角形,且伸出细长的丝状伪足,约 3 周达到 70%~80% 融合。连续传代后,PASC 呈典型的集落样生长(图 1)。通过 α-actin 的免疫荧光染色对其鉴定显示,PASC 内荧光分布均匀,细胞内呈绿色荧光的肌丝清晰可见(图 1)。

2.2 MSC-CM 对 T 淋巴细胞 TNF-α 生成的影响

共培养第 3 天时,与对照组比较,T 淋巴细胞刺激组培养上清液中 TNF-α 浓度升高,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。与 T 淋巴细胞刺激组比较,MSC-CM 干预组 TNF-α 浓度明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。见表 1。

2.3 MSC-CM 对 PASC 增殖的影响

共培养第 3 天时,与对照组比较,T 淋巴细胞刺激组 PASC 细胞的增殖能力显著地提高,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。与 T 淋巴细胞刺激组比较,MSC-CM 干预组 PASC 细胞的增殖能力降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。见表 1。

2.4 MSC 对 PASC 细胞内 CaN 活性的影响

共培养第 3 天时,与对照组比较,T 淋巴细胞刺激组 CaN 磷酸酶活性显著增强,差异有统计学意义(*P* < 0.01);与 T 淋巴细胞刺激组比较,MSC-CM 干预组 CaN 磷酸酶活性显著降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 共培养第 3 天时 3 组培养上清中 TNF-α 浓度、PASC 细胞 CaN 活性及增殖能力的变化(*n* = 3)  
Tab. 1 Changes of TNF-α concentration as well as CaN activity and proliferative ability of PASC in the supernatant of three groups on the 3rd day of co-culture

指标	对照组	T 淋巴细胞刺激组	MSC-CM 干预组
TNF-α (ng/L)	38.5 ± 15.5	758.6 ± 46.3	237.2 ± 31.5
PASC 增殖能力(OD)	0.73 ± 0.06	0.94 ± 0.05	0.78 ± 0.07
CaN 活性(U/mgprot)	0.32 ± 0.04	0.59 ± 0.06	0.37 ± 0.06

2.5 MSC-CM 对 PASC 细胞内 NFATc2 活化的影响

如图 2,NFAT 的活化主要表现为 NFAT 在各种因素的刺激作用下发生去磷酸化并转位进入细胞核内,结果显示,对照组中 PASC 单独培养时,FITC 荧光标记的 NFATc2 主要分布于细胞浆内;而在活化 T 淋巴细胞的刺激作用下,FITC 标记的 NFATc2 则在细胞核的分布明显增强,经荧光显微镜检测显示在与 DAPI 荧光重叠后显示为青色。

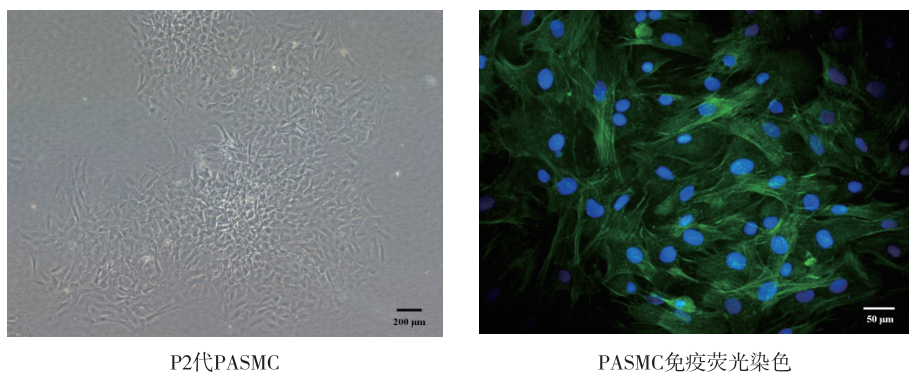


图 1 大鼠肺动脉血管平滑肌细胞的体外培养及鉴定

Fig. 1 *In vitro* Culture and Identification of PASM

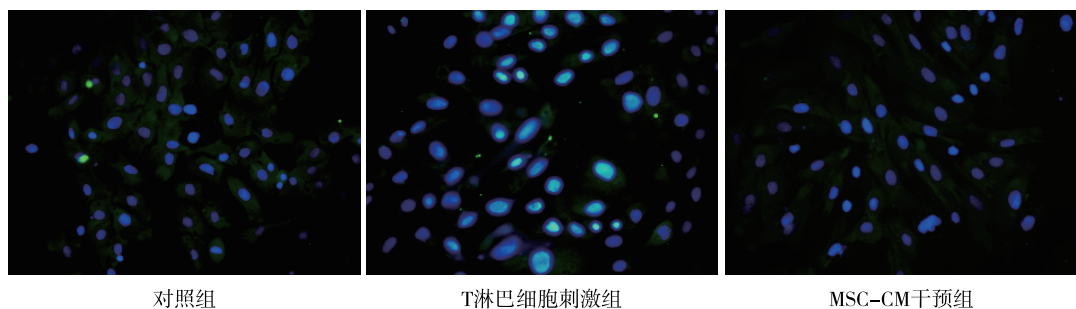


图 2 共培养体系中肺动脉血管平滑肌细胞内 NFATc2 的活化(400 ×)

Fig. 2 Activation of NFATc2 in PASM cells in co-culture system

MSC-CM 干预组,PASM 细胞核内 NFATc2 的分布则明显减少,提示在 MSC-CM 的作用下,NFATc2 的活化可以得到有效地抑制。

### 3 讨论

广泛的肺小动脉持续性收缩和肥厚是 PH 的主要病理特征,在 PH 的疾病进程中多能观察到免疫炎症反应及 PASM 的过度增殖的存在,并且有可能作为 PH 的治疗靶点<sup>[6]</sup>。MSC 作为一类具有自我更新和多系分化潜能的成体干细胞,由于其所具有强大的免疫调节、抗炎、抗纤维化能力而备受研究人员关注,并有望成为 PH 及其它肺部疾病的有效治疗工具<sup>[7-9]</sup>。有学者研究发现,当与活化的 T 淋巴细胞共同培养时 MSC 可以通过其分泌的多种免疫调节因子及前列腺素 E2 (prosta glandin E2, PGE2) 有效地抑制 T 淋巴细胞炎症性细胞因子的生成<sup>[10-11]</sup>。由于免疫炎症反应在 PH 的发病机制中起到了至关重要的作用,这一观点已经广泛的被人们所认识和接受,因此 MSC 所特有的强大的免疫调节作用或许极有利于 PH 的治疗。在低氧和

高氧诱导的肺损伤实验动物模型中应用 MSC-CM 同样可以起到与 MSC 移植类似的保护作用<sup>[12]</sup>,因此 MSC 的治疗机制更多的被归结于旁分泌途径。由于不存在伦理学等障碍的限制,具有与 MSC 同样作用效果的 MSC-CM 在临床中便显得具有更为广阔的应用前景和空间。NFAT 家族包括一系列免疫反应调控因子,广泛的分布于包括平滑肌在内的组织中。正常情况下 NFAT 以非活化状态存在于细胞浆中,而当 NFAT 在钙离子依赖的磷酸化 CaN 的作用下发生去磷酸化激活后则转位进入细胞核中,进而发挥其相应的调控作用。目前已经证实 CaN/NFAT 参与了 PH 的病理进程。PASM 细胞内 NFAT 的活化不仅出现在 PH 患者<sup>[6]</sup>,同时也可见于包括 MCT 诱导的 PH<sup>[6]</sup> 和低氧诱导的 PH 等诸多的实验动物模型中<sup>[13]</sup>。此外,通过抑制 CaN/ NFAT 可以有效地抑制 PASM 的过度增殖并促进其发生凋亡<sup>[6]</sup>,进而阻止低氧诱导的 PH 及右心室的肥厚<sup>[14-15]</sup>。因此,为了进一步阐释 MSC-CM 治疗 PH 的机制,本研究建立了一个由 PASM、T 淋巴细胞组成的体外共培养体系,并应用 MSC-CM 对其进行干预;通过分析加入 T 淋巴

细胞培养后上清中 TNF- $\alpha$  浓度, PASMCM 内 CaN 的磷酸酶活性以及 NFATc2 的活化情况, 进一步解释 MSC-CM 对炎症相关的 PASMCM 过度增殖的调控机制。研究结果显示, 在 ConA 的刺激作用下, T 淋巴细胞可以分泌高水平的 TNF- $\alpha$ , 进而增强 PASMCM 内 CaN 的磷酸酶活性, 促进 NFATc2 的活化, 对 PASMCM 的增殖起到显著的促进作用; 但在 MSC-CM 的免疫调节作用下, T 淋巴细胞所生成的 TNF- $\alpha$  显著减少, 从而使得与之处于共培养状态下的 PASMCM 内 CaN 的磷酸酶活性降低, NFATc2 的活化受到明显的抑制, 最终导致 PASMCM 的过度增殖得到了有效地控制。

综上所述, 本研究初步证实, 利用来源于 MSC-CM 对 PH 进行治疗的过程中, 有效地抑制 PASMCM 的过度增殖, 从而达到对 PH 的治疗作用, 可能是其主要作用机制之一。其治疗作用主要是通过抑制炎症性 TNF- $\alpha$  的生成, 进而抑制 PASMCM 内 CaN 的磷酸酶活性以及 NFATc2 的活化而实现的。然而, PH 的发生是一个极其复杂的病理过程, TNF- $\alpha$ /CaN/NFAT 信号途径也仅仅是 PH 疾病进程中 PASMCM 发生过度增殖的信号途径之一, 因此对于 MSC-CM 在 PH 治疗过程中的远期疗效及潜在的风险还有待于进一步的研究。尽管如此, 本研究成果还是能够为 PH 的治疗提供一个新思路, 并对相关的研究起到一定的借鉴作用。

4 参考文献

[1] PERROS F, DORFMÜLLER P, MONTANI D, et al. Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Resp Crit Care Med*, 2012, 185(3):311-321.

[2] 葛晓月, 张卫芳, 胡长平. 炎症在动脉性肺动脉高压病理生理过程中的作用[J]. *中南医学科学杂志*, 2017, 45(4): 325-330.

[3] ROWLANDS D J, ISLAM M N, DAS S R, et al. Activation of TNFR1 ectodomain shedding by mitochondrial Ca2+ determines the severity of inflammation in mouse lung microvessels[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(5):1986-1999.

[4] SAID S I, HAMIDI S A, GONZALEZ BOSCH L. Asthma and pulmonary arterial hypertension: do they share a key mechanism of pathogenesis[J]. *Eur Respir J*, 2010, 35

(4):730-734.

[5] 牛志浩, 戴坤鹏, 李宗辉, 等. 间充质干细胞条件培养基对实验性肺动脉高压大鼠的干预作用研究[J]. *疑难病杂志*, 2016, 15(6): 625-628.

[6] BONNET S, ROCHEFORT G, SUTENDRA G, et al. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(27):11418-11423.

[7] WEISS D J, BERTONCELLO I, BOROK Z, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2011, 8(3):223-272.

[8] 吴西军, 刘俊峰, 何志旭. 间充质干细胞对肺动脉高压的治疗作用及其对肿瘤坏死因子 $\alpha$ /活化T淋巴细胞核因子的影响[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2017, 32(13): 1018-1021.

[9] HANSMANN G, FERNANDEZ-GONZALEZ A, ASLAM M, et al. Mesenchymal stem cell-mediated reversal of bronchopulmonary dysplasia and associated pulmonary hypertension [J]. *Pulm Circ*, 2012, 2(2):170-181.

[10] YANG Z X, HAN Z B, JI Y R, et al. CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties [J]. *PloS One*, 2013, 8(3):e59354.

[11] HAN Z C, DU W J, HAN Z B, et al. New insights into the heterogeneity and functional diversity of human mesenchymal stem cells [J]. *Biomed Mater Eng*, 2017, 28(s1):29-45.

[12] SAMMOUR I, SOMASHEKAR S, HUANG J, et al. The effect of gender on mesenchymal stem cell (msc) efficacy in neonatal hyperoxia-induced lung injury[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10):e0164269.

[13] FRUTOS S, SPANGLER R, ALÒ D, et al. NFATc3 mediates chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling with alpha-actin up-regulation [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(20):15081-15089.

[14] BIERER R, NITTA C H, FRIEDMAN J, et al. NFATc3 is required for chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in adult and neonatal mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011, 301(6):L872-80.

[15] BALL M K, WAYPA G B, MUNGAI P T, et al. Regulation of hypoxia-induced Pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  [J]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014, 189(3):314-324.

(2018-03-18 收稿, 2018-05-29 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 乐萍