气液界面培养人肺泡Ⅱ型上皮细胞系 A549 在脂多糖诱导肺炎性损伤模型中的应用

冀晓丽[1,2]，盛云华[1,2]，李银霞[1,2,3]，胡　玥[1,2]，唐黎明[1,2]*

（1. 上海市食品药品检验所药物安全评价中心，药理毒理室，上海 201203；
2. 国家药品监督管理局化学药品制剂质量分析重点实验室，上海 201203；3. 复旦大学药学院，上海 201203）

摘要：建立了暴露于空气 - 液体界面（ALI）培养模式下的人肺泡Ⅱ型上皮细胞系 A549- 炎症损伤模型，采用脂多糖（LPS）作为炎性刺激因子，探讨其在不同质量浓度（0、10、30、50 μg/ml）和不同作用时间（1、3、5 h）下对白细胞介素（IL-1β、IL-6、IL-8、IL-18）、肿瘤坏死因子 -α、转化生长因子 -β 基因表达的影响。结果显示，LPS 作用 1 h 时，除 IL-6 外，其余各剂量组均诱导上述炎症因子表达增加。炎症因子的表达与 LPS 的质量浓度无关，与其作用时间有关，为确定 ALI 培养炎症细胞模型的最佳质量浓度和时间提供了试验基础。

关键词：A549 细胞；空气 - 液体界面培养；肺部炎症模型；脂多糖

中图分类号：R-332；R563　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)03-0367-06

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.03.013

Application of Air-liquid Interface Culture of Human Type Ⅱ Alveolar Epithelial A549 Cells in Lipopolysaccharide-induced Pulmonary Inflammation Model

JI Xiaoli[1,2], SHENG Yunhua[1,2], LI Yinxia[1,2,3], HU Yue[1,2], TANG Liming[1,2]*

(*1. Dept. of Pharmacology and Toxicology, Center for Drug Safety Evaluation, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203; 2. NMPA Key Lab. for Quality Analysis of Chemical Drug Preparations, Shanghai 210203; 3. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: A human type Ⅱ alveolar epithelial cell line A549-inflammation injury model exposed to air-liquid interface (ALI) cultivation mode was established using lipopolysaccharide (LPS) as an inflammatory stimulator. The effects of different mass concentrations (0, 10, 30, 50 μg/ml) and durations (1, 3, 5 h) of LPS on the gene expression of interleukins (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-18), tumor necrosis factor-α and transorming growth factor-β were investigated. The results showed that the expressions of the above-mentioned inflammatory factors were increased in all dose groups except IL-6 when LPS acted for 1 h. The expressions of inflammatory factors were independent of the mass concentration of LPS, but related to its action time, which provided an experimental basis for determining the optimal concentration and time of ALI cultured inflammatory cell model.

Key Words: A549 cell; air-liquid interface culture; pulmonary inflammation model; lipopolysaccharide

呼吸系统健康以及与环境空气污染有关的疾病是被广泛关注的一个重大问题。吸入物质对健康的影响是呼吸系统疾病病因研究的主要内容，由此形成了呼吸道体外模型的使用和发展[1]。然而，在吸入毒理学领域，仍缺乏相关的体外模型和暴露方法来预测可吸入物质的毒性效应[2]。因此，本课题组近年来构建了大鼠肺部炎症损伤模型、原代小鼠气管上皮细胞黏液 - 纤毛离体模型、人支气管腺癌细胞 Calu-3 急性吸入毒性预测模型等[3—4]。上述体外

收稿日期：2021-04-28

作者简介：冀晓丽(1982—)，女，博士，从事吸入毒理、分子毒理方向的研究。

通信作者：唐黎明(1964—)，男，主任药师，从事药理毒理方向的研究。

E-mail：tangliming@smda.sh.cn

模型可成功模拟呼吸道的近端和远端区域，同时气管与支气管的体外评价模型也均已成功建立，但是，有关肺泡上皮细胞的暴露模型研究仍不完善。人肺泡Ⅱ型上皮细胞系A549常被用于吸入性材料和纳米材料的毒性测试。基于此，本研究拟构建暴露于空气-液体界面（air-liquid interface，ALI）培养模式下的人肺泡Ⅱ型上皮细胞系A549-炎症损伤模型，以期为吸入毒理学体外模型的构建与暴露方法的研究提供技术支持。

目前，肺部炎症损伤模型的建立常采用脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）为造模剂，但LPS的作用浓度和时间标准不一，导致各种模型的研究结果差异较大，尤其缺乏对于ALI特殊培养模式下的细胞炎症模型的研究[5]。ALI技术是一种更接近体内吸入模式的体外暴露细胞培养方法，其使用空气暴露路径作为吸入路径传递外源性化学物质，能最大程度模拟体内呼吸道上皮细胞与可吸入物质的接触，从而获得与体内暴露相关性更好的试验数据[6]。呼吸系统可以在感染和非感染条件下引发一系列先天免疫反应，通常肺上皮细胞能被促炎症因子诱导产生炎症效应，最终导致肺组织损伤、结构破坏和功能丧失[7]。

本研究采用LPS作为炎性刺激因子，探讨其在不同质量浓度和不同作用时间下对A549细胞中的炎性因子［白细胞介素（IL-1β、IL-6、IL-8、IL-18）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、转化生长因子-β（TGF-β）］基因表达的影响，确定ALI培养模式下构建的A549细胞炎症损伤模型的最佳浓度和时间条件，以期为后续吸入物质的毒性评价应用提供试验基础和理论支持。

1　仪器与试药

Vi-cell XR型细胞活力测定仪（德国Beckman Counter公司）；Spectra Max M5型多功能酶标仪（美国Molecular Devices公司）；ABI 7300型实时荧光定量聚合酶链反应（RT-PCR）系统和Evolution 350型紫外分光光度计均购于美国Thermo Fisher Scientific公司。

DMEM培养基（批号11995065）、青霉素/链霉素（批号10378016）和胰酶（批号10165921001）均购于美国Gibco公司；胎牛血清（美国Hyclone公司，批号DBC0520）；磷酸盐缓冲液（PBS，美国Corning公司，批号26318001）；LPS（美国Sigma公司，批号L2880）；Ⅳ型胶原（美国BioMatrix公司，批号5005）；总RNA提取试剂盒（批号DP430）、FastKing RT Kit反转录试剂盒（批号KR106）、SuperReal PreMix Plus试剂盒（批号FP205）和TRIzol试剂（批号DP430）均购于天根生化科技（北京）有限公司；细胞活性检测（CCK-8）试剂盒［东仁化学科技（上海）有限公司，批号SA616］；Transwell®-Clear培养板（美国Corning-Costar公司，批号3450）。

A549细胞（中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心）。

2　方法与结果

2.1　细胞培养

取A549细胞，用含10%胎牛血清的DMEM培养基，于37 ℃、含5% CO_2 的培养箱中进行常规培养。选取状态良好的对数生长期细胞，消化，制成单细胞悬液并计数。将A549细胞以每500 μl培养基中含细胞（3～5）×10^5 个的密度接种至12孔培养板中，浸没式培养24 h。当细胞密度融合至80%～100%时，吸取上层小室培养基，更换底层培养基，转化为ALI培养模式，继续培养48 h，进行后续试验。如果小室的细胞无法贴壁或脱落，将上层小室包被上胶原［将Ⅳ型胶原（3 mg/ml）用无菌水稀释至30～50 μg/ml，加入12孔培养板中的过滤膜小室中，每孔加0.5～1 ml］，模拟基膜内环境，于37 ℃培养箱孵育过夜。第2天吸出胶原蛋白涂层溶液，风干滤膜5 min，置生物安全柜中，经紫外线消毒后再用无菌PBS冲洗小室和基底层3次，去除游离胶原蛋白。

2.2　LPS工作液的配制

量取LPS 10 mg置50 ml离心管中，加入PBS 10 ml，涡旋振荡混匀，过滤除菌，得LPS贮备液，分装后于－20 ℃冰箱中保存。分别精密量取上述LPS贮备液0、0.5、1.5、2.5 ml，用DMEM培养基稀释并定容至50 ml，配制成0、10、30、50 μg/ml的LPS工作液，冷藏于4 ℃冰箱中。临用前涡旋振荡1 min。

2.3 CCK-8 试验方法

采用 CCK-8 法检测 A549 细胞的活力。取已经在 37 ℃、含 5% CO_2 的培养箱中 ALI 培养 48 h 的 A549 细胞，更换 Transwell 培养板下层培养基进行染毒：将“**2.2**”项下不同质量浓度的 LPS 工作液加入 12 孔 Transwell 培养板下层，每孔 500 μl。经不同质量浓度 LPS 染毒不同时间后，吸出下层染毒培养基，将剩余 CCK-8 溶液和 DMEM 培养基以体积比 1 ∶ 9 混合，然后将混合物加入到每个孔中，于 37 ℃、含 5% CO_2 的培养箱中孵育 2 ～ 4 h。采用多功能酶标仪测量每个孔在 450 nm 处的吸光度（OD）值。另外，以培养板中仅含 CCK-8 试剂和培养基、没有细胞的孔为空白孔，以培养板中含 CCK-8 试剂、培养基和细胞的孔为对照孔，同上测定。按式①计算细胞存活率。

$$细胞存活率=(OD_{试验孔}-OD_{空白孔})/(OD_{对照组}-OD_{空白孔})\times100\% \quad 式①$$

2.4 RT-PCR 试验

收集 6 孔培养板中经历不同染毒时间的各小室中的的细胞，使用 TRIzol 试剂裂解细胞，使用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，采用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度，使用 FastKing RT Kit 试剂盒去除基因组 DNA（gDNA），采用 FastKing RT Kit 反转录试剂盒合成互补 DNA（cDNA）用作 RT-PCR 模板。引物设计使用 Primer-Blast 软件，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，引物序列见表 1。重复试验 3 次。在 RT-PCR 系统中扩增靶基因，使用 SuperReal PreMix Plus 试剂盒，采用 3 步法 PCR 程序：95 ℃，15 min；95 ℃，10 s；55 ℃，30 s；72 ℃，32 s，共 40 个循环。每个剂量组设置 3 个复孔，重复试验 3 次取平均值，获取试验组目的基因和内参基因 3- 磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）的 mRNA 值。以不经 LPS 作用的细胞为对照组，其余为试验组。试验组相对于对照组的基因变化通过公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 得到。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析，正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，2 个独立样本比较采用 t 检验，质量浓度与时间因素采用单因素方差分析，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

表 1 RT-PCR 检测的目的基因与内参基因引物序列

Tab.1 RT-PCR Target and Reference Gene Sequences for Primers

类别	名称	正、反引物序列
目的基因	IL-1β	正引物：ACAGTGGCAATGAGGATG 反引物：TGTAGTGGTGGTCGGAGA
	IL-6	正引物：GTAGTGAGGAACAAGCCAGAG 反引物：ACATTTGCCGAAGAGCC
	IL-8	正引物：TAAAGACATACTCCAAACCT 反引物：AAACTTCTCCACAACCC
	IL-18	正引物：GATAGCCAGCCTAGAGGTATGG 反引物：CCTTGATGTTATCAGGAGGATTCA
	TNF-α	正引物：CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG 反引物：ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC
	TGF-β	正引物：AACCCACAACGAAATCTATGAC 反引物：GCTGAGGTATCGCCAGGAAT
内参基因	GAPDH	正引物：CATCACTGCCACCCAGAAGACTG 反引物：ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG

2.6 LPS 对 A549 细胞存活率的影响

采用 Transwell 12 孔板，将 A549 细胞以每 500 μl 培养基中含细胞 (3 ～ 5) ×10^5 个的密度接种至培养板的上层小室中，分别标记为对照组、10 μg/ml 组、30 μg/ml 组和 50 μg/ml 组，按“**2.1**”项下方法进行培养，细胞在 ALI 模式下培养 48 h 后，分别取“**2.2**”项下 0（对照组）、10、30、50 μg/ml 的 LPS 工作液更换基底层培养基，按“**2.3**”项下方法进行 CCK-8 试验，检测细胞存活率。

经 10、30、50 μg/ml 的 LPS 染毒 5 h 后 A549 细胞的存活率结果如图 1 所示，LPS 对细胞活性几乎无影响，各剂量组与对照组相比均无统计学差异（$P>0.05$）。

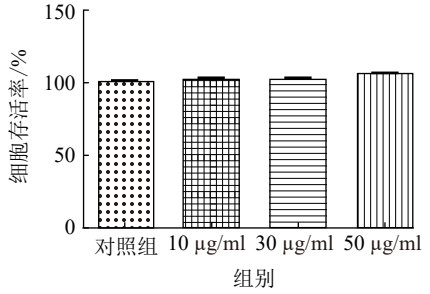


图 1 不同质量浓度 LPS 对 A549 细胞存活率的影响（n=3）

Fig.1 Effect of LPS Mass Concentration on the Viability of A549 Cells (n=3)

2.7　LPS 不同处理时间对多种促炎症因子 mRNA 表达的影响

分别取“**2.6**”项下经 0、10、30、50 μg/ml 的 LPS 工作液染毒 1、3、5 h 后的 A549 细胞，按“**2.4**”项下方法进行 RT-PCR 试验。

2.7.1　对 IL-1β 和 IL-6 mRNA 表达的影响

LPS 处理不同时间对 IL-1β 和 IL-6 mRNA 表达的影响结果见图 2。LPS 染毒 3 h 的 A549 细胞，30、50 μg/ml 剂量组 IL-1β mRNA 的表达升高，存在剂量 - 效应关系（P<0.05）；经 LPS 染毒 5 h 的 A549 细胞，各剂量组 IL-1β mRNA 的表达均下降（P<0.05）；经 LPS 染毒 1 h 的 A549 细胞，10 μg/ml 剂量组诱导 IL-6 mRNA 表达降低，50 μg/ml 剂量组诱导细胞 IL-6 mRNA 表达升高；经 LPS 染毒 3、5 h 的 A549 细胞，10、30、50 μg/ml 剂量组均诱导细胞 IL-6 mRNA 表达降低。

2.7.2　对 IL-8 和 IL-18 mRNA 表达的影响

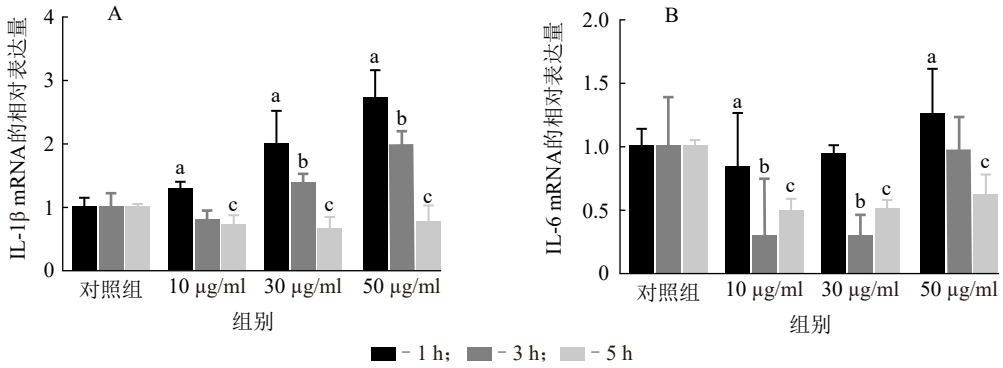
LPS 处理不同时间对 IL-8 和 IL-18 mRNA 表达的影响结果见图 3，经 LPS 染毒 1 h 的 A549 细胞，10、30、50 μg/ml 剂量组均诱导细胞 IL-8、IL-18 mRNA 表达升高（P<0.05）。随着染毒时间的增加，经 LPS 染毒 3、5 h 的 A549 细胞，10、30 和 50 μg/ml 剂量组均诱导 IL-8、IL-18 mRNA 表达降低（P<0.05）。在相同的剂量组中，相较于染毒 1 h，染毒 3、5 h 诱导 IL-8、IL-18 mRNA 表达降低。

2.7.3　对 TNF-α 和 TGF-β mRNA 表达的影响

LPS 处理不同时间对 TNF-α 和 TGF-β mRNA 表达的影响结果见图 4，经 LPS 染毒 1 h 的 A549 细胞，10、30、50 μg/ml 剂量组均诱导 TNF-α 和 TGF-β 表达升高（P<0.05）。随着染毒时间的增加，经 LPS 染毒 3、5 h 的 A549 细胞，10、30、50 μg/ml 剂量组均诱导 TNF-α 和 TGF-β mRNA 表达降低。相较于染毒 1 h，染毒 3、5 h，诱导 TNF-α 和 TGF-β mRNA 表达降低。

3　讨论

人类和小鼠、大鼠在呼吸解剖学方面存在关键差异，在人类的暴露环境下使用啮齿动物细胞模型获得的吸入毒性数据存在很大差异，因此应使用人类来源的细胞模型来解决与人类相关的呼吸问题[1]。目前已有的永生化细胞系（Calu-3、A549、人正常肺上皮细胞 BEAS-2B、人支气管上皮细胞 16HBE140-o 等）均已在 ALI 培养模式下用于呼吸系统相关研究[7]。与原代细胞培养相比，传代细胞可接种在胶原涂层或未经处理的渗透性过滤膜上，并以较低的密度进行培养。除了传统的浸没式培养模式，这些传代的细胞也可在 ALI 培养模式下生长。ALI 培养模式专注于肺部的特定解剖区域或分子途径，能够靶向性模拟与体内相关的过程，为可吸入物质直接沉积在半干燥的细胞表面提供暴露接触的机会，这种模型能够很好地模拟吸入物质沉积在体



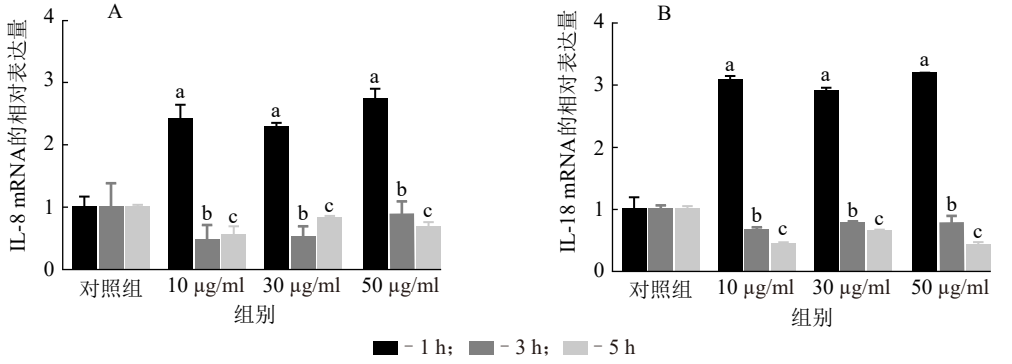
a 为 LPS 作用 1 h，各剂量组与对照组相比 P<0.05；b 为 LPS 作用 3 h，各剂量组与对照组相比 P<0.05；c 为 LPS 作用 5 h，各剂量组与对照组相比 P<0.05

图 2　LPS 处理时间对 A549 细胞中 IL-1β（A）和 IL-6（B）mRNA 表达的影响（n=3）

Fig.2　Effect of Treatment Time by LPS on the mRNA Expressions of IL-1β (A) and IL-6 (B) in A549 Cells (n=3)

内肺表面的行为[8]，为研究呼吸道的生物学反应、分子机制以及与不同类型细胞相互作用模式提供科学的方法[9—10]。

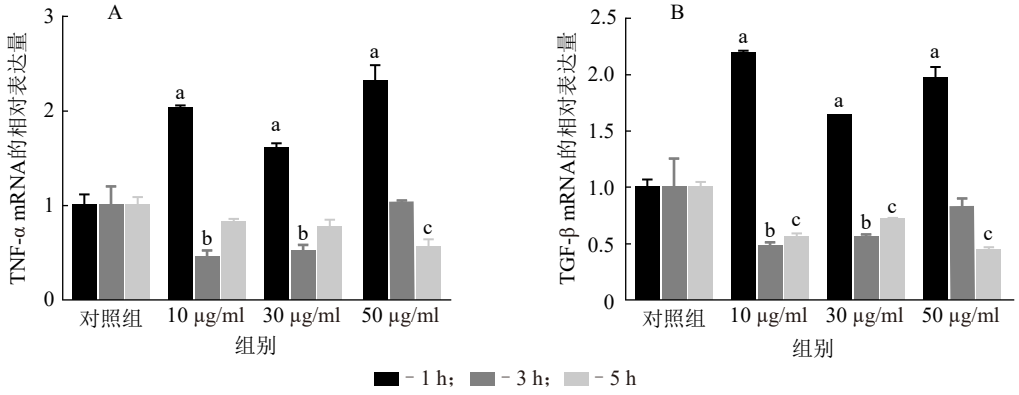
A549 细胞来源于人非小细胞肺癌的肿瘤细胞，在基础试验研究中将其作为人肺泡Ⅱ型上皮细胞的模拟细胞，主要应用于肺部肿瘤性疾病的发生发展、肺泡上皮细胞信号转导通路的机制研究、构建肺泡细胞模型及肺泡细胞共培养模型等[11]。在传统的 2D 浸没式细胞培养条件下，将 A549 细胞培养在单层的塑料培养皿表面，无法充分研究细胞特性与体内组织的相关性。有研究比较了采用浸没式培养和 ALI 培养模式将 A549 细胞暴露于氧化锌状态下的差异，结果表明 A549 细胞暴露于相同浓度的氧化锌时，浸没式培养的条件下细胞中多种炎症介质的 mRNA 表达与 ALI 培养相比，显著减弱[12]。此外，A549 和人单核细胞白血病细胞（THP-1 细胞）的共培养结果表明，与浸没暴露相比，在 ALI 暴露下，A549 和 THP-1 细胞对难溶性纳米材料（TiO_2 和 CeO_2）的敏感性更高[8]。肺泡上皮细胞作为肺组织的结构细胞，能表达和释放多种细胞因子、生长因子、趋化因子和炎性反应介质。LPS 来自细菌细胞壁，是细菌内毒素的主要组成部分。内毒素能够刺激细胞



a 为 LPS 作用 1 h，各剂量组与对照组相比 $P<0.05$；b 为 LPS 作用 3 h，各剂量组与对照组相比 $P<0.05$；c 为 LPS 作用 5 h，各剂量组与对照组相比 $P<0.05$

图 3 LPS 处理时间对 A549 细胞中 IL-8（A）和 IL-18（B）mRNA 表达的影响（n=3）

Fig.3 Effect of Treatment Time by LPS on the mRNA Expressions of IL-8（A）and IL-18（B）in A549 Cells（n=3）



a 为 LPS 作用 1 h，各剂量组与对照组相比 $P<0.05$；b 为 LPS 作用 3 h，各剂量组与对照组相比 $P<0.05$；c 为 LPS 作用 5 h，各剂量组与对照组相比 $P<0.05$

图 4 LPS 处理时间对 A549 细胞中 TNF-α（A）和 TGF-β（B）mRNA 表达的影响（n=3）

Fig.4 Effect of Treatment Time by LPS on the mRNA Expressions of TNF-α（A）and TGF-β（B）in A549 Cells（n=3）

产生促炎症因子、趋化因子、黏附分子和活性氧等，通过不同细胞受体介导不同信号转导通路，这些信号通路的下游效应器会导致机体产生炎症反应，破坏肺组织结构、促进成纤维细胞的增殖和胶原合成、诱导细胞凋亡，从而产生急性肺损伤[13]。

本研究通过ALI培养，构建了肺上皮细胞的3D培养模型，使用不同质量浓度的LPS处理A549细胞，在不同时间验证各种促炎症因子（IL-1β、IL-6、IL-8、IL-18、TNF-α和TGF-β）mRNA的表达。结果表明，经LPS染毒1 h的A549细胞，10、30、50 μg/ml剂量组均诱导各种促炎症因子mRNA表达增加（IL-6除外），与染毒3、5 h相比，差异有统计学意义。由此推测，LPS能够在短时间内调控细胞内相关信号转导通路，间接使促炎症因子的基因表达量增加。其余LPS作用浓度或作用时间下，促炎症因子基因表达量无明显变化，推测可能是细胞长时间进行ALI培养，导致相关受体表达下调，对炎症刺激反应出现耐受。

本研究与传统浸没式细胞培养模式相比，ALI培养的肺上皮细胞在LPS诱导下，其相关炎症因子的表达结果与传统浸没式培养相似[14]，LPS作用于ALI培养的肺上皮细胞炎症模型，作用时间1 h较为适宜。在细胞活性不被影响的浓度下，炎症因子的表达与造模剂的浓度无关，与其作用时间有关。后续试验将把该模型应用于吸入毒物的毒性评价中，以进一步探讨细胞信号转导通路及相关基因调控通路的影响机制。

参考文献：

[1] UPADHYAY S, PALMBERG L. Air-liquid interface: relevant *in vitro* models for investigating air pollutant-induced pulmonary toxicity [J]. *Toxicol Sci*, 2018, **164**(1): 21-30.

[2] SØRLI J B, HANSEN J S, NØRGAARD A W, *et al*. An *in vitro* method for predicting inhalation toxicity of impregnation spray products [J]. *Altex*, 2015, **32**(2): 101-111.

[3] 冀晓丽, 胡　玥, 盛云华, 等. 气液界面培养小鼠气管上皮细胞模型构建[J]. 中国药理学通报, 2021, **37**(2): 282-288.

[4] 胡　玥, 冯红敏, 盛云华, 等. 雾化丙三醇气液界面云暴露对人肺上皮细胞的毒性[J]. 中国药理学通报, 2020, **36**(5): 640-645.

[5] 陈祝桂, 彭志勇, 张智豪, 等. 不同浓度脂多糖对脓毒症急性肺损伤肺上皮细胞坏死性凋亡和线粒体自噬的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, **34**(4): 330-333.

[6] LACROIX G, KOCH W, RITTER D, *et al*. Air-liquid interface *in vitro* models for respiratory toxicology research: consensus workshop and recommendations [J]. *Appl In Vitro Toxicol*, 2018, **4**(2): 91-106.

[7] SØRLI J B, WANG Y S, SILVA E D, *et al*. Prediction of acute inhalation toxicity using *in vitro* lung surfactant inhibition [J]. *Altex*, 2018, **35**(1): 26-36.

[8] SAKAGAMI M. *In vivo*, *in vitro* and *ex vivo* models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery [J]. *Adv Drug Deliever Rev*, 2006, **58**(9/10): 1030-1060.

[9] LORET T, PEYRET E, DUBREUIL M, *et al*. Air-liquid interface exposure to aerosols of poorly soluble nanomaterials induces different biological activation levels compared to exposure to suspensions [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2016, **13**(1): 58.

[10] FIZESAN I, CAMBIER S, MOSCHINI E, *et al*. *In vitro* exposure of a 3D-tetraculture representative for the alveolar barrier at the air-liquid interface to silver particles and nanowires [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2019, **16**(1): 14.

[11] 尤学红, 郭媛媛, 刘晓明, 等. 脂多糖刺激巨噬细胞获得的外泌体促进TGF-β1诱导的人A549细胞上皮间质转化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019, **35**(8): 673-681.

[12] LENZ A G, KARG E, BRENDEL E, *et al*. Inflammatory and oxidative stress responses of an alveolar epithelial cell line to airborne zinc oxide nanoparticles at the air-liquid interface: a comparison with conventional, submerged cell-culture conditions [J]. *Biomed Res Int*, 2013, **2013**: 652632.

[13] 宋　颖, 吴露露. 青蒿素通过RAI14抑制脂多糖诱导的肺上皮细胞炎症效应[J]. 江苏科技信息, 2019, **36**(30): 36-39.

[14] 张腾松, 孙　乔, 邸　洁, 等. 脂多糖处理对A549细胞炎性因子基因表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2019, **31**(4): 464-467.