

Wnt经典通路诱导间充质干细胞向肺上皮细胞分化对自噬的影响

高春雪, 辛兆瑞, 蔡施霞, 李连弟*

青岛大学附属医院, 山东 青岛
Email: walllace@163.com, *liliandi75@sina.com

收稿日期: 2021年5月7日; 录用日期: 2021年5月25日; 发布日期: 2021年6月10日

摘要

目的: 证实细胞自噬参与Wnt经典通路诱导小鼠骨髓来源间充质干细胞(mice bone marrow derived mesenchymal stem cells, mMSCs)向肺泡上皮(type II alveolar epithelial, AT II)细胞的分化。方法: mMSCs与MLE-12结合小气道培养基(SAGM)共培养构建体外诱导MSC向肺上皮细胞分化的模型, 通过LiCl或DKK-1分别激活或抑制经典Wnt通路, 实验分组如下: a. MSC组: MSC单独培养、b. MSC + MLE组: MSC与MLE-12共培养、c. MSC + MLE + LiCl组: MSC与MLE-12共培养并给予4 mL LiCl激活经典Wnt通路、d. MSC + MLE + DKK-1组: MSC与MLE-12共培养并给予200 ng/mL DKK-1抑制Wnt经典通路。通过Western blot法检测诱导分化的第7天II型肺泡上皮细胞标志表面活性蛋白(surfactant protein, SP) C评估MSC向II型肺泡上皮细胞分化情况, 并检测诱导分化第1、3、7天自噬相关蛋白(LC3B及Beclin-1)的表达。结果: 与MSC单独培养及与MSC、MLE-12共培养相比较, 共培养中加入LiCl时SP-C表达增加($p < 0.05$); 与MSC单独培养、与MLE-12共培养及与共培养中加入4 mL LiCl相比, 加入DKK-1后SP-C表达下降($p < 0.05$)。通过Western blot法检测诱导分化第1、3、7天自噬相关蛋白(LC3B及Beclin-1)的表达发现: 与MSC单独培养相比较, 共培养中加入LiCl时Beclin-1、LC3-II/I表达增加($p < 0.05$); 而加入DKK-1后与MSC、MLE-12共培养相比较, Beclin-1、LC3-II/I表达下降($p < 0.05$)。结论: 激活经典Wnt通路促进MSC向肺上皮细胞分化, 激活经典Wnt通路增加MSC自噬水平。

关键词

间充质干细胞, 自噬, 分化

Effects of Wnt Classical Pathway on Autophagy Induced Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Lung Epithelial Cells

*通讯作者。

Chunxue Gao, Zhaorui Xin, Shixia Cai, Liandi Li*

The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Email: wallace@163.com, *liliandi75@sina.com

Received: May 7th, 2021; accepted: May 25th, 2021; published: Jun. 10th, 2021**Abstract**

Objective: It was confirmed that autophagy is involved in the induction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MMSCs) into the alveolar epithelium (type II alveolar epithelial, AT II). **Methods:** MMSCs and MLE-12 combined with small airway medium (SAGM) were co-cultured to establish a model of *in vitro* induction of differentiation of MSCs into lung epithelial cells. The classical Wnt pathway was activated or inhibited by LiCl or DKK-1, respectively. The experimental groups were as follows: a. MSC group: MSC was cultured alone; b. MSC+MLE group: MSC was co-cultured with MLE-12; c. MSC + MLE + LiCl group: MSCs were co-cultured with MLE-12 and given 4 mL LiCl to activate the classical Wnt pathway; d. MSC + MLE + DKK-1 group: MSCs were co-cultured with MLE-12 and given 200 ng/mL DKK-1 to inhibit the Wnt classical pathway. Western blot was used to detect II type alveolar epithelial cell marker surfactant protein (SP) C on day 7 of induced differentiation to evaluate the differentiation of MSC to type II alveolar epithelial cells. The expressions of autophagy-related proteins (LC3B and Beclin-L) on the 1st, 3rd and 7th day of differentiation induction were detected. **Results:** Compared with MSC alone culture and co-culture with MSC and MLE-12, the expression of SP-C was increased when LiCl was added in co-culture ($p < 0.05$). Compared with MSC alone culture, MLE-12 co-culture and co-culture with the addition of 4 mL LiCl, SP-C expression decreased after the addition of DKK-1 ($p < 0.05$). The expression of autophagy related proteins (LC3B and Beclin-L) at the 1st, 3rd and 7th day after induction of differentiation was detected by Western blot. Compared with MSC alone culture, the expressions of Beclin-L and LC3-II/I were increased when LiCl was added in co-culture ($p < 0.05$). The expression of Beclin-L and LC3-II/I decreased after DKK-1 co-culture compared with MSC and MLE-12 ($p < 0.05$). **Conclusion:** Activation of classical Wnt pathway promotes differentiation of MSCs into lung epithelial cells, and activation of classical Wnt pathway increases autophagy level of MSCs.

Keywords**Mesenchymal Stem Cells, Autophagy, Differentiation**

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

1. 引言

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由非心源性肺水肿引起的急性呼吸衰竭综合征。与 ARDS 发展相关的最常见的临床疾病是细菌性和病毒性肺炎。急性呼吸窘迫综合征也常由非肺源性脓毒症、严重创伤和胃内容物误吸引起,较少由胰腺炎和药物反应引起[1]。急性呼吸窘迫综合征的诊断标准随着时间的推移发生了变化:目前的定义为 2012 年的柏林定义(Berlin definition) [2],该定义包括三个主要标准,并改变了严重程度的分类。定义急性呼吸窘迫综合征的三个标准是:1) 在已知临床感染后 1 周内出现或出现新的或恶化的呼吸症状;2) 胸部 X 线或胸部 CT 不能完全解释为积液、肺

叶/肺萎陷的双侧浑浊；3) 不能完全由心脏衰竭或液体超载解释的呼吸衰竭。尽管进行了几十年的研究，但目前还没有有效的 ARDS 药物治疗。虽然已经建立了一些支持性护理方法，但 ARDS 仍然具有破坏性和生命危险[3] [4]。因此，ARDS 的治疗仍然存在重重困难。

随着干细胞的作用被大家所认识，使间质干细胞(MSC)被认为是治疗 ARDS 的很有意义的干预措施。我们前期实验已经验证治疗性 MSC 注入 ARDS 小鼠模型中可以发现在损伤的肺组织聚集大量 MSC 并向肺上皮细胞分化，促进损伤肺细胞的修复[5] [6]。新进许多研究发现自噬在 MSC 分化中发挥作用。MSCs 中的自噬调节可能影响其向多种细胞谱系分化的能力，并影响免疫细胞的增殖、激活和功能。而间充质干细胞向肺上皮细胞转化过程中自噬是否起参与，仍不清楚。因此本实验研究外源性 MSC 向肺泡上皮细胞分化过程中是否对自噬产生影响。运用 MSC 和肺上皮细胞共培养模型，通过观察调控 Wnt 经典通路对细胞自噬的影响，明确 Wnt 经典通路调控 MSC 向肺泡上皮定向分化过程自噬是否参与。

2. 材料与研究方法

2.1. 实验细胞

小鼠肺上皮细胞(murine lung epithelial, MLE-12 细胞)，购自拜力细胞库。

小鼠间充质干细胞(mMSCs)，来源于 C57BL/6 小鼠骨髓，购于 Cyagen Biosciences, Inc. (Guangzhou, China)。

2.2. 实验分组

- a) MSC 组：MSC 单独培养；
- b) MSC + MLE 组：MSC + MLE-12；
- c) MSC + MLE + LiCl 组：MSC + MLE-12 + 浓度 4 mmol/L 的 LiCl 激活经典 Wnt 通路；
- d) MSC + MLE + DKK-1 组：MSC + MLE-12 + 浓度 20 ng/mL 的 DKK-1 抑制经典 Wnt 通路。

2.3. 研究方法

MSC 与肺上皮细胞结合小气道培养基(SAGM)共培养构建体外诱导 MSC 向肺泡上皮细胞分化的模型，通过 LiCl 激活或 DKK-1 阻断 Wnt 经典通路，观察 MSC 向肺泡上皮细胞分化过程中调控经典 Wnt 通路对 MSC 的自噬活性的影响。

2.3.1. 检测细胞自噬活性

培养后第 1、3、7 天，运用 western blot 检测 MSC 自噬标记蛋白 LC3-I、LC3-II 及 Beclin-1 表达。

2.3.2. 评估 MSC 向肺细胞的分化情况

培养后第 7 天运用 western blot 检测共培养体系模型下室中诱导分化后 MSC 的 II 型肺泡上皮细胞特征蛋白 SP-C 的蛋白表达情况。

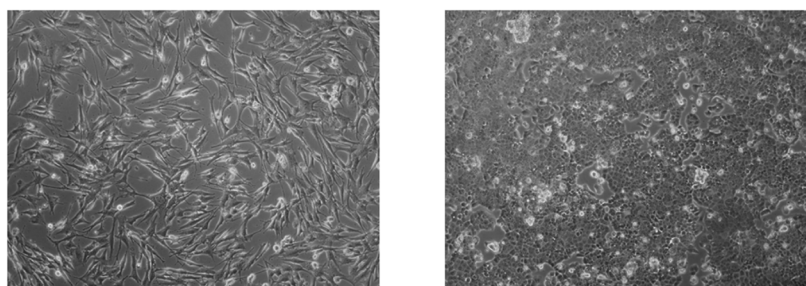
2.4. 统计学分析

应用 SPSS 软件进行数据分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示， $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 实验结果

3.1. 细胞复苏

按步骤复苏 MSC 与 MLE-12 并逐步传代，可分别观察发现镜下为梭形或三角形的 MSC 细胞，以及镜下形状为铺路石样形态的 MLE-12 (见图 1(A)、图 1(B))。



A MSC

B MLE-12

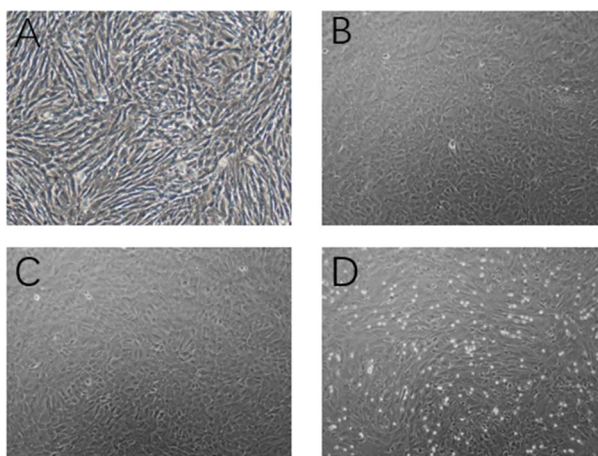
A. mMSCs 在光镜($\times 100$)下形态; B. MLE-12 在光镜($\times 100$)下形态。

Figure 1. Morphology of mMSCs and MLE-12 under light microscope

图 1. mMSCs、MLE-12 光镜下形态

3.2. MSC 向 MLE-12 分化

在肺上皮细胞结合小气道培养基(SAGM)与 MSC 共培养细胞模型基础上, 通过 LiCl 激活或 DKK1 阻断 Wnt 经典通路, 观察实验分组中第 1、3、7 天中 MSC 向肺泡上皮细胞的分化。首先随着共培养时间的增加, 各个实验组均发现, 后期共培养模型中发现梭型或三角形的成纤维细胞样变为铺路石样的类上皮细胞样结构。同时组间比较第 7 天镜下细胞形状, 可发现 LiCl 激活 Wnt 经典通路的实验组中, 镜下铺路石样细胞形态占比偏多。而使用 DKK1 阻断 Wnt 经典通路的实验组中, 镜下仍然可见梭形细胞形态, 铺路石样上皮细胞少见(见图 2(A)~(D))。



A. 空白组 mMSCs 在单独培养 7 天后光镜($\times 100$)下形态; B. MLE-12 细胞共培养结合 SAGM 诱导 mMSCs 分化 7 天后光镜($\times 100$)下形态; C. MSC + MLE-12 + 浓度 4 mmol/L 的 LiCl 共培养 7 天后光镜($\times 100$)下形态; D. MSC + MLE-12 + 浓度 20 ng/mL 的 DKK-1 共培养 7 天后光镜($\times 100$)下形态。

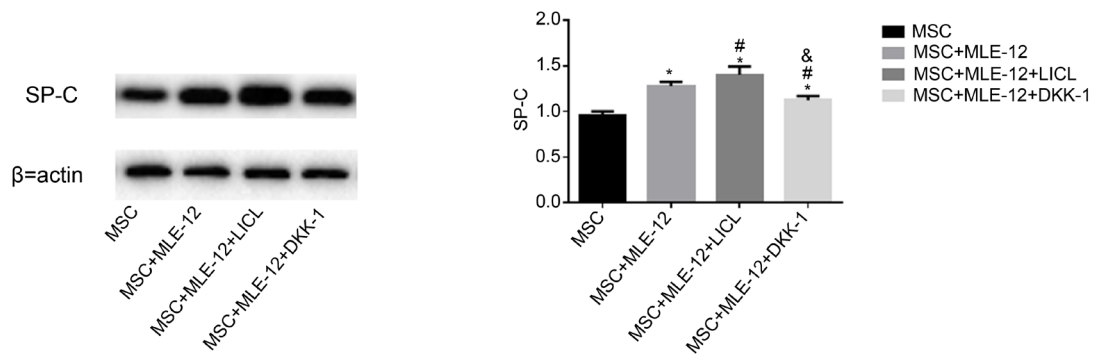
Figure 2. Morphological changes of mMSCs after differentiation into AT II cells

图 2. mMSCs 向 AT II 细胞分化后的形态学变化

3.3. Wnt 通路的调节 mMSCs 向肺上皮细胞分化

本研究分别将 4 mmol/L 的 LiCl, 200 ng/mL DKK-1 加入肺上皮细胞结合小气道培养基(SAGM)与 MSC 共培养细胞培养基中培养 7 天, Western blot 法检测 SP-C, MSC 与 MLE 共培养较 MSC 单独培养的 SP-C 表达增加($p < 0.05$); 与 MSC 单独培养及与 MSC、MLE-12 共培养相比较, 共培养中加入 LiCl 时 SP-C 表达增加($p < 0.05$); 与 MSC 单独培养, 与 MLE-12 共培养及与共培养中加入 4 mL LiCl 相比,

加入 DKK-1 后 SP-C 表达下降($p < 0.05$)。结果表明, LiCl 激活经典 Wnt 通路促进 mMSC 向肺上皮细胞分化, 抑制 Wnt 通路减少 MSC 向肺上皮细胞分化(见图 3)。



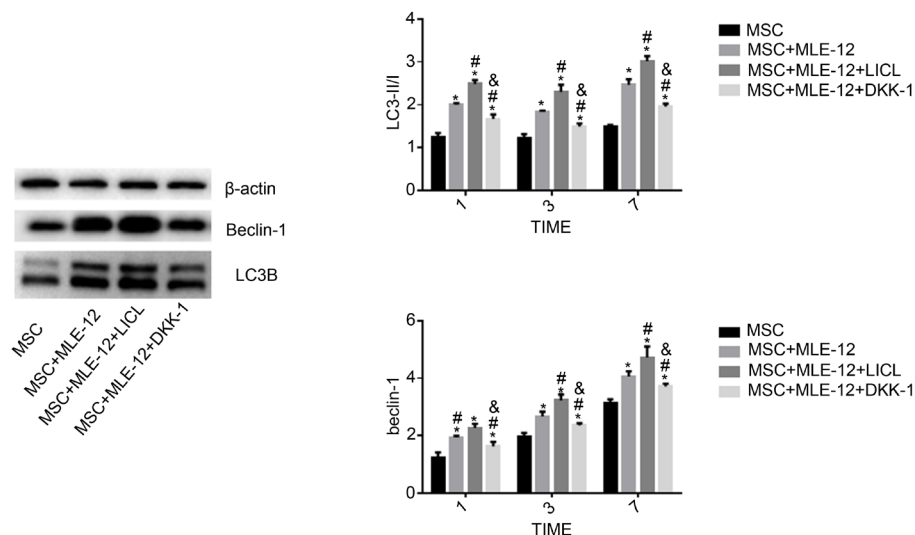
Western blot 法检测 MLE-12 细胞结合 SAGM 诱导 mMSCs 向 AT II 细胞分化不同时间 mMSCs 中 pro-SPC 蛋白的表达。(n = 3; * $p < 0.05$ VS MSC; # $p < 0.05$ VS MSC + MLE-12; & $p < 0.05$ VS MSC + MLE-12 + LiCl)。

Figure 3. The effect of classical Wnt pathway on the differentiation of MMSCs into AT II cells

图 3. 经典 Wnt 途径对 mMSCs 向 AT II 细胞分化的影响

3.4. 自噬的活性改变

在共培养结合 SAGM 诱导 MSC 向 AT II 细胞分化的过程中, 加入 4 mmol/L 的 LiCl 激活 MSC 的经典 Wnt 通路, 以及加入 200 ng/mL DKK-1 抑制 Wnt 通路。通过 Western blot 法检测诱导分化第 1、3、7 天自噬相关蛋白(LC3B 及 Beclin-1)的表达发现: 与 MSC 单独培养相比较, 共培养中加入 LiCl 时 Beclin-1、LC3-II/I 表达增加 $p < 0.05$; 与 MSC、MLE-12 共培养相比较, 共培养中加入 LiCl 时 Beclin-1、LC3-II/I 表达仍然增加 $p < 0.05$, 而加入 DKK-1 后与 MSC、MLE-12 共培养相比较, 加入 DKK-1 后 Beclin-1、LC3-II/I 表达下降($p < 0.05$); 与加入 LiCl 比较 Beclin-1、LC3-II/I 表达下降($p < 0.05$)。结果表明 LiCl 活化经典 Wnt 途径后, 细胞自噬相关蛋白表达增加, 而 DKK-1 抑制 Wnt 途径时自噬相关蛋白表达下降(见图 4)。



Western blot 法测定共培养结合 SAGM 诱导 MSC 向 AT II 细胞分化 1、3、7 d 时 MSC 的自噬标记蛋白 LC3-I、LC3-II 及 Beclin-1 的表达量。(n = 3; * $p < 0.05$ VS MSC; # $p < 0.05$ VS MSC + MLE-12; & $p < 0.05$ VS MSC + MLE-12 + LiCl)。

Figure 4. The effect of Wnt classical pathway on autophagy by regulating MSCs differentiation to AT II cells

图 4. Wnt 经典通路调节 MSC 向 AT II 细胞分化对细胞自噬的影响

4. 结论

- 1) 激活经典 Wnt 通路促进 MSC 向肺上皮细胞分化。
- 2) 激活经典 Wnt 通路增加 MSC 自噬水平。

5. 讨论

急性呼吸窘迫综合征病死率仍然居高不下, 研究如何治疗 ARDS 成为重中之重。肺泡上皮细胞和肺毛细血管内皮细胞弥漫性损伤[7]特别是肺泡上皮细胞的损伤, 导致肺泡屏障破坏和肺泡结构毁损, 是 ARDS 的主要病理改变。于是研究如何改善损伤的肺泡上皮细胞可以成为治疗 ARDS 的切入点。间质干细胞(MSC)治疗被认为是治疗 ARDS 的有希望的干预措施, 近年来许多研究证实给予外源性的 MSC 可以归巢到损伤肺组织, 并分化为肺泡上皮细胞, 从而促进损伤肺细胞的修复, 缓解肺损伤的病理改变, 提高 ARDS 动物的生存率[8]

而目前 Wnt 通路是被大家研究最为广泛的信号调节通路, 关于 Wnt 通路是否可以参与调节 MSC 向 AT II 细胞, 现在众多体内外实验结果均表明该通路可以参加细胞分化, 同时激活通路是实验发现细胞分化明显增加[9] [10]。本实验在共培养结合 SAGM 诱导 MSC 分化的基础上, 外源性干预经典 Wnt 通路, 观察经典 Wnt 通路对 MSC 向 AT II 细胞分化的调节作用。根据实验结果发现 Wnt 通路可调节 MSC 向 MLE-12 分化, 在加入 LICI 活化经典 Wnt 通路后 AT-II 细胞的特征蛋白 SP-C 表达上调, 表明分化在一定程度上增加。加入 DKK1 后, 发现其表达减少。表明激活经典 Wnt 通路可以促进外源性小鼠骨髓来源间充质干细胞向 II 型肺泡上皮细胞转化。

然而 MSC 在 ARDS 的外源性治疗与大家的理想假设存在差距, 具有一定局限型, 经研究发现其原因主要是在 ARDS 动物模型中, 发现外源性治疗注射 MSC 后无法在损伤的肺组织内部长时间停留并分化为相应细胞来改善受损伤的肺, 促进恢复。当外源性治疗性干细胞注入目标组织后, 将会面临一个充满敌意的环境, 包括缺氧、缺乏营养和基质支持, 细胞也可能成为免疫系统的目标并被排斥。因此, 干细胞的应激反应机制可能在注射细胞的存活中发挥重要作用, 并可能有助于其治疗效果[10]。自噬将多种底物(如细胞质成分、受损细胞器、蛋白聚集物或吞噬在双膜囊泡(自噬体)中的感染性颗粒)传递给溶酶体进行降解。其在细胞内平衡中起着多效性的作用, 其中最重要的作用是使细胞在营养缺乏时存活[11]。多种干细胞如造血干细胞、骨髓间充质干细胞和神经干细胞均存在自噬现象, 自噬与细胞的自我更新、定向分化和衰老密切相关[11] [12]。MSC 早期骨质生成和脂肪生成中涉及自噬通量[13]。因此自噬很大可能参与间充质干细胞向肺上皮细胞的分化。本实验通过测量 LC3-I 和 LC3-II 之间的比率来评估自噬。

本实验在 MSC、MLE-12 结合 SAGM 共培养构建体外诱导 MSC 向肺上皮细胞分化的模型基础上, 通过实验分组激活或抑制经典 Wnt 通路, 明确经典 Wnt 通路调节 MSC 向肺上皮细胞分化过程中对自噬活性的影响。结果验证加入 LICI 活化经典 Wnt 通路后, 细胞向肺上皮细胞分化增加, 同时自噬蛋白的表达同样上调, 说明在调控 Wnt 通路时自噬活性随之发生变化。我们有理由推测 MSC 向肺上皮细胞转化过程中自噬发挥一定作用。这对于进一步寻找促进 MSC 的肺泡上皮分化的有效途径, 突破目前 MSC 治疗 ARDS 的困境, 并对 ARDS 患者预后的改善具有重大意义。

参考文献

- [1] Ware, L.B. and Matthay, M.A. (2000) The Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, **342**, 1334-1349. <https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421806>
- [2] Ranieri, V.M., Rubenfeld, G.D., Taylor Thompson, B., et al. (2012) Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition. *JAMA*, **307**, 2526-2533.

- <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669>
- [3] Papazian, L., Aubron, C., Brochard, L., *et al.* (2019) Formal Guidelines: Management of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Annals of Intensive Care*, **9**, 69. <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0540-9>
- [4] Bellani, G., *et al.* (2016) Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA*, **315**, 788-800. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0291>
- [5] Weiss, D.J., Bertonecello, I., Borok, Z., *et al.* (2011) Stem Cells and Cell Therapies in Lung Biology and Lung Diseases. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **8**, 223-272. <https://doi.org/10.1513/pats.201012-071DW>
- [6] Gupta, N., Su, X., Popov, B., *et al.* (2007) Intrapulmonary Delivery of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Survival and Attenuates Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Journal of Immunology*, **179**, 1855-1863. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1855>
- [7] Wirawan, E., Berghe, T.V., Lippens, S., *et al.* (2012) Autophagy: For Better or for Worse. *Cell Research*, **22**, 43-61. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.152>
- [8] Peters, A.E., Mihalas, B.P., Bromfield, E.G., *et al.* (2020) Autophagy in Female Fertility: A Role in Oxidative Stress and Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, **32**, 550-568. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7986>
- [9] Liu, A.R., Liu, L., Chen, S., *et al.* (2013) Activation of Canonical Wnt Pathway Promotes Differentiation of Mouse Bone Marrow-Derived MSCs into Type II Alveolar Epithelial Cells, Confers Resistance to Oxidative Stress, and Promotes Their Migration to Injured Lung Tissue *In Vitro*. *Journal of Cellular Physiology*, **228**, 1270-1283. <https://doi.org/10.1002/jcp.24282>
- [10] Cai, S.X., Liu, A., Chen, S., *et al.* (2015) Activation of Wnt/ β -Catenin Signalling Promotes Mesenchymal Stem Cells to Repair Injured Alveolar Epithelium Induced by Lipopolysaccharide in Mice. *Stem Cell Research & Therapy*, **6**, 65. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0060-y>
- [11] Denham, M., Cole, T.J. and Mollard, R. (2006) Embryonic Stem Cells Form Glandular Structures and Express Surfactant Protein C Following Culture with Dissociated Fetal Respiratory Tissue. *American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, **290**, L1210-L1215. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00427.2005>
- [12] Van Vranken, B.E., Romanska, H.M., Polak, J.M., *et al.* (2005) Coculture of Embryonic Stem Cells with Pulmonary Mesenchyme: A Microenvironment That Promotes Differentiation of Pulmonary Epithelium. *Tissue Engineering*, **11**, 1177-1187. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1177>
- [13] Beljanski, V., Grinnemo, K.H. and Österholm, C. (2019) Pleiotropic Roles of Autophagy in Stem Cell-Based Therapies. *Cytotherapy*, **21**, 380-392. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.02.007>